



Universidade do Minho
Escola de Ciências

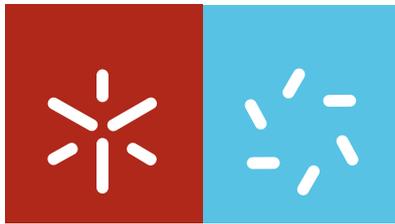
Marília Elisabete Tavares Ferreira Silva **Glicopéptidos fluorescentes:
síntese e caracterização**

Marília Elisabete Tavares Ferreira Silva

**Glicopéptidos fluorescentes:
síntese e caracterização**

UMinho | 2009

Junho de 2009



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Marília Elisabete Tavares Ferreira Silva

**Glicopéptidos fluorescentes:
síntese e caracterização**

Tese de Doutoramento em Ciências
Área de conhecimento Química

Trabalho efectuado sob orientação da
Doutora Ana Paula da Assunção Esteves
e da
Doutora Lígia Lourdes Miranda Marona Rodrigues

Junho de 2009

Autora:

Marília Elisabete Tavares Ferreira Silva

mariliasilva@portugalmail.com

Tese de Doutoramento em Ciências

Título: Glicopéptidos fluorescentes: síntese e caracterização.

Ano de publicação: 2009

Orientadoras:

Doutora Ana Paula da Assunção Esteves (Professora Auxiliar)

aesteves@quimica.uminho.pt

Doutora Lígia Lourdes Miranda Marona Rodrigues (Professora Auxiliar)

ligiar@quimica.uminho.pt

É autorizada a reprodução integral desta tese apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Universidade do Minho, 5 de Junho de 2009

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que não estão cá para ver mas que foram os principais impulsionadores desta minha vontade de aprender até morrer.

Os meus sinceros agradecimentos:

À Doutora Ana Paula Esteves e à Doutora Lígia Rodrigues, minhas orientadoras, pois sem o seu apoio este sonho nunca teria sido realizado. Quero agradecer pela orientação científica, pela disponibilidade, pelo incentivo e paciência que sempre demonstraram mas principalmente, e acima de tudo, pela amizade com que me presentearam e por terem acreditado em mim desde o primeiro dia.

À Professora Doutora Ana Campos agradeço a colaboração, apoio e amizade demonstrados e que foram auxiliares preciosos no decurso deste trabalho.

Ao Professor Doutor Radim Hrdina pela colaboração na cedência de fluoróforos e pelos estudos de fluorescência levados a cabo para alguns compostos cuja preparação se encontra descrita nos pontos 2.2 e 2.3.

Ao Doutor António Mendonça pela colaboração com os estudos de fluorescência realizados para alguns compostos cujas sínteses estão descritas nos pontos 2.4 e 2.6.2.

À Ana Isabel pelos bons momentos que compartilhamos nestes últimos anos, pela ajuda prestada no decurso do trabalho experimental e pelo companheirismo que se desenvolveu em termos profissionais e pessoais.

À Dra Natércia Nunes e ao Jorge Afonso, Técnicos do Departamento de Química, pela disponibilidade na resolução dos problemas decorrentes do trabalho no Laboratório.

À Dra. Elisa Pinto, Técnica Superior do Departamento de Química, pela rapidez e eficiência com que sempre executou os espectros de RMN e análises elementares e pela ajuda preciosa na interpretação dos mesmos.

À Ivone Ferreira, à Vânia Araújo e à Fernanda Dias, administrativas do Departamento, quero agradecer a disponibilidade e simpatia.

Aos meus amigos e colegas do Departamento, pelo ótimo convívio social e profissional.

Às minhas amigas Gabriela e Elisa pelo apoio e amizade que me demonstraram todos os dias e que me permitiu realizar este trabalho a 50 Km de casa.

E finalmente quero agradecer à minha família, especificamente aos meus filhos e ao meu marido por terem estado ao meu lado em todos os momentos.

RESUMO

O objectivo deste trabalho consistiu na síntese de *N*-glicopéptidos fluorescentes com potencial actividade biológica.

Inicialmente preparou-se uma glucosilamina a qual foi ligada a corantes, aminoácidos e a péptidos pela posição anomérica, originando uma ligação amida entre o açúcar e o grupo carboxílico do composto a ligar.

Sintetizou-se o péptido Gly-Phe-Pro por síntese sequencial e foram ainda feitas tentativas de preparação de um glicopéptido fluorescente por síntese convergente.

Como unidades fluorescentes utilizaram-se os corantes ácido 4-(nafto[1,2-*d*][1,2,3]triazol-2-il)benzóico e o ácido cumarina-3-carboxílico, anteriormente estudados pelo nosso grupo de investigação, que foram ligados à glucosilamina, à glicina ou à extremidade glicina do péptido Gly-Phe-Pro.

Foi realizada a desprotecção do açúcar ligado aos fluoróforos e também quando ligado a péptidos fluorescentes por um método catalítico em condições moderadas.

A formação da ligação amida foi realizada em solução por métodos convencionais usados em síntese peptídica.

Na pesquisa de novos fluoróforos foram feitos estudos com corantes vinilsulfónicos tendo sido sintetizado um composto pela ligação de um corante deste tipo à cisteína.

Foram realizadas reacções de aza-Michael com a metilvinilsulfona comercial e com um precursor de um corante vinilsulfónico.

Os compostos foram purificados por cromatografia em coluna e/ou recristalização e caracterizados pelas técnicas analíticas habituais.

ABSTRACT

The aim of this work was the synthesis of fluorescent *N*-glycopeptides with potential biological activity.

The project began with the synthesis of a glucosylamine that was used to perform amide linkage by the anomeric position with a carboxylic group from dyes, amino acids or peptides.

The tripeptide Gly-Phe-Pro was synthesised by sequential approach. Several attempts were carried out in order to prepare a fluorescent glycopeptide by convergent synthesis methodology.

4-(naphtho[1,2-*d*] [1,2,3]triazol-2-yl)benzoic and coumarin-3-carboxylic acids were used as fluorophores. These compounds were previously studied by our research team. In the present work they were reacted with the glucosylamine mentioned above, with glycine and with Gly-Phe-Pro by the glycine unit.

Removal of the acetyl groups from sugar moiety was carried out by a catalytic method under mild conditions.

All reactions involving the formation of an amide bond were performed using the conventional methods of peptide synthesis.

Some studies were done using vinyl sulphonic dyes. A new compound was prepared by reaction with cysteine.

Several products were prepared by aza-Michael reactions using methyl vinyl sulphone and a precursor of a vinyl sulphonic dye as acceptors.

All new compounds were purified by column chromatography and/or recrystallisation and fully characterized by the usual analytical techniques.

ÍNDICE

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

1 - ALGUMAS MOLÉCULAS QUE FIZERAM HISTÓRIA	2
2 - BIOMOLÉCULAS	6
2.1 – PROTEÍNAS.....	7
2.1.1– Aminoácidos	7
2.1.2 – Péptidos	8
2.1.3– Síntese peptídica	10
2.2 – HIDRATOS DE CARBONO	14
2.3– GLICOPÉPTIDOS	19
3 - CORANTES FLUORESCENTES	22
3.1 – REACÇÕES DE AZA-MICHAEL.....	29
3.2 – GLICOPÉPTIDOS FLUORESCENTES	31

CAPÍTULO II – DISCUSSÃO DE RESULTADOS

1 – SÍNTESE DE GLICOCONJUGADOS FLUORESCENTES.....	36
1.1- PREPARAÇÃO DE 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL- β -D-GLUCOPIRANOSIL-AMINA 41	36
1.2 - SÍNTESE DE GLICOCONJUGADOS FLUORESCENTES UTILIZANDO O FLUORÓFORO ÁCIDO 4-(NAFTO[1,2- <i>d</i>][1,2,3]TRIAZOL-2-IL)BENZÓICO	39
1.2.1 – Preparação de <i>N</i> -(2',3',4',6'-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil)-4-(2 <i>H</i> -nafto[1,2- <i>d</i>] [1,2,3]triazol-2-il-benzamida 43	41
1.2.2 – Síntese de <i>N</i> -(β -D-glucopiranosil)-4-(2 <i>H</i> -nafto[1,2- <i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il-benzamida 44	42
1.2.3 – Síntese do éster metílico do ácido 4-nafto[1,2- <i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il-benzoilamino acético 45	44

1.2.4 – Síntese do ácido 4-2-[4-(2 <i>H</i> -nafto[1,2- <i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il)benzamido]acético 46	44
1.2.5 – Síntese de <i>N</i> -[<i>N</i> -(2',3',4',6'-tetra- <i>O</i> -acetil-β- <i>D</i> -glucopiranosil)carbamoil-metil]-4-(2 <i>H</i> -nafto[1,2- <i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il)-benzamida 47	45
1.3 – SÍNTESE DE GLICOCONJUGADOS FLUORESCENTES UTILIZANDO O FLUORÓFORO ÁCIDO CUMARINA-3-CARBOXÍLICO	48
1.3.1 – Síntese de <i>N</i> -(2',3',4',6'-tetra- <i>O</i> -acetil-β- <i>D</i> -glucopiranosil)-(2-oxo-2 <i>H</i> -cromeno)-3-carboxamida 49	49
1.3.2 – Síntese de <i>N</i> -(β- <i>D</i> -glucopiranosil)-(2-oxo-2 <i>H</i> -cromeno)-3-carboxamida 50	49
1.3.3 – Síntese do éster metílico do ácido [(2-oxo-2 <i>H</i> -cromeno-3-carbonil)-amino]-acético 51	50
1.3.4 – Síntese de [<i>N</i> -(2',3',4',6'-tetra- <i>O</i> -acetil-β- <i>D</i> -glucopiranosil)-(2-oxo-2 <i>H</i> -cromeno-3-carbonil)-amino]-acetamida 53	51
1.4 - SÍNTESE DE <i>N</i> -GLICOPÉPTIDOS FLUORESCENTES CONTENDO O TRIPÉPTIDO Gly-Phe-Pro	53
1.4.1 – Síntese do tripéptido Gly-Phe-Pro	53
1.4.1.1 – Tentativa de síntese do tripéptido Z-Gly-Phe-Pro-OMe	53
1.4.1.2 – Síntese do dipéptido Z-Phe-Pro-OBu ^t	57
1.4.1.3 – Síntese do tripéptido protegido Z-Gly-Phe-Pro-OBu ^t 65	58
1.4.2 – Síntese de nafto[1,2- <i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il-benzamida-Gly-Phe-Pro-OBu ^t 67	59
1.4.3 – Síntese de nafto[1,2- <i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il-benzamida-Gly-Phe-Pro 68	61
1.4.4 – Síntese de nafto[1,2- <i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il-benzamida-Gly-Phe-Pro-glucopiranosilamida 69	62
1.4.5 – Síntese de nafto[1,2- <i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il-benzamida-Gly-Phe-Pro-glucopiranosilamida desacetilada 70	63

1.4.6 – Síntese de (2-Oxo-2 <i>H</i> -cromeno-3-carbonil)-amido-Gly-Phe-Pro-OBu ^t 71	64
1.4.7 – Síntese de (2-Oxo-2 <i>H</i> -cromeno-3-carbonil)-amido-Gly-Phe-Pro 72	65
1.4.8 – Síntese de (2-Oxo-2 <i>H</i> -cromeno-3-carbonil)-amido-Gly-Phe-Pro- glucopiranosilamida 73	66
1.4.9 – Síntese de (2-Oxo-2 <i>H</i> -cromeno-3-carbonil)-amido-Gly-Phe-Pro- glucopiranosilamida desacetilada 74	67
1.4.10 – Tentativa de preparação do composto (2-Oxo-2 <i>H</i> -cromeno-3- carbonil)-amido-Gly-Phe-Pro-glucopiranosilamida 73 por síntese convergente.....	72
2 – REACÇÕES COM CORANTES DA CLASSE DOS VINILSULFÓNICOS	74
2.1 – REACÇÕES DE AZA-MICHAEL.....	75
2.1.1 – Reacções de adição à metilvinilsulfona 38	76
2.1.2 – Reacções de adição à <i>p</i> -aminofenilvinilsulfona 37	78

CAPÍTULO III – PARTE EXPERIMENTAL

1- PROCEDIMENTOS GERAIS	86
1.1 – INSTRUMENTAÇÃO	86
1.2 – CROMATOGRAFIA	86
1.3 – SOLVENTES E MATERIAIS DE PARTIDA	88
2 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	90
2.1 – REACÇÕES COM A D-GLUCOSE ACETILADA	90
2.1.1 – Preparação de brometo de 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-glucopiranosilo 39	90
2.1.2 – Preparação de 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosilazida 40	91
2.1.3 – Preparação de 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosilamina 41	92
2.2 – SÍNTESE DE GLICOCONJUGADOS FLUORESCENTES UTILIZANDO O FLUORÓFORO ÁCIDO 4-(NAFTO[1,2- <i>d</i>][1,2,3]TRIAZOL-2-IL)BENZÓICO 42	92

2.2.1 – Síntese de <i>N</i> -(2',3',4',6'-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil)-4-(2 <i>H</i> -nafto[1,2- <i>d</i>] [1,2,3]triazol-2-il-benzamida 43	93
2.2.2 – Síntese de <i>N</i> -(β -D-glucopiranosil)-4-(2 <i>H</i> -nafto[1,2- <i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il-benzamida 44	94
2.2.3 – Síntese do éster metílico do ácido 4-nafto[1,2- <i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il-benzoilamino acético 45	95
2.2.4 – Síntese do ácido 4-2-[4-(2 <i>H</i> -nafto[1,2- <i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il)benzamido]acético 46	97
2.2.5 – Síntese de <i>N</i> -[<i>N</i> -(2',3',4',6'-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil)carbamoilmetil]-4-(2 <i>H</i> -nafto[1,2- <i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il)-benzamida 47	98
2.3– SÍNTESE DE GLICOCONJUGADOS FLUORESCENTES UTILIZANDO O FLUORÓFORO ÁCIDO CUMARINA-3-CARBOXÍLICO 48	99
2.3.1 – Síntese de <i>N</i> -(2',3',4',6'-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil)-(2-oxo-2 <i>H</i> -cromeno)-3-carboxamida 49	99
2.3.2 – Síntese de <i>N</i> -(β -D-glucopiranosil)-(2-oxo-2 <i>H</i> -cromeno)-3-carboxamida 50	100
2.3.3 – Síntese do éster metílico do ácido [(2-oxo-2 <i>H</i> -cromeno-3-carbonil)-amino]-acético 51	101
2.3.4 – Síntese do ácido [(2-oxo-2 <i>H</i> -cromeno-3-carbonil)-amino]-acético 52	102
2.3.5 – Síntese de <i>N</i> -(2',3',4',6'-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil)-(2-oxo-2 <i>H</i> -cromeno-3-carbonil)-amino]-acetamida 53	103
2.4 – SÍNTESE DE GLICOCONJUGADOS FLUORESCENTES A PARTIR DO PÉPTIDO PROTEGIDO Gly-Phe-Pro	105
2.4.1 - Preparação de Pro-OBu ^t 61	105
2.4.2 – Síntese de Z-Phe-Pro-OBu ^t 63	105
2.4.3 – Preparação de Phe-Pro-OBu ^t 64	106
2.4.4 – Síntese do tripéptido Z-Gly-Phe-Pro-OBu ^t 65	107
2.4.5 – Preparação do composto Gly-Phe-Pro-OBu ^t 66	108

2.4.6 – Síntese do nafto[1,2- <i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il-benzamida-Gly-Phe-ProOBu ^t 67	109
2.4.7 – Preparação de nafto[1,2- <i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il-benzamida-Gly-Phe-Pro 68	110
2.4.8 – Síntese de nafto[1,2- <i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il-benzamida-Gly-Phe-Pro- glucopiranosilamida 69	111
2.4.9 – Síntese de nafto[1,2- <i>d</i>][1,2,3]triazol-2-il-benzamida-Gly-Phe-Pro- glucopiranosilamida desacetilada 70	113
2.4.10 – Síntese de (2-Oxo-2 <i>H</i> -cromeno-3-carbonil)-amido-Gly- Phe-Pro-OBu ^t 71	114
2.4.11 – Síntese de (2-Oxo-2 <i>H</i> -cromeno-3-carbonil)-amido-Gly-Phe-Pro 72	116
2.4.12– Síntese de (2-Oxo-2 <i>H</i> -cromeno-3-carbonil)-amido-Gly-Phe-Pro- glucopiranosilamida 73	117
2.4.13 – Síntese de (2-Oxo-2 <i>H</i> -cromeno-3-carbonil)-amido-Gly-Phe-Pro- glucopiranosilamida desacetilada 74	118
2.5 – REACÇÕES COM CORANTES DA CLASSE DOS VINILSULFÓNICOS	120
2.5.1 - Preparação do 2-[3-(1 <i>H</i> -ciclopenta[α]naftaleno-2-il)fenilsulfonil]eteno 79-III	120
2.5.2 - Síntese do 2-[3-(1 <i>H</i> -ciclopenta[α]naftaleno-2-il)fenilsulfonil]etil-S-Cys 81	121
2.6 - REACÇÕES DE AZA-MICHAEL.....	121
2.6.1 – Reacções de adição à metilvinilsulfona 38	122
2.6.1.1 - Síntese da <i>N</i> -[2-(metilsulfonil)etil]-1-propanamina 84	122
2.6.1.2 – Síntese de 2-(2-(metilsulfonil) etilamino) etanol 85	122
2.6.1.3 – Síntese de 2-ciclo-hexil- <i>N</i> -[2-(2-metilsulfonil)etil]etanamina 86	123
2.6.1.4 – Síntese de <i>N,N</i> -dietil-2-(metilsulfonil)etanamina 87	124
2.6.1.5 – Síntese de <i>N</i> -metil- <i>N</i> -[2-(metilfenil)etil]prop-2-in-1-amina 88	124
2.6.1.6 – Síntese de 1-[2-(metilsulfonil)etil] pirrolidina 89	125

2.6.1.7 – Síntese de 1-[2-(metilsulfonil)etil] piperidina 90	125
2.6.1.8 – Síntese de <i>N</i> -[2-(metilsulfonil)etil]propano-1,3-diamina 91	126
2.6.2 – Reacções de adição à <i>p</i>-aminofenilvinilsulfona 37	127
2.6.2.1 – Preparação de <i>p</i> -aminofenilvinilsulfona 37	127
2.6.2.2 – Síntese de [2-(4'-aminofenilsulfonil)etilamino]propano 96	127
2.6.2.3 - Síntese da (2-(4'-aminofenilsulfonil)etilamino)propanodiamina 97	128
2.6.2.4 – Síntese de 2-[2-(4-aminofenilsulfonil)etilamino]etanol 98	128
2.6.2.5 – Síntese de 4-[2-(ciclo-hexilamino)etilsulfonil]benzenamina 99	129
2.6.2.6 – Síntese de 4-[2-(pirrolidin-1-il)etilsulfonil]benzenamina 100	130
2.6.2.7 – Síntese de 4-[2-(piperidin-1-il)etilsulfonil]benzenamina 101	130
2.6.2.8 – Síntese de 4-[2-(dietilamino)etilsulfonil]benzenamina 102	131
2.6.2.9 - Síntese da [2-(4'-aminofenilsulfonil)etilamino]- <i>N</i> -metilpropargil- amina 103	132

REFERÊNCIAS	134
--------------------------	------------

ANEXOS	140
---------------------	------------

LISTA DE ABREVIATURAS

δ	desvio químico (expresso em unidades de ppm)
ϵ	absortividade molar
ABG	α -acetobromogluose
Ac	acetilo
AcOEt	acetato de etilo
Ar	arilo
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
Asn	asparagina
assim	assimétrica
ATP	adenosina tri-fosfato
Boc	grupo <i>terc</i> -butoxicarbonilo
Bu ^t	<i>terc</i> -butilo
CAN	Nitrato de cério (IV) e amónio (Ceric Ammonium Nitrate)
Cap.	capítulo
¹³ C-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carcono 13
conc.	concentração
Cys	cisteína
d	duplete
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DCC	<i>N,N'</i> -diciclo-hexilcarbodiimida
DCM	diclorometano
dd	duplete de dupletos
ddd	duplete de dupletos de dupletos
dec.	decomposição
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamida
DMSO	sulfóxido de dimetilo
DMSO-d ₆	sulfóxido de dimetilo hexadeuterado
DIPEA	<i>N,N'</i> -diisopropiletilamina
dq	duplete de quartetos
dqAB	duplo quarteto AB
dt	duplete de tripletos
EI	Impacto Electrónico (<u>E</u> lectron <u>I</u> mpact)
equiv.	Equivalente

Et	grupo etilo
Exp.	experiência
Et ₃ N	trietilamina
FAB	<u>F</u> ast <u>A</u> tom <u>B</u> ombardement
Fmoc	fluronilmetoxicarbonilo
Gln	glutamina
Glu	ácido glutâmico
Gly	glicina
GTP	trifosfato de guanosina
h	hora
HBTU	hexafluorofosfato de <i>O</i> -benzotriazolil- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilurônio
HMBC	<u>H</u> eteronuclear <u>M</u> ultiple <u>B</u> ond <u>C</u> orrelation
HMQC	<u>H</u> eteronuclear <u>M</u> ultiple <u>Q</u> uantum <u>C</u> orrelation
HOBt	1-hidroxibenzotriazole
¹ H-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Protão
Hz	Hertz
IV	infravermelho
Ile	isoleucina
<i>J</i>	constante de acoplamento (expressa em Hertz)
Leu	leucina
Lit.	literatura
<i>m</i>	multiplete
<i>m</i>	<i>meta</i>
M ⁺	ião molecular
Me	grupo metilo
<i>m/z</i>	razão massa/carga
<i>o</i>	<i>orto</i>
<i>p</i>	<i>para</i>
p.a.	pró-análise
p.f.	ponto de fusão
Phe	fenilalanina
PLC	cromatografia em camada preparativa (<u>P</u> reparative <u>L</u> ayer <u>C</u> hromatography)
ppm	partes por milhão
Pro	prolina
q	quarteto
qAB	quarteto tipo AB

quint.	quinteto
s	singleto
sext.	sexteto
sim	simétrico
t	tripleto
<i>terc</i> -Bu	<i>terc</i> -butilo
TA	temperatura ambiente
TFA	ácido trifluoracético
TLC	cromatografia em camada fina (<u>T</u> hin <u>L</u> ayer <u>C</u> romatography)
Tyr	tirosina
UV	ultravioleta
Z	benziloxicarbonilo

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1- ALGUMAS MOLÉCULAS QUE FIZERAM HISTÓRIA

Desde a pré-história que o homem utiliza compostos orgânicos, de origem animal ou vegetal, e as suas reacções com diversos fins. No antigo Egipto usavam o índigo **1**, extraído da planta do mesmo nome (fig. 1) e a alizarina **2** como corantes, e o famoso púrpura real **3**, utilizado pelos fenícios, era também uma substância orgânica proveniente de moluscos (fig. 2).

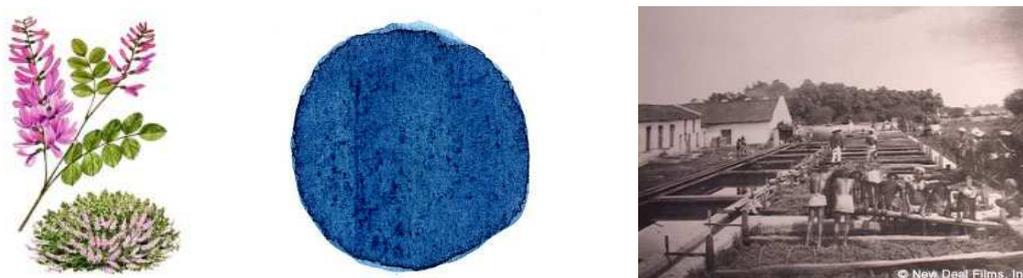
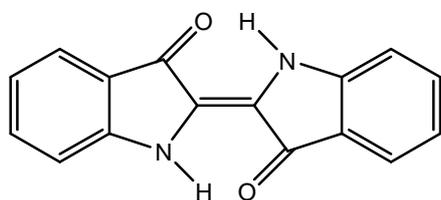
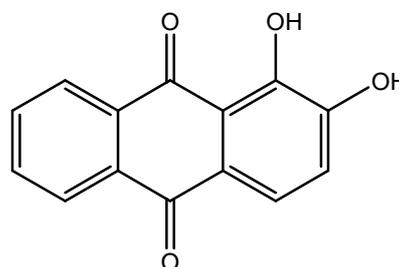


Figura 1. Planta do índigo, pigmento e plantação¹



1 - Índigo

2,2'-Bis(2,3-di-hidro-3-oxoindolilideno)

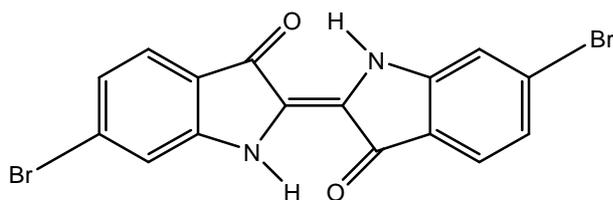


2 - Alizarina

1,2-di-hidroxi-9,10-antracenediona



Figura 2. *Murex brandaris*

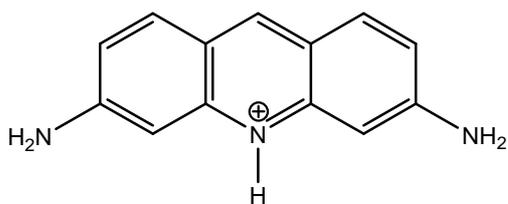
**3 - Púrpura Real**

6,6'-dibromoindigo

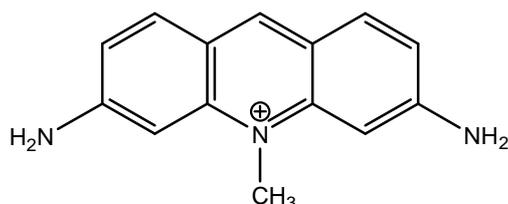
A fermentação das uvas para produzir álcool etílico e as propriedades alcoólicas do vinho são descritas na Bíblia e, provavelmente, eram já conhecidas anteriormente¹. No entanto, a Química Orgânica como ciência tem menos de 200 anos e a produção industrial de compostos orgânicos teve o seu grande desenvolvimento durante o século XX. Entre os vários ramos da Indústria Química podem salientar-se a produção de corantes e fármacos, compostos que aparentemente se encontram em extremos opostos do espectro industrial, mas que no fundo estão intimamente ligados. Apesar da síntese química tradicional nas duas áreas ser fundamentalmente diferente, assim como os conceitos no que diz respeito à pureza do produto, a relação aparece quando se constata que a Indústria Farmacêutica surge a partir da indústria dos corantes exactamente antes da II Guerra Mundial².

Entre os pioneiros que, no século XIX, participaram num projecto de desenvolvimento de drogas baseadas em corantes encontra-se Christian Gram que introduziu um método de diferenciação de bactérias utilizando corantes sintéticos. A classificação em *gram positivas* e *gram negativas*, utilizada até hoje, baseia-se na diferente coloração apresentada pelas bactérias que resulta de grandes diferenças na estrutura da parede celular. Entre os cientistas que desenvolveram trabalhos nesta linha está Paul Ehrlich que, no final do século XIX, com um trabalho verdadeiramente revolucionário, verificou que certos corantes apresentam selectividade para os organismos patológicos. A partir deste trabalho de corantes e pigmentos surgem os termos “toxicidade selectiva” e “quimioterapia”².

Durante o século XX, nomeadamente durante as I e II Guerras Mundiais, utilizaram-se tratamentos com drogas derivadas de corantes, entre os quais se destacaram dois derivados da acridina, proflavina **4** e acriflavina **5**, que se revelaram fundamentais no tratamento dos ferimentos de guerra com resultados muito melhores que os obtidos com os antissépticos conhecidos na época. Estes tratamentos eram referidos como “dye therapy”.

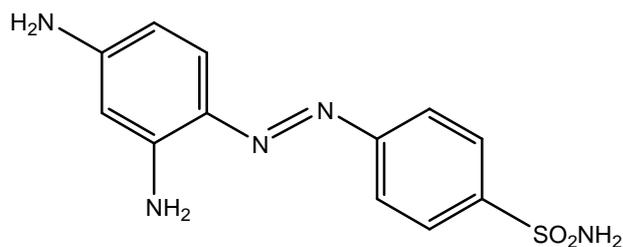


4 - Proflavina



5 - Acriflavina

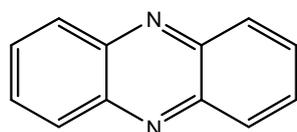
Ehrlich e seus seguidores fizeram ainda pesquisas no âmbito do tratamento de doenças tropicais com corantes e coloração selectiva, particularmente com corantes azo e seus derivados. Um dos exemplos mais marcantes destes corantes usados em terapia deve ser seguramente o *Prontosil*, o primeiro antibiótico antibacteriano disponível comercialmente, que foi desenvolvido pela equipa de investigação dos Laboratórios Bayer. A descoberta e o desenvolvimento deste composto, reconhecido como pro-fármaco para as sulfamidaz, e o seu lançamento sob forma clínica iniciou a chamada “Idade de Ouro dos Antibióticos” alguns anos antes do lançamento da penicilina². A sulfamidocrisoidina (KI-730) **6** foi inicialmente sintetizada por Joseph Clarer e Fritz Mietzsch sendo reconhecida como eficaz, para o tratamento de algumas infecções bacterianas importantes em ratos, por Gerhard Domagk, que subseqüentemente recebeu o Prémio Nobel de Medicina, em 1939, por este trabalho. O *Prontosil* resultou de cinco anos de investigação e testes envolvendo milhares de compostos relacionados com os corantes azo. Este medicamento foi utilizado em larga escala no tratamento de várias doenças bacterianas.

6 (*Prontosil rubrum*)

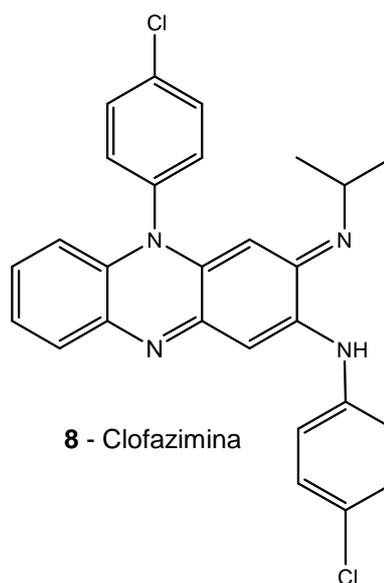
Como curiosidade pode referir-se que o impressionante sucesso clínico deste medicamento, com divulgação por toda a Europa, começou principalmente a partir da notícia da cura, em 1936, de Franklin Delano Roosevelt Jr., filho do então Presidente dos Estados Unidos Franklin Roosevelt, com injeções hipodérmicas de *Prontosil* e doses orais de um modificado de nome *Protolyn*.

Apesar de toda a notoriedade alcançada, Domagk não foi autorizado pelo regime Nazi alemão a deslocar-se a Estocolmo para receber o prémio. Só em 1947 recebeu a medalha, mas em virtude do tempo decorrido não pôde receber o prémio monetário³.

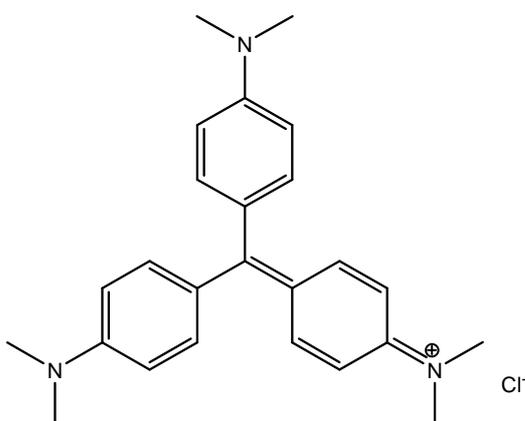
Nos dias de hoje com os problemas decorrentes do uso indiscriminado de antibióticos, nomeadamente a resistência microbiana às drogas e as mutações das espécies, os investigadores tentam encontrar respostas fora das drogas tradicionais o que inclui a utilização de corantes. Além da Terapia Fotodinâmica utilizada já em vários campos, oftalmológicos, oncológicos e outros, há tentativas de utilização de corantes no combate a outras patologias tais como: a doença de Hensen (lepra) com corantes de fenazina **7** e clofazimina **8**; o MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) no Japão com o violeta de cristal **9**; a malária com azul-de-metileno **10** e derivados da acridina e mais recentemente a doença de Creutzfeld-Jacob (nova variante) conhecida como “doença das vacas loucas” com corantes azo².



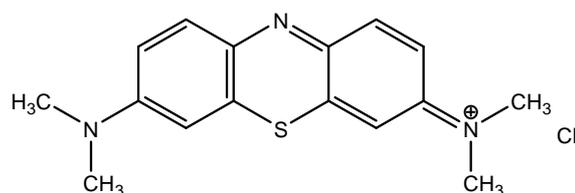
7 - Fenazina



8 - Clofazimina



9 - Violeta de cristal (*methyl violet 10B*)



10 -Azul de metileno

A utilização dos corantes com fins medicinais tem, no entanto, alguns problemas associados. Tendo os corantes como propriedades óbvias a sua capacidade para dar cor, a coloração da pele dos doentes sujeitos a tratamentos com estes produtos aparece como primeiro inconveniente tendo ainda de se considerar sempre a possível toxicidade destes produtos. Estes inconvenientes dependem das propriedades físicas e químicas dos corantes e ainda da concentração em que são utilizados e da forma de administração.

Na procura de novas drogas mais eficazes no combate às doenças os investigadores tentam encontrar análogos que, mantendo a actividade característica, não se apresentem prejudiciais pois o tratamento de doenças que são ainda hoje responsáveis por uma grande mortalidade, aliada à urgência de ultrapassar o problema da resistência bacteriana aos medicamentos, justifica uma investigação aturada neste campo. Um dos aspectos importantes desta investigação é a procura de compostos que apresentem, simultaneamente, uma maior eficácia do produto activo e uma menor toxicidade para protecção dos organismos saudáveis.

Diversos compostos, nomeadamente *N*-glicoconjugados fluorescentes permitem aliar as propriedades promissoras dos corantes com biomoléculas que poderão ser, pelas suas características, a parte fundamental de novos medicamentos no que diz respeito à assimilação, eliminação pelo organismo e baixa toxicidade.

2 - BIOMOLÉCULAS

Todas as formas de vida são materiais. Isto significa que todos os organismos vivos são constituídos por substâncias químicas orgânicas e inorgânicas⁴.

Apesar da grande diversidade dos organismos vivos e da sua complexa constituição celular, todos eles são compostos pelo mesmo tipo de substâncias que realizam os mesmos tipos de funções gerais.

As substâncias orgânicas que entram na constituição dos seres vivos são normalmente classificadas em quatro grandes grupos: proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono e lípidos. Além destas biomoléculas há uma substância inorgânica, fundamental para a vida e que ocorre em todos os organismos vivos, que é a água.

Apesar de todas as biomoléculas serem importantes as proteínas e os ácidos nucleicos destacam-se pois transportam a informação que determina o que acontece na célula².

2.1 – PROTEÍNAS

As proteínas são constituintes essenciais de todos os organismos vivos uma vez que estão envolvidas numa grande diversidade de funções, tais como regulação do metabolismo, transporte, defesa e catálise, sendo além disso materiais estruturais de todos eles.

A diversidade funcional exibida por esta classe de biomoléculas está directamente relacionada com as possibilidades de combinação das unidades monoméricas que as constituem, os aminoácidos⁵.

2.1.1– Aminoácidos

Os vinte aminoácidos fundamentais encontrados normalmente nas proteínas têm todos a mesma estrutura geral. São moléculas com um átomo de carbono central, denominado carbono α , ao qual estão ligados um grupo amina, um grupo carboxilo, um átomo de hidrogénio e um radical, cadeia lateral, que determina as diferentes características de cada aminoácido. A excepção a esta estrutura comum é a prolina com um grupo amina secundário formado por um anel fechado entre a cadeia lateral e o átomo de azoto da amina. Em virtude desta constituição a prolina confere rigidez à cadeia peptídica porque fica impedida a rotação em torno do carbono α .

Além da função primária como constituintes das proteínas os aminoácidos desempenham ainda várias funções biológicas. Assim, por exemplo, a glicina, a serotonina e a melatonina são neurotransmissores e a tiroxina é uma hormona. São precursores de moléculas complexas componentes dos nucleótidos e dos ácidos nucleicos e podem ainda actuar como intermediários metabólicos.

Em virtude da sua estrutura poder conter um carbono assimétrico, o carbono α , os aminoácidos podem apresentar estereoisómeros, com excepção da glicina. Geralmente os estereoisómeros dos aminoácidos são designados por D e L, por analogia com a estrutura do D-gliceraldeído e do L-gliceraldeído (fig. 3)

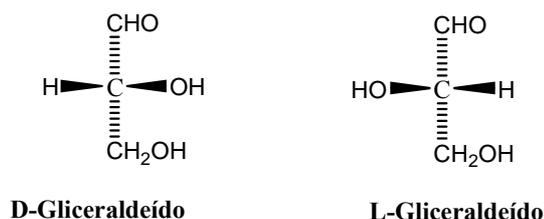


Figura 3

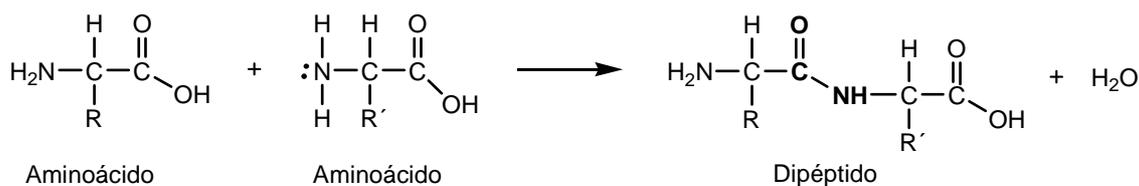
Nos organismos vivos é frequente encontrar-se apenas uma das formas isoméricas das moléculas assimétricas e, por exemplo, os aminoácidos constituintes das proteínas são, com raras exceções, L-aminoácidos. A quiralidade tem um efeito profundo nas propriedades estruturais e funcionais das biomoléculas. Uma evidência disto é o facto das enzimas, sendo moléculas quirais, somente se ligarem a substratos numa das formas enantioméricas. Por exemplo, as proteases, enzimas que degradam as proteínas por hidrólise da ligação peptídica, não conseguem degradar polipéptidos sintetizados em laboratório compostos por D-aminoácidos.

Os grupos funcionais das moléculas orgânicas determinam o tipo de reacção em que essas moléculas participam. Os aminoácidos, com os seus grupos carboxilo e amino, podem intervir em numerosas reacções químicas. Entre estas é de salientar a formação da ligação peptídica que é a base da formação dos polipéptidos, polímeros lineares de aminoácidos.

2.1.2 – Péptidos

Os péptidos são moléculas de constituição semelhante à das proteínas mas mais pequenas. Os termos péptido e proteína são usados na literatura um pouco indiscriminadamente, sendo normalmente aceite que proteína é uma macromolécula incorporando cerca de 5000 ou mais resíduos de aminoácido.

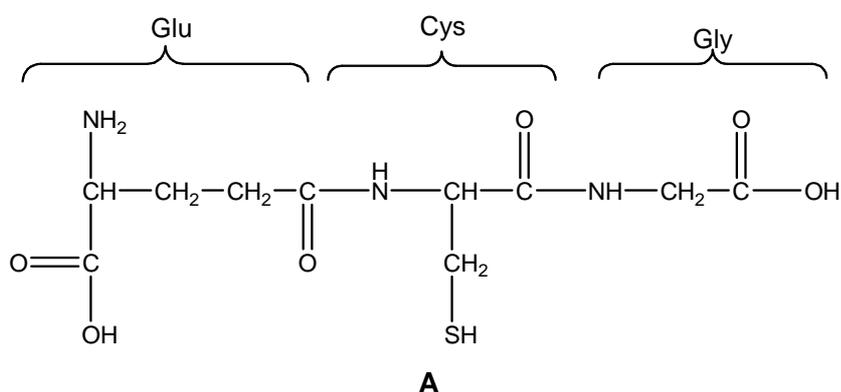
Designa-se por polipéptido qualquer cadeia linear simples de aminoácidos, ligados entre si por ligação peptídica, que se estabelece entre o grupo carboxilo terminal de um aminoácido e o grupo amino terminal de outro aminoácido, com a libertação de uma molécula de água (esquema 1).



Esquema 1

Uma vez que as ligações entre os resíduos de aminoácidos são ligações simples era previsível que os péptidos apresentassem variações de conformação pela rotação em torno dessas ligações. No entanto verificou-se que a ligação peptídica é rígida e planar em virtude da ligação C-N entre os aminoácidos apresentar características parciais de dupla ligação⁵. Por convenção, o aminoácido com o grupo amino livre é chamado resíduo N-terminal e é escrito à esquerda, e o que apresenta o carboxilo livre é indicado como C-terminal e aparece à direita.

Os polipéptidos têm estruturas tridimensionais bem definidas que são consequência directa da sequência dos aminoácidos constituintes. O número de resíduos constituinte de um péptido é, por vezes, designado por um prefixo – por exemplo, tripéptido, três resíduos. Para simplificar a representação das estruturas dos péptidos desenvolveu-se um sistema de fórmulas abreviadas em que cada aminoácido tem um código de três letras, derivado do seu nome trivial. A simplificação assim obtida é ilustrada na figura 4 em que se representa a estrutura completa **A** e a abreviatura **B** da glutatona⁶.



B γ -Glu-Cys-Gly

Figura 4. Glutaciona

Os péptidos, com estruturas menos complexas que as das proteínas, têm actividades biológicas importantes, pois intervêm na regulação de funções tão diversificadas como peso corporal (apetite e assimilação), pressão sanguínea e sensibilidade à dor. Assim, por exemplo, a glutathione (γ -Glu-Cys-Gly) está envolvida na síntese do ADN sendo além disso um importante antioxidante em virtude do poder redutor do grupo S-H da cisteína; a oxitocina (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂ (cisteínas ligadas entre si por uma ligação dissulfureto) é responsável pela contracção do útero durante o trabalho de parto e a produção de leite; a vasopressina, também chamada hormona antidiurética, de estrutura semelhante à oxitocina, mas onde a isoleucina é substituída por fenilalanina e a leucina por arginina, estimula a retenção de água pelo rim e, sendo um vaso constrictor, aumenta a pressão arterial; a neuropeptina Y (NPY) e a galanina são estimulantes do apetite estando, portanto, ligadas ao problema da obesidade que é, hoje em dia alvo de muitos estudos⁵.

A procura de péptidos e proteínas é já elevada e cresce todos os dias. As fontes naturais fornecem uma grande variedade mas as quantidades isoladas são por vezes minúsculas. Assim a síntese química peptídica é fundamental para o desenvolvimento em campos relevantes como a medicina, a engenharia genética e a biologia molecular⁶.

2.1.3– Síntese peptídica

Como foi referido anteriormente, a obtenção de péptidos de fontes naturais apresenta limitações tanto no que diz respeito à pureza dos produtos obtidos como à quantidade isolada de cada um deles. Assim, a síntese química de péptidos possibilita a caracterização dos compostos, o estudo dos mecanismos moleculares de actuação desses compostos e o desenvolvimento de péptidos miméticos. Estes são obtidos, normalmente, a partir da modificação de péptidos existentes com vista à alteração da estabilidade ou actividade biológica da molécula o que desempenha um papel importante na pesquisa de compostos para uso terapêutico⁷.

A formação da ligação amida, que é a etapa chave na síntese peptídica, requer a activação do grupo carboxilo. Como os aminoácidos têm, pelo menos, um grupo amino e um grupo carboxilo, podem participar em reacções de acilação e qualquer dos compostos pode ser acilado ou actuar como reagente de acilação, conduzindo a uma mistura de polipéptidos. Para evitar esta policondensação usam-se aminoácidos protegidos, deixando activos apenas os grupos envolvidos na reacção desejada.

A síntese peptídica envolve quatro etapas consecutivas fundamentais:

- 1 – Protecção dos grupos funcionais;
- 2 – Activação do grupo carboxilo do componente *N*-protegido;
- 3 – Formação da ligação peptídica;
- 4 – Remoção dos grupos protectores.

Assim, para sintetizar uma determinada cadeia peptídica, é necessário escolher a estratégia de síntese, seleccionar os grupos protectores necessários e o método de acoplamento mais indicado.

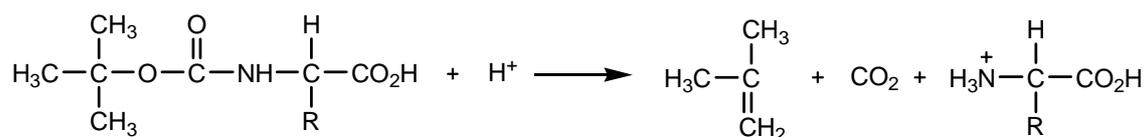
Os grupos protectores têm como função impedir a formação de ligações indesejáveis durante a reacção e para tal devem apresentar características específicas, tais como: relativa facilidade de introdução na molécula, estabilidade nas condições de formação da ligação amida e durante a purificação dos produtos sintetizados, baixa tendência para originar fenómenos de racemização e, finalmente, devem ser facilmente removidos no final do processo de síntese, em condições que não causem efeitos adversos na restante estrutura nomeadamente mantendo a integridade dos centros quirais⁶.

Os grupos protectores utilizados para bloquear a função amina dos aminoácidos e péptidos podem ser, genericamente: sais, grupos acilo, uretano, alquilo e arilo.

Os grupos uretano são dos mais usados em síntese peptídica pois são efectivos na protecção contra a acilação e suprimem a racemização. Entre estes podem destacar-se o benziloxicarbonilo (grupo Z) e o *terc*-butoxicarbonilo (grupo Boc).

A clivagem do grupo Z pode ser feita por vários métodos mas a hidrogenólise e reacção com brometo de hidrogénio em solução são os mais usados.

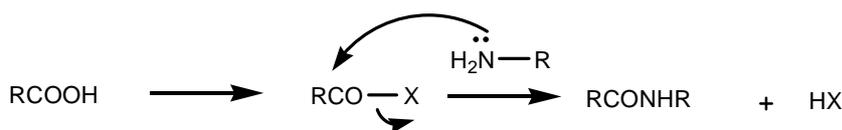
O grupo Boc é resistente à hidrogenação catalítica mas é rapidamente removido com ácido. A clivagem do grupo Boc em meio ácido envolve a formação de catiões *terc*-butilo que se convertem em isobuteno com a saída de um protão (esquema 2)⁸. A presença destes catiões pode facilitar a ocorrência de reacções secundárias indesejáveis o que pode ser evitado pela adição de compostos que reajam rapidamente com os catiões durante a sua formação.



Esquema 2

A protecção da função carboxilo tem como objectivo não somente impedir a reacção do grupo carboxilo com o agente acilante como também aumentar a solubilidade dos reagentes e facilitar a purificação dos produtos. Esta protecção é usualmente conseguida por esterificação ou através da formação de sais, sendo no entanto a esterificação o método mais utilizado. Os ésteres são normalmente obtidos por reacção entre o derivado do aminoácido e o álcool, em presença de um ácido como catalisador. A remoção dos grupos éster faz-se por hidrólise básica como, por exemplo, os ésteres etílicos e metílicos, ou por hidrólise ácida noutros casos como com o *terc*-butilo que, sendo mais sensível à acção dos ácidos, pode ser removido com ácido trifluoroacético em diclorometano⁹.

Tal como foi referido anteriormente a etapa subsequente à protecção dos grupos funcionais é a formação da ligação amida, que envolve a activação da função carboxilo do aminoácido *N*-protegido, seguido do ataque nucleofílico do componente amino do outro aminoácido (ou péptido) (esquema 3).



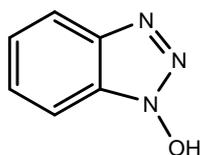
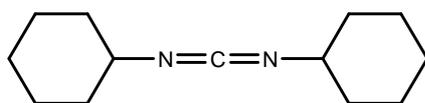
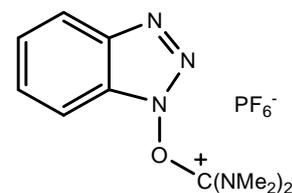
Esquema 3

A activação do grupo carboxilo pode ser conseguida pela utilização de reagentes de acoplamento apropriados. Entre esses reagentes podem referir-se: haletos de acilo, azidas, anidridos, ésteres activos, carbodiimidas, sais de fosfónio, sais de urónio, entre outros. Nos últimos anos têm sido desenvolvidos novos reagentes de acoplamento o que tem permitido um avanço significativo nas reacções de síntese de péptidos. Um dos aspectos importantes foi a descoberta de supressores de racemização. A racemização pode ocorrer no aminoácido C-terminal no decurso da

reação de acoplamento devido à ionização do hidrogénio- α e a formação de uma oxazolinona intermédia. Com um reagente que impeça esta racemização e outras reacções laterais pode garantir-se a integridade óptica dos centros quirais¹⁰.

Todos estes reagentes apresentam, como é lógico, vantagens e desvantagens sendo no entanto importante a consideração de determinados factores como as reacções laterais, a possibilidade de racemização e o custo.

Entre os agentes de acoplamento mais utilizados estão as carbodiimidas que apresentam a vantagem de serem muito simples de utilizar e de baixo custo. Apresentam, no entanto, o inconveniente da ocorrência de reacções secundárias pois os intermediários formados durante a reacção, as *O*-acilisoureas, são muito reactivos. As ureias que se formam como subproduto apresentam também alguns problemas de solubilidade. Para combater estes problemas foi introduzido, com sucesso, o aditivo 1-hidroxibenzotriazole (HOBt) **11** que juntamente com a *N,N'*-diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) **12** faz diminuir a racemização e aumenta a velocidade da reacção¹⁰.

**11 - HOBt****12 - DCC****13 - HBTU**

Um outro método muito utilizado é o do anidrido misto, com uma reacção muito limpa, mas que está limitado à utilização de péptidos com glicina ou prolina no C-terminal para evitar a racemização.

Actualmente os sais de fosfónio e amónio/urónio, derivados do hidroxibenzotriazole, são muito utilizados pois revelaram-se poderosos reagentes de acoplamento e desde a introdução, em 1978, do hexafluorofosfato de *O*-benzotriazolil-*N,N,N',N'*-tetrametilurónio (HBTU) **13**, o primeiro sal de urónio, que muitos análogos têm sido preparados e investigados, tendo-se revelado muito eficientes.

Em termos estratégicos, a síntese peptídica pode ser sequencial ou convergente. A síntese sequencial consiste em partir de um aminoácido ao qual são ligados sucessivamente outros aminoácidos de modo a formar-se a cadeia peptídica desejada. Com esta estratégia corre-se o risco de poder ocorrer racemização no

resíduo C-terminal excepto quando esse resíduo é glicina ou prolina. A síntese convergente envolve a preparação de diversos segmentos do péptido, seguida do seu acoplamento de modo a dar origem ao produto desejado. Nesta estratégia reduz-se o risco de racemização exigindo, no entanto, uma escolha cuidada dos grupos protectores.

Na síntese de péptidos pequenos (contendo cerca de 20-30 aminoácidos) a estratégia mais adequada é em fase sólida. Os péptidos maiores e as proteínas devem ser sintetizados por uma abordagem convergente, envolvendo a síntese de segmentos peptídicos protegidos em fase sólida, e a combinação destas unidades em solução¹¹.

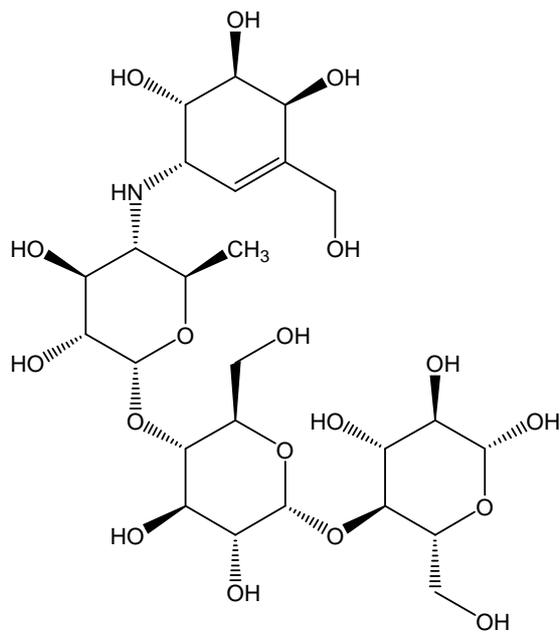
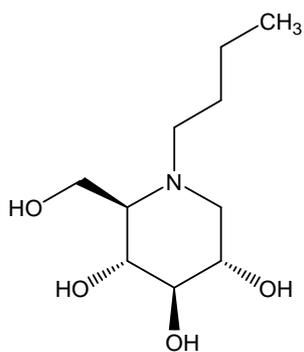
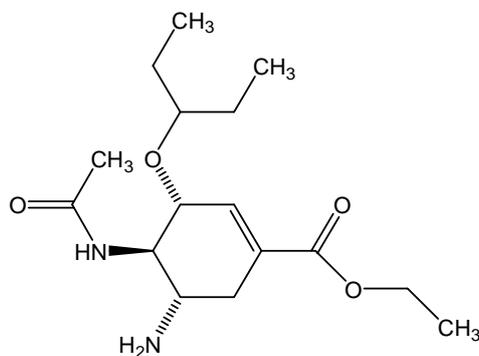
Uma área em crescimento contínuo é a dos compostos peptidomiméticos, onde tem sido desenvolvido um trabalho intenso nos últimos anos vocacionado para a síntese de aminoácidos não naturais, como primeira etapa na introdução de elementos que levem à obtenção de compostos miméticos muito diversos e com capacidade para gerar estruturas de ordem elevada que possam melhorar as propriedades catalíticas e de reconhecimento dos péptidos naturais, isto é, que possam actuar como novas drogas que ultrapassem as suas limitações farmacológicas¹².

2.2– HIDRATOS DE CARBONO

A palavra açúcar é associada, normalmente, a alimentação mas a superfície de qualquer célula do nosso corpo é revestida com um grande número de moléculas de açúcares assim como de proteínas que permitem às células comunicar com outras células e invadir agentes patogénicos¹³.

Sabe-se actualmente que os hidratos de carbono desempenham um papel fundamental no processo de reconhecimento biológico. Sendo moléculas com vários grupos hidroxilo, têm uma grande capacidade para formar pontes de hidrogénio que são uma característica de compostos complexos formados pela ligação de hidratos de carbono a proteínas¹⁴.

A síntese de açúcares miméticos é um domínio importante da glicoquímica e levou ao desenvolvimento de fármacos¹⁵ tais como o *Glucobay*TM **14** (acarbose)^a, *Zavesca*TM **15** (miglustato: 1-butil-2-(hidroximetil)piperidina-3,4,5-triol)^b ou *Tamiflu*TM **16** (oseltamivir: (3*R*,4*R*,5*S*)-4-acetilamino-5-amino-3-(1-etilpropoxi)-1-ciclo-hexeno-1-carboxilato de etilo)^c.

**14 - Acarbose****15 - Miglustato****16 - Oseltamivir**

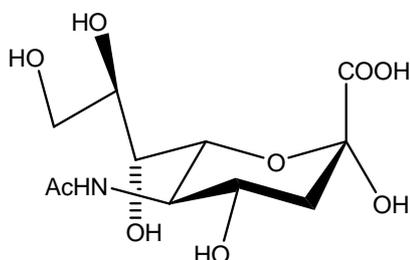
a - fármaco inibidor da α -glicosidase, enzima entérica que liberta glucose de hidratos de carbono maiores, usado no tratamento de diabetes *mellitus*

b - inibidor da enzima glicocerebrosidase, utilizado no tratamento da doença de Gaucher

c - antiviral utilizado no tratamento e profilaxia da *Influenza* A e B, inibidor da neuraminidase

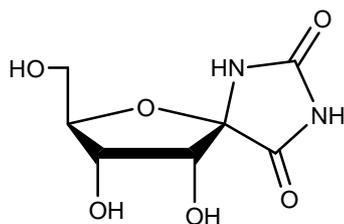
Como foi referido anteriormente, os compostos peptidomiméticos revestem-se de particular importância. Os aminoácidos derivados de hidratos de carbono (CAAs-carbohydrate amino acids) têm mostrado alto potencial como modelos rígidos na indução de conformações específicas em péptidos miméticos. As moléculas destes compostos combinam as características estruturais dos aminoácidos com as dos hidratos de carbono originando fragmentos polifuncionais e altamente substituídos¹⁶.

Entre os CAAs identificados na natureza pode referir-se o ácido siálico, o mais abundante e que ocorre em muitos polissacáridos, glicoproteínas e glicolípidos em animais e bactérias. O ácido siálico é um termo genérico para os derivados *N* ou *O* substituídos do ácido neuramínico, um monossacárido com uma cadeia de nove carbonos. É também o nome do membro mais comum deste grupo o ácido *N*-acetilneuramínico **17**¹⁷.

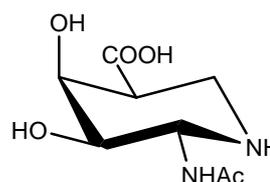


17- ácido *N*-acetilneuramínico

O derivado de hidantoina **18** e a siastatina B **19** são derivados do ácido siálico.



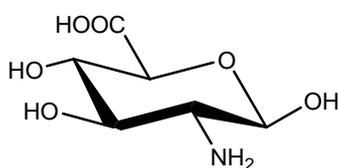
18 - Hidantocidina



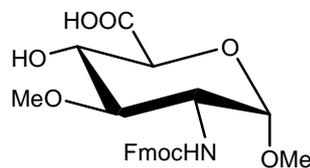
19 - Siastatina B

O primeiro CAA a ser sintetizado foi o ácido glucosaminurónico **20**, na década de 50, na tentativa de identificar a estrutura dos componentes da parede celular bacteriana e sintetizar análogos. A síntese destes compostos parte normalmente de monossacáridos disponíveis comercialmente tais como a glucose, a glucosamina ou a galactose, introduzindo subsequentemente as funções amina e ácido carboxílico.

Pode afirmar-se que os CAAs são uma importante classe de compostos com potencial importância biológica a vários níveis. Em particular os δ -aminoácidos derivados de hidratos de carbono têm sido investigados como peptidomiméticos promissores (por exemplo **20** e **21**)¹⁶.



20 - Ácido glucosaminurónico



21- Ácido 1,3-dimetil-2-desoxi-2-N-Fmoc-glucurónico

Os hidratos de carbono são moléculas muito abundantes, por vezes mais acessíveis que o petróleo que é, como se sabe, a matéria-prima mais utilizada na indústria química e particularmente em química orgânica¹⁸.

Considerando a política económica ligada ao petróleo, ao seu preço crescente, e as diversas crises que têm vindo a acontecer nas últimas décadas, é importante poder utilizar outros recursos que se insiram também nas actuais preocupações com o ambiente.

Atendendo ao facto da diminuição irrevogável das reservas de materiais fósseis e à pressão crescente do impacto ambiental provocado pela utilização desses materiais, é urgente a transição do sistema actual de produção industrial baseada no gás natural e no petróleo para um sistema de utilização de biomateriais renováveis. No entanto, existem vários obstáculos a esta viragem, tanto económicos como tecnológicos, pois os materiais fósseis estão ainda disponíveis a preço reduzido e os processos para a sua utilização em química orgânica estão excessivamente bem desenvolvidos e são basicamente diferentes dos requeridos para a transformação de hidratos de carbono em produtos com perfil de aplicação industrial. Esta situação deriva da complexidade da estrutura química dos materiais como a biomassa terrestre, com constituintes tão diversos como açúcares, aminoácidos, lípidos e biopolímeros tais como celulose, hemiceluloses, quitina, lenhina e proteínas. De longe a mais importante classe de compostos orgânicos, em termos de quantidade produzida, é a dos hidratos de carbono, nomeadamente os polissacáridos, ainda que a sua utilização não alimentar esteja confinada às indústrias têxtil, de papel e de revestimentos¹⁹.

Os hidratos de carbono têm várias vantagens sobre o petróleo, além das relacionadas com os custos e a poluição, de funcionalidade, quiralidade e variações estruturais.

O factor essencial da actual evolução de uma “química industrial” aponta no desenvolvimento de caminhos para a obtenção de algumas moléculas gerais flexíveis e com larga área de aplicabilidade. Isto corresponde, na tradicional indústria baseada no petróleo, a compostos como benzeno, etileno e acetileno¹⁸. No caso dos hidratos de carbono os materiais disponíveis que podem servir de base a processos químicos industriais são as unidades constituintes dos polissacáridos, glucose (celulose e amido), frutose (inulina), xilose e sacarose¹⁹.

Assim tem-se desenvolvido processos de “cracking” de obtenção dessas moléculas a partir dos hidratos de carbono que possam eventualmente tornar-se na base essencial da indústria química. Um dos aspectos em que estes compostos têm uma potencial vantagem é o da quiralidade que se tem revelado como um dos principais objectivos no desenvolvimento da tecnologia química, especialmente em áreas como a síntese de fármacos, onde o uso de intermediários opticamente puros e a conservação da integridade dos centros quirais em transformações subsequentes tem apresentado constrangimentos técnicos e económicos importantes no desenvolvimento de novos compostos, potenciais candidatos a fármacos.

Até há alguns anos a abordagem quiral foi dominada por métodos envolvendo aminoácidos, que são moléculas de estrutura simples e facilmente manipuladas, sendo um importante ponto de partida na biotecnologia. Em pesquisas recentes os hidratos de carbono têm-se revelado como os compostos mais promissores no meio quiral até por serem os constituintes maioritários de muitas moléculas dos sistemas vivos. Ocorrem em polímeros tais como amido, pectina, celulose e quitina. São componentes chave do ADN e do ARN; podem representar uma grande proporção na composição de algumas glicoproteínas e são constituintes fundamentais da parede celular de bactérias e outros microorganismos, e podem ainda ser moléculas mensageiras nos processos de armazenagem de energia nas células na forma de ATP, GTP, amido e glicogénio¹⁸.

As principais vantagens da utilização destes compostos como matéria-prima são o baixo custo, a abundância e a facilidade com que podem ser obtidos em estado puro e em quantidades apreciáveis, nomeadamente maltose, sacarose, lactose e

glucose. A elevada solubilidade em água de muitos destes compostos, é decididamente um ponto a favor na perspectiva, actualmente muito importante, da “química verde”. Estes factores são as vantagens-chave que os hidratos de carbono oferecem ao desenvolvimento de uma química quiral relevante comercialmente.

Há no entanto alguns obstáculos à utilização dos hidratos de carbono em síntese estereosselectiva. Em primeiro lugar a solubilidade limitada em solventes próticos muito polares restringe o espectro de transformações químicas em que podem intervir. A alta densidade e redundância dos grupos funcionais podem também ser uma desvantagem. Num hidrato de carbono típico quase todos os carbonos dos anéis são centros assimétricos e muitos dos grupos funcionais são hidroxilos o que leva a que a especificidade e selectividade das reacções seja muito difícil de conseguir.

2.3– GLICOPÉPTIDOS

A transferência de informação é um processo fundamental da vida e central para todos os sistemas celulares. Duma perspectiva biológica, a informação tem de ser intracelular e intercelular e passa de geração em geração. Os três maiores biopolímeros, proteínas, ácidos nucleicos e glicoconjugados, são os principais responsáveis pela transferência de informação, mas enquanto que a importância biológica dos primeiros está há muito tempo estudada, os oligossacáridos na forma de glicoconjugados estão menos bem compreendidos e só nos últimos anos têm sido alvo de maior interesse²⁰.

Os glicopéptidos são, como o nome indica, moléculas resultantes da ligação de péptidos a hidratos de carbono e que, conseqüentemente, conjugam características desses dois grupos de compostos.

O interesse pelos glicopéptidos aumentou a partir do reconhecimento da sua importância nos mais diversos processos bioquímicos como regulação do crescimento das células, ligação a estas de agentes patogénicos, comunicação intercelular e metástases²¹.

Os hidratos de carbono alteram muitas vezes a estrutura e função do péptido/proteína, pois ligando-se na superfície desta podem servir como elemento de reconhecimento quer a nível molecular, entre moléculas e células, ou a nível

intercelular e o seu papel pode variar durante o tempo de vida da célula. Uma glicosilação defeituosa pode modificar o reconhecimento intracelular e tem sido associada a distúrbios sérios incluindo doenças auto-imunes, infecções e cancro²². Estruturas específicas de hidratos de carbono têm sido identificadas como marcadores para certos tipos de tumores enquanto outras apresentam pontos de ligação para patogenias víricas e bacterianas²⁰.

Para reconhecer o papel dos glicopéptidos em biologia e utilizar o seu comportamento para fins médicos é necessário identificar em primeiro lugar a estrutura detalhada dos glicoconjugados em sistemas biológicos representativos²³. A dificuldade desta identificação passa pelas quantidades reduzidas de material disponível na natureza e pela complexidade de separação dos seus constituintes, pela sua heterogeneidade e diversidade, nomeadamente, na extensão de glicosilação.

Destes factos resulta a importância da síntese de compostos miméticos potencialmente muito úteis porque rivalizam com os compostos naturais, mas com boa estabilidade. Não se pode, no entanto, esquecer que muitos dos compostos preparados por síntese química não têm contrapartida na natureza o que não invalida a sua potencial utilidade na compreensão dos compostos naturais.

O desenvolvimento sofrido pela síntese e aplicação dos glicoconjugados foi determinado pelo comportamento ubíquo destes compostos na natureza, aliado à convicção partilhada pelos cientistas de que a manipulação dos glicoconjugados poderá, a seu tempo, permitir um controlo apurado dos factores de comunicação biológica²⁴.

Desde a publicação da primeira revista sobre glicopéptidos, em 1939, um longo caminho foi percorrido sendo particularmente sensível a evolução ocorrida durante os últimos anos do século XX. Este foi um período durante o qual o objectivo da química da glicosilação mudou. No início a importância dos açúcares foi dirigida para métodos de ligação entre eles. O facto de esta química ter atraído a atenção de muitos investigadores atesta a riqueza da química dos hidratos de carbono.

Todavia sentem-se ainda algumas dificuldades neste campo e pode dizer-se que a química da glicosilação não é uma rotina acessível em geral. Durante o século XX catalogaram-se muitos métodos de síntese de glicósidos, mas quase todos partem

de uma ligação comum com a química de Fisher e Koenigs e Knorr que data do final do século XIX²⁵.

A O e a N- glicosilação são modificações importantes pois, tal como foi referido, influenciam as propriedades dos péptidos e das proteínas tais como a solubilidade, estabilidade térmica e proteolítica assim como a conformação e a flexibilidade. Afecta ainda as funções biológicas das proteínas. Estima-se que mais de 50% das proteínas humanas são glicosiladas. Isto sugere um enorme potencial dos glicoconjugados na investigação de novos fármacos, particularmente porque a unidade açúcar exhibe propriedades ligantes reforçadas. Um dos campos onde é importante compreender o papel dos oligossacáridos é na interacção com os anticorpos pois isso serve de base na procura de vacinas ou inibidores de processos patológicos²⁶.

Os glicoconjugados isolados de fontes naturais ou produzidos por tecnologia genética são micro-heterogéneos. As diferentes propriedades exibidas por cada componente nessas misturas dificulta a compreensão da função exacta nas relações estrutura/actividade. Consequentemente têm sido desenvolvidas diversas metodologias na obtenção de miméticos homogéneos e estáveis quer pela via tradicional, convergente ou por blocos, quer pela via enzimática²⁷.

A síntese típica de glicoconjugados adopta uma de duas estratégias. A primeira é a formação da ligação ao hidrato de carbono, numa primeira fase, dando origem a fragmentos glicosilados, por exemplo com um aminoácido, que sejam posteriormente acoplados originando o glicoconjugado pretendido. Os aminoácidos ligados quer a monossacáridos quer a oligossacáridos podem ser utilizados em síntese de glicopéptidos tanto em solução como em fase sólida. No entanto, em casos em que as reacções de acoplamento envolvem fragmentos volumosos, podem originar baixos rendimentos. Para evitar este problema é por vezes melhor estratégia formar a ligação amida entre um aminoácido e um açúcar relativamente simples e, em seguida, expandir a parte do hidrato de carbono por síntese química ou enzimática²⁸. A segunda estratégia é a formação da ligação ao hidrato de carbono como etapa final directamente no péptido ou proteína desejados.

Dada a instabilidade que pode estar associada com a ligação e os requisitos para protecção, tanto no péptido como no açúcar, que devem ser considerados no uso de fragmentos glicosilados, é claro que a segunda estratégia têm-se revelado frequentemente como a opção mais atractiva.

Nesta abordagem tenta-se a máxima convergência com a construção, em primeiro lugar, de um glicósido complexo e então a sua incorporação é feita directamente no péptido.

Esta técnica tem sido seguida por vários investigadores com bons resultados o que demonstra que o método da glicosilação directa do péptido promete ser consensual na síntese de glicopéptidos²⁸.

3 - CORANTES FLUORESCENTES

O fenómeno da fluorescência encontra-se amplamente descrito na literatura, sendo uma consequência das transições electrónicas entre estados excitados e o estado fundamental. Um aspecto muito importante dessas transições electrónicas é o modo como a energia de excitação é perdida. A fluorescência e a fosforescência são exemplos da perda de energia por emissão espontânea de uma radiação. Na fluorescência a radiação emitida cessa imediatamente a seguir à radiação de excitação se extinguir, o que sugere que este fenómeno é uma conversão imediata da luz absorvida na luz emitida²⁹.

Quando uma molécula absorve luz é excitada de níveis vibracionais mais baixos, no seu estado fundamental (S_0) para uma variedade de níveis vibracionais no primeiro estado excitado de singlete (S_1^*). No caso dos corantes orgânicos é geralmente uma transição electrónica $\pi \rightarrow \pi^*$. A fluorescência ocorre se a molécula emite luz quando reverte do estado excitado para os níveis vibracionais do estado fundamental. Como consequência da dissipação de energia no estado excitado a emissão fluorescente ocorre a comprimentos de onda maiores que a absorção. Assim todos os materiais fluorescentes absorvem luz a um dado comprimento de onda e emitem a comprimentos de onda mais altos (radiações de menor energia).

A diferença entre os comprimentos de onda máximos de emissão e absorção é denominada desvio de Stokes. A intensidade de emissão de luz de um corante fluorescente é caracterizada pelo rendimento quântico que é a razão entre a energia emitida e absorvida.

São reconhecidos alguns aspectos estruturais dos corantes que influenciam a intensidade da fluorescência como sistemas conjugados extensos, anéis fundidos e rigidez da molécula³⁰.

É desejável que os corantes fluorescentes absorvam na região do visível e exibam emissões intensas. Para obter o efeito de fluorescência a fonte de luz incidente tem de ter energia correspondente aos comprimentos de onda apropriados aos corantes envolvidos.

Há ainda diversos estudos que abordam a influência dos solventes nas características de fluorescência dos corantes³¹.

Os corantes fluorescentes têm, actualmente, uma vasta área de aplicabilidade tanto na indústria como na biologia e medicina. Assim, utilizam-se corantes fluorescentes nas indústrias alimentares, de tintas, cosmética e têxtil, em biodiagnóstico e experiências de ressonância fluorescente (FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer), uma técnica usada para medição de distâncias à escala nanométrica muito utilizada em Biologia, e como marcadores biológicos³².

Na medicina os corantes fluorescentes ganharam um papel de destaque no momento em que mostraram as suas potencialidades no diagnóstico precoce do cancro que, sendo umas das doenças mais graves e de maior ocorrência na humanidade, mobiliza a atenção de muitos investigadores em todo o mundo.

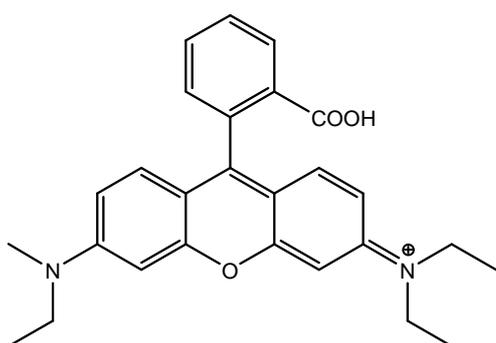
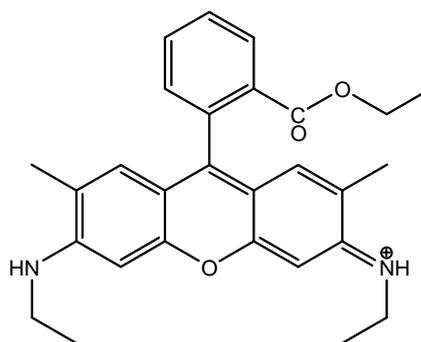
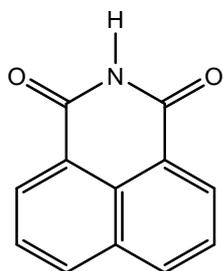
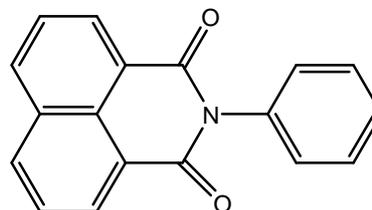
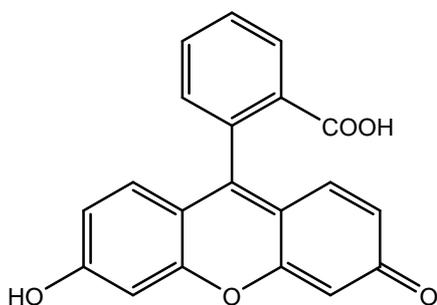
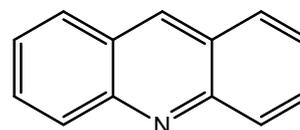
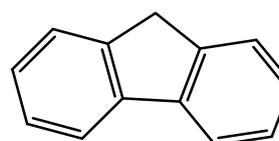
O Instituto Nacional Americano do Cancro (NCI – National Cancer Institute) e a Administração Americana de Alimentos e Drogas (FDA – Food and Drug Administration) têm investido nos últimos anos grandes quantias monetárias no desenvolvimento de marcadores biológicos baseados em corantes fluorescentes³³.

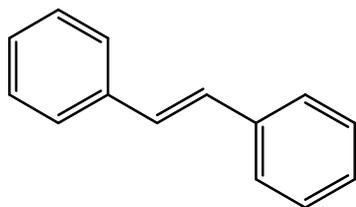
A tecnologia dos marcadores fluorescentes, tendo sido aplicada com sucesso no reconhecimento do cancro e da sida, é considerada universalmente como um dos métodos efectivos não radioactivo na marcação de células tumorais.

Esta técnica baseia-se na ligação do componente fluorescente ao objecto a marcar, por uma acção física ou química, formando um complexo fluorescente. Medindo a intensidade de fluorescência obtêm-se informações qualitativas e quantitativas sobre o objecto marcado. Usa-se na determinação de várias espécies de substâncias tais como poluentes ambientais, drogas, aminoácidos, moléculas quirais, nucleótidos, materiais do interior e do exterior das células.

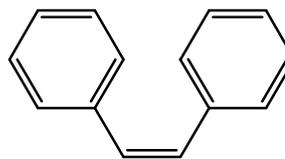
Os corantes fluorescentes, usados como meio de diagnóstico, apresentam aspectos muito positivos, tais como rapidez de detecção, boa reprodutibilidade, baixa dosagem e ausência de radioatividade³³.

Os corantes fluorescentes podem dividir-se em dois grupos dependendo do tipo de ligação do corante à célula a marcar. No primeiro grupo a ligação é feita por um grupo activo e inclui corantes como as rodaminas **22** e **23**, naftalimidas **24** e **25**, fluoresceínas **26**, acridina **27**, fluorenos **28** e estilbenos **29** e **30**.

**22** - Rodamina B**23** - Rodamina 6G**24** - 1,8-naftalimida**25** - N-aryl-1,8-naftalimida**26** - Fluoresceína**27** - Acridina**28** - Fluoreno

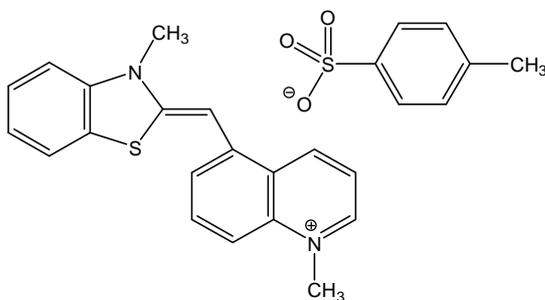


29 - E-estilbeno

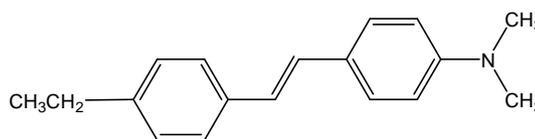


30 - Z-estilbeno

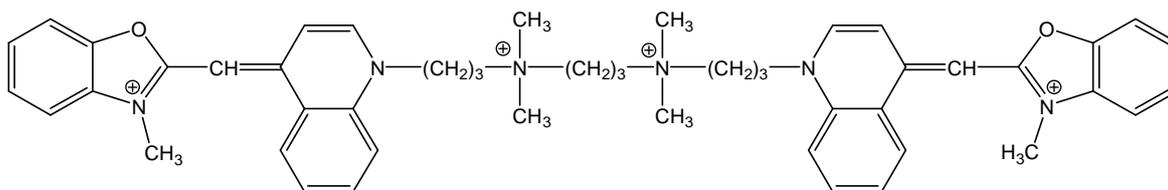
No segundo grupo o marcador liga-se à estrutura do ADN por afinidade como acontece com o *Thiazole orange*-TO **31**, *Oxazole yellow*-YO **32** e seus derivados e os corantes de cianina **33**. Estes últimos têm algumas vantagens pois não interferem no processo de detecção e têm mais afinidade para as células tumorais que para as normais.



31 - Thiazole orange



33 - Cianina



32 - Oxazole yellow

Embora os corantes fluorescentes tenham, normalmente, baixa selectividade quando fixados em suportes biologicamente activos, podem reconhecer células aberrantes selectivamente usando as características próprias dos suportes bioactivos.

A modificação dos corantes fluorescentes pode melhorar as suas propriedades de aplicação no desenvolvimento de marcadores biológicos pelo que é actualmente muito referida³³.

Para tentar obter sondas fluorescentes com boas propriedades tem de se identificar as relações entre as propriedades dos corantes e as suas estruturas moleculares. Alguns factores são determinantes nas aplicações biológicas tais como as propriedades de fluorescência, solubilidade, sensibilidade a soluções de pH baixo, possibilidade de preparação de diferentes tipos de derivados activos, baixa toxicidade interna e boa bioactividade³³.

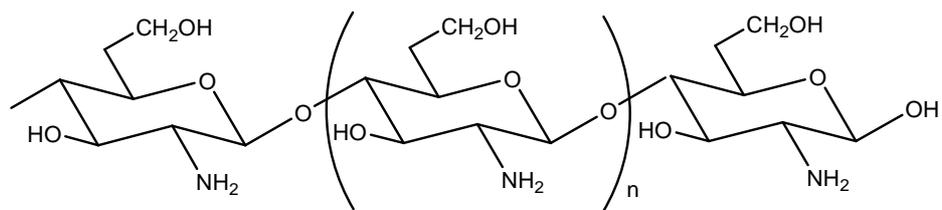
Os objectivos de pesquisa actual no campo das sondas biológicas fluorescentes são melhorar a solubilidade em água dos corantes, aumentar a sensibilidade e a estabilidade óptica e obter bons tecidos biológicos para padrões de marcação.

As sondas fluorescentes preparadas a partir do ADN e de corantes activos modificados pelos derivados de amina ou azida, podem melhorar muito a sensibilidade dos marcadores de células, o que dificilmente se encontrava nos métodos tradicionais³³.

Os corantes fluorescentes com grupos activos podem ser orientados para superfícies celulares contendo azida sendo incorporados nas células por uma reacção de Staudinger, passando a fornecer informações sobre a célula ligada. Aumentando a compatibilidade entre as sondas fluorescentes e o tecido humano melhora-se o desempenho dessas sondas aumentando a solubilidade e diminuindo a toxicidade dos corantes³³.

Recentemente têm surgido várias referências³³ mostrando o interesse crescente em corantes fluorescentes modificados com polissacáridos bioactivos. Estes compostos podem levar a novos caminhos no diagnóstico e tratamento de tumores.

Pela sua importância nos organismos vivos os polissacáridos têm atraído a atenção de biólogos, químicos e farmacologistas, sendo mesmo referido, por especialistas, o século XXI como a era dos polissacáridos. Dentre estes compostos os mais representativos são o alginato de sódio e o quitosano **34**, actuando este último como uma ponte entre os ligandos e os corantes, pois aumenta a compatibilidade celular com os corantes diminuindo a toxicidade. A combinação do quitosano com moléculas de corantes aumenta ainda a fluorescência o que é útil pois aumenta a sensibilidade e diminui a quantidade necessária de marcador fluorescente³³.



34 - Quitosano

O quitosano é um polissacárido composto por unidades repetitivas de β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosose com uma pequena quantidade de *N*-acetil-D-glucosamina.

O alginato de sódio é um polímero linear cujos monómeros são os ácidos gulurónico e manurónico. Devido às suas propriedades coloidais é muito usado em indústria química corrente de tingimento (espessante para corantes reactivos), estamperia e manufactura farmacêutica, e ainda como floculante no tratamento de águas. Pode ainda ser utilizado na imobilização de enzimas por inclusão, no estudo de genes e na distribuição de fármacos como uma espécie de transportador porque contém grupos hidroxilo, carboxilo e aldeído que participam nas reacções³³.

Os estudos sobre a quitina e o quitosano foram intensificados a partir de 1990 em virtude das suas propriedades biológicas tais como, a biodegradação no corpo humano, as características imunológicas e antibacterianas. Recentemente o quitosano foi considerado um bom candidato como material de suporte na distribuição de genes, cultura celular e engenharia de tecidos. Foi ainda utilizado na preparação de novos polímeros funcionais, nomeadamente a partir da sua ligação, ao ácido siálico para a obtenção de uma nova família de ácidos siálicos contendo polímeros. Apesar das suas potencialidades a utilização destes compostos está ainda pouco desenvolvida³⁴.

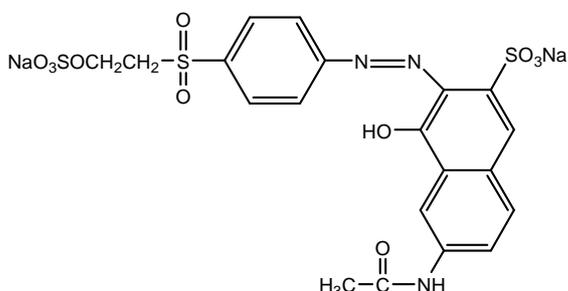
Encontram-se também referências³⁵ à ligação de hidratos de carbono com corantes reactivos – monoclorotriazinas, diclorotriazinas e vinilsulfónicos - em tingimento de couro e fibras naturais com a finalidade de melhorar a fixação dos corantes.

Desde que os corantes reactivos foram descobertos em 1954, por Rattee e Stephen³⁶, que se estuda a sua interacção com o colagénio e outras proteínas relacionadas, sendo referido que se formam ligações covalentes entre os grupos

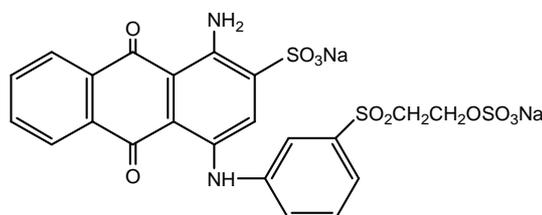
amino terminais dos resíduos de aminoácidos, ϵ -amino da lisina, hidroxilisina, arginina e hidroxiprolina do colagénio e as moléculas de corante.

As reacções de Maillard que ocorrem entre a L-lisina e os monossacáridos foram detectadas por L.C. Maillard em 1912. A partir daí muitos foram os estudos para aumentar a afinidade da lã para os corantes o que foi conseguido inicialmente pela interacção com a glucose. A incorporação dos hidratos de carbono permite activar a estrutura da fibra e construir grupos funcionais específicos com vista a economizar o consumo de corante e suavizar as condições de tingimento em virtude de aumentar a afinidade da fibra para o corante melhorando a estabilidade térmica e favorecendo a penetração e difusão dos corantes³⁵.

Os corantes vinilsulfónicos, também conhecidos pelo nome comercial *Remazol*^R, como por exemplo o **35** e o **36**, são corantes que reagem com a fibra e podem ser usados no tingimento de seda, lã e algodão, linho e outras fibras celulósicas. Estes corantes contêm um grupo precursor característico, o 2-sulfatoetilsulfonilo, e têm uma actividade intermédia entre os sistemas heterocíclicos altamente reactivos, tais como as diclorotriazinas (tipo *Procion MX*), e as espécies de baixa reactividade como a aminoclorotriazina (*Procion H*)³⁷.

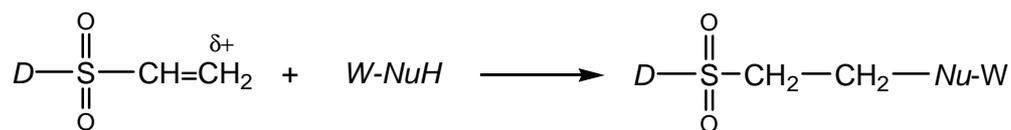


35 - Remazol Orange 3R



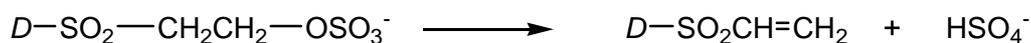
36 - Remazol Blue R

Estes corantes reagem com a fibra por um mecanismo de adição nucleofílica uma vez que possuem uma dupla ligação polarizada adjacente ao grupo sulfonilo fortemente retirador de electrões. A reacção ocorre por adição de Michael: o ataque nucleofílico dá-se no átomo de carbono electrofílico da dupla ligação, de acordo com o esquema 4, onde *W-Nu* representa o grupo nucleofílico da fibra e *D* o resíduo cromóforo sulfonado.



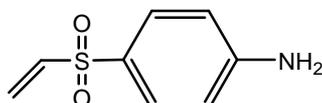
Esquema 4

Os corantes são sintetizados na forma sulfonada que sofre uma β -eliminação durante o tingimento a pH 5-7 para originar a forma vinilsulfónica reactiva como se mostra no esquema 5³⁸.



Esquema 5

Como parte de um projecto relacionado com a síntese de *N*-glicopéptidos fluorescentes foi preparada a *p*-aminofenilvinilsulfona **37**, como precursor de um corante vinilsulfónico fluorescente, e utilizada na síntese de várias aminas pela reacção de aza-Michael³⁹.

**37**

3.1– REACÇÕES DE AZA-MICHAEL

A reacção de aza-Michael envolvendo a adição conjugada de um azoto nucleofílico a compostos α,β -insaturados, de carbonilo ou nitrilo, constitui um método sintético muito útil na construção da ligação C-N para a preparação de compostos de β -aminocarbonilo ou nitrilo⁴⁰. Estes têm sido usados como fragmentos na síntese de vários compostos com importância biológica, tais como, β -aminoalcoóis, 1,2-diaminas e β -lactamas.

Durante muito tempo foram desenvolvidos vários métodos de preparação de β -aminocarbonilo mas as reacções de aza-Michael revelaram-se uma alternativa muito interessante devido à sua simplicidade operacional. Este tipo de reacções está bem documentado na literatura sob condições experimentais que utilizam catálise ácida ou

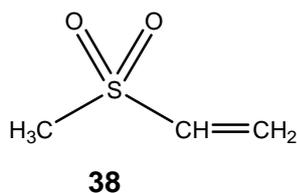
básica. Para impedir os problemas associados à utilização de ácidos e bases fortes, que pode favorecer reacções laterais, foram introduzidos outros catalisadores, particularmente ácidos de Lewis. Vários métodos foram utilizados para promover esta reacção com reagentes tais como sólidos iónicos ou líquidos heterogéneos, ou ainda temperaturas elevadas sem solvente. Muitos destes procedimentos apresentam, no entanto, alguns inconvenientes nomeadamente o preço e a toxicidade dos catalisadores. Adicionalmente, a maior parte dos métodos descritos são somente bem sucedidos com aminas alifáticas e falham ao serem aplicados a aminas aromáticas⁴⁰.

Recentemente, na procura de um catalisador para as reacções de aza-Michael mais simples, mais verde e mais eficiente, têm sido desenvolvidos vários métodos utilizando líquidos iónicos⁴¹, água⁴², Cu-nanopartículas⁴³, DBU⁴⁴, CAN⁴⁵ e de catalisadores biperrolidina-tioureia⁴⁶.

Com a química verde a tornar-se uma das prioridades do século XXI, o desenvolvimento da adição de aza-Michael com um catalisador reciclável e sem utilização de solventes prejudiciais é essencial. Nesta linha encontram-se estudos da utilização da água como solvente seguro, económico e amigo do ambiente, nomeadamente na adição de várias aminas a alcenos conjugados em condições biomiméticas usando catálise supramolecular envolvendo ciclodextrinas⁴⁷.

Num trabalho sobre a aplicação do catalisador Amberlyst-15 no desenvolvimento de metodologias sintéticas úteis, foi observado que ele pode catalisar eficientemente as reacções de aza-Michael de aminas com compostos α,β -insaturados de carbonilo e nitrilo, à temperatura ambiente e na ausência de solventes. Inicialmente a reacção foi conduzida na presença de vários solventes mas os rendimentos encontrados foram superiores na ausência dos mesmos. Pode verificar-se que as aminas alifáticas primárias e secundárias reagem em condições experimentais suaves (temperatura ambiente e tempo de reacção curto) com rendimentos razoáveis⁴⁰.

Este método encontra-se referido num trabalho recente utilizando a metilvinilsulfona comercial **38** e a p-aminofenilvinilsulfona **37** como aceitadores de Michael. As vinilsulfonas **37** e **38** reagem com várias aminas alifáticas primárias e secundárias, concluindo-se que este método limpo, simples e económico se revelou eficiente para a adição de aza-Michael usando vinilsulfonas como aceitadores e aminas alifáticas, primárias e secundárias, como nucleófilos. As aminas aromáticas revelaram-se menos reactivas talvez devido a serem nucleófilos mais fracos³⁹.



3.2 – GLICOPÉPTIDOS FLUORESCENTES

Tal como foi referido anteriormente, os corantes fluorescentes são utilizados frequentemente em métodos de diagnóstico e de terapia proporcionando alta especificidade e sensibilidade. Estas aplicações envolvem, em geral, a ligação das moléculas de corantes a substâncias como péptidos, células ou microorganismos e subsequente detecção por técnicas fluorimétricas ou microscópicas. Assim a ligação dos corantes a biomoléculas aparece com o objectivo de aliar as propriedades importantes dos dois grupos de compostos.

A bioconjugação tem surgido recentemente como uma tecnologia em rápido crescimento e que afecta quase todos os campos de estudos dos organismos vivos. Baseia-se na ligação de duas ou mais moléculas para formar um novo composto, logicamente mais complexo, com propriedades combinadas dos componentes individuais. Uma aplicação importante da bioconjugação é a modificação selectiva dos componentes, como sondas fluorescentes para investigação em biologia celular. É empregue vulgarmente um procedimento em etapas sequenciais no qual a entidade celular é primeiramente ligada ao corante fluorescente seguindo-se a purificação do produto obtido e posterior detecção.

A cumarina é muitas vezes escolhida como fluoróforo uma vez que a sua molécula tem um tamanho reduzido, é biocompatível e fácil de manusear sinteticamente⁴⁸.

Além da cumarina, as rodaminas e as fluoresceínas são outros corantes utilizados para a ligação a péptidos, embora hoje em dia se encontrem estudos envolvendo outros tipos de corantes com o mesmo fim. No entanto as cumarinas ocupam um lugar de destaque pois constituem um dos mais investigados e comercialmente significativos grupos de materiais orgânicos fluorescentes. Além da sua utilização em fibras sintéticas e como pigmentos para tintas fluorescentes tem também interesse em utilizações biológicas e medicinais. Muitos derivados da

cumarina, vulgarmente contendo substituintes hidroxilo, são compostos naturais e alguns desses produtos exibem efeitos fisiológicos marcantes, por exemplo, anticoagulantes, antitumorais, antifúngicos e antibióticos. São também referidas técnicas analíticas, envolvendo o uso de derivados fluorescentes das cumarinas, com importância considerável em pesquisa biológica e médica providenciando ferramentas úteis na procura de novos compostos biologicamente activos e no desenvolvimento de novos meios de diagnóstico⁴⁹.

CAPÍTULO II

DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Nota introdutória:

Para a atribuição dos nomes aos diferentes compostos não foram seguidas rigorosamente as regras de nomenclatura. Optou-se por nomear os compostos de modo a clarificar a sua estrutura.

As escolhas dos localizadores foi feita de modo a que os grupos que se repetem (corantes, glucosilamina e sulfonas) tenham sempre a mesma atribuição qualquer que seja a estrutura de que façam parte.

Como foi referido na introdução o interesse pelos glicopéptidos tem vindo a crescer em virtude da tomada de consciência da importância destes compostos nos mais diversos processos bioquímicos.

A difícil identificação dos produtos naturais, torna a síntese destes compostos fundamental, pois só assim se podem obter compostos puros e em quantidades apreciáveis que possibilitem a investigação de aplicações úteis, nomeadamente no campo da medicina.

Um outro aspecto em desenvolvimento é a ligação de glicopéptidos a corantes fluorescentes com o objectivo de obter compostos fluorescentes com aplicações em biologia e medicina, que apresentem boa compatibilidade com sistemas biológicos, fácil aplicabilidade e baixa toxicidade.

Neste trabalho sintetizaram-se novos *N*-glicopéptidos fluorescentes pela formação de uma ligação amida entre uma glicosilamina e aminoácidos ou péptidos fluorescentes. Foram utilizados diversos corantes e procedeu-se ainda ao estudo e preparação de fluoróforos com possibilidades de ligação a péptidos e a hidratos de carbono.

Como o objectivo do presente trabalho envolvia a formação de uma ligação amida entre um aminoácido, péptido ou corante com a função ácido carboxílico e um derivado de açúcar contendo o grupo $-NH_2$, foi necessário iniciar o trabalho pela formação da ligação *N*-glicosídica investigada em trabalhos anteriores⁵⁰.

A estratégia envolveu a preparação da α -acetobromoglucose, a sua conversão a azida e a redução desta à glucosilamina correspondente, substrato a ser usado nas reacções com corantes e péptidos estudados.

1 – SÍNTESE DE GLICOCONJUGADOS FLUORESCENTES

Tal como foi referido na introdução os corantes podem ligar-se a polissacáridos ou a péptidos com o intuito de melhorar as suas propriedades de aplicação³³. Os corantes utilizados neste trabalho são fundamentalmente corantes contendo um grupo activo - o grupo ácido carboxílico – que pode ligar-se aos grupos amino livres dos péptidos ou da glucosilamina por formação de uma ligação do tipo $-C(=X)NH$ em que $X=O, S, NH$. A formação da ligação amida ($X=O$) pode ser obtida pelo método de activação do grupo carboxilo por carbodiimida, pelo método do anidrido misto⁵¹ ou ainda seguindo os métodos de acoplamento utilizados na formação da ligação peptídica.

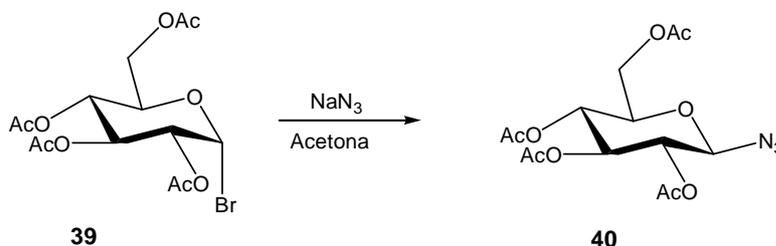
Com objectivo de testar as metodologias de síntese e avaliar a influência do aminoácido e/ou do açúcar nas propriedades de fluorescência do fluoróforo prepararam-se compostos com um aminoácido fluorescente obtido por introdução dos marcadores fluorescentes no C-terminal da glicina com formação de uma ligação amida. Foram utilizados dois fluoróforos, o ácido 4-(nafto[1,2-*d*][1,2,3]triazol-2-il)benzóico **42** e o ácido cumarina-3-carboxílico **48**. As propriedades de absorção e fluorescência destes compostos foram medidas em acetonitrilo e comparadas⁵².

1.1- PREPARAÇÃO DE 2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL- β -D-GLUCOPIRANOSIL-AMINA **41**

A α -acetobromoglucose **39** foi preparada pelo método descrito na literatura⁵³. A síntese inicia-se pela preparação do penta-acetato da D-glucose por reacção desta com anidrido acético, utilizando ácido perclórico como catalisador. Este composto, não isolado, reagiu com HBr (gerado *in situ* por reacção entre Br_2 e fósforo vermelho) originando o brometo. Após recristalização, obteve-se o composto **39** na forma de um sólido branco cristalino com um rendimento razoável (64%) e com ponto de fusão (88,7-89,4°C) concordante com o da literatura (88-89°C)⁵³ (Exp. 2.1.1)

Um método importante de obtenção das glucosilaminas consiste na utilização das glucosilazidas como precursores sendo estas facilmente preparadas por reacção entre um haleto de glucosilo e o ião N_3^- . As glucosilazidas apresentam a vantagem de serem estáveis face a diversas manipulações de protecção de grupos, sendo facilmente convertidas em glucosilaminas por hidrogenação catalítica.

A glucosilazida **40**, foi preparada por reacção entre a α -acetobromoglucose **39** e azida de sódio, em refluxo de acetona seca, durante 7h⁵⁴ (esquema 6), tendo sido obtida na forma de um sólido branco cristalino, depois de sujeita a uma cristalização de éter dietílico, com um rendimento de 86% (Exp. 2.1.2).



Esquema 6

No espectro do composto **39** identificou-se perfeitamente o protão anomérico pois, devido à sua proximidade ao átomo de oxigénio do anel e por ser geminal ao átomo de bromo, é mais desprotegido, e, em consequência, o que aparece a campo mais baixo. O protão anomérico do composto **40** também sofre influência do átomo de oxigénio do anel, mas sendo geminal com $-N_3$, que exerce um efeito retirador inferior ao bromo, aparece a um desvio químico menor, isto é, campo mais alto. Este protão aparece acoplado a um único protão (H-2) originando um duplete (desdobramento simples) permitindo uma análise de 1ª ordem e um cálculo exacto da constante de acoplamento⁵⁰.

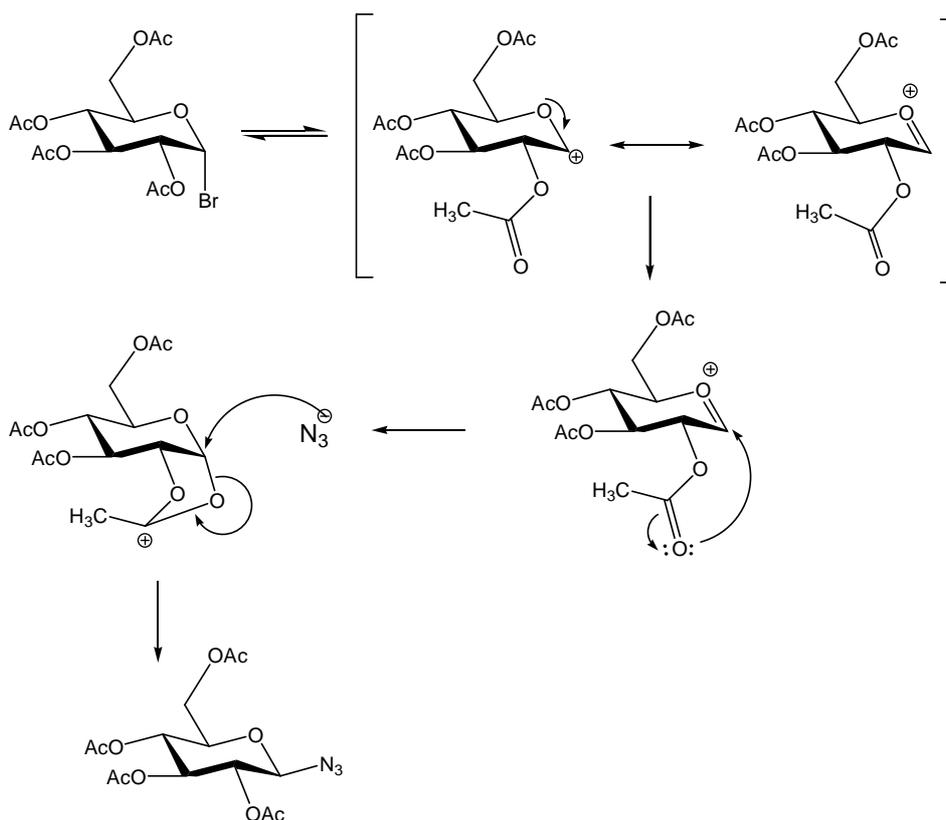
Para além da informação obtida com base nos desvios químicos, a espectrometria de ressonância magnética nuclear de protão constitui uma boa técnica para o estudo da configuração anomérica de glucósidos, podendo obter-se informação sobre a estereoquímica relativa dos protões vicinais com base nas suas constantes de acoplamento. A análise dos espectros de ¹H-RMN dos compostos **39** e **40** permite concluir que, durante esta reacção, ocorreu inversão completa da configuração do carbono anomérico tendo sido a reacção de preparação da azida **40** completamente estereosselectiva, com formação exclusiva do anómero β , conforme é evidenciado pelo espectro de ¹H-RMN.

Efectivamente, para o composto **39** o sinal do protão anomérico era um duplete com constante de acoplamento de 4,0 Hz, o qual evidencia o acoplamento $H_{\text{equatorial}}$ (1) – H_{axial} (2). Por sua vez no espectro da azida **40** o sinal correspondente ao protão

anomérico era um duplete de constante de acoplamento 9,0 Hz devido a H_{axial} (1) – H_{axial} (2).

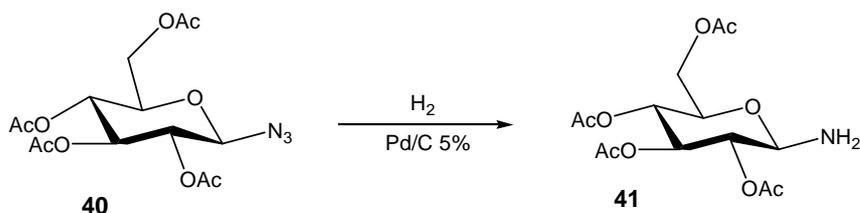
O espectro de IV do composto **40** apresenta uma banda de fraca intensidade a 2115 cm^{-1} correspondente à vibração das ligações do grupo $-\text{N}_3$.

O mecanismo proposto para esta reacção, representado no esquema 7, explica a inversão da configuração referida.



Esquema 7

O composto **40** foi posteriormente hidrogenado, na presença de um catalisador de Pd/C 5% (esquema 8) originando a correspondente glucopiranosilamina **41**, de acordo com o procedimento descrito na literatura⁵⁵, com um rendimento de 94% (Exp. 2.1.3).



Esquema 8

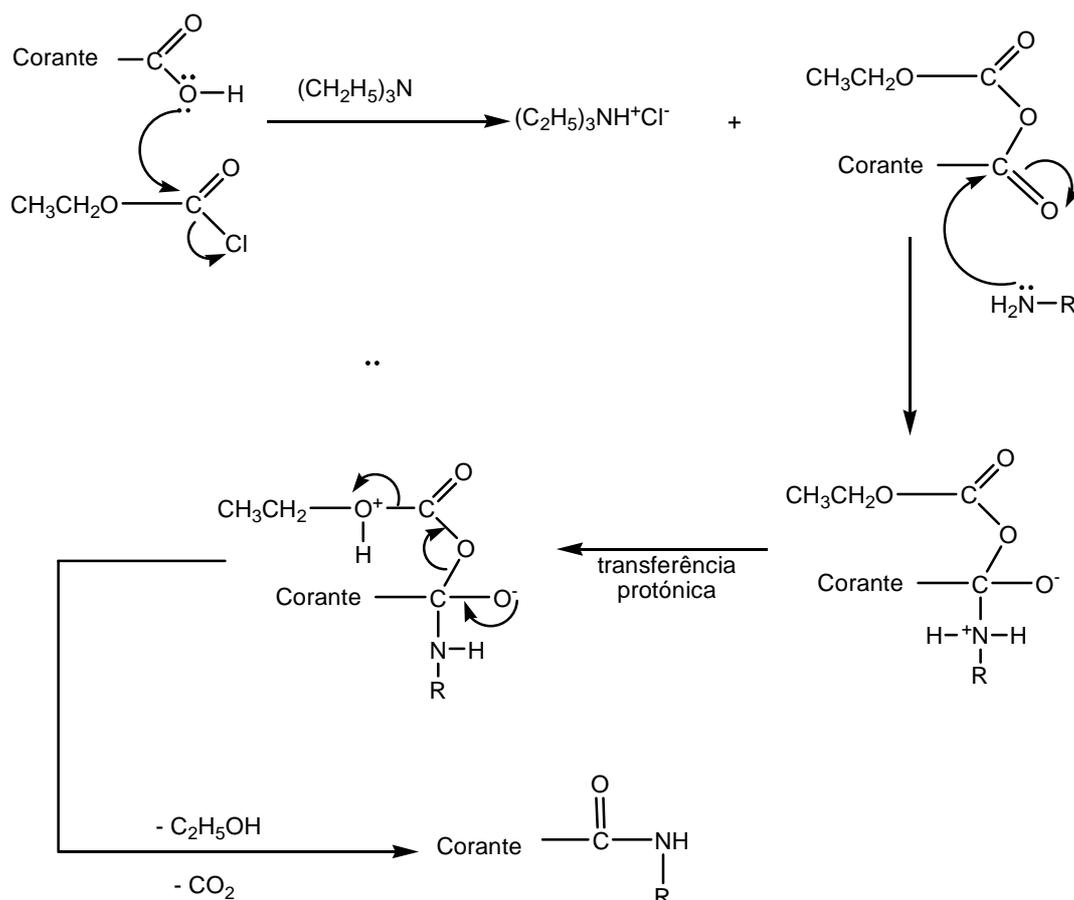
Pela análise do espectro de $^1\text{H-RMN}$ da amina **41** comprovou-se a existência de um singlete largo, a 2,02-2,10 ppm, que integra para dois, correspondente aos prótons do grupo $-\text{NH}_2$, o que está de acordo com o desaparecimento deste sinal por adição de D_2O . Os restantes sinais do composto **41** permaneceram idênticos aos do composto **40**, com excepção do sinal correspondente ao próton anomérico que aparece a 4,2 ppm, desvio químico ligeiramente inferior ao do composto **40**, o que indica que se encontra mais protegido devido ao menor poder retirador do grupo $-\text{NH}_2$ em comparação com o grupo $-\text{N}_3$.

No espectro de IV verificou-se o aparecimento de uma banda intensa a 3337 cm^{-1} devido ao grupo $-\text{NH}_2$.

1.2 - SÍNTESE DE GLICOCONJUGADOS FLUORESCENTES UTILIZANDO O FLUORÓFORO ÁCIDO 4-(NAFTO[1,2-*d*][1,2,3]TRIAZOL-2-IL)BENZÓICO

Em trabalhos anteriores foi utilizado o método do anidrido misto (método A) para ligar corantes carboxílicos a aminas com a formação de uma ligação amida o que permitiu transformações posteriores sem quebra da ligação⁵⁰. A activação do corante foi feita com cloroformiato de etilo que se revelou um método eficaz pois todos os corantes foram activados com facilidade ao fim de 5-30 minutos. A reacção foi efectuada em condições anidras para evitar a hidrólise da forma activada do corante.

A purificação das amidas resultantes foi feita por cromatografia em coluna tipo "flash". O produto pretendido foi obtido com bom grau de pureza mas baixo rendimento. A proposta de mecanismo para a reacção utilizando este método encontra-se descrita no esquema 9.

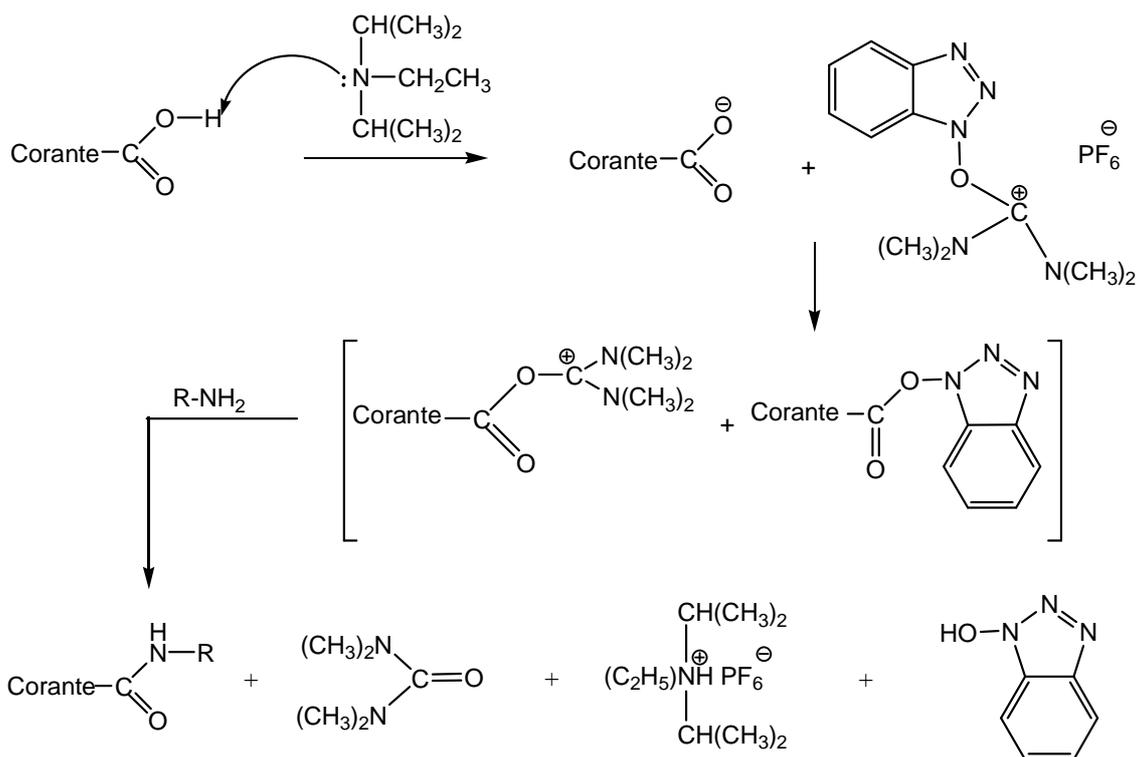


Esquema 9

Numa tentativa de melhorar o rendimento desta reacção utilizou-se o método de acoplamento com HBTU e DIPEA em DMF (método B), o qual se revelou simples de realizar e originando melhores rendimentos que o anterior⁵⁶.

Neste método a escolha da base é um factor importante a ter em conta. A escolha de aminas terciárias como a DIPEA baseia-se nas propriedades não nucleofílicas da própria base¹⁰.

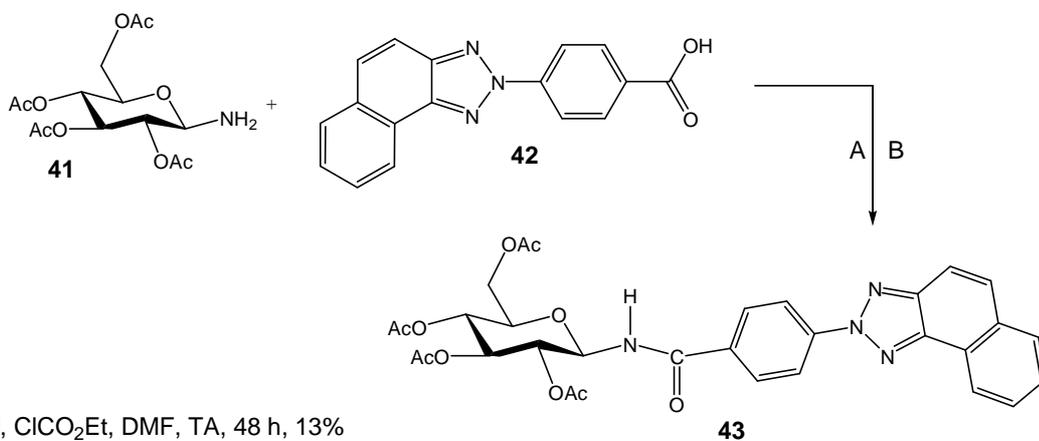
O corante reagiu com a amina segundo o procedimento descrito na bibliografia⁵² e o mecanismo proposto para a reacção é apresentado no esquema 10⁵⁷.



Esquema 10

1.2.1 – Preparação de *N*-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil)-4-(2*H*-nafto[1,2-*d*] [1,2,3]triazol-2-il-benzamida **43**

O composto **43** foi obtido a partir da reacção entre a glucosilamina **41** e o fluoróforo **42**, pelos dois métodos referidos anteriormente de acordo com o esquema 11 (Exp. 2.2.1).



A: Et₃N, ClCO₂Et, DMF, TA, 48 h, 13%

B: HBTU, DIPEA, DMF, TA, 18 h, 23%

Esquema 11

O método B originou melhores rendimentos com menor tempo de reacção. Em ambos os métodos a purificação foi feita por cromatografia em coluna tipo “flash” seguida de recristalização.

Pela interpretação do espectro de $^1\text{H-RMN}$ pode comprovar-se a formação da ligação pretendida. A análise revela o desaparecimento do sinal a 2,02-2,10 ppm em forma de singlete largo, correspondente ao grupo NH_2 , e a existência de um sinal a 7,16 ppm na forma de duplete, correspondente ao NH, que acopla com o próton anomérico com uma constante de acoplamento de 9,0 Hz. O deslocamento do sinal do próton anomérico de 4,20 ppm para 5,48 ppm explica-se pela proximidade do grupo carbonilo que sendo muito electronegativo o desprotege.

No espectro de infra-vermelho para além da banda do grupo carbonilo característica de ésteres (1748 cm^{-1}) aparece uma outra banda a menor nº de onda (1680 cm^{-1}) correspondente à vibração de estiramento da ligação C=O numa amida. Este espectro apresenta também uma banda de absorção intensa (3430 cm^{-1}) devido à ligação N-H do grupo amida.

O espectro de massa de alta resolução obtido pela técnica FAB para o composto **43** apresenta um ião $\text{M}^+ + 1$, a 619,2051 compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_{10}$.

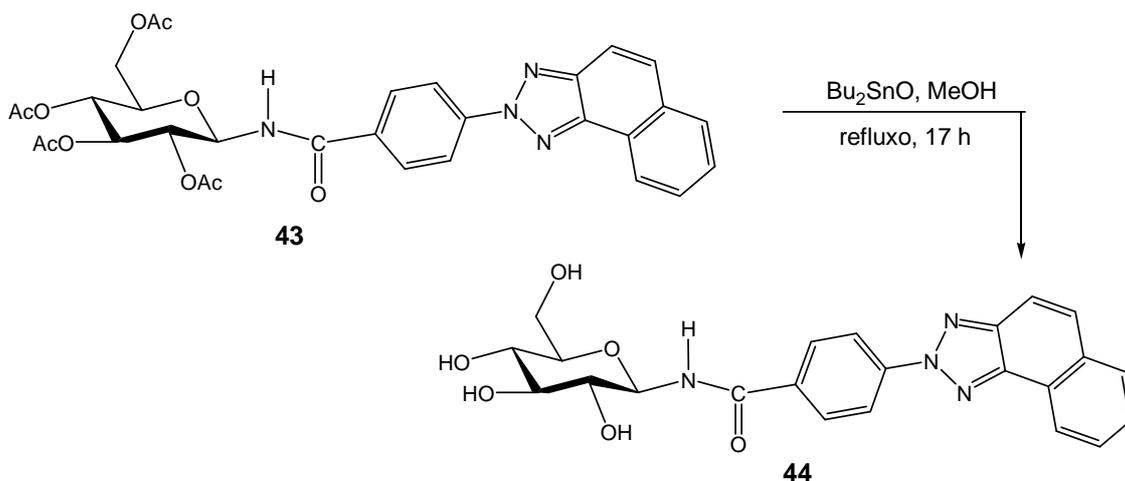
1.2.2 – Síntese de *N*-(β -D-glucopiranosil)-4-(2*H*-nafto[1,2-*d*] [1,2,3]triazol-2-il)-benzamida **44**

A protecção e desprotecção de grupos funcionais é uma das etapas-chave na síntese orgânica. Um dos grupos utilizados para proteger os hidratos de carbono é o grupo acetilo e a correspondente desprotecção, sob condições moderadas, não é só fundamental para a síntese de alguns glicósidos naturais, mas é também importante na síntese em geral uma vez que os produtos obtidos podem ter utilidade como intermediários versáteis⁵⁸.

Conhecem-se vários métodos e reagentes de desacetilação⁵⁹⁻⁶³ mas no presente trabalho utilizou-se o método descrito por Hong-Min Liu e colaboradores que utiliza o óxido de dibutilestanho (Bu_2SnO) como catalisador na hidrólise quimiosselectiva do grupo acetilo na unidade glicosilo. O método descrito consiste no aquecimento em refluxo do glicósido per-*O*-acetilado em metanol seco, na presença

de 10% mol de Bu_2SnO durante um tempo médio não inferior a 8 h, dependendo da estrutura do composto. O autor refere que aumentando a concentração do catalisador para 50% mol o tempo diminui⁵⁸.

A remoção dos grupos acetilo do composto **43** foi realizada segundo o método referido⁵⁸ com 200% mol de catalisador durante 17 h, de acordo com o esquema 12. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna tipo “flash” (Exp. 2.2.2) tendo-se isolado o composto **44** na forma de um sólido cor-de-rosa com um rendimento de 40%, cujo espectro de ^1H -RMN mostrou que a desprotecção foi conseguida. Os sinais correspondentes aos grupos acetilo, entre 2,07 e 2,11 (composto **43**) desapareceram e os sinais dos prótons da glucose deslocaram-se para campo mais alto, em virtude da substituição dos grupos OAc por OH (maior protecção). O próton do OH ligado na posição 6', a 4,54 ppm, é perfeitamente identificável pois aparece na forma de um tripleto. O produto desacetilado é solúvel em água o que vem ao encontro dos objectivos deste trabalho tal como se refere na introdução.

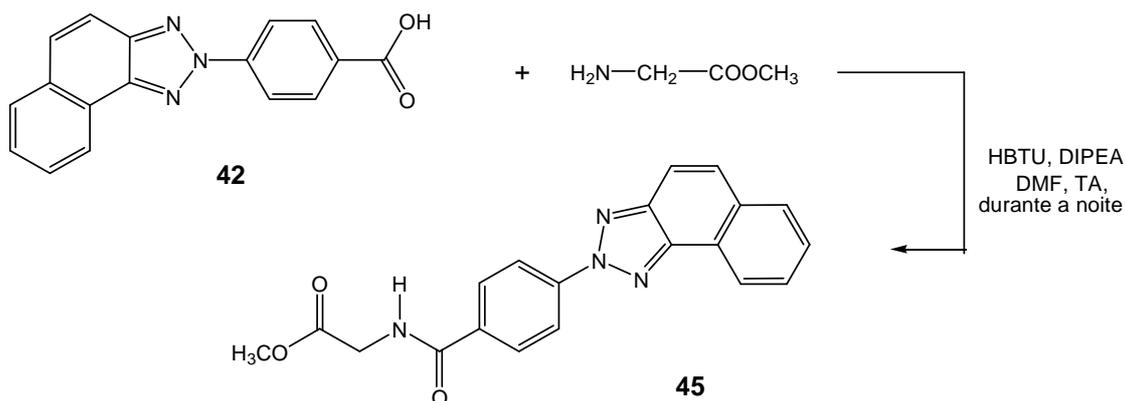


Esquema 12

O espectro de infra-vermelho do composto **44** apresenta duas diferenças fundamentais em relação ao espectro do composto **43**, o desaparecimento da banda do grupo carbonilo característica dos ésteres (1748 cm^{-1}) e aparecimento de uma banda correspondente ao grupo OH (3609 cm^{-1}) o que evidencia a desacetilação.

1.2.3 – Síntese do éster metílico do ácido 4-nafto[1,2-*d*][1,2,3] triazol-2-il-benzoilamino acético 45

A ligação do éster metílico da glicina ao fluoróforo **42** foi realizada pelo método B (Esquema 13). O resíduo sólido obtido foi purificado por cromatografia em coluna tipo “flash”, seguida de cristalização (Exp. 2.2.3) obtendo-se o composto **45** na forma pura como um sólido de cor laranja e com um rendimento de 45%.

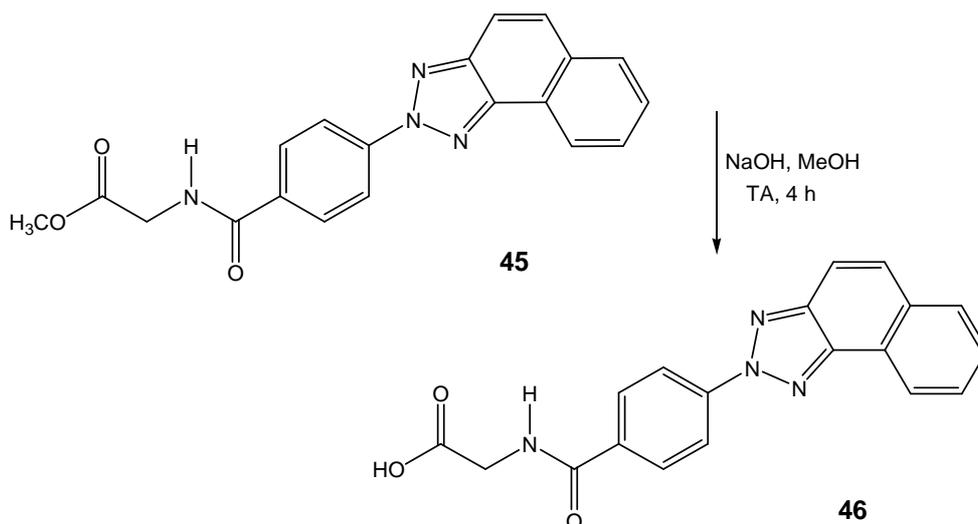


A análise do espectro de ^1H -RMN revela o aparecimento de um sinal a 9,19 ppm, na forma de um tripleto, com uma constante de acoplamento de 5,7 Hz, característica de um NH da glicina que evidencia o acoplamento deste próton com os prótons do grupo CH_2 da glicina e a formação da ligação amida.

O espectro de infra-vermelho para este composto evidencia bandas de absorção a 3362 e 1643 cm^{-1} devidas às vibrações de alongamento das ligações N-H e C=O, respectivamente, em amidas.

1.2.4 – Síntese do ácido 4-2-[4-(2H-nafto[1,2-*d*][1,2,3]triazol-2-il) benzamido]acético 46

Para ligar o composto **45** à glucosilamina foi necessário desproteger o grupo carboxilo da glicina pelo que se realizou a hidrólise básica do composto⁵² obtendo-se o ácido correspondente **46**, na forma pura, com um rendimento de 87% (Exp. 2.2.4) de acordo com o esquema 14.



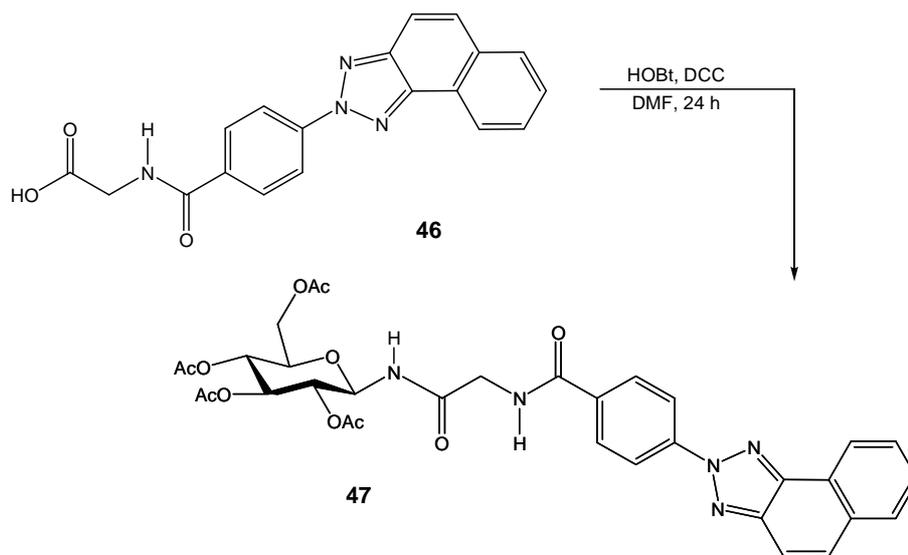
Esquema 14

Pela análise dos espectros de ^1H -RMN do composto **46** pode comprovar-se o desaparecimento do sinal a 3,67 ppm na forma de um singlete, que integrava para 3 prótons, correspondente ao grupo O-CH_3 e o aparecimento de um sinal a 12,80 ppm na forma de um singlete largo, correspondente ao próton do grupo ácido carboxílico.

O espectro de massa de alta resolução obtido pela técnica EI para o composto **46** apresenta um íon molecular, M^+ , a 346,1062 compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3$.

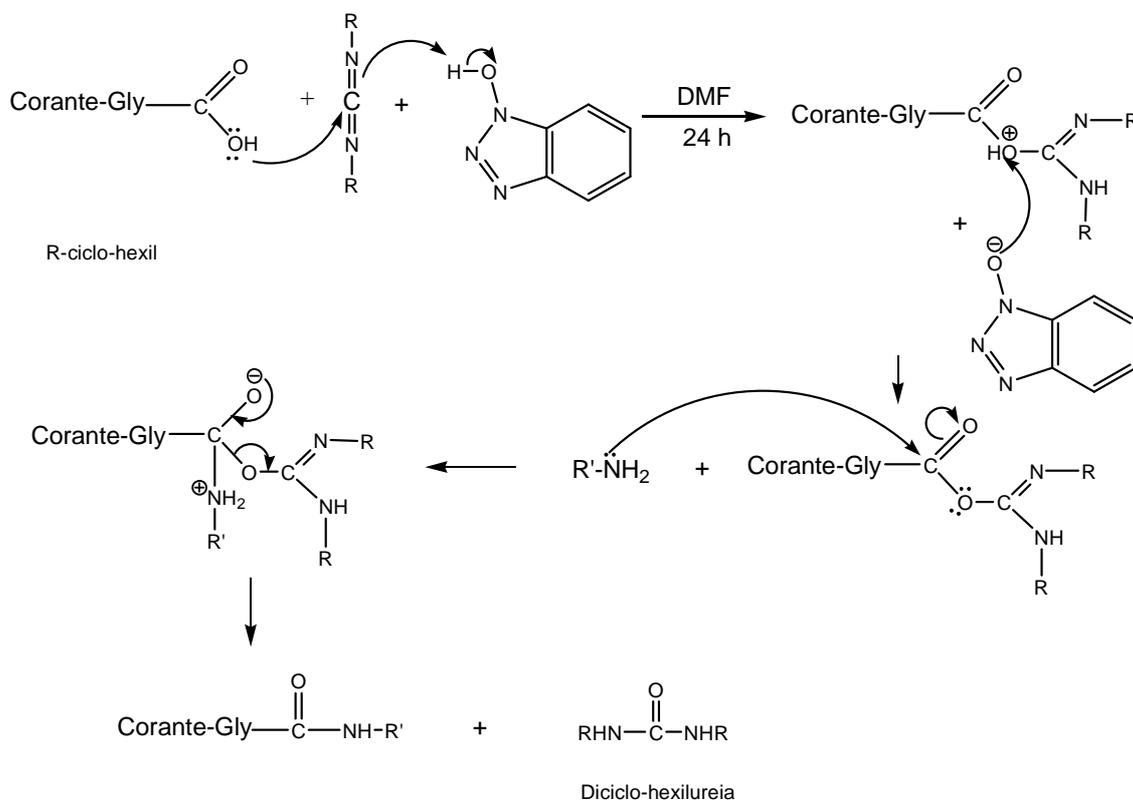
1.2.5 – Síntese de *N*-[*N*-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- β -*D*-glucopiranosil)carbamoilmetil]-4-(2*H*-naftol[1,2-*d*][1,2,3]triazol-2-il)-benzamida **47**

O composto **47** foi sintetizado de acordo com o esquema 15. Para esta ligação optou-se pela utilização do método de acoplamento com HOBt e DCC, referido na introdução, que se revelou eficiente e económico.



Esquema 15

A proposta de mecanismo para a reacção de acoplamento entre um composto com um grupo carboxilo e uma amina na presença de HOBt/DCC encontra-se descrita no esquema 16.



Esquema 16

O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna tipo “flash” e em seguida cristalizado obtendo-se o composto **47** puro na forma de um sólido cor de laranja (Exp. 2.2.5), com um rendimento de 23%.

A análise do espectro de $^1\text{H-RMN}$ comprova a formação da ligação amida pelo aparecimento de um sinal a 7,51 ppm, na forma de um duplete devido ao acoplamento com o próton anomérico, com constante de acoplamento de 9,0 Hz correspondente ao próton do grupo NH. Por irradiação a 3,90 ppm, correspondente ao próton 5', verificou-se que o sinal a 5,10 ppm passou de triplete a duplete o que o identificou como correspondente ao próton 4', sendo o sinal a 5,02 ppm o correspondente ao próton 2'. Irradiou-se em seguida a 5,10 ppm e verificou-se a alteração do sinal a 5,34 ppm o que o identificou como sendo correspondente ao próton 3'.

O espectro de IV evidencia a presença dos grupos amida na molécula devido às bandas de absorção a 3413 (NH) e 1607 (C=O) cm^{-1} .

Tal como foi referido na introdução a fluorescência de um composto está relacionada com a sua estrutura. A absorção de energia por uma dupla ligação C=C excita um electrão π para uma orbital π^* antiligante. A actividade do cromóforo é assim devida a uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$ correspondendo a uma energia de absorção de 180 nm (U.V), para uma dupla ligação não conjugada. Quando a dupla ligação é parte de uma cadeia conjugada, as energias das orbitais moleculares estão mais próximas umas das outras e a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ move-se para um comprimento de onda mais alto e pode chegar à região do visível se o sistema conjugado for suficientemente longo. A transição responsável pela absorção nos compostos de carbonilo pode ser devida aos electrões livres do átomo de oxigénio. Um desses electrões pode ser excitado para a orbital π^* vazia do grupo carbonilo o que leva a uma transição $n \rightarrow \pi^*$. As energias de absorção típicas neste caso correspondem a radiações de cerca de 290 nm²⁹.

O espectro de absorção UV/vis do fluoróforo **42** mostra uma estrutura vibracional a 340 ($\epsilon_{\text{max.}} \approx 24500 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e 360 nm (fig. 5). A substituição do grupo carboxilo pelos grupos amido nos compostos **43**, **45** e **47** não teve efeito significativo na posição nem na absorvidade molar das bandas de absorção de alto comprimento de onda.

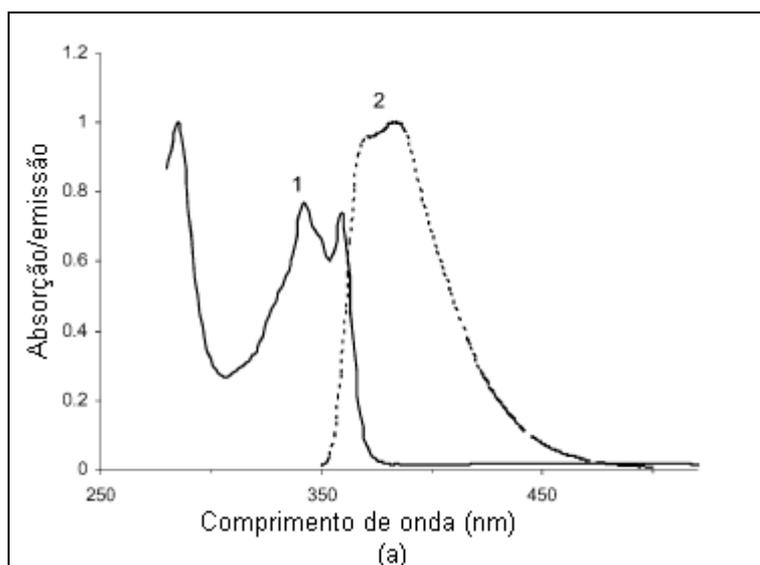


Figura 5. Espectros de absorção (curva 1) e de emissão (curva 2) do corante **42**

O espectro de fluorescência do estado estacionário do corante **42** mostra uma banda de emissão, também com estrutura vibracional, com máximos a 370 e 380 nm. A transformação do grupo carboxilo (**42**) em grupos amido (**43**, **45** e **47**) não afecta a forma nem a posição da banda de fluorescência mas tem um efeito considerável no rendimento quântico (53% para o **42** e perto de 100% para os outros compostos, com um desvio padrão $\leq 2\%$).

O coeficiente de absorção relativamente alto da 1^a banda de absorção do composto **42** e o alto rendimento quântico levam à conclusão que a 1^a banda de absorção dos derivados de triazole estudados têm um carácter de transição S0-S1 ($\pi \rightarrow \pi^*$). Para além disso, o alto rendimento quântico mostra que nenhum dos estados tripleto possíveis $n \rightarrow \pi^*$ (electrões não ligantes dos dois átomos de N-heterocíclicos e os electrões não ligantes do grupo carbonilo) estão situados abaixo do estado S1 ($\pi \rightarrow \pi^*$)⁵².

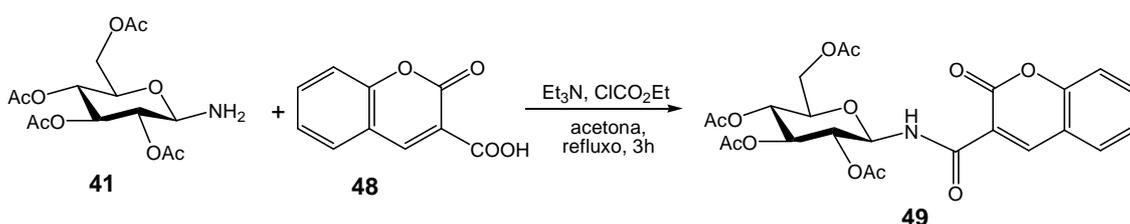
1.3 – SÍNTESE DE GLICOCONJUGADOS FLUORESCENTES UTILIZANDO O FLUORÓFORO ÁCIDO CUMARINA-3-CARBOXÍLICO

Tudo o que foi referido no ponto 1.2 se aplica aqui pois também este fluoróforo tem, como o nome indica, um grupo carboxilo e pode ser ligado a aminoácidos,

péptidos ou à glucosilamina pelos métodos de acoplamento comuns na síntese peptídica.

1.3.1 – Síntese de *N*-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil-β-*D*-glucopiranosil)-(2-oxo-2*H*-cromeno)-3-carboxamida **49**

O composto **49** foi preparado a partir da reacção entre a glucosilamina **41** e o fluoróforo **48** de acordo com o esquema 17, utilizando o método A, descrito na síntese do composto **43**, mas utilizando acetona seca como solvente e em refluxo durante 3 h.



Esquema 17

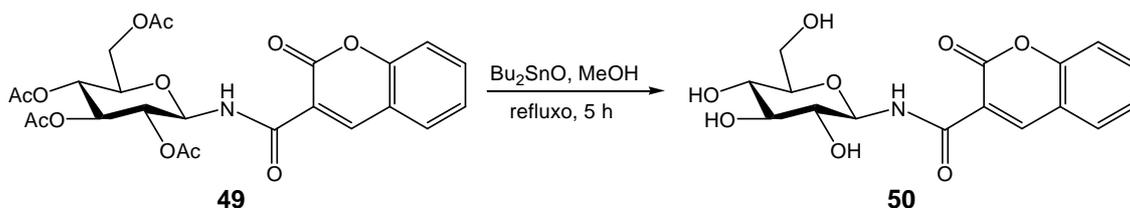
O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna tipo “flash” e recristalizado originando o produto **49** na forma de um sólido branco, com um rendimento de 23% (Exp. 2.3.1).

No espectro de ^1H -RMN o protão do grupo NH da ligação amida aparece a 9,31 ppm na forma de um duplete, com uma constante de acoplamento de 9,6 Hz, compatível com o acoplamento com o protão anomérico.

O espectro de IV apresenta uma banda a 3306 cm^{-1} do NH e outra a 1610 cm^{-1} correspondente ao grupo C=O da amida.

1.3.2 – Síntese de *N*-(β-*D*-glucopiranosil)-(2-oxo-2*H*-cromeno)-3-carboxamida **50**

O composto **49** foi tratado pelo método utilizado na obtenção do composto **44**, na presença de catalisador (100% mol) em refluxo durante 5 h, de acordo com o esquema 18.



Esquema 18

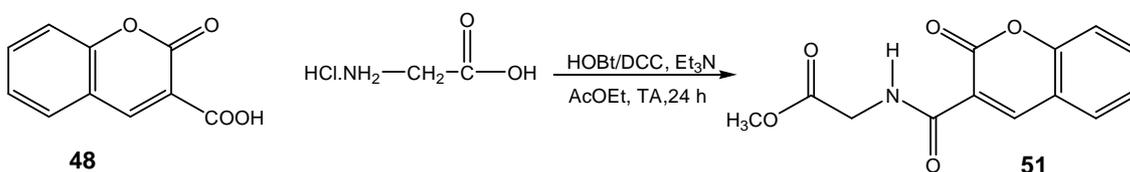
O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna tipo “flash” originando o composto **50** com um rendimento de 67% (Exp. 2.3.2). Este composto, tal como o **44**, é solúvel em água.

O espectro $^1\text{H-RMN}$ evidencia o desaparecimento dos sinais correspondentes aos grupos acetilo e o deslocamento dos sinais correspondentes aos prótons da glucosilamina para campo mais alto.

O espectro de IV apresenta também uma banda de absorção a 3476 cm^{-1} devido aos grupos OH.

1.3.3 – Síntese do éster metílico do ácido [(2-oxo-2H-cromeno-3-carbonil)-amino]-acético **51**

A preparação do composto **51** foi realizada em condições experimentais semelhantes às descritas para o composto **47**, a partir da reacção do fluoróforo **48** com o aminoácido HGly-OMe.HCl na presença de HOBt e DCC (esquema 19).

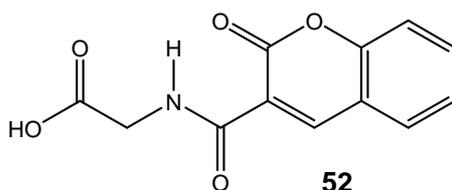


Esquema 19

O resíduo foi cristalizado de acetato de etilo-éter de petróleo originando o composto **51** na forma de um sólido branco com um rendimento de 30% (Exp. 2.3.3). O espectro de $^1\text{H-RMN}$ mostra que se formou a ligação amida pelo aparecimento do sinal a 9,26 ppm, na forma de um singlete largo, correspondente ao NH.

O espectro de IV evidencia a formação da ligação amida devido à presença de bandas de absorção a 3332 (NH) e 1607 (C=O) cm^{-1} .

Realizou-se em seguida a hidrólise básica do composto **51** por um procedimento experimental idêntico ao utilizado na preparação de **46** obtendo-se o ácido **52** com um rendimento de 86% (Exp. 2.3.4).



O desaparecimento do singlete a 3,81 ppm, correspondente ao grupo OCH_3 , no espectro de ^1H -RMN, e o aparecimento de um sinal a 12,8 ppm na forma de um singlete largo, correspondente ao grupo OH, mostram que a reacção ocorreu e que o composto obtido é o pretendido.

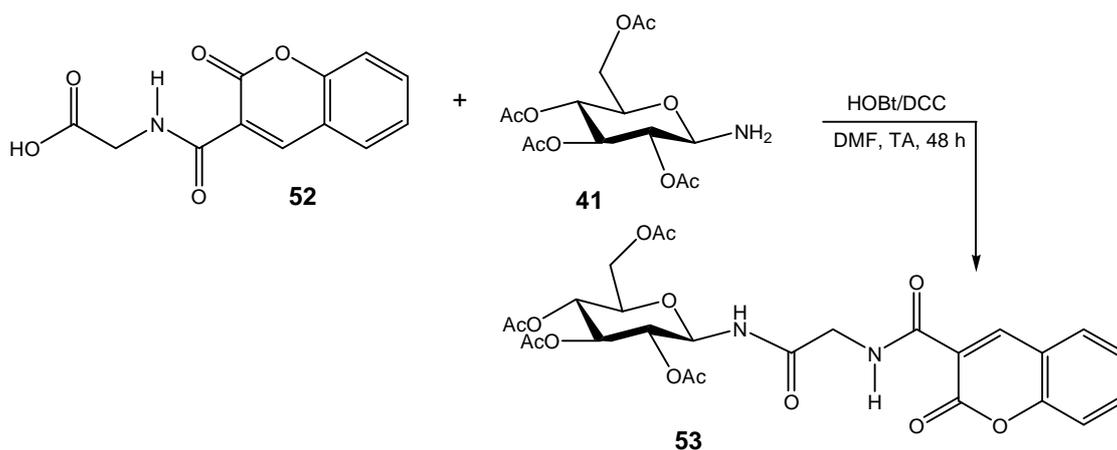
Para além disso, o espectro de IV do composto **52** apresenta uma banda de vibração larga a 3315 cm^{-1} devido ao grupo OH e ainda uma banda a 1760 cm^{-1} devida ao grupo C=O da função ácido carboxílico.

1.3.4 – Síntese de [N-(2',3',4',6'-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil)-(2-oxo-2H-cromeno-3-carbonil)-amino]-acetamida **53**

A síntese do composto **53** foi realizada em condições experimentais idênticas às utilizadas na preparação do composto **47**, por reacção entre o ácido **52** e a glucosilamina **41** e de acordo com o esquema 20.

O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna tipo “flash” e recristalizado de diclorometano-éter de petróleo originando o produto **53** na forma de um sólido branco, com um rendimento de 20% (Exp. 2.3.5).

O espectro de ^1H -RMN evidenciou a formação da ligação amida pelo aparecimento de um sinal a 7,01 ppm, na forma de um duplete, com uma constante de acoplamento de 9,3 Hz, correspondente ao próton NH, compatível com o acoplamento com o próton anomérico.



O espectro de absorção UV/vis do fluoróforo **41** mostrou uma banda larga a 300 ($\epsilon_{\text{max}} \approx 11400 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e um “shoulder” por volta de 330 nm, não havendo alteração significativa na posição das bandas de absorção de alto comprimento de onda para os derivados **49**, **51** e **53**. O espectro de fluorescência do estado estacionário do corante **48** mostrou uma banda de emissão larga com um máximo a 400 nm (“shoulder” a 370 nm) idêntico aos espectro de emissão dos derivados **49**, **51** e **53** (fig. 6) O rendimento quântico de fluorescência foi de 1,8% (desvio padrão de 0,1%) para o **48** e 2,1-2,4% para os compostos **49**, **51** e **53**⁵².

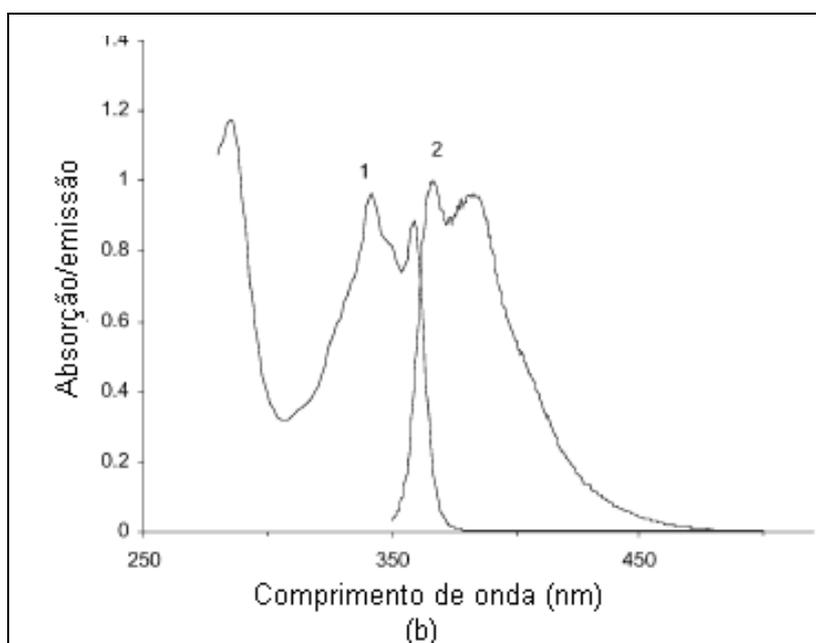


Figura 6. Espectros de absorção (curva 1) e de emissão (curva 2) do derivado da cumarina **53**

O espectro de massa de alta resolução obtido pela técnica FAB para o composto **53** apresenta um ião $M^+ + 1$ a 577,1671 compatível com a fórmula molecular $C_{26}H_{28}N_2O_{13}$.

O espectro de IV apresenta uma banda de absorção a 3413 cm^{-1} e outra a 1610 cm^{-1} devido às vibrações de estiramento da ligação N-H e C=O, respectivamente, em amidas.

1.4 - SÍNTESE DE N-GLICOPÉPTIDOS FLUORESCENTES CONTENDO O TRIPÉPTIDO Gly-Phe-Pro

Como foi referido na introdução a síntese peptídica pode seguir duas estratégias distintas, sequencial ou convergente. Na primeira os aminoácidos são ligados sequencialmente até se obter a cadeia peptídica desejada. Com esta estratégia há a possibilidade de controlar a racemização através da escolha adequada do grupo protector da função amino e do grupo activador do grupo carboxilo e os rendimentos atingidos são, normalmente, superiores aos obtidos na síntese convergente. Nesta são preparados vários segmentos de péptidos que, por subsquente acoplamento, originam o produto pretendido.

Neste trabalho pretendeu-se sintetizar, inicialmente o tripéptido Gly-Phe-Pro por síntese sequencial de N→C. Uma vez que o resíduo C-terminal é a prolina não se corre o risco de ocorrer racemização.

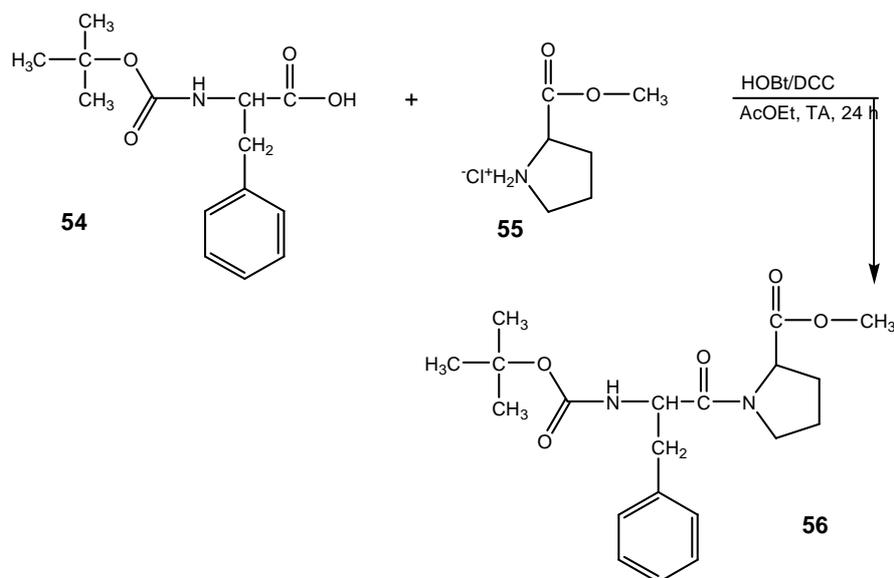
1.4.1 – Síntese do tripéptido Gly-Phe-Pro

1.4.1.1 – Tentativa de síntese do tripéptido Z-Gly-Phe-Pro-OMe

Como primeira etapa pretendia-se preparar o dipéptido Boc-Phe-Pro-OMe fazendo reagir Boc-Phe **54** com Pro-OMe.HCl **55**. Para isso utilizou-se o método de acoplamento B, com HBTU e DIPEA, em diclorometano, obtendo-se o dipéptido **56** na forma de um óleo, com um rendimento de 69%. Pela análise do espectro de $^1\text{H-RMN}$ verificou-se, no entanto, o aparecimento de um sinal a 2,89 ppm, correspondente a um sub-produto da reacção que se revelou difícil de eliminar. Repetiu-se então a reacção, mas utilizando HOBt e DCC, em acetato de etilo, de acordo com o esquema 21,

obtendo-se o produto **54**, na forma de um óleo, com um rendimento de 88,8%. O composto obtido foi utilizado nas reacções seguintes sem qualquer purificação.

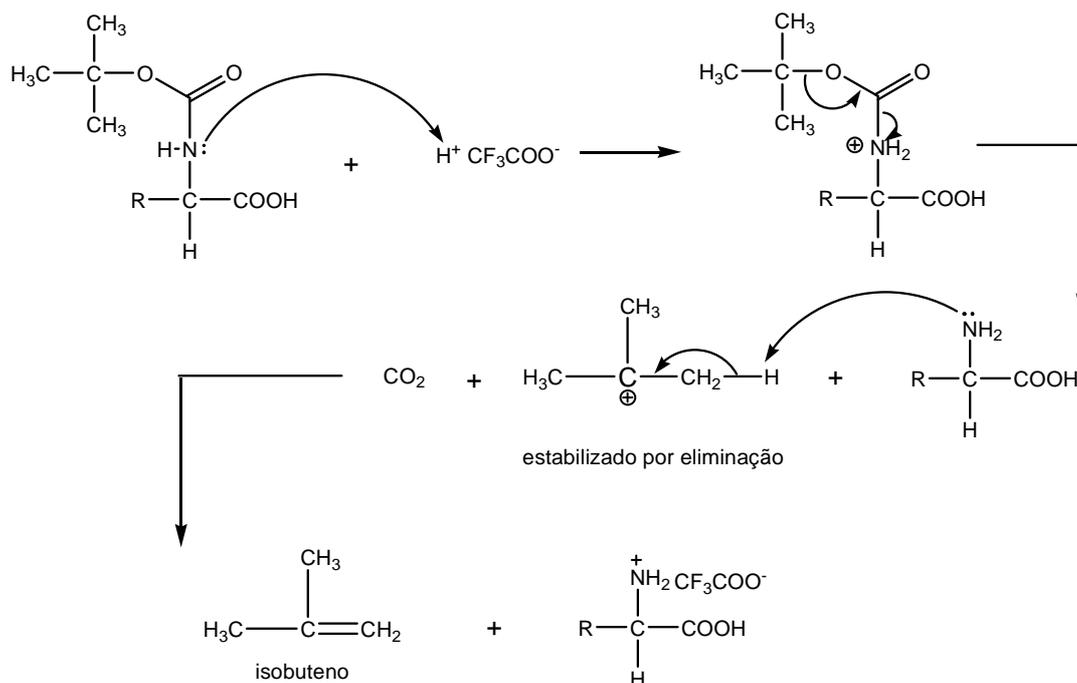
Pela análise do espectro de $^1\text{H-RMN}$ pode comprovar-se a formação da ligação peptídica pelo desaparecimento do sinal por volta de 3,00 ppm, na forma de singletto largo, correspondente ao grupo NH da prolina e a presença de todos os sinais característicos dos dois aminoácidos constituintes do dipéptido.



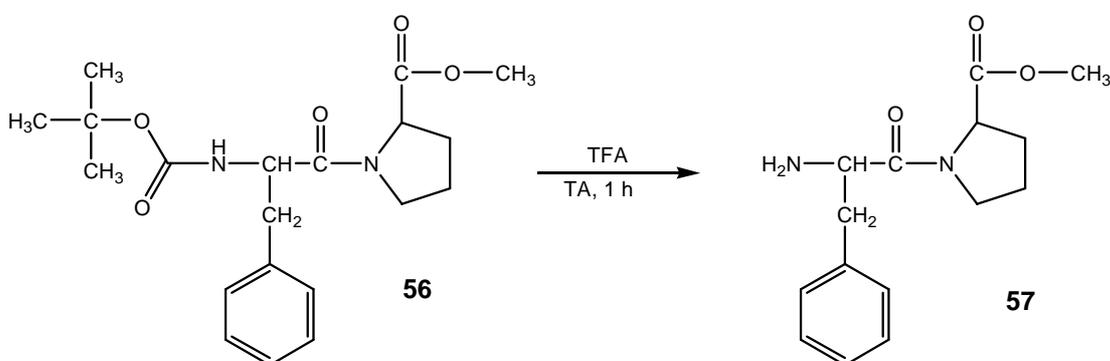
Esquema 21

Para prosseguir foi necessário desproteger a função amina da fenilalanina para fazer a ligação à glicina.

Tal como foi referido na introdução um dos aspectos importantes da síntese peptídica é a remoção dos grupos protectores. O grupo *tert*-butoxicarbonilo (grupo Boc), usado frequentemente, é removido por acção de um ácido, normalmente o ácido trifluoroacético. O mecanismo proposto para esta reacção está descrito no esquema 22.

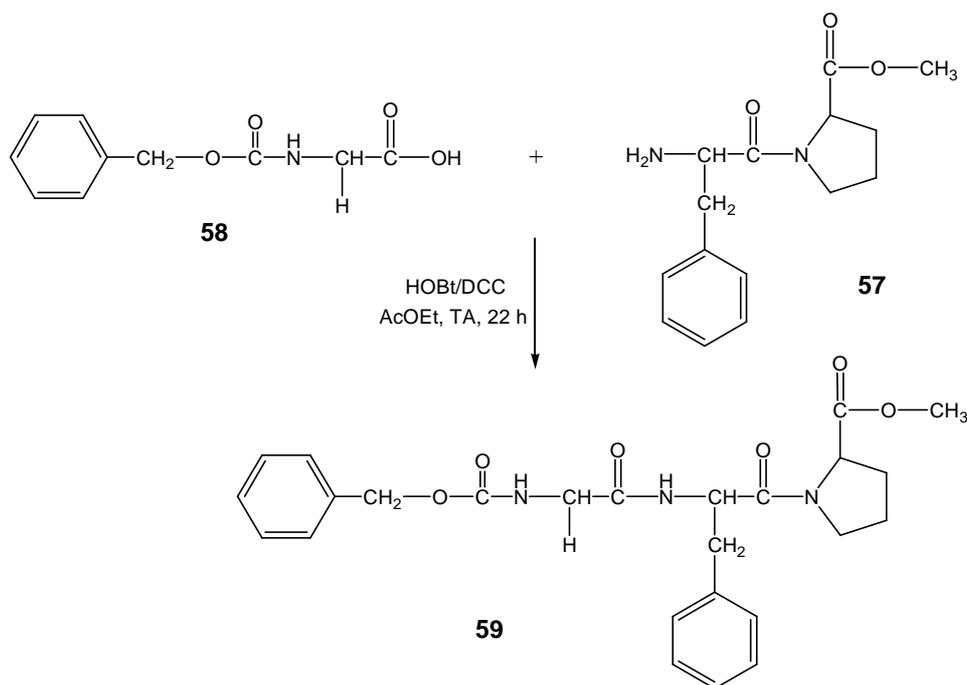


Procedeu-se à remoção do grupo Boc do dipéptido **56**, por acção do ácido trifluoroacético de acordo com o esquema 23, obtendo-se o produto **57** na forma de um óleo.



A análise do espectro de ^1H -RMN comprova a remoção do grupo Boc pois desapareceu o sinal a 1,39 ppm, na forma de singlete e que integrava para nove.

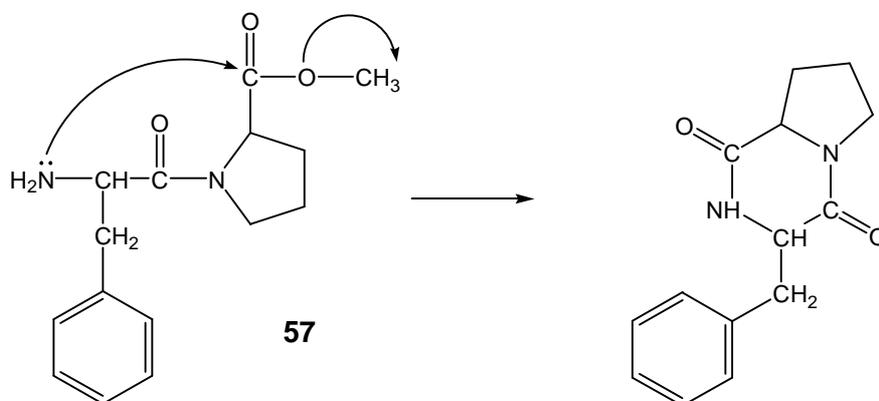
Para a síntese do tripéptido pretendido, Z-Gly-Phe-Pro-OMe, utilizou-se o dipéptido **57** sem qualquer purificação e tentou fazer-se a ligação à glicina **58**, protegida pelo grupo benziloxycarbonilo (Z), por um procedimento experimental idêntico ao seguido na preparação do composto **56**, de acordo com o esquema 24.



Esquema 24

Verificou-se que a reacção ocorreu em pequena extensão e o produto obtido revelou-se de difícil purificação.

Admite-se que este resultado seja explicado pela formação duma dicetopiperazina do péptido **57**, que ocorre por reacção intramolecular entre o grupo amino da fenilalanina e o grupo carbonilo da prolina (esquema 25). Os ésteres metílicos constituem uma boa protecção da função carboxílica mas podem surgir problemas quando se trabalha com dipéptidos pois o éster metílico livre de um dipéptido pode ciclizar facilmente formando uma dicetopiperazina⁶.

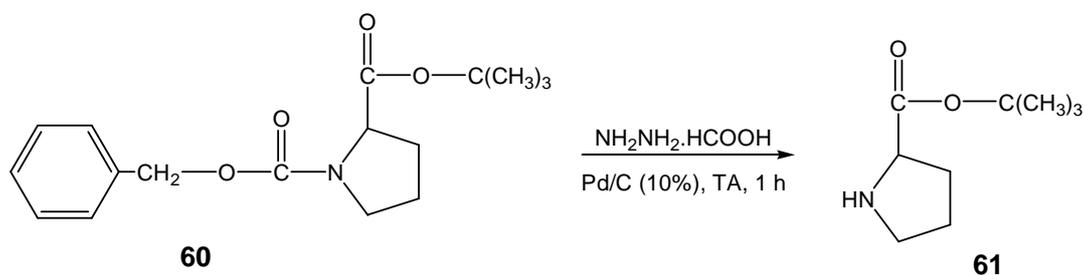


Esquema 25

1.4.1.2 – Síntese do dipéptido Z-Phe-Pro-OBu^t

Para ultrapassar o problema, e atendendo a que os ésteres *tert*-butilicos impedem a reacção intramolecular decidiu usar-se como produto de partida a prolina **61**, com o grupo ácido protegido na forma de éster *tert*-butilico, obtida pela desprotecção do composto Z-Pro-OBu^t **60**.

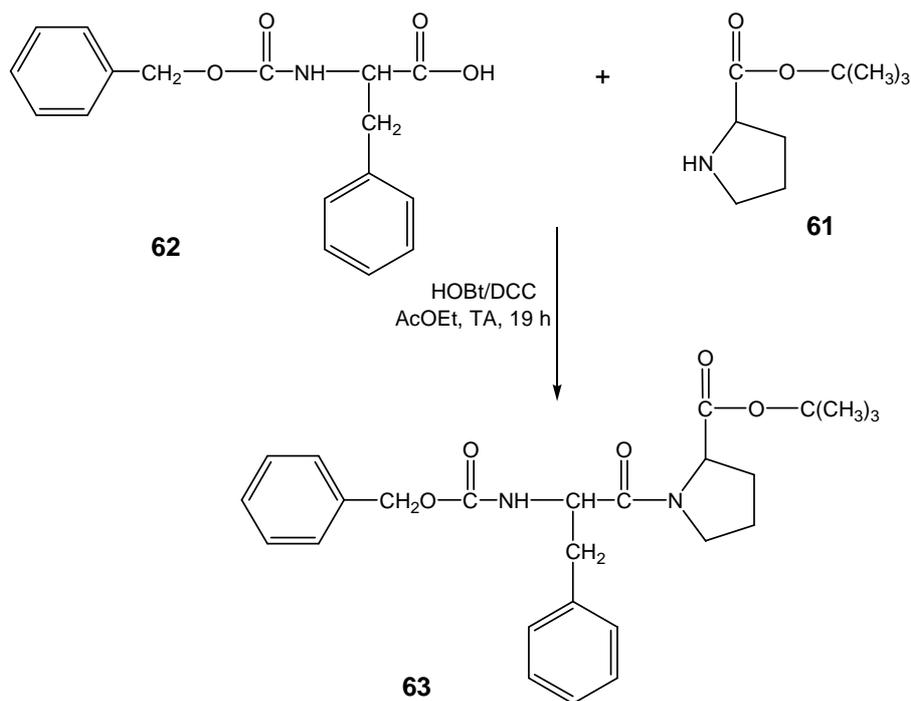
Como foi referido na introdução o grupo Z pode ser removido por hidrogenação catalítica. Assim, tentou desproteger-se o grupo amino do composto **60** por reacção com hidrogénio em presença de Pd/C (10%), em metanol seco, à temperatura ambiente. Ao fim de 4 h a mistura foi filtrada sobre Celite e evaporada. O resíduo obtido revelou-se muito difícil de secar e no final verificou-se ser uma quantidade muito reduzida o que revelou ter sido a reacção muito pouco efectiva. Depois de várias tentativas infrutíferas optou-se por utilizar um método diferente que consiste em fazer a reacção entre o aminoácido protegido **60** e monoformiato de hidrazina em metanol na presença do catalisador Pd/C (10%). A reacção decorreu à temperatura ambiente e completou-se numa hora (Esquema 26)⁶⁴, originando o composto **61** com um rendimento de 85% (Exp. 2.4.1).



Esquema 26

O composto **61** ligou-se então à benziloxicarbonil-fenilalanina **62**, em presença de HOBT e DCC, formando-se o dipéptido **63** (62%) de acordo com o esquema 27 (Exp. 2.4.2). O produto obtido foi utilizado, nas reacções posteriores, sem qualquer purificação.

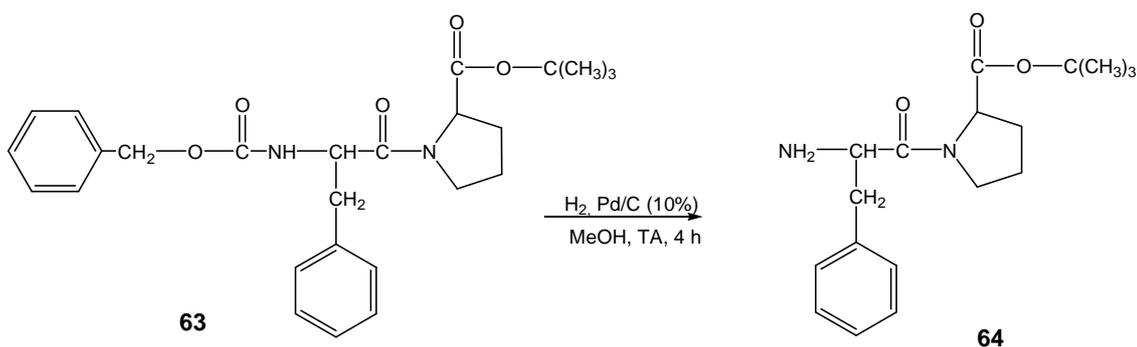
A análise do ¹H-RMN mostra um sinal a 5,50 ppm, na forma de um duplete, correspondente ao grupo NH da amida e o desaparecimento do sinal a 3,0 ppm do NH da prolina.



Esquema 27

1.4.1.3 – Síntese do tripéptido protegido Z-Gly-Phe-Pro-OBu^t **65**

De modo a poder efectuar a síntese do tripéptido **65**, por reacção entre Z-Gly e **63**, foi necessário remover primeiro o grupo Z deste último, de modo a obter o grupo NH₂ da fenilalanina na forma livre. Esta desprotecção foi realizada por reacção com hidrogénio em presença de Pd/C (10%) de acordo com o esquema 28.



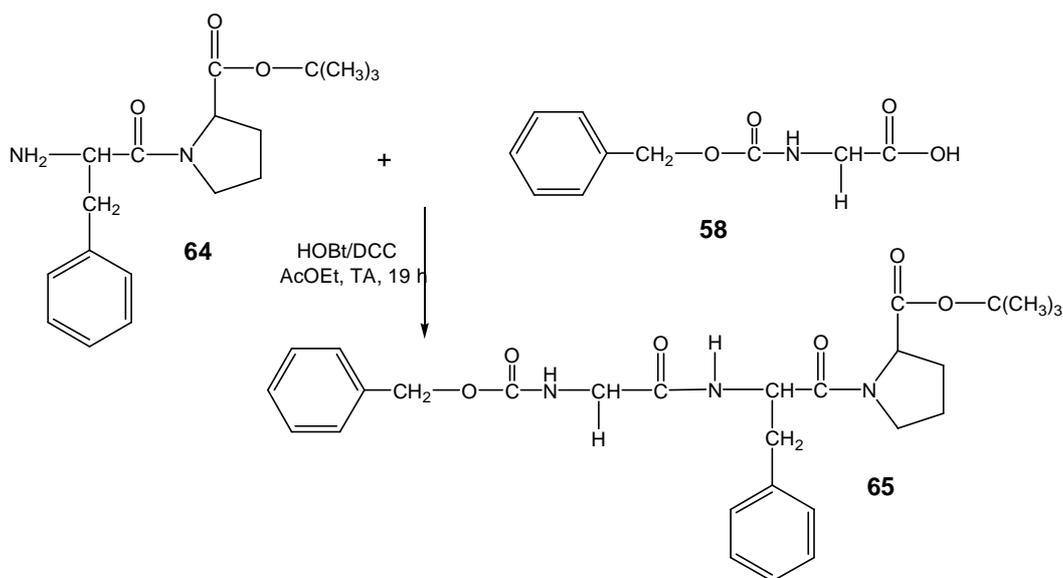
Esquema 28

O composto **64** foi obtido com 85% de rendimento e usado sem qualquer purificação (Exp. 2.4.3).

Pela análise do espectro de $^1\text{H-RMN}$ verificou-se a remoção do grupo protector pois desapareceram os sinais a 5,04 ppm correspondente ao $\text{CH}_2\text{-Z}$, a 5,50 ppm correspondente ao NH e os sinais de 7,26-7,27 ppm dos prótons arílicos. Por outro lado, aparece um sinal a 6,40 ppm, na forma de singleto largo e que integra para dois prótons, correspondente ao NH_2 .

Finalmente fez-se a ligação do composto **64** à glicina **58**, em presença de HOBt e DCC (Esquema 29), obtendo-se o tripéptido **65** com um rendimento de 62% (Exp. 2.4.4).

A análise do espectro de $^1\text{H-RMN}$ evidencia a formação da nova ligação amida pela presença do sinal a 8,23, que integra para um próton e que corresponde ao NH da fenilalanina, na forma de duplete com $J=8,4$ Hz, tendo desaparecido o sinal a 6,40 ppm, correspondente ao NH_2 .



Esquema 29

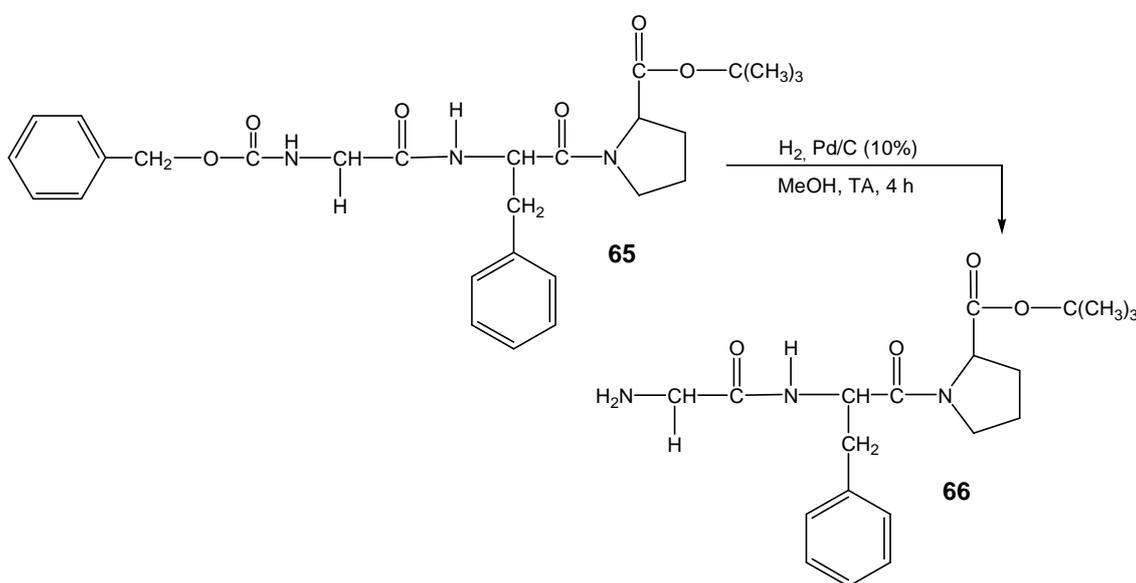
1.4.2 – Síntese de nafto[1,2-*d*][1,2,3]triazol-2-il-benzamida-Gly-Phe-Pro-OBu^t **67**

Tal como foi referido na introdução a ligação de corantes fluorescentes a péptidos integra um campo de investigação em pleno desenvolvimento na procura de compostos fluorescentes que apresentem boa compatibilidade com sistemas biológicos o que favorece a aplicação desses compostos.

Neste trabalho foi já referido a ligação de fluoróforos à glucosilamina e à glicina passando a descrever-se nos pontos seguintes a ligação ao tripéptido preparado em 1.4.1.3.

Para ligar o péptido **65** a um corante com um grupo activo ácido carboxílico é necessário remover o grupo protector da função amina (Z). O procedimento é o mesmo que foi utilizado na preparação do composto **64** de acordo com o esquema 30.

O tripéptido **66** foi obtido na forma de um sólido branco (94%) tendo sido usado sem qualquer purificação (Exp. 2.4.5).



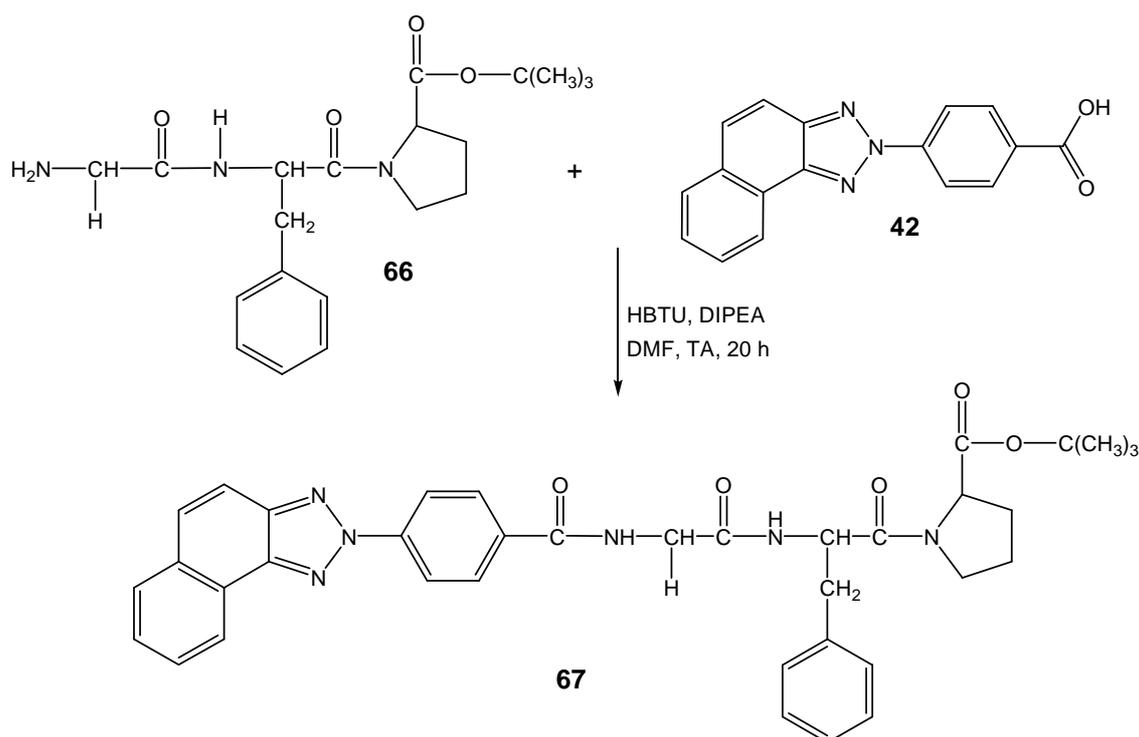
Esquema 30

A interpretação do espectro de 1H -RMN mostra o desaparecimento do sinal correspondente ao grupo Z-CH₂ a 5,00 ppm, e o sinal a 7,18-7,33 ppm que correspondia aos prótons do grupo arilo e ao NH da glicina que integrava para onze, passa a integrar apenas para 5 prótons correspondente ao anel aromático (a $\delta=7,27$ ppm) da fenilalanina e a 3,27 ppm aparece um sinal, na forma de um singlete largo integrando para dois prótons, correspondente ao grupo NH₂.

Para a ligação do fluoróforo **42** ao péptido **66** seguiu-se um procedimento experimental idêntico ao utilizado na preparação do composto **45**, representado no esquema 31. O método de acoplamento utilizado revelou-se muito eficaz e produto **67**

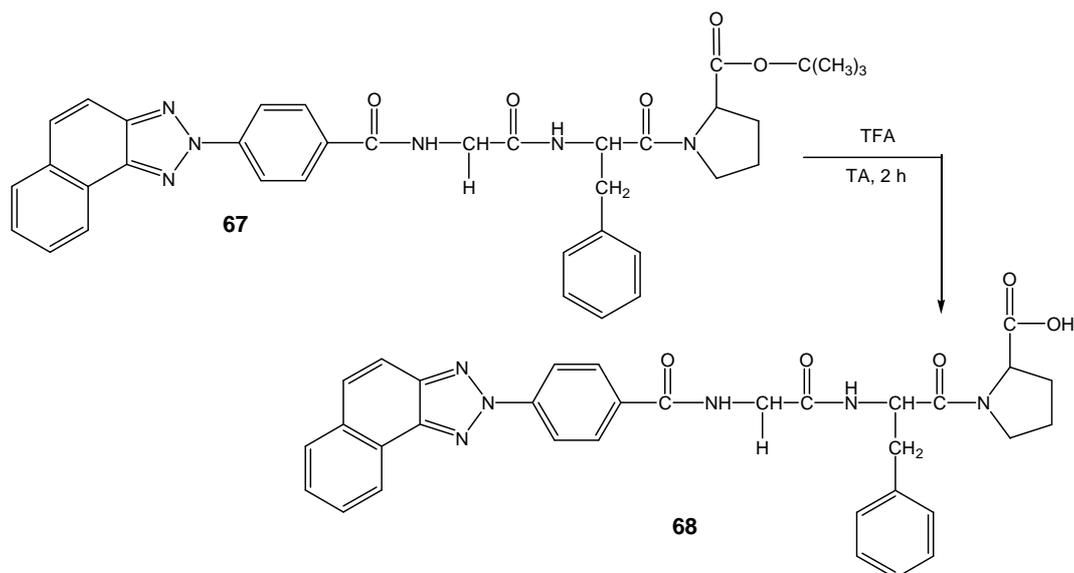
foi obtido puro, na forma de um sólido de cor rosa, com um rendimento de 87%. (Exp. 2.4.6).

A análise do espectro de ^1H -RMN comprova que o produto é o pretendido com os sinais dos prótons do corante e do péptido praticamente sem alteração à excepção do desaparecimento do sinal a 3,27 ppm do NH_2 da glicina e o aparecimento de um sinal a 8,85 ppm, na forma de um tripleto com constante de acoplamento de 5,7 Hz, compatível com o NH da ligação amida.



1.4.3 – Síntese de nafto[1,2-*d*][1,2,3]triazol-2-il-benzamida-Gly-Phe-Pro 68

Para poder ligar o composto **67** à glucosilamina foi necessário desproteger o grupo carboxilo o que foi feito por acção de TFA de acordo com o esquema 32.



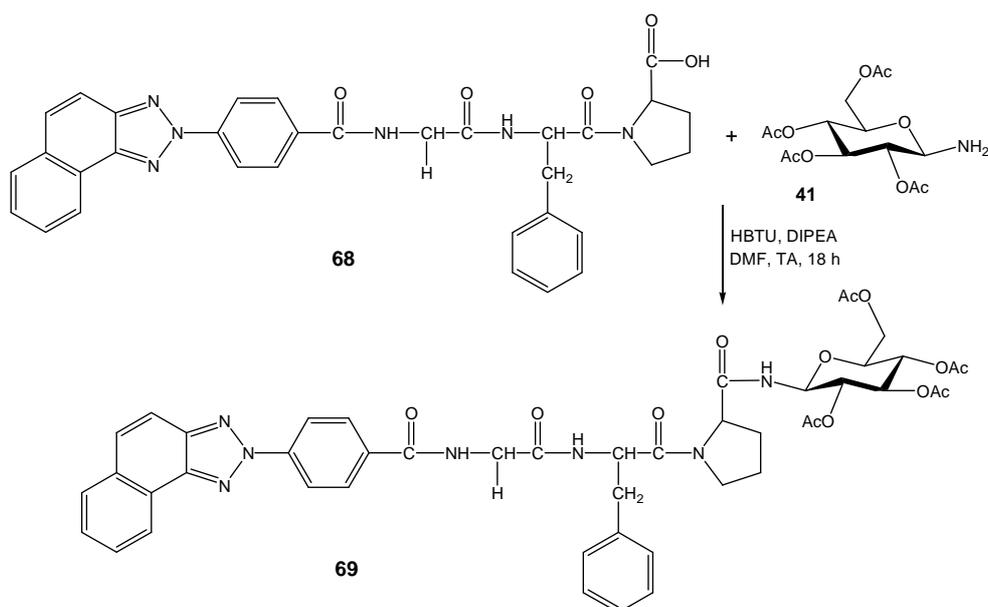
Esquema 32

O composto **68** foi obtido com um rendimento de 77% após recristalização de diclorometano-éter etílico (Exp. 2.4.7)

Pode comprovar-se a desprotecção, no espectro de ^1H -RMN, pelo desaparecimento do sinal a 1,38 ppm, na forma de um singlete e integrando para 9, correspondente ao grupo *terc*-butilo, e o aparecimento de um singlete largo a 12,52 ppm correspondente ao próton do OH.

1.4.4 – Síntese de nafto[1,2-*d*][1,2,3]triazol-2-il-benzamida-Gly-Phe-Pro-glucopiranosilamida **69**

O composto **68** reagiu com a glucosilamina **41** pelo método B descrito em 1.2.1. de acordo com o esquema 33. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna tipo “flash”, originando o produto **69**, sólido de cor rosa forte, com um rendimento de 53% (Exp. 2.4.8).

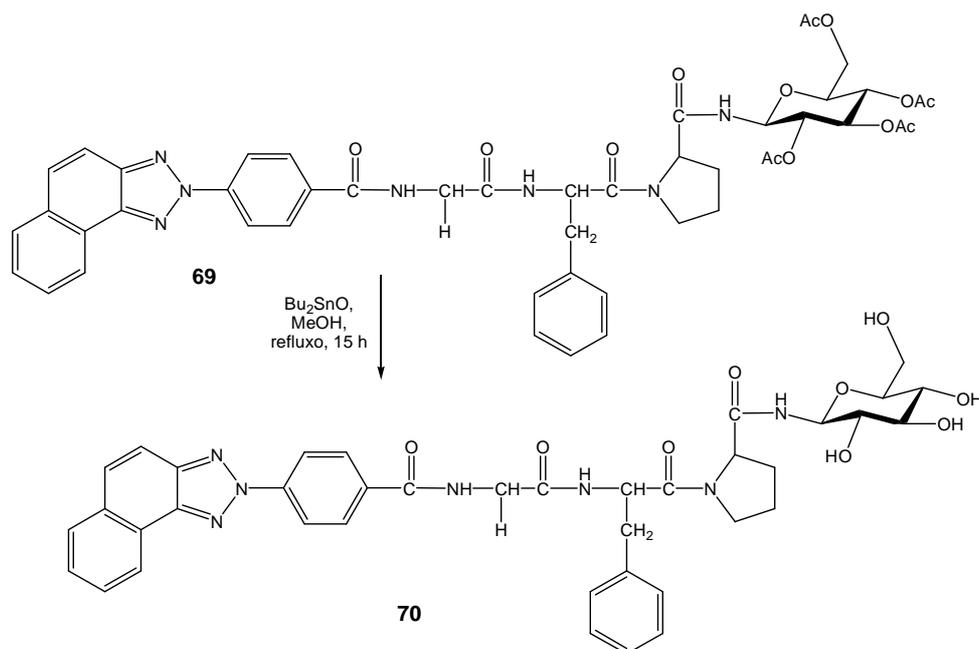


O espectro de ^1H -RMN revelou a formação de nova ligação amida entre o tripéptido e a unidade glucose devido ao aparecimento, a 7,40 ppm, de um duplete com constante de acoplamento 9,3 Hz, correspondente ao NH da glucosilamida.

O espectro de IV apresenta uma banda a 1751 cm^{-1} correspondente à vibração de estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ dos grupos acetilo.

1.4.5 – Síntese de nafto[1,2-*d*][1,2,3]triazol-2-il-benzamida-Gly-Phe-Pro-glucopiranosilamida desacetilada 70

O composto **69** foi submetido a um procedimento experimental idêntico ao utilizado na preparação do composto **50** (Esquema 34), com Bu_2SnO em metanol seco e aquecido sob refluxo, durante 15 h, tendo originado o composto **70** na forma de um sólido com um rendimento de 62% (Exp. 2.4.9).



Esquema 34

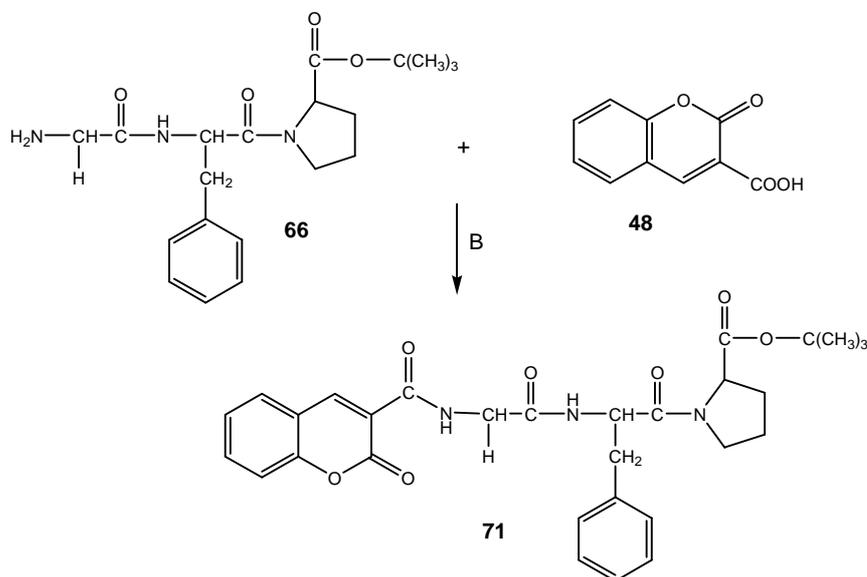
A interpretação do espectro de RMN de próton mostrou que a desprotecção foi efectiva pois desapareceram os sinais de 1,91 a 2,07 ppm correspondentes aos grupos acetilo. Por sua vez, os sinais correspondentes aos prótons do açúcar deslocaram-se para campo mais alto, sendo os maiores desvios correspondentes aos prótons 2', 3' e 4', seguidos dos 6', 5' e finalmente 1' que foi o que sofreu menor desvio. Também aqui o próton do grupo OH ligado na posição 6' originou um tripleto a 4,52 ppm, com $J=5,7$ Hz, enquanto que os outros, quando isolados, corresponderam a dupletos ou a singletos. Todos os outros sinais se mantiveram semelhantes evidenciando ter sido preservada a estrutura do péptido e do corante.

O espectro de IV comprovou a remoção dos grupos acetilo pois deixou de apresentar a banda a 1751 cm^{-1} , correspondente ao C=O do éster, e passou a apresentar uma banda a 3583 cm^{-1} correspondente aos grupos OH.

1.4.6 – Síntese de (2-Oxo-2H-cromeno-3-carbonil)-amido-Gly-Phe-Pro-OBu^t 71

Tal como se descreveu no ponto 1.4.2 para ligar o péptido **65** à cumarina **48** foi necessário desproteger a função amina do péptido. Seguiu-se o procedimento experimental descrito para a síntese do composto **67**, acoplamento na presença de

HBTU e DIPEA, em DMF (esquema 35). O composto **71** foi obtido por precipitação com água, filtrado e seco com um rendimento de 86% (Exp. 2.4.10). O método de acoplamento revelou-se eficaz, de fácil execução e originando bom rendimento.

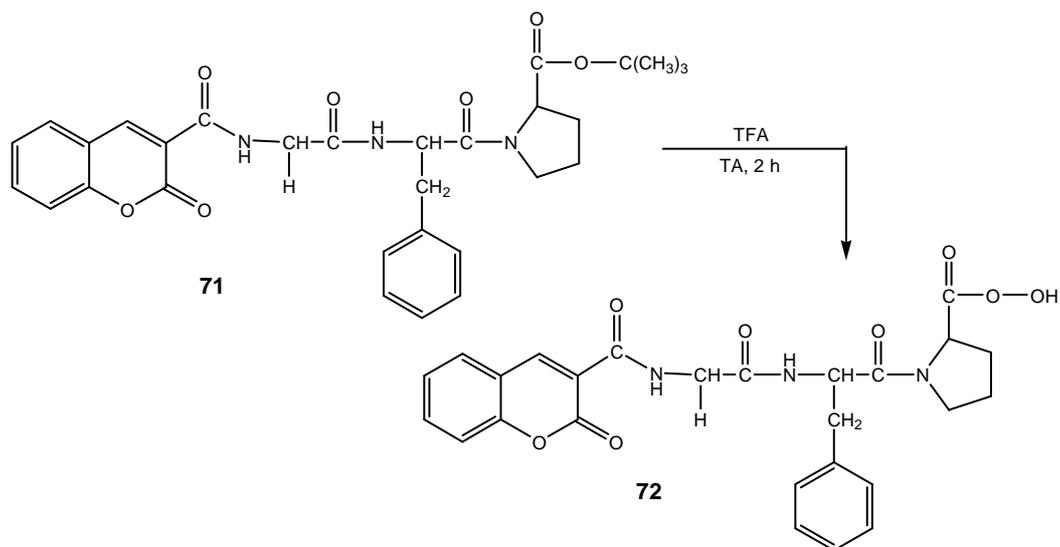


A formação da ligação amida foi detectada pelo desaparecimento do singlete largo, correspondente ao NH_2 , a 3,27 ppm, e o aparecimento do sinal a 9,22 ppm, na forma de um tripleto com uma constante de acoplamento de 5,4 Hz, típico do NH da glicina.

O espectro de infra-vermelho apresenta uma banda a 1641 cm^{-1} , que não estava presente no espectro do composto **66**, e que corresponde ao grupo $\text{C}=\text{O}$ de uma lactona, o que comprova a formação da ligação amida ao fluoróforo **48**.

1.4.7 – Síntese de (2-Oxo-2H-cromeno-3-carbonil)-amido-Gly-Phe-Pro **72**

O composto **71** foi tratado com TFA para remover o grupo protector do carboxilo com um procedimento semelhante ao utilizado na preparação do composto **68** de acordo com o esquema 36 (Exp. 2.4.11).

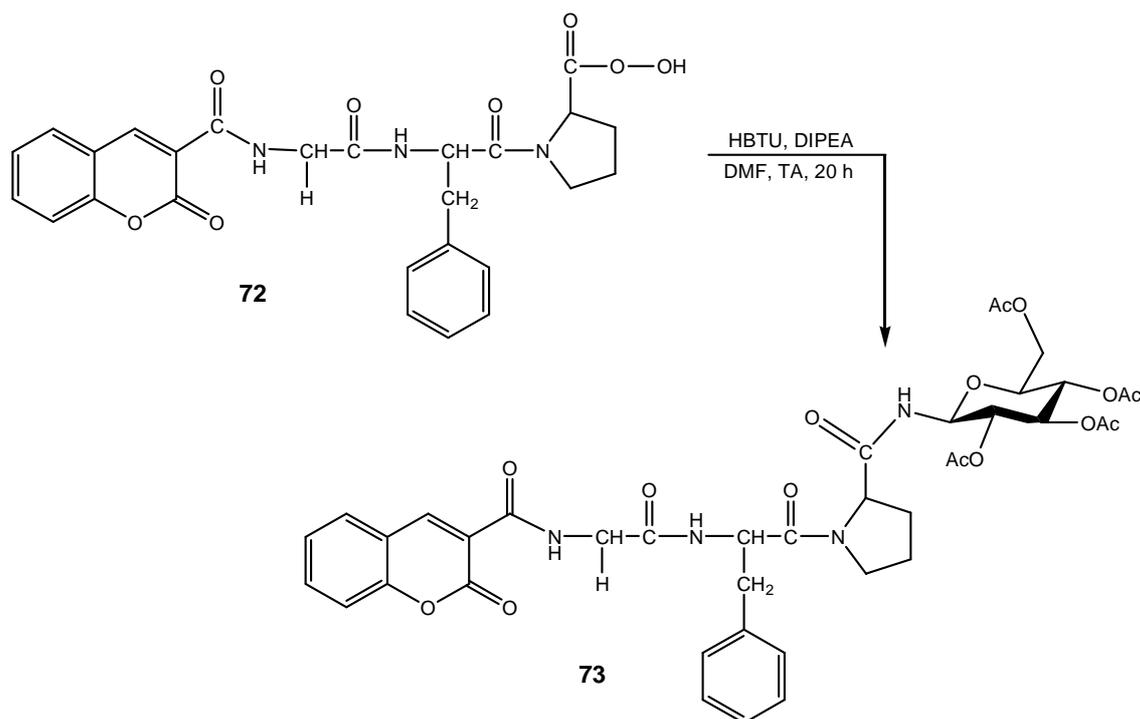


Pela análise do espectro de ^1H -RMN pode comprovar-se a remoção do grupo protector pois desapareceu o sinal a 1,48 ppm, na forma de um singleto, que integrava para 9, correspondente aos grupos CH_3 , tendo-se mantido todos os outros sinais praticamente sem alteração. Não foi detectado o sinal correspondente ao protão do grupo OH.

O espectro de IV evidencia a desprotecção do grupo ácido carboxílico pois apresenta uma banda a 3405 cm^{-1} correspondente ao grupo OH, e outra a 1691 cm^{-1} devido ao grupo $\text{C}=\text{O}$ do ácido.

1.4.8 – Síntese de (2-Oxo-2H-cromeno-3-carbonil)-amido-Gly-Phe-Pro-glucopiranosilamida 73

O composto **72** foi então ligado à glucosilamina **41**. Mais uma vez foi seleccionado o método de acoplamento com HBTU e DIPEA que se revelou razoável para esta síntese (esquema 37). O produto **73** foi precipitado da mistura reaccional por adição de água, filtrado e seco (53%) (Exp. 2.4.12).



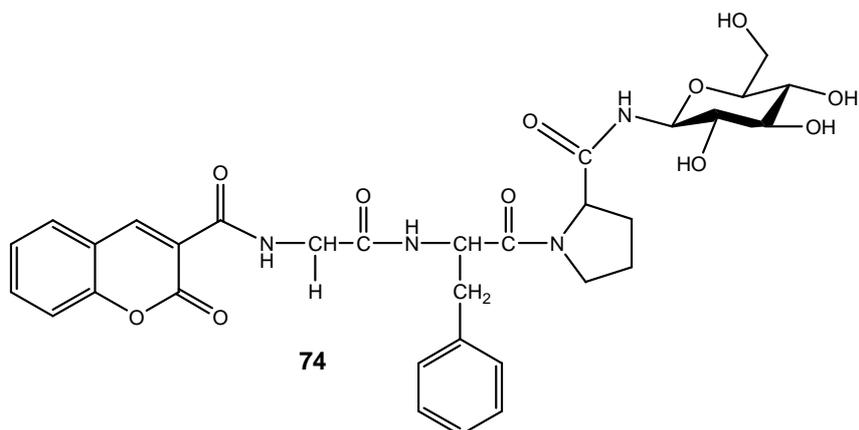
Esquema 37

A formação da ligação amida é evidenciada, no espectro de $^1\text{H-RMN}$, pelo sinal a 7,20-7,32 ppm, correspondente ao NH da amida que na glucosilamina aparecia a 2,02-2,10 ppm. O próton anomérico que aparecia na amina **41** a 4,20 ppm aparece agora a cerca de 5,28 ppm, campo mais baixo, o que é motivado pela proximidade de um grupo electronegativo que o desprotege.

1.4.9 – Síntese de (2-Oxo-2H-cromeno-3-carbonil)-amido-Gly-Phe-Pro-glucopiranosilamida desacetilada **74**

O composto **73** foi tratado de modo idêntico ao utilizado na preparação do composto **70**, com Bu_2SnO para remoção dos grupos acetilo. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna tipo “flash” originando o produto **74** com um rendimento de 59% (Exp. 2.4.13).

O espectro de $^1\text{H-RMN}$ evidencia a desprotecção pois desapareceram os sinais de 1,90 a 2,07 ppm, correspondentes aos grupos acetilo, e os sinais dos prótons do açúcar deslocaram-se para menores desvios químicos sendo o menos afectado o próton anomérico tal como acontece no composto **70**.



O espectro de fluorescência do corante **48** mostra uma banda de emissão, com estrutura vibracional, com máximo a 408,5 nm. A ligação do corante à glucosilamina, acetilada ou desprotegida (**49** e **50**), a péptidos (**71**) ou a glicopéptidos (**73** e **74**), não afecta nem a forma nem a posição da banda de fluorescência. Pela análise dos espectros, de absorção e de emissão, verifica-se que tanto no corante como nos compostos derivados a banda máxima de excitação se situa por volta dos 340 nm e a banda máxima de emissão entre os 400 e os 410 nm (Tabela 1).

A tabela 1 apresenta os comprimentos de onda máximos de excitação e de emissão para os compostos referidos.

Tabela 1 – Comprimentos de onda máximos de excitação e de emissão de derivados de cumarina

Composto	Máximo de excitação (nm)	Máximo de emissão (nm)
48	339	408,5
49	340,5	406,5
50	338,5	404,5
71	337	403,5
73	339	402
74	339	403

Nas figuras seguintes são apresentados os espectros de excitação e de emissão dos compostos.

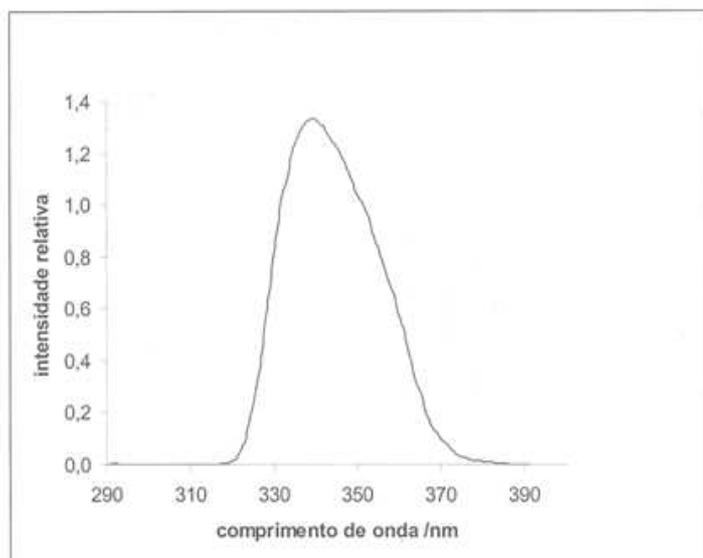


Figura 7. Espectro de excitação do composto **48** (λ_{max} de excitação=339 nm)

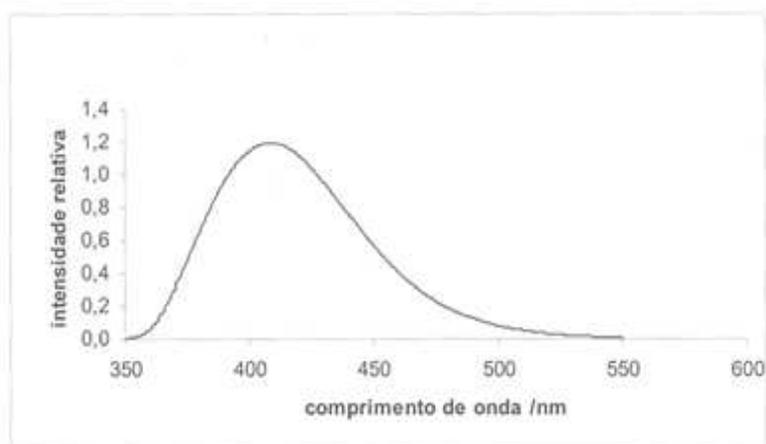


Figura 8. Espectro de emissão do composto **48** (λ_{max} de emissão=408,5 nm)

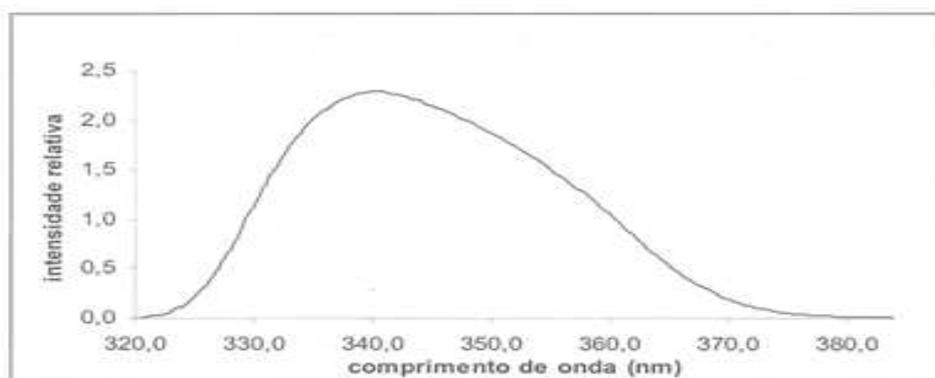


Figura 9. Espectro de excitação do composto **49** (λ_{max} =340,5 nm)

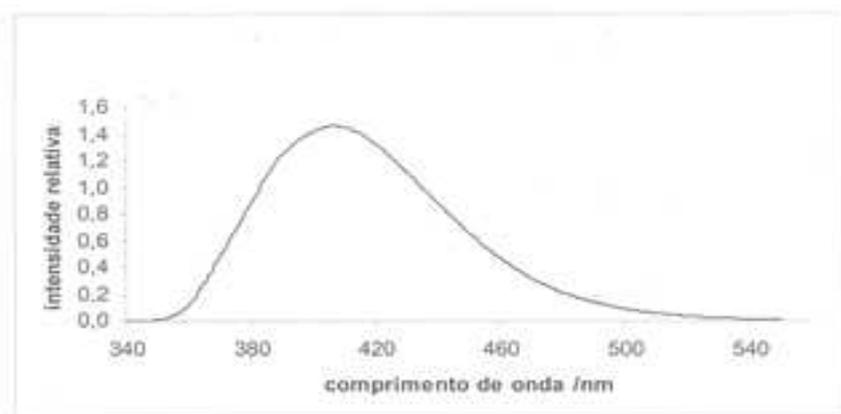


Figura 10. Espectro de emissão do composto **49** ($\lambda_{\text{max}}=406,5$ nm)

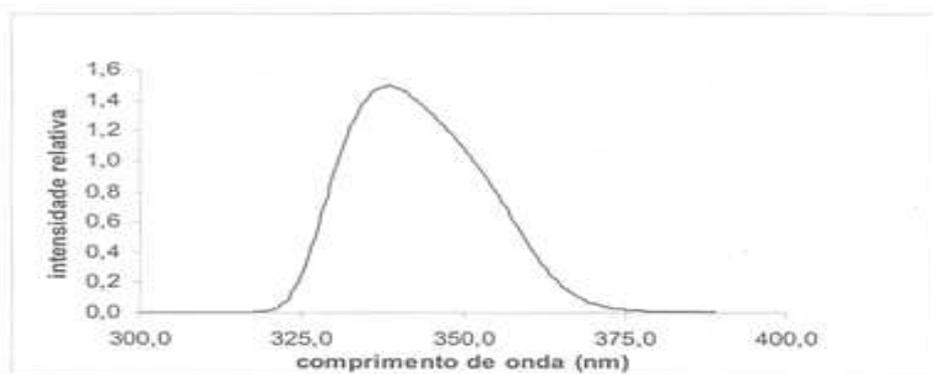


Figura 11. Espectro de excitação do composto **50** ($\lambda_{\text{max}}=338,5$ nm)

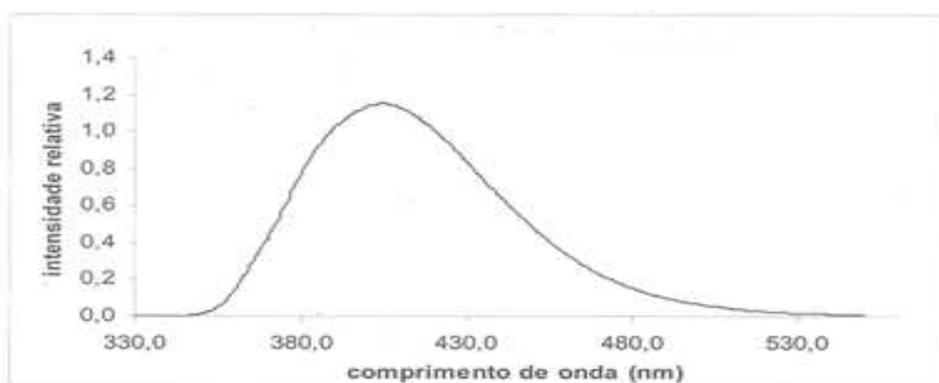


Figura 12. Espectro de emissão do composto **50** ($\lambda_{\text{max}}=404,5$ nm)

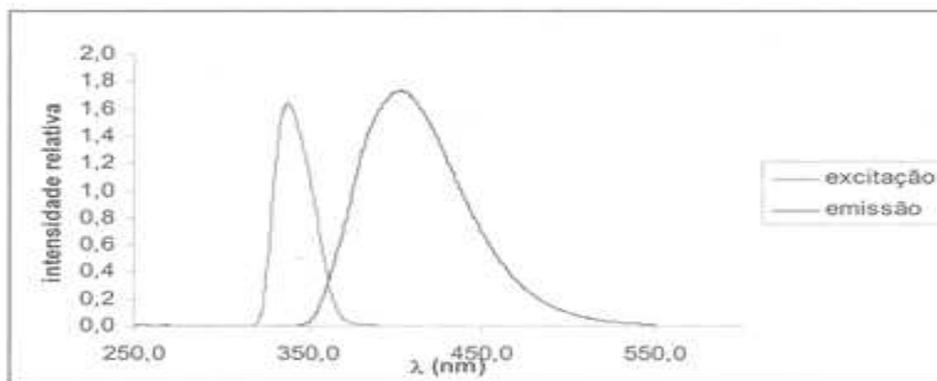


Figura 13. Espectro de excitação e de emissão do composto **71**
(λ_{max} de excitação=337 nm e λ_{max} de emissão=403,5 nm)

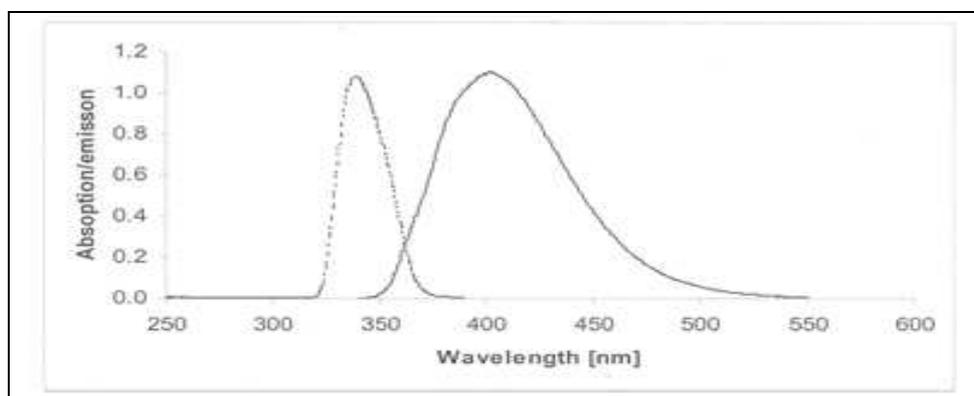


Figura 14. Espectro de excitação e de emissão do composto **73**
(λ_{max} de excitação=339 nm e λ_{max} de emissão=402 nm)

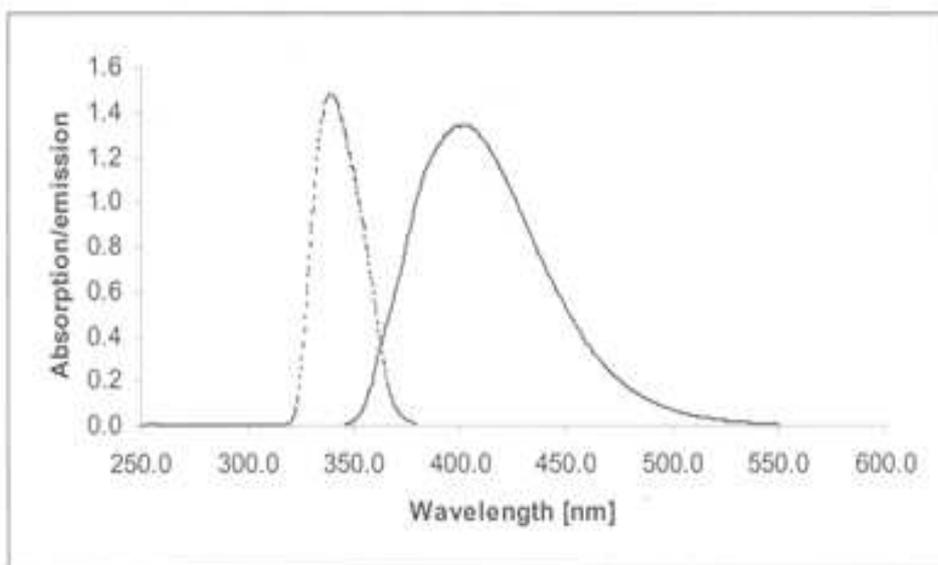


Figura 15. Espectro de excitação e de emissão do composto **74**
(λ_{max} de excitação=339 nm e λ_{max} de emissão=403 nm)

Em relação à intensidade dos espectros o modo de medição não permite fazer comparações uma vez que a fluorescência varia com a temperatura, intensidade da fonte e outros factores. Apenas o cálculo do rendimento quântico permitiria tirar outras conclusões.

1.4.10 – Tentativa de preparação do composto (2-Oxo-2H-cromeno-3-carbonil)-amido-Gly-Phe-Pro-glucopiranosilamida 73 por síntese convergente

Na síntese dos glicopéptidos fluorescentes foi adoptado o método de sintetizar o péptido fluorescente e só no final fazer a ligação com o açúcar que, tal como foi referido na introdução, é um método muito utilizado.

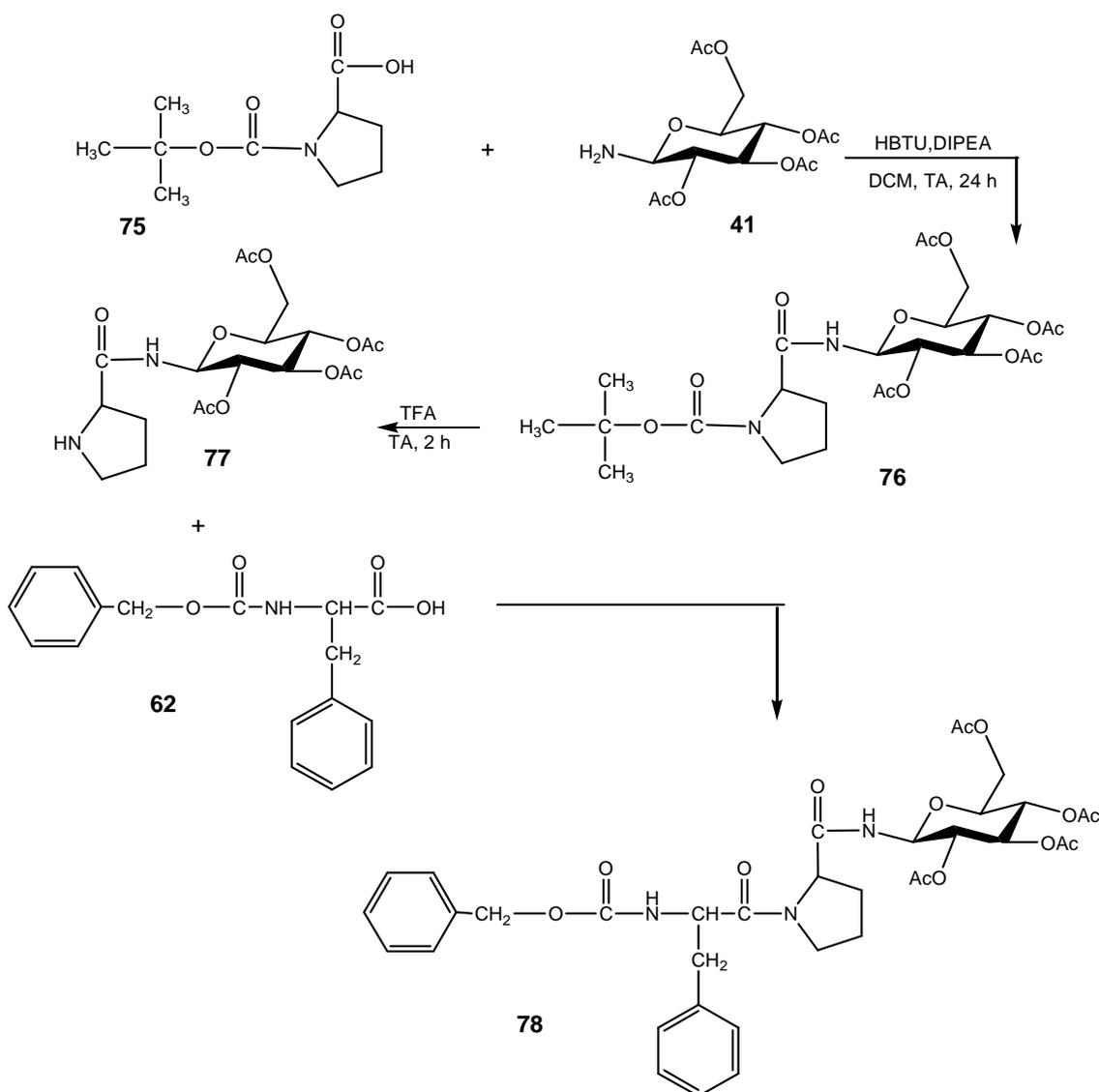
Neste trabalho pretendia-se preparar os compostos **69** e **73** por síntese convergente ligando, numa primeira etapa, o açúcar à prolina, seguida da ligação à fenilalanina e na etapa final fazer a ligação ao bloco fluoróforo-Gly já preparado anteriormente (compostos **46** e **52**).

Com este estudo pretendia-se comparar a facilidade de execução e os rendimentos obtidos nos dois métodos com vista à obtenção de outros glicopéptidos fluorescentes pela escolha adequada de blocos constituídos por fluoróforos e/ou aminoácidos diferentes.

Para atingir o objectivo pretendido ligou-se a Boc-Pro **75** à glucosilamina **41** utilizando o método de acoplamento com HBTU e DIPEA, em DCM, durante 24 h (Esquema 38). No final a mistura reaccional foi lavada com solução aquosa de HCl 1M, água, solução aquosa de NaHCO₃ a 10% e novamente com água. Depois das lavagens a solução foi seca (MgSO₄) e concentrada. O produto obtido, **76**, aparecia contaminado com o sub-produto da reacção com HBTU a que corresponde o sinal a 2,81 ppm no espectro de ¹H-RMN.

Tentou cristalizar-se o produto **76** mas não se conseguiu obter o produto puro em quantidade razoável para prosseguir a síntese (0,084 g; 38%). Fez-se então uma nova tentativa de sintetizar o produto mas utilizando DMF como solvente. No final tentou cristalizar-se o produto com adição de água de modo análogo ao utilizado em reacções anteriores (síntese do produto **73**) mas encontrou-se alguma dificuldade. A

solução foi deixada no frio durante 48 h e o produto **76** cristalizou na forma de um sólido branco com um rendimento de 25%.



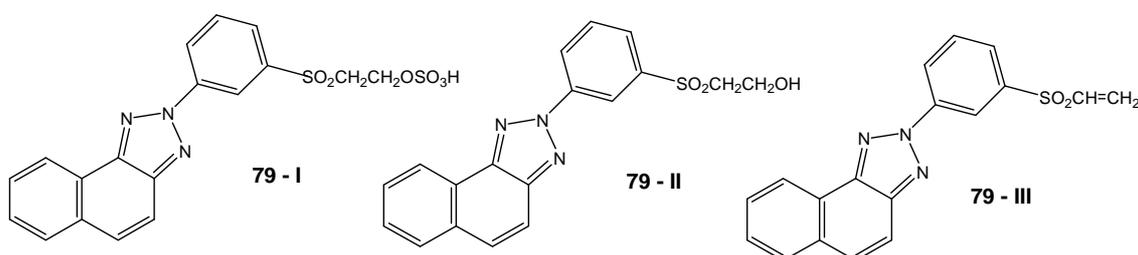
Esquema 38

Apesar dos baixos rendimentos prosseguiu-se com a síntese e para isso tratou-se o produto **76** com TFA à temperatura ambiente durante 2 h. O resíduo obtido foi lavado com éter etílico e éter de petróleo originando o produto **77** com um rendimento de 55%. O passo seguinte seria a ligação deste composto à Z-Phe **62** (esquema 38) mas em virtude das dificuldades encontradas na purificação dos produtos e dos baixos rendimentos decidiu-se abandonar o método pois entendeu-se não ser uma alternativa promissora na síntese destes compostos. Pode tentar explicar-se as dificuldades encontradas pela alteração na solubilidade dos compostos ao introduzir a glucosilamina.

2 – REACÇÕES COM CORANTES DA CLASSE DOS VINILSULFÓNICOS

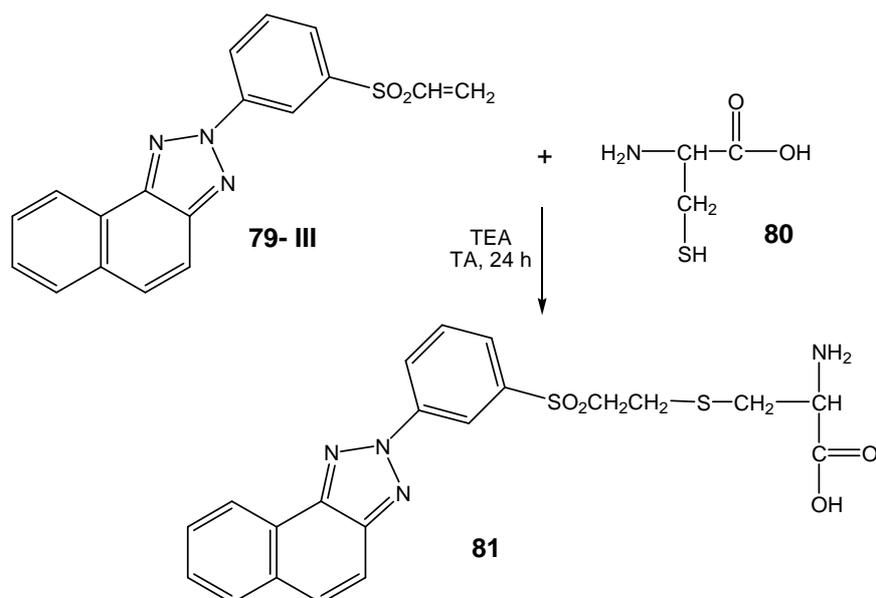
Na introdução foi referido o interesse e aplicação dos corantes reactivos e em particular dos vinilsulfónicos.

Neste trabalho realizou-se o estudo da utilização de um novo fluoróforo da classe dos vinilsulfónicos, preparado em laboratório e obtido como uma mistura do corante em 3 formas, como se ilustra em seguida.



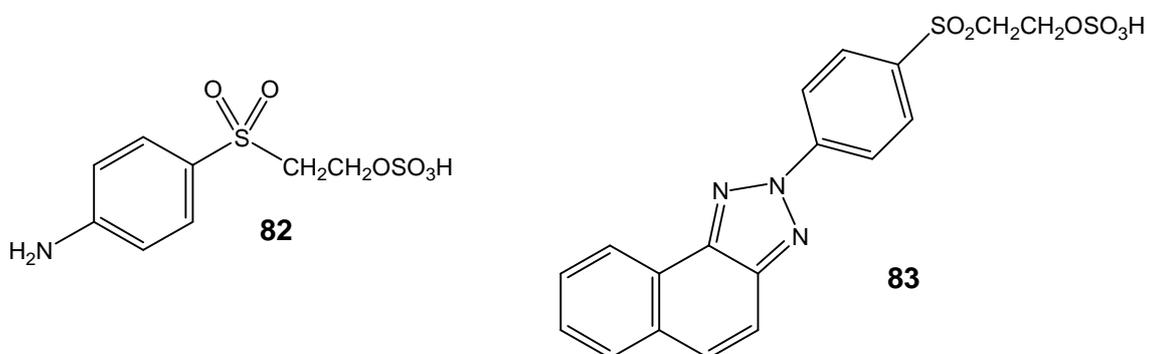
Para a ligação a aminoácidos, péptidos ou açúcares apenas interessa a forma III pelo que se tentou transformar as formas I e II na forma III. Por aquecimento a 60^o-70^oC, durante 2 horas a pH 8, transformou-se a forma I na forma III⁶⁵. A forma II tratada com trietilamina na presença de cloreto de mesitilo (cloreto de metanosulfonilo), durante 10 minutos à temperatura ambiente, transforma-se na forma III⁶⁶, a qual foi obtida na forma de um sólido acastanhado com um rendimento de 42% (Exp. 2.5.1). Tentou então ligar-se o corante na forma III à glicina e a outras aminas (4-metoxianilina, 2,5-dimetoxianilina e glucosilamina **41**) por uma reacção de adição à dupla ligação⁶⁶, mas as reacções foram muito incompletas e os produtos obtidos difíceis de purificar.

A reacção do corante **79- III** com cisteína **80**, por adição mediante o átomo de enxofre⁶⁶, foi realizada em DMF, adicionando TEA a 0^oC e deixando depois em agitação à temperatura ambiente durante 24 h (esquema 38). Por adição de água à mistura reaccional o composto **81** precipitou sendo posteriormente filtrado e seco (92%) (exp. 2.5.2).



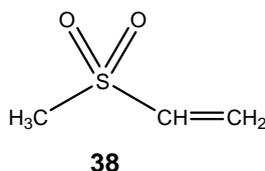
Esquema 38

No prosseguimento deste estudo foram realizadas reacções de adição com o composto **37**, precursor do corante vinilsulfónico **83**, que por reacções idênticas às descritas para transformar o corante **79** nas formas II e III, se transformam nas formas vinílicas.



2.1 – REACÇÕES DE AZA-MICHAEL

Referiu-se na introdução a importância das reacções de aza-Michael na síntese orgânica e vários métodos que têm sido desenvolvidos na realização destas reacções. Os compostos **37**, **79** e **83**, tal como se explicou no ponto anterior, podem ser transformados nas respectivas formas vinílicas podendo intervir em reacções de aza-Michael.

2.1.1 – Reacções de adição à metilvinilsulfona **38**

A metilvinilsulfona **38** reagiu com várias aminas primárias e secundárias, na presença do catalisador Amberlyst-15, à temperatura ambiente e pelo tempo apropriado a cada composto.

Na tabela 2 apresentam-se as reacções realizadas, tempo de reacção e rendimentos obtidos.

Tabela 2- Adição conjugada de aminas à metilvinilsulfona **38 catalisada por Amberlyst-15**

Entrada (Exp.)	Amina	Produto	Tempo (h)	Rendimento (%)
1 (2.6.1.1)	CH ₃ CH ₂ CH ₂ NH ₂	84	24	84
2 (2.6.1.2)	H ₂ NCH ₂ CH ₂ OH	85	10	95
3 (2.6.1.3)		86	0,5	51
4 (2.6.1.4)	(CH ₃ CH ₂) ₂ NH	87	5	62
5 (2.6.1.5)		88	24	92
6 (2.6.1.6)		89	0,5	95
7 (2.6.1.7)		90	24	74
8 (2.6.1.8)	H ₂ NCH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂	91	3	90

Os produtos correspondentes às entradas 1, 2, 5 e 6 foram obtidos numa forma pura sem qualquer purificação, com bons rendimentos. Destes, os compostos **84**, **85** e **88** foram obtidos utilizando um excesso de amina para permitir que a reacção fosse completa. Os produtos correspondentes às entradas 4, 7 e 8 foram purificados por cromatografia em coluna tipo “flash” usando como eluente misturas de clorofórmio-metanol nos dois primeiros **87** e **90** e acetona-etanol-água no último **91**.

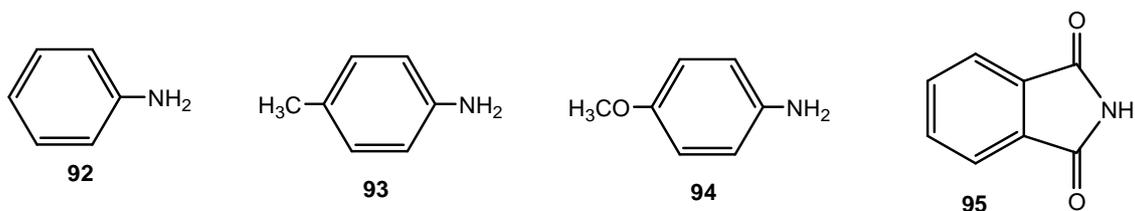
A análise dos espectros de ^1H -RMN mostra que os sinais correspondentes aos prótons dos dois grupos CH_2 da metilvinilsulfona aparecem, para todos os compostos, entre 2,84 e 3,30 ppm, o que evidencia a reacção de adição.

As aminas alifáticas primárias (Tabela 2, entradas 1-3 e 8) reagiram em condições moderadas (temperatura ambiente e tempo de reacção entre 30 minutos e 24 h) com rendimentos moderados a bons (51%-95%).

As aminas alifáticas secundárias acíclicas (dietilamina e propargilamina, entradas 4 e 5, respectivamente) e cíclicas (pirrolidina e piperidina, entradas 6 e 7) reagiram em condições semelhantes. Surpreendentemente a tentativa de reacção com a diisopropilamina originou um resíduo constituído apenas pelos reagentes mesmo depois de longos tempos de reacção. A ausência de reactividade da diisopropilamina, como nucleófilo, nestas reacções de aza-Michael pode dever-se a questões estéricas. De facto, depois do procedimento final recuperou-se a metilvinilsulfona pura. A análise do espectro de ^1H -RMN não evidenciou qualquer equilíbrio de adição-eliminação.

A reacção com a etanolamina (Tabela 2, entrada 2) foi completamente quimiosselectiva originando a amina esperada **85** com rendimento elevado (95%).

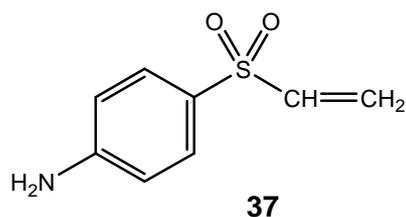
Foram feitas tentativas de reacção com aminas aromáticas, anilina **92**, *p*-toluidina **93** e *p*-anisidina **94**, e com a ftalimida **95**, mas as reacções não ocorreram ou ocorreram em muito pequena extensão (anilina e *p*-anisidina). Estes resultados são consistentes com a baixa reactividade das aminas aromáticas em comparação com a ciclo-hexilamina. Outros autores referem iguais dificuldades com as aminas aromáticas mesmo utilizando métodos diferentes e diferentes agentes de adição^{42,44}. Tentou ainda ligar-se a metilvinilsulfona a aminoácidos e à glucosilamina **41** mas também aqui não se conseguiram obter produtos em quantidades que permitissem uma caracterização completa.



Para avaliar a influência do catalisador nestas reacções repetiu-se a reacção da metilvinilsulfona com a piperidina, na ausência de catalisador, em condições experimentais idênticas às utilizadas quando na presença de Amberlyst-15. Ao fim de 24 h verificou-se que o rendimento baixou de 74% (com catalisador) para 55% (sem catalisador). Este resultado evidencia a eficiência do Amberlyst-15 para este tipo de reacções.

Uma vez que B. Das⁴⁰ refere no seu trabalho que o Amberlyst-15 é reciclável sendo possível a sua utilização três vezes consecutivas com pequenas alterações nos rendimentos das reacções, decidi investigar-se esse comportamento. Para isso realizou-se a reacção da metilvinilsulfona com a propilamina usando o mesmo catalisador por três vezes. Por análise do espectro de ¹H-RMN verificou-se que o produto formado na primeira utilização não continha qualquer sulfona de partida. Na segunda e terceira reacções o resíduo continha, respectivamente, 6% e 30% de metilvinilsulfona. Estes resultados evidenciam que o catalisador perde eficiência ao fim de um ciclo de reacções.

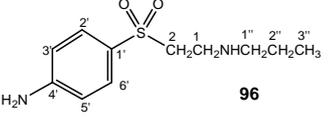
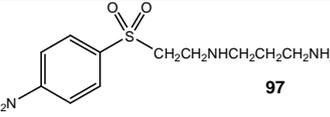
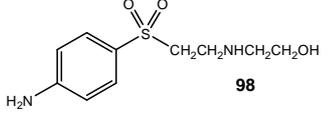
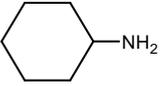
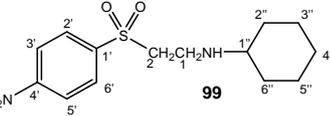
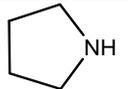
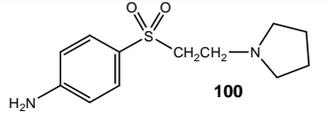
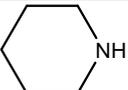
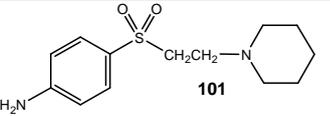
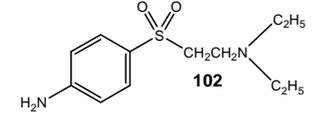
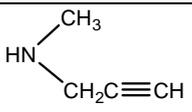
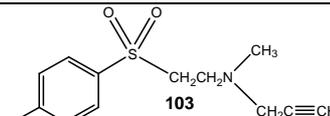
2.1.2 – Reacções de adição à *p*-aminofenilvinilsulfona **37**



A *p*-aminofenilvinilsulfona **37** reagiu com várias aminas alifáticas primárias e secundárias, na presença de Amberlyst-15, por um procedimento experimental idêntico ao utilizado nas reacções descritas em 2.5.1.

A Tabela 3 apresenta as reacções realizadas, os tempos de reacção e os rendimentos obtidos.

Tabela 3- Adição conjugada de aminas à *p*-aminofenilvinilsulfona 37 catalisada por Amberlyst-15

Entrada (Exp.)	Amina	Produto	Tempo (h)	Rendimento (%)
1 (2.6.2.2)	CH ₃ CH ₂ CH ₂ NH ₂	 96	0,67	71
2 (2.6.2.3)	H ₂ NCH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂	 97	0,17	100
3 (2.6.2.4)	H ₂ NCH ₂ CH ₂ OH	 98	4	23
4 (2.6.2.5)		 99	15	95
5 (2.6.2.6)		 100	0,5	87
6 (2.6.2.7)		 101	2	34
7 (2.6.2.8)	(CH ₃ CH ₂) ₂ NH	 102	5	100
8 (2.6.2.9)		 103	10	57

Os produtos correspondentes às entradas 2, 4 e 7 foram obtidos no estado puro sem qualquer purificação e com bons rendimentos. Destes os compostos **97** e **102** resultaram de reacções em presença de excesso de amina para aumentar a extensão da reacção.

Os produtos correspondentes às entradas 6 e 8 foram purificados por cromatografia em coluna tipo “flash” usando como eluentes misturas de acetato de etilo-éter etílico e acetato de etilo-metanol, respectivamente.

Os produtos **96** e **101** (Tabela 3, entradas 1 e 6) foram purificados por cristalização de éter etílico-éter de petróleo e diclorometano-éter de petróleo, respectivamente.

O produto correspondente à entrada 3 foi purificado por PLC sendo difícil a sua extracção da sílica o que justifica o baixo rendimento obtido. A dificuldade de extracção da sílica deve-se à presença do grupo OH que confere ao composto uma maior afinidade para a sílica.

Os espectros de ^1H -RMN mostram o desaparecimento dos sinais correspondentes aos prótons do grupo vinilo e o aparecimento de um sinal a 2,31-3,00 ppm correspondente ao H-1 e outro sinal a 2,58-3,32 ppm correspondente ao H-2. Ambos os sinais integram para dois o que evidencia a reacção de adição.

As aminas alifáticas primárias (Tabela 3, entradas 1-4) reagiram em condições moderadas e temperatura ambiente com rendimentos bons à excepção do composto **98** (Tabela 3, entrada 3) pelos motivos indicados anteriormente.

As aminas alifáticas secundárias acíclicas (dietilamina e propargilamina, entradas 7 e 8, respectivamente) e cíclicas (pirrolidina e piperidina, entradas 5 e 6) reagiram em condições semelhantes embora com rendimentos bastante diferentes relacionados com as técnicas de purificação utilizadas. À semelhança da metilvinilsulfona **38** também a sulfona **37** não reage com a diisopropilamina.

Foram ainda feitas tentativas de reacção com a prolina e com a glucosilamina que não foram bem sucedidas, tendo conduzido, em ambos os casos, a resíduos em que não se detectaram nem vestígios do composto de adição (por análise de ^1H -RMN).

Com as aminas aromáticas anilina **92** e *p*-anisidina **94** as reacções não ocorreram. Com a *p*-toluidina **93** a reacção ocorreu mas em pequena extensão. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna tipo “flash” e a segunda fracção isolada correspondia ao produto de adição (18%) mas em quantidade reduzida que não permitiu a caracterização completa do composto.

Como conclusão pode dizer-se que o procedimento experimental descrito, simples e económico, provou ser uma metodologia eficaz para as reacções de aza-

Michael usando vinilsulfonas como aceitadores de Michael e aminas alifáticas (primárias e secundárias) como nucleófilos. O catalisador representa um factor importante na optimização dos rendimentos. Embora o catalisador possa ser reutilizado observa-se uma redução moderada progressiva dos rendimentos. As aminas aromáticas são menos reactivas nestas condições experimentais provavelmente devido ao seu baixo carácter nucleofílico.

O espectro de fluorescência da sulfona **37** mostra uma banda de emissão, com estrutura vibracional, com um máximo a 451,0 nm correspondendo a uma banda de excitação com um máximo a 308,0 nm. Os compostos **96**, **99**, **100** e **102** resultantes da adição da sulfona **37**, respectivamente, à propanamina, à ciclo-hexilamina, à pirrolidina e à dietilamina apresentam bandas de fluorescência com forma semelhante e posição semelhante no que diz respeito às bandas de excitação com máximos de 308,0 nm para o composto **37** e cerca de 300 nm para os derivados. Quanto à posição das bandas de emissão observa-se uma diferença mais acentuada. A sulfona **37** apresenta um máximo de emissão a 451,0 nm e os derivados **96**, **99**, **100** e **102** apresentam máximos de 325,0, 322,5, 316,0 e 331,5 nm, respectivamente.

A Tabela 4 apresenta os comprimentos de onda máximos de excitação e de emissão para os compostos referidos e os espectros respectivos são apresentados nas figuras 16 a 20.

Tabela 4 – Comprimentos de onda máximos de excitação e de emissão da *p*-aminofenilvinilsulfona e de compostos de adição

Composto	Máximo de excitação (nm)	Máximo de emissão (nm)
37	308	451,0
96	301,5	316,0
99	301,0	325,0
100	298,5	322,5
102	302	331,5

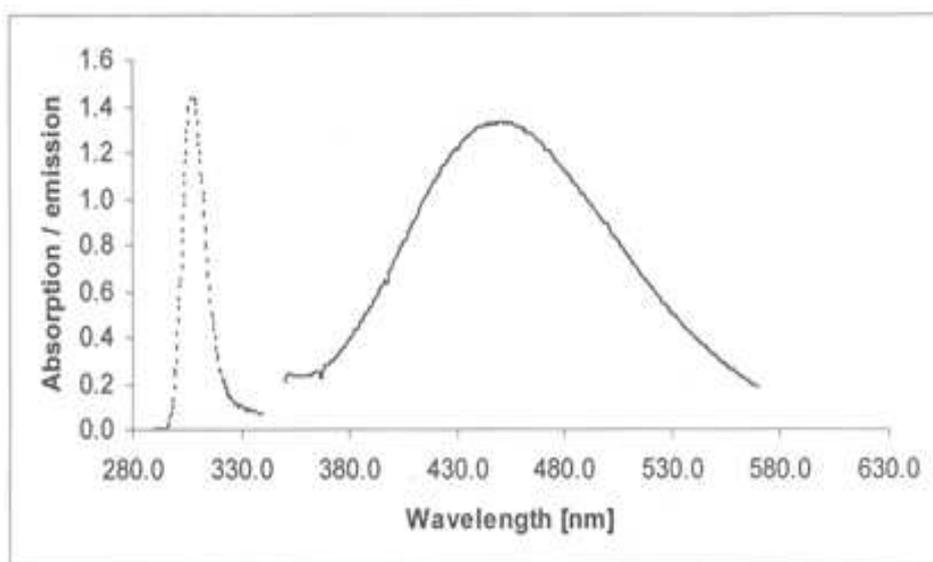


Figura 16. Espectros de excitação e de emissão do composto **37**
(λ_{max} de excitação=308,0 nm e λ_{max} de emissão=451,0 nm)

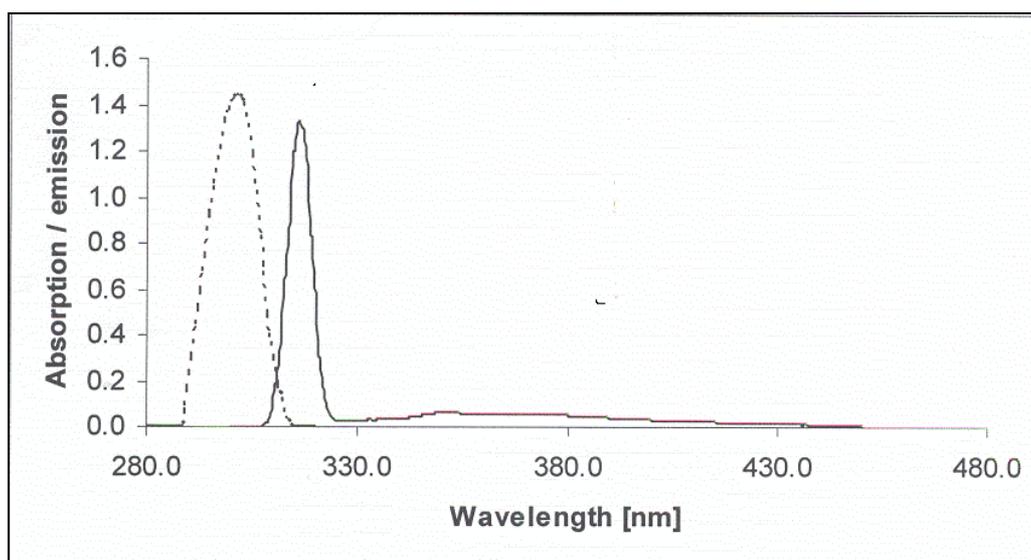


Figura 17. Espectros de excitação e de emissão do composto **96**
(λ_{max} de excitação=301,5 nm e λ_{max} de emissão=316,0 nm)

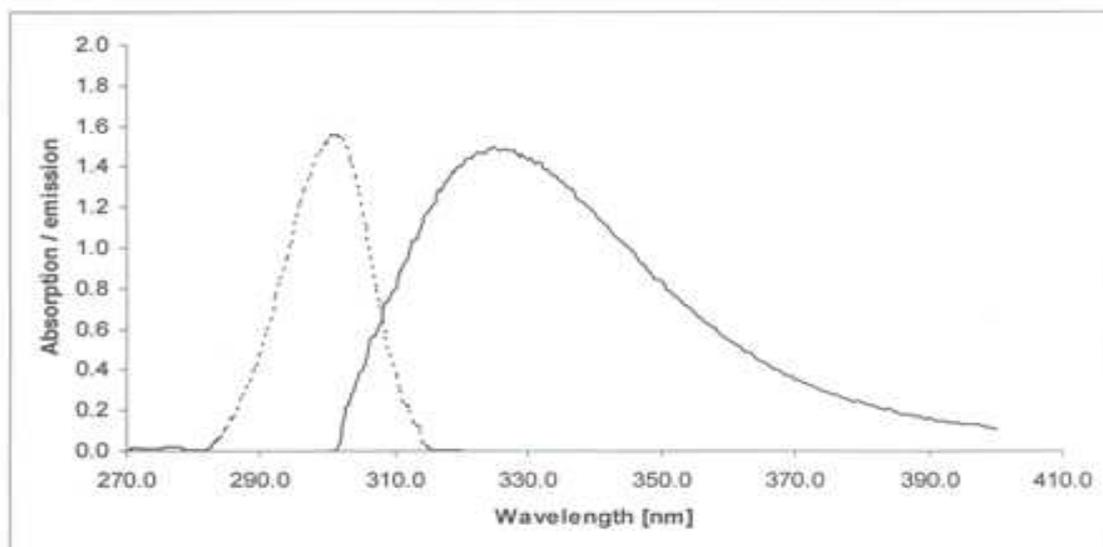


Figura 18. Espectro de excitação e de emissão do composto **99**
(λ_{max} de excitação=301 nm e λ_{max} de emissão=325 nm)

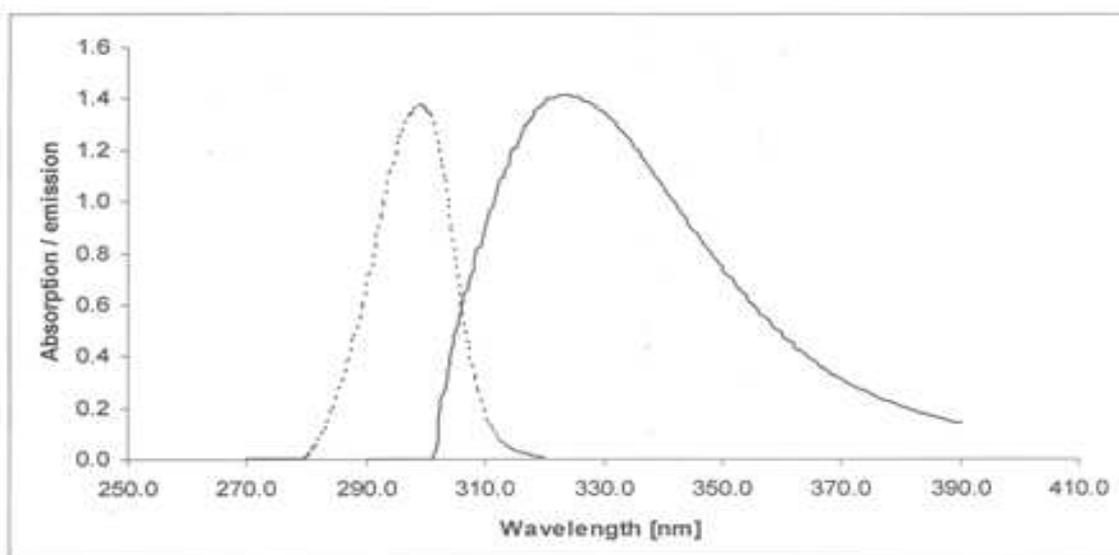


Figura 19. Espectro de excitação e de emissão do composto **100**
(λ_{max} de excitação=298,5 nm e λ_{max} de emissão=322,5 nm)

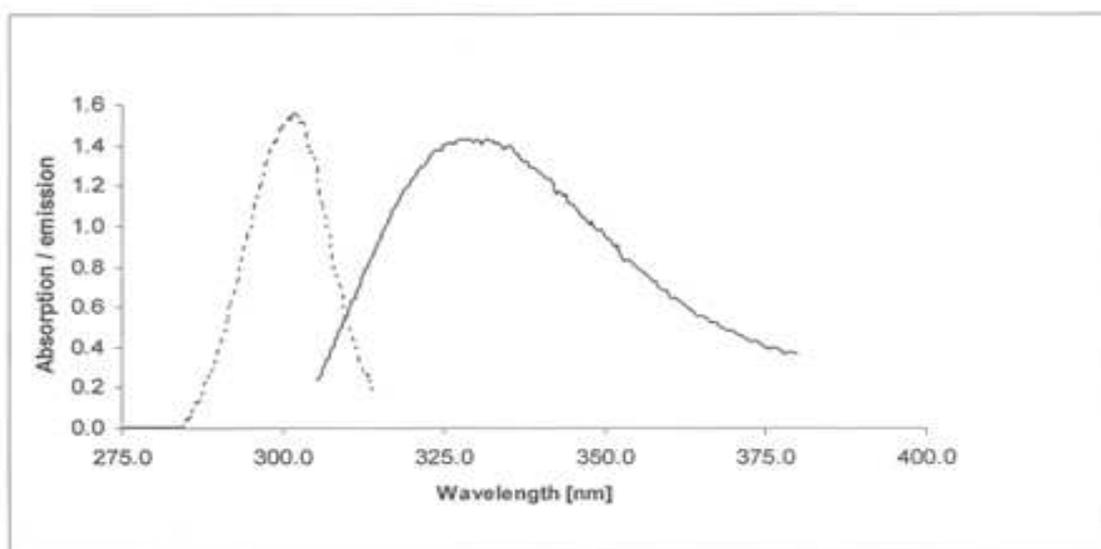


Figura 20. Espectro de excitação e de emissão do composto **102**
(λ_{max} de excitação=302 nm e λ_{max} de emissão=331,5 nm)

Também para estes compostos não foi feito o cálculo do rendimento quântico pelo que não se podem tirar conclusões quanto à intensidade da fluorescência.

CAPÍTULO III

PARTE EXPERIMENTAL

1- PROCEDIMENTOS GERAIS

1.1 - INSTRUMENTAÇÃO

- **Evaporações**

As evaporações efectuaram-se em dois evaporadores rotativos, Büchi 461 e B-480, sob pressão reduzida (trompa de água).

- **Revelação das placas de TLC**

As placas de TLC foram reveladas numa câmara CN-6 de luz ultra-violeta (λ_{\max} 254 nm) e numa câmara de iodo.

- **Pontos de fusão**

Os pontos de fusão foram determinados num aparelho Stuart SMP3 e não foram corrigidos.

- **Espectroscopia de IV**

Os espectros de IV foram registados num espectrofotómetro Bomen FTLA 2000. As amostras foram preparadas com Nujol e em células de cloreto de sódio. No caso dos óleos foram preparadas sem solvente, por deposição de uma gota de composto sobre células de cloreto de sódio.

- **Espectrofotometria**

Os estudos de fluorescência foram realizados conforme descrição seguinte:

1º- Espectros descritos em 2.2 e 2.3: os espectros de absorção foram registados num espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 35. Os espectros do estado estacionário de fluorescência foram medidos num espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS-5. Os rendimentos quânticos foram determinados em acetonitrilo usando sulfato de quinino como padrão de fluorescência. O comprimento é de 1 cm em células de quartzo.

2º - Os espectros de absorção e de emissão apresentados em 2.4 e 2.6.2 foram registados num espectrofluorímetro SPEX, modelo Fluoromax 2, com uma lâmpada de arco de Xénon de 150 W.

- **Espectrometria de RMN**

Os espectros de ^1H -RMN foram obtidos a 300 MHz num espectrómetro Varian Unity Plus ou a 400 MHz num Bruker Avance II⁺ 400, usando os sinais dos solventes residuais (CHCl_3 do CDCl_3 ou DMSO do DMSO-d_6) como referências internas. Os espectros de ^{13}C -RMN foram obtidos a 75,4 MHz (espectrómetro Varian) ou a 100,62 MHz (espectrómetro Bruker). A atribuição dos sinais foi confirmada pelas técnicas de HMQC e HMBC, dupla ressonância e/ou por analogia com compostos do mesmo tipo e previsão de desvios químicos.

- **Espectrometria de massa**

Os espectros de massa foram realizados pela técnica FAB ou EI nos modos de baixa e alta resolução num espectrómetro de massa VG Autospec.

- **Análise elementar**

A composição elementar dos compostos foi determinada num analisador LECO CHNS 932.

- **Actividade óptica**

O poder rotatório óptico específico foi medido num micro-polarímetro ACTIVITY-AA-1000. As temperaturas a que foram feitas as medições são apresentadas, caso a caso, na descrição experimental.

1.2 – CROMATOGRAFIA

Os materiais utilizados nas técnicas de cromatografia eram das marcas Merck ou Macherey-Nagel.

- **Cromatografia em camada fina**

Esta técnica foi utilizada para controlar a evolução das reacções. Para isso utilizaram-se placas de sílica com espessura 0,25 mm e com indicador de fluorescência para revelação por luz ultravioleta (Merck Kieselgel 60 F254, Art. 5715 ou Macherey-Nagel Ref^a 812008). Os eluentes variaram de acordo com a solubilidade dos compostos (acetato de etilo; acetato de etilo-éter etílico; acetato de etilo-metanol; éter etílico-éter de petróleo; clorofórmio-metanol).

- **Cromatografia em coluna tipo “flash”**

Nesta técnica utilizou-se sílica gel com tamanho de partícula 230-400 mesh (Merck, Art. 9385 ou Macherey-Nagel Ref^a 815381).

- **Cromatografia em camada preparativa**

Esta técnica foi efectuada utilizando placas de sílica gel de 20x20 cm e 2mm de espessura, com indicador para revelação no ultravioleta (Merck 5717).

- **Filtração do catalisador Pd/C**

As filtrações efectuadas nas reacções envolvendo Pd/C foram realizadas sobre Celite (Merck Art.8117).

1.3 – SOLVENTES E MATERIAIS DE PARTIDA

SOLVENTES

A maior parte dos solventes utilizados apresentava grau de pureza p.a., por isso foram utilizados sem purificação prévia. Contudo, em algumas preparações usaram-se solventes secos de acordo com os métodos seguintes:

- acetona foi refluxada sobre sulfato de magnésio anidro durante 2-3 h, e agitada com cloreto de cálcio anidro, durante a noite. Após esta secagem prévia, foi refluxada novamente 1 h sobre e destilada fraccionadamente de sulfato de magnésio anidro e guardada sobre crivos moleculares;
- diclorometano foi refluxado e destilado de pentóxido de fósforo e guardado sobre crivos moleculares.
- éter dietílico e éter de petróleo foram pré-secos sobre cloreto de cálcio anidro e guardados sobre fio de sódio;
- metanol foi seco aquecendo limalha de magnésio (5 g) e iodo (0,5 g) com 50-75 mL de metanol até desaparecimento da cor do iodo e todo o magnésio ter sido convertido em metóxido de magnésio. Fez-se a adição de metanol (até 1 L) o qual foi refluxado durante 3 h, destilado fraccionadamente e guardado sobre crivos moleculares⁶⁷.

REAGENTES

Os compostos de partida foram adquiridos no mercado e foram usados sem purificação prévia à excepção de:

- azida de sódio foi seca sob vácuo, à TA, numa pistola de secagem durante a noite.

Os corantes:

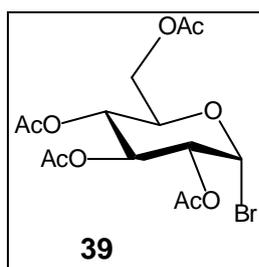
- sulfato de 2-(*p*-aminofenilsulfonil)etilo (PAFSES)
- Ácido 4-(nafto[1,2-*d*][1,2,3]triazol-2-il)benzóico
- 2-(3-(2*H*-naftol[1,2-*d*][1,2,3]triazol-2-il)fenilsulfoniletanol

foram gentilmente cedidos pelo Professor Radim Hrdina

2 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 – REACÇÕES COM A D-GLUCOSE ACETILADA

2.1.1 – Preparação de brometo de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosilo 39



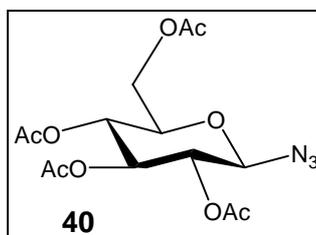
Adicionou-se ácido perclórico a 60% (1,8 mL) a anidrido acético (300 mL) à temperatura de 4°C. Após esta mistura ter atingido a temperatura ambiente, adicionou-se α -D-glucose seca (75 g, 0,42 mol) a uma velocidade tal que a temperatura da reacção se mantivesse entre 30-40°C. Depois de terminada a adição da glucose, e após a mistura reaccional ter arrefecido a 20°C, fez-se a adição de fósforo vermelho (23,25 g, 0,75 mol). Seguidamente adicionou-se bromo (135,75 g, 43,5 mL, 1,70 mol), gota a gota, de modo a manter a temperatura reaccional abaixo de 20°C. Por fim, adicionou-se água (27 mL) durante cerca de 30 minutos, deixando a mistura reaccional à temperatura ambiente durante 2 h. A mistura foi então diluída com diclorometano (225 mL) e filtrada sobre lã de vidro por um funil de gravidade. O filtrado foi lavado com água gelada (2x 600 mL) e solução aquosa saturada de hidrogenocarbonato de sódio (375 mL), à qual se adicionou gelo, até não se verificar a libertação de dióxido de carbono. A fase orgânica foi seca sobre sílica gel activada (7,5 g) e concentrada. O resíduo foi triturado com uma mistura de éter dietílico seco-éter de petróleo seco 1:2, filtrado, lavado com a mesma mistura de solventes e finalmente com éter dietílico seco gelado (~37,5 mL). Por recristalização com éter dietílico-éter de petróleo secos obteve-se a α -acetobromoglucose **39** (64%) na forma de um sólido branco cristalino.

p.f: 88,7-89,4°C (lit.⁵³ 88-89°C);

ν_{\max} (Nujol) 1744 (C=O éster); 1248 (C-O-C assim); 1080-1040 (C-O-C sim) cm^{-1} ;

^1H (300 MHz, CDCl_3) 2,05, 2,06, 2,11 e 2,12 (4s, 12H, 4 x COCH_3); 4,11-4,16 (m, 1H, H_a -6); 4,28-4,37 (m, 2H, H_b -5 e H_b -6); 4,85 (dd, $J=10,0$ e $4,0$ Hz, 1H, H-2); 5,17 (t, $J=10,0$ Hz, 1H, H-4); 5,57 (t, $J=10,0$ Hz, 1H, H-3); 6,42 (d, $J=4,0$ Hz, 1H, H-1) ppm.

2.1.2 – Preparação de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosilazida **40**



A uma solução de α -acetobromoglucose **39** (0,411 g, 1,0 mmol), em acetona seca (40 mL), adicionou-se azida de sódio seca (0,163 g, 2,5 mmol) e refluxou-se durante 7 h. No final fez-se a partição da mistura reaccional entre diclorometano e água ligeiramente arrefecida. A fase aquosa foi extraída com diclorometano. A fase orgânica foi seca (MgSO_4) e evaporada, obtendo-se a azida impura como um sólido amarelo claro em rendimento quantitativo. Por cristalização com éter etílico obteve-se a azida **40** na forma de um sólido cristalino branco com um rendimento de 86%;

p.f.: 125,6-126,5°C (lit⁶⁸ 126-127°C);

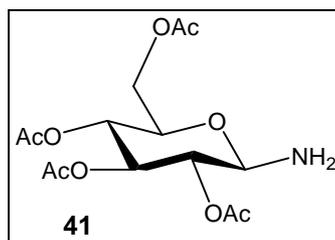
$[\alpha]_D^{27} = -29^\circ$ (c 2,0, CHCl_3);

ν_{max} (Nujol) 2115 ($\text{N}=\text{N}^+=\text{N}$); 1746 ($\text{C}=\text{O}$); 1213 ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$ assim); 1105-1042 ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$ sim) cm^{-1} ;

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): 2,02, 2,04, 2,09 e 2,11 (4s, 12H, 4 x COCH_3); 3,81 (ddd, $J=10,0$, 4,8 e 2,4 Hz, 1H, H-5); 4,18 (dd, $J=12,6$ e 2,4 Hz, 1H, H_a -6); 4,29 (dd, $J=12,6$ e 4,8 Hz, 1H, H_b -6); 4,66 (d, $J=9,0$ Hz, 1H, H-1); 4,97 (t, $J=9,3/9,0$ Hz, 1H, H-2); 5,11 (t, $J=9,3/9,9$ Hz, 1H, H-4); 5,23 (t, $J=9,3$ Hz, 1H, H-3) ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, CDCl_3): 20,51, 20,53 e 20,67 (4 x CH_3); 61,58 (C-6); 67,78 (C-4); 70,54 (C-2); 72,52 (C-3); 73,94 (C-5); 87,85 (C-1), 169,18, 169,28, 170,10 e 170,59 (4 x $\text{C}=\text{O}$) ppm.

2.1.3 – Preparação de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosilamina **41**



A uma solução de glucopiranosilazida **40** (0,336 g, 0,9 mmol), em acetato de etilometanol 1:1 (30 mL), foi adicionado Pd/C 5% (0,119 g). A mistura resultante foi agitada, durante 30 minutos, sob uma corrente de azoto, sendo depois submetida a uma atmosfera de hidrogénio, à pressão normal, durante 3 h. A mistura final foi filtrada sobre Celite e concentrada, sob vácuo, sem aquecimento, originando um sólido branco amarelado **41** (94%) que foi usado sem qualquer purificação;

p.f. : 105,0-106,1 °C;

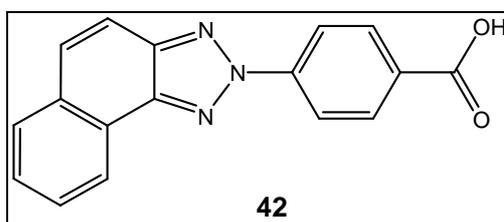
$[\alpha]_D^{27} = +16^\circ$ (c 2,0, CHCl₃);

ν_{\max} (Nujol) 3337 (NH₂); 1754 (C=O); 1224 (C-O-C assim); 1095-1062 (C-O-C sim) cm⁻¹;

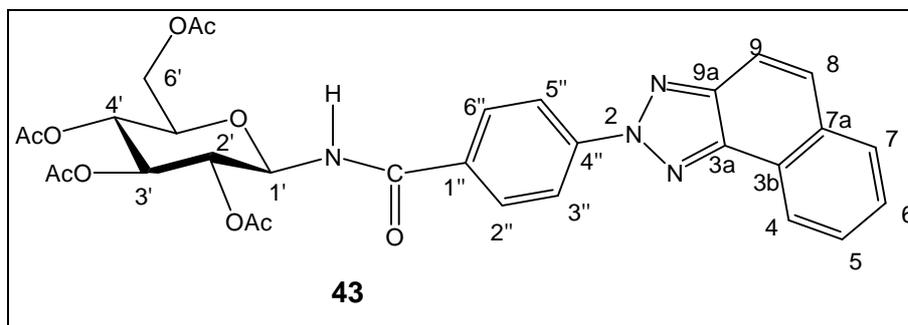
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 2,02, 2,04, 2,08 e 2,10 (4s, 12H, 4 x COCH₃); 2,02-2,10 (sob sinais do acetilo, 2H, NH₂), 3,70 (ddd, $J=10,0$, 4,8 e 2,4 Hz, 1H, H-5); 4,12 (dd, $J=12,3$ e 2,4 Hz, 1H, H_a-6); 4,20 (d, $J=8,7$ Hz, 1H, H-1); 4,24 (dd, $J=12,3$ e 4,8 Hz, 1H, H_b-6); 4,84 (t, $J=9,3/9,6$ Hz, 1H, H-2); 5,05 (t, $J=9,6$ Hz, 1H, H-4); 5,25 (t, $J=9,6$ Hz, 1H, H-3) ppm;

Análise elementar: C, 48,44; H, 6,09; N, 4,07. C₁₄H₂₁NO₉ requer C, 48,41; H, 6,10; N, 4,03 %.

2.2 – SÍNTESE DE GLICOCONJUGADOS FLUORESCENTES UTILIZANDO O FLUORÓFORO ÁCIDO 4-(NAFTO[1,2-d][1,2,3]TRIAZOL-2-IL)BENZÓICO **42**



2.2.1 – Síntese de *N*-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil)-4-(2*H*-nafto [1,2-*d*] [1,2,3]triazol-2-il-benzamida **43**



1º Processo – Método do anidrido misto

A uma solução de corante **42** (0,280 g, 0,969 mmol) em DMF (200 mL) a -5°C, adicionou-se trietilamina (0,098 g, 0,134 mL, 0,969 mmol) e cloroformiato de etilo (0,108 g, 0,096 mL, 0,969 mmol), deixando a mistura em agitação durante 30 minutos. Removeu-se o precipitado por filtração, mantendo o filtrado em banho de gelo. Adicionou-se o filtrado à amina **41** (0,337 g, 0,969 mmol), e a mistura resultante foi deixada em agitação, à temperatura ambiente, durante 48 h. Após evaporação, o resíduo obtido (0,404 g) foi purificado por cromatografia em coluna tipo “flash” (eluente: éter etílico-éter de petróleo 2:1 a 2,5:1). A fracção isolada foi recristalizada de acetato de etilo-éter de petróleo originando a amida **43** como um sólido de cor rosa (0,078 g, 13%).

2º Processo – Acoplamento com HBTU e DIPEA

A uma solução de corante **42** (0,289 g, 1,0 mmol) em DMF (25 mL), em banho de gelo, adicionou-se HBTU (0,379 g, 1,0 mmol), DIPEA a 98% (0,264 g, 0,352 mL, 2,0 mmol) e amina **41** (0,347 g, 1,0 mmol) e deixou-se em agitação à temperatura ambiente durante 18 h. Juntou-se água (100 mL) observando-se a formação de um precipitado cor de rosa. Colocou-se no frio durante 1 h e em seguida o sólido foi filtrado e seco (0,328 g, 53 %). O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna tipo “flash” (eluente: acetato de etilo-clorofórmio-metanol 5:2:1). A fracção isolada foi cristalizada de acetato de etilo-éter de petróleo originando a amida **43** como um sólido cor de rosa (0,142 g, 23%);

p.f.: 230,4-232,6 °C (dec);

$[\alpha]_D^{27} = -53^\circ$ (c 1,0, CHCl_3);

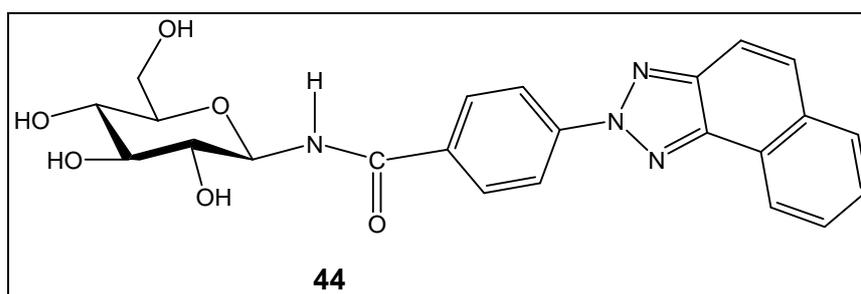
ν_{max} (Nujol) 3430 (N-H); 1748 (C=O, éster); 1680 (C=O, amida); 1607 (C=N) cm^{-1} ;

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): 2,07, 2,08, 2,09 e 2,11 (4s, 12H, 4 x COCH_3); 3,95 (ddd, $J=10,0$, 4,0 e 1,8 Hz, 1H, H-5'); 4,15 (dd, $J=12,6$ e 1,8 Hz, 1H, H_a-6'); 4,40 (dd, $J=12,6$ e 4,0 Hz, 1H, H_b-6'); 5,11 (t, $J=9,6/9,9$ Hz, 1H, H-2' ou H-4'); 5,15 (t, $J=10,2/9,3$ Hz, 1H, H-2' ou H-4'); 5,45 (t, $J=9,9/9,6$ Hz, 1H, H-3'); 5,48 (t, $J=9,0$ Hz, 1H, H-1'); 7,16 (d, $J=9,0$ Hz, 1H, NH); 7,62-7,82 (m, 4H, H-5, H-6, H-8, H-9); 7,92 (dd, $J=8,1$ e 1,8 Hz, 1H, H-4); 7,98 (d, $J=9,0$ Hz, 2H, H-3'' e H-5''); 8,50 (d, $J=9,0$ Hz, 2H, H-2'' e H-6''); 8,65 (dd, $J=7,5$ e 1,8 Hz, 1H, H-7) ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, CDCl_3): 20,60, 20,74 e 20,77 (4 x OCH_3); 61,58 (C-6'); 68,16 (C-2' ou C-4'); 70,87 (C-2' ou C-4'); 72,51 (C-3'); 73,65 (C-5'); 79,03 (C-1'); 116,31 (C-8 ou C-9); 119,96 (C-2'' e C-6''); 123,40 (C-7); 124,77 (C-3b); 127,73 (C-5); 127,92 (C-6); 128,70 (C-3'' e C-5''); 129,00 (C-4); 130,42 (C-8 ou C-9); 131,95 (C-4''); 132,51 (C-7a); 143,03 (C-1''); 143,42 (C-3a); 144,03 (C-9a); 166,10 (C=O, amida); 169,60, 169,88, 170,64 e 171,74 (4 x C=O, acetilo) ppm;

HRMS (FAB): calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_{10}$ (M^++1): 619,2040. Obtido: 619,2051.

2.2.2 – Síntese de *N*-(β -D-glucopiranosil)-4-(2*H*-nafto[1,2-*d*] [1,2,3]triazol-2-il)-benzamida **44**



A uma solução de composto **43** (0,136 g, 0,220 mmol) em metanol seco (8,5 mL) adicionou-se Bu_2SnO (0,109 g, 0,440 mmol) e aqueceu-se em refluxo durante 17 h. A reacção foi seguida por TLC (eluente: clorofórmio-metanol 10:3). O resíduo foi concentrado sob vácuo e purificado por cromatografia em coluna tipo “flash” (eluente:

clorofórmio-metanol 10:3). A segunda fracção correspondia ao produto pretendido **44** (0,040 g; 40%), na forma de um sólido de cor rosa;

p.f: 219,3-220,0°C – decomposição sem fundir;

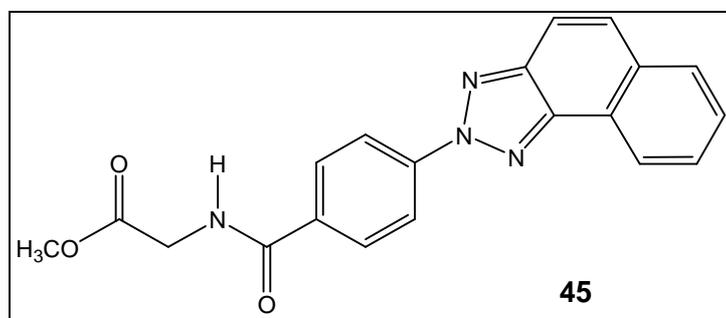
$[\alpha]_D^{27} = +16^\circ$ (c 1,0, DMF);

ν_{\max} (Nujol) 3609 (OH); 3371 (N-H); 1658 (C=O, amida); 1603 (C=N) cm^{-1} ;

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): 3,13 (dt, $J=5,6$ e $9,2$ Hz, 1H, H-2' ou H-4'); 3,19-3,23 (m, 1H, H-5'); 3,27 (dt, $J=4,8$ e $8,8$ Hz, 1H, H-2' ou H-4'); 3,38 (dt, $J=5,6$ e $9,2$ Hz, 1H, H-3'); 3,43-3,49 (m, 1H, H_a-6'); 3,69 (ddd, $J=12,0$, $6,0$ e $2,0$ Hz, 1H, H_b-6'); 4,54 (t, $J=6,0$ Hz, 1H, 6'-OH); 4,93 (d, $J=5,2$ Hz, 1H, OH); 4,98-5,04 (m, 3H, H-1' e 2 x OH); 7,72 (dt, $J=1,6$ e $7,6$ Hz, 1H, H-5 ou H-6); 7,77 (dt, $J=1,6$ e $7,6$ Hz, 1H, H-5 ou H-6); 7,92 (s, 2H, H-8 e H-9); 8,08 (dd, $J=7,2$ e $2,0$ Hz, 1H, H-4); 8,21 (dd, $J=7,2$ e $2,0$ Hz, 2H, H-3'' e H-5''); 8,42 (dd, $J=7,2$ e $2,0$ Hz, 2H, H-2'' e H-6''); 8,56 (d largo, $J=7,6$ Hz, 1H, H-7); 9,07 (d, $J=8,8$ Hz, 1H, NH) ppm;

^{13}C RMN (100,62 MHz, DMSO- d_6): 61,00 (C-6'); 70,04 (C-2' ou C-4'); 72,11 (C-3'); 77,53 (C-2' ou C-4'); 78,80 (C-5'); 80,37 (C-1'); 116,22 (C-8 ou C-9); 119,24 (C-2'' e C-6''); 122,83 (C-7); 122,85 (C-3b); 128,14 (C-5); 128,24 (C-6); 129,34 (C-4); 129,47 (C-3'' e C-5''); 130,49 (C-8 ou C-9); 132,13 (C-7a); 133,94 (C-4''); 141,40 (C-1''); 142,50 (C-3a); 143,36 (C-9a), 165,61 (C=O, amida) ppm.

2.2.3 – Síntese do éster metílico do ácido 4-nafto[1,2-*d*][1,2,3]triazol-2-il-benzoilamino acético **45**



A uma solução de corante **42** (0,145 g, 0,5 mmol) em DMF (10 mL), arrefecida em banho de gelo (+5°C), adicionou-se HglyOMe, HCl (0,063 g, 0,5 mmol), DIPEA (0,132

g, 0,176 mL, 1,0 mmol) e HBTU (0,190 g, 0,5 mmol). A mistura reaccional foi agitada à temperatura ambiente durante a noite e diluiu-se com água (50 mL). Deixou-se em arrefecimento durante 3 h. O sólido precipitado foi então filtrado e lavado com água. O resíduo sólido foi purificado por cromatografia em coluna tipo “flash” (eluente: acetato de etilo-diclorometano 5:1). Por recristalização de metanol-diclorometano-éter de petróleo obteve-se o composto **45** puro na forma de um sólido cor de laranja com rendimento de 45%;

p.f.: 229,2-231,0 °C;

ν_{\max} (Nujol) 3362 (N-H); 1754 (C=O, éster); 1643 (C=O amida); 1606 (C=N); 1295-1206 (C-O-C asim); 1179 (C-O-C sim) cm^{-1} ;

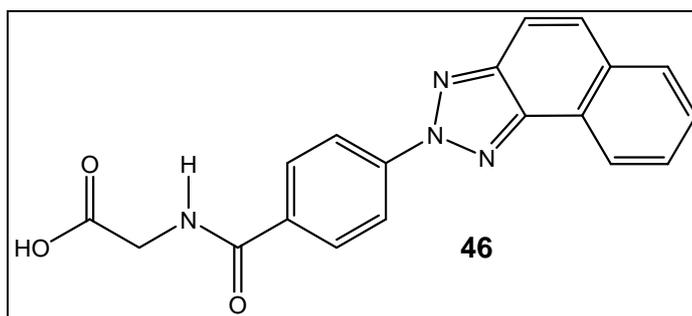
^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): 3,67 (s, 3H, OCH₃); 4,06 (d, $J=5,7$ Hz, 2H, CH₂); 7,69-7,79 (m, 2H, H-5 e H-6); 7,91 (s, 2H, H-8 e H-9); 8,07 (dd, $J=6,9$ e 2,0 Hz, 1H, H-4); 8,15 (d, $J=8,7$ Hz, 2H, H-2'' e H-6''); 8,42 (d, $J=8,7$ Hz, 2H, H-3'' e H-5''); 8,55 (dd, $J=7,2$ e 2,0 Hz, 1H, H-7); 9,19 (t, $J=5,7$ Hz, 1H, NH) ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, DMSO- d_6): 41,35 (CH₂); 51,87 (OCH₃); 116,27 (C-8 ou C-9); 119,46 (C-3'' e C-5''); 122,88 (C-7); 123,87 (C-3b); 128,18 (C-5); 128,30 (C-6); 129,18 (C-2'' e C-6''); 129,39 (C-4); 130,55 (C-8 ou C-9); 132,17 (C-7a); 133,38 (C-4''); 141,49 (C-1''); 142,53 (C-3a); 143,40 (C-9a); 165,66 (C=O, amida); 170,38 (C=O, éster) ppm;

m/z (FAB) (M^++1) 360,15;

Análise elementar: C, 66,25; H, 4,57; N, 15,03. C₂₀H₁₆N₄O₃ requer C, 66,66; H, 4,48; N, 15,55 %.

2.2.4 – Síntese do ácido 4-2-[4-(2*H*-nafto[1,2-*d*][1,2,3]triazol-2-il) benzamido] acético **46**



A uma solução do éster **45** (0,268 g, 0,744 mmol) em metanol (1 mL) adicionou-se NaOH 1M (1,9 mL, 1,861 mmol). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 4 h e, de seguida, adicionou-se uma solução de HCl 1M (0,75 mL, 0,744 mmol). O metanol foi removido por evaporação e o resíduo obtido, arrefecido num banho de gelo, foi acidificado até pH~2-3 com HCl 1M mantendo-se em agitação vigorosa durante 1 h. O sólido precipitado foi filtrado, lavado com água e seco. O composto **46** foi isolado com um rendimento de 87% e foi usado sem purificação posterior;

p.f.: 209,5-212,6 °C;

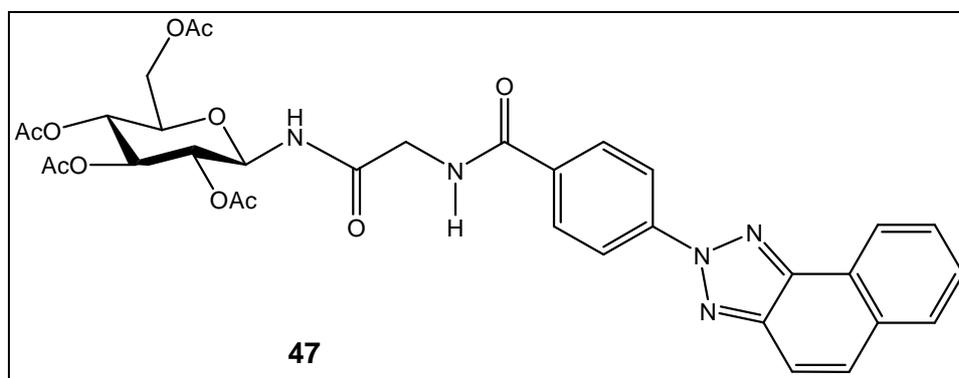
ν_{\max} (nujol) 3403 (O-H e N-H); 1681 (C=O ácido); 1633 (C=O, amida); 1605 (C=N); 1289 (C-O-C assim); 1167 (C-O-C sim) cm^{-1} ;

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): 3,97 (d, $J=5,7$ Hz, 2H, CH_2); 7,68-7,80 (m, 2H, H-5 e H-6); 7,92 (s, 2H, H-8 e H-9); 8,08 (d largo, $J=7,5$ Hz, 1H, H-4); 8,15 (d, $J=8,4$ Hz, 1H, H-2'' ou H-6''); 8,20 (d, $J=8,7$ Hz, 1H, H-2'' ou H-6''); 8,42 (d, $J=8,7$ Hz, 2H, H-3'' e H-5''); 8,55 (d largo, $J=7,2$ Hz, 1H, H-7); 9,05 (t, $J=5,7$ Hz, 1H, NH); 12,80 (s largo, 1H, OH) ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, DMSO- d_6): 41,34 (CH_2); 116,35 (C-8 ou C-9); 119,59 (C-3'' ou C-5''); 119,70 (C-3'' ou C-5''); 123,02 (C-7); 123,98 (C-3b); 128,34 (C-5); 128,44 (C-6); 129,25 (C-2'' ou C-6''); 129,50 (C-4); 130,68 (C-9 ou C-8); 131,34 (C-2'' ou C-6''); 132,29 (C-7a); 133,70 (C-4''); 141,57 (C-1''); 142,66 (C-3a); 143,52 (C-9a); 165,77 (C=O, amida); 171,32 (C=O, ácido) ppm;

HRMS (EI): Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3$ (M^+) 346,1066. Obtido: 346,1062.

2.2.5 – Síntese de *N*-[*N*-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil)carbamoilmetil]-4-(2*H*-naftol[1,2-*d*][1,2,3]triazol-2-il)-benzamida **47**



A uma solução do ácido **46** (0,258 g, 0,744 mmol) em DMF (10 mL), adicionou-se glucosilamina **41** (0,258 g, 0,744 mmol) e HOBT (0,111 g, 0,818 mmol). Arrefeceu-se a solução a +5°C, em banho de gelo, e adicionou-se DCC (0,161 g, 0,781 mmol). A mistura resultante foi deixada em agitação durante 24 h à temperatura ambiente. No final adicionou-se água (50 mL) e a mistura foi arrefecida durante 3 h. Filtrou-se o sólido precipitado que foi em seguida seco (0,414 g, 82%) e purificado por cromatografia em coluna tipo “flash” (eluente: acetato de etilo-diclorometano 5:1). A fracção isolada (0,226 g, 45%) foi recristalizada de diclorometano-éter de petróleo originando o composto **47** na forma de um sólido cor de laranja (0,117g; 23,%);

p.f.: 232-233°C;

$[\alpha]_D^{27} = +5^\circ$ (c 2,0, CHCl₃);

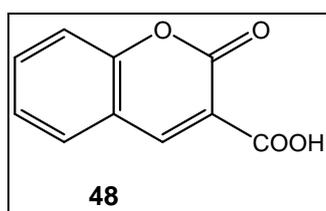
ν_{\max} (neat) 3413 (N-H); 1745 (C=O, éster); 1607 (C=O, amida); 1227 (C-O-C assim); 1160 (C-O-C sim) cm⁻¹;

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 2,01, 2,03, 2,07 e 2,09 (4s, 12H, 4 x COCH₃); 3,90 (ddd, *J*=10,0, 4,0 e 2,1 Hz, 1H, H-5'); 4,12-4,19 (m, 3H, H_a-6' e CH₂Gly); 4,31 (dd, *J*=12,6 e 4,0 Hz, 1H, H_b-6'); 5,02 (t, *J*=9,6 Hz, 1H, H-2'); 5,10 (t, *J*=9,6/10,0 Hz, 1H, H-4'); 5,34 (t, *J*=9,6 Hz, 2H, H-1' e H-3'); 7,30 (t, *J*=5,1 Hz, 1H, NH Gly); 7,51 (d, *J*=9,0 Hz, 1H, NH); 7,60-7,70 (m, 4H, H-5, H-6, H-8 e H-9); 7,82 (d, 1H, *J*=7,4 Hz, H-4); 8,00 (d, *J*=8,7 Hz, 2H, H-2" e H-6"); 8,38 (d, *J*=8,7 Hz, 2H, H-3" e H-5"), 8,53 (d, *J*=8,0 Hz, 1H, H-7) ppm;

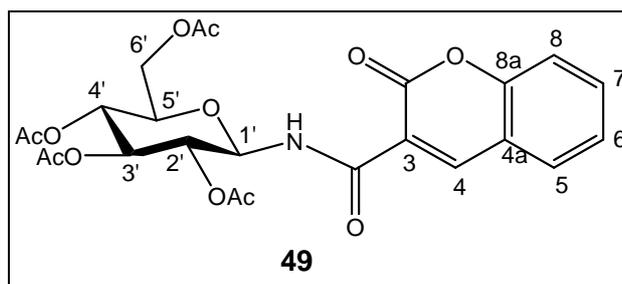
^{13}C RMN (75,4 MHz, CDCl_3): 20,53, 20,60 e 20,72, (4 x CH_3), 43,74 (CH_2Gly); 61,58 (C-6'); 68,05 (C-4'); 70,34 (C-2'); 72,73 (C-3'); 73,63 (C-5'); 78,21 (C-1'); 116,17 (C-8 ou C-9); 119,67 (C-3'' e C-5''); 123,28 (C-7); 124,65 (C-3b); 127,58 (C-5); 127,74 (C-6); 128,57 (C-2'' e C-6''); 128,87 (C-4); 130,20 (C-8 ou C-9); 132,36 (C-7a); 132,44 (C-4''); 142,55 (C-1''); 143,18 (C-3a); 143,80 (C-9a); 166,85 (C=O, corante); 169,52 (C=O, acetilo); 169,91 (C=O, acetilo); 169,97 (C=O, aminoácido); 170,72 (C=O, acetilo); 170,94 (C=O, acetilo) ppm;

Análise elementar: C, 58,84; H, 5,06; N, 10,24. $\text{C}_{33}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_{11}$ requer C, 58,66; H, 4,92; N, 10,37 %.

2.3- SÍNTESE DE GLICOCONJUGADOS FLUORESCENTES UTILIZANDO O FLUORÓFORO ÁCIDO CUMARINA-3-CARBOXÍLICO 48



2.3.1 – Síntese de *N*-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil)-(2-oxo-2H-cromeno)-3-carboxamida 49



A uma solução do composto **48** (0,138 g, 0,723 mmol) em acetona seca (20 mL) arrefecida a -5°C , adicionou-se trietilamina (0,146 g, 0,200 mL, 1,45 mmol) e clorofórmio de etilo (0,157 g, 0,143 mL, 1,45 mmol), deixando a mistura em agitação durante 30 minutos. Removeu-se o precipitado por filtração, mantendo o filtrado em banho de gelo. Adicionou-se o filtrado à amina **41** (0,251 g, 0,723 mmol), e a mistura resultante foi refluxada durante 3 h. Após evaporação, o resíduo obtido (0,357 g) foi purificado por cromatografia em coluna tipo “flash” (eluente: acetato de etilo-éter etílico 1:5). A fracção

isolada (0,158 g, 42%) foi recristalizada de diclorometano-éter etílico-éter de petróleo originando a amida **49** (0,085 g, 23%) como um sólido branco;

p.f.: 160,0-162,3°C;

$[\alpha]_D^{27} = -26^\circ$ (c 2,0, CHCl₃);

ν_{\max} (Nujol) 3306 (N-H); 1748 (C=O, éster); 1672 (C=O, lactona); 1610 (C=O, amida); 1214 (C-O-C assim); 1159-1034 (C-O-C sim) cm⁻¹;

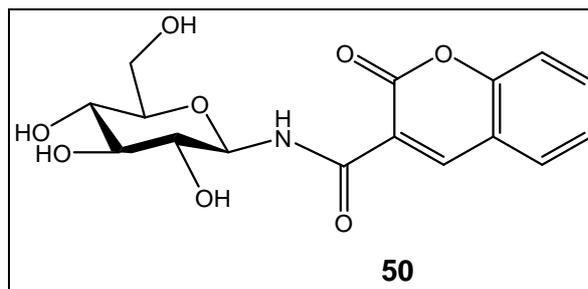
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 2,01, 2,04, 2,05 e 2,10 (4s, 12H, 4 x COCH₃); 3,90 (ddd, $J=10,0, 4,0$ e $2,1$ Hz, 1H, H-5'); 4,14 (dd, $J=12,6$ e $2,1$ Hz, 1H, H_a-6'); 4,30 (dd, $J=12,6$ e $4,0$ Hz, 1H, H_b-6'); 5,17 (q aparente, $J=9,6$ Hz, 2H, H-2' e H-4'); 5,36 (t, $J=9,6$ Hz, 1H, H-3'); 5,50 (t, $J=9,3$ Hz, 1H, H-1'); 7,38-7,44 (m, 2H, H-7 e H-8); 7,68-7,73 (m, 2H, H-5 e H-6); 8,90 (s, 1H, H-4); 9,31 (d, $J=9,6$ Hz, 1H, NH) ppm;

¹³C RMN (75,4 MHz, CDCl₃): 20,47, 20,54, 20,56 e 20,69 (4 x CH₃); 61,27 (C-6'); 68,04 (C-4'); 70,30 (C-2'); 73,01 (C-3'); 73,63 (C-5'); 78,16 (C-1'); 116,75 (C-7); 117,43 (C-3); 118,28 (C-8a); 125,36 (C-8); 129,95 (C-5); 134,65 (C-6); 149,48 (C-4); 154,62 (C-4a); 160,76 (C-2); 162,25 (C=O, amida); 169,39, 169,73, 170,03 e 170,65 (4 x C=O, acetilo) ppm;

m/z (FAB) (M⁺+1) 520,22;

Análise elementar: C, 55,47; H, 5,08; N, 2,56. C₂₄H₂₅NO₁₂ requer C, 55,48; H, 4,86; N, 2,70%.

2.3.2 – Síntese de *N*-(β-D-glucopiranosil)-(2-oxo-2*H*-cromeno)-3-carboxamida **50**



A uma solução de composto **49** (0,260 g, 0,5 mmol) em metanol seco (15 mL) adicionou-se Bu_2SnO (0,125 g, 0,5 mmol) e aqueceu-se em refluxo durante 5 h. A reacção foi seguida por TLC (eluente: clorofórmio-metanol 5:1). O resíduo foi concentrado sob vácuo e purificado por cromatografia em coluna tipo “flash” (eluente: clorofórmio-metanol 10:3). A terceira fracção isolada foi identificada como sendo o produto pretendido **50** (0,117 g; 67%) na forma de um sólido branco;

p.f.: a 216°C decompõe sem fundir;

$[\alpha]_D^{23} = +6,8^\circ$ (c 1,0 DMF);

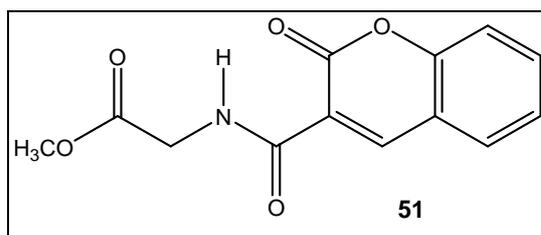
ν_{max} (Nujol) 3476 (O-H); 3293 (N-H); 1706 (C=O, lactona); 1612 (C=O, amida); 1247 (C-O-C assim); 1083-1044 (C-O-C sim) cm^{-1} ;

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): 3,10-3,16 (m, 2H, H-2' e H-4'); 3,19-3,29 (m, 2H, H-3' e H-5'); 3,40-3,46 (m, 1H, H_a-6'); 3,66 (ddd, $J=12,0, 5,4$ e $1,5$ Hz, 1H, H_b-6'); 4,57 (t, $J=5,4$ Hz, 1H, OH-6'); 4,97 (t aparente, $J=9,0/10,2$ Hz, 1H, H-1'); 5,06 (d, $J=4,8$ Hz, 1H, OH); 5,23 (d, $J=5,1$ Hz, 1H, OH); 7,43-7,53 (m, 2H, H-6 e H-7); 7,77 (ddd, $J=8,7, 7,5$ e $1,5$ Hz, 1H, H-5); 8,01 (dd, $J=7,8$ e $1,5$ Hz, 1H, H-8); 8,92 (s, 1H, H-4); 9,04 (d, $J=9,3$ Hz, 1H, NH) ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, CDCl_3): 60,88 (C-6'), 69,84 (C-4'); 73,19 (C-2'); 77,22 (C-3'); 78,91 (C-5'); 78,66 (C-1'); 116,28 (C-7); 118,39 (C-3); 118,46 (C-8a); 125,36 (C-8); 130,57 (C-5); 134,57 (C-6); 148,57 (C-4); 154,05 (C-4a); 160,57 (C-2); 161,58 (C=O, amida) ppm;

Análise elementar: 53,80; H, 4,93; N, 3,83. $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_8 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$ requer C, 53,33; H, 5,04; N, 3,89%.

2.3.3 – Síntese do éster metílico do ácido [(2-oxo-2H-cromeno-3-carbonil)-amino]-acético **51**



A uma solução de **48** (1,90 g, 10 mmol) em acetato de etilo (100 mL) adicionou-se HOBt (1,70 g, 10 mmol). Arrefeceu-se a solução obtida a 0°C e adicionou-se seguidamente DCC (2,16 g, 10,5 mmol), GlyOMe.HCl (1,26g, 10 mmol) e trietilamina (1,01 g, 1,38 mL, 10 mmol). A mistura reaccional foi deixada em agitação, à temperatura ambiente, durante 24 h. No final filtrou-se a mistura para retirar os materiais insolúveis. A camada orgânica foi lavada, sucessivamente, com NaHCO₃ a 5%, água, ácido cítrico a 5% e água e em seguida seca com MgSO₄. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto resultante (1,17 g; 45%) foi cristalizado de acetato de etilo-éter de petróleo originando o produto **51** (30%).

p.f.: 184,1-184,8°C;

ν_{\max} (Nujol) 3332 (N-H); 1748 (C=O, éster); 1713 (C=O, lactona); 1607 (C=O, amida); 1294 (C-O-C assim); 1218 (C-O-C sim) cm⁻¹;

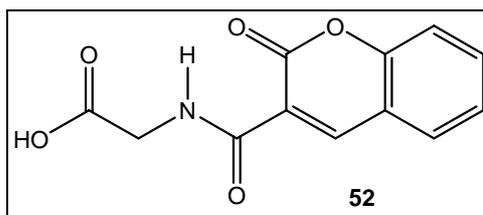
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 3,81 (s, 3H, OCH₃); 4,27 (d, *J*=6,0 Hz, 2H, CH₂); 7,37-7,44 (m, 2H, H-6 e H-8); 7,67-7,72 (m, 2H, H-5 e H-7); 8,92 (s, 1H, H-4); 9,26 (s largo, 1H, NH) ppm;

¹³C RMN (75,4 MHz, CDCl₃): 41,62 (CH₂); 52,35 (OCH₃); 116,64 (C-8); 117,90 (C-3); 118,44 (C-8a); 125,28 (C-6); 129,84 (C-5); 134,23 (C-7); 148,69 (C-4); 154,48 (C-4a); 161,16 (C=O, C-2); 162,83 (C=O, amida); 169,67 (C=O, éster) ppm;

m/z FAB (M⁺+1) 262,05;

Análise elementar: C, 59,76; H, 4,25; N, 5,36. C₁₃H₁₁NO₅ requer: C, 59,93; H, 4,46; N, 5,18%.

2.3.4 – Síntese do ácido [(2-oxo-2H-cromeno-3-carbonil)-amino]-acético **52**



O éster **51** (0,769 g, 3 mmol) foi dissolvido em metanol (5 mL) e adicionou-se NaOH 1M (7,5 mL, 7,5 mmol). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 4 h e em seguida adicionou-se HCl 1M (3,0 mL, 3 mmol). O metanol foi removido sob pressão reduzida e o resíduo obtido foi arrefecido num banho de gelo e acidificado a pH~2-3 com HCl 1M e agitado vigorosamente durante 1 hora. O sólido precipitado foi filtrado, lavado com água e seco.

O composto **52** foi isolado com um rendimento de 86% e foi usado sem posterior purificação;

p.f.: 238-239°C;

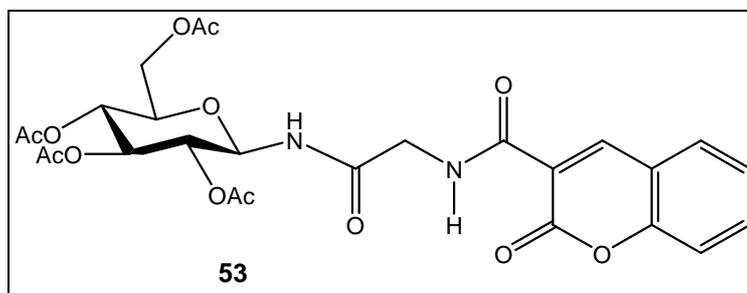
ν_{\max} (Nujol) 3315 (O-H e N-H); 1760 (C=O, ácido); 1712 (C=O, lactona); 1634 (C=O, amida); 1228 (C-O-C assim); 1162 (C-O-C sim) cm^{-1} ;

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): 4,05 (d, $J=5,7$ Hz, 2H, CH_2); 7,44 (t, $J=7,4$ Hz, 1H, H-6); 7,51 (d, $J=8,4$ Hz, 1H, H-8); 7,75 (dt, $J=1,5$ e 8,0 Hz, 1H, H-7); 7,99 (dd, $J=7,8$ e 1,5 Hz, 1H, H-5); 8,90 (s, 1H, H-4); 9,03 (t, $J=5,7$ Hz, 1H, NH); 12,8 (s largo, 1H, OH) ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, DMSO- d_6): 41,52 (CH_2); 116,18 (C-8); 118,19 (C-3); 118,43 (C-8a); 125,19 (C-6); 130,43 (C-5); 134,23 (C-7); 148,12 (C-4); 154,00 (C-4a); 160,39 (C-2); 161,18 (C=O, amida); 170,81 (C=O, ácido) ppm;

Análise elementar: C, 58,10; H, 3,93; N, 5,60. $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{NO}_5$ requer C, 58,18; H, 3,66; N, 5,65%.

2.3.5 – Síntese de *N*-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil)-(2-oxo-2*H*-cromeno-3-carbonil)-amino]-acetamida **53**



A uma solução de **52** (0,124 g, 0,5 mmol) em DMF (10 mL), adicionou-se glucosilamina **41** (0,174 g, 0,5 mmol) e HOBt (0,086 g, 0,55 mmol). Depois de arrefecer a 5°C, adicionou-se DCC (0,108 g, 0,525 mmol) e a mistura resultante ficou em agitação, à temperatura ambiente, durante 48 h. Em seguida adicionou-se água (50 mL) e a mistura foi arrefecida durante 3 h. O sólido precipitado foi filtrado, seco (0,131 g, 46%) e purificado por cromatografia em coluna tipo “flash” (eluente: acetato de etilo). A fracção isolada (0,074 g, 25,6%) foi recristalizada de diclorometano-éter de petróleo, obtendo-se o composto puro **53** na forma de um sólido branco com um rendimento de 20%;

p.f.: 245-246°C;

$[\alpha]_D^{27} = -11^\circ$ (c 2,0, CHCl₃);

ν_{\max} (Nujol) 3413 (NH); 1746 (C=O, éster); 1610 (C=O, amida); 1229 (C-O-C assim) cm⁻¹;

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 1,99, 2,03 e 2,09 (3s, 12H, 4 x COCH₃); 3,84 (ddd, $J=10,0, 4,5$ e $2,4$ Hz, 1H, H-5'); 4,08-4,15 (m, 1H, H_a-6'); 4,14 (d, $J=5,7$ Hz, 1H, CH₂Gly); 4,30 (dd, $J=12,6$ e $4,5$ Hz, 1H, H_b-6'); 4,90 (t, $J=9,6$ Hz, 1H, H-2'); 5,05 (t, $J=9,6/10,0$ Hz, 1H, H-4'); 5,24 (t, $J=9,6$ Hz, 1H, H-3'); 5,30 (t, $J=9,6$ Hz, 1H, H-1'); 7,01 (d, $J=9,3$ Hz, 1H, NH); 7,40 (d, $J=7,8$ Hz, 1H, H-8); 7,44 (d, $J=7,8$ Hz, 1H, H-5); 7,71 (t, $J=7,8$ Hz, 2H, H-6 e H-7); 8,91 (s, 1H, H-4); 9,26 (t, $J=4,8$ Hz, 1H, NH Gly) ppm;

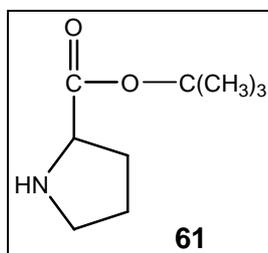
¹³C RMN (75,4 MHz, CDCl₃): 20,50, 20,55 e 20,70 (4x CH₃); 43,89 (CH₂Gly); 61,58 (C-6'); 68,09 (C-4'); 70,26 (C-2'); 72,55 (C-3'); 73,56 (C-5'); 78,22 (C-1'); 116,76 (C-7), 117,79 (C-3); 118,44 (C-8a); 125,41 (C-8), 129,92 (C-5); 134,44 (C-6); 148,85 (C-4); 154,54 (C-4a); 161,30 (C-2); 162,62 (C=O, amida); 169,28 (C=O, aminoácido); 169,50, 169,80, 170,63 e 171,10 (4 x C=O, acetilo) ppm;

HRMS (FAB): calculado para C₂₆H₂₈N₂O₁₃ (M⁺+1) 577,1670. Obtido: 577,1671;

Análise elementar: C, 53,85; H, 5,19; N, 4,72. C₂₆H₂₈N₂O₁₃ requer C, 54,16; H, 4,90; N, 4,86%.

2.4 – SÍNTESE DE GLICOCONJUGADOS FLUORESCENTES A PARTIR DO PÉPTIDO PROTEGIDO Gly-Phe-Pro

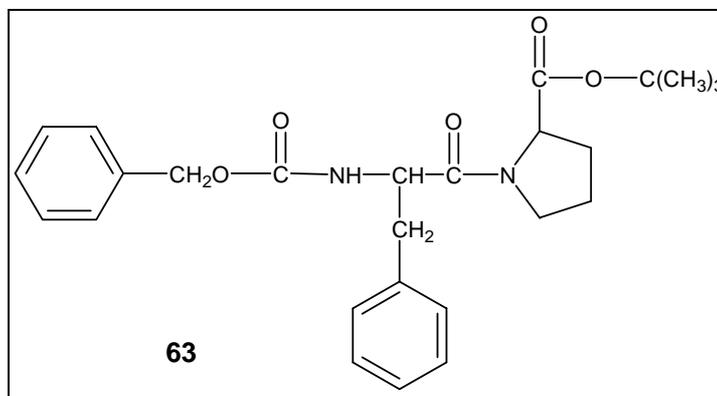
2.4.1- Preparação de Pro-OBu^t 61



A uma solução de Z-Pro-OBu^t **60** (0,200 g, 0,655 mmol) em metanol (2,5 mL), foi adicionado Pd/C 10% (0,200 g) e monoformiato de hidrazina a 65% (0,299 g, 2,62 mmol). A mistura resultante foi agitada durante 1 h, à temperatura ambiente. A reacção foi seguida por TLC (eluente: clorofórmio-metanol 7:1) No final adicionou-se metanol seco (20 mL), filtrou-se sobre Celite, lavou-se com metanol (20 mL) e concentrou-se. Ao resíduo obtido adicionou-se clorofórmio (20 mL), lavou-se com solução aquosa saturada de NaCl (2 x 10 mL), secou-se (MgSO₄) e concentrou-se, tendo-se obtido o produto **61** (0,100 g, 85%);

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 1,42 (s, 9H, 3 x CH₃); 1,63-1,82 (m, 3H, β e γCH₂ Pro); 2,01-2,13 (m, 1H, βCH₂ Pro); 2,82-2,90 (m, 2H, δCH₂ Pro); 3,00 (s largo, 1H, NH); 3,02-3,08 (m, 1H, δCH₂ Pro); 3,62 (dd, J=8,1 e 4,8 Hz, 1 H, αCH Pro) ppm.

2.4.2 – Síntese de Z-Phe-Pro-OBu^t 63

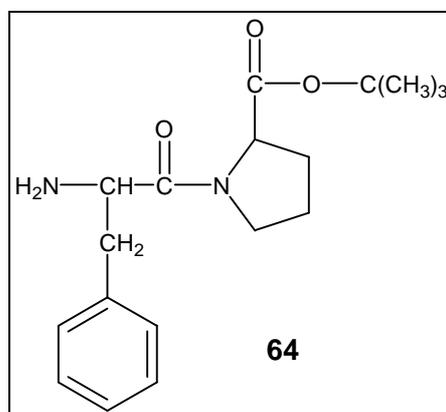


A uma solução de Z-Phe **62** (0,172 g, 0,590 mmol) em acetato de etilo (10 mL), adicionou-se HOBt (0,100 g, 0,740 mmol). Após arrefecer a solução em banho de gelo adicionou-se DCC (0,128 g, 0,619 mmol) e Pro-OBu^t **61** (0,101 g, 0,590 mmol). A mistura reaccional foi deixada em agitação, à temperatura ambiente, durante 19 horas. Adicionou-se acetato de etilo (10 mL) e colocou-se no frio durante 30 minutos. A seguir filtrou-se e a solução foi lavada sucessivamente com solução aquosa de NaHCO₃ 5% (3x10 mL), água, ácido cítrico 5% (3x10 mL), água, seca (MgSO₄) e o solvente evaporado. O produto obtido **63** foi utilizado sem posterior purificação (0,166 g; 62%);

$[\alpha]_D^{27} = -31,6^\circ$ (c 1,0, DMF);

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 1,36 e 1,49 (s, 9H, 3 x CH₃); 1,62-1,71 (m, 1H, βCH₂ Pro); 1,91-2,06 (m, 2H, γCH₂ Pro); 2,12-2,21 (m, 1H, βCH₂ Pro); 2,92 (dd, *J*=14,1 e 7,2 Hz, 1H, βCH₂ Phe); 3,15 (dd, *J*=14,1 e 5,7 Hz, 1H, βCH₂ Phe); 3,38-3,52 (m, 2H, δCH₂ Pro); 4,34 (dd, *J*=8,7 e 4,2 Hz, 1H, αCH Pro); 4,69-4,76 (m, 1H, αCH Phe); 5,04 (d, *J*=5,7 Hz, 1H, CH₂-Z); 5,10 (d, *J*=5,1 Hz, 1H, CH₂-Z); 5,50 (d, *J*=8,4 Hz, 1H, NH); 7,26-7,27 (m, 10H, 2 x Ar-H) ppm.

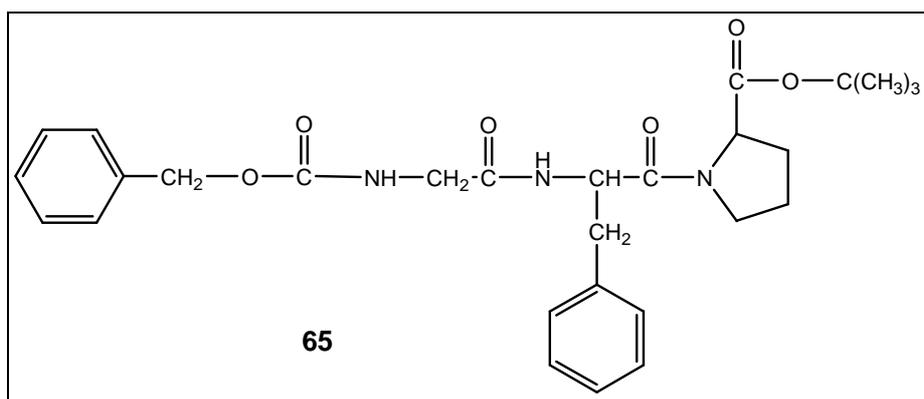
2.4.3 – Preparação de Phe-Pro-OBu^t **64**



A uma solução de **63** (0,153 g, 0,338 mmol) em metanol seco (4,2 mL) adicionou-se Pd/C 10% (0,034 g). A mistura resultante foi agitada durante 30 minutos, sob uma corrente de azoto, sendo depois submetida a uma atmosfera de hidrogénio, à pressão normal, durante 4 h. A mistura foi filtrada sobre Celite e concentrada originando o produto **64** (0,091 g, 85%) que foi utilizado sem qualquer purificação;

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): 1,43 (s, 9H, 3 x CH_3); 1,78-1,95 (m, 3H, β , γCH_2 Pro); 2,00-2,20 (m, 1H, βCH_2 Pro); 2,80-3,00 (m, 1H, βCH_2 Phe); 3,20-3,35 (m, 1H, δCH_2 Pro); 3,60-3,70 (m, 1H, δCH_2 Pro); 4,35-4,42 (m, 1H, αCH_2 Pro); 4,45-4,58 (m, 1H, αCH Phe); 6,40 (s largo, 2H, NH_2); 7,25-7,29 (m, 4H, H-Ar); 7,44 (d, $J=6,6$ Hz, 2 H, 1 Ar-H e NH) ppm.

2.4.4 – Síntese do tripéptido Z-Gly-Phe-Pro-OBu^t 65



A uma solução de Z-Gly **58** (0,060 g, 0,286 mmol) em acetato de etilo (2,8 mL) adicionou-se HOBt (0,049 g, 0,286 mmol) e arrefeceu-se a mistura a 0°C (banho de gelo e acetona). Adicionou-se DCC (0,062 g, 0,300 mmol), Phe-Pro-OBu^t **64** (0,091 g, 0,286 mmol). A mistura reaccional foi agitada à temperatura ambiente durante 19 h. A solução foi filtrada, o solvente evaporado, sob pressão reduzida, e o resíduo diluído com diclorometano. A fase orgânica foi lavada sucessivamente com solução aquosa de NaHCO_3 5% (3x10 mL), água, ácido cítrico 5% (3x10 mL), água, seca (MgSO_4) e o solvente evaporado. O resíduo obtido correspondia ao composto **65** (0,091 g, 62%);

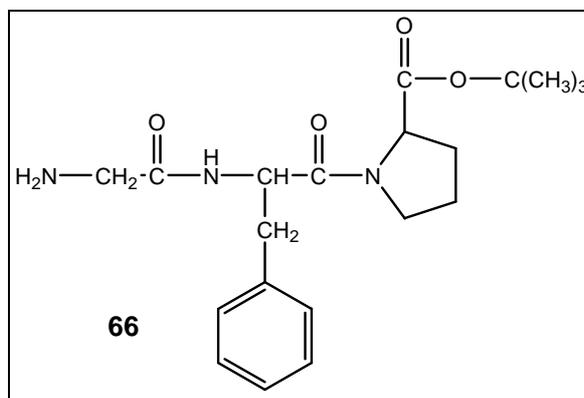
$[\alpha]_D^{27} = -33,8^\circ$ (c 1,0, DMF);

^1H RMN (300 MHz, DMSO-d_6): 1,50 (s, 9H, 3 x CH_3); 1,76-1,98 (m, 3H, β , γCH_2 Pro), 2,07-2,17 (m, 1H, βCH_2 Pro); 2,75 (dd, $J=14,1$ e $9,3$ Hz, 1H, βCH_2 Phe); 2,96 (dd, $J=14,1$ e $4,5$ Hz, 1H, βCH_2 Phe); 3,45-3,65 (m, 4H, δCH_2 Pro e CH_2 Gly); 4,18 (dd, $J=8,1$ e $4,5$ Hz, 1H, αCH Pro); 4,68 (ddd, $J=12,6$, $8,4$ e $4,5$ Hz, 1H, αCH Phe); 5,00 (s, 2H, CH_2 Z); 7,18-7,33 (m, 11H, 2 x Ar-H e NH Gly); 8,23 (d, $J=8,4$ Hz, 1H, NH Phe) ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, DMSO-d_6): 24,54 (γCH_2 Pro); 27,59 (3 x CH_3); 28,61 (βCH_2 Pro), 36,80 (βCH_2 Phe); 43,11 (CH_2 Gly); 46,49 (δCH_2 Pro); 51,90 (αCH Phe); 59,47 (αCH Pro); 65,40 (CH_2 Z); 80,36 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 126,41 (CH-Ar Z *para*); 127,67 (2 CH-Ar Z *orto*); 127,77

(CH-Ar Phe *para*); 128,13 (2CH-Ar Z *meta*); 128,35 (2CH-Ar Phe *orto*); 129,32 (2CH-Ar Phe *meta*); 137,05 (Cquat Z); 137,44 (Cquat. Phe); 156,39 (C=O Z); 168,74 (C=O Gly), 169,39 C=O Phe); 170,91 (C=O Pro) ppm.

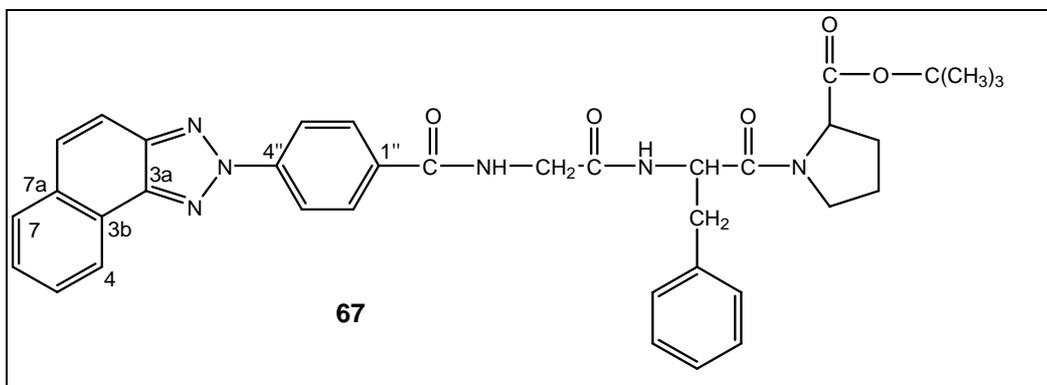
2.4.5 – Preparação do composto Gly-Phe-Pro-OBu^t 66



A uma solução do péptido **65** (1,019 g, 2,0 mmol) em metanol (20 mL) foi adicionado Pd/C 10% (0,200 g). A mistura resultante foi agitada durante 30 minutos sob uma corrente de azoto, sendo depois submetida a uma atmosfera de hidrogénio, à pressão normal, durante 4 h. A mistura final foi filtrada sobre Celite e concentrada, sob vácuo. O produto obtido na forma de óleo foi triturado com éter etílico originando o produto **66** na forma de um sólido branco (0,706 g, 94%), que foi usado sem purificação posterior;

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 1,49 (s, 9H, 3 x CH₃); 1,90-1,99 (m, 3H, β, γCH₂ Pro); 2,15-2,19 (m, 1H, βCH₂ Pro); 2,96 (dd, *J*=14,1 e 7,5 Hz, 1H, βCH₂ Phe); 3,19 (dd, *J*=14,1 e 6,3 Hz, 1H, βCH₂ Phe); 3,27 (s largo, 2H, NH₂); 3,32-3,45 (m, 2H, δCH₂ Pro); 3,47-3,59 (m, 1H, CH₂ Gly); 3,69-3,76 (m, 1H, CH₂Gly); 4,39 (dd, *J*=9,0 e 4,8 Hz, 1H, αCH Pro); 5,00 (q aparente, *J*=7,0 Hz, 1H, αCH Phe); 7,27 (s, 5H, H-Ar); 7,65 (d, *J*=8,1 Hz, 1H, NH) ppm.

2.4.6 – Síntese do nafto[1,2-*d*][1,2,3]triazol-2-il-benzamida-Gly-Phe-ProOBU^t 67



A uma solução do péptido **66** (0,350 g, 0,931 mmol) em DMF (30 mL) adicionou-se corante **42** (0,169 g, 0,931 mmol). Arrefeceu-se a solução num banho de gelo e adicionou-se HBTU (0,353 g, 0,931 mmol) e DIPEA (0,241 g, 0,328 mL, 1,862 mmol). A mistura resultante foi deixada em agitação, à temperatura ambiente, durante 20 h. A reacção foi seguida por TLC (eluente: clorofórmio-metanol 6:1). No final adicionou-se água (150 mL) com a mistura reaccional em banho de gelo e deixou-se no frio cerca de 3 h. O precipitado formado foi removido por filtração e seco. O sólido assim obtido, de cor rosa, correspondia ao produto desejado **67** (0,524 g, 87%);

p.f.: 114,2-114,9°C;

$[\alpha]_D^{23} = -33,4^\circ$ (c 1,0, DMF);

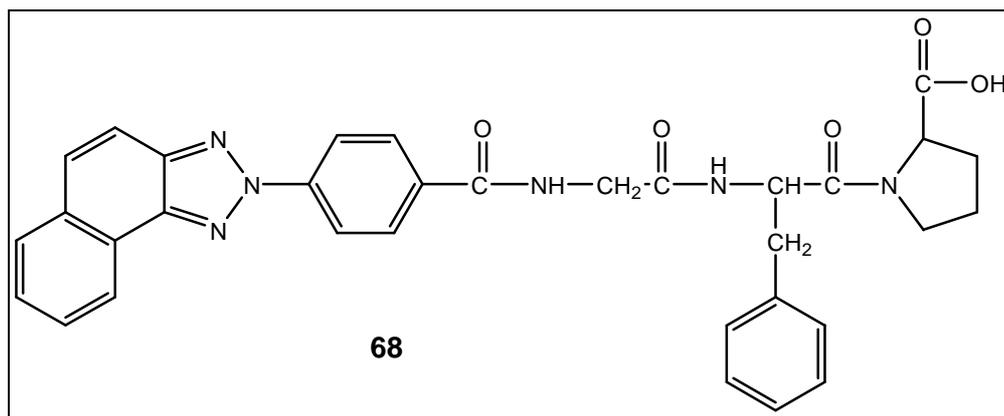
ν_{\max} (Nujol) 3303 (N-H); 1736 (C=O, éster); 1607 (C=O, amida); 1295 e 1228 (C-O-C assim); 1205 e 1153 (C-O-C sim); cm^{-1}

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): 1,38 (s, 9H, 3 x CH_3); 1,77-2,18 (m, 4H, β , γCH_2 Pro); 2,75-3,01 (m, 2H, βCH_2 Phe); 3,52-3,71 (m, 2H, δCH_2 Pro); 3,81-4,02 (m, 2H, CH_2 Gly); 4,20 (dd, 1H, $J=8,4$ e $4,5$ Hz, αCH Pro); 4,65-4,78 (m, 1H, αCH Phe); 7,16-7,34 (m, 5H, Ar-H); 7,76 (t, $J=7,2$ Hz, 2H, H-5 e H-6); 7,93 (s, 2H, H-8 e H-9); 8,09 (d, $J=7,2$ Hz, 1H, H-7); 8,13 (d, $J=8,7$ Hz, 2H, H-2'' e H-6''); 8,42 (d aparente, $J=8,7$ Hz, 3H, NH Phe, H-3'' e H-5''); 8,54 (d, $J=7,8$ Hz, 1H, H-4); 8,85 (t, $J=5,7$ Hz, 1H, NH Gly) ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, DMSO- d_6): 24,52 (γCH_2 Pro); 27,57 ($3\times\text{CH}_3$); 28,62 (βCH_2 Pro); 36,79 (βCH_2 Phe); 42,27 (CH_2 Gly); 46,49 (δCH_2 Pro); 52,02 (αCH Phe); 59,46 (αCH Pro); 80,35 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 116,22 (C-9); 119,30 (C-3'' e C-5''); 122,83 (C-4); 123,85 (C-3b); 126,41 (CH-Ar *para*); 128,13 (C-5, C-6, 2CH-Ar *orto*); 129,19 (C-2'' e C-6''); 129,33 (C-7, 2CH-Ar *meta*); 130,46 (C-8); 132,13 (C-7a); 133,83 (C-4''); 137,50 (Cquat. Phe); 141,29 (C-1''); 142,47 (C-3a); 143,34 (C-9a); 165,33 (C=O Gly); 168,58 (C=O Fluoróforo); 169,43 (C=O Phe); 170,89 (C=O Pro) ppm;

Análise elementar: C, 67,76; H, 6,03; N, 12,92. $\text{C}_{37}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_5 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ requer C, 67,77; H, 6,00; N, 12,92%.

2.4.7 – Preparação de nafto[1,2-*d*][1,2,3]triazol-2-il-benzamida-Gly-Phe-ProOH 68



O composto **67** (0,400 g, 0,618 mmol) foi tratado com ácido trifluoroacético (4,56 g, 3,08 mL, 40,0 mmol) durante 2 h, com agitação ocasional. Adicionou-se éter etílico à solução e a mistura foi concentrada sob pressão reduzida. Este procedimento foi repetido várias vezes até eliminação total do TFA. O produto obtido (0,294 g) foi recristalizado de diclorometano-éter etílico originando o composto **68** na forma de um sólido rosa (0,280 g, 77%);

p.f.: 141,7-142,1°C;

$[\alpha]_D^{23} = -24,8^\circ$ (c 1,0, DMF);

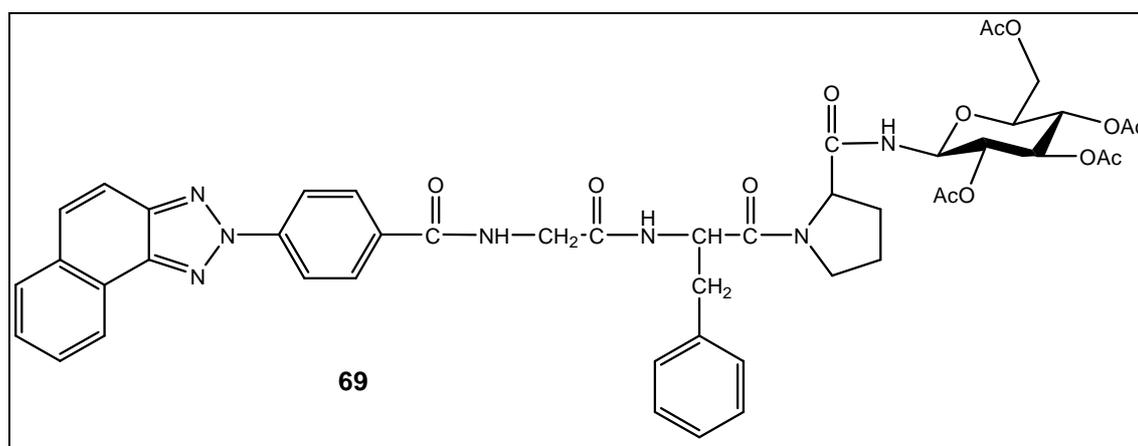
ν_{\max} (Nujol) 3583 (OH); 3280 (N-H); 1732 (C=O, ácido); 1606 (C=O, amida) cm^{-1} ;

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): 1,82-2,17 (m, 4H, $\beta,\gamma\text{CH}_2$ Pro); 2,77-2,89 (m, 1H, βCH_2 Phe); 2,99 (dd, $J=13,8$ e $5,1$ Hz, 1H, βCH_2 Phe); 3,45-3,71 (m, 2H, δCH_2 Pro); 3,88 (dqAB, $J=6,0$ e $16,5$ Hz, 2H, CH_2 Gly); 4,27 (dd aparente, $J=9,3/8,4$ e $4,2/3,3$ Hz, 1H, αCH Pro); 4,72 (q aparente, $J=8,4$ Hz, 1H, αCH Phe); 7,17-7,31 (m, 5H, Ar-H); 7,76 (dt, $J=1,5$ e $7,2$ Hz, 2H, H-5 e H-6); 7,92 (s, 2H, H-8 e H-9); 8,08 (d, $J=7,2$ Hz, 1H, H-7); 8,13 (d, $J=8,7$ Hz, 2H, H-2'' e H-6''); 8,37 (d, $J=8,1$ Hz, 1H, NH Phe); 8,41 (d, $J=9,0$ Hz, 2H, H-3'' e H-5''); 8,56 (d, $J=7,8$ Hz, 1H, H-4); 8,86 (t, 1H, $J=5,7$ Hz, NH Gly); 12,52 (s largo, 1H, OH) ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, DMSO- d_6): 24,50 (γCH_2 Pro); 28,63 (βCH_2 Pro); 36,90 (βCH_2 Phe); 42,27 (CH_2 Gly); 46,50 (δCH_2 Pro); 51,96 (αCH Phe); 58,61 (αCH Pro); 116,24 (C-9); 119,33 (C-3'' e C-5''); 122,84 (C-4); 123,86 (C-3b); 126,38 (CH-Ar *para*); 128,11 (C-5, C-6, 2CH-Ar *orto*); 129,14 (C-2'' e C-6''); 129,40 (C-7, 2CH-Ar *meta*); 130,48 (C-8); 132,14 (C-7a); 133,83 (C-4''); 137,40 (Cquat. Phe); 141,32 (C-1''); 142,49 (C-3a); 143,36 (C-9a); 165,36 (C=O Gly); 168,52 (C=O Fluoróforo); 169,49 (C=O Phe); 173,16 (C=O Pro) ppm;

Análise elementar: C, 65,44; H, 5,37; N, 13,96. $\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ requer C, 65,12; H, 5,30; N, 13,81%.

2.4.8 – Síntese de nafto[1,2-*d*][1,2,3]triazol-2-il-benzamida-Gly-Phe-Pro-glucopiranosilamida 69



A uma solução de composto **68** (0,200 g, 0,330 mmol) em DMF (10 mL) adicionou-se glucosilamina **41** (0,115 g, 0,330 mmol). Arrefeceu-se a solução num banho de gelo e adicionou-se HBTU (0,125 g, 0,330 mmol) e DIPEA (0,085 g, 0,111 mL, 0,660 mmol). A mistura resultante foi deixada em agitação, à temperatura ambiente, durante 18 h. A reacção foi seguida por TLC (eluente: clorofórmio-metanol 6:1). No final adicionou-se água (50 mL) com a mistura reaccional em banho de gelo e deixou-se no frio durante a noite. O precipitado formado foi removido por filtração, seco e purificado por cromatografia em coluna tipo "flash" (eluente: clorofórmio-metanol 12:1). A 2ª fracção isolada, sólido de cor rosa forte, correspondia ao produto pretendido **69** (0,161g, 53%);

p.f.: 137,1-137,6°C;

$[\alpha]_D^{23} = -6,4^{\circ}$ (c 1,0, DMF);

ν_{\max} (Nujol) 3291 (N-H); 1751 (C=O, éster); 1605 (C=O, amida); 1222 (C-O-C assim); 1035 (C-O-C sim) cm^{-1} ;

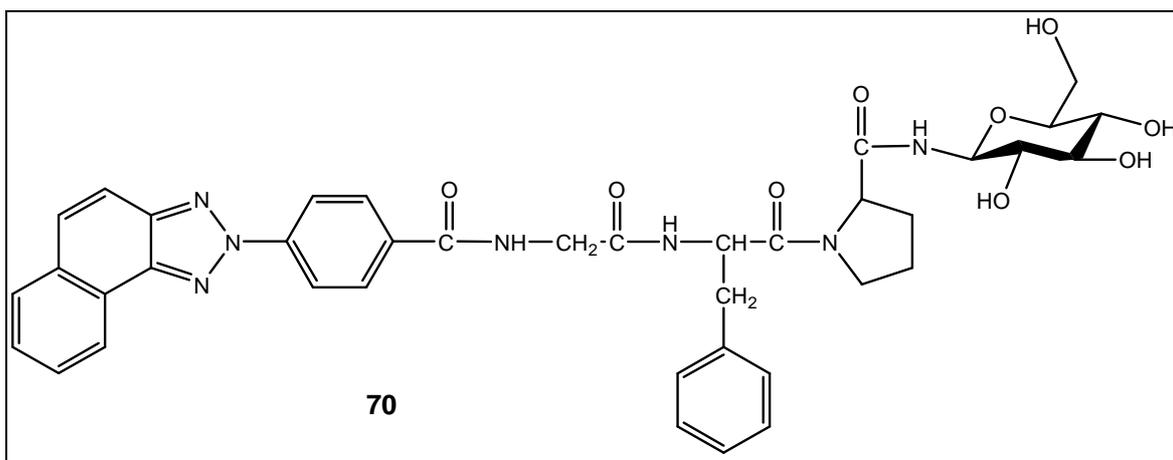
^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): 1,91, 1,99, 2,02 e 2,07 (4s, 12 H, 4 x COCH_3); 1,93-2,18 (m, 4H, $\beta,\gamma\text{CH}_2$ Pro); 3,03 (dd, $J=14,0$ e 6,9 Hz, 1H, βCH_2 Phe); 3,18 (dd, $J=14,0$ e 6,9 Hz, 1H, βCH_2 Phe); 3,35-3,42 (m, 2H, δCH_2 Pro); 3,83 (ddd, $J=9,9$, 3,9 e 2,1 Hz, 1H, H-5'); 4,05-4,25 (m, 2H, CH_2 Gly); 4,08 (dd, $J=12,3$ e 1,8 Hz, 1H, H_a-6'); 4,24-4,33 (m, 2H, H_b-6' e αCH Pro); 4,45-4,49 (m, 1H, αCH Phe); 4,95 (t, $J=9,6$ Hz, 1H, H-4'); 5,00 (t, $J=9,6$ Hz, 1H, H-2'); 5,29 (t, $J=9,6$ Hz, 1H, H-1' ou H-3'); 5,31 (t, $J=9,3$ Hz, 1H, H-1' ou H-3'); 7,22-7,34 (m, 5H, Ar-H); 7,40 (d, $J=9,3$ Hz, 1H, NH glucosilamida); 7,63 (dt, $J=1,8$ e 7,2 Hz, 2H, H-5 e H-6); 7,70 (s, 2H, H-8 e H-9); 7,85 (dd, $J=7,2$ e 1,8 Hz, 1H, H-7); 8,00 (d, $J=8,7$ Hz, 2H, H-2'' e H-6''); 8,40 (d aparente, $J=8,7$ Hz, 3H, NH Phe, H-3'' e H-5''); 8,56 (dd, $J=7,5$ e 1,8 Hz, 1H, H-4); 8,65 (t, $J=6,6$ Hz, 1H, NH Gly) ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, DMSO-d_6): 20,55 (2 x CH_3 Ac); 20,72 (2 x CH_3 Ac); 24,81 (γCH_2 Pro); 28,95 (βCH_2 Pro); 38,34 (βCH_2 Phe); 43,37 (CH_2 Gly); 47,58 (δCH_2 Pro); 52,13 (αCH Pro); 60,51 (αCH Phe); 61,65 (C-6'); 68,05 (C-2'); 70,40 (C-4'); 73,06 (C-1' ou C-3'); 73,65 (C-5'); 78,17 (C-1' ou C-3'); 116,20 (C-9); 119,66 (C-3'' e C-5''); 123,31 (C-4); 124,68 (C-3b); 127,16 (CH-Ar *para*); 127,59 (C-6); 127,75 (C-5); 128,59 (C-2'' e C-6''); 128,70 (2CH-Ar *orto*); 128,89 (C-7); 129,52 (2CH-Ar *meta*); 130,23 (C-8); 132,38 (C-7a); 132,69 (C-4''); 135,82 (Cquat. Phe); 142,48 (C-1''); 143,19 (C-3a); 143,81 (C-9a); 166,59

(C=O Gly); 168,59 (C=O Fluoróforo); 169,50 (C=O Phe); 169,95 (C=O Acetilo); 170,64 (C=O Ac); 170,74 (C=O Ac); 170,86 (C=O Ac); 171,88 (C=O Pro) ppm;

Análise elementar: C, 59,57; H, 5,63; N, 10,33. $C_{47}H_{49}N_7O_{13} \cdot 3/2H_2O$ requer C, 59,57; H, 5,54; N, 10,35%.

2.4.9 – Síntese de nafto[1,2-*d*][1,2,3]triazol-2-il-benzamida-Gly-Phe-Pro-glucopiranosilamida desacetilada **70**



A uma solução de composto **69** (0,279 g, 0,303 mmol) em metanol seco (11 mL) adicionou-se Bu_2SnO (0,113 g, 0,455 mmol) e aqueceu-se em refluxo durante 15 h. A reacção foi seguida por TLC (eluente: clorofórmio-metanol 5:1). O resíduo foi concentrado sob vácuo e purificado por cromatografia em coluna tipo “flash” (eluente: clorofórmio-metanol 10:3) obtendo-se o produto pretendido **70** (0,140 g, 62%) na forma de um sólido rosa alaranjado;

p.f.: 149,6-151,2°C;

$[\alpha]_D^{23} = -19,4^{\circ}$ (c 1,0, DMF);

ν_{max} (nujol) 3583 (OH); 3324 (N-H); 1605 (C=O, amida); 1260 (C-O-C assim); 1075-1018 (C-O-C sim) cm^{-1} ;

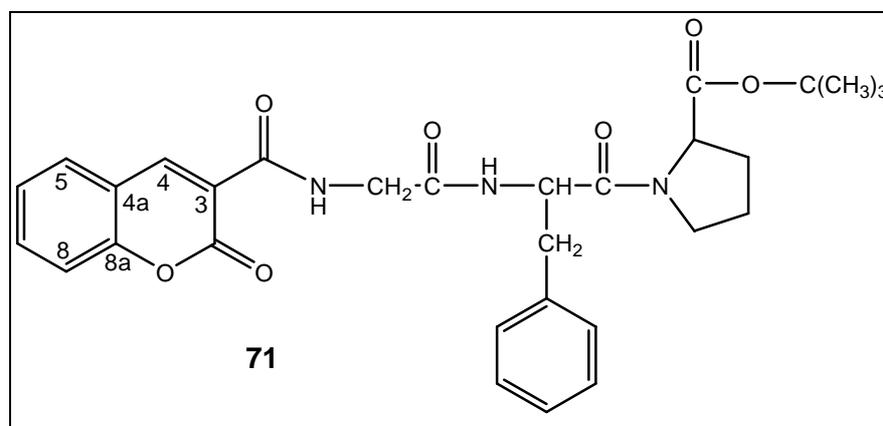
1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): 1,67-2,04 (m, 4H, $\beta, \gamma CH_2$ Pro); 2,79 (dd, $J=13,8$ e $9,0$ Hz, 1H, βCH_2 Phe); 3,01 (dd, $J=13,5$ e $4,5$ Hz, 1H, βCH_2 Phe); 3,06-3,21 (m, 4H, H-2', H-3', H-4' e

H-5'); 3,45 (dd aparente, $J=11,7$ e $7,2$ Hz, 2H, H_a-6' e δCH_2 Pro); 3,64 (dd aparente, $J=11,4$ e $5,7$ Hz, 2H, H_b-6' e δCH_2 Pro); 3,87 (dqAB, $J=16,5$ e $5,4$ Hz, 2H, CH_2 Gly); 4,38 (dd, $J=9,3$ e $3,3$ Hz, 1H, αCH Pro); 4,52 (t, $J=5,7$ Hz, 1H, OH-6'); 4,71 (t aparente, $J=8,7$ Hz, 3H, αCH Phe, H-1' e OH); 4,93 (d largo, $J=3,6$ Hz, 1H, OH); 5,02 (s largo, 1H, OH); 7,17-7,32 (m, 6H, Ar-H e NH glucosilamina); 7,69-7,79 (m, 2H, H-5 e H-6); 7,92 (s, 2H, H-8 e H-9); 8,08 (d, $J=7,5$ Hz, 1H, H-7); 8,13 (d, $J=8,4$ Hz, 2H, H-2'' e H-6''); 8,30 (d, $J=8,4$ Hz, 1H, OH); 8,41 (d aparente, $J=8,4$ Hz, 3H, NH Phe, H-3'' e H-5''); 8,55 (d, $J=7,5$ Hz, 1H, H-4); 8,86 (t, $J=5,7$ Hz, 1H, NH Gly) ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, DMSO- d_6): 24,36 (γCH_2 Pro); 29,01 (βCH_2 Pro); 37,00 (βCH_2 Phe); 42,25 (CH_2 Gly); 46,87 (δCH_2 Pro); 52,18 (αCH Phe); 59,70 (αCH Pro); 60,92 (C-6'); 70,01 (C-2'); 72,65 (C-3' ou C-5'); 77,47 (C-3' ou C-5'); 78,69 (C-4'); 79,89 (C-1'); 116,26 (C-9); 119,35 (C-3'' e C-5''); 123,87 (C-4); 123,87 (C-3b); 126,40 (CH-Ar *para*); 128,18 (C-5 e C-6); 128,23 (2CH-Ar *orto*); 129,17 (C-2'' e C-6''); 129,35 (2CH-Ar *meta*); 129,48 (C-7); 130,51 (C-8); 132,16 (C-7a); 133,84 (C-4''); 137,67 (Cquat. Phe); 141,33 (C-1''); 142,51 (C-3a); 143,38 (C-9a); 165,37 (C=O Gly); 168,61 (C=O Fluoróforo); 169,99 (C=O Phe); 171,76 (C=O Pro) ppm;

Análise elementar: C, 56,31; H, 6,06; N, 11,28. $C_{39}H_{41}N_7O_9 \cdot 9/2H_2O$ requer C, 56,24; H, 6,05; N, 11,77%.

2.4.10 – Síntese de (2-Oxo-2H-cromeno-3-carbonil)-amido-Gly- Phe-Pro-OBu^t 71



A uma solução do péptido **66** (0,197 g, 0,524 mmol) em DMF (2,5 mL) adicionou-se corante **48** (0,100 g, 0,524 mmol). Arrefeceu-se a solução num banho de gelo e

adicionou-se HBTU (0,199 g, 0,524 mmol) e DIPEA (0,135 g, 0,177 mL, 1,048 mmol). A mistura resultante foi deixada em agitação, à temperatura ambiente, durante 22 h. A reacção foi seguida por TLC (eluente: clorofórmio-metanol 6:1). No final adicionou-se água (7,5 mL) com a mistura reaccional em banho de gelo e deixou-se no frio cerca de 3 h. O precipitado formado foi removido por filtração e seco. O sólido assim obtido, de cor branca, correspondia ao produto desejado **69** (0,248 g, 86,%);

p.f.: 99,7-101,2°C;

$[\alpha]_D^{23} = -34^\circ$ (c 1,0, DMF);

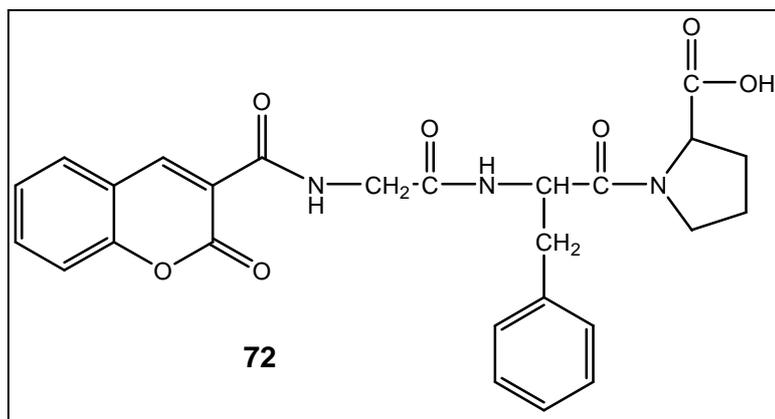
ν_{\max} (Nujol) 3320 (N-H); 1722 (C=O, éster); 1641 (C=O, lactona); 1605 (C=O, amida) cm^{-1} ;

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): 1,48 (s, 9H, 3 x CH_3); 1,90-2,20 (m, 4H, β,γ CH_2 Pro); 2,98 (dd, $J=14,1$ e $6,6$ Hz, 1H, βCH_2 Phe); 3,18 (dd, $J=14,1$ e $6,6$ Hz, 1H, βCH_2 Phe); 3,34-3,40 (m, 1H, δCH_2 Pro); 3,64-3,73 (m, 1H, δCH_2 Pro); 4,09 (t, $J=6,3$ Hz, 2H, CH_2 Gly); 4,41 (dd, $J=9,0$ e $4,5$ Hz, 1H, αCH Pro); 5,01 (dd, $J=14,1$ e $6,3$ Hz, 1H, αCH Phe); 6,73 (d, $J=7,8$ Hz, 1H, NH Phe); 7,22-7,30 (m, 5H, Ar-H); 7,40 (t, $J=7,8$ Hz, 1H, H-6); 7,43 (d, $J=8,7$ Hz, 1H, H-8); 7,70 (t aparente, $J=8,7$ Hz, 2H, H-5 e H-7); 8,90 (s, 1H, H-4); 9,22 (t, $J=5,4$ Hz, 1H, NH Gly);

^{13}C RMN (75,4 MHz, CDCl_3): 24,74 (γCH_2 Pro); 27,95 (3x CH_3); 29,00 (βCH_2 Pro); 38,16 (βCH_2 Phe); 43,46 (CH_2 Gly); 46,96 (δCH_2 Pro); 51,78 (αCH Phe); 59,69 (αCH Pro); 81,35 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 116,65 (C-8); 117,88 (C-3); 118,51 (C-4a); 125,27 (C-6); 126,81 (CH-Ar *para*); 128,32 (2CH-Ar *orto*); 129,77 (2CH-Ar *meta*); 129,93 (C-5); 134,21 (C-7); 135,87 (Cquat. Phe); 148,85 (C-4); 154,51 (C-8a); 161,09 (C-2); 162,04 (C=O, amida); 167,78 (C=O, Gly); 169,73 (C=O, Phe); 170,95 (C=O, Pro) ppm;

Análise elementar: C, 63,33; H, 6,17; N, 7,46. $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ requer C, 63,70; H, 6,24; N, 7,43%.

2.4.11 – Síntese de (2-Oxo-2H-cromeno-3-carbonil)-amido-Gly-Phe-Pro 72



O composto **71** (0,177 g, 0,323 mmol) foi tratado com ácido trifluoroacético (2,37 g, 1,6 mL, 20,8 mmol) durante 2 h, com agitação ocasional. No final adicionou-se éter etílico e concentrou-se sob pressão reduzida. Este procedimento foi repetido várias vezes até eliminação total do TFA, obtendo-se o produto **72** na forma de um sólido branco (0,159 g, 100%);

p.f.: 119,5-120,1°C;

$[\alpha]_D^{23} = -34,6^\circ$ (c 1,0, DMF);

ν_{\max} (Nujol) 3405 (OH); 3295 (N-H); 1725 (C=O, éster); 1691 (C=O, ácido); 1634 (C=O, lactona); 1610 (C=O, amida); 1240 (C-O-C assim); 1163-1152 (C-O-C sim) cm^{-1} ;

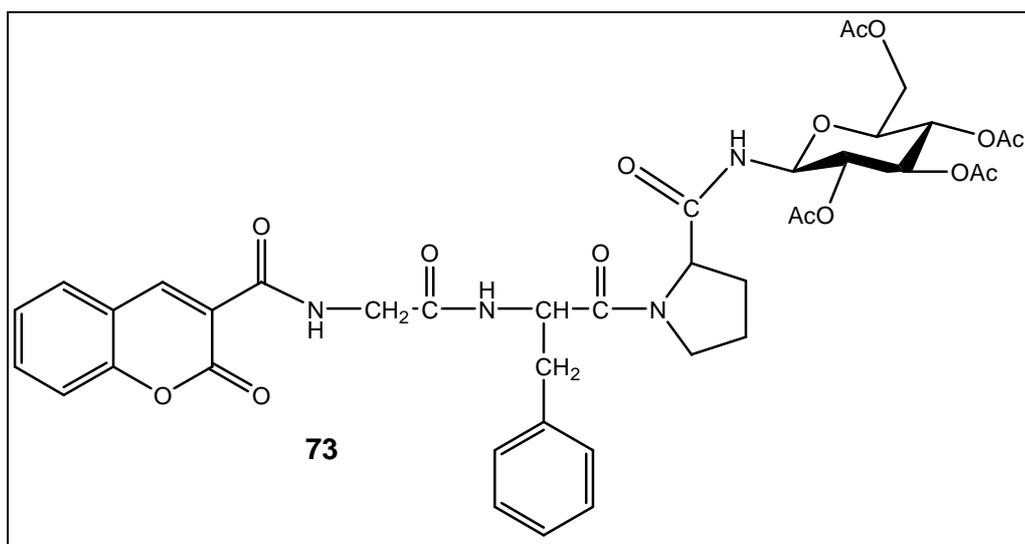
^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): 1,83 (dqAB, $J=6,6$ e $12,6$ Hz, 2H, γCH_2 Pro); 1,98 (dt aparente, $J=12,9$ e $6,6$ Hz, 1H, βCH_2 Pro); 2,20 (dt aparente, $J=12,0$ e $6,9$ Hz, 1H, βCH_2 Pro); 2,76 (dd, $J=16,8$ e $6,9$ Hz, 1H, δCH_2 Pro); 3,04 (d, $J=6,6$ Hz, 2H, βCH_2 Phe); 3,48 (dd, $J=16,5$ e $6,9$ Hz, 1H, δCH_2 Pro); 4,29-4,38 (m, 3H, αCH Pro e CH_2 Gly); 5,15 (dd, $J=14,1$ e $6,6$ Hz, 1H, αCH Phe); 7,21-7,30 (m, 5H, Ar-H); 7,40 (t, $J=7,2$ Hz, 1H, H-6); 7,44 (d, $J=8,7$ Hz, 1H, H-8); 7,70 (t aparente, $J=7,8$ Hz, 2H, H-5 e H-7); 8,77 (d, $J=7,8$ Hz, 1H, NH Phe); 8,97 (s, 1H, H-4); 10,04 (t, $J=5,9$ Hz, 1H, NH Gly) ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, CDCl_3): 25,03 (γCH_2 Pro); 28,97 (βCH_2 Pro); 40,38 (βCH_2 Phe); 43,45 (CH_2 Gly); 47,64 (δCH_2 Pro); 53,09 (αCH Phe); 59,70 (αCH Pro); 116,80 (C-8); 117,46 (C-3); 118,35 (C-4a); 125,29 (C-6); 127,02 (CH-Ar *para*); 128,49 (2CH-Ar *orto*); 129,86 (C-5); 129,94 (2CH-Ar *meta*); 134,44 (C-7); 135,76 (Cquat. Phe); 148,84 (C-4);

154,65 (C-8a); 160,66 (C-2); 162,37 (C=O, amida); 167,18 (C=O, Gly); 170,57 (C=O, Phe); 173,43 (C=O, Pro) ppm;

Análise elementar: C, 56,54; H, 5,25; N, 7,53. $C_{26}H_{25}N_3O_7 \cdot 7/2H_2O$ requer C, 56,31; H, 5,82; N, 7,58%.

2.4.12– Síntese de (2-Oxo-2H-cromeno-3-carbonil)-amido-Gly-Phe-Pro-glucopiranosilamida **73**



A uma solução de composto **72** (0,159 g, 0,323 mmol) em DMF (2 mL) adicionou-se glicosilamina **41** (0,112 g, 0,323 mmol). Arrefeceu-se a solução num banho de gelo e adicionou-se HBTU (0,123 g, 0,323 mmol) e DIPEA (0,083 g, 0,109 mL, 0,646 mmol). A mistura resultante foi deixada em agitação, à temperatura ambiente, durante 20 h. A reacção foi seguida por TLC (eluente: clorofórmio-metanol 6:1). No final adicionou-se água (6 mL) com a mistura reaccional em banho de gelo e deixou-se no frio durante 2 h. O precipitado formado foi removido por filtração e seco correspondendo ao produto pretendido **73** (0,171, 53 %);

p.f.: 131,2-131,7°C;

$[\alpha]_D^{27} = -12^\circ$ (c 1,0, DMF);

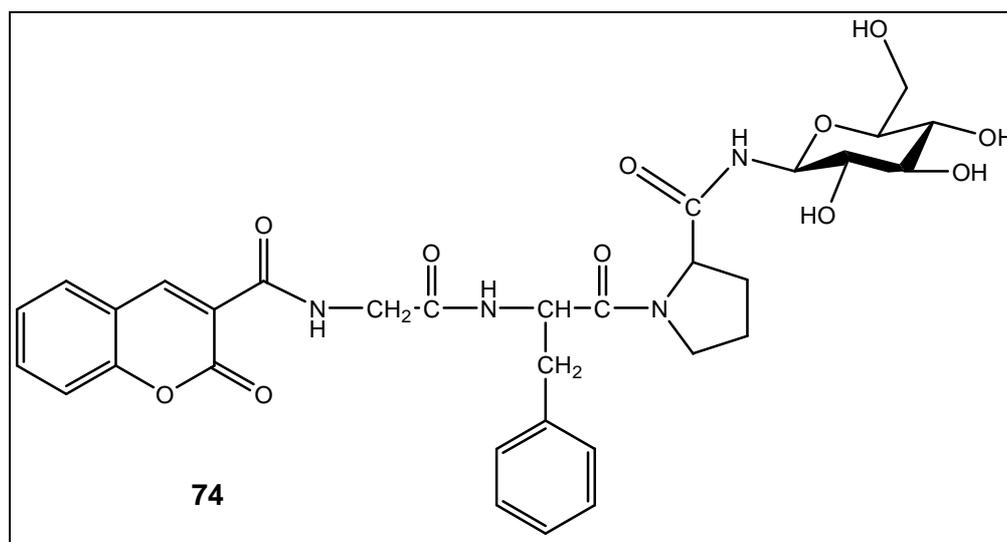
ν_{\max} (Nujol) 3311 (N-H); 1752 (C=O, éster); 1712 (C=O, lactona); 1608 (C=O, amida); 1217 (C-O-C assim); 1032 (C-O-C sim) cm^{-1} ;

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): 1,90, 1,98, 2,03 e 2,07 (4s, 12H, 4 x COCH_3); 1,90-2,07 (m, 4H, β , γCH_2 Pro); 3,00 (dd, $J=13,5$ e 6,6 Hz, 1H, βCH_2 Phe); 3,13 (dd, $J=13,5$ e 6,6 Hz, 1H, βCH_2 Phe); 3,25-3,32 (m, 1H, δCH_2 Pro); 3,67-3,75 (m, 1H, δCH_2 Pro); 3,82 (ddd, $J=10,2$, 4,2 e 2,1 Hz, 1H, H-5'); 4,09 (dd, $J=12,6$ e 1,8 Hz, 1H, H_a-6'); 4,13 (t, $J=6,0$ Hz, 2H, CH_2 Gly); 4,32 (dd, $J=12,6$ e 4,2 Hz, 1H, H_b-6'); 4,42 (dd, $J=10,5$ e 4,8 Hz, 1H, αCH Pro); 4,92 (t, $J=9,6$ Hz, 1H, H-4'); 4,99-5,04 (m, 1H, αCH Phe); 5,09 (t, $J=9,6$ Hz, 1H, H-2'); 5,28 (t, $J=9,3$ Hz, 1H, H-1' ou H-3'); 5,29 (t, $J=9,6$ Hz, 1H, H-1' ou H-3'); 7,20-7,32 (m, 7H, Ar-H, NH Phe, NH amida); 7,36-7,42 (m, 2H, H-6 e H-8); 7,70 (t aparente, $J=8,4$ Hz, 2H, H-5 e H-7); 8,90 (s, 1H, H-4); 9,31 (t, $J=5,1$ Hz, 1H, NH Gly) ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, CDCl_3): 20,54, 20,71 (4 x CH_3); 24,83 (γCH_2 Pro); 28,71 (βCH_2 Pro); 38,47 (βCH_2 Phe); 43,62 (CH_2 Gly); 47,48 (δCH_2 Pro); 51,83 (αCH Phe); 60,44 (αCH Pro); 61,69 (C-6''); 68,10 (C-2''); 70,27 (C-4''); 73,04 (C-3''); 73,63 (C-5''); 78,23 (C-1''); 116,67 (C-8), 117,80 (C-3), 118,46 (C-4a), 125,32 (C-6), 127,01 (CH-Ar *para*), 128,60 (2CH-Ar *orto*), 129,54 (2CH-Ar *meta*), 129,95 (C-5), 134,31 (C-7), 135,84 (Cquat. Phe), 148,78 (C-4), 154,52 (C-8a), 161,03 (C-2); 162,17 (C=O, amida); 167,85 (C=O, Gly); 169,52, 169,92, 170,6, 170,74 (4xCO, acetilo); 170,74 (C=O, Phe); 171,80 (C=O, Pro) ppm;

Análise elementar: C, 56,07; H, 5,69; N, 6,48. $\text{C}_{40}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_{15}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ requer C, 56,07; H, 5,65; N, 6,54%.

2.4.13 – Síntese de (2-Oxo-2H-cromeno-3-carbonil)-amido-Gly-Phe-Pro-glucopiranosilamida desacetilada 74



A uma solução de composto **73** (0,140 g, 0,171 mmol) em metanol seco (5 mL) adicionou-se Bu₂SnO (0,065 g, 0,257 mmol) e aqueceu-se em refluxo durante 16 h. A reacção foi seguida por TLC (eluente: clorofórmio-metanol 5:1). O resíduo foi concentrado sob vácuo e purificado por cromatografia em coluna tipo “flash” (eluente: clorofórmio-metanol 10:3). A terceira fracção isolada correspondia ao produto pretendido **74** (0,068 g, 59%) na forma de um sólido amarelo;

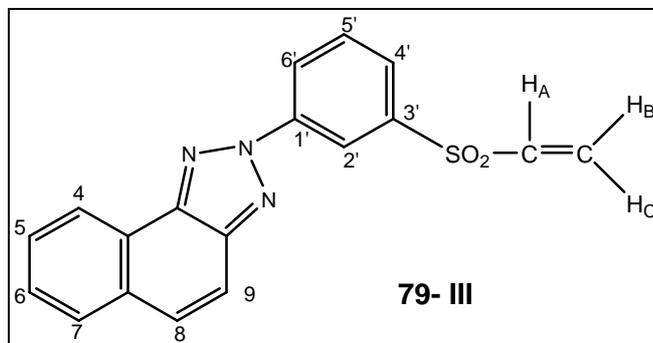
¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): 1,82-2,04 (m, 4H, β, γCH₂ Pro); 2,76 (dd, J=13,8 e 9,3 Hz 1H, βCH₂ Phe); 3,01 (dd, J=13,8 e 9,0 Hz, 1H, βCH₂ Phe); 3,05-3,12 (m, 3H, H-2', H-4' e H-5'); 3,18 (dd, J=8,1 e 4,5 Hz, 1H, H-3'); 3,41 (dd, J=12,0 e 6,6 Hz, 1H, H_a-6'); 3,46-3,51 (m, 1H, δCH₂ Pro); 3,61-3,69 (m, 2H, δCH₂ Pro e H_b-6'); 3,94 (dqAB, J=4,8 e 16,8 Hz, 2H, CH₂ Gly); 4,36 (t largo, J=3,3/4,5 Hz, 1H, αCH Pro); 4,49 (t, J=6,0 Hz, 1H, OH-6'); 4,64-4,74 (m, 3H, αCH Phe, H-1' e OH); 4,89 (d, J=4,5 Hz, 1H, OH-3' ou H-4'); 4,98 (d, J=4,5 Hz, 1H, OH-3' ou OH-4'); 7,16-7,31 (m, 5H, Ar-H); 7,44 (t, J=7,8 Hz, 1H, H-6); 7,50 (d, J=8,4 Hz, 1H, H-8); 7,75 (t, J=8,4 Hz, 1H, H-7); 7,99 (dd, J=7,8 e 1,5 Hz, 1H, H-5); 8,28 (t aparente, J=6,6/8,7 Hz, 1H, NH amida); 8,54 (d, J=8,1 Hz, 1H, NH Phe); 8,88 (s, 1H, H-4); 8,98 (t, J=4,8 Hz, 1H, NH Gly) ppm;

¹³C RMN (75,4 MHz, DMSO-d₆): 24,34 (γCH₂ Pro); 28,96 (βCH₂ Pro); 36,93 (βCH₂ Phe); 43,33 (CH₂ Gly); 46,86 (δCH₂ Pro); 52,25 (αCH Phe); 59,68 (αCH Pro); 61,90 (C-6'); 69,99 (C-4'); 72,64 (C-2'); 77,44 (C-3'); 78,67 (C-5'); 78,85 (C-1'); 116,17 (C-8); 118,34 (C-3); 118,42 (C-4a); 125,18 (C-6); 126,40 (CH-Ar *para*); 128,23 (2CH-Ar *orto*); 129,28 (2CH-Ar *meta*); 130,38 (C-5); 134,26 (C-7); 137,60 (Cquat. Phe); 147,83 (C-4), 153,95 (C-8a), 160,36 (C-2); 160,86 (C=O, amida); 167,80 (C=O, Gly); 169,89 (C=O, Phe); 171,70 (C=O, Pro) ppm;

Análise elementar: C, 52,09; H, 5,83; N, 7,26. C₃₂H₃₆N₄O₁₁.5H₂O requer C, 51,75; H, 6,12; N, 7,73%.

2.5 – REACÇÕES COM CORANTES DA CLASSE DOS VINILSULFÓNICOS

2.5.1 – Preparação do 2-[3-(1*H*-ciclopenta[α]naftaleno-2-il)fenilsulfonyl]eteno 79-III



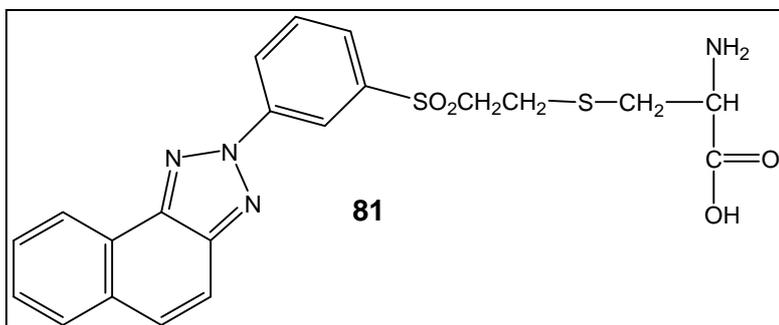
A uma solução de corante **79-II** (0,518 g, 1,47 mmol) em DCM (4,71 mL), arrefecida a 0°C, adicionou-se TEA (0,373 g, 0,511 mL, 3,67 mmol) e MsCl (0,202 g, 0,136 mL, 1,76 mmol). A mistura reaccional foi agitada, à temperatura ambiente, durante 10 minutos. No final lavou-se com solução aquosa saturada de NH₄Cl (5 mL), secou-se (MgSO₄) e concentrou-se. O resíduo obtido (0,379 g; 77%) foi purificado por cromatografia em coluna tipo “flash” (eluente: clorofórmio-metanol 10:1). A primeira fracção isolada correspondia ao composto **79-III** na forma de um sólido acastanhado (0,160 g; 42%);

p.f.:201,3-202,1°C;

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 6,17 (d, *J*=9,6 Hz, 1H, H_B); 6,62 (d, *J*=16,5 Hz, 1H, H_C); 6,80 (dd, *J*=16,5 e 9,6 Hz, 1H, H_A); 7,66-7,80 (m, 5H, H-8, H-9, H-5', H-6' e H-4'); 7,92 (dd, *J*=7,8 e 1,5 Hz, 1H, H-4 ou H-7); 7,96 (dd, *J*=7,8 e 0,9 Hz, 1H, H-4 ou H-7); 8,67 (dt, *J*=0,9 e 8,1 Hz, 2H, H-5 e H-6); 8,94 (t, *J*=1,8 Hz, 1H, H-2');

HRMS (FAB): calculado para C₁₈H₁₃N₃O₂S (M⁺+1) 336,0807. Obtido: 336,0812.

2.5.2 - Síntese do 2-[3-(1*H*-ciclopenta[α]naftaleno-2-il)fenilsulfonil]etil-S-Cys 81



A uma solução de corante **79-III** (0,150 g, 0,447 mmol) em DMF (5 mL), arrefecida a 0°C, adicionou-se L-Cys **80** (0,190 g, 0,894 mmol), TEA (0,090 g, 0,124 mL, 0,894 mmol), água (0,5 mL) e deixou-se em agitação durante a noite à temperatura ambiente. A reacção foi seguida por TLC (eluente: clorofórmio-metanol 1:1). No final adicionou-se água (15 mL) mantendo a mistura reaccional arrefecida em banho de gelo. O precipitado formado, depois de filtrado e seco, correspondia ao produto **81** (0,187; 92%);

p.f.: 174,8-175,6°C (dec.);

HRMS (FAB): Calculado para C₂₁H₂₀N₄O₄S₂ (M⁺+1) 457,1004. Obtido 457,1001

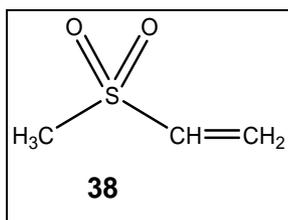
2.6 - REACÇÕES DE AZA-MICHAEL

Método Geral:

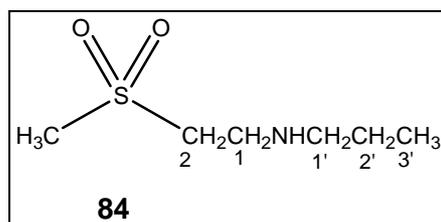
A uma mistura de vinilsulfona (2,5 mmol) e Amberlyst-15 (30% m/m), adicionou-se a amina (2 mmol) e agitou-se à temperatura ambiente pelo tempo apropriado. A reacção foi seguida por TLC. A mistura final foi diluída com diclorometano (10 mL) e o catalisador removido por filtração. O solvente foi evaporado e o resíduo obtido era constituído pelos compostos pretendidos, nalguns casos no estado puro.

Alguns dos resíduos foram purificados por cromatografia em coluna tipo “flash” ou em camada preparativa usando como solvente misturas de clorofórmio-metanol ou acetato de etilo-éter de petróleo.

2.6.1 – Reacções de adição à metilvinilsulfona 38



2.6.1.1 - Síntese da *N*-[2-(metilsulfonil)etil]-1-propanamina 84



Nesta reacção foi utilizado um ligeiro excesso de propilamina (2 gotas) e o tempo de reacção foi de 24 h. O produto foi obtido, na forma de um óleo, sem purificação com um rendimento de 84%.

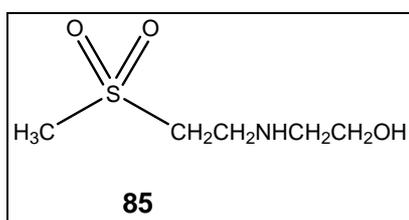
ν_{\max} (neat) 3317 (NH); 1293 e 1132 (R-SO₂-R); 961 (C-N) cm⁻¹;

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 0,90 (t, *J*=7,2 Hz, 3H, H-3'); 1,48 (sext, *J*=7,2 Hz, 2H, H-2'); 1,81 (s largo, 1H, NH); 2,57 (t, *J*=7,5 Hz, 2H, H-1'); 2,99 (s, 3H, CH₃); 3,10-3,17 (m, 4H, H-1 e H-2) ppm;

¹³C RMN (75,4 MHz, CDCl₃): 11,59 (C-3'); 22,87 (C-2'); 42,02 (CH₃); 43,05 (C-1); 51,32 (C-1'); 54,62 (C-2) ppm.

HRMS (EI): Calculado para C₆H₁₅NO₂S (M⁺): 165,0824. Obtido: 165,0827.

2.6.1.2 – Síntese de 2-(2-(metilsulfonil) etilamino) etanol 85



A mistura reaccional formada por metilvinilsulfona (1 mmol), etanolamina (1,2 mmol) e Amberlyst-15 foi agitada à TA durante 10 h. O produto **85** foi obtido, na forma de um óleo, sem purificação, com um rendimento de 95%.

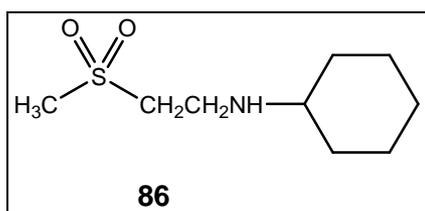
ν_{\max} (neat): 3316 (OH e NH); 1290 e 1135 (R-SO₂-R); 1056 (C-OH); 963 (C-N) cm⁻¹;

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 1,85 (s largo, 2H, NH e OH); 2,82 (t, *J*=5,1 Hz, 2H, H-1'); 3,01 (s, 3H, CH₃); 3,20 (s aparente, 4H, H-1 e H-2); 3,68 (t, *J*=5,1 Hz, 2H, H-2') ppm;

¹³C RMN (75,4 MHz, CDCl₃): 42,06 (CH₃); 42,69 (C-1); 50,83 (C-1'); 54,75 (C-2); 60,98 (C-2') ppm;

HMRS (EI): Calculado para C₅H₁₃NO₃S (M⁺): 166,0619. Obtido: 166,0613.

2.6.1.3 – Síntese de 2-ciclo-hexil-*N*-[2-(2-metilsulfonyl)etil]etanamina **86**



O tempo de reacção foi de 30 minutos. O resíduo obtido (73%) foi cristalizado de acetato de etilo-éter de petróleo originando o produto **86** (51%);

p.f.: 45,1-46,0°C;

ν_{\max} (Nujol) 3312 (NH); 1287 e 1127 (R-SO₂-R); 963 (C-N) cm⁻¹;

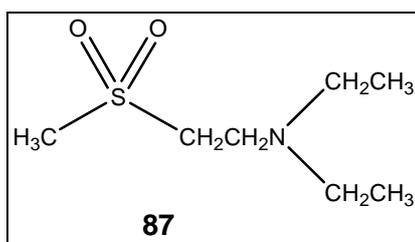
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): 1,05 (dqAB, *J*=3,6 e 12,4 Hz, 2H, H-3' e H-5'); 1,12 (dt, *J*=11,6 e 3,6 Hz, 1H, H-4'); 1,19-1,30 (m, 2H, H-2' e H-6'); 1,57 (s largo, 1H, NH); 1,59-1,62 (m, 1H, H-4'); 1,70-1,74 (m, 2H, H-3' e H-5'); 1,85-1,89 (m, 2H, H-2' e H-6'); 2,44 (tt, *J*=10,4 e 3,6 Hz, 1H, H-1'); 3,00 (s, 3H, CH₃); 3,15 (s aparente, 4H, H-1 e H-2) ppm;

¹³C RMN (100,62 MHz, CDCl₃): 24,81 (C-3' e C-5'); 25,95 (C-4'); 33,36 (C-2' e C-6'); 40,24 (C-1); 42,23 (CH₃); 55,36 (C-2); 56,47 (C-1') ppm;

HRMS (EI): Calculado para $C_9H_{19}NO_2S$ (M^+): 205,1137. Obtido: 205,1141;

Análise elementar: C, 52,24; H, 9,13; N, 6,71; S, 15,32. $C_9H_{19}NO_2S$ requer C, 52,65; H, 9,33; N, 6,82; S, 15,62%.

2.6.1.4 – Síntese de *N,N*-dietil-2-(metilsulfonil)etanamina **87**

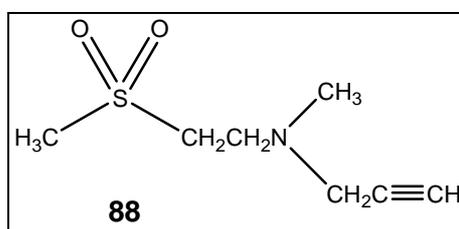


O tempo de reacção foi de 5 h. O resíduo obtido (73%) foi purificado por cromatografia em coluna tipo “flash” usando como eluente a mistura clorofórmio-metanol 10:1. A segunda fracção isolada correspondia ao produto **87**, obtido como óleo, com um rendimento de 62%.

1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): 1,03 (t, $J=7,2$ Hz, 6H, 2 x H-2'); 2,54 (q, $J=7,2$ Hz, 4H, 2 x H-1'); 2,95 (t, $J=6,3$ Hz, 2H, H-1); 3,00 (s, 3H, CH_3); 3,11 (t, $J=6,6$ Hz, 2H, H-2) ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, $CDCl_3$): 11,44 (C-2'); 42,26 (CH_3); 46,65 (C-1'); 46,66 (C-1); 52,41 (C-2) ppm.

2.6.1.5 – Síntese de *N*-metil-*N*-[2-(metilfenil)etil]prop-2-in-1-amina **88**



O tempo de reacção foi de 24 h. Utilizou-se um ligeiro excesso de amina (2 gotas) e o produto **88** foi obtido na forma de óleo, sem purificação e com um rendimento de 92%.

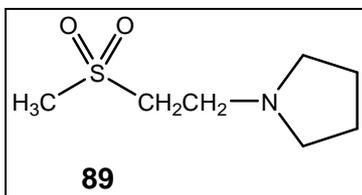
ν_{max} (neat): 3270 ($\equiv C-H$); 2103 ($C\equiv C$); 1292 e 1137 ($R-SO_2-R$) cm^{-1} ;

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): 2,27 (t, $J=2,4$ Hz, 1H, H-3'); 2,34 (s, 3H, N- CH_3); 2,95 (t, $J=6,3$ Hz, 2H, H-1); 2,99 (s, 3H, CH_3); 3,13 (t, $J=6,3$ Hz, 2H, H-2); 3,37 (d, $J=2,4$ Hz, 2H, H-1') ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, CDCl_3): 41,32 (N- CH_3); 42,09 (CH_3); 45,58 (C-1'); 49,27 (C-1); 52,66 (C-2); 73,89 (C-2'); 77,47 (C-3') ppm.

HRMS (EI): Calculado para $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{S}$ (M^+): 174,0589. Obtido: 174,0596.

2.6.1.6 – Síntese de 1-[2-(metilsulfonyl)etil] pirrolidina **89**



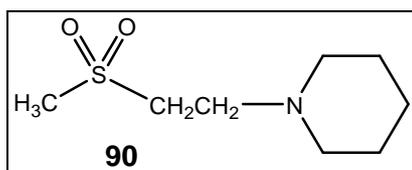
O tempo de reacção foi de 30 minutos. O produto **89** foi obtido na forma de um óleo, com um rendimento de 95%, sem qualquer purificação.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): 1,84-1,89 (m, 4H, H-2' e H-3'); 2,73-2,78 (m, 4H, H-1' e H-4'); 3,01 (s, 3H, CH_3); 3,12 (t, $J=6,9$ Hz, 2H, H-1); 3,30 (t, $J=7,0$ Hz, 2H, H-2) ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, CDCl_3): 23,39 (C-2' e C-3'); 41,76 (CH_3); 48,81 (C-1); 52,67 (C-2); 53,78 (C-1' e C-4') ppm;

Análise elementar: C, 47,15; H, 8,33; N, 8,05; S, 18,29. $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}$ requer C, 47,43; H, 8,53; N, 7,90; S, 18,09%.

2.6.1.7 – Síntese de 1-[2-(metilsulfonyl)etil] piperidina **90**

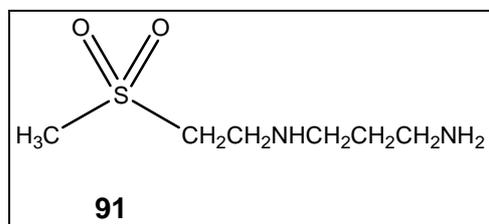


O tempo de reação foi de 24 h e o resíduo obtido (90%) foi purificado por cromatografia em coluna tipo “flash” (eluente: clorofórmio-metanol 10:1). A segunda fração correspondia ao produto **90** (74%);

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): 1,42-1,48 (m, 2H, H-3’); 1,55-1,62 (m, 4H, H-2’ e H-4’); 2,46 (t largo, $J=4,8$ Hz, 4H, H-1’ e H-5’); 2,84 (t, $J=6,3$ Hz, 2H, H-1); 3,03 (s, 3H, CH_3); 3,16 (t, $J=6,3$ Hz, 2H, H-2) ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, CDCl_3): 23,87 (C-3’); 25,66 (C-2’ e C-4’); 42,26 (CH_3); 52,06 (C-2); 52,21 (C-1); 54,24 (C-1’ e C-5’) ppm.

2.6.1.8 – Síntese de *N*-[2-(metilsulfonyl)etil]propano-1,3-diamina **91**



Após 3 h de agitação à TA o resíduo foi purificado em coluna (eluente: acetona-etanol-água 5:1:0,5) originando o produto **91** com um rendimento de 90%;

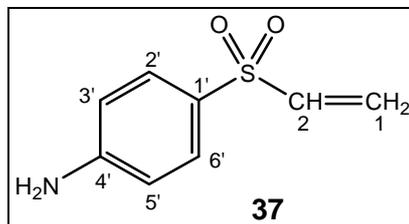
max (Nujol) 3381 (N-H); 1304 e 1148 ($\text{R-SO}_2\text{-R}$) cm^{-1} ;

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): 1,67 (quint, $J=5,7$ Hz, 2H, H-2’); 2,63 (t, $J=5,7$ Hz, 2H, H-1’); 2,92 (t aparente, $J=6,6/6,0$ Hz, 3H, H-1 e NH); 3,01 (s aparente, 5H, CH_3 e NH_2); 3,15 (t, $J=6,3$ Hz, 2H, H-2); 3,29 (s largo, 2H, H-3’) ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, CDCl_3): 22,24 (C-2’); 42,30 (CH_3); 48,01 (C-1); 51,89 (C-1’); 52,64 (C-2); 74,73 (C-3’) ppm.

2.6.2 – Reacções de adição à *p*-aminofenilvinilsulfona **37**

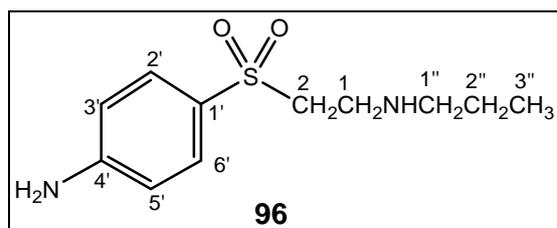
2.6.2.1 – Preparação de *p*-aminofenilvinilsulfona **37**



A uma mistura de sulfato de 2-(*p*-aminofenilsulfonyl)etilo (PAFSES) **82** (0,563 g, 2,0 mmol) e água (10 mL) adicionou-se Na₂CO₃ sólido até pH 8. Aqueceu-se a mistura, em agitação, a 50-60°C durante 2 h, sendo o pH controlado por adição de Na₂CO₃ sólido. No final extraiu-se com CH₂Cl₂ e a solução foi lavada com solução aquosa saturada de NaCl, seca (MgSO₄) e evaporada, obtendo-se o composto **37** na forma de um sólido acastanhado com um rendimento de 88%;

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 4,22 (s largo, 2H, NH₂); 5,91 (d, *J*=9,6 Hz, 1H, H-1); 6,33 (d, *J*=16,5 Hz, 1H, H-1); 6,63 (dd, *J*=16,5 e 9,9 Hz, 1H, H-2); 6,71 (d, *J*=8,7 Hz, 2H, H-3' e H-5'); 7,65 (d, *J*=8,7 Hz, H-2' e H-6')

2.6.2.2 – Síntese de [2-(4'-aminofenilsulfonyl)etilamino]propano **96**



O tempo de reacção foi de 40 minutos. O resíduo obtido foi cristalizado de éter etílico-éter de petróleo originando o produto **96** (71%);

p.f.: 66,3-66,7 °C;

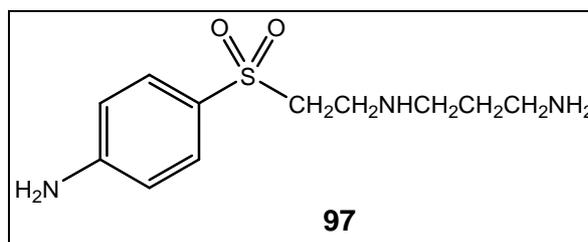
¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): 0,80 (t, *J*=7,2 Hz, 3H, H-3''); 1,30 (sext, *J*=7,2 Hz, 2H, H-2''); 2,35 (t, *J*=7,2 Hz, 2H, H-1''); 2,68 (t, *J*=7,5 Hz, 2H, H-1); 3,19 (t, *J*=7,5 Hz, 2H, H-2);

3,31 (s largo, 1H, NH); 6,12 (s, 2H, NH₂); 6,63 (d, $J=8,7$ Hz, 2H, H-3' e H-5'); 7,45 (d, $J=9,0$ Hz, 2H, H-2' e H-6') ppm;

¹³C RMN (75,4 MHz, DMSO-d₆): 11,69 (C-3''); 22,54 (C-2''); 43,14 (C-1); 50,66 (C-1''); 55,54 (C-2); 112,74 (C-3' e C-5'); 123,78 (C-1'); 129,50 (C-2' e C-6'); 153,64 (C-4') ppm;

HRMS (FAB): Calculado para C₁₁H₁₈N₂O₂S (M⁺+1): 243,1167. Obtido: 243,1168.

2.6.2.3 - Síntese da (2-(4'-aminofenilsulfonil)etilamino)propanodiamina **97**

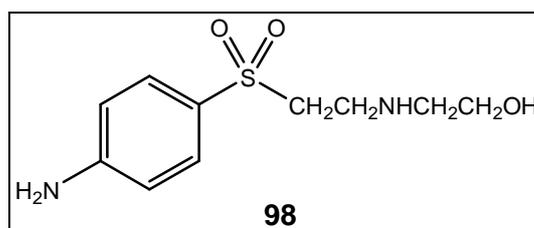


A mistura reaccional, constituída por vinilsulfona **37**, um ligeiro excesso de amina (1,2 equiv.) e o catalisador foi agitada durante 10 minutos e o resíduo correspondia ao composto **97**, na forma de um óleo e com rendimento quantitativo;

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): 1,47 (s largo, 2H, 3''-NH₂); 1,55-1,65 (m, 2H, H-2''); 2,66 (t, $J=6,9$ Hz, 2H, 1''); 2,74 (t, $J=6,9$ Hz, 2H, H-3''); 2,80 (t, $J=6,6$ Hz, 1H, NH); 2,99 (t, $J=6,6$ Hz, 2H, H-1); 3,24 (t, $J=6,6$ Hz, 2H, H-2); 4,26 (s largo, 2H, NH₂); 6,72 (d, $J=8,7$ Hz, 2H, H-3' e H-5'); 7,66 (d, $J=8,7$ Hz, 2H, H-2' e H-6') ppm;

HRMS (FAB): Calculado para C₁₁H₁₉N₃O₂S (M⁺+1): 258,1276. Obtido: 258,1271.

2.6.2.4 – Síntese de 2-[2-(4-aminofenilsulfonil)etilamino]etanol **98**



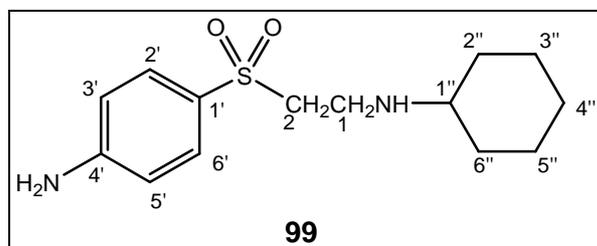
Após 4 h de reacção o resíduo obtido foi purificado por PLC (eluente: acetato de etilo-metanol 10:1) originando o produto **98** com um rendimento de 23%;

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): 1,58 (quint aparente, $J=3,0/3,6/3,6/3,0$, 2H, NH e OH); 2,31 (t, $J=6,6$ Hz, 4H, H-1 e H-1''); 2,58 (t, $J=7,5$ Hz, 2H, H-2); 3,25 (t, $J=7,5$ Hz, 2H, H-2''); 6,11 (s largo, 2H, NH_2); 6,62 (d, $J=8,7$ Hz, 2H, H-3' e H-5'); 7,46 (d, $J=9,0$ Hz, 2H, H-2' e H-6') ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, DMSO- d_6): 48,86 (C-2); 53,17 (C-1 e C-1''); 54,52 (C-2''); 112,64 (C-3' e C-5'); 123,88 (C-1'); 129,60 (C-2' e C-6'); 153,59 (C-4') ppm;

HRMS (FAB): Calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ (M^++1): 245,0960. Obtido: 245,0965.

2.6.2.5 – Síntese de 4-[2-(ciclo-hexilamino)etilsulfonil]benzenamina 99



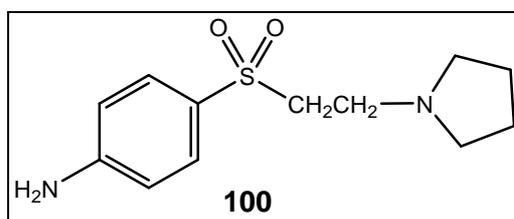
A mistura reaccional constituída por vinilsulfona **37** e ciclo-hexilamina, na proporção de 1:2, em CH_2Cl_2 (3,5 mL) foi agitada durante 15 h à TA originando o produto **99** sem qualquer purificação com um rendimento de 95%;

p.f.: 131,0-131,4°C;

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): 0,88-1,22 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-4'', H5'' e H-6''); 1,46-1,70 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-4'', H5'' e H-6''); 2,22-2,28 (m, 1H, H-1''); 2,71 (t, $J=7,2$ Hz, 2H, H-1); 3,17 (t, $J=7,2$ Hz, 2H, H-2); 3,30 (s largo, 1H, NH); 6,13 (s, 2H, NH_2); 6,63 (d, $J=8,7$ Hz, 2H, H-3' e H-5'); 7,45 (d, $J=9,0$ Hz, 2H, H-2' e H-6') ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, DMSO- d_6): 24,26, 25,78 e 32,74 (C-3'', C-5'', C-4'', C-2'' e C-6''); 40,23 (C-1); 55,34 (C-1''); 55,85 (C-2); 112,73 (C-3' e C-5'); 123,74 (C-1'); 129,53 (C-2' e C-6'); 153,65 (C-4') ppm;

HRMS (FAB): Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ (M^++1): 283,1480. Obtido: 283,1484.

2.6.2.6 – Síntese de 4-[2-(pirrolidin-1-il)etilsulfonil]benzenamina **100**

A mistura reaccional foi agitada durante 30 minutos, em CH_2Cl_2 (2,5 mL), tendo-se obtido o produto **100**, sem qualquer purificação, com um rendimento de 87%;

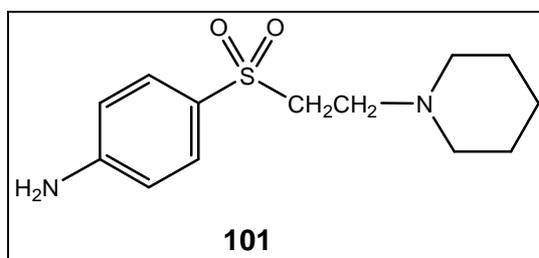
p.f.: 149-150°C;

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): 1,73-1,77 (m, 4H, H-2'' e H-3''); 2,48-2,52 (m, 4H, H-1'' e H-4''); 2,88 (t, $J=7,4$ Hz, 2H, H-1); 3,32 (t, $J=7,8$ Hz, 2H, H-2); 4,30 (s largo, 2H, NH_2); 6,69 (d, $J=8,7$ Hz, 2H, H-3' e H-5'); 7,64 (d, $J=8,7$ Hz, 2H, H-2' e H-6') ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, CDCl_3): 23,41 (C-2'' e C-3''); 49,08 (C-1); 53,82 (C-1'' e C-4''); 55,33 (C-2); 113,98 (C-3' e C-5'); 127,00 (C-1'); 130,08 (C-2' e C-6'); 151,50 (C-4') ppm;

HRMS (FAB): Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ (M^++1): 255,1167. Obtido: 255,1169;

Análise elementar: C, 56,05; H, 7,09; N, 10,91; S, 12,30. $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ requer C, 56,67; H, 7,13; N, 11,01; S, 12,61%.

2.6.2.7 – Síntese de 4-[2-(piperidin-1-il)etilsulfonil]benzenamina **101**

O tempo de reacção foi de 2 h. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna tipo "flash" (eluente: acetato de etilo-metanol 10:1 a 9:1) e cristalizado de diclorometano-éter de petróleo originando o produto **101** (34%);

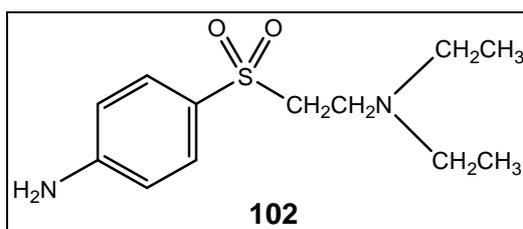
p.f.: 120,6-121,1°C;

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): 1,29 (t aparente, $J=4,5/3,6$ Hz, 2H, H-3''); 1,37 (q aparente, $J=4,8/5,1/4,8$ Hz, 4H, H-2'' e H-4''); 2,18-2,22 (m, 4H, H-1'' e H-5''); 2,44-2,50 (m, 2H, H-1); 3,24 (t, $J=7,5$ Hz, 2H, H-2); 6,10 (s largo, 2H, NH_2); 6,62 (d, $J=9,0$ Hz, 2H, H-3' e H-5'); 7,46 (d, $J=8,7$ Hz, 2H, H-2' e H-6') ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, DMSO- d_6): 23,74 (C-3''); 25,32 (C-2'' e C-4''); 51,96 (C-1); 52,91 (C-2); 53,50 (C-1'' e C-5''); 112,61 (C-3' e C-5'); 124,08 (C-1'); 129,60 (C-2' e C-6'); 153,54 (C-4') ppm;

HRMS (FAB): Calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ (M^++1): 269,1324. Obtido: 269,1321.

2.6.2.8 – Síntese de 4-[2-(dietilamino)etilsulfonil]benzenamina **102**



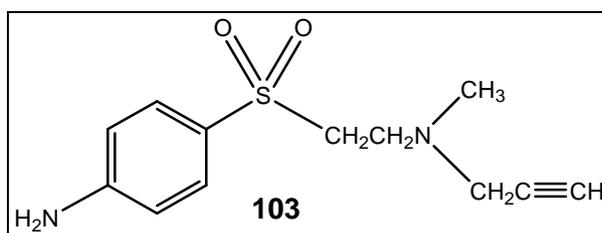
A mistura reaccional formada por vinilsulfona **37**, dietilamina (2 equiv.) e Amberlyst-15 foi agitada à TA durante 5 h, tendo-se obtido o composto **102** na forma pura com um rendimento quantitativo;

p.f.: 51,2-52,0°C;

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): 0,97 (t, $J=7,2$ Hz, 6H, H-2''); 2,46 (q, $J=7,2$ Hz, 4H, H-1''); 2,86-2,92 (m, 2H, H-1); 3,17-3,22 (m, 2H, H-2); 4,26 (s largo, 2H, NH_2); 6,70 (d, $J=8,4$ Hz, 2H, H-3' e H-5'); 7,64 (d, $J=9,0$ Hz, 2H, H-2' e H-6') ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, CDCl_3): 11,74 (C-2''); 45,74 (C-1); 46,81 (C-1''); 53,20 (C-2); 114,02 (C-3' e C-5'); 127,24 (C-1'); 129,98 (C-2' e C-6'); 151,41 (C-4') ppm;

HRMS (FAB): Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ (M^++1): 257,1324. Obtido: 257,1330.

2.6.2.9 - Síntese da [2-(4'-aminofenilsulfonil)etilamino]-*N*-metilpropargilamina **103**

A mistura reaccional formada por vinilsulfona **37** e *N*-metilpropargilamina, em quantidades equimolares, foi agitada à TA durante 10 h. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna tipo “flash” usando como eluente acetato de etilo-éter etílico 1:2. O produto **103** foi obtido com um rendimento de 57%;

pf.: 76,8-77,4°C;

ν_{\max} (Nujol): 3210 ($\equiv\text{C-H}$); 1907 ($\text{C}\equiv\text{C}$); 1290 e 1130 ($\text{R-SO}_2\text{-R}$) cm^{-1} ;

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): 2,21 (t, $J=2,1$ Hz, 1H, H-3''); 2,26 (s, 3H, CH_3); 2,83 (t, $J=7,8$ Hz, 2H, H-1); 3,23 (t, $J=7,8$ Hz, 2H, H-2); 3,28 (d, $J=2,1$ Hz, 2H, H-1''); 4,23 (s largo, 2H, NH_2); 6,70 (d, $J=8,7$ Hz, 2H, H-3' e H-5'); 7,65 (d, $J=9,0$ Hz, 2H, H-2' e H-6') ppm;

^{13}C RMN (75,4 MHz, CDCl_3): 41,36 (CH_3); 45,43 (C-1''); 48,98 (C-1); 54,44 (C-2); 73,80 (C-3''); 77,58 (C-2''); 113,98 (C-3' e C-5'); 127,08 (C-1'); 130,08 (C-2' e C-6'); 151,47 (C-4') ppm;

HRMS (FAB): Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ (M^++1): 253,1011. Obtido: 253,1014;

Análise elementar: C, 56,91; H, 6,35; N, 10,80; S, 12,30. $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ requer C, 57,12; H, 6,39; N, 11,10; S, 12,71.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. T. W. G. Solomons, "Organic Chemistry", 5^a Ed., John Wiley & Sons, N.Y., 1992, págs. 1-10
2. M. Wainwright, "Dyes in development of drugs and pharmaceuticals", *Dyes and Pigments*, **76**, **2008**, 582-586
3. W. J. Stork, "The Top Pharmaceuticals that changed the world", *Chem. & Eng. News*, **83**, **2005**, 1-3
4. R. C. Bohinski, "Modern concepts in Biochemistry", 3^a Ed., Allyn and Bacon, Inc, 1979, págs. 3-9, 88-93
5. T. Mckee, J. R. Mckee, "Biochemistry - The molecular basis of life", 3^a Ed., McGraw-Hill, 2003, págs. 8-11, 109-124
6. J. Jones, "Amino acid and peptide synthesis", Oxford Science Publications, 1992, págs. 1-7, 25-35
7. C. Denicourt and S. F. Dowdy, "Targeting Apoptotic Pathways in Cancer Cells", *Science*, **305**, **2004**, 1411-1413
8. P. D. Bailey, "An Introduction to Peptide Chemistry", John Wiley & Sons, **1990**, págs. 114-136
9. S. H. Pine, J. B. Hendrickson, D. J. Cram, G. S. Hammond, "Organic Chemistry", 4^a Ed., McGraw-Hill, 1981, págs. 785-806
10. S.-J. Han, J. Ah Kim, "Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis", *Tetrahedron*, **60**, **2004**, 2447-2467
11. F. Alberício, "Developments in peptide and amide synthesis", *Current Opinion in Chemical Biology*, **8**, **2004**, 211-221
12. F. Fernández, J. C. Estévez, R. J. Estévez, "A New contribution to the stereocontrolled ring closing methathesis mediated synthesis of polyhydroxylated cyclopentane β -Amino Acids", IV Iberian Carbohydrate Meeting, Santiago de Compostela, **2008**, PO12
13. S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, "In Vivo imaging of membrane-associated glycans in developing Zebrafish", *Science*, **320**, **2008**, 664-667
14. F. J. Cañada, "Carbohydrates and aromatic amino acids: mutual attraction or marriage of convenience", IV Iberian Carbohydrate Meeting, Santiago de Compostela, **2008**, IL8

15. J. Sardinha, A. P. Rauter, P. Sinäy, M. Sollogoub, "Synthesis of *gem*-Difluorocarbasugars: A step further in sugar mimetics", IV Iberian Carbohydrate Meeting, Santiago de Compostela, **2008**, OC7
16. S. D. Lucas, "Oxetane δ -Amino Acids Synthesis and Derivatisation", Tese de Doutoramento, Univ. Lisboa, 2008, págs. 6-16
17. A. Varki, R. Schauer, "Essentials of glycobiology", Cold Spring Press. **14**, **2008**, 784
18. R. I. Hollingsworth, G. Wang, "Toward a carbohydrate-based chemistry: progress in development of general-purpose chiral synthons from carbohydrates", *Chem. Rev.* **100**, **2000**, 4267-4282
19. F. W. Lichtenthaler, S. Peters, "Carbohydrates as green raw materials for chemical industry", *C. R. Chimie*, **7**, **2004**, 65-90
20. P. H. Seeberger, W.-C. Haase, "Solid-Phase oligosaccharide synthesis and combinatorial carbohydrate libraries", *Chem. Rev.* **100**, **2000**, 4349-4393
21. G. Arsequell, G. Valencia, "Recent advances in synthesis of complex *N*-glycopeptides", *Tetrahedron: Asymmetry*, **10**, **1999**, 3045-3094
22. R. J. Payne, S. Ficht, S. Tang, A. Brik, Y.-Y. Yang, D. A. Case, C.-H. Wong, "Extended Sugar-Assisted Glycopeptide Ligations: Development, Scope and Applications", *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, **2007**, 13527-13536
23. C. M. Taylor, "Glycopeptides and Glycoproteins: Focus on the Glycosidic Linkage", *Tetrahedron*, **54**, **1998**, 11317-11362
24. B. G. Davis, "Recent developments in glycoconjugates", *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1999**, 3215-3237
25. B. G. Davis, "Recent developments in oligosaccharide synthesis", *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2000**, 2137-2160
26. E. F. Hounsell, "Glycosylation targets for drug design", *Carbohydr. Res.* **300**, **1997**, 47-48
27. C. Böttcher, J. Spengler, S. A. Essawy, K. Burger, "Hexafluoroacetone as protecting and activation reagent. A new approach to *N*-Glycosides", *Monatshefte für Chemie*, **135**, **2004**, 853-863
28. L. Liu, C. S. Bennett, C.-H. Wong, "Advances in glycoprotein synthesis", *Chem. Comm.*, **2006**, 21-33
29. P. W. Atkins "Physical Chemistry" 5ª Edição, W. H. Freeman and Company, 1994, págs. 591-599
30. R. M. Christie, "Fluorescent dyes", *Rev. Prog. Coloration*, **23**, **1993**, 1-18

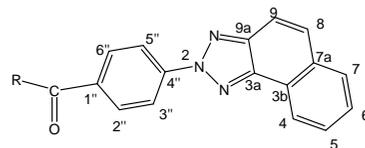
31. S.-Y. Park, M. Ebihara, Y. Kubota, K. Funabiki, M. Matsui, "The relationship between solid-state fluorescence intensity and molecular packing of coumarin dyes", *Dyes and Pigments*, **82**, **2009**, 258-267
32. G. R. Bardajee, A. Y. Li, J. C. Haley, M. A. Winnik, "The synthesis and spectroscopic properties of novel, functional fluorescent naphthalimide dyes", *Dyes and Pigments*, **79**, **2008**, 24-32
33. X. Fei, Y. Gu, "Progress in modifications and applications of fluorescent dye probe", *Progress in Natural Science*, **19**, **2009**, 1-15
34. H. Sashiwa, S. Aiba, "Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials" *Pro. Polym. Sci.*, **29**, **2004**, 887-908
35. A. A. Haroun, H. F. Mansour, "New approaches for the reactive dyeing of the retanned carbohydrate crust leather", *Dyes and Pigments*, **76**, **2008**, 213-219
36. D. F. O. Pinto, "Corantes Reactivos para Fibras Celulósicas" Ed. Publindústria, Porto, 1991, págs. 1-6
37. J. Shore, "Cellulosics Dyeing", Ed. John Shore, Society of dyers and colourist, 1995, págs. 200
38. D. M. Lewis, S. M. Smith, "Substituted thiol derivatives of vinyl sulphone dyes", *Dyes and Pigments*, **29**, **1995**, 275-294
39. A. P. Esteves, M. E. Silva, L. M. Rodrigues, A. M. F. Oliveira-Campos, Radim Hrdina, "Aza-Michael reactions with vinyl sulfones and Amberlyst-15 as catalyst", *Tetrahedron Lett.*, **48**, **2007**, 9040-9043
40. B. Das, N. Chowdhury, "Amberlyst-15: An efficient reusable heterogeneous catalyst for aza-Michael reactions under solvent-free conditions", *J. Mol. Catal. A: Chem.*, **263**, **2007**, 212-215
41. L. Yang, L.-W. Xu, W. Zhou, L. Li, C.-G. Xia, "Highly efficient aza-Michael reactions of aromatic amines and *N*-heterocycles catalyzed by a basic ionic liquid under solvent-free conditions", *Tetrahedron Lett.*, **47**, **2006**, 7723-7726
42. B. C. Ranu, S. Banerjee, "Significant rate acceleration of aza-Michael reaction in water", *Tetrahedron Lett.*, **48**, **2007**, 141-143
43. A. K. Verma, R. Kumar, P. Chaudhary, A. Saxena, R. Shankar, S. Mozumdar, R. Chandra, "Cu-nanoparticles: a chemoselective catalyst for the aza-Michael reactions of *N*-alkyl and *N*-arylpiperazines with acrylonitrile", *Tetrahedron Lett.*, **46**, **2005**, 5229-5232
44. C.-E. Yeom, M. J. Kim, B. M. Kim, "1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) - promoted efficient and versatile aza-Michael addition", *Tetrahedron*, **63**, **2007**, 904-909

45. R. Varala, N. Sreelatha, S. R. Adapa, "Ceric ammonium nitrate catalyzed aza-Michael addition of aliphatic amines to α,β -unsaturated carbonyl compounds and nitriles in water", *Synlett*, **2006**, 1549-1553
46. Y.-J. Cao, W.-W. Lai, X. Wang, Y.-J. Li, W.-J. Xiao, "Michael additions in water of ketones to nitroolefins catalyzed by readily tunable and bifunctional pyrrolidine-thiourea organocatalysts", *Tetrahedron Lett.*, **48**, **2007**, 21
47. K. Surendra, N. S. Krishnaveni, R. Sridhar, K. R. Rao, " β -Cyclodextrin promoted aza-Michael addition of amines to conjugated alkenes in water", *Tetrahedron Lett.*, **47**, **2006**, 2125-2127
48. K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, Q. Wang, "A fluorogenic 1,3-dipolar cycloaddition reaction of 3-azidocoumarins and acetylenes", *Org. Lett.*, **6**, **2004**, 4603-4606
49. R. M. Christie, C.-H. Lui, "Studies of fluorescent dyes: part 1. An investigation of the electronic spectral properties of substituted coumarins", *Dyes and Pigments*, **42**, **1999**, 85-93
50. M. E. Silva, "Marcadores fluorescentes ligados a hidratos de carbono" Tese de Mestrado, Univ. Minho, 2001
51. N. K. Kochetkov, A. Y. Chernyak, "Advances in Macromolecular Research", *Jai Press Inc.*, **1**, **1997**, 93-117
52. A. P. Esteves, L. M. Rodrigues, M. E. Silva, S. Gupta, A. M. F. Oliveira-Campos, O. Machalicky and A. J. Mendonça, "Synthesis and characterization of novel fluorescent *N*-glycoconjugates", *Tetrahedron*, **61**, **2005**, 8625-8632
53. Vogel's Textbook, "Practical Organic Chemistry", 5^a Ed., Longman, London, 1989, págs. 637-664
54. F. Michael, A. Klemer, "Glucosyl fluorides and azides", *Adv. Carbohydr. Chem.*, **16**, **1961**, 95
55. H. Paulsen, K.-W. Pflughaupt, In *The Carbohydrates, Chem and Biochem.*, 2^a Ed., Vol IB, Academic Press: N. Y., 1980, págs. 881-927
56. N. L. Benoiton, Y. C. Lee, R. Steinaur, F. M. F. Chen, "Studies on sensitivity to racemisation of activated residues in couplings of *N*-benzyloxycarbonyldipeptides", *Int. J. Peptide Protein Res.*, **40**, **1992**, 559-566
57. V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudrou, "O-Benzotriazolyl-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate as coupling reagent for the synthesis of peptides of biological interest", *Synthesis*, **1984**, 572-574

58. H.-M. Liu, X. Yan, W. Li, C. Huang, "A mild and selective method for cleavage of O-acetyl groups with dibutyltin oxide", *Carbohydr. Res.*, 337, **2002**, 1763-1767
59. M. A. Glozak, N. Sengupta, X. Zhang and E. Seto, "Acetylation and deacetylation of non-histone proteins", *Gene*, 363, **2005**, 15-23
60. S. P. Campana F^o, R. Signini, "Efeito de aditivos na desacetilação de quitina", *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 11, **2001**, 169-173
61. J. Li and Y. Wang, "An efficient and regioselective deprotection method for acetylated glycosides", *Synth. Comm.*, 34, **2004**, 211-217
62. P. Allevi, P. Ciuffreda, A. Longo, M. Anastasia, "Lipase-catalysed chemoselective monoacetylation of hydroxyalkylphenols and chemoselective removal of a single acetyl group from their diacetates", *Tetrahedron: Asymmetry*, 9, **1998**, 2915-2924
63. S.-M. Wang, W.-Z. Ge, H.-M. Liu, D.-P. Zou, X.-B. Yan, "Synthesis of acetylated steroid glycosides and selective cleavage of O-acetyl groups in sugar moiety", *Steroids*, 69, **2004**, 599-604
64. D. C. Gowda and B. Mahesh, "New hydrogen donor: A facile method for the removal of hydrogenolysable protecting groups in peptide synthesis", *Protein and Peptide Letters*, 9, **2002**, 225-230
65. D. M. Lewis, S.M. Smith, "Substituted Thiol Derivatives of Vinyl Sulphone Dyes", *Dyes and Pigments*, 29, **1995**, 275-294
66. U. Galli, L. Lazzarato, M. Bertinaria, G. Sorba, A. Gasco, S. Parapini, D. Taramelli, "Synthesis and antimalarial activities of some furoxan sulfones and related furazans", *Eur. J. Med. Chem.*, 40, **2005**, 1335-1340
67. C. S. Marvel, "Organic Synthetic Collection", Vol. V, 1973, pág. 912
68. D. E. Soli, A. S. Manoso, M. C. Patterson, P. J. DeSong, R. Hirschmann, A. B. Smith, "Azide and cyanide displacements via hypervalent silicate intermediates", *J. Org. Chem*, 64, **1999**, 3171-3177

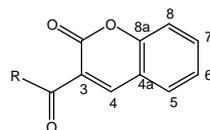
ANEXOS

Dados de ¹H-RMN para os compostos 43-47



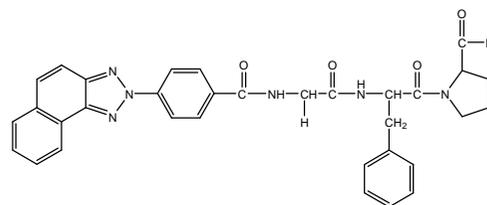
Nº	R	1'	2'	4'	3'	5'	6'a	6'b	2''	6''	3''	5''	4	5	6	8	9	7	NH	OAc	OCH ₃	CH ₂
43		5,48 t	5,11 ou t 5,15 t		5,45 t	3,95 ddd	4,15 dd	4,40 dd	8,50 d		7,98 d		7,92 dd		7,62 - 7,82 m			8,65 dd	7,16 d	2,07 2,08 2,09 2,11		
44		4,98- 5,04 m	3,13 - dt ou 3,27 dt		3,38 dt	3,19- 3,23 m	3,43- 3,49 m	3,69 ddd	8,42 dd		8,21 dd		8,08 dd		7,72 dt ou 7,77 dt		7,92 s		8,56 dlargo	9,07 d		
45									8,15 d		8,42 d		8,07 dd		7,69-7,79 m		7,91 s		8,55 dd	9,19 t	3,67 s	4,06 d
46									8,15 d ou 8,20 d	8,15 d ou 8,20	8,42 d		8,08 d largo		7,68 - 7,80 m		7,92 s		8,55 d largo	9,05 t		3,97 d
47		5,34 t	5,02 t	5,34 t	5,10 t	3,90 ddd	4,12 - 4,19 + CH ₂ Gly m	4,31 dd	8,00 d		8,38 d		7,82 d		7,60 - 7,70 m			8,53 d	7,30 t amid a 7,51 d	2,01 2,03 2,07 2,09 s		

Dados de ¹H-RMN para os compostos 49-53



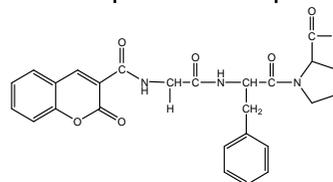
Composto		1'	2'	3'	4'	5'	6'a	6'b	4	5	6	7	8	NH	OCH ₃	6'OH	OAc	Gly CH2	OH	Gly NH
Nº	R																			
49		5,50 t	5,17 q ap	5,36 t	5,17 tap	3,90 ddd	4,14 dd	4,30 dd	8,90 s	7,68-7,73 m		7,38-7,44 m		9,31 d			OAc 2,01, 2,04, 2,05, 2,10 s			
50		4,97 t ap	3,10- 3,16 m	3,19- 3,29 m	3,10- 3,16 m	3,19- 3,29 m	3,40- 3,46 m	3,66 ddd	8,92 s	7,77 ddd	7,43-7,53 m		8,01 dd	9,04 d		4,57 t				
51									8,92 s	7,67- 7,72 m	7,37- 7,44 m	7,67- 7,72 m	7,37- 7,44 m		3,81 s			4,27 d		9,26 s largo
52									8,90 s	7,99 dd	7,44 t	7,75 dt	7,51 d					4,05 d	12,8 s largo	9,03 t
53		5,30 t	4,90 t	5,24 t	4,90 t	5,05 t	4,08- 4,15 m	4,30 dd	8,91 s	7,44 d	7,71 t		7,40 d	7,01 d			OAc 1,99, 2,03, 2,09 s	4,14 d		9,26 t

Dados de ¹H-RMN para os compostos 67-70



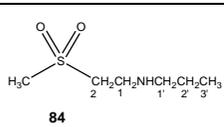
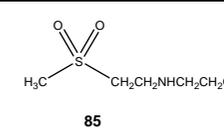
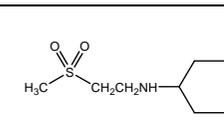
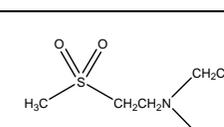
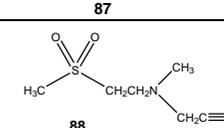
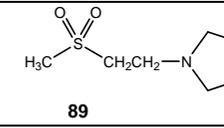
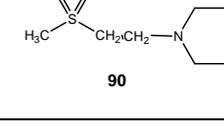
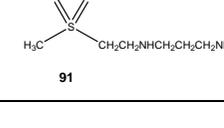
		1'	6'a	6'b	2''	6''	3''	5''	4	5	6	8	9	7	NH Gly	βPro CH ₂	γPro CH ₂	δPro CH ₂	Gly CH ₂	βPhe CH ₂	αPro CH	αPhe CH	Phe NH	Ar-H	CH ₃
67	-O-C(CH ₃) ₃				8,13 d		8,42 d ap	8,54 d	7,76 t	7,93 s	8,09 d	8,85 t	1,77-2,18 m	3,52-3,71 m	3,81-4,02 m	2,75-3,01 m	4,20 dd	4,65-4,78 m	8,42 d ap	7,16-7,34 m	1,38 s				
68	-OH				8,13 d	8,41 d	8,56 d	7,76 dt	7,92 s	8,08 d	8,86 t	1,82-2,17 m	3,45-3,71 m	3,88 dAB q	2,77-2,89 m	2,99 dd	4,27 ddap	4,72 q ap	8,37 d	7,17-7,31 m					
69		5,29 t ou 5,31 t	4,08 dd	4,24 - 4,33 m	8,00 d	8,40 d ap	8,56 dd	7,63 d t	7,70 s	7,85 dd	8,65 t	1,93-2,18 m	3,35-3,42 m	4,05-4,25 m	3,03 dd e 3,18 dd	4,24-4,33 m	4,45 - 4,49 m	8,40 d ap	7,22-7,34 m	8,40 NH ami 7,40 d	OAc 1,91 1,99 2,02 2,07 s				
70		4,71 t ap	3,45 dd ap	3,64 ddap	8,13 d	8,41 d ap	8,55 d	7,69 - 7,79 m	7,92 s	8,08 d	8,86 t	1,67-2,04 m	3,45 ddap e 3,64 dd ap	3,87 dq AB	2,79 dd e 3,01 dd	4,38 dd	4,71 t ap	8,41 d ap	7,17 - 7,32 m + NH						

Dados de ¹H-RMN para os compostos 65, 71-74

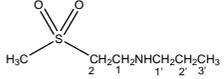
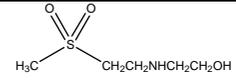
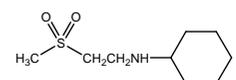
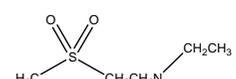
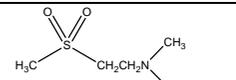
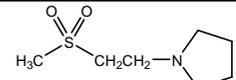
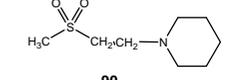
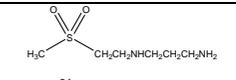


Composto		1'	2'	3'	4'	5''	6a'	6b'	4	5	7	6	8	Gly NH	βPro CH2	γPro CH2	δPro CH2	Gly CH2	βPhe CH2	αPro CH	αPhe CH	Phe NH	ArH	CH ₃	OAc
65	Z-Gly-Phe-Pro-OBu ^t													7,18-7,33 m	1,76-1,98 m e 2,07-2,17 m	1,76-1,98 m	3,45-3,65 m	2,75 dd e 2,96 dd	4,18 dd	4,68 ddd	8,23 d	7,18-7,33 m	1,50 s		
Nº	R																								
71	-O-C(CH ₃) ₃								8,90 s	7,70 tap		7,40 t	7,43 d	9,22 t	1,90-2,20 m		3,34-3,40 m e 3,64-3,73 m	4,09 t	2,98 dd e 3,18 dd	4,41 dd	5,01 dd	6,73 d	7,22-7,30 m	1,48 s	
72	-OH								8,97 s	7,70 tap		7,40 t	7,44 d	10,04 t	1,98 dt ap e 2,20 dt ap	1,83 dqAB	2,76 dd e 3,48 dd	4,29-4,38 m	3,04 d	4,29-4,38 m	5,15 dd	8,77 d	7,21-7,30 m		
73		5,28 t ou 5,29 t	5,09 t	5,28 t ou 5,29 t	4,92 t	3,82 ddd	4,09d d	4,32 dd	8,90 s	7,70 tap		7,36-7,42 m	9,31 t	1,90-2,07 m	3,25-3,32 m e 3,67-3,75 m	4,13 t	3,00 dd e 3,13 dd	4,42 tdd	4,99-5,04 m		7,20-7,32 m e NH amida e NH Phe		1,90, 1,98, 2,03, 2,07 s		
74		4,64 - 4,74 m	3,05 - 3,12 m	3,18 dd	3,05-3,12 m		3,41 dd	3,61 - 3,69 m	8,88 s	7,99 dd	7,75 t	7,44 t	7,50 d	8,98 t NH amida 8,28 tap	1,82-2,04 m	e 3,46-3,51 m 3,61-3,69 m	3,94 dq AB	2,76 dd e 3,01 dd	4,36 t largo	4,64 - 4,74 m	8,54 d	7,16 - 7,31 m			

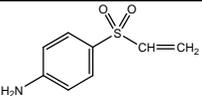
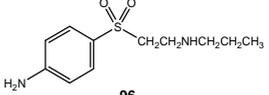
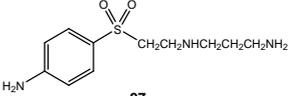
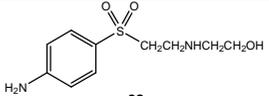
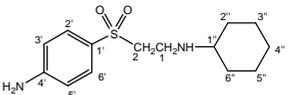
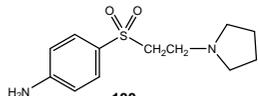
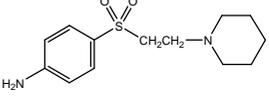
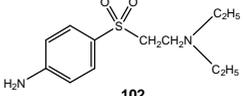
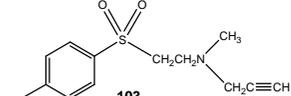
Dados de ¹H-RMN para os compostos **84-91**

	1	2	1'	2'	3'	4'	5'	6'	CH ₃	NH	OH
 <p>84</p>	3,10-3,17 m		2,57 t	1,48 sext	0,90 t				2,99 s	1,81 s largo	
 <p>85</p>	3,20 s ap		2,82 t	3,68 t					3,01 s	1,85 s largo	
 <p>86</p>	3,15 sap		2,44 tt	1,19-1,30 me 1,85-1,89 m	1,05 dqAB e 1,70-1,74 m	1,12 dt e 1,59-1,62 m	1,05 dqAB e 1,70-1,74 m	1,19-130 me 1,85-1,89 m	3,00 s	1,57 s largo	
 <p>87</p>	2,95 t	3,11 t	2,54 q	1,03 t					3,00 s		
 <p>88</p>	2,95 t	3,13 t	3,37 d		2,27 t				2,99 s	CH ₃ -N 2,34 s	
 <p>89</p>	3,12 t	3,30 t	2,73-2,78 m	1,84-1,89 m		2,73-2,78 m			3,01 s		
 <p>90</p>	2,84 t	3,16 t	2,46 t largo	1,55-1,62 m	1,42-1,48 m	1,55-1,62 m	2,46 t largo		3,03 s		
 <p>91</p>	2,92 t ap	3,15 t	2,63 t	1,67 quint	3,29 s largo				CH ₃ e NH ₂ 3,01 s	2,92 t ap	

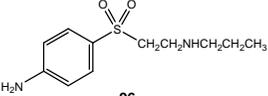
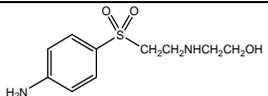
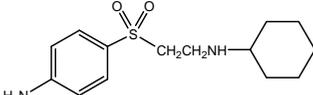
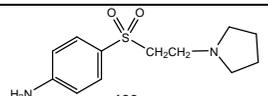
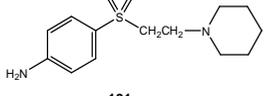
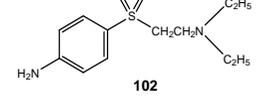
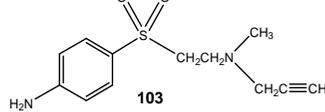
Dados de ^{13}C -RMN para os compostos **84-91**

	C-1	C-2	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'	CH ₃
 <p>84</p>	43,05	54,62	51,32	22,87	11,59				42,02
 <p>85</p>	42,69	54,75	50,83	60,98					42,06
 <p>86</p>	40,24	55,36	56,47	33,36	24,81	25,95	24,81	33,36	42,23
 <p>87</p>	46,66	52,41	46,65	11,44					42,26
 <p>88</p>	49,27	52,66	45,58	73,89	77,47				42,09 e 41,32 N
 <p>89</p>	48,81	52,67	53,78	23,39		53,78			41,76
 <p>90</p>	52,21	52,06	54,24	25,66	23,87	25,66	54,24		42,26
 <p>91</p>	48,01	52,64	51,89	22,24	74,73				42,30

Dados de ¹H-RMN para os compostos 37, 96-103

	1	2	1'	2'	6'	4'	3'	5'	1''	2''	6''	3''	5''	4''	NH	NH ₂	CH ₃	OH	NH ₂	
 37	5,91 e 6,33 d	6,63 dd		7,65 d				6,71 d									4,22 s largo			
 96	2,68 t	3,19 t		7,45 d				6,63 d	2,35 t	1,30 sext		0,80 t				3,31 s largo	6,12 s			
 97	2,99 t	3,24 t		7,66 d				6,72 d	2,66 t	1,55- 1,65 m		2,74 t			2,80 t	4,26 s largo			1,47 s largo	
 98	2,31 t	2,58 t		7,46 d				6,62 d	2,31 t	3,25 t					1,58 quint ap	6,11 s largo		1,58 quint ap		
 99	2,71 t	3,17 t		7,45 d				6,63 d	2,22- 2,28 m	0,88-1,22 m e 1,46-1,70 m					3,30 s largo	6,13 s				
 100	2,88 t	3,32 t		7,64 d				6,69 d	2,48- 2,52 m	1,73- 1,77 m		1,73- 1,77 m		2,48- 2,52 m		4,30 s largo				
 101	2,44- 2,50 m	3,24 t		7,46 d				6,62 d	2,18- 2,22 m	1,37 q ap		1,29 t ap	2,18- 2,22 m	1,37 q ap		6,10 s largo				
 102	2,86- 2,92 m	3,17- 3,22 m		7,64 d				6,70 d	2,46 q	0,97 t						4,26 s largo				
 103	2,83 t	3,23 t		7,65 d				6,70 d	3,28 d			2,21 t				4,23 s l argo	2,26 s			

Dados de ^{13}C -RMN para os compostos **96**, **98-103**

	C-1	C-2	C-1'	C-2'	C-6'	C-4'	C-3'	C-5'	C-1''	C-2''	C-6''	C-4''	C-3''	C-5''	CH ₃	
 96	43,14	55,54	123,78	129,50		153,64	112,74		50,66	22,54			11,69			
 98	53,17	48,86	123,88	129,60		153,59	112,64		53,17	54,52						
 99	40,23	55,85	123,74	129,53		153,65	112,73		55,34	32,74			25,78			
 100	49,08	55,33	127,00	130,08		151,50	113,98		53,82	23,41		53,82	23,41			
 101	51,96	52,91	124,08	129,60		153,54	112,61		53,50	25,32		25,32	23,74	53,50		
 102	45,74	53,20	127,24	129,98		151,41	114,02		46,81	11,74						
 103	48,98	54,44	127,08	130,08		151,47	113,98		45,43	77,58			73,80		41,36	

