

Universidade do Minho
Escola de Ciências

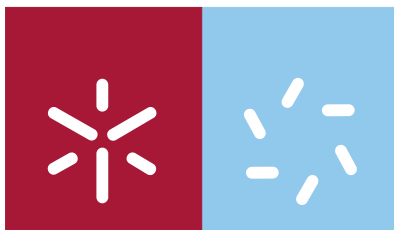
Ana Maria Silva Soares

Bioconjugados fluorescentes: síntese e aplicação em estudos de clivagem foto-induzidos

Ana Maria Silva Soares **Bioconjugados fluorescentes: síntese e aplicação em estudos de clivagem foto-induzidos**

UMinho | 2009

Dezembro de 2009



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Ana Maria Silva Soares

**Bioconjugados fluorescentes: síntese
e aplicação em estudos de clivagem
foto-induzidos**

Mestrado em Química Medicinal

Trabalho efectuado sob a orientação da
Professora Doutora M. Sameiro T. Gonçalves

Dezembro de 2009

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

*Aos meus pais,
irmão e amigos*

Agradecimentos

Esta Dissertação não representa apenas o resultado de extensas horas de estudo, reflexão e trabalho durante as diversas etapas que a constituem. É igualmente o culminar de um objectivo académico a que me propus e que não seria possível alcançar sem a ajuda de um número considerável de pessoas.

O meu mais sincero agradecimento à Doutora Maria do Sameiro Torres Gonçalves pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho, pela sua orientação sem igual, ensinamento, apoio e disponibilidade. Agradeço ainda a amizade e o carinho com que sempre me recebeu. Muito Obrigada!

Agradeço à Doutora Susana Costa pela simpatia, ajuda e disponibilidade que sempre demonstrou.

Agradeço ao Doutor António Gil Fortes, Director do Mestrado em Química Medicinal pela disponibilidade e delicadeza com que sempre me recebeu.

Agradeço de forma muito especial às minhas meninas do Laboratório, Andréa, Maria José, Cátia, Sarala, Ana Margarida, Cristina e Ana Maria, por todos os bons momentos que me proporcionaram, são pessoas muito especiais que vou guardar para sempre, muito obrigada por todo o incentivo, carinho e força sempre presentes. Obrigada do fundo do meu coração.

Agradeço também a todos os outros amigos e colegas, Carla, Cristina, Humberto, Joana, Ricardo, Rosa, Sara, Sofia, Susana, Xana e ainda a todos aqueles que apesar de não mencionados, de alguma maneira, se cruzaram na minha vida e deixaram a sua marca na construção daquilo que sou hoje.

O meu muito obrigado à Dra. Elisa Pinto, por toda a simpatia, empenho e rapidez na realização dos espectros de RMN.

A todos os funcionários do Departamento de Química, técnicos e administrativos, pelos serviços prestados.

À FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo financiamento da minha bolsa de investigação inserida no Projecto PTDC/QUI/69607/2006, “Desenvolvimento de novos grupos fotocliváveis como phototriggers e grupos protectores: síntese, estudos fotofísicos e de fotoclivagem”.

Agradeço aos meus pais, por me inculirem o amor ao estudo e à realização profissional, entre outros valores que regem a minha vida. À minha família, pela sua tolerância, compreensão e carinho ao longo desta etapa.

À minha amiga Inês agradeço toda a amizade e o apoio que mesmo à distância sempre me proporcionou.

É a todos vocês que, sem reservas, dedico esta Dissertação.

<i>Agradecimentos</i>	ii
<i>Índice geral</i>	iv
<i>Índice de figuras</i>	vii
<i>Índice de esquemas</i>	ix
<i>Índice de tabelas</i>	x
<i>Resumo</i>	xi
<i>Abstract</i>	xii
<i>Nota introdutória</i>	xiii
<i>Publicações e Comunicações</i>	xiv
<i>Abreviaturas e símbolos</i>	xvi

Capítulo 1: Introdução

1. Moléculas neurotransmissoras.....	2
1.1. Colinas neurotransmissoras.....	3
1.2. Aminas neurotransmissoras.....	3
1.3. Aminoácidos neurotransmissores.....	5
1.4. Péptidos neurotransmissores.....	6
2. Grupos protectores fotocliváveis em aplicações <i>caging</i>	7
2.1. Introdução.....	7
2.2. <i>Caging</i> de biomoléculas.....	11
2.3. <i>Caging</i> de aminoácidos neurotransmissores.....	18
2.3.1. <i>Caging</i> de aminoácidos neurotransmissores com grupos diferentes de cumarina.....	19
2.3.2. <i>Caging</i> de aminoácidos neurotransmissores com cumarinas.....	23
3. Importância dos benzoxazoles.....	28

Capítulo 2: Apresentação e Discussão dos Resultados

1. Introdução.....	33
2. Síntese dos heterociclos de oxobenzopirano 1 , 5 e de oxazole 6 , 8	35
2.1. Síntese dos 6-metoxi-2-oxo-2 <i>H</i> -benzo[<i>h</i>]benzopiranos 1 e 5	35
2.2. Síntese dos oxazoles 6 e 8	38
3. Síntese dos bioconjugados de oxobenzopirano e oxazole 11a-d , 12a-c , 14a,b , 15 e 16	41
3.1. Síntese dos bioconjugados de oxobenzopirano 11a-d , 12a-c e 14a,b	41
3.2. Síntese dos bioconjugados de oxazole 15 e 16	44
4. Caracterização fotofísica dos bioconjugados de oxobenzopirano e oxazole 11a-d , 12a-c , 14a,b , 15 e 16	45
4.1. Caracterização fotofísica dos bioconjugados de oxobenzopirano 11a-d , 12a-c e 14a,b	46
4.2. Caracterização fotofísica dos bioconjugados de oxazole 15 e 16	49
5. Estudos de fotoclivagem dos bioconjugados de oxobenzopirano e oxazole 11a-d , 12a-c , 14a,b , 15 e 16	52
5.1. Estudos de fotoclivagem dos bioconjugados de oxobenzopirano 11a-d , 12a-c e 14a,b	53
5.2. Estudos de fotoclivagem dos bioconjugados de oxazole 15 e 16	61
6. Conclusões e perspectivas futuras.....	63

Capítulo 3: Parte Experimental

1. Procedimentos gerais.....	66
2. Síntese dos heterociclos de oxobenzopirano 1 , 5 e de oxazole 6 , 8	68
2.1. Síntese dos 6-metoxi-2-oxo-2 <i>H</i> -benzo[<i>h</i>]benzopiranos 1 e 5	68
2.2. Síntese dos oxazoles 6 e 8	73

3. Síntese dos bioconjugados de oxobenzopirano e oxazole 11a-d, 12a-c, 14a,b, 15 e 16	76
3.1. Síntese dos bioconjugados de oxobenzopirano 11a-d, 12a-c e 14a,b	76
3.2. Síntese dos bioconjugados de oxazole 15 e 16	85
4. Caracterização fotofísica dos bioconjugados de oxobenzopirano e oxazole 11a-d, 12a-c, 14a,b, 15 e 16	87
4.1. Procedimento geral.....	87
5. Estudos de fotoclivagem dos bioconjugados de oxobenzopirano e oxazole 11a-d, 12a-c, 14a,b, 15 e 16	88
5.1. Método geral de fotoclivagem.....	88

Índice de figuras

Capítulo 1 - Introdução teórica

Figura 1. Estrutura da acetilcolina.....	3
Figura 2. Algumas aminas neurotransmissoras importantes.....	4
Figura 3. Alguns aminoácidos neurotransmissores.....	6
Figura 4. Estrutura primária da insulina.....	7
Figura 5. Método de <i>caging</i>	8
Figura 6. ATP <i>caged</i> reportado por Kaplan <i>et al.</i>	9
Figura 7. Exemplos de compostos <i>caged</i>	10
Figura 8. Estrutura dos grupos protectores mais usados em <i>caging</i>	11
Figura 9. Exemplos de biomoléculas <i>caged</i> com o grupo Bhc.....	17
Figura 10. Estruturas de GABA <i>caged</i>	19
Figura 11. Derivados de glutamato <i>caged</i>	20
Figura 12. Estruturas de GABA e glicina <i>caged</i> com NI.....	21
Figura 13. Estrutura do GABA <i>caged</i>	22
Figura 14. Estrutura de derivados <i>caged</i> do GABA.....	26

Capítulo 2 - Apresentação e discussão dos resultados

Figura 1. Espectros normalizados de absorção (A) e de fluorescência (F) dos precursores 1 e 5 , e dos conjugados 12c e 14b em etanol (1 , λ_{exc} 379 nm; 5 , λ_{exc} 365 nm; 12c , λ_{exc} 375 nm; 14b , λ_{exc} 374 nm) (1 , linha a preto; 5 , linha a cinzento; 12c , linha tracejada a preto; 14b , linha tracejada a cinzento).....	49
Figura 2. Espectros normalizados de fluorescência dos precursores 6 , 8 e dos conjugados 15 , 16 em etanol (6 , λ_{exc} 334 nm; 8 , λ_{exc} 325 nm; 15 , λ_{exc} 301 nm; 16 , λ_{exc} 322 nm) (6 , linha a preto; 8 , linha a cinzento; 15 , linha tracejada a preto; 16 , linha tracejada a cinzento).....	51
Figura 3. Estrutura dos bioconjugados de 2-oxo-2H-benzo[f]benzopirano 17a,b	54
Figura 4. Traçado do $\ln A$ versus tempo de irradiação para a fotólise dos conjugados 12a (Δ), 12b (\square), 12c (\circ) e 14b (\times) a 350 nm, em metanol/HEPES (80:20).....	55
Figura 5. Espectros de RMN de 1H em metanol- d_4 /D $_2$ O (80:20) da fotólise do conjugado Z- β -Ala-OFlu 11c ($C = 1,08 \times 10^{-2}$ M) a 350 nm: (a) antes da irradiação; (b)	

após 40 min. de irradiação; (c) após 155 min. de irradiação; (d) após 285 min. de irradiação; (e) H-β-Ala-OH.....	58
Figura 6. Espectros de RMN de ¹ H em metanol- <i>d</i> ₄ /D ₂ O (80:20) da fotólise do conjugado H-β-Ala-OFlu 12c (C = 1,47×10 ⁻² M) a 350 nm: (a) antes da irradiação; (b) após 20 min. de irradiação; (c) após 40 min. de irradiação; (d) após 140 min. de irradiação; (e) H-β-Ala-OH.....	59
Figura 7. Espectros de RMN de ¹ H em metanol- <i>d</i> ₄ /D ₂ O (80:20) da fotólise do conjugado Flu-β-Ala-OH 14b (C = 1,05×10 ⁻² M) a 350 nm: (a) antes da irradiação; (b) após 35 min. de irradiação; (c) após 60 min. de irradiação; (d) após 90 min. de irradiação; (e) H-β-Ala-OH.....	60
Figura 8. Traçado ln A versus tempo de irradiação para a fotólise dos conjugados 15 (Δ, a 254 nm; ○, a 300 nm) e 16 (□, a 254 nm; ×, a 300 nm), numa solução de metanol/HEPES (80:20).....	62

Índice de esquemas

Capítulo 1 - *Introdução teórica*

Esquema 1	11
Esquema 2	12
Esquema 3	13
Esquema 4	18
Esquema 5	21
Esquema 6	23
Esquema 7	24
Esquema 8	25
Esquema 9	27
Esquema 10	28
Esquema 11	29
Esquema 12	30
Esquema 13	31

Capítulo 2 - *Apresentação e discussão dos resultados*

Esquema 1	35
Esquema 2	36
Esquema 3	37
Esquema 4	39
Esquema 5	42
Esquema 6	44
Esquema 7	56
Esquema 8	61

Índice de tabelas

Capítulo 1 - *Introdução teórica*

Tabela 1. Velocidade de fotólise dos conjugados 3a-h em acetonitrilo.....	13
Tabela 2. Compostos <i>caged</i> obtidos a partir do grupo <i>pHP</i>	15
Tabela 3. Propriedades espectroscópicas e fotoquímicas de acetatos de cumarina <i>caged</i>	16

Capítulo 2 - *Apresentação e discussão dos resultados*

Tabela 1. Síntese dos compostos 1-5	37
Tabela 2. Síntese dos compostos 6-9	40
Tabela 3. Síntese dos compostos 11a-d, 12a-c e 14a,b	43
Tabela 4. Síntese dos compostos 15 e 16	45
Tabela 5. Dados de UV/visível dos precursores 1-5 e conjugados 11a-d, 12a-c e 14a,b em etanol e em metanol/HEPES (80:20).....	47
Tabela 6. Dados de fluorescência dos precursores 1-5 e conjugados 11a-d, 12a-c e 14a,b em etanol e em metanol/HEPES (80:20).....	48
Tabela 7. Dados de UV/visível dos precursores 6 e 8 , e conjugados 15 e 16 em etanol e metanol/HEPES (80:20).....	50
Tabela 8. Dados de fluorescência dos precursores 6 e 8 e conjugados 15 e 16 em etanol e em metanol/HEPES (80:20).....	51
Tabela 9. Tempos de irradiação (em min) e constantes de velocidade ($\times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) para a fotólise dos conjugados 11a-d, 12a-c, 14a,b e 17a,b a diferentes comprimentos de onda de irradiação em solução de metanol/HEPES (80:20).....	53
Tabela 10. Tempos de irradiação (em min) e constantes de velocidade ($\times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$) para a fotólise dos conjugados 15 e 16 , a diferentes comprimentos de onda de irradiação em solução de metanol/HEPES (80:20).....	61

Com o objectivo de desenvolver grupos protectores fotocliváveis para síntese orgânica e também para aplicações *caging*, baseados em novos derivados fluorescentes policíclicos de oxobenzopirano e oxazole, sintetizaram-se os compostos funcionalizados 4-(clorometil)-6-metoxi-2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopirano, 4-(hidroximetil)-6-metoxi-2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopirano, 2-(bromometil)nafto[2,3-*d*]oxazole e 2-(bromometil)-8-metil-6-oxo-6*H*-benzopirano[6,7-*d*]oxazole.

Estes compostos foram usados na preparação de bioconjugados fluorescentes do tipo éster e uretano, usando como moléculas bifuncionais modelo aminoácidos neurotransmissores (glicina, alanina, β -alanina e ácido γ -aminobutírico (GABA)).

No sentido de avaliar a capacidade de biomarcação dos fluoróforos e de determinar os parâmetros necessários à monitorização do processo de fotólise foram efectuados estudos de espectroscopia de UV/visível e de fluorescência dos compostos obtidos em etanol e metanol/tampão HEPES (80:20).

Todos os bioconjugados sintetizados foram submetidos a estudos de clivagem foto-induzida em soluções de metanol/tampão HEPES (80:20) a diferentes comprimentos de onda de radiação (254, 300, 350 e 419 nm). A monitorização foi efectuada por HPLC e RMN de protão, tendo sido possível obter dados cinéticos para as reacções de fotoclivagem de todos os bioconjugados.

Aiming at the development of new polycyclic fluorescent oxobenzopyran- and oxazole-based photocleavable protecting groups for organic synthesis and also for *caging* applications, the novel functionalised 4-(chloromethyl)-6-methoxy-2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopyran, 4-(hydroxymethyl)-6-methoxy-2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopyran, 2-(bromomethyl)naphtho[2,3-*d*]oxazole and 2-(bromomethyl)-8-methyl-6-oxo-6*H*-benzopyran[6,7-*d*]oxazole were synthesised.

These compounds were used in the preparation of fluorescent bioconjugates, by linking through an ester or urethane bond to several model neurotransmitter amino acids (glycine, alanine, β -alanine and γ -aminobutyric acid, (GABA)), which were chosen as models of bifunctional molecules.

In order to assess the ability of biolabelling of the fluorophores and to determine parameters for the monitorisation during photolysis, UV/visible and fluorescence studies in ethanol and methanol/HEPES buffer (80:20) solutions were carried out.

All synthesised bioconjugates were subjected to photo-induced cleavage studies in methanol/HEPES buffer (80:20) solutions at different wavelengths of irradiation (254, 300, 350 and 419 nm). The monitorisation was carried out by HPLC and proton NMR, and for all bioconjugates photocleavage kinetic data were collected.

1. Comentário à nomenclatura usada

Os 2-oxo-2*H*-benzopiranos são habitualmente designados por cumarinas (designação não IUPAC). Nesta dissertação usaram-se ambas as designações; a designação IUPAC para o trabalho experimental efectuado e apresentado, e a designação comum sempre que eram referidos os resultados de outros autores.

2. Código dos fluoróforos e aminoácidos utilizados

A denominação dos fluoróforos derivados de oxobenzobenzopirano nos conjugados dos neurotransmissores correspondentes foi efectuada pela atribuição de um código de três letras (Flu), para simplificar a escrita e leitura dos mesmos.

Os aminoácidos naturais são indicados ao longo do texto pelo seu código de três e/ou quatro letras (ex. alanina, Ala; ácido γ -aminobutírico, GABA).

Assim, por exemplo ao éster (6-metoxi-2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopiran-4-il) metílico da *N*-(benziloxicarbonil)-glicina foi atribuída a designação Z-Gly-OFlu.

3. Utilização de termos técnicos na forma original

Dado que alguns termos técnicos utilizados têm ampla divulgação e utilização na forma original (inglês), ao contrário da forma em português, optou-se por não efectuar a sua tradução. Assim sendo, apresentam-se ao longo do texto na forma original em itálico (ex. *caging*, *uncaging*, *caged*, *phototrigger*).

4. Numeração de figuras, esquemas e tabelas

A numeração das figuras, esquemas e tabelas apresentadas no Capítulo 1 é independente daquela que se utilizou nos capítulos seguintes.

5. Sistema de referências

Ao longo do texto as referências bibliográficas são indicadas por números, por ordem crescente e indicadas como nota de rodapé no corpo de texto

Publicações e Comunicações

Alguns dos resultados apresentados nesta Dissertação constam das publicações, actas em congressos e comunicações seguintes:

Publicações

§ A. M. S. Soares, S. P. G. Costa, M. S. T. Gonçalves, “2-Oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopyran as a new light sensitive protecting group for neurotransmitter amino acids”, *Amino Acids* **2009**, doi 10.1007/s00726-009-0383-z.

Actas em congressos

§ A. M. S. Soares, S. P. G. Costa, M. S. T. Gonçalves, “4-(Hydroxymethyl)-6-methoxy-2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopyran- β -alanine conjugate: synthesis and photocleavage”, *Proceedings of ECSOC-13, The 13th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*, <http://www.mdpi.org/ecsoc-13/>, J. A. Seijas Vázquez, A002, 1-30 de Novembro de **2009**, no prelo.

Comunicações

§ A. M. S. Soares, S. P. G. Costa, M. S. T. Gonçalves, “Synthesis and photophysical properties of new fluorescent benzobenzopyran bioconjugates of neurotransmitter amino acids”, comunicação em poster (P2.180), *ESOC 2009, The Sixteenth European Symposium on Organic Chemistry*, Praga, República Checa, 12-16 Julho de **2009**.

§ A. M. S. Soares, S. P. G. Costa, M. S. T. Gonçalves, “Photorelease of neurotransmitter amino acids from fluorescent benzocoumarin conjugates”, comunicação em poster (P1.179), *ESOC 2009, The Sixteenth European Symposium on Organic Chemistry*, Praga, República Checa, 12-16 Julho de **2009**.

§ A. M. S. Soares, S. P. G. Costa, M. S. T. Gonçalves, “4-(Hydroxymethyl)-6-methoxy-2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopyran- β -alanine conjugate: synthesis and photocleavage”, comunicação A002, *ECSOC-13, The 13th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*, 1-30 Novembro de **2009**.

Abreviaturas e símbolos

Ac	grupo acetilo: CH ₃ CO-
Ala	alanina
β-Ala	β-alanina
Asp	ácido aspártico
ATP	adenosina trifosfato
Boc	grupo <i>terc</i> -butiloxicarbonilo
Boc ₂ O	pirocarbonato de <i>t</i> -butilo
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
CDI	1,1'-carbonildiimidazole
d	duplete
DCC	dicicloexilcarbodiimida
dd	duplo duplete
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO-d ₆	dimetilsulfóxido hexadeuterado
DNA	ácido desoxirribonucleico
δ	desvio químico
EI	impacto eletrônico
eq	equivalente
ESI	ionização por <i>electrospray</i>
Et ₃ N	triethylamina
EtOH	etanol
ex.	exemplo
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (do Latim, referência a outras pessoas)
ε	absorptividade molar expressa em M ⁻¹ cm ⁻¹
Φ _F	rendimento quântico de fluorescência
GABA	ácido γ-aminobutírico
Glu	ácido glutâmico
Gly	glicina
HEK 293T	<i>human embryonic kidney cells</i>
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-peperazin-1-iletanosulfônico

HMBC	correlação espectroscópica heteronuclear bidimensional, a longa distância (<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>)
HMQC	correlação espectroscópica heteronuclear bidimensional (<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>)
HOBt	1-hidroxibenzotriazole
HPLC	cromatografia em fase líquida de alta eficiência
Hz	hertz
IV	infravermelho
J	constante de acoplamento (em hertz)
k	constante de velocidade de fotoclivagem
λ_{\max}	comprimento de onda de absorção máxima
λ_{em}	comprimento de onda de emissão máxima
λ_{exc}	comprimento de onda de excitação
m	mutipeto
min	minuto
m/z	relação massa/carga (espectrometria de massa)
M^+	ião molecular
Me	grupo metilo
MeOH	metanol
MIC	<i>minimum inhibitory concentration</i>
nm	nanómetro
ν	frequência
OMe	grupo metoxilo
p.a.	<i>pro analysi</i>
p.f.	ponto de fusão
Ph	fenilo
ppm	partes por milhão
R_f	factor de retenção
RMN	ressonância magnética nuclear
RNA	ácido ribonucleico
η	rendimento (em %)
s	singleto
SNC	sistema nervoso central

t	triplete
t.a.	temperatura ambiente
$t_{1/2}$	tempo de meia vida da fotoclivagem
<i>t</i> Bu	grupo <i>terc</i> -butilo
TFA	ácido trifluoroacético
TLC	cromatografia em camada fina
u.a.	unidades arbitrárias
UV	ultravioleta

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO TEÓRICA

1. Moléculas neurotransmissoras

Quimicamente, os neurotransmissores são moléculas relativamente pequenas e simples, sintetizadas endogenamente pelos neurónios (células nervosas). Actuam ao nível do Sistema Nervoso Central (SNC), transportando uma grande diversidade de informação entre as sinapses (ligações nervosas).¹

De um modo geral, a passagem de informação dá-se por libertação do neurotransmissor numa sinapse nervosa e consequente ligação deste a um receptor, durante um determinado período de tempo, desencadeando uma resposta celular. Esta resposta pode ser de dois tipos: eléctrica ou química dependendo do neurotransmissor e do neurorreceptor em questão.

Existem vários tipos de neurotransmissores tendo sido ao longo dos anos identificados cerca de 60 neurotransmissores diferentes que se encontram agrupados em quatro categorias: colinas, aminas biogénicas, aminoácidos e neuropéptidos.^{2,3}

¹ <http://www.afh.bio.br/nervoso/nervoso1.asp>

² http://www.cerebromente.org.br/n12/fundamentos/neurotransmissores/nerves_p.html

³ <http://neuromed88.blogspot.com/2008/09/neurotransmissores.html>

1.1. Colinas neurotransmissoras

De entre as colinas mais importantes destaca-se a acetilcolina (ACh) (Figura 1) que foi o primeiro neurotransmissor a ser descoberto. Este neurotransmissor controla a tensão muscular através dos neurónios colinérgicos que transportam a informação até ao cérebro. A acetilcolina regula ainda a actividade de áreas cerebrais relacionadas com a atenção, aprendizagem e memória. As pessoas que sofrem da doença de Alzheimer apresentam tipicamente baixos níveis de acetilcolina no córtex cerebral; as drogas que aumentam a sua acção podem melhorar a memória em tais pacientes.

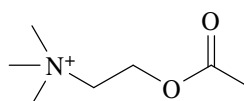


Figura 1. Estrutura da acetilcolina.

1.2. Aminas neurotransmissoras

Das aminas biogénicas destacam-se a serotonina, a histamina e as catecolaminas – a dopamina, a norepinefrina e a epinefrina, como as mais importantes (Figura 2).

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é uma amina neurotransmissora derivada do triptofano que é incluída em muitos anti-depressivos (por ex. no Prozac) e, deste modo tornou-se conhecida como o neurotransmissor do “bem-estar”. Este tipo de medicamentos age de modo a produzir um aumento da disponibilidade desta substância no espaço entre um neurónio e outro. A serotonina tem um efeito modulador geral da actividade psíquica, uma vez que tem influência nas alterações de humor, sono, actividade sexual, apetite, ritmo cardíaco, funções neuroendócrinas, temperatura corporal, sensibilidade à dor, actividade motora e funções cognitivas. Para além disso, influencia quase todas as funções cerebrais, inibindo-as de forma directa ou estimulando o sistema do neurotransmissor do ácido γ -aminobutírico.⁴

⁴ D. E. Nichols, C. D. Nichols, *Serotonin receptors*. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1614-1641.

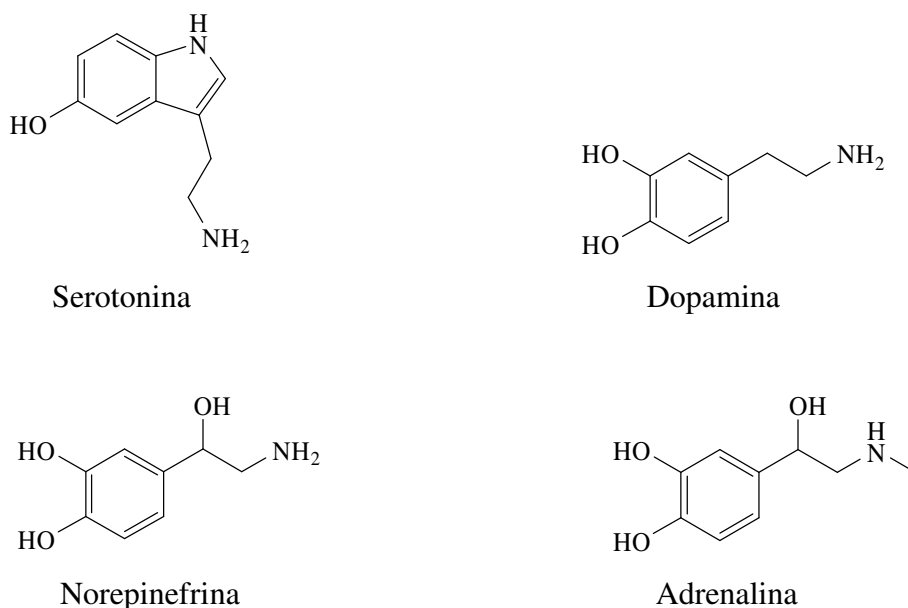


Figura 2. Algumas aminas neurotransmissoras importantes.

A histamina é um mediador de respostas alérgicas e também regula a secreção de ácido gástrico no estômago. A histamina age no receptor H₂ do coração aumentando a frequência cardíaca e o débito cardíaco, com risco de arritmias. Ambos os receptores H₁ e H₂ agem sobre os vasos sanguíneos causando vasodilatação generalizada, com diminuição da pressão arterial, rubor cutâneo e cefaleia.

As catecolaminas controlam os sistemas adrenérgicos do SNC, e de entre as mais relevantes destacam-se a dopamina, a norepinefrina e a epinefrina. A dopamina é um neurotransmissor inibitório derivado da tirosina. Produz sensações de satisfação e prazer. Os neurónios dopaminérgicos podem ser divididos em três subgrupos com diferentes funções. O primeiro grupo regula os movimentos: uma deficiência em dopamina neste sistema provoca a doença de Parkinson, caracterizada por tremuras, inflexibilidade e outras desordens motoras. Em fases avançadas pode verificar-se demência. O segundo grupo, o mesolímbico, funciona na regulação do comportamento emocional. O terceiro grupo, o mesocortical, projecta-se apenas para o córtex pré-frontal. Esta área do córtex está envolvida em várias funções cognitivas, memória, planeamento de comportamento e pensamento abstracto, assim como, em aspectos emocionais, especialmente relacionados com o stress. Distúrbios nos dois últimos sistemas estão associados com a esquizofrenia. A norepinefrina é outra catecolamina neurotransmissora que induz a excitação física, mental e o bom humor. A sua produção é centrada na área do cérebro chamada de *locus coeruleus*, que é um dos muitos candidatos ao chamado centro de “prazer” do cérebro.

A medicina comprovou que a norepinefrina é uma mediadora dos batimentos cardíacos, da pressão sanguínea, da taxa de conversão de glucose em energia, assim como de outros benefícios físicos.

Por último, a epinefrina vulgarmente designada por adrenalina, deriva do aminoácido tirosina e, para além de actuar como neurotransmissor no encéfalo, também é libertada pelas glândulas supra-renais para a circulação sanguínea. Esta catecolamina é produzida em momentos de maior stress preparando o organismo para grandes esforços físicos. Nesses casos, estimula o coração, eleva a tensão arterial, relaxa e/ou contrai certos músculos, entre outros efeitos. É usada clinicamente em casos de paragem cardíaca ou para aumentar a duração de anestésicos locais devido ao seu efeito vasoconstritor.

Esta hormona afecta tanto os receptores beta¹-adrenérgicos (cardíaco) como os beta²-adrenérgicos (pulmonar). Possui propriedades alfa-adrenérgicas que resultam em vasoconstricção. A adrenalina também tem como efeitos terapêuticos a broncodilatação, o controle da frequência cardíaca e da pressão arterial.^{5,6}

1.3. Aminoácidos neurotransmissores

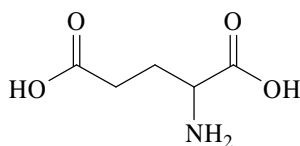
Os aminoácidos mais importantes que actuam como neurotransmissores incluem o ácido glutâmico e o ácido aspártico, aminoácidos de natureza acídica que se ionizam no organismo originando o glutamato e o aspartato, que funcionam como substâncias excitatórias e transportam informação no sentido ascendente para os centros de consciência do cérebro (Figura 3). Destes dois neurotransmissores o glutamato é o principal excitante do SNC, vital para estabelecer os vínculos entre os neurónios que são a base da aprendizagem e da memória a longo prazo.

De entre os aminoácidos de carácter neutro surgem a glicina e o ácido γ -aminobutírico que funcionam como inibidores do SNC, sendo o GABA o neurotransmissor inibidor mais potente do SNC, em contraste com o glutamato. Este aminoácido neurotransmissor funciona como redutor dos sistemas excitatórios na medida em que contraria o efeito do glutamato e do aspartato, impedindo o transporte de iões cálcio para o interior das células nervosas. Quando ligado aos receptores, abre-se um canal por onde entram iões cloreto para as células neuronais, fazendo com que a célula fique hiperpolarizada, dificultando a despolarização e

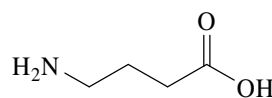
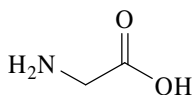
⁵ <http://neuromed88.blogspot.com/2008/09/aminas-biognicas-ou-monoaminas.html>

⁶ http://www.cerebromente.org.br/n12/fundamentos/neurotransmissores/nerves_p.html

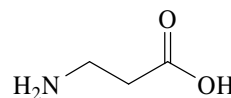
como consequência, dá-se a diminuição da condução neuronal, provocando a inibição do SNC.



Ácido glutâmico

Ácido γ -aminobutírico (GABA)

Glicina



β-Alanina

Figura 3. Alguns aminoácidos neurotransmissores.

A glicina tem um papel semelhante ao do GABA actuando, no entanto, em zonas diferentes. É o principal neurotransmissor inibidor do tronco cerebral, espinal medula e retina. Quando receptores de glicina são activados, os iões cloreto entram nos neurónios através de receptores ionotrópicos, causando um potencial pós-sináptico inibitório. Um défice de glicina provoca um aumento da rigidez muscular e morte por paralisia dos músculos respiratórios.

A β -alanina é o único beta-aminoácido natural, actua como um transmissor fisiológico e como precursor da carnosina, que é um dipéptido de β -alanina-histidina presente nos músculos e tecidos cerebrais.⁷ Por outro lado, a alanina é também um neurotransmissor inibitório e actua como agonista nos receptores glicinérgicos e nos receptores GABA.⁸

1.4. Péptidos neurotransmissores

Os péptidos neurotransmissores ou neuropéptidos são caracterizados por terem uma cadeia peptídica de 3 a 40 aminoácidos. As encefalinas e as endorfinas são neurotransmissores que se inserem neste grupo. Um dos neuropéptidos mais conhecidos é a insulina (Figura 4), que para além de ser a hormona responsável pela captação do açúcar no sangue e da penetração deste nas células, é também um neurotransmissor.

⁷ J. M. Khurana, R. Arora, *Rapid chemoselective deprotection of benzyl esters by nickel boride*. *Synthesis* **2009**, 7, 1127-1130.

⁸ P. Legendre, *The glycinergic inhibitory synapse*. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, 58, 760-793.

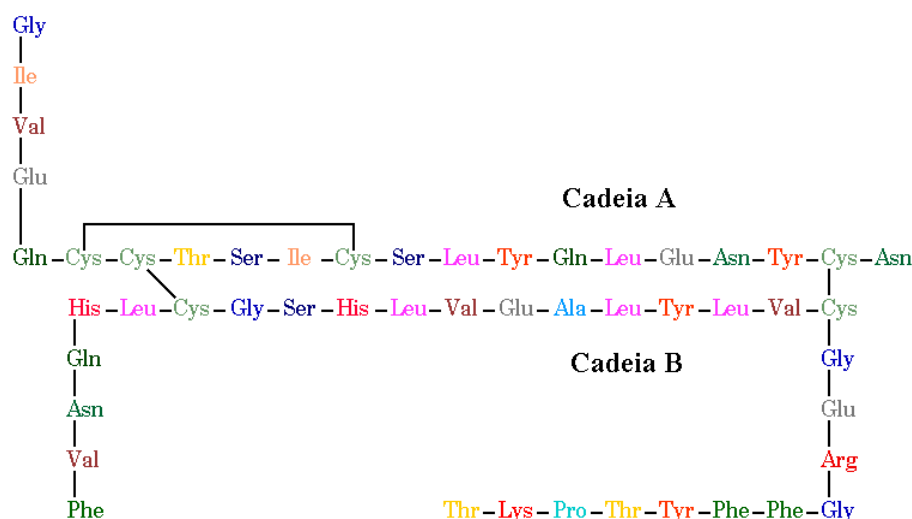


Figura 4. Estrutura primária da insulina.

Atendendo a que os neurotransmissores desempenham funções importantes no organismo torna-se relevante conhecer os processos químicos inerentes, as vias metabólicas das quais fazem parte e a sua forma de actuação.

A marcação destas moléculas com compostos fluorescentes, que podem ser removidos de forma espacial e temporalmente controlada (*caging/uncaging*), revelou ser uma estratégia bastante interessante no estudo de processos biológicos.

Assim, este trabalho pretende contribuir para aumentar o número e a variedade de novos grupos protectores fotocliváveis para moléculas neurotransmissoras, nomeadamente aminoácidos neurotransmissores.

2. Grupos protectores fotocliváveis em aplicações *caging*

2.1. Introdução

Os grupos protectores fotocliváveis foram inicialmente desenvolvidos para serem usados como máscaras temporárias de grupos funcionais em síntese orgânica, que pudessem ser removidos por acção apenas de radiação e de forma ortogonal (possibilidade de remoção selectiva de um grupo na presença de outros numa determinada sequência), numa alternativa aos métodos clássicos de clivagem química.^{9,10} Actualmente, a protecção de moléculas

⁹ V. N. R. Pillai, M. Mutter, *New, easily removable poly(ethylene glycol) supports for the liquid-phase method of peptide synthesis. J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 5364-5370.

biologicamente activas com grupos protectores fotossensíveis é uma estratégia bastante comum em Biologia Celular e Bioquímica.

A aplicação de um grupo protector fotossensível (*caging group/phototrigger*), a uma biomolécula torna-a inactiva, podendo esta ser reactivada por irradiação com luz (Figura 5). A ligação deve ser efectuada de forma covalente entre o *caging group* e o grupo funcional da biomolécula formando assim um conjugado inactivo, que habitualmente se designa por composto *caged*. A libertação/concentração da molécula activa pode ser controlada pela intensidade e duração do pulso de luz incidente. Desta forma torna-se também possível controlar no tempo e no espaço o efeito causado por um determinado composto biologicamente activo.¹¹

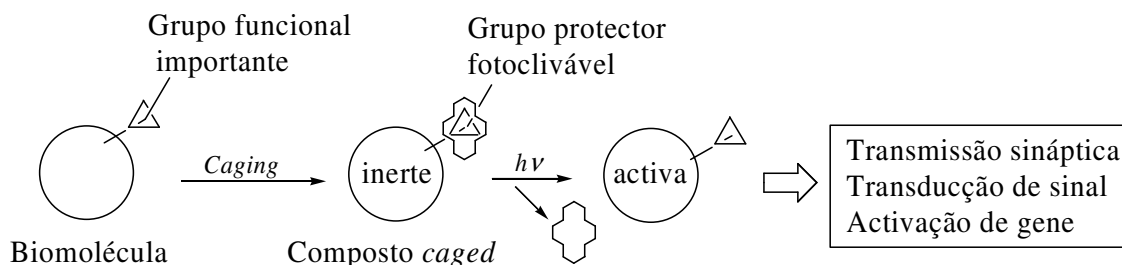


Figura 5. Método de *caging*.

Para que um grupo protector possa ser usado em aplicações de *caging*, deve satisfazer os critérios seguintes:¹²

- i.* a fotólise deve ser rápida, ocorrer com bom rendimento e a comprimentos de onda compatíveis com o sistema biológico;
- ii.* em estudos resolvidos no tempo, a velocidade de libertação da molécula activa deve ser superior ao efeito que está a ser estudado;
- iii.* o cromóforo deve possuir um coeficiente de absorptividade molar (ϵ) elevado a comprimentos de onda superiores a 300 nm, que são menos prejudiciais para o meio celular;
- iv.* não deve interferir com o método utilizado para medir a resposta do sistema;

¹⁰ A. Blanc, C. G. Bochet, *Wavelength-controlled orthogonal photolysis of protecting groups*. *J. Org. Chem.* **2002**, *62*, 5567-5577.

¹¹ T. Furuta, K. Noguchi, *Controlling cellular systems with Bhc-caged compounds*. *Trends Anal. Chem.* **2004**, *23*, 511-519.

¹² A. P. Pelliccioli, J. Wirz, *Photoremovable protecting groups: reaction mechanisms and applications*. *J. Photochem. Photobiol. A.* **2002**, *1*, 441-458.

v. os produtos secundários da fotólise não devem interagir com os processos fisiológicos em estudo, devem ser transparentes no comprimento de onda de irradiação que está a ser usado para evitar absorção competitiva da radiação;

vi. o composto *caged* deve ter boa solubilidade em meio aquoso, capacidade para passar barreiras biológicas tais como, membranas celulares (em certos casos) e estabilidade hidrolítica no escuro.

A utilização de grupos protectores fotocliváveis na supressão temporária da actividade biológica foi referida pela primeira vez em 1977 por Engels e Schlaeger¹³ que reportaram o éster 2-nitrobenzílico do 3',5'-monofosfato de adenosina cíclica (NB-cAMP) como um derivado de cAMP fotoclivável, com capacidade de atravessar membranas biológicas. Kaplan *et al.*¹⁴ reportaram no ano seguinte a clivagem fotoquímica e testes biológicos de dois análogos de ATP, os ésteres 2-nitrobenzilo de ATP e 1-(2-nitrofenil)etilo de ATP (NPE-ATP), designados por ATP *caged* (Figura 6).

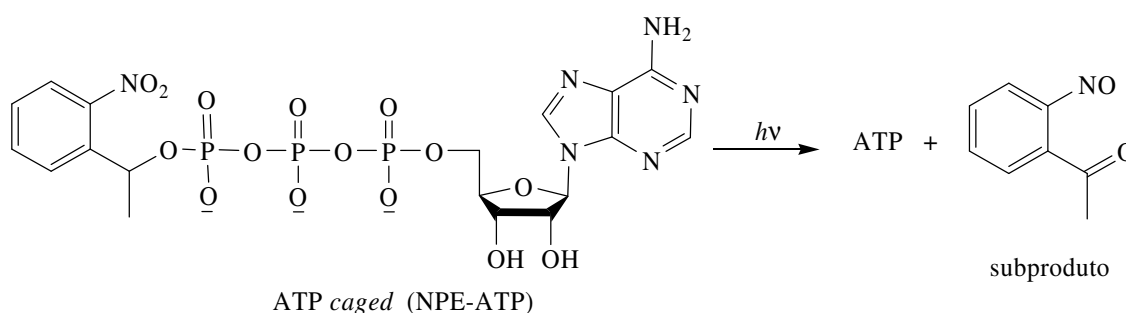


Figura 6. ATP *caged* reportado por Kaplan *et al.*.

Os grupos protectores fotocliváveis são estudados actualmente para a aplicação em síntese de péptidos, polissacáridos e nucleótidos. A sua utilização na obtenção de compostos *caged* confere-lhes um estatuto de destaque em bioaplicações. Com efeito, os *caging groups* podem ser usados na fotolibertação de materiais bioactivos tais como, neurotransmissores,

¹³ J. Engels, E. J. Schlaeger, *Synthesis, structure, and reactivity of adenosine cyclic 3',5'-phosphate benzyl triesters*. *J. Med. Chem.* **1977**, 20, 907-911.

¹⁴ J. H. Kaplan, B. Forbush, J. F. Hoffman, *Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analogue: utilization by the Na:K pump of human red blood cell ghosts*. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 1929-1935.

ATP ou iões cálcio, em intervalos de tempo muito reduzidos permitindo seguir acontecimentos fisiológicos em tempo real (Figura 7).^{15,16,17}

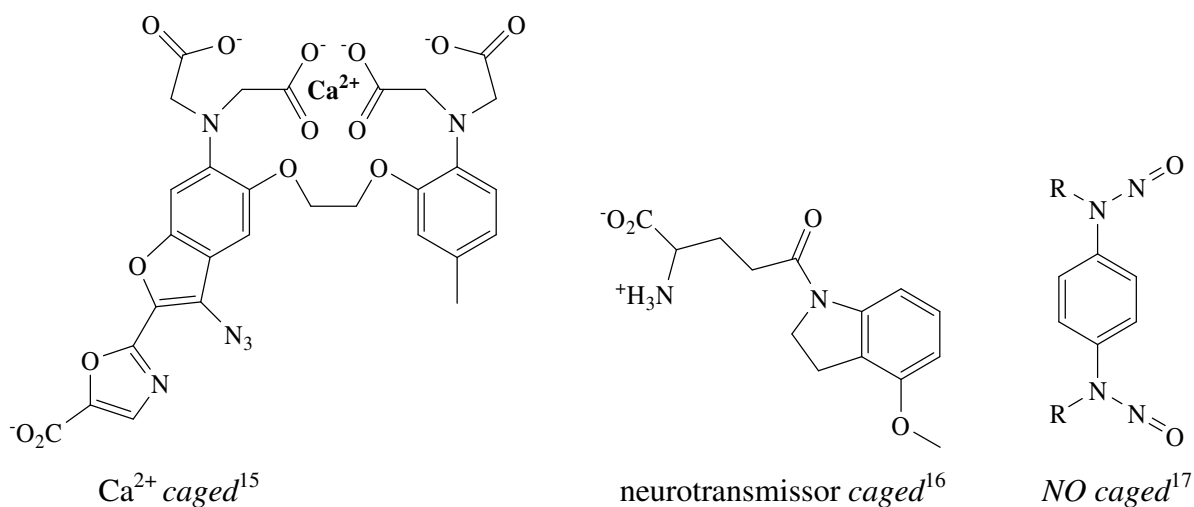


Figura 7. Exemplos de compostos caged.

Nos últimos anos a investigação tem sido direccionada para a utilização de luz infravermelha e excitação multifotónica, que causa menos danos, é mais penetrante (no caso de estudos *in vivo*) e é mais selectiva espacialmente, dado que limita a libertação da molécula activa ao foco do raio laser (cerca de $1 \mu\text{m}^3$). A introdução da microscopia laser de varrimento de dois fotões tem permitido obter imagens em regiões mais interiores dos tecidos com resolução espacial ao nível submicrométrico.

É de referir que os cromóforos com sensibilidade para excitação multifotónica tendem também a ter elevada sensibilidade à excitação por um único fotão (*single-photon excitation*), o que é uma vantagem adicional, pois os tempos de irradiação serão mais curtos e poderão utilizar-se fontes de radiação de baixo custo.¹⁸

¹⁵ S. R. Adams, V. Lev-Ram, R. Y. Tsien, *A new caged Ca^{2+} , azid-1, is far more sensitive than nitrobenzyl-based chelators.* *Chem. Biol.* **1997**, 4, 867-878.

¹⁶ M. L. N. Canepari, G. Papageorgiou, J. E. T. Corrie, D. Ogden, *Photochemical and pharmacological evaluation of 7-nitroindolinyl- and 4-methoxy-7-nitroindolinyl-amino acids as novel, fast caged neurotransmitters.* *J. Neurosci. Methods* **2001**, 112, 29-42.

¹⁷ S. Namiki, T. Arai, K. Fugimori, *High-performance caged nitric oxide: a new molecular design, synthesis, and photochemical reaction.* *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3840-3841.

¹⁸ B. Lendvai, S. I. Szabo, A. I. Barth, T. Zelles, E. S. Vizi, *Application of two-photon microscopy to the study of cellular pharmacology of central neurons.* *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, 58, 841-849.

2.2. Caging de biomoléculas

Os grupos fotocliváveis que se destacam em estratégias de *caging* de moléculas bioactivas são os derivados do 2-nitrobenzilo, *p*-hidroxifenacilo e cumarin-4-ilmetilo (designação trivial para 4-(metil)-2-oxo-2*H*-benzopirano) (Figura 8).

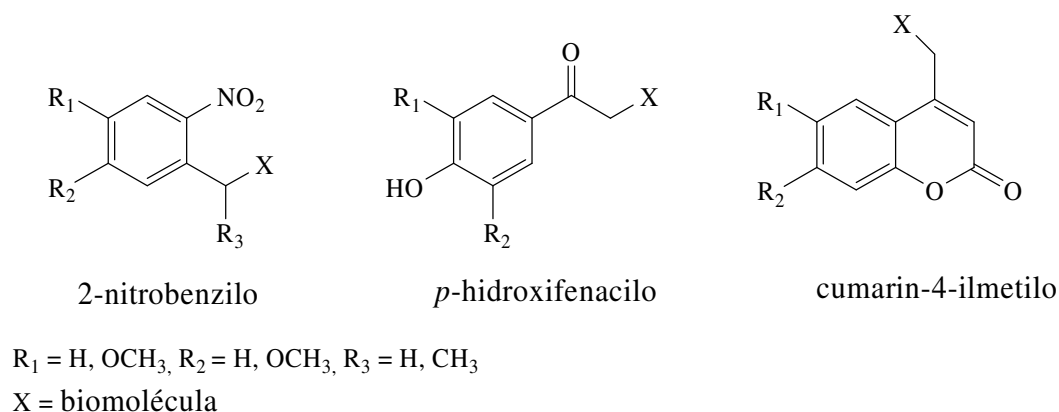
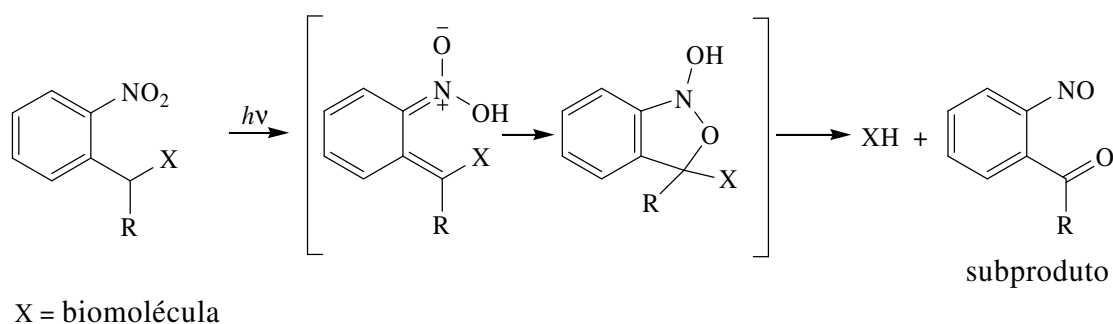


Figura 8. Estrutura dos grupos protectores mais usados em *caging*.

O 2-nitrobenzilo ($\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{H}$), proposto Patchornik como grupo protector fotoclivável mostra-se compatível com uma gama elevada de grupos funcionais.¹⁹ No entanto, possui algumas desvantagens enquanto *caging group*, nomeadamente fotossensibilidade baixa quando exposto a comprimentos de onda superiores a 350 nm, sendo a velocidade de libertação do composto activo lenta, formação de um fotoproducto secundário do tipo nitrosaldeído (Esquema 1) que absorve fortemente no UV e pode actuar como filtro interno da radiação, além de ser uma espécie reactiva na presença de aminas.



Esquema 1

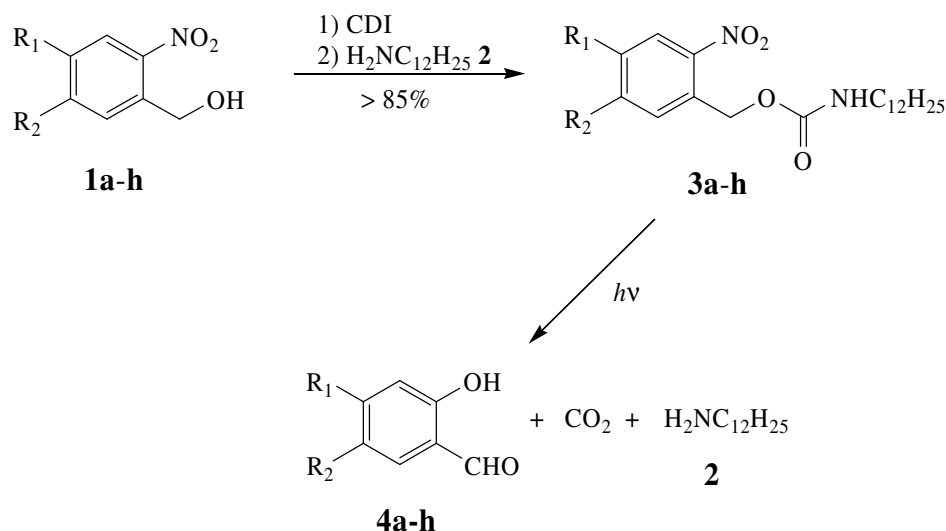
¹⁹ A. Patchornik, B. Amit, R. B. Woodward, *Photosensitive protecting groups*. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6333-6335.

O grupo 2-nitrobenzilo e seus derivados clivam de acordo com um mecanismo de fotoisomerização, ocorrendo por irradiação a formação de um intermediário do tipo acetal que se transforma posteriormente em aldeído ou cetona, libertando o fragmento desejado, que no caso seria uma molécula biologicamente activa (XH) (Esquema 1).

O derivado do 2-nitrobenzilo em que $R_1 = R_2 = H$ e $R_3 = CH_3$ (grupo nitrofeniletilo, Figura 8) apresenta uma fotólise mais rápida e um produto de clivagem do tipo nitrosocetona menos reactivo. No entanto, introduz um novo centro quiral na molécula o que pode ser altamente indesejado em aplicações biológicas.

O comprimento de onda de absorção pode ser alterado através dos substituintes do anel aromático e no grupo protector 2-nitroveratrilo ($R_1 = R_2 = OCH_3$ e $R_3 = H$), os dois grupos metoxilo desviam a absorção para um comprimento de onda superior a 320 nm.

Bochet *et al.*²⁰ estudaram a reactividade à fotólise, em diferentes comprimentos de onda, do grupo 2-nitroveratrilo **1a** e de análogos **1b-h** com padrões de substituição diferentes, acoplados à 1-dodecilamina **2** e verificaram que o tipo de substituinte e a sua posição podem alterar significativamente o tempo de fotoclivagem (Esquema 2, Tabela 1).



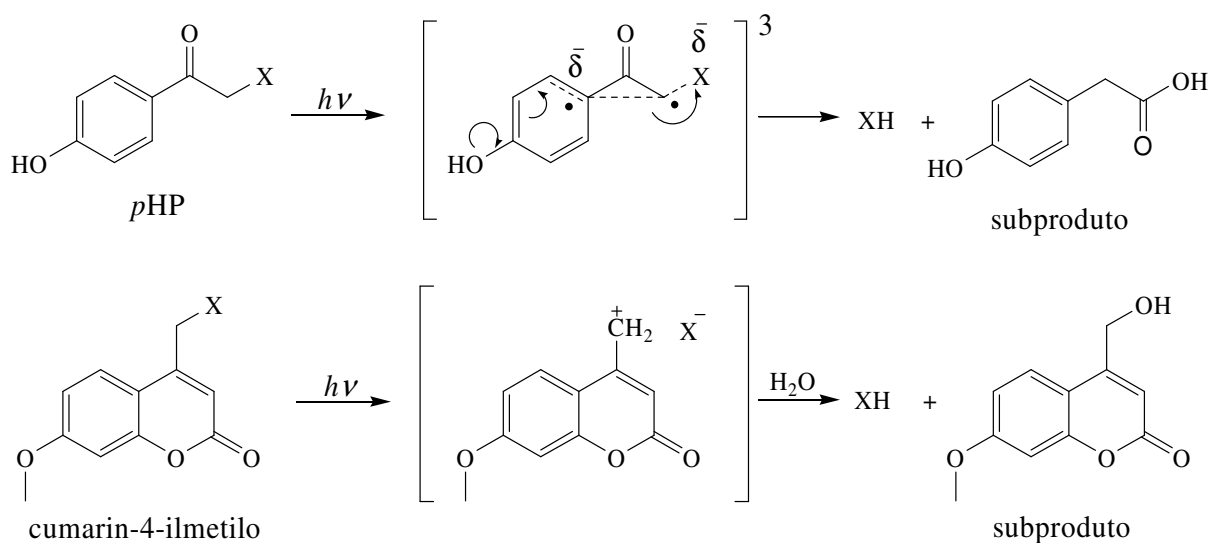
Esquema 2

²⁰ C. G. Bochet, *Wavelength-selective cleavage of photolabile protecting groups*. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6341-6346.

Tabela 1. Velocidade de fotólise dos conjugados **3a-h** em acetonitrilo.

Carbamato	R ₁	R ₂	t _{1/2} (254)(min)	t _{1/2} (420)(min)
3a	OMe	OMe	98	330
3b	NO ₂	H	55	462
3c	Br	H	29	578
3d	Cl	H	27	481
3e	H	Cl	48	550
3f	H	H	47	420
3g	H	1-piperidil	304	estável
3h	Ph	H	14	385

Com o objectivo de minimizar as características menos positivas do grupo 2-nitrobenzilo e seus derivados, têm sido desenvolvidos outros grupos protectores fotocliváveis dos quais de destacam o *p*-hidroxifenacilo (*p*HP)²¹ e a cumarin-4-ilmetilo,²⁰ já referidos. Estes grupos apresentam propriedades fotofísicas melhoradas, nomeadamente maior velocidade de clivagem, menor formação de subprodutos interferentes, comprimento de onda de clivagem superior a 350 nm (Esquema 3).

**Esquema 3**

²¹ R. S. Givens, in *Dynamic studies in biology: phototriggers, photoswitches and caged biomolecules*. M. Goeldner, R. S. Givens (Eds.), Wiley-VCH, Weinheim, Germany **2004**, 55-64.

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

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

Por outro lado, a ligação do grupo *p*HP ao substrato não induz um centro quiral, eliminando os problemas relacionados com a obtenção de misturas diastereoméricas.

O uso do grupo *p*HP numa grande variedade de moléculas biologicamente activas incluindo o ATP,²² fosfato,²³ o ácido glutâmico,²⁴ o dipéptido Ala-Ala^{24,25} e o péptido da bradiquinina²⁵ foi proposto por Givens e seus colaboradores (Tabela 2).

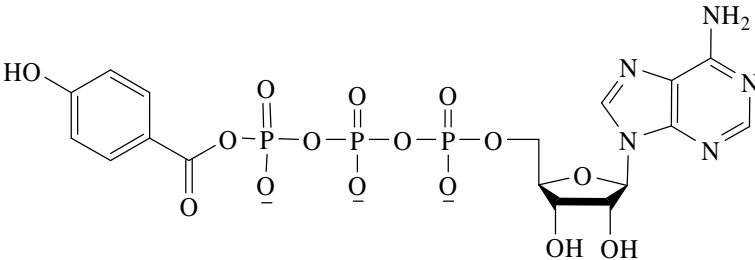
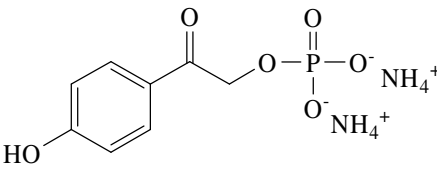
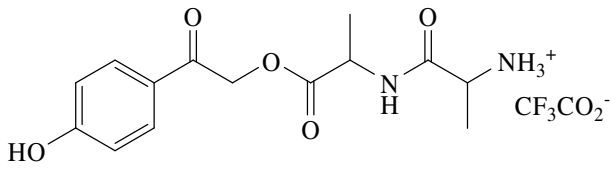
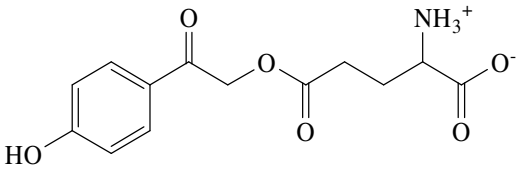
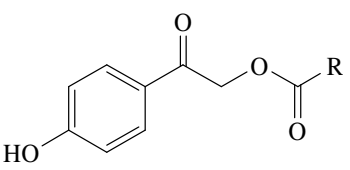
²² R. S. Givens, C.-H. Park, *p*-Hydroxyphenacyl ATP: a new phototrigger. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6259-6262.

²³ C.-H. Park, R. S. Givens, *New photoactivated protecting groups. 6. p*-Hydroxyphenacyl: a phototrigger for chemical and biochemical probes. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2453-2463.

²⁴ R. S. Givens, A. Jung, C.-H. Park, J. Weber, W. Bartlett, *New photoactivated protecting groups. 7. p*-Hydroxyphenacyl: a phototrigger for excitatory amino acids and peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8369-8370.

²⁵ R. S. Givens, J. F. W. Weber, P. G. Conrad, G. Orosz, S. L. Donahue, S. A. Thayer, *New phototriggers 9: p*-hydroxyphenacyl as a C-terminal photoremovable protecting group for oligopeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2687-2697.

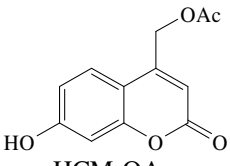
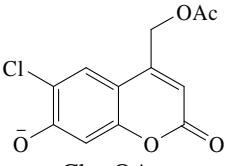
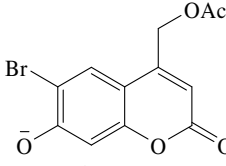
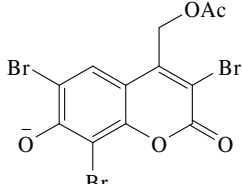
Tabela 2. Compostos *caged* obtidos a partir do grupo *pHP*.

Compostos <i>caged</i>	Substrato
	ATP
	Fosfato
	Ala-Ala
	Glutamato
 <p>R = Arg-Phe-Pro-Ser-Phe-Gly-Pro-Pro-Arg-NH₂</p>	Bradiquinina

Considerando a importância de derivados de cumarina como grupos protectores fotocliváveis, a título exemplificativo a Tabela 3 compara os dados de absorção no UV/visível e os rendimentos quânticos de fotólise de quatro acetatos de cumarina *caged*.²⁶

²⁶ T. Furuta, S. S.-H. Wang, J. Dantzker, *Brominated 7-hydroxycoumarin-4-ylmethyls: photolabile protecting groups with biologically useful cross-sections for two-photon photolysis. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, 96, 1193-2000.

Tabela 3. Propriedades espectroscópicas e fotoquímicas de acetatos de cumarina *caged*.

				
λ_{\max}^a (nm)	325	370	370	397
ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	11600	16000	15000	15900
Φ_{350}^b	0,025	0,010	0,037	0,065

^a Absorção máxima

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

Dos derivados halogenados de cumarina destaca-se o grupo Bhc que foi posteriormente usado na preparação de compostos *caged* de carboxilatos,²⁶ aminas,^{26,27} fosfatos,²⁸ álcoois,^{29,30,31} fenóis,³¹ e carbonilos.³² Este derivado cumarínico foi usado em *caging* de neurotransmissores, do DNA e RNA (Figura 9).¹¹

²⁷ H. J. Montgomery, B. Perdicakis, D. Fishlock, G. A. Lajoie, E. Jervis, J. G. Guillemette, *Photo-control of nitric oxide synthase activity using a caged isoform specific inhibitor*. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1919-1927.

²⁸ H. Ando, T. Furuta, R. Y. Tsien, H. Okamoto, *Photo-mediated gene activation using caged RNA/DNA in zebrafish embryos*. *Nat. Genet.* **2001**, *28*, 317-325.

²⁹ W. Lin, D. S. Lawrence, *A strategy for the construction of caged diols using a photolabile protecting group*. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2723-2726.

³⁰ V. G. Robu, E. S. Pfeiffer, S. L. Robia, R. C. Balijepalli, Y. Pi, T. J. Kamp, J. W. Walker, *Localization of functional endothelin receptor signaling complexes in cardiac transverse tubules*. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 48154-48161.

³¹ A. Z. Suzuki, T. Watanabe, M. Kawamoto, K. Nishiyama, H. Yamashita, M. Ishii, M. Iwamura, T. Furuta, *Coumarin-4-ylmethoxycarbonyls as phototriggers for alcohols and phenols*. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4867-4870.

³² M. Lu, O. D. Fedoryak, B. R. Moister, T. M. Dore, *Bhc-diol as a photolabile protecting group for aldehydes and ketones*. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2119-2122.

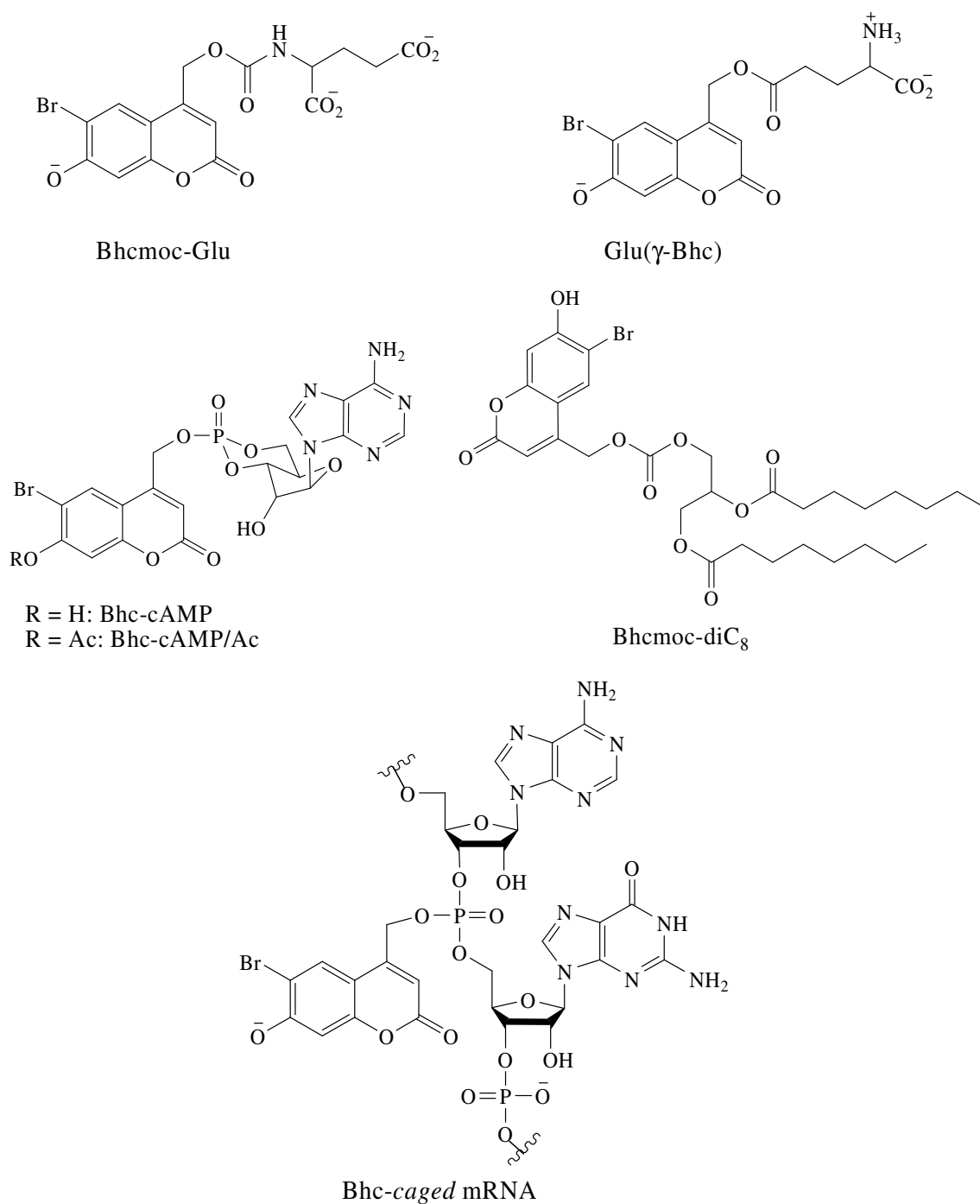
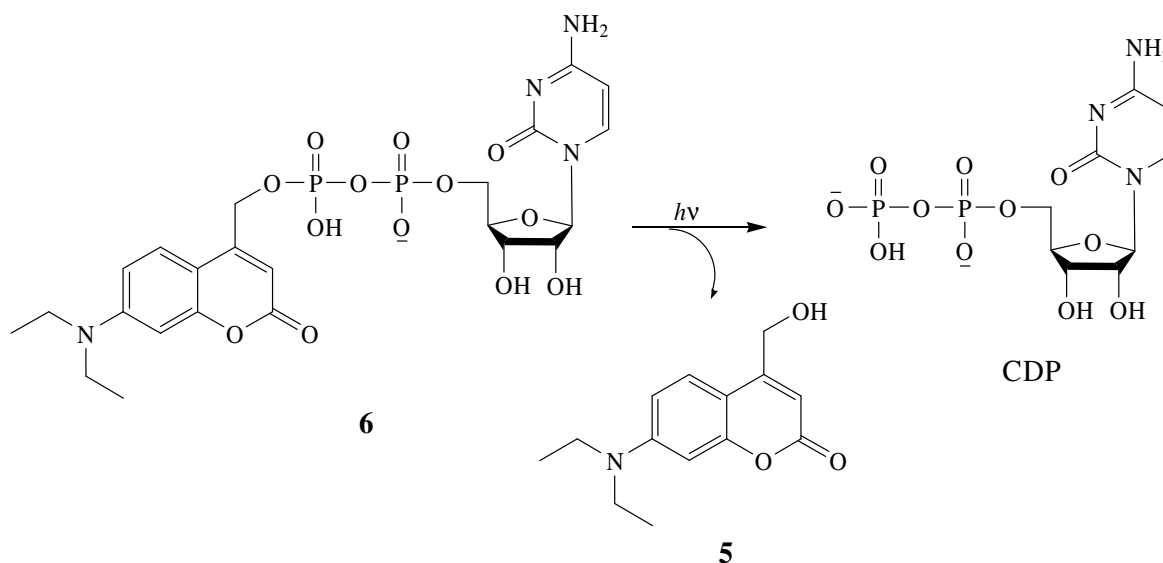


Figura 9. Exemplos de biomoléculas *caged* com o grupo Bhc.

Derivados amina de cumarinas têm sido também reportados com sucesso na inativação temporária de biomoléculas. A 7-dietilam in-4-hidroxi-4-metilcumarina **5** foi usada

por Schönleber *et al.*³³ no *caging* de citidina 5'-difosfato (CDP) permitindo a libertação de CDP por irradiação entre 365 e 436 nm (Esquema 4).



Esquema 4

2.3. *Caging* de aminoácidos neurotransmissores

Nos últimos anos, a investigação referente aos grupos protectores fotocliváveis e/ou *phototriggers* tem evoluído no sentido da aplicação de compostos com absorção a comprimentos de onda na região do visível, incluindo moléculas fluorescentes e, deste modo, os estudos envolvendo a síntese e aplicação de novos derivados de cumarina tem-se evidenciado.

Os aminoácidos neurotransmissores são uma classe de compostos com grande importância uma vez que são moléculas responsáveis por desencadear diversas respostas excitatórias e/ou inibitórias ao nível do SNC, tal como já referido.

Atendendo à sua importância e uma vez que foram usados nesta dissertação como modelos de moléculas biológicas bifuncionalizadas, são mencionados em seguida alguns trabalhos, para além dos anteriormente referidos, no âmbito do *caging* de aminoácidos neurotransmissores com grupos fotossensíveis que se têm mostrados particularmente efectivos, incluindo derivados de cumarina.

³³ R. O. Schönleber, J. Bendig, V. Hagen, B. Giese, *Rapid photolytic release of cytidine 50-diphosphate from a coumarin derivative: a new tool for the investigation of ribonucleotide reductases*. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 97-101.

2.3.1. Caging de aminoácidos neurotransmissores com grupos diferentes de cumarina

A liberação rápida e localizada dos neurotransmissores inibidores GABA e glicina a partir de precursores *caged* é útil nos estudos cinéticos de ativação *in situ* dos receptores de GABA e glicina, na distribuição dos receptores em compartimentos neurais e para “silenciar” os neurónios pela liberação localizada com uma resolução temporal de milissegundos de pequenas quantidades de inibitórios em estudos de actividade.

A Figura 10 mostra as estruturas de três derivados *caged* de GABA, nomeadamente o éster α -carboxi-2-nitrobenzilo **7**,³⁴ o éster pirenimetílico do GABA **8**³⁵ (o grupo clorometilpireno foi também usado no *caging* da glicina, alanina, β -alanina e ácido glutâmico) e um complexo de coordenação de ruténio do GABA **9**.³⁶ Apesar da importância na foto-libertação do neurotransmissor, estes compostos continuam a apresentar algumas limitações para aplicações práticas.

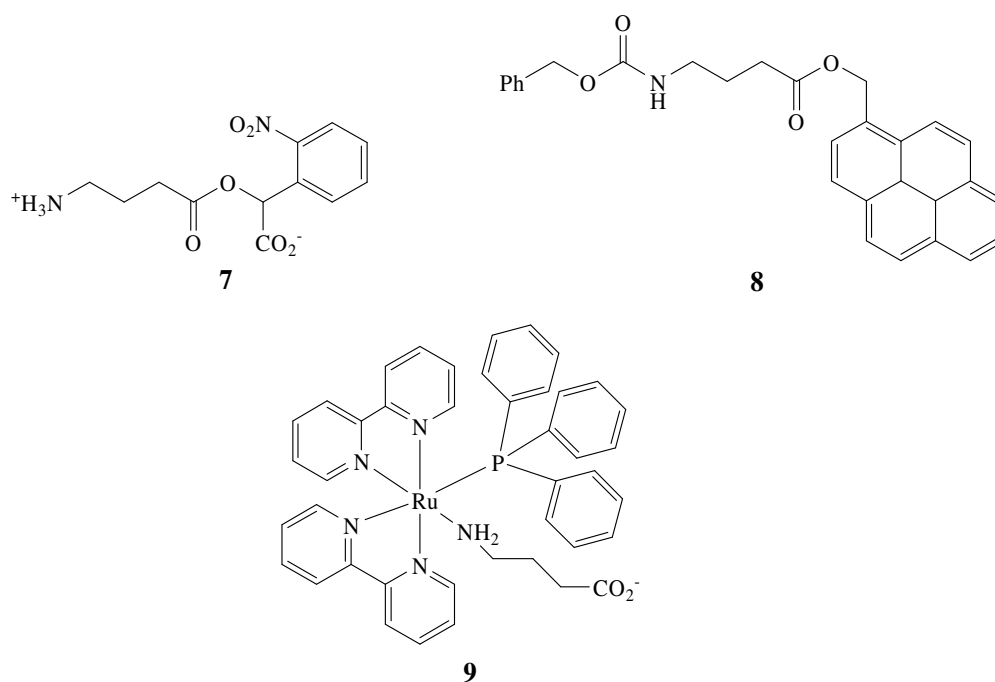


Figura 10. Estruturas de GABA *caged*.

³⁴ R. Wieboldt, D. Ramesh, B. K. Carpenter, G. P. Hess, *Synthesis and photochemistry of photolabile derivatives of γ -aminobutyric acid for chemical kinetic investigations of the γ -aminobutyric acid receptor in the millisecond time region*. *Biochemistry* **1994**, *33*, 1526-1533.

³⁵ M. J. G. Fernandes, M. S. T. Gonçalves, S. P. G. Costa, *Photorelease of amino acid neurotransmitters from pirenymethyl ester conjugates*. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 10133-10139.

³⁶ E. M. R. Verde, L. Zayat, R. Etchenique, R. Yuste, *Photorelease of GABA with visible light using an inorganic caging group*. *Front. Neural. Circuits* **2008**, *2*, 1-8.

O desenvolvimento de neurotransmissores inibitórios *caged* que não apresentem actividade nos receptores antes da fotólise é difícil. Derivados *caged* de aminoácidos neuroactivos com a 7-nitroindolina possuem as propriedades fotoquímicas e farmacológicas apropriadas para serem usados na caracterização de neurotransmissores receptores.^{16,37,38} Os derivados *caged* do glutamato com 5-metoxycarbonilmetil-7-nitroindolina (NI) e 4-metoxi-7-nitroindolina (MNI) são inertes em relação aos receptores e transportadores de glutamato, possuem elevada eficiência na fotólise por irradiação a cerca de 400 nm, são estáveis à hidrólise e solúveis em água (Figura 11).

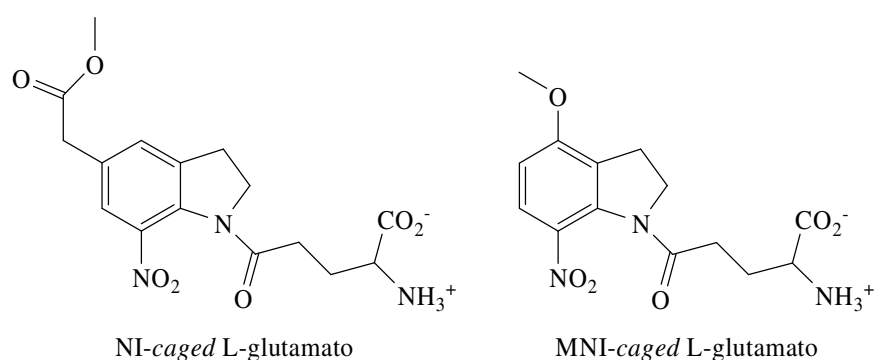


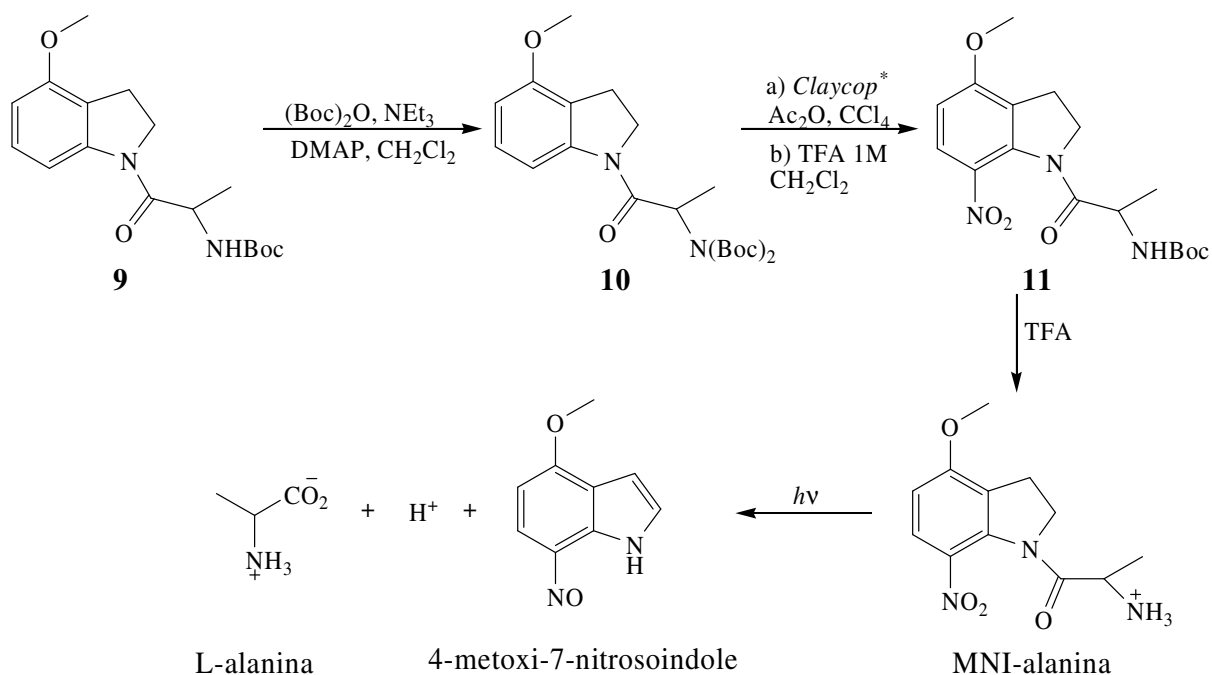
Figura 11. Derivados de glutamato *caged*.

Zhang *et al.*³⁹ descreveram a síntese e caracterização de um novo derivado *caged* de alanina usando a 4-metoxi-7-nitroindolina (MNI) (Esquema 5).

³⁷ G. Papageorgiou, J. E. T. Corrie, *Synthetic and photochemical studies of N-arenesulfonyl amino acids*. *Tetrahedron* **1999**, 55, 237-254.

³⁸ J. Morrison, P. Wan, J. E. T. Corrie, G. Papageorgiou, *Mechanisms of photorelease of carboxylic acids from 1-acyl-7-nitroindolines in solutions of varying water content*. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, 1, 960-969.

³⁹ Z. Zhang, G. Papageorgiou, J. E. T. Corrie, C. Grewer, *Pre-steady-state currents in neutral amino acid transporters induced by photolysis of a new caged alanine derivative*. *Biochemistry* **2007**, 46, 3872-3880.



* $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ em gesso

Esquema 5

O conjugado MNI-alanina foi testado com três transportadores de aminoácidos neutros (ASCT2, SNAT1 e SNAT2) e mostrou ser biologicamente inativo a esses sistemas de transporte. Por outro lado, aquando da fotólise este liberta a alanina na forma livre, a qual activa as correntes específicas nas células que expressam os transportadores já referidos.

Pelo contrário, as propriedades farmacológicas dos derivados GABA *caged* com NI (NI-*caged*-GABA) e dos análogos de glicina mostram evidências de ligação aos respectivos receptores, inibindo a acção do GABA e da glicina, tornando-se por isso inadequados para estudos de cinética *in situ* dos receptores (Figura 12).¹⁶

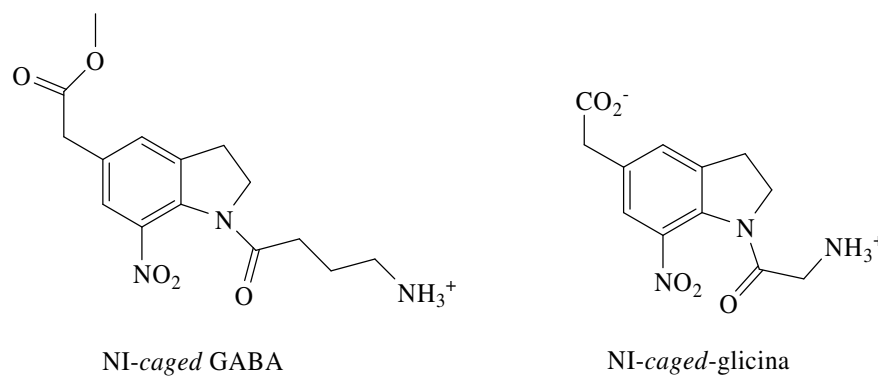
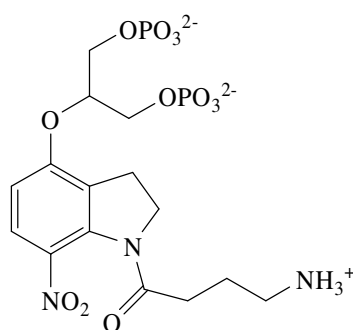


Figura 12. Estruturas de GABA e glicina *caged* com NI.

No sentido de solucionar este problema, Trigo *et al.*⁴⁰ reportaram recentemente a síntese de um novo derivado *caged* de GABA com uma nitroindolina (DPNI-GABA). A estrutura do grupo *caging* permitiu minimizar algumas das interferências observadas com outros derivados de nitroindolina antes da foto-libertação do GABA, mantendo as vantagens associadas a heterociclos deste tipo (Figura 13).

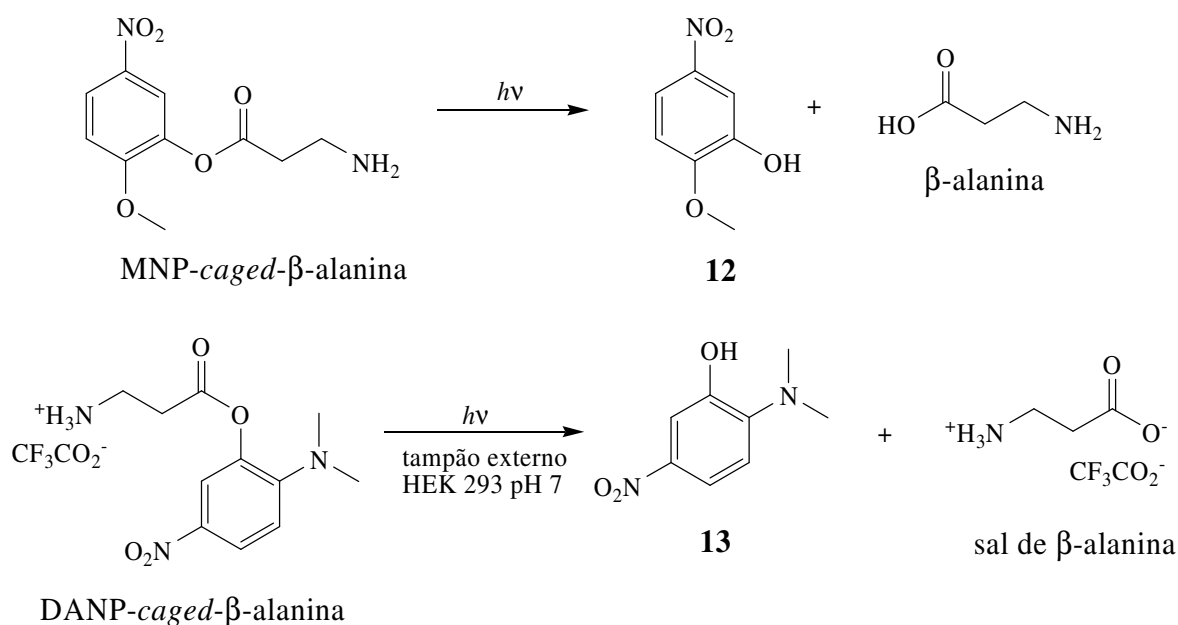
DPNI-*caged*-GABA**Figura 13.** Estrutura do GABA *caged*.

Na obtenção de derivados *caged* da β -alanina, neurotransmissor que activa a inibição do receptor glicina no SNC, destaca-se o 2-metoxi-5-nitrofenil (MNP)⁴¹ e, mais recentemente, o análogo 2-(dimetilamino)-5-nitrofenil (DANP)⁴² (Esquema 6). Em ambos os casos, nem os bioconjugados antes da fotoclivagem, nem os produtos secundários da fotólise inibem ou activam os receptores de glicina no SNC.

⁴⁰ F. F. Trigo, G. Papageorgiou, J. E. T. Corrie, D. Ogden, *Laser photolysis of DPNI-GABA, a tool for investigating the properties and distribution of GABA receptors and for silencing neurons in situ. J. Neurosci. Methods* **2009**, *181*, 159-169.

⁴¹ L. Niu, R. Wieboldt, D. Ramesh, B. K. Carpenter, G. P. Hess, *Synthesis and characterization of a caged receptor ligand suitable for chemical kinetic investigations of the glycine receptor in the 3 μ s time domain. Biochemistry*, **1996**, *35*, 8136-8142.

⁴² A. Banerjee, C. Grewer, L. Ramakrishnan, J. Jäger, A. Gameiro, H. A. Breiting, K. R. Gee, B. K. Carpenter, G. P. Hess, *Toward the development of new photolabile protecting groups that can rapidly release bioactive compounds upon photolysis with visible light. J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8361-8367.



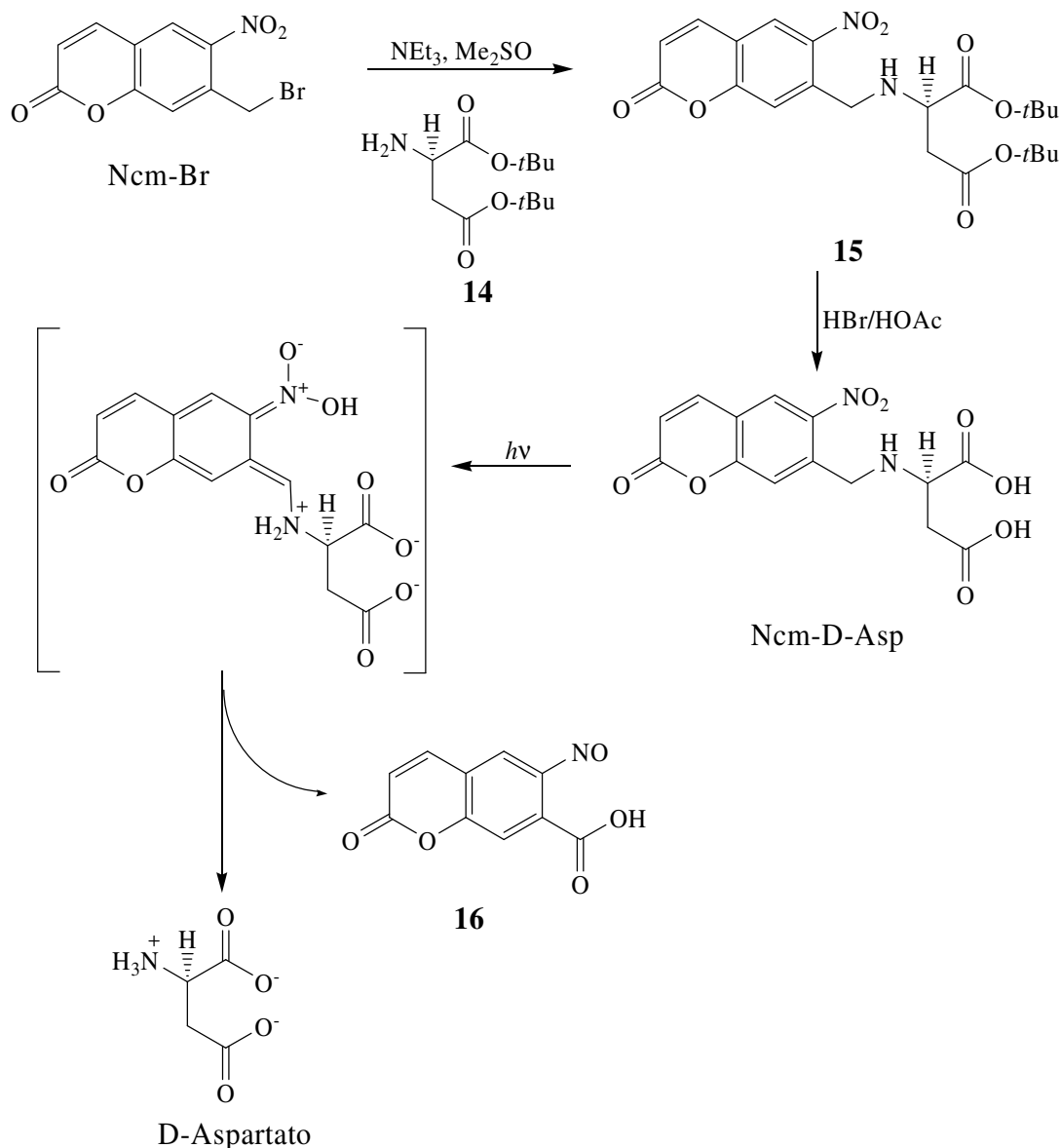
Esquema 6

2.3.2. Caging de aminoácidos neurotransmissores com cumarinas

Com o objectivo de monitorizar o comportamento dos transportadores de glutamato e dos receptores do *N*-metil-D-aspartato (NMDA) em células de tecido cerebral, Huang *et al.*⁴³ reportaram a síntese de um novo derivado *caged* do ácido D-aspártico, o ácido *N*-[(6-nitrocumarin-7-il)]metil-D-aspártico (Ncm-D-Asp) (Esquema 7).

Os resultados obtidos na fotólise do Ncm-D-Asp mostraram que nem o composto *caged*, nem os fotoprodutos resultantes do grupo protector activam ou inibem a actividade dos transportadores e receptores em estudo, são por isso biologicamente inertes. A actividade biológica resulta apenas da libertação do D-aspartato na superfície das células. Desta forma, o novo bioconjugado pode ser usado para estudar os receptores de NMDA nas sinapses excitatórias e a interacção entre transportadores e receptores nos tecidos cerebrais.

⁴³ Y. H. Huang, S. Muralidharan, S. R. Sinha, J. P. Y. Kao, D. E. Bergles, *Ncm-D-aspartate: a novel caged D-aspartate suitable for activation of glutamate transporters and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in brain tissue. Neuropharmacology* **2005**, 49, 831-842.



Esquema 7

A 7-*N,N*-dietilamino-4-hidroxi metilcumarina (DECM) **5**, já referida em aplicações *caging* em nucleótidos, tais como ADP e ATP^{33,44} foi também usada por Shembekar *et al.* no *caging* dos aminoácidos neurotransmissores ácido glutâmico⁴⁵ e glicina⁴⁶ (Esquema 8).

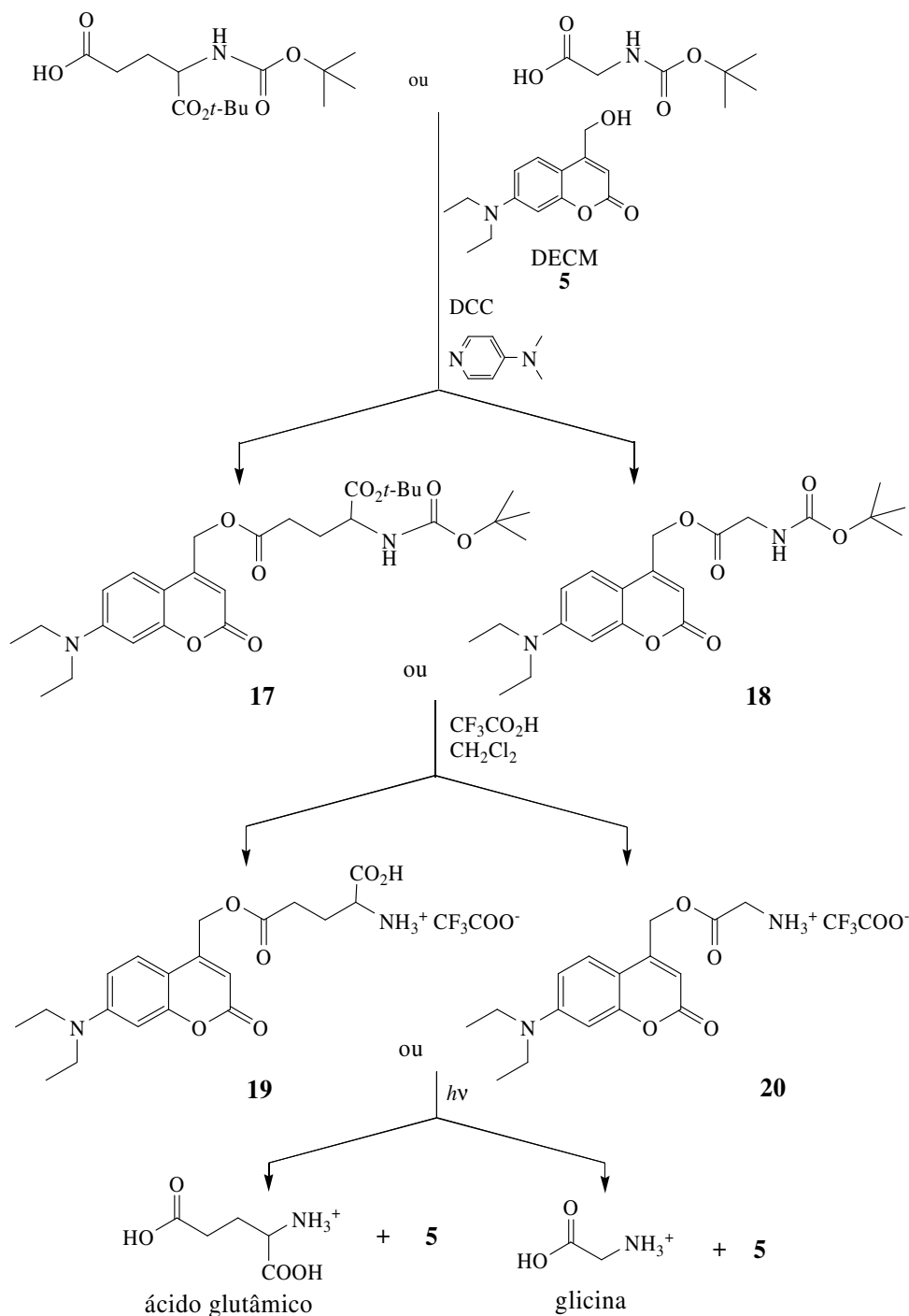
⁴⁴ V. Hagen, S. Frings, B. Wiesner, S. Helm, U. B. Kaupp, J. Bendig, [7-(Dialkylamino)coumarin-4-yl]methyl-caged compounds as ultrafast and effective long-wavelength phototriggers of 8-bromo-substituted cyclic nucleotides. *Chem. Bio. Chem.* **2003**, 4, 434-442.

⁴⁵ V. R. Shembekar, Y. Chen, B. K. Carpenter, G. P. Hess, A protecting group for carboxylic acids that can be photolyzed by visible light. *Biochemistry* **2005**, 44, 7107-7114.

⁴⁶ V. R. Shembekar, Y. Chen, B. K. Carpenter, G. P. Hess, Coumarin-caged glycine that can be photolyzed within 3 μ s by visible light. *Biochemistry* **2007**, 46, 5479-5484.

Os bioconjugados obtidos mostraram ser suficientemente solúveis em água ou em soluções tampão e estáveis no escuro. Por irradiação no visível (≥ 400 nm), o ácido glutâmico e a glicina foram libertados rapidamente do precursor *caged* e foi verificado que em ambos os casos, os aminoácidos *caged* e os produtos secundários da fotólise eram biologicamente inertes.

Estes resultados mostram que a DECM é particularmente eficiente no *caging* dos neurotransmissores estudados.



Esquema 8

O precursor *caged* do GABA com a DECM **21**, foi também sintetizado e mostrou libertar o neurotransmissor por fotólise (Figura 14). No entanto, o bioconjugado inibe vários receptores GABA_A, não sendo por isso adequado para determinado tipo de estudos envolvendo o neurotransmissor em causa.

Com o objectivo de ultrapassar a actividade biológica indesejada do composto **21**, Fan *et al.*⁴⁷ sintetizaram recentemente um novo precursor fotoclivável do ácido γ -aminobutírico **22** (Figura 14). Este derivado *caged* do GABA apresenta as propriedades necessárias para ser um precursor eficiente do neurotransmissor (clivagem a 400 nm com bom rendimento quântico), com a particularidade de quer o composto **22**, quer os subprodutos da fotólise serem inertes ao receptor de GABA testado (HEK 293T).

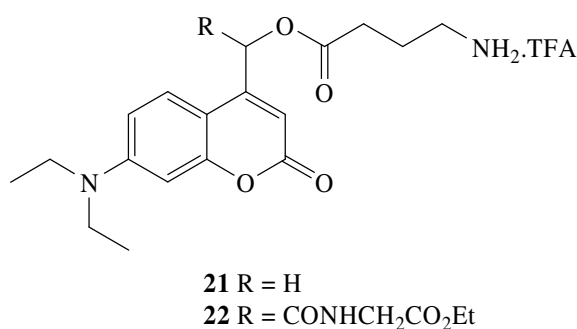


Figura 14. Estrutura de derivados *caged* do GABA.

No âmbito da investigação do grupo de trabalho onde foi elaborada esta dissertação, têm sido também sintetizados novos derivados de cumarina e benzocumarina e avaliados como grupos protectores fotocliváveis e/ou *phototriggers* das funções ácido carboxílico, amino e hidroxilo de aminoácidos, incluindo aminoácidos neurotransmissores, como modelos de biomoléculas.^{48,49,50,51}

⁴⁷ L. Fan, R. W. Lewis, G. P. Hess, B. Ganem, *A new synthesis of caged GABA compounds for studying GABA_A receptors*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3932-3933.

⁴⁸ A. S. C. Fonseca, M. S. T. Gonçalves, S. P. G. Costa, *Photocleavage studies of fluorescent amino acid conjugates bearing different types of linkages*. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1353-1359.

⁴⁹ A. M. Piloto, D. Rovira, S. P. G. Costa, M. S. T. Gonçalves, *Oxobenzo[f]benzopyrans as new fluorescent photolabile protecting groups for the carboxylic function*. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11955-11962.

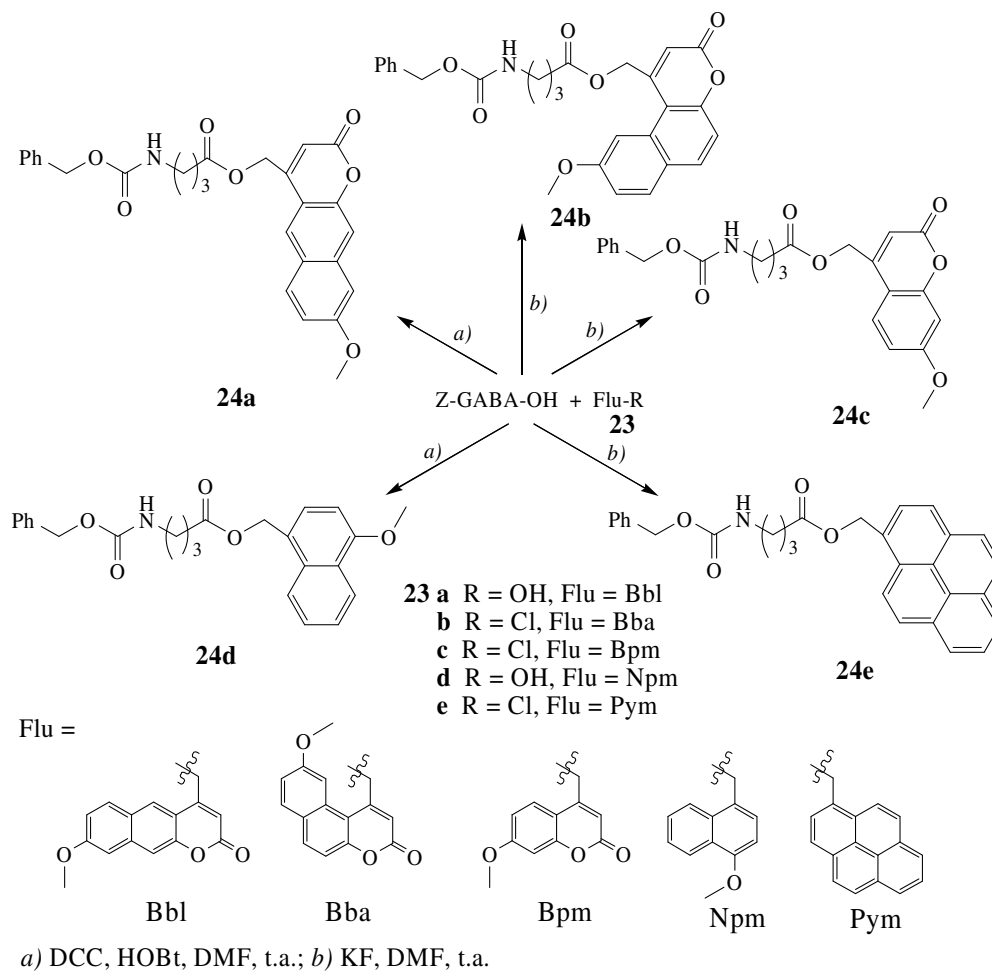
⁵⁰ M. J. G. Fernandes, M. S. T. Gonçalves, S. P. G. Costa, *Comparative study of polyaromatic and polyheteroaromatic fluorescent photocleavable protecting groups*. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 3032-3038.

⁵¹ M. J. G. Fernandes, M. S. T. Gonçalves, S. P. G. Costa, *Neurotransmitter amino acid oxobenzo[f]benzopyran conjugates: synthesis and photorelease studies*. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 11175-11179.

Os compostos *caged* obtidos resultam de ligações covalentes de diferentes tipos, designadamente éster, uretano, anidrido e carbonato, entre o aminoácido e a benzo(cumarina) (*caging group*).

Com o objectivo de comparar a foto-sensibilidade de diferentes compostos hetero(aromáticos) incluindo derivados de benzocumarina (**23a,b**), cumarina (**23c**), naftaleno (**23d**) e pireno (**23e**), Fernandes *et al.*⁵⁰ sintetizaram diferentes bioconjugados do aminoácido neurotransmissor GABA (**24a-e**) e efectuaram estudos de fotólise numa solução de metanol/tampão HEPES (80:20) a diferentes comprimentos de onda (254, 300, 350 e 419 nm) (Esquema 9).⁵⁰

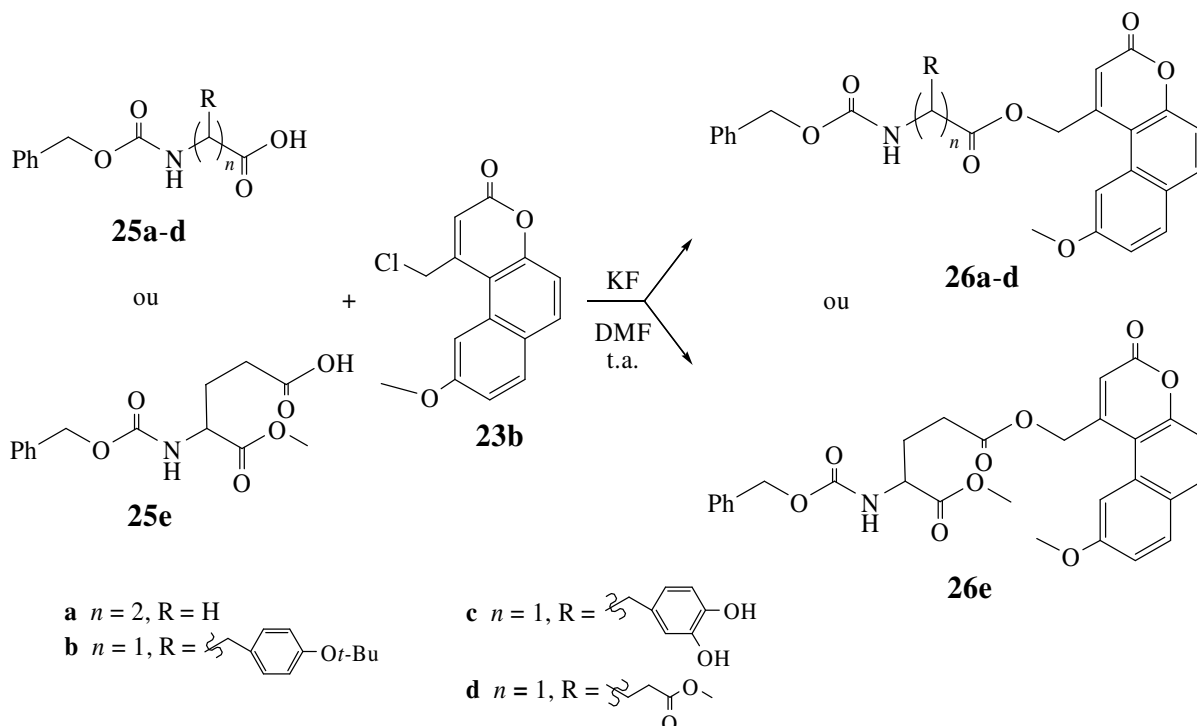
Os resultados obtidos mostraram que o tempo de irradiação necessário à libertação do neurotransmissor depende da estrutura do *caging group*. Assim, o grupo protector pode ser escolhido mediante a estabilidade à radiação num determinado comprimento de onda: a 350 nm, a benzocumarina **23b**; a 300 nm o naftaleno **23d** e a 254 nm o pireno **23e**. Os tempos de irradiação obtidos a 419 nm eram demasiado longos, pouco convenientes para aplicações práticas.



Esquema 9

Apesar de todos os compostos estudados se mostrarem adequados como grupos protectores, o composto **23b** apresentou-se como o mais efectivo por irradiação a 350 nm – valor mais apropriado em estudos com biomoléculas.

Na sequência destes resultados, Fernandes *et al.*⁵¹ efectuaram o estudo de *caging* e *uncaging* de outros aminoácidos neurotransmissores, designadamente β-alanina, tirosina, 3,4-di-hidroxifenilalanina (DOPA) e ácido glutâmico, usando a benzocumarina **23b** como grupo protector fotoclivável (Esquema 10).



Esquema 10

Os resultados obtidos para a fotólise a 254, 300 e 350 nm dos bioconjugados mostraram que a estrutura do neurotransmissor influencia os tempos de irradiação, sendo o conjugado da tirosina especialmente adequado para aplicações práticas. No entanto, o heterociclo usado mostrou ser também um grupo protector apropriado para a foto-libertação dos restantes neurotransmissores.

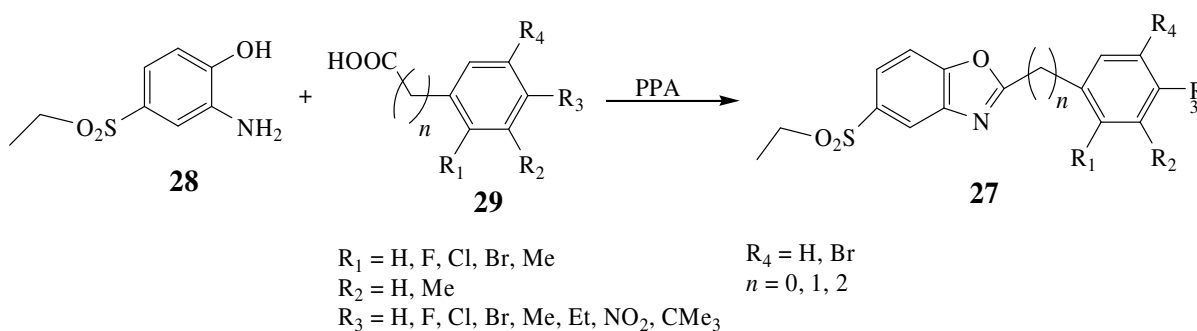
3. Importância dos benzoxazoles

Os benzoxazoles têm sido dos heterociclos mais estudados em Química Medicinal. Compostos com este núcleo têm mostrado actividade biológica considerável como antivirais,

antibióticos, antimicrobianos, inibidores da topoisomerase I e II, antiparasitários, anti-inflamatórios e ainda como agentes anticancerígenos.^{52,53}

Devido à gama alargada de bioactividade esta classe de compostos tem suscitado o interesse de vários grupos de investigação. Por conseguinte, em seguida serão referidos alguns exemplos de benzoxazoles recentemente sintetizados e dos quais já foi avaliada a actividade.

Os derivados do 5-etilsulfunil-2-(fenil/benzil/feniletil)benzoxazole **27** obtidos por reacção entre o 4-etilsulfunil-2-aminofenol **28** e o ácido carboxílico **29** correspondente na presença de ácido polifosfórico (método de síntese idêntico ao usado nesta dissertação), foram avaliados quanto à sua actividade antimicrobiana em bactérias *Gram-positivas*, *Gram-negativas* e no fungo *Cândida albicans*.⁵² Os resultados obtidos mostraram que estes compostos apresentam um largo espectro de actividade com valores de MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) entre 250 e 7,81 mg/mL.



Esquema 11

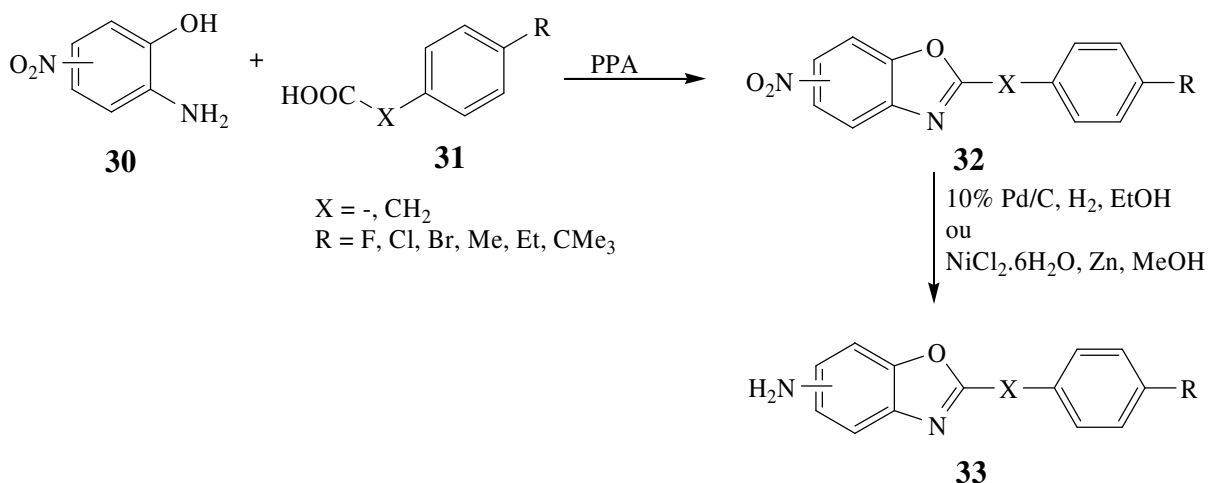
Recentemente Ertan *et al.*⁵⁴ sintetizaram uma nova série de derivados de 5 (ou 6)-nitro amino-2-(fenil/benzil)benzoxazole **32**, seguindo um método idêntico ao referido anteriormente e avaliaram a sua actividade antibacteriana e antifúngica contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*

⁵² Ö. Temiz-Arpaci, I. Yildiz, S. Özkan, F. Kaynak, E. Aki-Sxener, I. Yalçin, *Synthesis and biological activity of some new benzoxazoles*. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1423-1431.

⁵³ M. Radi, S. Saletti, M. Botta, *A one-pot, two-step microwave-assisted synthesis of highly functionalized benzoxazoles using solid-supported reagents (SSRs)*. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4464-4466, referências aí citadas.

⁵⁴ T. Ertan, I. Yildiz, B. Tekiner-Gulbas, K. Bolelli, O. Temiz-Arpaci, S. Ozkan, F. Kaynak, I. Yalcin, E. Aki, *Synthesis, biological evaluation and 2D-QSAR analysis of benzoxazoles as antimicrobial agents*. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 501-510.

e *Candida albicans* (Esquema 12). O grupo nitro foi posteriormente reduzido a amina e a actividade dessa série de compostos **33** foi também avaliada. Os resultados obtidos revelaram que os heterociclos sintetizados apresentam um largo espectro de actividade contra os microrganismos testados com valores de MIC entre > 400 e 12,5 µg/mL.



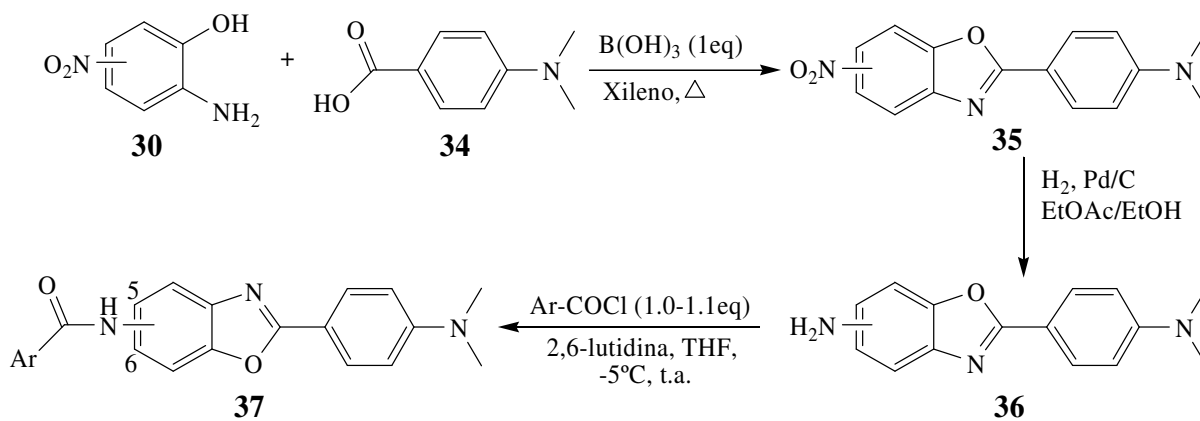
Esquema 12

Hausner *et al.*⁵⁵ reportaram a síntese e avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial como sensores de imagiologia para a doença de Alzheimer de uma nova série de benzoxazoles (Esquema 13).

Os benzoxazoles **35** foram obtidos por reacção de condensação do aminonitrofenol **30** correspondente com o ácido 4-(dimetilamino)benzóico **34**, catalizada por ácido borónico. A redução do grupo nitro a amina seguida de condensação com o cloreto de acilo aromático apropriado originou os compostos **37** pretendidos.

Os resultados obtidos relativos às potenciais aplicações como sensores foram úteis para direccionar o design de novos derivados de benzoxazole no sentido de melhorar as suas propriedades no âmbito do estudo efectuado.

⁵⁵ S. H. Hausner, D. Alagille, A. O. Koren, L. Amici, J. K. Staley, K. P. Cosgrove, R. M. Baldwin, G. D. Tamagnan, *Synthesis of 5- and 6-substituted 2-(4-dimethylaminophenyl)-1,3-benzoxazoles and their in vitro and in vivo evaluation as imaging agents for amyloid plaque. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 543-545.



Ar = fenil, 3,4,5-trimetoxifenil, 4-iodofenil, *p*-tolil, etc.

Esquema 13

Apesar da importância biológica desta classe de compostos, o interesse pelos benzoxazoles nesta dissertação resulta do facto de este tipo de heterociclos nunca ter sido usado como grupos protectores fotocliváveis e/ou *phototriggers*.

Deste modo, foram sintetizados dois novos derivados de oxazole a avaliada a sua fotossensibilidade quando ligados ao neurotransmissor β-alanina, tal como será discutido posteriormente nesta dissertação.

CAPÍTULO 2

APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

1. Introdução

A libertação de moléculas com relevância química e biológica (*uncaging*) tem sido alvo de especial atenção em áreas de investigação relacionadas com a Química, Biologia e Medicina. A libertação controlada no espaço e no tempo da molécula activa pode ser desencadeada por enzimas,⁵⁶ ou estímulos externos como o pH,⁵⁷ redutores ou oxidantes,^{7,58} ultra-sons,⁵⁹ corrente eléctrica,⁶⁰ temperatura⁶¹ e luz.⁶²

A utilização de moléculas fotoactiváveis é uma metodologia recente e de rápido desenvolvimento, que pode encontrar aplicação na elucidação dos processos de sinalização que envolvem neurotransmissores no âmbito dos sistemas celulares e de processos

⁵⁶ T. L. Anderson, J. Davidsen, M. Begtrup, O. G. Mouritsen, K. Jorgensen, *Enzymatic release of antitumor ether lipids by specific phospholipase A2 activation of liposome-forming prodrugs*. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1694-1703.

⁵⁷ H. M. Lee, J. Chmielewski, *Liposomal cargo unloading induced by pH-sensitive peptides*. *J. Pept. Res.* **2005**, *65*, 355-363.

⁵⁸ C. Vaxelaire, F. Souquet, M. I. Lannou, J. Ardisson, J. Royer, *Anodic oxidation: an attractive alternative to CAN-mediated cleavage of para-methoxyphenyl ethers*. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *19*, 3138-3140.

⁵⁹ S. Kapoor, A. J. Bhattacharyya, *Ultrasound-triggered controlled drug delivery and biosensing using silica nanotubes*. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 7155-7163.

⁶⁰ S. Y. Kim, Y. M. Lee, *Drug release behavior of electrical responsive poly(vinylalcohol)/poly(acrylic acid) IPN hydrogels under an electric stimulus*, *J. Appl. Polym. Sci.* **2009**, *74*, 1752-1761.

⁶¹ H. D. Han, T. W. Kim, B. C. Shin, H. S. Choi, *Release of calcein from temperature-sensitive liposomes in a poly(N-isopropylacrylamide) hydrogel*. *Macromol. Res.* **2005**, *13*, 54-61.

⁶² G. Mayer, A. Heckel (Ed. 45) *Biologically active molecules with a "light switch"*. *Angew Chem. Int.* **2006**, 4900-4921.

metabólicos, em síntese orgânica sequencial, com reagentes polifuncionais que necessitam de múltiplos passos de protecção/desprotecção; em química combinatória e analítica, entre outros exemplos.^{12,62,63}

2-Oxo-benzopiranos (cumarinas) têm recebido atenção especial em fotoquímica aplicada e, devido à sua capacidade de fotoclivagem, derivados da cumarina têm sido reportados como grupos protectores adequados em várias classes de compostos, tal como anteriormente referido. Os benzopiranos apresentam fluorescência numa ampla gama espectral e rendimento quântico elevado. Este facto leva à sua utilização na síntese de conjugados fluorescentes para estudos de clivagem foto-induzidos.

Os aminoácidos neurotransmissores são uma classe de compostos onde estratégias de *caging* têm sido amplamente aplicadas, geralmente através de uma ligação éster entre um grupo fotoclivável adequado (incluindo cumarinas) e o seu terminal carboxílico. De entre os aminoácidos que desempenham um papel importante na comunicação neuronal no sistema nervoso central (SNC), destacam-se a glicina e o ácido γ -aminobutírico que actuam como os principais transmissores inibitórios no SNC dos mamíferos. A β -alanina actua como um transmissor fisiológico, e a alanina é um neurotransmissor inibitório e agonista de receptores de glicina ionotrópicos e de GABA.^{64,8}

Os interesses recentes da equipa de investigação onde foi desenvolvido o trabalho conducente a esta dissertação inclui a síntese de novos derivados hetero(aromáticos), nomeadamente de heterociclos de oxigénio e azoto e a sua aplicação como marcadores fluorescentes e grupos protectores fotocliváveis para as funções ácido carboxílico e amina de aminoácidos.^{48,49,50,51,65}

Atendendo aos factos mencionados, este trabalho pretende dar um contributo na síntese de novos derivados heterocíclicos de oxobenzobenzopirano e de oxazole e na sua avaliação como novos grupos protectores fotocliváveis/*phototriggers* para ácidos carboxílicos e aminas, nomeadamente de aminoácidos neurotransmissores.

⁶³ C. G. Bochet, *Photolabile protecting groups and linkers*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2002**, *1*, 125-142.

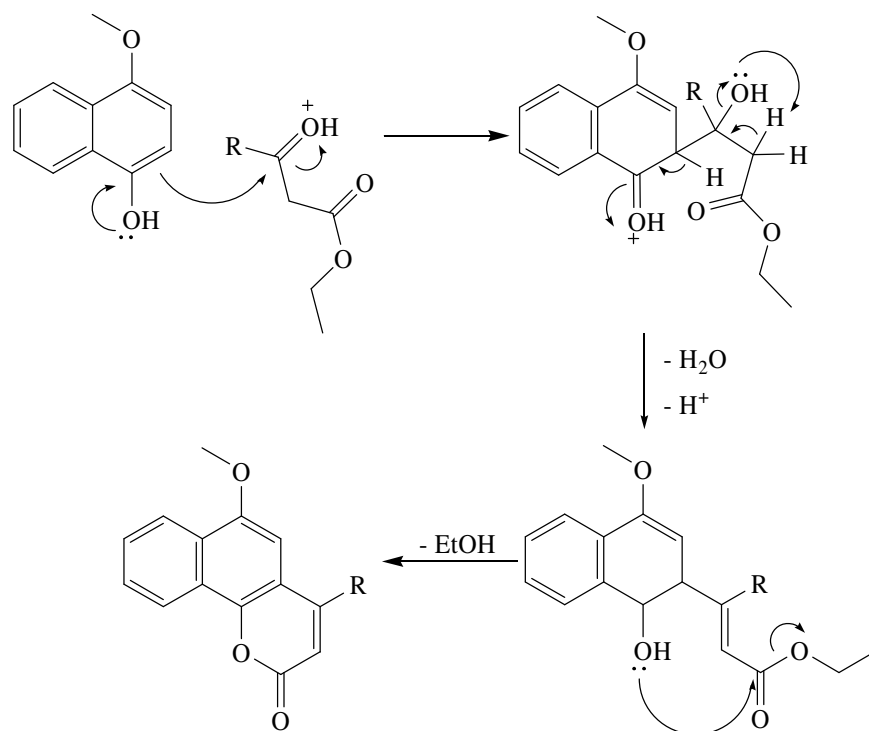
⁶⁴ N. Treffort, G. Dubreucq, M. H. Canu, Y. Guérardel, M. Falempin, F. Picquet, *Variations in amino acid neurotransmitters in the rat ventral spinal cord after hindlimb unloading*. *Neurosci. Lett.* **2006**, *403*, 147-150.

⁶⁵ A. M. Piloto, A. S. C. Fonseca, S. P. G. Costa, M. S. T. Gonçalves, *Carboxylic fused furans for amino acid fluorescent labelling*, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 9258-9267.

2. Síntese dos heterociclos de oxobenzopirano 1, 5 e de oxazole 6, 8

2.1. Síntese dos 6-metoxi-2-oxo-2H-benzo[h]benzopiranos 1 e 5

A síntese dos 2-oxo-2H-benzo[h]benzopiranos **1** e **2** (precursor do composto **5**) ocorreu por reacção de Pechmann entre o derivado hidroxilado do naftaleno, 4-metoxi-1-naftol, e o β -ceto éster correspondente, em meio ácido de acordo com o mecanismo apresentado no Esquema 1. Neste processo o grupo carbonilo do β -ceto éster é protonado pelo catalisador ácido e sofre ataque nucleofílico por parte do derivado hidroxilado do naftaleno. O intermediário resultante perde uma molécula de água e através de um novo ataque nucleofílico, desta vez intramolecular, pelo grupo hidroxilo, no grupo carbonilo do éster, ocorre o fecho do anel de oxopirano.⁶⁶

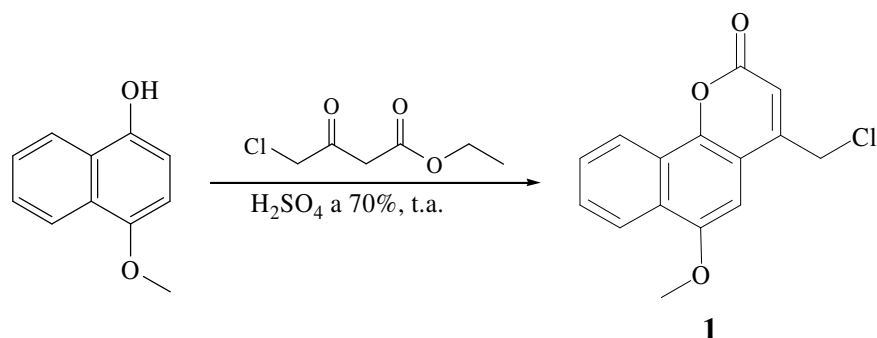


Esquema 1

A reacção do 4-metoxi-1-naftol com 4-cloroacetoacetato de etilo, em meio ácido (solução aquosa de ácido sulfúrico a 70%), à temperatura ambiente, seguida de purificação por cromatografia “seca”, em sílica gel, originou o 4-(clorometil)-6-metoxi-2-oxo-2H-

⁶⁶ J. D. Hepworth, in *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*. A. R. Katrisky, C. W. Rees (Eds), Pergamon, Oxford, **1984**, *3*, 802.

benzo[*h*]benzopirano **1** na forma de um sólido verde com rendimento de 45% (Esquema 2, Tabela 1).



Esquema 2

Partindo novamente do 4-metoxi-1-naftol e seguindo as mesmas condições reaccionais, mas usando o acetoacetato de etilo como β -ceto éster, obteve-se o 6-metoxi-4-metil-2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopirano **2** (sintetizado anteriormente por um método diferente⁶⁷) (15%) e o derivado demetilado inesperado 6-hidroxi-4-metil-2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopirano **3** (12%) (Esquema 3, Tabela 1).

O composto **3** foi posteriormente convertido no derivado metilado **2**, com bom rendimento (70%), por reacção de metilação com iodeto de metilo na presença de carbonato de potássio, refluxo em DMF, sob atmosfera de azoto.

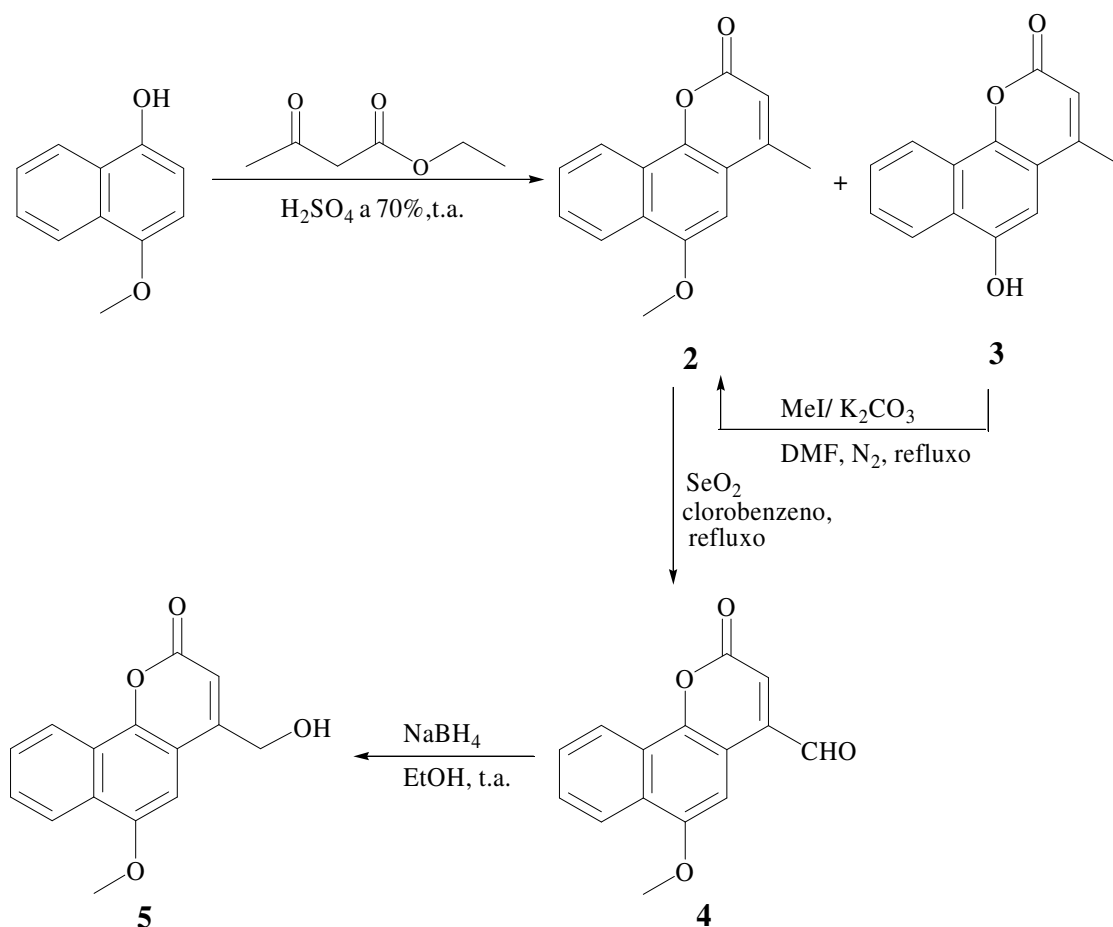
Atendendo a que o objectivo primário deste trabalho consistiu na síntese de compostos poliaromáticos funcionalizados, para posterior ligação a aminoácidos, o composto **2** foi usado como precursor do derivado hidroximetilado **5**. Assim, por reacção de oxidação com dióxido de selénio, refluxo em clorobenzeno, do oxobenzo[*h*]benzopirano **2**, seguida de purificação por cromatografia “seca”, em sílica gel, obteve-se o 6-metoxi-2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopirano-4-carbaldeído **4** com rendimento de 79%. A redução do grupo aldeído deste composto com boridreto de sódio, em clorofórmio/etanol, a baixa temperatura (banho de gelo), seguida de purificação por cromatografia “seca”, originou o 4-(hidroximetil)-6-metoxi-2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopirano **5** em 47%.

O composto **5** foi também obtido por hidroxilação alílica⁶⁸ do precursor **2** com dióxido de selénio e isolado como subproduto da reacção (10%).

⁶⁷ B. Gangadasu, P. Narender, B. C. Raju, V. J. Rao, *ZrCl₄ catalysed solvent free synthesis of coumarins*. *J. Chem. Res.* **2004**, 7, 480-481.

⁶⁸ L. A. Paquete, *Encyclopedia of reagents for organic synthesis*, Wiley, New York, Ed **1995**, 6, 4437-4438.

Os fluoróforos **1** e **5** serão referidos ao longo desta dissertação por um código de três letras (Flu) para simplificar a designação dos bioconjugados que serão discutidos posteriormente.



Esquema 3

Tabela 1. Síntese dos compostos **1-5**.

Composto	Rendimento (%)	p.f. (°C)
1	45	180,5 - 181,9
2	15	131,1 - 133,4
3	12	289,0 - 291,5
4	79	222,5 - 224,8
5	47	219,1 - 220,7

Os compostos **1-5** foram caracterizados por espectroscopia de IV, RMN (^1H e ^{13}C) e espectrometria de massa de alta resolução.

Nos espectros de IV observaram-se as bandas de absorção correspondentes às vibrações de alongamento do grupo carbonilo do heterociclo para todos os compostos entre 1731 e 1680 cm^{-1} e do aldeído para o composto **2** a 1712 cm^{-1} .

Nos compostos **3** e **5** surgiram também as bandas correspondentes às vibrações de alongamento do grupo hidroxilo entre 3650-3186 cm^{-1} .

Os espectros de RMN de ^1H mostraram os sinais esperados para os prótons do anel de oxobenzo[*h*]benzopirano, dos quais se destacam os tripletos (J 0,8-1,6 Hz) correspondentes aos prótons H-3 (δ 6,35-6,63 ppm; **1**, **2**, **3**, **5**; δ 7,89 ppm, **4**) e os singletos dos prótons H-5 (δ 6,73-7,0 ppm). Para além dos prótons aromáticos surgiram também os sinais relativos aos prótons alifáticos, nomeadamente para os grupos metoxilo (singletos, δ 4,02-4,08 ppm, **1**, **2**, **4**, **5**) metilo (singletos, δ 2,49 ppm, **2**, **3**), clorometilo (singlete, δ 4,73 ppm, **1**), hidroximetilo (duplo duplete, δ 4,86 ppm, **5**), e os prótons dos grupos funcionais aldeído (singlete, δ 10,16 ppm, **4**), hidroxilo aromático (singletos, δ 10,42 ppm, **3**) e hidroxilo alifático (triplete J 4,2 Hz, δ 5,73 ppm, **5**).

Nos espectros de RMN de ^{13}C dos compostos **1-5** destacam-se os sinais dos carbonos do anel de oxobenzopirano, designadamente C-2 (δ 159,88-161,30 ppm), C-3 (δ 110,22-115,27 ppm, **1**, **2**, **3**, **5**; δ 97,28 ppm, **4**) e C-5 (δ 96,02-100,90 ppm).

Foram também observados os sinais relativos aos carbonos alifáticos, nomeadamente dos grupos metoxilo (δ 55,70-56,01 ppm, **1**, **2**, **4**, **5**), metilo (δ 19,34 ppm, **2**; δ 12,63 ppm, **3**), clorometilo (δ 41,92 ppm, **1**) e hidroximetilo (δ 59,58 ppm, **5**), para além do carbono do grupo aldeído (δ 192,13 ppm, **4**).

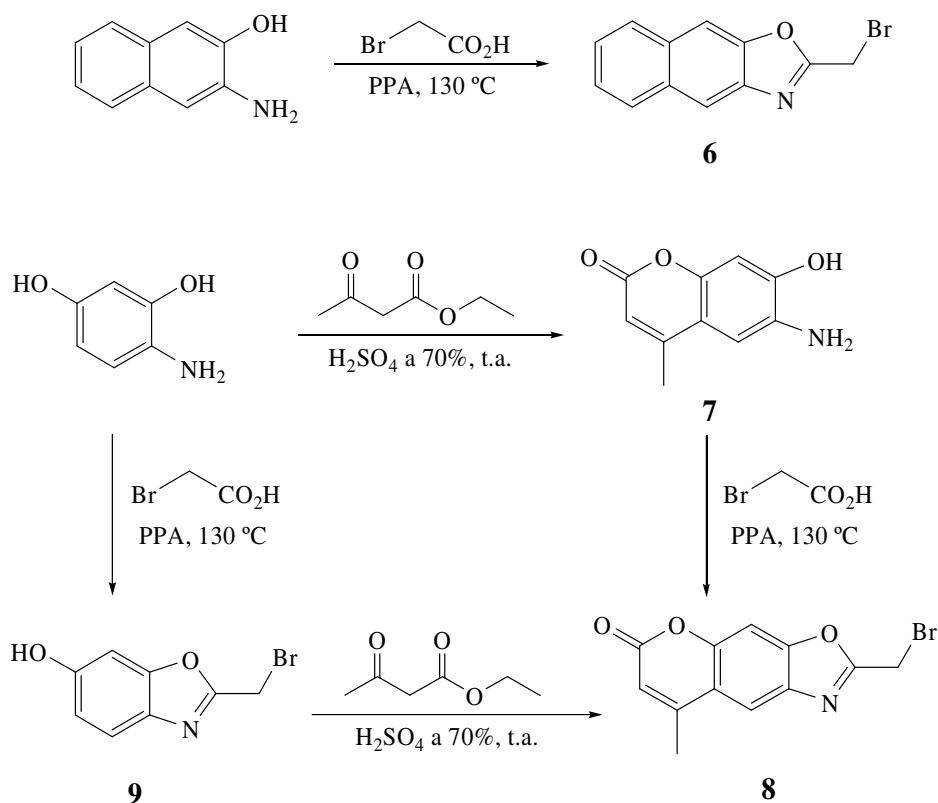
2.2. Síntese dos oxazoles 6 e 8

Como foi já referido no Capítulo 1 (ponto 3) os benzoxazoles são dos compostos heterocíclicos mais estudados em Química Medicinal, pois possuem um largo espectro de actividade biológica. No entanto, apesar da sua importância biológica, a utilização destes heterociclos como grupos protectores fotocliváveis não foi reportada até ao momento.

Considerando estes factos, e com o objectivo de investigar a possibilidade de utilização de novos derivados de oxazole como grupos protectores fotocliváveis, decidiu-se sintetizar os heterociclos fluorescentes funcionalizados **6** e **8**. Estes compostos foram usados posteriormente na preparação de bioconjugados e submetidos a condições de fotólise.

O método de síntese usado baseou-se na reacção de condensação de um análogo do *o*-aminofenol com um ácido carboxílico na presença de um grande excesso de ácido polifosfórico, a temperatura elevada.

Por reacção do 3-amino-2-naftol com ácido bromoacético, em PPA, com aquecimento (130 °C), seguida de purificação por cromatografia “seca” obteve-se o 2-(bromometil)nafto[2,3-*d*]oxazole **6** (Esquema 4, Tabela 2).



Esquema 4

Com o objectivo de preparar um outro composto tricíclico possuindo um anel de oxopirano, para além do oxazole, começou-se por sintetizar o oxobenzopirano **7** que foi ciclizado posteriormente originando o oxazole pretendido **8**.

Por reacção de Pechmann do 4-aminobenzeno-1,3-diol com acetoacetato de etilo em meio ácido (solução aquosa de ácido sulfúrico a 70 %), à temperatura ambiente, obteve-se o 6-amino-7-hidroxi-4-metil-2-oxo-2*H*-benzopirano **7** com rendimento quantitativo. Este composto reagiu com o ácido 3-bromoacético, num excesso de ácido polifosfórico, à temperatura de 130 °C, originando, após purificação por cromatografia “seca”, o 2-(bromometil)-8-metil-6-oxo-6*H*-benzopirano[6,7-*d*]oxazole **8** com 23% de rendimento (Esquema 4, Tabela 2).

Uma outra via de síntese para o heterociclo **8** foi também considerada e baseava-se na obtenção inicial do benzoxazole **9** que depois ciclizava por reacção de Pechmann com acetoacetato de etilo originando o oxobenzopirano[6,7-*d*]oxazole **8** desejado. Assim, partiu-se do 4-aminobenzeno-1,3-diol, efectuou-se a reacção de condensação com o ácido 3-bromoacético na presença de PPA, em condições idênticas às referidas anteriormente e obteve-se o 2-(bromometil)benzo[*d*]oxazol-6-ol **9**, com baixo rendimento (7%). Atendendo a este resultado decidiu-se abandonar esta via de síntese e optar pela inicialmente mencionada, uma vez que permitiu a obtenção quantitativa do precursor **7**.

Tabela 2. Síntese dos compostos **6-9**.

Composto	Rendimento (%)	p.f. (°C)
6	13	133,1-133,9
7	99	243,6-244,2
8	23	220,1-221,4
9	7	153,8-154,8

Os compostos **6-9** obtidos foram caracterizados pelas técnicas espectroscópicas habituais.

Nos espectros de IV observaram-se bandas de absorção correspondentes às vibrações de alongamento do grupo imina do anel de oxazole entre 1613 e 1698 cm^{-1} (**6**, **8**, **9**), do grupo carbonilo do anel de oxobenzopirano a 1731 cm^{-1} (**7**) e 1739 cm^{-1} (**8**) e das funções hidroxilo e amina entre 3646 e 3380 cm^{-1} (**7**, **9**).

Os espectros de RMN de ^1H mostraram os sinais esperados para os protões alifáticos, designadamente os singletos correspondentes aos protões do grupo bromometilo (δ 4,56-4,63 ppm, **6**, **8**, **9**) e os dupletos (J 1,2 Hz) dos grupos metilo (δ 2,32 ppm, **7**; δ 2,53 ppm, **8**). Para os compostos **6** e **9** os protões aromáticos provenientes dos anéis de naftaleno (δ 7,48-8,19 ppm, **6**) e de fenol (δ 6,90-7,53 ppm, **9**) são também visíveis. No caso dos compostos **7** e **8**, destacam-se os dupletos (J 1,2 Hz) correspondentes aos protões do anel de oxopirano (H-3 δ 6,15 ppm, **7**; H-7 δ 6,34 ppm, **8**). Salienta-se o facto dos singletos dos protões H-5 (δ 7,24 ppm) e H-8 (δ 6,78 ppm) do oxobenzopirano **7** serem desviados para valores mais elevados após a reacção de ciclização da qual resultou o oxobenzopirano-oxazole **8** (H-9 δ 7,96 ppm e H-4 δ 7,52 ppm).

Nos espectros de RMN de ^{13}C dos compostos **6**, **8** e **9** destacam-se os sinais do grupo bromometilo (δ 20,08-20,88 ppm) e do C-2 do anel de oxazole (δ 159,67-163,25 ppm). No

caso dos compostos **7** e **8** surgiram também os sinais relativos ao anel de oxobenzopirano, designadamente o grupo carbonilo (δ cerca de 160,30 ppm), o carbono adjacente a este grupo (δ 110,89 ppm, C-3, **7**; δ 114,35 ppm, C-7, **8**) e os sinais das ligações C-H aromáticas: C-5 (δ 113,64 ppm) e C-8 (δ 102,21 ppm) no composto **7** ou C-9 (δ 115,78 ppm) e C-4 (δ 99,68 ppm) no composto **8**. Destacam-se também para ambos os heterociclos os sinais dos grupos metilo (δ 18,15 ppm, **7** e 19,22 ppm, **8**).

3. Síntese dos bioconjugados de oxobenzopirano e oxazole 11a-d, 12a-c, 14a,b, 15 e 16

3.1. Síntese dos bioconjugados de oxobenzopirano 11a-d, 12a-c e 14a,b

Com o objectivo de investigar a possibilidade de utilização dos novos compostos heterocíclicos funcionalizados **1**, **5**, **6** e **8** como grupos protectores fotocliváveis em síntese orgânica, mas principalmente em aplicações *caging*, decidiu-se usar estes compostos na preparação de vários bioconjugados, através de ligações químicas diferentes, nomeadamente éster e uretano.

Neste trabalho foram usados como modelos de moléculas biológicas os aminoácidos neurotransmissores glicina, L-alanina, β -alanina e o ácido γ -aminobutírico que, dependendo do grupo funcional do heterociclo e das condições reaccionais usadas, sofreram reacção nos terminais ácido carboxílico e amina.

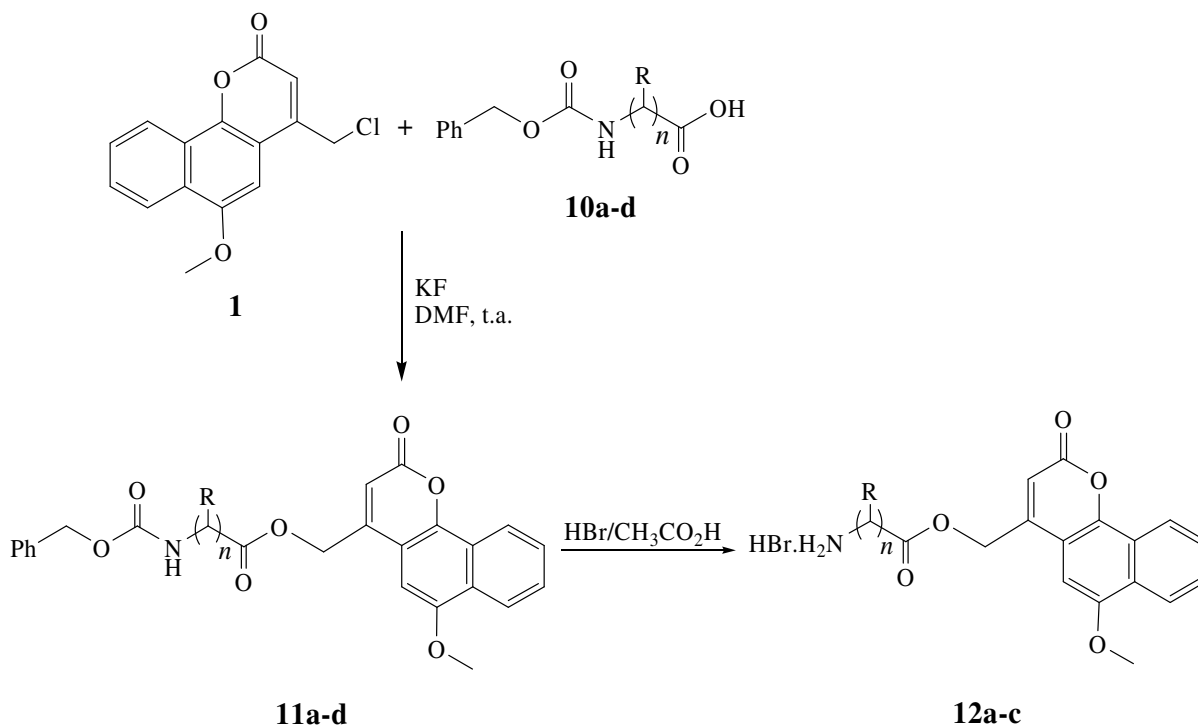
Os aminoácidos glicina (Z-Gly-OH, **10a**), L-alanina (Z-Ala-OH, **10b**), β -alanina (Z- β -Ala-OH, **10c**) e o ácido γ -aminobutírico (Z-GABA-OH, **10d**), protegidos na função amina com o grupo benziloxicarbonilo, foram derivatizados no *C-terminus* com o 4-(clorometil)-6-metoxi-2-oxo-2H-benzo[h]benzopirano **1** na presença de fluoreto de potássio,⁶⁹ em DMF, à temperatura ambiente. Após purificação por cromatografia “seca” em sílica gel, isolaram-se os bioconjugados **11a-d** possuindo uma ligação éster entre o aminoácido e o fluoróforo, na forma de sólidos com bons rendimentos (53-86%) (Esquema 5, Tabela 3).

No sentido de tornar estes bioconjugados num modelo mais adequado para a avaliação da viabilidade do novo derivado de oxobenzo[h]benzopirano **1** como grupo protector fotoclivável de aminoácidos neurotransmissores, decidiu-se efectuar a remoção do grupo

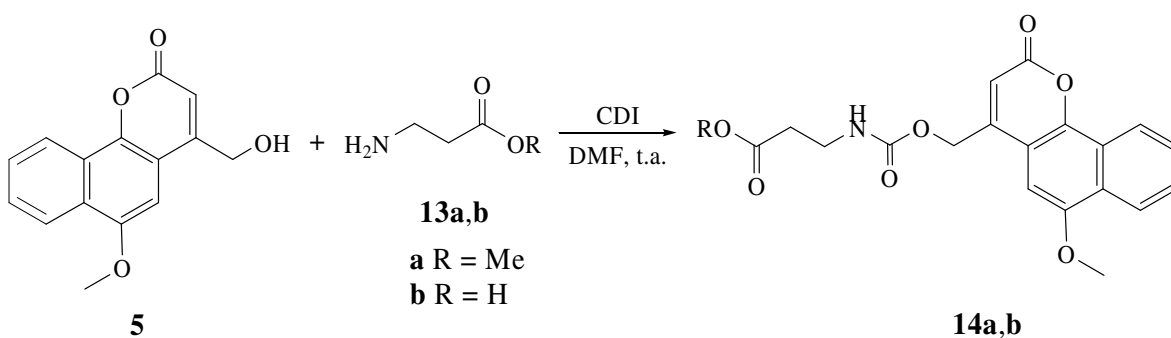
⁶⁹ F. S. Tjoeng, G. A. Heavner, *Improved preparation of 4-(Boc-aminoacyloxymethyl)-phenylacetic acids for use in peptide-synthesis on solid supports utilizing a protecting group removable by photolysis or reduction. Synthesis* **1981**, 897-899.

protector benziloxicarbonilo, ficando apenas o neurotransmissor ligado ao heterociclo fotossensível.

Com efeito, os compostos **11a-c** foram submetidos a condições de acidólise, solução de ácido bromídrico em ácido acético,⁷⁰ tendo resultado os bioconjugados correspondentes **12a-c** na forma de sólidos (18-71%).



- a** $n = 1$, R = H
- b** $n = 1$, R = Me
- c** $n = 2$, R = H
- d** $n = 3$, R = H



Esquema 5

O 4-(hidroximetil)-6-metoxi-2-oxo-2H-benzo[h]benzopirano **5** reagiu com o terminal amina do éster metílico da β -alanina **13a** e com a β -alanina completamente desprotegida **13b**,

⁷⁰ M. Bodanszky, A. Bodanszky, *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer: Berlin **1984**.

por uma reacção de transferência de carbonilo com 1,1'-carbonildiimidazole (CDI),⁷¹ em DMF, à temperatura ambiente. Após purificação por cromatografia “seca” em sílica gel, obtiveram-se os conjugados **14a** (42%) e **14b** (82%) com ligação uretano e possuindo ou não o grupo protector éster metílico na função ácido carboxílico da β -alanina (Esquema 5, Tabela 3).

Tabela 3. Síntese dos compostos **11a-d**, **12a-c** e **14a,b**.

Composto	Rendimento (%)	p.f. °C
11a	53	173,5 – 175,1
11b	86	153,3 – 154,7
11c	70	119,9 - 122,6
11d	56	144,5 - 146,4
12a	18	194,8 – 195,9
12b	71	198,2 – 198,8
12c	45	204,3 – 205,4
14a	42	175,7 - 177,9
14b	82	224,9 - 225,9

Todos os compostos sintetizados foram caracterizados por espectroscopia de IV, RMN (¹H e ¹³C) e espectrometria de massa de alta resolução.

Nos espectros de IV dos conjugados **11a-d**, **12a-c** e **14a,b** surgiram as bandas correspondentes às vibrações de alongamento para os diferentes grupos carbonilo presentes nos conjugados fluoróforo-aminoácido entre 1643 e 1758 cm⁻¹.

Os espectros de RMN de ¹H mostraram os sinais dos resíduos de aminoácidos, designadamente o α -CH₂ (δ 4,16 ppm, **11a** ou δ 4,13 ppm, **12a**), α -CH (δ 4,49-4,59 ppm, **11b** ou δ 4,40-4,50 ppm, **12b**), α -, β -CH₂ (δ 2,43-3,02 ppm, 3,20-3,62 ppm, **11c**, **12c**, **14a,b**), assim como os α -, β -, γ -CH₂ (δ 2,56, 1,84-2,00, 3,30-3,33 ppm, **11d**). O grupo metileno do fluoróforo era também visível para todos os conjugados (δ 5,26-5,74 ppm). Destacam-se ainda os prótons aromáticos característicos do anel de oxobenzopirano, H-3 (δ 6,44-6,66 ppm) e H-5 (δ 6,46-7,0 ppm).

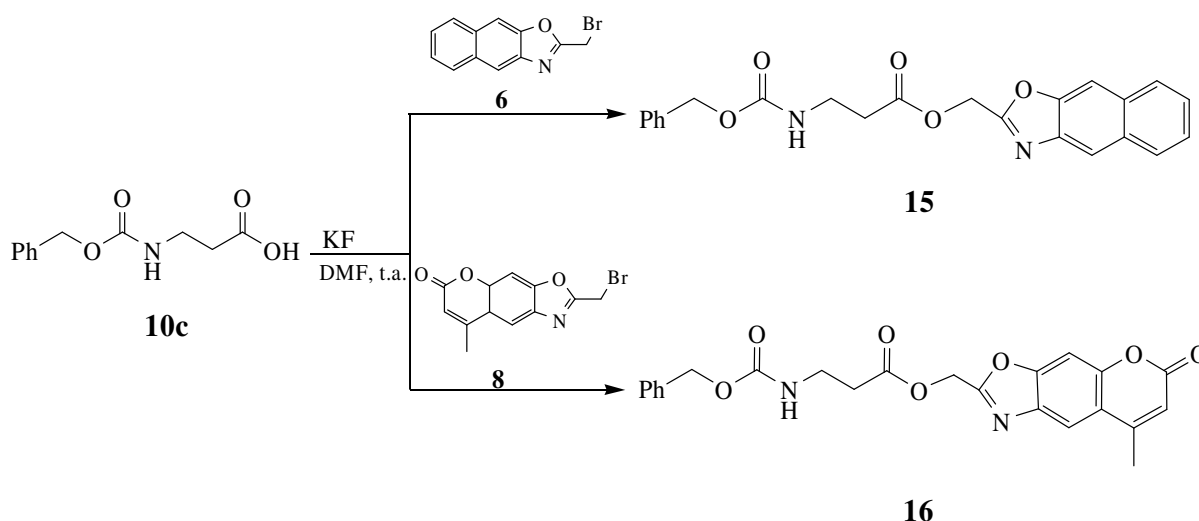
⁷¹ D. D'Addona, C. G. Bochet, *Preparation of carbamates from amides and alcohols under mild conditions*, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 5227-5229.

A confirmação da formação das novas ligações éster (**11a-d**) e uretano (**14a,b**) foi também evidente por espectroscopia de RMN de ^{13}C , surgindo os sinais do grupo carbonilo correspondente (δ 169,47-172,37 ppm, **11a-d**; δ a cerca de 155,30 ppm, **14a,b**).

3.2. Síntese dos bioconjugados de oxazole **15** e **16**

À semelhança dos oxobenzobenzopiranos **1** e **5**, os oxazoles tricíclicos funcionalizados **6** e **8**, foram também usados na síntese de novos bioconjugados, tendo como modelo de molécula bifuncional o aminoácido neurotransmissor β -alanina.

Com efeito, a *N*-benziloxycarbonil- β -alanina (**10c**) foi derivatizada no *C-terminus* com os fluoróforos 2-(bromometil)nafto[2,3-*d*]oxazole **6** e 2-(bromometil)-8-metil-6-oxo-6*H*-benzopirano[6,7-*d*]oxazole **8** na presença de fluoreto de potássio,⁶⁹ em DMF, à temperatura ambiente (Esquema 6, Tabela 4).



Esquema 6

Salienta-se o facto da reacção de acolplamento ter ocorrido muito mais rapidamente neste caso, ou seja, usando derivados bromometilados (5 horas) do que quando foram usados os compostos clorometilados (24 horas), nas mesmas condições reaccionais.

Após purificação por cromatografia “seca” em sílica gel, isolaram-se os bioconjugados com ligação éster **15** e **16** com rendimentos elevados. Estes compostos foram caracterizados pelas técnicas espectroscópicas habituais.

Tabela 4. Síntese dos compostos **15** e **16**.

Composto	Rendimento (%)	p.f. °C
15	90	105,6 – 106,9
16	95	114,6 – 115,4

Nos espectros de IV dos conjugados **15** e **16** surgiram as bandas correspondentes às vibrações de alongamento dos grupos carbonilo da ligação éster fluoróforo- β -alanina, da ligação uretano do grupo *N*-benziloxycarbonilo e do anel de oxobenzopirano (**16**) entre 1691 e 1750 cm^{-1} , assim como as bandas relativas à ligação imina dos anéis de oxazole entre 1631 e 1638 cm^{-1} .

Os espectros de RMN de ^1H mostraram para além dos sinais da β -alanina, designadamente os tripletos do $\alpha\text{-CH}_2$ (δ a cerca de 2,74 ppm) e os multipletos do $\beta\text{-CH}_2$ (δ 3,50 – 3,75 ppm), os singletos correspondentes ao grupo metilo dos fluoróforos (δ a cerca de 5,40 ppm). No caso do conjugado **16** destacam-se também os sinais do anel de oxobenzopirano tais como, o singlete do grupo metilo (δ 2,40 ppm) e o duplete (J 0,8 Hz) do próton H-7 (δ 6,31 ppm).

A confirmação da formação das novas ligações éster foi também evidente por espectroscopia de RMN de ^{13}C , surgindo os sinais do grupo carbonilo a δ cerca de 171,30 ppm.

4. Caracterização fotofísica dos bioconjugados de oxobenzopirano e oxazole 11a-d, 12a-c, 14a,b, 15 e 16

Atendendo a que este trabalho envolve a avaliação de compostos heterocíclicos fluorescentes como novos grupos protectores fotocliváveis, a caracterização fotofísica é fundamental. Este estudo irá permitir a avaliação das propriedades dos bioconjugados em comparação com as dos fluoróforos de partida, assim como a determinação de parâmetros necessários à monitorização por HPLC do processo de fotoclivagem.

Deste modo, foi efectuado o estudo fotofísico de todos os compostos obtidos, nomeadamente dos heterociclos funcionalizados **1**, **5**, **6** e **8** e dos respectivos precursores (excepto do composto **7**), assim como dos bioconjugados correspondentes **11a-d**, **12a-c**, **14a,b**, **15** e **16**.

Foram traçados os espectros de UV/visível e de fluorescência de soluções (10^{-5} M) desses compostos em etanol absoluto e em metanol/solução tampão de HEPES (80:20) e os

resultados obtidos serão discutidos para os bioconjugados em comparação com os fluoróforos de partida.

Os comprimentos de onda de absorção máxima (λ_{\max}) e de emissão máxima (λ_{em}), a absorptividade molar (ϵ), os rendimentos quânticos relativos de fluorescência (Φ_F) e os desvios de Stokes foram determinados e são apresentados.

Os rendimentos quânticos relativos de fluorescência foram calculados usando o 9,10-difenilantraceno (DPA) como padrão (Φ_F 0,95 em etanol).⁷² Para a determinação dos valores de Φ_F , o padrão fluorescente foi excitado ao comprimento de onda de absorção máxima encontrado para cada um dos compostos a ser testado e em todas as medições fluorimétricas a absorvância da solução não excedia 0,1.

4.1. Caracterização fotofísica dos bioconjugados de oxobenzopirano **11a-d**, **12a-c** e **14a,b**

O estudo fotofísico iniciou-se com a caracterização dos compostos **11a-d**, **12a-c** e **14a,b**, dos respectivos fluoróforos **1** e **5** e dos precursores correspondentes, em etanol e em metanol/solução tampão de HEPES (80:20) (Tabelas 5 e 6).

Por comparação dos comprimentos de onda de absorção máxima de todos os compostos nos dois solventes, não se observam alterações significativas (λ_{\max} 365-380 nm, em etanol e 370-383 nm, em metanol/HEPES) (Tabela 5). Além disso, após a ligação do oxobenzobenzopirano **1** aos aminoácidos **10a-d**, ocorreu apenas um ligeiro desvio hipsocrômico (até 8 nm em etanol e até 13 nm em metanol/HEPES), observado nos bioconjugados **11a-d** e nos conjugados correspondentes **12a-c**, que não possuem o grupo protector benziloxicarbonilo.

No caso do oxobenzobenzopirano **5** e dos conjugados **14a,b** não ocorreu qualquer variação no valor do comprimento de onda de absorção máxima (**14b** em metanol/HEPES), ou ocorreu um desvio batocrômico em ambos, etanol e metanol/HEPES.

⁷² J. V. Morris, M. A. Mahaney, J. R. Huber, *Fluorescence quantum yield determinations. 9,10 - diphenylanthracene as a reference standard in different solvents*, *J. Phys. Chem.* **1976**, *80*, 969-974.

Tabela 5. Dados de UV/visível dos precursores **1-5** e conjugados **11a-d**, **12a-c** e **14a,b** em etanol e em metanol/HEPES (80:20).

Composto	Etanol		Metanol/ HEPES (80:20)	
	λ_{\max} (nm)	log ϵ	λ_{\max} (nm)	log ϵ
1	379	3,68	383	3,70
2	371	3,57	371	3,68
3	380	3,71	377	3,73
4	377	3,73	380	3,61
5	365	3,69	371	3,73
11a	376	3,72	373	3,73
11b	375	3,72	374	3,72
11c	375	3,75	376	3,78
11d	373	3,66	370	3,60
12a	374	3,39	372	3,62
12b	373	3,49	373	3,64
12c	371	3,33	370	3,63
14a	374	3,70	374	3,71
14b	373	3,52	371	3,62

Os bioconjugados **11a-d** e **12a-c** exibem bons rendimentos quânticos de fluorescência em etanol ($0,43 < \Phi_F < 0,63$) e na solução metanol/HEPES (80:20) ($0,28 < \Phi_F < 0,53$), e são superiores aos valores obtidos para o precursor **1** correspondente (pelo menos 10 vezes (9-13) em etanol e até 50 vezes (28-53) em metanol/HEPES (80:20)) (Tabela 6). No caso dos conjugados **14a,b**, quando comparados com o fluoróforo **5**, verifica-se que o valor mais elevado surge para o composto **14b** ($\Phi_F = 0,71$) em etanol.

Os compostos **11a-d**, **12a-c** e **14a,b** apresentam uma emissão máxima por volta dos 472 nm (em etanol) e no intervalo 469-484 nm (em metanol/HEPES), com desvios de Stokes elevados (cerca de 100 nm) - característica importante na biomarcação fluorescente. Além disso, por comparação dos precursores **1** e **5** com os conjugados correspondentes **11c**, **14a** e **14b**, em etanol e em metanol/HEPES, verifica-se que todos os compostos exibem comprimentos de onda de emissão máxima superiores em metanol/HEPES.

Por comparação dos valores de λ_{em} dos oxobenzobenzopiranos **1** e **5**, e dos conjugados correspondentes **11a-d**, **12a-c** e **14a,b** observa-se um desvio para comprimentos de onda superiores (9-12 nm) em etanol. Na solução metanol/HEPES não ocorreu uma variação

considerável nos valores de λ_{em} , excepto para os conjugados **11c** (13 nm), **14a** e **14b** (8 nm) onde ocorreu um desvio batocrômico. A Figura 1 mostra os espectros normalizados de absorção e de fluorescência dos fluoróforos **1** e **5** e dos bioconjugados de β -alanina correspondentes **12c** e **14b** em etanol. O aspecto dos espectros em metanol/HEPES é semelhante.

Tabela 6. Dados de fluorescência dos precursores **1-5** e conjugados **11a-d**, **12a-c** e **14a,b** em etanol e em metanol/HEPES (80:20).

Composto	Etanol			Metanol/ HEPES (80:20)		
	λ_{em} (nm)	Φ_F	Desvio de Stokes (nm)	λ_{em} (nm)	Φ_F	Desvio de Stokes (nm)
1	461	0,05	82	471	0,01	88
2	463	0,33	72	447	0,32	76
3	459	0,17	79	466	0,02	89
4	461	0,49	84	472	0,30	92
5	460	0,45	95	469	0,45	98
11a	473	0,48	97	474	0,34	101
11b	472	0,56	98	472	0,31	98
11c	471	0,63	96	484	0,28	108
11d	473	0,60	100	470	0,38	100
12a	471	0,43	97	469	0,51	97
12b	471	0,50	98	471	0,53	98
12c	470	0,63	99	469	0,43	99
14a	472	0,31	98	477	0,44	103
14b	471	0,71	98	477	0,47	106

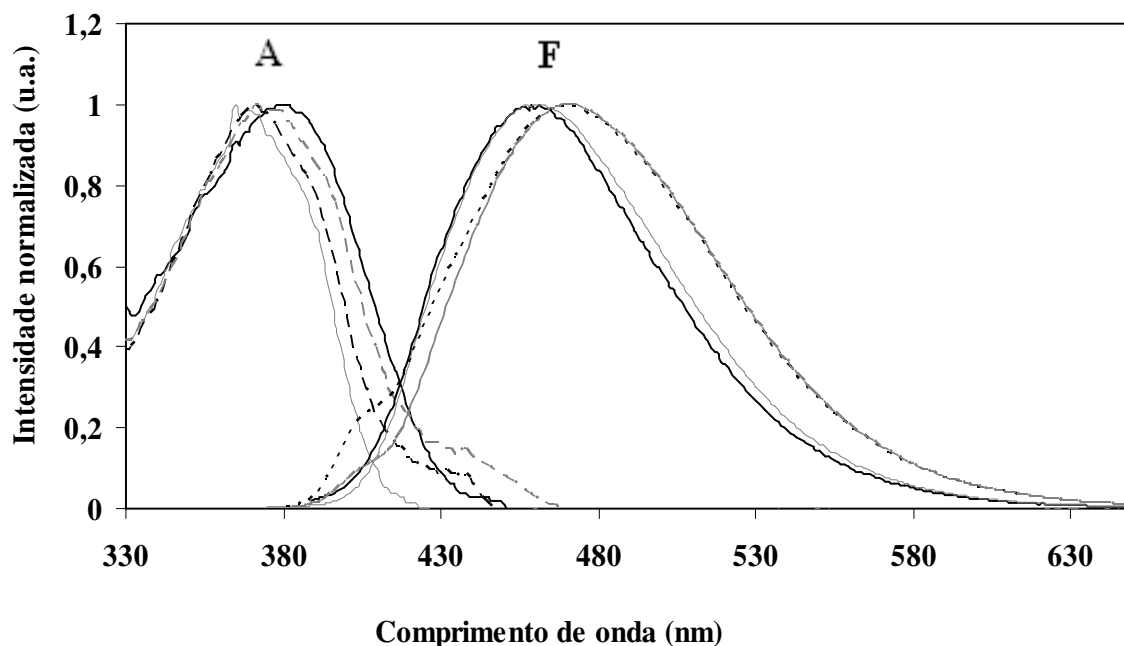


Figura 1. Espectros normalizados de absorção (A) e de fluorescência (F) dos precursores **1** e **5**, e dos conjugados **12c** e **14b** em etanol (**1**, λ_{exc} 379 nm; **5**, λ_{exc} 365 nm; **12c**, λ_{exc} 375 nm; **14b**, λ_{exc} 374 nm) (**1**, linha a preto; **5**, linha a cinzento; **12c**, linha tracejada a preto; **14b**, linha tracejada a cinzento).

4.2. Caracterização fotofísica dos bioconjugados de oxazole **15** e **16**

O estudo fotofísico relativo aos conjugados **15** e **16**, e fluoróforos respectivos **6** e **8** foi efectuado em etanol e metanol/solução tampão de HEPES (80:20) e conduziu aos valores apresentados nas Tabelas 7 e 8 para os diferentes parâmetros considerados (λ_{max} , λ_{em} , ϵ , desvio de Stokes e Φ_F).

Por comparação do comprimento de onda de absorção máxima de todos os compostos nos dois solventes, verifica-se que os valores obtidos são iguais (λ_{max} 301-334 nm), (Tabela 7).

Após a ligação dos oxazoles **6** e **8** à β -alanina **10c** ocorreu em ambos, etanol e metanol/HEPES um desvio hipsocrómico no λ_{max} que é mais significativo para os compostos **6** e **15** (33 nm; **8** e **16**, 3 ou 4 nm, dependendo do solvente).

Tabela 7. Dados de UV/visível dos precursores **6** e **8**, e conjugados **15** e **16** em etanol e metanol/HEPES (80:20).

Composto	Etanol		Metanol/ HEPES (80:20)	
	λ_{\max} (nm)	$\log \varepsilon$	λ_{\max} (nm)	$\log \varepsilon$
6	334	3,67	334	3,60
8	325	3,80	325	3,54
15	301	4,04	301	3,63
16	322	4,01	321	3,80

Os bioconjugados **15** e **16** exibem rendimentos quânticos relativos de fluorescência na solução metanol/HEPES (Φ_F 0,30, **15** e 0,43, **16**) superiores aos valores observados em etanol (Φ_F 0,19, **15** e 0,20, **16**) (Tabela 8).

Os valores de Φ_F dos bioconjugados **15** e **16** são superiores aos dos oxazoles precursores **6** e **8**, sendo para o conjugado **15** cerca de 4 e 15 vezes e para o conjugado **16** cerca de 19 e 430 vezes, em etanol e metanol/HEPES, respectivamente. Este resultado mostra claramente que os oxazoles **6** e **8** são reagentes fluorogénicos em ambos os solventes (o composto **6** é o menos significativo em etanol), sendo o composto **8** excepcionalmente relevante.

Todos os compostos apresentam uma emissão máxima na região 374-424 nm (em etanol) e 380-452 nm (em metanol/HEPES).

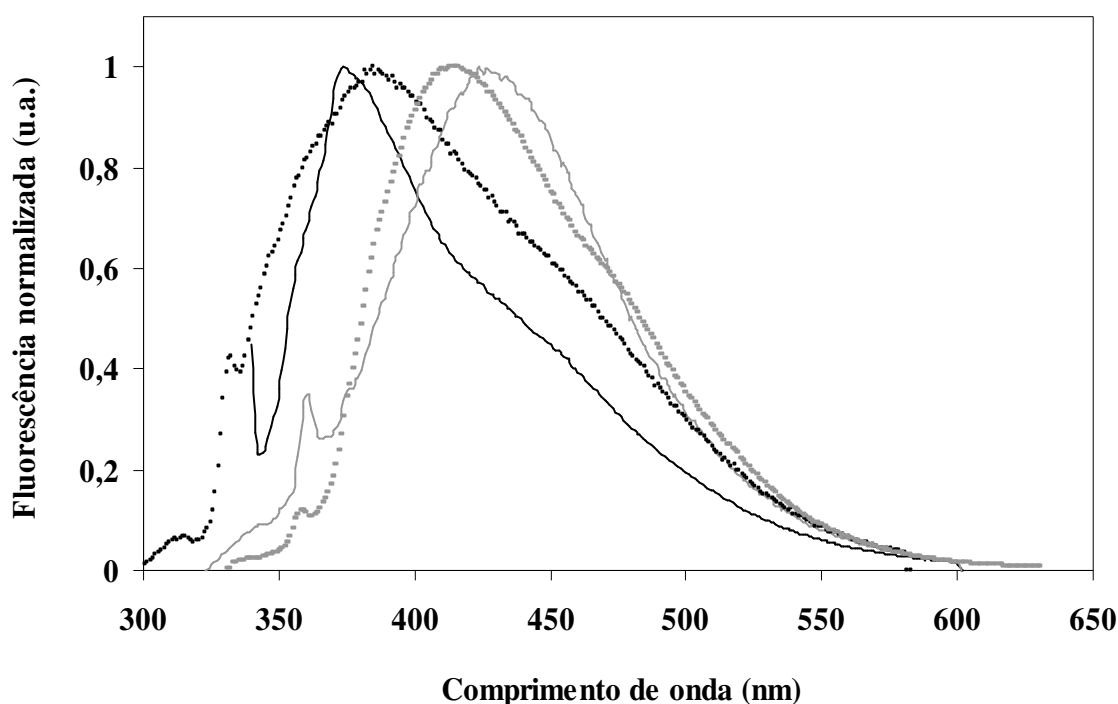
Por comparação dos valores de λ_{em} dos precursores **6** e **8**, e dos bioconjugados **15** e **16** correspondentes, verifica-se que ocorre um desvio batocrómico em ambos os casos (excepto para o conjugado **16** em etanol), sendo mais relevante para o conjugado **16** em metanol/HEPES (56 nm).

Os desvios de Stokes registados variam de 40 a 130 nm, estando o 2-(bromometil)-8-metil-6-oxo-6*H*-benzopirano[6,7-*d*]oxazole **8** e respectivo conjugado associados aos valores mais elevados (71-130 nm), em ambos os solventes usados.

Tabela 8. Dados de fluorescência dos precursores **6**, **8** e conjugados **15**, **16** em etanol e em metanol/HEPES (80:20).

Composto	Etanol			Metanol/ HEPES (80:20)		
	λ_{em} (nm)	Φ_F	Desvio de Stokes (nm)	λ_{em} (nm)	Φ_F	Desvio de Stokes (nm)
6	374	0,05	40	380	0,02	46
8	424	0,01	99	396	0,001	71
15	384	0,19	83	385	0,30	84
16	413	0,20	90	452	0,43	130

A Figura 2 mostra os espectros normalizados de absorção e de fluorescência dos oxazoles **6** e **8**, e dos bioconjugados de β -alanina **15** e **16** em etanol. O aspecto dos espectros em metanol/HEPES é semelhante.

**Figura 2.** Espectros normalizados de fluorescência dos precursores **6**, **8** e dos conjugados **15**, **16** em etanol (**6**, λ_{exc} 334 nm; **8**, λ_{exc} 325 nm; **15**, λ_{exc} 301 nm; **16**, λ_{exc} 322 nm) (**6**, linha a preto; **8**, linha a cinzento; **15**, linha tracejada a preto; **16**, linha tracejada a cinzento).

Os neurotransmissores usados como modelos neste trabalho são representativos de aminoácidos alifáticos, os quais não absorvem ou emitem significativamente na região do UV/visível, não sendo facilmente detectáveis por técnicas de absorção e de fluorescência. Por este motivo, a ligação a um fluoróforo ou fluorogénio como os oxobenzobenzopiranos **1** e **5**

ou os oxazoles **6** e **8** apresenta-se como uma excelente abordagem para a melhoria das propriedades fotofísicas de biomoléculas deste tipo.

5. Estudos de fotoclivagem dos bioconjugados de oxobenzopirano e oxazole 11a-d, 12a-c, 14a,b, 15 e 16

De forma a avaliar a sensibilidade à radiação UV/visível das ligações éster e uretano estabelecidas entre os aminoácidos neurotransmissores e os fluoróforos heterocíclicos **1**, **5**, **6** e **8**, efectuaram-se estudos de clivagem foto-induzida dos bioconjugados **11a-d**, **12a-c**, **14a,b**, **15** e **16**.

Soluções dos compostos referidos ($1,0 \times 10^{-4}$ M) em metanol/HEPES foram irradiadas num reactor Rayonet RPR-100 a 254, 300, 350 e 419 nm.

A reacção de fotoclivagem foi monitorizada por HPLC de fase reversa com detecção UV. Com base no traçado dos valores médios das áreas dos picos correspondentes a cada bioconjugado em função do tempo de irradiação verificou-se que ocorreu uma diminuição gradual das áreas ao longo do tempo, tendo esta diminuição sido detectada até 5 % do valor inicial.

Efectuou-se o traçado do logaritmo neperiano da área em função do tempo de irradiação que mostrou tratar-se de uma correlação linear, o que sugere uma reacção de 1ª ordem. Como se tratava de soluções diluídas, existia uma relação linear entre a concentração e a área dos picos, o que permitiu calcular o valor das constantes de velocidade directamente dos dados das áreas dos picos, tendo sido obtidos valores compreendidos entre $4,8 \times 10^{-3}$ e $9,94 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ (**11a-d**, **12a-c**, **14a,b**), $8,0 \times 10^{-4}$ (**15**) e $6,3 \times 10^{-1}$ (**16**) min^{-1} . Foi aplicado o método dos mínimos quadrados para obter a equação da recta que melhor se ajustava aos dados experimentais, bem como o coeficiente de correlação, r (0,7728-0,9980).

5.1. Estudos de fotoclivagem dos bioconjugados de oxobenzopirano **11a-d**, **12a-c** e **14a,b**

Os resultados obtidos nos estudos de fotoclivagem dos bioconjugados **11a-d**, **12a-c** e **14a,b** nas condições anteriormente referidas são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Tempos de irradiação (em min) e constantes de velocidade ($\times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) para a fotólise dos conjugados **11a-d**, **12a-c**, **14a,b** e **17a,b**^{50,51} a diferentes comprimentos de onda de irradiação em solução de metanol/HEPES (80:20).

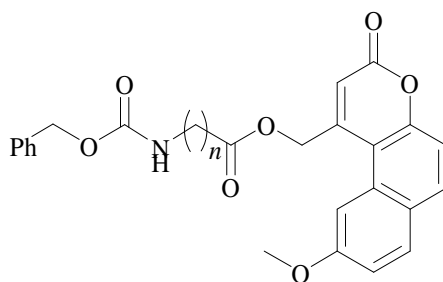
Composto	254 nm		300 nm		350 nm		419 nm	
	Tempo	<i>k</i>	Tempo	<i>k</i>	Tempo	<i>k</i>	Tempo	<i>k</i>
11a Z-Gly-OFlu	93	3,24	144	2,09	60	5,02	--	--
11b Z-Ala-OFlu	48	5,45	49	6,17	30	9,94	57	5,36
11c Z- β -Ala-OFlu	52	6,16	592	0,48	438	0,62	--	--
11d Z-GABA-OFlu	52	5,35	45	6,62	39	6,77	245	1,21
12a H-Gly-OFlu	--	--	--	--	469	0,67	--	--
12b H-Ala-OFlu	--	--	--	--	441	0,66	--	--
12c H- β -Ala-OFlu	--	--	--	--	370	0,80	--	--
14a Flu- β -Ala-OMe	75	4,10	140	1,50	140	1,87	--	--
14b Flu- β -Ala-OH	--	--	--	--	63	3,91	--	--
17a Z- β -Ala-OBba	418	0,72	957	0,31	513	0,59	--	--
17b Z-GABA-OBba	169	1,75	124	2,51	84	3,78	--	--

Considerando a influência do comprimento de onda de irradiação na velocidade das reacções de fotoclivagem dos conjugados **11a-d** e **14a** em solução de metanol/HEPES (80:20), verifica-se que a 300 e 350 nm os tempos de irradiação são comparáveis, e os melhores resultados foram obtidos a 350 nm.

Atendendo à influência da estrutura do aminoácido neurotransmissor na velocidade de fotoclivagem, verifica-se que o conjugado de β -alanina **11c** apresenta os tempos de irradiação mais elevados a 300 e 350 nm. Pelo contrário, os tempos de irradiação para os conjugados de alanina **11b** e GABA **11d** foram sempre os menores e muito semelhantes, tendo sido testada também a fotoclivagem a 419 nm para estes dois compostos. Os valores obtidos mostraram que para o bioconjugado **11b** o tempo de irradiação foi cerca de 2 vezes maior (57 min) que o obtido a 350 nm e para o composto **11d** foi 6 vezes maior (245 min). Apesar do aumento verificado, estes valores indicam que para os conjugados **11b** e **11d** o comprimento de onda

de 419 nm continua a representar uma alternativa possível caso a foto-desprotecção seja considerada.

Nesta altura, é possível efectuar-se a comparação dos valores obtidos para os conjugados de β -alanina e GABA com os fluoróforos de oxobenzo[*h*]benzopirano **11c** e **11d** obtidos neste trabalho e de oxobenzo[*f*]benzopirano **17a** e **17b**, publicados anteriormente.^{50,51} Estes compostos diferem apenas no modo de fusão dos anéis da estrutura tricíclica do fluoróforo (Tabela 9, Figura 3). Considerando os resultados obtidos para os bioconjugados **11c,d** e **17a,b**, verifica-se que, a fotoclivagem de **11c** e **11d** ocorre com tempos de irradiação menores a 300 e 350 nm (até 3 vezes), assim como a 254 nm (até 8 vezes). Nas duas séries, os conjugados de β -alanina estão associados a clivagens lentas. Estes resultados confirmam que o novo derivado heterocíclico, 4-(clorometil)-6-metoxi-2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopirano **1** apresenta vantagens como grupo protector fotoclivável quando comparado com os oxobenzo[*f*]benzopiranos publicados anteriormente.



17 a $n = 2$ Z- β -Ala-OBba
b $n = 3$ Z-GABA-OBba

Figura 3. Estrutura dos bioconjugados de 2-oxo-2*H*-benzo[*f*]benzopirano **17a,b**.

No seguimento da avaliação da clivagem foto-induzida dos bioconjugados de oxobenzo[*h*]benzopirano, os conjugados possuindo apenas a unidade foto-sensível ligada ao aminoácido neurotransmissor **12a-c** e **14b** foram também irradiados a 350 nm em solução de metanol/HEPES, nas condições referidas anteriormente (Figura 4). Os resultados obtidos mostram que os tempos de irradiação foram superiores para os compostos **12a,b** (370-469 min) e inferiores para o conjugado de β -alanina **12c**, relativamente às clivagens dos conjugados correspondentes possuindo a função amina protegida com o grupo benziloxicarbonilo (**11a-c**). A clivagem do composto **14b** foi a mais rápida; a β -alanina livre foi obtida em cerca de metade do tempo de irradiação necessário à sua clivagem na forma de éster metílico a partir do conjugado **14a** (Tabela 9).

Por comparação dos conjugados de β -alanina **11c** e **14a**, assim como **12c** e **14b**, que diferem apenas no tipo de ligação entre o fluoróforo e o neurotransmissor, verificou-se que a 300 e 350 nm, a ligação uretano (**14a,b**) cliva num intervalo de tempo significativamente inferior ao da ligação éster (**11c, 12c**).

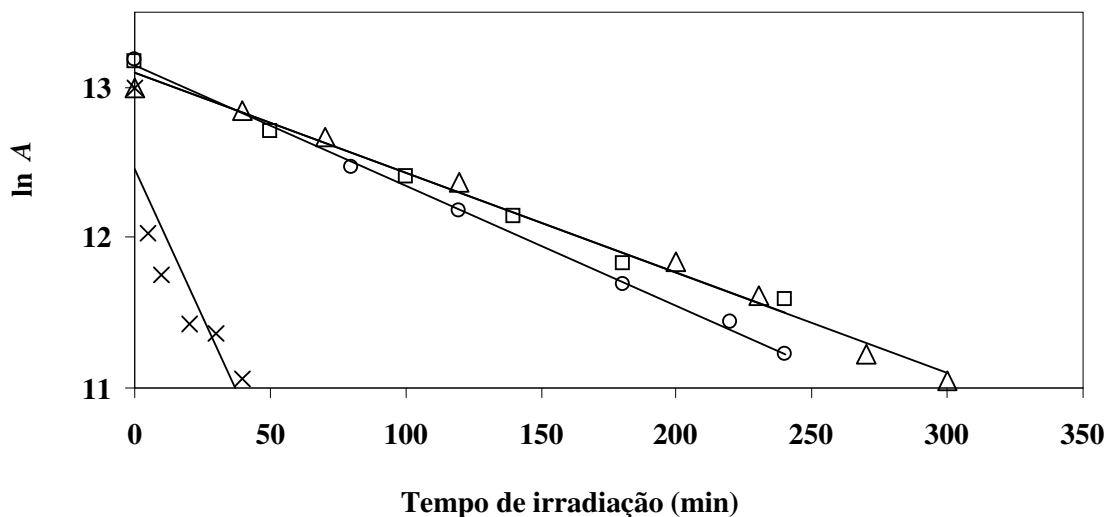
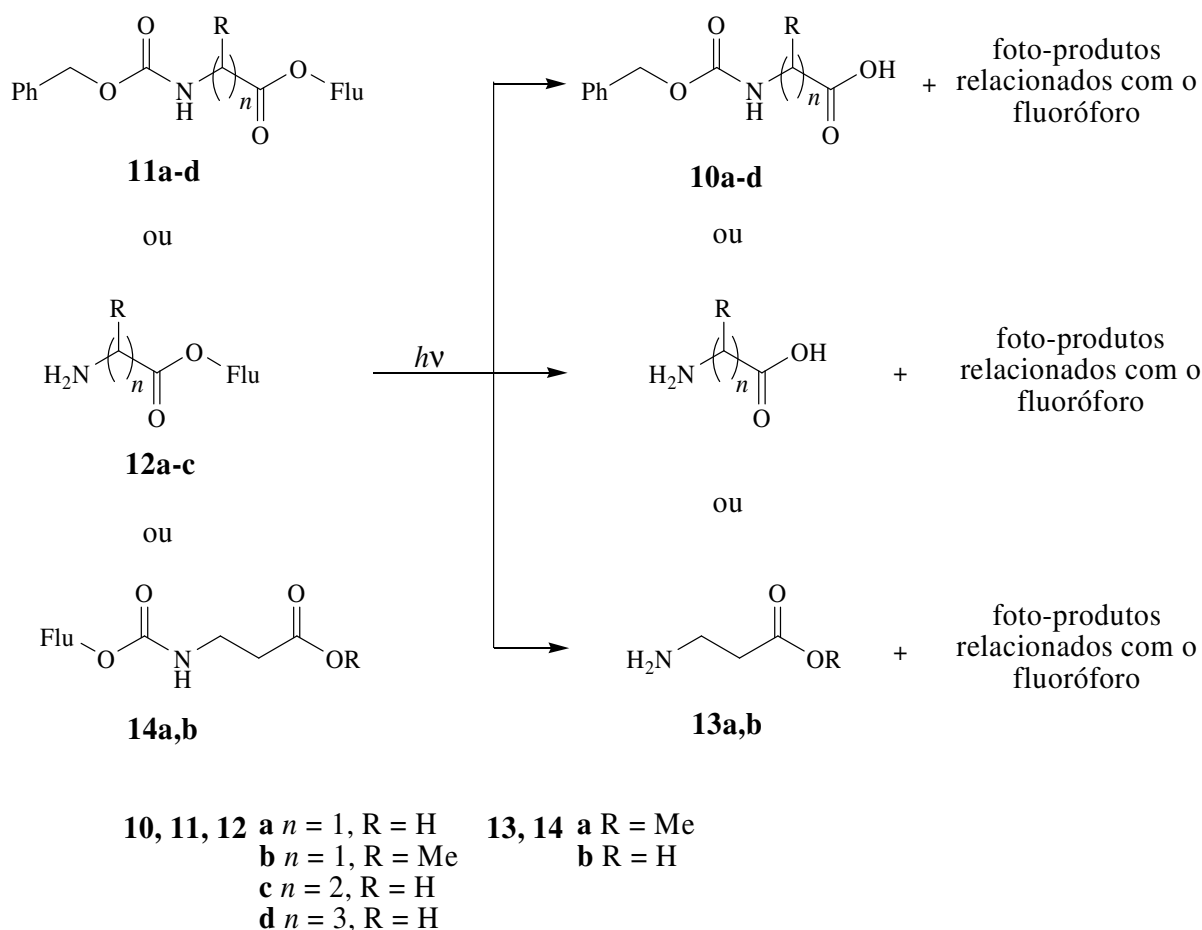


Figura 4. Traçado do $\ln A$ versus tempo de irradiação para a fotólise dos conjugados **12a** (Δ), **12b** (\square), **12c** (\circ) e **14b** (\times) a 350 nm, em metanol/HEPES (80:20).

As reacções de fotólise dos bioconjugados **11a-d**, **12a-c** e **14a,b** e a consequente obtenção dos *N*-benziloxycarbonil-aminoácidos (**10a-d**), do éster metílico da β -alanina (**13a**) e dos resíduos livres, como produtos esperados deste processo, foram também monitorizados por RMN de próton em soluções de metanol- d_4 / D_2O (80:20) com concentrações entre $1,05 \times 10^{-2}$ e $1,47 \times 10^{-2}$ M (Esquema 7).



Flu = oxobenzobenzopirano

Esquema 7

Após irradiação aos comprimentos de onda usuais, surgiu nos espectros de RMN um conjunto novo de sinais referente aos prótons alifáticos dos resíduos de aminoácidos e aos grupos protectores dos terminais N e C (no caso da clivagem dos conjugados **11a-c** e **14a**). Prolongando a irradiação por um período de tempo variável (dependendo do comprimento de onda de irradiação usado e da estrutura do conjugado) os sinais dos aminoácidos da forma conjugada desapareceram completamente dando lugar a um conjunto de sinais correspondente aos *N*-benziloxicarbonil-aminoácidos (*Z*-Aaa-OH, para **11a-d**), éster metílico da β -alanina (H- β -Ala-OMe, para o **14a**) e aos aminoácidos neurotransmissores livres (H-Aaa-OH, para **12a-c** e **14b**). Estas observações confirmam a libertação quantitativa dos aminoácidos sem ocorrer clivagem do grupo protector Z, quando este está presente, o que é um resultado interessante considerando que o tipo de ligação é igual à ligação uretano que o novo grupo protector fotoclivável oxobenzobenzopirano **1** estabelece. Para além dos sinais relativos aos prótons dos aminoácidos, é possível identificar nos espectros de RMN de 1H , os sinais resultantes dos subprodutos do fluoróforo.

A título de exemplo as Figuras 5-7 mostram os espectros de RMN de próton para a fotólise a 350 nm dos conjugados de Z- β -alanina **11c**, de β -alanina **12c** e **14b**, em comparação com os espectros da Z- β -alanina e β -alanina livre, respectivamente. Como mencionado anteriormente, após irradiação é visível um decréscimo dos tripletos referentes aos prótons α -CH₂ e β -CH₂ (δ 2,76 e 3,51 ppm, **11c**; δ 3,04 e 3,33 ppm, **12c**; δ 2,60 e 3,48 ppm, **14b**), assim como do singlete do CH₂ tipo benzílico do fluoróforo (δ 5,40 ppm, **11c**; δ 5,62 ppm, **12c**; δ 5,49 ppm, **14b**). Nos três casos, a β -alanina libertada origina um novo conjunto de sinais, designadamente o α -CH₂ (δ a cerca de 2,55 ppm, **11c** e 2,70 ppm, **12c**, **14b**) e β -CH₂ (δ a cerca de 3,39 ppm, **11c** e 3,20 ppm, **12c**, **14b**).

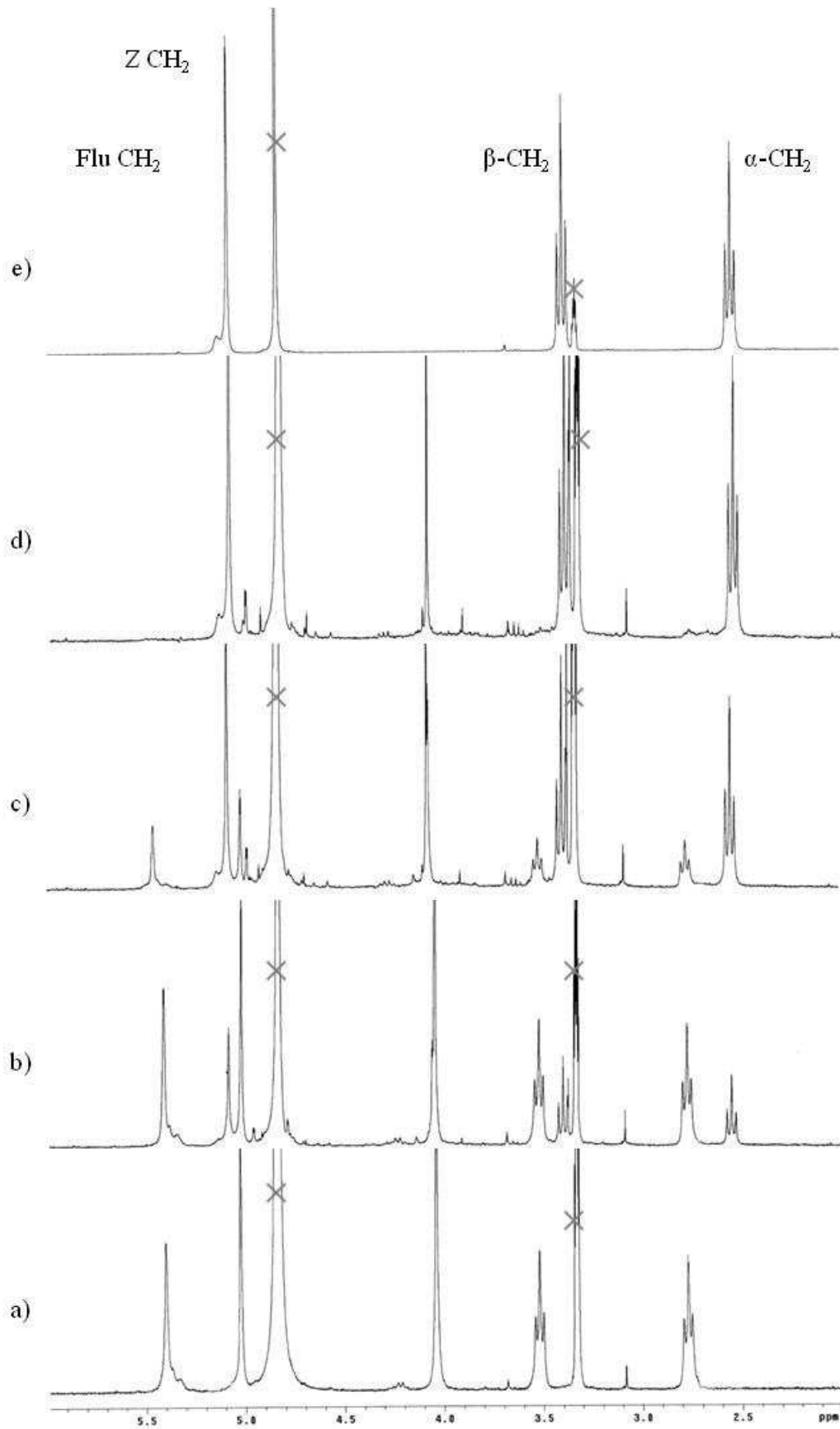


Figura 5. Espectros de RMN de ^1H em metanol- d_4 / D_2O (80:20) da fotólise do conjugado Z- β -Ala-OFlu **11c** ($C = 1,08 \times 10^{-2}$ M) a 350 nm: (a) antes da irradiação; (b) após 40 min. de irradiação; (c) após 155 min. de irradiação; (d) após 285 min. de irradiação; (e) H- β -Ala-OH.

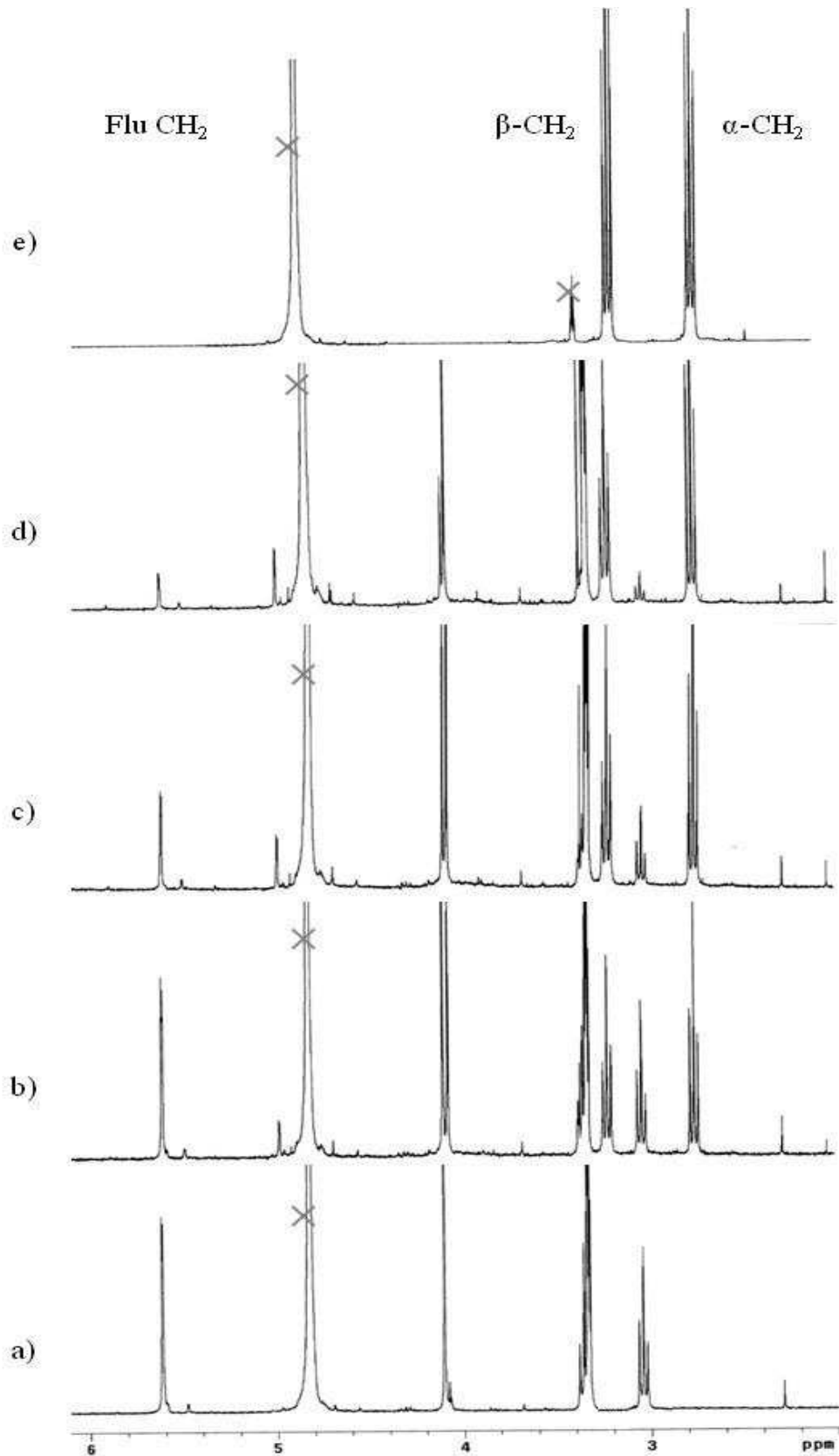


Figura 6. Espectros de RMN de ^1H em metanol- $d_4/\text{D}_2\text{O}$ (80:20) da fotólise do conjugado H- β -Ala-OFlu **12c** ($C = 1,47 \times 10^{-2}$ M) a 350 nm: (a) antes da irradiação; (b) após 20 min. de irradiação; (c) após 40 min. de irradiação; (d) após 140 min. de irradiação; (e) H- β -Ala-OH.

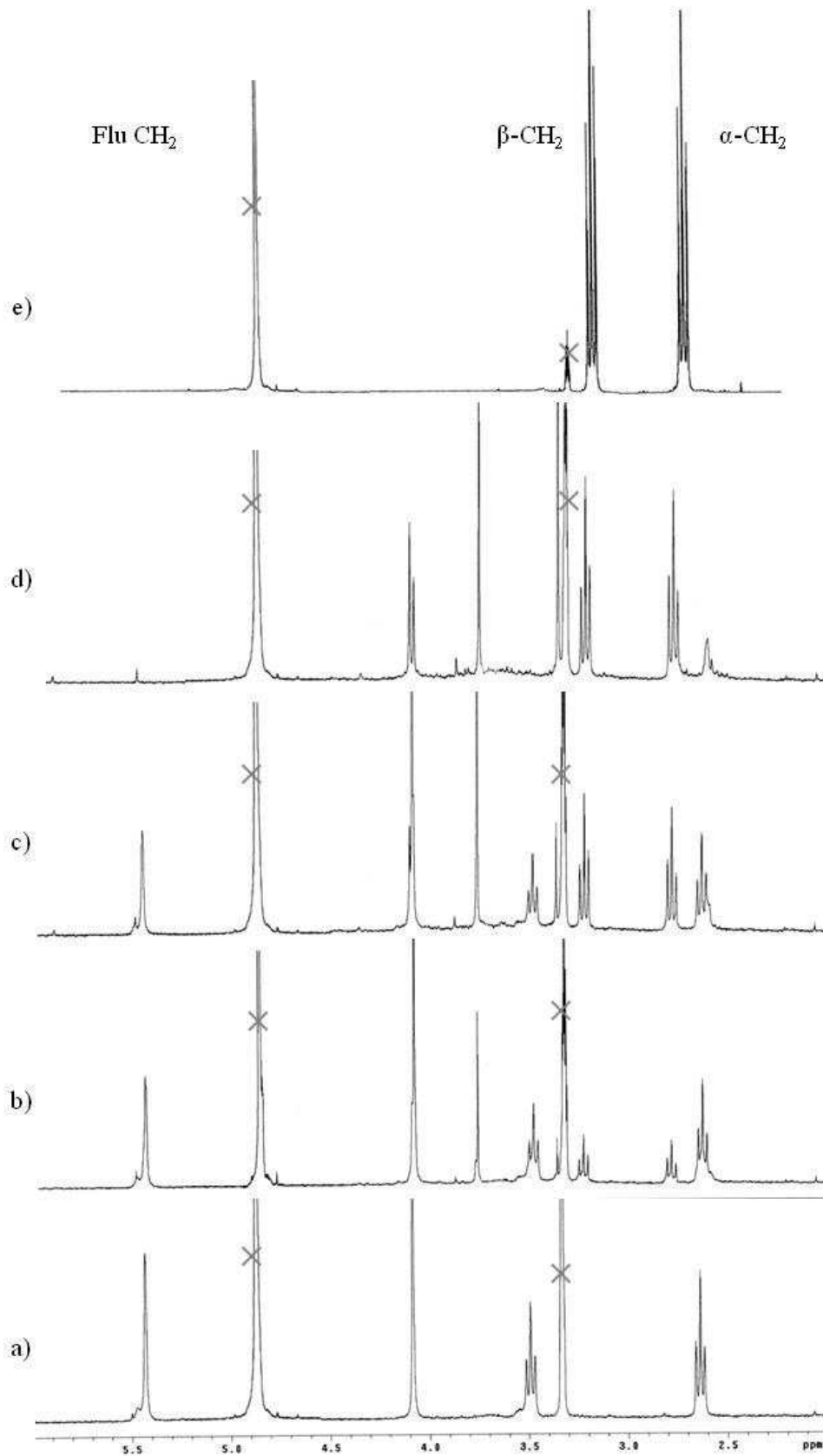
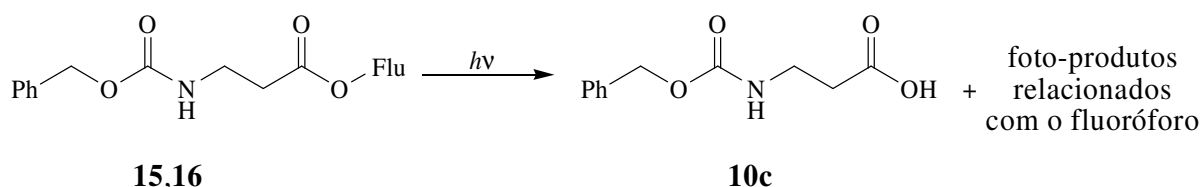


Figura 7. Espectros de RMN de ^1H em metanol- d_4 / D_2O (80:20) da fotólise do conjugado Flu-β-Ala-OH **14b** ($C = 1,05 \times 10^{-2}$ M) a 350 nm: (a) antes da irradiação; (b) após 35 min. de irradiação; (c) após 60 min. de irradiação; (d) após 90 min. de irradiação; (e) H-β-Ala-OH.

5.2. Estudos de fotoclivagem dos bioconjugados de oxazole 15 e 16

O estudo de clivagem foto-induzida dos conjugados éster de β -alanina – fluoróforos de oxazole **15** e **16** foi efectuado com radiação de 254, 300 e 350 nm, em soluções de metanol/HEPES (80:20), tal como descrito anteriormente. As reacções de fotoclivagem foram monitorizadas por HPLC (Esquema 8, Tabela 10).



Flu = oxazoles **6** ou **8**

Esquema 8

Tabela 10. Tempos de irradiação (em min) e constantes de velocidade ($\times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$) para a fotólise dos conjugados **15** e **16**, a diferentes comprimentos de onda de irradiação em solução de metanol/HEPES (80:20).

Composto	254 nm		300 nm		350 nm	
	Tempo	<i>k</i>	Tempo	<i>k</i>	Tempo	<i>k</i>
15	4,8	6,30	5,3	5,46	3731	0,008
16	27,8	1,08	37	0,82	--	--

Considerando a influência do comprimento de onda de irradiação na velocidade das reacções de fotólise dos bioconjugados **15** e **16**, verifica-se que a 254 e a 300 nm os tempos de irradiação são comparáveis para o conjugado **15**, surgindo a 254 nm o melhor resultado para o conjugado **16**.

Atendendo a que o composto **15** clivava rapidamente a 300 nm, decidiu-se estudar o seu comportamento por irradiação a 350 nm. No entanto, o valor obtido foi extremamente elevado, o que torna a clivagem a este comprimento de onda inviável do ponto de vista prático (Figura 8).

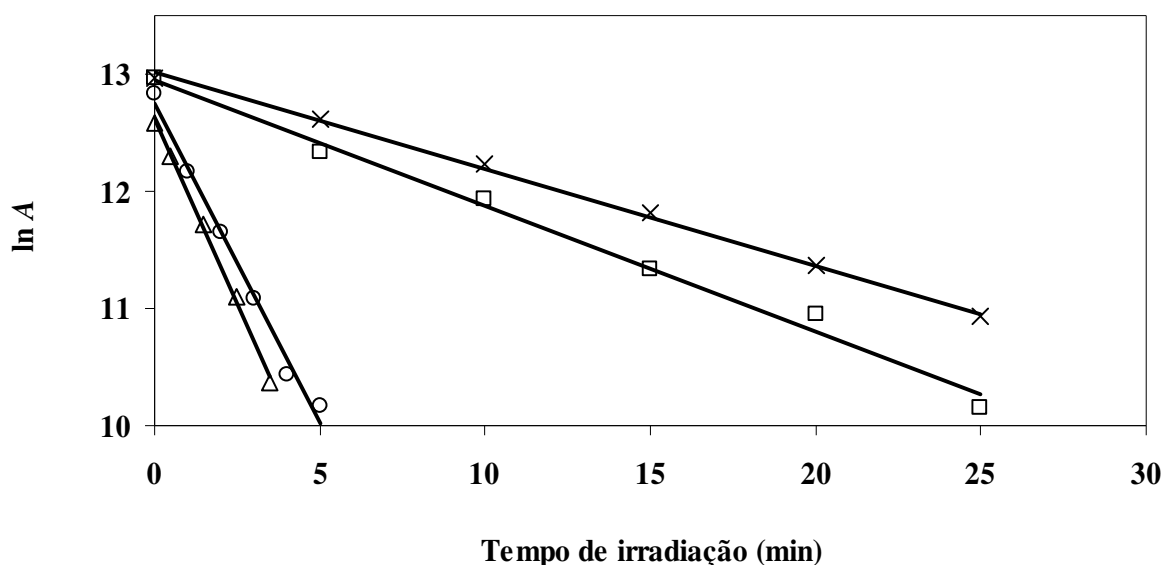


Figura 8. Traçado $\ln A$ versus tempo de irradiação para a fotólise dos conjugados **15** (Δ , a 254 nm; \circ , a 300 nm) e **16** (\square , a 254 nm; \times , a 300 nm), numa solução de metanol/HEPES (80:20).

As estruturas dos bioconjugados **15** e **16**, apenas diferem na unidade fotossensível. No entanto, verifica-se que a presença de um segundo anel heterocíclico no fluoróforo (anel de oxopirano) resulta num aumento significativo dos tempos de clivagem (cerca de 6 vezes a 254 nm e 7 vezes a 300 nm).

O uso de oxazoles como grupos protectores fotocliváveis não foi reportado até ao momento e os resultados obtidos neste trabalho são extremamente positivos.

Atendendo a estes factos e no sentido de entender o comportamento deste tipo de compostos e de aprofundar os resultados preliminares obtidos serão efectuados num futuro próximo mais estudos usando bioconjugados de outros aminoácidos neurotransmissores e novos fluoróforos poli(hetero)aromáticos de oxazole.

6. Conclusões e perspectivas futuras

Ao longo deste trabalho foram sintetizados e caracterizados estruturalmente pelos métodos habituais dois novos oxobenzobenzopiranos, designadamente o 4-(clorometil)-6-metoxi-2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopirano **1** com bom rendimento e num passo único e o 4-(hidroximetil)-6-metoxi-2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopirano **5**, através de vários passos de modificações sintéticas habituais.

Foram também sintetizados dois novos oxazoles funcionalizados, um naftoxazole, o 2-(bromometil)nafto[2,3-*d*]oxazole **6**, num passo único e o análogo *bis*-heterocíclico, o 2-(bromometil)-8-metil-6-oxo-6*H*-benzopirano[6,7-*d*]oxazole **8**, a partir do oxobenzopirano **7**, correspondente.

Os compostos poli(hetero)aromáticos **1**, **5**, **6** e **8**, foram usados na síntese eficiente de conjugados do tipo éster (**11a-d**, **15** e **16**) e uretano (**14a,b**), por reacção nos terminais ácido carboxílico e amina dos aminoácidos neurotransmissores excitatórios e inibitórios, tais como glicina, alanina, β -alanina e ácido γ -aminobutírico, protegidos com os grupos benziloxicarbonilo e éster metílico, ou na forma livre (no caso do **14b**).

A caracterização fotofísica dos bioconjugados foi efectuada em etanol e solução de metanol/tampão HEPES (80:20) e os resultados obtidos sugerem que os 2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopiranos **1**, **5**, e os oxazoles **6**, **8** são fluoróforos ou fluorogénios apropriados para a derivatização de moléculas não-fluorescentes, originando bioconjugados com rendimentos quânticos de fluorescência de moderados a elevados.

Os estudos de clivagem foto-induzida dos bioconjugados fluorescentes de oxobenzobenzopirano **11a-d**, **12a-c** e **14a,b**, em solução de metanol/tampão HEPES (80:20), a 254, 300 e 350 nm mostraram que a estrutura do neurotransmissor influencia o tempo de irradiação.

Apesar de ser possível encontrar um comprimento de onda de irradiação adequado para todos os conjugados de neurotransmissores, os aminoácidos alanina e GABA protegidos na função amina com o grupo benziloxicarbonilo (Z-Ala-OH e Z-GABA-OH), são os que surgem mais rapidamente em todos os comprimentos de onda testados.

Considerando os tempos de irradiação, a fotólise a 419 nm pode também ser usada nalguns dos compostos estudados.

De modo a restaurar a actividade biológica como neurotransmissor, conjugados possuindo apenas o aminoácido ligado ao grupo protector fotossensível **12a-c** (o grupo Z foi removido nos compostos **11a-c** originando os compostos **12a-c**), e **14b** foram irradiados a 350

nm, tendo-se verificado que os melhores resultados foram obtidos para a clivagem da β -alanina a partir do conjugado uretano.

Os estudos de fotoclivagem com os bioconjugados **15** e **16** dos derivados policíclicos de oxazoles revelaram que a clivagem pode ser efectuada a 300 nm, com tempos de irradiação curtos, que dependem da estrutura do fluoróforo, sendo o conjugado de naftoxazole **15** o que cliva mais depressa.

Apesar dos tempos de fotólise serem variáveis, foi possível verificar que ocorreu a clivagem quantitativa de todos os neurotransmissores estudados nas condições reaccionais usadas. Para além disso, os novos derivados de oxobenzobenzopirano **1** e **5** podem ser considerados um avanço relativamente aos heterociclos fundidos deste tipo já publicados. Os estudos iniciados neste trabalho com compostos de oxazole foram reveladores de uma nova alternativa no desenvolvimento de novos grupos protectores fotocliváveis que interessa explorar num futuro próximo.

CAPÍTULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

1. Procedimentos gerais

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H foram determinados nos aparelhos Varian Unity Plus numa frequência de 300 MHz para ^1H e 75,4 MHz para ^{13}C e Bruker Avance III 400 numa frequência de 400 MHz para ^1H e 100,6 MHz para ^{13}C , usando o pico de solvente como referência interna, a 25°C. Os solventes deuterados usados foram clorofórmio (Acros Organics), dimetilsulfóxido (DMSO- d_6) (Acros Organics), metanol- d_4 (Acros Organics) e D_2O (Aldrich) com grau de deuturação superior a 99,8%. As constantes de acoplamento são dadas em Hz. Na atribuição dos sinais de ^1H e ^{13}C recorreu-se a técnicas de correlação espectrocópica heteronuclear, bidimensional nomeadamente HMQC e HMBC.

Os espectros de infravermelho foram registados num espectrofotómetro BOMEM MB 104. As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr 1% ou usadas na forma de filme líquido.

Os espectros de ultravioleta/visível (200-700 nm) foram obtidos num espectrofotómetro Shimadzu UV/2501PC.

Os espectros de fluorescência foram registados num espectrofluorímetro FluoroMax-4, em soluções desgaseificadas por ultra-sons durante 30 minutos.

Os espectros de massa de alta resolução foram efectuados no “C.A.C.T.I.- Unidad de Espectrometria de Masas”, na Universidade de Vigo, Espanha.

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

Nas cromatografias “secas” utilizou-se Kieselgel Merck 60 (230-400 mesh). As cromatografias preparativas foram efectuadas em placas Merck de sílica gel com 2,0 mm de

espessura (Fertiplatten Kieselgel 60F₂₅₄) e reveladas no ultravioleta (λ_{max} 254 e 365 nm) numa câmara CN-6 de luz ultravioleta.

As análises por TLC foram efectuadas em placas Merck de sílica gel com 0,25 mm de espessura (Fertigplatten Kieselgel 60F₂₅₄) e os processos de revelação usados foram: (i) ultravioleta (λ_{max} 254 e 365 nm) na câmara referida anteriormente; (ii) exposição a vapores de iodo; (iii) pulverização com uma solução de ninidrina a 0,2% em acetona seguida de aquecimento a 105 °C.

As fotoclivagens foram efectuadas num reactor fotoquímico Rayonet RPR-100, equipado com dez lâmpadas de 254 (35W), 300 (21W), 350 (24W) e 419 (14W) \pm 10 nm.

As análises em HPLC foram efectuadas usando uma coluna Licrospher 100 RP18 (5 μm) num sistema constituído por uma bomba Jasco PU-980, detector de UV/visível Shimadzu SPD-GAV e um registador Shimadzu C-RGA Chromatopac.

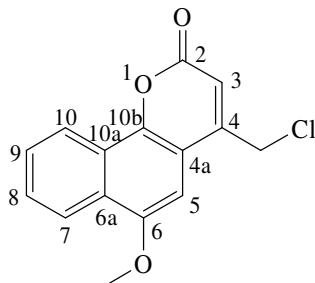
Os reagentes utilizados foram produtos *p.a.* ou para síntese das firmas Sigma-Aldrich, Fluka, Acros Organics e Senn Chemicals. O cloridrato do éster metílico da β -alanina existia no laboratório, tendo sido sintetizado a partir do respectivo aminoácido livre.

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

2. Síntese dos heterociclos de oxobenzopirano **1**, **5** e de oxazole **6**, **8**

2.1. Síntese dos 6-metoxi-2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopiranos **1** e **5**

[**1**] 4-(Clorometil)-6-metoxi-2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopirano



A uma solução de 4-metoxi-1-naftol (0,501 g, $2,88 \times 10^{-3}$ mol) em ácido sulfúrico aquoso a 70% (3 mL) adicionou-se com agitação, à temperatura ambiente, 4-cloroacetoacetato de etilo (0,6 mL, $4,36 \times 10^{-3}$ mol). A mistura reaccional foi mantida nestas condições durante 4 horas. Seguiu-se a reacção por TLC (acetato de etilo/*n*-hexano 6:4).

Deitou-se a mistura sobre gelo, deixando-se agitar durante 2 horas. Recolheu-se o precipitado verde formado por filtração, lavou-se o sólido com água fria e secou-se em estufa sob vácuo, à temperatura ambiente durante uma noite.

Após purificação por cromatografia “seca” (acetato de etilo/*n*-hexano, misturas de polaridade crescente), obteve-se o composto **1** na forma de um sólido verde.

η = 45% (0,358 g)

p.f. = 180,5-181,9 °C

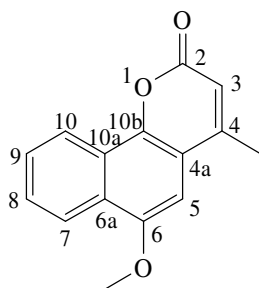
R_f = 0,69 (acetato de etilo/*n*-hexano 1:1)

IV (KBr 1%): ν_{\max} = 3427, 2934, 2850, 1709, 1601, 1565, 1508, 1476, 1466, 1422, 1388, 1274, 1251, 1175, 1163, 1143, 1110, 1077, 1028, 986, 949, 922, 884, 845, 730 cm^{-1} .

¹H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} = 4,07 (s, 3H, OCH_3), 4,73 (s, 2H, CH_2), 6,63 (t, J = 0,8 Hz, 1H, H-3), 6,84 (s, 1H, H-5), 7,64-7,72 (m, 2H, H-8 e H-9), 8,25-8,33 (m, 1H, H-7), 8,49-8,55 (m, 1H, H-10) ppm.

¹³C RMN (CDCl_3 , 100,6 MHz): δ_{C} = 41,92 (CH_2), 55,85 (OCH_3), 96,02 (C-5), 112,58 (C-4a), 115,27 (C-3), 122,27 (C-7), 122,45 (C-10), 124,03 (C-10a), 127,50 (C-6a), 127,94 (C-9), 128,55 (C-8), 146,11 (C-10b), 150,10 (C-4), 152,23 (C-6), 160,56 (C-2) ppm.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 274,0395. Valor calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_3^{35}\text{Cl}$: 274,0397. Valor obtido: M^+ , 276,0370. Valor calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_3^{37}\text{Cl}$: 276,0367.

[2] 6-Metoxi-4-metil-2-oxo-2H-benzo[h]benzopirano

A uma solução de 4-metoxi-1-naftol (0,612 g, $3,51 \times 10^{-3}$ mol) em ácido sulfúrico aquoso a 70% (6 mL) adicionou-se com agitação, à temperatura ambiente acetoacetato de etilo (1,4 mL, $1,1 \times 10^{-2}$ mol). A mistura reaccional foi mantida nestas condições durante 3 horas. Seguiu-se a reacção por TLC (acetato de etilo/*n*-hexano 4:6).

Deitou-se a mistura sobre gelo, deixando-se agitar durante 2 horas. Recolheu-se o precipitado rosa formado por filtração, lavou-se com água fria e secou-se em estufa sob vácuo, à temperatura ambiente durante uma noite.

Após purificação por cromatografia “seca” (acetato de etilo/*n*-hexano, misturas de polaridade crescente), obteve-se o composto **2** na forma de um sólido beje.

η = 15% (0,130 g)

p.f. = 131,1-133,4 °C

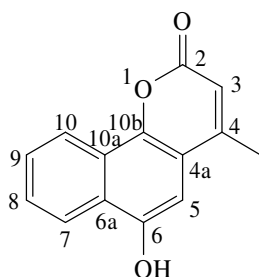
R_f = 0,65 (acetato de etilo/*n*-hexano 1:1)

IV (KBr 1%): ν_{\max} = 3417, 2926, 1725, 1610, 1596, 1564, 1506, 1469, 1453, 1429, 1386, 1384, 1272, 1248, 1234, 1208, 1176, 1151, 1110, 1083, 1032, 990, 944, 933, 873, 851, 815 cm^{-1} .

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ_{H} = 2,49 (s, 3H, CH_3), 4,04 (s, 3H, OCH_3), 6,35 (d, J = 1,2 Hz, 1H, H-3), 6,73 (s, 1H, H-5), 7,70-7,58 (m, 2H, H-8 e H-9), 8,20-8,28 (m, 1H, H-7), 8,46-8,53 (m, 1H, H-10) ppm.

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75,4 MHz): δ_{C} = 19,34 (CH_3), 55,70 (OCH_3), 96,55 (C-5), 114,46 (C-3), 114,94 (C-4a), 122,12 (C-7), 122,37 (C-10), 123,90 (C-10a), 127,22 (C-6a), 127,64 (C-9 ou C-8), 128,04 (C-8 ou C-9), 145,23 (C-10b), 151,93 (C-6), 153,17 (C-4), 161,13 (C-2) ppm.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 240,0791. Valor calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_3$: 240,0786.

[3] 6-Hidroxi-4-metil-2-oxo-2H-benzo[h]benzopirano

Na reacção anterior, para além do composto **2**, isolou-se também o composto **3** na forma de um sólido esverdeado.

$\eta = 12\%$ (0,095 g)

p.f. = 289,0-291,5 °C

$R_f = 0,35$ (acetato de etilo/*n*-hexano 1:1)

IV (KBr 1%): $\nu_{\max} = 3650-3186, 2956, 2925, 2854, 1680, 1598, 1563, 1482, 1422, 1403, 1384, 1372, 1348, 1296, 1274, 1259, 1236, 1206, 1176, 1148, 1094, 1078, 1020, 950, 881, 853, 781, 734, 665 \text{ cm}^{-1}$.

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz): $\delta_{\text{H}} = 2,49$ (s, 3H, CH₃), 6,45 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H, H-3), 7,00 (s, 1H, H-5), 7,63-7,73 (m, 2H, H-8 e H-9), 8,19 (dt, $J = 8,4$ e 1,6 Hz, 1H, H-7), 8,30 (dt, $J = 8,0$ e 1,6 Hz, 1H, H-10), 10,42 (s, 1H, OH) ppm.

¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 100,6 MHz): $\delta_{\text{C}} = 12,63$ (CH₃), 100,90 (C-5), 114,07 (C-3), 115,40 (C-4a), 121,49 (C-10), 122,45 (C-7), 123,19 (C-10a), 126,32 (C-6a), 127,59 (C-9 ou C-8), 127,61 (C-8 ou C-9), 143,10 (C-10b), 149,51 (C-6), 153,67 (C-4), 159,88 (C-2) ppm.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 226,0633. Valor calculado para C₁₄H₁₀O₃: 226,0630.

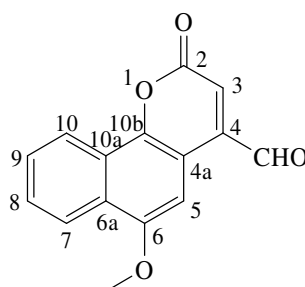
O composto **3** foi convertido no composto **2** por reacção de metilação nas condições descritas em seguida.

A uma solução de 6-hidroxi-4-metil-2-oxo-2H-benzo[h]benzopirano **3** (0,098 g, $4,35 \times 10^{-4}$ mol) em DMF seca (10 mL) adicionou-se carbonato de potássio (0,064 g, $4,65 \times 10^{-4}$ mol) e iodeto de metilo (0,029 mL, $4,59 \times 10^{-4}$ mol), gota-a-gota, com agitação. A mistura reaccional foi refluxada, em atmosfera de azoto, durante 4 horas. Seguiu-se a reacção por TLC (acetato de etilo/*n*-hexano 4:6).

À mistura reaccional adicionou-se água (5 mL) e extraiu-se com acetato de etilo (4×10 mL). A fase orgânica lavou-se com solução aquosa saturada de cloreto de sódio,

secou-se (MgSO_4 anidro) e após evaporação do solvente obteve-se o composto **2**, sob a forma de um sólido castanho escuro (0,072 g, 70%). Os dados espectroscópicos eram comparáveis aos dados obtidos por reacção de Pechmann a partir do 4-metoxi-1-naftol, anteriormente referidos e confirmaram a estrutura esperada.

[4] 6-Metoxi-2-oxo-2H-benzo[h]benzopiran-4-carbaldeído



A uma solução de 6-metoxi-4-metil-2-oxo-2H-benzo[h]benzopirano **2**, (0,108 g, $4,50 \times 10^{-4}$ mol) em clorobenzeno (5 mL) adicionou-se dióxido de selénio (0,299 g, $3,70 \times 10^{-3}$ mol) e refluxou-se durante 36 horas. Seguiu-se a reacção por TLC (acetato de etilo/*n*-hexano 6:4).

Filtrou-se a mistura a quente, evaporou-se o solvente e purificou-se por cromatografia “seca” (acetato de etilo/*n*-hexano, misturas de polaridade crescente). O composto **4** surgiu como um sólido laranja.

η = 79% (0,090 g)

p.f. = 222,5-224,8 °C

R_f = 0,69 (clorofórmio/metanol 9,5:0,5)

IV (KBr 1%): ν_{\max} = 3430, 3066, 2962, 2926, 2850, 1731, 1712, 1630, 1594, 1561, 1504, 1472, 1450, 1418, 1381, 1272, 1247, 1183, 1138, 1110, 1083, 1028, 985, 928, 893, 867, 855, 775 cm^{-1} .

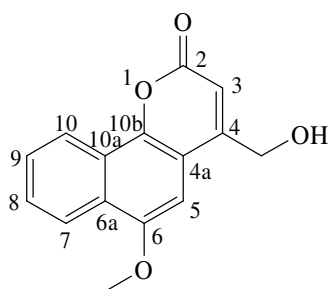
^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} = 4,08 (s, 3H, OCH_3), 6,94 (s, 1H, H-5), 7,65-7,72 (m, 2H, H-8 e H-9), 7,89 (s, 1H, H-3), 8,25-8,32 (m, 1H, H-7), 8,48-8,54 (m, 1H, H-10), 10,16 (s, 1H, CHO) ppm.

^{13}C RMN (CDCl_3 , 100,6 MHz): δ_{C} = 55,86 (OCH_3), 97,28 (C-3), 110,48 (C-4a), 122,27 (C-10), 122,40 (C-7), 123,51 (C-10a), 125,19 (C-5), 127,62 (C-6a), 127,87 (C-9), 128,92 (C-8), 144,19 (C-10b), 147,09 (C-6), 152,66 (C-4), 160,51 (C-2), 192,13 (CHO) ppm.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 254,0589. Valor calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$: 254,0579.

Na mesma reacção, para além do composto **4**, isolou-se também o 4-(hidroximetil)-6-metoxi-2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopirano **5** na forma de um sólido amarelo claro (0,011 g, 10%). Os dados espectroscópicos são comparáveis aos obtidos por reacção de redução, a partir do composto **4**, e confirmam a estrutura esperada.

[5] 4-(Hidroximetil)-6-metoxi-2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopirano



Dissolveu-se o 6-metoxi-2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopiran-4-carbaldeído **4** (0,098 g, $3,85 \times 10^{-4}$ mol) em clorofórmio (7 mL) e adicionou-se etanol (15 mL). Arrefeceu-se a solução (banho de gelo) e adicionou-se, com agitação, gota-a-gota, durante 30 minutos, boroidreto de sódio (0,016 g, $4,28 \times 10^{-4}$ mol) suspenso em etanol (2 mL). A mistura reaccional manteve-se nestas condições durante 30 minutos e à temperatura ambiente durante 3 dias. Seguiu-se a reacção por TLC (acetato de etilo/*n*-hexano 7:3).

Após evaporação do solvente purificou-se o resíduo por cromatografia “seca” (acetato de etilo/*n*-hexano, misturas de polaridade crescente). O composto **5** foi obtido na forma de um sólido amarelo claro.

$$\eta = 47\% (0,046 \text{ g})$$

$$\text{p.f.} = 219,1\text{-}220,7 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$R_f = 0,60 \text{ (acetato de etilo/}n\text{-hexano 7:3)}$$

IV (KBr 1%): $\nu_{\text{max}} = 3410, 2924, 2853, 1707, 1602, 1567, 1506, 1474, 1451, 1422, 1384, 1355, 1315, 1275, 1250, 1143, 1117, 1097, 1061, 987, 950, 856, 762, 736, 666 \text{ cm}^{-1}$

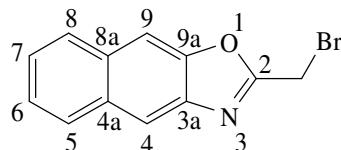
¹H RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz): $\delta_{\text{H}} = 4,02$ (s, 3H, OCH₃), 4,86 (dd, $J = 4,2$ e 1,2 Hz, 2H, CH₂), 5,73 (t, $J = 4,2$ Hz, 1H, OH), 6,55 (t, $J = 1,2$ Hz, 1H, H-3), 6,93 (s, 1H, H-5), 7,67-7,75 (m, 2H, H-8 e H-9), 8,19 (dd, $J = 8,0$ e 1,5 Hz, 1H, H-7), 8,32 (dd, $J = 7,6$ e 1,6 Hz, 1H, H-10) ppm.

^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100,6 MHz): δ_{C} = 56,01 (OCH₃), 59,58 (CH₂), 97,12 (C-5), 110,22 (C-3), 112,78 (C-4a), 121,60 (C-10), 121,90 (C-7), 123,03 (C-10a), 126,28 (C-6a), 127,92 (C-9), 128,23 (C-8), 144,17 (C-10b), 151,08 (C-6), 157,37 (C-4), 160,12 (C-2) ppm.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 256,0745. Valor calculado para C₁₅H₁₂O₄: 256,0736.

2.2. Síntese dos oxazoles 6 e 8

[6] 2-(Bromometil)nafto[2,3-*d*]oxazole



A uma mistura de 3-amino-2-naftol (0,300 g, $1,88 \times 10^{-3}$ mol) em ácido polifosfórico (1,88 g), adicionou-se, com agitação, à temperatura ambiente, ácido bromoacético (0,262 g, $1,88 \times 10^{-3}$ mol). Aqueceu-se a mistura reaccional a 130 °C (banho de óleo), mantendo a agitação, durante 4 horas. Seguiu-se a reacção por TLC (acetato de etilo/*n*-hexano 1:1).

Por adição de água fria à mistura reaccional precipitou um sólido verde que foi recolhido por filtração e seco em estufa sob vácuo, à temperatura ambiente, durante uma noite. Após purificação por cromatografia “seca” (acetato de etilo/*n*-hexano, misturas de polaridade) obteve-se o composto **6** na forma de um sólido rosa claro.

η = 13% (0,062 g)

p.f. = 133,1-133,9 °C

R_f = 0,98 (acetato de etilo/*n*-hexano 1:1)

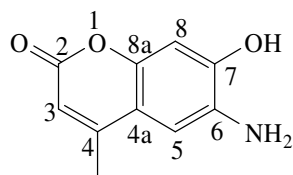
IV (KBr 1%): ν_{max} = 3395, 3355, 3166, 1659, 1622, 1604, 1590, 1547, 1485, 1455, 1420, 1357, 1250, 1233, 1218, 1158, 1019, 971, 879, 864, 747, 715, 666 cm^{-1} .

^1H RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ_{H} = 4,63 (s, 2H, CH₂), 7,48-7,58 (m, 2H, H-6 e H-7), 7,94 (s, 1H, H-9), 7,96 (dd, J = 6,8 e 2,7 Hz, 1H, H-8), 8,01 (dd, J = 6,9 e 2,7 Hz, 1H, H-5), 8,19 (s, 1H, H-4) ppm.

^{13}C RMN (CDCl₃, 75,4 MHz): δ_{C} = 20,62 (CH₂), 106,78 (C-9), 118,17 (C-4), 124,96 (C-7), 125,94 (C-6), 127,95 (C-8), 128,61 (C-5), 131,38 (C-8a), 131,99 (C-4a), 140,81 (C-3a), 149,80 (C-9a), 163,25 (C-2) ppm.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 260,9786. Valor calculado para C₁₂H₈NO⁷⁹Br: 260,9789.

Valor obtido: M^+ , 262,9767. Valor calculado para C₁₂H₈NO⁸¹Br: 262,9769.

[7] 6-Amino-7-hidroxi-4-metil-2-oxo-2H-benzopirano

A uma suspensão de 4-aminobenzeno-1,3-diol (0,040 g, $2,48 \times 10^{-4}$ mol) em ácido sulfúrico aquoso a 70% (2 mL) adicionou-se, com agitação, acetoacetato de etilo (0,1 mL, $7,44 \times 10^{-4}$ mol). A mistura reaccional foi mantida nestas condições durante um dia. Seguiu-se a reacção por TLC (acetato de etilo/*n*-hexano 1:1).

Adicionou-se água fria à mistura reaccional e o precipitado cinzento que se formou foi recolhido por filtração e seco em estufa sob vácuo, à temperatura ambiente, durante uma noite. O composto **7** obteve-se na forma de um sólido branco.

$\eta = 99\%$ (0,047 g)

p.f. = 243,6-244,2 °C

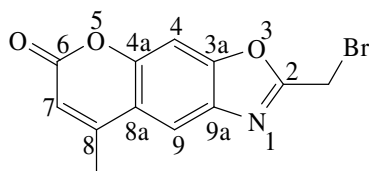
Rf = 0,88 (acetato de etilo/*n*-hexano 1:1)

IV (KBr 1%): $\nu_{\max} = 3646, 3390, 3065, 2928, 2623, 1731, 1639, 1622, 1577, 1537, 1515, 1454, 1395, 1370, 1353, 1281, 1251, 1233, 1215, 1174, 1139, 1120, 1060, 976, 929, 892, 854, 745, 708, 686, 666 \text{ cm}^{-1}$.

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 300 MHz): $\delta_{\text{H}} = 2,32$ (d, $J = 1,2$ Hz, 3H, CH₃), 6,15 (d, $J = 1,2$ Hz, 1H, H-3), 6,78 (s, 1H, H-8), 7,24 (s, 1H, H-5) ppm.

¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 75,4 MHz): $\delta_{\text{C}} = 18,15$ (CH₃), 102,21 (C-8), 110,89 (C-3), 111,92 (C-4a), 113,64 (C-5), 125,79 (C-6), 149,92 (C-8a), 151,41 (C-7), 152,98 (C-4), 160,30 (C-2) ppm.

m/z (EI) Valor obtido: M⁺, 191,0589. Valor calculado para C₁₂H₉NO₃: 191,0582.

[8] 2-(Bromometil)-8-metil-6-oxo-6H-benzopirano[6,7-*d*]oxazole

A uma mistura de 6-amino-7-hidroxi-4-metil-2-oxo-2H-benzopirano **7** (0,100 g, $5,24 \times 10^{-4}$ mol) em ácido polifosfórico (0,524 g), adicionou-se, com agitação, à temperatura ambiente, ácido bromoacético (0,109 g, $7,85 \times 10^{-4}$ mol). Aqueceu-se a mistura reaccional a

130 °C (banho de óleo), mantendo a agitação, durante 5h30min. Seguiu-se a reacção por TLC (acetato de etilo/*n*-hexano 1:1).

Por adição de água fria à mistura reaccional precipitou um sólido bege que foi recolhido por filtração e seco em estufa, sob vácuo, à temperatura ambiente, durante uma noite. Após purificação por cromatografia “seca” (acetato de etilo/*n*-hexano, misturas de polaridade crescente), obteve-se o composto **8** na forma de um sólido branco.

$$\eta = 23\% (0,036 \text{ g})$$

$$\text{p.f.} = 220,1\text{-}221,4 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$R_f = 0,94 \text{ (acetato de etilo/}n\text{-hexano 1:1)}$$

IV (KBr 1%): $\nu_{\text{max}} = 3400, 3083, 3029, 2969, 2924, 2854, 1739, 1698, 1635, 1598, 1571, 1470, 1438, 1386, 1349, 1297, 1265, 1227, 1208, 1139, 1055, 1037, 945, 931, 894, 878, 864, 816, 754, 742, 698, 666 \text{ cm}^{-1}$.

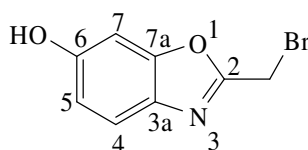
¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz): $\delta_{\text{H}} = 2,53 \text{ (d, } J = 1,2 \text{ Hz, 3H, CH}_3\text{)}, 4,60 \text{ (s, 2H, CH}_2\text{)}, 6,34 \text{ (d, } J = 1,2 \text{ Hz, 1H, H-7)}, 7,52 \text{ (s, 1H, H-4)}, 7,96 \text{ (s, 1H, H-9)}$ ppm.

¹³C RMN (CDCl₃, 75,4 MHz): $\delta_{\text{C}} = 19,22 \text{ (CH}_3\text{)}, 20,03 \text{ (CH}_2\text{)}, 99,68 \text{ (C-4)}, 114,35 \text{ (C-7)}, 115,78 \text{ (C-9)}, 118,08 \text{ (C-8a)}, 137,98 \text{ (C-9a)}, 152,24 \text{ (C-4a)}, 152,31 \text{ (C-8)}, 152,57 \text{ (C-3a)}, 160,31 \text{ (C-6)}, 162,73 \text{ (C-2)}$ ppm.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 292,9691. Valor calculado para C₁₂H₈NO₃⁷⁹Br: 292,9688.

Valor obtido: M^+ , 294,9679. Valor calculado para C₁₂H₈NO₃⁸¹Br: 294,9667.

[9] 2-(Bromometil)benzo[*d*]oxazol-6-ol



A uma mistura de 4-aminobenzeno-1,3-diol (0,105 g, $6,53 \times 10^{-4}$ mol) em ácido polifosfórico (0,694 g) adicionou-se, com agitação, à temperatura ambiente, ácido bromoacético (0,091 g, $6,53 \times 10^{-4}$ mol). Aqueceu-se a mistura reaccional a 130 °C (banho de óleo), durante 4 horas. Seguiu-se a reacção por TLC (acetato de etilo/*n*-hexano 8:2).

Adicionou-se água fria à mistura reaccional, extraiu-se a fase orgânica com clorofórmio e secou-se (MgSO₄ anidro). Após evaporação do solvente, obteve-se o composto **9** na forma de um sólido castanho.

$\eta = 7,2\%$ (0,010 g)

p.f. = 153,8-154,8 °C

$R_f = 0,86$ (acetato de etilo/*n*-hexano 8:2)

IV (KBr 1%): $\nu_{\max} = 3380, 2963, 2926, 2853, 2786, 2693, 2626, 2551, 1627, 1613, 1567, 1490, 1420, 1402, 1326, 1316, 1262, 1235, 1138, 1111, 1023, 980, 949, 887, 856, 840, 803, 703, 666, 634 \text{ cm}^{-1}$.

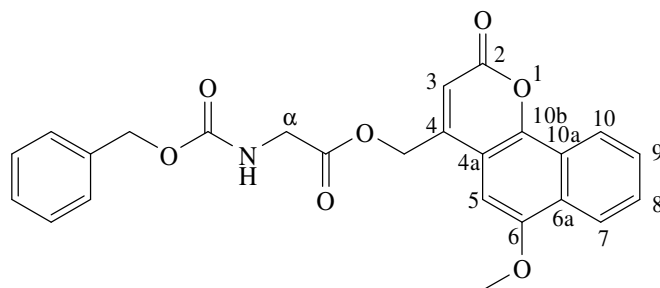
$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta_{\text{H}} = 4,56$ (s, 2H, CH_2), 6,90 (dd, $J = 8,6$ e $2,0$ Hz, 1H, H-5), 7,03 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H-7), 7,53 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, H-4) ppm.

$^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3 , 100,6 MHz): $\delta_{\text{C}} = 20,88$ (CH_2), 97,74 (C-7), 113,83 (C-5), 120,45 (C-4), 134,36 (C-3a), 152,08 (C-7a), 155,68 (C-6), 159,67 (C-2) ppm.

3. Síntese dos bioconjugados de oxobenzopirano e oxazole 11a-d, 12a-c, 14a,b, 15 e 16

3.1. Síntese dos bioconjugados de oxobenzopirano 11a-d, 12a-c e 14a,b

[11a] Éster (6-metoxi-2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopirano-4-il)metílico da *N*-(benziloxicarbonil)-glicina, *Z*-Gly-OFlu



A uma solução de 4-(clorometil)-6-metoxi-2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopirano **1** (0,063 g, $2,30 \times 10^{-4}$ mol) em DMF seca (2 mL), adicionou-se, com agitação, à temperatura ambiente, fluoreto de potássio (0,040 g, $6,85 \times 10^{-3}$ mol) e *N*-(benziloxicarbonil)-glicina (*Z*-Gly-OH) **10a** (0,054 g, $1,21 \times 10^{-4}$ mol). A mistura reaccional foi mantida nestas condições durante um dia. Seguiu-se a reacção por TLC (acetato de etilo/éter de petróleo 4:6).

Evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo por cromatografia “seca” (acetato de etilo/éter de petróleo, misturas de polaridade crescente). O composto **11a** foi obtido na forma de um sólido amarelo.

$\eta = 53\%$ (0,054 g)

p.f. = 173,5-175,1 °C

$R_f = 0,48$ (acetato de etilo/éter de petróleo 4:6)

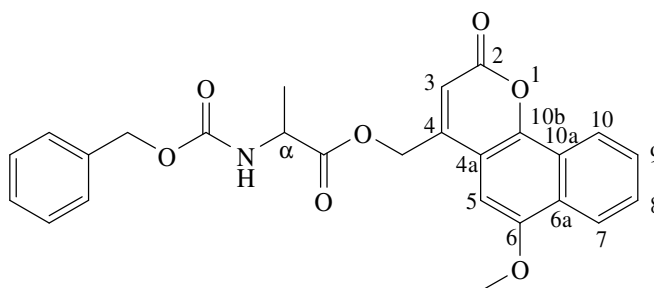
IV (KBr 1%): $\nu_{\max} = 3315, 2925, 1735, 1687, 1600, 1538, 1475, 1455, 1422, 1386, 1291, 1197, 1110, 1085, 1060, 989, 750 \text{ cm}^{-1}$.

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta_{\text{H}} = 4,04$ (s, 3H, OCH_3), 4,16 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H, CH_2 Gly), 5,16 (s, 2H, CH_2 Z), 5,34 (s alargado, 1H, α -NH Gly), 5,43 (s, 2H, CH_2), 6,56 (s, 1H, H-3), 6,61 (s, 1H, H-5), 7,28-7,40 (m, 5H, $5 \times \text{Ar-H}$ Z), 7,64-7,72 (m, 2H, H-8 e H-9), 8,25-8,30 (m, 1H, H-7), 8,48-8,54 (m, 1H, H-10) ppm.

^{13}C RMN (CDCl_3 , 100,6 MHz): $\delta_{\text{C}} = 42,80$ (CH_2 Gly), 55,90 (OCH_3), 62,37 (CH_2), 67,35 (CH_2 Z), 95,17 (C-5), 112,05 (C-4a), 112,95 (C-3), 122,27 (C-7), 122,41 (C-10), 123,97 (C-10a), 127,41 (C-6a), 127,99 (C-9 e Ar-C), 128,15 (Ar-C), 128,28 (Ar-C), 128,52 (Ar-C), 128,55 (C-8 e Ar-C), 135,99 (Ar-C), 145,79 (C-10b), 148,86 (C-4), 152,38 (C-6), 156,32 (C=O uretano), 160,55 (C-2), 169,47 (C=O éster) ppm.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 448,13908. Valor calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{NO}_7$: 448,14095.

[11b] Éster (6-metoxi-2-oxo-2H-benzo[h]benzopirano-4-il)metílico da N-(benziloxicarbonil)-L-alanina, Z-Ala-OFlu



Partiu-se de 4-(clorometil)-6-metoxi-2-oxo-2H-benzo[h]benzopirano **1** (0,070 g, $2,55 \times 10^{-4}$ mol), usou-se DMF seca (3 mL), fluoreto de potássio (0,045 g, $7,75 \times 10^{-4}$ mol) e N-(benziloxicarbonil)-L-alanina (Z-Ala-OH) **10b** (0,058 g, $2,59 \times 10^{-4}$ mol), e procedeu-se de um modo semelhante ao descrito na preparação do conjugado **11a**. Tempo de reacção um dia.

Isolou-se o composto **11b** na forma de um sólido amarelo.

$\eta = 86\%$ (0,101 g)

p.f. = 153,3-154,7 °C

$R_f = 0,87$ (acetato de etilo/n-hexano 1:1)

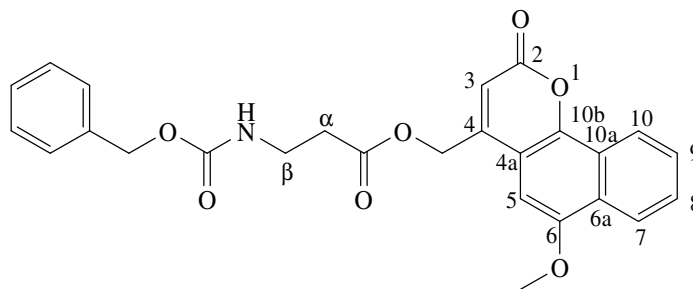
IV (KBr 1%): ν_{\max} = 3312, 2928, 1758, 1714, 1598, 1566, 1551, 1506, 1473, 1455, 1422, 1387, 1345, 1311, 1276, 1252, 1211, 1178, 1161, 1116, 1085, 1073, 1030, 986, 959, 856, 815 cm^{-1}

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} = 1,53 (d, J = 7,2 Hz, 3H, β - CH_3 Ala), 4,00 (s, 3H, OCH_3), 4,49-4,59 (m, 1H, α -CH Ala), 5,07-5,17 (m, 2H, CH_2 Z), 5,28-5,47 (m, 3H, CH_2 e α -NH Ala), 6,52 (s, 1H, H-3), 6,53 (s, 1H, H-5), 7,25-7,40 (m, 5H, $5 \times$ Ar-H Z), 7,60-7,70 (m, 2H, H-8 e H-9), 8,23 (d, J = 9,2 Hz, 1H, H-7), 8,45 (d, J = 9,2 Hz, 1H, H-10) ppm.

^{13}C RMN (CDCl_3 , 100,6 MHz): δ_{C} = 18,23 (β - CH_3 Ala), 49,77 (α -CH Ala), 55,79 (OCH_3), 62,36 (CH_2), 67,09 (CH_2 Z), 95,11 (C-5), 111,98 (C-4a), 112,78 (C-3), 122,21 (C-10), 122,27 (C-7), 123,83 (C-10a), 127,27 (C-6a), 127,88 (C-9 e Ar-C), 128,09 (Ar-C), 128,18 (C-8 e Ar-C), 128,40 (Ar-C), 128,48 (Ar-C), 136,02 (Ar-C), 145,59 (C-10b), 148,94 (C-4), 152,20 (C-6), 155,67 (C=O uretano), 160,47 (C-2), 172,37 (C=O éster) ppm.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 462,15473. Valor calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{NO}_7$: 462,15467.

[11c] Éster (6-metoxi-2-oxo-2H-benzo[h]benzopirano-4-il)metílico da N-(benziloxicarbonil)- β -alanina, Z- β -Ala-OFlu



Partiu-se de 4-(clorometil)-6-metoxi-2-oxo-2H-benzo[h]benzopirano **1** (0,087 g, $3,16 \times 10^{-4}$ mol), usou-se DMF seca (2 mL), fluoreto de potássio (0,055 g, $9,49 \times 10^{-4}$ mol) e N-(benziloxicarbonil)- β -alanina (Z- β -Ala-OH) **10c**, (0,074 g, $3,29 \times 10^{-4}$ mol), e procedeu-se de um modo semelhante ao descrito na preparação do conjugado **11a**. Tempo de reacção 3 dias.

Isolou-se o composto **11c** na forma de um sólido amarelo.

η = 70% (0,099 g)

p.f. = 119,9-122,6 $^{\circ}\text{C}$

R_f = 0,64 (acetato de etilo/*n*-hexano 1:1)

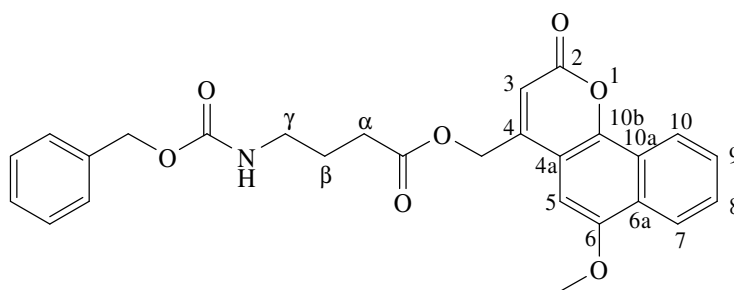
IV (KBr 1%): ν_{\max} = 3346, 2936, 1721, 1643, 1614, 1599, 1565, 1529, 1507, 1474, 1455, 1422, 1385, 1312, 1274, 1249, 1170, 1143, 1112, 1087, 1029, 989, 951, 860, 770 cm^{-1} .

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): $\delta_{\text{H}} = 2,74$ (t, $J = 6,0$ Hz, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$ $\beta\text{-Ala}$), 3,56 (q, $J = 6,0$ Hz, 2H, $\beta\text{-CH}_2$ $\beta\text{-Ala}$), 3,94 (s, 3H, OCH_3), 5,10 (s, 2H, CH_2 Z), 5,26 (s, 2H, CH_2), 5,41 (s alargado, 1H, NH $\beta\text{-Ala}$), 6,44 (s, 1H, H-3), 6,46 (s, 1H, H-5), 7,24-7,38 (m, 5H, $5 \times$ Ar-H Z), 7,56-7,66 (m, 2H, H-8 e H-9), 8,12-8,20, (m, 1H, H-7), 8,34-8,42 (m, 1H, H-10) ppm.

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75,4 MHz): $\delta_{\text{C}} = 34,34$ ($\alpha\text{-CH}_2$ $\beta\text{-Ala}$), 36,46 ($\beta\text{-CH}_2$ $\beta\text{-Ala}$), 55,68 (OCH_3), 61,55 (CH_2), 66,71 (CH_2 Z), 94,90 (C-5), 111,85 (C-4a), 112,25 (C-3), 122,11 (C-7 e C-10), 123,66 (C-10a), 127,09 (C-6a), 127,77 (Ar-C), 128,00 (C-9), 128,05 (C-8), 128,27 ($2 \times$ Ar-C), 128,41 ($2 \times$ Ar-C), 136,26 (Ar-C), 145,36 (C-10b), 149,20 (C-4), 152,02 (C-6), 156,23 (C=O uretano), 160,45 (C-2), 171,42 (C=O éster) ppm.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 462,15473. Valor calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{NO}_7$: 462,15600.

[11d] N-(Benziloxicarbonil)- γ -butanoato de (6-metoxi-2-oxo-2H-benzo[h]benzopiran-4-il)metílico, Z-GABA-OFlu



Partiu-se de 4-(clorometil)-6-metoxi-2-oxo-2H-benzo[h]benzopirano **1** (0,097 g, $3,55 \times 10^{-4}$ mol), usou-se DMF seca (3 mL), fluoreto de potássio (0,065 g, $1,12 \times 10^{-3}$ mol) e ácido *N*-(benziloxicarbonil)- γ -butírico (Z-GABA-OH) **10d** (0,087g, $3,67 \times 10^{-4}$ mol), e procedeu-se de um modo semelhante ao descrito na preparação do conjugado **11a**. Tempo de reacção 3 dias.

Isolou-se o composto **11d** na forma de um sólido amarelo.

$\eta = 56\%$ (0,095 g)

p.f. = 144,5-146,4 °C

$R_f = 0,74$ (acetato de etilo/éter de petróleo 1:1)

IV (KBr 1%): $\nu_{\text{max}} = 3310, 2927, 1737, 1715, 1692, 1652, 1565, 1556, 1505, 1455, 1385, 1321, 1266, 1249, 1174, 1137, 1110, 1083, 1030, 945, 828, 772, 737, 665 \text{ cm}^{-1}$.

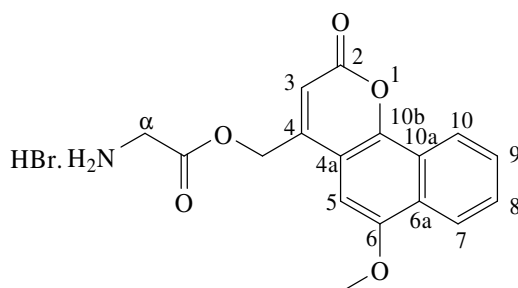
^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta_{\text{H}} = 1,84\text{-}2,0$ (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$ GABA), 2,56 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$ GABA), 3,30 e 3,33 ($2 \times$ d, $J = 6,4$ e 6,8 Hz, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$ GABA),

4,01 (s, 3H, OCH₃), 4,96 (s alargado, 1H, NH GABA), 5,10 (s, 2H, CH₂ Z), 5,34 (s, 2H, CH₂), 6,55 (s, 1H, H-3), 6,58 (s, 1H, H-5), 7,28-7,38 (m, 5H, 5 × Ar-H Z), 7,62-7,70 (m, 2H, H-8 e H-9), 8,26 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, H-7), 8,49 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, H-10) ppm.

¹³C RMN (CDCl₃, 100,6 MHz): $\delta_C = 25,17$ (β -CH₂ GABA), 31,16 (α -CH₂ GABA), 40,22 (γ -CH₂ GABA), 55,85 (OCH₃), 61,51 (CH₂), 66,72 (CH₂ Z), 95,15 (C-5), 112,08 (C-4a), 112,36 (C-3), 122,22 (C-7), 122,34 (C-10), 123,92 (C-10a), 127,31 (C-6a), 127,91 (Ar-C), 128,05 (Ar-C), 128,09 (C-9 e Ar-C), 128,40 (Ar-C), 128,47 (C-8 e Ar-C), 136,41 (Ar-C), 145,63 (C-10b), 149,58 (C-4), 152,24 (C-6), 156,45 (C=O uretano), 160,68 (C-2), 172,36 (C=O éster) ppm.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 476,1704. Valor calculado para C₂₇H₂₆NO₇: 476,1717.

[12a] Bromidrato do éster (6-metoxi-2-oxo-2H-benzo[h]benzopiran-4-il)metílico da glicina, H-Gly-OFlu



Adicionou-se, com agitação, à temperatura ambiente, uma solução de ácido bromídrico em ácido acético a 45% (20 μ L) e ácido acético glacial (1 mL) ao Z-Gly-OFlu **11a** (0,025 g, $5,59 \times 10^{-5}$ mol). A mistura reaccional foi mantida nestas condições durante três dias e o processo foi seguido por TLC (acetato de etilo/*n*-hexano 6:4). Durante este tempo foi adicionada mais solução de ácido bromídrico em ácido acético em pequenas fracções até ao volume total de 110 μ L.

Por adição de éter dietílico (0,5 mL) à mistura reaccional formou-se um precipitado que se filtrou e lavou com o mesmo solvente. O composto **12a** surgiu na forma de um sólido amarelo claro.

$\eta = 18\%$ (0,004 g)

p.f. = 194,8-195,9 °C

$R_f = 0,54$ (acetato de etilo/metanol 4:3)

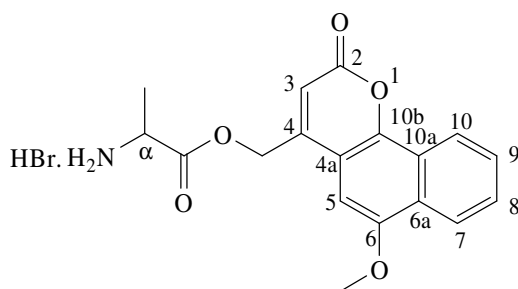
IV (KBr 1%): ν_{\max} = 3515, 3414, 2992, 2926, 2719, 2651, 1729, 1596, 1567, 1505, 1475, 1453, 1423, 1387, 1317, 1276, 1253, 1172, 1143, 1111, 1086, 1061, 985, 963, 923, 871, 840, 733, 666 cm^{-1} .

$^1\text{H RMN}$ (CD_3OD , 400 MHz): δ_{H} = 4,13 (s, 5H, $\alpha\text{-CH}_2$ Gly e OCH_3), 5,74 (s, 2H, CH_2), 6,66 (s, 1H, H-3), 6,95 (s, 1H, H-5), 7,70-7,80 (m, 2H, H-8 e H-9), 8,31-8,37 (m, 1H, H-7), 8,46-8,51 (m, 1H, H-10) ppm.

$^{13}\text{C RMN}$ (CD_3OD , 100,6 MHz): δ_{C} = 41,07 ($\alpha\text{-CH}_2$ Gly), 56,60 (OCH_3), 64,28 (CH_2), 97,09 (C-5), 113,03 (C-3), 113,72 (C-4a), 122,94 (C-10), 123,45 (C-7), 125,08 (C-10a), 128,82 (C-6a), 129,23 (C-9), 129,73 (C-8), 146,65 (C-10b), 151,92 (C-4), 153,84 (C-6), 162,66 (C-2), 168,32 (C=O éster) ppm.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 313,09504. Valor calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_5$: 313,09505.

[12b] Bromidrato do éster (6-metoxi-2-oxo-2H-benzo[h]benzopirano-4-il)metílico da L-alanina, H-Ala-OFlu



Partiu-se do *Z*-Ala-OFlu **11b** (0,035 g, $7,59 \times 10^{-5}$ mol), usou-se uma solução de ácido bromídrico em ácido acético a 45% (130 μL , volume total) e procedeu-se de modo semelhante ao descrito na remoção do grupo *N*-benziloxicarbonilo do conjugado **11a**. Isolou-se o composto **12b** na forma de um sólido amarelo claro.

η = 71% (0,022 g)

p.f. = 198,2-198,8 $^{\circ}\text{C}$

R_f = 0,74 (acetato de etilo/metanol 4:3)

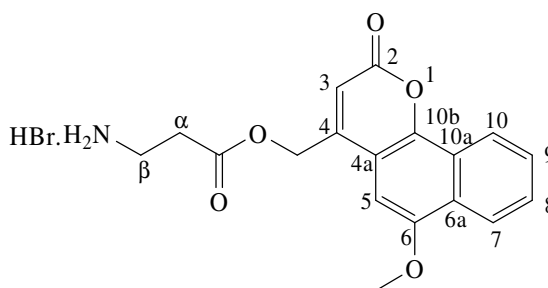
IV (KBr, 1%): ν_{\max} = 3426, 2924, 1727, 1698, 1638, 1613, 1597, 1566, 1505, 1474, 1453, 1423, 1386, 1315, 1274, 1249, 1204, 1176, 1145, 1111, 1085, 1031, 987, 960, 857, 815, 787, 733, 666 cm^{-1} .

$^1\text{H RMN}$ (CD_3OD , 400 MHz): $\delta_{\text{H}} = 1,70$ (d, $J = 7,2$ Hz, 3H, $\beta\text{-CH}_3$ Ala), 4,11 (s, 3H, OCH_3), 4,40-4,50 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$ Ala), 5,70 (s, 2H, CH_2), 6,61 (s, 1H, H-3), 6,90 (s, 1H, H-5), 7,70-7,78 (m, 2H, H-8 e H-9), 8,28-8,34 (m, 1H, H-7), 8,42-8,47 (m, 1H, H-10) ppm.

$^{13}\text{C RMN}$ (CD_3OD , 100,6 MHz): $\delta_{\text{C}} = 16,29$ ($\beta\text{-CH}_3$ Ala), 49,90 ($\alpha\text{-CH}$ Ala), 56,90 (OCH_3), 64,53 (CH_2), 97,06 (C-5), 113,14 (C-3), 113,68 (C-4a), 122,91 (C-10), 123,44 (C-7), 125,01 (C-10a), 128,77 (C-6a), 129,22 (C-9), 129,72 (C-8), 146,62 (C-10b), 151,80 (C-4), 153,78 (C-6), 162,59 (C-2), 170,67 (C=O éster) ppm.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 327,11072. Valor calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_5$: 327,11071.

[12c] Bromidrato do éster (6-metoxi-2-oxo-2H-benzo[h]benzopirran-4-il)metílico da β -alanina, H- β -Ala-OFlu



Partiu-se do Z- β -Ala-OFlu **11c** (0,040 g, $8,67 \times 10^{-5}$ mol), usou-se uma solução de ácido bromídrico em ácido acético a 45% (60 μL , volume total) e procedeu-se de modo semelhante ao descrito na remoção do grupo *N*-benziloxicarbonilo do conjugado **11a**. Isolou-se o composto **12c** na forma de um sólido amarelo claro.

$\eta = 45\%$ (0,016 g)

p.f. = 204,3-205,4 $^{\circ}\text{C}$

$R_f = 0,26$ (acetato de etilo/metanol 4:3)

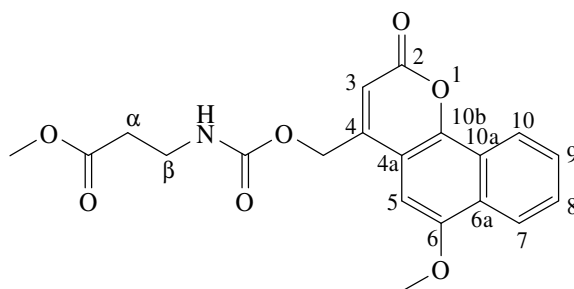
IV (KBr 1%): $\nu_{\text{max}} = 3437, 3010, 2923, 1741, 1699, 1631, 1607, 1592, 1565, 1504, 1473, 1444, 1422, 1383, 1336, 1312, 1275, 1251, 1197, 1172, 1150, 1114, 1088, 1032, 1017, 992, 959, 927, 877, 729, 666 \text{ cm}^{-1}$.

$^1\text{H RMN}$ (CD_3OD , 400 MHz): $\delta_{\text{H}} = 3,02$ (t, $J = 6,4$ Hz, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$ β -Ala), 3,30-3,40 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$ β -Ala), 4,08 (s, 3H, OCH_3), 5,58 (s, 2H, CH_2), 6,57 (s, 1H, H-3), 6,85 (s, 1H, H-5), 7,66-7,77 (m, 2H, H-8 e H-9), 8,23-8,30 (m, 1H, H-7), 8,37-8,45 (m, 1H, H-10) ppm.

^{13}C RMN (CD_3OD , 100,6 MHz): δ_{C} = 32,20 ($\alpha\text{-CH}_2$ $\beta\text{-Ala}$), 36,33 ($\beta\text{-CH}_2$ $\beta\text{-Ala}$), 56,55 (OCH_3), 63,42 (CH_2), 97,02 (C-5), 112,81 (C-3), 113,77 (C-4a), 122,88 (C-10), 123,41 (C-7), 124,97 (C-10a), 128,69 (C-6a), 129,15 (C-9), 129,05 (C-8), 146,49 (C-10b), 152,49 (C-4), 153,69 (C-6), 162,71 (C-2), 171,59 (C=O éster) ppm.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 327,11071. Valor calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_5$: 327,11071.

[14a] Éster metílico da *N*-[(6-metoxi-2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopirano-4-il)metiloxi-carbonil- β -alanina, Flu- β -Ala-OMe



A uma solução de CDI (0,059 g, $3,61 \times 10^{-4}$ mol) em DMF seca (1 mL) adicionou-se, gota-a-gota, com agitação, à temperatura ambiente, o 4-(hidroximetil)-6-metoxi-2-oxo-2*H*-benzo[*h*]benzopirano **5** (0,060 g, $2,43 \times 10^{-4}$ mol) dissolvido em DMF seca (3 mL). A mistura reaccional foi mantida nestas condições durante três horas. Adicionou-se o cloridrato do éster metílico da β -alanina **13a** (0,025 g, $2,44 \times 10^{-4}$ mol) e manteve-se nas mesmas condições durante 12 horas. Seguiu-se a reacção por TLC (clorofórmio/metanol 9,5:0,5).

Evaporou-se o solvente e purificou-se por cromatografia “seca” (clorofórmio/metanol, misturas de polaridade crescente). Isolou-se o composto **14a** na forma de um sólido amarelo claro.

η = 42% (0,038 g)

p.f. = 175,7-177,9 °C

R_f = 0,75 (clorofórmio/metanol 9,5:0,5)

IV (KBr 1%): ν_{max} = 3324, 3081, 2925, 2854, 1739, 1711, 1612, 1598, 1562, 1554, 1505, 1474, 1451, 1420, 1382, 1324, 1312, 1252, 1197, 1174, 1145, 1110, 1083, 1052, 1016, 986, 952, 890, 876, 811, 734 cm^{-1} .

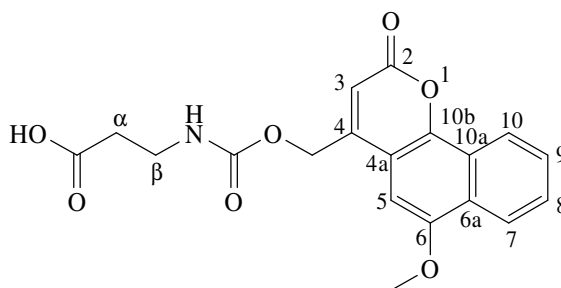
^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ_{H} = 2,62 (t, J = 5,7 Hz, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$ $\beta\text{-Ala}$), 3,50-3,62 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$ $\beta\text{-Ala}$), 3,74 (s, 3H, OCH_3 $\beta\text{-Ala}$), 4,04 (s, 3H, OCH_3), 5,38 (s, 2H, CH_2), 5,59

(t, $J = 5,7$ Hz, 1H, NH β -Ala), 6,56 (s, 1H, H-3), 6,65 (s, 1H, H-5), 7,64-7,72 (m, 2H, H-8 e H-9), 8,24-8,32 (m, 1H, H-7), 8,48-8,56 (m, 1H, H-10) ppm.

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75,4 MHz): $\delta_{\text{C}} = 34,02$ ($\alpha\text{-CH}_2$ β -Ala), 36,74 ($\beta\text{-CH}_2$ β -Ala), 51,9 (OCH_3 β -Ala), 55,87 (OCH_3), 62,01 (CH_2), 95,29 (C-5), 112,10 (C-4a), 112,21 (C-3), 122,22 (C-10), 122,40 (C-7), 123,97 (C-10a), 127,31 (C-6a), 127,88 (C-9), 128,37 (C-8), 145,63 (C-10b), 150,52 (C-4), 152,24 (C-6), 155,27 (C=O uretano), 160,90 (C-2), 172,68 (C=O éster).

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 386,12343. Valor calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{NO}_7$: 386,12455.

[14b] N-[(6-Metoxi-2-oxo-2H-benzo[h]benzopiran-4-il)metiloxicarbonil]- β -alanina, Flu- β -Ala-OH



Partiu-se da CDI (0,046 g, $2,84 \times 10^{-4}$ mol) em DMF seca (1 mL), usou-se 4-(hidroximetil)-6-metoxi-2-oxo-2H-benzo[h]benzopirano **5** (0,020 g, $7,93 \times 10^{-4}$ mol) em DMF seca (1 mL) e β -alanina **13b** (0,014 g, $1,59 \times 10^{-4}$ mol), e procedeu-se de um modo semelhante ao descrito na preparação do conjugado **14a**. O tempo de reacção foi de um dia antes e após a adição de H- β -Ala-OH. TLC (acetato de etilo).

Evaporou-se o solvente, dissolveu-se o resíduo em metanol e filtrou-se o sólido branco que se formou. A solução em metanol foi evaporada e purificada por cromatografia preparativa (acetato de etilo/metanol 9:1). Isolou-se o composto **14b** na forma de um sólido amarelo claro.

$\eta = 82\%$ (0,024 g)

p.f. = 224,9-225,9 °C

$R_f = 0,61$ (acetato de etilo/metanol 8:2)

IV (KBr 1%): $\nu_{\text{max}} = 3269, 3081, 2991, 2933, 2972, 1741, 1714, 1690, 1613, 1572, 1505, 1476, 1461, 1426, 1386, 1305, 1274, 1197, 1180, 1147, 1114, 1085, 1046, 992, 956, 888, 844, 770, 738, 666 \text{ cm}^{-1}$.

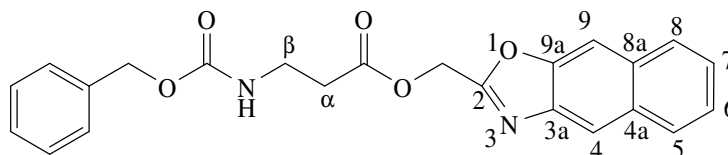
^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz): $\delta_{\text{H}} = 2,43$ (t, $J = 6,8$ Hz, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$ $\beta\text{-Ala}$), 3,20-3,30 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$ $\beta\text{-Ala}$), 4,05 (s, 3H, OCH₃), 5,44 (s, 2H, CH₂), 6,50 (s, 1H, H-3), 7,00 (s, 1H, H-5), 7,66 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H, NH $\beta\text{-Ala}$), 7,71-7,79 (m, 2H, H-8 e H-9), 8,20-8,26 (m, 1H, H-7), 8,33-8,38 (m, 1H, H-10) ppm.

^{13}C RMN (DMSO- d_6 , 100,6 MHz): $\delta_{\text{C}} = 34,07$ ($\alpha\text{-CH}_2$ $\beta\text{-Ala}$), 36,66 ($\beta\text{-CH}_2$ $\beta\text{-Ala}$), 56,11 (OCH₃), 61,44 (CH₂), 97,36 (C-5), 111,25 (C-3), 112,50 (C-4a), 121,70 (C-10), 122,00 (C-7), 123,04 (C-10a), 126,46 (C-6a), 128,15 (C-9), 128,57 (C-8), 144,51 (C-10b), 151,27 (C-6), 152,44 (C-4), 155,31 (C=O uretano), 159,76 (C-2), 172,72 (CO₂H) ppm.

m/z (EI) Valor obtido: M^+ , 339,11072. Valor calculado para C₁₉H₁₇NO₇: 339,11071.

3.2 Síntese dos bioconjugados de oxazole 15 e 16

[15] Éster (nafto[2,3-*d*]oxazol-2-il)metílico da *N*-(benziloxicarbonil)- β -alanina



Partiu-se de 2-(bromometil)nafto[2,3-*d*]oxazole **6** (0,031 g, $1,20 \times 10^{-4}$ mol), usou-se DMF seca (2 mL), fluoreto de potássio (0,021 g, $3,61 \times 10^{-4}$ mol) e *N*-(benziloxicarbonil)- β -alanina **10c** (0,028 g, $1,20 \times 10^{-4}$ mol), e procedeu-se de um modo semelhante ao descrito na preparação do conjugado **11a**. Tempo de reacção 5 horas. TLC (acetato de etilo/*n*-hexano 1:1). Após purificação por cromatografia “seca” (acetato de etilo) isolou-se o composto **15** na forma de um sólido amarelo.

$\eta = 90\%$ (0,044 g)

p.f. = 105,6-106,9 °C

$R_f = 0,92$ (acetato de etilo/*n*-hexano 1:1)

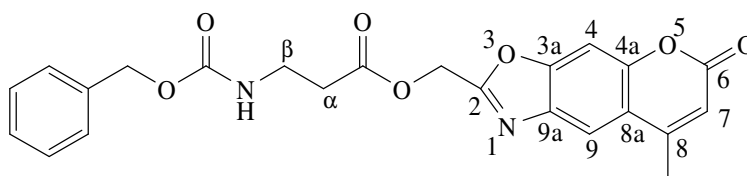
IV (KBr 1%): $\nu_{\text{max}} = 3305, 3066, 2958, 2921, 2850, 1750, 1724, 1715, 1638, 1620, 1577, 1546, 1506, 1457, 1426, 1409, 1382, 1366, 1278, 1254, 1245, 1231, 1202, 1179, 1165, 1140, 1080, 1046, 1025, 971, 911, 888, 869, 778, 751, 697 \text{ cm}^{-1}$.

^1H RMN (CDCl₃, 300 MHz): $\delta_{\text{H}} = 2,76$ (t, $J = 5,7$ Hz, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$ $\beta\text{-Ala}$), 3,55-3,75 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$ $\beta\text{-Ala}$), 5,15 (s, 2H, CH₂ Z), 5,45 (s, 2H, CH₂), 6,15 (s alargado, 1H, NH $\beta\text{-Ala}$), 7,30-7,42 (m, 5H, 5 \times Ar-H Z), 7,43-7,60 (m, 2H, H-6 e H-7), 7,80-8,00 (m, 3H, H-9, H-8 e H-5), 8,07 (s, 1H, H-4) ppm.

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75,4 MHz): $\delta_{\text{C}} = 34,74$ ($\alpha\text{-CH}_2$ $\beta\text{-Ala}$), 36,80 ($\beta\text{-CH}_2$ $\beta\text{-Ala}$), 58,18 (CH_2), 66,78 (CH_2 Z), 106,73 (C-9), 117,03 (C-4), 124,86 (C-7), 125,80 (C-6), 127,60 (Ar-C), 127,90 (Ar-C), 128,06 (Ar-C), 128,11 (C-8), 128,24 (Ar-C), 128,53 (Ar-C), 128,61 (C-5), 131,28 (C-8a), 131,68 (C-4a), 136,47 (Ar-C), 140,06 (C-3a), 149,48 (C-9a), 156,53 (C=O uretano), 162,94 (C-2), 171,34 (C=O éster) ppm.

m/z (ESI) Valor obtido: $\text{M}^+ + 1$, 405,1445. Valor calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5$: 405,1444.

[16] Éster (8-metil-6-oxo-6*H*-benzopirano[6,7-*d*]oxazol-2-il)metílico da *N*-(benziloxicarbonil)- β -alanina.



Partiu-se de 2-(bromometil)-8-metil-6-oxo-6*H*-benzopirano[6,7-*d*]oxazole **8** (0,030 g, $1,02 \times 10^{-4}$ mol), usou-se DMF seca (2 mL), fluoreto de potássio (0,018 g, $3,07 \times 10^{-3}$ mol) e *N*-(benziloxicarbonil)- β -alanina **10c** (0,024 g, $1,02 \times 10^{-4}$ mol), e procedeu-se de um modo semelhante ao descrito na preparação do conjugado **11a**. Tempo de reacção 5 horas. TLC (acetato de etilo/*n*-hexano 1:1). Após purificação por cromatografia “seca” (acetato de etilo), isolou-se o composto **16** na forma de um sólido amarelo.

$\eta = 95\%$ (0,042 g)

p.f. = 114,6-115,4 °C

$R_f = 0,89$ (acetato de etilo/*n*-hexano 1:1)

IV (KBr 1%): $\nu_{\text{max}} = 3366, 3060, 3047, 2958, 2927, 2852, 1742, 1716, 1691, 1631, 1600, 1576, 1535, 1498, 1455, 1441, 1418, 1394, 1347, 1324, 1311, 1289, 1261, 1211, 1166, 1133, 1081, 1069, 1030, 1013, 975, 938, 920, 894, 884, 816, 784, 739, 666 \text{ cm}^{-1}$.

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta_{\text{H}} = 2,40$ (s, 3H, CH_3), 2,74 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$ $\beta\text{-Ala}$), 3,58-3,63 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$ $\beta\text{-Ala}$), 5,13 (s, 2H, CH_2 Z), 5,41 (s, 2H, CH_2), 5,82 (s alargado, 1H, NH $\beta\text{-Ala}$), 6,31 (d, $J = 0,8$ Hz, 1H, H-7), 7,25-7,40 (m, 5H, $5 \times \text{Ar-H}$ Z), 7,50 (s, 1H, H-4), 7,89 (s, 1H, H-9) ppm.

^{13}C RMN (CDCl_3 , 100,6 MHz): $\delta_{\text{C}} = 19,08$ (CH_3), 34,55 ($\alpha\text{-CH}_2$ $\beta\text{-Ala}$), 36,72 ($\beta\text{-CH}_2$ $\beta\text{-Ala}$), 57,91 (CH_2), 66,72 (CH_2 Z), 99,66 (C-4), 114,27 (C-7), 115,60 (C-9), 117,94

(C-8a), 127,91 (Ar-C), 128,12 (Ar-C), 128,30 (Ar-C), 128,55 (Ar-C), 136,42 (Ar-C), 137,42 (C-9a), 151,98 (C-4a), 152,26 (C-8), 152,39 (C-3a), 156,40 (C=O uretano), 160,37 (C-6), 162,29 (C-2), 171,30 (C=O éster) ppm.

m/z (ESI) Valor obtido: $M^+ + 1$, 437,1343. Valor calculado para $C_{23}H_{21}N_2O_7$: 437,1353.

4. Caracterização fotofísica dos bioconjugados de oxobenzopirano e oxazole 11a-d, 12a-c, 14a,b, 15 e 16

4.1. Procedimento geral

As medições fluorimétricas foram realizadas com soluções desgaseificadas dos compostos sintetizados **1-6**, **8**, **11a-d**, **12a-c**, **14a,b**, **15** e **16**, de concentração 1×10^{-5} M em etanol e com uma solução etanólica do composto padrão, o 9,10-difenilantraceno ($\Phi_{Fp} = 0,95$),⁷² de concentração da mesma ordem de grandeza.

A fluorescência foi medida, num ângulo de 90° em relação à radiação incidente de excitação, em células de quartzo. O comprimento de onda de excitação foi o comprimento de onda de absorção máxima, para cada composto. O padrão foi excitado no comprimento de onda de absorção máxima de cada composto. Após o traçado do espectro de fluorescência determinou-se a respectiva área abaixo da curva e utilizou-se a expressão seguinte para o cálculo do rendimento quântico relativo de fluorescência dos compostos em estudo (Φ_{Fcomp}):

$$\frac{\Phi_{Fcomp}}{\Phi_{Fp}} = \frac{A_p \times F_{comp} \times n_p^2}{A_{comp} \times F_p \times n_{comp}^2}$$

onde A_p e A_{comp} são as absorvâncias das soluções nos comprimentos de onda de excitação do padrão e do composto em estudo, respectivamente, e F_p e F_{comp} são as áreas abaixo da curva de fluorescência do padrão e do composto em estudo. Os termos n_p e n_{comp} representam o valor do índice de refração do solvente das soluções do padrão e do composto, respectivamente.

Foram também efectuadas medições fluorimétricas dos compostos **1-7**, **8**, **11a-d**, **12a-c**, **14a,b**, **15** e **16** e do padrão, 9,10-difenilantraceno de concentração 1×10^{-5} M em soluções desgaseificadas de metanol/tampão HEPES (80:20).

Usando a expressão anteriormente referida determinou-se o Φ_{Fp} em metanol/HEPES (80:20) (considerando o Φ_{Fp} em etanol como referência) e usou-se esse valor na determinação do rendimento quântico relativo de fluorescência dos compostos em estudo.

5. Estudos de fotoclivagem dos bioncojugados de oxobenzopirano e oxazole 11a-d, 12a-c, 14a,b, 15 e 16

5.1. Método geral de fotoclivagem

As soluções dos compostos **11a-d**, **12a-c**, **14a,b**, **15** e **16** de concentração 1×10^{-4} M em metanol/tampão HEPES (80:20) (5 mL) foram irradiadas em tubos de quartzo num reactor Rayonet RPR-100 nos comprimentos de onda e durante os tempos referidos no Capítulo 2, pontos 5.1. e 5.2.

Foram recolhidas amostras de 100 μ L em intervalos regulares de tempo, que foram analisadas por HPLC.

O eluente de HPLC, acetonitrilo/água 3:1, foi filtrado através de um filtro Milipore, tipo HN 0,45 μ m e degaseificado por ultra-sons durante 30 minutos, antes da utilização. O fluxo do eluente foi de 0,8 mL/min para todos os compostos.

Os cromatogramas foram traçados por detecção de absorção UV no comprimento de onda de absorção máxima (em metanol/HEPES (80:20)) para cada composto (tempo de retenção: **11a**, 6,6; **11b**, 6,5; **11c**, 6,7; **11d**, 6,0; **12a**, 4,2; **12b**, 4,2; **12c**, 4,2; **14a**, 4,7; **14b**, 2,3; **15**, 6,2; **16**, 4,1 min).

A solução tampão de HEPES a pH 7,2 foi preparada com as proporções seguintes dos compostos constituintes: HEPES, 0,01 M; NaCl, 0,12 M; KCl 0,003 M; CaCl₂, 0,001 M. Após a preparação por dissolução dos vários sólidos em água destilada, o pH foi acertado a 7,2 por adição de solução aquosa de hidróxido de sódio 1M. A solução foi mantida no frigorífico e utilizada com a maior brevidade possível na preparação das soluções dos compostos submetidos a fotólise em conjunto com metanol, na proporção desejada.

Traçado dos gráficos de consumo de reagente

Para cada amostra recolhida a intervalos regulares foram efectuadas três injeções no HPLC, tendo-se utilizado o valor médio das áreas dos picos dos três ensaios, com tempo de retenção correspondente a cada composto, para traçar os gráficos área média *versus* tempo de irradiação e logaritmo neperiano da área média ($\ln A$) *versus* tempo de irradiação.

No caso do gráfico logaritmo neperiano da área média ($\ln A$) *versus* tempo de irradiação foi aplicado o método dos mínimos quadrados para obter a recta que melhor se ajustava aos dados experimentais e os valores dos coeficientes de correlação variaram entre 0,7728 e 0,9980.