

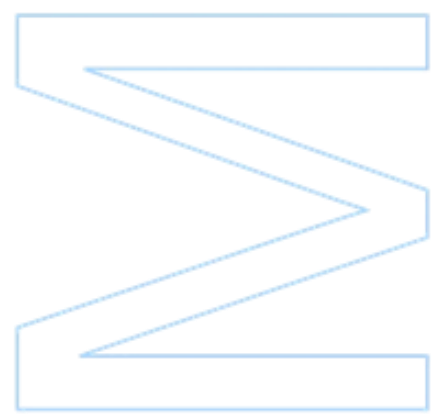
Síntese e Avaliação Biológica de Prolinomiméticos do PLG com Potencial Atividade Neuroprotetora

Ivo Emanuel Sampaio Dias

Dissertação de Mestrado em Bioquímica apresentada à

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

2013





U.PORTO

 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

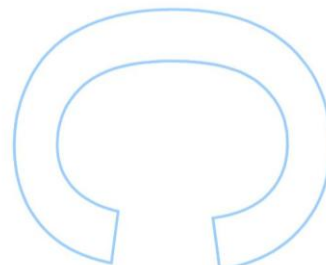
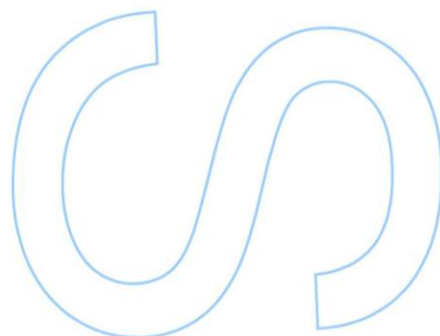
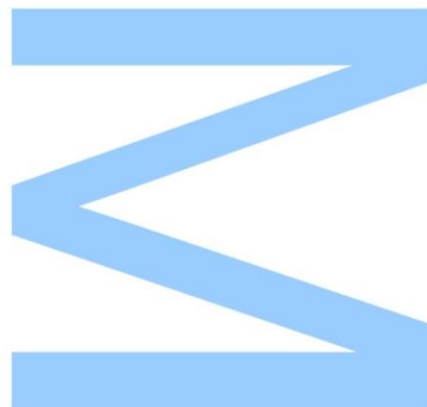
U.PORTO

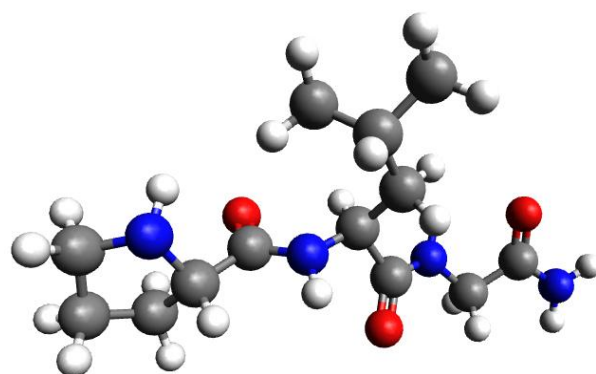
FC FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto,
____/____/____





Síntese e Avaliação Biológica de Prolinomiméticos do PLG com Potencial Atividade Neuroprotetora

Ivo Emanuel Sampaio Dias

Mestrado em Bioquímica

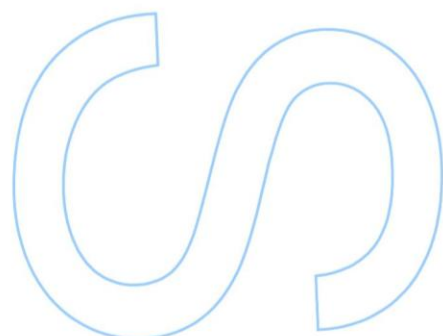
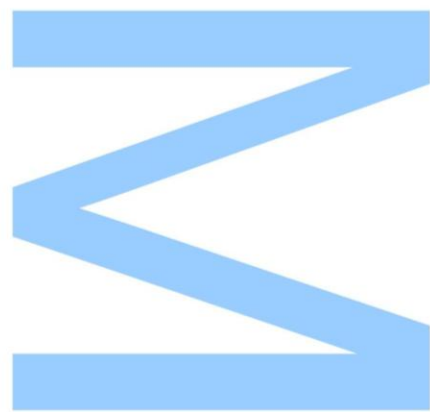
Departamento de Química e Bioquímica
2013

Orientador

José Enrique Rodríguez Borges, Professor Auxiliar com Agregação,
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Coorientador

Xerardo García Mera, Professor Titular,
Faculdade de Farmácia da Universidade de Santiago de Compostela



*O conhecido é finito, o desconhecido infinito;
intelectualmente estamos numa ilha no meio dum oceano ilimitado de inexplicabilidade.
O nosso dever em cada geração é recuperar um pouco mais de terra.*

T. H. Huxley, 1887

Agradecimientos

Os meus mais sinceros agradecimentos ao Prof. Doutor José Enrique Rodríguez Borges por ter-me recebido no seu grupo de investigação e por me acompanhar durante o meu percurso académico. Valorizo muito o esforço e preocupação demonstrados para que reunisse todas as condições para o desenvolvimento do meu trabalho, num ambiente problematizador e recompensador. Obrigado por todos os ensinamentos e por receber sempre de forma tão cordial as minhas ideias, sugestões e questões. É para mim uma honra a oportunidade de trabalhar consigo e poder contar com a sua amizade.

Al Prof. Doctor Xerardo García Mera, mi supervisor de ERASMUS, por me recibir de forma tan gentil en su grupo de investigación y por me influenciar con su metodología de trabajo, su sentido de organización y de estética. Gracias por todas sus enseñanzas y por toda su disponibilidad. Por nunca me dejar sin respuesta y por darme bagaje para buscar y construir las respuestas a mis questiones. Espero poder contar con su amistad por mi vida academica e personal.

A la Prof. Doctora Olga Caamãno por su amabilidad y ayuda sin reservas. Gracias por su colaboración para unos de los mejores ambientes en los que he trabajado.

À Doutora Joana Ferreira da Costa, pela forma cordial como me recebeu. Pela paciência com que partilhou a sua experiência enquanto investigadora na área da síntese peptídica. Pelo apoio incessante, boa disposição e por toda a preocupação que demonstrou para que atingisse uma boa postura laboratorial. Estou muito grato por todos os ensinamentos que foram de extrema importância para que este trabalho chegasse a bom porto. Não posso deixar de agradecer a companhia nos momentos de enchimento dos balões de hidrogénio nos dias de muito frio e, claro, pelo tempo de espera à hora da saída. Obrigado por tornar a minha estadia melhor.

A Xosé, por toda la disponibilidad y rigor de su trabajo. Muchas gracias por tornar todo el mío menos pesado. Por toda su simpatía y dedicación se queda mi respecto.

Aos colegas do laboratório 2.24, por todo o companheirismo e boa disposição, em especial ao Doutor Fábio Rizzo Aguiar, por todo o apoio durante o meu percurso neste laboratório. Agradeço veementemente os teus ensinamentos e questões pertinentes.

À Prof. Doutora Paula Gomes por ter aceite fazer parte do júri.

À licenciada Bruna Machado, por me acompanhar desde sempre, pela inesgotável amizade e carinho. Uma das pessoas mais importantes, com quem posso contar pela vida fora. Obrigado por todo o teu apoio e pela tua paciência.

À Mestre Rosana Cardoso Volpati, por toda a amizade ao longo de largos anos. Obrigado por acreditares nas minhas capacidades e mostrares-me um mundo melhor visto pelos teus olhos.

Ao Antônio Gonçalves, por todo o apoio, sugestões, correções e envolvimento no meu trabalho de forma a superar-me e procurar sempre mais. Sem dúvida uma das pessoas mais inteligentes que conheci. Agradeço veementemente por desenformares o meu pensamento, revelando-me um pouco da tua ciência.

À minha família, o meu *núcleo* sólido. Obrigado por me permitirem chegar mais longe, cada um à sua maneira e por me oferecerem uma base sólida para edificar todos os meus sonhos, projetos e ambições.

À Sandra Dias, por toda a nossa cumplicidade, desabafos e pela confiança mútua. Por ser uma segunda mãe e carregar-me desde sempre, pelo orgulho que nutres por todos nós. Obrigado por me teres incentivado a enveredar pela Bioquímica, pelos teus conselhos, por me conheceres.

À Marisa Dias, por despertar em mim o gosto pelo estudo e incentivar-me sempre a procurar fazer tudo com gosto e dedicação. Por me deixar fazer parte das suas *relíquias*.

À Solange Dias, por ser a minha confidente e pela nossa cumplicidade, por me conhecer tão bem sem que seja, muitas vezes, necessário falar.

Ao Miguel Dias Monteiro, por no alto dos teus cinco anos, entenderes a importância do trabalho do tio e compreenderes as brincadeiras adiadas. Nada mais recompensador do que o momento em pude dar a resposta que tanto ansiavas à pergunta: "Já terminaste o teu trabalho?". Obrigado pela tua felicidade genuína e contagiante, por me recordares o que é ser criança.

À Maria Dias Monteiro, por mostrar-me um sorriso uma vez por outra, sei que provavelmente não recordarás a minha pequena ausência, mas eu nunca esquecerei os sorrisos.

À minha avó, Maria Dias, o meu exemplo de força e persistência.

Ao meu pai, Amadeu Dias, por me deixar ver através do óbvio e tornar tudo à minha volta mais cómodo e, essencialmente, por saber sempre o que preciso sem que seja preciso pedir.

À minha mãe, Alice Dias, a quem dedico todo o meu trabalho e por quem nutro o maior respeito e admiração. Obrigado pela dedicação incondicional e por teres sempre uma solução para todos e, acima de tudo, por me mostrares o que é mais importante, a família. Obrigado por representares o meu maior modelo de conduta.

A todos, a minha eterna gratidão.

I. Índice Geral

ÍNDICE GERAL

I. Índice Geral.....	I
II. Índice de Figuras.....	IX
III. Índice de Esquemas	XIII
IV. Índice de Tabelas	XVII
V. Glossário.....	XXI
VI. Relação de Compostos Descritos	XXIX
VII. Resumo / Abstract / Resumen	XXXV
RESUMO	XXXVII
ABSTRACT.....	XXXIX
RESUMEN.....	XLI
CAPÍTULO 1 - Introdução Teórica	1
1.1. PROLINOMIMÉTICOS	3
1.1.1. Antecedentes	3
1.1.2. Prolinomiméticos e a Síntese de Fármacos	6
1.2. ATIVIDADE NEUROPROTETORA DO TRIPÉPTIDO L-PROLIL-L- LEUCILGLICINAMIDA (PLG)	10
1.2.1. Antecedentes	10
1.2.2. Síndromes Neurodegenerativas.....	11
1.2.2.1. Aspectos Gerais.....	11
1.2.2.2. Síndrome de Parkinson.....	14
1.3. CIRCUITOS E RECETORES DOPAMINÉRGICOS.....	31
1.3.1. Antecedentes	31
1.3.2. Circuitos dopaminérgicos.....	31
1.3.3. Recetores dopaminérgicos.....	34
1.3.3.1. Família e estrutura básica dos recetores dopaminérgicos.....	34
1.3.3.2. Recetores da Família D ₂	37
1.4. PEQUENOS PÉPTIDOS COM ATIVIDADE NEUROPROTETORA	38
1.4.1. Aspectos Gerais.....	38
1.4.2. Introdução aos péptidos.....	39
1.4.2.1. Ligação peptídica	39
1.4.2.2. Estrutura dos péptidos	41
1.4.2.2.1. Estrutura secundária dos péptidos	42

1.5. PLG COMO MODULADOR ALOSTÉRICO DE RECETORES DOPAMINÉRGICOS D ₂ E POTENCIAL FÁRMACO NO TRATAMENTO DE PATOLOGIAS NEURODEGENERATIVAS DO SNC	47
1.5.1. Neuropéptido PLG	47
1.5.2. PLG como ligando alostérico	49
1.5.3. Prolinomiméticos do PLG	51
1.6. ÂMBITO DO PROJETO E OBJETIVOS	54
1.6.1. Âmbito do Projeto	54
1.6.2. Objetivos	54
1.6.2.1. Síntese de prolinomiméticos	55
1.6.2.2. Síntese dos tripéptidos prolinomiméticos do PLG	55
1.6.2.3. Avaliação Biológica dos Prolinomiméticos	56
1.7. PLANO DE TRABALHOS	57
1.7.1. Plano de Síntese das Pseudoprolinas	58
1.7.2. Plano de Síntese dos Prolinomiméticos do PLG	59
CAPÍTULO 2 - Parte Teórica e Discussão de Resultados	61
2.1. DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS PROLINOMIMÉTICOS	63
2.1.1. Planeamento Sintético	63
2.1.2. Aminoácidos não naturais: Síntese do ácidos carboxílicos 7-exo e 8-exo	64
2.2. SÍNTESE DE AZABICICLOS COMO PRECURSORES PROLINOMIMÉTICOS.....	65
2.2.1. Reação de Diels-Alder	65
2.2.2. Reação de aza-Diels-Alder: Síntese dos adutos 4-exo/5-endo	71
2.2.2.1. Síntese do 2-hidroxi-2-metoxietanoato de metilo (2): precursor do glioxilato de metilo.....	75
2.2.2.2. Síntese dos adutos 4-exo/5-endo	78
2.2.3. Síntese de <i>cis</i> -dióis vicinais.....	81
2.2.3.1. Síntese de ($\pm$)- <i>exo</i> -2-benzil-5,6-di-hidroxi-2-azabíciclo[2.2.1]heptano-3-carboxilato de metilo (6-exo)	83
2.2.4. Síntese dos ácidos carboxílicos 7-exo e 8-exo	87
2.2.4.1. Hidrólise de ésteres	87
2.2.4.2. Hidrólise por catálise ácida	87
2.2.4.3. Hidrólise por catálise alcalina	88
2.2.4.4. Síntese do ácido ($\pm$)- <i>exo</i> -2-benzil-5,6-di-hidroxi-2-azabíciclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (7-exo) e do ácido ($\pm$)- <i>exo</i> -2-benzil-2-azabíciclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (8-exo).....	89
2.3. SÍNTESE DE PÉPTIDOS	94
2.3.1. Fundamentos da Síntese Péptidica	94

2.3.2. Natureza química e estereoquímica dos aminoácidos	94
2.3.3. Abordagem Genérica de Proteção e Formação da ligação peptídica	95
2.3.4. Metodologia genérica para a formação de ligações peptídicas	96
2.3.5. Grupos Protetores	98
2.3.5.1. Proteção do grupo amina	98
2.3.5.2. Proteção do grupo carboxílico	101
2.3.6. Agentes acilantes e reagentes de acoplamento	102
2.3.6.1. Agentes acilantes	103
2.3.6.2. Acoplamento usando carbodiimidas	107
2.3.6.3. Ésteres Ativos	109
2.3.6.4. Sais de fosfônio e amidínio/urônio	110
2.3.7. Importância da Quiralidade	113
2.3.7.1. Mecanismos de racemização	114
2.3.8. Síntese dos dipéptidos 11a-c	115
2.3.9. Desproteção dos dipéptidos 11a-c : síntese dos dipéptidos 12a-c	120
2.3.10. Síntese dos tripéptidos prolinomiméticos 13a-c/13a'-c'	124
2.3.11. Hidrogenação	129
2.3.11.1. Hidrogenação Catalítica	129
2.3.11.2. Processo de hidrogenação catalítica	132
2.3.12. Hidrogenólise catalítica	133
2.3.13. Hidrogenação e <i>N</i> -desbenzilação catalítica dos tripéptidos 13a-c/13a'-c' : síntese dos tripéptidos desprotegidos 14a-c/14a'-c'	134
2.3.14. Hidrólise dos ésteres 14a-c/14a'-c' : síntese dos tripéptidos 15a-c/15a'-c'	138
2.4. VIA DE SÍNTESE COMPLEMENTAR PARA A SÉRIE P*LG	143
2.4.1. Reação de aza-Diel-Alder: síntese dos adutos 17-exo e 18-endo	145
2.4.2. Síntese de ($\pm$)- <i>exo</i> -2-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)-2-azabíciclo[2.2.1]heptano-3-carboxilato de etilo (19-exo)	149
2.4.3. Síntese do ácido ($\pm$)- <i>exo</i> -2-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)-2-azabíciclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (20-exo)	152
2.4.4. Via de síntese alternativa para o tripéptido 15a/15a'	155
2.4.4.1. Síntese dos tripéptidos 21a/21a'	155
2.4.4.2. Síntese dos tripéptidos 22a/22a'	158
2.4.4.3. Síntese dos tripéptidos 15a/15a'	162
2.5. CONSIDERAÇÕES NA SÍNTESE PEPTÍDICA	163
CAPÍTULO 3 - Parte Experimental	169
3.1. Aspectos Gerais	171

3.2. SÍNTESE DOS PRECURSORES PROLINOMIMÉTICOS	174
3.2.1. Síntese de 2-hidroxi-2-metoxiacetato de metilo (2)	174
3.2.2. Síntese de ($\pm$)- <i>endo</i> -2-benzil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carboxilato de metilo (4-<i>exo</i>) e ($\pm$)- <i>exo</i> -2-benzil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carboxilato de metilo (5-<i>endo</i>)	177
3.2.3. Síntese de ($\pm$)- <i>exo</i> -2-benzil-5,6-di-hidroxi-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxilato de metilo (6-<i>exo</i>)	183
3.2.4. Síntese do ácido ($\pm$)- <i>exo</i> -2-benzil-5,6-di-hidroxi-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (7-<i>exo</i>)	186
3.2.5. Síntese do ácido ($\pm$)- <i>exo</i> -2-benzil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carboxílico (8-<i>exo</i>)	189
3.2.6. ($\pm$)- <i>exo</i> -2-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carboxilato de etilo (17-<i>exo</i>) e ($\pm$)- <i>endo</i> -2-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carboxilato de etilo (18-<i>endo</i>)	192
3.2.7. Síntese de ($\pm$)- <i>exo</i> -2-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxilato de etilo (19-<i>exo</i>)	200
3.2.8. Síntese do ácido ($\pm$)- <i>exo</i> -2-(<i>terc</i> -butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (20-<i>exo</i>)	204
3.3. SÉRIE P*LG	207
3.3.1. Síntese de (<i>terc</i> -butoxicarbonil)-L-leucilglicinato de metilo (11a)	207
3.3.2. Síntese do trifluoracetato de L-leucilglicinato de metilo amónio (12a)	211
3.3.3. Síntese do {(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-2-benzil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carbonil}-L-leucilglicinato de metilo (13a) e do {(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2-benzil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carbonil}-L-leucilglicinato de metilo (13a')	214
3.3.4. Síntese do {(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-leucilglicinato de metilo (14a) e do {(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-leucilglicinato de metilo (14a')	219
3.3.5. Síntese de {(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-leucilglicina (15a) e de {(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-leucilglicina (15a')	224
3.3.6. Síntese de {(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-2-(<i>terc</i> -butiloxycarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-leucilglicinato de metilo (21a) e de {(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-(<i>terc</i> -butiloxycarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-leucilglicinato de metilo (21a')	229
3.3.7. Síntese de {(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-2-(<i>terc</i> -butiloxycarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-leucilglicina (22a) e de {(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-(<i>terc</i> -butiloxycarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-leucilglicina (22a')	234
3.3.8. Síntese de {(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-leucilglicina (15a) e de {(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-leucilglicina (15a')	239
3.4. SÉRIE P*GL	240
3.4.1. Síntese de (<i>terc</i> -butoxicarbonil)glicil-L-leucinato de metilo (11b)	240
3.4.2. Síntese do trifluoracetato de glicil-L-leucinato de metilo amónio (12b)	244

3.4.3. Síntese de {(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-2-benzil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carbonil}-glicil-L-leucinato de metilo (13b) e de {(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2-benzil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carbonil}-glicil-L-leucinato de metilo (13b')	247
3.4.4. Síntese de {(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-glicil-L-leucinato de metilo (14b) e de {(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-glicil-L-leucinato de metilo (14b').....	251
3.4.5. Síntese de {(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-glicil-L-leucina (15b) e de {(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-glicil-L-leucina (15b')	255
3.5. SÉRIE P*VA.....	259
3.5.1. Síntese do (<i>terc</i> -butoxicarbonil)-L-valil-L-alaninato de metilo (11c).....	259
3.5.2. Síntese do trifluoracetato de L-valil-L-alaninato de metilo amónio (12c).....	263
3.5.3. Síntese de {(1 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2-benzil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carbonil}-L-valil-L-alaninato de metilo (13c) e de {(1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-2-benzil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carbonil}-L-valil-L-alaninato de metilo (13c')	266
3.5.4. Síntese de {(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-valil-L-alaninato de metilo (14c) e de {(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-valil-L-alaninato de metilo (14c')	270
3.5.5. Síntese de {(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-valil-L-alanina (15c) e de {(1 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-valil-L-alanina (15c'). 274	
CAPÍTULO 4 - Ensaios Farmacológicos	279
4.1 ENSAIOS DE COMPETIÇÃO AGONISTA/ANTAGONISTA DO RECETOR D ₂ DE DOPAMINA	281
4.1.1. Material e Métodos.....	281
4.1.1.1. Preparação de membranas	282
4.1.1.2. Ensaios de união ao recetor D ₂ humano	282
4.1.2. Resultados	282
CAPÍTULO 5 - Considerações Finais	285
6. Anexos	289

II. Índice de Figuras

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Os principais circuitos dopaminérgicos: <i>via nigroestriada</i> (a vermelho); <i>via meso-límbica</i> (a preto); <i>via mesocortical</i> (a azul); <i>via tuberoinfundibular</i> (a roxo)	33
Figura 1.2: Representação esquemática de um recetor de dopamina acoplado a proteínas G ...	34
Figura 1.3: Representação esquemática de um recetor de dopamina evidenciando a sua organização em sete domínios.....	36
Figura 1.4: Representação dos ângulos diedros <i>phi</i> , ϕ , referente à rotação em torno da ligação N-C $_{\alpha}$ e <i>psi</i> , ψ , referente à rotação em torno da ligação C $_{\alpha}$ -C	41
Figura 1.5: Níveis de hierarquização estrutural das cadeias peptídicas, desde a sua sequência primária até à estrutura quaternária	42
Figura 1.6: Representação de um gráfico de Ramachandran contendo os valores de ϕ e ψ para várias estruturas. Apesar de ser possível a formação de hélices- α sinistrorsas, estas não surgem em proteínas	43
Figura 1.7: Representação de uma hélice- α (dextrorsa).....	44
Figura 1.8: Representação de uma folha- β (antiparalela) e de uma folha- β pregueada (paralela). As setas indicam o a direção e o sentido das porções das cadeias apresentadas (N-terminal $\rightarrow$ C-terminal)	44
Figura 1.9: Representação de uma volta- β (à esquerda) e de uma volta- γ (à direita)	45
Figura 1.10: Representação esquemática relativa aos modos de ação do efeito alostérico.....	49
Figura 1.11: Conformação em volta- β do PLG, incluindo as ligações hidrogénio intramoleculares	51
Figura 2.1: Interação entre as orbitais LUMO de um dienófilo com as HOMO de um dieno no processo de cicloadição	69
Figura 2.2: Isomeria <i>endo/exo</i> em sistemas de norbornano	69
Figura 2.3: Interações orbitais primárias e secundárias no estado de transição <i>exo</i> e <i>endo</i>	70
Figura 2.4: Principais interações π (primárias e secundárias) na definição estereoquímica (<i>exo/endo</i>) dos adutos resultantes de reação de aza-Diels-Alder na obtenção de sistemas 2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-enos	71
Figura 2.5: Natureza estereoquímica dos α -aminoácidos	95
Figura 2.6: Abordagem geral de proteção e desproteção na formação de ligações peptídicas num sistema ortogonal. R : cadeia lateral; GP : Grupo protetor	97
Figura 2.7: Formas mais comuns de ácidos carboxílicos ativados, por ordem de aumento de complexidade, também correspondendo, à exceção dos anidridos mistos, à ordem na qual os métodos se tornaram disponíveis	102
Figura 2.8: Espectro de ^1H -RMN do racemato 17-exo evidenciando duplicação de sinais.....	147
Figura 2.9: Espectro de massa (ESI-MS) do cicloaduto 19-exo	151
Figura 2.10: Estudo de fragmentação de 19-exo por ESI-MS ^{n} : (A) MS ^{2} ; (B) MS ^{3}	152
Figura 2.11: Espectro de massa (ESI-MS) do cicloaduto 20-exo	154

Figura 2.12: Estudo de fragmentação de 20-exo por ESI-MS ⁿ : (A) MS ² ; (B) MS ³	154
Figura 2.13: Espectro de massa (ESI-MS) dos tripéptidos 21a/21a'	157
Figura 2.14: Estudo de fragmentação de 21a/21a' por ESI-MS ²	158
Figura 2.15: Espectro de massa (ESI-MS) dos tripéptidos 22a/22a'	161
Figura 2.16: Estudo de fragmentação de 22a/22a' por ESI-MS ²	161
Figura 2.17: Espectro de ¹ H-RMN da mistura dos diastereoisómeros 13a/13a' , com expansão dos singletos relativos aos ésteres metílicos utilizados para estabelecer a proporção diastereoisomérica (1:1.4).....	163
Figura 2.18: Espectro de ¹³ C-RMN da mistura dos diastereoisómeros 13a/13a' , com expansão a campos altos, evidenciando a duplicação de sinais.....	164
Figura 2.19: Espectro de ¹ H-RMN da mistura dos diastereoisómeros 14c/14c' , com expansão dos sinais relativos às amidas, com ênfase para a presença dos diastereoisómeros (a vermelho) e respectivos rotâmeros (a azul).....	164
Figura 2.20: Espectro de ¹³ C-RMN da mistura dos diastereoisómeros 14c/14c' , com expansão dos sinais a campos altos, com ênfase para a presença de rotâmeros (a azul)	165
Figura 2.21: Espectro de ¹ H-RMN da mistura dos diastereoisómeros 21a/21a' , com expansão dos singletos relativos aos ésteres metílicos utilizados para estabelecer a proporção diastereoisomérica (1:1.4).....	166
Figura 2.22: Espectro de ¹³ C-RMN da mistura dos diastereoisómeros 21a/21a' , com destaque para os sinais a campos mais altos onde se verifica um elevado número de rotâmeros.....	166
Figura 2.23: Espectro de IV do dipéptido 11a , com destaque para a duplicação das bandas relativas ao estiramento C=O	167
Figura 3.1: Dipéptido (<i>terc</i> -butoxicarbonil)-L-leucilglicinato de metilo. Exemplo de numeração adotada na atribuição dos protões (ou grupo de protões) e dos carbonos nas estruturas peptídicas. A numeração para cada resíduo de α -aminoácido constituinte da cadeia peptídica inicia-se no carbono do seu grupo carbonilo.....	173

III. Índice de Esquemas

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1.1: Biossíntese da L-prolina a partir do L-glutamato	4
Esquema 1.2: Biossíntese da L-prolina a partir da L-arginina.....	5
Esquema 1.3: Representação esquemática da biossíntese de dopamina a partir da L-tirosina... 18	
Esquema 1.4: Representação esquemática simplificada do metabolismo da dopamina. COMT: catecol-O-metiltransferase, MAO-B: monoamina oxidase B.....	19
Esquema 1.5: Esquema-síntese do metabolismo da L-dopa e da dopamina e principais enzimas envolvidos nesses processos evidenciando-se estes como os atuais alvos terapêuticos na SP através das setas a vermelho.....	25
Esquema 1.6: Análise retrossintética dos prolinomiméticos do PLG	57
Esquema 1.7: Via de síntese proposta para a preparação dos prolinomiméticos 7-exo e 8-exo 58	
Esquema 1.8: Via de síntese proposta para a preparação dos tripéptidos prolinomiméticos respetiva às série P*LG, P*GL e P*VA.....	59
Esquema 2.1: Reação de aza-Diels-Alder entre a imina do glioxilato de metilo e o CPD	64
Esquema 2.2: Via de síntese proposta para a preparação dos prolinomiméticos 7-exo e 8-exo 64	
Esquema 2.3: Reação de Diels-Alder entre sistemas π demonstrando o rearranjo dos eletrões π e a formação de novas ligações σ	65
Esquema 2.4: Representação das orbitais da reação de Diels-Alder entre o buta-1,3-dieno e o eteno	66
Esquema 2.5: Formação do dicitopentadieno por dimerização do ciclopentadieno através da reação de Diels-Alder.....	67
Esquema 2.6: Cicloadição atípica entre o quadriciclano e o DMAD operando por um anel de ciclopropano para originar a respetiva 1,2-dizetidina	67
Esquema 2.7: Reação de Diels-Alder entre o buta-1,3-dieno (na conformação <i>s-cis</i>) e o <i>cis/trans</i> -maleato de dietilo evidenciando a regra de Alder-Stein, com retenção da estereoquímica da ligação dupla (<i>cis/trans</i>) do dieno no aduto final	68
Esquema 2.8: Esquema retrossintético para eventuais <i>vias</i> de síntese da piperidina.....	72
Esquema 2.9: Via de síntese para obtenção da imina protonada do glioxilato de metilo	73
Esquema 2.10: Formação de cicloadutos por reação de aza-Diels-Alder com indicação das possíveis aproximações (<i>exo</i> e <i>endo</i>) e faces de ataque (<i>re</i> e <i>si</i>) entre o ciclopentadieno e a imina protonada do glioxilato de metilo.....	74
Esquema 2.11: Equilíbrio entre o 2-hidroxi-2-metoxietanoato de metilo e o respetivo glioxilato	75
Esquema 2.12: Síntese do hemiacetal 2 com formação do éter metílico a partir da reação entre o glioxilato de metilo e metanol.....	76
Esquema 2.13: Síntese do hemiacetal 2 com formação do éster metílico a partir da reação entre o glioxilato de metilo e metanol	76

Esquema 2.14: Mecanismo do ciclo catalítico de di-hidroxição respeitante ao aduto <i>exo</i> com OsO ₄ utilizando a NOMM como co-oxidante para regeneração do catalisador.....	85
Esquema 2.15: Mecanismo de hidrólise catalisada por ácido (A _{AC2}).....	88
Esquema 2.16: Mecanismo de hidrólise catalisada por base (B _{AC2}).....	89
Esquema 2.17: Rearranjo de tipo McLafferty proposto para o composto 7-<i>exo</i>	92
Esquema 2.18: Ativação da função ácido carboxílico e consequente acoplamento peptídico com um α -aminoácido contendo o grupo amina livre e a função ácido carboxílico suprimida. GP^N : grupo protetor de aminas; GP^O : grupo protetor de ácidos carboxílicos.....	96
Esquema 2.19: Mecanismo de desproteção acidolítica do grupo Boc com TFA.....	99
Esquema 2.20: Mecanismo de halogenação de ácidos carboxílicos com SOCl ₂ para obtenção dos correspondentes cloretos de acilo	104
Esquema 2.21: Mecanismo de formação de ligações peptídicas a partir de azidas de <i>N</i> -alcoxycarbonilaminoácidos.....	105
Esquema 2.22: Ativação do ácido carboxílico <i>via</i> formação de acilimidazole por reação com o carbonildiimidazole (CDI)	105
Esquema 2.23: Formação de amidas terciárias obtidas por reação de aminas secundárias com carbonilimidazole e iodometano	106
Esquema 2.24: Formação de anidridos mistos de <i>N</i> -alcoxycarbonilaminoácidos <i>via</i> cloroformatos de alquilo, denotando a tracejado, as reações secundárias comuns utilizando esta metodologia de síntese peptídica: formação da 2-alcoxi-5(4 <i>H</i>)-oxazolona e o respetivo álcool acompanhada por descarboxilação e ainda formação de um carbamato	107
Esquema 2.25: Acoplamento peptídico usando DCC	107
Esquema 2.26: Mecanismo de ativação pelo 1-hidroxi-1 <i>H</i> -benzotriazole (HOBt)	110
Esquema 2.27: Mecanismo geral da reação de condensação peptídica usando TBTU e DIEA como base terciária.....	113
Esquema 2.28: Mecanismo de formação de oxazol-5(4 <i>H</i>)-onas. B : base.....	114
Esquema 2.29: Mecanismo de remoção direta de um protão. X : grupo protetor; Y : grupo ativante; B : base	114
Esquema 2.30: Mecanismo de hidrogenação catalítica na redução da olefina entre C-5 e C-6 dos adutos bicíclicos. Os átomos de hidrogénio ligam-se ao centro metálico presente na superfície do catalisador e são transferidos aos carbonos insaturados do alceno adsorvido à superfície do mesmo	133
Esquema 2.31: <i>Via</i> de síntese proposta para a preparação dos cicloadutos prolinomiméticos 20-<i>exo</i>	144
Esquema 2.32: <i>Via</i> de síntese alternativa proposta para a preparação de 15a/15a'	144

IV. Índice de Tabelas

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Bandas de IV mais características para os cicloadutos 4-exo e 5-endo	79
Tabela 2.2: Desvios químicos de ^1H -RMN para os cicloadutos 4-exo e 5-endo	79
Tabela 2.3: Desvios químicos de ^{13}C -RMN para os cicloadutos 4-exo e 5-endo	80
Tabela 2.4: Resultados obtidos na preparação de 6-exo	84
Tabela 2.5: Resultados obtidos na preparação dos aminoácidos prolinomiméticos 7-exo e 8-exo	91
Tabela 2.6: Resultados obtidos na preparação dos dipéptidos protegidos 11a-c	116
Tabela 2.7: Bandas de IV mais características para os dipéptidos protegidos 11a-c	117
Tabela 2.8: Desvios químicos de ^1H -RMN mais característicos para os dipéptidos protegidos 11a-c	118
Tabela 2.9: Desvios químicos de ^{13}C -RMN mais característicos para os dipéptidos protegidos 11a-c	119
Tabela 2.10: Picos mais característicos de ESI-MS para os dipéptidos protegidos 11a-c	120
Tabela 2.11: Resultados obtidos na preparação dos dipéptidos desprotegidos 12a-c	121
Tabela 2.12: Bandas de IV mais características para os dipéptidos desprotegidos 12a-c	121
Tabela 2.13: Desvios químicos de ^1H -RMN mais característicos para os dipéptidos desprotegidos 12a-c	122
Tabela 2.14: Desvios químicos de ^{13}C -RMN mais característicos para os dipéptidos desprotegidos 12a-c	123
Tabela 2.15: Picos mais característicos de ESI-MS para os dipéptidos desprotegidos 12a-c ..	123
Tabela 2.16: Resultados obtidos na preparação dos tripéptidos protegidos 13a-c/13a'-c'	125
Tabela 2.17: Bandas de IV mais características para os tripéptidos protegidos 13a-c/13a'-c'	125
Tabela 2.18: Desvios químicos de ^1H -RMN mais característicos para os tripéptidos protegidos 13a-c/13a'-c'	126
Tabela 2.19: Desvios químicos de ^{13}C -RMN mais característicos para os tripéptidos protegidos 13a-c/13a'-c'	127
Tabela 2.20: Picos mais característicos de ESI-MS para os tripéptidos protegidos 13a-c/13a'-c'	128
Tabela 2.21: Resultados obtidos na síntese dos tripéptidos desprotegidos 14a-c/14a'-c'	135
Tabela 2.22: Bandas de IV mais características para os tripéptidos desprotegidos 14a-c/14a'-c'	136
Tabela 2.23: Desvios químicos de ^1H -RMN mais característicos para os tripéptidos desprotegidos 14a-c/14a'-c'	136
Tabela 2.24: Desvios químicos de ^{13}C -RMN mais característicos para os tripéptidos desprotegidos 14a-c/14a'-c'	137

Tabela 2.25: Picos mais característicos de ESI-MS para os tripéptidos desprotegidos 14a-c/14a'-c'	138
Tabela 2.26: Resultados obtidos na síntese dos tripéptidos 15a-c/15a'-c'	139
Tabela 2.27: Bandas de IV mais características para os tripéptidos 15a-c/15a'-c'	140
Tabela 2.28: Desvios químicos de ^1H -RMN mais característicos para os tripéptidos 15a-c/15a'-c'	140
Tabela 2.29: Desvios químicos de ^{13}C -RMN mais característicos para os tripéptidos 15a-c/15a'-c'	141
Tabela 2.30: Picos mais característicos de ESI-MS para os tripéptidos 15a-c/15a'-c'	142
Tabela 2.31: Bandas de IV mais características para os cicloadutos 17-exo e 18-endo	146
Tabela 2.32: Desvios químicos de ^1H -RMN mais característicos para os cicloadutos 17-exo e 18-endo	146
Tabela 2.33: Desvios químicos de ^{13}C -RMN mais característicos para os cicloadutos 17-exo e 18-endo	148
Tabela 2.34: Picos mais característicos de ESI-MS para os cicloadutos 17-exo e 18-endo	149
Tabela 4.1: Compostos prolinomiméticos utilizados nos ensaios biológicos de competição agonista/antagonista utilizando a técnica de fixação de ligandos para determinação do efeito modulador alostérico de recetores D_2 de dopamina	283

V. Glossário

GLOSSÁRIO

A $\equiv$ Ala	L-alanina
A_{AC}2	Hidrólise de ésteres catalisada por ácido
AC	Adenilato ciclase
ACh	Acetilcolina
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
ADN	Ácido 2-desoxirribonucleico
ADTN	2-amino-6,7-di-hidroxi-1,2,3,4-tetra-hidronaftaleno
AngII	Angiotensina II
Alloc	Aliloxicarbonilo
AMP	Monofosfato de Adenosina
ATA $\equiv$ TFA	Ácido trifluoroacético
ATP	Trifosfato de Adenosina
ATR	Reflexão Atenuada Total, do inglês <i>Attenuated Total Reflection</i>
B_{AC}2	Hidrólise de ésteres catalisada por base
BDDC	1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida
BHE	Barreira hematoencefálica
Bn	Grupo benzilo
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
Boc₂O	Anidrido de <i>tert</i> -butoxicarbonilo
BOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfónio
BOP-Cl	Cloreto do ácido bis(2-oxo-3-oxazolidino)fosfínico
cAMP	AMP cíclico
CC	Cromatografia de adsorção em coluna
CDI	Carbonildiimidazol
CF	Cloroformiato de alquilo
COMT	Catecol-O-metiltransferase
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CPD	Ciclopentadieno
C_q	Carbono quaternário
D	Dupleto
DA	Dopamina
DATATOP	<i>Deprenyl and Tocophenol Antioxidative Therapy of Parkinsonism</i>
DCC	Diciclo-hexilcarbodiimida

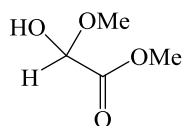
DCU	Diciclo-hexilureia
dd	Duplo duplete
DDC	Levodopa descarboxilase
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DFT	Teoria do Funcional de Densidade
DHB	Di-hidrobiopterina
dH₂O	Água desionizada
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DIEA	<i>N</i> -etil- <i>N,N</i> -diisopropilamina
DMAD	Azodicarboxilato de dimetilo
DMF	Dimetilformamida
DMSO-<i>d</i>6	Dimetilsulfóxido <i>hexa</i> -deuterado
DOPAC	Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético
dq	Duplo quarteto
dt	Duplo tripleto
DT	Discinesia Tardia
EC	<i>Enzyme Commission</i>
ECP	Estimulação Cerebral Profunda
EDC	1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EI⁺-MS	Espectrometria de Massa com ionização por Impacto Eletrónico
EMAR	Espectroscopia de Massa de Alta Resolução
EMEMF12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12</i>
eq.	Equivalentes estequiométricos
ESI-MS	Espectrometria de Massa com ionização por <i>Electrospray</i>
Et₃N	Trietilamina
EtOH	Etanol
FBS	Soro Fetal Bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonilo
Fmoc-OSu	<i>N</i> -(9-fluorenilmetoxycarbonilo)succinimida
G ≡ Gly	Glicina
GDP	Guanosina difosfato
Glu	Glutamato
GPE	Ácido glicil-L-prolil-L-glutâmico
Gpp[NH]p	Guanilimido difosfato

GTP	Guanosina trifosfato
HATU	Hexafluorofosfato de 2-(1 <i>H</i> -7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio
hERG	Human <i>Ether-à-go-go</i> -Related Gene
Hex	Hexano
HBTU	Hexafluorofosfato de <i>O</i> -benzotriazol-1-il- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilurônio
HMPA	Hexametilfosforotriamida
HOBt	1-hidroxi-1 <i>H</i> -benzotriazole
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HVA	Ácido homovanílico
IGF-1	Fator de crescimento insulínico tipo 1
IQ⁺-MS	Espectrometria de Massa por Ionização Química
IV	Espectroscopia de Infravermelho
L ≡ Leu	L-leucina
L-dopa	Levodopa
LRRK2 ≡ PARK-8	<i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
JPNG	<i>Joint Programme – Neurodegenerative Disease Research</i>
m	Multiplete
M⁺	Ião parental (espectrometria de massa)
mACh	Recetor muscarínico de acetilcolina
mGluR	Recetor muscarínico de glutamato
MAO	Monoamina oxidase
MAO-B	Monoamina oxidase B
mc	Multiplete complexo
md	Multiplete desdobrado
MeOH	Metanol
MIF-1	Fator de inibição da libertação da hormona estimuladora de melanócitos
m/z	Relação massa/carga (espectrometria de massa)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
Na_v	Canal de Na ⁺ dependente de voltagem
NET	Transportador de norepinefrina
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
NOMM	<i>N</i> -óxido de <i>N</i> -metilmorfolina
NPA	<i>N</i> -propilnorapomorfina

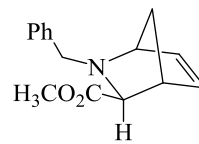
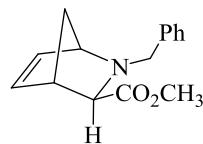
Nps	2-nitrofenilsulfonilo
NpsCl	Cloreto de 2-nitrofenilsulfonilo
OBn	Éster benzílico
OEt	Éster etílico
OMe	Éster metílico
O'Bu	Éster <i>terc</i> -butílico
PAOPA	Pirrolidinilcarbonilamino-2-oxopirrolidinacetamida
P.f.	Ponto de fusão
Ph	Fenilo
PINK1	<i>Phosphatase and tensin homolog induced putative kinase 1</i>
PLG	L-prolil-L-leucilglicinamida
PNP	Fosforilases de nucleósidos de purina
PPII	Hélice II de poliprolina
PRKN	Gene da parkina
p	Penteto
P ≡ Pro	L-prolina
PyBOP	Hexafluorofosfato de (benzatriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfónio
P*	2-azabíciclo[2.2.1]heptano
P*GL	2-azabíciclo[2.2.1]heptano-3-carbonilglicil-L-leucina
P*LG	2-azabíciclo[2.2.1]heptano-3-carbonil-L-leucilglicina
P*VA	2-azabíciclo[2.2.1]heptano-3-carbonilglicil-L-valil-L-alanina
q	Quarteto
RD	Recetores dopaminérgicos
R_f	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
t.a.	Temperatura ambiente
Tris-HCl	Cloridrato de tris(hidroximetil)aminometano
s	Singleto
SA	Síndrome de Alzheimer
SH	Síndrome de Huntington
sl	Singleto largo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNCA	Gene da α -sinucleína
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SP	Síndrome de Parkinson
str	Estiramento, do inglês <i>stretching</i>

t	Tripleto
THB	Tetra-hidrobiopterina
^tBu	<i>terc</i> -butilo
^tBuOH	<i>terc</i> -butanol
TBTU	Tetrafluoroborato de <i>O</i> -(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio
TFA $\equiv$ ATA	Ácido trifluoracético
TFBE	Eterato de trifluoreto de boro
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografia em camada fina, do inglês <i>Thin-Layer Chromatography</i>
TMS	Tetrametilsilano
TMU	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametilureia
Tri	Trifenilmetilo
Troc	2,2,2-tricloroetoxicarbonilo
UCH-L1	Hidrolase C-terminal de Ubiquitina
V $\equiv$ Val	L-valina
WFT	Teoria do Funcional de Onda
Z	Benziloxicarbonilo
δ	Desvio químico
ψPro	Pseudoprolina
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2,4,5-T	Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético
3-MT	3-metoxitiramina

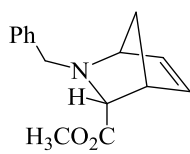
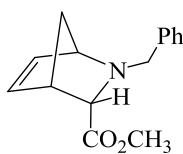
VI. Relação de Compostos Descritos



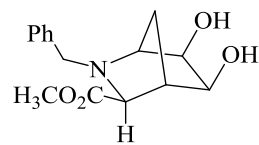
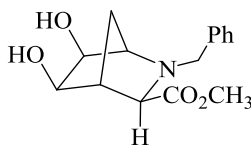
2
C₄H₈O₄
120.10 g mol⁻¹



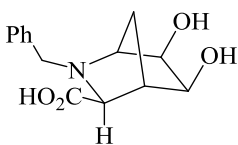
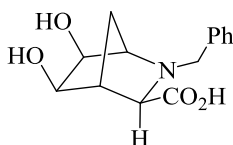
4-*exo*
C₁₅H₁₇NO₂
243.31 g mol⁻¹



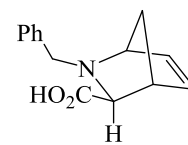
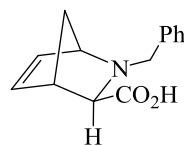
5-*endo*
C₁₅H₁₇NO₂
243.31 g mol⁻¹



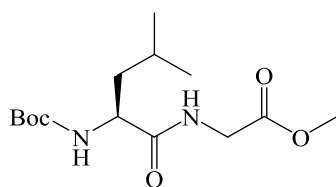
6-*exo*
C₁₅H₁₉NO₄
277.32 g mol⁻¹



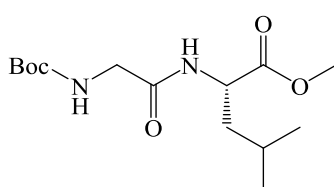
7-*exo*
C₁₄H₁₇NO₄
263.29 g mol⁻¹



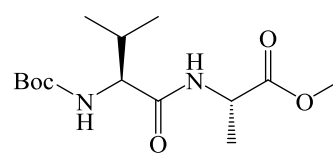
8-*exo*
C₁₄H₁₅NO₂
229.28 g mol⁻¹



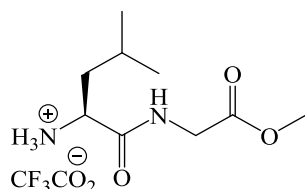
11a
C₁₄H₂₆N₂O₅
302.37 g mol⁻¹



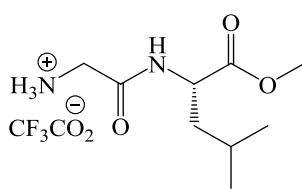
11b
C₁₄H₂₆N₂O₅
302.37 g mol⁻¹



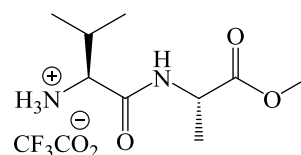
11c
C₁₄H₂₆N₂O₅
302.37 g mol⁻¹



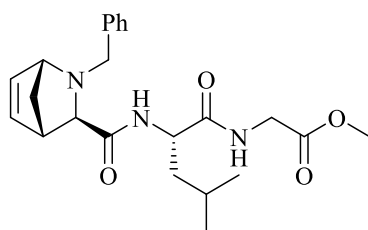
12a
C₁₁H₁₉F₃N₂O₅
316.28 g mol⁻¹



12b
C₁₁H₁₉F₃N₂O₅
316.28 g mol⁻¹

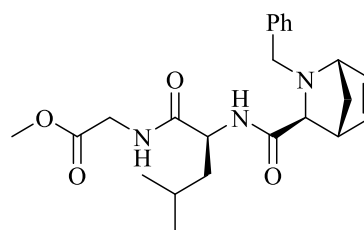


12c
C₁₁H₁₉F₃N₂O₅
316.28 g mol⁻¹



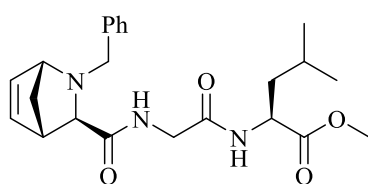
13a

$C_{23}H_{31}N_3O_4$
413.51 g mol⁻¹



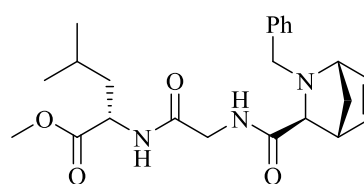
13a'

$C_{23}H_{31}N_3O_4$
413.51 g mol⁻¹



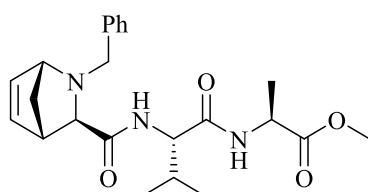
13b

$C_{23}H_{31}N_3O_4$
413.51 g mol⁻¹



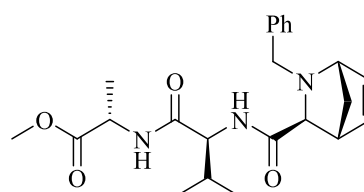
13b'

$C_{23}H_{31}N_3O_4$
413.51 g mol⁻¹



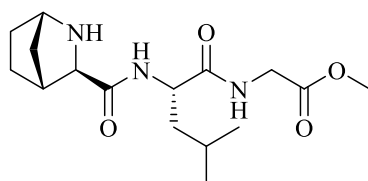
13c

$C_{23}H_{31}N_3O_4$
413.51 g mol⁻¹



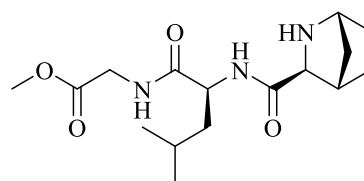
13c'

$C_{23}H_{31}N_3O_4$
413.51 g mol⁻¹



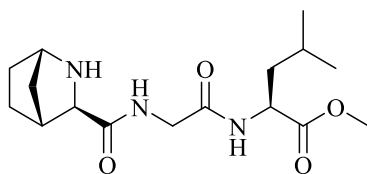
14a

$C_{16}H_{27}N_3O_4$
325.41 g mol⁻¹



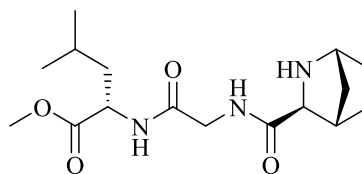
14a'

$C_{16}H_{27}N_3O_4$
325.41 g mol⁻¹



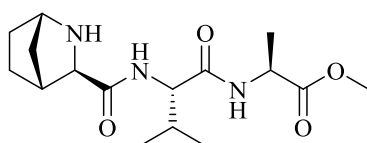
14b

$C_{16}H_{27}N_3O_4$
325.41 g mol⁻¹



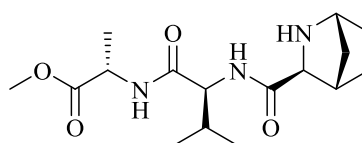
14b'

$C_{16}H_{27}N_3O_4$
325.41 g mol⁻¹



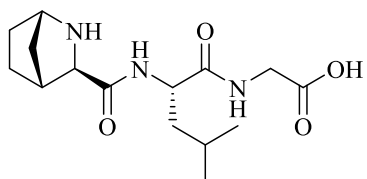
14c

$C_{16}H_{27}N_3O_4$
325.41 g mol⁻¹



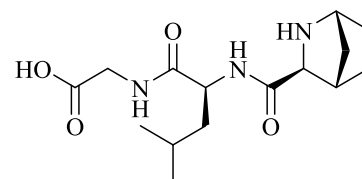
14c'

$C_{16}H_{27}N_3O_4$
325.41 g mol⁻¹



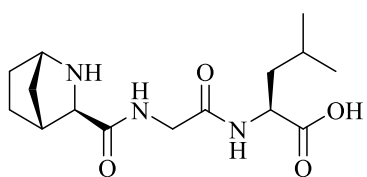
15a

$C_{15}H_{25}N_3O_4$
311.38 g mol⁻¹



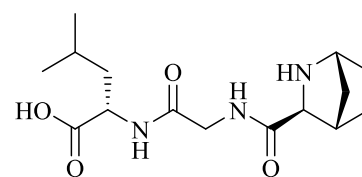
15a'

$C_{15}H_{25}N_3O_4$
311.38 g mol⁻¹



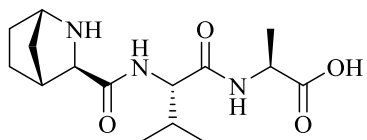
15b

$C_{15}H_{25}N_3O_4$
311.38 g mol⁻¹



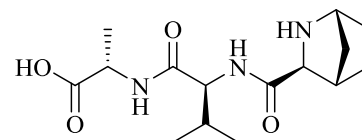
15b'

$C_{15}H_{25}N_3O_4$
311.38 g mol⁻¹



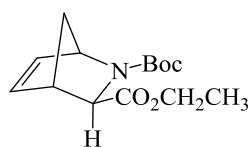
15c

$C_{15}H_{25}N_3O_4$
311.38 g mol⁻¹

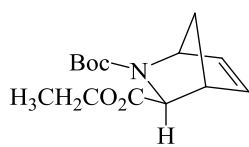


15c'

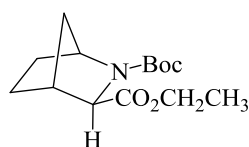
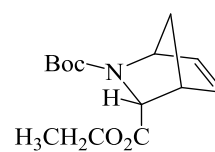
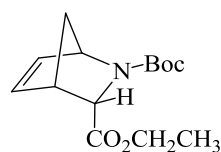
$C_{15}H_{25}N_3O_4$
311.38 g mol⁻¹



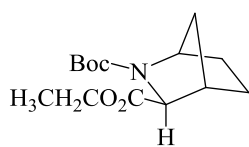
17-exo
 $C_{14}H_{21}NO_4$
 267.32 g mol⁻¹



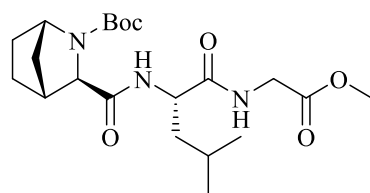
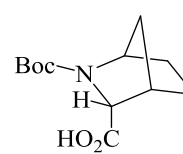
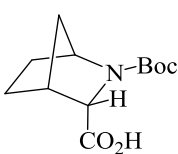
18-endo
 $C_{14}H_{21}NO_4$
 267.32 g mol⁻¹



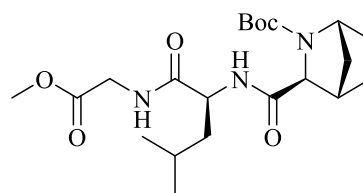
19-exo
 $C_{14}H_{23}NO_4$
 269.34 g mol⁻¹



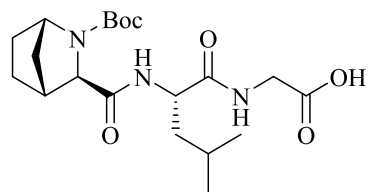
20-exo
 $C_{12}H_{19}NO_4$
 241.29 g mol⁻¹



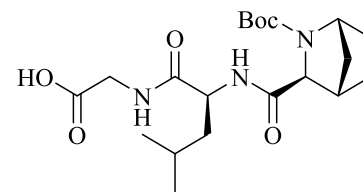
21a
 $C_{21}H_{35}N_3O_6$
 425.53 g mol⁻¹



21a'
 $C_{21}H_{35}N_3O_6$
 425.53 g mol⁻¹



22a
 $C_{20}H_{33}N_3O_6$
 411.50 g mol⁻¹



22a'
 $C_{20}H_{33}N_3O_6$
 411.50 g mol⁻¹

VII. Resumo / Abstract / Resumen

RESUMO

A importância biológica dos péptidos está associada à ampla variedade de funções que estes desempenham nos organismos vivos. Neste contexto, a utilização de péptidos como potenciais fármacos constitui um importante campo de investigação. Nas últimas décadas, muitos investigadores procuram sintetizar péptidos estruturalmente modificados de forma a melhorar a estabilidade e a atividade biológica deste tipo de compostos.

Um exemplo paradigmático recai no tripéptido natural **PLG** (L-prolil-L-leucil-glicinamida) o qual é encontrado no soro humano por clivagem proteolítica da hormona oxitocina. Este tripéptido desempenha importantes funções no sistema nervoso central revelando conferir neuroproteção *in vitro* e *in vivo* em patologias neurológicas como a Síndrome de Parkinson. Estudos apontam que o resíduo de α -aminoácido L-prolina possui um papel importante em péptidos bioativos contendo este resíduo, devido às suas propriedades conformacionais únicas. Neste sentido torna-se atrativo e imperativo desenvolver análogos prolinomiméticos destes neuropéptidos de modo a estudar de que forma alterações neste resíduo poderão contribuir para o desenvolvimento de fármacos que confirmem maior atividade neuroprotetora.

Neste sentido, o presente trabalho tem por objetivo desenvolver vias de síntese exploratórias conducentes à preparação de análogos do PLG substituindo o resíduo de L-prolina por uma unidade prolinomimética baseada no sistema 2-azabicyclo[2.2.1]heptano, **P***. Desta forma, propõe-se a construção de três séries distintas de análogos, incluindo as séries **P*LG**, **P*GL** e **P*VA**, como potenciais análogos do PLG.

Este trabalho inicia-se com a criação de um *pool* de estruturas prolinomiméticas abrangendo nove precursores na sua forma racémica, elegendo-se uma dessas estruturas de forma a iniciar a síntese dos derivados do PLG.

Numa segunda parte está descrita a síntese dos fragmentos C-terminais, para cada um das séries propostas, contabilizando a preparação de seis dipéptidos. Em seguida, procedeu-se ao acoplamento da unidade prolinomimética com os dipéptidos correspondentes às séries anteriormente consideradas de forma a obter-se os tripéptidos almejados. Desta forma, foram sintetizados onze tripéptidos sob a forma de misturas de diastereoisómeros cujas tentativas de separação revelaram-se infrutíferas. As vias sintéticas encontram-se bem descritas, tendo sido efetuado um estudo complementar de otimização da via conducente à preparação do P*LG.

Finalmente, nove desses tripéptidos foram sujeitos a avaliação biológica frente a recetores D₂ dopaminérgicos de forma a averiguar o seu potencial efeito como moduladores positivos destes recetores. Os resultados obtidos revelaram-se inconclusivos, sendo necessária mais investigação neste campo.

ABSTRACT

The biological relevance of peptides is associated with the wide variety of roles they play in living organisms. In this context, the use of peptides as potential drugs is an important field of research. In recent decades, many researchers are seeking to synthesize peptides structurally modified to improve the stability and biological activity of such compounds.

A paradigmatic example lies on **PLG** (L-prolyl-L-leucyl-glycinamide) a natural tripeptide which is found in human serum by proteolytic cleavage of the oxytocin hormone. This tripeptide plays important roles in the central nervous system revealing confer neuroprotection *in vitro* and *in vivo* in neurological diseases such as Parkinson's Syndrome. Studies indicate that the amino acid residue L-proline plays an important role in bioactive peptides containing this residue due to its unique conformational properties. Having this in mind it becomes imperative and attractive to develop prolinemimetic analogues of these neuropeptides in order to study how changes in this residue may contribute to the development of pharmaceuticals that confer greater neuroprotective activity .

Therefore, the present work aims to develop exploratory synthetic routes leading to the preparation of PLG analogues replacing the residue of L-proline by a prolinemimetic unit system based on 2-azabicyclo[2.2.1]heptane, **P***. It is also proposed to build three distinct series of analogs, including **P*LG**, **P*GL** and **P*VA** series as potential analogs of PLG. This work begins creating a pool of prolinemimetic structures containing nine precursors in its racemic forms, electing up one of these structures in order to initiate the synthesis of the PLG derivatives.

In the second part the synthesis of C-terminus fragments is described for each of the series proposed, accounting with the preparation of six dipeptides. Afterward, we proceeded to the coupling between the prolinemimetic unit with the corresponding dipeptide to the previously considered series in order to obtain the desired tripeptides. Thereby, eleven tripeptides were synthesized in the form of mixtures of diastereoisomers whose separation attempts have proved unsuccessful. The synthetic routes are well described, having been made a complementary study of optimization in respect to the pathway leading to the preparation of P*LG .

Finally, nine of these tripeptides were subjected to biological evaluation against dopamine D₂ receptors in order to ascertain its potential effect as positive modulators of these receptors. The results proved to be inconclusive, requiring further research in this field.

RESUMEN

La importancia biológica de los péptidos se asocia con la amplia variedad de funciones que desempeñan en los organismos vivos. En este contexto, el uso de péptidos como potenciales fármacos es un importante campo de investigación. En las últimas décadas, muchos investigadores buscan sintetizar péptidos estructuralmente modificados para mejorar su estabilidad y actividad biológica.

Un ejemplo paradigmático es el caso del PLG (L-prolil-L-leucil-glicinamida) un tripéptido natural que se encuentra en el suero humano por ruptura proteolítica de la hormona oxitocina. Este tripéptido desempeña papeles importantes en el sistema nervioso central revelando conferir neuroprotección *in vitro* y *in vivo* en enfermedades neurológicas tales como el Síndrome de Parkinson. Estudios realizados indican que el residuo del aminoácido L-prolina juega un papel importante en la actividad biológica de péptidos que contienen este aminoácido debido a sus propiedades conformacionales únicas. Con esto en mente, se vuelve imperativo y atractivo el desarrollo de análogos miméticos de prolina de estos neuropéptidos con el fin de estudiar cómo los cambios estructurales en las unidades de aminoácidos pueden contribuir al desarrollo de nuevos productos farmacéuticos que confieran mayor actividad neuroprotectora.

Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo el desarrollo exploratorio de rutas sintéticas que conduzcan a la preparación de análogos de PLG remplazando el residuo de L-prolina por una unidad prolinomimética sobre la base del sistema 2-azabicyclo[2.2.1]heptano, **P***. También se propone la construcción de tres series distintas de análogos, incluyendo las series **P*LG**, **P*GL** y **P*VA**, estudiándolos como potenciales análogos del PLG.

Este trabajo comienza creando un *pool* de estructuras prolinomiméticas conteniendo nueve precursores en sus formas racémicas, eligiendo una de estas estructuras con el fin de iniciar la síntesis de los derivados del PLG.

En la segunda parte del trabajo se describe la síntesis de los fragmentos C-terminales de cada una de las series propuestas, lo que representa la preparación de seis dipéptidos. A continuación, se relata como se procedió para el acoplamiento entre la unidad prolinomimética y los correspondientes dipéptidos para las series consideradas con el fin de obtener los tripéptidos deseados. De este modo, once tripéptidos se sintetizaron en forma de mezclas de diastereoisómeros. Las vías de síntesis están bien descritas, habiendo sido hecho un estudio complementario de optimización con respecto a la vía que conduce a la preparación de la serie **P*LG**.

Por último, nueve de estos tripéptidos se sometieron a evaluación biológica contra los receptores D₂ de la dopamina con el fin de determinar su potencial efecto como modulador positivo de estos receptores. Hasta el presente los resultados demostraron ser no concluyentes, lo que requiere más investigación en este campo.

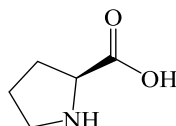
CAPÍTULO 1

Introdução Teórica

1.1. PROLINOMIMÉTICOS

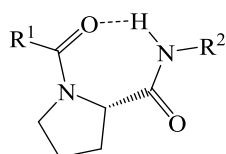
1.1.1. Antecedentes

O α -aminoácido **L-prolina (Pro ou P)** é um dos vinte codificados pelo ácido 2-desoxirribonucleico (ADN). Faz parte dos α -aminoácidos *não essenciais*, uma vez que é sintetizado pelo organismo. A forma mais comum, L, possui estereoquímica S, a par dos restantes α -aminoácidos naturais, com exceção da cisteína e seus derivados. O α -aminoácido L-prolina é o único que apresenta uma cadeia lateral cíclica, que pode ser vista como sendo o resultado da sua ligação covalente ao azoto do grupo α -amina,¹ apresentando-se como uma α -amina secundária em detrimento dos restantes. Esta propriedade torna este α -aminoácido um bloco de síntese único, revestido de uma enorme importância na síntese de péptidos e proteínas.

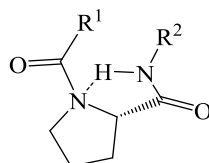


L-Prolina

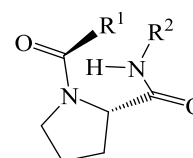
Com efeito, as regiões polipeptídicas contendo L-prolinas são menos flexíveis provocando *kinks* na estrutura das proteínas obrigando, na maioria dos casos, a ligação peptídica que antecede estes resíduos de α -aminoácidos, a adotar uma conformação *cis*, ao contrário dos restantes α -aminoácidos naturais que formam, preferencialmente, ligações peptídicas *trans*. Isto deve-se, em parte, à baixa barreira energética entre o equilíbrio (*cis-trans*) das ligações peptídicas do resíduo de prolina sendo que a conformação *trans* está apenas ligeiramente favorecida sobre a *cis*. Desta forma, uma característica das moléculas contendo o resíduo L-prolina, é a capacidade de formação de ligações peptídicas *cis* e a possibilidade de isomerização (*cis-trans*) muito facilmente devido à diminuta diferença na barreira energética.² Por outro lado, a inexistência de um hidrogénio ligado ao azoto aquando de uma ligação amida, diminui a estabilização por pontes de hidrogénio das ligações peptídicas que antecederem os resíduos de L-prolina.



trans



Estado de Transição

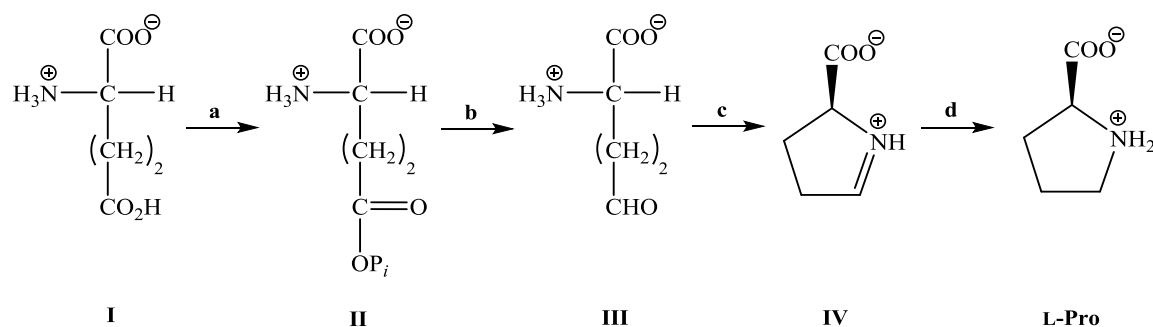


cis

¹Freire, A. P.; Quintas, A. Estrutura e Propriedades dos Aminoácidos e Péptidos, in *Bioquímica Organização Molecular da Vida*, 1 ed., Lidel, **2008**, 10, p. 142.

²Breznik, M.; Kikelj, D. *Farm. Vestn.* **2000**, 51, 553.

A L-prolina é biossinteticamente derivada do α -aminoácido ácido L-glutâmico (Esquema 1.1). Em seguida, apresentam-se os passos da *via* de síntese da L-prolina: **a**) o carboxilato da cadeia lateral do glutamato (**I**) reage com o ATP por ação do glutamato cinase (EC 2.7.2.11), originando γ -fosfato de glutamilo (**II**); **b**) o enzima glutamato desidrogenase (EC 1.4.1.2) catalisa a redução do γ -fosfato de glutamilo com recurso a NADH ou NADPH, formando-se γ -semialdeído glutâmico (**III**) e libertando-se o grupo fosfato do substrato da reação; **c**) o γ -semialdeído glutâmico cicliza, de forma não enzimática, originando o 5-carboxilato de Δ^1 -pirrolina (**IV**); **d**) a redução do intermediário anterior com NADPH ou NADH, por ação do pirrolina-carboxilato redutase (EC 1.5.1.2), converte-o na L-prolina. Os enzimas que participam na biossíntese de L-prolina a partir de L-glutamato não catalisam as reações inversas nas condições fisiológicas. A principal *via* oxidativa da L-prolina leva à formação de glutamato, no entanto a sua oxidação a 5-carboxilato de Δ^1 -pirrolina (**IV**) e a oxidação deste intermediário a L-glutamato são catalisadas por enzimas diferentes.

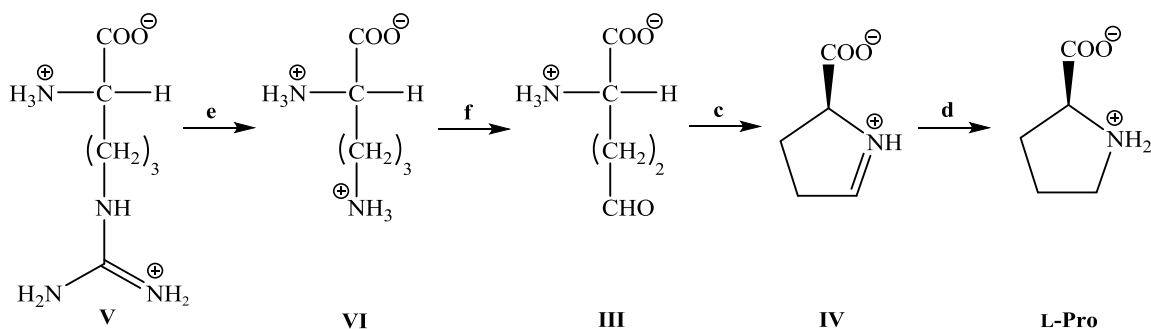


Esquema 1.1

Biossíntese da L-prolina a partir do L-glutamato.

Em mamíferos, o γ -semialdeído glutâmico pode também formar-se por transaminação da L-ornitina (**VI**), como representado no Esquema 1.2. Esta reação permite obter L-prolina a partir de L-arginina (**V**), uma vez que a L-arginina é convertida em L-ornitina (**VI**) e ureia pelo arginase (EC 1.5.3.1), um enzima do ciclo da ureia. Note-se que por outro lado, em decorrência da ciclização espontânea do γ -semialdeído glutâmico (**III**), este geralmente não é convertido em L-ornitina por transaminação. Logo, o ornitina δ -aminotransferase (EC 2.6.1.13) não catalisa esta reação no sentido da formação de L-ornitina, a não ser que a L-arginina proveniente da dieta não seja suficiente para satisfazer as necessidades do organismo.³

³Lages, N. F.; Silva, M.; Halpern, M., J. Metabolismo dos Aminoácidos e de outras Moléculas Nitrogenadas. In *Bioquímica Organização Molecular da Vida*, 1 ed., Lidel, **2008**, 35, pp. 540-541.

**Esquema 1.2**

Biossíntese da L-prolina a partir da L-arginina.

Os *peptidomiméticos*, por sua vez, são uma classe de compostos contendo unidades que mimetizam um ou mais α -aminoácidos numa cadeia peptídica. Com efeito, os *prolinomiméticos* são uma importante subclasse de peptidomiméticos em que o α -aminoácido L-prolina é mimetizado, sendo desta forma designados por *compostos prolinomiméticos*, *pseudoprolinas* ou ψ Pro.⁴ No que diz respeito aos compostos prolinomiméticos, esta designação compreende a síntese de unidades miméticas da prolina e o uso dessas unidades como bloco para a construção de compostos (péptidos ou proteínas) que mimetizem o produto natural e, ainda, abarca o estudo das propriedades físico-químicas dos compostos contendo essas pseudoprolinas, bem como as suas propriedades biológicas.

Atualmente, existe uma forte investigação no campo de desenvolvimento de estruturas prolinomiméticas, que se pode constatar pelo crescente número de patentes registadas por grandes companhias farmacêuticas e institutos de investigação nesta área.⁵

Existe um vasto e diversificado espólio de variações estruturais relativo aos compostos prolinomiméticos, desde introdução de modificações no anel de pirrolidina, substituindo-se um átomo de carbono por um heteroátomo obtendo-se derivados de oxazolidinas,⁶ tiazolidinas,^{7,8} pirazolidinas⁹ e imidazolidinas,¹⁰ até à síntese de análogos contendo grupos substituintes no anel de pirrolidina nas diferentes posições.

⁴Tuchscherer, G.; Mutter, M. *Chimia* **2001**, 55 (4), 306-313.

⁵(a) Copeland, R. A.; Albright, C. F.; Combs, A. P.; Dowling, R. L.; Graciani, N. R.; Han, W.; Higley, C. A.; Huang, P. S.; Yue, E. W.; Dimeo, S. V. (Dupont Pharmaceuticals Company). WO 01/068145 (**2001**). (b) Jackson, P.; Steiner, J. (Guilford Pharmaceuticals Inc.). WO 01/034594 (**2001**). (c) Maring, C. J.; Gu, Y. G.; Chen, H.-J.; Chen, Y.; Degoe, D. A.; Flosi, W. J.; Giranda, V. L.; Grampovnik, D. J.; Kati, W. M.; Kempf, D. (d) Zhang, K.; Schweizer, F. (University of Manitoba, Can.). WO 2010113035 (**2010**). (e) Kuehne, R.; Oschkinat, H.; Schmalz, H.-G.; Opitz, R.; Mueller, M.; Reuter, C.; Huy, P. (Forschungsverbund Berlin e V, Germany; Universitaet zu Koeln). WO 2013030111 (**2013**).

⁶Khrustalev, D. P.; Suleimenova, A. A.; Fazylov, S. D.; Gazaliev, A. M. *Russian Journal of General Chemistry* **2007**, 77, 5, 969.

⁷Fernandez, X.; Fellous, R.; Lizzani-Cuvelier, L.; Loiseau, M.; Duñach, E. *Tetrahedron Letters* **2001**, 42, 1519-1521.

⁸Karpyak, V. V.; Obushak, N. D.; Ganushchak, N. I. *Chemistry of Heterocyclic Compounds* **1997**, 33 (9), 1121-1122.

⁹Santos, J.-M. de los; López, Y.; Aparicio, D.; Palacio, F. *J. Org. Chem.* **2008**, 73 (2), 550-557.

¹⁰Liu, H.; Du, D.-M. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, 351, 489-519.

Nestes últimos, encontram-se amplamente descritos os derivados 2-monossustituídos,¹¹ 3-monossustituídos,^{12,13,14} 4-monossustituídos,^{15,16} 5-monossustituídos,^{5b} os 2,3-dissustituídos,^{17,18} 2,4-dissustituídos,^{11,16} 3,4-dissustituídos e, pelo nosso grupo de investigação, derivados 3,5-dissustituídos.^{19,20} Também estão descritos alguns casos de derivados 2,3,4-trissustituídos,²¹ 2,4,5-trissustituídos¹⁶ e 3,4,5-trissustituídos¹⁴. A par destas modificações também têm sido descritos prolinomiméticos em que o anel pirrolidínico é substituído por sistemas bicíclicos.²²

1.1.2. Prolinomiméticos e a Síntese de Fármacos

Existem inúmeros compostos com importante atividade biológica que apresentam nas suas estruturas pelo menos um α -aminoácido cíclico. Estes são, portanto, revestidos de uma inegável importância na síntese de potenciais fármacos com diferentes atividades biológicas,^{23,24,25} sendo os derivados da L-prolina os mais comuns.

A título de exemplo pode nomear-se fármacos com atividade antiviral como o **boceprevir** e o **telaprevir**, que foram aprovados pela FDA em 2011, para serem administrados juntamente com a ribavirina e o interferão-alfa peguilado para o tratamento da hepatite C crónica; estes fármacos pertencem ao grupo dos chamados inibidores do protease NS3/4A do vírus da hepatite C, enzima que intervém na fragmentação de uma poliproteína viral, na qual estão incluídas todas as proteínas virais estruturais e não estruturais, sendo imprescindível a sua fragmentação para libertação dessas proteínas e, assim, continuar o ciclo de replicação viral.

^{5b}Jackson, P.; Steiner, J. (Guilford Pharmaceuticals Inc.). WO 01/034594 (2001).

¹¹Robinson, J. A. *Synlett* **2000**, 429.

¹²Sabol, J.; Flynn, G. A.; Friedrich, D.; Huber, E. W. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3687.

¹³Khan, M.; Eguchi, M. Synthesis of Peptides Incorporating β -Turn Inducers and Mimetics. In Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry, Murray, G.; Felix, A.; Moroder, L.; Toniolo, C. Eds., *Thieme*, **2003**, vol. E, 22c, p. 695.

¹⁴Lorthiois, E.; Marek, I.; Normant, J. F. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 2442.

¹⁵Beeli, R.; Steger, M.; Linden, A.; Robinson, J. A. *Helv. Chim. Acta* **1996**, 79, 2235.

¹⁶Damour, D.; Doerflinger, G.; Pantel, G.; Labaudiniere, R.; Leconte, J.-P.; Sable, S.; Vuilhorgne, M.; Mignani, S. *Synlett* **1999**, 189.

¹⁷Cativiela, C.; Díaz-de-Villegas, M. D. *Tetrahedron-Asymm.* **2000**, 11, 645.

¹⁸Damour, D.; Barreau, M.; Blanchard, J.-C.; Burgevin, M.-C.; Doble, A.; Pantel, G.; Labaudinière, R.; Mignani, S. *Chem. Lett.* **1998**, 943.

¹⁹Duan, S.; Moeller, K. D. *Tetrahedron* **2001**, 57, 6407.

²⁰Costa, J. F.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; Midón, P.; Rodríguez-Borges, J. E. *Tetrahedron* **2010**, 66, 6797-6805.

²¹Karoyan, P.; Sagan, S.; Lequin, O.; Quancard, J.; Lavielle S.; Chassaing, G. *Substituted Prolines. Synthesis and Applications in Structure-Activity Relationship Studies of Biologically Active Peptides*. In Targets in Heterocyclic Systems. Chemistry and Properties, Attanasi, O.A.; Spinelli, D. Eds., Royal Socie of Chemistry, Cambridge, **2005**, vol. 8, p. 216.

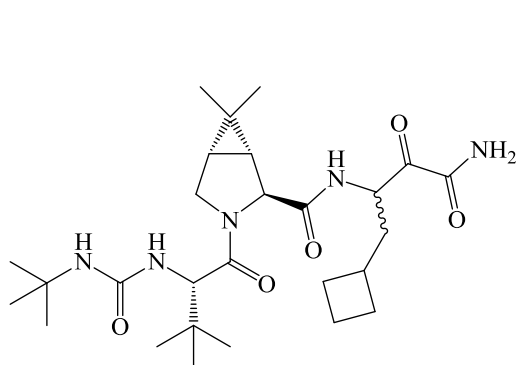
²²Chamberlin, S. G.; Sargood, K. J.; Richter, A.; Mellor, J. M.; Anderson, D. W.; Richards, N. G. J.; Turner, D. L.; Sharma, R. P.; Alexander, P.; Davies, D. E. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 21062-21067.

²³Sizonenko, S. V.; Sirimanne, E. S.; Willians, C. E.; Gluckman, P. D. *Brain Res.* **2001**, 922, 42.

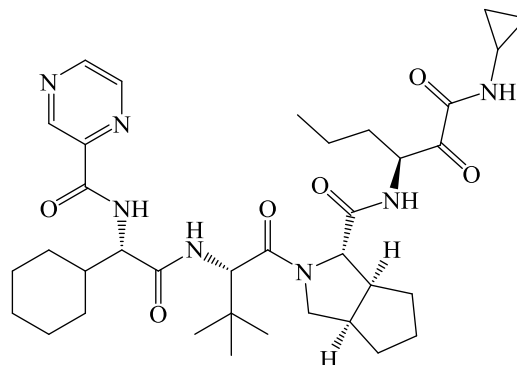
²⁴Guan, J.; Krishnamurthi, R.; Waldvogel, H. J.; Faull, R. L. M.; Clark, R.; Gluckman, P. *Brain Res.* **2000**, 859, 286.

²⁵Alexi, T.; Hughes, P. E.; Van Roon-Mom, W. M. C.; Faull, R. M.; Willians, C. E.; Clark, R. G.; Gluckman, P. D. *Exp. Neurol.* **1999**, 159, 84

Ambos os fármacos apresentam na sua estrutura prolinomiméticos com restrição parcial dos seus graus de liberdade. Muitas investigações têm sido realizadas no sentido de encontrar alternativas aos fármacos anteriormente mencionados, pela modificação da restante estrutura.²⁶



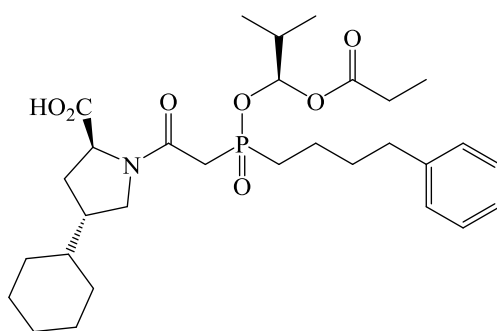
Boceprevir



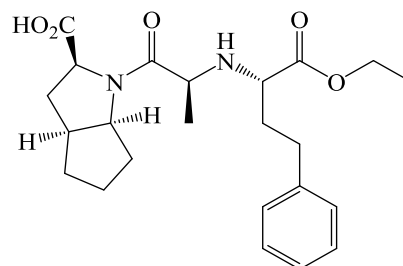
Telaprevir

O **monopril** e o **ramipril** são exemplos de outros fármacos contendo prolinomiméticos nas suas estruturas, sendo ambos inibidores do enzima conversor de angiotensina (EC 3.4.15.1),²⁷ em que o primeiro é o único inibidor deste enzima fosforado. Tanto o monopril como o ramipril são usados como pró-fármacos, i.e., fármacos na sua forma inativa que, quando administrados, sofrem biotransformação *in vivo*, passando a produzir metabólitos ativos. Adicionalmente, podem ainda melhorar a absorção ou a ação.

No caso do monopril e do ramipril, estes são convertidos através de esterases do fígado nas suas formas biologicamente ativas, o monoprilato e o ramiprilato, respetivamente.



Monopril



Ramipril

²⁶Nilsson, M.; Belfrage, A. K.; Lindstroem, S.; Waehling, H.; Lindquist, C.; Ayesa, S.; Kahnberg, P.; Pelcman, M.; Benkestock, K.; Agback, T.; Vrang, T.; Terelius, Y.; Wikström, E. H.; Rydergard, C.; Edlund, M.; Eneroth, A.; Raboisson, P.; Lin, T.-I.; Kock, de H.; Wigerrinck, P.; Simmen, K.; Samuelsson, B.; Rosenquist, A. *Bioorg. Med. Chem Lett.* **2010**, 20, 4004.

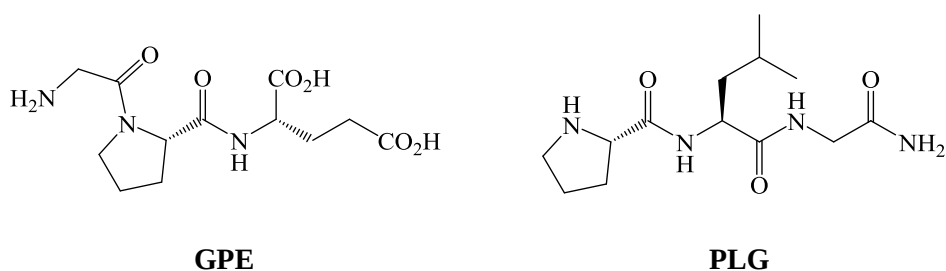
²⁷Pilote, L.; Abrahamowicz, M.; Eisenberg, M.; Humphries, K.; Behlouli, H.; Tu, J.V. *CMAJ* **2008**, 178 (10), pp. 1303-11.

Em algumas complicações cardiovasculares, a habilidade do coração para bombear o sangue, no sentido de satisfazer as necessidades fisiológicas, torna-se comprometida.²⁸ Esta condição pode ter várias causas, dentre elas sublinha-se alterações nas válvulas cardíacas, infarte do miocárdio, hipertensão, deficiência de vitamina B₁, predisposição genética, entre outras. Quando o débito cardíaco diminui, os rins respondem através do aumento da secreção de renina a partir do aparelho justaglomerular. A renina é convertida em angiotensinogénio (forma inativa), este último é convertido em angiotensina I que, por sua vez, é convertido a angiotensina II (AII) pelo enzima conversor de angiotensina.

A AII pode ter efeitos nefastos em caso de complicações cardiovasculares na medida em que causa vasoconstrição arterial e, consequentemente, hipertensão, resultando num agravamento da situação cardíaca. Dessa forma, o uso destes fármacos reveste-se de uma grande importância para inibição dos efeitos indesejados da AII nestas situações, diminuindo a resistência vascular periférica, o débito cardíaco e a pressão arterial.²⁹

Note-se que ambos os fármacos apresentam na sua constituição prolinomiméticos. No caso do monopril, este apresenta um prolinomimético 4-substituído contendo um grupo ciclo-hexilo. Já no ramipril, a unidade prolinomimética apresenta-se sob a forma de um sistema rígido de ciclo-penta[b]pirrolidina.

Os peptidomiméticos contendo ψ Pro podem ser de grande interesse noutro âmbito terapêutico, como é o caso dos neuropéptidos **GPE (ácido glicil-L-prolil-glutâmico)** e o **PLG (L-prolil-L-leucilglicinamida)**. Estes pequenos péptidos, presentes no organismo dos mamíferos, possuem propriedades neuroprotetoras face a processos neurodegenerativos como as síndromes de Huntington (SH), Parkinson (SP), Alzheimer (SA) e, ainda, na Discinesia tardia (DT).



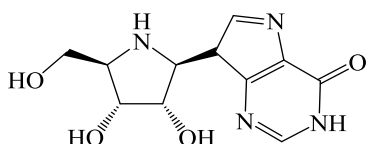
Têm sido sintetizados vários análogos destes tripéptidos, entre as modificações estruturais levadas a cabo, incluem-se elementos de restrição em diferentes posições nos tripéptidos, o que implica, muitas vezes, a modificações estruturais nos restantes resíduos de α -aminoácidos que os constituem.

²⁸Guyton, A. C.; Hall, J. E. *Textbook of Medical Physiology*, 11th ed., **2006**, Philadelphia: Elsevier Saunders.

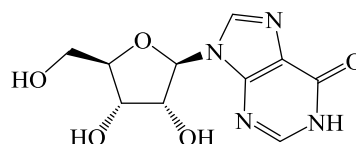
²⁹Katzung, B. G.; Masters, S. B.; Trevor, A. J. *Basic and Clinical Pharmacology*. 11th ed., **2009**, New York: McGraw-Hill.

Verifica-se ainda o uso de prolinomiméticos na síntese de novos aza ou isoazanucleósidos,^{30,31} cujas moléculas apresentam possíveis atividades anticancerígenas, antimaláricas e/ou antivirais.

Um exemplo de destaque é a **imucilina-H**, um aza-*C*-nucleósido que impede o crescimento de culturas de *Plasmodium falciparum*³² e *Staphylococcus aureus*³³ por redução da incorporação da **inosina** nos ácidos nucleicos através da inibição das PNPs (fosforilases de nucleósidos de purina), culminando com a morte do parasita por inanição.

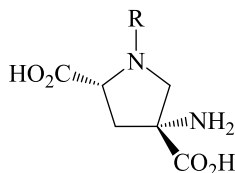


Imucilina-H



Inosina

Os prolinomiméticos possuem também relevância como análogos constringidos do glutamato onde derivados do ácido (2*R*,4*R*)-4-aminopirrolidino-2,4-dicarboxílico podem funcionar como agonistas, agonistas parciais ou antagonistas sobre recetores de glutamato, a saber: mGluR2, mGluR3 e/ou mGluR6.



R : 2- ou 3- ou 4-hidroxibenzilo,
2- ou 3- ou 4-carboxibenzilo,
2- ou 3- ou 4-nitrobenzilo

³⁰Flores, R.; Alibés, R.; Figueredo, M.; Font, J. *Tetrahedron* **2009**, 65, 6912.

³¹Piperno, A.; Giofre, S. V.; Iannazzo, D.; Romeo, R.; Romeo, G.; Chiacchio, U.; Rescifina, A.; Piotrowska, D. G. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 2798.

³²Kicska, G. A.; Tyler, P. C.; Evans, G. B.; Furneaux, R. H.; Schramm, V. L.; Kim, K. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 3226.

³³Stratton, C. F.; Schramm, V. L. *Bioinformation* **2013**, 9, 9.

1.2. ATIVIDADE NEUROPROTETORA DO TRIPÉPTIDO L-PROLIL-L-LEUCILGLI-CINAMIDA (PLG)

1.2.1. Antecedentes

Os vinte α -aminoácidos codificados pelo ADN são importantes blocos na construção de diversas biomoléculas, os quais se encontram unidos através de ligações peptídicas para formarem cadeias mais ou menos longas, às quais se dá a designação de cadeias polipeptídicas. É comum designar-se por péptido, quaisquer cadeias polipeptídicas contendo menos do que cem resíduos de α -aminoácidos, para as restantes cadeias contendo cem ou mais resíduos de α -aminoácidos na sua constituição atribui-se, genericamente, a designação de proteína. Grande parte das ligações covalentes das cadeias polipeptídicas possui livre rotação, à exceção das ligações peptídicas, o que lhes permite adotar um vasto leque de conformações, possibilitando assumir diferentes níveis de organização estrutural tridimensional.^{34,35}

Os péptidos, juntamente com as proteínas, são as moléculas mais abundantes nos sistemas biológicos. Esta classe de biomoléculas são essenciais para a maioria dos processos bioquímicos que estão na base da vida, uma vez que se encontram envolvidas praticamente em todas as propriedades estruturais e funcionais dos seres vivos. Existem vários milhões de proteínas nos sistemas biológicos apresentando assim, um lato espectro de formas, dimensões e funções biológicas.

Dentre as múltiplas funções desempenhadas pelos péptidos e proteínas, pode-se nomear a *catálise enzimática* – os enzimas são biocatalisadores de milhares de reações bioquímicas, aumentando a velocidade da reação que catalisam; a *defesa* – esta é assegurada por um conjunto de péptidos e proteínas com efeito sinérgico na defesa dos organismos, desde a queratina que protege os vertebrados contra agressões mecânicas, até às imunoglobulinas do sistema imunitário, que auxiliam os seres vivos contra a invasão de organismos patogénicos; *função estrutural* – uma grande parte destas biomoléculas está implicada no suporte e proteção dos seres vivos, como as proteínas que compõem o citoesqueleto até ao colagénio, uma proteína que está envolvida na elasticidade da pele; o *movimento* – a actina e a miosina são essenciais no processo de contração e relaxamento muscular que está na base do movimento de seres vivos vertebrados; *armazenamento* – com efeito, a ceroplasmina é uma proteína muito importante no sequestro de cobre; *regulação* – a ligação de pequenos péptidos, como o neuropeptído PLG, aos recetores dopaminérgicos D₂, resulta na modulação destes últimos, regulando a sua atividade.³⁶

³⁴Quintas, A.; Ascenso, C. Introdução às Proteínas, in *Bioquímica Organização Molecular da Vida*, 1 ed., Lidel, **2008**, 11, pp. 161-163.

³⁵Ben-Shev, A.; Frolow, F.; Nelson, N. *Nature* **2003**, 426: 630-635.

³⁶Creighton, T. E. *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2 Ed., **1993**, W. H. Freeman and Company, New York.

1.2.2. Síndromes Neurodegenerativas

1.2.2.1. Aspetos Gerais³⁷

O tecido nervoso encontra-se imbuído no organismo, interligando-se e formando uma rede de comunicações, constituindo desta forma o sistema nervoso. Anatomicamente, este é vulgarmente dividido em: Sistema Nervoso Central (SNC), formado pelo encéfalo, constituintes neuronais do sistema fotorrecetor e medula espinhal, e pelo Sistema Nervoso Periférico (SNP), formado pelos nervos e por pequenos agregados de células nervosas denominados gânglios nervosos. Os nervos são constituídos principalmente por prolongamentos dos neurónios situados no SNC ou nos gânglios nervosos.

Os dois componentes principais do tecido nervoso são os neurónios e vários tipos de células da glia (ou neuroglia), que sustentam os neurónios e participam de outras funções importantes. No SNC, há uma segregação entre os corpos celulares dos neurónios e os seus prolongamentos. Este facto é responsável pelo reconhecimento de duas porções distintas no encéfalo e na medula espinhal, denominadas substância branca e substância cinzenta.

A substância cinzenta recebe essa designação porque revela essa coloração quando observada macroscopicamente, sendo formada em geral por corpos celulares dos neurónios e células da glia, contendo também prolongamento de outros neurónios.

A substância branca, por seu turno, não contém corpos celulares de neurónios, sendo constituída por prolongamentos de neurónios e por células da glia. Esta designação resulta da presença de grande quantidade de mielina, uma substância que envolve certos prolongamentos dos neurónios (axónios).

Os neurónios têm a propriedade de responder a alterações do meio em que se encontram (estímulos) com modificações da diferença de potencial elétrico que existe entre as superfícies interna e externa da membrana celular. As células que exibem essa propriedade (neurónios, células musculares e algumas glândulas) são ditas "excitáveis". Os neurónios reagem, prontamente, aos estímulos e a modificação de potencial elétrico pode restringir-se ao local do estímulo ou propagar-se pela célula, através da sua membrana. Esta propagação constitui o que se denomina por impulso nervoso, cuja função é transmitir informações a outros neurónios, a músculos, glândulas ou outras células efectoras.

Os neurónios, através dos seus prolongamentos geralmente longos e numerosos, formam circuitos neuronais, de diversos tamanhos e graus de complexidade. Um circuito neuronal pode ser simples porém, na maioria das vezes, trata-se da combinação de dois ou mais circuitos que interagem para executar uma dada função.

³⁷Junqueira, L. C.; Carneiro, J. *Histologia Básica*, 11 ed., 2008, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

As funções basilares do sistema nervoso são: detetar, transmitir, analisar e utilizar as informações geradas pelos estímulos sensoriais representados pelo calor, luz, energia mecânica e modificações químicas do ambiente externo e interno. Além disso, o sistema nervoso colmata atividades atinentes à organização e coordenação, direta ou indiretamente, do funcionamento de quase todas as funções do organismo, entre as quais, as funções motoras, viscerais, endócrinas e psíquicas.

Os neurónios comunicam entre si através de um processo designado por sinapse. Existem dois tipos de sinapses: as elétricas e as químicas. As últimas afiguram-se enquanto mais frequentes. Nas sinapses químicas um determinado impulso nervoso gerado num dado neurónio por ação de um estímulo é conduzido através do axónio por sucessivas despolarizações e repolarizações da membrana. No término do axónio, a despolarização da membrana ativa canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem havendo influxo de Ca^{2+} que culmina na exocitose de neurotransmissores (moléculas que servem de transmissores da informação) por fusão das membranas das vesículas que contêm os neurotransmissores com a membrana do término do axónio (célula pré-sináptica), libertando desta forma os neurotransmissores para a fenda sináptica. Esses neurotransmissores ligam-se a recetores específicos da célula pós-sináptica (que pode ser um neurónio ou uma célula-efetora), havendo passagem da informação por indução de uma nova despolarização da célula pós-sináptica.³⁸ Os neurotransmissores podem ser categorizados, essencialmente, em três grupos, dependendo da sua natureza química: aminas biogénicas, aminoácidos e péptidos. Estes funcionam como mensageiros químicos possibilitando a comunicação interneuronal, bem como com as restantes células-alvo. Para que a esta troca de informação ocorra de forma precisa é necessário que haja homeostasia dos níveis destes neurotransmissores ao longo do sistema nervoso.

Destarte, torna-se inteligível que alterações nos níveis de determinados neurotransmissores poderá por em causa a comunicação interneuronal, alterando os circuitos neuronais, com implicações nefastas mais ou menos acentuadas decorrentes do grau de perturbação, as populações neuronais implicadas e a extensão do dano, que poderá conduzir, em último caso, à indução de mecanismos apoptóticos e processos neurodegenerativos.

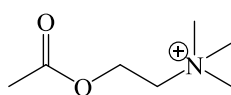
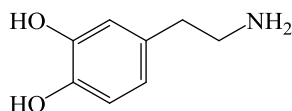
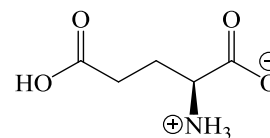
Com efeito, verifica-se em várias síndromes neurodegenerativas uma alteração dos níveis de alguns neurotransmissores; desta forma na Síndrome de Alzheimer (SA), os níveis de acetilcolina (ACh) encontram-se diminuídos;³⁹ na Síndrome de Parkinson os níveis de dopamina (DA) encontram-se diminuídos;⁴⁰ já no que se refere à Esclerose Amiotrófica Lateral, os níveis de glutamato (Glu) estão aumentados.⁴¹

³⁸Waites, C. L.; Garner, C. C. *Trends Neurosci.* **2011**, 34, 326.

³⁹Geula, C.; Mesulam, M. M. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* **1995**, 9 (2), 23-28.

⁴⁰Obeso, J. A.; Rodríguez-Oroz, M. C.; Benitez-Temino, B. *et al. Mov. Disord.* **2008**, 23 (3), 548-559.

⁴¹Al-Chalabi, A.; Leigh, P. N. *Current Opinion in Neurology* **2000**, 13 (4), 397-405.

**Acetilcolina****Dopamina****Glutamato**

Estas síndromes caracterizam-se pela apoptose de populações específicas de neurónios, que culmina nas manifestações clínicas próprias de cada processo neurodegenerativo.^{42,43}

De acordo com o *EU Joint Programme – Neurodegenerative Disease Research* (JPND), as doenças neurodegenerativas são condições debilitantes e incuráveis, que resultam na degeneração progressiva e/ou na morte das células nervosas. Esta neurodegeneração causa problemas no movimento, as ataxias, ou no próprio funcionamento cerebral, originando a demência.

A demência é um declínio progressivo ou crónico da função cognitiva, que afeta a memória, o pensamento, o comportamento, a linguagem, a capacidade de cálculo, a aprendizagem e a emoção, não devendo nunca ser associada a um processo normal de envelhecimento. Estima-se que 153 000 cidadãos portugueses e 9.9 milhões de cidadãos europeus sofram de algum tipo de demência.⁴⁴ De acordo com o relatório *DEMENTIA – A Public Health Priority*,⁴⁵ no mundo inteiro, em 2010, o número ascendia a 35.6 milhões. Anualmente, calcula-se que o número de novos casos de pessoas com demência seja cerca de 7.7 milhões, ou seja, um novo caso a cada 4 segundos. As previsões são para que, em 2050, o número de pessoas que sofrem de demência no mundo inteiro triplique, situando-se nos 115.4 mil milhões de pessoas.

Num estudo efetuado no Reino Unido, foi demonstrado que os custos associados à demência equivalem a cerca do dobro dos custos associados ao cancro, a cerca do triplo dos associados a doença cardíaca e a cerca de quatro vezes os associados a ataques cardíacos.⁴⁶

Prevê-se que o impacto socioeconómico da demência seja um dos maiores desafios do futuro da Sociedade Europeia, dado o envelhecimento da população, o aumento da esperança de vida e o facto da incidência da demência aumentar exponencialmente com a idade. Neste contexto, o rastreio e o diagnóstico precoce são passos essenciais para que as demências sejam atempadamente diagnosticadas, contribuindo para o abrandamento da evolução da doença e o adiamento dos sintomas mais severos nos doentes.⁴³

⁴²Kovacs, G. G.; Budka, H. *Focus Struct. Biol.* **2009**, 7, 251.

⁴³Gibrat, C.; Cicchetti, F. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2011**, 35, 380.

⁴⁴Parlamento Europeu. *Relatório sobre a iniciativa europeia em matéria da doença de Alzheimer e outras formas de demência*. Bruxelas: Parlamento Europeu, **2010**.

⁴⁵World Health Organization. *Dementia: A Public Health Priority*. Reino Unido: [s.e.], **2012**.

⁴⁶Luengo-Fernandez, R.; Leal, J.; Gray, A. *Dementia 2010 - The economic burden of Dementia and associated research funding in the United Kingdom*. Cambridge: Alzheimer's Research Trust, **2010**.

1.2.2.2. Síndrome de Parkinson

Etiologia

A Síndrome de Parkinson, descrita em 1817 pelo médico Inglês James Parkinson (1755 – 1824),⁴⁷ é a segunda doença neurodegenerativa mais comum. De acordo com a *European Parkinson's Disease Association*, em 2011,⁴⁸ na Europa estima-se que existam mais de 1.2 milhões de pessoas com a SP e espera-se que, em 2030, esse número duplique. Em Portugal, segundo a Associação Portuguesa de Doentes de Parkinson, dados epidemiológicos de 2011 apontam para cerca de 20 000 pessoas, sendo expectável que existam 6 milhões em todo o mundo.⁴⁹

Esta é uma síndrome idiopática, i.e., de causa indefinida e multifacetada, caracterizada como sendo uma desordem neurodegenerativa – uma α -sinucleinopatia – com prevalência de 160 casos por cada 100 000 habitantes na Europa aumentando até 4% da população cima dos 80 anos.⁵⁰ Sob o ponto de vista patológico, a SP manifesta-se pela perda de neurónios na substância negra, componente ventral da *pars compacta*. Estima-se que até ao falecimento, os doentes apresentem uma redução neuronal de 50-70% nesta zona em comparação com indivíduos não afetados. As alterações patológicas mais precocemente descritas na SP foram observadas no bulbo radiquiano/*pontine tegmentum* e no bulbo olfatório.⁵¹ Nesses estágios iniciais os pacientes são pré-sintomáticos. À medida que a síndrome progride a substância negra, áreas do mesencéfalo e do prosencéfalo basal tornam-se envolvidas. Por fim, as alterações patológicas manifestam-se no neocórtex.

Esta progressão das alterações patológicas deve-se à distribuição dos corpos de lewy, estes são inclusões imunorreativas à α -sinucleína contendo um número de proteínas neurofilamentosas adstritas com proteínas responsáveis pela proteólise. Estas incluem a ubiquitina, as proteínas *heat shock*, as quais possuem um papel crucial na sinalização de moléculas para proteólise. Mutações no gene que codifica a α -sinucleína são responsáveis por algumas das formas de SP familiares nas quais verifica-se a presença de corpos de lewy. Mutações no gene que codifica para a parkina é responsável por uma forma de SP em que não se verificam os corpos de lewy em casos juvenis, sugerindo que esta proteína possui um papel importante no desenvolvimento dos corpos de lewy. Tem sido demonstrado que a parkina facilita a ligação de outras proteínas à ubiquitina (ubiquitinação), tais como a sinfilina-1 (proteína de interação com a α -sinucleína), levando à formação de corpos de lewy.⁵²

⁴⁷Dauer, W.; Przedborski, S. *Neuron* **2003**, 39, 889-909.

⁴⁸European Parkinson's Disease Association. *The European Parkinson's Disease Standards of care consensus Statement*. United Kingdom, **2011**.

⁴⁹Associação Portuguesa de Doentes de Parkinson, *Revista Parkinson*, nº30, **2011**.

⁵⁰Mutch, W. J.; Dingwall-Fordyce, I.; Downie, A. W. *et al. BMJ* **1986**, 292, 534-536.

⁵¹Braak, H.; Bohl, J. R.; Müller, C. M. *et al. Mov. Disord.* **2006**, 21, 2042-2051.

⁵²Chung, K. K.; Zhang, Y.; Lim, K. L. *et al. Nat. Med.* **2001**, 7, 1144-1150.

O sistema ubiquitina-proteossoma é importante para proteólise intracelular e é responsável por um vasto número de processos que mantêm a viabilidade das células. Atua através da remoção de proteínas ubiquitinadas, isto é, selecionadas através da ligação à ubiquitina para serem eliminadas. Uma falha no sistema ubiquitina-proteossoma conduzirá a uma anormal agregação intracelular de proteínas, incluindo a α -sinucleína que é o maior componente dos corpos de lewy. Um dos principais locais onde há depósito de corpos de lewy é o bulbo olfatório, não sendo por isso de estranhar que nos casos de clínicos precoces se detetem alterações no cheiro e paladar,⁵³ endossando a noção de que a formação de corpos de lewy possam ser importantes na ativação de vias que conduzam à disfunção e morte neuronal.

Fatores Genéticos^{54,55}

Apesar da SP ser usualmente uma síndrome esporádica, existe um crescente número de mutações num único gene que têm sido identificados. Até ao presente onze genes foram mapeados por ligação genética com seis identificados: α -sinucleína (SNCA), hidrolase C-terminal de ubiquitina L1 (UCH-L1), parkina (PRKN), LRRK2, PINK1 e DJ-1. Estas mutações num único gene, com a notável exceção da LRRK2, estão presentes apenas num diminuto número de pacientes com SP, embora a sua identificação e as proteínas por estes genes codificadas, sejam relevantes para descortinar os mecanismos responsáveis pela SP e de outras patologias neurodegenerativas.

Uma única mutação no gene SNCA é responsável pelo surgimento de SP em idades precoces, com um padrão de herança autossómico dominante. Contudo, é de salientar que a duplicação ou triplicação do gene SNCA em pacientes com SP leva ao desenvolvimento da sintomatologia característica da SP em idades mais avançadas, por volta da quarta e quinta décadas, reforçando a ideia de que a sobreexpressão do SNCA poderá ser um fator preponderante na SP esporádica.

O gene LRRK2 (PARK8) está implicado, até à data, na SP familiar, também designada de SP "esporádica".⁵⁶ A frequência de mutações no gene LRRK2 em pacientes com histórico de casos de SP na família é de 5-7%. O gene LRRK2 codifica para uma proteína designada dardarina (derivada da palavra basca para tremor). Os corpos de lewy têm sido identificados em alguns casos em que existe mutação no gene LRRK2. Muitos dos pacientes portadores desta mutação apresentam sintomatologia da SP com idade de manifestação mediana ou mais avançada.

Um número de mutações associadas a um único gene, e.g. DJ-q e parkina, com padrões de herança autossómica recessiva, apresentam-se, em recorrência, numa idade mais precoce, de forma menos agressiva com boa resposta à levodopa e com a presença de distonia.

⁵³Hawkes, C.M. *BMJ* **1995**, 311, 129.

⁵⁴Warner, T. T.; Schapira, A. H. *Ann Neurol* **2003**, 53 (Suppl 3), S16-S23; discussion S23-S25. Review.

⁵⁵Cookson, M. R.; Xiromerisiou, G.; Singleton, A. *Curr Opin Neurol* **2005**, 18, 706-711.

⁵⁶Gilks, W. P.; Abou-Sleiman, P. M.; Gandhi, S. *et al. Lancet* **2005**, 365, 415-416.

Tem sido também implicadas alterações mitocondriais com o desenvolvimento de SP. Anomalias no Complexo 1 da *via* do enzima de fosforilação oxidativa foram detetadas nos cérebros de pacientes com SP, nas plaquetas sanguíneas e no músculo esquelético. Este é o dado mais consistente implicando alterações mitocondriais na SP, embora alterações noutros complexos também tenham sido referidos na literatura.⁵⁷

Os neurónios da *pars compacta* parecem ser particularmente suscetíveis ao *stress* oxidativo. Estudos envolvendo ADN mitocondrial falharam na busca de um gene indubitavelmente envolvido no *stress* oxidativo que explicasse os defeitos de fosforilação oxidativa na SP. Contudo, parece consistente que anomalias mitocondriais possam ter um papel importante nas vias que conduzem à disfunção e morte neuronal. O gene PINK1 codifica para um complexo mitocondrial e tem sido implicado numa forma autossómica recessiva de SP, porém existem indícios que apontam não ser um dos fatores de risco mais preponderantes na SP esporádica.

Fatores Ambientais

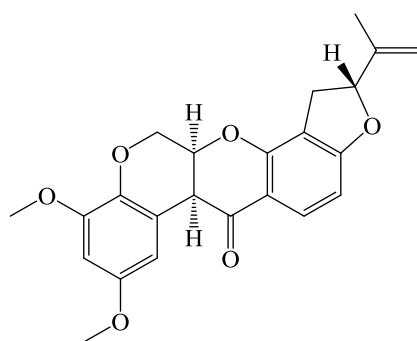
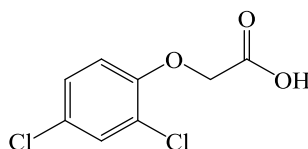
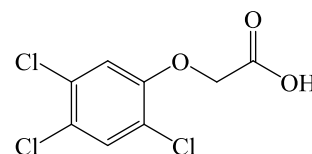
Alguns fatores ambientais provaram estar implicados, em certo grau, com a SP. É o caso do fumo de cigarro onde se constata uma forte correlação com o desenvolvimento desta síndrome. É também possível que disfunções mitocondriais despoletadas por uma ou mais toxinas ambientais propiciem o desenvolvimento de SP. Além disso, viver num ambiente rural parece conferir um risco acrescido, na medida em que, estudos revelam uma correlação entre SP e a exposição a pesticidas e conservantes de madeira.⁵⁸ Alguns desses pesticidas incluem inseticidas como a **rotenona** e herbicidas como *Agent Orange*,⁵⁹ que na verdade se apresenta como mistura de herbicidas, o **2,4-D** (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e o **2,4,5-T** (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético). A exposição a metais pesados também parece ser um fator de risco, com consequente acumulação na substância negra; contudo, estudos efetuados mostraram-se inconclusivos nesta pendência.⁶⁰

⁵⁷Schapira, A. H. *Lancet Neurol* **2008**, 7, 97-109.

⁵⁸Dick, F. D. *Br Med Bull* **2006**, 79-80, 219-231.

⁵⁹Tanner, C. M.; Kamel, F.; Ross, G. W. *et al. Environ Health Perspect* **2011**, 119 (6), 866-872.

⁶⁰de Lau, L. M.; Breteler, M. M. *Lancet Neurol*. **2006**, 5 (6), 525-535.

**Rotenona****2,4-D****2,4,5-T**

Diagnóstico Clínico⁶¹

Os sintomas cardinais na SP são: bradicinesia (dificuldade na iniciação do movimento), rigidez muscular (dificuldade no relaxamento dos músculos), instabilidade postural (dificuldades de manter o equilíbrio) e tremor de repouso (essencialmente nas mãos e nos pés). Estes sintomas podem não se manifestar concomitantemente. Alterações mais subtis, como é o caso de modificações na caligrafia (e.g. micrografia) ou redução da expressão facial, são geralmente características precoces da manifestação da sintomatologia. À medida que a neurodegeneração progride verifica-se também hipofonia (voz fraca devido à incoordenação dos músculos vocais), redução dos movimentos de deglutição e alterações dos reflexos. Complicações não motoras associadas à SP tornam-se mais graves à medida que a neurodegeneração recrudesce, havendo desenvolvimento de quadros depressivos em cerca de 40% dos pacientes. O tremor de cabeça e na voz poderão também estar presentes.

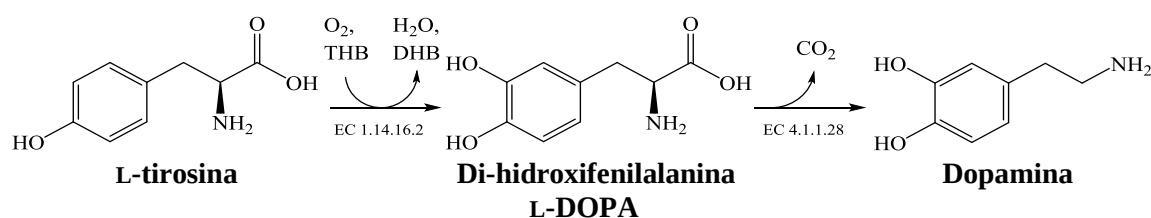
Tratamento

É necessário ter em conta que existem duas vias antagónicas de controlo, uma *via dopaminérgica* que é responsável por "inibir a inibição", i.e., que desbloqueia os movimentos voluntários e, uma *via colinérgica*, contrária à anterior, capaz de "excitar a inibição", i.e., que bloqueia o controlo dos movimentos voluntários. Por conseguinte, a perda de neurónios dopaminérgicos que está na base desta síndrome neurodegenerativa, provoca a perda do bloqueio dopaminérgico, conduzindo a um desequilíbrio entre as duas vias opostas supracitadas, resvalando nas manifestações motoras típicas na SP.

⁶¹Davie, C. A. *British Medical Bulletin* **2008**, 86, 109-127.

Com base nisto, as estratégias terapêuticas farmacológicas fundamentam-se em duas abordagens possíveis ao nível do SNC: potenciação da atividade dopaminérgica, a qual pode ser conseguida através da indução do aumento da libertação de dopamina endógena, por administração de dopamina exógena, redução da taxa de degradação de dopamina e através de estimulação dos recetores dopaminérgicos do SNC. Outra abordagem passa pela inibição da atividade colinérgica de forma a compensar a diminuição da atividade dopaminérgica que se vai instalando com a progressão desta síndrome.

Para entender a estratégia terapêutica utilizada na SP é necessário conhecer-se o ciclo metabólico da dopamina (Esquema 1.3). A biossíntese da dopamina no organismo humano faz-se a partir da L-tirosina, sobre a qual atua o tirosina hidroxilase (EC 1.14.16.2) na presença de oxigénio molecular e de tetra-hidrobiopterina (THB), originando L-dopa, uma molécula de água e di-hidrobiopterina (DHB). A L-dopa, por sua vez, através do L-dopa descarboxilase (EC 4.1.1.28) dá origem ao neurotransmissor dopamina com libertação de uma molécula de CO₂.



Esquema 1.3

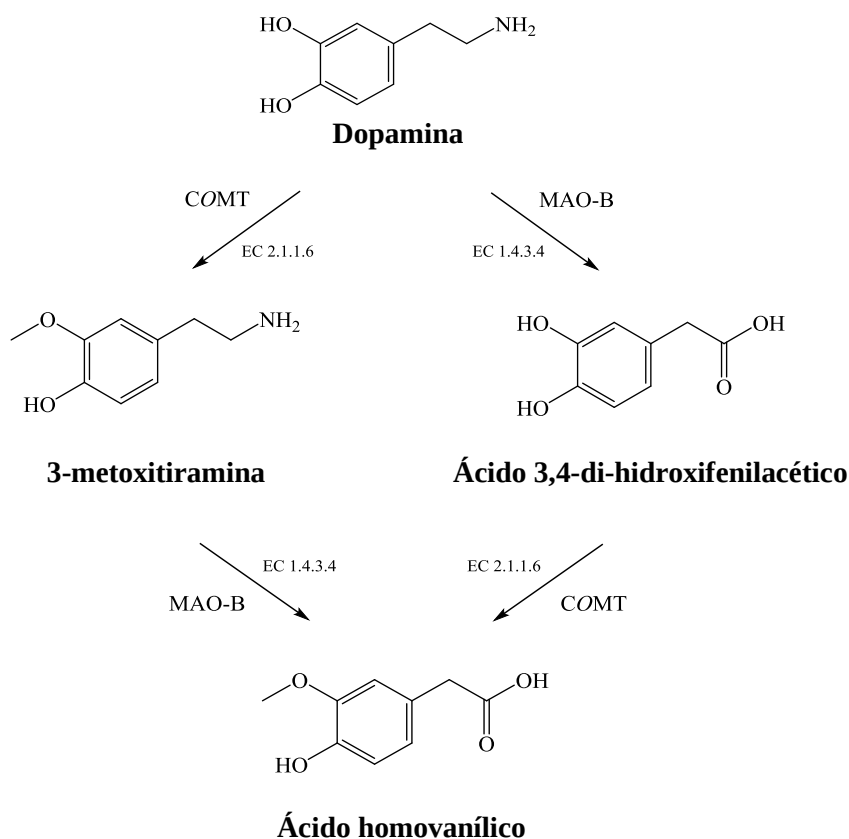
Representação esquemática da biossíntese de dopamina a partir da L-tirosina.

No interior das células dopaminérgicas, a dopamina citosólica é metabolizada principalmente por duas reações sucessivas. Primeiro, o monoamina oxidase, MAO (EC 1.4.3.4) converte a dopamina no correspondente aldeído que, por sua vez serve de substrato ao aldeído desidrogenase (EC 1.2.1.3) produzindo-se o ácido 3,4-di-hidroxi-fenilacético (DOPAC). O DOPAC, em seguida, difunde para o meio extracelular e pode ser tanto conjugado com glucorónidos ou convertido a ácido homovanílico (HVA) pelo catecol-O-metiltransferase, COMT (EC 2.1.1.6).⁶²

O MAO-B encontra-se localizado fora dos neurónios dopaminérgicos, i.e., nas células gliais, enquanto o COMT encontra-se apenas no exterior dos neurónios dopaminérgicos. Uma fração da dopamina libertada, é primeiro O-metilada pelo COMT a 3-metoxitiramina (3-MT) e depois oxidada pelo MAO-B para formar HVA.⁶¹

⁶¹Davie, C. A. *British Medical Bulletin* **2008**, 86, 109-127.

⁶²Männistö, P. T.; Ulmanen, I.; Lundström, K.; Taskinen, J.; Tenhunen, J.; Tilgmann, C.; Kaakkola, S. *Prog Drug Res* **1992**, 39, 291-350.

**Esquema 1.4**

Representação esquemática simplificada do metabolismo da dopamina. **COMT**: catecol-*O*-metiltransferase, **MAO-B**: monoamina oxidase B.

A farmacologia vigente na SP visa então atenuar a sintomatologia através da reposição do equilíbrio DA/ACh. Para o efeito, podem ser empregues diferentes estratégias que visam a potenciação da atividade dopaminérgica: utilizando fármacos que estimulem a produção e libertação de dopamina; indiretamente através do uso de fármacos inibidores do metabolismo da dopamina ou a combinação de ambas as estratégias num esforço sinérgico. Em certos estádios da SP pode-se recorrer ao bloqueio da atividade colinérgica mediante a utilização de fármacos antimuscarínicos.

Uma das abordagens no tratamento farmacológico da SP consiste em realizar um aporte exógeno de dopamina, contudo, seria leviana a administração exclusiva de dopamina exógena para a reposição dos níveis deste neurotransmissor. Neste sentido, é necessário ter em conta o metabolismo da dopamina e as suas características bioquímicas e fisiológicas. Em primeiro lugar, a dopamina é uma molécula muito polar e, portanto, incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE).

Na terapia antiparkinsoniana pretendem-se os efeitos da dopamina ao nível do SNC, pelo que aquando da administração da dopamina por quaisquer vias convencionais (oral ou sub-lingual na forma de comprimidos, ou por via endovenosa em soro glicosado), os únicos resultados que se conseguiriam alcançar seriam os seus efeitos periféricos, como por exemplo, a estimulação cardíaca. Esta situação pode ser obviada mediante a administração do seu precursor periférico, o aminoácido DOPA, na sua forma isomérica fisiológica (*levo*), este por seu turno, consegue atravessar a BHE, devido à existência de um sistema de transporte ativo, específico para aminoácidos aromáticos. A levodopa uma vez que se encontra no SNC sofre descarboxilação enzimática (*vide* Esquema 1.3), convertendo-se em dopamina que suprime a escassez deste neurotransmissor nos gânglios basais, corrigindo a sintomatologia na SP.

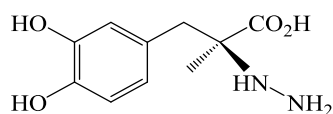
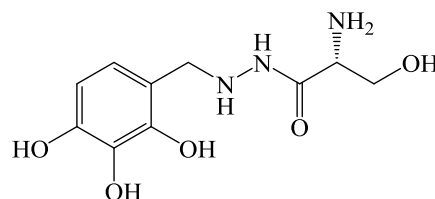
No entanto, a levodopa também pode originar dopamina ao nível periférico, i.e., o enzima que catalisa a descarboxilação da levodopa (levodopa descarboxilase) também se encontra ao nível periférico, convertendo cerca de 90% da levodopa administrada, o que resulta no surgimento de efeitos periféricos indesejáveis (e.g. taquicardia), com diminuição da quantidade de levodopa que chega ao SNC.

Inibidores reversíveis do levodopa descarboxilase periférico

Durante 40 anos a levodopa (L-dopa), combinada com um inibidor do levodopa descarboxilase periférico tem sido encarada como padrão no tratamento da SP.⁶¹ O uso da levodopa justifica-se na medida que é um precursor endógeno do neurotransmissor DA, sendo absorvido a nível do trato gastrointestinal e, adicionalmente, consegue atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), ao contrário da dopamina, daí que não seja usada no tratamento da SP. Contudo, a levodopa não pode ser administrada sem a co-administração de inibidores reversíveis do levodopa descarboxilase (DDC) periférico como a **carbidopa**⁶³ ou a **benserazida**. Estes inibidores do DDC impedem que a L-dopa seja perifericamente degradada, aumentando a sua concentração no SNC em 70% quando administrados concomitantemente com a levodopa. Suplementos de vitamina B₆ são co-enzimas para o levodopa descarboxilase e, portanto, devem ser evitados.

⁶¹Davie, C. A. *British Medical Bulletin* **2008**, 86, 109-127.

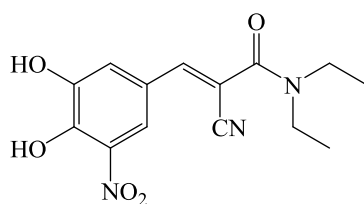
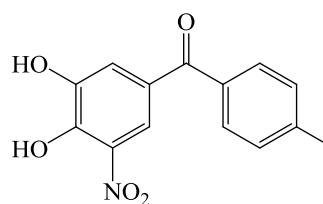
⁶³Gilbert, J. A.; Frederick, L. M.; Ames, M. M. *American Association for Cancer Research* **2000**, 6 (11): 4365-4372.

**Carbidopa****Benserazida**

Inibidores do catecol-O-metiltransferase (COMT)

O COMT é um enzima envolvido no metabolismo periférico da L-dopa. Neste grupo de fármacos destacam-se o **entacapone**, que complementa a ação dos inibidores do descarboxilase de aminoácidos. Assumindo que o volume de distribuição permanece inalterado, a adição de entacapone aumenta a semi-vida plasmática da levodopa em aproximadamente 45% após cada dose. Da mesma forma o **tolcapone**, produz um aumento da semi-vida da levodopa, mesmo embora seja dado independentemente do regime de dose da levodopa. Desta forma, estes inibidores do COMT devem ser administrados conjuntamente com a levodopa e um inibidor do DDC periférico, com o intuito de aumentar a semi-vida da dopamina.^{64,65}

O tolcapone foi inicialmente retirado do mercado em 1998 devido a estudos que alegam que este fármaco apresenta hepato-toxicidade, mas foi reintroduzido em 2004 para uso restrito sob monitorização segundo *guidelines*. Este não é o caso do entacapone, o qual é também disponível como um medicamento triplo, em associação com levodopa e um inibidor do descarboxilase de aminoácidos. O entacapone e o tolcapone são inibidores reversíveis, potentes e específicos do COMT que oferece benefícios significativos na terapêutica da SP.

**Entacapone****Tolcapone**

⁶⁴Forsberg, M. M.; Huotari, M.; Savolainen, J.; Mannisto P. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, 24, 503.

⁶⁵Seeberger, L. C.; Hauser, R. A. *Expert Rev. Neurother.* **2009**, 9, 929.

Não obstante, a eficácia terapêutica da levodopa diminui ao longo do tempo da terapêutica devido tanto à progressão natural da síndrome como também, possivelmente, devido a mecanismos de retroação negativa de compensação através da diminuição da atividade dos recetores dopaminérgicos face à terapêutica. Além do mais, a terapêutica com levodopa está associada a efeitos secundários de desenvolvimento lento, em média entre 2-3 anos, como o surgimento de discinesias (movimentos de agitação involuntários) com uma taxa média de 10% por ano, embora esta taxa seja maior em pacientes com início da sintomatologia em idades mais precoces.⁶¹ Flutuações motoras estão, na maioria das vezes, relacionadas com a duração e exposição à levodopa, enquanto as discinesias são, predominantemente, devido à duração do tratamento.⁶⁶ Outro efeito secundário verificado na terapêutica com levodopa são as flutuações na resposta antiparkinsoniana (efeito "on-off"). Estudos prévios,^{67,68} com o objetivo de verificar se o tratamento da SP com levodopa tem influência na taxa de progressão da doença foram inconclusivos quanto ao facto da levodopa poder conferir, em certo ponto, neurotoxicidade.⁶¹

Agonistas Dopaminérgicos

O uso de agonistas dopaminérgicos no tratamento da SP iniciou-se em 1974 por Donald Calne, com a introdução na terapêutica da **bromocriptina**. Este fármaco foi inicialmente utilizado como terapêutica complementar da levodopa com o intuito de diminuir os efeitos motores associados à levodopa. Recentemente, tem-se verificado a sua utilização como monoterapia da SP, com o objetivo de postergar a iniciação do tratamento com levodopa, ou em combinação com doses baixas da mesma.⁶⁹

Os efeitos inerentes ao uso deste tipo de agonistas dopaminérgicos devem-se ao facto de estes estimularem diretamente e de forma contínua os recetores dopaminérgicos pré- e pós-sinápticos.⁷⁰ Existem oito agonistas dopaminérgicos disponíveis, sendo que seis podem ser administrados por via oral, destes, quatro são derivados ergóticos como a bromocriptina, **pergolida**, **cabergolina** e **lisurida**; e dois não ergóticos, o **ropinirol**, o **pramipexol**. A **rotigotina** é um agonista não ergótico disponível sob a forma de penso transdermal.

A **apomorfina** é um derivado da morfina, tendo sido usada desde 1951 em casos de SP,⁷¹ mas o seu primeiro uso clínico é datado de 1970 por Cotzias *et al.*⁷²

⁶¹Davie, C. A. *British Medical Bulletin* **2008**, 86, 109-127.

⁶⁶Schrag, A.; Quinn, N. *Brain* **2000**, 123, 2297-2305.

⁶⁷Fahn, S. *Arch Neurol* **1999**, 56, 529-535.

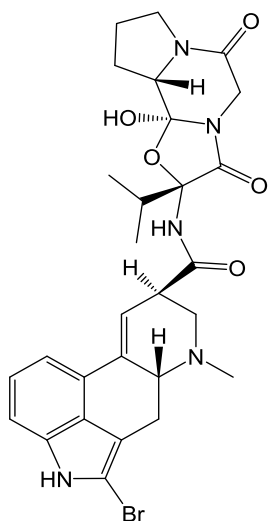
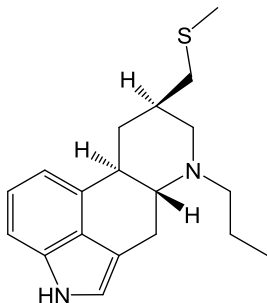
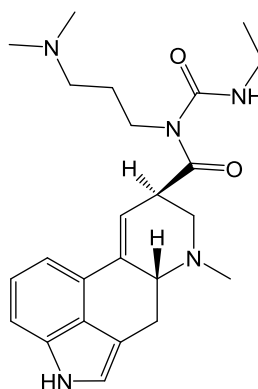
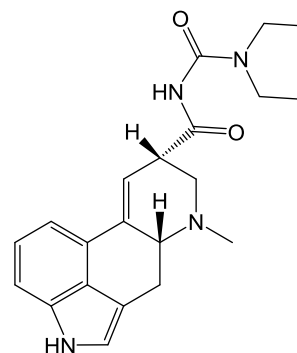
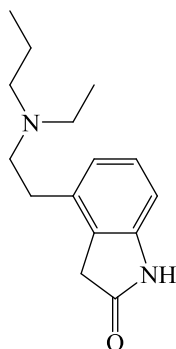
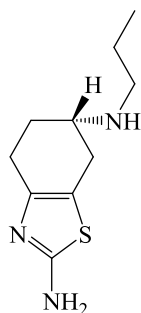
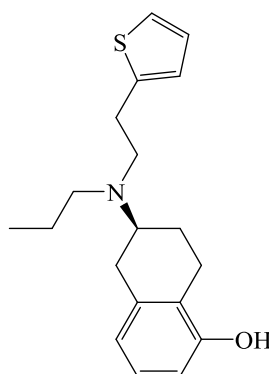
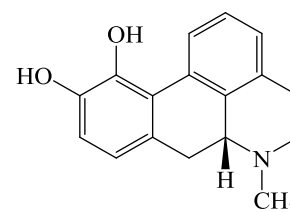
⁶⁸Parkinson Study Group *N Engl Med J* **2004**, 351, 2498-2508.

⁶⁹Foley, P.; Gerlach, M.; Double, K. L.; Riederer, P. *J. Neural. Transm.* **2004**, 111, 1375.

⁷⁰Radad, K.; Gille, G.; Rausch, W.-D. *Pharmacol. Rep.* **2005**, 57, 701.

⁷¹Schwab, R.; Amador, L.; Lettvin, J. *Trans Am Neurol Assoc* **1951**, 56, 251-3.

⁷²Cotzias, G.; Papavasiliou, P.; Fehling, C.; Kaufman, B.; Mena, I. *N Engl J Med* **1970**, 282, 31-3.

**Bromocriptina****Pergolida****Cabergolina****Lisurida****Ropinirol****Pramipexol****Rotigotina****Apomorfina**

As suas propriedades eméticas e tempo de semi-vida curto tornam o uso oral impraticável, sendo administrada por via intravenosa. O seu uso na terapia farmacológica da SP é efetivo porque a apomorfina tem forte ação dopaminérgica, com um efeito rápido (entre 3-20 minutos após injeção), contudo, não duradouro.⁷³

Tem surgido grande celeuma no que se refere à segurança destes agonistas dopaminérgicos, havendo indícios de efeitos secundários graves em pacientes de idade mais avançada, não descurando os possíveis efeitos secundários em pacientes mais jovens, alertando que estes devem ser sujeitos a acompanhamento médico aquando da terapêutica com agonistas dopaminérgicos.

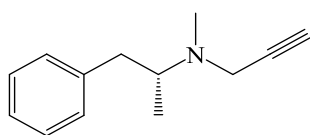
⁷³Chaudhuri, K.; Clough, C. *BMJ* **1998**, 316, 641.

A cabergolina possui elevada afinidade para os recetores dopaminérgicos D₂ e D₃, contudo, têm surgido inúmeros trabalhos que relacionam a degeneração fibrótica não inflamatória das válvulas cardíacas com agonistas ergóticos,^{74,75} com especial relevo para este ergótico⁷⁶ e a pergolida.⁷⁷ Por essa razão, estes dois fármacos não são recomendados como primeira linha de tratamento da SP. Para os pacientes que façam terapêutica com agonistas ergóticos recomenda-se vigília médica. Um efeito incomum, porém descrito, associado aos agonistas dopaminérgicos não ergóticos como o pramipexol, é um risco incrementado para o jogo patológico.^{78,79}

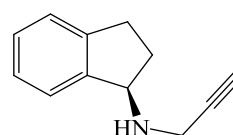
Inibidores do monoamina oxidase B (MAO-B)

Este grupo de fármacos pertence à família dos inibidores dos enzimas responsáveis pelo catabolismo da dopamina. Os inibidores do MAO-B foram amplamente usados segundo o estudo DATATOP (*Deprenyl and tocopherol antioxidative therapy of parkinsonism*)⁸⁰ para a averiguação da sua eficácia na melhoria da sintomatologia e do presumível efeito neuroprotetor conferido por esta classe de fármacos. Contudo, um subsequente estudo⁸¹ envolvendo mais de 700 pacientes revelou um significativo aumento na mortalidade em pacientes tratados com a **selegilina**⁸² e levodopa, comparativamente ao tratamento com apenas levodopa ou bromocriptina. No entanto, estudos posteriores não confirmaram esses resultados, tendo mesmo sido sugestionado o oposto, uma possível redução na mortalidade.⁸³ Um estudo mais recente e mais expressivo, envolvendo 3525 pacientes, revela que os inibidores do MAO-B reduzem a necessidade de levodopa e a incidência de flutuações motoras, sem efeitos secundários substanciais ou riscos de mortalidade acrescidos.⁸⁴

Estudos envolvendo a **rasagilina**,⁸⁵ um novo inibidor do MAO-B, demonstraram eficácia tanto em casos precoces como em situações clínicas mais avançadas na SP.⁸⁶



Selegilina



Rasagilina

⁷⁴Muller, T.; Fritze, J. *J Clin Neuropharmacol* **2003**, 26, 109-111.

⁷⁵Zanettini, R.; Antonini, A.; Gatto, G. *et al. N Engl J Med* **2007**, 356, 39-46.

⁷⁶Schade, R.; Andersohn, F.; Suissa, S.; Haverkamp, W.; Garbe, E. *N Engl J Med* **2007**, 356 (1), 29-38.

⁷⁷Breitenstein, C. *et al. Neuropsychopharmacology* **2006**, 31 (11), 2552-2564.

⁷⁸Voon, V.; Hassan, K.; Zurowski, M. *et al. Neurology* **2006**, 66, 1750-1752.

⁷⁹Imamura, A.; Uitti, R. J.; Wszolek, Z. K. *Parkinsonism Relat Disord* **2006**, 12, 506-508.

⁸⁰Parkinson's Study Group *N Engl J Med* **1989**, 321, 1364-1371.

⁸¹The Parkinson's Disease Research Group of the United Kingdom *BMJ* **1995**, 311, 1602-1607.

⁸²Patkar, A. A.; Pae, C.; Masand, P. S. *CNS Spectr.* **2006**, 11, 363.

⁸³Parkinson's Study Group *Ann Neurol* **1996**, 39, 37-45.

⁸⁴Ives, N. J.; Stowe, R. L.; Marro, J. *et al. BMJ* **2004**, 329, 593.

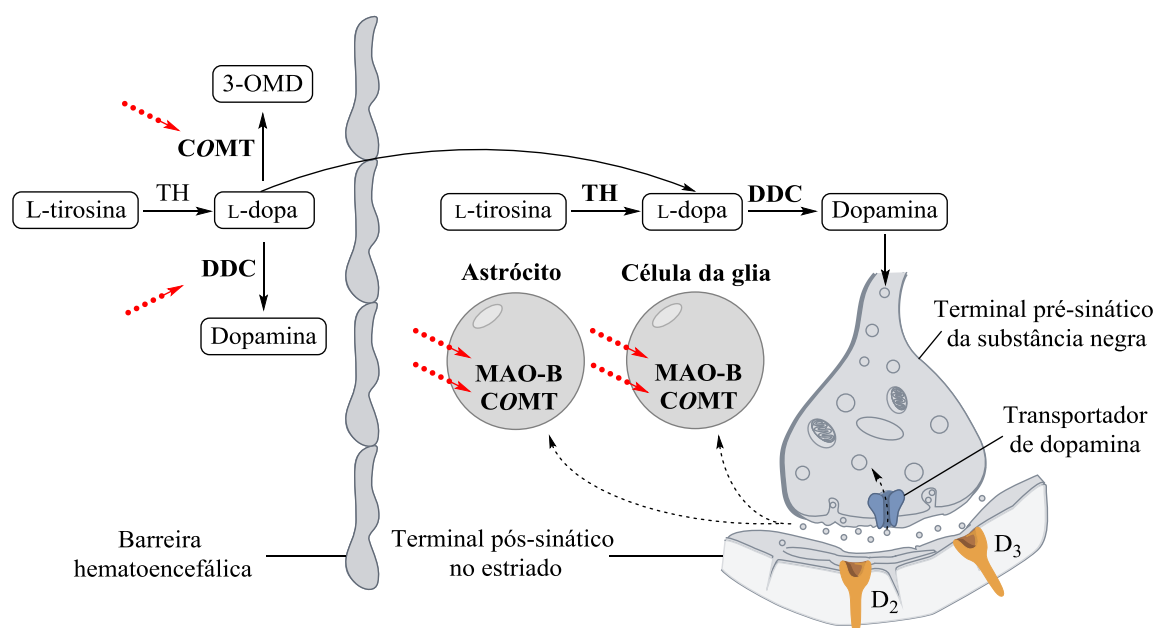
⁸⁵Youdim, M. B. H.; Bakhle, Y. S. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, 147, S287.

⁸⁶Parkinson's Study Group *Arch Neurol* **2002**, 59, 1937-1943.

Na busca de possíveis soluções para esta síndrome neurodegenerativa, foram levados a cabo inúmeros estudos de atividade biológica com o tripéptido PLG, isolado pela primeira vez de tecido estriado bovino em 1971,^{87,88} que revelaram a sua atividade em transtornos do sistema nervoso central. Mais tarde, observou-se que o PLG exerce o seu efeito neuroprotetor através da modulação positiva sobre o sistema dopaminérgico,⁸⁹ aumentando a afinidade de ligandos agonistas sobre os recetores dopaminérgicos do tipo D₂ (D_{2S} e D_{2L}) e D₄, ainda que não apresente quaisquer ações sobre os restantes tipos de recetores (D₁, D₃ e D₅).

Foi também proposto que o PLG poderia atenuar o efeito do guanilimido difosfato (Gpp[NH]p), o análogo não hidrolisável da guanosina trifosfato (GTP), em culturas celulares de neuroblastoma humano transfetado com ADN complementar do recetor D₂⁹⁰ em membranas de estriado bovino.⁹¹

Além destes resultados *in vitro*, este tripéptido mostrou ser eficaz como modulador positivo de agonistas dopaminérgicos *in vivo*, em modelos de ratos exibindo fenotipicamente sintomatologia típica parkinsoniana ou de discinesia.



Esquema 1.5

Esquema-síntese do metabolismo da L-dopa e da dopamina e principais enzimas envolvidos nesses processos evidenciando-se estes como os atuais alvos terapêuticos na SP através das setas a vermelho.

⁸⁷Nair, R. M. G.; Kastin, A. J.; Schally, A. V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, 43, 1376.

⁸⁸Durcker, G. E.; Ritzmann, R. F.; Wichlinski, L. J.; Engh, K.; Gordon, J. H.; Fields, J. Z. *Pharmacol. Biochem. Be.* **1994**, 47, 141.

⁸⁹Plotnikoff, N. P.; Kastin, A. J.; Anderson, M. S.; Schally, A. V. *Life Sci.* **1971**, 10, 1279.

⁹⁰Verma, V.; Mann, A.; Costain, W.; Pontoriero, G.; Castellano, J., M.; Skoblenick, K.; Gupta, S. K.; Pristupa, Z.; Niznik, H. B.; Johnson, R. L.; Nair, V. D.; Mishra, R. K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 315, 1228-1236.

⁹¹Srivastava, L. K.; Bajwa, S. B.; Johnson, R. L.; Mishra, R. K. *J. Neurochem.* **1988**, 50, 960-968.

Anticolinérgicos e Amantadina

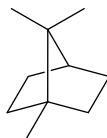
Os agentes anticolinérgicos constituíram, durante muitos anos, o foco central no tratamento da SP. Atuam, principalmente, através da redução da atividade colinérgica produzida pela perda do controlo inibitório dopaminérgico mas, a maior parte destes fármacos, pode também inibir a recaptação pré-sináptica e o armazenamento de dopamina, o que conduz a um aumento da concentração de dopamina na fenda sináptica.

Estes fármacos possuem uma eficácia limitada nas formas pouco severas de parkinsonismo e a sua ação mais interessante centra-se no combate à rigidez e, em menor extensão, os tremores e a hipocinesia (redução do movimento).

Do ponto de vista químico, os agentes anticolinérgicos utilizados no tratamento da SP exibem uma elevada lipofilia, consequência da presença de um ou mais anéis aromáticos e do elevado efeito estérico devido à tripla substituição do átomo de azoto da amina terciária que apresentam, o que provoca *ocultação* do par eletrónico não compartilhado.

Desta maneira é possível distinguir características transversais nesta classe de fármacos:

1. Um grupo amino terciário, cujos substituintes não devem ser grupos muito volumosos, e.g., metilo, etilo ou formando parte de um anel alifático.
2. Um átomo eletronegativo separado do *N* amínico terciário por uma cadeia de dois ou três átomos de carbono. Normalmente, é um átomo de oxigénio, ainda que possa ser um átomo de azoto ou mesmo um átomo de carbono com hibridação sp^2 .
3. Um dos anéis aromáticos próximos ao átomo eletronegativo, sendo estes que atuam como inibidores dos recetores muscarínicos da acetilcolina no SNC. Eventualmente estes anéis aromáticos podem ser substituídos por sistemas anulares alifáticos complexos, como o **bornano** ou outras estruturas similares.

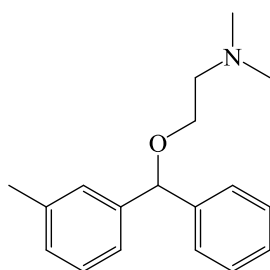


Bornano

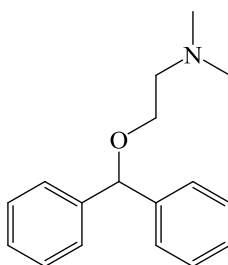
Derivados de benzidriléteres

Esta classe de compostos é derivada do álcool benzidrílico, entre os quais destacam-se a **orfenadrina** e a **etanautina**. A primeira possui um efeito anticolinérgico, atuando como antagonista dos recetores mACh,⁹² possui ainda uma ação anti-histamínica atuando nos recetores H₁,⁹³ antagoniza os recetores NMDA (*N*-metil-D-aspartato),⁹⁴ inibe o *reuptake* de norpinefrina (bloqueador NET),⁹⁵ e bloqueia ainda os canais de sódio Na_v1.7, Na_v1.8 e Na_v1.9,⁹⁶ assim como o canal de potássio hERG.⁹⁷

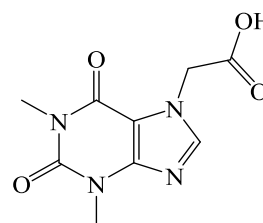
No que tange à etanautina esta é utilizada genericamente sob a forma de um sal de monoacefilinato, de modo a contrabalançar a ação estimulante da **acefilina** através do efeito sedativo da etanautina, resultando num melhor perfil terapêutico.



Orfenadrina



Etanautina



Acefilina

Derivados de fenil-álcoois terciários

Estes derivados são os mais importantes no grupo dos anticolinérgicos eficazes no tratamento da SP. Um deles é o **tri-hexilfenidilo**, um agente antiparkinsoniano da classe dos antimuscarínicos. Este fármaco liga-se aos recetores muscarínicos M₁⁹⁸ e, possivelmente, a recetores de dopamina.⁹⁹ Estima-se que 50-75% dos pacientes com SP reajam positivamente e experienciem uma melhoria entre 20-30% da sintomatologia. Para aumentar a atividade terapêutica o tri-hexilfenidilo é, geralmente, prescrito concomitantemente com a levodopa, outro antimuscarínico ou anti-histamínico. A combinação de agonistas dopaminérgicos como a cabergolina também é possível, sendo resultado de uma abordagem multidimensional.

⁹²Syvälähti, E. K.; Kunelius, R.; Laurén, L. *Pharmacology & Toxicology* **1988**, 62 (2), 90-94.

⁹³Rumore, M. M.; Schlichting, D. A. *Life Sciences* **1985**, 36 (5), 403-416.

⁹⁴Kornhuber, J.; Parsons, C. G.; Hartmann, S. *et al. Journal of Neural Transmission* **1995**, 102 (3), 237-246.

⁹⁵Pubill, D.; Canudas, A. M.; Pallàs, M. *et al. The Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1999**, 51 (3), 307-312.

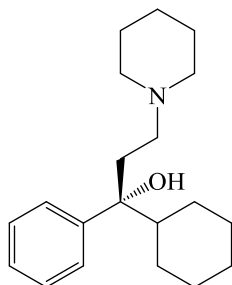
⁹⁶Desaphy, J. F.; Dipalma, A.; De Bellis, M. *et al. Pain* **2009**, 142 (3), 225-235.

⁹⁷Scholz, E. P.; Konrad, F. M.; Weiss, D. L. *et al. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **2007**, 376 (4), 275-284.

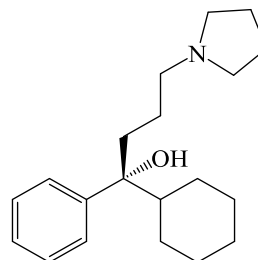
⁹⁸Giachetti, A.; Giraldo, E.; Ladinsky, H.; Montagna, E. *British Journal of Pharmacology* **1986**, 89 (1), 83-90.

⁹⁹Berke, J. D.; Hyman, S. E. *Neuron* **2000**, 25 (3), 515-532.

Outro derivado anticolinérgico que faz parte da segunda linha de fármacos no tratamento da SP é a **prociclina**¹⁰⁰. O seu uso é limitado, uma vez que se sabe que este fármaco é capaz de melhorar o tremor, mas não a bradicinesia.



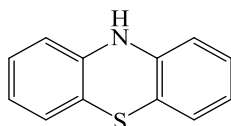
Tri-hexilfenidilo



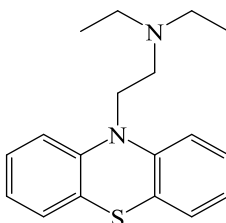
Prociclina

Derivados da fenotiazina

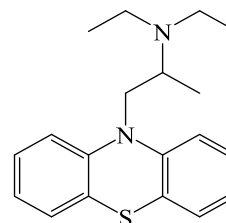
Os anéis aromáticos estão rigidamente unidos, formando parte de um anel fenotiazínico. Estes compostos são etilenodiaminas que, apesar da sua ação anticolinérgica, exercem marcados efeitos sobre os recetores H₁ de histamina. A **dietazina** e a **etopropazina** são derivados da fenotiazina e são usados como agentes antiparkinsonianos, possuindo ações anticolinérgicas, anti-histamínicas e antiadrenérgicas. São também usados no alívio da síndrome extrapiramidal induzido por fármacos como outras fenotiazinas, mas à semelhança de outros compostos, com propriedades antimuscarínicas.



Fenotiazina



Dietazina

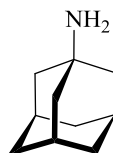


Etopropazina

¹⁰⁰Adamson, D. W.; Barrett, P. A.; Wilkinson, S. *Journal of the Chemical Society* **1951**, 11 (0), 52-60.

Amantadina

A **amantadina** é um fármaco aprovado para o uso como antiparkinsoniano, mas também é sobejamente utilizado como antivírico. Apesar disso, a sua efetividade como antiparkinsoniano é inconclusiva. Um estudo revela que existe pouca evidência para suportar a sua eficácia e segurança, contudo continua a ser prescrita.¹⁰¹ A amantadina é um antagonista fraco dos recetores de glutamato do tipo NMDA,^{102,103} aumenta a libertação de dopamina e bloqueia o seu *reuptake*. Pode ser usada como monoterapia ou juntamente com a levodopa. Um possível efeito secundário do uso da amantadina é o *livedo reticularis* (padrão vascular reticulado de coloração arroxeadada causada pelo inchaço das vênulas devido à obstrução de capilares por trombos) quando usada no tratamento da SP.¹⁰⁴



Amantadina

Abordagem cirúrgica - Estimulação Cerebral Profunda (ECP)

Em 2012, o órgão regulador norte-americano, *Food and Drug Administration* (FDA), aprovou a ECP como tratamento na SP.¹⁰⁵ Este tratamento baseia-se num procedimento invasivo que envolve a implantação de um dispositivo médico (*pacemaker* cerebral) que envia impulsos elétricos para áreas cerebrais específicas.

A ECP não cura a SP, mas pode ser de extrema importância na redução de alguns dos sintomas associados a esta síndrome, melhorando a qualidade de vida dos pacientes que recorrem a este procedimento.¹⁰⁶ Esta cirurgia é realizada apenas em pacientes cuja sintomatologia não pode ser adequadamente controlada com a terapia farmacológica disponível, ou cuja medicação possua efeitos colaterais severos que justifique este procedimento.

¹⁰¹Crosby, N. J.; Deane, K.; Clarke, C. E. Amantadine in Parkinson's disease. In Clarke, C. E. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2003**, John Wiley & Sons, Ltd.

¹⁰²Kornhuber, J.; Bormann, J.; Hübers, M.; Rusche, K.; Riederer, P. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sect.* **1991**, 206, 297-300.

¹⁰³Blanpied, T. A.; Clarke, R. J.; Johnson, J. W. *Journal of Neuroscience* **2005**, 25 (13), 3312-3322.

¹⁰⁴Vollum, D. I.; Parkes, J. D.; Doyle, D. *Br Med J* **1971**, 2, (5762), 627-8.

¹⁰⁵Kringelbach, M. L.; Jenkinson, N.; Owen, S. L. F.; Aziz, T. Z. *Nature Reviews Neuroscience* **2007**, 8, 623-635.

¹⁰⁶Kleiner-Fisman, G.; Herzog, J.; Fisman, D. N.; Tamma, F.; Lyons, K. E.; Pahwa, R.; Lang, A. E.; Deuschl, G. *Mov. Disord.* **2006**, 21 (14), 290-304.

Os efeitos decorrentes da estimulação elétrica através de impulsos de alta frequência na fisiologia das células nervosas e dos neurotransmissores encontra-se em debate, porém através do envio destes impulsos elétricos em regiões específicas do cérebro consegue mitigar¹⁰⁷ e/ou diminuir os efeitos secundários induzidos pela terapêutica farmacológica,¹⁰⁸ permitindo reduzir o esquema terapêutico e/ou tornando-o mais tolerável.

Não obstante, a ECP revelou ser de grande valia na redução sintomatológica em alguns pacientes com SP, existe um potencial risco de complicações graves associado a este procedimento,¹⁰⁹ que dizem respeito a riscos comuns a quaisquer procedimentos invasivos, e.g. infeções (3-5%) e hemorragias (1-2%).¹¹⁰

Os mecanismos por detrás do alívio sintomático da SP com recurso à ECP são, até à data, desconhecidos.

¹⁰⁷Moro, E.; Lang, A. E. *Expert Review of Neurotherapeutics* **2006**, 6 (11), 1695-1705.

¹⁰⁸Apetauerova, D.; Ryan, R. K.; Ro, S. I.; Arle, J.; Shils, J.; Papavassiliou, E.; Tarsy, D. *Movement Disorders* **2006**, 21 (8), 1277-1279.

¹⁰⁹Gildenberg, P. L. *Stereotact Funct Neurosurg* **2005**, 83 (2-3), 71-79.

¹¹⁰Doshi, P. K. *Stereotact Funct Neurosurg* **2011**, 89 (2), 89-95.

1.3. CIRCUITOS E RECETORES DOPAMINÉRGICOS

1.3.1. Antecedentes

Em 1958, no laboratório de Farmacologia Química do Instituto Nacional do Coração na Suécia, Arvid Carlsson e Nils-Åke Hillarp detetaram a presença de dopamina no cérebro e pouco depois, em 1959, Bertler e Rosengren detetaram uma elevada concentração da mesma no corpo estriado, na qual se encontra uma baixa concentração de noradrenalina. Estes feitos levaram a descartar a ideia existente nessa época de que a dopamina era um simples precursor de outras catecolaminas.

A dopamina é, com efeito, um dos neurotransmissores catecolaminérgicos mais importantes do SNC. É um neurotransmissor versátil, que participa na regulação de diversas funções fisiológicas que vão desde o controlo do movimento até ao desenvolvimento de condutas de base emocional.

1.3.2. Circuitos dopaminérgicos

Os circuitos dopaminérgicos são *vias* de transmissão do neurotransmissor dopamina entre diferentes regiões cerebrais. Assim, no caso da transmissão de dopamina são conhecidas quatro *vias* principais, a saber: a *via nigroestriada*, a *mesolímbica*, a *mesocortical* e a *via tuberoinfundibular* (Figura 1.1).¹¹¹

Via nigroestriada: é a *via* de controlo do movimento. A dopamina oriunda de uma zona cerebral denominada **substância negra**, que por sua vez está conectada com o **corpo estriado**, que desempenha um papel importante no controlo do sistema músculo-esquelético. A perda de neurónios dopaminérgicos na substância negra é um dos principais marcos patológicos que está na base da sintomatologia da SP,¹¹² levando a uma redução expressiva da função dopaminérgica nesta *via*. Note-se que, os sintomas associados a esta síndrome surgem, tipicamente, após a perda de 80-90% da função dopaminérgica. Esta *via* também está envolvida em outras síndromes que afetam o movimento, como a discinesia tardia, um dos efeitos colaterais das drogas ansiolíticas. Estes fármacos bloqueiam os recetores D₂ em várias *vias* cerebrais. A utilização de fármacos que visam reduzir os sintomas psicóticos têm como objetivo a redução da função dopaminérgica na *via mesolímbica*, contudo, como muitos desses fármacos não são muito seletivos, eles podem bloquear a função dopaminérgica em todas as *vias*. Quando a *via nigroestriada* é afetada pelo seu uso, pode-se manifestar desordens de movimento similares às encontradas na SP.

¹¹¹Anden, N. E.; Carlsson, A.; Dahlstroem, A.; Fuxe, K.; Hillarp, N. A.; Larsson, K. *Life Sci* **1964**, 3, 523-530.

¹¹²Diaz, J. *How Drugs Influence Behavior*, Englewood Cliffs: Prentice Hall, **1996**.

Via mesolímbica: é a segunda *via* cerebral em que intervém ativamente a dopamina. Esta tem início a partir dos neurónios da **região tegmental ventral** do cérebro e está conetada ao sistema límbico (responsável, por sua vez, pela regulação das emoções, da motivação, da conduta e o sentido do olfato e diversas funções involuntárias, como o batimento cardíaco ou os ciclos ventilatórios), à *via* núcleos *accumbens*, à amígdala e ao hipocampo, assim como ao córtex pré-frontal mediano. O sistema dopaminérgico do mesolímbico é amplamente apontado como a *via* da recompensa, porém essa hipótese não é unânime.¹¹³

Uma vez que esta *via* está associada com os sentimentos de recompensa e desejo, torna-se implicada em teorias neurobiológicas de adição, esquizofrenia e depressão.¹¹⁴ A adição, perda de controlo face ao uso de uma droga ou a procura compulsiva e abuso de drogas apesar das consequências adversas são devido a um aumento de transmissão dopaminérgica no sistema límbico, cujo mecanismo depende do princípio ativo em causa (psicoestimulantes, opiatos, etanol e nicotina).^{115,116} Tal como os efeitos da adição a drogas, a esquizofrenia e a depressão possuem alterações estruturais e funcionais semelhantes da transmissão dopaminérgica.¹¹⁷

Via mesocortical: transmite dopamina desde a **região tegmental ventral** até ao lóbulo frontal do córtex pré-frontal. É uma das *vias* essenciais à normal função cognitiva do córtex pré-frontal dorsolateral (parte do lóbulo frontal), e pensa-se estar implicada nas respostas emocionais cognitivas e na motivação. Alterações nesta *via* parecem estar relacionadas com psicoses tal como a esquizofrenia. Esta *via* está intimamente associada à *via mesolímbica*, que também é conhecida como *via mesolímbica* da recompensa.

Via tuberoinfundibular: refere-se a uma população de neurónios **no núcleo arqueado do hipotálamo médio basal (região tuberal)** que se projetam na eminência mediana (*região infundibular*). A libertação de dopamina neste local regula a função neuroendocrinal através da estimulação da secreção de prolactina na glândula anterior da pituitária. Alguns fármacos antipsicóticos bloqueiam a transmissão dopaminérgica na *via tuberoinfundibular*, o que causa o aumento dos níveis plasmáticos de prolactina (hiperprolactinemia) que se reflete no surgimento de galactorreia, ginecomastia, disrupção do ciclo menstrual na mulher, problemas visuais, dor de cabeça, infertilidade, entre outros sintomas.

¹¹³Berridge, K. C. *Psychopharmacology* **2007**, 191,391-431.

¹¹⁴Laviolette, S. R. *Schizophrenia Bulletin* **2007**, 33, 971-981.

¹¹⁵Pierce, R. C.; Kumaresan, V. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **2006**, 30, 215-238.

¹¹⁶Janhunen, S.; Ahtee, L. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **2007**, 31, 287-314.

¹¹⁷Van den Heuvel, D. M. A.; Pasterkamp, R. J. *Progress in Neurobiology* **2008**, 85, 75-93.

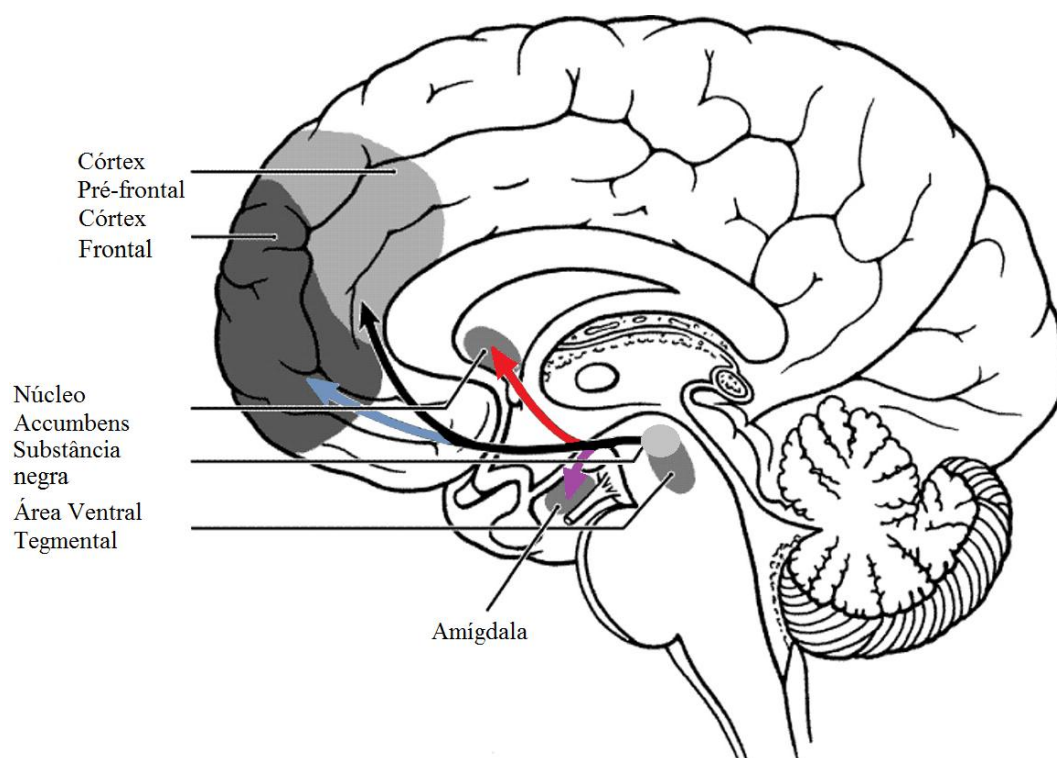


Figura 1.1

Os principais circuitos dopaminérgicos: *via nigroestriada* (a vermelho); *via mesolímbica* (a preto); *via mesocortical* (a azul); *via tuberoinfundibular* (a roxo).

1.3.3. Recetores dopaminérgicos

1.3.3.1. Famílias e estrutura básica dos recetores dopaminérgicos

Os recetores definem-se como moléculas (ou arranjos moleculares) capazes de reconhecer com elevada seletividade um ligando específico e ser ativado por ele com eficácia intrínseca de forma a iniciar um evento celular.¹¹⁸ As proteínas G, são proteínas envolvidas na ativação de cascatas de sinalização intracelular e recebem esta designação pela sua interação com nucleótidos de guanina (GTP/GDP). Muitos recetores encontram-se associados a este tipo de proteínas G, sendo designados por recetores acoplados a proteínas G. Estas últimas revestem-se de extrema importância na transdução de sinais, já que através destas se estimula (G_s) ou se inibe (G_i) o adenilato ciclase (EC 4.6.1.1), ou se estimula (G_q) o fosfolipase C (EC 3.1.4.11), regulando-se assim, os níveis intracelulares de segundos mensageiros como o AMP cíclico (cAMP) e o fosfatidil inositol, respetivamente. Quando os recetores estão acoplados a proteínas G, revelam menos afinidade para os ligandos agonistas (estado de baixa afinidade), ao passo que, aqueles recetores acoplados, i.e., funcionalmente ativos, mostram uma maior afinidade (estado de alta afinidade). Assim, o estado de alta afinidade do recetor corresponde à formação do complexo ternário agonista-recetor-proteína G.

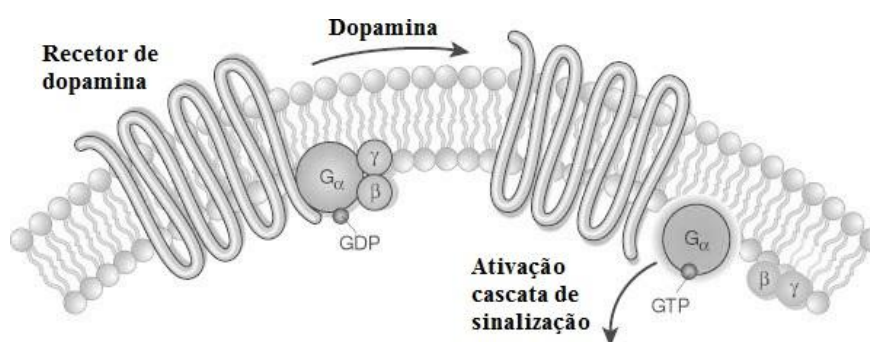


Figura 1.2

Representação esquemática de um recetor de dopamina acoplado a proteínas G.

Desde a descoberta das funções fisiológicas da dopamina, em 1957,¹¹⁹ este transmissor catecolaminérgico tem atraído muita atenção. As ações fisiológicas decorrentes da dopamina são mediadas por cinco proteínas G distintas acopladas a recetores, porém altamente relacionadas.

Estas cinco proteínas G encontram-se divididas em dois grandes grupos: as classes D_1 e D_2 de recetores dopaminérgicos.^{120,121}

¹¹⁸Humphrey, P. P. A. *Ann. New York Acad. Sci.* **1997**, 812, 1.

¹¹⁹Carlsson, A.; Lindqvist, M.; Magnusson, T. *Nature* **1957**, 180, 1200.

¹²⁰Andersen, P. H.; Gingrich, J. A.; Bates, M. D.; Dearry, A.; Falardeau, P.; Senogles, S. E.; Caron, M. G. *Trends Pharmacol Sci* **1990**, 11, 231-236.

¹²¹Vallone, D.; Picetti, R.; Borrelli, E. *Neurosci Biobehav Rev* **2000**, 24, 125-132.

Esta classificação é feita tendo por base as observações bioquímicas que revelam o efeito modulatório da atividade do adenilato ciclase (AC) por parte da dopamina.

Foi mostrado em 1978 que os recetores de dopamina poderiam existir em duas populações distintas, em que apenas um subgrupo estaria positivamente acoplado com o AC.¹²² Esta observação conduziu subsequentemente à separação dos subtipos D₁ e D₂ dos recetores dopaminérgicos, baseado em grande parte, na capacidade de modulação da produção de cAMP e nas diferenças das suas propriedades farmacológicas.¹²³ Mais tarde, com o surgimento da tecnologia de ADN recombinante e com a clonagem molecular de recetores em 1990, verificou-se uma heterogeneidade colossal em termos bioquímicos, farmacológicos e fisiológicos nos mesmos.^{124,125,126} Com base nesses novos dados, estes recetores foram classificados em recetores da classe D₁ (que inclui os subtipos D₁ e D₅ - originalmente identificado como D_{1B})¹²⁷ aos quais se associam funções estimuladoras e recetores de dopamina da classe D₂ (inclui os subtipos D_{2L}, D_{2S}, D₃ e D₄).¹²⁸

Os recetores D₁ são os mais abundantes no SNC, localizando-se em todas as áreas do cérebro que recebem inervação dopaminérgica (corpo estriado, núcleo *accumbens* e córtex); já os recetores D₂ localizam-se nos neurónios que sintetizam dopamina (terminações dopaminérgicas do corpo estriado e do núcleo *accumbens*, no corpo celular destes neurónios na substância negra e na área tegmental ventral).

Todos os recetores dopaminérgicos possuem, na sua constituição, sete domínios transmembranares contituídos cada um por 20-25 resíduos de α -aminoácidos hidrofóbicos, estando os domínios conetados de forma a possuírem, alternadamente, porções extracelulares e intracelulares, estas últimas acopladas a sistemas de transdução intracelulares mediante proteínas G.¹²⁹ A região N-terminal corresponde a um domínio extracelular glicosilado. Os efeitos da ativação destes recetores devem-se à interação que a última ansa citoplasmática e a região C-terminal (ambas intracelulares), estabelecem com as proteínas G. O terceiro domínio citoplasmático é responsável por conferir seletividade a cada subtipo de recetor, na medida que este exhibe diferenças de subtipo para subtipo de recetores.

¹²²Spano, P. F.; Govoni, S.; Trabucchi, M. *Adv Biochem Psychopharmacol* **1978**, *19*, 155-165.

¹²³Kebabian, J. W.; Calne, D. B. *Nature* **1979**, *277*, 93-96.

¹²⁴Bunzow, J. R.; Van Tol, H. H.; Grandy, D. K.; Albert, P.; Salon, J.; Christie, M.; Machida, C. A.; Neve, K. A.; Civelli, O. *Nature* **1988**, *336*, 783-787.

¹²⁵Van Tol, H. H.; Bunzow, J. R.; Guan, H. C.; Sunahara, R. K.; Seeman, P.; Niznik, H. B.; Civelli, O. *Nature* **1991**, *350*, 610-614.

¹²⁶Sunahara, R. K.; Guan, H. C.; O'Dowd, B. F.; Seeman, P.; Laurier, L. G.; Ng, G.; George, S. R.; Torchia, J.; Van Tol, H. H.; Niznik, H. B. *Nature* **1991**, *350*, 614-619.

¹²⁷Tiberi, M.; Jarvie, K. R.; Silvia, C.; Falardeau, P.; Gingrich, J. A.; Godinot, N.; Bertrand, L.; Yang-Feng, T. L.; Freneau, R. T. Jr.; Caron, M. G. *Proc Natl Acad Sci USA* **1991**, *88*, 7491-7495.

¹²⁸Sokoloff, P.; Andrieux, M.; Besanc, R.; Pilon, C.; Martres, M. P.; Giros, B.; Schwartz, J. C. *Eur J Pharmacol* **1992**, *225*, 331-337.

¹²⁹Schwartz, J.-C.; Giros, B.; Martres, M.-P.; Sokoloff, P. *Curr. Trends Treat. Parkinson's Dis., Proc. Symp.* **1992**, 59.

Desta forma, este domínio é responsável pela interação de um dado subtipo de recetor com uma família particular de proteínas G, traduzindo-se nos diferentes sinais intracelulares despoletados.¹³⁰

Os recetores D₁ e D₅ caracterizam-se por possuírem uma ansa curta do domínio VII, uma região C-terminal larga e por se acoplarem a proteínas G_s, ao passo que os recetores D₂, D₃ e D₄ possuem uma estrutura oposta, i.e., uma ansa larga do domínio VII e uma região C-terminal curta, acoplando-se estes últimos a proteínas G_i.

As famílias de recetores dopaminérgicos revelam diferenças substanciais nas suas características moleculares. Existe uma elevada homologia de sequências entre os membros da família D₁, assim como existe entre os membros da família D₂. Em contraste, verifica-se que o grau de homologia entre subtipos de diferentes famílias (D₁ e D₂) corresponde a 42-46%.^{131,132}

Outro dado que corrobora este facto baseia-se na organização genética das diferentes famílias de recetores. Na família D₁ os genes que codificam para os subtipos de recetores desta família não possuem intrões nas suas regiões codificantes, ao passo que na família D₂, todos os subtipos desta família possuem intrões nas suas regiões codificantes, assim existem 6 intrões na região que codifica para o recetor D₂, cinco intrões para o recetor D₃ e três para o recetor D₄.¹³³

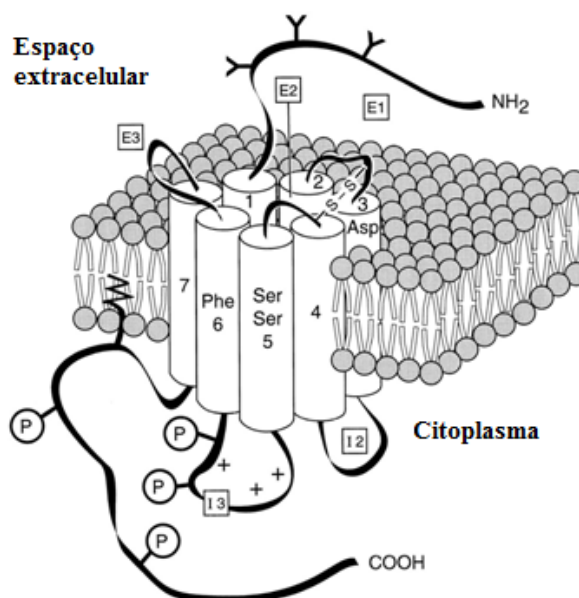


Figura 1.3

Representação esquemática de um recetor de dopamina evidenciando a sua organização em sete domínios.

¹³⁰Dixon, R. A.; Sigal, I. S.; Rands, E.; Register, R. B.; Candelore, M. R.; Blake, A. D.; Strader, C. D. *Nature* **1987**, 326, 73.

¹³¹Missale, C.; Nash, S. R.; Robinson, S. W.; Jaber, M.; Caron, M. G. *Physiol. Rev.* **1998**, 78, 189.

¹³²Sawada, H.; Ibi, M.; Kihara, T.; Urushitani, M.; Akaike, A.; Kimura, J.; Shimohama, S. *Ann. Neurol.* **1998**, 44, 110.

¹³³Gingrich, J. A.; Caron, M. G. *Annu Rev Neurosci* **1993**, 16, 299-321.

1.3.3.2. Recetores da Família D₂

A família de recetores D₂ é constituída por três subtipos denominados D₂, D₃ e D₄. Através da utilização de agonistas seletivos, foi possível determinar as implicações farmacológicas destes recetores, estando envolvidos na bradicinesia, rigidez e tremores, manifestações características de afeções como a SP, ou outras menos frequentes como o síndrome das pernas inquietas de Ekborn. Esta família de recetores relaciona-se, portanto, com as funções motoras, com diferentes respostas observadas no abuso de drogas¹³⁴ e, ainda, com propriedades neuroprotetoras,¹³⁵ entre outras.

O recetor D₂ existe em duas isoformas maioritárias, denominadas de recetores D₂ largos (D_{2L}, constituído por 444 resíduos de α -aminoácidos) e recetores D₂ curtos (D_{2S}, contendo 415 resíduos de α -aminoácidos) formados a partir de um mesmo gene por *splicing* alternativo,¹³⁶ diferindo numa cadeia de 29 resíduos de α -aminoácidos localizados no terceiro *loop* citoplasmático.¹²¹ Estas duas isoformas possuem um padrão de expressão semelhante, sendo que a proporção depende da região cerebral em causa. Estas duas isoformas (D_{2L} e D_{2S}) apresentam um perfil farmacológico análogo, mas diferentes características funcionais, devido ao facto do terceiro *loop* intracelular desempenhar um papel-chave na transmissão do sinal, com relevo na determinação da especificidade de ligação a uma determinada proteína G, e por conseguinte, da ativação de diferentes vias de sinalização intracelulares.¹³⁷

¹²¹Vallone, D.; Picetti, R.; Borrelli, E. *Neurosci Biobehav Rev* **2000**, 24, 125-132.

¹³⁴Volkow, N. D.; Fowler, J. S.; Wang, G. P.; Swanson, J. M. *Mol. Psychiatry* **2004**, 9, 557.

¹³⁵Iida, M.; Miyazaki, I.; Tanaka, K.; Kabuto, H.; Iwata-Ichikawa, E.; Ogawa, N. *Brain Res.* **1999**, 838, 51.

¹³⁶Montmayeur, J. P.; Bausero, P.; Amalaiky, N.; Maroteaux, I.; Hen, R.; Borrelli, E. *FEBS Lett.* **1991**, 278, 239.

¹³⁷Senogles, S. E.; Heimert, T. L.; Odife, E. R.; Quasney, M. W. *J. Biol. Chem.* **2004**, 24, 1601.

1.4. PEQUENOS PÉPTIDOS COM ATIVIDADE NEUROPROTETORA

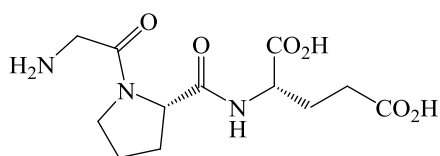
1.4.1. Aspetos Gerais

Vários estudos têm vindo a demonstrar que pequenos péptidos são revestidos de um papel muito importante em processos fisiológicos de natureza variada, dotando este tipo de moléculas de elevado interesse no desenvolvimento de novos fármacos.¹³⁸

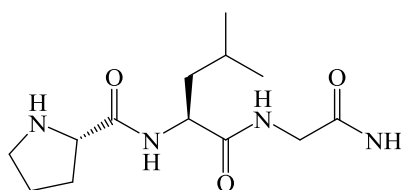
Neste contexto, a utilização de péptidos como potenciais fármacos constitui um importante campo de investigação, apesar da baixa estabilidade metabólica e da pobre absorção que estes compostos normalmente apresentam.¹³⁹ De forma genérica, as ligações amida são bastante sensíveis à atividade de sistemas enzimáticos, não obstante do facto desta classe de compostos ter dificuldade de transportar através das membranas citoplasmáticas e de sofrerem excreção por parte do fígado e rins. Ainda neste contexto, a elevada flexibilidade inerente a estes compostos tem como resultado uma seletividade, muitas vezes, diminuída face a recetores.

Sabe-se, contudo, que os péptidos endógenos atuam de forma muito seletiva numa miríade de processos biológicos e uma vez cumprida a sua função biológica estes sofrem mecanismos de degradação enzimáticos mediado por proteases, não havendo acumulação no organismo e, assim, não se coloca o problema de toxicidade.

Este é o caso do tripéptido **ácido glicil-L-prolil-L-glutâmico (GPE)** que se origina através da clivagem do *N*-terminal do fator de crescimento insulínico tipo 1 (IGF-1), também conhecido como **glipromato** e do tripéptido **L-prolil-L-leucilglicinamida (PLG)**, também designado por **melanostatina** ou fator de inibição da libertação da hormona estimuladora de melanócitos (MIF-1).



GPE
(Glipromato)



PLG
(Melanostatina)

¹³⁸Hokfelt, T.; Broberger, C.; Xu, Z.-Q. D.; Sergeyev, V.; Ubink, R.; Diez, M. *Neuropharmacology* **2000**, 39, 1337.

¹³⁹Trabochi, A., Scarpi, D., Guarna, A. *Amino Acids* **2008**, 34, 1-24.

1.4.2. Introdução aos péptidos

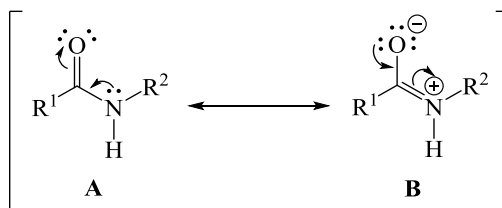
1.4.2.1. Ligação peptídica

As cadeias peptídicas formam-se através da união de dois ou mais α -aminoácidos de forma iterativa. Estas ligações são o resultado da reação entre o grupo carboxilo de um α -aminoácido e o grupo amina de outro, com eliminação de uma molécula de água. Nos péptidos e nas proteínas estas ligações amida recebem a designação de *ligações peptídicas* ou *ligações amida*. A ligação peptídica ou amida (-CONH-), representa-se geralmente como sendo uma ligação simples. No entanto, possui uma série de características que a aproximam mais de uma ligação dupla: os átomos de C, N e O que participam na ligação amida apresentam uma hibridização sp^2 , de modo que as cinco orbitais ligantes do tipo σ adotam uma disposição co-planar. Os eletrões p dos átomos de C, N e O que não estão implicados nas ligações σ podem formar orbitais híbridas π , i.e., podem participar na formação de ligação duplas.

Esta disposição atómica está estabilizada por efeito de ressonância de forma a que os seis átomos implicados na formação da ligação peptídica estão contidos no mesmo plano. Uma consequência importante do efeito de ressonância é que incrementa a polaridade da ligação amida, estabelecendo um momento dipolar. O efeito de ressonância permite ao átomo de azoto doar o seu par de eletrões não ligante ao átomo de carbono do grupo carbonilo, deslocando os eletrões da ligação dupla do carbonilo para o átomo de oxigénio, colocando uma carga negativa neste. O efeito mesomérico é, portanto, altamente estabilizador, uma vez que os eletrões podem ser estabilizados sobre múltiplos átomos, com uma estrutura de ressonância especialmente estável contendo o átomo de O (muito eletronegativo) sob a forma de anião.

O caráter intermédio entre ligação simples e dupla entre os átomos C-N resulta numa distância de ligação mais curta (1.32 Å vs. o comprimento verificado numa ligação simples C-N, 1.47 Å). Este efeito de ressonância permite aumentar a estabilidade da ligação peptídica e reduzir a rotação ao longo da mesma. O caráter de ligação dupla parcial pode ainda ser fortalecido ou enfraquecido tendo em conta o ambiente químico a que está sujeita, e.g, num ambiente altamente hidrofóbico a estrutura de ressonância onde está presente a ligação dupla é limitada uma vez que esta estrutura gera cargas, nomeadamente uma carga negativa no átomo de oxigénio e uma carga positiva no átomo de átomo. Consequentemente, o átomo de azoto aquando da formação de amidas não adota um arranjo piramidal. Estima-se, por exemplo, que a acetamida *in silico* seja descrita em 62% pela estrutura de ressonância A e 28% pela estrutura B.¹⁴⁰

¹⁴⁰Kemnitz, C. R.; Loewen, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (9), 2521-2528.



Por este motivo, cada ligação peptídica pode participar em pontes de hidrogénio, sendo que numa destas ligações o átomo de azoto da amida atua como um dador de hidrogénio e na outra o oxigénio do carbonilo atua como um aceitador de hidrogénio. Esta propriedade contribui notavelmente para a estrutura tridimensional dos péptidos e proteínas. Como o N é menos eletronegativo que o O, a ligação C-O tem 60% de caráter de ligação dupla enquanto que ligação C-N possui 40%. Portanto, a ligação peptídica apresenta características intermédias entre uma ligação simples e uma ligação dupla. Este facto é evidenciado pelas distâncias interatómicas medidas na ligação peptídica entre os átomos C-O e C-N, apresentando-se intermédias entre uma ligação simples e dupla, em ambos os casos. O caráter parcial de ligação simples e dupla da ligação amida impede a livre rotação em torno da ligação que liga os átomos de C e N, apresentando-se como uma ligação rígida.

Aquando da formação da ligação peptídica os C_α dos α -aminoácidos participantes podem estar do mesmo lado, ou, do lado oposto à ligação amida. No primeiro caso, trata-se de uma ligação peptídica *cis* e, no segundo, de uma ligação peptídica *trans*. Em péptidos e proteínas o mais habitual é encontrar ligações peptídicas em *trans*. Quando são poucos os α -aminoácidos que formam o péptido (menos de 10) trata-se de um oligopéptido, e.g. tripéptido (constituído por três resíduos de α -aminoácido). Genericamente, quando o número de α -aminoácidos está compreendido entre 10 e 100 designa-se por polipéptido e, se o número de α -aminoácidos ascende a centena, fala-se então de proteínas. Note-se que as terminologias "polipéptido" e "proteína" não são sempre equivalentes, uma vez que muitas proteínas são formadas por mais do que uma cadeia polipeptídica (e.g. transtirretina). Neste caso, cada polipéptido não se considera como proteína, mas sim como uma subunidade de uma proteína. Numa cadeia (poli)peptídica é possível distinguir-se duas regiões elementares: a *cadeia principal* e as *cadeias laterais*.

A *cadeia principal* ou *esqueleto* (do inglês, *backbone*) é a unidade repetitiva básica, comum a todos os péptidos de igual longitude e é independente da constituição aminoacídica. Esta é formada pelo NH do grupo amina, o C_α (ligado a um hidrogénio e à cadeia lateral) e o CO do grupo ácido carboxílico.

As *cadeias laterais* projetam-se a partir da cadeia principal e são as responsáveis pelas propriedades bioquímicas dos péptidos. Independentemente da longitude da cadeia polipeptídica, num extremo haverá um grupo amina livre (extremo *N-terminal*) e, no extremo oposto, um grupo ácido carboxílico livre (*C-terminal*).

Quando se conhecem os α -aminoácidos que fazem parte da cadeia e a ordem que estão ligados pode-se afirmar que é conhecida a sua sequência. Por convenção, a sequência lê-se começando pelo α -aminoácido que ocupa o extremo amina, ou *N*-terminal. Conhecer a sequência de um péptido ou de uma proteína equivale a conhecer a sua sequência primária, sendo a que está codificada no material genético.

Por este motivo as possibilidades conformacionais dos péptidos (e proteínas) são limitadas. Estes apenas podem alterar de conformação mediante rotação em torno das ligações simples dos C_α tetraédricos (com hibridização sp^3), mas não por rotação em torno da ligação peptídica entre C-N (átomos com hibridização sp^2). Os C_α de cada α -aminoácido estabelecem ângulos de torção (também denominados por ângulos diédricos que variam entre -180° a $+180^\circ$) com os planos que formam as ligações peptídicas contíguas: o ângulo *phi* (ϕ) refere-se à rotação em torno da ligação N- C_α e o ângulo *psi* (ψ) refere-se à rotação em torno da ligação C_α -C.

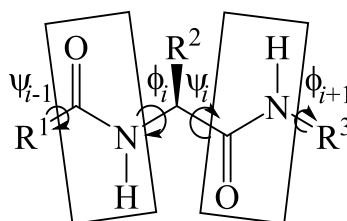


Figura 1.4

Representação dos ângulos diédricos *phi*, ϕ , referente à rotação em torno da ligação N- C_α e *psi*, ψ , referente à rotação em torno da ligação C_α -C.

1.4.2.2. Estrutura dos péptidos

Nos meados de 1950, Linderstrøm-Lang, um eminente enzimologista, conduziu uma palestra na Universidade de Stanford e, para facilitar a comunicação, aplicou três novos termos – *estrutura primária*, *estrutura secundária* e *estrutura terciária* – para convencer a sua audiência da noção que havia uma hierarquia estrutural nas proteínas.^{141,142}

Estes termos, que se referem a diferentes níveis de organização, foram gradualmente adotados pela comunidade científica e tornaram-se impregnados na linguagem científica. A estrutura primária refere-se à estrutura química da cadeia peptídica, i.e., a sequência de resíduos de α -aminoácido ligados entre si através de ligações peptídicas. As ligações de hidrogénio intramoleculares e outras interações não covalentes são responsáveis pelo enrolamento das cadeias peptídicas (*fold*ing) que representa o segundo nível de organização – a *estrutura secundária*.

¹⁴¹Linderstrøm-Lang, K. U. *Lane Lectures*, Vol. VI, p 115. Stanford University Press, Palo Alto, CA, **1952**.

¹⁴²Linderstrøm-Lang, K. U.; Schellman, J. A. Protein structure and enzyme activity, in Boyer, P. D.; Myrback, L. K. eds. *The Enzymes*, **1959**, 2 ed. Academic Press, New York, pp. 443-510.

O empacotamento de um ou mais elementos da estrutura secundária, origina unidades com um nível de organização superior, estamos assim perante a *estrutura terciária*. Um quarto termo, *estrutura quaternária*, emergiu quando se reconheceu que uma entidade distinta pode ser formada pela associação de duas ou mais cadeias polipeptídicas, como é o caso da hemoglobina. Note-se, contudo, que muitos autores utilizam a expressão *sequência primária* em detrimento de *estrutura primária*, apresentando a primeira menor ambiguidade, uma vez que esta designa a *sequência* de resíduos de α -aminoácidos na cadeia peptídica e não a "*estrutura de α -aminoácidos*". Aconselha-se, destarte, o abandono da expressão "*estrutura primária*".¹⁴³

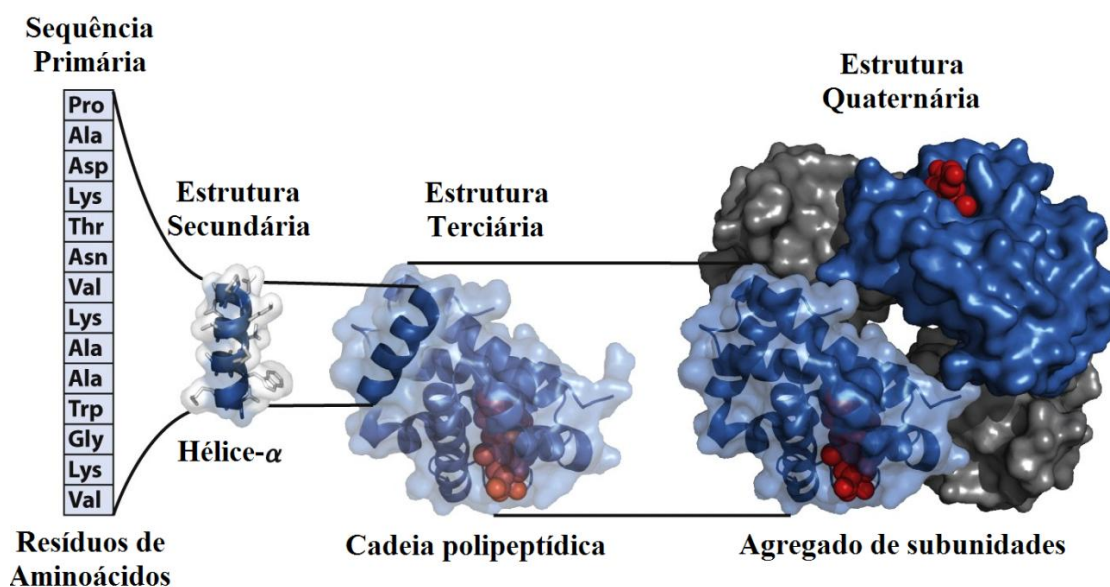


Figura 1.5

Níveis de hierarquização estrutural das cadeias peptídicas, desde a sua sequência primária até à estrutura quaternária. Adaptado de Nelson *et al.*.¹⁴⁴

1.4.2.2.1. Estrutura secundária dos péptidos¹⁴⁴

Na estrutura de um péptido ou de uma proteína, cada α -aminoácido apresenta valores determinados para ϕ e ψ . Como estes são os únicos graus de liberdade que a estrutura apresenta, a conformação da cadeia peptídica fica completamente determinada quando se conhecem os valores de ϕ e ψ para cada α -aminoácido. Se representarmos os valores de ϕ e ψ para todos os α -aminoácidos de um péptido ou proteína, obtém-se o denominado diagrama de Ramachandran (Figura 1.6).

¹⁴³Benoiton, N. L. *Chemistry of Peptide Synthesis*, 1st ed., CRC Press. Taylor & Francis Group: New York, **2006**, p. 283.

¹⁴⁴Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th ed., W. H. Freeman and Company: New York, **2008**, 116-156.

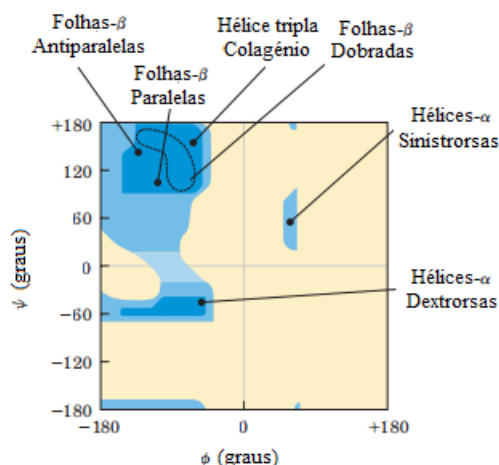


Figura 1.6

Representação de um gráfico de Ramachandran contendo os valores de ϕ e ψ para várias estruturas. Apesar de ser possível a formação de hélices- α sinistrorsas, estas não surgem em proteínas. Adaptado de Nelson *et al.*¹⁴⁴

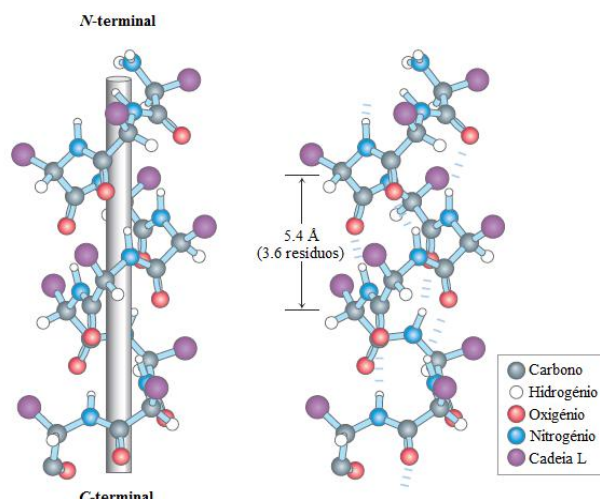
Este diagrama é importante para distinguir três regiões com valores "permitidos" para os ângulos de torção, ou seja, aqueles valores que não dão lugar a impedimentos estéricos na estrutura. Estas regiões correspondem aos elementos de estrutura secundária das proteínas. Note-se que certos valores de ϕ e ψ podem não existir devido a impedimentos estéricos limitando o ângulos de torção.

Os graus de liberdade e outros parâmetros como o número de α -aminoácidos e natureza dos mesmos e as interações intramoleculares são determinantes para definir uma conformação,¹³ que está na base da sua estrutura secundária. De maneira geral, podem-se classificar estes tipos de conformações, baseado na disposição espacial dos resíduos de α -aminoácidos que constituem a cadeia peptídica.

Hélice- α : Nesta estrutura o esqueleto polipeptídico está estreitamente enrolado ao longo do maior eixo da molécula e as cadeias laterais dos resíduos de α -aminoácido projetam-se para fora do esqueleto helicoidal. A estabilização dá-se pela presença das ligações de hidrogénio entre o grupo CON-H de um resíduo de α -aminoácido (i) e o grupo carbonilo do resíduo de α -aminoácido que dista quatro resíduos de α -aminoácido na sequência linear ($i + 4$). O sentido de giro de uma α -hélice pode ser para a direita (hélice dextrorsa) ou para a esquerda (hélice sinistrorsa). As α -hélices encontradas em proteínas são dextrorsas.

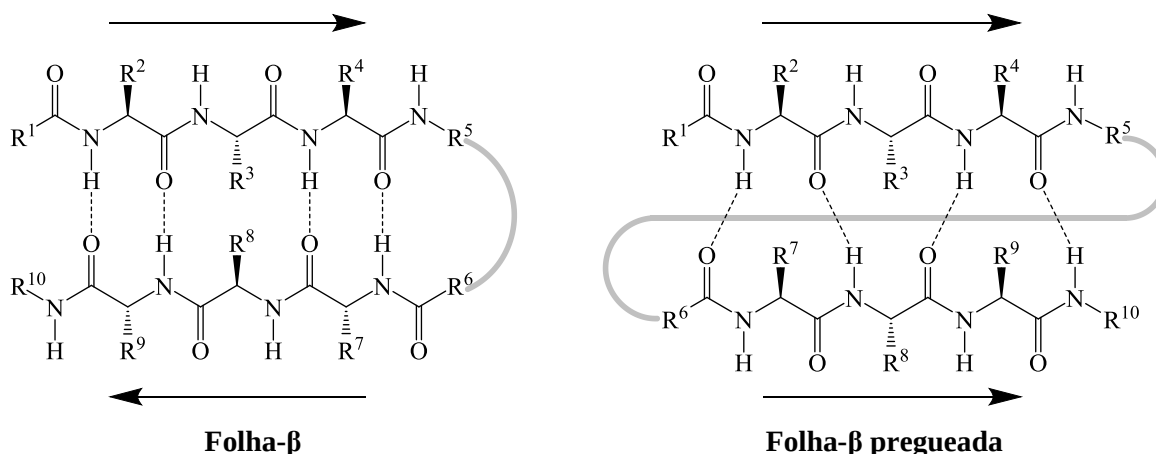
¹³Khan, M.; Eguchi, M. Synthesis of Peptides Incorporating β -Turn Inducers and Mimetics. In Houben-Weyl *Methods of Organic Chemistry*, Murray, G.; Felix, A.; Moroder, L.; Toniolo, C. Eds., **2003**, vol. E, 22c, p. 695.

¹⁴⁴Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th ed., W. H. Freeman and Company: New York, **2008**, 116-156.

**Figura 1.7**

Representação de uma hélice- α (dextrorsa). Adaptado de Nelson *et al.*¹⁴⁴

Folha- β : é um padrão estrutural encontrado em várias cadeias peptídicas, nas quais regiões vizinhas da cadeia polipeptídica associam-se por meio de ligações de hidrogénio, resultando numa estrutura achatada e rígida. A **folha- β pregueada**, ou configuração β , é uma estrutura também mantida por pontes de hidrogénio entre as unidades peptídicas. Neste caso, entretanto, as ligações são estabelecidas entre cadeias polipeptídicas diferentes, distendidas e paralelas, ou entre segmentos distantes e distendidos de uma mesma cadeia. As pontes de hidrogénio são perpendiculares ao eixo das cadeias, e os grupos laterais dos α -aminoácidos projetam-se para cima e para baixo do plano da folha pregueada. Quando o número de cadeias associadas é grande, resulta numa estrutura flexível, mas não elástica.

**Figura 1.8**

Representação de uma folha- β (antiparalela) e de uma folha- β pregueada (paralela). As setas indicam o a direção e o sentido das porções das cadeias apresentadas (N-terminal $\rightarrow$ C-terminal).

¹⁴⁴Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th ed., W. H. Freeman and Company: New York, 2008, 116-156.

Voltas: são motivos de estrutura secundária constituídos por uma sequência de 3-5 resíduos de α -aminoácido, que induzem uma alteração da direção da cadeia peptídica.¹⁴⁵ Esses resíduos não formam estruturas secundárias regulares tais como hélices- α ou folhas- β . Em oposição às hélices- α , os ângulos diedros do esqueleto não são, geralmente, constantes em todos os resíduos envolvidos na volta. As voltas são classificadas de acordo com a distância entre os dois resíduos finais. Assim, tendo em conta o número de resíduos envolvidos, que estabelecem ligações de hidrogénio, podem-se formar voltas específicas em que os resíduos finais (i) encontram-se separados por n ligações peptídicas ($i \rightarrow \pm n$). Tendo em conta este critério, é possível distinguir-se, essencialmente, cinco tipos de voltas, a saber: **voltas- α** ($i \rightarrow \pm 4$); **voltas- β** ($i \rightarrow \pm 3$), sendo este arranjo o mais comum; **voltas- γ** ($i \rightarrow \pm 2$); **voltas- δ** ($i \rightarrow \pm 1$) e, finalmente, **voltas- π** ($i \rightarrow \pm 5$).

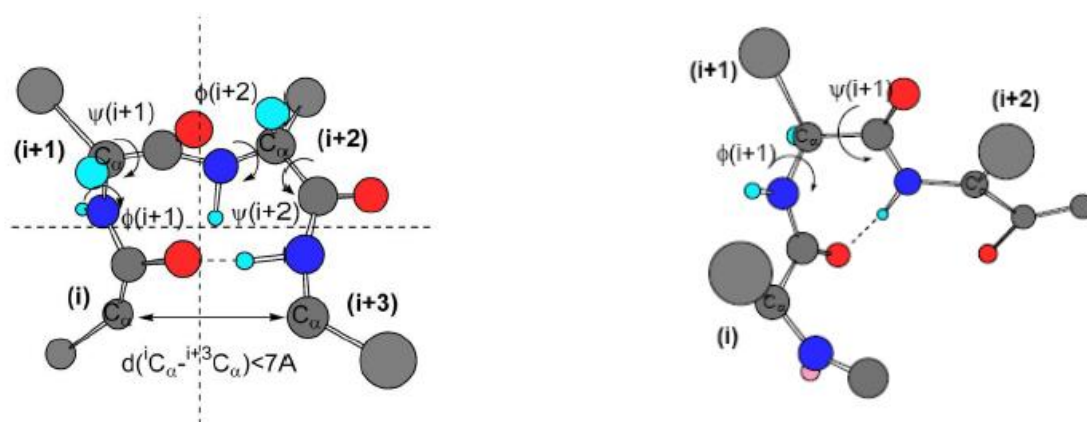


Figura 1.9

Representação de uma volta- β (à esquerda) e de uma volta- γ (à direita).

As **voltas- γ** estabelecem-se entre três resíduos de α -aminoácido formando um pseudociclo de sete átomos. A ligação de hidrogénio estabelece-se entre o carbonilo do primeiro resíduo (i) e o grupo amida do último resíduo ($i + 2$).^{146,147} Existem dois tipos de voltas, denominadas **voltas- γ** e **voltas- γ inversas** que são definidas pelos ângulos diedros do resíduo ($i + 1$).

As **voltas- β** , ou **conformação β -girada**, foram reveladas pela primeira vez em 1968 por Venkatachalam,¹⁴⁷ a sua formação é muito frequente em cadeias peptídicas devido, em grande extensão, à estabilidade que provocam e além disso, são as melhores conhecidas até ao momento.

¹⁴⁵Venkatachalam, C. M. *Biopolymers* **1968**, 6 (10), 1425-1436.

¹⁴⁶Chon, K. C. *Anal. Biochem.* **2000**, 286, 1.

¹⁴⁷Rosenstroem, U.; Skoeld, C.; Plouffe, B.; Beandry, H.; Lindeberg, G.; Botros, M.; Nyberg, F.; Wolf, G.; Karlem, A.; Gallo-Payet, N.; Hallberg, A. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 4009.

Para a formação desta conformação, é necessária a participação de quatro resíduos de α -aminoácido: (i) , $(i + 1)$, $(i + 2)$ e $(i + 3)$, ordenados desde o extremo N -terminal do resíduo (i) até ao extremo C -terminal do resíduo $(i + 3)$, formando um pseudociclo de dez átomos, em que o grupo amida do resíduo $(i + 3)$ participa como dador numa ligação hidrogénio com o grupo carbonilo do resíduo (i) . Destarte, este tipo de conformação obriga a que distância entre os C_α dos resíduos (i) e $(i + 3)$ seja menor que $7\text{\AA}$, sendo que os resíduos $(i + 1)$ e $(i + 2)$ não descrevem uma estrutura helicoidal.

Uma volta- β pode adotar diferentes arranjos espaciais dependendo dos ângulos diedros dos resíduos $(i + 1)$ e $(i + 2)$ que, em regra, apresentam uma abundância variável.

A atividade biológica de um número significativo de péptidos de baixo peso molecular são associados às conformações β -giradas. Este é o caso de uma centena de ligandos reconhecidos por recetores de membrana associados a proteínas G.

1.5. PLG COMO MODULADOR ALOSTÉRICO DE RECETORES DOPAMINÉRGICOS D₂ E POTENCIAL FÁRMACO NO TRATAMENTO DE PATOLOGIAS NEURODEGENERATIVAS DO SNC

1.5.1. Neuropeptídeo PLG

O tripéptido L-prolil-L-leucilglicinamida (PLG), também conhecido como fator de inibição da libertação da hormona estimuladora de melanócitos (MIF-1),^{90,148} é um tripéptido hipotalâmico endógeno derivado da clivagem da hormona oxitocina.^{149,150} O PLG é um neuropeptídeo endógeno encontrado no sistema nervoso central,^{151,152,153} onde estudos farmacológicos mostraram exercer as suas funções biológicas na modulação da transmissão neuronal dopaminérgica na *via nigrostriatal*.^{91,148,154,155} Estudos demonstraram que este neuropeptídeo modula a neurotransmissão dopaminérgica através de processos que não contemplam a síntese, captação, ou metabolismo da dopamina.¹⁵⁶ Mais precisamente exerce um potencial efeito sobre a L-dopa,¹⁵⁷ além de aumentar o efeito dos agonistas dopaminérgicos nos recetores D₂ tais como *N*-propilnorapomorfina (NPA), apomorfina e 2-amino-6,7-di-hidroxi-1,2,3,4-tetra-hidronaftaleno (ADTN),^{90,91} através da modulação dos receptores D₂ de dopamina, de um modo bifásico dependente da dose para dar uma curva dose-resposta em forma de sino.^{151,158} Contudo, o PLG não possui nenhum efeito na ligação de antagonistas tal como o espiroperidol a estes recetores de dopamina.^{90,91}

Estudos mostram que o PLG potencia a ligação do [³H]-NPA e do [³H]-quinpirrole de um modo dependente da dose relativamente aos subtipos dos receptores dopaminérgicos D_{2L}, D_{2S} e D₄, sem potenciar a ligação aos recetores de dopamina D₁ e D₃.^{90,91} Estes resultados revelam que o PLG atua promovendo a conversão dos recetores dopaminérgicos (RD) do seu estado de baixa afinidade para o estado de alta afinidade, tornando-os mais sensíveis aos agonistas.^{20,91,153,154}

²⁰Costa, J. F.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; Midón, P.; Rodríguez-Borges, J. E., *Tetrahedron* **2010**, 66, 6797-6805.

⁹⁰Verma, V.; Mann, A.; Costain, W.; Pontoriero, G.; Castellano, J., M.; Skoblenick, K.; Gupta, S. K.; Pristupa, Z.; Niznik, H. B.; Johnson, R. L.; Nair, V. D.; Mishra, R. K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 315, 1228-1236.

⁹¹Srivastava, L. K.; Bajwa, S. B.; Johnson, R. L.; Mishra, R. K. *J. Neurochem.* **1988**, 50, 960-968.

¹⁴⁸Mann, Amandeep; Verma, V.; Basu, D.; Skoblenick, K. J.; Beyaert, M. G. R.; Fischer, A.; Thomas, N.; Johnson, R. L.; Mishra, R. K., *European Journal of Pharmacology* **2010**, 641, 96-101.

¹⁴⁹Celis, M. E.; Taleisnik, S.; Walter, R., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1971**, 68 (7): 1428-33.

¹⁵⁰Petersson, M.; Uvnäs-Moberg, *Physiology & Behavior* **2004**, 83 (3): 475-81.

¹⁵¹Mishra, R. K.; Chiu, S.; Chiu, P.; Mishra, C. P., *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **1983**, 5, 203-233.

¹⁵²Saitton, S.; Tredici, A. L.; Saxtin, M.; Stenström, T.; Kihlberg, J.; Luthman, K., *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 1647-1654.

¹⁵³Saitton, S.; Tredici, A. L.; Mohell, N.; Vollinga, R. C.; Boström, D.; Kihlberg, J.; Luthman, K., *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 6595-6602.

¹⁵⁴Reed, G. W.; Olson, G. A.; Olson, R. D., *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1994**, 18, 519-525.

¹⁵⁵Fischer, A.; Mann, A.; Verma, V.; Thomas, N.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L., *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 307-317.

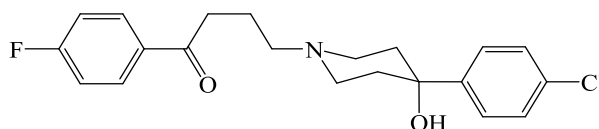
¹⁵⁶Bhargava, H. N., *Gen. Pharmacol.* **1983**, 14, 609-614.

¹⁵⁷Huidobro-Toro, J. P.; De Carolis, A. S.; Longo, V. G., *Pharmacol. Biochem. Be.* **1974**, 2, 105.

¹⁵⁸Chiu, S.; Paulose, C. S.; Mishra, R. K., *Peptides* **1981**, 2, 105.

Um estudo envolvendo membranas de sinaptossomas bovinos mostrou que o PLG exibe o seu efeito modulatório máximo nos subtipos D_{2L} dos recetores de dopamina.^{90,91,148} O PLG possui variadas atividades farmacológicas ao nível do sistema nervoso,¹⁴⁸ porém o mecanismo de ação preciso na modulação dos recetores dopaminérgicos permanece pouco inteligível.^{148,158} Estudos preliminares sugerem a evidência de um local de ligação do PLG nos RD.^{148,158,159} Conjetura-se, portanto, a existência de um local de ligação no próprio RD ou numa outra macromolécula independente que, de alguma forma, liga-se ao recetor para formar um complexo com o RD.¹⁴⁸ Uma série de estudos demonstraram que este tripéptido possui atividade terapêutica substancial no tratamento da SP,¹⁶⁰ e ainda, capacidade para interagir com outros fármacos modificando os seus efeitos. Assim, por exemplo, antagoniza a catalepsia induzida por morfina,¹⁶¹ bem como discinesia induzida por fármacos antipsicóticos^{162,163}

Tendo em conta estes resultados, outros estudos sobre o PLG centraram-se na potencial atividade deste tripéptido para aliviar as alterações de conduta provocadas pela SP em modelos animais.^{164,165} Os primeiros passos no sentido de deslindar o mecanismo de ação associado ao PLG surgiram com a descoberta da sua afinidade com o tecido estriado humano, assim como a sua capacidade para reduzir a sensibilidade induzida pelo **haloperidol** (antagonista do recetor de dopamina D₂)¹⁶⁶ sobre os recetores dopaminérgicos. A posterior demonstração que o PLG atua como um modulador alostérico positivo dos recetores de dopamina assim como a sua capacidade de incrementar o efeito inibitório dos recetores D₂ de dopamina sobre o adenilato ciclase,¹⁶⁷ serviram para dar algumas pistas acerca do seu possível mecanismo de ação.



Haloperidol

⁹⁰Verma, V.; Mann, A.; Costain, W.; Pontoriero, G.; Castellano, J., M.; Skoblenick, K.; Gupta, S. K.; Pristupa, Z.; Niznik, H. B.; Johnson, R. L.; Nair, V. D.; Mishra, R. K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 1228-1236.

⁹¹Srivastava, L. K.; Bajwa, S. B.; Johnson, R. L.; Mishra, R. K. *J. Neurochem.* **1988**, *50*, 960-968.

¹⁴⁸Mann, Amandeep; Verma, V.; Basu, D.; Skoblenick, K. J.; Beyaert, M. G. R.; Fischer, A.; Thomas, N.; Johnson, R. L.; Mishra, R. K., *European Journal of Pharmacology* **2010**, *641*, 96-101.

¹⁵⁸Chiu, S.; Paulose, C. S.; Mishra, R. K., *Peptides* **1981**, *2*, 105

¹⁵⁹Chiu, S.; Wong, Y. W.; Wan, Y. P.; Chiu, P.; Mishra, R. K., *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* **1983**, *7*, 739-742.

¹⁶⁰Barbeau, A.; Roy, M.; Kastin, A. J. *Can. Med. Assoc. J.* **1976**, *114*, 120.

¹⁶¹Chiu, S.; Mishra, R. K. *Eur. J. Pharmacol.* **1979**, *53*, 119.

¹⁶²(a) Sharma, S.; Paladino, P.; Gabriele, J.; Saeedi, H.; Henry, P.; Chang, M.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *Peptides* **2003**, *24*, 313. (b) Mycroft, F. J.; Bhargava, H. N.; Wei, E. T. *Peptides* **1987**, *8*, 1051.

¹⁶³Chiu, P.; Rajakumar, G.; Chiu, S.; Johnson, R. L.; Mishra, R. K. *Peptides* **1985**, *6*, 179.

¹⁶⁴Smith, J. R.; Morgan, M. *Gen. Pharmacol.* **1982**, *13*, 203.

¹⁶⁵Marcotte, E. R.; Chugh, A.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *Peptides* **1998**, *19*, 403.

¹⁶⁶Kjaera, J. B.; Hjarvarda, B. M.; Jensena, K. H.; Hansen-Møllerb, Naesbye Larsenc, J. O. *Applied Animal Behaviour Science* **2004**, *86* (1-2), 77-91.

¹⁶⁷Mishra, R. K.; Makman, M. H.; Costain, W. J.; Nair, V. D.; Johnson, R. L. *Neurosci. Lett.* **1999**, *269*, 21.

Mais recentemente, em 2010, o PLG demonstrou a capacidade de induzir um aumento da expressão de c-Fos (um proto-oncogene, i.e., um gene que codifica para proteínas que ajudam a regular o crescimento celular e a diferenciação) em regiões com inervação dopaminérgica,¹⁶⁸ ainda que também esteja envolvida na redução da expressão do transcrito da c-Fos induzida por haloperidol.¹⁶⁹ Estes resultados, delineiam a possibilidade de que a modulação de recetores D₂ através deste tripéptido possa incitar a funcionalização seletiva do recetor D₂ através de vias não clássicas, dependendo do meio celular.

1.5.2. PLG como ligando alostérico

Diferentes mutações ou polimorfismos nos recetores acoplados a proteínas G estão associados a uma miríade de patologias. Este facto faz destes recetores alvos importantes para o desenvolvimento de novos fármacos. Contudo, devido à elevada homologia presente nos centros ortostéricos (de ligação do agonista) e ao vasto número de modos de ligação a esses centros (uma vez que reconhecem uma enorme diversidade de ligandos endógenos)¹⁷⁰ presentes nos diferentes subtipos de recetores pertencentes a uma mesma família, torna-se uma tarefa hercúlea encontrar ligandos seletivos (agonistas ou antagonistas) de recetores associados a proteínas G. Uma abordagem utilizada para colmatar esta dificuldade passa pelo uso de moduladores de pequeno tamanho que atuem noutra zona destes recetores que não nos seus locais ortostéricos de forma a provocar um efeito, quer seja ativante ou inibitório, da resposta induzida pela ligação agonista-recetor, i.e., com efeito alostérico.¹⁶⁴

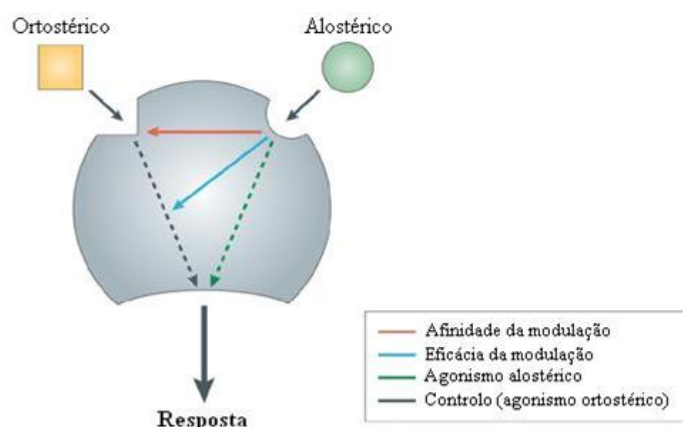


Figura 1.10

Representação esquemática relativa aos modos de ação do efeito alostérico.

¹⁶⁴Smith, J. R.; Morgan, M. *Gen. Pharmacol.* **1982**, 13, 203.

¹⁶⁸Kahn, R. S.; Yu, C.; Kastin, A. J.; He, Y.; Ehrensing, R. H.; Hsueh, H.; Stone, K. P.; Pan, W. *Int. J. Pept.* **2010**, ID 537639.

¹⁶⁹Ott, M. C.; Costain, W. J.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *Peptides* **2000**, 21, 301.

¹⁷⁰Conn, P. J.; Christopoulos, A.; Lindsley, C. W. *Nature Rev. Drug Discov.* **2009**, 8, 41.

Regra geral, a ligação modulador-recetor altera a resposta biológica (sinal induzido) devido a alterações conformacionais no centro ortostérico, através da interação de ligandos alostéricos nestes recetores por meio de um, ou mesmo, pela combinação de vários mecanismos de ação. Desta forma, a interação de ligandos alostéricos induz no centro ortostérico (Figura 1.10) uma maior ou menor afinidade para o ligando endógeno (seta vermelha), quer respostas intracelulares (seta azul), além de poderem exibir um agonismo intrínseco, mesmo na ausência de ligando ortostérico (seta verde).

No que diz respeito ao mecanismo modulador por detrás da estabilização do estado de alta afinidade dos recetores dopaminérgicos despoletado pelo PLG, ainda não está definido até ao momento, um mecanismo indubitável e consistente. Porém, são propostas duas possíveis vias que tentam dar resposta a esta questão: especula-se que o PLG possua interação direta com um domínio do recetor diferente do seu local ortostérico, ou até mesmo através de um mecanismo indireto associado ao aumento da taxa de hidrólise de GTP por parte da proteína G;¹⁶⁷ contudo esta hipótese parece menos provável, na medida que, o efeito modulador não se observa noutros recetores acoplados a proteínas G, como é o caso dos recetores adrenérgicos α_2 , nem com recetores acoplados a proteínas G_s, como a dos recetores dopaminérgicos da família D₁,⁹⁰ evidenciando especificidade para os recetores D₂.

Além de se desconhecer o mecanismo exato da modulação alostérica conferida por este tripéptido, também não é clara qual a conformação bioativa do mesmo, ainda que se tenham realizados estudos de conformação do tripéptido livre em solução mediante técnicas espectroscópicas de RMN em DMSO-*d*₆¹⁷¹ e de dicroísmo circular.¹⁷²

Adicionalmente, estudos teóricos efetuados no mesmo solvente, indicam que a conformação em volta- β é uma das mais estáveis, i.e., menos energéticas, supondo-se que este tripéptido apresente elevada flexibilidade.¹⁷³ Também se sabe que no estado sólido (difracção de raios-X)¹⁷⁴ a molécula apresenta uma ligação de hidrogénio intramolecular entre o átomo de oxigénio carbonílico do resíduo de L-prolina e o protão amídico *trans* do resíduo de glicinamida (Figura 1.11).

A confluência destas informações sugere que, tanto em solução como no estado sólido, o PLG adota uma conformação em volta- β na ausência de ligação ao recetor. A existência entre uma ligação de hidrogénio adicional entre o átomo de azoto do grupo amina do resíduo de L-prolina e o protão amídico do resíduo de L-leucina faz diminuir o ângulo diédrico ψ_i (Figura 1.11).

⁹⁰Verma, V.; Mann, A.; Costain, W.; Pontoriero, G.; Castellano, J., M.; Skoblenick, K.; Gupta, S. K.; Pristupa, Z.; Niznik, H. B.; Johnson, R. L.; Nair, V. D.; Mishra, R. K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 315, 1228-1236.

¹⁶⁷Mishra, R. K.; Makman, M. H.; Costain, W. J.; Nair, V. D.; Johnson, R. L. *Neurosci. Lett.* **1999**, 269, 21.

¹⁷¹Higashijima, T.; Tasumi, M.; Miyazawa, T.; Miyoshi, M. *Eur. J. Biochem.* **1978**, 89, 543.

¹⁷²Schwartz, R.; Mattice, W. L.; Spirtes, M. A. *Biopolymers* **1979**, 18, 1835.

¹⁷³Zimmerman, S. S.; Baum, R.; Scheraga, H. A. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1982**, 19, 143.

¹⁷⁴Reed, L. L.; Johnson, P. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 7523.

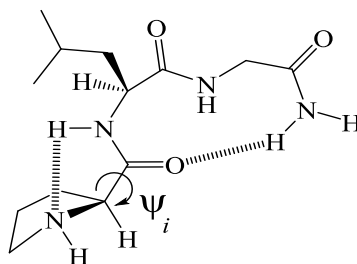


Figura 1.11

Conformação em volta- β do PLG, incluindo as ligações hidrogênio intramoleculares.

Mais recentemente, em 2004, Strohmeier *et al.*¹⁷⁵ compararam valores teóricos e experimentais de tensores de desvios químicos de ^{13}C e ^{15}N no PLG, alcançando dados concordantes com os obtidos por difração de raios-X, corroborando a disposição do esqueleto do PLG e os dos seus análogos. Posteriormente, em 2010, Wood *et al.*¹⁷⁶ desenvolveram protocolos no intuito de obterem modelos computacionais que permitessem determinar o funcional de densidade (DFT), o funcional de onda (WFT) e cálculos de mecânica molecular para o PLG e outras pequenas moléculas relacionadas.

Através da análise conformacional de um grupo de novos modelos de prolinomiméticos do PLG contendo uma β -lactâma em detrimento do resíduo de L-leucina (resíduo central) em soluções de CDCl_3 e de $\text{DMSO}-d_6$, mediante técnicas de espectroscopia de RMN mono e bidimensionais,¹⁷⁷ revelam que se estabelece um equilíbrio entre as conformações em volta- βII e volta- γ .

1.5.3. Prolinomiméticos do PLG

O **pirrolidinilcarbonilamino-2-oxopirrolidinacetamida, PAOPA**, foi um dos primeiros prolinomiméticos do PLG pertencendo a um grupo de análogos deste tripéptido que incluíam elementos de restrição em diferentes posições do tripéptido (**1-8**). No caso do PAOPA, este possui uma anel de γ -lactâma, com configuração *R* na posição α do mesmo. Estes análogos foram sujeitos a ensaios biológicos *in vitro* para estudar o seu efeito sobre a $[^3\text{H}]\text{-ADTN}$, comprovando-se que tanto o PAOPA como o composto **4** incrementavam a fixação do agonista a recetores D_2 de membranas do núcleo caudado bovino (núcleo localizado nos núcleos da base do cérebro de muitas espécies de animais que possui um papel importante no sistema de aprendizagem e memória), sendo o maior efeito verificado relativo ao PAOPA.

¹⁷⁵Strohmeier, M.; Grant, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 966.

¹⁷⁶Wood, R. L.; Young-Dixon, B. J.; Roy, A.; Gay, B. C.; Johnson, R. L.; Amin, E. A.; *J. Mol. Struct.* **2010**, 944, 76.

¹⁷⁷Aizpurua, J. M.; Palomo, C.; Balentova, E.; Jimenez, A.; Andreie, E.; Sagartzazu-Aizpurua, M.; Miranda, J. I.; Linde, A. *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 224.

Após estes resultados, os mesmos autores inseriram outros elementos de restrição parcial na estrutura do PLG alcançando vários análogos, porém nenhum deles revelou uma atividade superior àquela conferida pelo PAOPA.

O prolinomimético **5** demonstrou possuir um aumento da afinidade do agonista NPA para o recetor D₂. Os análogos **6** e **7** (X = S), contendo na sua constituição dois resíduos de prolina consecutivos e, portanto, capazes de induzir uma hélice II de poliprolina (PPII), também revelaram um efeito modulador sobre a afinidade do NPA dos recetores D₂. Isto parece indicar que a restrição conformacional necessária para interagir com o recetor pode ser exercida não exclusivamente pela posição central dos pseudopéptidos, mas também por modificações nos restantes posições, de forma a potenciarem essa interação.

O pseudopéptido **8**¹⁷⁸ é capaz de aumentar a afinidade do agonista NPA para os recetores dopaminérgicos D₂ em membranas de caudado humano dez vezes superior ao efeito observado na sua ausência. Apesar de inúmeros trabalhos sugerirem que a conformação bioativa do PLG é do tipo volta-β do tipo II,¹⁷⁹ Saitton *et al.* usaram piridinas 2,3,4-substituídas na síntese de miméticos do PLG.¹⁵² Análises conformacionais destes miméticos contendo derivados piridínicos revelaram que estes não adotam a conformação volta-β do tipo II. Contudo, através de ensaios farmacológicos, estes investigadores mostraram que estes miméticos são mais potentes na modulação positiva da NPA nos recetores D₂ humanos do que o próprio PLG. A uma concentração de 10 nM, a resposta máxima usando o mimético **9** foi de 146% contra 115% para o PLG.¹⁵²

Embora seja reconhecida a eficácia do PLG na redução da sintomatologia no tratamento da síndrome de Parkinson e na discinesia tardia, a sua curta semi-vida biológica tem limitado a sua eficácia clínica.¹⁴⁸ Desta forma, no sentido de colmatar estas dificuldades, um grande número de estruturas conformacionalmente constringidas como o pseudopéptido **9** (contendo um anel de piridina na sua estrutura) têm sido documentadas no sentido de auxiliar o desenvolvimento análogos que visem melhorar as propriedades farmacológicas associadas ao PLG.^{152,153} Ainda assim é necessária mais investigação de forma a incrementar eficácia e potência destes análogos.⁹⁰

⁹⁰Verma, V.; Mann, A.; Costain, W.; Pontoriero, G.; Castellano, J., M.; Skoblenick, K.; Gupta, S. K.; Pristupa, Z.; Niznik, H. B.; Johnson, R. L.; Nair, V. D.; Mishra, R. K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 1228-1236.

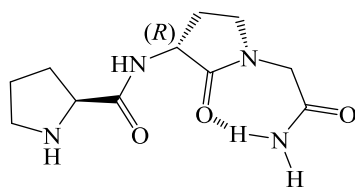
¹⁴⁸Mann, Amandeep; Verma, V.; Basu, D.; Skoblenick, K. J.; Beyaert, M. G. R.; Fischer, A.; Thomas, N.; Johnson, R. L.; Mishra, R. K., *European Journal of Pharmacology* **2010**, *641*, 96-101.

¹⁵²Saitton, S.; Tredici, A. L.; Saxtin, M.; Stenström, T.; Kihilberg, J.; Luthman, K., *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1647-1654.

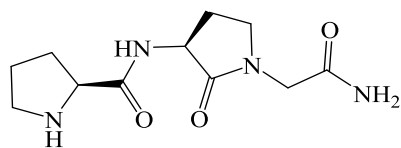
¹⁵³Saitton, S.; Tredici, A. L.; Mohell, N.; Vollinga, R. C.; Boström, D.; Kihilberg, J.; Luthman, K., *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6595-6602.

¹⁷⁸Tese de Doutoramento de Natividad Jiménez. *Estudio de Pseudopéptidos β-lactámicos Conformacionalmente Restringidos. Aplicación al Diseño de Análogos del Neuropéptido PLG*. Universidad del País Vasco UPV/EHU, **2009**.

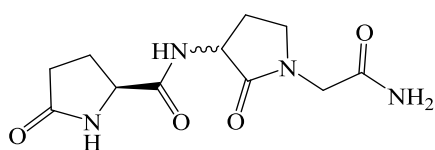
¹⁷⁹Ung, P.; Winkler, D. A. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1111-1125.



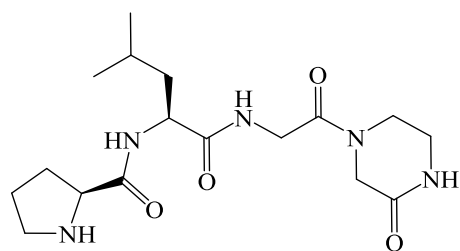
1a, PAOPA



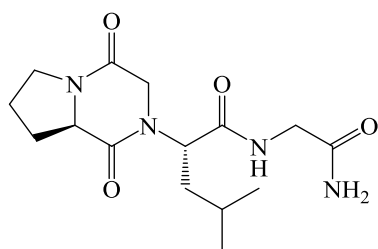
1b



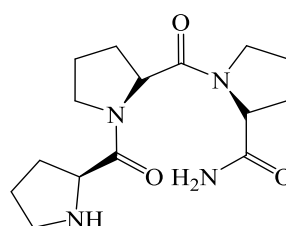
3



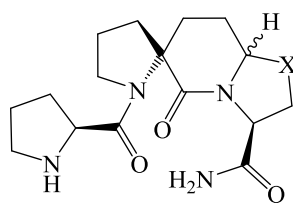
4



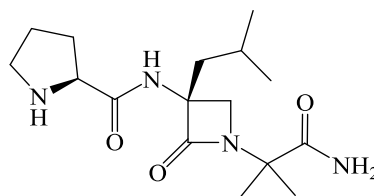
5



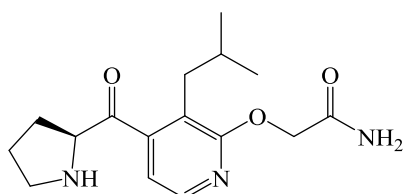
6



7 (X = CH₂, S)



8



9

1.6. ÂMBITO DO PROJETO E OBJETIVOS

1.6.1. Âmbito do Projeto

O presente trabalho foi realizado no âmbito do Mestrado em Bioquímica da Faculdade de Ciências e do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, subordinado ao projeto de investigação no campo da síntese orgânica, caracterização e avaliação biológica de prolinomiméticos com potencial atividade neuroprotetora em síndromes neurodegenerativas. A investigação constante nesta dissertação foi desenvolvida, em parte, no Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, na Linha de Síntese Orgânica de Compostos Bioativos (Linha 1) do Centro de Investigação em Química (CIQ-UP), sob orientação do Professor Doutor José Enrique Rodríguez Borges e, ao abrigo do Programa ERASMUS, no Departamento de Química Orgânica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Santiago de Compostela, sob orientação do Professor Doutor Xerardo García Mera.

1.6.2. Objetivos

De acordo com o anteriormente exposto neste capítulo, a revisão bibliográfica prévia deste trabalho revelou uma forte investigação no campo da síntese de pseudoprolinas a partir de derivados substituídos no anel de pirrolidina, contudo denotou escassez de derivados de prolinomiméticos baseados em sistemas bicíclicos (**secção 1.1.**).

Neste sentido, de forma a dar continuidade ao trabalho que tem sido explorado pelo nosso grupo de investigação, que recentemente tem contribuído para o aumento de pseudoprolinas²⁰ e síntese de prolinomiméticos do PLG,¹⁸⁰ procurou-se através do presente trabalho desenvolver e introduzir uma pseudoprolina estruturalmente constringida, o sistema **2-azabicyclo[2.2.1]heptano (P*)**, na estrutura natural do neuropéptido PLG em detrimento da L-prolina natural.

Para o efeito, propuseram-se três objetivos principais: **1)** contribuir para o *pool* de estruturas constringidas que mimetizam o α -aminoácido L-prolina, i.e., síntese de pseudoprolinas estruturalmente rígidas; **2)** Síntese dos correspondentes tripéptidos prolinomiméticos e introdução de diversidade química; e **3)** Avaliação biológica por meio de ensaios farmacológicos dos análogos sintetizados, de forma a averiguar o seu potencial efeito como moduladores positivos dos recetores D₂ dopaminérgicos.

²⁰Costa, J. F.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; Midón, P.; Rodríguez-Borges, J. E. *Tetrahedron*. **2010**, 66, 6797-6805.

¹⁸⁰Costa, J. F.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; Sampaio-Dias, I. E.; Brea, J. M.; Cadavid, M. I. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 69, 146-158.

1.6.2.1. Síntese de prolinomiméticos

Neste *primeiro objetivo*, pretendeu-se, a partir da síntese do 2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carboxilato de metilo, através de metodologias de síntese sobejamente conhecidas no nosso grupo de investigação, sintetizar diferentes pseudoprolinas.

De acordo com revisão bibliográfica efetuada, pareceu-nos pertinente desenvolver prolinomiméticos substituindo o anel de pirrolidina por um sistema bicíclico conferindo maior rigidez estrutural de forma a serem utilizados como *sintons* prolinomiméticos.

Os derivados são conseguidos por rotas sintéticas que têm a sua origem nos ácidos 2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carboxílicos que conduzem, de maneira precisa, aos compostos prolinomiméticos.

1.6.2.2. Síntese de tripéptidos prolinomiméticos do PLG

Uma vez alcançado o *primeiro objetivo*, partiu-se desta classe de compostos prolinomiméticos de forma a atingir o nosso *segundo objetivo*, de aplicação mais imediata no âmbito da Química Medicinal, que consistiu em demonstrar a utilidade do sistema 2-azabicyclo[2.2.1]heptano como prolinomimético na síntese de pequenos péptidos análogos do neuropéptido PLG. De forma complementar, pretendeu-se criar modificações na estrutura dos tripéptidos em simultâneo com a pseudoprolina **P***, permitindo investigar se estas modificações possuem relevância farmacológica mediante ensaios biológicos dos correspondentes análogos. Assim, almejou-se a criação de três séries de análogos do PLG tendo em conta essas modificações, nomeadamente as séries **P*LG**, **P*GL**, **P*VA**, a seguir desenvolvidas.

Série P*LG: ambicionou-se, face ao tripéptido natural PLG, substituir o resíduo de L-prolina pelo sistema bicíclico, **P***. Os restantes α -aminoácidos da cadeia permanecem inalterados, possibilitando instigar as repercussões decorrentes das alterações no resíduo de prolina na atividade neuroprotetora.

Série P*GL: a ordem dos dois resíduos de α -aminoácidos C-terminais é invertida. Esta modificação conserva a constituição α -aminoacídica do tripéptido, possibilitando a introdução de diversidade química através da inversão dos constituintes aminoacídicos.

Série P*VA: de forma análoga à série P*GL, pretendeu-se introduzir com esta série diversidade química. O α -aminoácido L-valina apresenta elevada homologia estrutural com o α -aminoácido L-leucina, (a L-valina possui menos um grupo metileno que a L-leucina), sendo ambos α -aminoácidos apolares. No que respeita à troca do α -aminoácido glicina por L-alanina, este último α -aminoácido possui um grupo metilo adicional que o anterior, possuindo um estereocentro, o que não sucede na glicina, que é aquiral.

1.6.2.3. Avaliação Biológica dos Prolinomiméticos

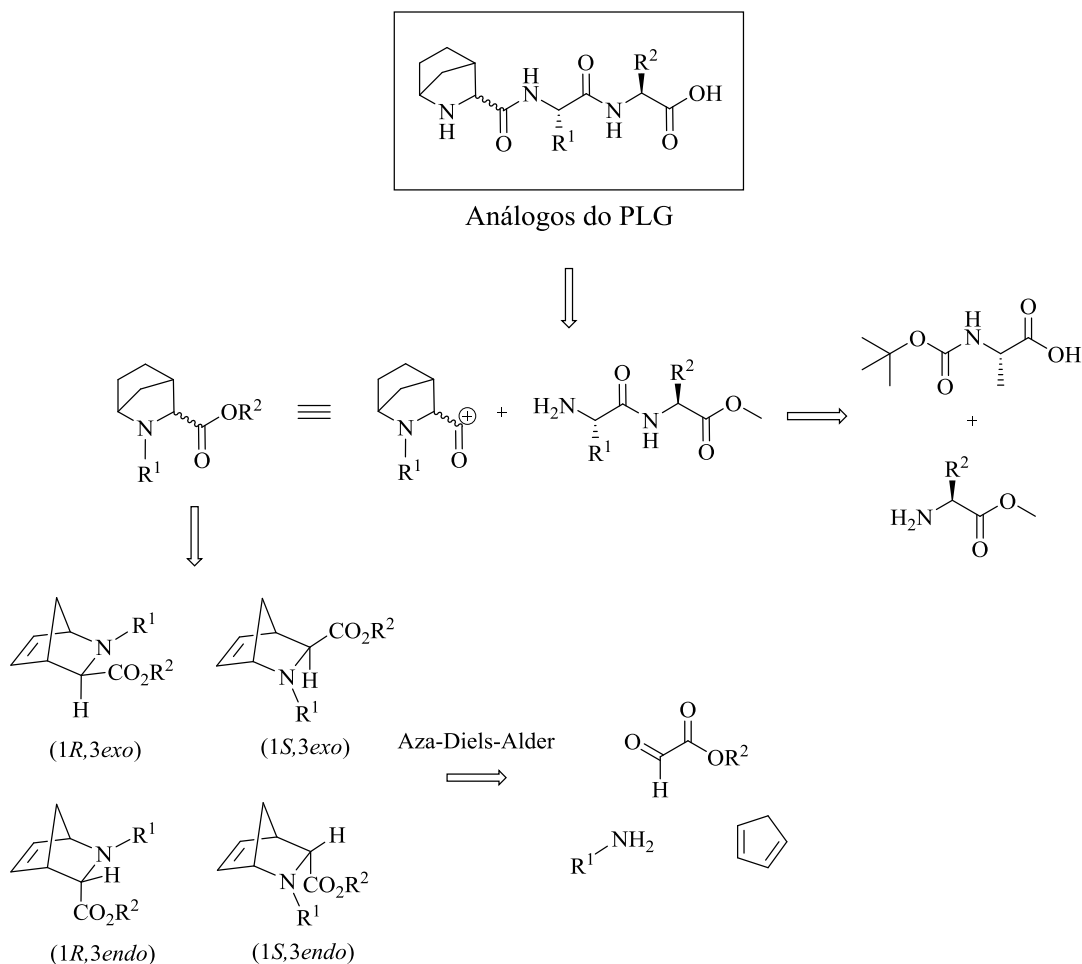
De forma complementar, propôs-se como *terceiro objetivo*, a avaliação biológica dos análogos do PLG preparados através de ensaios farmacológicos, averiguando o potencial destes prolinomiméticos como eventuais moduladores alostéricos de recetores D₂ dopaminérgicos procedentes de caudado humano, mediante experiências de competição agonista/antagonista utilizando a técnica de fixação de ligandos (*binding*). Este estudo foi realizado na **Unidade de Avaliação de Atividades Farmacológicas de Compostos Químicos** da Universidade de Santiago de Compostela.

A análise da informação recolhida através destes ensaios preliminares efetuados aos tripéptidos prolinomiméticos obtidos pelo cumprimento do *segundo objetivo* (**secção 1.6.2.**) permitirá inferir acerca da estrutura-atividade no desenho de novas estruturas prolinomiméticas para futuras linhas de investigação no campo dos análogos do PLG.

1.7. PLANO DE TRABALHOS

De forma a cumprir os objetivos apresentados na **secção 1.6.2.**, delineou-se um plano de trabalhos que conduzisse de forma acurada à síntese dos tripéptidos prolinomiméticos do PLG propostos. O estudo através da análise retrossintética (Esquema 1.6), possibilitou verificar-se que, em oposição à síntese linear, pode optar-se por uma *via* de síntese convergente, i.e, construção de fragmentos moleculares de forma independente para posterior processo de convergência sintética.

Tendo em conta que a posição da pseudoprolina a introduzir nos análogos do PLG ocupará a posição do *N*-terminal, isto permite a síntese dos dipéptidos *C*-terminais propostos de forma desconexa das pseudoprolinas. A vantagem de seguir esta *via* de síntese convergente é a diminuição de operações químicas envolvendo os sistemas bicíclicos que, para além de constituírem a parte inovadora neste trabalho, são sistemas muito sensíveis.



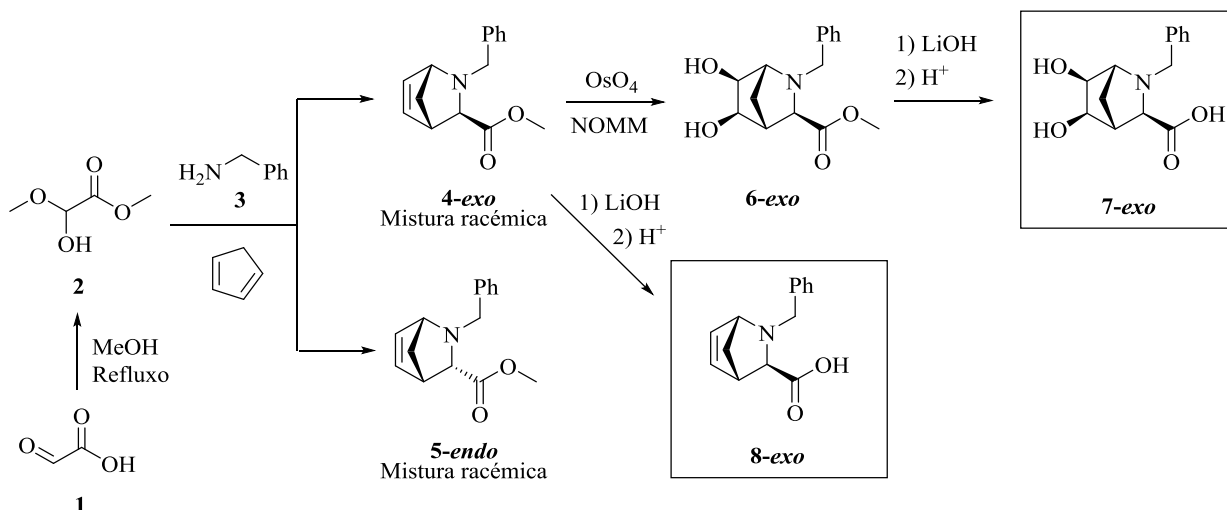
Esquema 1.6

Análise retrossintética dos prolinomiméticos do PLG.

1.7.1. Plano de Síntese das Pseudoprolinas

No sentido de concretizar o *primeiro objetivo*, delineou-se um plano de síntese de precursores do sistema 2-azabicyclo[2.2.1]heptano *N*-protegido. Tendo em conta a análise retrosintética (Esquema 1.6) é possível verificar-se que este tipo de precursores pode ser obtido através da reação de aza-Diels-Alder partindo de um glioxilato, uma amina primária e do ciclopentadieno. O nosso grupo possui uma vasta experiência na síntese deste tipo de precursores, quer sob a forma racémica,¹⁸¹ quer sob a forma enantiomericamente pura.¹⁸² Na síntese das pseudoprolinas optou-se pela síntese dos cicloadutos precursores sob a forma racémica, uma vez que esta é menos dispendiosa e mais direta, não envolvendo o uso de auxiliares quirais. Outra justificação para o uso de racematos baseia-se no facto de que, no decurso das reações envolvendo o acoplamento com compostos enantiomericamente puros possa, eventualmente, ser possível a separação dos diastereoisómeros socorrida por técnicas cromatográficas.

Assim, pela análise do Esquema 1.7, partiu-se do ácido glioxílico (**1**) para obtenção do glioxilato de metilo (**2**) por esterificação com metanol, em refluxo. A reação entre o hemiacetal **2** com a benzilamina (**3**) gera, *in situ*, mediante utilização de ácidos de Lewis, a imina do glioxilato de metilo que, por adição do ciclopentadieno a baixas temperaturas, originou os cicloadutos derivados do 2-benzil-2-azabicyclo[2.2.1]hep-5-eno-3-carboxilato de metilo, **4-exo** e **5-endo**. A di-hidroxição dos cicloadutos **4-exo** com OsO₄ resultou nos *cis*-dióis **6-exo**. A hidrólise em meio básico dos ésteres **4-exo** e **6-exo**, deu origem aos respetivos ácidos carboxílicos, **8-exo** e **7-exo**.



Esquema 1.7

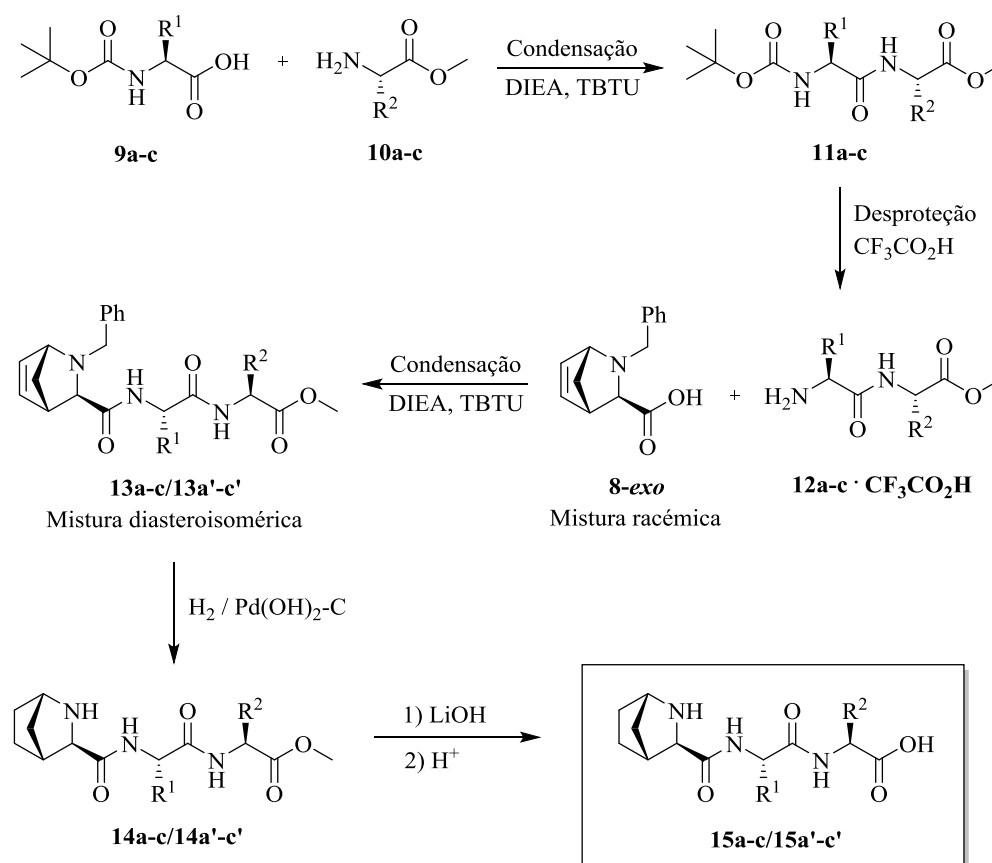
Via de síntese proposta para a preparação dos prolinomiméticos **7-exo** e **8-exo**.

¹⁸¹Rodríguez-Borges, J. E.; García-Mera, X.; Fernández, F.; Lopes, V. H. C.; Magalhães, A. L.; Cordeiro, M. N. D. S. *Tetrahedron* **2005**, 61, 10951-10957.

¹⁸²Vale, M. L. C.; Rodríguez-Borges, J. E.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X. *Tetrahedron* **2006**, 62, 9475-9482.

1.7.2. Plano de Síntese dos Prolinomiméticos do PLG

De forma cumprir o *segundo objetivo*, para cada série de tripéptidos prolinomiméticos propostos (Esquema 1.8), procedeu-se à síntese, num primeiro passo, dos correspondentes dipéptidos **11a-c**, de forma a manter a sequência C-terminal pretendida, a partir dos aminoácidos comerciais protegidos **9a-c** e **10a-c**, utilizando o TBTU como agente de acoplamento. Mediante desproteção acidolítica do grupo *tert*-butoxicarbonilo (Boc) com ácido trifluoracético obtiveram-se os correspondentes sais de trifluoracetato de amónio, **12a-c**. O acoplamento destes últimos, com o racemato **8-*exo***, mediante as mesmas condições de condensação supracitadas, resultou na síntese dos tripéptidos **13a-c/13a'-c'**. Através da hidrogenação catalítica destes precursores prolinomiméticos, procedeu-se à saturação da olefina e, por prolongamento das condições reacionais, à *N*-desproteção (*N*-desbenzilação), alcançando-se os tripéptidos **14a-c/14a'-c'**. A hidrólise em meio básico dos ésteres metílicos presentes nos tripéptidos **14a-c/14a'-c'** conduziu à obtenção dos tripéptidos prolinomiméticos almejados, **15a-c/15a'-c'**.



Série P*LG (a/a'):	Série P*GL (b/b'):	Série P*VA (c/c'):
R ¹ = Leu, -CH ₂ CH(CH ₃) ₂	R ¹ = Gly, -H	R ¹ = Val, -CH(CH ₃) ₂
R ² = Gly, -H	R ² = Leu, -CH ₂ CH(CH ₃) ₂	R ² = Ala, -CH ₃

Esquema 1.8

Via de síntese proposta para a preparação dos tripéptidos prolinomiméticos respetiva às série P*LG, P*GL e P*VA.

CAPÍTULO 2

Parte Teórica e Discussão de Resultados

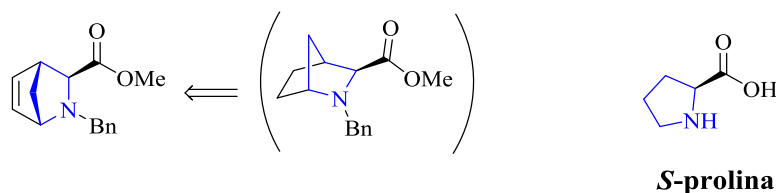
2.1. DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS PROLINOMIMÉTICOS

2.1.1. Planeamento Sintético

Relativamente ao desenvolvimento de estruturas prolinomiméticas constringidas, poder-se-iam apresentar diferentes abordagens sintéticas. O nosso grupo de investigação possui uma vasta experiência na preparação do sistema bicíclico do tipo **4-*exo*** e **5-*endo***, tanto na forma racémica como dos quatro estereoisómeros enantiomericamente puros a partir de precursores e/ou auxiliares quirais comerciais ou previamente preparados,¹⁸³ tendo trabalhado no seu aproveitamento sintético dirigido a outros campos, nomeadamente aza-açúcares e azanucleósidos.¹⁸⁴ Desta forma elegeu-se a forma racémica **4-*exo*** para o desenvolvimento de uma metodologia exploratória em detrimento ao uso da forma enantiomericamente pura destes compostos bicíclicos.



Esta abordagem justifica-se na medida em que é consideravelmente menos dispendiosa tanto do ponto de vista metodológico (uma vez que não envolve o uso de auxiliares quirais) como do ponto de vista economicista (uma vez que estes auxiliares são bastante caros). Assim, é possível conhecer a química inerente à síntese desta classe de tripéptidos análogos do PLG de forma exploratória. Partimos do racemato *exo* para a obtenção dos prolinomiméticos almejados uma vez que o enantiómero (1*S*,3*S*,4*R*)-2-benzil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carboxilato de metilo é o sistema bicíclico precursor que estruturalmente se assemelha mais à **S-prolina** natural, podendo ser vista como um análogo de prolina *trans*-3,5-dissubstituído,¹⁸⁵ e ainda, porque tem a vantagem de se conseguir excesso diastereoisomérico deste par de enantiómeros, *exo*.



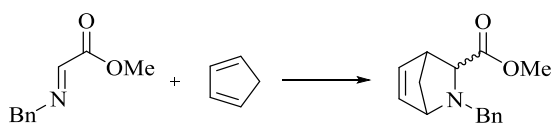
¹⁸³(a) Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; Rodríguez-Borges, J. E. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 4123. (b) Fernández, F.; García-Mera, X.; López, C.; Rodríguez, G.; Rodríguez-Borges, J. E. *Tetrahedron-Asymm.* **2000**, 11, 4805. (c) Fernández, F.; García-Mera, X.; Rodríguez-Borges, J. E.; Blanco, J. M. *Tetrahedron* **2001**, 42, 5239.

¹⁸⁴(a) Blanco, J. M.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; López, C.; Rodríguez, G.; Rodríguez-Borges, J. E.; Rodríguez-Hergueta, A. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 5663-5666. (b) Fernández, F.; García-Mera, X.; Vale, M. L. C.; Rodríguez-Borges, J. E. *Synlett* **2005**, 319-321. (c) García-Mera, X.; Rodríguez-Borges, J. E.; Vale, M. L. C.; Alves, M. J. *Tetrahedron* **2011**, 67 (37), 7162-7172.

¹⁸⁵Venkatraman, S.; Njoroge, F. G.; Wu, W.; Girijavallabhan, V.; Prongay, A. J.; Butkiewicz, N.; Pichardo, J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, 16, 1628-1632.

2.1.2. Aminoácidos não naturais: Síntese dos ácidos carboxílicos 7-*exo* e 8-*exo*

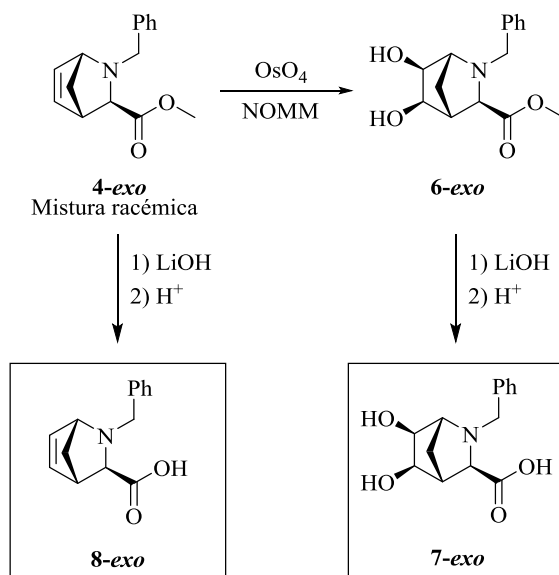
Neste contexto, para a síntese dos correspondentes prolinomiméticos propostos (7-*exo* e 8-*exo*), a primeira tarefa a realizar consistirá na obtenção de quantidades suficientes do aduto 4-*exo*. Para o efeito, seguindo os antecedentes bibliográficos do nosso grupo de trabalho, a abordagem sintética mais conveniente resulta da reação de aza-Diels-Alder entre o ciclopentadieno (CPD) e a imina protonada do glioxilato de metilo formada *in situ* pelo glioxilato de metilo e a benzilamina na presença de ácidos de Lewis,¹⁸³ precursores acessíveis tanto pela disponibilidade comercial e acessibilidade de preço (Esquema 2.1).



Esquema 2.1

Reação de aza-Diels-Alder entre a imina do glioxilato de metilo e o CPD.

No que respeita à preparação do ácido 7-*exo*, este pode ser obtido a partir da di-hidroxilação do aduto 4-*exo* originando o correspondente *cis*-diol, 6-*exo*. Este último, através de hidrólise alcalina (saponificação), resultará no respetivo ácido carboxílico pretendido. Para a síntese do ácido 8-*exo*, levar-se-á a cabo a hidrólise alcalina do amino-éster correspondente, 4-*exo* (Esquema 2.2).



Esquema 2.2

Via de síntese proposta para a preparação dos prolinomiméticos 7-*exo* e 8-*exo*.

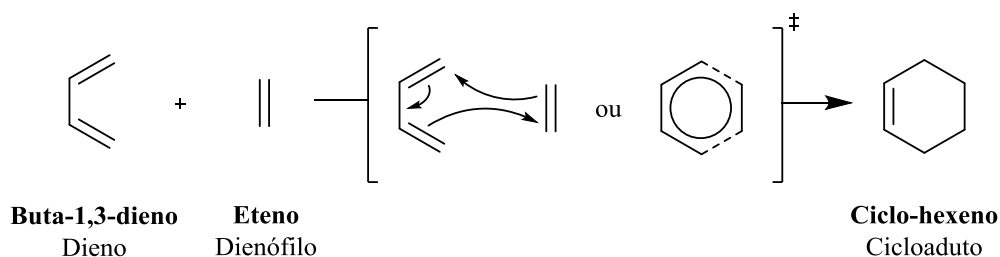
¹⁸³(a) Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; Rodríguez-Borges, J. E. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 4123. (b) Fernández, F.; García-Mera, X.; López, C.; Rodríguez, G.; Rodríguez-Borges, J. E. *Tetrahedron-Asymm.* **2000**, 11, 4805. (c) Fernández, F.; García-Mera, X.; Rodríguez-Borges, J. E.; Blanco, J. M. *Tetrahedron* **2001**, 42, 5239.

2.2. SÍNTESE DE AZABICICLOS COMO PRECURSORES PROLINOMIMÉTICOS

2.2.1. Reação de Diels-Alder

A reação de Diels-Alder¹⁸⁶ foi descoberta por Diels e Alder, em 1928. Por este trabalho estes investigadores ganharam o Premio Nobel em Química, em 1950. Esta reação é uma adição de um dieno conjugado com um alceno, resultando na formação de um ciclo-hexeno.¹⁸⁷ A reação de Diels-Alder é uma das ferramentas mais versáteis em síntese orgânica,^{188,189,190,191} que devido ao facto de se poder gerar vários estereocentros novos simultaneamente, deu lugar a vastas aplicações na síntese de moléculas altamente complexas, como é o caso da síntese total de produtos naturais.^{192,193,194} Este tipo de reação é definida como uma reação pericíclica concertada em que duas ou mais moléculas insaturadas (ou mesmo partes da mesma molécula) combinam-se para formar um aduto cíclico no qual verifica-se uma redução da multiplicidade da ligação (cicloadição). É, portanto uma reação de cicloadição concertada [4+2] entre um **(hetero)diene conjugado** contendo um sistema eletrónico 4π e um alceno (ou alcino) substituído, também designado por **(hetero)dienófilo**, contendo um sistema eletrónico 2π .¹⁹⁵

Este tipo de reação resulta na formação de duas novas ligações σ a partir dos dois eletrões de uma ligação π do dieno e de dois eletrões da ligação π do dienófilo que visa a formação de um sistema ciclo-hexénico substituído. O exemplo mais simples da reação de Diels-Alder entre sistemas π é a adição do **buta-1,3-dieno** ao **eteno**, em fase gasosa, para dar origem ao respetivo cicloaduto, o **ciclo-hexeno** (Esquema 2.3).



Esquema 2.3

Reação de Diels-Alder entre sistemas π demonstrando o rearranjo dos eletrões π e a formação de novas ligações σ .

¹⁸⁶Diels, O.; Alder, K. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1928**, 98, 460

¹⁸⁷Diels, O.; Alder, K. *Ber.* **1929**, 62, 2081-2087.

¹⁸⁸Kloetzel, M. C. *Org. React.* **1948**, 4, 1-59.

¹⁸⁹Holmes, H. L. *Org. React.* **1948**, 4, 60-173.

¹⁹⁰Kagan, H. B.; Riant, O. *Chemical Reviews* **1992**, 92 (5), 1007-1019.

¹⁹¹Nicolaou, K. C.; Snyder, S. A.; Montagnon, T.; Vassilikogiannakis, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1668-1698.

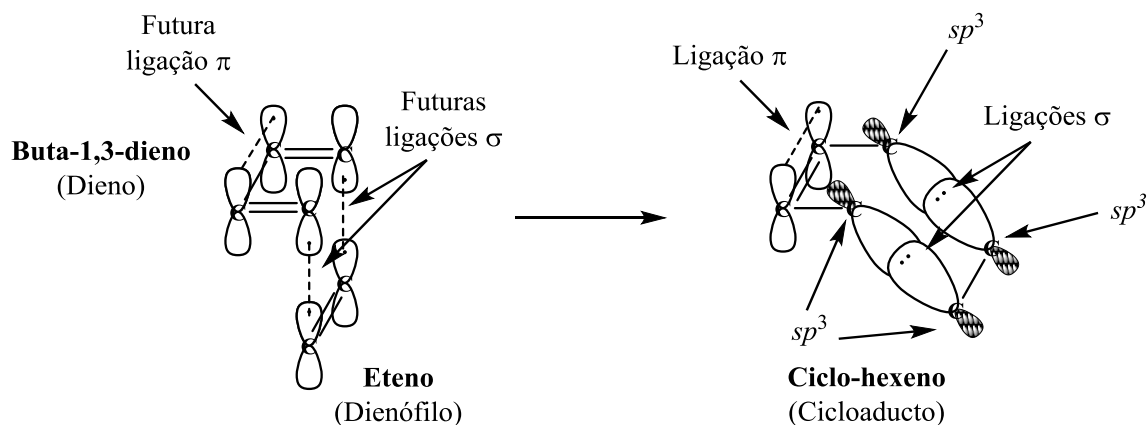
¹⁹²Carruthers, W. *Cycloaddition Reactions in Organic Synthesis*, Pergamon, Oxford, **1990**.

¹⁹³Oppolzer, W. *Comprehensive Organic Synthesis*, Paquette, L. Ed., Pergamon, Oxford, **1991**.

¹⁹⁴Coxon, J. M.; Foese, R. D. J.; Ganguly, B.; Marchand, A. P.; Morukuma, K. *Synlett* **1999**, 11, 1681.

¹⁹⁵Vollhardt, K.; Peter, C. *Organic Chemistry: Structure and Function*, 6th ed., W. H. Freeman and Company: New York, **2011**, p 628.

Esta reação ocorre através de um único estado de transição, de forma concertada, i.e., todas ligações quebram-se e formam-se num único passo. Tal como o benzeno é estabilizado devido à sobreposição cíclica de seis electrões, o processo de Diels-Alder também beneficia da presença deste arranjo no estado de transição. Uma representação das orbitais pode mostrar claramente a formação das ligações por sobreposição das orbitais p do dienófilo com as orbitais p terminais do dieno. Enquanto estes quatro carbonos re-hibridizam para originar orbitais sp^3 , as restantes orbitais p do dieno dão origem à nova ligação π (Esquema 2.4).



Esquema 2.4

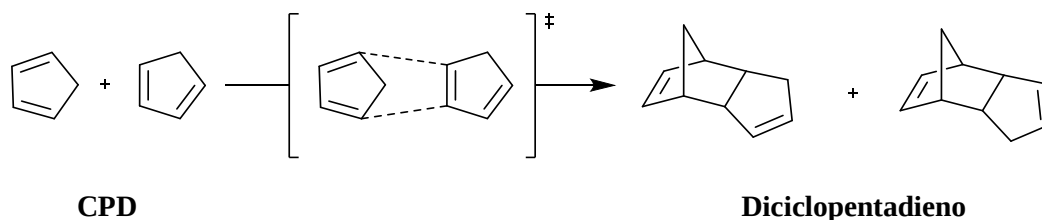
Representação das orbitais da reação de Diels-Alder entre o buta-1,3-dieno e o eteno.

O rendimento da reação entre o eteno e o buta-1,3-dieno é baixo e requer temperaturas elevadas, contudo consegue-se obter rendimentos elevados em reações de Diels-Alder, tendo em conta a estrutura eletrónica do dienófilo e do dieno envolvido na reação. O conhecimento das propriedades físico-químicas tanto dos dienos conjugados como dos dienófilos reveste-se de grande importância para o sucesso deste tipo de reações de cicloadição.

Dieno conjugado

A reação de Diels-Alder é favorecida quando os dienos conjugados são ricos em eletrões, i.e., dienos substituídos com grupos dadores de eletrões. O dieno conjugado pode ser uma cadeia aberta ou fechada e pode possuir diferentes tipos de substituintes. Apenas possui uma limitação: deve existir na conformação *s-cis*. Os dienos de cadeia aberta estão em equilíbrio entre a conformação *s-cis* e *s-trans*, sendo o equilíbrio deslocado para a conformação *s-cis*, uma vez que a reatividade do dieno na conformação *s-cis* é elevada, reagindo prontamente com o dienófilo. Dienos *s-trans* que reagem com dienófilos originam anéis de seis membros contendo uma ligação dupla *trans* altamente constringida.

Dienos que estão permanentemente na conformação *s-cis* são extremamente reativos em cicloadições, sendo o **ciclopentadieno (CPD)** um exemplo paradigmático, apresentando tal reatividade que, à temperatura ambiente, dimeriza espontaneamente – originando o **diciclopentadieno** (Esquema 2.5). Pode-se reverter este processo de forma a obter-se o CPD na sua forma monomérica através de uma destilação simples *via* retro-Diels-Alder.

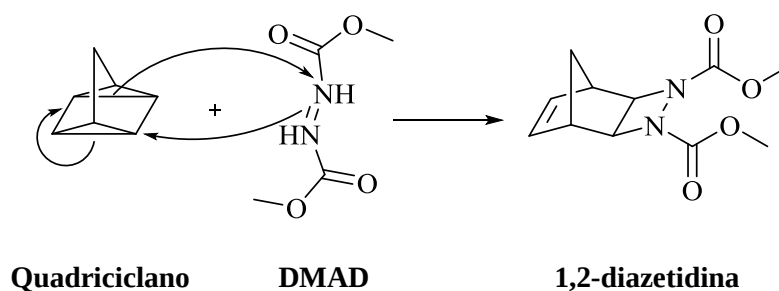


Esquema 2.5

Formação do diciclopentadieno por dimerização do ciclopentadieno através da reação de Diels-Alder.

Os dienos cíclicos que estão permanentemente numa conformação *s-trans* e estão impedidos de adotar a conformação *s-cis* não participam em reações de cicloadição de Diels-Alder, pelo menos não como dienos conjugados.

Existem, contudo, algumas exceções a este tipo de cicloadições, como é o caso da reação entre o **quadriciclano** e o **azodicarboxilato de dimetilo (DMAD)** para originar a respetiva **1,2-diazetidina**.^{196,197} Em vez de ocorrer por ligações π , operam por anéis de ciclopropano com elevada tensão, na medida em que estes apresentam um significativo carácter π (Esquema 2.6).



Esquema 2.6

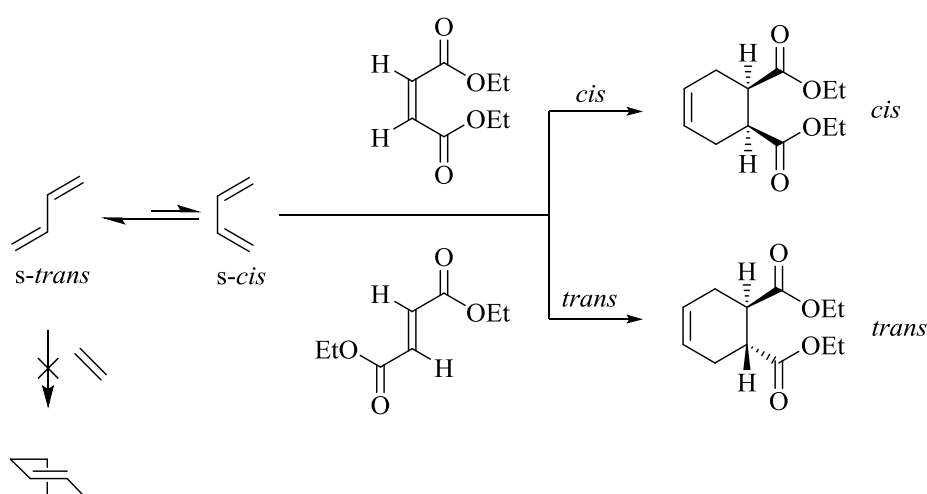
Cicloadição atípica entre o quadriciclano e o DMAD operando por um anel de ciclopropano para originar a respetiva 1,2-diazetidina.

¹⁹⁶Jones, G. A.; Shephard, M. J.; Paddon-Row, M. N.; Beno, B. R.; Houk, K. N.; Redmond, K.; Carpenter, B. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 4334-4339.

¹⁹⁷Jaap, E. K.; Jan, B. F. N. Engberts *Nature* **2005**, 435, 746-747.

Dienófilo

Em reações de Diels-Alder típicas, os dienófilos são normalmente deficientes em eletrões ou possuem, pelo menos, um grupo eletronegativo conjugado com o alceno, possibilitando a deslocalização dos eletrões π e posterior ataque nucleofílico ao carbono eletrofílico do dieno conjugado, o que favorece a reação uma vez que baixa a energia das orbitais LUMO. Bons dienófilos usualmente possuem um ou dois dos seguintes substituintes: CHO, COR, COOR, CN, C=C, Ph, ou halogéneos. Estas reações de adição ocorrem segundo um mecanismo *syn* havendo, por isso, retenção da estereoquímica da ligação dupla (*cis/trans*) do dienófilo no produto (reação estereosseletiva) – Regra de Alder-Stein – como se evidencia no Esquema 2.7.



Esquema 2.7

Reação de Diels-Alder entre o buta-1,3-dieno (na conformação *s-cis*) e o *cis/trans*-maleato de dietilo evidenciando a regra de Alder-Stein, com retenção da estereoquímica da ligação dupla (*cis/trans*) do dieno no aduto final.

Características gerais da reação de Diels-Alder

É requerido que haja sobreposição entre as orbitais moleculares HOMO do dieno e as orbitais moleculares LUMO do dienófilo e que as orbitais possuam energia similar. A transferência inicial de eletrões da orbital molecular HOMO do dieno para a orbital molecular LUMO do dienófilo torna este último mais nucleofílico e o dieno que perde esses eletrões torna-se, concomitantemente, mais eletrofílico. Desta forma, os eletrões da orbital HOMO do dienófilo podem ser transferidos para a orbital LUMO do dieno. Para a formação da segunda ligação σ o dienófilo atua como nucleófilo. No caso de dienófilos simétricos, uma vez estando tanto o dieno como o dienófilo posicionados para que ocorra transferência eletrónica, a formação das duas novas ligações σ ocorre tão rapidamente que não se verificam intermediários zwitteriónicos ou bi-radicalares – *reação concertada*.

O dieno e o dienófilo aproximam-se um do outro em planos aproximadamente paralelos, tendo em conta as propriedades de simetria das orbitais através interações estabilizantes entre os carbonos 1 e 4 do dieno e os carbonos do dienófilo. A interação entre as orbitais fronteira podem ser observadas na Figura 2.1.

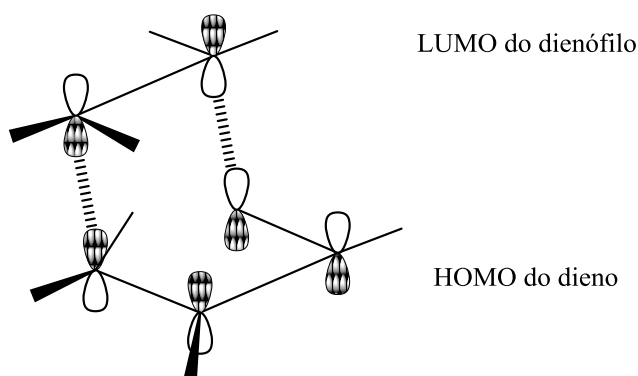


Figura 2.1

Interação entre as orbitais LUMO de um dienófilo com as HOMO de um dieno no processo de cicloadição.

Isomeria *endo/exo*¹⁹⁸

A adição de um dienófilo a um dieno cíclico origina sistemas bicíclicos. Se o dienófilo é um etileno substituído, é possível haver a formação de dois isómeros configuracionais: os isómeros *endo* e *exo*.

A isomeria *endo/exo* é um tipo especial de isomerismo encontrado em compostos orgânicos com um substituinte num sistema de anel em ponte. O prefixo *endo* é reservado para o isómero com o substituinte mais próximo, ou "*syn*", da a ponte mais longa, i.e, mais próximo da ponte com maior número de átomos. O prefixo *exo* é reservado para o isómero com o substituinte mais distante, ou "*anti*", da a ponte mais longa (Figura 2.2). Este tipo de geometria molecular é encontrado em sistemas de norbornano.

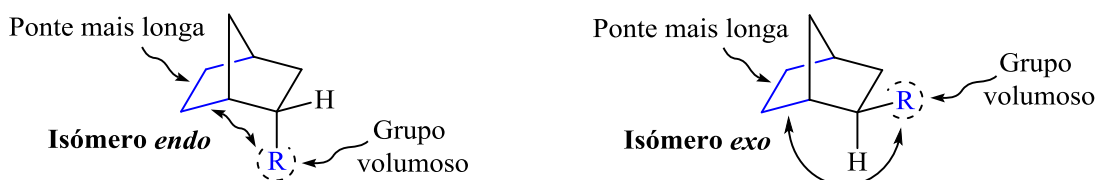


Figura 2.2

Isomeria *endo/exo* em sistemas de norbornano.

¹⁹⁸Moss, G. P. *Pure & Appl. Chem.* **1996**, 68 (12), 514.

No estado de transição *endo*, o substituinte de referência no dienófilo encontra-se orientado para as orbitais π do dieno, enquanto que no estado de transição *exo*, o substituinte de referência encontra-se afastado do sistema π (Figura 2.3).¹⁹⁹ Embora os isómeros *exo* sejam geralmente os mais estáveis – controlo termodinâmico –, estas reações podem dar origem a isómeros *endo* em quantidades apreciáveis, facto este que pode ser explicado pelo controlo cinético, formando-se os compostos cineticamente mais favoráveis.

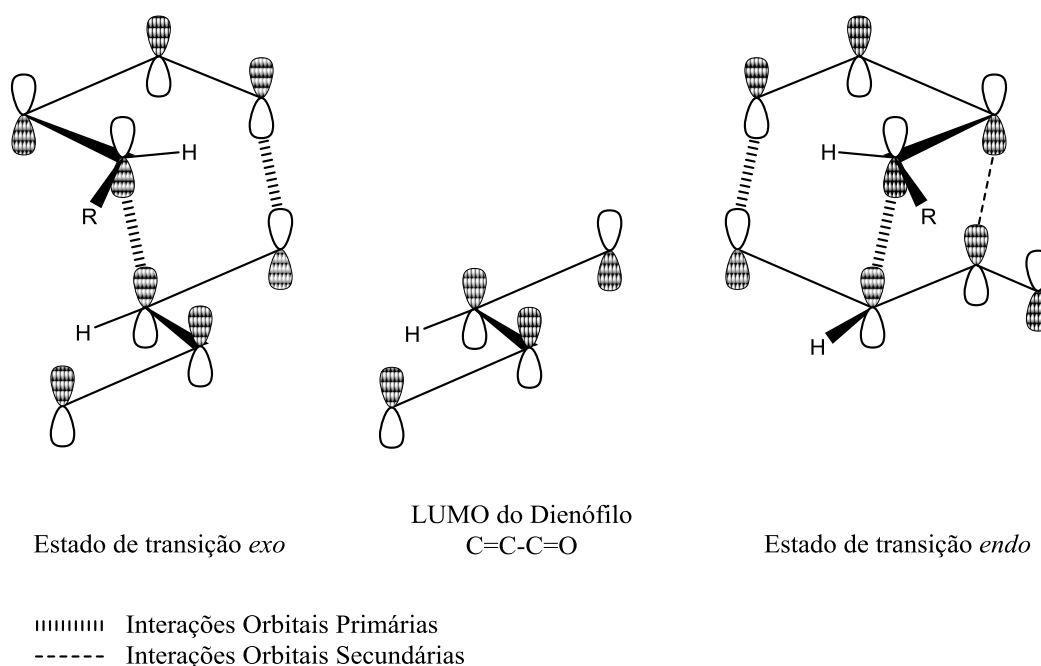


Figura 2.3

Interações orbitais primárias e secundárias no estado de transição *exo* e *endo*.

De acrescentar que, para além das interações primárias entre as orbitais π do dieno e do dienófilo que são responsáveis para que ocorra a reação, poderão existir interações secundárias entre as orbitais π do dieno e grupos π -eletrodeficientes ligados ao dienófilo, que se pensa favorecem desta forma a aproximação *endo* em detrimento à aproximação *exo* pela estabilização do estado de transição da primeira. Contudo, em determinadas situações, os efeitos estereoquímicos poderão ser substancialmente mais significativos que as interações secundárias, favorecendo assim a aproximação *exo*, como ocorre no caso das reações de aza-Diels-Alder entre iminas de glioxilatos volumosos e o ciclopentadieno (Figura 2.4).^{184a,200}

^{184a}Blanco, J. M.; Caamaño, O.; Fernández, F.; Garcia-Mera, X.; López, C.; R. Borges, J. E.; Hergueta, A. *Tetrahedron Letters* **1998**, 39, 5663-5666.

¹⁹⁹Carey, F. A.; Sundberg, R. J. *Advanced Organic Chemistry*, Plenum Press, **1990**, vol. A-B.

²⁰⁰Fernández, F.; García-Mera, X.; Rodríguez-Borges, J. E.; Vale, M. L. C. *Tetrahedron Letters* **2003**, 44, 431-433.

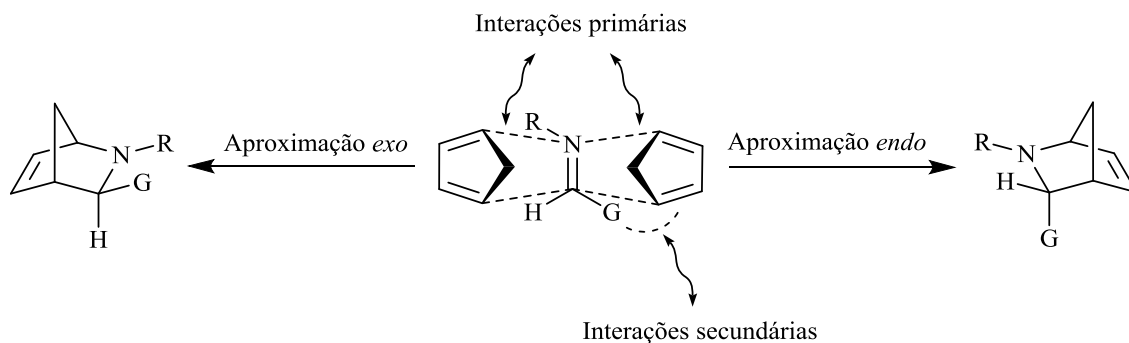


Figura 2.4

Principais interações π (primárias e secundárias) na definição estereoquímica (*exo/endo*) dos adutos resultantes de reação de aza-Diels-Alder na obtenção de sistemas 2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-enos.

Deste modo, verifica-se que outros fatores, para além da natureza dos grupos funcionais presentes tanto no dieno como no dienófilo, podem revestir-se de extrema importância no que diz respeito às relações estereoseletivas apresentadas e/ou aos rendimentos das próprias reações.²⁰¹ Entre os fatores supracitados pode nomear-se a influência da polaridade do solvente utilizado, as condições de pressão e temperatura assim como o uso de diferentes ácidos de Lewis como catalisadores (e.g. AlCl_3 ou ZnCl_2) que coordenam com o dienófilo tornando-o mais eletrofílico (e, portanto, mais reativo) frente ao dieno conjugado.

2.2.2. Reação de aza-Diels-Alder: Síntese dos adutos 4-*exo*/5-*endo*

A reação de Diels-Alder permite ainda a formação de estruturas heterocarbocíclicas caso algum dos carbonos, quer do dieno conjugado quer do dienófilo, possua heteroátomos nas posições das ligações insaturadas.

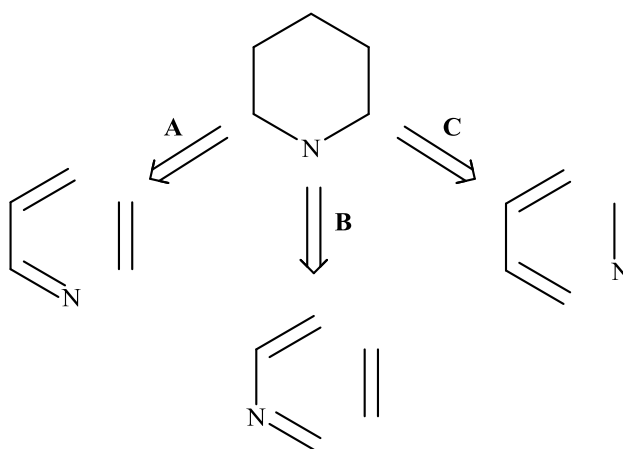
Se o heteroátomo que substitui um desses carbonos for um átomo de azoto, a reação de Diels-Alder toma a designação de “aza-Diels-Alder”. Um grande número de estruturas heterocarbocíclicas pode ser obtido pela variação da natureza do dieno e do dienófilo. Esta classe de reações é também conhecida pela sua notável estereosseletividade e regiosseletividade, permitindo a formação de até quatro estereocentros em simultâneo.²⁰²

²⁰¹(a) Sauer, J.; Sustmann, R. *Angew.Chem. Int. Ed.* **1980**, 19, 779. (b) Streitwieser, A.; Heathcock, C. H. *Química Orgânica*, Interamericana, **1986**. (c) Houk, K. N.; *Tetrahedron Lett.* **1970**, 2621. (d) Birney, D. M.; Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 4127.

²⁰²Kurti, L.; Czako, B. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis* Hayhurst, J., Ed.; Elsevier Academic Press: Burlington, MA, **2005**; p.140-141.

A reação de aza-Diels-Alder é, possivelmente, a via sintética mais útil para a produção de sistemas azotados de anéis heterocíclicos e, devido à sua natureza específica, foi considerada uma boa metodologia para a síntese de vários fármacos, produtos naturais, péptidos biologicamente ativos e catalisadores quirais.²⁰³ Os glioxilatos de 2-azabíciclo[2.2.1]hept-5-enilos atraem considerável atenção, não só pela utilidade como precursores de compostos quirais de potencial atividade biológica, mas também pelo seu uso na preparação de ligandos quirais para catalisadores organometálicos.²⁰³

A reação de aza-Diels-Alder pode apresentar até três variantes que se podem obviar através do esquema retrosintético apresentado para a síntese da piperidina (Esquema 2.8):



Esquema 2.8

Esquema retrosintético para eventuais *vias* de síntese da piperidina.

Na rota A e B, a imina encontra-se na estrutura do dieno (1-azadienos e 2-azadienos, respetivamente), ao passo que na rota C a imina encontra-se no dienófilo, sendo este caso o mais comum das variantes apresentadas.^{204,205}

Rota A (1-azadienos): Esta rota revelou-se particularmente frustrante nas reações de cicloadição [4 + 2], sendo que se verificam reações paralelas competitivas envolvendo o grupo imina.

Desta forma, esta rota sintética não se afigura como sendo relevante para a síntese assimétrica de piperidinas substituídas apesar de ter sido possível a ligação química de auxiliares quirais ao átomo de nitrogénio.

Rota B (2-azadienos): A síntese de compostos baseados em anéis de piperidina através desta rota *via* reação de aza-Diels-Alder também se revelaram infrutíferas, denotando não haver um método simples através do qual se possa ligar um auxiliar quiral que, posteriormente, possa ser eliminado.

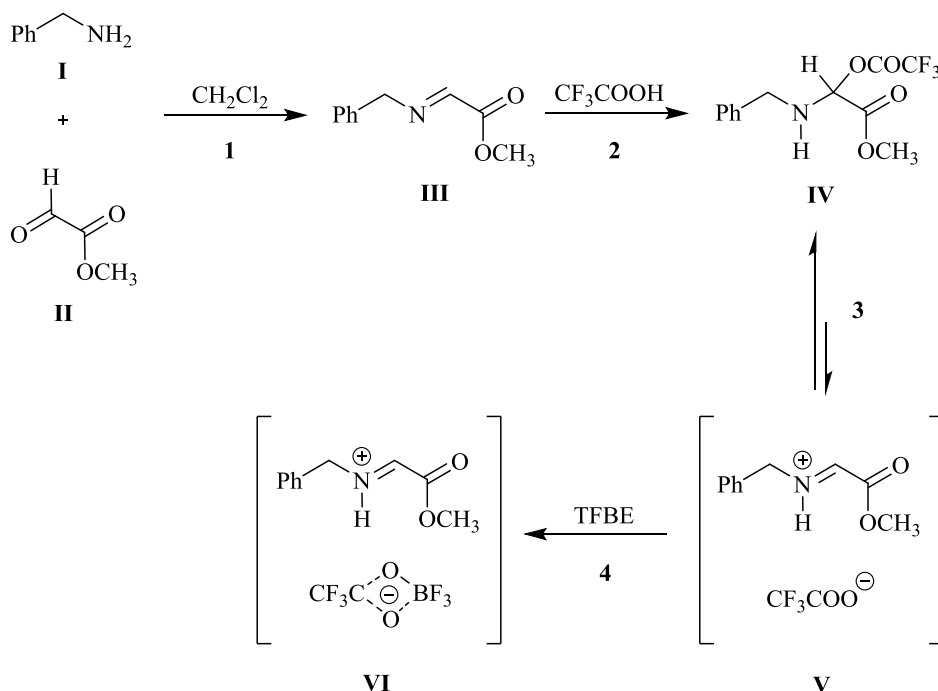
²⁰³Sampaio-Dias, I. E. **2011**, Relatório de Projeto em Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, *Síntese de Novos Tripéptidos Prolinomiméticos com Potencial Atividade Neuroprotetora*.

²⁰⁴Buonora, P.; Olsen, J. C.; Taboem, O. *Tetrahedron* **2001**, 57, 6099.

²⁰⁵Bailey, P.; Millwood, P.; Smith P. *Chem. Com.* **1998**, 633.

Rota C (Iminas como dienófilos): A reação de aza-Diels-Alder entre iminas ou sais de imínio com carbodienos é uma das rotas mais eficientes para a síntese de piperidinas. As iminas podem ser facilmente obtidas pela reação entre aldeídos (ou cetonas) com as correspondentes aminas, obtendo-se assim, um vasto leque de iminodienófilos servindo como substratos neste tipo de cicloadição. Alder descreve, em 1943, o uso de iminas como aza-dienófilos em reações de cicloadição [4 + 2].²⁰⁶ As reações de aza-Diels-Alder típicas, denominadas de "tipo normal" são HOMO-dieno controladas em que é utilizado um dienófilo eletrodeficiente. Os iminodienófilos podem ser ativados através da presença de grupos eletroatraidores tais como sulfonilo ou carbonilo, sendo os últimos mais eficazes. Outra forma passa pela protonação da imina recorrendo a ácidos de Lewis para o efeito.

No início dos anos 90, Stella e seus colaboradores,²⁰⁷ descreveram uma *via* sintética para a obtenção deste tipo de compostos descrevendo os passos fundamentais para a ativação do dienófilo (Esquema 2.9): (1) adição nucleofílica da benzilamina (**I**) ao glioxilato de metilo (**II**) gerando, *in situ*, a correspondente imina (**III**); (2) a imina é protonada na presença de ATA de forma a originar **IV**; (3) a imina protonada **IV** encontra-se em equilíbrio com a sua estrutura sob a forma de sal de imínio (**V**), apresentando esta um melhor carácter como dienófilo; (4) estabilização da imina protonada com TFBE para originar o intermediário **VI**, a baixas temperaturas (-78°C). Posteriormente, por adição do CPD, resulta na formação dos respetivos cicloadutos através da reação de aza-Diels-Alder (Esquema 2.10).



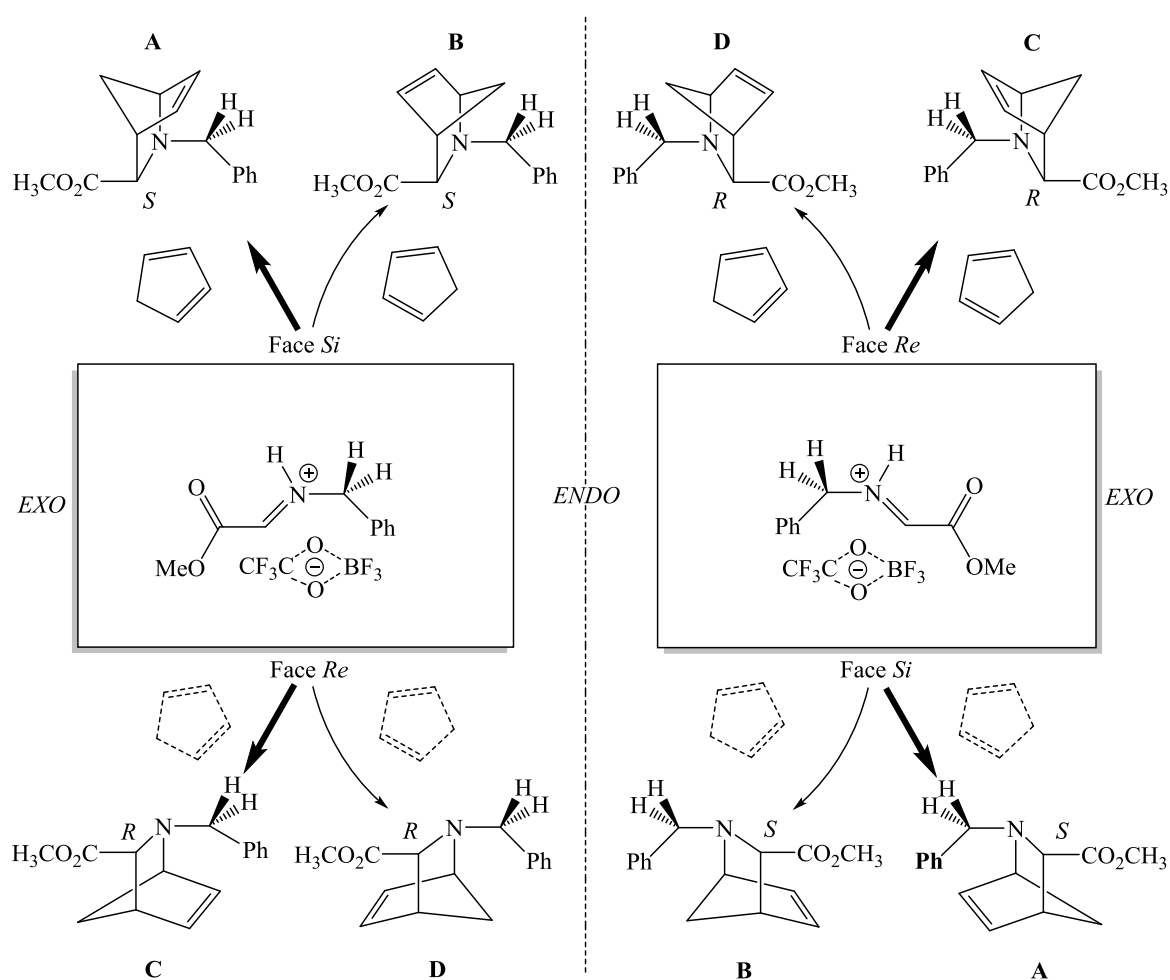
Esquema 2.9

Via de síntese para obtenção da imina protonada do glioxilato de metilo. Adaptado de Stella *et al.*²¹²

²⁰⁶Alder, K. *Newer methoden der praperative organischen chemie*, Verlag Chemie, Weinheim, **1943**.

²⁰⁷Stella, L.; Abraham, H. *Tetrahedron Letters* **1990**, 31 (18), 2604-6.

A adição do dieno (ciclopentadieno) ao dienófilo **VI** (imina estabilizada do glioilato de metilo) pode ocorrer de quatro maneiras distintas, originando quatro isómeros. Tendo como referência a função éster, o dieno pode aproximar-se de forma a originar dois diastereoisómeros (*exo* e *endo*) e, para cada um desses diastereoisómeros, o ataque pode ser feito indistintamente pela face *si* ou *re* do dienófilo, resultando assim num par de enantiómeros *exo* e um par de enantiómeros *endo*, como obviado no Esquema 2.10. Como resultado, obtêm-se duas famílias de diastereoisómeros (*exo* e *endo*), apresentando-se cada uma, sob a forma de mistura racémica.



Esquema 2.10

Formação de cicloadutos por reação de aza-Diels-Alder com indicação das possíveis aproximações (*exo* e *endo*) e faces de ataque (*re* e *si*) entre o ciclopentadieno e a imina protonada do glioilato de metilo.

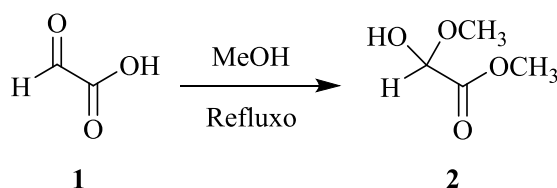
A reação é altamente estereosseletiva, quanto mais baixa é a temperatura maior a estereosseletividade no que diz respeito à formação dos adutos *exo*.

O nosso grupo de investigação tem vindo a estudar há alguns anos este tipo de reações de aza-Diels-Alder entre iminas de glioxilatos quirais e o ciclopentadieno, para a obtenção estereoespecífica dos correspondentes adutos bicíclicos.^{20,181,184b,184c,208}

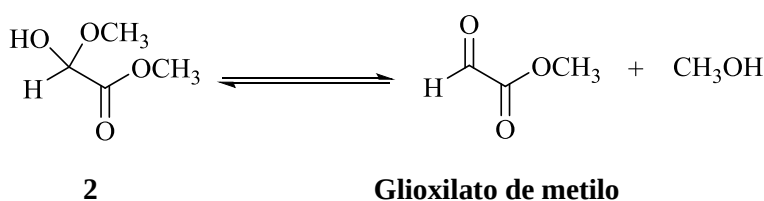
O uso de racematos, como precursores, é prático em termos sintéticos uma vez que permite a investigação de novas reações sem a necessidade da exaustiva de resolução dos enantiómeros ou a utilização de metodologias de síntese assimétrica, servindo como medida exploratória, o que de outra forma implicaria elevados custos. Apenas justificar-se-ia a utilização de compostos enantiomericamente puros uma vez comprovada a viabilidade da síntese dos compostos prolinomiméticos almejados, assim como na preparação dos peptidomiméticos do PLG e a posterior avaliação da sua eventual atividade biológica. Além do mais, uma vez partindo de prolinomiméticos sob a forma racémica, o acoplamento delineado com os dipéptidos enantiomericamente puros poderá possibilitar a separação dos diastereoisómeros nas etapas conducentes à síntese dos tripéptidos propostos.

2.2.2.1. Síntese de 2-hidroxi-2-metoxietanoato de metilo (2): precursor do glioxilato de metilo.

Este hemiacetal pode ser preparado por esterificação direta do ácido glioxílico com metanol em refluxo,²⁰⁹ como evidenciado pela seguinte equação química:



O glioxilato de metilo forma-se também *in situ* a partir do 2-hidroxi-2-metoxietanoato de metilo (2) (Esquema 2.11).



Esquema 2.11

Equilíbrio entre o 2-hidroxi-2-metoxietanoato de metilo e o respetivo glioxilato.

²⁰Costa, J. F.; Caamaño, O.; Fernández, F.; García-Mera, X.; Midón, P.; Rodríguez-Borges, J. E. *Tetrahedron* **2010**, 66, 6797-6805.

¹⁸¹Rodríguez-Borges, J.; García-Mera, X.; Fernández, F.; Lopes, C.; Hugo, V.; Magalhães, A. L.; Morales, M.; Cordeiro, M. N. D. S. *Tetrahedron* **2005**, 61, 10951-10957.

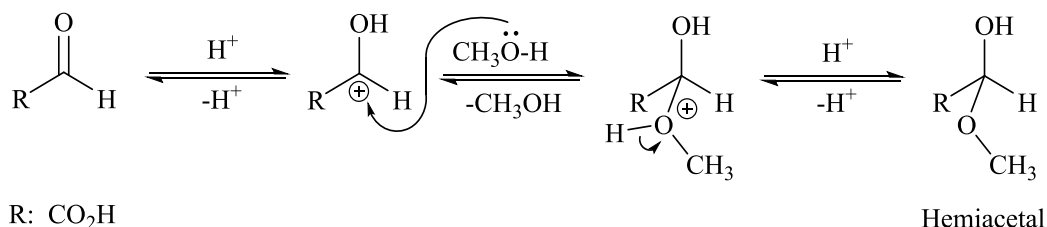
^{184b}Fernández, F.; García-Mera, X.; Vale, M. L. C.; Rodríguez-Borges, J. E., *Synlett* **2005**, 2, 319-321.

^{184c}García-Mera, X.; Rodríguez-Borges, J. E.; Vale, M. L. C. do; Alves, M. J., *Tetrahedron* **2011**, 67 (37), 7162-7172.

²⁰⁸Rodríguez-Borges, J. E.; Vale, M. L. C.; Aguiar, F. R.; Alves, M. J.; García-Mera, X. *Synthesis* **2008**, 6, 971-977.

²⁰⁹Dewar, M. J. S.; Olivella, S.; Stewart, J. J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 5771.

A síntese deste hemiacetal (**2**) a partir do ácido glioílico em condições de refluxo em metanol, conduz ao ataque deste último ao grupo formilo e, ainda, à esterificação pelo ataque ao ácido carboxílico. O mecanismo para a formação do éter encontra-se representado no Esquema 2.12:

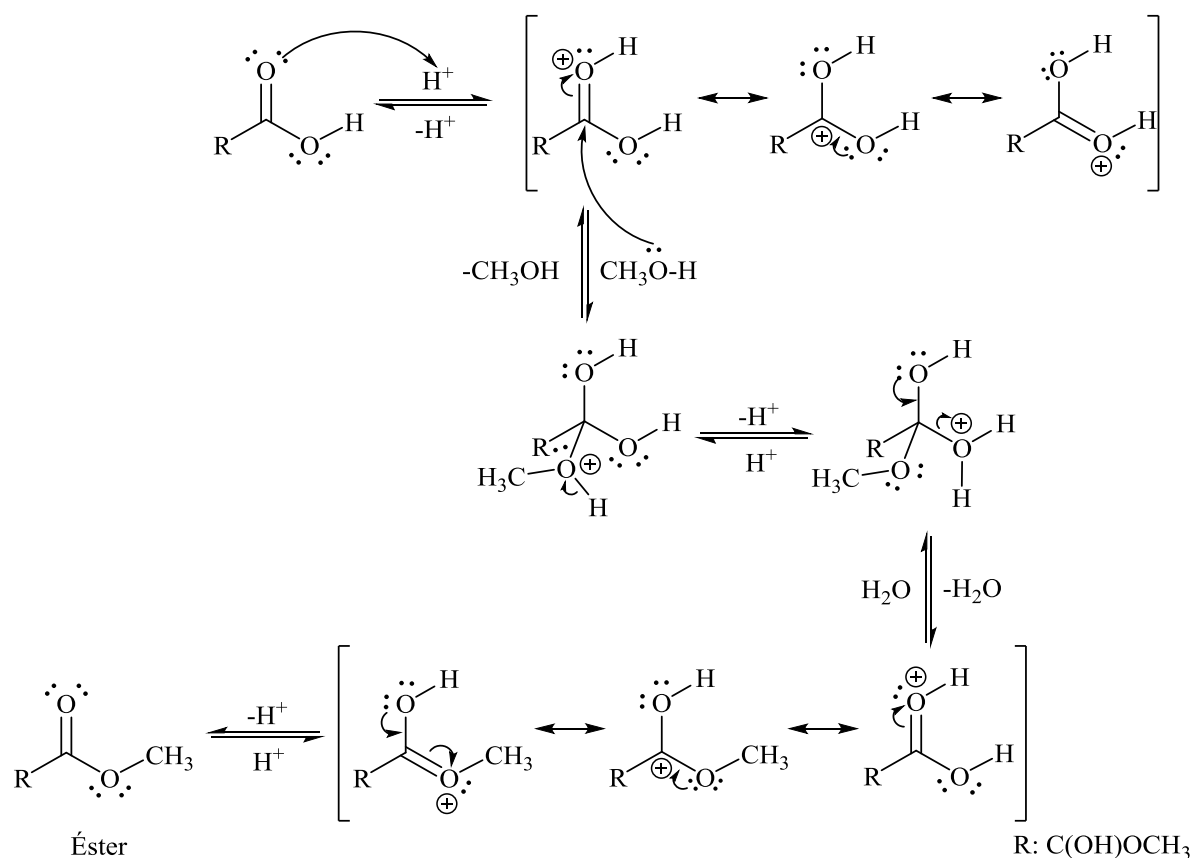


Esquema 2.12

Síntese do hemiacetal **2** com formação do éter metílico a partir da reação entre o glioilato de metilo e metanol.

O próton envolvido na reação é gerado pelo próprio ácido glioílico. O outro grupo hidroxilo formado não segue a reação uma vez que o hemiacetal é mais estável que o respetivo acetal.

No outro local da molécula ocorre o processo de esterificação de Fischer-Speier²¹⁰. O mecanismo de esterificação encontra-se a seguir evidenciado (Esquema 2.13).



Esquema 2.13

Síntese do hemiacetal **2** com formação do éster metílico a partir da reação entre o glioilato de metilo e metanol.

²¹⁰Fischer, E.; Speier, A. *Chemische Berichte* **1895**, 28, 3252-3258.

Resultados Próprios

Partiu-se de uma solução de ácido glioxálico mono-hidratado em MeOH anidro e deixou-se em refluxo, com agitação contínua, durante 18h. Arrefeceu-se a mistura reacional, adicionou-se KHCO_3 sólido e evaporou-se o solvente com recurso a pressão reduzida. O resíduo obtido foi dissolvido em CH_2Cl_2 , secou-se com Na_2SO_4 anidro e filtrou-se a suspensão lavando-se abundantemente com CH_2Cl_2 . Purificou-se o composto com recurso à cromatografia de adsorção em coluna de gel de SiO_2 , obtendo-se **2** como um óleo incolor. Rendimento de 90%.

A análise estrutural do hemiacetal **2** foi realizada mediante espectroscopia de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT e IV e, por espectrometria de massa, IQ^+ -MS (**secção 3.2.1.**). Os resultados obtidos permitiram confirmar a estrutura esperada para o composto, estando concordantes com os apresentados na literatura.^{181,209}

Em seguida, apresentam-se os resultados espectroscópicos e espectrométricos para o hemiacetal **2**.

2-hidroxi-2-metoxiacetato de metilo (**2**)

IV: É possível verificar-se uma banda a 3424.96 cm^{-1} relativa ao estiramento O-H, duas bandas relativas ao estiramento $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ a 2957.30 e 2841.60 cm^{-1} e outra banda forte a 1742.37 cm^{-1} , relativa ao estiramento C=O do éster metílico. Estes dados estão de acordo com a estrutura esperada para o hemiacetal.

^1H -RMN: Pela análise deste espectro é possível identificar-se inequivocamente os prótons da estrutura esperada. Verifica-se um singleto correspondente ao próton H-2 a $\delta = 4.86\text{ ppm}$; um singleto largo que permuta com D_2O , compatível com o próton do grupo hidroxilo a $\delta = 3.87\text{ ppm}$, e ainda, dois singletos correspondentes a 1-OCH_3 e 2-OCH_3 , a $\delta = 3.81$ e 3.47 ppm , respetivamente.

^{13}C -RMN e DEPT: A co-análise dos espectros obtidos evidenciaram um pico respeitante a um carbono quaternário a campo baixo ($\delta = 169.72\text{ ppm}$), compatível com o carbono C-1; verifica-se um pico a $\delta = 93.22\text{ ppm}$ relativo ao carbono C-2 e, ainda, os picos respeitantes aos carbonos dos grupos 1-OCH_3 e 2-OCH_3 , a $\delta = 55.36$ e 52.89 ppm , respetivamente.

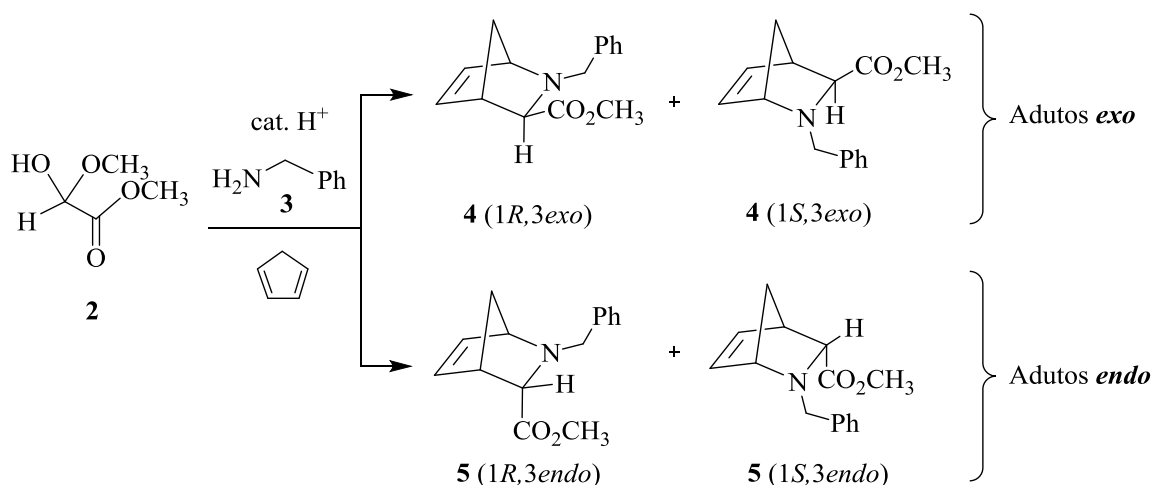
EM: Detetou-se a presença de um pico a $m/z = 121\text{ u.m.a.}$, compatível com o ião *quasi*-molecular, MH^+ , da molécula-alvo (m/z esperado = 121 u.m.a.) e um pico a $m/z = 120\text{ u.m.a.}$ coincidente com o ião molecular, M^+ (m/z esperado = 120 u.m.a.). Pode-se ainda constatar um pico a $m/z = 103\text{ u.m.a.}$, $[\text{M}-17]^+$, concordante com eliminação do grupo -OH e um pico a $m/z = 90\text{ u.m.a.}$, $[\text{M}-30]^+$, concordante com eliminação de um grupo $-\text{OCH}_3$.

¹⁸¹Rodríguez-Borges, J. E.; García-Mera, X.; Fernández, F.; Lopes, V. H. C.; Magalhães, A. L.; Cordeiro, M. N. D. S. *Tetrahedron* **2005**, 61, 10951.

²⁰⁹Dewar, M. J. S.; Olivella, S.; Stewart, J. J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 5771.

2.2.2.2. Síntese dos adutos 4-*exo* e 5-*endo*

A síntese dos cicloadutos, **4-*exo*** e **5-*endo***, pode ser descrita pela seguinte equação:



A preparação dos cicloadutos **4-*exo*** e **5-*endo*** foi efetuada como descrito previamente,¹⁸¹ mediante ativação do hemiacetal do glioxilato de metilo por reação de quantidades equimolares de benzilamina para gerar *in situ* a respetiva imina protonada do glioxilato de metilo através da adição de ATA e TFBE em CH₂Cl₂ seco e adição, por último, de CPD recentemente bidestilado e colocado em banho de gelo, a 0°C. Tal justifica-se na medida em que, como referido na **secção 2.2.1.** (Esquema 2.5), o CPD dimeriza espontaneamente à temperatura ambiente, para obviar essa situação recorre-se à destilação de forma a obter-se o ciclopentadieno na sua forma monomérica (retro-Diels-Alder). Este pode ser guardado durante alguns dias na sua forma monomérica se mantido a 0°C, uma vez que à t.a. o processo de dimerização é rápido.²¹¹ A reação decorreu num sistema previamente arrefecido a -78°C mediante banho criostático de acetona/azoto líquido de forma a assegurar o controlo termodinâmico, conduzindo a um maior rendimento do racemato *exo* em detrimento ao racemato *endo*. Desta forma obtiveram-se os racematos **4-*exo*** e **5-*endo***, os quais foram purificados mediante cromatografia líquida de adsorção em coluna de gel de SiO₂ usando-se como eluente Hex/AcOEt (4:1), recolhendo-se um primeiro grupo de frações correspondente aos adutos maioritários, **4-*exo*** (75%), um segundo grupo de frações de uma mistura **4-*exo*/5-*endo*** enriquecida em **5-*endo*** e, por último, um grupo de frações do aduto minoritário, **5-*endo*** (19%).

A análise estrutural dos racematos **4-*exo*** e **5-*endo*** foi realizada mediante espectroscopia de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT e IV e, por espectrometria de massa, IE⁺-MS (**secção 3.2.2.**).

Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para os compostos, estando concordantes com os apresentados na literatura.¹⁸¹

¹⁸¹Rodríguez-Borges, J. E.; García-Mera, X.; Fernández, F.; Lopes, V. H. C.; Magalhães, A. L.; Cordeiro, M. N. D. S. *Tetrahedron* **2005**, 61, 10951.

²¹¹Hönicke, D.; Födisch, R.; Claus, P.; Olson, M. *Cyclopentadiene and Cyclopentene* in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.

IV: Os espectros obtidos para os cicloadutos **4-exo** e **5-endo**, revelam a presença de bandas de estiramento C_{sp^2} -H, concordantes a presença do anel aromático (grupo benzilo), bem como da olefina entre os carbonos C-5 e C-6. Verificam-se, ainda, bandas de estiramento C_{sp^3} -H e, uma banda de estiramento C=O, como esperado, respeitante ao éster metílico. Em seguida, apresentam-se os dados relativos às bandas mais características sumariados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1

Bandas de IV mais características para os cicloadutos **4-exo** e **5-endo**.

Entrada	IV / cm^{-1}		
	C_{sp^2} -H (str)	C_{sp^3} -H (str)	C=O (str)
4-exo	3059.51, 3026.72	2992.02, 2950.55, 2876.21, 2833.88	1740.44
5-endo	3063.37, 3021.80	2991.05, 2947.66, 2871.49, 2800.13	1736.58

^1H -RMN: Pela análise dos espectros obtidos para os cicloadutos **4-exo** e **5-endo**, é possível identificar-se alguns padrões, nomeadamente a presença de um multiplete na zona aromática e sinais relativos aos prótons C_{sp^2} -H, H-5 e H-6, a campos baixos. De acrescentar a presença de um singlete típico dos prótons do grupo $-\text{OCH}_3$, compatível com o éster metílico. Na Tabela 2.2, encontram-se sumariados os prótons relativos aos racematos **4-exo** e **5-endo** e correspondentes desvios químicos.

Tabela 2.2

Desvios químicos de ^1H -RMN para os cicloadutos **4-exo** e **5-endo**.

Sinais	^1H -RMN (δ / ppm)	
	4-exo	5-endo
ArH	7.43 – 7.06	7.55 – 7.10
H-1	3.83	3.42 – 3.31
H-3	2.28	3.42 – 3.31
H-4	2.28	3.36
H-5	6.42	6.47
H-6	6.26 – 6.12	6.14
H-7_{syn}	1.95	1.82
H-7_{anti}	1.36	1.56
OCH₃	3.55	3.56

Note-se que, o desvio químico do próton H-3 no racemato **4-exo** surge a campos relativamente mais altos ($\delta = 2.28$ ppm) em comparação com o mesmo próton no racemato **5-endo** ($\delta = 3.36$ ppm). De acrescentar que próton H-7_{syn} do racemato **4-exo** encontra-se mais desprotegido ($\delta = 1.95$ ppm), pela maior proximidade do grupo éster, em comparação com o mesmo próton do racemato **5-endo** ($\delta = 1.82$ ppm).

¹³C-RMN e DEPT: Através da co-análise dos espectros obtidos para os cicloadutos **4-exo** e **5-endo**, é possível identificar-se alguns padrões, nomeadamente a presença de um pico respeitante a um carbono quaternário a campos muito baixos, compatível com o éster metílico, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$, e ainda um carbono quaternário na zona aromática, compatível com o carbono C-1' do anel aromático do grupo benzilo e ainda os restantes sinais nesta zona, corroborando a presença do grupo benzilo; verificam-se ainda os sinais correspondentes aos carbonos C_{sp²}-H da olefina entre os carbonos C-5 e C-6; constata-se a presença do carbono do grupo metilo respeitante ao éster metílico e ainda é possível distinguir inequivocamente os carbonos metilénicos do grupo benzilo e da ponte metilénica do sistema biciclo, C-7, a campos relativamente mais altos. Na Tabela 2.3, encontram-se sumariados os resultados obtidos para os carbonos e correspondentes desvios químicos. A atribuição realizada está de acordo com a estrutura esperada.

Tabela 2.3

Desvios químicos de ¹³C-RMN para os cicloadutos **4-exo** e **5-endo**.

Sinais	¹³ C-RMN e DEPT (δ / ppm)	
	4-exo	5-endo
<u>CO₂CH₃</u>	<u>174.60</u>	<u>173.06</u>
C-1'	<u>139.06</u>	<u>138.73</u>
C-2' + C-6'	129.19	128.73
C-3' + C-5'	128.25	127.72
C-4'	127.12	126.60
C-1	64.34	64.47
C-3	64.90	65.42
C-4	48.55	47.41
C-5	136.67	138.31
C-6	133.71	134.65
C-7	<u>46.69</u>	<u>44.83</u>
CO₂C_H₃	51.92	51.15
NCH₂Ph	<u>58.99</u>	<u>60.41</u>

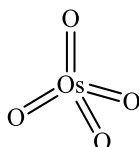
EM: Detetou-se, para ambos os cicloadutos **4-exo** e **5-endo**, a presença de um pico a $m/z = 243$ u.m.a., coincidente com o ião *quasi*-molecular, M^+ , da molécula-alvo (m/z esperado = 243 u.m.a.). Pode-se ainda constatar um pico $m/z = 184$ u.m.a., $[M-59]^+$, que é compatível com o fragmento obtido pela α -clivagem, com eliminação do éster metílico ($-\text{CO}_2\text{CH}_3$); um pico a $m/z = 152$ u.m.a., $[M-91]^+$, que corresponde ao fragmento obtido pela eliminação do grupo benzilo e, ainda, um pico a $m/z = 91$ u.m.a. que corresponde ao fragmento do próprio grupo benzilo, $[\text{Bn}]^+$.

2.2.3. Síntese de *cis*-dióis vicinais

Di-hidroxição Vicinal *Syn* de alcenos com Tetróxido de Ósmio

O **tetróxido de ósmio (VII)**, OsO_4 , possui um arranjo espacial tetraédrico, por isso é uma molécula apolar. Este composto é volátil, sublimando à temperatura ambiente. Este, na sua forma pura é, provavelmente, incolor,²¹² sugerindo-se que a sua aparência trivial sob a forma de um sólido amarelo se deva a impurezas de dióxido de ósmio (OsO_2).²¹³

O OsO_4 é um dos reagentes disponíveis mais fiáveis na di-hidroxição de alcenos para a obtenção de dióis vicinais *syn*.²¹⁴ Hoffman, foi pioneiro a documentar a redução do OsO_4 por espécies insaturadas, mostrando que o OsO_4 pode ser empregue como catalisador na presença de clorato de sódio (ou postássio) na hidroxição de alcenos.²¹² O seu trabalho foi mais tarde complementado por Milas,²¹⁵ que descreve a oxidação de alcenos usando OsO_4 e H_2O_2 .



Tetróxido de ósmio (VII)

Mecanismo de *cis*-hidroxilação

O mecanismo de *cis*-hidroxilação proposto por Dewar,^{216,217,218} sugere ocorrer *via* ataque direto por parte do oxigénio a um dos carbonos insaturados resultando num estado de transição cíclico contendo seis eletrões, possibilitando desta forma a adição *cis*.

²¹²Butler, I. S.; Harrod, J. F. *Inorganic Chemistry: Principles and Applications*, Benjamin / Cummings. **1989**, p. 343.

²¹³Cotton, F. A. *Advanced Inorganic Chemistry*, 6th ed., New Delhi, India: J. Wiley **2007**, p. 1002.

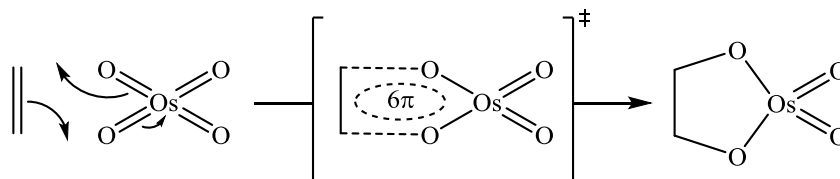
²¹⁴Schröder, M. *Chem. Rev.* **1980**, 80 (2), 187-213.

²¹⁵Milas, N. A.; Sussman, S. *J. Am. Soc.* **1936**, 58, 1302.

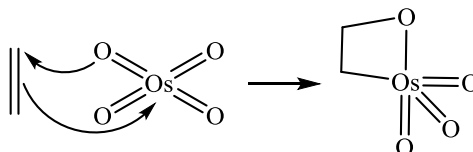
²¹⁶Dewar, M. J. S. *Ind. Chim. Belge* **1950**, 15, 181.

²¹⁷Dewar, M. J. S.; Longuet-Higgins, H. C. *Proc. R. Soc. A* **1952**, 214, 482.

²¹⁸Dewar, M. J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 3341.



Contudo, Sharpless *et al.*²¹⁹ sugerem a possibilidade de um ataque nucleófilo por parte do alceno ao átomo de Os, visto este ser mais eletropositivo, com consequente formação de um intermediário organometálico.



Zelikoff e Taylor,²²⁰ consideram que o intermediário organometálico sofre um rearranjo de forma a obter-se um complexo éster cíclico constituído por cinco membros, com subsequente hidrólise relativamente rápida.

A hidrólise dos complexos éster de Os^{VI} pode ser efetuada tanto por processos redutivos como por oxidativos.²²¹ A hidrólise redutiva envolve espécies como sulfito ou bissulfito de sódio ou potássio, hidreto de alumínio ou sulfureto de hidrogénio.²¹⁸ Neste processo são gerados os correspondentes *cis*-dióis juntamente com formas de ósmio que podem ser removidas por filtração.²¹⁸

Os processos oxidativos envolvem o uso de cloratos metálicos, *N*-óxido de *N*-metilmorfolina (NOMM), H₂O₂ ou hidroperóxido de *tert*-butilo. Neste último processo, é gerado o *cis*-diol juntamente com OsO₄, que por sua vez é regenerado o seu poder oxidante e, portanto, pode voltar a reagir com os alcenos, resvalando num processo cíclico.

Outros compostos de ósmio podem ser usados como catalisadores, incluindo sais de Os^{VI}, [OsO₂(OH)₄]²⁻, e o tricloreto de ósmio hidratado, OsCl₃·xH₂O. Estas espécies, na presença de co-oxidantes, oxidam a Os^{VIII}.²²² O uso de NOMM como co-oxidante no processo de di-hidroxilação de alcenos tem a vantagem de se obter maiores rendimentos relativamente quando são usados outros co-oxidantes como H₂O₂ ou cloretos de metais.²²¹ Por este motivo, o uso de NOMM neste tipo de reações verifica-se como sendo um co-oxidante muito eficiente, sendo obtidos *cis*-dióis a partir dos correspondentes alcenos com bons rendimentos.²²³

²¹⁸Dewar, M. J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 3341.

²¹⁹Sharpless, K. B.; Teranishi, A. Y.; Bäckvall, J.-E. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 3120.

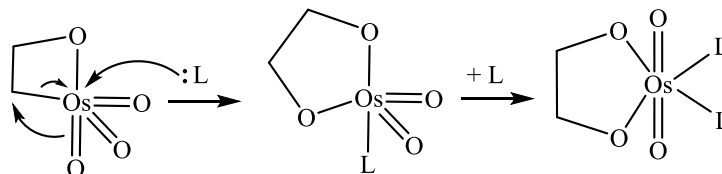
²²⁰Zelikoff, M.; Taylor, H. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 5039.

²²¹Schröder, M. *Chem. Rev.* **1980**, 80, 187-213.

²²²Ogino, Y.; Chen, H.; Kwong, H.-L.; Sharpless, K. B. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32 (32), 3965-3968.

²²³Rheenan, V. Van; Kelly, R. C.; Cha, D. Y. *Tetrahedron Lett.* **1976**, 1973.

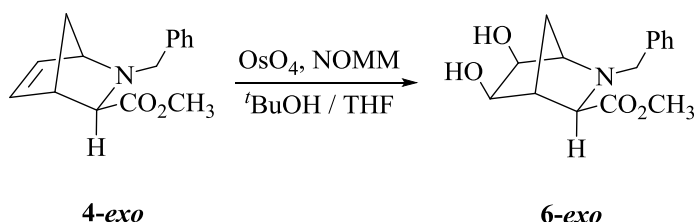
Note-se que, a hidrólise dos complexos contendo ésteres de Os^{VI}, ocorre com exclusiva quebra da ligação éster Os-O, pois a hidrólise em H₂¹⁸O revelou que não há incorporação de ¹⁸O nos dióis.²²⁴ Verifica-se ainda que, bases de Lewis como aminas terciárias e ainda derivados piridínicos aumentam a taxa de di-hidroxilação, uma vez que a doação eletrônica por parte de bases de Lewis ao centro metálico (Os) induz a quebra da ligação carbono-ósio a uma taxa superior neste passo, levando à formação de complexos [OsO₂(OR)L] e, finalmente, [OsO₂(O₂R)L₂].²¹⁹ Se a amina é quiral, então a di-hidroxilação pode proceder com enantiosseletividade.²²⁵



Resultados Próprios

2.2.3.1. Síntese de (±)-*exo*-2-benzil-5,6-di-hidroxi-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxilato de metilo (6-*exo*)

A reação de di-hidroxilação do aduto **4-*exo*** para obtenção dos correspondente *cis*-diol **6-*exo***, pode ser descrita pela seguinte equação:



O catalisador eleito para a di-hidroxilação do aduto **4-*exo*** foi o OsO₄, uma vez que apresenta um melhor perfil para a obtenção do *cis*-diol pretendido, **6-*exo***. A reação foi realizada à temperatura ambiente adicionando uma quantidade muito reduzida de OsO₄ (0.01 equivalentes) a partir de uma solução de OsO₄ 0.01 M numa mistura dioxano/H₂O (3:1), a uma solução do alceno **4-*exo*** em THF/^tBuOH (1:1). Elegeu-se como agente co-oxidante a NOMM (1.5 eq.) que regenera o estado de oxidação do centro metálico (Os^{VI} → Os^{VIII}).

²¹⁹Sharpless, K. B.; Teranishi, A. Y.; Bäckvall, J.-E. *Soc.* **1977**, 99, 3120.

²²⁴Subbaraman, L. R.; Subbaraman, J.; Behrman, E. J. *Inorgan. Chem.* **1972**, 11, 2621.

²²⁵Berrisford, D. J.; Bolm, C.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int.* **1995**, 34 (10), 1059-1070.

Finalizada a reação, removeu-se o OsO_4 através de filtração sob pressão reduzida numa camada de celite/ Na_2SO_4 e concentrou-se o filtrado. Posteriormente, procedeu-se à purificação por cromatografia em coluna de gel de SiO_2 usando o eluente Hex/ AcOEt (1:1), obtendo-se o *cis*-diol **6-exo** com rendimentos compreendidos entre 90-94%. Na Tabela 2.4 encontram-se sumariados os resultados obtidos.

Tabela 2.4

Resultados obtidos na preparação de **6-exo**.

Exp.	m / g (n / mmol)	t / h	Rendimento (%)
1	2.01 (8.26)	24	91
2	1.00 (4.11)	24	90
3	1.00 (4.11)	19	94

O mecanismo desta reação encontra-se evidenciado no Esquema 2.14: (1) reação inicial da ligação π com o OsO_4 (**I**), que constitui uma adição concertada na medida em que três pares de eletrões movem-se simultaneamente para originar um éster cíclico contendo Os^{VI} . Este processo pode ser visto como um ataque eletrofílico do alceno ao OsO_4 , no qual, dois eletrões do alceno reduzem o metal ($\text{Os}^{\text{VIII}} \rightarrow \text{Os}^{\text{VI}}$); (2) cicloadição redutiva *syn* do OsO_4 ao alceno pela face *exo* (menos impedida), formado o intermediário “diéter osmato” (**III**) que, por razões estéricas, apenas se forma o produto em que os dois átomos de oxigénio são introduzidos na mesma face da ligação dupla – *adição syn*. Este intermediário usualmente não pode ser isolado, contudo pode ser convertido no diol livre por tratamento redutivo; (3) este, por sua vez, através da hidrólise do complexo de Os, origina o *cis*-diol vicinal desejado (**IV**) e OsO_4H_2 ; (4) o estado de oxidação do centro metálico catalizador é regenerado ($\text{Os}^{\text{VI}} \rightarrow \text{Os}^{\text{VIII}}$) pela oxidação com NOMM, iniciando-se um novo ciclo.

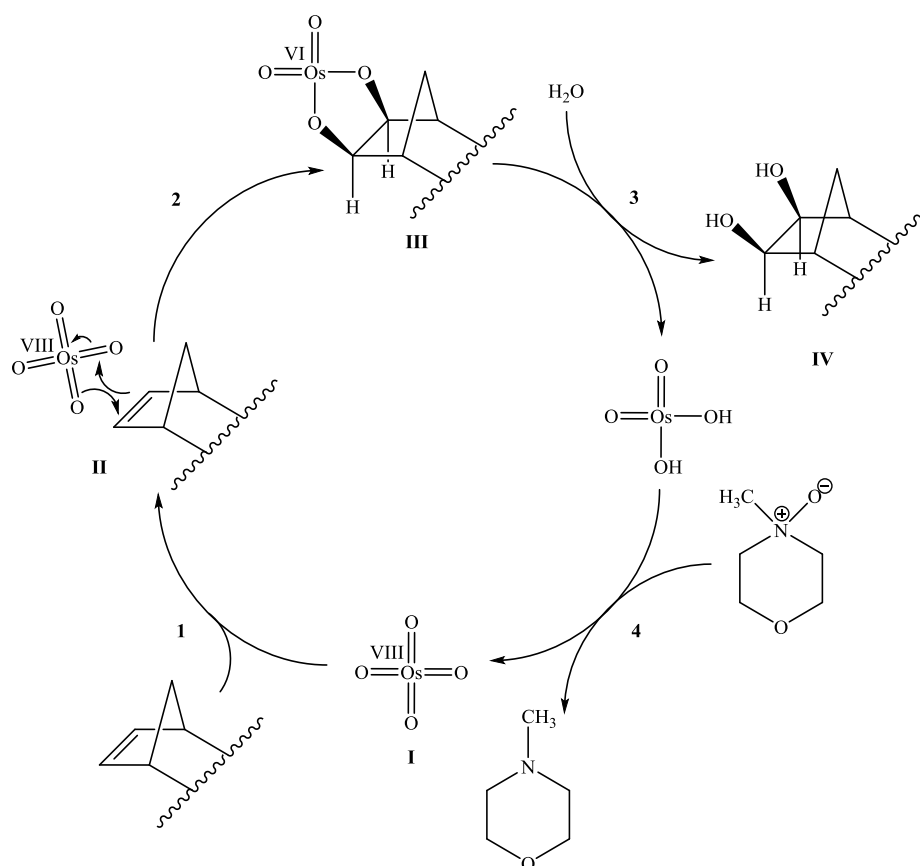
Note-se que este processo possibilita a obtenção de dióis vicinais *syn* a partir de alcenos, sendo um mecanismo complementar do processo epoxidação seguida de hidrólise do oxaciclopropano originando dióis vicinais *anti*.

Uma vez que o OsO_4 é altamente tóxico e dispendioso, torna-se imperativo utilizar-se quantidades catalíticas deste reagente apesar dos rendimentos das oxidações de alcenos para obtenção dos dióis ocorrerem melhor quando usadas quantidades estequiométricas de OsO_4 . Para colmatar esta situação, é prática corrente a utilização de quantidades catalíticas de OsO_4 e a co-adição de quantidades estequiométricas de outro agente oxidante tal como H_2O_2 (no regente de Milas), ou a NOMM,²²⁶ que serve para reoxidar o ósmio reduzido durante o processo de di-hidroxilação.

²²⁶VanRheenan, V.; Kelly, R. C.; Cha, D. Y. *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 17, 1973.

Poder-se-á usar, em detrimento do OsO_4 , o permanganato de potássio (KMnO_4), um reagente muito vulgar na di-hidroxilação vicinal *syn* de alcenos. Apesar deste reagente atuar de forma mecanisticamente semelhante ao OsO_4 , o KMnO_4 é menos seletivo para a síntese de dióis uma vez que, sendo um forte agente oxidante, promove a sobreoxidação, originando baixos rendimentos.

A di-hidroxilação *syn* com OsO_4 a partir de alcenos *cis* origina compostos *meso*, ao passo que alcenos *trans* originam uma mistura racémica.²²⁷



Esquema 2.14

Mecanismo do ciclo catalítico de di-hidroxilação respeitante ao aduto *exo* com OsO_4 utilizando a NOMM como co-oxidante para regeneração do catalisador.

A análise estrutural do cis-diol **6-*exo*** foi realizada mediante espectroscopia de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT e IV e, por espectrometria de massa, EI^+ -MS (**secção 3.2.3.**). Os resultados obtidos permitiram confirmar a estrutura esperada para o composto **6-*exo***, estando concordantes com os apresentados na literatura.²²⁸

²²⁷Vollhardt, K.; Peter, C. *Organic Chemistry: Structure and Function*, 6th ed., W. H. Freeman and Company: New York, **2011**, p 535.

²²⁸Alves, M. J.; García-Mera, X.; Vale, M. L. C.; Santos, T. P.; Aguiar, F. R.; Rodríguez-Borges, J. E.; *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 7595-7597.

(±)-*exo*-2-benzil-5,6-di-hidroxi-2-azabíciclo[2.2.1]heptano-3-carboxilato de metilo (**6-*exo***)

IV: É clara a presença de bandas relativas ao estiramento dos O-H a 3383.50 cm^{-1} (que mascaram as bandas relativas ao estiramento $C_{sp^2}\text{-H}$ do anel aromático do grupo benzilo), bandas de estiramento $C_{sp^3}\text{-H}$ a 2951.52 e 2842.56 cm^{-1} e, ainda, uma banda forte, a 1732.73 cm^{-1} , respeitante ao estiramento $C=O$, compatível com o éster metílico.

^1H -RMN: Pela análise deste espectro é possível identificar-se a presença de um multipeto na zona aromática ($\delta = 7.35 - 7.22\text{ ppm}$) cuja integração corrobora a presença de um anel aromático, como esperado para o grupo benzilo; constata-se ainda a ausência de sinais de prótons $C_{sp^2}\text{-H}$, resultado da reação de di-hidroxilação. Nota-se a presença de dois novos sinais, por contraste com os dados espectroscópicos homólogos para o aduto **4-*exo*** (secção 3.2.2.), dos prótons H-5 e H-6 ($\delta = 4.25$ e 3.86 ppm) e, ainda, dos dois prótons relativos aos *cis*-diol vicinal que surgem como sinais largos sobrepostos com o sinal H-1, corroborando o sucesso da reação. Outro aspeto observado é o deslocamento do próton relativo ao H-7_{anti} a campos mais baixos, aproximando-se do próton H-7_{syn}, surgindo estes prótons como um multipeto a $\delta = 1.83 - 1.64\text{ ppm}$, devido ao efeito indutivo negativo causado pelos grupos hidroxilo. A atribuição dos restantes prótons está de acordo com a estrutura esperada.

^{13}C -RMN e DEPT: A co-análise dos espectros obtidos evidenciaram um pico respeitante a um carbono quaternário a campos muito baixos, $\delta = 174.52\text{ ppm}$, compatível com o éster metílico; sinais na zona aromática concordantes com a presença do anel aromático do grupo benzilo; nota-se a ausência de sinais $C_{sp^2}\text{-H}$ característicos de olefinas, compatível com a estrutura esperada. Foi ainda possível distinguir o carbono metilénico do grupo benzilo a $\delta = 55.56\text{ ppm}$ e, do carbono C-7, a $\delta = 31.08\text{ ppm}$. A atribuição dos restantes carbonos está de acordo com a estrutura esperada.

EM: Detetou-se a presença de um pico a $m/z = 277.0\text{ u.m.a.}$, compatível com o ião *quasi*-molecular, M^+ , da molécula-alvo (m/z esperado = 277.1 u.m.a.). Pode-se ainda constatar um pico $m/z = 259.9\text{ u.m.a.}$, $[M-17]^+$, que é compatível com o fragmento obtido pela eliminação de um grupo hidroxilo (-OH); um pico a $m/z = 185.8\text{ u.m.a.}$, $[M-91]^+$, compatível com o fragmento obtido pela eliminação do grupo benzilo e, ainda, um pico a $m/z = 91\text{ u.m.a.}$, que corresponde ao fragmento do próprio grupo benzilo, $[Bn]^+$.

2.2.4. Síntese dos ácidos carboxílicos 7-*exo* e 8-*exo*

2.2.4.1. Hidrólise de ésteres

Em termos gerais, a hidrólise é definida como uma transformação química na qual uma molécula orgânica, RX, reage com água, resultando na formação de uma nova ligação covalente com OH e a quebra da ligação covalente com X (o grupo de saída) na molécula em questão.^{229,230}

Os mecanismos de hidrólise de ésteres têm sido amplamente investigados. Apesar de nove mecanismos distintos terem sido propostos,²³¹ os mecanismos apresentados serão limitados aos dois mecanismos mais comuns envolvendo a quebra da ligação acil-oxigénio por catálise ácida, A_{AC}2, e por catálise alcalina (ou básica), B_{AC}2.

2.2.4.2. Hidrólise por catálise ácida

Os ésteres podem ser hidrolisados por catálise ácida (A_{AC}2) para originarem os respetivos ácidos carboxílicos. Neste caso, o mecanismo é exatamente o oposto da esterificação de Fischer-Speier,²¹⁰ a reação é, por isso, reversível. Quando se pretende sintetizar o éster, remove-se a água da mistura reacional a fim de deslocar o equilíbrio no sentido da formação do mesmo. Pelo contrário, quando se pretende hidrolisar o éster, realiza-se a reação na presença de um grande excesso de água. Em face ao que sucede durante a esterificação nas reações catalisadas por ácido, este serve duas funções: protonação do oxigénio do grupo carbonilo da função éster, tornando o carbono do grupo carbonilo mais suscetível ao ataque nucleofílico e, ainda, protonação do oxigénio do alcóxi-do no intermediário tetraédrico, tornando-o num melhor grupo de saída, favorecendo desta forma, a hidrólise do éster.

Mecanismo A_{AC}2

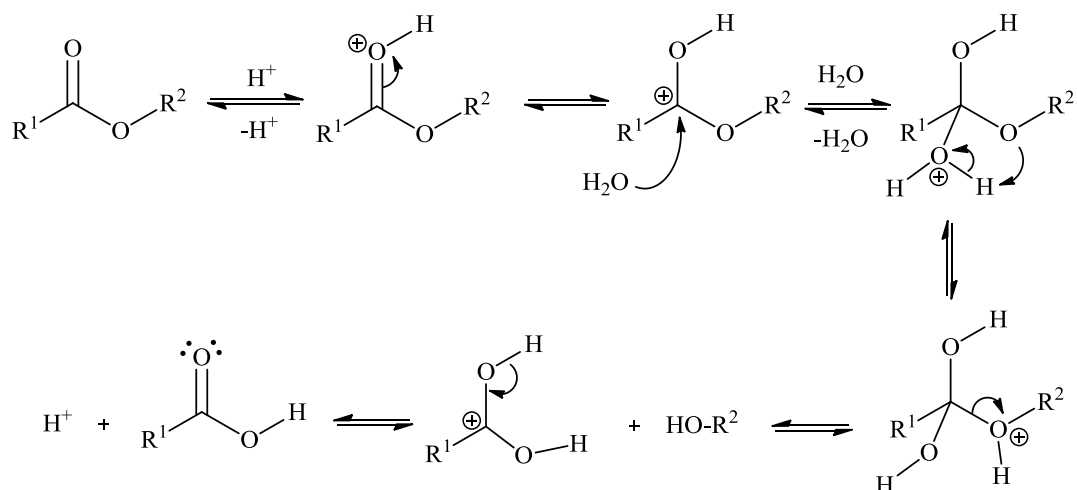
A hidrólise *via* mecanismo A_{AC}2 envolve inicialmente a protonação do oxigénio do grupo carbonilo. A protonação polariza o grupo carbonilo, removendo densidade eletrónica do átomo de carbono tornando-o mais eletrofílico e, desta forma, mais suscetível ao ataque nucleófilo por parte da água (Esquema 2.15).

²¹⁰Fischer, E.; Speier, A. *Chemische Berichte* **1895**, 28, 3252-3258.

²²⁹Harris, J. C. Rate of hydrolysis, in *Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behavior of Organic Compounds*, Eds. (New York, NY: McGraw-Hill), **1981**, 7, pp. 1-48.

²³⁰Mill, T.; Mabey, W. Hydrolysis of organic chemicals, in *Handbook of Environmental Chemistry, Volume 2D: Reactions and Processes*, Ed., (New York, NY: Springer-Verlag), **1988**, pp. 71-111.

²³¹Larson, R. A., *Reaction Mechanisms in Environmental Organic Chemistry*, 1 ed., CRC-Press, **1994**, p. 127.



Esquema 2.15

Mecanismo de hidrólise catalisada por ácido (A_{AC2}).

2.2.4.3. Hidrólise por catálise alcalina

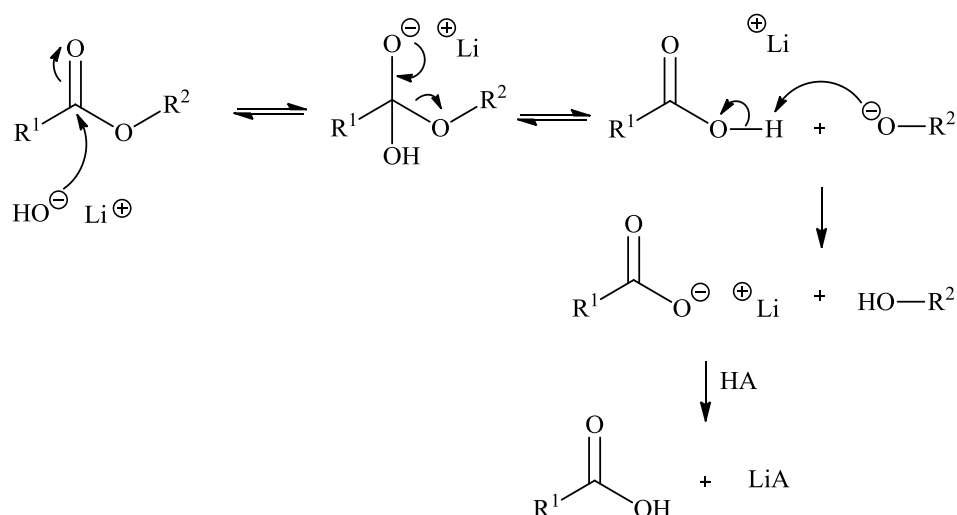
A hidrólise em meio alcalino (ou básico) – saponificação – difere da hidrólise em meio ácido em diferentes aspetos. Neste caso, a hidrólise não é realizada pela água, mas pelo anião hidroxilo. O mecanismo de hidrólise catalisada por base (B_{AC2}) procede *via* ataque nucleofílico direto do anião hidróxido ao átomo de carbono do grupo carbonilo (adição nucleófila do ião hidróxido, seguida de eliminação do grupo alcóxido). A hidrólise do éster em solução básica é irreversível pelo que o seu estudo mais detalhado se justifica.

Mecanismo B_{AC2}

Este mecanismo é constituído por dois passos: adição-eliminação e desprotonação. Inicialmente, ocorre o ataque nucleofílico por parte do ião hidroxilo ao carbono do grupo carbonilo da função éster, formando-se um intermediário tetraédrico, este passo é reversível sendo que poderá haver expulsão tanto do grupo hidroxilo (obtendo-se o produto de partida), como poderá formar-se o ácido carboxílico desejado, com a expulsão do respetivo alcóxido (Esquema 2.16).

De quaisquer formas, este processo envolve sempre a perda de um mau grupo de saída, porém a expulsão do grupo alcóxido é favorecida em relação ao grupo hidroxilo. O motivo pelo qual isto se verifica deve-se em parte à força da ligação $C=O$ e a estabilidade associada aos compostos carbonílicos. O intermediário tetraédrico possui uma energia superior do que a sua conversão num composto carbonílico, que é tipicamente um processo exotérmico, mesmo quando um mau grupo de saída é expelido. O processo de hidrólise alcalina beneficia ainda de um passo importante: o passo de desprotonação.

Após o passo de adição-eliminação é gerado um alcóxido, que em regra, é uma base muito forte, abstraindo imediatamente o próton lábil do ácido carboxílico gerado para dar origem ao respectivo carboxilato, desta forma o último passo da reação é irreversível: o carboxilato sendo uma base relativamente fraca não tem tendência a abstrair o próton do álcool (ácido muito fraco). Este passo é muito importante, na medida em que conduz a reação de hidrólise no sentido de formação do carboxilato desejado, sendo esta *via* de hidrólise praticamente completa.²³² Subsequentemente, o tratamento com solução aquosa acídica origina o ácido carboxílico desejado na sua forma livre.



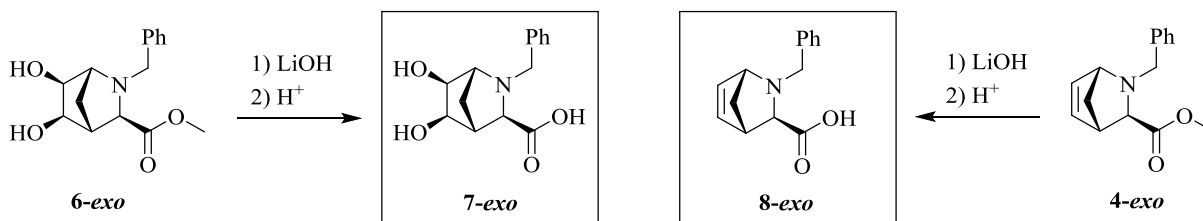
Esquema 2.16

Mecanismo de hidrólise catalisada por base (B_{AC2}).

Resultados Próprios

2.2.4.4. Síntese do ácido (±)-*exo*-2-benzil-5,6-di-hidroxi-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (7-*exo*) e do ácido (±)-*exo*-2-benzil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carboxílico (8-*exo*)

A síntese dos ácidos carboxílicos **7-*exo*** e **8-*exo*** a partir dos correspondentes aminoésteres, **6-*exo*** e **4-*exo***, pode ser descrita através das seguintes equações:



²³²Vollhardt, P.; Peter, K. *Organic Chemistry: Structure and Function*, 6th ed., W. H. Freeman and Company: New York, 2011, p 937.

Neste trabalho optou-se pela hidrólise catalisada por base (saponificação) dos ésteres **4-exo** e **6-exo** para obtenção dos respetivos ácidos carboxílicos, **8-exo** e **7-exo**. Para o efeito, utilizou-se o LiOH, uma vez que apresenta menor basicidade, i.e., menor habilidade para doar o anião hidroxilo, comparativamente com os restantes hidróxidos de metais alcalinos. O Li^+ é o catião mais pequeno dos metais alcalinos, possuindo os seus sais, maior carácter covalente. Assim, a energia reticular destes é, geralmente, maior em comparação com os restantes metais alcalinos.

A energia reticular, ao exceder a energia de hidratação, torna este sal menos solúvel em água. Desta forma, enquanto o NaOH ou KOH doam o anião hidroxilo rapidamente, o LiOH permite a hidrólise de ésteres mais lenta e mais seletiva. Assim, a basicidade aumenta ao longo do grupo, sendo que o CsOH é o mais básico dos hidróxidos de metais alcalinos e, portanto, o LiOH é o menos básico. Outra vantagem de usar o LiOH em detrimento de NaOH ou KOH é que, devido ao seu menor carácter básico, diminui o risco de ocorrência de epimerizações no carbono- α relativo ao grupo carbonilo.

Para a preparação dos ácidos **7-exo** e **8-exo** partiu-se dos respetivos ésteres metílicos, **6-exo** e **4-exo**, dissolvendo-os numa mistura THF / H_2O (1:1). Tendo em conta que o THF é solúvel em H_2O , possibilita o encontro das espécies orgânicas com o LiOH, aumentando a velocidade de reação. O LiOH foi dissolvido no mesmo solvente usado para os ésteres metílicos sendo adicionado gota-a-gota, sob agitação, às soluções contendo **4-exo** e **6-exo**, previamente arrefecidas a 0°C mediante banho de gelo, permitindo-se atingir a temperatura ambiente. Após o término das reações, estas foram sujeitas a extração líquido-líquido com CH_2Cl_2 de forma a remover composto de partida que, eventualmente, não tenha reagido e/ou produtos secundários. Note-se que, neste ponto, maior parte do composto pretendido encontra-se, no fim da reação, sob a forma de sal de lítio. Desta forma o composto de interesse será solúvel em água.

Após este passo, a fase aquosa foi arrefecida a 0°C , mediante banho de gelo, e procedeu-se à acidificação com adição de solução H_2SO_4 1M, gota-a-gota e com agitação magnética, até $\text{pH} \approx 4$. Após este passo, a H_2O foi eliminada com recurso a pressão reduzida tendo-se obtido um sólido branco que foi dissolvido numa mistura $\text{Et}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (1:3), extraíndo-se a quente, mediante filtração por gravidade. Em seguida, o solvente foi eliminado à secura, obtendo-se assim, os ácidos carboxílicos **7-exo** e **8-exo**.

De destacar que os passos de acidificação e de extração a quente revelaram ser cruciais na obtenção do aminoácido **8-exo**. Verificou-se que, a sobreacidificação das soluções aquosas contendo o composto **8-exo**, origina degradação do mesmo. Ainda no que respeita à extração a quente, o sobreaquecimento também teve um impacto negativo na integridade deste composto. Desta forma, foram estudadas as condições de pH e temperatura ideais para a síntese desta classe de compostos.

O composto **7-exo** foi obtido com rendimentos compreendidos entre 74–82%, ao passo que para o composto **8-exo**, alcançou-se rendimentos entre 78–95%. Na Tabela 2.5 encontram-se sumariados os resultados obtidos, assim como as condições experimentais.

Tabela 2.5

Resultados obtidos na preparação dos aminoácidos prolinomiméticos **7-exo** e **8-exo**.

Entrada	Exp.	m / g (n / mmol)	pH	T / °C	t / d	Resultado (%)
6-exo	1	0.790 (2.85)	3	60	2	7-exo (74)
6-exo	2	0.71 (2.56)	4	60	2	7-exo (81)
6-exo	3	0.64 (2.31)	4	60	2	7-exo (82)
4-exo	4	0.100 (0.411)	2	60	5	Degradação
4-exo	5	0.107 (0.440)	3	60	4	Degradação
4-exo	6	0.101 (0.415)	4	60	4	Degradação
4-exo	7	0.100 (0.411)	4	40	5	Degradação
4-exo	8	0.500 (2.06)	4	40	6	8-exo (84)
4-exo	9	2.10 (8.63)	4	40	5	8-exo (95)
4-exo	10	1.03 (4.23)	4	40	5	8-exo (91)
4-exo	11	2.00 (8.22)	4	40	5	8-exo (78)
4-exo	12	1.03 (4.23)	4	40	5	8-exo (89)

A análise estrutural dos ácidos carboxílicos **7-exo** (secção 3.2.4.) e **8-exo** (secção 3.2.5.) foi realizada mediante espectroscopia de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT e IV e, por espectrometria de massa, EI^+ -MS e IQ^+ -MS, respetivamente. Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para estes compostos.

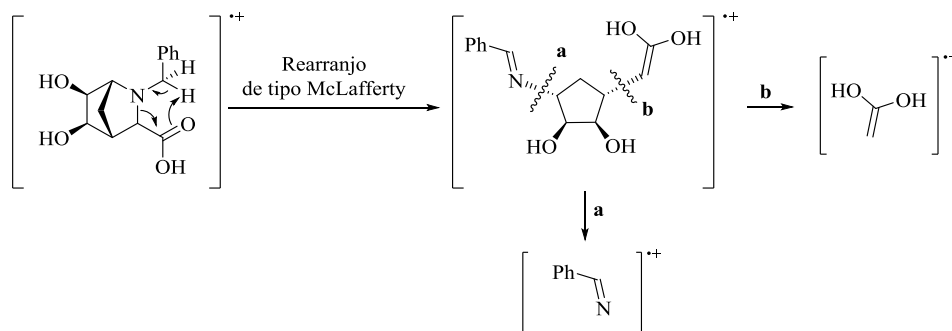
Ácido ($\pm$)-exo-2-benzil-5,6-di-hidroxi-2-azabíciclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (**7-exo**)

IV: É clara a presença de uma banda larga entre 3700 e 2300 cm^{-1} , característica do estiramento COO-H, confirmando a presença da função ácido carboxílico que, juntamente com a presença de uma banda forte, a 1616.06 cm^{-1} , respeitante ao estiramento C=O, corrobora o sucesso da reação de hidrólise. De destacar uma banda a 3370.96 cm^{-1} relativa a estiramento O-H dos grupos hidroxilo do *cis*-diol. Nesta região não é possível identificar-se de forma inequívoca as bandas relativas ao estiramento C_{sp^2} -H do anel aromático uma vez que estas podem estar mascaradas pela banda intensa e larga do estiramento do ácido carboxílico. Verificam-se bandas relativas ao estiramento C_{sp^3} -H a 2951.52 e 2842.56 cm^{-1} .

^1H -RMN: Pela análise deste espectro é possível identificar-se a presença de um multipeto na zona aromática ($\delta = 7.86 - 7.17$ ppm), cuja integração é compatível com a presença de um anel aromático corroborando a presença do grupo benzilo; verifica-se a ausência do singlete característico do grupo metilo da função éster, por contraste com os dados espectroscópicos homólogos para o composto **6-exo** (secção 3.2.3.). Outro aspeto observado é o deslocamento do protão H-3 a campos mais baixos ($\delta = 3.96$ ppm) em comparação com os dados obtidos para o mesmo protão para o composto **6-exo** ($\delta = 2.64$ ppm). Este facto pode ser explicado tendo em conta que o H-3 é um H- α , encontrando-se eletronicamente mais desprotegido devido ao efeito indutivo negativo causado pela função ácido carboxílico adjacente. A atribuição dos restantes protões está de acordo com a estrutura esperada.

^{13}C -RMN e DEPT: A co-análise dos espectros obtidos evidenciaram um pico respeitante a um carbono quaternário a $\delta = 171.68$ ppm, compatível com o ácido carboxílico e sinais na zona aromática concordantes com a presença do anel aromático do grupo benzilo; nota-se a ausência do sinal correspondente ao carbono do grupo metilo da função éster, como previsto, resultante da reação de hidrólise. Foi ainda possível distinguir inequivocamente o carbono metilénico do grupo benzilo a $\delta = 54.26$ ppm e, do carbono C-7, a $\delta = 30.10$ ppm. A atribuição dos restantes carbonos está de acordo com a estrutura esperada.

EM: Detetou-se a presença de um pico a $m/z = 264.0$ u.m.a., compatível com o ião *quasi*-molecular, MH^+ , da molécula-alvo (m/z esperado = 264.1 u.m.a.). Pode-se ainda constatar um pico $m/z = 246.0$ u.m.a., $[\text{M}-17]^+$, compatível com o fragmento obtido pela eliminação de um grupo hidroxilo (-OH); um pico a $m/z = 218.1$ u.m.a., $[\text{M}-44]^+$, compatível com o fragmento obtido pela α -clivagem, resultando na eliminação de CO_2 protonado. Propõe-se o rearranjo de tipo McLafferty, segundo o Esquema 2.17, para justificar o sinal obtido a $m/z = 202.1$ u.m.a., $[\text{M}-60]^+$, obtido pela eliminação do enol do ácido acético, que também é detetado a $m/z = 60.9$ u.m.a. e, ainda, o sinal a $m/z = 158$ u.m.a., $[\text{M}-105]^+$, concordante com a eliminação de -NBn, também é detetado a $m/z = 105.1$ u.m.a. Verifica-se ainda um pico a $m/z = 91$ u.m.a., que corresponde ao fragmento do grupo benzilo, $[\text{Bn}]^+$.



Esquema 2.17

Rearranjo de tipo McLafferty proposto para o composto **7-exo**.

Ácido ($\pm$)-*exo*-2-benzil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carboxílico (**8-*exo***)

IV: Verifica-se a presença de uma banda larga a entre 3700 e 2100 cm^{-1} , característica do estiramento COO-H, confirmando a presença da função ácido carboxílico, juntamente com a presença de uma banda forte, a 1654.62 cm^{-1} , respeitante ao estiramento C=O, corroborando o sucesso da reação de hidrólise. É ainda possível identificar-se bandas relativas ao estiramento C_{sp^2} -H do anel aromático e/ou da olefina entre C-5 e C-6, a 3060.48 e a 3032.51 cm^{-1} . Nota-se ainda bandas de estiramento C_{sp^3} -H a 2927.41 e 2880.17 cm^{-1} .

^1H -RMN: Pela análise deste espectro é possível identificar-se a presença de um multiplete na zona aromática ($\delta = 7.57 - 7.14$ ppm), cuja integração é compatível com a presença de um anel aromático corroborando a presença do grupo benzilo; verifica-se ainda ausência do singleto característico do grupo metilo da função éster, por contraste com os dados espectroscópicos homólogos para o composto **4-*exo*** (secção 3.2.2.). Outro aspeto observado é o deslocamento do protão H-3 a campos mais baixos ($\delta = 3.45$ ppm), em comparação com os dados obtidos para o mesmo protão para o composto **4-*exo*** ($\delta = 2.28$ ppm). A explicação para esta observação é análoga ao apresentado para os cicloadutos **7-*exo***. A atribuição dos restantes protões está de acordo com a estrutura esperada.

^{13}C -RMN e DEPT: A co-análise dos espectros obtidos evidenciaram um pico respeitante a um carbono quaternário a $\delta = 171.09$ ppm, compatível com o ácido carboxílico; sinais na zona aromática concordantes com a presença do anel aromático do grupo benzilo; nota-se a ausência do sinal correspondente ao carbono do grupo metilo da função éster, como previsto, resultante da reação de hidrólise. Foi ainda possível distinguir inequivocamente o carbono metilénico do grupo benzilo a $\delta = 51.17$ ppm e, do carbono C-7, a $\delta = 45.50$ ppm. A atribuição dos restantes carbonos está de acordo com a estrutura esperada.

EM: Detetou-se a presença de um pico a $m/z = 229.9$ u.m.a., compatível com o ião *quasi*-molecular, M^+ , da molécula-alvo (m/z esperado = 229.1 u.m.a.). Pode-se ainda constatar um pico $m/z = 185.0$ u.m.a., $[\text{M}-45]^+$, que é compatível com o fragmento obtido pela α -clivagem, resultando na eliminação de CO_2 protonado; um pico a $m/z = 123.0$ u.m.a., $[\text{M}-105]^+$, obtido pelo arranjo de tipo McLafferty, de forma análoga ao evidenciado em (**a**), no Esquema 2.17, concordante com a eliminação de -NBn, que também é detetado a $m/z = 106.0$ u.m.a.. Verifica-se ainda um pico a $m/z = 91$ u.m.a., que corresponde ao fragmento do grupo benzilo, $[\text{Bn}]^+$.

2.3. SÍNTESE DE PÉPTIDOS

2.3.1. Fundamentos da Síntese Peptídica

No início do século XX, Curtius²³³ e Fisher²³⁴, de forma independente, deram os primeiros passos na síntese química de pequenos péptidos, com o intuito de sintetizar péptidos e proteínas biologicamente ativos. Desde então, até ao presente, a química da síntese peptídica tem oferecido desafios constantes.

A metodologia aplicada no desenvolvimento de estruturas peptídicas sustenta-se sobre dois aspetos basilares: o conhecimento e eleição de grupos protetores seletivos para aminas e ácidos carboxílicos na formação da ligação peptídica, assim como para posterior desproteção seletiva e, ainda, a otimização das condições reacionais.

Para além disso, é necessário o conhecimento da natureza química e estereoquímica dos aminoácidos, as metodologias para a formação das ligações peptídicas e importância da quiralidade na síntese peptídica.

Para o efeito, recentes metodologias de síntese de péptidos utilizam dois tipos de abordagens – a síntese tradicional, i.e., *síntese em solução*, e a *síntese em fase sólida* – ainda que ambas se sustentem fundamentalmente nos mesmos princípios.²³⁵

2.3.2. Natureza química e estereoquímica dos aminoácidos

Os α -aminoácidos são os monómeros que estão na base da formação de cadeias peptídicas. Os primeiros são compostos contendo um átomo de carbono ligado covalentemente a um grupo ácido carboxílico, um grupo amina, um átomo de hidrogénio e a uma cadeia lateral variável, responsável por conferir identidade a um dado α -aminoácido (Figura 2.5). O α -aminoácido mais simples é a glicina, cuja cadeia lateral é um átomo de hidrogénio, portanto, o carbono- α é um centro aquiral, resvalando na ausência de formas estereoquímicas distintas. Para os restantes α -aminoácidos, o carbono- α apresenta-se como um centro quiral e, desta forma, é possível duas configurações ou arranjos espaciais distintos em redor do carbono central, existindo duas formas estereoquímicas possíveis: isomeria L/D, de configurações opostas. Os α -aminoácidos "naturais" são L-isómeros e são designados desta forma pois possuem a mesma configuração que o gliceraldeído natural. De acordo com o sistema de nomenclatura de Cahn-Ingold-Prelog,²³⁶ os L-aminoácidos são aqueles que possuem configuração (S), exceto para a cisteína e seus derivados.

²³³Curtius, T. J. *Prakt. Chemie.* **1881**, 24, 239.

²³⁴Fisher, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1907**, 40, 1754.

²³⁵Tsuda, Y.; Okada, Y. *Solution-Phase Peptide Synthesis*. In Hughes, A. B. *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry*, Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2011**, vol. 3, p. 203.

²³⁶Moss, J. P. *Pure Appl. Chem.* **1996**, 68, 2193.

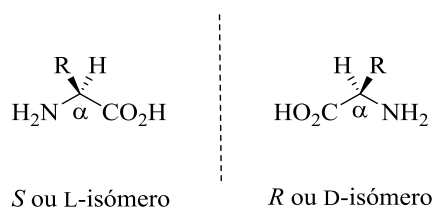


Figura 2.5

Natureza estereoquímica dos α -aminoácidos.

2.3.3. Abordagem genérica de proteção e formação da ligação peptídica

Natureza Iônica dos aminoácidos

Nos α -aminoácidos os grupos ácido carboxílico e amina podem existir na forma carregada ou não, tudo depende de dois parâmetros fundamentais: a natureza química e o pH da solução. O intervalo de pH em que um determinado grupo capta ou perde um próton, é melhor definido pelo logaritmo da constante de dissociação associada a cada grupo, designado por pK_a , que corresponde ao pH no qual metade das moléculas se encontram protonadas (e metade não protonadas). Os valores de pK_a para determinados grupos são influenciados por grupos adjacentes e por grupos na vizinhança (interações intermoleculares). A equação de Hendersen-Hasselbalch descreve a relação entre o pH e o rácio das duas formas. A pH inferior ao pK_a do ácido carboxílico, o aminoácido apresenta-se sob a forma catiónica com o(s) grupo(s) amina(s) completamente protonado(s); a pH superior ao pK_a do grupo amina, o aminoácido apresenta-se sob a forma aniónica com o(s) grupo(s) ácido(s) carboxílico(s) sob a forma de carboxilato(s); a pH entre os dois valores de pK_a , o aminoácido apresenta-se sob a forma de ião dual, ou ião *zwitter*, sendo a sua carga global nula. Este fenómeno é responsável pela ausência de migração, para um dado valor de pH, de um ião *zwitter* ao longo de um gradiente de pH quando sujeito a um campo elétrico, valor esse específico para cada α -aminoácido, referido como ponto isoelétrico, pI .

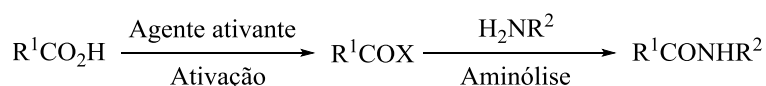
O conhecimento da natureza iónica dos aminoácidos é importante, na medida em que, durante a síntese peptídica, além do péptido pretendido, o material de partida pode afigurar-se como um contaminante durante o processo de purificação. Torna-se vantajoso este conhecimento, uma vez que o péptido protegido é solúvel em solventes orgânicos e insolúvel em água. Aminoácidos *N*-protegidos excedentes também são em regra solúveis em solventes orgânicos, contudo podem tornar-se insolúveis em solventes orgânicos e solúveis em soluções aquosas alcalinas, por desprotonação do ácido carboxílico; no que respeita aos α -aminoácidos sob a forma de ésteres, estes também são solúveis em solventes orgânicos, porém podem ser convertidos nas suas formas protonadas formando catiões alquilamónio em soluções aquosas ácidas.

Desta forma pode-se obter o péptido desejado livre de material de partida remanescente tirando proveito do conhecimento da natureza iônica dos dois reagentes de partida, sendo estes removidos por lavagens aquosas (ácidas e alcalinas). Este método facilita as eventuais purificações subsequentes e deve ser o primeiro passo no processo de purificação, quando aplicável.

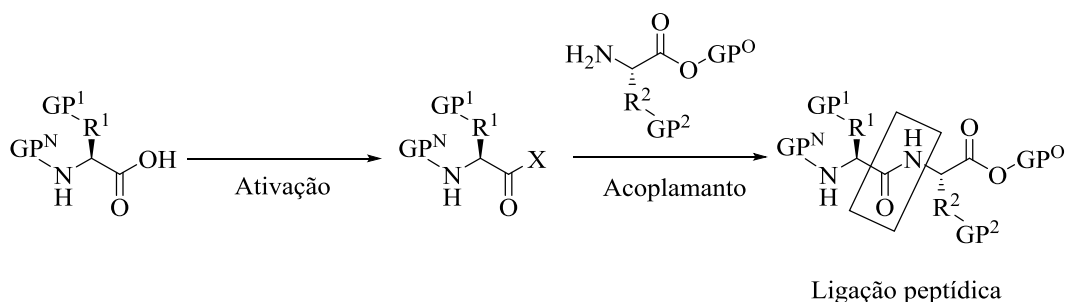
2.3.4. Metodologia genérica para a formação de ligações peptídicas

Este tipo de ligação química é tipicamente sintetizado pela reação entre um ácido carboxílico e uma amina; contudo a formação de amidas – com a necessária eliminação de uma molécula de água – não ocorre espontaneamente à temperatura ambiente pela reação direta entre estes dois grupos, salvo a elevadas temperaturas (e.g. $> 200^{\circ}\text{C}$),²³⁷ condições tipicamente incompatíveis com a integridade dos próprios reagentes e, ainda, responsável por diminuir a energia de ativação necessária para a ocorrência de reações secundárias indesejáveis.

Para formação de uma ligação amida, é necessário previamente suprimir a reatividade dos grupos funcionais nos aminoácidos (ou fragmentos peptídicos) que não se pretendam incorporar na mesma. Isto pode ser conseguido através de derivatizações desses grupos funcionais, mas também pode envolver a sua quelação com um ião metálico ou até mesmo a sua conversão na sua forma carregada. Contudo, é essencial que essa modificação seja reversível.



Por esta razão, é normalmente necessário primeiramente ativar o ácido carboxílico, um processo que usualmente passa por converter o grupo -OH da função ácido carboxílico num bom grupo de saída antes de colocar a reagir com a amina (Esquema 2.18):



Esquema 2.18

Ativação da função ácido carboxílico e consequente acoplamento peptídico com um α -aminoácido contendo o grupo amina livre e a função ácido carboxílico suprimida. GP^{N} : grupo protetor de aminas; GP^{O} : grupo protetor de ácidos carboxílicos.

²³⁷Jursic, B. S; Zdravkovdki, Z. *Synth. Commun.* **1993**, 23, 2761-2770.

Após a formação da primeira ligação amida, o passo seguinte para o alongamento da cadeia peptídica passa por expor os grupos funcionais que se encontravam protegidos na etapa anterior para a formação da seguinte ligação peptídica – passo de *desproteção*. Este é o passo fundamental na síntese peptídica, uma vez que a desproteção de um grupo deve ser incólume para os restantes grupos. Para o efeito, cada grupo protegido deve ser desprotegido através de um mecanismo específico de forma a não interferir com os restantes. As operações de desproteção seletiva e acoplamento são repetidas até que a cadeia desejada seja alcançada. Todos os restantes grupos são depois removidos (caso não façam parte do objetivo de síntese) para originar cadeia peptídica pretendida. Quando dois grupos requerem diferentes mecanismos para a sua remoção estamos perante um *sistema ortogonal*, em que num dado conjunto de grupos protetores, cada um é removível na presença do outro, em qualquer ordem.

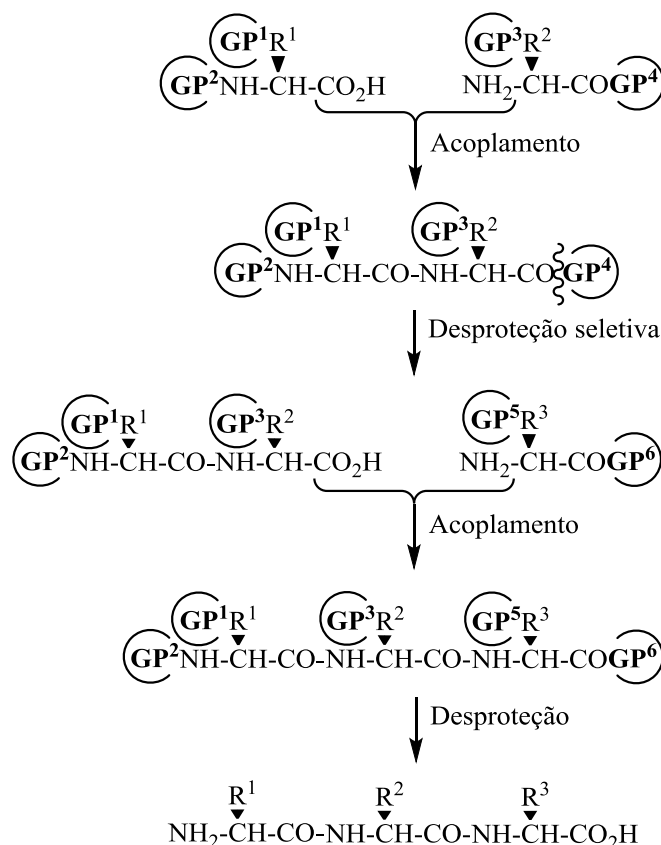


Figura 2.6

Abordagem geral de proteção e desproteção na formação de ligações peptídicas num sistema ortogonal. **R**: cadeia lateral; **GP**: Grupo protetor.

É, portanto, imperativo um planeamento prévio cuidadoso da metodologia de síntese empregue para cumprir o objetivo proposto. Para o efeito, torna-se crucial o conhecimento dos grupos protetores utilizados em síntese peptídica e os mecanismos de desproteção inerentes de forma a obterem-se sistemas ortogonais.

2.3.5. Grupos Protetores

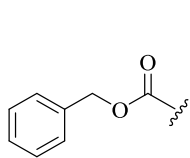
Os compostos de partida para a síntese peptídica são α -aminoácidos (ou fragmentos peptídicos) protegidos. Entre as características essenciais ou desejáveis num bom grupo protetor é a sua fácil remoção através de um mecanismo que não conduza à formação de co-produtos (ou pelo menos de forma apreciável) e sem interferência na quiralidade dos resíduos de α -aminoácidos.

A *N*-proteção e a *C*-proteção devem ocorrer através de mecanismos independentes de forma a conseguir-se desproteger um determinado grupo seletivamente sem interferir com os restantes, i.e., deve-se procurar obter um sistema ortogonal.

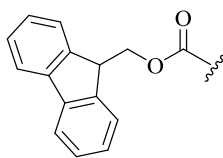
2.3.5.1. Proteção do grupo amina

O método sobejamente empregue na proteção do grupo amina passa por converter as amins dos α -aminoácidos em carbamatos, uma vez que estes oferecem grandes vantagens, nomeadamente estabilidade ótica, i.e., diminui a probabilidade de racemização dos centros quirais adjacentes aos carbamatos.

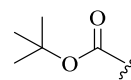
Estes podem ser preparados a partir da respetiva amina na presença de um anidrido, que depende do grupo protetor que se pretende. Assim, dentro desta classe de grupos *N*-protetores, os mais frequentes são o **benziloxicarbonilo (Z)**, o **9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc)** e o ***tert*-butoxicarbonilo (Boc)**.



Z



Fmoc



Boc

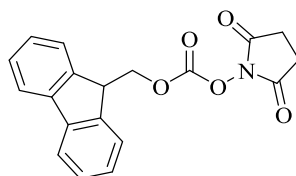
O grupo Z, introduzido por Bergman e Zervas,²³⁸ pode ser facilmente removido através de hidrogenação catalítica operando à temperatura ambiente e pressão atmosférica, ou, através de acidólise usando HBr.²³⁹ Outros métodos de desproteção deste grupo envolve o uso de sódio em amoníaco líquido ou HF.

Modificações estruturais no grupo Z, conduziram ao desenvolvimento de inúmeros grupos protetores baseados na formação de carbamatos, que se distinguem pela sua estabilidade frente a diferentes condições químicas. O uso de um grupo específico deve, portanto, ser selecionado mediante as condições reacionais que serão empregues.

²³⁸Bergmann, M.; Zervas, L. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **1932**, 65, 1192.

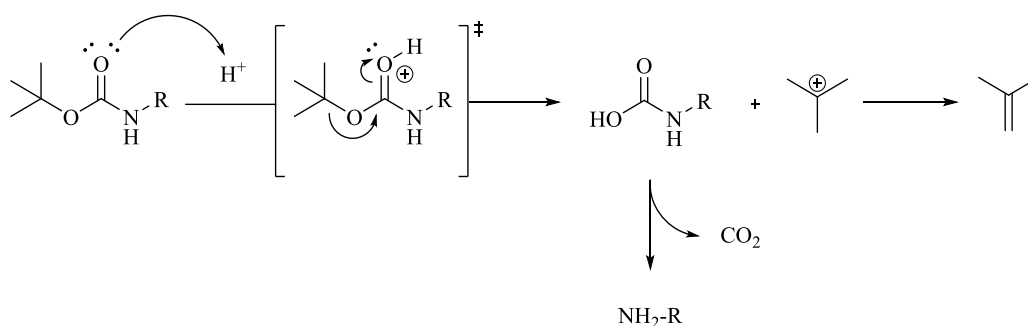
²³⁹Ben-Ishai, D.; Berger, A. *J. Org. Chem.* **1952**, 17, 1564.

Os aminoácidos *N*-protegidos com o grupo Fmoc obtêm-se, geralmente, a partir do respectivo cloreto de acilo. Esta reação é, no entanto, acompanhada por reações secundárias que culminam com a formação de pequenas quantidades de dipéptidos Fmoc. Desta forma, para evitar a formação destes co-produtos recorre-se, muitas vezes, a derivados do Fmoc, como por exemplo o **Fmoc-OSu**.²⁴⁰ Este grupo é muito estável na presença de ácidos e pode-se eliminar facilmente em determinadas condições básicas, geralmente pelo uso de piperidina em DMF à temperatura ambiente.²⁴¹



Fmoc-OSu

O grupo Boc, descrito por McKay e Albertson,²⁴² é estável frente a hidrogenação catalítica, permitindo a utilização do grupo Z temporariamente e do grupo Boc de forma permanente, ou vice-versa. Este grupo é facilmente desprotegido através do tratamento com ácidos de Brønsted fortes (TFA, HCl, HBr, HNO₃ e H₂SO₄) e também alguns ácidos de Lewis. O TFA é o agente mais comumente usado quando se trata de aminoácidos, péptidos e seus derivados, dado ser seletivo, rápido e eficiente.²⁴³ Este grupo pode ser removido com uma solução de TFA à temperatura ambiente durante 30-60 min (Esquema 2.19),²⁴⁴ ou HCl (cerca de 10 eq.) em ácido acético, AcOEt ou dioxano, com eliminação deste grupo em menos de 30 min,²⁴⁵ condições estas praticamente inertes para o grupo Z.



Esquema 2.19

Mecanismo de desproteção acidolítica do grupo Boc com TFA.

²⁴⁰Kortenaar, T.; Van Dijk, P. B. W.; Peeters, B. G.; Raaben, J. M.; Adams, P. J. H. M., Tesser, G. I. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, 27, 398.

²⁴¹Carpino, L. A. *Acc. Chem. Res.* **1987**, 20, 401.

²⁴²(a) McKay, F. C.; Albertson, N. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 4686. (b) Tarbell, D. S.; Yamamoto, Y.; Pope, B. M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1972**, 69, 730. (c) Moroder, L.; Hallett, A.; Wuensh, E.; Keller, O.; Wersin, G. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1976**, 357, 1651.

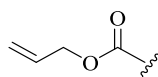
²⁴³Navathm R. S.; Pabbisetty, K. B.; Hu, L. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 389-393.

²⁴⁴Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 98.

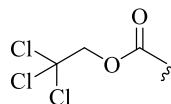
²⁴⁵Klee, W.; Breener, M. *Helv. Chim. Acta* **1950**, 44, 2151.

São de destacar outros grupos de interesse e amplamente usados na síntese peptídica como, por exemplo, o **aliloxicarbonilo (Alloc)**,²⁴⁶ que pode ser facilmente removido por uma reação de transferência da porção alílica envolvendo catálise mediada por paládio, reagindo com diferentes espécies nucleófilas sob condições neutras.

O grupo **2,2,2-tricloroetoxicarbonilo (Troc)** representa outra alternativa de interesse, sendo estável tanto em meio ácido como básico, podendo ser eliminado pelo uso de zinco (pó) em ácido acético.²⁴⁷



Alloc

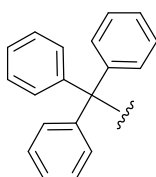


Troc

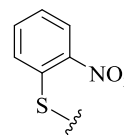
Conhecem-se ainda outros grupos protetores não derivados de uretanos como o **trifenilmetilo (Tri)** e o **2-nitrofenilsulfonilo (Nps)**. Estes grupos também conseguem impedir a racemização e, por isso, são usados em algumas estratégias na síntese peptídica.

O grupo Tri pode ser introduzido em aminoácidos mediante reação entre o clorotrifênilmetano com ésteres de aminoácidos na presença de uma amina terciária ou piridina, seguido de saponificação do grupo éster.²⁴⁸ O impedimento estérico associado a este grupo pode dificultar a formação da ligação peptídica, porém tem sido utilizado com bons resultados na síntese peptídica.²⁴⁹

Os aminoácidos contendo o grupo Nps são obtidos através da reação dos aminoácidos com o cloreto de 2-nitrofenilsulfonilo (NpsCl) em condições básicas. Este é talvez um dos grupos não derivado de uretano mais usado na síntese de cadeias peptídicas complexas.²⁵⁰ A forma de remoção deste grupo consiste no tratamento com dois equivalentes HCl anidro, ainda que por vezes seja muito difícil evitar-se reações secundárias, sobretudo na presença de L-triptofano.



Tri



Nps

²⁴⁶Kunz, H.; Unverzagt, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1984**, 23, 436.

²⁴⁷(a) Windholz, T. B.; Johnston, D. B. R. *Tetrahedron Lett.* **1967**, 8, 2555. (b) Lapatsanis, L.; Milias, G.; Froussios, K.; Kolovos, M. *Synthesis* **1983**, 8, 671.

²⁴⁸(a) Helferich, B.; Moog, L.; Junger, A. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **1925**, 58, 872. (b) Zervas, L.; Theodoropoulos, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 1359. (c) Barlos, K.; Papaioannou, D.; Patrianakou, S.; Tseggenidis, T. *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, 11, 1950.

²⁴⁹Sieber, P.; Kamber, B.; Hartmann, A.; Jöhl, A.; Riniker, B.; Rittel, W. *Helv. Chim. Acta* **1974**, 57, 2617.

²⁵⁰(a) Wünsch, E.; Spangenberg, R. *Chem. Ber.* **1972**, 105, 740. (b) Zervas, L.; Borovas, D.; Gazis, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3660.

2.3.5.2. Proteção do grupo carboxílico

Apesar do ácido carboxílico não ser muito reativo frente a aminas, a sua proteção é crucial na medida em que suprime o grupo carboxílico do aminoácido ou fragmento peptídico que irá reagir com o aminoácido ativado. Desta forma, evita-se a eventual ativação do carboxilato do aminoácido *N*-livre evitando-se reações secundárias, sobretudo se usado agente de acoplamento em excesso. Uma vantagem do uso da proteção do grupo carboxílico é aumentar a solubilidade do péptido formado em solventes orgânicos.

Os grupos mais utilizados para mascarar o grupo carboxílico em α -aminoácidos são o metóxilo (-OMe) e o etóxilo (-OEt). Os correspondentes ésteres podem ser preparados por esterificação de Fischer-Speier a partir do ácido carboxílico com o respetivo álcool ou halogeneto de alquila.

Estes ésteres são estáveis na presença de HBr/AcOH, TFA, tióis, aminas, em condições de hidrogenação catalítica e em solventes orgânicos. Destarte, podem ser usados concomitantemente com quaisquer grupos protetores de aminas.

O método mais comumente usado para a desproteção deste tipo de grupos protetores é alcançado através dos mecanismos de hidrólise de ésteres, como abordado anteriormente (**secção 2.2.4.1.**). Para além disso, estes ésteres podem ser convertidos nas correspondentes amidas por tratamento com amoníaco²⁵¹ e, em hidrazinas, por hidrazinólise.²⁵²

O uso do **éster benzílico (-OBn)** como grupo protetor popularizou-se por apresentar menos problemas associados com a desproteção comparativamente com os ésteres metílicos e etílico, ainda que de forma análoga a estes últimos, tende a formar dicetopiperazinas. Este grupo pode ser eliminado por saponificação, mas também com recurso a HBr/AcOH e hidrogenação catalítica,²⁵³ mas não pela ação do TFA. Tal como os ésteres anteriores, pode também ser convertido na correspondente amida nas mesmas condições descritas anteriormente.²⁵⁴ Pode ainda ser convertido na hidrazida correspondente por tratamento com hidrato de hidrazina.²⁵⁵

Os ésteres **terc-butílicos (-O^tBu)** são outra alternativa aos ésteres anteriores e podem ser obtidos através da reação dos aminoácidos com isobutileno na presença de quantidades catalíticas de ácido sulfúrico,²⁵⁶ ou por transesterificação a partir do α -aminoácido e acetato de *terc*-butilo, na presença de ácido perclórico.²⁵⁷

²⁵¹Bodanszky, M.; du Vigneaud, V. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 5688.

²⁵²Fujii, N.; Shimokura, M.; Nomizu, M.; Yajima, H.; Shono, F.; Tsuda, M.; Yoshitake, A. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 520.

²⁵³Okada, Y.; Shintomi, N.; Kondo, Y.; Yokoi, T.; Joshi, S.; Li, W. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*, 1860.

²⁵⁴du Vigneaud, V.; Ressler, C.; Swan, J. M.; Roberts, C. W.; Katsoyannis, P. G.; Gordon, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 4879.

²⁵⁵Strachan, R. G.; Paleveda, W. J.; Nutt, R. F.; Vitali, R. A.; Veber, D. F.; Dickinson, M. J.; Garsky, V.; Walton, E.; Jenkins, S. R.; Holly, F. W.; Hirschmann, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 503.

²⁵⁶Roeske, R. W. *Chem. and Ind.* **1969**, 1121.

²⁵⁷Taschner, E.; Chimiak, A.; Bator, B.; Solowska, T. *Liebigs Ann. Chem.* **1961**, *646*, 134.

2.3.6. Agentes acilantes e reagentes de acoplamento

Generalidades

No sentido de ativar a função ácido carboxílico é possível usar-se reagentes de acoplamento, que atuam de forma independente para gerar compostos intermediários como cloretos de ácido, anidridos (mistos), anidridos carbônicos ou ésteres ativos. A escolha do reagente de acoplamento é, contudo, crítica. Por exemplo, as amidas são geralmente preparadas usando um espectro lato de reagentes com reatividades variáveis, e.g., anilinas, aminas secundárias, espécies volumosas. Um reagente de acoplamento tem de ser apto para lidar com este extenso e particular portfólio de aspetos que determinam a reatividade das espécies envolvidas.

As metodologias de síntese usadas no sentido de condensar dois α -aminoácido através de uma ligação peptídica são referidos como *métodos de acoplamento*. O acoplamento envolve ataque nucleofílico por parte do átomo de nitrogénio do grupo amina de um α -aminoácido ao carbono eletrofílico do grupo carbonilo de outro α -aminoácido contendo o grupo carbonilo ativado pela introdução de um grupo eletroatraidor Y. A ativação pode ser realizada na presença do N-nucleófilo ou na sua ausência, quer por escolha ou por necessidade. A ativação na ausência do nucleófilo é referida como *pré-ativação*. Quando o acoplamento é efetuado pela adição de um único composto numa mistura de dois reagentes, o composto é referido como *reagente de acoplamento*. Em alguns casos, o reagente de acoplamento requer desprotonação de um dos reagentes para que haja reação. As formas mais comuns de ácidos carboxílicos ativados estão presentes na Figura 2.7, por ordem de aumento de complexidade, o que também corresponde, à exceção dos anidridos mistos, à ordem na qual os métodos se tornaram disponíveis.

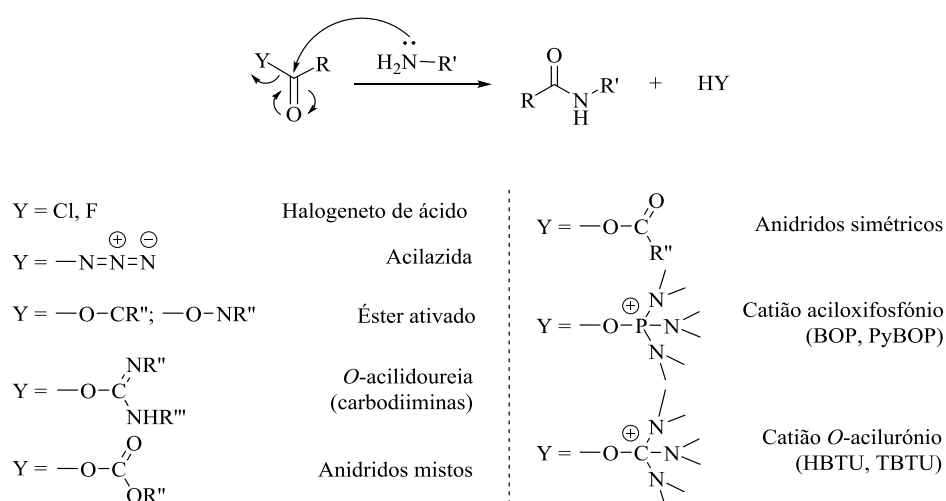


Figura 2.7

Formas mais comuns de ácidos carboxílicos ativados, por ordem de aumento de complexidade, também correspondendo, à exceção dos anidridos mistos, à ordem na qual os métodos se tornaram disponíveis.

Algumas formas ativadas são mais estáveis do que outras, sendo possível distinguir-se três tipos distintos. As formas ativadas podem ser reagentes estáveis tais como ésteres ativados; um composto de estabilidade intermédia (como um halogeneto de acilo, uma acilazida ou um anidrido simétrico ou misto) que pode, ou não, ser isolado; ou um intermediário transiente que não pode ser isolado nem detetado. O último intermediário sofre aminólise para originar o péptido ou pode reagir com um segundo nucleófilo originado pelos reagentes ou pela sua adição intencional, formando um éster ativado mais estável ou um anidrido simétrico, cuja aminólise originará o péptido pretendido.

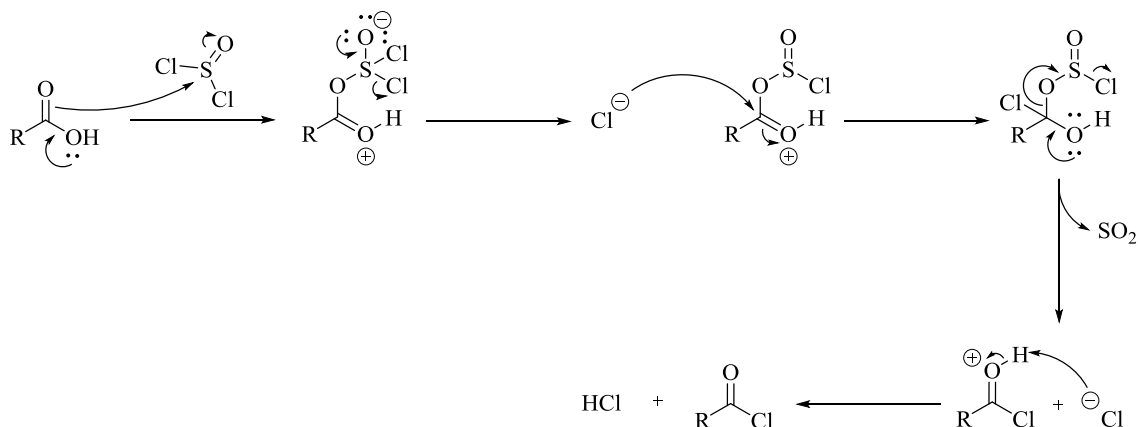
É importante referir que, durante o acoplamento, existem dois tipos de grupos acilo envolvidos: aqueles originados a partir de um *N*-alcoxycarbonilaminoácido e aqueles originados a partir dos péptidos. Todos os reagentes de acoplamento podem ser usados no acoplamento de aminoácidos *N*-protegidos, mas nem todos são recomendados para o acoplamento de péptidos. Alguns métodos como os halogenetos de acilo e anidridos simétricos não podem ser usados para acoplamento de péptidos. Mesmo no que se refere aos protocolos de acoplamento, estes podem diferir para os dois tipos de grupos acilo supracitados.

2.3.6.1. Agentes acilantes

Os **halogenetos de acilo** podem ser utilizados através de derivatização dos correspondentes ácidos carboxílicos. Os halogenetos de acilo mais comuns são os cloretos de acilo e podem ser obtidos através de reação do correspondente ácido carboxílico com cloreto de tionilo (SOCl_2).

Os halogenetos de acilo são bastante reativos em comparação aos ácidos carboxílicos, sendo facilmente atacados por nucleófilos fortes (e.g. aminas), através de um mecanismo de adição-eliminação para gerar a amida correspondente. Neste tipo de reações devem ser utilizadas aminas terciárias (e.g. Et_3N , DIEA) de forma a neutralizar o HCl que se gera através da formação dos correspondentes sais. Para além disso, as aminas terciárias podem reagir com os halogenetos de acilo formando intermediários ainda mais reativos que estes, uma vez que as aminas terciárias são excelentes grupos de saída.

Contudo, a utilização deste tipo de intermediários revela pouco interesse na síntese peptídica, uma vez que estes compostos sofrem hidrólise muito facilmente, originam usualmente racemização, podem reagir com grupos protetores e, ainda, promover reações colaterais. Os **fluoretos de acilo**, relativamente aos respetivos cloretos, são mais reativos frente a aminas e são compatíveis com grupos *N*-protetores como o Fmoc e o grupo Z.



Esquema 2.20

Mecanismo de halogenação de ácidos carboxílicos com SOCl₂ para obtenção dos correspondentes cloretos de acilo.

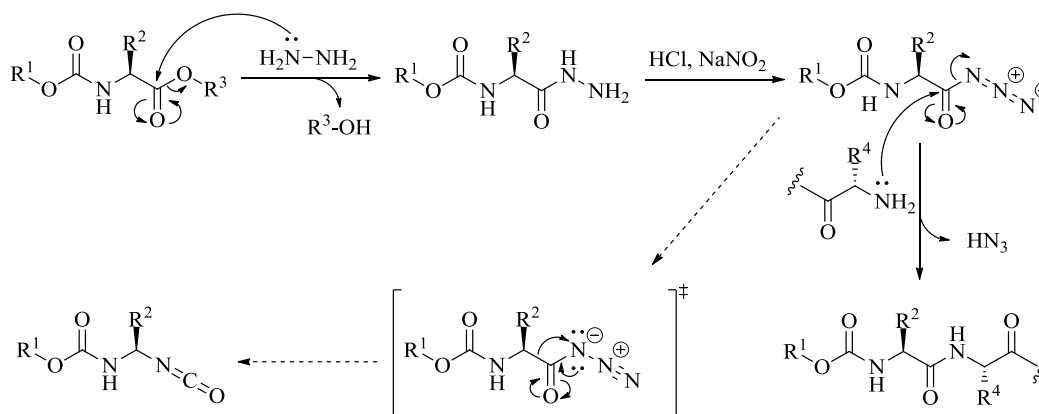
As **acilazidas** são outros derivados de ácidos carboxílicos que tiveram grande importância na síntese peptídica durante cerca de um século, contudo esta abordagem metodológica não é atrativa para uso rotineiro, uma vez que envolve quatro passos reacionais distintos, incluindo dois intermediários estáveis que requerem purificação. O primeiro passo envolve a preparação do éster (metílico, etílico ou benzílico).

O éster é posteriormente convertido na correspondente hidrazida por reação com excesso de hidrazina em álcool à temperatura ambiente ou a temperaturas mais elevadas. O excesso de hidrazina é requerido para assegurar que a diacetil-hidrazina seja produzida. A hidrazida purificada é convertida na azida pela adição de ácido nítrico que é, geralmente, conseguido pela adição de nitrito de sódio a uma solução arrefecida de hidrazida numa mistura de ácidos acético e hidrocloreto. A acilazida é gerada a temperaturas baixas uma vez que rapidamente se decompõe com libertação de azoto molecular à temperatura ambiente. A azida é extraída com um solvente orgânico e o péptido é obtido deixando a solução na presença de uma amina nucleofílica, num sistema arrefecido durante algumas horas.

Uma reação colateral que pode acontecer a temperaturas moderadamente altas é o rearranjo da acilazida no correspondente isocianato, podendo este último reagir com o nucleófilo, originando uma ureia peptídica que pode ser difícil de remover. Devido ao tempo e esforço requeridos, este método envolvendo acilazidas não é apropriado para sínteses envolvendo vários passos reacionais. A grande vantagem é que este método de ativação de *N*-acilaminoácidos ou péptidos gera intermediários que podem ser isolados e, cuja ciclização para formar a respetiva oxazolona, não foi demonstrada.^{258,259}

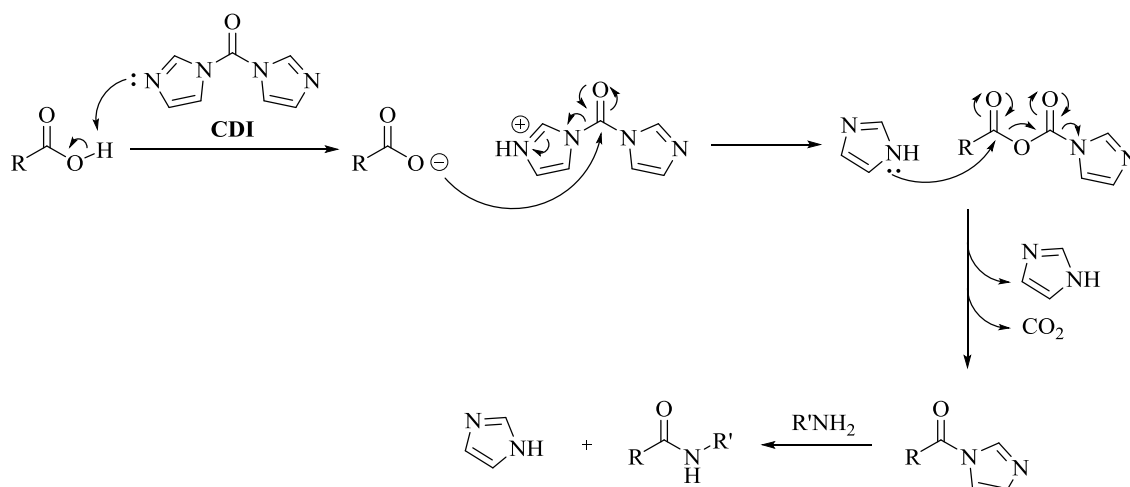
²⁵⁸Curtius, T. *Ber Deutsch Chem Ges* **1902**, 35, 3226.

²⁵⁹Meienhofer, J. The azide method in peptide synthesis, in Gross, E.; Meienhofer eds. *The peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Academic, New York, **1979**, pp 179-239.


Esquema 2.21

Mecanismo de formação de ligações peptídicas a partir de azidas de *N*-alcoxicarbonilaminoácidos.

O **carbonildiimidazole (CDI)**²⁶⁰ é amplamente usado na síntese peptídica como agente de acoplamento, através da derivatização do ácido carboxílico no **acilimidazole** ativado, num tempo relativamente curto (≈ 1 h).

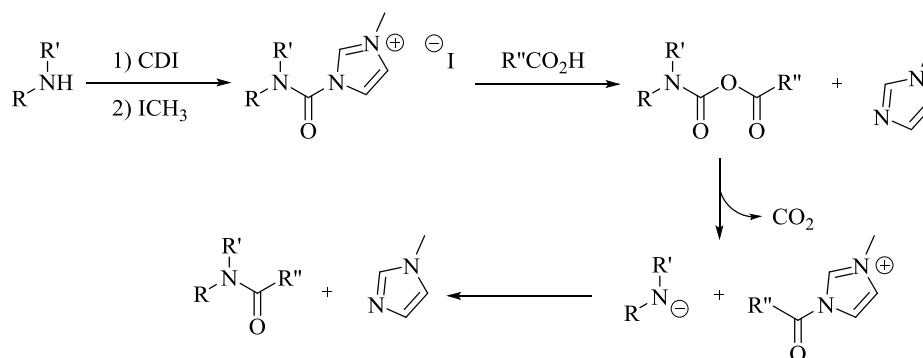

Esquema 2.22

Ativação do ácido carboxílico via formação de acilimidazole por reação com o carbonildiimidazole (CDI).

Os **sais de carbonilimidazole** obtidos por reação do CDI com aminas secundárias e iodo-metano são eficazes na formação de amidas terciárias (Esquema 2.23).²⁶¹

²⁶⁰Paul, R.; Anderson, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 4596.

²⁶¹Grzyb, J. A.; Batey, R. A. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 7485.

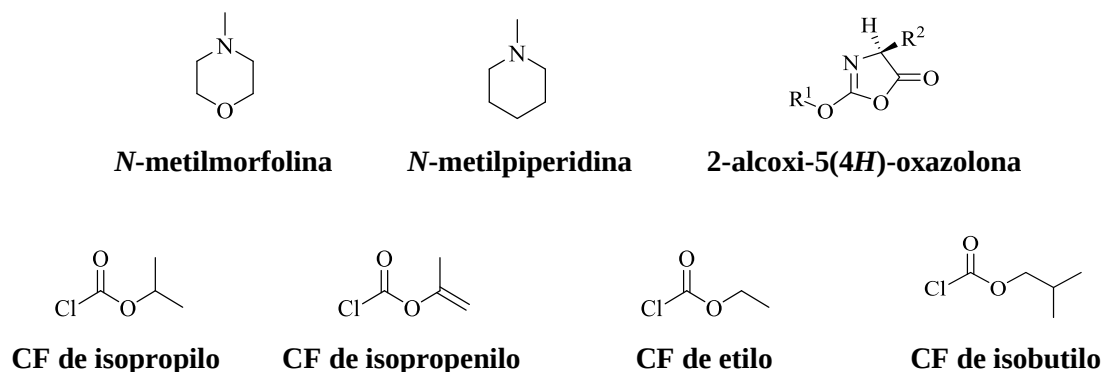


Esquema 2.23

Formação de amidas terciárias obtidas por reação de aminas secundárias com carbonilimidazole e iodometano.

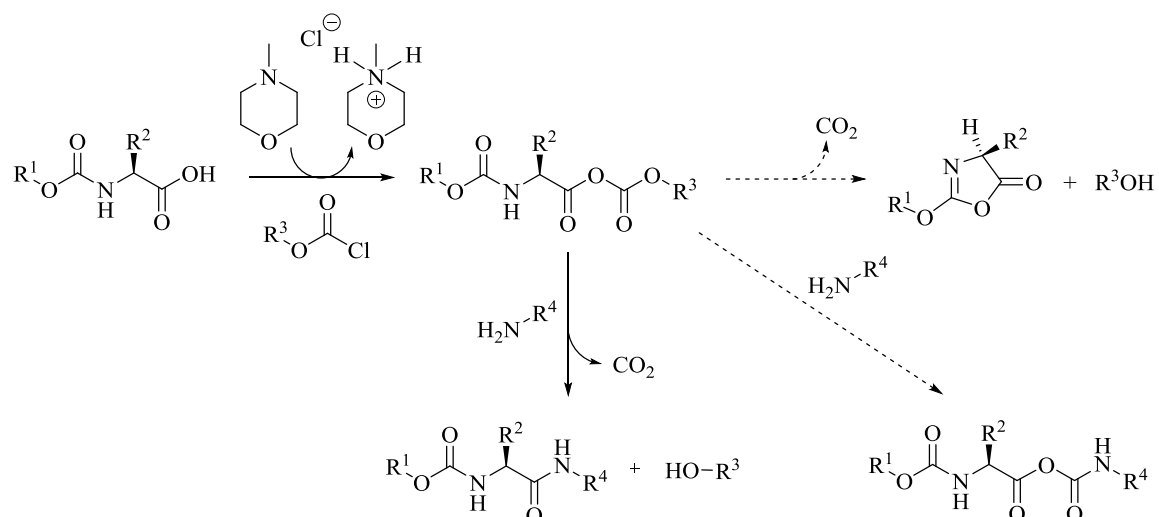
Os **anidridos** podem reagir com as aminas para gerar amidas. Os **anidridos mistos** de *N*-alcoxicarbonilaminoácidos podem ser obtidos com elevado grau de pureza através da reação do ácido carboxílico com um cloroformiato de alquilo (CF), à temperatura ambiente, na presença de ***N*-metilmorfolina** ou ***N*-metilpiperidina** durante cerca de dois minutos, seguido de lavagem com solução aquosa acídica. Os produtos são razoavelmente estáveis, sofrendo decomposição lenta pelo ataque por parte do átomo de oxigénio do grupo carbonilo do uretano ao átomo de carbono do grupo carbonilo ativado do anidrido para originar o **2-alcoxi-5(4*H*)-oxazolona**, o respetivo álcool e CO₂.

A facilidade de ciclização depende da natureza do grupo alquilo do carbonato, desta forma o anidrido derivado do **cloroformiato de isopropilo** é mais estável do que os cloroformiatos de alquilo primários. O anidrido gerado a partir do **cloroformiato de isopropenilo** é dos anidridos menos estáveis. Um corolário importante a retirar destas observações, é que os acoplamentos peptídicos utilizando o método dos anidridos mistos, usando cloroformiato de isopropilo, deverá conduzir a uma menor extensão da epimerização do que acoplamentos usando **cloroformiato de etilo**²⁶² ou **isobutilo**²⁶³. Um uso prático adicional destas observações é o desenvolvimento de um método geral de preparação de 2-alcoxi-5(4*H*)-oxazolonas a partir de anidridos mistos, usando para o efeito, cloroformiato de isopropenilo.



²⁶²Boissonas, R. A. *Helv. Chim. Acta* **1951**, 34, 874.

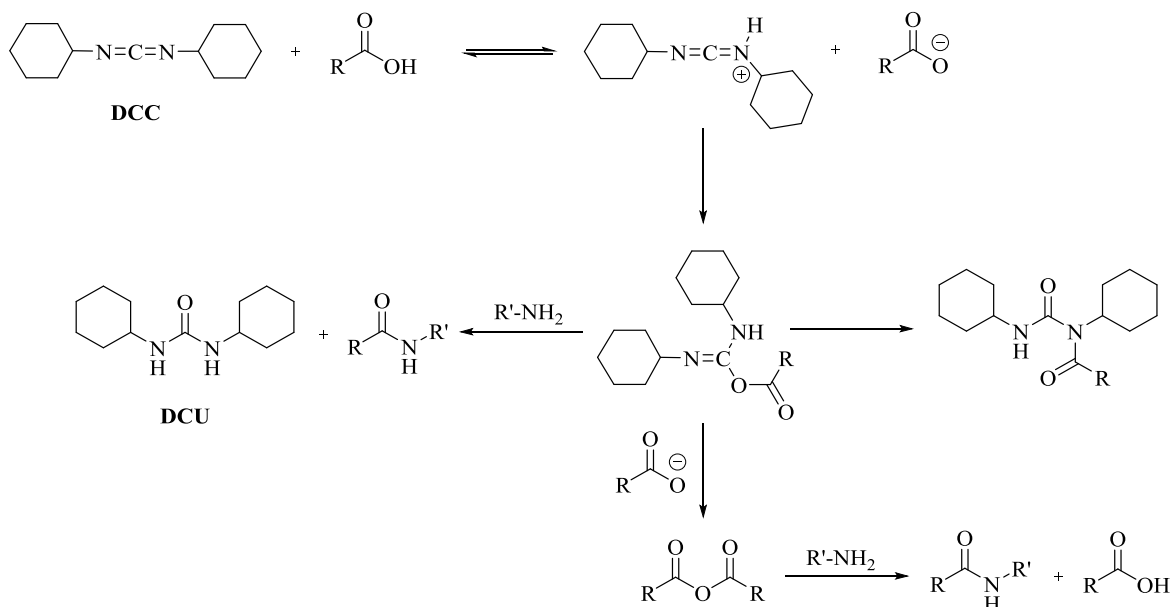
²⁶³(a) Vaughan, J. R.; Osato, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 676. (b) Chaudhary, A.; Girgis, M.; Prashad, M.; Hu, B.; Har, D.; Repic, O.; Blacklock, T. J. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 5543.


Esquema 2.24

Formação de anidridos mistos de *N*-alcoxicarbonilaminoácidos *via* cloroformatos de alquilo, denotando a tracejado, as reações secundárias comuns utilizando esta metodologia de síntese peptídica: formação da 2-alcoxi-5(4*H*)-oxazolona e o respectivo álcool acompanhada por descarboxilação e ainda formação de um carbamato.

2.3.6.2. Acoplamento usando carbodiimidas

As carbodiimidas foram os primeiros reagentes de acoplamento a serem sintetizados. A **diciclo-hexilcarbodiimida (DCC)**²⁶³ tem sido usada nas reações de acoplamento desde 1955,²⁶⁴ o mecanismo para o acoplamento entre ácidos carboxílicos e aminas está presente no Esquema 2.25.


Esquema 2.25

Acoplamento peptídico usando DCC.

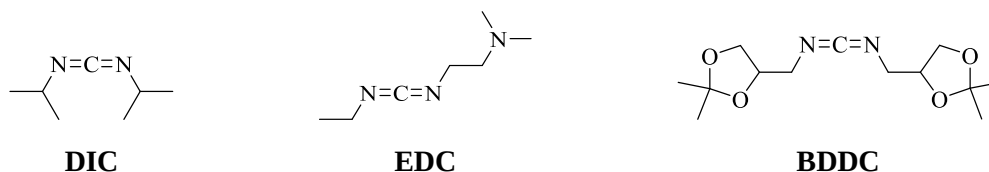
²⁶³(a) Vaughan, J. R.; Osato, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 676. (b) Chaudhary, A.; Girgis, M.; Prashad, M.; Hu, B.; Har, D.; Repic, O.; Blacklock, T. J. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 5543.

²⁶⁴Sheehan, J. C.; Hess, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1067-1068.

O primeiro passo envolve a reação do ácido carboxílico com a DCC para formar a *O*-acilureia. Este intermediário pode então originar diferentes produtos: a amida, *via* acoplamento direto com a amina, com consequente formação da diciclo-hexilureia (**DCU**) como co-produto, que é normalmente insolúvel no solvente usado na reação podendo ser removido através de filtração; formação de uma *N*-acilureia como co-produto e, ainda, de um anidrido do ácido carboxílico que, subsequentemente, dá origem à amida através da reação com a amina (necessita de dois equivalentes do ácido carboxílico). Quando se usa DCC, pode haver formação de oxazolona após geração da *O*-acilureia conduzindo à epimerização,²⁶⁵ sendo especialmente importante quando há ativação de grupos ácidos na posição da ligação peptídica.

Outras carbodiimidas

A partir da aplicação da DCC para formação de ligações peptídicas, muitas outras carbodiimidas foram descritas, incluindo a **diisopropilcarbodiimida (DIC)** e o **1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC)**. A atenção focou-se na obtenção de carbodiimidas solúveis em água uma vez que as ureias formadas aquando do uso de DCC ou de DIC são, muitas vezes, difíceis de remover. As ureias resultantes do uso da EDC e bis{[4-(2,2-dimetil-1,3-dioxolil)]metil}carbodiimida (**BDDC**)^{266a} são geralmente hidrossolúveis e, portanto, podem ser removidas através de extração com água. Sheehan^{264,266b} investigou inúmeros análogos e concluiu que o acoplamento era mais eficiente quando eram usados derivados de carbodiimidas contendo aminas terciárias em detrimento de aminas quaternárias.



A predominância das técnicas de ativação da função ácido carboxílico *via* carbodiimida tem sido gradualmente substituída pelos sais de “ónio”.

²⁶⁴Sheehan, J. C.; Hess, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1067-1068.

²⁶⁵Anderson, G. W.; Callahan, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 2902-2903.

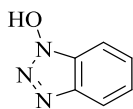
²⁶⁶(a) Gibson, F. S.; Park, M. S.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 7503-7507. (b) Cruickshank, P. A.; Boshart, G. L. *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 2525.

2.3.6.3. Ésteres ativos

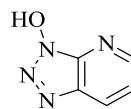
De forma a reduzir os níveis de epimerização quando se usam as carbodiimidas como agente de acoplamento, Koenig e Geiger introduziram o **1-hidroxi-1H-benzotriazole (HOBt)** como aditivo,^{267,268} mostrando que, quando usado juntamente com a carbodiimida, atingem-se rendimentos superiores com concomitante diminuição dos níveis de epimerização.

Pensa-se que o HOBt reage inicialmente com a *O*-acilureia para originar o éster ativo OBt, que potencia a reatividade do “éster ativado” através da estabilização da aproximação da amina via pontes de hidrogénio (Esquema 2.26). Contudo o HOBt pode originar co-produtos indesejáveis, como a formação de diazetidina.²⁶⁹

Em 1994, Carpino reportou um aditivo relacionado com o HOBt, o **1-hidroxi-7-azabenzotriazole (HOAt)**, sendo este mais eficiente do que o primeiro em termos de rendimento, cinética e na redução dos níveis de epimerização.²⁷⁰



HOBt



HOAt

Albericio mostrou ainda que, complexos de cobre (II) com HOAt ou HOBt, eram eficientes aditivos no que respeita à diminuição dos níveis de epimerização. Contudo, é necessário ter em consideração que o uso de benzotriazóis (e variantes) acarreta questões importantes de segurança, na medida em que estes compostos apresentam propriedades explosivas.^{271,272}

O HOBt e o HOAt baseados em sais de urónio, fosfónio e imónio estão, presentemente, a dar provas de serem muito eficientes.²⁷³

²⁶⁷Koenig, W.; Geiger, R. *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788-798.

²⁶⁸Koenig, W.; Geiger, R. *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 2024-2033.

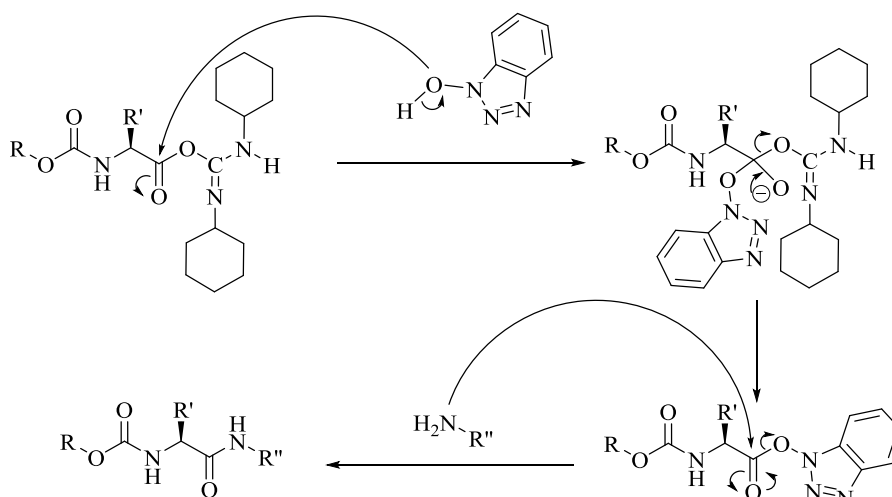
²⁶⁹Williams, A.; Ibrahim, I. T. *Chem. Rev.* **1981**, *81*, 589-636.

²⁷⁰Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.

²⁷¹Malow, M.; Wehrstedt, K. D.; Neuenfeld, S. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1233-1235.

²⁷²Wehrstedt, K. D.; Wandrey, P. A.; Heitkamp, D. *J. Hazard. Mater.* **2005**, *126*, 1-7.

²⁷³Iran, J. *Chem. Soc.* **2007**, *3*, 364-369.



Esquema 2.26

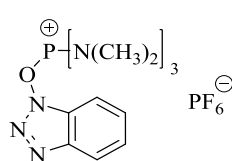
Mecanismo de ativação pelo 1-hidroxi-1*H*-benzotriazole (HOBt).

A utilização de aditivos permite a formação *in situ* de ésteres ativados, sendo estes por sua vez, mais facilmente hidrolizáveis comparativamente com os ésteres alquílicos, na medida em que se verifica aumento da eletrofilia no carbono do grupo carbonilo. Tal facto, torna estes ésteres mais propensos a reagir com um amplo conjunto de nucleófilos, não originando produtos secundários apreciáveis em condições suaves. Adicionalmente, estes ésteres provocam escassa racemização.

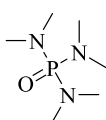
2.3.6.4. Sais de fosfónio e amidínio/urónio

Castro *et al.*²⁷⁴ desenvolveram o **hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetil-amino)fosfónio (BOP)**, usado como agente de acoplamento na síntese peptídica. Verifica-se que este é um reagente fácil de manusear, promovendo um acoplamento rápido, contudo, apresenta um inconveniente muito relevante, a formação de um composto secundário extremamente tóxico, a **hexametilfosforotriamida (HMPA)**.²⁷⁵ A partir da estrutura do BOP Castro *et al.*, desenvolveram o **hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfónio (PyBOP)**, que ao substituir a dimetilamina presente no BOP por pirrolidina evita a formação de HMPA.²⁷⁶

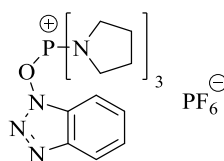
Posteriormente, foram desenvolvidos novos reagentes de acoplamento baseados em sais de fosfónio, nomeadamente o **cloreto do ácido bis(2-oxo-3-oxazolidino)fosfínico (BOP-Cl)**.



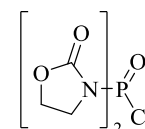
BOP



HMPA



PyBOP



BOP-Cl

²⁷⁴Castro, B.; Dormay, J. R.; Evin, G.; Selve, C. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 1219.

²⁷⁵Le-Nguyen, D; Heitz, A.; Castro, B. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1987**, 1915.

²⁷⁶Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 205.

Um tipo diferente de reagente de acoplamento, que incorpora 1-hidroxibenzotriazole na sua estrutura, foi desenvolvido pouco tempo após o BOP, contudo, elicitou pouca atenção até cerca de uma década depois do seu surgimento, quando foi usada com sucesso no acoplamento por outros investigadores. Neste reagente, os grupos dimetilamino encontram-se ligados a um átomo de carbono em vez de um átomo de fósforo, $\text{BtOC}^+(\text{NMe}_2)_2$. O contra-íão do composto original conhecido como **HBTU (hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N',N'-tetrametilurónio)**,²⁷⁷ é preparado a partir da tetrametilureia usando fosgeno e, depois, HOBT. Uma segunda forma é conhecida como **TBTU (tetrafluorborato de O-benzotriazolitetrametilurónio)**,²⁷⁸ com tetrafluorborato como contra-íão, que se tornou disponível assim que foi possível sintetizar o carbénio usando o cloreto de oxalilo em vez do fosgénio. Note-se que estes compostos não são designados como carbénios substituídos (C^+), mas como derivados substituídos de urónio (OC^+N_2), contudo estudos estruturais mais avançados revelam que estes se apresentam como *N*-óxidos de guanidínia,²⁷⁹ embora que correntemente se designem como derivados de urónio.

Estes agentes de acoplamento não reagem com os ácidos carboxílicos *per se* mas sim com os correspondentes carboxilatos. Os artigos originais não tinham em conta o papel da amina terciária, este dado surgiu mais tarde, com a *N,N*-diisopropil-*N*-etilamina (**DIEA**) emergindo como uma base superior. Uma vez originado o carboxilato por remoção do protão lábil do ácido carboxílico pela amina terciária, este ataca o reagente de acoplamento, originando o intermediário aciloxycarbénio que é aminolizado ou convertido no éster benzotriazolilo. A formação da ligação peptídica ocorre de forma tão rápida como quando se utiliza o BOP, originando-se **tetrametilureia (TMU)** que é miscível com água, por isso é mais fácil a sua remoção comparativamente com a hexametilfosforamida. Os compostos de urónio são ligeiramente menos reativos do que o BOP, contudo são mais utilizados na síntese peptídica devido à sua maior estabilidade durante o armazenamento. Existe pouca diferença entre o HBTU e o TBTU, exceto nos propósitos de classificação de transporte, sendo o último classificado como sendo inflamável.

Muitos reagentes de acoplamento são baseados no sistema HOBt/HOAt.²⁸⁰ Os isómeros urónio e amínio destes reagentes têm sido estruturalmente identificados e a verdadeira forma é provavelmente uma questão de debate, dependendo do solvente, método de isolamento, contra-íão, entre outros aspetos.²⁷⁹ Os reagentes de acoplamento baseados em sais de urónio foram primeiramente descritos como sendo *O*-isómeros.

²⁷⁷Dourtoglou, V.; Ziegler, J.-C.; Gross, B. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 15, 1269.

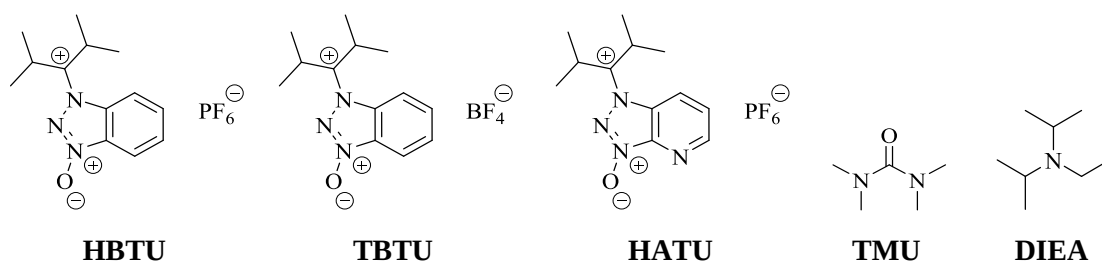
²⁷⁸Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillessen, D. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927.

²⁷⁹Carpino, L. A.; Imazumi, H.; El-Faham, A.; Ferrer, F. J.; Zhang, C. W.; Lee, Y. S.; Foxman, B. M.; Henklein, P.; Hanay, C.; Mugge, C. M.; Wenschuh, H.; Klose, J.; Beyermann, M.; Bienert, M. *Angew.Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 441-445.

²⁸⁰Albericio, F.; Bofill, J. M.; El-faham, A.; Kates, S. A. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 9678-9683.

Contudo, Carpino mostrou por cristalografia de raios-X que o **HATU** (**hexafluorofosfato de 2-(1*H*-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio**) e o HBTU são, na verdade, *N*-isômeros. Estes reagentes reagem com carboxilatos para formar esteres ativos OAt/OBt que, por sua vez, reagem com as amina (Esquema 2.26.).

Uma reação paralela ocorre quando a amina reage com o reagente de acoplamento dando origem como co-produto, um guanidíneo, deste modo, a ordem de adição e o tempo entre adições é crucial neste tipo de reações. Estudos comparativos, usando HBTU e TBTU, mostraram que o contra-íão não possui praticamente nenhuma influência na velocidade de acoplamento ou em processos de racemização usando estes dois reagentes. Atualmente, o HATU pode ser considerado como sendo o agente de acoplamento de maior utilidade no acoplamento de péptidos, sobretudo no caso de formação de ligações peptídicas mais laboriosas, tanto em fase sólida como em fase líquida. Este é especialmente eficaz no processo de macrociclicização, condensação de fragmentos peptídicos e acoplamento de aminoácidos *N*-substituídos.²⁸¹

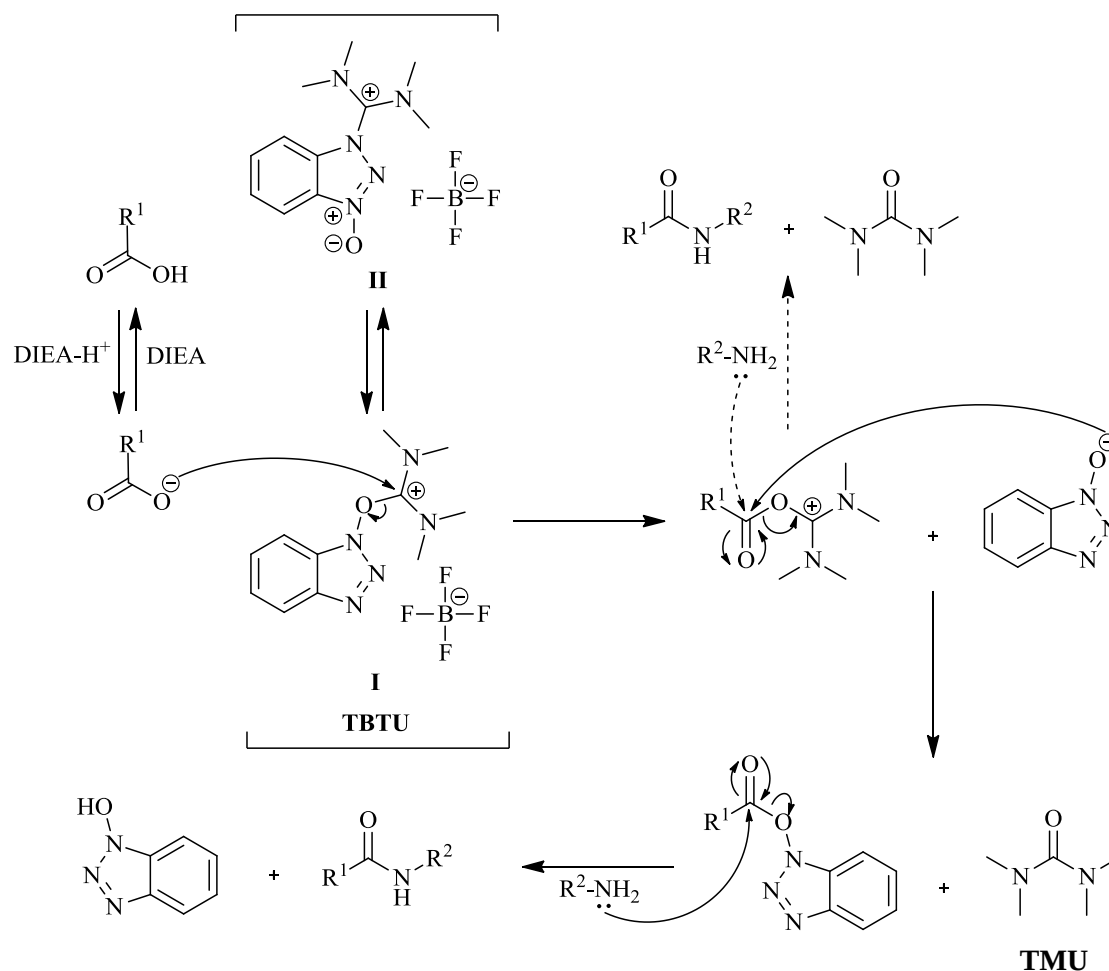


Mecanicamente, os sais de fósforo e de urônio possuem o mesmo *modus operandi*, a amina terciária abstrai o próton lábil do ácido carboxílico, formando o correspondente carboxilato, que ataca a espécie de urônio/guanidina formando o intermediário acilurônio, altamente reativo, que se converte no éster ativo, sofrendo aminólise.²⁸²

Com efeito, no acoplamento usando TBTU como agente de acoplamento, inicialmente o ácido carboxílico é dissolvido em CH₂Cl₂ anidro e, em seguida, adiciona-se um excesso de DIEA no sentido de abstrair o próton lábil do grupo ácido carboxílico, ativando este grupo para posterior ataque nucleofílico ao TBTU. Desta reação resulta um intermediário possuindo o grupo carbonilo ativado (muito eletrofílico). A amina é adicionada em último lugar, desta forma promove-se ataque nucleofílico por parte do átomo de nitrogênio do grupo amina ao intermediário formado *in situ* e não ataque ao TBTU. Desta forma, a amina pode atacar tanto o primeiro intermediário que se forma pela reação do carboxilato como o TBTU, como o segundo, com consequente formação da ligação amida, originando como produtos secundários TMU e HOBT (Esquema 2.27).

²⁸¹Kamencka, T. M.; Danishefsky, S. J. *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 41.

²⁸²Dourtoglou, V.; Gross, B.; Lambropoulou, V.; Zioudrou, C. *Synthesis* **1984**, 572.



Esquema 2.27

Mecanismo geral da reação de condensação peptídica usando TBTU e DIEA como base terciária.

2.3.7. Importância da Quiralidade

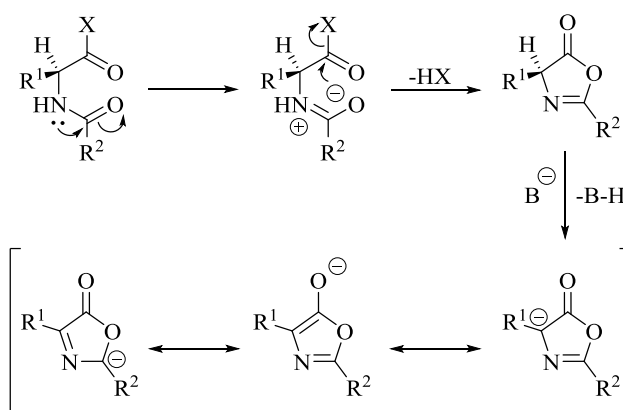
Tendo em conta que, dezanove dos vinte α -aminoácidos naturais que compõem as cadeias peptídicas são opticamente ativos, reveste-se de especial atenção os processos de racemização a que as cadeias peptídicas estão sujeitas. É de extrema importância na preparação de péptidos e proteínas, a conservação da configuração L dos resíduos de α -aminoácido, de forma a conservarem as suas propriedades biológicas. Este processo de racemização pode ocorrer tanto durante a proteção e desproteção dos grupos funcionais dos α -aminoácidos, como nas etapas de ativação dos mesmos.

2.3.7.1. Mecanismos de racemização

Formação de oxazol-5(4*H*)-onas.²⁸³ Com exceção da L-prolina, os acilaminoácidos ativados e os péptidos acilados podem gerar um composto heterocíclico sob a influência de uma base (Esquema 2.28).

As oxazol-5(4*H*)-onas formadas conduzem a intermediários instáveis *via* tautomeria, sendo a velocidade de racemização maior que a formação da ligação peptídica.

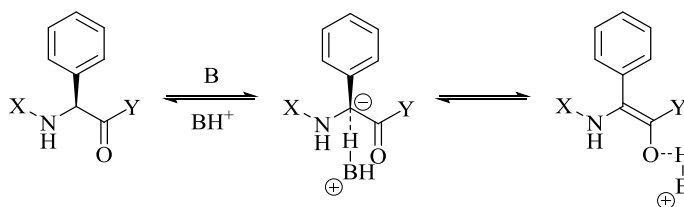
A probabilidade de formação de oxazol-5(4*H*)-onas é reduzida quando o grupo amina do α -aminoácido se encontra protegido por um derivado de uretano como o grupo Boc, sendo por essa razão o uso de derivados de uretano tão populares na síntese peptídica.



Esquema 2.28

Mecanismo de formação de oxazol-5(4*H*)-onas. **B**: base.

Remoção direta de um próton.²⁸⁴ Este mecanismo ocorre em casos muito particulares como na rápida racemização de derivados da L-fenilglicina (Esquema 2.29), procedendo-se pela remoção direta do próton- α por bases fortes. Pode-se evitar a ocorrência deste processo mediante a aplicação de condições de reação adequadas e, especialmente, com o uso de aminas terciárias como bases.²⁸⁵



Esquema 2.29

Mecanismo de remoção direta de um próton. **X**: grupo protetor; **Y**: grupo ativante; **B**: base.

²⁸³ Goodman, M.; Levine, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 2918.

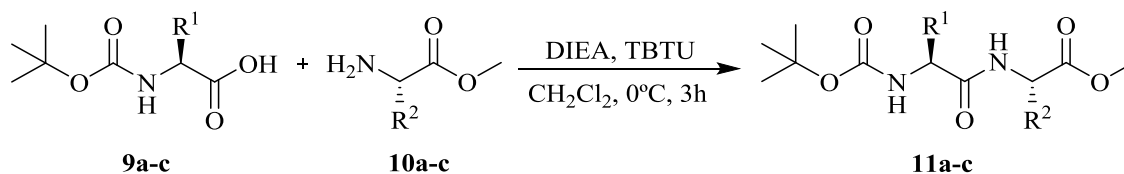
²⁸⁴ Bodanszky, M.; Klausner, Y. S.; Ondetti, M. A. *Peptide Synthesis* John Wiley & Sons, Ltd, New York, **1976**.

²⁸⁵ (a) Kemp, D. S.; Wang, S. W.; Busby, G.; Hugel, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 1043. (b) Bodanzky, M.; Bodanzky, A.; Casaretto, M.; Zahn, H. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1985**, 26, 550.

Resultados Próprios

2.3.8. Síntese dos dipéptidos **11a-c**

A reação de acoplamento entre os aminoácidos **9a-c** e **10a-c**, para obtenção dos correspondentes dipéptidos, **11a-c**, pode ser descrita pela seguinte equação genérica:



A obtenção dos dipéptidos **11a-c** corresponde, de acordo com o plano de trabalhos apresentados na **secção 1.7.3.**, ao primeiro passo sintético do Esquema 1.8. Estes compostos foram preparados através de reação de condensação peptídica entre os respetivos α -aminoácidos para cada série (**9a-c** e **10a-c**), usando o TBTU como agente de acoplamento. A ordem de adição é crucial para o sucesso da reação. Assim, os α -aminoácidos *N*-protegidos com o grupo Boc (**9a-c**) foram dissolvidos em CH_2Cl_2 anidro, num sistema previamente purgado com Ar e arrefecido a 0°C , mediante banho de gelo. Em seguida, adicionou-se DIEA no sentido de abstrair o protão lábil do ácido carboxílico, de forma a gerar o correspondente carboxilato para que reaja com o agente de acoplamento, deixando-se em agitação durante 15 min. Posteriormente, adicionou-se o TBTU, e deixou-se em agitação durante 30 min. Ao fim deste tempo adicionou-se o α -aminoácido correspondente para cada série (**10a-c**) sob a forma de amina livre e com a função ácido carboxílico suprimida sob a forma de éster metílico evitando, deste modo, reações colaterais. A reação permaneceu em agitação durante 48h, tendo-se permitido o sistema alcançar a temperatura ambiente.

Findas as reações, eliminou-se o solvente com recurso a pressão reduzida e fez-se várias lavagens com CH_2Cl_2 de forma a co-evaporar o máximo da DIEA possível. Dissolveu-se o resíduo obtido em AcOEt e procedeu-se à extração líquido-líquido com solução saturada de NaHCO_3 e de NaCl, de forma a remover excesso de DIEA e produtos secundários hidrossolúveis como a tetrametilureia (TMU).

Os dipéptidos preparados, **11a-c**, foram purificados recorrendo-se a diferentes técnicas de purificação, nomeadamente cromatografia de adsorção em coluna de gel de SiO_2 e recristalização, de forma independente e/ou complementar, com o intuito de estudar a melhor abordagem de purificação. Os resultados obtidos encontram-se sumariados na Tabela 2.6.

Tabela 2.6

Resultados obtidos na preparação dos dipéptidos protegidos **11a-c**.

Entrada	(9)-R ¹	(10)-R ²	(9) m / g (n / mmol)	Purificação	Resultado (%)
1	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-H	0.100 (0.401)	Rec.	11a (54)
2	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-H	1.98 (7.94)	CC e Rec.	11a (87)
3	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-H	2.00 (8.02)	CC e Rec.	11a (86)
4	-H	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	0.117 (0.668)	CC	11b (91)
5	-H	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	0.970 (5.54)	CC	11b (98)
6	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₃	0.153 (0.704)	Rec.	11c (83)
7	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₃	1.00 (4.60)	CC e Rec.	11c (88)

Rec.: Recristalização.

CC: Cromatografia de adsorção em coluna de gel de SiO₂.

Os resultados obtidos para estes compostos foram muito satisfatórios na medida em que se obtiveram excelentes rendimentos, cujos dependeram da técnica de purificação utilizada.

Perante estes resultados, verifica-se que, na preparação do dipéptido **11a**, a co-cristalização do composto pretendido no meio reacional, seguida de filtração dos cristais obtidos num funil de Büchner, com lavagens de éter etílico arrefecido a 0°C, e posterior recristalização no mesmo solvente, é uma abordagem prática, mas conduz a rendimentos moderados (Entrada 1). Tal deve-se ao facto do dipéptido **11a** apresentar solubilidade apreciável em éter etílico, mesmo a frio. Para colmatar esta situação, optou-se por realizar uma primeira purificação através de cromatografia de adsorção em coluna usando como eluente CH₂Cl₂/CH₃OH (10:1), seguida de recristalização do sólido amorfo obtido anteriormente. Através da combinação destas técnicas, obtiveram-se resultados muito satisfatórios, com rendimentos entre 86–87% (Entradas 2 e 3).

O dipéptido **11b** foi purificado recorrendo-se apenas à técnica de cromatografia de adsorção em coluna, uma vez que este apresenta-se sob a forma de um óleo, tendo sido infrutuosas as tentativas de cristalização do mesmo. Desta forma, este dipéptido foi purificado usando o eluente CH₂Cl₂/CH₃OH (20:1), obtendo-se rendimentos excelentes entre 91–98% (Entradas 4 e 5, respetivamente).

Para o dipéptido **11c**, verifica-se que a co-cristalização do composto pretendido no meio reacional, seguida de filtração dos cristais obtidos num funil de Büchner, com lavagens de hexano a 0°C, e posterior recristalização no mesmo solvente, é uma abordagem prática e eficaz, conduzindo a um excelente rendimento de 83% (Entrada 6).

De forma a investigar se o rendimento poderia ser melhorado através de uma pré-purificação recorrendo à cromatografia de adsorção em coluna de gel de SiO₂, verificou-se que o rendimento final alcançado foi de 88%, ligeiramente superior ao obtido utilizando apenas a técnica de recristalização (Entrada 7).

A análise estrutural dos dipéptidos **11a** (secção 3.3.1.), **11b** (secção 3.4.1.) e **11c** (secção 3.5.1.) foi realizada mediante espectroscopia de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT e IV e, por espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para os compostos.

IV: Os espectros obtidos para os dipéptidos **11a-c**, revelam a presença de bandas de estiramento CON-H, concordantes com a ligação amida e do carbamato. Verificam-se, ainda, três bandas de estiramento C=O, uma relativa carbamato, outra da amida e uma terceira respeitante ao éster metílico, corroborando assim, o sucesso da reação de acoplamento. É possível detetar-se ainda bandas relativas ao estiramento C_{sp}³-H. Em seguida, apresentam-se os dados relativos às bandas mais características sumariados na Tabela 2.7.

Tabela 2.7

Bandas de IV mais características para os dipéptidos protegidos **11a-c**.

Entrada	IV / cm ⁻¹		
	CON-H (<i>str</i>)	C _{sp} ³ -H (<i>str</i>)	C=O (<i>str</i>)
11a	3275.50	2977.55, 2956.34, 2869.56	1757.80, 1736.58, 1677.77, 1655.59
11b	3308.29	2957.30, 2871.49	1742.37, 1713.44, 1671.02
11c	3307.32, 3246.57	2975.62, 2933.20, 2874.38	1750.08, 1679.69, 1646.91

De referir que, no caso do dipéptido **11a**, verifica-se a presença de rotâmeros, relativamente ao estiramento C=O, surgindo quatro bandas distintas (Tabela 2.7, Entrada **11a**).

¹H-RMN: Pela análise dos espectros obtidos para os dipéptidos **11a-c**, é possível identificar-se alguns padrões, nomeadamente a presença da ligação peptídica (CONH) e do carbamato a campos baixos. Verifica-se a presença dos H-α dos resíduos de α-aminoácido que compõem os dipéptidos **11a-c**, a campos compatíveis de prótons adjacentes a amidas. Constata-se ainda, a presença do singlete característico do grupo éster metílico e ainda um singlete a campo alto, cuja integração é concordante com o grupo Boc.

Na Tabela 2.8, encontram-se sumariados os resultados obtidos para os prótons mais característicos e correspondentes desvios químicos. A atribuição dos restantes prótons está de acordo com as estruturas esperadas.

Tabela 2.8

Desvios químicos de ^1H -RMN mais característicos para os dipéptidos protegidos **11a-c**.

Sinais	^1H -RMN (δ / ppm)		
	11a	11b	11c
CONH	6.83, 5.03	7.02, 5.64	6.63, 5.17
OCH₃	3.72	3.63	3.74
H_L-2	4.17	4.53	-
H_G-2	3.99	3.75	-
H_V-2	-	-	3.97 – 3.93
H_A-2	-	-	4.58
Boc	1.42	1.36	1.45

No caso do dipéptido **11c**, é ainda possível identificar-se inequivocamente, o grupo $-\text{CH}_3$ do resíduo de L-alanina ($\text{H}_\text{A}-3$), que surge como um duplete a $\delta = 1.41$ ppm, com $J = 7.3$ Hz, confirmando o acoplamento com $\text{H}_\text{A}-2$, que por sua vez surge como um penteto a $\delta = 4.58$ ppm, com $J = 7.3$ Hz; ainda é possível identificar-se os dois grupos $-\text{CH}_3$ do resíduo de L-valina ($\text{H}_\text{V}-4$), que surgem como dois dupletos a $\delta = 0.97$ e 0.93 ppm, com $J = 6.8$ Hz.

^{13}C -RMN e DEPT: Através da co-análise dos espectros obtidos para os dipéptidos **11a-c**, é possível identificar-se alguns padrões, nomeadamente, a presença de dois picos respeitantes a carbonos quaternários compatíveis com a amida, CONH , e com o éster metílico, CO_2CH_3 ; dois carbonos quaternários a campos mais altos relativos ao carbamato do grupo Boc e do ^tBu do mesmo grupo. Foi possível distinguir por DEPT os sinais respeitantes aos grupos metileno dos resíduo de L-leucina ($\text{C}_\text{L}-3$) e glicina ($\text{C}_\text{G}-2$). Verifica-se, ainda, a presença dos $\text{C}-\alpha$ de cada resíduo de α -aminoácido e ainda o grupo metilo da função éster metílico a campos baixos. Identificou-se, a campos altos, o sinal relativo aos carbonos dos grupos metilo, $-(\text{CH}_3)_3$, do grupo Boc.

Na Tabela 2.9, encontram-se sumariados os resultados obtidos para os carbonos mais característicos e correspondentes desvios químicos. A atribuição dos restantes carbonos está de acordo com as estruturas esperadas.

Tabela 2.9

 Desvios químicos de ^{13}C -RMN mais característicos para os dipéptidos protegidos **11a-c**.

Sinais	^{13}C -RMN e DEPT (δ / ppm)		
	11a	11b	11c
<u>CONH</u> / <u>CO₂CH₃</u>	<u>173.02, 170.16</u>	<u>173.29, 169.66</u>	<u>174.07, 172.16</u>
Boc	<u>155.75, 79.79, 28.29</u>	<u>156.12, 79.79, 28.17</u>	<u>156.77, 80.72, 29.19</u>
OCH₃	52.28	50.56	60.63
C_L-2	52.93	52.13	-
C_L-3	<u>41.11</u>	<u>41.07</u>	-
C_G-2	<u>41.25</u>	<u>43.99</u>	-
C_V-2	-	-	53.29
C_A-2	-	-	48.85

COSY/HSQC: Efetuaram-se análises bidimensionais para os dipéptidos **11b** e **11c**, cujos dados permitiram atribuir inequivocamente a correspondência entre os sinais dos prótons e os respectivos carbonos. A análise do espectro de HSQC do dipéptido **11b** permitiu a atribuição dos carbonos ligados ao H- α do resíduo de L-leucina (C_L-2) e de glicina (C_G-2) a δ = 53.13 e 43.99 ppm, respectivamente. Pela análise do espectro de HSQC do dipéptido **11c** é possível a atribuição dos carbonos ligados ao H- α do resíduo de L-valina (C_V-2) e de L-alanina (C_A-2) a δ = 53.29 e 48.85 ppm, respectivamente. Esta análise revestiu-se de extrema importância para elucidar a atribuição dos carbonos relativos aos grupos metilo do resíduo L-valina (C_V-4) e de L-alanina (C_A-3). Seria de se esperar que este último surgisse a campos mais baixos do que os carbonos C_V-4, contudo, verifica-se que aparece a δ = 19.06 ppm, entre os sinais destes últimos (δ = 20.04 e 18.65 ppm). Sem esta análise seria impossível a atribuição inequívoca para estes sinais.

EM: Através da análise dos espectros obtidos para os dipéptidos **11a-c** é possível identificar-se alguns padrões, nomeadamente a detecção de um pico compatível com o íon molecular formando um aduto com Na⁺, [M+Na]⁺, da molécula-alvo (m/z esperado = 325.1734 u.m.a.). Verificam-se ainda os picos relativos à perda do grupo ^tBu, [M-^tBu]⁺, e ainda da descarboxilação, culminando na formação do íon respetivo, [M-Boc]⁺. Verifica-se também um pico relativo à α -clivagem do éster metílico, [M-OMe]⁺, m/z esperado = 271.1658 u.m.a.; nos dipéptidos **11a** e **11b** constata-se também os fragmentos respeitantes ao resíduo de L-leucina e, ainda, de L-valina para o dipéptido **11c**, cujos valores de m/z esperados são: 86.0970 u.m.a. para [Leu]⁺, e, 72.0 u.m.a. para [Val]⁺. Na Tabela 2.10, encontram-se sumariados os resultados obtidos para a fragmentação mais característica e os correspondentes valores de m/z .

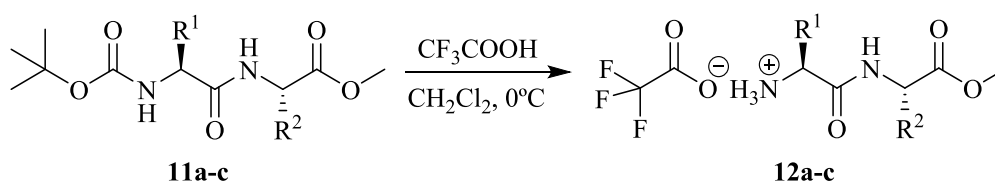
Tabela 2.10

Picos mais característicos de ESI-MS para os dipéptidos protegidos **11a-c**.

Entrada	ESI-MS (<i>m/z</i> / u.m.a.)					
	[M+Na] ⁺	[M- ^t Bu] ⁺	[M-Boc] ⁺	[M-OMe] ⁺	[Leu] ⁺	[Val] ⁺
11a	325.1724	247.1276	203.1375	269.1116	86.0948	-
11b	325.1734	247.1306	203.1401	269.1101	86.0955	-
11c	325.2	247.1	203.1	269.1	-	72.1

2.3.9. Desproteção dos dipéptidos **11a-c**: síntese dos dipéptidos **12a-c**

A reação de desproteção dos dipéptidos **11a-c** para obtenção dos correspondentes dipéptidos **12a-c**, pode ser descrita pela seguinte equação genérica:



A obtenção dos dipéptidos **12a-c** corresponde, de acordo com o plano de trabalhos apresentados na **secção 1.7.3.**, ao segundo passo sintético do Esquema 1.8. Os dipéptidos **11a-c** foram desprotegidos por remoção acidolítica do grupo *N*-protetor Boc. Para o efeito, os dipéptidos **11a-c** foram dissolvidos em CH₂Cl₂ anidro num sistema previamente purgado com Ar e arrefecido a 0°C, mediante banho de gelo. A solução foi mantida em agitação magnética e procedeu-se, em seguida, à adição de TFA, gota-a-gota. Finda a acidólise, os dipéptidos desprotegidos foram obtidos sob a forma de sal de trifluoroacetato de amónio, **12a-c**, através de lavagens com CH₂Cl₂ para remoção do TFA excedente.

Esta reação apresenta como principais vantagens a facilidade de operação, rapidez e o facto de não ser necessário recorrer-se a técnicas de purificação cromatográficas. Ainda assim, procedeu-se à tentativa de cristalização destes dipéptidos, tendo-se conseguido cristalizar os dipéptidos **12b** e **12c** através de uma mistura Et₂O/AcOEt (10:1). Os resultados obtidos encontram-se sumariados na Tabela 2.11. As desproteções efetuadas foram praticamente quantitativas, obtendo-se para **12a** um rendimento compreendido entre 98–99% (Entradas 1-3), para **12b** um rendimento de 97–98% (Entradas 4 e 5) e, para **12c**, um rendimento entre 98–99% (Entradas 6-8).

Tabela 2.11

Resultados obtidos na preparação dos dipéptidos desprotegidos **12a-c**.

Entrada	R ¹	R ²	(11) <i>m</i> / <i>g</i> (<i>n</i> / mmol)	Resultado (%)
1	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-H	0.500 (1.65)	12a (99)
2	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-H	1.01 (3.34)	12a (98)
3	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-H	0.96 (3.17)	12a (98)
4	-H	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	0.152 (0.503)	12b (97)
5	-H	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	1.72 (5.69)	12b (98)
6	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₃	0.200 (0.661)	12c (98)
7	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₃	0.98 (3.24)	12c (99)
8	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₃	1.08 (3.57)	12c (99)

A análise estrutural dos dipéptidos **12a** (secção 3.3.2.), **12b** (secção 3.4.2.) e **12c** (secção 3.5.2.) foi realizada mediante espectroscopia de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT e IV e, por espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para os compostos.

IV: Os espectros obtidos para os dipéptidos **12a-c**, revelam a presença de bandas de estiramento CON-H e N-H, concordantes com a ligação amida e amina livre. Verificam-se, ainda, duas bandas de estiramento C=O, uma banda relativa à amida e outra respeitante ao éster metílico. Note-se a ausência de uma terceira banda de estiramento C=O relativa ao carbamato por comparação com os dados homólogos para os dipéptidos **11a-c**, corroborando assim, o sucesso da reação de *N*-desproteção. Constatam-se a presença de bandas de estiramento C_{sp³}-H. Em seguida, apresentam-se os dados relativos às bandas mais características, sumariados na Tabela 2.12.

Tabela 2.12

Bandas de IV mais características para os dipéptidos desprotegidos **12a-c**.

Entrada	IV / cm ⁻¹		
	CON-H/ N-H (<i>str</i>)	C _{sp³} -H (<i>str</i>)	C=O (<i>str</i>)
12a	3082.65	2962.13, 2877.27	1742.37, 1664.27
12b	3146.29	2963.09, 2729.74, 2626.57	1743.33, 1671.98
12c	3353.60	2969.84	1720.19, 1673.92

¹H-RMN: Pela análise dos espectros obtidos para os dipéptidos **12a-c**, é possível identificar-se alguns padrões, nomeadamente a presença dos H- α dos resíduos de aminoácido que compõem os dipéptidos **12a-c**, a campos compatíveis de prótons adjacentes a amidas e, ainda, a presença do singlete característico do grupo éster metílico. Na Tabela 2.13, encontram-se sumariados os resultados obtidos para os prótons mais característicos e correspondentes desvios químicos. A atribuição dos restantes prótons está de acordo com as estruturas esperadas.

Tabela 2.13

Desvios químicos de ¹H-RMN mais característicos para os dipéptidos desprotegidos **12a-c**.

Sinais	¹ H-RMN (δ / ppm)		
	12a	12b	12c
OCH₃	3.64	3.70	3.74
H_L-2	3.83	4.60 – 4.40	-
H_G-2	4.02 – 3.93, 3.91 – 3.78	3.72	-
H_V-2	-	-	3.97 – 3.93
H_A-2	-	-	4.58

Não foi possível traçar os espectros para os dipéptidos **12a-c** em solventes deuterados apolares, e.g. CDCl₃, uma vez que estes são insolúveis ou apresentam baixa solubilidade nesses solventes. Desta forma, não é possível identificar-se os sinais relativos às amidas (CONH), ainda assim, é possível a sua caracterização de forma inequívoca. De realçar a ausência do singlete característico do grupo Boc a campos altos, o que confirma o sucesso da reação de desproteção.

Concretamente para o espectro de **12a**, é possível verificar-se que, relativamente aos dados espectroscópicos homólogos para o dipéptido **11a**, nota-se que os H- α dos resíduos de L-leucina (H_L-2) e de glicina (H_G-2) trocaram de posição relativa, estando este último a campos mais baixos do que o H_L-2 (Tabela 2.13). Ao contrário do que se verifica anteriormente para **11a**, o H_G-2 deste composto apresenta-se sob a forma de um sistema AB, com $J = 17.6$ Hz. No espectro de **12b**, constata-se que, relativamente aos dados espectroscópicos homólogos para o dipéptido **11b**, o H- α do resíduo de L-leucina (H_L-2) surge como um multipeto a $\delta = 4.60 - 4.40$ ppm, ao passo que o H- α da glicina (H_G-2) surge como um singlete a campos mais altos, $\delta = 3.72$ ppm.

¹³C-RMN e DEPT: Através da co-análise dos espectros obtidos para os dipéptidos **12a-c**, é possível identificar-se alguns padrões, nomeadamente, a presença de dois picos respeitantes a carbonos quaternários a campos muito baixos, compatíveis com a amida, CONH, e com o éster metílico, CO₂CH₃. Note-se a ausência dos picos quaternários característicos do grupo Boc, corroborando o sucesso da reação de *N*-desproteção. Foi possível distinguir por DEPT os sinais relativos aos grupos metileno dos resíduo de L-leucina (C_L-3) e glicina (C_G-2).

Verifica-se, ainda, a presença dos C- α de cada resíduo de α -aminoácido, bem como o -CH₃ da função éster. Na Tabela 2.14, encontram-se sumariados os resultados obtidos para os carbonos mais característicos e correspondentes desvios químicos. A atribuição dos restantes carbonos está de acordo com as estruturas esperadas.

Tabela 2.14

Desvios químicos de ¹³C-RMN mais característicos para os dipéptidos desprotegidos **12a-c**.

Sinais	¹³ C-RMN e DEPT (δ / ppm)		
	12a	12b	12c
<u>CONH</u> / <u>CO₂CH₃</u>	<u>170.89, 170.82</u>	<u>172.89, 166.01</u>	<u>176.58, 171.92</u>
CO ₂ <u>CH₃</u>	52.28	50.56	60.63
C _L -2	52.93	52.13	-
C _L -3	<u>41.11</u>	<u>41.07</u>	-
C _G -2	<u>41.25</u>	<u>43.99</u>	-
C _V -2	-	-	53.29
C _A -2	-	-	48.85

EM: Através da análise dos espectros obtidos para os dipéptidos **12a-c** é possível identificar-se alguns padrões, nomeadamente a deteção de um pico compatível com o ião molecular da molécula-alvo formando um aduto com Na⁺, [M+Na]⁺, m/z esperado = 225.1210 u.m.a.; um pico compatível com o ião *quasi*-molecular, MH⁺, para as estruturas consideradas, m/z esperado = 203.1390 u.m.a.; um pico relativo à α -clivagem do éster metílico, [M-OMe]⁺, m/z esperado = 171.1134 u.m.a.; verifica-se também os fragmentos respeitantes ao resíduo de L-leucina nos dipéptidos **12a** e **12b** e, ainda, de L-valina para o dipéptido **12c**, cujos valores de m/z esperados são: 86.0970 u.m.a. para [Leu]⁺, e, 72.0 u.m.a. para [Val]⁺. Na Tabela 2.15, encontram-se sumariados os resultados obtidos para a fragmentação mais característica e os correspondentes valores de m/z .

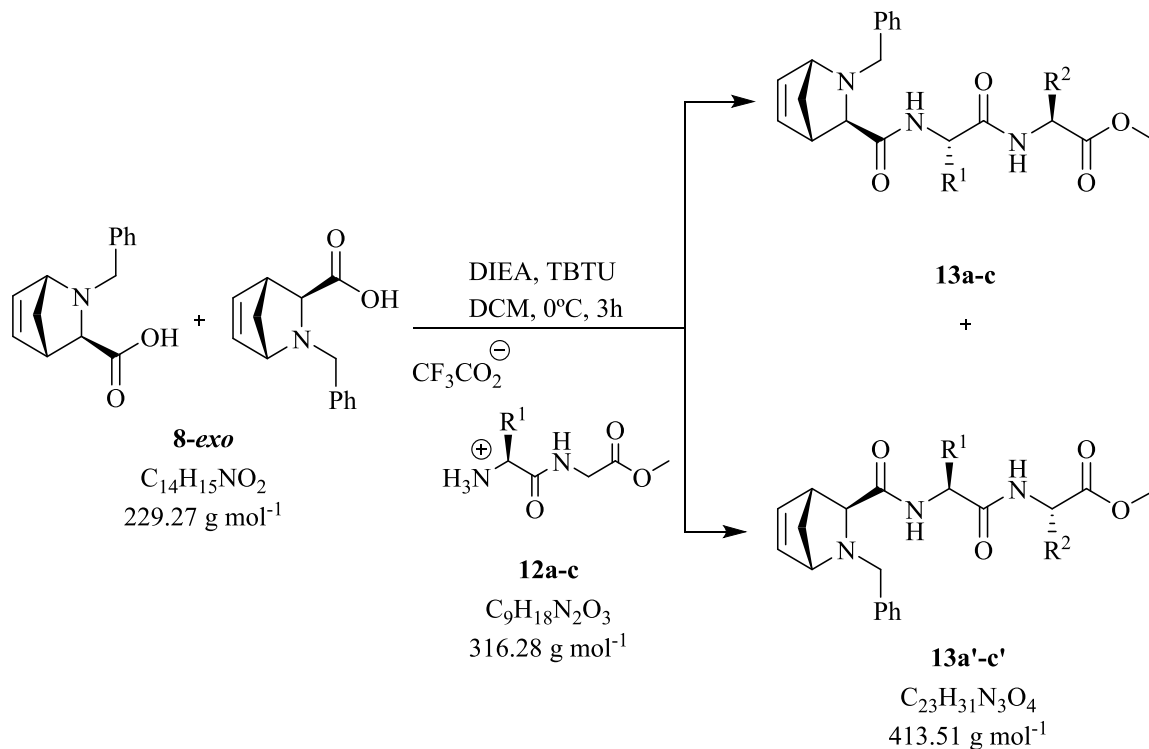
Tabela 2.15

Picos mais característicos de ESI-MS para os dipéptidos desprotegidos **12a-c**.

Entrada	ESI-MS (m/z / u.m.a.)				
	[M+Na] ⁺	[M+H] ⁺	[M-OMe] ⁺	[Leu] ⁺	[Val] ⁺
12a	225.1253	203.1390	171.1134	86.0759	-
12b	225.1209	203.1388	171.1134	86.0971	-
12c	225.1	203.1	171.1	-	72.1

2.3.10. Síntese dos tripéptidos prolinomiméticos **13a-c/13a'-c'**

A reação de acoplamento dos prolinomiméticos **8-exo** com os respectivos dipéptidos **12a-c** para obtenção dos correspondentes tripéptidos, **13a-c/13a'-c'**, pode ser descrita pela seguinte equação genérica:



A obtenção dos tripéptidos **13a-c/13a'-c'** corresponde, de acordo com o plano de trabalhos apresentados na **secção 1.7.3.**, ao terceiro passo sintético do Esquema 1.8. Estes compostos foram preparados através de reação de condensação peptídica entre os prolinomiméticos **8-exo** e os correspondentes dipéptidos para cada série, **12a-c**, usando o TBTU como agente de acoplamento, segundo o procedimento descrito para a preparação dos dipéptidos **11a-c** (**secção 2.3.8.**). Fez-se o tratamento corrente e procedeu-se, em seguida, à purificação dos tripéptidos preparados, recorrendo-se à cromatografia de adsorção em coluna de gel de SiO₂.

Tentou-se proceder à separação cromatográfica dos diastereoisómeros **13a-c/13a'-c'** sintetizados, testando para o efeito vários solventes ou mistura de solventes como eluente. Estas tentativas foram infrutíferas, pelo que se usou a mistura de diastereoisómeros nas reações subsequentes de forma a que, numa etapa posterior fosse possível a separação dos mesmos.

Os resultados obtidos encontram-se sumariados na Tabela 2.16. Os rendimentos, contudo, foram bastante satisfatórios obtendo-se para **13a/13a'** um rendimento compreendido entre 74–76% (Entradas 1-3), para **13b/13b'** um rendimento de 64–66% (Entradas 4 e 5) e, para **13c/13c'**, um rendimento entre 58–70% (Entradas 6-8).

Tabela 2.16

 Resultados obtidos na preparação dos tripéptidos **13a-c/13a'-c'**.

Entrada	R ¹	R ²	(12) <i>m</i> / <i>g</i> (<i>n</i> / mmol)	Resultado (%)
1	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-H	0.100 (0.316)	13a/13a' (74)
2	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-H	0.541 (1.71)	13a/13a' (76)
3	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-H	0.499 (1.58)	13a/13a' (74)
4	-H	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	0.142 (0.449)	13b/13b' (64)
5	-H	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	0.812 (2.57)	13b/13b' (66)
6	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₃	0.142 (0.449)	13c/13c' (70)
7	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₃	0.689 (2.18)	13c/13c' (58)
8	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₃	0.869 (2.75)	13c/13c' (67)

A análise estrutural dos tripéptidos **13a/13a'** (seção 3.3.3.), **13b/13b'** (seção 3.4.3.) e **13c/13c'** (seção 3.5.3.) foi realizada mediante espectroscopia de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT e IV e, por espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para os compostos.

IV: Os espectros obtidos para os tripéptidos **13a-c**, revelam a presença de bandas de estiramento CON-H, concordantes com a ligação amida. Verificam-se ainda bandas de estiramento C=O, compatíveis tanto com a presença das amidas como do éster metílico. Constatam-se bandas de estiramento C_{sp²}-H, compatíveis tanto com o anel aromático do grupo benzilo como da olefina presente no sistema bicíclico. Destaca-se, ainda, a presença de bandas de estiramento C_{sp³}-H. Os resultados obtidos encontram-se sumariados na Tabela 2.17. Note-se que seriam de esperar três bandas de estiramento C=O (duas das amidas e uma do éster metílico), contudo, talvez devido a sobreposição destes sinais, apenas surgem duas bandas intensas para os tripéptidos **13a-c/13a'-c'**.

Tabela 2.17

 Bandas de IV mais características para os tripéptidos protegidos **13a-c/13a'-c'**.

Entrada	IV / cm ⁻¹			
	CON-H (<i>str</i>)	C _{sp²} -H (<i>str</i>)	C _{sp³} -H (<i>str</i>)	C=O (<i>str</i>)
13a/13a'	3312.14	3063.37, 3024.90	2996.87, 2954.41, 2871.49	1753.94, 1648.84
13b/13b'	3308.29	3063.37	2955.38	1741.41, 1647.88
13c/13c'	3298.64	3060.48, 3030.59	2960.20, 2877.27, 2841.60	1746.23, 1645.95

¹H-RMN: As análises dos espectros de relativos aos compostos **13a-c/13a'-c'** revelam-se complexos na medida em que se trata de uma mistura dos dois diastereoisómeros, verificando-se ainda a presença de rotâmeros. É possível identificar-se alguns padrões, nomeadamente a presença das ligações peptídicas (CONH) a campos baixos; um multipletto na zona aromática compatível com a presença do anel aromático do grupo benzilo e, ainda, sinais relativos à olefina presente no sistema bicíclico. Verifica-se a presença dos H- α dos resíduos de aminoácido que compõem os tripéptidos **13a-c/13a'-c'** a campos compatíveis com prótons adjacentes a amidas. Constata-se, adicionalmente, a presença do singletto característico do éster metílico. Na Tabela 2.18, encontram-se sumariados os resultados obtidos para os prótons mais característicos e correspondentes desvios químicos. A atribuição dos restantes prótons está de acordo com as estruturas esperadas.

Tabela 2.18

Desvios químicos de ¹H-RMN mais característicos para os tripéptidos protegidos **13a-c/13a'-c'**.

Sinais	¹ H-RMN (δ / ppm)		
	13a/13a'	13b/13b'	13c/13c'
CONH	7.93, 6.91, 6.52	8.24, 6.95-6.70, 6.55	8.28, 8.16, 6.66
Ph	7.53-7.18	7.57-7.14	7.39-7.22
H-5	6.70-6.55	6.64, 6.55	6.23
H-6	6.27	6.37, 6.23	6.56
OCH₃	3.74, 3.73	3.71, 3.72	3.74, 3.73
H_L-2	4.50-4.26	4.47-4.30, 4.47-4.30	-
H_G-2	4.07-3.80	4.06-3.94	-
H_V-2	-	-	4.22
H_A-2	-	-	4.54, 4.53

No caso dos tripéptidos **13c/13c'**, é ainda possível identificar-se inequivocamente os prótons respeitantes ao grupo -CH₃ do resíduo de L-alanina (H_A-3), que surge como dois dupletos a δ = 1.39 e 1.37 ppm, com J = 7.0 Hz para ambos os sinais, confirmando o acoplamento com H_A-2, que se apresenta como dois pentetos a δ = 4.54 e 4.53 ppm, com J = 7.0 Hz.

¹³C-RMN e DEPT: A co-análise dos espectros relativos aos compostos **13a-c/13a'-c'** revelam-se complexos pelas mesmas circunstâncias elencadas anteriormente na análise de ¹H-RMN. Contudo, é possível identificar-se alguns padrões, nomeadamente a presença de picos respeitantes a carbonos quaternários a campos muito baixos, compatíveis com as amidas, CONH, e com o éster metílico, CO₂CH₃.

Constata-se a presença de um pico quaternário na zona aromática, correspondente ao C-1' e ainda picos nessa zona compatíveis com o anel aromático do grupo benzilo; é possível identificar-se os carbonos C_{sp²}-H da olefina entre os carbonos C-5 e C-6 do sistema bicíclico a campos baixos e o -CH₃ do éster metílico. Foi possível distinguir, por DEPT, os carbonos metilénicos do grupo benzilo, do carbono C-7 e, no caso dos tripéptidos **13a/13a'** e **13b/13b'**, os carbonos metilénicos do resíduo de L-leucina (C_L-3), assim como do resíduo de glicina (C_G-2). Verifica-se, ainda, a presença dos C-α de cada resíduo de α-aminoácido. Na Tabela 2.19, encontram-se sumariados os resultados obtidos para os carbonos mais característicos e correspondentes desvios químicos. A atribuição dos restantes carbonos está de acordo com as estruturas esperadas.

Tabela 2.19

Desvios químicos de ¹³C-RMN mais característicos para os tripéptidos protegidos **13a-c/13a'-c'**.

Sinais	¹³ C-RMN e DEPT (δ / ppm)		
	13a/13a'	13b/13b'	13c/13c'
<u>C</u> ONH /	<u>174.21, 173.41, 173.30,</u>		<u>173.14, 173.13, 173.09,</u>
<u>C</u> O ₂ CH ₃	<u>172.21, 171.91, 169.97</u>	<u>173.82, 173.06, 168.72</u>	<u>172.97, 170.73, 170.37</u>
C-1'	<u>138.35</u>	<u>138.30</u>	<u>137.79, 137.71</u>
C-2'+C-6'	129.32, 129.02	129.04	129.19, 128.91
C-3'+C-5'	128.70, 128.65	128.46	128.66, 128.52
C-4'	127.46, 127.35	127.30	127.37, 127.24
C-5	137.90, 137.87	137.66, 137.63	138.51, 138.42
C-6	133.18, 133.04	132.99, 132.98	133.14, 132.97
C-7	<u>46.02, 45.94</u>	<u>45.94, 45.88</u>	<u>45.95, 45.91</u>
NCH ₂ Ph	<u>58.73, 58.55</u>	<u>58.33, 58.29</u>	<u>58.55, 58.24</u>
OCH ₃	52.24, 52.23	52.22, 52.21	52.35
C _L -2	51.37, 51.02	50.70	-
C _G -2	<u>41.12, 41.09</u>	<u>43.96, 42.96</u>	-
C _V -2	-	-	58.09, 57.95
C _A -2	-	-	49.15, 48.82
C _L -3	<u>40.53, 40.40</u>	<u>41.20, 41.14</u>	

COSY/HSQC: Recorreu-se a estas técnicas espectroscópicas bidimensionais para a mistura dos tripéptidos **13a/13a'**. A análise destes espectros permitiu esclarecer algumas ambiguidades na atribuição dos prótons nas estruturas esperadas. Foi possível identificar-se por COSY claramente a interação que o próton H-4 estabelece com os prótons H-3, H-5 e H-7 e, a partir daí, tornou-se mais fácil a atribuição dos restantes prótons, como por exemplo, os sinais relativos aos H-5 e H-6. Verifica-se ainda interação entre os sinais das ligações amida a $\delta = 7.93$ e 6.91 ppm, com os prótons H_L-2 e H_G-2, respetivamente. Verifica-se que o multipeto a $\delta = 3.64 - 3.44$ ppm e o sistema AB a $\delta = 3.43 - 3.32$ ppm são os sinais relativos aos NCH₂Ph de cada diastereoisómero, desta forma foi possível distinguir estes sinais do multipeto a $\delta = 4.07 - 3.80$ ppm relativo aos prótons H_G-2 de ambos os diastereoisómeros (sobrepostos). O espectro de HSQC foi bastante útil para deslindar a atribuição dos carbonos para as estruturas esperadas, nomeadamente foi possível distinguir os sinais dos carbonos metilénicos que surgiam em DEPT para C-7, C_G-2 e C_L-3 que, pela proximidades dos seus desvios químicos, entre $\delta = 40.40$ e 46.02 ppm, tornariam a análise subjetiva. Destarte, foi possível a atribuição inequívoca para estes carbonos.

EM: Através da análise dos espectros obtidos para os tripéptidos **13a-c/13a'-c'** é possível identificar-se alguns padrões, nomeadamente a deteção de um pico compatível com o ião *quasi*-molecular, MH⁺, para as estruturas consideradas, m/z esperado = 414.2387 u.m.a.. Verificam-se adicionalmente, picos relativos ao fragmento obtido pela *N*-clivagem do grupo benzilo, [M-Bn-2H]⁺, e ainda, do próprio grupo benzilo, [Bn]⁺, cujos valores de m/z esperados são: 320.1610 u.m.a. para [M-Bn-2H]⁺ e, 91.0548 u.m.a., para [Bn]⁺. Na Tabela 2.20, encontram-se sumariados os resultados obtidos para a fragmentação mais característica e os correspondentes valores de m/z .

Tabela 2.20

Picos mais característicos de ESI-MS para os tripéptidos protegidos **13a-c/13a'-c'**.

Entrada	ESI-MS (m/z / u.m.a.)		
	[M+H] ⁺	[M-Bn-2H] ⁺	[Bn] ⁺
13a/13a'	414.2377	320.1970	91.0546
13b/13b'	414.2371	320.1960	91.0548
13c/13c'	414.2388	320.1971	91.0541

2.3.11. Hidrogenação

A hidrogenação é o tipo de reação química que ocorre quando uma molécula é obtida pela adição de hidrogénio a uma cadeia insaturada. Este processo é utilizado para reduzir ou saturar compostos orgânicos através da adição de um (ou mais) par(es) de átomos de hidrogénio a uma molécula, geralmente alcenos.²⁸⁶ Todavia, os alcenos não reagem com H_2 , uma vez que a barreira energética para a dissociação do hidrogénio molecular é muito elevada. A hidrogenação de uma ligação múltipla embora seja um processo exotérmico, não ocorre espontaneamente, nem mesmo a temperaturas elevadas.

Um exemplo paradigmático incide na hidrogenação do eteno a altas temperaturas (200°C) por prolongados períodos de tempo, sem que se verifique, pelo menos de forma mensurável, a formação do correspondente alcano, o etano. Para obviar esta situação, recorre-se ao uso de catalisadores metálicos, sendo o seu uso justificado na medida em que, estes últimos, são capazes de baixar a energia de dissociação do hidrogénio molecular para que a reação ocorra.

2.3.11.1. Hidrogenação Catalítica

Com raras exceções, não ocorre reação espontânea entre H_2 e compostos orgânicos abaixo dos 480°C na ausência de um catalisador metálico. Os catalisadores geralmente são materiais insolúveis, criando suspensões no meio reacional, tal como paládio (e.g. disperso em C, Pd-C), platina (**catalisador de Adams**, PtO_2 , que é convertido em platina metálica coloidal na presença de H_2) e níquel (finamente disperso, tal como na preparação do **níquel de Raney**, **Ra-Ni**). Os catalisadores de platina, paládio, ródio e rutério operam a baixas temperaturas e baixas pressões de H_2 , sendo considerados excelentes catalisadores. Catalisadores baseados em metais não-preciosos, especialmente aqueles formados por níquel (e.g. níquel de Raney e **níquel de Urushibara**) têm sido desenvolvidos como alternativas mais económicas, mas apresentam atividade catalítica reduzida em comparação com os restantes catalisadores disponíveis ou requerem temperaturas elevadas para atingir a mesma eficiência catalítica. A principal função do catalisador é ativar o hidrogénio molecular para gerar hidrogénio ligado aos átomos metálicos, presentes na superfície do catalisador.

Sem o metal, a clivagem térmica da ligação H-H seria energeticamente proibitiva. Os solventes comumente usados nos processos de hidrogenação catalítica são o metanol, etanol, ácido acético e acetato de etilo. A escolha de um catalisador está dependente da sua atividade vs custo e/ou custo do aparato necessário para utilizar elevadas pressões, como é o caso do catalisador Ra-Ni, que requer a aplicação de elevadas pressões.^{287,288}

²⁸⁶ Miloš, H. *Reductions in Organic Chemistry*, 2nd ed., American Chemical Society, Washington DC, **1996**.

²⁸⁷ Allen, C. F. H.; VanAllan, J. *Org. Synth.* **1955**, 3, 827.

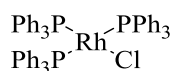
²⁸⁸ Mekler, A. B.; Ramachandran, S.; Swaminathan, S.; Melvin, S. N. *Org. Synth.* **1973**, 5, 743.

A atividade catalítica e a sua seletividade estão intimamente relacionadas com a natureza do metal usado como catalisador, mais propriamente com as suas propriedades eletrónicas. Para que possa dissociar e aceitar hidrogénio, este terá de possuir um número reduzido de orbitais *d* vazias. Se o número destas orbitais vazias for muito elevado, o hidrogénio será fortemente adsorvido ao metal, inviabilizando a sua transferência. Os metais do grupo 8 da tabela periódica proporcionam, geralmente, bons catalisadores, uma vez que os complexos de hidreto formados com estes metais não são tão estáveis como com outros metais.²⁸⁹ Assim, pode nomear-se alguns dos metais mais usados em hidrogenações catalíticas, como é o caso do Pd, Pt, Ni, Rh e Ru, dadas as suas capacidades para a quimioadsorver de forma dissociativa H₂, quando se usam como superfícies metálicas para coordenar com H mediante um processo de adição oxidativa, no caso do catalisador ser um complexo. De facto, a redução de ligações múltiplas usando hidrogénio molecular e um catalisador contendo um metal é uma reação familiar em química orgânica.

É possível distinguir duas famílias de catalisadores – os *catalisadores homogéneos* e os *catalisadores heterogéneos*. Os primeiros são solúveis no solvente usado na reação de hidrogenação que contém o composto insaturado. Os segundos são partículas sólidas que estão suspensas no mesmo solvente em que está dissolvido o composto insaturado ou pode, este último, ser adicionado sob a forma de gás.

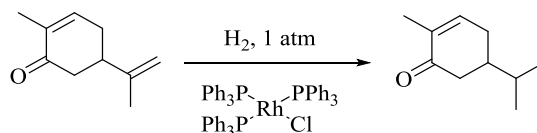
Catalisadores homogéneos

Como exemplo de catalisadores homogéneos, temos o catalizador de **Wilkinson**, assim designado em honra do químico organometálico e prémio Nobel em Química (1973), Sir Geoffrey Wilkinson, nome por que é conhecida a **clorotris(trifenilfosfina) de ródio (I)**.²⁹⁰ Esta classe de catalisadores inclui, ainda, outros compostos contendo Rh.



Clorotris(trifenilfosfina) de ródio (I)

Um exemplo prático do uso do catalisador de Wilkinson é a hidrogenação da carvona²⁹¹:



²⁸⁹Jardine, F. H. *Rhodium: Inorganic and Coordination Chemistry*, Enc. Inorg. Chem. Bruce King, R. Ed., John Wiley & Sons, London, **1994**, vol 6, p. 3488.

²⁹⁰(a) Birch, A. J.; Williamson, D. H. *Org. React.* **1976**, 24, 1. (b) James, B. R. *Homogeneous Hydrogenation*, John Wiley & Sons, New York, **1973**.

²⁹¹Robert, S.; Ireland, E.; Bey, P. *Org. Synth.* **1988**, 6, 459.

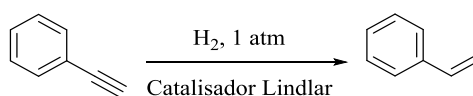
Outra classe de catalisadores homogêneos abarca os **catalisadores de Crabtree**, que contemplam compostos derivados de Ir.

A hidrogenação é sensível a efeitos estéricos, explicando desta forma a seletividade para ligações duplas exocíclicas mas não para ligações duplas internas. A atividade e seletividade destes catalisadores pode ser ajustada através da modificação dos seus ligandos. Em moléculas pró-quirais, a seletividade do catalisador pode ser modificada de forma a favorecer um enantiômero sobre o outro. Em muitos processos de hidrogenação homogênea, o metal liga-se a ambos os componentes para originar um complexo intermediário, alceno-metal(H₂).

Catalisadores heterogêneos

Este tipo de catalisadores são mais comuns a nível industrial no que respeita a reações de hidrogenação. Tal como acontece nos catalisadores homogêneos, a atividade é ajustada através de alterações no ambiente químico à volta do metal, i.e., esfera de coordenação do metal. Diferentes faces de um catalisador heterogêneo cristalino apresentam diferentes atividades. Similarmente, os catalisadores heterogêneos são afetados pelos seus suportes, ou seja, o material ao qual o catalisador heterogêneo está ligado.

A escolha criteriosa e cuidada é importante consoante o objetivo que se pretende. Desta forma, é possível usar alguns catalisadores na hidrogenação de alguns grupos funcionais sem afetar outros, como a hidrogenação de alcenos sem interferência em anéis aromáticos ou, ainda, a hidrogenação seletiva de alcinos em detrimento de alcenos usando o catalisador de **Lindlar**^{292,293} (paládio disperso em carbonato de cálcio ou sulfato de bário tratado com várias formas de chumbo). Um exemplo do uso do catalisador de Lindlar verifica-se na conversão de fenilacetileno a estireno.²⁹²



Frequentemente utiliza-se o Pd na forma de um pó com reduzida granulometria, ou também o hidróxido de paládio, designado por catalisador de Pearlman, Pd(OH)₂, dispersos num material inerte, como carvão vegetal, Pd/C e Pd(OH)₂/C, no caso do Pd e Pd(OH)₂, respetivamente. Desta forma a área superficial é aumentada e, conseqüentemente, a velocidade de hidrogenação.

A hidrogenação assimétrica também é possível através da catálise heterogênea num metal modificado por um ligando quiral.²⁹⁴

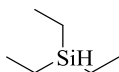
²⁹²Lindlar, H.; Dubuis, R. *Org. Synth.* **1973**, 5, 880.

²⁹³Lindlar, H. *Helv. Chim. Acta* **1952**, 35 (2), 446.

²⁹⁴Mallat, T.; Orglmeister, E.; Baiker, A. *Chemical Reviews* **2007**, 107 (11), 4863-90.

2.3.11.2. Processo de hidrogenação catalítica

Para a maioria das hidrogenações é usado hidrogénio gasoso, contudo em alguns casos pode-se usar fontes alternativas de hidrogénio como por exemplo **trietilsilano (TES)** que, na presença de Pd, gera hidrogénio molecular *in situ*, sendo denominadas de *hidrogenações de transferência*. Desta lista conta ainda a hidrazina, di-hidronaftaleno, di-hidroantraceno, isopropanol e ácido fórmico. A hidrogenação de transferência é muito útil para a redução assimétrica de moléculas insaturadas polares como cetonas, aldeídos e iminas.²⁹⁵



Trietilsilano

A hidrogenação catalítica apresenta elevada quimio-, regio- e estereosseletividade sob condições suaves, responsável pela redução de muitos grupos funcionais. Uma vantagem do uso de catalisadores heterogéneos em detrimento dos homogéneos é que os primeiros podem ser facilmente eliminados do meio reacional através de filtração, obtendo-se os compostos pretendidos sem contaminações por parte destes metais.²⁸⁶

Em sólidos, o mecanismo aceite é o de Horiuti-Polanyi²⁹⁶ (Esquema 2.30):

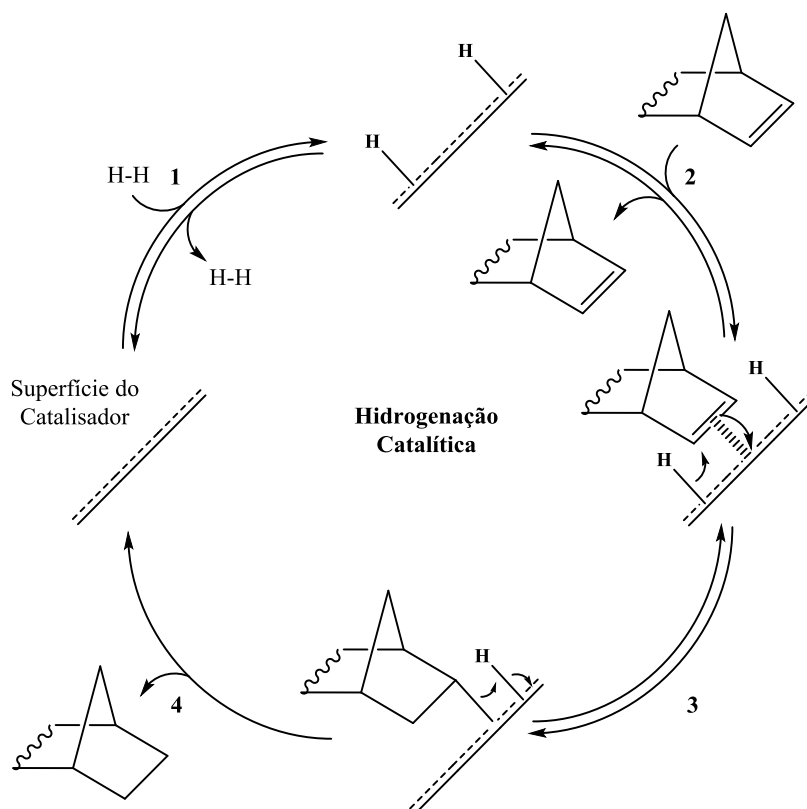
1. Clivagem do hidrogénio molecular e, consequentemente, ligação dos átomos de hidrogénio aos átomos metálicos presentes na superfície do catalisador;
2. Adsorção da molécula insaturada à superfície do catalisador (interação de uma orbital *d* vazia do metal com a ligação π do alceno);
3. Transferência do primeiro átomo de hidrogénio para um dos carbonos sp^2 do alceno;
4. Transferência do segundo átomo de hidrogénio, completando o processo de hidrogenação catalítica, com a libertação do alceno da superfície do catalisador.

A hidrogenação de cicloalcenos, na presença de catalisadores heterogéneos origina seletivamente o produto *syn*, ou seja, os átomos de hidrogénio são adicionados do mesmo lado do anel. O alceno resultante como produto da hidrogenação só deixa a superfície do catalisador após a transferência dos dois átomos de hidrogénio. A velocidade da reação de hidrogenação depende do grau de substituição na ligação dupla. Alcenos substituídos com grupos volumosos mostram uma menor taxa de reação do que aqueles substituídos com grupos menos volumosos. Este facto pode ser explicado pelo maior impedimento estérico, bem como uma melhor estabilização da ligação π em alcenos contendo grupos volumosos. Portanto, a hidrogenação seletiva de ligações duplas mesmo na presença de diferentes grupos é, muitas vezes, possível.

²⁸⁶Miloš, H. *Reductions in Organic Chemistry*, 2nd ed., American Chemical Society, Washington DC, **1996**.

²⁹⁵van Es, T.; Staskun, B. *Org. Syn.* **1988**, 6, 631.

²⁹⁶Horiuti, I.; Polanyi, M. *Transactions of the Faraday Society* **1934**, 30, 1164.



Esquema 2.30

Mecanismo de hidrogenação catalítica na redução da olefina entre C-5 e C-6 dos adutos bicíclicos. Os átomos de hidrogênio ligam-se ao centro metálico presente na superfície do catalisador e são transferidos aos carbonos insaturados do alceno adsorvido à superfície do mesmo.

2.3.12. Hidrogenólise catalítica

A hidrogenólise refere-se à reação química em que se verifica clivagem de ligação simples carbono-carbono, C-C, ou carbono-heteroátomo, C-X (X = O, N, S), pela adição de hidrogênio na presença de um catalisador metálico, com consequente formação de novas ligações C-H e H-X.²⁹⁷

Este processo tem grande relevância no que respeita às X-desbenzilações. Com efeito, é amplamente utilizado em O-desbenzilações como método de desproteção do grupo Z (-OBn) em síntese peptídica e, ainda, em N-desbenzilações. As S-desbenzilações são mais difíceis na medida em que o enxofre provoca envenenamento do catalisador. Ainda que a N-desbenzilação ocorra com maior dificuldade do que a O-desbenzilação, este grupo de proteção aplicado a aminas reveste-se de grande utilidade em síntese orgânica, tendo sido aplicado a uma grande variedade de aminas que foram desprotegidas mediante condições suaves de hidrogenação catalítica com bons rendimentos, sem gerar quantidade apreciável de co-produtos.²⁹⁸

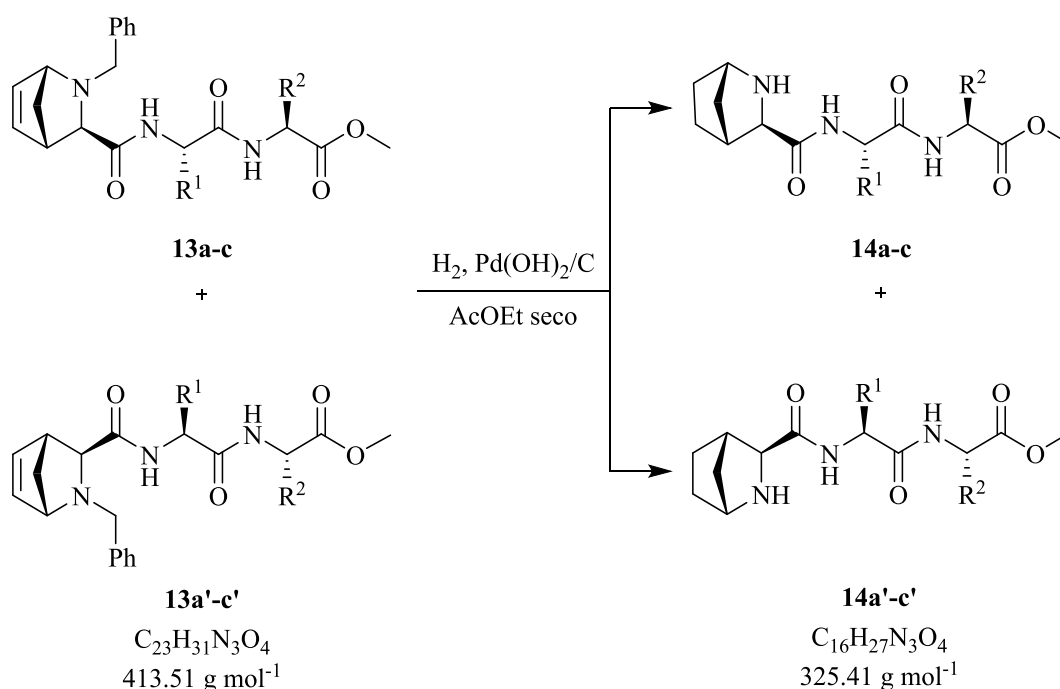
²⁹⁷Connor, R.; Adkins, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, 54, 4678-4690.

²⁹⁸Hartung, W. H.; Siminiff, R. *Org. React.* **1953**, 7, 263.

Dentre os variados catalisadores metálicos, os melhores no processo de hidrogenólise de X-benzilos são os de Pd, obtendo-se excelentes resultados com o catalisador de Pearlman.²⁹⁹

2.3.13. Hidrogenação e *N*-desbenzilação catalítica dos tripéptidos **13a-c/13a'-c'**: síntese dos tripéptidos desprotegidos **14a-c/14a'-c'**

As reações de hidrogenação e subsequente *N*-desbenzilação dos tripéptidos **13a-c/13a'-c'** para obtenção dos correspondentes tripéptidos desprotegidos **14a-c/14a'-c'**, pode ser descrita pela seguinte equação genérica:



A obtenção dos tripéptidos **14a-c/14a'-c'** corresponde, de acordo com o plano de trabalhos apresentados na **secção 1.7.3.**, ao quarto passo sintético do Esquema 1.8. Os tripéptidos **13a-c/13a'-c'** foram sujeitos a hidrogenação catalítica e subsequente *N*-desbenzilação, através do prolongamento das condições reacionais. As reações foram realizadas utilizando-se uma suspensão de $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ 20% em AcOEt seco sob agitação num balão de fundo redondo, de forma a obter-se uma elevada área de superfície, num sistema previamente purgado com Ar. A esta suspensão foram adicionados os correspondentes tripéptidos **13a-c/13a'-c'**, dissolvidos previamente em AcOEt seco. A reação iniciou-se pela deslocação do Ar com hidrogénio à pressão atmosférica, recorrendo a balões de H_2 . Após saturação do sistema com hidrogénio, deixou-se a reação à t.a. com agitação magnética e procedeu-se à manutenção de hidrogénio até se verificar a formação da amina livre por TLC. Constatou-se que a reação de hidrogenação ocorreu de forma mais rápida do que a *N*-desbenzilação.

²⁹⁹Pearlman, W. M. *Tetrahedron Lett.* **1967**, 8, 1663.

Com efeito, 24h após a adição de H₂, notou-se o desaparecimento dos sinais com R_f característico dos tripéptidos **13a-c/13a'-c'** e aparecimento de novas manchas com R_f muito próximo, apresentando uma coloração mais clara usando solução etanólica de ácido fosfomolibdico a quente como método de revelação. A *N*-desbenzilação ocorreu mais lentamente, com aparecimento de outros sinais com R_f muito próximo da linha de base. Findas as reações, procedeu-se à filtração sob pressão reduzida através de uma camada de celite com várias lavagens com AcOEt. A mistura foi concentrada à secura e procedeu-se à purificação dos tripéptidos pretendidos através de cromatografia de adsorção em coluna de gel de SiO₂, usando-se como eluente AcOEt, com o intuito de remover impurezas resultantes do processo de hidrogenação catalítica e, por fim, MeOH de forma a arrastar os compostos pretendidos. As tentativas de separação cromatográfica dos diastereoisómeros **14a-c/14a'-c'** foram infrutíferas. Os resultados obtidos encontram-se sumariados na Tabela 2.21. Os rendimentos foram bastante satisfatórios obtendo-se para **14a/14a'** um rendimento compreendido entre 81–83% (Entradas 1 e 2), para **14b/14b'** um rendimento de 73% (Entradas 3 e 4) e, para **14c/14c'**, um rendimento entre 66–70% (Entradas 5 e 6).

Tabela 2.21

Resultados obtidos na síntese dos tripéptidos desprotegidos **14a-c/14a'-c'**.

Entrada	R ¹	R ²	(13) <i>m</i> / g (<i>n</i> / mmol)	<i>t</i> / d	Resultado (%)
1	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-H	0.237 (0.573)	8	14a/14a' (83)
2	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-H	0.262 (0.634)	8	14a/14a' (81)
3	-H	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	0.285 (0.689)	4	14b/14b' (73)
4	-H	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	0.312 (0.755)	5	14b/14b' (73)
5	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₃	0.150 (0.363)	5	14c/14c' (70)
6	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₃	0.300 (0.725)	6	14c/14c' (66)

A análise estrutural dos tripéptidos **14a/14a'** (secção 3.3.4.), **14b/14b'** (secção 3.4.4.) e **14c/14c'** (secção 3.5.4.) foi realizada mediante espectroscopia de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT e IV e, por espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para os compostos.

IV: Os espectros obtidos para os tripéptidos **14a-c/14a'-c'**, revelam a presença de bandas de estiramento CON-H e N-H. Verificam-se ainda bandas de estiramento C=O, compatíveis tanto com a presença das amidas como do éster metílico; cumulativamente, detetam-se bandas de estiramento C_{sp³}-H. Note-se a ausência de bandas relativas ao estiramento C_{sp²}-H, em comparação com os dados espectroscópicos homólogos para os tripéptidos **13a-c/13a'-c'**, corroborando o sucesso tanto da hidrogenação como da hidrogenólise. Em seguida, apresentam-se os dados relativos às bandas mais características, sumariados na Tabela 2.22.

Tabela 2.22

Bandas de IV mais características para os tripéptidos desprotegidos **14a-c/14a'-c'**.

Entrada	IV / cm ⁻¹		
	CON-H e N-H (<i>str</i>)	C _{sp³-H (<i>str</i>)}	C=O (<i>str</i>)
14a/14a'	3290.93	2956.34, 2872.45	1752.01, 1648.84
14b/14b'	3269.72	2995.38, 2868.59	1741.41, 1654.62
14c/14c'	3282.25	2961.16, 2874.38	1743.33, 1645.95

Os resultados obtidos revelam duas bandas de estiramento C=O, sendo esperadas três bandas, duas relativas às ligações amida (CONH) e uma relativa ao éster metílico (CO₂CH₃). Tal facto pode dever-se à sobreposição de duas bandas de estiramento C=O, apresentando-se como uma única banda, com contribuição de dois sinais distintos.

¹H-RMN: As análises dos espectros relativos aos tripéptidos **14a-c/14a'-c'** revelam-se complexos na medida em que se trata de uma mistura de dois diastereoisómeros, verificando-se ainda a presença de rotâmeros. É possível identificar-se alguns padrões, nomeadamente a presença dos H- α dos resíduos de aminoácido que compõem os tripéptidos **14a-c/14a'-c'** a campos compatíveis com prótons adjacentes a amidas. Constata-se, ainda, a presença do singlete característico do éster metílico. Adicionalmente, verifica-se a ausência de sinais aromáticos bem como dos sinais relativo à olefina, o que está de acordo com o esperado, denotando o sucesso da reação hidrogenação e de *N*-desproteção mediada por hidrogenólise do grupo benzilo. Na Tabela 2.23, encontram-se sumariados os resultados obtidos para os prótons mais característicos e correspondentes desvios químicos. A atribuição dos restantes prótons está de acordo com as estruturas esperadas.

Tabela 2.23

Desvios químicos de ¹H-RMN mais característicos para os tripéptidos desprotegidos **14a-c/14a'-c'**.

Sinais	¹ H-RMN (δ / ppm)		
	14a/14a'	14b/14b'	14c/14c'
CONH	8.59, 8.31, 8.05, 7.97, 7.89	8.69-8.35, 8.33-7.98, 7.24-6.79	8.38, 8.28, 7.82, 7.34, 7.23, 7.04
OCH₃	3.63	3.69	3.69
H_L-2	4.72-4.49	4.47-4.30, 4.47-4.30	-
H_G-2	3.99-3.80	4.06-3.94	-
H_V-2	-	-	4.31-4.15
H_A-2	-	-	4.48

¹³C-RMN e DEPT: A co-análise dos espectros relativos aos compostos **14a-c/14a'-c'** revelam-se complexos pelas mesmas razões elencadas anteriormente na análise de ¹H-RMN. Contudo, é possível identificar-se alguns padrões, nomeadamente, a presença de picos respeitantes a carbonos quaternários a campos muito baixos, compatíveis com as amidas, CONH, e com o éster metílico, CO₂CH₃. Verificam-se os carbonos metilénicos relativos ao carbono C-7 e, no caso dos tripéptidos **14a/14a'** e **14b/14b'**, os carbonos metilénicos do resíduo de L-leucina (C_L-3) e do resíduo de glicina (C_G-2). Consta-se a presença dos C-α de cada resíduo de aminoácido, assim como o grupo -CH₃ da função éster a campos baixos. Note-se a ausência dos sinais relativos aos carbonos aromáticos e olefínicos, por contraste com os dados homólogos para **13a-c/13a'-c'**, corroborando o sucesso da hidrogenação e da hidrogenólise. Adicionalmente, foi possível distinguir, por DEPT, os carbonos metilénicos C-5 e C-6. Na Tabela 2.24, encontram-se sumariados os resultados obtidos para os carbonos mais característicos e correspondentes desvios químicos. A atribuição dos restantes carbonos está de acordo com as estruturas esperadas.

Tabela 2.24

Desvios químicos de ¹³C-RMN mais característicos para os tripéptidos desprotegidos **14a-c/14a'-c'**.

Sinais	¹³ C-RMN e DEPT (δ / ppm)		
	14a/14a'	14b/14b'	14c/14c'
<u>C</u> ONH /	<u>173.50, 173.42,</u>	<u>176.36, 173.35, 173.30,</u>	<u>173.28, 173.18, 172.99,</u>
<u>C</u> O ₂ CH ₃	<u>171.11, 167.72, 167.63</u>	<u>172.53, 168.99, 168.90</u>	<u>172.27, 170.92, 170.90</u>
<u>O</u> CH ₃	52.40, 52.20	52.21	52.82
C _L -2	53.10, 52.53	50.73, 50.45	-
C _G -2	<u>41.09, 40.98</u>	<u>43.15, 43.04</u>	-
C _V -2	-	-	58.09, 57.95
C _A -2	-	-	48.03, 47.98
C _L -3	<u>40.57</u>	<u>40.95</u>	-
C-5	<u>22.51, 22.48</u>	<u>29.57</u>	<u>28.09, 27.89</u>
C-6	<u>26.45, 26.31</u>	<u>27.78</u>	<u>31.25</u>
C-7	<u>38.55, 38.47</u>	<u>34.56</u>	<u>48.03</u>

EM: Através da análise dos espectros obtidos para os tripéptidos **14a-c/14a'-c'** é possível identificar-se alguns padrões, nomeadamente, a detecção de um pico compatível com o ião *quasi*-molecular, MH^+ , para as estruturas consideradas, m/z esperado = 326.2074 u.m.a.. Verificam-se ainda os picos relativos à perda do sistema prolinomimético bicíclico, $[M-P]^+$; do sistema bicíclico obtido pela α -clivagem da ligação amida, $[M-P*CO]^+$, e ainda, do próprio sistema bicíclico, $[P]^+$. Note-se a ausência do fragmento característico do grupo -Bn a 91 u.m.a., consistente com o sucesso da reação de hidrogenólise. Na Tabela 2.25, encontram-se sumariados os resultados obtidos para a fragmentação mais característica e os correspondentes valores de m/z .

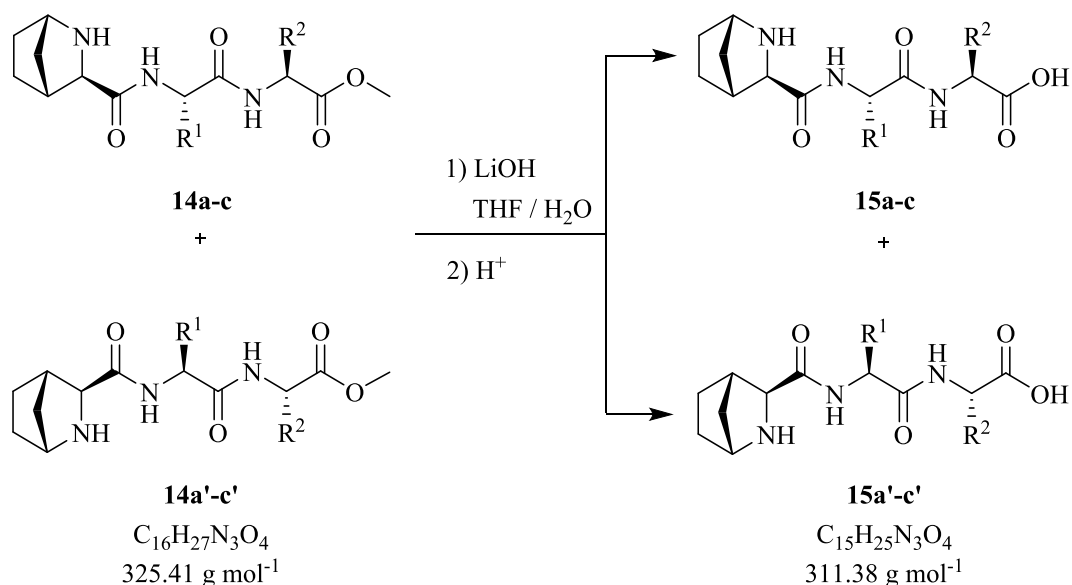
Tabela 2.25

Picos mais característicos de ESI-MS para os tripéptidos desprotegidos **14a-c/14a'-c'**.

Entrada	ESI-MS (m/z / u.m.a.)			
	$[M+H]^+$	$[M-P]^+$	$[M-P*CO]^+$	$[P]^+$
14a/14a'	326.2082	229.1545	124.1072	96.0682
14b/14b'	326.2066	229.1538	124.1130	96.0805
14c/14c'	326.2091	229.1510	124.1127	96.0844

2.3.14. Hidrólise dos ésteres **14a-c/14a'-c'**: síntese dos tripéptidos **15a-c/15a'-c'**

A obtenção dos tripéptidos **15a-c/15a'-c'**, a partir da hidrólise alcalina dos correspondentes tripéptidos **14a-c/14a'-c'**, pode ser descrita pela seguinte equação genérica:



A obtenção dos tripéptidos **15a-c/15a'-c'** corresponde, de acordo com o plano de trabalhos apresentados na **secção 1.7.3.**, ao quinto e último passo sintético do Esquema 1.8.

Os tripéptidos **15a-c/15a'-c'** foram obtidos através de hidrólise alcalina dos respectivos ésteres **14a-c/14a'-c'**, nas mesmas condições empregues para a síntese dos aminoácidos prolinomiméticos, **7-exo** e **8-exo** (secção 2.2.4.4.). Contudo, para esta classe de compostos foi necessário proceder-se a purificação mediante técnicas cromatográficas, uma vez que se verificou a presença de produtos secundários em TLC. Para o efeito, recorreu-se à técnica de cromatografia de adsorção em coluna de gel de SiO₂ usando como eluente AcOEt a fim de remover impurezas, uma vez que o composto pretendido fica muito retido na sílica e, por fim, MeOH de forma a arrastá-lo. Um grande obstáculo generalizado decorrente do processo de purificação deve-se à baixa solubilidade que estes compostos apresentam em solventes orgânicos apróticos. As tentativas de separação cromatográfica para os diastereoisómeros **15a-c/15a'-c'** foram infrutíferas. Os resultados obtidos encontram-se sumariados na Tabela 2.26. Os rendimentos foram bastante satisfatórios obtendo-se para **15a/15a'** um rendimento compreendido entre 83–89% (Entradas 1 e 2), para **15b/15b'** um rendimento de 84–85% (Entradas 3 e 4) e, para **15c/15c'**, um rendimento entre 72–74% (Entradas 5 e 6).

Tabela 2.26

Resultados obtidos na síntese dos tripéptidos **15a-c/15a'-c'**.

Entrada	R ¹	R ²	(14) <i>m</i> / <i>g</i> (<i>n</i> / mmol)	<i>t</i> / <i>d</i>	Resultado (%)
1	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-H	0.107 (0.329)	24	15a/15a' (83)
2	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-H	0.102 (0.313)	24	15a/15a' (89)
3	-H	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	0.130 (0.399)	9	15b/15b' (85)
4	-H	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	0.263 (0.808)	12	15b/15b' (84)
5	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₃	0.169 (0.519)	48	15c/15c' (74)
6	-CH(CH ₃) ₂	-CH ₃	0.188 (0.578)	48	15c/15c' (72)

A análise estrutural dos tripéptidos **15a/15a'** (secção 3.3.5.), **15b/15b'** (secção 3.4.5.) e **15c/15c'** (secção 3.5.5.) foi realizada mediante espectroscopia de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT e IV e, por espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para os compostos.

IV: Os espectros obtidos para os tripéptidos **15a-c/15a'-c'**, revelam a presença de uma banda larga característica do estiramento COO-H, confirmando a presença da função ácido carboxílico, juntamente com a presença de bandas fortes estiramento C=O (*str*), corroborando o sucesso da reação de hidrólise. Verificam-se, ainda, bandas de estiramento CON-H e N-H, assim como bandas de estiramento C=O, compatíveis tanto com a presença das amidas como do ácido carboxílico. Constatam-se, adicionalmente, bandas de estiramento C_{sp³}-H. Em seguida, apresentam-se os dados relativos às bandas mais características, sumariados na Tabela 2.27.

Tabela 2.27

Bandas de IV mais características para os tripéptidos **15a-c/15a'-c'**.

Entrada	Bandas IV / cm^{-1}			
	O-H (<i>str</i>)	CON-H e N-H (<i>str</i>)	$\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$	C=O (<i>str</i>)
15a/15a'	3700 - 2700	3270.68	2955.38, 2871.49	1761.65, 1696.09, 1648.84
15b/15b'	3700 - 2700	3269.72	2995.38, 2868.59	1748.64, 1651.73, 1643.32
15c/15c'	3700 - 2200	3249.42	2964.05	1722.12, 1649.80

Os resultados obtidos revelam apenas duas bandas de estiramento C=O para os tripéptidos **15c/15c'**, sendo esperadas três bandas, duas relativas às ligações amida (CONH) e uma relativa ao ácido carboxílico (CO_2H). Tal pode dever-se à sobreposição de duas bandas de estiramento C=O, apresentando-se como uma única banda, com contribuição de dois sinais.

^1H -RMN: As análises dos espectros relativos aos compostos **15a-c/15a'-c'** revelam-se complexos na medida em que se trata de uma mistura de dois diastereoisômeros, verificando-se ainda a presença de rotâmeros. É possível identificar-se alguns padrões, nomeadamente a presença dos H- α dos resíduos de aminoácido que compõem os tripéptidos **15a-c/15a'-c'** a campos compatíveis de prótons adjacentes a amidas. Verifica-se a ausência do singlete característico do éster metílico, que está concordante com o esperado, resultante da formação do ácido carboxílico, corroborando o sucesso da reação de hidrólise alcalina. Na Tabela 2.28, encontram-se sumariados os resultados obtidos para os prótons mais característicos e correspondentes desvios químicos. A atribuição dos restantes prótons está de acordo com as estrutura esperadas.

Tabela 2.28

Desvios químicos de ^1H -RMN mais característicos para os tripéptidos **15a-c/15a'-c'**.

Sinais	^1H -RMN (δ / ppm)		
	15a/15a'	15b/15b'	15c/15c'
H_L-2	4.72-4.49	4.47-4.30, 4.47-4.30	-
H_G-2	3.99-3.80	4.06-3.94	-
H_V-2	-	-	4.31-4.15
H_A-2	-	-	4.48

Nos espectros obtidos não é possível verificar-se os prótons lábeis das ligações amida, do grupo amina ou do ácido carboxílico uma vez que, devido a baixa solubilidade destes compostos em solventes orgânicos apróticos, foram utilizados solventes deuterados como CH₃OD ou D₂O, permutando com estes prótons.

¹³C-RMN e DEPT: A co-análise dos espectros relativos aos compostos **15a-c/15a'-c'** revelam-se complexos pelas mesmas razões elencadas anteriormente na análise de ¹H-RMN. Contudo, é possível identificar-se alguns padrões, nomeadamente, a presença de picos respeitantes a carbonos quaternários a campos muito baixos, compatíveis com as amidas, CONH, e com o ácido carboxílico, CO₂H. Foi possível distinguir, por DEPT, os carbonos metilénicos dos carbonos C-5, C-6, C-7 e, no caso dos tripéptidos **15a/15a'** e **15b/15b'**, os carbonos secundários do resíduo de L-leucina (C_L-3) e, ainda, do resíduo de glicina (C_G-2). Denota-se adicionalmente a presença dos sinais relativos aos C- α de cada resíduo de α -aminoácido. Na Tabela 2.29, encontram-se sumariados os resultados obtidos para os carbonos mais característicos e correspondentes desvios químicos. A atribuição dos restantes carbonos está de acordo com as estruturas esperadas.

Tabela 2.29

Desvios químicos de ¹³C-RMN mais característicos para os tripéptidos **15a-c/15a'-c'**.

Sinais	¹³ C-RMN e DEPT (δ / ppm)		
	15a/15a'	15b/15b'	15c/15c'
<u>C</u> ONH /	<u>174.32, 173.62, 173.55,</u>	<u>179.70, 170.03,</u>	<u>175.12, 175.05, 175.04, 171.54,</u>
<u>C</u> O ₂ H	<u>171.95, 171.78, 167.36, 167.08</u>	<u>169.93, 169.29, 169.21</u>	<u>171.55, 168.21, 168.16, 168.15</u>
C _L -2	52.60, 52.32	53.81, 53.76	-
C _G -2	<u>40.03, 39.93</u>	<u>42.67, 42.60</u>	-
C _V -2	-	-	62.53, 62.25, 61.39
C _A -2	-	-	43.11, 42.84, 42.35, 42.11
C _L -3	<u>37.88</u>	<u>40.56, 40.54</u>	-
C-5	<u>22.13, 22.07</u>	<u>26.31, 26.29</u>	<u>24.93, 24.89</u>
C-6	<u>25.47, 24.36</u>	<u>24.97</u>	<u>26.77, 26.53, 26.47</u>
C-7	<u>35.65</u>	<u>33.83, 33.81</u>	<u>34.82, 34.71, 33.72, 33.64</u>

Verifica-se a ausência do sinal correspondente ao carbono do grupo metilo da função éster, o que corrobora o sucesso da reação de hidrólise dessa função.

EM: Através da análise dos espectros obtidos para os tripéptidos **15a-c/15a'-c'** é possível identificar-se alguns padrões, nomeadamente a deteção de um pico compatível com o ião *quasi*-molecular, MH^+ , para as estruturas consideradas, m/z esperado = 312.1918 u.m.a.. Verificam-se ainda os picos relativos à perda do sistema prolinomimético bicíclico, $[M-P^*]^+$, e ainda, do próprio sistema bicíclico, $[P^*]^+$. Na Tabela 2.30, encontram-se sumariados os resultados obtidos para a fragmentação mais característica e os correspondentes valores de m/z .

Tabela 2.30

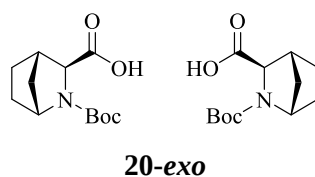
Picos mais característicos de ESI-MS para os tripéptidos **15a-c/15a'-c'**.

Entrada	ESI-MS (m/z / u.m.a.)		
	$[M+H]^+$	$[M-P^*]^+$	$[P^*]^+$
15a/15a'	312.1917	215.1367	96.0817
15b/15b'	312.1925	215.1384	96.0816
15c/15c'	312.1922	215.1380	96.0813

2.4. VIA DE SÍNTESE COMPLEMENTAR PARA A SÉRIE P*LG

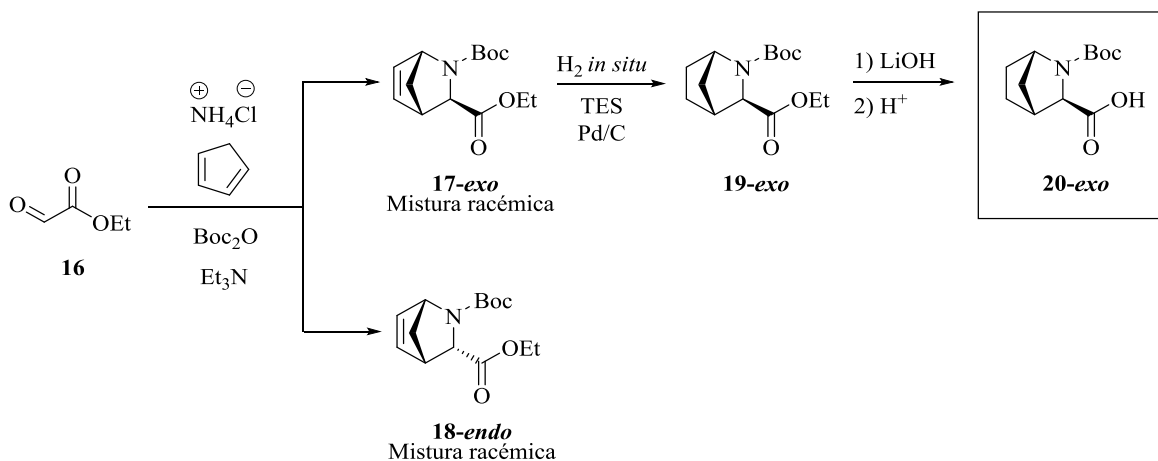
Cumpridos os objetivos sintéticos propostos para este trabalho com sucesso, nomeadamente a síntese das três séries de tripéptidos prolinomiméticos, P*LG, P*GL e P*VA, propôs-se, de forma complementar, o estudo de novos intermediários prolinomiméticos na síntese de análogos da série P*LG.

Este estudo justificou-se na medida em que ofereceu um esforço suplementar na tentativa de separação dos diastereoisómeros obtidos nas séries anteriores pelo uso dos derivados do racemato **4-exo**, esquadrinhando a otimização das condições empregues através de metodologias alternativas. Assim, propôs-se substituir o grupo benzilo como grupo *N*-protetor uma vez que a reação de hidrogenólise conduziu a longos períodos de tempo de reação. Destarte, procedeu-se à síntese de um intermediário análogo ao sistema bicíclico do tipo **4-exo** contendo um grupo *N*-protetor diferente. Tendo em conta a experiência obtida na preparação dos dipéptidos **12a-c**, cuja *N*-desproteção acidolítica com TFA do grupo *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) apresentou-se como uma metodologia de execução prática, rápida (aproximadamente 3h) e com excelentes resultados, elegeu-se este grupo para *N*-proteção no desenho de novos prolinomiméticos do tipo **20-exo**.



Neste contexto, optou-se por realizar um plano sintético partindo do glioxilato de etilo em vez do glioxilato de metilo, de forma a criar cicloadutos contendo um grupo carboxilato de etilo em detrimento aos cicloadutos **4-exo** e **5-endo**, oferecendo um maior efeito estérico que pode ser útil na subsequente hidrólise para alcançar o ácido carboxílico almejado (**20-exo**).

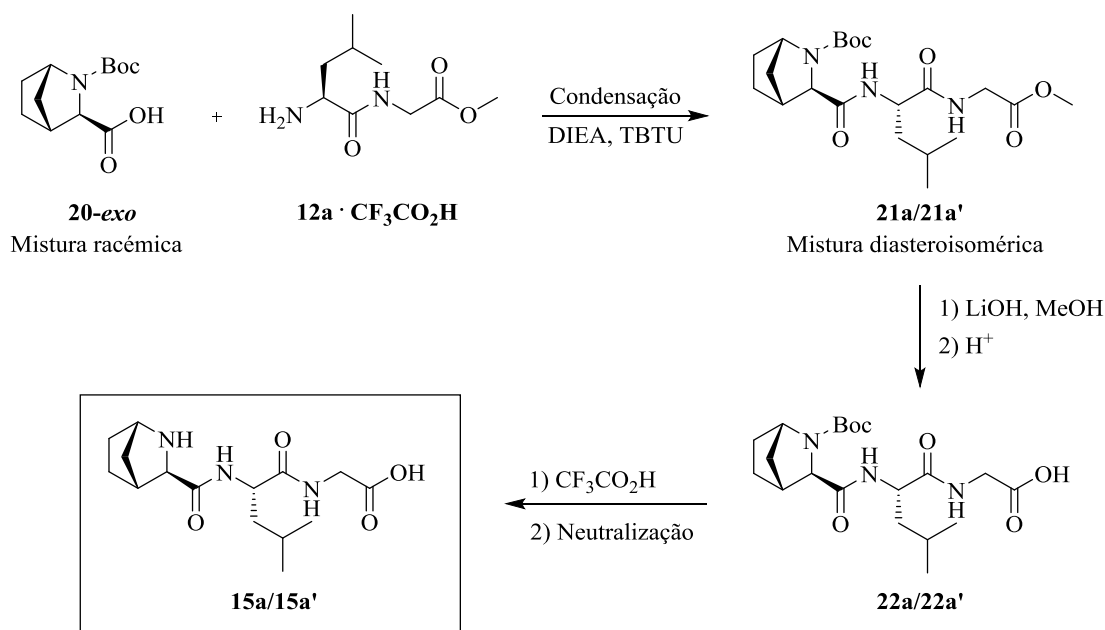
O primeiro passo passa pela formação da amina do sistema 2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carboxilato de etilo *via* reação de aza-Diels-Alder, em meio aquoso, pela reação entre o cloreto de amónio e o glioxilato de etilo (ambos comerciais), para originar *in situ* a respetiva imina protonada do glioxilato de etilo. Em seguida, por adição posterior de ciclopentadieno obtiveram-se os cicloadutos pretendidos. O passo subsequente visou a *N*-proteção com o grupo Boc usando para o efeito anidrido de *tert*-butoxicarbonilo, Boc₂O, na presença de trietilamina, Et₃N (Esquema 2.31).



Esquema 2.31

Via de síntese proposta para a preparação dos cicloadutos prolinomiméticos **20-exo**.

Após a síntese dos prolinomiméticos **20-exo**, pretendeu-se determinar a sua aplicabilidade para obtenção de tripéptidos prolinomiméticos para a série P*LG, testando-se a pertinência no uso destes intermediários para alcançar estes tripéptidos de forma rápida e eficiente (Esquema 2.32).

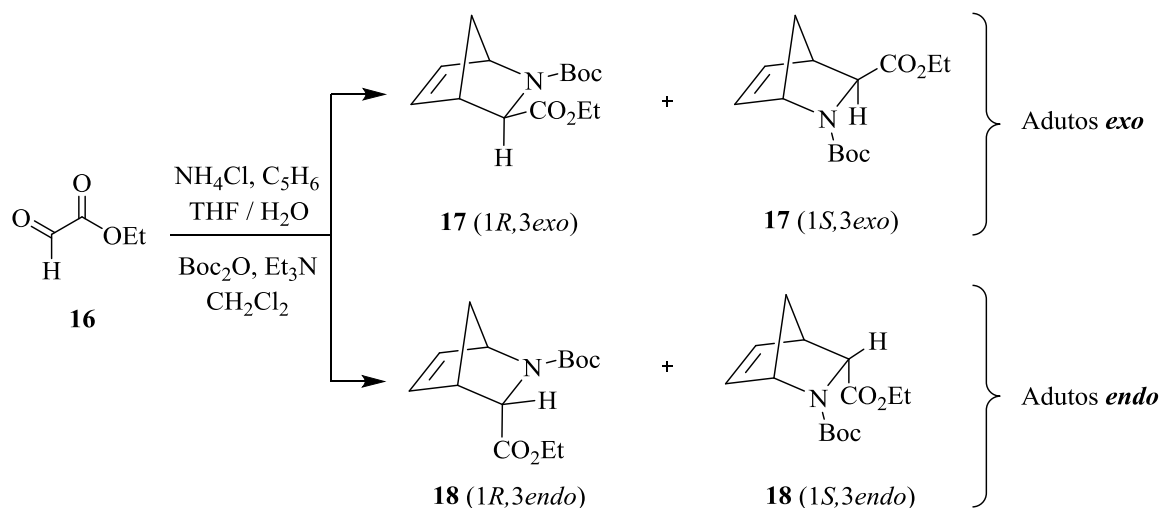


Esquema 2.32

Via de síntese alternativa proposta para a preparação de **15a/15a'**.

2.4.1. Reação de aza-Diel-Alder: síntese dos adutos **17-*exo*** e **18-*endo***

A síntese dos cicloadutos, **17-*exo*** e **18-*endo***, a partir do glioxilato de etilo e do cloreto de amônio para gerar *in situ* o respetivo glioxilato protonado, seguido de adição ao ciclopentadieno, através da reação de aza-Diels-Alder, pode ser descrita pela seguinte equação:



A preparação dos cicloadutos **17-*exo*** e **18-*endo*** foi efetuada mediante dissolução do glioxilato de etilo (**16**) numa mistura equivolumétrica de THF/ H_2O e, em seguida, adicionou-se cloreto de amônio para gerar, *in situ*, a imina protonada do glioxilato de etilo. Por último, adicionou-se CPD recentemente bidestilado, mantido a 0°C , mediante banho de gelo. Deixou-se a mistura reacional em agitação magnética, durante 21h, à temperatura ambiente.

A mistura foi lavada com AcOEt e ajustou-se o pH da fase aquosa para 9 com recurso a solução saturada de NaHCO_3 e solução de KOH 1M. Tal procedimento justifica-se na medida em que os cicloadutos no final da reação encontram-se sob a forma de amina protonada, assim o tratamento com solução KOH 1M, até $\text{pH} \approx 9$, providencia a obtenção da amina maioritariamente na sua forma neutra, sendo neste momento possível a sua extração com solventes orgânicos.

Verificou-se que, a solução anteriormente incolor, desenvolveu progressivamente, uma tonalidade cor de vinho durante a adição de KOH à fase aquosa. Em seguida, procedeu-se à extração com CH_2Cl_2 , reuniram-se as fases orgânicas e secou-se com Na_2SO_4 anidro. Filtrou-se a suspensão obtida e concentrou-se o filtrado à secura. O óleo cor de vinho obtido foi diluído com CH_2Cl_2 e adicionou-se Boc_2O e Et_3N , deixando-se a reagir durante 24h. A Et_3N reveste-se de grande importância na medida em que torna a amina mais reativa frente ao anidrido pela remoção do protão lábil da amina secundária do biciclo. A mistura resultante foi concentrada à secura alcançando-se um óleo castanho que foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna de gel de SiO_2 , usando-se como eluente Hex/AcOEt (3:1), recolhendo-se um primeiro grupo de frações correspondentes aos adutos maioritários, **17-*exo*** (72%), um grupo de frações da mistura **17-*exo*/18-*endo***, enriquecida em **18-*endo***, e por último, as frações do aduto minoritário, **18-*endo*** (22%).

A análise estrutural dos racematos **17-exo** e **18-endo** foi realizada mediante espectroscopia de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT e IV e, por espectrometria de massa, ESI-MS (**secção 3.2.6.**). Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para os compostos.

IV: Os espectros obtidos para os cicloadutos **17-exo** e **18-endo**, revelam a presença de bandas de estiramento $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$, concordantes a presença da olefina entre os carbonos C-5 e C-6. Verificam-se bandas de estiramento $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ e, ainda, duas banda de estiramento C=O , como esperado, uma respeitante ao éster etílico e outra ao carbamato do grupo Boc. Em seguida, apresentam-se os dados relativos às bandas mais características, sumariados na Tabela 2.31.

Tabela 2.31

Bandas de IV mais características para os cicloadutos **17-exo** e **18-endo**.

Entrada	IV / cm^{-1}		
	$\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H (str)}$	$\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H (str)}$	C=O (str)
17-exo	3069.16	2977.55, 2934.16	1748.16, 1698.02
18-endo	3072.05	2978.52, 2933.20	1753.94, 1730.80

^1H -RMN: Pela análise dos espectros obtidos para os cicloadutos **17-exo** e **18-endo**, é possível identificar-se alguns padrões, nomeadamente a presença de sinais relativos aos prótons $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$, H-5 e H-6, a campos baixos. Verifica-se, ainda, um quarteto e um tripleto característicos do éster etílico, comprovando a sua presença na estrutura. De acrescentar a presença de um singlete a campos altos, cuja integração é compatível com a presença do grupo Boc, corroborando o sucesso de síntese destes cicloadutos. Na Tabela 2.32, encontram-se sumariados os resultados obtidos para os prótons mais característicos e correspondentes desvios químicos. A atribuição dos restantes prótons está de acordo com as estruturas esperadas.

Tabela 2.32

Desvios químicos de ^1H -RMN mais característicos para os cicloadutos **17-exo** e **18-endo**.

Sinais	^1H -RMN (δ / ppm)	
	17-exo	18-endo
H-3	2.28	3.36
H-5	6.65 – 6.26	6.06
H-6	6.65 – 6.26	6.51
H-7_{syn}	1.99	1.69 – 1.55
CH_2	4.15	4.00 – 4.17
CH_3	1.29	1.21
Boc	3.59 – 3.37	4.37

Verifica-se que estes espectros exibem duplicação de alguns sinais. Note-se que, o desvio químico do próton H-3 no racemato **17-*exo*** surge a campos relativamente mais altos ($\delta = 3.59 - 3.37$ ppm) comparativamente com o mesmo próton no racemato **18-*endo*** ($\delta = 4.37 - 4.19$ ppm). De acrescentar que próton H-7_{syn} do racemato **17-*exo*** encontra-se mais desprotegido ($\delta = 1.99$ ppm), pela maior proximidade do grupo éster, em comparação com o mesmo próton do racemato **18-*endo*** que surge praticamente sobreposto com o H-7_{anti} ($\delta = 1.69 - 1.55$ ppm).

No espectro do racemato **17-*exo*** verifica-se a presença de dois sinais para o grupo $-\text{CH}_2$ que se apresentam como dois quartetos sobrepostos com $J = 7.0$ Hz, encontrando-se acoplados com os prótons do grupo $-\text{CH}_3$, um triplete com $J = 7.0$ Hz, como se pode constatar na Figura 2.8. A multiplicidade destes sinais, as constantes de acoplamento, a integração e os desvios químicos que apresentam são compatíveis com a presença do éster etílico (Tabela 2.32). No caso do racemato **17-*endo***, o sinal relativo ao $-\text{CH}_2$ apresenta-se sob a forma de um multipeto complexo, não sendo tão clara esta observação.

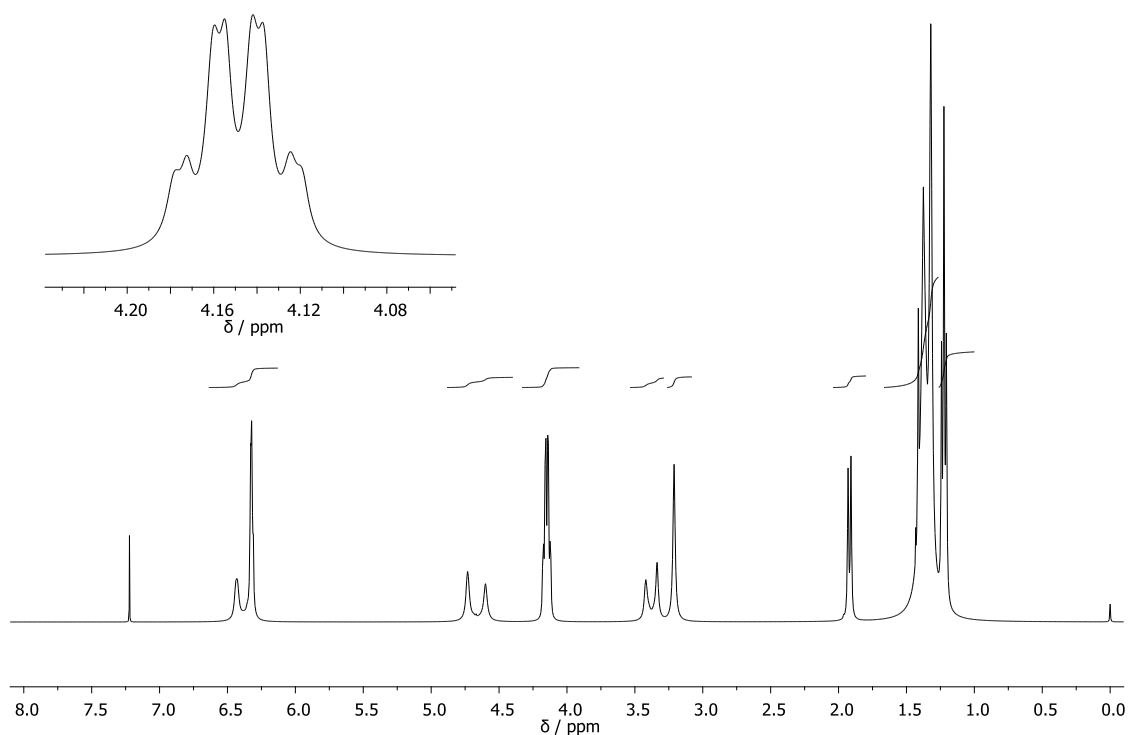


Figura 2.8

Espectro de ¹H-RMN do racemato **17-*exo*** evidenciando duplicação de sinais.

^{13}C -RMN e DEPT: Através da co-análise dos espectros obtidos para os cicloadutos **17-*exo*** e **18-*endo***, é possível identificar-se alguns padrões, nomeadamente a presença de um pico respeitante a um carbono quaternário a campos muito baixos, compatível com o éster etílico, $-\text{CO}_2\text{Et}$, e ainda, dois carbonos quaternários característicos do grupo Boc; constata-se a presença do pico relativo aos carbonos $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ do grupo Boc. Esta análise revela os sinais correspondentes aos carbonos $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$ da olefina entre os carbonos C-5 e C-6; cumulativamente constata-se a presença do carbono do grupo $-\text{CH}_3$ do éster etílico e ainda é possível distinguir inequivocamente o carbonos $-\text{CH}_2$ do éster etílico e da ponte metilénica do sistema biciclo, C-7, a campos relativamente mais altos. Na Tabela 2.33, encontram-se sumariados os resultados obtidos para os carbonos mais característicos e correspondentes desvios químicos. A atribuição dos restantes carbonos está de acordo com as estruturas esperadas.

Tabela 2.33

Desvios químicos de ^{13}C -RMN mais característicos para os cicloadutos **17-*exo*** e **18-*endo***.

Sinais	^{13}C -RMN e DEPT (δ / ppm)	
	17- <i>exo</i>	18- <i>endo</i>
$\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	<u>171.61</u>	<u>170.64</u>
Boc	<u>155.78, 154.63, 79.87</u>	<u>153.81, 79.85</u>
$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	28.31	28.47
C-5	137.19 / 136.25	136.75
C-6	137.19 / 136.25	134.03
$\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	<u>61.03</u>	<u>60.75</u>
$\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	14.23	14.34
C-7	<u>45.48, 45.19</u>	<u>49.70</u>

COSY/HSQC: A análise destes espectros bidimensionais permitiu esclarecer algumas ambiguidades na atribuição dos protões na estrutura esperada, como por exemplo os sinais relativos aos H-5 e H-6 e respetivos carbonos, C-5 e C-6. Foi possível identificar-se claramente o H-4 pela interação que possui com os protões H-3, H-5 e H-7 e, a partir daí, tornou-se mais fácil a atribuição dos restantes protões e respetivos carbonos nas estruturas esperadas. Estas análises revelaram ser muito úteis também no esclarecimento da duplicação dos picos observados para a maior parte dos sinais e a sua atribuição na estrutura esperada para estes compostos.

EM: Através da análise dos espectros obtidos para os cicloadutos **17-exo** e **18-endo** é possível identificar-se alguns padrões, nomeadamente a deteção de um pico compatível com o ião molecular formando um aduto com Na^+ , $[\text{M}+\text{Na}]^+$, para as estruturas consideradas, m/z esperado = 290.1363 u.m.a.. Verificam-se ainda os picos relativos à perda do grupo ^tBu , $[\text{M}-^t\text{Bu}]^+$, e ainda, da descarboxilação subsequente, culminando na formação do ião respetivo, $[\text{M}-\text{Boc}]^+$. Para além destes picos, nota-se um pico referente ao sistema bicíclico, $[\text{P}^*]^+$, resultante da clivagem do grupo Boc e ainda da α -clivagem do éster etílico; também é possível verificar-se o pico referente ao fragmento do éster etílico, $[\text{CO}_2\text{Et}]^+$. Na Tabela 2.34, encontram-se sumariados os resultados obtidos para a fragmentação mais característica e os correspondentes valores de m/z .

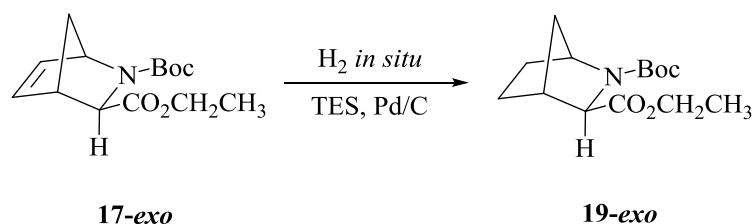
Tabela 2.34

Picos mais característicos de ESI-MS para os cicloadutos **17-exo** e **18-endo**.

Entrada	ESI-MS (m/z / u.m.a.)				
	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	$[\text{M}-^t\text{Bu}]^+$	$[\text{M}-\text{Boc}]^+$	$[\text{P}^*]^+$	$[\text{CO}_2\text{Et}]^+$
17-exo	290.1352	234.0735	190.0814	95.0493	77.0371
18-endo	290.1352	234.0735	190.0829	95.0491	77.0410

2.4.2. Síntese de ($\pm$)-exo-2-(*tert*-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxilato de etilo (**19-exo**)

A reação de hidrogenação dos cicloadutos **17-exo** para obtenção dos correspondentes cicloalcanos **19-exo**, pode ser descrita pela seguinte equação:



Optou-se por realizar a redução da insaturação presente entre os carbonos C-5 e C-6 do sistema bicíclico, através de formação de hidrogénio molecular *in situ*, usando para o efeito TES (trietilsilano) na presença de Pd/C, de acordo com o procedimento descrito por Mandal e McMurray,³⁰⁰ uma vez que está descrita a saturação de olefinas de forma rápida (aproximadamente 10 min) e eficiente.

³⁰⁰Mandal, P. K.; McMurray, J. S. J. *Org. Chem.* **2007**, 72, 6599-6601.

Para tal, dissolveu-se a mistura dos cicloadutos **17-exo** num balão de fundo redondo em MeOH seco e, em seguida, adicionou-se uma suspensão de Pd/C 10% no mesmo solvente, num sistema contendo um funil de adição equilibrador de pressão, previamente purgado com H₂. Colocou-se a suspensão em agitação magnética à temperatura ambiente e adicionou-se, gota-a-gota, TES. Verificou-se quase de imediato a formação de efervescência, denotando a produção de hidrogénio molecular. No topo do funil de adição equilibrador de pressão colocou-se um balão de forma a acompanhar o desenvolvimento da formação de H₂.

Ao fim de 10 min de reação evaporou-se o MeOH com recurso a pressão reduzida e procedeu-se à eliminação do catalisador por filtração em camada de celite sob pressão reduzida, com lavagens de CH₂Cl₂. Eliminou-se o solvente à secua obtendo-se um óleo amarelo claro. Procedeu-se à purificação do composto pretendido através de cromatografia líquida de adsorção em coluna de gel de SiO₂, utilizando como eluente Hex/AcOEt (3:1). Obteve-se de um óleo amarelo claro que se identificou como sendo os cicloalcanos **19-exo**, com rendimento quantitativo.

A análise estrutural de **19-exo** foi realizada mediante espectroscopia de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT e IV e, por espectrometria de massa, ESI-MS (**secção 3.2.7.**). Os resultados obtidos permitiram confirmar a estrutura esperada.

IV: O espectro obtido para os cicloadutos **19-exo**, revela a ausência de bandas de estiramento C_{sp²}-H, concordantes a estrutura esperada, corroborando o sucesso da redução da insaturação entre os carbonos C-5 e C-6, em comparação com os dados espectroscópicos homólogos para os cicloadutos **17-exo**. Verificam-se bandas de estiramento C_{sp³}-H a 2977.55, 2930.31 e 2877.27 cm⁻¹ e, ainda, duas banda de estiramento C=O, como esperado, uma respeitante ao éster metílico e outra ao carbamato do grupo Boc, a 1751.05 e 1697.05 cm⁻¹.

¹H-RMN: Pela análise do espectro obtido para os cicloadutos **19-exo**, é possível verificar-se a duplicação de alguns sinais, contudo nota-se a ausência de sinais relativos a protões C_{sp²}-H e o surgimento de novos sinais a campos altos, cuja integração é compatível com a presença dos quatro protões, H-5 e H-6, corroborando o sucesso de síntese destes cicloadutos. Constata-se o sinal do -CH₂ sobreposto com o H-3 a $\delta = 4.27 - 4.11$ ppm e, o H-4, a $\delta = 2.78$ ppm. De acrescentar a presença dois singletos a campos altos ($\delta = 1.46$ e 1.40 ppm), compatíveis com a presença do grupo Boc e, ainda, dois tripletos a $\delta = 1.29$ e 1.28 ppm, ambos com $J = 7.1$ Hz, característico dos grupos metilo do éster etílico. A atribuição dos restantes protões está de acordo com a estrutura esperada.

¹³C-RMN e DEPT: Através da co-análise dos espectros obtidos para os cicloadutos **19-exo**, é possível identificar-se a presença de dois picos respeitantes a carbonos quaternários a campos muito baixos ($\delta = 171.08$ e 170.49 ppm), compatível com o éster etílico, -CO₂Et, e ainda dois os carbonos quaternários característicos do grupos Boc ($\delta = 153.68$, 153.03 e 79.44 ppm); constata-se a presença do pico relativo aos carbonos -C(CH₃)₃ do grupo Boc a $\delta = 28.47$ e 28.29 ppm.

Verifica-se a ausência de sinais correspondentes a carbonos C_{sp^2} -H, de acordo com o esperado, comprovando a eficácia da redução; estas análises evidenciam a presença do carbono do grupo $-CH_3$ do éster etílico a $\delta = 14.33$ e 14.21 ppm e é ainda possível distinguir-se, inequivocamente, o carbono $-CH_2$ do éster etílico ($\delta = 60.62$ ppm), da ponte metilénica do sistema biciclo, C-7, a campos relativamente mais altos ($\delta = 39.03$ e 38.86 ppm), bem como dois novos sinais relativos a carbonos secundários, concordantes com a saturação dos carbonos C-5 e C-6 ($\delta = 23.61$ e $29.83, 29.71$ ppm, respetivamente). A atribuição dos restantes carbonos está de acordo com a estrutura esperada.

EM: Detetou-se a presença de um pico a $m/z = 308.12416$ u.m.a., compatível com o aduto da molécula-alvo com potássio, $[M+K]^+$, m/z esperado = 308.12587 u.m.a.; um pico a $m/z = 292.15031$ u.m.a., compatível com o aduto da molécula-alvo com sódio, $[M+Na]^+$, m/z esperado = 292.15193 u.m.a. e, ainda, um pico a $m/z = 270.16845$ u.m.a., compatível com o ião *quasi*-molecular, MH^+ , m/z esperado = 270.16998 u.m.a. (Figuras 2.9 e 2.10).

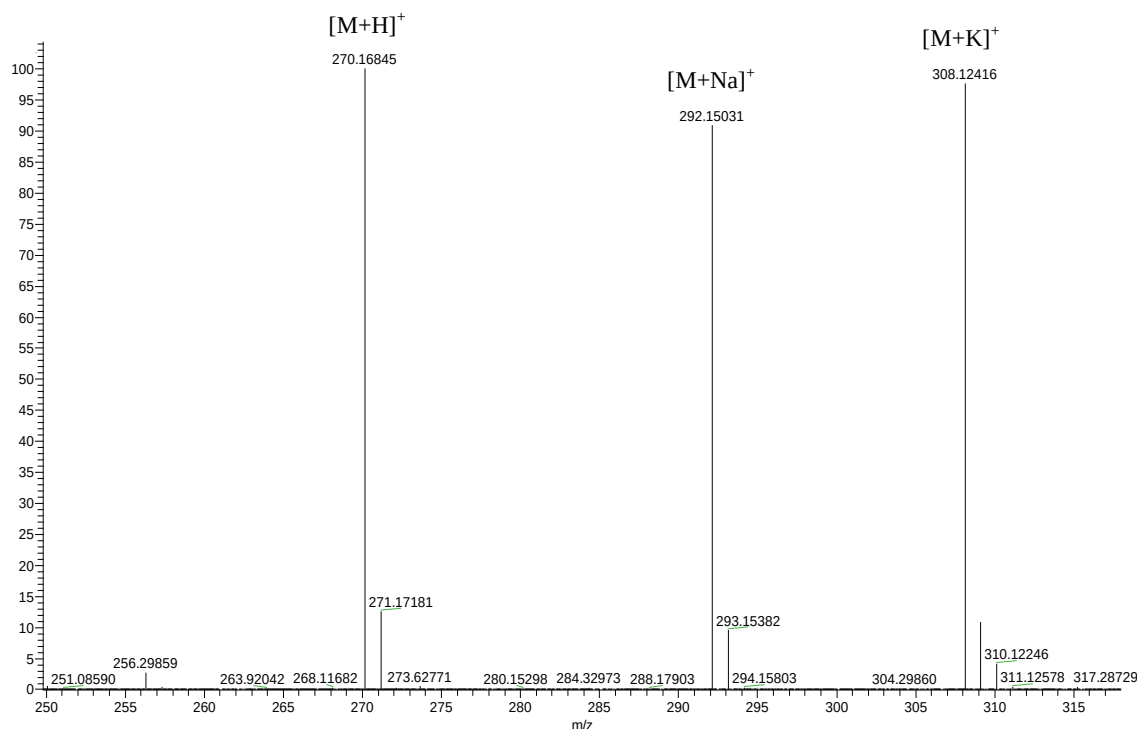


Figura 2.9

Espectro de massa (ESI-MS) do cicloaduto **19-exo**.

O subsequente estudo de fragmentação do ião MH^+ revelou a perda do grupo tBu (MS^2) com evidência do ião $[M-tBu]^+$, seguido de descarboxilação (MS^3), resultando no fragmento desprovido do grupo Boc, $[M-Boc]^+$, o sistema 2-azabiciclo[2.2.1]heptano-3-carboxilato de etilo.



Estudo de fragmentação de **19-exo** por ESI-MSⁿ: (A) MS²; (B) MS³.

lico (20-*exo*)

aminoácidos **20-*exo***, pode ser descrita pela seguinte equação:



de 84%.

permitiram confirmar a estrutura esperada.

IV: O espectro obtido para os cicloadutos **20-exo**, revela uma banda de estiramento intensa e larga entre 3700 e 2900 cm^{-1} característico do estiramento COO-H que, juntamente com a presença de bandas de estiramento C=O, evidenciam a existência da função ácido carboxílico, concordante a estrutura esperada, corroborando o sucesso da hidrólise do éster etílico. Nota-se a presença de quatro bandas de estiramento C=O, o que provavelmente deve-se a uma duplicação das bandas de estiramento do carbamato do grupo Boc e do ácido carboxílico (CO_2H). Verificam-se, cumulativamente, bandas de estiramento $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ a 2971.77, 2923.56 e 2877.27 cm^{-1} .

^1H -RMN: Pela análise do espectro obtido para os cicloadutos **20-exo**, é possível verificar-se de um singlete largo a campos baixos ($\delta = 9.27$ ppm), corroborando a presença do próton da função ácido carboxílico, $-\text{CO}_2\text{H}$. Constata-se o efeito de desproteção do próton H-3 que se localiza a campos mais baixos ($\delta = 4.42 - 4.22$ ppm), relativamente aos dados espectroscópicos homólogos obtidos para este próton respeitante aos cicloadutos **19-exo** (secção 2.4.2.), estando de acordo com a proximidade ao $-\text{CO}_2\text{H}$. O próton H-4 surge como um singlete a $\delta = 2.81$ ppm e, verifica-se ainda, o singlete característico do grupo Boc a campos altos, $\delta = 1.43$ ppm. A atribuição dos restantes prótons está de acordo com a estrutura esperada.

^{13}C -RMN e DEPT: Através da co-análise dos espectros obtidos para os cicloadutos **20-exo**, é possível identificar-se a presença de dois picos respeitantes a carbonos quaternários a campos muito baixos ($\delta = 174.15$ e 173.87 ppm), compatível com o ácido carboxílico, $-\text{CO}_2\text{H}$, e ainda dois pares de carbonos quaternários característicos dos grupos Boc ($\delta = 154.47, 154.17$ e $79.49, 79.39$ ppm); constata-se a presença do pico relativo aos carbonos $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ do grupo Boc a $\delta = 27.47$ e 27.29 ppm. É possível distinguir inequivocamente os carbonos $-\text{CH}_2$ da ponte metilénica do sistema bicíclico, C-7, a ($\delta = 38.46$ e 38.34 ppm), e os carbonos secundários, C-5 ($\delta = 23.15$ e 23.10 ppm) e C-6 ($\delta = 29.04$ e 29.00 ppm). Note-se a ausência dos sinais relativos ao éster etílico, nomeadamente o pico relativo ao seu carbono secundário, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, a campos baixos e do seu grupo metilo, $-\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, a campos altos. A atribuição dos restantes carbonos está de acordo com a estrutura esperada.

EM: Detetou-se a presença de um pico a $m/z = 248.14582$ u.m.a., compatível com o aduto da molécula-alvo com lítio, $[\text{M}+\text{Li}]^+$, m/z esperado = 248.14686 u.m.a. (Figura 2.11). O subsequente estudo de fragmentação do ião MH^+ evidenciou a perda do grupo ^tBu (MS^2) com evidência do ião $[\text{M}-^t\text{Bu}]^+$, seguido de descarboxilação (MS^3), resultando no fragmento desprovido do grupo Boc, $[\text{M}-\text{Boc}]^+$, o ácido 2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico.

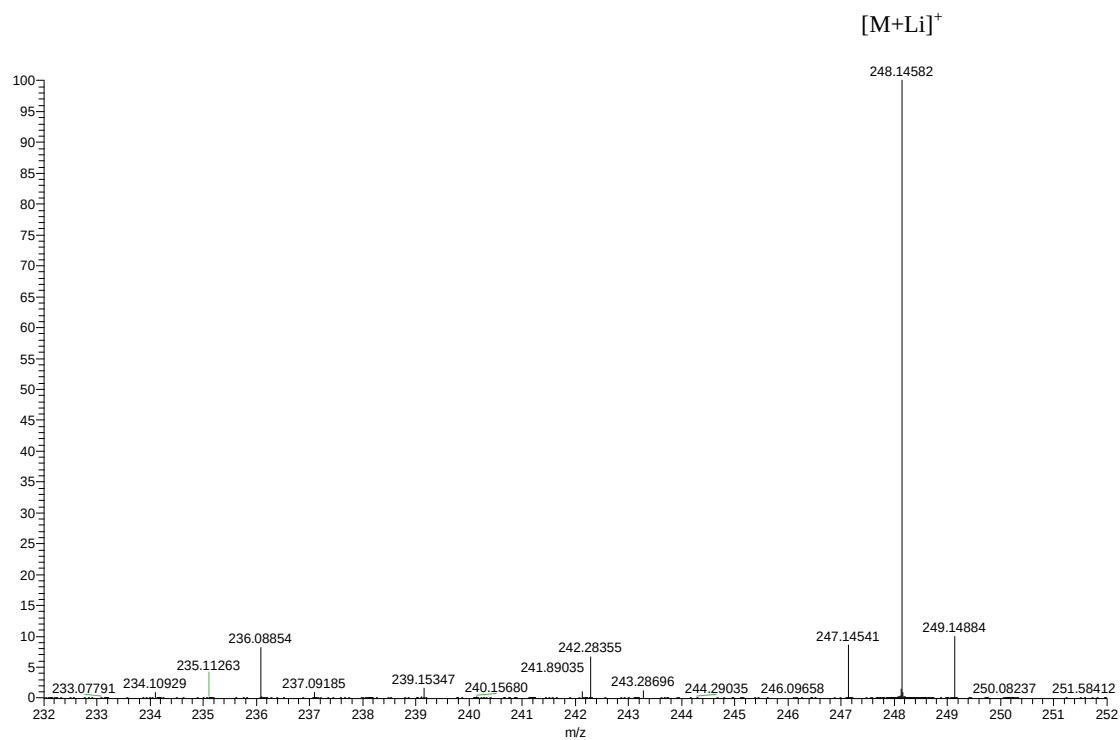


Figura 2.11

Espectro de massa (ESI-MS) do cicloaduto **20-exo**.

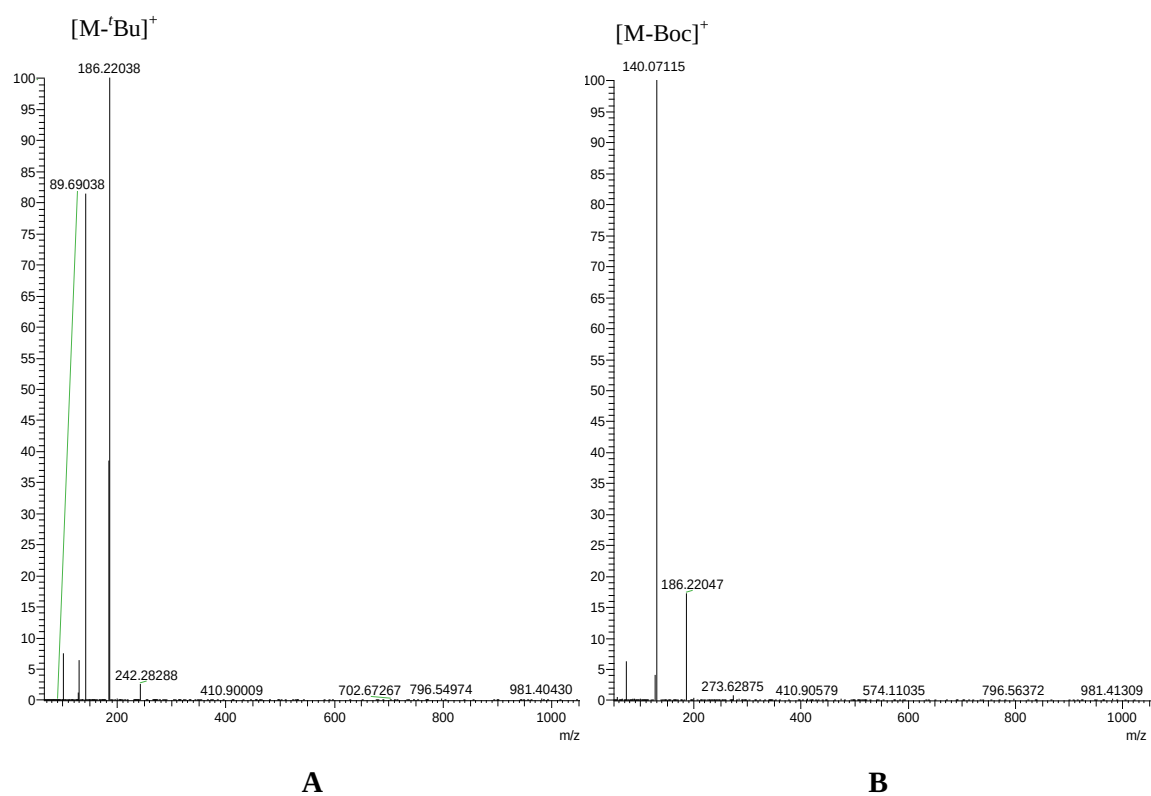


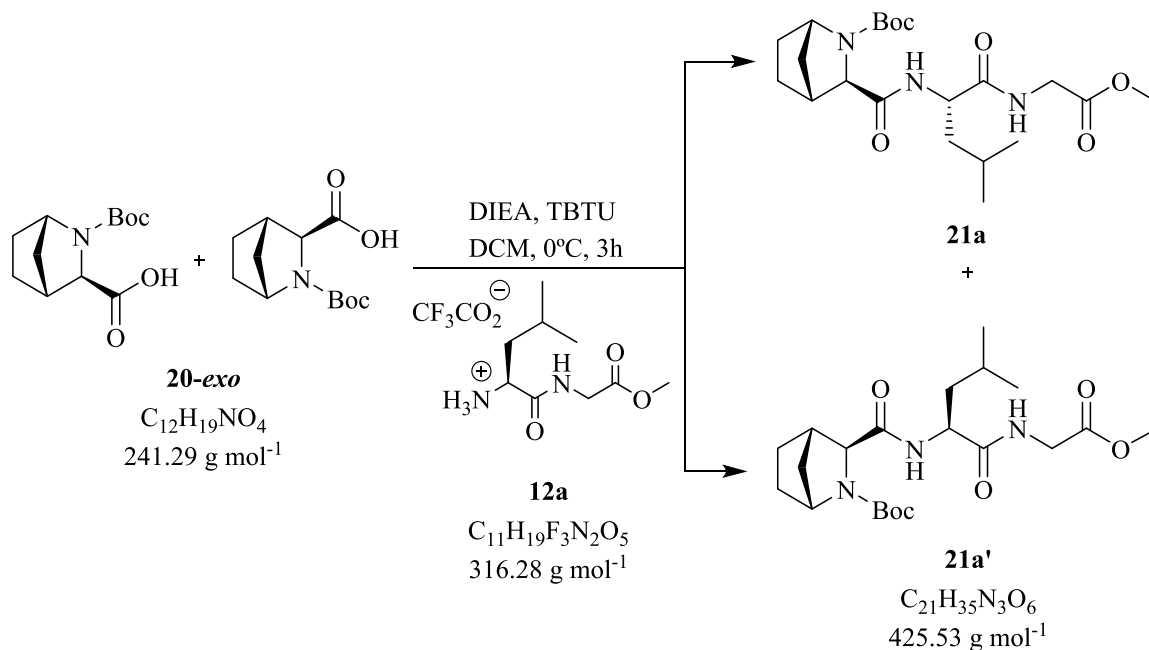
Figura 2.12

Estudo de fragmentação de **20-exo** por ESI-MSⁿ: (A) MS²; (B) MS³.

2.4.4. Via de síntese alternativa para o tripéptido 15a/15a'

2.4.4.1. Síntese dos tripéptidos 21a/21a'

A reação de acoplamento dos prolinomiméticos **20-exo** com o dipéptido **12a** para obtenção dos correspondentes tripéptidos **21a/21a'**, pode ser descrita pela seguinte equação:



A obtenção dos tripéptidos **21a/21a'** corresponde, de acordo com o plano de trabalhos apresentados na **secção 2.4.**, ao primeiro passo sintético do Esquema 2.32. Estes compostos foram preparados através da reação de condensação peptídica entre os prolinomiméticos **20-exo** e o correspondente dipéptido, **12a**, usando o TBTU como agente de acoplamento, segundo o procedimento descrito para a preparação dos dipéptidos **11a-c** (**secção 2.3.8.**). Fez-se o tratamento corrente e procedeu-se em seguida à purificação dos tripéptidos preparados, recorrendo-se à cromatografia de adsorção em coluna de gel de SiO_2 usando como eluente AcOEt, obtendo-se um sólido verde cristalino que foi recristalizado numa mistura de AcOEt/ Et_2O (1:5), alcançando-se um excelente rendimento (90%), superior ao acoplamento realizado para os precursores **13a/13a'** (74-76%).

Tentou-se proceder à separação cromatográfica dos diastereoisómeros sintetizados mediante técnicas cromatográficas, testando para o efeito vários solventes ou mistura de solventes como eluente. Estas tentativas foram infrutíferas, pelo que se usou a mistura de diastereoisómeros nas reações subsequentes de forma a que, em etapas ulteriores, fosse possível a separação dos diastereoisómeros.

A análise estrutural dos tripéptidos **21a/21a'** (**secção 3.3.6.**), foi realizada mediante espectroscopia de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT e IV e, por espectrometria de massa, ESI-MS. Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para os compostos.

IV: Apresentam-se, em seguida, as bandas mais relevantes obtidas para os tripéptidos **21a/21a'**, nomeadamente a presença de uma banda de estiramento CON-H, concordante com as ligações amida a 3273.57 cm^{-1} . Verificam-se, ainda, quatro bandas de estiramento C=O, compatíveis tanto com a presença das amidas como do éster metílico e do carbamato do grupo Boc a 1746.65 , 1746.23 , 1696.09 e 1649.80 cm^{-1} . Constata-se, adicionalmente, a presença de bandas de estiramento $C_{sp^3}\text{-H}$ a 2954.41 , 2930.31 e 2871.49 cm^{-1} . Estes resultados estão concordantes com a estrutura esperada para estes tripéptidos.

^1H -RMN: A análise do espectro relativo aos tripéptidos **21a/21a'** revela-se complexa na medida em que se trata de uma mistura dos dois diastereoisómeros, verificando-se ainda a presença de rotâmeros. É possível identificar-se a presença dos prótons das ligações peptídicas (CONH) a campos baixos ($\delta = 7.57$, 6.88 , 6.60 , e 6.41 ppm). Constata-se a presença dos H- α dos resíduos de aminoácido L-leucina e glicina, $H_L\text{-}2$ e $H_G\text{-}2$, a campos compatíveis de prótons adjacentes a amidas ($\delta = 4.70 - 4.49$ e $4.14 - 3.89\text{ ppm}$, respetivamente). Esta análise revela ainda a presença de dois pares de singletos com valores quase coincidentes, característicos do grupo éster metílico, comprovando a presença dos diastereoisómeros e dos respetivos rotâmeros a $\delta = 3.73$, 3.73 , 3.70 e 3.70 ppm . Verifica-se, ainda, dois singletos característicos de dois grupos Boc, a $\delta = 1.43$ e 1.42 ppm . A atribuição dos restantes prótons está de acordo com as estruturas esperadas.

^{13}C -RMN e DEPT: A co-análise dos espectros relativos aos compostos **21a/21a'** revelam-se complexos pelas mesmas circunstâncias elencadas anteriormente na análise de ^1H -RMN. Contudo, é possível identificar-se quatro picos respeitantes a carbonos quaternários a campos muito baixos, compatíveis com as amidas, CONH, e com o éster metílico, CO₂CH₃ a $\delta = 172.15$, 171.19 , 170.01 e 169.95 ppm . Constata-se, ainda, a presença de picos relativos aos carbonos quaternários característicos do grupo Boc ($\delta = 155.48$, 81.24 e 80.55 ppm); assim como um pico intenso a $\delta = 28.24\text{ ppm}$ relativo ao 'Bu do mesmo grupo, -C(CH₃)₃. Denota-se a presença de picos relativos aos carbonos -CH₃ dos ésteres metílicos, a $\delta = 52.25$ e 52.11 ppm . Foi possível distinguir, por DEPT, os carbonos metilénicos do sistema bicíclico, C-5, C-6 e C-7, a $\delta = 23.20$, 23.07 ; 30.30 , 29.75 e 39.23 , 39.01 ppm , respetivamente. Identificaram-se também os carbonos metilénicos relativos aos resíduos de L-leucina ($C_L\text{-}3$), a $\delta = 40.50\text{ ppm}$ e, de glicina ($C_G\text{-}2$), a $\delta = 41.15$ e 41.06 ppm , bem como a presença do C- α do resíduo de L-leucina ($C_L\text{-}2$), a $\delta = 51.17$ e 50.90 ppm . A atribuição dos restantes carbonos está de acordo com as estruturas esperadas.

COSY/HSQC: A atribuição inequívoca dos prótons e dos carbonos só foi possível pela análise destes espectros bidimensionais, na medida em que, por exemplo, na atribuição dos picos relativos aos carbonos C-7, $C_G\text{-}2$ e $C_L\text{-}3$, ambos apresentam-se em DEPT como carbonos metilénicos, possuindo desvios químicos muito semelhantes, entre $\delta = 41.15$ e 39.01 ppm , pelo que a atribuição destes carbonos teve de ser suportada por HSQC.

Também no que se refere à atribuição dos carbonos C_L-2 e do grupo $-CH_3$ do éster metílico, visto apresentarem desvios muito próximos (entre $\delta = 52.25$ e 50.90 ppm), apenas por HSQC foi possível a atribuição inequívoca destes picos. Destarte, foi possível atribuir corretamente os picos observados aos respectivos carbonos.

EM: Detetou-se a presença de um pico a $m/z = 873.49357$ u.m.a., compatível com o aduto de duas moléculas-alvo com sódio, $[2M+Na]^+$, m/z esperado = 873.49439 u.m.a.; a presença de um pico a $m/z = 464.21430$ u.m.a., compatível com o aduto da molécula-alvo com potássio, $[M+K]^+$, m/z esperado = 464.21574 u.m.a.; um pico a $m/z = 448.24113$ u.m.a., compatível com o aduto da molécula-alvo com sódio, $[M+Na]^+$, m/z esperado = 448.24181 u.m.a.; e, ainda, um pico a $m/z = 426.25986$ u.m.a. relativo o ião *quasi*-molecular, MH^+ , m/z esperado = 426.26016 u.m.a (Figura 2.13).

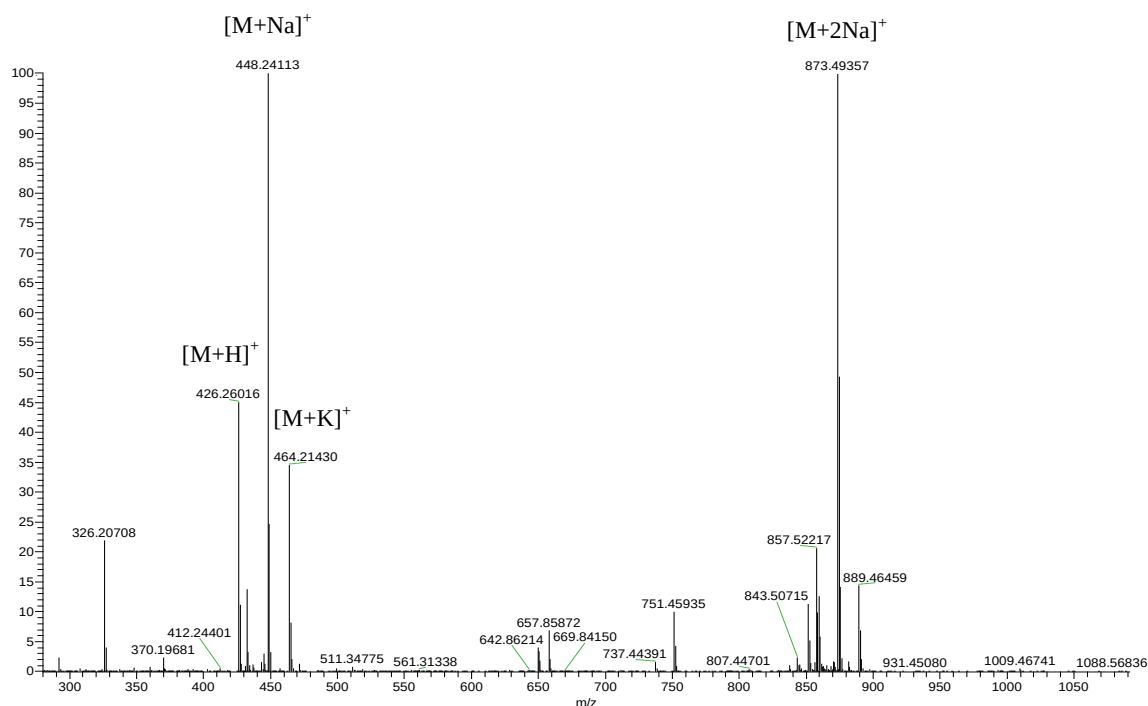


Figura 2.13

Espectro de massa (ESI-MS) dos tripéptidos **21a/21a'**.

O subsequente estudo de fragmentação do ião $[M+Na]^+$ revelou a perda do grupo 'Bu (MS^2), com evidência do ião $[M-'Bu]^+$, e ainda, o fragmento desprovido do grupo Boc, $[M-Boc]^+$, o sistema 2-azabíciclo[2.2.1]heptano-3-carbonil-L-leucilglicinato de metilo (Figura 2.14).

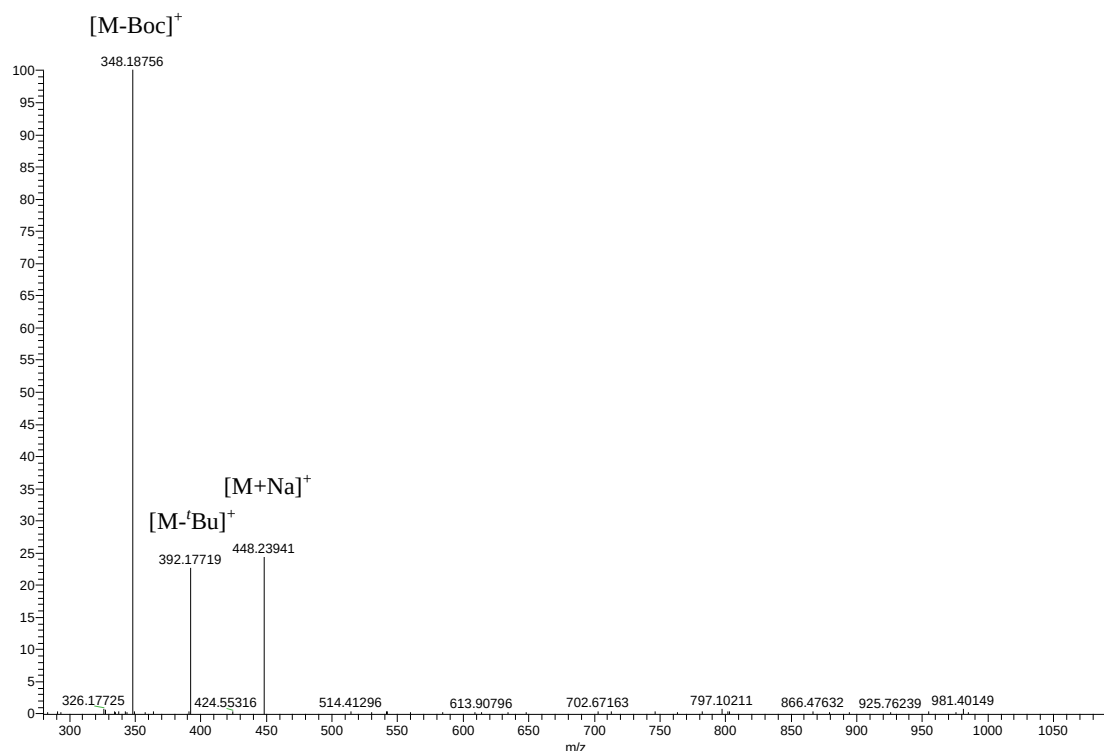
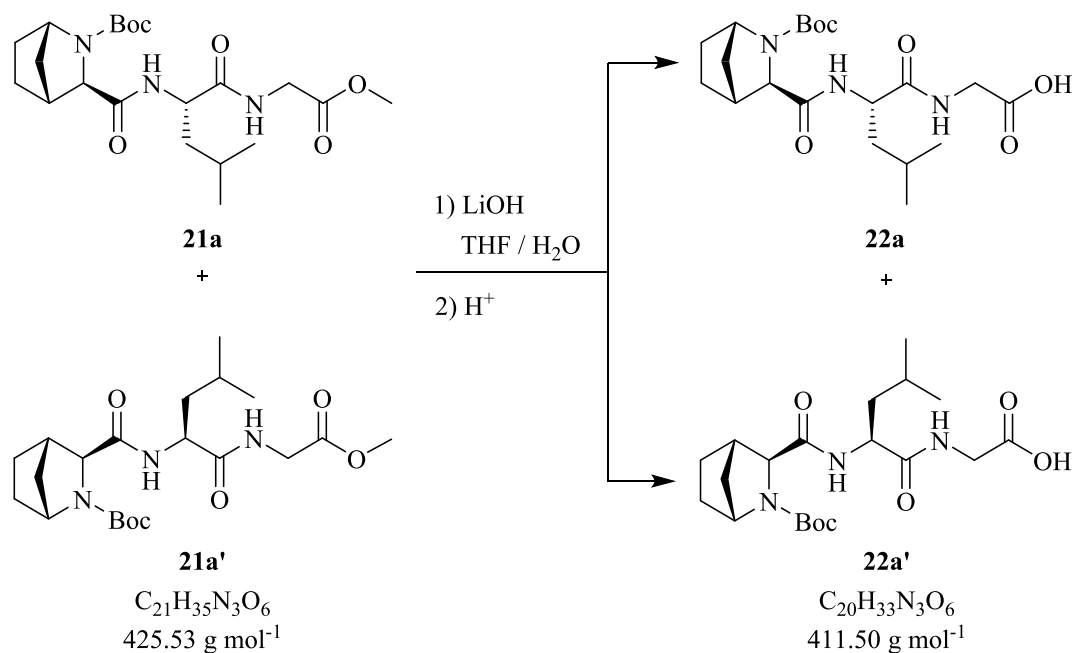


Figura 2.14

Estudo de fragmentação de **21a/21a'** por ESI-MS².

2.4.4.2. Síntese dos tripéptidos **22a/22a'**

A reação de hidrólise alcalina dos tripéptidos **21a/21a'**, para obtenção dos correspondentes tripéptidos **22a/22a'**, pode ser descrita pela seguinte equação:



A obtenção dos tripéptidos **22a/22a'** corresponde, de acordo com o plano de trabalhos apresentados na **secção 2.4.**, ao segundo passo sintético do Esquema 2.32.

Estes compostos foram preparados segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **7-exo** e de **8-exo** (**secção 2.2.4.4.**), contudo, verificou-se que o composto apresentava pouca solubilidade na mistura THF/H₂O, tendo-se procedido à alteração do solvente nesta reação para MeOH. O único inconveniente desta alteração de solvente depreende-se com a dificuldade em dissolver o LiOH, todavia este aspeto pode ser obviado recorrendo-se a um banho de ultrassons. De resto todo o procedimento decorreu de forma análoga. Procedeu-se então à hidrólise alcalina dos tripéptidos **21a/21a'** deixando-se reagir durante 48 h e, em seguida, efetuou-se o tratamento corrente. Obteve-se **22a/22a'** como um sólido branco. Rendimento de 91%.

Tentou-se separar cromatograficamente os diastereoisómeros, mas mais uma vez tal não foi possível, verificando-se apenas um sinal consistente em TLC.

A análise estrutural dos tripéptidos **22a/22a'** foi realizada mediante espectroscopia de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT e IV e, por espectrometria de massa, ESI-MS (**secção 3.3.7.**). Os resultados obtidos permitiram confirmar as estruturas esperadas para estes compostos.

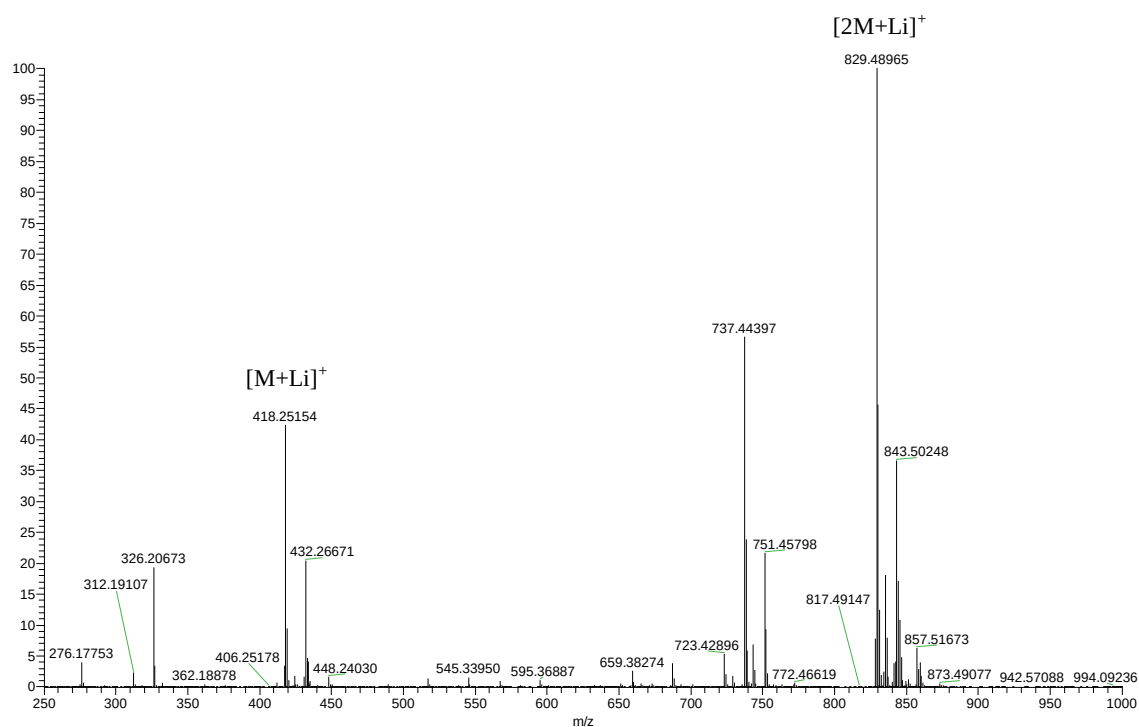
IV: Apresentam-se, em seguida, as bandas mais relevantes obtidas para os tripéptidos **22a/22a'**, nomeadamente a presença de uma banda larga de estiramento COO-H, porém pouco acentuada, entre 3700 e 2200 cm⁻¹ e, ainda, uma banda de estiramento CON-H, concordante com as ligações amida, a 3297.68 cm⁻¹. Esta análise denota a presença de uma banda muito larga e forte de estiramento C=O, a 1647.88 cm⁻¹, que se supõe ser resultado da sobreposição das bandas relativas às amidas, ao carbamato e ao ácido carboxílico, no entanto não é possível retirar muita informação nesta região. Adicionalmente, constata-se ainda a presença de bandas de estiramento C_{sp³}-H a 2957.30, 2927.41 e 2871.49 cm⁻¹.

¹H-RMN: A análise do espectro relativo aos tripéptidos **22a/22a'** revela-se complexa na medida em que se trata de uma mistura dos dois diastereoisómeros, verificando-se ainda a presença de rotâmeros. É possível identificar-se a presença de sinais de grupos de prótons muito desprotegidos (a campos baixos), relativos às ligações peptídicas, CONH, e ao próton do ácido carboxílico, CO₂H, a δ = [8.00 – 7.43, 7.21 – 6.7, 5.91 – 5.26 ppm]. Verifica-se a presença dos H- α dos resíduos de aminoácido L-leucina e glicina, H_L-2 e H_G-2, a campos compatíveis com prótons adjacentes a amidas, porém encontram-se dispersos e sobrepostos com os prótons H-1 e H-3, tornando impossível a sua identificação inequívoca (δ = 4.90 – 3.45 ppm). Constata-se o desaparecimento dos singletos característicos do éster metílico, comprovando o sucesso da hidrólise. De notar que o H-4 surge como dois singletos de proporções quase equivalentes (relativos aos diastereoisómeros), a δ = 2.88 e 2.82 ppm, surgindo ainda um outro singlete a δ = 2.62 ppm de menor intensidade, relativo a um rotâmero. Verificam-se ainda dois singletos relativos a dois grupos Boc, a δ = 1.43 e 1.42 ppm. A atribuição dos restantes prótons está de acordo com as estruturas esperadas.

¹³C-RMN e DEPT: A co-análise dos espectros relativos aos compostos **22a/22a'** revelam-se complexos pelas mesmas razões enlencadas anteriormente para análise do espectro de ¹H-RMN. Contudo, é possível identificar-se picos respeitantes a carbonos quaternários a campos muito baixos, compatíveis com as amidas, CONH , e com o ácido carboxílico, CO_2H , a $\delta = 174.72, 174.68, 174.53, 173.93, 173.89, 173.66, 171.66, 171.36$ e 171.34 ppm. Constata-se ainda a presença de picos relativos aos carbonos quaternários característicos do grupo Boc ($\delta = 155.35, 155.32$ e $80.56, 79.76$ ppm); adicionalmente, é possível identificar-se três picos intensos a $\delta = 28.28, 28.20, 28.12$ ppm relativos ao ^tBu do grupo Boc, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$. Constata-se a ausência de picos relativos aos carbonos $-\text{CH}_3$ dos ésteres metílicos. Foi possível distinguir, por DEPT, os carbonos metilénicos do sistema bicíclico, C-5, C-6 e C-7 a $\delta = 23.12, 23.05; 29.95, 29.65$ e $40.94, 39.27$ ppm, respetivamente, assim como os carbonos metilénicos relativos aos resíduos de L-leucina (C_L-3) a $\delta = 38.99$ ppm e, de glicina (C_G-2), a $\delta = 44.82, 44.76, 44.67, 43.71, 42.58$ ppm. Verifica-se, ainda, a presença do C- α do resíduo de L-leucina (C_L-2), a $\delta = 51.38, 50.55$ ppm. A atribuição dos restantes carbonos está de acordo com as estruturas esperadas.

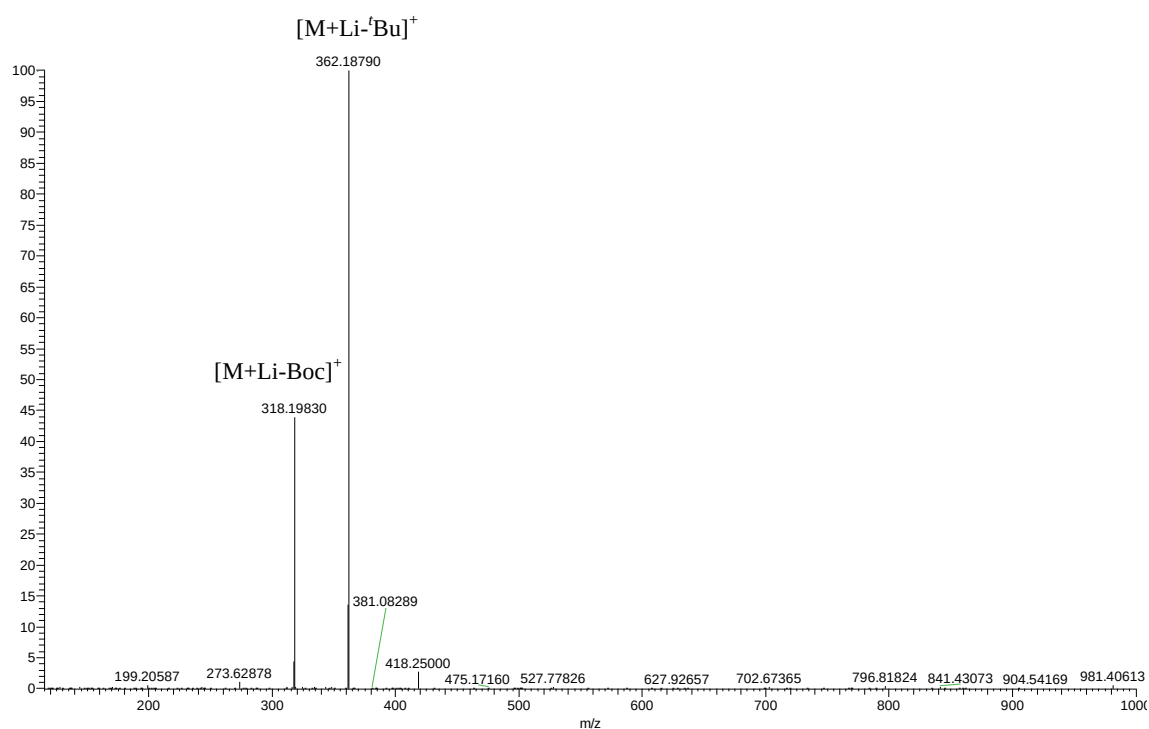
COSY/HSQC: A atribuição inequívoca dos prótons e dos carbonos só foi possível pela análise destes espectros bidimensionais, na medida em que, por exemplo, na atribuição do sinal do próton H-4, verifica-se a presença de três singletos, que apenas por ¹H-RMN não seria conclusivo se se tratariam de sinais para o mesmo próton. Desta forma, foi possível averiguar que se tratavam, de facto, do mesmo próton, relativo aos dois diastereoisómeros e ainda de um rotâmero dos mesmos. Ainda no que diz respeito à atribuição dos carbonos C-7, C_G-2 e C_L-3 , ambos se apresentam como carbonos metilénicos em DEPT, possuindo desvios químicos muito semelhantes, entre $\delta = 44.82$ e 38.99 ppm, sendo a análise de ¹³C-RMN e DEPT suportada por HSQC. Assim, foi possível atribuir corretamente os sinais observados aos respetivos carbonos da estrutura esperada.

EM: Detetou-se a presença de um pico a $m/z = 829.48965$ u.m.a., compatível com o aduto de duas moléculas-alvo com lítio, $[2\text{M}+\text{Li}]^+$, m/z esperado = 829.48933 u.m.a.; um pico a $m/z = 418.25154$ u.m.a., compatível com o aduto da molécula-alvo com lítio, $[\text{M}+\text{Li}]^+$, m/z esperado = 418.25239 u.m.a. (Figura 2.15).


Figura 2.15

Espectro de massa (ESI-MS) dos tripéptidos **22a/22a'**.

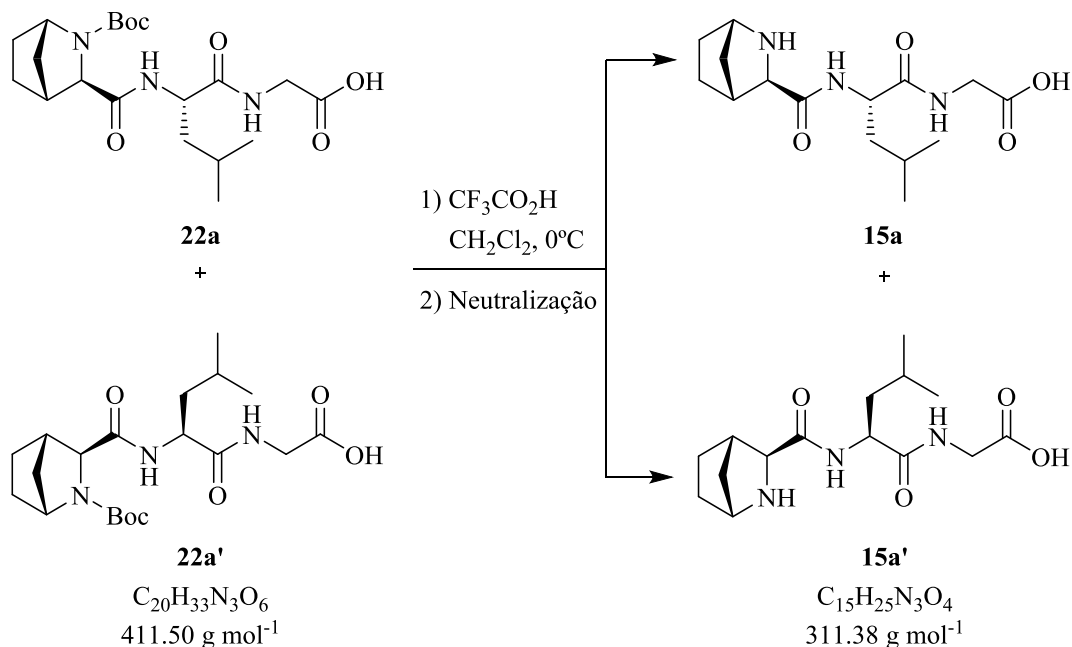
O subsequente estudo de fragmentação do ião $[M+Li]^+$ revelou a perda do grupo tBu (MS^2), com evidência do ião $[M+Li-tBu]^+$ e, ainda, o fragmento desprovido do grupo Boc, $[M+Li-Boc]^+$, o sistema 2-azabíciclo[2.2.1]heptano-3-carbonil-L-leucilglicina formando um aduto com lítio (Figura 2.16).


Figura 2.16

Estudo de fragmentação de **22a/22a'** por ESI- MS^2 .

2.4.4.3. Síntese dos tripéptidos 15a/15a'

A reação de desproteção dos tripéptidos **22a/22a'**, para obtenção dos correspondentes tripéptidos **15a/15a'**, pode ser descrita pela seguinte equação:



A obtenção dos tripéptidos **15a/15a'** corresponde, de acordo com o plano de trabalhos apresentados na **secção 2.4.**, ao terceiro e último passo sintético do Esquema 2.32. Estes compostos foram preparados segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **12a** (**secção 2.3.9.**). Os tripéptidos **22a/22a'** foram dissolvidos em CH_2Cl_2 (10 mL) deixando-se reagir durante 3h e, em seguida, efetuou-se o tratamento habitual, obtendo-se um óleo ligeiramente acastanhado.

Em seguida, dissolveu-se a mistura em dH_2O , neutralizou-se com solução saturada de NaHCO_3 e procedeu-se à extração com AcOEt . Juntaram-se as fases orgânicas e secou-se com Na_2SO_4 anidro. Filtrou-se a suspensão obtida com recurso a pressão reduzida com lavagens de AcOEt e concentrou-se à secura, obtendo-se um óleo acastanhado (105 mg), identificado como a mistura dos tripéptidos pretendidos **15a/15a'**. Rendimento de 98%.

Tentou-se proceder à separação cromatográfica dos diastereoisómeros sintetizados mediante técnicas cromatográficas, testando para o efeito vários solventes ou mistura de solventes como eluente, porém, estas tentativas revelaram-se infrutíferas.

Os resultados obtidos para a análise estrutural dos tripéptidos **15a/15a'** estão concordantes com os apresentados nas **secções 2.3.14.** e **3.3.5.** para os mesmos compostos.

2.5. CONSIDERAÇÕES NA SÍNTESE PEPTÍDICA

O uso dos prolinomiméticos na sua forma racêmica no acoplamento com os fragmentos C-terminais enantiomericamente puros originou misturas de diastereoisómeros que foram utilizadas nas reações subsequentes, visto que as tentativas de separação cromatográfica revelaram-se infrutíferas. Não foi possível em nenhum passo reacional posterior a separação dos diastereoisómeros, pelo que os dados espectroscópicos obtidos apresentam, não raras vezes, um carácter complexo no que respeita à análise e interpretação dos mesmos.

Com efeito, a maior parte dos tripéptidos preparados nas diferentes séries relativas à síntese de análogos do PLG revelam a presença de diastereoisómeros e, ainda, evidenciam a presença de rotâmeros quando se efetuam as análises espectroscópicas de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN.

Um caso paradigmático representativo da presença da mistura de diastereoisómeros em ^1H -RMN e ^{13}C -RMN incide nos tripéptidos **13a/13a'** (Figuras 2.17 e 2.18, respetivamente), sendo possível estabelecer proporção diastereoisomérica de 1:1.4, mediante integração dos singletos relativos aos ésteres metílicos. É visível a duplicação de vários sinais, tanto em ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, havendo em alguns casos sobreposição dos mesmos.

Por outro lado, é notória a presença de rotâmeros, para além da mistura dos diastereoisómeros, tornando as análises mais laboriosas. Nos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN da mistura dos tripéptidos **14c/14c'** (Figuras 2.19 e 2.20, respetivamente), é notória a presença dos diastereoisómeros, assim como de rotâmeros associados a estes.

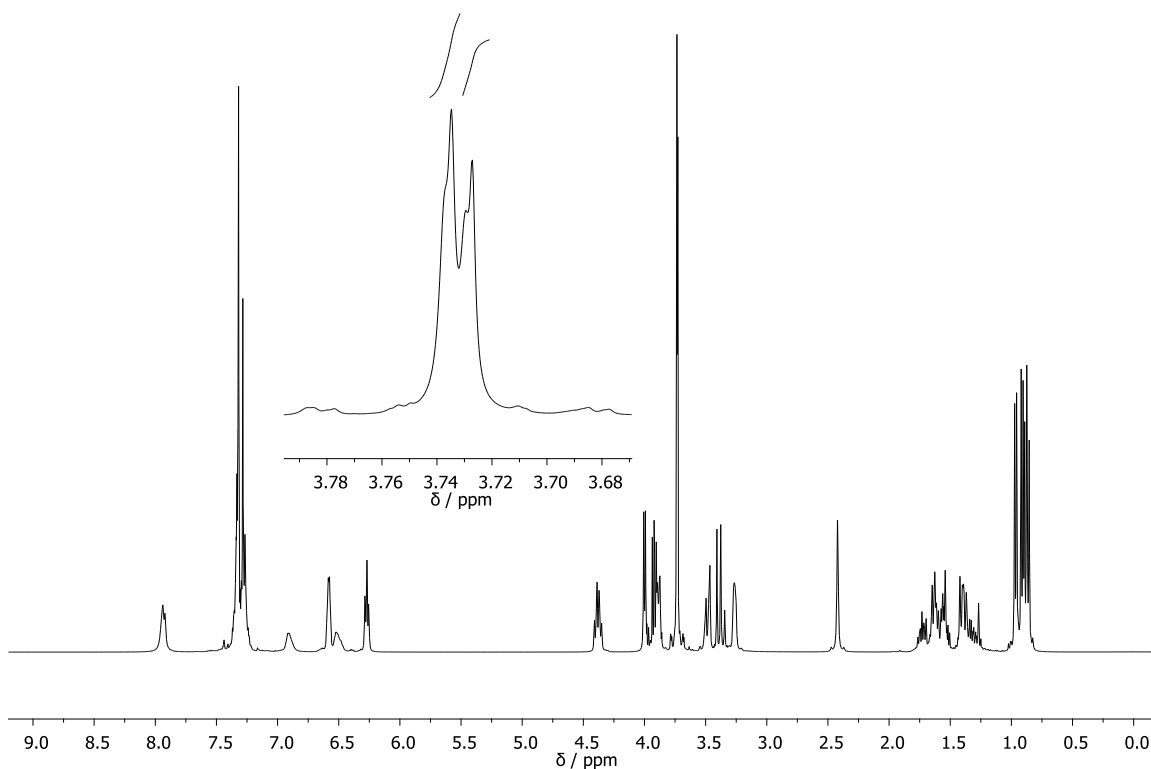


Figura 2.17

Espectro de ^1H -RMN da mistura dos diastereoisómeros **13a/13a'**, com expansão dos singletos relativos aos ésteres metílicos utilizados para estabelecer a proporção diastereoisomérica (1:1.4).

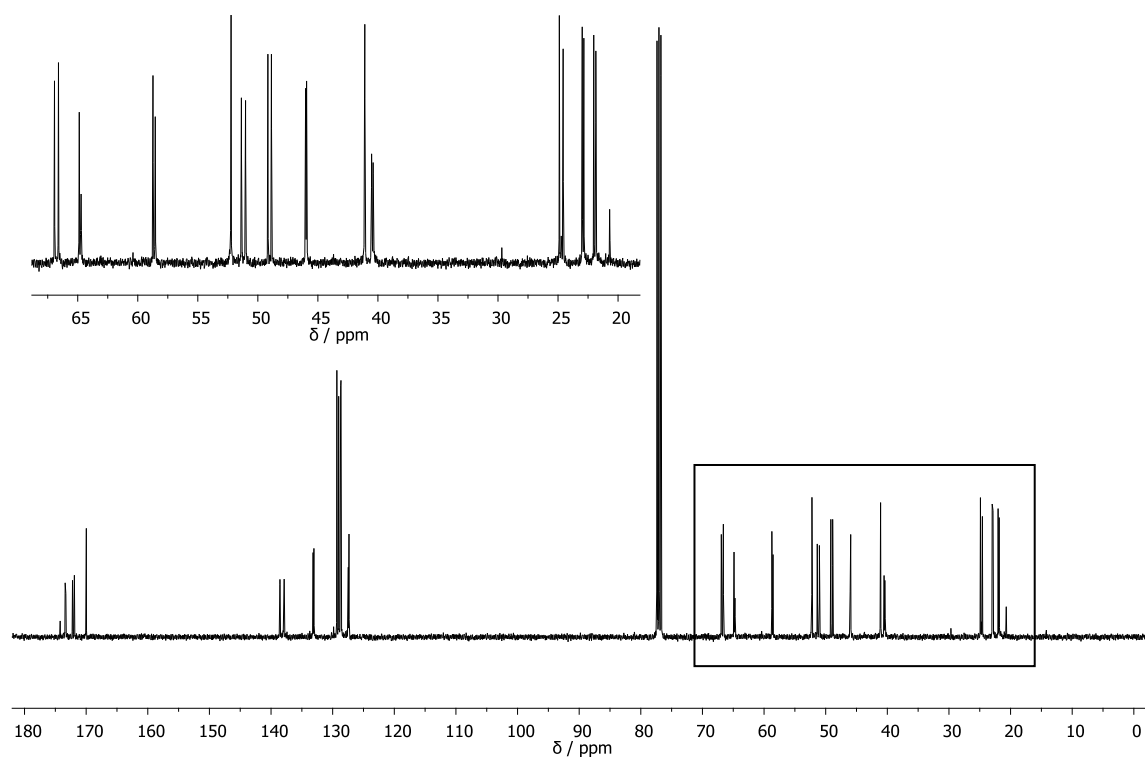


Figura 2.18

Espectro de ^{13}C -RMN da mistura dos diastereoisômeros **13a/13a'**, com expansão a campos altos, evidenciando a duplicação de sinais.

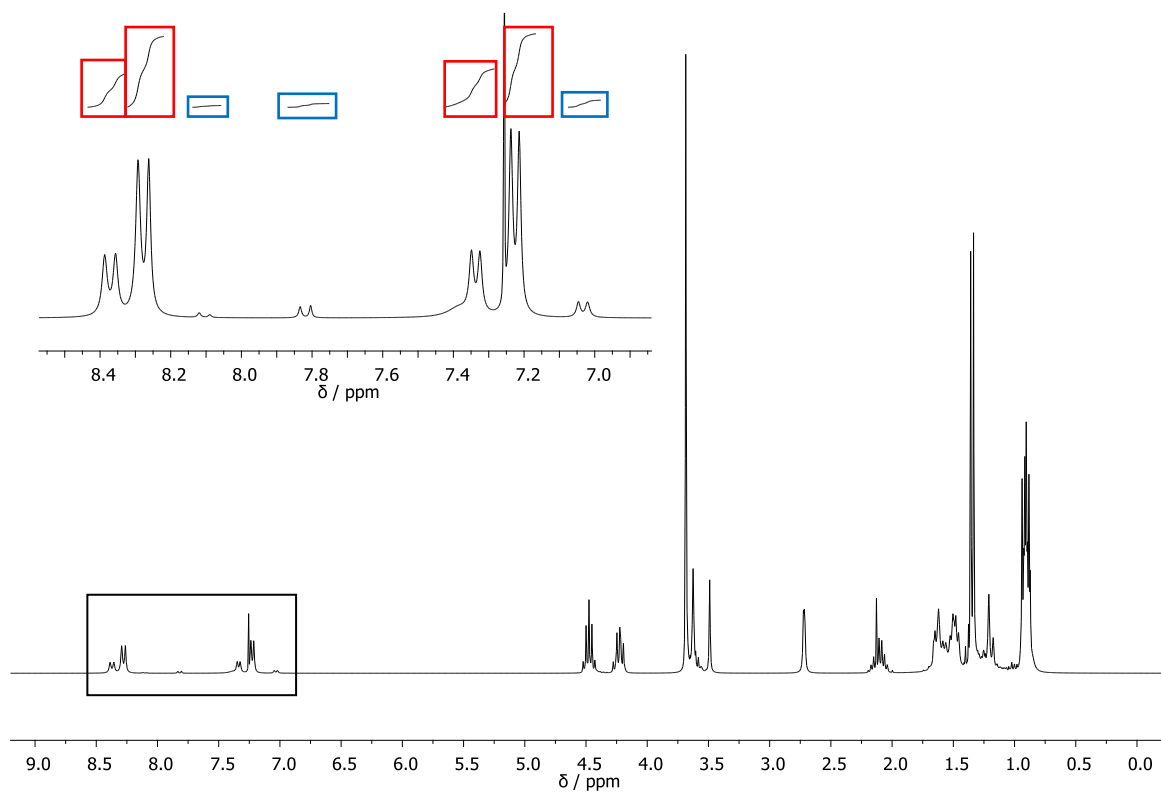
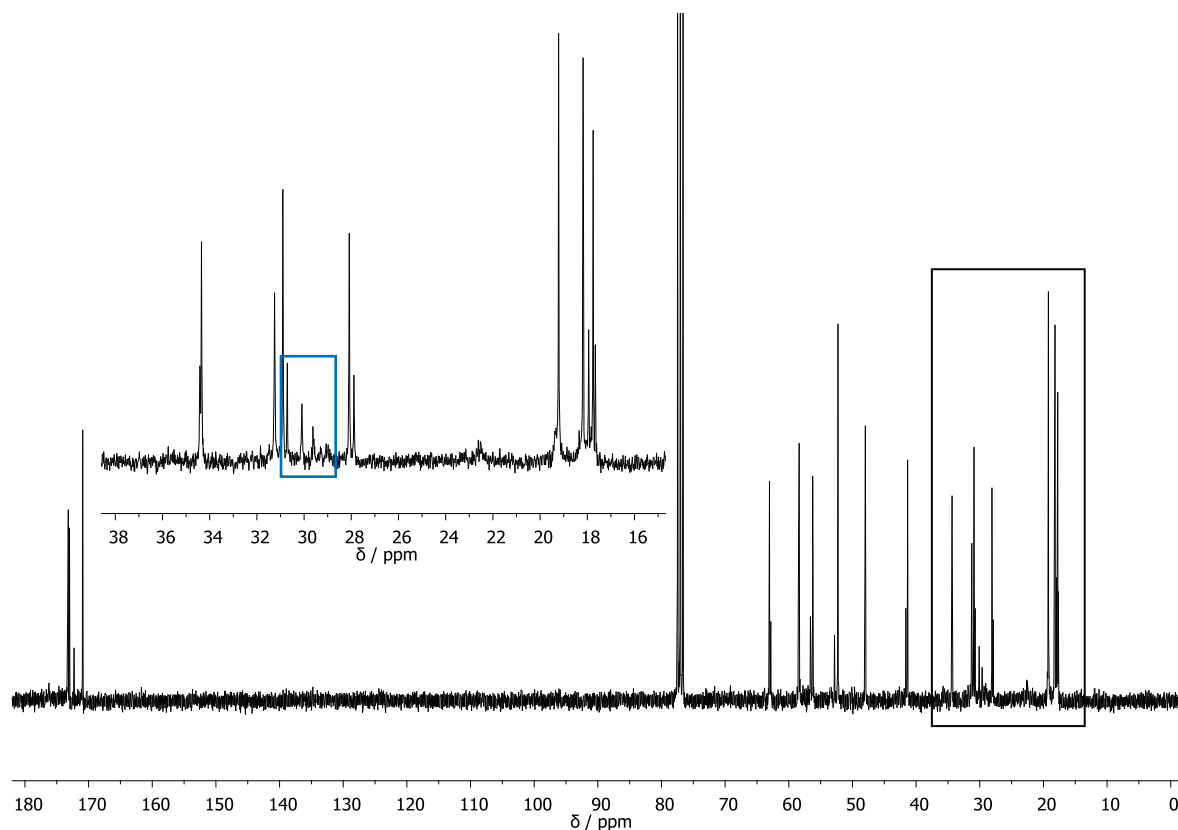


Figura 2.19

Espectro de ^1H -RMN da mistura dos diastereoisômeros **14c/14c'**, com expansão dos sinais relativos às amidas, com ênfase para a presença dos diastereoisômeros (a vermelho) e respectivos rotâmeros (a azul).

**Figura 2.20**

Espectro de ^{13}C -RMN da mistura dos diastereoisômeros **14c/14c'**, com expansão dos sinais a campos altos, com ênfase para a presença de rotâmeros (a azul).

No que respeita à *via de síntese alternativa* do P*LG verificou-se, a par com o ocorrido nas outras séries, a presença da mistura de diastereoisômeros nas análises de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN, sendo possível estabelecer proporção diastereoisomérica de 1:1.4, mediante integração dos singletos relativos aos ésteres metílicos a partir dos dados espectroscópicos de ^1H -RMN da mistura **21a/21a'** (Figura 2.21). Verificou-se, adicionalmente, um exacerbamento de rotâmeros face às restantes séries, como pode ser verificado no espectro de ^{13}C -RMN da mistura dos diastereoisômeros **21a/21a'** (Figura 2.22). Daqui avança-se que, a substituição do grupo benzilo como *N*-protetor pelo carbamato de *terc*-butilo, poderá estar na origem do incremento de rotâmeros verificado.

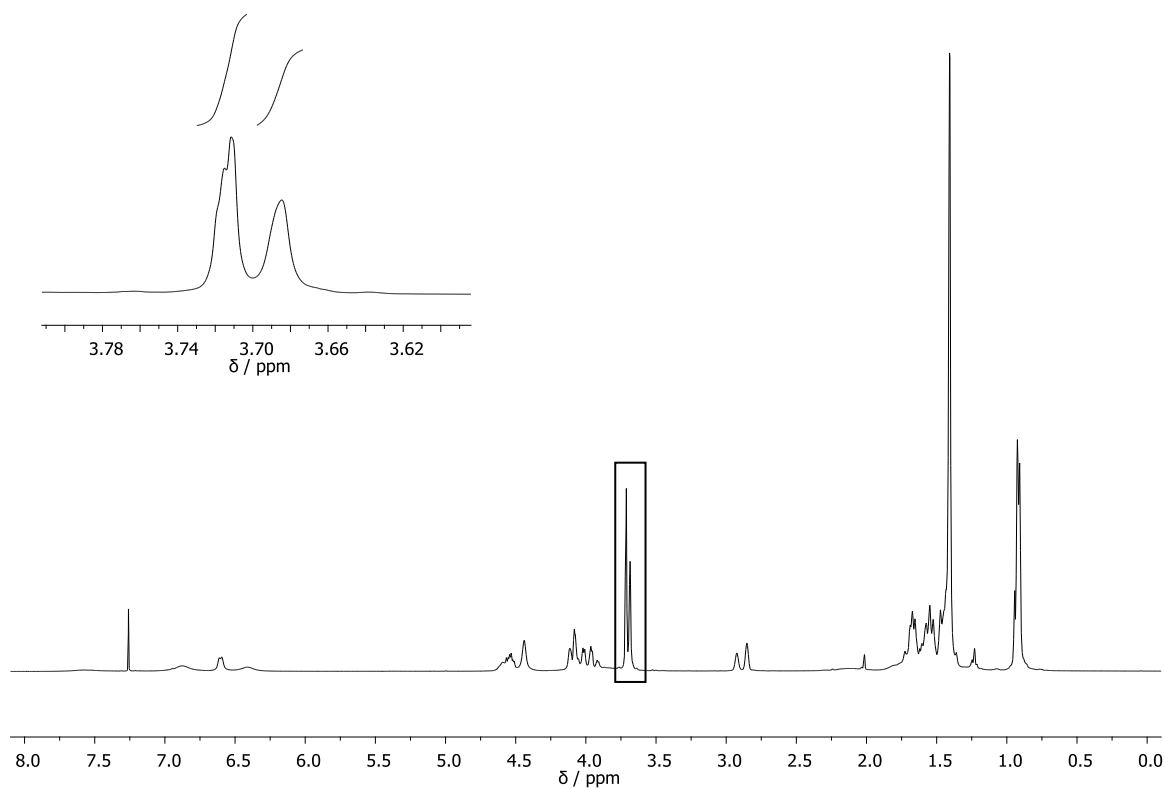


Figura 2.21

Espectro de ^1H -RMN da mistura dos diastereoisômeros **21a/21a'**, com expansão dos singletos relativos aos ésteres metílicos utilizados para estabelecer a proporção diastereoisomérica (1:1.4).

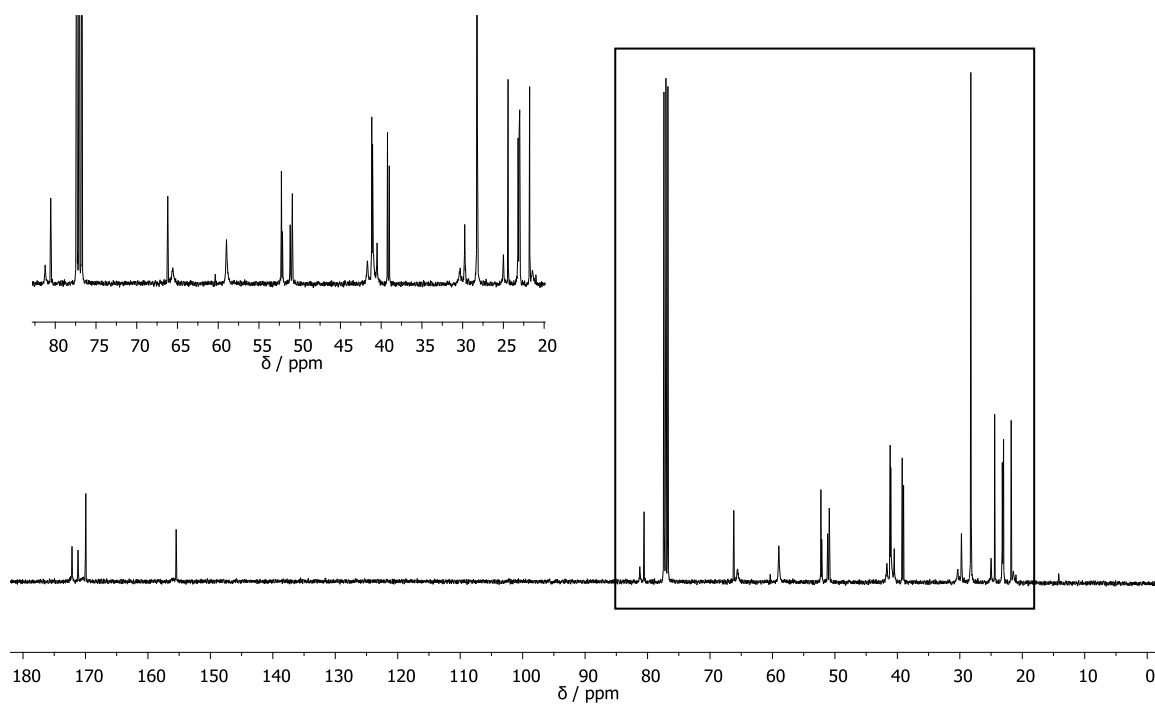


Figura 2.22

Espectro de ^{13}C -RMN da mistura dos diastereoisômeros **21a/21a'**, com destaque para os sinais a campos mais altos onde se verifica um elevado número de rotâmeros.

Para fazer esta proposta baseamo-nos em trabalhos anteriores de autores dedicados ao estudo de aspetos conformacionais em dipéptidos e tripéptidos, em que se demonstra que, além das possíveis conformações (*cis-trans*) que os derivados de anel de prolina (com frequência encontradas em estruturas de raios-X de péptidos^{301,302,303} e proteínas),^{304,305} os carbamatos, ao apresentar uma unidade estrutural similar às amidas, contendo um átomo de oxigénio adicional, espera-se que provoque nos pequenos péptidos perturbações estruturais e eletrónicas sobre a unidade da amida e, como consequência, as barreiras de rotação dos carbamatos são 3-4 kcal mol⁻¹ ($\approx$ 15-20%) mais baixas do que as correspondentes amidas, favorecendo a existência de um maior número de rotâmeros.³⁰⁶ Este feito atribui-se a uma menor interação entre o par de eletrões não ligante do átomo de nitrogénio e o grupo carbonilo, uma vez que compete com a interação entre o átomo de oxigénio do éster e o grupo carbonilo aquando da rotação sobre a rotação C-N.³⁰⁷

Assim, estudos realizados com *N*-metoxycarbonil-L-prolil-*N*¹-metilamida revelam que, a substituição do grupo *N*-amida pelo grupo *N*-carbamato, tem como resultado, mudanças nas conformações preferenciais.³⁰⁸ Estudos utilizando a técnica de espectroscopia de infravermelho evidenciam a presença de rotâmeros em péptidos no estado sólido.^{309,310} Neste trabalho, encontramos um exemplo em que surgiu esta situação, assim, no espectro de infravermelho do dipéptido **11a** denota-se claramente a duplicação de bandas de absorção respeitantes a vibrações de estiramento C=O das amidas/carbamato (Figura 2.23).

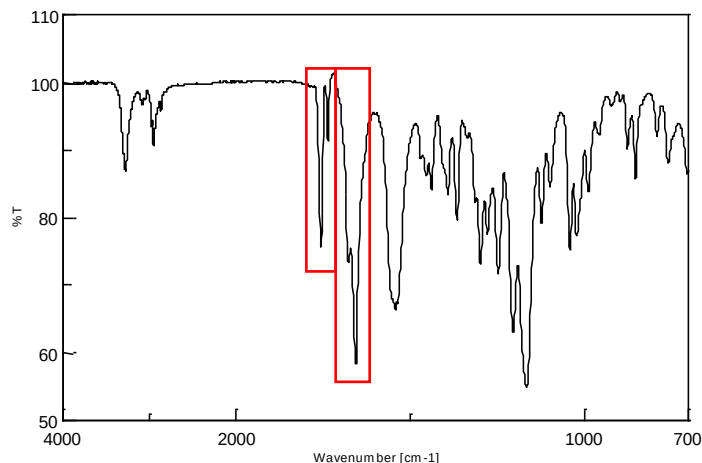


Figura 2.23

Espectro de IV do dipéptido **11a**, com destaque para a presença de rotâmeros associados às bandas de estiramento C=O.

³⁰¹Momany, F. A.; McGuire, R. F.; Burgess, A. W.; Scheraga, H. A. *J. Phys. Chem.* **1975**, 79, 2361.

³⁰²DeTar, D. F.; Luthra, N. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 1232.

³⁰³Madison, V. *Biopolymers* **1977**, 16, 2671.

³⁰⁴Pal, D.; Chakrabarti, P. *J. Mol. Biol.* **1999**, 294, 271.

³⁰⁵Vitagliano, L.; Berisio, R.; Mastrangelo, A.; Mazzarella, L.; Zagari, A. *Protein Sci.* **2001**, 10, 2627.

³⁰⁶Kang, Y. K.; Kang, S.N. *J. Comput. Chem.* **2009**, 30, 1116.

³⁰⁷(a) Drakenberg, T.; Dahlqvist, K.-I.; Forsen, S. *J. Phys. Chem.* **1972**, 76, 2178. (b) Eberhardt, E. S.; Loh, S. N.; Hinck, A. P.; Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 5437.

³⁰⁸Kang, Y. K.; Choi, H. Y. *Biophys. Chem.* **2004**, 111, 135.

³⁰⁹Deber, C. M. *Macromolecules* **1974**, 7, 47.

³¹⁰Baures, P.W.; Ojala, W.H.; Gleason, W.B.; Johnson, R.L. *J. Peptide Res.* **1997**, 50, 1.

CAPÍTULO 3

Parte Experimental

3.1. Aspetos Gerais

1. Os reagentes comerciais (Aldrich Chemical Company e BACHEM) foram usados sem purificação prévia à exceção do ciclopentadieno.
2. Os solventes utilizados nas reações foram purificados por destilação sobre um agente secante adequado, seguindo os procedimentos descritos por Vogel³¹¹ e secos por destilação sobre um agente secante, em atmosfera inerte de árgon antes de serem utilizados. Os agentes secantes empregues foram os seguintes: P₂O₅, para CH₂Cl₂ e CHCl₃; K, para (CH₃CH₂)₂O e THF; K₂CO₃, para (CH₃)₂CO e AcOEt; Mg/I₂, para CH₃OH e CH₃CH₂OH; CaCl₂ anidro, para o ^tBuOH.
3. O CPD utilizado na reação de Diels-Alder foi previamente bidestilado sob decalina aquecida e aquando da recolha do destilado adicionou-se hidroquinona.
4. Para arrefecimento de reações entre -60 a -78 °C, aplicaram-se banhos de acetona/N₂ líquido.
5. Para acompanhamento da evolução das reações recorreu-se à técnica de cromatografia em camada fina (TLC), utilizando-se placas recobertas de alumínio recobertas com gel de sílica Merk tipo 60 F₂₅₄ sensíveis à radiação ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm. Os cromatogramas foram revelados por irradiação por UV (lâmpada UV: VOO 7752 da Vilben Lourmat) e, em solução etanólica de ácido fosfomolídico, a quente. As manchas reveladas por estes métodos apresentam diferentes colorações, contudo existe proporcionalidade direta entre a concentração do composto presente detetado e a intensidade das mesmas.
6. Os rendimentos apresentados referem-se aos compostos finais obtidos após purificação.
7. Os compostos obtidos foram purificados utilizando a técnica de cromatografia líquida de adsorção em coluna de vidro. A fase estacionária utilizada foi uma matriz de gel de sílica 60 Å da Scharlau (granulometria 0.04 – 0.06 mm, pH = 7, superfície mássica 550 m² / g), que foi previamente suspensa no eluente a utilizar. A eluição e recolha das fracções de eluato foram realizadas manualmente. As fases móveis utilizadas serão indicadas caso-a-caso.
8. Os solventes foram eliminados sob pressão reduzida num evaporador rotativo modelo RESONA 300 no Departamento de Química Orgânica da Faculdade de Farmácia da USC e num Büchi Heating Bath B-490 no Departamento de Química e Bioquímica da FCUP.
9. Os pontos de fusão foram determinados num aparelho Reichert Kofler Thermopan no Departamento de Santiago de Compostela e não estão corrigidos.

³¹¹Vogel, A. I., *Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th ed., Longman Scientific and Technical, London, 1989, p. 395.

10. Todos os compostos foram objeto de um estudo de rotina por espectroscopia de infravermelho (IV) usando um espectrofotômetro *JASCO FT/IR-4100* provido de um acessório ATR (Reflexão Atenuada Total, do inglês *Attenuated Total Reflection*) do Departamento de Química Orgânica da Faculdade de Farmácia de Santiago de Compostela. Estes dados referem-se às bandas mais intensas e características de cada composto, expressando os seus valores em números de onda, cm^{-1} .
11. Os espectros de massa com sistema de ionização por impacto electrónico (IE) e ionização química (IQ) realizaram-se num espectrómetro de massa *Micromass Autospec*; os espectros de massa com sistema de ionização por técnica de *electrospray* (ESI-TOF) realizaram-se num espectrómetro de massa *Bruker Microtof*.
12. Os dados de Ressonância Magnética Nuclear de protão e de carbono-13 (^1H -RMN e ^{13}C -RMN, respetivamente) foram registados por diferentes aparelhos: Em Santiago de Compostela (C.A.C.T.U.S., serviço de RMN) por um aparelho *Varian Mercury 300* e *Varian INova 500* operando a 300 e 500 MHz, para ^1H -RMN e 75 e 125 MHz, respetivamente, para ^{13}C -RMN; no CEMUP num aparelho *Bruker Avance III 400* operando a 400 MHz (^1H -RMN) e a 101 MHz (^{13}C -RMN). As análises espectroscópicas foram efetuadas à temperatura ambiente em CDCl_3 , CH_3OD e D_2O , usando o sinal do TMS e/ou do próprio solvente parcialmente não deuterado como referência interna.
A concentração necessária da amostra decorreu da abundância isotópica do núcleo de interesse para investigação. O volume típico das amostras utilizadas foi de cerca de 500 μL e as amostras foram analisadas encapsuladas em tubos de quartzo (4 mm diâmetro por 140 mm comprimento).
13. Os dados referentes aos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de protão encontram-se especificados do seguinte modo: ^1H -RMN (solvente deuterado utilizado, intensidade do campo magnético, em MHz) – δ H (desvio-químico em ppm), multiplicidade do sinal (**s**: singleto, **sl**: singleto largo, **d**: duplete, **t**: tripleto, **q**: quarteto, **p**: penteto, **dd**: duplo duplete, **dt**: duplo tripleto, **dq**: duplo quarteto, **m**: multiplete, **md**: multiplete desdobrado, **mc**: multiplete complexo), área relativa do sinal ($n\text{H}-m$, onde n = número de protões e $m = n.^\circ$ do protão na molécula), constante de acoplamento (J , em Hertz), localização do protão na molécula.
14. Os dados referentes aos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13 (^{13}C -RMN) encontram-se especificados do seguinte modo: ^{13}C -RMN (solvente deuterado utilizado, intensidade do campo magnético, em MHz) – δ C (desvio químico em ppm), localização do átomo de carbono na molécula e indicando os carbonos quaternários como **Cq**.

15. A nomenclatura empregue para a localização dos prótons e/ou átomos de carbono nas cadeias peptídicas para efeitos de RMN foi efetuada de acordo a identificação do resíduo de α -aminoácido através do sistema de uma letra (**G**: glicina; **L**: L-leucina; **V**: L-valina; **A**: L-alanina) em subscrito, com indicação do próton (ou grupo de prótons) e do carbono respetivo iniciando a numeração da cadeia principal para cada resíduo de α -aminoácido no carbono do seu grupo carbonilo. Por exemplo, no dipéptido (*terc*-butoxicarbonil)-L-leucilglicinato de metilo, o CH₂ do resíduo de α -aminoácido da L-leucina é referenciado como H_{L-3}, em ¹H-RMN, e, como C_{L-3}, em ¹³C-RMN (Figura 3.1).

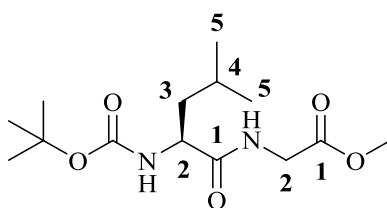
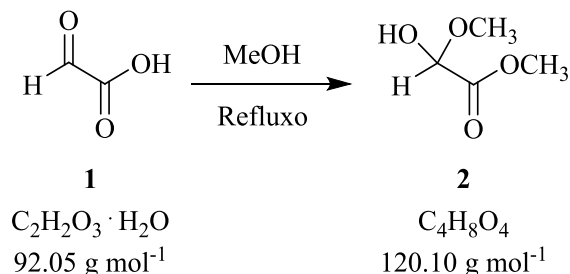


Figura 3.1

Dipéptido (*terc*-butoxicarbonil)-L-leucilglicinato de metilo. Exemplo de numeração adotada na atribuição dos prótons (ou grupo de prótons) e dos carbonos nas estruturas peptídicas. A numeração para cada resíduo de α -aminoácido constituinte da cadeia peptídica inicia-se no carbono do seu grupo carbonilo.

3.2. SÍNTESE DOS PRECURSORES PROLINOMIMÉTICOS

3.2.1. Síntese de 2-hidroxi-2-metoxiacetato de metilo (2)^{181,209}



Preparou-se uma solução de ácido glioxálico mono-hidratado (**1**) (5.77 g, 62.7 mmol, 1 eq.) em MeOH anidro (50 mL) e deixou-se em refluxo durante 18h sob atmosfera de Ar, com agitação magnética. Adicionou-se à mistura reacional, previamente arrefecida à temperatura ambiente, KHCO_3 sólido (1.5 g) e evaporou-se o solvente com recurso a pressão reduzida. O resíduo obtido foi dissolvido em CH_2Cl_2 (80 mL), secou-se com Na_2SO_4 anidro e filtrou-se a suspensão lavando-se abundantemente com CH_2Cl_2 . Por eliminação do solvente à secura obteve-se um óleo ligeiramente amarelo que foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna de gel de SiO_2 , obtendo-se um óleo incolor (6.77 g) que se identificou como sendo o hemiacetal pretendido (**2**). Os dados espectroscópicos obtidos estão em concordância com os descritos na literatura.^{181,209} Rendimento de 90%.

Composto **2**: óleo incolor.

R_f: 0.58 em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (20:1).

IV ν (cm^{-1}): 3424.96, 2957.30, 2841.60, 1742.37, 1445.39, 1359.57, 1226.50, 1069.33, 981.590, 917.950, 858.168, 782.958.

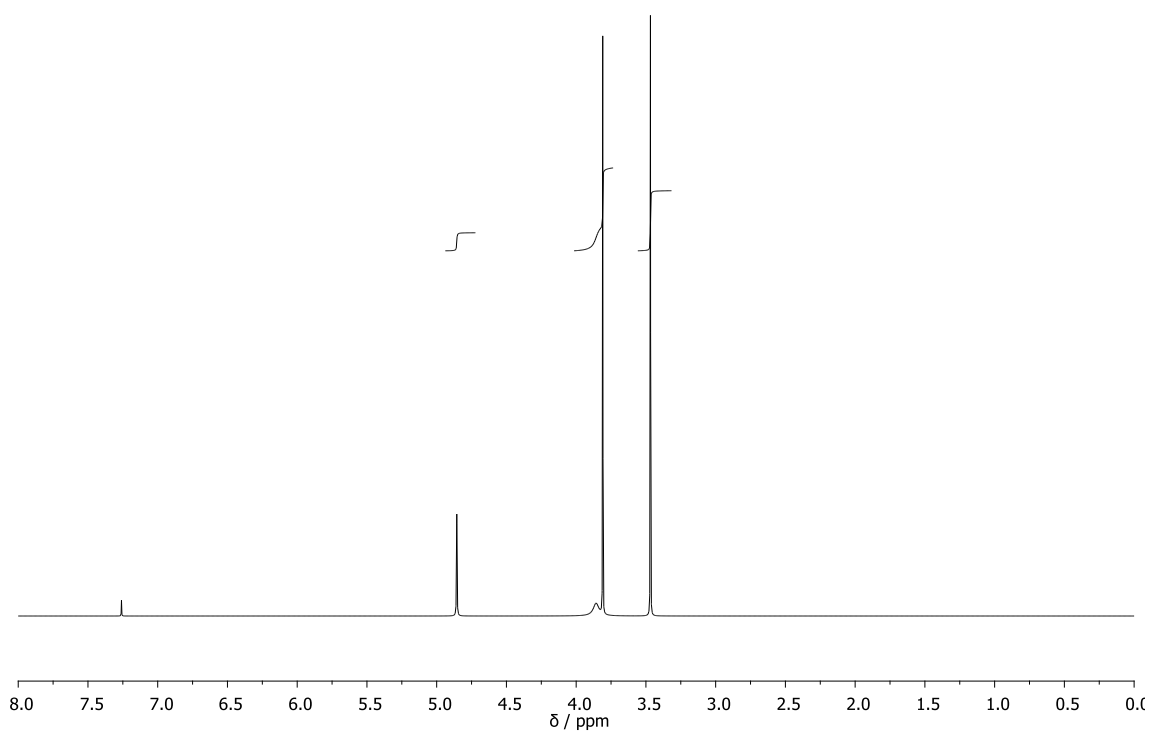
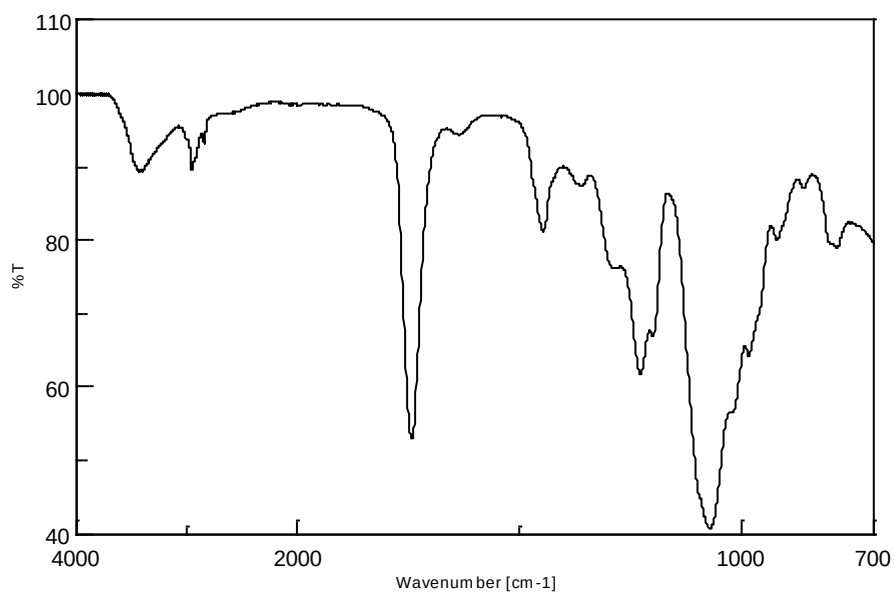
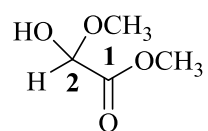
¹H-RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ ppm: 4.86 (s, 1H, H-2), 3.87 (sl, 1H, permuta com D_2O , OH), 3.81 (s, 3H, 1- OCH_3), 3.47 (s, 3H, 2- OCH_3).

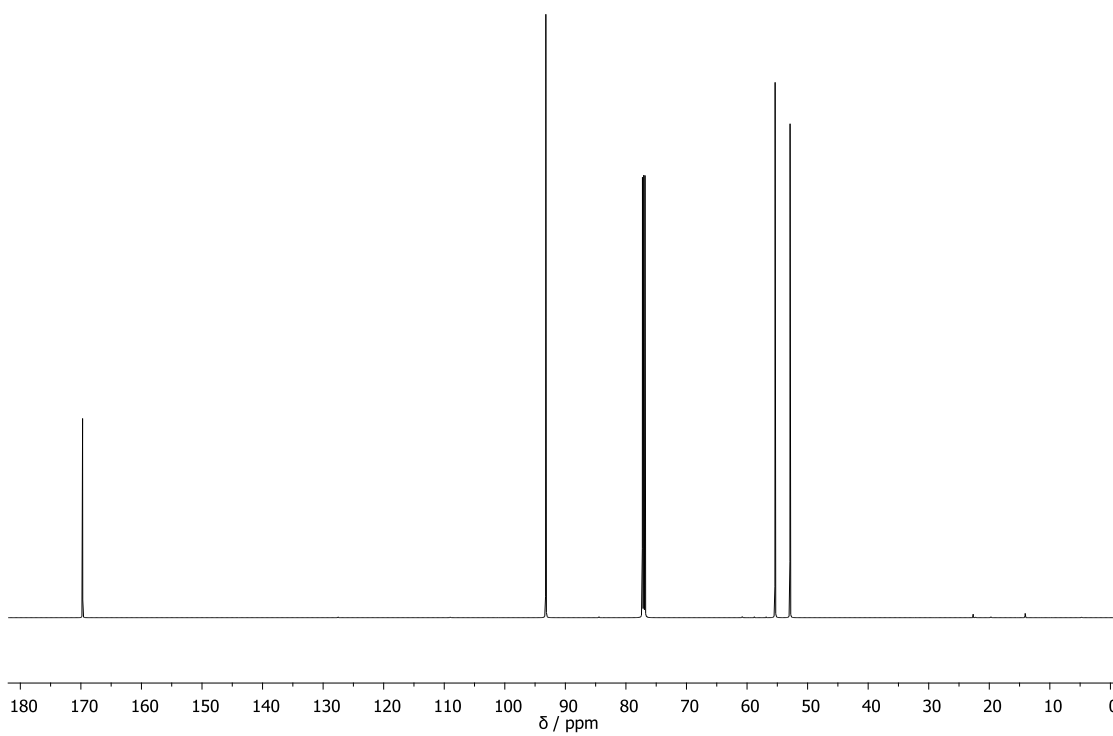
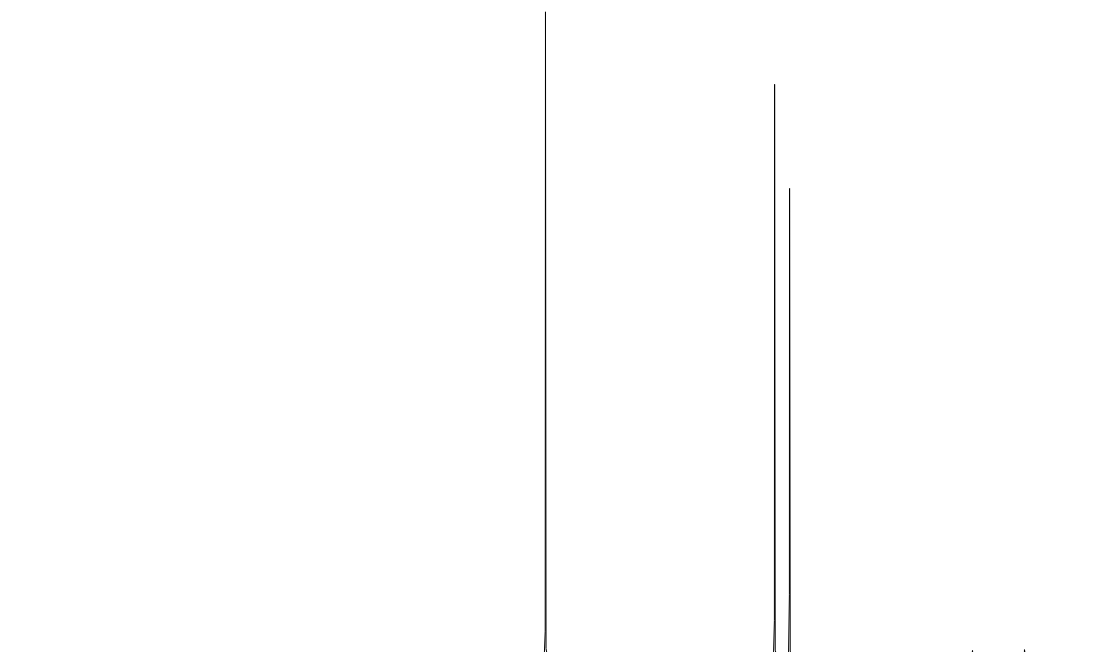
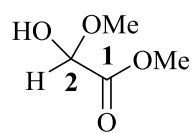
¹³C-RMN (CDCl_3 , 101 MHz) δ ppm: 169.72 (C, C-1), 93.22 (CH, C-2), 55.36 (CH_3 , 1- OCH_3), 52.89 (CH_3 , 2- OCH_3).

EM (IQ^+): m/z (%): 121 (MH^+ , 44), 120 (M^+ , 2), 103 (45), 90 (82).

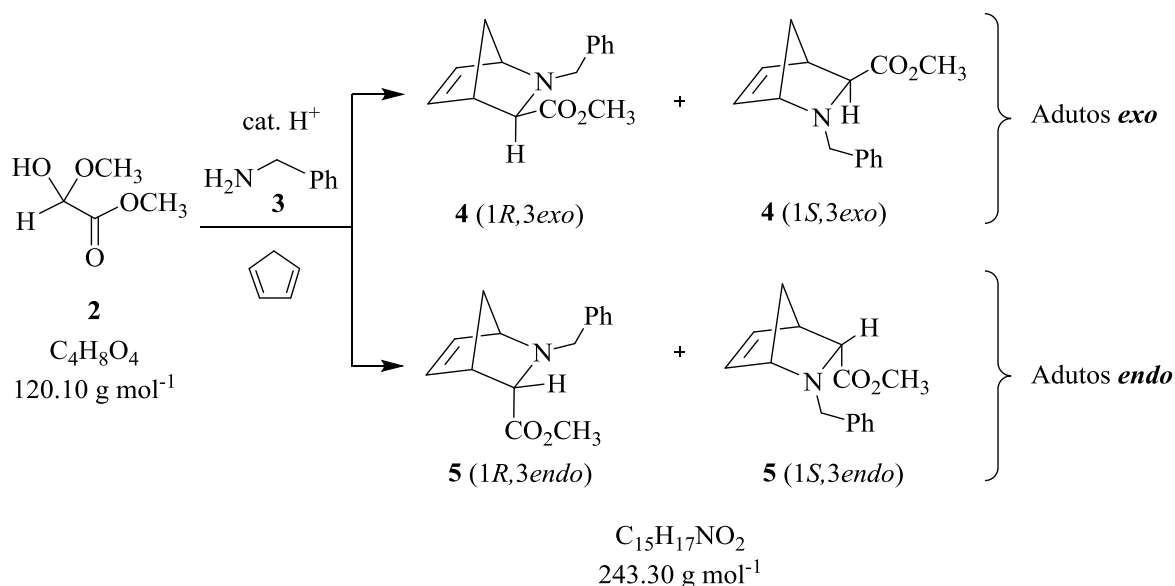
¹⁸¹Rodríguez-Borges, J. E.; García-Mera, X.; Fernández, F.; Lopes, V. H. C.; Magalhães, A. L.; Cordeiro, M. N. D. S. *Tetrahedron* **2005**, 61, 10951.

²⁰⁹Dewar, M. J. S.; Olivella, S.; Stewart, J. J. P. J., *Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 5771.





3.2.2. Síntese de (±)-endo-2-benzil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carboxilato de metilo (4-exo) e (±)-exo-2-benzil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carboxilato de metilo (5-endo)¹⁸¹



Num balão de fundo redondo, contendo filtros moleculares 4Å, procedeu-se à ativação dos mesmos com recurso a pressão reduzida e calor. Após ativação, colocou-se uma solução do hemiacetal **2** (6.77 g, 56.4 mmol, 1eq.) em CH_2Cl_2 anidro (50 mL) com agitação e purgou-se o sistema com Ar. Em seguida, adicionou-se através de um funil de adição, benzilamina (**2**) (6.2 mL, 56.4 mmol, 1 eq.) em CH_2Cl_2 anidro (50 mL). A mistura foi arrefecida a -78°C mediante banho criostático de acetona/azoto líquido.

Seguidamente, e de forma consecutiva, adicionou-se TFA (4.3 mL, 56.4 mmol, 1 eq.), TFBE (7.2 mL, 56.4 mmol, 1 eq.) e CPD recentemente bidestilado (10.6 mL, 128.6 mmol, 2.1 eq.). Após 6h de reação, adicionou-se solução saturada de NaHCO_3 (100 mL) e NaHCO_3 sólido (10 g), deixando-se em agitação à temperatura ambiente durante a noite. A mistura foi filtrada sob pressão reduzida com recurso a uma camada de celite/ SiO_2 , com lavagens de CH_2Cl_2 e dH_2O . Separaram-se as fases e extraiu-se com CH_2Cl_2 (3 x 100 mL). As fases orgânicas foram sucessivamente lavadas com solução saturada de NaHCO_3 (2 x 100 mL) e de NaCl (2 x 100 mL) e, posteriormente, foram secas com Na_2SO_4 anidro. Filtrou-se e concentrou-se o filtrado obtido à secura obtendo-se 13.70 g de um óleo castanho escuro que foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna de gel de SiO_2 , recorrendo-se a eluição em gradiente Hex/AcOEt 6:1 (V/V) $\rightarrow$ 4:1 (V/V). Obteve-se 10.29 g de um óleo amarelo, identificado como sendo **4-exo** (rendimento de 75%); 0.54 g de um resíduo oleoso acastanhado como mistura dos adutos **4-exo/5-endo**; 2.62 g de um óleo amarelo-escuro, identificado como sendo **5-endo** (rendimento de 19%). Os dados espectroscópicos obtidos estão em concordância com os descritos na literatura.¹⁸¹

¹⁸¹Rodríguez-Borges, J. E.; García-Mera, X.; Fernández, F.; Lopes, V. H. C.; Magalhães, A. L.; Cordeiro, M. N. D. S. *Tetrahedron* **2005**, 61, 10951.

Composto ($\pm$)-**4-exo**: óleo amarelo.

R_f = 0.53, em Hex/AcOEt 4:1.

IV ν (cm^{-1}): 3059.51, 3026.72, 2992.02, 2950.55, 2876.21, 2833.88, 1740.44, 1494.56, 1453.10, 1433.82, 1356.68, 1322.93, 1250.61, 1236.15, 1189.86, 1165.76, 1103.08, 1066.44, 1025.94, 987.375, 970.019, 908.308, 888.059, 844.669, 795.493, 756.923, 733.782.

^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ ppm: 7.43 – 7.06 (m, 5H, ArH), 6.42 (dt, 1H, J = 5.6, 2.9 Hz, H-5), 6.26 – 6.12 (m, 1H, H-6), 3.83 (m, 1H, H-1), 3.60 – 3.49 [3.55 (s), 4H, OCH_3 + (parte A sistema AB, NCHHPh)], 3.42 (parte B do sistema AB, 1H, J = 12.6 Hz, NCHHPh), 3.05 (s, 1H, H-4), 2.28 (d, 1H, J = 1.9 Hz, H-3), 1.95 (dd, 1H, J = 8.3, 1.5 Hz, H-7_{syn}), 1.36 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H-7_{anti}).

^{13}C -RMN e DEPT (CDCl_3 , 101 MHz) δ ppm: 174.60 (Cq, CO_2CH_3), 139.06 (Cq, C-1'), 136.67 (CH, C-5), 133.71 (CH, C-6), 129.19 (2CH, C-2' + C-6'), 128.25 (2CH, C-3' + C-5'), 127.12 (CH, C-4'), 64.90 (CH, C-3), 64.31 (CH, C-1), 58.99 (CH_2 , NCH_2Ph), 51.92 (CH_3 , OCH_3), 48.55 (CH, C-4), 46.69 (CH_2 , C-7).

EM (IE^+) m/z (%): 243 (M^+ , 2), 184 (33), 152 (1), 91 (100, pico base).

Composto ($\pm$)-**5-endo**: óleo amarelo.

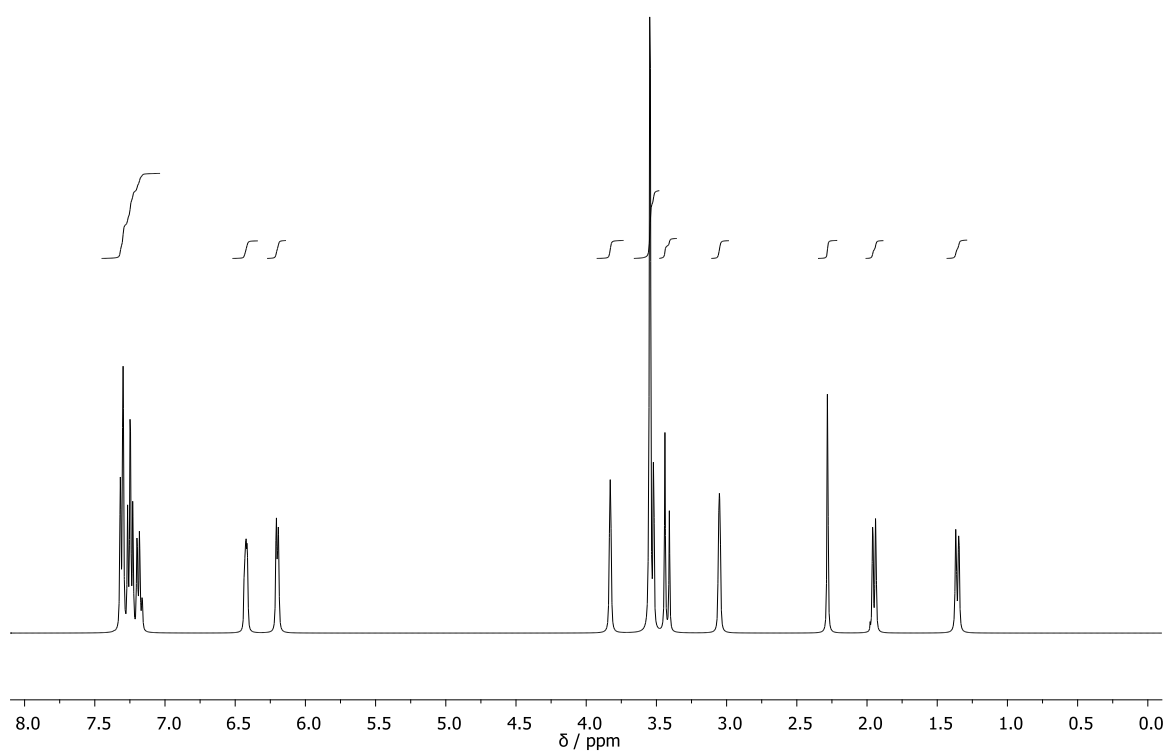
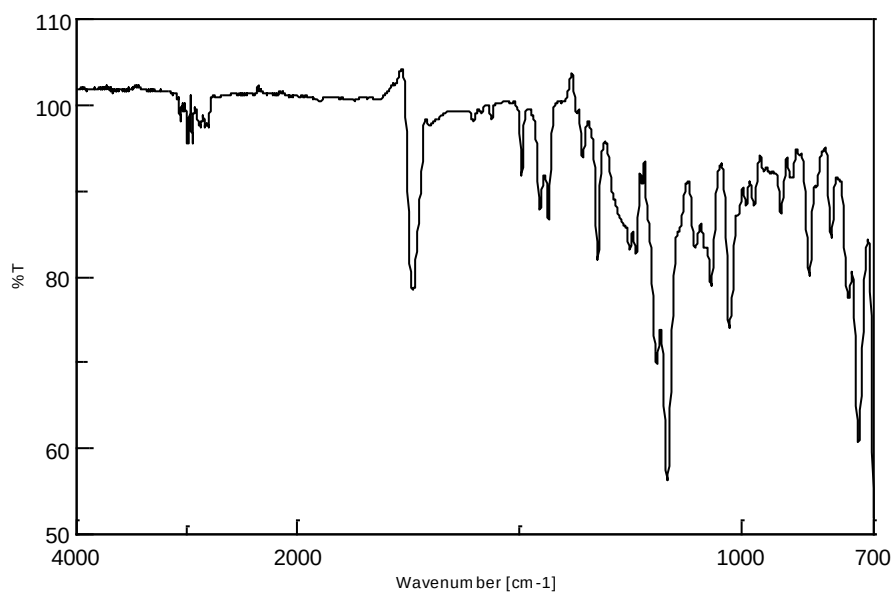
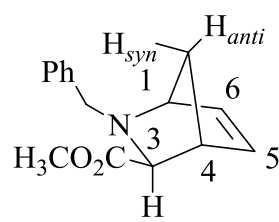
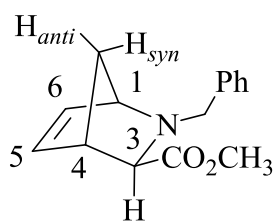
R_f = 0.31, em Hex/AcOEt 4:1

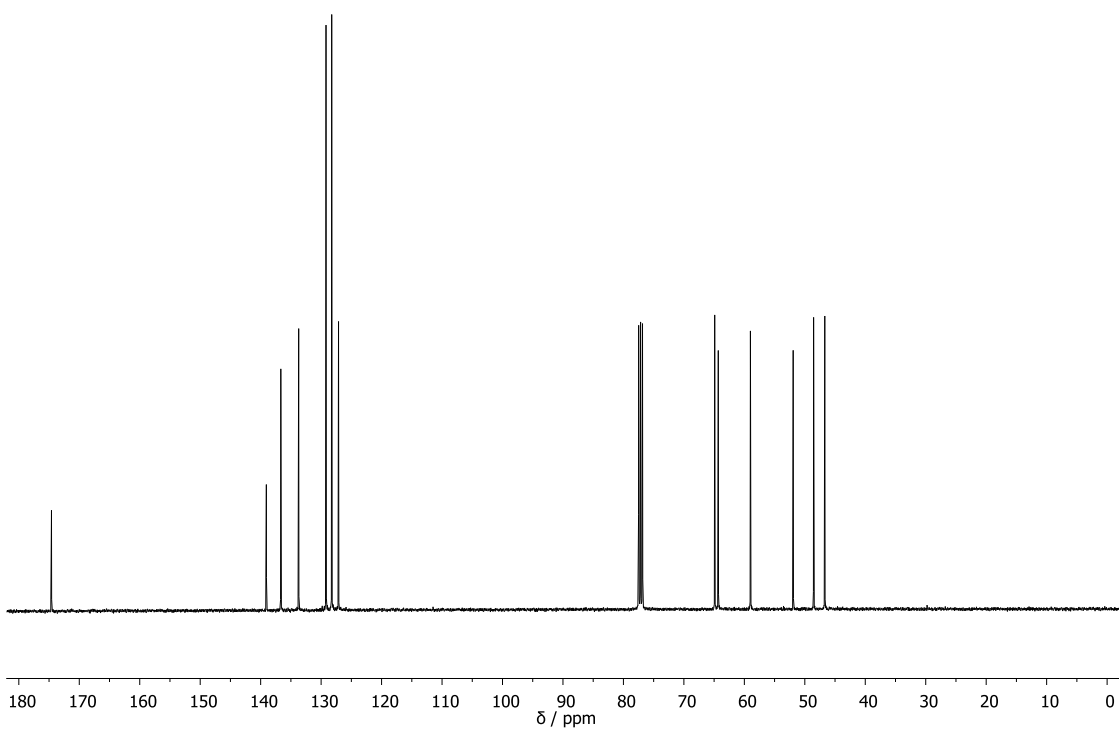
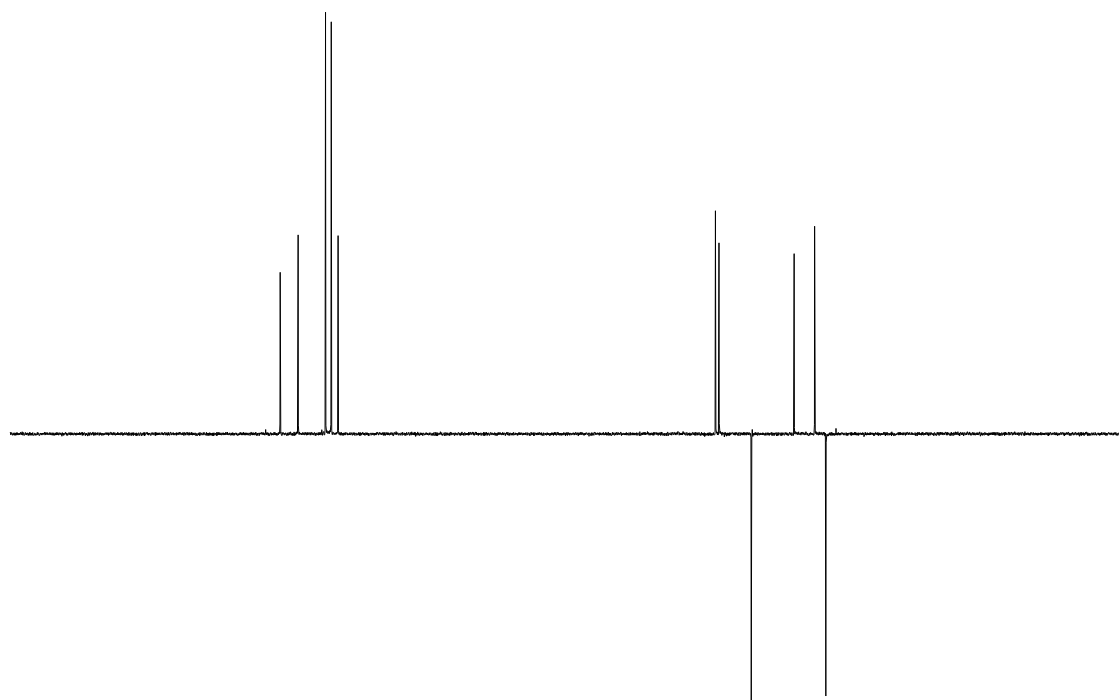
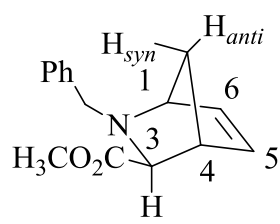
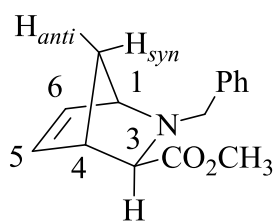
IV ν (cm^{-1}): 3063.37, 3021.80, 2991.05, 2947.66, 2871.49, 2800.13, 1736.58, 1493.60, 1453.10, 1434.78, 1364.39, 1332.57, 1243.86, 1193.72, 1167.69, 1108.87, 1026.91, 907.344, 857.204, 809.956, 775.244, 738.603, 719.316.

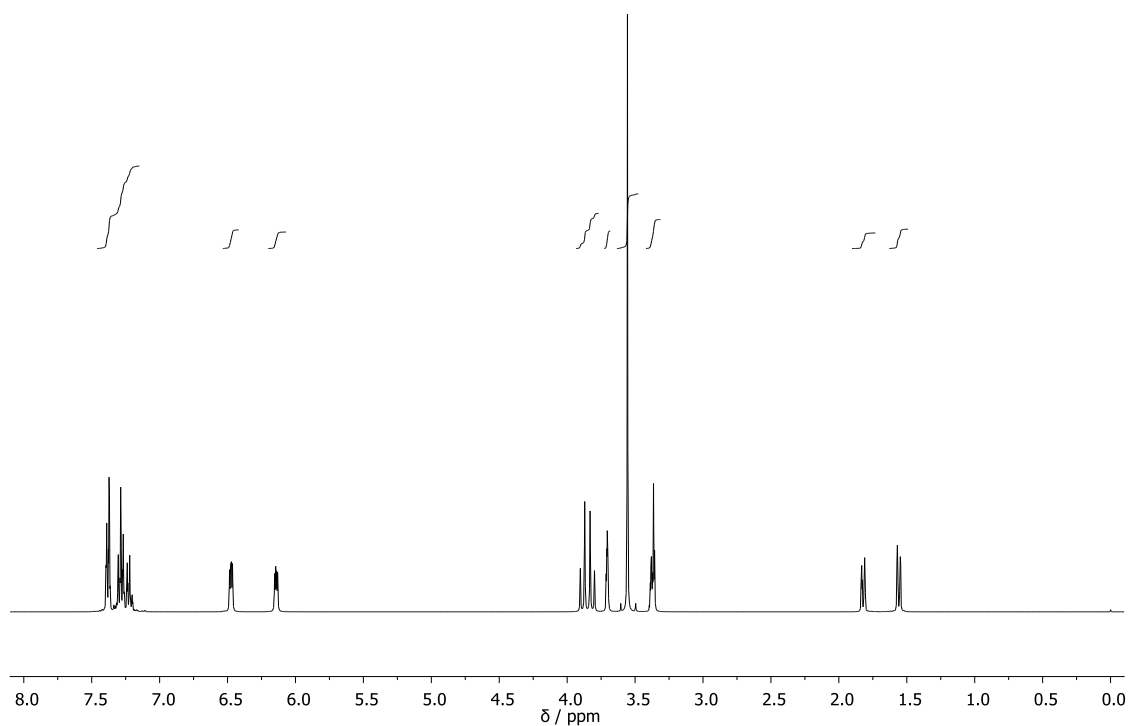
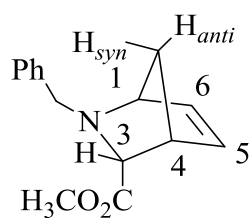
^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ ppm: 7.55 – 7.10 (m, 5H, ArH), 6.47 (dd, 1H, J = 5.6, 3.0 Hz, H-5), 6.14 (dd, 1H, J = 5.7, 2.9 Hz, H-6), 3.90 – 3.80 (Sistema AB, 2H, J = 12.9 Hz, NCH_2Ph), 3.70 (m, 1H, H-4), 3.56 (s, 3H, OCH_3), 3.42 – 3.31 (m, 2H, H-1 + H-3), 1.82 (m, 1H, H-7_{syn}), 1.56 (m, 1H, H-7_{anti}).

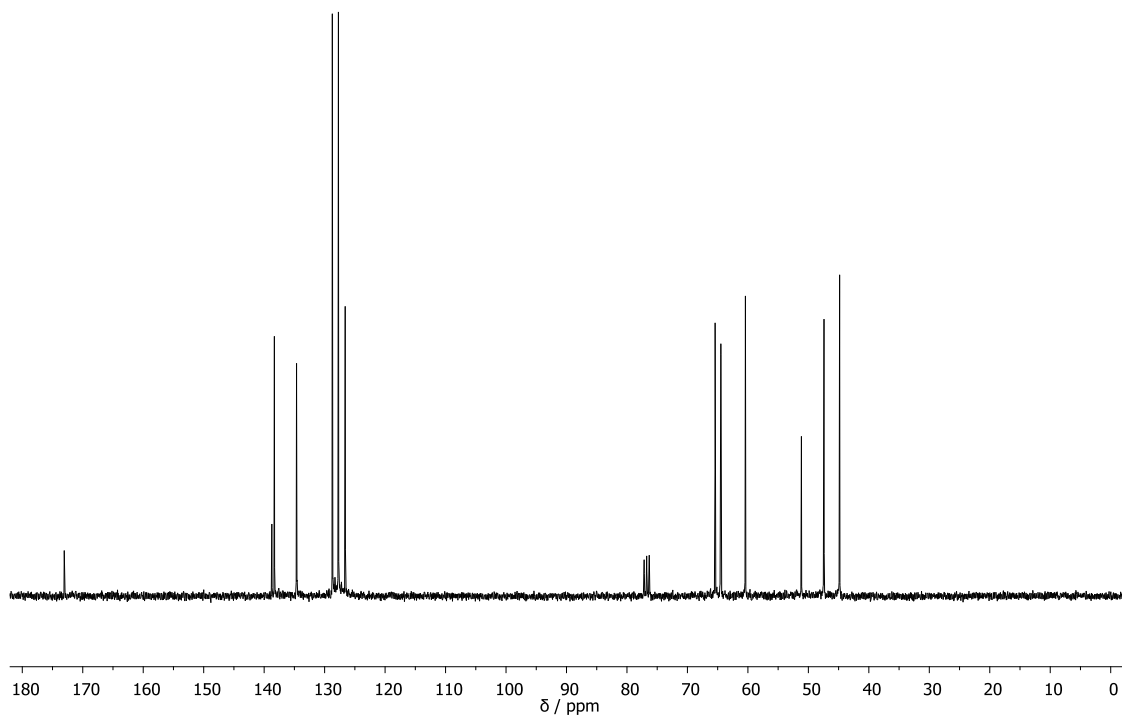
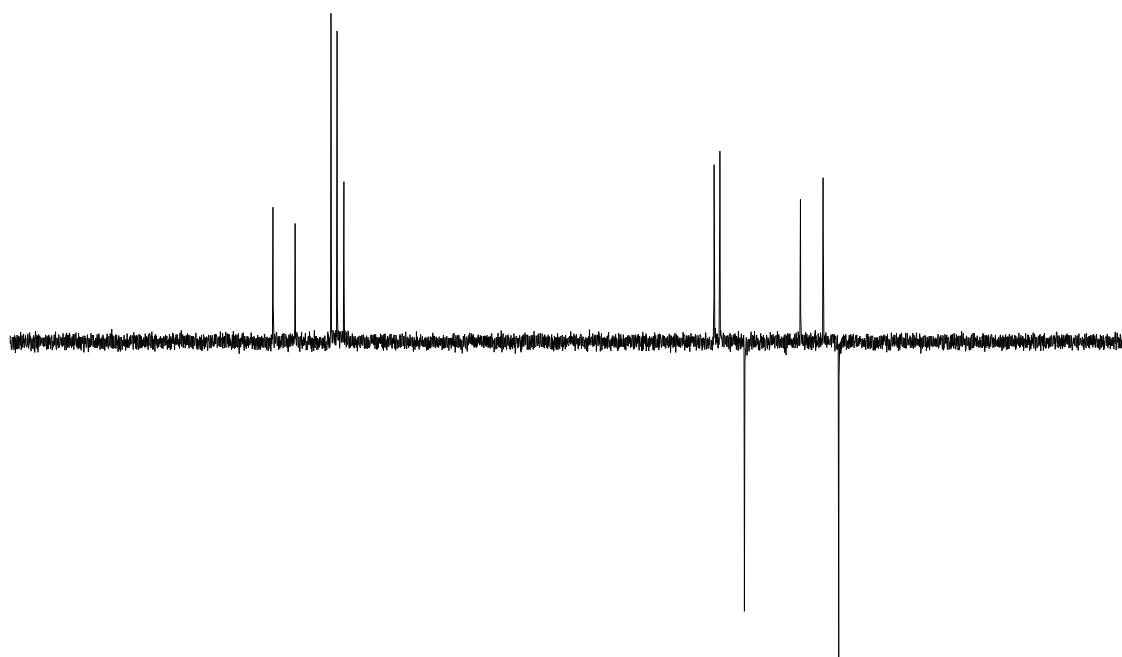
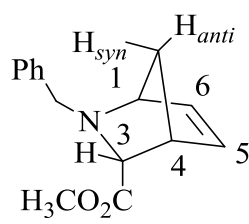
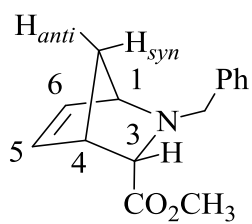
^{13}C -RMN e DEPT (CDCl_3 , 101 MHz) δ ppm: 173.06 (Cq, CO_2CH_3), 138.73 (Cq, C-1'), 138.31 (CH, C-5), 134.65 (CH, C-6), 128.73 (2CH, C-2' + C-6'), 127.72 (2CH, C-3' + C-5'), 126.60 (CH, C-4'), 65.42 (CH, C-3), 64.47 (CH, C-1), 60.41 (CH_2 , NCH_2Ph), 51.15 (CH_3 , OCH_3), 47.41 (CH, C-4), 44.83 (CH_2 , C-7).

EM (IE^+) m/z (%): 243 (M^+ , 2), 184 (29), 152 (1), 91 (100, pico base).

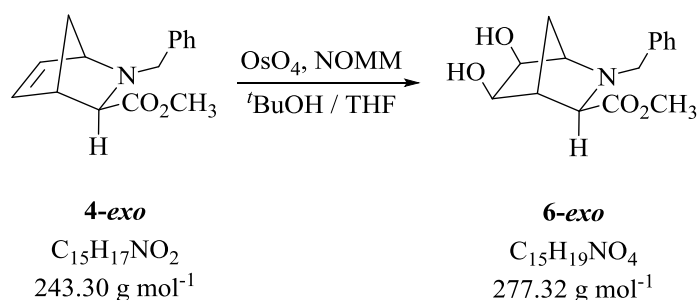








3.2.3. Síntese de (±)-*exo*-2-benzil-5,6-di-hidroxi-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxilato de metilo (6-*exo*)²⁴⁰



Num balão de fundo redondo colocou-se o aduto **4-*exo*** (1.00 g, 4.11 mmol, 1 eq.) e dissolveu-se em 20 mL de uma mistura ^tBuOH/THF 1:1 (V/V). Por fim, adicionou-se NOMM (0.73 g, 6.17 mmol, 1.5 eq) e solução de OsO₄ em dioxano/H₂O (3:1) (4.13 mL, 0.0411 mmol, 0.01 eq.) deixando-se a mistura reacional em agitação à t.a. durante 24h. O catalisador foi removido por filtração através de uma camada de celite/Na₂SO₄ com recurso a pressão reduzida e lavagens de AcOEt (60 mL). Concentrou-se o filtrado à secura e o óleo amarelo resultante (2.26 g) foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna em gel de SiO₂, usando como eluente Hex/AcOEt (1:1), alcançando-se um óleo amarelo escuro (1.07 g), identificado como o diol pretendido (**6-*exo***). Rendimento de 94%.

Composto (±)-**6-*exo***: Óleo amarelo escuro.

R_f: 0.43 em Hex/AcOEt (1:1).

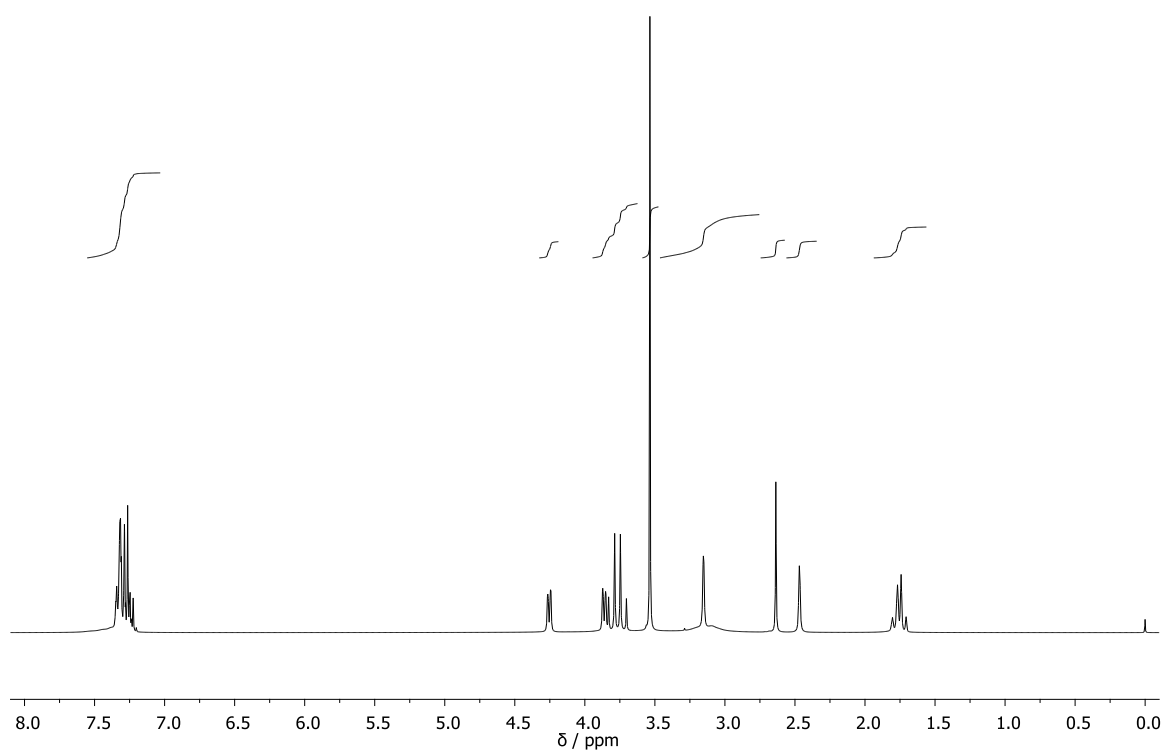
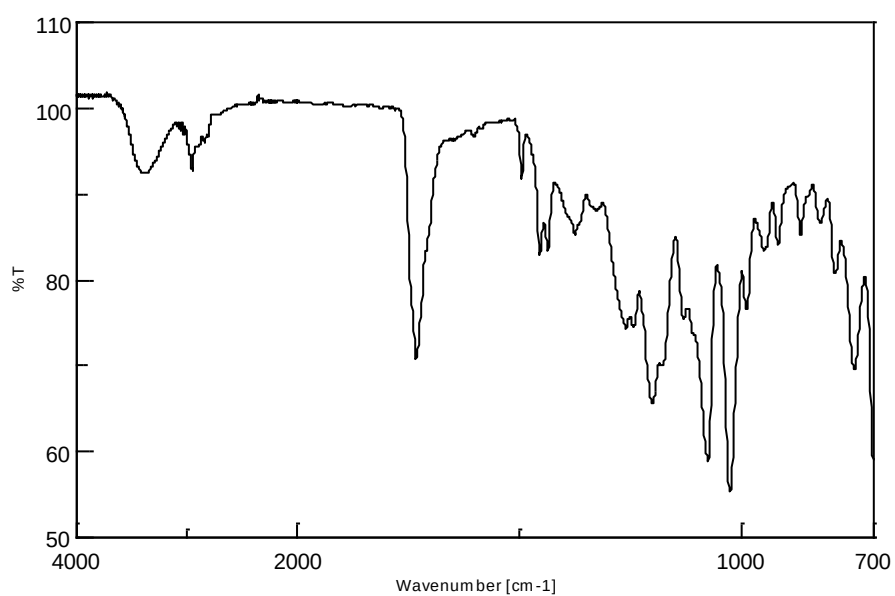
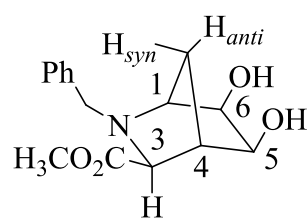
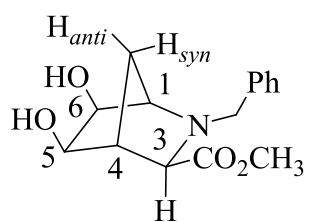
IV ν (cm⁻¹): 3383.50, 2951.52, 2842.56, 1732.73, 1494.56, 1454.06, 1435.74, 1374.03, 1325.82, 1259.29, 1241.93, 1198.54, 1129.12, 1074.16, 1024.02, 986.411, 947.842, 916.022, 864.917.

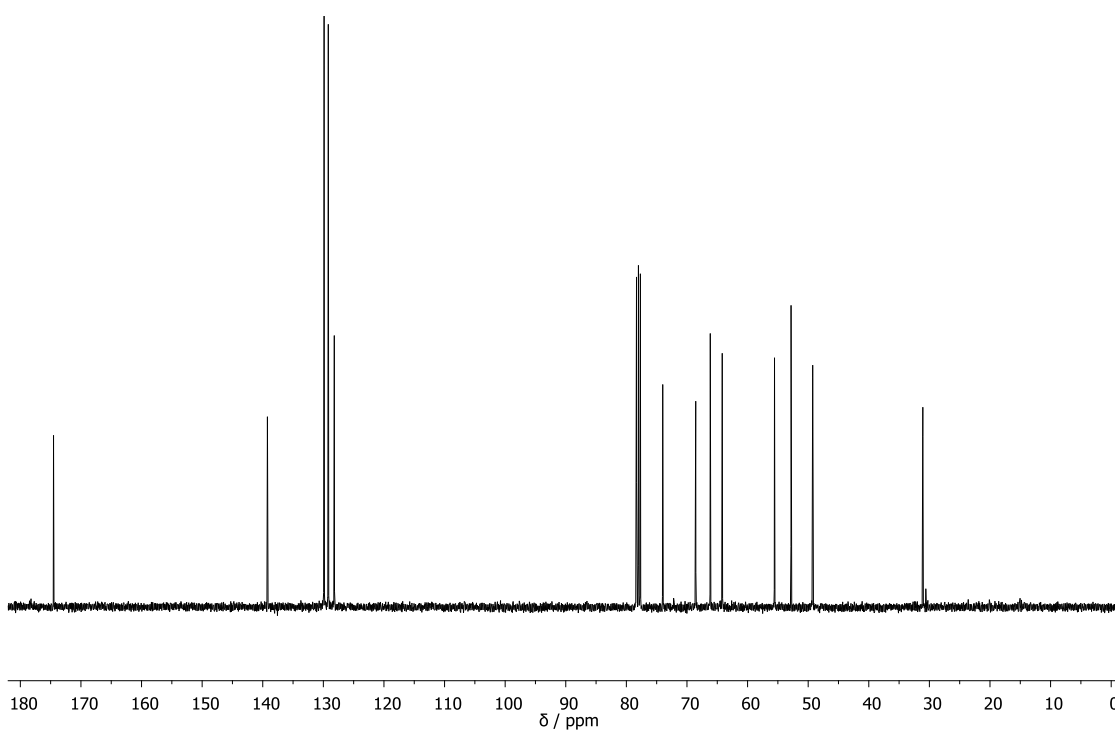
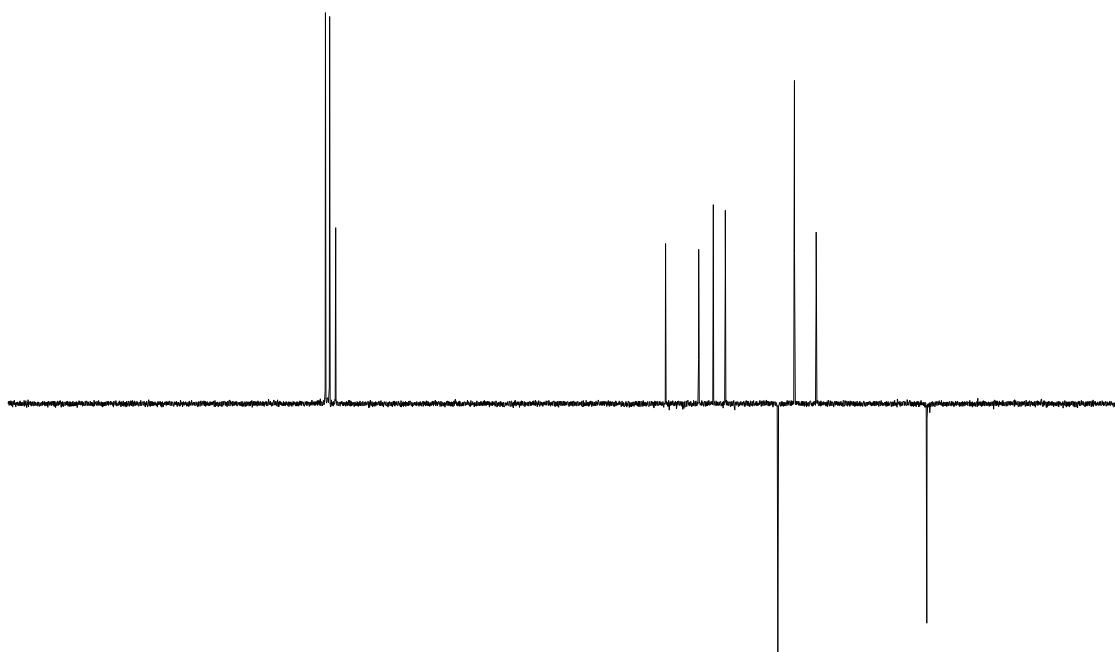
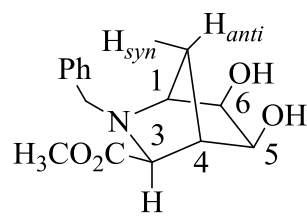
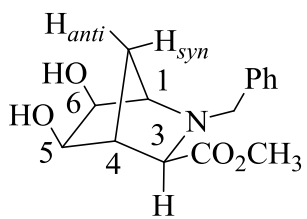
¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ ppm: 7.35 – 7.22 (m, 5H, ArH), 4.25 (d, 1H, J = 5.9 Hz, H-5), 3.86 (d, 1H, J = 6.0 Hz, H-6), 3.84 – 3.69 (sistema AB, 2H, J = 13.0 Hz, NCH₂Ph), 3.54 (s, 3H, OCH₃), 3.41 – 2.90 [3.15 (s), 3H, 2 permutam com D₂O, H-1 + 2 x OH], 2.64 (s, 1H, H-3) 2.47 (s, 1H, H-4), 1.83 – 1.64 (m, 2H, H-7).

¹³C-RMN e DEPT (CDCl₃, 75 MHz) δ ppm: 174.52 (Cq, C=O₂CH₃), 139.23 (Cq, C-1'), 129.88 (2CH, C-2' + C-6'), 129.18 (2CH, C3' + C5'), 128.19 (CH, C-4'), 74.00 (CH, C-6), 68.56 (CH, C-5), 66.15 (CH, C-1), 64.18 (CH, C-3), 55.56 (CH₂, NCH₂Ph), 52.82 (CH₃, OCH₃), 49.26 (CH, C-4), 31.08 (CH₂, C-7).

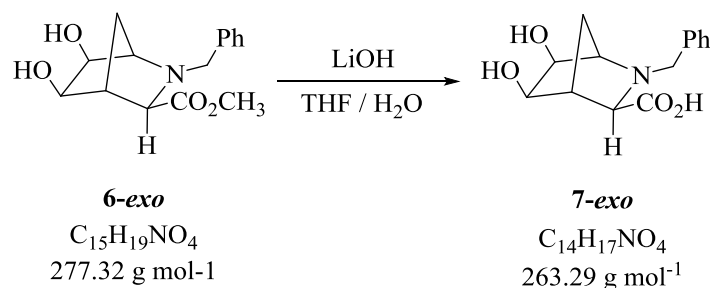
EM (EI⁺) m/z (%): 277.0 (M⁺, 68), 259.9 (66), 215.9 (100, pico base), 185.8 (3), 157.8 (93), 90.9 (85), 65.0 (45).

²²⁸Alves, M. J.; García-Mera, X.; Vale, M. L. C.; Santos, T. P.; Aguiar, F. R.; Rodríguez-Borges, J. E.; *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 7595-7597.





3.2.4. Síntese do ácido ($\pm$)-*exo*-2-benzil-5,6-di-hidroxi-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (7-*exo*)



Sobre uma solução do diol **6-*exo*** (0.64 g, 2.31 mmol, 1 eq.) em THF (6 mL) arrefecida num banho de gelo, adicionou-se uma solução de LiOH (0.853 g, 35.62 mmol, 12.5 eq.) em THF/H₂O (28/23 mL) e deixou-se a mistura resultante reagir com agitação contínua a 0°C durante 30 min e, 48 h, à t.a.. Eliminou-se o THF com recurso a pressão reduzida e procedeu-se à extração líquido-líquido lavando a fase aquosa com CH₂Cl₂. Neutralizou-se a fase aquosa resultante com H₂SO₄ 1M até pH $\approx$ 4 e, em seguida, concentrou-se à secura obtendo-se um sólido branco. Procedeu-se à extração a quente partindo de uma mistura de Et₂O/EtOH (1:3) (100 mL) e filtrou-se. O filtrado resultante foi concentrado sob pressão reduzida obtendo-se um sólido amarelo (0.499 g), identificado como o ácido pretendido (**7-*exo***). Rendimento de 82%.

Composto ($\pm$)-**7-*exo***: sólido amarelo.

R_f: 0.10 em CH₂Cl₂/CH₃OH (10:1).

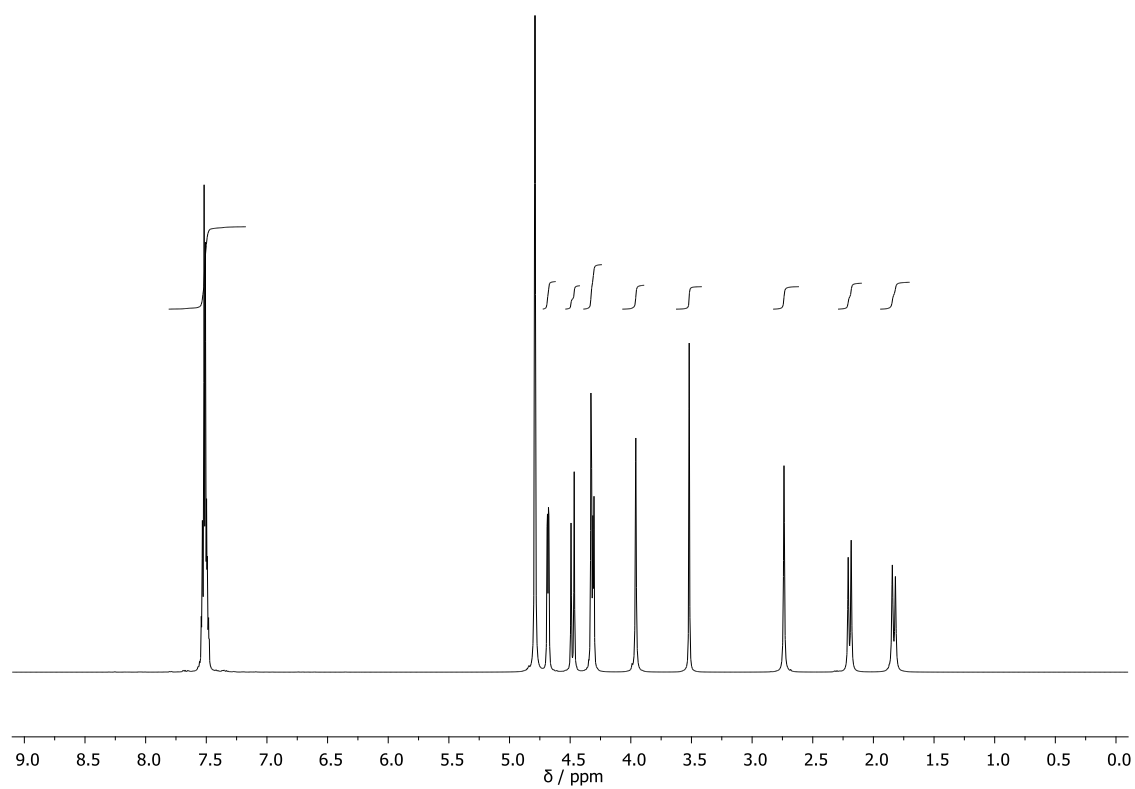
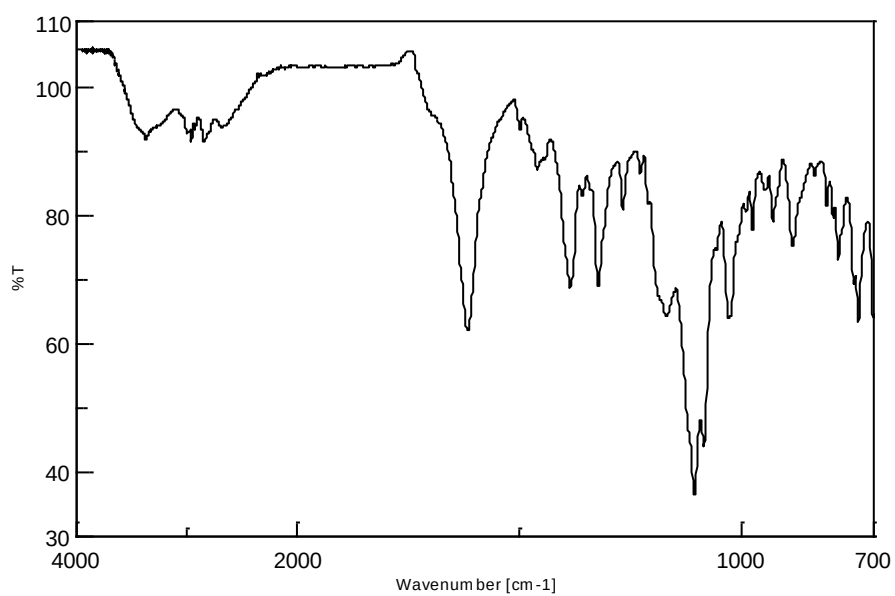
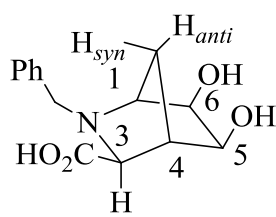
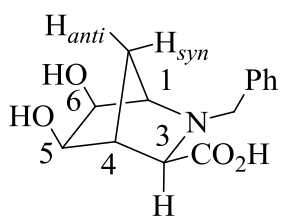
P.f.: 233–235°C

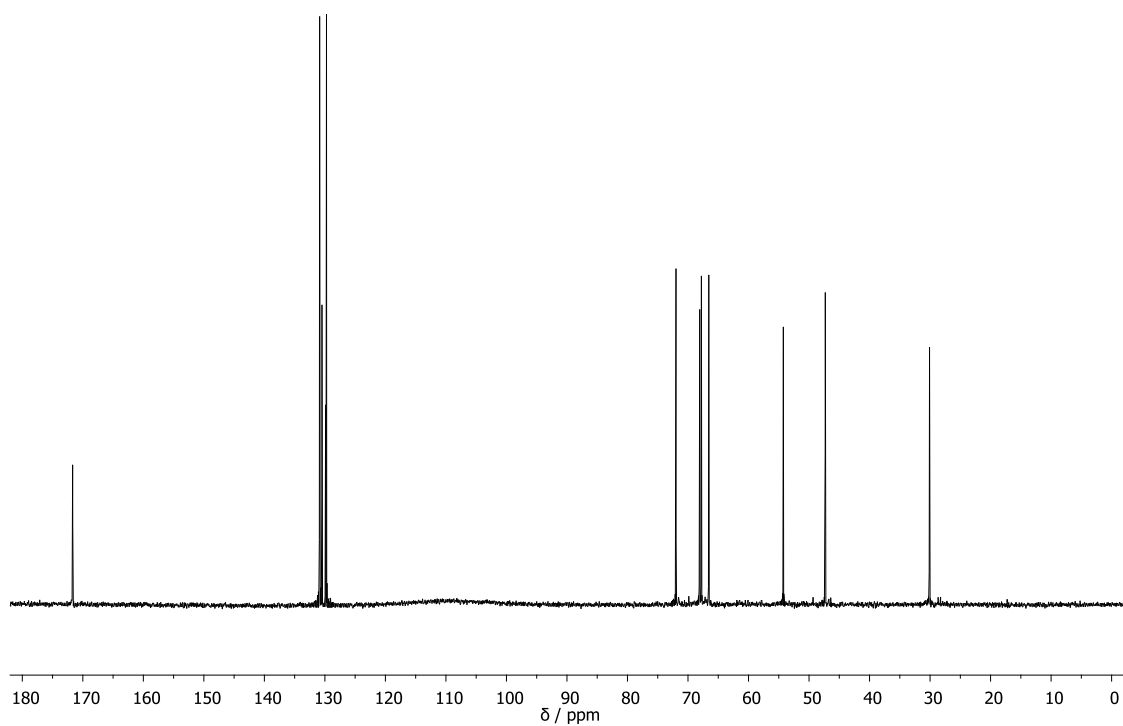
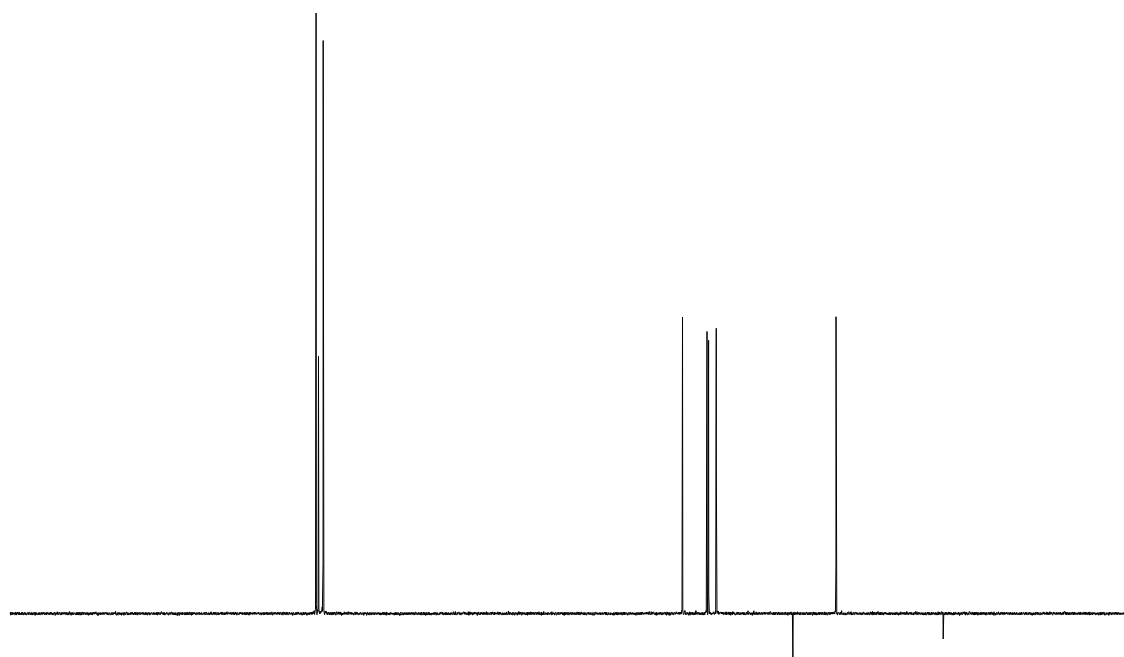
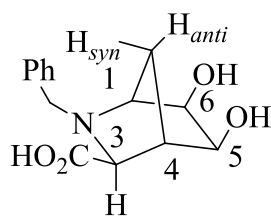
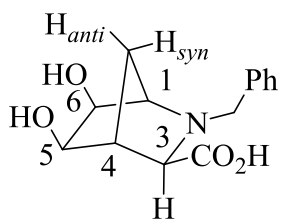
IV ν (cm⁻¹): 3370.96, 2961.16, 2847.38, 1616.06, 1497.45, 1458.89, 1384.64, 1321.00, 1266.04, 1169.62, 1105.01, 1082.83, 1027.87, 882.27, 780.06, 733.78.

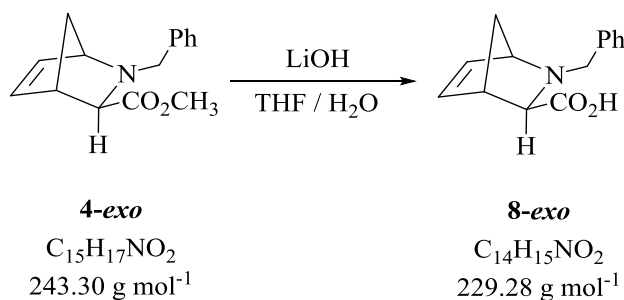
¹H-RMN (D₂O, 500 MHz) δ ppm: 7.86 – 7.17 (m, 5H, ArH), 4.68 (dd, 1H, J = 5.9, 1.7 Hz, H-6), 4.53 – 4.42 (parte A do sistema AB, 1H, J = 13.0 Hz, NCHHPh), 4.37 – 4.25 [4.32 (d, 1H, J = 5.1 Hz, H-5) + (parte B sistema AB, 1H, J = 13.0 Hz, NCHHPh)], 3.96 (s, 1H, H-3), 3.52 (s, 1H, H-1), 2.74 (s, 1H, H-4) 2.20 (d, 1H, J = 12.5 Hz, H-7_{syn}), 1.83 (d, 1H, J = 12.5 Hz, H-7_{anti}).

¹³C-RMN e DEPT (D₂O, 125 MHz) δ ppm: 171.68 (Cq, CO₂H), 130.87 (Cq, C-1'), 130.49 (2CH, C-2' + C-6'), 129.89 (2CH, C-3' + C-5'), 129.73 (CH, C-4'), 71.99 (CH, C-6), 68.07 (CH, C-5), 67.79 (CH, C-1), 66.57 (CH, C-3), 54.26 (CH₂, NCH₂Ph), 47.32 (CH, C-4), 30.10 (CH₂, C-7).

EM (IE⁺) m/z (%): 264.0 (MH⁺, 100, pico base), 246.0 (44), 218.1 (24), 202.1 (52), 158.2 (80), 105.1 (6) 91.1 (74).





3.2.5. Síntese do ácido ($\pm$)-*exo*-2-benzil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carboxílico (**8-*exo***)

Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação do ácido **7-*exo*** (secção 3.2.4.), procedeu-se à hidrólise alcalina do aduto **4-*exo*** (1.030 g, 4.23 mmol) deixando-se reagir durante 48h e, em seguida, efetuou-se o tratamento corrente. Obteve-se um sólido branco (0.882 g), identificado como o ácido pretendido (**8-*exo***). Rendimento de 91%.

Composto ($\pm$)-**8-*exo***: sólido branco.

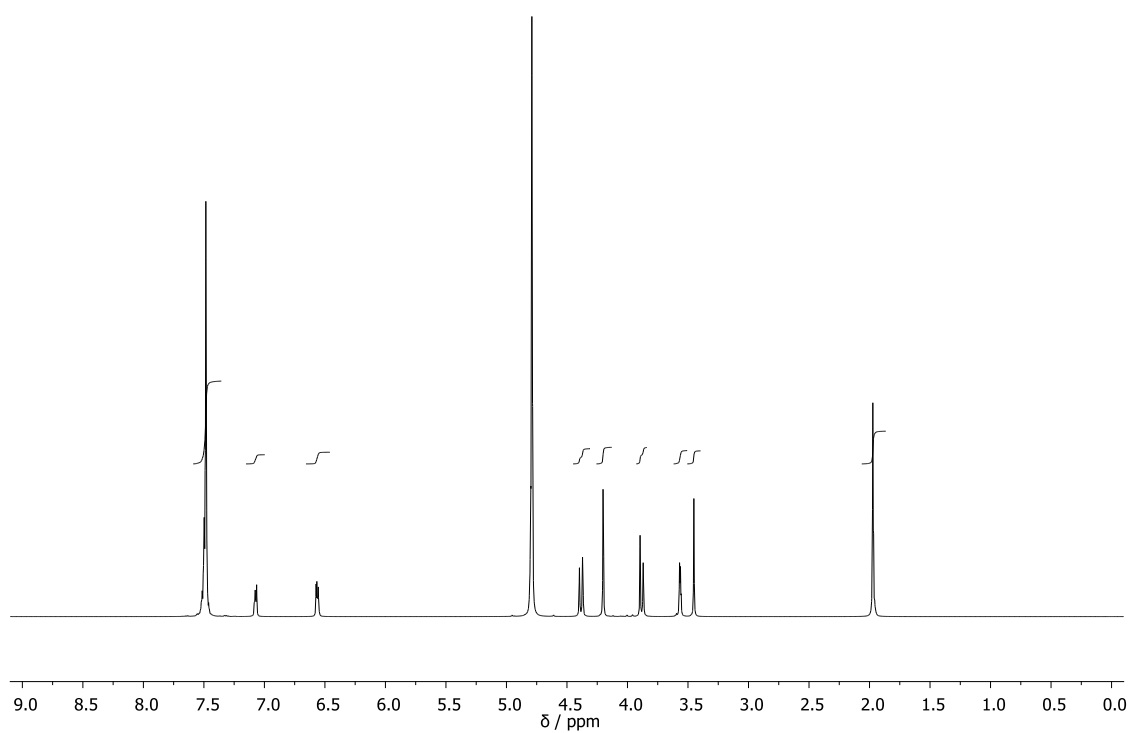
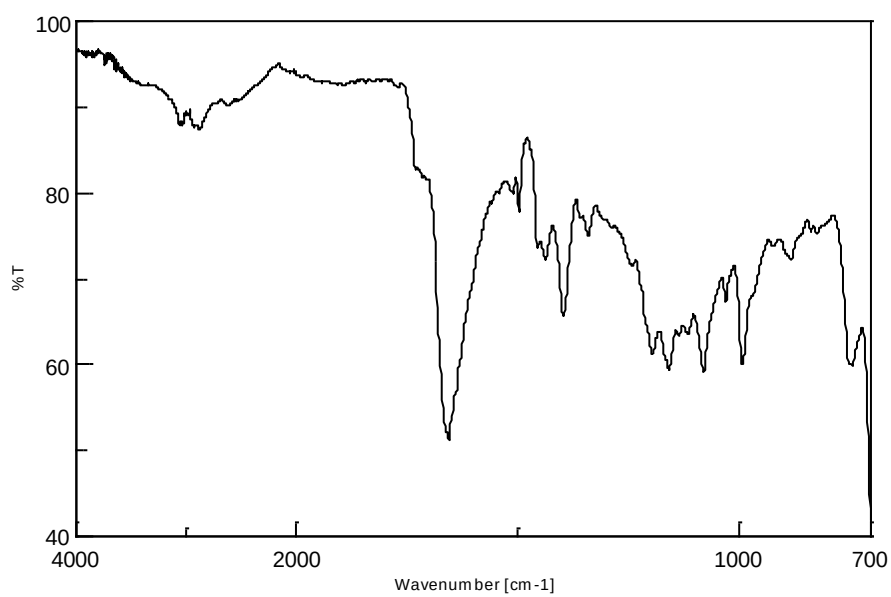
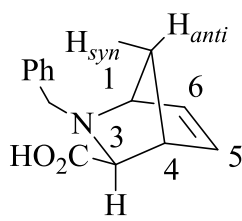
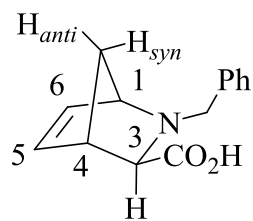
P.f.: 111–112°C

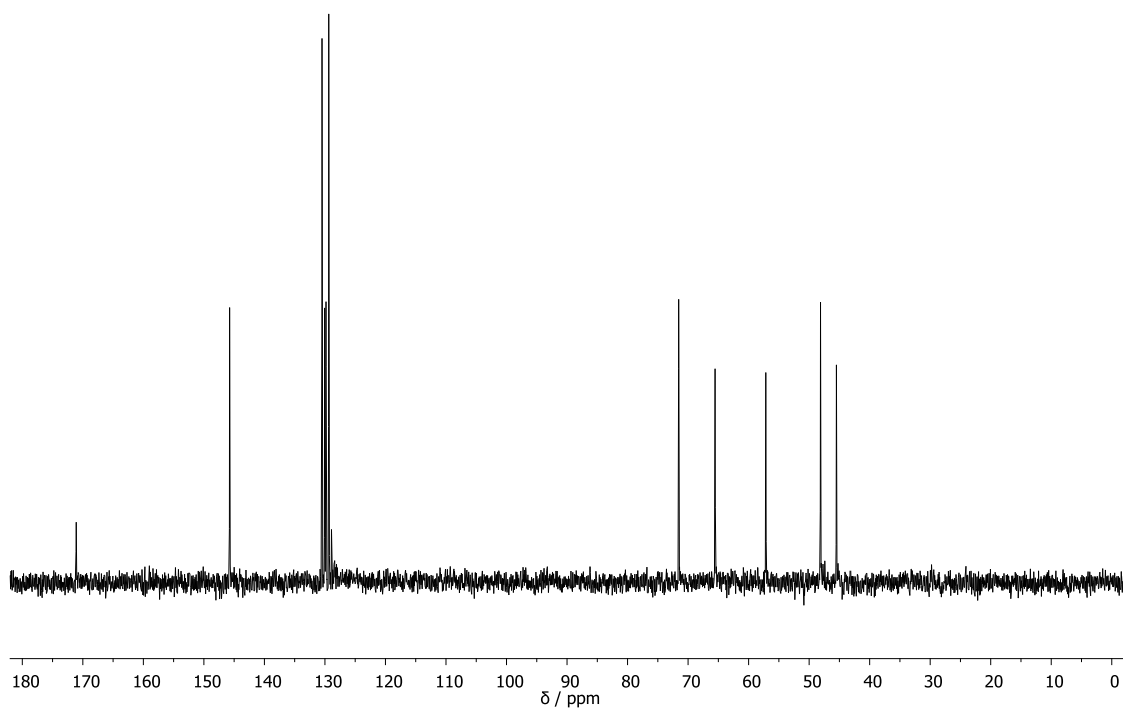
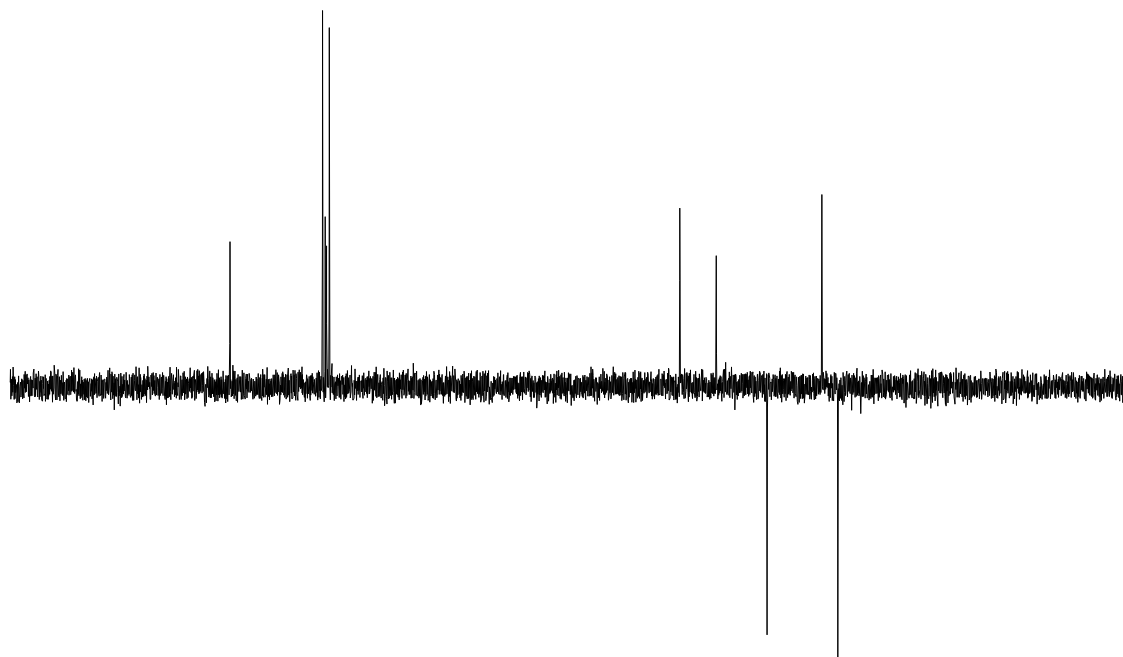
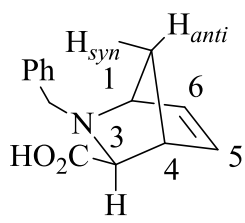
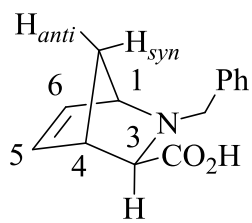
IV ν (cm^{-1}): 3060.48, 3032.51, 2927.41, 2880.17, 1654.62, 1509.03, 1496.49, 1453.10, 1436.71, 1396.21, 1339.32, 1240.97, 1194.69, 1156.12, 1114.65, 1078.98, 1028.84, 991.232, 921.807, 880.345, 835.99, 821.527, 741.496.

^1H -RMN (D_2O , 500 MHz) δ ppm: 7.57 – 7.41 (m, 5H, ArH), 7.07 (dd, 1H, $J = 5.9$, 3.2 Hz, H-5), 6.56 (dd, 1H, $J = 5.9$, 3.2 Hz, H-6), 4.43 – 4.34 (parte A do sistema AB, 1H, $J = 12.8$ Hz, NCHHPh), 4.20 (s, 1H, H-1), 3.93 – 3.83 (parte B do sistema AB, 1H, $J = 12.8$ Hz, NCHHPh), 3.57 (d, 1H, $J = 3.5$ Hz, H-4), 3.45 (s, 1H, H-3), 1.97 (s, 2H, H-7).

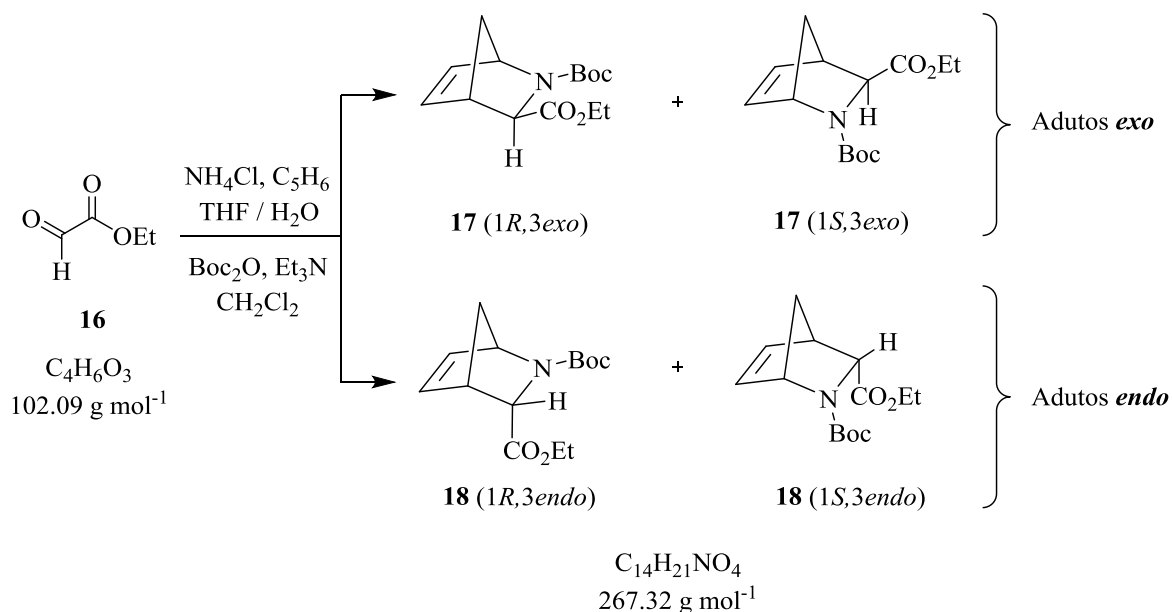
^{13}C -RMN e DEPT (D_2O , 125 MHz) δ ppm: 171.09 (Cq , CO_2H), 145.75 (CH, C-5), 130.48 (2CH, C-2' + C-6'), 130.05 (CH, C-6), 129.85 (Cq , C-1'), 129.82 (CH, C-4'), 129.37 (2CH, C-3' + C-5'), 71.56 (CH, C-3), 65.55 (CH, C-1), 51.17 (CH_2 , NCH_2Ph), 48.12 (CH, C-4), 45.50 (CH_2 , C-7).

EM (IQ^+) m/z : 229.9 (M^+ , 61), 210.0 (19), 193.9 (52), 185.0 (22), 175.9 (11), 163.9 (96), 145.9 (36), 134.0 (21), 117.0 (60), 106.0 (90), 91.0 (100, pico base), 79.1 (46), 67.1 (59), 55.2 (16).





3.2.6. (±)-*exo*-2-(*tert*-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carboxilato de etilo (17-*exo*) e (±)-*endo*-2-(*tert*-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carboxilato de etilo (18-*endo*)



Sobre uma solução de glioxilato de etilo comercial (**16**) (3.00 g, 29.39 mmol, 1 eq.) em THF (40 mL), adicionou-se uma solução de NH_4Cl (3.14 g, 58.77 mmol, 2 eq.) em dH_2O (40 mL) e, em seguida, CPD recentemente bidestilado (4.8 mL, 58.77 mmol) deixando-se reagir durante 21h. A mistura resultante lavou-se com $AcOEt$ (3 x 80 mL) e ajustou-se o pH da fase aquosa para 9 com solução saturada de $NaHCO_3$ e KOH 1M; extraiu-se com CH_2Cl_2 (6 x 80 mL), secou-se com Na_2SO_4 anidro, filtrou-se e concentrou-se à secura. O óleo cor de vinho obtido foi diluído com CH_2Cl_2 (100 mL) e adicionou-se Boc_2O (6.30 g, 29.39 mmol, 1 eq.), Et_3N (8.2 mL, 58.77 mmol, 2 eq.) e deixou-se a reagir durante 24h.

A mistura resultante foi concentrada à secura alcançando-se 8.42 g de um óleo castanho que foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna de gel de SiO_2 , usando-se como eluente Hex/ $AcOEt$ (3:1). Obteve-se 5.62 g de um óleo amarelo claro, identificado como sendo o aduto **17-*exo*** (rendimento de 72%); 0.47 g de um resíduo oleoso acastanhado como mistura dos adutos **17-*exo*/18-*endo***; 1.72 g de um óleo amarelo claro, identificado como sendo **18-*endo*** (rendimento de 22%).

Composto (±)-**17-*exo***: óleo amarelo claro.

R_f: 0.49 em Hex/ $AcOEt$ (3:1).

IV ν (cm^{-1}): 3069.16, 2977.55, 2934.16, 1748.16, 1698.02, 1477.21, 1455.99, 1388.50, 1365.35, 1322.93, 1286.29, 1250.61, 1218.79, 1193.72, 1159.97, 1140.69, 1122.37, 1105.01, 1087.66, 1028.84, 954.591, 931.450, 899.63, 862.025, 817.670, 775.244, 751.138, 728.961.

^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ ppm (verifica-se a presença de rotâmeros): 6.65 – 6.26 (m, 2H, H-5 + H-6), 4.87 – 4.57 (m, 1H, H-1), 4.15 (q, 2H, $J = 7.0$ Hz, CH_2CH_3), 3.59 – 3.37 (m, 1H, H-3), 3.28 (s, 1H, H-4), 1.99 (dt, 1H, $J = 8.6, 1.6$ Hz, H-7_{syn}), 1.63 – 1.35 [1.39 (s), 10H, H-7_{anti} + Boc], 1.29 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, CH_2CH_3).

^{13}C -RMN e DEPT (CDCl_3 , 101 MHz) δ ppm (verifica-se a presença de rotâmeros): 171.61 (Cq, CO_2Et), [155.78, 154.63, (Cq, Boc)], [137.19, 136.25, (C-5 + C-6)], 79.87 (Cq, Boc), 61.84 (CH, C-3), 61.03 (CH_2 , CH_2CH_3), 60.36 (CH, C-3), 59.01 (CH, C-1), [48.95, 48.26, (CH, C-4)], [45.48, 45.19, (CH_2 , C-7)], 28.31(3CH_3 , Boc), 14.23 (CH_3 , CH_2CH_3)

EM (ESI, CH_3OH) m/z (%): 290.1352 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100, pico base), 234.0735 (20), 212.0918 (7), 190.0814 (3), 187.0745 (3), 151.0754 (53), 123.0449 (61), 105.0361 (90), 95.0493 (58), 77.0371 (1).

EMAR: cálculo para $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NNaO}_4^+$: 290.1363; obtida: 290.1352.

Composto ($\pm$)-**18-endo**: óleo amarelo claro.

R_f: 0.40 em Hex/ AcOEt (3:1).

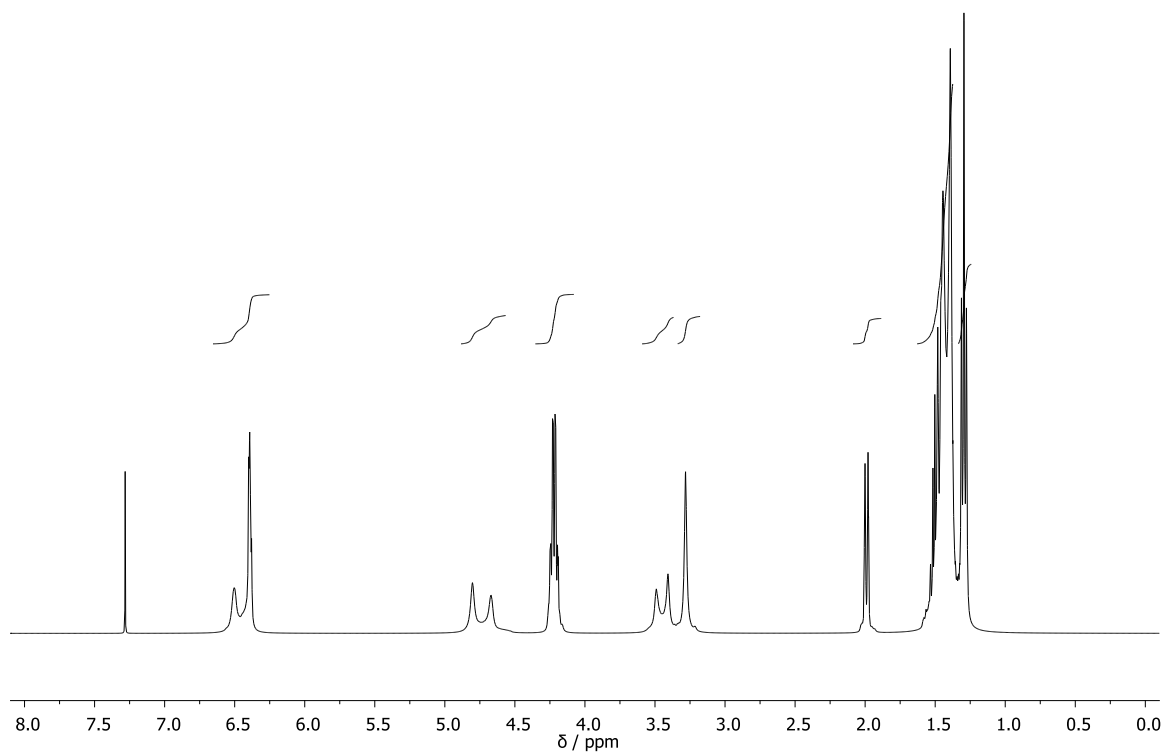
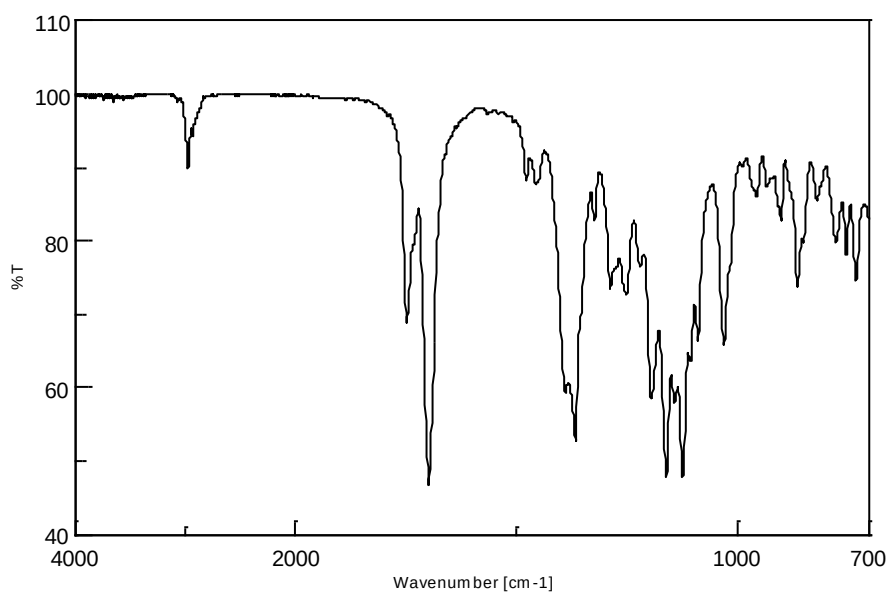
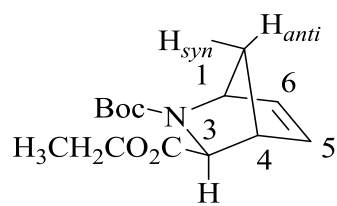
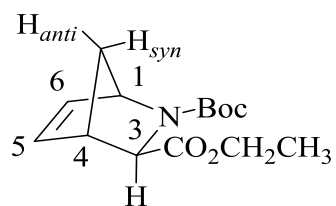
IV ν (cm^{-1}): 3072.05, 2978.52, 2933.20, 1753.94, 1730.80, 1697.05, 1476.24, 1455.99, 1397.17, 1365.35, 1329.68, 1297.86, 1255.43, 1245.75, 1221.68, 1179.26, 1159.97, 1131.05, 1106.94, 1086.69, 1029.80, 967.126, 948.806, 907.344, 866.846, 832.133, 801.278, 763.673, 747.281, 726.068.

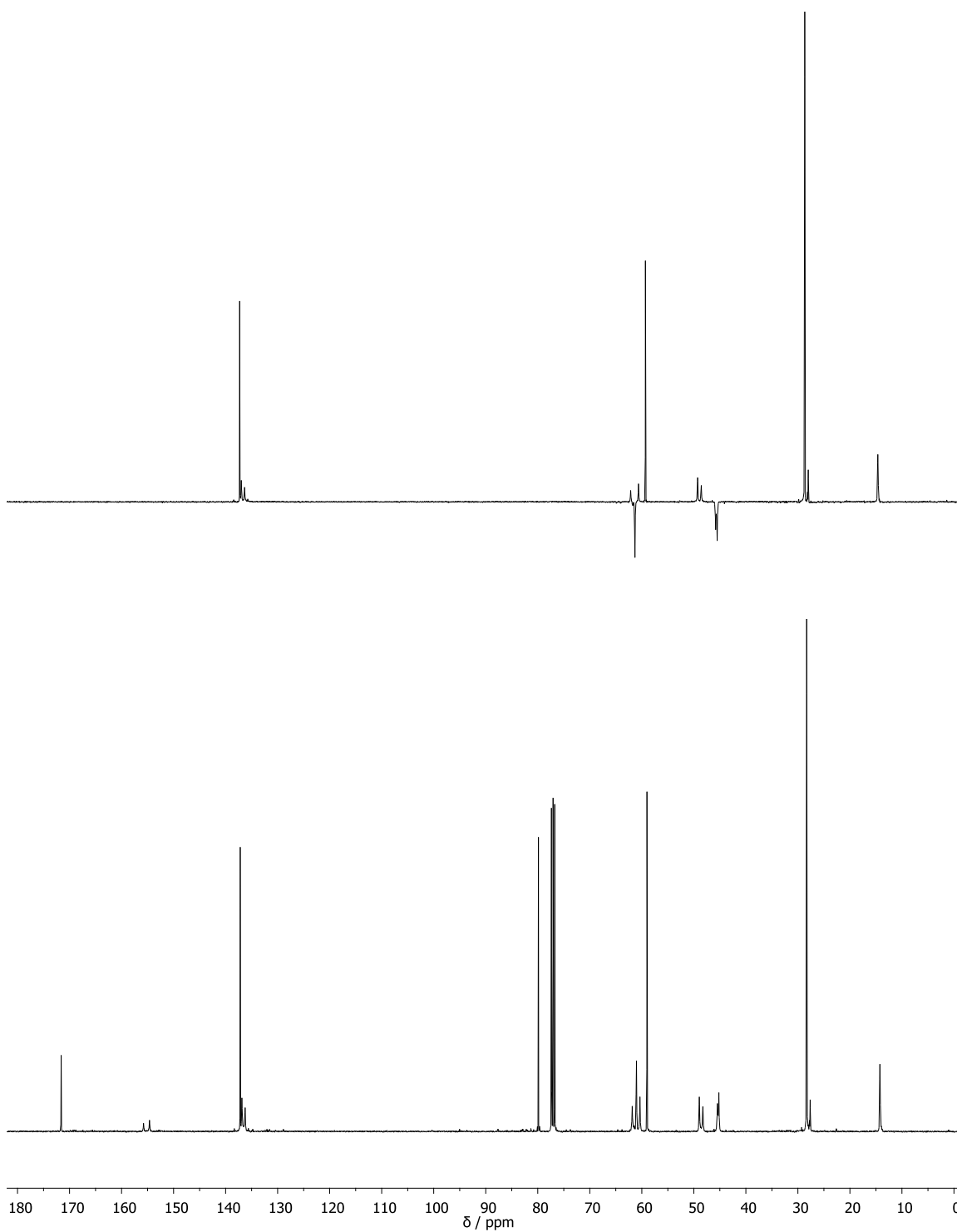
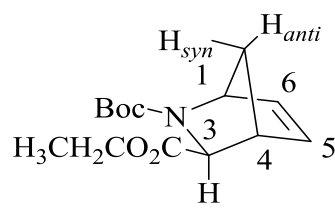
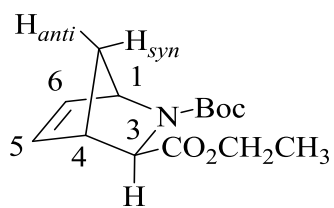
^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ ppm (verifica-se a presença de rotâmeros): 6.51 (s, 1H, H-6), 6.06 (s, 1H, H-5), 4.94 – 4.65 (m, 1H, H-1), 4.37 – 4.19 (m, 1H, H-3), 4.17 – 4.00 (m, 1H, CH_2CH_3), 3.44 (dtd, 1H, $J = 2.8, 1.8, 1.0$ Hz, H-4), 1.37 (s, 9H, Boc), 1.69 – 1.55 (m, 2H, H-7), 1.21 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH_2CH_3).

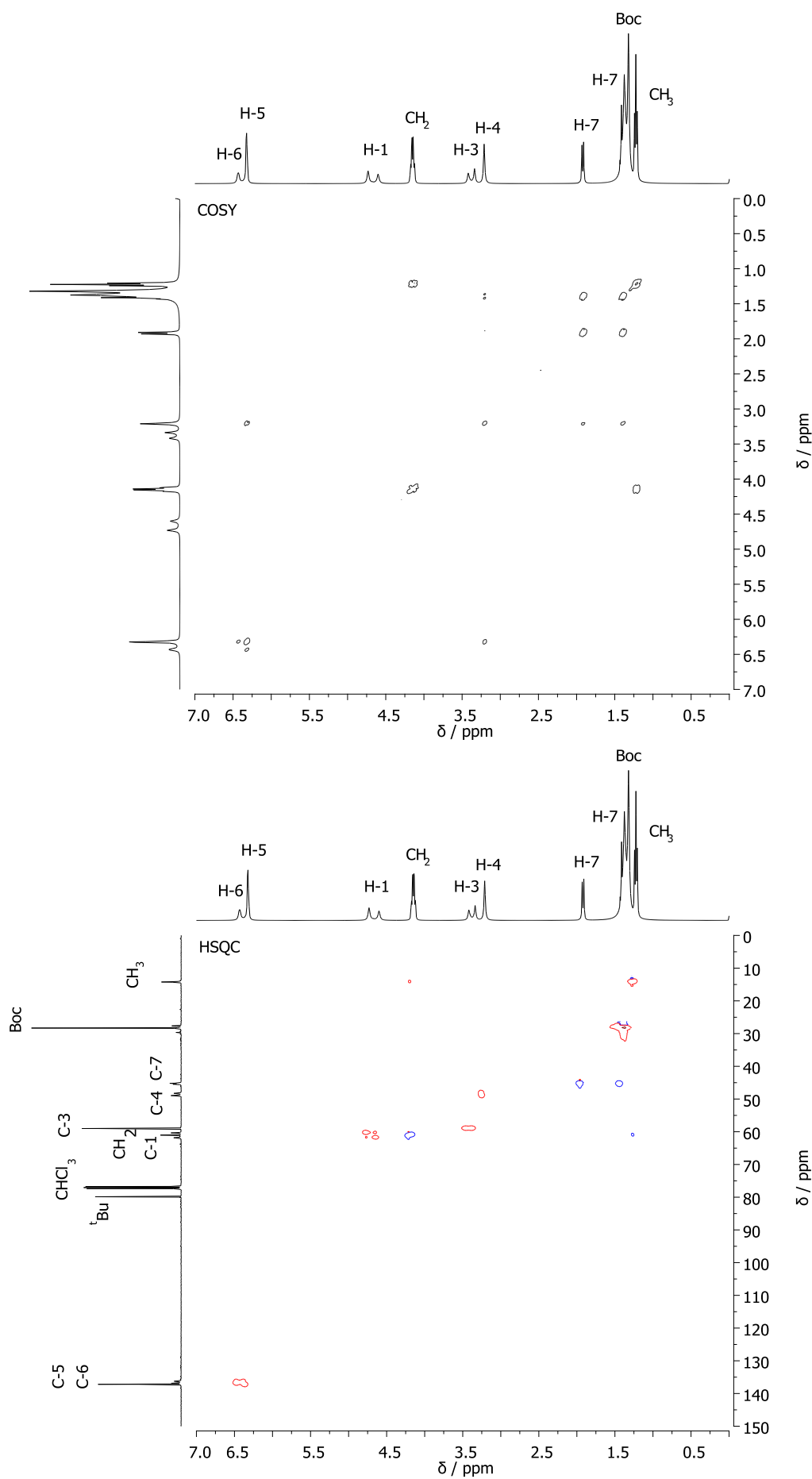
^{13}C -RMN e DEPT (CDCl_3 , 101 MHz) δ ppm (verifica-se a presença de rotâmeros): 170.64 (Cq, CO_2Et), 153.81 (Cq, Boc), 136.75 (CH, C-5), 134.03 (CH, C-6), 79.85 (Cq, Boc), 61.27 (CH, C-3), 60.75 (CH_2 , CH_2CH_3), 57.96 (CH, C-1), 49.70 (CH_2 , C-7), 48.40 (CH, C-4), 28.47 (3CH_3 , Boc), 14.34 (CH_3 , CH_2CH_3).

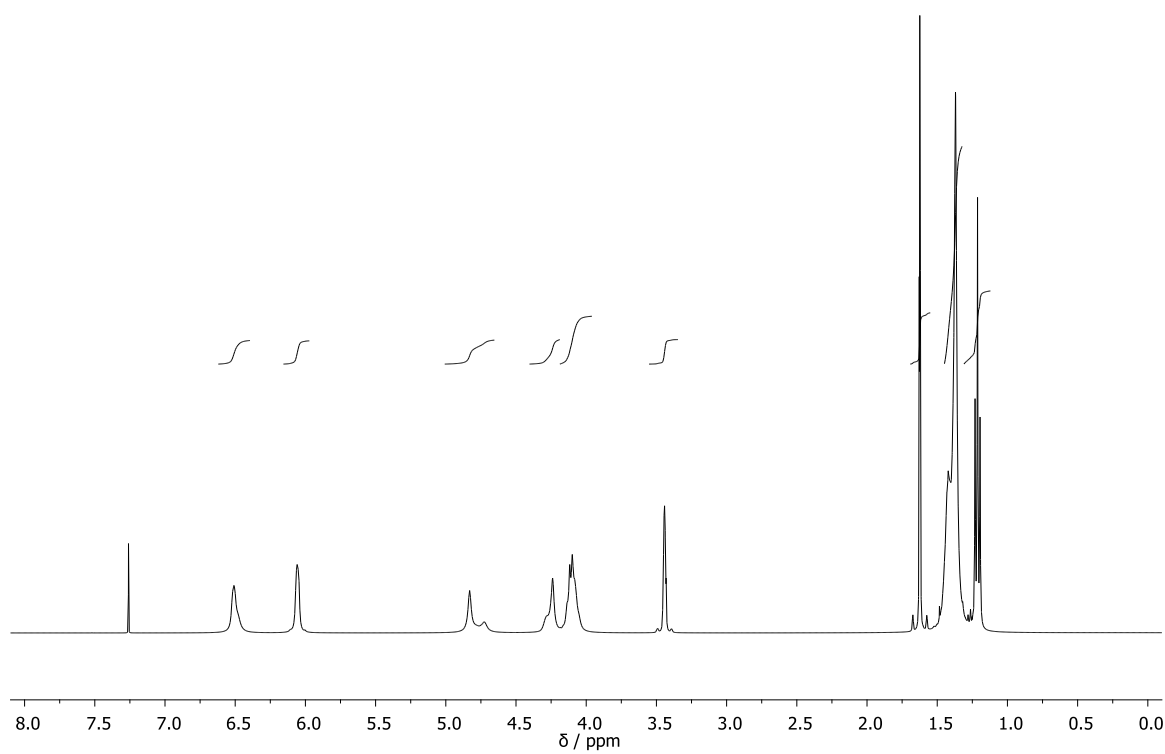
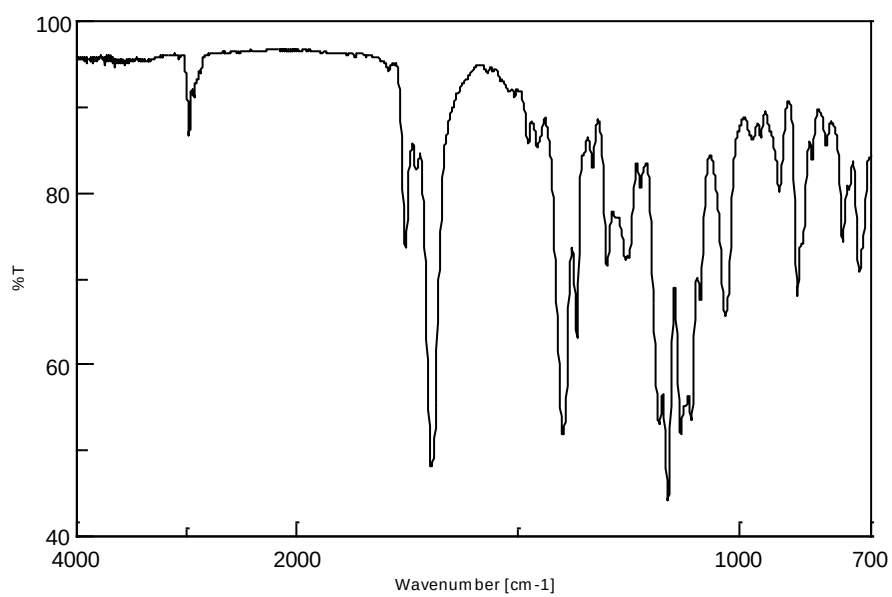
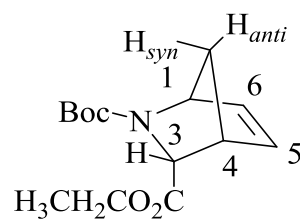
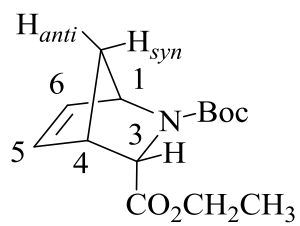
EM (ESI, CH_3OH) m/z (%): 290.1352 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100, pico base), 234.0739 (19), 212.0921 (8), 190.0829 (6), 187.0745 (3), 151.0752 (50), 123.0445 (60), 105.0359 (99), 95.0491 (64), 77.0410 (2).

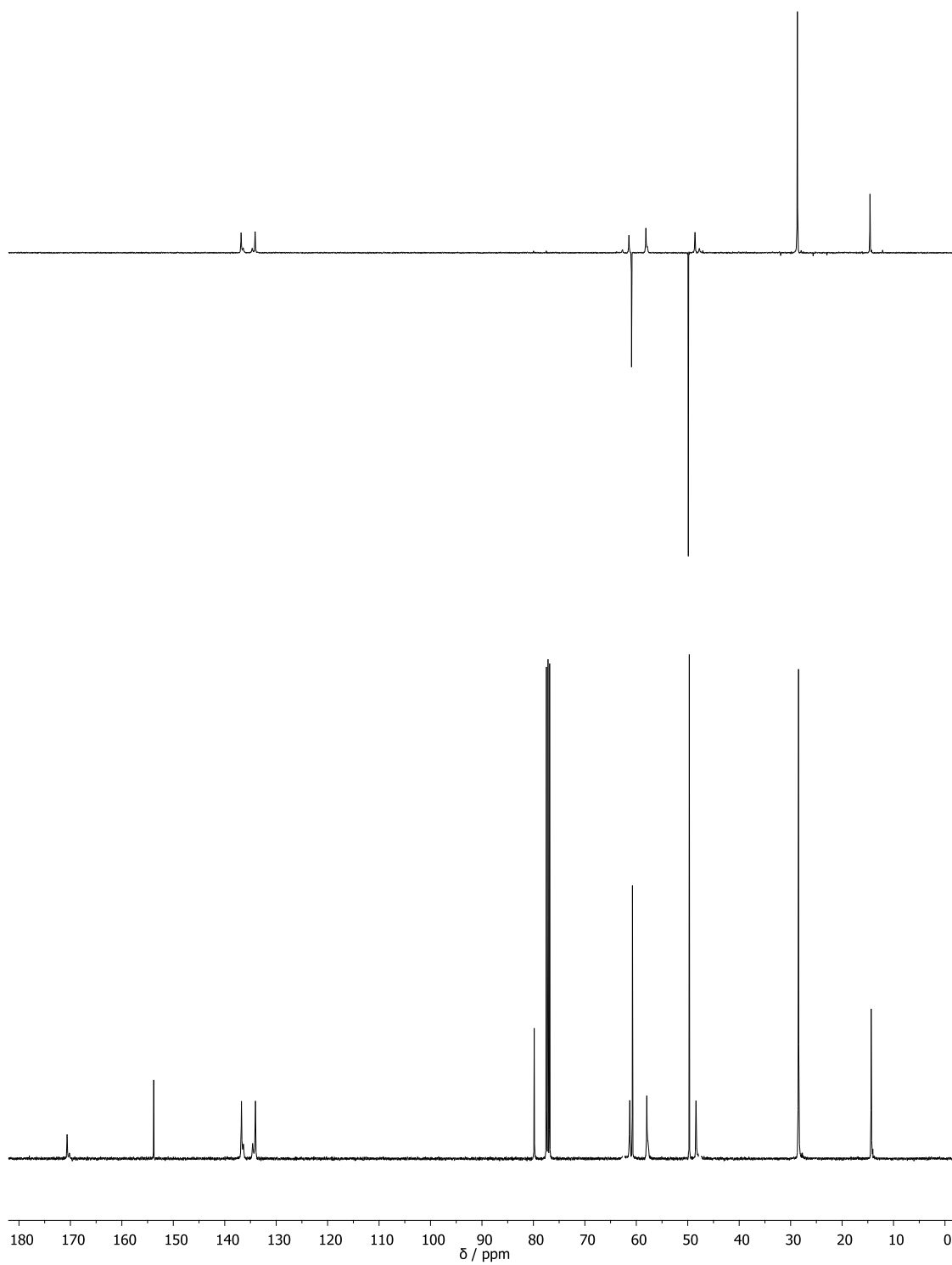
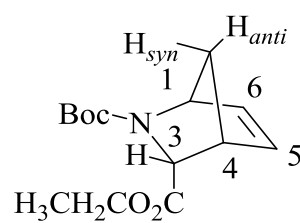
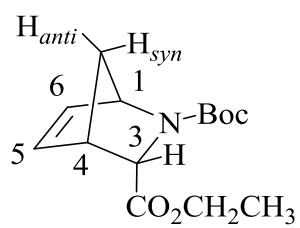
EMAR: cálculo para $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NNaO}_4^+$: 290.1363; obtida: 290.1352.

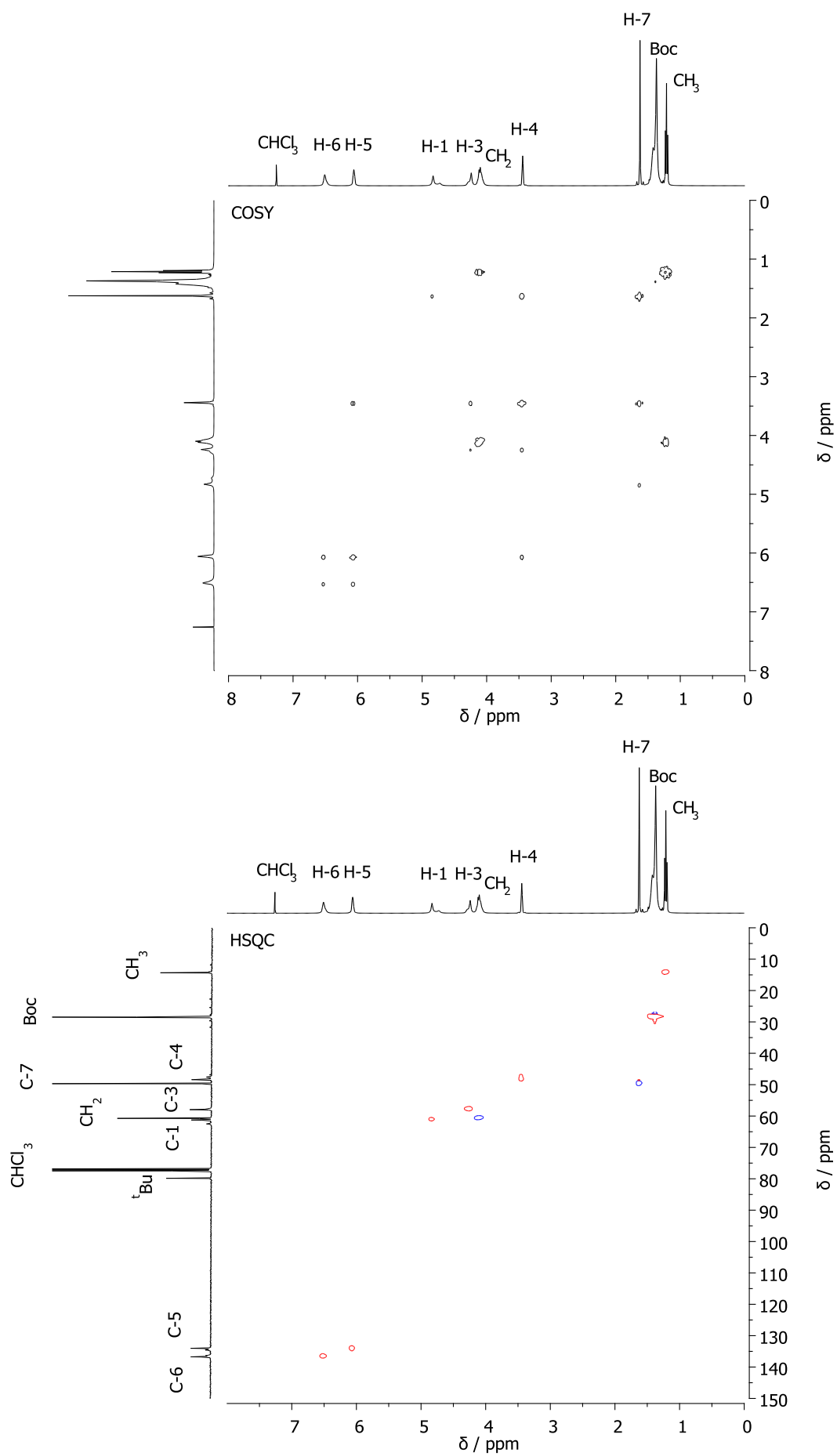




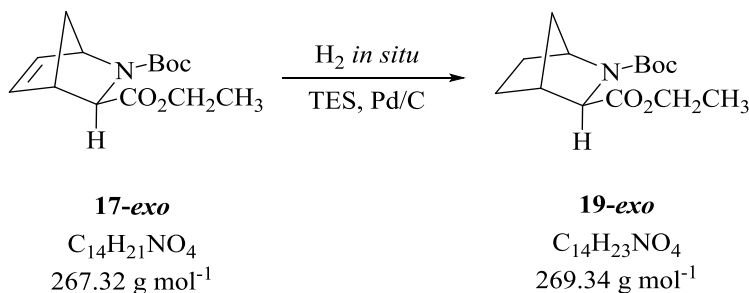








3.2.7. Síntese de (±)-*exo*-2-(*terc*-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxilato de etilo (**19-*exo***)



De acordo com o procedimento descrito por Mandal e McMurray,³⁰⁰ num balão de fundo redondo adicionou-se uma solução do aduto **17-*exo*** (1.05 g, 3.93 mmol, 1 eq.) em MeOH seco (4 mL) e, em seguida, Pd/C 10% (0.105 g) em MeOH seco (10 mL) num sistema contendo um funil de adição equilibrador de pressão previamente purgado com H₂. Colocou-se a suspensão em agitação magnética à temperatura ambiente e adicionou-se, gota-a-gota, TES (5.96 mL, 37.4 mmol, 10 eq.).

Ao fim de 10 min de reação evaporou-se o MeOH com recurso a pressão reduzida e procedeu-se à eliminação do catalisador por filtração em camada de celite com lavagens de CH₂Cl₂. Eliminou-se o solvente à secua obtendo-se 5.81 g de um óleo amarelo claro. Procedeu-se à purificação do composto pretendido através de cromatografia líquida de adsorção em coluna de gel de SiO₂ utilizando-se como eluente Hex/AcOEt (3:1). Obteve-se de um óleo amarelo claro (1.0585 g), identificado como sendo o bicyclo pretendido (**19-*exo***). Rendimento de 100%.

Composto (±)-**19-*exo***: óleo amarelo claro.

R_f: 0.40 em Hex/AcOEt (3:1).

IV ν (cm⁻¹): 2977.55, 2930.31, 2877.27, 1751.05, 1697.05, 1476.24, 1454.06, 1402.96, 1365.35, 1319.07, 1300.75, 1279.54, 1258.32, 1247.72, 1179.26, 1158.04, 1116.58, 1100.19, 1027.87, 957.484, 925.664, 891.916, 864.917, 846.597, 814.777, 791.636, 762.709, 744.388.

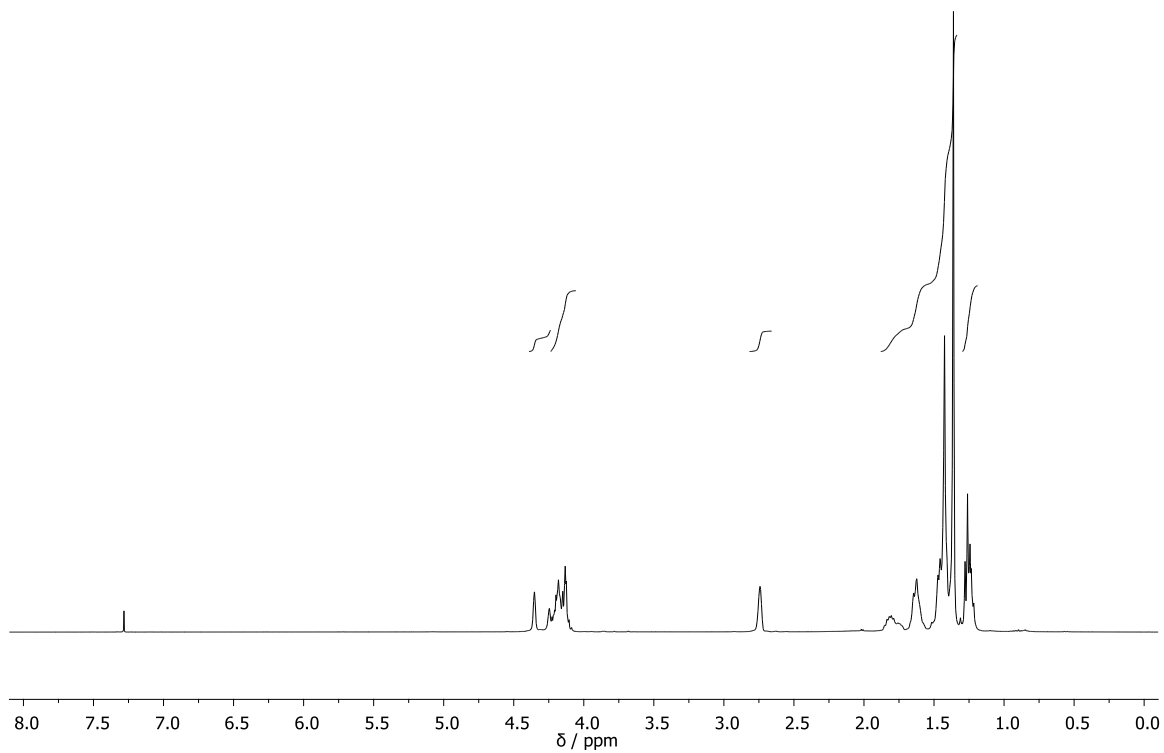
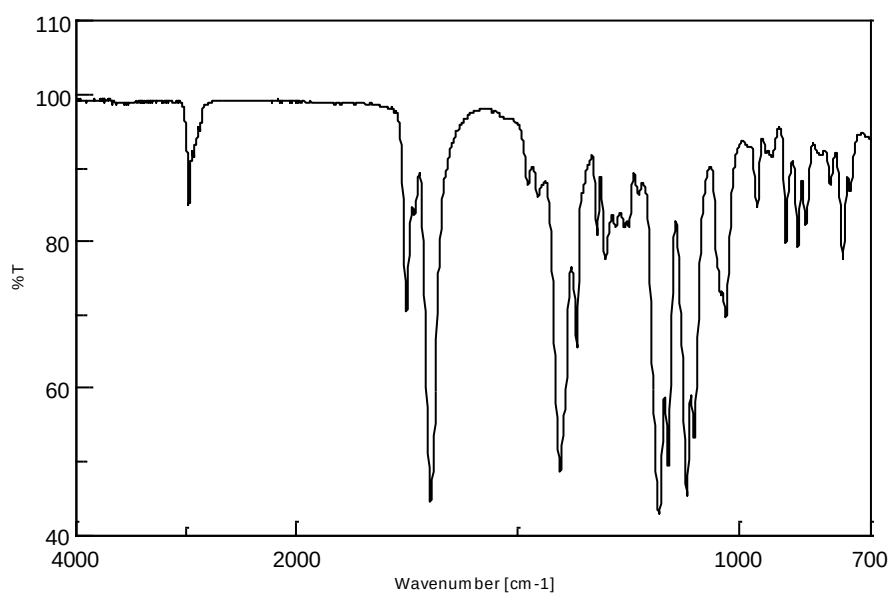
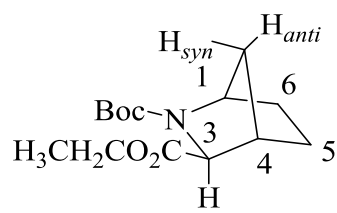
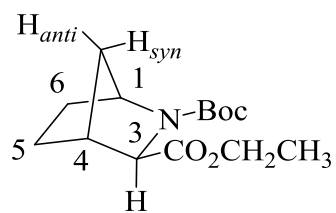
¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 4.44 – 4.28 (m, 1H, H-1), 4.27 – 4.11 (m, 3H, H-3 + CH₂CH₃), 2.78 (s, 1H, H-4), 1.97 – 1.36 [1.46 (s), 1.40 (s), 15H, H-5 + H-6 + H-7 + Boc], 1.36 – 1.21 [1.29 (t, *J* = 7.1 Hz), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz), 3H, CH₂CH₃].

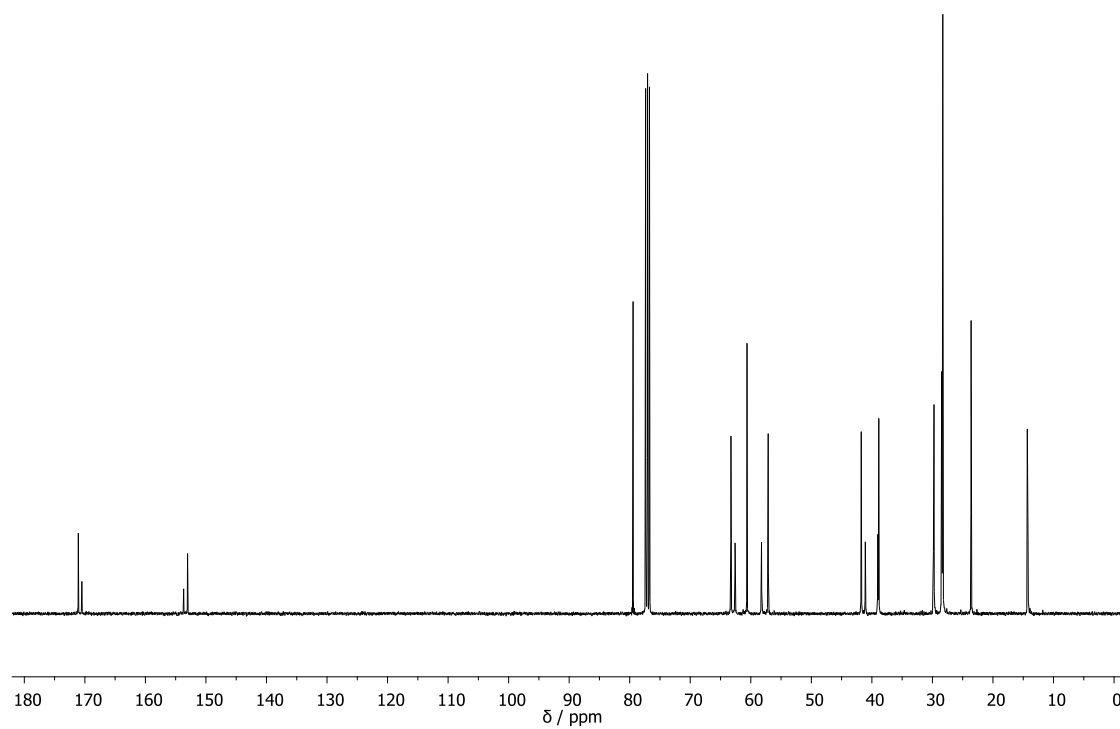
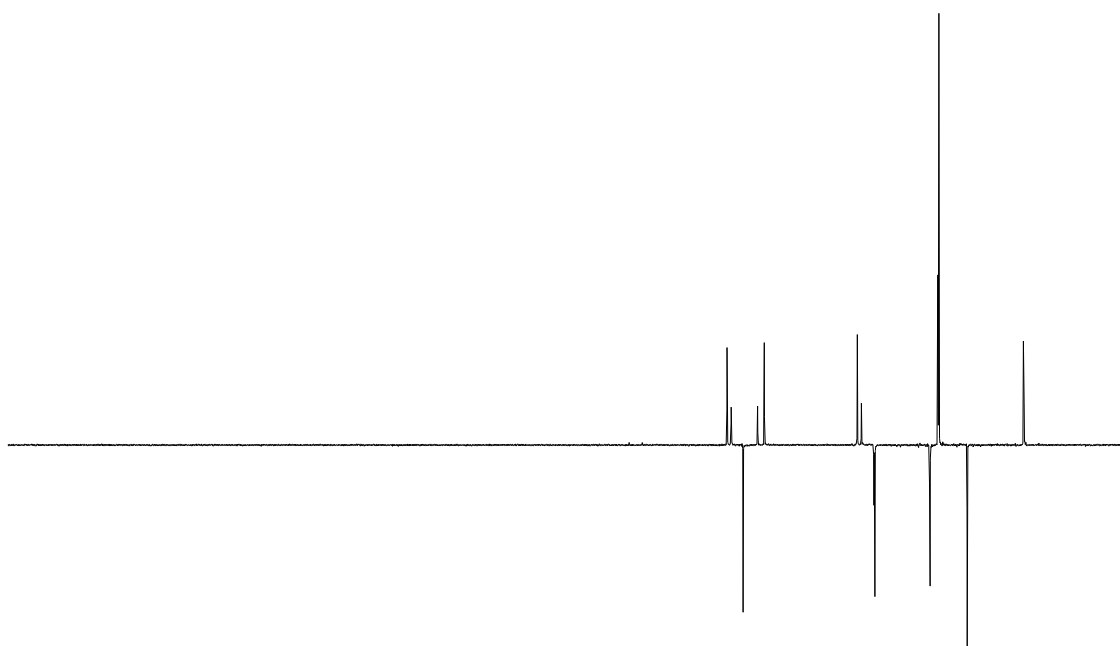
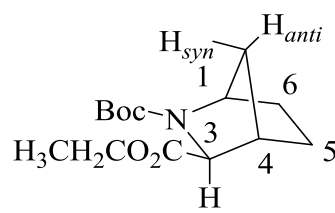
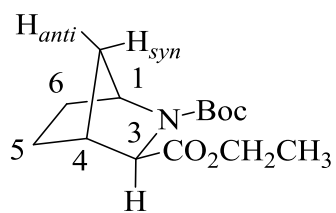
³⁰⁰Mandal, P. K.; McMurray, J. S. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 6599-6601.

^{13}C -RMN e DEPT (CDCl_3 , 101 MHz) δ ppm: [171.08 (Cq), 170.49 (Cq), CO_2Et], [153.68 (Cq), 153.03 (Cq), CO_2^tBu], 79.44 (Cq, Boc), [63.28 (CH), 62.60 (CH), C-3], 60.62 (CH_2 , CH_2CH_3), [58.23 (CH), 57.13 (CH), C-1], [41.76 (CH), 41.08 (CH), C-4], [39.03 (CH_2), 38.86 (CH_2), C-7], [29.83 (CH_2), 29.74 (CH_2), C-6], [28.47 (3CH_3), 28.29 (3CH_3), Boc], 23.61 (CH_2 , C-5), [14.33 (CH_3), 14.21 (CH_3), CH_2CH_3].

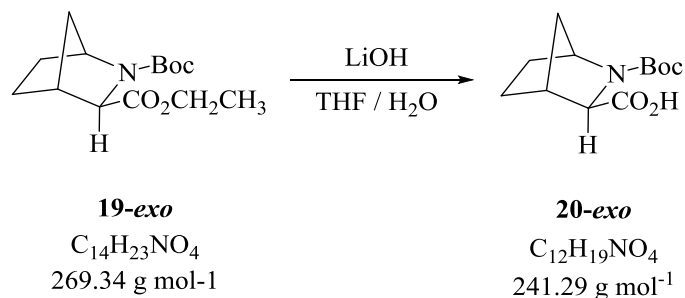
EM (ESI, CH_3OH) m/z (%): 308.12416 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, 6), 292.15031 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 6), 270.16931 (MH^+ , 6), 214.10624 (100, pico base), 170.11647 (86).

EMAR: cálculo para $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{NO}_4^+$: 270.16998; obtida: 270.16931.





3.2.8. Síntese do ácido ($\pm$)-*exo*-2-(*tert*-butoxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carboxílico (**20-*exo***)



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação do ácido **7-*exo*** (seção 3.2.4.), procedeu-se à hidrólise alcalina de **19-*exo*** (1.0664 g, 3.96 mmol, 1 eq.) deixando-se reagir durante 48 h e, em seguida, efetuou-se o tratamento corrente. Obteve-se **20-*exo*** como um sólido bege (803.3 mg). Rendimento de 84%.

Composto ($\pm$)-**20-*exo***: sólido bege.

R_f : 0.11 em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (20:1).

$P.f.$: 148–150°C

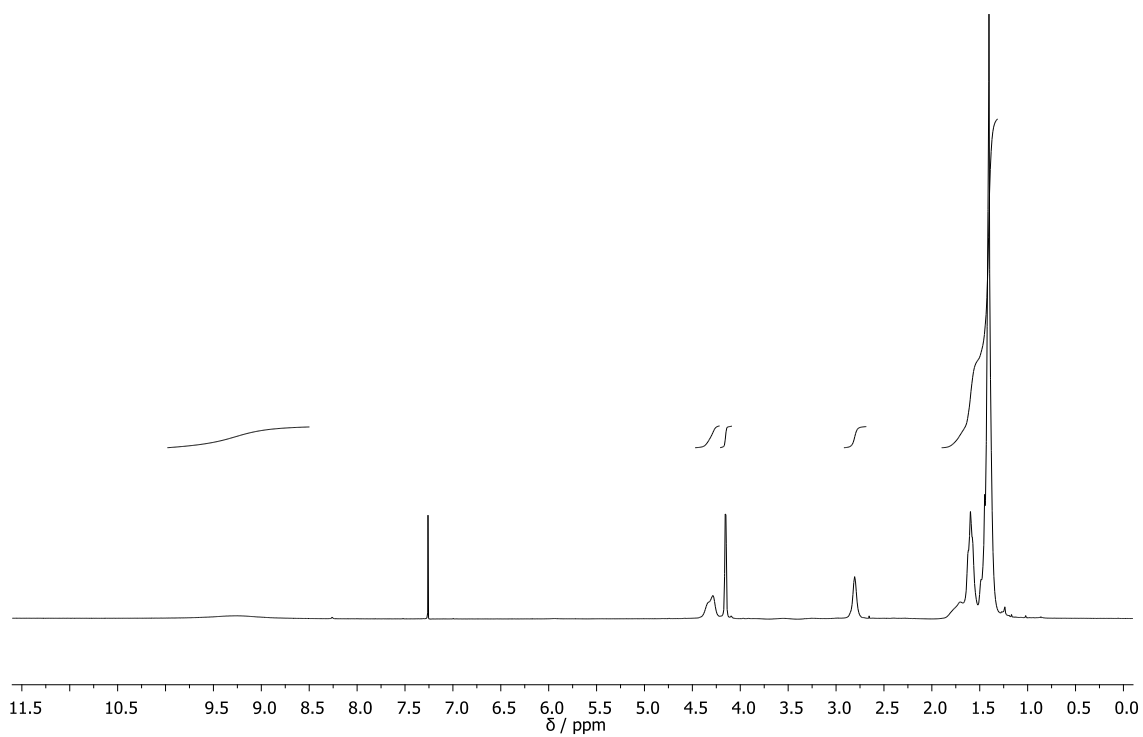
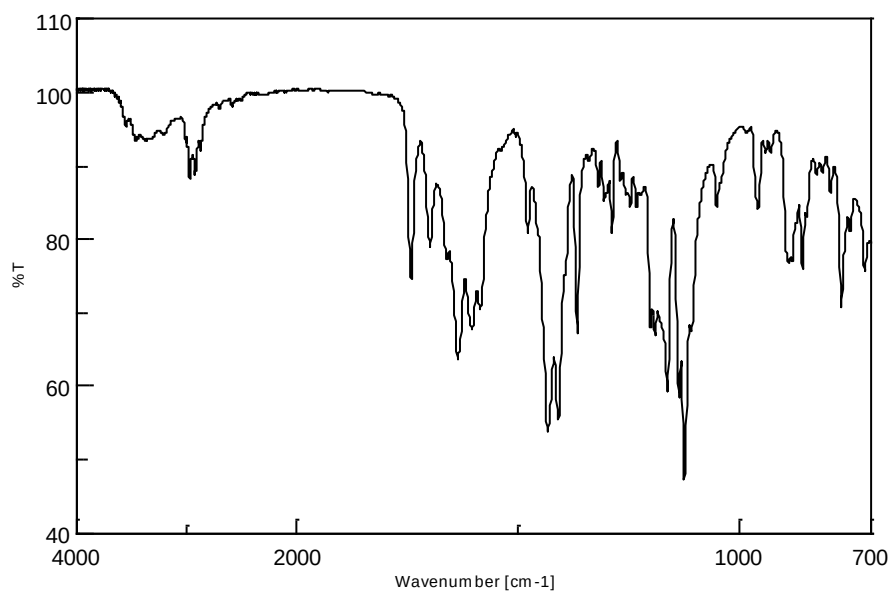
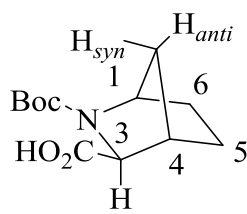
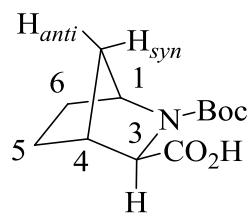
$\text{IV } \nu \text{ (cm}^{-1}\text{)}$: 3370.96, 2971.77, 2923.56, 2877.27, 1741.41, 1698.98, 1636.30, 1603.52, 1585.20, 1477.21, 1431.89, 1407.78, 1365.35, 1317.14, 1304.61, 1286.29, 1245.79, 1231.33, 1199.51, 1188.90, 1160.94, 1134.90, 1122.37, 1049.09, 955.555, 942.056, 927.593, 886.131, 855.275, 822.491, 791.636, 766.566, 747.281, 713.533.

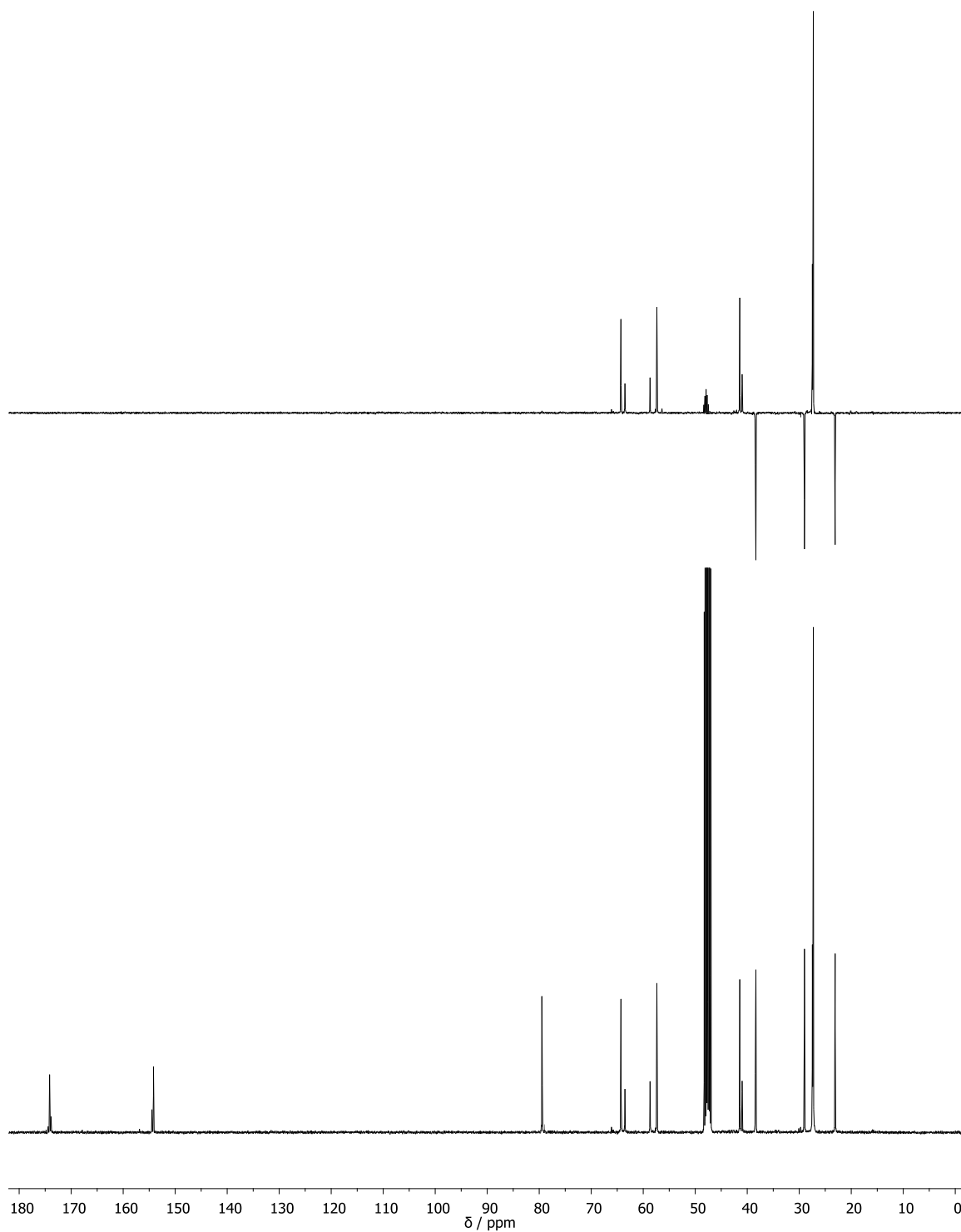
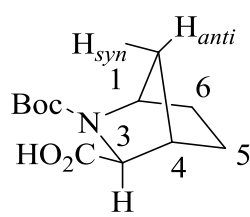
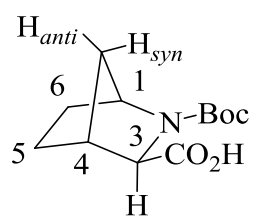
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ ppm: 9.27 (sl, 1H, permuta com D_2O , CO_2H), 4.42 – 4.22 (m, 1H, H-3), 4.15 (d, 1H, $J = 2.8 \text{ H}$, H-1), 2.81 (sl, 1H, H-4), 1.91 – 1.30 [1.43 (s), 15H, H-5 + H-6 + H-7 + Boc].

$^{13}\text{C-RMN e DEPT}$ (CD_3OD , 101 MHz) δ ppm: [174.15 (Cq), 173.87 (Cq), $\text{C=O}_2\text{H}$], [154.47 (Cq), 154.17 (Cq), $\text{C=O}_2^t\text{Bu}$], [79.49 (Cq), 79.39 (Cq), $\text{C}(\text{CH}_3)_3$], [64.28 (CH), 63.52 (CH), C-3], [58.69 (CH), 57.38 (CH), C-1], [41.43 (CH), 40.98 (CH), C-4], [38.46 (CH_2), 38.34 (CH_2), C-7], [29.04 (CH_2), 29.00 (CH_2), C-6], [27.47 (3CH_3), 27.29 (3CH_3), Boc], [23.15 (CH_2), 23.10 (CH_2), C-5].

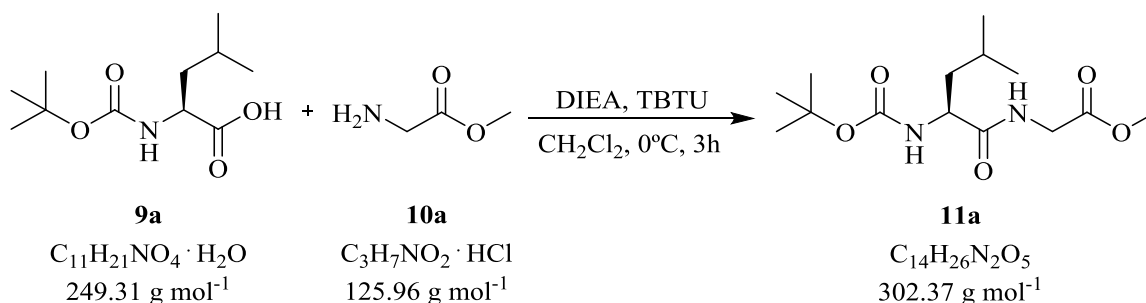
EM (ESI, CH_3OH) m/z (%): 248.14582 ($[\text{M}+\text{Li}]^+$, 100, pico base), 242.28355 (MH^+ , 7), 186.22038 (62), 140.07115 (46).

EMAR: cálculo para $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{LiNO}_4^+$: 248.14686; obtida: 248.14582.





3.3. SÉRIE P*LG

3.3.1. Síntese de (*tert*-butoxicarbonil)-L-leucilglicinato de metilo (**11a**)

Num balão de fundo redondo dissolveu-se *tert*-butoxicarbonil-L-leucina mono-hidratada (**9a**) (1.98 g, 7.94 mmol, 1 eq.) em CH_2Cl_2 anidro (60 mL) num sistema previamente purgado com Ar. Colocou-se a solução num banho de gelo e adicionou-se DIEA (5.5 mL, 31.76 mmol, 4 eq.), em seguida, TBTU (3.82 g, 11.91 mmol, 1.5 eq.) e, por fim, hidrocloreto de glicinato de metilo (1.00 g, 7.94 mmol, 1 eq.). Deixou-se a mistura em agitação contínua a 0°C durante 3h e à t.a. durante 48h.

Evaporou-se à securo e adicionou-se 80 mL de AcOEt e lavou-se a fase orgânica com solução saturada de NaHCO_3 (2 x 80 mL) e, posteriormente, com solução saturada de NaCl (80 mL). Secou-se a fase orgânica obtida com adição de Na_2SO_4 anidro. Filtrou-se com recurso a pressão reduzida e eliminou-se o solvente à securo obtendo-se um sólido branco.

O composto foi purificado recorrendo-se à cromatografia de adsorção em coluna de gel de SiO_2 , usando-se como eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (10:1) e procedeu-se, em seguida, à recristalização em éter etílico arrefecido a 0°C mediante banho de gelo. Os cristais obtidos foram filtrados com recurso a funil de Büchner e pressão reduzida, obtendo-se um sólido cristalino (2.10 g), identificado como sendo o dipéptido protegido pretendido (**11a**). Rendimento de 87%.

Composto **11a**: sólido cristalino.

R_f: 0.66 em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (10:1).

P.f.: 131–133°C

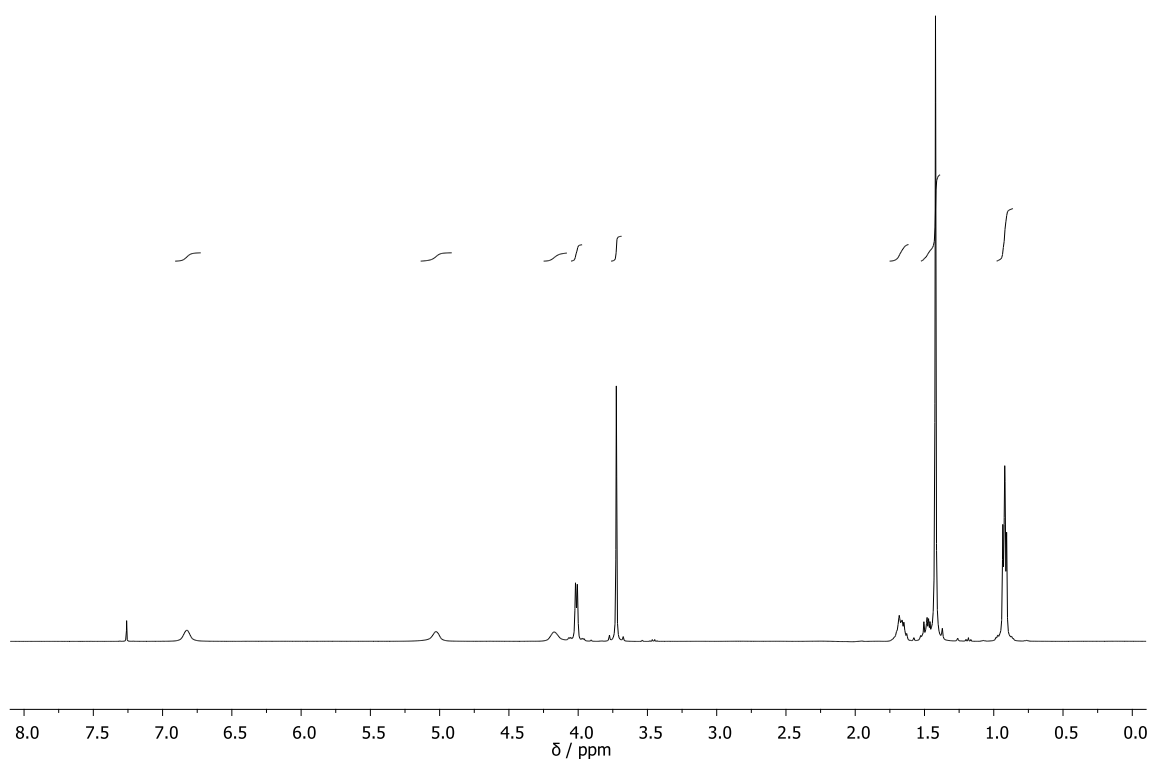
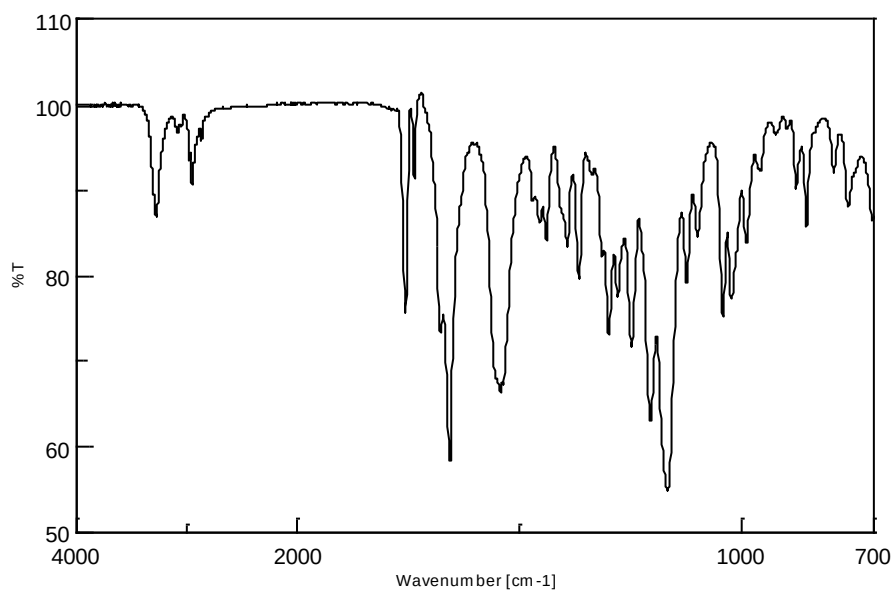
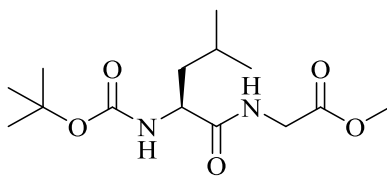
IV ν (cm^{-1}): 3275.50, 3085.55, 2977.55, 2956.34, 2869.56, 1757.80, 1736.58, 1677.77, 1655.59, 1542.77, 1468.53, 1454.06, 1438.64, 1391.39, 1364.39, 1297.86, 1277.61, 1246.75, 1204.33, 1164.79, 1122.37, 1097.30, 1039.44, 1021.12, 987.375, 955.555, 920.843, 894.809, 874.560, 851.418, 789.707, 757.888.

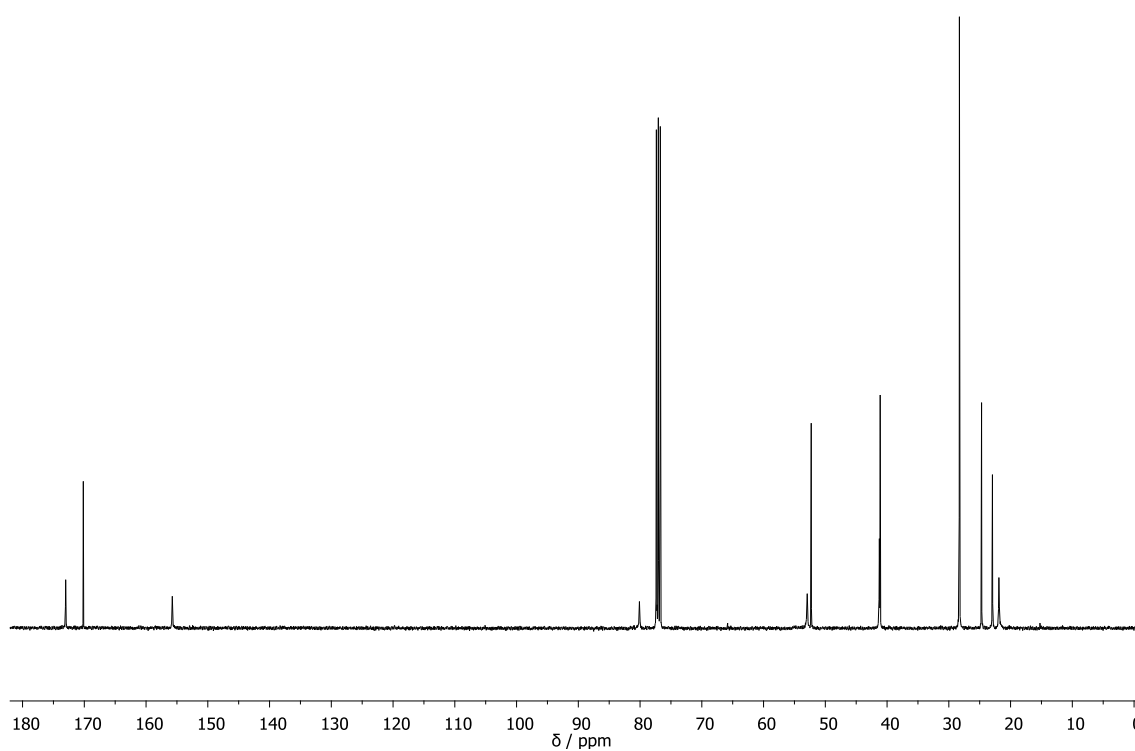
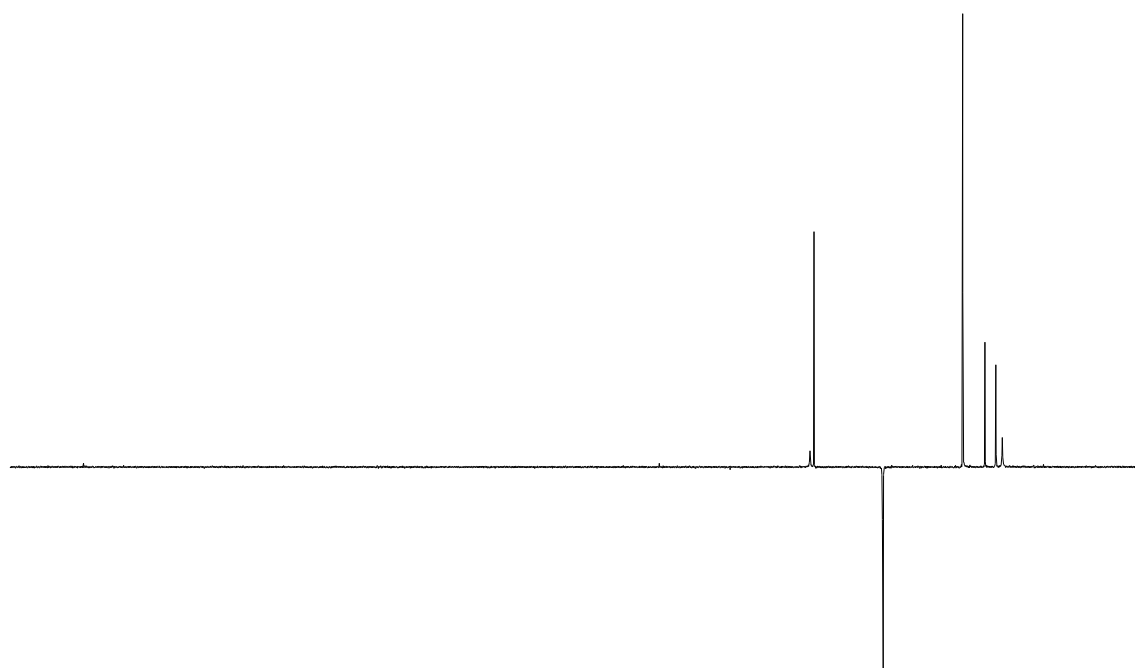
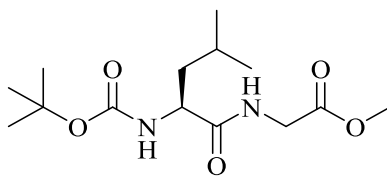
¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 6.83 (sl, 1H, permuta com D₂O, CONHH), 5.03 (sl, 1H, permuta com D₂O, CONHH), 4.17 (sl, 1H, H_L-2), 3.99, (d, 2H, *J* = 5.2 Hz, H_G-2) 3.72 (s, 3H, OCHH₃), 1.78 – 1.60 (m, 2H, H_L-3), 1.51 – 1.36 [(m, 1H, H_L-4) + 1.42 (s, 9H, Boc)], 0.98 – 0.86 (m, 6H, H_L-5).

¹³C-RMN e DEPT (CDCl₃, 101 MHz) δ ppm: [173.02 (Cq), 170.16 (Cq), CONH + CO₂CH₃], 155.75 (Cq, CO₂^tBu), 80.10 (Cq, Boc), 52.93 (CH, C_L-2), 52.28 (CH₃, OCH₃), 41.25 (CH₂, C_G-2), 41.11 (CH₂, C_L-3), 28.29 (3CH₃, Boc), 24.70 (CH, H_L-4), [22.94 (CH₃), 21.89 (CH₃), C_L-5].

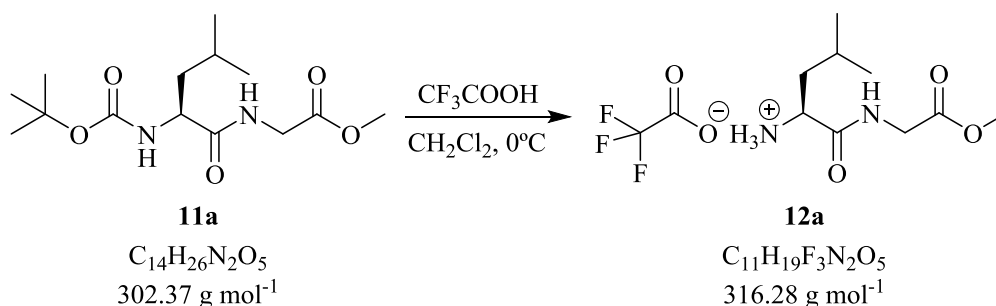
EM (ESI, CH₃OH) *m/z* (%): 325.1724 ([M+Na]⁺, 46), 269.1116 (5), 247.1276 (21), 225.1204 (34), 203.1375 (100, pico base), 130.0881 (4), 86.0948 (64).

EMAR: cálculo para C₁₄H₂₆N₂NaO₅⁺: 325.1734; obtida: 325.1724.





3.3.2. Síntese do trifluoracetato de L-leucilglicinato de metilo amônio (12a)



Sobre uma solução do dipéptido protegido (carbamato-éster) **11a** (0.500 g, 1.65 mmol, 1 eq.) em CH_2Cl_2 (10 mL) num sistema previamente purgado com Ar e provida de agitação e arrefecida a $0^\circ C$ num banho de gelo, adicionou-se gota-a-gota, ATA (3.83 mL, 49.5 mmol, 30 eq.) que permaneceu em agitação durante 8h.

Procedeu-se à eliminação dos solventes à secura sob pressão reduzida, obtendo-se um óleo viscoso ligeiramente acastanhado (0.517 g), identificado como trifluoracetato de amônio pretendido (**12a**). Rendimento de 99%.

Composto **12a**: óleo viscoso ligeiramente acastanhado.

R_f: 0.26 em CH_2Cl_2/CH_3OH (10:1).

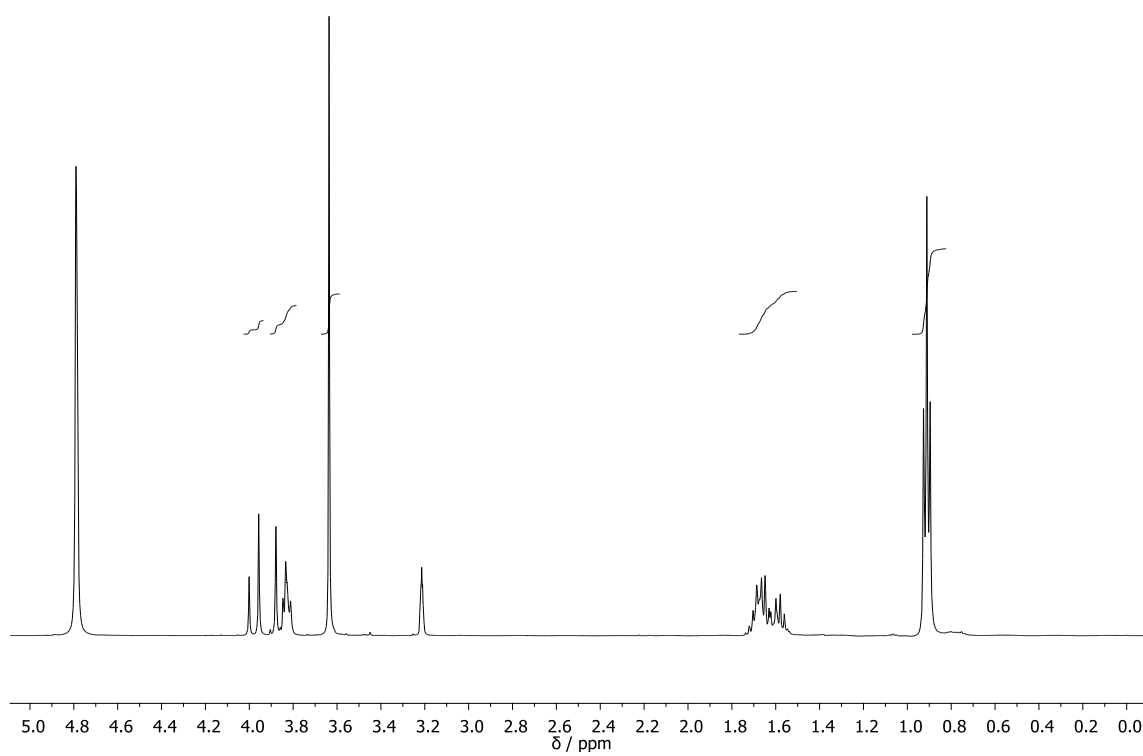
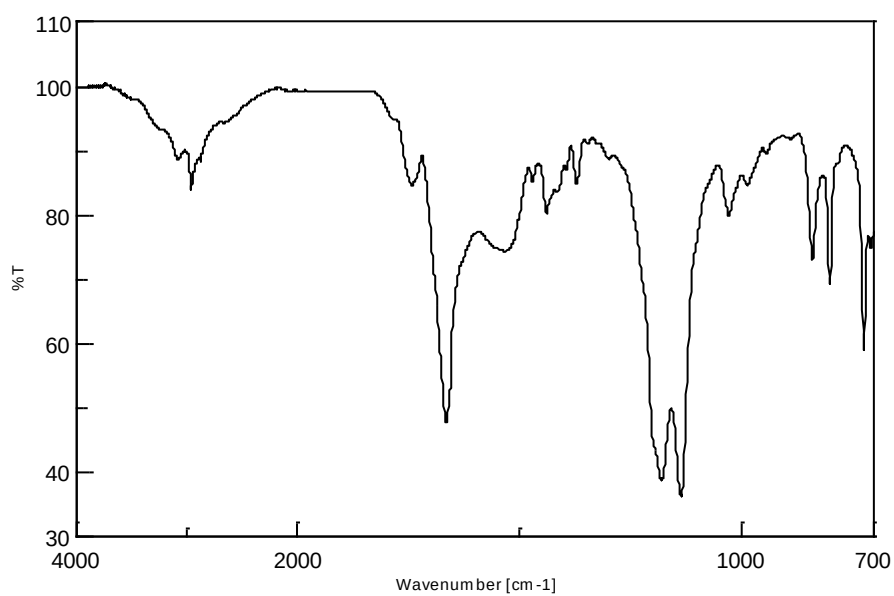
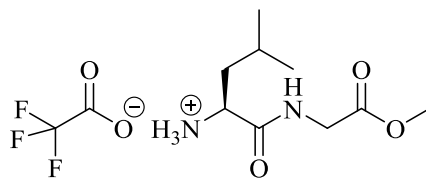
IV ν (cm^{-1}): 3082.65, 2962.13, 2877.27, 1742.37, 1664.27, 1534.10, 1470.46, 1438.64, 1411.64, 1371.14, 1179.26, 1134.90, 1026.91, 985.447, 837.919, 798.385, 722.211, 705.819.

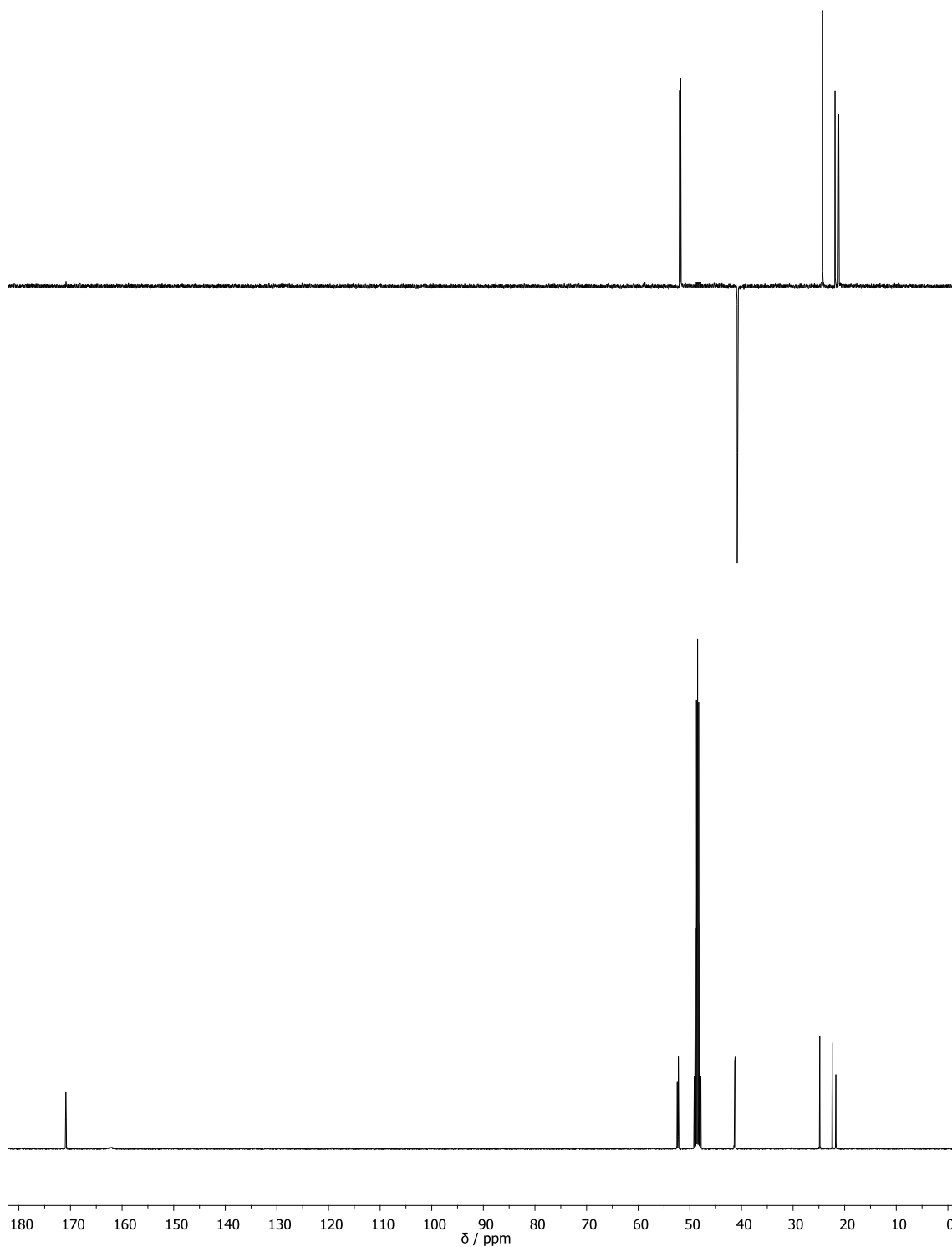
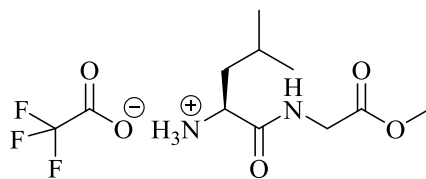
^1H -RMN (CD_3OD , 400 MHz) δ ppm: 4.02 – 3.93, (parte A do sistema AB, 1H, $J = 17.6$ Hz, H_{C-2}), 3.91 – 3.78 [(parte B do sistema AB, $J = 17.6$ Hz) + 3.83 (t, $J = 6.8$ Hz), 2H, $H_{C-2} + H_{L-2}$], 3.64 (s, 3H, OCH_3), 1.75 – 1.52 (m, 3H, $H_{L-3} + H_{L-4}$), 0.98 – 0.83 (m, 6H, H_{L-5}).

^{13}C -RMN e DEPT (CD_3OD , 101 MHz) δ ppm: [170.89 (Cq), 170.82 (Cq), $\underline{CONH} + \underline{CO_2CH_3}$], 52.44 (CH, C_{L-2}), 52.22 (CH_3 , OCH_3), [41.31 (CH_2), 41.22 (CH_2), $C_{L-3} + C_{G-2}$], 24.82 (CH, C_{L-4}), [22.42 (CH_3), 21.71 (CH_3), C_{L-5}].

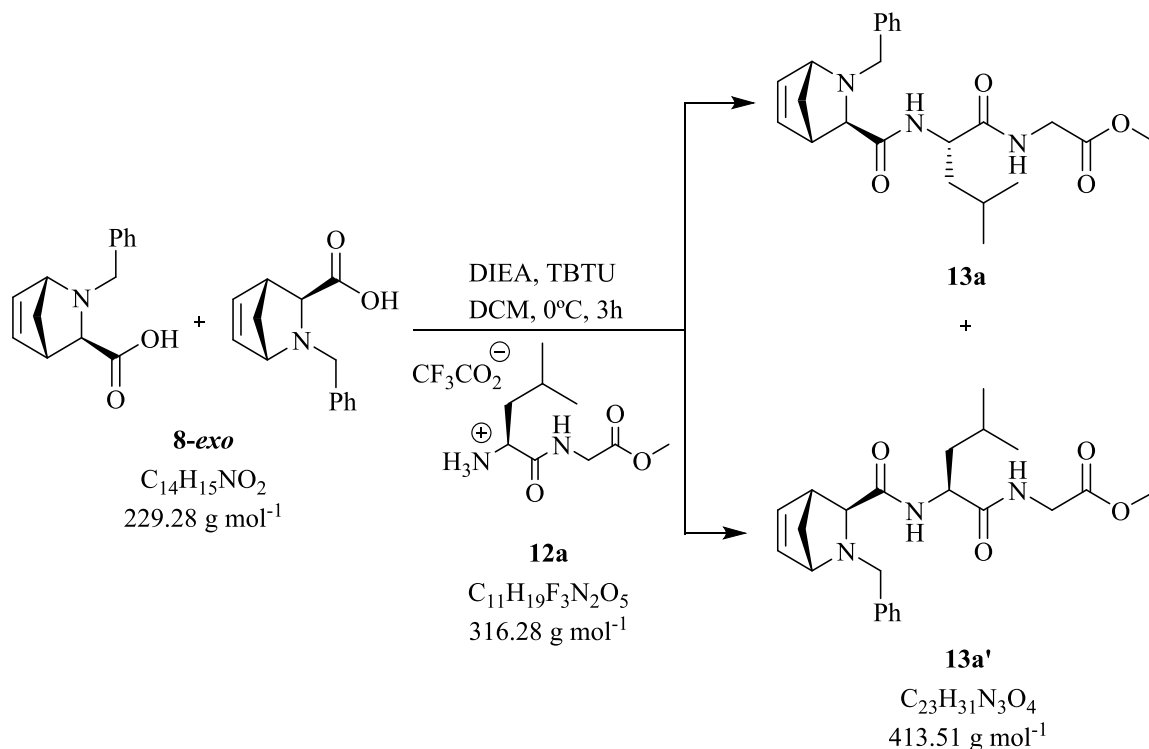
EM (ESI, CH_3OH) m/z (%): 203.1390 (MH^+ , 45), 189.1248 (5), 171.1134 (1), 86.0754 (100, pico base).

EMAR: cálculo para $C_9H_{19}N_2O_3^+$: 203.1390; obtida: 203.1390.





3.3.3. Síntese do {(1*R*,3*S*,4*R*)-2-benzil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carbonil}-L-leucilglicinato de metilo (13a) e do {(1*S*,3*R*,4*S*)-2-benzil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carbonil}-L-leucilglicinato de metilo (13a')



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **11a** (secção 3.3.1.), procedeu-se ao acoplamento entre ($\pm$)-**8-*exo*** (0.393 g, 1.71 mmol, 1 eq.) e o trifluoracetato de L-leucilglicinato de metilo amónio, **12a** (0.541 g, 1.71 mmol, 1 eq) deixando-se reagir durante 48h e, em seguida, efetuou-se o tratamento corrente, obtendo-se 747 mg de um óleo amarelo. Procedeu-se à purificação do composto pretendido por cromatografia em coluna de adsorção em gel de SiO₂, utilizando como eluente Hex/AcOEt (1:9) tendo-se obtido um óleo ligeiramente amarelo (537.2 mg), identificado como a correspondente mistura de diastereoisómeros, **13a/13a'**. Rendimento de 76%.

Compostos **13a/13a'**: óleo ligeiramente amarelo.

R_f: 0.64 em Hex/AcOEt (1:9).

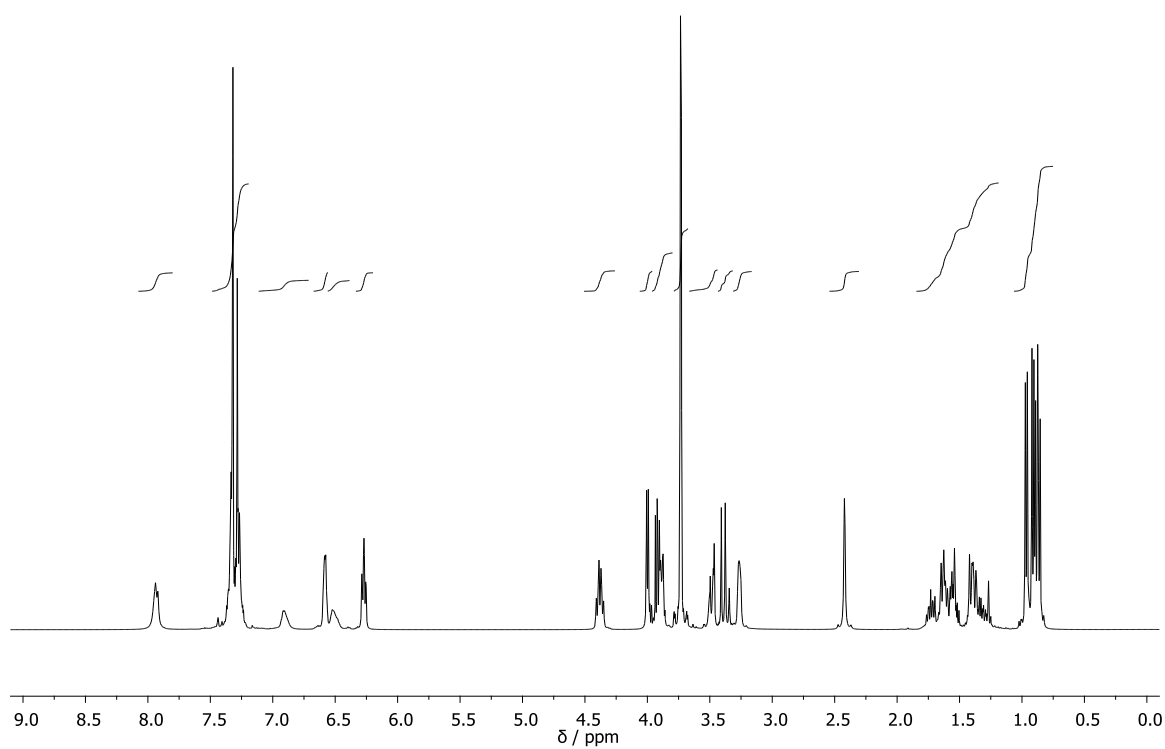
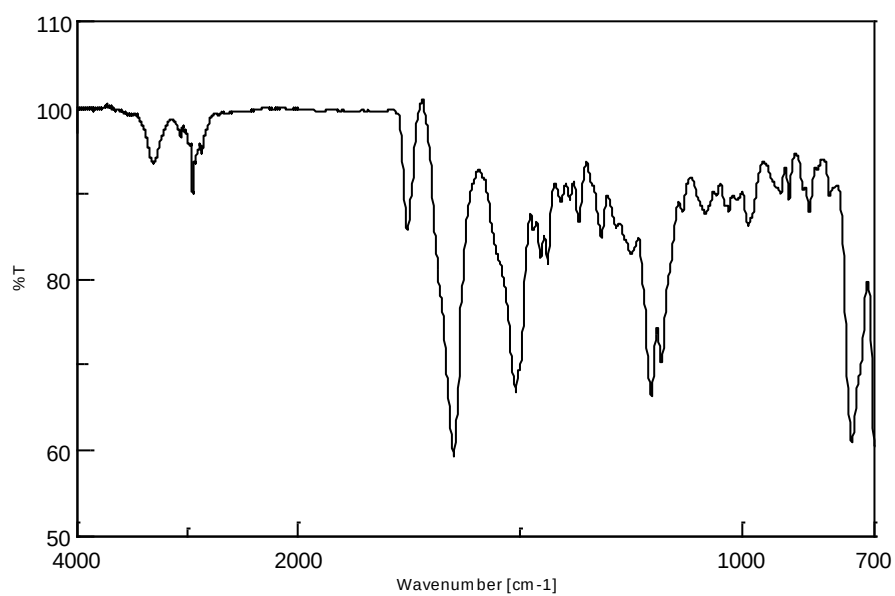
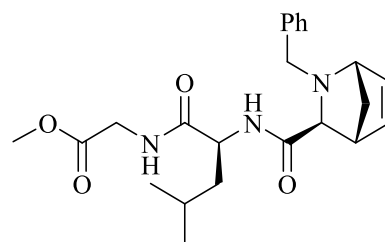
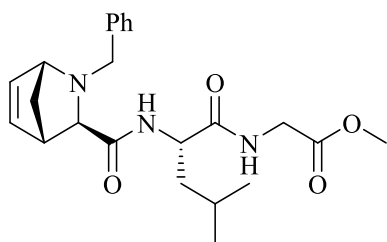
IV ν (cm⁻¹): 3312.14, 3063.37, 3024.80, 2996.87, 2954.41, 2871.49, 1753.94, 1648.84, 1509.03, 1468.53, 1454.06, 1436.71, 1406.82, 1386.57, 1367.28, 1315.21, 1249.65, 1203.36, 1180.22, 1133.94, 1081.87, 1028.84, 984.482, 911.201, 891.916, 846.597, 800.314, 750.174.

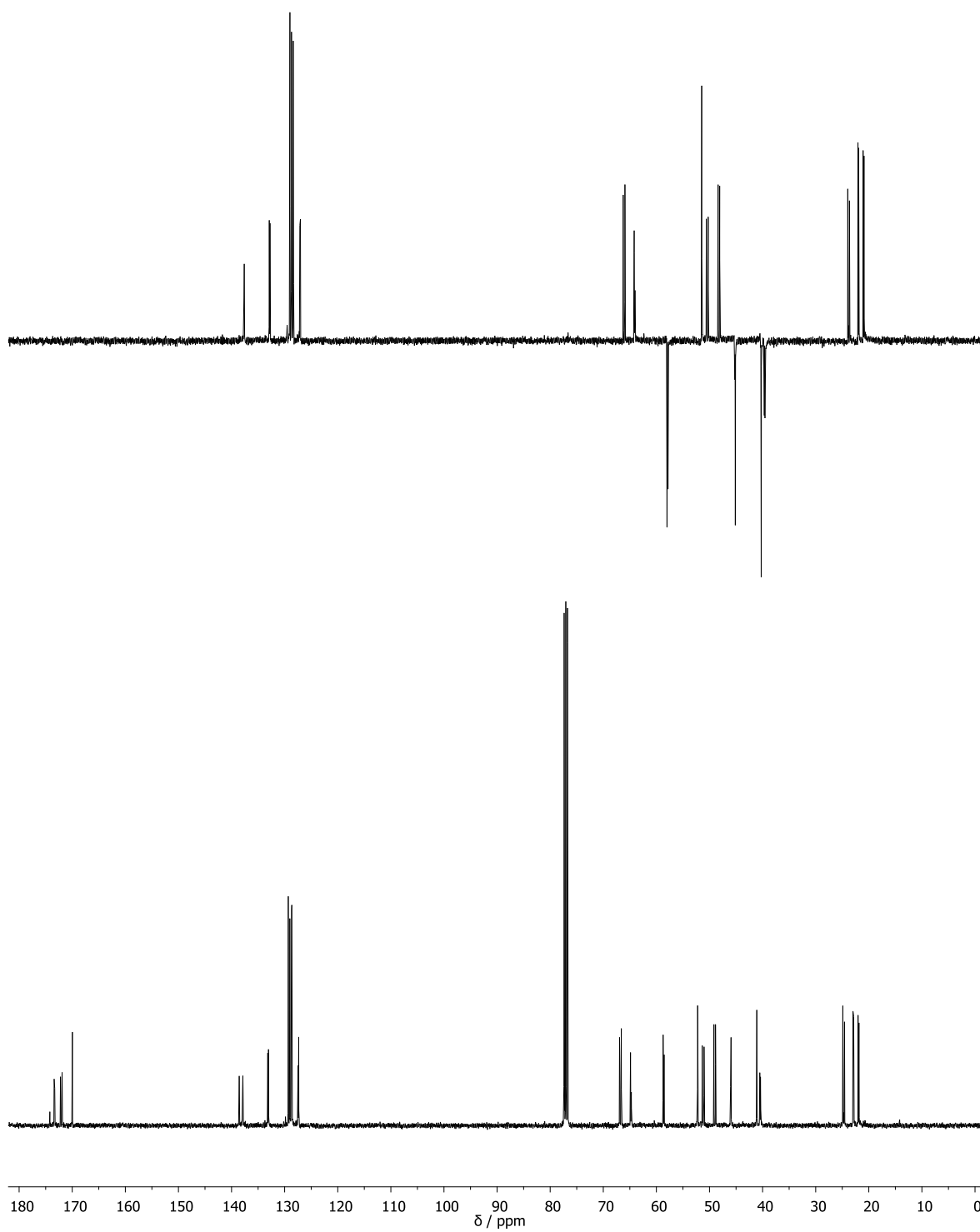
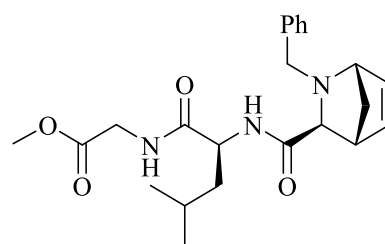
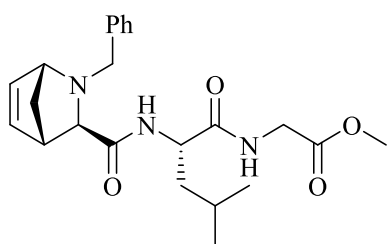
¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm (verifica-se a presença de rotâmeros): 7.93 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz, permutam com D₂O, 2 x CONH), 7.53 – 7.18 (m, 10H, 2 x ArH), 6.91 (d, 1H, $J = 4.3$ Hz, permuta com D₂O, CONH), 6.70 – 6.55 (m, 2H, 2 x H-5), 6.54 – 6.37 [6.52 (d, $J = 2.9$ Hz), 1H, permuta com D₂O, CONH], 6.27 (dt, 2H, $J = 6.1$, 1.6 Hz, 2 x H-6), 4.50 – 4.26 (mc, 2H, 2 x H_L-2), 4.07 – 3.80 [mc, 6H, 2 x (H_G-2 + H-1)], [3.74 (s), 3.73 (s), 6H, 2 x OCH₃], 3.64 – 3.44 (m, 2H, NCH₂Ph), 3.43 – 3.32 (sistema AB, 2H, $J = 12.8$ Hz, NCH₂Ph), 3.32 – 3.16 (m, 2H, 2 x H-4), 2.42 (s, 2H, 2 x H-3), 1.84 – 1.19 [m, 10H, 2 x (H-7 + H_L-3 + H_L-4)], [0.97 (d, 3H, $J = 6.3$ Hz), 0.91 (d, 3H, $J = 6.3$ Hz), 0.88 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz), 0.86 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz), 2 x H_L-5].

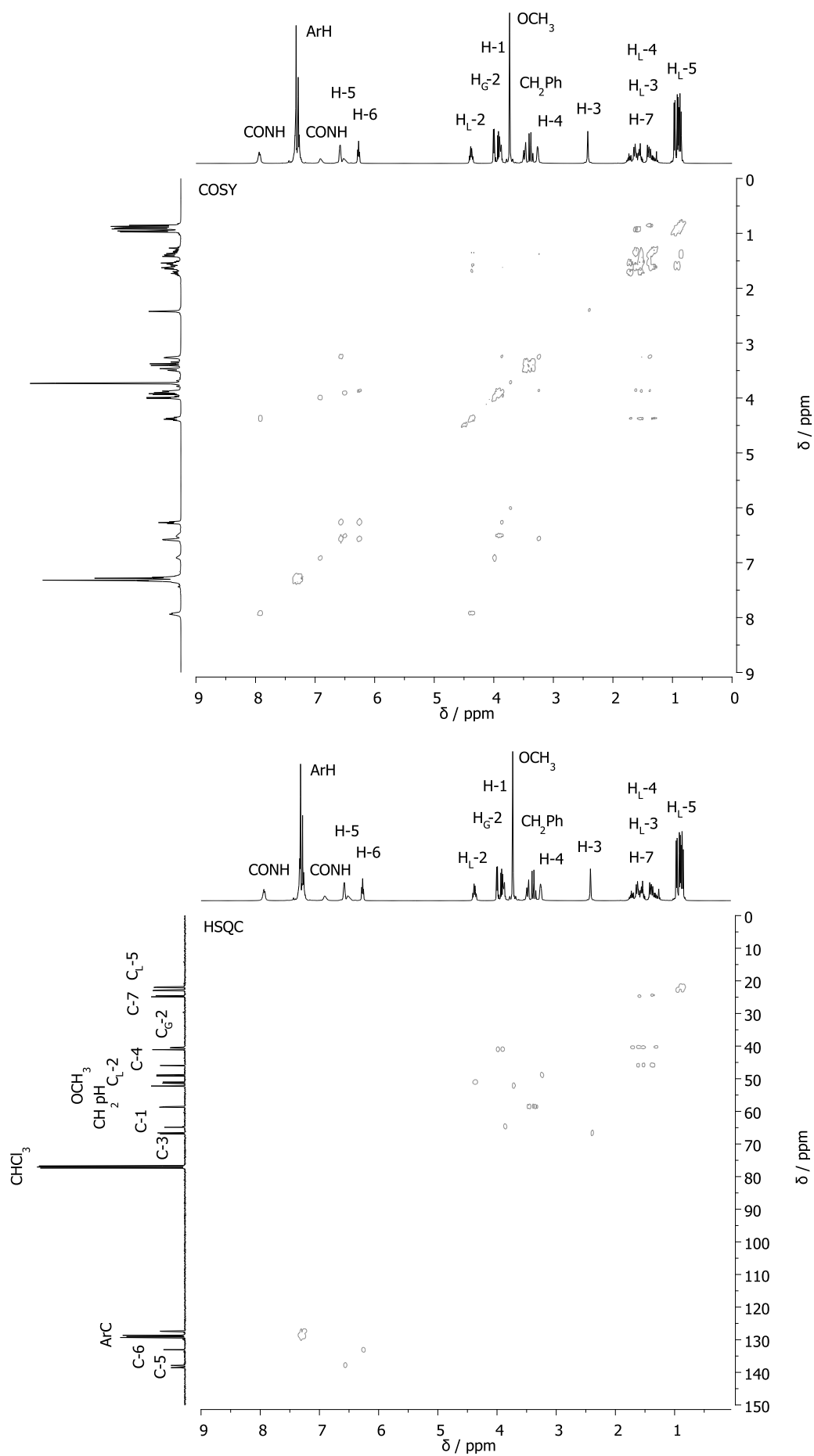
¹³C-RMN e DEPT (CDCl₃, 101 MHz) δ ppm: [174.21 (Cq), 173.41 (Cq), 173.30 (Cq), 172.21 (Cq), 171.91 (Cq), 169.97 (Cq), 4 x CONH + 2 x CO₂CH₃], 138.55 (Cq, 2 x C-1'), [137.90 (CH), 137.87 (CH), 2 x C-5], [133.18 (CH), 133.04 (CH), 2 x C-6], [129.32, (2CH), 129.02 (2CH), 2 (C-2' + C-6')], [128.70 (2CH), 128.65 (2CH), 2 x (C-3' + C-5')], [127.46 (CH), 127.35 (CH), 2 x C-4'], [66.93 (CH), 66.60 (CH), 2 x C-3], [64.87 (CH), 64.72 (CH), 2 x C-1], [58.73 (CH₂), 58.55 (CH₂), 2 x NCH₂Ph], [52.24 (CH), 52.23 (CH), 2 x OCH₃], [51.37 (CH₃), 51.02 (CH₃), 2 x C_L-2], [49.16 (CH), 48.87 (CH), 2 x C-4], [46.02 (CH₂), 45.94 (CH₂), 2 x C-7], [41.12 (CH₂), 41.09 (CH₂), 2 x C_G-2], [40.53 (CH₂), 40.40 (CH₂), 2 x C_L-3], [24.89 (CH), 24.57 (CH), 2 x C_L-4], [22.98 (CH₃), 22.85 (CH₃), 22.02 (CH₃), 21.85 (CH₃), 2 x C_L-5)].

EM (ESI, CH₃OH) m/z (%): 414.2377 (MH⁺, 1), 348.1918 (21), 320.1970 (2), 259.1436 (30), 231.1505 (100, pico base), 231.1227 (12), 91.0546 (37).

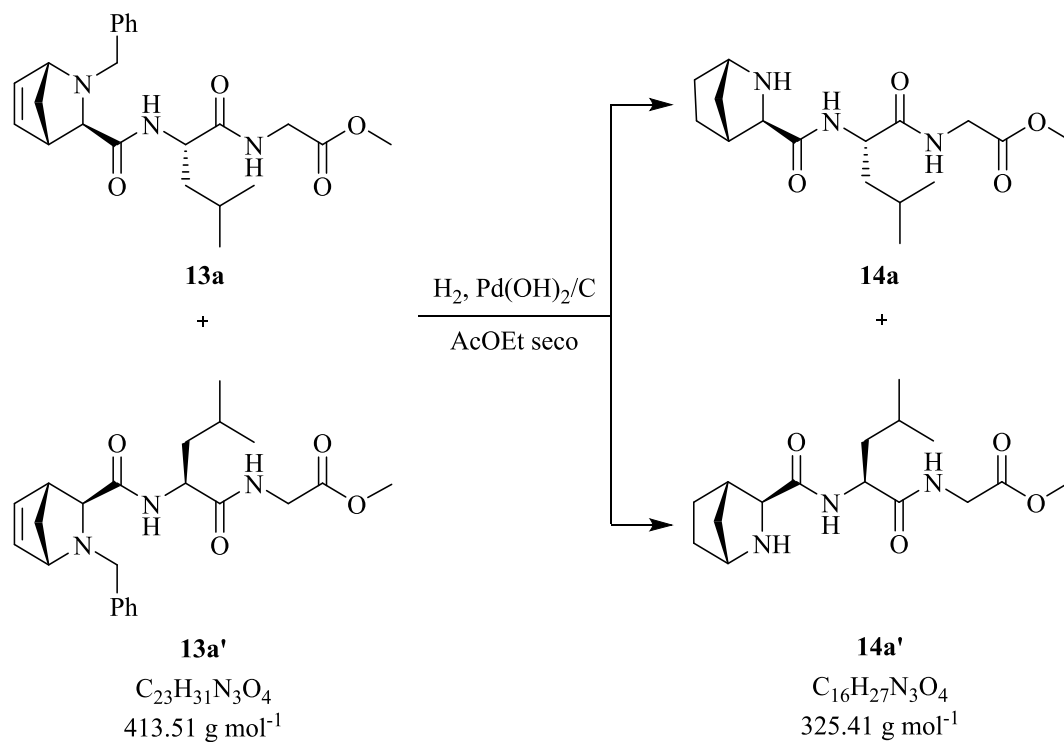
EMAR: cálculo para C₂₃H₃₂N₃O₄⁺: 414.2387; obtida: 414.2377.







3.3.4. Síntese do {(1*S*,3*R*,4*R*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-leucilglicinato de metilo (**14a**) e do {(1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-leucilglicinato de metilo (**14a'**)



Sobre uma suspensão de $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ 20% (0.040 g, 0.285 mmol, 0.5 eq.) em AcOEt seco (6 mL) adicionou-se uma solução da mistura dos tripéptidos protegidos (**13a/13a'**) (0.237 g, 0.573 mmol, 1 eq.) em AcOEt seco (6 mL) num sistema previamente purgado em Ar. Saturou-se o sistema com H_2 e deixou-se a mistura reacional em agitação contínua à t.a. sob pressão atmosférica de H_2 , com recurso a balões de H_2 , durante 8 dias. Removeu-se o catalisador por filtração com celite e lavagens com AcOEt (80 mL). O solvente foi eliminado por pressão reduzida originando-se um resíduo oleoso amarelo (213 mg) que se purificou por cromatografia de adsorção em coluna de gel de SiO_2 usando como eluente AcOEt . Obteve-se de um óleo amarelo (154 mg), identificado como a mistura dos diastereoisómeros hidrogenados pretendidos, **14a/14a'**. Rendimento de 83%.

Compostos **14a/14a'**: óleo amarelo.

R_f : 0.64 em Hex/ AcOEt (1:9).

IV ν (cm^{-1}): 3290.93, 2956.34, 2872.45, 1752.01, 1648.84, 1517.70, 1468.53, 1436.71, 1407.78, 1368.25, 1332.57, 1242.90, 1201.43, 1180.22, 1136.83, 1113.69, 1096.33, 1036.55, 1011.48, 953.627, 930.485, 889.023, 846.597, 800.314, 751.138.

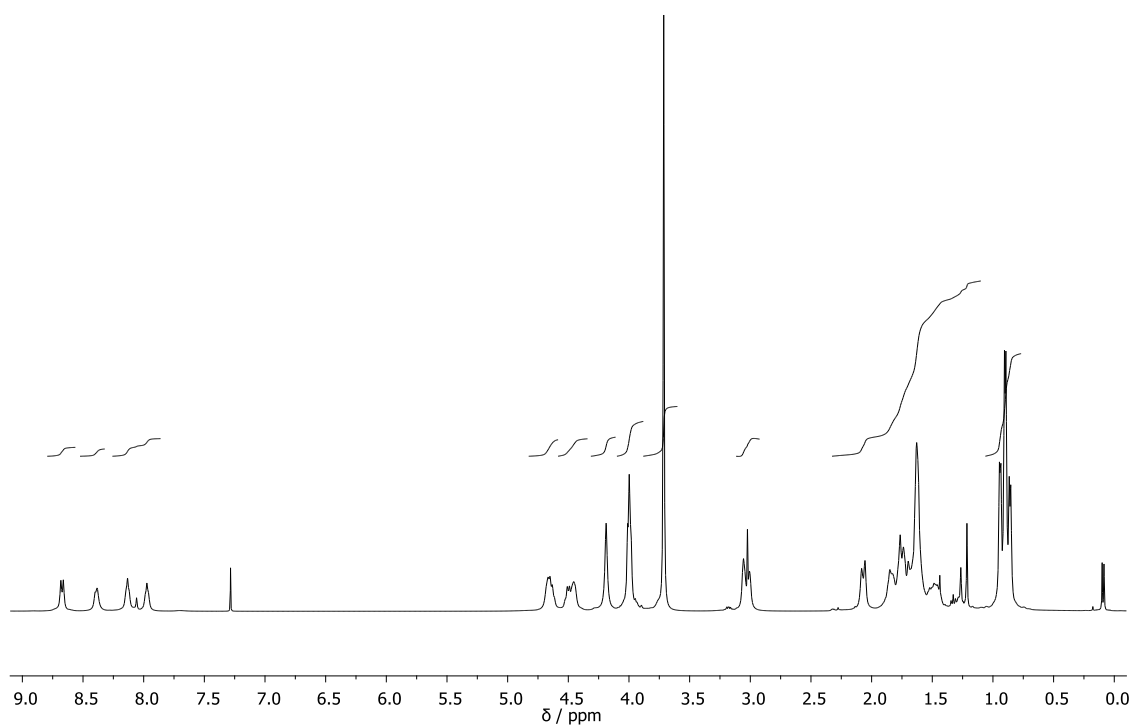
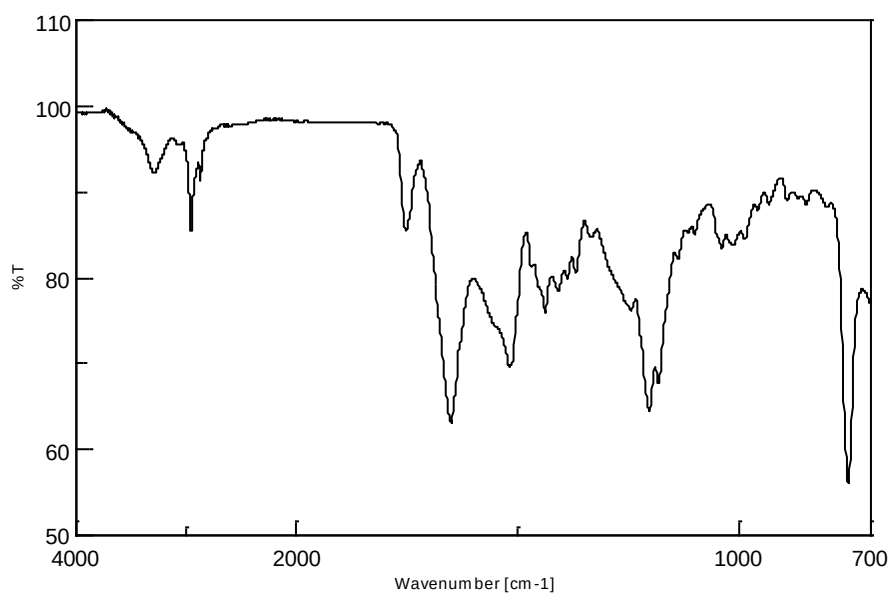
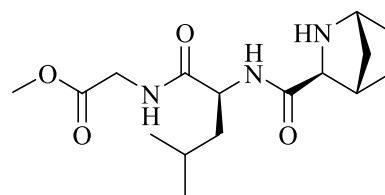
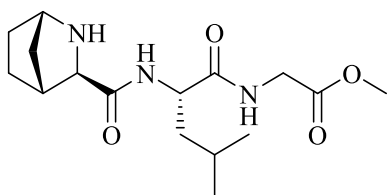
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ ppm (observa-se a presença de rotâmeros): 8.59 (d, 1H, $J = 7.9$

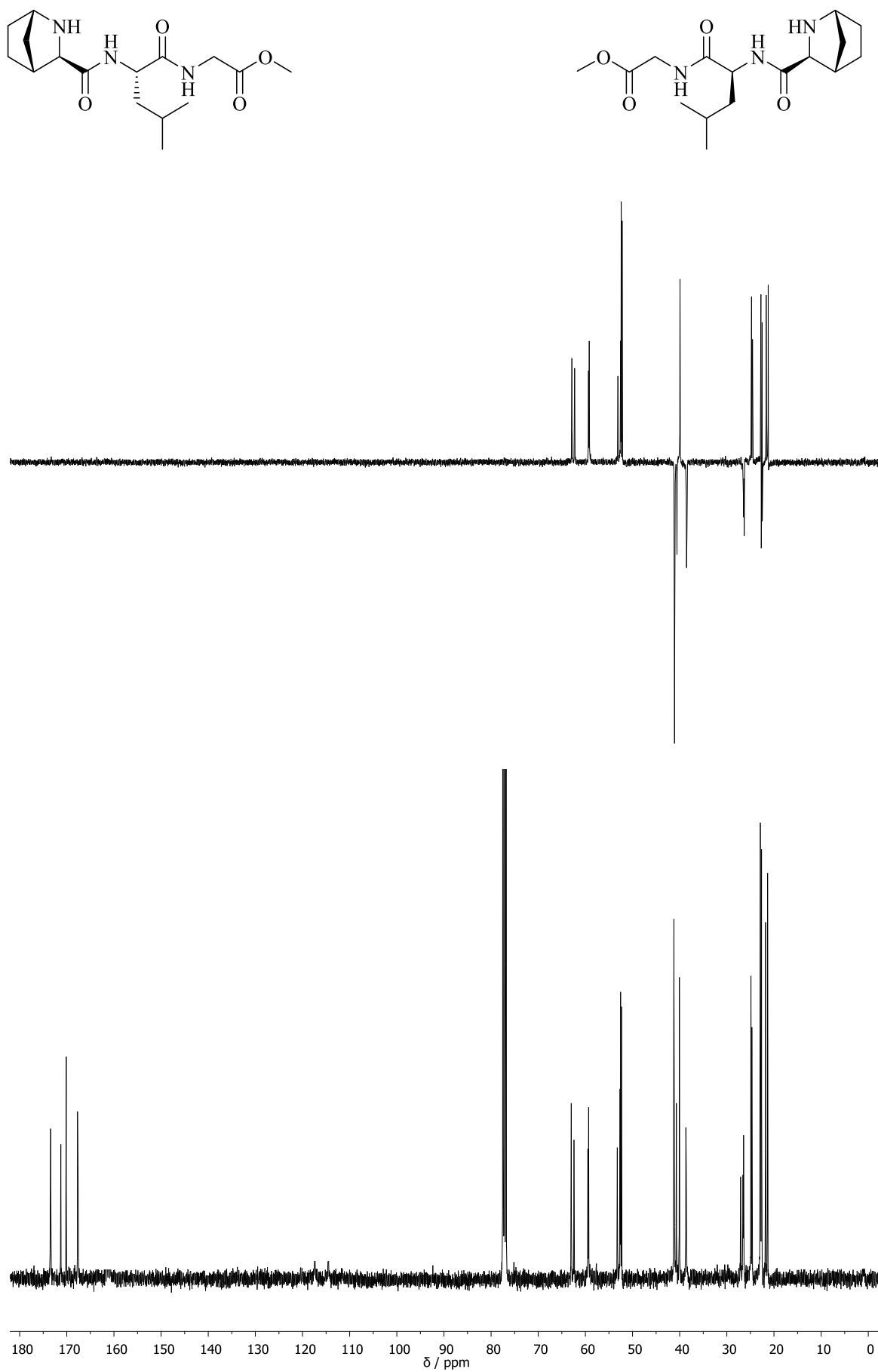
Hz, permuta com D₂O, CONH), 8.31 (d, 1H, $J = 6.3$ Hz, permuta com D₂O, CONH), [8.05 (s), 7.97 (s), 7.89 (s), 2H, permutam com D₂O, 2 x CONH), 4.72 – 4.25 [4.72 – 4.49 (m), 4.48 – 4.25 (m), 4H, 2 x (H_L-2+ H-3)], 4.10 (s, 2H, 2 x H-1), 3.99 – 3.80 (m, 4H, 2 x H_G-2), 3.63 (s, 6H, 2 x OCH₃), [2.97 (s), 2.94 (s), 2H, 2 x H-4], 2.13 – 1.05 [mc, 20H, dois deles permutam com D₂O 2 x (H-5, H-6, H-7, H_L-3, H_L-4, NH)], 0.93 – 0.63 (m, 12H, 2 x H_L-5).

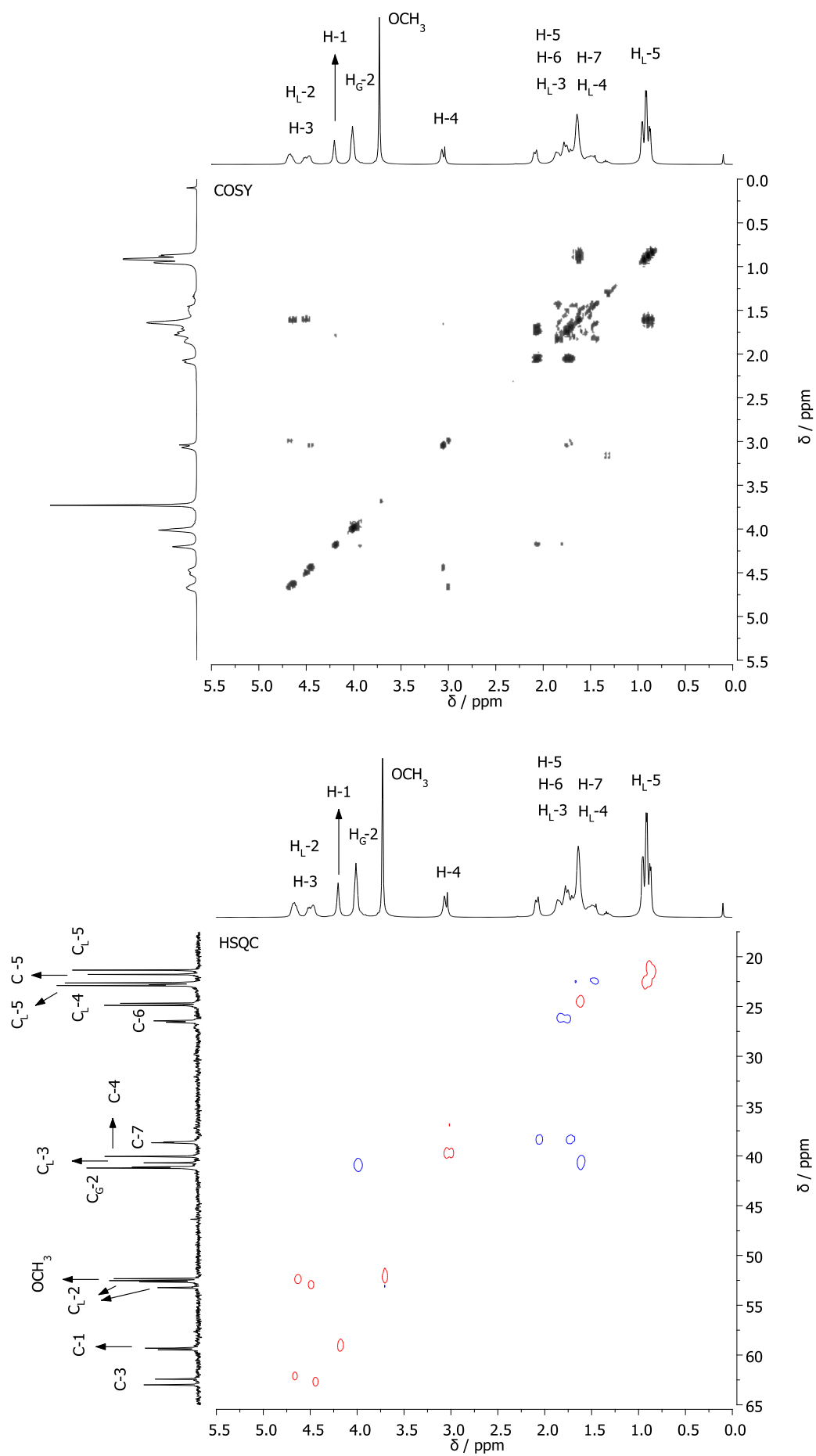
¹³C-RMN e DEPT (CDCl₃, 101 MHz) δ ppm (observa-se a presença de rotâmeros): [173.50 (Cq), 173.42 (Cq), 171.26 (Cq), 170.11 (Cq), 167.72 (Cq), 167.63 (Cq), 4 x CONH + 2 x CO₂CH₃], [62.86 (CH), 62.28 (CH), 2 x C-3], [59.34 (CH), 59.18 (CH), 2 x C-1], [53.10 (CH), 52.53 (CH), 2 x C_L-2], [52.40 (CH₃), 52.20 (CH₃), 2 x OCH₃], [41.09 (CH₂), 40.98 (CH₂), 2 x C_G-2], 40.57 (2CH₂, 2 x C_L-3), 39.93 (2CH, 2 x C-4), [38.55 (CH₂), 38.47 (CH₂), 2 x C-7], [26.45 (CH₂), 26.31 (CH₂), 2 x C-6], [24.75 (CH), 24.55 (CH), 2 x C_L-4], [22.77 (CH₃), 22.51 (CH₂), 22.69 (CH₃), 22.48 (CH₂), C_L-5 + 2 x C-5], [21.65 (CH₃), 21.22 (CH₃), C_L-5].

EM (ESI) m/z (%): 326.2082 (MH⁺, 4), 237.1956 (19), 229.1545 (1), 209.1663 (2), 166.0865 (20), 138.0911 (21), 124.1072 (100, pico base), 110.0400 (5), 96.0682 (17).

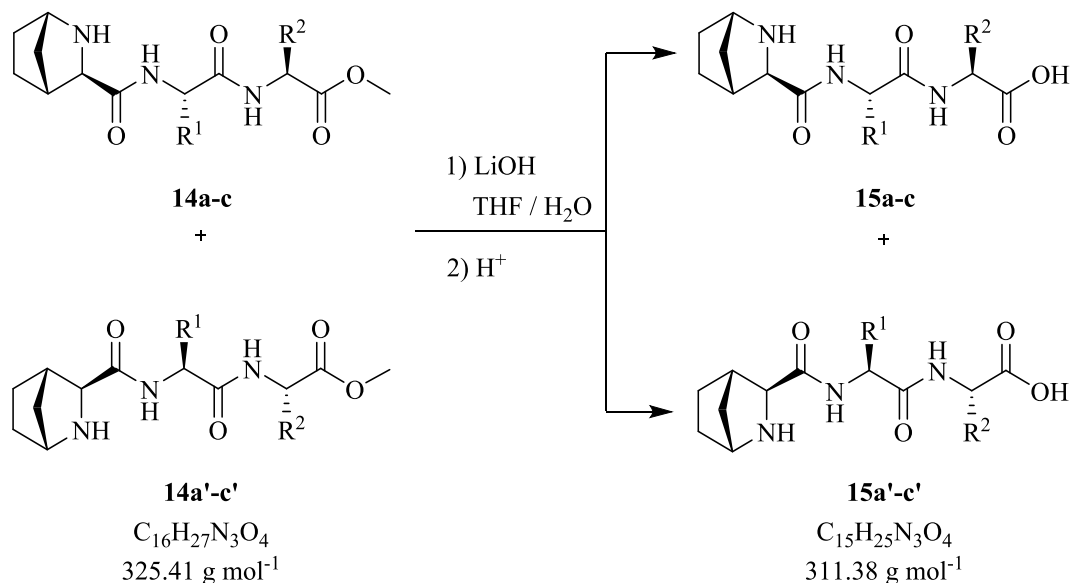
EMAR: cálculo para C₁₆H₂₈N₃O₄⁺: 326.2074; obtida: 326.2082.







3.3.5. Síntese de {(1*S*,3*R*,4*R*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-leucilglicina (15a**) e de {(1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-leucilglicina (**15a'**)**



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação do ácido **7-*exo*** (secção 3.2.4.), procedeu-se à hidrólise alcalina da mistura dos tripéptidos **14a/14a'** (0.102 g, 0.313 mmol) deixando-se reagir durante 24h e, em seguida, efetuou-se o tratamento corrente. Obteve-se um óleo acastanhado (87 mg), identificado como a mistura dos tripéptidos **15a/15a'**. Rendimento de 89%.

Compostos **15a/15a'**: óleo acastanhado.

R_f: 0.10 em AcOEt

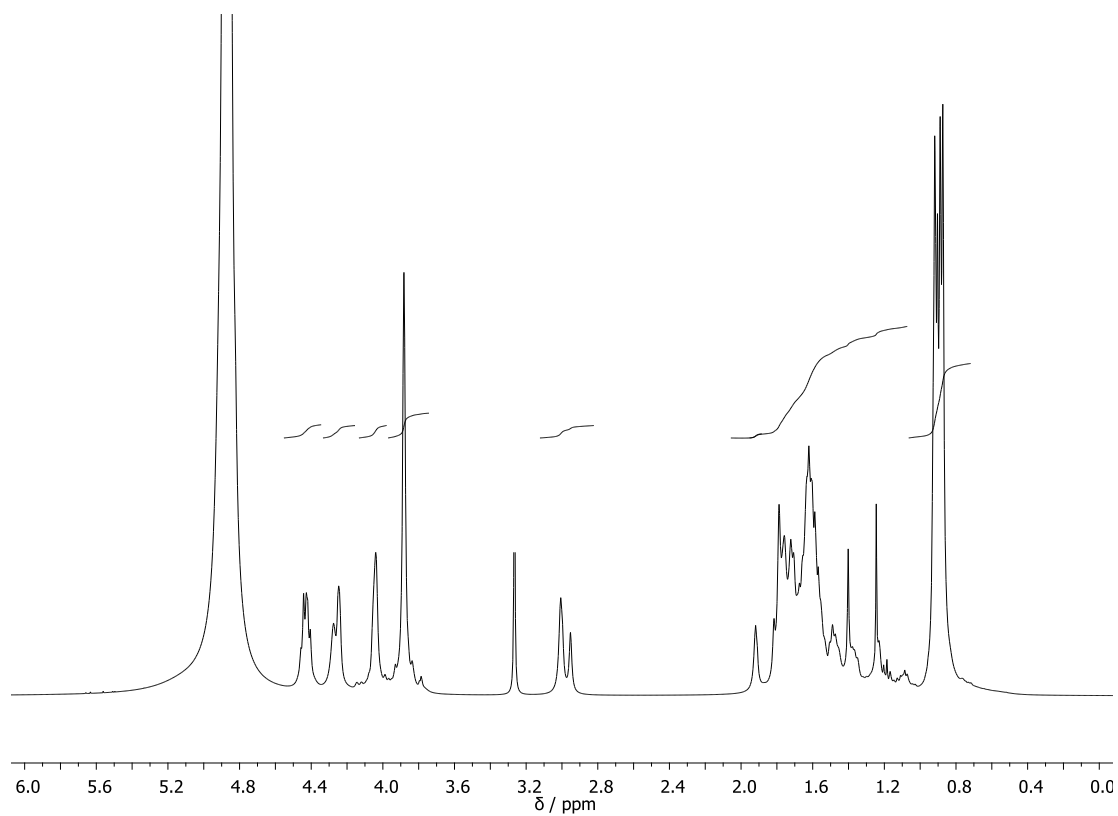
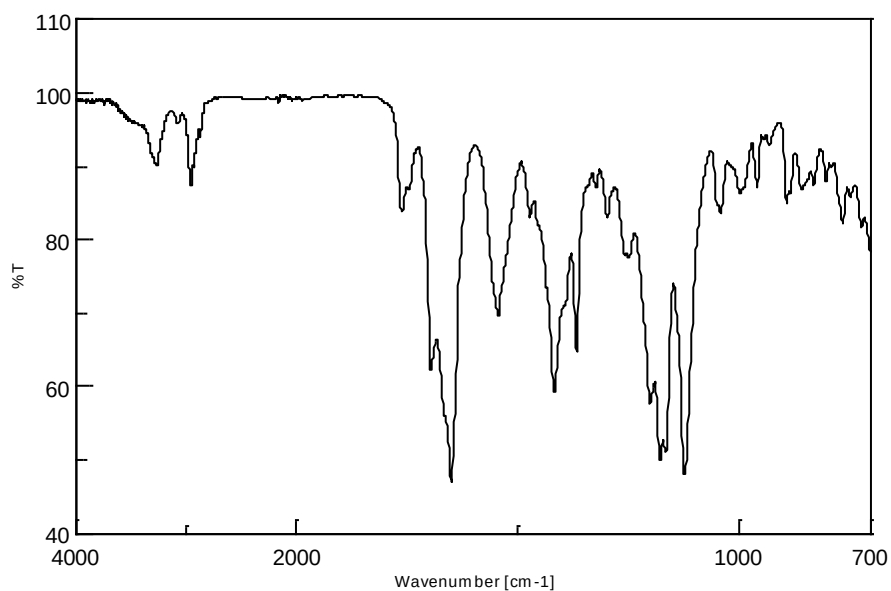
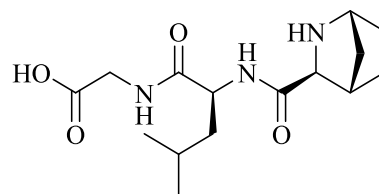
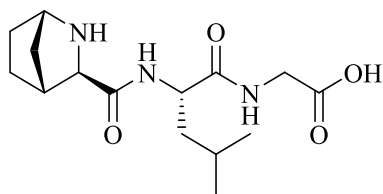
IV ν (cm⁻¹): 3270.68, 3069.16, 2955.38, 2871.49, 1761.65, 1746.23, 1696.09, 1648.84, 1542.77, 1471.42, 1416.46, 1366.32, 1320.04, 1295.93, 1247.72, 1199.51, 1177.33, 1160.94, 1121.40, 1039.44, 997.017, 957.484, 924.700, 889.987, 856.239, 801.278, 785.850, 762.709, 741.496, 714.497.

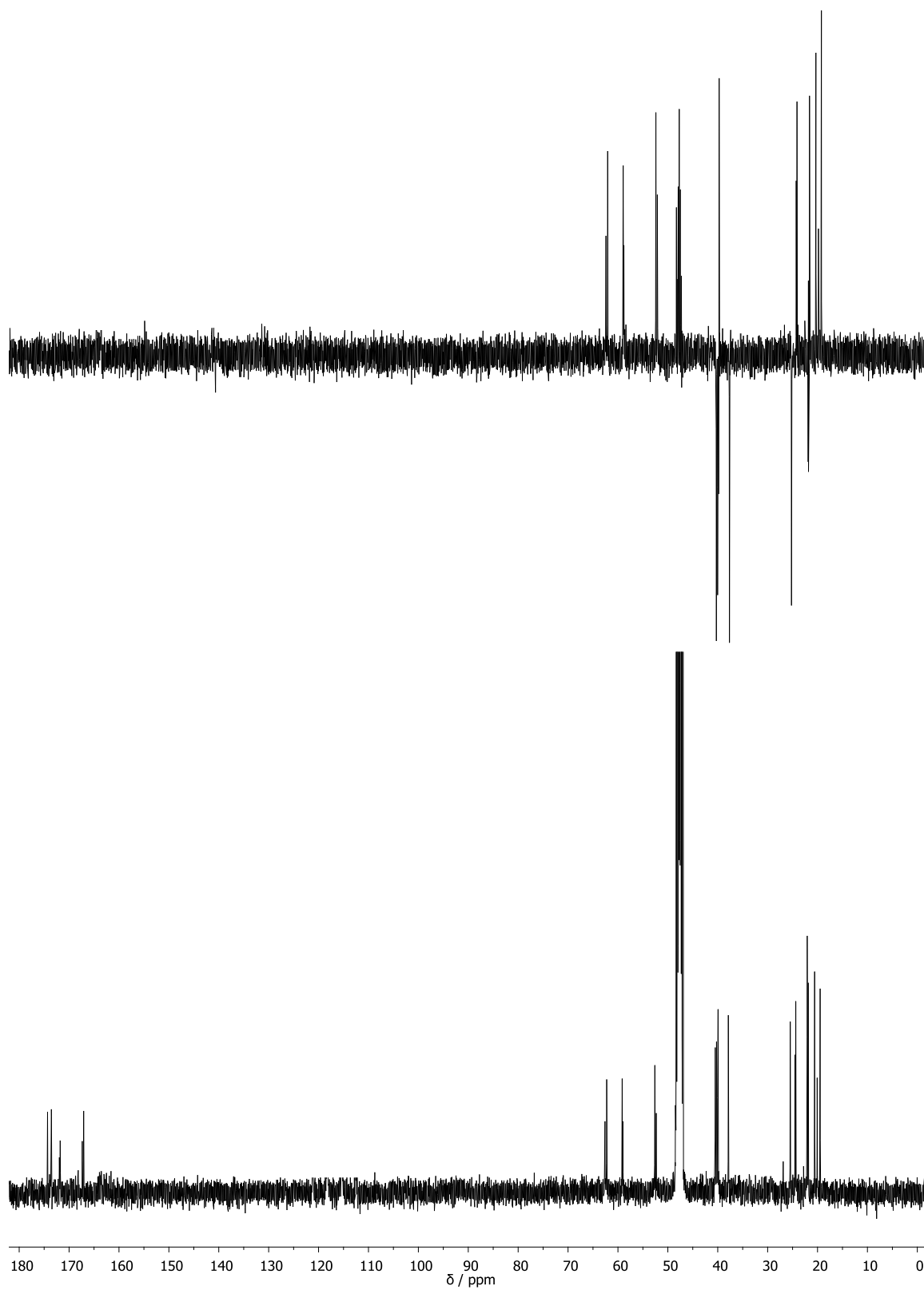
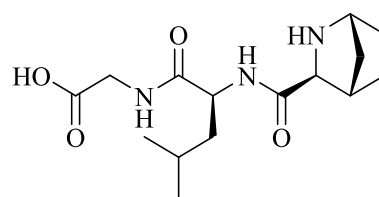
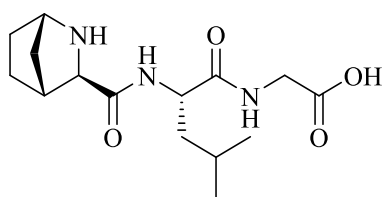
¹H-RMN (CH₃OD, 400 MHz) δ ppm: 4.54 – 4.32 (m, 2H, 2 x H_L-2), 4.34 – 4.16 [4.28 (s) + 4.25 (s), 2H, 2 x H-3], 4.14 – 3.98 (m, 2H, 2 x H-1), 3.97 – 3.75 (s, 4H, 2 x H_G-2), 3.12 – 2.85 [3.01 (s) + 2.95 (s), 2H, 2 x H-4], 2.06 – 1.08 [m, 18H, 2 x (H-5 + H-6 + H-7 + H_L-3 + H_L-4)], 1.06 – 0.73 (m, 12H, 2 x H_L5).

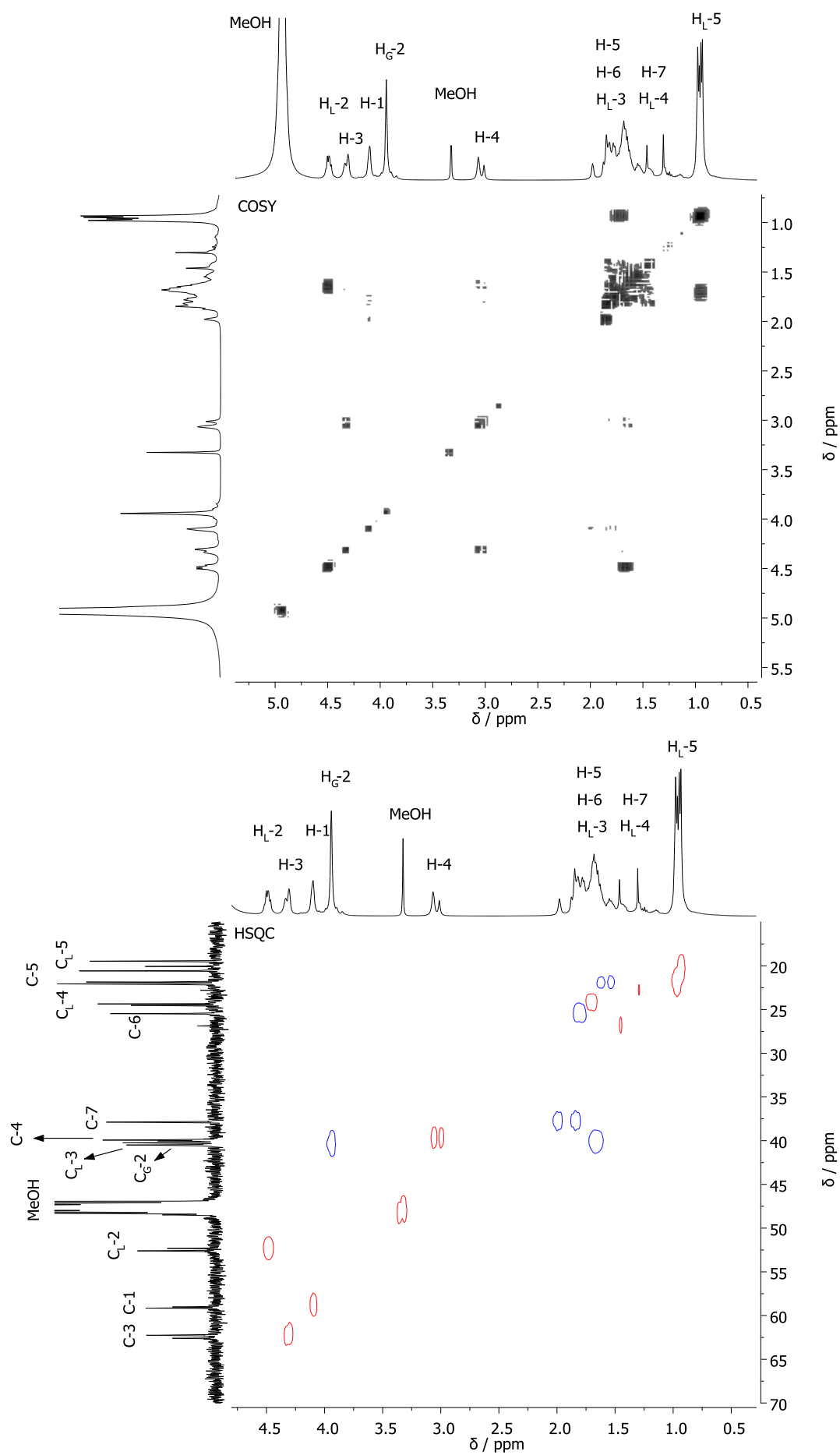
^{13}C -RMN e DEPT (CH_3OD , 101 MHz) δ ppm: [174.32(Cq), 173.62 (Cq), 173.55 (Cq), 171.95 (Cq), 171.78 (Cq), 167.36 (Cq), 167.08 (Cq), 4 x $\underline{\text{C}}\text{ONH}$ + 2 x $\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{H}$], [62.60 (CH), 62.25 (CH), 2 x C-3], [59.15 (CH), 59.01 (CH), 2 x C-1], [52.60 (CH), 52.32 (CH), C_L-2], [40.50 (CH), 40.24 (CH), 2 x C-4], [40.03 (CH_2), 39.93 (CH_2), 2 x C_G-2], 37.88 (2CH_2 , 2 x C_L-3), 35.65 (2CH_2 , 2 x C-7), [25.47 (CH_2), 24.36 (CH_2), 2 x C-6], [22.13 (CH_2), 22.07 (CH_2), 2 x C-5], [21.86 (CH_3), 20.58 (CH_3), 20.07 (CH_3), 19.47 (CH_3), 2 x H_L-5].

EM (ESI, CH_3OH) m/z (%): 312.1917 (MH^+ , 9), 282.2790 (2), 213.1228 (8), 181.0976 (14), 153.1038 (22), 96.0817 (100, pico base).

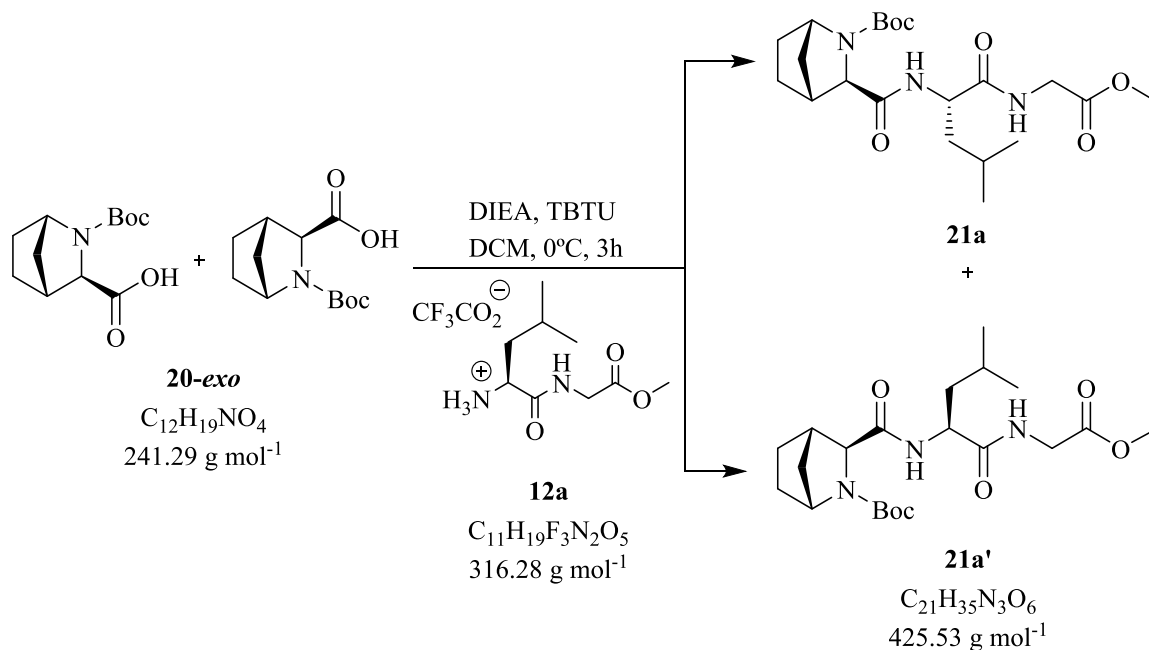
EMAR: cálculo para $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_4^+$: 312.1918; obtida: 312.1917.







3.3.6. Síntese de {(1*S*,3*R*,4*R*)-2-(*tert*-butiloxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-leucilglicinato de metilo (21a**) e de {(1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*tert*-butiloxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-leucilglicinato de metilo (**21a'**)**



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **11a** (secção 3.3.1.), procedeu-se ao acoplamento entre **20-*exo*** (0.797 g, 3.30 mmol, 1 eq.) e o trifluoracetato de L-leucilglicinato de metilo amónio, **12a** (1.252 g, 3.30 mmol, 1.2 eq) deixando-se reagir durante 48h e, em seguida, efetuou-se o tratamento corrente, obtendo-se 2.112 g de um sólido suspenso num óleo amarelo. Procedeu-se à purificação do composto pretendido por cromatografia em coluna de adsorção em gel de SiO_2 , utilizando como eluente AcOEt tendo-se obtido de um sólido verde claro (1.264 g) que foi recristalizado numa mistura de AcOEt/ Et_2O (1:5), identificado como a mistura dos correspondentes tripéptidos protegidos pretendidos (**21a/21a'**). Rendimento de 90%.

Compostos **21a/21a'**: sólido verde claro cristalino.

R_f : 0.63 em AcOEt.

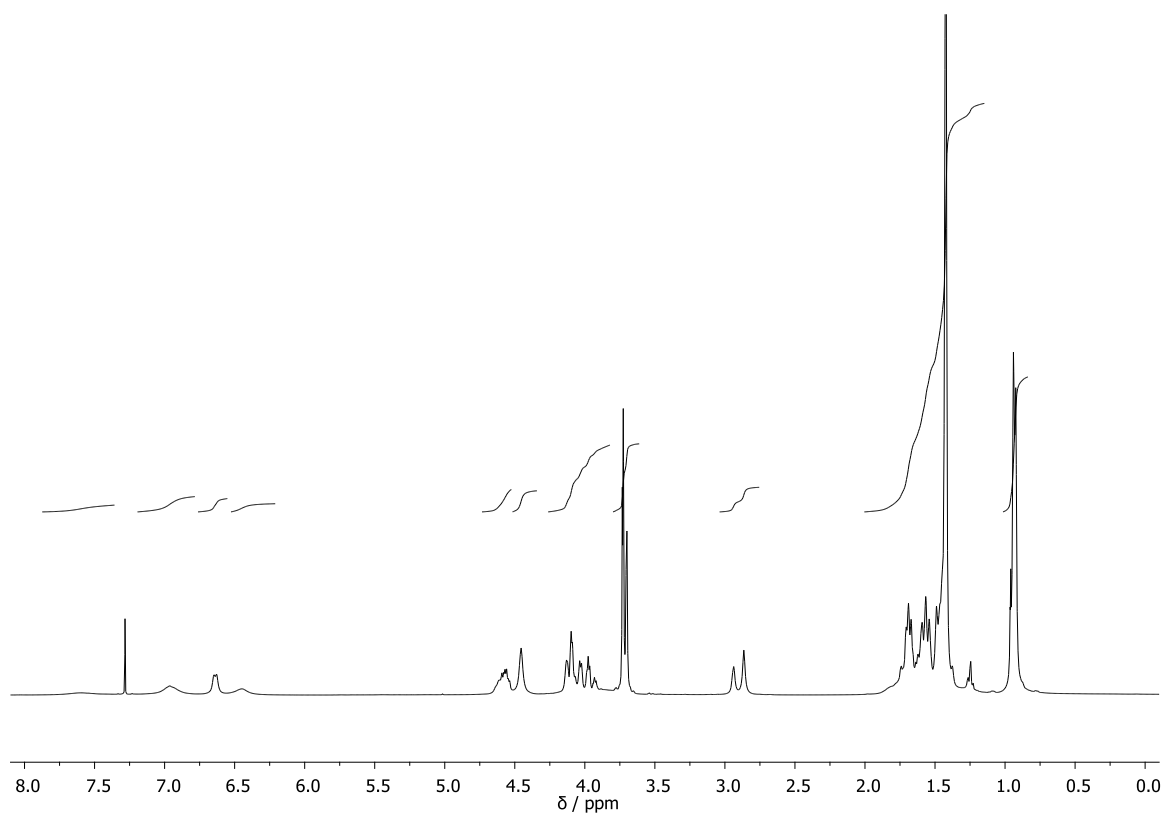
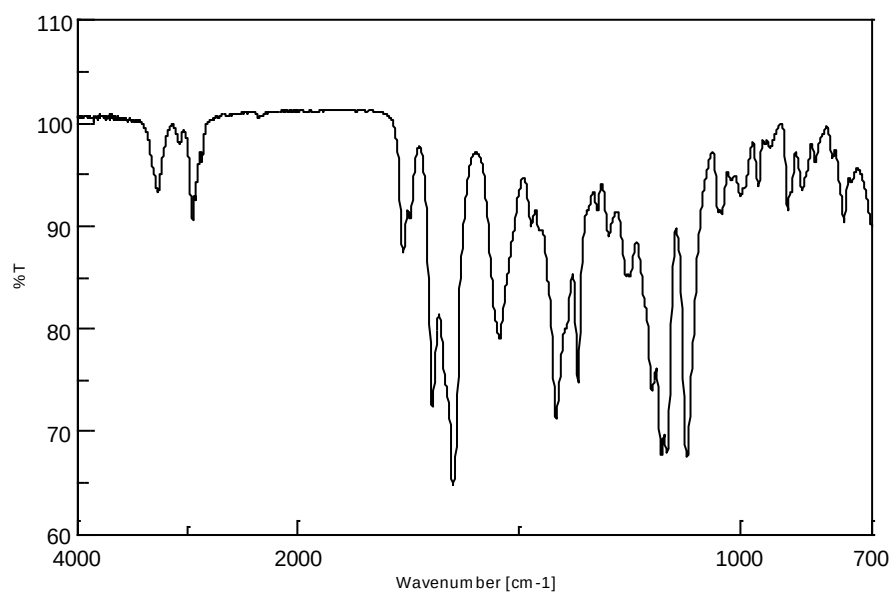
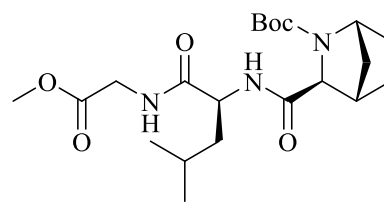
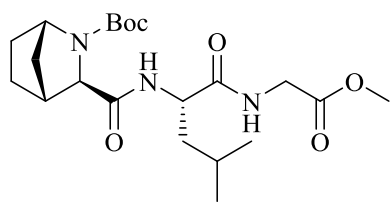
IV ν (cm^{-1}): 3273.57, 3074.94, 2954.41, 2930.31, 2871.49, 1761.65, 1746.23, 1696.09, 1649.80, 1542.77, 1474.31, 1415.49, 1365.35, 1320.04, 1295.93, 1248.68, 1197.58, 1177.33, 1160.94, 1119.48, 1039.44, 1019.19, 997.982, 956.520, 927.593, 889.987, 857.204, 827.312, 785.85, 762.709.

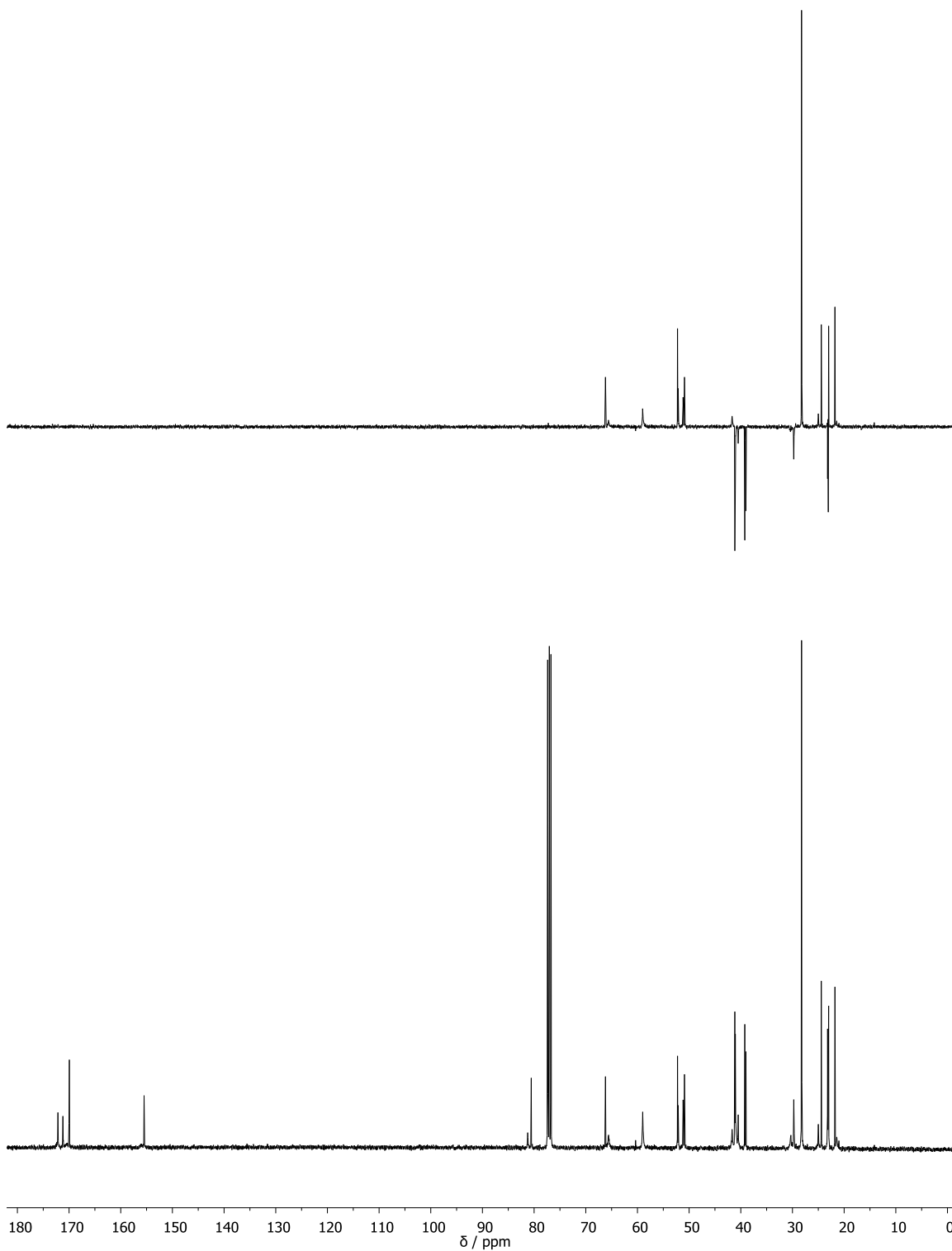
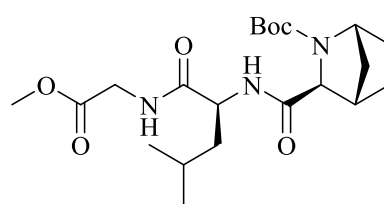
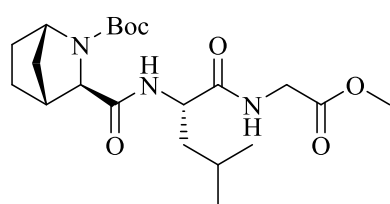
¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm (verifica-se a presença de rotâmeros): [7.57 (sl), 6.88 (sl), 6.60 (d, $J = 7.2$ Hz), 6.41 (sl), 4H, permutam com D₂O, 4 x CONH], 4.70 – 4.49 (m, 2H, 2 x H_L-2), 4.44 (s, 2H, 2 x H-1), 4.14 – 3.89 (m, 4H, 2 x H_C-2), 3.80 – 3.62 [3.73 (s), 3.73 (s), 3.70 (s), 3.70 (s) 6H, 2 x OCH₃], [2.92 (s), 2.85 (s), 2H, 2 x H-4], 2.30 – 1.15 [1.43 (s), 1.42 (s), 36H, 2 x (H-5, H-6 + H-7 + H_L-3 + H_L-4 + Boc)].

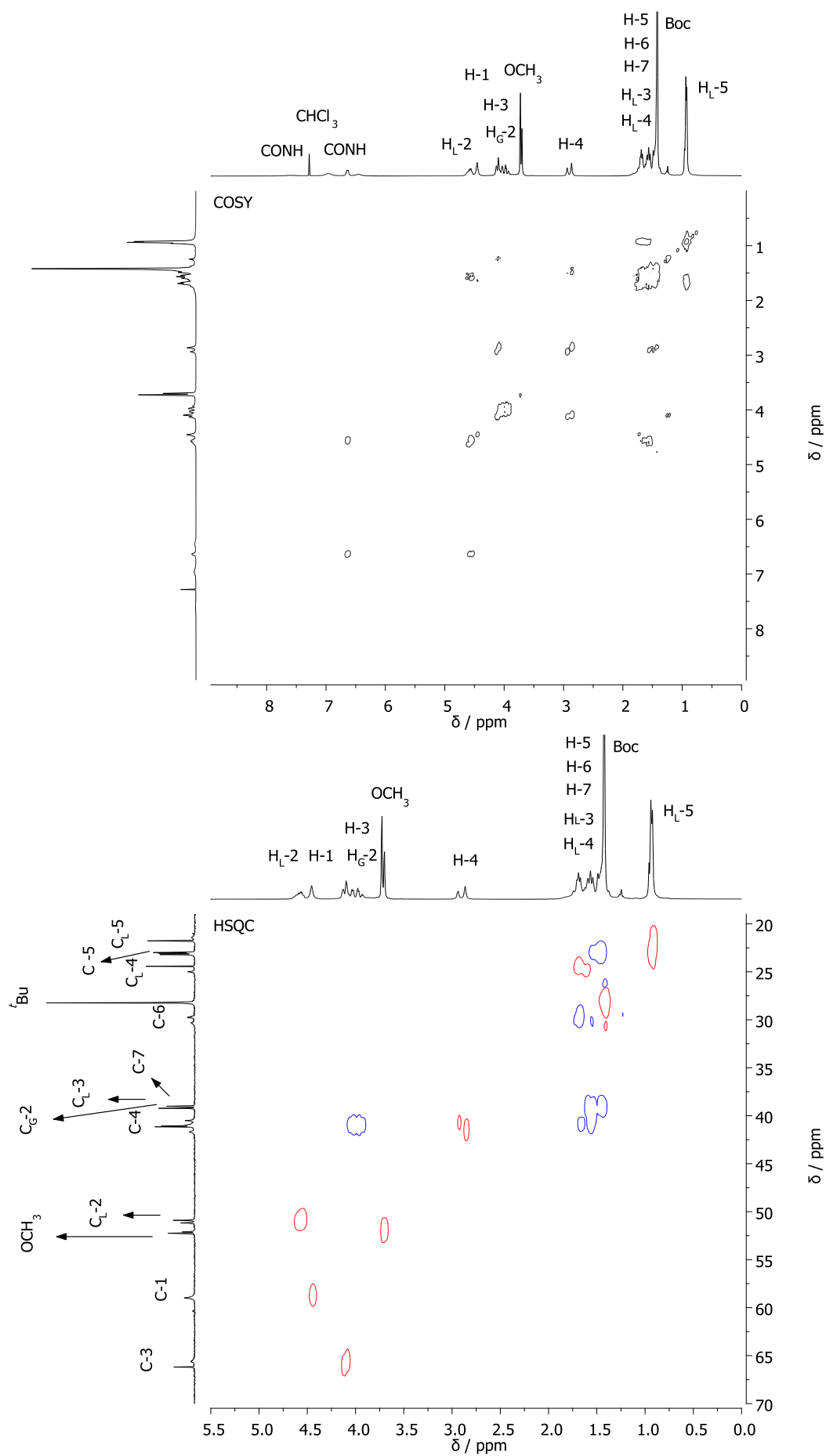
¹³C-RMN e DEPT (CDCl₃, 101 MHz) δ ppm: [172.15 (Cq), 171.19 (Cq), 170.01 (Cq), 169.95 (Cq), 4 x CONH + 2 x CO₂CH₃], 155.48 (Cq, CO₂^tBu), [81.24 (Cq), 80.55 (Cq), 2 x Boc], [66.19 (CH), 65.57 (CH), 2 x C-3], [60.36 (CH), 58.99 (CH), 2 x C-1], [52.25 (CH₃), 52.11 (CH₃), 2 x OCH₃], [51.17 (CH), 50.90 (CH), 2 x C_L-2], 41.69 (2CH, 2 x C-4), [41.15 (CH₂), 41.06 (CH₂), 2 x C_G-2], 40.50 (2CH₂, 2 x C_L-3), [39.23 (CH₂), 39.01 (CH₂), 2 x C-7], [30.30 (CH₂), 29.75 (CH₂), 2 x C-6], 28.24 (3CH₃, 2 x ^tBu), [25.00 (CH), 24.42 (CH), 2 x C_L-4], [23.20 (CH₂), 23.16 (CH₃), 23.07 (CH₂), 23.00 (CH₃), 21.78 (CH₃), 21.44 (CH₃), 2 x (C-5 + C_L-5)].

EM (ESI, CH₃OH) m/z (%): 873.49357 ([2M+Na]⁺, 99), 464.21392 ([M+K]⁺, 34), 448.24113 ([M+Na]⁺, 100, pico base), 426.25925 (MH⁺, 45), 326.20708 ([M-Boc]⁺, 22).

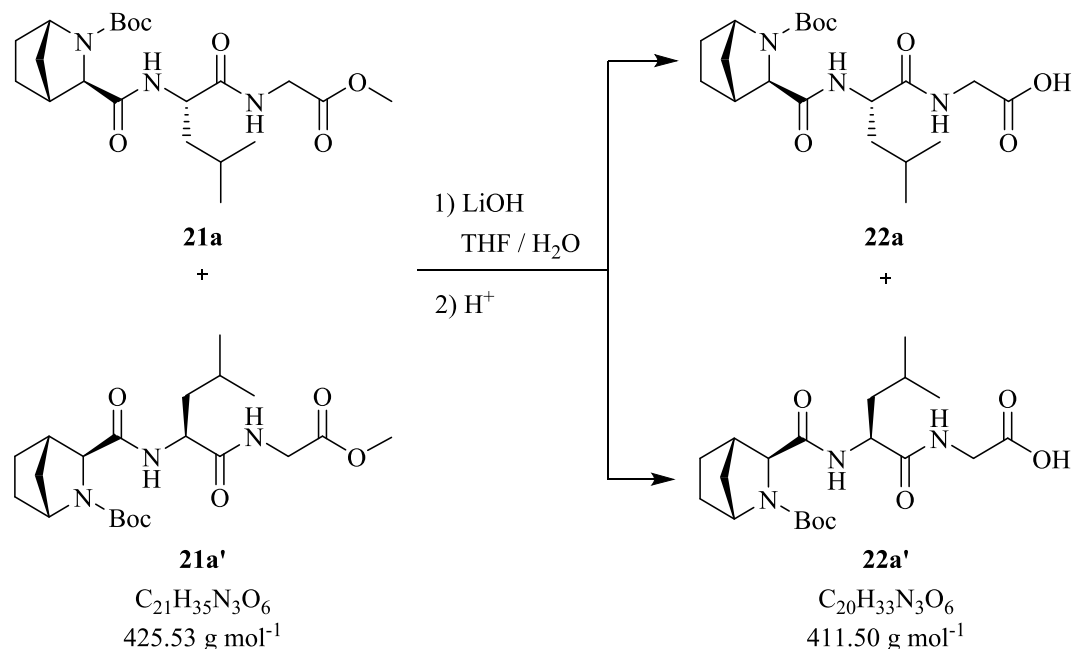
EMAR: cálculo para C₂₁H₃₆N₃O₆⁺: 426.25986; obtida: 426.25925.







3.3.7. Síntese de {(1*S*,3*R*,4*R*)-2-(*tert*-butiloxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-leucilglicina (22a**) e de {(1*R*,3*S*,4*S*)-2-(*tert*-butiloxicarbonil)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-leucilglicina (**22a'**)**



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **7-exo** (secção 3.2.4.), procedeu-se à hidrólise alcalina da mistura dos tripéptidos **21a/21a'** (0.120 g, 0.282 mmol), porém utilizou-se CH₃OH como solvente, deixando-se reagir durante 48h e, em seguida, efetuou-se o tratamento corrente. Obteve-se um sólido branco de baixo ponto de fusão (105.5 mg) identificado como a mistura dos ácidos **22a/22a'**. Rendimento de 91%.

Composto **22a/22a'**: sólido branco.

R_f: 0.12 em AcOEt.

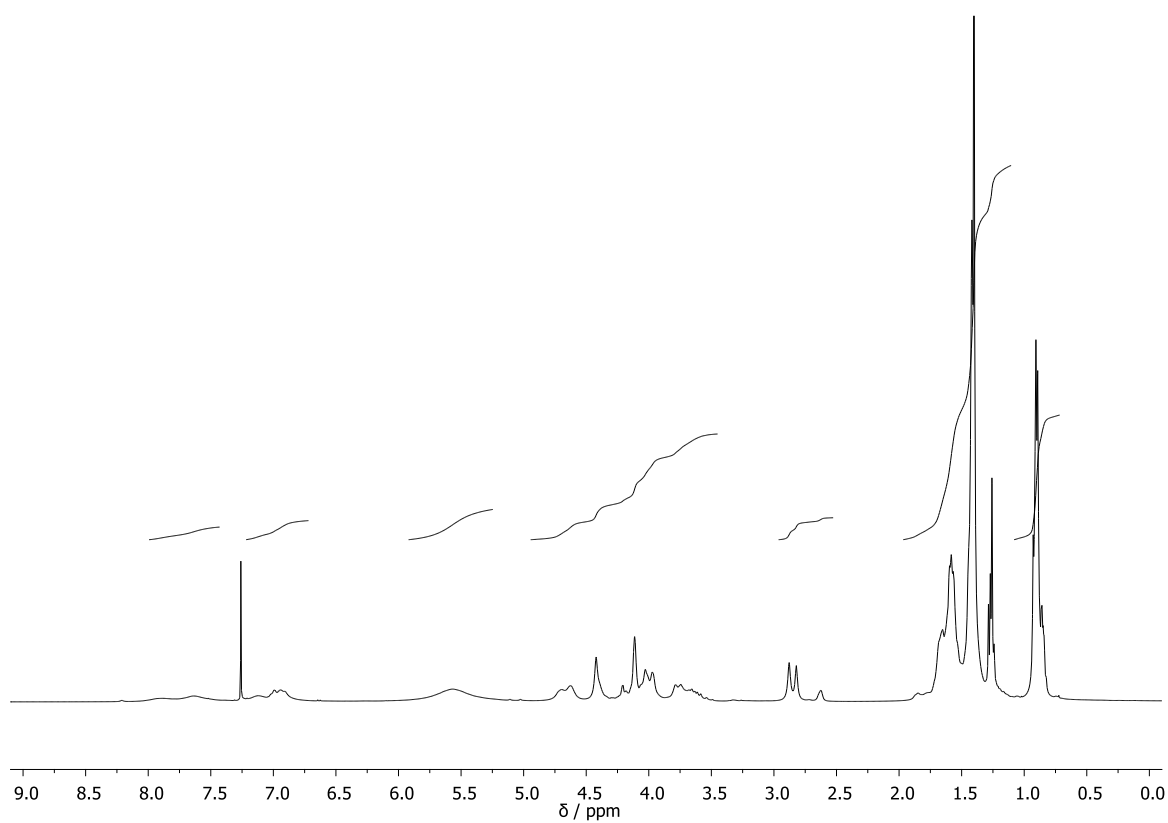
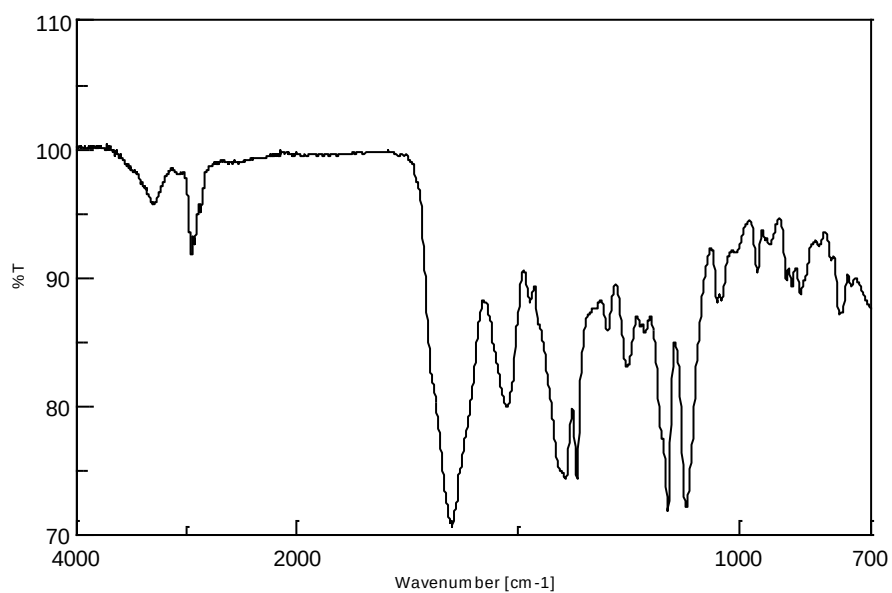
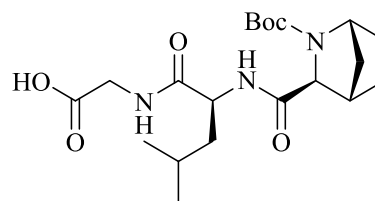
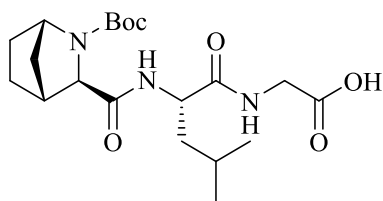
IV ν (cm⁻¹): 3297.68, 3077.83, 2957.30, 2927.41, 2871.49, 1647.88, 1524.45, 1471.42, 1391.39, 1365.35, 1295.93, 1253.50, 1208.18, 1159.97, 1118.51, 1048.12, 1036.55, 956.52, 930.485, 859.132, 821.527, 785.85, 771.387, 744.388.

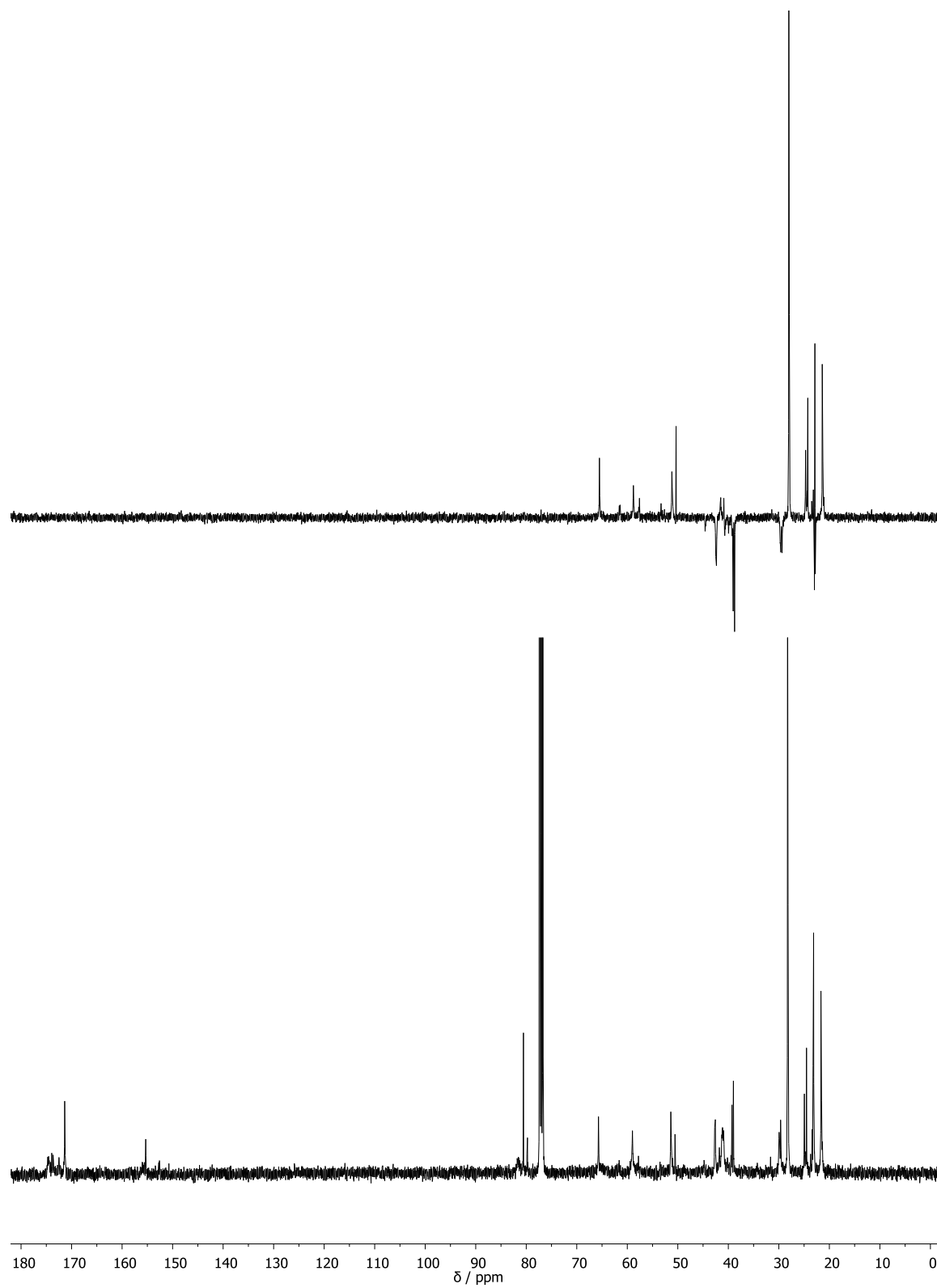
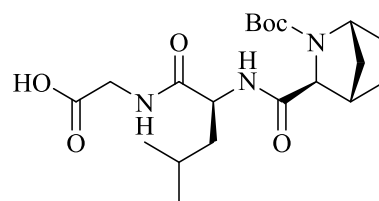
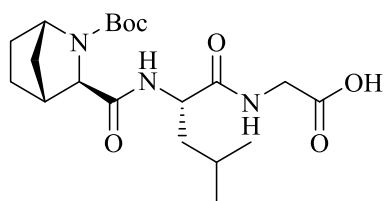
¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: [8.00 – 7.43(m), 7.21 – 6.73 (m), 5.91 – 5.26 (m), 6H, 4 x $\underline{\text{CONH}}$ + 2 x $\underline{\text{CO}_2\text{H}}$], 4.90 – 3.45 [mc, 10H, 2 x (C-1 + C-3 + C_L-2 + C_G-2)], 2.98 – 2.53 [2.88 (s), 2.82 (s), 2.62 (s), 2H, 2 x C-4], 1.97 – 1.10 [1.42 (s), 1.40 (s), 36H, 2 x (C-5 + C-6 + C-7 + C_L-3 + C_L-4 + Boc)], 1.06 – 0.72 (m, 12H, 2 x C_L-5).

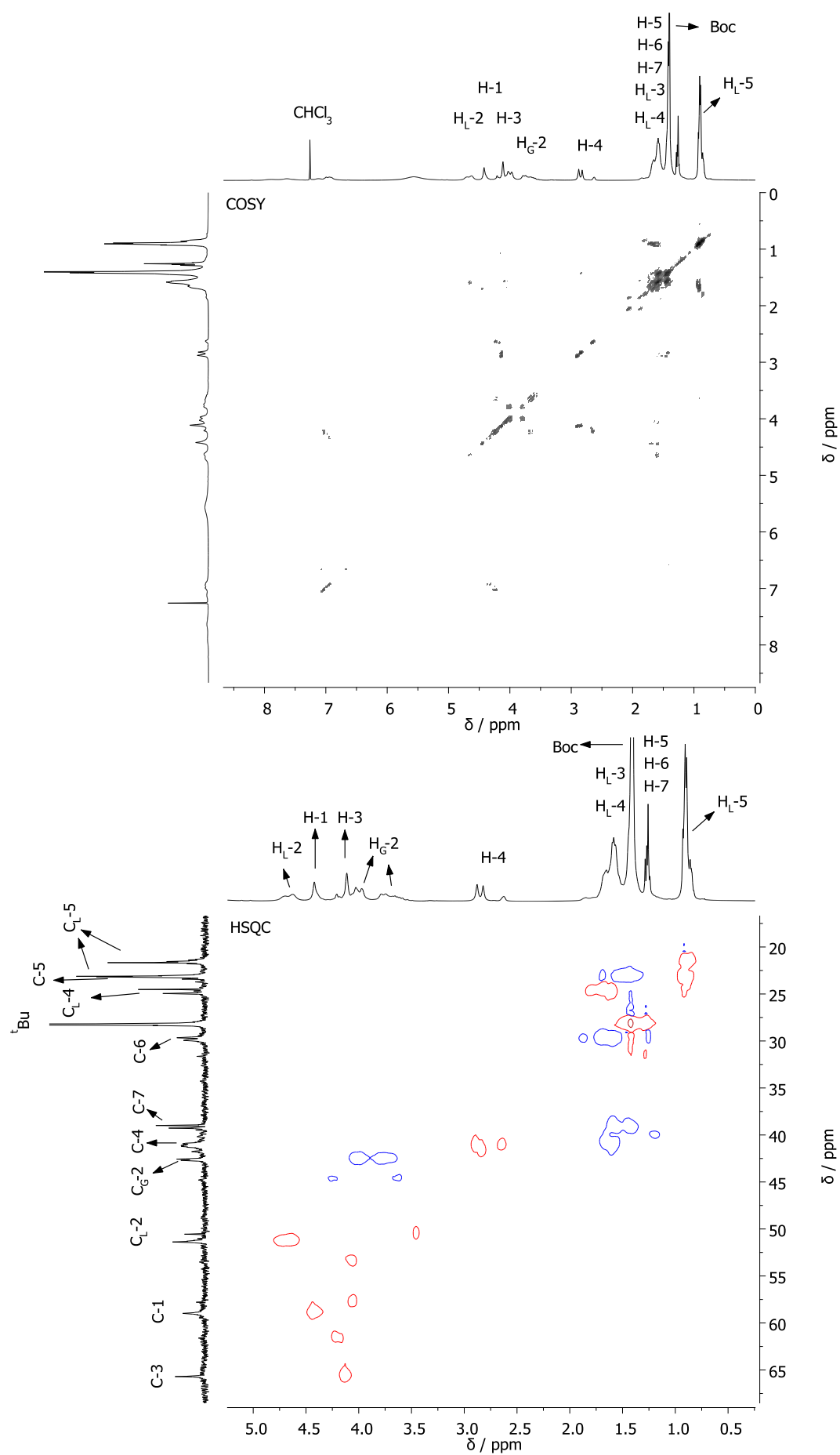
^{13}C -RMN e DEPT (CDCl_3 , 101 MHz) δ ppm: [174.72 (Cq), 174.68 (Cq), 174.53 (Cq), 173.93 (Cq), 173.89 (Cq), 173.66 (Cq), 171.66 (Cq), 171.36 (Cq), 171.34 (Cq), 4 x CONH + 2 x CO_2H], [155.35 (Cq), 155.32 (Cq), CO_2^tBu], [80.56 (Cq), 79.76 (Cq), 2 x Boc], [65.70 (CH), 62.78 (CH), 61.63 (CH), 2 x C-3], [58.98, 2 x C-1], [51.38 (CH), 50.55 (CH), 2 x C_L -2], [44.82 (CH_2), 44.76 (CH_2), 44.67 (CH_2), 43.71 (CH_2), 42.58 (CH_2), 2 x C_G -2], [41.30 (CH), 41.21 (CH), 41.11 (CH), 2 x C-4], [40.94 (CH_2), 39.27 (CH_2), 2 x C-7], 38.99 (2CH_2 , 2 x C_L -3), , [29.95 (CH_2), 29.65 (CH_2), 2 x C-6], [28.28 (CH_3), 28.20 (CH_3), 28.12 (CH_3), 2 x ^tBu], [24.95 (CH), 24.52 (CH), 2 x C_L -4], [23.42 (CH_2), 23.17 (CH_3), 23.12 (CH_3), 23.05 (CH_2), 21.79 (CH_3), 21.67 (CH_3), 21.55 (CH_3), 2 x (C-5 + C_L -5)].

EM (ESI, CH_3OH) m/z (%): 434.22616 [$(\text{M}+\text{Na})^+$, 14], 412.24421 (MH^+ , 20), 348.15503 (27), 332.18689 (45), 318.171223 (74), 273.62881 (100, pico base), 199.20615 (42), 228.90115 (15), 157.59750 (15).

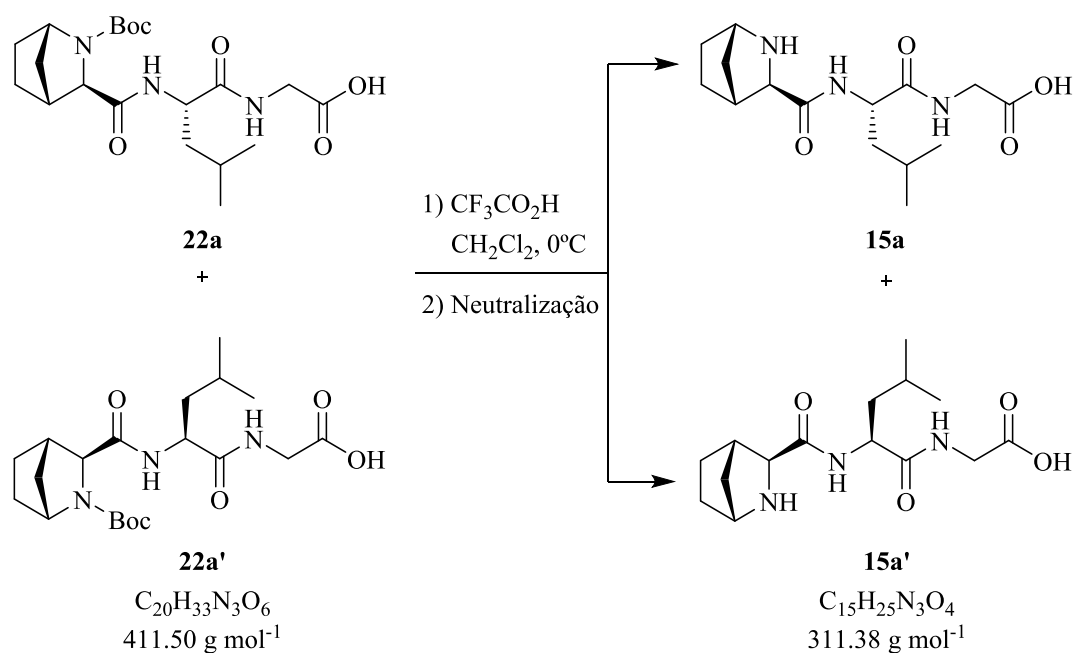
EMAR: cálculo para $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_6^+$: 412.24424; obtida: 412.24421.







3.3.8. Síntese de {(1*S*,3*R*,4*R*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-leucilglicina (**15a**) e de {(1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-leucilglicina (**15a'**)



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **12a** (secção 3.3.2.), a mistura dos tripéptido **22a/22a'** (0.141 g, 0.343 mmol) foi dissolvida em CH_2Cl_2 (10 mL) deixando-se reagir durante 3h e, em seguida, efetuou-se o tratamento habitual, obtendo-se um óleo ligeiramente acastanhado.

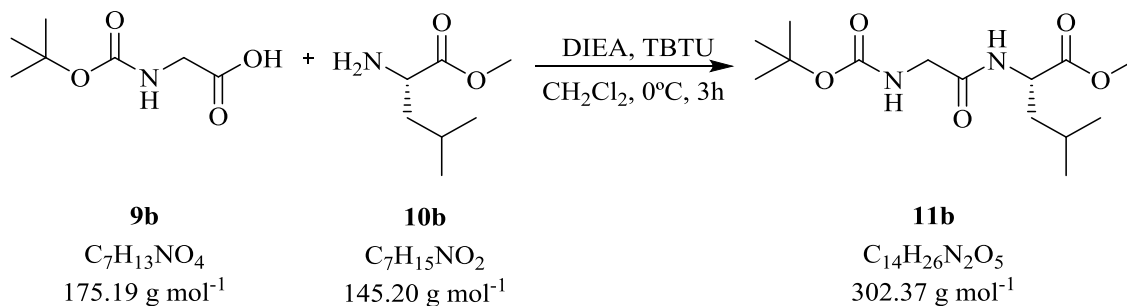
Em seguida, dissolveu-se a mistura em dH_2O (10 mL), neutralizou-se com solução saturada de NaHCO_3 e procedeu-se à extração com AcOEt . Juntaram-se as fases orgânicas e secou-se com Na_2SO_4 anidro. Filtrou-se a suspensão obtida com recurso a pressão reduzida com lavagens de AcOEt e concentrou-se à secura, obtendo-se um óleo acastanhado (105 mg), identificado como a mistura dos tripéptidos pretendidos **15a/15a'**. Rendimento de 98%.

Compostos **15a/15b**: óleo ligeiramente acastanhado.

Os dados espectroscópicos obtidos são coincidentes com os constantes na secção 3.3.5..

3.4. SÉRIE P*GL

3.4.1. Síntese de (terc-butoxicarbonil)glicil-L-leucinato de metilo (11b)



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **11a** (secção 3.3.1.), procedeu-se ao acoplamento entre **9b** (0.97 g, 5.54 mmol, 1 eq.) e **10b** (0.80 g, 5.54 mmol, 1eq.) em CH_2Cl_2 seco (50 mL) deixando-se reagir durante 48h e, em seguida, efetuou-se o tratamento corrente.

O composto foi purificado recorrendo-se à cromatografia de adsorção em coluna de gel de SiO_2 , usando-se como eluente CH_2Cl_2/CH_3OH (20:1), tendo-se obtido um óleo amarelo (1.64 g), identificado como o correspondente dipéptido protegido **11b**. Rendimento de 98%.

Composto **11b**: óleo amarelo.

R_f : 0.39 em CH_2Cl_2/CH_3OH (20:1).

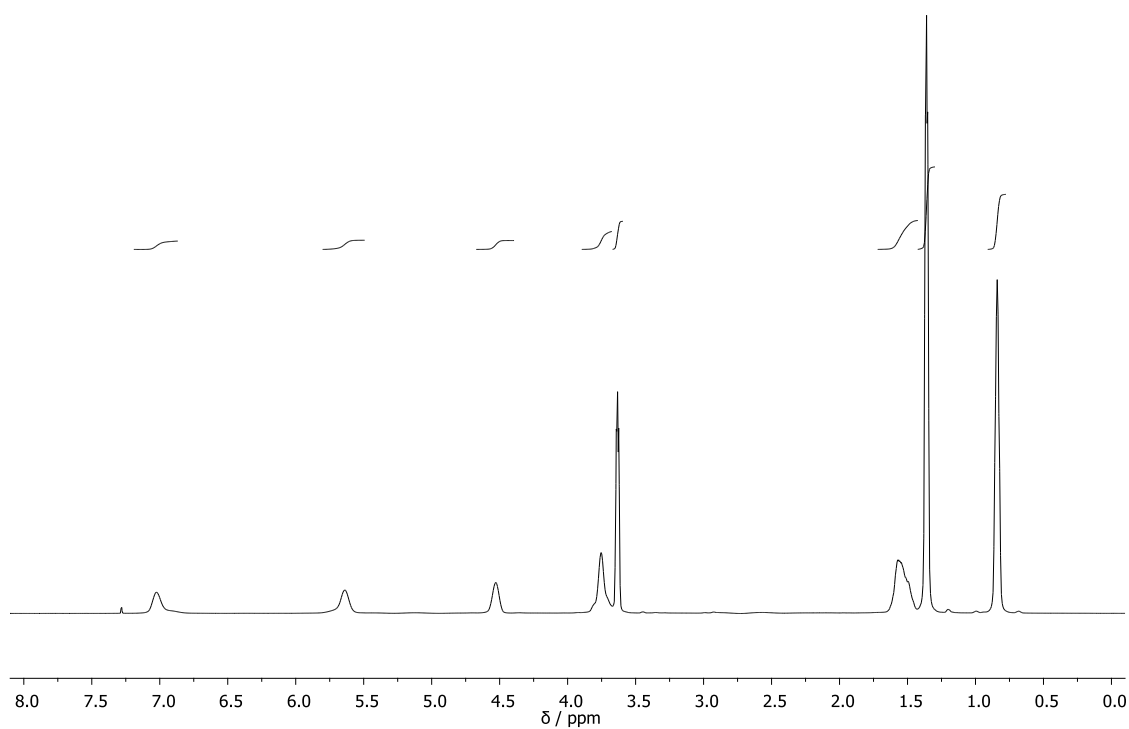
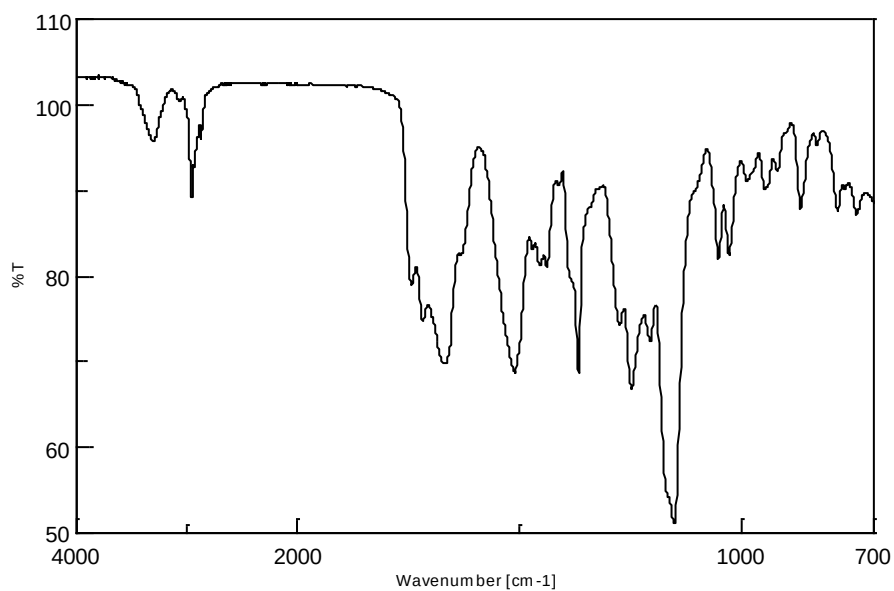
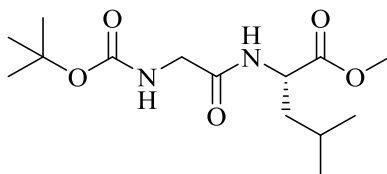
IV ν (cm^{-1}): 3308.29, 2957.30, 2871.49, 1742.37, 1713.44, 1671.02, 1509.03, 1437.67, 1366.32, 1272.79, 1246.75, 1204.33, 1150.33, 1050.05, 1025.94, 985.45, 945.91, 864.92, 781.03, 738.60.

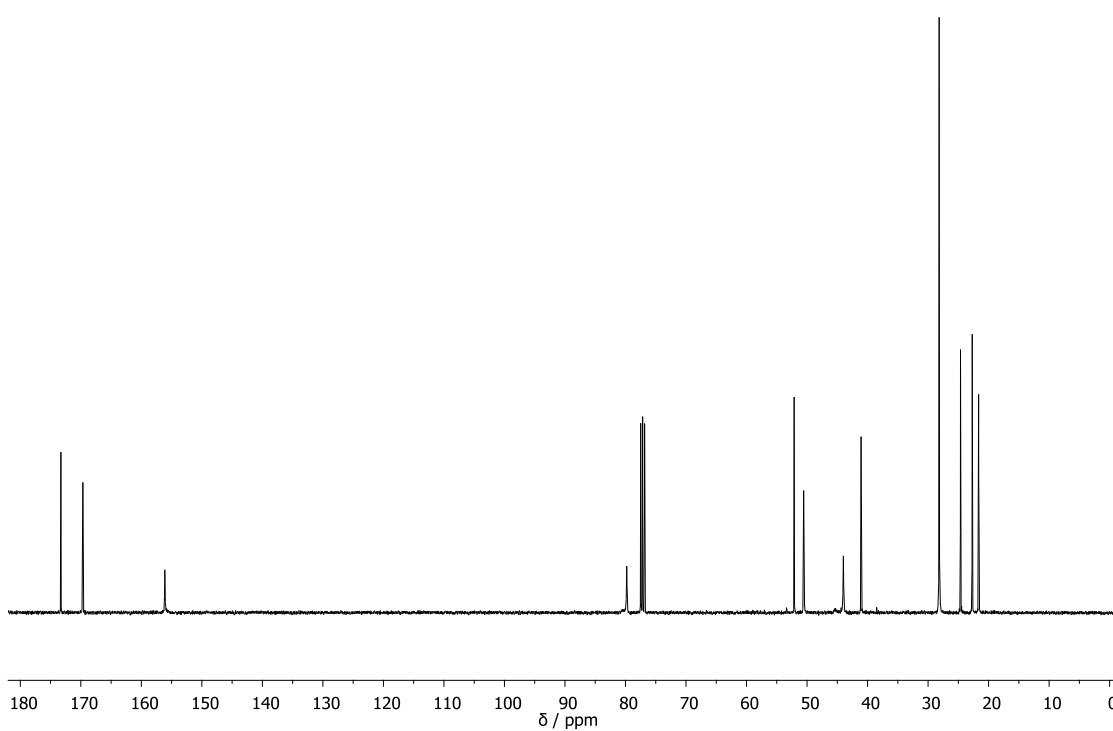
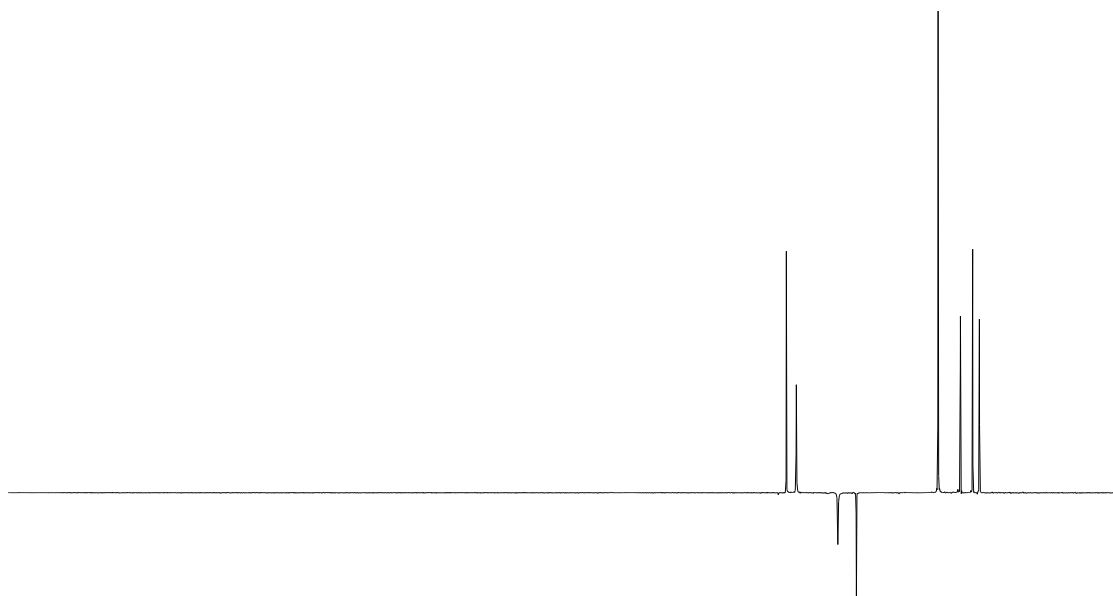
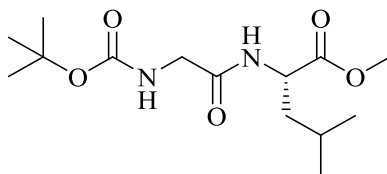
^1H -RMN ($CDCl_3$, 300 MHz) δ ppm: 7.02 (sl, 1H, permuta com D_2O , $CONH$), 5.64 (sl, 1H, permuta com D_2O , $CONH$), 4.53 (sl, 1H, H_L-2), 3.75 (m, 2H, H_G-2), 3.63 (s, 3H, OCH_3), 1.67 – 1.53 (m, 3H, $H_L-3 + H_L-4$), 1.36 (s, 9H, Boc), 0.97 – 0.73 (m, 6H, H_L-5).

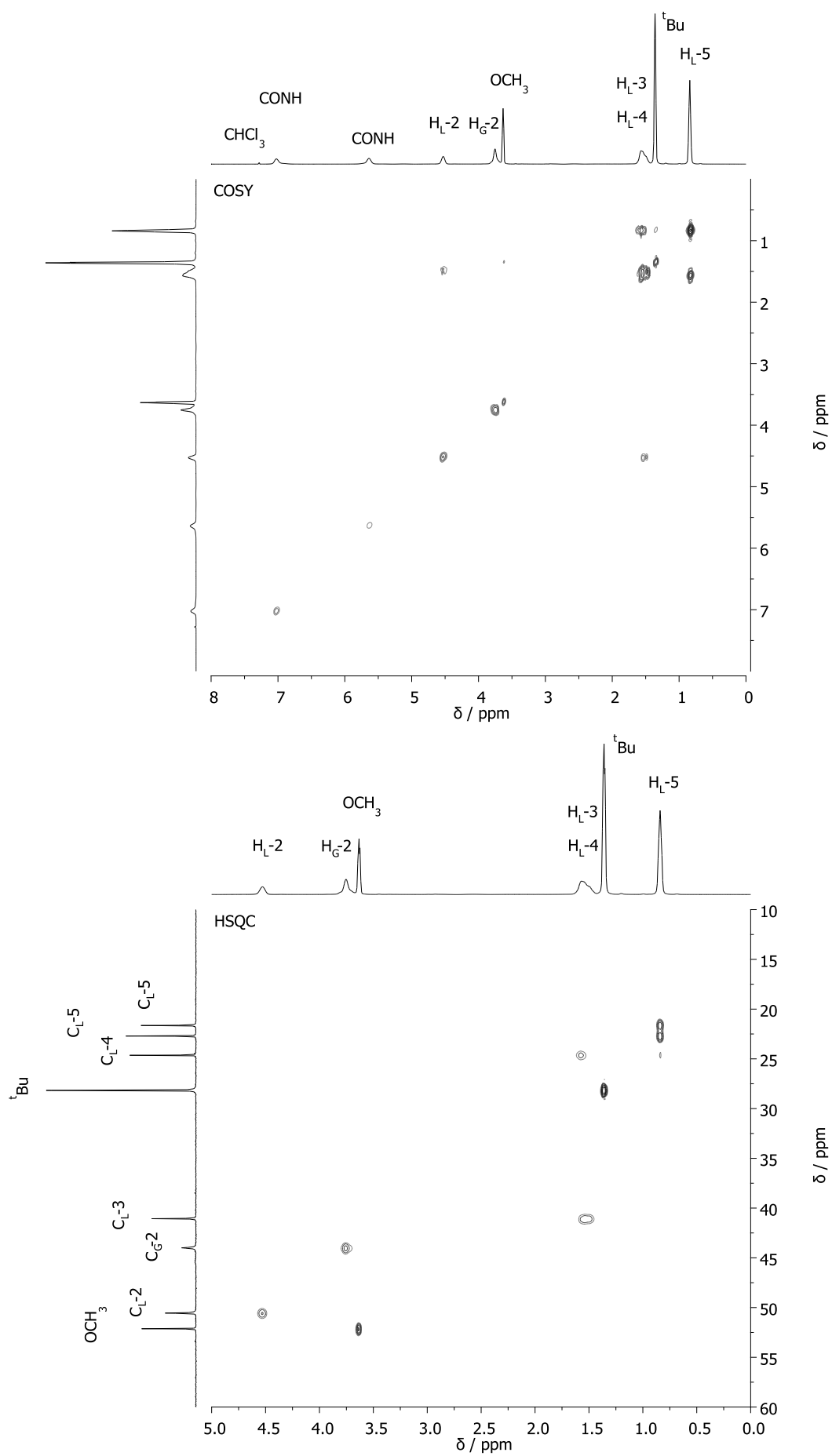
^{13}C -RMN e DEPT ($CDCl_3$, 75 MHz) δ ppm: 173.29 (Cq, $\underline{CONH}$), 169.66 (Cq, $\underline{CO_2CH_3}$), 156.12 (Cq, $\underline{CO_2}^tBu$), 79.79 (Cq, Boc), 52.13 (CH, C_L-2), 50.56 (CH_3 , OCH_3), 43.99 (CH_2 , C_G-2), 41.07 (CH_2 , C_L-3), 28.17 ($3CH_3$, Boc), 24.64 (CH, C_L-4), 22.71 (CH_3 , C_L-5), 21.65 (CH_3 , C_L-5).

EM (ESI, CH_3OH) m/z (%): 325.1734 ($[M+Na]^+$, 48), 269.1101 (7), 247.1306 (37), 225.1503 (59), 203.1401 (46), 187.1073 (13), 146.1183 (100, pico base), 143.1184 (29), 117.1041 (40), 86.0955 (3).

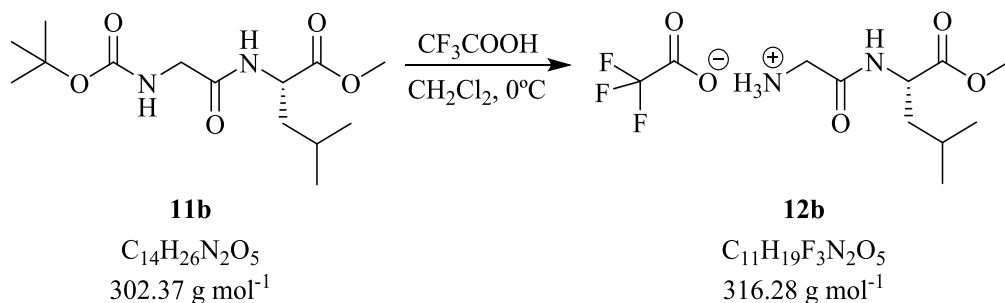
EMAR: cálculo para $C_{14}H_{26}N_2O_5Na^+$: 325.1734; obtida: 325.1734.







3.4.2. Síntese do trifluoracetato de glicil-L-leucinato de metilo amónio (12b)



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **12a** (secção 3.3.2.), o dipéptido (carbamato-éster) **11b** (1.72 g, 5.69 mmol) foi dissolvido em CH_2Cl_2 (50 mL) deixando-se reagir durante 3h e, em seguida, efetuou-se o tratamento habitual, obtendo-se um óleo denso ligeiramente amarelo. Por recristalização em $Et_2O/AcOEt$ (10:1) e, através de subsequentes lavagens com Et_2O , alcançou-se de um sólido bege (1.771 g), identificado como o sal trifluoracetato de amónio **12b**. Rendimento de 98%.

Composto **12b**: sólido bege.

P.f.: 114–115°C

R_f: 0.25 em CH_2Cl_2/CH_3OH (10:1).

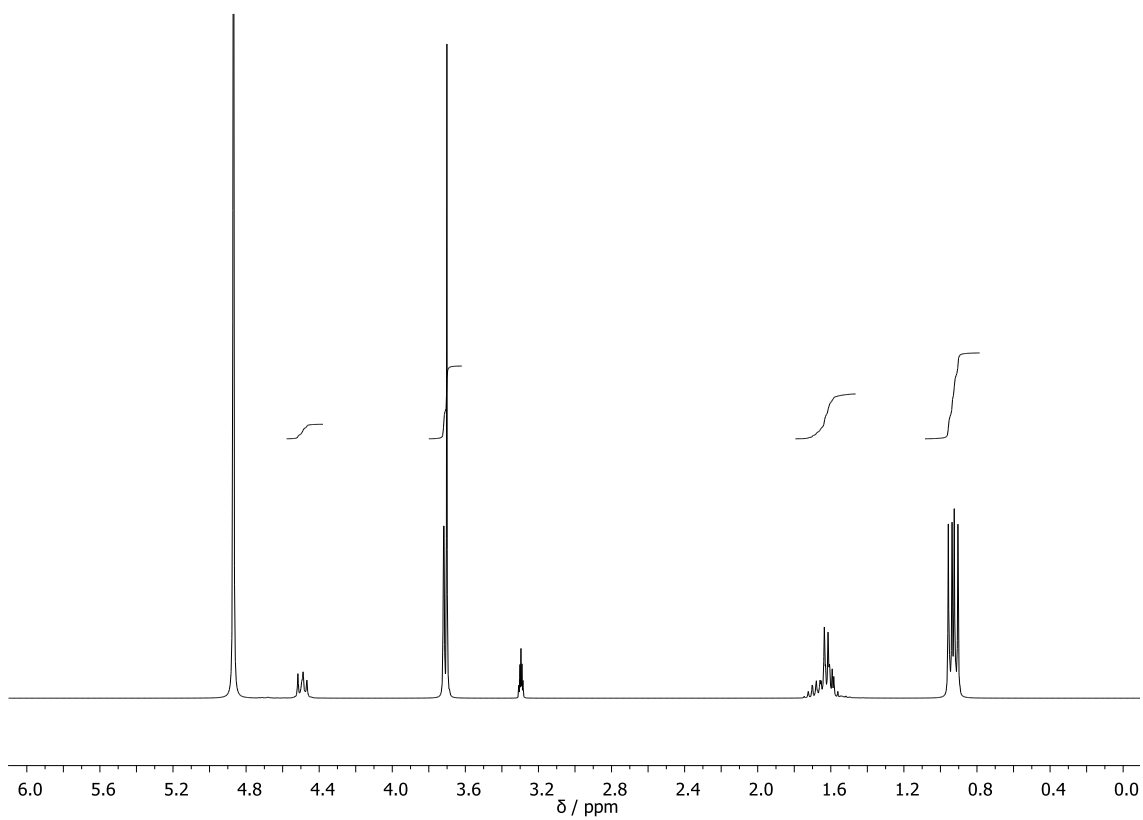
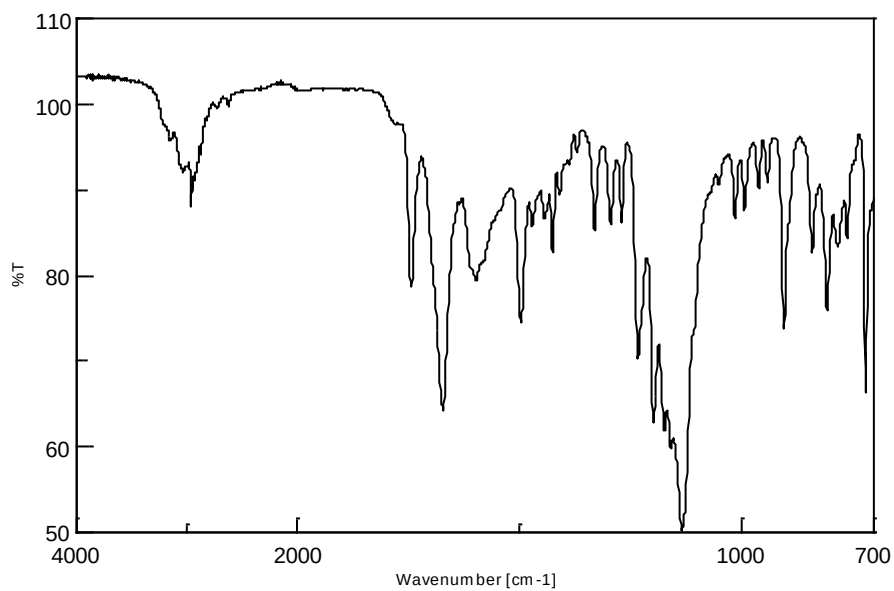
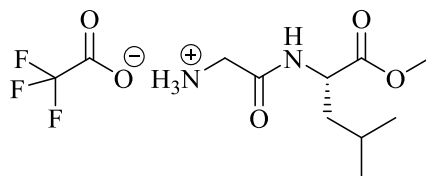
IV ν (cm^{-1}): 3146.29, 3033.48, 2963.09, 2729.74, 2626.57, 1743.33, 1671.98, 1597.73, 1496.49, 1470.46, 1443.46, 1425.14, 1408.75, 1369.21, 1329.68, 1293.04, 1268.93, 1232.29, 1196.61, 1172.51, 1133.94, 1012.45, 991.232, 959.412, 939.163, 902.523, 838.883, 805.135, 781.029, 759.816, 717.390.

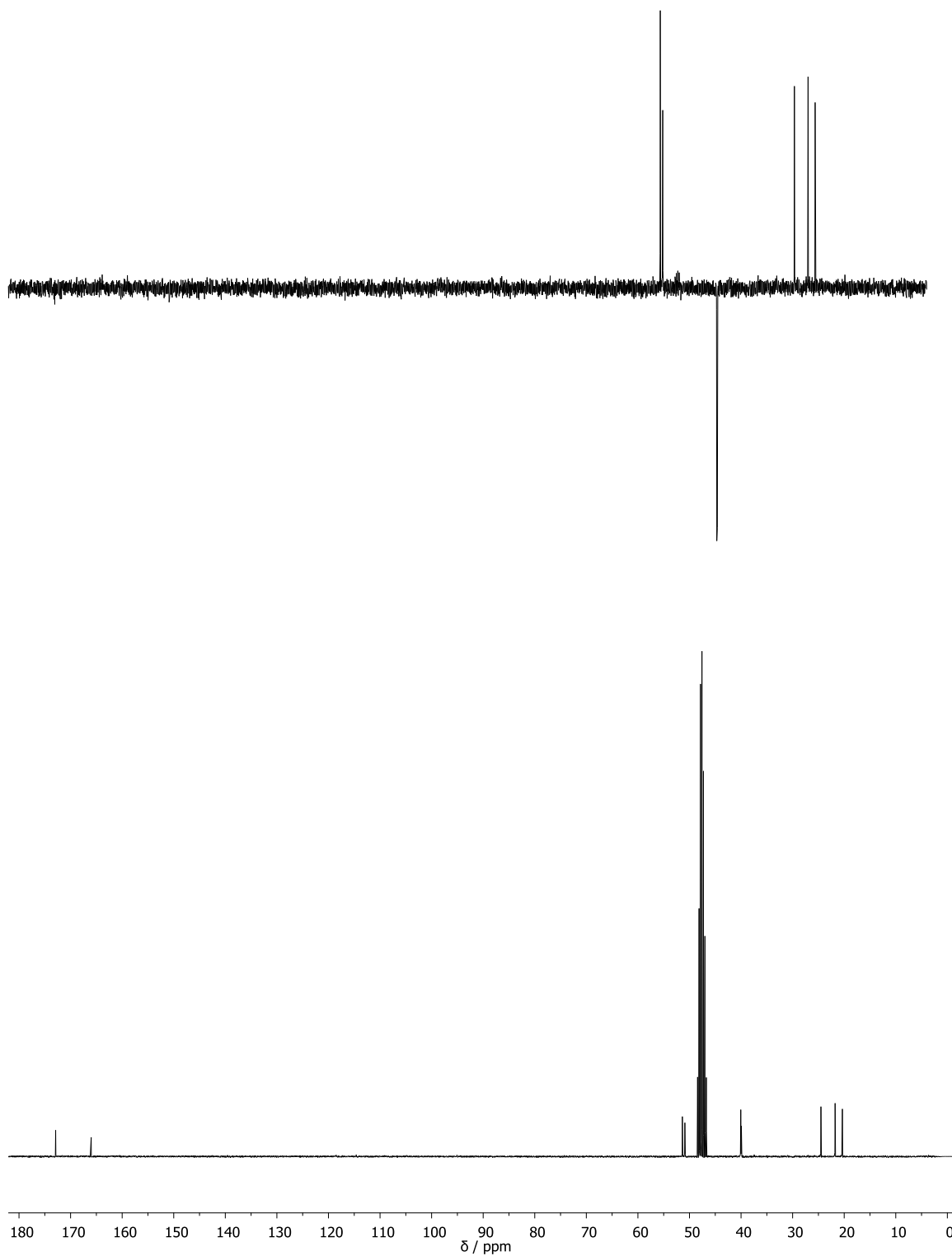
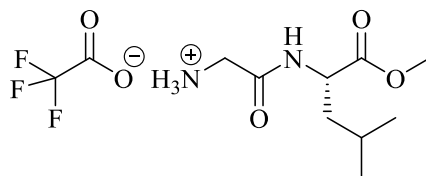
¹H-RMN (CD_3OD , 300 MHz) δ ppm: 4.60 – 4.40 (m, 1H, H_{L-2}), 3.72 (s, 2H, H_{G-2}), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 1.75 – 1.56 (m, 3H, $H_{L-3} + H_{L-4}$), 1.01 – 0.87 [0.95 (d, $J = 6.0$ Hz), 0.92 (d, $J = 6.0$ Hz), 6H, H_{L-5}].

¹³C-RMN e DEPT (CD_3OD , 75 MHz) δ ppm: 172.89 (Cq, $\underline{C}ONH$), 166.01 (Cq, $\underline{C}O_2CH_3$), 51.38 (CH, C_{L-2}), 50.89 (CH_3 , OCH_3), [40.05 (CH_2), 39.94 (CH_2), $C_{G-2} + C_{L-3}$], 24.51 (CH, C_{L-4}), [21.76 (CH_3), 20.35 (CH_3), C_{L-5}].

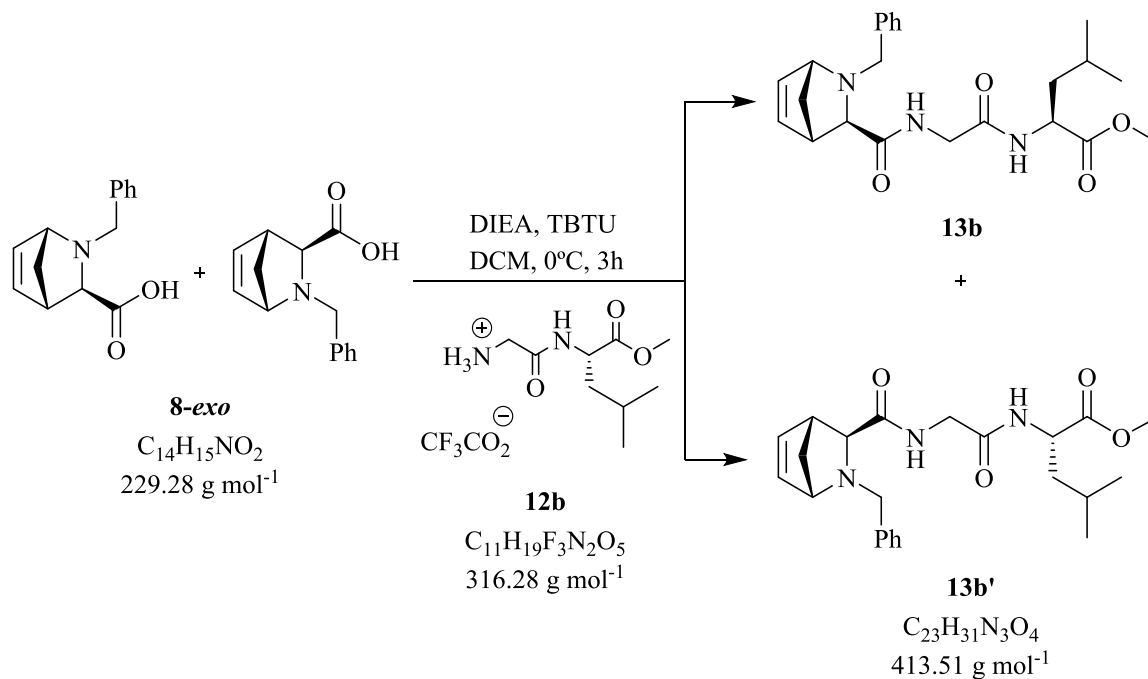
EM (ESI, CH_3OH) m/z (%): 225.1209 ($[M+Na]^+$, 13), 203.1388 (70), 171.1134 (9), 146.1189 (100, pico base), 143.1188 (71), 117.1040 (2), 86.0971 (87).

EMAR: cálculo para $C_9H_{18}N_2NaO_3^+$: 203.1390; obtida: 203.1388.





3.4.3. Síntese de {(1*R*,3*S*,4*R*)-2-benzil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carbonil}glicil-L-leucinato de metilo (13b**) e de {(1*S*,3*R*,4*S*)-2-benzil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carbonil}glicil-L-leucinato de metilo (**13b'**)**



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **11a** (secção 3.3.1.), procedeu-se ao acoplamento entre ($\pm$)-**8-*exo*** (0.590 g, 2.57 mmol) e **12b** (0.812 g, 2.57 mmol) em CH_2Cl_2 seco (40 mL) deixando-se reagir durante 48h e, em seguida, efetuou-se o tratamento corrente, obtendo-se 1.44 g de um óleo amarelo escuro. Procedeu-se à purificação do composto pretendido por cromatografia em coluna de adsorção em gel de SiO_2 , utilizando como eluente Hex/AcOEt (1:4), tendo-se obtido um óleo amarelo (703.0 mg), identificado como a correspondente mistura de diastereoisómeros, **13b/13b'**. Rendimento de 66%.

Compostos **13b/13b'**: óleo amarelo.

R_f : 0.43 em Hex/AcOEt (1:4).

IV ν (cm^{-1}): 3308.29, 3063.37, 2955.38, 1741.41, 1647.88, 1514.81, 1437.67, 1370.18, 1317.14, 1204.33, 1156.12, 1027.87, 970.019, 846.597, 802.242, 734.746.

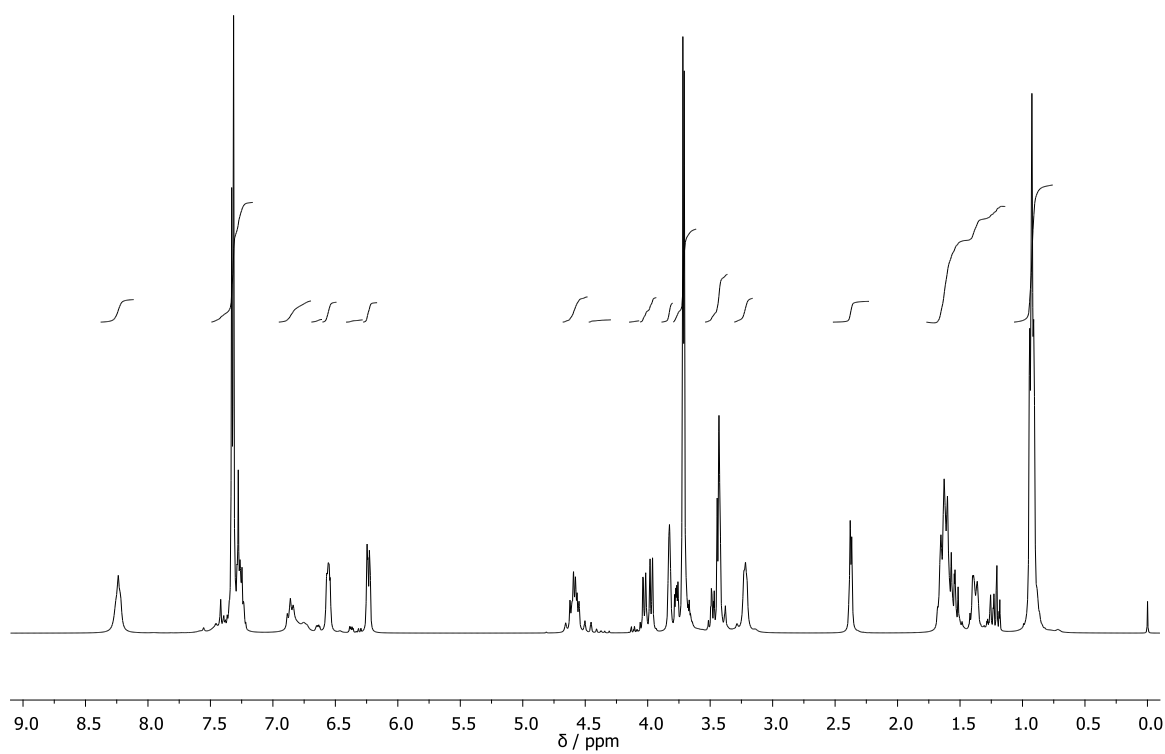
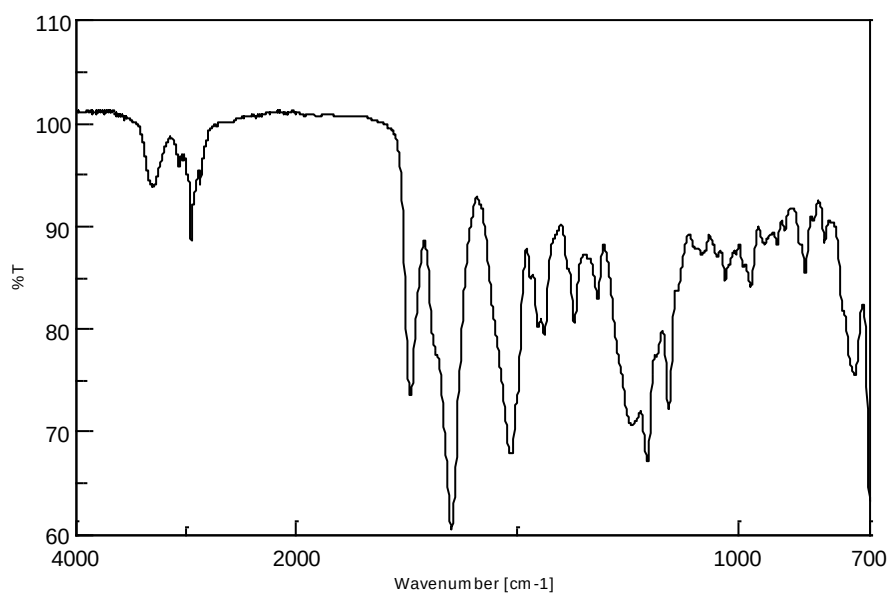
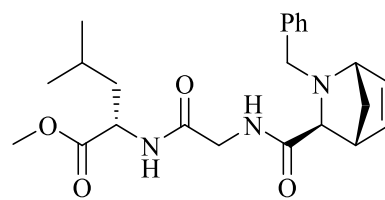
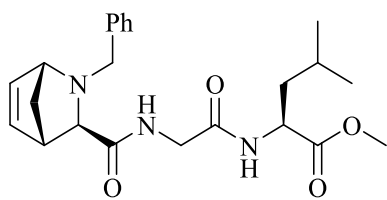
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ ppm (observa-se a presença de rotâmeros): 8.24 (sl, 2H, permuta com D_2O , 2 x CONH), 7.57 – 7.14 (m, 10H, 2 x ArH), 6.95 – 6.70 (m, 2H, permutam com D_2O , 2 x CONH), [6.64 (dd, $J = 5.4$, 2.7 Hz), 6.55 (dd, $J = 4.7$, 2.3 Hz), 2H, 2 x H-5], [6.37 (dd, $J = 5.6$, 2.5 Hz), 6.23 (dd, $J = 5.5$, 1.8 Hz), 2H, 2 x H-6], [4.68 – 4.48 (m), 4.47 – 4.30 (m), 2 x $\text{H}_{\text{L-2}}$], 4.06 – 3.94 (sistema

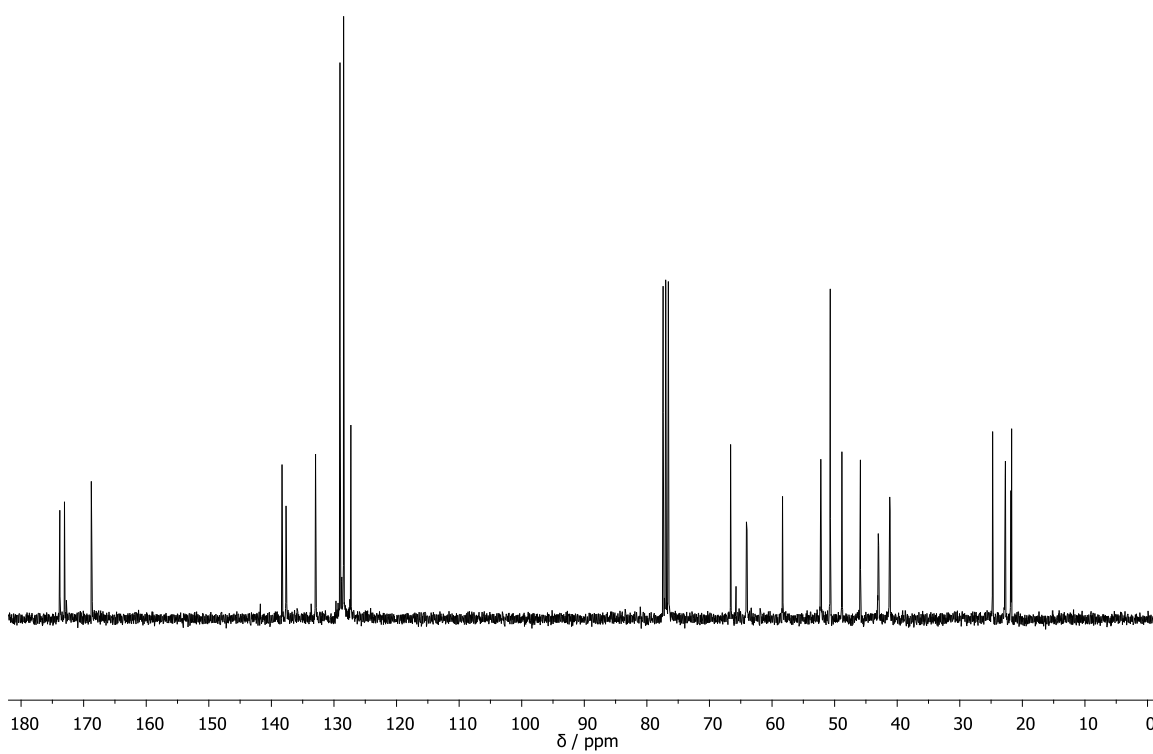
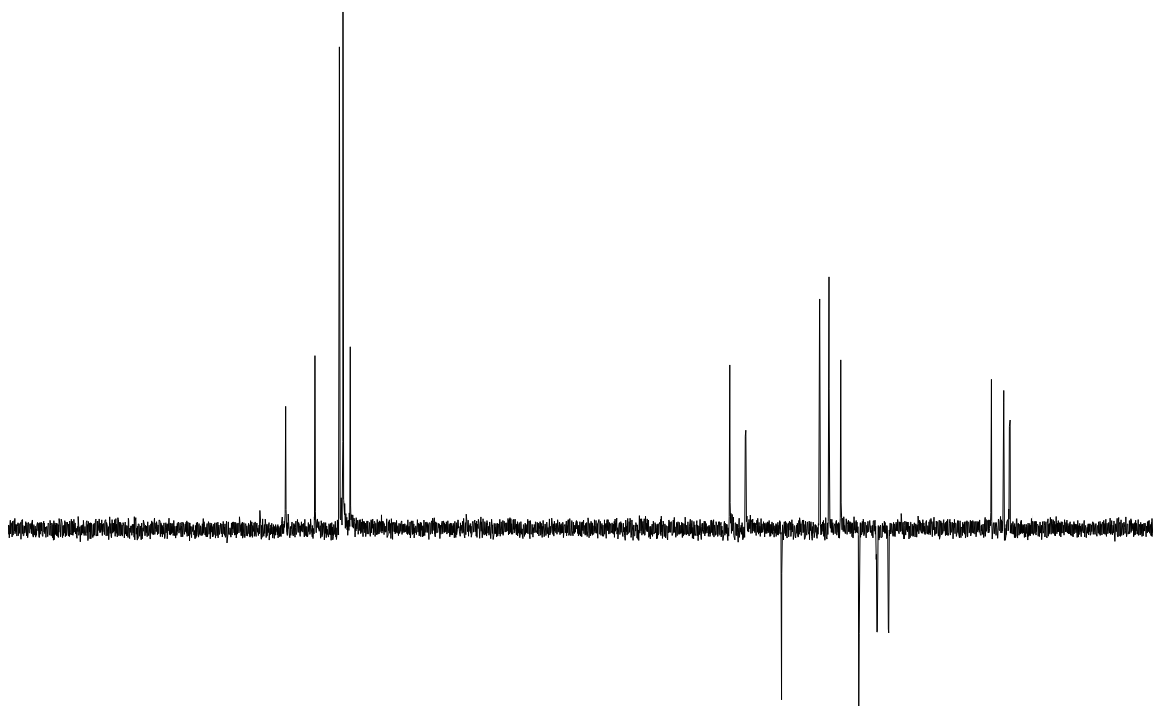
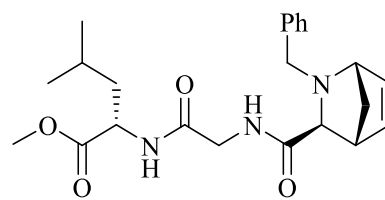
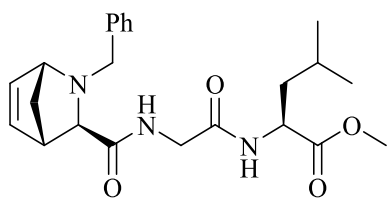
AB, $J = 6.0$ Hz, 2H, H_G-2), 3.83 (sl, 2H, H-1), 3.79 – 3.61 [3.71 (s), 3.72 (s), 8H, 2 x OCH₃ + H_G-2], 3.54 – 3.33 (m, 4H, 2 x NCH₂Ph), 3.31 – 3.16 (m, 2H, 2 x H-4), 2.37 (d, 2H, $J = 3.6$ Hz, 2 x H-3), 1.77 – 1.14 [mc, 10H, 2 x (H-7 + H_L-3 + H_L-4)], 1.07 – 0.77 (m, 12H, 2 x H_L-5].

¹³C-RMN e DEPT (CDCl₃, 75 MHz) δ ppm (observa-se a presença de rotâmeros): [173.82 (Cq), 173.06 (Cq), 168.77 (Cq), 168.72 (Cq), 4 x CONH + 2 x CO₂CH₃], 138.30 (2Cq, 2 x C-1'), [137.66 (CH), 137.63 (CH), 2 x C-5], [132.99 (CH), 132.98 (CH), 2 x C-6], 129.04 [4CH, 2 x (C-2' + C-6')], 128.46 [4CH, 2 x (C-3' + C-5')], 127.30 (2CH, 2 x C-4'), [66.62 (CH), 66.58 (CH), 65.75 (CH), 2 x C-3], [64.09 (CH), 64.00 (CH), 2 x C-1], [58.33 (CH₂), 58.29 (CH₂), 2 x NCH₂Ph], [52.22 (CH₃), 52.21 (CH₃), 2 x OCH₃], 50.70 (2CH, 2 x C_L-2), [48.84 (CH), 48.81 (CH), 2 x C-4], [45.94 (CH₂), 45.88 (CH₂), 2 x C-7], [43.03 (CH₂), 42.96 (CH₂), 2 x C_G-2], [41.20 (CH₂), 41.14 (CH₂), 2 x C_L-3], [24.75 (CH), 24.71 (CH), 2 x C_L-4], [22.73 (CH₃), 22.71 (CH₃), 21.83 (CH₃), 21.72 (CH₃), 2 x C_L-5].

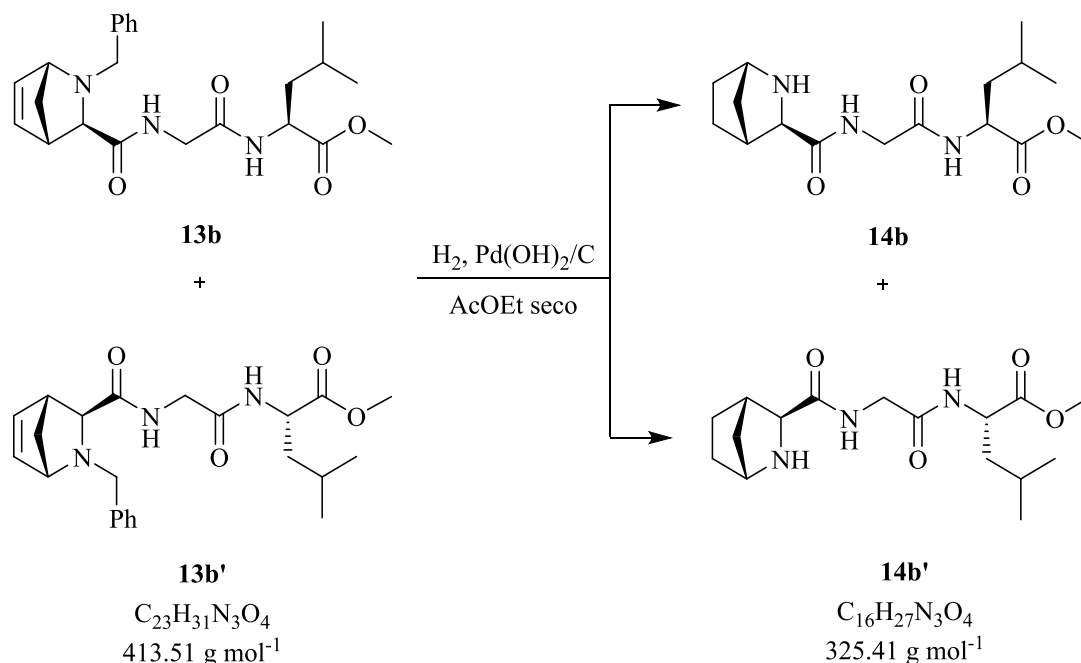
EM (ESI, CH₃OH) m/z (%): 414.2371 (MH⁺, 22), 348.1959 (54), 320.1960 (16), 288.2886 (31), 241.1170 (13), 203.0814 (55), 175.0860 (28), 146.1185 (100, pico base), 127.0762 (4), 91.0548 (41).

EMAR: cálculo para C₂₃H₃₂N₃O₄⁺: 414.2387; obtida: 414.2371.





3.4.4. Síntese de {(1*S*,3*R*,4*R*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}glicil-L-leucinato de metilo (14b**) e de {(1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}glicil-L-leucinato de metilo (**14b'**)**



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **14a/14a'** (secção 3.3.4.), o tripéptido **13b** (0.285 g, 0.689 mmol) foi dissolvido em AcOEt seco (20 mL) deixando-se reagir durante 4d e, em seguida, efetuou-se o tratamento corrente, obtendo-se 305 mg de um óleo amarelo. Procedeu-se à purificação do composto pretendido por cromatografia em coluna de adsorção em gel de SiO_2 , utilizando como eluente Hex/AcOEt (1:4), e em seguida, MeOH, tendo-se obtido sólido amarelo de baixo ponto de fusão (163.7 mg), identificado como a mistura dos diastereoisómeros hidrogenados pretendidos, **14b/14b'**. Rendimento de 73%.

Compostos **14b/14b'**: sólido amarelo.

P.f.: 28–30°C

R_f: 0.14 em AcOEt.

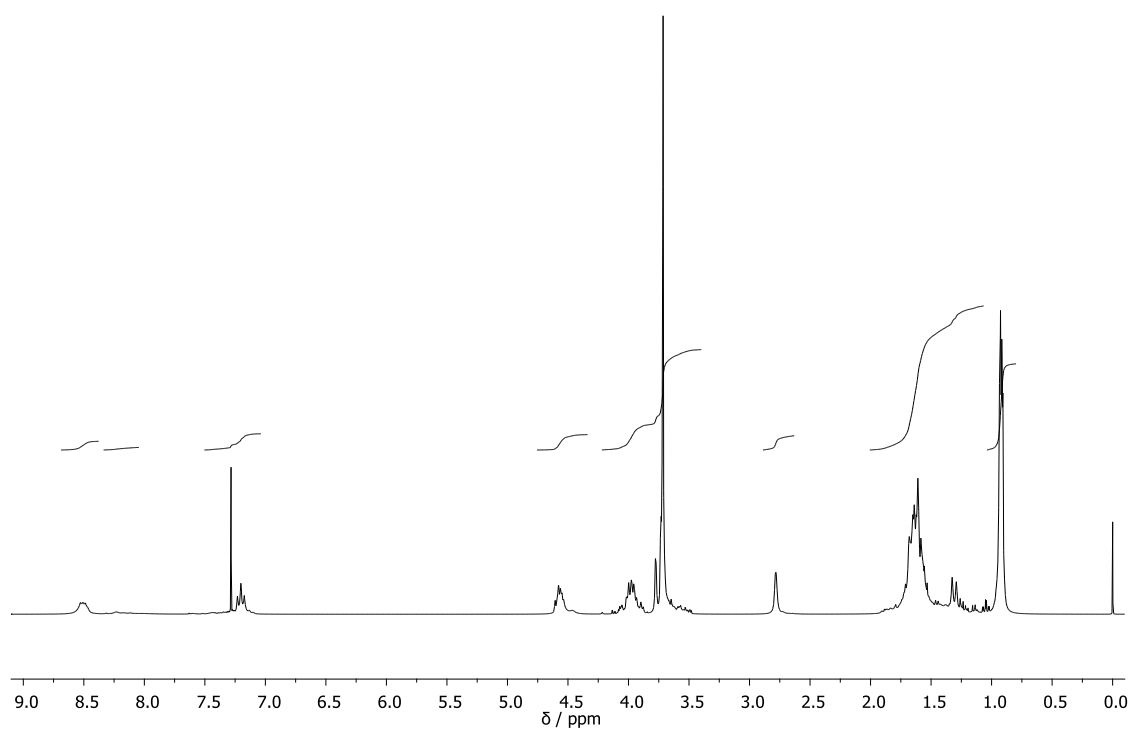
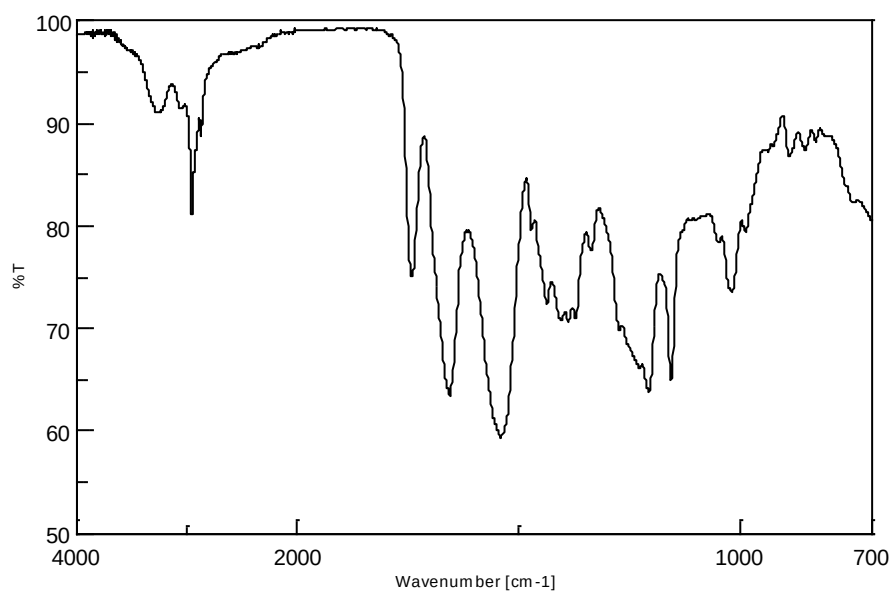
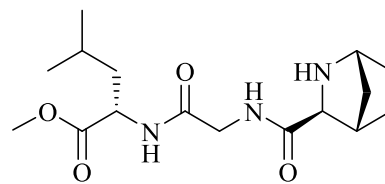
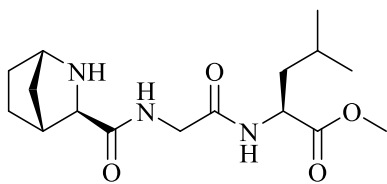
IV ν (cm^{-1}): 3269.72, 3054.69, 2956.34, 2871.49, 1741.41, 1654.62, 1540.85, 1471.42, 1435.74, 1386.57, 1335.46, 1269.90, 1225.54, 1205.29, 1154.19, 1045.23, 1017.27, 983.518, 887.095, 850.454, 824.420, 744.388.

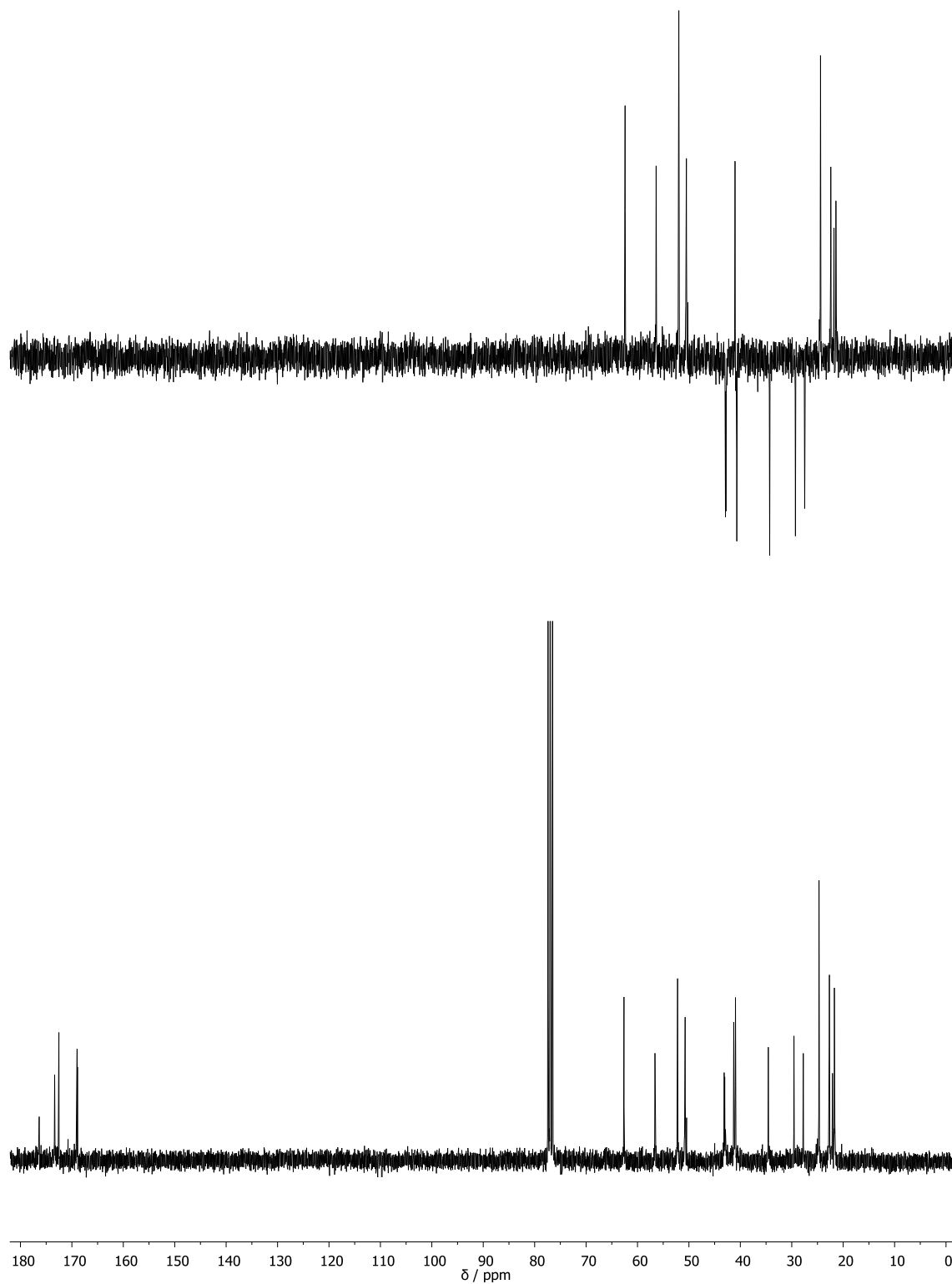
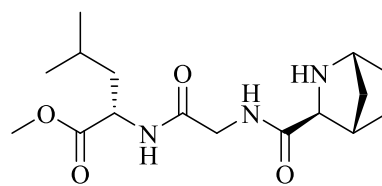
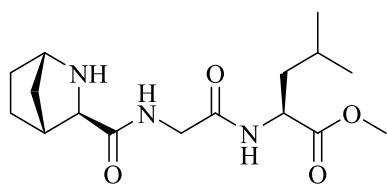
¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ ppm (observa-se a presença de rotâmeros): [8.69 – 8.35 (m), 8.33 – 7.98 (m), 2H, permutam com D₂O, 2 x CONH], 7.24 – 6.79 [7.18 (t, *J* = 8.5 Hz), 2H, permutam com D₂O, 2 x CONH], 4.70 – 4.35 (m, 2H, 2 x H_L-2), 4.17 – 3.30 [3.75 (s), 3.69 (s), 14H, 2 x (H_G-2 + H-1 + H-3 + OCH₃)], 2.76 (s, 2H, 2 x H-4), 1.78 – 1.01 [m, 20H, dois deles permutam com D₂O, 2 x (H-5 + H-6 + H-7 + H_L-3 + H_L-4 + NH)], 0.99 – 0.75 (m, 12H, 2 x H_L-5).

¹³C-RMN e DEPT (CDCl₃, 75 MHz) δ ppm (observa-se a presença de rotâmeros): [176.36 (Cq), 173.35 (Cq), 173.30 (Cq), 172.53 (Cq), 168.99 (Cq), 168.90 (Cq), 4 x CONH + 2 x CO₂CH₃], 62.64 (2CH, 2 x C-3), [56.61 (CH), 56.59 (CH), 2 x C-1], 52.21 (2CH₃, 2 x OCH₃), [50.75 (CH), 50.73 (CH), 50.45 (CH), 2 x C_L-2], [43.15 (CH₂), 43.04 (CH₂), 2 x C_G-2], [41.29 (CH), 41.28 (CH), 2 x C-4], 40.95 (2CH₂, 2 x C_L-3), 34.56 (2CH₂, 2 x C-7), 29.57 (2CH₂, 2 x C-5), [27.78 (CH₂), 27.76 (CH₂), 2 x C-6], [24.92 (CH), 24.69 (CH), 2 x C_L-4], [22.70 (CH₃), 22.68 (CH₃), 22.07 (CH₃), 21.71 (CH₃), 21.66 (CH₃), 2 x C_L-5].

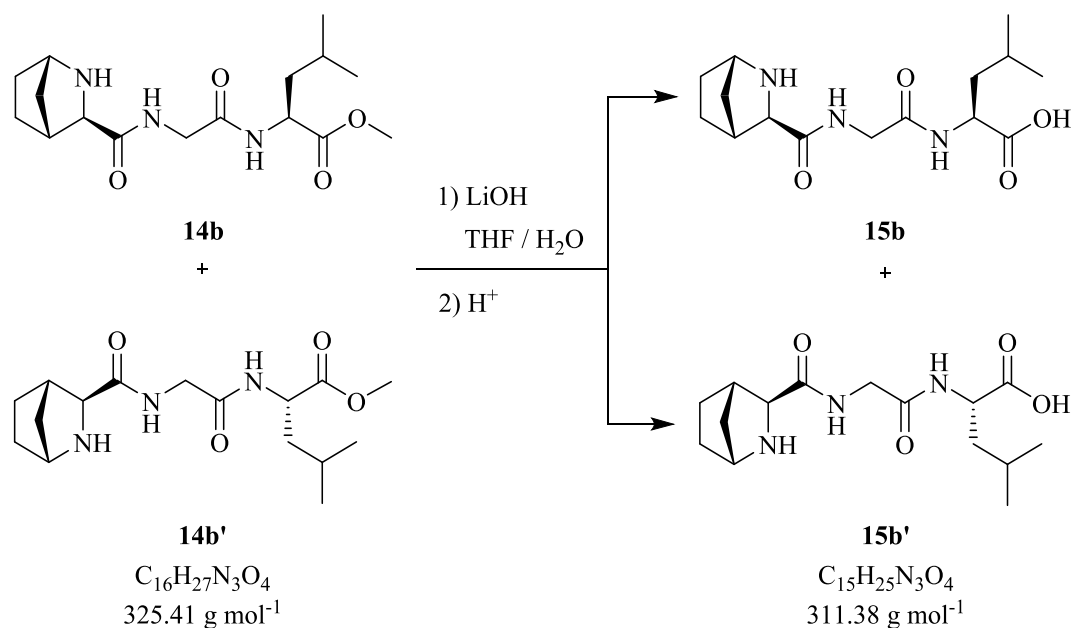
EM (ESI, CH₃OH) *m/z* (%): 326.2066 (MH⁺, 59), 229.1538 (5), 203.1395 (11), 181.0977 (31), 153.1024 (38), 124.1130 (16), 105.0479 (25), 96.0805 (100, pico base).

EMAR: cálculo para C₁₆H₂₈N₃O₄⁺: 326.2074; obtida: 326.2066.





3.4.5. Síntese de {(1*S*,3*R*,4*R*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}glicil-L-leucina (**15b**) e de {(1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}glicil-L-leucina (**15b'**)



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação do ácido **7-*exo*** (secção 3.2.4.), procedeu-se à hidrólise alcalina da mistura dos tripéptidos **14b/14b'** (0.130 g, 0.399 mmol) deixando-se reagir durante 9h e, em seguida, efetuou-se o tratamento habitual. O composto pretendido foi purificado através de cromatografia adsorção em coluna de gel de SiO₂ usando-se como eluente AcOEt e, em seguida, MeOH. Obteve-se um sólido bege cristalino de baixo ponto de fusão (0.106 g), identificado como a mistura dos correspondentes tripéptidos, **15b/15b'**. Rendimento de 85%.

Compostos **15b/15b'**: sólido bege.

R_f: 0.44 em CH₂Cl₂/CH₃OH (4:1).

P.f.: 34–36 °C

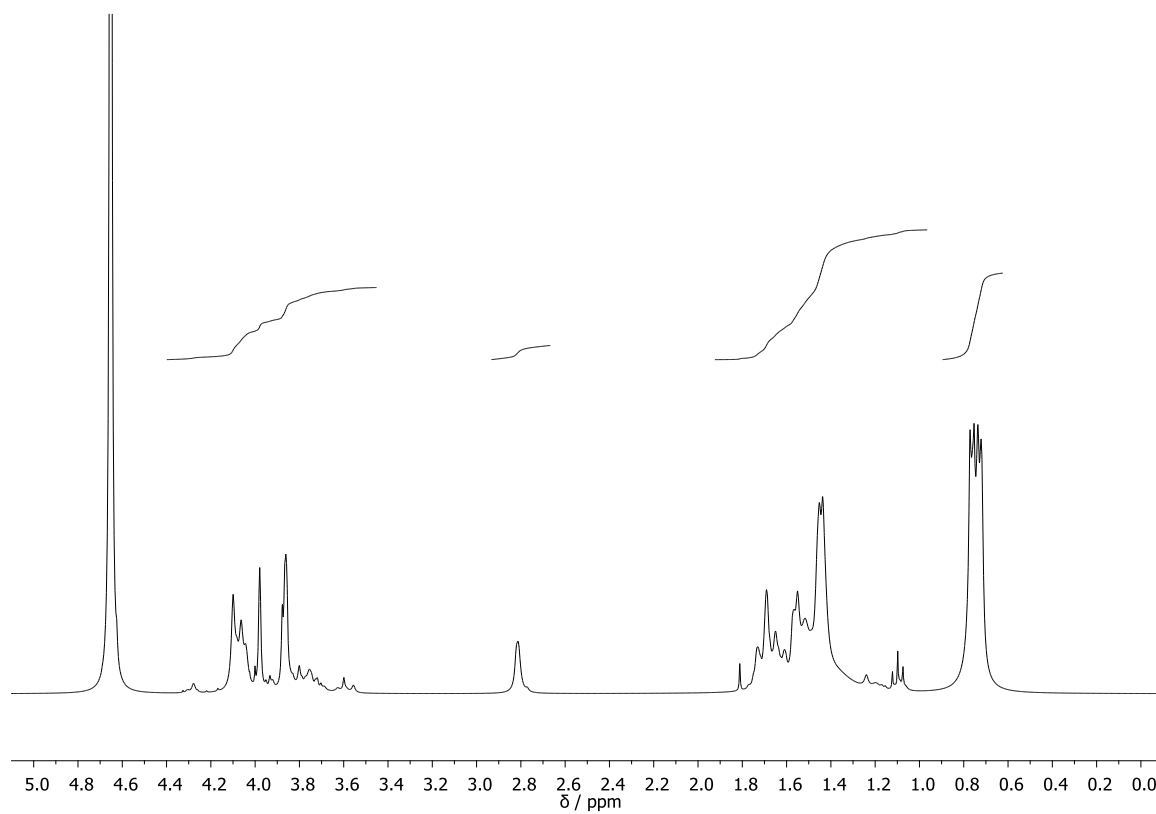
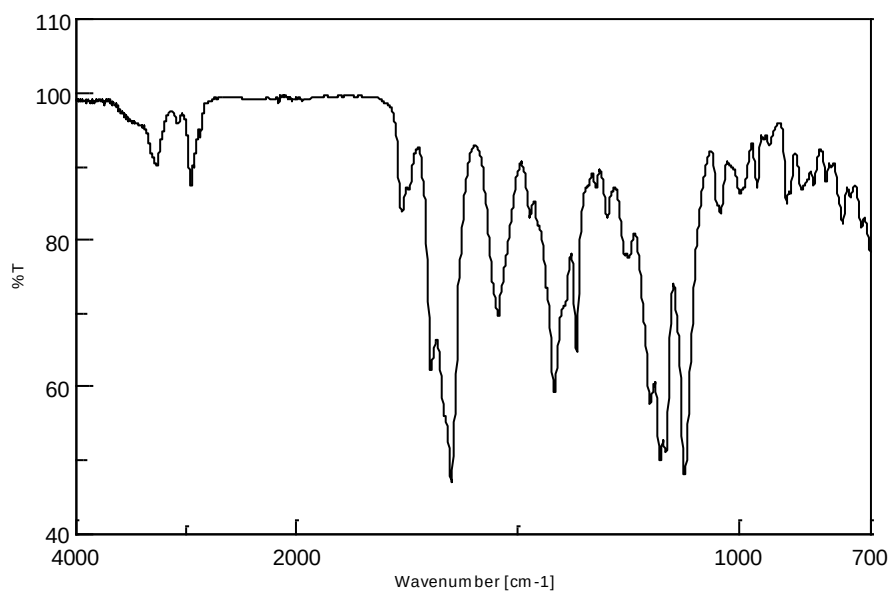
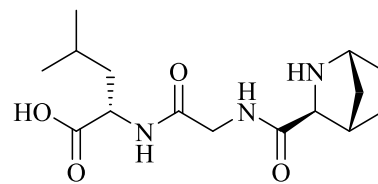
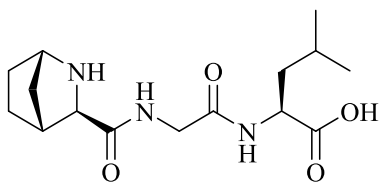
IV ν (cm⁻¹): 3243.68, 3066.26, 2995.38, 2868.59, 1748.64, 1651.73, 1643.32, 1587.13, 1468.53, 1405.85, 1367.28, 1338.36, 1272.79, 1107.90, 1072.23, 1027.87, 971.947, 936.271, 883.238, 853.347.

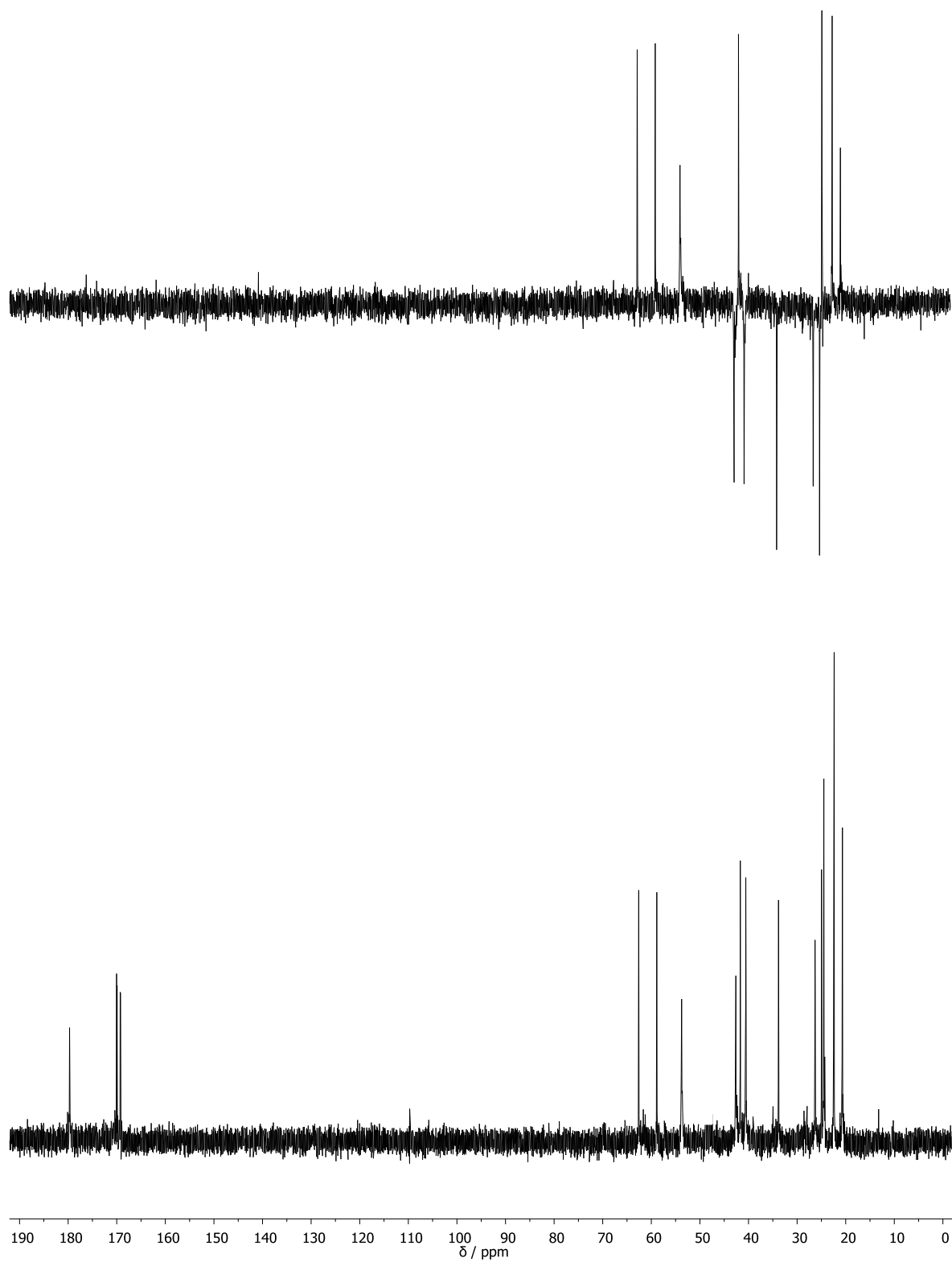
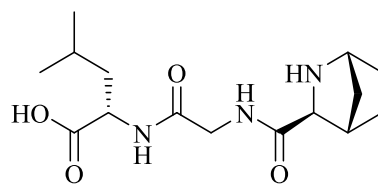
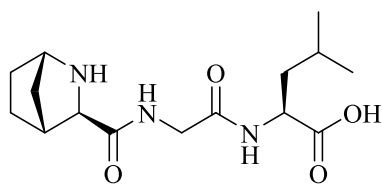
¹H-RMN (D₂O, 300 MHz) δ ppm (verifica-se a presença de rotâmeros): 4.31 – 4.16 (m, 4H, 2 x H_G-2), 4.12 (s, 2H, 2 x H-3), 4.03 – 3.97 (m, 2H, 2 x H_L-2), 2.95 (s, 2H, 2 x H-1), 2.32 – 1.18 [m, 20H, 2 x (H-4 + H-5 + H-6 + H-7 + H_L-3 + H_L-4)], [0.90 (d, *J* = 5.5 Hz), 0.87 (d, *J* = 5.6 Hz), 12H, 2 x H_L-5].

^{13}C -RMN e DEPT (D_2O , 75 MHz) δ ppm (verifica-se a presença de rotâmeros): [179.70 (Cq), 170.03 (Cq), 169.93 (Cq), 169.29 (Cq), 169.21 (Cq), 4 x $\underline{\text{CONH}}$ + 2 x $\underline{\text{CO}_2\text{H}}$], 62.59 (2CH, 2 x C-3), 58.87 (2CH, 2 x C-1), [53.81 (CH), 53.76 (CH), 2 x C_L -2], 47.73, [42.67 (CH_2), 42.60 (CH_2), 2 x C_G -2], 41.69 (2CH, 2 x C-4), [40.56(CH_2), 40.54 (CH_2), 2 x C_L -3], [33.83 (CH_2), 33.81 (CH_2), 2 x C-7], [26.31 (CH_2), 26.29 (CH_2), 2 x C-5], [24.97 (CH_2), 2 x C-6], [24.51 (CH), 22.49 (CH), 22.31 (CH), 2 x C_L -4], [22.37 (CH_3), 22.37 (CH_3), 20.73 (CH_3), 20.67 (CH_3), 2 x C_L -5].

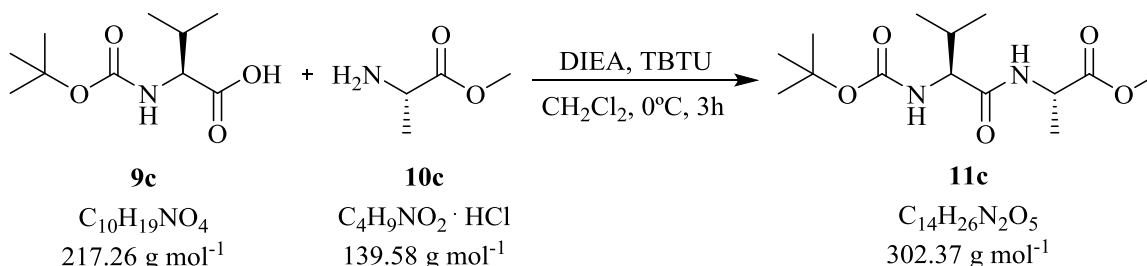
EM (ESI, CH_3OH) m/z (%): 312.1925 (MH^+ , 50), 220.0977 (26), 181.0989 (20), 153.1031 (31), 124.1136 (23), 105.0461 (57), 96.0816 (100, pico base).

EMAR: cálculo para $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_4^+$: 312.1918; obtida: 312.1925.





3.5. SÉRIE P*VA

3.5.1. Síntese do (*tert*-butoxicarbonil)-L-valil-L-alaninato de metilo (**11c**)

Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **11a** (secção 3.3.1.), procedeu-se ao acoplamento entre **9c** (0.153 g, 0.704 mmol, 1eq.) e **10c** (0.099 g, 0.709 mmol, 1 eq) deixando-se reagir durante 48h e, em seguida, efetuou-se o tratamento habitual.

O composto foi purificado recorrendo-se à cromatografia de adsorção em coluna de gel de SiO_2 , usando-se como eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (10:1) e procedeu-se, em seguida, à recristalização em hexano arrefecido a 0°C mediante banho de gelo. Os cristais obtidos foram filtrados com recurso a funil de Büchner e pressão reduzida, obtendo-se um sólido cristalino branco com textura de algodão (0.185 g), identificado como sendo o dipéptido protegido **11c**. Rendimento de 88%.

Composto **11c**: sólido cristalino branco.

R_f: 0.79 em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (10:1).

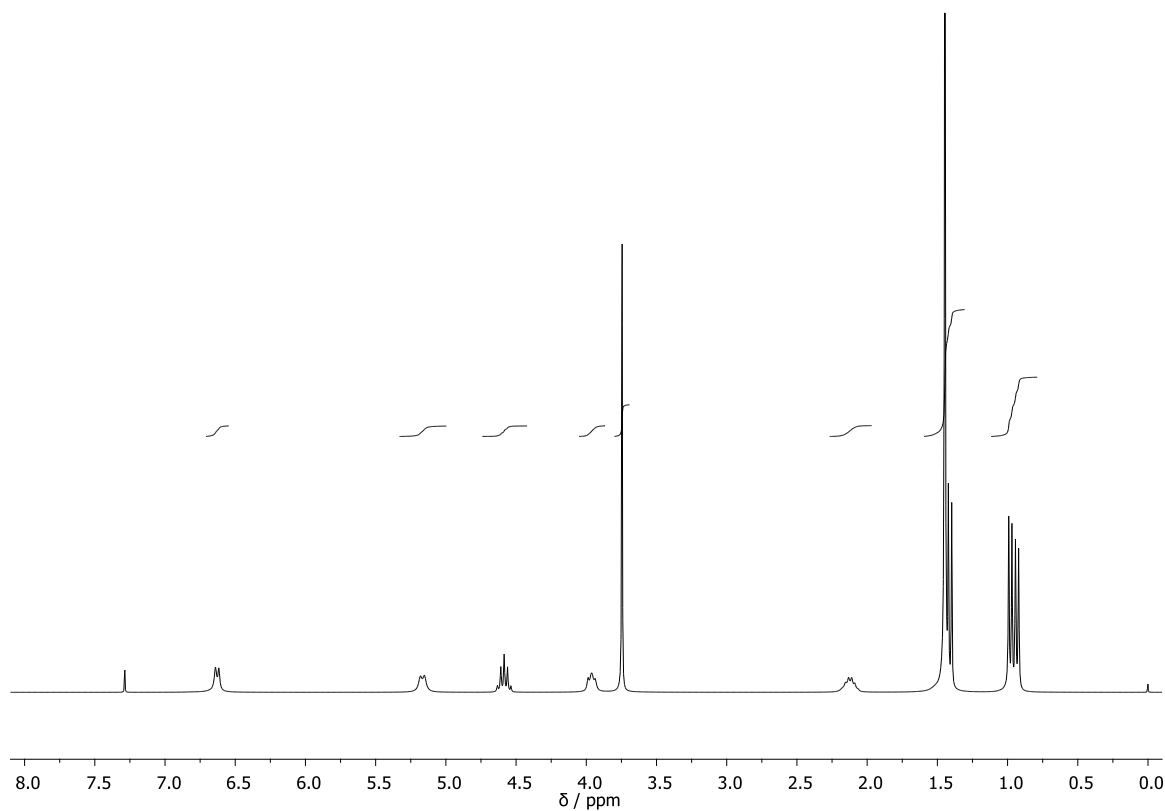
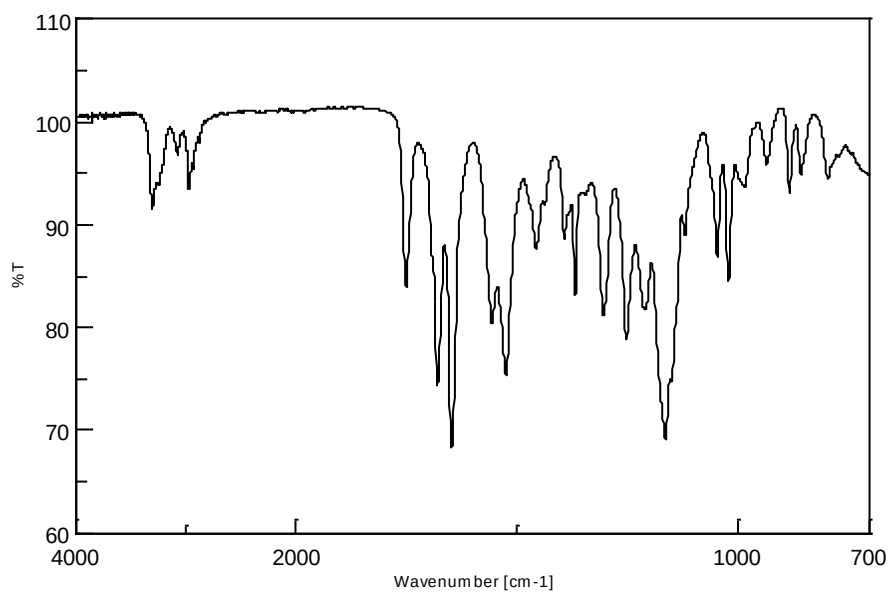
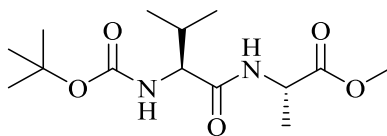
P.f.: $139\text{--}140^\circ\text{C}$

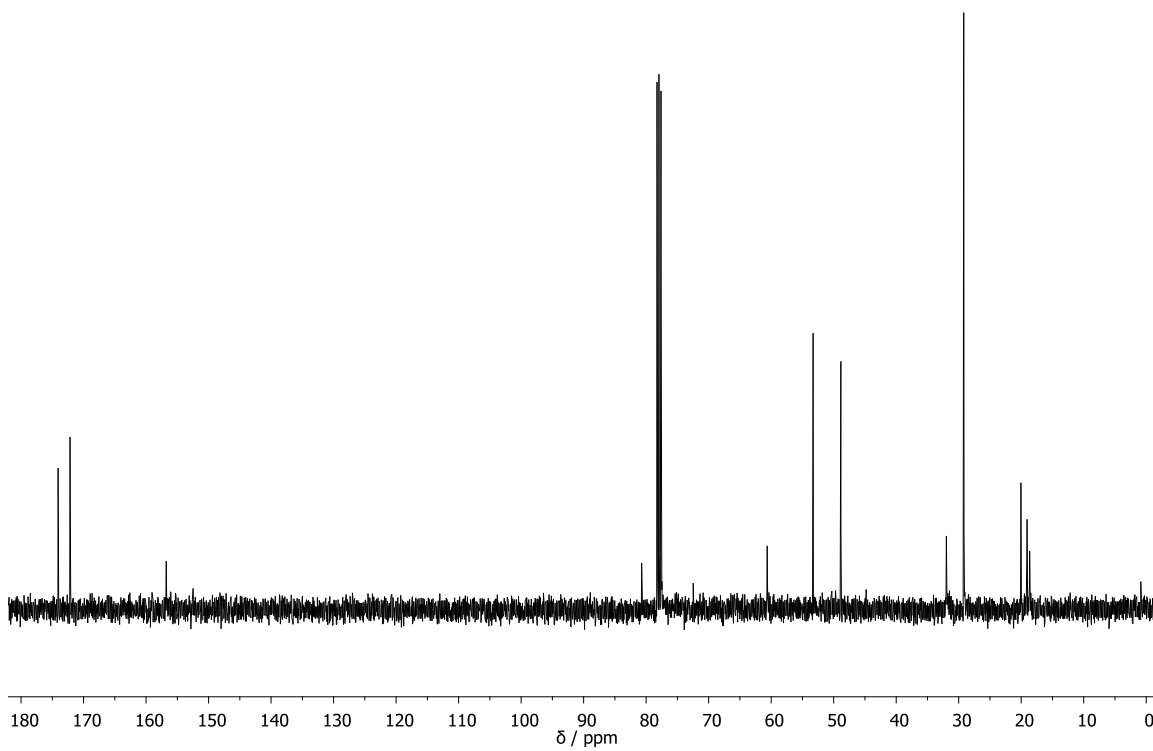
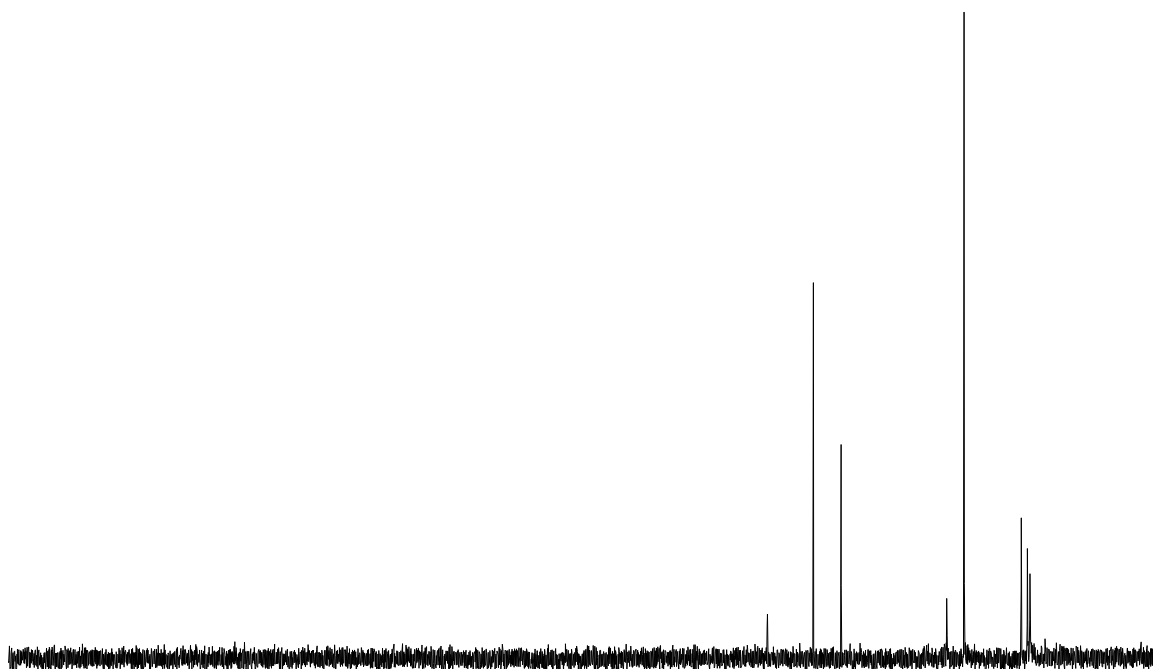
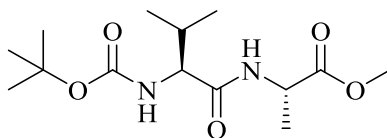
IV v (cm^{-1}): 3307.32, 3246.57, 3076.87, 2975.62, 2933.20, 2874.38, 1750.08, 1679.69, 1646.91, 1557.24, 1524.45, 1455.99, 1392.35, 1367.28, 1303.64, 1250.61, 1209.15, 1162.87, 1118.51, 1045.23, 1019.19, 983.518, 932.414, 881.309, 855.275.

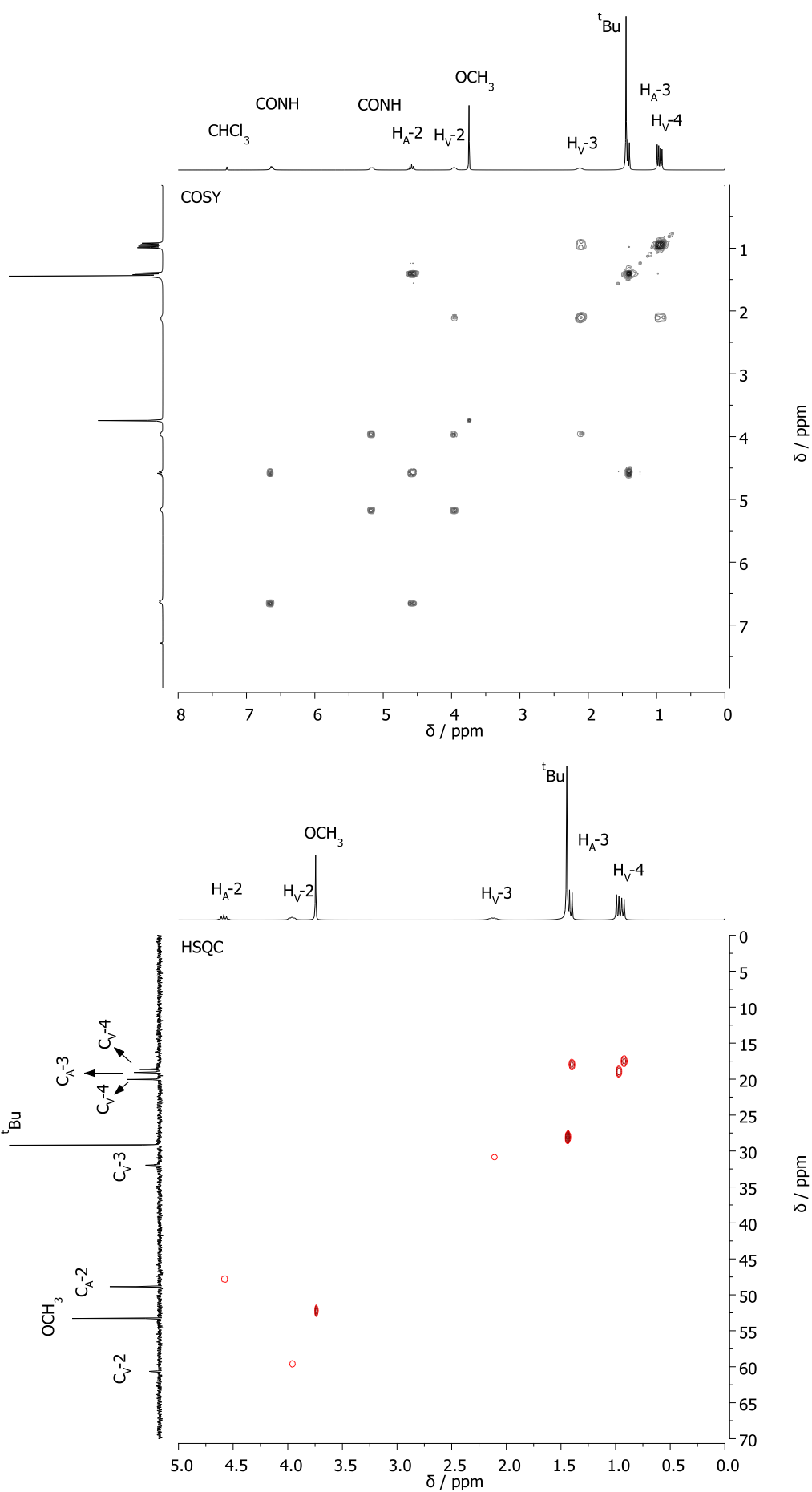
^1H -RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ ppm: 6.63 (d, 1H, $J = 7.1$ Hz, permuta com D_2O , CONH), 5.17 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, permuta com D_2O , CONH), 4.58 (p, 1H, $J = 7.2$ Hz, $\text{H}_\text{A-2}$), 3.97 – 3.93 (m, 1H, $\text{H}_\text{V-2}$), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 2.09 (m, 1H, $\text{H}_\text{V-3}$), 1.60 – 1.30 [1.45 (s), 1.41 (d, $J = 7.3$ Hz), 12H, Boc + $\text{H}_\text{A-3}$], [0.97 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz), 0.93 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz), 6H, $\text{H}_\text{V-4}$].

^{13}C -RMN e DEPT (CDCl_3 , 75 MHz) δ ppm: [174.07 (Cq), 172.16 (Cq), CONH + CO_2CH_3], 156.77 (Cq, CO_2^tBu), 80.72 (Cq, Boc), 60.63 (CH_3 , OCH_3), 53.29 (CH, $\text{C}_\text{V-2}$), 48.85 (CH, $\text{C}_\text{A-2}$), 31.97 (CH, $\text{C}_\text{V-3}$), 29.19 (3CH_3 , Boc), 20.04 (CH_3 , $\text{C}_\text{V-4}$), 19.06 (CH_3 , $\text{C}_\text{A-3}$), 18.65 (CH_3 , $\text{C}_\text{V-4}$).

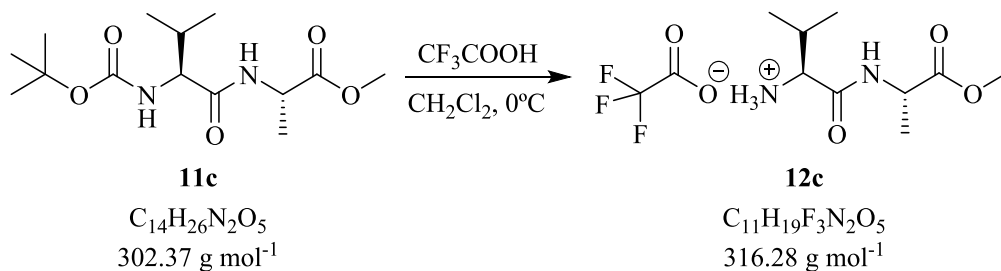
EM (ESI, CH_3OH) m/z (%): 325.2 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 24), 288.3 (4), 269.1 (5), 247.1 (1), 241.1 (2), 225.1 (100, pico base), 203.1 (13), 116.1 (3), 104.1 (13), 72.1 (1).







3.5.2. Síntese do trifluoracetato de L-valil-L-alaninato de metilo amônio (12c)



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **12a** (secção 3.3.2.), dipéptido (carbamato-éster) **11c** (1.08 g, 3.57 mmol, 1 eq.) foi dissolvido em CH_2Cl_2 (40 mL) deixando-se reagir durante 3h e, em seguida, efetuou-se o tratamento corrente, obtendo-se um óleo denso ligeiramente amarelo. Por recristalização em $Et_2O/AcOEt$ (10:1) e, através de subsequentes lavagens com Et_2O , alcançou-se de um sólido branco (1.19 g), identificado como o sal trifluoracetato de amônio **12c**. Rendimento de 99%.

Composto **12c**: sólido branco.

R_f: 0.26 em CH_2Cl_2/CH_3OH (10:1).

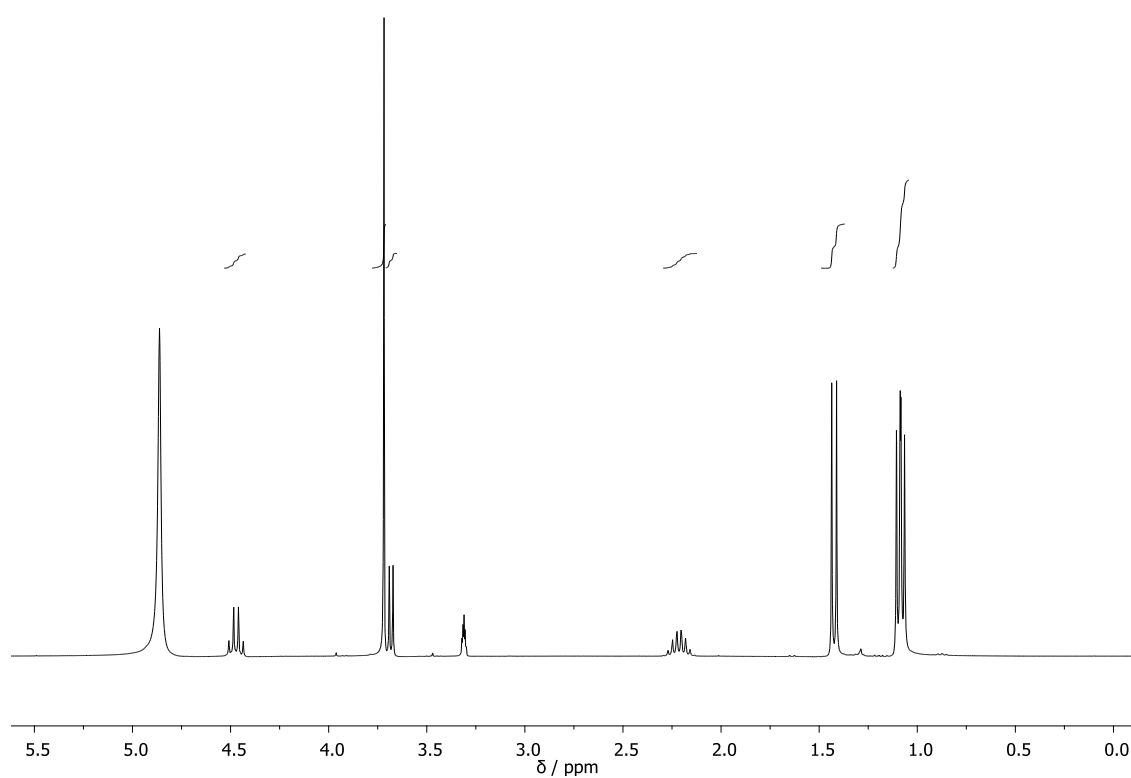
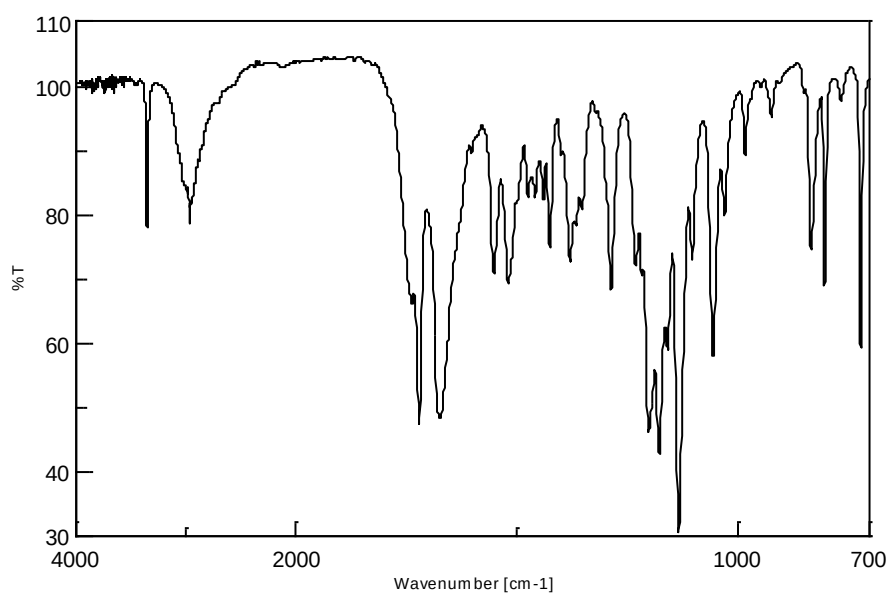
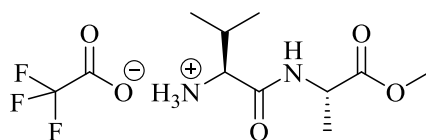
P.f.: 140–141°C

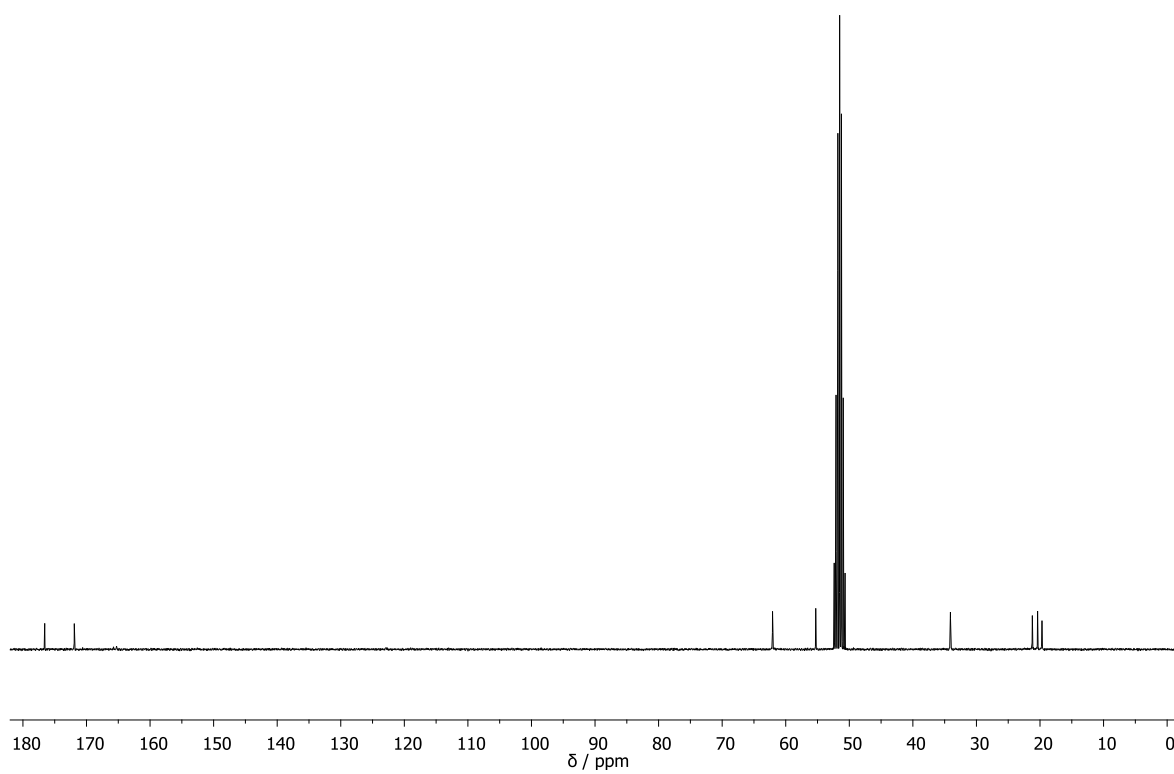
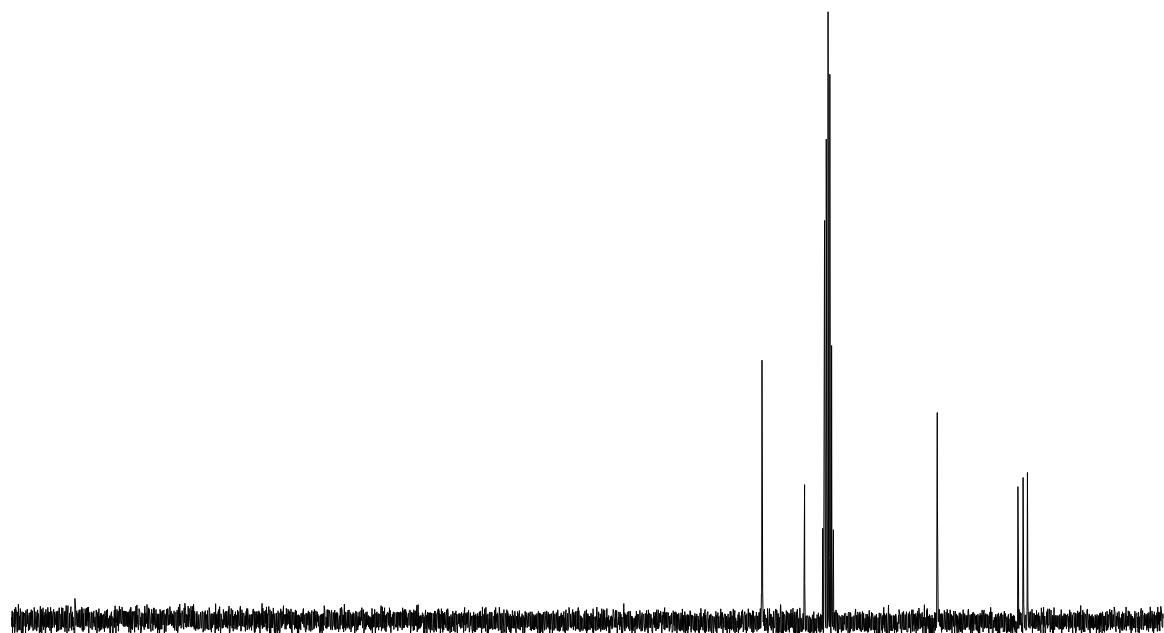
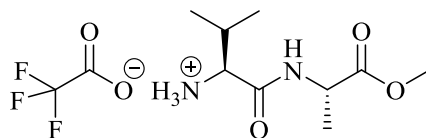
IV ν (cm^{-1}): 3353.60, 2969.84, 1720.19, 1673.91, 1551.45, 1518.67, 1474.31, 1457.92, 1438.64, 1425.14, 1378.85, 1285.32, 1229.40, 1200.47, 1176.36, 1157.08, 1132.97, 1102.12, 1054.87, 1028.84, 981.590, 921.807, 831.169, 801.278, 764.637, 719.318.

¹H-RMN (CD_3OD , 300.16 MHz) δ ppm: 4.47 (q, 1H, $J = 7.3$ Hz, H_{A-2}), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 3.68 (d, 1H, $J = 5.8$ Hz, H_{V-2}), 2.21 (m, 1H, H_{V-3}), 1.43 (d, 3H, $J = 7.3$ Hz, H_{A-3}), 1.16 – 0.97 [1.10 (d, $J = 5.6$ Hz), 1.08 (d, $J = 5.6$ Hz), 6H, H_{V-4}].

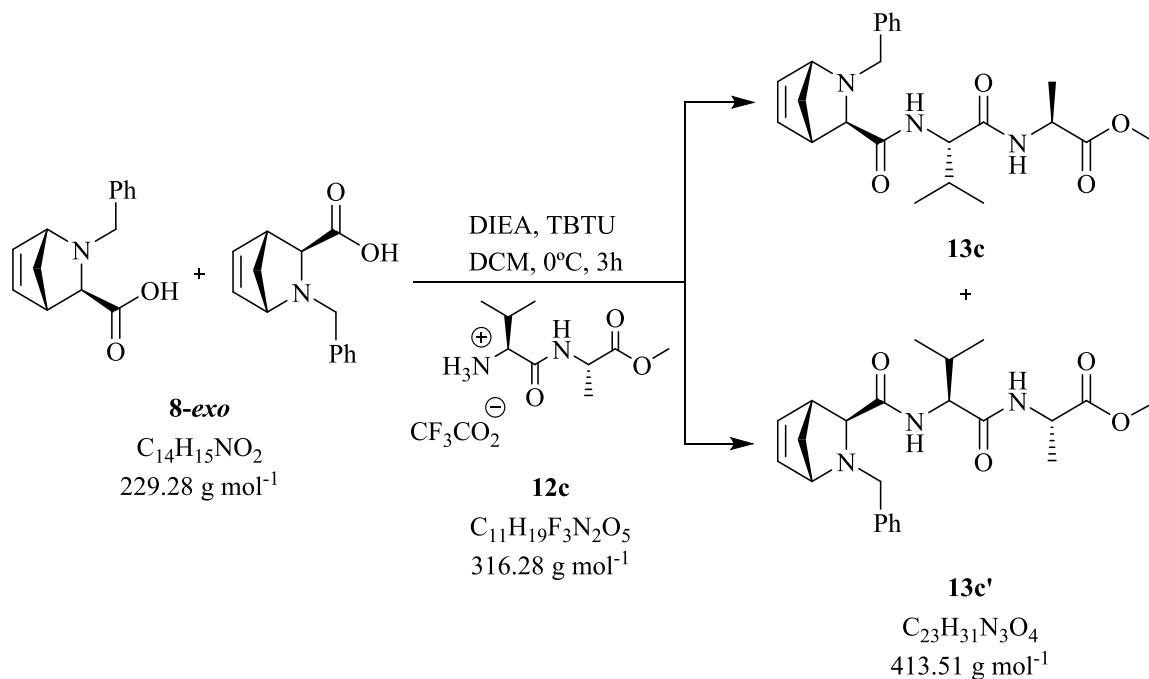
¹³C-RMN e DEPT (CD_3OD , 75 MHz) δ ppm: [176.58 (Cq), 171.92 (Cq), $\underline{C}ONH + \underline{C}O_2CH_3$], [62.09 (CH), 62.06 (CH), $C_{V-2} + C_{A-2}$], 55.28 (CH, OCH_3), 34.09 (CH, C_{V-3}), 21.21 (CH_3 , C_{V-4}), 20.39 (CH, C_{A-3}), 19.70 (CH_3 , C_{V-4}).

EM (ESI, CH_3OH) m/z (%): 225.1 (61), 203.1 (100, pico base), 171.1 (2), 143.1 (2), 104.1 (31), 72.1 (8).





3.5.3. Síntese de {(1*R*,3*R*,4*S*)-2-benzil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carbonil}-L-valil-L-alaninato de metilo (13c**) e de {(1*S*,3*S*,4*R*)-2-benzil-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-eno-3-carbonil}-L-valil-L-alaninato de metilo (**13c'**)**



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **11a** (secção 3.3.1.), procedeu-se ao acoplamento entre **8-*exo*** (0.103 g, 0.449 mmol, 1 eq.) dissolvido em CH₂Cl₂ seco (20 mL) e **12c** (0.142 g, 0.449 mmol, 1 eq) deixando-se reagir durante 48h e, em seguida, efetuou-se o tratamento corrente, obtendo-se 260.0 mg de um óleo amarelo. Procedeu-se à purificação do composto pretendido por cromatografia em coluna de adsorção em gel de SiO₂, utilizando como eluente Hex/AcOEt (1:4) tendo-se obtido um sólido amarelo claro de baixo ponto de fusão (104.4 mg), identificado como a correspondente mistura de diastereoisómeros, **13c/13c'**. Rendimento de 70%.

Compostos **13c/13c'**: sólido amarelo claro.

R_f: 0.53 em Hex/AcOEt (1:4).

P.f.: 31–32°C

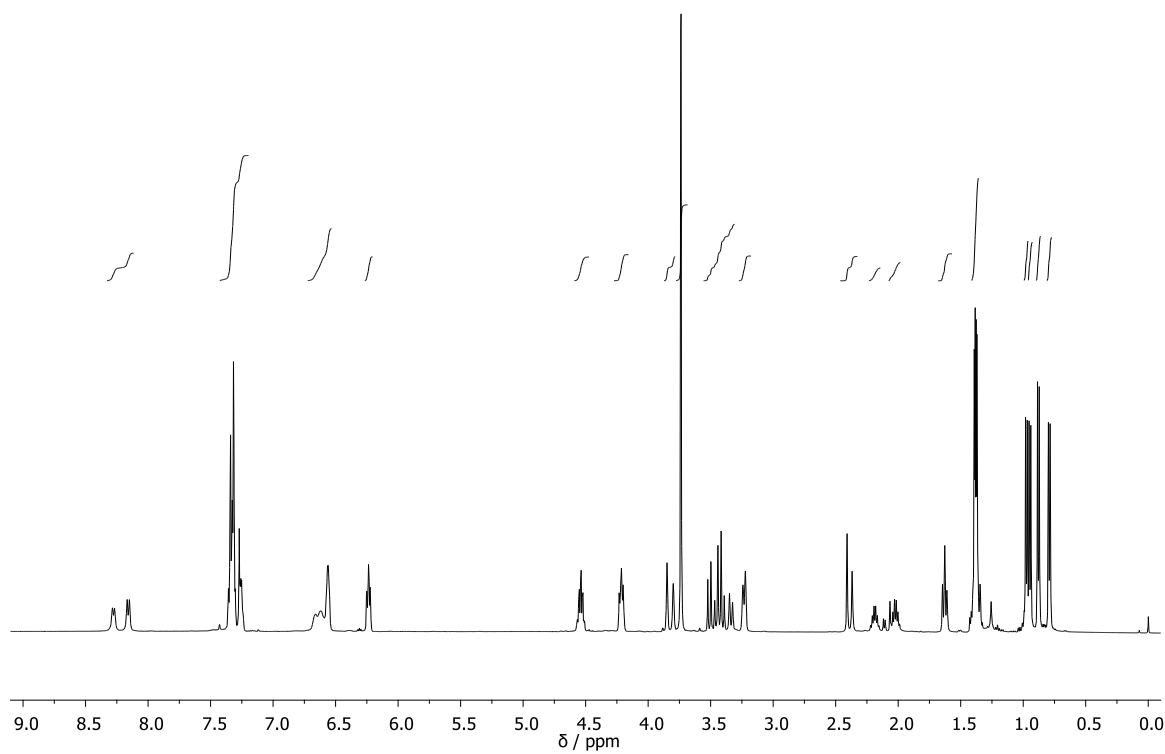
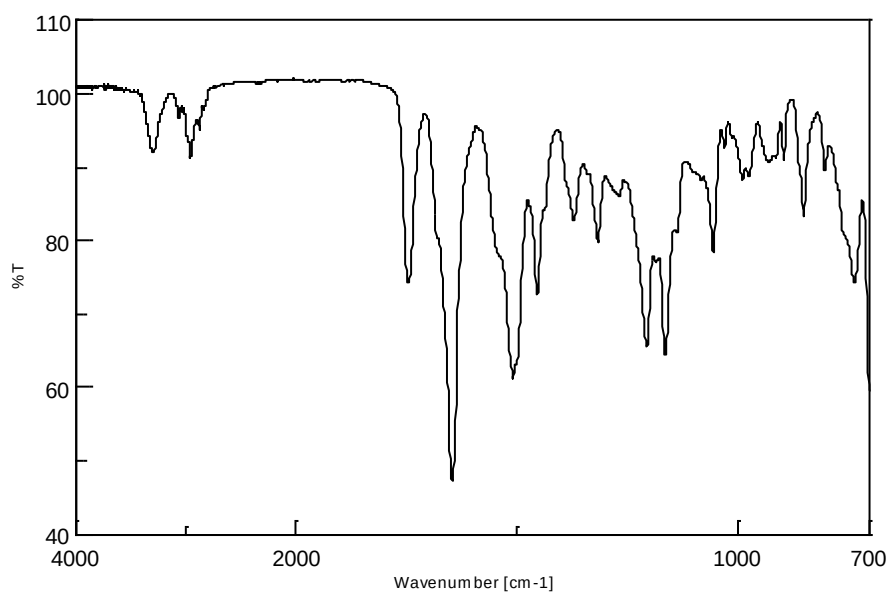
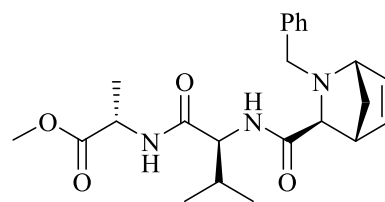
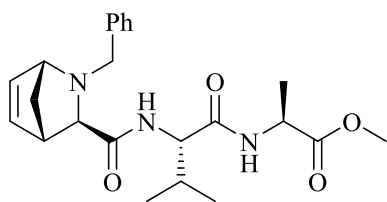
IV ν (cm⁻¹): 3298.64, 3060.48, 3030.59, 2960.20, 2877.27, 2841.60, 1746.23, 1645.95, 1508.06, 1453.10, 1370.18, 1315.21, 1267.00, 1205.29, 1162.87, 1053.91, 1028.84, 987.375, 926.628, 893.844, 848.525, 801.278, 732.817.

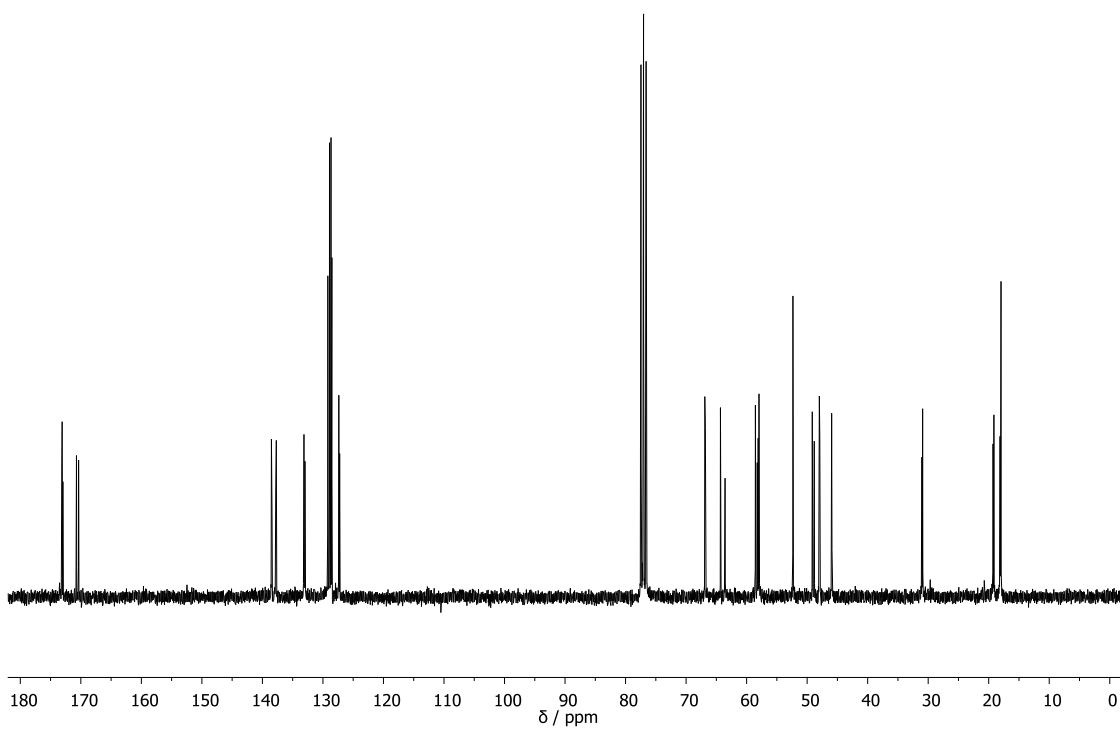
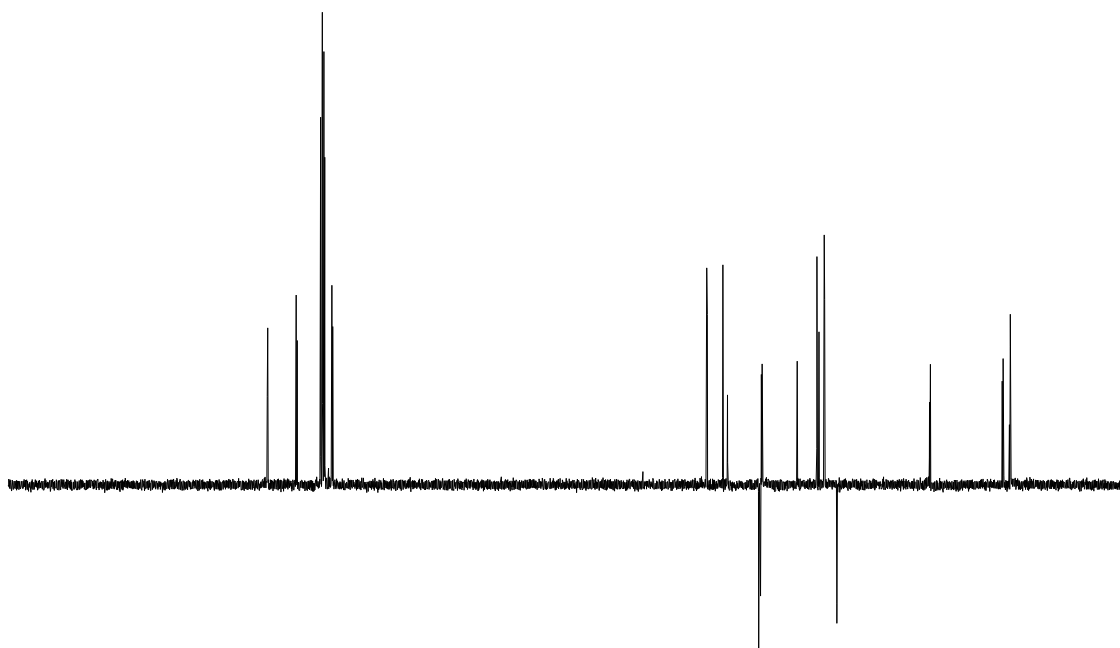
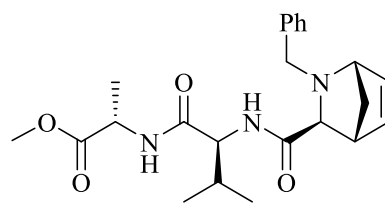
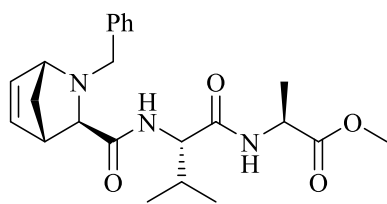
¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ ppm: 8.28 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, permuta com D₂O, CONH), 8.16 (d, 1H, *J* = 9.5 Hz, permuta com D₂O, CONH), 7.39 – 7.22 (m, 10H, 2 x ArH), 6.66 (sl, 1H, permuta com D₂O, CONH), 6.62 (sl, 1H, permuta com D₂O, CONH), 6.56 (m, 2H, 2 x H-6), 6.23 (dd, *J* = 10.1, 4.0 Hz, 2H, 2 x H-5), [4.54 (p, *J* = 7.0 Hz), 4.53 (p, *J* = 7.0 Hz), 2 x H_A-2], 4.22 (dd, 1H, *J* = 9.2, 6.5 Hz, 2H, 2 x H_V-2), [3.85 (s), 3.80 (s), 2H, 2 x H-3], [3.74 (s), 3.73 (s), 6H, 2 x OCH₃], 3.54 – 3.48 (parte A do sistema AB, *J* = 13.0 Hz, NCHHPh), 3.48 – 3.43 (Sistema AB, *J* = 13.0 Hz, NCH₂Ph), 3.43 – 3.30 (parte B do Sistema AB, *J* = 13.0 Hz, NCHHPh), [3.24 (s), 3.22 (s), 2H, 2 x H-1], [2.41 (s), 2.37 (s), 2H, 2 x H-4], [2.24 – 2.13 (m, 1H), 2.08 – 1.98 (m, 1H), 2H, 2 x H_V-3], 1.63 (t, 2H, *J* = 8.9 Hz, 2 x H-7_{syn}), [1.39 (d, *J* = 7.0 Hz), 1.37 (d, *J* = 7.0 Hz), 8H, 2 x (H_A-3 + H-7_{anti})], [0.97 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz), 0.95 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz), 0.88 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz), 0.79 (d, 3H, *J* = 7.0 Hz), 12H, 2 x H_V-4].

¹³C-RMN e DEPT (CDCl₃, 125 MHz) δ ppm: [173.14 (Cq), 173.13 (Cq), 173.09 (Cq), 172.97 (Cq), 170.73 (Cq), 170.37 (Cq), 4 x CONH + 2 x CO₂CH₃], [138.51 (CH), 138.42 (CH), 2 x C-5], [137.79 (Cq), 137.71 (Cq), 2 x C-1'], [133.14 (CH), 132.97 (CH), 2 x C-6], [129.19 (2CH), 128.91 (2CH), 2 x (C-2' + C-6')], [128.66 (2CH), 128.52 (2CH), 2 x (C-3' + C-5')], [127.37 (CH), 127.24 (CH), 2 x C-4'], [66.91 (CH), 66.82 (CH), 2 x C-3], [64.32 (CH), 63.56 (CH), 2 x C-1], [58.55 (CH₂), 58.24 (CH₂), 2 x NCH₂Ph], [58.09 (CH), 57.95 (CH), 2 x C_V-2], 52.35 (CH₃, 2 x OCH₃), [49.15 (CH), 48.82 (CH), 2 x C_A-2], [47.98 (CH), 47.91 (CH), 2 x C_V-3], [45.95 (CH₂), 45.91 (CH₂), 2 x C-7], [31.04 (CH), 30.91 (CH), 2 x C-4], [19.29 (CH₃), 19.14 (CH₃), 18.13 (CH₃), 18.03 (CH₃), 2 x C_V-4], 17.97 (2CH₃, 2 x C_A-3).

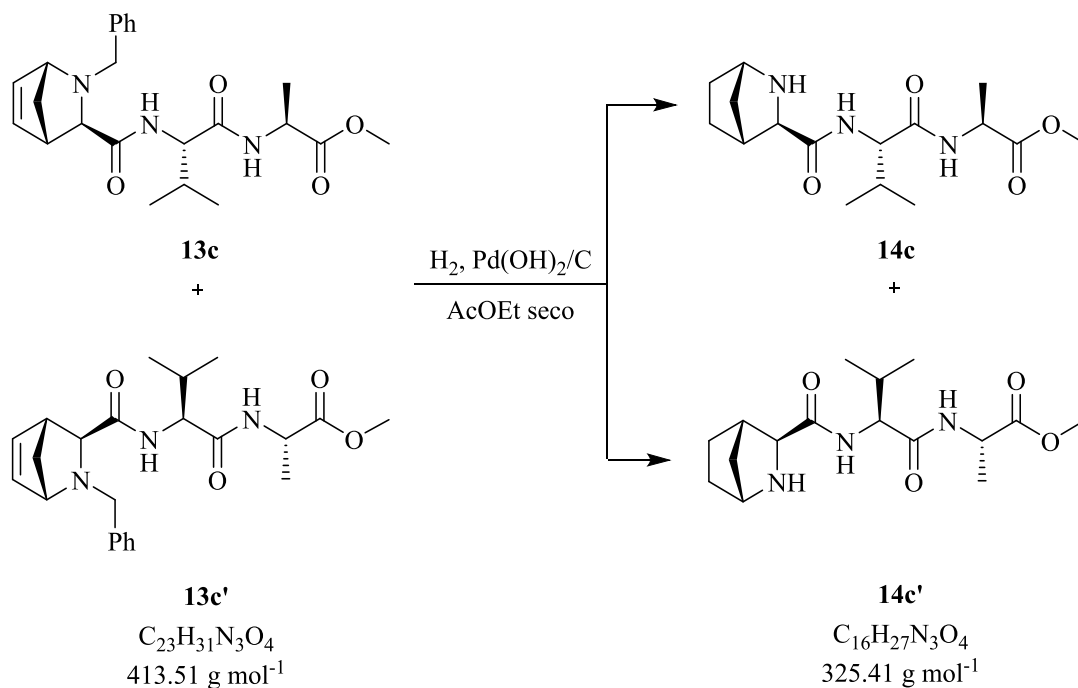
EM (ESI, CH₃OH) *m/z* (%): 414.2388 (MH⁺, 1), 348.1912 (18), 320.1971 (1), 316.1649 (2), 245.1286 (42), 217.1406 (100, pico base), 104.0728 (19), 91.0541 (22).

EMAR: cálculo para C₂₃H₃₂N₃O₄⁺: 414.2387; obtida: 414.2388.





3.5.4. Síntese de {(1*S*,3*R*,4*R*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-valil-L-alaninato de metilo (14c**) e de {(1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-valil-L-alaninato de metilo (**14c'**)**



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **14a/14a'** (secção 3.3.4.), a mistura dos tripéptidos protegidos **13c/13c'** (0.150 g, 0.363 mmol) foi dissolvida em AcOEt seco (20 mL) deixando-se reagir durante 5d e, em seguida, efetuou-se o tratamento corrente, obtendo-se 155.3 mg de um óleo amarelo. Procedeu-se à purificação do composto pretendido por cromatografia em coluna de adsorção em gel de SiO_2 , utilizando como eluente AcOEt, tendo-se obtido um sólido amarelo com baixo ponto de fusão (83.1 mg), identificado como a mistura dos diastereoisômeros hidrogenados pretendidos, **14c/14c'**. Rendimento de 70%.

Compostos **14c/14c'**: óleo amarelo.

R_f : 0.10 em AcOEt.

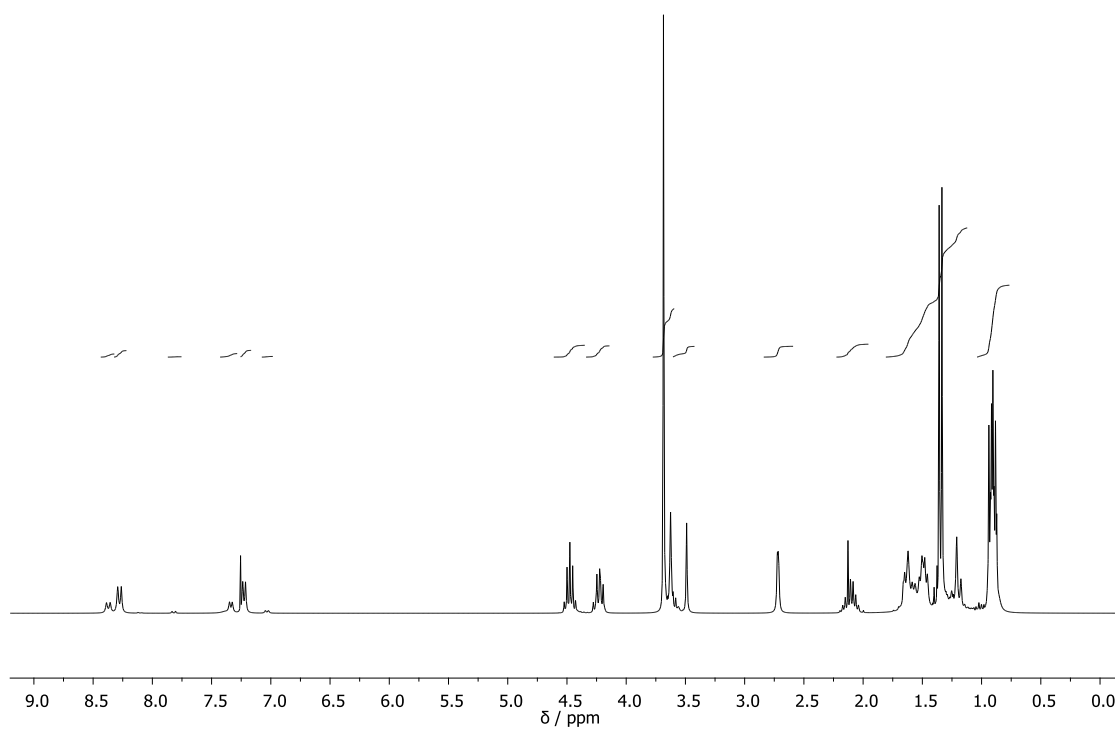
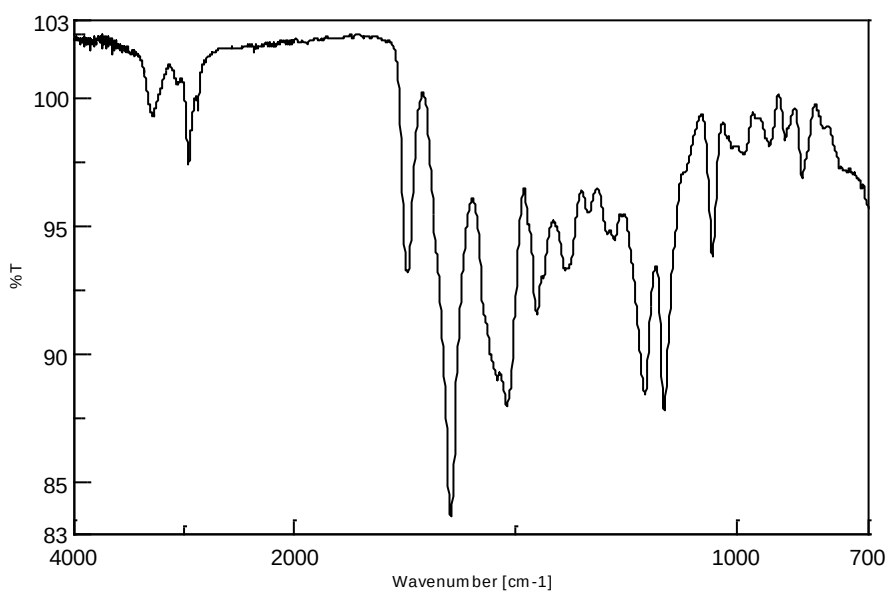
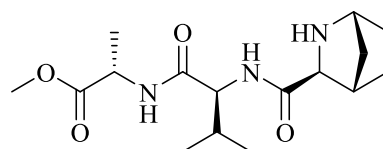
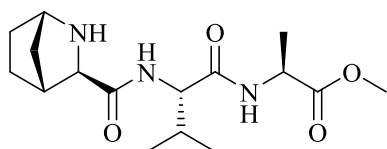
IV ν (cm^{-1}): 3282.25, 3060.48, 2961.16, 2874.38, 1743.33, 1645.95, 1538.92, 1518.67, 1450.21, 1382.71, 1332.57, 1291.11, 1272.79, 1206.26, 1162.87, 1052.94, 983.518, 924.700, 886.131, 849.490, 797.421.

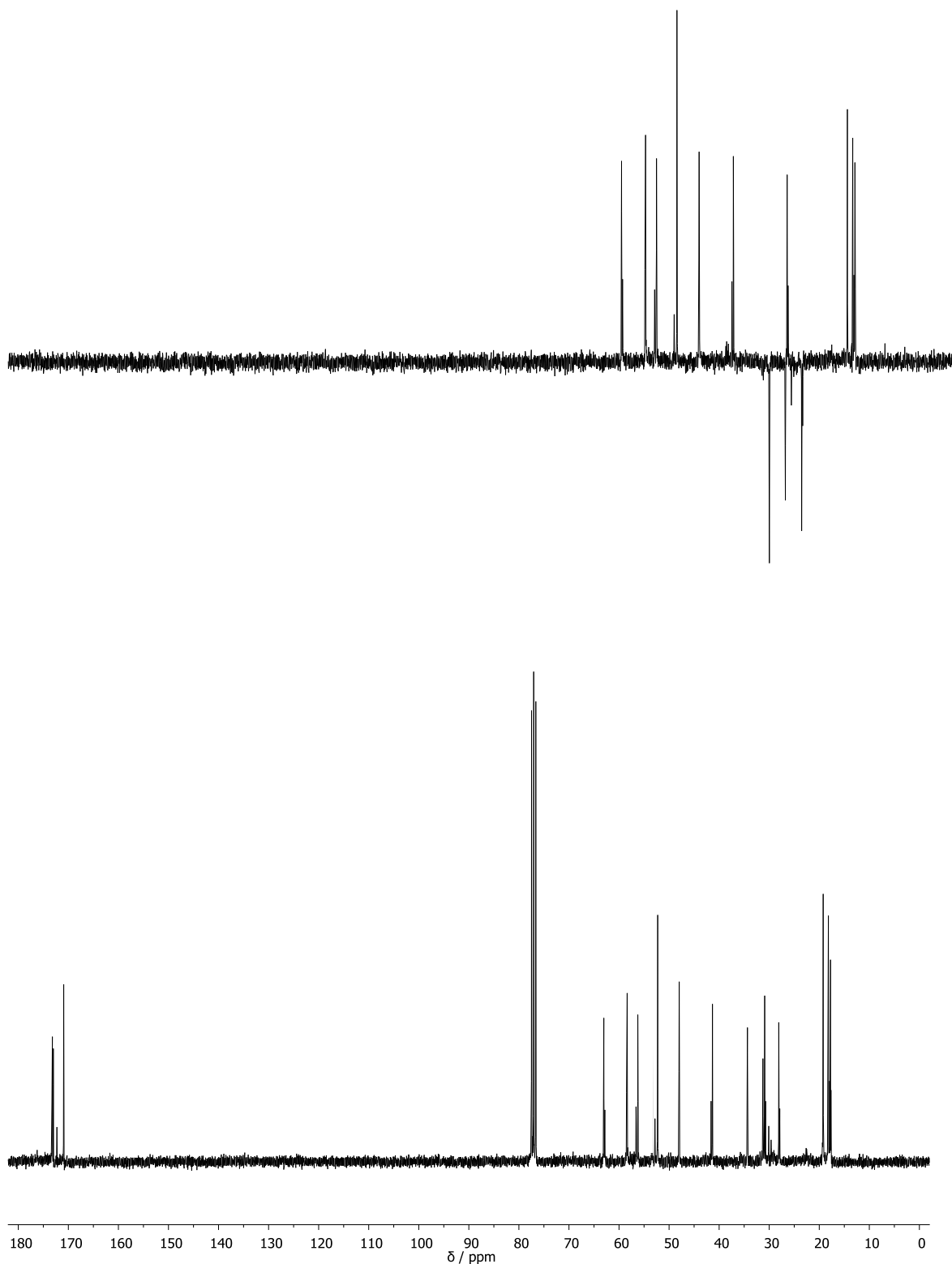
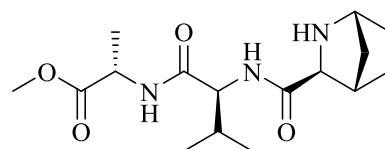
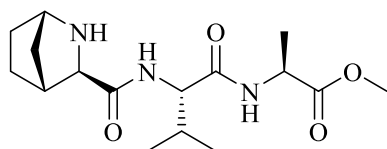
¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ ppm (verifica-se a presença de rotâmeros): [8.38 (d, *J* = 9.2 Hz), 8.28 (d, *J* = 9.0 Hz), 7.82 (d, *J* = 8.9 Hz), 2H, permutam com D₂O, 2 x CONH], [7.34 (d, *J* = 7.2 Hz), 7.23 (d, *J* = 7.1 Hz), 7.04 (d, *J* = 7.8 Hz), 2H, permutam com D₂O, 2 x CONH], 4.48 (p, 2H, *J* = 7.1 Hz, 2 x H_A-2), 4.31 – 4.15 (m, 2H, 2 x H_V-2), 3.69 (s, 6H, 2 x OCH₃), 3.63 (s, 2H, 2 x H-3), 3.49 (s, 2H, 2 x H-1), 2.72 (d, 2H, *J* = 1.8 Hz, 2 x H-4), 2.24 – 1.97 (m, 2H, 2 x H_V-3), 1.71 – 1.16 [1.35 (d, *J* = 7.0 Hz), 20H, dois deles permutam com D₂O, 2 x (H-5 + H-6 + H-7 + H_A-3 + NH)], [0.93 (d, *J* = 6.6 Hz), 0.91 (d, *J* = 6.6 Hz), 0.89 (d, *J* = 6.6 Hz), 0.88 (d, *J* = 6.6 Hz), 12H, 2 x H_V-4].

¹³C-RMN e DEPT (CDCl₃, 75 MHz) δ ppm (observa-se a presença de rotâmeros): [173.28 (Cq), 173.18 (Cq), 172.99 (Cq), 172.27 (Cq), 170.92 (Cq), 170.90 (Cq), 4 x CONH + 2 x CO₂CH₃], 63.03 [(CH), 62.83 (CH), 2 x C-3], [58.51 (CH), 58.37 (CH), 2 x C_V-2], [56.60 (CH), 56.25 (CH), 2 x C-1], [52.82 (CH₃), 52.27 (CH₃), 2 x OCH₃], [48.03 (CH), 47.98 (CH), 2 x C_A-2], [41.61 (CH), 41.33 (CH), 2 x C-4], [34.42 (CH₂), 34.35 (CH₂), 2 x C-7], 31.25 (2CH₂, 2 x C-6), [30.90 (CH), 30.72 (CH), 2 x C_V-3], [28.09 (CH₂), 27.89 (CH₂), 2 x C-5], [19.22 (CH₃), 18.18 (CH₃), 17.94 (CH₃), 17.76 (CH₃), 2 x C_V-4], 17.66 (2CH₃, 2 x C_A-3).

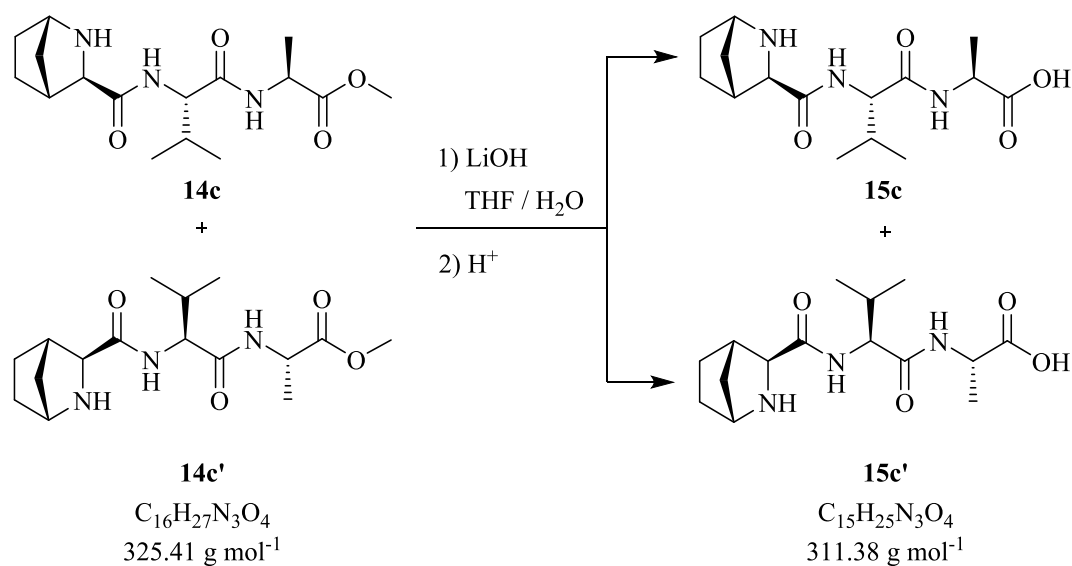
EM (ESI, CH₃OH) *m/z* (%): 326.2091 (MH⁺, 34), 229.1510 (1), 223.1449 (26), 195.1546 (100, pico base), 124.1127 (9), 96.0844 (58).

EMAR: cálculo para C₁₆H₂₈N₃O₄⁺: 326.2074; obtida: 326.2091.





3.5.5. Síntese de {(1*S*,3*R*,4*R*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-valil-L-alanina (15c) e de {(1*R*,3*S*,4*S*)-2-azabicyclo[2.2.1]heptano-3-carbonil}-L-valil-L-alanina (15c')



Segundo o procedimento descrito anteriormente para a preparação de **7-*exo*** (secção **3.2.4.**), procedeu-se à hidrólise alcalina da mistura dos tripéptidos **14c/14c'** (0.169 g, 0.519 mmol) deixando-se reagir durante 48h e, em seguida, efetuou-se o tratamento corrente. O composto pretendido foi purificado através de cromatografia adsorção em coluna de gel de SiO₂ usando-se como eluente CH₂Cl₂/CH₃OH (1:1). Obteve-se um sólido bege cristalino de baixo ponto de fusão (0.120 g), identificado como a mistura dos correspondentes tripéptidos, **15c/15c'**. Rendimento de 74%.

Compostos **15c/15c'**: sólido bege cristalino.

R_f: 0.31 em CH₂Cl₂/CH₃OH (1:1).

P.f.: 162–164°C

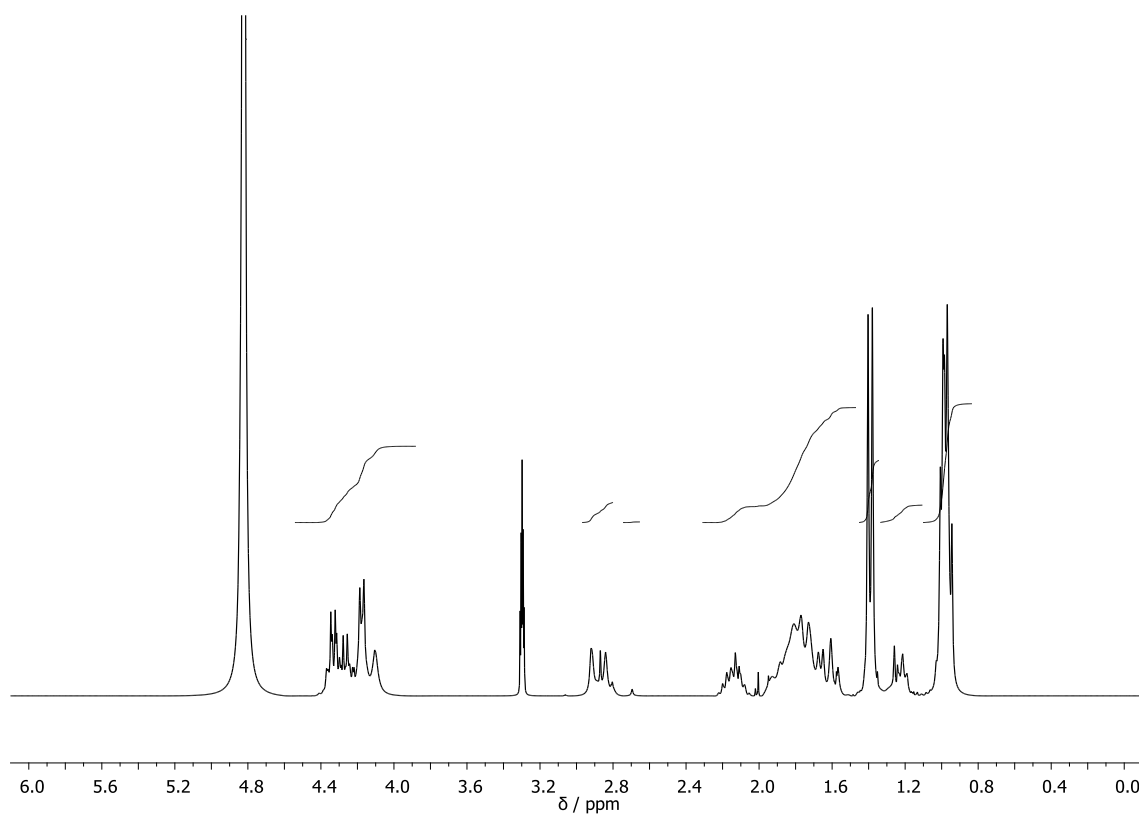
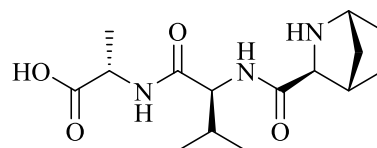
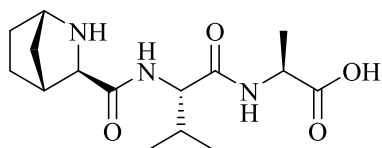
IV ν (cm⁻¹): 3249.47, 3057.58, 2964.05, 1722.12, 1649.80, 1542.77, 1454.06, 1372.10, 1267.00, 1099.23, 891.916, 844.669.

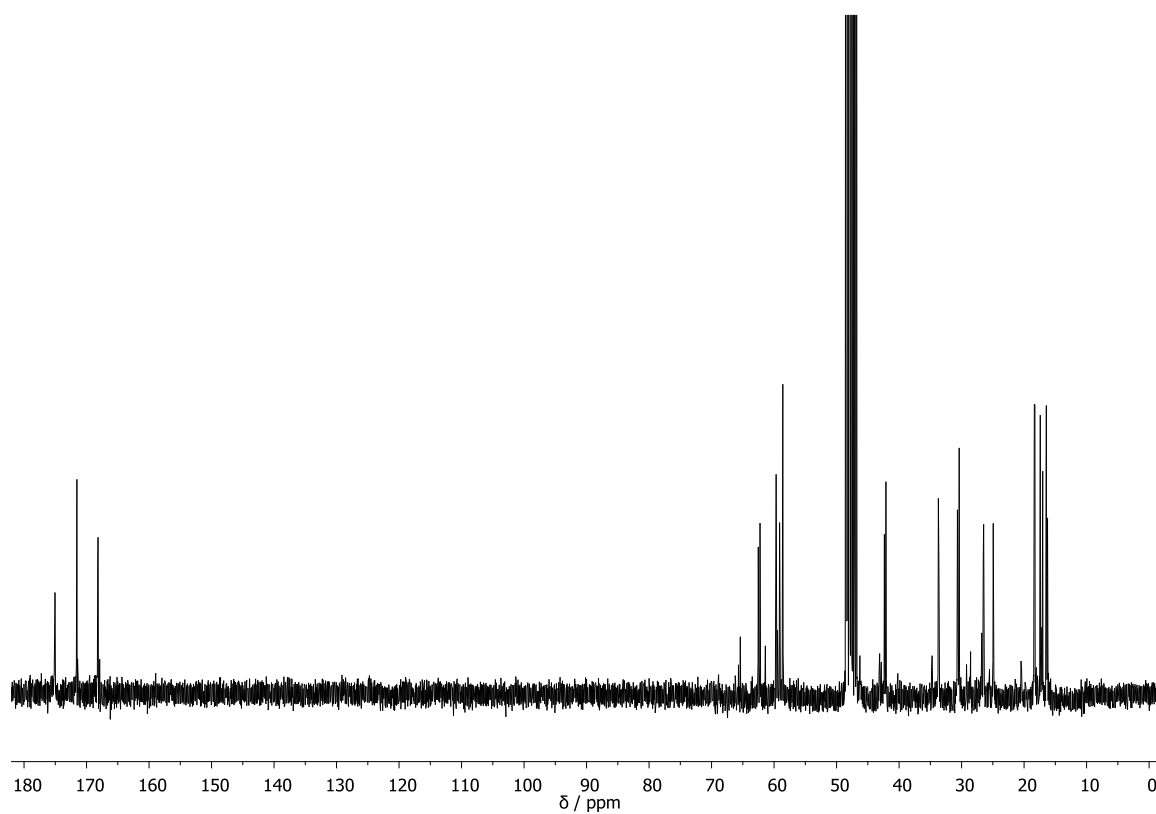
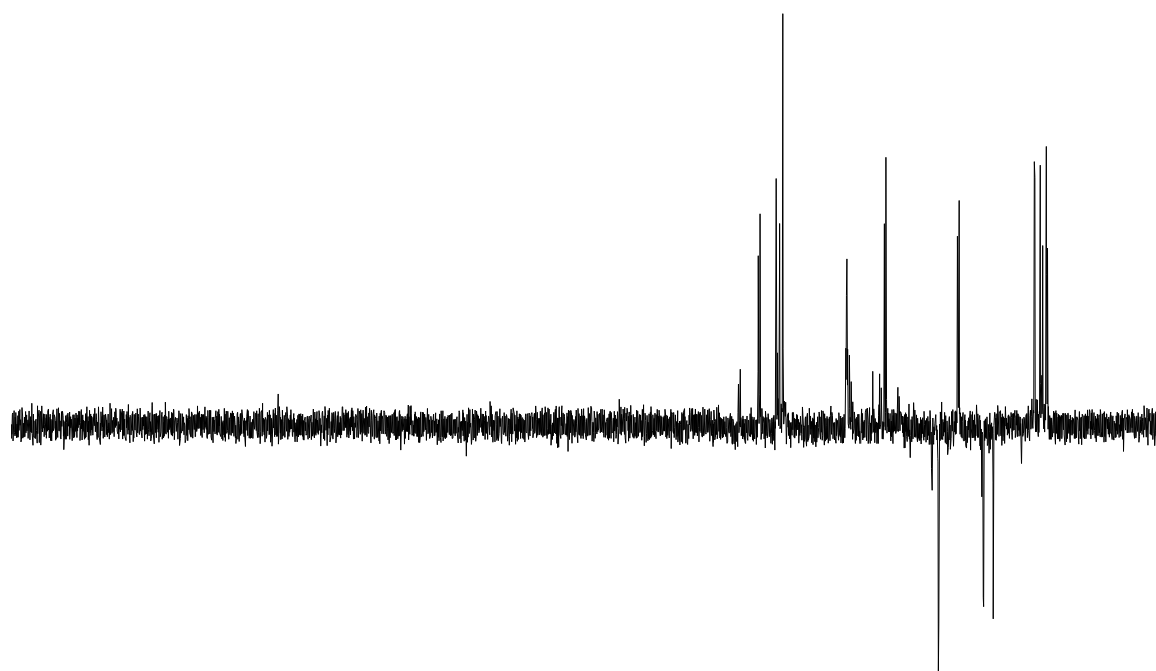
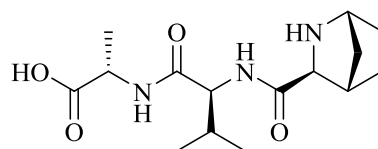
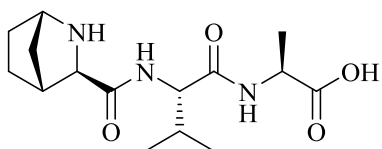
¹H-RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ ppm (observa-se a presença de rotâmeros): 4.55 – 3.94 [m, 8H, 2 x (H_{V-2} + H_{A-2} + H-1 + H-3)], 2.99 – 2.80 [2.92 (s), 2.87 (s), 2.84 (s), 2.70 (s), 2H, 2 x H-4], 2.32 – 1.48 [mc, 12H, 2 x (H-5 + H-6 + H-7_{syn} + H_{V-3})], 1.39 (d, *J* = 7.1 Hz, H_{A-3}), 1.34 – 1.11 (m, 2H, 2 x H-7_{anti}), 1.10 – 0.83 (m, 12H, 2 x H_{V-4}).

¹³C-RMN e DEPT (CDCl₃, 75 MHz) δ ppm (observa-se a presença de rotâmeros): [175.12 (Cq), 175.05 (Cq), 175.04 (Cq), 171.54 (Cq), 171.55 (Cq), 168.21 (Cq), 168.16 (Cq), 168.15 (Cq), 4 x C=ONH + 2 x C=O₂H], [65.70 (CH), 65.41 (CH), 2 x C-3], [62.53 (CH), 62.25 (CH), 61.39 (CH), 2 x C_V-2], [59.67 (CH), 59.12 (CH), 59.45 (CH), 58.60, (2CH, 2 x C-1), [48.51 (CH), 48.42 (CH), 48.34 (CH), 48.23 (CH), 2 x C-4], [43.11 (CH), 42.84 (CH), 42.35 (CH), 42.11 (CH), , 2 x C_A-2], [34.82 (CH₂), 34.71 (CH₂), 33.72 (CH₂), 33.64 (CH₂), 2 x C-7], [30.67 (CH), 30.38 (CH), 2 x C_V-3], [26.77 (CH₂), 26.53 (CH₂), 26.47 (CH₂), 2 x C-6], [24.93 (CH₂), 24.89 (CH₂), 2 x C-5], [18.36 (CH₃), 18.27 (CH₃), 17.41 (CH₃), 17.02 (CH₃), 2 x C_V-4], [16.44 (CH₃), 16.25 (CH₃), 2 x C_A-3)].

EM (ESI, CH₃OH) *m/z* (%): 312.1922 (MH⁺, 31), 223.1583 (7), 215.1380 (1), 195.1495 (100, pico base), 166.0869 (4), 124.1128 (43), 96.0813 (58).

EMAR: cálculo para C₁₅H₂₆N₃O₄⁺: 312.1918; obtida: 312.1922.





CAPÍTULO 4

Ensaaios Farmacológicos

4.1 ENSAIOS DE COMPETIÇÃO AGONISTA/ANTAGONISTA DO RECETOR D₂ DE DOPAMINA

4.1.1. Material e Métodos

As experiências de competição agonista/antagonista utilizando a técnica de fixação de ligandos, ou *binding*, necessários para determinar o efeito como moduladores alostéricos de recetores D₂ de dopamina dos análogos prolinomiméticos apresentados nesta dissertação foram realizados na **Unidade de Avaliação de Atividades Farmacológicas de Compostos Químicos** da Universidade de Santiago de Compostela.

4.1.1.1. Preparação de membranas

Para o efeito, utilizaram-se recetores humanos transfetados na linha celular de ovário de *hamster* chinês expressa em células humanas de recetores D₂, dispostas em placas de Petri de 150 mm em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (EMEMF12), suplementado com soro fetal bovino (FBS) a 10% dializado. Quando as células se encontraram em confluência, i.e., a cobrir a base da placa de Petri sem que haja diferenciação, eliminou-se o meio e as células foram lavadas duas vezes com **solução-tampão A** [cloridrato de tris(hidroximetil)aminometano, Tris-HCl, pH = 7.4 e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 2 mM]. As células foram em seguida ressuspensas por raspagem e homogeneizou-se a solução num Pilytron (ajuste 10, dois pulsos de 15 segundos). A suspensão de células resultante foi centrifugada (1100 G, 10 min, 4°C). O sobrenadante foi submetido a centrifugação (48400 G; 4 °C; 60 min) e o *péllet* resultante da centrifugação foi ressuspensado na **solução-tampão B** (Tris-HCl 50 mM, pH = 7.4) e determinou-se a quantidade de proteína pelo método de Bradford.³¹²

4.1.1.2. Ensaio de união ao recetor D₂ humano

As membranas expressando o recetor D₂ humano (30 µg / poço) foram incubadas numa solução de [³H]NPA 0.25 nM (concentração final) e realizaram-se os ensaios com os compostos durante 60 min a 25 °C, em 96 poços de polipropileno com um tampão de incubação (Tris-HCl 50 mM, pH = 7.6; NaCl 120 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 4 mM, EDTA 1 mM), até um volume total de 250 µL. A união inespecífica determinou-se na presença de (+)-butaclamol 1 µM.

³¹²Bradford, M. M. *Anal Biochem.* **1976**, 72, 248.

Transcorrido o tempo de incubação, transferiu-se 200 µL para uma microplaca Millipore GF/C, pré-tratada com polietilenimina a 0.5% e as amostras foram filtradas e lavadas quatro vezes com 250 µL de tampão de lavagem (Tris-HCl 50 mM, pH = 7.6; NaCl 120 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 4 mM, EDTA 1 mM). Os filtros foram secos e adicionou-se, em cada poço, 30 µL de *cocktail* de cintilação (Universol) e a radioatividade foi detetada mediante um contador de cintilação (Microbeta Trilux) para leitura de microplacas.

Os dados expressam-se como um incremento da especificidade da união, mediante a seguinte equação (1):

$$\% \text{ Incremento} = \left(\frac{(X - \text{NSB} \times 100)\text{BT} - \text{NSB}}{\text{BT} - \text{NSB}} \right) - 100 \quad (1)$$

Onde,

X: radioatividade detetada no poço ensaiado;

BT: radioatividade detetada quando [³H]NPA foi incubado na ausência do composto;

NSB: radioatividade detetada quando se co-incubou [³H]NPA com (+)-butaclamol 1 µM.

A significância estatística avaliou-se segundo uma análise ANOVA, usando o software SPSS (V15.0), determinando-se o limite de significância em valores de $P < 0.05$.

4.1.2. Resultados

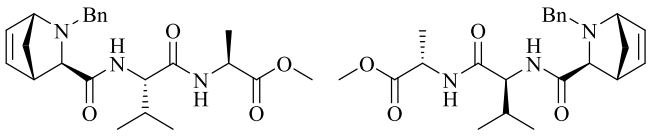
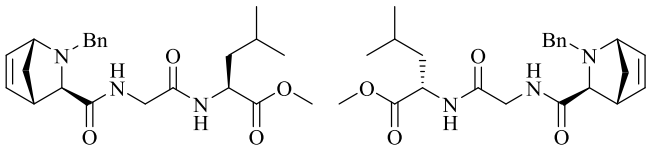
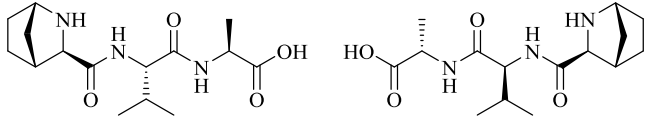
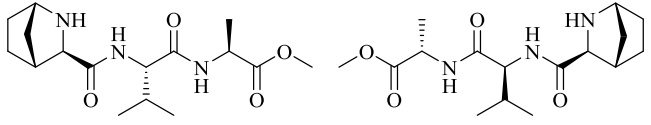
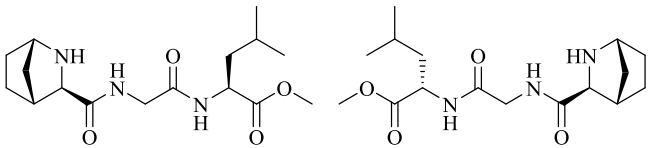
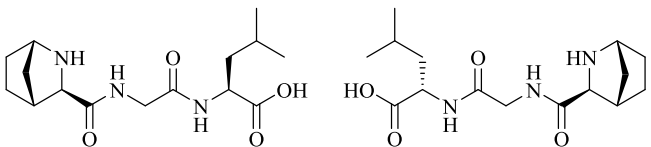
Sobre seis novos compostos prolinomiméticos do tripéptido natural PLG na forma de misturas diastereoisoméricas, **13b-c/13b'-c'**, **14b-c/14b'-c'** e **15b-c/15b'-c'**, previamente sintetizados, realizaram-se ensaios relativos à sua capacidade para potenciar a união do agonista [³H]NPA frente a recetores de dopamina D₂ clonados, tal como descrevem Verma *et al.*⁹⁰.

Estes compostos foram estudados em oito concentrações diferentes (compreendidas entre 10⁻¹² a 10⁻⁵ M). Os dados obtidos para os análogos do PLG sobre a união de [³H]NPA, encontram-se em *Anexo*, segundo a Tabela 4.1.

⁹⁰Verma, V.; Mann, A.; Costain, W.; Pontoriero, G.; Castellano, J., M.; Skoblenick, K.; Gupta, S. K.; Pristupa, Z.; Niznik, H. B.; Johnson, R. L.; Nair, V. D.; Mishra, R. K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 315, 1228-1236.

Tabela 4.1

Compostos prolinomiméticos utilizados nos ensaios biológicos de competição agonista/antagonista utilizando a técnica de fixação de ligandos para determinação do efeito modulador alostérico de receptores D₂ de dopamina.

Código ID	Fórmula de Estrutura		Compostos	F. Molecular
	XG1ID01		13c/13c'	C ₂₃ H ₃₁ N ₃ O ₄
	XG1ID02		13b/13b'	C ₂₃ H ₃₁ N ₃ O ₄
	XG1ID03		15c/15c'	C ₁₅ H ₂₅ N ₃ O ₄
	XG1ID04		14c/14c'	C ₁₆ H ₂₇ N ₃ O ₄
	XG1ID05		14b/14b'	C ₁₆ H ₂₇ N ₃ O ₄
	XG1ID06		15b/15b'	C ₁₅ H ₂₅ N ₃ O ₄

CAPÍTULO 5

Considerações Finais

Neste trabalho foram desenvolvidas diferentes abordagens sintéticas de forma a contribuir para o aumento do *pool* de pseudoprolinas constringidas baseadas no sistema 2-azabicyclo[2.2.1]heptano. Primeiramente, procedeu-se à síntese de derivados *N*-benzilados, nomeadamente os prolinomiméticos racémicos **4-exo**, **5-endo**, **6-exo**, **7-exo** e **8-exo** e, ulteriormente, desenvolveram-se precursores alternativos aos racematos **4-exo** e **5-endo**, a saber, **17-exo** e **18-endo**, bem como os seus derivados, **19-exo** e **20-exo**.

Partiu-se dos precursores **8-exo** de forma a criar três séries de prolinomiméticos do PLG. A metodologia adotada, nomeadamente *via* síntese convergente, com a preparação dos fragmentos peptídicos *C*-terminais para cada série de forma independente, resultou na síntese de três dipéptidos *N*-protegidos (**11a-c**) e de três dipéptidos *N*-desprotegidos (**12a-c**), com excelentes rendimentos, tanto no acoplamento (87–98%) como na *N*-desproteção (98–99%).

O acoplamento entre os prolinomiméticos racémicos **8-exo** com os dipéptidos **12a-c**, para a preparação dos correspondentes tripéptidos **13a-c/13a'-c'**, revelou-se uma metodologia muito prolífica, apresentando rendimentos na ordem dos 66–76%. A principal vantagem desta metodologia passa por diminuir o número de operações envolvendo o sistema bicíclico.

Posteriormente, a hidrogenação e hidrogenólise destes tripéptidos conduziu à síntese dos respetivos tripéptidos *N*-desprotegidos, **14a-c/14a'-c'**. Embora os rendimentos tenham sido, em geral, muito bons (70–83%), os tempos de reação foram muito extensos no que respeita à *N*-desbenzilação, entre 4 a 8 dias (Tabela 2.21).

O último passo de desproteção dos ésteres metílicos para obtenção dos correspondentes ácidos na sua forma livre revelou-se muito eficaz, com rendimentos na ordem dos 74–89%.

Através do estudo da *via alternativa* para a síntese do PLG, utilizando derivados *N*-protegidos sob a forma de carbamato de *tert*-butilo (Boc), verificou-se que estes últimos são melhores intermediários do que os derivados *N*-benzilados em termos de pureza e rendimento global do procedimento sintético utilizado, como pode ser constatado por comparação dos rendimentos globais relativos às sequências reacionais: 48% (**8-exo** → **13a/13a'** → **14a/14a'** → **15a/15a'**) vs. 69% (**20-exo** → **21a/21a'** → **22a/22a'** → **15a/15a'**). O rendimento global das restantes séries, P*GL e P*VA, foi de 39 e 32%, respetivamente. No total, foram preparados 11 misturas de diastereoisómeros prolinomiméticos.

Os ensaios biológicos levados a cabo para os tripéptidos **13b-c/13b'-c'**, **14b-c/14b'-c'** e **15b-c/15b'-c'**, foram meramente estudos preliminares de carácter exploratório, uma vez que o objetivo primordial era proceder a este estudo com os tripéptidos enantiomericamente puros, contudo, como tal não foi possível, usaram-se as misturas diastereoisoméricas dos compostos supracitados de forma a instigar o seu potencial papel como moduladores positivos dos recetores de dopamina D₂. Os resultados dos ensaios biológicos revelam que nenhuma das misturas de diastereoisómeros analisada induz afinidade dos recetores D₂ para com o [³H]NPA.

Todavia, estes resultados não são conclusivos uma vez que os tripéptidos foram analisados como uma mistura diatereoisomérica. Como tal, o efeito de um diatereoisómero poderá antagonizar o efeito de outro; ainda de destacar que a concentração usada em cada ensaio reflete a mistura de diastereoisómeros e não de cada diástereoisómero *per se*. Esta observação é de extrema importância, na medida em que, a atividade é padronizada em relação à concentração do PLG, que se encontra enantiomericamente puro (controlo positivo), assim poderão estar subvalorizados eventuais efeitos modulatórios frente aos recetores D₂, mascarando a sua atividade contingencial.

Apesar de não ter sido possível a separação dos diastereoisómeros presentes nas misturas obtidas para as diferentes séries, e portanto, a aferição do potencial efeito modulatório dos recetores D₂ desta classe de análogos do PLG, este trabalho cumpriu com os objetivos propostos, nomeadamente o conhecimento da química desta classe de análogos do PLG como medida exploratória, tendo-se procedido ainda, de forma complementar, à otimização da via de síntese de prolinomiméticos do PLG através da *via alternativa* do P*LG.

De enfatizar que, a proposta metodológica demonstrou-se muito eficaz, robusta e pertinente, deste modo perspectiva-se, face aos resultados obtidos neste trabalho, o uso de sistemas prolinomiméticos sob a forma enantiomericamente pura na síntese de derivados do PLG, mediante a metodologia desenvolvida e otimizada nesta dissertação. Destarte, será possível a síntese de prolinomiméticos do PLG, na sua forma impermista, elegíveis portanto, para ensaios farmacológicos, elucidando de forma inequívoca acerca da sua potencialidade como candidatos ao desenvolvimento de novos fármacos neuroprotetores pela modulação dos recetores D₂ dopaminérgicos.

Os tripéptidos preparados serão futuramente submetidos a um processo de avaliação biológica adicional para conhecer a sua atividade neuroprotetora, tanto em ausência como em presença de diferentes agentes neurotóxicos como glutamato (que induz excitotoxicidade e morte neuronal através de uma sobrecarga de Ca²⁺ na célula), ou água oxigenada, que induz stresse oxidativo.

6. Anexos

ESTUDIO: USEF544-13B

Informe Final

Nº ESTUDIO:	USEF544-13B
CONCEPTO DEL ESTUDIO:	Informe de la puesta a punto de la metodología de cuantificación de la modulación alostérica del receptor D ₂ .
FECHA:	31 de Julio de 2013

SOLICITANTE:

Dr. Xerardo Xusto García Mera
Departamento de Química Orgánica
Facultad de Farmacia
Campus Universitario Sur s/n
15782 Santiago de Compostela
Tel. 881815047. E-mail: molga.caamano@usc.es

CONFIDENCIAL

ESTUDIO: USEF544-13B

CONCEPTO: Informe de la evaluación de 6 compuestos en el receptor D₂ humano marcado con [³H]NPA.

MÉTODO SIMPLIFICADO:

BINDING D₂:

Tampón de incubación:	50mM Tris-HCl pH=7.6 120 mM NaCl 5 mM KCl 4 mM MgCl ₂ 1mM EDTA
Tampón de filtración:	50mM Tris-HCl pH=7.4 0.9 % NaCl
Membranas:	30 µg/punto. Procedentes de células CHO preparadas en nuestro laboratorio (Lot A001 29/09/10). Concentración de proteína: 1765 µg/ml.
Radioligando:	[³ H]-NPA, 0.25 nM (60 Ci/mmol, 1 mCi/ml, ARC-ITISA #ART0811)
Inespecífico:	Butaclamol 1 µM (Sigma D033)
Incubación:	60 minutos a 25 °C en placa de polipropileno (V _T =250 µl). Pasar 200 µl a placa GF/C
Filtración:	Filtros GF/C pretratados con 0.5% PEI y tratados con tampón de incubación 15 minutos. Lavar 4x 250µl de tampón de lavado.

RESULTADOS:

Se ensayaron 8 concentraciones de cada compuesto en 3 experimentos independientes con determinaciones por duplicado en cada uno de ellos. Se incluyó PLG en todos los ensayos como control positivo (Verma y cols., 2005).

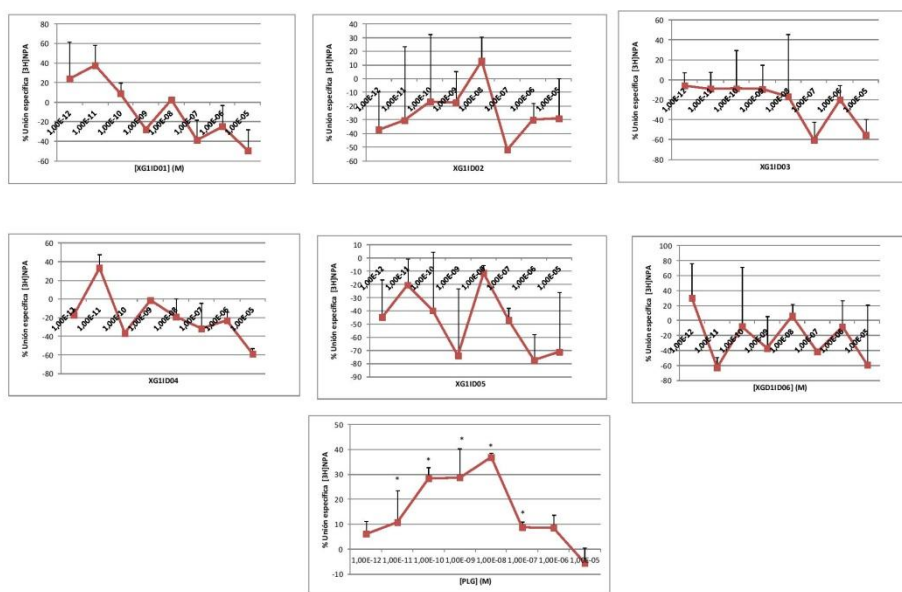


Figura 1: Modulación de la unión de [3H]NPA ejercida por ocho concentraciones de compuesto. Se muestra la media $\pm$ desviación estándar (barras verticales) de tres ensayos independientes. (* $P < 0.05$; test t de student).

CONCLUSIONES:

- Ninguno de los compuestos estudiados mostró un incremento de la unión de [^{3} H]NPA al receptor D₂.

Bibliografía:

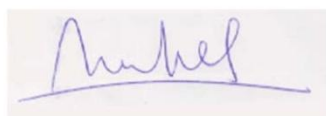
Verma V, Mann A, Costain W, Pontoriero G, Castellano JM, Skoblenick K, Gupta SK, Pristupa Z, Niznik HB, Johnson RL, Nair VD, Mishra RK. **Modulation of agonist binding to human dopamine receptor subtypes by L-prolyl-L-leucyl-glycinamide and a peptidomimetic analog.** J Pharmacol. 2005; 315(3):1228-36.

Santiago de Compostela, 31 de Julio de 2013



Fdo.: José Manuel Brea Floriani
Investigador responsable

Vº Bº



Fdo.: Mª Isabel Loza García
Coordinadora científica



Fdo.: Mª Isabel Cadavid Torres
Coordinadora científica

