
Grupos Protectores Fotocliváveis para Aminoácidos e Péptidos

Mestrado em Química
Especialização em Ensino

Ana Margarida Loureiro Piloto

*Aos meus pais,
Ao Nuno,
Aos meus amigos.*

Agradecimentos

Este trabalho é a conclusão de uma etapa iniciada há alguns anos e é com muito prazer que agradeço a todos aqueles que contribuíram para que a sua realização fosse possível.

Em primeiro lugar gostaria de manifestar o meu reconhecimento à minha orientadora, a Doutora Maria do Sameiro Torres Gonçalves, pelo apoio, pelo empenho, pelos ensinamentos e pela disponibilidade sempre presentes. Também pela amizade e pelo carinho com que sempre me recebeu, o meu muito obrigado à Doutora Sameiro.

À Professora Doutora Maria Fernanda Proença e ao Professor Doutor Michael Smith, Directores do Mestrado em Química (Especialização em ensino) e do Departamento de Química, pelo bom acolhimento e pelas facilidades concedidas ao longo deste trabalho.

À Doutora Susana Costa, pela amabilidade com que sempre me atendeu e pelo seu valioso contributo na consecução do meu trabalho.

À Professora Doutora Ana Maria Campos, pelo empréstimo do reactor fotoquímico usado na realização dos ensaios de fotoclivagem.

Ao Doutor João Carlos Marcos, pelos esclarecimentos na área da Bioquímica.

A todos os colegas de laboratório, pela paciência que tiveram para comigo durante a execução experimental deste trabalho.

À Dra. Elisa, pela solicitude manifestada na realização dos espectros de RMN e das análises elementares.

Aos funcionários do Departamento de Química, técnicos e administrativos, pelo apoio prestado tanto no laboratório como a nível burocrático.

Ao Departamento de Física, pelas facilidades concedidas na execução dos estudos de fluorescência.

A todos os meus amigos, porque sempre acreditaram que era capaz de chegar ao fim desta etapa.

A ti, Sandrinha, agradeço a amizade e o mimo sempre demonstrados em momentos mais difíceis.

Aos meus pais, pela sua compreensão, pelo incentivo e, acima de tudo, pelo amor e pelo apoio ao longo destes anos.

Por fim a ti, Nuno, pelo carinho, pela paciência e pelo incentivo sempre presentes. O teu apoio e afecto foram indispensáveis para superar os momentos mais difíceis que surgiram durante este trabalho.

É de uma forma muito especial que a ti e aos meus pais dedico esta Tese.

Índice

Índice	i
Resumo	iv
Abstract	v
Nota Introdutória	vi
Publicações e Comunicações	vii
Abreviaturas e Símbolos	ix

Capítulo 1: Introdução

Grupos protectores fotocliváveis

1. Introdução	2
2. Derivados do álcool <i>o</i> -nitrobenzílico	3
2.1. Protecção do átomo de azoto de heterociclos	5
2.2. Protecção do grupo fosfato	7
2.3. Protecção do grupo hidroxilo	8
2.4. Protecção do grupo carbonilo	10
2.5. Protecção do grupo amina	12
2.6. Compostos “caged”	17
3. Derivados do álcool benzílico	20
3.1. Protecção do grupo amina	20
3.2. Protecção do grupo hidroxilo	24
3.3. Compostos “caged”	24
4. Derivados de benzoina	30
5. Ésteres de fenacilo	34
6. Transferência fotoelectrónica	36
7. Aspectos experimentais	38
8. Perspectivas futuras	38

Capítulo 2: Apresentação e Discussão dos Resultados

1. Introdução	42
2. Síntese dos ácidos nafto[2,1- <i>b</i>]furan-1-il etanóicos 2a-c e aplicação a aminoácidos	43
2.1. Importância de benzofuranos e de naftofuranos	43
2.2. Síntese dos ácidos nafto[2,1- <i>b</i>]furan-1-il etanóicos 2a-c	45
2.3. Derivatização de aminoácidos nos <i>N</i> - e <i>O</i> - terminus com os ácidos 2a-c	47
2.4. Estudos de absorção e de fluorescência	50
2.5. Estudos de estabilidade química do sistema fluorescente	52
3. Aplicação de 1-clorometil-3-oxo-3 <i>H</i> -benzo[<i>f</i>]benzopiranos 1a-c a aminoácidos	53
3.1. Introdução	53
3.2. Derivatização de aminoácidos no <i>C</i> - terminus com os cloretos de metilo 1a-c	53
3.3. Estudos de absorção e de fluorescência	56
3.4. Estudos de estabilidade/ clivagem químicas do sistema fluorescente	58
3.5. Estudos de fotoclivagem do sistema fluorescente	59
3.5.1. Introdução	59
3.5.2. Fotólise de Tos-Phe-Obm (11g)	60
3.5.3. Fotólise de Z-Phe-Obb (11a) e de Z-Phe-Obh (11b)	63
3.5.4. Cinética da fotoclivagem	64
4. Conclusões e perspectivas futuras	66

Capítulo 3: Parte Experimental

1. Procedimentos gerais	69
2. Síntese dos ácidos nafto[2,1- <i>b</i>]furan-1-il etanóicos 2a-c e aplicação a aminoácidos	71
2.1. Síntese dos 1-clorometil-3-oxo-3 <i>H</i> -benzo[<i>f</i>]benzopiranos 1a-c	71
2.2. Síntese dos ácidos nafto[2,1- <i>b</i>]furan-1-il etanóicos 2a-c	74
2.3. Derivatização de aminoácidos nos <i>N</i> - e <i>O</i> - terminus com os ácidos 2a-c	77
2.4. Estudos de estabilidade química do sistema fluorescente	86

2.4.1. Hidrogenação catalítica	86
2.4.2. Acidólise	86
2.4.3. Aminólise	86
2.4.4. Redução química	86
2.4.5. Hidrólise alcalina	87
3. Aplicação de 1-clorometil-3-oxo-3 <i>H</i> -benzo[<i>f</i>]benzopiranos 1a-c a aminoácidos	88
3.1. Derivatização de aminoácidos no <i>C-terminus</i> com os cloretos de metilo 1a-c	88
3.2. Estudos de estabilidade/ clivagem químicas do sistema fluorescente	95
3.2.1. Hidrogenação catalítica	95
3.2.2. Acidólise	96
3.2.3. Redução química	98
3.2.4. Hidrólise alcalina	99
3.3. Estudos de fotoclivagem do sistema fluorescente	99
3.3.1. Procedimentos gerais	99
3.3.2. Método geral de fotólise	100
Bibliografia	102

Resumo

O objectivo primário deste trabalho consistiu na síntese de novos derivados de heterociclos de oxigénio, os ácidos nafto[2,1-*b*]furan-1-il etanóicos e os 1-clorometil-3-oxo-3*H*-benzo[*f*]benzopiranos e na sua aplicação a aminoácidos como modelos representativos de biomoléculas.

Por reacção de acoplamento entre os ésteres metílicos de aminoácidos α e os ácidos nafto[2,1-*b*]furan-1-il etanóicos sintetizados foi possível obter derivados de aminoácidos fluorescentes marcados nos grupos amina das cadeias principal e lateral, e também no grupo hidroxilo da cadeia lateral. Investigou-se a estabilidade do fluoróforo da função amina em condições que são usadas frequentemente nas reacções de clivagem química em síntese peptídica.

A derivatização de aminoácidos α , *N*-protegidos (benziloxicarbonilo e tosilo), com 1-clorometil-3-oxo-3*H*-benzo[*f*]benzopiranos originou derivados de aminoácidos fluorescentes marcados no *C-terminus*.

Todos os compostos obtidos foram caracterizados pelas técnicas espectroscópicas habituais. Estudos de fluorescência dos heterociclos e dos derivados fluorescentes foram também efectuados.

Com o objectivo final de investigar a possível aplicação dos 1-clorometil-3-oxo-3*H*-benzo[*f*]benzopiranos como grupos protectores fotocliváveis, efectuaram-se estudos de fotólise (lâmpada de mercúrio de média pressão de 150 W) dos derivados fluorescentes de fenilalanina. Testes de estabilidade e de remoção química do marcador foram também efectuados.

Abstract

The first purpose of this work was the synthesis of new oxygen heterocyclic derivatives, naphtho[2,1-*b*]furan-1-yl ethanoic acids and 1-chloromethyl-3-oxo-3*H*-benzo[*f*]benzopyrans, and their application to amino acids as representative models of biomolecules.

It was possible to obtain fluorescent α -amino acids labelled at their amino *N*-terminus or at their amino or hydroxyl side-chain groups by coupling reaction between α -amino acid methyl esters and naphtho[2,1-*b*]furan-1-yl ethanoic acids. The stability of these compounds under deprotection conditions usually used in peptide synthesis was evaluated.

Derivatisation of *N*-protected (benzyloxycarbonyl and tosyl) α -amino acids with 1-chloromethyl-3-oxo-3*H*-benzo[*f*]benzopyrans gave fluorescent amino acid derivatives at their *C*-terminus.

All compounds were fully characterised by the usual techniques and the fluorescence properties were also evaluated.

The last objective of this work was to investigate the use of the 1-chloromethyl-3-oxo-3*H*-benzo[*f*]benzopyrans as photocleavable protecting groups. Thus, photolysis studies (medium pressure mercury arc lamp of 150 W) with fluorescently labelled phenylalanine were carried out. Stability tests and chemical removal of the label were also done.

Nota Introdutória

1. Comentário à nomenclatura usada

Segundo as regras da IUPAC (IUPAC, 1993), as cumarinas são designadas por 2-benzopiranonas. Nesta dissertação usaram-se ambas as designações; a designação IUPAC para o trabalho experimental efectuado e apresentado, e a designação comum sempre que eram referidos os resultados de outros autores.

2. Utilização de termos técnicos na forma original

Dado que alguns termos técnicos utilizados têm ampla divulgação e utilização na forma original (inglês), ao contrário da forma em português, optou-se por não efectuar a sua tradução. Assim sendo figuram ao longo do texto na forma original entre aspas.

Os termos são os seguintes:

- caged
- caging groups
- linker
- phototrigger
- quenching
- self-quenching

3. Sistema de referências

Ao longo do texto a referência é indicada do seguinte modo: é referido o apelido do primeiro autor (ou editor) seguido do ano da publicação.

A lista de referências apresenta-se organizada por ordem crescente do ano e, dentro de cada ano, por ordem alfabética do apelido do primeiro autor ou editor.

4. Numeração

A numeração dos compostos, esquemas e tabelas apresentados no Capítulo 1 é independente daquela que se utilizou nos capítulos seguintes.

Publicações e Comunicações

Alguns dos resultados apresentados nesta tese constam das seguintes publicações/comunicações:

Publicações

A. M. Piloto, S. P. G. Costa e M. S. T. Gonçalves, “A naphtho[2,1-*b*]furan as a new fluorescent label: synthesis and spectral characterization”, *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 46(28), 4757-4760.

A. M. Piloto, S. P. G. Costa e M. S. T. Gonçalves, “Benzo[*f*]benzopyranones as fluorescent labels for amino acids”, *Proceedings of ECSOC-9, The Nineth International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*, <http://www.mdpi.net/ecsoc/>, **2005**, A039, *no prelo*.

A. M. Piloto, S. P. G. Costa e M. S. T. Gonçalves, “Synthesis and spectral characterization of a fluorescent marker”, *Proceedings of ECSOC-8, The Eighth International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*, <http://www.mdpi.org/ecsoc-8.htm>, J. A. Seijas e M. P. V. Tato (Eds), MDPI, Basel, **2004**, A005.

Comunicações

A. M. Piloto, S. P. G. Costa e M. S. T. Gonçalves, “Benzo[*f*]benzopyranones as fluorescent labels for amino acids”, *ECSOC-9, The Nineth International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*, <http://www.mdpi.net/ecsoc/>, comunicação (A039), Novembro de **2005**.

A. M. Piloto, S. P. G. Costa e M. S. T. Gonçalves, “Preliminary Results of a Fluorescent Photolabile Protecting Group”, *6º Encontro Nacional de Química Orgânica*, comunicação em painel (P99), Universidade do Minho, Braga, Portugal, Julho de **2005**.

A. M. Piloto, S. P. G. Costa e M. S. T. Gonçalves, "Synthesis and spectral characterization of a fluorescent marker", *ECSOC-8, The Eighth International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*, <http://www.mdpi.org/ecsoc-8.htm>, comunicação (A005), Novembro de **2004**.

Abreviaturas e Símbolos

Abs	absorção
Ac	grupo acetilo: CH ₃ CO-
ATP	adenosina - trifosfato
Boc	grupo <i>tert</i> -butiloxicarbonilo
BOP	hexafluorofosfato de 1-il-oxibenzotriazole
Bzl	grupo benzilo
cAMP	monofosfato de adenosina cíclica
cGMP	monofosfato de guanosina cíclica
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
d	duplete
DCC	dicicloexilcarbodiimida
dd	duplo duplete
DEAEA	dietilaminoetilamina
DIC	diisopropilcarbodiimida
DIEA	diisopropiletilamina
DIPCDI	diisopropilcarbodiimida
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO-d ₆	dimetilsulfóxido hexadeuterado
DNA	ácido desoxirribonucleico
dt	duplo tripleto
δ	desvio químico
Δ	aquecimento
e ⁻	electrão
Et ₃ N	triethylamina
ε	coeficiente de extinção molar expresso em M ⁻¹ cm ⁻¹
Φ	rendimento quântico de fluorescência
FTIR	infravermelho com transformada de Fourier
GC	cromatografia gasosa

<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (do Latim, referência a outras pessoas)
EI	impacto electrónico
HMBC	correlação espectroscópica heteronuclear bidimensional, a longa distância (“Heteronuclear Multiple Bond Coherence”)
HMQC	correlação espectroscópica heteronuclear bidimensional (“Heteronuclear Multiple Quantum Coherence”)
HOBt	1-hidroxibenzotriazole
HPLC	cromatografia em fase líquida de alta eficiência
Hz	hertz
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (“International Union of Pure and Applied Chemistry”)
IV	infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento (em hertz)
$\lambda_{\text{máx}}$	comprimento de onda de absorção máxima
m	mutiplete
min.	minuto
m/ z	relação massa/ carga (espectrometria de massa)
M^+	ião molecular
MeOH	metanol
μs	microsegundo
Nfh-OH	ácido 8-hidroxi-nafto[2,1- <i>b</i>]furan-1-il etanóico
Nfm-OH	ácido 8-metoxi-nafto[2,1- <i>b</i>]furan-1-il etanóico
Nfu-OH	ácido nafto[2,1- <i>b</i>]furan-1-il etanóico
ν	frequência
Obb-Cl	1-clorometil-3-oxo-3 <i>H</i> -benzo[<i>f</i>]benzopirano
Obh-Cl	1-clorometil-9-hidroxi-3-oxo-3 <i>H</i> -benzo[<i>f</i>]benzopirano
Obm-Cl	1-clorometil-9-metoxi-3-oxo-3 <i>H</i> -benzo[<i>f</i>]benzopirano
PdC	paládio em carvão activado
p.f.	ponto de fusão
ppm	partes por milhão
<i>R_f</i>	factor de retenção
RMN	ressonância magnética nuclear

η	rendimento (em %)
s	singleto
SPPS	síntese em fase sólida
t	triplete
<i>t</i> Bu	grupo <i>terc</i> -butilo
t.a.	temperatura ambiente
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetraidrofurano
TLC	cromatografia em camada fina
TR	tempo de retenção
UV	ultravioleta
VIH	vírus da imunodeficiência humana

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Grupos protectores fotocliváveis

1. Introdução

Os grupos protectores são uma “ferramenta” importante em Química Orgânica, nomeadamente em síntese peptídica, apesar dos inconvenientes inerentes à sua utilização incluindo a síntese eficiente, a estabilidade química e a remoção selectiva (Schelhaas, 1996).

Estudos nesta área têm conduzido ao desenvolvimento de uma diversidade grande de grupos sendo a ortogonalidade (possibilidade de remoção selectiva de um grupo na presença de outros numa determinada sequência) um dos maiores desafios (Greene, 1999). Desta forma, a fotólise (reacção na presença de luz), apresenta-se como uma alternativa aos métodos clássicos de clivagem química (Bochet, 2001). A ausência de reagentes químicos no processo de fotoclivagem dos grupos protectores, torna esta *via* mais compatível com uma variedade elevada de grupos protectores já existentes (Pillai, 1987; Pillai, 1980).

Os grupos protectores fotocliváveis foram reportados com sucesso, pela primeira vez, por Barltrop e Schofield em 1962 (Baltrop, 1962), os quais verificaram que a *N*-benziloxicarbonilglicina era convertida no aminoácido livre por irradiação com luz ultravioleta. Desde essa altura têm sido desenvolvidos grupos protectores sensíveis à radiação para os diferentes grupos funcionais.

Actualmente, os grupos protectores fotocliváveis são explorados para a síntese de péptidos, de polissacarídeos e de nucleótidos. A sua utilização na obtenção de compostos “caged” confere-lhes um estatuto de destaque em bioaplicações. Com efeito, estes grupos podem ser usados na fotolibertação de materiais bioactivos tais como, neurotransmissores, ATP ou simplesmente iões cálcio, em intervalos de tempo muito reduzidos permitindo seguir acontecimentos fisiológicos em tempo real.

Neste capítulo, pretende-se abordar de forma simples e actualizada alguns dos grupos protectores fotocliváveis mais importantes. É dado maior destaque ao

nitroveratroiloxicarbonilo (NVOC) e análogos, por serem de longe os grupos mais usados.

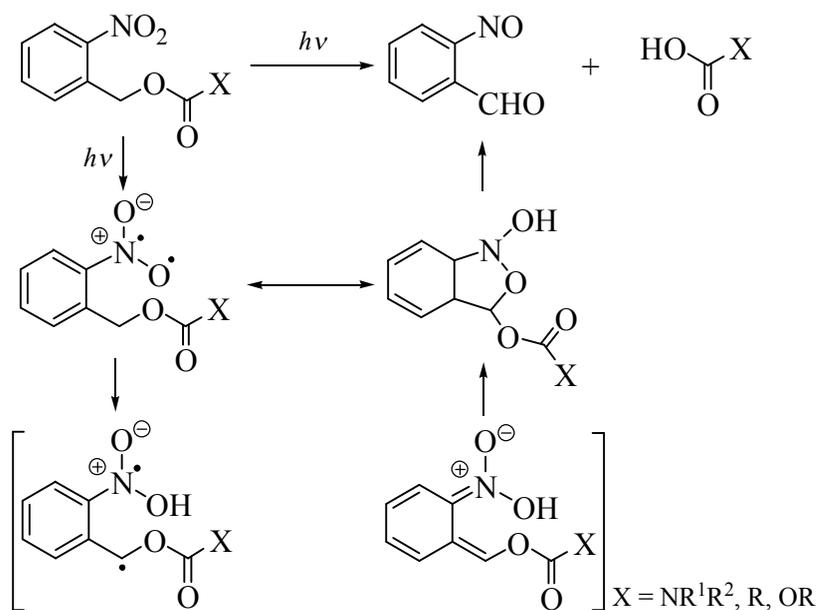
Os derivados e “análogos” do álcool benzílico são também referidos com algum pormenor, principalmente os que possuem um núcleo de cumarina. Com efeito, os grupos protectores sintetizados e testados neste trabalho podem considerar-se análogos desta classe de compostos.

Após algumas considerações ao método experimental de fotólise, esta revisão termina com as perspectivas futuras de investigação neste domínio.

2. Derivados do álcool *o*-nitrobenzílico

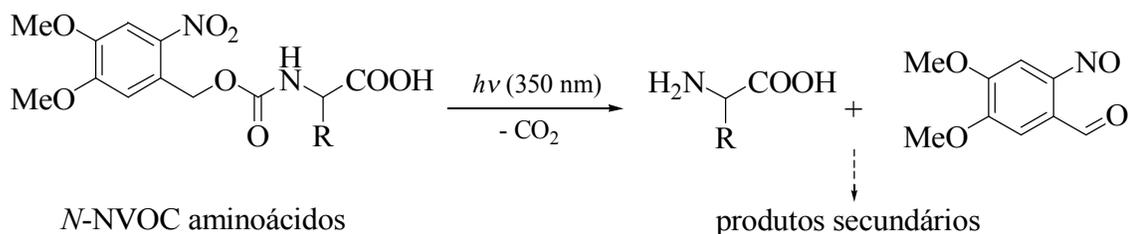
O grupo protector fotoclivável mais conhecido é sem dúvida o 6-nitroveratroiloxicarbonilo (NVOC), introduzido por Patchornick, Amit e Woodward em 1970 (Patchornick, 1970).

A desprotecção é baseada na fotoisomerização dos derivados do álcool *o*-nitrobenzílico no *o*-nitrosobenzaldeído correspondente (Esquema 1). Assim, os carbamatos, os carbonatos e os ésteres são convertidos num derivado acetal que origina espontaneamente um aldeído e a molécula inicial. No caso dos carbamatos, a descarboxilação espontânea conduz à amina livre.



Esquema 1

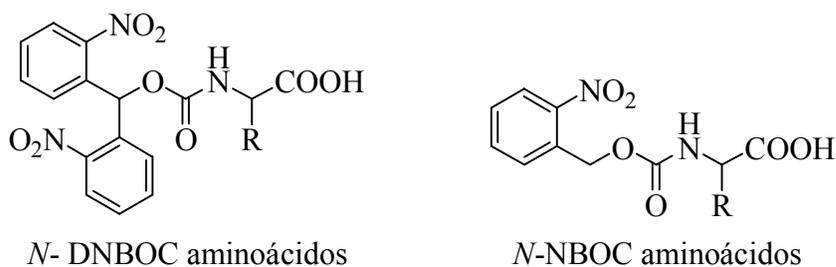
O estudo inicial baseou-se nos derivados NVOC (tipo carbamato) de aminoácidos (Esquema 2). Os dois grupos metoxilo foram introduzidos para aumentar a absorvância a comprimentos de onda superiores a 320 nm. Nestas condições, nem mesmo o triptofano, o aminoácido mais fotossensível, foi afectado.



Esquema 2

Contudo, a recuperação dos aminoácidos foi significativamente menor do que era esperada. Este facto deveu-se à formação de uma imina, resultante da reacção entre a amina libertada e o fotoproducto aldeído. A adição à mistura reaccional de um sequestrador do grupo carbonilo tal como, o cloridrato de semicarbazida, permitiu evitar reacções paralelas, conduzindo aos aminoácidos com rendimentos quantitativos.

Outra solução, para evitar o uso de aditivos, é substituir o grupo metileno do benzilo com outro grupo, *o*-nitrofenilo (a simetria previne a formação de diastereoisómeros). Nesse caso, a fotólise origina uma cetona, muito menos propensa à formação de iminas do que os aldeídos. Assim, o grupo di(nitrobenzil)oxycarbonilo (DNBOC) conduziu a rendimentos de fotodesprotecção superiores a 70% (Esquema 3).



Esquema 3

Este grupo foi também testado na protecção de ácidos carboxílicos *via* éster, tendo sido recuperados os ácidos de partida com rendimentos quantitativos.

Pirrung propôs um outro método interessante para a “captura” do fotoproducto nitroso reactivo. Nesse método, o centro benzílico era substituído por uma cadeia de

pentadienilo. A reacção intramolecular de Diels-Alder, entre o dieno e o grupo nitroso, mostrou ser eficiente na inactivação do produto secundário (Pirrung, 1999).

Num estudo dirigido para a fotogeração de bases, Cameron e Fréchet (Cameron, 1991) examinaram em detalhe os efeitos dos substituintes no grupo nitrobenzilo carbonilo (NBOC) (Esquema 3). Apesar das expectativas, devido à estabilidade elevada de um radical benzílico terciário, a introdução de um grupo metilo α não aumentou o rendimento quântico ($\Phi = 0,11$; $\Phi = 0,13$ para o não substituído).

Por outro lado, a introdução de um grupo nitro na outra posição *orto* aumentou drasticamente o rendimento quântico ($\Phi = 0,62$). Este facto resultou de estarem presentes mais espécies capazes de promover a abstracção de hidrogénio. O rendimento quântico do DNBOC foi também mais elevado do que o do composto análogo ($\Phi = 0,26$). Em geral, os rendimentos quânticos são maiores para os carbamatos do que para os ésteres. A influência no rendimento quântico dos substituintes em centros benzílicos foi descrita como uma combinação complexa de efeitos estéreos e electrónicos.

Os efeitos dos substituintes foram igualmente estudados em ésteres (em vez de carbamatos) e foi observada uma tendência semelhante, excepto no rendimento quântico do derivado α -metílico que registou um aumento significativo (Reichmanis, 1985).

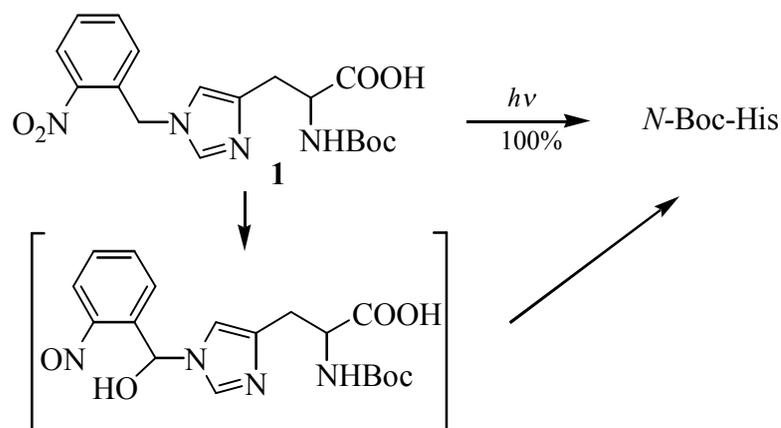
Outros estudos mecanísticos de fotoclivagem têm sido efectuados, alguns com recurso à técnica de fotólise de relâmpago à escala do picossegundo (Schupp, 1987; Zhu, 1987).

Com efeito, a maioria dos estudos reportados centra-se na eficiência da fotólise. No entanto, a facilidade de introdução de um grupo protector é tão importante quanto a sua remoção. Em muitos casos, o cloreto de NBOC (um cloroformiato) é usado na protecção de amins ou álcoois; quando outros análogos não estão comercialmente disponíveis ou são instáveis, pode usar-se a 1,1'- carbonildiimidazola sob condições experimentais suaves (D'Addona, 2001).

A introdução deste grupo protector é mais difícil de efectuar quando o impedimento estereoquímico é elevado. Por exemplo, os métodos convencionais falharam na preparação do carbamato de 2,2,6,6-tetrametilpiperidina (Martina, 1994). Contudo, foi possível pela primeira vez tratar com foscénio a amina e depois adicionar o álcool *o*-nitrobenzílico.

2.1. Protecção do átomo de azoto de heterociclos

O grupo fotoclivável *o*-nitrobenzilo foi usado directamente na protecção do imidazole da cadeia lateral da histidina, por alquilação do átomo de azoto do heterociclo com o brometo correspondente, originando o composto **1** (Esquema 4) (Kalbag, 1975).

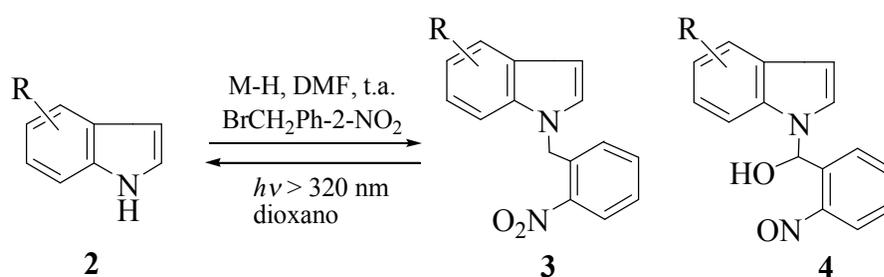


Esquema 4

A fotólise (lâmpada de média pressão de mercúrio de 450 W com filtro de pirex) permitiu a recuperação da histidina quantitativamente sem a ocorrência de racemização.

Mais recentemente, o grupo *o*-nitrobenzilo foi usado como grupo protector do átomo azoto nos indoles **2**, **5**, **6** e **7**, no benzimidazole **8** e no 6-cloroacilo **9** (Voelker, 1998).

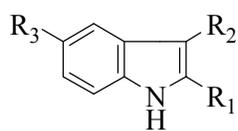
No Esquema 5 mostra-se a síntese dos indoles protegidos **3** e a recuperação dos indoles **2** de partida acompanhados do subproduto **4**.



M-H = LiH ou NaH

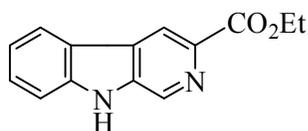
Esquema 5

Os rendimentos de obtenção dos restantes heterociclos, após fotólise, surgem no Esquema 6. É de notar que os tempos de fotorreacção são superiores para os compostos **7**, **8** e **9**, no entanto, os rendimentos são bons.



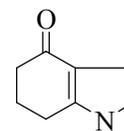
5

- a** R¹, R², R³ = H (5h; 45%)
b R¹, R³ = H, R² = CHO (5h; 95%)
c R¹ = CO₂Et, R², R³ = H, (7h; 72%)
d R¹, R² = H, R³ = CN (7h; 70%)



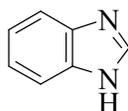
6

(3h; 91%)



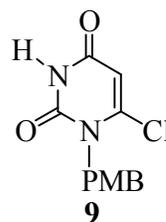
7

(14h; 79%)



8

(12h; 77%)



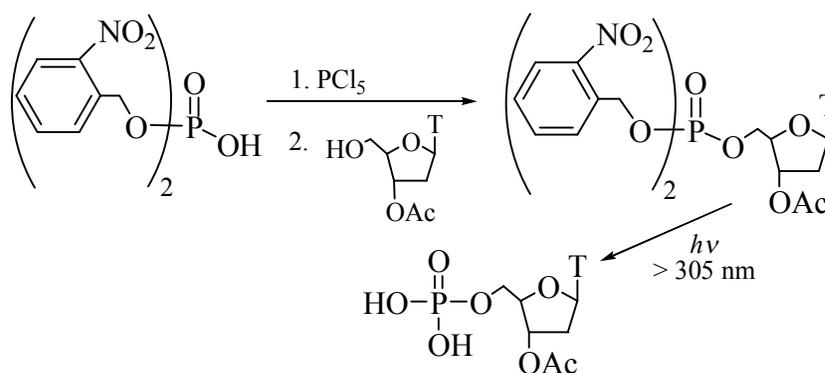
9

(40h; 76%)

Esquema 6

2.2. Protecção do grupo fosfato

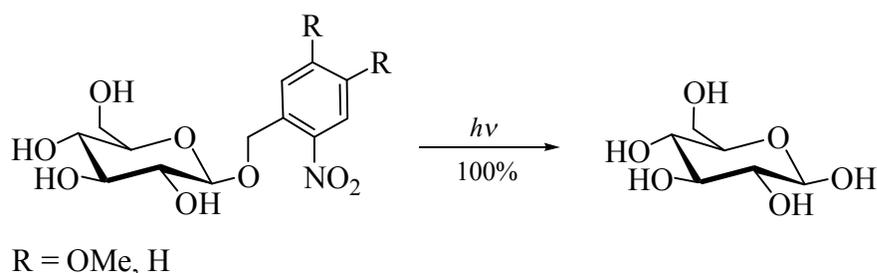
Os derivados do álcool *o*-nitrobenzílico foram usados na protecção do grupo fosfato em síntese de polinucleótidos (Esquema 7) (Rubinstein, 1975). A protecção e a desprotecção foram ambas eficientes. Nas tentativas iniciais, os produtos secundários derivados de nitrosoaldeído causaram um escurecimento significativo da solução, actuando como filtros internos, impedindo uma absorção de luz eficiente. No entanto, a aplicação de uma resina sequestradora do tipo semicarbazida permitiu a recuperação dos nucleótidos com rendimentos superiores a 70%.



Esquema 7

2.3. Protecção do grupo hidroxilo

Os grupos NVOC e NBOC foram igualmente usados para a protecção dos grupos hidroxilo em hidratos de carbono (Zehavi, 1972 a e b). Por exemplo, o hemiacetal da glucose foi protegido como um acetal misto. Em ambos os casos, a fotólise originou a glucose quantitativamente (Esquema 8)

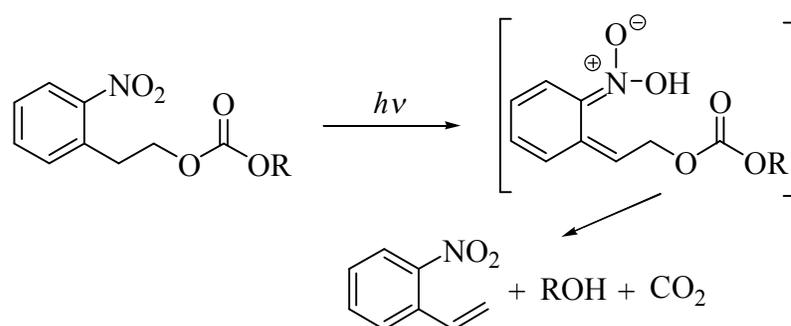


Esquema 8

Éteres deste tipo foram igualmente usados para a protecção do grupo 2'-OH em ribonucleósidos. A protecção foi efectuada por reacção de um álcool livre com o *o*-nitrofenildiazometano na presença de dicloreto de alumínio (foi obtida uma mistura dos éteres 3' e 2' sendo necessária a sua separação) (Bartholomew, 1975). O rendimento da fotólise foi também quantitativo.

Esta protecção do 2'-OH foi muito útil na preparação de oligorribonucleótidos, em solução e em fase sólida (Ohtsuka, 1978, a e b; Ohtsuka, 1977 e Tanaka, 1988). Um esquema de protecção ortogonal interessante para a síntese de RNA usando um análogo de um acetal foi desenvolvido por Pitsch e Gough (Pitsch, 1997; Stutz, 1999; Schwartz, 1992).

O grupo funcional a proteger pode igualmente ser ligado ao grupo *o*-nitrobenzilo na posição β , como se mostra no trabalho recente de Hasan com carbonatos de nucleósidos (Esquema 9) (Hasan, 1997).

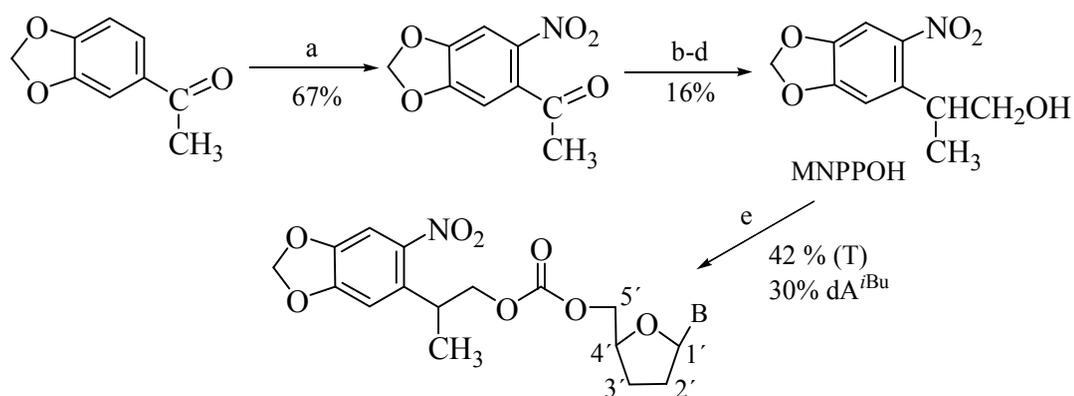


Esquema 9

A variação dos rendimentos quânticos em função dos substituintes é comparável à obtida no caso dos carbonatos ligados na posição α . Este facto, torna improvável a abstracção directa do hidrogénio β , pelo que foi proposto um mecanismo alternativo.

O mesmo trabalho mostrou a influência de substituintes no anel aromático, no rendimento quântico, para os carbonatos ligados nas posições α e β . Os compostos *o*-halogenados mostraram um aumento no rendimento quântico, excepto com o flúor. Grupos electronegativos como o grupo metoxilo (por exemplo, o padrão 4,5-dimetoxilo) reduzem drasticamente o rendimento quântico ($\Phi = 0,0013$, enquanto no análogo NBOC não substituído, $\Phi = 0,033$). Salienta-se o facto destas medições terem sido efectuadas nos carbonatos timidina e não nos de cicloxilo como anteriormente (Cameron, 1991). A elevada reactividade observada por Patchornik a 320 nm, foi certamente devida a um aumento significativo na absorvância, compensando o decréscimo no rendimento quântico.

O 2-(3,4-metilenedioxi-6-nitrofenil)propanol, MNPPOH foi usado como grupo protector fotoclivável na protecção do grupo hidroxilo (5'-OH) de nucleósidos T e dA^{iBu} (Berroy, 2001). Apesar dos rendimentos modestos da síntese, por irradiação a 365 nm (lâmpada de mercúrio de 500 W) os nucleósidos de partida foram obtidos com bons rendimentos (95-99%). O grupo MNPPOH mostrou ser compatível com os reagentes usados na síntese de oligonucleótidos (Esquema 10).



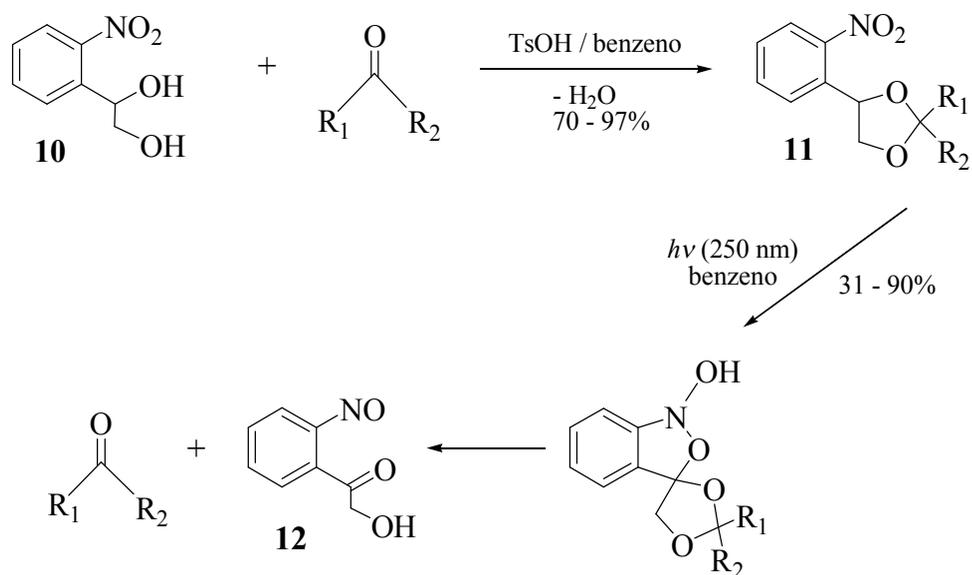
a) 70% HNO₃, 10-15 °C, 1h; b – i) MeOCH₂P⁺Ph₃Cl⁻, BuLi, THF, 0°C, 20 min., ii) 0°C, 1,5h; c) HCl 6N/ CH₃CN v/v 1/1, t.a., 1h; d) NaBH₄, MeOH, t.a., 1h; e - i) Cl₃COCO₂CCl₃, CH₂Cl₂, 0°C, 1h, ii) piridina, -15°C, 45 min. e t.a. durante a noite.

Esquema 10

2.4. Protecção do grupo carbonilo

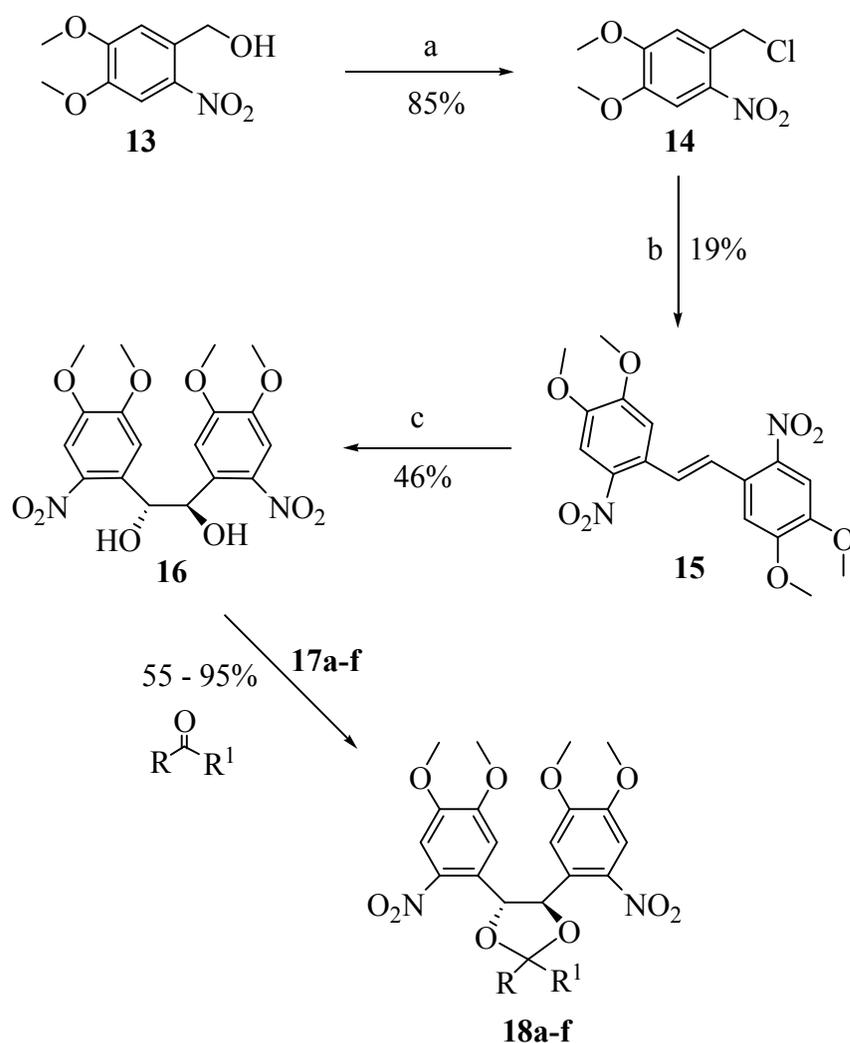
Gravel (Gravel, 1983) propôs o *o*-nitrofeniletlenoglicol (**10**) como protector do grupo carbonilo de cetonas, *via* cetal (**11**) (Esquema 11). A clivagem por fotólise ($\lambda = 350$ nm, em benzeno) foi eficiente, tendo sido recuperada a cetona de partida num rendimento superior a 97%.

Um dos problemas deste grupo protector é a sua baixa estabilidade em vários reagentes. Os cetais **11** mostraram-se instáveis em agentes redutores, tais como o hidreto de sódio e o hidreto de alumínio e lítio. Por outro lado, foi registada estabilidade elevada a ácidos, e inclusivé resistência perante breves exposições a HCl em THF ou ácido sulfúrico. O mecanismo de fotólise proposto, idêntico ao da clivagem do grupo NVOC, foi confirmado pelo isolamento e pela identificação do intermediário nitroso de hidroxiacetona **12**.



Esquema 11

Recentemente, Kantevari e seus colaboradores (Kantevari, 2005) descreveram a síntese de um grupo protector fotoclivável novo, o *bis*-(4,5-dimetoxi-2-nitrofenil)etilenoglicol **16**, a partir do álcool 4,5-dimetoxi-2-nitrobenzílico **13**, em três passos, com bom rendimento (Esquema 12).



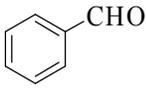
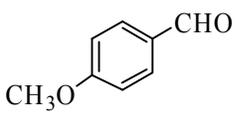
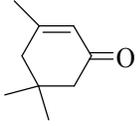
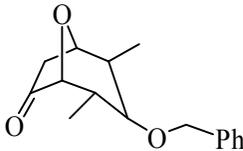
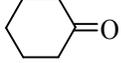
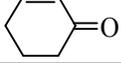
a) $\text{PCl}_5/\text{CHCl}_3$; b) KOH/DMSO - etanol; c) $\text{OsO}_4/\text{óxido de } N\text{-metilmorfolina}$; d) *p*-toluenossulfonato de piridínio, benzeno.

Esquema 12

Com o objectivo de estudar a eficiência deste grupo protector, foi efectuada a reacção do composto **16** com os aldeídos **17a-b** e as cetonas **17c-f** tendo sido obtidos os acetais **18a-b** e os cetais **18c-f**, respectivamente (Esquema 12).

Estes compostos eram estáveis em condições reaccionais ácidas e básicas, clivando por irradiação a 350 e 400 nm regenerando o composto carbonílico em rendimentos elevados (Tabela 1).

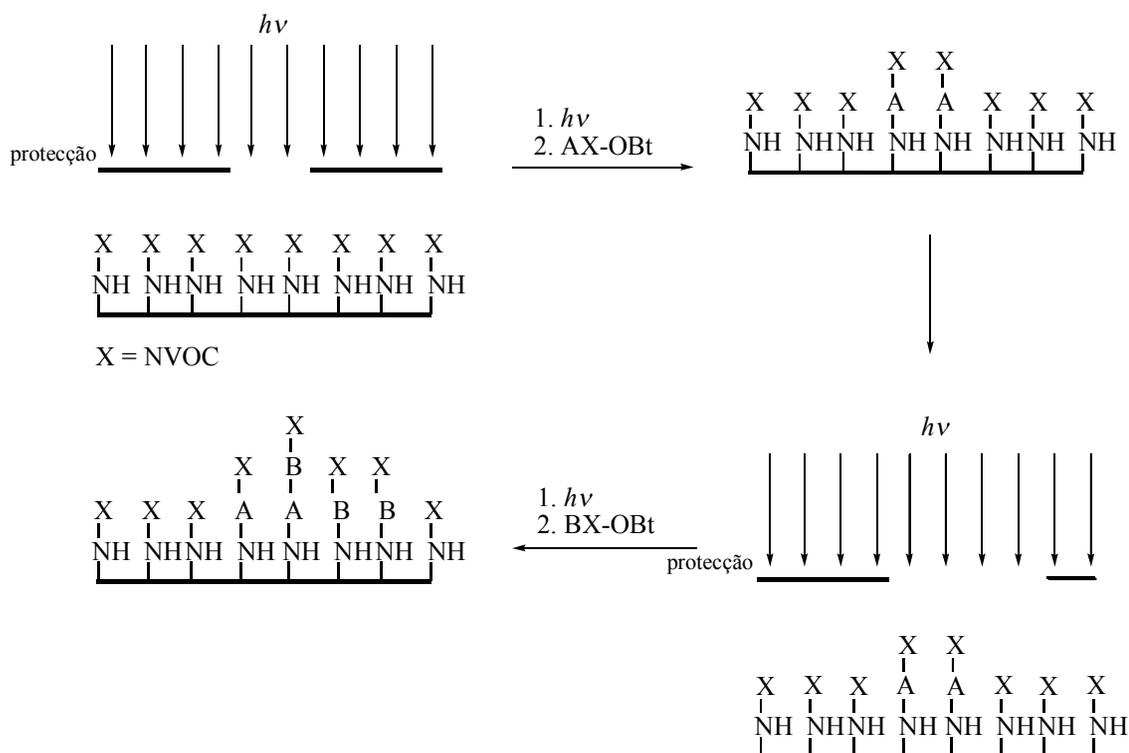
Tabela 1 - Protecção e desprotecção de aldeídos e cetonas com o diol **16**.

Composto 17	Composto 18	Rendimento (%)		
		Síntese	Fotólise	
			350 nm	400 nm
A 	a	77	80	58
B 	b	95	82	62
C 	c	55	68	-
D 	d	65	74	-
E 	e	90	92	75
F 	f	73	81	-

Os resultados da Tabela 1 mostram que a fotólise foi mais eficiente a 350 nm e que apenas o cetal **18e** clivou a 400 nm.

2.5. Protecção do grupo amina

Em 1991, Fodor e seus colaboradores (Fodor, 1991) demonstraram pela primeira vez que segmentos peptídicos podiam ser sintetizados em superfícies de vidro usando o NVOC como grupo protector fotoclivável do terminal da cadeia em crescimento. Nesta estratégia, os grupos amino protegidos com NVOC eram ligados a uma placa de vidro através de um aminoácido ligante. A desprotecção fotoquímica seguida de reacção com ésteres activados de aminoácidos protegidos com NVOC, permitiu o acoplamento de aminoácidos na placa apenas em certas posições. A variação na posição de desprotecção e várias interações permitiram a síntese de um número elevado de péptidos diferentes (em tamanho e sequência) (Esquema 13).

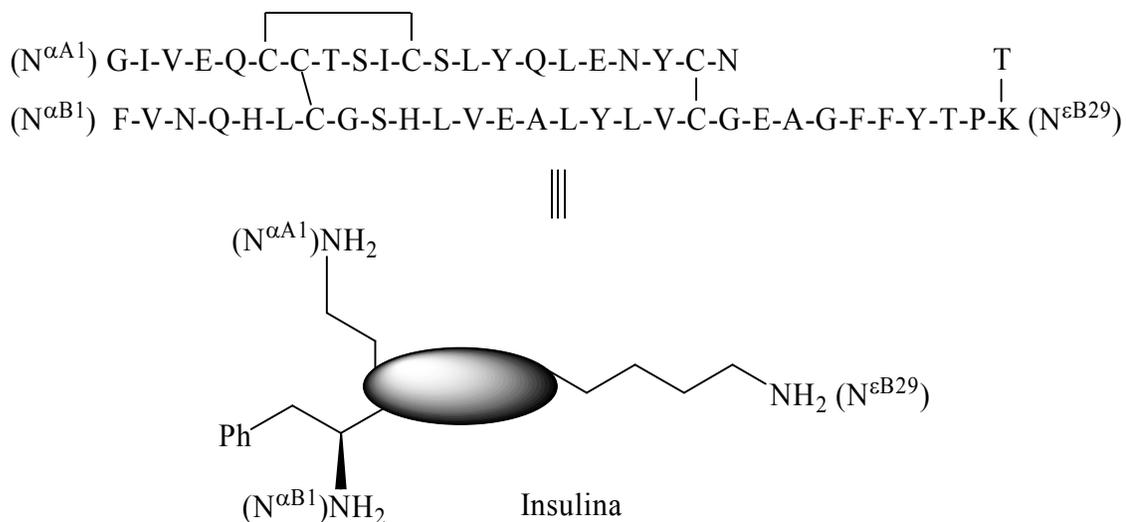


Esquema 13

A mesma estratégia foi aplicada na síntese de oligonucleótidos, usando um grupo α -Me-NVOC ligeiramente modificado (Pease, 1994; McGall, 1997; Pirrung, 1998; Pirrung, 1995).

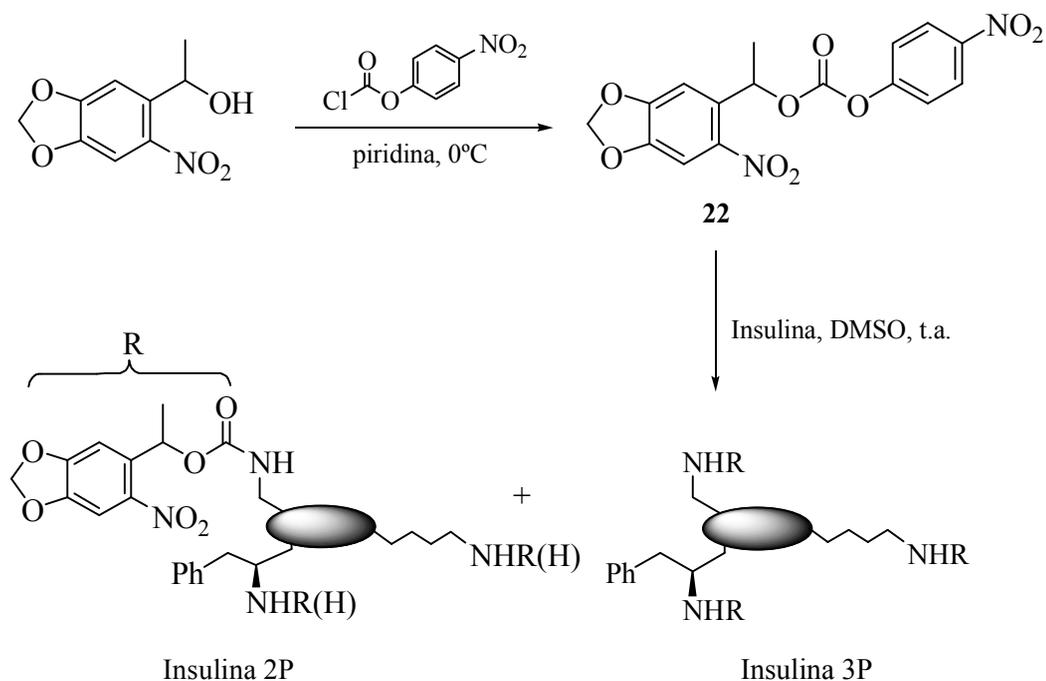
Nos últimos anos tem aumentado o interesse na síntese de segmentos de oligonucleótidos e de péptidos em vidro e noutras superfícies, usando processos fotolitográficos para estudos em genómica e proteómica, respectivamente (Housemen, 2002; Vernet, 2002).

Liu e seus colaboradores (Liu, 2005) descreveram a síntese eficiente de monómeros de ácidos peptídicos nucleicos (PNA), usando o *o*-nitroveratroiloxicarbonilo (NVOC) como grupo protector fotoclivável. A escolha deste grupo baseou-se no facto de ser bastante usado em síntese peptídica e do núcleo de *o*-nitrobenzilo ser removido por irradiação, geralmente a comprimentos de onda superiores a 300 nm, sem danificar os ácidos nucleicos (Fordor, 1991; Robertson, 1991). Na estratégia de síntese usada, o intermediário chave era o composto **19**, que foi preparado de acordo com o que é apresentado no Esquema 14.



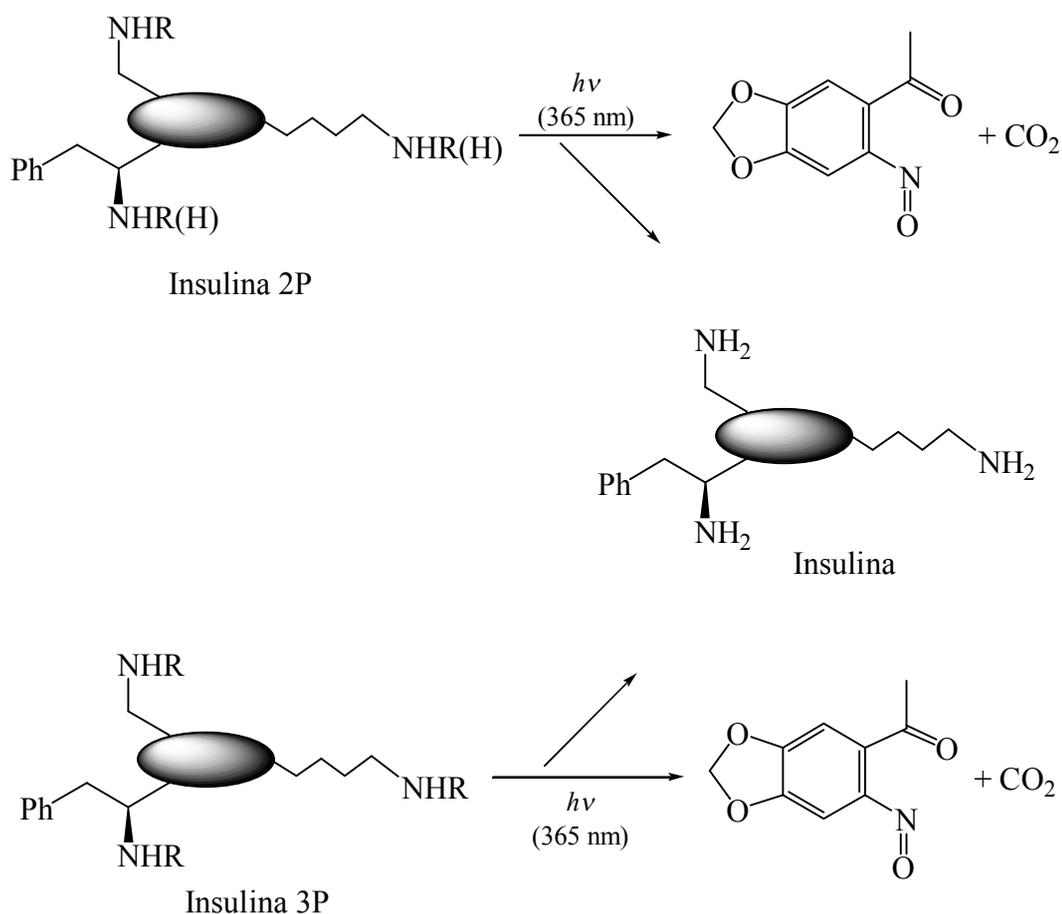
Esquema 16

Os pró-fármacos fotocliváveis de insulina 2P e 3P, foram desenvolvidas pela protecção do grupo amina dos aminoácidos GlyA1 ($N^{\alpha A1}$) e um ou os dois PheB1 ($N^{\alpha B1}$) e LysB29 ($N^{\epsilon B29}$) da insulina original usando o composto **22** como grupo protector (Esquema 17).



Esquema 17

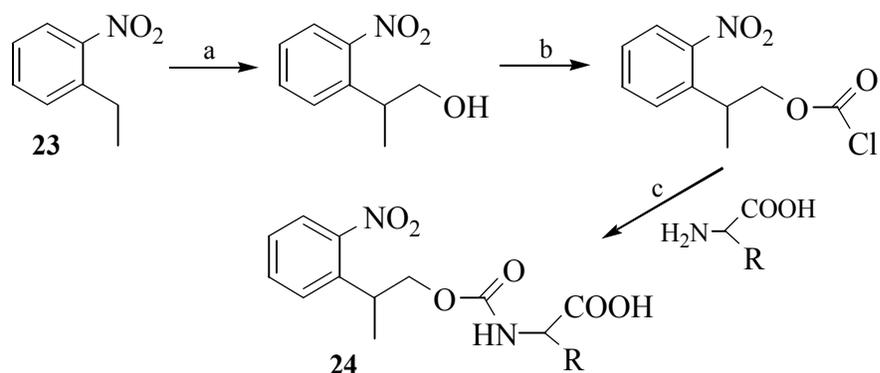
Os derivados de insulina foram activados eficientemente por exposição à radiação de UV ($\lambda = 365 \text{ nm}$) para produzirem a insulina de partida quantitativamente (Esquema 18) (Li, 2005).



Esquema 18

O 2-(2-nitrofenil)propiloxicarbonilo (NPPOC) mostrou ser um grupo protector fotoclivável eficiente na protecção de nucleótidos (Beier, 2000). Consequentemente, Bhushan *et al.* (Bushman, 2003) decidiram usar este grupo na síntese de aminoácidos, para posterior utilização em síntese peptídica em fase sólida fotolitográfica.

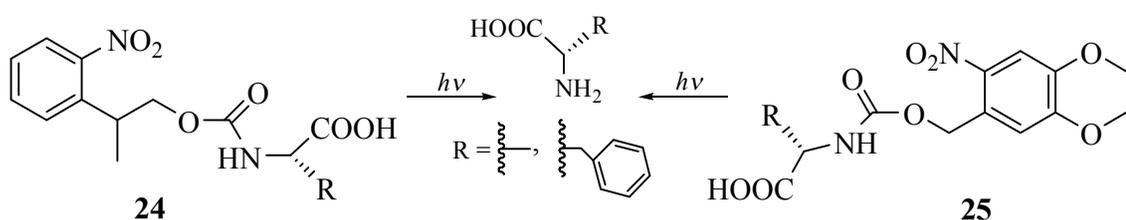
Na síntese dos derivados *N*-protegidos de aminoácidos (**24**) os autores partiram do composto nitro **23** e seguiram a *via* de síntese apresentada no Esquema 19. Os compostos **24** pretendidos foram obtidos com rendimentos entre 78 e 86%.



- a) $(\text{HCHO})_n$, Triton B (40% em MeOH), refluxo (6h)
 b) COCl_2 , THF, 0°C (3h)
 c) Na_2CO_3 , 1,4-dioxano/ H_2O (1:1), 25°C (~20h)

Esquema 19

Os resultados dos estudos de fotólise com os compostos **24** (irradiação a 365 nm) mostraram que a velocidade de desprotecção era pelo menos duas vezes superior à dos derivados NVOC correspondentes (**25**), nas mesmas condições (Esquema 20).



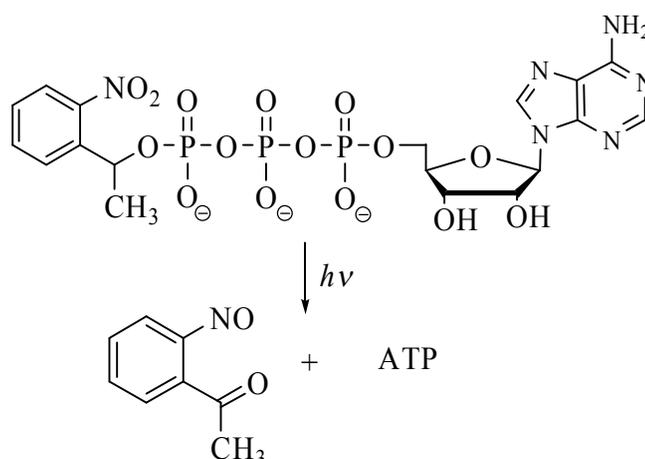
Esquema 20

2.6. Compostos “caged”

Grupos protectores, também designados por “caging groups” em Biologia, originam compostos bioactivos inertes até serem removidos por fotólise.

A aplicação de grupos protectores fotocliváveis na protecção da actividade biológica foi referida pela primeira vez por dois grupos. Em 1977, Engels e Schalaeger (Engels, 1977) reportaram o éster 2-nitrobenzílico do 3',5'-monofosfato de adenosina cíclica (NB-cAMP), como um derivado de cAMP fotoclivável, com capacidade de atravessar membranas biológicas.

Kaplan e seus colaboradores (Kaplan, 1978), reportaram no ano seguinte a síntese fotoquímica e os testes biológicos de dois análogos de ATP, os ésteres 2-nitrobenzilo e 1-(2-nitrofenil)etilo de ATP, designados por ATP “caged” (Esquema 21).

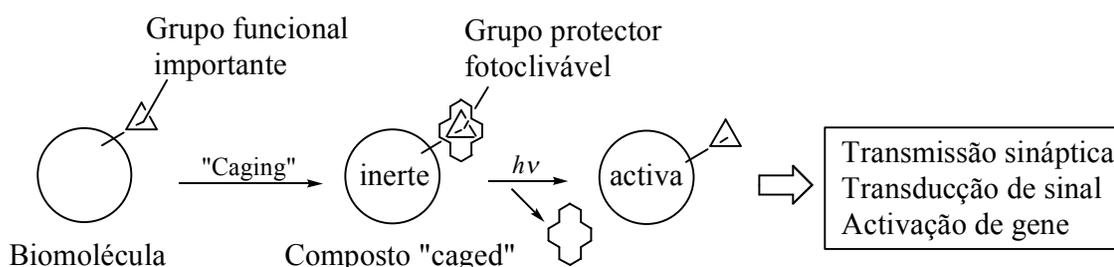


Esquema 21

Desde essa altura, os compostos “caged” têm sido introduzidos em Biologia Celular, Fisiologia e Farmacologia (Rothman, 2005).

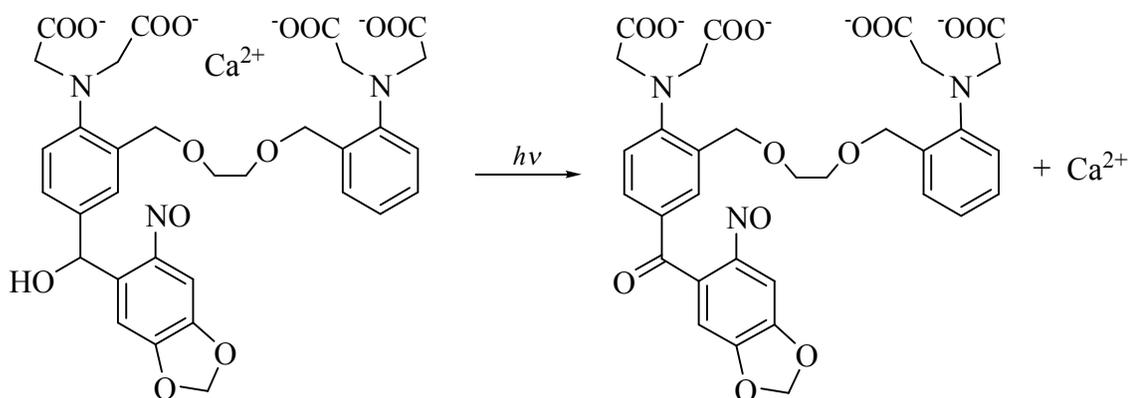
A estrutura dos compostos “caged” consiste geralmente num grupo protector fotoclivável, ligado a um grupo polar da substância biologicamente activa transformando-a desta forma numa molécula inactiva (Esquema 22).

Da exposição dos compostos “caged” à radiação UV ocorre uma reacção fotoquímica que regenera rapidamente, entre micro a milissegundos, a molécula original biologicamente activa.



Esquema 22

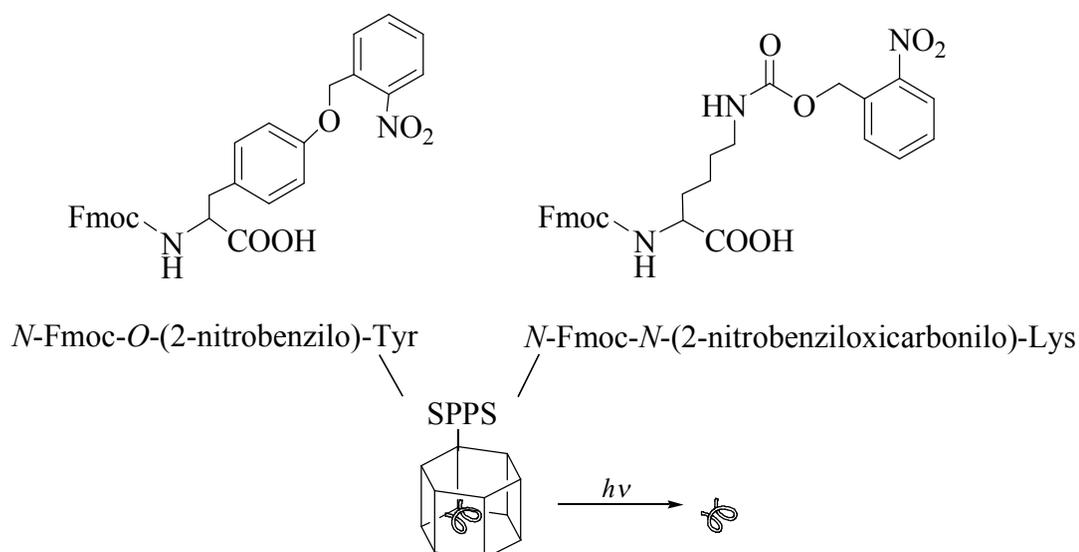
Os grupos 2-nitrobenzilo e nitroveratroilo têm sido muito utilizados em compostos “caged”. Adams desenhou ligandos quelantes, baseados em álcoois *o*-nitrobenzílico substituídos, que libertavam Ca^{2+} quando irradiados (Esquema 23) (Adams 1988; Adams 1989).



Esquema 23

A fotolibertação de fosfatos tais como, o ATP, o cAMP ou o cGMP (Kaplan, 1978; Walker, 1988; Nerbonne, 1984) e de neurotransmissores foi também testada (Wilcox, 1990).

A síntese e aplicação de péptidos e proteínas “caged” com propriedades biológicas importantes foi revista por Shigeri *et al.*, recentemente (Shigeri, 2001). É possível verificar a importância do grupo nitrobenzilo, no método de síntese em fase sólida (Esquema 24).



Esquema 24

A urotensina-II (U-II) é um péptido cíclico com onze aminoácidos, conhecido como um potente vasoconstrictor em mamíferos. Para estudar algumas acções intracelulares do U-II, Bourgault *et al.* (Bourgault, 2005) desenvolveram, já em 2005, alguns análogos “caged” deste péptido os quais se tornavam biologicamente activos por

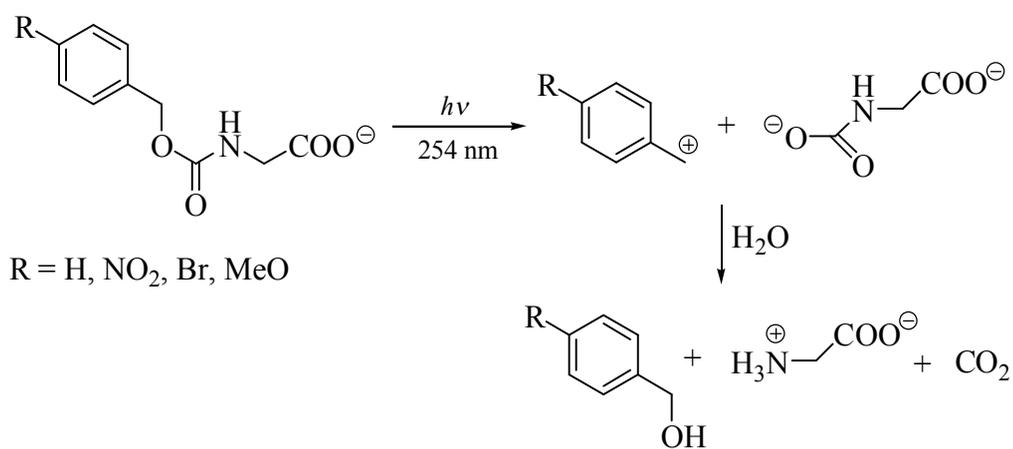
irradiação com UV. Estes análogos foram obtidos por derivatização das cadeias laterais dos aminoácidos Lys-8 e Tyr-9 com o grupo 4,5-dimetoxinitrobenzilo.

Neste trabalho, para além da síntese dos novos derivados “caged” da U-II, os autores demonstraram que a vasoconstrição da U-II pode ser controlada pela protecção e desprotecção de dois resíduos chave.

3. Derivados do álcool benzílico

3.1. Protecção do grupo amina

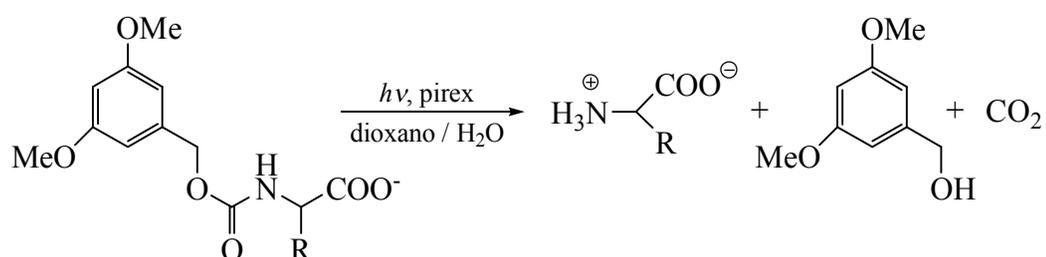
A primeira observação do processo de fotoclivagem reporta-se a Barltrop e Schofield, em 1962 (Barltrop, 1962; Barltrop, 1965). Estes autores verificaram que a *N*-benziloxicarbonil (Cbz) glicina era desprotegida por irradiação a 254 nm (Esquema 25), em rendimentos químico e quântico significativos ($\eta = 75\%$, $\Phi = 0,15$).



Esquema 25

Foi proposto um mecanismo heterolítico baseado principalmente na obtenção de álcoois benzílicos como subprodutos. Esta proposta mecanística era sustentada na forte dependência do pH e no aumento do rendimento quântico quando o anel era substituído com grupos doadores de electrões. O rendimento quântico também mostrou um aumento significativo quando era adicionada água ao solvente.

Chamberlin verificou que a introdução de dois grupos metoxilo nas posições *meta* conduzia a um aumento acentuado na reactividade (Chamberlin, 1966). Neste estudo foram testados vários aminoácidos e péptidos (Esquema 26).



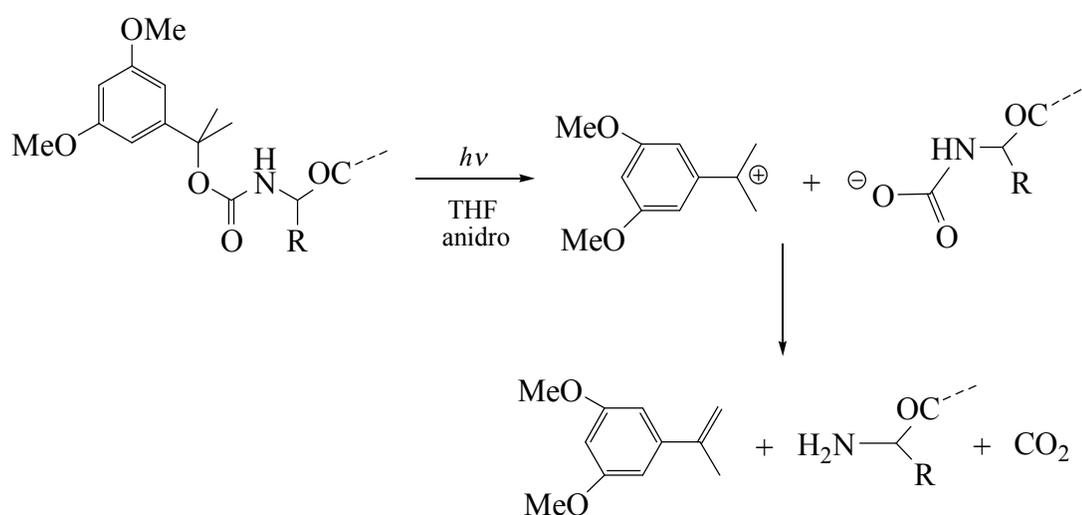
Esquema 26

Os rendimentos típicos (com lâmpada de mercúrio de alta pressão e filtro “Vycor”, em dioxano aquoso) variaram entre 42 e 85%. Curiosamente, os grupos Cbz não foram clivados a mais de 10%, nestas condições. Com efeito, a lisina protegida na amina α com o grupo 3,5-dimetoxibenziloxicarbonilo e na amina ϵ com o Cbz sofreu clivagem selectiva na amina α .

Relativamente ao mecanismo, nada foi dito explicitamente, tendo apenas sido mencionado um estudo de Zimmerman, onde foi investigado o efeito de um grupo metoxilo em posição *meta* (Zimmerman, 1963, a e b). A natureza heterolítica da clivagem foi reforçada pela presença de um álcool benzílico como subproduto, o qual foi considerado altamente improvável de se formar pela recombinação de um radical benzílico e de um radical hidroxilo.

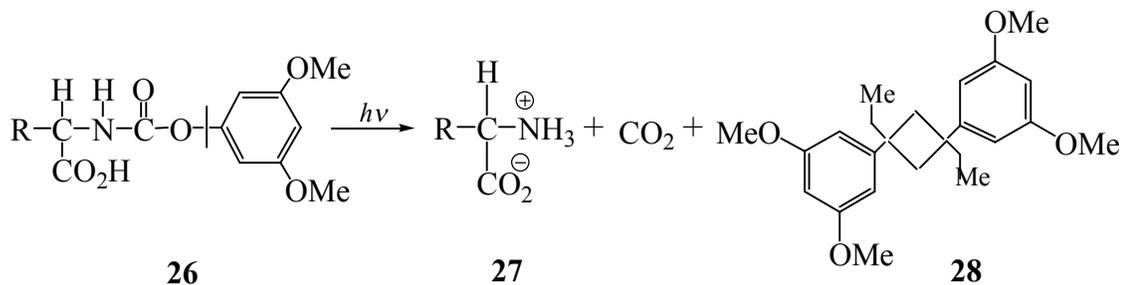
Mais tarde, Pincock (Pincock, 1997) propôs uma revisão detalhada deste mecanismo, sugerindo que o passo fotoquímico dominante seria antes a clivagem homolítica da ligação do heteroátomo benzílico, conduzindo a um par radicalar no estado fundamental. Ocorreria subsequentemente uma transferência electrónica para dar o par iónico proposto nos mecanismos anteriores. Contudo, permanece a controvérsia devido a cálculos teóricos efectuados, que confirmam o mecanismo inicial (Zimmerman, 1995).

Independentemente da natureza exacta do mecanismo, ou seja, de se formar no passo determinante um radical benzílico ou um carbocatião, espera-se que grupos estabilizadores facilitem a reacção. Por exemplo, no α,α -dimetil-3,5-dimetoxibenziloxicarbonilo (Ddz), os dois grupos metilo α , foram introduzidos por Birr em 1972 (Birr, 1972) e usados em aminoácidos (Esquema 27).



Esquema 27

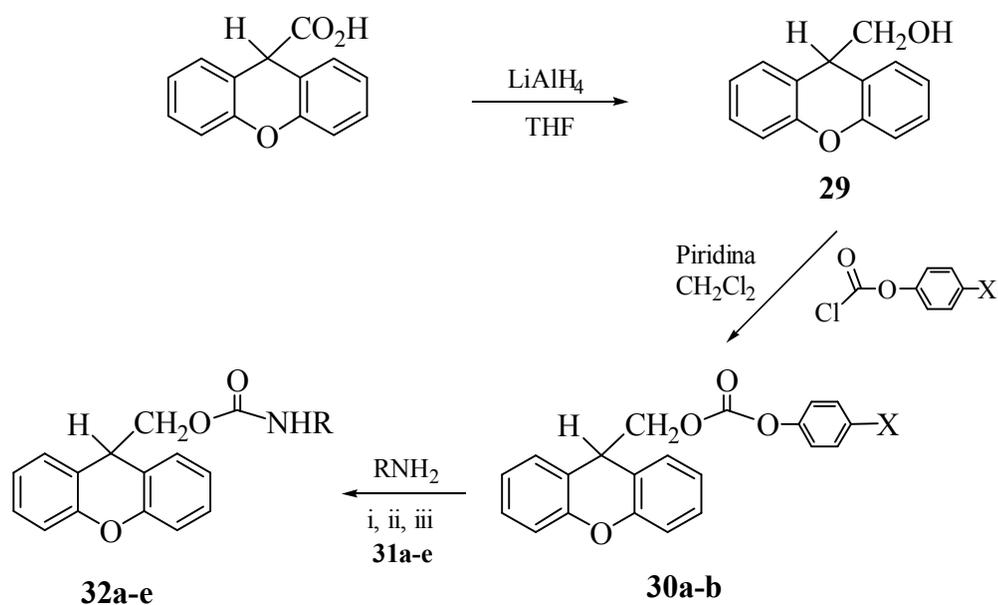
Este grupo mostrou ser muito interessante, uma vez que clivou quantitativamente por acção de ácido (5% de TFA em diclorometano) e fotoquimicamente os aminoácidos protegidos com Ddz foram mais reactivos que os derivados de 3,5-dimetoxibenzoina. A remoção do grupo Ddz do aminoácido protegido (**26**) originou o aminoácido dipolar **27** conjuntamente com o produto **28** (Esquema 28).



Esquema 28

A reactividade deste grupo foi mais tarde explorada por Cameron e Fréchet, em bases fotogeradas para sistemas de imagem (Fréchet, 1990).

Outros grupos fotocliváveis *via* carbocatiões benzílicos têm sido desenvolvidos. O composto **29**, por exemplo, foi proposto por Du e Boyd (Du, 2001) como um grupo protector fotoclivável para aminas (Esquema 29, Tabela 2).



30a X = H, **30b** X = NO₂, **31a-c** i) DMF, **31d** ii) Na₂CO₃ / THF, **31e** iii) Et₃N / THF.

Esquema 29

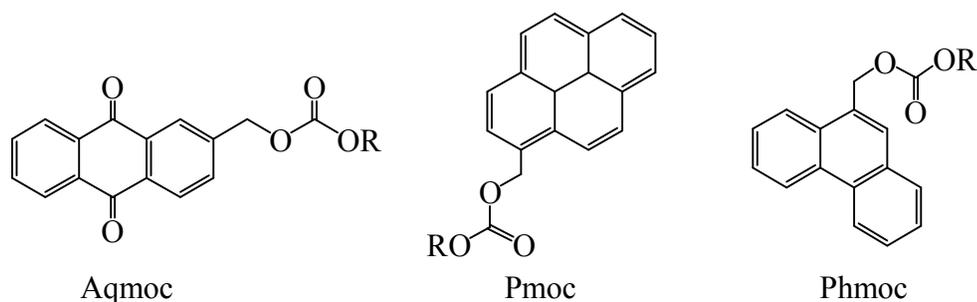
A desprotecção fotoquímica ocorreu por irradiação a 300 nm (lâmpada de baixa pressão de mercúrio) dos derivados **32a-e** em solução aquosa de acetonitrilo. As aminas **31a-c** foram recuperadas com bons rendimentos, o que torna este composto um bom grupo protector fotoclivável para aminas primárias (Tabela 2). No entanto, as aminas **31d** e **31e** foram recuperadas com rendimentos inferiores devido a reacções fotoquímicas secundárias entre estas e a xantona (produto secundário da irradiação).

Tabela 2: Rendimentos de protecção e de desprotecção das aminas.

Substratos	Rendimento de protecção (%)	Rendimento de desprotecção (%)
31a cicloexilamina	81	90
31b benzilamina	68	72
31c fenetilamina	77	79
31d fenilamina	62	52
31e glicinato de benzilo	84	65

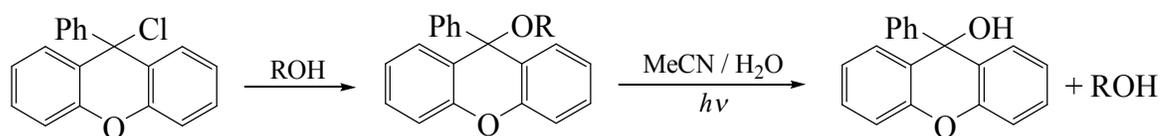
3.2. Protecção do grupo hidroxilo

Compostos aromáticos policíclicos contendo grupos metilbenzílicos têm sido reportados como grupos protectores fotocliváveis para álcoois (Esquema 30) (Furuta, 2001; Iwamura, 1991).



Esquema 30

O 9-fenilxantilo (Esquema 31) e o 9-feniltioxantilo foram também reportados como protectores fotocliváveis para álcoois (Misetic, 1998; Coleman, 1999). A fotólise ocorre *via* carbocátion benzílico.



Esquema 31

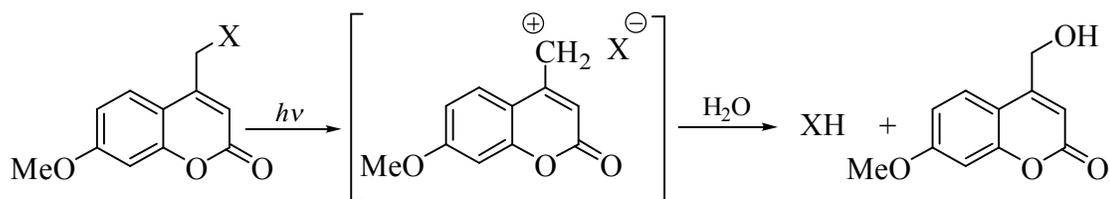
As condições moderadamente acídicas utilizadas para clivar o 9-fenilxantilo da posição 5' de nucleósidos, originou a desprotecção parcial dos grupos THP na posição 2'. Este facto limita a sua aplicação em síntese de oligorribonucleótidos. Contudo, em trabalhos recentes foi possível efectuar a fotólise em acetonitrilo aquoso, com uma lâmpada de mercúrio de baixa pressão, em células de quartzo. A fotoclivagem foi bastante eficiente (78-97%), enquanto os rendimentos da protecção foram ligeiramente mais baixos (66-74%).

3.3. Compostos “caged”

Os ésteres benzílicos são potenciais candidatos à obtenção de compostos “caged”. Contudo, os ésteres benzílicos simples apresentam uma absorção máxima a

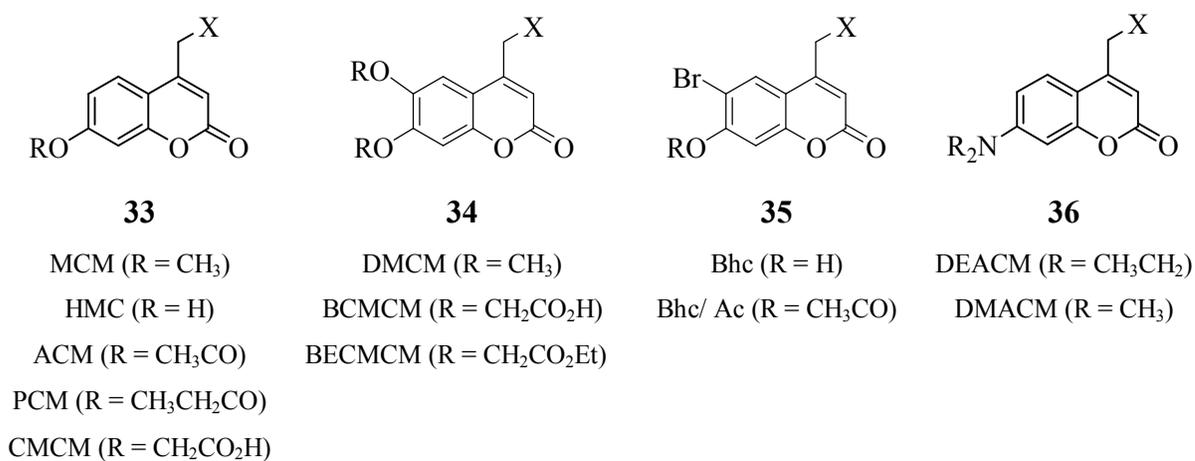
aproximadamente 254 nm. Por esta razão, a fotólise será efectuada a comprimentos de onda inadequados para aplicações em biologia celular. Apenas os ésteres benzílicos possuindo cromóforos com absorção superior a 350 nm poderão ser usados nesta área como grupos fotocliváveis.

Com efeito, derivados de cumarina têm sido sugeridos e usados como grupos protectores fotocliváveis em biomoléculas (Esquema 32).



Esquema 32

O Esquema 33 mostra as estruturas destes compostos agrupados em quatro categorias, de acordo com o respectivo padrão de substituição: 7-alcoxi (**33**), 6,7-dialcoxi (**34**), 6-bromo-7-alcoxi (**35**) e 7-dialquilamino (**36**) coumarinas.



Esquema 33

Estes grupos protectores satisfazem os requisitos seguintes:

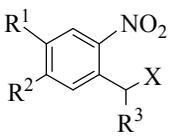
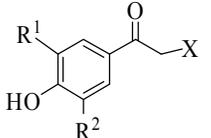
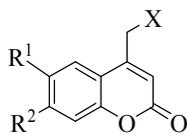
- i) possuem bandas de absorção largas entre 330 e 400 nm;
- ii) elevados rendimentos quânticos de fotólise;
- iii) possuem estabilidade suficiente para aplicações práticas;

iv) originam derivados protegidos solúveis em água ou permeáveis a membranas.

Por outro lado, as características espectroscópicas e fotoquímicas das cumarinas podem ser facilmente alteradas pela adição de substituintes que perturbem as propriedades electrónicas destes cromóforos. Até certo ponto, a permeabilidade em membranas e a solubilidade em água podem ser melhoradas pela introdução, designadamente, de grupos funcionais.

A Tabela 3 compara as propriedades espectroscópicas e fotoquímicas da 4-il-metilcumarina com as de outros dois grupos (2-nitrobenzilo e *p*-hidroxifenacilo) que têm sido usados na preparação de compostos “caged”.

Tabela 3: Propriedades espectroscópicas e fotoquímicas de compostos “phototriggers”.

“Phototriggers”			
	2-nitrobenzilo	<i>p</i> -hidroxifenacilo	4-il-metilcumarina
λ_{\max} (nm)	260-350	280-370	330-400
Φ^a	~ 0,7	~ 0,3	~ 0,2
k^b (s ⁻¹)	~ 10 ⁴	~ 10 ⁸	~ 10 ⁹
X ^c	P, C, S, Am, Al, Fe, Ti, CO	P, C	P, C, S, Am, Al, Fe, CO

a - Rendimento quântico para o desaparecimento do material de partida por irradiação.

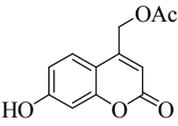
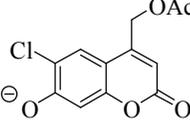
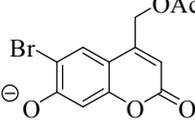
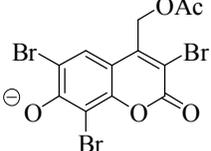
b - Constante de velocidade da fotólise.

c - Grupos funcionais que formam compostos “caged”. P, fosfatos; C, carboxilatos; S, sulfatos; Am, aminas; Al, alcoóis; Fe, fenois; Ti, tióis e CO, carbonilos.

Da observação dos dados da Tabela 3, pode verificar-se que os derivados de cumarina são os compostos com velocidades de fotólise e comprimentos de onda de absorção máxima mais elevados, o que os torna muito atractivos em aplicações como “phototriggers”.

As propriedades espectroscópicas de quatro acetatos de cumarina “caged” confirmam o efeito de halogéneos como substituintes. A presença dos átomos de cloro e de bromo provocam desvios hipsocrómicos no comprimento de onda de absorção máxima de 45 nm (HCM-OAc *versus* Chc-OAc e Bhc-OAc) (Tabela 4) (Furuta, 1999).

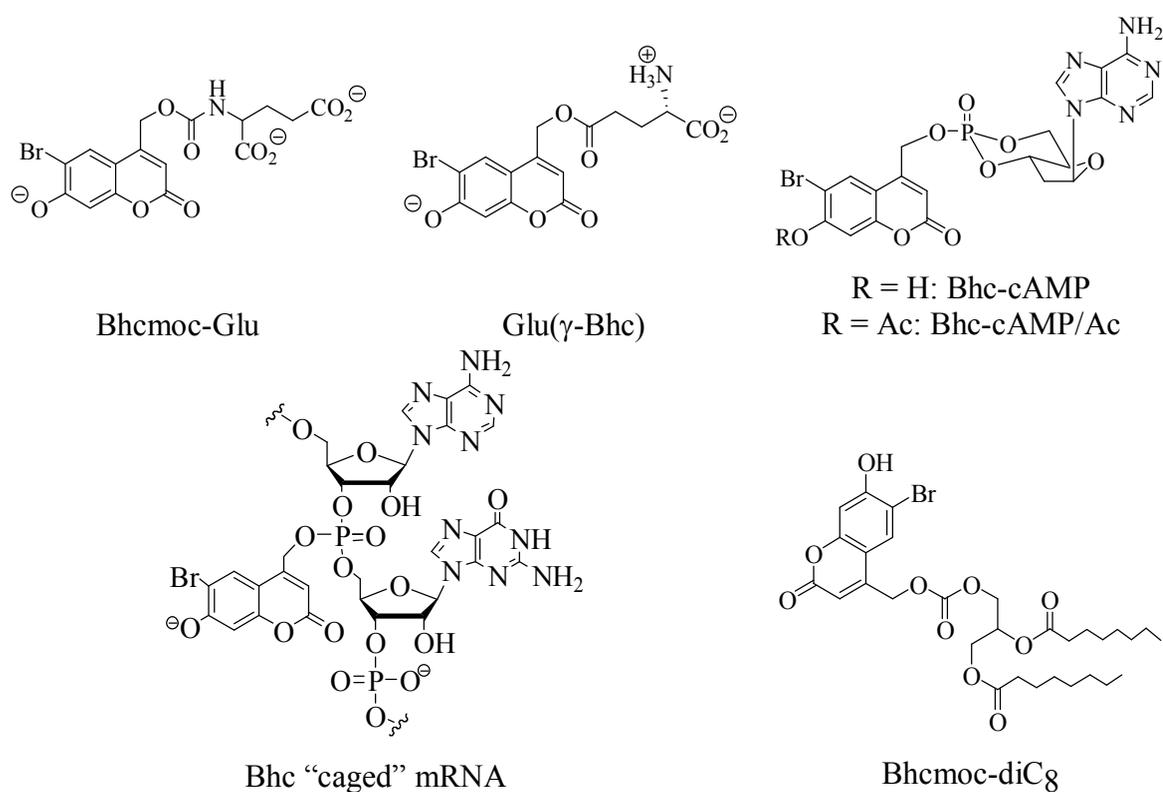
Tabela 4: Propriedades espectroscópicas e fotoquímicas dos acetatos de cumarinas “caged”.

Acetatos “caged”				
	HCM-OAc	Chc-OAc	Bhc-OAc	tBhc-OAc
λ_{\max} (nm)	325	370	370	397
ϵ_{\max} ($M^{-1}cm^{-1}$)	11600	16000	15000	15900
Φ_{350}^a	0,025	0,010	0,037	0,065

a - Rendimento quântico para o desaparecimento do material de partida por irradiação a 350 nm.

Dos derivados de cumarinas destaca-se o grupo Bhc que tem sido usado na preparação de compostos “caged” de carboxilatos (Furuta, 1999), aminas (Furuta, 1999; Montgomery, 2002), fosfatos (Ando, 2001), álcoois (Lin, 2002; Robu, 2003; Suzuki, 2003), fenóis (Suzuki; 2003) e compostos carbonilo (Lu, 2003) (Esquema 34).

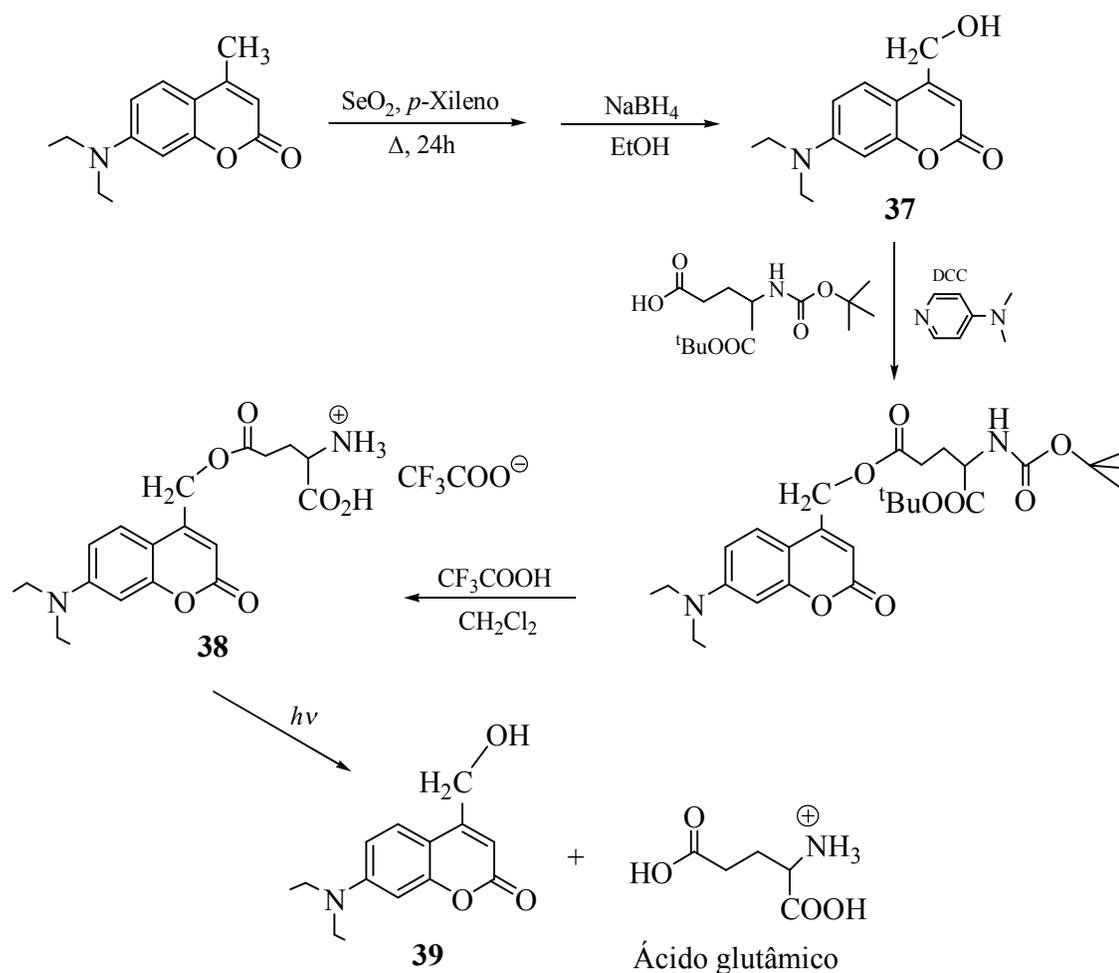
As aplicações destes compostos “caged” surgem ao nível dos neurotransmissores, do RNA e do DNA (Furuta, 2004).



Esquema 34

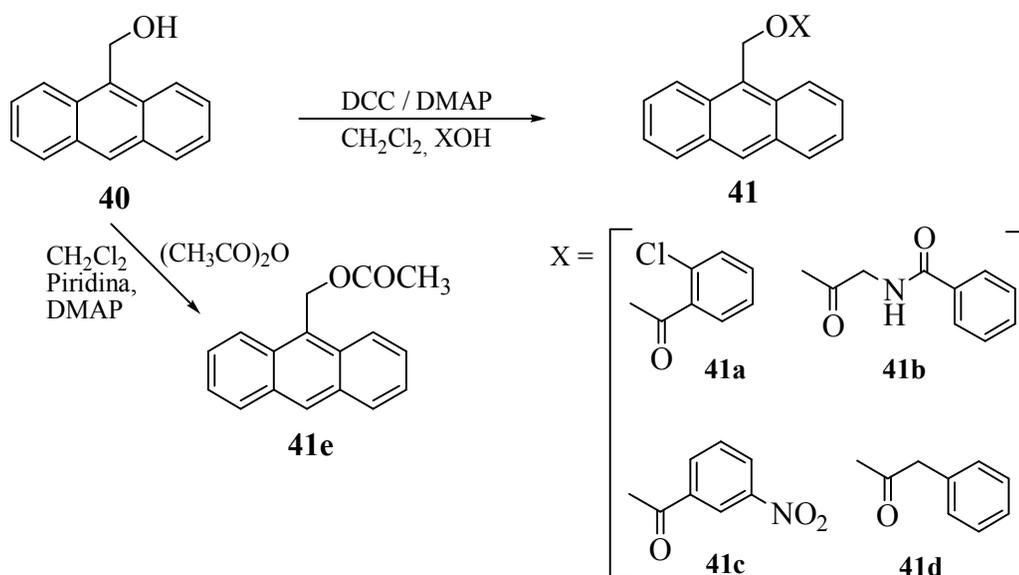
Já em 2005, Shembekar *et al.* (Shembekar, 2005) reportaram a síntese da cumarina **37** e a sua aplicação na protecção do grupo carbonilo γ do ácido glutâmico, que é um neurotransmissor, originando o derivado **38** (Esquema 35).

Este derivado era solúvel em água, estável a pH 7,4 e a 22°C. A sua fotólise na região do visível, em solução aquosa, originou o ácido glutâmico em 3 μ s. O fotoproduto secundário **39** mostrou ser biologicamente inerte.



Esquema 35

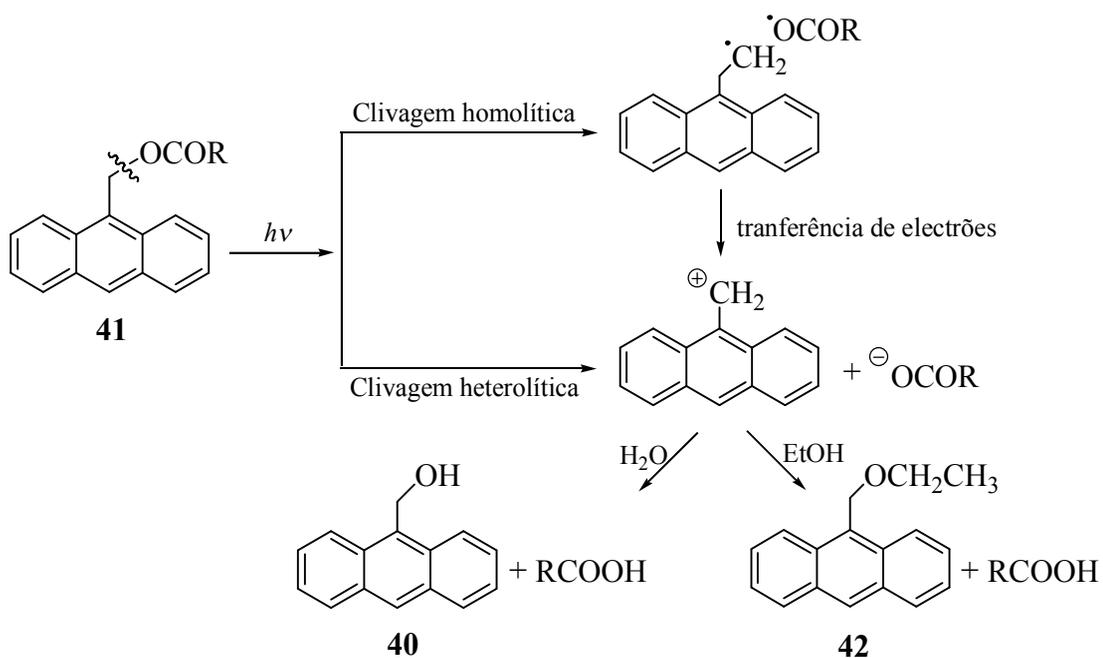
Para além dos derivados de cumarina, compostos aromáticos policíclicos têm sido sugeridos como “phototriggers”. Recentemente, Singh e Khade (Singh, 2005) reportaram o uso do composto **40** na protecção de ácidos carboxílicos (Esquema 36).



Esquema 36

A fotólise dos derivados protegidos em acetonitrilo - água (3:2 v/v) com uma lâmpada de média pressão de mercúrio (filtro de vidro, transmitância a 370 nm (47%) e a 420 nm (96%)), originou os ácidos carboxílicos respectivos em rendimentos de moderados a bons (43 – 100%).

Estudos de fotólise, em etanol, foram também efectuados com o composto **41a** (100%). Com base nesses estudos e nos produtos **40** e **42** da fotólise (HPLC), os autores propuseram o mecanismo provável para o processo fotoquímico (Esquema 37).



Esquema 37

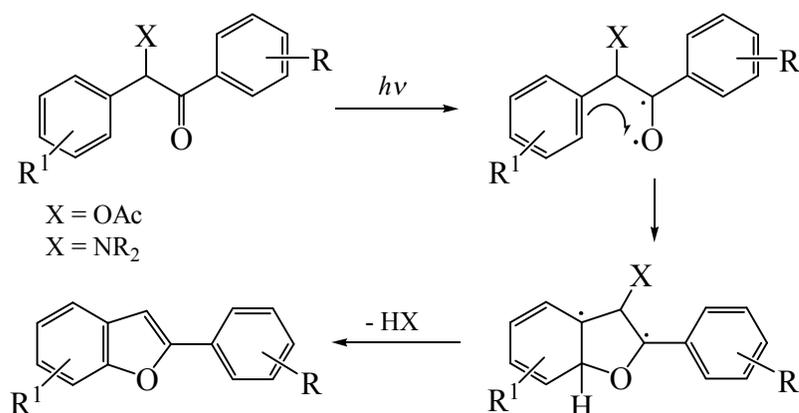
Nesta proposta mecanística são sugeridas ambas as clivagens, homolítica e heterolítica, conduzindo a um par radicalar ou iónico, respectivamente.

4. Derivados de benzoina

A benzoina apresenta propriedades interessantes como grupo protector fotoclivável. As vantagens da utilização deste grupo incluem rendimentos quânticos e de fotoclivagem elevados e a formação de um benzofurano inerte como subproduto.

A absorção mais importante dos derivados de benzoina ocorre a 300 nm (Corrie, 1992; Cameron, 1996) o que facilita a monitorização do avanço da reacção de fotólise por espectroscopia de UV. Por outro lado, esta propriedade pode ser uma desvantagem (possível absorção de luz pelo subproduto). O mesmo pode dizer-se da elevada fluorescência exibida pelo benzofurano (Pirrung, 1994).

A capacidade de ésteres de benzoina originarem o ácido de partida, após fotólise, foi verificada por Sheehan em 1964. O autor verificou que o acetato de benzoina quando irradiado podia ciclizar originando um benzofurano substituído na posição 2 (lâmpada de mercúrio de pressão elevada e filtro de pirex) (Esquema 38) (Sheehan, 1964).



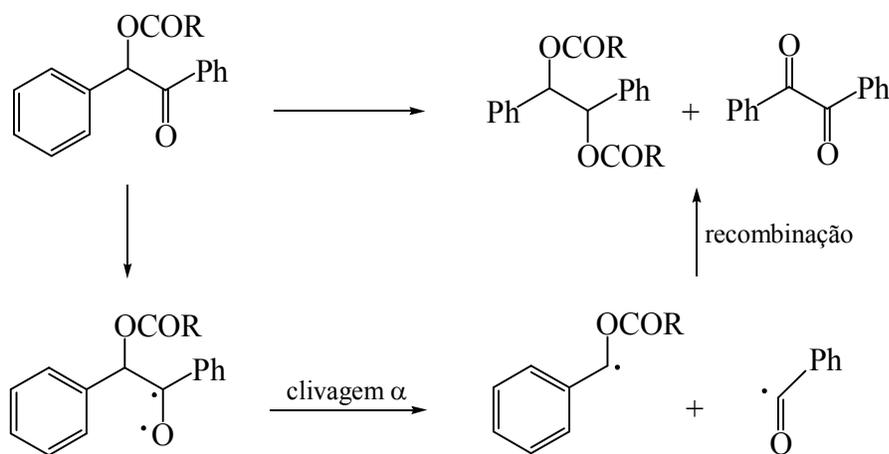
Esquema 38

O rendimento do benzofurano estava dependente não só do solvente (15% em benzeno, 10% em dioxano ou isopropanol), mas também do grupo de saída X (mais de 70% se fosse uma amina). O mecanismo proposto compreendia um processo birradicalar, iniciado por uma transição $n-\pi^*$ do grupo carbonilo.

Mais tarde, Sheehan e Wilson (Sheehan, 1971) reportaram que o acetato de 3',5'-dimetoxibenzoína (3'-5'-DMB) clivava de forma eficiente originando o benzofurano correspondente ($\Phi = 0,64$). Desde essa altura, os investigadores têm tentado outros padrões de substituição de forma a optimizarem os rendimentos quânticos e de produto fotoclivado, os quais são fortemente dependentes do grupo de saída (Corrie, 1992; Cameron, 1996; Pirrung, 1994; Sheehan, 1971; Baldwin, 1990).

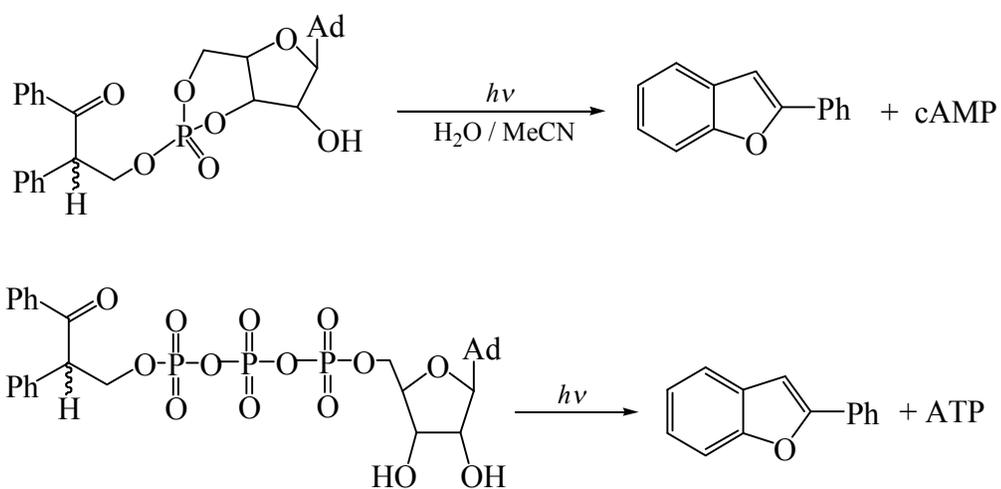
Estudos de “quenching” mostraram que a fotoclivagem dos derivados não substituídos de benzoína e de 3'-metoxibenzoína ocorriam através de um estado de tripleto excitado (Givens, 1992; Gee, 1996).

Outras sugestões mecanísticas foram propostas, algumas vezes em aparente contradição, baseadas em dados experimentais dependentes de factores tais como, os substituintes, o solvente e o grupo de saída. Por exemplo, Lewis (Lewis, 1975), Turro (Turro, 1996) e outros investigadores, mostraram que as benzoínas não substituídas reagem *via* clivagem α do birradical resultante da excitação do carbonilo (Esquema 39).



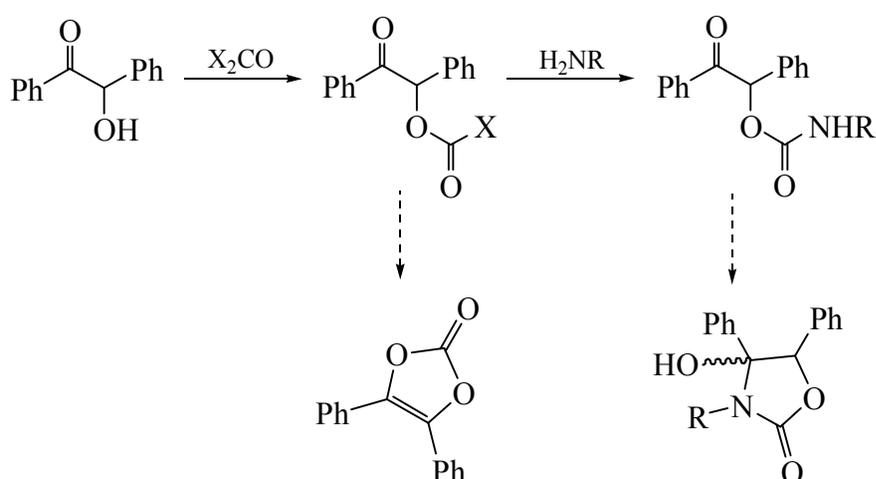
Esquema 39

Baldwin (Baldwin, 1990), Corrie (Corrie, 1992), Pirrung (Pirrung, 1994) e Givens (Givens, 1993, a e b) investigaram extensivamente aplicações destes grupos em fosfatos “caged”. Por exemplo, no Esquema 40 é mostrada a libertação de cAMP e de ATP (Givens, 1996).



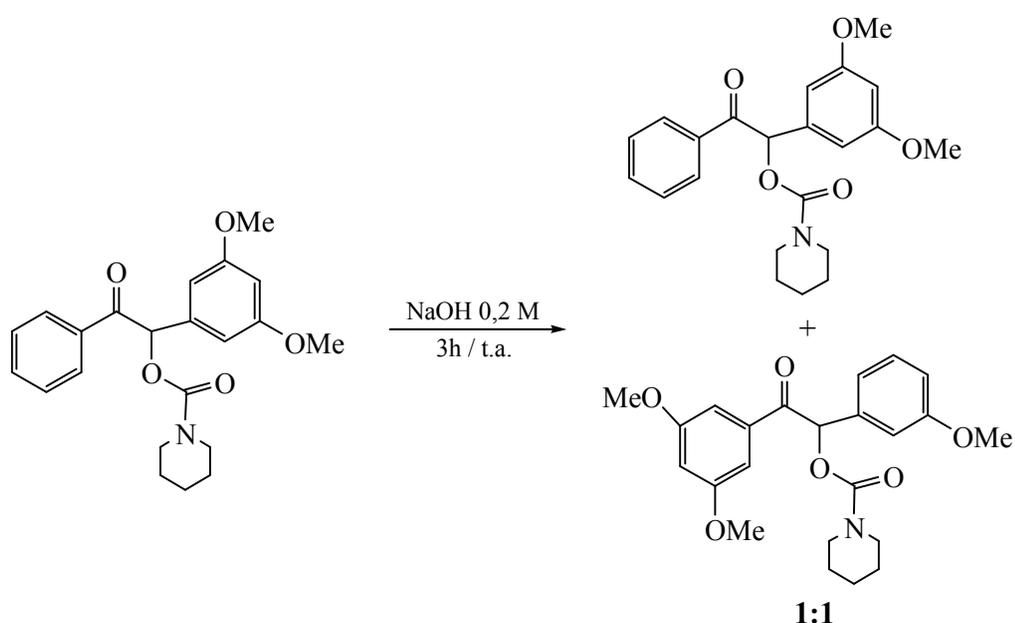
Esquema 40

Por outro lado, a protecção de aminas na forma de carbamatos foi mais problemática, por diversas razões. A primeira foi a dificuldade em preparar os carbamatos; ocorreu ciclização durante ou mesmo depois do passo de acoplamento (Esquema 41) (Cameron, 1997; Pirrung, 1995, b e c).



Esquema 41

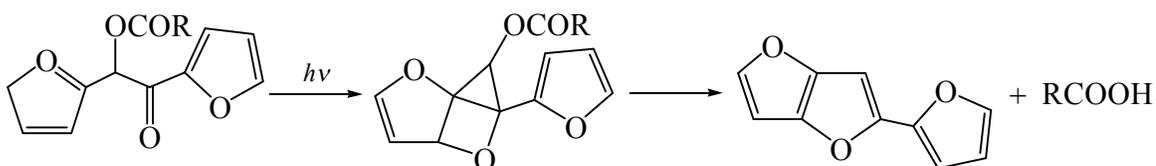
Para além disso, as benzoinas assimétricas apresentaram tendência para a isomerização em meio básico (Esquema 42) (Pirrung, 1995, b; Armesto, 1988; Corrie, 1998; Papageorgiou, 1997).



Esquema 42

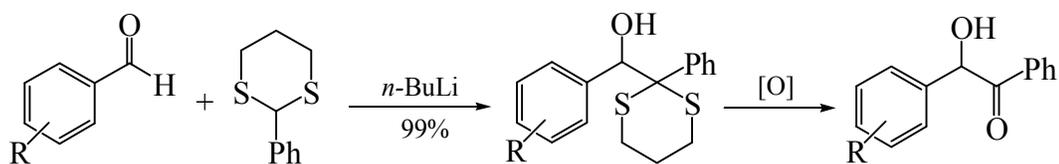
Estes problemas poderiam eventualmente ser ultrapassados (Cameron, 1997; Papageorgiou, 1997; Cameron, 1995). A pior desvantagem para aplicações em neurotransmissores foi a velocidade inevitavelmente lenta da reacção de descarboxilação dos ácidos carbâmicos (muito mais lenta do que a fotólise). Assim, os sistemas que necessitam de uma libertação rápida da amina (geralmente as espécies responsáveis pela resposta biológica) não podem basear-se em carbamatos de benzoina.

Análogos de benzoinas, as furoinas, foram propostas como grupos fotocliváveis (Peach, 1995) (Esquema 43). A fotólise dos ésteres de furoina ocorreu, mas muito mais lentamente do que a de 3',5'-dimetoxibenzoina (de uma ordem de magnitude).



Esquema 43

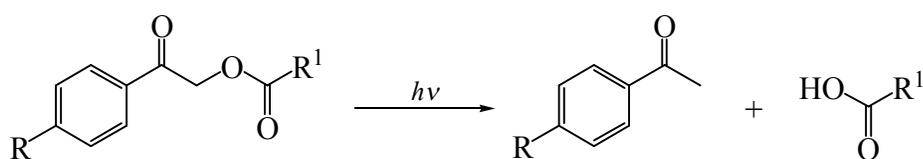
Para além das aplicações de benzoinas, têm sido reportados processos de preparação eficientes de benzoinas não simétricas, em solução e em fase sólida (Esquema 44) (Stowell, 1996; Routledge, 1997).



Esquema 44

5. Ésteres de fenacilo

A irradiação de ésteres de fenacilo conduziu à libertação do ácido de partida (Anderson, 1962; Sheehan, 1973) (Esquema 45).



Esquema 45

O uso de derivados de fenacilo como grupos protectores em síntese orgânica não é muito comum. No entanto, estes compostos, nomeadamente o *p*-hidroxifenacilo (*p*HP), é apresentado como uma alternativa promissora aos derivados do nitrobenzilo na preparação de compostos “caged”.

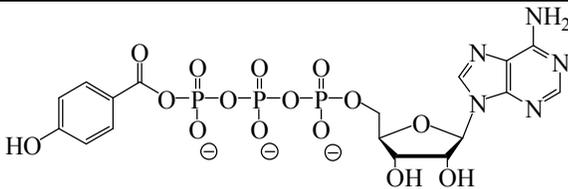
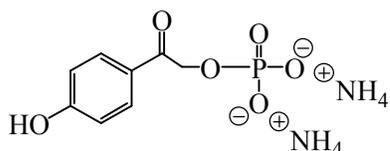
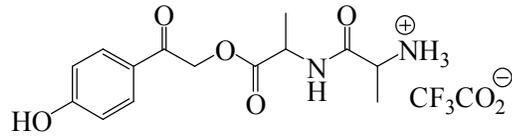
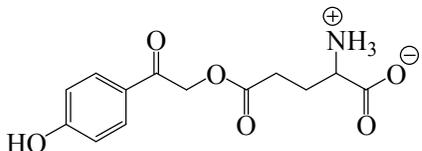
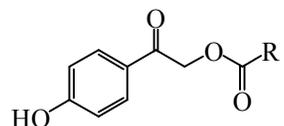
Os ésteres de fenacilo são solúveis em meio aquoso e estáveis em tampões biológicos durante 24h. O produto secundário principal é o ácido *p*-hidroxifenilacético, que também é solúvel em água e não é tóxico, ao contrário dos produtos formados na fotólise de derivados de nitrobenzilo.

A absorção UV do ácido *p*-hidroxifenilacético ocorre a comprimentos de onda superiores aos do precursor. Pela escolha adequada do comprimento de onda de irradiação é possível evitar a interferência do subproduto na absorção da radiação.

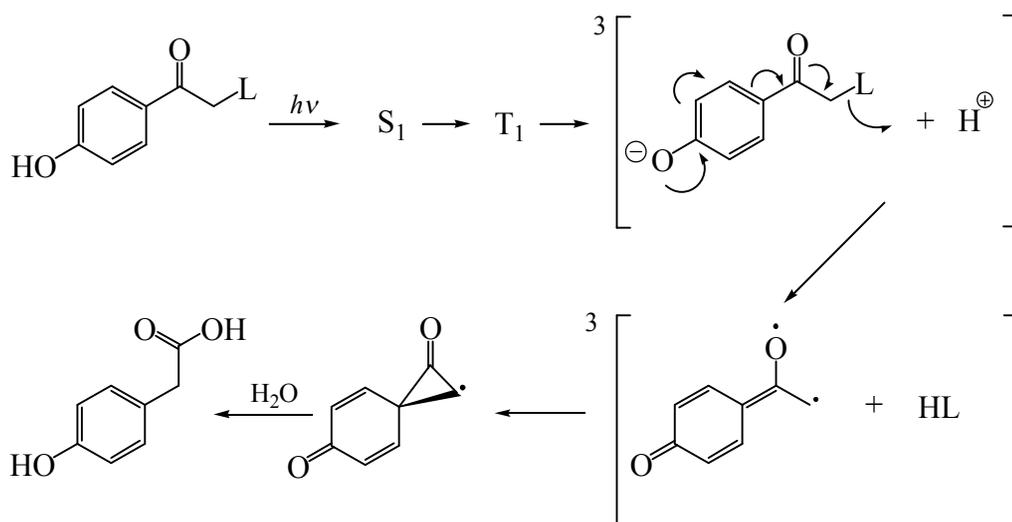
Por outro, ao contrário dos derivados de benzoina, a ligação do grupo *p*HP ao substrato não introduz um centro quiral, eliminando os problemas relacionados com a obtenção de misturas diastereoméricas.

O uso do grupo *p*HP numa grande variedade de moléculas biologicamente activas incluindo o ATP (Givens, 1996), fosfato (Park, 1997), o ácido glutâmico (Givens, 1997), o dipéptido Ala-Ala (Givens, 1997; Givens, 2000) e o péptido bradiquinina (Givens, 2000) foi proposto por Givens e seus colaboradores (Tabela 5).

Tabela 5: Compostos “caged” obtidos a partir do grupo *p*HP.

Compostos “caged”	Substrato	Referência
	ATP	Givens, 1996; Park, 1997
	Fosfato	Park, 1997
	Ala-Ala	Givens, 1997; Givens, 2000
	Glutamato	Givens, 1997
	Bradyquina	Givens, 2000
R = Arg-Phe-Pro-Ser-Phe-Gly-Pro-Pro-Arg-NH ₂		

Estudos mecanísticos da reacção de fotoclivagem têm sido desenvolvidos. No Esquema 46 apresenta-se uma proposta de mecanismo para esse processo (Park, 1997).

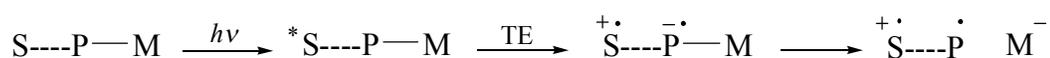


Esquema 46

Atendendo a este mecanismo, a clivagem do ligando L é simultânea ao decaimento do estado de tripleto excitado ($10^8 - 10^9 \text{ s}^{-1}$).

6. Transferência fotoelectrónica

Falvey introduziu uma estratégia interessante baseada na transferência electrónica fotoinduzida (Banerjee, 1997). O sistema consiste num grupo protector P ligado ao substrato M e num sensibilizador S, que pode ser ligado ao grupo protector ou pode simplesmente ser adicionado à solução (Esquema 47).



S = fotossensibilizador
P = grupo protector
M = substrato
TE = transferência electrónica

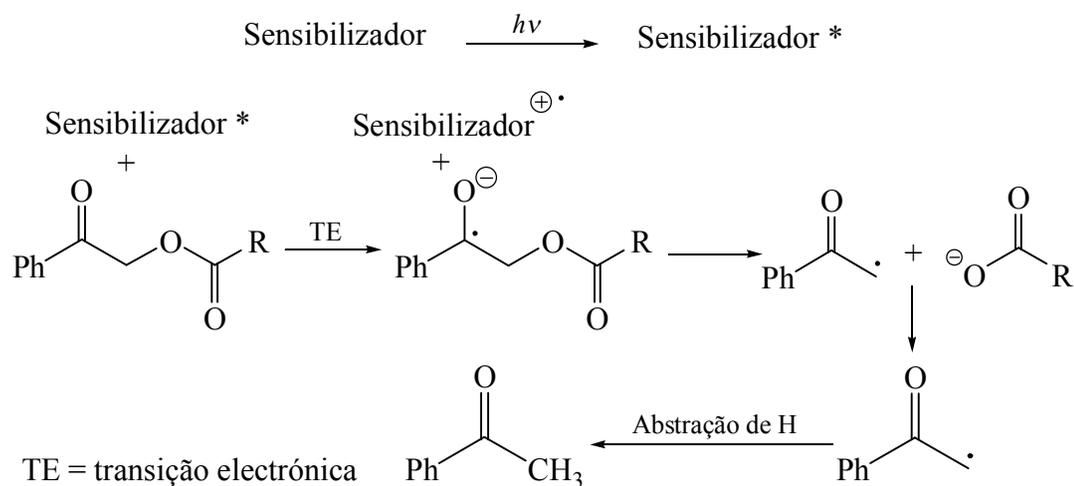
Esquema 47

Por irradiação, S absorve luz e transfere um electrão para a molécula protegida, originando o anião radicalar, $\text{P}^{\cdot-} - \text{M}$, que se dissocia libertando o substrato livre na sua forma aniónica. Para evitar a formação de radicais livres, o sensibilizador deverá ser ligado covalentemente ao grupo protector.

A principal vantagem desta estratégia é a possibilidade de utilização de radiação de comprimento de onda elevado ou mesmo na região do visível por variação apenas do sensibilizador, sem afectar o mecanismo e o rendimento da clivagem.

Um exemplo desta *via* de protecção usa o grupo fenacilo em combinação com vários sensibilizadores tais como, a *N,N*-dimetilanilina, a tetrametilbenzidina ou a tetrametilfenilendiamina (Esquema 48). A fotólise foi efectuada em acetonitrilo, com uma lâmpada de vapor de mercúrio de 150 W.

Vários ácidos carboxílicos aromáticos e alifáticos foram desprotegidos por este método com rendimentos quantitativos. Derivados *N*-Boc dos aminoácidos glicina, fenilalanina, 4-clorofenilalanina e do dipéptido isoleucina-glicina originaram resultados razoáveis.



Esquema 48

A desprotecção de álcoois foi também efectuada a partir de carbonatos de fenacilo (Banerjee, 1999). Neste caso o rendimento quântico da desprotecção foi 5 a 6 vezes inferior ao que foi obtido com os ácidos carboxílicos.

Em todos os casos anteriores os substratos protegidos com fenacilo foram fotolisados em solução (habitualmente de acetonitrilo) na presença de sensibilizadores.

Lee e Falvey (Lee, 2000) descreveram também um sistema no qual o fotossensibilizador e o grupo protector estavam ligados covalentemente. No caso da *N,N*-dimetilanilina obtiveram eficientemente os ácidos carboxílicos. Contudo, o uso do cromóforo antraceno não originou os ácidos correspondentes.

Uma desvantagem deste método relaciona-se com as limitações de substratos. Quando a molécula a ser protegida se reduz mais facilmente que o grupo fenacilo, ocorrem reacções secundárias indesejáveis.

7. Aspectos experimentais

As reacções fotoquímicas são em geral muito fáceis de efectuar em tubos de pirex normais. No entanto, para casos específicos requerendo comprimentos de onda de radiação baixos, é necessário usar tubos de quartzo. Como o oxigénio dissolvido pode actuar como um bom supressor, é recomendável que as misturas reaccionais sejam desarejadas (borbulhar árgon na solução por uns minutos é, na maioria dos casos, suficiente) antes de serem irradiadas.

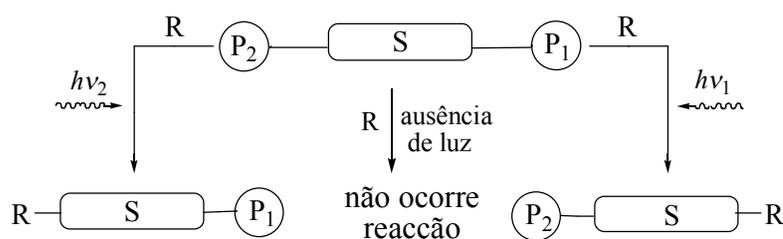
Quanto às formas de radiação, existe uma vasta variedade disponível no mercado, desde o laser, mais caro, aos projectores de slides, mais baratos (Pitsch, 1997). Em muitas aplicações, a fonte de radiação mais simples é uma lâmpada de mercúrio de média ou elevada pressão com um filtro apropriado. Para um controlo mais rigoroso do comprimento de onda da radiação é necessário um sistema equipado com feixes de luz monocromática a 254, 300, 350 ou 419 nm (Bochet, 2001).

8. Perspectivas futuras

Todo o trabalho anteriormente discutido mostra que existe uma grande variedade de grupos protectores fotocliváveis, que podem fornecer uma solução atractiva sempre que a ortogonalidade seja necessária.

No entanto, há um aspecto que só recentemente foi referido (Bochet, 2000). Será possível usar os comprimentos de onda da radiação para explorar o conceito de ortogonalidade dentro do conjunto dos grupos protectores fotocliváveis, e remover selectivamente cada um dos grupos num determinado comprimento de onda?

Com efeito, a possibilidade de clivagem selectiva de grupos protectores fotocliváveis pela escolha adequada do comprimento de onda da radiação (ortogonalidade cromática) (Esquema 49) (Bochet, 2001; Blanc, 2002) apresenta-se como uma estratégia inovadora na protecção de grupos funcionais.



S = substrato;

P_1, P_2 = grupos fotocliváveis a ν_1 e ν_2 ;

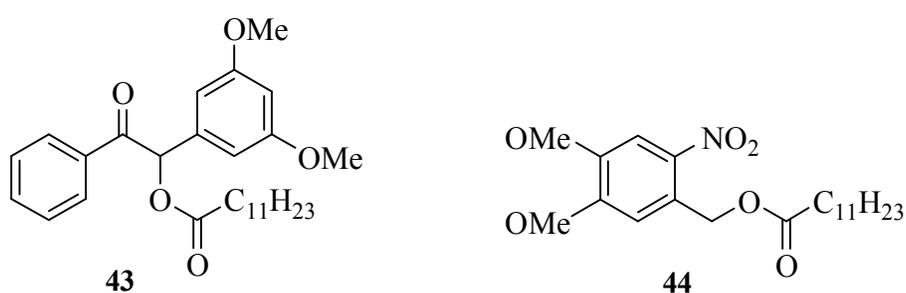
R = espécies reactivas (por exemplo, H).

Esquema 49

Contudo, antes da aplicação desta estratégia é necessário considerar diferentes aspectos:

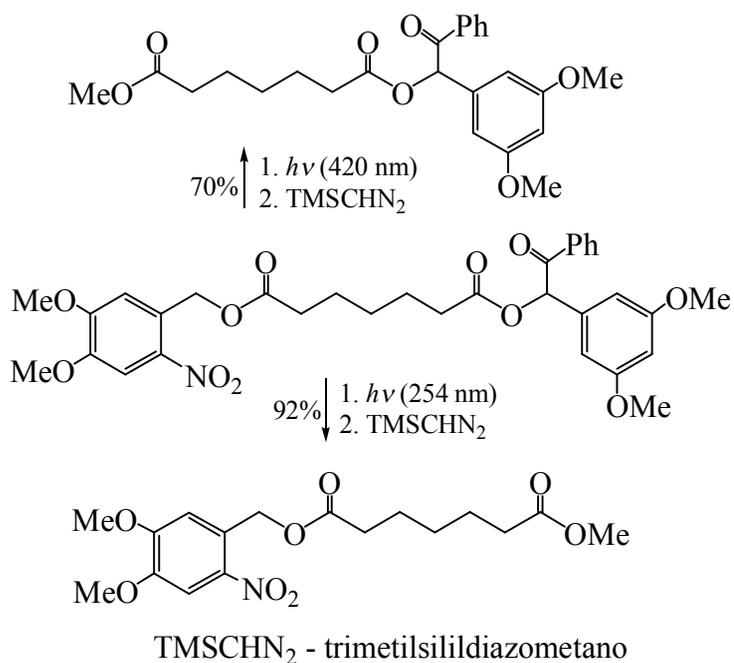
- i) a estabilidade intrínseca de cada grupo protector deverá ser bastante diferente a vários comprimentos de onda;
- ii) a transferência de energia entre um cromóforo excitado e o estado fundamental do vizinho deve ser evitada;
- iii) a clivagem a energia elevada (por exemplo, a $\lambda = 254$ nm) deverá ser muito rápida, para evitar a fotodegradação de outros grupos sensíveis.

Bochet (Bochet, 2001) mostrou que os ésteres 3',5'-dimetoxibenzoína **43** e os derivados de nitrobenzilo **44** (Esquema 50) eram dois bons candidatos para a protecção de moléculas bifuncionais, podendo ser seguida uma estratégia de desprotecção ortogonal cromática.



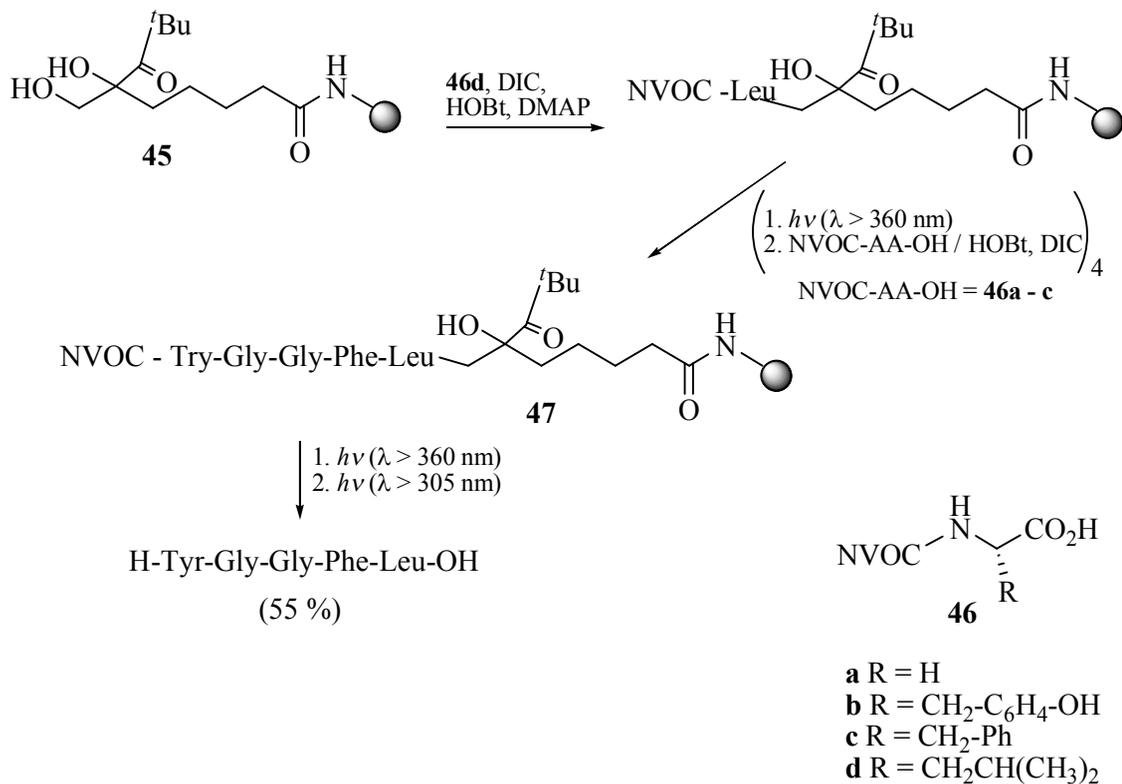
Esquema 50

No Esquema 51 é exemplificada esta nova metodologia.



Esquema 51

Na sequência de estudos preliminares anteriores, Kessler *et al.* (Kessler, 2002) usaram uma estratégia de ortogonalidade cromática em síntese de fase sólida recorrendo a um “linker” de *tert*-butilcetona (**45**) (sensível à irradiação a $\lambda = 305$ nm) e ao grupo NVOC (**46**) (sensível a $\lambda = 360$ nm) (Esquema 52).



Esquema 52

Esta possibilidade abre claramente novas perspectivas em química de protecção de grupos funcionais, em síntese orgânica em fase sólida, na libertação de compostos “caged” além de constituir material científico muito importante.

CAPÍTULO 2

APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

1. Introdução

As aplicações da espectroscopia de fluorescência têm registado, nos últimos anos, um aumento drástico, sendo esta técnica actualmente muito importante em áreas como, a biologia celular, a imunologia, a bioquímica, a biofísica, a microbiologia, a genética e a neurociência (Gatti, 2004; Song, 2004).

Os avanços registados ao nível da instrumentação conjugados com o desenvolvimento de novos ligandos fluorescentes são os responsáveis pela importância desta técnica. A utilização de biomoléculas marcadas com fluoróforos orgânicos (Haugland, 2002) em aplicações analíticas é uma área de investigação interessante. Um péptido ou uma proteína ligados a um sistema fluorescente constituem uma ferramenta importante para o estudo bioquímico e biológico das interações proteína-proteína e ligando receptor, em estudos conformacionais, entre outras aplicações, uma vez que permitem determinações qualitativas e quantitativas através de métodos rápidos e económicos.

Por outro lado, os grupos protectores fotocliváveis são um assunto muito importante em Química Orgânica, uma vez que não é necessário nenhum reagente para a sua clivagem, apenas luz. Esta categoria de grupos protectores permite trabalhar com moléculas extremamente sensíveis, incompatíveis com ácidos ou bases (Capítulo 1). Neste trabalho procurou-se conjugar estes dois aspectos fundamentais. Assim, sintetizaram-se heterociclos fluorescentes funcionalizados com núcleos de nafto[2,1-*b*]furanos e de oxobenzo[*f*]benzopiranos e aplicaram-se na derivatização de aminoácidos nos terminais N, O e C. Atendendo aos bons resultados da síntese e do acoplamento com aminoácidos, e aos aspectos anteriormente referidos, os fluoróforos de 1-

clorometil-3-oxo-3*H*-benzo[*f*]benzopiranos **1a-c** foram também estudados quanto à sua eventual utilização como grupos protectores fotocliváveis fluorescentes.

2. Síntese dos ácidos nafto[2,1-*b*]furan-1-il etanóicos 2a-c e aplicação a aminoácidos

Na marcação fluorescente de biomoléculas por ligação covalente, é essencial no fluoróforo a presença de um grupo funcional adequado, o qual irá reagir com outros grupos funcionais presentes no substrato (Hovius, 2000; Berthelot, 2004).

O objectivo principal no design de marcadores biológicos é a identificação de um sistema que possa oferecer uma emissão intensa e de longa duração, para proporcionar uma detecção altamente sensível, estabilidade elevada e desvios de Stokes largos de forma a minimizar os efeitos de “self-quenching”.

Atendendo ao interesse crescente no desenvolvimento de novos fluoróforos principalmente funcionalizados, decidiu-se iniciar este trabalho com a síntese de novos heterociclos de oxobenzo[*f*]benzopirano e de nafto[2,1-*b*]furano possuindo os grupos clorometilo e ácido carboxílico, respectivamente.

Admitindo a eventual aplicação destes compostos em biomarcação, usaram-se vários aminoácidos como modelo de biomoléculas e investigou-se a sua ligação aos heterociclos referidos.

Estudos de fluorescência de todos os compostos sintetizados foram efectuados e são apresentados nesta dissertação.

Considerando também a possível utilização dos fluoróforos de nafto[2,1-*b*]furano em síntese sequencial de péptidos, decidiu-se avaliar a estabilidade do marcador da função amina, em condições que são usadas habitualmente nas reacções de clivagem química de grupos protectores do terminal carboxilo dos resíduos peptídicos.

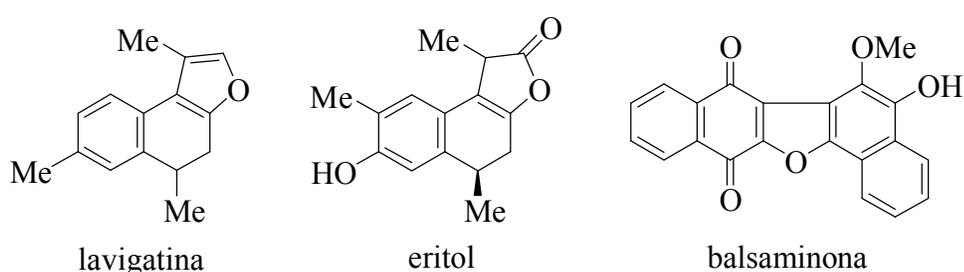
2.1. Importância de benzofuranos e de naftofuranos

Os benzofuranos e os naftofuranos são elementos estruturais chave presentes num número elevado de produtos naturais biologicamente importantes, relacionados

principalmente com as classes de sesquiterpeno e de arilquinona (Jakupovic, 1990; Miles, 1991).

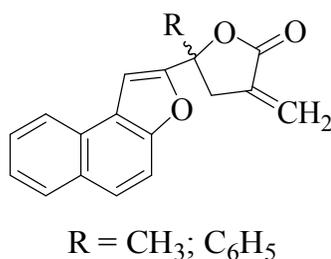
Muitos dos naftofuranos naturais tais como, (\pm) lavigatina (Bohlmann, 1977; Braga de Oliveira, 1978), (+) eritol (Miles, 1987; Zubaidha, 1991; Irie, 1990) e balsaminona (Ishiguro, 1998) possuem propriedades farmacológicas e citotóxicas interessantes (Esquema 1).

Alguns compostos sintéticos possuindo o heterociclo naftofurano estão associados a diversas actividades biológicas tais como, fungicida, bactericida (Einhorn, 1984), antivírica (Giovanninetti, 1974), β -adrenolítica (Gaggi, 1982), antitumoral (Hranjec, 2003) e antielmíntica (Mahadevan, 2001; Mahadevan, 2003).



Esquema 1

Le e Huang (Lee, 2002) prepararam os derivados tricíclicos de nafto[2,1-*b*]furano (Esquema 2) e verificaram que apresentavam perfis de citotoxicidade únicos. Nos casos de leucemia, estes compostos mostraram ter uma especificidade elevada para as células cancerígenas relativamente às células normais.



Esquema 2

Os derivados nitro de nafto[2,1-*b*]furanos têm sido estudados extensivamente devido às suas actividades mutagénicas, por exemplo, o 7-metoxi-2-nitronafto[2,1-*b*]furano é um dos mutagénicos descritos mais fortes para bactérias (Quillardet, 2000;

Hofnung, 2002) e também para células de mamíferos (Arrault, 2002; Quillardet, 2000; Hofnung, 2002).

Estes heterociclos são também mencionados com potenciais aplicações como corantes, sondas fluorescentes e como fotossensibilizadores (Abdul-Aziz, 1995; Frederiksen, 2001; Poulsen, 2001).

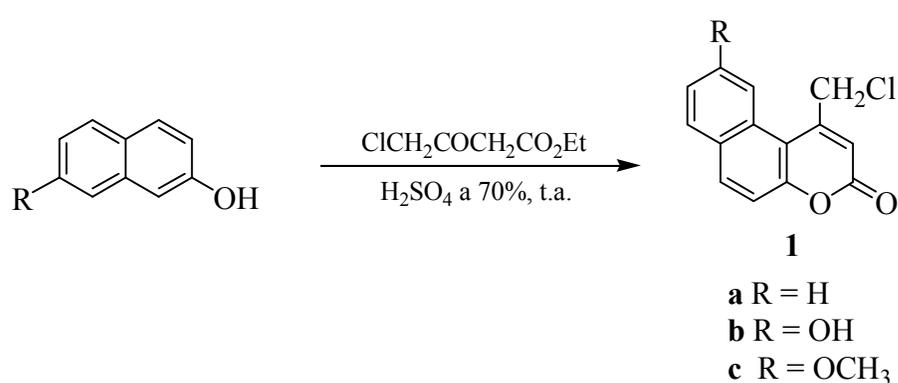
No entanto, apesar da sua importância, muito pouco tem sido referido acerca das propriedades fluorescentes e da sua aplicação como marcadores fluorescentes.

O interesse destes heterociclos, principalmente ao nível farmacológico, referido anteriormente, tem levado químicos orgânicos e medicinais ao desenvolvimento de vias de síntese cada vez mais eficientes para a obtenção de compostos de nafto[2,1-*b*]furano (Goel, 2004; Park, 2005).

De entre as inúmeras metodologias de síntese de naftofuranos que têm sido descritas na literatura, nos últimos anos, neste trabalho decidiu-se preparar o precursor correspondente, o oxobenzo[*f*]benzopirano através da reacção de Pechmann e efectuar posteriormente a sua conversão no nafto[2,1-*b*]furano pretendido por contracção do anel em meio alcalino (Furuta, 1999).

2.2. Síntese dos ácidos nafto[2,1-*b*]furan-1-il etanóicos 2a-c

O processo de síntese dos heterociclos iniciou-se pela preparação dos 1-clorometil-3-oxo-3*H*-benzo[*f*]benzopiranos **1a-c** por reacção entre o 2-naftol correspondente e o 4-cloroacetoacetato de etilo, em meio ácido (solução aquosa de H₂SO₄ a 70%), à temperatura ambiente (Esquema 3).



Esquema 3

Após purificação por cromatografia “seca”, em sílica gel, seguida de recristalização (**1a** e **1c**), obtiveram-se os oxobenzo[*f*]benzopiranos **1a-c** na forma de sólidos com rendimentos entre 71 e 92% (Tabela 1).

Os compostos **1a-c** foram caracterizados por espectroscopia de IV e de RMN (^1H e ^{13}C), análise elementar (**1c**) ou espectrometria de massa de alta resolução (**1a,b**).

Nos espectros de infravermelho dos compostos **1a-c** observaram-se bandas de absorção na zona entre 1739 e 1624 cm^{-1} correspondentes às vibrações de alongamento do grupo carbonilo do heterociclo.

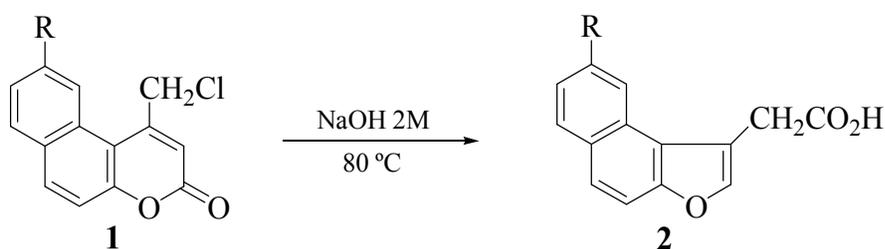
Os espectros de RMN de ^1H mostraram além dos sinais esperados para os prótons do anel de naftaleno, os singletos correspondentes ao próton 2 (H-2) do anel de piranona (δ entre 6,62 e 6,76 ppm) e aos prótons do grupo clorometilo (δ entre 4,98 e 5,30 ppm).

Nos espectros de ^{13}C dos compostos **1a-c** destacam-se os sinais típicos do anel de piranona, ou seja, C-1 (δ de 150,96 a 152,27 ppm), C-2 (δ de 115,77 a 117,37 ppm) e C-3 (C=O) (δ de 159,38 a 159,99 ppm), e também o sinal correspondente ao grupo clorometilo (δ de 45,60 a 46,17 ppm).

Tabela 1: Síntese dos compostos **1a-c** e **2a-c**.

Composto		Rendimento (%)	p.f. (°C)
1a	Obb - Cl	71	179,5-182,7
1b	Obh - Cl	92	250,0-250,7
1c	Obm - Cl	83	179,2-180,7
2a	Nfu - OH	94	171,4-173,0
2b	Nfh - OH	96	167,8-169,0
2c	Nfm - OH	98	176,8-178,9

Por aquecimento (80 °C) dos oxobenzo[*f*]benzopiranos **1a-c** numa solução aquosa de hidróxido de sódio 2M (18 horas) obtiveram-se os ácidos nafto[2,1-*b*]furan-1-il etanóicos **2a-c** com rendimentos entre 94 e 98%. (Esquema 4, Tabela 1).



Esquema 4

Os espectros de IV dos compostos **2a-c** mostraram as bandas de absorção correspondentes às vibrações de alongamento dos grupos hidroxilo entre 3550 e 3103 cm^{-1} e carbonilo entre 1703 e 1715 cm^{-1} .

Nos espectros de RMN de próton destacam-se os sinais típicos do próton 2 (H-2) do anel de furano, singletos entre 7,91 e 8,01 ppm e do próton do grupo carboxilo, singletos alargados, a valores de δ elevados (12,40 a 12,60 ppm).

Os espectros de RMN de ^{13}C permitem confirmar a transformação ocorrida no anel heterocíclico, surgindo os sinais correspondentes aos carbonos 1 e 2 (C-1 e C-2) a δ entre 115,62 e 115,94 ppm e δ entre 142,79 e 143,64 ppm, respectivamente. Salienta-se o facto do sinal devido ao C-3 nos compostos **1a-c** que surgia entre 159,38 e 159,99 ppm não estar presente nos heterociclos **2a-c**, tal como era esperado. A presença do grupo carbonilo é também confirmada pelos sinais característicos entre 172,13 e 172,62 ppm.

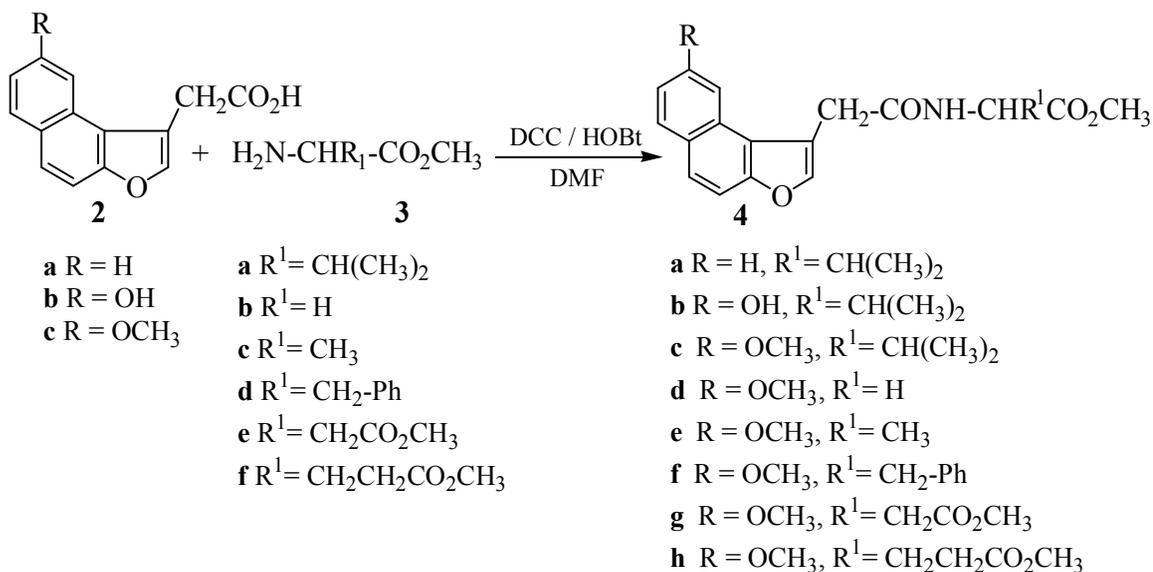
2.3. Derivatização de aminoácidos nos *N*- e *O*- terminus com os ácidos **2a-c**

Com o objectivo de investigar a possibilidade de marcação de biomoléculas com os derivados de nafto[2,1-*b*]furanos **2a-c** sintetizados, decidiu-se estudar a ligação covalente entre esses compostos e alguns L-aminoácidos naturais.

Assim, escolheu-se o cloridrato do éster metílico da L-valina como modelo para efectuar a ligação dos heterociclos carboxílicos **2a-c** ao grupo amina de aminoácidos α e comparar a influência dos substituintes do nafto[2,1-*b*]furano nos valores dos comprimentos de onda de absorção e de emissão máximas dos derivados marcados.

Com efeito, efectuou-se a derivatização do cloridrato do éster metílico da valina **3a** com os compostos **2a-c**, seguindo um método de acoplamento mediado por DCC

com HOBt como aditivo, à temperatura ambiente, e usando como solvente DMF (Esquema 5). Após purificação por cromatografia “seca” em sílica gel, obteve-se o éster da valina correspondente, Nfu-, Nfh- e Nfm-Val-OMe **4a-c** na forma de um sólido, com rendimentos entre 57 e 89% (Tabela 2).



Esquema 5

Por comparação dos rendimentos das reacções de acoplamento (Tabela 2) e principalmente dos resultados de fluorescência, que posteriormente serão mencionados, obtidos nos três derivados sintetizados **4a-c**, decidiu-se usar o composto **2c** nas reacções seguintes.

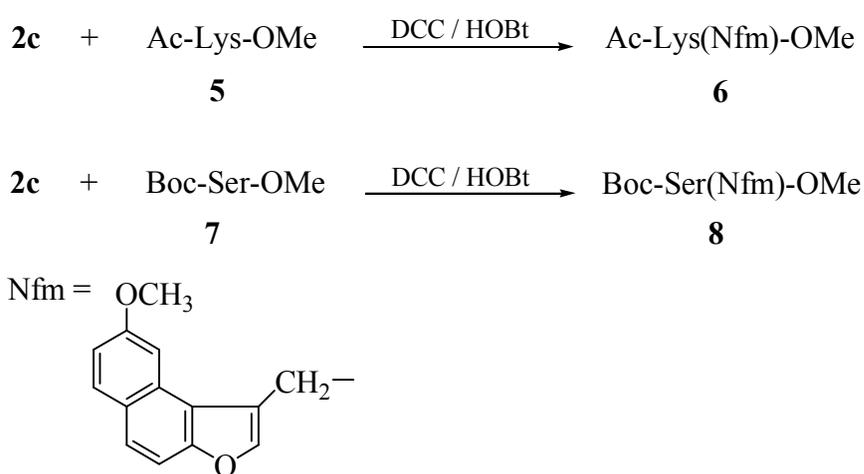
Tabela 2: Síntese dos compostos **4**, **6** e **8**.

Composto	Rendimento (%)	p.f. (°C)
4a Nfu - Val - OMe	83	141,5-143,0
4b Nfh - Val - OMe	57	145,3-145,9
4c Nfm - Val - OMe	89	159,0-161,0
4d Nfm - Gly - OMe	95	171,9-174,0
4e Nfm - Ala - OMe	90	190,1-192,0
4f Nfm - Phe - OMe	72	146,3-148,4
4g Nfm - Asp(OMe) - OMe	98	136,8-137,7
4h Nfm - Glu(OMe) - OMe	98	166,3-169,0
6 Ac - Lys(Nfm) - OMe	71	185,7-186,9
8 Boc - Ser(Nfm) - OMe	54	Óleo

Na tentativa de alargar este estudo à marcação do *N*-terminus dos principais aminoácidos naturais, usaram-se outros aminoácidos representativos. Assim, seguiu-se o método anteriormente referido, usando os cloridratos dos ésteres dos aminoácidos glicina (**3b**), alanina (**3c**), fenilalanina (**3d**), ácido aspártico (**3e**) e ácido glutâmico (**3f**).

Os derivados fluorescentes dos aminoácidos **4d-h** foram isolados como sólidos com rendimentos entre 72 e 98% (Tabela 2).

Para além da derivatização de aminoácidos no terminal *N*, foi estudada também a marcação alternativa no grupo amina ϵ da lisina. Deste modo, o éster metílico da *N*-acetil-L-lisina **5** foi acoplado (DCC/ HOBt) com o composto **2c**, e obteve-se o produto **6** como um sólido branco com um rendimento de 71% (Esquema 6, Tabela 2).



Esquema 6

Outra forma de marcação na cadeia lateral foi conseguida por reacção entre o éster metílico da *tert*-butiloxicarbonil-L-serina **7** com o heterociclo **2c** originando o éster fluorescente correspondente **8** em 54% (Esquema 6, Tabela 2).

Com efeito, foi possível obter derivados fluorescentes de aminoácidos α apolares alifáticos (valina e alanina), apolares aromáticos (fenilalanina), polares neutros (glicina e serina), ácidos (ácido aspártico e ácido glutâmico) e básicos (lisina), marcados nas cadeias principal e lateral através das funções amina e hidroxilo *via* ligação amida e éster, respectivamente,

Os compostos **4a-h**, **6** e **8** foram caracterizados por espectroscopia de IV e de RMN (^1H e ^{13}C), análise elementar ou espectrometria de massa de alta resolução.

Nos espectros de IV destes compostos surgiram as bandas de absorção correspondentes às vibrações de alongamento do grupo carbonilo das ligações amida entre 1658 e 1628 cm^{-1} e éster entre 1761 e 1707 cm^{-1} .

Os espectros de RMN de próton apresentaram para além dos sinais dos prótons do anel heterocíclico, os sinais correspondentes aos resíduos de aminoácidos, destacando-se os prótons do éster metílico, que surgiram na forma de um singleto (δ entre 3,45 e 3,94 ppm), do próton do α -CH que surgiu como um multiplete (δ entre 4,35 e 4,87 ppm) ou como um duplete a 3,97 ppm (**4d**) e do próton α -NH que surgiu na forma de um duplete (δ entre 5,18 e 6,69 ppm).

Nos espectros de RMN de ^{13}C salientam-se os sinais correspondentes ao grupo carbonilo, tipo amida a δ entre 169,70 e 171,01 ppm e tipo éster a δ entre 170,50 e 172,86 ppm.

Para facilitar a interpretação dos espectros de RMN recorreu-se às técnicas de dupla ressonância (^1H), de HMQC e de HMBC (^{13}C).

2.4. Estudos de absorção e de fluorescência

Os estudos de UV e de fluorescência dos compostos **1**, **2**, **4**, **6** e **8** foram efectuados usando soluções de concentração 10^{-5} a 10^{-6} M em etanol absoluto desarejado. Os comprimentos de onda de absorção e de emissão máximas, assim como os rendimentos quânticos de fluorescência foram obtidos para estes compostos e são apresentados na Tabela 3.

Os valores dos rendimentos quânticos de fluorescência foram calculados usando o 9,10-difenilantraceno como padrão ($\Phi = 0,95$, em etanol), tendo sido excitado aos comprimentos de onda de excitação máxima dos diferentes compostos testados (Morris, 1976).

Os compostos **1** e **2** apresentaram rendimentos quânticos de fluorescência de baixos a moderados (**2c**, $\Phi = 0,20$), na sua forma isolada. A interpretação dos valores obtidos (Tabela 3) permite dizer que o efeito electrodador do substituinte no núcleo de oxobenzo[*f*]benzopirano (**1a-c**) está relacionado com um desvio de Stokes elevado. Contudo, esta observação não se aplica aos nafto[2,1-*b*]furanos **2a-c**, uma vez que os

seus valores não variaram significativamente. Após reacção do heterociclo **2a-c** com os aminoácidos, a fluorescência aumentou, tal como se verifica nos derivados **4a-h**, **6** e **8**.

Por comparação dos rendimentos quânticos de fluorescência dos compostos **4a-c**, verifica-se que o melhor resultado foi obtido para o derivado 9-metoxilo (**4c**).

Com efeito, os aminoácidos marcados **4a-h**, **6** e **8** exibem rendimentos quânticos de fluorescência de moderados a bons ($0,10 < \Phi < 0,44$) e desvios de Stokes moderados (33 a 51 nm).

Tabela 3: Dados de UV e de fluorescência dos compostos **1**, **2**, **4**, **6** e **8**.

Composto		UV λ_{\max} (nm)	Fluorescência		Desvio de Stokes (nm)
			λ_{em} (nm)	Φ	
1a	Obb - Cl	352	418	0,08	66
1b	Obh - Cl	361	462	0,02	101
1c	Obm - Cl	354	472	0,03	118
2a	Nfu - OH	293	340	0,07	47
2b	Nfh - OH	301	349	0,06	48
2c	Nfm - OH	298	349	0,20	51
4a	Nfu - Val - OMe	292	325	0,13	33
4b	Nfh - Val - OMe	300	350	0,10	50
4c	Nfm - Val - OMe	298	346	0,37	49
4d	Nfm - Gly - OMe	297	343	0,24	46
4e	Nfm - Ala - OMe	298	349	0,24	49
4f	Nfm - Phe - OMe	298	349	0,32	52
4g	Nfm - Asp(OMe) - OMe	298	346	0,14	48
4h	Nfm - Glu(OMe) - OMe	298	347	0,14	49
6	Ac - Lys(Nfm) - OMe	297	347	0,44	50
8	Boc - Ser(Nfm) - OMe	298	349	0,13	51

Na Figura 1, mostram-se os espectros de fluorescência do nafto[2,1-*b*]furano **2c** e dos derivados fluorescentes obtidos com os aminoácidos alanina (**4e**), lisina (**6**) e serina (**8**).

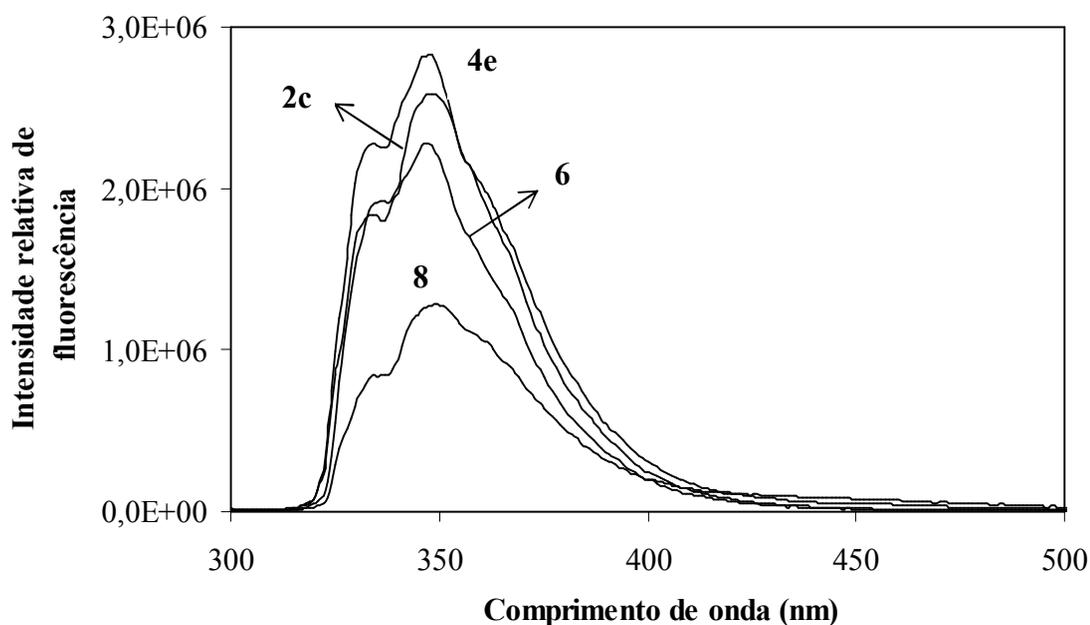


Figura 1: Espectros de fluorescência dos compostos **2c**, **4e**, **6** e **8**.

2.5. Estudos de estabilidade química do sistema fluorescente

Considerando a eventual utilização dos compostos **2a-c** como marcadores em síntese peptídica, investigou-se a estabilidade do fluoróforo a condições que são habitualmente usadas na clivagem química de grupos protectores da função carboxilo. Assim, o Nfm-Phe-OMe (**4f**) foi submetido a condições de hidrogenação catalítica (PdC e 1,4-cicloexadieno) (Jackson, 1976), acidólise (TFA e HCl 6M, à temperatura ambiente) (Bodansky, 1984), aminólise (*N,N*-dietilaminoetilamina - DEAEA) (Grehn, 1987) e redução com metais (Mg/ MeOH) (Maia, 2001).

Os resultados obtidos mostram que nas condições experimentais testadas, o composto **4f** é estável, tendo sido recuperado com rendimentos entre 95 a 100% (PdC, TFA, HCl, e Mg) e 85% (DEAEA), tal como foi confirmado por RMN de próton.

Foi também efectuado o tratamento com base (NaOH 1M) tendo sido isolado o composto **9** resultante da hidrólise quantitativa do éster metílico, não tendo sido afectado o fluoróforo.

3. Aplicação de 1-clorometil-3-oxo-3*H*-benzo[*f*]benzopiranos 1a-c a aminoácidos

3.1. Introdução

A marcação fluorescente permite a detecção rápida e eficiente das moléculas ligadas a fluoróforos, de forma qualitativa e quantitativa com sensibilidade e selectividade elevadas, sendo a sua aplicação amplamente reportada em diversas áreas, incluindo a síntese peptídica.

Sendo o objectivo final deste trabalho o desenvolvimento de grupos protectores fotocliváveis fluorescentes e atendendo ao estudo de marcação fluorescente anteriormente referido, decidiu-se usar os 1-clorometil-3-oxo-3*H*-benzo[*f*]benzopiranos (**1a-c**) na derivatização de L-aminoácidos *via* ligação éster.

Estudos das propriedades de absorvância e de fluorescência dos derivados marcados dos aminoácidos foram efectuados e serão discutidos.

Foi avaliada a estabilidade e a remoção do marcador fluorescente do *C*-terminus dos aminoácidos, em condições usadas habitualmente na clivagem química de grupos protectores do grupo carboxilo em síntese peptídica.

Usando os derivados fluorescentes de *N-p*-toluenossulfonilo e de *N*-benziloxicarbonilo da fenilalanina, Tos-Phe-Obm (**11g**), Z-Phe-Obb (**11a**) e Z-Phe-Obh (**11b**), investigou-se o comportamento deste sistema a condições de fotoclivagem.

3.2. Derivatização de aminoácidos no *C-terminus* com os cloretos de metilo 1a-c

As α -benzopiranonas, habitualmente designadas por cumarinas, representam uma das classes de compostos orgânicos fluorescentes mais extensivamente investigados e comercialmente significativos.

Por outro lado, os núcleos de α -benzopiranonas são a unidade estrutural de um elevado número de produtos naturais (Murray, 1991) apresentando muitos deles níveis de actividade biológica elevados.

Estes heterociclos de oxigénio são também usados como aditivos na alimentação, cosméticos, branqueadores ópticos (Siegrist, 1987), corantes fluorescentes dispersos

(para o tingimento de fibras sintéticas) e em pigmentos fluorescentes sendo, em parte, responsáveis pelo brilho nítido de uma gama elevada de tintas (Valizadeh, 2005; Christie, 1999).

Exemplos da importância biológica e medicinal de α -benzopiranoas (Shobini, 2001; Madhavan, 2003), incluem as capacidades de inibição da agregação das plaquetas (Mitra, 1998; Cravotto, 2001), as actividades antibactericida (Kayser, 1997), anticancerígena (Wang, 2002), e também a inibição da protease do VIH-1 (Kirkiacharian, 2002). Além disso, as técnicas analíticas envolvendo o uso de derivados fluorescentes de α -benzopiranoas são “ferramentas” importantes na pesquisa de novos compostos biologicamente activos e no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico.

As propriedades das α -benzopiranoas tornam estas moléculas muito interessantes, pelo que os químicos orgânicos têm desenvolvido diferentes estratégias de síntese. Estes heterociclos podem ser sintetizados pelas reacções de Perkin, Pechmann, Knoevenagel, Reformatsky e Wittig (Valizadeh, 2005).

A reacção de Pechmann tem sido o método mais usado uma vez que ocorre a partir de reagentes muito simples e origina bons rendimentos na preparação de uma gama elevada de cumarinas substituídas.

Com efeito, atendendo apenas aos últimos dois anos, têm sido reportadas sínteses *via* condensação de Pechmann, substituindo a catálise ácida convencional por diferentes catalisadores tais como, TiCl_4 (Valizadeh, 2005), heteropoliácidos (Romanelli, 2004), ZrCl_4 (Sharma, 2005), resinas de troca iónica (Sabou, 2005) e líquidos iónicos (Potdar, 2005; Singh, 2005).

Nos últimos anos, o uso de α -benzopiranoas como marcadores fluorescentes numa variedade alargada de compostos, tem sido reportado (Gikas, 2003; Ammar, 2003; Sastri, 2001). Contudo, o uso de oxobenzo[*f*]benzopiranos tem sido muito menos estudado.

Neste trabalho, a síntese dos 1-clorometil-3-oxo-3*H*-benzo[*f*]benzopiranos **1a-c**, foi efectuada pela reacção de Pechman, tal como foi referido anteriormente (2.2).

Na sequência do trabalho realizado com os ácidos nafto[2,1-*b*]furan-1-il etanóicos **2a-c**, decidiu-se iniciar este estudo investigando a possibilidade de utilização dos

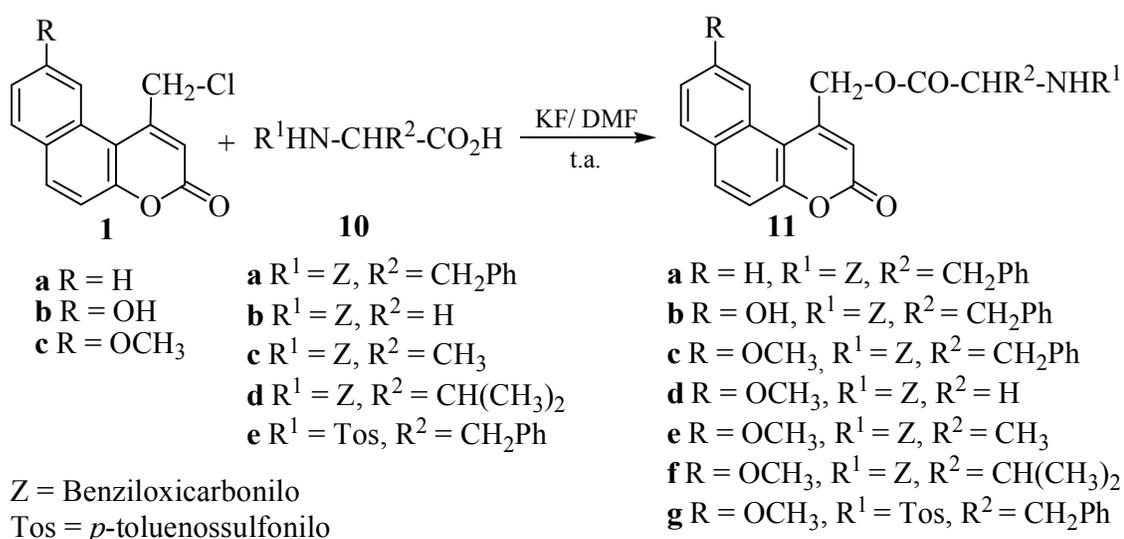
oxobenzofenilbenzopiranos **1a-c** na biomarcação. Deste modo, efectuou-se a ligação covalente entre os compostos **1a-c** e alguns L-aminoácidos naturais.

A *N*-benziloxycarbonil-L-fenilalanina, Z-Phe-OH (**10a**) foi usada como modelo para estudar a ligação dos heterociclos **1a-c** à função ácido carboxílico dos aminoácidos α através da ligação éster e comparar a influência dos substituintes do oxobenzofenilbenzopirano nas propriedades de absorção e de emissão dos derivados obtidos.

A derivatização do Z-Phe-OH (**10a**) com os fluoróforos **1a-c**, foi mediada por fluoreto de potássio, em DMF, à temperatura ambiente (Esquema 7).

Após purificação por cromatografia “seca” em sílica gel, seguida de recristalização (**11a**), obtiveram-se os derivados fluorescentes da fenilalanina **11a-c** como sólidos com rendimentos entre 71 a 96% (Tabela 4).

O composto **1c** foi usado posteriormente na marcação da função ácido carboxílico de outros aminoácidos naturais. Deste modo, seguiu-se o método anteriormente referido (KF/ t.a.), usando o derivado *N*-benziloxycarbonilo dos aminoácidos glicina (**10b**), alanina (**10c**) e valina (**10d**). Partindo da *N*-*p*-toluenossulfonilfenilalanina (**10e**) e usando o mesmo heterociclo, sintetizou-se também o composto **11g** que foi usado como modelo nos estudos de fotoclivagem.



Esquema 7

Os derivados fluorescentes **11a-g** foram isolados como sólidos com rendimentos de bons a excelentes (71 - 96%, Tabela 4) e foram caracterizados por espectroscopia de IV e de RMN (^1H e ^{13}C), análise elementar ou espectrometria de massa de alta resolução.

Tabela 4: Síntese dos compostos **11a-g**.

Composto	Rendimento (%)	p.f. (°C)
11a Z - Phe - Obb	96	127,8-129,8
11b Z - Phe - Obh	81	189,6-190,7
11c Z - Phe - Obm	71	180,8-182,1
11d Z - Gly - Obm	86	181,6-184,0
11e Z - Ala - Obm	83	132,8-134,0
11f Z - Val - Obm	94	122,6-124,0
11g Tos - Phe - Obm	82	184,8-186,6

Nos espectros de IV dos compostos **11a-g**, surgiram as bandas de absorção de alongamento dos grupos carbonilo entre 1757 e 1619 cm^{-1} .

Os espectros de RMN de ^1H apresentavam os sinais esperados para os prótons do fluoróforo e dos resíduos de aminoácidos, destacando-se os prótons do $\alpha\text{-CH}$ que surgiram como multipletos (δ entre 4,29 e 4,82 ppm) ou como um duplete a 4,18 ppm (**11d**).

Nos espectros de RMN de ^{13}C destacam-se os sinais correspondentes ao grupo carbonilo, CONH (δ entre 155,58 e 156,9 ppm), C-3 do heterociclo (δ entre 159,84 e 160,1 ppm) e O-CO da ligação éster entre o heterociclo e os aminoácidos (δ entre 169,4 e 172,31 ppm).

A interpretação dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foi confirmada pelas técnicas de dupla ressonância, de HMQC e de HMBC.

3.3. Estudos de absorção e de fluorescência

Os estudos de UV e de fluorescência dos compostos **11a-g** foram efectuados usando soluções de concentração 10^{-5} a 10^{-6} M em etanol absoluto desarejado. Os

comprimentos de onda de absorção e de emissão máximas, assim como os rendimentos quânticos de fluorescência foram obtidos e são apresentados na Tabela 5.

Os rendimentos quânticos de fluorescência foram calculados usando o 9,10-difenilantraceno como padrão ($\Phi = 0,95$, em etanol), tendo sido excitado nos comprimentos de onda de excitação máxima dos diferentes compostos testados (Morris, 1976). Os derivados dos aminoácidos **11a-g** exibem rendimentos quânticos de fluorescência de moderados a muito bons ($0,13 < \Phi < 0,70$) e desvios de Stokes entre 66 e 131 nm.

Tabela 5: Dados de UV e de fluorescência dos compostos **11a-g**.

Composto	UV λ_{\max} (nm)	Fluorescência		Desvio de Stokes (nm)
		λ_{em} (nm)	Φ	
11a Z - Phe - Obb	345	411	0,42	66
11b Z - Phe - Obh	360	456	0,13	96
11c Z - Phe - Obm	347	478	0,59	131
11d Z - Gly - Obm	347	471	0,70	124
11e Z - Ala - Obm	348	477	0,66	129
11f Z - Val - Obm	348	478	0,58	130
11g Tos - Phe - Obm	347	475	0,53	128

Na Figura 2, mostram-se os espectros de fluorescência dos compostos **11a**, **11b**, **11d** e **11g**.

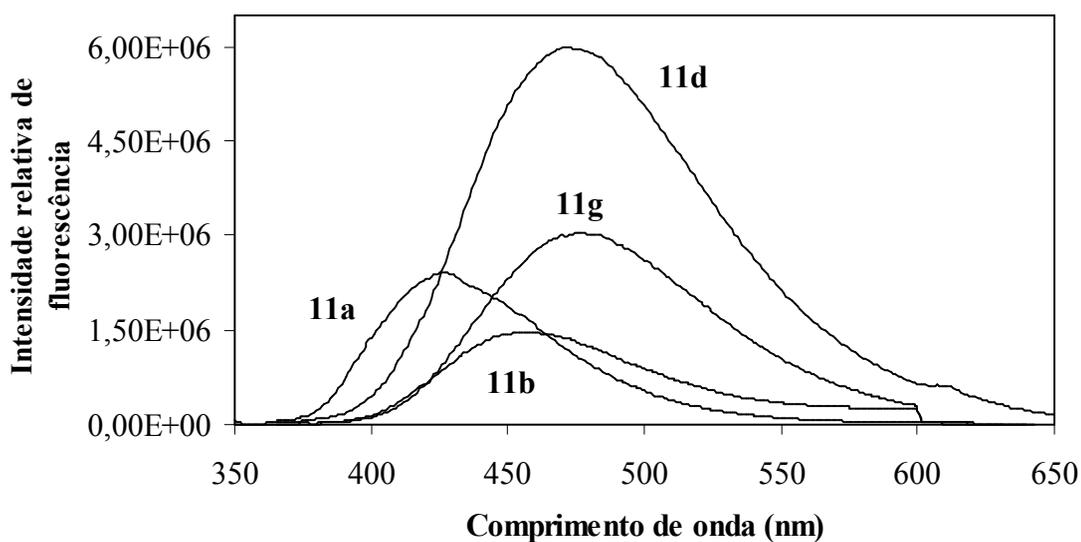


Figura 2: Espectros de fluorescência dos compostos **11a**, **11b**, **11d** e **11g**.

3.4. Estudos de estabilidade/ clivagem químicas do sistema fluorescente

Os estudos de estabilidade do fluoróforo foram efectuados a condições experimentais usadas na clivagem química de grupos protectores da função ácido carboxílico.

Assim, o Tos-Phe-Obm (**11g**) usado como modelo, foi submetido a condições de hidrogenação catalítica (PdC/ cicloexadieno), acidólise à temperatura ambiente e a refluxo (TFA, HCl 6M, HBr aquoso e HBr em CH₃COOH) (Bodansky, 1984), redução com metais (Mg/ MeOH) (Maia, 2001) e hidrólise alcalina (NaOH 1M) (Tabela 6).

Os resultados obtidos mostram que nas condições de hidrogenação catalítica o derivado **11g** não é estável, tendo-se isolado o Tos-Phe-OH (**10e**) e o composto **12** (Obm-H) com rendimentos baixos. Nas condições de acidólise testadas, à temperatura ambiente, o composto **11g** é estável tendo sido recuperado quantitativamente (TFA, HCl 6M e HBr aquoso) ou em 90% (HBr/ CH₃COOH).

À temperatura de ebulição este composto é estável em TFA (8 h 30 min, 100%), e foi recuperado em 83% em HCl 6M (17 h). Contudo, em HBr, a refluxo (5h) ocorreu a clivagem da ligação éster, fluoróforo - fenilalanina, tendo sido isolado o Tos-Phe-OH (**10e**) em rendimentos moderados (57 %, HBr aquoso e 68 %, HBr/ CH₃COOH).

Da reacção do Tos-Phe-Obm (**11g**) com magnésio nas condições experimentais testadas, isolou-se o composto pretendido, Tos-Phe-OH (**10e**) com um rendimento de 56%. Estudou-se também o comportamento do Tos-Phe-OH (**10e**) com magnésio, nas mesmas condições experimentais do ensaio do Tos-Phe-Obm (**11g**). O composto **10e** mostrou ser estável, tendo sido recuperado quantitativamente, tal como se previa.

O tratamento com NaOH 1M (9 h) provocou também a clivagem da ligação éster, tendo sido isolado o Tos-Phe-OH (**10e**) com rendimento quantitativo.

Em conclusão, pode dizer-se que o fluoróforo **1c** pode ser usado como grupo protector da função ácido carboxílico de aminoácidos, em síntese peptídica, sendo removido por clivagem química de forma quantitativa por hidrólise alcalina e em rendimentos moderados por acidólise com HBr a refluxo e com magnésio.

Tabela 6: Ensaio de estabilidade/ clivagem químicas de Tos-Phe-Obm (**11g**).

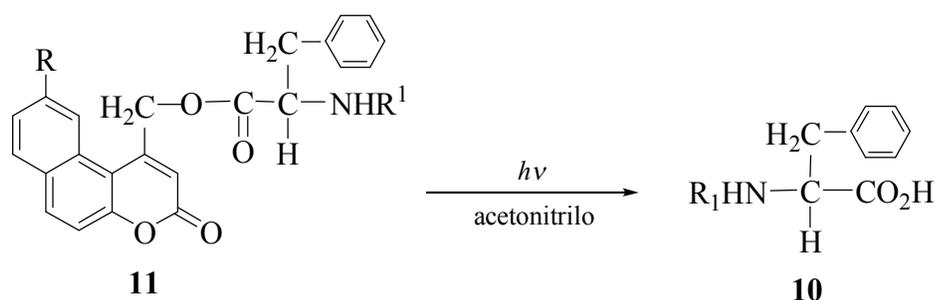
Método de clivagem	Tempo (h)	Rendimento (%)	
		Tos-Phe-Obm (11g)	Tos-Phe-OH (10e)
PdC/ cicloexadieno	6	36	11 ^{a, b}
TFA (t.a.)	2,5	100	-
TFA (refluxo)	8,5	100	-
HCl 6M (t.a.)	4,5	100	-
HCl 6M (refluxo)	17	83	-
HBr aq (t.a.)	4,5	100	-
HBr aq (refluxo)	5	-	57 ^a
HBr/ CH ₃ CO ₂ H (t.a.) ^c	4,5	90	-
HBr/ CH ₃ CO ₂ H (refluxo) ^c	5	-	68 ^a
Mg/ MeOH	3	-	56 ^a
NaOH 1M	9	-	100

a – Rendimento de produto isolado por cromatografia “seca”. b – Obteve-se também Obm-H (**12**) (25%). c – HBr/ CH₃CO₂H (45% m/v).

3.5. Estudos de fotoclivagem do sistema fluorescente

3.5.1. Introdução

Os estudos de fotoclivagem foram efectuados com os compostos Z-Phe-Obb (**11a**), Z-Phe-Obh (**11b**) e Tos-Phe-Obm (**11g**) e visavam a clivagem da ligação éster fluoróforo – aminoácido e consequentemente a obtenção da fenilalanina *N*-protegida, Z-Phe-OH (**10a**) e Tos-Phe-OH (**10e**) (Esquema 8).



a R = H, R¹ = Z

b R = OH, R¹ = Z

g R = OCH₃, R¹ = Tos

a R¹ = Z

e R¹ = Tos

Z = Benziloxycarbonilo

Tos = *p*-toluenossulfonilo

Esquema 8

Nestes estudos, as soluções dos compostos **11a**, **11b** e **11g**, em acetonitrilo ($9,69 \times 10^{-5}$ M) foram irradiadas com uma lâmpada de média pressão de mercúrio de 150 W, usando um reactor fotoquímico, modelo APQ 40. O processo foi seguido por HPLC nas condições referidas no Capítulo 3.

3.5.2. Fotólise de Tos-Phe-Obm (11g)

Para investigar o comportamento dos derivados fluorescentes dos aminoácidos (**11a-g**) à radiação, começou-se por usar o Tos-Phe-Obm (**11g**). Uma solução deste composto foi irradiada durante 35 minutos e foram efectuados os estudos respectivos por HPLC.

Iniciaram-se esses estudos pela monitorização do desaparecimento do reagente de partida (**11g**), usando como eluente acetonitrilo/ água 3:1. Com base no traçado dos valores médios das áreas do pico correspondente (TR = 6,86 min.) em função do tempo de irradiação (Figura 3), verificou-se que ocorreu uma diminuição gradual do Tos-Phe-Obm (**11g**) com o tempo, atingindo após 35 minutos 2,3% do valor da área inicial.

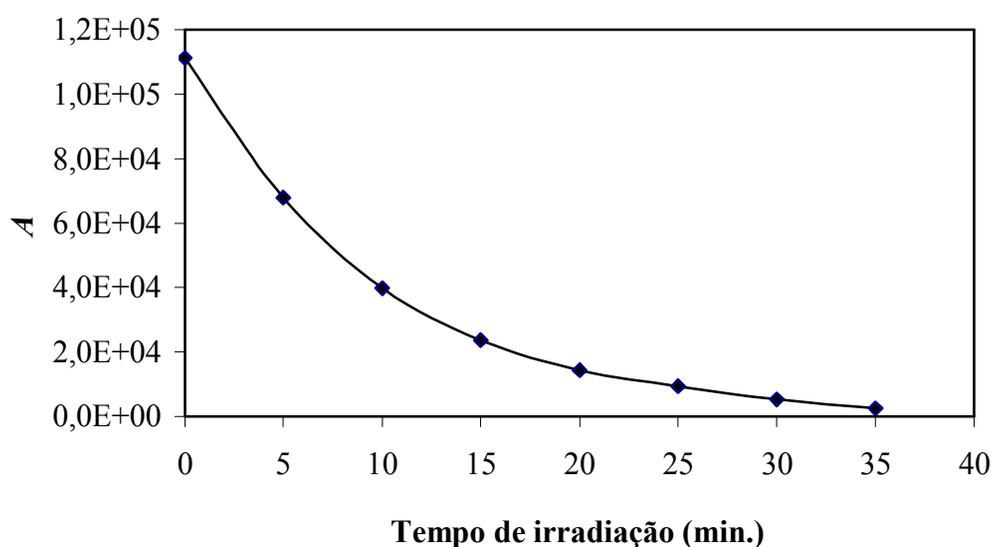


Figura 3: Valor médio das áreas (*A*) *versus* tempo de irradiação para a fotólise do composto Tos-Phe-Obm (**11g**): consumo do reagente a TR = 6,86 min.

Como o objectivo de avaliar o comportamento da ligação éster heterociclo fluorescente – tosilaminoácido e conseqüentemente a obtenção do Tos-Phe-OH (**10e**), decidiu-se estudar o aparecimento deste composto. Assim, injectaram-se no HPLC as amostras recolhidas, usando como eluente acetonitrilo/ água 3:1 com TFA 0,1%, nas condições especificadas no Capítulo 3. Com os valores médios das áreas do sinal com TR = 3,3-3,4 minutos em função do tempo de irradiação, traçou-se o gráfico correspondente (Figura 4).

Pela observação da Figura 4, verifica-se que no intervalo entre 5 e 20 minutos de reacção ocorreu um aumento linear dos valores das áreas, com o tempo de irradiação. Após 20 minutos de reacção, não ocorreu alteração significativa nos valores das áreas.

Atendendo à equação da recta de calibração, concentração *versus* áreas, obtida para o Tos-Phe-OH (**10e**) (TR = 3,2 min.) nas mesmas condições de HPLC, verificou-se que após 20 minutos de irradiação, o composto pretendido (**10e**) estava presente numa concentração de $6,54 \times 10^{-5}$ M, o que corresponde a um rendimento de fotoclivagem de 67,5%.

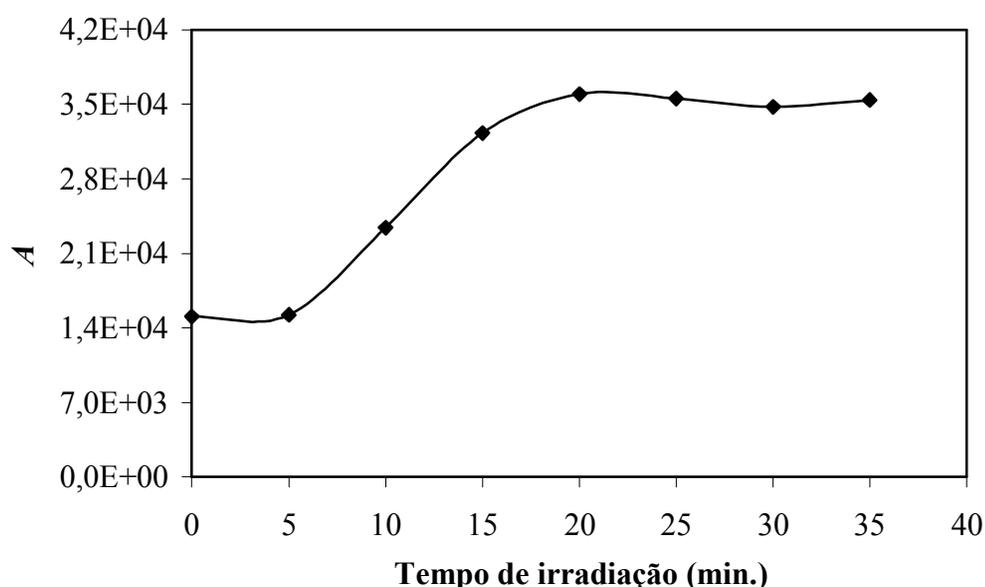


Figura 4: Valor médio das áreas (*A*) versus tempo de irradiação para a fotólise do composto Tos-Phe-Obm (**11g**): aparecimento do produto Tos-Phe-OH (**10e**) a TR = 3,3-3,4 min.

O grupo *p*-toluenossulfonilo não tem sido referido como sendo particularmente sensível à fotoclivagem. Contudo, para uma avaliação correcta da reacção de fotólise do Tos-Phe-Obm (**11g**), decidiu-se estudar o comportamento do Tos-Phe-OH (**10e**) em condições experimentais idênticas.

Com os valores médios das áreas (TR = 3,2 min.; eluente acetonitrilo/ água 3:1 e TFA 0,1 %) em função do tempo de irradiação, traçou-se o gráfico correspondente (Figura 5).

Pela análise da Figura 5, verifica-se que ocorreu consumo do reagente de partida (**10e**) ao longo do processo, registando-se o valor máximo de desaparecimento do composto (91,4 %), após 35 minutos de irradiação.

Os cromatogramas obtidos neste ensaio permitiram identificar dois sinais principais com TR 2,0 e 3,8 minutos, cujos valores das áreas aumentavam de forma gradual com o tempo de reacção. Supõe-se que o sinal a TR 2,0 minutos esteja relacionado com a fenilalanina (TR \cong 2,70 min. para uma amostra pura nas mesmas condições cromatográficas).

Com efeito, os resultados do ensaio com o Tos-Phe-OH (**10e**) mostraram que ocorreu consumo do composto tendo provavelmente ocorrido clivagem do grupo tosilo nas condições testadas durante o processo. Com base neste facto, supõe-se que na

fotólise de Tos-Phe-Obm (**11g**) possa ter ocorrido também clivagem do grupo tosilo, antes ou após a clivagem do fluoróforo.

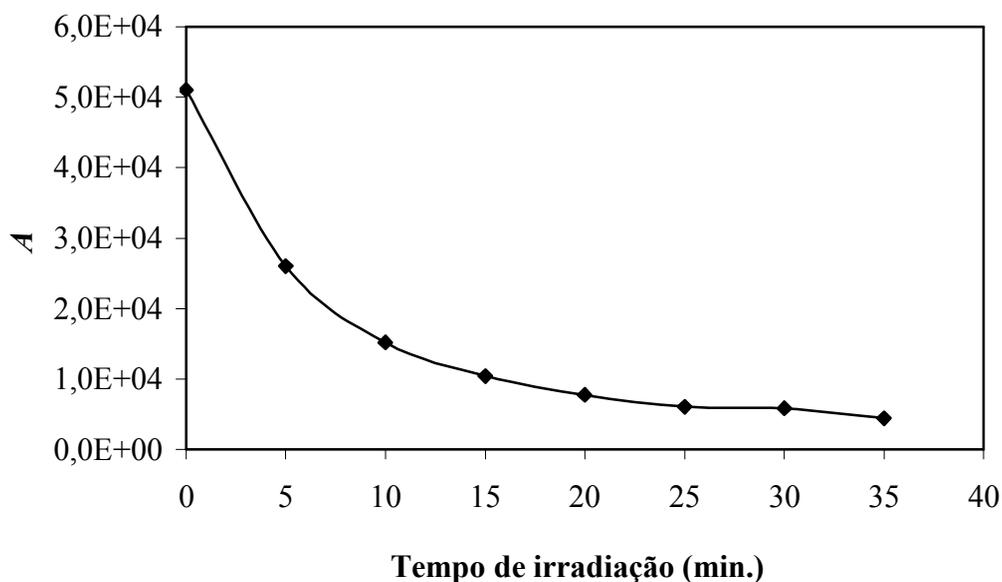


Figura 5: Valor médio das áreas (*A*) versus tempo de irradiação para a fotólise do composto Tos-Phe-OH (**10e**): consumo do reagente a TR = 3,2 min.

Atendendo a este resultado decidiu-se estudar por HPLC a presença de H-Phe-OH (**13**) no processo de fotólise de Tos-Phe-Obm (**11g**).

Nos cromatogramas obtidos era visível um sinal não resolvido a TR entre 2,0 e 2,7 minutos, que poderá estar relacionado com H-Phe-OH (**13**), no entanto não foi possível a sua quantificação.

3.5.3. Fotólise de Z-Phe-Obb (**11a**) e de Z-Phe-Obh (**11b**)

Usando condições experimentais semelhantes às dos estudos anteriores, irradiaram-se soluções dos compostos Z-Phe-Obb (**11a**) (65 min.) e Z-Phe-Obh (**11b**) (55 min.).

Em ambos os casos analisou-se o consumo dos compostos por HPLC (acetonitrilo/água 3:1), a tempos de retenção de 7,2 minutos (**11a**) e 5,2 minutos (**11b**) (Figura 6).

Pela análise da Figura 6 verifica-se que em ambos os casos ocorreu uma diminuição progressiva do composto, atingindo após 55 minutos de reacção um consumo de 92,9 % (**11a**) e de 98,4 % (**11b**).

Estudos por HPLC do aparecimento do produto Z-Phe-OH (**10a**) foram também efectuados. Contudo, não foi possível a sua quantificação, devido à formação de outros produtos de reacção que apresentavam tempos de retenção iguais ou muito próximos do valor do Z-Phe-OH (**10a**).

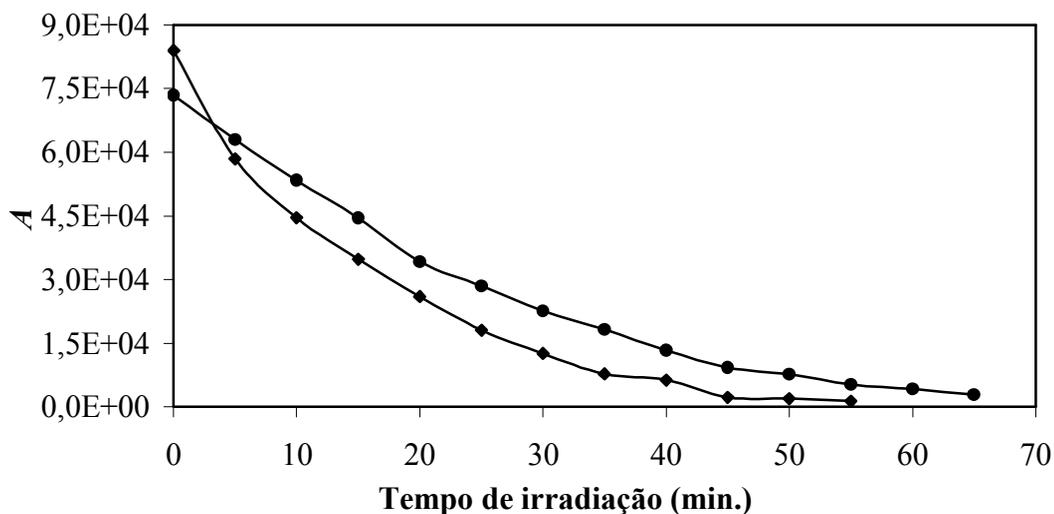


Figura 6: Valor médio das áreas (*A*) versus tempo de irradiação para as fotólises dos compostos Z-Phe-Obb (**11a**) (-●-) e Z-Phe-Obh (**11b**) (-◆-): consumo dos reagentes.

Para estudar o comportamento do Z-Phe-OH (**10a**), irradiou-se uma solução deste aminoácido em condições experimentais idênticas às usadas nos compostos **11a** e **11b**.

Por HPLC verificou-se que após 55 minutos de irradiação não houve alteração da área do reagente, indicando que o composto **10a** é fotoquimicamente estável nestas condições.

Atendendo a que é fundamental que as ligações amida sejam estáveis nas condições de clivagem do composto em estudo, decidiu-se irradiar uma solução do dipéptido H-Phe-Ala-OMe.HCl (**14**) nas condições experimentais usadas anteriormente. Após 60 minutos de irradiação verificou-se que não ocorreu a clivagem da ligação amida nas condições testadas.

3.5.4. Cinética da fotoclivagem

Com base nas análises por HPLC efectuaram-se também estudos cinéticos das reacções de fotoclivagem dos compostos, Tos-Phe-Obm (**11g**), Tos-Phe-OH (**10e**), Z-Phe-Obb (**11a**) e Z-Phe-Obh (**11b**).

O traçado dos logaritmos das concentrações em função do tempo de fotólise para os compostos estudados mostrou tratar-se de uma correlação linear, o que sugere uma reacção de 1ª ordem, com constantes de velocidade a variar entre 0,0502 e 0,1045 min.⁻¹ (Tabela 7). Exemplificam-se os resultados obtidos para o caso do Tos-Phe-Obm (**11g**) (Figura 7).

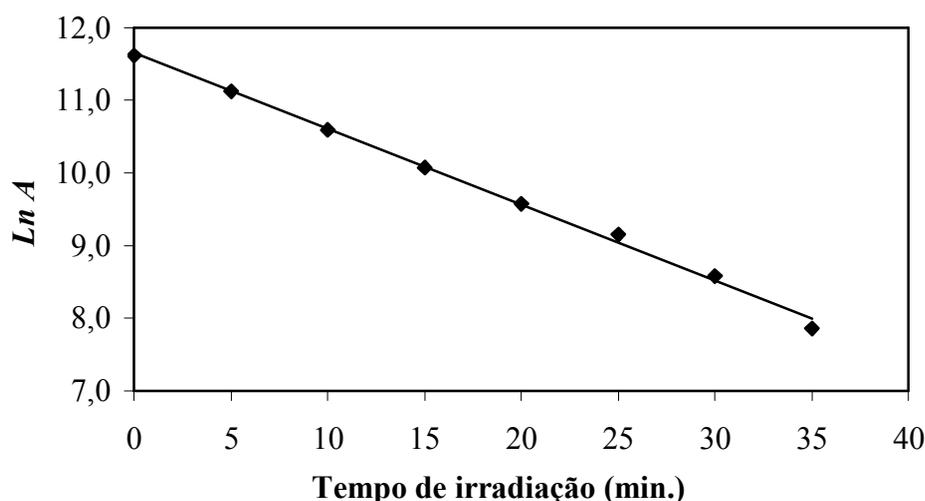


Figura 7: Logaritmo do valor médio das áreas ($\ln A$) versus tempo de irradiação para o desaparecimento do composto Tos-Phe-Obm (**11g**).

No ensaio com Tos-Phe-Obm (**11g**) foi também possível verificar que o aparecimento do produto Tos-Phe-OH (**10e**) obedecia a uma cinética de 1ª ordem, durante os primeiros 20 minutos (Tabela 7).

Tabela 7: Cinética de consumo e aparecimento dos compostos **11g**, **11a**, **11b** e **10e**.

Composto fotolisado		k (min. ⁻¹)	r ²
11g	Tos - Phe - Obm	0,1045	0,9969
10e*	Tos - Phe - OH	0,0556	0,9403
11a	Z - Phe - Obb	0,0502	0,9888
11b	Z - Phe - Obh	0,0765	0,9797
10e	Tos - Phe - OH	0,0580	0,9403

* Dados correspondentes ao aparecimento deste composto na fotólise de Tos-Phe-Obm (**11g**). k – Constante de velocidade. r² – Quadrado do coeficiente de correlação.

4. Conclusões e perspectivas futuras

Ao longo deste trabalho foram sintetizados e identificados pelos métodos habituais seis heterociclos funcionalizados de oxigénio; 1-clorometil-3-oxo-3*H*-benzo[*f*]benzopiranos (**1a-c**) (três) e ácidos nafto[2,1-*b*]furan-1-il etanóicos (**2a-c**) (três). Estes compostos foram usados na marcação de L-aminoácidos representativos tendo sido obtidos os derivados fluorescentes correspondentes.

Os estudos efectuados com a fenilalanina marcada no grupo amina com o ácido 8-metoxi-nafto[2,1-*b*]furan-1-il etanóico (**2c**) nas condições usadas na clivagem química de grupos protectores da função carboxilo mostraram que o Nfm é estável nessas condições.

O fluoróforo de oxobenzo[*f*]benzopirano quando ligado ao *C-terminus* de aminoácidos mostrou ser estável à acidólise em TFA, HCl 6M, HBr aquoso e HBr/CH₃CO₂H, à temperatura ambiente, e em TFA a refluxo. A clivagem química foi quantitativa por hidrólise alcalina, em condições suaves (NaOH 1M, 0 °C).

Os estudos de fotoclivagem dos derivados fluorescentes de fenilalanina com os três oxobenzo[*f*]benzopiranos (**11a**, **11b** e **11g**) mostraram que a fotoclivagem da ligação éster fluoróforo – aminoácido ocorreu entre 35 a 65 minutos nas condições experimentais testadas.

Os resultados obtidos nesta dissertação permitem concluir que os heterociclos funcionalizados sintetizados são potenciais candidatos à marcação de biomoléculas. Por outro lado, atendendo aos bons rendimentos da síntese e das reacções de derivatização, e também aos resultados promissores dos estudos preliminares de fotoclivagem, os 1-clorometil-3-oxo-3*H*-benzo[*f*]benzopiranos **1a-c** poderão ainda ser usados como grupos protectores fotocliváveis em síntese orgânica ou em aplicações biológicas tais como, na obtenção de compostos “caged”. Este fluoróforo poderá ser também usado como grupo protector clivável quimicamente por hidrólise alcalina, acidólise e redução com magnésio.

Os ensaios de fotoclivagem efectuados constituíram apenas um estudo muito preliminar do comportamento dos compostos sintetizados. Pretende-se num futuro muito próximo aferir as melhores condições de fotodesprotecção, estudando o efeito de

vários factores tais como, o comprimento de onda da radiação, o tempo de reacção, o solvente e a concentração das soluções.

É também fundamental melhorar as condições de detecção por HPLC, de forma a ser possível quantificar todos os aminoácidos obtidos.

CAPÍTULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

1. Procedimentos gerais

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H foram determinados num aparelho Varian Unity Plus a 300 MHz, usando o pico de solvente como referência interna. Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C foram determinados no mesmo aparelho, a 75,4 MHz, usando o pico de solvente como referência interna. Os solventes deuterados usados foram clorofórmio (Merck) e dimetilsulfóxido (DMSO-d_6) (Aldrich), com grau de deuteração superior a 99,7%.

Os espectros de infravermelho foram registados num espectrofotómetro Perkin-Elmer FTIR-1600. As amostras foram preparadas com Nujol em células de cloreto de sódio ou em pastilhas de KBr 1%.

Os espectros de ultravioleta foram obtidos num espectrofotómetro Hitachi U-2000.

Os espectros de fluorescência foram registados num espectrofluorímetro Spex Fluorolog 1680.

As análises elementares foram realizadas num analisador elementar LECO CHNS-932.

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

Nas cromatografias em coluna e “seca” utilizou-se Kieselgel Merck 60 (230-400 mesh – cat. nº 9385).

As análises por TLC foram efectuadas em placas Merck de sílica gel com 0,25 mm de espessura (DC-Fertigplatten Kieselgel 60F₂₅₄ – cat. nº 5715).

Os processos de revelação usados para as placas de TLC foram:

- i) revelação no ultravioleta ($\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$) numa câmara CN-6 de luz ultravioleta;
- ii) exposição a vapores de iodo;
- iii) pulverização com uma solução de ninidrina a 0,2% em acetona seguida de aquecimento a 105 °C.

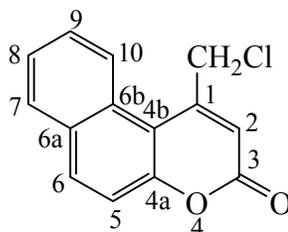
Os reagentes utilizados foram produtos “pro analysis” ou para síntese das firmas Merck, Sigma, Aldrich e Senn Chemicals. Os cloridratos dos ésteres metílicos da glicina, valina e fenilalanina, assim como, o Boc-Ser-OMe e o Tos-Phe-OH existiam no laboratório, tendo sido sintetizados a partir dos respectivos aminoácidos livres por outros investigadores.

Os solventes usados de grau *p.a.* foram fornecidos pela LabScan, Merck, Vaz Pereira e Pronalab.

2. Síntese dos ácidos nafto[2,1-*b*]furan-1-il etanóicos 2a-c e aplicação a aminoácidos

2.1. Síntese dos 1-clorometil-3-oxo-3*H*-benzo[*f*]benzopiranos 1a-c

[1a] 1-Clorometil-3-oxo-3*H*-benzo[*f*]benzopirano (Obb-Cl)



A uma solução de 2-naftol (1,00 g; $6,98 \times 10^{-3}$ mol) em ácido sulfúrico aquoso a 70% (5mL), adicionou-se com agitação, à temperatura ambiente, 4-cloroacetoacetato de etilo (1,4 mL; $1,05 \times 10^{-2}$ mol). A mistura reaccional foi mantida nestas condições durante 48 horas. Seguiu-se a reacção por TLC (acetato de etilo/ *n*-hexano 2:8). Adicionou-se gelo (1 g) à mistura reaccional e agitou-se durante 2 horas. Filtrou-se o precipitado obtido por sucção, lavou-se com água fria e purificou-se por cromatografia “seca” (acetato de etilo/ *n*-hexano 3:7). Após recristalização de acetato de etilo/ *n*-hexano, obteve-se o composto Obb-Cl (**1a**) na forma de um sólido amarelado.

$$\eta = 71\%$$

$$\text{p.f. } 179,5\text{-}182,7\text{ }^\circ\text{C}$$

$$R_f \text{ } 0,36 \text{ (acetato de etilo/ } n\text{-hexano 2:8)}$$

$$\lambda_{\text{max}} \text{ } 352 \text{ nm (etanol) } (\epsilon \text{ } 11449 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$$

ν_{max} (KBr) 3550, 3070, 1716, 1693, 1588, 1550, 1520, 1457, 1433, 1416, 1345, 1323, 1285, 1254, 1212, 1166, 1144, 1124, 1013, 1002, 918, 877, 862, 828 cm^{-1} .

δ_{H} (CDCl_3) 5,09 (2H, s, CH_2), 6,76 (1H, s, H-2), 7,52 (1H, d J 8,7 Hz, H-5), 7,61 (1H, dt J 7,6 e 1,0 Hz, H-8), 7,72 (1H, dt J 7,6 e 1,5 Hz, H-9), 7,96 (1H, dd J 8,1 e 1,2 Hz, H-7), 8,04 (1H, d J 9,0 Hz, H-6), 8,49 (1H, d alargado J 9,0 Hz, H-10) ppm. Atribuição confirmada com base na técnica de dupla ressonância.

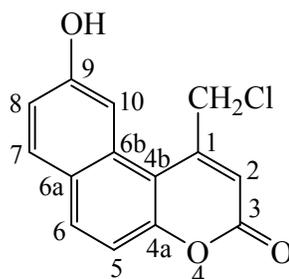
δ_{C} (CDCl_3) 45,79 (CH_2), 112,50 (C-4b), 117,37 (C-2), 117,78 (C-5), 124,90 (C-10), 125,80 (C-8), 128,51 (C-9), 128,75 (C-6b), 129,88 (C-7), 131,29 (C-6a), 134,33 (C-

6), 151,22 (C-1), 155,10 (C-4a), 159,97 (C-3) ppm. Atribuição confirmada com base em técnicas de HMQC e de HMBC.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 244,0290. Valor teórico para $C_{14}H_9O_2^{35}Cl$ 244,0291.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 246,0267. Valor teórico para $C_{14}H_9O_2^{37}Cl$ 246,0262.

[1b] 1-Clorometil-9-hidroxi-3-oxo-3H-benzo[f]benzopirano (Obh-Cl)



Partiu-se de 2,7-diidroxinaftaleno (0,320 g; $2,0 \times 10^{-3}$ mol) e procedeu-se de modo semelhante ao descrito na preparação do Obb-Cl (**1a**). Com o sólido obtido efectuou-se uma cromatografia “seca” (acetato de etilo/ *n*-hexano 6:4). Obteve-se o Obh-Cl (**1b**) na forma de um sólido bege.

$\eta = 92\%$

p.f. 250,0-250,7 °C

Rf 0,35 (clorofórmio/ metanol 5,8: 0,2)

λ_{\max} 361 (etanol) (ϵ 12190 $M^{-1} cm^{-1}$)

ν_{\max} (KBr) 3287, 2930, 1689, 1624, 1597, 1542, 1467, 1438, 1406, 1363, 1306, 1256, 1234, 1218, 1195, 1138, 1044, 1001, 968, 850, 840, 773, 731, 702 cm^{-1} .

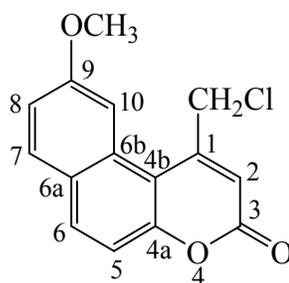
δ_H (DMSO) 5,30 (2H, s, CH_2), 6,76 (1H, s, H-2), 7,16 (1H, dd J 8,7 e 2,1 Hz, H-8), 7,32 (1H, d J 8,7 Hz, H-5), 7,81 (1H, d J 2,1 Hz, H-10), 7,92 (1H, d J 9,0 Hz, H-7), 8,09 (1H, d J 9,0 Hz, H-6), 10,21 (1H, s, OH) ppm. Atribuição confirmada com base na técnica de dupla ressonância.

δ_C (DMSO) 46,17 (CH_2), 108,66 (C-10), 110,67 (C-4b), 113,90 (C-5), 115,77 (C-2), 117,25 (C-8), 125,22 (C-6a), 130,31 (C-6b), 131,33 (C-7), 134,35 (C-6), 152,27 (C-1), 155,35 (C-4a), 157,80 (C-9), 159,38 (C-3) ppm. Atribuição confirmada com base em técnicas de HMQC e de HMBC.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 260,0246. Valor teórico para $C_{14}H_9O_3^{35}Cl$ 260,0240.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 262,0206. Valor teórico para $C_{14}H_9O_3^{37}Cl$ 262,0211.

[1c] 1-Clorometil-9-metoxi-3-oxo-3H-benzo[f]benzopirano (Obm-Cl)



Partiu-se de 7-metoxi-2-naftol (0,348 g; $2,0 \times 10^{-3}$ mol) e procedeu-se de um modo semelhante ao descrito na preparação de Obb-Cl (**1a**). Com o sólido obtido efectuou-se uma cromatografia “seca” (acetato de etilo/ *n*-hexano 3:7), seguida de recristalização de acetato de etilo/ *n*-hexano. Obteve-se o Obm-Cl (**1c**) na forma de um sólido amarelo.

$$\eta = 83\%$$

$$\text{p.f. } 179,2\text{-}180,7\text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$R_f \text{ } 0,58 \text{ (acetato de etilo/ } n\text{-hexano } 3:4)$$

$$\lambda_{\text{max}} \text{ } 354 \text{ nm (etanol) } (\epsilon \text{ } 12826 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$$

$$\nu_{\text{max}} \text{ (KBr) } 3068, 1739, 1626, 1585, 1548, 1521, 1445, 1430, 1346, 1286, 1242, 1218, 1168, 1148, 1054, 1021, 912, 899, 863, 837, 734 \text{ cm}^{-1}.$$

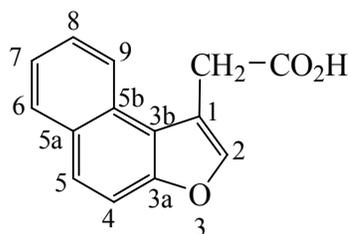
δ_{H} (CDCl₃) 4,02 (3H, s, OCH₃), 4,98 (2H, s, CH₂), 6,62 (1H, s, H-2), 7,24 (1H, dd *J* 9,0 e 2,4 Hz, H-8), 7,31 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-5), 7,79-7,90 (2H, m, H-10 e H-7), 7,92 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-6) ppm. Atribuição confirmada com base na técnica de dupla ressonância.

δ_{C} (CDCl₃) 45,60 (CH₂), 55,55 (OCH₃), 105,71 (C-10), 111,80 (C-4b), 115,11 (C-5), 117,02 (C-8), 117,24 (C-2), 126,29 (C-6a), 130,23 (C-6b), 131,15 (C-7), 133,93 (C-6), 150,96 (C-1), 155,76 (C-4a), 159,69 (C-9), 159,99 (C-3) ppm. Atribuição confirmada com base em técnicas de HMQC e de HMBC.

Valores obtidos: C, 65,50; H, 4,21. Valores teóricos para C₁₅H₁₁O₃Cl: C, 65,58; H, 4,04 %.

2.2. Síntese dos ácidos nafto[2,1-*b*]furan-1-il etanóicos 2a-c

[2a] Ácido nafto [2,1-*b*] furan-1-il etanóico (Nfu-OH)



Agitou-se, à temperatura de 80 °C, uma suspensão de Obb-Cl (**1a**) (0,207 g; 8,46 x 10⁻⁴ mol) numa solução aquosa de NaOH 2M (5mL) durante 18 horas. Seguiu-se a reacção por TLC (acetato de etilo/ *n*-hexano 3:7). Acidificou-se a mistura reaccional com HCl 6M até reacção do papel azul de Congo (pH ≈ 2). O precipitado obtido solubilizou em acetato de etilo. Extrauiu-se a mistura com o mesmo solvente. Secou-se a fase orgânica (MgSO₄) e após evaporação do solvente obteve-se um sólido que se recristalizou de acetato de etilo/ *n*-hexano. O composto Nfu-OH (**2a**) surgiu como um sólido bege.

$$\eta = 94\%$$

$$\text{p.f. } 171,4\text{-}173,0\text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$R_f\ 0,28\ (\text{clorofórmio/ metanol } 5:8: 0.2)$$

$$\lambda_{\text{max}}\ 293\ \text{nm}\ (\text{etanol})\ (\epsilon\ 7442\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1})$$

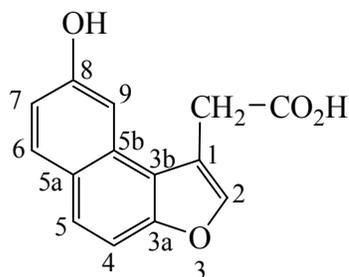
$$\nu_{\text{max}}\ (\text{KBr})\ 3550\text{-}3000,\ 2900,\ 1707,\ 1623,\ 1583,\ 1524,\ 1413,\ 1387,\ 1323,\ 1286,\ 1232,\ 1197,\ 1177,\ 1158,\ 1120,\ 1110,\ 1024,\ 992,\ 949,\ 939,\ 857,\ 830\ \text{cm}^{-1}.$$

δ_{H} (DMSO) 4,04 (2H, s, CH₂), 7,51 (1H, dt *J* 8,0 e 1,2 Hz, H-8), 7,60 (1H, dt *J* 8,0 e 1,2 Hz, H-7), 7,77 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-4), 7,84 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-5), 8,01 (1H, s, H-2), 8,04 (1H, d alargado *J* 8,1 Hz, H-9), 8,18 (1H, d alargado *J* 8,1 Hz, H-6), 12,60 (1H, s alargado, OH) ppm.

δ_{C} (DMSO) 31,08 (CH₂), 112,74 (C-4), 115,94 (C-1), 121,18 (C-3b), 123,14 (C-6), 124,44 (C-8), 125,67 (C-5), 126,49 (C-7), 127,96 (C-5a), 129,01 (C-9), 130,36 (C-5b), 143,64 (C-2), 152,69 (C-3a), 172,50 (CO₂H) ppm.

m/z (EI) Valor obtido: M⁺, 226,0634. Valor teórico para C₁₄H₁₀O₃ 226,0630.

[2b] Ácido 8-hidroxi-nafto [2,1-*b*] furan-1-il etanóico (Nfh-OH)



Partiu-se de Obh-Cl (**1b**) (0,205 g; $7,86 \times 10^{-4}$ mol) e procedeu-se de um modo semelhante ao descrito na preparação de Nfu-OH (**2a**). Seguiu-se a reacção por TLC (clorofórmio/ metanol 5,8: 0,2). Obteve-se o Nfh-OH (**2b**) na forma de um sólido castanho.

$$\eta = 96\%$$

$$\text{p.f. } 167,8\text{-}169,0 \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$R_f \text{ } 0,36 \text{ (clorofórmio/ metanol } 5:2)$$

$$\lambda_{\text{max}} \text{ } 301 \text{ nm (etanol) } (\epsilon \text{ } 7970 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$$

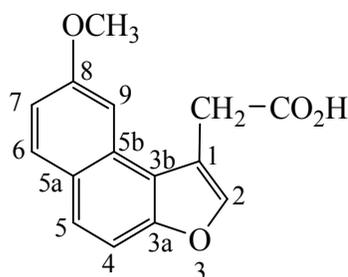
$$\nu_{\text{max}} \text{ (KBr) } 3365, 3107, 2926, 2860, 1715, 1636, 1533, 1471, 1419, 1388, 1360, 1334, 1286, 1259, 1239, 1193, 1173, 1107, 1033, 883, 860, 833 \text{ cm}^{-1}.$$

δ_{H} (DMSO) 3,97 (2H, s, CH₂), 7,05 (1H, dd J 8,7 e 2,4 Hz, H-7), 7,44 (1H, d J 2,4 Hz, H-9), 7,49 (1H, d J 8,7 Hz, H-4), 7,67 (1H, d J 9,0 Hz, H-5), 7,85 (1H, d J 9,0 Hz, H-6), 7,91 (1H, s, H-2), 9,84 (1H, s, OH), 12,57 (1H, s alargado, CO₂H) ppm. Atribuição confirmada com base na técnica de dupla ressonância.

δ_{C} (DMSO) 30,75 (CH₂), 105,71 (C-9), 109,25 (C-4), 115,62 (C-1), 116,07 (C-7), 119,91 (C-3b), 124,49 (C-5a), 125,60 (C-5), 129,64 (C-5b), 130,44 (C-6), 142,79 (C-2), 153,11 (C-3a), 156,04 (C-8), 172,13 (CO₂H) ppm. Atribuição confirmada com base em técnicas de HMQC e de HMBC.

$$m/z \text{ (EI) Valor obtido: } M^+, 242,0586. \text{ Valor teórico para } C_{14}H_{10}O_4 \text{ } 242,0579.$$

[2c] Ácido 8-metoxi-nafto [2,1-*b*]furan-1-il etanóico (Nfm-OH)



Partiu-se de Obm-Cl (**1c**) e procedeu-se de um modo semelhante ao descrito na preparação de Nfu-OH (**2a**). Seguiu-se a reacção por TLC (acetato de etilo/ *n*-hexano 6:4). Obteve-se o Nfm-OH (**2c**) na forma de um sólido acastanhado.

$\eta = 98\%$

p.f. 176,8 – 178,9 °C

R_f 0,51 (clorofórmio/ metanol 9,8: 0,2)

λ_{\max} 298 nm (etanol) (ϵ 8436 M⁻¹ cm⁻¹)

ν_{\max} (KBr) 3442, 3103, 3016, 2966, 2922, 1703, 1627, 1602, 1523, 1468, 1409, 1383, 1358, 1281, 1259, 1232, 1201, 1179, 1135, 1120, 1107, 1040, 1023, 947, 876, 838, 833 cm⁻¹.

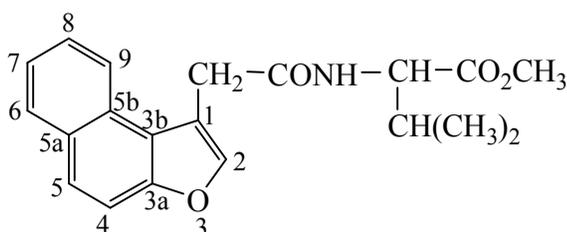
δ_{H} (DMSO) 3,90 (3H, s, OCH₃), 4,04 (2H, s, CH₂), 7,14 (1H, dd *J* 9,0 e 2,5 Hz, H-7), 7,56 (1H, s, H-9), 7,58 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-4), 7,75 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-5), 7,93 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-6), 7,96 (1H, s, H-2), 12,60 (1H, s alargado, OH) ppm. Atribuição confirmada com base na técnica de dupla ressonância.

δ_{C} (DMSO) 31,03 (CH₂), 55,06 (OCH₃), 102,99 (C-9), 110,09 (C-4), 115,74 (C-1), 115,87 (C-7), 120,52 (C-3b), 125,21 (C-5a), 125,45 (C-5), 129,13 (C-5b), 130,41 (C-6), 143,20 (C-2), 153,22 (C-3a), 157,78 (C-8), 172,62 (CO₂H) ppm. Atribuição confirmada com base em técnicas de HMQC e de HMBC.

Valores obtidos: C, 70,48; H, 4,81. Valores teóricos para C₁₅H₁₂O₄: C, 70,30; H, 4,72%.

2.3. Derivatização de aminoácidos no *N*- e *O*- terminus com os ácidos 2a-c

[4a] Nfu-Val-OMe



Arrefeceu-se a 0 °C (banho de gelo), uma solução de Nfu-OH (**2a**) (0,090 g; $3,71 \times 10^{-4}$ mol) em DMF (2 mL). Adicionou-se-lhe, com agitação HOBt (0,100 g; $7,42 \times 10^{-4}$ mol). Deixou-se a solução a agitar durante 10 minutos, após o que se adicionou DCC (0,16 g; $7,80 \times 10^{-4}$ mol) mantendo a temperatura a 0 °C. Após 10 minutos juntou-se o cloridrato do éster metílico da valina (**3a**) (0,137 g; $8,16 \times 10^{-4}$ mol) em DMF (1 mL) e trietilamina (0,114 mL; $8,16 \times 10^{-4}$ mol). A mistura reaccional foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, durante 72 horas. Seguiu-se a reacção por TLC (acetato de etilo/ *n*-hexano 4:6). O sólido formado foi separado por filtração, a solução foi levada à secura no vácuo e o resíduo foi retomado de acetona. Depois de algumas horas no frio separou-se a dicitloexilureia que ainda não tinha precipitado. O solvente foi evaporado e com o resíduo efectuou-se uma cromatografia “seca” (clorofórmio/ *n*-hexano 9:1). Isolou-se o Nfu-Val-OMe (**4a**) na forma de um sólido amarelo.

$$\eta = 83\%$$

$$\text{p.f. } 141,5\text{-}143,0 \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$R_f \text{ } 0,85 \text{ (acetato de etilo/ } n\text{-hexano } 1:1)$$

$$\lambda_{\text{max}} \text{ } 292 \text{ nm (etanol) } (\epsilon \text{ } 1758 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$$

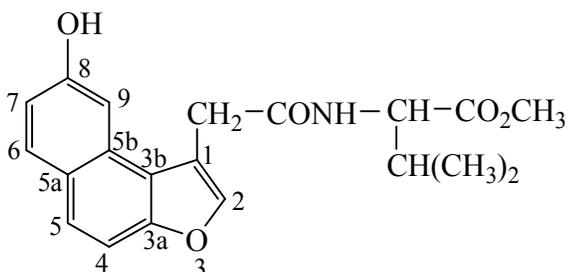
$$v_{\text{max}} \text{ (KBr) } 3290, 3279, 2960, 2929, 2852, 1809, 1742, 1658, 1651, 1584, 1538, 1464, 1437, 1388, 1372, 1312, 1266, 1205, 1151, 1107, 1022, 990, 931, 857, 804 \text{ cm}^{-1}.$$

δ_{H} (CDCl₃) 0,56 (3H, d *J* 6,9 Hz, γ -CH₃ Val), 0,66 (3H, d *J* 6,9 Hz, γ -CH₃ Val), 1,89-2,01 (1H, m, β -CH Val), 3,51 (3H, s, OCH₃ Val), 4,03 (2H, s, CH₂), 4,5-4,60 (1H, m, α -CH Val), 6,24 (1H, d *J* 9,0 Hz, α -NH Val), 7,45 (1H, dt *J* 7,2 e 1,0 Hz, H-8), 7,57 (1H, dt *J* 7,2 e 1,2 Hz, H-7), 7,65 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-4), 7,75 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-5), 7,76 (1H, s, H-2), 7,95 (1H, d *J* 8,7 Hz, H-9), 8,16 (1H, d *J* 8,4 Hz, H-6) ppm.

δ_C (CDCl₃) 17,4 (γ -CH₃ Val), 18,6 (γ -CH₃ Val), 31,0 (β -CH Val), 33,8 (CH₂), 51,9 (OCH₃), 57,2 (α -CH Val), 112,6 (C-4), 115,3 (C-1), 120,5 (C-3b), 123,0 (C-6), 124,5 (C-8), 126,3 (C-5), 126,7 (C-7), 128,04 (C-5a), 129,0 (C-9), 130,7 (C-5b), 143,1 (C-2), 153,8 (C-3a), 169,8 (CONH), 171,9 (CO₂CH₃) ppm. Atribuição com base em técnicas de HMQC e de HMBC.

m/z (EI) Valor obtido M⁺, 339,1471. Valor teórico para C₂₀H₂₁NO₄ 339,1471.

[4b] Nfh-Val-OMe



Partiu-se de Nfh-OH (**2b**) (0,090 g; $3,71 \times 10^{-4}$ mol) e procedeu-se de um modo semelhante ao descrito na preparação de Nfu-Val-OMe (**4a**). Obteve-se o Nfh-Val-OMe (**4b**) na forma de um sólido castanho claro.

$\eta = 57\%$

p.f. 145,3-145,9 °C

Rf 0,65 (acetato de etilo/ *n*-hexano 1:1)

λ_{\max} 300 nm (etanol) (ϵ 17650 M⁻¹ cm⁻¹)

ν_{\max} (KBr) 3427, 3313, 2961, 2929, 1723, 1658, 1629, 1537, 1468, 1441, 1410, 1387, 1289, 1261, 1219, 1195, 1155, 1136, 1120, 1102, 1032, 994, 847, 834 cm⁻¹.

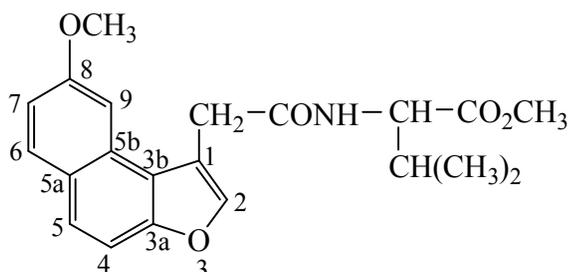
δ_H (CDCl₃) 0,62 (3H, d *J* 6,9 Hz, γ -CH₃ Val), 0,74 (3H, d *J* 6,9 Hz, γ -CH₃ Val), 2,00-2,10 (1H, m, β -CH Val), 3,57 (3H, s, OCH₃ Val), 4,04 (2H, s, CH₂), 4,52-4,62 (1H, m, α -CH Val), 6,45 (1H, d *J* 8,7 Hz, α -NH Val), 7,13 (1H, dd *J* 8,7 e 2,4 Hz, H-7), 7,47 (1H, d *J* 8,7 Hz, H-4), 7,54 (1H, d *J* 2,4 Hz, H-9), 7,66 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-5), 7,69 (1H, s, H-2), 7,82 (1H, d *J* 8,7 Hz, H-6), 8,16 (1H, s alargado, OH) ppm. Atribuição confirmada com base na técnica de dupla ressonância.

δ_C (CDCl₃) 17,43 (γ -CH₃ Val), 18,71 (γ -CH₃ Val), 30,73 (β -C Val), 33,56 (CH₂), 52,27 (OCH₃ Val), 57,57 (α -C Val), 105,78 (C-9), 109,72 (C-4), 114,68 (C-1), 116,20

(C-7), 119,36 (C-3b), 125,29 (C-5a), 126,32 (C-5), 129,21 (C-5b), 130,79 (C-6), 142,74 (C-2), 154,39 (C-3a), 155,67 (C-8), 171,01 (CONH), 172,53 (CO₂CH₃) ppm. Atribuição com base em técnicas de HMQC e de HMBC.

m/z (EI) Valor obtido: M⁺, 355,1416. Valor teórico para C₂₀H₂₁NO₅ 355,1420.

[4c] Nfm-Val-OMe



Partiu-se de Nfm-OH (**2c**) (0,095 g; 3,71 x 10⁻⁴ mol), usou-se o cloridrato do éster metílico da valina (**3a**) (0,075 g; 4,45 x 10⁻⁴ mol) e procedeu-se de um modo semelhante ao usado na preparação do Nfu-Val-OMe (**4a**). Com o sólido obtido efectuou-se uma cromatografia “seca” (clorofórmio/ *n*-hexano 9:1). Obteve-se o Nfm-Val-OMe (**4c**) como um sólido castanho.

η = 89%

p.f. 159,0-161,0 °C

R_f 0,48 (acetato de etilo/ *n*-hexano 4:6)

λ_{\max} 298 nm (etanol) (ϵ 10196 M⁻¹ cm⁻¹)

ν_{\max} (KBr) 3442, 3295, 3116, 3078, 2998, 2964, 1739, 1658, 1630, 1603, 1545, 1525, 1474, 1432, 1410, 1383, 1358, 1290, 1232, 1202, 1183, 1120, 1038, 1027, 832 cm⁻¹.

δ_{H} (CDCl₃) 0,54 (3H, d *J* 6,9 Hz, γ -CH₃ Val), 0,63 (3H, d *J* 6,9 Hz, γ -CH₃ Val), 1,85-2,00 (1H, m, β -CH Val), 3,48 (3H, s, OCH₃ Val), 4,02 (3H, s, OCH₃), 4,03 (2H, s, CH₂), 4,46-4,56 (1H, m, α -CH Val), 6,11 (1H, d *J* 8,4 Hz, α -NH Val), 7,13 (1H, dd *J* 9,0 e 2,4 Hz, H-7), 7,50 (1H, s, H-9), 7,52 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-4), 7,70 (1H, d *J* 8,7 Hz, H-5), 7,74 (1H, s, H-2), 7,84 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-6) ppm.

δ_{C} (CDCl₃) 17,47 (γ -CH₃ Val), 18,55 (γ -CH₃ Val), 30,91 (β -CH Val), 34,05 (CH₂), 51,84 (OCH₃ Val), 55,49 (OCH₃), 57,27 (α -CH Val), 102,43 (C-9), 110,00 (C-4),

115,23 (C-1), 116,55 (C-7), 119,87 (C-3b), 125,54 (C-5a), 126,24 (C-5), 129,30 (C-5b), 130,34 (C-6), 142,65 (C-2), 155,45 (C-3a), 158,49 (C-8), 170,00 (CONH), 171,77 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{CH}_3$) ppm. Atribuição confirmada com base em técnicas de HMQC e de HMBC.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 369,1560. Valor teórico para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ 369,1576.

[4d] Nfm-Gly-OMe

Partiu-se de Nfm-OH (**2c**) (0,177 g; $6,91 \times 10^{-4}$ mol) e do cloridrato do éster metílico da glicina (**3b**) (0,13 g; $1,04 \times 10^{-3}$ mol) e procedeu-se de um modo semelhante ao descrito na preparação de Nfu-Val-OMe (**4a**). Com o sólido obtido efectuou-se uma cromatografia “seca” (acetato de etilo/ *n*-hexano 3:7). Obteve-se o Nfm-Gly-OMe (**4d**) na forma de um sólido branco.

$\eta = 95\%$

p.f. 171,9-174,0 °C

Rf 0,46 (acetato de etilo/ *n*-hexano 7:3)

λ_{max} 297 nm (etanol) (ϵ 7965 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

ν_{max} (nujol) 3280, 2954, 2924, 2854, 1741, 1652, 1628, 1556, 1522, 1463, 1435, 1413, 1377, 1272, 1259, 1247, 1228, 1197, 1176, 826 cm^{-1} .

δ_{H} (CDCl_3) 3,57 (3H, s, OCH_3 Gly), 3,96 (3H, s, OCH_3), 3,97 (2H, d *J* 4,5 Hz, CH_2 Gly), 4,04 (2H, s, CH_2), 6,18 (1H, s alargado, α -NH Gly), 7,15 (1H, dd *J* 9,0 e 2,4 Hz, H-7), 7,50-7,55 (2H, m, H-4 e H-9), 7,70 (1H, d *J* 8,7 Hz, H-5), 7,74 (1H, s, H-2), 7,85 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-6) ppm.

δ_{C} (CDCl_3) 33,74 (CH_2), 41,27 (CH_2 Gly), 52,12 (OCH_3 Gly), 55,51 (OCH_3), 102,37 (C-9), 110,01 (C-4), 115,01 (C-1), 116,61 (C-7), 119,96 (C-3b), 125,53 (C-5a), 126,23 (C-5), 129,33 (C-5b), 130,34 (C-6), 142,75 (C-2), 154,40 (C-3a), 158,55 (C-8), 169,73 (CONH), 170,45 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{CH}_3$) ppm. Atribuição confirmada com base em técnicas de HMQC e de HMBC.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 327,1100. Valor teórico para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_5$ 327,1107.

[4e] Nfm-Ala-OMe

Partiu-se de Nfm-OH (**2c**) (0,104 g; $4,06 \times 10^{-4}$ mol), usou-se o cloridrato do éster metílico da alanina (**3c**) (0,054 g; $3,90 \times 10^{-4}$ mol) e procedeu-se de um modo semelhante ao usado na preparação de Nfu-Val-OMe (**4a**). Com o sólido obtido efectuou-se uma cromatografia “seca” (acetato de etilo/ *n*-hexano 3:7). Obteve-se o Nfm-Ala-OMe (**4e**) na forma de um sólido branco.

$$\eta = 90\%$$

$$\text{p.f. } 190,1-192,0 \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$R_f \text{ } 0,32 \text{ (acetato de etilo/ } n\text{-hexano 4:6)}$$

$$\lambda_{\text{max}} \text{ } 298 \text{ nm (etanol) } (\epsilon \text{ } 6456 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$$

$$\nu_{\text{max}} \text{ (KBr) } 3435, 3299, 2961, 2926, 1741, 1654, 1630, 1601, 1543, 1475, 1454, 1407, 1384, 1359, 1261, 1232, 1201, 1185, 1154, 1021, 829, 802 \text{ cm}^{-1}.$$

δ_{H} (CDCl₃) 1,20 (3H, d J 7,2 Hz, β -CH₃ Ala), 3,50 (3H, s, OCH₃ Ala), 3,95 (3H, s, OCH₃), 3,99 (2H, s, CH₂), 4,50-4,65 (1H, m, α -CH Ala), 6,22 (1H, d J 7,5 Hz, α -NH Ala), 7,14 (1H, dd J 9,0 e 2,7 Hz, H-7), 7,52 (2H, d J 9,0, H-9 e H-4), 7,66 (1H, d J 9,0 Hz, H-5), 7,72 (1H, s, H-2), 7,84 (1H, d J 9,0 Hz, H-6) ppm.

δ_{C} (CDCl₃) 18,00 (β -CH₃ Ala), 33,90 (CH₂), 48,08 (α -CH Ala), 52,16 (OCH₃ Ala), 55,49 (OCH₃), 102,42 (C-9), 110,02 (C-4), 115,09 (C-1), 116,55 (C-7), 119,97 (C-3b), 125,55 (C-5a), 126,19 (C-5), 129,33 (C-5b), 130,32 (C-6), 142,66 (C-2), 154,41 (C-3a), 158,48 (C-8), 169,71 (CONH), 172,74 (CO₂CH₃) ppm. Atribuição confirmada com base em técnicas de HMQC e de HMBC.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 341,1265. Valor teórico para C₁₉H₁₉NO₅ 341,1263.

[4f] Nfm-Phe-OMe

Partiu-se de Nfm-OH (**2c**) (0,095 g; $3,71 \times 10^{-4}$ mol), usou-se o cloridrato do éster metílico da fenilalanina (**3d**) (0,096 g; $4,45 \times 10^{-4}$ mol) e procedeu-se de um modo semelhante ao usado na preparação de Nfu-Val-OMe (**4a**). Com o sólido obtido efectuou-se uma cromatografia “seca” (acetato de etilo/ *n*-hexano 4:6). Obteve-se o Nfm-Phe-OMe (**4f**) na forma de um sólido branco.

$$\eta = 72\%$$

$$\text{p.f. } 146,3-148,4 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Rf 0,38 (acetato de etilo/ *n*-hexano 4:6)

λ_{\max} 298 nm (etanol) (ϵ 8261 M⁻¹ cm⁻¹)

ν_{\max} (KBr) 3284, 2958, 2927, 2852, 1750, 1662, 1625, 1543, 1524, 1468, 1431, 1362, 1262, 1224, 1199, 1174, 1099, 1017, 823, 792 cm⁻¹.

δ_{H} (CDCl₃) 2,80-2,96 (2H, m, β -CH₂ Phe), 3,57 (3H, s, OCH₃ Phe), 3,93 (3H, s, OCH₃), 3,96 (2H, s, CH₂), 4,80-4,90 (1H, m, α -CH Phe), 6,05 (1H, d *J* 8,1 Hz, α -NH Phe), 6,47 (2H, d alargado *J* 7,5 Hz, H-2 e H-6 Phe), 6,79 (2H, t alargado *J* 7,5 Hz, H-3 e H-5 Phe), 6,96 (1H, t alargado *J* 7,5 Hz, H-4 Phe), 7,14 (1H, dd *J* 9,0 e 2,1 Hz, H-7), 7,48 (1H, d *J* 2,1 Hz, H-9), 7,52 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-4), 7,62 (1H, s, H-2), 7,73 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-5), 7,85 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-6) ppm. Atribuição confirmada com base na técnica de dupla ressonância.

δ_{C} (CDCl₃) 33,97 (CH₂), 37,57 (β -CH₂ Phe), 52,15 (OCH₃ Phe), 52,87 (α -CH Phe), 55,56 (OCH₃), 102,32 (C-9), 109,99 (C-4), 115,04 (C-1), 116,77 (C-7), 120,00 (C-3b), 125,63 (C-5a), 126,26 (C-5), 126,85 (C-4 Phe), 128,13 (C-3 e C-5 Phe), 128,52 (C-2 e C-6 Phe), 129,41 (C-5b), 130,37 (C-6), 134,90 (C-1 Phe), 142,66 (C-2), 154,44 (C-3a), 158,65 (C-8), 169,75 (CONH), 171,38 (CO₂CH₃) ppm. Atribuição confirmada com base em técnicas de HMQC e de HMBC.

m/z (EI) Valor obtido: M⁺, 417,1588. Valor teórico para C₂₅H₂₃NO₅ 417,1576.

[4g] Nfm-Asp(OMe)-OMe

Partiu-se de Nfm-OH (**2c**) (0,10 g; 3,90 x 10⁻⁴ mol), usou-se o H-Asp(OMe)-OMe (**3e**) (0,193 g; 9,75 x 10⁻⁴ mol) e procedeu-se de um modo semelhante ao usado na preparação de Nfu-Val-OMe (**4a**). Com o sólido obtido efectuou-se uma cromatografia “seca” (acetato de etilo/ *n*-hexano 4:6). Obteve-se o Nfm-Asp(OMe)-OMe (**4g**) na forma de um sólido branco.

η = 98 %

p.f. 136,8-137,7 °C

Rf 0,46 (acetato de etilo/ *n*-hexano 6:4)

λ_{\max} 298 nm (etanol) (ϵ 7856 M⁻¹ cm⁻¹)

ν_{\max} (KBr) 3333, 2954, 2924, 2854, 1739, 1648, 1627, 1598, 1519, 1463, 1436, 1400, 1378, 1304, 1228, 1200, 1178, 1120, 1107, 1060, 1040, 1024 cm⁻¹.

^1H (CDCl_3) 2,60-2,70 (1H, m, β -CH Asp), 2,80-2,90 (1H, m, β -CH Asp), 3,15 (3H, s, OCH_3 Asp, cadeia lateral), 3,49 (3H, s, OCH_3 Asp, cadeia principal), 3,95 (3H, s, OCH_3), 4,00 (2H, s, CH_2), 4,78-4,87 (1H, m, α -CH Asp), 6,69 (1H, d J 7,5 Hz, α -NH Asp), 7,13 (1H, dd J 2,40 e 8,9 Hz, H-7), 7,45 (1H, d J 2,4 Hz, H-9), 7,50 (1H, d J 9,0 Hz, H-4), 7,66 (1H, d J 8,7 Hz, H-5), 7,72 (1H, s, H-2), 7,82 (1H, d J 9,0 Hz, H-6) ppm.

^{13}C (CDCl_3) 33, 86 (CH_2), 35,60 (β - CH_2 Asp), 48,45 (α -CH Asp), 51,49 (OCH_3 Asp, cadeia lateral), 52,50 (OCH_3 Asp, cadeia principal), 55,48 (OCH_3), 102,34 (C-9), 110,12 (C-4), 114,91 (C-1), 116,47 (C-7), 119, 90 (C-3b), 125,51 (C-5a), 126,06 (C-5), 129,30 (C-5b), 130,28 (C-6), 142,75 (C-2), 154,43 (C-3a), 158,45 (C-8), 170,00 (CONH), 170,58 (CO_2CH_3 Asp, cadeia principal), 170,70 (CO_2CH_3 Asp, cadeia lateral) ppm. Atribuição confirmada com base em técnicas de HMQC e de HMBC.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 399,1319. Valor teórico para $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}_7$ 399,1318.

[4h] Nfm-Glu(OMe)-OMe

Partiu-se de Nfm-OH (**2c**) (0,10 g; $3,90 \times 10^{-4}$ mol), usou-se o H-Glu(OMe)-OMe (**3f**) (0,193 g; $9,75 \times 10^{-4}$ mol) e procedeu-se de um modo semelhante ao usado na preparação de Nfu-Val-OMe (**4a**). Com o sólido obtido efectuou-se uma cromatografia “seca” (acetato de etilo/ *n*-hexano 2:8). Obteve-se o Nfm-Glu(OMe)-OMe (**4h**) na forma de um sólido branco amarelado.

$\eta = 98 \%$

p.f. 166,3-169,0 °C

R_f 0,48 (acetato de etilo/ *n*-hexano 7:3)

λ_{max} 298 nm (etanol) (ϵ 6716 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

ν_{max} (nujol) 3311, 2954, 2925, 2854, 1761, 1715, 1651, 1628, 1531, 1463, 1377, 1271, 1230, 1177, 1134, 1120, 1035, 1018, 829 cm^{-1} .

δ_{H} (CDCl_3) 1,60-1,80 (2H, m, β - CH_2 Glu), 1,82-2,00 (2H, m, γ - CH_2 Glu), 3,49 (3H, s, OCH_3 Glu), 3,50 (3H, s, OCH_3 Glu), 3,94 (3H, s, OCH_3), 3,99 (2H, s, CH_2), 4,52-4,64 (1H, m, α -CH Glu), 6,42 (1H, d J 7,8 Hz, α -NH Glu), 7,12 (1H, dd J 8,9 Hz e 2,4 Hz, H-7), 7,44-7,55 (2H, m, H-9 e H-4), 7,65-7,75 (2H, m, H-5 e H-2), 7,82 (1H, d J 9,0 Hz, H-6) ppm.

δ_C (CDCl₃) 26,63 (β -CH₂ Glu), 29,34 (γ -CH₂ Glu), 33,93 (CH₂), 51,58 (OCH₃ Glu, cadeia principal), 51,72 (α -CH Glu), 52,23 (OCH₃ Glu, cadeia lateral), 55,46 (OCH₃), 102,28 (C-9), 110,02 (C-4), 115,00 (C-1), 116,52 (C-7), 119,94 (C-3b), 125,53 (C-5a), 126,19 (C-5), 129,28 (C-5b), 130,35 (C-6), 142,74 (C-2), 154,43 (C-3a), 158,55 (C-8), 170,31 (CONH), 171,61 (CO₂CH₃ Glu, cadeia principal), 172,86 (CO₂CH₃ Glu, cadeia lateral) ppm. Atribuição confirmada com base em técnicas de HMQC e de HMBC.

m/z (EI) Valor obtido: M⁺, 413,1476. Valor teórico para C₂₂H₂₃NO₇ 413,1475.

[6] Ac-Lys(Nfm)-OMe

Partiu-se de Nfm-OH (**2c**) (0,10 g; 3,90 x 10⁻⁴ mol), usou-se Ac-Lys-OMe (**5**) (0,093 g; 3,90 x 10⁻⁴ mol) e procedeu-se de um modo semelhante ao usado na preparação de Nfm-Val-OMe (**4a**). Com o sólido obtido efectuou-se uma cromatografia “seca” (acetato de etilo/ *n*-hexano 3:7). Obteve-se o Ac-Lys(Nfm)-OMe (**6**) na forma de um sólido branco.

η = 71%

p.f. 185,7-186,9 °C

Rf 0,46 (clorofórmio/ metanol 5,8: 0,2)

λ_{\max} 297 nm (etanol) (ϵ 5333 M⁻¹ cm⁻¹)

ν_{\max} (KBr) 3289, 3077, 2951, 2931, 2859, 1748, 1651, 1633, 1601, 1550, 1525, 1474, 1464, 1454, 1434, 1415, 1375, 1359, 1290, 1258, 1231, 1200, 1180, 1146, 830 cm⁻¹.

δ_H (CDCl₃) 0,95-1,15 (2H, m, γ -CH₂ Lys), 1,20-1,50 (4H, m, β -CH₂ Lys e δ -CH₂ Lys), 1,97 (3H, s, CH₃ Ac), 3,00-3,60 (2H, m, ϵ -CH₂ Lys), 3,69 (3H, s, OCH₃ Lys), 3,96 (5H, s, OCH₃ e CH₂), 4,35-4,45 (1H, m, α -CH Lys), 5,82 (1H, t *J* 6,0 Hz, NH Lys, cadeia lateral), 5,95 (1H, d *J* 7,8 Hz, α -NH Lys), 7,15 (1H, dd *J* 9,0 e 2,4 Hz, H-7), 7,49 (1H, d *J* 2,4 Hz, H-9), 7,52 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-4), 7,70 (1H, s, H-2), 7,72 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-5), 7,85 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-6) ppm. Atribuição confirmada com base na técnica de dupla ressonância.

δ_C (CDCl₃) 22,23 (γ -CH₂ Lys), 23,00 (CH₃ Ac), 28,84 (β -CH₂ Lys), 31,65 (δ -CH₂ Lys), 33,97 (CH₂), 39,07 (ϵ -CH₂ Lys), 51,73 (α -CH Lys), 52,28 (OCH₃ Lys), 55,57

(OCH₃), 102,50 (C-9), 110,05 (C-4), 115,36 (C-1), 116,55 (C-7), 119,98 (C-3b), 125,52 (C-5a), 126,25 (C-5), 129,32 (C-5b), 130,40 (C-6), 142,72 (C-2), 154,41 (C-3a), 158,58 (C-8), 169,90 (CONH Ac), 170,32 (CONH), 172,84 (CO₂CH₃) ppm. Atribuição confirmada com base em técnicas e HMQC e de HMBC.

m/z (EI) Valor obtido: M⁺, 440,1948. Valor teórico para C₂₄H₂₈N₂O₆ 440,1947.

[8] Boc-Ser(Nfm)-OMe

Partiu-se de Nfm-OH (**2c**) (0,095 g; 3,71 x 10⁻⁴ mol), usou-se Boc-Ser-OMe (**7**) (0,097 g; 4,45 x 10⁻⁴ mol) e procedeu-se de um modo semelhante ao usado na preparação de Nfu-Val-OMe (**4a**). Com o sólido obtido efectuou-se uma cromatografia “seca” (acetato de etilo/ *n*-hexano 2:8). Obteve-se o Boc-Ser(Nfm)-OMe (**8**) na forma de um óleo incolor.

η = 54%

R_f 0,47 (acetato de etilo/ *n*-hexano 4:6)

λ_{max} 298 nm etanol (ε 12705 M⁻¹ cm⁻¹)

ν_{max} (KBr) 3376, 2977, 2839, 1745, 1720, 1707, 1629, 1598, 1519, 1505, 1474, 1436, 1367, 1232, 1161, 1121, 1060, 1022, 950, 876, 830 cm⁻¹.

δ_H (CDCl₃) 1,42 (9H, s, C(CH₃)₃) 3,45 (3H, s, OCH₃ Ser), 3,99 (3H, s, OCH₃), 4,07 (2H, s, CH₂), 4,40-4,48 (2H, m, β-CH₂ Ser), 4,50-4,60 (1H, m, α-CH Ser), 5,18 (1H, d *J* 7,5 Hz, α-NH Ser), 7,16 (1H, dd *J* 8,9 e 2,7 Hz, H-7), 7,51 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-4), 7,58 (1H, d *J* 2,7 Hz, H-9), 7,67 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-5), 7,69 (1H, s, H-2), 7,86 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-6) ppm. Atribuição confirmada com base em técnicas de dupla ressonância.

δ_C (CDCl₃) 28,20 (C(CH₃)₃), 31,73 (CH₂), 52,42 (OCH₃ Ser), 52,78 (α-CH Ser), 55,42 (OCH₃), 65,06 (β-CH₂ Ser), 80,31 (C(CH₃)₃), 103,08 (C-9), 110,22 (C-4), 114,23 (C-1), 115,65 (C-7), 120,15 (C-3b), 125,70 (C-5a), 125,77 (C-5), 129,36 (C-5b), 130,51 (C-6), 142,45 (C-2), 153,99 (C-3a), 155,07 (CO₂(CH₃)₃), 158,27 (C-8), 169,73 (CO₂CH₃), 170,43 (CO₂CH₂) ppm. Atribuição confirmada com base em técnicas de HMQC e de HMBC.

m/z (EI) Valor obtido: M⁺, 457,1736. Valor teórico para C₂₄H₂₇NO₈ 457,1737.

2.4. Estudos de estabilidade química do sistema fluorescente

2.4.1. Hidrogenação catalítica

A uma suspensão de Nfm-Phe-OMe (**4f**) ($4,0 \times 10^{-2}$ g; $9,58 \times 10^{-5}$ mol) em metanol (1,0 mL) adicionou-se 1,4-cicloexadieno ($9,6 \times 10^{-2}$ mL; $2,58 \times 10^{-4}$ mol) e PdC (0,014 g). A mistura reaccional refluxou durante 7 horas. Seguiu-se a reacção por TLC (acetato de etilo/ *n*-hexano 4:6). Filtrou-se o sólido, evaporou-se a solução no vácuo e surgiu um sólido branco que se verificou (RMN de ^1H , CDCl_3) ser o composto de partida ($3,8 \times 10^{-2}$ g; 95%).

2.4.2. Acidólise

i) TFA

Agitou-se, à temperatura ambiente, durante 4 horas, uma solução de Nfm-Phe-OMe (**4f**) ($2,2 \times 10^{-2}$ g; $5,27 \times 10^{-5}$ mol) em TFA (0,49 mL). Adicionou-se mais TFA (0,25 mL) e manteve-se nas condições descritas durante mais 1 hora. Seguiu-se a reacção por TLC (acetato de etilo/ *n*-hexano 6:4)

Evaporou-se o TFA no vácuo e surgiu um sólido branco que se verificou (RMN de ^1H , CDCl_3) ser o composto de partida ($2,2 \times 10^{-2}$ g; 100%).

ii) HCl 6M

Agitou-se à temperatura ambiente, durante 1 hora, Nfm-Phe-OMe (**4f**) ($2,01 \times 10^{-2}$ g; $4,36 \times 10^{-5}$ mol) em HCl 6M (0,2 mL). Seguiu-se a reacção por TLC (acetato de etilo/ *n*-hexano 4:6) Evaporou-se o HCl no vácuo e surgiu um sólido branco ($2,01 \times 10^{-2}$ g; 100%) que se verificou (RMN de ^1H , CDCl_3) ser o composto de partida.

2.4.3. Aminólise

A uma solução de Nfm-Phe-OMe (**4f**) ($2,0 \times 10^{-2}$ g; $4,79 \times 10^{-5}$ mol) em acetonitrilo seco (1,5 mL), adicionou-se *N,N*-dietilaminoetilamina (DEAEA) ($4,1 \times 10^{-2}$ mL; $2,87 \times 10^{-4}$ mol) e manteve-se com agitação, à temperatura ambiente, durante 27

horas. Seguiu-se a reacção por TLC (acetato de etilo/ *n*-hexano 4:6). Evaporou-se o solvente e com o resíduo obtido efectuou-se cromatografia em coluna (clorofórmio/ *n*-hexano 6:1). Obteve-se um sólido oleoso ($1,7 \times 10^{-2}$ g; 85%) que se verificou (RMN de ^1H , CDCl_3) ser o composto de partida.

2.4.4. Redução química

A uma solução de Nfm-Phe-OMe (**4f**) ($2,0 \times 10^{-2}$ g; $4,33 \times 10^{-5}$ mol) em metanol seco (2 mL), adicionou-se magnésio ($1,0 \times 10^{-2}$ g; $4,11 \times 10^{-5}$ mol) e sonicou-se durante 2 horas e 30 minutos. Adicionou-se mais magnésio ($3,2 \times 10^{-2}$ g; $1,32 \times 10^{-5}$ mol), em pequenas porções ($1,0 \times 10^{-2}$ g cada) e sonicou-se durante mais 7 horas. Seguiu-se a reacção por TLC (acetato de etilo/ *n*-hexano 4:6).

Adicionou-se à mistura reaccional uma solução saturada de cloreto de amónia (4 mL). Extraíu-se com acetato de etilo, secou-se a camada orgânica (MgSO_4) e após remoção do solvente por evaporação obteve-se um óleo incolor ($1,9 \times 10^{-2}$ g; 95%) que se verificou (RMN de ^1H , CDCl_3) ser o composto de partida.

2.4.5. Hidrólise alcalina

Arrefeceu-se uma solução de Nfm-Phe-OMe (**4f**) ($2,0 \times 10^{-2}$ g; $4,79 \times 10^{-5}$ mol) em 1,4-dioxano (2 mL), à temperatura de 0°C (banho de gelo) e adicionou-se gradualmente, com agitação, uma solução aquosa de NaOH 1M ($7,2 \times 10^{-2}$ mL; $7,19 \times 10^{-5}$ mol). Manteve-se nas condições descritas durante 5 horas. Seguiu-se a reacção por TLC (clorofórmio).

Ajustou-se o pH da mistura reaccional a 3 por adição de uma solução aquosa de KHSO_4 1M e extraíu-se com clorofórmio. Secou-se a fase orgânica (MgSO_4) e após evaporação do solvente obteve-se o Nfm-Phe-OH (**9**) na forma de um sólido amarelado.

$$\eta = 100\%$$

$$\text{p.f. } 191,0\text{-}193,0^\circ\text{C}$$

ν_{max} (Nujol) 3399, 3383, 2954, 2923, 2854, 2586, 1731, 1626, 1538, 1522, 1497, 1463, 1455, 1431, 1418, 1378, 1357, 1259, 1228, 1208, 1178, 1122, 1103, 1084, 1037, 1016, 831 cm^{-1} .

δ_H (CDCl₃) 2,80-2,90 (2H, m, β -CH₂ Phe), 3,87 (3H, s, OCH₃), 3,95 (2H, s, CH₂), 4,80-4,90 (1H, m, α -CH Phe), 6,12 (1H, d J 7,8 Hz, α -NH Phe), 6,48 (2H, d J 6,9 Hz, H-2 e H-6 Phe), 6,73 (2H, t J 7,5 Hz, H-3 e H-5 Phe), 6,91 (1H, t J 7,5 Hz, H-4 Phe), 7,13 (1H, dd J 9,3 e 2,4 Hz, H-7), 7,41 (1H, d J 2,4 Hz, H-9), 7,52 (1H, d J 9,0 Hz, H-4), 7,58 (1H, s, H-2), 7,72 (1H, d J 8,7 Hz, H-5), 7,85 (1H, d J 9,0 Hz, H-6) ppm.

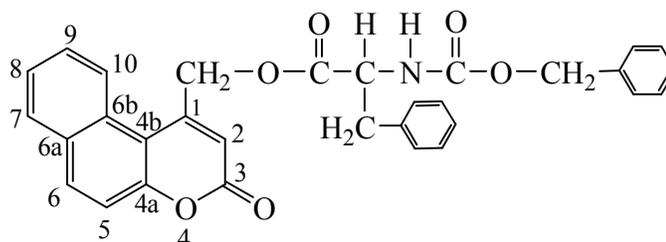
δ_C (CDCl₃) 33,72 (CH₂), 36,92 (β -CH₂ Phe), 52,91 (α -CH Phe), 55,51 (OCH₃), 102,20 (C-9), 109,99 (C-4), 114,63 (C-1), 116,80 (C-7), 119,84 (C-3b), 125,67 (C-5a), 126,36 (C-5), 126,98 (C-4 Phe), 128,19 (C-3 e C-5 Phe), 128,56 (C-2 e C-6 Phe), 129,34 (C-5b), 130,44 (C-6), 134,53 (C-1), 142,83 (C-2), 154,47 (C-3a), 158,67 (C-8) 170,88 (CONH), 174,16 (CO₂H) ppm.

m/z (FAB) Valor obtido: 403,1432. Valor teórico para C₂₄H₂₁NO₅ 403,1420.

3. Aplicação de 1-clorometil-3-oxo-3H-benzo[f]benzopiranos 1a-c a aminoácidos

3.1. Derivatização de aminoácidos no C-terminus com os cloretos de metilo 1a-c

[11a] Z-Phe-Obb



A uma solução de Obb-Cl (**1a**) (0,106 g; $4,30 \times 10^{-4}$ mol) em DMF (1,5 mL) adicionou-se, com agitação, à temperatura ambiente, fluoreto de potássio (0,076 g; $1,30 \times 10^{-3}$ mol) e Z-Phe-OH (**10a**) (0,130 g; $4,30 \times 10^{-4}$ mol). A mistura reaccional foi mantida em agitação durante 25 horas. Seguiu-se a reacção por TLC (acetato de etilo/ *n*-hexano 4:6). O sólido formado foi separado por filtração, a solução foi levada à secura no vácuo e com o resíduo obtido efectuou-se cromatografia “seca” (acetato de etilo/ *n*-hexano 3:7). Após recristalização de acetato de etilo/ *n*-hexano, obteve-se o Z-Phe-Obb (**11a**) na forma de um sólido branco.

$\eta = 96\%$

p.f. 127,8-129,8 °C

R_f 0,58 (acetato de etilo/ *n*-hexano 4:6)

λ_{max} 345 nm (etanol) (ϵ 10664 M⁻¹ cm⁻¹)

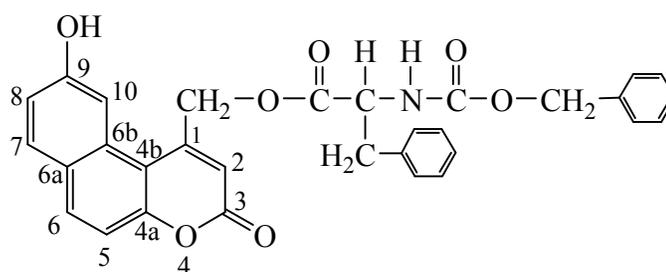
ν_{max} (KBr) 3287, 3028, 2963, 2918, 2848, 1740, 1728, 1686, 1553, 1532, 1496, 1455, 1413, 1340, 1290, 1258, 1207, 1198, 1166, 1052, 1019, 822, 803 cm⁻¹.

δ_{H} (CDCl₃) 3,17 (2H, d *J* 6,3 Hz, β -CH₂ Phe), 4,62-4,82 (1H, m, α -CH Phe), 5,02-5,20 (2H, m, CH₂ Z), 5,30 (1H, d *J* 7,8 Hz, α -NH Phe), 5,60-5,76 (2H, m, CH₂), 6,54 (1H, s, H-2), 7,10-7,18 (2H, m, 2x Ar-H Phe), 7,20-7,30 (3H, m, 3x Ar-H Phe), 7,32-7,40 (5H, m, 5x Ar-H Z), 7,49 (1H, d *J* 8,7 Hz, H-5), 7,59 (1H, t *J* 6,9 Hz, H-8), 7,67 (1H, dt *J* 8,3 e 1,5 Hz, H-9), 7,94 (1H, dd *J* 8,0 e 1,2 Hz, H-7), 8,01 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-6), 8,08 (1H, d *J* 8,4 Hz, H-10) ppm. Atribuição confirmada com base na técnica de dupla ressonância.

δ_{C} (CDCl₃) 38,10 (CH₂ Phe), 55,17 (α -CH Phe), 64,94 (CH₂), 67,22 (CH₂ Z), 112,44 (C-4b), 113,78 (C-2), 117,78 (C-5), 124,54 (C-10), 125,74 (C-8), 127,44 (C-4 Phe) 128,18 (C-4 Z), 128,23 (C-3 e C-5 Phe), 128,49 (C-2 e C-6 Z), 128,61 (C-9), 128,80 (C-3 e C-5 Z) 128,97 (C-6b), 129,04 (C-2 e C-6 Phe), 129,92 (C-7), 131,24 (C-6a), 134,11 (C-6), 135,11 (C-1 Phe), 135,95 (C-1 Z), 149,85 (C-1), 154,86 (C-4a), 155,69 (CONH), 159,84 (C-3), 171,10 (CO₂CH₃) ppm. Atribuição confirmada com base em técnicas de HMQC e de HMBC.

Valores obtidos: C, 73,28; H, 4,98; N, 2,85. Valores teóricos para C₃₁H₂₅NO₆: C, 73,36; H, 4,97; N, 2,76%.

[11b] Z-Phe-Obh



Partiu-se de Obh-Cl (**1b**) (0,100 g; 3,84 x 10⁻⁴ mol), usou-se Z-Phe-OH (**10a**) (0,115 g; 3,84 x 10⁻⁴ mol) e procedeu-se de um modo semelhante ao descrito na

preparação de Z-Phe-Obb (**11a**). Com o resíduo obtido efectuou-se cromatografia “seca” (acetato de etilo/ *n*-hexano 3:7). Obteve-se o Z-Phe-Obh (**11b**) na forma de um sólido branco.

$$\eta = 81\%$$

$$\text{p.f. } 189,6\text{-}190,7\text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$R_f\ 0,31\ (\text{acetato de etilo/ } n\text{-hexano } 4:6)$$

$$\lambda_{\text{max}}\ 360\ \text{nm}\ (\text{etanol})\ (\epsilon\ 10174\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1})$$

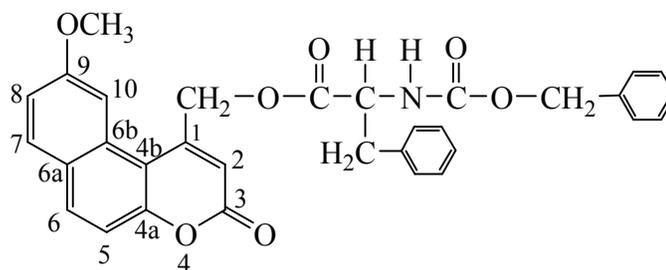
ν_{max} (nujol) 3346, 3299, 2954, 2924, 2854, 1744, 1710, 1685, 1622, 1553, 1538, 1463, 1456, 1366, 1333, 1290, 1253, 1232, 1215, 1195, 1163, 1140, 1048, 1014, 987, 963, 883 cm^{-1} .

δ_{H} (CDCl_3) 3,00-3,10 (2H, m, β - CH_2 Phe), 4,40-4,54 (1H, m, α -CH Phe), 4,95 (1H, d J 12,0 Hz, CH_2), 5,10-5,20 (2H, m, CH_2 Z), 5,36 (1H, d J 5,1 Hz, α -NH Phe), 5,48 (1H, d J 11,7 Hz, CH_2), 6,26 (1H, s, H-2), 7,14-7,24 (2H, m, H-8 e 1x Ar-H Phe), 7,28 (3H, d J 8,7 Hz, H-5 e 2x Ar-H Phe), 7,32-7,42 (7H, m, 2x Ar-H Phe e 5x Ar-H Z), 7,61 (1H, d J 1,8 Hz, H-10), 7,80 (1H, d J 8,7 Hz, H-7), 7,91 (1H, d J 9,0 Hz, H-6), 8,44 (1H, s, OH) ppm. Atribuição confirmada com base na técnica de dupla ressonância.

δ_{C} (CDCl_3) 37,05 (β - CH_2 Phe), 56,26 (α -CH Phe), 66,66 (CH_2), 68,26 (CH_2 Z), 107,54 (C-10), 112,30 (C-4b), 114,39 (C-5), 117,79 (C-8), 118,68 (C-2), 125,93 (C-6a), 127,87 (1x Ar-C Phe), 128,39 (1x Ar-C Z), 128,65 (2x Ar-C Z), 128,96 (2x Ar-C Phe), 129,07 (2x Ar-C Z), 130,61 (C-6b), 131,50 (C-7), 134,15 (2x Ar-C Phe), 134,61 (C-6), 134,80 (C-1 Phe e C-1 Z), 148,10 (C-1), 155,78 (C-4a), 156,86 (CONH), 157,59 (C-9), 160,07 (C-3), 171,60 (CO_2CH_2) ppm. Atribuição confirmada com base em técnicas de HMQC e de HMBC.

(*m/z*) (EI) Valor obtido M^+ , 523,1611. Valor teórico para $\text{C}_{31}\text{H}_{25}\text{NO}_7$ 523,1631.

[11c] Z-Phe-Obm



Partiu-se de Obm-Cl (**1c**) (0,104 g; $3,8 \times 10^{-4}$ mol), usando Z-Phe-OH (**10b**) (0,113 g; $3,8 \times 10^{-4}$ mol) e procedeu-se de um modo semelhante ao descrito na preparação de Z-Phe-Obb (**11a**). Com o residuo obtido efectuou-se uma cromatografia “seca” (acetato de etilo/ *n*-hexano 3:7). Obteve-se o Z-Phe-Obm (**11c**) na forma de um sólido amarelo claro.

$\eta = 71\%$

p.f. 180,8-182,1 °C

R_f 0,45 (acetato de etilo/ *n*-hexano 3:7)

λ_{\max} 347 nm (etanol) (ϵ 12075 M⁻¹ cm⁻¹)

ν_{\max} (nujol) 3285, 2954, 2925, 2854, 1746, 1664, 1630, 1549, 1463, 1409, 1378, 1366, 1275, 1248, 1233, 1201, 1183, 1104, 1086, 1038, 1021 cm⁻¹.

δ_{H} (CDCl₃) 3,16 (2H, d *J* 6,6 Hz, β-CH₂ Phe), 3,95 (3H, s, OCH₃), 4,72-4,84 (1H, m, α-CH Phe), 5,02-5,16 (2H, m, CH₂ Z), 5,28 (1H, d *J* 8,1 Hz, α-NH Phe), 5,66 (2H, s, CH₂), 6,50 (1H, s, H-2), 7,08-7,16 (2H, m, H-3 e H-5 Phe), 7,19-7,28 (3H, m, H-2, H-4 e H-6 Phe), 7,30-7,40 (7H, m, H-5, H-8 e 5x Ar-H Z), 7,42 (1H, s, H-10), 7,85 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-7), 7,93 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-6) ppm.

δ_{C} (CDCl₃) 38,21 (β-CH₂ Phe), 55,17 (α-CH Phe), 55,44 (OCH₃), 64,96 (CH₂), 67,25 (CH₂ Z), 105,58 (C-10), 111,82 (C-4b), 113,62 (C-2), 115,28 (C-5), 116,69 (C-8), 126,34 (C-6a), 127,45 (C-4 Phe), 128,19 (C-4 Z), 128,26 (C-3 e C-5 Phe), 128,51 (C-2 e C-6 Z), 128,80 (C-3 e C-5 Z), 129,03 (C-2 e C-6 Phe), 130,51 (C-6b), 131,34 (C-7), 133,81 (C-6), 135,07 (C-1 Phe), 135,95 (C-1 Z), 149,64 (C-1), 155,58 (C-4a e CONH), 159,71 (C-9), 160,00 (C-3), 171,16 (CO₂CH₂) ppm. Atribuição confirmada com base em técnicas de HMQC e de HMBC.

m/z (EI) Valor obtido: M⁺, 537,1798. Valor teórico para C₃₂H₂₇NO₇ 537,1788.

[11d] Z-Gly-Obm

Partiu-se de Obm-Cl (**1c**) (0,100 g; $3,64 \times 10^{-4}$ mol), usou-se Z-Gly-OH (**10b**) (0,076 g; $3,64 \times 10^{-4}$ mol) e procedeu-se de um modo semelhante ao descrito na preparação de Z-Phe-Obb (**11a**). Com o resíduo obtido efectuou-se uma cromatografia “seca” (acetato de etilo/ *n*-hexano 4:6). Obteve-se o Z-Gly-Obm (**11d**) na forma de um sólido branco amarelado.

$$\eta = 86\%$$

p.f. 181,6-184,0 °C

Rf 0,51 (acetato de etilo/ *n*-hexano 4:6)

λ_{\max} 347 nm (ϵ 11436 M⁻¹ cm⁻¹)

ν_{\max} (nujol) 3413, 2954, 2924, 2854, 1757, 1721, 1625, 1553, 1516, 1401, 1368, 1341, 1272, 1232, 1170, 1054, 1016 cm⁻¹.

δ_{H} (CDCl₃) 3,97 (3H, s, OCH₃), 4,18 (2H, d *J* 5,7 Hz, CH₂ Gly), 5,16 (2H, s, CH₂ Z), 5,35 (1H, s alargado, α -NH Gly), 5,77 (2H, s, CH₂), 6,66 (1H, s, H-2), 7,24 (1H, dd *J* 9,0 e 2,4 Hz, H-8), 7,30-7,40 (6H, m, H-5 e 5x Ar-H Z), 7,42 (1H, s, H-10), 7,84 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-7), 7,93 (1H, d *J* 8,7 Hz, H-6) ppm.

δ_{C} (CDCl₃) 42,79 (CH₂ Gly), 55,47 (OCH₃), 64,84 (CH₂), 67,36 (CH₂ Z), 105,54 (C-10), 111,77 (C-4b), 112,97 (C-2), 115,31 (C-5), 116,71 (C-8), 126,36 (C-6a), 128,17 (Ar-C Z), 128,28 (2x Ar-C Z), 128,54 (2x Ar-C Z), 130,52 (C-6b), 131,40 (C-7), 133,91 (C-6), 135,95 (C-1 Z), 150,20 (C-1), 155,59 (C-4a), 156,34 (CONH), 159,73 (C-9), 160,13 (C-3), 169,43 (C=O₂CH₂) ppm. Atribuição confirmada com base em técnicas de HMQC e de HMBC.

Valores obtidos: C, 67,40; H, 5,01; N, 3,06. Valores teóricos para C₂₅H₂₁NO₇: C, 67,67; H, 5,02; N, 3,03%.

[11e] Z-Ala-Obm

Partiu-se de Obm-Cl (**1c**) (0,201 g; $7,32 \times 10^{-4}$ mol), usou-se Z-Ala-OH (**10c**) (0,183 g; $8,2 \times 10^{-4}$ mol) e procedeu-se de um modo semelhante ao descrito na preparação de Z-Phe-Obb (**11a**). Com o resíduo obtido efectuou-se uma cromatografia

“seca” (acetato de etilo/ *n*-hexano, misturas de polaridade crescente). Obteve-se o *Z*-Ala-Obm (**11e**) na forma de um sólido branco.

$\eta = 83\%$

p.f. 132,8-134,0 °C

Rf 0,41 (acetato de etilo/ *n*-hexano 1:1)

λ_{\max} 348 nm (ϵ 809 M⁻¹ cm⁻¹)

ν_{\max} (KBr) 3422, 3335, 3065, 2958, 2933, 1732, 1719, 1619, 1543, 1518, 1449, 1418, 1355, 1331, 1249, 1230, 1211, 1168, 1105, 1067, 1024 cm⁻¹.

δ_{H} (CDCl₃) 1,52 (3H, d *J* 7,2 Hz, β -CH₃ Ala), 3,97 (3H, s, OCH₃), 4,48-4,62 (1H, m, α -CH Ala), 5,06-5,20 (2H, m, CH₂ Z), 5,26 (1H, d *J* 7,2 Hz, α -NH Ala), 5,66-5,87 (2H, m, CH₂), 6,67 (1H, s, H-2), 7,24 (1H, dd *J* 9,0 e 2,1 Hz, H-8), 7,30-7,41 (6H, m, H-5 e 5x Ar-H), 7,45 (1H, s, H-10), 7,86 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-7), 7,95 (1H, d *J* 9,0 Hz, H-6) ppm. Atribuição confirmada com base na técnica de dupla ressonância.

δ_{C} (CDCl₃) 18,14 (β -CH₃ Ala), 49,74 (α -CH Ala), 55,42 (OCH₃), 64,85 (CH₂), 67,10 (CH₂ Z), 105,62 (C-10), 111,66 (C-4b), 112,81 (C-2), 115,21 (C-5), 116,52 (C-8), 126,26 (C-6a), 128,12 (1x Ar-C Z), 128,17 (1x Ar-C Z), 128,46 (1x Ar-C Z), 130,44 (C-6b), 131,32 (C-7), 133,79 (C-6), 135,98 (C-1 Z), 150,24 (C-1), 155,48 (C-4a), 155,66 (CONH), 159,63 (C-9), 160,05 (C-3), 172,31 (CO₂CH₂) ppm. Atribuição confirmada com base em técnicas de HMQC e de HMBC.

Valores obtidos: C, 67,40; H, 5,01; N, 3,06. Valores teóricos para C₂₆H₂₃NO₇: C, 67,67; H, 5,02; N, 3,03%.

[11f] *Z*-Val-Obm

Partiu-se de Obm-Cl (**1c**) (0,104 g; 3,8 x 10⁻⁴ mol), usou-se *Z*-Val-OH (**10d**) (0,070 g; 2,8 x 10⁻⁴ mol) e procedeu-se de um modo semelhante ao descrito na preparação de *Z*-Phe-Obb (**11a**). Com o resíduo obtido efectuou-se cromatografia “seca” (acetato de etilo/ *n*-hexano 3:7). Obteve-se o *Z*-Val-Obm (**11f**) na forma de um sólido branco.

$\eta = 94\%$

p.f. 122,6-124,0 °C

Rf 0,48 (clorofórmio/ metanol 50:0,5)

λ_{\max} 348 nm (ϵ 838 M⁻¹ cm⁻¹)

ν_{\max} (KBr) 3391, 2966, 2928, 1731, 1721, 1625, 1553, 1520, 1456, 1426, 1351, 1306, 1275, 1232, 1180, 1164, 1098, 1059, 1025 cm⁻¹.

δ_{H} (CDCl₃) 0,95 (3H, d J 7,2 Hz, γ -CH₃ Val), 1,04 (3H, d J 6,9 Hz, γ -CH₃ Val), 2,20-2,35 (1H, m, β -CH₃ Val), 3,98 (3H, s, OCH₃) 4,40-4,50 (1H, m, α -CH Val), 5,13 (2H, s, CH₂ Z), 5,25 (1H, d J 8,4 Hz, α -NH Val), 5,76 (2H, d J 3,9 Hz, CH₂), 6,70 (1H, s, H-2), 7,25 (1H, dd J 7,8 e 2,4 Hz, H-8), 7,30-7,42 (6H, m, H-5 e 5x Ar-H Z), 7,47 (1H, s, H-10), 7,86 (1H, d J 9,0 Hz, H-7), 7,95 (1H, d J 9,0 Hz, H-6) ppm.

δ_{C} (CDCl₃) 17,45 (γ -CH₃ Val), 19,17 (γ -CH₃ Val), 30,96 (β -CH Val), 55,43 (OCH₃), 59,28 (α -CH Val), 64,81 (CH₂), 67,25 (CH₂ Z), 105,67 (C-10), 111,75 (C-4b), 113,08 (C-2), 115,25 (C-5), 116,58 (C-8), 126,31 (C-6a), 128,17 (1x Ar-C Z), 128,22 (2x Ar-C Z), 128,50 (2x Ar-C Z), 130,49 (C-6b), 131,34 (C-7), 133,82 (C-6), 135,99 (C-1 Z), 150,18 (C-1), 155,54 (C-4a), 156,25 (CONH), 159,70 (C-9), 160,07 (C-3), 171,51 (CO₂CH₂). Atribuição confirmada com base em técnicas de HMQC e de HMBC.

m/z (EI) Valor obtido: M⁺, 489,1790. Valor teórico para C₂₈H₂₇NO₇ 489,1788.

[11g] Tos-Phe-Obm

Partiu-se de Obm-Cl (**1c**) (0,060 g; 2,18 x 10⁻⁴ mol), usou-se Tos-Phe-OH (**10e**) (0,069 g; 2,18 x 10⁻⁴ mol) e procedeu-se de um modo semelhante ao descrito na preparação de Z-Phe-Obb (**11a**). Com o resíduo obtido efectuou-se uma cromatografia “seca” (acetato de etilo/ *n*-hexano 3:7). Obteve-se o Tos-Phe-Obm (**11g**) na forma de um sólido amarelo claro.

η = 82%

p.f. 184,8-186,6 °C

R_f 0,41 (acetato de etilo/ *n*-hexano 4:6)

λ_{\max} 347 nm (etanol) (ϵ 12883 M⁻¹ cm⁻¹)

ν_{\max} (KBr) 3434, 2921, 2846, 1707, 1625, 1550, 1506, 1443, 1349, 1224, 1161, 1080, 1011 cm⁻¹.

δ_{H} (CDCl₃) 2,27 (3H, s, CH₃), 3,08 (2H, d J 6,9 Hz, β -CH₂ Phe), 3,93 (3H, s, OCH₃), 4,28-4,40 (1H, m, α -CH Phe), 5,30-5,53 (2H, m, CH₂ e α -NH Phe), 6,39 (1H, s, H-2), 7,02-7,09 (2H, m, H-3 e H-5 Phe), 7,13-7,19 (5H, m, H-3 e H-5 Tos, H-2, H-4 e

H-6 Phe), 7,23 (1H, dd J 8,7 e 2,4 Hz, H-8), 7,27-7,32 (2H, m, H-5 e H-10), 7,61 (2H, d J 8,4 Hz, H-2 e H-6 Tos), 7,83 (1H, d J 8,7 Hz, H-7), 7,90 (1H, d J 9,0 Hz, H-6) ppm. Atribuição confirmada com base na técnica de dupla ressonância.

δ_C (CDCl₃) 21,30 (CH₃ Tos), 39,24 (β -CH₂ Phe), 55,45 (OCH₃), 57,07 (α -CH Phe), 64,88 (CH₂), 105,71 (C-10), 111,64 (C-4b), 113,25 (C-2), 115,20 (C-5), 116,44 (C-8), 126,29 (C-6a), 127,10 (C-2 e C-6 Tos), 127,43 (C-4 Phe), 128,69 (C-3 e C-5 Phe), 129,13 (C-2 e C-6 Phe), 129,60 (C-3 e C-5 Tos), 130,35 (C-6b), 131,37 (C-7), 133,82 (C-6), 134,55 (C-1 Phe), 136,51 (C-1 Tos), 143,73 (C-4 Tos), 149,39 (C-1), 155,45 (C-4a), 159,66 (C-9), 159,98 (C-3), 170,55 (\underline{C} O₂CH₂) ppm.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 557,1519. Valor teórico para C₃₁H₂₇NO₇S 557,1508.

3.2. Estudos de estabilidade/ clivagem químicas do sistema fluorescente

3.2.1. Hidrogenação Catalítica

Partiu-se de Tos-Phe-Obm (**11g**) (2,90 x 10⁻² g; 5,33 x 10⁻⁵ mol), usou-se PdC (10,5 x 10⁻³ g), 1,4-cicloexadieno (1,35 x 10⁻² mL; 1,40 x 10⁻⁴ mol) e refluxou-se durante 6 horas. Filtrou-se o sólido, evaporou-se a solução no vácuo e obteve-se um resíduo. Após cromatografia “seca” (acetato de etilo/ *n*-hexano 4:6) do resíduo, obteve-se um sólido oleoso (0,185 g; 11%) que se verificou (RMN de ¹H, CDCl₃) ser o Tos-Phe-OH (**10e**). Isolou-se também o composto Obm-H (**12**) (3,20 x 10⁻³ g; 25%) e o reagente de partida (**11g**) (1,07 x 10⁻² g; 36%).

[12] Obm-H

R_f = 0,63 (acetato de etilo/ *n*-hexano 6:4)

ν_{max} (filme líquido) 3414, 2918, 2848, 1716, 1623, 1552, 1515, 1455, 1356, 1261, 1228, 1093, 1018, 933 cm⁻¹.

δ_H (CDCl₃) 2,95 (3H, s, CH₃), 3,98 (3H, s, OCH₃), 6,36 (1H, s, H-2), 7,23 (1H, dd J 8,7 e 2,4 Hz, H-8), 7,34 (1H, d J 8,7 Hz, H-5), 7,84 (1H, d J 8,7 Hz, H-7), 7,91 (1H, d J 9,0 Hz, H-6), 7,95 (1H, d J 2,4 Hz, H-10) ppm.

δ_c (CDCl₃) 26,24 (CH₃), 55,42 (OCH₃), 106,35 (C-10), 113,77 (C-4b), 115,40 (C-5), 116,09 (C-2), 116,09 (C-8), 126,47 (C-6a), 131,10 (C-7), 131,73 (C-6b), 133,36 (C-6), 154,02 (C-1), 155,37 (C-4a), 159,11 (C-9), 160,47 (C-3) ppm. Atribuição confirmada com base em técnicas de HMQC e de HMBC.

m/z (EI) Valor obtido: M⁺, 240,0777. Valor teórico para C₁₅H₁₂O₃ 240,0786.

3.2.2. Acidólise

i) TFA

À temperatura ambiente

Agitou-se, à temperatura ambiente, Tos-Phe-Obm (**11g**) (3,00 x 10⁻² g; 5,39 x 10⁻⁵ mol) durante 2 horas e 30 minutos. Evaporou-se o TFA no vácuo e surgiu um sólido amarelado (3,00 x 10⁻² g; 100%) que se verificou (RMN de ¹H, CDCl₃) ser o composto de partida.

À temperatura de ebulição

Aqueceu-se a refluxo, uma solução de Tos-Phe-Obm (**11g**) (2,80 x 10⁻² g; 4,97 x 10⁻⁵ mol) em TFA (6 mL) durante 8 horas e 30 minutos. Evaporou-se o TFA no vácuo e surgiu um sólido branco-esverdeado (2,80 x 10⁻² g; 100%) que se verificou (RMN de ¹H, CDCl₃) ser o composto de partida.

ii) HCl 6M

À temperatura ambiente

Agitou-se, à temperatura ambiente, uma solução de Tos-Phe-Obm (**11g**) (2,10 x 10⁻² g; 3,77 x 10⁻⁵ mol), em HCl 6M (0,40 mL) durante 4 horas e 30 minutos. Evaporou-se a mistura reaccional e obteve-se um sólido branco (2,10 x 10⁻² g; 100%) que se verificou (RMN de ¹H, CDCl₃) ser o composto de partida.

À temperatura de ebulição

Refluxou-se uma solução de Tos-Phe-Obm (**11g**) ($2,10 \times 10^{-2}$ g; $3,77 \times 10^{-5}$ mol) durante 17 horas. Evaporou-se a mistura reaccional e surgiu um sólido branco que se verificou (RMN de ^1H , CDCl_3) ser o reagente de partida ($1,74 \times 10^{-3}$ g; 83%).

iii) HBr aquoso

À temperatura ambiente

Agitou-se, à temperatura ambiente, Tos-Phe-Obm (**11g**) ($2,20 \times 10^{-2}$ g; $3,91 \times 10^{-5}$ mol) em HBr aquoso (0,2 mL), durante 4 horas e 30 minutos. Evaporou-se a mistura reaccional e surgiu um sólido branco ($2,20 \times 10^{-2}$ g; 100%) que se verificou (RMN de ^1H , CDCl_3) ser o composto de partida.

À temperatura de ebulição

Aqueceu-se a refluxo, uma solução de Tos-Phe-Obm (**11g**) ($2,20 \times 10^{-2}$ g; $3,86 \times 10^{-5}$ mol) durante 5 horas. Evaporou-se a mistura reaccional e efectuou-se cromatografia “seca” (acetato de etilo/ *n*-hexano, misturas de polaridade crescente). O óleo amarelado obtido ($6,80 \times 10^{-3}$ g; 57%) tratava-se de Tos-Phe-OH (**10e**).

Rf 0,31 (acetato de etilo/ *n*-hexano 4:6)

ν_{max} (nujol) 3323, 2956, 2923, 2854, 1710, 1597, 1496, 1456, 1384, 1341, 1331, 1310, 1295, 1260, 1223, 1204, 1189, 1169, 1157, 1089, 1020 cm^{-1} .

δ_{H} (CDCl_3) 2,40 (3H, s, CH_3), 2,99-3,20 (2H, m, $\beta\text{-CH}_2$ Phe), 3,71 (3H, s, OCH_3), 4,20-4,30 (1H, m, $\alpha\text{-CH}$ Phe), 5,11 (2H, d J 8,4 Hz, $\alpha\text{-NH}$ Phe), 7,0-7,12 (2H, m, H-3 e H-5 Phe), 7,14-7,34 (5H, m, H-2, H-4 e H-6 Phe, H-3 e H-5 Tos), 7,60 (2H, d J 8,1 Hz, H-2 e H-6 Tos) ppm.

δ_{C} (CDCl_3) 21,51 (CH_3), 38,77 ($\beta\text{-CH}_2$ Phe), 56,33 ($\alpha\text{-CH}$ Phe), 127,06 (C-2 e C-6 Tos), 127,30 (C-4 Phe), 128,62 (C-3 e C-5 Phe), 129,43 (C-2 e C-6 Phe), 129,66 (C-3 e C-5 Tos), 134,69 (C-1 Phe), 136,36 (C-1 Tos), 143,80 (C-4 Tos), 175,31 (CO_2H) ppm.

iv) HBr em CH₃CO₂H

À temperatura ambiente

Agitou-se, à temperatura ambiente, Tos-Phe-Obm (**11g**) ($2,00 \times 10^{-3}$ g; $3,59 \times 10^{-5}$ mol), numa solução de HBr em CH₃CO₂H (45% m/v) (0,008 mL), durante 4 horas e 30 minutos. Evaporou-se a mistura reaccional e surgiu um sólido branco amarelado ($1,80 \times 10^{-2}$ g; 90%) que se verificou (RMN de ¹H, CDCl₃) ser o composto de partida.

À temperatura de ebulição

Aqueceu-se, à temperatura de ebulição, Tos-Phe-Obm (**11g**) ($2,00 \times 10^{-2}$ g; $3,59 \times 10^{-5}$ mol), numa solução de HBr em CH₃CO₂H (45% m/v) (0,008 mL), durante 5 horas. Evaporou-se a mistura e após cromatografia “seca” (acetato de etilo/ *n*-hexano, misturas de polaridade crescente), obteve-se um óleo incolor ($7,80 \times 10^{-3}$ g; 68 %) que se verificou (RMN de ¹H, CDCl₃) ser Tos-Phe-OH (**10e**).

3.2.3. Redução química

i) Tos-Phe-Obm (**11g**)

Partiu-se de Tos-Phe-Obm (**11g**) ($6,00 \times 10^{-2}$ g; $1,08 \times 10^{-4}$ mol), usou-se magnésio ($3,90 \times 10^{-2}$ g; $1,62 \times 10^{-3}$ mol) e procedeu-se de um modo semelhante ao descrito em 2.5.4., sendo o tempo de reacção de 3 horas. Seguiu-se a reacção por TLC (acetato de etilo/ *n*-hexano 6:4) até ao desaparecimento do composto de partida.

Após purificação por cromatografia “seca” (acetato de etilo/ *n*-hexano, misturas de polaridade crescente) obteve-se um sólido oleoso ($1,20 \times 10^{-2}$ g; 56%) que se verificou (RMN de ¹H, CDCl₃) ser Tos-Phe-OH (**10e**).

ii) Tos-Phe-OH (**10e**)

Partiu-se de Tos-Phe-OH (**10e**) ($5,90 \times 10^{-2}$ g; $1,88 \times 10^{-4}$ mol), usou-se magnésio ($4,60 \times 10^{-2}$ g; $1,88 \times 10^{-3}$ mol) e procedeu-se de um modo semelhante ao descrito em 2.5.4., sendo o tempo de reacção de 3 horas. Seguiu-se a reacção por TLC (acetato de etilo/ *n*-hexano 4:6).

Obteve-se um sólido branco ($5,00 \times 10^{-2}$ g; 84%) que se verificou (RMN de ^1H , CDCl_3) ser o composto de partida.

3.2.4. Hidrólise alcalina

Partiu-se de Tos-Phe-Obm (**11g**) ($3,10 \times 10^{-2}$ g; $5,47 \times 10^{-5}$ mol), usou-se uma solução aquosa de NaOH 1M (0,220 mL; $2,19 \times 10^{-4}$ mol) e procedeu-se de um modo semelhante ao descrito em 2.5.5., com um tempo de agitação de 9 horas. Seguiu-se a reacção por TLC (clorofórmio). Obteve-se o Tos-Phe-OH (**10e**) na forma de um óleo laranja ($4,10 \times 10^{-2}$ g; 100%).

3.3. Estudos de fotoclivagem do sistema fluorescente

3.3.1. Procedimentos gerais

Nos ensaios de fotólise dos compostos Tos-Phe-Obm (**11g**), Z-Phe-Obb (**11a**), Z-Phe-Obh (**11b**), Tos-Phe-OH (**10e**) e Z-Phe-OH (**10a**) usou-se como fonte de radiação uma lâmpada de arco de mercúrio de média pressão de 150 Watts, com um espectro de emissão na região do UV acima de 190 nm (Figura 8) (reactor fotoquímico modelo APQ 40 da Applied Photophysics).

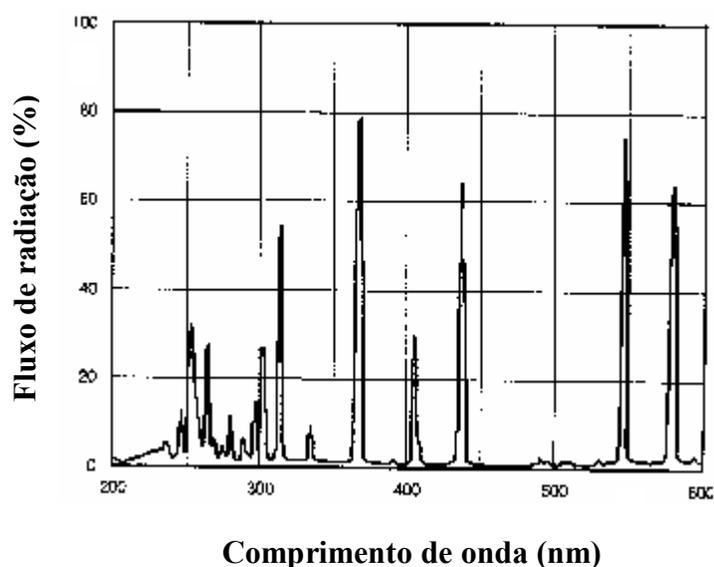


Figura 8: Espectro da lâmpada de média pressão de mercúrio.

Nos estudos por HPLC, usou-se um sistema constituído por uma bomba Jasco PU – 980, um detector UV/ visível Shimadzu SPD-GAV e um registador Shimadzu C – RGA Chromatopac. A coluna era de fase reversa, Lichrospher 100 RP 18 (5 µm).

Foram traçadas rectas de calibração área *versus* concentração para os compostos Tos-Phe-OH (**10e**), Z-Phe-OH (**10a**) e H-Phe-OH (**13**).

3.3.2. Método geral de fotólise

Irradiou-se uma solução de composto **11g**, **10e**, **11a**, **11b**, **10a**, **13** ou **14** ($7,20 \times 10^{-5}$ mol) em acetonitrilo (750 mL), durante o tempo referido na Tabela 8.

Ao longo do processo, de cinco em cinco minutos, recolheram-se amostras (0,5 mL), e injectaram-se no HPLC, usando as condições descritas na Tabela 8.

Tabela 8: Tempo de irradiação e condições de HPLC.

Composto	Tempo de irradiação (min.)	HPLC	
		Eluente	TR (min.)
11g Tos-Phe-Obm	35	A	6,86
10e Tos-Phe-OH	35	B	3,3-3,4
11a Z-Phe-Obb	65	A	7,2
11b Z-Phe-Obh	60	A	5,2
10a Z-Phe-OH	60	A/ B	3,6/ 3,2
13 H-Phe-OH	--	B	2,7
14 H-Phe-Ala-OMe. HCl	60	--	--

A - Acetonitrilo/ água 3:1; B - Acetonitrilo/ água 3:1 e TFA 0,1%.

Volume injectado = 10 µL; Comprimento de onda de detecção = 240 nm; Fluxo do eluente = 0,8 mL/ min. TR – tempo de retenção.

Bibliografia

Bibliografia

1962

- J. C. Anderson e C. B. Reese, *Tetrahedron Lett.*, 1962, **3**, 1.
- J. A. Barltrop e P. Schofield, *Tetrahedron Lett.*, 1962, **3**, 697.

1963

- a) - H. E. Zimmerman e V. R. Sandel, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 915.
- b) - H. E. Zimmerman e S. Somasekhara, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 922.

1964

- J. C. Sheehan e R. M. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, **86**, 5277.

1965

- J. A. Barltrop e P. Schofield, *J. Chem. Soc.*, 1965, 4758.

1966

- J. W. Chamberlin, *J. Org. Chem.*, 1966, **31**, 1658.

1970

- A. Patchornick, B. Amit e R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, **92**, 6333.

1971

- J. C. Sheehan, R. M. Wilson e A. W. Oxford, *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, **93**, 7222.

1972

- C. Birr, W. Lochinger, G. Stahnke e P. Lang, *Liebigs Ann. Chem.*, 1972, **763**, 162.
- a) - U. Zehavi, A. Patchornik e B. Amit, *J. Org. Chem.*, 1972, **37**, 2281.
- b) - U. Zehavi e A. Patchornik, *J. Org. Chem.*, 1972, **37**, 2285.

1973

- J. C. Sheehan e K. Umezawa, *J. Org. Chem.*, 1973, **38**, 3771.

1974

- G. Giovanninetti, V. Cavrini, A. Chiarini, L. Garuti e A. Mannini-Palenzona, *Farmaco. Ediz. Scientifica*, 1974, **29**, 375.

1975

- D. G. Bartholomew e A. D. Broom, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1975, 38.
- S. M. Kalbag e R. W. Roeske, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, **97**, 440.
- F. D. Lewis, R. T. Lauterbach, H. G. Heine e W. Hartmann, H. Rudolph, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, **97**, 1519.
- M. Rubinstein, B. Amit e A. Patchornik, *Tetrahedron Lett.*, 1975, **17**, 1445.

1976

- A. Jackson, E. Johnstone e A. W. Robert, *Synthesis*, 1976, 685.
- J. V. Morris, M. A. Mahaney e J. R. Huber, *J. Phys. Chem.*, 1976, **80**, 969.

1977

- F. Bohlmann e C. Zdero, *Chem. Ber.*, 1977, **110**, 487.
- J. Engels e E.-J. Schlaeger, *J. Med. Chem.*, 1977, **20**, 907.
- E. Ohtsuka, S. Tanaka e M. Ikehara, *Synthesis*, 1977, 453.

1978

- A. Braga de Oliveira, G. G. De Oliveira, F. Carazza, R. Braz Filho, C. T. Moreira Bacha, L. Bauer, G. A. de A. B. Silva e N. C. S. Siqueira, *Tetrahedron Lett.*, 1978, **30**, 2653.
- J. H. Kaplan, B. Forbush e J. F. Hoffman, *Biochemistry*, 1978, **17**, 1929.
- a) - E. Ohtsuka, S. Tanaka, T. Tanaka e M. Ikehara, *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, **100**, 4580.
- b) - E. Ohtsuka, S. Tanaka e M. Ikehara, *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, **100**, 8210.

1980

- V. N. R. Pillai, *Synthesis*, 1980, 1.

1982

- R. Gaggi, G. Giovanninetti e L. Garuti, *Farmaco. Ediz. Scientifica*, 1982, **37**, 149.

1983

- D. Gravel, J. Hebert e D. Thoraval, *Can. J. Chem.*, 1983, **61**, 400.

1984

- M. Bodansky e A. Bodansky, *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, Berlin, 1984, 169.
- J. Einhorn, P. Demerseman, R. Royer, R. Cavier e P. Gayral, *Eur. J. Med. Chem.*, 1984, **19**, 405.
- J. M. Nerbonne, S. Richard, J. Nargeot e H. A. Lester, *Nature*, 1984, **310**, 74.

1985

- E. Reichmanis, B. C. Smith e R. Gooden, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, 1985, **23**, 1.

1987

- L. Grehn, K. Gunnarson e U. Ragnarsson, *Acta Chem. Scand. Ser. B.*, 1987, **41**, 18.
- D. H. Miles, D. S. Lho, A. A. De la Cruz, E. D. Gomez, J. A. Weeks e J. L. Atwood, *J. Org Chem.*, 1987, **52**, 2930.
- V. N. R. Pillai, *Org. Photochem.*, 1987, **9**, 225.

- A. E. Siegrist, H. Hefti, H. R. Meyer e E. Schmidt, *Review of Progress in Coloration*, 1987, **17**, 39.

- H. Schupp, W. K. Wong e W. Schnabel, *J. Photochem.*, 1987, **36**, 85.

- Q. Q. Zhu, W. Schnabel e H. Schupp, *J. Photochem.*, 1987, **39**, 317.

1988

- S. R. Adams, J. P. Y. Kao, G. Gryniewicz, A. Minta e R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 3212.

- D. Armesto, W. M. Horspool, M. J. Ortiz e R. P. Ossorio, *Synthesis*, 1988, 799.

- T. Tanaka, M. Orita, S. Uesugi e M. Ikehara, *Tetrahedron*, 1988, **44**, 4331.

- J. W. Walker, G. P. Reid, J. A. McCray e D. R. Trentham, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 7170.

1989

- S. R. Adams, J. P. Y. Kao e R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 7957.

1990

- J. E. Baldwin, A. W. McConnaughie, M. G. Moloney, A. J. Pratt e S. B. Shim, *Tetrahedron*, 1990, **46**, 6879.

- J. F. Cameron e J. M. J. Fréchet, *J. Org. Chem.*, 1990, **55**, 5919.

- H. Irie, R. Matsumoto, M. Nishimura e Y. Zhang, *Chem. Pharm. Bull.*, 1990, **38**, 1852.

- J. Jakupovic, A. Schuster, U. Ganzer, F. Bohlmann e P. E. Boldt, *Phytochem.*, 1990, **29**, 2217.

- M. Wilcox, R. W. Viola, K. W. Johnson, A. P. Billington, B. K. Carpenter, J. A. McCray, A. P. Guzikowski e G. P. Hess, *J. Org. Chem.*, 1990, **55**, 1585.

1991

- J. F. Cameron e J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 4303.

- S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu e D. Solas, *Science*, 1991, **251**, 767.

- M. Iwamura, C. Hodota e M. Ishibashi, *Synlett*, 1991, 35.

- D. H. Miles, V. Chittawong, D. S. Lho, A. M. Payen, A. A. De la Cruz, E. D. Gomez, J. A. Weeks e J. L. Atwood, *J. Nat. Prod.*, 1991, **54**, 286.

- R. D. H. Murray, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, 1991, **58**, 84.

- S. A. Robertson, J. A. Ellman e P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 2722.

- P. K. Zubaidha, S. P. Chavan, U. S. Racherla e N. R. Ayyangar, *Tetrahedron*, 1991, **47**, 5759.

1992

- J. E. T. Corrie e D. R. Trentham, *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, 1992, 2409.

- R. S. Givens, P. S. Athey, L. W. Kueper, B. Matuszewski e J.-Y. Xue, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 8708.

- M. E. Schwartz, R. R. Breaker, G. T. Asteriadis, J. S. de Bear e G. R. Gough, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1992, **2**, 1019.

1993

a) - R. S. Givens, P. S. Athey, B. Matuszewski, L. W. Kueper, J.-Y. Xue e T. Fister, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 6001.

b) - R. S. Givens e L. W. Kueper, *Chem. Res.*, 1993, **93**, 55.

- IUPAC, *A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds, Recommendations*, 1993, Blackwell Science, Oxford, 1993.

1994

- S. Martina, S. A. MacDonald e V. Enkelmann, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 3281.

- A. C. Pease, D. A. Solas, E. J. Sullivan, M. T. Cronin, C. P. Holme e S. P. A. Fodor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**, 5022.

- M. C. Pirrung e S. W. Shuey, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 3890.

1995

- M. Abdul-Aziz, J. Auping e M. A. Meador, *J. Org. Chem.*, 1995, **60**, 1303.

- J. F. Cameron, C. G. Willson e J. M. J. Fréchet, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1995, 923.

- J. M. Peach, A. J. Pratt e J. S. Snaith, *Tetrahedron*, 1995, **51**, 10013.

a) - M. C. Pirrung e J. C. Bradley, *J. Org. Chem.*, 1995, **60**, 6270.

b) - M. C. Pirrung e J. C. Bradley, *J. Org. Chem.*, 1995, **60**, 1116.

c) - M. C. Pirrung e C. Y. Huang, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 5883.

- H. E. Zimmerman, *J. Am. Soc.*, 1975, **117**, 8988.

1996

- J. F. Cameron, C. G. Willson e J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 12925.

- K. R. Gee, L. W. Kueper, J. Barnes, G. Dudley e R. S. Givens, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 1228.

- R. S. Givens e C.-H. Park, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 6259.

- M. Lipson e N. J. Turro, *J. Photochem. Photobiol. A. Chem.*, 1996, **99**, 93.

- M. H. B. Stowell, R. S. Rock, D. C. Rees e S. I. Chan, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 307.

1997

- A. Banerjee e D. E. Falvey, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 6245.

- J. F. Cameron, C. G. Willson e J. M. J. Fréchet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1997, 2429.

- R. S. Givens, A. Jung, C.-H. Park, J. Weber e W. Barlett, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 8369.

- A. Hasan, K. P. Stengele, H. Giegrich, P. Cornwell, K. R. Isham, R. A. Sachleben, W. Pfeleiderer e R. S. Foote, *Tetrahedron*, 1997, **53**, 4247.

- O. Kayser e H. Kolodziej, *Planta Med.*, 1997, **63**, 508.

- G. H. McGall, A. D. Barone, M. Diggelmann, S. P. A. Fodor, E. Gentalen e N. Ngo, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 5081.

- G. Papageorgiou e J. E. T. Corrie, *Tetrahedron*, 1997, **53**, 3917.

- C.-H. Park e R. S. Givens, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 2453.

- J. A. Pinock, *Acc. Chem. Res.*, 1997, **30**, 43.

- S. Pitsch, *Helv. Chim. Acta*, 1997, **80**, 2286.

- A. Routledge, C. Abell e S. Balasubramanian, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 1227.

1998

- J. E. T. Corrie, *Tetrahedron*, 1998, **54**, 5407.

- K. Ishiguro, Y. Ohira e H. Oku, *J. Nat. Prod.*, 1998, **61**, 1126.

- A. Misetich e M. K. Boyd, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 1653.

- A. K. Mitra, A. De, N. Karchaudhuri, S. K. Misra e A. K. Mukopadhyay, *J. Indian Chem. Soc.*, 1998, **75**, 666.

- M. C. Pirrung, L. Fallon e G. McGall, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 241.

- T. Voelker, T. Ewell, J. Joo e E. D. Edstrom, *Tetrahedron Letters*, 1998, **39**, 359.

1999

- A. Banerjee, K. Lee e D. E. Falvey, *Tetrahedron*, 1999, **55**, 12699.

- R. M. Christie e C.-H. Lui, *Dyes and Pigments*, 1999, **42**, 85 e referências citadas.

- M. P. Coleman e M. K. Boyd, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 7911.

- T. Furuta, S. S.-H. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk e R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, **96**, 1193.

- T. W. Greene e P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999.
- M. C. Pirrung, Y. R. Lee, K. Park e J. B. Springer, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 5042.
- A. Stutz e S. Pitsch, *Synlett*, 1999, 930.

2000

- M. Beier e J. D. Hoheisel, *Nucleic Acids Res.*, 2000, **28**, e11.
- C. G. Bochet, *Tetrahedron Lett.*, 2000, **41**, 6339.
- E. Gershonov, I. Goldwasser, M. Fridkin e Y. Shechter, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 2530.
- R. S. Givens, J. F. W. Weber, P. G. Conrad, G. Orosz, S. L. Donahue e S. A. Thayer, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 2687.
- R. Hovius, P. Vallotton, T. Wohland e H. Vogel, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2000, **21**, 266.
- K. Lee e D. E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 9361.
- P. Quillardet, V. Minhel, X. Arrault, M. Hofnung e E. Touati, *Mutat. Res.*, 2000, **470**, 177.

2001

- H. Ando, T. Furuta, R. Y. Tsien e H. Okamoto, *Nat. Genet.*, 2001, **28**, 317.
- P. Berroy, M. L. Viriot e M. C. Carré, *Sens. Actuators, B*, 2001, **74**, 186.
- C. G. Bochet, *Angew Chem. Int. Ed.*, 2001, **40**, 2071.
- G. Cravotto, G. M. Nano, G. Palmisano e S. Tagliapietra, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2001, **12**, 707.
- D. D'Addona e C. G. Bochet, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 5227.
- H. Du e M. K. Boyd, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 6645.
- P. K. Frederiksen, M. Jorgensen e P. R. Ogilby, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 1215.
- T. Furuta, Y. Hirayama e M. Iwamura, *Org. Lett.*, 2001, **3**, 1809.
- K. M. Mahadevan, B. Padmashali e V. P. Vaidya, *Indian J. Heterocycl. Chem.*, 2001, **11**, 15.
- H. L. S. Maia, L. S. Monteiro e J. Sebastião, *Eur. J. Org. Chem.*, 2001, 1967.
- T. D. Poulsen, P. K. Frederiksen, M. Jorgensen, K. V. Mikkelsen e P. R. Ogilby, *J. Phys. Chem. A.*, 2001, **105**, 11488.
- S. Sastry, *Biophys. Chem.*, 2001, **91**, 191.
- Y. Shigeri, Y. Tatsu e N. Yumoto, *Pharmacology & Therapeutics*, 2001, **91**, 85.

- J. Shobini, A. K. Mishra, K. Sanhya e N. Chandra, *Spectrochem. Acta. A.*, 2001, **57**, 1133.

2002

- X. Arrault, V. Michel, P. Quillardet, M. Hofnung e E. Touati, *Mutagenesis*, 2002, **17**, 101.

- J. D. Hirsch, L. Eslamizar, B. J. Filanoski, N. Malekzadeh, R. P. Haugland, J. M. Beechem e R. P. Haugland, *Anal. Biochem.*, 2002, **308**, 343.

- M. Hofnung, P. Quillardet, V. Michel e E. Touati, *Res. Microbiol.*, 2002, **153**, 427.

- B. T. Housemen, J. H. Huh e M. Mrksich, *Nat. Biotechnol.*, 2002, **20**, 270.

- S. Kirkiacharian, D. T. Thuy, S. Sicsic, R. Bakhchinian, R. Kurkjian e T. Tonnaire, *IL Farmaco*, 2002, **57**, 703.

- K. H. Lee e B. R. Huang, *Eur. J. Med. Chem.*, 2002, **37**, 333.

- W. Lin e D. S. Lawrence, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 2723.

- H. J. Montgomery, B. Perdicakis, D. Fishlock, G. A. Lajoie, E. Jervis e J. G. Guillemette, *Bioorg. Med. Chem.*, 2002, **10**, 1919.

- G. Vernet, *Virus Res.* 2002, **82**, 65.

- C. J. Wang, Y. J. Hsieh, C. Y. Chu, Y. L. Lin e T. H. Tseng, *Cancer Lett.*, 2002, **183**, 163.

2003

- H. Ammar, S. Fery-Forgues e R. El Gharbi, *Dyes Pigments*, 2003, **57**, 259-265.

- K. R. Bhushan, C. DeLisi e R. A. Laursen, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 8585.

- E. Gikas, M. Parissi-Poulou e M. Kazanis, *Anal. Chim. Acta*, 2003, **489**, 153.

- M. Hranjec, M. Grdisa, K. Pavelic, D. W. Boykin e G. Karminski-Zamola, *IL Farmaco*, 2003, **58**, 1319.

- M. Kessler, R. Glatthar, B. Giese e C. G. Bochet, *Org Lett.*, 2003, **5**, 1179.

- M. Lu, O. D. Fedoryak, B. R. Moister e T. M. Dore, *Org. Lett.*, 2003, **5**, 2119.

- G. R. Madhavan, V. Balraju, B. Mallesham, R. Chaknabarti e V. B. Lohray, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 2547.

- K. M. Mahadevan e V. P. Vaidya, *Indian J. Pharm. Sci.*, 2003, **65**, 128.

- V. G. Robu, E. S. Pfeiffer, S. L. Robia, R. C. Balijepalli, Y. Pi, T. J. Kamp e J. W. Walker, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 48154.

- A. Z. Susuki, T. Watanabe, M. Kawamoto, K. Nishiyama, H. Yamashita, M. Iwamura e T. Furuta, *Org. Lett.*, 2003, **5**, 4867.

2004

- T. Berthelot, G. Lain, L. Latxague e G. Déleris, *J. Fluoresc.*, 2004, **14**, 671.
- T. Furuta e K. Noguchi, *Trends Anal. Chem.*, 2004, **23**, 511.
- R. Gatti, M. G. Gioia, P. Andreatta e G. Pentassuglia, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, **35**, 339.
- A. Goel e M. Dixit, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 8819 e referências citadas.
- G. P. Romanelli, D. Bennardi, D. M. Ruiz, G. Baronetti, H. J. Thomas e J. C. Autino, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 8935.
- A. Song, X. Wang, J. Zhang, J. Marick, C. B. Lebrilla e K. S. Lam, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, **14**, 161.

2005

- S. Bourgault, M. Létourneau e A. Fournier, *Peptides*, 2005, **26**, 1475.
- S. Kantevari, C. V. Narasinhaji e H. B. Mereyala, *Tetrahedron*, 2005, **61**, 5849.
- L.-S. Li, J. L. Babendure, S. C. Sinha, J. M. Olefsky e R. A. Lerner, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, **15**, 3917.
- Z.-C. Liu, D.-S. Shin, K.-T. Lee, B.-H. Jun, Y.-K. Kim e Y.-S. Lee, *Tetrahedron*, 2005, **61**, 7967.
- K. K. Park e J. Jeong, *Tetrahedron Lett.*, 2005, **61**, 545.
- M. K. Potdar, M. S. Rasalkar, S. S. Mohile e M. M. Salunkhe, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 2005, **232**, 249.
- D. M. Rothman, M. D. Shults e B. Imperiali, *Trends in Cell Biology*, 2005, **15**, 502.
- R. Sabou, W. F. Hoelderich, D. Ramprasad e R. Weinand, *J. Catal.*, 2005, **232**, 34.
- G. V. M. Sharma, J. J. Reddy, P. S. Lakshumi e P. R. Krishna, *Tetrahedron Lett.*, 2005, *no prelo*.
- V. R. Shembekar, Y. Chen, B. K. Carpenter e G. P. Hess, *Biochemistry*, 2005, **44**, 7107.
- V. Singh, S. Kaur, V. Sapehiya, J. Singh e G. L. Kad, *Catal. Commun.*, 2005, **6**, 57.
- A. K. Singh e K. K. Prashant, *Tetrahedron Lett.*, 2005, **46**, 5563.
- H. Valizadeh e A. Shockravi, *Tetrahedron Lett.*, 2005, **46**, 3501 e referências citadas.