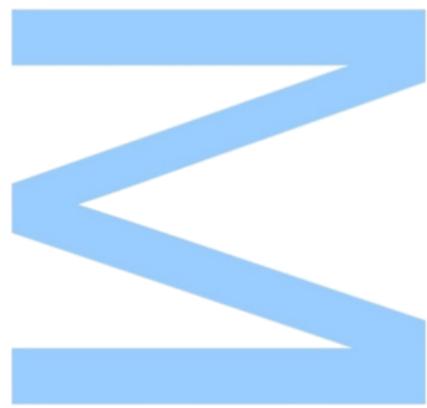
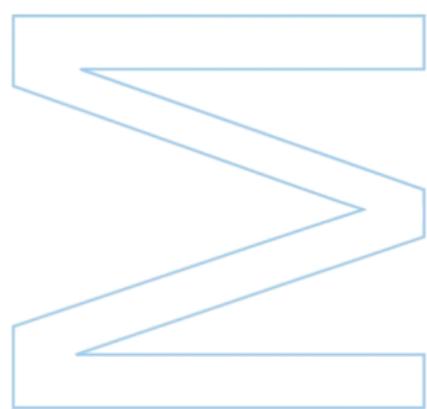


Síntese e Avaliação Biológica de Conjugados Lipofílicos do Ácido Glicil-L- Prolil-L-Glutâmico com Aminas Neuroprotetoras

Sara Carolina Silva Reis

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em
Química

2018

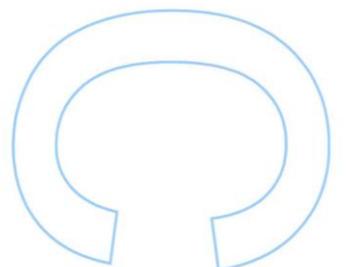
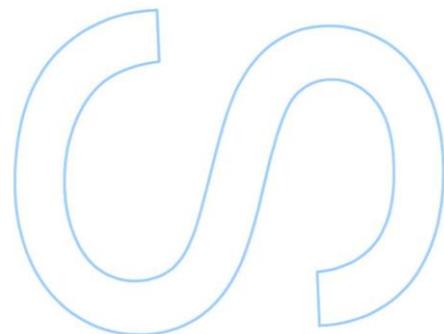
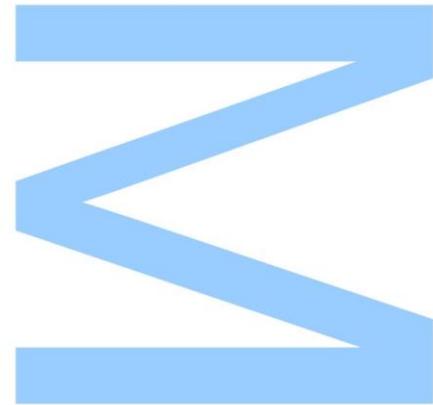


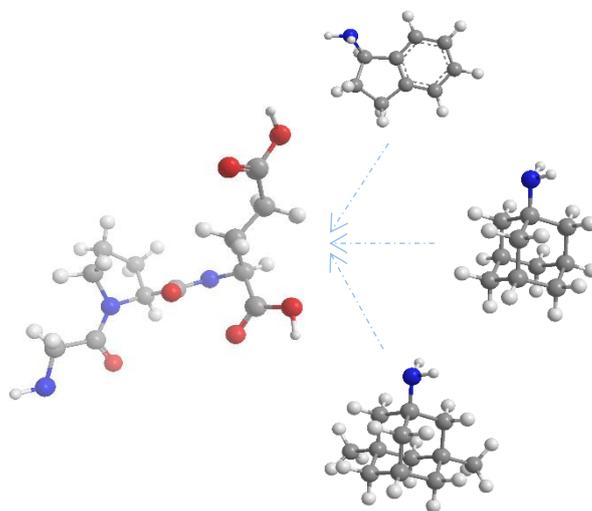


Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____





Síntese e Avaliação Biológica de Conjugados Lipofílicos do Ácido Glicil-L- Prolil-L-Glutâmico com Aminas Neuroprotetoras

Sara Carolina Silva Reis

Mestrado em Química

Departamento de Química e Bioquímica

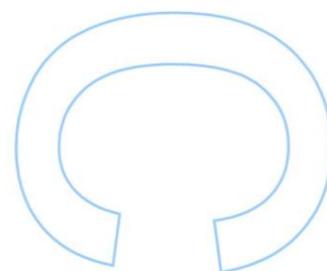
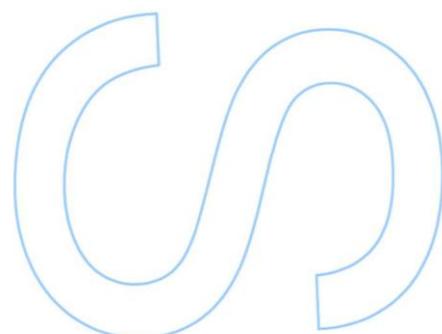
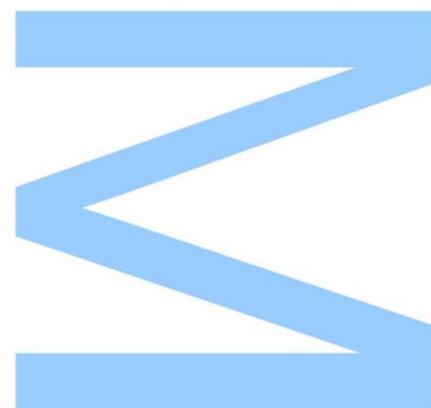
2018

Orientador

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

Coorientador

Márcia Almeida Liz, Investigadora Auxiliar, i3S-Instituto de Investigação e
Inovação em Saúde.



*“Science is not only a disciple of reason but, also,
one of romance and passion.”*

Stephen Hawking

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer ao Prof. Dr. José Enrique Rodríguez Borges, como meu orientador, agradeço pela oportunidade de participar no seu grupo investigação durante todo o meu percurso académico. O seu acolhimento permitiu aumentar a minha capacidade de iniciativa tendo contribuído para a minha evolução na síntese orgânica.

À Dr. Márcia Liz e Jéssica Eira (i3S), como coorientadora e aluna de doutoramento, respetivamente, pela colaboração incessante e persistente neste projeto ao realizarem os ensaios *in vitro* de neuroprotecção e todos os conselhos transmitidos.

À Prof. Dr. Paula Gomes, como líder do grupo de investigação no qual me encontro inserida, agradeço pela simpatia, pelo apoio e suporte que me proporcionou.

Aos colegas de laboratório (lab. 2.24) que tive ao longo do meu percurso académico, Ivo Dias, Mariana Sousa, Sandra Silva, Sílvia Vinhas e Vânia Gomes pela disponibilidade permanentemente demonstrada, para me ajudarem sempre que surgia alguma dificuldade e pela boa disposição fazendo com que dias longos de trabalho passassem mais rapidamente.

Ao Ivo Dias, como professor e parceiro na investigação, por todos os ensinamentos, paciência e alegria. A tua presença foi essencial para que conseguisse aprender e evoluir. Obrigada por me acompanhares sempre ao longo deste percurso, pelos teus conselhos, pela tua amizade e por todo o conhecimento que me transmitiste. Juntos ultrapassamos sempre os desafios que a investigação nos trouxe.

Às colegas do laboratório 2.28, Ana Gomes, Ana Teresa Silva, Cátia Teixeira, Melanie Fonte, Natália Tassi e Rita Ferreira, não só pela contribuição cedida no surgimento de algum problema relativo à síntese, mas também por todos os bons momentos proporcionados. Obrigada essencialmente à Melanie Fonte, como colega e amiga, por ter estado sempre presente nos bons e maus momentos, tendo sempre um bom conselho em todas as ocasiões; tu sabes o que significas.

À Cláudia Alves e Mafalda Flores, como colegas, pela boa receção proporcionando com que me sentisse em casa e pela boa disposição.

Ao Alexandre Oliveira, como namorado, pelo apoio incansável nos momentos de maior *stress*, pela compreensão nas épocas de maior ausência e pelos conselhos sempre que foram necessários. Quero agradecer por teres estado sempre ao meu lado, tendo facilitado toda a minha etapa académica.

Por fim, quero agradecer à minha família, por me terem oferecido esta oportunidade para conseguir enriquecer os meus conhecimentos. Dou muito valor ao apoio e sacrifício que me foi dado. Obrigada pela dedicação, tendo sido essencial para o aproveitamento desta fase.

RESUMO / ABSTRACT

O aumento da esperança média de vida é um fator determinante no surgimento de doenças neurodegenerativas (DNs), como por exemplo Doença de Alzheimer (DA) e Doença de Parkinson (DP), uma vez que se trata de doenças com maior incidência a partir dos 60 anos.

Estas doenças representam um impacto socio-económico nos países desenvolvidos ou em vias de desenvolvimento, sendo que a abordagem terapêutica para estas DNs é, contudo, limitada.

O ácido glicil-L-prolil-L-glutâmico (GPE) é um tripéptido endógeno com potencial terapêutico em condições neurodegenerativas como a DA e a DP, tendo sido patenteado pela farmacêutica *Neuren* sob a designação de Glypromate®. Todavia, este neuropéptido não foi aprovado como agente terapêutico devido à sua rápida degradação enzimática frente a carboxipeptidases.

Tendo em conta o potencial terapêutico do GPE e as suas propriedades farmacocinéticas desfavoráveis, têm sido feitas modificações estruturais ao nível dos três aminoácidos que compõem este neuropéptido. Relativamente à conjugação do GPE com outras biomoléculas está descrito até ao momento na literatura apenas um conjugado com o ácido lipóico, com resultados promissores. Desta forma, este trabalho pretendeu dar um contributo ao desenvolvimento de novos potenciais fármacos através da conjugação do GPE com aminas lipofílicas bioativas com atividade neuroprotetora *per se*, com intuito de promover um possível sinergismo ao nível da neuroprotecção, com conseqüente aumento da lipofilicidade deste tripéptido.

Assim, este projeto compreende a síntese e avaliação biológica de conjugados do GPE com o aminoindano (**a**), amantadina (**b**) e memantina (**c**), sendo estas duas últimas usadas presentemente na prática clínica. Relativamente à síntese, esta iniciou-se pela funcionalização dos glutamatos (através dos ácidos carboxílicos, tanto na cadeia lateral como na posição α) *via* acoplamento peptídico com as aminas neuroprotetoras (**a**, **b** e **c**). De seguida, os restantes aminoácidos da sequência do GPE (glicina e prolina) são introduzidos através de uma metodologia quimioseletiva de condensação peptídica *one-pot* previamente desenvolvida pelo grupo de investigação. Por fim, a amina livre da glicina é mascarada inserindo dois grupos metilo *via* aminação reductiva. Desta forma, foram preparados 12 conjugados finais com rendimentos globais entre os 25 – 63%.

Relativamente aos ensaios biológicos de neuroprotecção *in vitro*, usando células CAD e H₂O₂ como agente neurotóxico, estes foram realizados para os conjugados do GPE-aminoindano e respetivos controlos, tendo-se verificado que o conjugado **C-4a** é um candidato promissor uma vez que potenciou a viabilidade celular em 26% (MTT) em condições de *stress* oxidativo. Presentemente, encontram-se a decorrer os ensaios de neuroprotecção para as restantes famílias de conjugados preparados neste trabalho.

The increase in the average life expectancy is a determining factor in the development of neurodegenerative diseases (NDs), such as Alzheimer's Disease (AD) and Parkinson's Disease (PD), since they constitute the higher incidence diseases beyond the sixties.

These diseases represent a socio-economic impact in developed or developing countries. However, the therapeutic approach for these NDs, is limited.

Glycyl-L-prolyl-L-glutamic acid (GPE) is an endogenous tripeptide with therapeutic potential for neurodegenerative conditions such as AD and PD, that has been patented by the pharmaceutical company *Neuren* under the name Glypromate®. Nonetheless, this neuropeptide was not approved as a therapeutic agent because of its rapid enzymatic degradation by carboxypeptidases.

Considering the therapeutic potential of GPE and its unfavorable pharmacokinetic properties, structural modifications have been made at the level of the three amino acids that constitute this neuropeptide. Regarding the conjugation of the GPE with other biomolecules, only one conjugate with lipoic acid has been described so far in the literature, with promising results. In this way, this work aimed to contribute to the development of new potential drugs by the conjugation of GPE with bioactive lipophilic amines with neuroprotective activity *per se*, to promote a possible synergism regarding the neuroprotection, with consequent increase in the lipophilicity of this tripeptide.

Thus, this project comprised the synthesis and the biological evaluation of GPE conjugates with aminoindane (**a**), amantadine (**b**) and memantine (**c**), the latter two being currently used in clinical practice. Regarding the synthesis, it was initiated by the functionalization of glutamates (*via* the carboxylic acids in both the side chain and the α -position) by peptide coupling with the neuroprotective amines (**a**, **b** and **c**). Subsequently, the remaining amino acids of the GPE sequence (glycine and proline) were introduced through a chemoselective peptide condensation using a one-pot methodology previously developed by the research group. Finally, the free glycine amine is masked by introducing two methyl groups by reductive amination. In this way, 12 final conjugates were prepared with overall yields between 25 – 63%.

Regarding biological assays *in vitro* of neuroprotection using CAD cells and H₂O₂ as the neurotoxic agent, they were performed for the GPE-aminoindane conjugates and their controls, the **C-4a** conjugate was found to be a promising candidate since it potentiated the cellular viability in 26% (MTT) under conditions of oxidative stress. At present, neuroprotection assays are ongoing for the remaining conjugate families primed in this work.

PALAVRAS-CHAVE

Aminas bioativas, Conjugados, Doença de Alzheimer, Doenças neurodegenerativas, Doença de Parkinson, Glypromate[®], GPE, Neuroprotecção, Sinergismo, Síntese Orgânica, Síntese Peptídica em Solução, Química Medicinal.

KEYWORDS

Alzheimer's Disease, Bioactive Amines, Conjugates, Glypromate[®], GPE, Medicinal Chemistry, Neurodegenerative Diseases, Neuroprotection, Organic Synthesis, Parkinson's Disease, Peptide Solution Synthesis, Synergism.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	XXIX
ÍNDICE DE ESQUEMAS	XXXIII
ÍNDICE DE TABELAS	XXXIX
LISTA DE ABREVIATURAS	XLIII
LISTA DE COMPOSTOS SINTETIZADOS	LIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. SISTEMA NERVOSO	3
1.1.1. Unidades funcionais do Sistema Nervoso	3
1.1.2. Divisões do Sistema Nervoso	5
1.1.2.1. Sistema nervoso central	6
1.1.2.2. Sistema nervoso periférico	8
1.2. DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS	8
1.2.1. Doença de Alzheimer	9
1.2.1.1. Histopatologia	9
1.2.1.2. Tratamento / Farmacoterapia	10
1.2.2. Doença de Parkinson	13
1.2.2.1. Histopatologia	13
1.2.2.2. Tratamento / Farmacoterapia	14
1.3. GPE, UM TRIPÉPTIDO NEUROPROTETOR	19
2. ESTADO DA ARTE	21
2.1. MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS REALIZADAS NO GPE	23
2.1.1. Modificações estruturais no resíduo da Glicina	23

2.1.2. Modificações estruturais no resíduo da Prolina	25
2.1.3. Modificações estruturais no resíduo do Ácido Glutâmico	28
2.1.4. Modificações estruturais – análogos macrocíclicos	30
2.2. CONJUGADOS DO GPE	31
3. ÂMBITO DO TRABALHO E OBJETIVOS	33
3.1. ÂMBITO DO TRABALHO	35
3.2. OBJETIVOS	35
3.3. PLANO DE TRABALHOS	36
3.4. RESOLUÇÃO DA AMINA 1-METIQ	39
3.4.1. Objetivo / Plano de trabalhos	39
4. DISCUSSÃO E RESULTADOS OBTIDOS	41
4.1. SÍNTESE ORGÂNICA	43
4.1.1. Acoplamento Peptídico	43
4.1.1.1. Fundamentos da síntese peptídica	43
4.1.1.2. α -Aminoácidos: natureza química e estereoquímica	45
4.1.1.3. Atividade ótica	46
4.1.1.4. Formação da ligação amida	46
4.1.1.5. Grupos <i>N</i> -protetores	48
4.1.1.6. Grupos <i>C</i> -protetores	49
4.1.1.7. Agentes de acoplamento	50
4.1.1.8. Método de síntese <i>One-pot</i>	57
4.1.2. Reação de <i>N</i> -alquilação – Aminação redutiva	63

4.1.2.1. Agentes redutores	64
4.1.3. Resolução da amina 1-MeTIQ	69
4.1.3.1. Introdução geral	69
4.1.3.2. Resolução Enzimática	70
4.1.3.2.1. Resolução Enzimática da 1-MeTIQ	73
4.1.3.3. Resolução Química	74
4.1.3.3.1. Resolução Química da 1-MeTIQ	78
4.2. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	93
4.2.1. Propriedades farmacológicas	93
4.2.2. Ensaio <i>in vitro</i>	96
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS / PERSPETIVAS	99
6. PARTE EXPERIMENTAL	105
6.1. SÍNTESE ORGÂNICA	107
6.1.1. Aspetos gerais	107
6.1.2. Síntese dos conjugados de GPE com Aminoindano	110
6.1.2.1. Síntese do Boc-Glu(Aminoindano)-OMe (C-1a)	110
6.1.2.2. Síntese do Boc-Glu(OMe)-Aminoindano (C-6a)	112
6.1.2.3. Síntese do H-Glu(Aminoindano)-OMe (C-2a)	114
6.1.2.4. Síntese do H-Glu(OMe)-Aminoindano (C-7a)	116
6.1.2.5. Síntese do Boc-Gly-Pro-Glu(Aminoindano)-OMe (C-3a)	118
6.1.2.6. Síntese do Boc-Gly-Pro-Glu(OMe)-Aminoindano (C-8a)	120
6.1.2.7. Síntese do H-Gly-Pro-Glu(Aminoindano)-OMe (C-4a)	122
6.1.2.8. Síntese do H-Gly-Pro-Glu(OMe)-Aminoindano (C-9a)	124
6.1.2.9. Síntese do (N,N-dimetil-Gly)-Pro-Glu(Aminoindano)-OMe (C-5a)	126

6.1.2.10. Síntese do (<i>N,N</i> -dimetil-Gly)-Pro-Glu(OMe)-Aminoindano (C-10a)	128
6.1.3. Síntese dos conjugados de GPE com Amantadina	130
6.1.3.1. Síntese do Boc-Glu(Amantadina)-OMe (C-1b)	130
6.1.3.2. Síntese do Boc-Glu(OMe)-Amantadina (C-6b)	132
6.1.3.3. Síntese do H-Glu(Amantadina)-OMe (C-2b)	134
6.1.3.4. Síntese do H-Glu(OMe)-Amantadina (C-7b)	136
6.1.3.5. Síntese do Boc-Gly-Pro-Glu(Amantadina)-OMe (C-3b)	138
6.1.3.6. Síntese do Boc-Gly-Pro-Glu(OMe)-Amantadina (C-8b)	140
6.1.3.7. Síntese do H-Gly-Pro-Glu(Amantadina)-OMe (C-4b)	142
6.1.3.8. Síntese do H-Gly-Pro-Glu(OMe)-Amantadina (C-9b)	144
6.1.3.9. Síntese do (<i>N,N</i> -dimetil-Gly)-Pro-Glu(Amantadina)-OMe (C-5b)	146
6.1.3.10. Síntese do (<i>N,N</i> -dimetil-Gly)-Pro-Glu(OMe)-Amantadina (C-10b)	148
6.1.4. Síntese dos conjugados de GPE com Memantina	150
6.1.4.1. Síntese do Boc-Glu(Memantina)-OMe (C-1c)	150
6.1.4.2. Síntese do Boc-Glu(OMe)-Memantina (C-6c)	152
6.1.4.3. Síntese do H-Glu(Memantina)-OMe (C-2c)	154
6.1.4.4. Síntese do H-Glu(OMe)-Memantina (C-7c)	156
6.1.4.5. Síntese do Boc-Gly-Pro-Glu(Memantina)-OMe (C-3c)	158
6.1.4.6. Síntese do Boc-Gly-Pro-Glu(OMe)-Memantina (C-8c)	159
6.1.4.7. Síntese do H-Gly-Pro-Glu(Memantina)-OMe (C-4c)	161
6.1.4.8. Síntese do H-Gly-Pro-Glu(OMe)-Memantina (C-9c)	163
6.1.4.9. Síntese do (<i>N,N</i> -dimetil-Gly)-Pro-Glu(Memantina)-OMe (C-5c)	165
6.1.4.10. Síntese do (<i>N,N</i> -dimetil-Gly)-Pro-Glu(OMe)-Memantina (C-10c)	167
6.1.5. Síntese dos péptidos de controlo para os ensaios biológicos	169
6.1.5.1. Síntese do Boc-Gly-Pro-Glu(OMe)-OMe (C-I)	169
6.1.5.2. Síntese do H-Gly-Pro-Glu(OMe)-OMe (C-II)	171
6.1.5.3. Síntese do (<i>N,N</i> -dimetil-Gly)-Pro-Glu(OMe)-OMe (C-III)	173
6.1.6. Resolução da amina 1-MeTIQ	175
6.1.6.1. Síntese do (<i>S</i>)-(+)-10-canforsulfonato de 1-metil-1,2,3,4-tetraidroisoquinolin-2-io (C-1d)	175

6.1.6.2. Síntese da amina 1-MeTIQ a partir do sal C-1d	177
6.1.6.3. Derivatização da 1-MeTIQ isolada com o ácido de Mosher – Síntese do composto C-2d	179
6.1.6.4. Derivatização da 1-MeTIQ racémica com o ácido de Mosher – Síntese do composto C-2d	180
6.2. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	181
6.2.1. Ensaio <i>in vitro</i>	181
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	183

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO

Figura 1.1. Estrutura de um neurónio.	3
Figura 1.2. Representação simplificada de uma sinapse.	4
Figura 1.3. Organização do SNC.	6
Figura 1.4. Histopatologia da DA: A: Placas β -amilóide; B: Emaranhados neurofibrilares.	10
Figura 1.5. Substância negra em: A: cérebro saudável; B: cérebro com DP.	13
Figura 1.6. Corpos de Lewy intracitoplasmáticos.	14

2. ESTADO DA ARTE

Figura 2.1. Modificações realizadas no resíduo de Glicina do GPE.	24
Figura 2.2. Conformações <i>cis/trans</i> do GPE.	25
Figura 2.3. Primeiras modificações realizadas no resíduo da Prolina do GPE.	26
Figura 2.4. Outras modificações realizadas no resíduo da Prolina do GPE.	27
Figura 2.5. Primeiras modificações realizadas no resíduo do ácido glutâmico do GPE.	28
Figura 2.6. Outras modificações realizadas no resíduo do ácido glutâmico do GPE.	29
Figura 2.7. Análogos macrocíclicos do GPE.	30

4. DISCUSSÃO E RESULTADOS OBTIDOS

Figura 4.1. Metabolitos obtidos na digestão do aspartame.	43
Figura 4.2. Estrutura geral de um α -aminoácido.	45
Figura 4.3. Estereoquímica dos α -aminoácidos.	45
Figura 4.4. Exemplo esquemático da condensação peptídica (em solução), <i>via</i> éster ativado.	47
Figura 4.5. Representação em TLCs dos compostos C-1(a-c) e C-6(a-c) , salientando os respetivos valores de R_f (Eluente: AcOEt).	55
Figura 4.6. Representação geral de uma síntese peptídica one-pot (adaptada de Sampaio-Dias e co-autores).	57
Figura 4.7. Espectro de ^1H -RMN (realizado em CDCl_3) do produto secundário Boc-Gly-Pro-OSu, obtido na síntese do composto C-8c .	61
Figura 4.8. Efeito estérico de densidade eletrónica presente no $\text{NaBH}(\text{AcO})_3$.	66

Figura 4.9. Espectro de ¹ H-RMN em CDCl ₃ do composto Boc-Glu(1-MeTIQ)-OMe.	80
Figura 4.10. Espectros de ¹ H-RMN (CDCl ₃), truncados para o diastereoisómero isolado (C-1d) obtido da reação da 1-MeTIQ racémica e o cloreto (S)-(+)-10-canforsulfonilo a diferentes concentrações (A e B).	84
Figura 4.11. Espectro de massa (ESI-MS), em modo positivo, do composto C-1d .	85
Figura 4.12. Espectro de massa (ESI-MS), em modo negativo, do composto C-1d .	85
Figura 4.13. Espectro de ¹ H-RMN realizado ao reagente comercial cloreto de (S)-(+)-10-canfor-sulfonilo, em CDCl ₃ .	86
Figura 4.14. Espectro de ¹ H-RMN do reagente comercial cloreto de (S)-(+)-10-canfor-sulfonilo, em CDCl ₃ .	87
Figura 4.15. Espectro de ¹ H-RMN do reagente comercial ácido (1S)-canforsulfónico, em D ₂ O.	87
Figura 4.16. Espectro de ¹ H-RMN (em CDCl ₃) da amina 1-MeTIQ isolada.	89
Figura 4.17. Espectros de ¹⁹ F-RMN usando o ácido de Mosher referido com: A : 1-MeTIQ racémica; B : 1-MeTIQ isolada.	90
Figura 4.18. Estruturas otimizadas dos diastereoisómeros C-2d e C-3d .	92
Figura 4.19. Resultados da absorvância obtida para os conjugados de GPE com aminoindano e respetivos controlos, a uma concentração de 100 µm, após ensaio biológico de MTT utilizando células CAD.	97

6. PARTE EXPERIMENTAL

Figura 6.1. Numeração tida em conta para a atribuição dos prótons e carbonos nas análises de RMN efetuadas.	109
--	-----

ÍNDICE DE ESQUEMAS

1. INTRODUÇÃO

Esquema 1.1. Representação dos níveis de organização do sistema nervoso.	6
Esquema 1.2. Metabolismo da Rasagilina, evidenciando o produto maioritário.	16

3. ÂMBITO DO TRABALHO E OBJETIVOS

Esquema 3.1. Funcionalização dos glutamatos com aminas bioativas e remoção do grupo Boc.	37
Esquema 3.2. Síntese de conjugados do C-4(a-c) , C-5(a-c) , C-9(a-c) e C-10(a-c) .	37
Esquema 3.3. Síntese dos controlos C-II e C-III para ensaios biológicos.	38
Esquema 3.4. Esquema geral do plano de trabalhos para a resolução enzimática da 1-MeTIQ.	40
Esquema 3.5. Esquema geral do plano de trabalhos para a resolução química da 1-MeTIQ.	40

4. DISCUSSÃO E RESULTADOS OBTIDOS

Esquema 4.1. Mecanismo de remoção do grupo <i>N</i> -protetor Boc utilizando ATA.	48
Esquema 4.2. Formas tautoméricas do TBTU.	51
Esquema 4.3. Mecanismo de ativação/acoplamento <i>via</i> TBTU.	52
Esquema 4.4. Formação de guanidinas através da reação entre aminas primárias com TBTU.	53
Esquema 4.5. Síntese dos glutamatos funcionalizados C-1(a-c) e C-6(a-c) .	54
Esquema 4.6. Formação do L-pirolglutamato de metilo.	54
Esquema 4.7. Síntese dos compostos C-2(a-c) e C-7(a-c) .	56
Esquema 4.8. Mecanismo da síntese <i>one-pot</i> utilizada para o composto C-3a .	58
Esquema 4.9. Produtos secundários obtidos durante a síntese peptídica pelo método <i>one-pot</i> .	59
Esquema 4.10. Síntese dos compostos C-3(a-c) , C-8(a-c) e C-I .	60
Esquema 4.11. Síntese dos compostos C-4(a-c) , C-9(a-c) e C-II .	62

Esquema 4.12. Resumo geral dos produtos possíveis a partir da reação de aminação redutiva.	63
Esquema 4.13. Reação geral de aminação redutiva pelo método direto.	64
Esquema 4.14. Esquema geral de uma hidrogenação catalítica utilizada na aminação redutiva.	65
Esquema 4.15. Mecanismo de monometilação por aminação redutiva utilizando 1 eq. de formaldeído e triacetoxiborohidreto de sódio como agente redutor.	66
Esquema 4.16. Tentativa de síntese para obtenção do composto C-III utilizando a <i>N,N</i> -dimetilglicina.	67
Esquema 17. Síntese dos conjugados finais C-5(a-c) , C-10(a-c) e respetivo controlo C-III .	67
Esquema 4.18. Resolução do tartarato de sódio e amónio.	69
Esquema 4.19. Resolução química do ácido tartárico.	70
Esquema 4.20. Resolução enzimática do 1-aminoindano, utilizando subtilisina.	71
Esquema 4.21. Hidrólise de uma acetamida mediada pela lipase CALB.	71
Esquema 4.22. Resolução da 1-fenilprop-2-in-1-amina utilizando <i>Novozym</i> 435.	72
Esquema 4.23. Representação geral do processo de resolução cinética dinâmica.	72
Esquema 4.24. Resolução cinética dinâmica da α -feniletilamina, utilizando Pd/CALB e AcOEt.	73
Esquema 4.25. Tentativa de resolução cinética enzimática da 1-MeTIQ usando <i>Novozym</i> 435.	74
Esquema 4.26. Representação geral da resolução química utilizando um agente de resolução quiral.	75
Esquema 4.27. Resolução por cristalização da α -feniletilamina utilizando o ácido (<i>R,R</i>)-tartárico.	75
Esquema 4.28. Reação de basificação para obtenção da (<i>S</i>)-feniletilamina.	76
Esquema 4.29. Resolução da 1-(naftalin-1-il)etanamina, utilizando o ácido (<i>R</i>)-mandélico.	77
Esquema 4.30. Cristalização preferencial do ibuprofeno / (<i>S</i>)-lisina.	78
Esquema 4.31. Síntese quiral da 1-MeTIQ.	79

Esquema 4.32. Tentativa de resolução da 1-MeTIQ através do acoplamento com Boc-Glu(OH)-OMe <i>via</i> TBTU.	79
Esquema 4.33. Ácidos quirais utilizados na tentativa de resolução da 1-MeTIQ.	81
Esquema 4.34. Reação de formação dos diastereoisómeros utilizando cloreto de (S)-(+)-10-canfor-sulfonilo.	83
Esquema 4.35. Reação de ácido-base para a recuperação da 1-MeTIQ enantiomericamente pura.	88
Esquema 4.36. Derivatização da 1-MeTIQ racémica e previamente isolada utilizando o ácido de Mosher.	90
Esquema 4.37. Redução do MTT a MTT-Formazan.	96

ÍNDICE DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO

Tabela 1.1. Fármacos aprovados no tratamento da DA até ao presente.	12
--	----

4. DISCUSSÃO E RESULTADOS OBTIDOS

Tabela 4.1. Resultados obtidos na síntese dos glutamatos funcionalizados C-1(a-c) e C-6(a-c) .	55
Tabela 4.2. Resultados obtidos na síntese dos compostos C-2(a-c) e C-7(a-c) .	56
Tabela 4.3. Resultados obtidos na síntese dos compostos C-3(a-c) , C-8(a-c) e C-I .	61
Tabela 4.4. Resultados obtidos na síntese dos compostos C-4(a-c) , C-9(a-c) e C-II .	62
Tabela 4.5. Resultados obtidos na síntese dos compostos C-5(a-c) , C-10(a-c) e C-III .	68
Tabela 4.6. Quantidades utilizadas tentativa de resolução cinética enzimática da 1-MeTIQ.	74
Tabela 4.7. Eluentes testados para a separação dos diastereoisómeros de Boc-Glu(1-MeTIQ)-OMe.	80
Tabela 4.8. Condições utilizadas e resultados obtidos na tentativa de resolução da 1-MeTIQ por cristalização.	82
Tabela 4.9. Resultados obtidos na síntese do composto C-1d .	88
Tabela 4.10. Propriedades calculadas para o GPE, para os compostos finais C-4(a-c) e C-9(a-c) , e para o controlo C-II usando o software <i>Cheminformatics</i> (http://www.molinspiration.com).	93
Tabela 4.11. Propriedades calculadas para os compostos finais C-5(a-c) , C-10(a-c) e C-III , usando o software <i>Cheminformatics</i> (http://www.molinspiration.com).	95

6. PARTE EXPERIMENTAL

Tabela 6.1. Lista de reagentes utilizados.	107
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

#

δ	Desvio químico
α_D	Rotação específica
1-MeTIQ	1-Metil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina
6-OHDA	6-Hidroxidopamina

A

Aβ	β -Amilóide
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Etanol
AL	Ácido Lipóico
Ala	Alanina
Asp	Ácido aspártico
Asn	Asparagina
ATA	Ácido trifluoroacético

B

BBB	Barreira Hematoencefálica, do inglês <i>Blood-Brain barrier</i>
Boc	<i>Terc</i> -butoxicarbonilo
BuChE	Butirilcolinesterase

C

ca.	cerca
CAD	Células da linha tumoral catecolaminérgica diferenciadas, do inglês <i>Cath-a-differentiated</i>
CALB	Lipase <i>Candida Antarctica B</i> , do inglês <i>Candida Antarctica Lipase B</i>

Cbz	Benziloxicarbonilo
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CD₃OD	Metanol deuterado
ChEI	Inibidores de Colinesterase
COMT	Catecol-O-metiltransferase
cPG	Ciclo-L-Pro-Gly
CRL	Lipase <i>Candida Rugosa</i> , do inglês <i>Candida Rugosa Lipase</i>
Cys	Cisteína
CYP1A2	Citocromo P450

D

d	Dupleto
D₂O	Água deuterada
DA	Doença de Alzheimer
DCE	1,2-Dicloroetano
DCM	Diclorometano
dd	Duplo dupleto
DDC	L-DOPA Descarboxilase
ddd	Duplo duplo dupleto
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
Des-(1-3)-IGF-1	Des-(1-3)-Fator de Crescimento Insulínico Tipo 1
DIEA	<i>N,N</i> -diisopril- <i>N</i> -etilamina
DN	Doença neurodegenerativa
DNs	Doenças neurodegenerativas
DP	Doença de Parkinson
DKR	Resolução cinética dinâmica, do inglês <i>Dynamic Kinetic Resolution</i>
DMF	Dimetilformalmida
DMG	<i>N,N</i> -Dimetilglicina
DMSO	Dimetilsulfóxido
dtd	Duplo triplo dupleto

E

ee	Excesso Enantiomérico
EMA	Agência de Medicina Europeia, do inglês <i>European Medicine Agency</i>
Et₃N	Trietilamina
Et₂O	Éter etílico
ESI-MS	Espectrometria de Massa com ionização por <i>Electrospray</i>
eq.	Equivalentes estequiométricos

F

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fmoc	9-Fluorenilmetoxycarbonilo
Fmoc-OSu	<i>N</i> -(9-fluorenilmetoxycarboniloxi)succinimida

G

GABA	Ácido γ -aminobutírico
Gln	Glutamina
Glu	Ácido Glutâmico
Gly	Glicina
GPE	Ácido glicil-L-prolil-L-glutâmico

H

Hex	Hexano
HI	Hipóxia isquêmica
HOBt	1-Hidroxibenzotriazole
HOSU	<i>N</i> -Hidroxisuccinimida

I

i3S	Instituto de Investigação e Inovação em Saúde da Universidade do Porto
ibuprofren	(<i>R,S</i>)-2-(isobutilfenil)-propanóico
i.e.	Isto é
IEFPCM	Modelo Contínuo de Polarização de Formalismo de Equação Integral
IGF-1	Fator de Crescimento Insulínico Tipo 1
Ile	Isoleucina

K

Ki	Constante de inibição
KR	Resolução cinética, do inglês <i>Kinetic resolution</i>

L

LAQV	Laboratório Associado para a Química Verde
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
L-DOPA	Levodopa - Ácido (<i>S</i>)-2-amino-3-(3,4-diidróxifenil)propanóico
Leu	Leucina
logP	Coeficiente de Partição
Lys	Lisina

M

m	múltiplo
major	Rotâmero maioritário
MAO-A	Monoamina oxidase A
MAO-B	Monoamina oxidase B
MeOH	Metanol
Met	Metionina
minor	Rotâmero minoritário

MM	Massa molecular
MTPA	Ácido α -metoxi- α -trifluorometilfenilacético
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
MTT-Formazan	1-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenil-formazano
m/z	Relação massa/carga (espectrometria de massa)

N

NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
n_{APH}	Nº de aceitadores de pontes de hidrogénio
n.d.	Não determinado
n_{DPH}	Nº de dadores de pontes de hidrogénio
Nle	Norleucina
NMDA	<i>N</i> -metil-D-Aspartato
NNZ-2566	Ácido glicil- α -metil-L-prolil-L-glutâmico
Novozym 435	Lipase <i>Candida Antarctica B</i> imobilizada
n_{rot}	Nº de ligações rotáveis

O

OBn	Benzilo
OBt	Benzotriazolilo
OEt	Etoxilo
OMe	Metoxilo
O^tBu	<i>Terc</i> -butoxilo
OSu	Éster succinimídico

P

PAMPA	Ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela, do inglês <i>Parallel Artificial Membrane Permeability Assay</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PEA	Feniletilamina, do inglês <i>Phenylethylamine</i>

p.f.	Ponto de fusão
Ph	Fenilo
Phe	Fenilalanina
PPA	Proteína Precursora Amilóide
ppm	Partes por milhão
Pro	Prolina
PS	Placas Senis

R

rac	Racémico
REQUIMTE	Rede de Química e Tecnologia
R_f	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigénio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>

S

s	Singleto
Ser	Serina
SH-SY5Y	Linha celular derivada de neuroblastoma
sl	Singleto largo
SMD	Modelo de solvatação baseado na densidade eletrónica
(S)-MTPA	Ácido (S)-(-)- α -metoxi- α -trifluorometilfenilacético
SN	Sistema Nervoso
S_N2	Substituição Nucleofílica Bimolecular
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SPPS	Síntese Peptídica em Fase Sólida, do inglês <i>Solid-Phase Peptide Synthesis</i>
STAB	Triacetoxiborohidreto de Sódio, do inglês <i>Sodium Triacetoxyborohydride</i>

T

t	Tripleto
t	Tempo
T	Temperatura
TBTU	Tetrafluorborato de O-benzotriazoliltetrametilurónio
THF	Tetraidrofurano
TIQ	1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina
TLC	Cromatografia em camada fina, do inglês <i>Thin-layer chromatography</i>
TMS	Tetrametilsilano
TMU	Tetrametilureia
TSTU	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil- <i>O</i> -(<i>N</i> -succinimidil)urónio
tPSA	Área superficial polar topológica, do inglês <i>Topological Polar Surface Area</i>
Tyr	Tirosina

U

UV	Ultravioleta
-----------	--------------

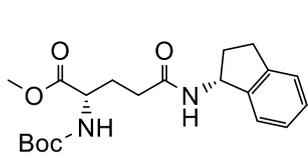
V

Val	Valina
VM	Volume molar

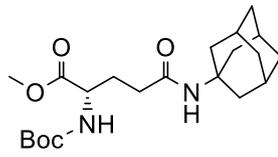
Z

Z	Benziloxycarbonilo
----------	--------------------

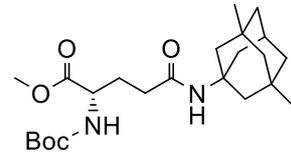
LISTA DE COMPOSTOS SINTETIZADOS



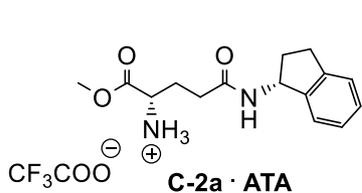
C-1a



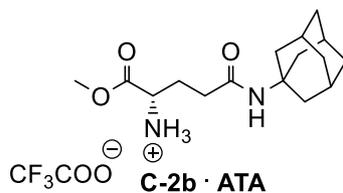
C-1b



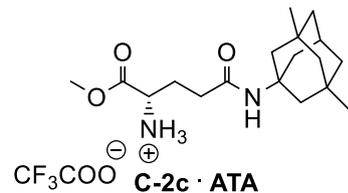
C-1c



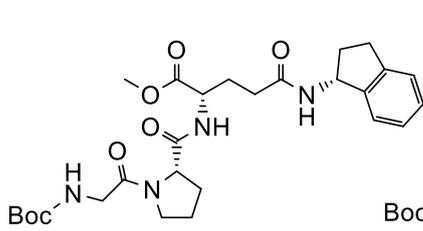
C-2a · ATA



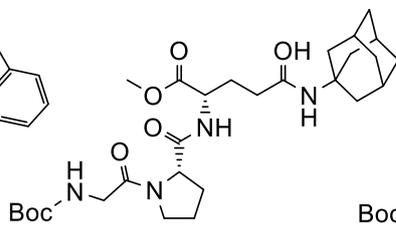
C-2b · ATA



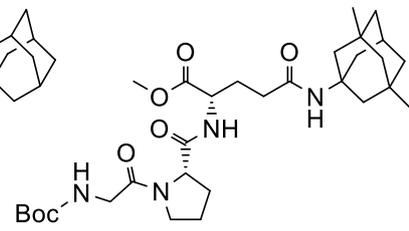
C-2c · ATA



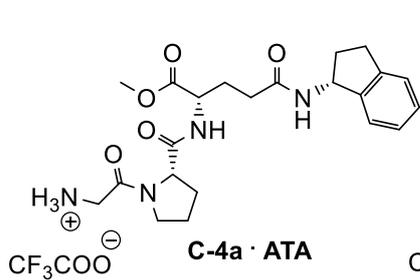
C-3a



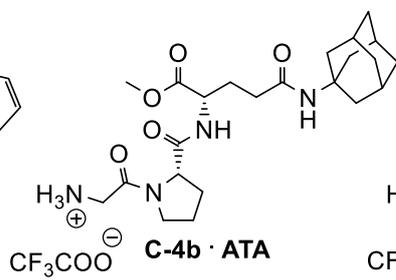
C-3b



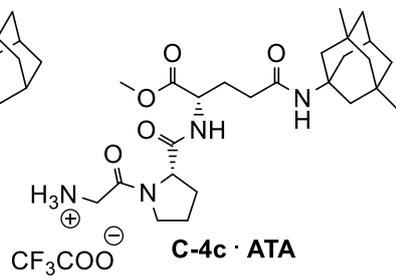
C-3c



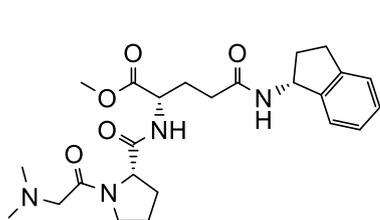
C-4a · ATA



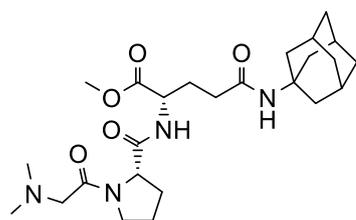
C-4b · ATA



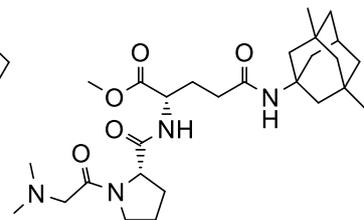
C-4c · ATA



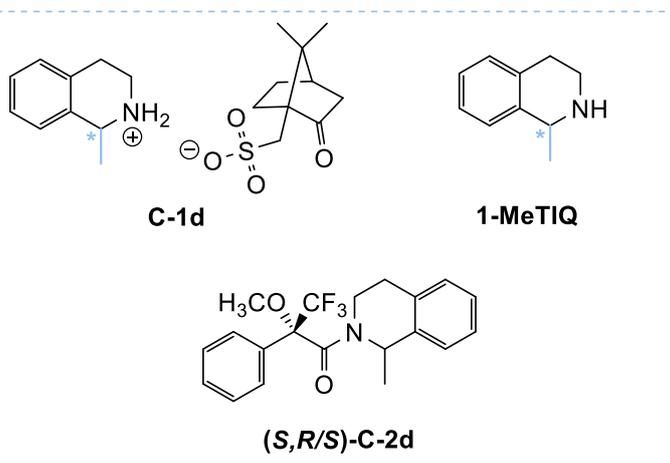
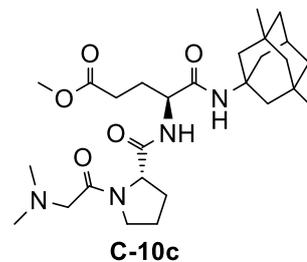
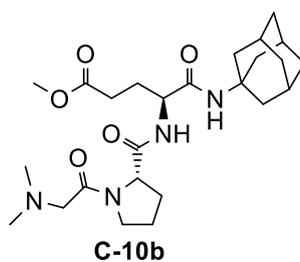
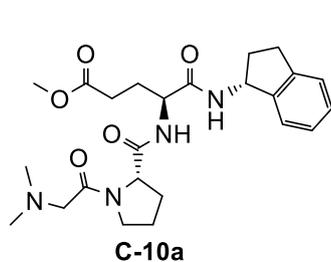
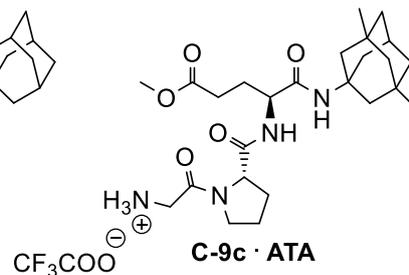
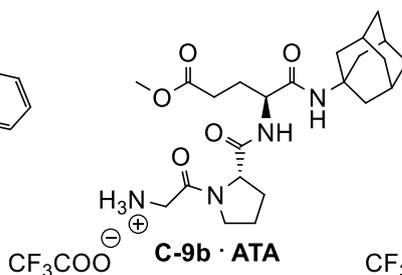
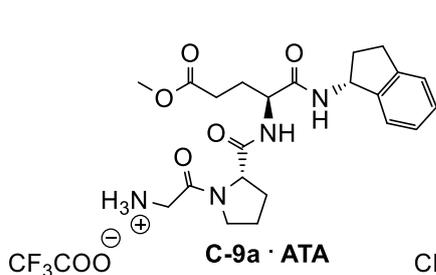
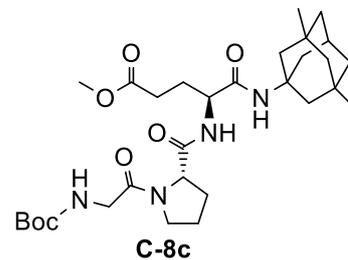
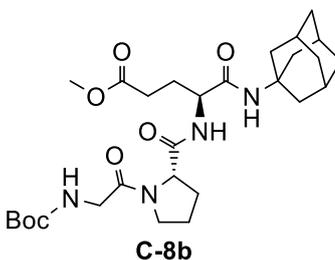
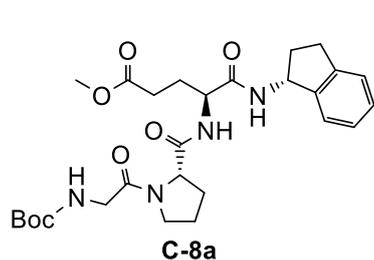
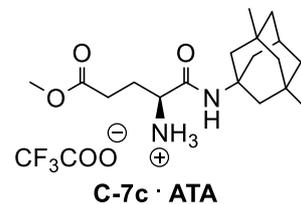
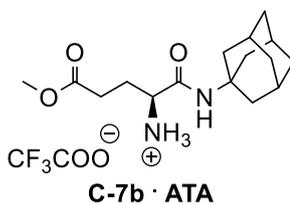
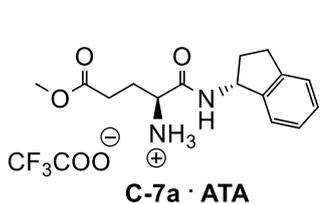
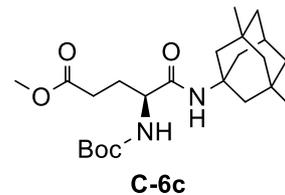
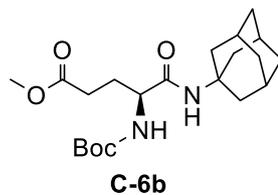
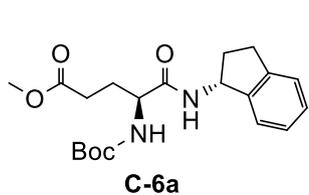
C-5a



C-5b



C-5c



1. INTRODUÇÃO

1.1. SISTEMA NERVOSO (SN)

1.1.1. Unidades funcionais do Sistema Nervoso

Os neurónios são as unidades básicas do sistema nervoso capazes de responder perante a estímulos provenientes do meio em que se encontram.

Estas unidades podem ser classificadas consoante a sua função ou de acordo com o número de processos que se estendem no corpo celular, sendo que, a maior parte se encontra principalmente na substância cinzenta do Sistema Nervoso Central (SNC), tendo diversas funções, tais como síntese de proteínas, manutenção da homeostasia da célula e ainda, análise, integração e armazenamento de informações.

Os neurónios são constituídos por três partes: corpo celular, dendrites e axónio (**Figura 1.1.**), sendo os dois últimos comumente referidos como nervos fibrilares.¹⁻⁴

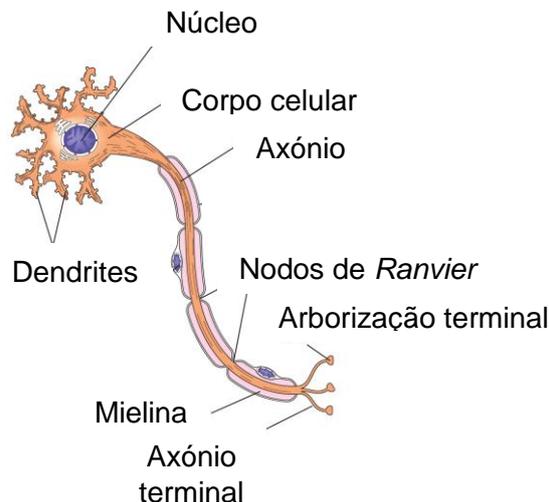


Figura 1.1. Estrutura de um neurónio.¹

As **dendrites** são projeções citoplasmáticas ramificadas do corpo celular, que têm como funções: receber as informações e posteriormente direcionar as mesmas para o corpo celular. Os **axónios** são também uma parte importante envolvida na transmissão da informação, sendo que estes se encontram cercados pela substância branca (constituída por mielina), que tem a função de revestir o axónio, tornando assim a condução do impulso mais eficiente.

A informação transmitida ao SNC (*via* neurónios sensoriais) é, posteriormente processada e comunicada através dos neurónios motores, sendo que esta informação pode ser conduzida através de meios elétricos ou químicos. Os impulsos elétricos, também denominados por potencial de ação, ocorrem devido ao movimento de iões através das membranas dos neurónios. Havendo diferenças na carga elétrica

(provocadas pela distribuição desigual dos iões de K^+ e de iões de Na^+) existente em ambos os lados da membrana celular, cria-se uma diferença de potencial. Quando a carga no interior da membrana é negativa (causada, principalmente pela impermeabilidade perante iões de Na^+ , e pela passagem condicionada de iões de K^+ pelos seus canais próprios para o exterior), a diferença de cargas faz com que a membrana fique polarizada sendo este processo denominado por potencial de repouso. Quando esta membrana polarizada sofre um estímulo forte, ocorre a sua despolarização, iniciando-se assim o impulso elétrico. Este impulso é conduzido ao longo do comprimento do axónio, tornando-se a parte anterior do axónio repolarizada, restaurando assim o potencial de repouso.

Os **nodos de Ranvier** são essenciais para acelerar a condução do impulso, uma vez que quando o impulso se encontra na substância branca dos axónios é posteriormente conduzido de um nodo para outro através do fluído celular.

Estes impulsos são transmitidos através de um fenómeno denominado por **sinapse** (*Figura 1.2.*). As sinapses (químicas) são junções em que os neurónios, denominados por pré-sinápticos (podendo ser também uma célula ou órgão efetor, como um músculo ou glândula) libertam um neurotransmissor químico, que irá conduzir os sinais para outros neurónios, denominados por pós-sinápticos.

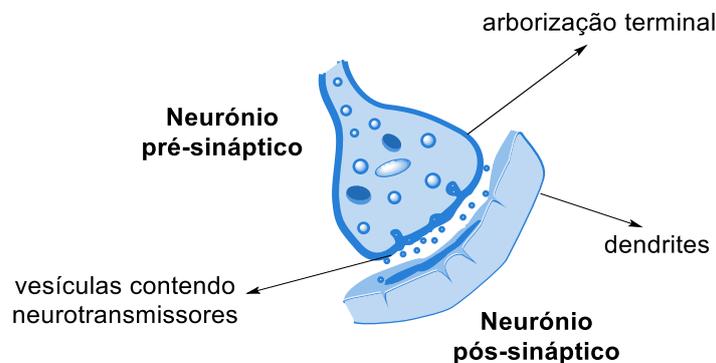
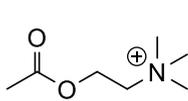
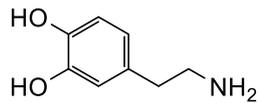
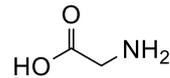
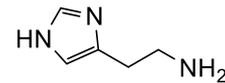
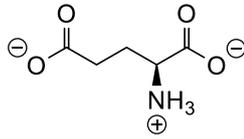
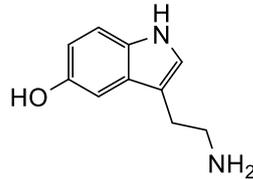
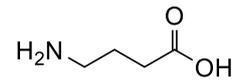


Figura 1.2. Representação simplificada de uma sinapse (figura realizada no programa ChemDraw).

Alguns exemplos de neurotransmissores são a **acetilcolina** (ACh), **dopamina**, **glicina** (Gly), **histamina**, **glutamato** (Glu), **serotonina**, **ácido γ -aminobutírico** (conhecido por GABA), sendo que existem mais de 200 neurotransmissores. É de notar que muitos neurotransmissores são aminoácidos naturais ou seus derivados.

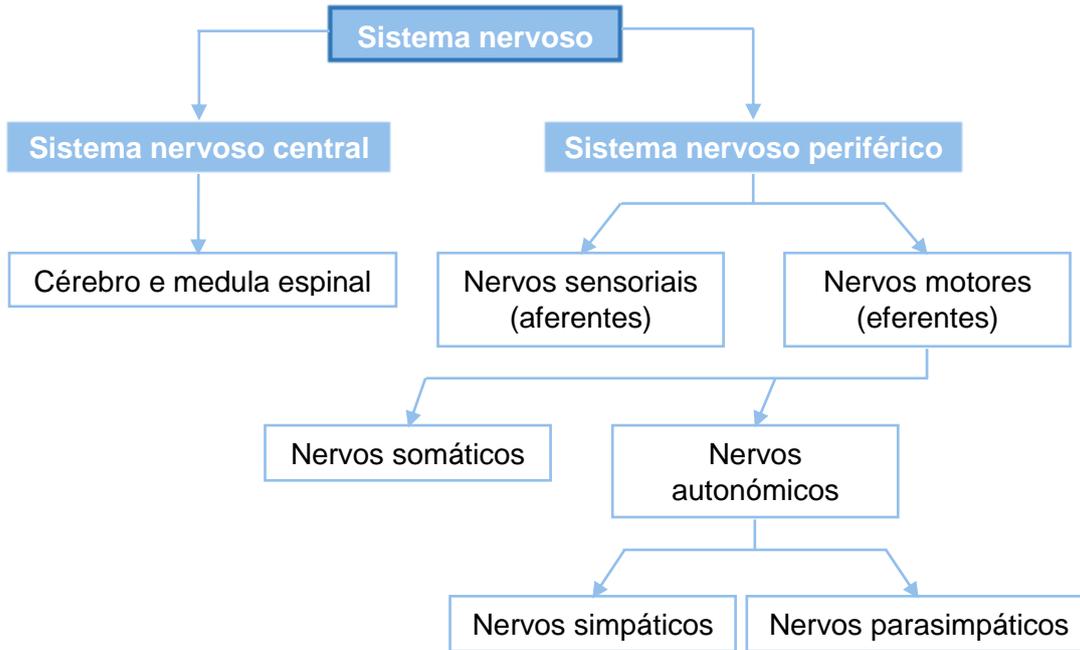
**Acetilcolina****Dopamina****Glicina****Histamina****Glutamato****Serotonina****Ácido γ -aminobutírico**

É importante que os níveis dos neurotransmissores estejam estáveis, pois se estes níveis se encontrarem alterados, podem desencadear processos de apoptose e neurodegenerativos, originando diversas doenças neurodegenerativas como por exemplo, a Doença de Alzheimer, em que se verifica a diminuição dos níveis de ACh,⁵ ou Doença de Parkinson, em que ocorre uma diminuição dos níveis de dopamina.⁶

Além destes neurotransmissores existentes no SNC, existem também conjuntos de axónios e dendrites agrupados, denominados por nervos. Estes podem ter diversas funções consoante a zona em que se encontram no SN. Assim, em suma, o SN é habitualmente dividido em diversas partes uma vez que este possui alguma complexidade.

1.1.2. Divisões do Sistema Nervoso

O sistema nervoso representa uma rede de comunicações do organismo, tendo como principal função a coordenação das ações (voluntárias e involuntárias) ao transmitir sinais entre as diferentes partes do organismo. Este sistema encontra-se dividido em duas partes: o SNC e o Sistema Nervoso Periférico (SNP), como representado no **Esquema 1.1.** O primeiro é formado pelo cérebro e medula espinal, enquanto que o último é constituído por todos os nervos fora do SNC, sendo estes essencialmente os nervos sensoriais e motores.



Esquema 1.1. Representação dos níveis de organização do sistema nervoso.¹

1.1.2.1. Sistema nervoso central

O SNC é responsável pela receção e transmissão de informações para todo o organismo. O córtex cerebral, um dos constituintes deste sistema, pode ser dividido em quatro partes principais: cérebro, diencefalo (constituído pelo tálamo e hipotálamo), cerebelo e tronco cerebral, sendo que este último também é comumente dividido em mesencéfalo, ponte e bolbo raquidiano (**Figura 1.3.**).

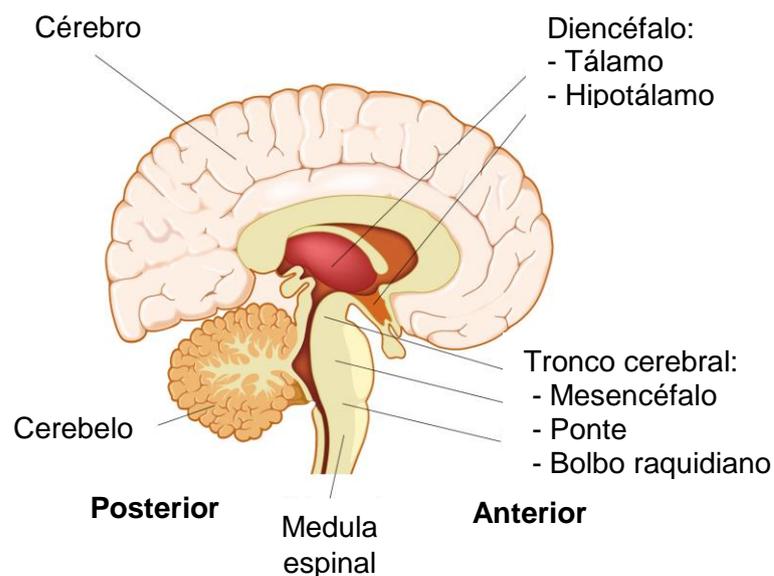


Figura 1.3. Organização do SNC.²

A substância cinzenta encontra-se localizada no **cérebro**, sendo esta designada desta forma devido à coloração dos corpos celulares dos neurónios e células da glia, contendo também prolongamentos de outros neurónios. A substância branca também se localiza no cérebro, tendo esta designação devido à presença de mielina. É feita ainda a divisão da parte constituinte da superfície do cérebro, denominando-se esta por córtex cerebral, sendo este dividido em dois hemisférios (esquerdo e direito) e cada hemisfério dividido em lobos, em que cada lobo contém funções específicas.

O **tálamo** (que constitui cerca de 80% do diencefalo) é uma área de massa cinzenta associada à transmissão da maioria dos impulsos sensoriais (com a exceção do olfato) para o córtex cerebral. Por outro lado, o **hipotálamo** funciona como recetor da informação transmitida pelos nervos sensoriais relativos ao estado corporal, fazendo assim a homeostasia, como por exemplo, da temperatura corporal.

O **cerebelo** é outro constituinte do cérebro, tendo como função a manutenção da postura e equilíbrio, sendo assim essencial para a locomoção.

Por outro lado, o **tronco cerebral** é constituído pelo mesencefalo, ponte e bolbo raquidiano. O **mesencefalo** contém vários centros de reflexo como o controlo do movimento dos olhos e da cabeça em resposta a estímulos visuais. Este é ainda um local de retransmissão para recetores de audição que passam do ouvido para o tálamo. A **ponte** também atua como local de retransmissão, entre o cérebro e o cerebelo, de informações associadas a sinais relacionados com o movimento voluntário. O **bolbo raquidiano** está associado a vários sistemas como ao sistema respiratório e sistema cardiovascular. Este constitui um local no qual as vias nervosas se cruzam para o lado oposto, da mesma maneira que o hemisfério cerebral esquerdo controla o movimento do lado direito e o hemisfério cerebral direito controla o movimento do lado esquerdo.

Por fim, a **medula espinal** é uma estrutura que se inicia no final do tronco cerebral e se estende até ao fim da coluna vertebral. Esta funciona como transportadora de informações sensoriais em forma de impulsos nervosos para o cérebro e de respostas motoras.

Uma vez que o sistema nervoso central é constituído por diversas divisões sensíveis, estas necessitam de alguma proteção que é dada pelas meninges, líquido cefalorraquidiano (LCR), células gliais, e também pelos ossos, tecido adiposo, tecido subcutâneo, pele e cabelo.

1.1.2.2. Sistema nervoso periférico

O SNP é constituído pelos nervos sensoriais e pelos nervos motores, também sendo comumente designados por nervos aferentes e eferentes, respetivamente (**Esquema 1.1., secção 1.1.2.**).

Os **nervos sensoriais** têm como função o transporte de informação para o cérebro e medula espinal a partir de recetores somáticos que se encontram por todo o corpo. Essa informação é posteriormente transmitida do cérebro para os órgãos ou tecidos efetores, como por exemplo, para o músculo esquelético, através dos nervos motores.

Relativamente aos **nervos motores**, estes podem ser divididos em nervos somáticos e nervos autonómicos, sendo que os primeiros estão relacionados com o movimento voluntário do músculo esquelético, enquanto que os segundos estão envolvidos na regulação da temperatura, frequência cardíaca, pressão arterial e glicémia. Os nervos autonómicos são constituídos por dois grupos que se suplementam: os nervos simpáticos, que são predominantes em situações de *stress* (como por exemplo, situações de aumento da frequência cardíaca) e nervos parassimpáticos, que são mais comuns em situações de repouso (como por exemplo, aumento da atividade gastrointestinal).

Em suma, e uma vez que os cromossomas dos neurónios não contêm centrossoma, i.e., não podem sofrer mitose, quando ocorre alguma danificação cerebral torna-se impossível a substituição dos mesmos. Deste modo, o bom funcionamento de todo o sistema nervoso é essencial para que não surjam doenças incuráveis, como é o caso das doenças neurodegenerativas.

1.2. DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

As doenças neurodegenerativas encontram-se inseridas num grupo de distúrbios crónicos e progressivos, caracterizados pela degeneração lenta e gradual de neurónios do SNC, tendo como consequência a perturbação de funções específicas (como por exemplo, memória, movimento ou cognição) dependendo da região do SNC que foi afetada, podendo originar demência.⁷

A demência é um termo genérico utilizado para designar um conjunto de doenças nas quais ocorre a perda de funções cerebrais, estimando-se que, em 2020 existam 48,1 milhões de pessoas com demência no mundo.⁸ De entre as formas mais comuns de demência encontram-se a Doença de Alzheimer e a Doença de Parkinson. Estas doenças podem advir da desregulação de espécies reativas de oxigénio (ROS)

provenientes quer de fatores ambientais, quer de fatores endógenos (como por exemplo na cadeia de eletrões mitocondrial). Este *stress* provoca danos oxidativos em macromoléculas celulares, estando por isso implicado na patogénese destas doenças.⁹

1.2.1. Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é o distúrbio neurodegenerativo progressivo mais comum, afetando cerca de 6% da população mundial com mais de 65 anos e com tendência a aumentar com a idade.¹⁰ Prevê-se que, em 2030, esta doença seja a quarta causa de mortalidade na América e a quinta na Europa,¹¹⁻¹² sendo que em Portugal, as doenças do sistema nervoso encontram-se em sétimo lugar das principais causas de morte no ano de 2015, apresentando um crescimento na ordem dos 20,5%, desde o ano de 2010.¹³

Esta doença, que foi primeiramente descrita, em 1906, por Alois Alzheimer,¹⁴ caracteriza-se pela degeneração e/ou morte dos neurónios, afetando conseqüentemente, o córtex cerebral e o hipocampo. As anomalias que lhe estão associadas são detetadas inicialmente no tecido cerebral, progredindo *a posteriori* para a zona do neocórtex.¹⁵

Os sintomas relacionados com a DA podem ser divididos em três grupos: disfunção cognitiva, sintomas psiquiátricos/sintomas não-cognitivos e dificuldade na realização de atividades do quotidiano. A disfunção cognitiva engloba sintomas como a perda de memória, dificuldades de linguagem e a falta da habilidade de coordenação intelectual. Em relação aos sintomas psiquiátricos/sintomas não-cognitivos encontram-se associados distúrbios comportamentais como depressão, alucinações e delírios. Por fim, os doentes possuem dificuldades na realização de atividades do quotidiano como o vestir, comer, conduzir, fazer compras, entre outras.¹⁶

1.2.1.1. Histopatologia

A causa da DA é ainda desconhecida, no entanto sabe-se quais as alterações patológicas associadas que provocam os sintomas característicos desta doença já mencionados anteriormente (**secção 1.2.1.**). Esta doença encontra-se associada a dois fatores principais: depósitos extracelulares da proteína β -amilóide ($A\beta$) levando à formação de placas senis (PS) e agregação intracelular da proteína Tau hiperfosforilada formando emaranhados neurofibrilares (**Figura 1.4., A e B** respetivamente).¹⁵

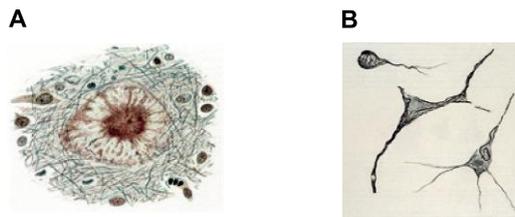


Figura 1.4. Histopatologia da DA: **A:** Placas β -amilóide; **B:** Emaranhados neurofibrilares.¹⁵

A proteína A β é obtida pela clivagem proteolítica (efetuada por β -secretases) da proteína precursora de amilóide (PPA). A PPA é uma glicoproteína expressa no cérebro que possui a função de regulação das sinapses e atividade neuronal.¹⁶⁻¹⁷

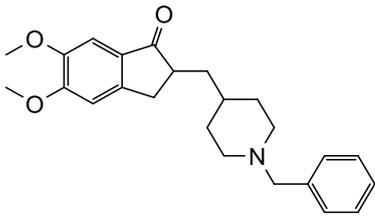
A A β para além de estar associada à produção de oxirradicais, sendo assim tóxica para os neurónios e células da glia, uma vez que estes radicais atuam na peroxidação lipídica da membrana celular, também é a principal constituinte das placas senis. Estas placas ativam as células da glia que estão envolvidas na neurodegeneração.¹⁷

Relativamente à proteína Tau, numa célula nervosa saudável, esta tem a função de auxiliar a formação de estruturas cilíndricas denominadas por microtúbulos, que são essenciais na comunicação entre os neurónios. Na DA, a proteína Tau encontra-se hiperfosforilada, conduzindo à formação de estruturas desorganizadas (emaranhados neurofibrilares) que obstruem os microtúbulos, perturbando assim a comunicação entre os neurónios.¹⁷

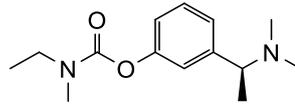
1.2.1.2. Tratamento / Farmacoterapia

As estratégias de tratamento da DA consistem principalmente na utilização de inibidores de colinesterase (ChEI),¹⁸ uma vez que estudos revelaram um défice de acetilcolina (que é um neurotransmissor importante associado à memória) no cérebro. Assim, os inibidores de colinesterase impedem que as enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE) degradem a acetilcolina, possibilitando uma maior concentração destes neurotransmissores, que por sua vez provoca uma melhor comunicação entre as células nervosas e deste modo é possível estabilizar os sintomas associados a esta doença.

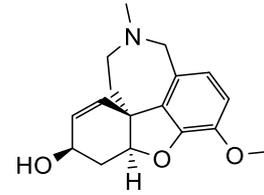
Existem, atualmente, três fármacos inibidores de colinesterase aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) e que se encontram também licenciados para serem utilizados em Portugal: **Donepezilo, Rivastigmina e Galantamina**.¹⁸⁻¹⁹



Donepezilo



Rivastigmina



Galantamina

O **Donepezilo** é um derivado de piperidina aprovado para o tratamento da DA nos seus diversos estádios, que funciona como inibidor reversível da AChE, contendo este boas propriedades farmacocinéticas, uma vez que é amplamente absorvido após a sua administração oral e, além disso, a sua concentração máxima é atingida em poucas horas (3 – 4 horas), tendo um tempo de semivida de, aproximadamente, 70 horas.^{18, 20}

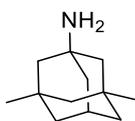
A **Rivastigmina** é um derivado de fenilcarbamato administrado quando a DA se encontra num estádio de leve a moderado, atuando como inibidor reversível tanto da AChE como da BuChE. Uma vez que é o único fármaco que atua na inibição da BuChE, pode ser vantajoso, tendo um papel importante aquando da neurodegeneração que ocorre na DA. Além disso, possui uma rápida absorção, atingindo a sua concentração máxima em 1 hora quando é administrado via oral (com um tempo de semivida de 1 a 2 horas).^{18, 20}

Por último, a **Galantamina** é um alcalóide terciário que atua também como inibidor reversível da AChE, aprovado para o tratamento da DA num estádio leve a moderado. Este fármaco tem a vantagem acrescida de se ligar alostericamente a recetores nicotínicos, aumentando a função colinérgica. Assim como a Rivastigmina, a Galantamina atinge o seu máximo de concentração em 1 hora sendo rapidamente absorvida quando administrada oralmente, contudo possui um tempo de semivida superior, de 7 a 8 horas.^{18, 20}

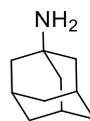
É de realçar que estes inibidores não revertem a DA nem impedem o processo de neurodegeneração, apenas retardam os avanços da mesma. Quanto aos efeitos secundários, os fármacos referidos são habitualmente toleráveis, porém, podem causar alguns efeitos secundários como náuseas, vômitos e perdas de apetite.²⁰

Estudos mais recentes comprovaram a importância do uso de reguladores da atividade do neurotransmissor glutamato, uma vez que este é um componente envolvido no processamento, armazenamento e recuperação de informação, que atua nos recetores de *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) tendo estes a função de regular a quantidade de cálcio numa célula nervosa.¹⁸

A **Memantina** é um antagonista dos recetores de NMDA, derivada da **Amantadina**, um fármaco aprovado para o tratamento da Doença de Parkinson.²¹



Memantina



Amantadina

Este fármaco (Memantina) foi aprovado para o tratamento da DA num estágio moderado a severo, tendo como função a regulação da atividade do glutamato ao bloquear parcialmente os recetores de NMDA, pois o excesso de glutamato estimula de uma forma excessiva estes recetores, tendo como consequência um excesso de cálcio nas células (excitotoxicidade).²¹⁻²² A Memantina atinge o seu máximo de concentração após 3 a 8 horas, sendo que o seu tempo de semivida é de 60 a 80 horas.

Uma vez que o mecanismo de ação deste derivado da Amantadina foi descrito como sendo complementar dos mecanismos de ação dos ChEI,²³ foi aprovado pela FDA, o seu uso em conjunto com o Donepezilo proporcionando assim uma terapia combinatória.²²

Na tabela seguinte (**Tabela 1.1.**) encontra-se um resumo dos fármacos que se encontram atualmente aprovados para o tratamento da DA e algumas das suas propriedades.

Tabela 1.1. Fármacos aprovados no tratamento da DA até ao presente.^{18, 21}

Fármaco	Donepezilo	Rivastigmina	Galantamina	Memantina	Memantina + Donepezilo
Função química	Piperidina	Fenilcarbamato	Alcaloide fenantreno	Amino adamantina	
Nome comercial	Aricept®	Exelon®	Razadyne®	Namenda®	Namzaric®
Ano de aprovação	1996	2000	2001	2002	2014
Estado da DA	Todos os estados	Médio a moderado	Médio a moderado	Moderado a severo	Moderado a severo
Biodisponibilidade / %	99	40	90	100	
t _{1/2} / h	70	1 – 2	7 – 8	60 – 80	
Mecanismo de ação	ChEI	ChEI	ChEI	Antagonista dos recetores de NMDA	

1.2.2. Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) está cada vez mais presente, tendo um grande impacto a nível mundial, uma vez que esta se manifesta em 1% da população mundial com mais de 65 anos.²⁴ Na Europa, em 2030, prevê-se que o número de pessoas com esta doença atinja os 2,4 milhões,²⁵ sendo que em Portugal é também esperado um aumento devido ao envelhecimento progressivo da população.

A descoberta da DP remota para o ano de 1817, uma vez que foi neste ano que o médico inglês James Parkinson a descreveu numa das suas monografias como sendo uma doença neurológica crónica bastante comum, em que ocorre a degeneração dos neurónios dopaminérgicos que se encontram na substância negra,²⁶ causando assim uma diminuição dos níveis de dopamina, que estão por base dos sintomas característicos da DP.

Os sintomas primários associados a esta doença são: tremores, bradicinesia (lentidão de movimento) e instabilidade postural (desequilíbrio). Estes sintomas permitem fazer um diagnóstico preliminar da DP, no entanto, com o evoluir da doença podem surgir outro tipo de sintomas como: micrografia (caligrafia pequena), disartria hipofonia (fala menos compreensível), postura encurvada, diminuição da expressão facial, mudanças de humor (depressão, ansiedade), mudanças cognitivas (perdas de memória, alucinações), incontinência, entre outros.

1.2.2.1. Histopatologia

A DP encontra-se associada à perda neuronal na substância negra (**Figura 1.5.**) e à acumulação intracelular generalizada de proteína α -sinucleína, apesar de estes fenómenos não serem exclusivos desta doença.²⁷

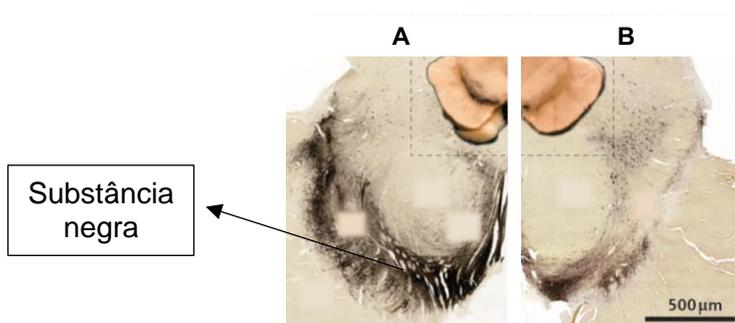


Figura 1.5. Substância negra em: **A:** cérebro saudável; **B:** cérebro com DP.²⁷

No início da doença, a perda neuronal é restrita à zona da substância negra ventrolateral, perda essa que se vai alastrando com o evoluir da doença e que é caracterizada pela despigmentação desta zona cerebral (como resultado da morte dos neurónios dopaminérgicos). Por outro lado, a α -sinucleína, num cérebro saudável desempenha funções essenciais na sinapse, sendo que num doente de Parkinson, ocorre a deposição anormal desta proteína, o que leva à formação de agregados denominados por corpos de Lewy (**Figura 1.6.**) que interferem na eficácia das sinapses, atingindo primeiramente as áreas do cérebro responsáveis pela memória e pelo movimento.²⁷

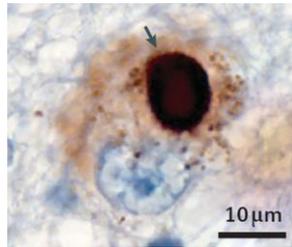


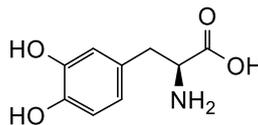
Figura 1.6. Corpos de Lewy intracitoplasmáticos.²⁷

1.2.2.2. Tratamento / Farmacoterapia

Atualmente, não existe cura para a DP, existindo apenas fármacos com a função de controlar os sintomas de maneira a retardar a sua evolução.

Os fármacos existentes para o tratamento destes sintomas são a Levodopa, Amantadina, e ainda fármacos inseridos nas classes dos agonistas de dopamina, inibidores da monoamina oxidase B (MAO-B), inibidores da catecol-O-metiltransferase (COMT) e anticolinérgicos.²⁷⁻²⁸

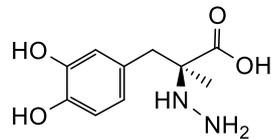
A Levodopa (**L-DOPA**) é o primeiro fármaco eficaz utilizado no tratamento da DP. Este é administrado *via* oral e é absorvida no intestino delgado, sendo que, após a sua entrada no cérebro através da BBB, é convertido em dopamina, o neurotransmissor ativo que se encontra diminuído na DP.²⁷⁻²⁸



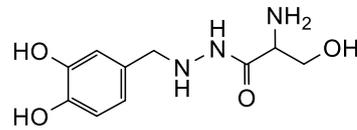
L-DOPA

No início da DP, a L-DOPA tem um período de atividade longo comparativamente com o efeito que proporciona após a evolução da doença que diminui para um tempo de semivida de 1 hora.²⁷⁻²⁸ Por este motivo, a L-DOPA tem sido administrada

conjuntamente com fármacos inibidores periféricos reversíveis da L-DOPA descarboxilase (DDC), tais como a **Carbidopa** (*Lodosyn*[®]) e a **Benserazida** (*Prolopa*[®]), com o objetivo de melhorar os efeitos terapêuticos.²⁹⁻³⁰

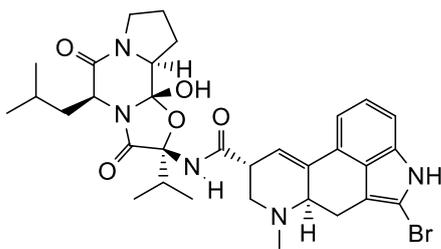


Carbidopa

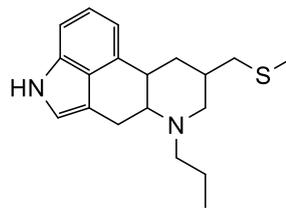


Benserazida

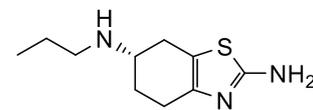
Em relação aos agonistas de dopamina, estes têm como função a ligação aos recetores que são ativados pela dopamina, de maneira a produzir o mesmo efeito que esta provoca. Dentro desta classe, alguns dos fármacos utilizados no tratamento da DP são: **Bromocriptina** (*Parlodel*[®]), **Pergolide** (*Permax*[®]), **Pramipexole** (*Mirapex*[®], *Mirapex ER*[®]), **Ropinirole** (*Requip*[®], *Requip XL*[®]), **Rotigotina** (*Neupro*[®]) e **Apomorfina** (*Apokyn*[®]).²⁷



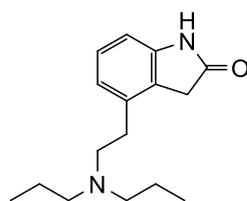
Bromocriptina



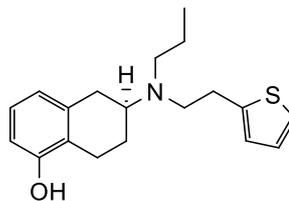
Pergolide



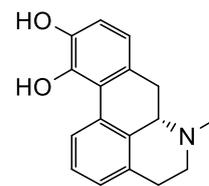
Pramipexole



Ropinirole



Rotigotina



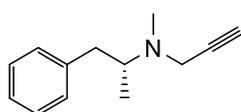
Apomorfina

Normalmente, estes agonistas da dopamina são mais eficazes que a L-DOPA, devido a possuírem um tempo de semivida maior e proporcionarem uma estimulação dopaminérgica mais contínua. No entanto, o tipo de agonista a ser utilizado no tratamento deve ser escolhido consoante o paciente, tendo em conta a dosagem necessária e outras doenças que possam estar presentes, uma vez que estes fármacos possuem alguns efeitos secundários como a fibrose pulmonar. Pacientes com

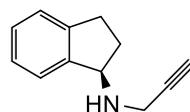
alucinações ou comprometimento cognitivo também devem evitar este tipo de tratamento uma vez que existe o risco de delírio prolongado.²⁷⁻²⁸

Relativamente aos inibidores da MAO-B, estes têm como função evitar a degradação da dopamina, uma vez que a MAO-B é uma das enzimas que atua na metabolização desta. Assim, a dopamina continua presente para ser utilizada na neurotransmissão e, conseqüentemente, os sintomas associados à DP podem ser amplamente diminuídos.²⁷⁻²⁸

Os fármacos utilizados como inibidores irreversíveis da MAO-B são a **Selegilina** (*Eldepryl*[®] ou *Zelapar*[®]) e a **Rasagilina** (*Azilect*[®]).



Selegilina

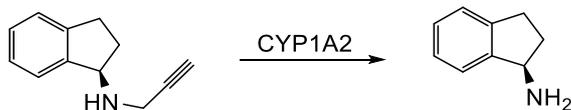


Rasagilina

A **Selegilina** é o fármaco mais eficaz nesta classe dos inibidores da MAO-B, no entanto esta deve ser administrada em baixas dosagens, uma vez que quando administrada em doses elevadas perde a sua especificidade e atua também como inibidor da MAO-A (isoforma que degrada monoaminas exógenas provenientes principalmente da alimentação).²⁸

A **Rasagilina**, apesar de não ser tão eficaz é mais seletiva, proporcionando melhorias a nível sintomático e evita a progressão da DP.²⁸

O metabolismo deste fármaco (**Esquema 1.2.**) é realizado pela enzima CYP1A2, obtendo-se como metabolito maioritário o (**R**)-1-aminoindano.³¹

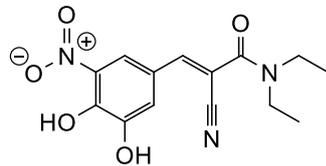


(R)-1-aminoindano

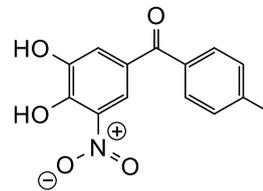
Esquema 1.2. Metabolismo da Rasagilina, evidenciando o produto maioritário.

Alguns estudos demonstram que este metabolito contém também propriedades neuroprotetoras e anti-apoptóticas frente a diversos insultos neurotóxicos (como o 6-OHDA e H₂O₂).³¹ Assim, apesar da formação de metabolitos não-inibidores da MAO-B, o (**R**)-1-aminoindano pode proporcionar neuroproteção, contribuindo também para a diminuição dos sintomas dos doentes de Parkinson.

Os inibidores da COMT, por outro lado, permitem que a L-DOPA não seja metabolizada e, conseqüentemente, ocorre um aumento da dopamina posteriormente obtida a partir desta. O **Entacapone** (*Comtan*[®]) e o **Tolcapone** (*Tasmar*[®]) são dois fármacos utilizados na DP que pertencem a este tipo de inibidores.



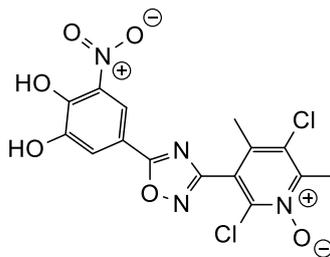
Entacapone



Tolcapone

O **Entacapone** tem um tempo de semivida de 1 hora e 30 minutos e é, normalmente, administrado concomitantemente com a L-DOPA. Por outro lado, o **Tolcapone** tem um tempo de semivida maior e pode ser administrado independentemente da L-DOPA, no entanto, é necessário realizar um controlo regular de testes sanguíneos da função hepática uma vez que este fármaco pode induzir hepatotoxicidade.²⁸

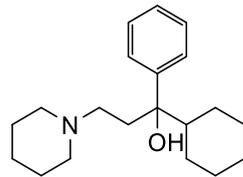
Outro fármaco inovador pertencente à classe dos inibidores da COMT é o **Opicapone** (*Ongentys*[®]). Este foi desenvolvido pela farmacêutica *Bial*, tendo sido aprovado recentemente (2016), pela Agência de Medicina Europeia (EMA do inglês *European Medicine Agency*).³²



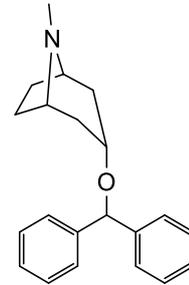
Opicapone

O **Opicapone** é um análogo hidrofílico do 1,2,4-oxadiazole com um *N*-óxido de piridina na posição 3. Uma vez que este fármaco foi obtido tendo como base os fármacos **Entacapone** e **Tolcapone**, referidos anteriormente, as modificações efetuadas nestes (para obter o **Opicapone**), refletiram-se no aumento da eficácia, prolongando o tempo de ação e diminuindo a toxicidade celular.³²⁻³³

Os fármacos anticolinérgicos não são utilizados como uma terapia dopaminérgica uma vez que estes são pouco responsivos, mas sim para o tratamento de alguns sintomas (como por exemplo, tremores). O **Triexifenidilo** (*Artane*[®]) e **Benztropina** (*Cogentin*[®]) são os dois anticolinérgicos mais comuns prescritos para a DP.



Triexifenidilo

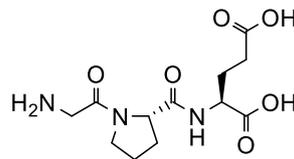


Benztropina

Por fim, a **Amantadina** (*Symmetrel*[®]) foi inicialmente desenvolvida para o tratamento do vírus *Influenza*, tendo-se descoberto que esta atua também na melhoria dos sintomas associados a DP. Apesar de o seu mecanismo de ação específico ser desconhecido, sabe-se que esta atua como um antagonista não competitivo do recetor de NMDA, aumentando a quantidade de dopamina produzida, podendo também interagir com múltiplos recetores no cérebro.³⁴

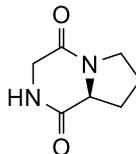
1.3. GPE, UM TRIPÉPTIDO NEUROPROTETOR

O ácido glicil-L-prolil-L-glutâmico (**GPE**), também denominado por Glypromate[®], é um tripéptido obtido pela clivagem do *N*-terminal do fator de crescimento insulínico tipo 1 (IGF-1). O IGF-1 encontra-se distribuído pelo SNC e tem sido alvo de diversos estudos relacionados com a neurodegeneração.



GPE

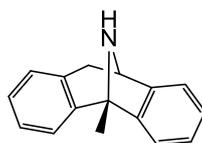
Este tripéptido, cuja bioatividade *in vitro* foi primeiramente relatada em 1989,³⁵ foi descoberto após o isolamento da des-(1-3)-IGF-1, (um péptido também obtido pela clivagem do IGF-1). A sua clivagem é realizada por carboxipeptidases (de *C*- para *N*-terminal), levando à formação do ciclo-L-Pro-Gly (**cPG**).³⁶



cPG

O GPE não se liga aos recetores de IGF-1 nem tem qualquer efeito neurotrófico. Além disso, apesar de não ser possível isolar este neuropéptido que é obtido naturalmente, sabe-se que o GPE sintético estimula a libertação de dopamina, acetilcolina e ainda possui propriedades neuroprotetoras contra diversos agentes neurotóxicos (como HI e glutamato).³⁷⁻³⁸

Testes *in vitro* revelaram que este tripéptido protege os neurónios do hipocampo perante a indução de toxicidade mediada por NMDA. A neuroprotecção obtida pelo GPE foi semelhante à **Dizocilpina** (também denominada por MK801), um antagonista não-competitivo do recetor de NMDA,³⁸ que não tem um uso clínico devido aos seus efeitos colaterais.³⁹



Dizocilpina

Apesar do potencial terapêutico do GPE, este possui uma fraca interação no local onde os recetores de NMDA são fortemente expressos.³⁸

Ainda assim, foram realizados também testes *in vivo* com o objetivo de comparar a atividade do IGF-1 com o GPE, tendo sido administrado em ratos adultos com lesão de HI. Os resultados revelaram que o GPE provoca a neuroprotecção em locais diferentes comparativamente ao IGF-1, sendo assim o seu modo de ação único, apesar de não estar bem definido.³⁸

No que diz respeito à farmacocinética deste tripéptido, sabe-se que este possui um tempo de semivida bastante curto (inferior a 2 minutos após administração intravenosa e inferior a 4 minutos quando administrado via intraperitoneal), sendo por isso rapidamente metabolizado. Relativamente ao SNC, o GPE possui um tempo de semivida mais prolongado (30 minutos), podendo assim exercer alguma atividade neuroprotetora.³⁸

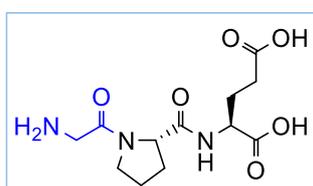
Estudos *in vivo* mais recentes revelaram que o GPE possui a capacidade de ativar as proteínas cinase B, contendo estas a propriedade de suprimir o efeito causado pelas proteínas β -amilóide, que, como já foi referido, se encontram envolvidas em processos apoptóticos. Estes estudos permitiram à farmacêutica *Neuren* patentear este tripéptido com o nome de Glypromate[®] em 2008. No entanto, este potencial fármaco não prosseguiu para além da fase III de ensaios clínicos devido à inexistência de eficácia significativamente relevante ao comparar um grupo de doentes tratados com placebo e um grupo de doentes tratado com Glypromate[®].³⁶

2. ESTADO DA ARTE

2.1. MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS REALIZADAS NO GPE

O GPE, como já foi referido anteriormente na **secção 1.3.**, é um tripéptido com grande potencialidade neuroprotetora, mas com algumas propriedades desfavoráveis como o seu baixo tempo de semivida, causado pela rápida degradação do mesmo.³⁸ Assim, têm vindo a ser desenvolvidos diversos análogos em que são modificados os seus três resíduos constituintes (Gly, Pro e Glu) com o objetivo de tentar melhorar as suas propriedades farmacocinéticas.

2.1.1. Modificações estruturais no resíduo da Glicina



A glicina é um aminoácido simples e não-essencial, que tem a propriedade de ser o único aminoácido proteínogénico sem atividade ótica.⁴⁰ Este resíduo é um importante constituinte do GPE, uma vez que contém propriedades neurotransmissivas, facilitando assim a transmissão excitatória no cérebro através de uma ativação alostérica do recetor NMDA.⁴¹

Deste modo, foram sintetizados glicinómiméticos pela substituição ou alteração da glicina, no tripéptido GPE, com o objetivo de explorar a importância deste aminoácido e identificar possíveis análogos com melhor atividade neuroprotetora (**Figura 2.1.**).⁴²

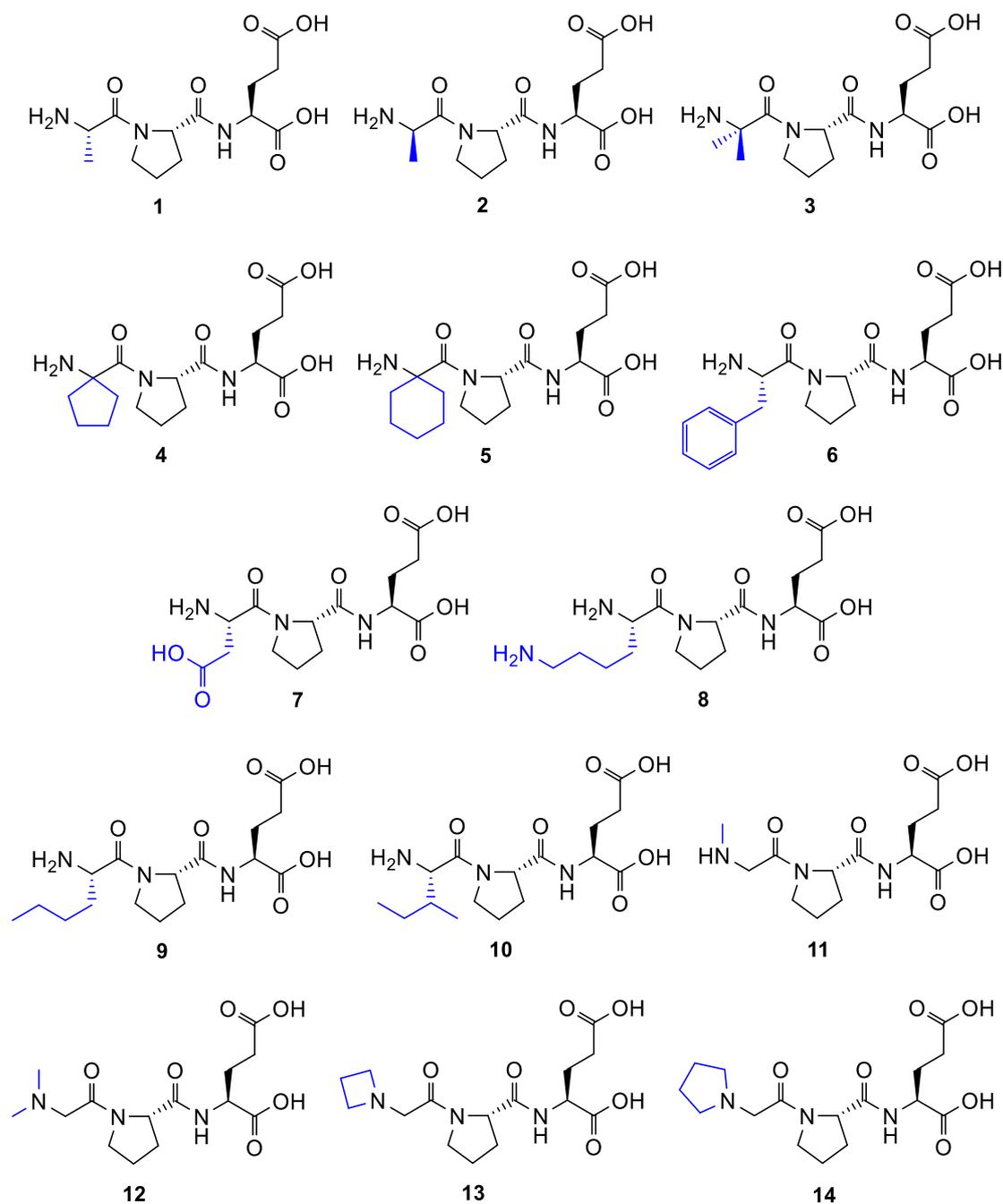


Figura 2.1. Modificações realizadas no resíduo de Glicina do GPE.⁴²

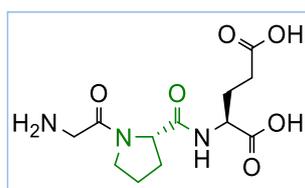
Os compostos **1-10** consistem na substituição dos hidrogénios- α da glicina, introduzindo grupos alquilo e arilo pequenos. Uma modificação subtil consiste na introdução de um grupo metilo no carbono- α da glicina, utilizando-se assim o aminoácido Ala (**1** e **2**) ou pela substituição dos protões- α da glicina por dois grupos metilo (**3**). Foram inseridos também grupos de maiores dimensões como no caso da substituição pelo grupo ciclopentilo (**4**) e ciclo-hexilo (**5**); e ainda foram realizadas outras modificações que incluem a substituição da glicina por outros aminoácidos como Phe (**6**), Asp (**7**), Lys (**8**), Nle (**9**) e Ile (**10**). Estas modificações permitiram de uma forma

geral o aumento da lipofilicidade e da estabilidade metabólica, comparativamente ao GPE.⁴²

Relativamente aos compostos **11-14**, estes representam a introdução de diversos grupos alquila na amina terminal da glicina, observando-se também um aumento da lipofilicidade e da estabilidade metabólica.⁴²

Entre estes, os compostos **2** e **12** revelaram ser os mais promissores. O composto **2** obteve uma boa afinidade de ligação aos recetores de glutamato e, em ensaios de viabilidade celular, obteve uma recuperação superior à obtida pelo GPE (26,4 % a uma concentração de 10 μ M em comparação com 20,1 % a uma concentração de 1 mM).⁴² Quanto ao composto **12**, para além dos bons resultados de viabilidade (recuperação de 30-35 % a uma concentração de 1 mM),⁴² este tem a vantagem acrescida de possuir propriedades antioxidantes, possuindo a capacidade de diminuir o *stress* oxidativo,⁴³ tornando-se, desta forma, um potencial fármaco.

2.1.2. Modificações estruturais no resíduo da Prolina



O resíduo de prolina possui propriedades importantes para o GPE pois, uma vez que se trata de um aminoácido cíclico de estrutura rígida,⁴⁴ confere características únicas aos compostos que a contêm. Uma dessas características é a restrição de conformações (*cis* e *trans* da ligação Pro-Glu relativamente ao GPE) (**Figura 2.2.**) que a ligação amida pode adotar (característica importante uma vez que a bioatividade e a suscetibilidade perante peptidases dependem da conformação ativa).⁴⁵⁻⁴⁶

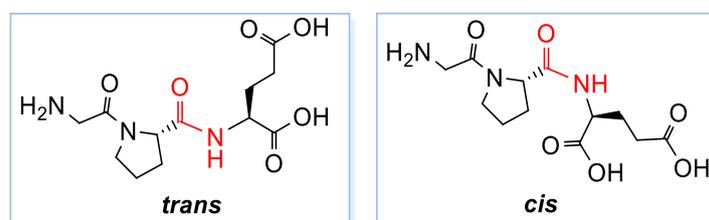


Figura 2.2. Conformações *cis/trans* do GPE.

Assim, foram sintetizados diversos prolinomiméticos (**Figura 2.3.** e **Figura 2.4.**), na tentativa de avaliar a influência do mesmo e encontrar possíveis candidatos com melhores propriedades farmacocinéticas.

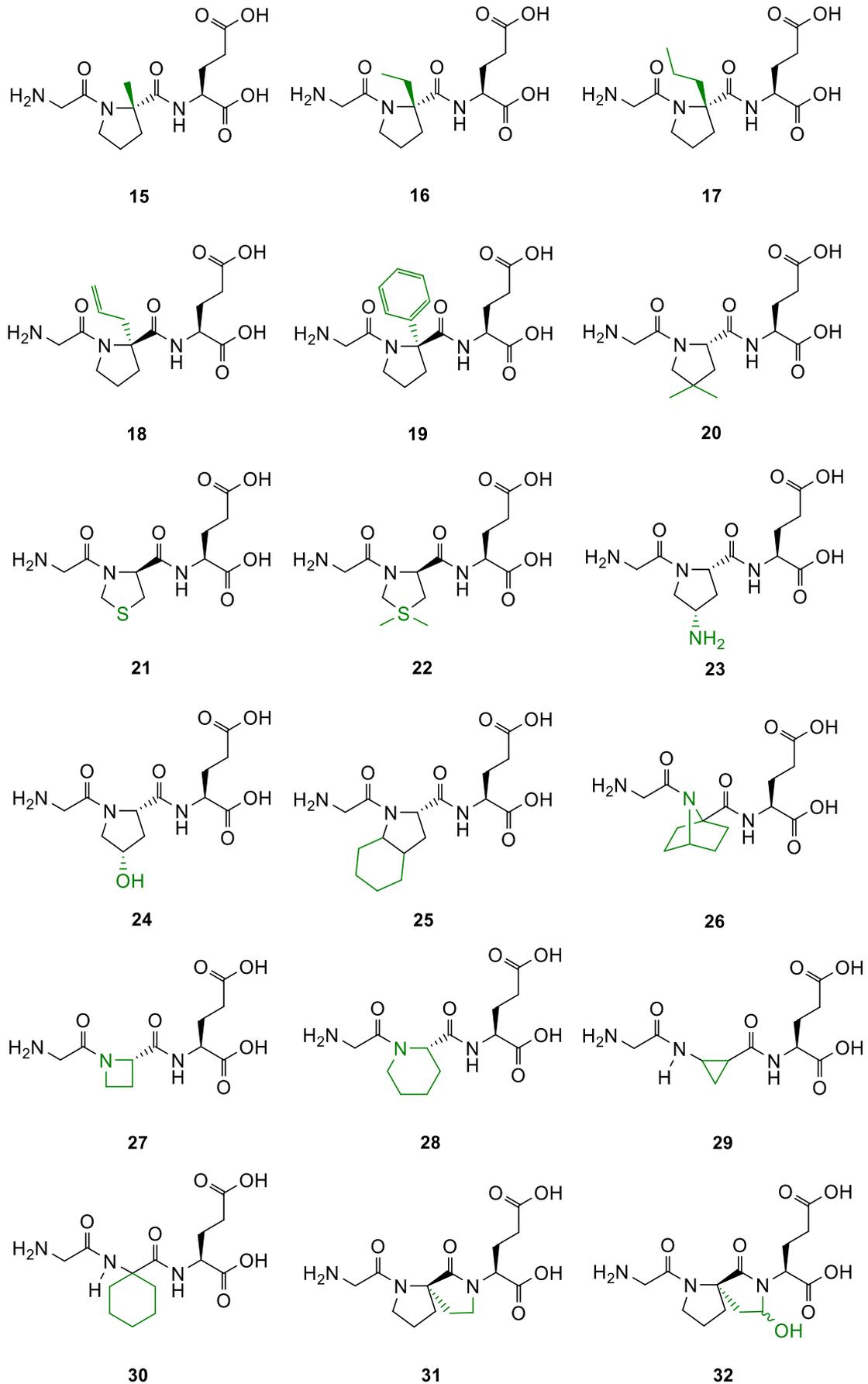


Figura 2.3. Primeiras modificações realizadas no resíduo da Prolina do GPE.⁴²

Nos compostos **15-19** foi substituído o protão- α por diversos grupos, tendo-se verificado a preferência pela conformação *trans* devido à sua maior estabilidade.⁴² Destes, o composto **15** é já bastante conhecido, uma vez que se trata de um fármaco em desenvolvimento (fase II dos ensaios clínicos), denominado por **NNZ-2566** ou **Trofinetide**, desenvolvido pelo grupo farmacêutico *Neuren*.⁴⁷ O **NNZ-2566** comprovou que, a substituição do protão- α da prolina por um grupo metilo proporcionou uma diminuição da sua degradação (enzimática), aumentando o seu tempo de semivida no plasma⁴⁸ e também uma boa neuroprotecção em modelos *in vivo* ao conferir boas propriedades anti-apoptóticas.⁴⁹

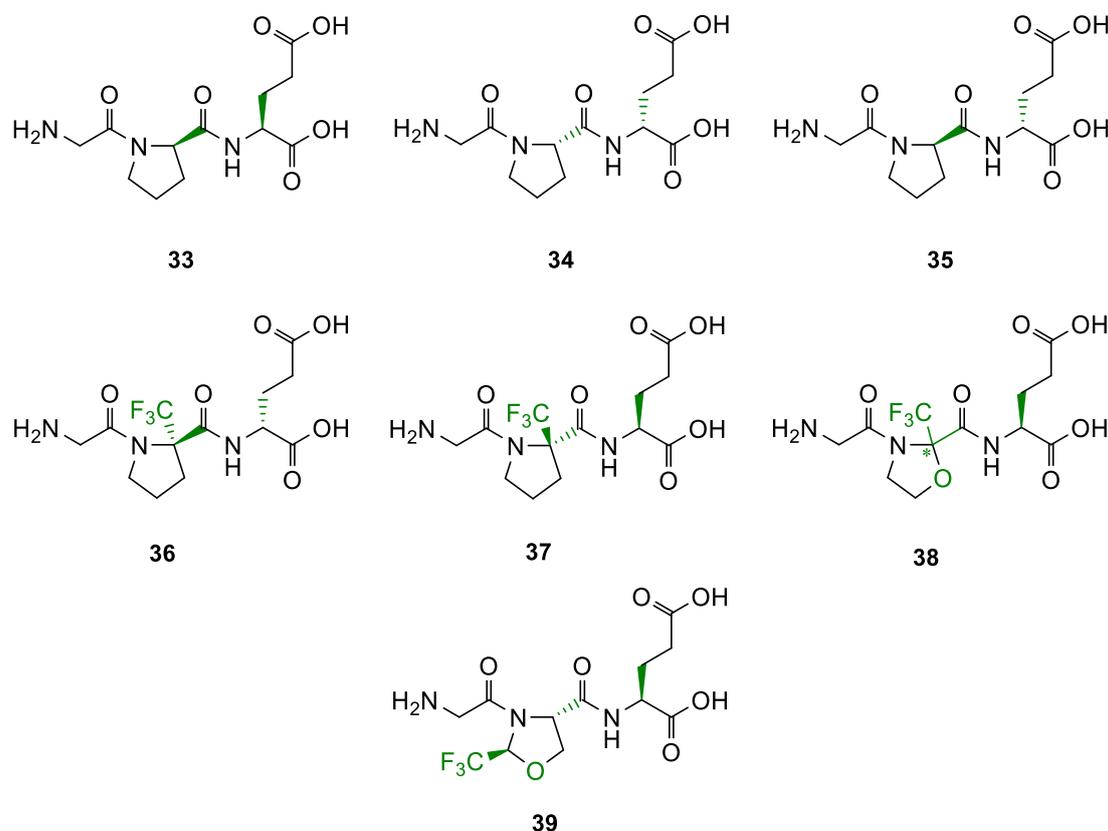
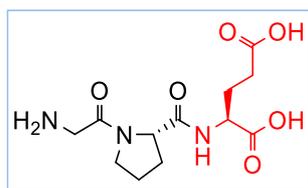


Figura 2.4. Outras modificações realizadas no resíduo da Prolina do GPE.^{42, 50}

Entre os prolinomiméticos **15-35**, para além do composto **15** que já foi referido como potencial fármaco, o composto que teve atividade com maior relevância foi o composto **20**, tendo tido este uma boa afinidade de ligação perante os recetores de glutamato ($K_i = 3,8 \pm 0,5 \mu\text{M}$), demonstrando também prevenir a morte causada pela excitotoxicidade de NMDA dos neurónios presentes no hipocampo.⁴² Uma vez que os compostos mais promissores deste grupo têm conformações opostas (composto **15** *trans* e composto **20** *cis*), é possível concluir que a conformação específica possui um papel pouco predominante na atividade neste tipo de compostos.

Os análogos que possuem fluor, designadamente os compostos **36-39**, foram recentemente desenvolvidos (2016),⁵⁰ sendo que, apesar de os ensaios de neuroprotecção ainda não estarem disponíveis, são esperados bons resultados, uma vez que os aminoácidos que contêm fluor estão descritos como tendo a capacidade de aumentar a estabilidade química.⁵¹

2.1.3. Modificações estruturais no resíduo do Ácido Glutâmico



Por fim, o glutamato é um importante neurotransmissor envolvido no funcionamento normal cerebral, tendo sido explorado por vários grupos de investigação modificações neste resíduo para obtenção de análogos do GPE (**Figura 2.5. e 2.6.**).

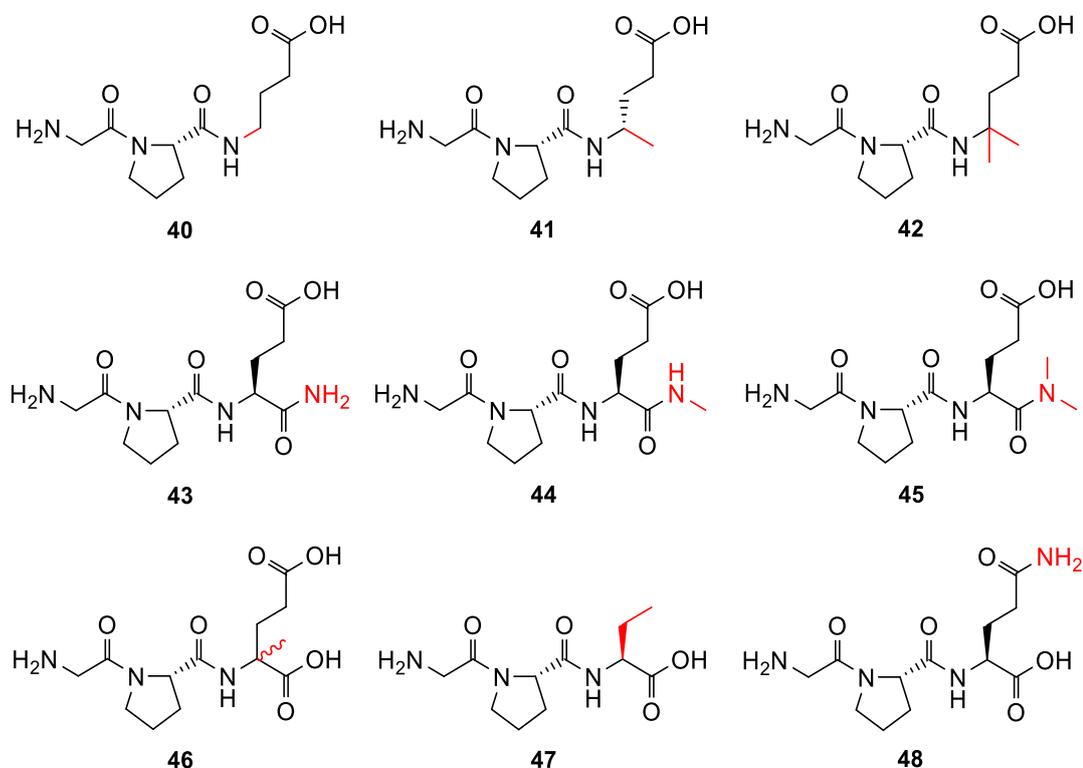


Figura 2.5. Primeiras modificações realizadas no resíduo do ácido glutâmico do GPE.⁴²

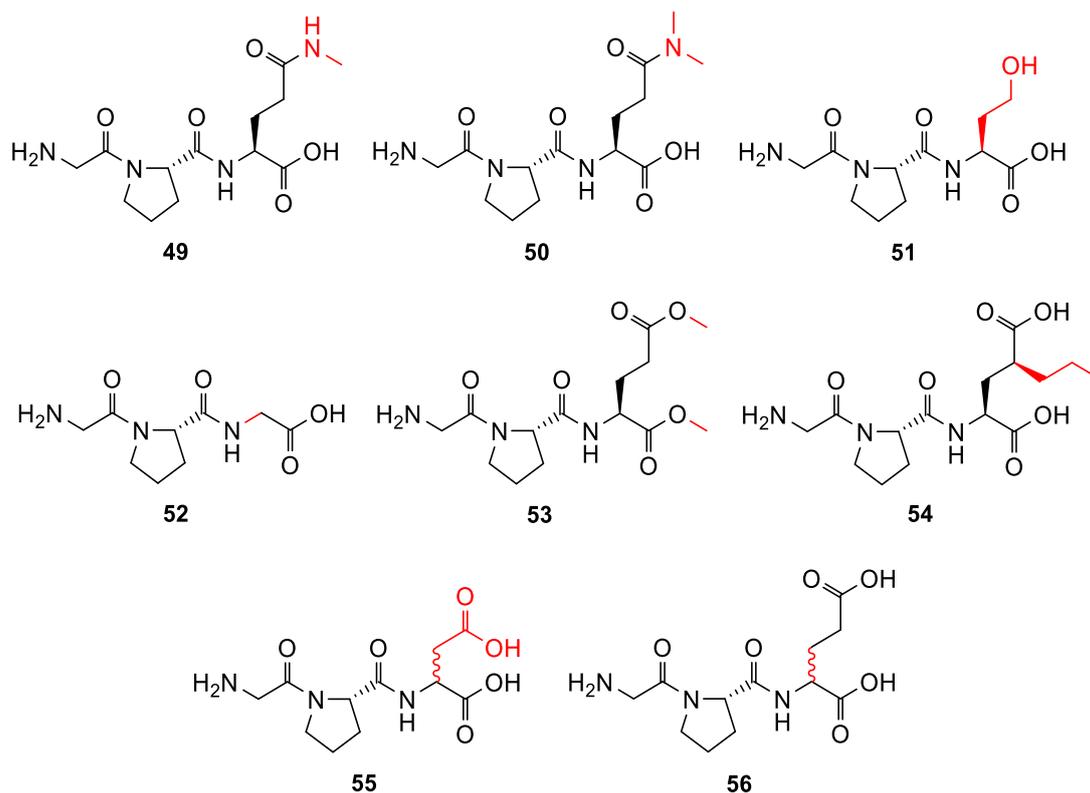


Figura 2.6. Outras modificações realizadas no resíduo do ácido glutâmico do GPE.⁴²

Os análogos **40-46** representam a substituição do grupo carboxílico- α , por hidrogénios, metilos ou amidas com amina primária, secundária e terciária, sendo que o aumento da lipofilicidade nestes compostos é uma vantagem para a obtenção de uma melhor permeabilidade através de membrana lipídicas. Deste grupo de compostos, o análogo **46** foi o que obteve uma melhor estabilidade metabólica, no entanto, os análogos **41** e **45** foram os únicos a demonstrar atividade neuroprotetora significativa.⁴²

Os compostos **47-54** consistem nas mesmas alterações descritas anteriormente, mas neste caso relativamente ao grupo carboxílico- γ da cadeia lateral. Neste grupo, o composto **47** obteve uma boa estabilidade metabólica e permeabilidade por membranas lipídicas, devido a uma menor polaridade. No entanto, o composto **52** foi o único a obter atividade neuroprotetora e afinidade de ligação significativa aos recetores de glutamato. Os restantes compostos não obtiveram nenhum resultado significativo.⁴²

Concluindo, o estudo de análogos do resíduo de glutamato no GPE tem alguma relevância, uma vez que o glutamato é um precursor do neurotransmissor inibitório GABA. Tendo sido o composto **45**, um dos análogos de glutamato com maior atividade neuroprotetora, permitiu concluir que o grupo glutamina, apesar de ser um potencial mediador de neurotoxicidade, quando inserida no restante péptido permite obter bons resultados.^{42, 52}

2.1.4. Modificações estruturais – análogos macrocíclicos

O número de conformações possíveis que cada ligação é capaz adotar pode interferir na atividade do próprio péptido. Deste modo, a introdução de bloqueadores conformacionais (**Figura 2.7.**) permite o controlo dessas conformações podendo esta capacidade melhorar a atividade biológica.⁴²

Os compostos **57-60** adotam, preferencialmente, a conformação *trans* que também é encontrada no GPE nativo, enquanto que os compostos **61** e **62** adotam a conformação *cis*. Relativamente ao composto **63**, este adota uma conformação *cis* devido a, neste tripéptido, a ligação amida da prolina ser mais flexível; enquanto que o composto **64** apenas se encontra na sua conformação *trans*.⁴²

Além destes estudos conformacionais, foram realizados ensaios de neuroprotecção, em que os compostos **57** e **59** demonstraram ter uma boa capacidade de protecção.⁴²

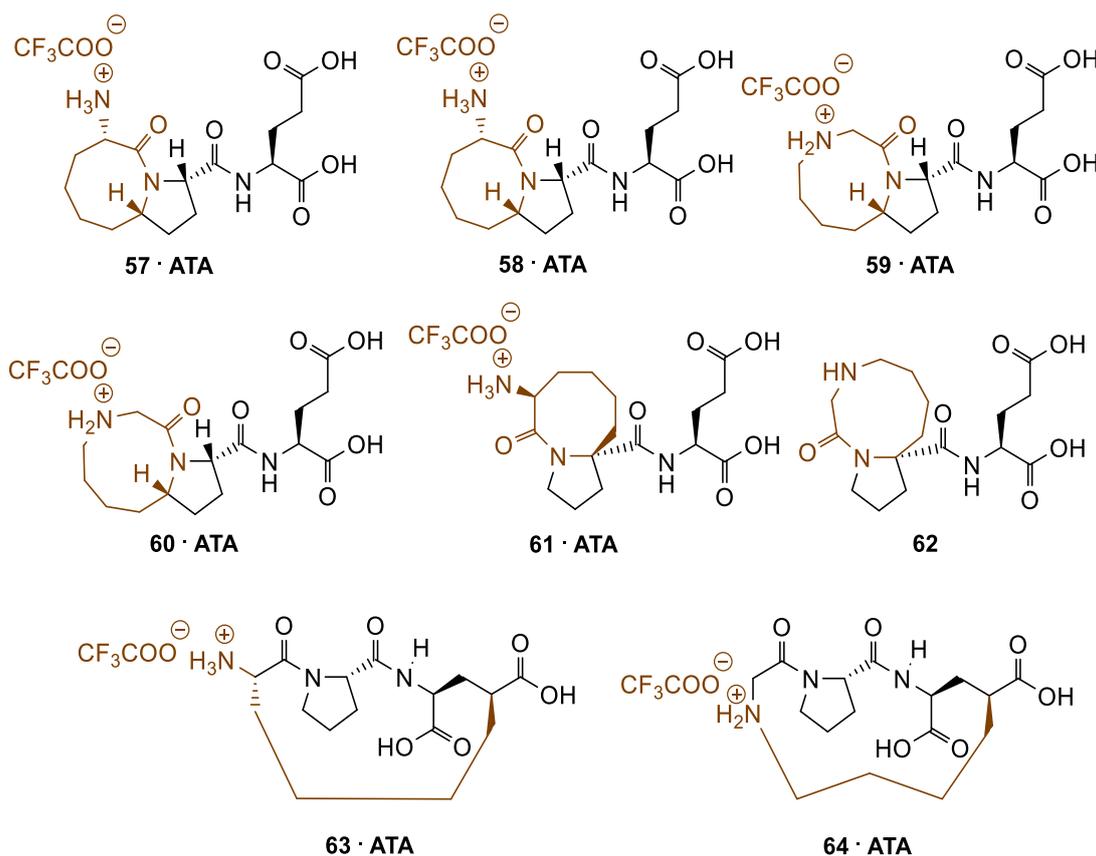
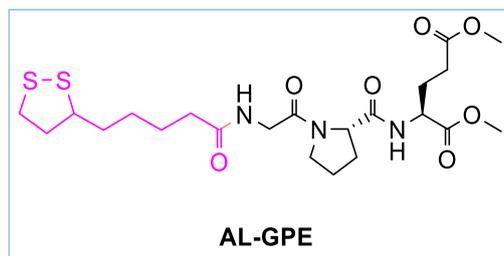


Figura 2.7. Análogos macrocíclicos do GPE.⁴²

2.2. CONJUGADOS DO GPE

Ácido lipóico-GPE



Com o objetivo de tentar verificar o possível sinergismo entre as propriedades do GPE com as propriedades do ácido lipóico em doenças neurodegenerativas,⁵³ foi sintetizado um conjugado de GPE com o ácido lipóico (**AL-GPE**) através da formação de uma ligação amida entre estes dois compostos, sendo este o único conjugado de GPE sintetizado até ao momento.⁵⁴ Este acoplamento poderá possuir inúmeras vantagens, uma vez que as doenças neurodegenerativas às quais o GPE se encontra associado estão também relacionadas com o *stress* oxidativo,⁵⁵ por isso ao haver um consumo elevado de oxigénio e uma quantidade elevada de lípidos no cérebro (tornando-se este vulnerável aos danos causados pelos radicais livres),⁵⁶⁻⁵⁷ este conjugado poderá participar não só na neuroprotecção, mas também na captura de espécies oxidativas que possam formar.

Foram determinadas algumas propriedades físico-químicas para avaliar a potencialidade deste conjugado relativamente à sua farmacocinética e ainda alguns testes *in vitro*. Em relação às propriedades físico-químicas, o logP obtido ($1,51 \pm 0,02$) permitiu concluir que este composto poderá ter uma boa distribuição comparativamente ao GPE (logP = $-4,39$). Foram também realizados testes de estabilidade em diferentes soluções tampão, permitindo assim observar que o AL-GPE é estável tanto em ambientes ácidos (como por exemplo no estômago) como em ambientes básicos (como os encontrados no intestino).⁵⁴

Relativamente aos ensaios *in vitro*, foi utilizada a linha celular SH-SY5Y, dois insultos de toxicidade, H₂O₂ e 6-OHDA, e o ensaio de MTT para avaliar a viabilidade celular após a presença destes estímulos neurotóxicos. Perante os dois insultos referidos, este conjugado obteve bons resultados de neuroprotecção e ainda apresentou efeito antioxidante, sendo de notar que o conjugado AL-GPE obteve melhores resultados do que quando usado unicamente o GPE ou unicamente o AL ou ainda utilizando uma mistura AL + GPE.⁵⁴

Para complementar todos os resultados já obtidos, foram realizados também ensaios de estabilidade enzimática para avaliar o tempo de semivida deste conjugado e ainda ensaios PAMPA. Os ensaios de estabilidade demonstraram que o tempo de semivida de AL-GPE em plasma humano é superior ($3,14 \pm 0,08$ h) comparativamente com o GPE nativo ($0,35 \pm 0,02$ h). Em relação aos ensaios PAMPA, o AL-GPE demonstrou ter uma elevada permeabilidade no SNC.⁵⁴

Todos os resultados positivos obtidos para este conjugado permitem concluir que a junção das propriedades neuroprotetoras e antioxidantes podem ser benéficas para o tratamento de doenças neurodegenerativas. Para além do sinergismo das propriedades dos dois compostos acoplados, o aumento da lipofilicidade em comparação com o GPE nativo causado pelo acoplamento do AL e pela proteção dos grupos polares expostos do glutamato, podem facilitar a passagem através da membrana hematoencefálica.

3. ÂMBITO DO TRABALHO E OBJETIVOS

3.1. ÂMBITO DO TRABALHO

Este trabalho enquadra-se no âmbito da dissertação de mestrado em Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (FCUP), desenvolvido no Departamento de Química e Bioquímica da FCUP sob a orientação científica do Professor Doutor José Enrique Rodríguez Borges, pertencente ao Laboratório Associado para a Química Verde (LAQV/REQUIMTE), e coorientação da Doutora Márcia Liz, líder do grupo de Neurodegeneração do Instituto de Investigação e Inovação em Saúde da Universidade do Porto (i3S).

O presente projeto insere-se na linha de investigação de *Síntese Estereoseletiva e Avaliação Biológica de Péptidos com Potencial Atividade Neuroprotetora* explorando novos conjugados do neuropéptido GPE com aminas bioativas, tendo como finalidade a aplicação na Química Medicinal face a doenças neurodegenerativas.

3.2. OBJETIVOS

Considerando o estado da arte apresentado na **secção 2** e, tendo sido detetado apenas um conjugado do GPE reportado na revisão bibliográfica apresentada, o objetivo deste trabalho passa por:

- Escolher fármacos utilizados no tratamento de DNs, nomeadamente aminas neuroprotetoras, para permitir o acoplamento peptídico entre a amina dos fármacos e ambos os grupos ácidos carboxílicos presentes no resíduo de ácido glutâmico do GPE. A escolha deste resíduo para o acoplamento com as aminas bioativas foi realizada tendo em consideração o facto de que é sabido que o GPE é clivado por carboxipeptidases, o que poderá permitir uma libertação controlada dos fármacos de forma seletiva.

- Tendo em conta a regra dos 5 de Lipinski, um dos critérios para maior probabilidade de absorção refere que as biomoléculas devem ter uma massa molecular ≤ 500 g/mol. Desta forma, foram escolhidas as seguintes aminas bioativas: aminoindano (**a**), amantadina (**b**) e memantina (**c**), sendo que as duas últimas são fármacos usados na DP e DA, respetivamente. Assim, como estas três aminas apresentam massas moleculares pequenas, ao preparar os conjugados propostos, estes não ultrapassam de forma significativa este critério.

- Averiguar a influência da posição em que se realiza a funcionalização do glutamato com as aminas bioativas através do acoplamento com o ácido carboxílico do glutamato na sua cadeia lateral ou na posição α (estando o ácido carboxílico que não foi funcionalizado protegido sob a forma de éster metílico), uma vez que o local da funcionalização pode afetar as propriedades dos conjugados finais. A razão de proteger o ácido carboxílico que não é funcionalizado sob a forma de éster metílico baseia-se no

facto de que quanto maior o carácter lipofílico, maior a permeabilidade dos compostos através de membranas biológicas e é utilizado o grupo metoxilo devido a sua baixa massa molecular.

- Aplicar a metodologia *one-pot* desenvolvida pelo grupo de investigação para introduzir, de forma quimiosseletiva, os restantes aminoácidos da sequência do GPE, nomeadamente os resíduos de glicina e L-prolina, aos glutamatos funcionalizados.

- Explorar o efeito do *N*-terminal livre ou mascarado sob a forma de amina terciária obtida por dimetilação da amina primária presente no resíduo de glicina, obtendo-se assim duas famílias de conjugados distintas.

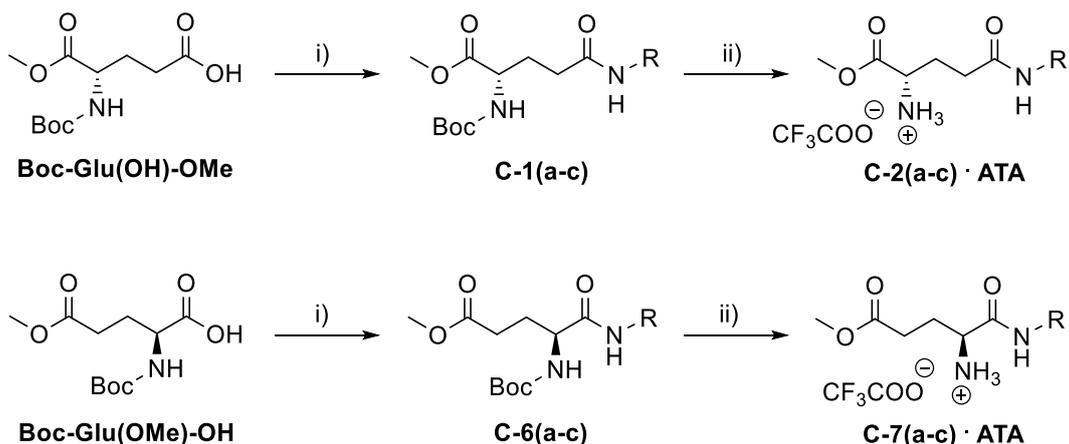
- Avaliar biologicamente os conjugados preparados usando a linha celular CAD e H₂O₂ como estímulo neurotóxico, uma vez que este é clinicamente relevante ao induzir *stress* oxidativo.

3.3. PLANO DE TRABALHOS

De forma a cumprir os objetivos propostos, o plano de trabalhos relativo à síntese dos conjugados do GPE com as aminas **a-c** divide-se em quatro partes:

- 1) Funcionalização dos glutamatos **Boc-Glu(OH)-OMe** e **Boc-Glu(OMe)-OH** com as aminas bioativas **a**, **b** e **c** por acoplamento peptídico usando TBTU como agente de acoplamento e DIEA como base terciária, obtendo-se os compostos **C-1(a-c)** e **C-6(a-c)**. Remoção acidolítica do grupo Boc dos compostos anteriormente sintetizados para a obtenção dos glutamatos **2(a-c)** e **C-7(a-c)** (**Esquema 3.1.**);
- 2) Síntese dos conjugados **C-3(a-c)** e **C-8(a-c)** por aplicação da metodologia *one-pot* com introdução dos restantes aminoácidos, glicina e L-prolina, aos glutamatos **C-2(a-c)** e **C-7(a-c)** sintetizados no ponto 1. Remoção acidolítica do grupo Boc para obtenção dos conjugados finais **C-4(a-c)** e **C-9(a-c)** (**Esquema 3.2.**);
- 3) Síntese dos conjugados finais **C-5(a-c)** e **C-10(a-c)** através de uma reação de aminação reductiva usando formaldeído e STAB como agente redutor, a partir dos conjugados **C-4(a-c)** e **C-9(a-c)**, apresentados no ponto 2 (**Esquema 3.2.**).
- 4) Tendo em conta que os ácidos carboxílicos não funcionalizados do resíduo de glutamato se encontram protegidos sob a forma de ésteres metílicos, e uma vez que está previsto verificar o efeito do *N*-terminal (amina livre e dimetilada), é necessário realizar os respetivos controlos para os ensaios biológicos, de forma a perceber a influência de cada parâmetro na atividade dos conjugados preparados. Assim, são necessários os controlos, **C-II** e **C-III**, correspondendo ao controlo dos conjugados com *N*-terminal livre e *N*-terminal dimetilado, respetivamente (**Esquema 3.3.**).

Funcionalização dos glutamatos e remoção do grupo Boc

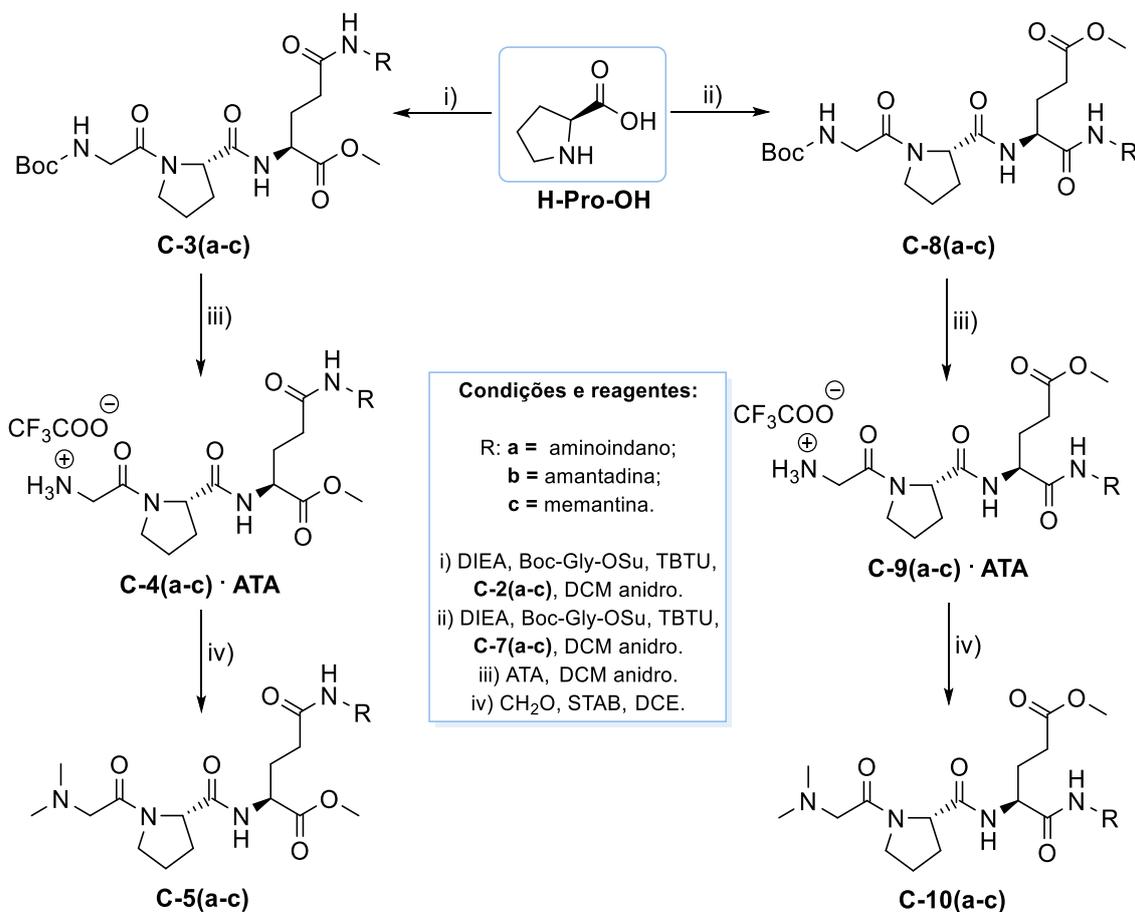


Condições e reagentes:

R: **a** = aminoindano; **b** = amantadina; **c** = memantina.
i) DIEA, TBTU, NH₂-R, DCM anidro.
ii) ATA, DCM anidro.

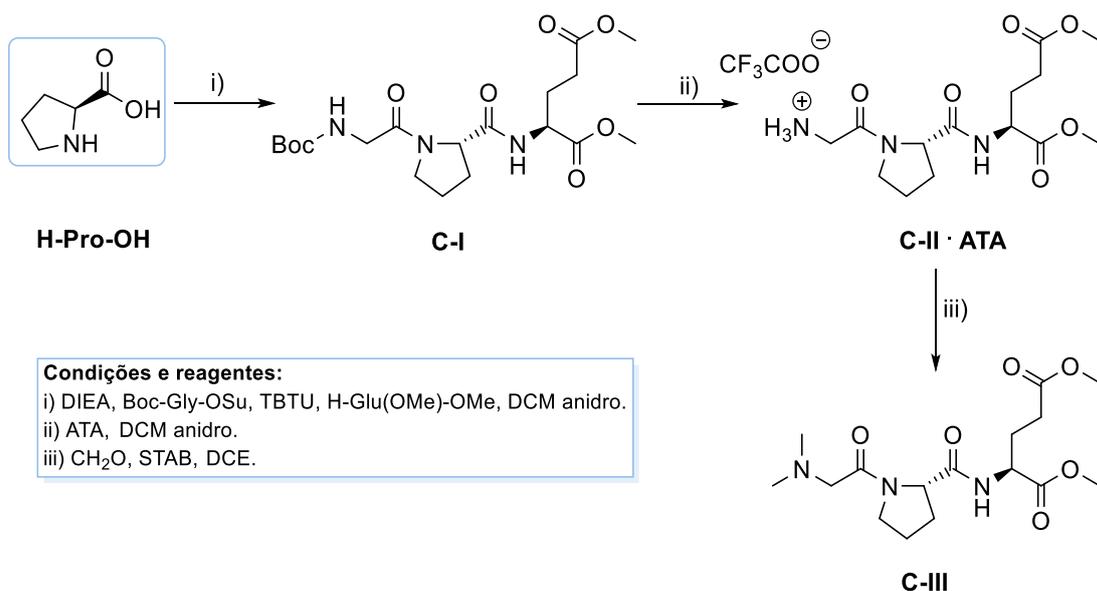
Esquema 3.1. Funcionalização dos glutamatos com aminas bioativas e remoção do grupo Boc.

Síntese de conjugados do GPE



Esquema 3.2. Síntese de conjugados do **C-4(a-c)**, **C-5(a-c)**, **C-9(a-c)** e **C-10(a-c)**.

Síntese dos controlos para os ensaios biológicos

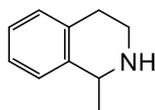


Esquema 3.3. Síntese dos controlos **C-II** e **C-III** para ensaios biológicos.

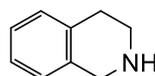
Relativamente ao plano de trabalhos relativo aos ensaios biológicos, pretende-se utilizar as células da linha celular CAD para avaliar a neuroprotecção dos conjugados finais sintetizados (e respetivos controlos), usando H₂O₂ como agente neurotóxico através da indução de *stress* oxidativo. A viabilidade celular, e, por conseguinte, o efeito neuroprotetor, será avaliado com utilizando o ensaio de MTT, sendo que os resultados obtidos serão estudados utilizando o teste *t* (independente).

3.4. RESOLUÇÃO DA AMINA 1-METIQ

Pretendeu-se ainda realizar a resolução da amina 1-metil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, também denominada por **1-MeTIQ**, sendo esta um derivado da 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (**TIQ**).



1-MeTIQ



TIQ

A 1-MeTIQ encontra-se naturalmente presente no SN de humanos e ratos, sob a forma de mistura racémica, sendo também encontrada em alimentos ricos em 2-feniletilamina. A atividade desta amina é bastante ampla no SN, atuando mais acentuadamente em regiões dopaminérgicas, como por exemplo na substância negra, implicada na DP.⁵⁸

Este derivado protege essencialmente os neurónios dopaminérgicos contra os danos causados por radicais livres, estando por isso associada à DP, uma vez que com a progressão da doença a sua produção diminui. Assim, esta amina revelou ser neuroprotetora, podendo assim ser utilizada no tratamento dos sintomas associados à DP. Adicionalmente, está associada à diminuição de comportamentos ligados ao vício.⁵⁹

No entanto, apesar de a 1-MeTIQ demonstrar atividade neuroprotetora na sua forma racémica, foi comprovado que essa atividade advém, principalmente, do seu enantiómero *R*, tendo este um papel importante na proteção dos neurónios que se encontram na substância negra. Uma vez que as metodologias de resolução desta amina são limitadas, havendo apenas uma rota sintética exaustiva para obter os dois enantiómeros separadamente e ainda um método enzimático,⁶⁰⁻⁶¹ torna-se premente a investigação de novas metodologias mais eficazes de resolução desta amina.

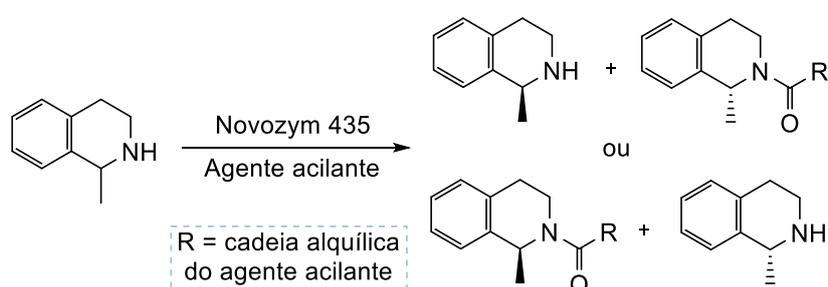
3.4.1. Objetivo / Plano de trabalhos

Tendo em conta a importância intrínseca da 1-MeTIQ em processos neurodegenerativos e os escassos métodos de preparação da mesma de forma enantiosseletiva, torna-se de grande importância o desenvolvimento de novas metodologias de síntese assimétrica para a preparação das formas opticamente puras desta amina.

Assim, de forma complementar ao plano de trabalhos e objetivos apresentados anteriormente (**secção 3.2.** e **secção 3.3.**), pretende-se realizar a resolução da amina

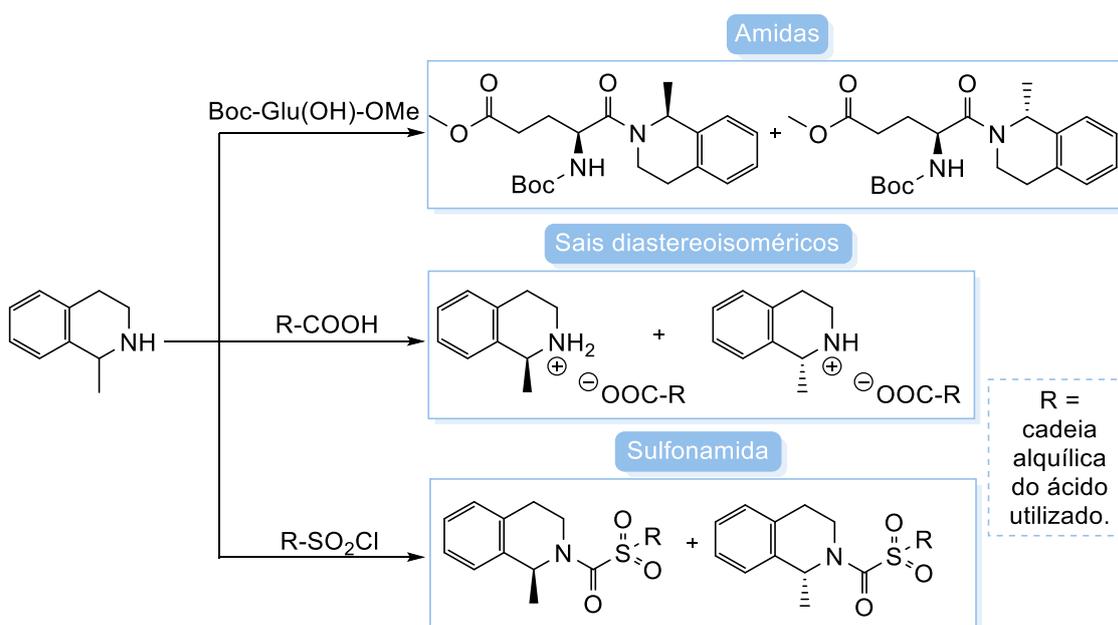
neuroprotetora 1-MeTIQ usando diversas estratégias aplicadas no campo da síntese assimétrica, quer por resolução enzimática, quer por resolução química. Desta forma, com o desenvolvimento de uma metodologia segura e reproduzível pretende-se obter o enantiómero mais ativo (de configuração *R*), para assim, posteriormente, este ser incorporado no GPE com o objetivo de sintetizar mais uma família de conjugados do GPE, em conformidade com o âmbito deste trabalho.

Relativamente ao método enzimático, pretende-se encontrar as condições ideais utilizando uma enzima diferente da que se encontra descrita na literatura para a resolução da 1-MeTIQ, como por exemplo a *Novozym 435*, usando diversos agentes acilantes (**Esquema 3.4**).



Esquema 3.4. Esquema geral do plano de trabalhos para a resolução enzimática da 1-MeTIQ.

Por outro lado, relativamente à resolução química, pretende-se realizar uma abordagem ampla ao procurar separar os seus dois enantiómeros através de métodos como a formação de diastereoisómeros *via* ligação amida ou sulfonamida e ainda pela formação de sais diastereoisoméricos, através do uso de agentes de resolução quirais (ácidos carboxílicos opticamente puros) (**Esquema 3.5**).



Esquema 3.5. Esquema geral do plano de trabalhos para a resolução química da 1-MeTIQ.

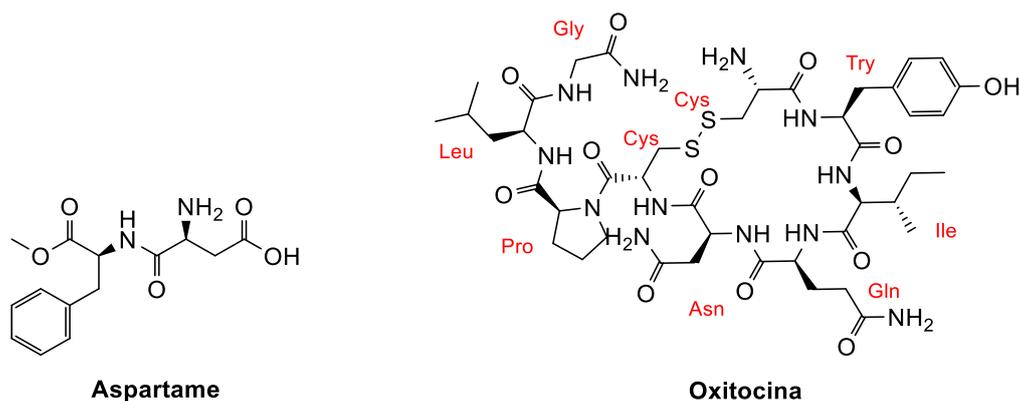
4. DISCUSSÃO E RESULTADOS OBTIDOS

4.1. SÍNTESE ORGÂNICA

4.1.1. Acoplamento Peptídico

4.1.1.1. Fundamentos da síntese peptídica

A síntese peptídica tem vindo a ter cada vez mais relevo, uma vez que um grande número de péptidos sintéticos é utilizado na formulação de produtos comerciais e farmacêuticos.⁶² Dois exemplos são o **Aspartame** e a **Oxitocina**. O Aspartame, descoberto em 1965 pela *Nutrasweet*,⁶³ é um dipéptido constituído pelos aminoácidos naturais L-fenilalanina e ácido L-aspártico. Este pode ser encontrado naturalmente em diversos alimentos como carnes e vegetais, no entanto, uma vez que se trata de um composto com propriedades adocicantes, este é amplamente produzido sinteticamente para o seu uso como substituto do açúcar.⁶³



Apesar de alguma controvérsia causada pela utilização do aspartame, uma vez que este, ao ser metabolizado (**Figura 4.1.**), ocorre a libertação de **metanol** (em quantidades insignificantes) e, ainda, os seus aminoácidos constituintes já referidos anteriormente, a **L-fenilalanina** associada à fenilcetonúria (doença genética caracterizada pelo aumento da concentração de fenilalanina devido ao défice de uma enzima hepática, provocando alterações ao nível fisiológico, neuronal, entre outros)⁶⁴ e o **ácido L-aspártico** associado a propriedades neurotóxicas, este adoçante encontra-se aprovado pela FDA em mais de 90 países.⁶⁵⁻⁶⁶

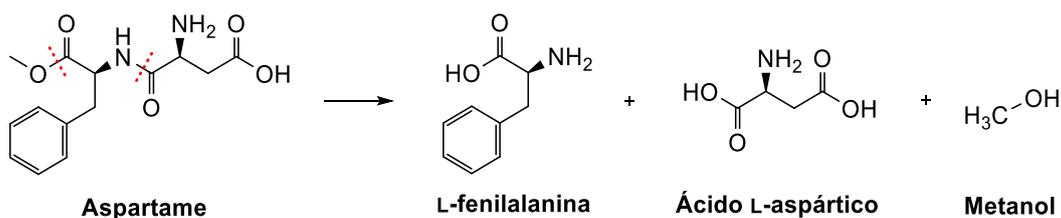


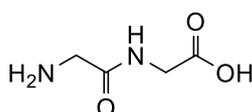
Figura 4.1. Metabolitos obtidos na digestão do aspartame.

Outro exemplo do uso de aminoácidos na medicina, é a Oxitocina, uma hormona constituída por 9 aminoácidos (Cys – Tyr – Ile – Gln – Asn – Cys – Pro – Leu – Gly – NH₂), obtida naturalmente uma vez que esta é produzida pelo hipotálamo.⁶⁷ A Oxitocina é considerada um neuropéptido com propriedades ansiolíticas e anti-stress, tendo enorme potencialidade para ser utilizada no tratamento de patologias associadas à ansiedade, *stress* pós-traumático, autismo, entre outras.⁶⁸ Além destas propriedades, este neuropéptido possui um papel essencial na estimulação da contração uterina, facilitando assim o parto, e ainda, no auxílio da amamentação.⁶⁷

No entanto, é necessário perceber o conceito de síntese peptídica e os seus pontos essenciais para que esta seja realizada com sucesso, tratando-se tanto da síntese de péptidos de cadeia curta como o exemplo dado do aspartame ou de um péptido de cadeias maiores como é o caso da oxitocina.

A síntese peptídica consiste então na ligação de dois ou mais aminoácidos através de uma reação de acoplamento (também denominada por condensação), sendo importante o conhecimento sobre grupos protetores de amins e de ácidos carboxílicos para que o acoplamento se realize de forma seletiva.

A primeira síntese de péptidos foi relatada por Fischer e Fourneau em 1901, tendo estes sintetizado o dipéptido **Glicilglicina**.⁶⁹



Glicilglicina

Posteriormente, em 1953, DuVigneaud conseguiu construir um péptido com atividade semelhante à oxitocina.⁷⁰

Os fundamentos brevemente descritos aplicam-se tanto à síntese de péptidos pela metodologia tradicional, ou seja, na síntese em solução, como também na síntese em fase sólida (SPPS do inglês *Solid-phase Peptide Synthesis*). A grande diferença entre estas duas metodologias foca-se na direção pela qual o péptido é sintetizado. Enquanto que na síntese em solução a formação do péptido pode ocorrer na direção de *N*- para *C*-terminal ou vice-versa, na síntese em fase sólida esta ocorre geralmente na direção de *C*- para *N*-terminal, além de que esta última necessita de um suporte polimérico insolúvel (resina).⁶²

4.1.1.2. α -Aminoácidos: natureza química e estereoquímica

Os α -aminoácidos são as subunidades estruturais das proteínas, também designados por monómeros. Estes são constituídos por um grupo amina, um grupo ácido carboxílico, um átomo de hidrogénio e ainda um grupo variável (grupo R), chamado de cadeia lateral, sendo que todos estes se encontram ligados a um carbono- α (**Figura 4.2.**).⁷¹

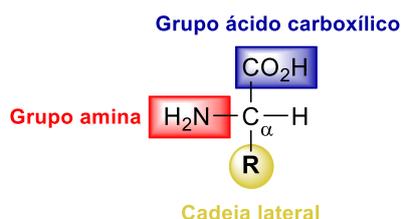


Figura 4.2. Estrutura geral de um α -aminoácido.

Com a exceção da glicina, que não é quiral, todos os aminoácidos podem adotar dois tipos de isomeria: L ou D. Os L-aminoácidos são designados como aminoácidos naturais uma vez que possuem a mesma configuração que o gliceraldeído natural. Em oposição, os D-aminoácidos são designados como aminoácidos não naturais.

Relativamente à configuração (**Figura 4.3.**), tendo em conta o sistema de nomenclatura Cahn-Ingold-Prelog,⁷² os L-aminoácidos detêm configuração (S), exceto a cisteína e seus derivados. Por outro lado, os D-aminoácidos possuem a configuração contrária (R).

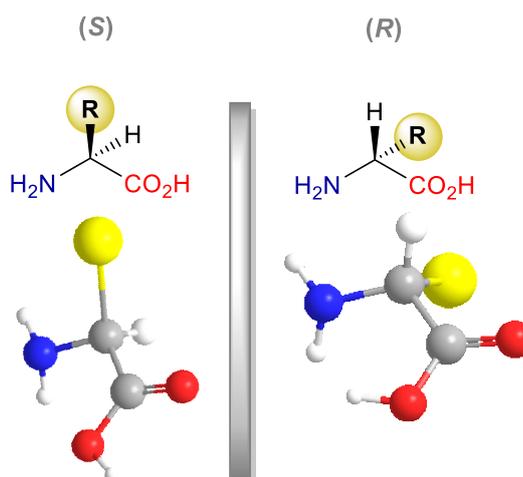
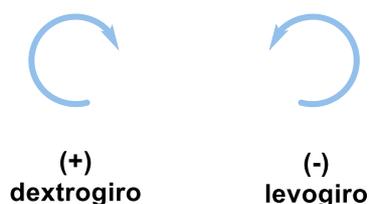


Figura 4.3. Estereoquímica dos α -aminoácidos.

4.1.1.3. Atividade ótica

Os α -aminoácidos que detêm um centro quiral, existem em duas formas estereoisoméricas, formas essas que se encontram relacionadas uma vez que uma é a imagem no espelho relativamente à outra. Estas moléculas têm a propriedade de serem óticamente ativas, sendo possível determinar o valor da rotação específica ($[\alpha]_D^T$), que é dependente da concentração da amostra, da temperatura e do comprimento de onda da luz que é utilizado. Esta medição é realizada num polarímetro e consiste em fazer passar luz polarizada através da amostra de um dos enantiómeros, o que faz com que o plano de polarização da luz seja girado numa determinada direção, em contrapartida o enantiómero oposto irá rodar esse plano no sentido oposto, com o mesmo valor em módulo.

Se o enantiómero rodar o plano da luz polarizada no sentido horário, ou seja, para a direita, é denominado por **dextrogiro** assumindo-se assim que se trata do enantiómero (+). Por outro lado, se o plano da luz girar no sentido anti-horário (para a esquerda) é denominado por **levogiro** tratando-se deste modo do enantiómero (-).



Esta propriedade permite facilmente identificar qual dos dois enantiómeros se encontra presente na solução que está a ser analisada (por comparação ao valor descrito na literatura). Uma vez que a quiralidade é uma propriedade amplamente encontrada em sistemas biológicos também devido à presença de aminoácidos, a identificação do enantiómero presente torna-se essencial, já que ambos possuem diferenças ao nível da biodisponibilidade, dos metabolitos obtidos, da seletividade em relação aos recetores e mesmo ao nível da toxicidade.⁷³

4.1.1.4. Formação da ligação amida

A função amida é bastante comum tanto em moléculas complexas como em moléculas mais simples. No que diz respeito à Química Medicinal, o grupo carboxamida está presente em mais de 25 % dos fármacos conhecidos.⁷⁴ Esta percentagem é espetável uma vez que as carboxamidas são neutras, estáveis e contêm tanto a capacidade de serem dadoras como aceitadoras de pontes de hidrogénio.

A nível biológico, a formação de uma ligação amida consiste, na condensação entre um ácido carboxílico e uma amina, com libertação de uma molécula de H_2O . Esta reação pode ser realizada, em contexto laboratorial, através de uma condensação direta (também denominada por condensação térmica) ou por condensação *via* éster ativado. A condensação direta pressupõe o uso de temperaturas altas (160 – 180 °C) e libertação de água,⁷⁵ sendo que esta metodologia não é muito comum uma vez que pode ser incompatível com outras funções químicas presentes nas moléculas e destruir a atividade ótica dos aminoácidos. Por outro lado, a condensação *via* éster ativado consiste essencialmente em quatro passos: proteção de grupos indesejáveis para a reação, ativação do ácido carboxílico, aminólise e por fim, desproteção dos grupos inicialmente protegidos (**Figura 4.4**).

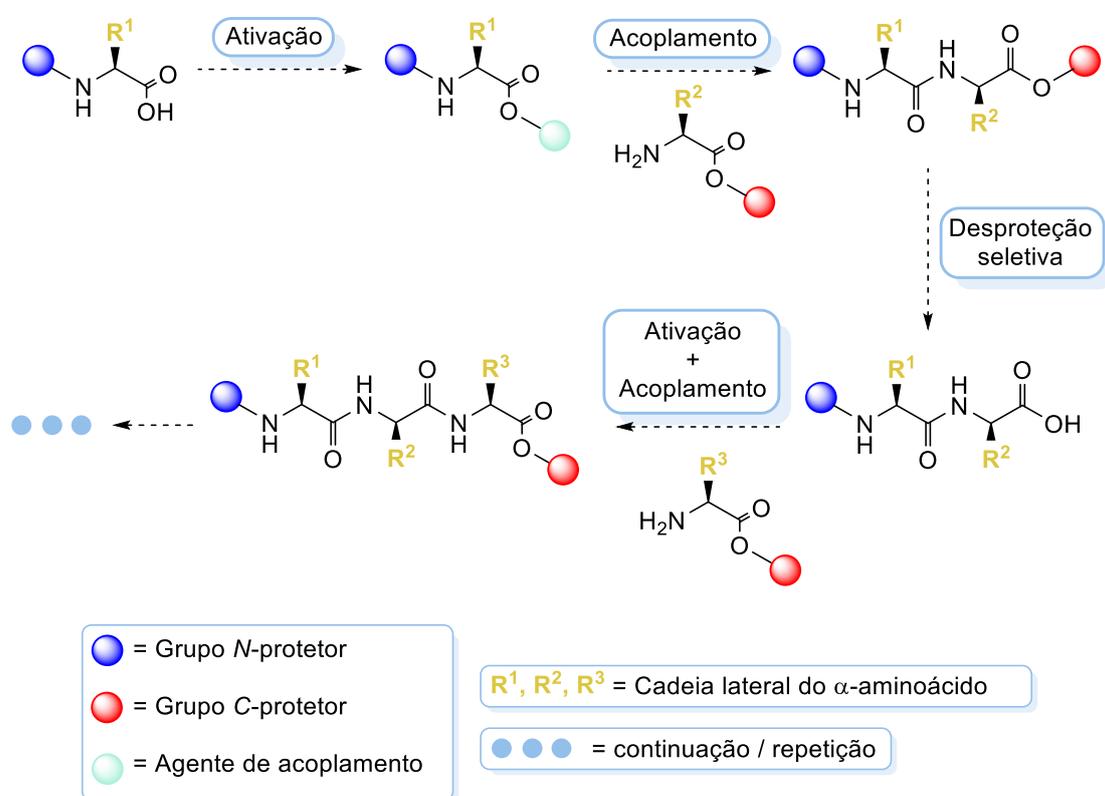


Figura 4.4. Exemplo esquemático da condensação peptídica (em solução) *via* éster ativado.

A utilização de grupos protetores é fundamental nas reações de acoplamento peptídico, uma vez que o seu uso permite suprimir a reatividade dos grupos funcionais que não se pretenda que participem na reação, evitando deste modo a polimerização do α -aminoácido, uma vez que este se encontra ativado, e conseqüentemente a formação de produtos indesejáveis.

A escolha dos grupos protetores a serem utilizados também deve ser ponderada e seguir um sistema ortogonal, possibilitando assim que tanto a proteção como a

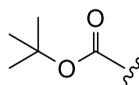
desproteção se concretizem de maneira seletiva e que não interfira na quiralidade dos α -aminoácidos.

Posteriormente à proteção, segue-se a ativação do ácido carboxílico utilizando agentes de acoplamento que irão tornar este ácido mais eletrófilo dispondo-o para o ataque da amina, facilitando assim a reação de acoplamento.

4.1.1.5. Grupos *N*-protetores⁷⁶⁻⁷⁷

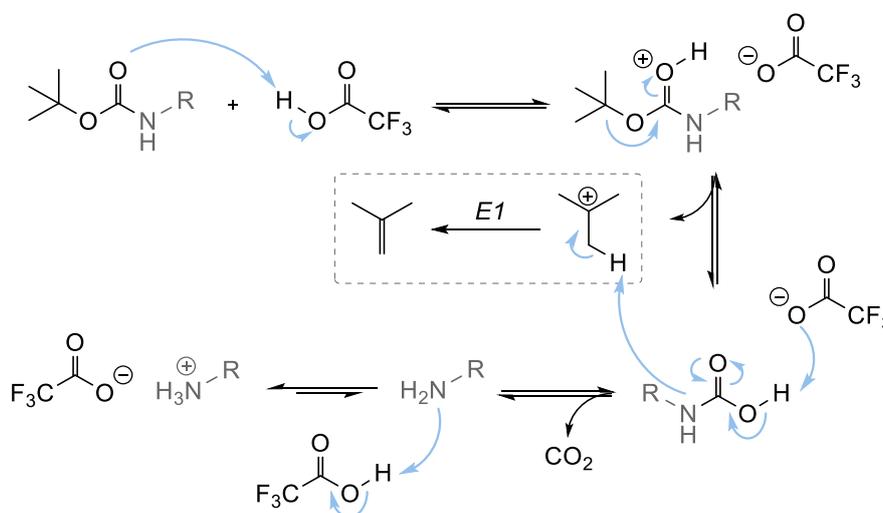
As aminas são usualmente convertidas em carbamatos (grupos *N*-protetores) de forma a suprimir a sua reatividade, tendo também como vantagem a diminuição da probabilidade de racemização dos centros quirais vizinhos. A formação de carbamatos é conseguida através da reação entre as aminas com os respectivos cloretos de acilo.

O grupo *tert*-butoxicarbonilo (**Boc**) foi o grupo *N*-protetor utilizado neste trabalho.



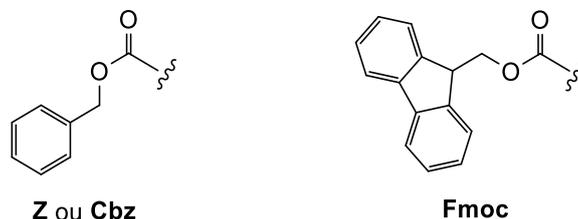
Boc

O grupo Boc é estável na presença da maioria dos nucleófilos e bases, sendo este removido sob condições ácidas, ou seja, utilizando alguns ácidos de Lewis como $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ e ZnBr_2 ,⁷⁸ ou ácidos de Brønsted-Lowry fortes como ácido trifluoroacético (ATA), HCl , H_2SO_4 , entre outros. Apesar de o ATA ser o ácido mais utilizado na remoção do grupo Boc (**Esquema 4.1.**), é necessário ter em consideração que este, além de ser corrosivo, carece de alguma seletividade uma vez que este também é capaz de remover esteres *tert*-butílicos em simultâneo.⁷⁸



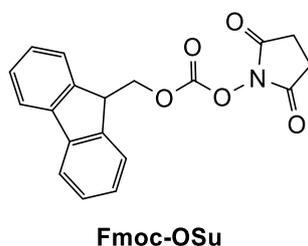
Esquema 4.1. Mecanismo de remoção do grupo *N*-protetor Boc utilizando ATA.

Também é de salientar a existência de outros grupos *N*-protetores comumente utilizados como é o caso do benziloxicarbonilo (**Z** ou **Cbz**) e do 9-fluorenilmetoxicarbonilo (**Fmoc**).



O grupo **Z** é bastante versátil uma vez que este é estável em diversas condições químicas e tem como principal vantagem a possibilidade de este poder ser utilizado em simultâneo com outros grupos protetores como o Boc ou o Fmoc. Este grupo é removido facilmente através de hidrogenólise catalítica à temperatura ambiente, utilizando Pd/C. Existem ainda outros métodos possíveis de remoção usando sódio em amoníaco líquido ou HF.

Quanto ao grupo **Fmoc**, ao contrário dos outros grupos este é usualmente introduzido sob a forma de **Fmoc-OSu** e não sob a sua forma de cloreto de acilo, uma vez que esta última tem como consequência a formação de dipéptidos Fmoc diminuindo assim o rendimento da reação de proteção.

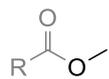


No que diz respeito à desproteção, já que este é estável perante ácidos, normalmente é usada uma base, sendo mais comum o uso da piperidina em DMF à temperatura ambiente.

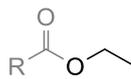
4.1.1.6. Grupos C-protetores^{77, 79}

Os grupos protetores de ácidos carboxílicos (grupos C-protetores) para além de serem utilizados com o objetivo de suprimir a sua reatividade, têm também a vantagem de aumentarem a solubilidade do composto em solventes orgânicos.

Os grupos mais comuns utilizados para mascarar ácidos carboxílicos são o metoxilo (-**OMe**) e o etoxilo (-**OEt**), tendo como resultado os correspondentes ésteres.



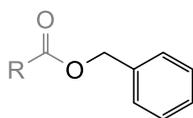
RCOOMe



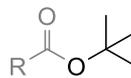
RCOOEt

Estes grupos podem ser introduzidos através de uma reação de esterificação de Fischer utilizando o respectivo álcool (metanol ou etanol) ou o respectivo halogeneto de alquilo (como por exemplo, clorometano ou cloroetano). Quanto à remoção, esta pode ser realizada através de mecanismos de hidrólise de ésteres. Uma vez que estes grupos são estáveis em ambientes ácidos e em condições de hidrogenação catalítica, os ésteres metílico e etílico têm a vantagem de poderem ser utilizados conjuntamente com os grupos *N*-protetores.

Existem outros ésteres mais volumosos que também podem ser utilizados como por exemplo o benzílico (-OBn) e o *tert*-butoxilo (-O^tBu). No caso do -OBn, a desproteção pode ser feita utilizando HBr/AcOH ou também por hidrogenação catalítica, sendo que estas condições podem interferir com alguns grupos *N*-protetores como é o caso do grupo Boc ou grupo Z. O grupo -O^tBu também é suscetível do mesmo problema, uma vez que a sua remoção é feita utilizando ácidos de Brønsted-Lowry fortes podendo afetar o grupo *N*-protetor Boc.⁷⁸



RCOOBn

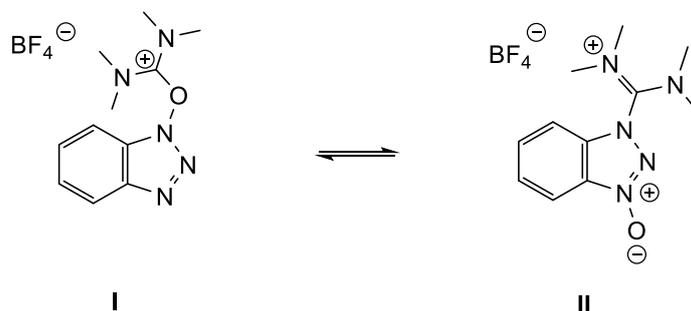
RCOO^tBu

4.1.1.7. Agentes de acoplamento

Na síntese peptídica é imprescindível o uso de um agente de acoplamento de forma a proporcionar as melhores condições de ataque nucleofílico por parte da amina que se pretende acoplar ao ácido carboxílico. O agente de acoplamento tem como função tornar o ácido carboxílico mais eletrófilo ativando-o para a aminólise.

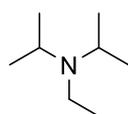
Existem diversas maneiras de ativação do ácido carboxílico, sendo que a forma do ácido carboxílico ativado depende do agente ativante utilizado. O agente que foi utilizado neste trabalho foi o tetrafluorborato de *O*-benzotriazoliltetrametilurônio (TBTU), sendo também um dos mais utilizados na síntese de péptidos uma vez que apresenta algumas propriedades benéficas como a sua alta eficiência em quantidades estequiométricas e a boa solubilidade nos solventes orgânicos comumente utilizados neste tipo de síntese.⁸⁰ Apesar de o TBTU existir em duas formas tautoméricas (na sua

forma urônio – I e na sua forma guanidina – II), é o tautómero I que participa na ativação (**Esquema 4.2.**)⁸⁰

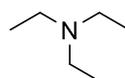


Esquema 4.2. Formas tautoméricas do TBTU.⁸⁰

O TBTU pressupõe a existência do ácido carboxílico sob a forma de carboxilato, sendo necessário a adição de uma base, como por exemplo, as aminas terciárias *N,N*-diisopropil-*N*-etilamina (**DIEA**) ou trietilamina (**Et₃N**) para proporcionar a formação do mesmo.

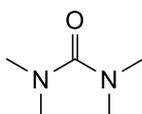


DIEA
pK_b = 3,02

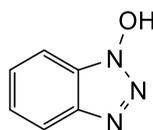


Et₃N
pK_b = 3,30

Após a formação do carboxilato, este reage com a forma tautomérica I do TBTU, originando o intermediário aciloxicarbénio que, sendo um bom eletrófilo irá ser atacado pela amina que se pretende acoplar. Além das vantagens já mencionadas, o uso do TBTU também provoca a formação de alguns produtos secundários, como a *N,N,N',N'*-tetrametilureia (**TMU**) e o 1-hidroxibenzotriazole (**HOBt**), que são facilmente eliminados por extração líquido-líquido utilizando uma solução saturada de NaHCO₃ como fase aquosa.



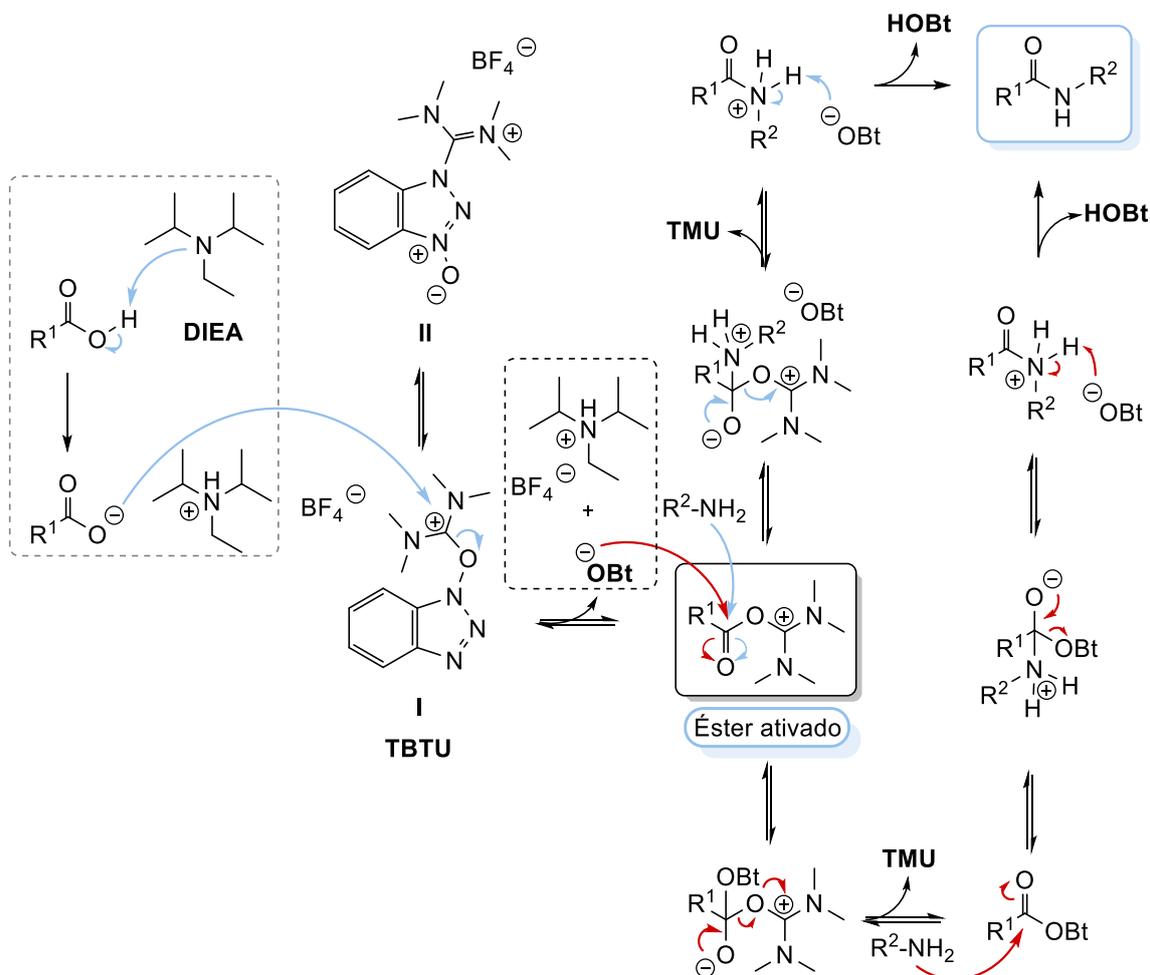
TMU



HOBt

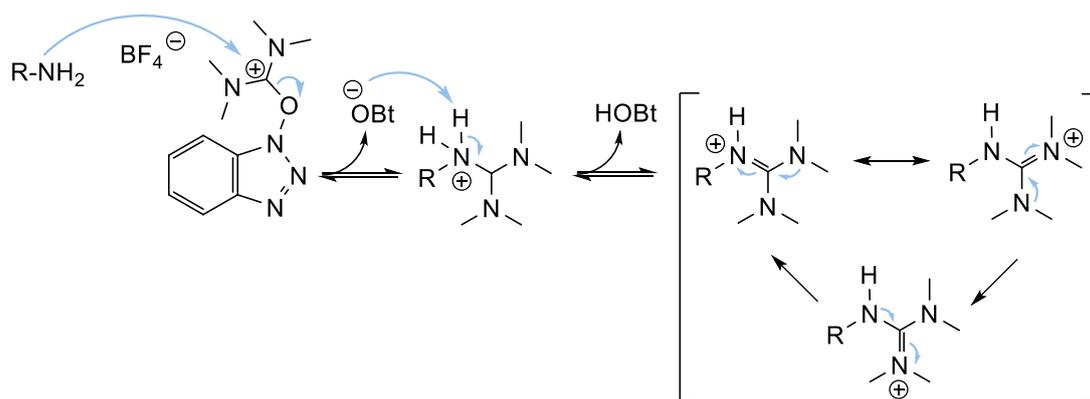
Resumindo, o procedimento de acoplamento peptídico *via* TBTU, cujo mecanismo se encontra representado no **Esquema 4.3.**, consiste em dissolver o ácido carboxílico em DCM anidro e posteriormente adicionar um excesso de DIEA. A DIEA para além de

garantir a formação do carboxilato ao remover o próton lábil do ácido carboxílico também aumenta a sua solubilidade. De seguida, adiciona-se o TBTU, que irá ativar o ácido carboxílico proporcionando assim o ataque nucleofílico do ácido ativado à amina que será o último componente a ser adicionado para se dar a formação da ligação amida e, conseqüentemente, a formação dos produtos secundários já referidos anteriormente.



Esquema 4.3. Mecanismo de ativação/acoplamento via TBTU.⁸⁰

É de salientar a importância da ordem de adição dos componentes desta reação, sendo essencial que a amina seja a última a ser adicionada para a obtenção de bons rendimentos. Se a amina for adicionada antes da ativação do ácido carboxílico, ou seja, em primeiro lugar, esta pode reagir com o TBTU originando outro produto que não o desejado como guanidinas (**Esquema 4.4.**)⁸¹



Esquema 4.4. Formação de guanidinas através da reação entre aminas primárias com TBTU.

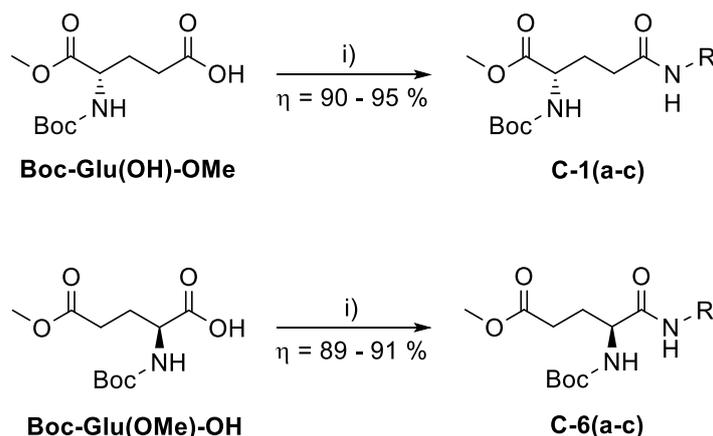
É importante também ter em conta que alguns aminoácidos carregados, como por exemplo o ácido glutâmico, podem adsorver água se estiverem expostos ao ar durante a reação de acoplamento. Deste modo, torna-se vantajoso o uso de uma atmosfera inerte (árgon ou azoto) e de solventes anidros, com o objetivo evitar a hidratação dos aminoácidos mais sensíveis e ainda a hidrólise do agente de acoplamento, aumentando assim os rendimentos das reações de condensação.

Resultados obtidos

Síntese dos glutamatos funcionalizados C-1(a-c) e C-6(a-c)

A síntese dos glutamatos funcionalizados **C-1(a-c)** e **C-6(a-c)** com aminas neuroprotetoras (**Esquema 4.5.**) foi realizada *via* TBTU utilizando DIEA (este mecanismo encontra-se representado anteriormente no **Esquema 4.3.**, da **secção 4.1.1.7.**). A base terciária DIEA é adicionada em excesso (3 eq.) e tem como função promover a desprotonação do ácido carboxílico livre dos glutamatos utilizados, convertendo-os em carboxilatos e, por conseguinte, aumentar a solubilidade. Além disso a DIEA também irá sequestrar o HCl uma vez que, no caso da amina amantadina, esta se encontra sob a forma de sal de cloridrato. De seguida, é então adicionado o TBTU com um pequeno excesso (1,1 eq.) e por fim a amina bioativa (**a-c**) que irá ser acoplada para formar a ligação amida.

Estas reações de acoplamento são realizadas em condições inertes, ou seja, sob uma atmosfera de árgon de maneira a evitar a formação de produtos indesejados e melhorar desta forma os rendimentos das reações.



Condições e reagentes:

R: **a** = aminoindano; **b** = amantadina; **c** = memantina.

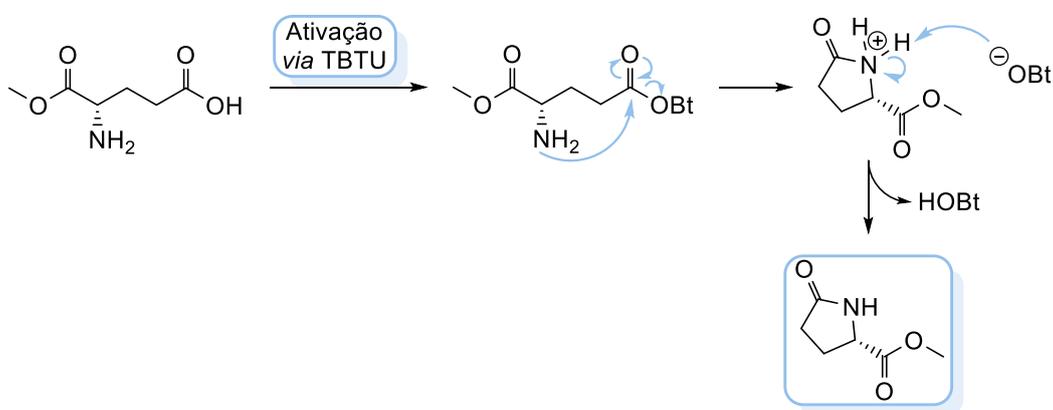
i) DIEA, TBTU, NH₂-R, DCM anidro.

Esquema 4.5. Síntese dos glutamatos funcionalizados **C-1(a-c)** e **C-6(a-c)**.

Para estas sínteses foram utilizados os glutamatos comerciais Boc-Glu(OH)-OMe e Boc-Glu(OMe)-OH, ou seja, com o ácido carboxílico protegido sob a forma de éster metílico tanto na posição- α , no caso dos compostos **C-1(a-c)**, como na cadeia lateral para os compostos **C-6(a-c)**.

É necessária a proteção de um dos ácidos carboxílicos para haver seletividade, evitando a ligação simultânea da amina aos dois ácidos carboxílicos. A escolha do grupo C-protetor metoxilo foi determinada pela sua pequena dimensão, uma vez que se pretende que o composto final tenha uma massa molecular restrita (< 500 g/mol).

Os glutamatos utilizados contêm ainda a amina protegida pelo grupo *N*-protetor Boc, escolhido principalmente pela sua facilidade de remoção e com o objetivo de prevenir a formação de produtos indesejados, uma vez que pode facilmente ocorrer a ciclização do glutamato originando um derivado do ácido piroglutâmico, o L-piroglutamato de metilo (**Esquema 4.6**).



Esquema 4.6. Formação do L-piroglutamato de metilo.

O fim da síntese foi determinado pelo consumo total do reagente de partida, consumo esse visualizado por TLC. De seguida, realizaram-se apenas extracções líquido-líquido básicas dissolvendo os compostos **C-1(a-c)** e **C-6(a-c)** em AcOEt e utilizando uma solução saturada de NaHCO₃ como fase aquosa. Estas extracções permitem remover grande parte dos produtos secundários formados durante o acoplamento tais como TMU, HOBt, DIEA e seus sais.

Por fim, os compostos foram purificados por cromatografia de adsorção em coluna de gel de sílica, com a exceção do composto **C-1b** em se conseguiu obter o composto puro por precipitação utilizando Et₂O.

É de notar ainda, a tendência existente para os glutamatos funcionalizados na cadeia lateral (**C-1(a-c)**) serem sempre mais polares que os glutamatos funcionalizados na posição α (**C-6(a-c)**) tendo, portanto, estes últimos um R_f sempre maior (**Figura 4.5.**). Este facto revela ser interessante uma vez que evidencia a influência da posição das diferentes aminas acopladas na polaridade dos compostos.

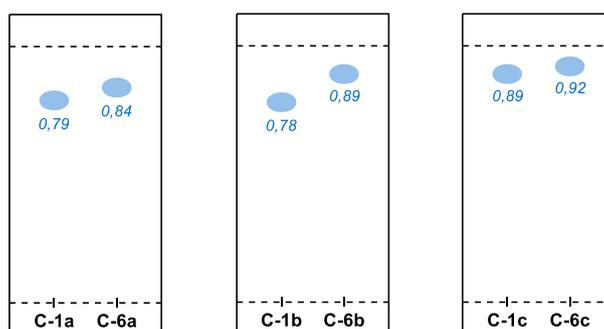


Figura 4.5. Representação em TLCs dos compostos **C-1(a-c)** e **C-6(a-c)**, salientando os respectivos valores de R_f (Eluente: AcOEt).

A funcionalização dos glutamatos foi assim realizada com sucesso, tendo-se obtido os compostos pretendidos com excelentes rendimentos, sendo estes semelhantes entre si (**Tabela 4.1.**).

Tabela 4.1. Resultados obtidos na síntese dos glutamatos funcionalizados **C-1(a-c)** e **C-6(a-c)**.

Reagente limitante	n _{reagente limitante} / mmol	Produto obtido	n _{produto obtido} / mmol	η / %
Boc-Glu(OH)-OMe	1,879	C-1a	1,785	95
Boc-Glu(OMe)-OH	1,884	C-6a	1,714	91
Boc-Glu(OH)-OMe	2,228	C-1b	2,005	90
Boc-Glu(OMe)-OH	2,221	C-6b	1,977	89
Boc-Glu(OH)-OMe	1,536	C-1c	1,444	94
Boc-Glu(OMe)-OH	1,539	C-6c	1,370	89

4.1.1.8. Método de síntese *One-pot*

A evolução associada à química de péptidos tem vindo a permitir o desenvolvimento de novos métodos de síntese de forma a tornar este tipo de reações mais sustentáveis e eficazes. No entanto, a maior parte das metodologias pressupõem passos intermediários, como por exemplo uma etapa de proteção e, conseqüentemente, desproteção, o que implica um maior uso de reagentes e solventes, uma vez que são necessárias purificações intermédias, para além de que ao serem realizados diversos passos o rendimento global também poderá ser afetado.

A metodologia *one-pot*, também denominada por síntese em cascata,⁸³ tem vindo a ser utilizada em diversos tipos de reações com o objetivo de aumentar a sustentabilidade associada às mesmas, como por exemplo na síntese de miméticos da **Progesterona** e⁸⁴ na síntese dos **Ácidos endiândricos A e B**.⁸⁵



Este método consiste em realizar diversas reações em apenas um reator, o que permite a eliminação de purificações intermédias, proporcionando assim uma síntese mais rápida com custos mais reduzidos, com um aumento da economia atômica e com rendimentos elevados, tornando-se assim bastante eficaz.^{83, 86}

Assim, foi desenvolvido pelo grupo de investigação um método *one-pot*, no qual tive a oportunidade de participar, aplicado à síntese de pequenos péptidos (tri- a hexapéptidos),⁸⁷ que consiste no acoplamento seletivo de aminoácidos em apenas um reator e realizando três passos reacionais (**Figura 4.6**).

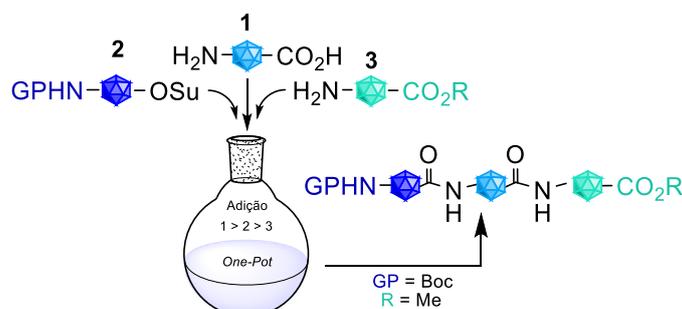


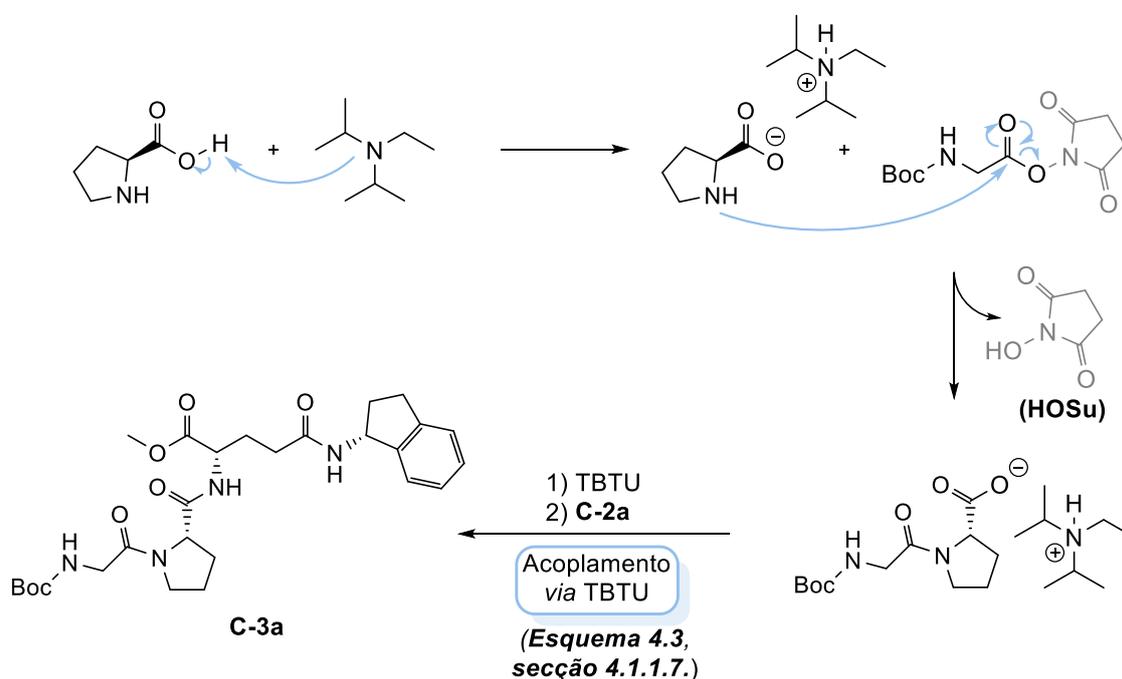
Figura 4.6. Representação geral de uma síntese peptídica *one-pot* (adaptada de Sampaio-Dias e co-autores).⁸⁷

Esta metodologia comprovou ser rápida, fácil, eficaz e compatível com diversos grupos *N*-protetores (Z, Boc e Fmoc) e utilizando vários tipos de aminoácidos (série D/L e não-proteinogénicos).

O procedimento consiste em, inicialmente, dissolver (em condições inertes) o primeiro aminoácido totalmente desprotegido em diclorometano anidro e adicionar uma base terciária como DIEA que irá formar o correspondente carboxilato de amónio, tornando deste modo a amina livre mais nucleófila. De seguida, é adicionado um aminoácido pré-ativado sob a forma de éster succinimídico (-OSu) para se dar o primeiro acoplamento. A necessidade de usar aminoácidos pré-ativados pode ser uma desvantagem uma vez que estes poderão não estar disponíveis comercialmente, tendo assim de requerer a mais um passo para a ativação do mesmo.

Após cerca de 12h, é adicionado como agente de acoplamento o TBTU, que irá ativar *in situ* o intermediário amida-carboxilato, para após 30 minutos, ao adicionar o terceiro aminoácido, se dar o segundo acoplamento desejado.

No **Esquema 4.8**, encontra-se representado o mecanismo do acoplamento *one-pot* para a síntese do composto **C-3a**, que serve de exemplo para os restantes compostos sintetizados pelo mesmo método (**C-3b**, **C-3c**, **C-8(a-c)** e **C-1**).

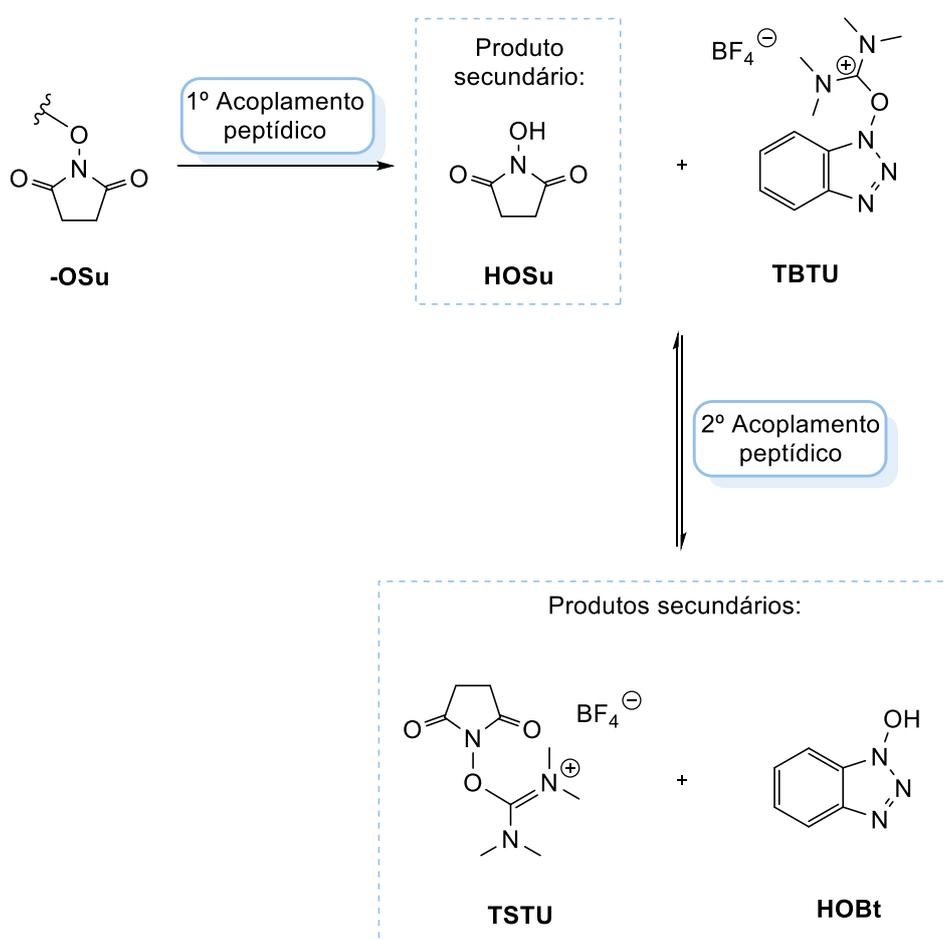


Esquema 4.8. Mecanismo da síntese *one-pot* utilizada para o composto **C-3a**.

No entanto existem alguns critérios que devem ser tidos em conta para a obtenção eficaz do produto pretendido: os produtos secundários obtidos no primeiro acoplamento não devem interferir no segundo acoplamento; os produtos secundários obtidos tanto

no primeiro acoplamento como no segundo, devem ser facilmente elimináveis; e a pureza estereoquímica deve ser preservada.

Uma vez adicionado um aminoácido pré-ativado sob a forma de éster succinimídico (**-OSu**), este ao reagir irá libertar como produto secundário *N*-hidroxisuccinimida (**HOSu**), sendo este um conhecido supressor de racemização utilizado na síntese peptídica (ajudando assim a evitar epimerização).⁸⁸ De seguida, uma vez que posteriormente é feita uma ativação *via* TBTU, este poderá reagir com o HOSu formado anteriormente, originando tetrafluoroborato de *N,N,N,N*-tetrametil-*O*-(*N*-succinimidil)urónio (**TSTU**) e **HOBt** como produtos secundários (**Esquema 4.9**).



Esquema 4.9. Produtos secundários obtidos durante a síntese peptídica pelo método *one-pot*.

A grande vantagem de todos estes produtos secundários referidos anteriormente é que podem ser facilmente eliminados no tratamento da reação, ao realizar extrações líquido-líquido. Além disso, uma vez que o TSTU é também um agente de acoplamento, a eliminação dos produtos secundários durante o método *one-pot* não é necessária.

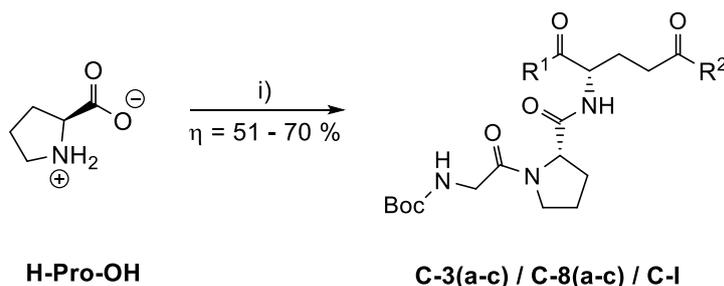
Resultados obtidos**Síntese dos compostos C-3(a-c), C-8(a-c) e C-I**

Os compostos **C-3(a-c)**, **C-8(a-c)** e **C-I** foram sintetizados (**Esquema 4.10**) utilizando o método *one-pot* descrito anteriormente, utilizando inicialmente 1 eq. do aminoácido L-prolina comercial totalmente desprotegido, dissolvido em diclorometano anidro e sob uma atmosfera de Árgon para evitar a hidrólise do agente de acoplamento (TBTU). A esta solução são adicionados 3 eq. de DIEA, uma vez que é necessário 1 eq. para desprotonar o ácido carboxílico, os outros 2 eq. para converter os sais de amónio tanto da prolina como dos glutamatos funcionalizados nas correspondentes amins livres.

De seguida, é adicionada a glicina também comercial com a amina protegida pelo grupo Boc e com o ácido carboxílico pré-ativado sob a forma de éster succinimida, tornando-a mais eletrófila para que o acoplamento se dê mais facilmente.

Após cerca de 12 horas, é adicionado ao dipéptido Boc-Gly-Pro-O⁻ formado *in situ* e sem qualquer purificação, o agente de acoplamento TBTU, para deste modo formar o carboxilato para o acoplamento seguinte.

Por fim, é adicionado o respetivo glutamato funcionalizado com a amina livre (**C-2(a-c)** ou **C-7(a-c)**), ou o glutamato comercial metilado em ambas as posições, Boc-Glu(OMe)-OMe, no caso da síntese do controlo **C-I**, para se dar a condensação *in situ* entre este e o dipéptido formado anteriormente.

**Condições e reagentes:****C-2(a-c) / C-3(a-c):** R¹ = -OMe ; R² = -NH-R³**C-7(a-c) / C-8(a-c):** R¹ = -NH-R³; R² = -OMe**C-I:** R¹ = -OMe ; R² = -OMeR³: **a** = aminoindano; **b** = amantadina; **c** = memantina.i) DIEA, Boc-Gly-OSu, TBTU, **C-2(a-c)** ou **C-7(a-c)** ou **Boc-Glu(OMe)-OMe**, DCM anidro.**Esquema 4.10.** Síntese dos compostos **C-3(a-c)**, **C-8(a-c)** e **C-I**.

Os rendimentos obtidos (**Tabela 4.3.**) revelaram ser mais baixos que os obtidos normalmente para este tipo de reações (80 – 95 %). Estes rendimentos, apesar de não

serem comuns, eram esperados uma vez que no fim de todas as reações, após o tratamento, era possível visualizar no TLC duas manchas de intensidade considerável, quando o expectável seria visualizar apenas uma mancha (correspondente ao produto pretendido). Este fenómeno revelou ser mais notório nos compostos **C-3c** e **C-8c**, o que se reflete no rendimento obtido para o composto **C-8c** e também se reflete no facto de não se ter conseguido isolar o composto **C-3c** na sua forma pura, apesar de se ter verificado a presença do composto pretendido.

Tabela 4.3. Resultados obtidos na síntese dos compostos **C-3(a-c)**, **C-8(a-c)** e **C-I**.

Reagente limitante	n _{reagente limitante} / mmol	Produto obtido	n _{produto obtido} / mmol	η / %
H-Pro-OH	1,321	C-3a	0,9247	70
	1,277	C-8a	0,8811	69
	1,451	C-3b	0,9867	68
	1,469	C-8b	0,9548	65
	1,074	C-3c	0,7518	n.d.
	0,9459	C-8c	0,4824	51
	2,612	C-I	1,593	61

n.d. = não determinado

Assim, na tentativa de averiguar qual o produto secundário formado nestas reações, procedeu-se ao isolamento de ambas as manchas.

A análise de ¹H-RMN do produto secundário isolado durante a purificação do composto **C-8c** (representativo para os restantes tripéptidos obtidos *via one-pot*) permitiu verificar que se trata do dipéptido Boc-Gly-Pro-OSu (**Figura 4.7**).

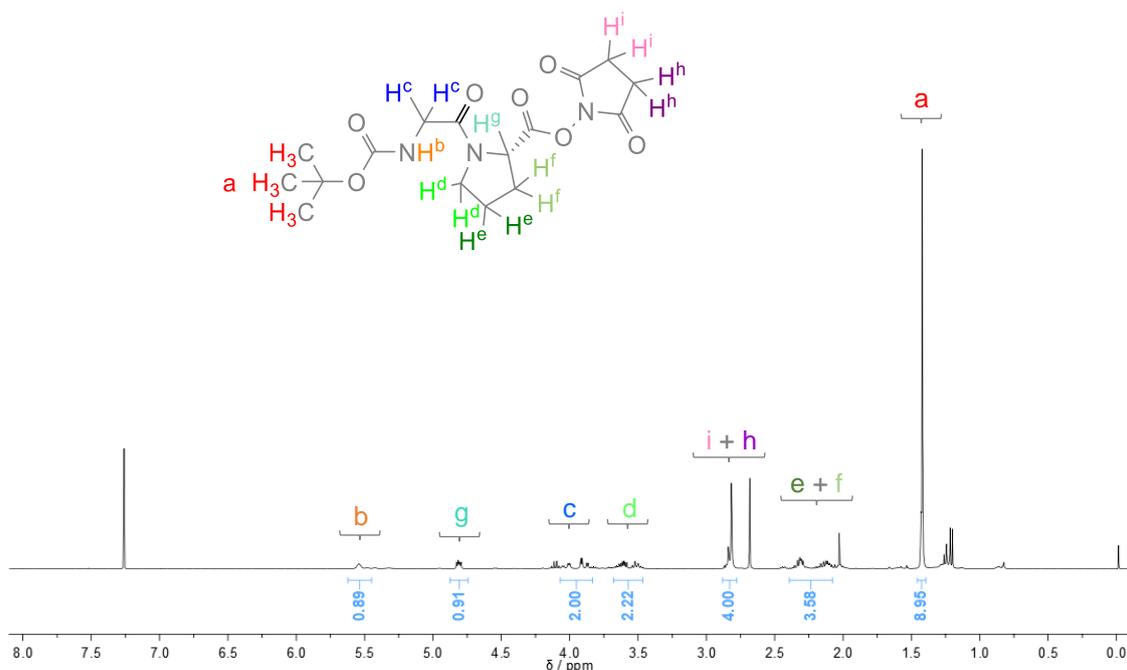
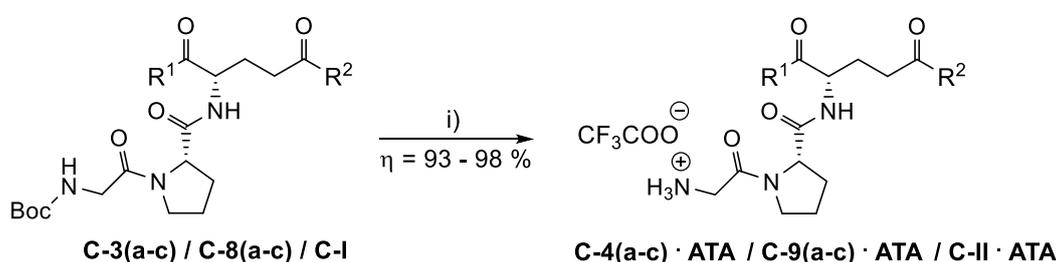


Figura 4.7. Espetro de ¹H-RMN (realizado em CDCl₃) do produto secundário Boc-Gly-Pro-OSu, obtido na síntese do composto **C-8c**.

A formação deste produto pode ter sido causada pelo excesso de tempo de reação (12 horas) e, uma vez que o HOSu é também nucleófilo, ocorreu assim a ativação do resíduo de Prolina. Por outro lado, o impedimento estereoquímico associado aos glutamatos funcionalizados principalmente com a amantadina e a memantina, poderá ter dificultado o acoplamento entre estes e o restante dipéptido.

Síntese dos compostos C-4(a-c), C-9(a-c) e C-II

A síntese dos compostos **C-4(a-c)**, **C-9(a-c)** e **C-II** (*Esquema 4.11.*) consiste na remoção acidolítica do grupo *N*-protetor Boc, utilizando ATA e DCM anidro como solvente (mecanismo apresentado anteriormente no *Esquema 4.1.*, *secção 4.1.1.5.*).



Condições e reagentes:

C-3(a-c) / C-4(a-c): R¹ = -OMe ; R² = -NH-R³

C-8(a-c) / C-9(a-c): R¹ = -NH-R³; R² = -OMe

C-I / C-II: R¹ = -OMe ; R² = -OMe

R³: **a** = aminoindano; **b** = amantadina; **c** = memantina.

i) ATA, DCM anidro.

Esquema 4.11. Síntese dos compostos C-4(a-c), C-9(a-c) e C-II.

Os resultados obtidos encontram-se representados na *Tabela 4.4.*, sendo que estes (93 – 98 %) não são significativamente diferentes dos rendimentos obtidos na remoção do grupo Boc dos compostos **C-1(a-c)** e **C-6(a-c)** (97 – 98 %).

Tabela 4.4. Resultados obtidos na síntese dos compostos C-4(a-c), C-9(a-c) e C-II.

Reagente limitante	n _{reagente limitante} / mmol	Produto obtido	n _{produto obtido} / mmol	η / %
C-3a	0,8637	C-4a	0,8378	97
C-8a	0,8202	C-9a	0,8038	98
C-3b	0,8196	C-4b	0,8032	98
C-8b	0,7711	C-9b	0,7557	98
C-3c	0,6956	C-4c	0,6608	95
C-8c	0,3783	C-9c	0,3518	93
C-I	1,166	C-II	1,119	96

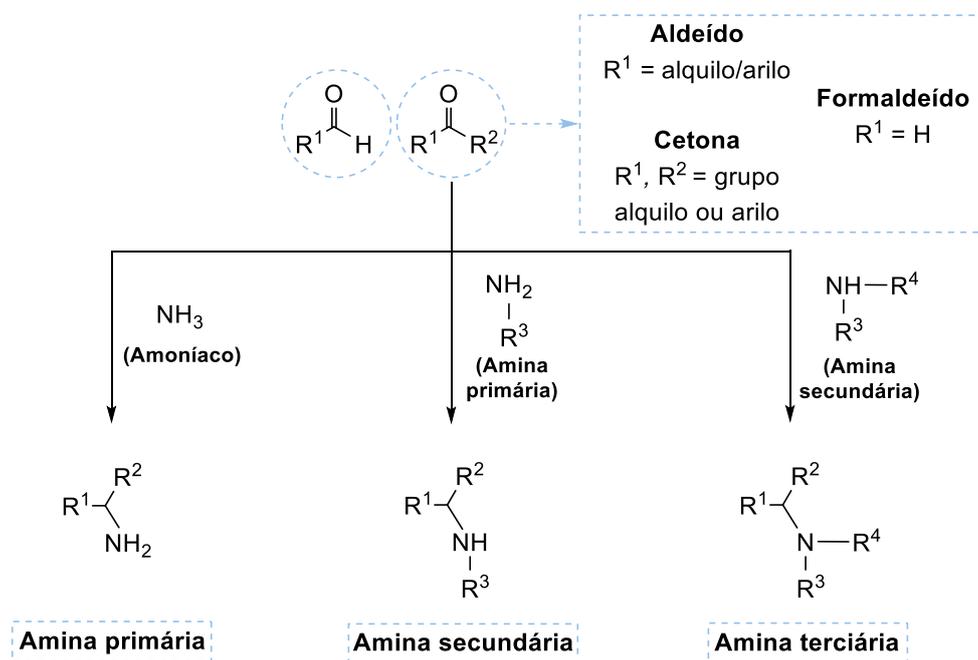
A desproteção dos compostos **C-3(a-c)**, **C-8(a-c)** e **C-I** permitiu obter os compostos **C-4(a-c)**, **C-9(a-c)** e **C-II**, possibilitando a obtenção imediata de uma série

de compostos finais em que a amina do aminoácido de glicina dos conjugados de GPE se encontra livre.

4.1.2. Reação de *N*-alquilação – Aminoação redutiva

A reação de aminoação redutiva (também denominada de *N*-alquilação de aminas, uma vez que é introduzido um grupo alquilo no grupo amina) é um método de síntese de aminas primárias, secundárias ou terciárias utilizando aldeídos ou cetonas, *via* imina ou ião imínio (no caso do uso de aminas secundárias) como intermediário, que tem revelado ser bastante útil e versátil na farmacêutica.⁸⁹

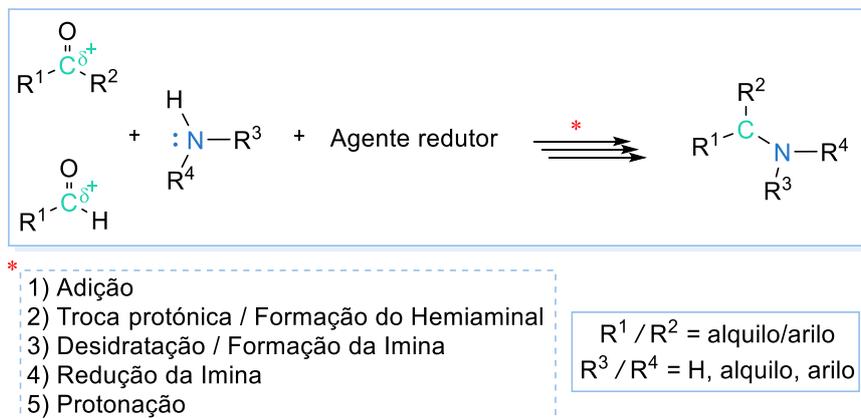
A amina utilizada na reação depende então da amina final desejada, ou seja, ao utilizar amoníaco obtém-se uma amina primária, por sua vez ao usar uma amina primária obtém-se uma amina secundária e, por fim, se for utilizada uma amina secundária é obtida uma amina terciária. A amina escolhida é exposta a um aldeído ou uma cetona, dependendo do grupo alquilo que se pretende introduzir, para se dar uma reação de condensação, formando assim uma ligação carbono-azoto e obtendo então o produto desejado (**Esquema 4.12.**)⁹⁰



Esquema 4.12. Resumo geral dos produtos possíveis a partir da reação de aminoação redutiva.

Inicialmente o aldeído (ou cetona) e a amina são dissolvidos em 1,2-dicloroetano (DCE), tetraidrofurano (THF) ou acetonitrilo, uma vez que são solventes amplamente utilizados neste tipo de reações.⁹¹ De seguida, existem dois métodos possíveis na realização da reação de aminoação redutiva: o método direto e o método indireto. Em relação ao método direto (**Esquema 4.13.**), a reação ocorre totalmente *in situ*,

adicionando-se todos os componentes (amina, aldeído e agente redutor) desde o início para obter a correspondente amina alquilada.



Esquema 4.13. Reação geral de aminação redutiva pelo método direto.

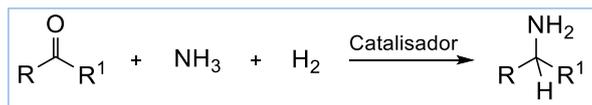
O método indireto consiste no isolamento da imina intermediária (ou ião imínio), para posteriormente ser adicionado o agente redutor com o objetivo de reduzir a mesma e obter o produto pretendido.⁹¹

O uso de um agente redutor é importante pois, uma vez que ocorre a formação da imina como intermediário, é necessária a adição de um agente seletivo para transformar a imina na correspondente amina pretendida. O agente redutor irá reagir mais rapidamente com a ligação dupla da imina do que com o grupo carbonilo devido à sua seletividade e, após protonação obtém-se o produto desejado.

4.1.2.1. Agentes redutores

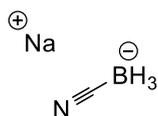
Existem diversos métodos que podem ser utilizados para a redução da imina intermediária formada durante a reação de aminação redutiva, sendo que a escolha é crucial para o sucesso da reação.

A hidrogenação catalítica, em que é utilizado paládio, platina ou níquel como catalisador, é um tipo de reação que pode ser utilizada na redução (**Esquema 4.14.**)⁹²⁻
⁹⁵ Este método consiste em utilizar H₂ como agente redutor, sendo que, para além de conter a desvantagem de necessitar de elevadas quantidades de amina, também pode apresentar outro tipo de inconvenientes tais como a obtenção de uma mistura de produtos, baixos rendimentos e também a incompatibilidade com diversos compostos que contém ligações duplas ou triplas de C-C, também com o grupo *N*-protetor Z e ainda com outros grupos que também poderão sofrer redução como por exemplo grupos nitro, ciano e furanilo.⁹³



Esquema 4.14. Esquema geral de uma hidrogenação catalítica utilizada na aminação redutiva.

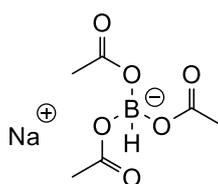
Mais recentemente, têm vindo a ser utilizados diversos tipos de hidretos, como por exemplo o cianoborohidreto de sódio (**NaBH₃CN**) sendo este um reagente extensivamente referido na literatura como agente redutor utilizado em aminações redutivas.^{90, 96}



NaBH₃CN

Este agente redutor reage mais rapidamente com a imina intermediária, pois devido às condições ácidas utilizadas com este reagente, a imina é protonada ficando assim facilitado o ataque por parte do NaBH₃CN.⁹⁰ Apesar desta vantagem, o uso deste agente redutor pressupõe a utilização de quantidades elevadas de amina,⁹⁷ a reação é geralmente mais lenta quando utilizadas aminas pouco básicas⁹⁸ e ainda, para além deste reagente ser tóxico,⁹⁹ o seu uso proporciona a formação de produtos secundários também tóxicos como o HCN e o NaCN.

O agente utilizado neste trabalho foi o triacetoxiborohidreto de sódio (**NaBH(AcO)₃**), conhecido por STAB (do inglês *Sodium triacetoxyborohydride*), sendo este também comumente utilizado em reações de aminação redutiva.



NaBH(AcO)₃

Este agente redutor é amplamente utilizado não só devido à sua seletividade, uma vez que atua preferencialmente em aminações de aldeídos do que em cetonas, mas também devido às condições suaves de redução que proporciona, condições essas causadas pelo efeito estérico e efeito da densidade eletrónica (**Figura 4.8.**), sendo que estes efeitos são provocados pelos três grupos etoxilos, que estabilizam a ligação boro-hidrogénio.¹⁰⁰

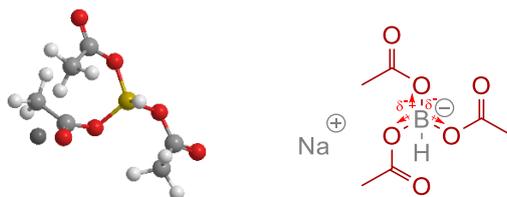
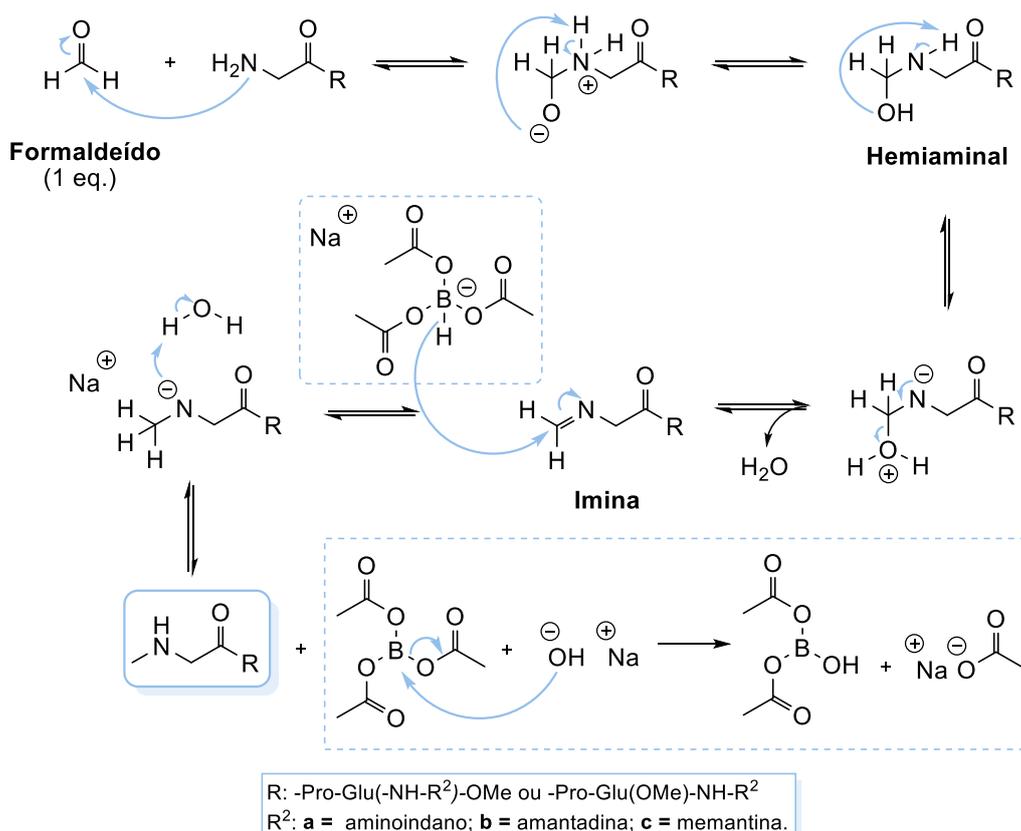


Figura 4.8. Efeito estérico de densidade eletrônica presente no $\text{NaBH}(\text{AcO})_3$.

O mecanismo de aminação reductiva (direta) para obter uma amina alquilada com um grupo metilo, utilizando STAB como agente redutor (**Esquema 4.15.**), consiste no ataque nucleofílico da amina ao **formaldeído**, em que por adição ocorre a formação de um **hemiaminal**. De seguida, ocorre troca protónica entre o grupo hidroxilo e o grupo amina do hemiaminal, troca essa que provocará a eliminação de uma molécula de água por desidratação, formando assim, neste caso, uma **imina**. A imina irá ser reduzida devido à presença de um agente redutor (como por exemplo, STAB) sendo que o produto resultante será protonado pela água produzida na reação ou mesmo pela água presente na solução de formaldeído que foi adicionada, formando assim a amina metilada pretendida.

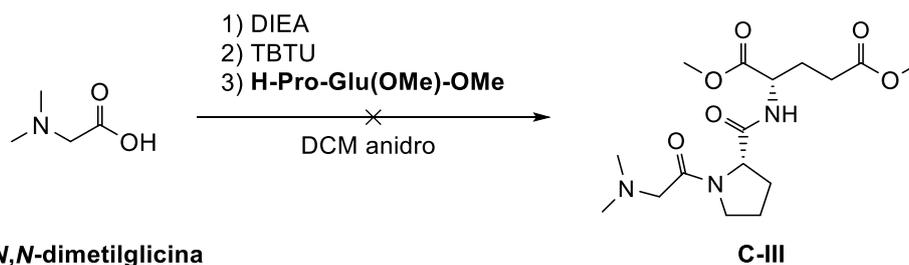


Esquema 4.15. Mecanismo de monometilação por aminação reductiva utilizando 1 eq. de formaldeído e triacetoxiborohidreto de sódio como agente redutor.

Usando 2 eq. de formaldeído obtém-se a correspondente amina dimetilada, sendo que o mecanismo da segunda metilação é análogo ao apresentado no **Esquema 4.15.**

Resultados obtidos**Síntese dos conjugados finais C-5(a-c) e C-10(a-c) / Síntese do controlo C-III**

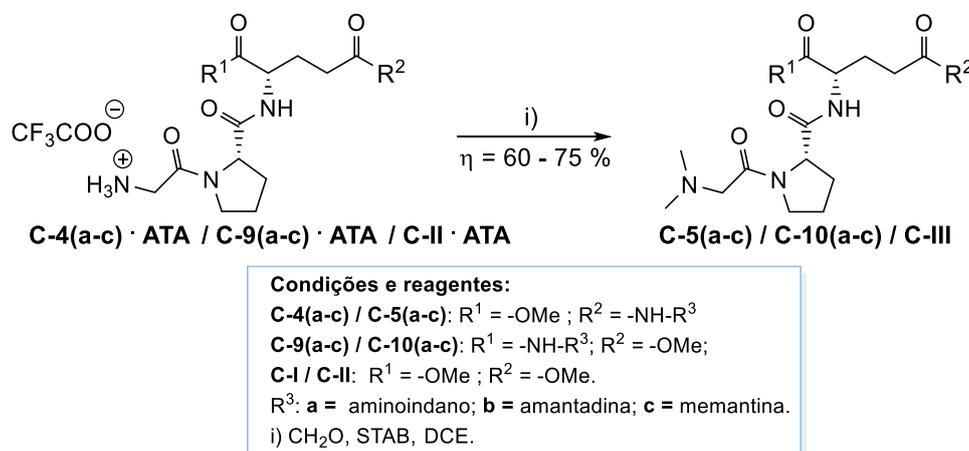
Inicialmente, o plano de síntese dos compostos **C-5(a-c)** e **C-10(a-c)** tinha como objetivo o uso do reagente comercial **N,N-dimetilglicina** (DMG). Assim, de forma a comprovar o sucesso deste método realizou-se uma condensação peptídica simples *via* TBTU para o acoplamento da DMG ao dipéptido H-Pro-Glu(OMe)-OMe que já tinha sido sintetizado previamente pelo grupo (**Esquema 4.16.**).



Esquema 4.16. Tentativa de síntese para obtenção do composto **C-III**, utilizando a *N,N*-dimetilglicina.

Verificou-se por TLC a formação de diversas manchas, sendo que uma delas pensou-se que poderia corresponder ao produto pretendido. Após a realização do tratamento (extrações básicas líquido-líquido) constatou-se a perda do composto para a fase aquosa. Este facto não era expectável uma vez que, sendo uma amina terciária é mais hidrofóbica, mas mesmo com extrações sucessivas, não foi possível recuperar o composto obtido, para averiguar se seria efetivamente o composto pretendido.

Uma vez que o método testado revelou ser bastante problemático para além de formar diversos produtos, decidiu-se testar a realização da aminação redutiva utilizando os compostos **C-4(a-c)**, **C-9(a-c)** e **C-II** (mecanismo apresentado no **Esquema 4.15.**, **secção 4.1.2.1.**) para a síntese dos compostos **C-5(a-c)**, **C-10(a-c)** e **C-III** (**Esquema 4.17.**).



Esquema 4.17. Síntese dos conjugados finais **C-5(a-c)**, **C-10(a-c)** e respetivo controlo **C-III**.

Assim, esta síntese iniciou-se com os compostos **C-4(a-c)**, **C-9(a-c)** e **C-II** previamente dissolvidos em 1,2-dicloroetano. De seguida adicionou-se 2,5 eq. de formaldeído (solução aquosa a 37% m/v), uma vez que se pretende a dimetilação da amina dos compostos mencionados. De seguida, adicionou-se um excesso de agente redutor, 5 eq. de STAB, para deste modo obter a amina dimetilada. É necessário o uso de um excesso significativo de agente redutor, uma vez que foi utilizada uma solução aquosa de CH₂O e, portanto, parte do STAB pode ser hidrolisado.

Este método revelou ser bastante mais limpo uma vez que não se verificou a formação de tantos produtos secundários como no primeiro método testado. A vantagem desta abordagem é que os compostos sintetizados são solúveis em DCM e o excesso de agente redutor não é solúvel nesse solvente orgânico. Assim, o tratamento dos compostos **C-5(a-c)**, **C-10(a-c)** e **C-III** consistiu na filtração por vácuo do excesso de agente redutor, em que se recuperaram as águas-mãe. De seguida, os compostos foram concentrados através da evaporação do solvente utilizando o evaporador rotativo, sendo que apenas com esse tratamento os compostos ficaram puros, com a exceção dos compostos **C-5a** e **C-III** que necessitaram de purificação por cromatografia de adsorção em coluna de gel de sílica.

Assim foram obtidos bons rendimentos, entre os 60 – 75% (**Tabela 4.5.**), utilizando um novo método de tratamento mais vantajoso uma vez que evita a realização de extrações e também, na maior parte das vezes, evita mesmo a purificação por coluna.

Tabela 4.5. Resultados obtidos na síntese dos compostos **C-5(a-c)**, **C-10(a-c)** e **C-III**.

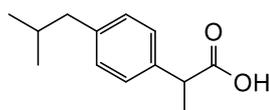
Reagente limitante	n _{reagente limitante} / mmol	Produto obtido	n _{produto obtido} / mmol	η / %
C-4a	0,6139	C-5a	0,4420	72
C-9a	0,5917	C-10a	0,4142	70
C-4b	0,6077	C-5b	0,4497	74
C-9b	0,5324	C-10b	0,3993	75
C-4c	0,4935	C-5c	0,2961	60
C-9c	0,1825	C-10c	0,1095	60
C-II	0,8261	C-III	0,5617	68

4.1.3. Resolução da amina 1-MeTIQ

4.1.3.1. Introdução geral

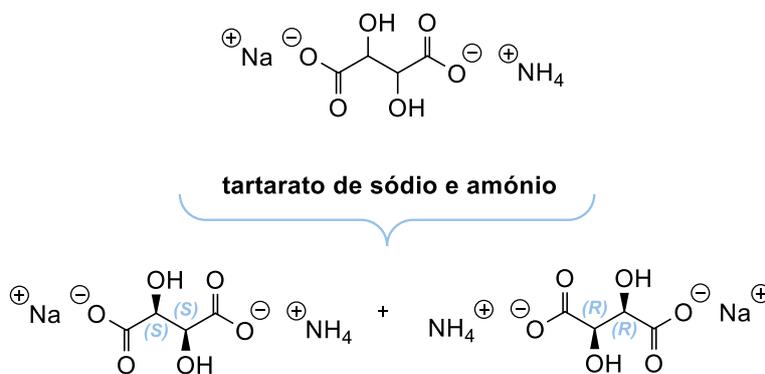
Muitos fármacos são administrados sob a forma de racematos. Um exemplo é o ácido (*R,S*)-2-(isobutilfenil)-propanóico, também conhecido por **ibuprofeno**, utilizado no tratamento de diversos sintomas como inflamações e febre.¹⁰¹

No entanto, em todos os fármacos, cada enantiómero representa um papel importante na farmacodinâmica e/ou farmacocinética do respetivo fármaco.¹⁰²



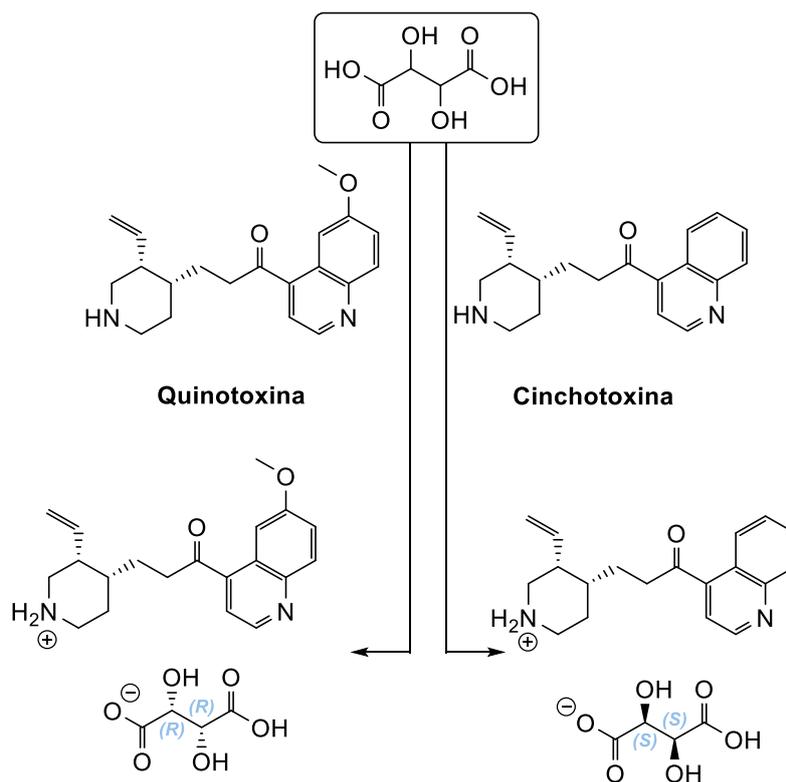
ibuprofeno

Em 1848, Louis Pasteur foi o pioneiro na separação de dois enantiómeros de uma mistura racémica, ao realizar a resolução do sal **tartarato de sódio e amónio** (**Esquema 4.18.**) separação essa que o próprio comprovou ao fazer passar luz polarizada através de uma solução de cada um destes e observar que um girava a luz no sentido dextrógiro ($[\alpha]_D = + 12, 7$) e o outro rodava no sentido contrário ($[\alpha]_D = - 12, 7$).¹⁰³



Esquema 4.18. Resolução do tartarato de sódio e amónio.

Alguns anos depois, em 1853, Louis Pasteur, utilizando bases quirais de quinuclidina, como a **quinotoxina** e a **cinchotoxina** em conjunto com o ácido tartárico na sua forma racémica, conseguiu obter um excesso enantiomérico do ácido L-tartárico e do ácido D-tartárico, respetivamente (**Esquema 4.19.**)¹⁰³⁻¹⁰⁴



Esquema 4.19. Resolução química do ácido tartárico.

Ainda, Louis Pasteur também foi o primeiro a realizar uma resolução cinética enzimática, ao observar que o L-tartarato de amónio era digerido pelo fungo *Penicillium Glaucum*, enquanto que o D-tartarato de amónio ficava intacto.¹⁰⁵

Assim, a síntese de compostos enantiomericamente puros tem vindo a ter cada vez mais importância, sendo um desafio para a química orgânica e tendo principalmente dois tipos de resolução: a resolução enzimática e a resolução química.

4.1.3.2. Resolução Enzimática

A resolução enzimática pode ser dividida em dois métodos principais: a resolução cinética clássica (KR, do inglês *Kinetic Resolution*) e a resolução cinética dinâmica (DKR, do inglês *Dynamic Kinetic Resolution*). A primeira consiste em tratar o racemato com uma enzima que irá reconhecer estereoseletivamente um dos enantiómeros convertendo-o num produto diferente, enquanto que o outro enantiómero permanece intacto, dando-se então a separação dos enantiómeros devido às suas diferentes propriedades físicas.

Relativamente à resolução de amins, normalmente ocorre a acilação assimétrica de um dos enantiómeros mediada por lípases, sendo que este tipo de resolução tem vindo a ser cada vez mais comum, tanto aplicada a amins primárias como

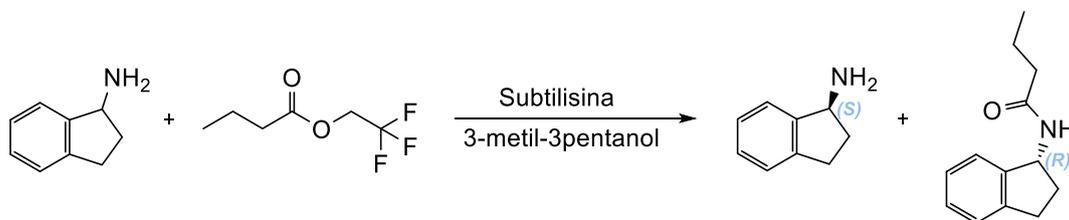
secundárias.¹⁰⁶⁻¹⁰⁷ Torna-se também vantajoso o uso da acilação catalisada *via* enzima em comparação com a acilação não-catalisada, uma vez que, sendo as aminas nucleófilos fortes, se não fossem utilizadas enzimas a acilação poderia ocorrer de uma forma não-seletiva, levando a um menor excesso enantiomérico (*ee*) do produto. A maior desvantagem deste tipo de resolução é que, teoricamente, os dois enantiómeros apenas podem ser obtidos com um rendimento máximo de 50%.

Kitaguchi e co-autores, em 1989, realizaram uma das primeiras acilações mediada por enzimas, tendo testado várias lipases e proteases na resolução da α -feniletilamina utilizando **butirato de 2,2,2-trifluoroetilo** como agente acilante.¹⁰⁸



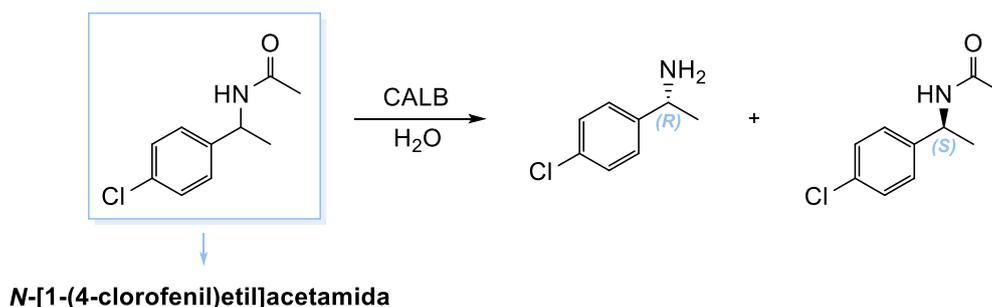
Além da escolha da enzima a utilizar, os mesmos autores observaram a influência do solvente na enantiosseletividade da reação, tendo os melhores resultados (*ee* \geq 99%) ao utilizar a subtilisina como protease e 3-metil-3-pentanol como solvente.

A mesma enzima (subtilisina) e o mesmo solvente (3-metil-3-pentanol) foram também utilizados por Gutman Aire e co-autores em 1992, na resolução cinética do 1-aminoindano (**Esquema 4.20.**) obtendo um *ee* \geq 98 %.¹⁰⁹



Esquema 4.20. Resolução enzimática do 1-aminoindano, utilizando subtilisina.

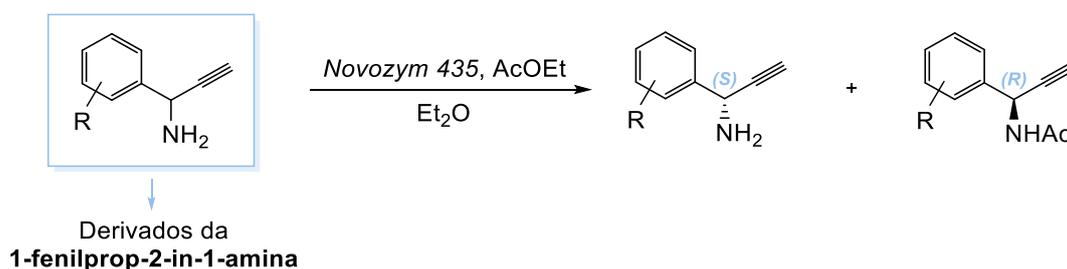
Alguns anos depois, em 1996, a farmacêutica Bayer, conseguiu realizar a hidrólise enantiosseletiva da **N-(1-(4-clorofenil)etil)acetamida** (*ee* \geq 99%), utilizando a lipase *Candida antarctica B* (CALB) (**Esquema 4.21.**)¹¹⁰



Esquema 4.21. Hidrólise de uma acetamida mediada pela lipase CALB.

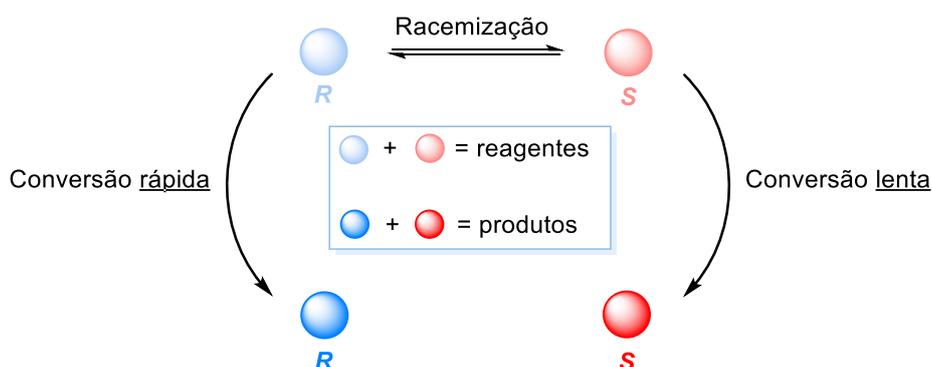
Esta enzima tem propriedades muito benéficas como uma elevada enantiosseletividade para uma vasta gama de substratos, estabilidade térmica e ainda, estabilidade em solventes orgânicos.¹¹¹⁻¹¹²

A CALB é comumente imobilizada numa superfície hidrofóbica, como numa resina acrílica e utilizada sob esta forma, sendo designada por *Novozym 435* (sendo esta comercial). Esta também tem vindo a ser utilizada com sucesso, por exemplo, na acilação enantiosseletiva de derivados da **1-fenilprop-2-in-1-amina** ($ee \geq 88\%$), utilizando acetato de etilo como agente acilante e éter etílico como solvente (**Esquema 4.22.**).¹¹³



Esquema 4.22. Resolução da 1-fenilprop-2-in-1-amina utilizando *Novozym 435*.¹¹³

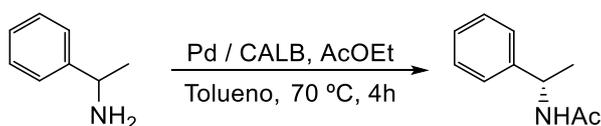
Relativamente à resolução cinética dinâmica, o racemato é resolvido através da transformação química de um dos enantiómeros (o que tiver menor energia de ativação), ocorrendo a racemização *in situ* do outro enantiómero, sendo possível obter um rendimento teórico de 100 % (**Esquema 4.23.**).¹¹⁴



Esquema 4.23. Representação geral do processo de resolução cinética dinâmica.

Filice e co-autores,¹¹⁵ realizaram a resolução cinética dinâmica da α -feniletilamina, utilizando um método híbrido proteico-inorgânico, ao usar uma mistura da enzima CALB com $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ em meio aquoso (**Esquema 4.24.**). Neste caso, a CALB atua como agente redutor dos catiões de Pd (II), proporcionando a formação de pequenas partículas de Pd dentro do complexo enzimático. Este complexo Pd / CALB demonstrou obter atividade de acilação e racemização, sendo que, o seu uso como catalisador

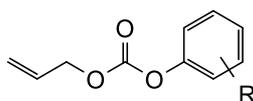
bifuncional neste tipo de resolução enzimática, permitiu obter a α -feniletilamina com bons rendimentos e excelente ee ($\geq 99\%$).¹¹⁵



Esquema 4.24. Resolução cinética dinâmica da α -feniletilamina, utilizando Pd/CALB e AcOEt.¹¹⁵

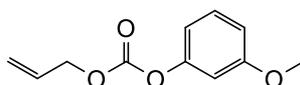
4.1.3.2.1. Resolução enzimática da 1-MeTIQ

A enzima descrita na literatura para resolução da 1-MeTIQ é a lipase *Candida rugosa* (também conhecida por CRL). G. F. Breen, em 2004, realizou um *screening* utilizando diversos tipos de lipases e esterases (usando acetato de etilo como agente acilante e éter diisopropílico como solvente), sendo que a CRL foi a única que demonstrou alguma atividade. O mesmo autor utilizou também esta enzima com diversos **carbonatos de alilo e fenilo substituídos** (com o grupo nitro, bromo e diferentes éteres, em várias posições), como agentes acilantes.⁶⁰



Carbonatos de alilo e fenilo substituídos

O melhor resultado foi obtido utilizando o **carbonato de alilo e 3-metoxifenilo** como agente acilante, originando a (S)-MeTIQ com um rendimento de 46 % e um ee de 99,65 %.⁶⁰

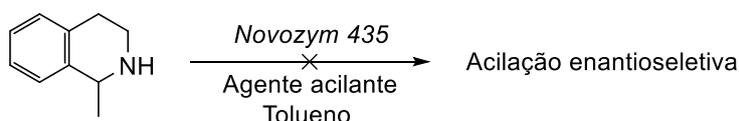


Carbonato de alilo e 3-metoxifenilo

No entanto, existem alguns problemas reportados associados a escassez de reprodutibilidade aquando o uso desta enzima. Esta desvantagem está relacionada com as condições, como a temperatura e a escolha do solvente, mas também com o *lipase loading*, o perfil isoenzimático e a influência do substrato.¹¹⁶

Resultados obtidos

Tentou-se realizar a resolução cinética enzimática da 1-MeTIQ com a enzima *Novozym 435* (**Esquema 4.25.**), uma vez que o grupo de investigação possui uma experiência positiva na utilização da mesma.¹¹⁷ Inicialmente, dissolveu-se a amina em Tolueno (4 mL) e de seguida, adicionou-se o agente acilante respetivo (0,5 – 0,6 eq.), sendo que foram utilizados três agentes acilantes, como se encontra representado na **Tabela 4.6.** Após a adição da enzima (25% m/m), a solução ficou em agitação orbital (48 horas), sendo esta reação acompanhada por TLC.



Esquema 4.25. Tentativa de resolução cinética enzimática da 1-MeTIQ usando *Novozym 435*.

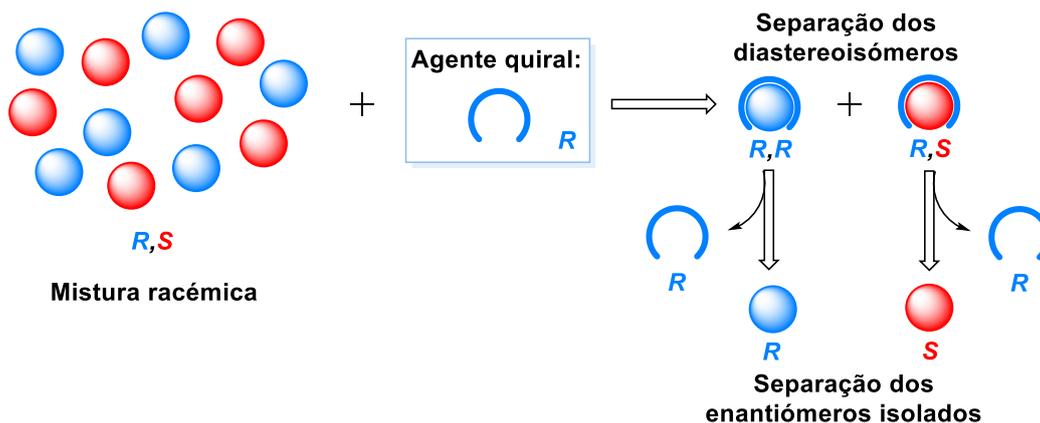
Tabela 4.6. Quantidades utilizadas tentativa de resolução cinética enzimática da 1-MeTIQ.

Reagente limitante	$n_{\text{reagente limitante}}$ / mmol	Agente acilante	$n_{\text{agente acilante}}$ / mmol	Solvente	t / h
1-MeTIQ	1,462	Acetato de vinilo	0,7310	Tolueno	48
	0,6936	Acetato de etilo	0,4162		
	0,7401	Dimetilcarbonato	0,4441		

Foi possível concluir pela observação dos TLCs realizados ao longo das reações, que a tentativa de resolução não foi bem-sucedida, uma vez que não se observou a formação do produto acilado. Estes resultados podem ter sido causados essencialmente por três motivos: a enzima pode não ser seletiva para este tipo de substrato; os agentes acilantes utilizados podem não ter sido os mais adequados; e o solvente pode não ter sido o mais apropriado.

4.1.3.3. Resolução Química

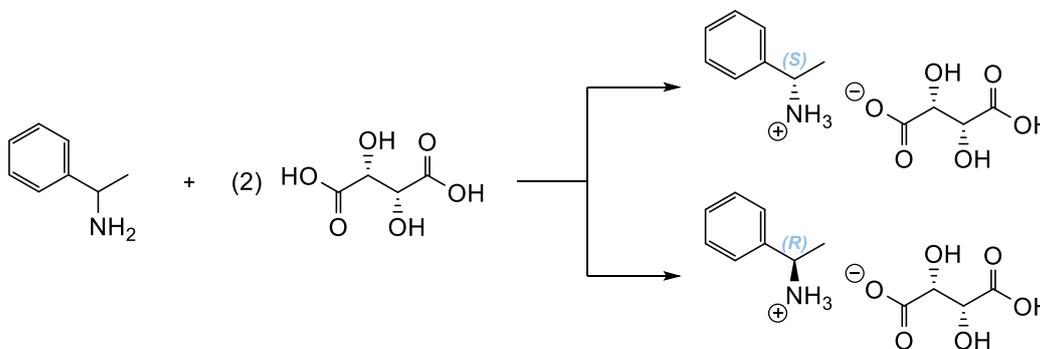
O princípio da separação de dois enantiómeros, através da resolução química, consiste no uso de um reagente auxiliar enantiomericamente puro, com a posterior formação preferencial de um dos diastereoisómeros que, devido às diferenças nas propriedades pode ser isolado, recuperando ainda o reagente auxiliar utilizado (**Esquema 4.26.**).



Esquema 4.26. Representação geral da resolução química utilizando um agente de resolução quiral.

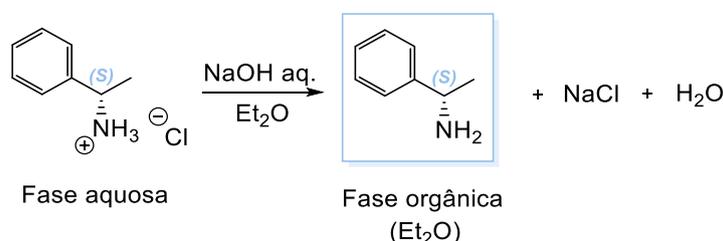
A formação de diastereoisômeros ocorre devido à presença de um agente de resolução quiral que irá reagir com o racemato. Este agente pode ser introduzido através de diferentes tipos de reação, ácido-base, condensação, acoplamento peptídico, substituição, entre outras, sendo que o tipo de reação que ocorre depende do agente quiral e da natureza química do racemato.

Uma das estratégias de resolução mais utilizadas e mais relevante é a formação de sais diastereoisoméricos, devido à facilidade de recuperar o auxiliar quiral utilizado. Estes sais formam-se utilizando ácidos ou bases na sua forma racêmica e um agente de resolução enantiomericamente puro básico ou ácido, respetivamente. Uma vez que os diastereoisômeros possuem propriedades físico-químicas diferentes, nomeadamente a solubilidade, torna-se possível a separação dos mesmos, isto quando ocorre cristalização preferencial (também denominada por resolução por arrastamento), ou seja, quando apenas um dos diastereoisômeros cristaliza e o outro é solúvel no solvente utilizado.¹¹⁸ Addison Ault demonstrou a aplicação deste método de resolução,¹¹⁹ que consiste na resolução da α -feniletilamina (sendo que esta amina já foi resolvida na presença de uma enzima, como foi demonstrado na **secção 4.1.3.2.**) usando o ácido (*R,R*)-tartárico (**Esquema 4.27.**).



Esquema 4.27. Resolução por cristalização da α -feniletilamina utilizando o ácido (*R,R*)-tartárico.

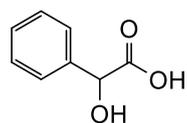
O ácido (*R,R*)-artárico (já mencionado na **secção 4.1.3.1.**) é um agente de resolução muito utilizado para formar sais diastereoisoméricos. Neste caso, o diastereoisómero (*S*)-feniletilamónio / (*R,R*)-tartarato cristaliza rapidamente em metanol (e o outro diastereoisómero é solúvel neste solvente), sendo que após a recuperação dos cristais e um tratamento ácido (com HCl aquoso), é possível extrair o agente de resolução com Et₂O, ficando a (*S*)-feniletilamina [(*S*)-PEA, do inglês (*S*)-phenylethylamine] sob a forma de sal de amónio na fase aquosa. De seguida, o sal obtido na fase aquosa é extraído utilizando uma solução básica de NaOH e Et₂O, obtendo-se assim a (*S*)-PEA enantiomericamente pura (**Esquema 4.28.**). Para conseguir obter o outro enantiómero, a (*R*)-feniletilamina [(*R*)-PEA], é utilizado o mesmo processo a partir da solução metanólica, ou seja, a partir das águas-mãe obtidas a partir da filtração dos cristais do sal diastereoisomérico com a (*S*)-PEA.¹¹⁹



Esquema 4.28. Reação de basificação para obtenção da (*S*)-feniletilamina.

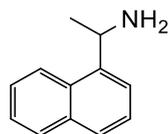
Estas duas aminas enantiomericamente puras são bastante úteis uma vez que as próprias também são muito utilizadas como agentes de resolução não só em reações de ácido-base, como também outros tipos de reações, uma vez que são facilmente recuperáveis.¹²⁰ Estas aminas são utilizadas para obter as correspondentes iminas quirais (pela condensação com aldeídos), para posterior uso em, por exemplo, reações assimétricas de aza-Diels-Alder,¹²¹ de hidrogenação ou adição nucleofílica.¹²⁰

O **ácido mandélico** é outro agente também muito comum, utilizado para a introdução de centros estereogénicos em transformações estereoseletivas.¹²²

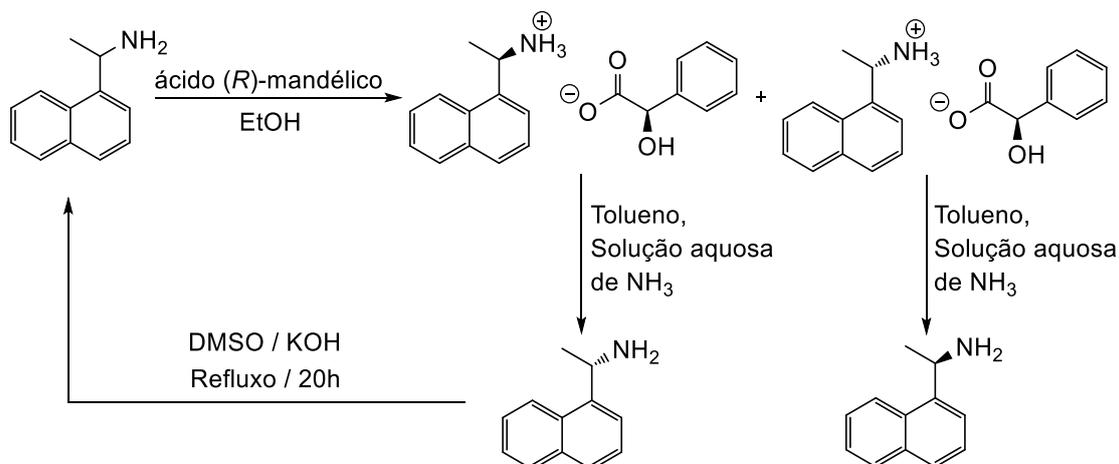


ácido mandélico

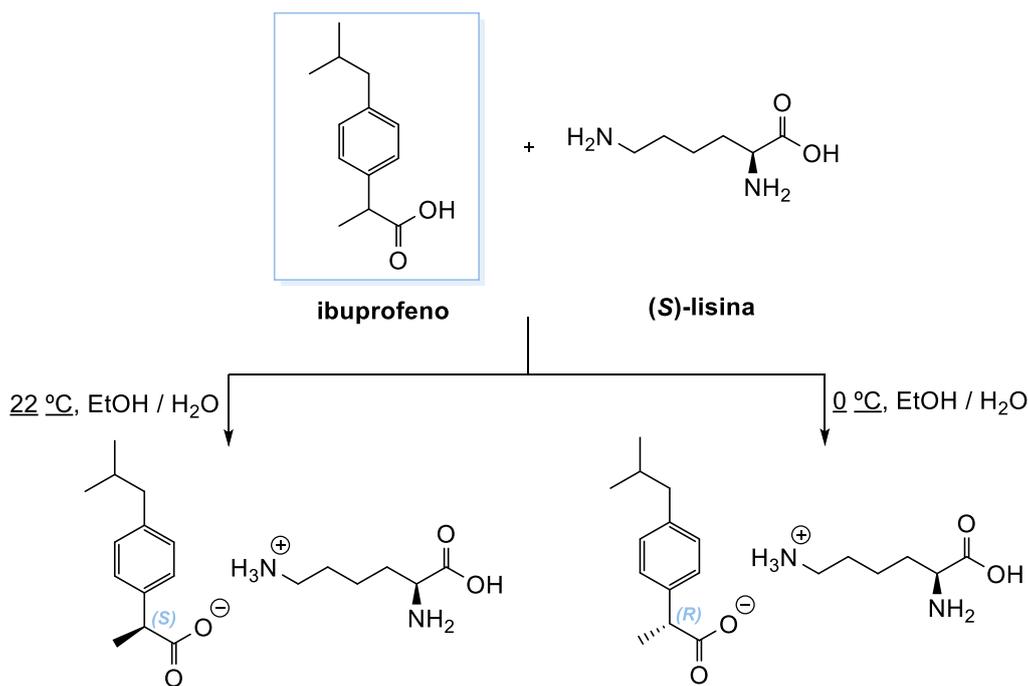
A resolução da **1-naftalen-1-iletanamina** realizada por Vijayavithal T. Mathad e co-autores,¹²³ é um exemplo do uso do ácido mandélico para a formação de sais diastereoisoméricos.

**1-naftalen-1-iletanamina**

Esta resolução consistiu em aquecer (55 – 60 °C) uma mistura constituída por esta amina racémica e o ácido (*R*)-mandélico em etanol até obter uma solução límpida. De seguida, foi realizado um arrefecimento até os 25 – 30 °C até obter um sólido, que foi filtrado e identificado como sendo o sal de (*R*)-1-naftalen-1-iletanamónio de mandelato. De seguida, este sofreu um tratamento básico, obtendo-se o isómero (*R*) pretendido com um rendimento de 72% e pureza enantiomérica maior que 99,5%. O isómero (*S*) foi obtido estabilizando as águas-mãe numa temperatura de 15 °C durante um longo período de tempo, sendo que, como este isómero não era o mais desejado, após a sua recuperação utilizando tratamento básico, este foi sujeito a racemização para a recuperação do racemato, utilizando DMSO, KOH e temperaturas elevadas (**Esquema 4.29.**)¹²³

**Esquema 4.29.** Resolução da 1-naftalen-1-iletanamina, utilizando o ácido (*R*)-mandélico.¹²³

Outro exemplo de cristalização preferencial é a resolução do **ibuprofeno** utilizando o aminoácido (**S**)-lisina como agente de resolução, realizada por Apurba Bhattacharya e David Murphy.¹²⁴ Neste caso, ocorreu primeiramente a cristalização do sal com (**S**)-**ibuprofeno** a 22 °C e, posteriormente, cristalizaram as águas-mãe utilizando uma temperatura menor (0 °C), obtendo o sal com o (**R**)-**ibuprofeno** (**Esquema 4.30.**).



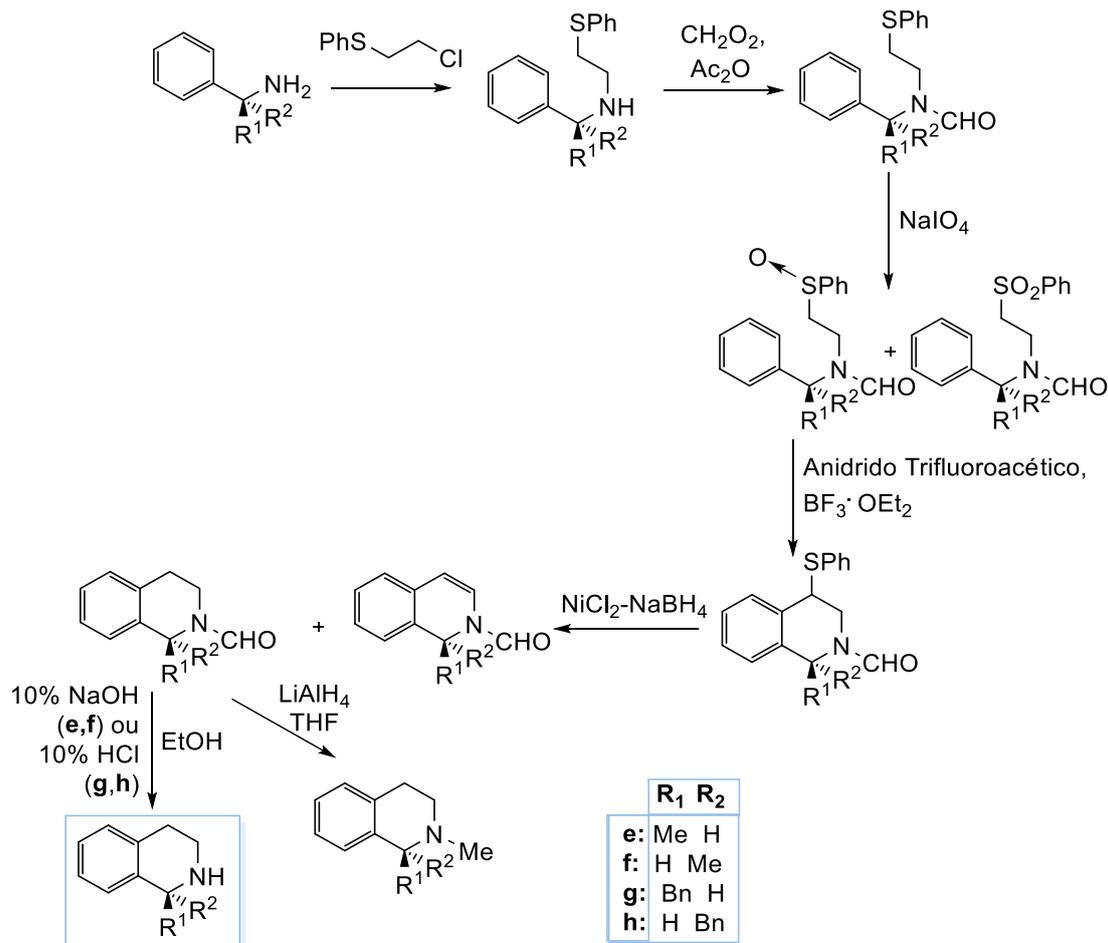
Esquema 4.30. Cristalização preferencial do ibuprofeno / (S)-lisina.¹²⁴

Neste caso ocorreu inicialmente a cristalização cinética, e depois, uma cristalização termodinâmica baseada na mudança de temperatura. De seguida, estes foram sujeitos a um tratamento ácido com uma solução aquosa de HCl, para deste modo obter os compostos enantiomericamente puros pretendidos.¹²⁴

Por vezes, pode acontecer a cristalização de ambos os sais diastereoisoméricos, podendo ocorrer a cristalização de ambos como mistura de cristais enantiopuros (denominando-se de conglomerados), sendo neste caso a resolução denominada por resolução espontânea. Este método é menos comum, devido às dificuldades associadas à separação dos sais formados, no entanto, por vezes estes podem ser separados utilizando métodos mecânicos que se baseiam, principalmente, nas diferenças das formas do cristal formado por cada diastereoisómero,¹²⁵⁻¹²⁶ ou mesmo utilizando os métodos referidos na cristalização preferencial quando possível.¹²⁷

4.1.3.3.1. Resolução Química da 1-MeTIQ

Atualmente, não se encontra reportado nenhum método de resolução da 1-MeTIQ. A única tentativa de obter esta amina enantiomericamente pura reportada é a realização da síntese completa desta amina através de um procedimento eficiente (com rendimento global de 51%),⁶¹ mas que tem como desvantagem o número elevado de passos reacionais (**Esquema 4.31**).

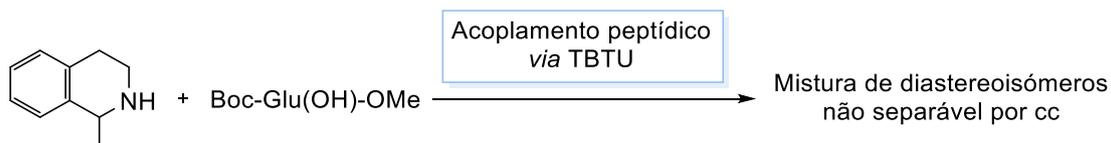


Esquema 4.31. Síntese quiral da 1-MeTIQ.⁶¹

Resultados obtidos

Tentativa de resolução por cromatografia em coluna

Inicialmente como o objetivo seria realizar a funcionalização dos glutamatos (Boc-Glu(OH)-OMe e Boc-Glu(OMe)-OH), realizou-se o acoplamento da 1-MeTIQ com o Boc-Glu(OH)-OMe (**Esquema 4.32.**), na tentativa de avaliar a possibilidade da formação de diastereoisómeros separáveis por cromatografia em coluna.



Esquema 4.32. Tentativa de resolução da 1-MeTIQ através do acoplamento com Boc-Glu(OH)-OMe via TBTU.

Após a reação, que ocorreu com sucesso como demonstrado no espectro apresentado na **Figura 4.9.**, realizaram-se diversos testes de eluentes (**Tabela 4.7.**) com a finalidade de conseguir separar os dois diastereoisómeros formados, contudo, não foi possível isolar, separadamente, os mesmos diastereoisómeros.

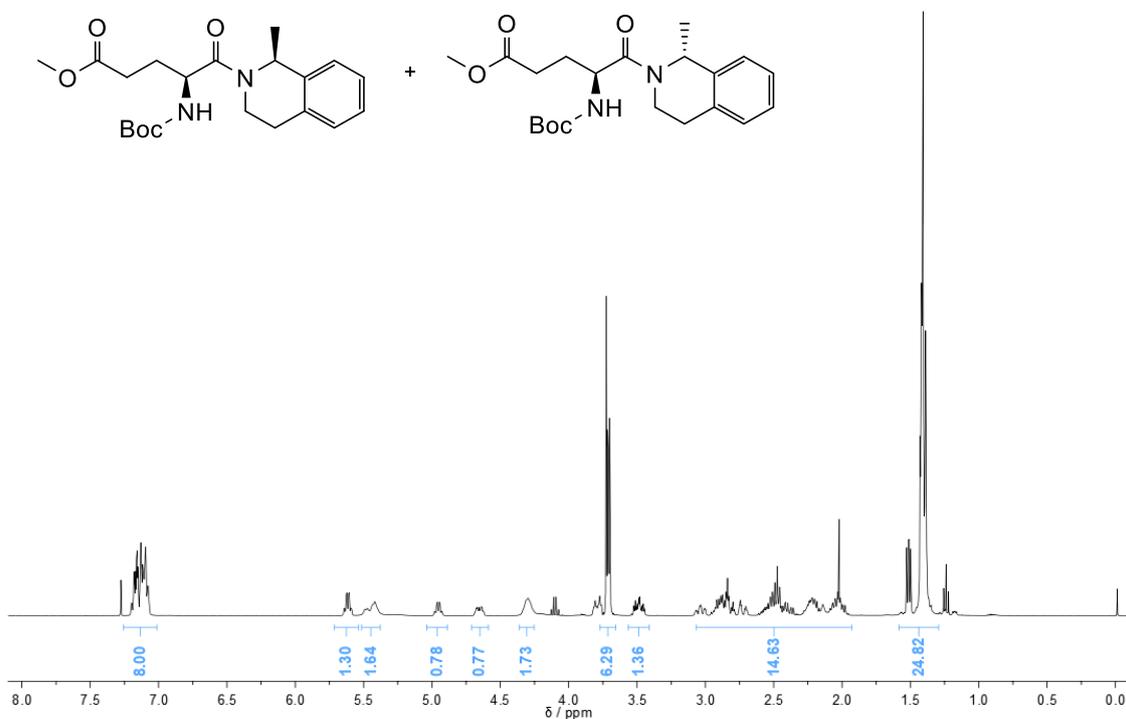


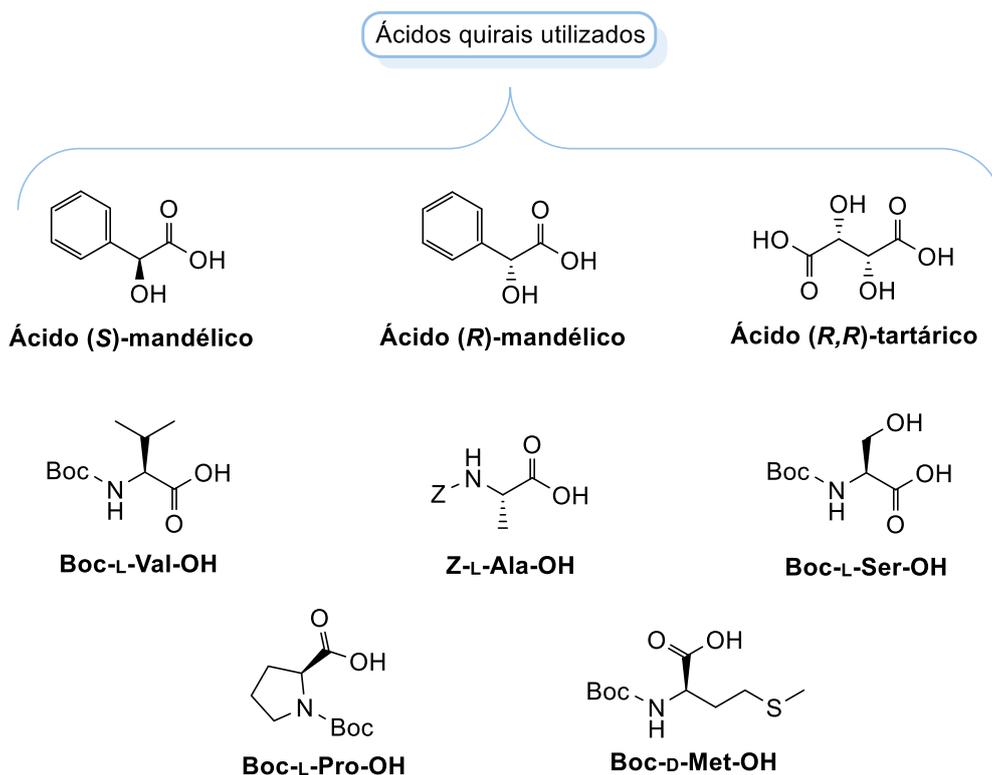
Figura 4.9. Espectro de ^1H -RMN em CDCl_3 do composto Boc-Glu(1-MeTIQ)-OMe.

Tabela 4.7. Eluentes testados para a separação dos diastereoisómeros de Boc-Glu(1-MeTIQ)-OMe.

Eluentes	Proporção
AcOEt	-
AcOEt / Hex	1:3
DCM / MeOH	5:1
DCM / MeOH	8:1
DCM / MeOH	10:1

Tentativa de resolução via formação de sais diastereoisoméricos

Uma vez sendo uma técnica de resolução bastante comum, a segunda tentativa de resolução química da amina 1-MeTIQ consistiu em realizar várias experiências com a finalidade da formação de sais diastereoisoméricos possíveis de separar *a posteriori*. Assim, utilizaram-se como agentes de resolução, os diversos ácidos quirais representados no **Esquema 4.33.**, para a formação dos correspondentes sais pretendidos.



Esquema 4.33. Ácidos quirais utilizados na tentativa de resolução da 1-MeTIQ.

Testaram-se ainda diversos solventes (**Tabela 4.8.**), com o objetivo proporcionar as condições ideais para se dar a cristalização de pelo menos um dos diastereoisómeros.

Tabela 4.8. Condições utilizadas e resultados obtidos na tentativa de resolução da 1-MeTIQ por cristalização.

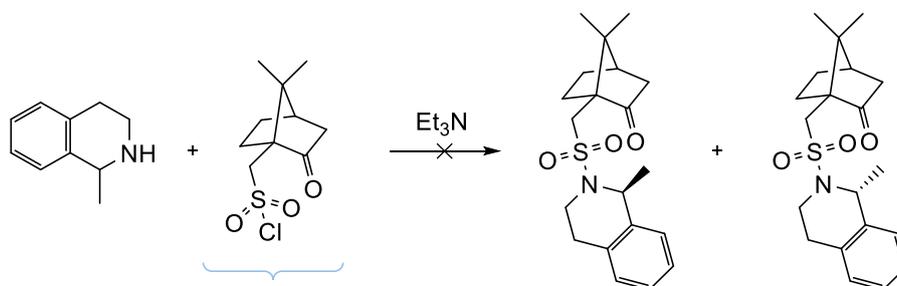
Agente de resolução	Solventes	Proporção	Resultado
Ácido (S)-mandélico	Et ₂ O	-	Precipitado branco
	Et ₂ O / MeOH	4:2	Precipitado branco + óleo viscoso amarelado
	Et ₂ O / MeOH	5:1	Precipitado branco + óleo viscoso amarelado
Ácido (R)-mandélico	Et ₂ O	-	Solução límpida
	Et ₂ O / MeOH	5:1	Solução límpida
	Hex	-	Solução límpida
	Hex / MeOH	6:1	Solução límpida
Ácido (R,R)-tartárico	Et ₂ O	-	Solução límpida
	Et ₂ O / MeOH	5:1	Solução turva
	Et ₂ O / MeOH	4:1	Solução límpida
	Hex / MeOH	6:1	Solução límpida
Boc-L-Val-OH	Et ₂ O	-	Solução límpida
	Et ₂ O / MeOH	5:1	Solução límpida
	Hex / MeOH	6:1	Solução límpida
Z-Ala-OH	Et ₂ O	-	Solução límpida
	Et ₂ O / MeOH	5:1	Solução límpida
Boc-Ser-OH	Et ₂ O	-	Solução límpida
	Et ₂ O / MeOH	5:1	Solução límpida
Boc-Pro-OH	Et ₂ O	-	Solução límpida
	Et ₂ O / MeOH	5:1	Solução límpida
Boc-D-Met-OH	Et ₂ O	-	Solução límpida
	Et ₂ O / MeOH	5:1	Precipitado branco

É possível concluir que nenhuma das experiências permitiu obter um resultado satisfatório para proporcionar a separação dos sais diastereoisoméricos. Ao testar diversos solventes, apenas o ácido (S)-mandélico e a Boc-D-Met-OH permitiram obter um resultado que se poderia prever uma possível separação. No caso do ácido (S)-mandélico, após a filtração do precipitado obtido, verificou-se que estes ficaram com um aspeto de óleo muito viscoso, tendo-se identificado como sendo a mistura racémica. Por outro lado, ao utilizar a Boc-D-Met-OH, verificou-se a formação de um precipitado que foi devidamente isolado, sendo que este foi identificado como sendo apenas a Boc-D-Met-OH e não como o sal pretendido, podendo não ter ocorrido a formação do sal, ou este se ter formado, mas ter-se decomposto *a posteriori*.

Assim, apesar de se terem testado diversos solventes em várias proporções, poderiam ter sido testadas outras condições como por exemplo mudanças de temperatura, para deste modo proporcionar uma melhor solubilidade diferencial dos sais diastereoisoméricos.

Resolução utilizando Cloreto de (S)-(+)-10-canfor-sulfonilo

Nesta tentativa de resolução da amina 1-MeTIQ utilizou-se o **Cloreto de (S)-(+)-10-canfor-sulfonilo**, com o objetivo de, após a formação da sulfonamida, tentar a separação dos diastereoisómeros formados (**Esquema 4.34**).



Cloreto de (S)-(+)-10-canfor-sulfonilo

Esquema 4.34. Reação de formação dos diastereoisómeros utilizando cloreto de (S)-(+)-10-canfor-sulfonilo.

Assim, dissolveu-se a 1-MeTIQ em DCM anidro, num ambiente inerte (Árgon), uma vez que o cloreto de sulfonilo pode sofrer hidrólise, de seguida adicionou-se 1,2 eq. de Et_3N , uma vez que é necessário a captura do HCl que se irá formar *in situ*.

Após o tratamento procedeu-se à purificação da mistura obtida por cromatografia em coluna tendo-se isolado um dos compostos. O espetro de ^1H -RMN obtido para o composto isolado (**secção 6.1.6.1.**), revelou que se trata de apenas um dos diastereoisómeros. A análise do espetro aparentemente parecia compatível com a estrutura prevista (sulfonamida), contudo, consegue perceber-se uma lombada a campos baixos (ca. 8 ppm), que pode ser indicativo de um sinal característico de prótons ácidos. Preparou-se uma nova solução do composto isolado em CDCl_3 com uma concentração diferente para se verificar se este sinal sofria alguma alteração, uma vez que os prótons lábeis se deslocam consoante a concentração da amostra e da temperatura (**Figura 4.10.**). O resultado obtido permitiu concluir que se tratam de prótons lábeis, uma vez que houve deslocamento do sinal (ca. 5.2 ppm) e, portanto, indicativo que a estrutura não poderia ser a sulfonamida esperada.

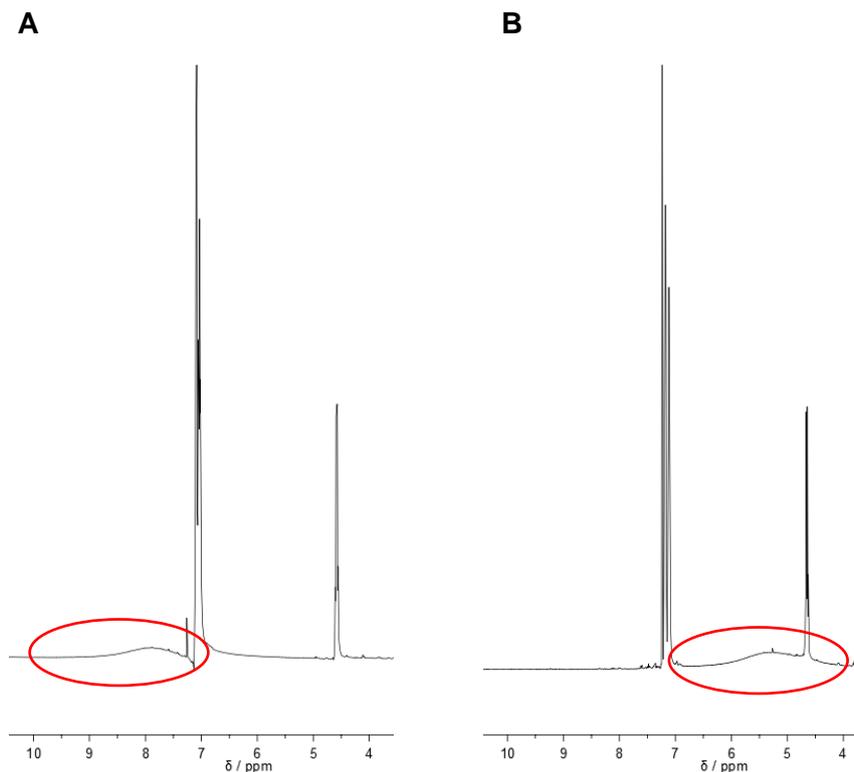
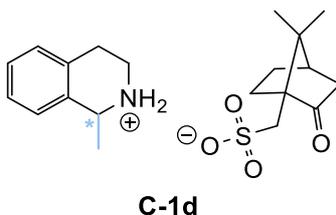


Figura 4.10. Espectros de ^1H -RMN (CDCl_3), truncados para o diastereoisómero isolado (**C-1d**) obtido da reação da 1-MeTIQ racémica e o cloreto (S)-(+)-10-canforsulfonilo a diferentes concentrações (**A** e **B**).

Este sinal não seria espectável para o composto pretendido, suspeitando-se assim da existência do sal (S)-(+)-10-canforsulfonato de 1-metil-1,2,3,4-tetraidroisoquinolin-2-íio (**C-1d**).



Deste modo, decidiu-se realizar uma análise de massa (ESI-MS), tanto em modo positivo (**Figura 4.11.**) como em modo negativo (**Figura 4.12.**), para confirmar qual o composto realmente sintetizado.

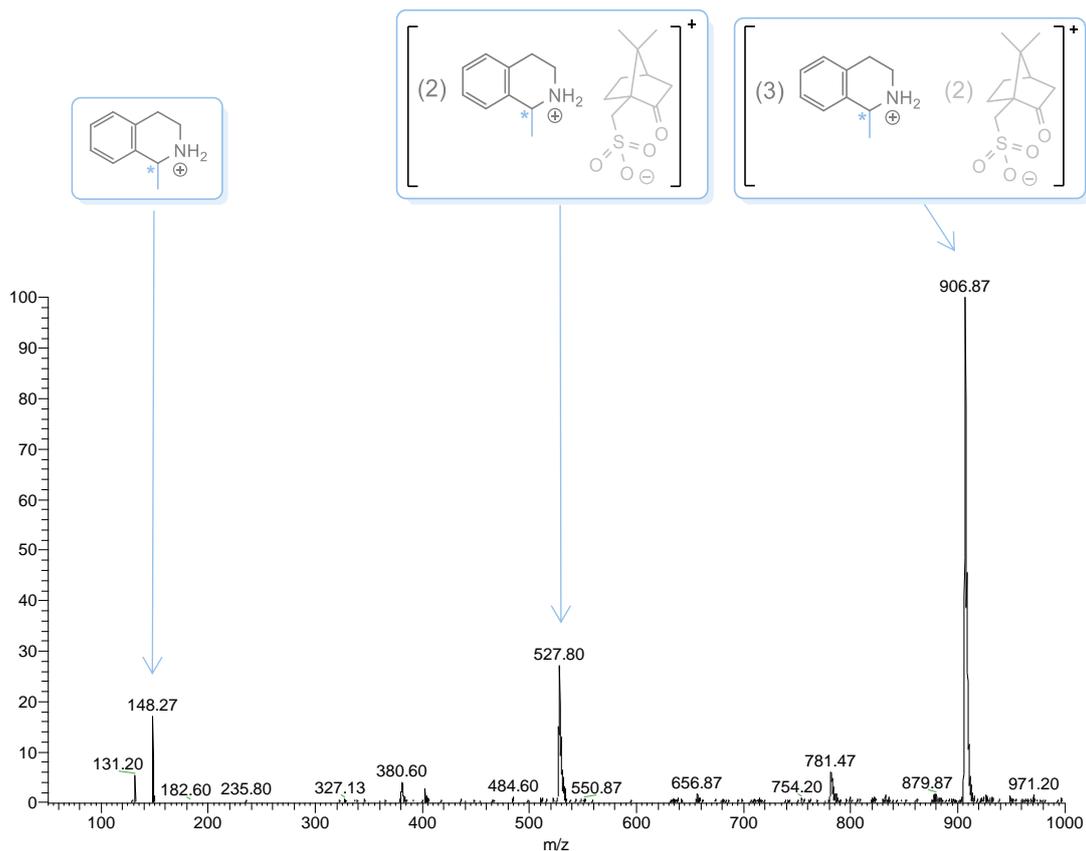


Figura 4.11. Espectro de massa (ESI-MS), em modo positivo, do composto C-1d.

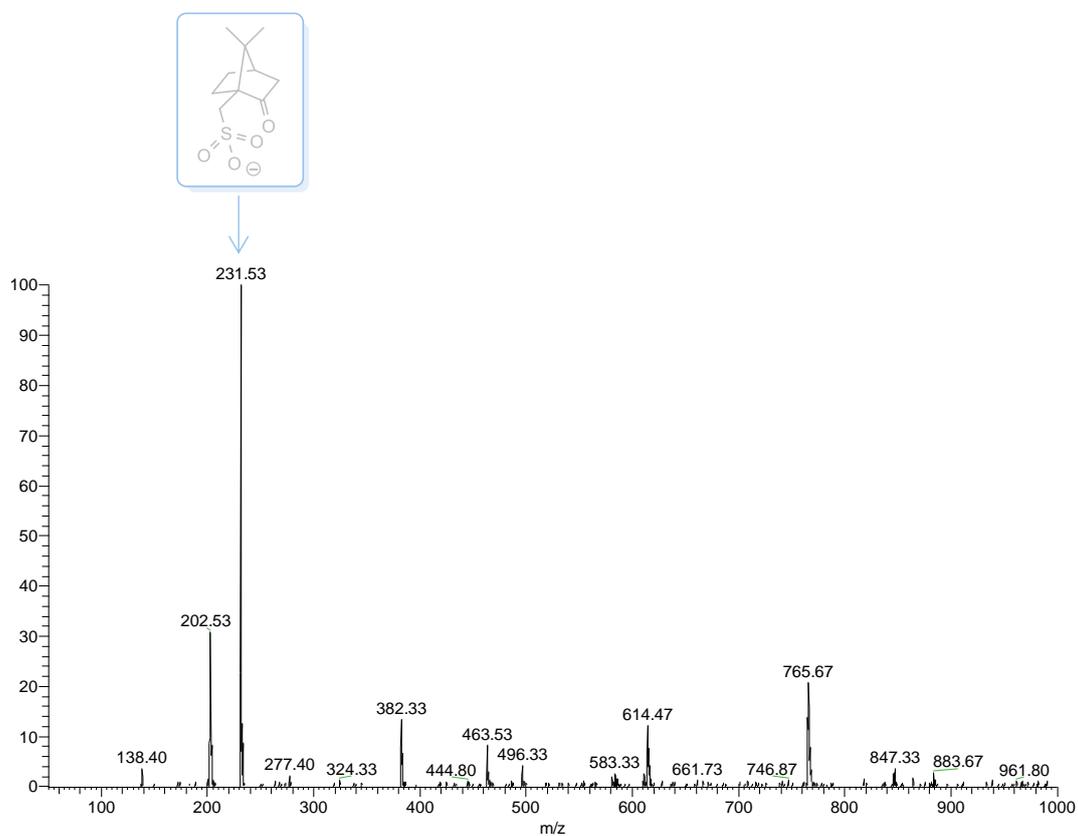


Figura 4.12. Espectro de massa (ESI-MS), em modo negativo, do composto C-1d.

Pelo espectro de massa realizado em modo positivo (**Figura 4.11.**), foi possível verificar a existência do catião 1-metil-1,2,3,4-tetraidroisoquinolin-2-íon (1-MeTIQ⁺, $m/z = 148.27$ u.m.a.), um trímero constituído por dois catiões 1-MeTIQ⁺ e o anião (S)-(+)-10-canforsulfonato ($m/z = 527.80$ u.m.a.) e um pentâmero constituído por três catiões 1-MeTIQ⁺ e dois aniões de (S)-(+)-10-canforsulfonato ($m/z = 906.87$ u.m.a.).

Por outro lado, ao analisar o espectro de massa realizado em modo negativo (**Figura 4.12.**), verificou-se a existência do anião (S)-(+)-10-canforsulfonato ($m/z = 251.53$ u.m.a.).

Deste modo, foi possível concluir que o composto que foi sintetizado e isolado por cromatografia em coluna foi realmente o sulfonato de amónio e não a sulfonamida pretendida. Apesar deste contratempo, conseguiu-se igualmente cumprir o objetivo principal da separação dos diastereoisómeros, tendo-se conseguido isolar apenas um deles, embora até ao momento ainda não se tenha informação estrutural que permita indubitavelmente atribuir a estereoquímica do catião.

Assim, uma vez que o esperado seria a formação da sulfonamida, decidiu-se analisar o cloreto de (S)-(+)-10-canfor-sulfonilo (reagente comercial) por ¹H-RMN (**Figura 4.13.**), uma vez que este poderia não estar nas melhores condições, motivo pelo qual não se obteve o produto inicialmente pretendido. Analisaram-se ainda os espectros de ¹H-RMN disponíveis da *Sigma-Aldrich*, tanto do cloreto de (S)-(+)-10-canfor-sulfonilo (**Figura 4.14.**), como do ácido (1S)-canfor-sulfónico (**Figura 4.15.**), para deste modo, por comparação concluir acerca da composição do reagente utilizado.

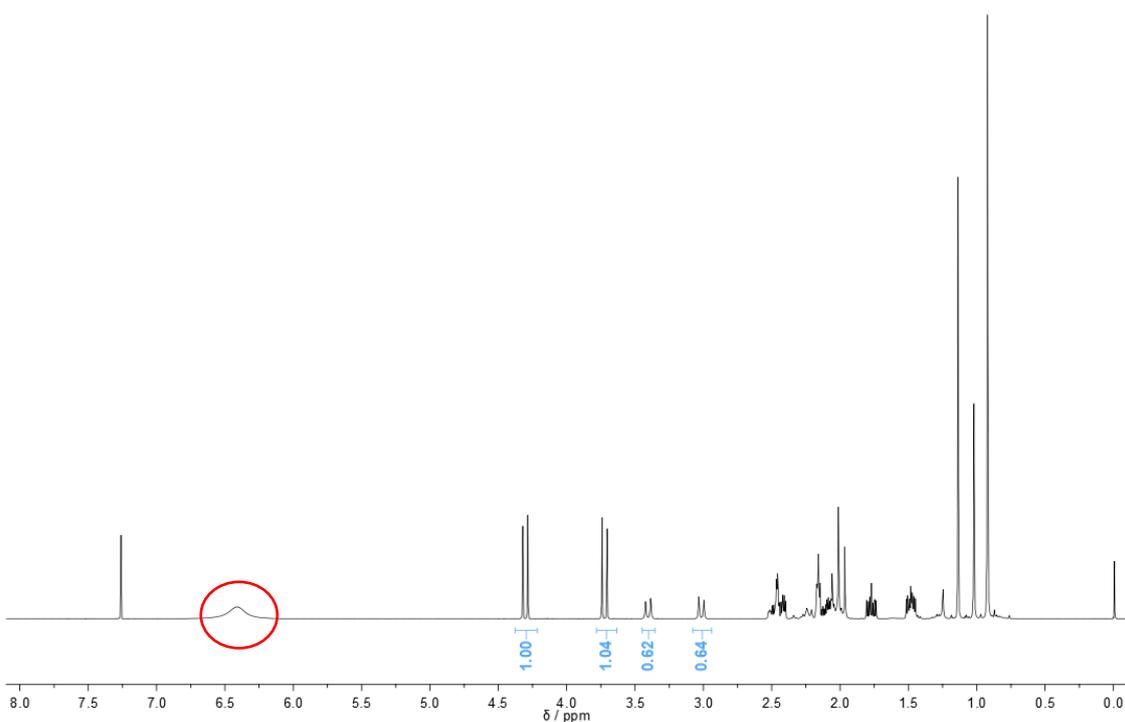


Figura 4.13. Espectro de ¹H-RMN realizado ao reagente comercial cloreto de (S)-(+)-10-canfor-sulfonilo, em CDCl₃.

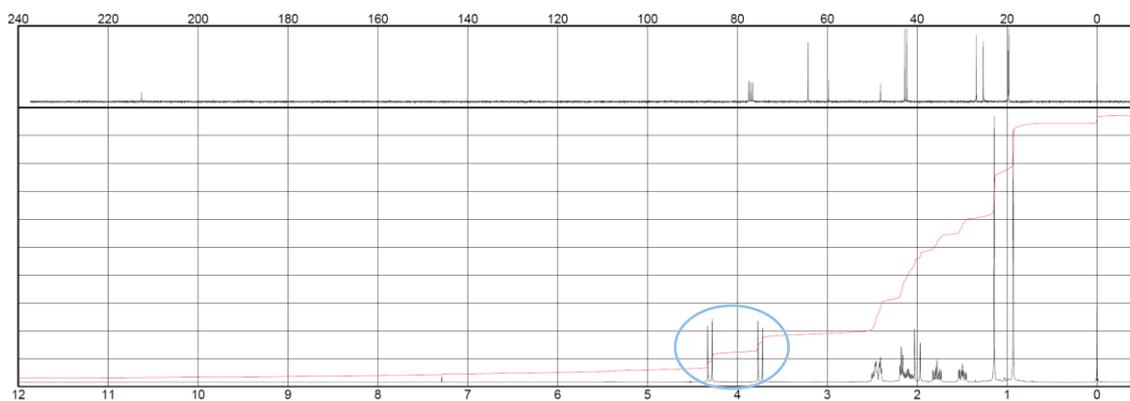


Figura 4.14. Espectro de ^1H -RMN do reagente comercial cloreto de (S)-(+)-10-canfor-sulfonilo, em CDCl_3 .¹²⁸

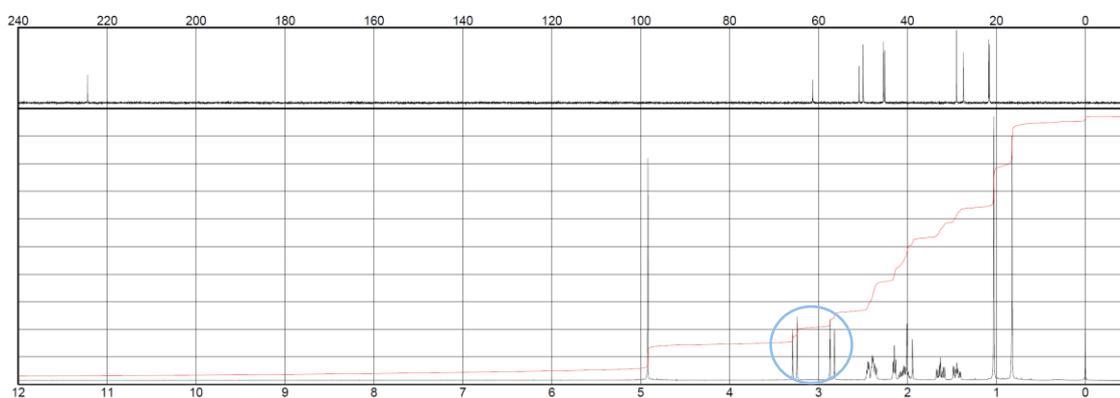


Figura 4.15. Espectro de ^1H -RMN do reagente comercial ácido (1S)-canforsulfônico, em D_2O .¹²⁹

Pela análise do espectro relativo ao reagente comercial usado (**Figura 4.13.**) é possível verificar-se a presença do reagente descrito no rótulo (62 %) e ainda, o produto resultante da sua hidrólise (o ácido (1S)-canfor-sulfônico, 38 %). Para o efeito, a quantificação foi feita pela integração dos sinais dos prótons diastereotópicos $\text{H}_{\text{canf-10}}$, sendo estes bastante característicos, para a atribuição inequívoca destes compostos, que por comparação destes sinais com os sinais dos mesmos prótons visualizados nos dados espectroscópicos (^1H -RMN) de reagentes comerciais fornecidos pelo *site Sigma-Aldrich* (**Figuras 4.14.** e **4.15.**), é possível verificar que os prótons diastereotópicos $\text{H}_{\text{canf-10}}$ no cloreto de (S)-(+)-10-canfor-sulfonilo surgem como um sistema AB, com um desvio químico a aproximadamente 4 ppm; enquanto que o sistema AB para os mesmos prótons no ácido (1S)-canfor-sulfonico surge a campos mais altos, com um desvio químico de, aproximadamente 3 ppm.

Assim, conclui-se que o problema associado para esta síntese recai sobre o reagente comercial, o cloreto de (1S)-canfor-sulfonilo, que se encontrava parcialmente hidrolisado.¹³⁰

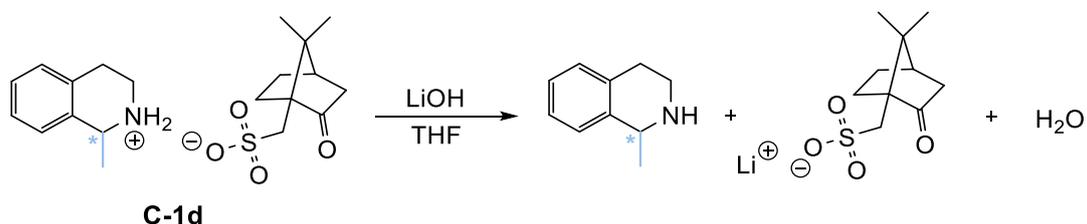
Os resultados obtidos para esta reação encontram-se apresentados na **Tabela 4.9.**, tendo-se realizado o procedimento descrito.

Tabela 4.9. Resultados obtidos na síntese do composto **C-1d**.

Exp.	Reagente limitante	n _{reagente limitante} / mmol	Produto obtido	n _{produto obtido} / mmol	η / %
1	Cloreto de (1S)-(+)-10-canfor-sulfonilo	0,4064	C-1d	0,1260	31
2		1,980		0,8118	41
3		1,980		0,7524	38
4		0,4125		0,1320	32

Apesar deste contratempo, tal resultado foi motivador uma vez que demonstrou que a separação dos sais diastereoisoméricos usando o ácido (1S)-canfor-sulfónico pode ser uma metodologia viável para a resolução da 1-MeTIQ.

Sabendo que se isolou um dos sais diastereoisoméricos, o passo seguinte consiste na dissociação dos sais ao utilizar uma base, que neste caso foi o LiOH. Nesta reação dissolveu-se o sal sintetizado **C-1d** em THF e adicionou-se 2 eq. de LiOH (**Esquema 4.35.**). Após a evaporação do THF e do tratamento, que abrange extrações líquido-líquido com uma solução saturada de NaHCO₃, verificou-se por TLC (efetuado à fase orgânica) uma mancha correspondente à amina pretendida.



Esquema 4.35. Reação de ácido-base para a recuperação da 1-MeTIQ enantiomericamente pura.

Foi realizada uma análise de ¹H-RMN à amina devidamente isolada (**Figura 4.16.**), com o objetivo de comprovar o seu isolamento completo e que não se encontrava ainda sob a forma de sal.

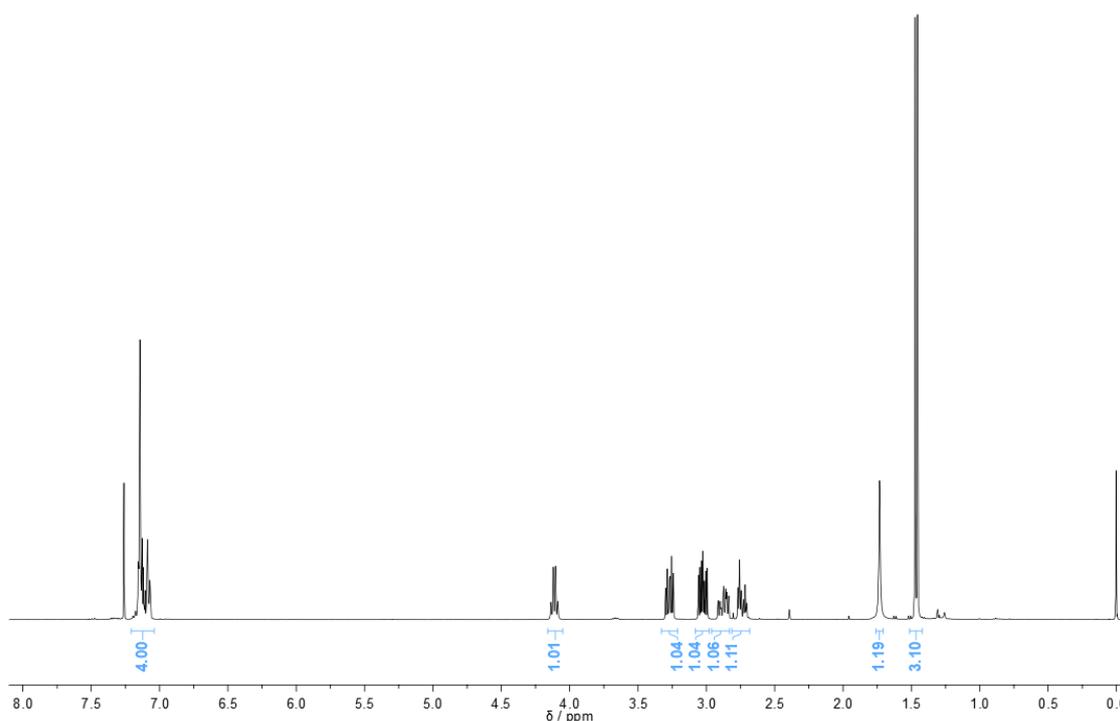
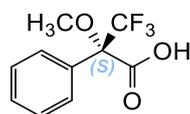


Figura 4.16. Espectro de ^1H -RMN (em CDCl_3) da amina 1-MeTIQ isolada.

Uma vez que pelo espectro de ^1H -RMN não é possível verificar a pureza enantiomérica da amina isolada, procedeu-se à sua derivatização utilizando o ácido (*S*)-(-)- α -metoxi- α -trifluorometilfenilacético ((*S*)-MTPA), também conhecido por **ácido de Mosher**.



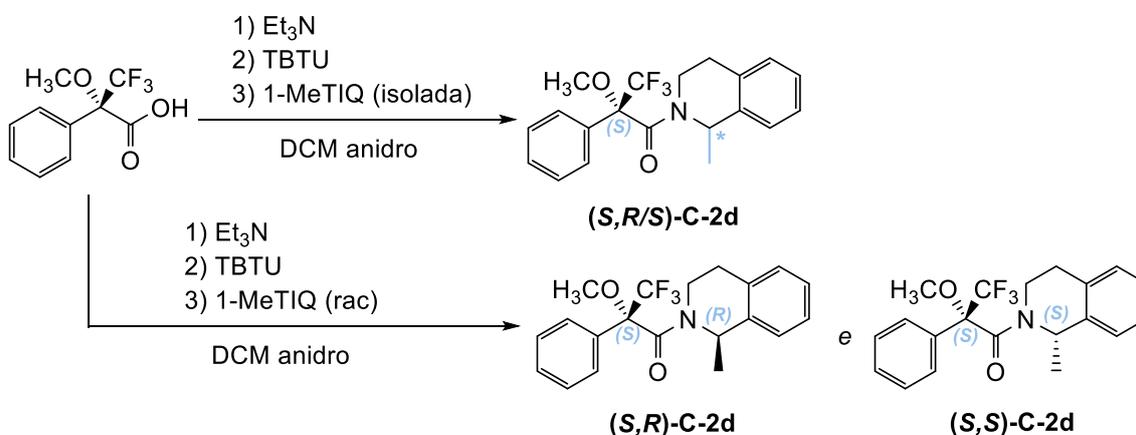
ácido de Mosher

O ácido de Mosher é um agente de derivatização quiral muito utilizado na determinação da configuração absoluta de álcoois¹³¹ e também de aminas (primárias e secundárias).¹³²⁻¹³³ Este método consiste na transformação do substrato quiral em dois compostos diferentes (diastereoisómeros) que sejam possíveis de identificar e diferenciar por espectroscopia de RMN.

Ao utilizar o ácido de Mosher, os diastereoisómeros formados são possíveis de identificar por ^1H -RMN, no entanto, uma vez que este reagente possui átomos de fluor, é possível o uso de ^{19}F -RMN para a identificação dos diastereoisómeros formados, sendo uma grande vantagem uma vez que o espectro deste último é muito mais simplificado, para além de que como se trata de um isótopo com abundância relativa de 100%, permite a sua quantificação direta.

Assim, realizou-se uma reação de acoplamento, utilizando o ácido de Mosher e tanto com a amina isolada (obtendo-se o composto (*S,R/S*)-**C-2d**), como com a amina

racêmica (obtendo-se a mistura de diastereoisómeros **(S,R)-C-2d** + **(S,S)-C-2d**) (**Esquema 4.36.**) para, posteriormente, ser possível a identificação do enantiómero obtido por comparação.



Esquema 4.36. Derivatização da 1-MeTIQ racêmica e previamente isolada utilizando o ácido de Mosher.

Após a síntese destes diastereoisómeros, e sem a realização de qualquer tratamento ou purificação, procedeu-se então à análise por ¹⁹F-RMN, tanto da mistura diastereoisomérica em que foi utilizada a amina racêmica (**Figura 4.17., A**) como da mistura em que foi utilizada a amina previamente isolada (**Figura 4.17., B**)

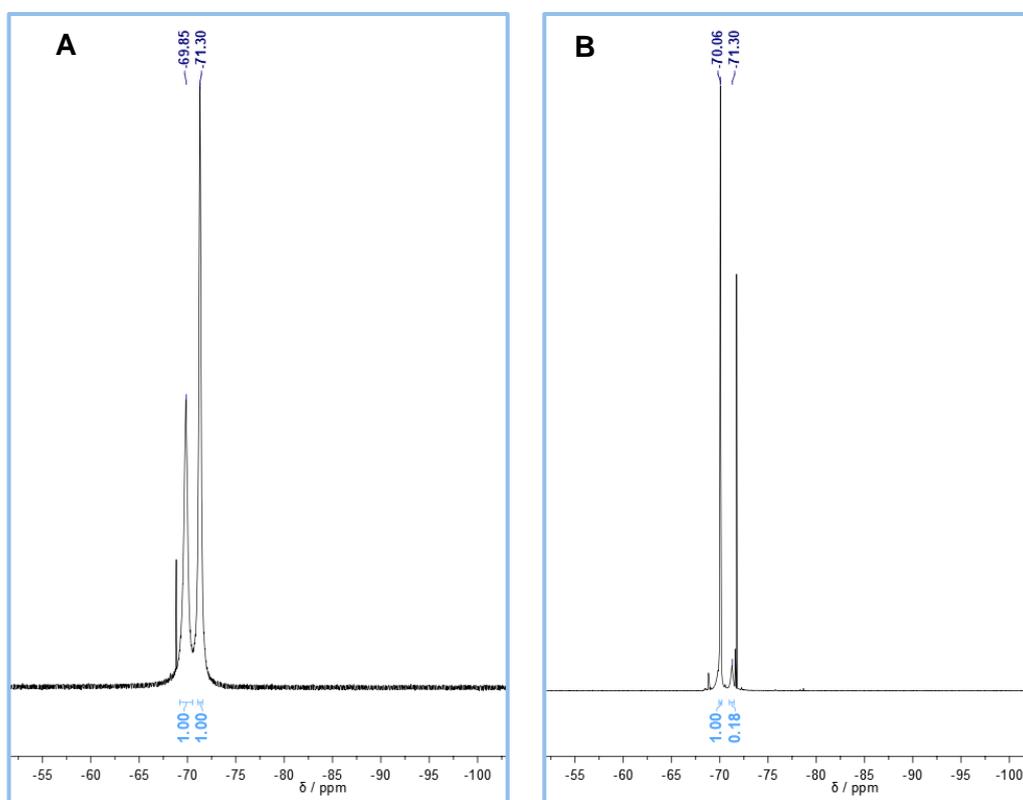


Figura 4.17. Espetros de ¹⁹F-RMN usando o ácido de Mosher referido com: **A:** 1-MeTIQ racêmica; **B:** 1-MeTIQ isolada.

Por comparação dos espetros obtidos é possível concluir que se conseguiu isolar um dos enantiómeros da amina 1-MeTIQ com uma pureza ótica de 70 %.

Uma vez que esta amina não se encontra totalmente pura não foi possível obter nenhum dos $[\alpha]_D$ descritos na literatura para os enantiómeros desta amina (+ 75,0 para a 1-(*R*)-MeTIQ e -77,5 para a 1-(*S*)-MeTIQ),⁶¹ para conseguir identificar qual dos enantiómeros se encontra em excesso nesta solução. Assim, tentou-se averiguar qual o enantiómero mais provável através do impedimento estérico causado.

Ao avaliar as configurações dos compostos (**S,R**)-**C-2d** e (**S,S**)-**C-2d**, evidenciou-se que o diastereoisómero (**S,R**)-**C-2d** se encontra numa configuração *sin*, ou seja, os dois grupos volumosos de ambos os componentes (ácido de Mosher e 1-(*R*)-MeTIQ) se encontram para o mesmo lado. Por outro lado, no caso do diastereoisómero (**S,S**)-**C-2d**, verificou-se que os mesmos grupos se encontram posicionados para lados opostos, tendo este uma configuração *anti*.

Uma vez que a configuração *anti* é a mais estável,¹³⁴ devido a proporcionar menores repulsões estereoquímicas, o diastereoisómero que é mais provável ter-se formado com excesso é o (**S,S**)-**C-2d**, correspondendo este ao sinal com desvio químico maior no espetro de ¹⁹F-RMN representado anteriormente na **Figura 4.17**.

De forma complementar, foram realizados cálculos *in silico* de maneira a obter a minimização da energia de ambas as estruturas representadas ((**S,R**)-**C-2d** e (**S,S**)-**C-2d**), para deste modo confirmar qual a estrutura mais estável.

Cálculos in silico

Foram realizados cálculos teóricos em colaboração com o Dr. Luis Silva do Centro de Investigação em Química da Universidade do Porto (CIQUP) da FCUP. Para estes cálculos foi utilizado o software *Gaussian 09*.¹³⁵ As otimizações de geometria e a análise vibracional foram feitas no nível teórico de M06-2X/6-311+G(d,p)¹³⁶ em fase gasosa. As energias foram reavaliadas no nível teórico de M06-2X/6-311+G(d,p) em DCM implícito. Foi utilizado o M06-2X funcional uma vez que este é conhecido por apresentar bons resultados em aplicações que envolvem interações termoquímicas, cinéticas e não covalentes.¹³⁶⁻¹³⁷ A solvatação implícita foi considerada com o modelo SMD (modelo de solvatação baseado na densidade eletrónica),¹³⁸ que se baseia no modelo de formalismo de equação integral (IEFPCM), mas com raios e termos não eletrostáticos do modelo de solvência SMD de Truhlar e co-autores. O SMD tem a vantagem de incluir termos não eletrostáticos nos cálculos.¹³⁸

A partir dos cálculos efetuados verificou-se o diastereoisómero **(S,S)-C-2d** (*Figura 4.18., B*) é 12,9 kcal/mol mais estável que o composto **(S,R)-C-2d** (*Figura 4.18., A*), confirmando assim a intuição explicada anteriormente.

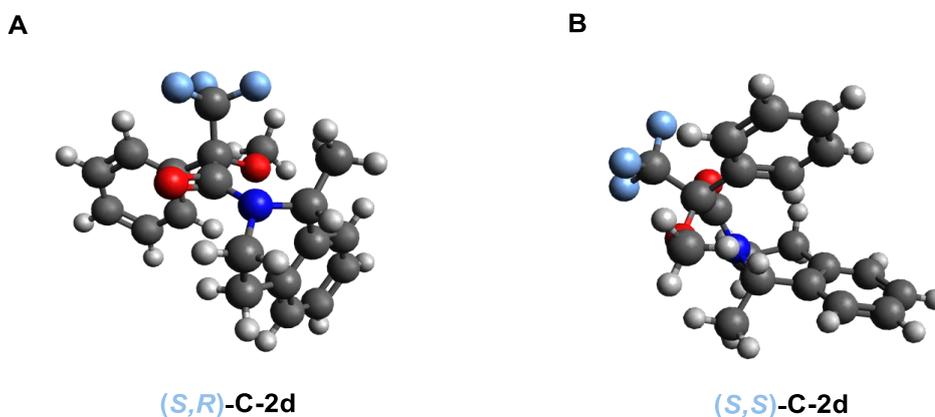


Figura 4.18. Estruturas otimizadas dos diastereoisómeros **(S,R)-C-2d** e **(S,S)-C-2d**. Cinza escuro: carbono; cinza claro: hidrogénio; vermelho: oxigénio; azul escuro: azoto; azul claro: fluor.

Em suma, deduz-se que é necessário continuar a investir na resolução da amina 1-MeTIQ uma vez que se conseguiu obter um excesso enantiomérico de 82%. A diminuição da pureza ótica, pode ter sido causada pela utilização da base forte aquando da hidrólise do sal **C-1d**, ou também pelas condições utilizadas no acoplamento da amina com o ácido de Mosher, podendo ter ocorrido epimerização, o que impediu atingir um ee mais próximo dos 100%.

4.2. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

4.2.1. Propriedades Farmacológicas

Uma vez tratando-se de compostos finais, foram calculadas algumas propriedades físico-químicas dos compostos **C-4(a-c)**, **C-9(a-c)** e **C-II** (**Tabela 4.10.**), para estimar a biodisponibilidade oral e a permeabilidade através da membrana destes compostos. Foram considerados alguns parâmetros propostos por Lipinski e co-autores¹³⁹ [massa molecular (MM), coeficiente de partição (clogP), número de aceitadores de pontes de hidrogénio (n_{APH}) e número de dadores de pontes de hidrogénio (n_{DPH})], conjuntamente com alguns parâmetros sugeridos posteriormente por Veber e co-autores¹⁴⁰ [soma do número de dadores e aceitadores de pontes de hidrogénio ($n_{\text{APH}} + n_{\text{DPH}}$), número de ligações rotáveis (n_{rot}), volume molecular (VM / Å^3)], e área superficial polar topológica (tPSA, do inglês *topological polar surface area*, em Å^2). Foram calculadas as mesmas propriedades para o GPE (composto nativo), para posteriormente comparar com os valores obtidos para os compostos sintetizados.

Tabela 4.10. Propriedades calculadas para o GPE, para os compostos finais **C-4(a-c)** e **C-9(a-c)**, e para o controlo **C-II** usando o software Cheminformatics (<http://www.molinspiration.com>).

Composto	MM g mol ⁻¹	n_{APH}	n_{DPH}	$n_{\text{APH}} + n_{\text{DPH}}$	n_{rot}	clogP	VM / Å^3	tPSA / Å^2
Ref. ¹⁴¹⁻¹⁴²	≤ 500	≤ 10	≤ 5	≤ 12	≤ 10	≤ 5	-	≤ 140
GPE	301,30	9	5	14	7	-4,39	264,70	150,03
C-4a	430,50					-0,69	397,61	
C-9a						-1,00		
C-4b	448,56	9	4	13	9	0,39	421,89	130,83
C-9b						0,08		
C-4c						0,51		
C-9c	476,62					0,20	454,36	
C-II	329,35	9	3	12	9	-2,09	299,76	128,04

A análise das propriedades calculadas permite concluir que todos os parâmetros para todos os compostos sintetizados se encontram dentro dos valores de referência, (com exceção do somatório do número de dadores de pontes de hidrogénio com o número de aceitadores de pontes de hidrogénio), o que significa que poderão ter boas propriedades farmacocinéticas tendo assim uma probabilidade maior de virem a ser fármacos de sucesso.

A MM dos compostos sintetizados é maior que a MM do GPE, no entanto continua abaixo do limite delineado pela referência. A MM está relacionada com o VM, uma vez que estes são diretamente proporcionais. O VM afeta o tamanho da cavidade que se irá

formar para solubilizar o composto, sendo assim importante que este esteja dentro dos limites, uma vez que está relacionado com a absorção intestinal e também na penetração na barreira hematoencefálica.¹⁴³

O número de aceitadores e dadores de pontes de hidrogénio não deve ser demasiado elevado, uma vez que o aumento das ligações por pontes de hidrogénio aumenta a solubilidade num meio hidrofílico, e sendo estas ligações difíceis de romper, é dificultada a passagem do composto pelas membranas lipídicas.¹⁴² Os valores obtidos não são muito favoráveis, apesar de serem inferiores (e por isso mais benéficos) aos obtidos para o composto nativo GPE.

O clogP é um parâmetro importante a ser calculado uma vez que a hidrofobicidade afeta a absorção dos compostos, a sua biodisponibilidade, o metabolismo e a toxicidade. Verificou-se que todos os compostos apresentam um valor de clogP próximo do 0 (com a exceção dos compostos **C-9a** e **C-II**, com valor de -1,00 e -2,09, respetivamente). Este resultado (coerente com o número de dadores e aceitadores de pontes de hidrogénio, que já permitia prever uma baixa hidrofobicidade) permite concluir que os compostos sintetizados são bastante hidrofílicos, o que pode não ser benéfico uma vez que deste modo existe uma grande probabilidade de estes terem dificuldades na absorção oral e na passagem através de membranas lipídicas no intestino, por outro lado, sendo estes hidrofílicos, a etapa de excreção realizada pelos rins é facilitada.¹⁴⁴ Apesar desta aparente desvantagem, ao comparar com o composto nativo GPE, conclui-se que os compostos sintetizados possuem menor carácter hidrofílico, ou seja, terão uma maior facilidade para serem absorvidos.

O cálculo da tPSA é de grande relevância uma vez que os grupos polares são envolvidos na dessolvatação quando passam de um ambiente hidrofílico para um ambiente hidrofóbico, sendo importantes para a biodisponibilidade dos compostos. No cálculo desta área normalmente é utilizada a conformação de menor energia.¹⁴⁵ Este parâmetro é um dos mais desfavoráveis do GPE, uma vez que ultrapassa o valor de referência. Assim, o valor obtido para os compostos sintetizados revelou ser bastante satisfatório uma vez que se conseguiu diminuir a tPSA comparativamente ao valor do GPE, estando assim dentro do limite.

É importante também referir que as mesmas propriedades calculadas para o controlo **C-II** que irá ser utilizado nos ensaios biológicos para estes compostos, também se encontram dentro dos parâmetros estabelecidos, sendo que o valor mais disperso em relação aos restantes é o do clogP (-2,09), como foi referido anteriormente, podendo ser vantajoso.

As mesmas propriedades foram calculadas para os compostos finais mais lipofílicos, **C-5(a-c)**, **C-10(a-c)** e **C-III**, encontrando-se os resultados descritos na **Tabela 4.11.**

Tabela 4.11. Propriedades calculadas para os compostos finais **C-5(a-c)**, **C-10(a-c)** e **C-III**, usando o software Cheminformatics (<http://www.molinspiration.com>).

Composto	MM g mol ⁻¹	n _{APH}	n _{DPH}	n _{APH} + n _{DPH}	n _{rotb}	clogP	VM / Å ³	tPSA / Å ²
C-5a	458,56	9	2	11	10	0,53	432,23	108,05
C-10a						0,22		
C-5b	476,62					1,61	456,51	
C-10b						1,30		
C-5c	504,67					1,73	488,98	
C-10c						1,43		
C-III	357,41	9	1	10	10	- 0,87	334,38	105,25

Neste caso os compostos **C-5c** e **C-10c** ultrapassam o limite da massa molecular, sendo que o valor não é muito superior ao delimitado pelas regras referidas na **Tabela 4.10., secção 4.2.1.**

Por outro lado, verifica-se uma tendência dos compostos **C-5(a-c)** terem um valor de clogP mais elevado comparativamente aos obtidos para os compostos **C-10(a-c)**, o que permite concluir que os compostos **C-5(a-c)** poderão ter uma maior facilidade na absorção oral e na passagem através de membranas lipídicas existentes no organismo humano, uma vez que estes são mais hidrofóbicos.

Por fim, em relação ao valor obtido para a tPSA, este revela ser significativamente mais baixo que o obtido para os compostos **C-4(a-c)** e **C-9(a-c)** e ainda para o composto nativo GPE (130,83 Å² e 150,03 Å², respetivamente), sendo que uma descida deste valor já seria esperada uma vez que todos os grupos polares expostos foram mascarados. Apesar de o valor de referencia para esta propriedade ser os 140 Å², existem autores que revelam a necessidade de este valor ser mais baixo, por volta dos 90 Å², quando se trata do sistema nervoso central, ou seja, da passagem pela BBB.¹⁴⁶ Assim, tendo estes compostos um valor mais próximo dos 90 Å², é possível concluir que terão uma maior facilidade na passagem por estas membranas lipídicas, tendo assim uma grande vantagem perante o GPE e perante os restantes compostos sintetizados.

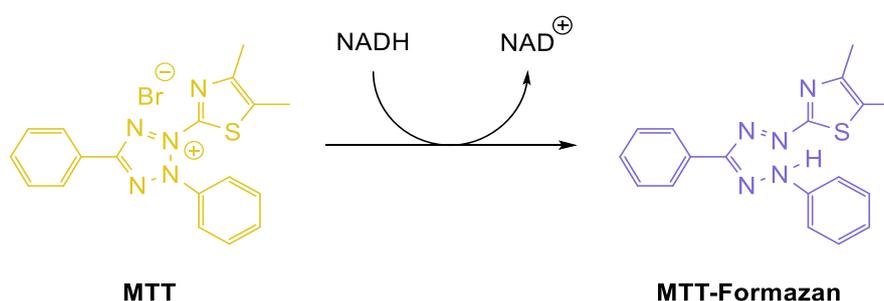
É importante também referir que as mesmas propriedades calculadas para um dos controlos que irá ser utilizado nos ensaios biológicos para estes compostos, ou seja, o composto **C-III**, também se encontram dentro dos parâmetros estabelecidos, sendo que o valor mais desfasado em relação aos restantes é o do clogP (-0,87), uma vez que é o único valor negativo obtido, contudo, este valor é próximo dos valores obtidos para **C-5a** e **C-10a**, uma vez que estão todos próximos de zero.

4.2.2. Ensaios *in vitro*

Resultados de MTT para os conjugados de GPE-aminoindano (compostos C-4a, C-5a, C-9a e C-10a, utilizando os controlos C-II, C-III, aminoindano (a) e o composto nativo GPE)

A atividade neuroprotetora dos compostos **C-4a**, **C-9a**, **C-5a** e **C-10a** (e os controlos **C-II**, **C-III**, **a** e GPE comercial do fornecedor *Bachem*) foi realizada em colaboração com o grupo de Neurodegeneração da Dra. Márcia Liz, do Instituto de Investigação e Inovação em Saúde da Universidade do Porto (i3S).

Deste modo, foi utilizada a linha celular CAD (*Cath.-a-differentiated*), sendo estas obtidas através de uma linha celular tumoral catecolaminérgica do SNC, e tendo a propriedade de serem capazes de reproduzir processos neuronais normais.¹⁴⁷ Utilizou-se, como agente neurotóxico, o H₂O₂, uma vez que este é fisiologicamente relevante (pois está presente no organismo humano) e simula o *stress* oxidativo pela formação de espécies reativas de oxigénio (ROS). Assim, para o efeito, as células foram incubadas na presença dos compostos a testar, a duas concentrações diferentes (50 µM e 100 µM), durante 24 horas. De seguida deu-se a adição de 1mM de H₂O₂ por 30 minutos. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), que se baseia na redução efetuada pelas células viáveis, do **MTT** (de cor amarela) transformando-o em **MTT-Formazan** (de cor púrpura), sendo este último um composto de cor púrpura com absorvância máxima próxima de 540 nm (**Esquema 4.37**).¹⁴⁸⁻¹⁴⁹



Esquema 4.37. Redução do MTT a MTT-Formazan.

Apesar de o mecanismo exato não ser conhecido, sabe-se que o mais provável é esta transformação ocorrer mediada por NADH ou moléculas redutoras semelhantes, e uma vez que as células mortas não possuem a capacidade de converter o MTT em MTT-Formazan, deste modo, a cor serve como marcador útil das células viáveis, podendo assim ser possível uma quantificação das mesmas.¹⁴⁸⁻¹⁴⁹

Os resultados obtidos na **Figura 4.19**. dizem respeito ao ensaio usando a concentração de 100 μM , uma vez que a 50 μM não se verificou quaisquer alterações significativas na viabilidade celular. Estes resultados foram analisados usando o teste *t* independente.

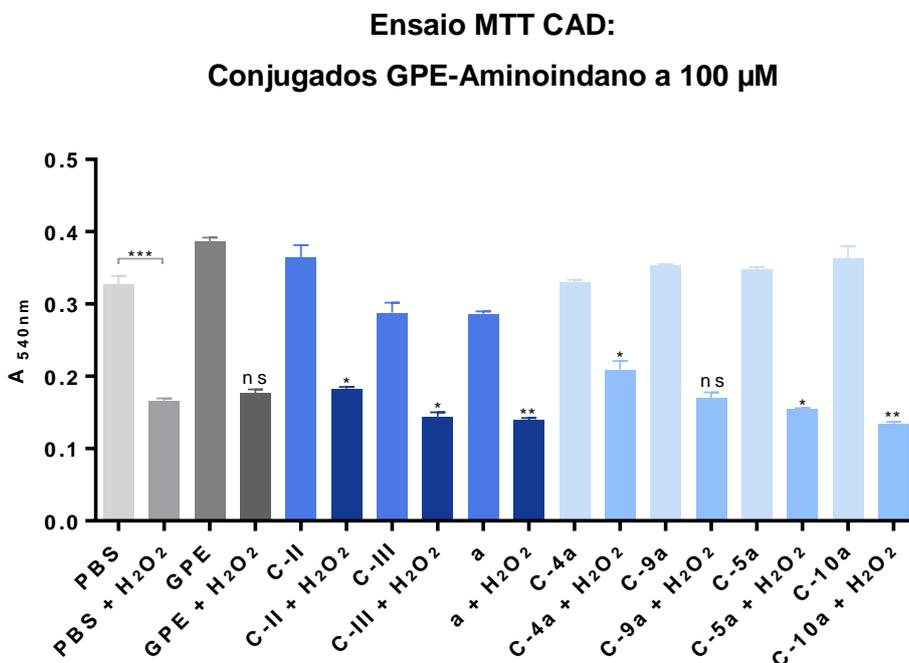


Figura 4.19. Resultados da absorvância obtida para os conjugados de GPE com aminoindano e respetivos controlos, a uma concentração de 100 μM , após ensaio biológico de MTT utilizando células CAD. ns: não estatístico (do inglês non-statistical); *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$ (relativamente ao controlo PBS + H₂O₂).

Neste ensaio, nenhum dos compostos testados apresenta neurotoxicidade significativa, pelo que é seguro conduzir as experiências nesta gama de concentrações.

Através da análise dos resultados obtidos para o controlo negativo (PBS), é possível verificar-se que o agente neurotóxico é capaz de induzir *stress* oxidativo de forma significativa ($P = 0,0005$) nas condições testadas.

Desta forma, aplicando as mesmas condições para os compostos sintetizados da família de conjugados do GPE-aminoindano e aos seus controlos, constatou-se que o controlo positivo de neuroprotecção (GPE + H₂O₂) não funcionou, uma vez que não se conseguiu reproduzir a neuroprotecção conferida pelo GPE comercial como descrito na literatura.⁵⁴

Relativamente aos compostos **C-II** e **C-4a**, após incubação com H₂O₂, verificou-se que estes apresentam um aumento significativo da viabilidade celular em 10 e 26 %, respetivamente, em comparação com a condição controlo positivo de toxicidade (PBS + H₂O₂).

Embora que, para o composto **C-9a** se verifique um aumento da viabilidade celular, este não é, contudo, significativo devido a uma elevada variabilidade ($P > 0,05$).

O conjugado **C-4a**, que resulta da funcionalização da cadeia lateral do glutamato na sequência do GPE com o aminoindano, parece sugerir um possível efeito sinérgico ao potenciar a viabilidade celular (incremento de 26 % face ao PBS + H₂O₂) dos respetivos controlos **C-II** (incremento 10 % face ao PBS + H₂O₂) e **a** (-16 % face ao PBS + H₂O₂).

Contudo, esta experiência constitui um resultado preliminar, uma vez que apenas foi realizado um ensaio ($n = 1$) e que o controlo positivo de neuroprotecção (GPE + H₂O₂) não funcionou, sendo assim necessário reproduzir os resultados obtidos neste ensaio e otimizar o método utilizado, de forma a inferir conclusões válidas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS / PERSPETIVAS

Este trabalho iniciou-se pela funcionalização dos glutamatos com as aminas bioativas aminoindano (**a**), amantadina (**b**) e memantina (**c**) através de uma metodologia de acoplamento peptídico em solução utilizando TBTU como agente de acoplamento e DIEA como base terciária. Assim, foram usados os glutamatos comerciais adequados (**Boc-Glu(OH)-OMe** e **Boc-Glu(OMe)-OH**) e as aminas referidas anteriormente, obtendo-se os compostos **C-1(a-c)** e **C-6(a-c)** com ótimos rendimentos (89 – 95%). A remoção acidolítica do grupo Boc destes compostos permitiu obter os glutamatos **C-2(a-c)** e **C-7(a-c)** com rendimentos de 97 – 98%, sendo que, globalmente, a metodologia de síntese dos glutamatos funcionalizados comprovou ser bastante eficaz.

A introdução dos restantes aminoácidos (glicina e prolina) aos glutamatos **C-2(a-c)** e **C-7(a-c)** para a síntese dos conjugados **C-3(a-c)** e **C-8(a-c)**, foi efetuada através de uma metodologia *one-pot* previamente estabelecida que permitiu efetuar dois acoplamentos no mesmo reator de uma forma quimioseletiva. Este método revelou ser bastante vantajoso para o desenvolvimento destes conjugados uma vez que não são necessárias purificações intermediárias ou introdução/remoção de grupos protetores. Adicionalmente, este método assegura a pureza ótica dos péptidos, não causando epimerização significativa e ainda permite poupar reagentes (como por exemplo, DIEA). Pela aplicação desta metodologia obteve-se os compostos **C-3(a-c)**, **C-8(a-c)** e **C-I** com rendimentos satisfatórios (51 – 70%). Embora esteja descrito rendimentos na ordem dos 80 – 95% usando este método *one-pot*, os rendimentos aqui apresentados são ligeiramente inferiores aos reportados. Tal facto poderá estar associado a um maior impedimento estereoquímico no acoplamento dos respetivos glutamatos funcionalizados com estas aminas, causando uma diminuição na eficácia destes acoplamentos. Isto pode ser também confirmado pela competição entre dois nucleófilos distintos: o HOSu (gerado no primeiro acoplamento) e os glutamatos funcionalizados **C-2(a-c)** e **C-7(a-c)**, verificando-se a presença de um produto secundário, o dipéptido Boc-Gly-Pro-OSu. Este efeito foi mais notório para as famílias da amantadina e memantina (de notar que estas aminas são mais volumosas), que apresentaram maior formação deste produto secundário.

Para a obtenção dos conjugados finais **C-4(a-c)** e **C-9(a-c)** e do controlo **C-II** foi necessário realizar uma reação de desproteção (remoção acidolítica do grupo Boc), tendo-se obtido ótimos rendimentos (93 – 98%), que são comuns neste tipo de reação usando ATA.

Para a obtenção dos compostos finais **C-5(a-c)** e **C-10(a-c)** e do controlo **C-III** que apresentam a amina da glicina dimetilada, foi realizada uma reação de aminação redutiva utilizando os conjugados **C-4(a-c)** e **C-9(a-c)** e o controlo **C-II** na presença de formaldeído e STAB, tendo-se obtido bons rendimentos (60 – 75%). Para a preparação

dos compostos **C-5(a-c)**, **C-10(a-c)** e **C-III** foi desenvolvido um novo método mais eficaz de tratamento/purificação, tendo-se assim diminuído as perdas inerentes a outros tipos de tratamento (como as extrações líquido-líquido).

Deste modo, para os conjugados do GPE com o aminoindano **C-4a**, **C-5a**, **C-9a** e **C-10a** foram alcançados rendimentos globais de 63, 45, 60 e 42%, respetivamente. Relativamente aos conjugados do GPE com a amantadina, **C-4b**, **C-5b**, **C-9b** e **C-10b** estes foram obtidos com um rendimento global de 59, 43, 56 e 42%, respetivamente. Por fim, para os conjugados do GPE com a memantina, designadamente **C-4c**, **C-5c**, **C-9c** e **C-10c**, foram obtidos rendimentos globais de 61, 38, 41 e 25%, respetivamente (é de referir que os rendimentos globais dos compostos **C-4c** e **C-5c** foram calculados considerando um rendimento de 70% para a síntese do composto **C-3c**, tendo-se tido em conta os rendimentos obtidos para os compostos em que se realizou a mesma reação, ou seja **C-3(a-b)**). Relativamente a estes conjugados finais anteriormente referidos, deduz-se ainda que o aumento da lipofilicidade dos compostos causada pela introdução das aminas lipofílicas e da proteção dos grupos polares expostos utilizando o grupo metilo permitiu melhorar algumas propriedades farmacocinéticas comparativamente ao composto nativo GPE, nomeadamente o $\log P$ e a tPSA, proporcionando assim, de acordo com a previsão efetuada, uma maior permeabilidade através da BBB e um aumento da biodisponibilidade.

Ainda, respetivamente aos controlos **C-II** e **C-III** sintetizados para serem utilizados nos ensaios biológicos, estes foram alcançados de forma eficaz com rendimentos globais de 59 e 40%, respetivamente.

É possível concluir que, genericamente, na síntese dos conjugados (e em qualquer passo ao longo da rota sintética) em que quando o glutamato está funcionalizado na cadeia lateral (em comparação com a funcionalização na posição- α) obteve-se rendimentos superiores. Esta preferência pode ser causada pelo impedimento estereoquímico menos evidente quando a amina bioativa se encontra na cadeia lateral do glutamato.

No que diz respeito aos testes biológicos realizados para os conjugados GPE-aminoindano e seus controlos, os resultados indicam que estes compostos não apresentam neurotoxicidade em células da linha celular CAD, a uma concentração de 100 μM . Nesta família de compostos, o conjugado **C-4a** revelou ser bastante promissor uma vez que aumentou a viabilidade celular em 26%, relativamente à condição PBS + H_2O_2 . Ainda assim, é necessário efetuar um número significativo de repetições ($n = 3$) para ser possível corroborar os resultados preliminares obtidos.

Foi possível ainda, realizar o estudo em paralelo de novas metodologias de resolução da 1-MeTIQ com o objetivo de, posteriormente, sintetizar mais uma família de conjugados do GPE com o enantiómero mais ativo desta amina. Para o efeito inúmeros agentes de resolução foram usados, tendo-se verificado que o ácido (1S)-canfor-sulfónico foi o que apresentou melhores resultados, através da formação de um sal diastereoisomérico que, após tratamento e derivatização com o ácido de Mosher, a amina obtida apresentou um $ee = 70\%$ (determinado por ^{19}F -RMN).

Contudo, uma vez que se trata de um projeto em desenvolvimento, é necessário averiguar um tratamento mais eficaz para obter a 1-MeTIQ enantioméricamente pura, uma vez que a base utilizada (LiOH) pode ser bastante forte e causar epimerização com consequente diminuição da pureza ótica da 1-MeTIQ isolada. Ainda assim, e apesar de ao que tudo indica, não se ter isolado o enantiómero mais ativo desta amina, deduz-se que é necessário continuar a investir na resolução da amina 1-MeTIQ uma vez que esta tem aplicação médica, mais concretamente na DP e que, os resultados obtidos até ao momento representam grande avanço neste sentido.

Em suma, os objetivos principais deste trabalho foram cumpridos tendo-se realizado três famílias de conjugados do GPE totalizando 12 conjugados finais, 6 deles com *N*-terminal livre e outros 6 com amina *N*-dimetilada.

Até ao momento encontram-se a decorrer os restantes ensaios biológicos (para as famílias da amantadina e memantina) sendo que após estes resultados, como perspetiva futura ambiciona-se ainda testar os conjugados aqui descritos utilizando outros tipos de insultos neurotóxicos, como por exemplo a 6-OHDA, uma vez que os resultados podem também ser bastante interessantes, tendo em conta que este agente neurotóxico é capaz de induzir parkinsonismo e, portanto, é útil no estudo da DP.

Adicionalmente pretende-se ainda estudar a estabilidade dos conjugados que apresentarem melhor perfil neuroprotetor em plasma humano, de forma a compreender se a ligação GPE-amina neuroprotetora é lábil o suficiente para permitir uma libertação controlada das mesmas e, assim, possibilitar usar o GPE como veículo destas aminas.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. SÍNTESE ORGÂNICA

6.1.1. Aspetos gerais

1. Os reagentes comerciais (**Tabela 6.1.**) foram utilizados sem purificação prévia.

Tabela 6.1. Lista de reagentes utilizados.

Reagentes	Fornecedor	CAS
Boc-Glu(OH)-OMe	<i>Fluorochem</i>	72086-72-7
Boc-Glu(OMe)-OH	<i>Fluorochem</i>	45214-91-3
H-Glu(OMe)-OMe · HCl	<i>Bachem</i>	23150-65-4
H-Pro-OH	<i>Merk</i>	147-85-3
Boc-Gly-OSu	<i>Fluorochem</i>	3392-07-2
(<i>R</i>)-1-aminoindano	<i>Alfa Aesar</i>	10277-74-4
Amantadina · HCl	<i>Fluorochem</i>	665-66-7
Memantina	<i>Acros Organics</i>	41100-52-1
<i>N,N</i> -diisopropil- <i>N</i> -etilamina	<i>VWR</i>	7087-68-5
Trietilamina	<i>Fluorochem</i>	554-68-7
Tetrafluorborato de <i>O</i> -benzotriazoliltetrametilurónio	<i>Bachem</i>	125700-67-6
Formaldeído	<i>Fisher Scientific</i>	7732-18-5
Triacetoxiboro-hidreto de sódio	<i>Sigma-Aldrich</i>	56553-60-7
Cloreto de (<i>S</i>)-(+)-10-cânfor-sulfonilo	<i>Sigma-Aldrich</i>	21286-54-4
1-metil-1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolina	<i>Fluorochem</i>	4965-09-7
(<i>S</i>)-(-)- α -metoxi- α -trifluorometilfenilacético	<i>Fluorochem</i>	17257-71-5
Ácido trifluoroacético	<i>VWR</i>	76-05-1
Hidróxido de Lítio	<i>Acros Organics</i>	1310-65-2

2. Os solventes utilizados são das marcas *Sigma Aldrich* e *Fischer*.
3. Todas as reações foram acompanhadas através da técnica de cromatografia em camada fina (TLC), utilizando-se placas de alumínio recobertas com gel de sílica *Merk* tipo 60 F₂₅₄ sensíveis à radiação ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm. Os cromatogramas foram revelados por irradiação por UV (lâmpada UV: VOO 7752 da *Vilben Lourmat*) e, em solução etanólica de ácido fosfomolibdico, a quente. As manchas reveladas por estes métodos apresentam diferentes colorações.
4. Os rendimentos apresentados referem-se aos compostos finais obtidos após purificação.
5. Os compostos obtidos foram purificados utilizando a técnica de cromatografia líquida de adsorção em coluna de vidro. A fase estacionária utilizada foi uma matriz de gel de

sílica 60 Å da *Scharlau* (granulometria 0.04 – 0.06 mm, pH = 7, superfície mássica 550 m² / g), que foi previamente suspensa no eluente a utilizar. A eluição e recolha das frações de eluato foram realizadas manualmente. As fases móveis utilizadas são referidas em cada síntese.

6. Os solventes foram eliminados sob pressão reduzida num evaporador rotativo modelo *Büchi Heating Bath B-490*.

7. Os pontos de fusão foram determinados num aparelho de marca *Stuart Scientific Bibby* e não foram corrigidos.

8. Os valores da rotação específica, $[\alpha]_D^T$, foram determinados no polarímetro de marca *Jasco* e modelo P-2000.

9. Todos os compostos foram analisados através de ressonância magnética nuclear de protão e de carbono-13 para comprovar que foi sintetizado o composto pretendido, com a exceção do composto **(S,R/S)-C-2d** que foi analisado apenas através de ressonância magnética nuclear de fluor-19.

10. Os dados de Ressonância Magnética Nuclear de protão, de carbono-13 e fluor-19 (¹H-RMN, ¹³C-RMN e ¹⁹F-RMN, respetivamente) foram registados no CEMUP (Centro de Materiais da Universidade do Porto) num aparelho *Bruker Avance III 400* operando a 400 MHz (¹H-RMN), a 101 MHz (¹³C-RMN) e a 377 MHz (¹⁹F-RMN). As análises espectroscópicas foram efetuadas à temperatura ambiente em CDCl₃ ou CD₃OD, usando o sinal do TMS e/ou do próprio solvente parcialmente não deuterado como referência interna.

11. A concentração necessária da amostra decorreu da abundância isotópica do núcleo de interesse para investigação. O volume típico das amostras utilizadas foi de cerca de 600 µL e as amostras foram analisadas encapsuladas em tubos de quartzo (4 mm diâmetro por 140 mm comprimento).

12. Os dados referentes aos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de protão encontram-se especificados do seguinte modo: ¹H-RMN (solvente deuterado utilizado, intensidade do campo magnético em MHz, existência de rotâmeros e a sua proporção) – δ H (desvio-químico em ppm), multiplicidade do sinal (s: singlete, sl: singlete largo, d: duplete, dd: duplo duplete, ddd: duplo de duplo duplete, dtd: duplo triplo de duplete, dp: duplo penteto, t: tripleto, q: quarteto, m: multiplete), rotâmero maioritário (*major*) / minoritário (*minor*) se estiverem presentes e/ou forem possíveis de identificar, área relativa do sinal (nH-m, em que n = número de protões e m = n.^o do protão na molécula), constante de acoplamento (*J*, em Hertz), localização do protão na molécula.

13. Os dados referentes aos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13 (¹³C-RMN) encontram-se especificados do seguinte modo: ¹³C-RMN (solvente

deuterado utilizado, intensidade do campo magnético em MHz, existência de rotâmeros) – δ C (desvio químico em ppm), localização do átomo de carbono na molécula e indicando os carbonos quaternários como Cq.

14. Os dados referentes aos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de fluor-19 (^{19}F -RMN) encontram-se especificados do seguinte modo: ^{19}F -RMN (solvente deuterado utilizado, intensidade do campo magnético, em MHz) – δ F (desvio químico em ppm), multiplicidade do sinal (s: singleto), CF_3 , *major* ou *minor*.

15. A nomenclatura utilizada para a localização dos prótons e/ou átomos de carbono nas cadeias peptídicas para efeitos de RMN (**Figura 6.1.**) foi efetuada de acordo a identificação do resíduo de α -aminoácido através do sistema de uma letra (**G**: glicina; **P**: L-prolina; **E**: ácido L-glutâmico) em subscrito, com indicação do próton (ou grupo de prótons) e do carbono respetivo iniciando a numeração da cadeia principal para cada resíduo de α -aminoácido no carbono do seu grupo carbonilo. Para as aminas neuroprotetoras e derivado da cânfora, utilizou-se a numeração seguinte: **a**: (*R*)-1-aminoindano; **b**: amantadina; **c**: memantina; **d**: 1-metil-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina; **cânf**: cloreto de (1*S*)-(+)-10-cânfor-sulfonilo.

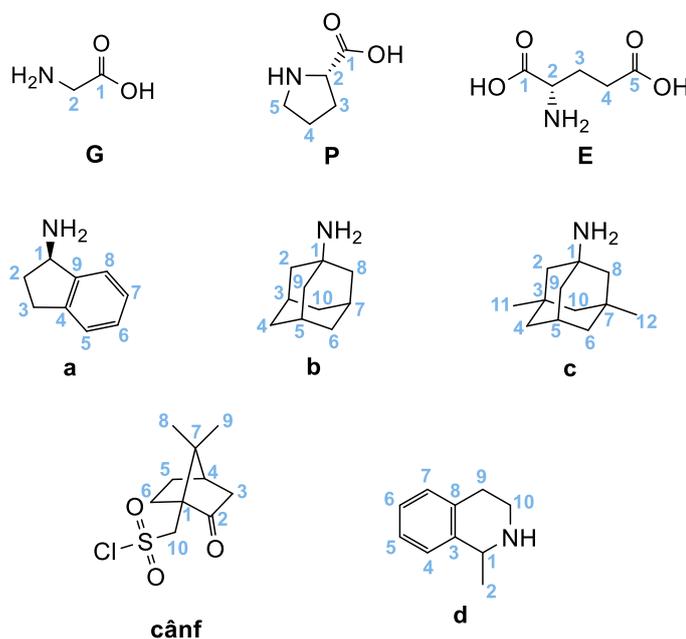
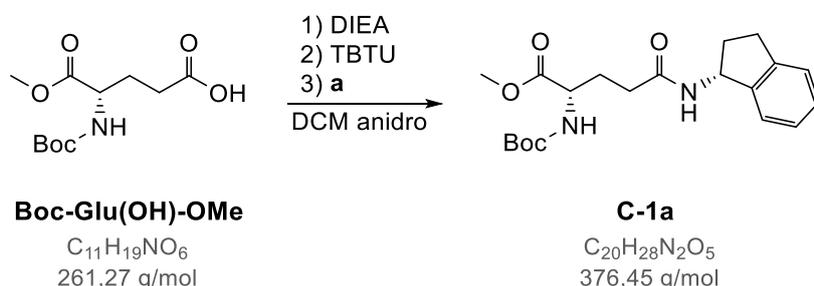


Figura 6.1. Numeração tida em conta para a atribuição dos prótons e carbonos nas análises de RMN efetuadas.

6.1.2. Síntese dos conjugados de GPE com Aminoindano

6.1.2.1. Síntese do Boc-Glu(Aminoindano)-OMe (C-1a)



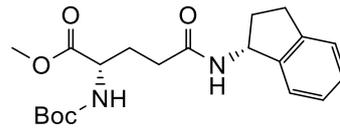
Num balão de fundo redondo dissolveu-se **Boc-Glu(OH)-OMe** (0,4910 g; 1,879 mmol) em DCM anidro (30 mL) sob atmosfera de Ar. Adicionou-se DIEA (0,982 mL; 5,64 mmol) e de seguida, adicionou-se TBTU (0,6640 g; 2,068 mmol). Após 15 minutos adicionou-se a amina **a** (0,3002 g; 2,254 mmol), deixando-se reagir, sob agitação magnética durante 2 horas.

Eliminou-se o solvente a pressão reduzida, em seguida adicionou-se AcOEt, transferiu-se a solução para uma ampola de decantação e lavou-se a fase orgânica com solução saturada de $NaHCO_3$ (3 x 20 mL). Secou-se a fase orgânica com adição de Na_2SO_4 anidro, filtrou-se (por gravidade utilizando um funil e algodão) o Na_2SO_4 e concentrou-se *in vacuo*. O óleo obtido foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna de gel de sílica usando AcOEt como eluente, obtendo-se 0,6720 g do composto **C-1a**. Rendimento: 95 %.

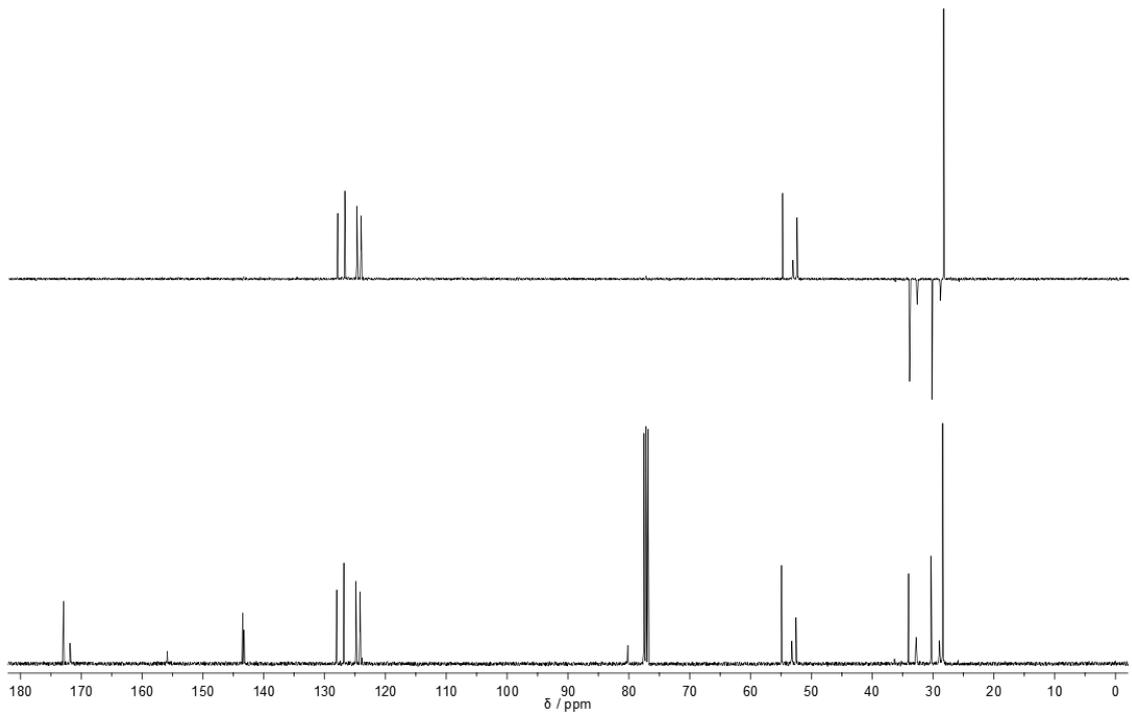
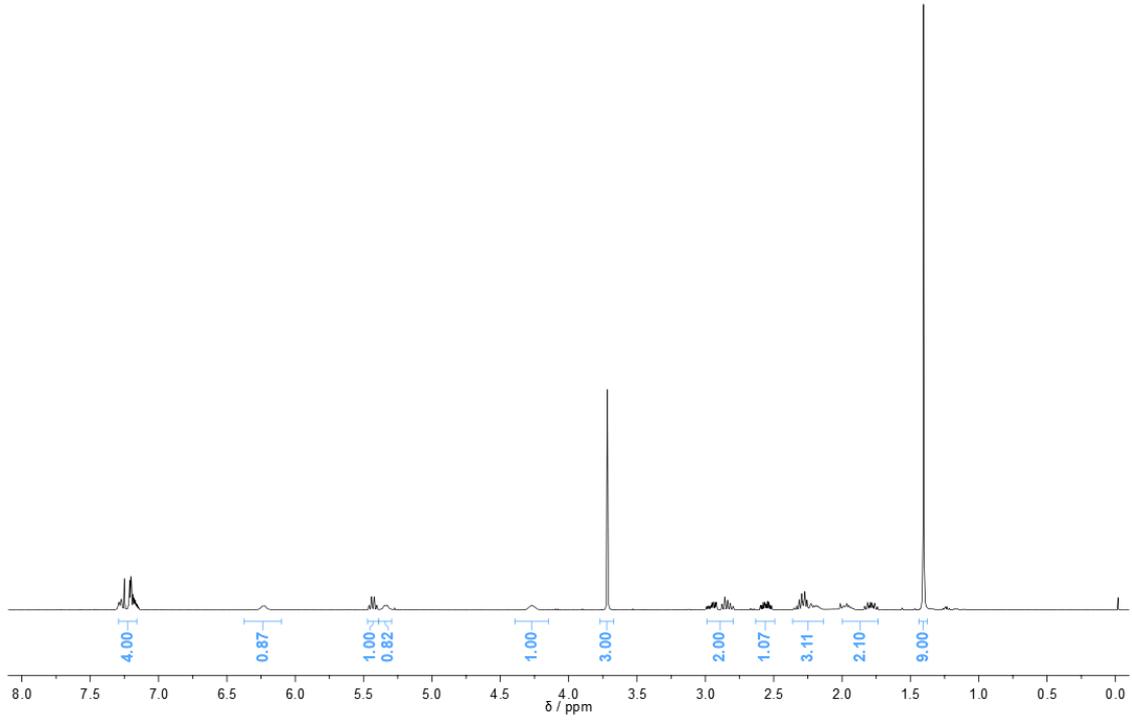
Aspeto	R_f	p.f.	$[\alpha]_D^{18}$
sólido castanho	0,79 em AcOEt	120 – 122 °C	$-655,4 \pm 0,1$ (c1, $CHCl_3$)

1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ ppm: 7.30 – 7.14 (m, 4H, $H_{a-5} + H_{a-6} + H_{a-7} + H_{a-8}$); 6.23 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, OCONH); 5.43 (q, $J = 7.7$ Hz, 1H, H_{a-1}); 5.34 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, CONH); 4.27 (sl, 1H, H_{E-2}); 3.72 (s, 3H, $COOCH_3$); 3.00 – 2.81 (m, 2H, H_{a-3}); [2.56 (dtd, $J = 12.8, 7.9, 4.0$ Hz, 1H), 2.36 – 2.16 (m, 3H), $H_{a-2} + H_{E-3}$]; 2.00 – 1.73 (m, 2H, H_{E-4}); 1.40 (s, 9H, $(CH_3)_3$).

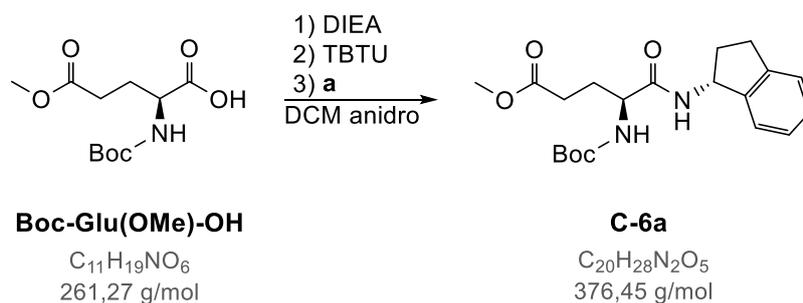
^{13}C -RMN e DEPT ($CDCl_3$, 101 MHz) δ ppm: [172.90 (Cq), 171.81 (Cq), $C_{E-1} + C_{E-5}$]; 155.85 (Cq, $OCONH$); [143.46 (Cq), 143.23 (Cq), $C_{a-4} + C_{a-9}$]; [128.02 (CH), 126.83 (CH), 124.85 (CH), 124.17 (CH), $C_{a-5} + C_{a-6} + C_{a-7} + C_{a-8}$]; 80.16 (Cq, $C(CH_3)_3$); [54.89, 53.20, 52.51 (2 x CH + CH_3), $C_{a-1} + C_{E-2} + COOCH_3$]; [34.04 (CH_2), 32.78 (CH_2), 30.32 (CH_2), 28.94 (CH_2), $C_{a-2} + C_{a-3} + C_{E-3} + C_{E-4}$]; 28.40 (3 x CH_3 , $C(CH_3)_3$).



C-1a



6.1.2.2. Síntese do Boc-Glu(OMe)-Aminoindano (C-6a)



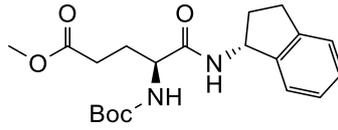
Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-1a** (secção 6.1.2.1.), procedeu-se ao acoplamento entre **Boc-Glu(OMe)-OH** (0,4923 g; 1,884 mmol) e a amina **a** (0,3011 g; 2,261 mmol), utilizando DIEA (0,984 mL; 5,65 mmol) e TBTU (0,6654 g; 2,072 mmol), deixando-se reagir durante 2 horas após a adição do último componente. Em seguida, procedeu-se ao tratamento idêntico ao realizado para o composto **C-1a**.

O óleo obtido foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna de gel de sílica usando AcOEt como eluente, obtendo-se 0,6454 g do composto **C-6a**. Rendimento: 91 %.

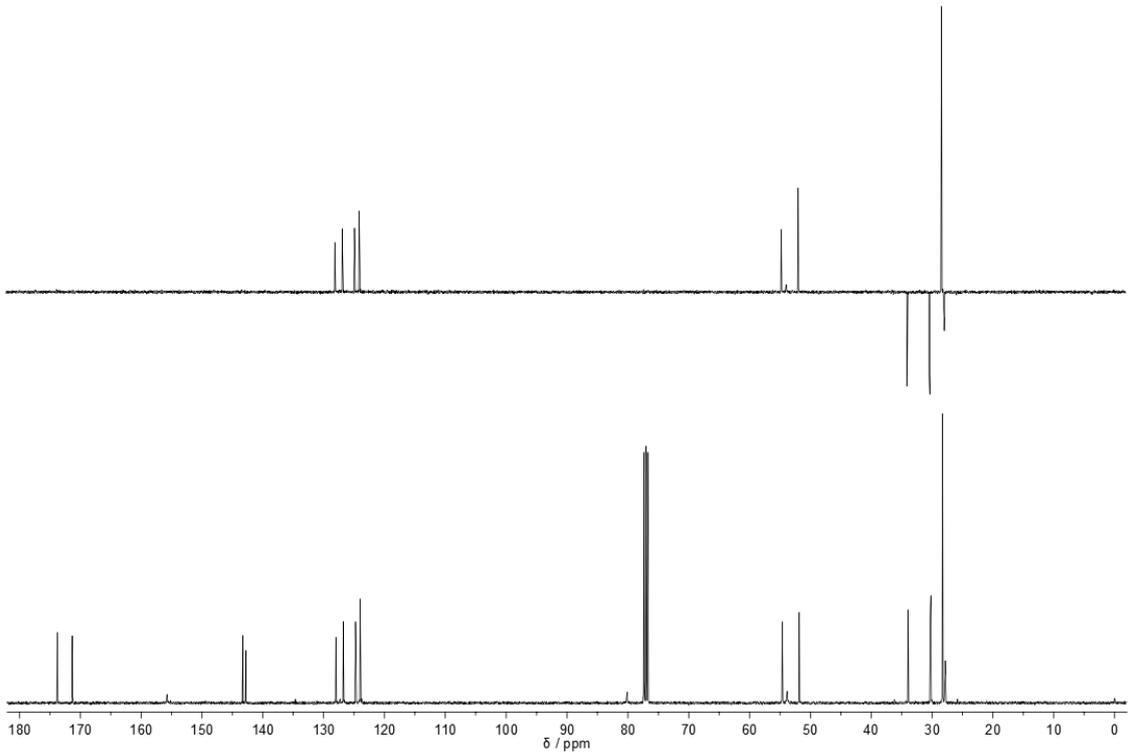
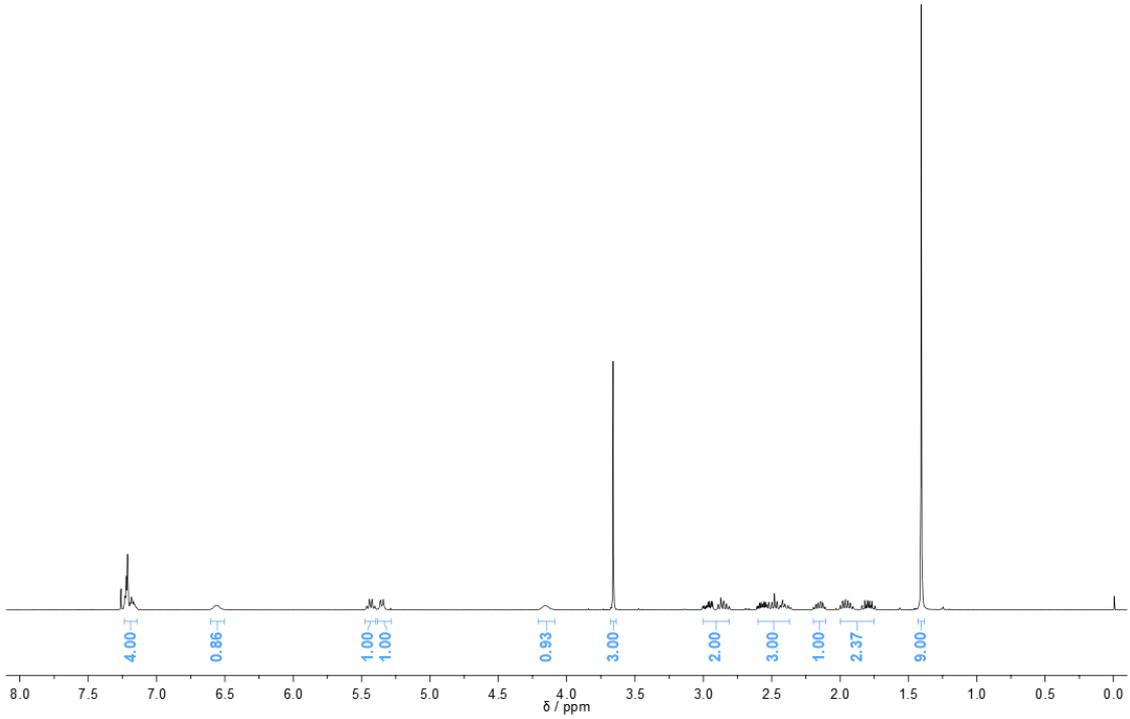
Aspeto	R _f	p.f.	[α] _D ¹⁹
sólido castanho claro	0,84 em AcOEt	96 – 98 °C	– 24,0 ± 0,1 (c1, CHCl ₃)

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 7.26 – 7.12 (m, 4H, H_a-5 + H_a-6 + H_a-7 + H_a-8); 6.56 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, OCONH); 5.43 (q, *J* = 7.8 Hz, 1H, H_a-1); 5.35 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, CONH); 4.15 (s, 1H, H_E-2); 3.66 (s, 3H, COOCH₃); 3.02 – 2.77 (m, 2H, H_a-3); [2.64 – 2.35 (m, 3H); 2.15 (dtd, *J* = 12.7, 7.3, 5.5 Hz, 1H), H_a-2 + H_E-3]; 1.99 – 1.73 (m, 2H, H_E-4); 1.41 (s, 9H, C(CH₃)₃).

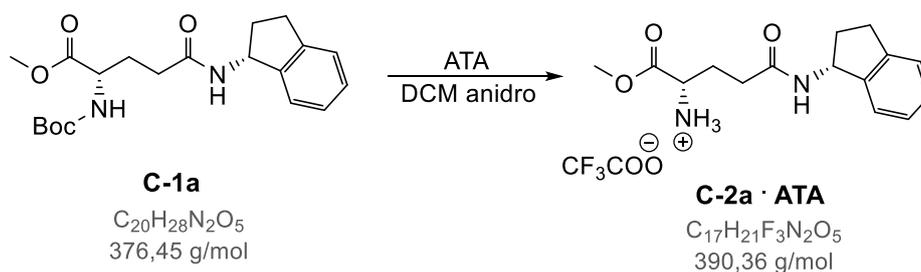
¹³C-RMN e DEPT (CDCl₃, 101 MHz) δ ppm: [173.88 (Cq), 171.39 (Cq), C_E-1 + C_E-5]; 155.84 (Cq, OCONH); [143.40 (Cq), 142.92 (Cq), C_a-4 + C_a-9]; [128.10 (CH), 126.88 (CH), 124.87 (CH), 124.11 (CH), C_a-5 + C_a-6 + C_a-7 + C_a-8]; 80.23 (Cq, C(CH₃)₃); [54.74, 53.93, 51.94 (2 x CH + CH₃), C_a-1 + C_E-2 + COOCH₃]; [34.05 (CH₂), 30.42 (CH₂), 30.32 (CH₂), 28.39 (CH₂), C_a-2 + C_a-3 + C_E-3 + C_E-4]; 27.95 (3 x CH₃, C(CH₃)₃).



C-6a



6.1.2.3. Síntese do H-Glu(Aminoindano)-OMe (C-2a)

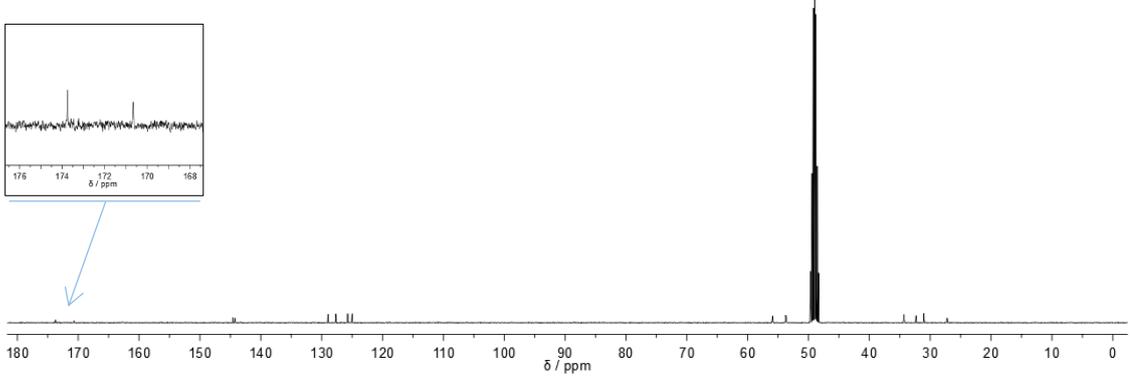
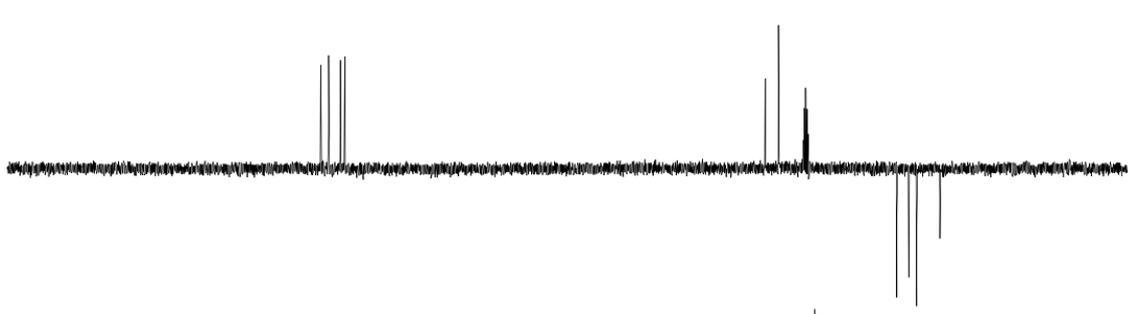
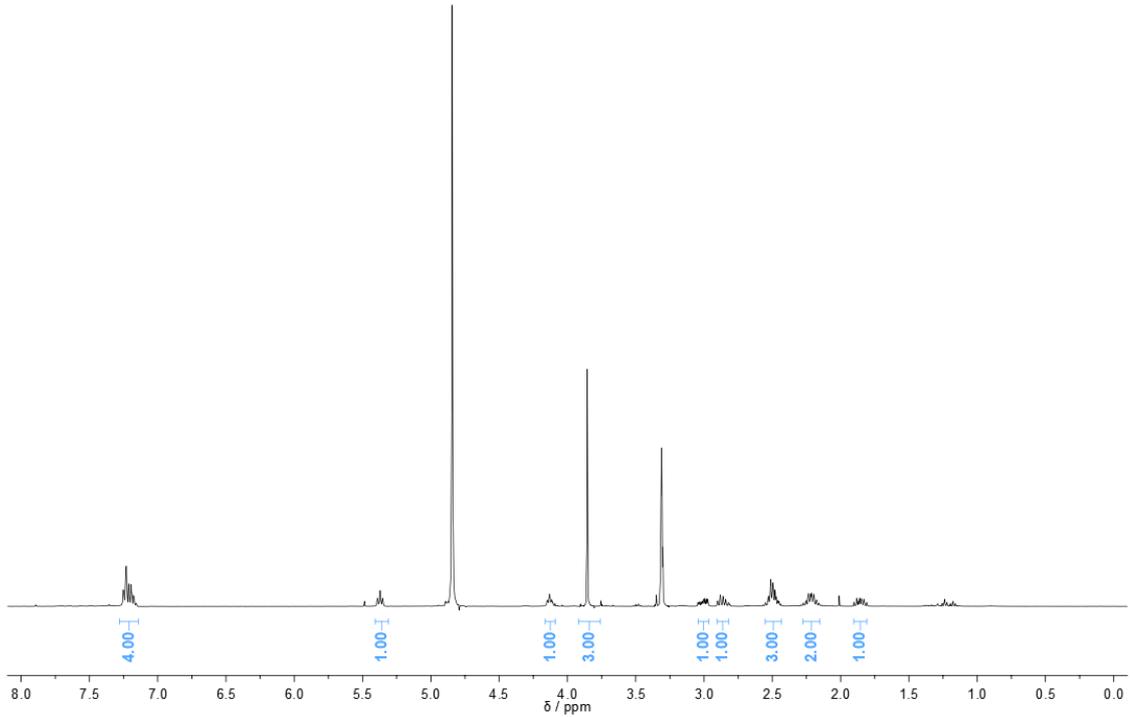
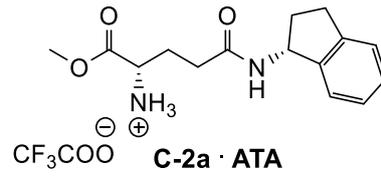


Dissolveu-se o composto **C-1a** (0,6441 g; 1,711 mmol) em DCM anidro (30 mL) e de seguida, adicionou-se ATA (3,95 mL; 51,3 mmol) deixando-se em agitação magnética durante cerca de 1 hora. Eliminou-se o ATA a pressão reduzida, tendo-se obtido 0,6479 g do composto **C-2a**. Rendimento: 97 %.

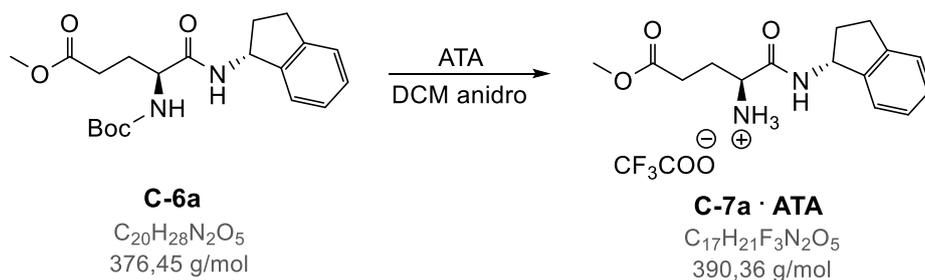
Aspeto	R _f	[α] _D ¹⁷
óleo castanho	0,70 em AcOEt	+ 35,6 ± 0,2 (c1, CHCl ₃)

¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ ppm: 7.28 – 7.14 (m, 4H, H_a-5 + H_a-6 + H_a-7 + H_a-8); 5.37 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H_a-1); 4.15 – 4.09 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, H_E-2); 3.85 (s, 3H, COOCH₃); 3.01 (m, 1H, H_a-3); 2.85 (m, 1H, H_a-3); [2.58 – 2.42 (m, 3H), 2.22 (dp, *J* = 14.6, 6.9 Hz, 2H), 1.85 (ddd, *J* = 16.0, 12.8, 8.2 Hz, 1H), H_a-2 + H_E-3 + H_E-4].

¹³C-RMN e DEPT (CD₃OD, 101 MHz) δ ppm: [173.75 (Cq), 170.66 (Cq), C_E-1 + C_E-5]; [144.56 (Cq), 144.21 (Cq), C_a-4 + C_a-9]; [128.96 (CH), 127.65 (CH), 125.72 (CH), 124.99 (CH), C_a-5 + C_a-6 + C_a-7 + C_a-8]; [55.93, 53.74, 53.67, (2 x CH + CH₃), C_a-1 + C_E-2 + COOCH₃]; [34.31 (CH₂), 32.34 (CH₂), 31.04 (CH₂), 27.22 (CH₂), C_a-2 + C_a-3 + C_E-3 + C_E-4].



6.1.2.4. Síntese do H-Glu(OMe)-Aminoindano (C-7a)

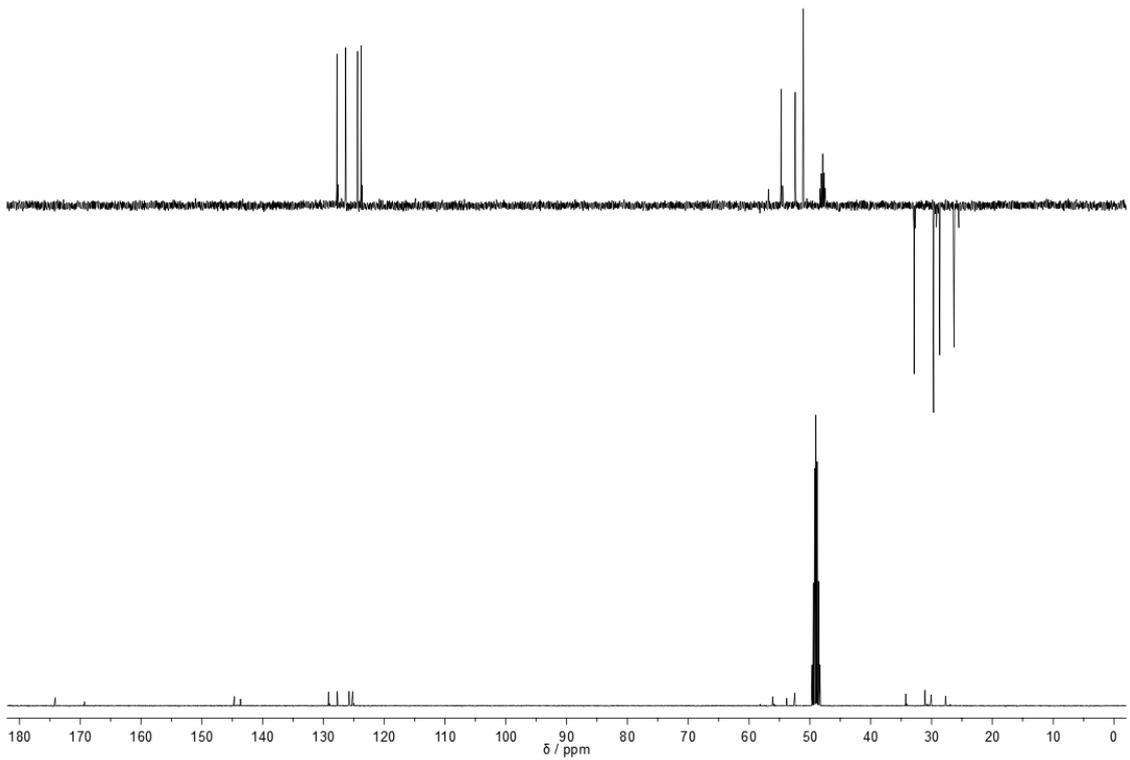
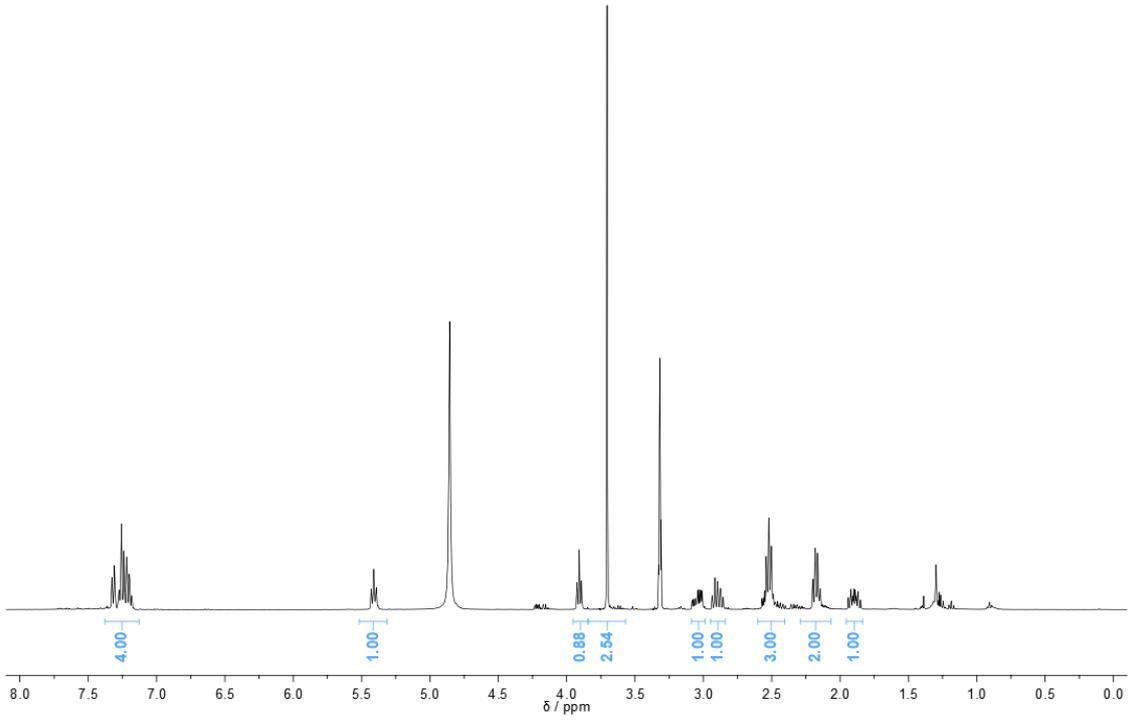
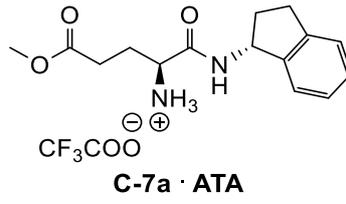


Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-2a** (secção 6.1.2.3.) procedeu-se à remoção acidolítica do grupo Boc do composto **C-6a** (0,6173 g; 1,640 mmol) com ATA (3,79 mL; 49,2 mmol), tendo-se obtido 0,6274 g do composto **C-7a**. Rendimento: 98 %.

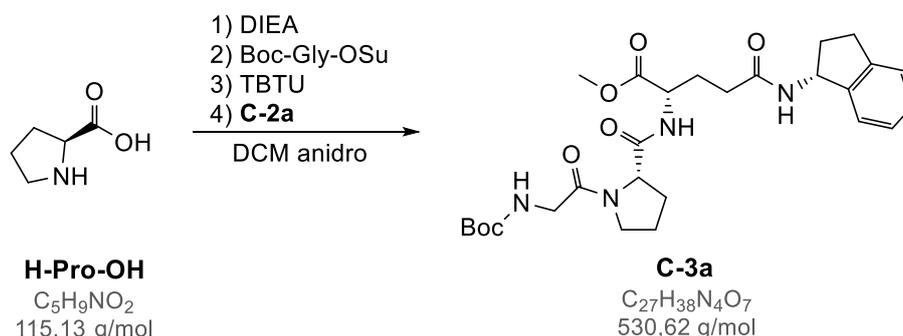
Aspetto	R_f	$[\alpha]_D^{21}$
óleo castanho	0,65 em AcOEt	+ 60,9 ± 0,3 (c1, CHCl ₃)

¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ ppm: 7.37 – 7.11 (m, 4H, H_a-5 + H_a-6 + H_a-7 + H_a-8); 5.41 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H_a-1); 3.91 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H, H_E-2); 3.70 (s, 3H, COOCH₃); 3.04 (ddd, $J = 15.9, 8.7, 4.3$ Hz, 1H, H_a-3); 2.90 (m, 1H, H_a-3); [2.62 – 2.41 (m, 3H); 2.30 – 2.07 (m, 2H); 1.97 – 1.83 (m, 1H), H_a-2 + H_E-3 + H_E-4].

¹³C-RMN e DEPT (CD₃OD, 101 MHz) δ ppm: [174.08 (Cq), 169.30 (Cq), C_E-1 + C_E-5]; [144.64 (Cq), 143.67 (Cq), C_a-4 + C_a-9]; [129.17 (CH), 127.72 (CH), 125.78 (CH), 125.19 (CH), C_a-5 + C_a-6 + C_a-7 + C_a-8]; [56.14, 53.79, 52.47 (2 x CH + CH₃), C_a-1 + C_E-2 + COOCH₃]; [34.27 (CH₂), 31.06 (CH₂), 30.04 (CH₂), 27.70 (CH₂), C_a-2 + C_a-3 + C_E-3 + C_E-4].



6.1.2.5. Síntese do Boc-Gly-Pro-Glu(Aminoindano)-OMe (C-3a)



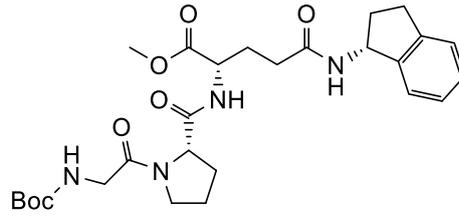
Num balão de fundo redondo dissolveu-se **H-Pro-OH** (0,1521 g; 1,321 mmol) em DCM anidro (30 mL) sob atmosfera de Ar. Adicionou-se DIEA (0,690 mL; 3,96 mmol) e, após 15 minutos adicionou-se o aminoácido pré-ativado Boc-Gly-OSu (0,3956 g; 1,453 mmol), deixando-se em agitação magnética aproximadamente durante 12 horas. Em seguida, adicionou-se TBTU (0,4666 g; 1,453 mmol) e, após 30 minutos, **C-2a** (0,6188 g; 1,585 mmol), deixando-se reagir por mais 2h.

Realizou-se o tratamento habitual, obtendo-se, 0,4907 g do composto **C-3a**.
Rendimento: 70 %.

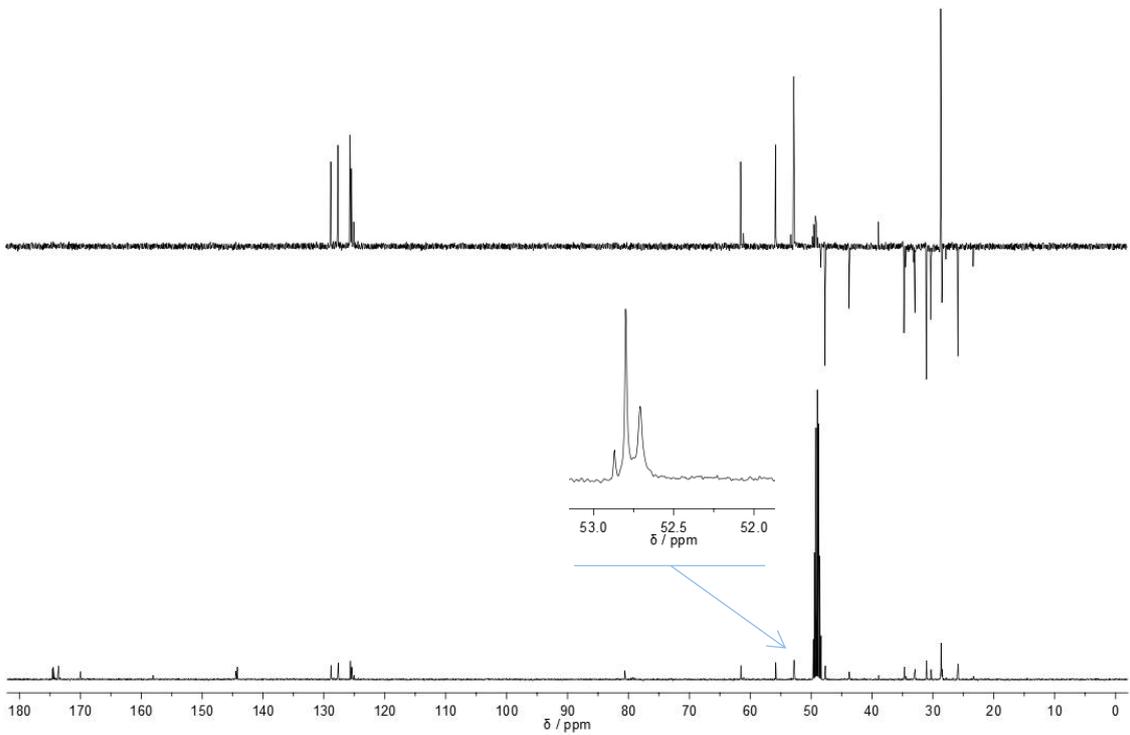
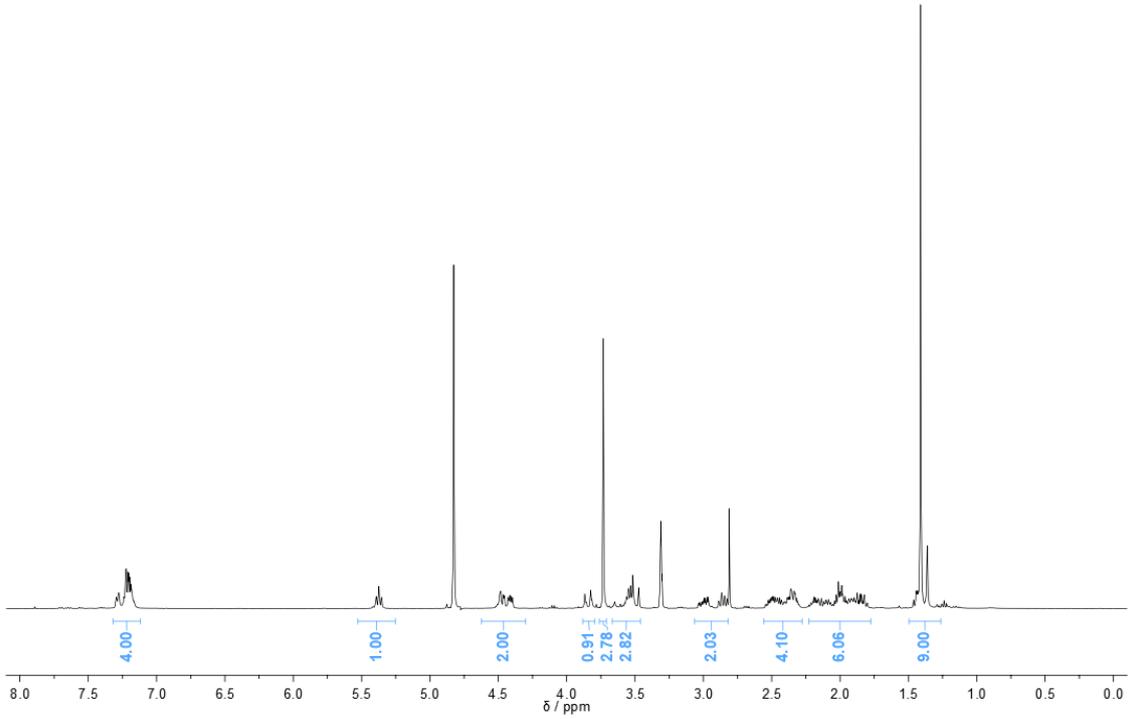
Aspetto	R _f	p.f.	[α] _D ¹⁵
sólido castanho claro	0,70 em DCM/MeOH (9:1)	43 – 45 °C	– 22,0 ± 0,3 (c1, CHCl ₃)

¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros 85:15): 7.34 – 7.11 (m, 4H, H_a-5 + H_a-6 + H_a-7 + H_a-8); 5.37 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H_a-1); 4.53 – 4.30 (m, 2H, H_E-2 + H_P-2); 3.85 (dd, *J* = 16.9, 3.9 Hz, 1H, H_G-2); 3.73 (s, 3H, COOCH₃); 3.58 – 3.46 (m, 3H, H_G-2 + 2H_P-5); 3.00 – 2.75 (m, 2H, H_a-3); 2.56 – 2.28 (m, 4H, H_P-3 + H_a-2); 2.24 – 1.78 (m, 6H, H_P-4 + H_E-3 + H_E-4); [1.41 (s, *major*), 1.36 (s, *minor*), 9H, C(CH₃)₃].

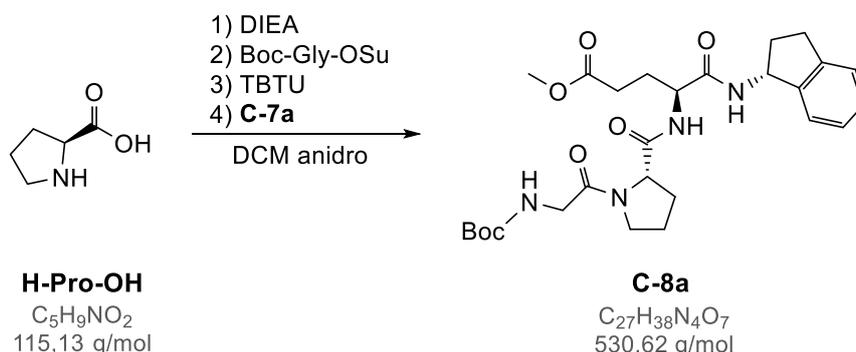
¹³C-RMN e DEPT (CD₃OD, 101 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros): [174.53 (Cq), 174.43 (Cq), 173.55 (Cq), 170.00 (Cq), C_E-1 + C_E-5 + C_P-1 + C_G-1]; 158.03 (Cq, OCONH); [144.49 (Cq), 144.22 (Cq), C_a-4 + C_a-9]; [128.83 (CH), 127.65 (CH), 125.65 (CH), 125.44 (CH), C_a-5 + C_a-6 + C_a-7 + C_a-8]; 80.58 (Cq, C(CH₃)₃); [61.53, 55.80, 52.80, 52.71, (3 x CH + CH₃), C_a-1 + C_E-2 + C_P-2 + COOCH₃]; [47.65 (CH₂), 43.72 (CH₂), C_P-5 + C_G-2]; 38.88 (CH, C_P-2); [34.70 (CH₂), 32.92 (CH₂), C_a-2 + C_a-3]; 31.04 (CH₂, C_P-4); 30.29 (CH₂, C_E-4); [28.67, 28.64, 3 x CH₃, C(CH₃)₃]; [28.48 (CH₂), 27.81 (CH₂), C_E-3]; [25.85 (CH₂), 23.35 (CH₂), C_P-3].



C-3a



6.1.2.6. Síntese do Boc-Gly-Pro-Glu(OMe)-Aminoindano (C-8a)



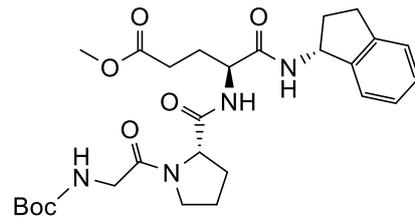
Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-3a** (secção 6.1.2.5.), procedeu-se ao acoplamento entre **H-Pro-OH** (0,1470 g; 1,277 mmol), Boc-Gly-OSu (0,3802 g; 1,404 mmol) e **C-7a** (0,5980 g; 1,532 mmol), utilizando DIEA (0,667 mL; 3,83 mmol) e TBTU (0,4511 g; 1,405 mmol), deixando-se em agitação magnética durante cerca de 2 horas após a adição do último componente.

Realizou-se o tratamento habitual, obtendo-se 0,4675 g do composto **C-8a**.
Rendimento: 69 %.

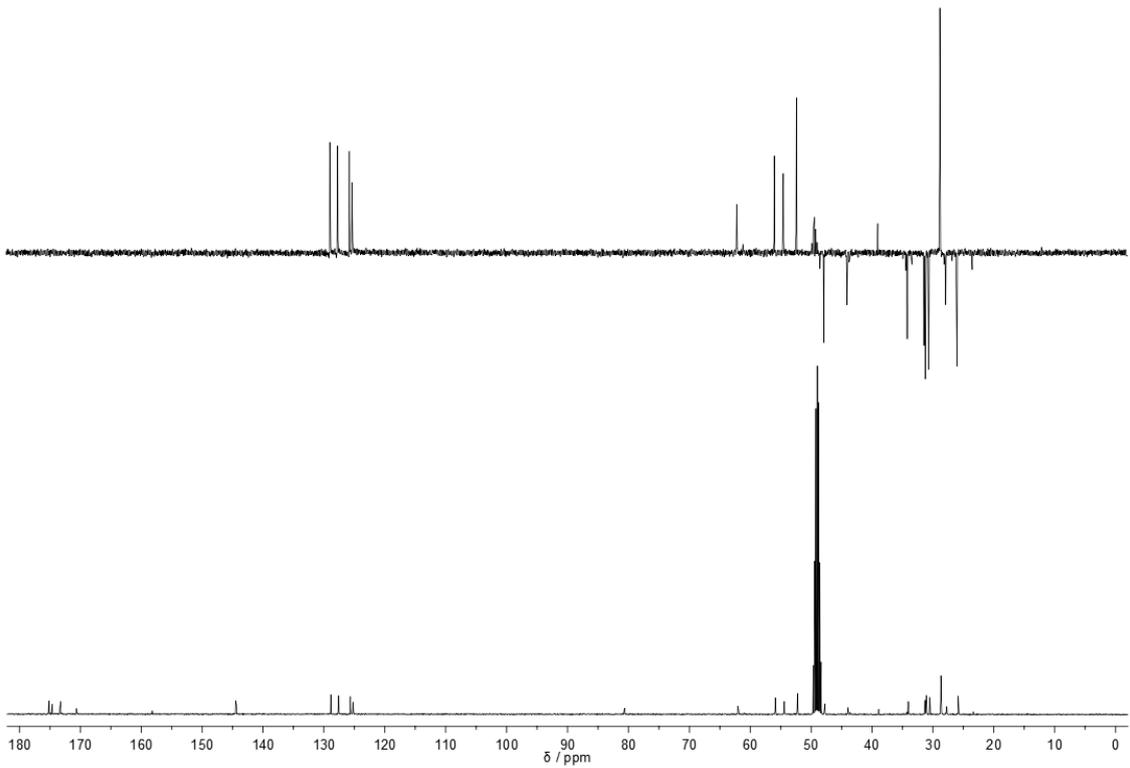
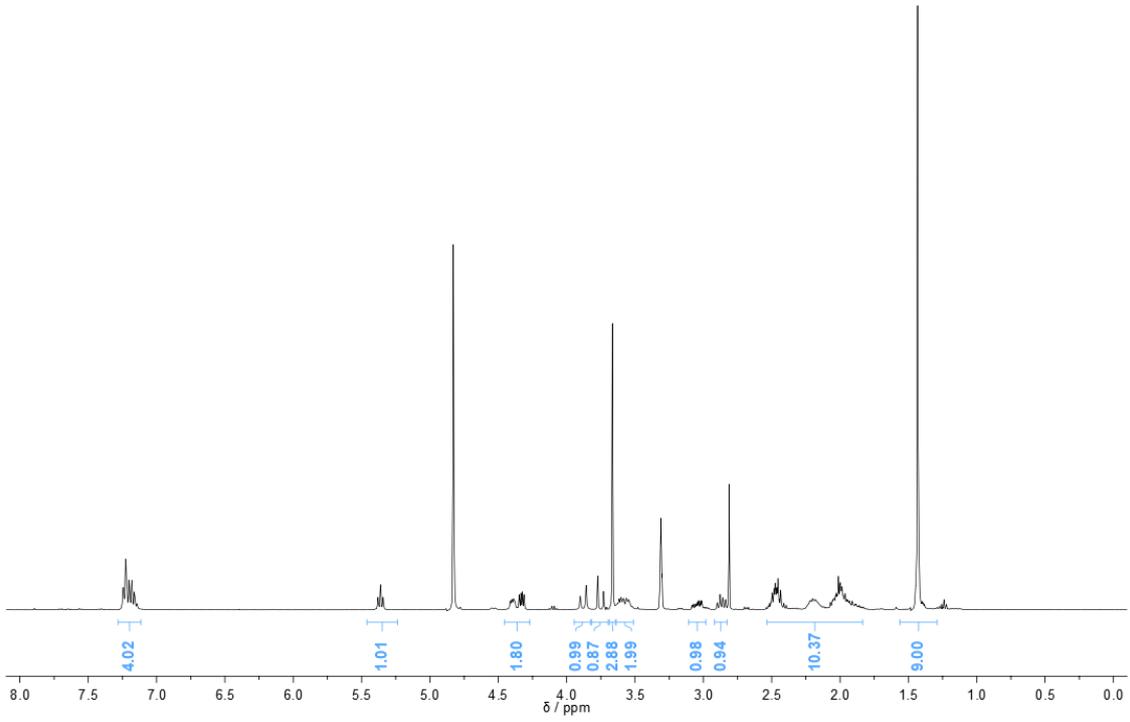
Aspetto	R _f	p.f.	[α] _D ¹⁶
sólido castanho claro	0.75 em DCM/MeOH (9:1)	48 – 50 °C	– 13,1 ± 0,1 (c1, CHCl ₃)

¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ ppm: 7.28 – 7.12 (m, 4H, H_{a-5} + H_{a-6} + H_{a-7} + H_{a-8}); 5.36 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H_{a-1}); 4.43 – 4.29 (m, 2H, H_{E-2} + H_{P-2}); 3.88 (d, *J* = 17.1 Hz, 1H, H_{G-2}); 3.75 (d, *J* = 17.1 Hz, 1H, H_{G-2}); 3.67 (s, 3H, COOCH₃); 3.63 – 3.49 (m, 2H, H_{P-5}); 3.05 (ddd, *J* = 15.8, 8.7, 3.7 Hz, 1H, H_{a-3}); 2.87 (m, 1H, H_{a-3}); 2.56 – 1.77 (m, 10H, H_{a-2} + H_{P-3} + H_{P-4} + H_{E-3} + H_{E-4}); 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃).

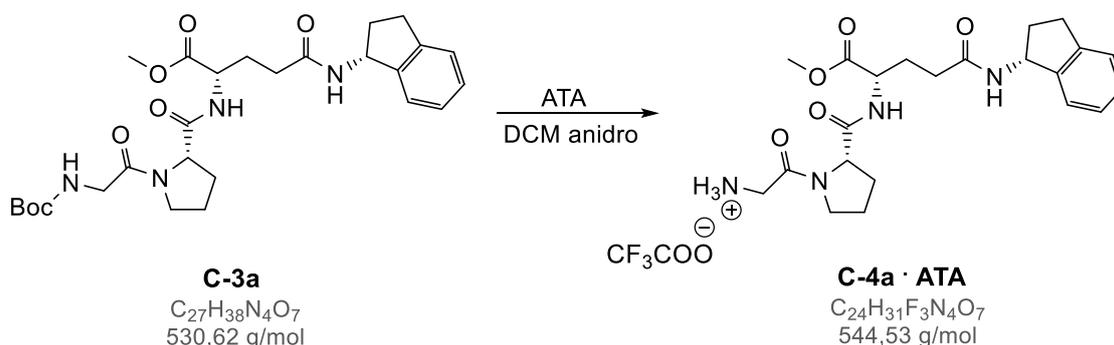
¹³C-RMN e DEPT (CD₃OD, 101 MHz) δ ppm: [175.17 (Cq), 174.62 (Cq), 173.22 (Cq), 170.61 (Cq), C_{E-1} + C_{E-5} + C_{P-1} + C_{G-1}]; 158.18 (Cq, OCONH); [144.51 (Cq), 144.37 (Cq), C_{a-4} + C_{a-9}]; [128.87 (CH), 127.57 (CH), 125.66 (CH), 125.23 (CH), C_{a-5} + C_{a-6} + C_{a-7} + C_{a-8}]; 80.65 (Cq, C(CH₃)₃); [62.04, 55.89, 54.40, 52.24, (3 x CH + CH₃), C_{a-1} + C_{E-2} + C_{P-2} + COOCH₃]; [47.76 (CH₂), 43.94 (CH₂), C_{P-5} + C_{G-2}]; 38.88 (CH, C_{P-2}); [34.04 (CH₂), 31.29 (CH₂), 31.09 (CH₂), 30.50 (CH₂), C_{a-2} + C_{a-3} + C_{P-4} + C_{E-4}]; 28.69 (3 x CH₃, C(CH₃)₃); 27.73 (CH₂, C_{E-3}); 25.86 (CH₂, C_{P-3}).



C-8a



6.1.2.7. Síntese do H-Gly-Pro-Glu(Aminoindano)-OMe (C-4a)



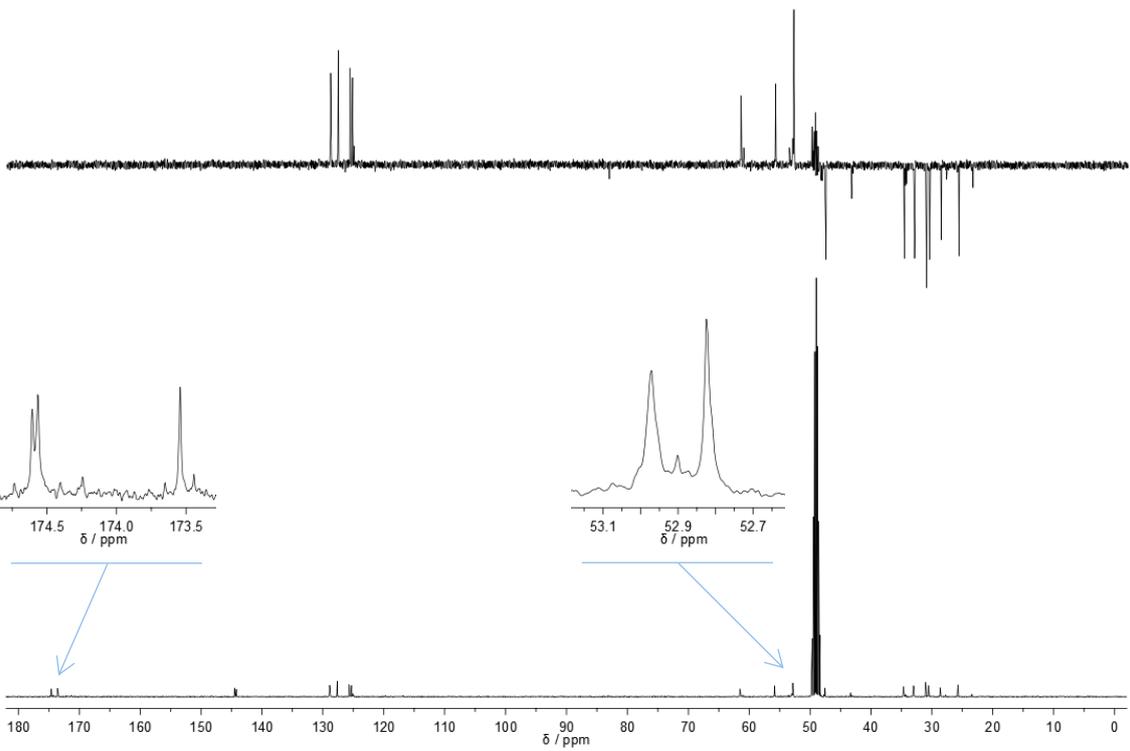
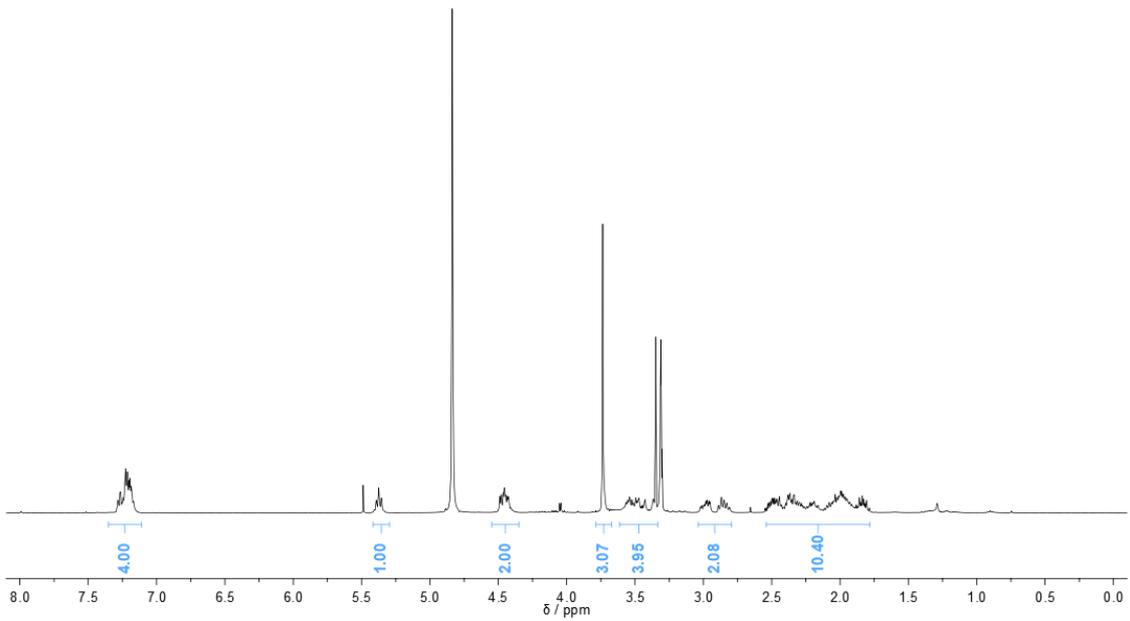
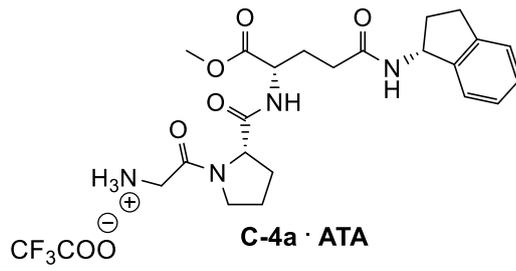
Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-2a** (secção 6.1.2.3.) procedeu-se à remoção acidolítica do grupo Boc do composto **C-3a** (0,4583 g; 0,8637 mmol) com ATA (1,99 mL; 25,9 mmol).

Dissolveu-se o sólido obtido em DCM/MeOH e purificou-se por cromatografia de adsorção em coluna de gel de sílica usando DCM/MeOH (9:1) como eluente, obtendo-se 0,4562 g do composto **C-4a**. Rendimento: 97 %.

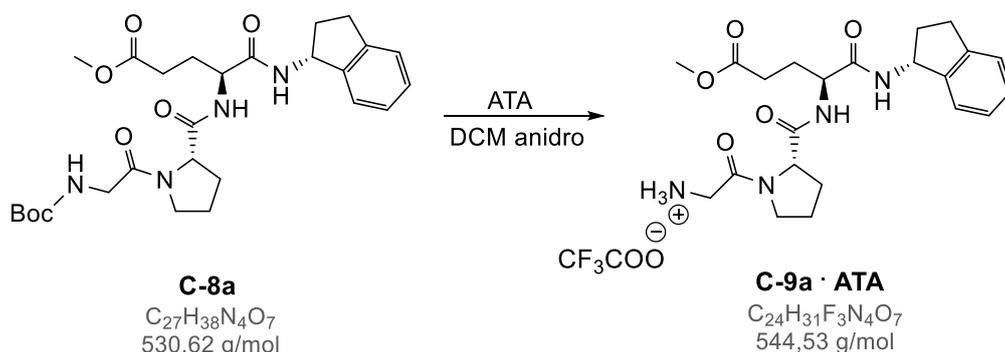
Aspeto	R _f	p.f.	[α] _D ¹⁶
sólido branco	0,16 em DCM/MeOH (9:1)	47 – 48 °C	– 88,8 ± 0,6 (c1, MeOH)

¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ ppm: 7.36 – 7.14 (m, 4H, H_a-5 + H_a-6 + H_a-7 + H_a-8); 5.37 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H_a-1); 4.55 – 4.39 (m, 2H, H_E-2 + H_P-2); 3.74 (s, 3H, COOCH₃); 3.64 – 3.33 (m, 4H, 2H_P-5 + 2H_G-2); 2.99 – 2.77 (m, 2H, H_a-3); 2.57 – 1.75 (m, 10H, H_a-2 + H_P-3 + H_P-4 + H_E-3 + H_E-4).

¹³C-RMN e DEPT (CD₃OD, 101 MHz) δ ppm: [174.61 (Cq), 174.56 (Cq), 174.24 (Cq), 173.54 (Cq), C_E-1 + C_E-5 + C_P-1 + C_G-1]; [144.51 (Cq), 144.21 (Cq), C_a-4 + C_a-9]; [128.90 (CH), 127.64 (CH), 125.70 (CH), 125.24 (CH), C_a-5 + C_a-6 + C_a-7 + C_a-8]; [61.49, 55.83, 52.97, 52.82, (3 x CH + CH₃), C_a-1 + C_E-2 + C_P-2 + COOCH₃]; [47.54 (CH₂), 43.34 (CH₂), C_P-5 + C_G-2]; 33.02 (CH₂, C_a-2 + C_a-3); 31.01 (CH₂, C_P-4); 30.54 (CH₂, C_E-4); 28.61 (CH₂, C_E-3); 25.71 (CH₂, C_P-3).



6.1.2.8. Síntese do H-Gly-Pro-Glu(OMe)-Aminoindano (C-9a)



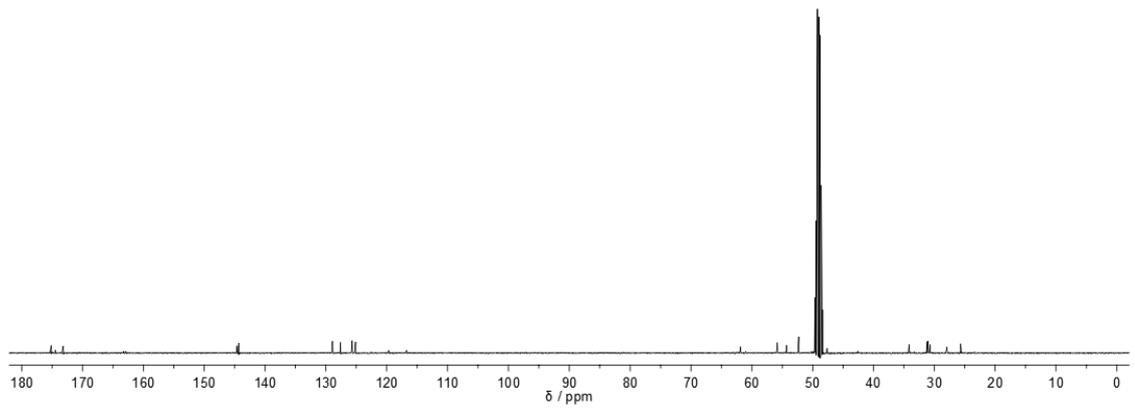
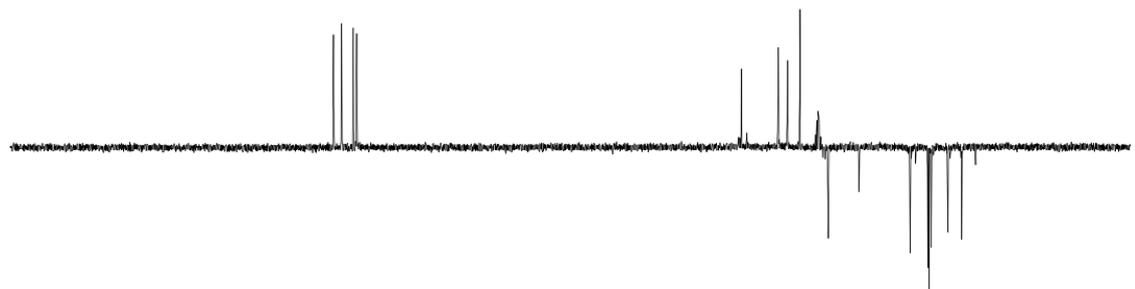
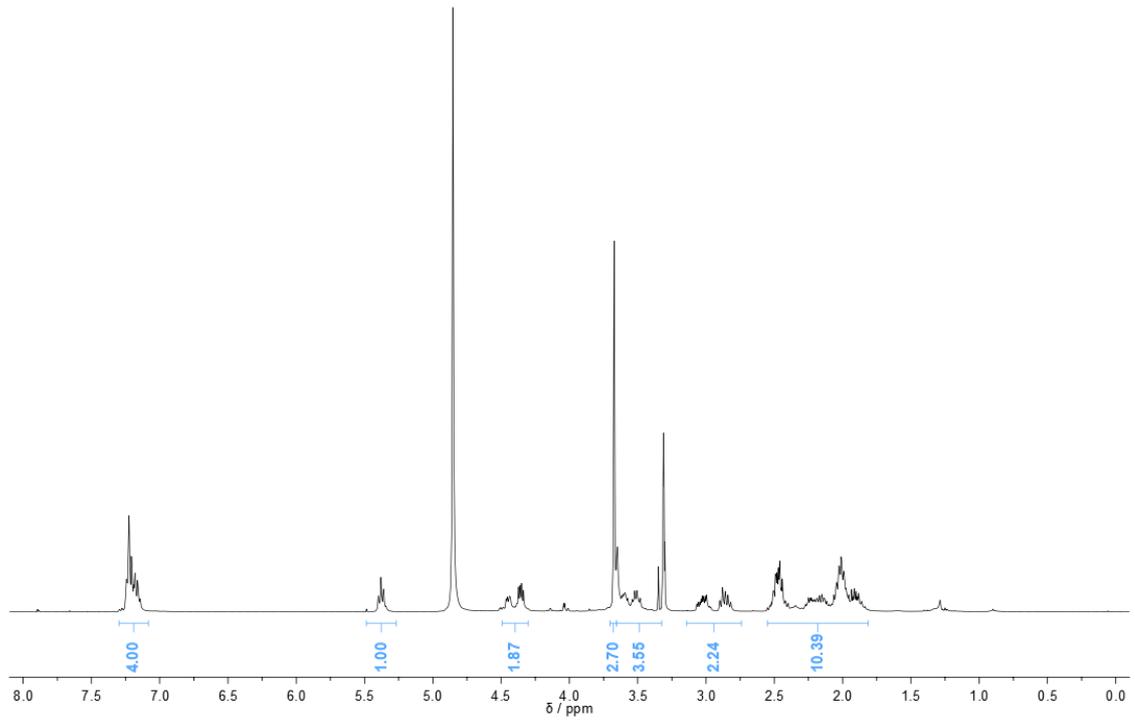
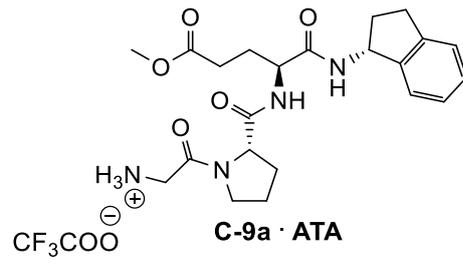
Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-2a** (secção 6.1.2.3.) procedeu-se à remoção acidolítica do grupo Boc do composto **C-8a** (0,4352 g; 0,8202 mmol) com ATA (1,89 mL; 24,6 mmol).

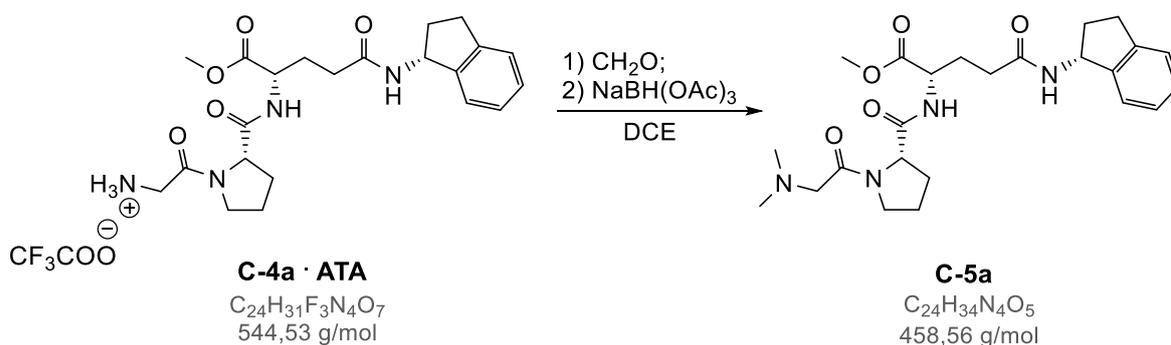
Dissolveu-se o sólido obtido em DCM/MeOH e purificou-se por cromatografia de adsorção em coluna de gel de sílica usando DCM/MeOH (9:1) como eluente, obtendo-se 0,4377 g do composto **C-9a**. Rendimento: 98 %.

Aspeto	R _f	p.f.	[α] _D ¹⁷
sólido castanho	0,11 em DCM/MeOH (9:1)	52 – 54 °C	– 11,7 ± 0,8 (c1, MeOH)

¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros): 7.30 – 7.08 (m, 4H, H_a-5 + H_a-6 + H_a-7 + H_a-8); 5.38 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H_a-1); 4.51 – 4.27 (m, 2H, H_E-2 + H_P-2); 3.67 (s, 3H, COOCH₃); 3.64 – 3.35 (m, 4H, 2H_G-2 + 2H_P-5); 3.13 – 2.73 (m, 2H, H_a-3); 2.60 – 1.72 (m, 10H, H_a-2 + H_P-3 + H_P-4 + H_E-3 + H_E-4).

¹³C-RMN e DEPT (CD₃OD, 101 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros): [175.15, 174.43, 173.16, (4 x Cq), C_E-1 + C_E-5 + C_P-1 + C_G-1]; [144.58 (Cq), 144.29 (Cq), C_a-4 + C_a-9]; [128.92 (CH), 127.59 (CH), 125.67 (CH), 125.11 (CH), C_a-5 + C_a-6 + C_a-7 + C_a-8]; [61.91, 55.80, 54.33, 52.28, (3 x CH + CH₃), C_a-1 + C_E-2 + C_P-2 + COOCH₃]; [47.64 (CH₂), 42.56 (CH₂), C_P-5 + C_G-2]; 31.24 (CH₂, C_P-4); 31.07 (CH₂, C_a-2 + C_a-3); 30.69 (CH₂, C_E-4); 27.93 (CH₂, C_E-3); 25.67 (CH₂, C_P-3).



6.1.2.9. Síntese do (*N,N*-dimetil-Gly)-Pro-Glu(Aminoindano)-OMe (C-5a)

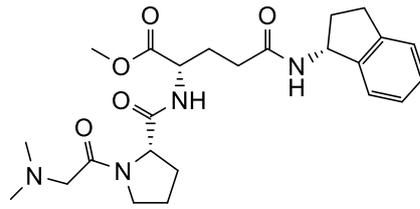
Num balão de fundo redondo dissolveu-se o composto **C-4a** (0,3343 g; 0,6139 mmol) em DCE (40 mL). Adicionou-se uma solução aquosa de CH₂O a 37% m/v (0,115 mL; 1,54 mmol) e de seguida adicionou-se o agente redutor NaBH(OAc)₃ (0,6506 g; 3,069 mmol) e deixou-se em agitação magnética durante cerca de 2 horas.

Eliminou-se o solvente a pressão reduzida, de seguida adicionou-se DCM e filtrou-se o excesso de agente redutor. Eliminou-se o solvente das águas-mãe e procedeu-se à purificação habitual por cromatografia de adsorção em coluna de gel de sílica usando DCM/MeOH (4:1) como eluente, tendo-se obtido 0,2027 do composto **C-5a** pretendido. Rendimento: 72 %.

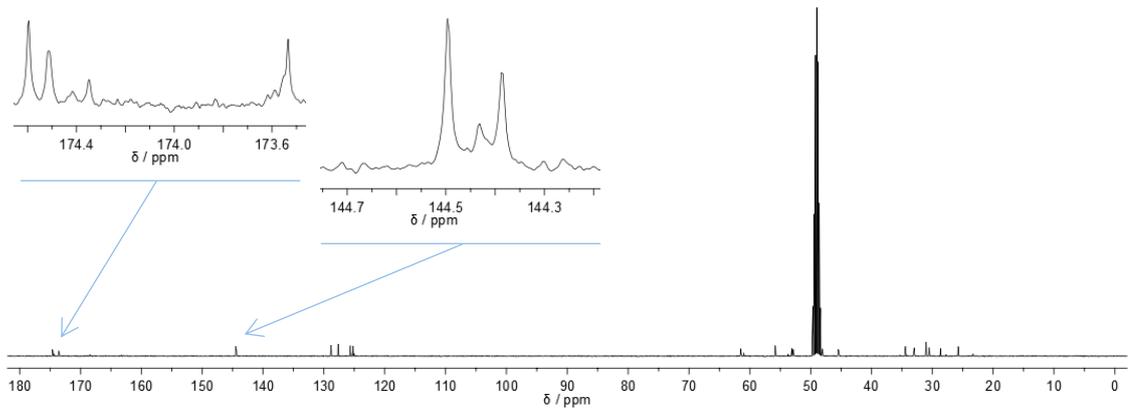
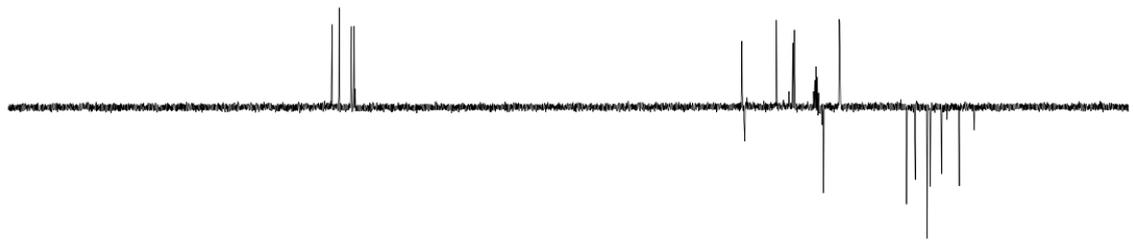
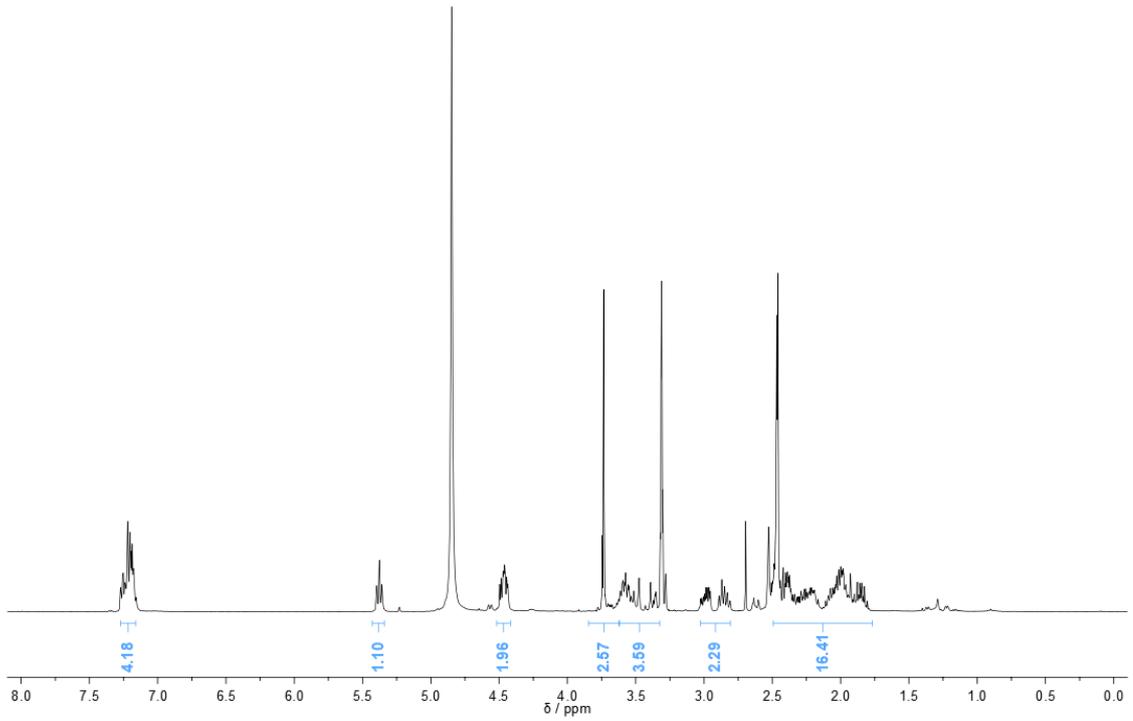
Aspeto	R _f	p.f.	[α] _D ²²
sólido cristalino ligeiramente amarelado	0,51 em DCM/MeOH (4:1)	39 – 41 °C	+ 68,6 ± 0,1 (c1, MeOH).

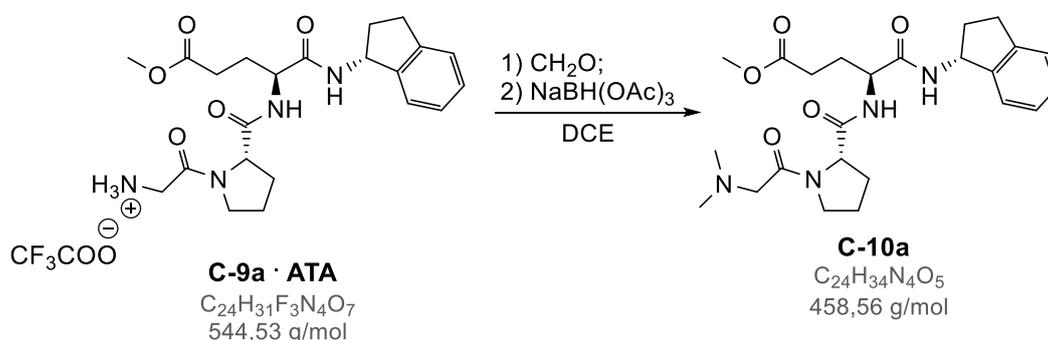
¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros 80:20): 7.28 – 7.14 (m, 4H, H_a-5 + H_a-6 + H_a-7 + H_a-8); 5.38 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H_a-1); 4.51 – 4.39 (m, 2H, H_E-2 + H_P-2); [3.75 (s, *minor*), 3.73 (s, *major*), 3H, COOCH₃]; 3.63 – 3.33 (m, 4H, 2H_G-2 + 2H_P-5); 3.05 – 2.79 (m, 2H, H_a-3); 2.49 – 1.89 (m, 16H, (CH₃)₂-N + H_a-2 + H_P-3 + H_P-4 + H_E-3 + H_E-4).

¹³C-RMN e DEPT (CD₃OD, 101 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros): [174.60 (Cq), 174.51 (Cq), 174.35 (Cq), 173.53 (Cq), C_E-1 + C_E-5 + C_P-1 + C_G-1]; [144.50 (Cq), 144.39 (Cq), C_a-4 + C_a-9]; [128.81 (CH), 127.66 (CH), 125.64 (CH), 125.19 (CH), C_a-5 + C_a-6 + C_a-7 + C_a-8]; [61.46, 55.80, 53.11, 52.82, (3 x CH + CH₃), C_a-1 + C_E-2 + C_P-2 + COOCH₃]; [48.31 (CH₂), 48.04 (CH₂), C_G-2]; [45.46 (CH₃), 45.41 (CH₃), 45.33 (CH₃), 45.28 (CH₃), (CH₃)₂-N]; [34.41 (CH₂), 34.33 (CH₂), C_P-5]; [33.07 (CH₂), 32.98 (CH₂), C_P-4]; 31.02 (CH₂, C_a-2 + C_a-3); 30.51 (CH₂, C_E-4); [28.67 (CH₂), 27.76 (CH₂), C_E-3]; [25.76 (CH₂), 23.28 (CH₂), C_P-3].



C-5a



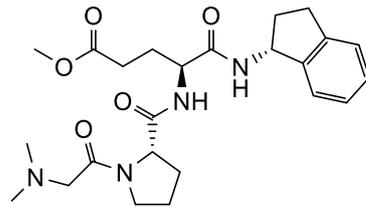
6.1.2.10. Síntese do (*N,N*-dimetil-Gly)-Pro-Glu(OMe)-Aminoindano (C-10a)

Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-5a** (secção 6.1.2.9.) procedeu-se à *N*-dimetilação do composto **C-9a** (0,3222 g; 0,5917 mmol), utilizando uma solução aquosa de CH_2O a 37% m/v (0,111 mL; 1,48 mmol) e $NaBH(OAc)_3$ (0,6270 g; 2,958 mmol), deixando-se em agitação magnética durante cerca de 2 horas. Fez-se o tratamento descrito para o composto **C-5a**, tendo-se obtido 0,1899 g do composto **C-10a**. Rendimento: 70 %.

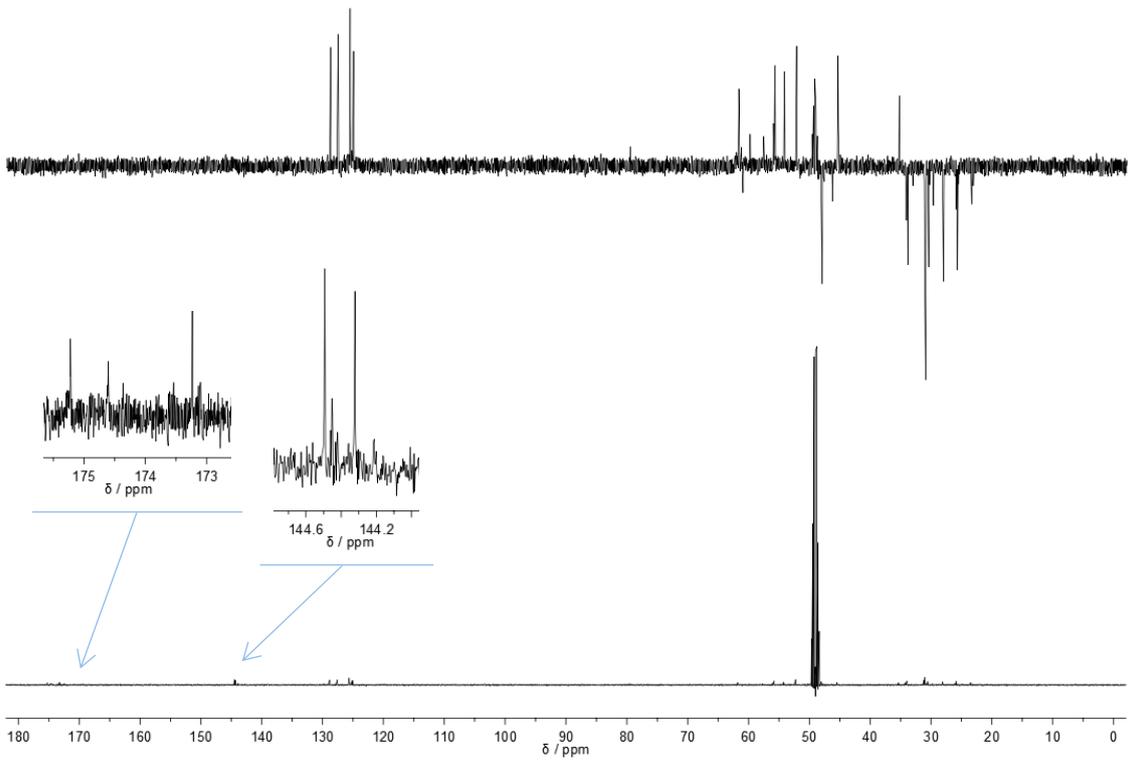
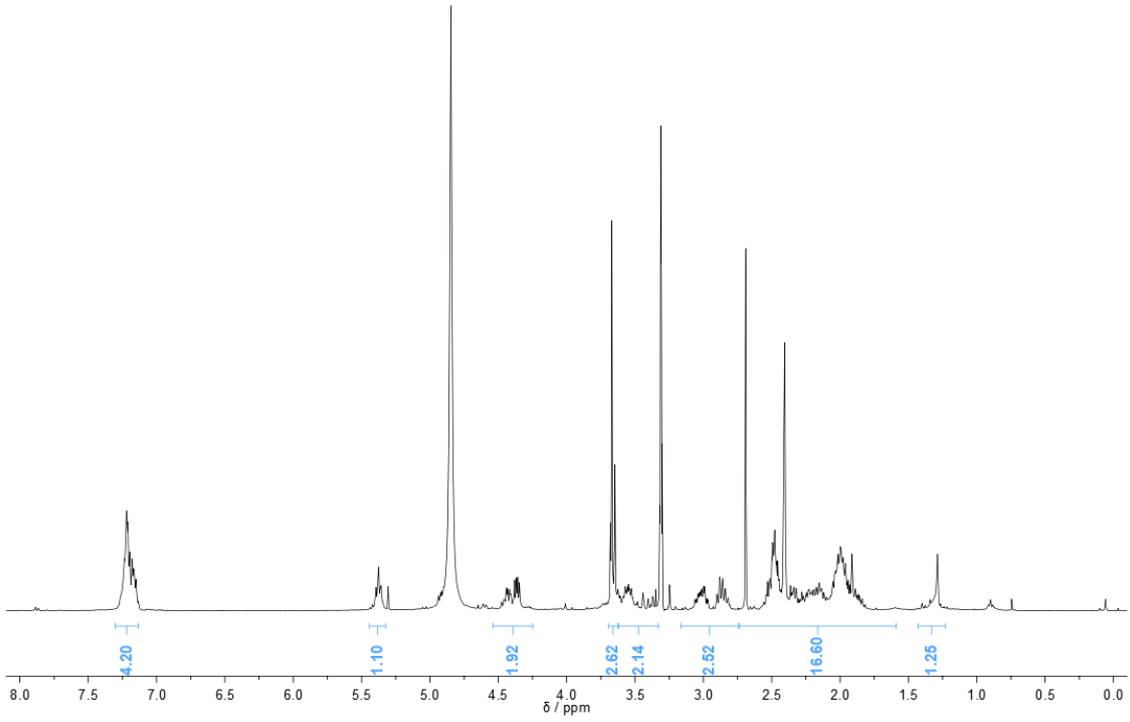
Aspetto	R_f	$[\alpha]_D^{22}$
óleo amarelo viscoso	0,63 em DCM/MeOH (4:1)	$-12,2 \pm 1,0$ (c1, MeOH)

1H -RMN (CD_3OD , 400 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros 80:20): 7.29 – 7.09 (m, 4H, $H_{a-5} + H_{a-6} + H_{a-7} + H_{a-8}$); 5.38 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_{a-1}); 4.51 – 4.30 (m, 2H, $H_{E-2} + H_{P-2}$); [3.68 (*minor*), 3.67 (s, *major*), 3H, $COOCH_3$]; 3.59 – 3.34 (m, 2H, H_{G-2}); 3.10 – 2.79 (m, 3H, H_{a-3}); [2.71 – 1.80 (m, 17H), 1.35 – 1.24 (m, 1H), $H_{P-5} + H_{a-2} + (CH_3)_2-N + H_{P-3} + H_{P-4} + H_{E-3} + H_{E-4}$].

^{13}C -RMN e DEPT (CD_3OD , 101 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros): [175.22, 173.24, (4 x Cq), $C_{E-1} + C_{E-5} + C_{P-1} + C_{G-1}$]; [144.49 (Cq), 144.32 (Cq), $C_{a-4} + C_{a-9}$]; [128.94 (CH), 127.59 (CH), 125.65 (CH), 125.09 (CH), $C_{a-5} + C_{a-6} + C_{a-7} + C_{a-8}$]; [61.76, 55.84, 54.26, 52.27, (3 x CH + CH_3), $C_{a-1} + C_{E-2} + C_{P-2} + COOCH_3$]; [48.31 (CH_2), 48.04 (CH_2), C_{G-2}]; [45.50 (CH_3), 45.46 (CH_3), 45.41 (CH_3), $(CH_3)_2-N$]; [34.23 (CH_2), 33.99 (CH_2), C_{P-5}]; [31.26 (CH_2), 31.17 (CH_2), C_{P-4}]; 31.05 (CH_2 , $C_{a-2} + C_{a-3}$); 30.57 (CH_2 , C_{E-4}); 28.12 (CH_2 , C_{E-3}); [26.02 (CH_2), 25.84 (CH_2), C_{P-3}].

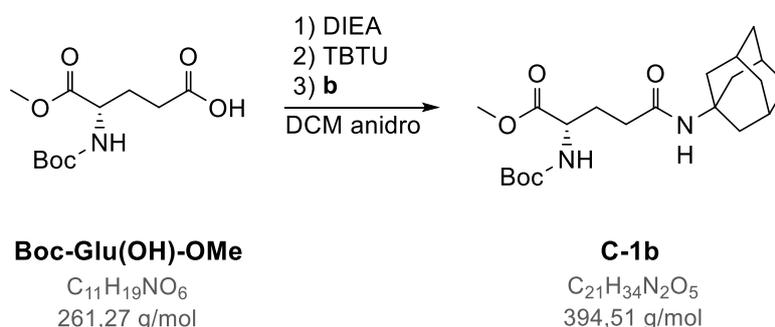


C-10a



6.1.3. Síntese dos conjugados de GPE com Amantadina

6.1.3.1. Síntese do Boc-Glu(Amantadina)-OMe (C-1b)



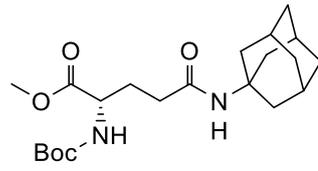
Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-1a** (secção 6.1.2.1.), procedeu-se ao acoplamento entre **Boc-Glu(OH)-OMe** (0,5821 g; 2,228 mmol) e a amina **b** (0,5019 g; 2,674 mmol), utilizando DIEA (1,16 mL; 6,68 mmol) e TBTU (0,7870 g; 2,451 mmol), deixando-se reagir durante cerca de 1 hora e 30 minutos após a adição do último componente. Em seguida, procedeu-se ao tratamento idêntico ao realizado para o composto **C-1a**.

O precipitado obtido foi filtrado (por filtração a pressão reduzida) e lavado com Et_2O , obtendo-se 0,7911 g do composto **C-1b**. Rendimento: 90 %.

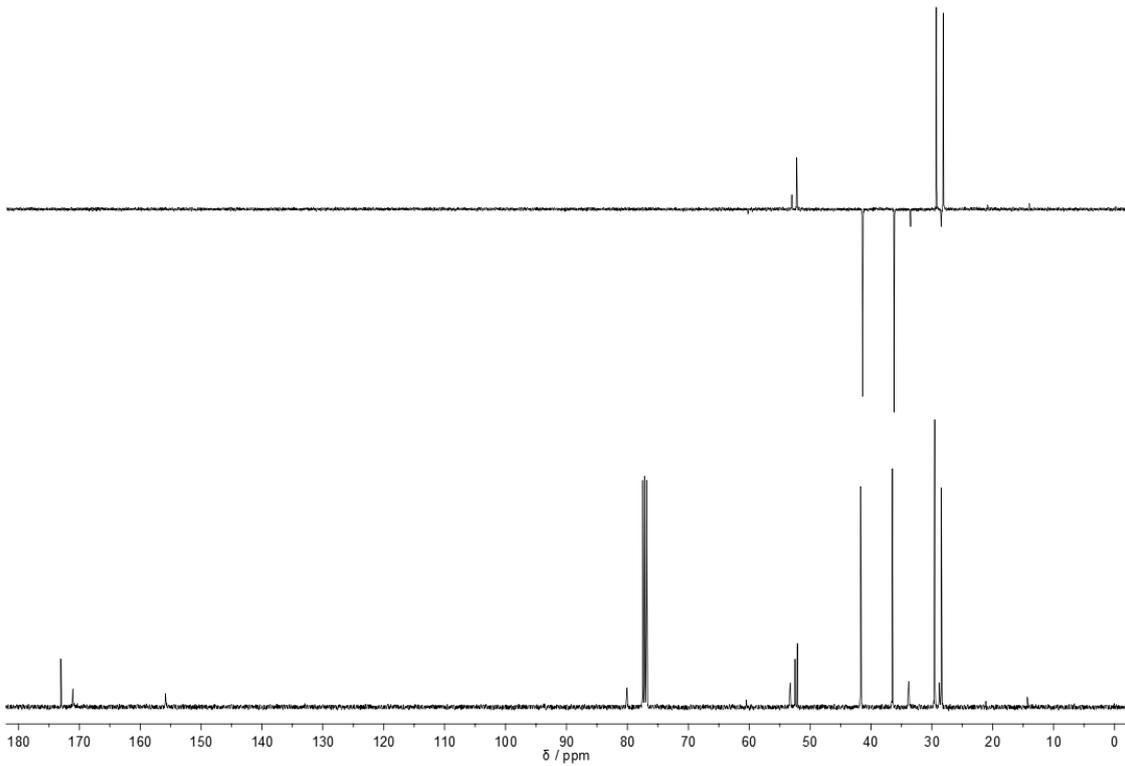
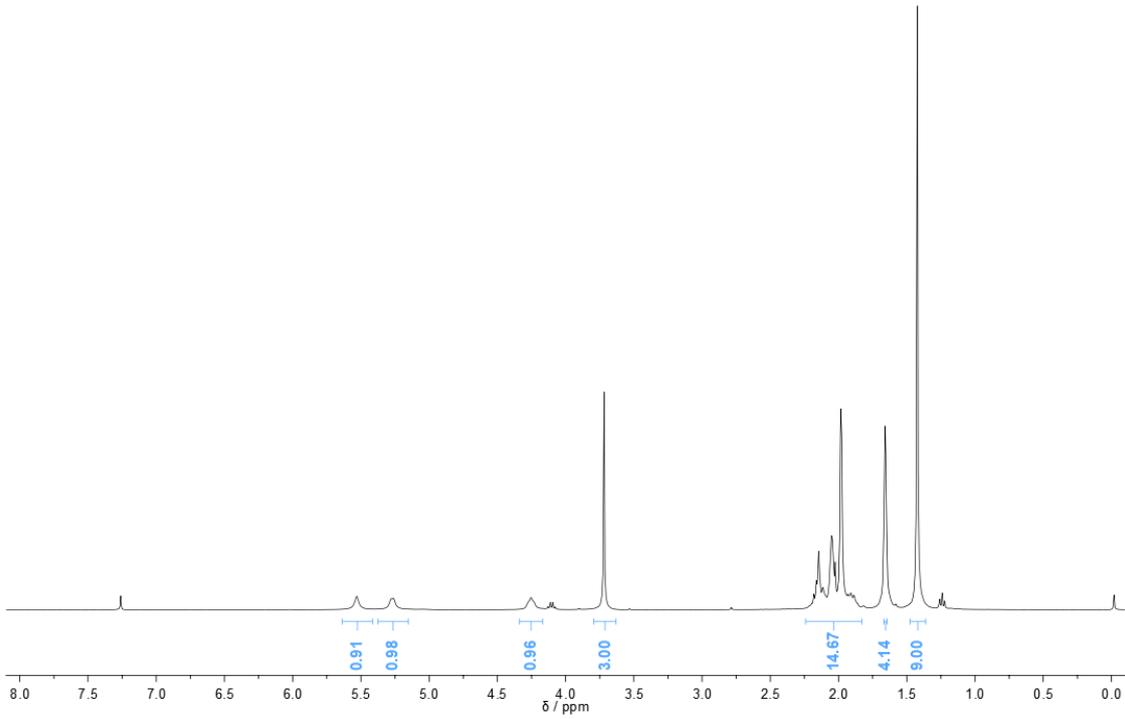
Aspeto	R _f	p.f.	$[\alpha]_D^{16}$
sólido branco	0,78 em AcOEt	190 – 191 °C	+ 14,5 ± 0,1 (c1, CHCl ₃)

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 5.53 (sl, 1H, CONH); 5.27 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, CONH); 4.25 (m, 1H, H_E-2); 3.72 (s, 3H, COOCH₃); 2.23 – 1.84 (m, 15H, H_E-3 + H_E-4 + H_b-2 + H_b-3 + H_b-5 + H_b-7 + H_b-8 + H_b-9 + H_b-10); 1.66 (s, 4H, H_b-4 + H_b-6); 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃).

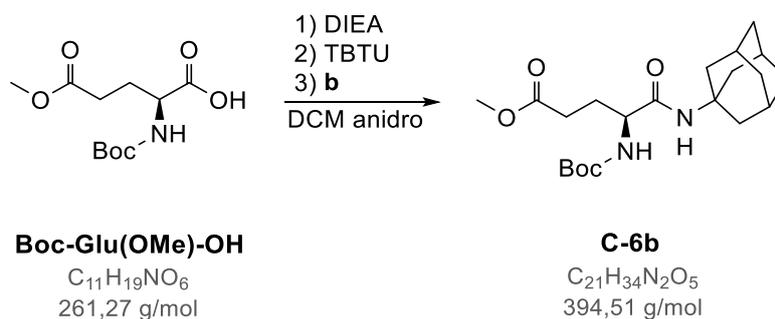
¹³C-RMN e DEPT (CDCl₃, 101 MHz) δ ppm: [173.01 (Cq), 171.05 (Cq), C_E-1 + C_E-5]; 155.84 (Cq, OCONH); 80.05 (Cq, C(CH₃)₃); [53.27, 52.48, (CH + CH₃), C_E-2 + COOCH₃]; 52.10 (Cq, C_b-1); [41.68, 36.48, 33.81, (6 x CH₂), C_b-2 + C_b-4 + C_b-6 + C_b-8 + C_b-9 + C_b-10]; 29.55 (3x CH, C_b-3 + C_b-5 + C_b-7); 28.76 (2 x CH₂, C_E-3 + C_E-4); 28.43 (3 x CH₃, C(CH₃)₃).



C-1b



6.1.3.2. Síntese do Boc-Glu(OMe)- Amantadina (C-6b)



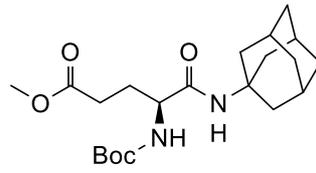
Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-1a** (secção 6.1.2.1.), procedeu-se ao acoplamento entre **Boc-Glu(OMe)-OH** (0,5803 g; 2,221 mmol) e a amina **b** (0,5003 g; 2,665 mmol), utilizando DIEA (1,16 mL; 6,66 mmol) e TBTU (0,7844 g; 2,443 mmol), deixando-se reagir durante 1 hora e 30 minutos. Em seguida, procedeu-se ao tratamento idêntico ao realizado para o composto **C-1a**.

O óleo obtido foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna de gel de sílica usando AcOEt como eluente, obtendo-se 0,7798 g do composto **C-6b**. Rendimento: 89 %.

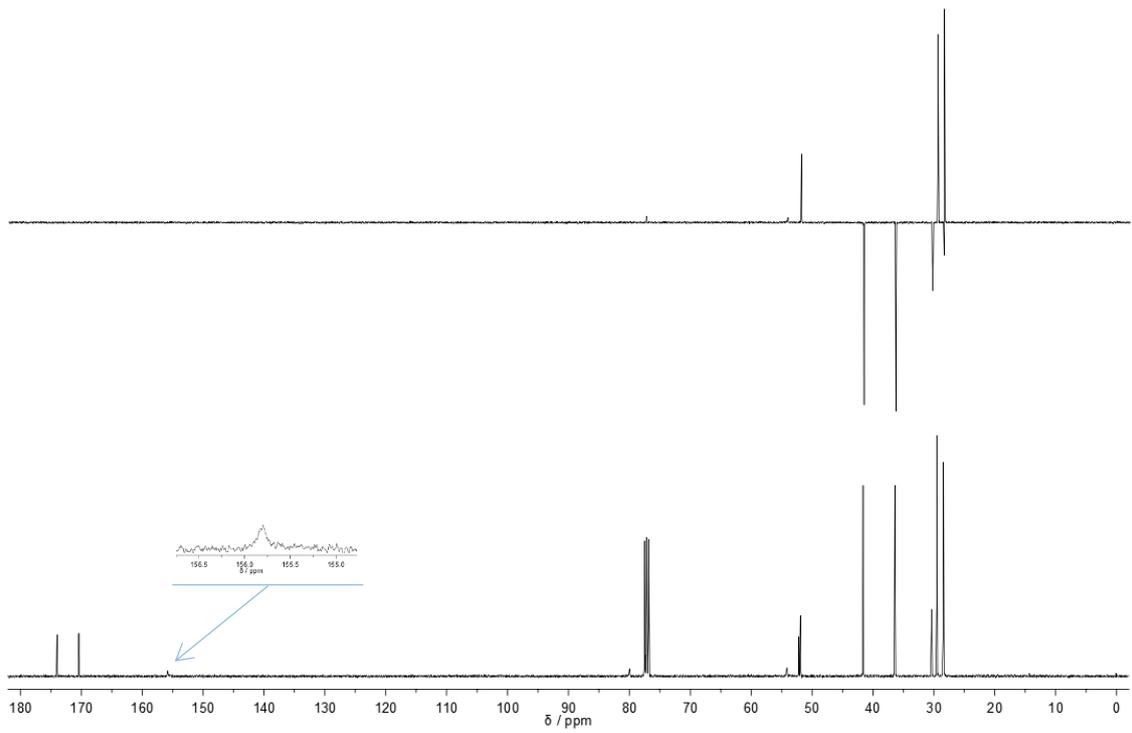
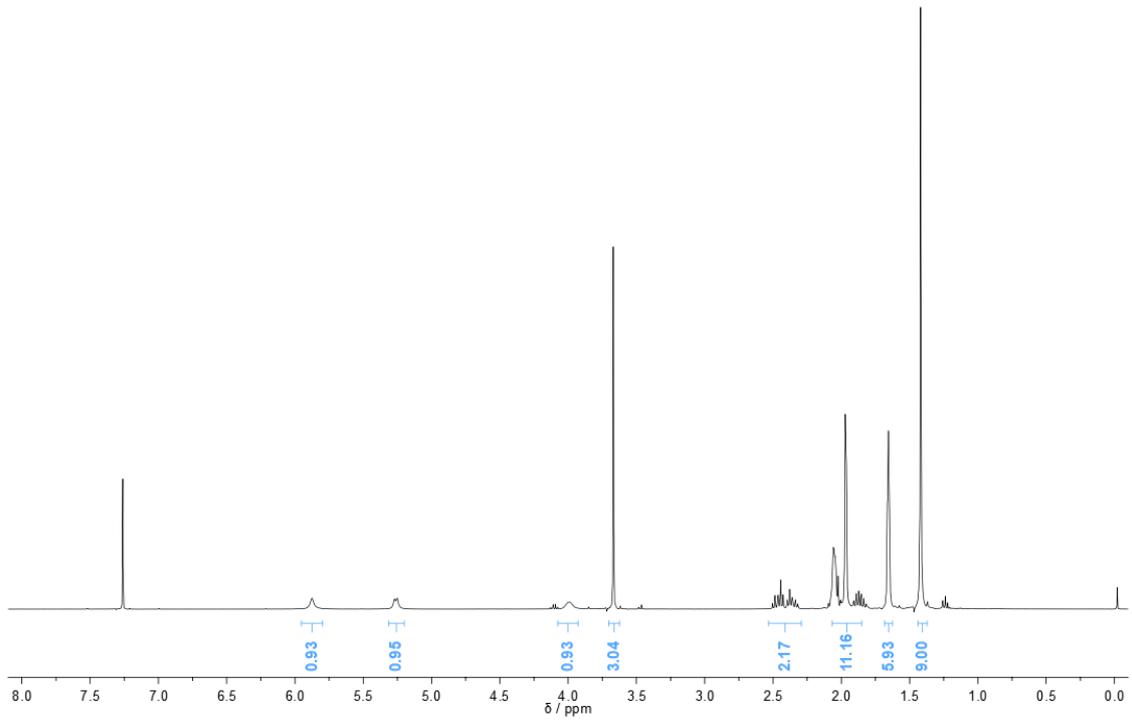
Aspeto	R_f	$[\alpha]_D^{16}$
óleo incolor	0,89 em AcOEt	- 14,3 ± 0,2 (c1, CHCl ₃)

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 5.88 (sl, 1H, CONH); 5.26 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, CONH); 3.99 (s, 1H, H_{E-2}); 3.67 (s, 3H, COOCH₃); 2.54 – 2.27 (m, 2H, H_{E-4}); 2.11 – 1.80 (m, 11H, H_{E-3} + H_{b-2} + H_{b-3} + H_{b-5} + H_{b-7} + H_{b-8} + H_{b-9}); 1.66 (t, 6H, H_{b-4} + H_{b-6} + H_{b-10}); 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃).

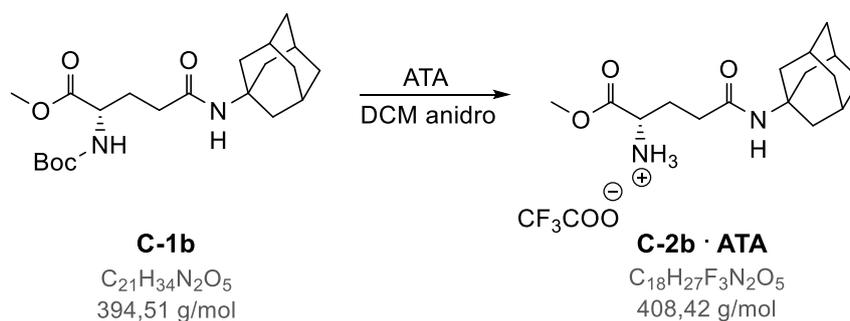
¹³C-RMN e DEPT (CDCl₃, 101 MHz) δ ppm: [173.97 (Cq), 170.40 (Cq), C_{E-1} + C_{E-5}]; 155.80 (Cq, OCONH); 79.98 (Cq, C(CH₃)₃); [54.14, 51.91, (CH + CH₃), C_{E-2} + COOCH₃]; 52.18 (Cq, C_{b-1}); [41.63, 36.41, 30.38, (6 x CH₂), C_{b-2} + C_{b-4} + C_{b-6} + C_{b-8} + C_{b-9} + C_{b-10}]; 29.51 (3 x CH, C_{b-3} + C_{b-5} + C_{b-7}); 28.48 (2 x CH₂, C_{E-3} + C_{E-4}); 28.42 (3 x CH₃, C(CH₃)₃).



C-6b



6.1.3.3. Síntese do H-Glu(Amantadina)-OMe (C-2b)

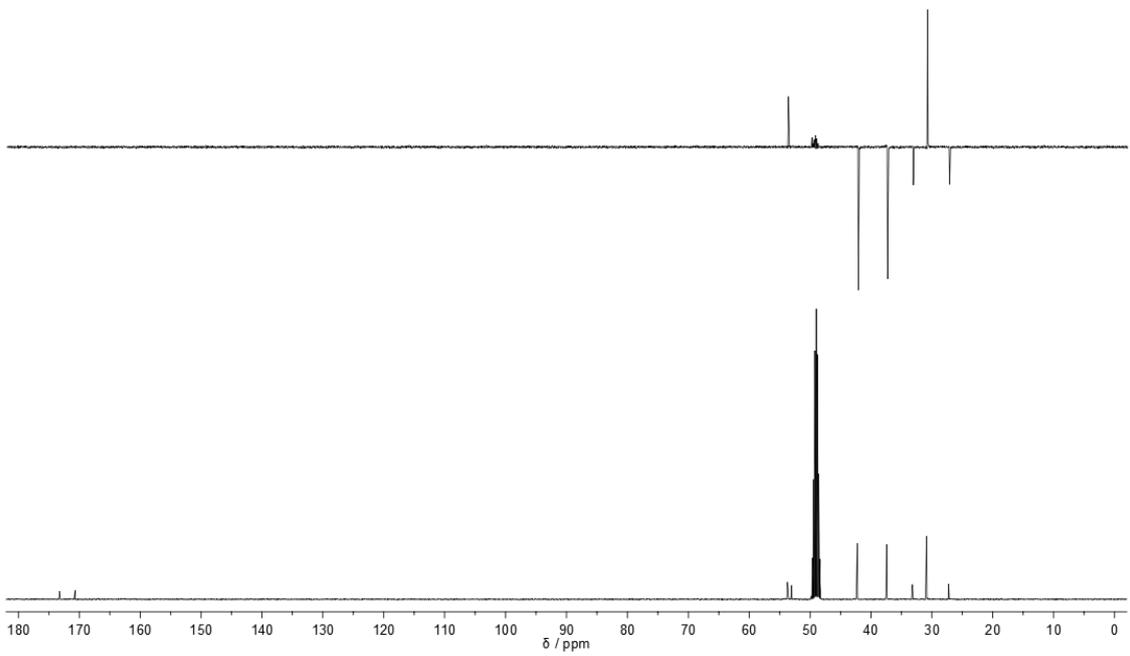
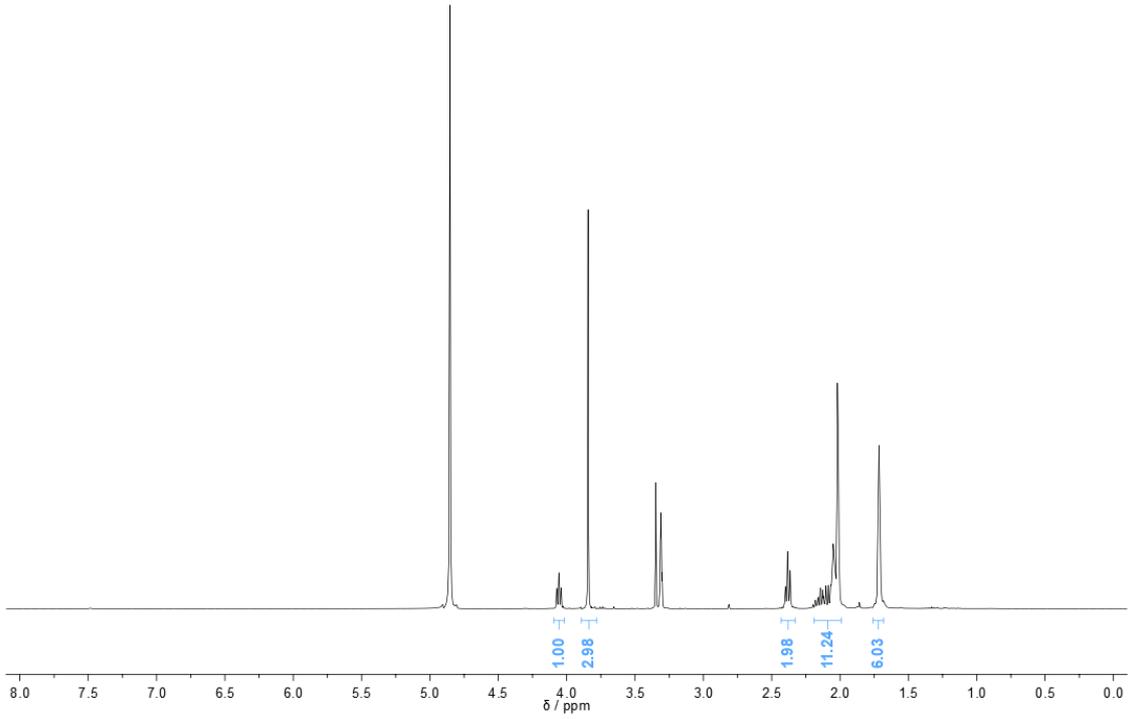
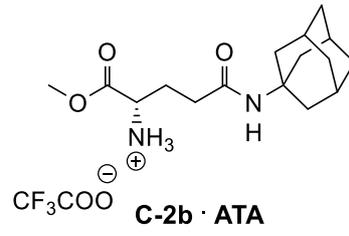


Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-2a** (secção 6.1.2.3.) procedeu-se à remoção acidolítica do grupo Boc do composto **C-1b** (0,7570 g; 1,919 mmol) com ATA (4,43 mL; 57,6 mmol), tendo-se obtido 0,7681 g do composto **C-2b**. Rendimento: 98 %.

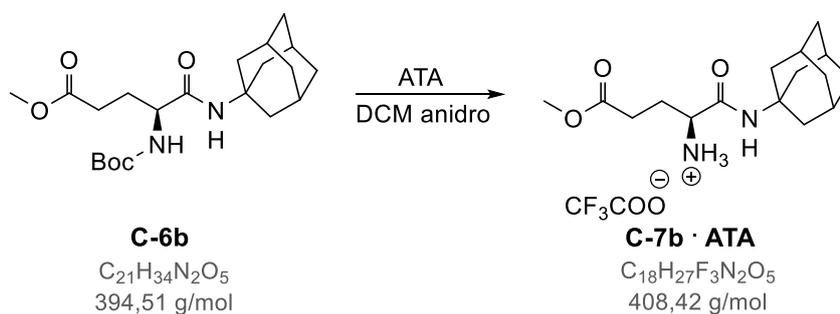
Aspetto	R_f	$[\alpha]_D^{22}$
óleo amarelo viscoso	0,59 em AcOEt	+ 25,6 ± 0,1 (c1, CHCl ₃)

¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ ppm: 4.06 (t, J = 6.4 Hz, 1H, H_E-2); 3.84 (s, 3H, COOCH₃); 2.39 (dd, J = 10.5, 4.3 Hz, 2H, H_E-4); 2.21 (m, 11H, H_E-3 + H_b-2 + H_b-3 + H_b-5 + H_b-7 + H_b-8 + H_b-9); 1.71 (s, 6H, H_b-4 + H_b-6 + H_b-10).

¹³C-RMN e DEPT (CD₃OD, 101 MHz) δ ppm: [173.21 (Cq), 170.68 (Cq), C_E-1 + C_E-5]; [53.72, 53.68, (CH + CH₃), C_E-2 + COOCH₃]; 53.02 (Cq, C_b-1); [42.25, 37.45, 33.21 (6 x CH₂), C_b-2 + C_b-4 + C_b-6 + C_b-8 + C_b-9 + C_b-10]; 30.87 (3 x CH, C_b-3 + C_b-5 + C_b-7); 27.25 (2 x CH₂, C_E-3, C_E-4).



6.1.3.4. Síntese do H-Glu(OMe)-Amantadina (C-7b)

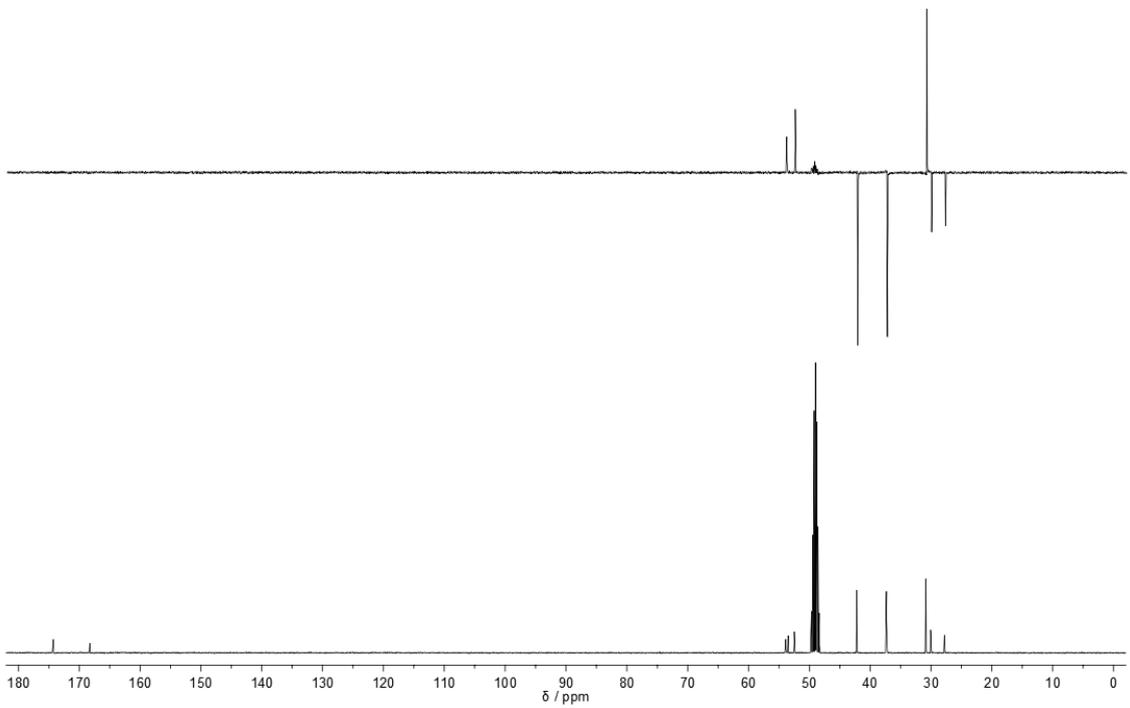
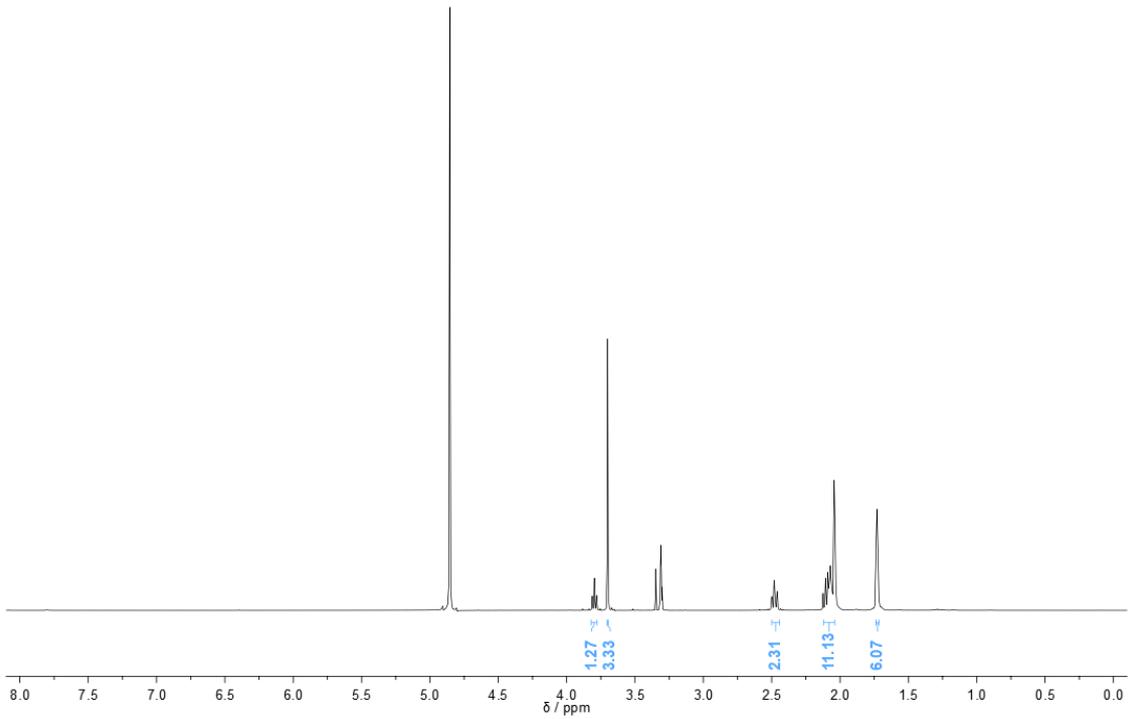
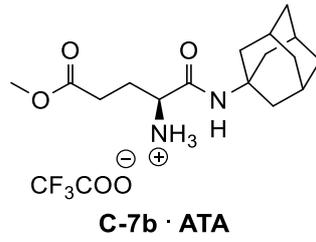


Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-2a** (secção 6.1.2.3.) procedeu-se à remoção acidolítica do grupo Boc do composto **C-6b** (0,7284 g; 1,846 mmol) com ATA (4,26 mL; 55,4 mmol), tendo-se obtido 0,7390 g do composto **C-7b**. Rendimento: 98 %.

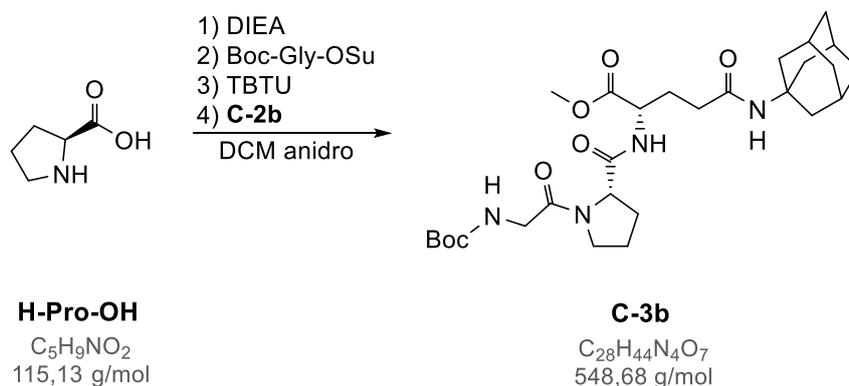
Aspeto	R_f	$[\alpha]_D^{22}$
sólido transparente de baixo p.f.	0,51 em AcOEt	+ 5,4 ± 0,1 (c1, CHCl ₃)

¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ ppm: 3.80 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, H_E-2); 3.70 (s, 3H, COOCH₃); 2.48 (td, $J = 7.3, 1.3$ Hz, 2H, H_E-4); 2.16 – 2.01 (m, 11H, H_E-3 + H_b-2 + H_b-3 + H_b-5 + H_b-7 + H_b-8 + H_b-9); 1.73 (s, 6H, H_b-4 + H_b-6 + H_b-10).

¹³C-RMN e DEPT (CD₃OD, 101 MHz) δ ppm: [174.22 (Cq), 168.26 (Cq), C_E-1 + C_E-5]; [53.88, 53.48, (CH + CH₃), C_E-2 + COOCH₃]; 52.48 (Cq, C_b-1); [42.20, 37.34, 30.84 (6 x CH₂), C_b-2 + C_b-4 + C_b-6 + C_b-8 + C_b-9 + C_b-10]; 30.08 (3 x CH, C_b-3 + C_b-5 + C_b-7); 27.80 (2 x CH₂, C_E-3, C_E-4).



6.1.3.5. Síntese do Boc-Gly-Pro-Glu(Amantadina)-OMe (C-3b)



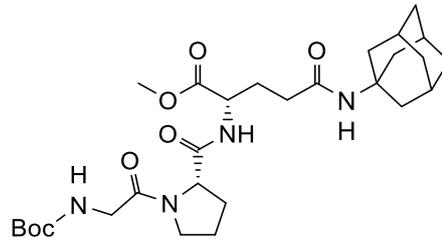
Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-3a** (secção 6.1.2.5.), procedeu-se ao acoplamento entre **H-Pro-OH** (0,1670 g; 1,451 mmol), Boc-Gly-OSu (0,4345 g; 1,596 mmol) e **C-2b** (0,7109 g; 1,741 mmol), utilizando DIEA (0,758 mL; 4,35 mmol) e TBTU (0,5125 g; 1,596 mmol), deixando-se em agitação magnética durante cerca de 2 horas após a adição do último componente. De seguida, procedeu-se ao tratamento habitual.

O óleo obtido foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna de gel de sílica usando AcOEt como eluente obtendo-se 0,5414 g do composto **C-3b**. Rendimento: 68 %.

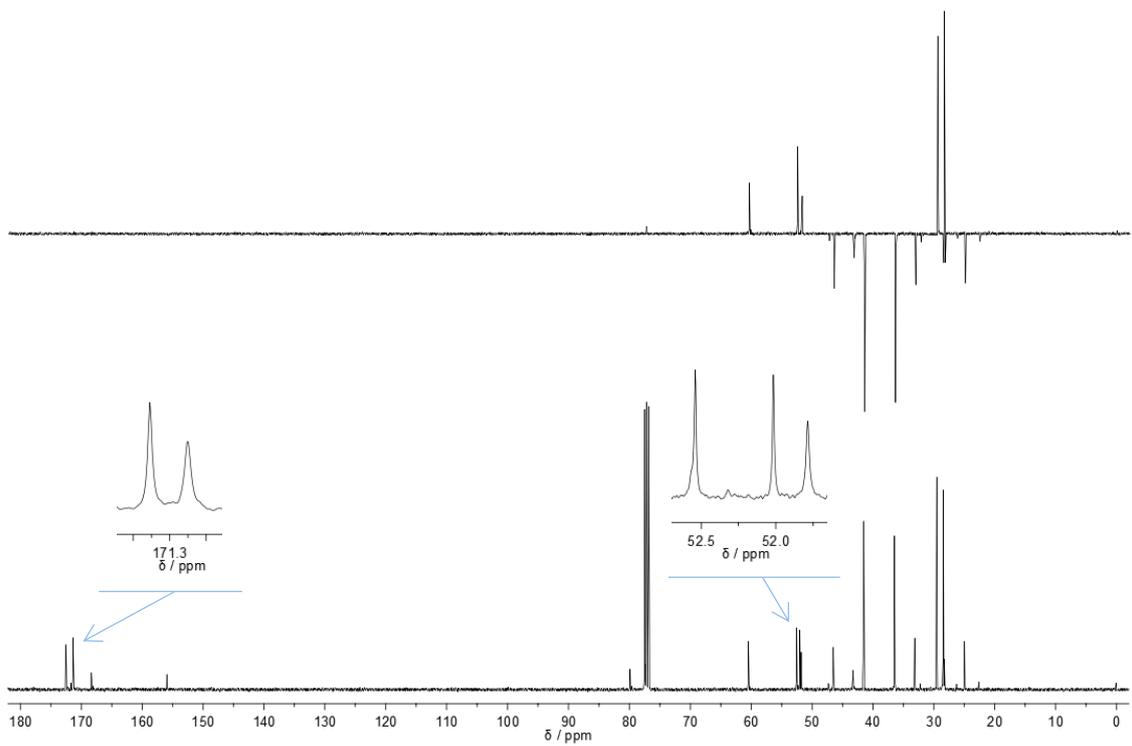
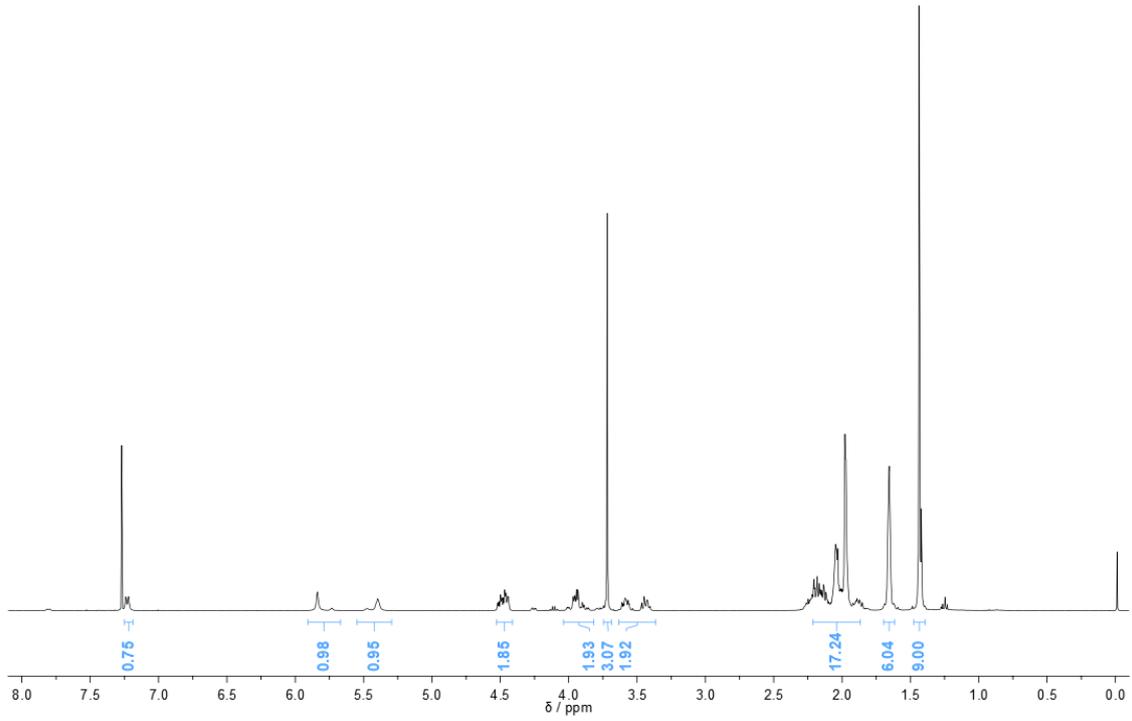
Aspetto	R _f	p.f.	[α] _D ¹⁶
sólido branco	0,27 em AcOEt	61 – 63 °C	– 9,8 ± 0,3 (c1, CHCl ₃)

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros 85:15): 7.23 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, CONH); [5.84 (sl, *major*), 5.73 (sl, *minor*), 1H, CONH]; [5.48 (sl, *minor*), 5.40 (sl, *major*), 1H, CONH]; 4.56 – 4.41 (m, 2H, H_E-2 + H_P-2); 4.05 – 3.83 (m, 2H, H_G-2); 3.72 (s, 3H, COOCH₃); 3.63 – 3.34 (m, 2H, H_P-5); 2.24 – 1.84 (m, 17H, H_E-3 + H_E-4 + H_P-3 + H_P-4 + H_b-2 + H_b-3 + H_b-5 + H_b-7 + H_b-8 + H_b-9); 1.66 (s, 6H, H_b-4 + H_b-6 + H_b-10); 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃).

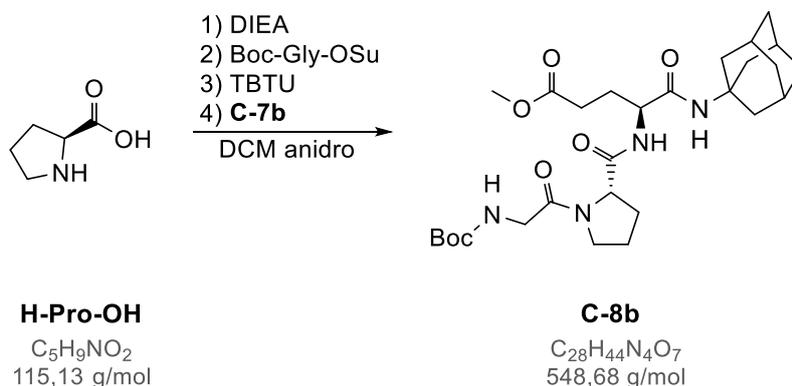
¹³C-RMN e DEPT (CDCl₃, 101 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros): [172.51 (Cq), 171.35 (Cq), 171.25 (Cq), 168.36 (Cq), C_E-1 + C_E-5 + C_P-1 + C_G-1]; 155.92 (Cq, OCONH); 79.88 (Cq, C(CH₃)₃); [60.46, 52.54, 51.78, (2 x CH + CH₃), C_P-2 + C_E-2 + COOCH₃]; 52.02 (Cq, C_b-1); [47.31 (CH₂), 46.53 (CH₂), 43.27 (CH₂), C_G-2 + C_P-5]; [41.53, 36.48 (6 x CH₂), C_b-2 + C_b-4 + C_b-6 + C_b-8 + C_b-9 + C_b-10]; [33.15, 32.25, CH₂, C_P-4]; 29.53 (3 x CH, C_b-3 + C_b-5 + C_b-7); 28.55 (CH₂, C_E-4); 28.45 (3 x CH₃, C(CH₃)₃); 28.28 (CH₂, C_E-3); [24.98 (CH₂), 22.92 (CH₂), C_P-3].



C-3b



6.1.3.6. Síntese do Boc-Gly-Pro-Glu(OMe)-Amantadina (C-8b)



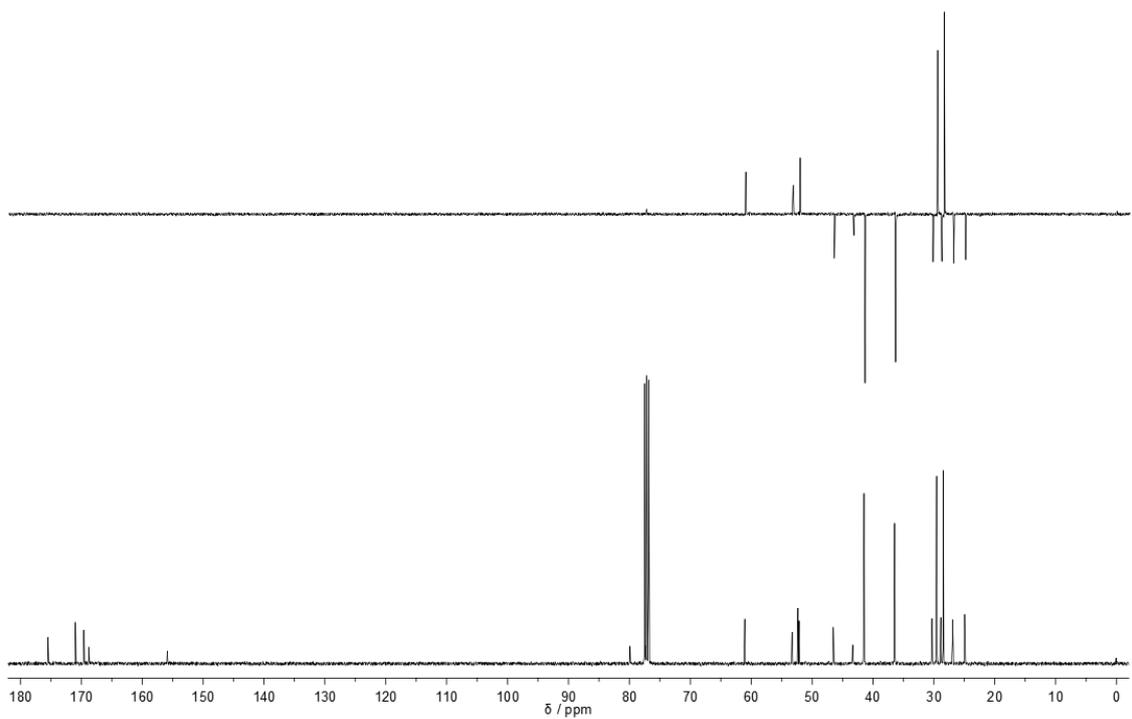
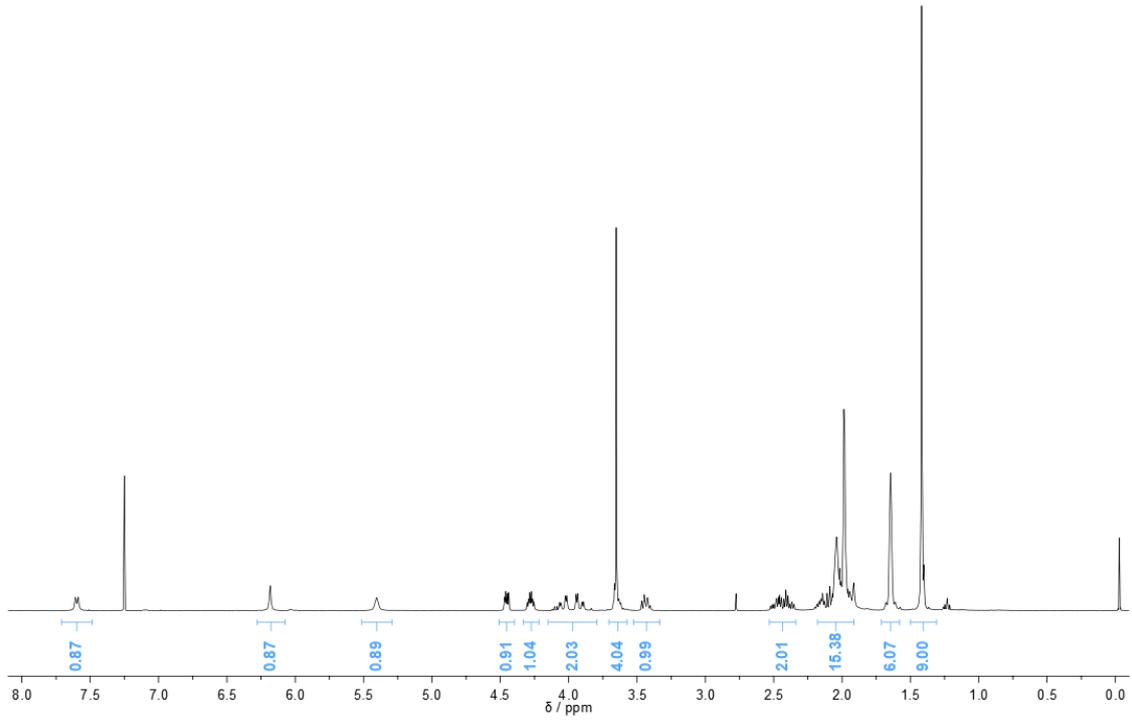
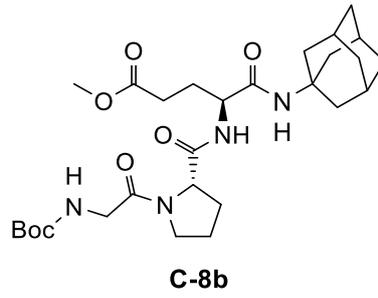
Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-3a** (secção 6.1.2.5.), procedeu-se ao acoplamento entre **H-Pro-OH** (0,1691 g; 1,469 mmol), Boc-Gly-OSu (0,5283 g; 1,940 mmol) e **C-7b** (0,7198 g; 1,762 mmol), utilizando DIEA (0,768 mL; 4,41 mmol) e TBTU (0,5188 g; 1,616 mmol), deixando-se em agitação magnética durante cerca de 2 horas após a adição do último componente. De seguida, procedeu-se ao tratamento habitual.

O óleo obtido foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna de gel de sílica usando AcOEt como eluente obtendo-se 0,5239 g do composto **C-8b**. Rendimento: 65 %.

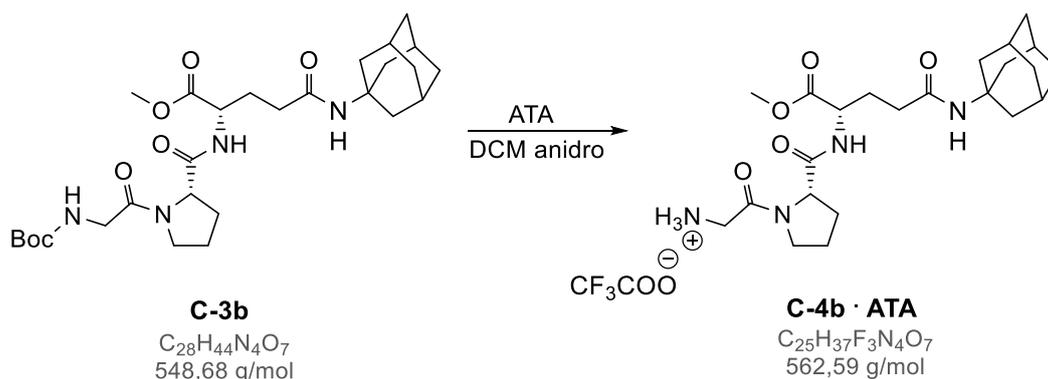
Aspetto	R _f	p.f.	[α] _D ¹⁶
sólido branco	0,44 em AcOEt	56 – 58 °C	– 29,9 ± 0,1 (c1, CHCl ₃)

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 7.60 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, CONH); 6.18 (sl, 1H, CONH); 5.40 (sl, 1H, CONH); 4.45 (dd, *J* = 7.9 Hz, 1H, H_{E-2}); 4.28 (td, *J* = 7.6, 4.4 Hz, 1H, H_{P-2}); 4.14 – 3.81 (m, 2H, H_{G-2}); 3.70 – 3.55 (m, 4H, COOCH₃ + H_{P-5}); 3.48 – 3.37 (m, 1H, H_{P-5}); 2.53 – 2.34 (m, 2H, H_{E-4}); 2.18 – 1.90 (m, 15H, H_{E-3} + H_{P-3} + H_{P-4} + H_{b-2} + H_{b-3} + H_{b-5} + H_{b-7} + H_{b-8} + H_{b-9}); 1.65 (s, 6H, H_{b-4} + H_{b-6} + H_{b-10}); 1.42 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-RMN e DEPT (CDCl₃, 101 MHz) δ ppm: [175.47 (Cq), 170.95 (Cq), 169.57 (Cq), 168.76 (Cq), C_{E-1} + C_{E-5} + C_{P-1} + C_{G-1}]; 155.87 (Cq, OCONH); 79.89 (Cq, C(CH₃)₃); [61.05, 53.28, 52.13, (2 x CH + CH₃), C_{P-2} + C_{E-2} + COOCH₃]; 52.32 (Cq, C_{b-1}); [46.51(CH₂), 43.32 (CH₂), C_{G-2} + C_{P-5}]; [41.47, 36.46, (6 x CH₂), C_{b-2} + C_{b-4} + C_{b-6} + C_{b-8} + C_{b-9} + C_{b-10}]; 30.29 (CH₂, C_{P-4}); 29.56 (3 x CH, C_{b-3} + C_{b-5} + C_{b-7}); 28.86 (CH₂, C_{E-4}); 28.46 (3 x CH₃, C(CH₃)₃); 26.92 (CH₂, C_{E-3}); 24.94 (CH₂, C_{P-3}).



6.1.3.7. Síntese do H-Gly-Pro-Glu(Amantadina)-OMe (C-4b)

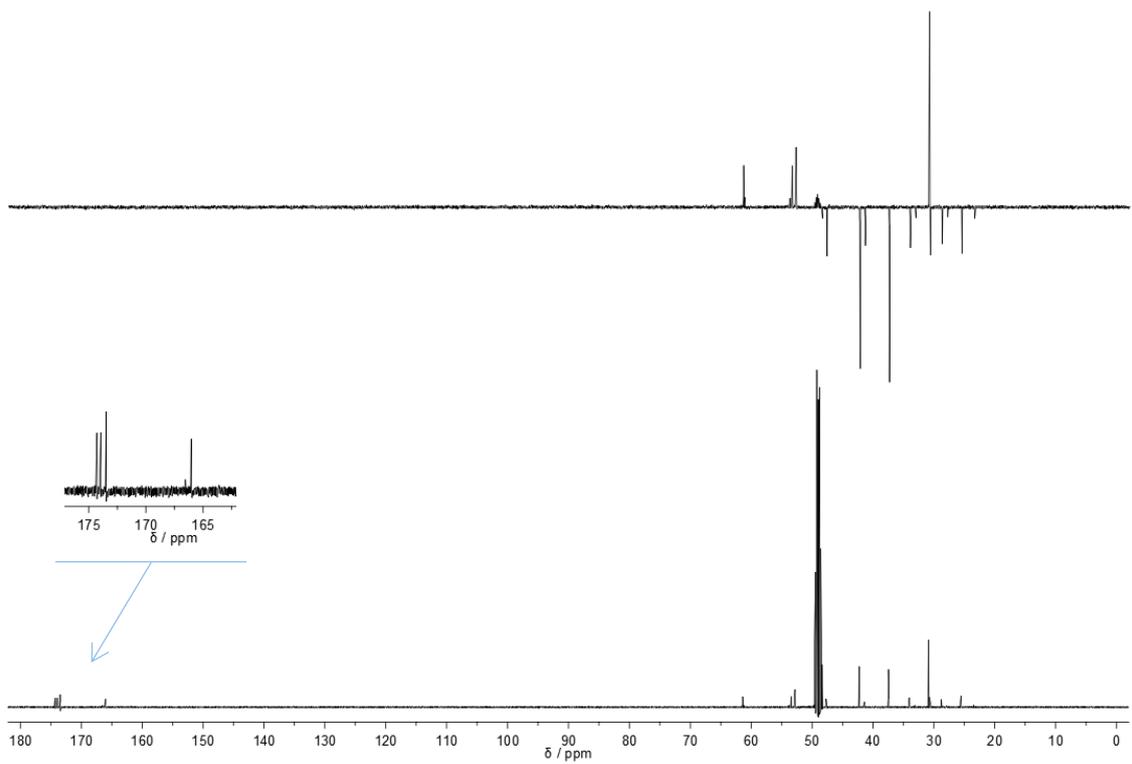
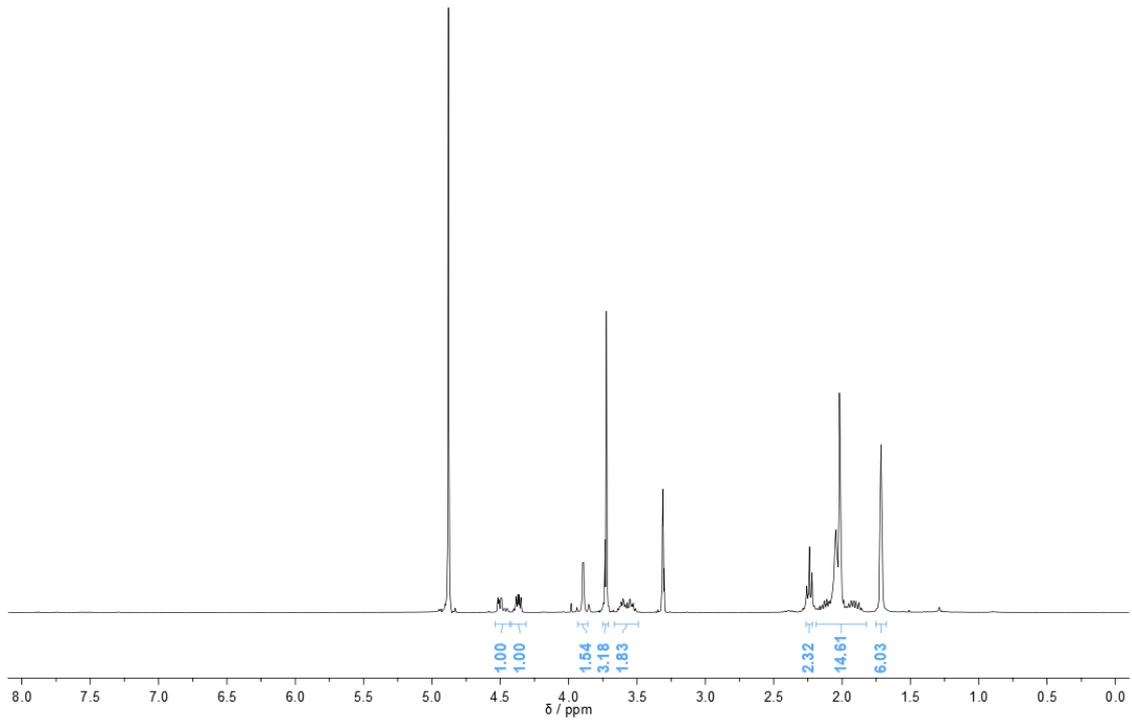
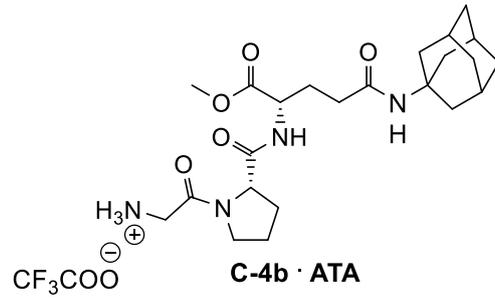


Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-2a** (secção 6.1.2.3.) procedeu-se à remoção acidolítica do grupo Boc do composto **C-3b** (0,4497 g; 0,8196 mmol) com ATA (1,89 mL; 24,6 mmol), tendo-se obtido 0,4519 g do composto **C-4b**. Rendimento: 98 %.

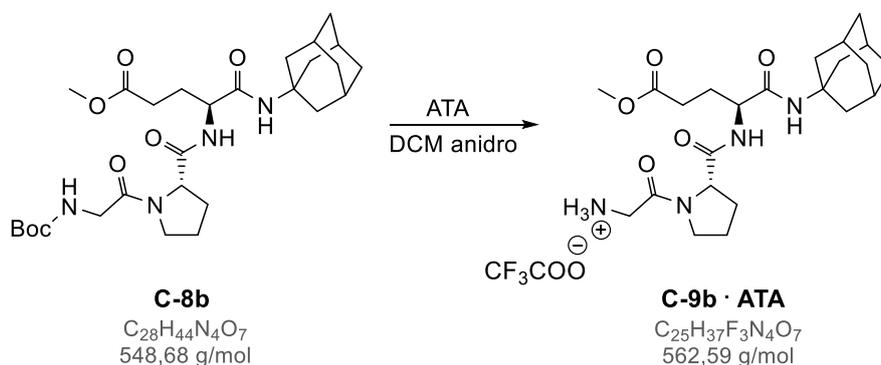
Aspetto	R _f	p.f.	[α] _D ¹⁶
sólido amarelo	0,62 em DCM/MeOH (4:1)	54 – 57 °C	+ 32,2 ± 0,4 (c1, MeOH).

¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros 80:20): [4.50 (dd, *J* = 8.3, 3.4 Hz, *major*), 4.46 (dd, *J* = 8.7, 2.9 Hz, *minor*), 1H, H_{E-2}]; 4.41 – 4.33 (m, 1H, H_{P-2}); 3.89 (d, *J* = 3.2 Hz, 2H, H_{G-2}); [3.73 (s, *minor*), 3.72 (s, *major*), 3H, COOCH₃]; 3.67 – 3.49 (m, 2H, H_{P-5}); 2.27 – 2.21 (m, 2H, H_{E-4}); 2.19 – 1.82 (m, 15H, H_{E-3} + H_{P-3} + H_{P-4} + H_{b-2} + H_{b-3} + H_{b-5} + H_{b-7} + H_{b-8} + H_{b-9}); 1.71 (s, 6H, H_{b-4} + H_{b-6} + H_{b-10}).

¹³C-RMN e DEPT (CD₃OD, 101 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros): [174.28 (Cq), 173.95 (Cq), 173.48 (Cq), 166.02 (Cq), C_{E-1} + C_{E-5} + C_{P-1} + C_{G-1}]; [61.41, 61.24, 53.81, 53.44, 52.80, (2 x CH + CH₃), C_{P-2} + C_{E-2} + COOCH₃]; 52.84 (Cq, C_{b-1}); [48.47 (CH₂), 47.69 (CH₂), C_{G-2} + C_{P-5}]; [42.31, 42.28, 41.44, 37.48, (6 x CH₂), C_{b-2} + C_{b-4} + C_{b-6} + C_{b-8} + C_{b-9} + C_{b-10}]; [34.04 (CH₂), 33.95 (CH₂), C_{P-4}]; 30.88 (3 x CH, C_{b-3} + C_{b-5} + C_{b-7}); 30.73 (CH₂, C_{E-4}); [28.77 (CH₂), 27.89 (CH₂), C_{E-3}]; [25.54 (CH₂), 23.44 (CH₂), C_{P-3}].



6.1.3.8. Síntese do H-Gly-Pro-Glu(OMe)-Amantadina (C-9b)

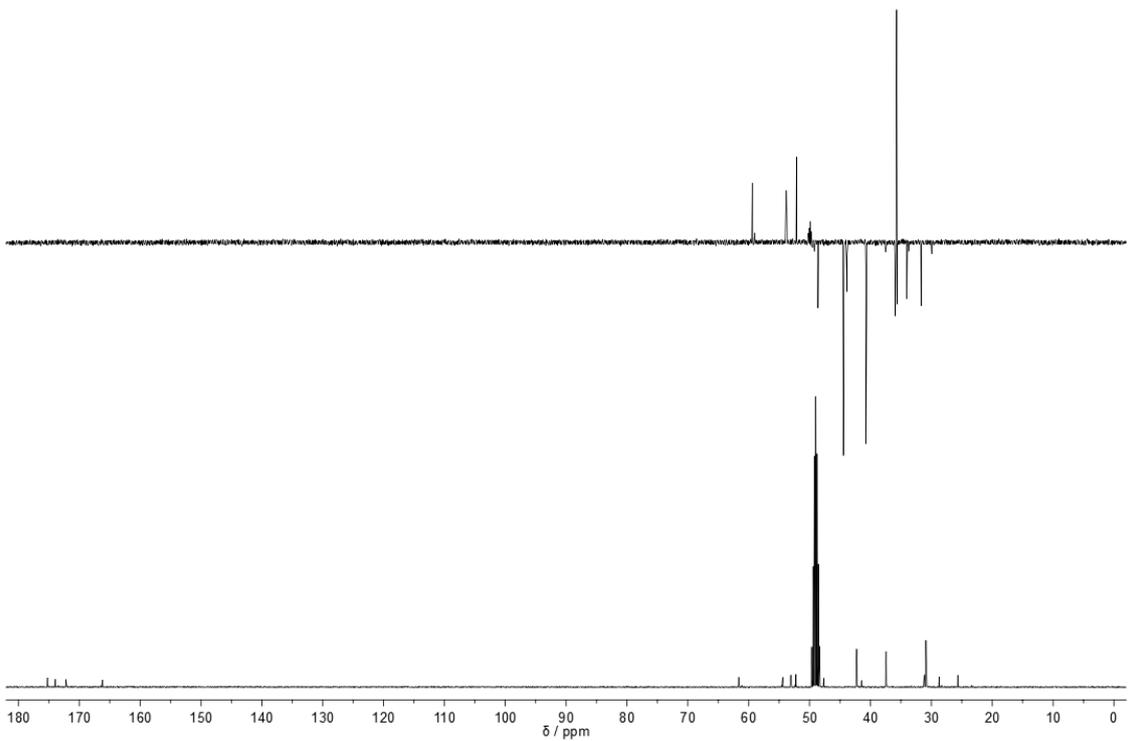
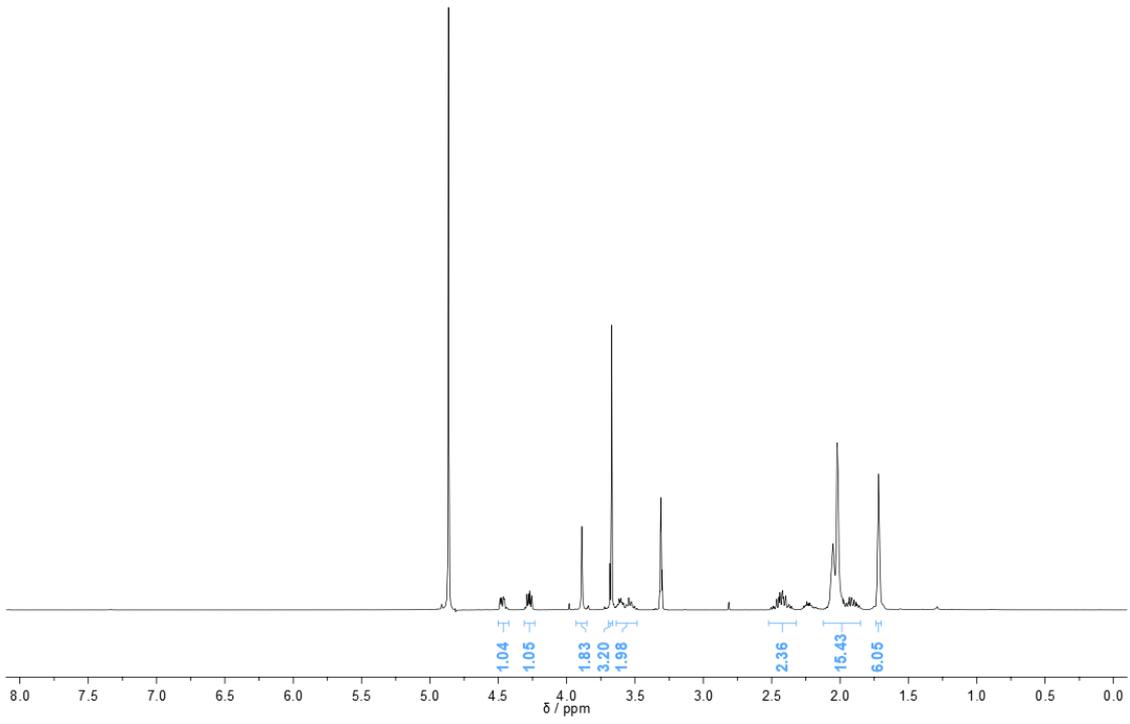
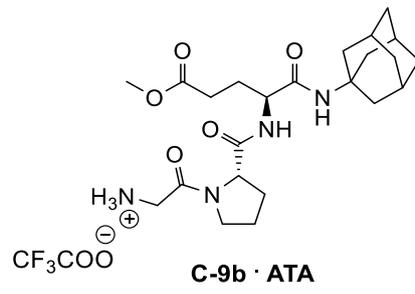


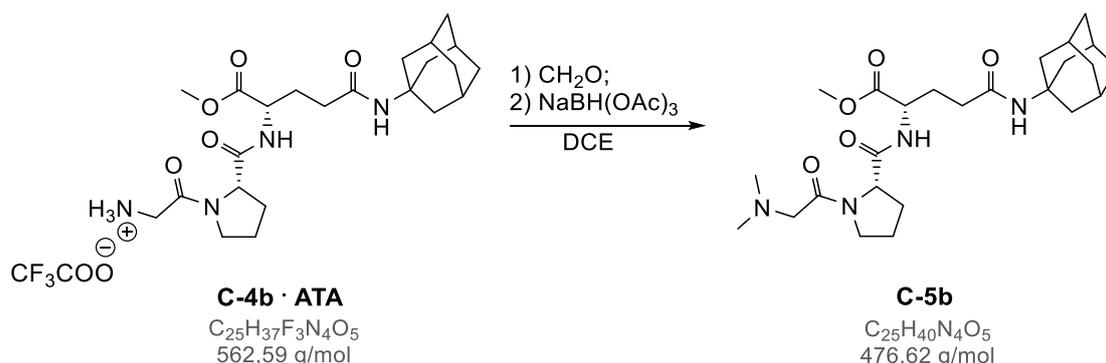
Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-2a** (secção 6.1.2.3.) procedeu-se à remoção acidolítica do grupo Boc do composto **C-8b** (0,4231 g; 0,7711 mmol) com ATA (1,78 mL; 23,1 mmol), tendo-se obtido 0,4251 g do composto **C-9b**. Rendimento: 98 %.

Aspeto	R _f	p.f.	[α] _D ¹⁶
sólido branco	0,60 em DCM/MeOH (4:1)	67 – 69 °C	– 31,2 ± 0,2 (c1, MeOH)

¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros 85:15): 4.51 – 4.43 (m, 1H, H_E-2); 4.31 – 4.23 (m, 1H, H_P-2); 3.89 (s, 2H, H_G-2); [3.68 (s, *minor*), 3.67 (s, *major*), 3H, COOCH₃]; 3.63 – 3.49 (m, 2H, H_P-5); 2.52 – 2.34 (m, 2H, H_E-4); 2.11 – 1.85 (m, 15H, H_E-3 + H_P-3 + H_P-4 + H_b-2 + H_b-3 + H_b-5 + H_b-7 + H_b-8 + H_b-9); 1.72 (s, 6H, H_b-4 + H_b-6 + H_b-10).

¹³C-RMN e DEPT (CD₃OD, 101 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros): [175.20 (Cq), 173.97 (Cq), 172.20 (Cq), 166.20 (Cq), C_E-1 + C_E-5 + C_P-1 + C_G-1]; [61.66, 61.15, 54.61, 54.41, 52.38, 52.25, (2 x CH + CH₃), C_P-2 + C_E-2 + COOCH₃]; 53.07 (Cq, C_b-1); [47.67 (CH₂), 42.25 (CH₂), C_G-2 + C_P-5]; [41.49, 37.43, (6 x CH₂), C_b-2 + C_b-4 + C_b-6 + C_b-8 + C_b-9 + C_b-10]; [31.27 (CH₂), 31.15 (CH₂), C_P-4]; 30.88 (3 x CH, C_b-3 + C_b-5 + C_b-7); 30.76 (CH₂, C_E-4); [28.71 (CH₂), 28.27 (CH₂), C_E-3]; [25.66 (CH₂), 23.41 (CH₂), C_P-3].



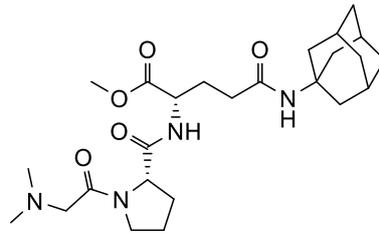
6.1.3.9. Síntese do (*N,N*-dimetil-Gly)-Pro-Glu(Amantadina)-OMe (C-5b)

Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-5a** (secção 6.1.2.9.) procedeu-se à *N*-dimetilação do composto **C-4b** (0,3419 g; 0,6077 mmol), utilizando uma solução aquosa de CH_2O a 37% m/v (0,114 mL; 1,52 mmol) e $NaBH(OAc)_3$ (0,6440 g; 3,038 mmol), deixando-se em agitação magnética durante cerca de 2 horas. Fez-se o tratamento descrito para o composto **C-5a**, tendo-se obtido 0,2143 g do composto **C-5b**. Rendimento: 74 %.

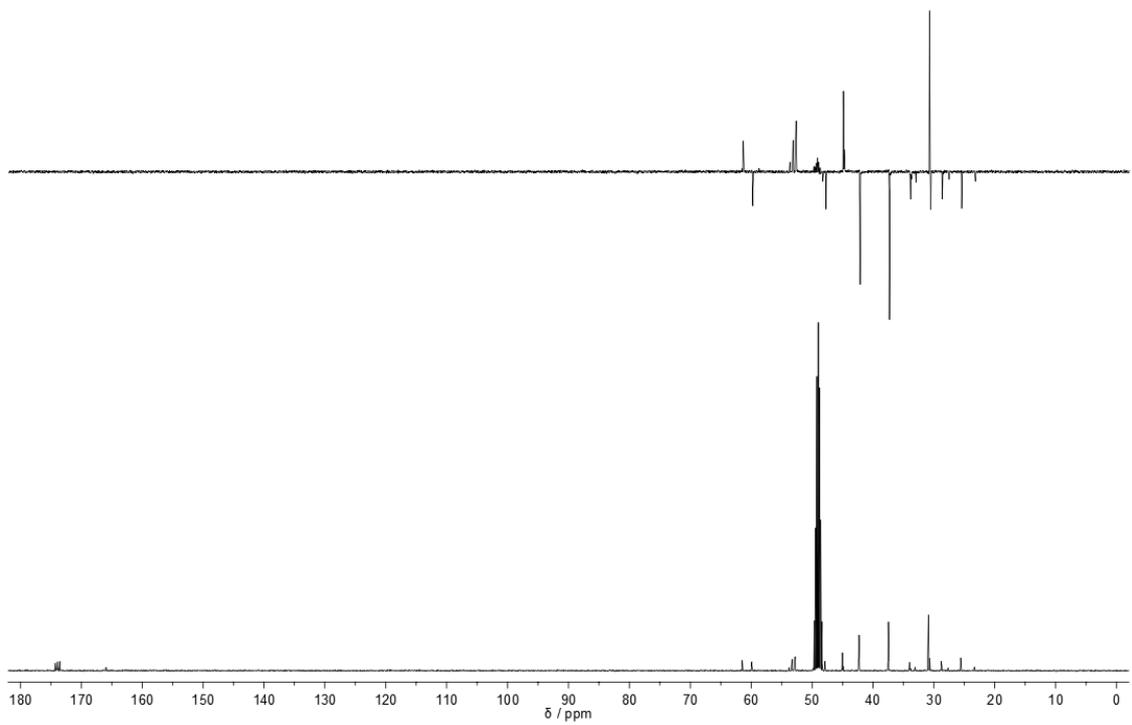
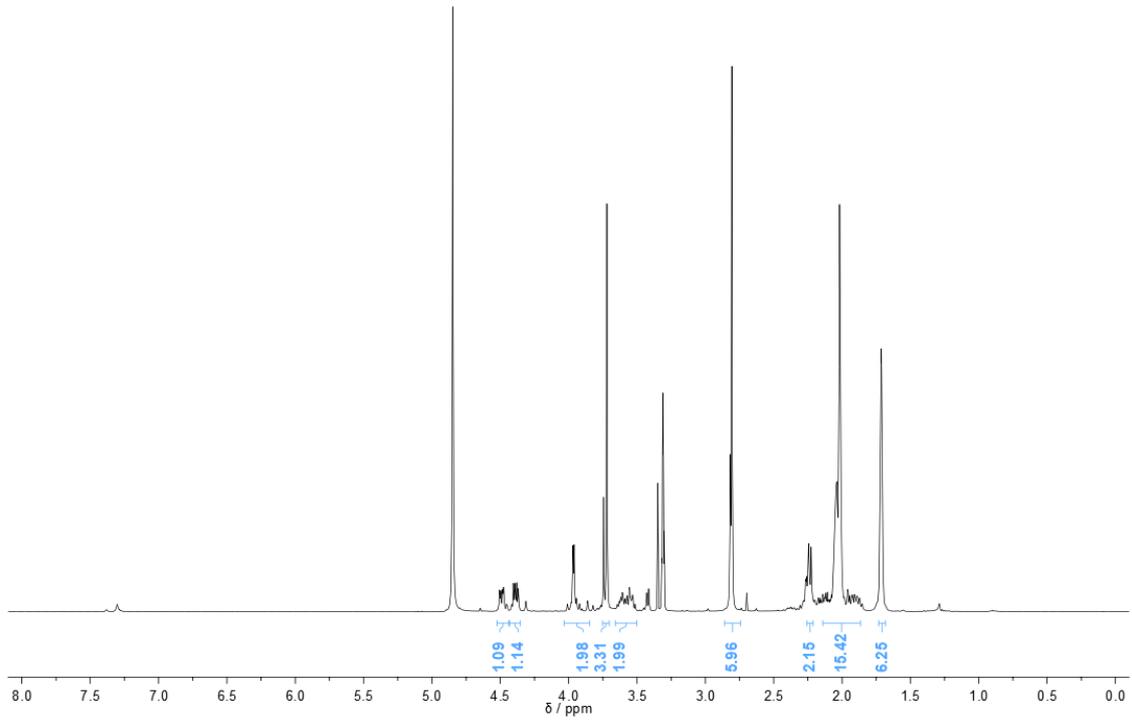
Aspetto	R_f	p.f.	$[\alpha]_D^{20}$
sólido branco cristalino	0,52 em DCM/MeOH (4:1)	79 – 81 °C	$-28,8 \pm 0,2$ (c_1 , MeOH)

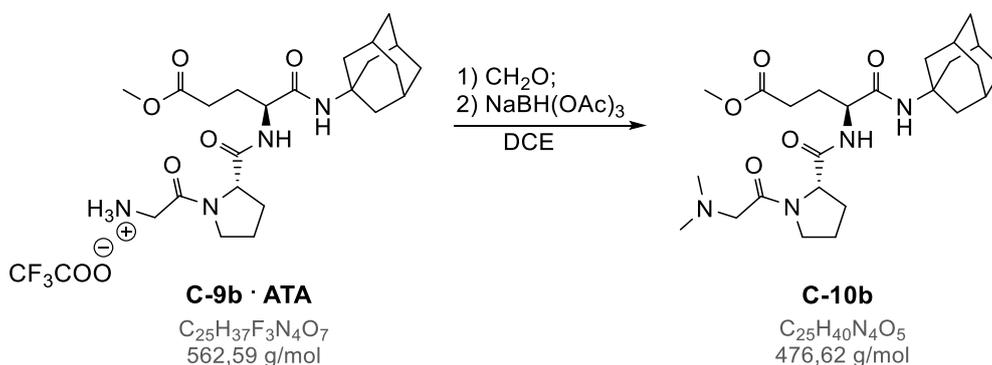
1H -RMN (CD_3OD , 400 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros 80:20): 4.52 – 4.44 (m, 1H, H_E-2); 4.39 (dd, $J = 9.4, 4.8$ Hz, 1H, H_P-2); 4.02 – 3.93 (m, 2H, H_G-2); [3.74 (s, *minor*), 3.72 (s, *major*), 3H, $COOCH_3$]; 3.65 – 3.50 (m, 2H, H_P-5); 2.81 (s, 6H, $(CH_3)_2N$); 2.28 – 2.20 (m, 2H, H_E-4); 2.14 – 1.87 (m, 15H, $H_E-3 + H_P-3 + H_P-4 + H_b-2 + H_b-3 + H_b-5 + H_b-7 + H_b-8 + H_b-9$); 1.71 (s, 6H, $H_b-4 + H_b-6 + H_b-10$).

^{13}C -RMN e DEPT (CD_3OD , 101 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros): [174.26 (Cq), 173.92 (Cq), 173.51 (Cq), 165.93 (Cq), $C_E-1 + C_E-5 + C_P-1 + C_G-1$]; [61.47, 53.81, 53.29 (2 x CH + CH_3), $C_P-2 + C_E-2 + COOCH_3$]; 52.84 (Cq, C_b-1); [59.90 (CH_2), 47.86 (CH_2), $C_G-2 + C_P-5$]; 45.05 (2 x CH_3 , $(CH_3)_2N$); [42.29, 37.48, (6 x CH_2), $C_b-2 + C_b-4 + C_b-6 + C_b-8 + C_b-9 + C_b-10$]; [34.01 (CH_2), 33.10 (CH_2), C_P-4]; 30.88 (3 x CH, $C_b-3 + C_b-5 + C_b-7$); 30.68 (CH_2 , C_E-4); [28.78 (CH_2), 27.69 (CH_2), C_E-3]; [25.61 (CH_2), 23.36 (CH_2), C_P-3].



C-5b



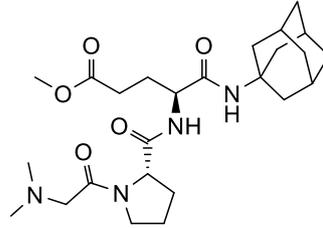
6.1.3.10. Síntese do (*N,N*-dimetil-Gly)-Pro-Glu(OMe)-Amantadina (**C-10b**)

Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-5a** (secção 6.1.2.9.) procedeu-se à *N*-dimetilação do composto **C-9b** (0,2995 g; 0,5324 mmol), utilizando uma solução aquosa de CH_2O a 37% (0,100 mL; 1,33 mmol) e NaBH(OAc)_3 (0,5642 g; 2,662 mmol), deixando-se em agitação magnética durante cerca de 2 horas. Fez-se o tratamento descrito para o composto **C-5a**, tendo-se obtido 0,1903 g do composto **C-10b**. Rendimento: 75 %.

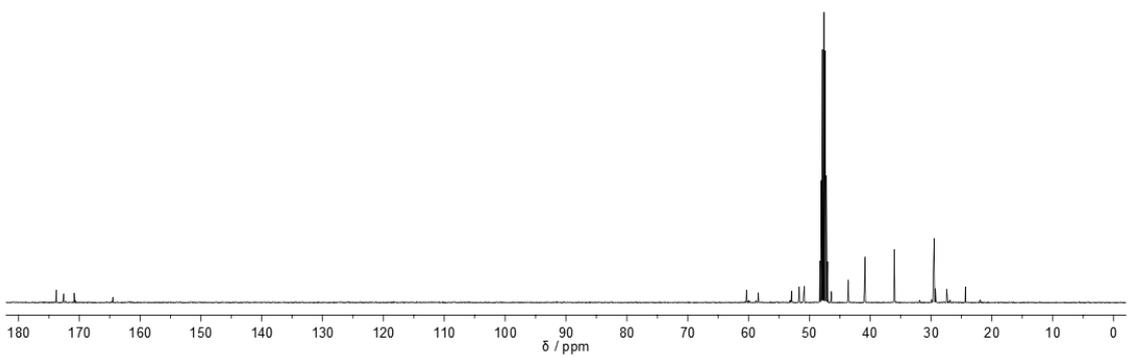
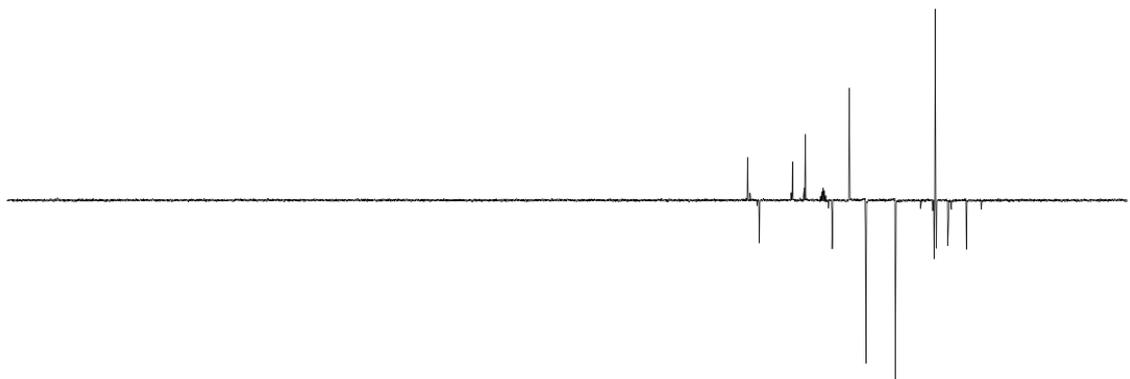
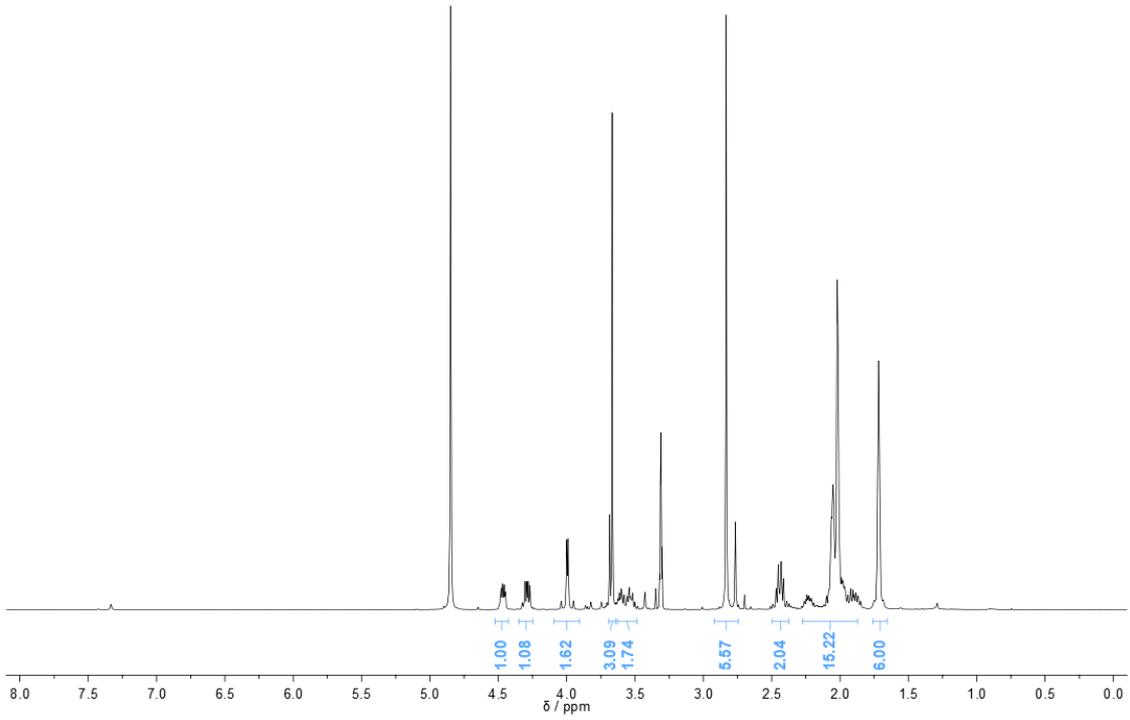
Aspetto	R_f	p.f.	$[\alpha]_D^{20}$
sólido branco cristalino	0,53 em DCM/MeOH (4:1)	67 – 69 °C	+ 23,9 ± 0,2 (c1, MeOH)

$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros 85:15): 4.46 (dd, $J = 8.6$, 4.1 Hz, 1H, H_{E-2}); 4.29 (dd, $J = 8.9$, 5.1 Hz, 1H, H_{P-2}); 3.99 (d, $J = 3.8$ Hz, 2H, H_{G-2}); [3.69 (s, *minor*), 3.67 (s, *major*), 3H, COOCH_3]; 3.63 – 3.48 (m, 2H, H_{P-5}); 2.83 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{N}$); 2.50 – 2.37 (m, 2H, H_{E-4}); 2.27 – 1.86 (m, 15H, $\text{H}_{E-3} + \text{H}_{P-3} + \text{H}_{P-4} + \text{H}_{b-2} + \text{H}_{b-3} + \text{H}_{b-5} + \text{H}_{b-7} + \text{H}_{b-8} + \text{H}_{b-9}$); 1.72 (s, 6H, $\text{H}_{b-4} + \text{H}_{b-6} + \text{H}_{b-10}$).

$^{13}\text{C-RMN e DEPT}$ (CD_3OD , 101 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros): [173.78 (Cq), 172.58 (Cq), 170.79 (Cq), 164.48 (Cq), $\text{C}_{E-1} + \text{C}_{E-5} + \text{C}_{P-1} + \text{C}_{G-1}$]; [60.32, 59.93, 53.17, 52.95, 51.00, 50.84, (2 x CH + CH_3), $\text{C}_{P-2} + \text{C}_{E-2} + \text{COOCH}_3$]; 51.66 (Cq, C_{b-1}); [58.78 (CH_2), 58.39 (CH_2), 46.43 (CH_2), $\text{C}_{G-2} + \text{C}_{P-5}$]; 43.63 (2 x CH_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{N}$); [40.88, 36.04, (6 x CH_2), $\text{C}_{b-2} + \text{C}_{b-4} + \text{C}_{b-6} + \text{C}_{b-8} + \text{C}_{b-9} + \text{C}_{b-10}$]; [29.92 (CH_2), 29.68 (CH_2), C_{P-4}]; 29.29 (CH_2 , C_{E-4}); 29.49 (3 x CH, $\text{C}_{b-3} + \text{C}_{b-5} + \text{C}_{b-7}$); [27.42 (CH_2), 26.84 (CH_2), C_{E-3}]; [24.37 (CH_2), 21.93 (CH_2), C_{P-3}]

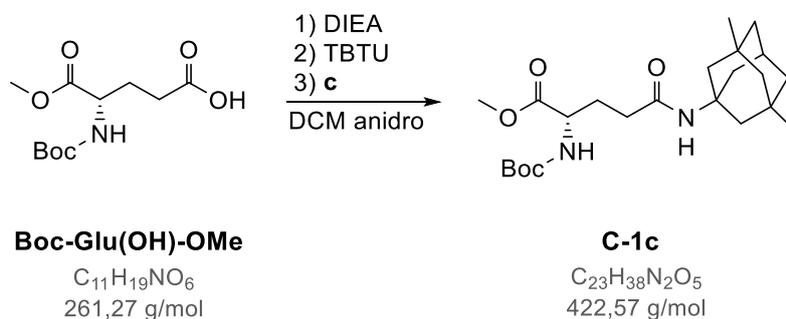


C-10b



6.1.4. Síntese dos conjugados de GPE com Memantina

6.1.4.1. Síntese do Boc-Glu(Memantina)-OMe (C-1c)



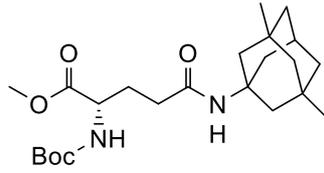
Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-1a** (secção 6.1.2.1.), procedeu-se ao acoplamento entre **Boc-Glu(OH)-OMe** (0,4012 g; 1,536 mmol) e a amina **c** (0,5018 g; 1,843 mmol), utilizando DIEA (0,803 mL; 4,61 mmol) e TBTU (0,5425 g; 1,690 mmol), deixando-se reagir durante 2 horas e 30 minutos após a adição do último componente. Em seguida, procedeu-se ao tratamento idêntico ao realizado para o composto **C-1a**.

O óleo obtido foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna de gel de sílica usando AcOEt como eluente obtendo-se 0,6101 g do composto **C-1c**. Rendimento: 94 %.

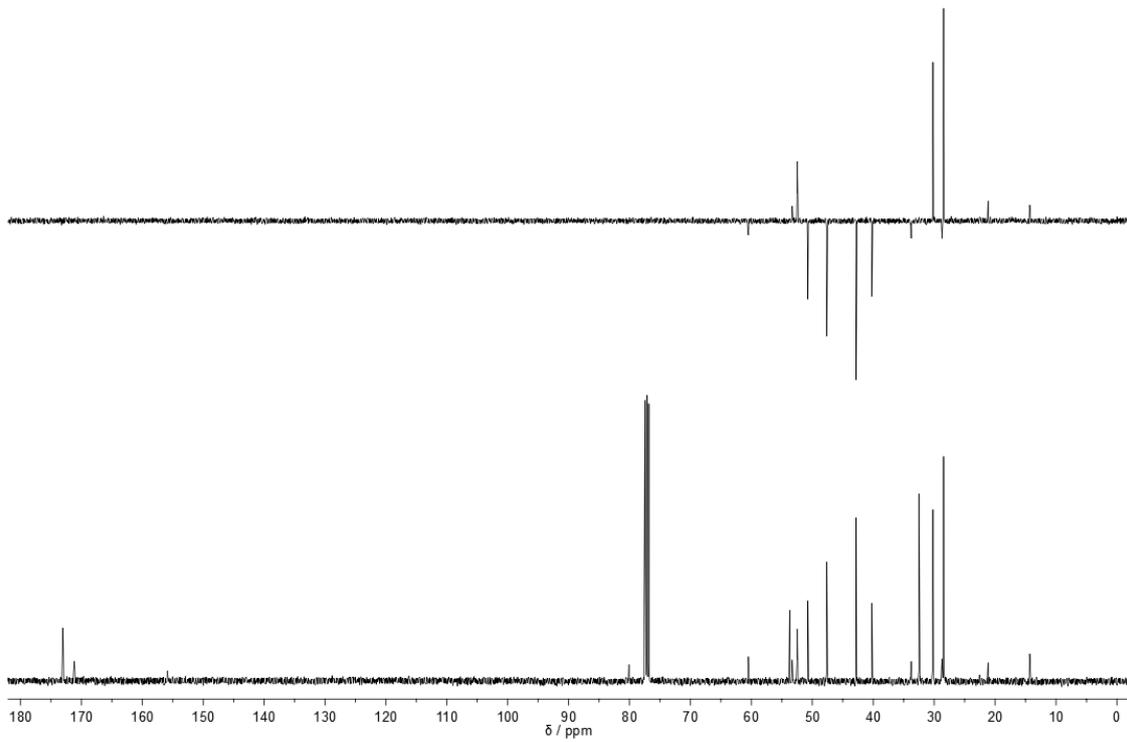
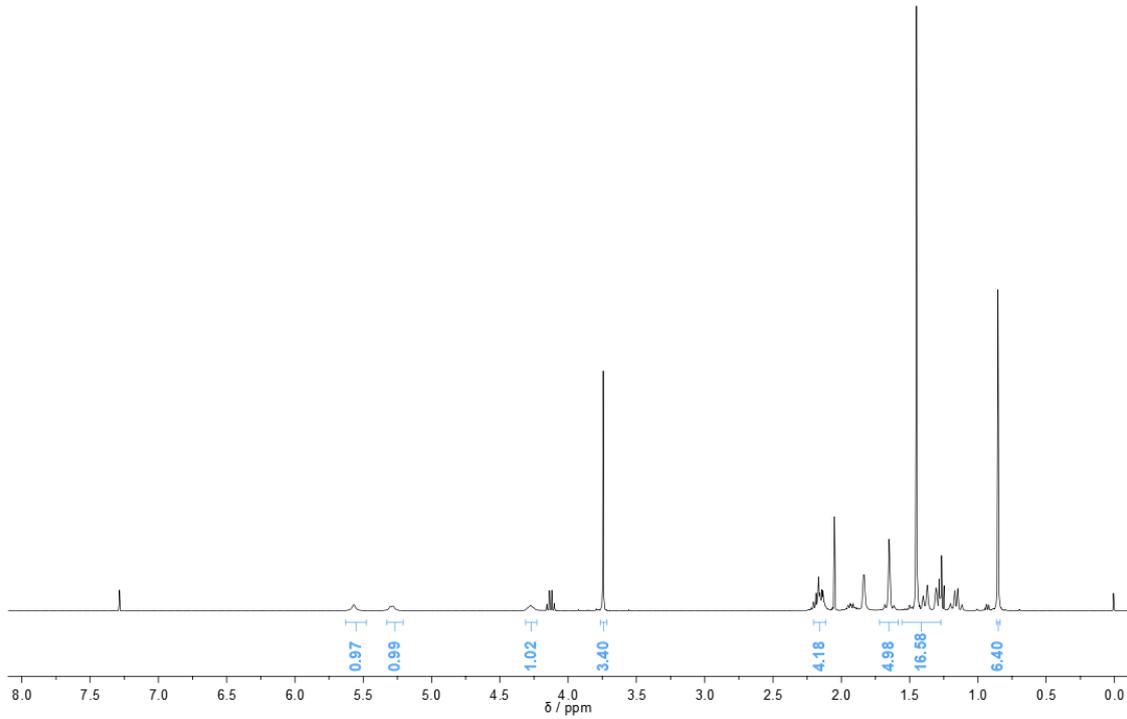
Aspetto	R _f	[α] _D ²²
óleo amarelo viscoso	0,89 em AcOEt	+ 52,2 ± 0,4 (c1, CHCl ₃)

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 5.57 (sl, 1H, CONH); 5.29 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, CONH); 4.27 (sl, 1H, H_E-2); 3.74 (s, 3H, COOCH₃); 2.22 – 2.11 (m, 4H, H_E-3 + H_E-4); [1.71 – 1.60 (m, 5H), 1.54 – 1.31 (m, 17H), C(CH₃)₃ + H_c-2 + H_c-3 + H_c-4 + H_c-5 + H_c-6 + H_c-7 + H_c-8 + H_c-9 + H_c-10]; 0.85 (s, 6H, H_c-11 + H_c-12).

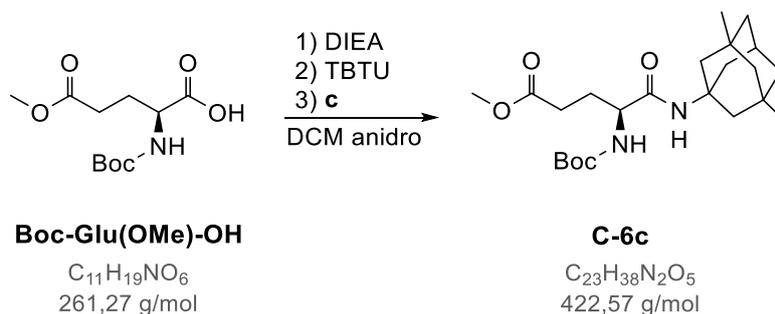
¹³C-RMN e DEPT (CDCl₃, 101 MHz) δ ppm: [173.01 (Cq), 171.12 (Cq), C_E-1 + C_E-5]; 155.88 (Cq, OCONH); 80.10 (Cq, C(CH₃)₃); 53.71 (Cq, C_c-1); [53.29, 52.48 (CH + CH₃), C_E-2 + COOCH₃]; [50.72, 47.62, 42.79, (6 x CH₂), C_c-2 + C_c-4 + C_c-6 + C_c-8 + C_c-9 + C_c-10]; 40.21 (2 x CH₂, C_E-3 + C_E-4); 32.48 (2 x Cq, C_c-3 + C_c-7); [30.19, 28.45, 21.15, (CH + 5 x CH₃), C_c-11 + C_c-12 + C(CH₃)₃ + C_c-5].



C-1c



6.1.4.2. Síntese do Boc-Glu(OMe)- Memantina (C-6c)



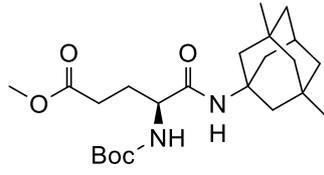
Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-1a** (secção 6.1.2.1.), procedeu-se ao acoplamento entre **Boc-Glu(OMe)-OH** (0,4021 g; 1,539 mmol) e a amina **c** (0,3985 g; 1,847 mmol), utilizando DIEA (0,804 mL; 4,62 mmol) e TBTU (0,5436 g; 1,693 mmol), deixando-se reagir durante 2 horas e 30 minutos após a adição do último componente. Em seguida, procedeu-se ao tratamento idêntico ao realizado para o composto **C-1a**.

O óleo obtido foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna de gel de sílica usando AcOEt como eluente, obtendo-se 0,5788 g do composto **C-6c**. Rendimento: 89 %.

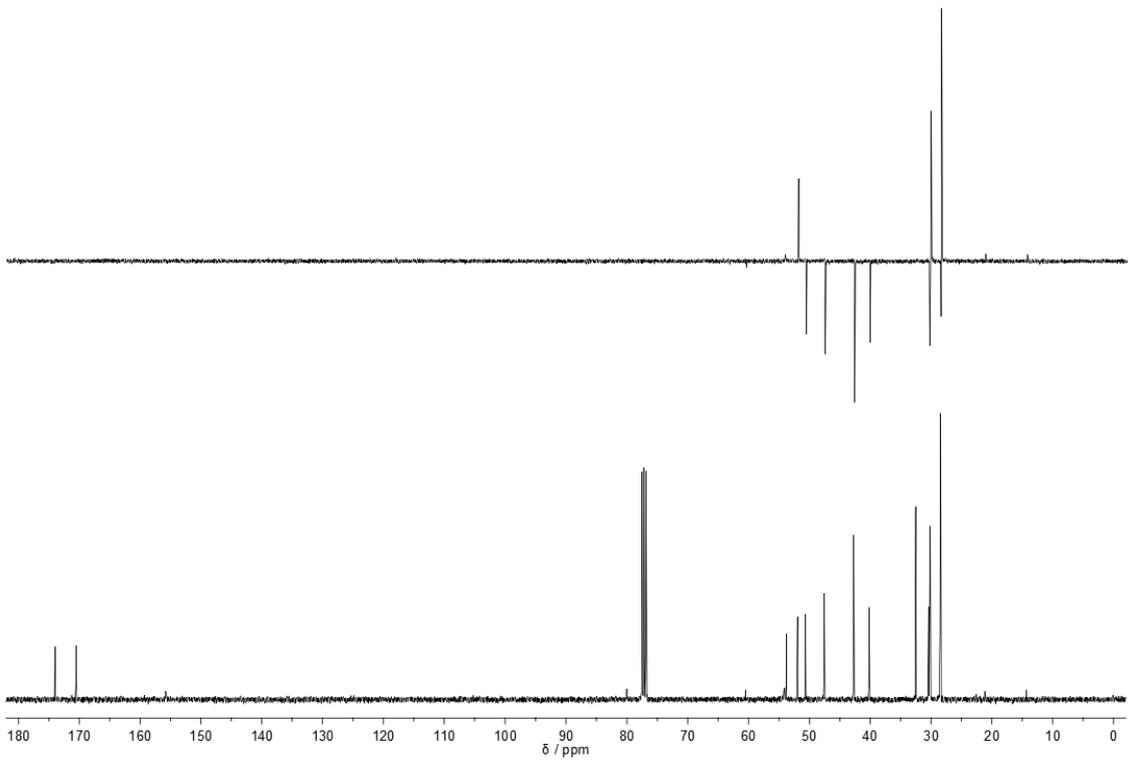
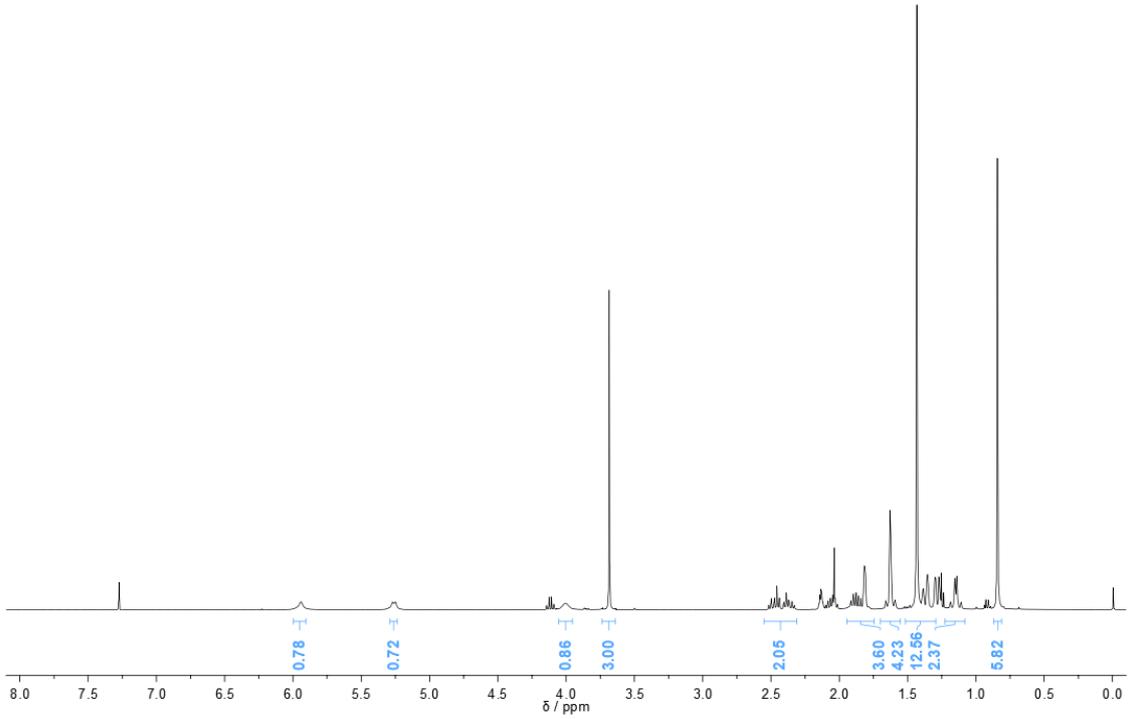
Aspeto	R_f	$[\alpha]_D^{22}$
sólido branco de baixo p.f.	0,92 em AcOEt	$-16,5 \pm 0,3$ (c1, CHCl ₃)

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 5.94 (sl, 1H, CONH); 5.26 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, CONH); 4.00 (sl, 1H, H_E-2); 3.68 (s, 3H, COOCH₃); 2.59 – 2.32 (m, 2H, H_E-4); [1.94 – 1.75 (m, 4H), 1.70 – 1.56 (m, 4H), 1.51 – 1.30 (m, 13H), 1.22 – 1.08 (m, 3H), H_E-3 + C(CH₃)₃ + H_C-2 + H_C-3 + H_C-4 + H_C-5 + H_C-6 + H_C-7 + H_C-8 + H_C-9 + H_C-10]; 0.84 (s, 6H, H_C-11 + H_C-12).

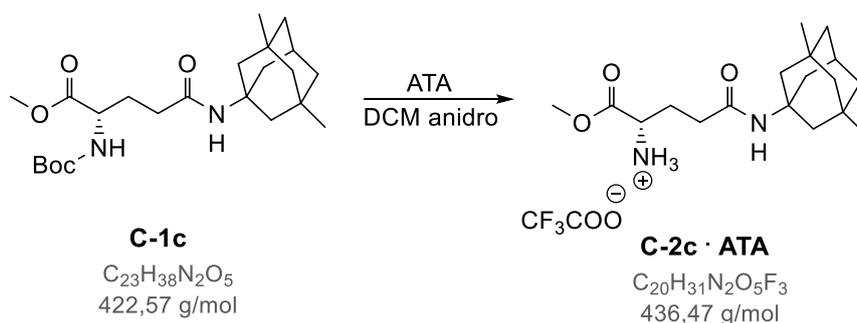
¹³C-RMN e DEPT (CDCl₃, 101 MHz) δ ppm: [173.97 (Cq), 170.51 (Cq), C_E-1 + C_E-5]; 155.80 (Cq, OCONH); 80.00 (Cq, C(CH₃)₃); 53.78 (Cq, C_C-1); [54.11, 51.93, (CH + CH₃), C_E-2 + COOCH₃]; [50.67, 47.56, 42.79, (6 x CH₂), C_C-2 + C_C-4 + C_C-6 + C_C-8 + C_C-9 + C_C-10]; 40.17 (2 x CH₂, C_E-3 + C_E-4); 32.50 (2 x Cq, C_C-3 + C_C-7); [30.15, 28.43, 21.15, (CH + 5 x CH₃), C_C-11 + C_C-12 + C(CH₃)₃ + C_C-5].



C-6c



6.1.4.3. Síntese do H-Glu(Memantina)-OMe (C-2c)

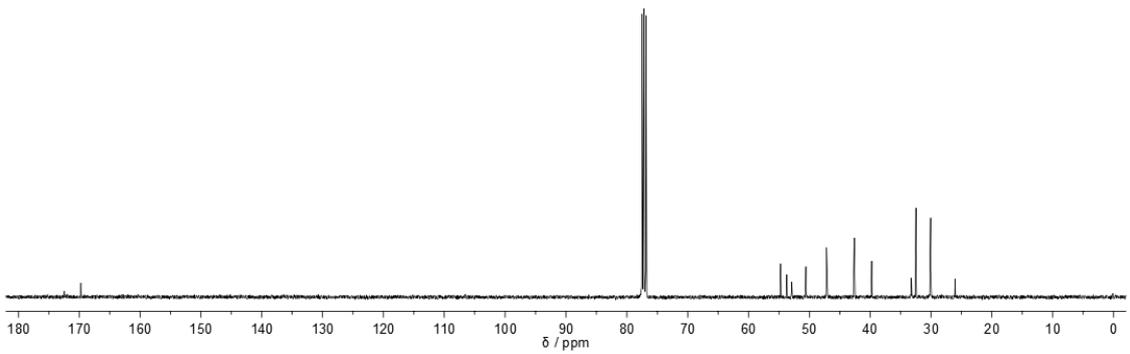
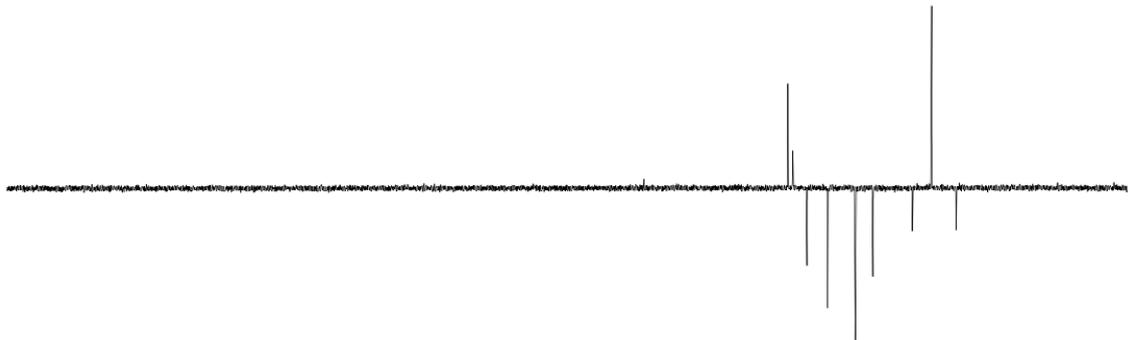
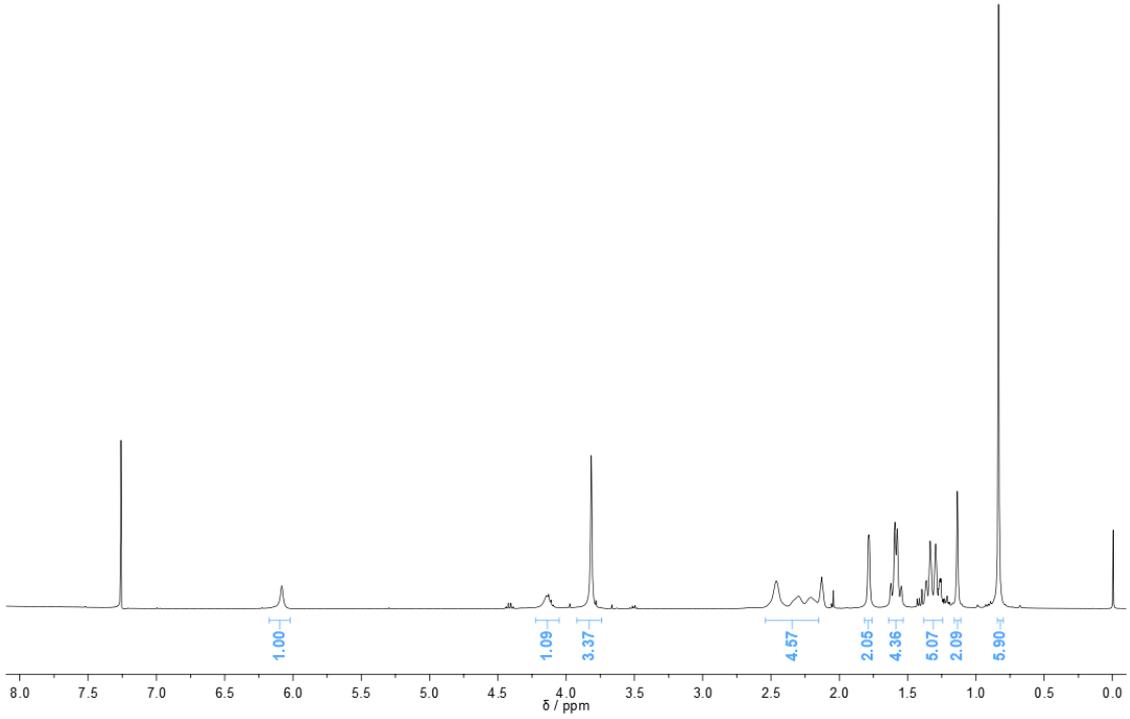
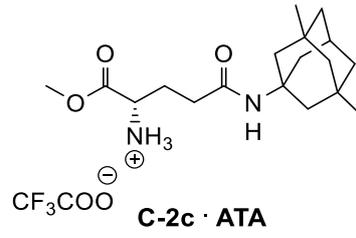


Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-2a** (secção 6.1.2.3.) procedeu-se à remoção acidolítica do grupo Boc do composto **C-1c** (0,5590 g; 1,323 mmol) com ATA (3,06 mL; 39,7 mmol), tendo-se obtido 0,5659 g do composto **C-2c** pretendido. Rendimento: 98%.

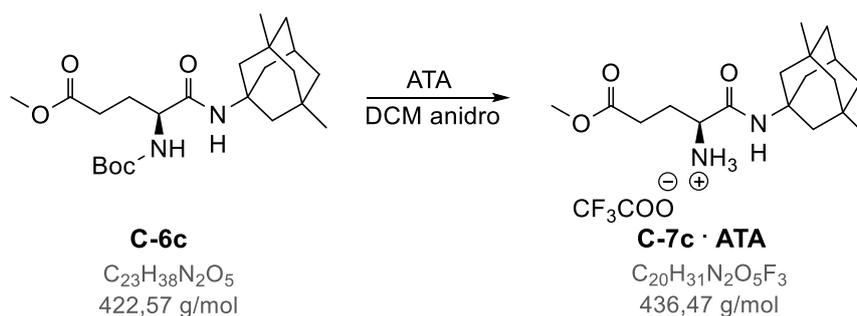
Aspetto	R _f	[α] _D ²¹
óleo amarelo	0,075 em AcOEt	- 8,2 ± 0,9 (c1, CHCl ₃)

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 6.08 (sl, 1H, CONH); 4.14 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, H_E-2); 3.82 (s, 3H, COOCH₃); [2.54 – 2.14 (m, 5H), 1.79 (s, 2H), 1.58 (q, *J* = 12.0 Hz, 5H), 1.38 – 1.25 (m, 5H), 1.14 (s, 2H), H_E-3 + H_E-4 + H_C-2 + H_C-4 + H_C-5 + H_C-6 + H_C-8 + H_C-9 + H_C-10]; 0.85 (s, 6H, H_C-11 + H_C-12).

¹³C-RMN e DEPT (CDCl₃, 101 MHz) δ ppm: [172.46 (Cq), 169.72 (Cq), C_E-1 + C_E-5]; 54.73 (Cq, C_C-1); [53.70, 52.89, (CH + CH₃), C_E-2 + COOCH₃]; [50.58, 47.18, 42.63, (6 x CH₂), C_C-2 + C_C-4 + C_C-6 + C_C-8 + C_C-9 + C_C-10]; 39.74 (2 x CH₂, C_E-3 + C_E-4); 32.48 (2 x Cq, C_C-3 + C_C-7); [30.08, 26.05, (CH + 2 x CH₃), C_C-5 + C_C-11 + C_C-12].



6.1.4.4. Síntese do H-Glu(OMe)-Memantina (C-7c)

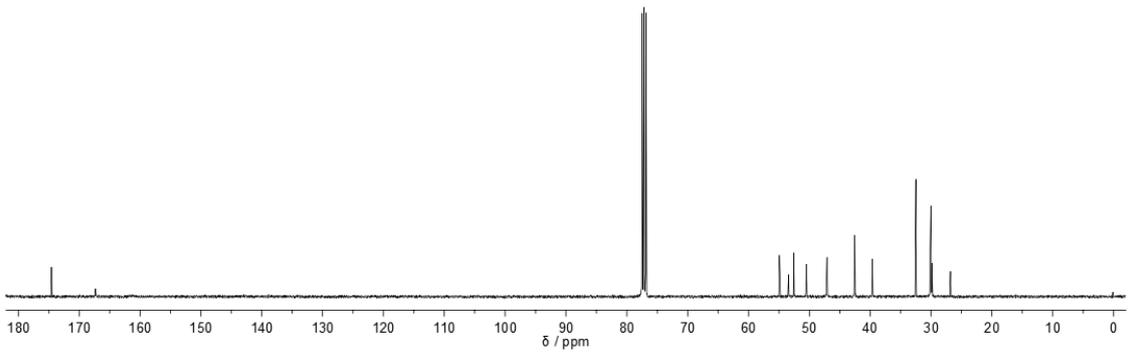
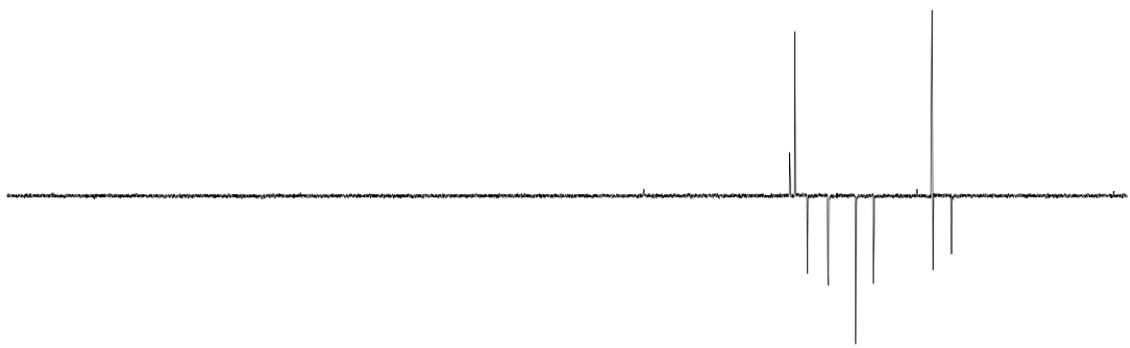
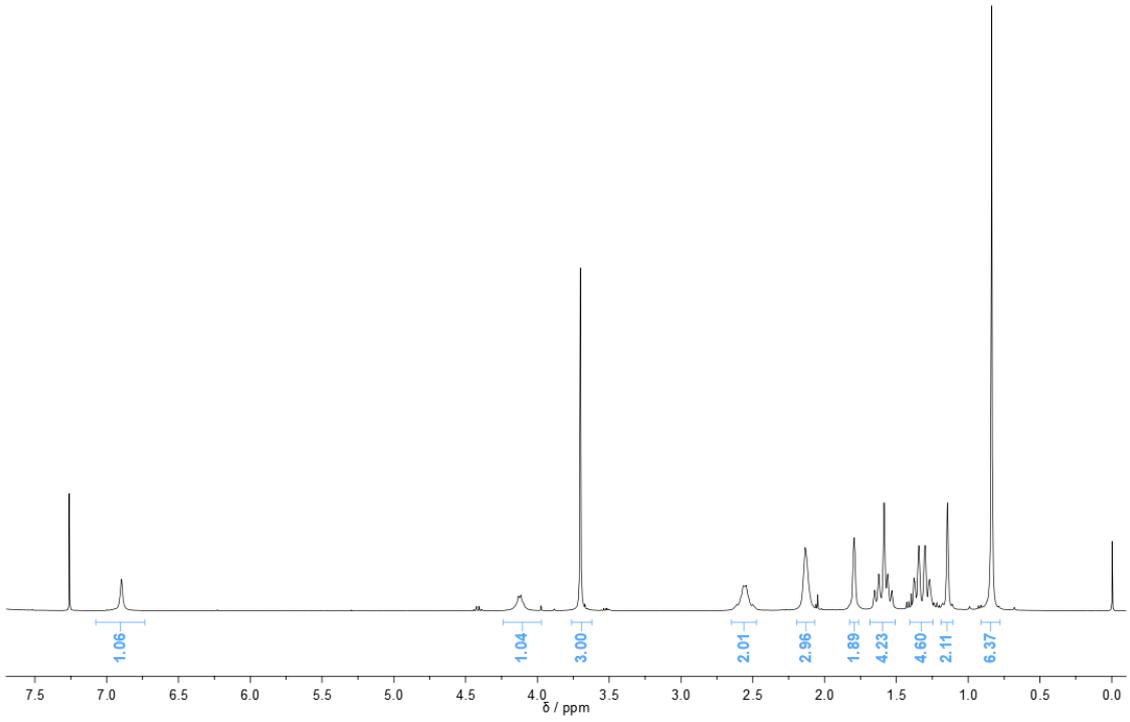
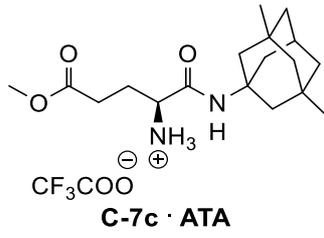


Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-2a** (secção 6.1.2.3.) procedeu-se à remoção acidolítica do grupo Boc do composto **C-6c** (0,5281 g; 1,250 mmol) com ATA (2,89 mL; 37,5 mmol), tendo-se obtido 0,5292 g do composto **C-7c**. Rendimento: 97 %.

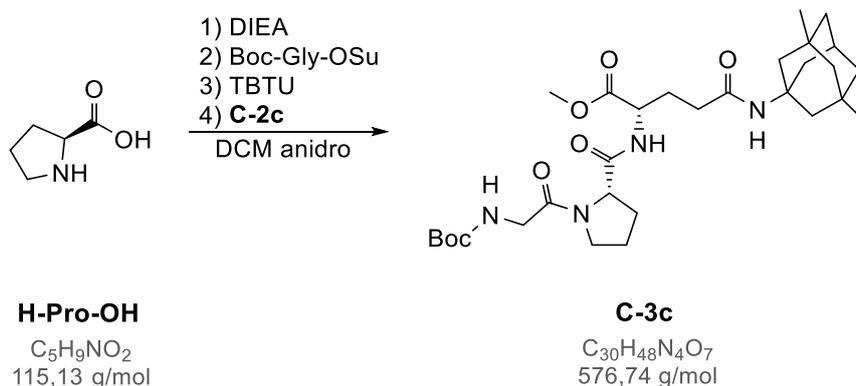
Aspeto	R_f	$[\alpha]_D^{21}$
óleo acastanhado	0,098 em AcOEt	+ 7,7 ± 0,9 (c1, CHCl ₃)

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 6.90 (sl, 1H, CONH); 4.12 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, H_E-2); 3.70 (s, 3H, COOCH₃); [2.56 (q, $J = 18.2$ Hz, 2H), 2.13 (s, 3H), 1.79 (s, 2H), 1.72 – 1.48 (m, 4H), 1.40 – 1.24 (m, 5H), 1.14 (s, 2H), H_E-3 + H_E-4 + H_C-2 + H_C-4 + H_C-5 + H_C-6 + H_C-8 + H_C-9 + H_C-10]; 0.84 (s, 6H, H_C-11 + H_C-12).

¹³C-RMN e DEPT (CDCl₃, 101 MHz) δ ppm: [174.54 (Cq), 167.31 (Cq), C_E-1 + C_E-5]; 54.93 (Cq, C_C-1); [53.41, 52.57, (CH + CH₃), C_E-2 + COOCH₃]; [50.51, 47.12, 42.55, (6 x CH₂), C_C-2 + C_C-4 + C_C-6 + C_C-8 + C_C-9 + C_C-10]; 39.66 (2 x CH₂, C_E-3 + C_E-4); 32.48 (2 x Cq, C_C-3 + C_C-7); [30.02, 26.82, (CH + 2 x CH₃), C_C-5 + C_C-11 + C_C-12].



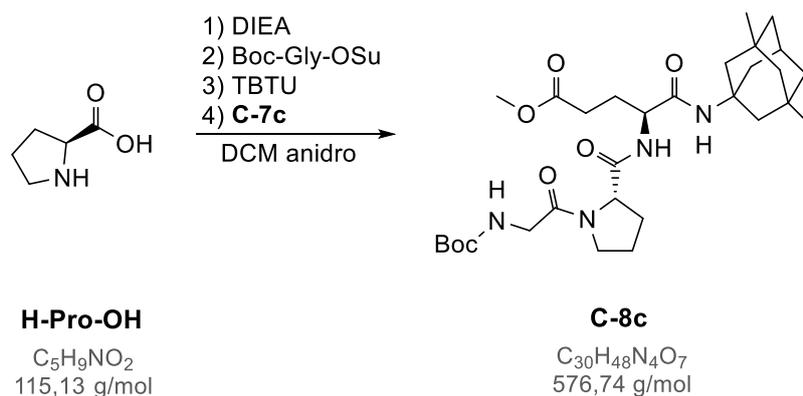
6.1.4.5. Síntese do Boc-Gly-Pro-Glu(Memantina)-OMe (C-3c)



Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-3a** (secção 6.1.2.5.), procedeu-se ao acoplamento entre **H-Pro-OH** (0,1236 g; 1,074 mmol), Boc-Gly-OSu (0,3215 g; 1,181 mmol) e **C-2c** (0,5623 g; 1,289 mmol), utilizando DIEA (0,281 mL; 3,22 mmol) e TBTU (0,3793 g; 1,181 mmol), deixando-se em agitação magnética durante cerca de 2 horas após a adição do último componente. De seguida, procedeu-se ao tratamento habitual.

O óleo obtido foi sujeito a cromatografia de adsorção em coluna de gel de sílica usando AcOEt como eluente, obtendo-se 0,4336 g do composto **C-3c** com algumas impurezas.

6.1.4.6. Síntese do Boc-Gly-Pro-Glu(OMe)- Memantina (C-8c)



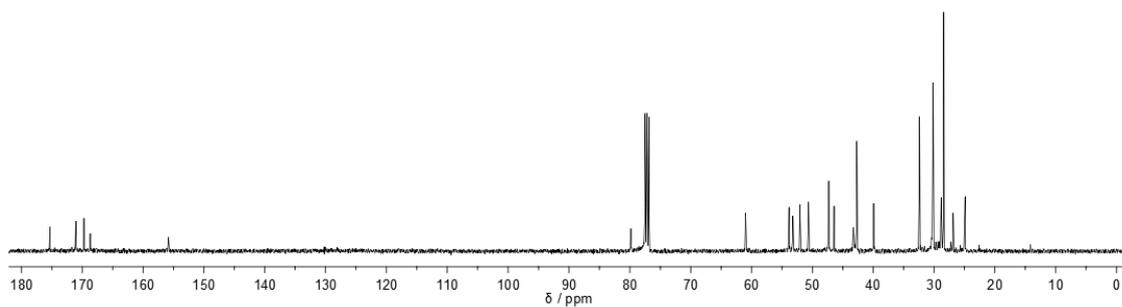
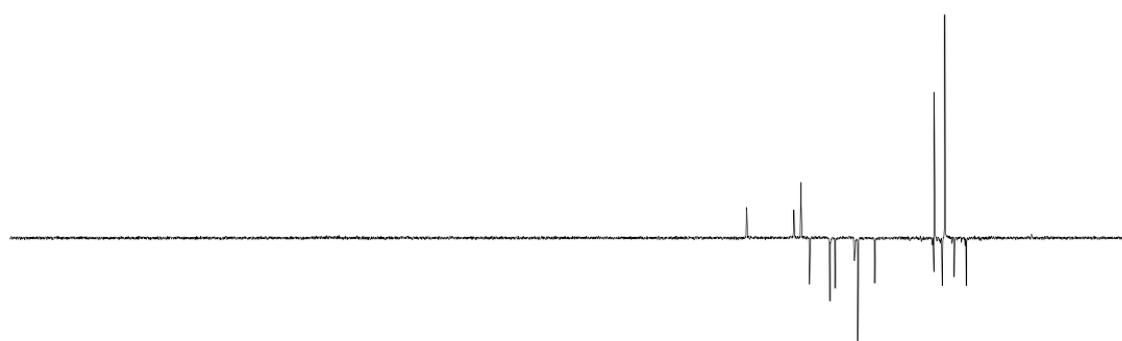
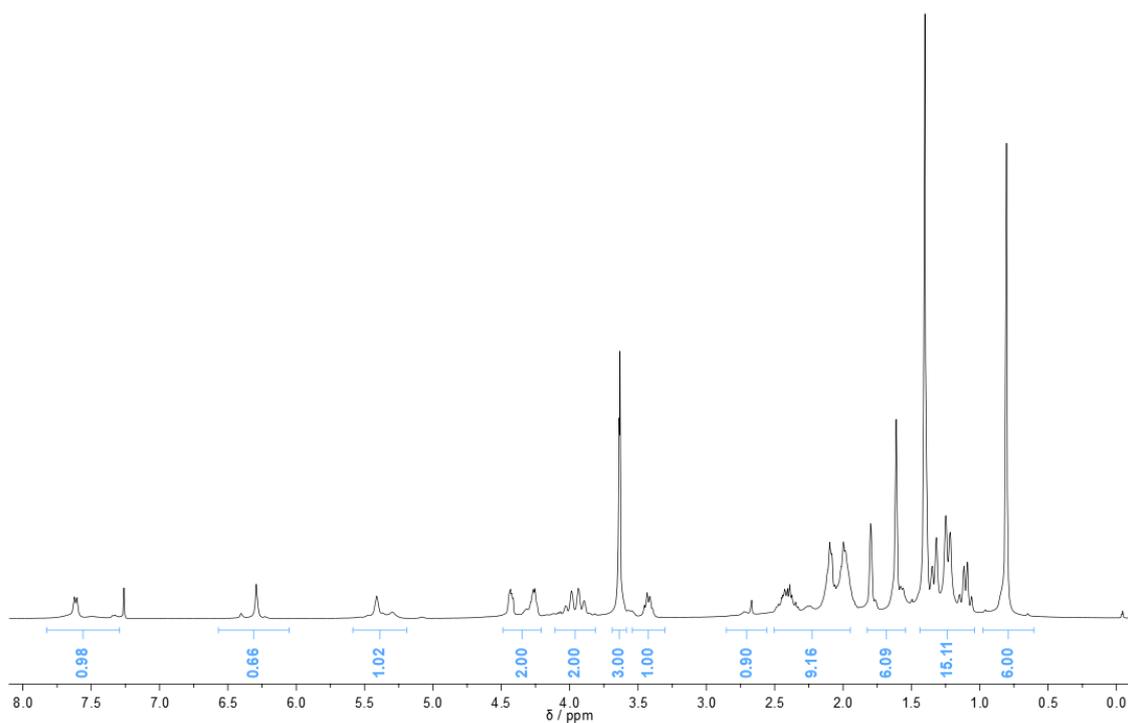
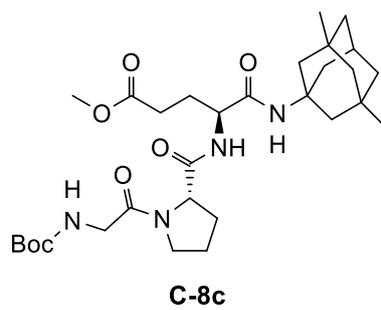
Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-3a** (secção 6.1.2.5.), procedeu-se ao acoplamento entre **H-Pro-OH** (0,1089 g; 0,9459 mmol), Boc-Gly-OSu (0,2833 g; 1,040 mmol) e **C-7c** (0,4954 g; 1,135 mmol), utilizando DIEA (0,494 mL; 2,84 mmol) e TBTU (0,3341 g; 1,040 mmol), deixando-se em agitação magnética durante cerca de 2 horas após a adição do último componente. De seguida, procedeu-se ao tratamento habitual.

O óleo obtido foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna de gel de sílica usando AcOEt como eluente, obtendo-se 0,2782 g do composto **C-8c**. Rendimento: 51 %.

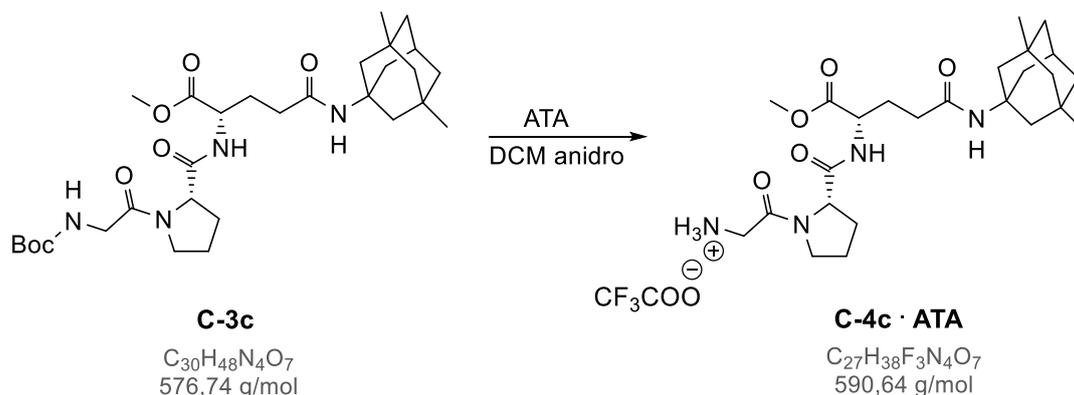
Aspeto	R_f	$[\alpha]_D^{24}$
óleo castanho	0,51 em AcOEt	$-10,6 \pm 0,9$ (c1, $CHCl_3$).

1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros 85:15): 7.61 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, CONH); [6.40 (s, *minor*), 6.29 (s, *major*), 1H, CONH]; [5.41 (s, *major*), 5.30 (s, *minor*), 1H, CONH]; 4.53 – 4.19 (m, 2H, $H_E-2 + H_P-2$); 4.08 – 3.84 (m, 2H, H_G-2); 3.63 (s, 3H, $COOCH_3$); [2.54 – 2.32 (m, 1H), 2.81 – 2.62 (m, 1H), H_P-5]; 2.49 – 1.62 (m, 9H, $H_P-3 + H_P-4 + H_E-3 + H_E-4 + H_C-5$); 1.84 – 1.55 (m, 6H, $H_C-4 + H_C-6 + H_C-9$); 1.43 – 1.03 (m, 15H, $C(CH_3)_3 + H_C-2 + H_C-8 + H_C-10$); 0.80 (s, 6H, $H_C-11 + H_C-12$).

^{13}C -RMN e DEPT ($CDCl_3$, 101 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros): [175.29 (Cq), 171.04 (Cq), 169.71 (Cq), 168.67 (Cq), $C_E-1 + C_E-5 + C_P-1 + C_G-1$]; 155.82 (Cq, OCONH); 79.83 (Cq, $C(CH_3)_3$); [60.97, 53.20, 52.03, 51.95 (2 x CH + CH_3), $C_P-2 + C_E-2 + COOCH_3$]; 51.95 (CH, C_C-5); 53.83 (Cq, C_C-1); [50.64 (CH_2), 47.31 (CH_2), $C_G-2 + C_P-5$]; [46.43, 42.70, 39.91 (6 x CH_2), $C_C-2 + C_C-4 + C_C-6 + C_C-8 + C_C-9 + C_C-10$]; 32.39 (2 x Cq, $C_C-3 + C_C-7$); [30.43 (CH_2), 30.21 (CH_2), C_P-4]; 30.16 (2 x CH_3 , $C_C-11 + C_C-12$); [29.16 (CH_2), 28.83 (CH_2), C_E-4]; 28.41 (3 x CH_3 , $C(CH_3)_3$); [27.23 (CH_2), 26.86 (CH_2), C_E-3]; [25.07 (CH_2), 24.89 (CH_2), C_P-3].



6.1.4.7. Síntese do H-Gly-Pro-Glu(Memantina)-OMe (C-4c)

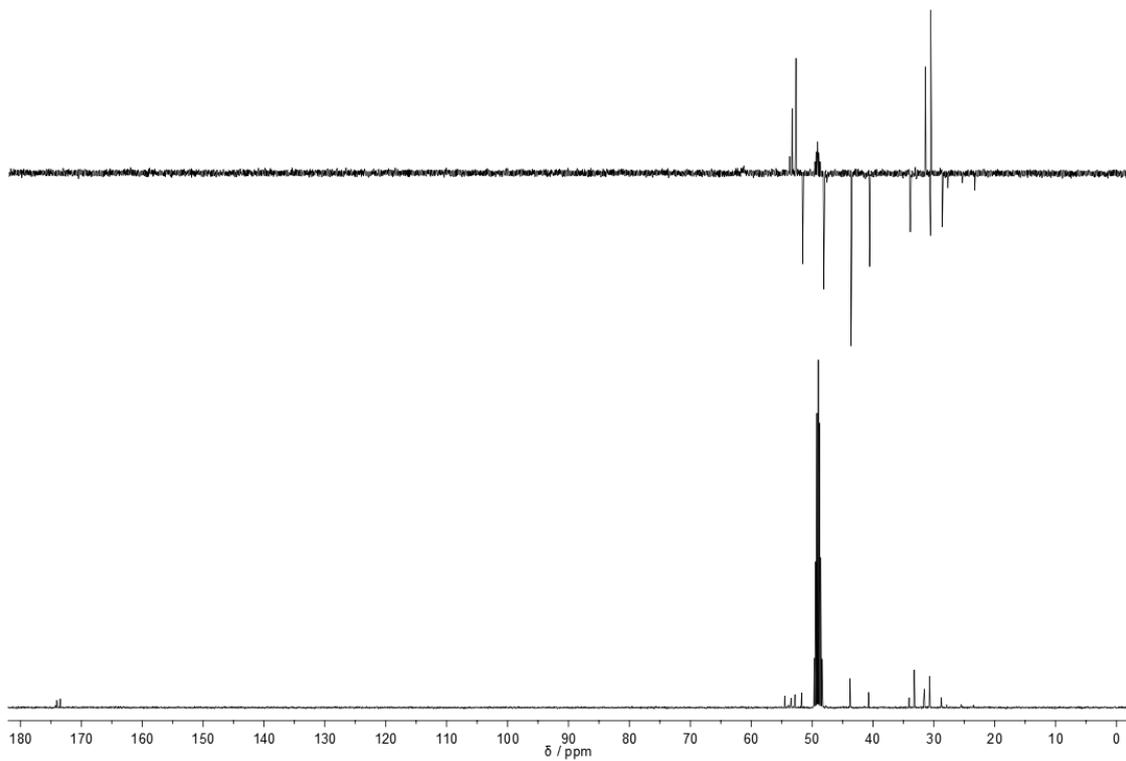
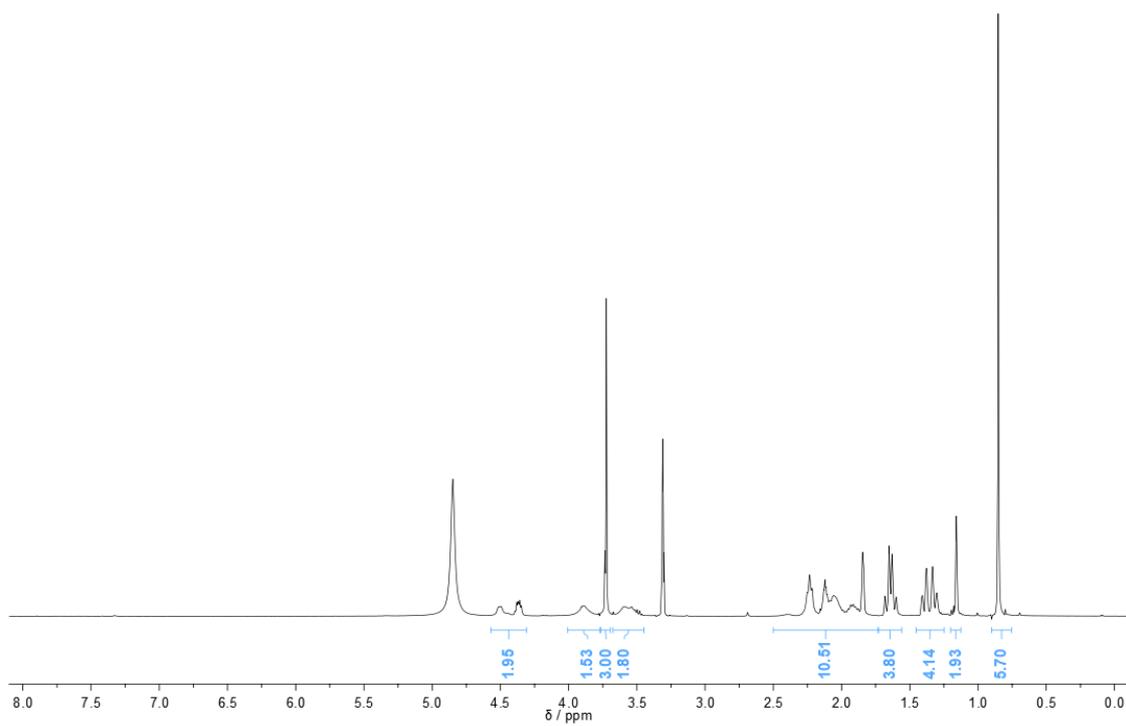
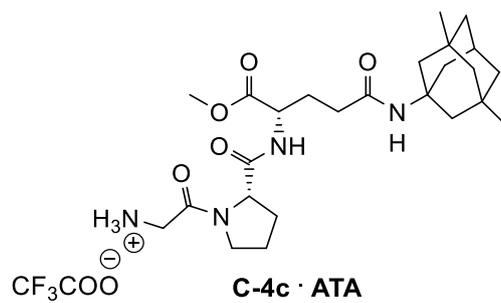


Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-2a** (secção 6.1.2.3.) procedeu-se à remoção acidolítica do grupo Boc do composto **C-3c** (0,4012 g; 0,6956 mmol) com ATA (1,61 mL; 20,9 mmol), tendo-se obtido 0,3903 g do composto **C-4c**. Rendimento: 95 %.

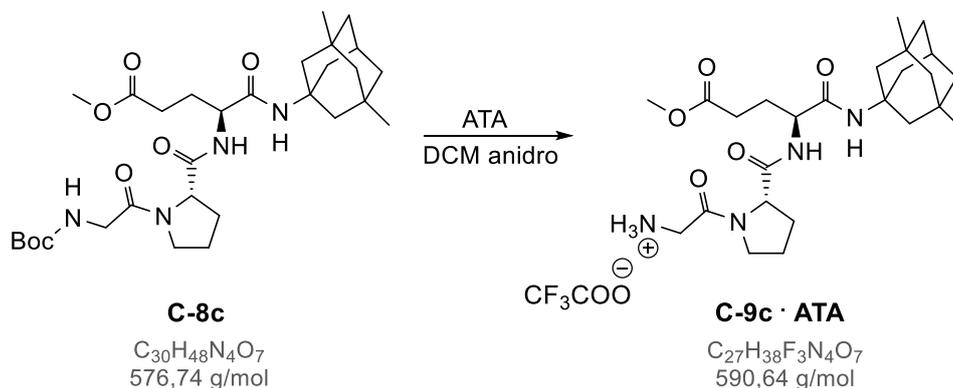
Aspetto	R_f	$[\alpha]_D^{19}$
Sólido branco de baixo p.f.	0,49 em DCM/MeOH (4:1)	$-36,1 \pm 0,2$ (c1, MeOH)

1H -RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros 80:20): 4.58 – 4.30 (m, 2H, H_E-2 + H_P-2); 3.90 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_G-2); [3.73 (s, *minor*), 3.72 (s, *major*), 3H, COOCH₃]; 3.64 – 3.45 (m, 2H, H_P-5); [2.52 – 1.73 (m, 11H), 1.64 (q, $J = 11.9$ Hz, 4H), 1.36 (dd, $J = 29.8, 11.4$ Hz, 4H), 1.16 (s, 2H), H_P-3 + H_P-4 + H_E-3 + H_E-4 + H_C-2 + H_C-4 + H_C-5 + H_C-6 + H_C-8 + H_C-9 + H_C-10]; 0.85 (s, 6H, H_C-11 + H_C-12).

^{13}C -RMN e DEPT (CD₃OD, 101 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros): [174.01 (Cq), 173.47 (Cq), C_E-1 + C_E-5 + C_P-1 + C_G-1]; 54.49 (Cq, C_C-1); [53.45, 52.91, 52.80, (2 x CH + CH₃), C_P-2 + C_E-2 + COOCH₃]; [51.72 (CH₂), 48.27 (CH₂), C_G-2 + C_P-5]; [43.76 (CH₂), 40.75 (CH₂), 34.05 (CH₂), 33.96 (CH₂), C_C-2 + C_C-4 + C_C-6 + C_C-8 + C_C-9 + C_C-10]; 33.22 (2 x Cq, C_C-3 + C_C-7); [31.55, 30.69, (CH + 2 x CH₃), C_C-5 + C_C-11 + C_C-12]; 30.73 (CH₂, C_P-4); 28.78 (CH₂, C_E-4); 27.88 (CH₂, C_E-3); 23.47 (CH₂, C_P-3).



6.1.4.8. Síntese do H-Gly-Pro-Glu(OMe)- Memantina (C-9c)

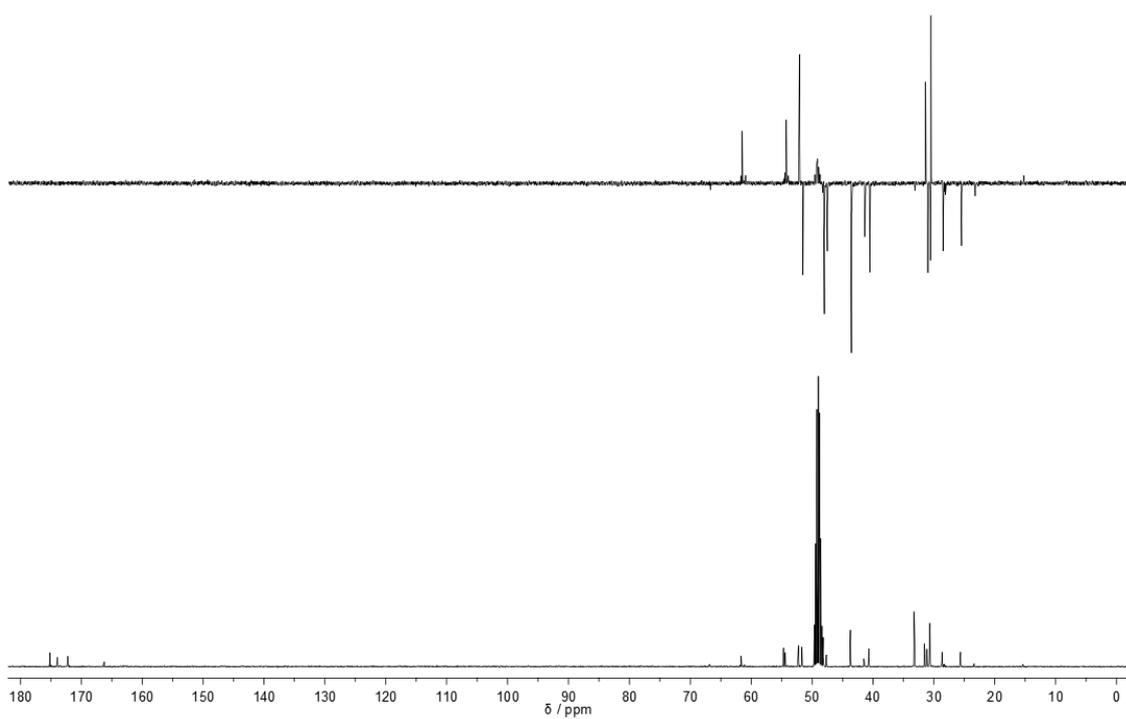
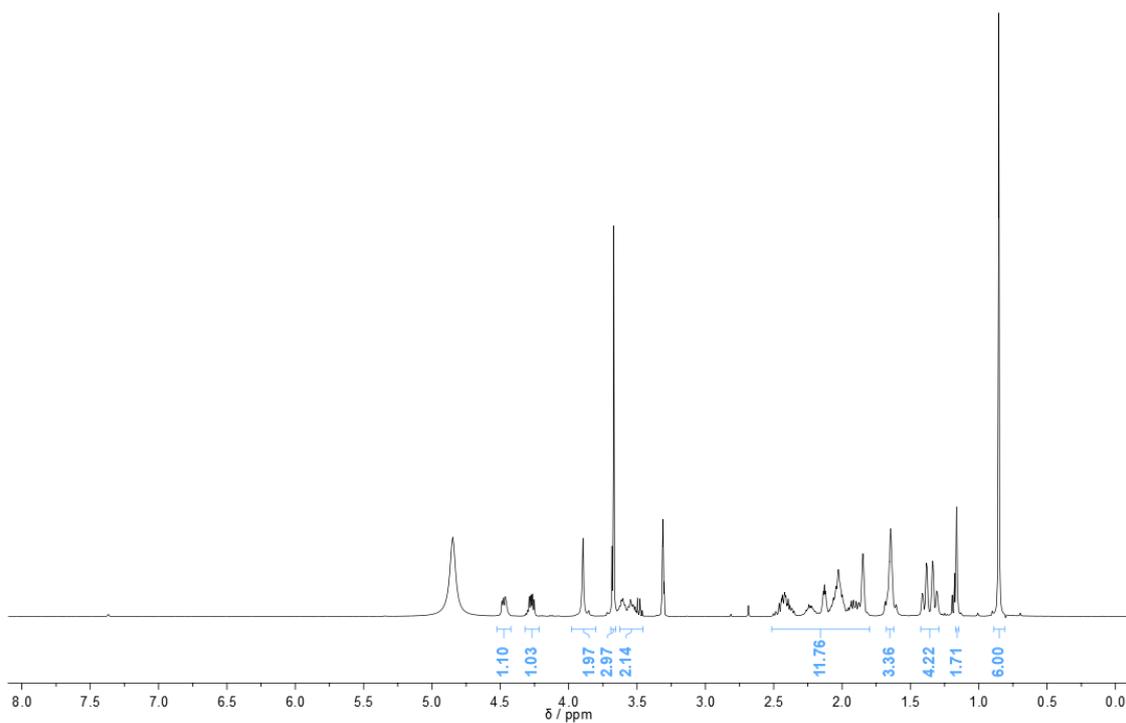
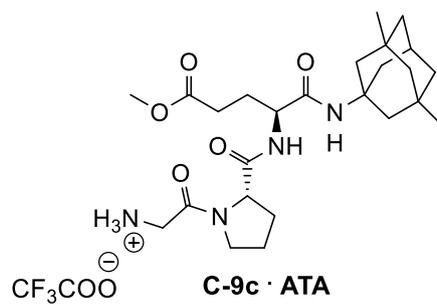


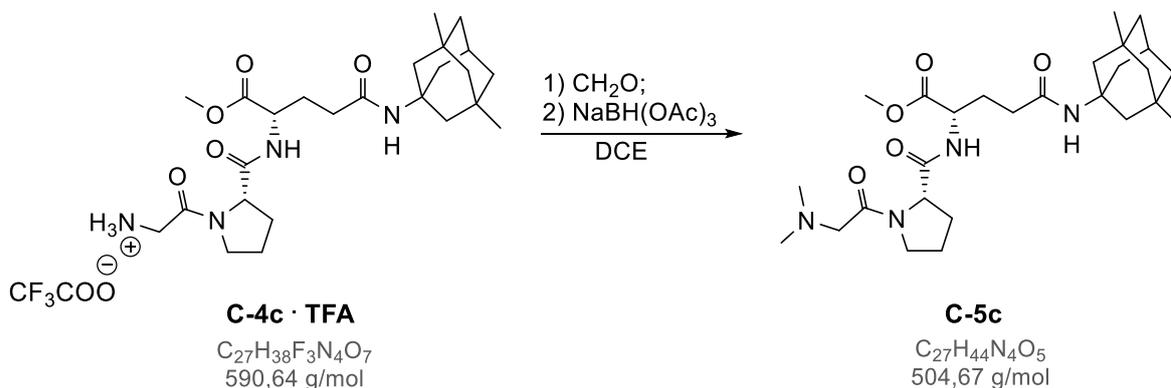
Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-2a** (secção 6.1.2.3.) procedeu-se à remoção do grupo Boc do composto **C-8c** (0,2182 g; 0,3783 mmol) com ATA (0,874 mL; 11,4 mmol), tendo-se obtido 0,2078 g do composto **C-9c**. Rendimento: 93 %.

Aspeto	R _f	p.f.	[α] _D ¹⁹
sólido castanho	0,54 em DCM/MeOH (4:1)	130 – 135 °C	– 26,9 ± 0,2 (c1, MeOH)

¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros 80:20): 4.51 – 4.43 (m, 1H, H_E-2); 4.32 – 4.24 (m, 2H, H_P-2); 3.87 (d, 2H, H_G-2); [3.68 (s, *minor*), 3.67 (s, *major*), 3H, COOCH₃]; 3.63 – 3.44 (m, 2H, H_P-5); [2.51 – 1.80 (m, 12H), 1.69 – 1.60 (m, 3H), 1.36 (dd, *J* = 30.6, 12.3 Hz, 4H), 1.16 (s, 2H), H_P-3 + H_P-4 + H_E-3 + H_E-4 + H_C-2 + H_C-4 + H_C-5 + H_C-6 + H_C-8 + H_C-9 + H_C-10]; 0.85 (s, 6H, H_C-11 + H_C-12).

¹³C-RMN e DEPT (CD₃OD, 101 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros): [175.18 (Cq), 173.94 (Cq), 172.25 (Cq), 166.25 (Cq), C_E-1 + C_E-5 + C_P-1 + C_G-1]; [61.65, 54.41, 52.26, (2 x CH + CH₃), C_P-2 + C_E-2 + COOCH₃]; 54.69 (Cq, C_C-1); [51.66 (CH₂), 48.16 (CH₂), C_G-2 + C_P-5]; [47.66, 43.70, 41.49, 40.71 (6 x CH₂), C_C-2 + C_C-4 + C_C-6 + C_C-8 + C_C-9 + C_C-10]; 33.24 (2 x Cq, C_C-3 + C_C-7); [31.53, 30.65, (CH + 2 x CH₃), C_C-5 + C_C-11 + C_C-12]; [31.25 (CH₂), 31.14 (CH₂), C_P-4]; [30.74 (CH₂), 31.06 (CH₂), C_E-4]; [28.68 (CH₂), 28.44 (CH₂), C_E-3]; [25.63 (CH₂), 23.39 (CH₂), C_P-3].



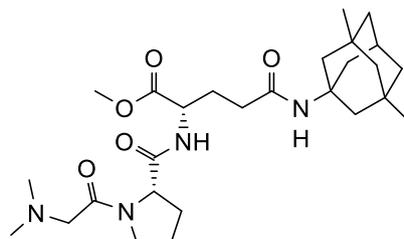
6.1.4.9. Síntese do (*N,N*-dimetil-Gly)-Pro-Glu(Memantina)-OMe (C-5c)

Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-5a** (secção 6.1.2.9.) procedeu-se à *N*-dimetilação do composto **C-4c** (0,2915 g; 0,4935 mmol), utilizando uma solução aquosa de CH_2O a 37% m/v (0,0920 mL; 1,23 mmol) e $NaBH(OAc)_3$ (0,5230 g; 2,468 mmol), deixando-se em agitação magnética durante cerca de 2 horas. Fez-se o tratamento descrito para o composto **C-5a**, tendo-se obtido 0,1494 g do composto **C-5c**. Rendimento: 60 %.

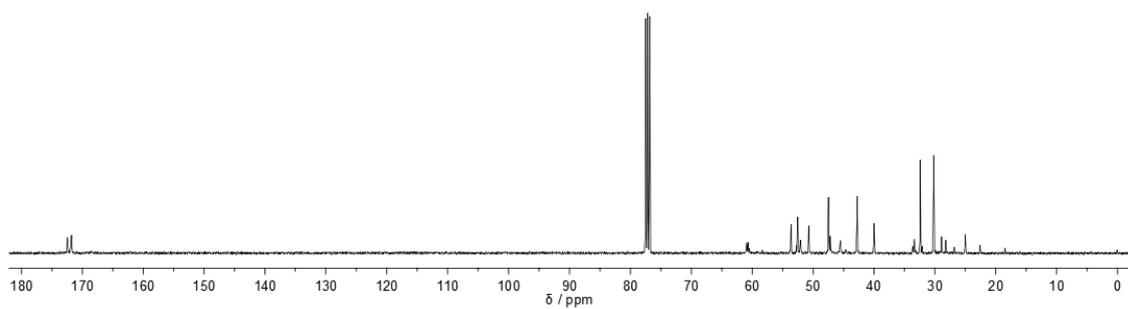
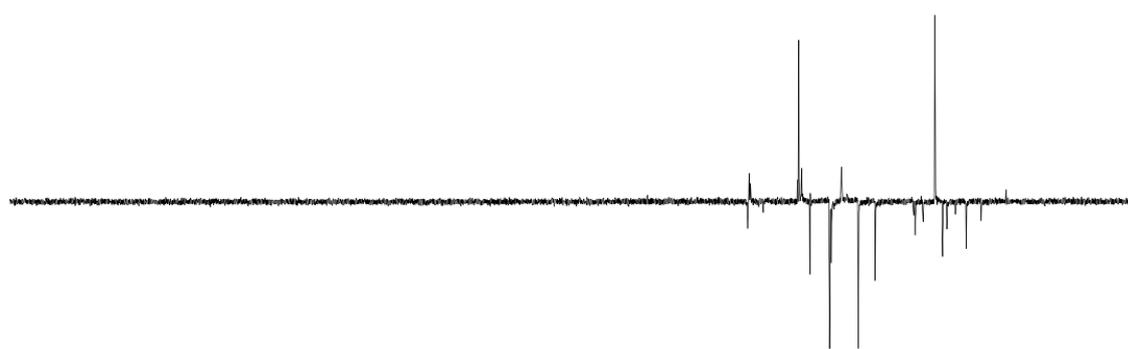
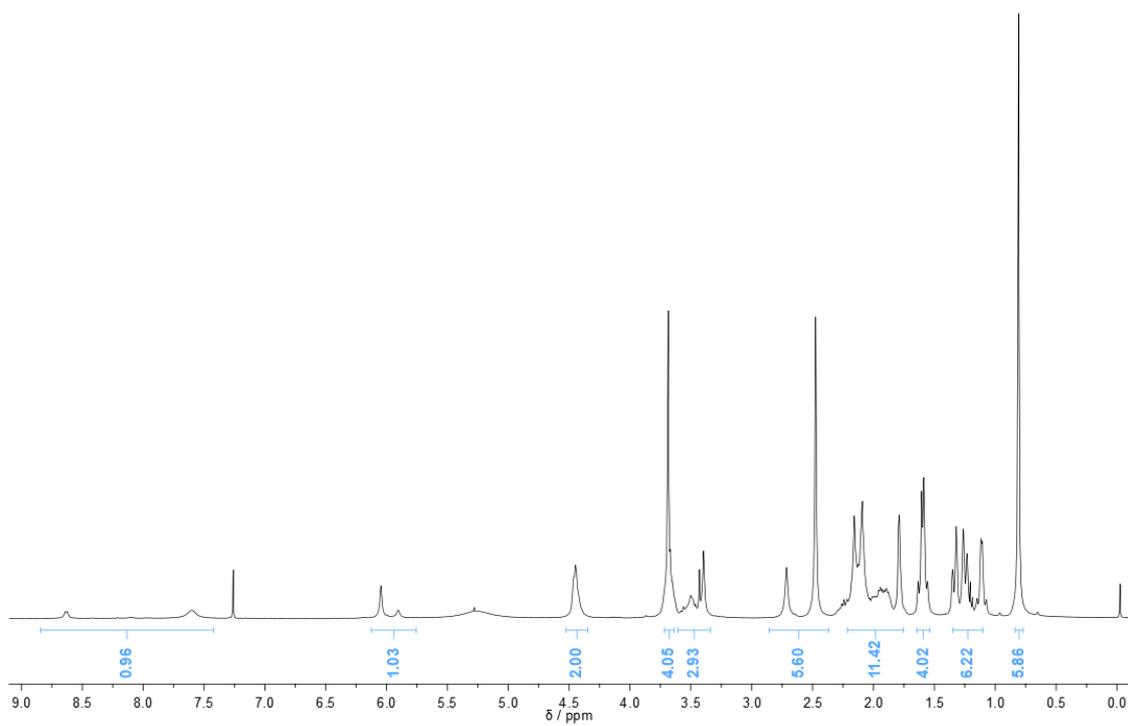
Aspeto	R_f	p.f.	$[\alpha]_D^{19}$
sólido branco cristalino	0,43 em DCM/MeOH (4:1)	73 – 75 °C	– 57,1 ± 0,2 (c1, MeOH).

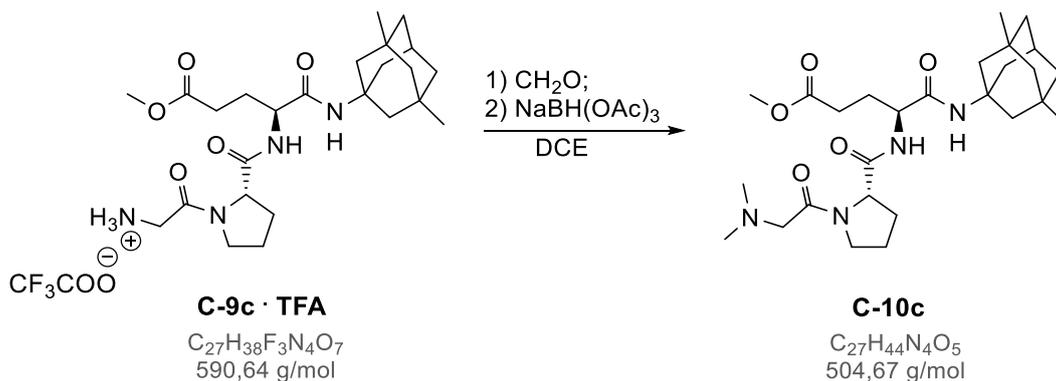
1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros 75:25): [8.62 (sl, *minor*), 7.60 (sl, *major*), 1H, CONH]; [6.05 (sl, *major*), 5.90 (sl, *minor*), 1H, CONH]; 4.45 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H, $H_E-2 + H_P-2$); [3.75 – 3.63 (m, 4H), 3.60 – 3.34 (m, 3H), $COOCH_3 + H_G-2 + H_P-5$]; [2.71 (s, *minor*), 2.48 (s, *major*), 6H, $(CH_3)_2N$]; [2.25 – 1.74 (m, 11H), 1.60 (q, $J = 11.8$ Hz, 4H), 1.39 – 1.07 (m, 6H), $H_P-3 + H_P-4 + H_E-3 + H_E-4 + H_C-2 + H_C-4 + H_C-5 + H_C-6 + H_C-8 + H_C-9 + H_C-10$]; 0.81 (s, 6H, $H_C-11 + H_C-12$).

^{13}C -RMN e DEPT ($CDCl_3$, 101 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros): [172.46 (Cq), 172.31 (Cq), 171.86 (Cq), 171.76 (Cq), $C_E-1 + C_E-5 + C_P-1 + C_G-1$]; [60.68, 52.74, 52.51, (2 x CH + CH_3), $C_P-2 + C_E-2 + COOCH_3$]; 53.63 (Cq, C_C-1); [50.71 (CH_2), 47.46 (CH_2), 47.17 (CH_2), $C_G-2 + C_P-5$]; [42.76, 39.97, 33.65, 33.39, 32.11 (6 x CH_2), $C_C-2 + C_C-4 + C_C-6 + C_C-8 + C_C-9 + C_C-10$]; 32.41 (2 x Cq, $C_C-3 + C_C-7$); [30.21, 30.19, (CH + 2 x CH_3), $C_C-5 + C_C-11 + C_C-12$]; 28.90 (CH_2 , C_P-4); [28.20 (CH_2), 26.81 (CH_2), C_E-4]; 25.02 (CH_2 , C_E-3); 22.58 (CH_2 , C_P-3).



C-5c



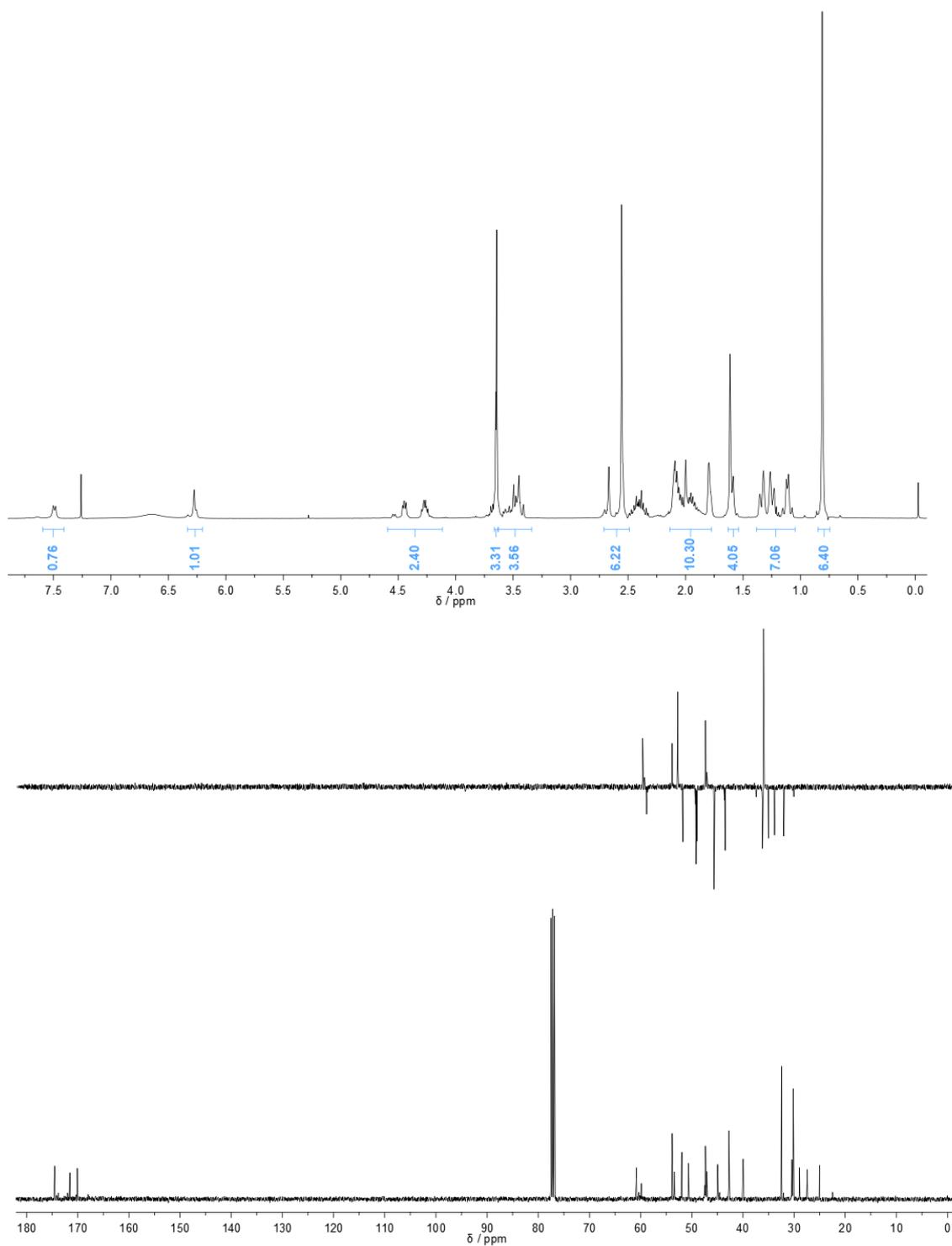
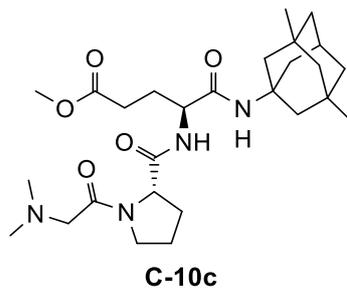
6.1.4.10. Síntese do (*N,N*-dimetil-Gly)-Pro-Glu(OMe)- Memantina (C-10c)

Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-5a** (secção 6.1.2.9.) procedeu-se à *N*-dimetilação do composto **C-9c** (0,1078 g; 0,1825 mmol), utilizando uma solução aquosa de CH_2O a 37% m/v (0,0609 mL; 0,456 mmol) e $NaBH(OAc)_3$ (0,1934 g; 0,9125 mmol), deixando-se em agitação magnética durante cerca de 2 horas. Fez-se o tratamento descrito para o composto **C-5a**, tendo-se obtido 0,0553 g do composto **C-10c**. Rendimento: 60 %.

Aspeto	R_f	p.f.	$[\alpha]_D^{19}$
sólido branco cristalino	0,40 em DCM/MeOH (4:1)	60 – 63 °C	- 42,6 ± 0,3 (c1, MeOH)

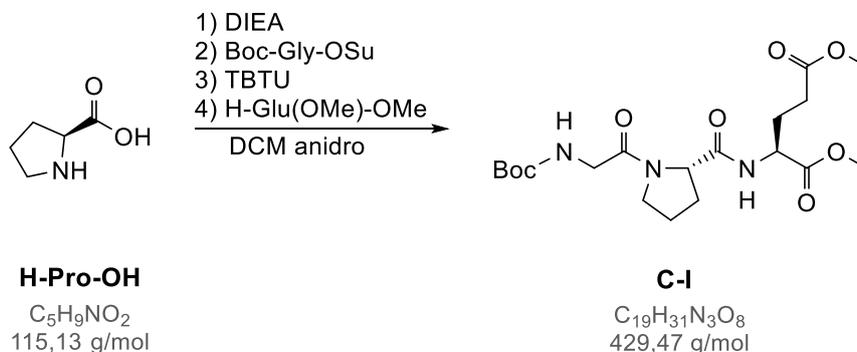
1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros 70:30): 7.49 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, CONH); 6.29 (s, 1H, CONH); 4.57 – 4.21 (m, 2H, $H_{E-2} + H_{P-2}$); [3.65 (s, *minor*), 3.64 (s, *major*), 3H, $COOCH_3$]; 3.58 – 3.35 (m, 4H, $H_{G-2} + H_{P-5}$); 2.56 (s, 6H, $(CH_3)_2N$); [2.14 – 1.77 (m, 10H), 1.61 (s, 4H), 1.38 – 1.06 (m, 7H), $H_{P-3} + H_{P-4} + H_{E-3} + H_{E-4} + H_{C-2} + H_{C-4} + H_{C-5} + H_{C-6} + H_{C-8} + H_{C-9} + H_{C-10}$] 0.81 (s, 6H, $H_{C-11} + H_{C-12}$).

^{13}C -RMN e DEPT ($CDCl_3$, 101 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros): [174.50 (Cq), 171.56 (Cq), 170.06 (Cq), 171.76 (Cq), $C_{E-1} + C_{E-5} + C_{P-1} + C_{G-1}$]; [60.83, 53.40, 51.93, (2 x CH + CH_3), $C_{P-2} + C_{E-2} + COOCH_3$]; 53.85 (Cq, C_{C-1}); [50.66 (CH_2), 47.29 (CH_2), 47.05 (CH_2), $C_{G-2} + C_{P-5}$]; [42.74, 40.07, 39.94, (6 x CH_2), $C_{C-2} + C_{C-4} + C_{C-6} + C_{C-8} + C_{C-9} + C_{C-10}$]; 32.44 (2 x Cq, $C_{C-3} + C_{C-7}$); [30.43 (CH_2), 32.08 (CH_2), C_{P-4}]; [30.17, (CH + 2 x CH_3), $C_{C-5} + C_{C-11} + C_{C-12}$]; 28.96 (CH_2 , C_{E-4}); 27.43 (CH_2 , C_{E-3}); [25.04 (CH_2), 22.51 (CH_2), C_{P-3}].



6.1.5. Síntese dos péptidos de controlo para os ensaios biológicos

6.1.5.1. Síntese do Boc-Gly-Pro-Glu(OMe)-OMe (C-I)



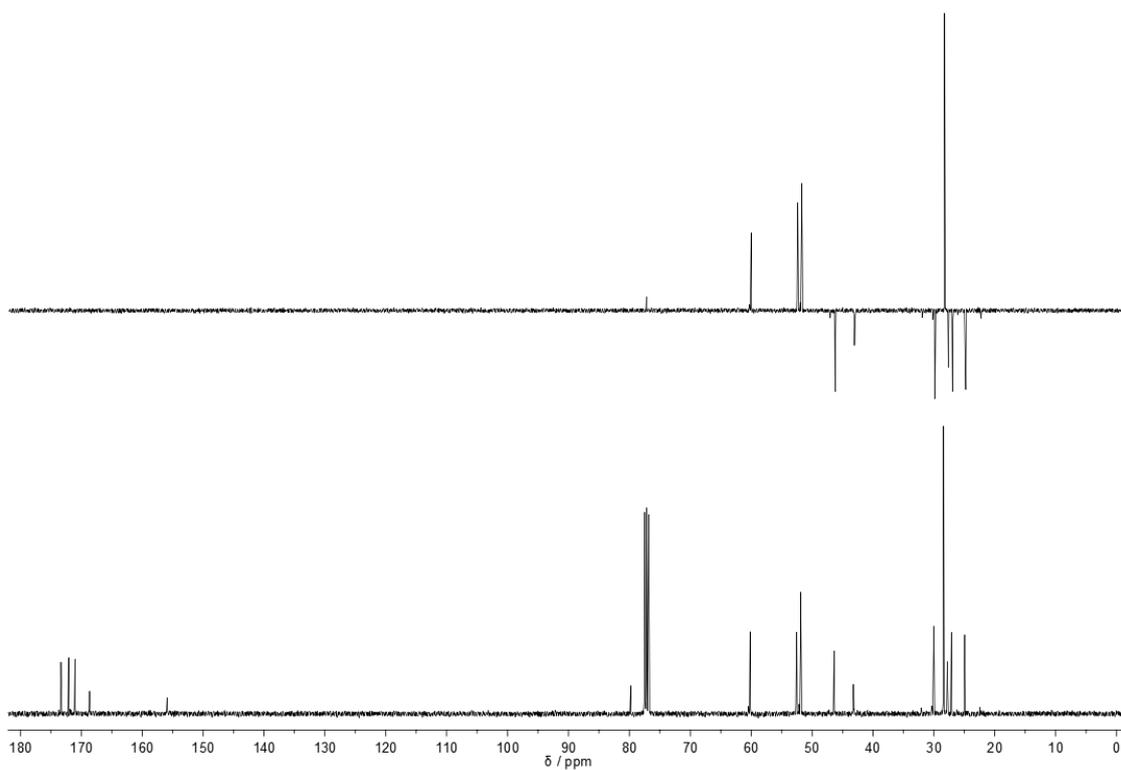
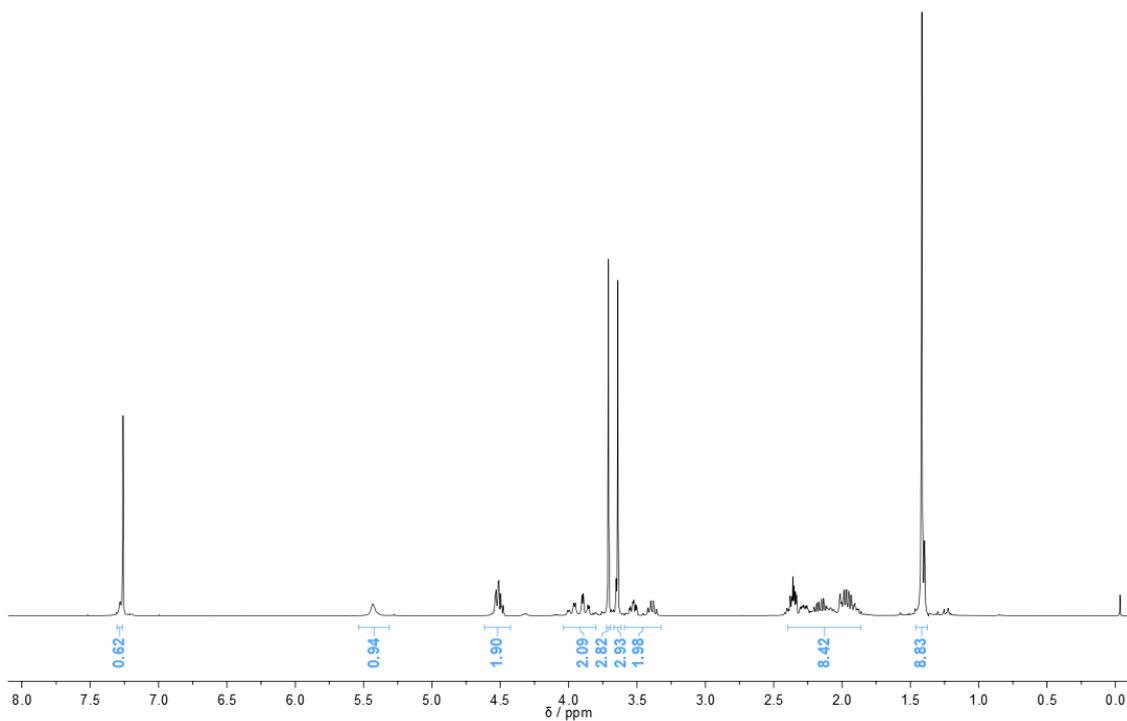
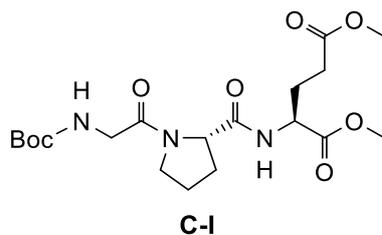
Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-3a** (secção 6.1.2.5.), procedeu-se ao acoplamento entre **H-Pro-OH** (0,3007 g; 2,612 mmol), **Boc-Gly-OSu** (0,7822 g; 2,873 mmol) e **H-Glu(OMe)-OMe** (0,6633 g; 3,134 mmol), utilizando DIEA (1,36 mL; 7,84 mmol) e TBTU (0,9225 g; 2,873 mmol), deixando-se em agitação magnética durante cerca de 2 horas após a adição do último componente.

Realizou-se o tratamento habitual, tendo-se purificado o óleo obtido por cromatografia de adsorção em coluna de gel de sílica usando AcOEt como eluente, obtendo-se 0,6843 g do composto **C-I**. Rendimento: 61 %.

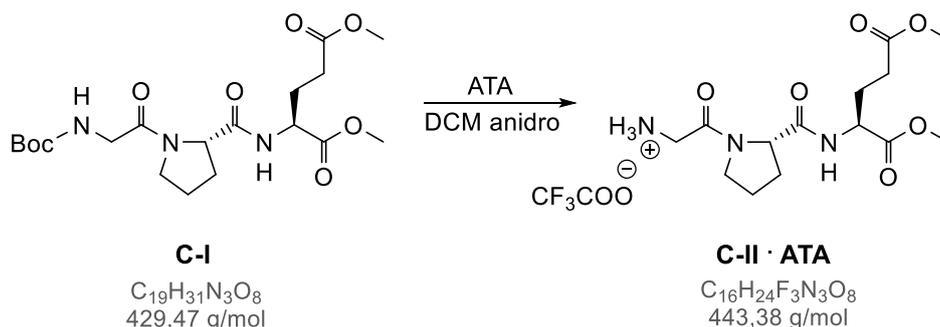
Aspeto	R_f	p.f.	$[\alpha]_D^{22}$
sólido branco	0,32 em AcOEt	82 – 84 °C	$-57,9 \pm 0,2$ (c1, CHCl ₃)

¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros 85:15): 7.28 (sl, 1H, CONH); 5.43 (sl, 1H, CONH); 4.57 – 4.45 (m, 2H, H_{E-2} + H_{P-2}); 4.03 – 3.81 (m, 2H, H_{G-2}); 3.71 (s, 3H, COOCH₃); [3.65 (s, *minor*), 3.64 (s, *major*), 3H, COOCH₃]; 3.57 – 3.34 (m, 2H, H_{P-5}); 2.45 – 1.83 (m, 8H, H_{E-3} + H_{E-4} + H_{P-3} + H_{P-4}); [1.42 (s, *major*), 1.40 (*minor*), 9H, C(CH₃)₃].

¹³C-RMN e DEPT (CDCl₃, 101 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros): [173.33 (Cq), 172.08 (Cq), 171.03 (Cq), 168.66 (Cq), C_{E-1} + C_{E-5} + C_{P-1} + C_{G-1}]; 155.89 (Cq, OCONH); 79.78 (Cq, C(CH₃)₃); [60.17, 52.65, 52.53, 52.09, 51.87, (2 x CH + 2 x CH₃), C_{P-2} + C_{E-2} + COOCH₃]; [46.38 (CH₂), 43.20 (CH₂), C_{G-2} + C_{P-5}]; [30.31 (CH₂), 30.01 (CH₂), C_{P-4}]; 28.41 (3 x CH₃, C(CH₃)₃); 27.78 (CH₂, C_{E-4}); 27.11 (CH₂, C_{E-3}); (24.94 (CH₂, C_{P-3})).



6.1.5.2. Síntese do H-Gly-Pro-Glu(OMe)-OMe (C-II)



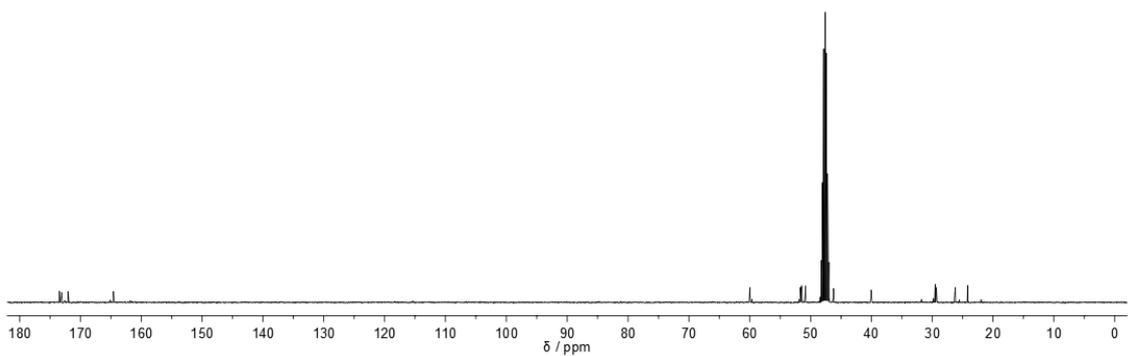
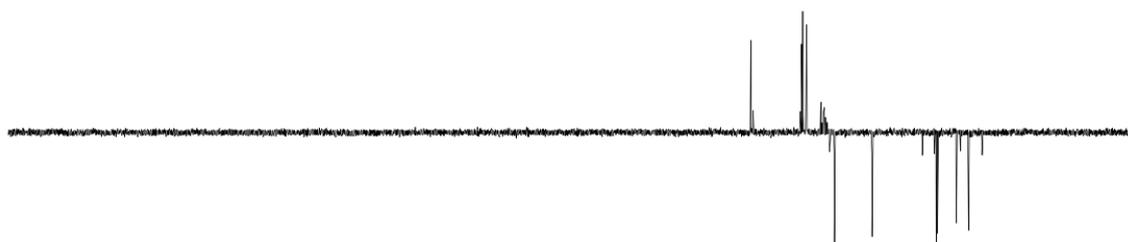
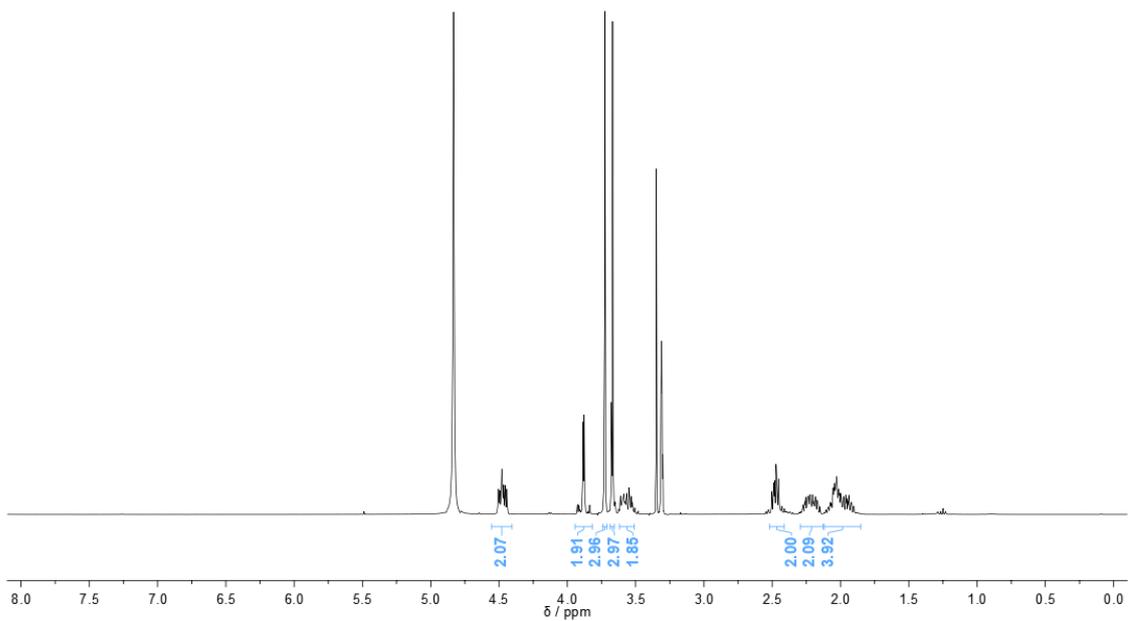
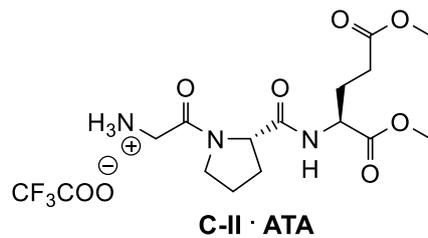
Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-2a** (secção 6.1.2.3.) procedeu-se à remoção acidolítica do grupo Boc do composto **C-I** (0,5009 g; 1,166 mmol) com ATA (2,69 mL; 35,00 mmol) deixando-se em agitação magnética durante cerca de 1 hora.

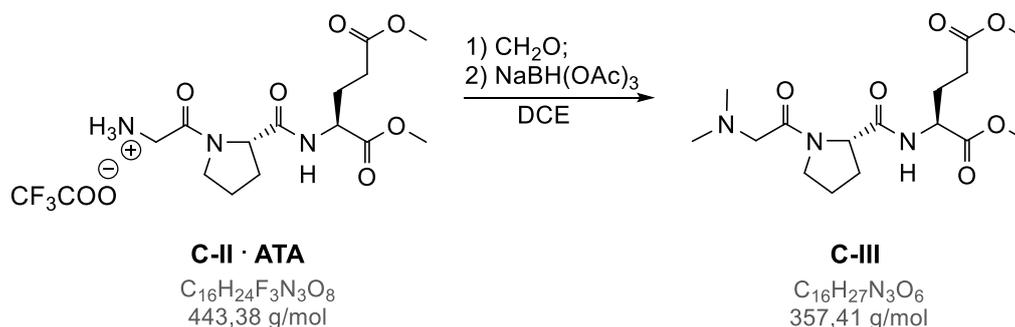
Eliminou-se o ATA a pressão reduzida, e procedeu-se à purificação habitual por cromatografia de adsorção em coluna de gel de sílica usando-se DCM/MeOH (4:1), tendo-se obtido 0,4963 do composto **II** pretendido. Rendimento: 96 %.

Aspeto	R _f	[α] _D ²²
óleo castanho	0,40 em DCM/MeOH (4:1)	+ 38,0 ± 0,2 (c1, CHCl ₃)

¹H-RMN (CD₃OD, 400 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros 80:20): 4.52 – 4.43 (m, 2H, H_E-2 + H_P-2); 3.94 – 3.81 (m, 2H, H_G-2); [3.73 (s, *minor*), 3.72 (s, *major*), 3H, COOCH₃]; [3.68 (s, *minor*), 3.67 (s, *major*), 3H, COOCH₃]; 3.63 – 3.50 (m, 2H, H_P-5); [2.51 – 2.41 (m, 2H), 2.29 – 2.13 (m, 2H), 2.11 – 1.85 (m, 4H), H_E-3 + H_E-4 + H_P-3 + H_P-4].

¹³C-RMN e DEPT (CD₃OD, 101 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros): [174.85 (Cq), 174.44 (Cq), 173.38 (Cq), 165.95 (Cq), C_E-1 + C_E-5 + C_P-1 + C_G-1]; [59.99, 51.66, 51.45, (2 x CH + 2 x CH₃), C_P-2 + C_E-2 + COOCH₃]; [47.08 (CH₂), 46.25 (CH₂), 40.06 (CH₂), 39.96 (CH₂), C_G-2 + C_P-5]; [31.80 (CH₂), 29.52 (CH₂) C_P-4]; [29.82 (CH₂), 29.31 (CH₂), C_E-4]; [26.21 (CH₂), 25.55 (CH₂), C_E-3]; [24.20 (CH₂), 21.99 (CH₂), C_P-3].



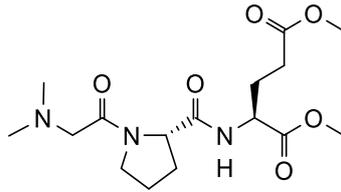
6.1.5.3. Síntese do (*N,N*-dimetil-Gly)-Pro-Glu(OMe)-OMe (III)

Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-5a** (secção 6.1.2.9.) procedeu-se à *N*-dimetilação do composto **II** (0,3663 g; 0,8261 mmol), utilizando uma solução aquosa de CH_2O a 37% m/v (0,155 mL; 2,07 mmol) e $NaBH(OAc)_3$ (0,8754 g; 4,130 mmol), deixando-se em agitação magnética durante cerca de 2 horas. Fez-se o tratamento descrito para o composto **C-5a**, e de seguida procedeu-se à purificação habitual por cromatografia de adsorção em coluna de gel de sílica usando DCM/MeOH (4:1) como eluente, tendo-se obtido 0,2008 g do composto **C-III** pretendido. Rendimento: 68 %.

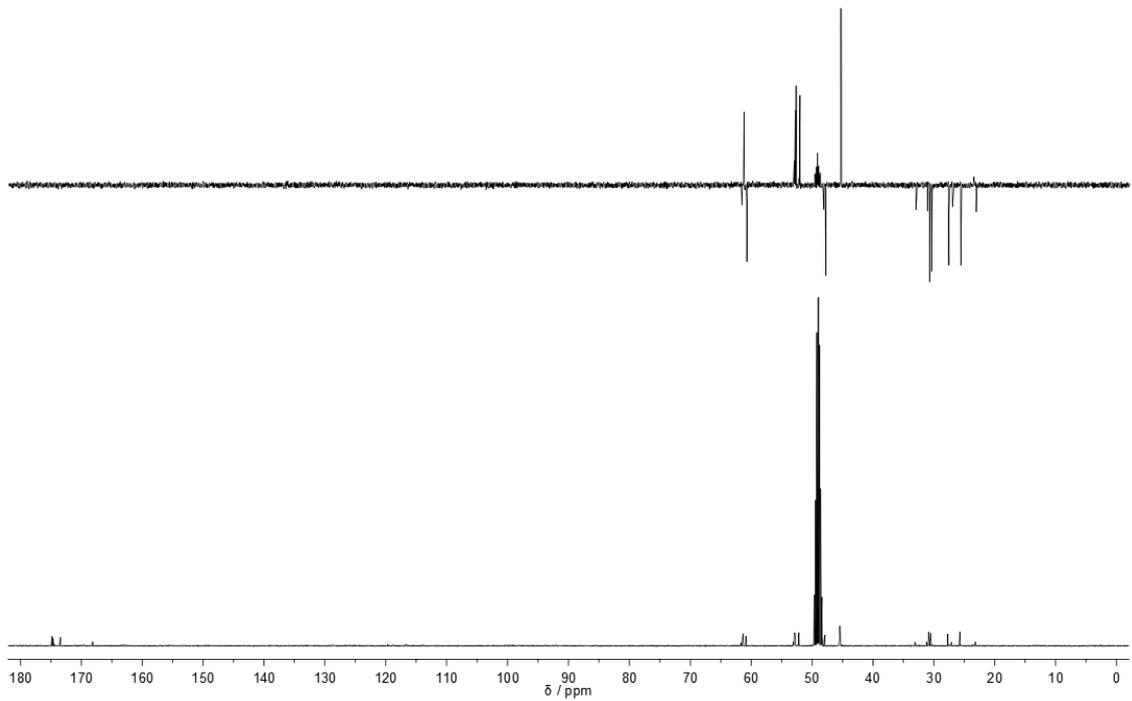
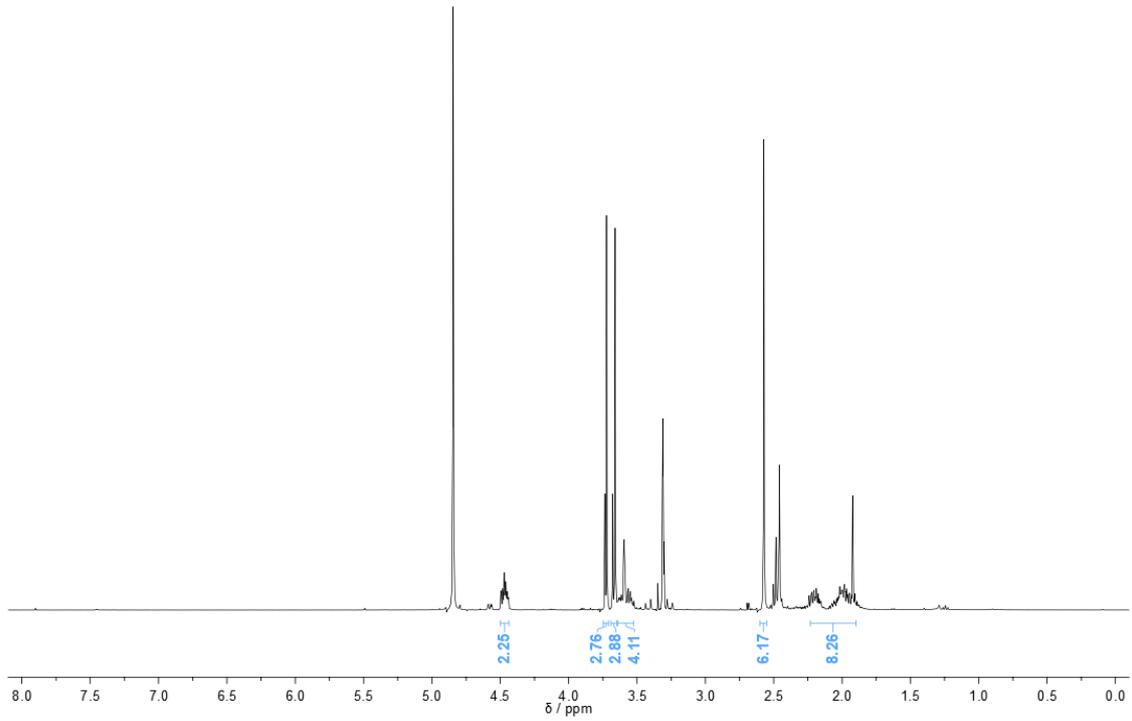
Aspeto	R_f	$[\alpha]_D^{22}$
óleo incolor	0,51 em DCM/MeOH (4:1)	$-50,5 \pm 0,5$ (c_1 , $CHCl_3$)

1H -RMN (CD_3OD , 400 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros 75:25): 4.50 – 4.45 (m, 2H, $H_{E-2} + H_{P-2}$); [3.74 (s, *minor*), 3.72 (s, *major*), 3H, $COOCH_3$]; [3.68 (s, *minor*), 3.66 (s, *major*), 3H, $COOCH_3$]; 3.63 – 3.52 (m, 4H, $H_{P-5} + H_{E-2}$); 2.57 (s, 6H, $(CH_3)_2N$); 2.25 – 1.91 (m, 8H, $H_{E-3} + H_{E-4} + H_{P-3} + H_{P-4}$).

^{13}C -RMN e DEPT (CD_3OD , 101 MHz) δ ppm (presença de rotâmeros): [174.82 (Cq), 174.61 (Cq), 173.42 (Cq), 168.16 (Cq), $C_{E-1} + C_{E-5} + C_{P-1} + C_{G-1}$]; [61.35, 61.31, 53.10, 52.93, 52.29, 52.15, (2 x CH + 2 x CH_3), $C_{P-2} + C_{E-2} + COOCH_3$]; 45.42 (2 x CH_3 , $(CH_3)_2N$); [31.17 (CH_2), 30.83 (CH_2), 30.51 (CH_2), $C_{G-2} + C_{P-5}$]; 27.71 (CH_2 , C_{P-4}); 27.11 (CH_2 , C_{E-4}); 25.74 (CH_2 , C_{E-3}); 23.21 (CH_2 , C_{P-3}).

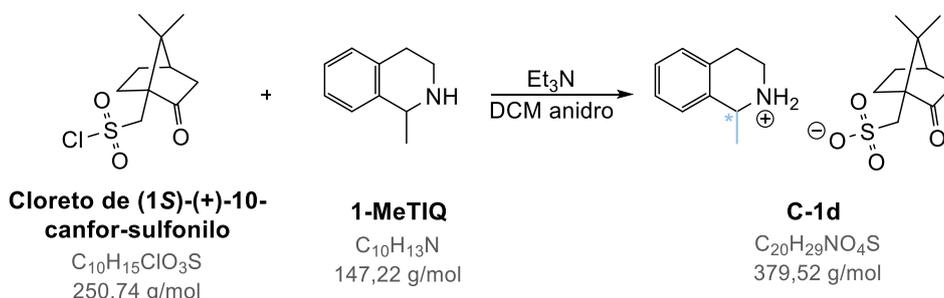


C-III



6.1.6. Resolução da amina 1-MeTIQ

6.1.6.1. Síntese do (S)-(+)-10-canforsulfonato de 1-metil-1,2,3,4-tetraidroisoquinolin-2-íolo (C-1d)



Num balão de fundo redondo dissolveu-se **Cloreto de (S)-(+)-10-canfor-sulfonilo** (0,5003 g; 1,995 mmol) em DCM anidro (30 mL) sob atmosfera de Ar. Adicionou-se Et_3N (0,278 mL; 2,00 mmol) e, após 10 minutos adicionou-se **1-MeTIQ** (0,2937 g; 1,995 mmol), deixando-se reagir, em agitação magnética durante 2 horas.

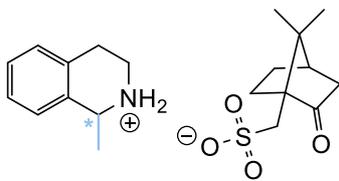
Eliminou-se o solvente a pressão reduzida, em seguida, o óleo obtido foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna de gel de sílica usando DCM/MeOH (5:1) como eluente, obtendo-se 0,3786 g de um dos diastereoisómeros do composto **C-1d**. Rendimento: 49 %.

Aspeto	R_f	$[\alpha]_D^{22}$
óleo amarelo	0,82 em DCM/MeOH (5:1)	+ 119,7 ± 0,6 (c1, $CHCl_3$)

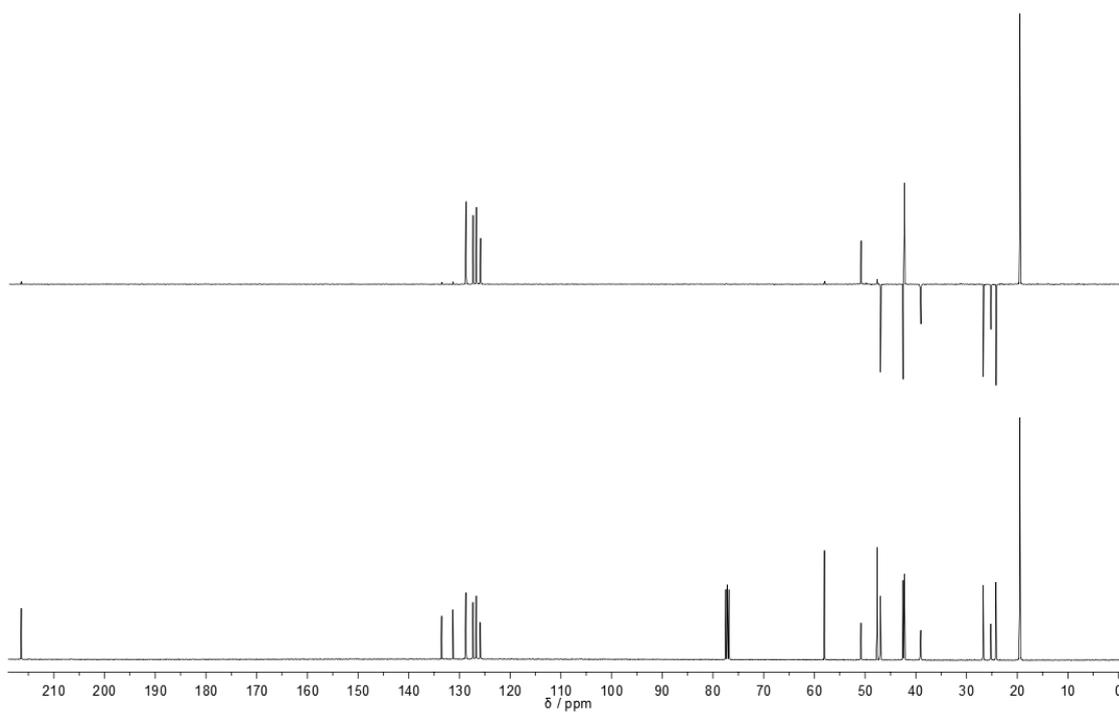
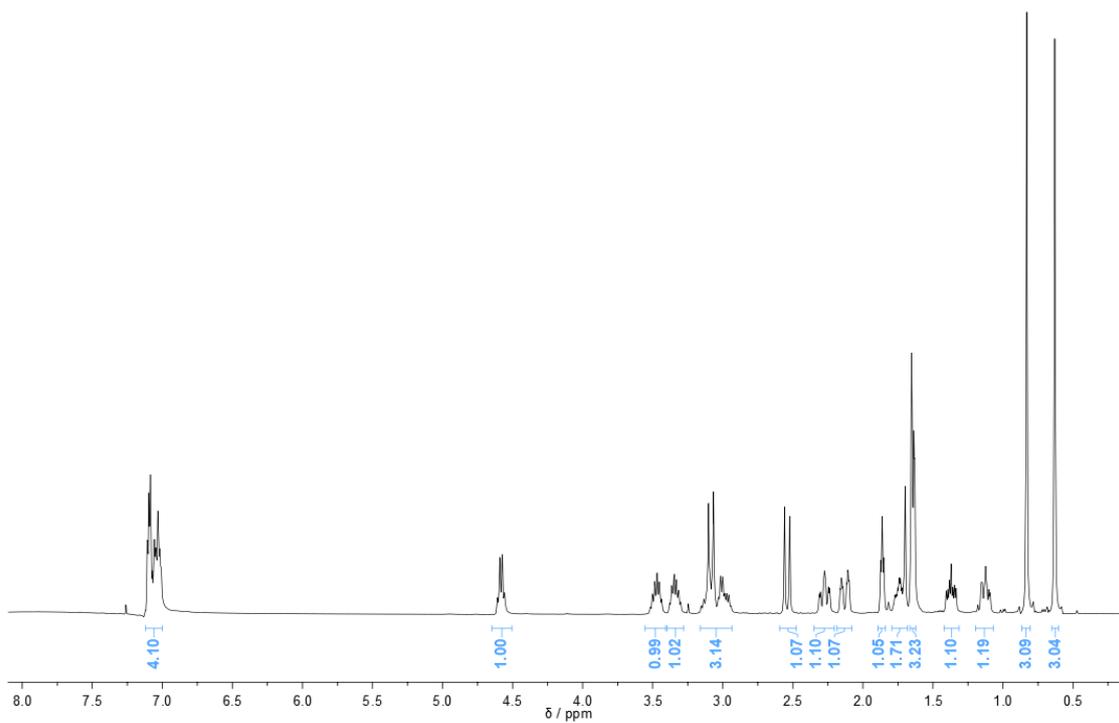
1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ ppm: 7.12 – 6.98 (m, 4H, $H_d-4 + H_d-5 + H_d-6 + H_d-7$); 4.58 (q, 1H, $J = 6.7$ Hz, H_d-1); 3.48 (td, 1H, $J = 12.6, 6.5$ Hz, $H_{c\grave{a}nf-10}$); 3.33 (td, 1H, $J = 12.6, 6.3$ Hz, $H_{c\grave{a}nf-10}$); 3.17 – 2.92 (m, 3H, $H_d-10 + H_d-9$); 2.54 (d, 1H, $J = 14.7$ Hz, H_d-9); 2.35 – 2.21 (m, 1H, $H_{c\grave{a}nf-3}$); 2.18 – 2.09 (m, 1H, $H_{c\grave{a}nf-3}$); 1.86 (t, 1H, $J = 4.3$ Hz, $H_{c\grave{a}nf-4}$); 1.79 – 1.68 (m, 2H, $H_{c\grave{a}nf-5}$); 1.67 – 1.62 (m, 3H, H_d-2); 1.44 – 1.31 (m, 1H, $H_{c\grave{a}nf-6}$); 1.21 – 1.08 (m, 1H, $H_{c\grave{a}nf-6}$); 0.83 (s, 3H, $H_{c\grave{a}nf-8}$); 0.63 (s, 3H, $H_{c\grave{a}nf-9}$).

^{13}C -RMN e DEPT ($CDCl_3$, 101 MHz) δ ppm: 216.43 (Cq, $C_{c\grave{a}nf-2}$); [133.51 (Cq), 131.29 (Cq), $H_d-3 + H_d-8$]; [128.73 (CH), 127.34 (CH), 126.69 (CH), 125.90 (CH), $H_d-4 + H_d-5 + H_d-6 + H_d-7$]; 58.03 (Cq, $C_{c\grave{a}nf-1}$); 50.81 (CH, H_d-1); 47.64 (CH_2 , $C_{c\grave{a}nf-10}$); 46.99 (CH_2 , H_d-10); 45.63 (Cq, $C_{c\grave{a}nf-7}$); 42.53 (CH_2 , $C_{c\grave{a}nf-3}$); 42.27 (CH, $C_{c\grave{a}nf-4}$); [26.72 (CH_2), 25.20 (CH_2), 24.18 (CH_2), $C_{c\grave{a}nf-6} + H_d-9 + C_{c\grave{a}nf-5}$]; 19.50 (3 x CH_3 , $C_{c\grave{a}nf-8} + C_{c\grave{a}nf-9} + H_d-2$).

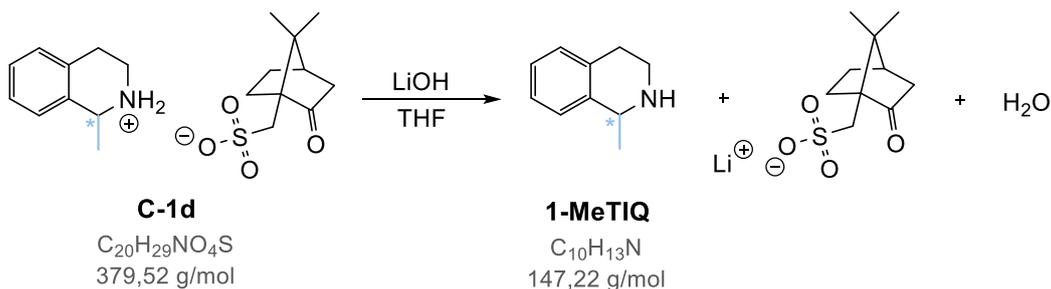
ESI-MS, m/z : $C_{10}H_{14}N^+$, calculado: 148.23, encontrado: 148.27; $C_{30}H_{43}N_2O_4S^+$, calculado: 527.29, encontrado: 527.80; $C_{50}H_{72}N_3O_8S_2^+$, calculado: 906.48, encontrado: 906.87; $C_{10}H_{15}O_4S^-$, calculado: 231.07, encontrado: 231.53.



C-1d



6.1.6.2. Síntese da amina 1-MeTIQ a partir do sal C-1d



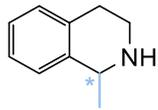
Num balão de fundo redondo dissolveu-se **C-1d** (0,3531 g, 0,9304 mmol) em THF (15 mL) e de seguida adicionou-se LiOH (0,0446 g; 1,86 mmol), deixando-se reagir em agitação magnética durante 1 hora.

Eliminou-se o solvente a pressão reduzida, adicionou-se DCM (20 mL) e realizaram-se extrações líquido-líquido utilizando água desionizada (1 x 20 mL). Secou-se a fase orgânica com adição de Na_2SO_4 anidro, filtrou-se (por gravidade utilizando um funil e algodão) e concentrou-se o filtrado *in vacuo*, tendo-se obtido 0,1501 g da amina **1-MeTIQ**. Rendimento: 69 %.

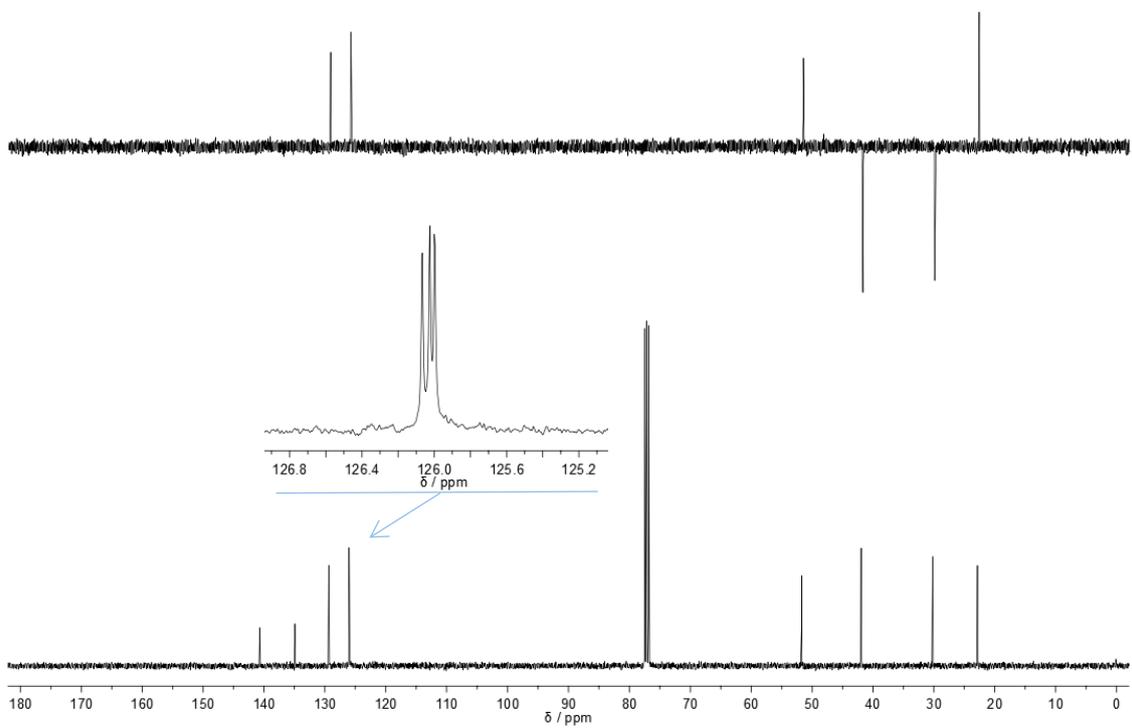
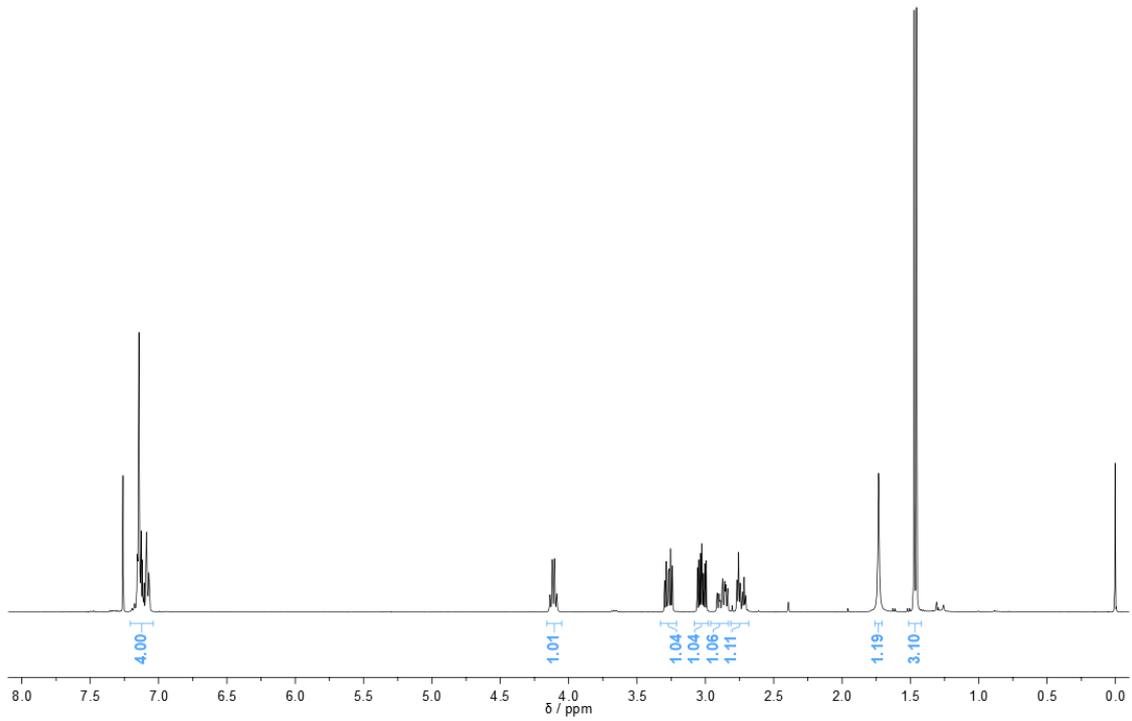
Aspeto	R_f
óleo amarelo	0,20 em DCM/MeOH (5:1)

1H -RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ ppm: 7.20 – 7.04 (m, 4H, $H_{d-4} + H_{d-5} + H_{d-6} + H_{d-7}$); 4.11 (q, 1H, $J = 6.7$ Hz, H_{d-1}); [3.32 – 3.18 (m, 1H), 3.08 – 2.97 (m, 1H), 2.94 – 2.82 (m, 1H), 2.79 – 2.67 (m, 1H), $H_{d-10} + H_{d-9}$]; 1.73 (s, 1H, NH); 1.46 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, H_{d-2}).

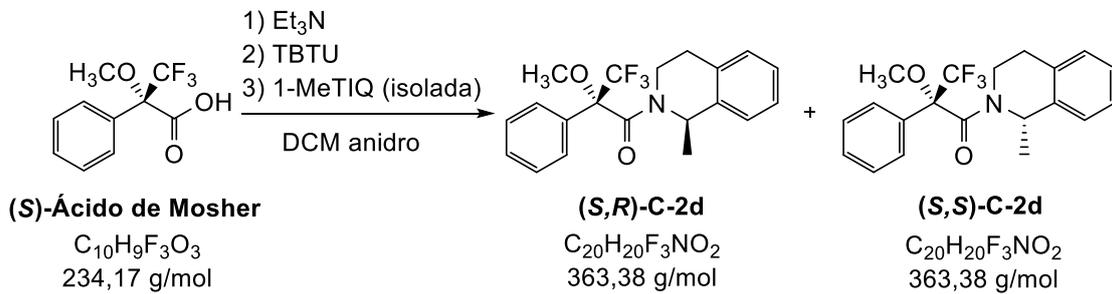
^{13}C -RMN e DEPT ($CDCl_3$, 101 MHz) δ ppm: [140.67 (Cq), 134.93 (Cq), $H_{d-3} + H_{d-8}$]; [129.35 (CH), 126.07 (CH), 126.02 (CH), 126.00 (CH), $H_{d-4} + H_{d-5} + H_{d-6} + H_{d-7}$]; 51.73 (CH, H_{d-1}); 41.95 (CH_2 , H_{d-10}); 30.18 (CH_2 , H_{d-9}); 22.85 (CH_3 , H_{d-2}).



1-MeTIQ



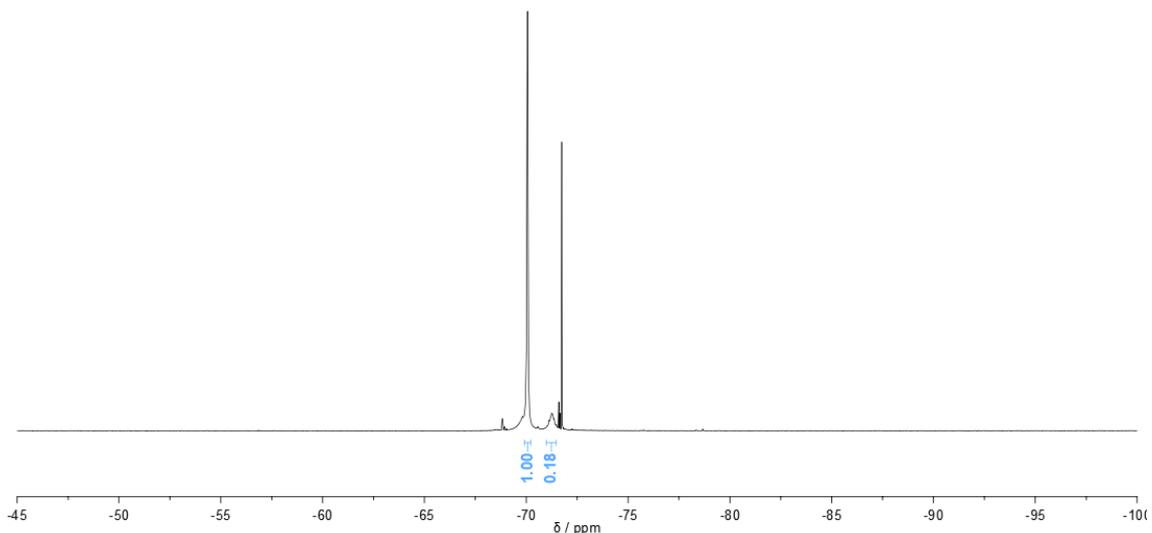
6.1.6.3. Derivatização da 1-MeTIQ isolada com o ácido de Mosher – Síntese do composto C-2d

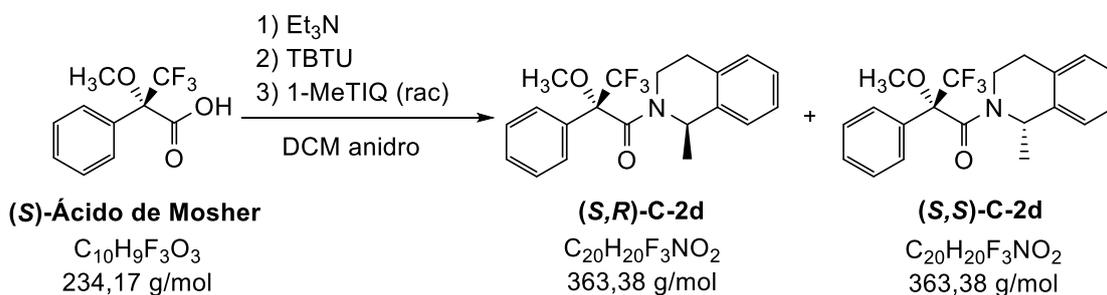


Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-1a** (secção 6.1.2.1.), procedeu-se ao acoplamento entre o **(S)-Ácido de Mosher** (0,1584 g; 0,6764 mmol) e a amina 1-MeTIQ isolada (0,1195 g; 0,8117 mmol), utilizando Et_3N (0,283 mL; 2,03 mmol) e TBTU (0,2389 g; 0,7440 mmol), deixando-se reagir durante 1 hora e 30 minutos. Após o tratamento habitual obteve-se 0,1966 g da mistura **(S,R/S)-C-2d** (ee = 82 %) que foi analisada por ^{19}F -RMN, sem outro tipo purificação.

Aspetto	R _f
óleo ligeiramente amarelado	0,67 em DCM

^{19}F -RMN (CDCl_3 , 377 MHz) δ ppm: - 70.06 (s, CF_3 , major); - 71.30 (s, CF_3 , minor).

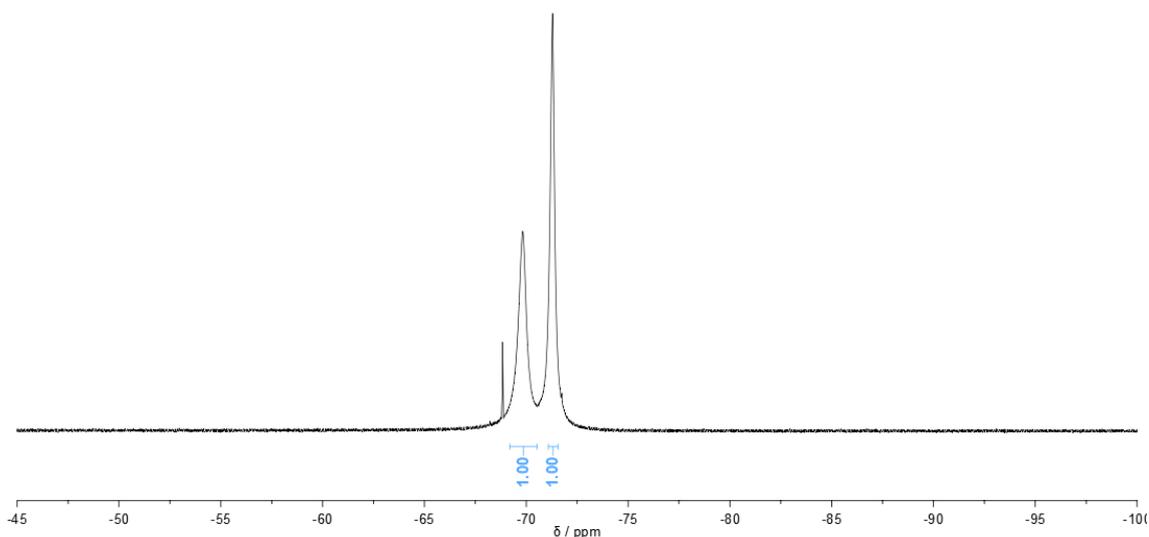


6.1.6.4. Derivatização da 1-MeTIQ racémica com o ácido de Mosher –
Síntese do composto C-2d

Segundo o procedimento descrito para a síntese do composto **C-1a** (secção 6.1.2.1.), procedeu-se ao acoplamento entre **(S)-Ácido de Mosher** (0,1583 g; 0,6762 mmol) e a amina 1-MeTIQ racémica (0,1195 g; 0,8114 mmol), utilizando Et_3N (0,283 mL; 2,03 mmol) e TBTU (0,2388 g; 0,7438 mmol), deixando-se reagir durante 1 horas e 30 minutos. Após o tratamento habitual obteve-se 0,1917 g da mistura **(S,R/S)-C-2d** (50:50) que foi analisada por ^{19}F -RMN, sem outro tipo de purificação.

Aspetto	R_f
óleo ligeiramente amarelado	0,68 em DCM

^{19}F -RMN ($CDCl_3$, 377 MHz) δ ppm: - 69.85 (s, CF_3); - 71.30, (s, CF_3).



6.2. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

6.2.1. Ensaio *in vitro*

As células Cath.-a-diferenciadas (CAD), provenientes da linha celular catecolaminérgica do sistema nervoso central (SNC)¹⁴⁷ foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS do inglês *fetal bovine serum*) e com 1% de penicilina/estreptomicina.

Para os ensaios de MTT, as células CAD foram subcultivadas em placas de 96 poços (2700 células por poço) durante 24 horas em meio normal. Para induzir a diferenciação das neurites, o soro foi retirado por 48 horas e, posteriormente, foram adicionados os compostos sintetizados (família de conjugados do GPE-aminoindano e respetivos controlos), sendo que as células foram de seguida incubadas durante mais de 24 horas. Após a incubação dos compostos, adicionou-se H₂O₂ (1mM) durante 30 minutos, e de seguida, as células foram tratadas com 20 µL de solução de MTT (5 mg/mL em PBS) em cada poço e incubadas por 30 minutos a 37°C.

Por fim, a placa foi lida a 540 nm num leitor de *Microelizaao Titertek Multiscan* (*Flow Laboratories*, Irvine, CA, EUA). As análises estatísticas (teste *t* independente) foram realizadas com *Software GraphPad Prism v. 6.01*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- [1] Farley, A.; Johnstone, C.; Hendry, C.; McLafferty, E., Nervous system: part 1. *Nursing Standard*, **2014**, 28 (31), 46-51.
- [2] Hendry, C.; Farley, A.; McLafferty, E.; Johnstone, C., Nervous system: part 2. *Nursing Standard*, **2014**, 28 (32), 45-59.
- [3] Farley, A.; McLafferty, E.; Johnstone, C.; Hendry, C., Nervous system: part 3. *Nursing Standard*, **2014**, 28 (33), 46-50.
- [4] Purves, D.; Augustine, G. J.; Fitzpatrick, D.; Katz, L. C.; LaMantia, Anthony-Samuel; McNamara, J. O.; Williams, S. M. *Neuroscience*. 2nd ed.; Sunderland (MA), **2001**.
- [5] Geula, C.; Mesulam, M. M. *Alzheimer Disease and Associated Disorders* **1995**, 9 (2), 23-28.
- [6] Hisahara, S.; Shimohama, S. *International Journal of Medicinal Chemistry*, **2011**, 2011, 1-16.
- [7] Gao, H. M.; Hong, J. S. *Trends in Immunology*, **2008**, 29 (8), 357-365.
- [8] Organization, W. H., Dementia: A Public Health Priority. **2012**, 5-32.
- [9] Chen, X.; Guo, C.; Kong, J. *Neural Regeneration Research*, **2012**, 7 (5), 376-385.
- [10] Ferri, C. P.; Prince, M.; Brayne, C.; Brodaty, H.; Fratiglioni, L.; Ganguli, M.; Hall, K.; Hasegawa, K.; Hendrie, H.; Huang, Y.; Jorm, A.; Mathers, C.; Menezes, P. R.; Rimmer, E.; Scazufca, M. *Lancet*, **2005**, 366 (9503), 2112-2117.
- [11] Holtzman, D. M.; Morris, J. C.; Goate, A. M. *Science Translational Medicine* **2011**, 3 (77), 1-17.
- [12] Prince, M.; Bryce, R.; Albanese, E.; Wimo, A.; Ribeiro, W.; Ferri, C. P. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, **2013**, 9 (1), 63-75.
- [13] Farmacêutica, A. P. d. I., Indústria Farmacêutica em Números 2016. *Apifarma* **2017**.
- [14] Hippus, H.; Neundörfer, G. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, **2003**, 5 (1), 101-108.
- [15] Masters, C. L.; Bateman, R.; Blennow, K.; Rowe, C. C.; Sperling, R. A.; Cummings, J. L. *Nature reviews. Disease primers*, **2015**, 1 (15056), 1-18.
- [16] Burns, A.; Iliffe, S. *British Medical Journal (Clinical research ed.)*, **2009**, 338, 467-471.
- [17] Dong, S.; Duan, Y.; Hu, Y.; Zhao, Z. *Translational Neurodegeneration*, **2012**, 1 (1), 18.
- [18] Fadi, M.; Serge, G. *Current Neuropharmacology*, **2010**, 8 (1), 69-80.
- [19] Inibidores da colinesterase. *Alzheimer Portugal*.
<http://alzheimerportugal.org/pt/text-0-9-35-27-inibidores-da-colinesterase>. Acedido em: 20-07-2018.
- [20] Casey, D. A.; Antimisiaris, D.; O'Brien, J. *P & T: a Peer-reviewed Journal for Formulary Management*, **2010**, 35 (4), 208-211.

- [21] Sonkusare, S. K.; Kaul, C. L.; Ramarao, P. *Pharmacological Research*, **2005**, 51 (1), 1-17.
- [22] Yiannopoulou, K. G.; Papageorgiou, S. G. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, **2013**, 6 (1), 19-33.
- [23] Atri, A.; Hendrix, S. B.; Pejovic, V.; Hofbauer, R. K.; Edwards, J.; Molinuevo, J. L.; Graham, S. M. *Alzheimer's Research & Therapy*, **2015**, 7 (1), 28.
- [24] Behari, M.; Srivastava, A. K.; Pandey, R. M. *Parkinsonism & Related Disorders* **2005**, 11 (4), 221-226.
- [25] Association, E. P. S. D. *The European Parkinson's Disease Standards of Care Consensus Statement (United Kingdom)*, **2011**.
- [26] Parkinson, J. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, **2002**, 14 (2), 223-236.
- [27] Poewe, W.; Seppi, K.; Tanner, C. M.; Halliday, G. M.; Brundin, P.; Volkman, J.; Schrag, A.-E.; Lang, A. E. *Nature Reviews Disease Primers*, **2017**, 3 (17013), 1-21.
- [28] Fung, V. S. C.; Hely, M.; Moore, G.; Morris, J. *Drugs for Parkinson's Disease*, **2001**, 24, 92-95.
- [29] Freuen, N. D.; Norton, N. S. *The Comprehensive Pharmacology Reference*, Enna, S. J.; Bylund, D. B., Eds. Elsevier: New York, **2007**, 1-6.
- [30] Waller, D. G.; Sampson, A. P. *Medical Pharmacology and Therapeutics (5th Edition)*, Waller, D. G.; Sampson, A. P., Eds. Elsevier: **2018**, 325-336.
- [31] Bar-Am, O.; Weinreb, O.; Amit, T.; Youdim, M. B. *Journal of Neurochemistry*, **2010**, 112 (5), 1131-1137.
- [32] Scott, L. J. *Drugs*, **2016**, 76 (13), 1293-1300.
- [33] Bonifácio, M. J.; Torrão, L.; Loureiro, A. I.; Palma, P. N.; Wright, L. C.; Soares-da-Silva, P. *British Journal of Pharmacology*, **2015**, 172 (7), 1739-1752.
- [34] Crosby, N.; Deane, K. H.; Clarke, C. E. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, **2003**, (1), 1-22.
- [35] Sara, V. R.; Carlsson-Skwirut, C.; Bergman, T.; Jornvall, H.; Roberts, P. J.; Crawford, M.; Hakansson, L. N.; Civalero, I.; Nordberg, A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1989**, 165 (2), 766-771.
- [36] Burgos-Ramos, E.; Martos-Moreno, G. A.; Lopez, M. G.; Herranz, R.; Aguado-Llera, D.; Egea, J.; Frechilla, D.; Cenarruzabeitia, E.; Leon, R.; Arilla-Ferreiro, E.; Argente, J.; Barrios, V. *Journal of neurochemistry*, **2009**, 109 (2), 360-370.
- [37] Alonso De Diego, S. A.; Gutierrez-Rodriguez, M.; Perez de Vega, M. J.; Gonzalez-Muniz, R.; Herranz, R.; Martin-Martinez, M.; Cenarruzabeitia, E.; Frechilla, D.; Del Rio,

- J.; Jimeno, M. L.; Garcia-Lopez, M. T. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, 16 (13), 3396-3400.
- [38] Guan, J.; Mathai, S.; Liang, H. P.; Gunn, A. J. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, **2013**, 8 (2), 142-160.
- [39] Kovacic, P.; Somanathan, R. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2010**, 3 (1), 13-22.
- [40] Gundersen, R. Y.; Vaagenes, P.; Breivik, T.; Fonnum, F.; Opstad, P. K. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, **2005**, 49 (8), 1108-1116.
- [41] Monod, J.; Wyman, J.; Changeux, J. P. *Journal of Molecular Biology*, **1965**, 12, 88-118.
- [42] Cacciatore, I.; Cornacchia, C.; Baldassarre, L.; Fornasari, E.; Mollica, A.; Stefanucci, A.; Pinnen, F. *Mini reviews in medicinal chemistry*, **2012**, 12 (1), 13-23.
- [43] Takahashi, T.; Sasaki, K.; Somfai, T.; Nagai, T.; Manabe, N.; Edashige, K. *The Journal of Reproduction and Development*, **2016**, 62 (2), 209-212.
- [44] Wedemeyer, W. J.; Welker, E.; Scheraga, H. A. *Biochemistry*, **2002**, 41 (50), 14637-14644.
- [45] Chierici, S.; Jourdan, M.; Figuet, M.; Dumy, P. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2004**, 2 (17), 2437-2441.
- [46] Dumy, P.; Keller, M.; Ryan, D. E.; Rohwedder, B.; Wöhr, T.; Mutter, M. *Journal of the American Chemical Society*, **1997**, 119 (5), 918-925.
- [47] Brimble, M.; Gluckman, P.; Thomas, G.; Guan, J.; Dragunow, M.; Anand, A.; Rosbo, N.; Sieg, F. *Neuren Pharmaceuticals Ltd*, Patent: US20070298009A1, **2005**.
- [48] Bickerdike, M. J.; Thomas, G. B.; Batchelor, D. C.; Sirimanne, E. S.; Leong, W.; Lin, H.; Sieg, F.; Wen, J.; Brimble, M. A.; Harris, P. W.; Gluckman, P. D. *Journal of the Neurological Sciences*, **2009**, 278 (1-2), 85-90.
- [49] Svedin, P.; Guan, J.; Mathai, S.; Zhang, R.; Wang, X.; Gustavsson, M.; Hagberg, H.; Mallard, C. *Developmental Neuroscience*, **2007**, 29 (4-5), 393-402.
- [50] Simon, J.; Pytkowicz, J.; Lensen, N.; Chaume, G.; Brigaud, T. *The Journal of Organic Chemistry*, **2016**, 81 (13), 5381-5392.
- [51] Asante, V.; Mortier, J.; Wolber, G.; Kokschi, B. *Amino acids*, **2014**, 46 (12), 2733-2744.
- [52] Kelly, A.; Stanley, C. A., *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, **2001**, 7 (4), 287-295.
- [53] Holmquist, L.; Stuchbury, G.; Berbaum, K.; Muscat, S.; Young, S.; Hager, K.; Engel, J.; Munch, G. *Pharmacology & Therapeutics*, **2007**, 113 (1), 154-164.

- [54] Cacciatore, I.; Baldassarre, L.; Fornasari, E.; Cornacchia, C.; Di Stefano, A.; Sozio, P.; Cerasa, L.; Fontana, A.; Fulle, S.; Di Filippo, E.; La rovere, R.; Pinnen, F. *ChemMedChem*, **2012**, 7 (11), 2021-2029.
- [55] Farooqui, T.; Farooqui, A. A. *Mechanisms of Ageing and Development*, **2009**, 130 (4), 203-215.
- [56] Uttara, B.; Singh, A. V.; Zamboni, P.; Mahajan, R. T. *Current Neuropharmacology*, **2009**, 7 (1), 65-74.
- [57] Sayre, L. M.; Smith, M. A.; Perry, G. *Current Medicinal Chemistry*, **2001**, 8 (7), 721-738.
- [58] Antkiewicz-Michaluk, L.; Wasik, A.; Michaluk, J. *Neurotoxicity Research*, **2014**, 25 (1), 1-12.
- [59] Antkiewicz-Michaluk, L.; Wąsik, A.; Romańska, I.; Bojarski, A.; Michaluk, J. *Neurotoxicity Research*, **2011**, 20 (2), 134-149.
- [60] Breen, G. F. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**, 15 (9), 1427-1430.
- [61] Shinohara, T.; Takeda, A.; Toda, J.; Sano, T. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **1998**, 46 (3), 430-433.
- [62] Stawikowski, M.; Fields, G. B. *Current Protocols in Protein Science / editorial board, John E. Coligan, et al*, **2002**, Unit 18.1.
- [63] Bassoli, A.; Merlini, L. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (2nd Edition)*, Caballero, B., Ed. Academic Press: Oxford. **2003**, 5688-5695.
- [64] Brown, C. S.; Lichter-Konecki, U. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, **2016**, 6, 8-12.
- [65] Lean, M. E. J.; Hankey, C. R. *British Medical Journal*, **2004**, 329 (7469), 755-756.
- [66] Aspartame: commissioner's final decision, Federal Register, **1981**, (46), 38283-382308.
- [67] Lee, H. J.; Macbeth, A. H.; Pagani, J. H.; Young, W. S. *Progress in Neurobiology*, **2009**, 88 (2), 127-151.
- [68] Neumann, I. D.; Slattery, D. A. *Biological Psychiatry*, **2016**, 79 (3), 213-221.
- [69] Suresh Babu, V. V. *Resonance*, **2011**, 16 (7), 640-647.
- [70] Vigneaud, V. D.; Ressler, C.; Swan, C. J. M.; Roberts, C. W.; Katsoyannis, P. G.; Gordon, S. *Journal of the American Chemical Society*, **1953**, 75 (19), 4879-4880.
- [71] Ouellette, R. J.; Rawn, J. D. *Organic Chemistry Study Guide*, Ouellette, R. J.; Rawn, J. D., Eds. Elsevier: Boston. **2015**, 569-586.
- [72] Aalund, M. P.; Pincock, J. A. *Journal of Chemical Education*, **1986**, 63 (7), 600.
- [73] McConathy, J.; Owens, M. J. *Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry*, **2003**, 5 (2), 70-73.

- [74] Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J. *Journal of Combinatorial Chemistry*, **1999**, 1 (1), 55-68.
- [75] Jursic, B. S.; Zdravkovski, Z. *Synthetic Communications*, **1993**, 23 (19), 2761-2770.
- [76] Geiger, R.; KÖNig, W., Chapter 1, *Protection of Functional Groups in Peptide Synthesis*, Gross, E.; Meienhofer, J., Eds. Academic Press. **1981**, 3, 1-99.
- [77] Isidro-Llobet, A.; Álvarez, M.; Albericio, F. *Chemical Reviews*, **2009**, 109 (6), 2455-2504.
- [78] Navath, R. S.; Pabbisetty, K. B.; Hu, L. *Tetrahedron Letters*, **2006**, 47 (3), 389-393.
- [79] Roeske, R. W., Chapter 2 *Protection of Functional Groups in Peptide Synthesis*, Gross, E.; Meienhofer, J., Eds. Academic Press. **1981**, 3, 101-136.
- [80] Balalaie, S.; Mahdidoust, M.; Eshaghi-Najafabadi, R. *Journal of the Iranian Chemical Society*, **2007**, 4 (3), 364-369.
- [81] Valeur, E.; Bradley, M. *Chemical Society Reviews*, **2009**, 38 (2), 606-631.
- [82] López, S. E.; Salazar, J. *Journal of Fluorine Chemistry*, **2013**, 156, 73-100.
- [83] Nicolaou, K. C.; Edmonds, D. J.; Bulger, P. G. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, **2006**, 45 (43), 7134-7186.
- [84] Johnson, W. S.; Gravestock, M. B.; McCarry, B. E. *Journal of the American Chemical Society*, **1971**, 93 (17), 4332-4334.
- [85] Nicolaou, K. C.; Petasis, N. A.; Zipkin, R. E.; Uenishi, J. *Journal of the American Chemical Society*, **1982**, 104 (20), 5555-5557.
- [86] Hayashi, Y. *Chemical Science*, **2016**, 7 (2), 866-880.
- [87] Sampaio-Dias, I. E.; Sousa, C. A. D.; Silva-Reis, S. C.; Ribeiro, S.; García-Mera, X.; Rodríguez-Borges, J. E. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2017**, 15 (36), 7533-7542.
- [88] Nagaraj, R.; Balaram, P. *Tetrahedron*, **1981**, 37 (10), 2001-2005.
- [89] Samuelsson, G., *Drugs of Natural Origin*. Pharmaceutical, S., Ed. CRC Press: Stockholm, **1992**, 214.
- [90] Vollhardt, K. P. C.; Schore, N. E., *Organic Chemistry*. W. H. Freeman: **2010**.
- [91] Abdel-Magid, A. F.; Carson, K. G.; Harris, B. D.; Maryanoff, C. A.; Shah, R. D. *The Journal of Organic Chemistry*, **1996**, 61 (11), 3849-3862.
- [92] Rylander, P. N., *Hydrogenation methods*. Academic Press: **1985**.
- [93] Tarasevich, V.; Kozlov, N. *Russian Chemical Reviews*, **1999**, 68 (1), 55-72.
- [94] Huang, H.; Zhao, Y.; Yang, Y.; Zhou, L.; Chang, M. *Organic Letters*, **2017**, 19 (8), 1942-1945.
- [95] Touchy, A. S.; Hakim Siddiki, S. M. A.; Kon, K.; Shimizu, K.-i. *ACS Catalysis*, **2014**, 4 (9), 3045-3050.
- [96] Wrobel, J. E.; Ganem, B. *Tetrahedron Letters*, **1981**, 22 (36), 3447-3450.

- [97] Borch, R. F.; Bernstein, M. D.; Durst, H. D. *Journal of the American Chemical Society*, **1971**, 93 (12), 2897-2904.
- [98] Mattson, R. J.; Pham, K. M.; Leuck, D. J.; Cowen, K. A. *The Journal of Organic Chemistry*, **1990**, 55 (8), 2552-2554.
- [99] Pereyre, M.; Quintard, J.-P.; Rahm, A., Chapter 1, *Tin in Organic Synthesis*, Pereyre, M.; Quintard, J.-P.; Rahm, A., Eds. Butterworth-Heinemann. **1987**, 3-7.
- [100] Gribble, G. W.; Ferguson, D. C. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **1975**, (13), 535-536.
- [101] Evans, A. M. *Clinical Rheumatology*, **2001**, 20 (1), 9-14.
- [102] Porter, W. H. In *Pure and Applied Chemistry*, **1991**, 63, 1119.
- [103] Pasteur, L. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, **1848**, 26, 535.
- [104] Woodward, R. B.; Doering, W. E. *Journal of the American Chemical Society*, **1945**, 67 (5), 860-874.
- [105] Fogassy, E.; Nógrádi, M.; Pálovics, E.; Schindler, J. *Resolution of Enantiomers by Non-Conventional Methods*, **2005**, 36, 1555-1568.
- [106] van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *Tetrahedron*, **2004**, 60 (3), 501-519.
- [107] Morgan, B.; Zaks, A.; Dodds, D. R.; Liu, J.; Jain, R.; Megati, S.; Njoroge, F. G.; Girijavallabhan, V. M. *The Journal of Organic Chemistry*, **2000**, 65 (18), 5451-5459.
- [108] Kitaguchi, H.; Fitzpatrick, P. A.; Huber, J. E.; Klibanov, A. M. *Journal of the American Chemical Society*, **1989**, 111 (8), 3094-3095.
- [109] Gutman Arie, L.; Meyer, E.; Kalerin, E.; Polyak, F.; Sterling, J. *Biotechnology and Bioengineering*, **1992**, 40 (7), 760-767.
- [110] Hauke Smidt, A. F., Peter Fischer, Rolf D. Schmid, Uwe Stelzer Process for preparing optically active amines. **1996**.
- [111] Anderson, E. M.; Larsson, K. M.; Kirk, O. *Biocatalysis and Biotransformation*, **1998**, 16 (3), 181-204.
- [112] Rotticci, D.; Rotticci-Mulder, J. C.; Denman, S.; Norin, T.; Hult, K. *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology*, **2001**, 2 (10), 766-770.
- [113] Messina, F.; Botta, M.; Corelli, F.; Schneider, M. P.; Fazio, F. *The Journal of Organic Chemistry*, **1999**, 64 (10), 3767-3769.
- [114] Faber, K. *Chemistry – A European Journal*, **2001**, 7 (23), 5004-5010.
- [115] Verho, O.; Bäckvall, J.-E. *Journal of the American Chemical Society*, **2015**, 137 (12), 3996-4009.
- [116] Domínguez de María, P.; Montero, J. M.; V Sinisterra, J.; Alcántara, A. *Understanding Candida rugosa lipases: An overview*, **2006**, 24, 180-196.

- [117] Sousa, C.; Sampaio-Dias, I.; Aguiar, F.; Garcia-Mera, X.; Borges, J. *RSC Advances*, 2015, 5, 104509-104515.
- [118] Levilain, G.; Coquerel, G. *CrystEngComm*, **2010**, 12 (7), 1983-1992.
- [119] Ault, A. *Organic Synthesis*, **1969**, 49, 93.
- [120] Juaristi, E.; Romo, J. L.; Reyes-Ramírez, A.; Escalante, J. *Tetrahedron*, **1999**, 10, 2441-2495.
- [121] K Bertilsson, S.; K Ekegren, J.; Modin, S.; Andersson, P. *Tetrahedron*, **2001**, 57 (30), 6399-6406.
- [122] Wang, P.; Zhang, E.; Niu, J.-F.; Ren, Q.-H.; Zhao, P.; Liu, H.-M. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2012**, 23 (14), 1046-1051.
- [123] Mathad, V. T.; Shinde, G. B.; Ippar, S. S.; Niphade, N. C.; Panchangam, R. K.; Vankawala, P. J. *Synthetic Communications*, **2011**, 41 (3), 341-346.
- [124] Bhattacharya, A.; Murphy, D. *Organic Process Research & Development*, **2003**, 7 (5), 717-722.
- [125] Nohira, H.; Sakai, K. *Enantiomer Separation: Fundamentals and Practical Methods*, Toda, F., Ed. Springer Netherlands: Dordrecht. **2004**, 165-191.
- [126] D'Oria, E.; Karamertzanis, P. G.; Price, S. L. *Crystal Growth & Design*, **2010**, 10 (4), 1749-1756.
- [127] Bredikhin, A. A.; Bredikhina, Z. A.; Antonovich, O. A.; Zakharychev, D. V.; Krivolapov, D. B. *Journal of Molecular Structure*, **2017**, 1144, 443-450.
- [128] (S)-(+)-10-canfor-sulfonilo: ¹H-RMN (*Sigma Aldrich*):
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/219576?lang=pt®ion=PT>.
Acedido em: 31-07-2018.
- [129] Ácido (1S)-(+)-10-Canforsulfonico: ¹H-RMN (*Sigma Aldrich*):
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/c2107?lang=pt®ion=PT>.
Acedido em 31-07-2018.
- [130] Cermak, S. C.; Wiemer, D. F. *Journal of Chemical Education*, **1999**, 76 (12), 1715.
- [131] Dale, J. A.; Dull, D. L.; Mosher, H. S. *The Journal of Organic Chemistry*, **1969**, 34 (9), 2543-2549.
- [132] Kusumi, T.; Fukushima, T.; Ohtani, I.; Kakisawa, H. *Tetrahedron Letters*, **1991**, 32 (25), 2939-2942.
- [133] Allen, D. A.; Tomaso, A. E.; Priest, O. P.; Hindson, D. F.; Hurlburt, J. L. *Journal of Chemical Education*, **2008**, 85 (5), 698.
- [134] Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R. *Chemical Reviews*, **2004**, 104 (1), 17-118.
- [135] Frisch, M. J. T., G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A., GAUSSIAN09. .
Revision D. 01. Gaussian Inc., Wallingford, CT, USA. 2013.

- [136] Zhao, Y.; Truhlar, D. G., The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theoretical Chemistry Accounts* **2008**, *120* (1), 215-241.
- [137] Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Accounts of Chemical Research*, **2008**, *41* (2), 157-167.
- [138] Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. *The Journal of Physical Chemistry*, **2009**, *113* (18), 6378-6396.
- [139] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2001**, *46* (1-3), 3-26.
- [140] Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H. Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2002**, *45* (12), 2615-2623.
- [141] Yusof, I.; Segall, M. D. *Drug Discovery Today*, **2013**, *18* (13-14), 659-666.
- [142] Kerns, E. H.; Di, L., Chapter 4, *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods*, Kerns, E. H.; Di, L., Eds. Academic Press: San Diego. **2008**, 37-42.
- [143] Kerns, E. H.; Di, L., Chapter 5, *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods*, Kerns, E. H.; Di, L., Eds. Academic Press: San Diego. **2008**, 43-47.
- [144] Topliss, J. G. *Journal of Medicinal chemistry* **1996**, *39* (26), 5287-5288.
- [145] Van de Waterbeemd, H., 5.28 - In Silico Models to Predict Oral Absorption. In *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, Taylor, J. B.; Triggle, D. J., Eds. Elsevier: Oxford, 2007; pp 669-697.
- [146] Hitchcock, S. A.; Pennington, L. D., Structure–Brain Exposure Relationships. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2006**, *49* (26), 7559-7583.
- [147] Qi, Y.; Wang, J. K.; McMillian, M.; Chikaraishi, D. M. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, **1997**, *17* (4), 1217-1225.
- [148] Mosmann, T. *Journal of Immunological Methods*, **1983**, *65* (1-2), 55-63.
- [149] Marshall, N. J.; Goodwin, C. J.; Holt, S. J. *Growth Regulation*, **1995**, *5* (2), 69-84.