

TMUP  
182  
2008

Joana Catarina Moreira de Matos

**Estudo da Síntese de derivados  
dipeptídicos como potenciais sistemas  
de cedência biorreversível de fármacos  
contendo o grupo amida/imida**



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO  
SETEMBRO 2007/2008

QD262  
MATj E  
2008



FC

Biblioteca  
Faculdade de Ciências  
Universidade do Porto



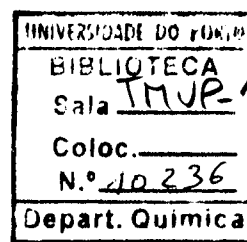
D000120063

# Estudo da Síntese de derivados dipeptídicos como potenciais sistemas de cedência biorreversível de fármacos contendo o grupo amida/imida

**U. PORTO**

**FC** FACULDADE DE CIÊNCIAS  
UNIVERSIDADE DO PORTO

*De acordo com a  
resolução aprovada pelo júri.  
Doutor das Artes Ribera do IFE  
30/Dezembro/2008*



Tese Submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para obtenção do  
grau de Mestre em Química

## **À Minha Família**

## **Agradecimentos**

À Professora Paula Gomes, por todo o apoio, incentivos, ensinamentos e opiniões fornecidos no decorrer deste trabalho de investigação. Contar com um sorriso, mesmo quando as coisas não correm como esperado, é uma mais-valia para que o trabalho decorra da maneira mais proveitosa possível, e uma ajuda para mantermos o optimismo e o interesse no trabalho desempenhado. Obrigada!!!

Ao Nuno Vale, por ter sempre uma palavra amiga, incentivos e bons palpites. São estes que nos fazem acreditar que depois da tempestade vem sempre a bonança. Obrigada por todo o apoio e amizade que me dispensaste ao longo deste ano. Eu às vezes até consigo ser chata!!!!!!!!!!!!

À Joana, que embora esteja do outro lado da janela, está sempre pronta com uma palavra amiga quando mais precisamos.

Às Marias, Ana, Liliana, Tânia e Vânia. Vocês foram e são sempre essenciais para manter uma boa auto-estima. Obrigada pela vossa boa disposição, e pelo interesse que sempre demonstraram por este trabalho, mesmo não percebendo nada do que estava a ser feito.

Aos colegas com quem compartilhei horas de trabalho, em especial à Sílvia, com quem dividi maior parte do meu tempo de trabalho, partilhando sucessos e insucessos. Obrigada a todos pois grande parte do sucesso de um trabalho está no bom ambiente de trabalho criado.

Aos meus pais, irmãos, tios, primos e avós, é de vocês que parte o primeiro incentivo, que nos faz acreditar que tudo é possível de alcançar. Obrigada por estarem presentes com uma palavra amiga sempre que necessário.

**“É nas adversidades que nos conhecemos e nos revelamos.”**

**A todos Obrigada!**

## Resumo

O desenvolvimento de pró-fármacos tem permitido melhorar o índice terapêutico de diversos fármacos, por alteração das suas propriedades físico-químicas. Os pró-fármacos por si só são inactivos, mas originam *in vivo* um ou mais metabolitos activos, entre os quais o fármaco parental, através de activação enzimática ou química. A maioria dos pró-fármacos são ésteres derivados de fármacos contendo grupos carboxilo ou hidroxilo e sofrem essencialmente activação por via enzimática. Contudo, a activação enzimática é afectada pela variabilidade biológica, o que justifica a procura de estruturas activáveis exclusiva ou preferencialmente por via química.

O nosso grupo de investigação tem vindo a trabalhar com derivados dipeptídicos de fármacos hidroxilados e aminados, activáveis através de uma reacção de ciclização-eliminação que envolve a libertação do fármaco parental e da dicetopiperazina derivada do transportador dipeptídico, tendo-se observado que a facilidade com que ocorre esta activação química depende do  $pK_a$  do fármaco enquanto grupo abandonante. O trabalho descrito na presente dissertação incidiu no estudo da aplicação desta estratégia a fármacos contendo o grupo amida ou imida, nomeadamente, a valpromida, a etossuximida e a fenacetina. A aplicação de métodos clássicos de condensação peptídica, desde o uso de agentes de condensação, de anidridos mistos, ou mesmo de ésteres activos na presença de hidreto de sódio ou LiHMDS, permitiu demonstrar que a baixa reactividade dos fármacos requer a utilização de condições reaccionais drásticas para obtenção dos produtos-alvo. De todas as aproximações sintéticas testadas, aquela que se baseou na catálise básica, usando LiHMDS como base, e ésteres de pentafluorofenol como agentes acilantes, foi a que apresentou resultados mais promissores.

## Abstract

The development of prodrugs has allowed the improvement of the therapeutic index of many drugs, by modulation of their physico-chemical properties. Prodrugs are pharmacologically inert chemical derivatives that, by chemical or enzymatic activation, are converted *in vivo* into one or more active metabolites, one of them the parent drug. Most of the prodrugs are ester derivatives of drugs containing carboxyl or hydroxyl groups, which are readily converted into the parent drug through enzymatic pathways. However, the development of prodrugs that can regenerate the parent drug through non-enzymatic pathways has emerged as an alternative approach in which prodrug activation is not influenced by biological variability.

Our research group has been working on drug modification with dipeptide carriers that can release the parent drug through a cyclization-elimination reaction that also yields the 2,5-diketopiperazine dipeptide cyclization product. The easiness with which this cyclization-elimination drug release pathway takes place has been found to depend on the drug's  $pK_a$  that influences its leaving group ability. The work described in the present thesis was targeted at the application of a similar strategy to the synthesis of prodrugs of therapeutically active compounds containing either the amide or the imide functions, namely, valpromide, etossuximide and fenacetin. The application of classic peptide coupling procedures, as use of condensation agents, mixed anhydrides, or even active esters in the presence of sodium hydride or LiHMDS, showed that the low reactivity of the chosen drugs require drastic conditions to reach the target products. Of all the synthetic approaches tested, the one based on basic catalysis using LiHMDS and pentafluorophenol esters as acylating agents presented the most promising results.

## Resumé

Le développement des propharmaciens a permis d'améliorer l'indice thérapeutique de plusieurs produits pharmaciens, a travers le changement de leurs propriétés. Les propharmaciens en soi sont inactifs, mais ils provoquent *in vivo* un ou plusieurs métabolites actifs, parmi les quels le pharmacien parental à travers l'activation enzymatique ou chimique. La plupart des propharmaciens sont esters dérivés de pharmaciens contenant des groupes carboxyle ou hydroxyle et ils sont activés essentiellement par voie enzymatique. Cependant, l'activation enzymatique est influencé par la variabilité biologique, ce que justifie la recherche de structures activables exclusive ou préférentiellement par voie chimique.

Notre groupe de recherche travaille depuis longtemps avec des dérivés dipeptidiques de pharmaciens hydroxylés et aminés, activables a travers une réaction de cyclization-élimination qui suppose la libération du pharmacien parental et d'une dicetopipérazine dérivé du transporteur peptidique, ayant été observé que la facilité avec laquelle cette activation chimique arrive dépend du  $pK_a$  du pharmacien en tant que groupe abandonnant. Le travail exposé dans cet essai se réfère à l'étude de l'application de cette stratégie a des pharmaciens contenant le groupe amide, notamment, la valpromide, la, étossuccimide et la fenacétine. L'application de méthodes classiques de condensation peptidique y compris l'usage d'agents de condensation, d'anhydrides mixtes ou mêmes d'esters actifs en présence d'hydrure de sodium ou LiHMDS a permis de démontrer que la faible réactivité des pharmaciens choisis exige l'utilisation de conditions de réactions drastiques pour l'obtention des produits-cibles. De toutes les expériences synthétiques essayées, celle qui s'est basée sur la catalyse basique, utilisant LiHMDS comme base, et des esters de pentafluorophénol comme des agents acilants, a présenté des résultats plus encourageants.



4.2.2. Abordagens sintéticas baseadas no emprego de anidridos mistos	36
4.2.3. Aproximação sintética com base no uso de ésteres activos	39
4.3. Estudo da <i>N</i> -acilação da Etossuximida e da Fenacetina	45
4.3.1. Tentativas de <i>N</i> -acilação da Etossuximida	45
4.3.2. <i>N</i> -acilação da Fenacetina	46
4.4. Desprotecção do composto FNCT.Gly.Boc por acidólise	51
4.5. Condensação do aminoácido Boc.Phe.OH ao composto FNCT-Gly (30)	55
5. Recurso a um reactor de síntese assistida por microondas	59
6. Considerações finais e Perspectivas Futuras	65
7. Procedimentos Experimentais	67
7.0. Notas Gerais	67
7.1. Preparação da valpromida a partir do valproato de sódio	69
7.2. Protecção da VPD com o grupo <i>tert</i> -butiloxicarbonilo (Boc)	70
7.3. Esterificação de Boc-AA-OH com pentafluorofenol (PFP)	71
7.4. Esterificação do Boc.Gly.OH com <i>N</i> -hidroxissuccinimida (HOSu)	72
7.5. Metodologias de síntese testadas para a <i>N</i> -acilação dos fármacos	73
7.5.1. Condensação do aminoácido ou dipéptido <i>N</i> -Boc protegido via activação <i>in situ</i> promovida por carbodiimidas	73
a. Tentativa de condensação do aminoácido ou dipéptido à VPD usando DCCI	73
b. Tentativa de condensação da Boc.Gly.OH à VPD, a baixa temperatura e em atmosfera de argón, usando DIPCDI	75
7.5.2. Uso de anidridos mistos como agentes acilantes: Tentativas de condensação do aminoácido ou dipéptido à VPD usando o anidrido benzóico na presença de ZnCl <sub>2</sub>	77
7.5.3. Uso de ésteres activos como agentes acilantes	79
7.5.3.1. Tentativa de <i>N</i> -acilação dos fármacos usando o éster succinimídico da <i>N</i> <sup>α</sup> -Boc Glicina (Boc.Gly.OSu)	79
a. Usando K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> como base	79

b. Usando NaH como base	80
7.5.3.2. <i>N</i> -acilação da FNCT usando ésteres pentafluorofenólicos da <i>N</i> <sup>α</sup> -Boc Glicina (Boc.Gly.OPFP)	83
7.6. Desprotecção de FNCT.Gly.Boc: Remoção do grupo Boc por acidólise com TFA	85
7.7. Tentativa de condensação do dipéptido <i>N</i> <sup>α</sup> -Boc fenilalanina ao derivado FNCT.Gly	86
a. Com activação <i>in situ</i> promovida por carbodiimidas	86
b. Usando ésteres activos como agentes acilantes	87
c. Com activação <i>in situ</i> promovida pelo agente de condensação HCTU	88
8. Bibliografia	

## Índice de Esquemas

<b>Esquema 1:</b> Representação esquemática do conceito de pró-fármaco.	1
<b>Esquema 2:</b> Representação esquemática de pró-fármacos por ciclização-eliminação.	2
<b>Esquema 3:</b> Reacção de activação de um pró-fármaco por ciclização-eliminação.	6
<b>Esquema 4:</b> O anião carboxilato na activação intramolecular de pró-fármacos de fenóis.	6
<b>Esquema 5:</b> Estrutura química do fármaco KNI-727 e seus pró-fármacos.	7
<b>Esquema 6:</b> Activação dos pró-fármacos do KNI-727 por ciclização-eliminação.	8
<b>Esquema 7:</b> Activação por ciclização-eliminação de derivados dipeptídicos de um fármaco HX.	10
<b>Esquema 8:</b> Reacção de condensação do dipéptido Boc.Phe.Gly.OH aos fármacos VPD (6), ESM (7) e FNCT (8) para obtenção dos derivados dipeptídicos 13, 14 e 15.	15
<b>Esquema 9:</b> <i>N</i> -acilação de amidas via carbodiimidas (A).	16
<b>Esquema 10:</b> <i>N</i> -acilação de amidas via anidridos mistos (B).	16
<b>Esquema 11:</b> <i>N</i> -acilação de amidas via ésteres activos com catálise básica (C).	16
<b>Esquema 12:</b> Mecanismo da eventual <i>N</i> -acilação de um fármaco amídico com o dipéptido Boc.Phe.Gly.OH por activação <i>in situ</i> com carbodiimidas.	18
<b>Esquema 13:</b> Activação do anidrido por parte do MgBr <sub>2</sub> .OEt <sub>2</sub> .	19
<b>Esquema 14:</b> Reacção representativa da <i>N</i> -acilação de uma sulfonamida pelo método dos anidridos simétricos.	19
<b>Esquema 15:</b> Reacção representativa da <i>N</i> -acilação de uma sulfonamida pelo método dos anidridos mistos descrito por Reddy et al.	20
<b>Esquema 16:</b> Reacção de <i>N</i> -acilação de amidas usando cloretos de ácido.	21
<b>Esquema 17:</b> Reacção representativa da <i>N</i> -acilação de amidas, via formação de um anidrido misto, usando cloretos de ácido.	21
<b>Esquema 18:</b> Reacção representativa da <i>N</i> -acilação de amidas usando ésteres activos com catálise básica.	23

<b>Esquema 19:</b> Mecanismo da reacção de preparação da VPD a partir do valproato de sódio.	24
<b>Esquema 20:</b> Mecanismo hipotético da reacção de condensação do Boc.Phe.Gly.OH à VPD via carbodiimidas.	27
<b>Esquema 21:</b> Mecanismo da reacção de formação do éster etílico do dipéptido Boc.Phe.Gly.OH.	30
<b>Esquema 22:</b> Formação da <i>N</i> -acilureia <b>21</b> .	33
<b>Esquema 23:</b> Mecanismo hipotético para a <i>N</i> -acilação da VPD via ésteres activos.	39
<b>Esquema 24:</b> Mecanismo da reacção projectada para a acilação da Boc-VPD a um éster activo e subsequente desprotecção para obtenção do composto pretendido.	41
<b>Esquema 25:</b> Esquema representativo da hipotética remoção de um H <sup>α</sup> da glicina no composto <b>30</b> , gerando-se um enolato porventura capaz de atacar nucleofilicamente outra molécula de <b>30</b> , conduzindo à formação de uma estrutura dimérica.	57
<b>Esquema 26:</b> Métodos testados em microondas usando a VPD, ESM e FNCT.	61

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> O anti-convulsionante Fenitoína e o seu pró-fármaco fosfenitoína.	4
<b>Figura 2:</b> Estrutura química do aciclovir e do seu pró-fármaco valaciclovir.	4
<b>Figura 3:</b> Derivados dipeptídicos do AZT (5a-h).	10
<b>Figura 4:</b> Derivados mono-substituídos da VPD.	13
<b>Figuras 5:</b> Espectros de massa (ESI-MS) da VPD: $m/z$ ( $MH^+$ ) = 144,40 (esperado, 144,24).	25
<b>Figura 6:</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ; 300 MHz) do composto VPD.	26
<b>Figura 7:</b> Espectros de massa (ESI-MS) do produto isolado na reacção A.1 (20).	28
<b>Figura 8:</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ; 300MHz) do composto 20.	29
<b>Figura 9:</b> Espectro de massa (ESI-MS) do composto 21, isolado da reacção A.2.	31
<b>Figura 10:</b> Espectros de fragmentação MS <sup>2</sup> e MS <sup>3</sup> do composto 21.	31
<b>Figura 11:</b> Espectros de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ; 300 MHz) do composto 21.	32
<b>Figura 12:</b> Espectro de massa (ESI-MS) dos compostos 22 (M') e 23 (M).	34
<b>Figura 13:</b> Estudos de fragmentação MS <sup>2</sup> e MS <sup>3</sup> do composto 23 (M-composto 23 e M'-composto 22).	34
<b>Figura 14:</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ; 300 MHz) do composto 22.	35
<b>Figura 15:</b> Espectro de massa (ESI-MS) e fragmentação MS <sup>2</sup> do composto isolado na reacção B.2.	37
<b>Figura 16:</b> Espectro de massa (ESI-MS) do composto isolado na reacção C.1 (25).	40
<b>Figura 17:</b> Espectro de massa (ESI-MS) do composto isolado na reacção D.1 (27).	43
<b>Figura 18:</b> Estudo de fragmentação MS <sup>2</sup> , MS <sup>3</sup> e MS <sup>4</sup> do produto isolado na reacção D.1 (provavelmente apresentando a estrutura 27).	43
<b>Figura 19:</b> Espectro de massa (ESI-MS) do composto FNCT.Gly.Boc (29).	46
<b>Figura 20:</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ; 400 MHz) do composto FNCT.Gly.Boc (29).	47
<b>Figura 21:</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ; 400 MHz) do composto FNCT.Gly.Boc (29).	48

<b>Figura 22:</b> Espectro de DEPT (CDCl <sub>3</sub> ; 400 MHz) do composto FNCT.Gly.Boc (29).	49
<b>Figura 23:</b> Espectro de massa (ESI-MS) do composto FNCT.Gly (30).	51
<b>Figura 24:</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (MeOH; 400 MHz) do composto FNCT.Gly (30).	52
<b>Figura 25:</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (MeOH; 400 MHz) do composto FNCT.Gly (30).	53
<b>Figura 26:</b> Espectro de DEPT (MeOH; 400 MHz) do composto FNCT.Gly (30).	54
<b>Figura 27:</b> Espectro de massa (ESI-MS) dos produtos (A e B) isolados na reacção de condensação do aminoácido Boc.Phe.OH ao composto 30.	56
<b>Figura 28:</b> Aparelho de síntese assistida por microondas <i>Discover LabMate</i> , com sistema de controlo de pressão <i>IntelliVent<sup>TM</sup></i> .	60

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Reagentes e temperaturas de reacção usadas nas reacções <b>B<sub>1-3</sub></b> .	36
<b>Tabela 2:</b> Condições e Observações experimentais relativas às tentativas de <i>N</i> -acilação da VPD assistidas por microondas.	62
<b>Tabela 3:</b> Condições e Observações experimentais relativas às tentativas de <i>N</i> -acilação da ESM assistidas por microondas.	63
<b>Tabela 4:</b> Condições e Observações relativas às tentativas de <i>N</i> -acilação da FNCT assistidas por microondas.	64
<b>Tabela 5:</b> Sistema de eluentes usados nas técnicas de cromatografia.	67
<b>Tabela 6:</b> Condições reaccionais usadas nas reacções de <i>N</i> -acilação usando carbodiimidas.	76
<b>Tabela 7:</b> Condições gerais das reacções <b>B.1-B.3</b> .	78
<b>Tabela 8:</b> Reagentes e quantidades usadas nas reacções <b>C.1-C.9</b> .	81

## Lista de Abreviaturas

**LiHMDS:** bis(trimetilsilil)amida de lítio

**DKP:** dicetopiperazina

**VPD:** Valpromida

**ESM:** Etossuximida

**FNCT:** Fenacetina

**VCD:** Valnoctamida

**VPA:** ácido valpróico

**DCCI:** *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida

**DIPCDI:** *N,N'*-diisopropilcarbodiimida

**DMAP:** 4-(*N,N'*-dimetil)aminopiridina

**HOSu:** hidroxisuccinimida

**PFP:** pentafluorofenol

**TFA:** ácido trifluoroacético

**DCM:** diclorometano

**DMF:** dimetilformamida

**DIEA:** *N*-etildisopropilamina

**HOBt:** 1-hidroxibenzotriazole

**HBTU:** hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamínio

**HCTU:** hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1-hidroxibenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamínio

**Boc:** *tert*-butiloxicarbonilo

**eq.:** equivalentes molares

**T<sub>amb</sub>:** Temperatura ambiente

**TLC:** cromatografia de camada fina

**ESI-MS:** Espectroscopia de massa com ionização por electro-spray

**RMN-<sup>1</sup>H:** Ressonância magnética nuclear de próton

**RMN-<sup>13</sup>C:** Ressonância magnética nuclear de carbono 13

**DEPT:** *Distortionless Enhancement by polarization transfer*

**TMS:** tetrametilsilano

**TEA:** trietilamina

**DCU:** *N,N'*-diciclohexilureia

**THF:** tetrahidrofurano

**sl:** singleto largo

**m:** multiplete

**t:** tripleto

**s:** singleto

**d:** duplete

**q:** quarteto

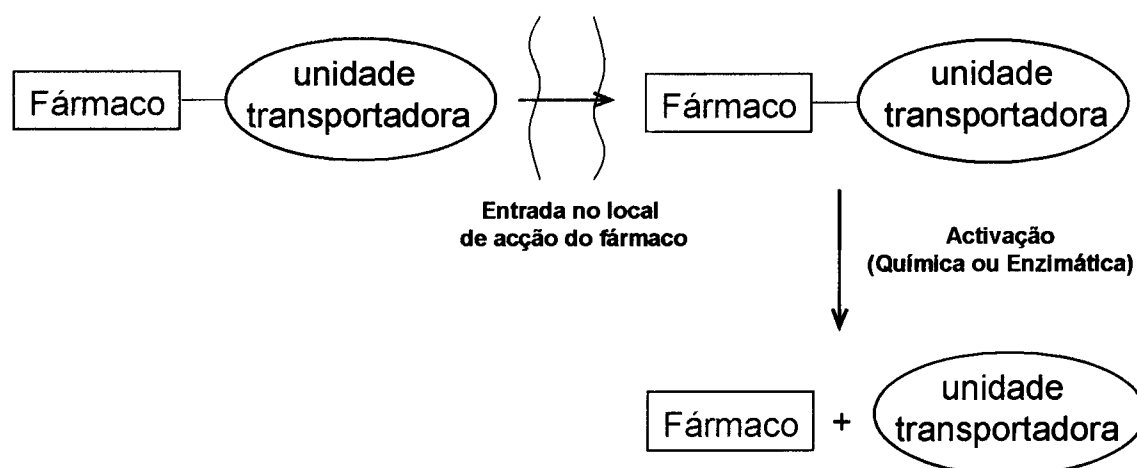
**δ:** desvio químico

**J:** constante de acoplamento

# 1. Introdução

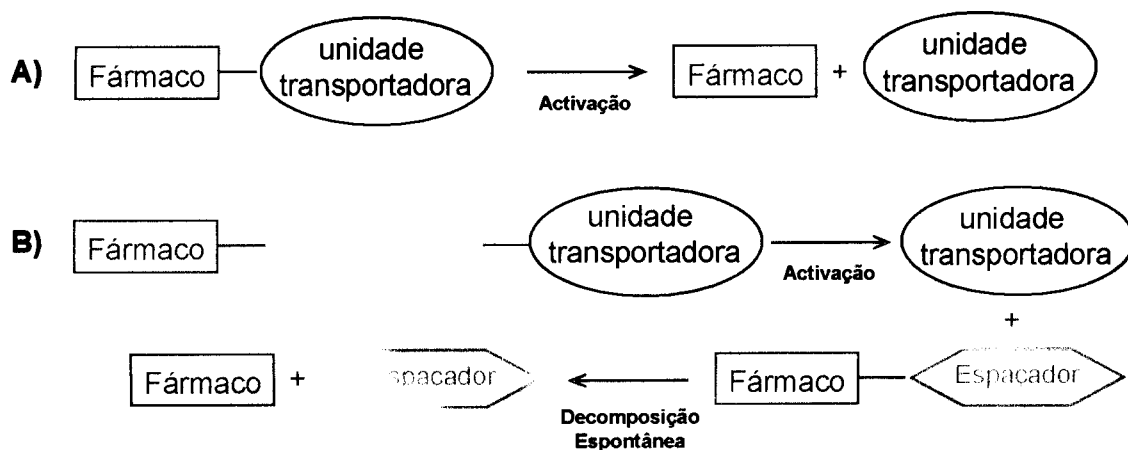
## 1.1. Pró-Fármacos e sua Activação

Muitos agentes terapêuticos apresentam propriedades farmacêuticas, farmacológicas e farmacocinéticas indesejáveis, que constituem barreiras à aplicação clínica desses agentes. O desenvolvimento de pró-fármacos é, actualmente, uma das mais importantes estratégias de melhoramento do índice terapêutico de diversos fármacos e da vectorização destes para libertação no local de acção (**Esquema 1**).<sup>[1-7]</sup>



**Esquema 1:** Representação esquemática do conceito de pró-fármaco.<sup>[4]</sup>

Os pró-fármacos são por si só inactivos, mas originam *in vivo* um ou mais derivados ou metabolitos activos, entre os quais o fármaco parental, através de activação química ou enzimática.<sup>[3-5, 8]</sup> Os pró-fármacos podem ser considerados como sistemas bipartidos ou tripartidos (**Esquema 2 – A e B**, respectivamente). Os pró-fármacos bipartidos têm a unidade transportadora directamente ligada ao fármaco, ocorrendo a sua libertação aquando da activação do pró-fármaco. Este tipo de pró-fármaco é conseguido quando se logra estabelecer uma ligação entre o fármaco e a unidade transportadora, a qual seja depois quebrada por meio enzimático ou químico. Contudo, quando não é possível estabelecer este tipo de ligação directamente entre fármaco e transportador, pode utilizar-se um espaçador, que após activação e consequente libertação da unidade transportadora, se liberta por decomposição espontânea.<sup>[9]</sup>



**Esquema 2:** Representação esquemática de pró-fármacos bipartidos e tripartidos.

Pode-se efectuar uma discriminação entre os pró-fármacos obtidos intencional ou fortuitamente. Como o nome indica, os pró-fármacos intencionais são obtidos por derivatização ou modificação de um princípio activo conhecido. A maioria dos pró-fármacos em uso clínico cai nesta categoria. No entanto, os pró-fármacos fortuitos, ainda que em menor número relativamente aos intencionais, são importantes pois a descoberta do princípio activo por eles libertado contribui significativamente para a compreensão do mecanismo de acção do mesmo, descobrindo-se muitas vezes novas classes terapêuticas.<sup>[8]</sup>

No que diz respeito à concepção de pró-fármacos, os químicos e bioquímicos deparam-se muitas vezes com a dificuldade de prever ou alcançar a estrutura ideal ou óptima, principalmente devido a dois factores: (i) a variabilidade biológica, resultado das diferenças intra e inter-espécies na natureza das diferentes enzimas e dos diferentes transportadores envolvidos no metabolismo de xenobióticos, e (ii) a potencial toxicidade do pró-fármaco, que pode resultar da formação de um metabolito tóxico ou reactivo, por decomposição metabólica do próprio pró-fármaco.<sup>[8]</sup> No âmbito da optimização de pró-fármacos como sistemas de libertação de fármacos em locais específicos, Stella e Himmelstein sugerem três factores: rápido transporte do pró-fármaco até ao local de acção, activação selectiva e rápida absorção do fármaco.<sup>[7]</sup> Contudo, a activação selectiva de um pró-fármaco em determinado local do organismo só é possível quando a enzima-alvo ou o transportador membranar específico são únicos nesse tecido, ou pelo menos se encontram em maior quantidade relativamente à sua expressão noutros tecidos. Os estudos desenvolvidos têm focado principalmente o desenvolvimento de pró-fármacos compatíveis com transportadores membranares, devido ao problema da variabilidade biológica associado à activação enzimática.

De entre todos os transportadores transmembranares, os transportadores de aminoácidos e oligopéptidos são os que suscitam maior interesse. Teoricamente, podem-se obter centenas de dipéptidos e tripéptidos pela combinação de 20 aminoácidos química e estruturalmente diversos, o que nos permite desenvolver substratos com maior especificidade para com o transportador em causa.<sup>[7]</sup>

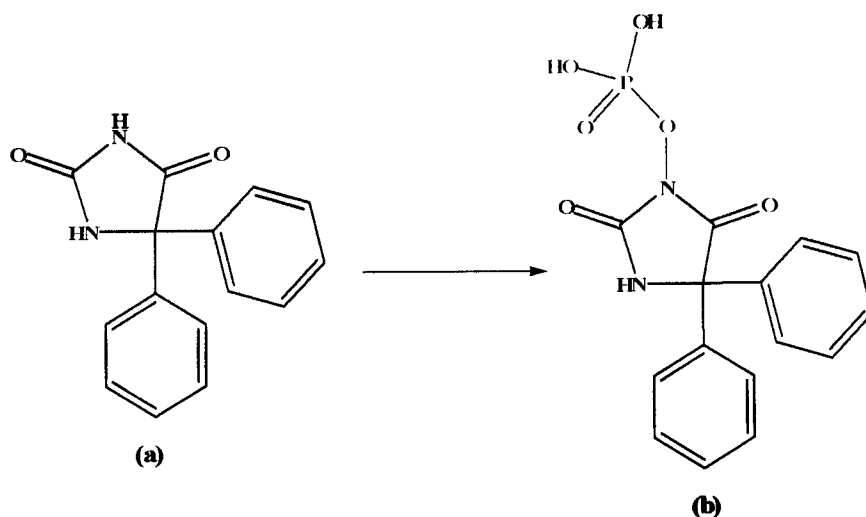
O mecanismo de activação de um pró-fármaco é um ponto de interesse devido às vantagens e desvantagens apresentadas pelas duas vias principais de activação, química ou enzimática, já referidas. Embora a activação por via enzimática tenha a vantagem de o tempo e local de activação serem conhecidos, a variabilidade biológica a que esta está sujeita compromete a previsibilidade do sistema terapêutico, tornando-o pouco atractivo. Ainda assim, a maioria dos pró-fármacos em uso clínico é activada por via enzimática, sendo tipicamente ésteres derivados de fármacos contendo o grupo carboxilo ou hidroxilo.<sup>[5]</sup> O desenvolvimento de pró-fármacos activáveis exclusiva ou preferencialmente por via química surge como uma alternativa atractiva.<sup>[5,10]</sup> Um caso particular de activação por via química, que tem atraído a atenção dos químicos nas últimas três décadas, é a ciclização intramolecular, que se descreve com maior detalhe na secção 1.3.

## 1.2. Interesse dos Pró-Fármacos

As razões que levam os cientistas a optarem pelo desenvolvimento de pró-fármacos são variadas, destacando-se como as mais importantes:

a) **Biodisponibilidade** – existe uma variedade de factores a ter em conta quando se pretende melhorar a biodisponibilidade de um determinado fármaco:

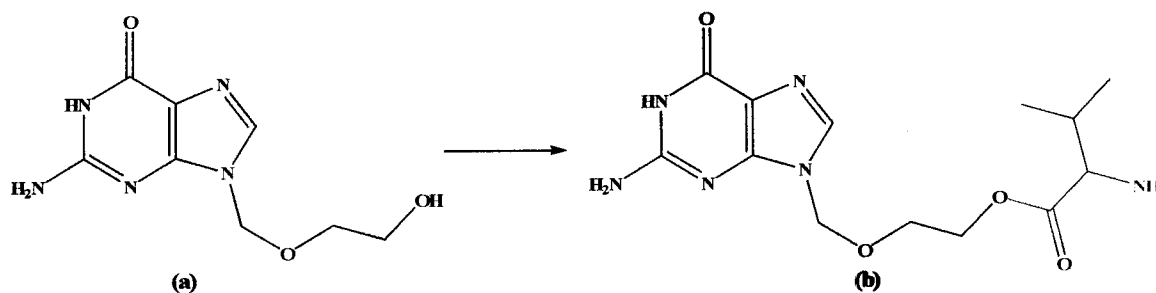
(i) solubilidade, que sendo muitas vezes baixa no fármaco, pode ser substancialmente aumentada por introdução de grupos hidrofílicos, como é o caso do fosfato; exemplo disso é o da fosfenitoína (**b** – Figura 1) um pró-fármaco do anti-convulsivo Fenitoína (**a** – Figura 1) que resulta da introdução de um grupo fosfato nesta última.



**Figura 1:** O anti-convulsionante Fenitoína e o seu pró-fármaco fosfenitoína.

Um potencial problema do uso de grupos solubilizantes é que estes podem originar metabolitos tóxicos. Por exemplo, apesar da introdução do grupo fosfato na fenitoína contribuir para o aumento da solubilidade deste fármaco para administração intravenosa, uma elevada concentração de fosfato, resultante da activação do pró-fármaco, poderá levar a problemas como falha do sistema renal e desordens do foro neurológico (comichões e alucinações sensoriais)<sup>[10]</sup>,

(ii) Absorção intestinal – a conjugação de fármacos com aminoácidos ou nucleósidos é uma das formas correntes de melhoramento da absorção intestinal, uma vez que é aumentada e melhorada a compatibilidade entre xenobiótico e transportadores intestinais. O valaciclovir (**b** – Figura 2) é um exemplo desta estratégia: é um pró-fármaco do aciclovir (**a** – Figura 2) que resulta da condensação deste ao aminoácido L-valina (Figura 2). O valaciclovir apresenta uma biodisponibilidade oral 5 vezes superior à do próprio aciclovir, como consequência da maior compatibilidade do pró-fármaco com os transportadores oligopeptídicos epiteliais, como é o caso do hPept1 e do hPept2.<sup>[10]</sup>



**Figura 2:** Estrutura química do aciclovir e do seu pró-fármaco valaciclovir.

(iii) protecção dos fármacos contra degradação metabólica prematura/inactivante – a modificação dos fármacos pode também visar torná-los menos susceptíveis a sofrer degradação metabólica indesejada. Assim, procura-se que a acção terapêutica do fármaco no organismo seja mais prolongada, o que pode significar, em muitos casos, uma diminuição da dose e/ou número de doses que têm que ser administradas para se obter o efeito terapêutico desejado.<sup>[10]</sup>

b) **Distribuição Selectiva do Fármaco** – este é um aspecto chave no desenvolvimento de pró-fármacos. Para isso, é necessário estipular os alvos concretos de acção do próprio princípio activo, como sejam transportadores ou enzimas específicas dos tecidos. Hoje em dia, muitos são os estudos desenvolvidos a pensar na especificidade de determinado agente terapêutico para com os receptores-alvo, principalmente no que diz respeito a agentes anti-neoplásicos.<sup>[10]</sup> O desenvolvimento de pró-fármacos dirigidos a alvos bem definidos requer um conhecimento sólido dos sistemas envolvidos, incluindo as suas características moleculares e funcionais. Recentemente, os avanços na clonagem genética permitem conhecer melhor a natureza molecular das enzimas e das proteínas constituintes dos transportadores, tornando possível o desenvolvimento mais eficaz de pró-fármacos dirigidos a um receptor específico.<sup>[10]</sup>

### 1.3. Activação de pró-fármacos por ciclização intramolecular

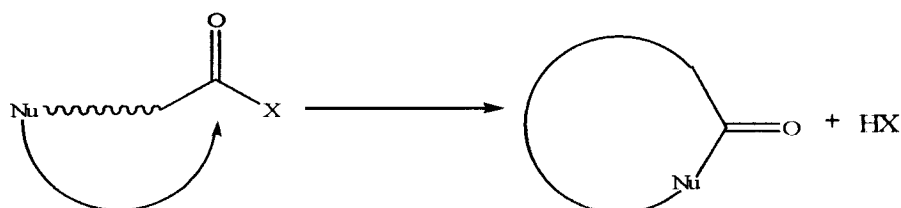
De entre as várias reacções de activação não enzimática, a activação intramolecular (**Esquema 3**) é aquela que tem suscitado um maior interesse por parte dos investigadores.<sup>[5,6]</sup> Classicamente, podem considerar-se duas estratégias para este tipo de activação, sendo a primeira baseada numa catálise intramolecular, enquanto que na segunda a activação dá-se por substituição nucleófila intramolecular.

A primeira estratégia, embora não se conheça nenhum pró-fármaco cuja activação ocorra intencionalmente segundo este mecanismo, resulta da existência de um catalisador intramolecular, como o caso de um grupo amino básico, que promove a hidrólise do fármaco.<sup>[6]</sup>

A segunda estratégia corresponde a uma activação do pró-fármaco através de uma reacção de ciclização-eliminação, cujo princípio químico está demonstrado no

**Esquema 3.** Neste tipo de activação podemos considerar três vias de libertação do fármaco:

- 1) este corresponde ao grupo abandonante (HX) na reacção do **Esquema 3**;
- 2) este corresponde ao produto cíclico formado na reacção do **Esquema 3**;
- 3) o passo de ciclização-eliminação conducente à libertação do fármaco só ocorre após uma primeira reacção de pré-activação (geralmente enzimática) onde se gera a espécie activável por ciclização intramolecular (*two-step prodrugs*);

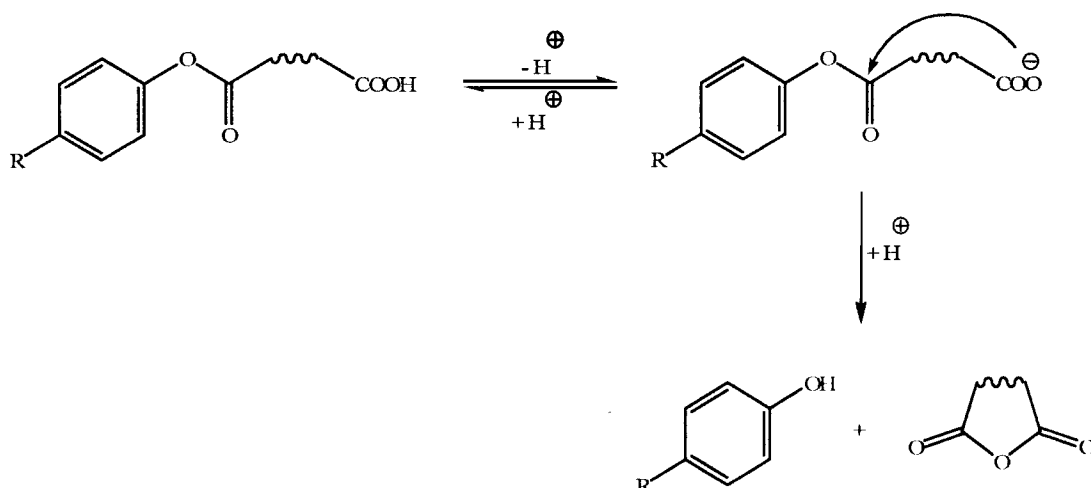


X = RO<sup>-</sup>; RS<sup>-</sup>; RNH<sup>-</sup>; RCONH<sup>-</sup>;

Nu = N<sup>-</sup>; COO<sup>-</sup>; OH ou N básico

**Esquema 3:** Reacção de activação de um pró-fármaco por ciclização-eliminação.<sup>[5]</sup>

A maioria dos pró-fármacos activáveis por ciclização intramolecular, proposta na literatura, segue a primeira via acima referida, isto é, o fármaco é o grupo abandonante da reacção. Dentro desta categoria, a grande maioria dos pró-fármacos possui um azoto (de um grupo amida ou amino) como agente nucleófilo. Begtrup et al. propuseram o anião carboxilato como um agente nucleófilo alternativo, útil por exemplo na activação de pró-fármacos de fenóis (**Esquema 4**).<sup>[5]</sup>

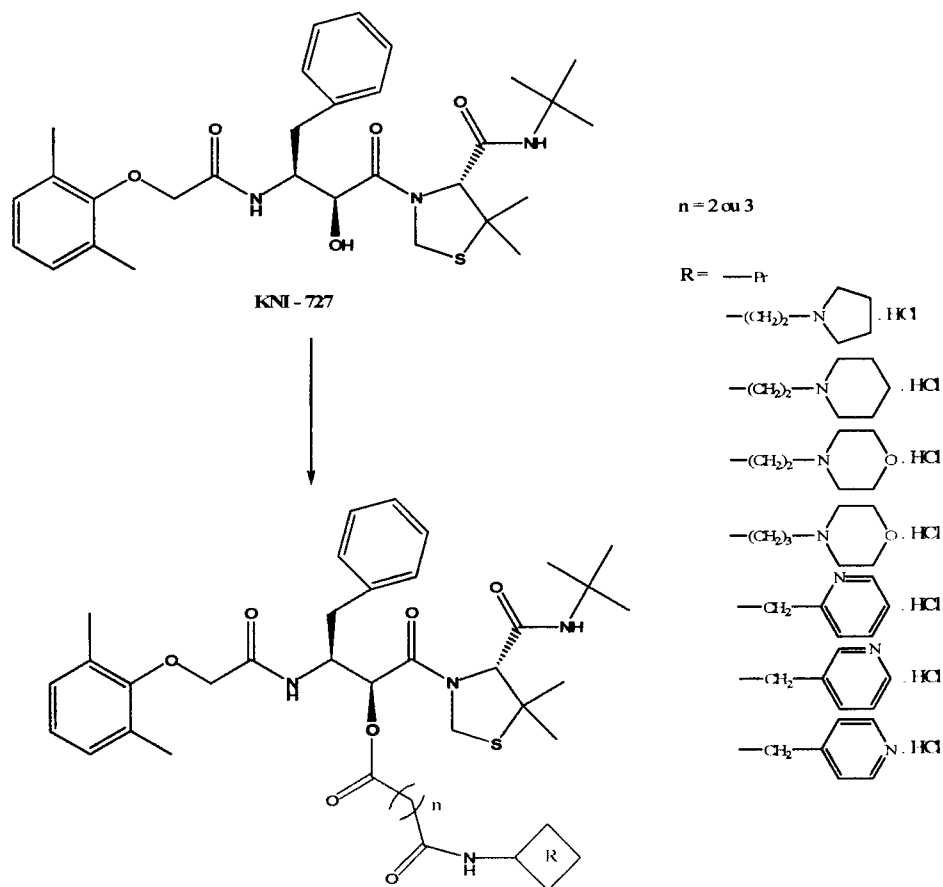


**Esquema 4:** O anião carboxilato na activação intramolecular de pró-fármacos de fenóis.<sup>[5]</sup>

Nos estudos desenvolvidos por estes autores verificou-se que a presença de um grupo carregado negativamente, perto da ligação éster, bem como o grau de ramificação da

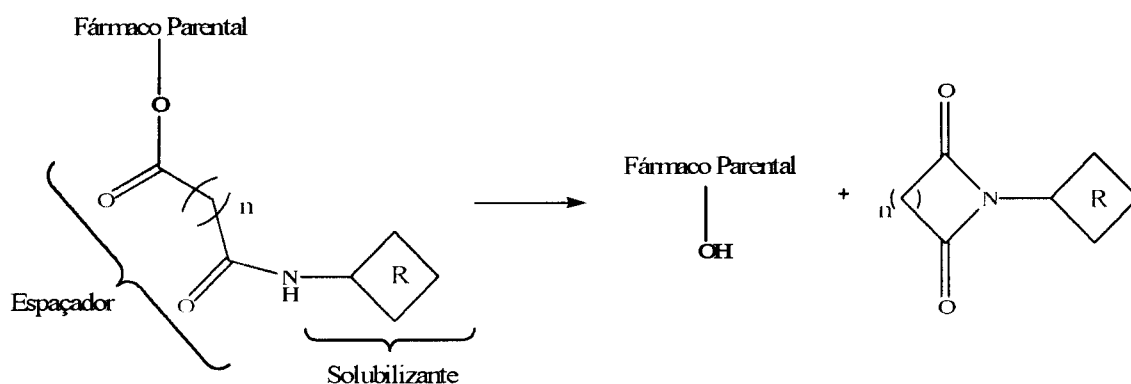
cadeia alifática do substrato, torna estes pró-fármacos menos susceptíveis à degradação enzimática. Demonstrou-se, também, que os hemiésteres alifáticos de fármacos fenólicos se decompõem preferencialmente por ciclização intramolecular, a pH fisiológico e em plasma humano, sendo a velocidade desta reação influenciada pelo  $pK_a$  do fármaco, pelo tamanho da cadeia alifática do substrato e pelo grau de ramificação da mesma. Todavia, os resultados obtidos para a degradação em fígado de ratinhos demonstraram que a ativação por catálise enzimática se torna bastante significativa neste meio. Assim, apesar dos bons resultados apresentados em plasma humano, é provável que o anião carboxilato não desempenhe um bom papel na prevenção da ativação por via enzimática ao nível do fígado.<sup>[7]</sup>

As amidas ácidas podem desempenhar o mesmo papel que um azoto nucleofílico (de amina) e promover a reação de ciclização intramolecular. Thomsen e Bundgaard foram pioneiros nesta aproximação, mas mais recentemente Sohma et al. têm-na aplicado na síntese de pró-fármacos do KNI-727, um inibidor da protease do HIV-1 (Esquema 5). Esta aproximação visou o aumento da solubilidade do inibidor em condições fisiológicas.<sup>[11,12]</sup>



**Esquema 5:** Estrutura química do fármaco KNI-727 e seus pró-fármacos. (a laranja está representado o espaçador e a verde o solubilizante).<sup>[14]</sup>

Utilizando-se a conversão por via química, em condições fisiológicas, a activação do pró-fármaco poderá ocorrer em qualquer altura ou lugar desde que reunidas as condições adequadas (por ex. pH). Portanto, este tipo de pró-fármaco deverá apresentar um tempo de meia-vida adequado em condições fisiológicas, para além de uma boa solubilidade que maximize a absorção intestinal do mesmo. Esta preocupação está também patente no trabalho de Sohma et al., onde se caracterizaram diferentes pró-fármacos do KNI-727 obtidos por modificações ao nível quer do espaçador (n, **Esquema 5**), quer do grupo solubilizante (R, **Esquema 5**).<sup>[11,12]</sup> Dos diferentes pró-fármacos estudados verificou-se que a libertação do fármaco parental ocorre exclusivamente por quebra da ligação fármaco-substrato, através de uma reacção de ciclização-eliminação, com formação de uma imida (**Esquema 6**).<sup>[11,12]</sup>



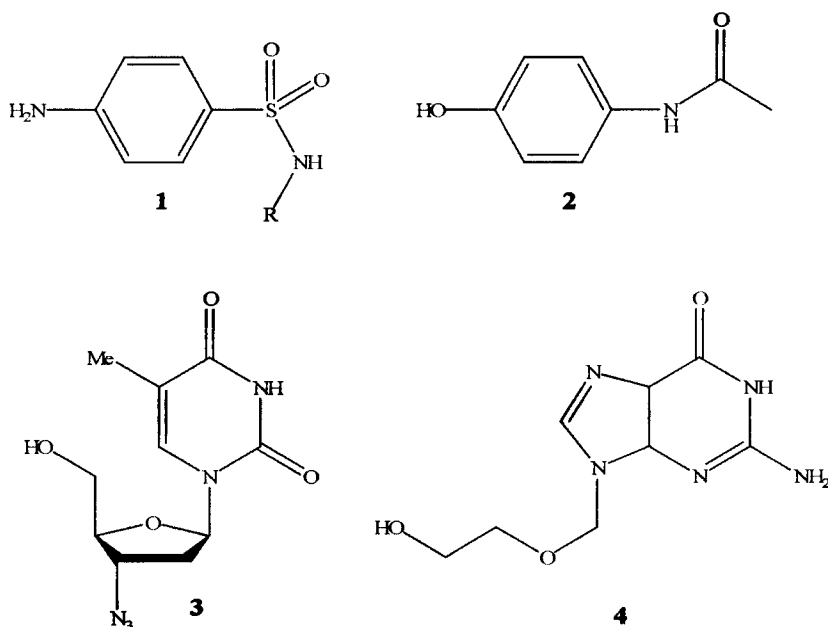
**Esquema 6:** Activação dos pró-fármaco do KNI-727 por ciclização-eliminação.<sup>[11]</sup>

De todos os grupos funcionais que podem ser utilizados como agentes nucleófilos para a activação intramolecular de pró-fármacos, o grupo amino é o que tem suscitado maior interesse por parte dos cientistas. Neste âmbito, os péptidos têm sido propostos e largamente usados como unidades transportadoras biocompatíveis que fornecem o grupo amino necessário para a activação do pró-fármaco.<sup>[5]</sup> O uso de péptidos na concepção de pró-fármacos activáveis intramolecularmente pode ter duas finalidades: (i) o péptido actua como um pró-fármaco de um péptido cíclico bioactivo que é formado no processo de activação por ciclização; (ii) o péptido corresponde ao transportador ligado ao fármaco, que é o grupo abandonante no processo de ciclização do péptido. É, no entanto, difícil conseguir uma ciclização espontânea de um oligopéptido sem que haja intervenção de enzimas específicas, com excepção do caso dos dipéptidos, que facilmente ciclizam dando origem a 2,5-dicetopiperazinas (DKP, **Esquema 7**). De facto, quando o fármaco é o grupo abandonante numa reacção de

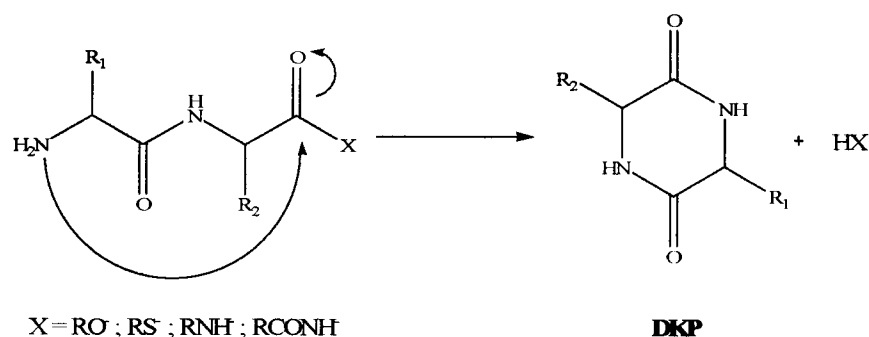
ciclização-eliminação envolvendo um transportador dipeptídico, este sofre aminólise intramolecular pelo grupo amino do aminoácido *N*-terminal, da qual resulta, simultaneamente, a libertação da DKP e do fármaco parental.<sup>[5]</sup> Muitos são os trabalhos publicados nesta área, que podem ser facilmente revistos em diversos artigos de revisão existentes sobre o assunto.<sup>[1,3]</sup>

#### 1.4. Contextualização da Presente Dissertação

No âmbito desta Dissertação, torna-se relevante focar o trabalho que tem vindo a ser desenvolvido no grupo de investigação onde a investigação aqui descrita foi realizada. O grupo tem vindo a trabalhar neste campo, nomeadamente ao nível da concepção de pró-fármacos dipeptídicos de sulfonamidas (1)<sup>[3]</sup>, paracetamol (2)<sup>[12,13]</sup>, AZT (3)<sup>[14]</sup> e Aciclovir (4).<sup>[15]</sup>

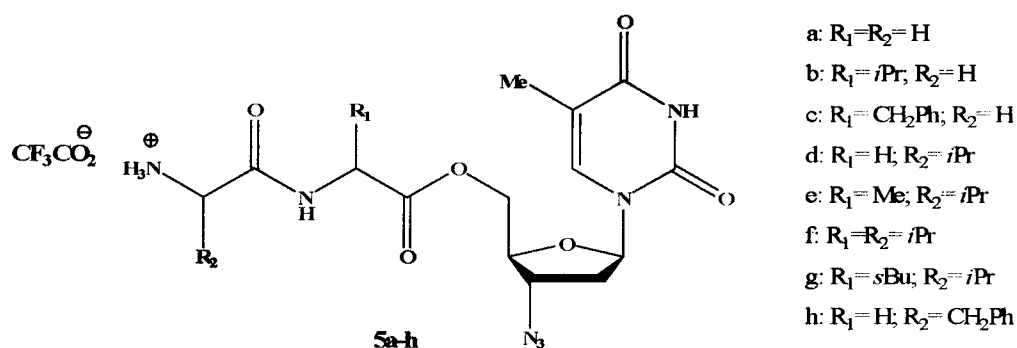


Assim, vários foram os derivados dipeptídicos desenvolvidos por Gomes e colaboradores, potencialmente activáveis segundo uma reacção de ciclização-eliminação, envolvendo a libertação do fármaco parental (HX) e da DKP derivada do transportador dipeptídico (**Esquema 7**).



**Esquema 7:** Activação por ciclização-eliminação de derivados dipeptídicos de um fármaco HX.

De todas as famílias de pró-fármacos desenvolvidas no grupo, a que se centrou no AZT (**3**), o agente anti-HIV com maior aplicação clínica, foi a que apresentou características mais promissoras. Assim, Santos et al. desenvolveram uma família de oito derivados dipeptídicos do AZT (**5a-h**, Figura 3) com o intuito de minimizar ou eliminar os conhecidos efeitos perniciosos do AZT para o fígado e para a medula, ao mesmo tempo contribuindo para o aumento de biodisponibilidade oral deste fármaco.<sup>[14]</sup> A concepção de pró-fármacos dipeptídicos do AZT teve por base a busca de um reconhecimento selectivo dos compostos por parte do transportador peptídico intestinal hPept1 e a capacidade dos compostos libertarem o princípio activo por ciclização-eliminação.



**Figura 3:** Derivados dipeptídicos do AZT (**5a-h**)

Dos estudos efectuados com os derivados **5a-h**, concluiu-se que estes são activados por amino e diaminopeptidases, o que leva a uma libertação lenta e quantitativa de **3**, com a vantagem adicional dos substratos (pró-fármacos) serem menos tóxicos que o fármaco parental.<sup>[14]</sup> Todos os derivados estudados apresentavam afinidade significativa para com o transportador hPept1, afinidade essa manifestamente superior para os compostos que possuíam um aminoácido *N*-terminal β-ramificado (Val, Ile).<sup>[14]</sup> Em suma, os resultados demonstraram que, ainda que a sua activação não ocorresse preferencialmente por via exclusivamente química, os derivados dipeptídicos

podem ser uma solução viável para diminuir os problemas associados ao uso clínico do AZT, mediante uma escolha apropriada do transportador dipeptídico.<sup>[14]</sup>

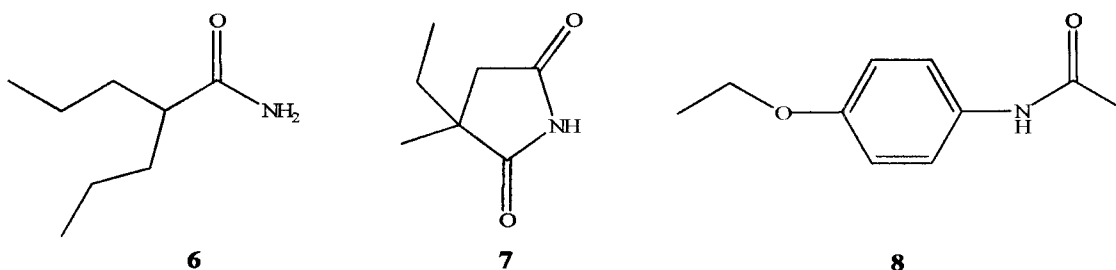
Os mesmos autores já haviam aplicado uma estratégia semelhante com o fármaco 2 (paracetamol), logrando diminuir a hepatotoxicidade deste fármaco em ratos e comprovando que a libertação do princípio activo ocorria quase exclusivamente por ciclização-eliminação em tampão ao pH fisiológico, a velocidades que dependiam da estrutura do dipéptido.<sup>[5,12,13]</sup> Contudo, a velocidade de libertação em plasma humano revelou-se bastante elevada, indicando uma activação enzimática neste meio.<sup>[5,12,13]</sup>

Estes dois exemplos reforçam o elevado potencial que os transportadores dipeptídicos têm no desenvolvimento de pró-fármacos. Assim, no trabalho desenvolvido no âmbito da presente Dissertação, pretendeu-se aplicar a mesma estratégia a fármacos contendo o grupo funcional amida ou imida, de que são exemplos a valpromida, a etossuximida e a fenacetina.

## 2. Âmbito e Objectivos do Projecto

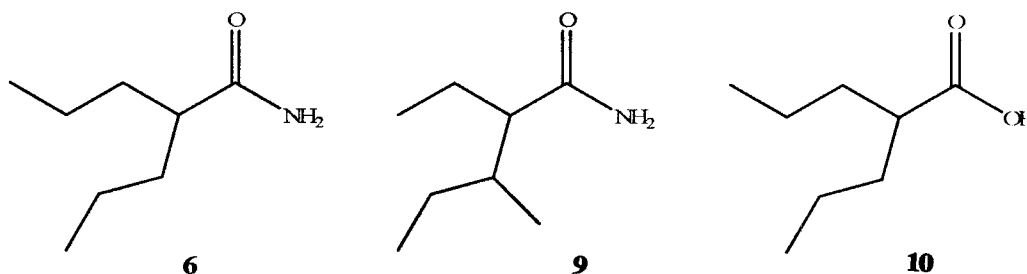
O trabalho experimental a seguir apresentado está inserido num projecto de investigação que envolve o estudo da síntese de derivados dipeptídicos como potenciais sistemas de cedência biorreversível de fármacos contendo o grupo amida. Este projecto é levado a cabo no Grupo de Investigação de Síntese Orgânica de Compostos Biocompatíveis (Gisocb), do Centro de Investigação em Química da Universidade do Porto, sob a orientação da Professora Doutora Paula Gomes.

O principal objectivo do trabalho foi a síntese de potenciais pró-fármacos da valpromida (VPD, **6**), etossuximida (ESM, **7**) e fenacetina (FNCT, **8**), que possuem o grupo funcional amida ou imida.



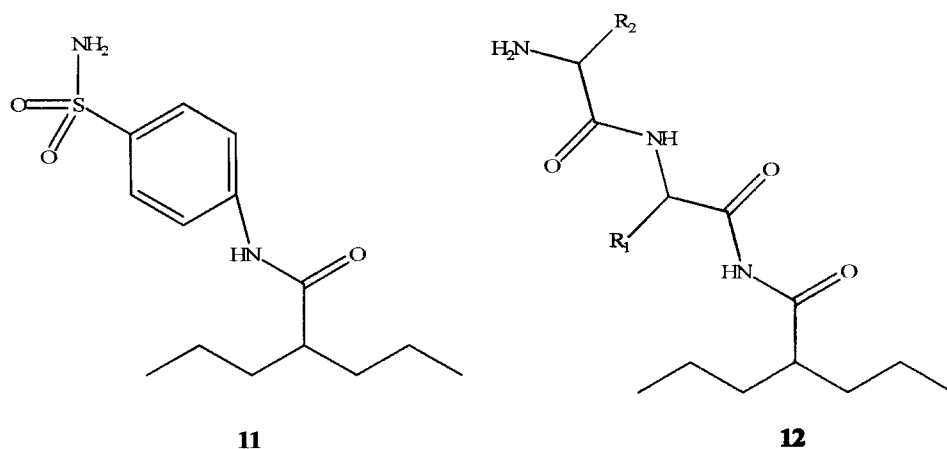
Os dois primeiros fármacos têm propriedades anti-convulsionantes notórias, mas estão associados a efeitos adversos que convirá eliminar ou minimizar num futuro próximo, visando abordagens mais seguras ao tratamento da epilepsia.

A valpromida, tal como a valnoctamida (VCD, **9**) são carboxamidas derivadas do ácido valpróico (VPA, **10**), um dos anti-convulsionantes mais utilizados em todo o mundo.<sup>[16]</sup> O ácido valpróico começou por ser utilizado como excipiente até que, em 1962, foi utilizado como solvente de potenciais agentes anti-convulsionantes, sendo descoberta a sua actividade farmacológica. Infelizmente, o VPA apresenta actividade teratogénica no Homem, para além de efeitos tóxicos para o fígado e pâncreas.<sup>[17-20]</sup>



O primeiro registo dos efeitos teratogénicos do VPA foi publicado em 1982. Vários estudos *in vitro* foram desenvolvidos desde então para determinar a origem da teratogenicidade deste fármaco, identificando-se que este possui um efeito anti-proliferativo no crescimento celular. Curiosamente, esta descoberta abriu novas perspectivas ao nível do uso do VPA para o tratamento de neoplasias.<sup>[19,21]</sup>

Os efeitos adversos associados ao VPA originaram uma intensa procura de derivados com maior/igual actividade terapêutica, mas com níveis de toxicidade substancialmente inferiores.<sup>[18,19]</sup> Estudos toxicológicos demonstraram que a presença do grupo carboxílico na molécula do VPA é essencial para a sua actividade teratogénica, o que conduziu ao desenvolvimento de amidas derivadas do VPA, caracterizadas por uma maior actividade anti-convulsionante e, potencialmente, menor toxicidade.<sup>[22,23]</sup> A VPD é uma dessas amidas, sendo actualmente utilizada como anti-epiléptico e anti-psicótico.<sup>[24]</sup> A VPD não apresenta actividade teratogénica e possui uma maior actividade anti-convulsionante relativamente ao VPA.<sup>[18]</sup> Contudo, coloca-se a questão de, no organismo, a VPD ser biotransformada em VPA.<sup>[24,25]</sup> Tal não será inteiramente verdade se forem efectuadas modificações estruturais ao nível do grupo amida, que irão certamente alterar os mecanismos de biotransformação da VPD. Esta hipótese é sustentada pelos estudos farmacocinéticos de Tasso et al. com vários derivados mono e di-substituídos da VPD, demonstrando que estes actuam como entidades intactas das quais apenas 4% é metabolizado a VPA.<sup>[25]</sup>



**Figura 4:** Derivados mono-substituídos da VPD.

Neste contexto, o derivado 11 (Figura 4) foi o que apresentou resultados mais promissores, sendo mais activo e menos tóxico que a estrutura parental.<sup>[25]</sup>

No âmbito desta Dissertação visou-se desenvolver derivados dipeptídicos da VPD (12, Figura 4), tendo por finalidade a obtenção de potenciais pró-fármacos com

índices terapêuticos melhorados face aos derivados do VPA actualmente disponíveis. A aplicação de dipéptidos transportadores visou ir de encontro a uma provável activação por ciclização intramolecular, na sequência de trabalhos que têm vindo a ser desenvolvidos pelo grupo nesta área (já antes referidos).<sup>[13,14]</sup>

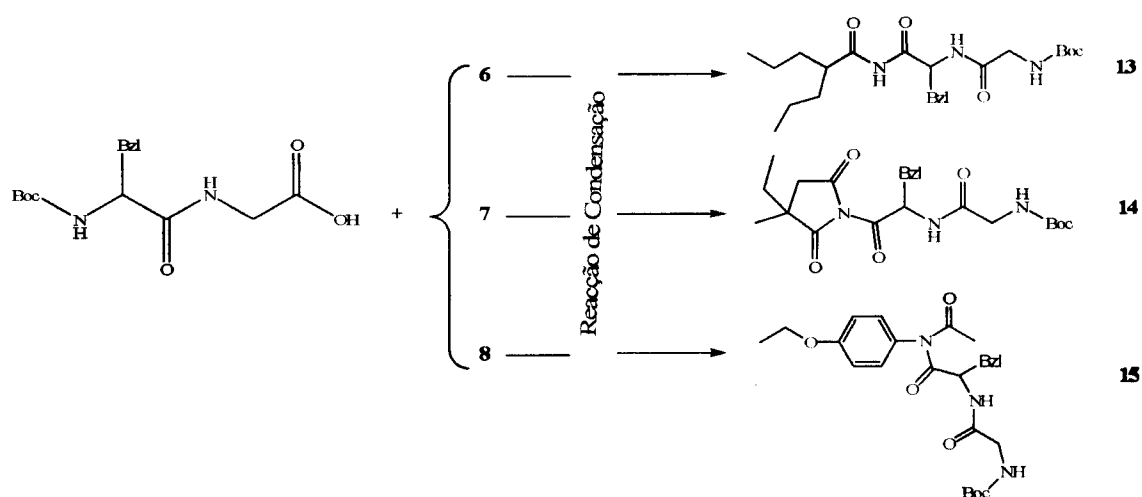
Pensou-se aplicar a mesma estratégia ao outro agente anti-convulsionante, a ESM, em virtude deste fármaco estar associado a alguns efeitos hemato-, nefro- e hepato-tóxicos. Na verdade, sendo a ESM o princípio activo de dois fármacos largamente usados em casos clínicos de epilepsia, o Zarontin e o Emeside, é de todo o interesse que se minimizem tais efeitos indesejáveis, permitindo a administração deste princípio activo a pacientes que tenham deficiências funcionais a nível hepático ou renal.<sup>[26-29]</sup>

Já a inclusão da FNCT neste estudo foi feita com base em dois aspectos: em primeiro lugar, porque este analgésico e anti-pirético derivado do paracetamol surge como uma “evolução natural” do trabalho de investigação anterior do grupo sobre este último fármaco e, em segundo lugar, porque existem evidências de uma certa nefrotoxicidade associada a este fármaco.<sup>[30-35]</sup>

Globalmente, a concepção dos pró-fármacos dipeptídicos aqui propostos visa em última instância a minimização indirecta da toxicidade dos princípios activos, através de um possível aumento da sua biodisponibilidade, com consequente diminuição das dosagens necessárias para atingir um mesmo efeito terapêutico.

### 3. Plano de Trabalho

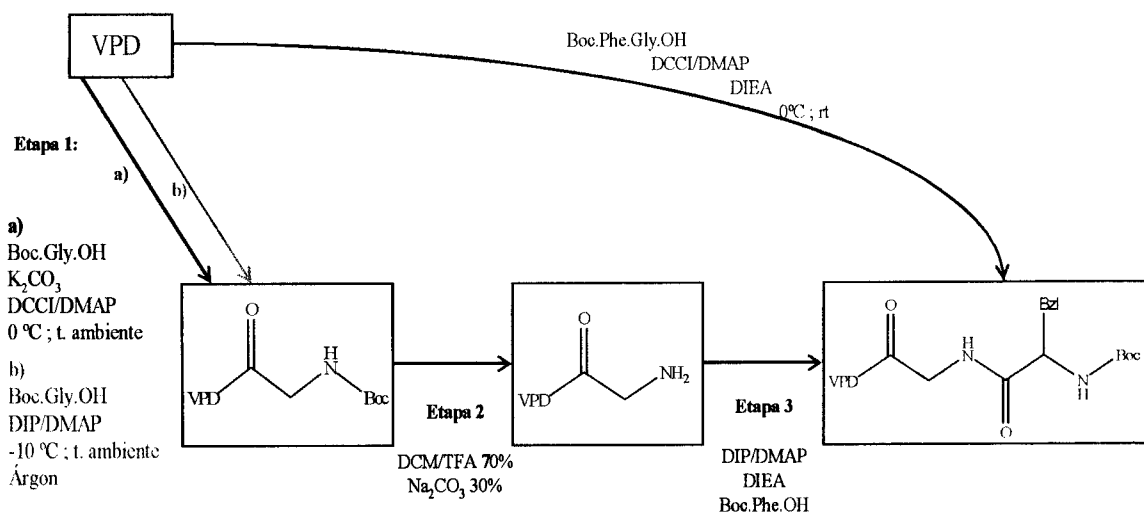
Para atingir os objectivos sintéticos do presente trabalho, e devido à reconhecida baixa reactividade das amidas face a agentes acilantes,<sup>[36]</sup> planeou-se levar a cabo um extenso estudo metodológico visando a condensação dos três fármacos com o precursor *N*-Boc-protégido do dipéptido fenilalanilglicina (**Esquema 8**). Na prática, geralmente optou-se por uma estratégia de condensação em dois passos, acilando-se o fármaco em primeiro lugar com a *N*<sup>α</sup>-Boc-glicina e, após remoção do grupo protector do produto de acilação, acilar este último com a *N*<sup>α</sup>-Boc-fenilalanina (**Esquemas 9, 10 e 11**).



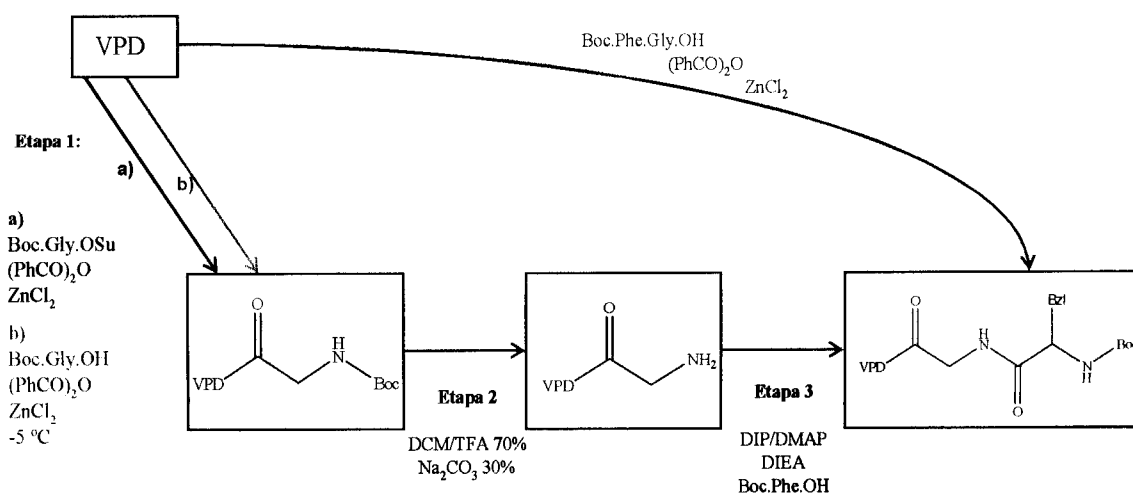
**Esquema 8:** Reacção de condensação do dipéptido Boc.Phe.Gly.OH aos fármacos VPD (6), ESM (7) e FNCT (8) para obtenção dos derivados dipeptídicos 13, 14 e 15.

Considerando as estruturas dos fármacos em estudo, planeou-se iniciar o trabalho focado nas reacções de *N*-acilação da VPD (6). Sendo esta a única amida primária, esperar-se-ia maior facilidade de *N*-acilação neste caso, em comparação com os dois outros fármacos. Projectaram-se três métodos diferentes de *N*-acilação, nomeadamente:

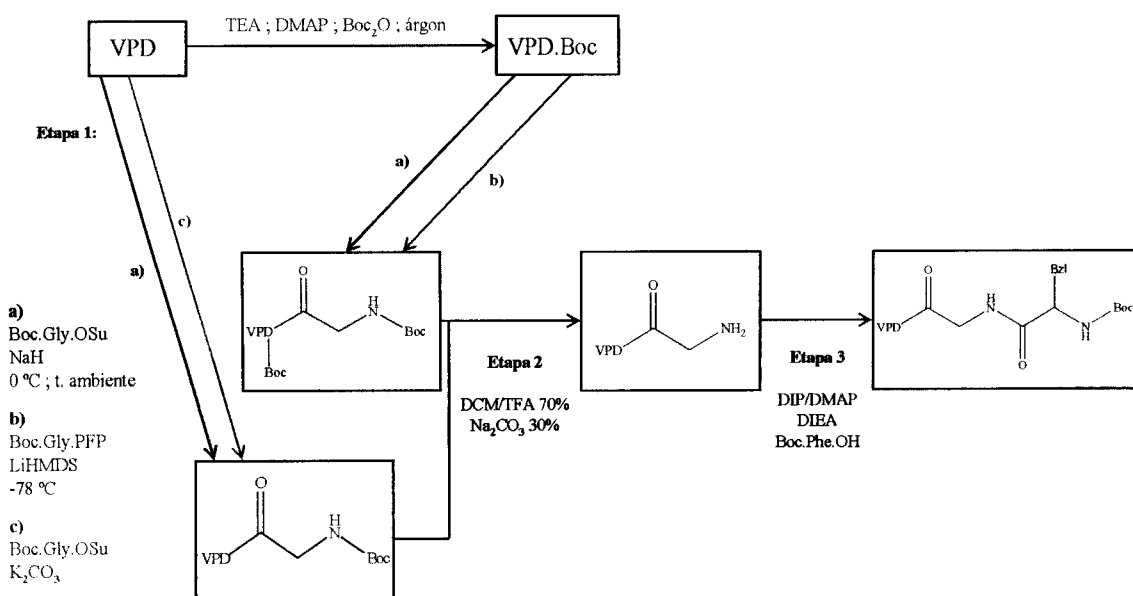
- A) activação *in situ* via carbodiimidas (**Esquema 9**);
- B) activação *in situ* via anidridos mistos (**Esquema 10**);
- C) activação via ésteres activos com catálise básica (**Esquema 11**);



**Esquema 9: N-actilação de amidas via carbodiimidas (A).** [49-50]



**Esquema 10: N-actilação de amidas via anidridos mistos (B).** [40]



**Esquema 11: N-actilação de amidas via ésteres activos com catálise básica (C).** [42,43]

## 4. Resultados e Discussão

### 4.0. Considerações iniciais sobre a *N*-acilação de amidas

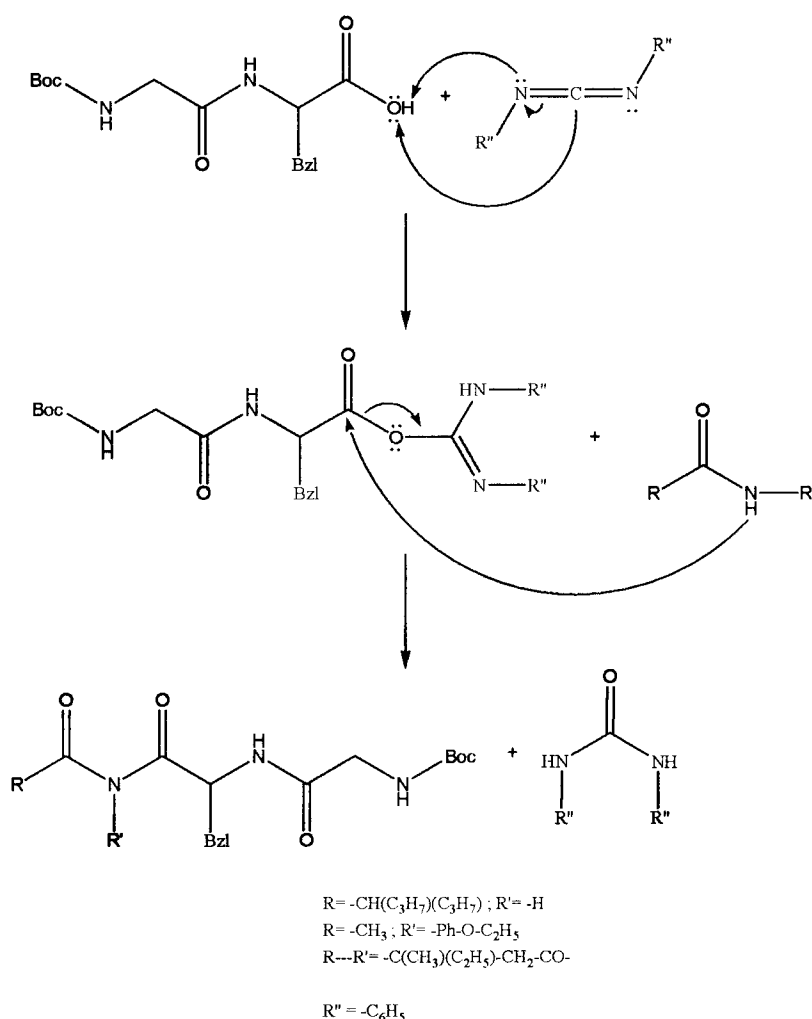
Tendo em vista os objectivos sintéticos acima referidos, procedeu-se a uma pesquisa bibliográfica exaustiva sobre condições de acilação de amidas. Embora a literatura existente sobre o assunto seja bastante escassa, e a maioria datada de meados do século passado, foi possível encontrar alguns estudos recentes nesta área.<sup>[37-43]</sup> Regra geral, as reacções relevantes, tal com estão descritas na literatura, diferem umas das outras na forma de activação do agente acilante, para que se torne mais susceptível a sofrer um ataque nucleófilo por parte do azoto amídico. Alguns dos métodos de acilação mais relevantes, aplicados ou eventualmente aplicáveis a amidas, são apresentados de seguida.

#### 4.0.1. Recurso a carbodiimidas como agentes de condensação

As carbodiimidas são os agentes de condensação *in situ* por excelência. São eficazes em síntese peptídica quer em solução, quer em fase sólida<sup>[44-46]</sup>, sendo também aplicadas com sucesso na condensação de aminoácidos e outros componentes acilo a fármacos hidroxilados e aminados.<sup>[3,13,14,47-50]</sup>

Gomes et al. aplicaram com sucesso o método das carbodiimidas na condensação de aminoácidos e dipéptidos *N*<sup>α</sup>-protegidos a sulfanilamidas. No entanto, a *N*-acilação destes fármacos ocorreu quase sempre exclusivamente no azoto anilínico, havendo apenas casos pontuais em que o grupo sulfonamida se apresentou ligeiramente reactivo face à acilação por aminoácidos.<sup>[3,49]</sup>

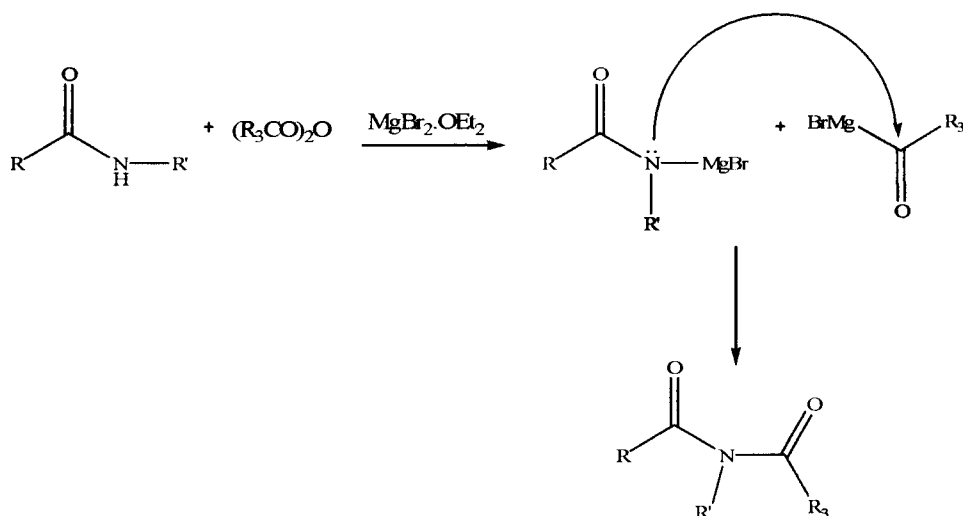
Ainda assim, considerou-se que seria relevante testar este método como via de *N*-acilação das amidas em estudo, esperando-se um mecanismo reaccional como o ilustrado no **Esquema 12**.



**Esquema 12:** Mecanismo da eventual *N*-acilação de um fármaco amídico com o dipéptido Boc.Phe.Gly.OH, por activação *in situ* com carbodiimidás.

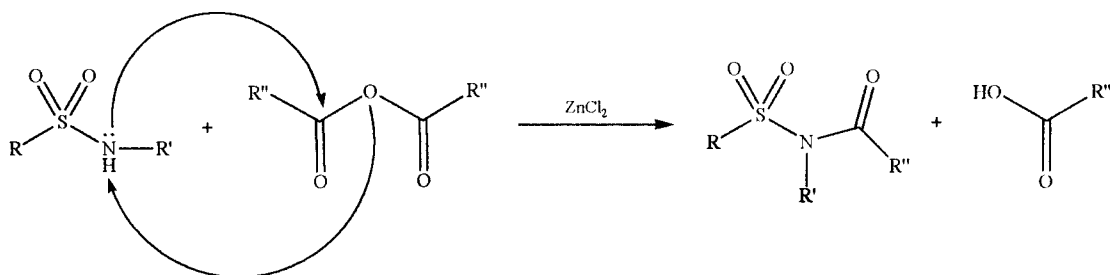
#### 4.0.2. Recurso a anidridos como agentes acilantes

Os anidridos são reconhecidamente mais electrófilos relativamente aos correspondentes ácidos carboxílicos, sendo por isso muitas vezes utilizados como agentes acilantes.<sup>[39,40,51]</sup> No que diz respeito à *N*-acilação de amidas, Yamada et al. utilizaram anidridos na presença de  $\text{MgBr}_2 \cdot \text{OEt}_2$ , obtendo resultados bastante satisfatórios.<sup>[39]</sup> O  $\text{MgBr}_2 \cdot \text{OEt}_2$  proporciona uma dupla activação, tanto do anidrido como da amida, favorecendo a *N*-acilação desta última (**Esquema 13**).



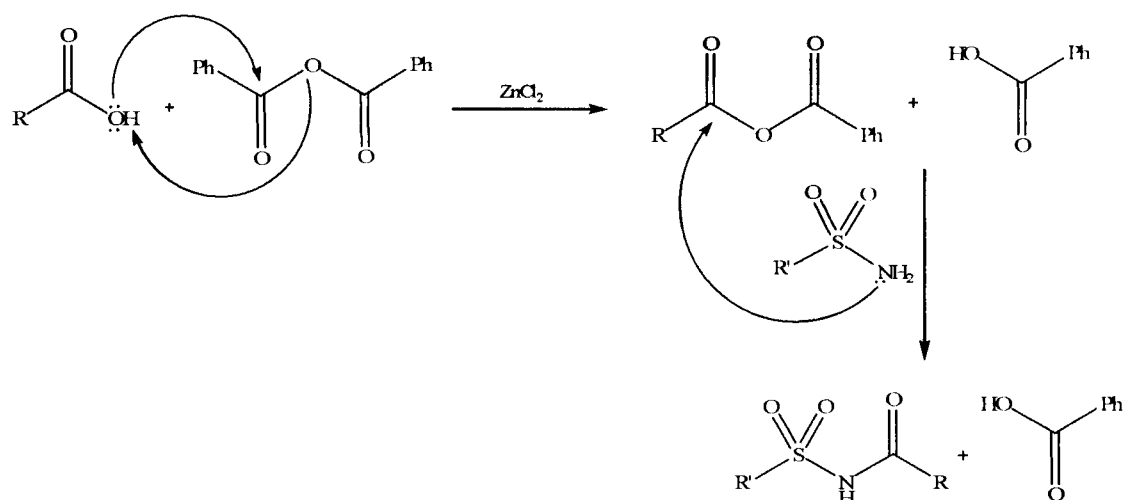
**Esquema 13:** Activação de anidridos e amidas por parte do  $\text{MgBr}_2 \cdot \text{OEt}_2$ .

No caso particular do uso de um dipéptido como componente acilo, este método provavelmente conduziria à activação da própria ligação peptídica, devido à utilização do  $\text{MgBr}_2 \cdot \text{OEt}_2$ .<sup>[39]</sup> Tal poderia ser contornado por acoplamento passo a passo de cada um dos aminoácidos ou, preferencialmente, por aplicação das condições propostas por Reddy et al.<sup>[40]</sup> para a *N*-acilação de sulfonamidas. Estes autores sugerem o uso de um ácido de Lewis, como catalisador, na reacção entre o anidrido e a sulfonamida (**Esquema 14**).



**Esquema 14:** Reacção representativa da *N*-acilação de uma sulfonamida pelo método do anidrido simétrico.

Todos os ácidos de Lewis testados por Reddy et al. ( $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{TiCl}_4$ ,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{MOCl}_5$ ,  $\text{B}(\text{C}_6\text{F}_5)_3$  e  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ ) apresentaram resultados bastante satisfatórios, pelo que os mesmos autores testaram idênticas condições para a *N*-acilação de sulfonamidas via anidridos mistos. Para isso, fizeram reagir a sulfonamida directamente com o ácido carboxílico desejado, na presença de anidrido benzóico (**Esquema 15**).<sup>[40,51]</sup>



**Esquema 15:** Reacção representativa da *N*-acilação de uma sulfonamida pelo método dos anidridos mistos descrito por Reddy et al.<sup>[40]</sup>

O uso do anidrido benzóico prende-se com a baixa reactividade do componente benzoílo relativamente ao outro componente acilo do anidrido misto formado *in situ*. Desta forma, o ataque nucleófilo ocorrerá preferencialmente no grupo carbonilo do ácido carboxílico usado, pois o grupo carbonilo do componente benzoílo encontra-se estabilizado por ressonância.<sup>[51]</sup>

Face aos bons resultados deste método para a *N*-acilação de sulfonamidas, considerou-se como uma via sintética atractiva para alcançar os objectivos sintéticos da presente Dissertação, com a vantagem adicional de envolver condições reaccionais suaves e o uso de reagentes disponíveis comercialmente e de fácil manuseamento.<sup>[40]</sup>

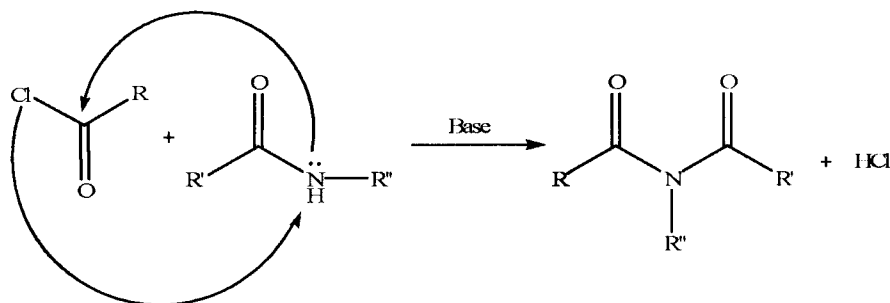
#### 4.0.3. *N*-Acilação de amidas usando cloretos de ácido

O uso de cloretos de ácido como agentes acilantes é muitas vezes preferido relativamente ao uso dos correspondentes ácidos, devido à elevada reactividade dos primeiros.

Bao et al. efectuaram estudos de comparação entre o uso de cloretos de ácido e anidridos, relativamente à sua eficácia na acilação de sulfonamidas. Das reacções realizadas por Bao, verificou-se que aquelas que utilizavam os cloretos de ácido a baixas temperaturas ( $T = 0\text{ }^{\circ}\text{C}$  ou  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), na presença de piridina, apresentavam maior rendimento.<sup>[41]</sup>

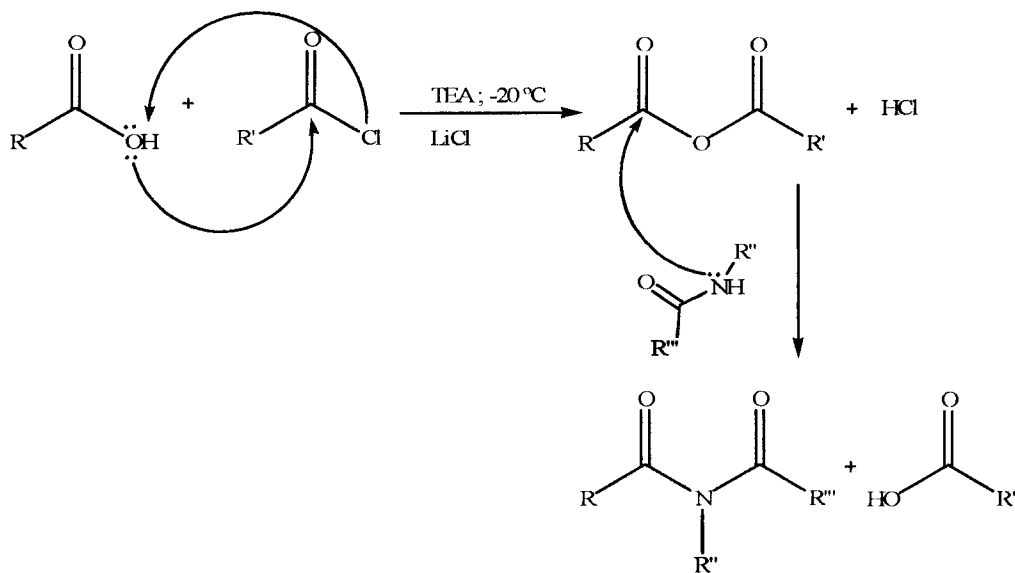
Geralmente, as reacções entre amidas e cloretos de ácido podem originar: a) uma monoacilação, b) uma diacilação, e c) a formação de um nitrilo, sendo as condições

reaccionais, e muitas vezes a estrutura das amidas usadas, que determinam qual ou quais das reacções ocorrerá em maior extensão.<sup>[52]</sup> A *N*-acilamida forma-se fazendo reagir o cloreto de ácido directamente com a amida, na presença de uma base não nucleófila para evitar a formação de sais não reactivos (**Esquema 16**), podendo esta reacção ser catalisada por piridina ou 4-(*N,N'*-dimetil)aminopiridina (DMAP).<sup>[53]</sup>



**Esquema 16:** Reacção de *N*-acilação de amidas usando cloretos de ácido.

Porém, nem sempre o recurso a cloretos de ácido é eficaz para a *N*-acilação de amidas, por reacção directa daqueles com estas. Ho et al. desenvolveram um método alternativo onde fazem reagir o cloreto de ácido com um ácido carboxílico, como exemplificado no **Esquema 17**.



**Esquema 17:** Reacção representativa da *N*-acilação de amidas, via formação de um anidrido misto, usando cloretos de ácido.

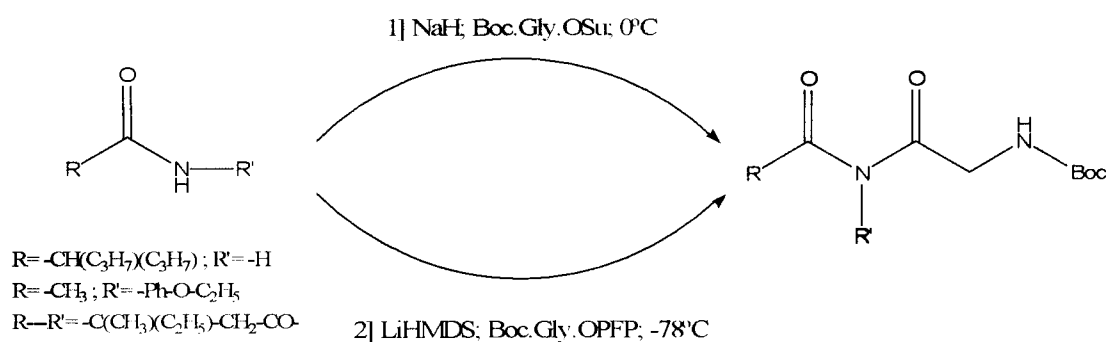
Ao fazer reagir o ácido carboxílico com o cloreto de ácido, a baixa temperatura, forma-se um anidrido misto, que reagirá depois com a amida, originando o composto desejado.<sup>[56]</sup> Adicionalmente, o uso de cloretos de ácido apresenta algumas

desvantagens, pois estes agentes podem provocar a hidrólise de vários compostos, promover a remoção de grupos protectores, ou ainda favorecer a racemização de aminoácidos.<sup>[53-55]</sup> Para além disso, quando os cloretos de ácido não se encontram comercialmente disponíveis, é necessário proceder à sua preparação, através de métodos que envolvem riscos de segurança e técnicas menos triviais de manuseamento dos reagentes.

#### 4.0.4. Uso de ésteres activos como agentes acilantes

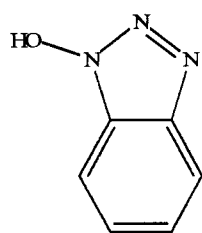
Os ésteres activos, ou reactivos, constituem também um exemplo clássico de agentes acilantes.<sup>[42,43]</sup> Neste âmbito, Andrus et al. desenvolveram um método de *N*-acilação de amidas baseado na reacção de um éster pentafluorofenólico (PFP, **18**) com a amida desprotonada, a baixa temperatura ( $T = -78\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), na presença de uma base forte como o bis(trimetilsilil)amida de lítio (LiHMDS).<sup>[42]</sup> Posteriormente, Tomasini et al.<sup>[43]</sup> aplicaram este mesmo método na acilação de amidas cíclicas, mas realizando as reacções a temperaturas mais altas ( $T = 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e fazendo um estudo sistemático para determinar qual a melhor base a usar neste tipo de reacções: *N*-etilidisopropilamina (DIEA), hidreto de sódio (NaH), LiHMDS, carbonato de céσιο ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ) e, 1,8-diazobicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU). Este estudo permitiu verificar que o uso de DIEA, misturas DIEA/DMAP, ou  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  não conduziam a bons resultados. Em contrapartida, os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou LiHMDS, embora o uso de NaH também tenha conduzido a resultados bastante satisfatórios.<sup>[42,43]</sup>

Face aos resultados positivos destes autores, considerou-se relevante avaliar também a viabilidade desta aproximação sintética para alcançar os objectivos do trabalho. Devido, respectivamente, à sua disponibilidade comercial ou à facilidade da sua preparação, optou-se por utilizar ésteres da glicina com hidroxisuccinimida (HOSu, **19**) e com pentafluorofenol, para condensação deste aos fármacos amídicos em estudo, como se ilustra no **Esquema 18**. Sendo esta aproximação eficaz, bastaria depois remover-se o grupo *N*<sup>α</sup>-protector e proceder ao subsequente acoplamento de *N*<sup>α</sup>-Boc-fenilalanina.

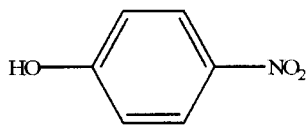


**Esquema 18:** Reacção representativa da *N*-acilação de amidas usando ésteres activos com catálise básica.

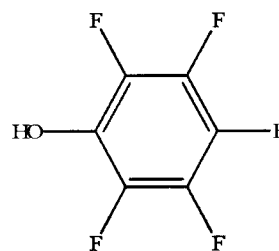
Outros ésteres activos poderiam ser considerados para levar a cabo as *N*-acilações desejadas, como por exemplo, ésteres de 1-hidroxibenzotriazole (HOBt, **16**) ou de *para*-nitrofenol (PNP, **17**), mas não foram encontrados na literatura exemplos de sucesso na aplicação destes ésteres à *N*-acilação de amidas.



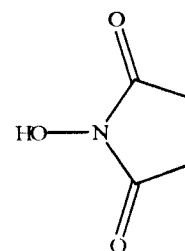
**16**



**17**



**18**



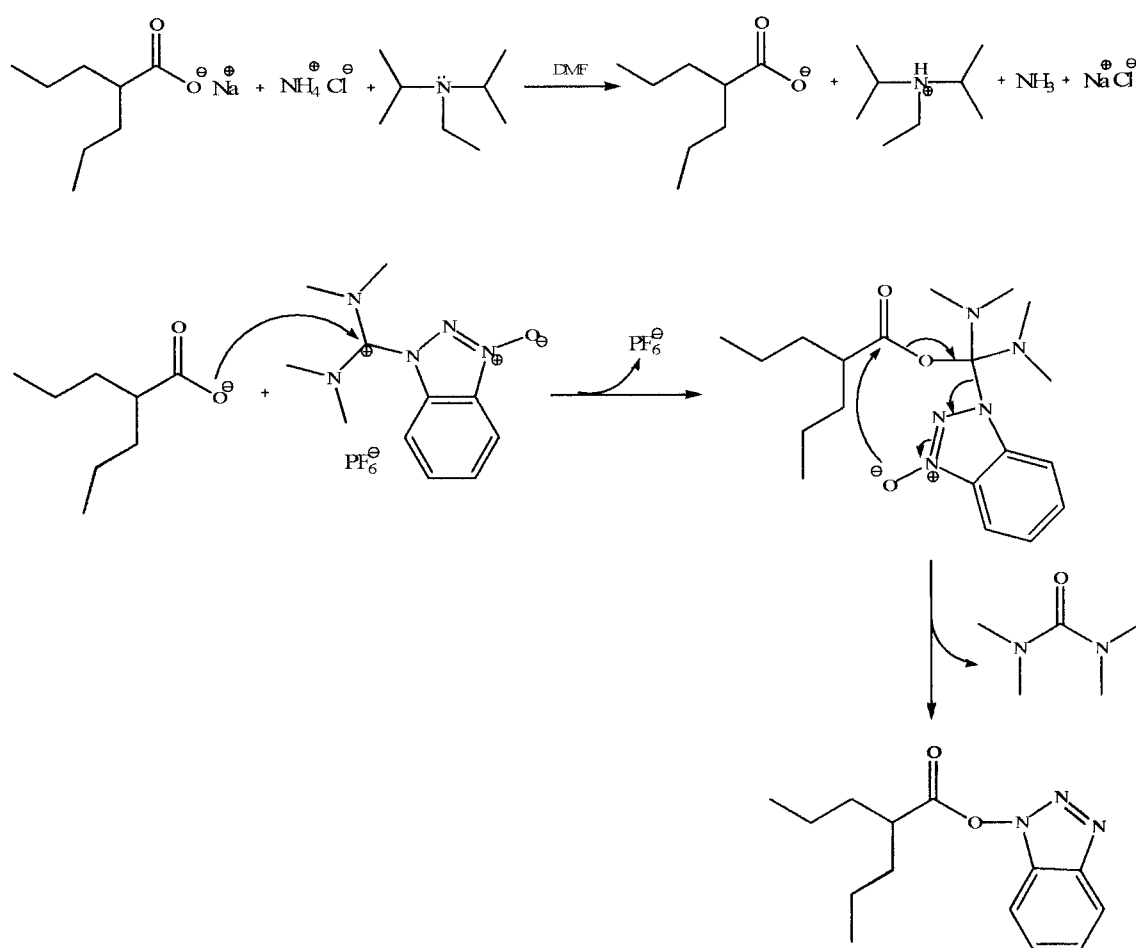
**19**

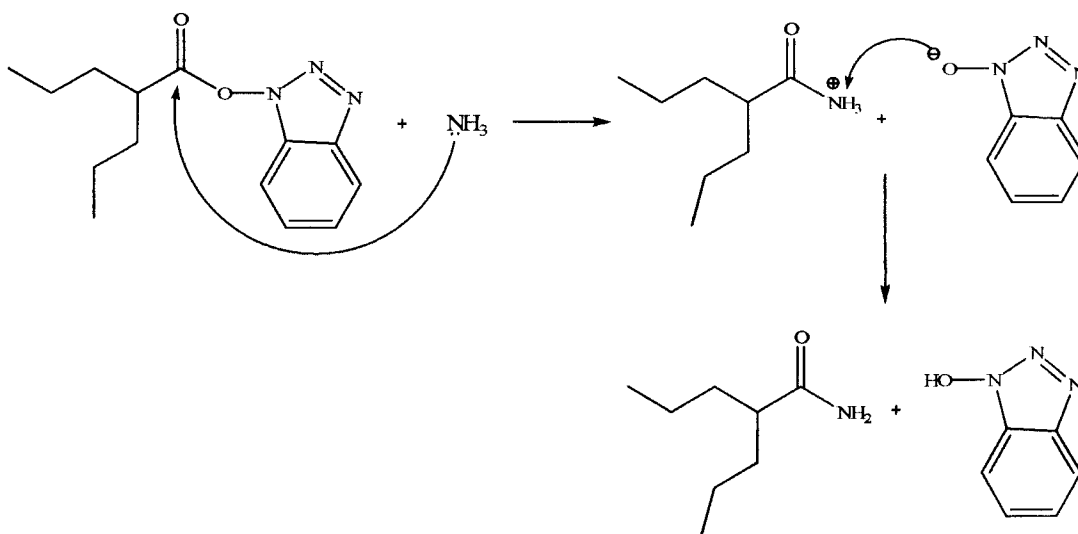
## 4.1. Estudo da *N*-Acilação da Valpromida

### 4.1.1. Preparação da Valpromida

Foi necessário proceder à preparação da VPD a partir do valproato de sódio, na medida que apenas este e o VPA estão disponíveis comercialmente.

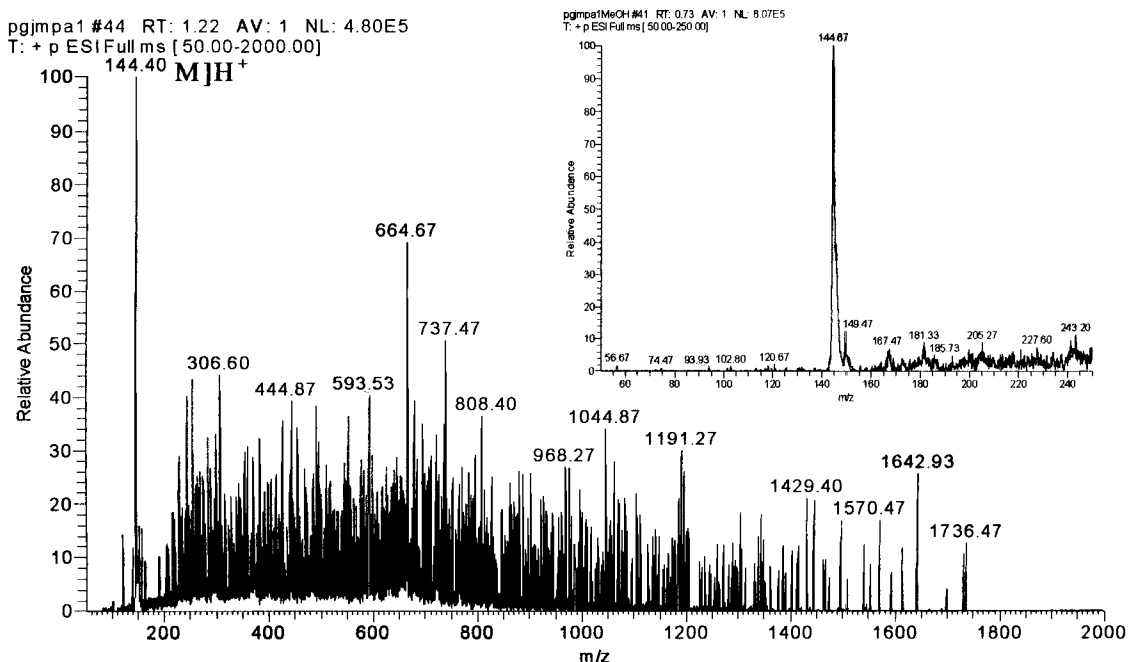
A síntese foi levada a cabo conforme descrito na Parte Experimental, tendo sido realizado um total de 23 reacções (**R**<sub>1-23</sub>), em que a VPD se obteve como um sólido branco, com rendimentos entre 60 e 80 %. Como se ilustra no **Esquema 19**, na reacção de preparação da VPD é utilizado um nucleófilo auxiliar, hexafluorofosfato de 2-(1H-bezotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamínio (HBTU), que activará o grupo carboxilo do valproato de sódio, para que este sofra ataque nucleófilo por parte do cloreto de amónio (NH<sub>4</sub>Cl), formando-se assim o composto desejado.





**Esquema 19:** Mecanismo da reacção de preparação da VPD a partir do valproato de sódio.

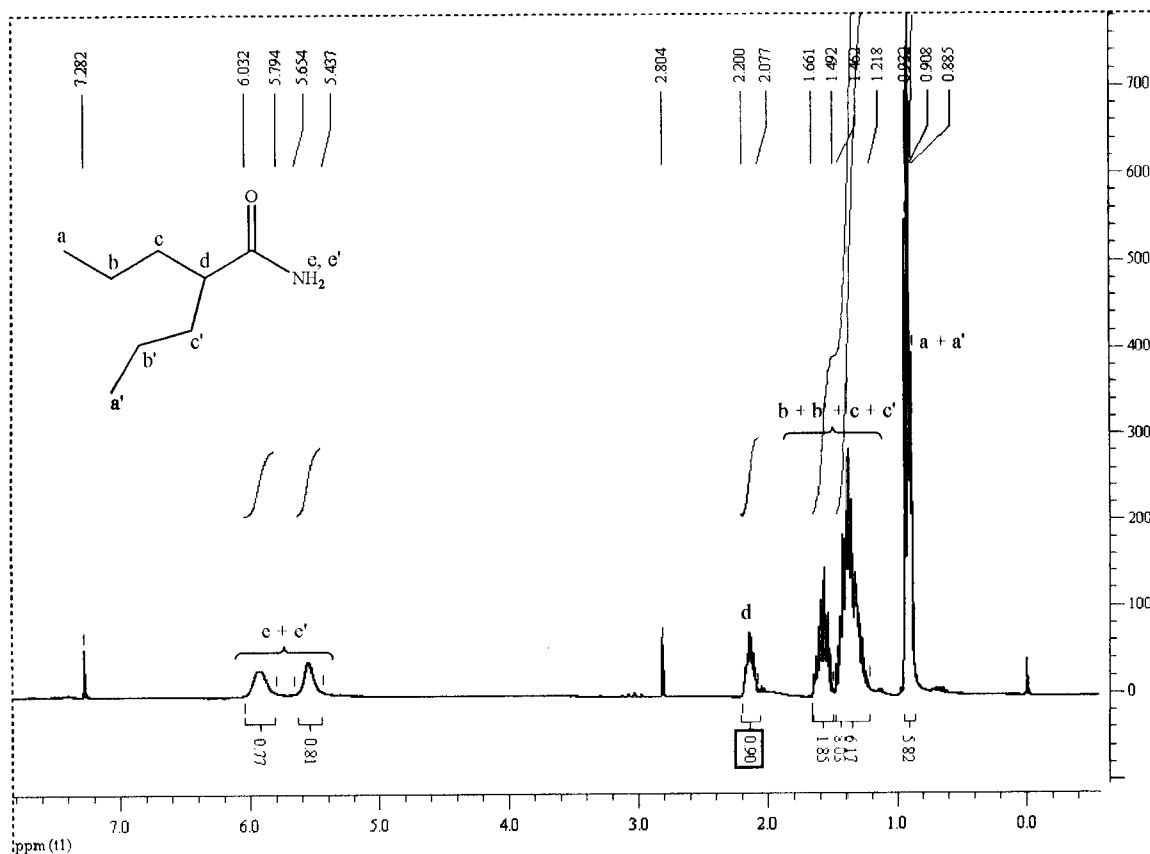
Apenas o composto obtido na primeira reacção foi analisado por espectrometria de massa (ESI-MS, **Figura 5**) e ressonância magnética nuclear de próton (RMN- $^1\text{H}$ , **Figura 6**), para confirmação da sua identidade como sendo a VPD. Nas restantes 22 reacções, a identificação do produto foi feita por análise cromatográfica (TLC) comparativa, usando-se uma porção da VPD sintetizada na primeira reacção como padrão.



**Figura 5:** Espectro de massa (ESI-MS) da VPD:  $m/z$  ( $\text{MH}^+$ ): 144,40 (esperado, 144,24).

Como se pode constatar da análise dos espectros de ESI-MS e RMN-<sup>1</sup>H da VPD sintetizada, esta apresentou a estrutura esperada.

Assim, o espectro de massa apresentou o pico-base a  $m/z = 144,40$ , correspondente ao pico de íon quasi-molecular  $MH^+$  da VPD ( $m/z$  calculado de 144,24). De referir que o elevado ruído registado no espectro resultou da baixa concentração da amostra analisada.



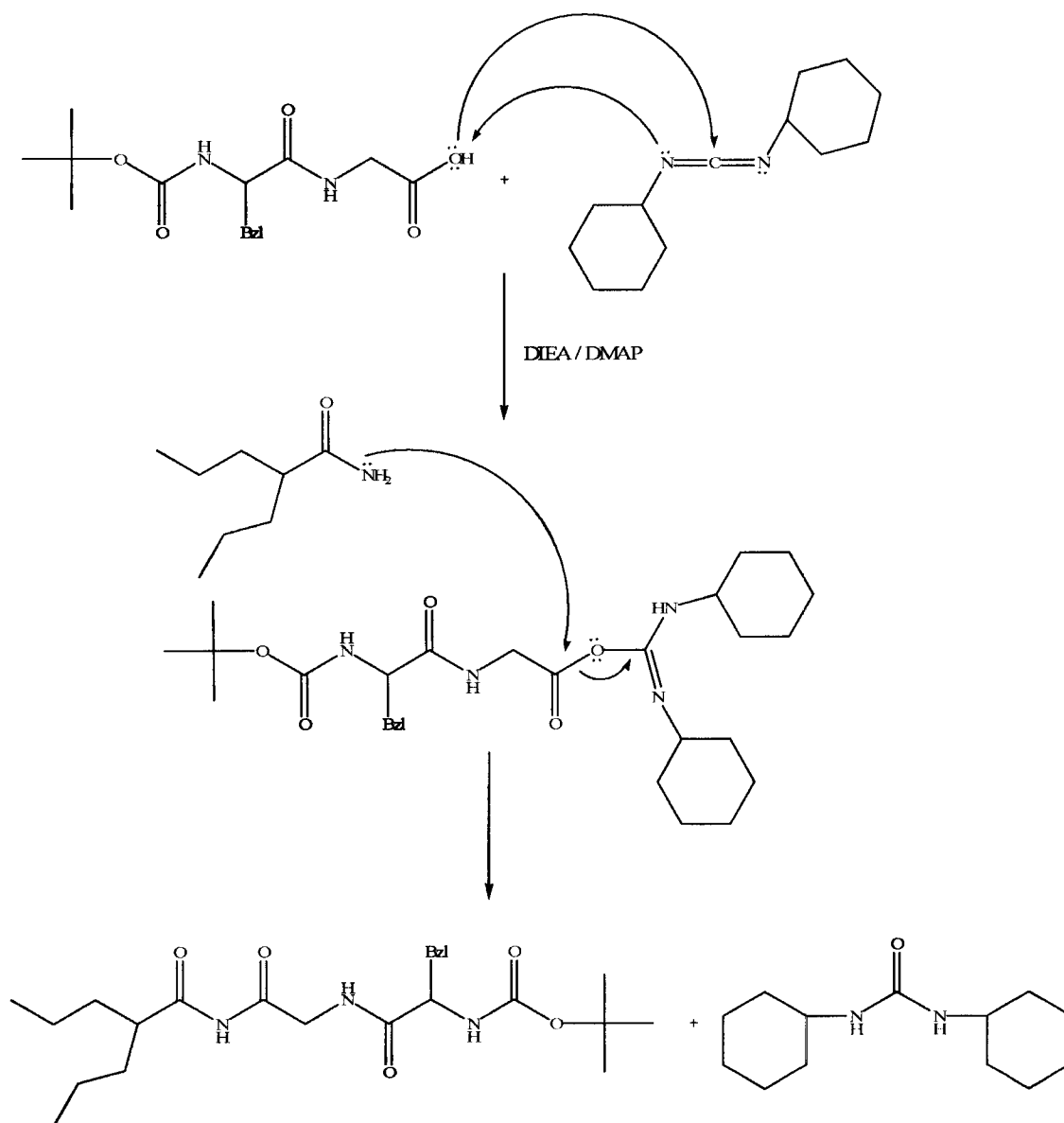
**Figura 6:** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) do composto VPD.

Da análise do espectro de RMN-<sup>1</sup>H foi possível confirmar a estrutura do composto obtido. Observaram-se dois picos a cerca de 6 ppm correspondentes aos prótons do grupo amida (H<sub>e,e'</sub>), bem como os prótons correspondentes aos grupos metileno (H<sub>b,c,b',c'</sub>) e aos grupos metilo (H<sub>a,a'</sub>) nas respectivas zonas características (respectivamente, 1,2 a 1,7 ppm e 0,91 ppm). O sinal do próton ligado ao carbono  $\alpha$  (H<sub>d</sub>) foi também observado a 2,1 ppm.

## 4.2. Aproximações sintéticas à *N*-acilação da Valpromida

### 4.2.1. Condensação directa do dipéptido *N*<sup>α</sup>-protegido (Boc.Phe.Gly.OH) com activação *in situ* mediada por carbodiimidas

A primeira abordagem à *N*-acilação da VPD com um dipéptido baseou-se na condensação directa deste à VPD, usando a *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCCI) para activação *in situ* do componente carboxílico (**Esquema 20**).



**Esquema 20:** Mecanismo hipotético da reacção de condensação do Boc.Phe.Gly.OH à VPD via carbodiimidas.

O seguimento da reacção (secção 7.5.1, reacção A.1) por TLC permitiu observar a formação de um produto, que se isolou sob a forma de um sólido branco. Este sólido foi analisado por ESI-MS (Figura 7) e RMN-<sup>1</sup>H (Figura 8), concluindo-se que o composto obtido era o éster etílico do dipéptido *N*<sup>α</sup>-Boc protegido (20, Boc.Phe.Gly.OEt).

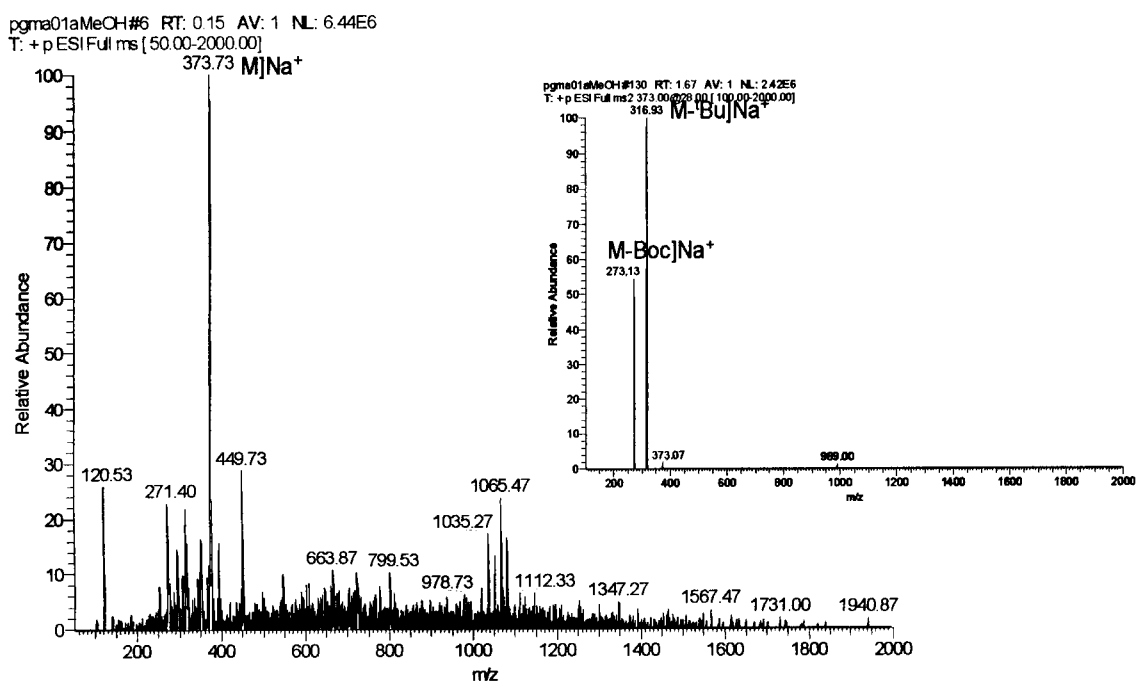
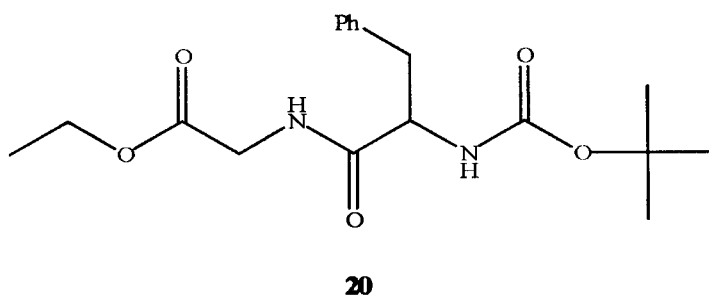
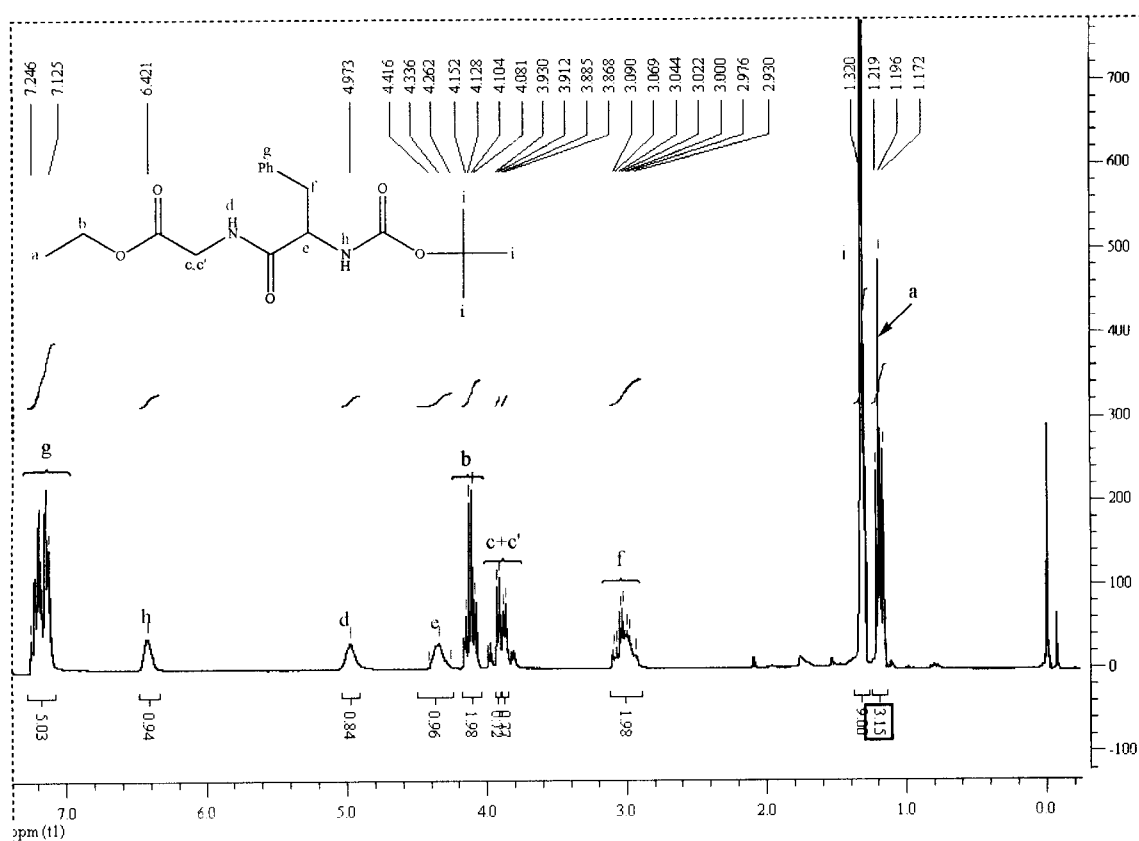


Figura 7: Espectros de massa (ESI-MS e MS<sup>2</sup>) do produto isolado na reacção A.1 (20).

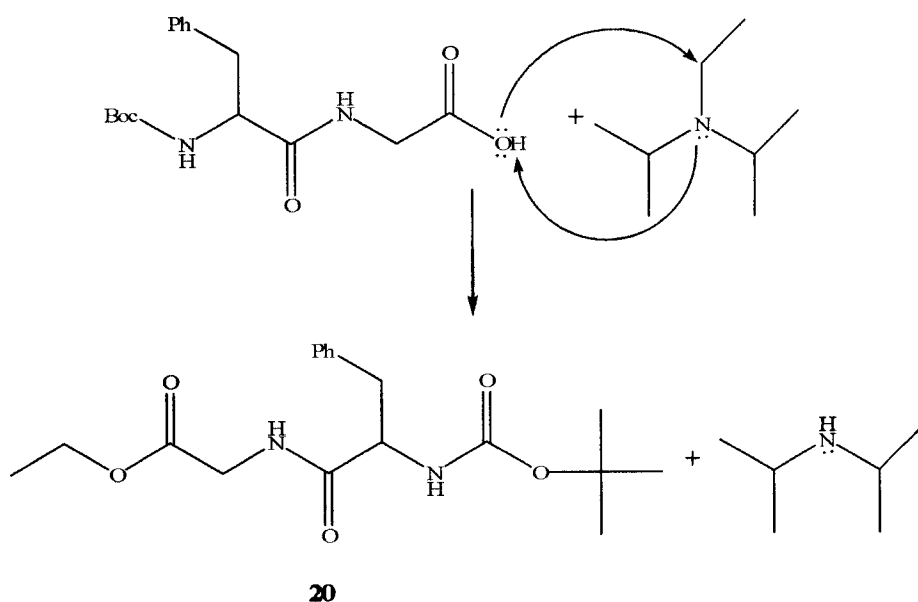
O espectro de massa apresentou-se compatível com o valor esperado para o composto 20, tendo o pico-base  $m/z = 373,93$ , correspondente ao aducto de sódio  $MNa^+$  ( $m/z$  esperado de 373,18). A fragmentação adicional (MS<sup>2</sup>) do ião do pico base conduziu a dois iões cujos valores de  $m/z$  eram compatíveis, respectivamente, com a perda de um grupo *tert*-butilo e de um grupo Boc. Tal permitiu concluir que o composto isolado seria derivado do dipéptido *N*<sup>α</sup>-Boc protegido usado na reacção.



**Figura 8:** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz) do composto **20**.

A análise de RMN-<sup>1</sup>H do produto permitiu confirmar que o composto apresentava a estrutura **20**. Assim, para além da observação dos picos correspondentes aos prótons do dipéptido (H<sub>c,c',d,e,f,g,h,i</sub>), nas suas zonas características, foi possível verificar o aparecimento dos picos correspondentes aos prótons dos grupos metileno (H<sub>b</sub>) e metilo (H<sub>a</sub>) a cerca de 4,1 ppm (quarteto, J = 7,14 Hz) e 1,2 ppm (triplete, J = 7,14 Hz), respectivamente.

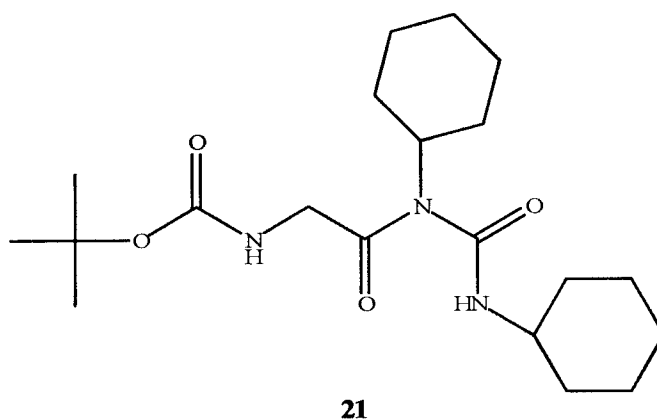
Apesar de, à partida, parecer uma hipótese algo remota, pensa-se que devido à baixa reactividade da amida (VPD) como nucleófilo, o próprio dipéptido possa ter funcionado como nucleófilo atacando o grupo etilo da base usada na reacção (*N*-etildisopropilamina, DIEA), ocorrendo uma substituição nucleófila, como se ilustra no **Esquema 21**.



**Esquema 21:** Mecanismo da reacção de formação do éster etílico do dipéptido Boc.Phe.Gly.OH.

Partindo desta permissa, repetiu-se a tentativa de *N*-acilação da VPD, mediada por carbodiimida, mas desta vez na presença de uma base inorgânica ( $K_2CO_3$ ) e usando-se o aminoácido Boc.Gly.OH como agente acilante (secção 7.5.1, reacção A.2)

A reacção A.2 deu lugar à formação de um composto novo, que se isolou como um sólido branco. Este sólido foi analisado por ESI-MS (**Figura 9**) e RMN- $^1H$  (**Figura 11**), verificando tratar-se de uma *N*-acilureia derivada do aminoácido (**21**).



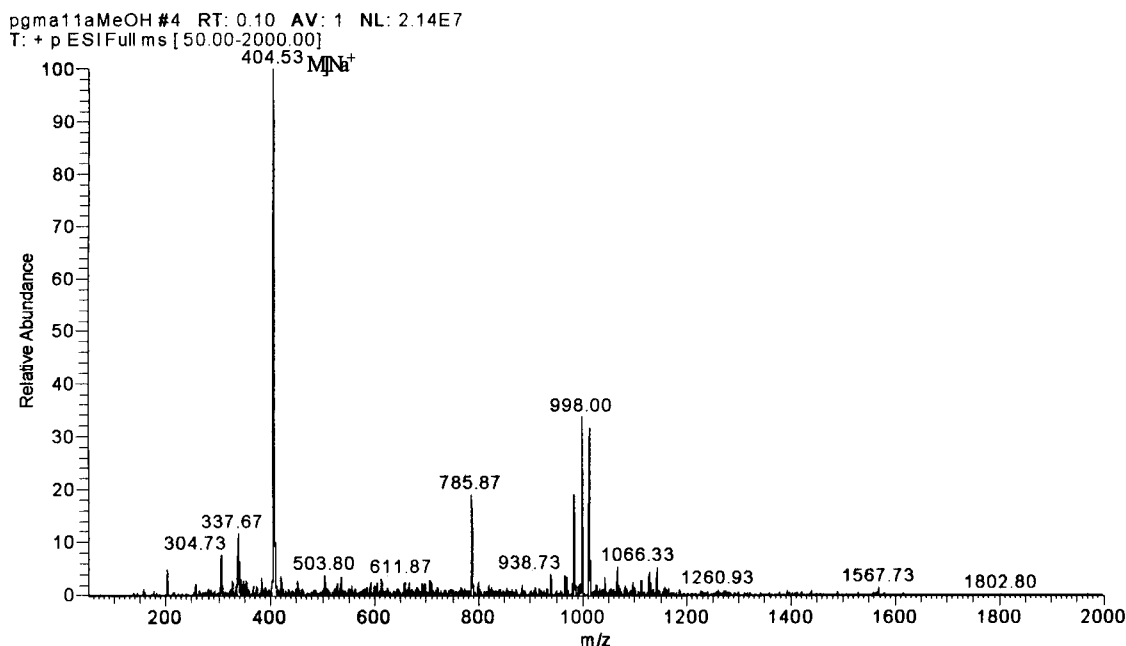


Figura 9: Espectro de massa (ESI-MS) do composto 21, isolado da reacção A.2.

O espectro de ESI-MS evidenciou um pico-base a  $m/z = 404,40$ , compatível com o aducto de sódio do composto 21 ( $m/z$  esperado de 404,51). Tal como no caso do produto da reacção anterior (20), também estudos adicionais de fragmentação ( $MS^2$  e  $MS^3$ ) permitiram avançar com alguma segurança que a estrutura do composto isolado correspondia a 21, pois na fragmentação  $MS^2$  ocorreu a perda do grupo Boc, seguida da perda da *N*-ciclo-hexil-2-aminoetanamida, na fragmentação  $MS^3$  (Figura 10).

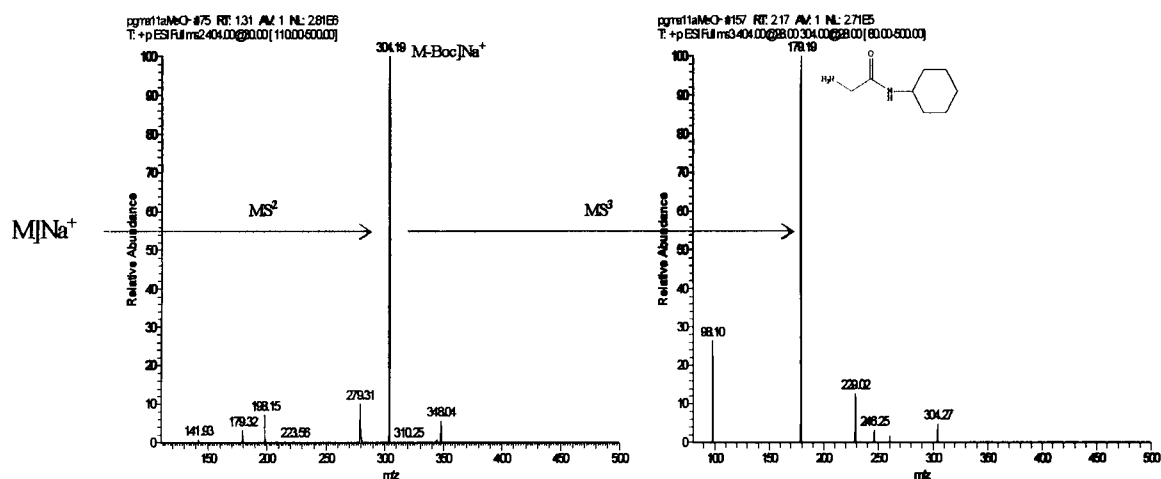
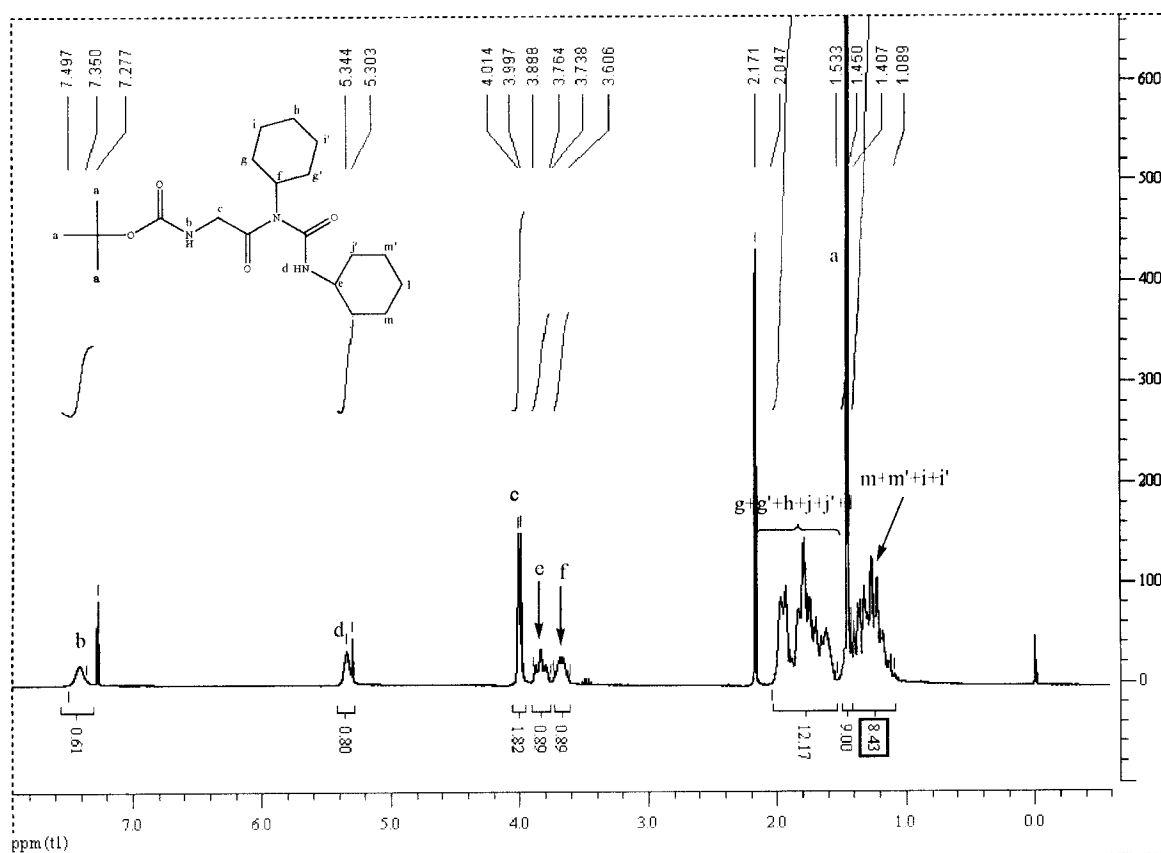


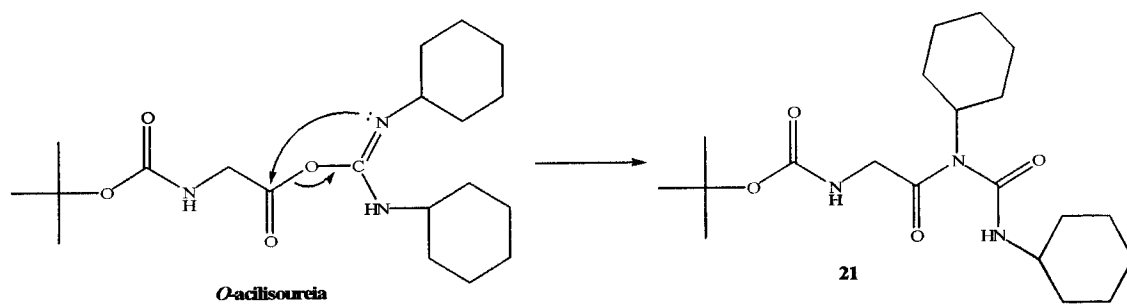
Figura 10: Espectros das fragmentações  $MS^2$  e  $MS^3$  do composto 21.

O espectro de RMN-<sup>1</sup>H veio corroborar a estrutura já deduzida através da análise de massa. Neste espectro foi possível identificar o pico correspondente ao NH da *N*-acilureia (H<sub>d</sub>) e os picos devidos aos prótons dos dois grupos ciclo-hexilo (H<sub>f,g,g',h,h',i</sub> e H<sub>e,j,j',l,m,m'</sub>), para além dos picos característicos do aminoácido Boc-protégido.



**Figura 11:** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz) do composto **21**.

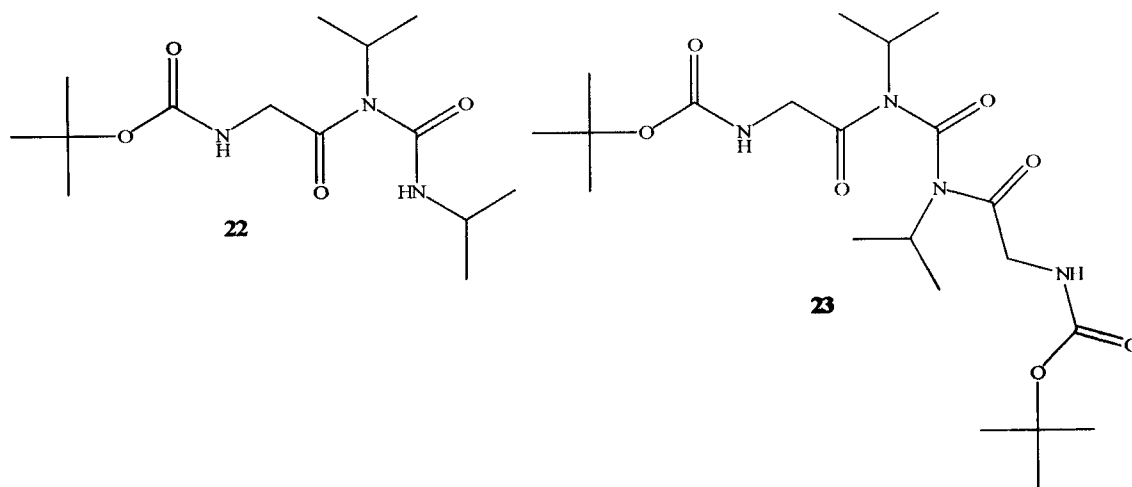
A formação do composto **21** surgiu como mais uma consequência do modesto carácter nucleófilo da VPD. De acordo com o mecanismo de activação via DDCI, ilustrado no **Esquema 20**, a activação do aminoácido passa pela formação de uma *O*-acilisoureia, como intermediário reactivo, em que o grupo carbonilo do aminoácido está mais electrófilo, logo, mais propenso a sofrer um ataque nucleófilo. No entanto, se a reactividade do agente nucleófilo for baixa, ou seja, o ataque deste ao aminoácido activado for muito lento, favorecer-se-á o ataque intramolecular evidenciado no **Esquema 22**, formando-se uma *N*-acilureia (**21**), estável e não reactiva.



**Esquema 22:** Formação da *N*-acilureia 21.

Face a estes resultados constatou-se, portanto, que não será possível recorrer a carbodiimidas para a activação do aminoácido que acilaria a VPD, pois a reacção de formação de 21 é a mais favorecida. Ainda assim, antes de se afastar definitivamente este método de condensação, realizou-se novamente a reacção (secção 7.5.1, reacção A.3) na presença de uma outra carbodiimida (*N,N'*-diisopropilcarbodiimida, DIPCDI), a baixas temperaturas ( $T = -10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

O seguimento da reacção A.3 por TLC permitiu verificar a formação de dois produtos que foram isolados e analisados por ESI-MS (Figura 12) e RMN-<sup>1</sup>H (Figura 14). Destas análises constatou-se que a estrutura do produto maioritário correspondia a 22, ao passo que o produto minoritário teria a estrutura 23.



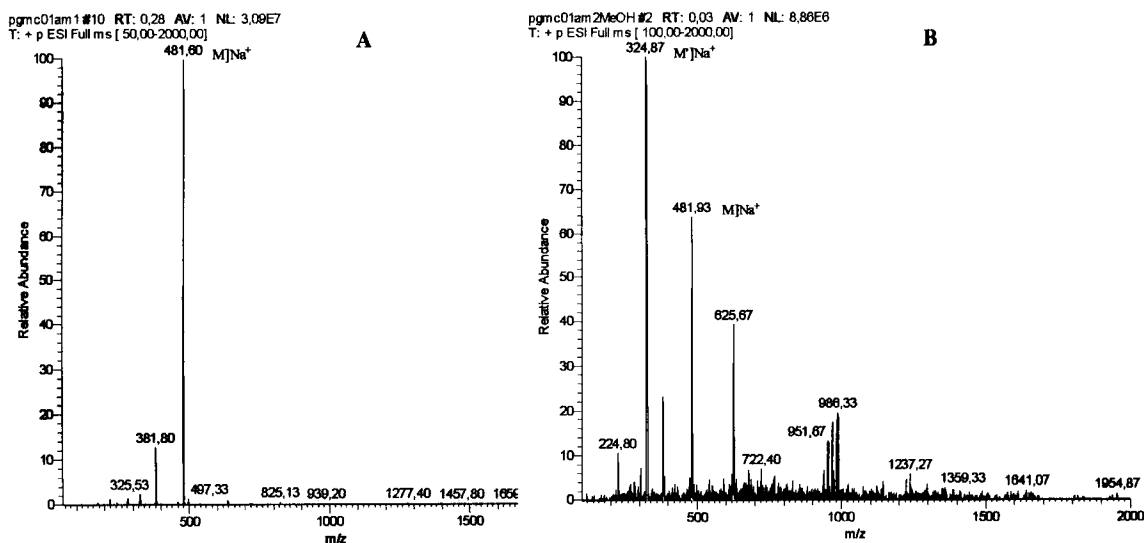


Figura 12: Espectro de massa (ESI-MS) dos compostos 22 ( $M'$ ) e 23 ( $M$ ).

No espectro de massa do produto 22 (B, Figura 12) o pico-base apresentou-se a  $m/z = 324,23$ , compatível com o aducto de sódio  $MNa^+$  ( $m/z$  esperado de 324,27). Já no espectro do composto 23 (A, Figura 12), o pico-base surgiu a  $m/z = 481,53$ , compatível com o aducto de sódio  $MNa^+$  ( $m/z$  esperado de 481,55). No caso deste último composto, foram também realizados estudos adicionais de fragmentação  $MS^2$  e  $MS^3$ , que contribuíram para a confirmação da estrutura atribuída. Assim, na fragmentação  $MS^2$  verificou-se a perda de um grupo Boc, enquanto que na fragmentação  $MS^3$  houve a perda adicional de um dos aminoácidos, seguida da perda de mais um grupo Boc. Paralelamente, foi também registada a fragmentação  $MS^3$  correspondente à perda dos dois grupos Boc da estrutura 23 (Figura 13).

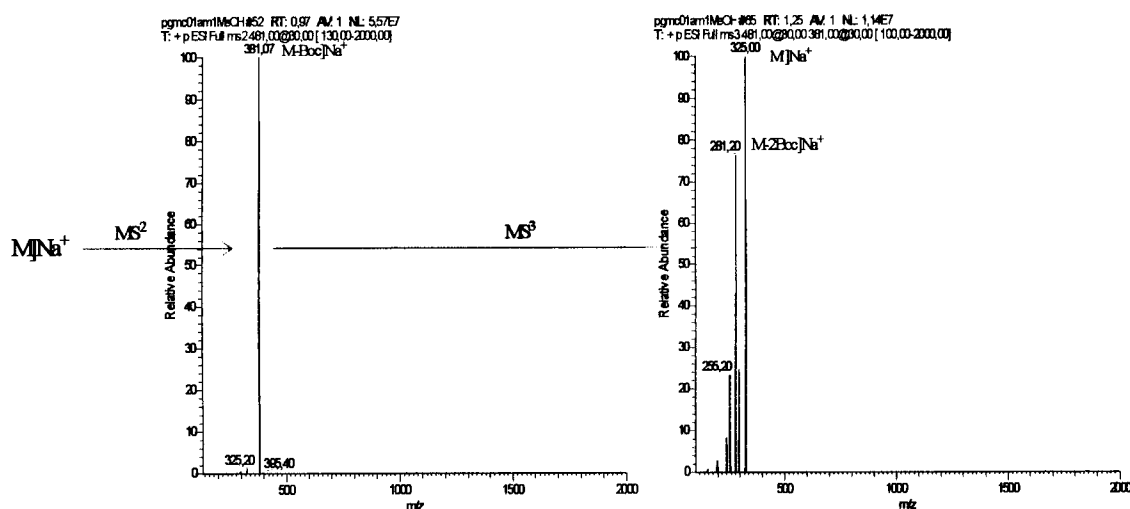
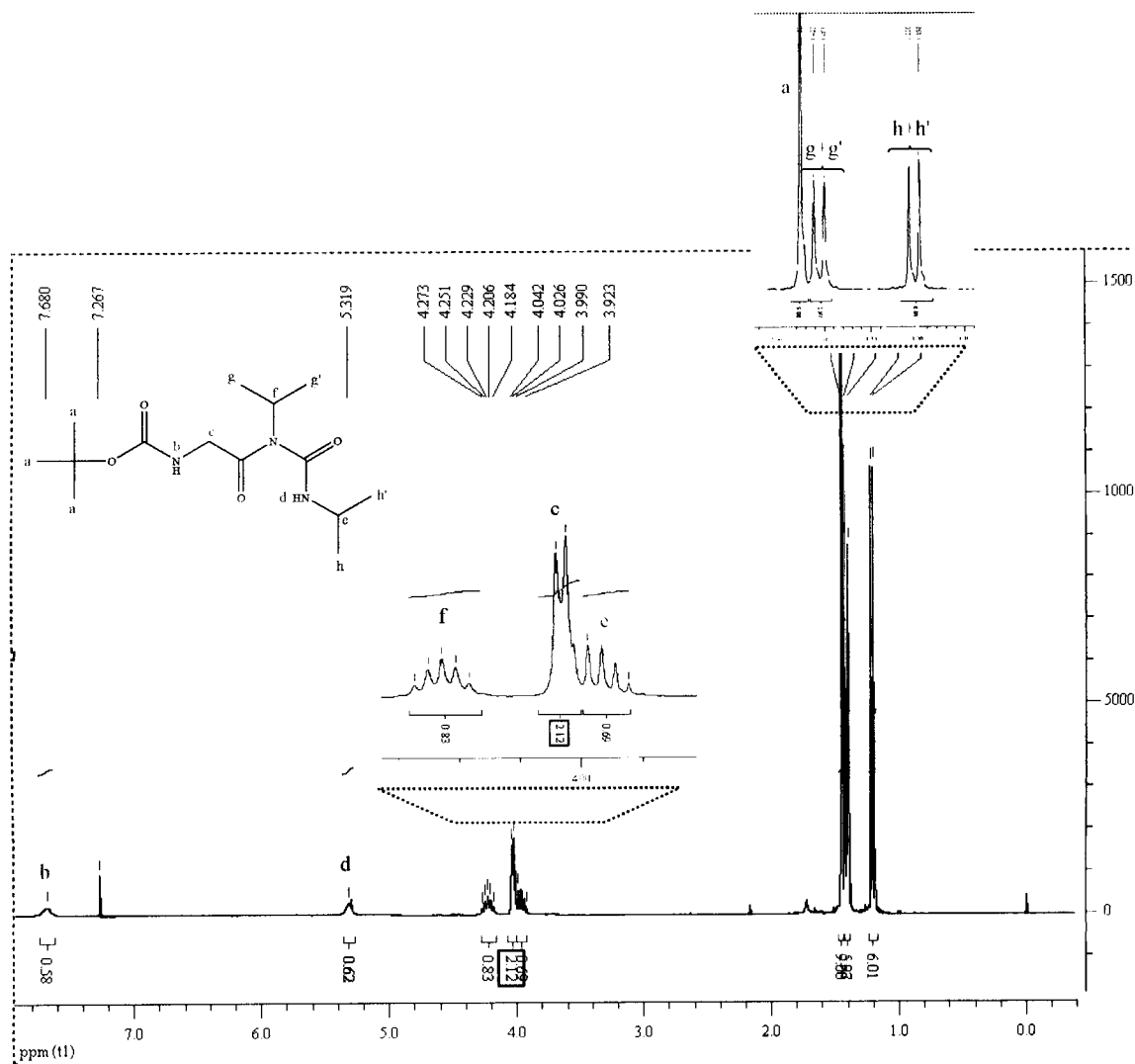


Figura 13: Estudos de fragmentação  $MS^2$  e  $MS^3$  do composto 23 ( $M$  – composto 23 e  $M'$  – composto 22).

O produto maioritário (**22**) foi analisado por RMN-<sup>1</sup>H, verificando-se, tal como no composto **21**, o aparecimento de picos relativos ao protão NH da *N*-acilureia (H<sub>d</sub>) e a grupos *iso*-propilo (H<sub>f,g,g',e,h,h'</sub>).

Em suma, esta terceira reacção permitiu reforçar a inviabilidade do recurso a carbodiimidas como agentes de condensação de aminoácidos ou dipéptidos *N*<sup>α</sup>-Boc protegidos à valpromida.



**Figura 14:** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz) do composto **22**.

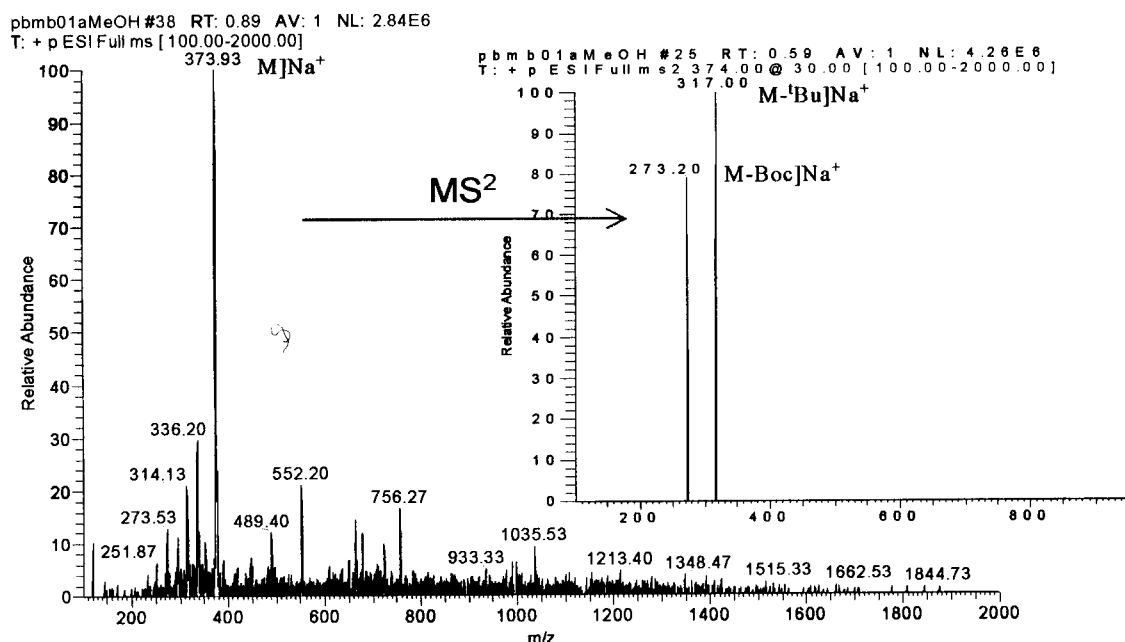
#### 4.2.2. Abordagens sintéticas baseadas no emprego de anidridos mistos

Face aos resultados apresentados na secção anterior, optou-se por recorrer à formação de um anidrido misto *in situ* para a activação do aminoácido ou dipéptido. Para tal, foram realizadas três reacções (**B<sub>1-3</sub>**) com vista à obtenção do composto-alvo. Na **Tabela 1** encontram-se descritos os reagentes e as temperaturas de reacção utilizadas em cada uma das três reacções.

**Tabela 1:** Reagentes e temperaturas de reacção usadas nas reacções **B<sub>1-3</sub>**.

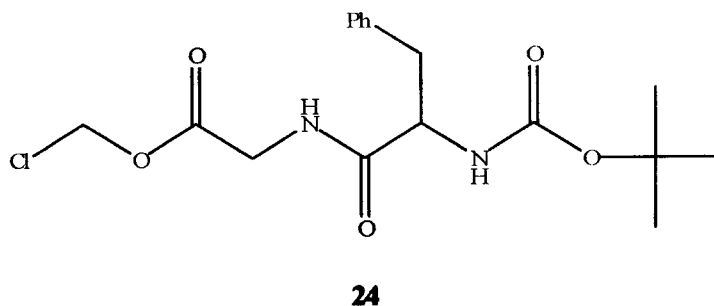
Reacção	Reagentes	T reacção/ °C
B.1	Boc.Phe.Gly.OH ZnCl <sub>2</sub> (PhCO) <sub>2</sub> O DCM	T <sub>amb</sub>
B.2	Boc.Gly.OH ZnCl <sub>2</sub> (PhCO) <sub>2</sub> O DMF	T <sub>amb</sub>
B.3	Boc.Gly.OH ZnCl <sub>2</sub> (PhCO) <sub>2</sub> O DMF	-5 °C (2 h iniciais) → T <sub>amb</sub>

No seguimento da reacção **B.1** por TLC, observou-se a formação de um produto que apresentava um R<sub>f</sub> idêntico ao do produto formado na reacção **A.1**, isto é, ao composto **20** (secção 4.2.1, página 28). Após isolamento do produto da reacção **B.1** e sua análise por ESI-MS (**Figura 15**), constatou-se que, efectivamente, o produto apresentava características compatíveis com a estrutura **20**.



**Figura 15:** Espectro de massa (ESI-MS) e fragmentação  $MS^2$  do composto isolado na reacção B.2.

Assim, o espectro de massa (**Figura 15**) apresentou o pico-base a  $m/z = 373,93$ , compatível com o aducto de sódio,  $MNa^+$ , do composto **20** ( $m/z$  esperado de 373,18). Para além disso, o subsequente estudo de fragmentação  $MS^2$  mostrou a perda de grupos 'Bu e Boc, factos novamente compatíveis com a estrutura **20** e concordantes com anteriores observações relativas ao produto da reacção A.1 (**Figura 7**, página 28). No entanto, a origem do hipotético grupo etilo para formar o éster **20** não parece óbvia neste caso, atendendo aos reagentes usados. Uma alternativa seria a interpretação do pico-base observado como devido ao ião quasi-molecular do éster clorometílico do dipéptido  $N^\alpha$ -Boc protegido (**24**), cujo valor de  $m/z$  para o ião mais abundante é de 370,83, sendo o grupo clorometilo proveniente do solvente (diclorometano).



Ainda assim, não só o valor de  $m/z$  registado se desvia quase quatro unidades deste valor, como seria de esperar que o espectro de massa apresentasse também picos importantes a  $m/z$  372,13 e 371,13 atendendo à distribuição isotópica do cloro.

Infelizmente, não foi possível traçar um espectro de RMN-<sup>1</sup>H do produto isolado, que permitisse confirmar (ou não) as hipóteses atrás levantadas.

Na eventualidade do solvente ter um papel relevante no curso da reacção **B.1**, optou-se por realizar nova reacção (**B.2**), usando-se DMF como solvente. Nesta reacção verificou-se a formação de uma mancha nova, que se isolou e analisou por ESI-MS. Desta análise constatou-se que não havia ocorrido a formação do composto pretendido. O subsequente estudo de fragmentação MS<sup>2</sup> e MS<sup>3</sup> do composto isolado não forneceu informação suficiente para uma identificação inequívoca do produto.

Atendendo a que, nas reacções anteriores, não se havia comprovado a formação do anidrido misto, a espécie reactiva requerida para a ocorrência da acilação desejada, optou-se por realizar uma nova reacção (**B.3**), mas que se manteve a baixa temperatura durante as primeiras duas horas, de acordo com procedimentos descritos na literatura<sup>[57,58]</sup>. Durante essas duas horas de reacção, não se verificou a formação de qualquer produto. Mesmo assim, decidiu-se adicionar o fármaco após essas duas horas, o que conduziu à formação de um produto que se isolou como um sólido branco (m = 5,0 mg) e se analisou por ESI-MS e RMN-<sup>1</sup>H. Destas análises concluiu-se que, pese embora não identificada a sua estrutura, o produto isolado não correspondia ao composto-alvo.

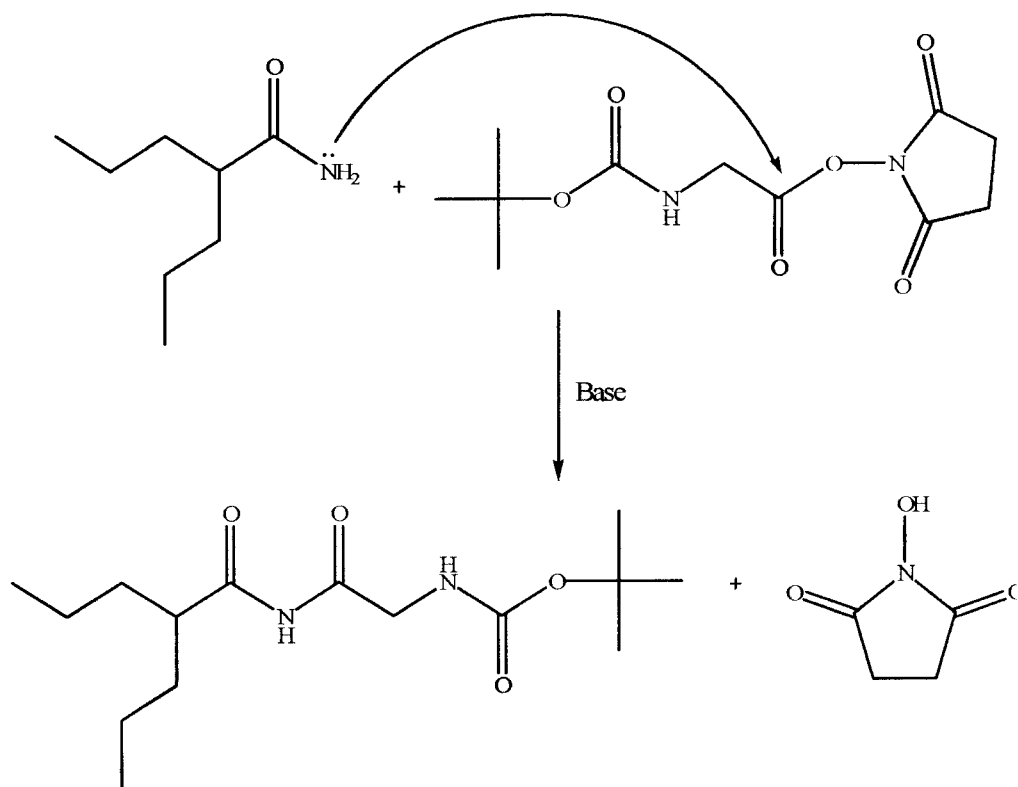
Não se sabendo se o insucesso registado na aplicação do método dos anidridos mistos se deveu à não formação destes ou à baixa reactividade da VPD como nucleófilo, decidiu-se de qualquer forma abandonar esta via de síntese.

### 4.2.3. Aproximação sintética com base no uso de ésteres activos

Em virtude das observações experimentais descritas nas secções anteriores, decidiu-se abordar a *N*-acilação da VPD mediante emprego de ésteres activos do aminoácido (glicina) *N*<sup>α</sup>-Boc protegido (**Esquema 23**).

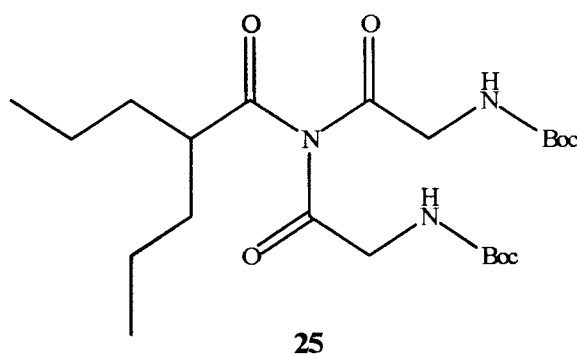
Começou-se por utilizar o éster de *N*-hidroxisuccinimida da Boc.Gly.OH (Boc.Gly.OSu), que se fez reagir com a VPD conforme se descreve na secção 7.5.3.1

(a). O acompanhamento da reacção por TLC permitiu detectar a formação de um produto que se isolou por cromatografia em coluna sob a forma de um sólido branco (*m* = 2,1 mg). Porém, as análises de ESI-MS e RMN-<sup>1</sup>H do produto isolado, ainda que inconclusivas quanto à estrutura do mesmo, mostraram não tratar-se do composto-alvo.

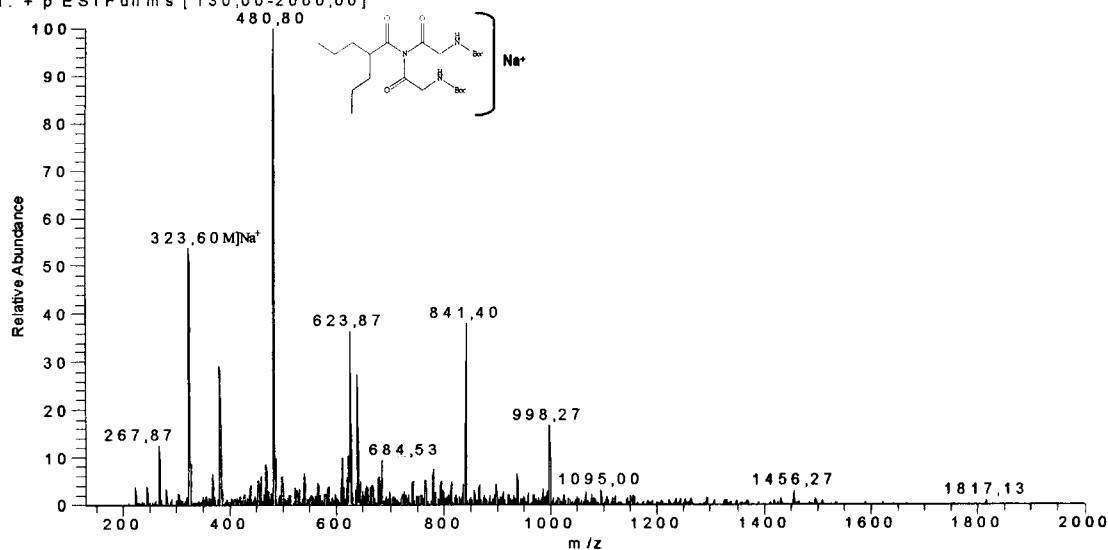


**Esquema 23:** Mecanismo de reacção esperado para a *N*-acilação da VPD via éster de HOSu.

Perante o insucesso obtido, e face a descrições na literatura em que se apontava para a catálise básica por hidretos como um aspecto crucial para o sucesso na *N*-acilação de amidas,<sup>[42,43]</sup> decidiu-se repetir a reacção em condições idênticas, mas na presença de hidreto de sódio. Da reacção realizada nestas condições (C.2) resultou um produto que se isolou como um óleo amarelo (*m* = 15,2 mg) e cuja análise de ESI-MS (**Figura 16**) revelou tratar-se, provavelmente, do produto de *N,N'*-diacilação da VPD (**25**).

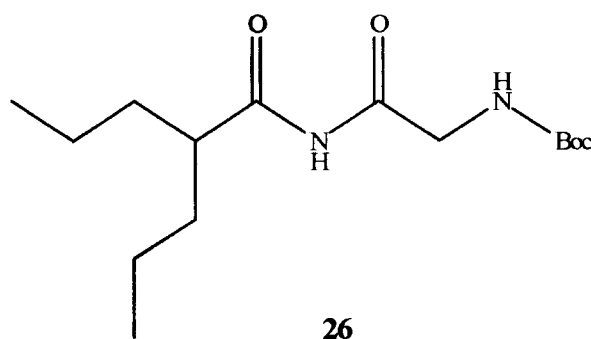


pgmd01aMeOH #179 RT: 3,10 AV: 1 NL: 7,61E6  
T: + p ESI Full ms [ 130,00-2000,00]



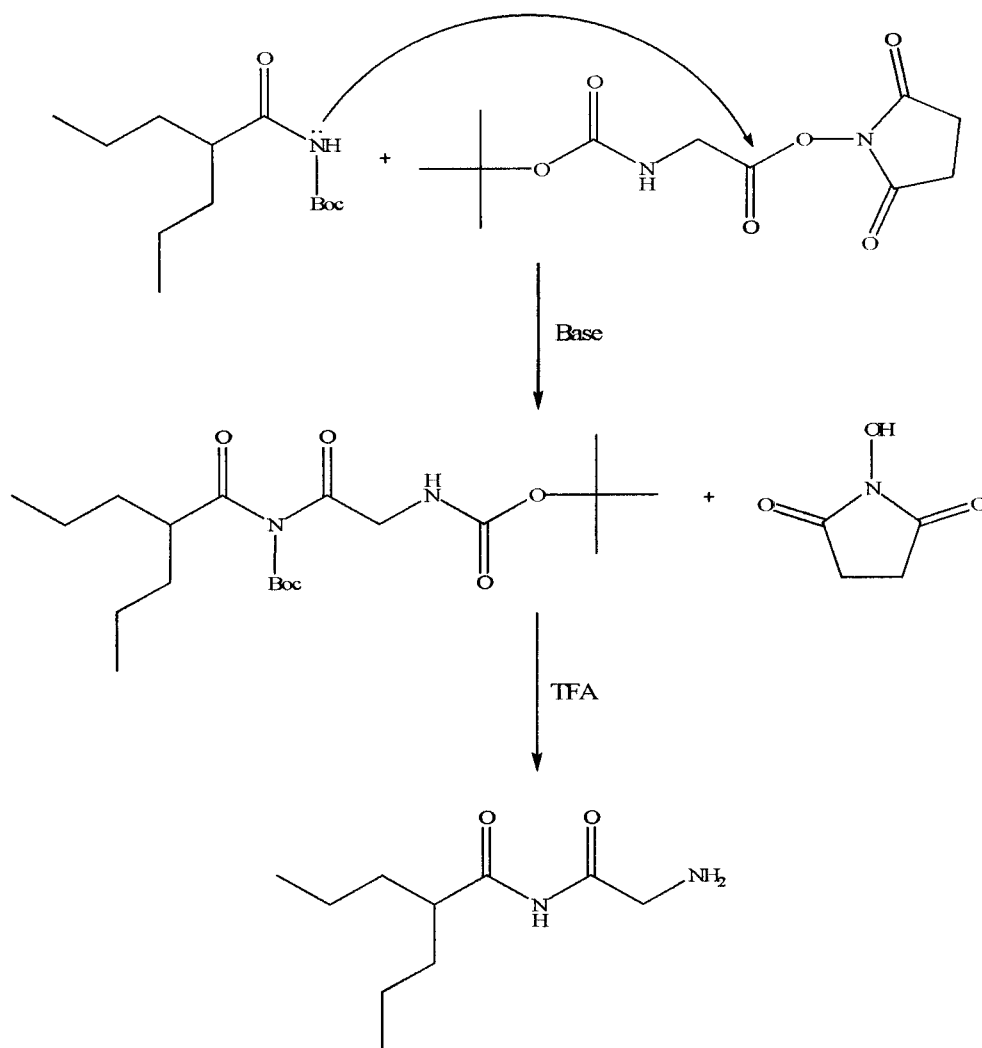
**Figura 16:** Espectro de massa (ESI-MS) do composto isolado na reacção C.1 (25).

Assim, o espectro de massa apresenta o pico-base a  $m/z = 480,80$ , compatível com o aducto de sódio,  $MNa^+$ , do composto **25** ( $m/z$  esperado de 480,56). No mesmo espectro é também possível observar o pico a  $m/z = 323,60$ , compatível com o valor esperado para o aducto de sódio do derivado mono-acilado da VPD (**26**), ou seja do composto-alvo ( $m/z$  esperado de 323,39).



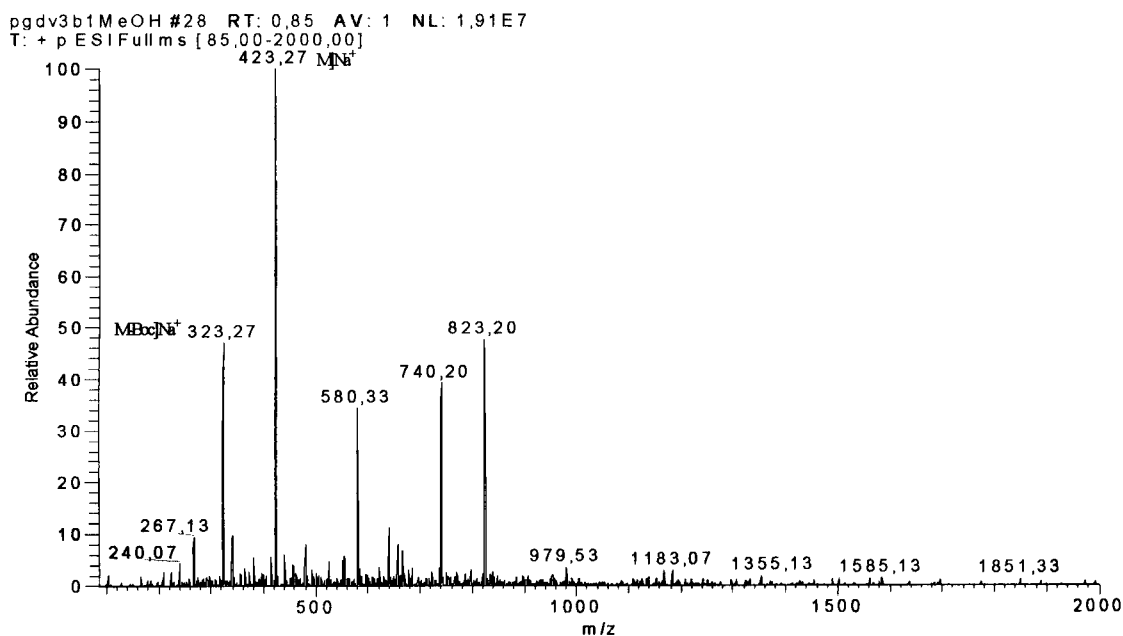
Se, por um lado, o produto predominante resultou da di-acilação da VPD, por outro, não se podia garantir que o pico a  $m/z = 323,39$  se devia à presença do composto **26**, ou à formação deste último por fragmentação do composto **25** na fonte. Assim, optou-se por realizar uma série de reacções (C.2 - C.5), nas quais se foram variando diversos parâmetros experimentais, com a base usada, a proporção relativa dos reagentes ou a sua ordem/forma de adição, como descrito na secção 7.5.3.1, **Tabela 8**, sempre com o intuito de se favorecer a formação do derivado mono-acilado (**26**) em detrimento do di-acilado (**25**). Contudo, nenhuma destas reacções conduziu à formação de qualquer destes dois compostos.

Neste ponto, decidiu-se testar novamente a acilação nas condições de C.2, mas utilizando VPD *N*-Boc protegida, para garantir a entrada de apenas uma molécula de aminoácido, segundo o esquema reaccional proposto no **Esquema 24**.



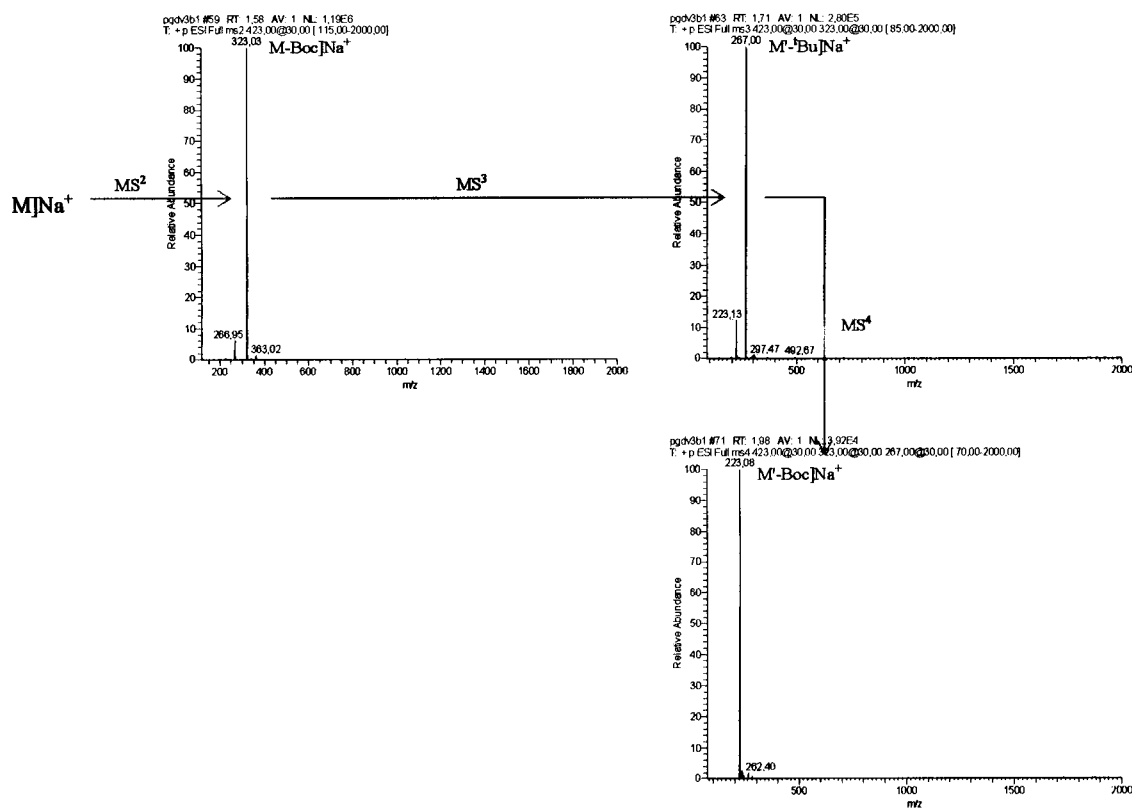
**Esquema 24:** Mecanismo de reacção projectado para a acilação da Boc-VPD com um éster activo e subsequente desprotecção para obtenção do composto pretendido.





**Figura 17:** Espectro de massa (ESI-MS) do composto isolado na reacção D.1 (27).

O subsequente estudo de fragmentação  $MS^2$  (Figura 18) evidenciou a perda de um grupo Boc. Fragmentações adicionais  $MS^3$  e  $MS^4$  conduziram à perda de um grupo  $t$ Bu, seguida da perda de  $CO_2$ , observação mais uma vez compatível com uma estrutura original possuidora de dois grupos Boc, como é o caso de 27.



**Figura 18:** Estudos de Fragmentação  $MS^2$ ,  $MS^3$  e  $MS^4$  do produto isolado na reacção D.1 (provavelmente apresentando a estrutura 27).

Todavia, as análises de RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C e DEPT foram inconclusivas, no sentido de comprovar a estrutura do composto de uma forma inequívoca, uma vez que a quantidade de composto isolada foi demasiado baixa para obtenção de espectros com qualidade suficiente.

Na tentativa de aumentar a quantidade de produto foram realizadas mais três reacções, tendo-se igualmente isolado compostos que apresentavam R<sub>f</sub> idêntico ao do produto da reacção anterior. No entanto, inesperadamente, os espectros de massa traçados para estes produtos não reproduziram o primeiro resultado, nem apresentaram informação útil no sentido de se identificar a estrutura dos produtos isolados nestas três reacções.

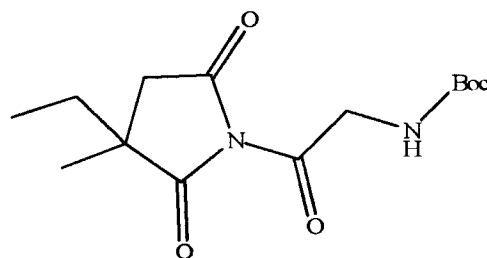
Perante a sucessão de resultados negativos nas diversas tentativas de *N*-acilação da VPD, mas tendo em conta o resultado aparentemente promissor da reacção, decidiu-se abandonar este fármaco e testar a aplicação das condições desta reacção para a *N*-acilação dos outros dois fármacos considerados no plano de trabalho, nomeadamente a Etossuximida e a Fenacetina. Estas abordagens sintéticas são alvo de discussão na secção seguinte.

### 4.3. Estudo da *N*-acilação da Etossuximida e da Fenacetina

Perante as grandes dificuldades experimentais nas diversas tentativas de *N*-acilação da VPD, mas ainda assim com resultados aparentemente promissores quando se recorreu ao uso de ésteres activos como agentes acilantes, na presença de bases fortes (Secção 4.2.3), decidiu-se aplicar este método para a tentativa de *N*-acilação da Etossuximida (ESM) e da Fenacetina (FNCT).

#### 4.3.1. Tentativas de *N*-acilação da Etossuximida

Começou-se por testar a viabilidade da *N*-acilação da ESM usando Boc.Gly.OSu como espécie acilante, na presença de hidreto de sódio, como se descreve na secção 7.5.3.1 (b). No entanto, não se logrou detectar a formação do produto de acilação (28) esperado, detectando-se apenas a formação de quantidades mínimas de um composto cujo espectro de massa era incompatível com a estrutura 28.



28

Assim, passou a testar-se o emprego de um éster activo de pentafluorofenol (PFP), na presença de LiHMDS, de acordo com o método descrito por Andrus et al.,<sup>[42]</sup> seguindo o procedimento apresentado na secção 7.6. Foram realizadas duas reacções (D.4 e D.5), de cada uma das quais sendo isolado um produto cujo espectro de ESI-MS não se apresentou compatível com a estrutura do produto de *N*-acilação pretendido (28).

### 4.3.2. *N*-acilação da Fenacetina

Apesar dos consecutivos resultados negativos, descritos nas secções anteriores, decidiu-se fazer uma última tentativa de aplicação do método de Andrus et al.<sup>[42]</sup> para a *N*-acilação da fenacetina, como se descreve na secção 7.6.

Assim, realizou-se uma reacção, da qual se isolou um produto que se apresentou como um sólido branco ( $m = 0,3353$  g) cuja análise por ESI-MS (Figura 19), RMN-<sup>1</sup>H (Figura 20), RMN-<sup>13</sup>C (Figura 21) e DEPT (Figura 22) mostrou tratar-se do produto de *N*-acilação desejado (29).

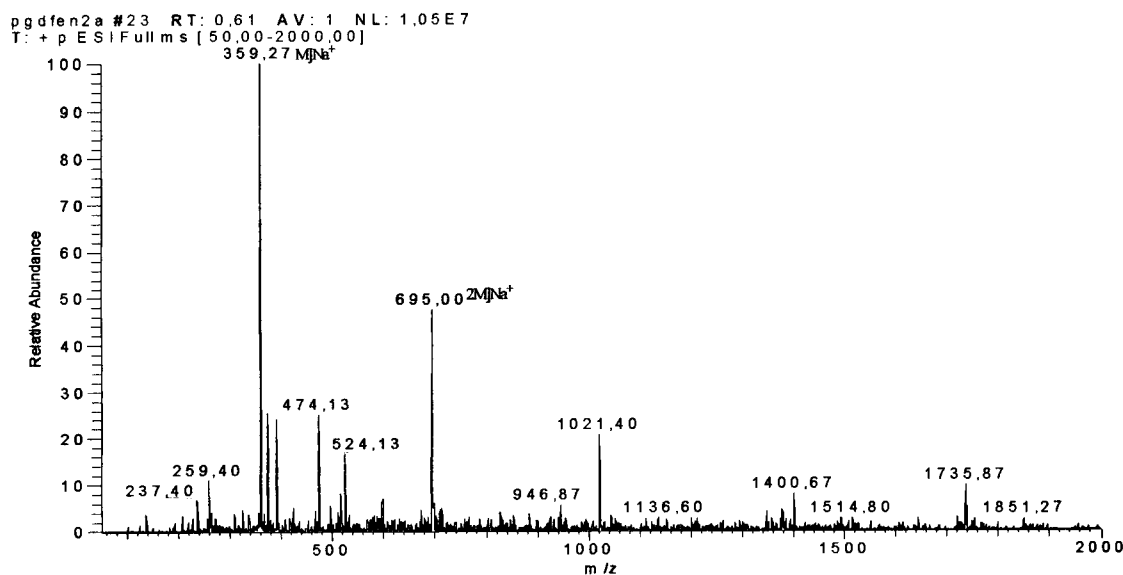
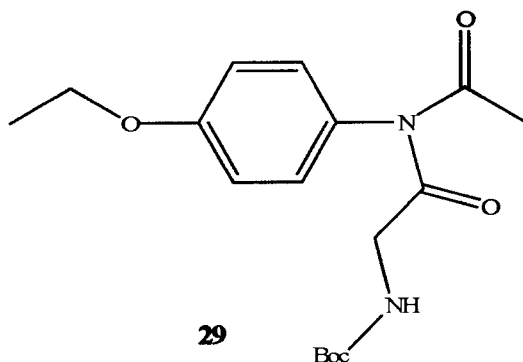
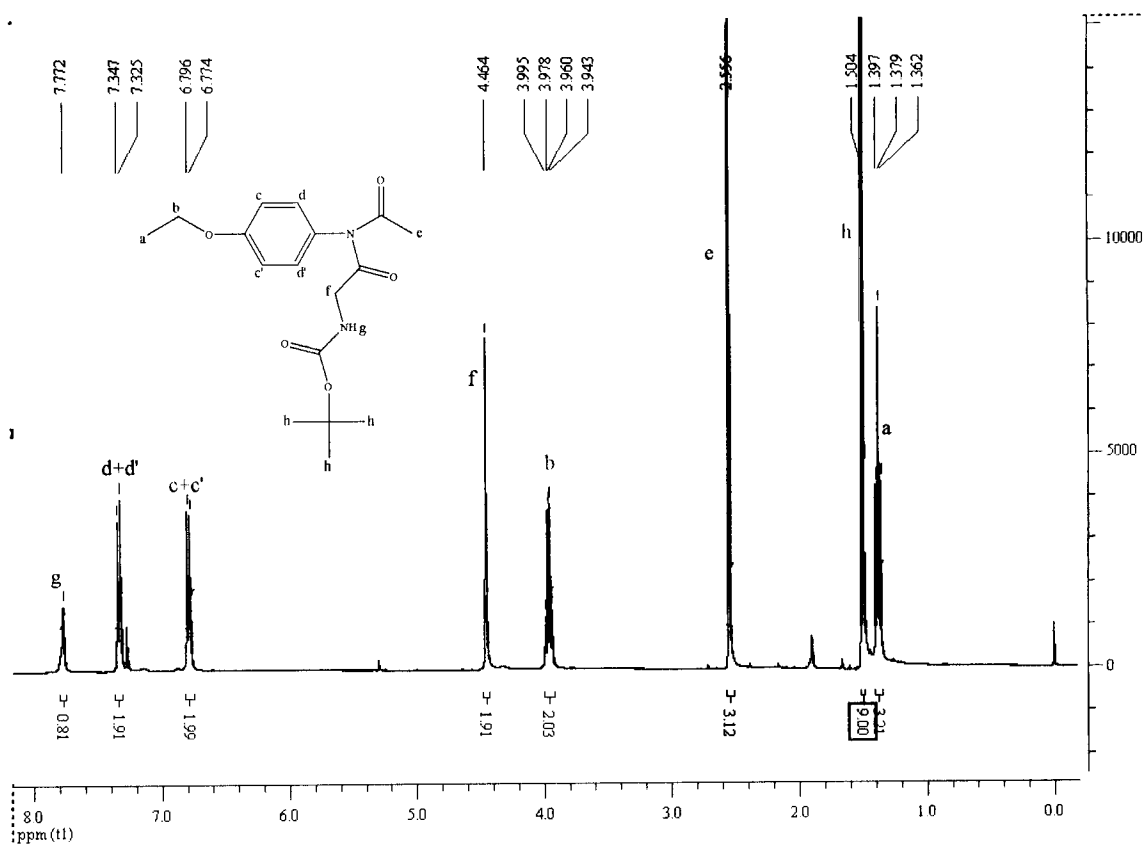


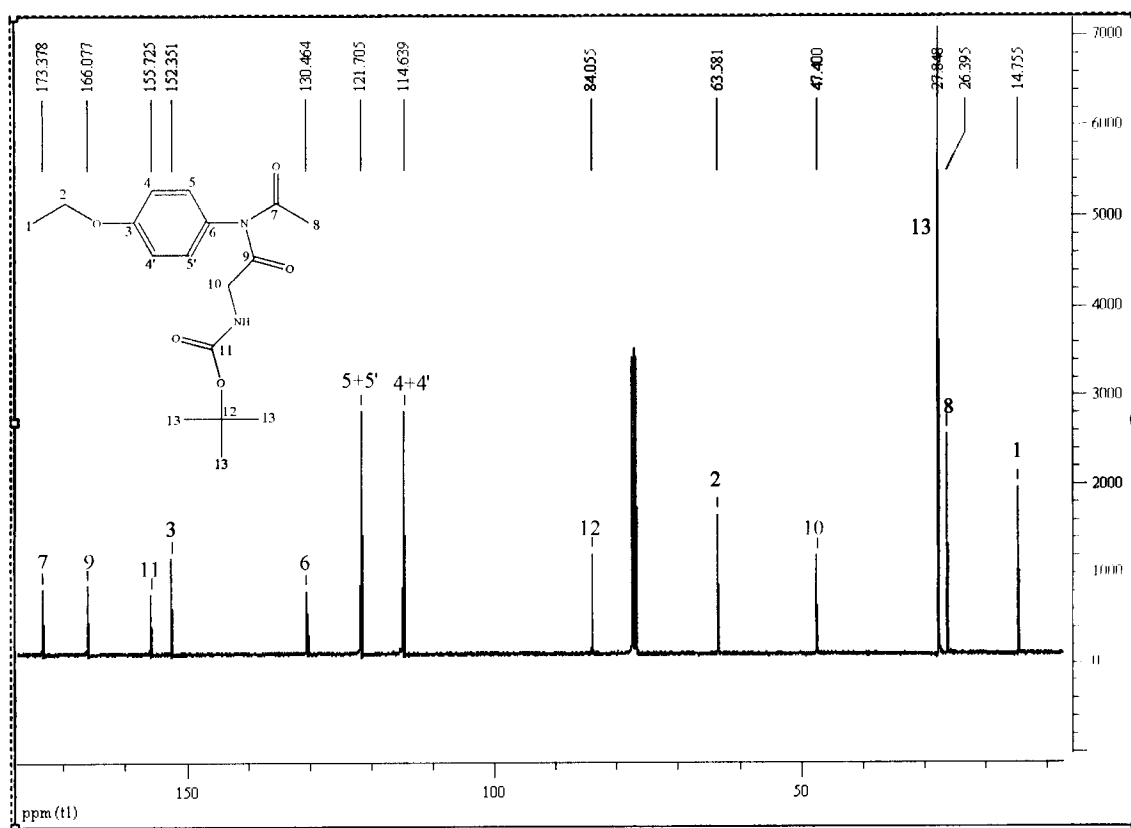
Figura 19: Espectro de massa (ESI-MS) do composto FNCT.Gly.Boc (29).

O espectro de massa apresentou o pico-base a  $m/z = 359,27$ , compatível com o aducto de sódio,  $MNa^+$ , do composto 29 ( $m/z$  esperado de 359,38).



**Figura 20:** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz) do composto FNCT.Gly.Boc (**29**).

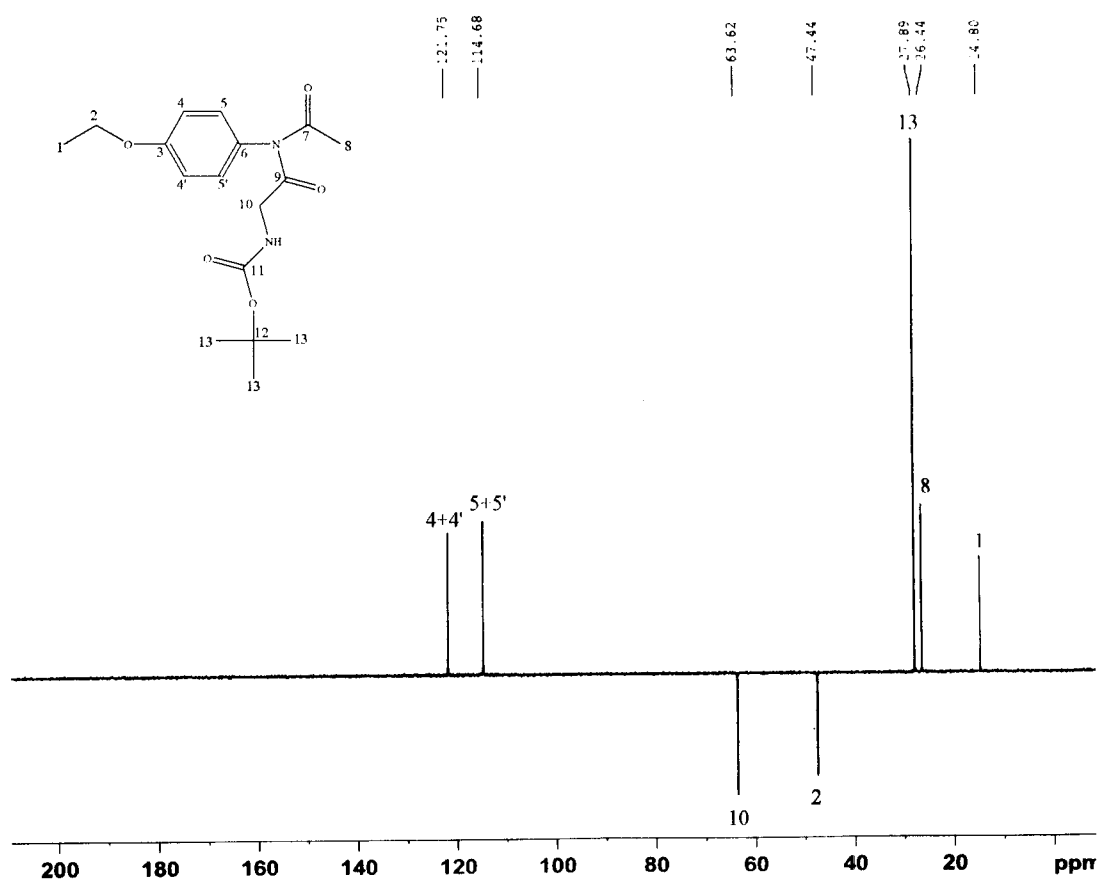
Relativamente à análise do espectro de RMN-<sup>1</sup>H do composto **29**, observaram-se, para além dos picos característicos do fármaco (H<sub>a</sub>-H<sub>e</sub>), os picos correspondentes ao protão NH do grupo uretano (H<sub>g</sub>) do aminoácido protegido, os dois protões do grupo metileno do aminoácido (H<sub>f</sub>) e os protões relativos ao *tert*-butilo do grupo Boc (H<sub>h</sub>).



**Figura 21:** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz) do composto FNCT.Gly.Boc (**29**).

O espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  também se apresentou compatível com a estrutura do composto **29**, observando-se, para além dos picos devidos a carbonos do fármaco ( $\text{C}_1$ - $\text{C}_8$ ), o aparecimento de dois picos na zona dos 160-180 ppm correspondentes aos dois grupos carbonilo do aminoácido ( $\text{C}_9$ ) e do grupo Boc ( $\text{C}_{11}$ ), e ainda os picos correspondentes aos carbonos  $\text{C}_{12}$  e  $\text{C}_{13}$ , relativos ao grupo Boc, e  $\text{C}_{10}$ , do grupo metileno da glicina.

A atribuição dos picos observados neste espectro (**Figura 21**) aos carbonos referidos veio a ser confirmada através de uma análise DEPT (**Figura 22**).



**Figura 22:** Espectro de DEPT ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz) do composto FNCT.Gly.Boc (29).

Este resultado conduziu à constatação de que a aplicação do método descrito por Andrus et al.<sup>[42]</sup> é viável para a *N*-acilação da FNCT com um aminoácido *N*<sup>α</sup>-protegido. Globalmente, o trabalho descrito até aqui permite salientar o relativo sucesso ou insucesso destas abordagens sintéticas, estando este bastante dependente, não só do método de *N*-acilação escolhido mas também da própria natureza da amida (ou imida) como agente nucleófilo.

De salientar que, na planificação inicial do trabalho, se pensou que seria a VPD que apresentaria características nucleófilas mais favoráveis, dado ser aquela em que o grupo amida, primário, se apresentava estereoquimicamente mais desimpedido, não estando ligado a grupos electroattractores. Em contraste, a ESM, pela sua rigidez estrutural e pelo facto do seu azoto ser imídico, logo, vizinho de dois carbonilos que contribuem para torná-lo menos nucleofílico, foi considerado como o menos promissor dos três fármacos. À FNCT coube um lugar intermédio, em que um maior impedimento estereoquímico (relativamente à VPD) faria antever algumas dificuldades.

Como se pode comprovar, a experimentação evoluiu em certa medida de forma distinta do esperado, tendo-se maior sucesso na *N*-acilação deste último fármaco, porventura

fruto do efeito electrodoador (+M) do substituinte etoxilo em posição *para*, que tenha contribuído para a maior nucleofilicidade do azoto.

#### 4.4. Desprotecção do composto 29 por acidólise

Uma vez produzido, com sucesso, o composto 29 procedeu-se à remoção acidolítica do seu grupo *N*-protector, Boc. Obteve-se o composto desprotegido sob a forma de um trifluoroacetato que, após neutralização com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e extracção com acetato de etilo, originou a respectiva base livre, 30. O composto 30 apresentou-se como um sólido branco, sendo isolado com um rendimento de 70% e caracterizado por ESI-MS (Figura 23), RMN-<sup>1</sup>H (Figura 24), RMN-<sup>13</sup>C (Figura 25) e DEPT (Figura 26).

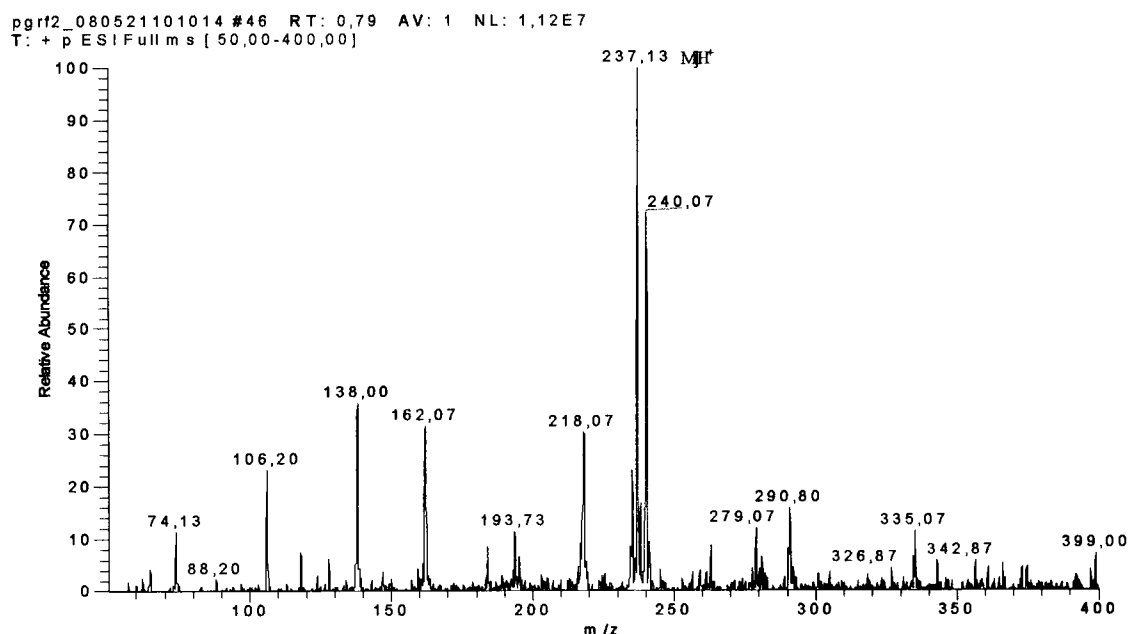
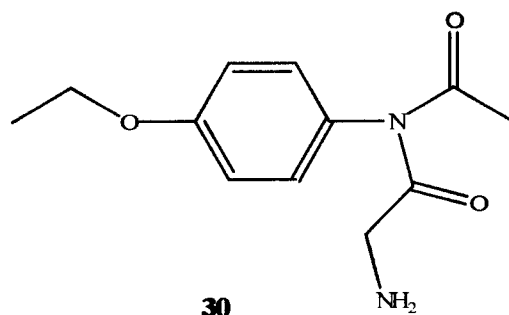


Figura 23: Espectro de massa (ESI-MS) do composto FNCT.Gly (30).

O espectro de massa apresenta-se compatível com a estrutura do composto 30, tendo pico-base a  $m/z = 237,13$ , correspondente ao ião quasi-molecular  $MH^+$  ( $m/z$  esperado de 237,28).

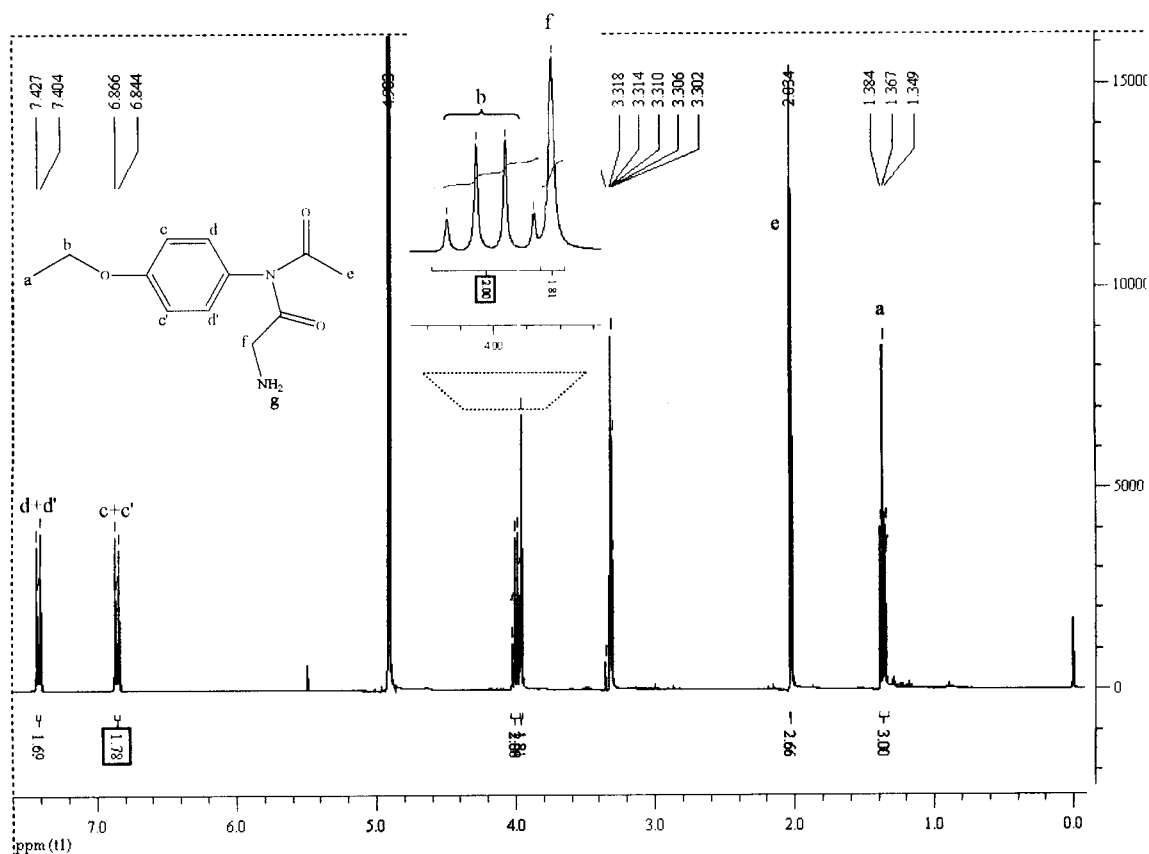
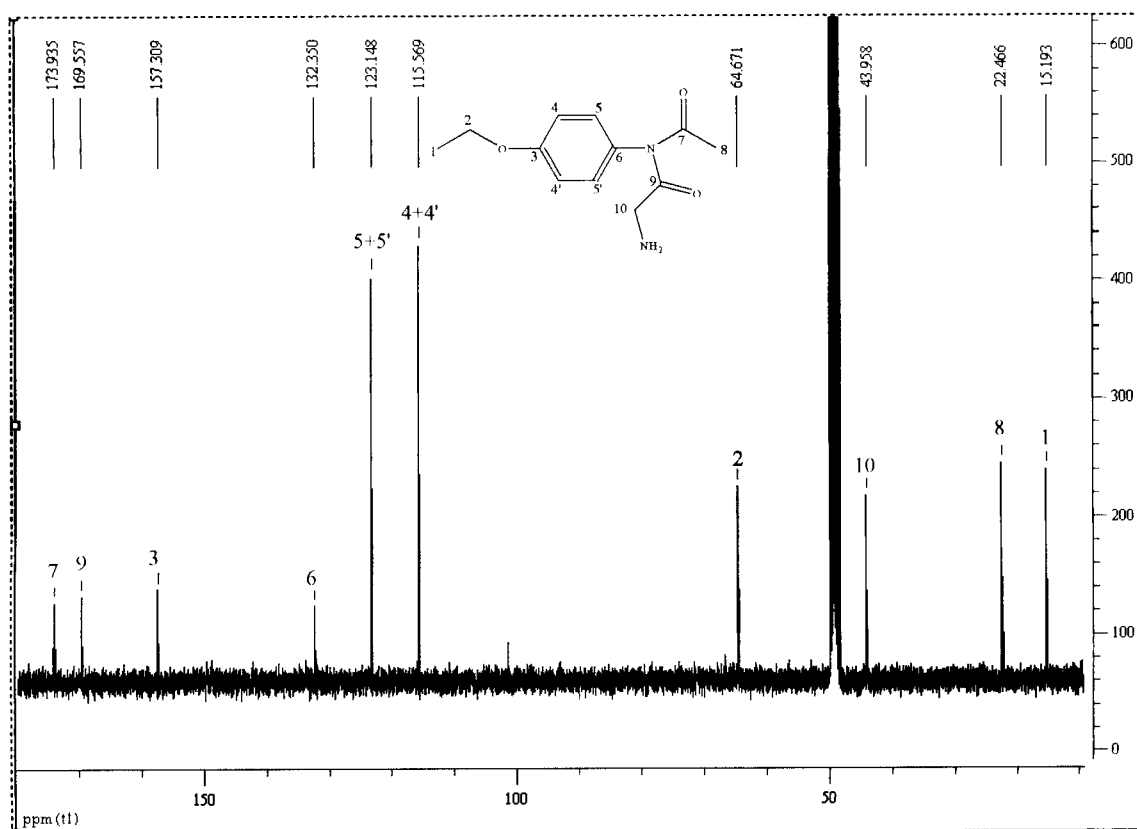


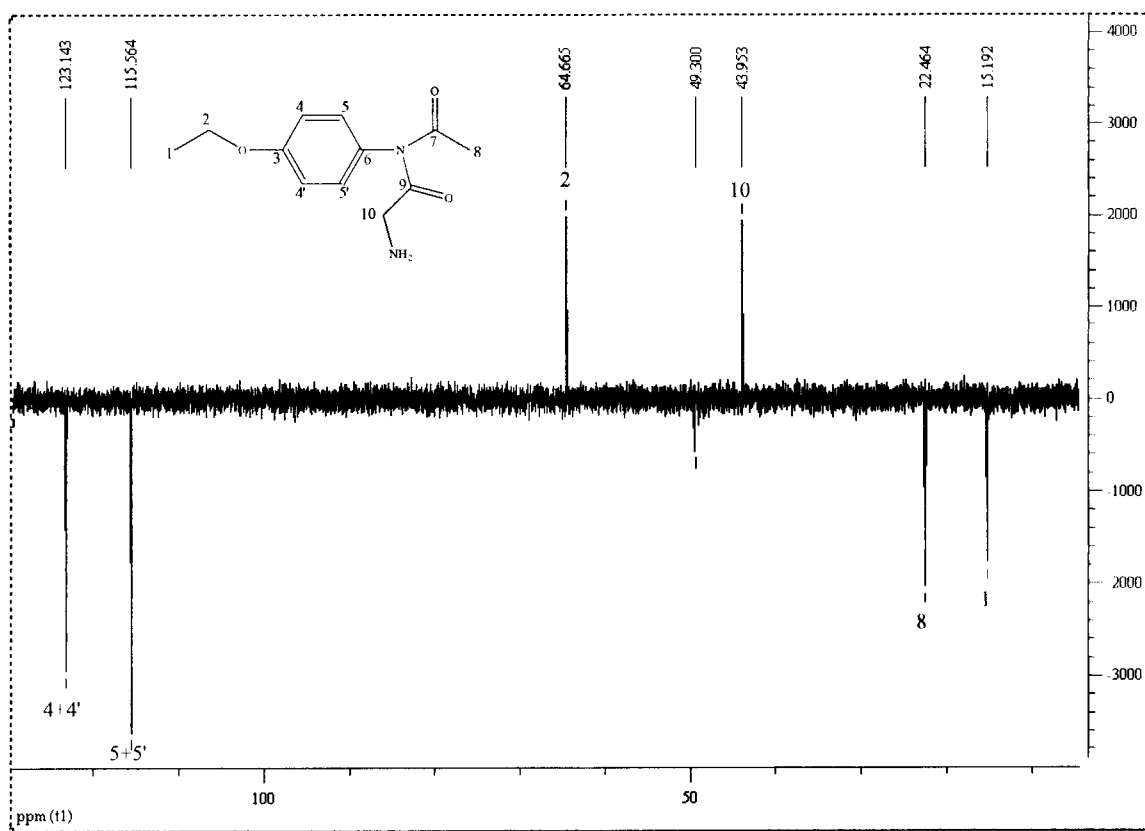
Figura 24: Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (MeOD; 400MHz) do composto FNCT.Gly (30).

Da análise do espectro de RMN- $^1\text{H}$  do produto desprotegido, constata-se o desaparecimento do pico correspondente aos prótons do grupo Boc e, ainda, do pico correspondente ao próton NH do grupo uretano, agora convertido num grupo amino primário (não detectado no espectro obtido de uma solução de **30** em MeOD). Todos os restantes picos, referentes quer à glicina ( $H_f$ ), quer ao fármaco ( $H_a-H_e$ ), foram registados com os desvios químicos, intensidades e multiplicidades esperados.



**Figura 25:** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (MeOD; 400 MHz) do composto FNCT.Gly (30).

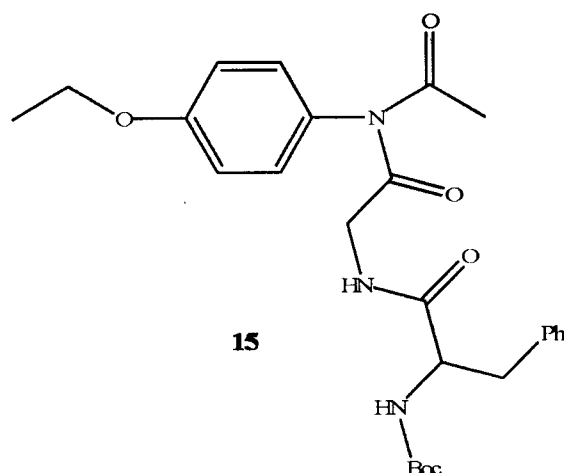
Também o espectro de RMN-<sup>13</sup>C do produto desprotegido permitiu confirmar o sucesso da clivagem acidolítica do grupo Boc, verificando-se o desaparecimento dos picos correspondentes a este grupo protector. Por sua vez, o espectro de DEPT atestou a atribuição dos picos do espectro de RMN-<sup>13</sup>C, apresentado na **Figura 25**.



**Figura 26:** Espectro de DEPT (MeOD; 400 MHz) do composto FNCT.Gly (30).

#### 4.5. Condensação do aminoácido Boc.Phe.OH ao composto FNCT.Gly (30)

Com vista à obtenção do composto-alvo (15), procedeu-se à condensação do aminoácido Boc.Phe.OH ao composto 30 por activação *in situ* utilizando-se carbodiimidas. Atendendo a que este método é geralmente aplicado com sucesso na condensação entre aminoácidos ou destes a grupos nucleófilos (amino, hidroxilo) presentes noutras moléculas, considerou-se adequado para o fim em vista.



No entanto, a reacção realizada tal como descrito na secção 7.8 (a) não conduziu à formação do composto-alvo. Decidiu-se repeti-la a baixa temperatura ( $T = -10^{\circ}\text{C}$ ) e em atmosfera de árgon (secção 7.8 (a)), mas também neste caso os produtos formados não apresentavam dados espectroscópicos compatíveis com a estrutura esperada.

Decidiu-se, então, substituir a carbodiimida por um agente de condensação derivado do 1-hidroxibenzotriazole, o hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1-hidroxibenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamínio (HCTU), conhecido por promover condensações difíceis em síntese peptídica.<sup>[60,61]</sup> A utilização desta via de activação *in situ*, como se descreve na secção 7.8 (c), não conduziu a resultados melhores que os anteriores.

Perante o insucesso da activação *in situ*, optou-se por recorrer novamente à condensação via ésteres activos na presença de uma base (secção 7.8 (b)), o que

conduziu à formação de dois produtos que, após isolamento, foram analisados por ESI-MS (Figura 27).

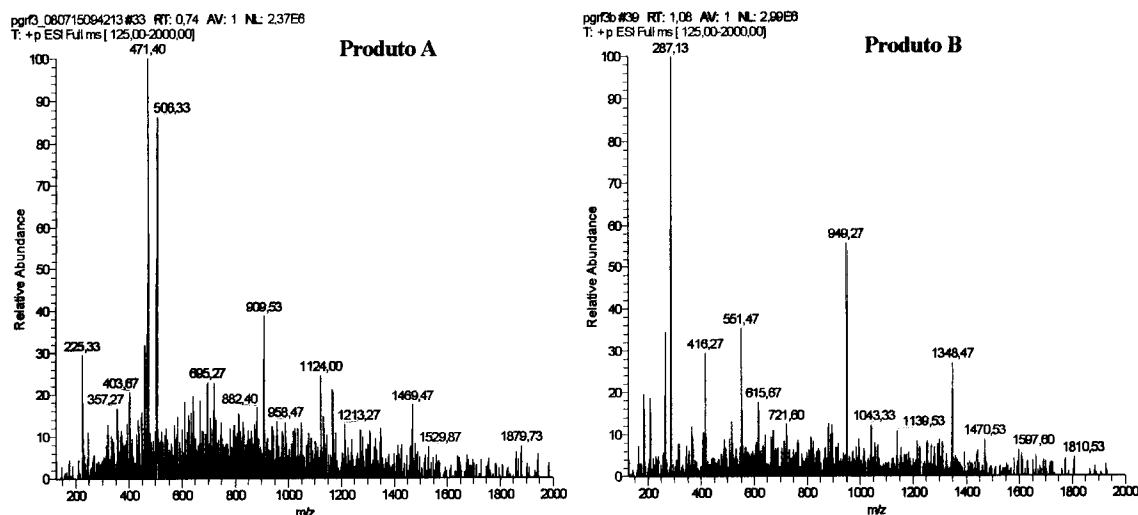
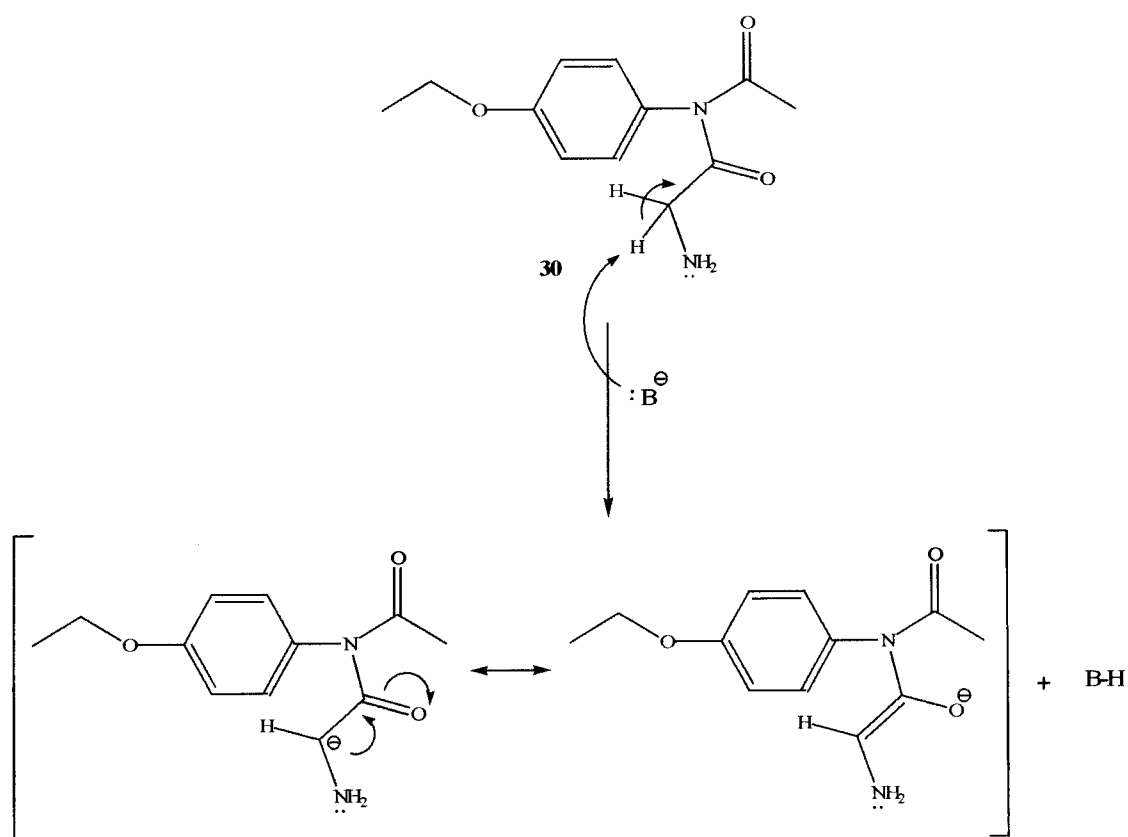


Figura 27: Espectros de massa (ESI-MS) dos produtos (A e B) isolados na reacção de condensação do aminoácido Boc.Phe.OH ao composto 30.

O espectro de massa do **produto A** (óleo amarelo) apresentou o pico a  $m/z = 471,40$ , eventualmente compatível com um dímero desidrogenado do composto **30** (o valor de  $m/z$  esperado para  $M_2-2H$ , sendo  $M$  a molécula **30**, é de 470,54). Este resultado poderá indiciar que o uso do hidreto conduziu à remoção de um  $H^\alpha$  da glicina no composto **30**, gerando-se um enolato que atacaria outra molécula de **30**, obtendo-se um dímero deste mesmo produto (**Esquema 25**).

De facto, o LiHMDS é uma base muito forte frequentemente usada para gerar enolatos para diversos fins sintéticos.<sup>[60-62]</sup>



**Esquema 25:** Esquema representativo da hipotética remoção de um  $H^\alpha$  da glicina no composto 30, gerando-se um enolato porventura capaz de atacar nucleofílicamente outra molécula 30, conduzindo à formação de uma estrutura dimérica.

O segundo pico mais relevante do espectro de massa do **produto A** apresenta um valor de  $m/z$  compatível com o aducto de sódio do produto esperado, 15 ( $m/z$  esperado de 506,56), sugerindo que pelo menos uma parte dos reagentes foi consumida na reacção desejada. Infelizmente, a pequena quantidade de “**Produto A**” e o insucesso das subsequentes tentativas de separação dos dois componentes principais, impediram a realização de análises espectroscópicas adicionais (RMN) que confirmassem esta hipótese de forma inequívoca.

No que diz respeito ao segundo produto da mesma reacção (B), o respectivo espectro de massa apresentou o pico-base a  $m/z = 287,13$ , compatível com o aducto de sódio da  $N^\alpha$ -Boc-fenilalanina, muito provavelmente formada por hidrólise parcial do éster activo de pentafluorofenol utilizado na reacção.

Em suma, pode-se concluir desta parte do trabalho que a condensação de um aminoácido (e, provavelmente de um qualquer componente acilo) a uma  $N$ -aminoacil-fenacetina não é um processo trivial, na medida em que apenas houve indícios de algum sucesso quando se recorreu a ésteres activos na presença de hidretos.

Tal método, por seu turno, parece ter estado na base da ocorrência de uma reacção indesejada como evento principal, provavelmente catalisada por hidretos.

## 5. Recurso a um reactor de síntese assistida por microondas

Hoje em dia, as reacções assistidas por micro-ondas são utilizadas como forma de simplificar as condições reaccionais e melhorar os resultados de muitas reacções de síntese. Regra geral, as sínteses assistidas por microondas desenrolam-se mais rapidamente, com menos reacções laterais, com melhores rendimentos e com maior reprodutibilidade, relativamente às reacções realizadas em condições normais.<sup>[52,64,65]</sup> Estudos realizados por Hellal et al. demonstraram que reacções de síntese de pseudo-péptidos desenvolvidas nas mesmas condições (tempo e temperatura), mas sem micro-ondas, apresentaram rendimentos bastante inferiores aos daquelas realizadas sob irradiação com microondas. Assim, para que se conseguisse um rendimento idêntico, o tempo de reacção teria que ser 10 vezes superior, relativamente ao procedimento com micro-ondas.<sup>[66]</sup>

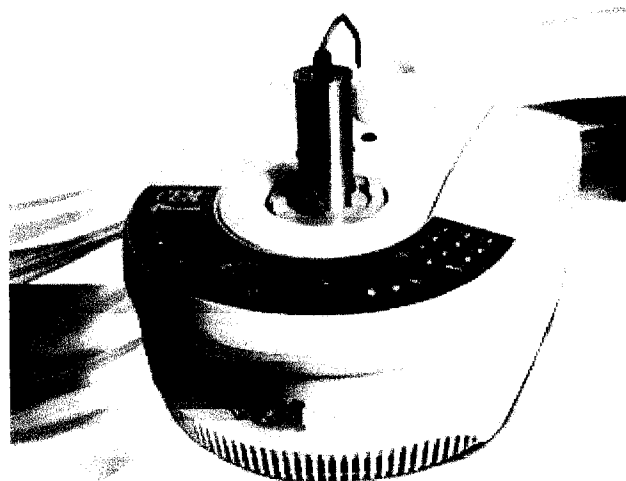
A aplicação da síntese assistida por microondas é bastante alargada na preparação de péptidos e outros compostos orgânicos,<sup>[63,67]</sup> sendo que o seu emprego em reacções “secas” (sem solvente) tem atraído o interesse da indústria química, pelas vantagens inerentes à ausência do recurso a solventes em termos económicos, processuais e ambientais.<sup>[68]</sup>

Face aos bons resultados de outros grupos de investigação em síntese assistida por microondas (MW), optou-se por testar esta abordagem, aplicando-a aos métodos de síntese atrás descritos. Para tal, utilizou-se um aparelho *Discover LabMate* da CEM com *IntelliVent™ Pressure Control System* (Figura 28), realizando-se experiências piloto em vasos reaccionais de volume máximo 10 mL, nas seguintes condições:

Potência (MW): 150 W;

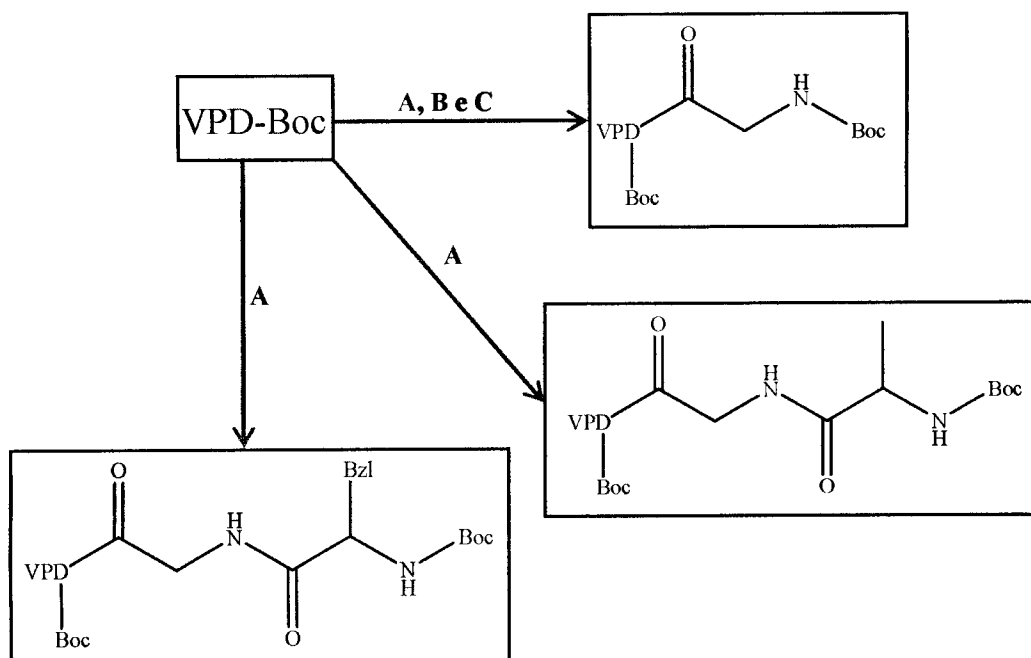
$t_{\text{reacção}}$ : 10 ou 15 minutos;

Temperatura: 80 – 120 °C;



**Figura 28:** Aparelho de síntese assistida por microondas *Discover LabMate*, com sistema de controlo de pressão *IntelliVent™*.

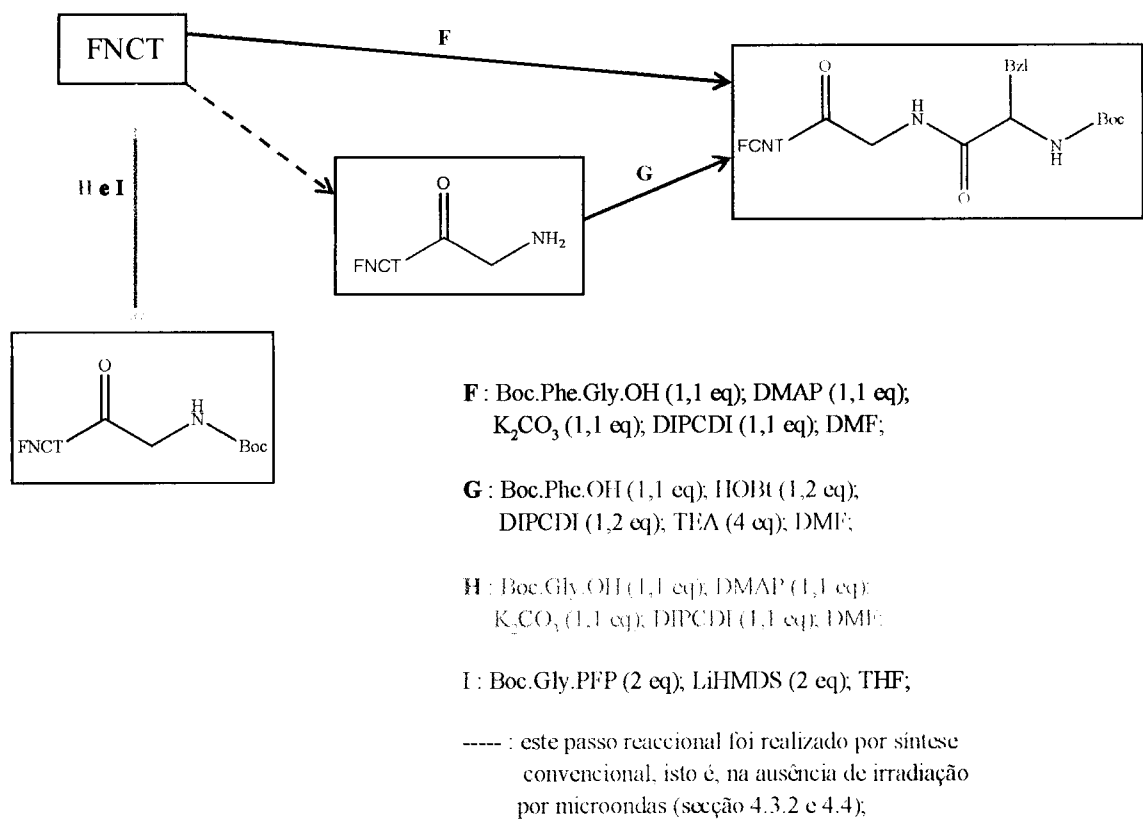
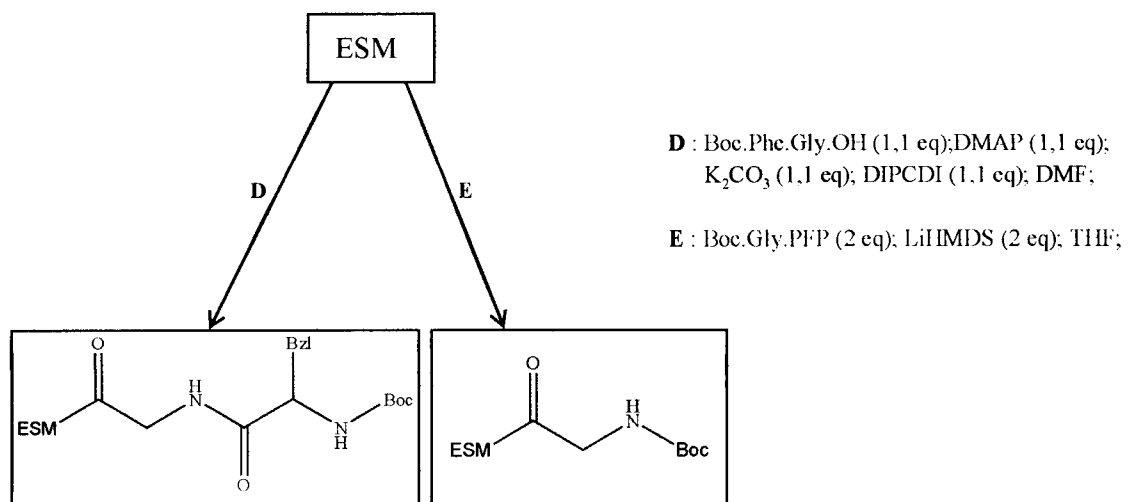
No **Esquema 26**, apresenta-se um diagrama ilustrativo de todas as reacções testadas com irradiação por microondas, cujas condições e observações experimentais se compilam nas **Tabelas 2 a 4**.



**A :** Boc.Gly.OH, Boc.Phe.Gly.OH ou Boc.Ala.Gly.OH (1,1 eq);  
 DMAP (1,1 eq);  $K_2CO_3$  (1,1 eq); DIPC DI (1,1 eq); DMF;

**B :** Boc.Gly.OH (1,2 eq);  $ZnCl_2$  (0,05 eq);  $(PhCO)_2O$  (1,2 eq);  
 DCM;

**C :** Boc.Gly.PFP (2 eq); LiHMDS (2 eq); THF;



**Esquema 26:** Métodos testados em microondas usando a VPD, a ESM e a FNCT.

Tabela 2: Condições e Observações experimentais relativas às tentativas de *N*-acilação da VPD assistida por microondas.

Reacção	Reagentes	Solvente	Condições Reaccionais	Composto-alvo	Observações
1	VPD-Boc Boc.Gly.OH K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> DIPCDI/DMAP	DMF	3 ciclos de 15 min.; T <sub>1</sub> = 80°C T <sub>2</sub> = 100°C T <sub>3</sub> = 120°C	27	Não se verificou formação de qualquer composto no primeiro ciclo de 15 min. O aumento da temperatura fez a reacção evoluir, sendo esta quase completa após um terceiro ciclo de 15 min. a 120°C. O produto formado foi isolado e analisado por ESI-MS, não se tratando do composto-alvo.
2	VPD-Boc Boc.Gly.OH K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> DIPCDI/DMAP	DMF	t = 15 min. T = 120°C	27	Aplicou-se apenas um ciclo de 15 min. a 120°C, obtendo-se resultados idênticos aos da reacção 1.
3	VPD-Boc Boc.Phe.Gly.OH K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> DIPCDI/DMAP	DMF	2 ciclos de 15 min.; T <sub>1</sub> = 100°C T <sub>2</sub> = 120°C	13	Houve formação de um produto que, após isolamento e análise por ESI-MS, não se identificou como o composto pretendido.
4	VPD-Boc Boc.Ala.Gly.OH K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> DIPCDI/DMAP	DMF	3 ciclos de 15 min.; T <sub>1</sub> = 80°C T <sub>2</sub> = 100°C T <sub>3</sub> = 120°C	31	Resultados semelhantes aos da reacção anterior.
5	VPD-Boc ZnCl <sub>2</sub> (PhCO) <sub>2</sub> O Boc.Gly.OH	DMF	t = 15 min. T = 80°C	27	Formação de outro produto que não o pretendido.
6	VPD-Boc LiHMDS Boc.Gly.OPFP	THF	t <sub>1</sub> = 15 min; T <sub>1</sub> = 80 °C t <sub>2</sub> = 10 min.; T <sub>2</sub> = 100°C	27	Formou-se o mesmo composto anteriormente detectado aquando da realização da reacção a -78 °C (secção 4.2.3)

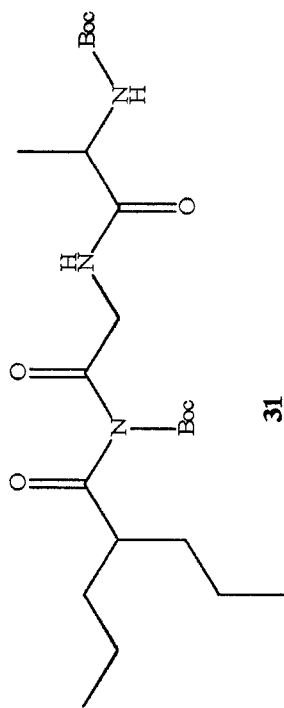


Tabela 3: Condições e Observações experimentais relativas às tentativas de *N*-acilação da ESM assistida por microondas.

Reacção	Reagentes	Solvente	Condições Reacionais	Composto-alvo	Observações
7	ESM Boc.Phe.Gly.OH K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> DIPCDI/DMAP	DMF	2 ciclos de 15 min.: T <sub>1</sub> = 100°C T <sub>2</sub> = 120°C	14	Formação de outro produto que não o pretendido.
8	ESM LiHMDS Boc.Gly.OPFP	THF	2 ciclos de 15 min.: T <sub>1</sub> = 100°C T <sub>2</sub> = 120°C	28	Deteção (TLC) da formação de um produto que se degradou durante o processo de isolamento por extracção líquido-líquido.

Tabela 4: Condições e Observações experimentais relativas às tentativas de *N*-acilação da FNCT assistida por microondas.

Reacção	Reagentes	Solvente	Condições Reacionais	Composto-alvo	Observações
9	FNCT Boc.Phe.Gly.OH K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> DIPCDI/DMAP	DMF	2 ciclos de 15 min.: T <sub>1</sub> = 100°C T <sub>2</sub> = 120°C	15	Formação de um produto que, após isolamento e análise por ESI-MS, não se verificou tratar do composto pretendido.
10	FNCT Boc.Gly.OH K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> DIPCDI/DMAP	DMF	2 ciclos de 15 min.: T <sub>1</sub> = 100°C T <sub>2</sub> = 120°C	29	Provável formação do produto acima referido (reacção 9), de acordo com comparação por TLC.
11	FNCT.Gly Boc.Phe.OH DIPCDI/HOBt TEA	DMF	2 ciclos de 15 min.: T <sub>1</sub> = 100°C T <sub>2</sub> = 120°C	15	Resultado idêntico ao das duas reacções anteriores (reacção 9 e 10).
12	FNCT LiHMDS Boc.Gly.OPFP	THF	2 ciclos de 15 min.: T <sub>1</sub> = 80°C T <sub>2</sub> = 100°C	29	Formação de um produto com R <sub>f</sub> próximo do valor esperado para o composto-alvo (29). Após isolamento, e por nova comparação com um padrão do composto 29, verificou-se não se tratar do mesmo composto.

## 6. Considerações Finais e Perspectivas Futuras

Analisando globalmente as observações experimentais e resultados registados no decurso do trabalho de investigação aqui descrito, conclui-se que a *N*-acilação de amidas/imidas é uma reacção extraordinariamente difícil, mesmo quando se recorre a condições mais fortes como o uso de hidretos/bases fortes para a catálise básica ou o recurso a síntese assistida por microondas. Ainda assim, e apesar da quase total impossibilidade de fazer reagir os fármacos da forma desejada, em grande parte devido ao seu carácter nucleófilo fraco ou mesmo nulo, logrou-se observar a *N*-acilação da fenacetina por recurso a um éster pentafluorofenólico da *N*<sup>α</sup>-Boc-Glicina e a uma base muito forte, o LiHMDS. O produto de *N*-acilação foi obtido com um rendimento aceitável (24%) e mostrou-se resistente às condições acidolíticas de remoção do grupo *N*<sup>α</sup>-protector (Boc). Porém, não reagiu da forma esperada nas subseqüentes tentativas de condensação do segundo aminoácido, revelando-se aparentemente não reactivo face à condensação com activação *in situ* mediada quer por carbodiimida, quer por sal de amínio. Em contrapartida, novamente o recurso a ésteres activos e à catálise por base forte foi a única via que mostrou resultados aparentemente promissores, se bem que com indícios da promoção de reacção indesejada por parte da base.

Relativamente aos outros dois fármacos, verificou-se uma quase ausência de reactividade por parte da etossuximida, independentemente do método usado, ao passo que a *N*-acilação da valpromida foi detectada aquando do recurso a um éster activo (*N*-pentafluorofenólico) na presença de LiHMDS.

Por tudo o acima exposto, parece razoável concluir que a *N*-acilação destes três fármacos, ou pelo menos da fenacetina e da valpromida, terá sempre que passar pelo recurso a ésteres activos como espécies acilantes e a hidretos ou LiHMDS como catalisadores básicos. Provavelmente, o binómio éster pentafluorofenólico/LiHMDS será um factor-chave para o sucesso, requerendo este último uma optimização cuidadosa das condições reaccionais.

Atendendo a que o recurso a síntese assistida por microondas em nada melhorou os resultados obtidos pela via convencional, uma futura abordagem aos objectivos sintéticos aqui apresentados poderá passar pela preparação do éster pentafluorofenólico do dipéptido *N*<sup>α</sup>-Boc protegido e sua posterior condensação, na presença de LiHMDS, quer à fenacetina, quer à *N*-Boc-valpromida. Uma outra aproximação para a obtenção de

*N*-acil-valpromidas poderá passar pelo uso de ácido valpróico como agente acilante e do derivado amídico do aminoácido ou dipéptido como agente nucleófilo.

## 7. Procedimentos Experimentais

### 7.0. Notas Gerais

Nas reacções realizadas neste trabalho experimental foram utilizados aminoácidos e dipéptidos  $N^\alpha$ -protegidos da NovaBiochem e da Bachem, respectivamente. Todos os solventes usados eram de qualidade pró-análise e, quando necessário, os solventes foram previamente secos com filtros moleculares (4 Å) pré-activados.

Para o seguimento das reacções, e para confirmação da homogeneidade dos compostos isolados, recorreu-se à técnica de cromatografia em camada fina (TLC). Para execução desta técnica utilizaram-se placas de alumínio recobertas com gel-silica 60 F<sub>254</sub> (0,25 mm) da Merck, sensíveis à luz ultravioleta de comprimento de onda 254 nm. A revelação dos cromatogramas fez-se por irradiação com luz ultravioleta 254 nm e, adicionalmente, por pulverização com uma solução de dicarboxidina, após exposição das placas a atmosfera de cloro.

Na purificação dos compostos sintetizados foram utilizadas técnicas como a extracção líquido-líquido, e a cromatografia líquida de adsorção em coluna. Para execução desta última utilizou-se uma suspensão de gel-silica 60 (70-230 mesh ASTM) da Merck, num eluente adequado, como fase estacionária. O sistema de eluentes utilizados em cromatografia, quer em placa, quer em coluna, encontram-se indicados na **Tabela 5**.

**Tabela 5:** Sistemas de eluentes usados nas técnicas de cromatografia.

Sistema de Eluentes	Composição
A	DCM/Me <sub>2</sub> CO (1:1)
B	AcOEt/n-Hexano (1:4)
C	DCM/Me <sub>2</sub> CO (3:1)
D	DCM/Me <sub>2</sub> CO (6:1)
E	AcOEt/n-Hexano (3:1)

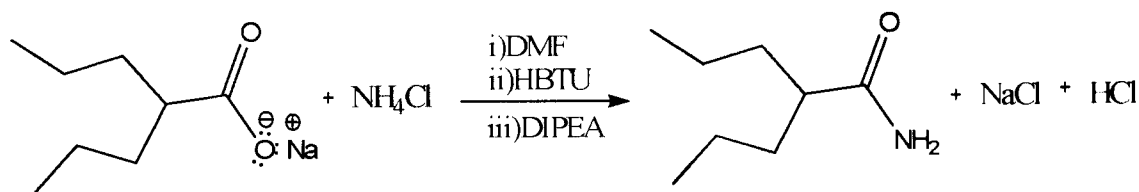
A evaporação dos solventes foi sempre realizada sob pressão reduzida em evaporador rotativo *Heidolph Laborota 4001*.

A análise dos compostos isolados por espectrometria de massa foi realizada em espectrómetro de massa *Finnigan Surveyor LCQ DECA XP MAX*. Todos os espectros foram obtidos no modo positivo, sendo as amostras preparadas em metanol (Sigma-Aldrich).

Os espectros de RMN-<sup>1</sup>H e RMN-<sup>13</sup>C de alguns compostos foram traçados em espectrómetro Bruker AMX (300 MHz), na Universidade de Santiago de Compostela. Para outros compostos, os espectros de RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C e DEPT foram traçados em espectrómetro Bruker Ultrashield 400 Plus (400 MHz), na Universidade do Porto. Os desvios químicos observados foram registados relativamente ao padrão interno tetrametilsilano (TMS) em soluções dos compostos em clorofórmio deuterado ou metanol deuterado.

As reacções assistidas por micro-ondas foram realizadas no aparelho *Discover LabMate* com *IntelliVent<sup>TM</sup> Pressure Control System* da CEM.

## 7.1. Preparação da Valpromida a partir do valproato de sódio<sup>[33]</sup>



Dissolveu-se o valproato de sódio (0,5439 g; 3,273 mmol) e 1,5 equivalentes molares (eq.) de HBTU em 12 mL de DMF. A mistura foi deixada em agitação magnética durante 5 minutos, ao fim dos quais se adicionou à mistura 2 eq. de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e de DIEA. A mistura permaneceu em agitação magnética por mais 30 minutos.

Finda a reacção, procedeu-se à filtração da solução obtida e à posterior remoção do solvente por evaporação. O resíduo daí obtido apresentou-se como um sólido amarelado que, por TLC, se verificou tratar de uma mistura.

Procedeu-se, então, a uma extracção ácido-base para remoção das impurezas, dissolvendo-se a mistura em 50 mL de solução aquosa saturada de  $\text{NaCl}$  e extraíndo-se com 3 porções de 25 mL de acetato de etilo ( $\text{AcOEt}$ ). A fase orgânica resultante foi lavada com duas porções de 20 mL de solução aquosa de  $\text{HCl}$  a 2M, seguida de 2 porções de 20 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , 2 porções de 20 mL de solução aquosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  e 2 porções de 20 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . A fase orgânica foi seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro durante 10 minutos, sendo o sólido removido por filtração por gravidade e o filtrado levado à secura por evaporação.

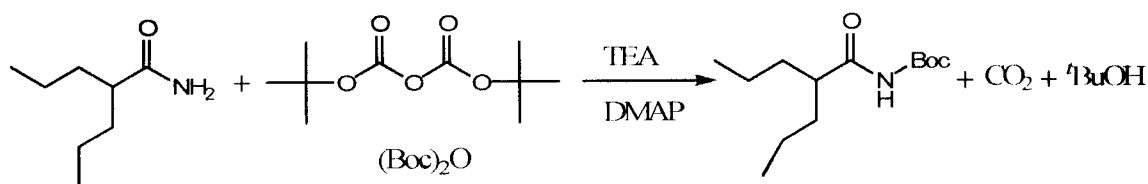
Obteve-se um sólido branco (0,3231 g; 68,9%) que, por TLC, se verificou estar cromatograficamente homogéneo:  $R_f(\text{A}) = 0,39$ . A análise do sólido por  $\text{RMN-}^1\text{H}$  permitiu confirmar que se tratava da valpromida pretendida.

### **$\text{RMN-}^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ; 300 MHz)**

5,92 (sl; 1H,  $-\text{CO-NH}(\text{H})$ ); 5,55 (sl; 1H,  $-\text{CO-NH}(\text{H})$ ); 2,20 a 2,08 (m; 1H,  $>\text{CH-CO-}$ ); 1,66 a 1,22 (m; 8H,  $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2]_2$ ); 0,91 (t,  $J = 6,95$  Hz; 6H,  $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2]_2$ );  
 $m/z$  ( $\text{MH}^+$ ) = 144,40 (esperado 144,23)

As restantes reacções de síntese da valpromida,  $\text{R}_{2-23}$ , foram realizadas de modo idêntico, confirmando-se a identidade dos respectivos produtos por TLC comparativa, usando o composto obtido na primeira reacção ( $\text{R}_1$ ) como padrão.

## 7.2. Protecção da VPD com o grupo *tert*-butiloxicarbonilo (Boc)<sup>[59]</sup>



A uma solução de VPD (0,4690 g; 3,274 mmol) em 20,0 mL de DCM seco, adicionou-se 1 eq. de TEA, 2 eq. de (Boc)<sub>2</sub>O e 1 eq. de DMAP. A mistura foi mantida em agitação magnética e à temperatura ambiente por 4 horas.

Terminada a reacção, evaporou-se o solvente sob vácuo, e o resíduo daí resultante foi purificado por cromatografia em coluna, usando-se o eluente **B** (Tabela 5). Após combinação de todas as fracções que continham o produto puro, e evaporação do solvente, obteve-se o composto final como um sólido branco em forma de agulhas (0,1125 g; 14,1%) que, por TLC, se verificou estar cromatograficamente homogéneo,  $R_f(\mathbf{B}) = 0,34$ . A análise estrutural do produto isolado (RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C e ESI-MS) permitiu confirmar que se tratava do composto desejado.

### RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz)

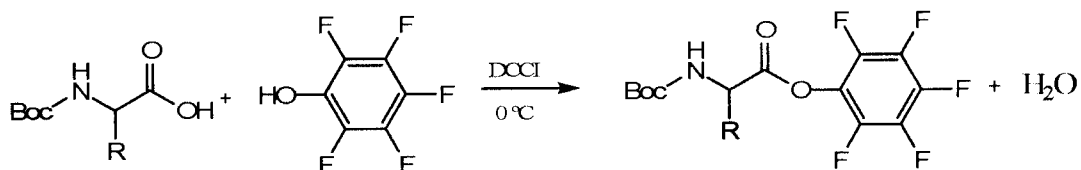
7,28 (sl; 1H, -NH-CO-); 1,67 a 1,60 (m; 1H, >CH-CO-); 1,50 (s; 9H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,45 a 1,27 (m; 8H, 2×(-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)); 0,89 (t, J = 7,30 Hz; 6H, 2×(-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)).

### RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz)

149,89 (-CO-NH-); 148,84 (-NH-CO-O-); 82,33 (-O-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 45,20 (>CH-CO-); 34,45 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> e -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 27,66 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 20,43 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>- e CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-); 14,10 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>- e CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-).

$m/z$  (MNa<sup>+</sup>) = 266,93 (esperado 266,24).

### 7.3. Esterificação de Boc-AA-OH com Pentafluorofenol (PFP)<sup>[69]</sup>



R = - H, **a**  
- CH<sub>2</sub>Ph, **b**

Uma solução contendo Boc-AA-OH (1,0175 g; 5,8082 mmol) e 1,1 eq. de PFP, em 20,0 mL de AcOEt, foi arrefecida num banho de gelo, adicionando-se de seguida 1,1 eq. de DCCI sob agitação magnética. A mistura permaneceu em agitação e banho de gelo durante 1 hora, após o que se removeu a ureia precipitada (DCU) por filtração sob vácuo e evaporou-se o solvente do filtrado. Obteve-se um resíduo impuro que se recristalizou de hexano, resultando um sólido branco que apresentou um valor de *m/z* compatível com a estrutura esperada.

a. Boc.Gly.PFP (**a**):

1,5278 g;

*R<sub>f</sub>* (C) = 0,69

*m/z* (MNa<sup>+</sup>) = 364,20 (esperado 364,23).

b. Boc.Phe.PFP (**b**):

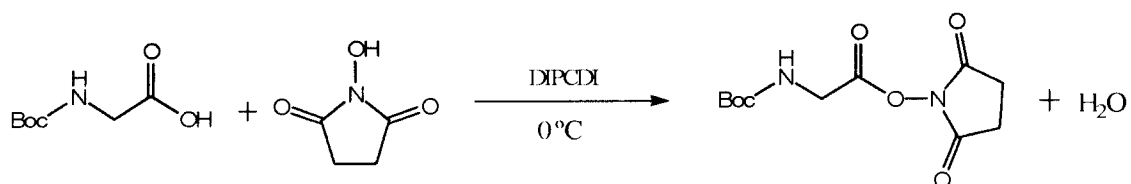
1,5155 g;

*R<sub>f</sub>* (C) = 0,72

*m/z* (MNa<sup>+</sup>) = 511,27 (esperado 511,40).

Os rendimentos dos produtos isolados não foram calculados devido à utilização imediata destes produtos após a sua obtenção. Por isso, estes não se encontravam devidamente secos para que se pudesse calcular o seu rendimento.

#### 7.4. Esterificação do Boc-Gly-OH com *N*-hidroxissuccinimida (HOSu)<sup>[70]</sup>



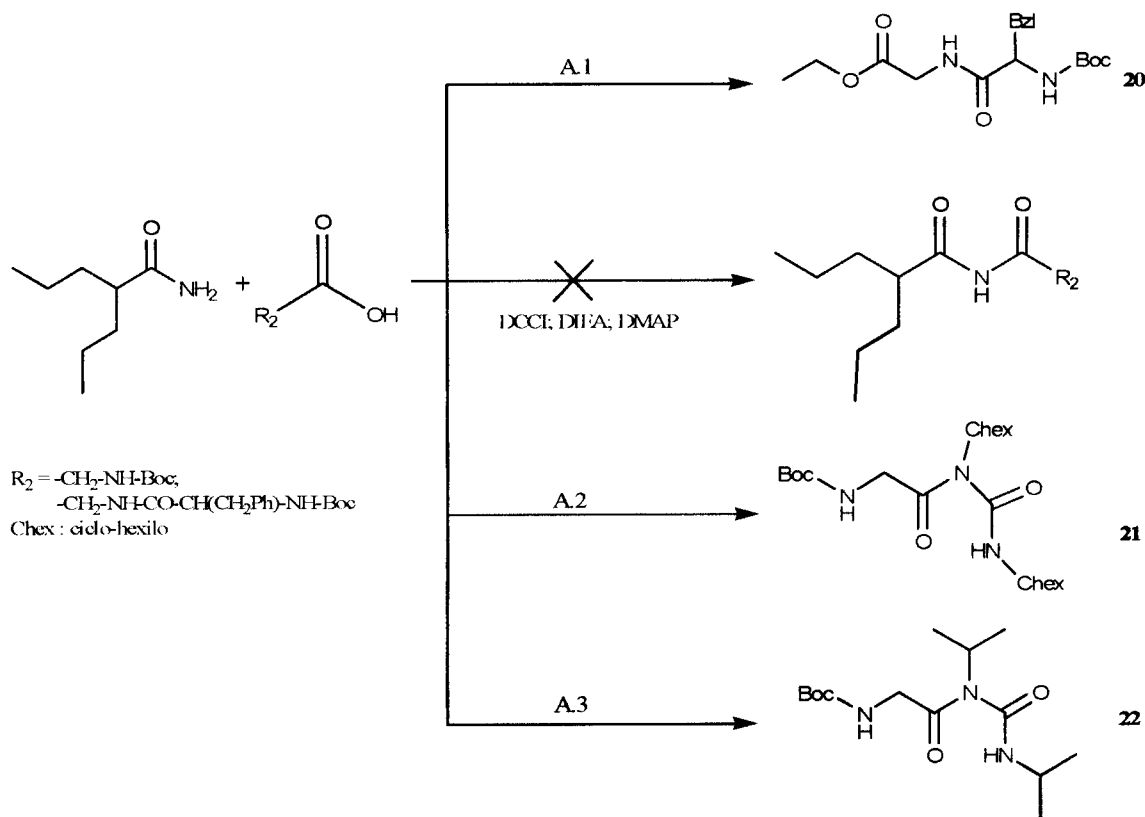
A uma solução de Boc-Gly-OH (1,1017 g; 6,2889 mmol) e 1 eq. de HOSu, em 30,0 mL de dioxano seco e em banho de gelo, adicionou-se 1 eq. de DIPCPI com agitação. A mistura reaccional foi mantida no frigorífico ( $T = -4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante a noite, após o que, se removeu a ureia precipitada por filtração sob vácuo e se levou o filtrado à secura por evaporação.

A mistura resultante foi purificada por cromatografia em coluna, utilizando-se o eluente **C** (Tabela 5). Após combinação de todas as fracções que continham o produto puro, e evaporação do solvente sob vácuo, obteve-se o composto final como um sólido branco granuloso (1,5901 g) que, por TLC, se verificou estar cromatograficamente homogéneo:  $R_f$  (C) = 0,56. A identidade do composto foi confirmada por TLC comparativo, usando-se uma amostra de Boc.Gly.OSu comercial existente no laboratório.

O rendimento do produto isolado não foi calculado devido à utilização imediata deste produto após a sua obtenção. Por isso, este não se encontrava devidamente seco para que se pudesse calcular o seu rendimento.

## Metodologias de Síntese testadas para a *N*-acilação dos fármacos

### 7.5.1. Condensação do aminoácido ou dipéptido *N*-Boc-protégido via activação *in situ* promovida por carbodiimidas.



#### a. Tentativa de condensação do aminoácido ou dipéptido à VPD usando DCCl.<sup>[49]</sup>

Foram realizadas várias tentativas de *N*-acilação segundo este método, variando-se solventes, agente acilante e base, conforme se especifica na **Tabela 6**. De um modo geral, o procedimento foi idêntico para todas elas, como se descreve de seguida.

A uma suspensão de VPD, em 20 mL de solvente seco, adicionou-se 1 eq. de base e deixou-se a mistura reaccional em banho de gelo e agitação magnética, durante 30 minutos. Adicionou-se 1,1 eq. do reagente dador de acilo (aminoácido ou dipéptido), 0,1 eq. de DMAP e 1,2 eq. de DCCl, dissolvida em 10 mL de solvente seco. A reacção decorreu a 0 °C durante 2 horas, prosseguindo depois à temperatura ambiente. A evolução da reacção foi controlada por TLC. Quando se observou que a reacção não

evoluía de forma detectável, extraiu-se a mistura reaccional com solução aquosa de HCl a 1% (3×15 mL) e solução aquosa de NaHCO<sub>3</sub> a 30% (3×15 mL). A fase orgânica resultante foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, sendo o sólido removido por filtração por gravidade e o solvente do filtrado evaporado sob vácuo.

Os compostos obtidos em todas as reacções realizadas foram purificados por cromatografia em coluna e analisados por ESI-MS e RMN-<sup>1</sup>H, como abaixo discriminado.

***N-terc-butiloxicarbonilglicilfenilalaninato de etilo* (reacção A.1)**

0,1794 g ( $\eta = 22,3\%$ ); Rf (D) = 0,56.

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz)**

7,25 a 7,12 (m; 5H, -CH<sub>2</sub>-Ph); 6,42 (bs; 1H, >CH-NH-CO-); 4,97 (bs; 1H, -CH<sub>2</sub>-NH-CO-); 4,42 a 4,25 (m; 1H, -CO-CH<); 4,12 (q, J = 5,08 Hz; 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-); 3,92 (d, J = 5,38 Hz; 1H, -CO-CH(H)-NH-); 3,88 (d, J = 5,08 Hz; 1H, -CO-CH(H)-NH-); 3,09 a 2,03 (m; 2H, -CH<sub>2</sub>-Ph); 1,32 (s; 9H, -O-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,20 (t, J = 7,14 Hz; 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-).

m/z (MNa<sup>+</sup>) = 373,18 (esperado 373,41).

***N'-ciclo-hexil-N'-ciclo-hexilcarbamoil-N-terc-butiloxicarbonilglicinamida***

(reacção A.2)

0,0976 g ( $\eta = 17,7\%$ ); Rf (D) = 0,53.

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz)**

7,41 (sl; 1H, -NH-CH<sub>2</sub>-); 5,34 (sl; 1H, -NH-Ph); 4,01 (d, J = 5,14 Hz; 2H, -NH-CH<sub>2</sub>-); 3,89 a 3,76 (m; 1H, -CO-NH-CH<); 3,74 a 3,61 (m; 1H, >N-CH<); 2,05 a 1,53 (m; 12H, -NH-(ciclo-hexano: H<sub>2,4,6</sub>); >N-(ciclo-hexano: H<sub>2,4,6</sub>); 1,45 (s; 9H, -O-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,41 a 1,09 (m; 8H, -NH-(Chex H<sub>3,5</sub>); >N-(Chex: H<sub>3,5</sub>)).

m/z (MNa<sup>+</sup>) = 404,40 (esperado 404,26).

**b. Tentativa de condensação da Boc.Gly.OH à VPD, a baixa temperatura e em atmosfera de árgon, usando DIPCDI.<sup>[50]</sup>**

Dissolveu-se 5 eq. de Boc.Gly.OH, 5 eq. de DIPCDI e 0,5 eq. de DMAP em 10 mL de DMF seca, deixando-se a mistura reaccional durante 30 minutos em banho refrigerado a -10 °C, sob atmosfera de árgon e agitação magnética. Adicionou-se, de seguida, VPD dissolvida em 10 mL de DMF seca, deixando-se a reacção prosseguir a -10 °C durante 12 horas, e deixando-se subir a temperatura do banho durante mais 5 dias de reacção. Quando a reacção aparentou não evoluir mais (TLC), extraiu-se a mistura reaccional com solução aquosa de NaHCO<sub>3</sub> a 10% (3×15 mL) e a fase orgânica resultante foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, removendo-se a fase sólida por filtração por gravidade e levando-se o filtrado à secura por evaporação.

Isolou-se o produto da reacção **A.3** por cromatografia em coluna, utilizando o eluente **C** (Tabela 5), o qual se apresentou como um sólido branco de R<sub>f</sub> (C) = 0,45 (m= 0,1055 g; η= 5,4%). Este sólido foi analisado por ESI-MS e RMN-<sup>1</sup>H, sendo identificado como a *N*-acilureia (**22**), resultante da reacção entre o aminoácido e a carbodiimida, de acordo com os dados espectroscópicos abaixo indicados.

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz)**

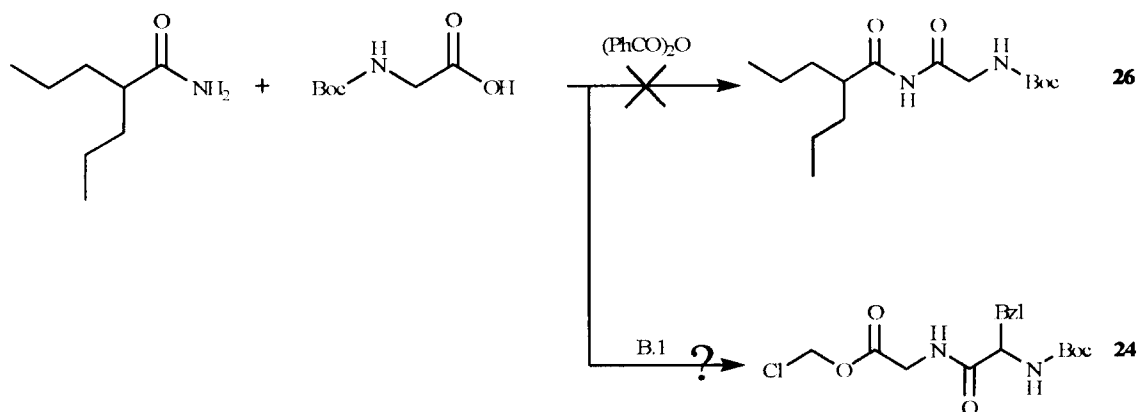
7,68 (sl; 1H, -CO-NH-CH<sub>2</sub>-); 5,32 (sl; 1H, -CO-NH-CH<); 4,27 a 4,18 (m; 1H, >N-CH<); 4,03 (d, J= 4,81 Hz; 2H, -NH-CH<sub>2</sub>-); 3,99 a 3,92 (m; 1H, -NH-CH<); 1,45 (s; 9H, -O-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,41 (d, J= 6,76 Hz; 6H, >N-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1,21 (d, J= 6,50 Hz; 6H, -NH-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

m/z(MNa<sup>+</sup>) = 324,87 (esperado 324,27).

Tabela 6: Condições reacionais usadas nas reações de N-actilação usando carbodiimidas.

Reacção	Temperatura	Carbodiimida	Solvente	Reagentes	Composto obtido
A.1	0 °C → T <sub>amb</sub>	DCCI	DCM	Boc.Phe.Gly.OH DIEA DMAP	
A.2	0 °C → T <sub>amb</sub>	DCCI	DMF	Boc.Gly.OH K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> DMAP	
A.3	-10 °C → 12 °C	DIPCDI	DMF	Boc.Gly.OH DMAP	

**7.5.2. Uso de anidridos mistos como agentes acilantes: Tentativas de condensação do aminoácido ou dipéptido à VPD usando o anidrido benzóico na presença de  $ZnCl_2$ <sup>[40]</sup>**



Foram realizadas três reacções (B.1-B.3) nas condições dadas na Tabela 7, de acordo com o procedimento geral seguinte.

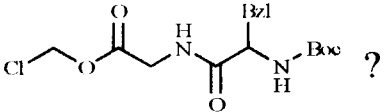
A uma solução contendo 0,05 eq. de  $ZnCl_2$  em 15,0 mL de solvente seco, adicionou-se 1,2 eq. de aminoácido ou dipéptido  $N^\alpha$ -Boc protegido e igual quantidade molar de anidrido benzóico. A mistura permaneceu em agitação à temperatura ambiente e em atmosfera de árgon durante 10 minutos, findos os quais se adicionou uma solução de VPD em 10,0 mL de solvente seco. Deixou-se a reacção prosseguir nestas condições por 24 horas.

No fim da reacção, extraiu-se a mistura reaccional com água ( $3 \times 10$  mL) e com solução aquosa de  $Na_2CO_3$  a 10% ( $3 \times 10$  mL). As fases orgânicas foram combinadas e secas com  $Na_2SO_4$  anidro, sendo o sólido removido por filtração por gravidade e o filtrado levado à secura por evaporação sob vácuo.

O resíduo obtido foi submetido a cromatografia preparativa em coluna de gel de sílica, isolando-se o produto que foi analisado por ESI-MS. Apenas no caso da reacção B.1 foi possível atribuir uma possível estrutura ao composto como sendo o éster clorometílico do dipéptido:

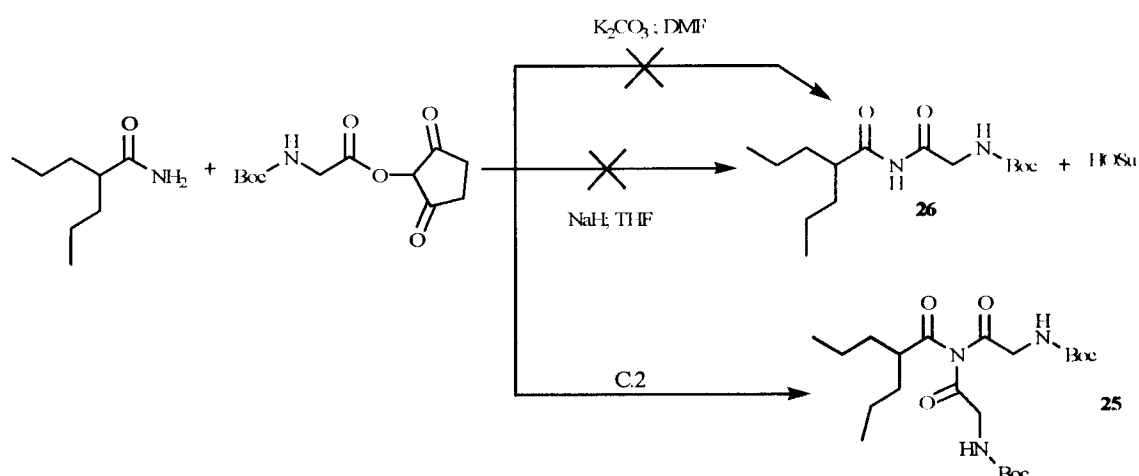
$$m/z (MNa^+)_{B.1} = 373,93 \text{ (esperado } 370,83).$$

**Tabela 7: Condições gerais das reacções B.1-B.3.**

Reacção	Ácido Carboxílico	Solvente	T <sub>reacção</sub> /°C	Composto obtido
B.1	Boc.Phe.Gly.OH	DCM	T <sub>amb</sub>	
B.2	Boc.Gly.OH	DMF	T <sub>amb</sub>	?
B.3	Boc.Gly.OH	DMF	- 5°C	?

### 7.5.3. Uso de ésteres activos como agentes acilantes

#### 7.5.3.1. Tentativa de *N*-acilação dos fármacos usando o éster succinimídico da *N*<sup>α</sup>-Boc glicina (Boc.Gly.OSu)



##### a. Usando $K_2CO_3$ como base

Dissolveu-se, em 20 mL de DMF seca, VPD (0,1241 g; 8,664 mmol) e 1,1 eq. de  $K_2CO_3$ , deixando-se a mistura em banho de gelo e sob agitação magnética por 30 minutos. Adicionou-se, de seguida, 1,1 eq. de Boc.Gly.OSu, deixando-se a reacção prosseguir nas mesmas condições por 2 horas, ao fim das quais se removeu o banho de gelo e se deixou prosseguir a reacção à temperatura ambiente por 24 horas.

No fim da reacção (C.1), extraiu-se a mistura reaccional com solução aquosa de HCl a 1% (3×20 mL) e solução aquosa de  $NaHCO_3$  a 10% (3×20 mL). A fase orgânica foi seca com  $Na_2SO_4$  anidro, removendo-se a fase sólida por filtração por gravidade e levando-se o filtrado à secura por evaporação.

O resíduo obtido foi submetido a purificação por cromatografia em coluna, usando o eluente C (Tabela 5), obtendo-se um produto que foi analisado por ESI-MS e RMN-<sup>1</sup>H. No entanto, ambas as análises foram inconclusivas no que diz respeito à identificação inequívoca do produto isolado.

### b. Usando NaH como base<sup>[43]</sup>

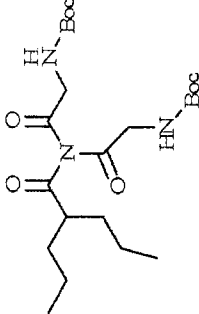
A uma suspensão de fármaco em 20,0 mL de THF seco a 0°C, adicionou-se 1,2 eq. de NaH. A mistura permaneceu em agitação e sob atmosfera de árgon por 20 minutos, e depois por mais 20 minutos à temperatura ambiente. De seguida, adicionou-se uma mistura de 1,2 eq. de Boc.Gly.OSu em 10,0 mL de THF seco, deixando-se a reagir a 0 °C durante 20 minutos, prosseguindo por mais 3 horas à temperatura ambiente.

No fim da reacção, adicionou-se 10 mL de H<sub>2</sub>O e removeu-se o solvente orgânico por evaporação sob vácuo. A mistura resultante foi extraída com AcOEt (3×15 mL) e a fase orgânica seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, removendo-se o sólido por filtração por gravidade e levando-se o filtrado à secura por evaporação.

O resíduo resultante foi purificado por cromatografia em coluna usando o eluente E (Tabela 5), não sendo possível isolar qualquer fracção cromatograficamente homogénea. Contudo, optou-se por analisar a mistura isolada por ESI-MS, verificando-se que o pico maioritário correspondia à VPD di-substituída,  $m/z (M^+Na^+) = 480,80$  (esperado 480,39), e o pico minoritário ao composto pretendido,  $m/z (MNa^+) = 323,60$  (esperado 323,39).

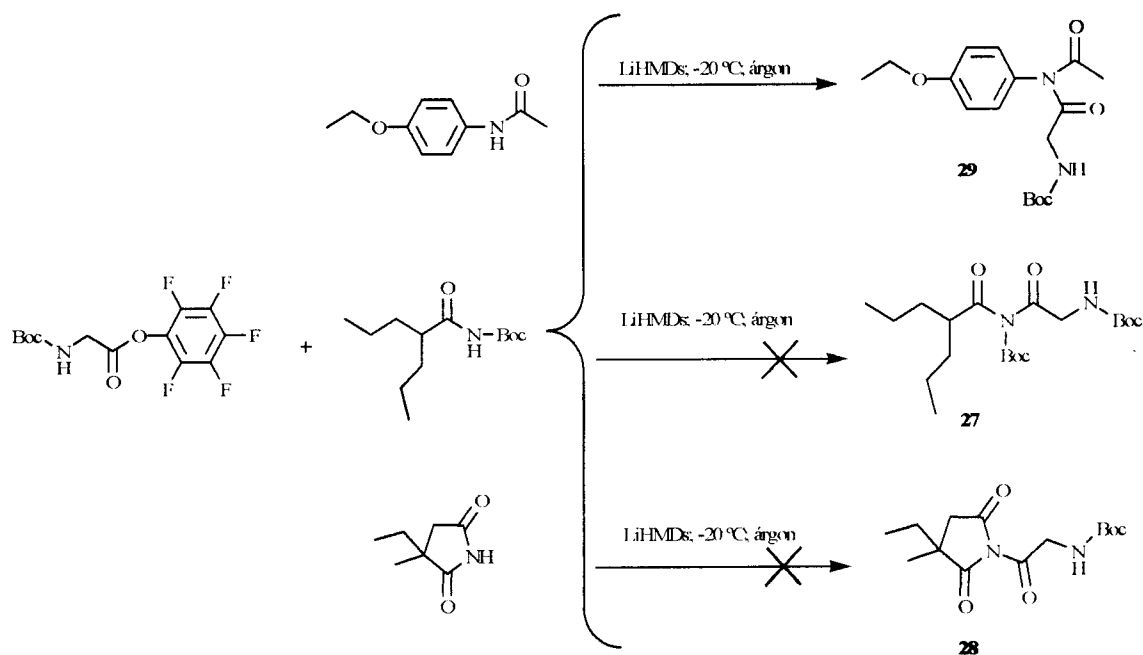
Na tentativa de se obter o composto pretendido como produto maioritário e cromatograficamente homogéneo, realizaram-se mais 5 reacções onde se alteraram algumas condições reaccionais, como indicado na Tabela 8. No entanto, em nenhuma destas reacções foi possível reproduzir o resultado obtido na reacção C.2.

Tabela 8: Reagentes e quantidades usadas nas reações C.1-C.9.

Reacção	Base	Fármaco	Temperatura	eq. molares	Composto obtido
C.1	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	VPD	0 °C → T <sub>amb</sub>	1,1 (K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ); 1,1 (Boc.Gly.OSu)	?
C.2	NaH	VPD	0 °C → T <sub>amb</sub>	1,2 (NaH); 1,2 (Boc.Gly.OSu)	
C.3	NaH	VPD	0 °C → T <sub>amb</sub>	0,5 (NaH); 0,5 (Boc.Gly.OSu)	?
C.4	<sup>t</sup> BuOK	VPD	0 °C → T <sub>amb</sub>	0,5 ( <sup>t</sup> BuOK); 0,5 (Boc.Gly.OSu)	?
C.5	NaH	VPD	0 °C → T <sub>amb</sub>	0,5 (NaH); 0,5 (Boc.Gly.OSu) Adição lenta	?
C.6	NaH	VPD-Boc	0 °C → T <sub>amb</sub>	0,5 (NaH); 0,5 (Boc.Gly.OSu)	?
C.7	NaH	VPD-Boc	0 °C → T <sub>amb</sub>	2 (NaH); 2,5 (Boc.Gly.OSu)	?

C.8	NaH	ESM	0 °C → T <sub>amb</sub>	0,5 (NaH); 0,5 (Boc.Gly.OSu)	?
C.9	NaH	FNCT	0 °C → T <sub>amb</sub>	2 (NaH); 2,5 (Boc.Gly.OSu)	?

### 7.5.3.2. *N*-acilação da FNCT usando o éster pentafluorofenólico da *N*<sup>α</sup>-Boc glicina (Boc.Gly.OPFP)<sup>[42]</sup>



A uma solução de FNCT (0,7379 g; 4,117 mmol) em 7,0 mL de THF anidro adicionou-se 2 eq. de LiHMDS, mantendo-se a mistura em agitação magnética, sob atmosfera de argon e a -20 °C durante 30 minutos. Adicionou-se uma solução de 2 eq. de Boc.Gly.OPFP em 7,0 mL de THF anidro, deixando-se a reacção prosseguir nas mesmas condições por mais 3 horas.

No fim da reacção, evaporou-se o solvente sob vácuo e dissolveu-se o resíduo resultante em 15 mL de água. Extraíu-se a fase aquosa com AcOEt (3×15,0 mL), secando-se a fase orgânica resultante com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Removeu-se o sólido por filtração por gravidade e levou-se o filtrado à secura por evaporação.

O resíduo foi submetido a purificação por cromatografia em coluna, usando o eluente **C** (Tabela 5), isolando-se o produto como um sólido branco (0,3353 g;  $\eta = 24,2\%$ ) de  $R_f$  (**C**) = 0,64, cuja análise (ESI-MS, RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C e DEPT) permitiu confirmar que se tratava do derivado *N*-acilado pretendido.

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz)**

7,77 (sl; 1H, -CH<sub>2</sub>-NH-CO-); 7,34 (d, J= 8,94 Hz; 2H, >N-C(CH-)(CH-)); 6,78 (d, J= 8,93 Hz; 2H, -O-C(CH-)(CH-)); 4,46 (s; 2H, -CO-CH<sub>2</sub>-NH-); 3,97 (q, J= 6,98 Hz; 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-O-); 2,56 (s; 3H, -CO-CH<sub>3</sub>); 1,50 (s; 9H, -O-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 1,38 (t, J= 6,97 Hz; 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-O-).

**RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz)**

173,38 (>N-CO-CH<sub>3</sub>); 166,08 (-CO-CH<sub>2</sub>-); 155,72 (-NH-CO-O-); 152,35 (-O-C<); 130,46 (>C-N<); 121,71 (-C(CH-)(CH-)); 114,64 (-O-C(CH-)(CH-)); 84,06 (-O-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 63,58 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-); 47,40 (-CO-CH<sub>2</sub>-NH-); 27,85 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 26,40 (-CO-CH<sub>3</sub>); 14,76 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-).

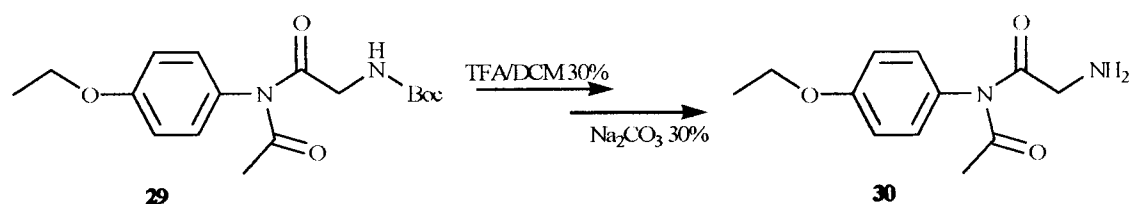
**DEPT (CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz)**

121,75 (-C(CH-)(CH-)); 114,68 (-O-C(CH-)(CH-)); 63,62 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-); 47,44 (-CO-CH<sub>2</sub>-NH-); 27,89 (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 26,44 (-CO-CH<sub>3</sub>); 14,80 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-).

m/z ((2M)Na<sup>+</sup>) = 695,20 (esperado 695,76); m/z (MNa<sup>+</sup>) = 359,27 (esperado 359,38).

De salientar que, perante o sucesso desta aproximação sintética, aplicou-se o mesmo procedimento nas tentativas de *N*-acilação da *N*-Boc-VPD e da ESM. No entanto, não se logrou reproduzir os bons resultados obtidos com a FNCT.

## 7.6. Desprotecção de 29: remoção do grupo Boc por acidólise com TFA<sup>[50]</sup>



Dissolveu-se o composto **29** em cerca de 3,0 mL de solução de TFA com DCM a 30%, deixando-se a solução em agitação magnética durante 1,5 horas. Adicionou-se, de seguida, solução aquosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 30%, até se atingir o pH de 9, deixando-se a mistura em agitação magnética por mais 30 minutos.

No fim da reacção, extraiu-se a mistura reaccional com 6 fracções de 5,0 mL de AcOEt, secando-se a fase orgânica resultante com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, removendo-se o sólido por filtração por gravidade e levando-se o filtrado à secura por evaporação a pressão reduzida.

Obteve-se um sólido branco (0,1505 g;  $\eta = 70,1\%$ ) que, por TLC, se verificou estar cromatograficamente homogéneo:  $R_f$  (C) = 0,14. A análise espectroscópica deste produto permitiu identificá-lo como o composto desejado (**30**).

### RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>; 400 MHz)

7,42 (d,  $J = 9,12$  Hz; 2H, -N-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>-)); 6,86 (d,  $J = 9,11$  Hz; 2H, -O-C(CH<sub>2</sub>)(CH-)); 4,00 (q,  $J = 6,99$  Hz; 2H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>); 3,96 (s; 2H, -CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 2,03 (s; 3H, -CO-CH<sub>3</sub>); 1,37 (t,  $J = 6,98$  Hz; 3H, -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

### RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz)

173,94 (-CO-CH<sub>3</sub>); 169,55 (-CO-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 157,31 (-O-C(CH<sub>2</sub>)(CH-)); 132,50 (-N-C(CH<sub>2</sub>)(CH-)); 123,15 (-N-C(CH<sub>2</sub>)(CH-)); 115,57 (-O-C(CH<sub>2</sub>)(CH-)); 64,67 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-O-); 43,96 (-CO-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 22,47 (-CO-CH<sub>3</sub>); 15,19 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-O-).

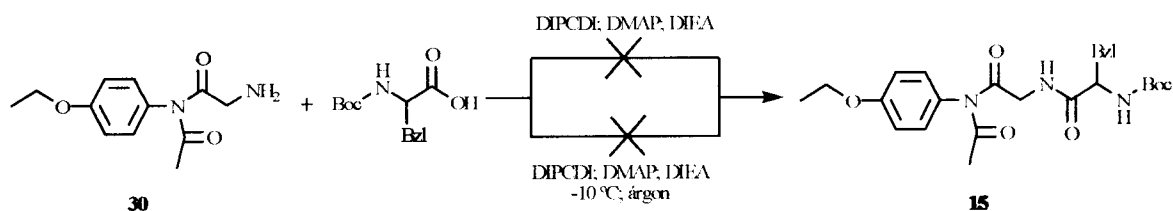
### DEPT (CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz)

123,14 (-N-C(CH<sub>2</sub>)(CH-)); 115,56 (-O-C(CH<sub>2</sub>)(CH-)); 64,66 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-O-); 43,95 (-CO-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 22,46 (-CO-CH<sub>3</sub>); 15,19 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-O-).

$m/z$  (MH<sup>+</sup>) = 237,13 (esperado 237,28).

## 7.7. Tentativa de condensação do dipéptido $N^\alpha$ -Boc fenilalanina ao derivado 30

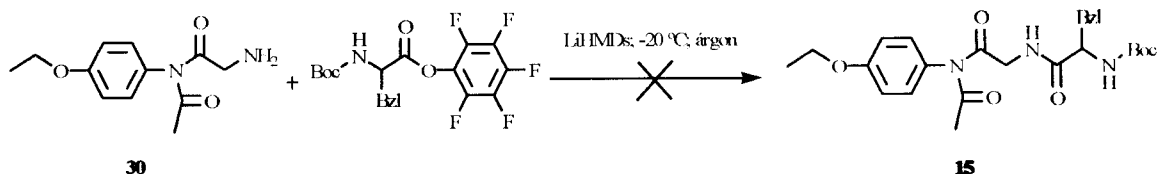
### a. Com activação *in situ* promovida por carbodiimidas



Iniciou-se o estudo de *N*-acilação do aminoácido fenilalanina ao derivado FNCT-Gly segundo o método de activação *in situ* mediado por carbodiimidas. Seguiu-se o mesmo procedimento já anteriormente descrito na secção 7.5.1 (a). O composto, isolado após várias etapas de purificação, foi analisado por ESI-MS, mostrando-se esta análise espectroscópica inconclusiva no que diz respeito à identificação inequívoca do produto isolado.

Face aos resultados obtidos na primeira reacção, tentou-se novamente a *N*-acilação do derivado 30 com o aminoácido, modificando algumas condições reaccionais. O procedimento seguido, nesta segunda tentativa, foi o mesmo que o anteriormente descrito na secção 7.5.1 (b). Também nesta reacção o produto isolado foi analisado por ESI-MS, contudo a análise foi novamente inconclusiva quanto à identificação inequívoca do produto isolado.

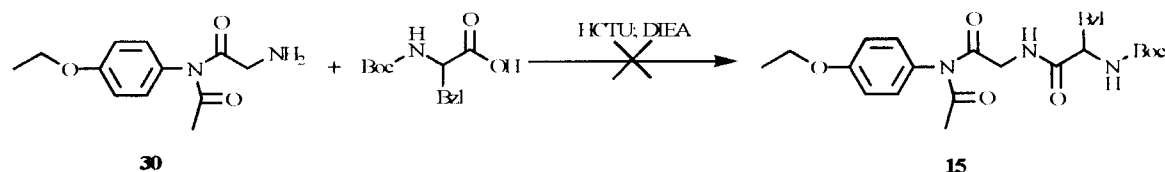
### b. Usando ésteres activos como agentes acilantes



Na tentativa de obter o derivado dipeptídico do fármaco FNCT, testou-se mais um método de condensação. Desta vez usando um éster activo (Boc.Phe.OPFP) como agente acilante e LiHMDS como base catalítica. O procedimento seguido encontra-se

descrito na secção 7.6. O produto isolado nesta reacção foi analisado por ESI-MS e RMN-<sup>1</sup>H, mas tais análises não foram conclusiva quanto à estrutura do produto isolado.

**c. Com activação *in situ* promovida por HCTU**



Numa última tentativa de *N*-acilação do aminoácido fenilalanina ao derivado **30**, realizou-se mais uma reacção segundo o procedimento descrito de seguida.

Dissolveu-se 1 eq. de Boc.Phe.OH, 1 eq. de HCTU e 2 eq. de DIEA em 10 mL de DMF seca, deixando-se a mistura reaccional durante 10 minutos em banho de gelo e agitação magnética. Adicionou-se, de seguida, FNCT.Gly dissolvida em 10 mL de DMF seca, deixando-se a reacção prosseguir em banho de gelo por 2h, e à temperatura ambiente durante mais 3 horas. Quando a reacção não aparentou mais evolução (TLC), extraiu-se a mistura reaccional com solução aquosa de KHSO<sub>4</sub> a 30% (3×15 mL) e com solução aquosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 30% (3×15 mL). A fase orgânica resultante foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, removendo-se a fase sólida por filtração por gravidade e levando-se o filtrado à secura por evaporação.

O resíduo foi submetido a purificação por cromatografia em coluna, usando-se o eluente C (Tabela 5). Isolou-se o produto como um sólido branco de R<sub>f</sub> (C) = 0,71, cuja análise espectrocópica (ESI-MS e RMN-<sup>1</sup>H) não foi conclusiva quanto à sua estrutura.

## 8. Bibliografia

- [1] Stella, V. J.; Nti-Addae, K. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**; 59: 677-694
- [2] Matsumoto, H.; Shoma, Y.; Kimura, T.; Hayashy, Y.; Kiso, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**; 11: 605-609
- [3] Gomes, P.; Gomes, J.; Rodrigues, M.; Moreira, R. *Tetrahedron* **2003**; 59: 7473-7480
- [4] Waller, D.; George, C. *Br. J. Clin. Pharmacy.* **1989**; 28: 497-507
- [5] Gomes, P.; Vale, N.; Moreira, R. *Molecules* **2007**; 12: 2484-2506
- [6] Testa, B.; Mayer, J. *Drug Metab. Rev.* **1998**; 30: 787-807
- [7] Han, H.; Amidon, G. *AAPS PharmaSci.* **2000**; 2: 1-11
- [8] Testa, B. *Biochem. Pharmacol.* **2004**; 68: 2097-2103
- [9] Suaifan, G.; Mahon, M.; Arafat, T.; Threadgill, M. *Tetrahedron* **2006**; 62: 11245-11266
- [10] Ettemayer, P.; Amidon, G.; Clement, B.; Testa, B. *J. Med. Chem.* **2004**; 47: 2393-2404
- [11] Sohma, Y.; Hayashy, Y.; Ito, T.; Matsumoto, H.; Kimura, T.; Kiso, Y. *J. Med. Chem.* **2003**; 46: 4124-4135
- [12] Santos, C. *Tese de Doutoramento, FCUP (2007)*; pp: 2-27
- [13] Santos, C.; Mateus, M.; Santos, A.; Moreira, R.; Gomes, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**; 15: 1595-1598
- [14] Santos, C.; Morais, J.; Gouveia, L.; Clerq, E.; Pannecouque, C.; Nielsen, C.; Steffansen, B.; Moreira, R.; Gomes, P. *Chem. Med. Chem.* **2008**; 3: 970-978
- [15] Santos, C.; Capela, R.; Pereira, C.; Valente, E.; Gouveia, L.; Pannecouque, C.; Clerq, E.; Moreira, R.; Gomes, P. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**; (doi: 10.1016/j.ejmech.2008.08)
- [16] Armand, V.; Louvel, J.; Pumain, R.; Ronco, G.; Villa, P. *Epilepsy Res.* **1995**; 22: 185-192
- [17] Radatz, M.; Ehlers, K.; Yagen, B.; Bialer, M.; Nau, H. *Epilepsy Res.* **1998**; 30: 41-48
- [18] Blain, H.; Baty, V.; Blain, A.; Tréchet, P.; Jeandel, C. *Eur. J. Int. Med.* **1999**; 10: 117-119
- [19] Peterson, G.; Naunton, M. *J. Clin. Pharm. Therapeutics* **2005**; 30: 417-421

- [20] Henry, T. *Psychopharmacology Bulletin* **2003**; 37: 5-16
- [21] Singh, G.; Driever, P.; Sander, J. *Brain* **2005**; 128: 7-17
- [22] Bialer, M. *J. Controlled Release* **1999**; 62: 187-192
- [23] Owens, J.; Nemeroff, C. *Psychopharmacology Bulletin* **2003**; 37: 17-24
- [24] Blotnik, S.; Bergman, F.; Bialer, M. *Eur. J. Pharm. Sci.* **1998**; 6: 93-98
- [25] Tasso, S.; Moon, S.; Blanch, L.; Estiú, G. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**; 12: 3857-3869
- [26] Chen, S-H.; Wu, H-L.; Shen, M-C.; Kou, H-S; *J. Chromatogr. B* **1999**; 729: 111-117
- [27] [www.netdoctor.co.uk/medicines/100002828.html](http://www.netdoctor.co.uk/medicines/100002828.html) (site visto em 29.08.08 pelas 11 horas)
- [28] [www.drugs.com/pro/zarontin.html](http://www.drugs.com/pro/zarontin.html) (site visto em 29.08.08 pelas 11 horas)
- [29] Masruha, M.; Marques, C.; Vilanova, L.; Alves, M.; Peres, M.; Rodrigues, M. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2005**; 76: 1604-1610
- [30] Lujten, M.; Speksnijder, E.; Alphen, N.; Westerman, A.; Heisterkamp, S.; Benthem, J.; Kreijl, C.; Beems, R.; Sterg, H. *Mutation Res.* **2006**; 596: 143-150
- [31] Kankuri, E.; Solantuturi, E.; Vapaatalo, H. *Trombosis Res.* **2003**; 110: 299-303
- [32] <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/eleventh/profiles/s143phen.pdf> (Visto em 25.08.08 pelas 14h58min)
- [33] Abbott, F.; Hellemans, K. *Behav. Brain. Res.* **2000**; 112: 177-186
- [34] Duggin, G.; *Kidney Int.* **1980**; 18: 553-561
- [35] Koutsaimanis, K.; Wardener, H.; *Br. Med. J.* **1970**; 4: 131-134
- [36] Meilslich, H.; Meier, M.; Nechamkin, H.; Muzyka, J.; Sharefkin, J. *Organic Chemistry*, McGraw-Hill, NY **1999**; pp: 96-99
- [37] Rothman, E.; Serota, S.; Swern, D. *J. Org. Chem.* **1964**; 29: 646-650
- [38] Davidson, D.; Skovronek, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**; 80:376-379
- [39] Yamada, S.; Yaguchi, S.; Matsuda, K. *Tetrahedron Lett.* **2002**; 43: 647-651
- [40] Reddy, C.; Mahipal, B.; Yaragorla, S. *Tetrahedron Lett.* **2007**; 48: 7528-7532
- [41] Bao, M.; Shimizu, M.; Shimada, S.; Tanaka, M. *Tetrahedron* **2003**; 59: 303-309

- [42] Andrus, M.; Li, W.; Keyes, R. *Tetrahedron Lett.* **1998**; 39: 5464-5468
- [43] Tomasini, C.; Villa, M. *Tetrahedron Lett.* **2001**; 42: 5211-5214
- [44] Carpino, L.; El-Faham, A. *Tetrahedron* **1999**; 55: 6813-6830
- [45] Schneider, S.; Bishop, P.; Salazar, M.; Bishop, O.; Anslyn, E. *Tetrahedron* **1998**; 54: 15063-15086
- [46] Drewry, D.; Gerritz, S.; Linn, J. *Tetrahedron Lett.* **1997**; 38: 3377-3380
- [47] Vale, N.; Matos, J.; Moreira, R.; Gomes, P. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**; 19: 1476-1490
- [48] Vale, N.; Matos, J.; Moreira, R.; Gomes, P. *Tetrahedron* **2008** (doi: 10.1016/j.tet.2008.09.058)
- [49] Gomes, P.; Araújo, M.; Rodrigues, M.; Vale, N.; Azevedo, Z.; Iley, J.; Chambel, P.; Morais, J.; Moreira, R. *Tetrahedron* **2004**; 60: 5551-5562
- [50] Vale, N.; Matos, J.; Gut, J.; Nogueira, F.; Rosário, V.; Rosenthal, P.; Moreira, R.; Gomes, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**; 18: 4150-4153
- [51] Chen, C.; Kuo, J.; Pawar, V.; Munot, Y.; Weng, S.; Ku, C.; Liu, C. *J. Org. Chem.* **2005**; 70: 1188-1197
- [52] Thompson, Q. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**; 73: 5841-5846
- [53] Montalbetti, C.; Falque, V. *Tetrahedron* **2005**; 61: 10827-10852
- [54] Han, S.; Kim, Y. *Tetrahedron* **2004**; 60: 2447-2467
- [55] Rayle, H.; Fellmeth, L. *Org. Process Res. Dev.* **1999**; 3: 172-176
- [56] Ho, G.; Mathre, D. *J. Org. Chem.* **1995**; 60: 2271-2273
- [57] Galema, S. *Chem. Soc. Rev.* **1997**; 26: 233-236
- [58] Bodanszky, M.; Bodanszky, A. *The practice of peptides synthesis*, Springer-Verlag; **1984**, pp: 122-123
- [59] Flynn, D.; Zelle, R.; Grieco, P. *J. Org. Chem.* **1983**; 48: 2424-2426
- [60] Taylor, S.; Friedl, J.; Grasse, Y.; Marolewski, A.; Pelton, E.; Poel, T.; Rezanka, D.; Whittaker, M. *J. Org. Chem.* **1993**; 58: 7304-7307
- [61] Dussert, A.; Audin, P.; Paris, J. *Synlett* **1993**; 507-508
- [62] Ye, B.; Qiao, L.-X.; Zhang, Y.-B.; Wu, Y.-L. *Tetrahedron* **1994**; 50: 9061-9066
- [63] Gelens, E.; Smeets, L.; Sliedregt, L.; Steen, B.; Kruse, C.; Leurs, R.; Orru, R. *Tetrahedron Lett.* **2005**; 46: 3751-3754
- [64] Gold, H.; Ax, A.; Vrang, L.; Samuelsson, B.; Karlém, A.; Hallberg, A.; Larhed, M. *Tetrahedron* **2006**; 62: 4671-4675

- [65] Hellal, M.; Bihel, F.; Mongeot, A.; Bourguignon, J. *Org. Biomol. Chem.* **2006**; 4: 3142-3146
- [66] Park, M.; Oh, H.; Cho, H.; Lee, K. *Tetrahedron Lett.* **2007**; 48: 1053-1057
- [67] Khadilkar, B.; Madyar, V. *Synth. Commun.* **2002**; 32: 1731-1734
- [68] Anderson, G.; Zimmerman, J. Callahan, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**; 86: 1839-1842
- [69] Decostaire, I.; Levièvre, D.; Zhang, H.; Delmas, A. *Tetrahedron Lett.* **2006**; 47: 7057-7060
- [70] Ortiz-Acevedo, A.; Dieckmann, G. *Tetrahedron Lett.* **2004**; 45: 6795-6798