



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Beatriz Salgado Pereira

SÍNTESE DE NOVOS DERIVADOS 6,7-
BIS(HIDROXIMETIL)-1*H*,3*H*-
PIRROLO[1,2-*C*]TIAZÓIS QUIRAIS COMO
ATIVADORES DA PROTEÍNA P53 PARA O
TRATAMENTO DO CANCRO COLORRETAL

Dissertação de Mestrado em Química Medicinal,
orientada pela Professora Doutora Teresa Pinho e Melo
e coorientada pela Doutora Maria Isabel Lopes Soares e
apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de
Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Beatriz Salgado Pereira

SÍNTESE DE NOVOS DERIVADOS 6,7-
BIS(HIDROXIMETIL)-1*H*,3*H*-
PIRROLO[1,2-*C*]TIAZÓIS QUIRAIS COMO
ATIVADORES DA PROTEÍNA P53 PARA O
TRATAMENTO DO CANCRO COLORRETAL

Dissertação de Mestrado em Química Medicinal,
orientada pela Professora Doutora Teresa Pinho e Melo
e coorientada pela Doutora Maria Isabel Lopes Soares e
apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de
Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2023

“A descoberta consiste em ver o que todos viram e em pensar no que ninguém pensou.”
Albert Szent- Györgyi.

Prefácio

O projeto científico apresentado nesta dissertação foi realizado entre setembro de 2022 e julho de 2023 no Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Neste período de tempo foi efetuado o desenvolvimento do trabalho de síntese química no grupo de Química Orgânica do Centro de Química de Coimbra. De referir ainda a participação na avaliação da atividade biológica, entre os dias 6 e 10 de fevereiro de 2023, na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Agradecimentos

Depois de um ano desafiante e com altos e baixos pelo meio, quero agradecer a todos aqueles que sempre estiveram ao meu lado e que tornaram esta jornada mais fácil de percorrer. Partilharam comigo momentos, histórias, risos e, sobretudo, permitiram que crescesse convosco, pessoalmente e profissionalmente. Assim, este espacinho é dedicado a todos vocês.

Começo por agradecer à Professora Doutora Teresa Margarida Vasconcelos Dias de Pinho e Melo por me ter dado a oportunidade de realizar este projeto de investigação no seu grupo, pela sua orientação e por todo o conhecimento e ensinamentos transmitidos.

Seguidamente agradeço à Doutora Maria Isabel Lopes Soares, por toda a ajuda, paciência e dedicação que sempre me proporcionou.

A todos os elementos do grupo de Química Orgânica, Professora Doutora Elisa Serra, Professora Doutora Dina Murtinho, Doutora Ana Lúcia Cardoso e Doutora Susana Lopes, muito obrigada por toda a atenção e disponibilidade que mostraram ao longo da realização deste projeto.

Agradeço também ao Mestre Pedro Cruz, pela sua colaboração nos estudos de ressonância magnética nuclear e pelas amostras “feitas na hora”.

Um especial agradecimento a todos os colegas de laboratório, ao Américo, ao João Vítor, à Cláudia, à Bruna e à Catarina, pela forma como fui bem recebida e acarinhada por todos vocês, pela vossa ajuda, por todos os momentos bem passados e todas as gargalhadas. Américo, agradeço toda a tua boa disposição e toda a ajuda que me deste na semana alucinante de março, quando eu decidi que queria candidatar-me ao doutoramento com apenas uma semana para tratar de tudo; João Vítor, muito obrigada por toda a animação e alegria que trazes contigo todos os dias e que fizeste questão de partilhar comigo; Cláudia, o que posso dizer? Obrigada pela tua maluquice e pela tua gargalhada inesquecível, que faz vibrar todo o laboratório; Bruna, muito obrigada por todos os conselhos e por seres a minha parceira do hidreto, não me vou esquecer desses momentos; Catarina, a minha chiquita, agradeço-te por toda a ajuda que me deste e pela tua boa disposição matinal, quando for grande quero fazer colunas como as tuas.

Não posso deixar de agradecer a todos os meus colegas de turma, que momentos inesquecíveis que passamos. Foi um orgulho para mim ter-vos conhecido e ter partilhado

tantos dias e noites com vocês, e que noites... Vou levar-vos sempre comigo, espero que também levem um bocadinho de mim no vosso coração.

“Reunião de Condomínio”, claro que tinha de haver todo um parágrafo dedicado a vocês. Cada um à sua maneira, contribuíram para que este percurso fosse tão mais fácil e divertido. A vida é tão melhor convosco, acreditem! Cris, obrigada pelas tuas histórias à hora de almoço e por estares lá para me apresentar a senhora todas as segundas-feiras no *DrWhy*, eternamente grata. Bigi, o meu *bestie* do Norte, que bom foi ter alguém que sabia do que eu estava a falar, quando todas as outras pessoas diziam que nunca tinham ouvido tais palavras. Estarei aqui para melhorar os teus dias sempre que precisares e para me juntar a ti no Porto a comer uma boa francesinha. Mari, a madrinha da Xuanini, foi um privilégio enorme ter convivido contigo e estar ao teu lado todos os dias a ouvir-te falar sobre a xuaaaaa. És uma menina muito especial e um orgulho para a tua família e para mim. Soraiazita, a miúda do “tu não me stresses”, que gosta mais de bolo e de lipossomas do que ninguém: que bonito foi ver-te crescer e crescer ao teu lado. Espero um dia ir ter contigo a Pombal para me mostrares as iguarias de que tanto falas, e não te preocupes que eu levo um bolo com formigas. João, o maior crominho de todos. Faltam-me as palavras para descrever o quão importante te tornaste para mim nestes últimos tempos: foste a minha companhia em muitos dos momentos que passei, desde as horas de entrar e de sair do laboratório, das histórias na paragem de autocarro, das minhas dúvidas existenciais e da partilha de músicas e de histórias que vão ficar para sempre guardadas. Obrigada por seres a pessoa mais bondosa (até demais), por estares sempre pronto a ajudar o outro e por seres o meu pai numa outra cidade.

Sei que a vida ainda vos vai sorrir muito, espero estar ao vosso lado a acompanhar-vos e a ver-vos alcançar coisas tão boas como vocês, o vosso sucesso será sempre o meu sucesso também.

Carolina e Gabi, a minha vida não teria sido a mesma sem vocês. Obrigada por me fazerem sentir em casa sem estar realmente em casa, pelos momentos divertidos que passamos juntas e pelas noites de estudo semi-produtivas. Ganhei duas amigas para a vida e mal posso esperar por mais viagens juntas!

Para as minhas manas, Bia 1, Bia 6, DD, Guida e Débora, que caminhada fizemos até aqui. Bia 1, a minha confidente e mais que tudo; Bia 6, a que tem o riso mais contagiante e sempre uma palavra amiga para partilhar; DD, a moça das novidades e de uma bondade infinita; Guida, a mais antiga, com as palavras certas no momento certo;

Débora, uma menina especial. Tenho a agradecer-vos tudo o que foram e ainda são para mim, a vossa amizade, confiança, partilha e ajuda ajudaram-me a ser a pessoa que sou hoje. Continuem a estar por perto porque o que o sexto ano uniu, ninguém separa.

Hélder e Catarina, o meu maior presente de entrada na universidade. Sinto um orgulho imenso em poder ter passado todos estes anos convosco, os melhores anos das nossas vidas. Obrigada por serem alegria, união, presença e por significarem tanto para mim. Tenho a certeza de que o nosso encontro não foi por acaso e se há pessoas que ficam, vocês são dois exemplos claros disso. A vossa felicidade e sucesso serão a minha maior alegria. Para sempre nós.

Carolina e Pedro, que bom é ter família. Obrigada por estarem presentes em todos os momentos importantes da minha vida e nunca se esquecerem de mim.

Para a tia Lurdes, obrigada por me teres acompanhado desde que eu era pequenina e por me teres ajudado sempre que podias. Espero poder fazer o mesmo se algum dia precisares.

Padrinhos, obrigada por todos os conselhos que me transmitiram e por todo o companheirismo e amizade.

Avós, apesar da distância, agradeço tudo o que fizeram e fazem por mim, todas as conversas e ensinamentos que tive a oportunidade de aprender e interiorizar. Aos avós que infelizmente já não estão presentes, espero que estejam tão orgulhosos de mim como eu sempre estive de vocês.

Por fim, mas não menos importante, muito pelo contrário, agradeço aos meus pais. Aqueles que tornaram tudo isto possível e que fizeram “das tripas coração” para que eu pudesse ter a melhor vida de sempre. Tudo o que sou devo-vos a vocês. Obrigada por serem os meus pilares, por sempre me apoiarem e estarem lá para mim, por me ajudarem a tomar as melhores decisões, a nunca desistir, a confiar em mim e, acima de tudo, por me confortarem nos momentos mais tristes e por celebrarem comigo nos mais felizes. Que um dia quando crescer possa ser como vocês. É só isto.

Índice

Prefácio	VI
Agradecimentos	VIII
Índice de Figuras	XVI
Lista de Esquemas	XX
Lista de Tabelas	XXII
Nomenclatura	XXV
Lista de Abreviaturas	XXVII
Resumo	XXIX
Abstract	XXXI
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
1.1. Cancro e Cancro Colorretal - Epidemiologia.....	3
1.1.1. Patogénese da Doença e Fatores de Risco.....	4
1.1.2. Tipos de Tratamento	5
1.2. A Proteína p53 como Alvo Terapêutico do CCR	9
1.2.1. Estrutura da p53.....	9
1.2.2. Inativação da p53.....	11
1.2.3. Estratégias para a reativação da p53	13
1.3. 1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -Pirroló[1,2- <i>c</i>]tiazóis	15
1.3.1. Síntese de 1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -Pirroló[1,2- <i>c</i>]tiazóis	15
1.3.2. A reação de ciclo-adição 1,3-dipolar	19
1.3.3. Atividade Biológica e Antitumoral dos Pirroló[1,2- <i>c</i>]tiazóis.....	25
1.4. MANIO	29
1.5. Modulação Estrutural do MANIO	35

CAPÍTULO 2 – SÍNTESE DE 6,7-BIS(HIDROXIMETIL)-1<i>H</i>,3<i>H</i>-PIRROLO[1,2-<i>c</i>]TIAZÓIS	37
2.1. Síntese do derivado do MANIO com configuração absoluta <i>S</i> alquilado em C-1	39
2.2. Síntese de derivados do MANIO com configuração absoluta <i>R</i> e substituintes aromáticos em C-3.....	42
2.3. Síntese de derivados do MANIO com configuração absoluta <i>R</i> e substituintes heteroaromáticos em C-3.....	50
2.4. Síntese de sulfonas e sulfóxidos derivados do enantiómero do MANIO.....	56
CAPÍTULO 3 – ATIVIDADE BIOLÓGICA DE 6,7-BIS(HIDROXIMETIL)-1<i>H</i>,3<i>H</i>-PIRROLO[1,2-<i>c</i>]TIAZÓIS	67
Ensaio Sulforodamina B e a Atividade Biológica de 6,7-bis(hidroximetil)-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazóis	69
CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	73
CAPÍTULO 5 – PARTE EXPERIMENTAL.....	77
5.1. Aparelhagem Utilizada	79
5.2. Solventes e Reagentes	81
5.3. Síntese e Caracterização	82
5.3.1. Proteção de Aldeídos Heteroaromáticos.....	82
5.3.2. Síntese de Ácidos 1,3-tiazolidina-4-carboxílicos	83
5.3.3. Síntese da 2-(1-benzil-1 <i>H</i> -pirrol-2-il)tiazolidina-4-carboxilato de metilo (2.19)	86
5.3.4. Síntese de 1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazóis-6,7-dicarboxilatos de dimetilo ...	87
5.3.5. Reação de Peguilação do (3 <i>R</i>)-3-(pentafluorofenil)-5-metil-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo.....	89

5.3.6. Síntese de 2-oxo-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazóis-6,7-dicarboxilatos de dimetilo e 2,2-dioxo-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazóis-6,7-dicarboxilatos de dimetilo.	90
5.3.7. Síntese de 6,7-bis(hidroximetil)-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazóis.....	93

CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 99

Índice de Figuras

Figura 1.1: Ranking nacional do cancro como causa de morte em idades < 70 anos em 2019 (fonte: GLOBOCAN 2020). ³	3
Figura 1.2: Incidência e mortalidade nos cancros mais comuns, para ambos os sexos (fonte: GLOBOCAN 2020). ³	4
Figura 1.3: Fatores de risco (modificáveis e não modificáveis) do cancro colorretal. ⁵ Consultado em 10/07/2023.....	5
Figura 1.4: Representação da proteína p53. (fonte: https://www.mskcc.org/news/new-findings-clarify-how-guardian-genome-works , consultado em 11/07/2023).....	9
Figura 1.5: Representação esquemática dos vários domínios da proteína p53. ¹⁰	10
Figura 1.6: Representação da estrutura quaternária da p53 em solução e informações estruturais sobre a ligação do DBD da p53 ao ADN. ¹²	10
Figura 1.7: Representação esquemática da via de sinalização da p53 sob condições sem stress e com stress. ¹⁴	13
Figura 1.8: Moléculas em ensaios clínicos que visam a reativação da p53. ^{10,11}	14
Figura 1.9: Representação estrutural do MANIO. ¹⁵	15
Figura 1.10: Principais tipos de 1,3-dipolos e respetiva classificação. ³⁶	21
Figura 1.11: Tipos de reações de ciclo-adição.....	24
Figura 1.12: Estrutura genérica de um imidazotiazole (1.21) e de um pirrolotiazole (1.22).....	25
Figura 1.13: Atividade anticancerígena contra a linha celular humana MCF7 apresentada pelos compostos 1.23,1.24 e 1.25 , com 72 e 96 h de incubação. ⁵²	26
Figura 1.14: Valores de IC ₅₀ apresentados pelos vários compostos nas linhas celulares MCF7 e HCC1806, às 72 e 96 h (quando possível) de incubação. ⁵³	27
Figura 1.15: Estrutura e principais propriedades do MANIO. ¹⁵	28
Figura 1.16: Valores de IC ₅₀ num painel de linhas celulares cancerígenas humanas com diferentes estados da p53. ¹⁵	29
Figura 1.17: Modo de ligação do MANIO à WTp53 (à esquerda) e à mutp53 R248W (à direita), no DBD. ¹⁵	30
Figura 1.18: Curvas dose-resposta do efeito inibitório do crescimento de MANIO em células do cancro colorretal derivadas de pacientes. ¹⁵ CCA2, CCZ1 etc dizem respeito ao “nome” atribuído ao paciente.	31

Figura 1.19: Modelos de xenografos de HCT116 p53 ^{+/+} . ¹⁵	32
Figura 1.20: Modelos de xenografos de SW837. ¹⁵	32
Figura 1.21: Modelos de xenografos de HCT116 p53 ^{-/-} . ¹⁵	32
Figura 1.22: Representação do efeito sinérgico entre o MANIO e os quimioterápicos convencionais. ¹⁵	33
Figura 1.23: Avaliação dos danos no ADN nas células HCT116 p53 ^{+/+} (48 h), utilizando o ensaio cometa. ¹⁵	34
Figura 1.24: Estruturas químicas de novos bis(hidroximetil)-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazóis e valores de IC ₅₀ em linhas celulares HCT116 p53 ^{+/+} e HCT116 p53 ^{-/-} (resultados não publicados).	35
Figura 1.25: Modulação estrutural do MANIO.....	36
Figura 2.1: Espectro de RMN ¹ H do composto 2.4 (CDCl ₃ , 400 MHz). * Sinais correspondentes a acetato de etilo presente na amostra.	41
Figura 2.2: i) Esquema 2.4: Síntese do composto (3 <i>R</i>)-6,7-bis(hidroximetil)-3-(pentafluorofenil)-5-metil-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazole (2.8b); ii) Tabela 2.1: Condições de reação testadas na síntese do (3 <i>R</i>)-6,7-bis(hidroximetil)-3-(pentafluorofenil)-5-metil-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazole (2.8b).....	44
Figura 2.3: i) Esquema 2.5: Síntese do composto (3 <i>R</i>)-3-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-((2-(2-hidroxietoxi)etil)amino)fenil)-5-metil-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (2.10); ii) Tabela 2.1: Condições de reação testadas na síntese do (3 <i>R</i>)-6,7-bis(hidroximetil)-3-(pentafluorofenil)-5-metil-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazole (2.8b).	47
Figura 2.4: i) Esquema 2.6: Síntese do composto (3 <i>R</i>)-6,7-bis(hidroximetil)-3-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-((2-(2-hidroxietoxi)etil)amino)fenil)-5-metil-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazole (2.11); ii) Tabela 2.3: Otimização das condições de reação para obtenção do (3 <i>R</i>)-6,7-bis(hidroximetil)-3-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-((2-(2-hidroxietoxi)etil)amino)fenil)-5-metil-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazole (2.11).	48
Figura 2.5: Espectro de RMN ¹ H do composto 2.16 (CDCl ₃ , 400 MHz). * Sinais correspondentes a acetato de etilo presente na amostra.	52
Figura 2.6: i) Esquema 2.10: Síntese do 2-(1-benzil-1 <i>H</i> -pirrol-2-il)-4-carboxilato de metilo (2.19); ii) Tabela 2.4: Tentativas de otimização da reação de síntese da tiazolidina éster 2.19	54
Figura 2.7: Espectro IV do composto 2.22	57
Figura 2.8: Espectro IV do composto 2.23	58

Figura 2.9: Espectro de RMN ¹ H do composto 2.25 (CDCl ₃ , 400 MHz). * Sinais correspondentes a acetato de etilo presente na amostra; • Sinal correspondente a água presente na amostra.	60
Figura 2.10: Espectro de RMN ¹ H do composto mono-reduzido 2.24 (CDCl ₃ , 400 MHz). • Sinal correspondente a água presente na amostra.....	60
Figura 2.11: Espectro HMBC do composto mono-reduzido 2.24 (CDCl ₃ , 400 MHz)...	61
Figura 2.12: Espectro HSQC do composto mono-reduzido 2.24 (CDCl ₃ , 400 MHz)....	61
Figura 2.13: i) Esquema 2.14: Síntese do (3 <i>R</i>)-7-(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-2-oxo-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazole-6-carboxilato de metilo (2.26); ii) Tabela 2.5: Otimização das condições de redução para síntese do composto (3 <i>R</i>)-7-(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-2-oxo-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazole-6-carboxilato de metilo (2.26).....	62
Figura 2.14: Espectro de RMN ¹ H do composto mono-reduzido 2.26 (CDCl ₃ , 400 MHz).	64
Figura 2.15: Espectro HMBC do composto mono-reduzido 2.26 (CDCl ₃ , 400 MHz)...	65
Figura 3.1: Estrutura do MANIO, do seu enantiómero e dos derivados preparados no âmbito do presente projeto.	70

Lista de Esquemas

Esquema 1.1: Processo de obtenção de <i>1H,3H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazóis. ²¹	16
Esquema 1.2: Primeiro exemplo de síntese de um pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazole, descrita por Kane et al. ²⁰	16
Esquema 1.3: Condições de reação de <i>N</i> -acetilação de ácidos 1,3-tiazolidina-4-carboxílicos utilizadas para a obtenção exclusiva de um único diastereoisómero. ²⁶	17
Esquema 1.4: Síntese de ésteres quirais <i>1H,3H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazole-6,7-dicarboxílicos a partir de ácidos <i>N</i> -acil-1,3-tiazolidina-4-carboxílicos. ²⁵	18
Esquema 1.5: Síntese de novos <i>1H,3H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazóis quirais partindo de uma mistura diastereoisomérica de compostos. ²⁹	18
Esquema 1.6: Exemplo de uma reação de ciclo-adição 1,3-dipolar intramolecular de <i>5H,7H</i> -tiazolo[3,4- <i>c</i>]oxazol-4- <i>io</i> -1-olatos.....	19
Esquema 1.7: Rearranjo eletrônico observado entre o 1,3-dipolo e o dipolarófilo.....	20
Esquema 1.8: Mecanismo concertado da reação de ciclo-adição 1,3-dipolar.....	22
Esquema 1.9: Mecanismo da reação de ciclo-adição 1,3-dipolar do óxido de 4-nitrobenzonitrilo com etileno dideuterado.	23
Esquema 2.1: Síntese do 6,7-bis(hidroximetil)- <i>1H,3H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazole (2.4), derivado da <i>D</i> -penicilamina.....	40
Esquema 2.2: Síntese dos (<i>3R</i>)- <i>1H,3H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazóis-6,7-dicarboxilatos de dimetilo (2.7).	42
Esquema 2.3: Reação de redução do derivado do MANIO 2.8a	43
Esquema 2.7: Síntese do composto 2.13 e do ácido 2-(1-acetil- <i>1H</i> -indol-3-il)-1,3-tiazolidina-4-carboxílico (2.14) a partir do aldeído acetilado 2.13	51
Esquema 2.8: Estratégia de síntese do (<i>3R</i>)-6,7-bis(hidroximetil)-3-(<i>1H</i> -indol-3-il)-5-metil- <i>1H,3H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazole (2.16), partindo da tiazolidina previamente acetilada 2.14	51
Esquema 2.9: Síntese do 1-benzil- <i>1H</i> -pirrole-2-carbaldeído (2.18).	53
Esquema 2.11: Possível estratégia sintética para obtenção do álcool com o núcleo pirrole, partindo do composto 2.19	55
Esquema 2.12: Estratégia de síntese utilizada na obtenção do (<i>3R</i>)-3-fenil-5-metil-2,2-dioxo- <i>1H,3H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (2.22) e do (<i>3R</i>)-3-fenil-5-metil-2-oxo- <i>1H,3H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (2.23).	56

Esquema 2.13: Síntese do (3 <i>R</i>)-6,7-bis(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-2,2-dioxo-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazole (2.25), onde se observou também a formação do composto (3 <i>R</i>)-7-(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-2,2-dioxo-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazole-6-carboxilato de metilo (2.24).	58
Esquema 2.15: Metodologia sintética para obtenção do composto (3 <i>R</i>)-6,7-(bishidroximetil)-3-fenil-5-metil-2-oxo-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazole.....	63
Esquema 2.16: Via sintética para obtenção do (3 <i>S</i>)-3-fenil-5-metil-2,2-dioxo-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (2.29) e do (3 <i>S</i>)-3-fenil-5-metil-2-oxo-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (2.30).....	66
Esquema 3.1: Ensaio SRB para avaliação da atividade antiproliferativa.	69

Lista de Tabelas

Tabela 1.1: Combinações de fármacos utilizadas no tratamento do cancro colorretal. Adaptado de ⁸	7
Tabela 1.2: Atividade anticancerígena do MANIO comparativamente com as moléculas PRIMA-1 ^{MET} e Nutlin-3a, em ensaios clínicos. Adaptado de ¹⁵	33
Tabela 3.1: Valores de IC ₅₀ dos compostos 1.25 , 1.26 , 2.4 e 2.25 em linhas celulares do cancro colorretal HCT116 p53 ^{+/+} e HCT116 p53 ^{-/-}	71

Nomenclatura

A nomenclatura utilizada nesta dissertação segue as regras gerais da IUPAC.^a Foi utilizado o sistema Hantzsch-Widman (compostos heterociclos monocíclicos) e o sistema de nomenclatura para anéis fundidos.^b

Na escrita desta dissertação foi utilizado o plural “óis”, para compostos heterocíclicos em que o singular é “le”, como demonstra o exemplo.

Exemplo: tiazole → tiazóis

^a Panico R., Powell W. H., J.-C. Richer J.-C. (1993) *A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds, Recommendations*.

^b McNaught A. D., Smith P. A. S. (1984). Nomenclature of Heterocyclic Compounds. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry, 1*, 7-45.

Lista de Abreviaturas

5-Fu – 5-fluorouracilo

ADN – ácido desoxirribonucleico

APC – polipose adenomatosa coli

aprox. – aproximadamente

Ar – grupo aromático

ARF-BP1 – ubiquitina ligase

CCR – cancro colorretal

ChIP – imunoprecipitação da cromatina

Cop1 – do inglês *Constitutive Photomorphogenesis 1*

crio-EM – crio microscopia eletrônica

d – dubleto

DCM – diclorometano

dd – duplo dubleto

ddd – duplo duplo dubleto

DMAD – acetilenodicarboxilato de dimetilo

DMAP – 4-dimetilaminopiridina

DMSO-*d*₆ – dimetilsulfóxido deuterado

dt – duplo tripleto

EMAR – espetrometria de massa de alta resolução

eq – equivalentes

ESI – ionização por eletrospray

Hex – hexano

HMBC – do inglês *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HOMO – orbital molecular ocupada de maior energia, do inglês *highest occupied molecular orbital*

HSQC – do inglês *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

IC₅₀ – valor da concentração de um inibidor necessária para reduzir pela metade a atividade enzimática

IV – espectroscopia de infravermelho

LUMO – orbital molecular não ocupada de menor energia, do inglês *lowest unoccupied molecular orbital*

m – multipleteo

MCPBA – ácido 3-cloroperoxibenzóico

MDM2 – do inglês *murine doble minute 2*

MDM4 – do inglês *murine doble minute 4*

MTT – brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

MW – irradiação por micro-ondas, do inglês *microwave irradiation*

NMP – *N*-metil-2-pirrolidona

p.f. – ponto de fusão

p53 – proteína p53

PEG – polietilenoglicol

Pirh2 – do inglês *p53-induced RING-H2*

ppm – partes por milhão

q – quarteto

RB1 – retinoblastoma

RMN – espectroscopia de ressonância magnética nuclear

RMN ¹³C – espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN ¹H – espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton

s – singleto

SAXS – do inglês *small-angle X-ray scattering*

sl – singleto largo

SRB – sulforodamina B

t – tripleto

TCA – ácido tricloroacético

TLC – cromatografia em camada fina, do inglês *thin layer chromatography*

TMAO – *N*-óxido de trietilamina

TMS – tetrametilsilano

TP53 – gene que codifica a proteína p53

VHL – Von Hippel-Lindau

Resumo

O cancro colorretal (CCR) é o terceiro tipo de cancro mais comum e a segunda causa de morte relacionada com o cancro em todo o mundo. Grandes esforços foram efetuados para o desenvolvimento de novos fármacos direcionados para o cancro colorretal, no entanto a não existência de um tratamento universal dirigido a todos os pacientes faz com que a procura e a identificação de novos alvos terapêuticos continuem a ser feitas.

A proteína p53 é um alvo terapêutico promissor para o tratamento do CCR uma vez que avanços na compreensão da patogénese do CCR demonstraram que disfunções desta proteína são um evento crítico em CCRs locais e avançados. Assim, restabelecer a atividade da p53 tornou-se uma das estratégias terapêuticas mais atrativas para o tratamento do CCR. Dentro desta estratégia, apenas duas abordagens resultaram, até agora, em compostos que se encontram em fase de ensaios clínicos, que são via restabelecimento da atividade nativa da proteína p53 mutada (mutp53) e via inibição dos reguladores negativos da p53.

Recentemente foi descoberto no grupo de investigação onde foi desenvolvido este projeto científico um composto promissor para o tratamento do cancro colorretal, o (3*S*)-6,7-bis(hidroximetil)-5-metil-3-fenil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole (MANIO). O MANIO é um ativador seletivo da proteína p53 na terapia do CRC, que ativa tanto a p53 nativa quanto várias formas mutantes com alta prevalência clínica.

O objetivo do projeto científico apresentado nesta dissertação centrou-se na modulação estrutural do composto líder, MANIO, a fim de obter derivados do tipo MANIO com propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas otimizadas. As estratégias sintéticas abordadas pretendem manter a estrutura base da molécula, o sistema heterocíclico 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole, explorando várias alterações estruturais, nomeadamente a introdução de grupos alquilo em C-1, a substituição do grupo fenilo por grupos arilo/heteroarilo e a oxidação a sulfonas e sulfóxidos, cujas sínteses se encontram descritas no capítulo 2.

Foram efetuados estudos preliminares da atividade biológica de alguns destes compostos como agentes anticancerígenos para o cancro colorretal, tendo sido avaliada a atividade antitumoral em linhas celulares do cancro colorretal HCT116 p53^{+/+} e HCT116 p53^{-/-}, cujos resultados são apresentados no capítulo 3.

Os resultados alcançados permitiram estabelecer relações estrutura-atividade e contribuíram para um melhor conhecimento do mecanismo de ação dos derivados do MANIO como agentes anticancerígenos e ativadores da proteína p53.

Palavras-chave: Cancro colorretal; proteína p53; MANIO; modulação estrutural; atividade antitumoral.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer and the second cause of cancer-related death worldwide. Great efforts have been made to develop new drugs aimed at colorectal cancer, however the lack of a universal treatment aimed at all patients means that the search and identification of new therapeutic targets continues to be carried out.

The p53 protein is a promising therapeutic target for the treatment of CRC as advances in understanding the pathogenesis of CRC have demonstrated that dysfunctions of this protein are a critical event in local and advanced CRCs. Thus, restoring p53 activity has become one of the most attractive therapeutic strategies for the treatment of CRC. Within this strategy, only two approaches have so far resulted in compounds that are in the clinical trial phase, which are via the reestablishment of the native activity of the mutated p53 protein (mutp53) and via the inhibition of p53 negative regulators.

Recently, a promising compound for the treatment of colorectal cancer, (3*S*)-6,7-bis(hydroxymethyl)-5-methyl-3-phenyl-1*H*,3*H*-pyrrolo[1,2-*c*]thiazole (MANIO) was discovered in the research group where this scientific project was developed. MANIO is a selective activator of the p53 protein in CRC therapy, which activates both native p53 and several mutant forms with high clinical prevalence.

The objective of the scientific project presented in this dissertation focused on the structural modulation of the lead compound, MANIO, in order to obtain MANIO-type derivatives with optimized pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. The synthetic strategies addressed aim to maintain the basic structure of the molecule, the 1*H*,3*H*-pyrrolo[1,2-*c*]thiazole heterocyclic system, exploring several structural changes, namely the introduction of alkyl groups at C-1, the replacement of the phenyl group by aryl/heteroaryl groups and oxidation to sulfones and sulfoxides, the syntheses of which are described in chapter 2.

Preliminary studies of the biological activity of some of these compounds as anticancer agents for colorectal cancer were carried out, and the antitumor activity was evaluated in colorectal cancer cell lines HCT116 p53^{+/+} and HCT116 p53^{-/-}, the results of which are presented in chapter 3.

The results achieved allowed the establishment of structure-activity relationships and contributed to a better understanding of the mechanism of action of MANIO derivatives as anticancer agents and activators of the p53 protein.

Keywords: Colorectal cancer; p53 protein; MANIO; structural modulation; antitumor activity.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1. Cancro e Cancro Colorretal - Epidemiologia

O cancro é uma doença que provém de alterações fisiopatológicas no processo inerente de divisão celular – caracteriza-se essencialmente por uma divisão anormal e descontrolada das células, formando tumores, que podem invadir tecidos ou órgãos adjacentes.¹ Nos últimos anos, a mortalidade relacionada com o cancro aumentou cerca de 40%, tornando-se assim numa das doenças mais fatais em todo o mundo, com milhões de mortes todos os anos.²

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2019, o cancro era a primeira ou a segunda principal causa de morte em idades inferiores aos 70 anos em 112 de 183 países, e ocupava o terceiro ou o quarto lugar noutros 23 países³ – **figura 1.1**.

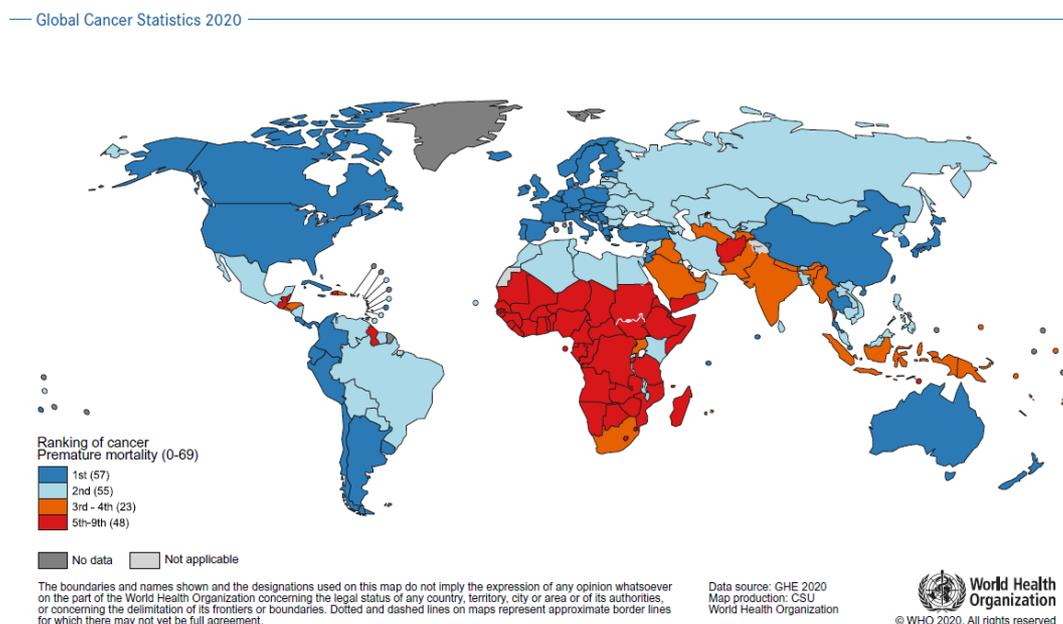


Figura 1.1: Ranking nacional do cancro como causa de morte em idades < 70 anos em 2019 (fonte: GLOBOCAN 2020).³

Em 2020, foram reportados aproximadamente 19.3 milhões de novos casos e 10 milhões de mortes por cancro.³ Existem vários fatores que tem condicionado o tratamento adequado dos vários tipos de cancro, nomeadamente a variação da doença em diferentes partes do mundo e fatores do foro socioeconómico, como por exemplo acesso à saúde, instalações médicas disponíveis e disponibilidade de tratamentos.²

Na **figura 1.2**, a seguir apresentada, é possível ver a distribuição da incidência e mortalidade em 2020, dos cancros mais comuns, para ambos os sexos, sendo o cancro colorretal (CCR) o terceiro tipo de cancro mais comum e o segundo em termos de mortalidade, contando com 1.85 milhões de novos casos anuais e 850.000 mortes.³

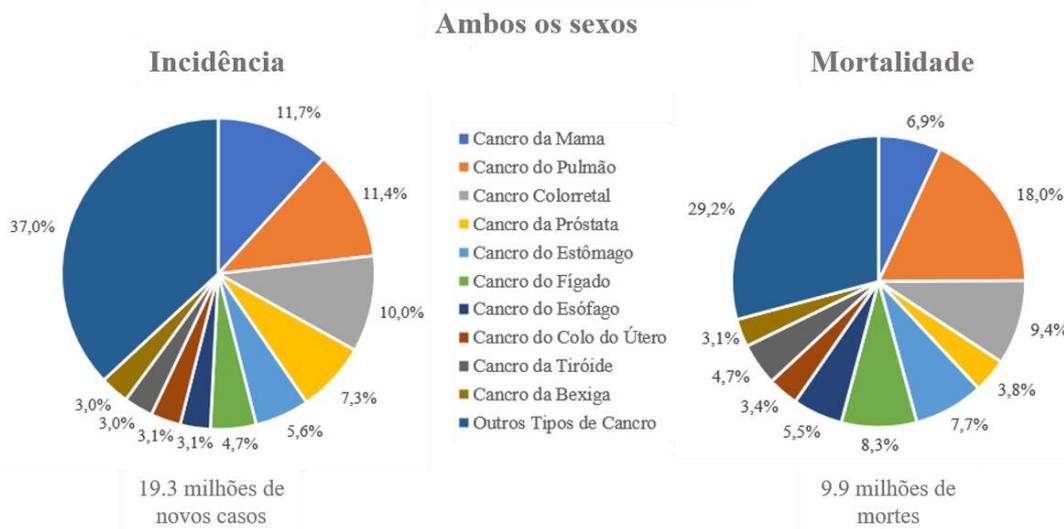


Figura 1.2: Incidência e mortalidade nos cancros mais comuns, para ambos os sexos (fonte: GLOBOCAN 2020).³

1.1.1. Patogénese da Doença e Fatores de Risco

O cancro colorretal está associado à saúde geral do cólon e do reto, e estudos demonstram que o microambiente no cólon e no reto e a resposta inflamatória estão intimamente relacionadas com o desenvolvimento de cancro colorretal. O microambiente é responsável por criar os processos relacionados com as respostas imunes, uma vez que este compreende células imunes, estromais e também a microbiota intestinal. Assim, este microambiente pode suprimir ou aumentar estas respostas e, no caso de aumentar, geram-se então os processos inflamatórios que moldam a patogénese imune do cancro colorretal.²

Além disso, foi observado que a disbiose da microbiota intestinal progride com o avanço e desenvolvimento deste tipo de cancro, sendo que alguns metabolitos derivados da microbiota são (ou estão) associados à carcinogénese do cancro colorretal, como é o caso do TMAO (*N*-óxido de trietilamina).²

As causas exatas do cancro colorretal ainda não são totalmente conhecidas, no entanto existem alguns fatores de risco que são importantes considerar, como por

exemplo a idade, o sexo, se há um histórico familiar de cancro colorretal e historial de pólipos colorretais ou de outras doenças inflamatórias do intestino.⁴

Recentemente, os casos de cancro colorretal em pacientes com idade inferior a 50 anos têm vindo a aumentar, o que sugere que componentes relacionados com a dieta e com o estilo de vida, nomeadamente sedentarismo, tabagismo e consumo excessivo de álcool, também podem ser incluídos nos fatores de risco (**figura 1.3**), resultando no aumento da incidência e do número de casos.⁴ Mitigar estes fatores de risco torna-se importante na prevenção desta doença.

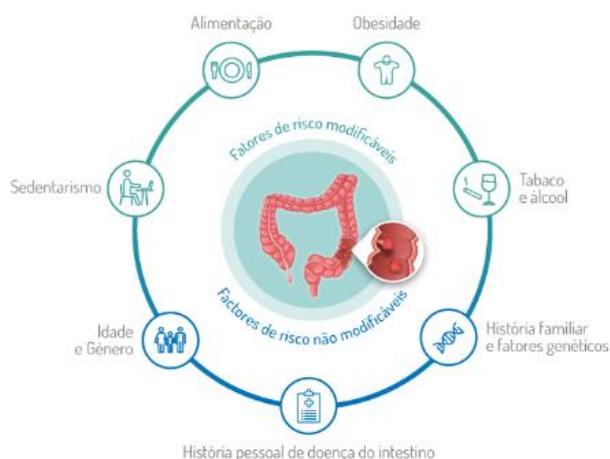


Figura 1.3: Fatores de risco (modificáveis e não modificáveis) do cancro colorretal.⁵ Consultado em 10/07/2023.

1.1.2. Tipos de Tratamento

O tratamento do cancro colorretal depende principalmente do estágio em que se encontra e da localização do tumor. Os principais métodos utilizados são a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia.⁵ No entanto, a terapia cirúrgica primária é o tratamento mais utilizado nos pacientes com cancro colorretal, visto que o seu objetivo é remover o tumor e os tecidos circundantes.

Nos estádios 0 e I a cirurgia é, de facto, a opção de tratamento mais utilizada; no estágio II é feita a cirurgia e também quimioterapia, geralmente como complemento à cirurgia, e radioterapia; no estágio III são utilizadas as três opções de tratamento referidas no estágio II e, por fim, no estágio IV, a terapêutica é muito variável, podendo incluir vários dos tratamentos dos estádios anteriores.⁵

A quimioterapia recorre a fármacos para destruir as células cancerígenas e/ou para impedir o seu crescimento – este método de tratamento é frequentemente realizado a seguir à cirurgia, para eliminar as células cancerígenas remanescentes (terapêutica adjuvante).⁵

Desde os anos de 1950 que a quimioterapia à base de 5-fluorouracil (5-FU), uma fluoropirimidina, tem sido a terapêutica base para o tratamento do cancro colorretal. Contudo, nos últimos anos, foram desenvolvidos novos agentes citotóxicos, como é o caso do irinotecano, capecitabina e oxaliplatina.⁶

O 5-FU é um fármaco administrado de forma intravenosa e é amplamente utilizado na quimioterapia do cancro colorretal, uma vez que se encontra presente na maior parte dos regimes terapêuticos. A sua função consiste em inibir a síntese do ácido desoxirribonucleico (ADN), impedindo a divisão celular e o crescimento das células cancerígenas. Normalmente o 5-FU é administrado em conjunto com o ácido fólico ou com a leucovorina (uma forma reduzida do ácido fólico), para aumentar a taxa de resposta ao fármaco, pois estas moléculas têm como objetivo estabilizar a ligação entre o 5-FU e a TS (timildato sintase), uma enzima-chave na síntese do ADN.⁶

A capecitabina foi o primeiro quimioterapêutico oral para o tratamento do cancro colorretal. É um pró-fármaco que é metabolizado no organismo, mais concretamente no fígado, e que se converte sequencialmente em 5-FU, a forma ativa que lhe permite exercer o seu efeito citotóxico.⁶

O irinotecano funciona como um inibidor da enzima topoisomerase I, uma enzima necessária para a replicação do ADN. Assim, este fármaco vai impedir que a ligação se restabeleça, provocando a quebra do ADN e, conseqüentemente, a morte celular.

Por último, a oxaliplatina, como o nome indica, é um derivado da platina que, apesar de apresentar uma atividade limitada quando utilizada isoladamente, em combinação com o 5-FU ou com a capecitabina permite uma resposta mais eficaz. O seu mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido, mas pensa-se que esteja relacionado com o ADN, na medida em que as ligações cruzadas formadas com o ADN interferem na sua capacidade de se replicar normalmente durante a divisão celular. Como resultado, ocorrem erros na replicação do ADN e a célula não consegue continuar a dividir-se e a proliferar-se.⁶

Na **tabela 1.1** estão apresentadas as combinações farmacológicas utilizadas no tratamento do cancro colorretal com quimioterapia.

Tabela 1.1: Combinações de fármacos utilizadas no tratamento do cancro colorretal. Adaptado de ⁸.

Nome	Combinação de Fármacos
<u>AIO</u>	Ácido fólico, 5-Fluorouracil e Irinotecano
<u>CAPOX</u>	Capecitabina e Oxaliplatina
<u>Douillard</u>	Ácido fólico, 5-Fluorouracil e Irinotecano
<u>FOLFIRI</u>	Leucovorina, 5-Fluorouracil e Irinotecano
<u>FOLFOX</u>	Oxaliplatina, Leucovorina e 5-Fluorouracil
<u>FOLFOXIRI</u>	Irinotecano, Oxaliplatina, Leucovorina e 5-Fluorouracil
<u>FUFOX</u>	5-Fluorouracil, Oxaliplatina e Leucovorina
<u>FUOX</u>	5-Fluorouracil e Oxaliplatina
<u>XELOX</u>	Capecitabina e Oxaliplatina

Apesar da quimioterapia como um dos tratamentos no cancro colorretal ter uma relativa taxa de sucesso em muitos doentes, existem algumas limitações, que incluem a falta de seletividade e especificidade para o tumor, o que conduz a mais efeitos secundários indesejáveis, a toxicidade sistémica e a resistência, inata ou adquirida. Desta forma, surgem novas abordagens que saem um pouco do âmbito do que é o tratamento convencional desta doença.⁷

A terapia dirigida aparece como uma aliada à quimioterapia: também envolve o uso de medicamentos, no entanto estes visam inibir especificamente certos processos celulares, como a proliferação, diferenciação e migração celular, atuando diretamente nas células cancerígenas. Os anticorpos monoclonais são os uma classe importante nesta terapêutica, já que se tratam de agentes direcionados a recetores específicos que estão localizados nas células tumorais. Como exemplos temos o cetuximab, o bevacizumab e o pembrolizumab.⁷

Existe ainda a radioterapia, que utiliza radiação de alta energia para destruir as células tumorais e é normalmente realizada antes da intervenção cirúrgica, com a finalidade de reduzir o tamanho do tumor. A radioterapia ou a combinação da radioterapia com a quimioterapia usada após a cirurgia só é realizada em doentes específicos que apresentem um risco elevado do cancro voltar a reaparecer.^{5,8}

Finalmente, a imunoterapia utiliza as defesas do sistema imunitário de cada organismo para combater o cancro – os fármacos usados neste tipo de tratamento ajudam a que as células imunitárias do paciente reconheçam as células cancerígenas como estranhas, eliminando-as.^{5,8}

Face ao mencionado anteriormente, é possível concluir que, após muitos anos de desenvolvimento, foram desenvolvidos grandes esforços para a criação de novos fármacos direcionados ao cancro colorretal, de modo a proporcionar uma melhor recetividade do paciente à terapêutica (fazer com que o mesmo tome consciência do tratamento e com que o seu comportamento coincida com as orientações dadas para controlar ou curar a doença que tem), menos efeitos indesejáveis e um tratamento mais individualizado, sobretudo com a descoberta da terapia dirigida. No entanto, ainda não existe até ao momento um tratamento universal que possa ser aplicado a todos os pacientes com igual eficácia, o que significa que a procura e a identificação de novos alvos terapêuticos devem continuar a ser feitas, de forma a contrariar aspetos como a resistência à terapêutica, que é uma das maiores fragilidades desta doença.⁷

1.2. A Proteína p53 como Alvo Terapêutico do CCR

O cancro surge como resultado de um conjunto de alterações fisiopatológicas, capazes de alterar as vias de sinalização responsáveis pelo controlo da proliferação celular. Como tal, é necessária uma regulação deste processo, que é obtida através da ação de uma enorme variedade de genes, nomeadamente genes supressores de tumor, os quais devem assegurar que esta proliferação ocorra de forma controlada.⁹

A proteína p53, ou p53, também conhecida como “a guardiã do genoma”, é uma proteína supressora tumoral que apresenta várias e importantes funções a nível celular, garantindo a manutenção do genoma e a integridade do ADN. No que diz respeito ao controlo do ciclo celular, a p53 é responsável por verificar se existem erros de replicação do ADN – quando tais erros são detetados, a p53 encarrega-se de reparar o ADN; no caso de os erros serem irreparáveis, a sua função passa por impedir que a célula se divida e dê origem a novas células, através da indução da morte celular (apoptose celular).^{9,10,11}



Figura 1.4: Representação da proteína p53. (fonte: <https://www.mskcc.org/news/new-findings-clarify-how-guardian-genome-works>, consultado em 11/07/2023)

1.2.1. Estrutura da p53

A proteína p53 é um homotetrâmero de quatro cadeias idênticas de 393 aminoácidos, com uma massa de 53 kDa. Cada monómero apresenta uma estrutura composta por vários domínios funcionais distintos: uma região N-terminal, que compreende o domínio de transativação (TAD), responsável pela mediação da atividade transcricional da p53, e um domínio rico em prolina (PRR), que tem sido associado à inibição do crescimento celular e também à morte celular; um domínio de ligação ao ADN (DBD), que permite a ligação

específica da sequência ao ADN. Esta região é caracterizada por ser a localização de aproximadamente 80% das mutações do gene TP53.^{10,11,12}

Este último domínio é seguido por uma região de ligação (LR), que por sua vez é seguida pelo domínio de oligomerização (OD) – encontra-se abrangido pela região C-terminal, que está associada a várias funções, como a ligação ao ADN, conferindo estabilidade proteica, recrutamento de cofatores e regulação subcelular da p53.^{10,12}

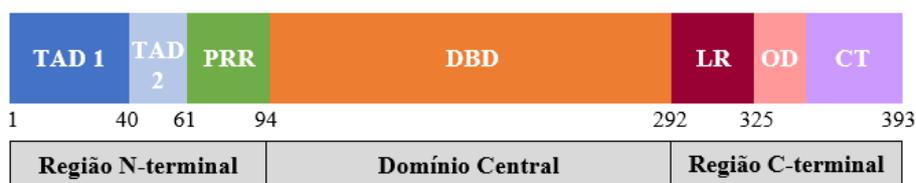


Figura 1.5: Representação esquemática dos vários domínios da proteína p53.¹⁰

Recorrendo a técnicas como SAXS, RMN e crio-EM, foi possível verificar que a p53 no seu comprimento total forma um tetrâmero com uma estrutura aberta em forma de cruz, sendo que os ODs se localizam no centro e um par de dímeros DBD estão fracamente acoplados nas extremidades, acessíveis para se ligarem ao ADN e às proteínas parceiras.¹²

Esta proteína é um fator de transcrição biologicamente ativo como um homotetrâmero (montado como um dímero de dímeros) e o reconhecimento do ADN ocorre mediante um processo de ligação cooperativa, o que significa que a formação da interação dos dímeros correspondentes ao DBD-DBD seguida da tetramerização feita pelos ODs é favorecida na presença de ADN, e tanto as interações proteína-proteína como proteína-ADN contribuem para a estabilidade geral do complexo.¹²

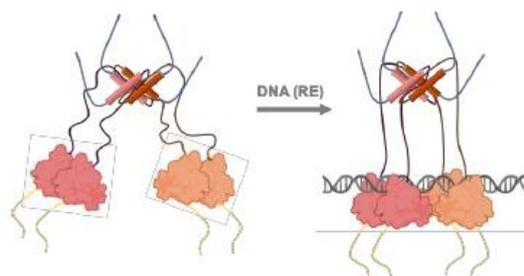


Figura 1.6: Representação da estrutura quaternária da p53 em solução e informações estruturais sobre a ligação do DBD da p53 ao ADN.¹²

1.2.2. Inativação da p53

O gene TP53 apresenta mutações ou inativações em cerca de 50% dos vários tipos de cancro, incluindo o cancro colorretal, o que significa que estas alterações vão comprometer a expressão da proteína codificada pelo referido gene, ou seja, pela p53 e alterar a sua função normal, contribuindo para o processo de carcinogénese. De facto, a grande maioria dos cancros desenvolve-se quando a resposta celular da p53 se encontra diminuída, visto que existe uma perda da ação supressora tumoral e uma interação com reguladores negativos, que impedem a proteína de atuar.^{9,10,13}

Os dois mecanismos principais responsáveis pela inativação do gene TP53 estão precisamente relacionados com o tópico referido no parágrafo anterior, e são a mutação do gene e a interação da proteína com reguladores negativos, como o MDM2 e MDM4, um homólogo de MDM2 (também conhecido como MDMX).¹⁰

1.2.2.1. Mutação do gene TP53

Ao contrário da grande maioria dos genes supressores de tumor, como é o caso do RB1, APC ou VHL, onde as mutações são principalmente deleções ou *nonsense*, o que resulta na pouca expressão da proteína, o tipo predominante de mutação no gene TP53 é o *missense*. Aproximadamente 70-80% das mutações resultam da substituição de um único aminoácido numa proteína, decorrente da mutação de um único nucleótido, o que conduz à produção de proteínas alteradas ou defeituosas.¹⁰

As mutações *missense* podem ocorrer em toda a molécula, no entanto elas são mais frequentemente encontradas no domínio de ligação ao ADN, uma região essencial para a p53 reconhecer sequências específicas de ADN nos promotores dos seus genes-alvo. Dentro deste domínio, certos resíduos de aminoácidos apresentam uma frequência muito maior de mutações do que outros, sendo que esses resíduos são designados por *hotspots*. Como exemplos temos o R175, G245, R248, R249, R273 e o R282.^{10,13,14}

Estas mutações são classificadas como sendo do tipo contacto ou estruturais, dependendo se os resíduos desempenham um papel direto no contacto com o ADN ou na manutenção da conformação da forma nativa da p53 (WTp53), respetivamente. As mutações de contacto prejudicam a ligação da p53 ao ADN, como resultado da perda de contactos essenciais proteína-ADN, enquanto que as mutações estruturais dão origem a

proteínas desestabilizadas, com uma estrutura 3D alterada. Existem, para além das mutações *missense*, um pequeno número de mutações *nonsense*, *frameshift*, inserções e deleções que também são encontradas no gene TP53.^{10,15}

As substituições nos resíduos R175 (estrutural), R248 e R273 (de contacto) são as mutações mais frequentes no caso do cancro colorretal.^{10,15}

As mutações no gene TP53 não só causam perda de função e prejudicam a atividade transcricional, como também podem fazer com que as espécies mutantes adquiram novas funções – chamado ganho de função (GOF), contribuindo para piores desfechos, quimiorresistência e eventos de recaída.^{13,14,15}

1.2.2.2. Interação da p53 com reguladores negativos

Em muitos tumores em que o gene TP53 não apresenta qualquer mutação, a WTP53 é mantida em níveis baixos devido à interação com reguladores negativos, como o MDM2 e o MDM4. Isto acontece uma vez que a atividade intrínseca da p53 também precisa de ser regulada de uma forma cuidadosa, para evitar respostas excessivas ou indesejadas – estes reguladores (e outros, mas menos importantes) interagem com a p53 para inibir a sua função ou promover a sua degradação, garantindo que a sua ativação é feita apenas quando necessário.¹⁰

A proteína MDM2 é um exemplo de regulador negativo da WTP53, que promove a sua translocação do núcleo para o citoplasma, levando à degradação através do proteossoma. Já a MDM4 interage com a WTP53 e inibe a sua atividade transcricional, bloqueando a capacidade da p53 se ligar ao ADN e de estimular a transcrição de genes associados ao controlo do ciclo celular e à apoptose. De referir que, em resposta a estímulos como erros no ADN, estas proteínas são inibidas, permitindo assim que a p53 se acumule e ative a expressão de genes responsivos.^{10,16}

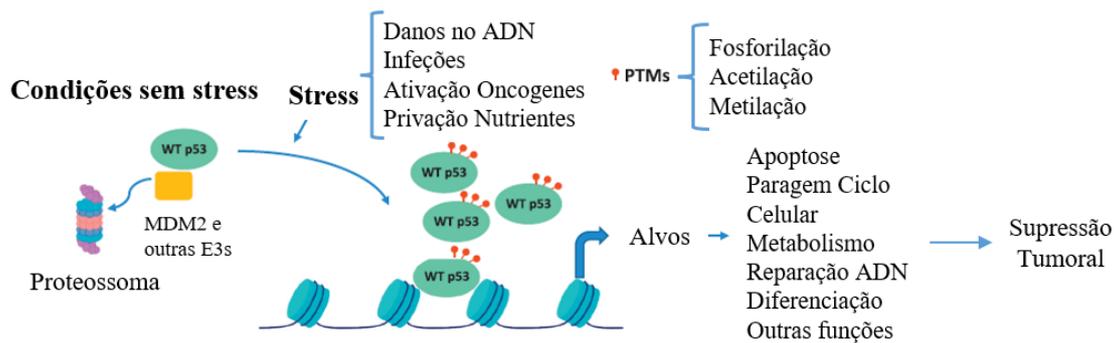


Figura 1.7: Representação esquemática da via de sinalização da p53 sob condições sem stress e com stress.¹⁴

1.2.3. Estratégias para a reativação da p53

Embora várias estratégias tenham sido investigadas para direcionar a p53 disfuncional no tratamento do cancro colorretal, apenas duas destas estratégias resultaram, até agora, em compostos que se encontram em fase de ensaios clínicos: via restabelecimento da atividade nativa da proteína p53 mutada (mutp53) e via inibição dos reguladores negativos da p53.^{10,12}

No primeiro caso, a reativação da p53 tem como objetivo corrigir os defeitos estruturais ou funcionais, provocados pelas mutações no gene TP53. Estas mutações levam à perda da atividade da p53 como fator de transcrição e, conseqüentemente, ao comprometimento das suas funções normais. Este restabelecimento da atividade nativa pode ser feito utilizando terapias direcionadas específicas, por exemplo moléculas que corrijam a conformação da proteína mutante, ou então mediante o uso de terapia génica, de modo a introduzir uma forma funcional da p53 na célula.¹³

No caso da reativação da p53 ser por inibição dos seus reguladores negativos, esta abordagem visa bloquear a interação dessas proteínas com a p53, o que torna o MDM2 e o MDM4, por exemplo, bons alvos moleculares de possíveis fármacos para o tratamento do cancro, já que a sua inibição aumentará os níveis da p53, bem como a sua atividade transcricional.¹⁴ Para além de MDM2 e de MDM4, existem outros reguladores negativos que podem ser modulados para reativação da p53, como é o caso de Cop1, ARF-BP1 e Pirh2, onde se encontram a ser investigados inibidores destas proteínas também como potenciais abordagens alternativas.^{17,18,19}

Existe um número relativamente elevado de moléculas que ativam a p53, uma vez que a sua refuncionalização é uma estratégia encorajadora para o tratamento do cancro, nomeadamente do cancro colorretal. No entanto, a maior parte destas moléculas permanece na fase pré-clínica devido à sua falta de especificidade.¹⁵

Na **figura 1.8** estão representadas algumas moléculas em ensaios clínicos que tem como objetivo a reativação da p53, quer pelo restabelecimento da atividade nativa da mutp53, quer pela inibição dos reguladores negativos da p53.^{10,11} Todas elas avançaram para ensaios clínicos de fase I/II, inclusive as moléculas PRIMA-1^{MET}, RG7388, AMG232 e DS-3032b avançaram para a fase de ensaios clínicos de fase III. No entanto, estudos adicionais permitiram concluir que as últimas moléculas apresentavam uma atividade inibitória independente da p53 no cancro colorretal, o que significa que não se enquadram na terapia do cancro baseada na p53.^{10,11,15}

Desta forma, é necessária a realização de mais estudos e pesquisas, para encontrar novos ativadores da p53 mais efetivos e com melhores resultados.

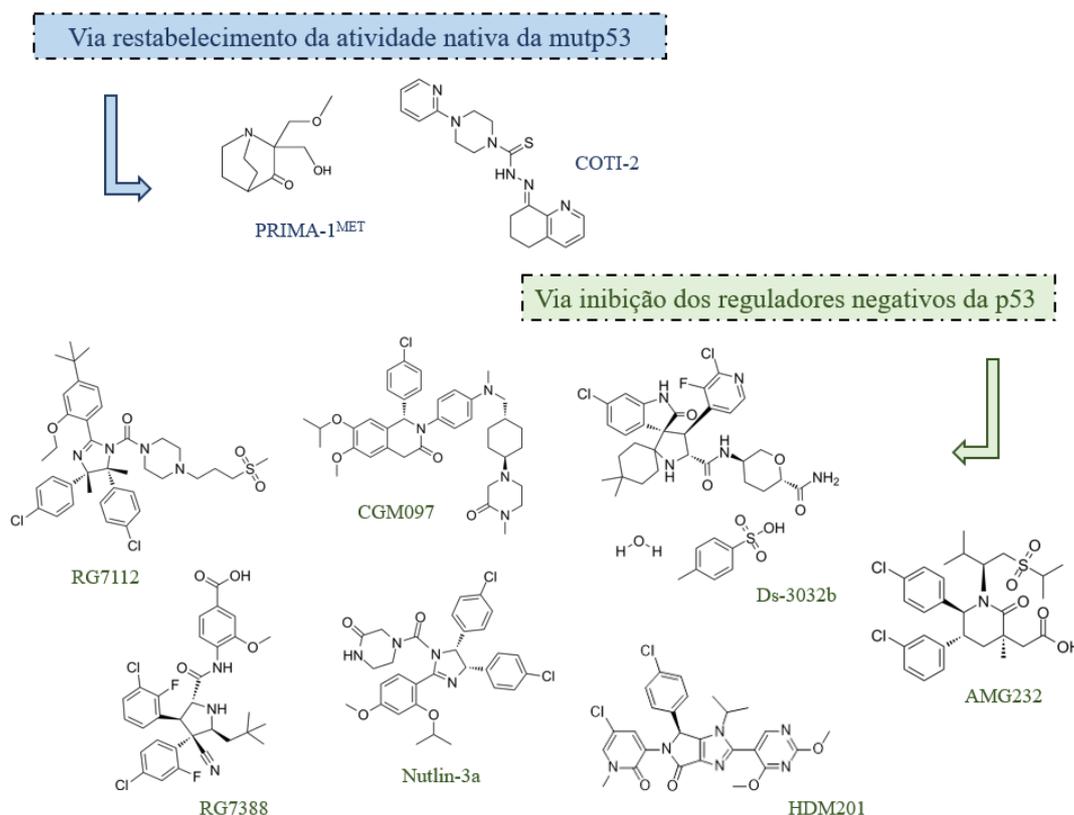


Figura 1.8: Moléculas em ensaios clínicos que visam a reativação da p53.^{10,11}

1.3. 1*H*,3*H*-Pirrolol[1,2-*c*]tiazóis

Recentemente foi descoberto no grupo de investigação um composto promissor para o tratamento do cancro colorretal, o (3*S*)-6,7-bis(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolol[1,2-*c*]tiazole, também conhecido como MANIO, representado na **figura 1.9**.¹⁵

O núcleo base desta molécula é o 1*H*,3*H*-pirrolol[1,2-*c*]tiazole e, visto que os compostos sintetizados apresentados na dissertação tem este núcleo, torna-se importante perceber de que forma são obtidos e quais os processos que ocorrem durante a sua síntese.

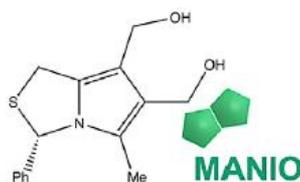
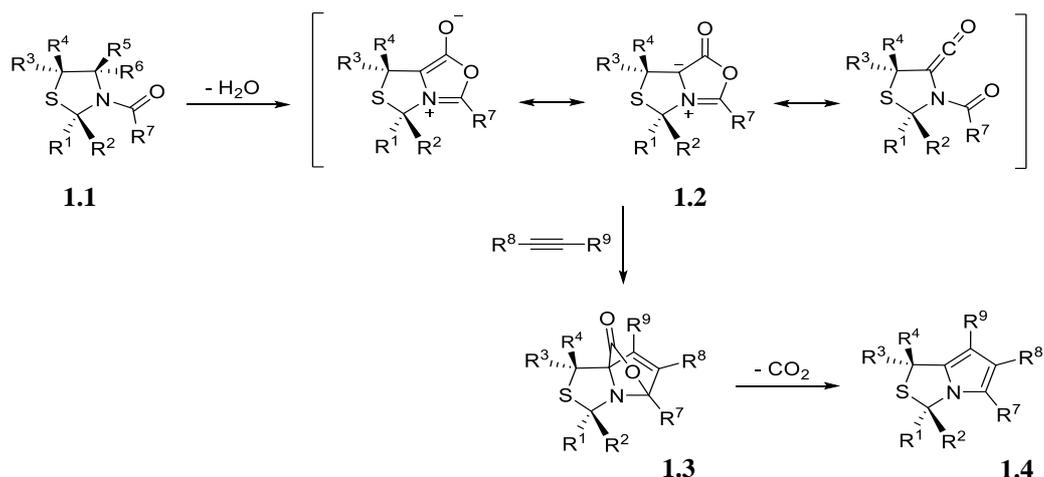


Figura 1.9: Representação estrutural do MANIO.¹⁵

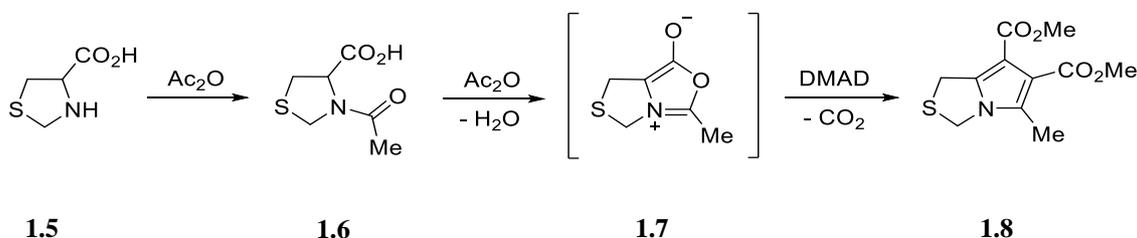
1.3.1. Síntese de 1*H*,3*H*-Pirrolol[1,2-*c*]tiazóis

Os 1*H*,3*H*-pirrolol[1,2-*c*]tiazóis podem ser obtidos a partir de ácidos 1,3-tiazolidina-4-carboxílicos, compostos que se obtém por reação da cisteína ou da penicilamina com aldeídos aromáticos ou alifáticos. Estas tiazolidinas são precursores de sistemas mesoiónicos bicíclicos do tipo 1,3-oxazolio-5-olatos, concretamente 5*H*,7*H*-tiazolo[3,4-*c*]oxazol-4-*io*-1-olatos **1.2**, por ciclo-desidratação promovida por reagentes tais como o anidrido acético (Ac₂O). Estes sistemas mesoiónicos bicíclicos podem atuar como ileto azometino mascarado em reações de ciclo-adição 1,3-dipolar na presença de dipolarófilos para dar os correspondentes cicloadutos **1.3** que sofrem eliminação de dióxido de carbono, dando 1*H*,3*H*-pirrolol[1,2-*c*]tiazóis **1.4**.²⁰⁻²⁵ O processo geral de síntese de 1*H*,3*H*-pirrolol[1,2-*c*]tiazóis encontra-se apresentado no **esquema 1.1**.



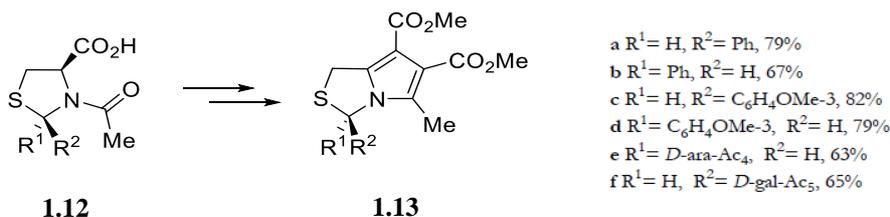
Esquema 1.1: Processo de obtenção de 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis.²¹

Na década de 80 Kane descreveu o primeiro exemplo de síntese de um 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole.²⁰ Nesse exemplo, Kane partiu do ácido 1,3-tiazolidina-4-carboxílico **1.5** derivado da *L*-cisteína e efetuou a reação em anidrido acético na presença do dipolarófilo acetilenodicarboxilato de dimetilo (DMAD). O 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole não quiral **1.8** foi obtido através de uma sequência de *N*-acetilação, ciclo-desidratação, reação de ciclo-adição 1,3-dipolar seguida de eliminação de CO₂ (**esquema 1.2**).²⁰



Esquema 1.2: Primeiro exemplo de síntese de um pirrolo[1,2-*c*]tiazole, descrita por Kane et al.²⁰

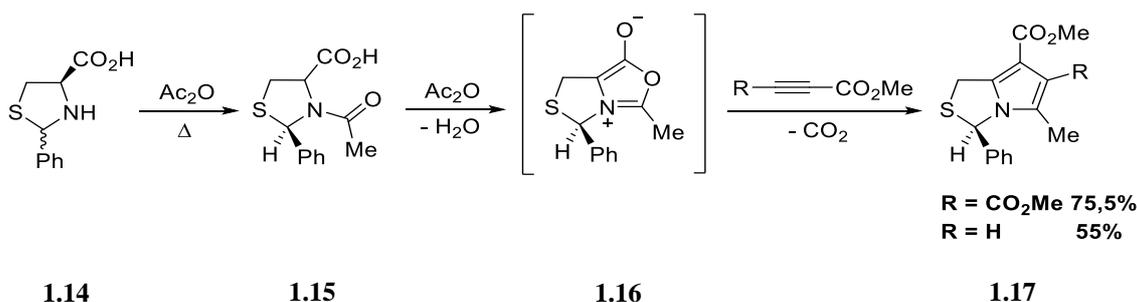
Os ácidos ou ésteres de 1,3-tiazolidinas-4-carboxílicos substituídos na posição 2 são preparados por reação de aldeídos com *D*- ou *L*-cisteína (ou com os correspondentes ésteres metílicos) num processo em que o centro quiral C-4 na tiazolidina não é afetado e é criado um novo centro assimétrico na posição 2 da tiazolidina. Esta reação de condensação não é estereosseletiva, o que significa que conduz à formação de misturas diastereoisoméricas. Szilágyi e colaboradores estudaram esta reação da *D*- e *L*-cisteína com aldeídos aromáticos e obtiveram sempre misturas de epímeros na posição 2 dos ácidos 1,3-tiazolidina-4-carboxílicos, uma vez que é a interconversão das tiazolidinas



Esquema 1.4: Síntese de ésteres quirais 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6,7-dicarboxílicos a partir de ácidos *N*-acil-1,3-tiazolidina-4-carboxílicos.²⁵

O grupo de investigação onde foi desenvolvido o projeto de investigação apresentado nesta dissertação tem explorado reações de ciclo-adição 1,3-dipolar de espécies mesoiónicas 5*H*,7*H*-tiazolo[3,4-*c*]oxazol-4-*io*-1-olatos para a preparação de uma diversidade de 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis quirais.²⁹⁻³³

As sínteses iniciais envolveram a reação da espécie mesoiónica 3-metil-5-fenil-5*H*,7*H*-tiazolo[3,4-*c*]oxazol-4-*io*-1-olato com DMAD e propiolato de metilo. O estudo permitiu concluir que partindo do ácido 2-feniltiazolidina-4-carboxílico **1.14** como mistura de epímeros, a *N*-acetilação diastereoseletiva pode ser promovida *in situ* por aquecimento em anidrido acético, tornando esta estratégia bastante atrativa uma vez que num único processo é possível converter tiazolidinas em 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis quirais com a configuração absoluta *R* em C-3 sem comprometer o rendimento global (esquema 1.5).²⁹

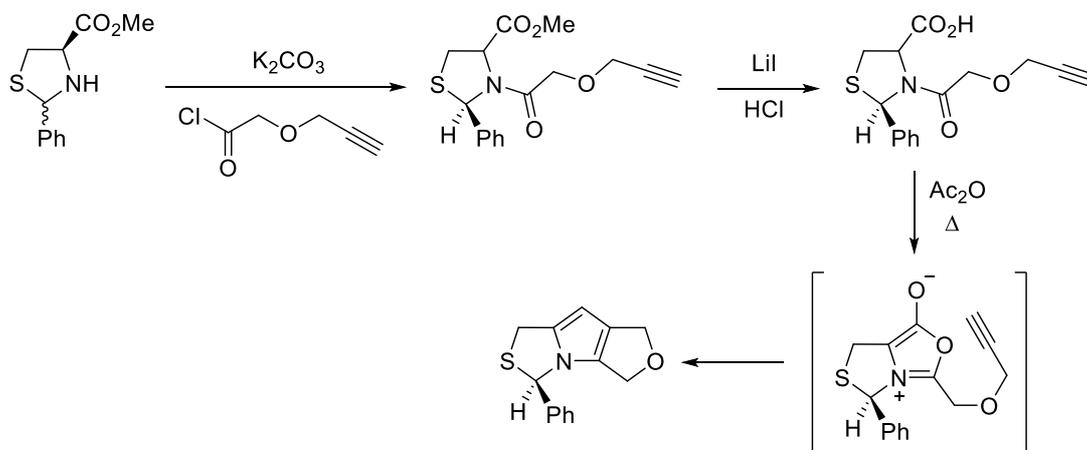


Esquema 1.5: Síntese de novos 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis quirais partindo de uma mistura diastereoisomérica de compostos.²⁹

A possibilidade de utilização de uma grande variedade de dipolarófilos e de introduzir alterações no anel de tiazolidina faz desta reação de ciclo-adição um importante método de síntese de pirrolo[1,2-*c*]tiazóis quirais, o que proporcionou a obtenção de uma biblioteca relativamente extensa desta família de compostos heterocíclicos.²⁹⁻³³

O método desenvolvido pelo grupo de investigação para obter os pirrolo[1,2-*c*]tiazóis com a configuração absoluta *R* foi mencionado anteriormente. Para obter os derivados *S* recorreu-se às condições já existentes na literatura para este tipo de compostos: partindo das tiazolidinas geradas como misturas diastereoisoméricas (*2S,4R*) e (*2R,4R*) por condensação de *L*-cisteína com aldeídos aromáticos, foi possível obter de forma diastereosseletiva *N*-acetil-tiazolidinas com configuração absoluta (*2S,4R*). As tiazolidinas acetiladas são posteriormente utilizadas para gerar *5H,7H*-tiazol[3,4-*c*][1,3]oxazol-4-*io*-1-olatos. Estes sistemas mesoiônicos, gerados *in situ* pela ciclo-desidratação das *N*-acetil-tiazolidinas atuam como 1,3-dipolos em reações de ciclo-adição 1,3-dipolar com dipolarófilos ativados, levando à obtenção de *1H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis quirais com configuração absoluta *S* após eliminação de dióxido de carbono.³³

O grupo de investigação também desenvolveu uma metodologia para a reação de ciclo-adição 1,3-dipolar intramolecular de *5H,7H*-tiazolo[3,4-*c*]oxazol-4-*io*-1-olatos. Este estudo permitiu a síntese de novos sistemas tricíclicos de forma seletiva, tal como ilustrado no **esquema 1.6**.^{34,35}

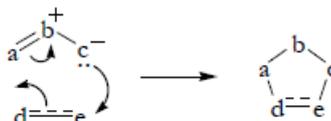


Esquema 1.6: Exemplo de uma reação de ciclo-adição 1,3-dipolar intramolecular de *5H,7H*-tiazolo[3,4-*c*]oxazol-4-*io*-1-olatos.

1.3.2. A reação de ciclo-adição 1,3-dipolar

Dado que é através de uma reação de ciclo-adição 1,3-dipolar que se obtém o núcleo heterocíclico *1H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole, torna-se importante o conhecimento acerca deste tipo de reação.

A reação de ciclo-adição 1,3-dipolar, também conhecida como reação de ciclo-adição [3+2] é uma das reações mais utilizadas para a síntese de compostos heterocíclicos de 5 membros.³⁶⁻³⁸ Esta reação envolve a adição de um sistema com 4 eletrões π , denominado de 1,3-dipolo, a um sistema com ligações múltiplas, o dipolarófilo (reações do tipo $4\pi + 2\pi$). Este mecanismo ocorre, em regra, através de um processo concertado envolvendo 6 eletrões π , que se encontra representado no **esquema 1.7**.



Esquema 1.7: Rearranjo eletrónico observado entre o 1,3-dipolo e o dipolarófilo.

Em geral, o dipolarófilo pode ser qualquer composto que possua 2 eletrões π , ligações duplas ou triplas contendo ou não heteroátomos, e que seja suscetível de participar na reação de ciclo-adição.

O 1,3-dipolo contém 3 átomos, sendo pelo menos um deles um heteroátomo, onde se encontram distribuídos os 4 eletrões π . O termo 1,3-dipolo está relacionado com a teoria de ligação de valência, uma vez que estes compostos apenas podem ser descritos através de estruturas de Lewis dipolares, que sejam ambivalentes nas três posições. Para que a estrutura obedeça à regra do octeto, ela é representada através de formas canónicas zwiteriónicas, na qual a carga positiva está localizada no átomo central e a carga negativa é distribuída pelos 2 átomos terminais (no entanto, existe deslocalização de carga sobre os 3 átomos).³⁶

Existe uma grande variedade de 1,3-dipolos contendo diferentes combinações possíveis de carbono e heteroátomos (18). Na **figura 1.10** estão resumidos os principais tipos de 1,3-dipolos, que tem como elementos principais o carbono, nitrogénio e oxigénio.³⁶ São também conhecidos 1,3-dipolos que incorporam átomos de fósforo ou enxofre na sua constituição. No caso dos 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis o 1,3-dipolo presente é o ileto azometino.

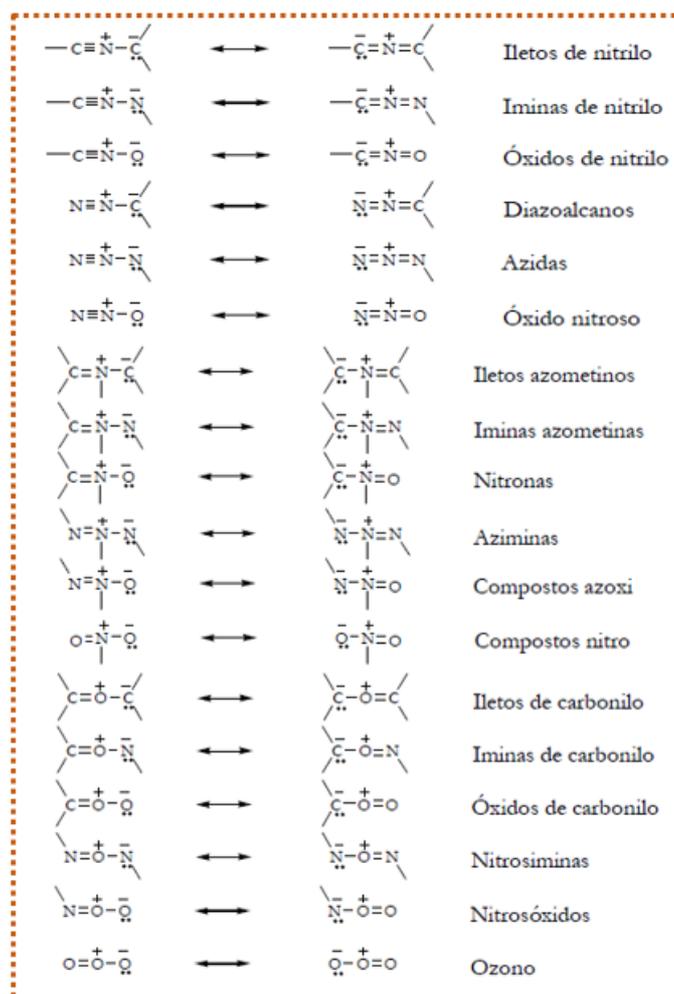


Figura 1.10: Principais tipos de 1,3-dipolos e respetiva classificação.³⁶

A criação do conceito de 1,3-dipolo surgiu pela primeira vez em 1883, quando Curtius descobriu o éster diazoacético.³⁹ Anos mais tarde, outros investigadores descreveram e desenvolveram as primeiras reações deste tipo, mas foi nos anos 60 que a reação de ciclo-adição 1,3-dipolar foi utilizada como estratégia de síntese de heterociclos de 5 membros, pelo químico alemão Rolf Huisgen.³⁶ O estudo pormenorizado desta reação levou à descoberta de uma ampla variedade de 1,3-dipolos que, conseqüentemente, deram lugar ao estudo de todo um conjunto de novas reações.

De facto, nos dias de hoje a reação de ciclo-adição 1,3-dipolar já se tornou um método bastante usado na síntese de heterociclos de 5 membros, uma vez que os 1,3-dipolos são relativamente acessíveis e também porque existe uma grande quantidade e variedade de dipolarófilos, que possibilitam a extensão deste tipo de reação. Contudo, nem todos os exemplos de 1,3-dipolos apresentados na **figura 1.10** são suficientemente

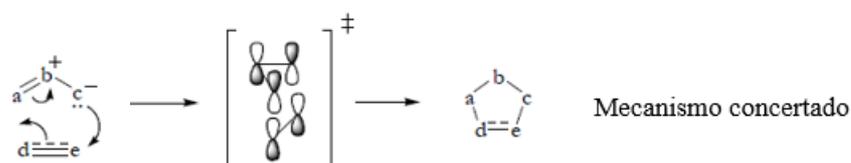
estáveis para serem isolados, o que significa que normalmente são gerados *in situ*, através de um precursor e do dipolarófilo.

A reação de ciclo-adição 1,3-dipolar pode ser de 2 tipos, intermolecular ou intramolecular. Ela é do tipo intermolecular quando o 1,3-dipolo e o dipolarófilo são moléculas distintas, o que leva apenas à formação de um novo anel. No caso do 1,3-dipolo e do dipolarófilo fazerem parte da mesma molécula, a ciclo-adição é designada por intramolecular, e os produtos obtidos são geralmente mais complexos, como resultado da formação de um sistema bicíclico.⁴⁰

1.3.2.1. Mecanismo da reação de ciclo-adição 1,3-dipolar

Existem aspetos que evidenciam a existência de um estado de transição muito ordenado e, portanto, de um mecanismo concertado nas ciclo-adições 1,3-dipolares, nomeadamente a estereoespecificidade, a entropia de ativação negativa e a influência, de forma moderada, que a polaridade do solvente exerce na velocidade da reação. Estudos efetuados por Huisgen suportam a existência de um mecanismo concertado, que envolve um único passo, no qual as duas novas ligações são formadas parcialmente, no estado de transição.⁴¹

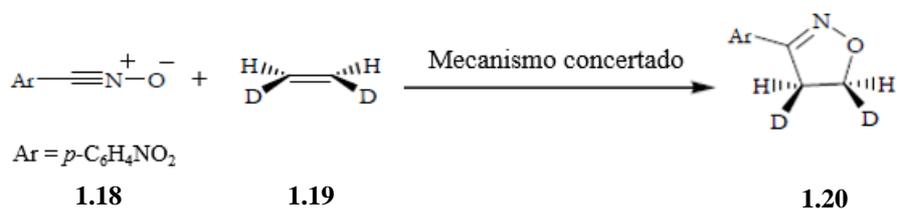
De acordo com as regras de Woodward-Hoffman, se a reação ocorrer através de um mecanismo concertado a sua descrição $[4\pi s + 2\pi s]$ é permitida termicamente, o que quer dizer que as três orbitais p do dipolo e as duas orbitais p do dipolarófilo se combinam suprafacialmente, como se encontra representado no **esquema 1.8**.⁴¹



Esquema 1.8: Mecanismo concertado da reação de ciclo-adição 1,3-dipolar.

O estudo da reação de ciclo-adição do óxido de 4-nitro-benzonitrilo **1.18** com etileno dideuterado **1.19**, por Houk e colaboradores, conduziu à formação da *cis*-3-(4-nitrofenil)-2-isoxazolina deuterada **1.20**, de forma estereosseletiva (superior a 98%) (**esquema 1.9**). Este resultado indica que a reação ocorre através de um mecanismo

concertado pois se se formasse um intermediário birradicalar, havia rotação em torno da ligação terminal, o que levaria à obtenção de uma mistura de isômeros *cis* e *trans*.⁴²



Esquema 1.9: Mecanismo da reação de ciclo-adição 1,3-dipolar do óxido de 4-nitro-benzonitrilo com etileno dideuterado.

No entanto, são conhecidos exemplos de ciclo-adições 1,3-dipolares em que o mecanismo por passos ocorre em competição com o mecanismo concertado e onde as reações deixam de ser estereosseletivas.^{37,43} Neste contexto, Huisgen propôs duas situações em que a reação ocorre pelo mecanismo em 2 passos: a primeira dessas situações é quando existe um grande impedimento estéreo em pelo menos um dos terminais do dipolo, e a segunda quando a diferença de energia entre as orbitais de fronteira do dipolo e do dipolarófilo é muito grande.

1.3.2.2. Reatividade e Regiosseletividade da reação de ciclo-adição 1,3-dipolar

Sustmann sugeriu um modelo baseado em perturbações à teoria das orbitais moleculares, teoria das orbitais de fronteira, para explicar a reatividade e regiosseletividade das reações de ciclo-adição 1,3-dipolar. Este modelo tem como base as interações entre a HOMO e a LUMO, quer do dipolo quer do dipolarófilo, e o processo foi classificado em 3 tipos, representados na **figura 1.11**.^{44,45}

Tipo I: a interação determinante para a análise da reatividade e regiosseletividade é a $\text{HOMO}_{\text{dipolo}}\text{-LUMO}_{\text{dipolarófilo}}$;

Tipo II: a semelhança das energias HOMO e LUMO faz com que as ambas as interações, $\text{HOMO}_{\text{dipolo}}\text{-LUMO}_{\text{dipolarófilo}}$ e $\text{LUMO}_{\text{dipolo}}\text{-HOMO}_{\text{dipolarófilo}}$, sejam determinantes na reatividade e regiosseletividade;

Tipo III: a interação determinante para a análise da reatividade e regiosseletividade é a $\text{LUMO}_{\text{dipolo}}\text{-HOMO}_{\text{dipolarófilo}}$.

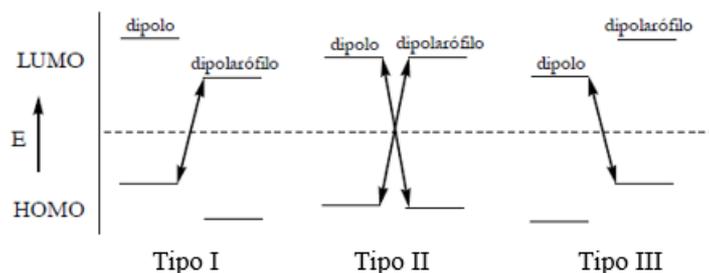


Figura 1.11: Tipos de reações de ciclo-adição.

Iletos azometinos são exemplos de 1,3-dipolos que participam em reações de ciclo-adição 1,3-dipolar do tipo I, onde a interação determinante para a análise da reatividade e regioselectividade é a $HOMO_{\text{dipolo}}-LUMO_{\text{dipolarófilo}}$.

Em relação à reatividade, podemos inferir que será tanto maior quanto mais próximas em energia estiverem as orbitais moleculares de fronteira. Este último parâmetro encontra-se relacionado com a estabilização do estado de transição, de uma forma inversamente proporcional, ou seja, quanto menor for a diferença de energia entre as orbitais envolvidas, mais estável será o estado de transição obtido. De salientar ainda que a introdução de grupos substituintes dadores ou atratores de elétrons, no dipolo ou no dipolarófilo pode fazer variar as energias relativas das orbitais moleculares de fronteira, o que se traduzirá na possível alteração do tipo de interação dominante.^{46-48,49}

Quanto à previsão acerca da regioselectividade, esta pode ser feita através das magnitudes relativas dos coeficientes na HOMO e na LUMO do 1,3-dipolo e do dipolarófilo, que são uma medida de polarização da molécula. Sabe-se que, no estado de transição, a orientação preferencial da molécula é aquela que aproxima os extremos do dipolo e do dipolarófilo com os coeficientes de maior magnitude e por isso o cicloaduto que se formará seletivamente na reação de ciclo-adição será o resultante desta interação. Neste caso, também o efeito de grupos substituintes se traduz numa modificação da magnitude relativa dos coeficientes das orbitais moleculares de fronteira.^{47,49}

Nas reações de ciclo-adição 1,3-dipolar do tipo intermolecular ou intramolecular, no caso de esta ser do tipo intramolecular, as orientações que seriam favoráveis segundo a teoria das orbitais moleculares de fronteira, podem tornar-se desfavoráveis devido a fatores como o impedimento estérico. Assim, nestas situações a regioselectividade é controlada pela tensão geométrica provocada pelo alinhamento correto que o 1,3-dipolo

deve possuir para a reação com o dipolarófilo, sendo de esperar uma seletividade elevada para este tipo de reações de ciclo-adição.^{47,49}

1.3.3. Atividade Biológica e Antitumoral dos Pirrolo[1,2-*c*]tiazóis

Os heterociclos são anéis que contém pelo menos um heteroátomo (N, O ou S), para além dos átomos de carbono e compreendem a maior família de compostos orgânicos, onde os compostos heterocíclicos mais comuns têm 5 ou 6 membros.^{50,51}

Cada vez mais os sistemas heterocíclicos fundidos têm captado um grande interesse na área da química medicinal devido às inúmeras propriedades biológicas e fisiológicas que apresentam, como anticancerígenos, anti-inflamatórios, antioxidantes, antivirais e também antimicrobianos.^{50,51}

Por exemplo, a eficácia comprovada e demonstrada dos imidazotiazóis para o tratamento de várias doenças levou ao estudo de sistemas heterocíclicos fundidos relacionados, nomeadamente imidazotriazóis e pirrolotiazóis. O pirrolotiazole é um isómero do imidazotiazole, em que o átomo de nitrogénio do anel imidazólico é substituído pelo grupo CH – **figura 1.12**. Na literatura encontram-se diversos exemplos de moléculas com atividade relevante contendo o núcleo pirrolotiazole, nomeadamente como hepatoprotetores, anticonvulsivantes, antidiabéticos, anticancerígenos, entre outras.⁵⁰

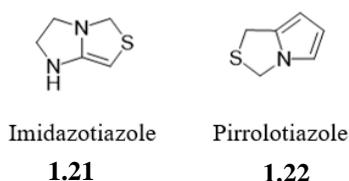


Figura 1.12: Estrutura genérica de um imidazotiazole (**1.21**) e de um pirrolotiazole (**1.22**).

Assim, novos 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis quirais foram sintetizados e testados quanto à sua atividade como agentes anticancerígenos em linhas celulares humanas de três tipos de cancro: adenocarcinoma colorretal (WiDR), melanoma (A375) e cancro da mama (MCF7). Os compostos estudados mostraram melhores resultados para linhas celulares do cancro da mama, tendo os compostos mais promissores apresentado valores de IC₅₀ da ordem dos 1 µM (**figura 1.13**). De referir que o composto (3*R*)-6,7-bis(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole (**1.25**) mostrou ser o mais

ativo. Os valores de IC₅₀ observados para os (3*R*)-6-hidroximetil-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole (**1.23**) e (3*R*)-7-hidroximetil-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole (**1.24**), contendo somente um grupo hidroximetilo, permitiram identificar relações de estrutura-atividade, nomeadamente a importância da presença de um grupo hidroximetilo no carbono C-6 para garantir um bom nível de atividade.⁵²

IC₅₀ na linha celular MCF7

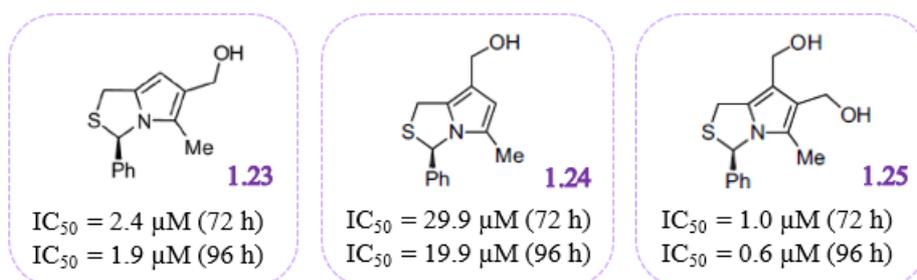


Figura 1.13: Atividade anticancerígena contra a linha celular humana MCF7 apresentada pelos compostos **1.23**, **1.24** e **1.25**, com 72 e 96 h de incubação.⁵²

Dado o potencial do (3*R*)-6,7-bis(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole **1.25** contra o cancro da mama, foram reportadas mais sínteses de 6,7-bis(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis, onde foram efetuadas pequenas alterações estruturais na molécula, de forma a identificar relações estrutura-atividade e eventualmente encontrar compostos com atividade anticancerígena melhorada. Estes estudos incluíram a análise do impacto da configuração absoluta na atividade anticancerígena.

Foi preparado o enantiómero do composto **1.25** apresentado acima, o (3*S*)-6,7-bis(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole (**1.26**), MANIO, que mostrou ser o composto mais ativo, com um valor de IC₅₀ = 0.5 μM nas linhas celulares humanas de cancro da mama MCF7.³³

Estudos mais aprofundados dos 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis foram realizados, nomeadamente para ver o potencial destes compostos na terapia do cancro da mama triplo-negativo, um dos tumores mais desafiantes em toda a prática clínica.

A atividade anticancerígena foi testada em várias linhas celulares humanas de cancro da mama, mais concretamente na MCF7, HCC1954 e HCC1806 (linha celular do cancro da mama triplo-negativo). O composto *p*-hidroxifenil **1.28** foi o que se mostrou

mais promissor na linha HCC1806, com um valor de $IC_{50} = 5.4 \mu\text{M}$ após 96 h de incubação (**figura 1.14**).⁵³

IC₅₀ nas linhas celulares MCF7 e HCC1806

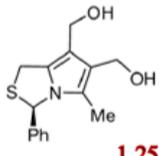
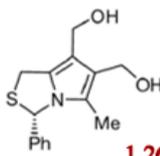
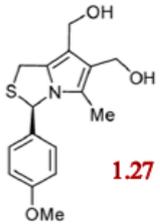
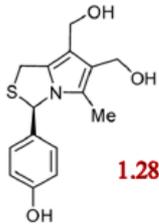
	 1.25	 1.26	 1.27	 1.28
MCF7	1.0 μM (72 h)	0.5 μM (72 h)	33 μM (72 h)	54 μM (72 h)
HCC1806	51 μM (72 h) 14 μM (96 h)	78 μM (72 h)	19 μM (72 h) 13 μM (96 h)	12 μM (72 h) 5.4 μM (96 h)

Figura 1.14: Valores de IC_{50} apresentados pelos vários compostos nas linhas celulares MCF7 e HCC1806, às 72 e 96 h (quando possível) de incubação.⁵³

Para os compostos mais ativos foram testados alguns efeitos celulares, nomeadamente a sobrevivência e viabilidade celular, danos no ADN e expressão de proteínas relacionadas com as vias de morte celular, sendo que o 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole **1.25** mostrou influência na expressão da p53.⁵³

De facto, em estudos *in vitro* na linha HCT116 p53^{+/+}, uma linha celular humana de cancro colorretal que expressa a p53, foi descoberto o composto **1.26** (MANIO), representado na **figura 1.15**, e proposto como uma molécula promissora no tratamento do cancro colorretal. Apresenta-se como um ativador seletivo da p53 (um requisito que as moléculas em ensaios clínicos não possuíam dado que a sua atividade inibitória era independente da p53) e é responsável por ativar de forma seletiva a forma nativa da p53 (WTp53) e restabelecer a atividade nativa da mutp53 em células do cancro colorretal.¹⁵

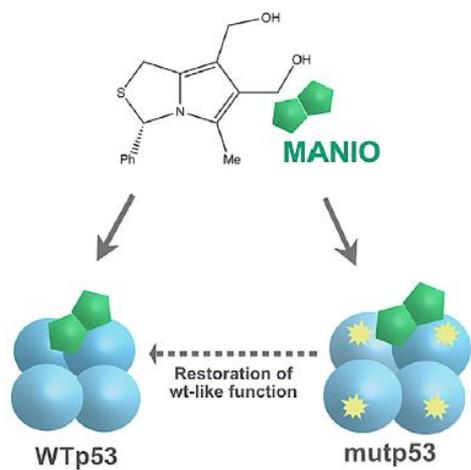


Figura 1.15: Estrutura e principais propriedades do MANIO.¹⁵

1.4. MANIO

Numa tentativa de identificar novos ativadores da p53 com propriedades anticancerígenas, foi estudado o efeito antiproliferativo de uma pequena biblioteca de 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis num painel de células cancerígenas humanas com diferentes estados da p53, onde o MANIO mostrou ter uma seletividade notória para células cancerígenas que expressam a p53, uma vez que os valores de IC₅₀ para células cancerígenas que expressam a WTp53 ou a mutp53 são consideravelmente mais baixos comparativamente com os valores apresentados para células que não têm a p53 (HCT116 p53^{-/-}).¹⁵

Em particular, o valor de IC₅₀ do MANIO em células do cólon HCT116 que expressam a WTp53 (HCT116 p53^{+/+}) foi de 0.97 μM, cerca de 50x mais baixo do que o obtido para o derivado isogénico nulo (HCT116 p53^{-/-}; 48.25 μM) (**figura 1.16**). Foi possível concluir que o MANIO apresenta potente atividade antiproliferativa dependente da p53, que se encontra associada à paragem do ciclo celular e apoptose.¹⁵

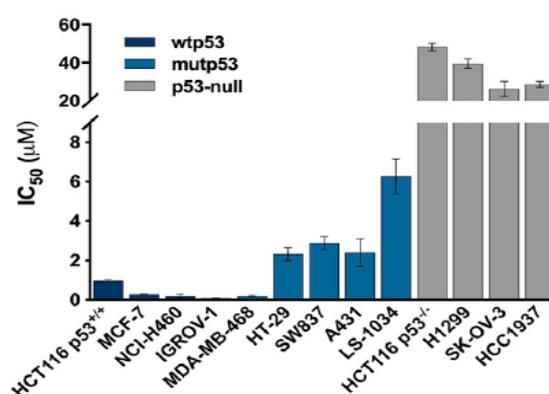


Figura 1.16: Valores de IC₅₀ num painel de linhas celulares cancerígenas humanas com diferentes estados da p53.¹⁵

Através do ensaio de imunoprecipitação da cromatina (ChIP) verificou-se que o aumento da atividade transcricional da p53 pelo MANIO resultou num aumento da capacidade de ligação ao ADN em células HCT116 p53^{+/+}. Tendo como objetivo compreender melhor o modo de ação do MANIO, foram feitas análises que confirmam que o MANIO ativa a via p53 por ligação ao domínio de ligação ao ADN (DBD) da p53, no sulco menor.¹⁵

Foi avaliada a capacidade do MANIO para reativar diferentes formas da mutp53 (quer de contacto, quer estruturais) com relevância clínica em cancros humanos, também por

ligação ao DBD. Neste estudo observou-se que o MANIO restaura as propriedades nativas da mutp53 R248W, o que demonstrou algum nível de seletividade para algumas destas formas mutadas da p53.¹⁵ Este ensaio foi efetuado avaliando o efeito antiproliferativo do MANIO em células cancerígenas que não expressam a p53, as H1299, onde as diferentes formas da mutp53 foram expressas de forma ectópica.

A representação destes modos de ligação pode ser observada abaixo, na **figura 1.17**.

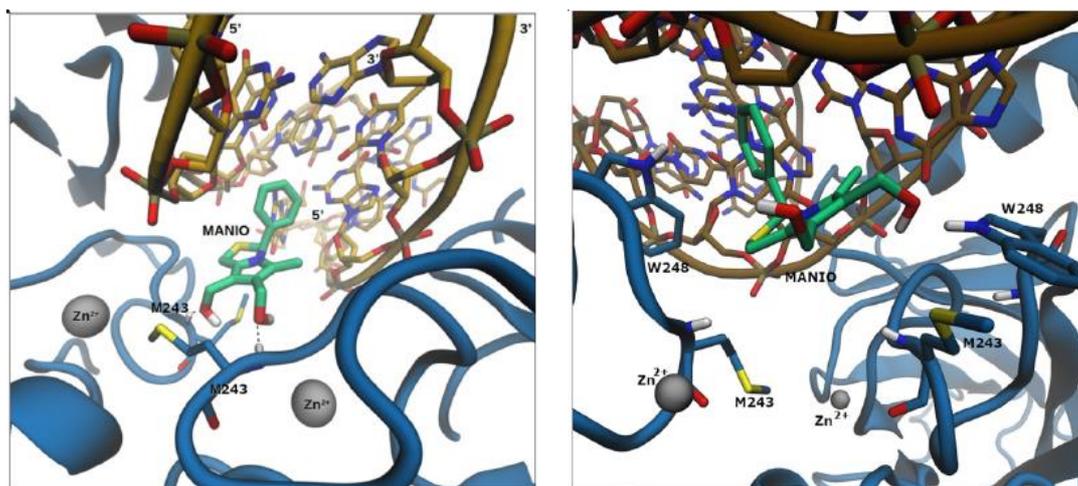


Figura 1.17: Modo de ligação do MANIO à WTp53 (à esquerda) e à mutp53 R248W (à direita), no DBD.¹⁵

Como forma de verificar o comportamento do MANIO em células de doentes com cancro colorretal, um sistema-modelo mais relevante e mais próximo da heterogeneidade e sensibilidade dos tumores aos fármacos, foi estudado o seu efeito antiproliferativo em pacientes com diferentes idades, sexo e diagnóstico prévio, de onde se concluiu que este composto apresenta atividade citotóxica neste tipo de células, como é possível confirmar pela **figura 1.18**.¹⁵

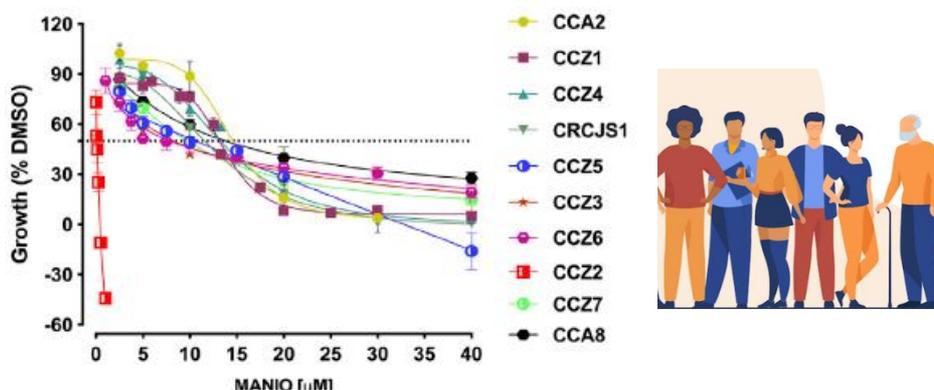


Figura 1.18: Curvas dose-resposta do efeito inibitório do crescimento de MANIO em células do cancro colorretal derivadas de pacientes.¹⁵ As siglas CCA2, CCZ1, etc referem-se à identificação de cada paciente.

Visto que o MANIO apresenta uma excelente atividade anticancerígena *in vitro*, a sua atividade antitumoral foi avaliada *in vivo*, utilizando modelos animais *Swiss nude mice* com HCT116 p53^{+/+} (WTp53), HCT116 p53^{-/-} (sem a proteína p53) e SW837 (um tipo de mutp53). Estes modelos foram tratados intraperitonealmente com 50 ou 100 mg/kg de MANIO ou controlo, duas vezes por semana durante duas semanas. Observou-se que o MANIO não interferiu com o crescimento dos tumores na linha celular que não tem a p53, o que suporta o facto de a sua atividade anticancerígena estar dependente da p53. Nos modelos de xenograftos de HCT116 p53^{+/+} e SW837 o MANIO reduziu a proliferação celular e induziu a apoptose, indicando resultados concordantes com os obtidos *in vitro*.¹⁵

De ressaltar que durante o tempo experimental, foram feitos alguns estudos *in vivo*: comparando os camundongos tratados com MANIO com os grupos controlo, foi possível afirmar que não houve perda significativa de peso corporal nem presença de sinais de morbidade, para além de que não se notaram diferenças significativas no peso dos órgãos nem nos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Os dados relativos a estas observações estão nas **figuras 1.19 – 1.21**. Também foi testada a toxicidade do composto *in vivo*, que não apresentou toxicidade aparente.¹⁵

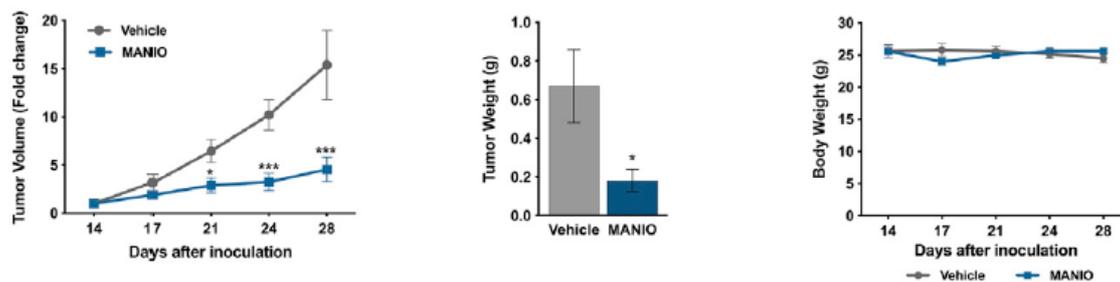


Figura 1.19: Modelos de xenografos de HCT116 p53^{+/+}.¹⁵

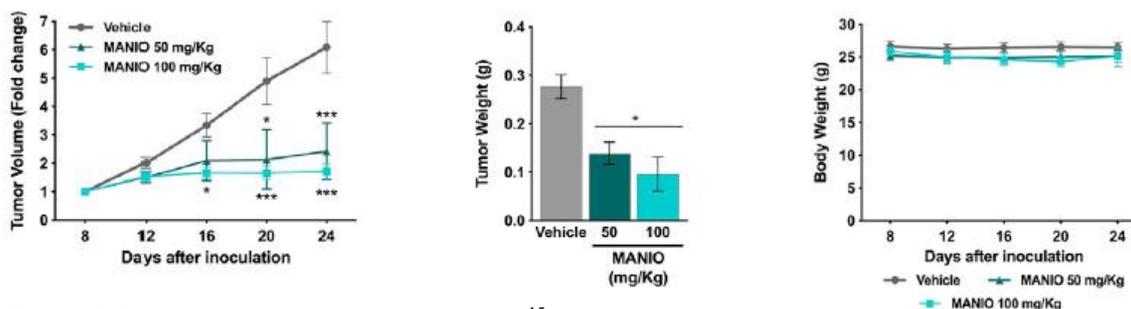


Figura 1.20: Modelos de xenografos de SW837.¹⁵

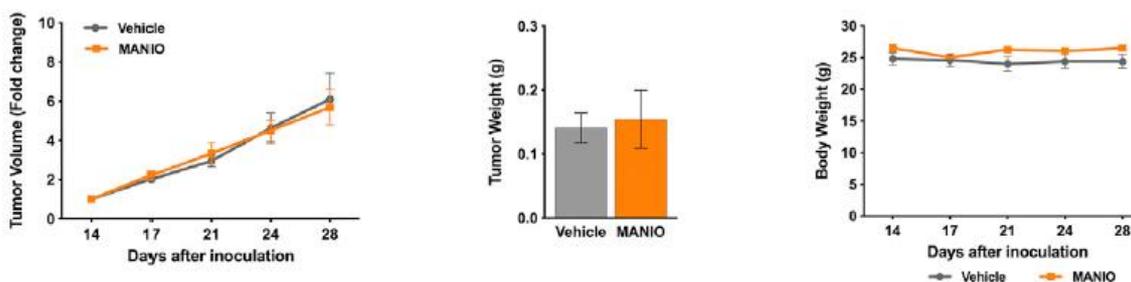
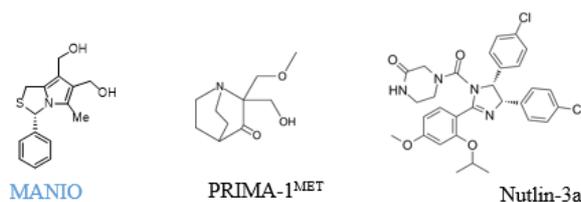


Figura 1.21: Modelos de xenografos de HCT116 p53^{-/-}.¹⁵

Como existem compostos ativadores da p53 em ensaios clínicos e quimioterápicos convencionais que são utilizados no tratamento atual do cancro colorretal, é interessante ver como se posiciona o MANIO perante as estratégias atuais ou em desenvolvimento. Estudos *in vitro* mostraram que o MANIO exibe uma maior potência e seletividade do que ativadores da p53 em ensaios clínicos, como é o caso das moléculas PRIMA-1^{MET} e Nutlin-3a – tabela 1.2.¹⁵

Tabela 1.2: Atividade anticancerígena do MANIO comparativamente com as moléculas PRIMA-1^{MET} e Nutlin-3a, em ensaios clínicos. Adaptado de ¹⁵.



Células cancerígenas humanas (cancro colorretal)	Estado da p53	IC ₅₀ (μM)		
		MANIO	PRIMA-1 ^{MET}	Nutlin-3a
HCT116 p53 ^{+/+}	WTp53	0.97 ± 0.04	19.50 ± 0.40	3.20 ± 0.10
HCT116 p53 ^{-/-}	sem p53	48.25 ± 1.97	6.57 ± 0.12	24.00 ± 0.70
SW837	mutp53	2.75 ± 0.32	26.50 ± 4.60	> 50
HT-29	mutp53	2.33 ± 0.33	39.80 ± 2.00	> 50

No que diz respeito à terapia atual, observou-se que o MANIO sinergiza com os quimioterápicos convencionais, fazendo-o não só em células de doentes com CCR que expressam a WTp53, como também em células do CCR que expressam a mutp53. Assim, com esta combinação, há um aumento do efeito inibidor apresentado e o MANIO pode reduzir a dose efetiva dos agentes quimioterápicos, levando à redução de alguns efeitos indesejáveis como a toxicidade e a quimiorresistência.¹⁵ A **figura 1.22** mostra o efeito sinérgico entre o MANIO e duas moléculas utilizadas na terapia atual do cancro colorretal, a DOXO (doxorubicina) e a CISP (cisplatina).¹⁵

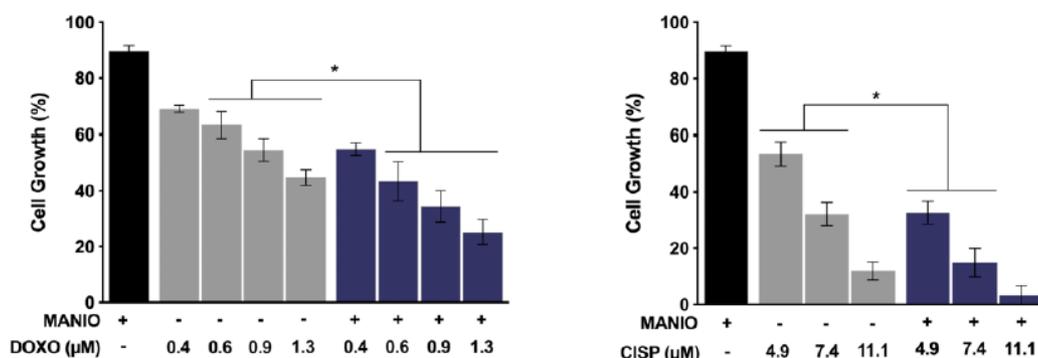


Figura 1.22: Representação do efeito sinérgico entre o MANIO e os quimioterápicos convencionais.¹⁵

Foram realizados estudos adicionais para verificar se a atividade antiproliferativa do MANIO estava associada com danos no ADN: o potencial genotóxico do MANIO foi avaliado em células normais e cancerígenas, onde se concluiu que, contrariamente aos controlos positivos, concentrações de MANIO de 1 e 2.5 μM não aumentaram a percentagem de “cometas positivos” em células HCT116 p53^{+/+}, como se encontra na **figura 1.23**, provando que o MANIO não é genotóxico.¹⁵

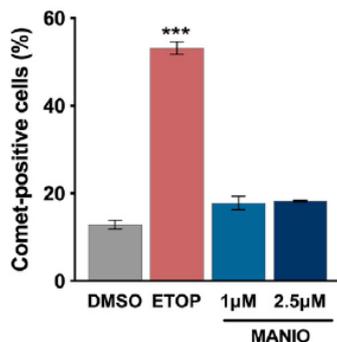


Figura 1.23: Avaliação dos danos no ADN nas células HCT116 p53^{+/+} (48 h), utilizando o ensaio cometa.¹⁵

Por fim, o MANIO apresenta perfil de fármaco, dado que obedece à “regra dos 5” de Lipinski,⁵⁴ possuindo propriedades farmacocinéticas adequadas para candidato a fármaco:

- permanece mais tempo no organismo, em função da sua taxa mais lenta de eliminação, o que exige doses menos frequentes e menores de fármaco;¹⁵
- foi detetada uma quantidade mínima de MANIO ligada a proteínas plasmáticas, indicando que uma percentagem elevada se encontra farmacologicamente ativa e livre para ser distribuída;¹⁵
- a sua cinética é boa, já que uma injeção por via intravenosa resultou na biodisponibilidade rápida e completa do composto.¹⁵

1.5. Modulação Estrutural do MANIO

Os resultados obtidos acima são altamente promissores, no entanto existem alguns aspetos menos positivos que devem ser considerados, como por exemplo o facto do MANIO não apresentar uma boa solubilidade em soluções aquosas de pH baixo e também de não ter o melhor resultado no que diz respeito à permeabilidade intestinal, já que o estudo feito revelou que, apesar da boa permeabilidade, com uma boa percentagem de MANIO recuperada, alguma quantidade de MANIO sofreu efluxo, o que limita a absorção do possível fármaco a nível intestinal.¹⁵

Como tal, e de forma a resolver estes problemas, o objetivo presente nesta dissertação foca-se na modulação estrutural do composto líder MANIO, de modo a obter derivados com propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas melhoradas.

Já foram sintetizados no grupo de investigação novos compostos quirais bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis **1.29-1.34**, e obtidos os respetivos valores de IC₅₀ em células do cólon HCT116 que expressam a WTp53 (HCT116 p53^{+/+}) e no derivado isogénico nulo (HCT116 p53^{-/-}). Os resultados encontram-se apresentados na **figura 1.24**. (resultados não publicados)

Valores de IC₅₀ nas linhas celulares HCT116 p53^{+/+} e HCT116 p53^{-/-}

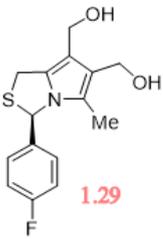
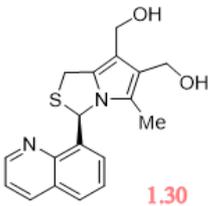
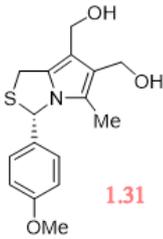
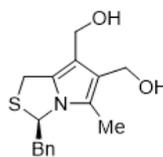
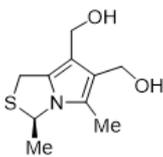
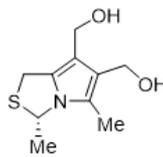
			
1.29	1.30	1.31	
HCT116 p53 ^{+/+}	7.5 μM	1.5 μM	4.4 μM
HCT116 p53 ^{-/-}	>50 μM	23.5 μM	32.5 μM
			
1.32	1.33	1.34	
HCT116 p53 ^{+/+}	16.3 μM	33.0 μM	31.0 μM
HCT116 p53 ^{-/-}	29.0 μM	46.0 μM	42.7 μM

Figura 1.24: Estruturas químicas de novos bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis e valores de IC₅₀ em linhas celulares HCT116 p53^{+/+} e HCT116 p53^{-/-} (resultados não publicados).

De acordo com os valores obtidos, verificou-se que nenhum dos compostos sintetizados se mostrou melhor do que o MANIO, o que significa que devem ser exploradas novas modulações estruturais. Assim, o trabalho apresentado nesta dissertação inclui outras mudanças estruturais à volta do núcleo *1H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole, nomeadamente a introdução de grupos alquilo em C-1, a substituição do grupo fenilo por outros grupos arilo ou heteroarilo e a oxidação a sulfóxidos ou sulfonas, moléculas alvo que se encontram presentes na **figura 1.25**.

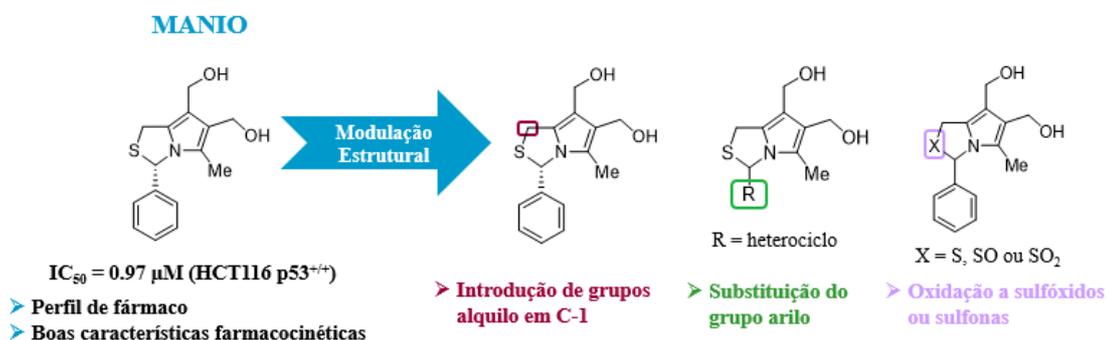


Figura 1.25: Modulação estrutural do MANIO.

No capítulo seguinte vão estar apresentadas as estratégias de síntese para a obtenção destes novos derivados do MANIO

CAPÍTULO 2

**SÍNTESE DE 6,7-
BIS(HIDROXIMETIL)-1*H*,3*H*-
PIRROLO[1,2-*c*]TIAZÓIS**

Neste capítulo são apresentadas as estratégias sintéticas utilizadas para a obtenção de novos derivados do MANIO. No geral, as metodologias usadas foram adaptadas de procedimentos que já se encontram descritos na literatura, em particular processos sintéticos desenvolvidos no grupo de investigação onde foi realizado o projeto científico apresentado nesta dissertação de Mestrado.^{33,52,53}

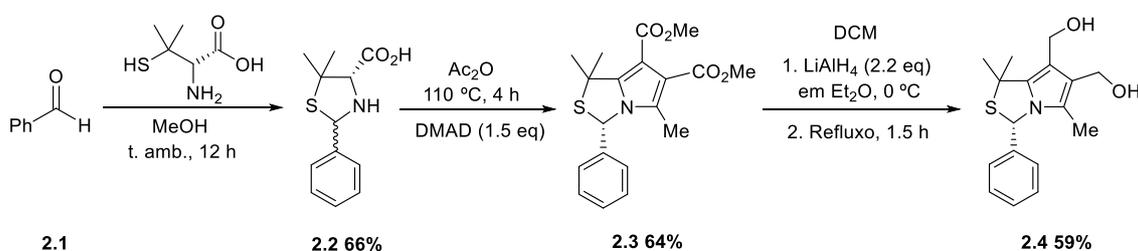
De forma a estabelecer relações estrutura-atividade dos compostos sintetizados, foram realizados estudos de atividade biológica de alguns destes compostos como agentes anticancerígenos. Foi avaliada a atividade antitumoral em linhas celulares humanas de cancro colorretal HCT116 p53^{+/+} e HCT116 p53^{-/-}, com recurso ao ensaio da sulforodamina B (SRB). Estes resultados serão apresentados e discutidos no Capítulo 3.

2.1. Síntese do derivado do MANIO com configuração absoluta *S* alquilado em C-1

O trabalho teve início com a síntese de um 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole incorporando grupos alquilo em C-1, de acordo com o ilustrado na **figura 1.25** do Capítulo 1. Assim, foi sintetizado o 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole **2.4** contendo dois grupos metilo na posição 1 e com configuração absoluta *S* em C-3. A síntese deste composto foi efetuada segundo o método desenvolvido pelo grupo de investigação, onde se partiu de uma tiazolidina derivada da *D*-penicilamina como uma mistura de diastereoisómeros em C-2.⁵³

A síntese do composto **2.4** é apresentada no **esquema 2.1**.⁵³ A tiazolidina **2.2** foi obtida como uma mistura de diastereoisómeros (*2R,4S*) e (*2S,4S*), através da reação do benzaldeído **2.1** com a *D*-penicilamina. A reação, efetuada à temperatura ambiente durante 12 h, usado metanol como solvente, conduziu à obtenção da tiazolidina com um rendimento de 66 %. Por sua vez, a reação de ciclo-adição 1,3-dipolar do dipolo, gerado *in situ* a partir da tiazolidina **2.2**, com DMAD a 110 °C durante 4 h, permitiu a obtenção do composto (*3S*)-3-fenil-1,1,5-trimetil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (**2.3**), com formação seletiva do isómero com configuração *S* e um rendimento de 64 %. A conversão no produto **2.4** foi conseguida através da redução dos grupos éster com LiAlH₄, permitindo a obtenção do álcool correspondente, com um rendimento de 59%.

De salientar que a síntese deste composto já tinha sido descrita pelo grupo de investigação de Química Orgânica com o objetivo de estudar a sua atividade antitumoral em linhas celulares humanas de cancro da mama.⁵³ Pretendia-se com esta síntese obter mais composto para estudar a sua atividade antitumoral em linhas celulares do cancro colorretal (HCT116 p53^{+/+} e HCT116 p53^{-/-}).



Esquema 2.1: Síntese do 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole (2.4), derivado da *D*-penicilamina.

Na **figura 2.1** é apresentado o espetro de RMN de ¹H do composto 2.4, onde é possível identificar os sinais correspondentes aos três grupos metilo presentes na molécula, na zona entre os 1.5-2.0 ppm. Os dois singletos largos aproximadamente a 2.8 e 2.9 ppm dizem respeito aos grupos hidroxilo, confirmando a presença do 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole pretendido.

Na zona dos 4.5 ppm encontram-se os sinais dos prótons metilénicos dos grupos hidroximetilo, sendo que um dos grupos CH₂ surge como sistema AB e outro como singlete. A 6.3 ppm é possível ver o sinal do próton em C-3 como singlete e, por fim, entre os 7.0 e os 7.5 ppm os sinais dos cinco prótons aromáticos.

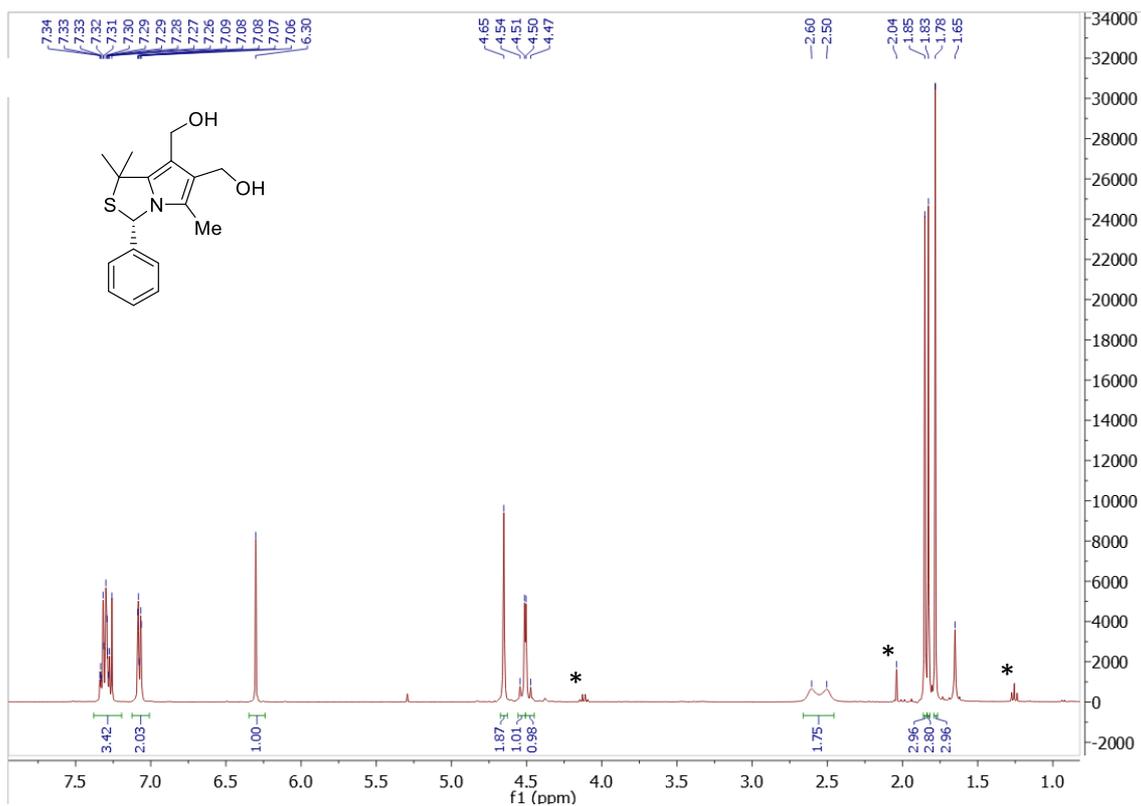


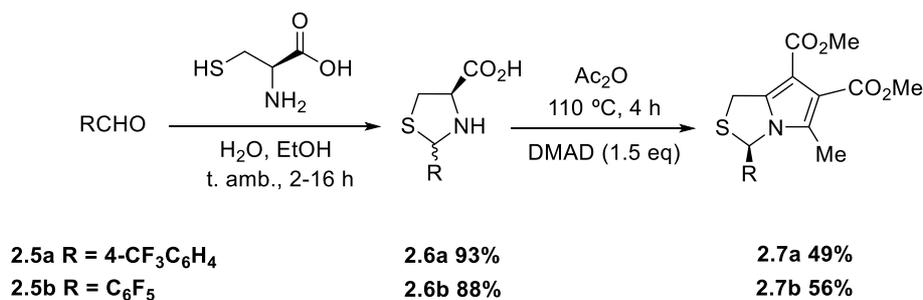
Figura 2.1: Espetro de RMN ^1H do composto **2.4** (CDCl_3 , 400 MHz). * Sinais correspondentes a acetato de etilo presente na amostra.

2.2. Síntese de derivados do MANIO com configuração absoluta *R* e substituintes aromáticos em C-3

Outras mudanças estruturais levadas a cabo incluíram a substituição do grupo fenilo em C-3 por outros grupos arilo. De acordo com a literatura, desde o sucesso dos corticosteróides fluorados na década de 1950, que compostos contendo fluor têm atraído cada vez mais atenção pela sua atividade biológica, sendo que fluorofármacos representam cerca de 20% dos fármacos comerciais.⁵⁵ Desta forma, uma das alterações propostas foi a introdução de flúor ou grupos contendo flúor no substituinte aromático em C-3. De ressaltar que nesta fase foi dada prioridade à síntese do enantiómero *R* dos 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis derivados da *L*-cisteína, devido ao facto de envolver uma sequência sintética mais curta. Os resultados posteriores referentes à avaliação da atividade biológica darão indicação de necessidade ou não de sintetizar os correspondentes enantiómeros.

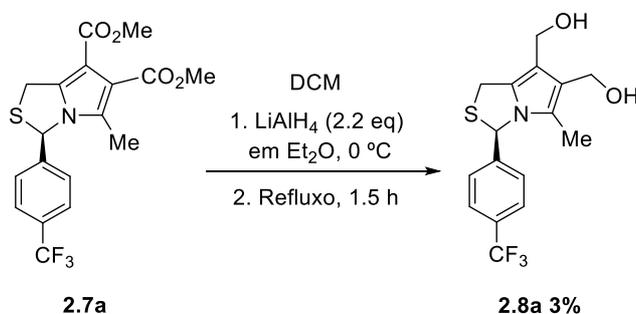
Assim, foram sintetizados os 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis-6,7-dicarboxilatos de dimetilo **2.7a** e **2.7b** contendo um grupo 4-(trifluorometil)fenilo e pentafluorofenilo na posição 3, respetivamente, de acordo com a metodologia sintética desenvolvida no grupo de investigação (**esquema 2.2**).³³ A tiazolidina **2.6a** foi obtida como uma mistura diastereoisomérica (2*S*,4*R*) e (2*R*,4*R*) por reação de condensação da *L*-cisteína com o 4-(trifluorometil)benzaldeído **2.5a**, com rendimento de 93%. A tiazolidina **2.6b** foi obtida igualmente com rendimento elevado (88%) partindo do pentafluorobenzaldeído (**2.5b**).

O aquecimento das tiazolidinas à temperatura de 110 °C durante 4 h, em anidrido acético, gerou os correspondentes sistemas mesoiónicos *in situ*, que atuaram como 1,3-dipolos na reação com o dipolarófilo DMAD em reações de ciclo-adição 1,3-dipolar. Os (3*R*)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis-6,7-dicarboxilatos de dimetilo quirais **2.7** foram obtidos com rendimentos moderados (49 e 56%).



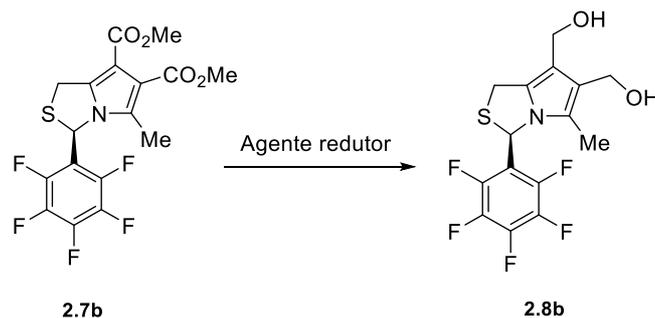
Esquema 2.2: Síntese dos (3*R*)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis-6,7-dicarboxilatos de dimetilo (**2.7**).

Seguidamente, de forma a obter os derivados fluorados do MANIO, procedeu-se à conversão dos grupos éster dos compostos **2.7** a grupos hidroximetil usando como agente redutor o LiAlH_4 . A redução do (3*R*)-3-(4-(trifluorometil)fenil)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (**2.7a**) foi efetuada utilizando as mesmas condições da síntese do álcool **2.4**, previamente descrita na secção 2.1 (**esquema 2.3**). O composto alvo, o (3*R*)-6,7-bis(hidroximetil)-3-(4-(trifluorometil)fenil)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole (**2.8a**), foi obtido com um rendimento de apenas 3%, após cromatografia em coluna com um eluente constituído por uma mistura de acetato de etilo e hexano. A observação por TLC de uma mistura relativamente complexa do crude da reação, associada à aparente falta de estabilidade deste composto, parece justificar este resultado.



Esquema 2.3: Reação de redução do derivado do MANIO **2.8a**.

A reação de redução e condições experimentais para obtenção do composto (3*R*)-6,7-bis(hidroximetil)-3-(pentafluorofenil)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole (**2.8b**) encontram-se apresentadas na **figura 2.2**. As condições utilizadas anteriormente, 2.2 equivalentes de LiAlH_4 durante 1.5 h a 40 °C não conduziram à obtenção do produto pretendido (**tabela 2.1**, ensaio 1). A análise por TLC ao crude da reação indica que a mancha mais intensa pertencia ao reagente de partida. Assim, foram feitas algumas modificações no sentido de conseguir a síntese do composto pretendido, nomeadamente no que se refere ao agente redutor utilizado e respetiva quantidade, assim como tempos e temperatura de reação (**tabela 2.1**, ensaios 2-6).



Ensaio	Agente Redutor / eq	Temperatura (°C)	Tempo Reação (h)	Rendimento (%)
1	LiAlH ₄ / 2.2	40	1.5	a
2	LiAlH ₄ / 4.4	40	1.5	a
3	LiAlH ₄ / 2.2	25	26	4
4	LiAlH ₄ / 2.2	25	1.5	4
5	LiAlH ₄ / 2.2	0	3	b
6	NaBH ₄ / 16	70	48	c

a) não se obteve o produto pretendido; b) composto **2.8b** obtido em quantidade vestigial e de forma muito impura; c) não ocorreu qualquer reação.

Figura 2.2: i) Esquema 2.4: Síntese do composto (3*R*)-6,7-bis(hidroxiometil)-3-(pentafluorofenil)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole (**2.8b**); ii) Tabela 2.1: Condições de reação testadas na síntese do (3*R*)-6,7-bis(hidroxiometil)-3-(pentafluorofenil)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole (**2.8b**).

A reação de **2.7b** com 4.4 equivalentes de LiAlH₄ em éter etílico a 0 °C, seguida de refluxo a 40 °C durante 1.5 h também não conduziu à formação do produto desejado **2.8b** (tabela 2.1, ensaio 2). Efetivamente, o controle da reação por TLC mostrou o consumo do reagente de partida ao fim de 1.5 h de reação, contudo a purificação da mistura reacional por cromatografia em coluna não permitiu isolar o composto pretendido. De forma a suavizar as condições de reação, procedeu-se ao ensaio 3, onde voltaram a ser utilizados 2.2 equivalentes de LiAlH₄ como no ensaio 1, mas a temperatura da reação foi reduzida para temperatura ambiente (25 °C) (tabela 2.1, ensaio 3). O controle por TLC às 1.5 h e 4h de reação mostrava já várias manchas, embora o reagente de partida fosse ainda o composto principal na reação, pelo que o tempo de reação foi prolongado até às 26 h. A purificação da mistura reacional por cromatografia em coluna permitiu o isolamento de várias frações contendo compostos mais polares que o reagente de partida. Uma dessas frações correspondeu ao produto pretendido, o álcool **2.8b**, que foi isolado em quantidade vestigial (rendimento de 4%) e de forma impura.

Devido à formação desta mistura complexa foi realizado em ensaio semelhante ao ensaio 3, com exceção do tempo de reação que foi reduzido para 1.5 h de forma a tentar minimizar a formação de produtos secundários (**tabela 2.1**, ensaio 4). Novamente foi possível isolar o álcool **2.8b**, no entanto o rendimento manteve-se inalterado e o produto foi igualmente obtido de forma impura. De salientar que neste ensaio todo o reagente de partida foi consumido. Seguidamente, e de modo a tentar evitar a formação de produtos de degradação, foi efetuado um ensaio onde se manteve o número de equivalentes de LiAlH_4 (2.2), mas a reação foi realizada à temperatura de 0 °C (**tabela 2.1**, ensaio 5). O controlo por TLC mostrou o consumo do reagente após 3 h de reação e confirmou a presença do produto desejado que foi purificado por cromatografia em coluna. Apesar do espetro de RMN ^1H mostrar que se trata do produto da redução, mais uma vez, este foi obtido de forma bastante impura e em quantidade vestigial. Estes resultados apontam para que o problema desta reação esteja na estabilidade do composto formado, dado que a suavização das condições da reação, com temperaturas mais baixas e tempos de reação mais curtos, não provocou alterações significativas nem melhores resultados.

Mesmo assim, foi ainda tentada a reação de redução utilizando um agente redutor menos forte do que o LiAlH_4 . Para tal, foi estudado como agente redutor um sistema boro-hidreto de sódio (NaBH_4) – metanol, por adaptação de um procedimento descrito na literatura para a redução de ésteres aromáticos (**tabela 2.1**, ensaio 6).⁵⁶ Neste caso foram utilizados 16 equivalentes de NaBH_4 e a reação foi feita em THF a 70 °C. Houve o controlo da reação por TLC, porém ao fim de 48 h ainda não havia evidência da formação do produto **2.8b** e a mancha principal observada no TLC continuava a ser o reagente, o que significa que o agente redutor não funciona nestas condições.

Após todas as tentativas efetuadas, tem-se que as melhores condições obtidas para esta reação corresponderam ao ensaio 4, no qual a reação foi realizada à temperatura ambiente e o tempo de reação é menor do que no ensaio 3, conduzindo à formação de menos produtos secundários.

Tendo em conta que um dos problemas associados ao MANIO está relacionado com o facto de ele não apresentar uma boa solubilidade em meios aquosos, uma das alternativas propostas envolveu a síntese de um composto derivado do MANIO contendo um grupo amino-polietilenoglicol (PEG).

O PEG é um polímero sintético, altamente solúvel em meio aquoso e biocompatível, produzido numa grande variedade de tamanhos e utilizado, por exemplo,

em biofármacos.⁵⁷ A modificação química com PEG é uma metodologia conhecida aplicada no desenho de novos fármacos, para obter compostos com propriedades ideais e para aumentar a solubilidade aquosa do composto,⁵⁷ fazendo com que **2.10** seja mais hidrofílico. De referir que neste caso não foi utilizado um polímero mas sim um reagente de cadeia curta, ou seja, embora se tenha optado pela utilização de um amino-PEG de cadeia curta, a polaridade deste grupo poderia permitir a modulação da lipofilicidade dos pirrolo[1,2-*c*]tiazóis.

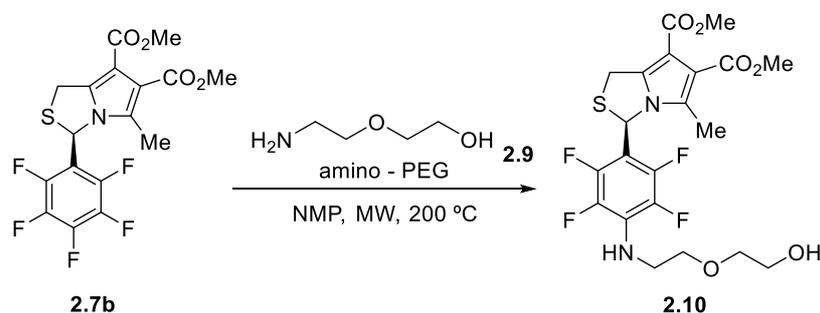
Assim, foi idealizada a síntese de um 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole contendo um grupo amino-PEG na posição *para* do grupo fenilo em C-3. Para tal, partiu-se do (3*R*)-3-(pentafluorofenil)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (**2.7b**) cuja síntese foi descrita previamente (ver **esquema 2.2**). Seguidamente foi efetuada uma reação de substituição nucleófila aromática, em condições de irradiação por micro-ondas (MW), envolvendo a substituição do átomo de flúor pela amino-PEG (**2.9**), mais hidrofílica.

A irradiação por micro-ondas é uma alternativa ao aquecimento convencional para introduzir energia nas reações, sendo que a síntese de compostos orgânicos utilizando esta via tem sido uma área em rápido desenvolvimento. Isto acontece uma vez que algumas reações químicas ocorrem mais rapidamente e com maiores rendimentos sob condições de irradiação por micro-ondas comparativamente com o aquecimento convencional. Efetivamente, reações que requerem várias horas à temperatura de refluxo sob condições clássicas podem ser concluídas em minutos com recurso à radiação de MW, mesmo com temperaturas semelhantes. Desta forma, este método mostra-se bastante eficiente e de grande aplicação numa gama alargada de reações em síntese orgânica.^{58,59}

A síntese do composto **2.10** encontra-se apresentada na **figura 2.3**, **esquema 2.5**. As condições experimentais utilizadas para a reação de substituição nucleófila aromática foram adaptadas de um procedimento descrito na literatura.⁶⁰

Começou por testar-se a utilização de 2.5 equivalentes de amino-PEG no solvente *N*-metil-2-pirrolidona (NMP), sob condições de irradiação por micro-ondas a uma temperatura de 200 °C durante 10 min, que conduziu à obtenção do composto **2.10** com rendimento de 37% (**tabela 2.2**, ensaio 1). Contudo, estas condições não se revelaram totalmente eficientes pois o reagente não foi consumido na totalidade, o que indica que a

reação não foi completa. Desta forma, foram feitas algumas alterações às condições de reação no sentido de otimizar o processo de síntese.



Ensaio	Amina-PEG / eq	Tempo de Irradiação (min)	Rendimento (%)
1	2.5	10	37
2	5	20	6
3	3.5	13	66

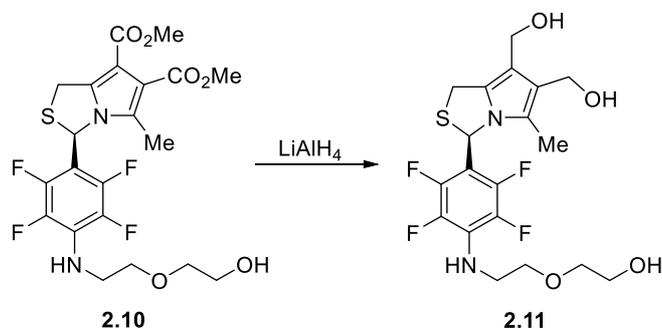
Figura 2.3: i) **Esquema 2.5:** Síntese do composto (3*R*)-3-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-((2-(2-hidroxi)etoxi)etil)amino)fenil)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrólo[1,2-*c*]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (**2.10**); ii) **Tabela 2.1:** Condições de reação testadas na síntese do (3*R*)-6,7-bis(hidroxi)etil-3-(pentafluorofenil)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrólo[1,2-*c*]tiazole (**2.8b**).

No ensaio 2 foi utilizado o dobro dos equivalentes dos utilizados inicialmente, e a reação foi irradiada por micro-ondas durante 20 min. O TLC realizado ao fim deste tempo permitiu inferir que todo o reagente tinha sido consumido e confirmar a presença do produto pretendido, bem como a formação de alguns subprodutos. A purificação do composto **2.10** foi feita através de uma cromatografia em coluna, contudo o rendimento obtido foi de apenas 6% e o composto foi obtido de forma impura, conforme constatado pela análise do espectro de RMN ¹H. Tendo em conta que não houve perdas significativas de produto nos passos de isolamento decorrentes da reação, não foi possível identificar uma justificação para o baixo rendimento obtido. Por outro lado, o facto de terem sido alteradas duas variáveis simultaneamente, o número de equivalentes de amina-PEG e o tempo de reação, não permite identificar qual delas está a afetar o resultado que foi observado.

Foi aumentado o número de equivalentes relativamente aos utilizados inicialmente, de 2.5 para 3.5, e a reação foi irradiada por micro-ondas durante 10 min. O TLC efetuado ao fim deste tempo mostrou somente vestígios de reagente, e por isso irradiou-se a reação apenas por mais 3 min, o que conduziu a um tempo de reação total

de 13 min e permitiu o consumo total do reagente (**tabela 2.2**, ensaio 3). O produto foi purificado por cromatografia em coluna, seguida de lavagens sucessivas do produto obtido (solubilizado em acetato de etilo) com água destilada. Estas lavagens destinaram-se a eliminar uma impureza não visível por TLC e apenas detetada através da análise do espectro de RMN ^1H . Estas condições conduziram a uma melhoria significativa do rendimento da reação, tendo permitido obter o (3*R*)-3-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-((2-(2-hidroxietoxi)etil)amino)fenil)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (**2.10**), com um rendimento de 66%.

O passo final para a obtenção do derivado do MANIO contendo um substituinte amino-PEG trata-se da reação de redução do composto **2.10**, cujas condições estão indicadas na **figura 2.4** (**esquema 2.6** e **tabela 2.3**). Inicialmente foram testadas as condições de reação habitualmente utilizadas para a redução dos 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis-6,7-dicarboxilatos de dimetilo:⁴⁷ adição lenta de uma solução do 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6,7-dicarboxilato em DCM a uma suspensão contendo 2.2 equivalentes de LiAlH_4 em Et_2O a $0\text{ }^\circ\text{C}$, seguida de refluxo a $40\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1.5 h (**tabela 2.3**, ensaio 1). Tal como observado para o 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole,6,7-dicarboxilato de dimetilo **2.7b**, também a redução do composto **2.10**, nestas condições experimentais, conduziu à formação de uma mistura complexa de produtos.



Ensaio	LiAlH_4 / eq	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Tempo Reação (h)	Rendimento (%)
1	2.2	40	1.5	a
2	4.4	25	4	7
3	3.3	25	4	39

a) espectro com bastante degradação.

Figura 2.4: i) Esquema 2.6: Síntese do composto (3*R*)-6,7-bis(hidroximetil)-3-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-((2-(2-hidroxietoxi)etil)amino)fenil)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole (**2.11**); **ii) Tabela 2.3:** Otimização das condições de reação para obtenção do (3*R*)-6,7-bis(hidroximetil)-3-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-((2-(2-hidroxietoxi)etil)amino)fenil)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole (**2.11**).

Neste contexto, foram efetuados estudos no sentido de suavizar as condições de reação, sistematizadas na **tabela 2.3**. Começou-se por aumentar a quantidade de agente redutor para 4.4 equivalentes e simultaneamente reduzir a temperatura de reação (**tabela 2.3**, ensaio 2). A opção de aumentar o número de equivalentes de LiAlH_4 deve-se ao facto de existir um grupo hidroxilo na molécula que também consome parte do agente redutor. O controlo por TLC mostra o consumo do reagente de partida após 4 h de reação. A mistura reacional foi purificada por cromatografia em coluna, sendo possível obter o composto pretendido (3*R*)-6,7-bis(hidroxi)etil-3-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-((2-(2-hidroxi)eto)etil)amino)fenil)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole (**2.11**) com um rendimento de 7%. Além do produto ter sido obtido com baixo rendimento, foi observado por espectroscopia de RMN ^1H a presença de uma impureza que não conseguiu ser retirada depois de várias tentativas de lavagens e extrações.

De modo a tentar aumentar o rendimento da reação e diminuir a formação de produtos secundários ou de degradação, todas as condições do ensaio anterior foram mantidas constantes, exceto o número de equivalentes de LiAlH_4 , que foi reduzido para 3.3 equivalentes (**tabela 2.3**, ensaio 3). Nas condições indicadas conseguiu obter-se o composto **2.11** com um rendimento superior (39%), porém a mesma impureza continua presente no espectro de RMN ^1H .

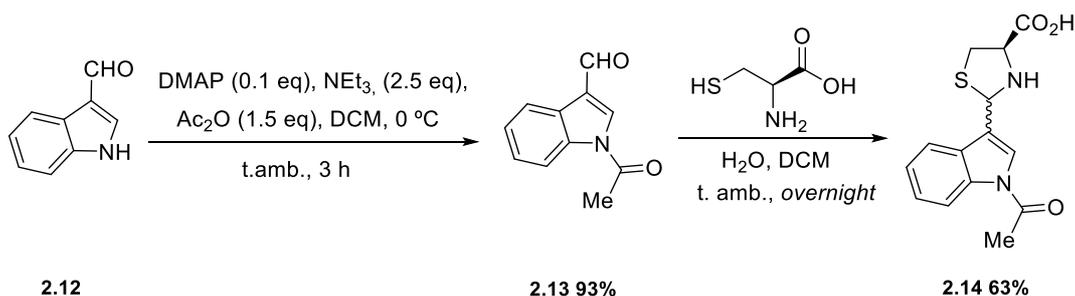
2.3. Síntese de derivados do MANIO com configuração absoluta *R* e substituintes heteroaromáticos em C-3

Outro dos objetivos do trabalho apresentado nesta dissertação envolvia a síntese de compostos análogos ao MANIO em que o grupo fenilo em C-3 era substituído por um grupo heteroarilo, nomeadamente o anel pirrole e o indole. Trabalho desenvolvido anteriormente no grupo de investigação demonstrou a necessidade de proteção inicial do grupo NH em ambos os aldeídos heteroaromáticos para a síntese das correspondentes tiazolidinas de partida.

No caso do indole-3-carbaldeído (**2.12**), foi efetuada uma *N*-acetilação segundo condições descritas na literatura (**esquema 2.7**).⁶¹ Foi utilizado DCM como solvente da reação, NEt₃ para promover a desproteção do próton da amina, 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalisador e Ac₂O para a acetilação. A reação, efetuada à temperatura ambiente e em atmosfera inerte durante 3 h, conduziu à obtenção do composto desejado **2.13** com um rendimento de 93%.

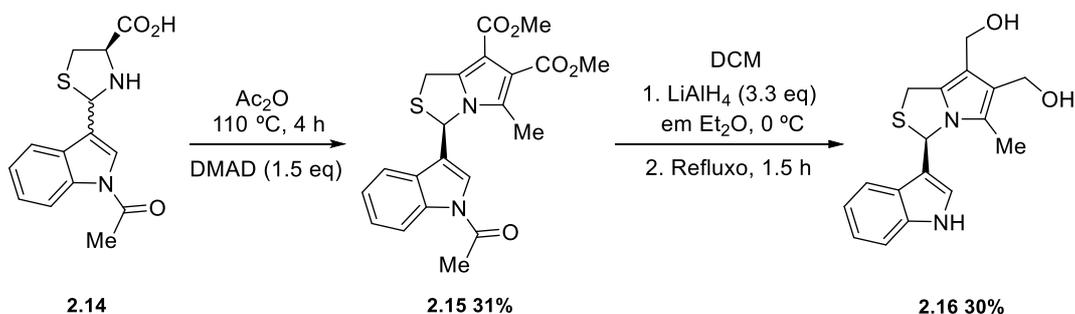
De seguida foi efetuada a síntese do ácido 2-(1-acetil-1*H*-indol-3-il)-1,3-tiazolidina-4-carboxílico (**2.14**), por condensação do aldeído acetilado **2.13** com a *L*-cisteína. Para isso, foi seguido o protocolo convencional para esta reação,³³ no qual a uma solução aquosa de *L*-cisteína, foi adicionada uma suspensão do aldeído **2.13** em etanol. A reação, deixada *overnight* à temperatura ambiente, conduziu à obtenção da tiazolidina com rendimento de 25%. O baixo rendimento desta reação quando comparado com os rendimentos obtidos para as outras tiazolidinas pode dever-se ao facto de não se ter conseguido dissolver completamente o aldeído em etanol, o que comprometeu a evolução da reação.

Assim, foi testada a solubilidade do aldeído **2.13** num solvente polar aprótico, o diclorometano, sendo que todas as outras variáveis se mantiveram constantes. Com esta alteração, foi possível obter a tiazolidina alvo com um rendimento de 63%.



Esquema 2.7: Síntese do composto **2.13** e do ácido 2-(1-(acetil-1*H*-indol-3-il)-1,3-tiazolidina-4-carboxílico (**2.14**) a partir do aldeído acetilado **2.13**.

A estratégia adotada para a síntese do (3*R*)-6,7-bis(hidroxiometil)-3-(1*H*-indol-3-il)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole (**2.16**) encontra-se descrita no **esquema 2.8**. O 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole **2.15**, precursor do álcool alvo, foi obtido de acordo com a metodologia sintética já descrita nesta dissertação,³³ via reação de ciclo-adição 1,3-dipolar do dipolo gerado *in situ* a partir da tiazolidina **2.14**, com DMAD a 110 °C durante 4 h. O 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole **2.15** foi obtido seletivamente com configuração absoluta *R* na posição 3 e rendimento de 31%. Tendo como objetivo a obtenção do álcool correspondente, o (3*R*)-6,7-bis(hidroxiometil)-3-(1*H*-indol-3-il)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole (**2.16**), a sua síntese foi efetuada nos mesmos moldes das que já se encontram descritas na literatura para este tipo de compostos.³³ Neste caso, e devido à presença do grupo *N*-acetilo no indole em C-3, foi alterado o número de equivalentes de LiAlH₄ utilizados: em vez de 2.2 foram 3.3 equivalentes. Pretendia-se desta forma promover a redução dos grupos éster, mas também a desproteção no nitrogénio do indole. A remoção do grupo acetilo no indole envolve o ataque nucleófilo do hidreto ao carbonilo e subsequente formação do alcóxido, seguida de eliminação de acetaldeído e protonação do nitrogénio. Estas condições permitiram a obtenção do produto final pretendido **2.16** com um rendimento de 30%.



Esquema 2.8: Estratégia de síntese do (3*R*)-6,7-bis(hidroxiometil)-3-(1*H*-indol-3-il)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole (**2.16**), partindo da tiazolidina previamente acetilada **2.14**.

Na **figura 2.5** está apresentado o espectro de RMN ^1H do álcool **2.16**, onde se pode observar que apenas está presente um grupo metilo na molécula, o que significa que ocorreu efetivamente a desproteção do nitrogénio do indole. A 4.1 e 4.2 ppm é possível observar os dois dubletos dos prótons metilénicos em C-1, que dizem respeito ao sistema AB e cujas constantes de acoplamento são 12.8 Hz. Os prótons dos dois grupos hidroximetilo encontram-se a 4.5 4 4.6 ppm. Entre os 6.5 e os 7.5 ppm encontram-se os sinais correspondentes ao próton da tiazolidina na posição C-3 e a 8.5 ppm é possível observar um singlete largo correspondente ao próton NH.

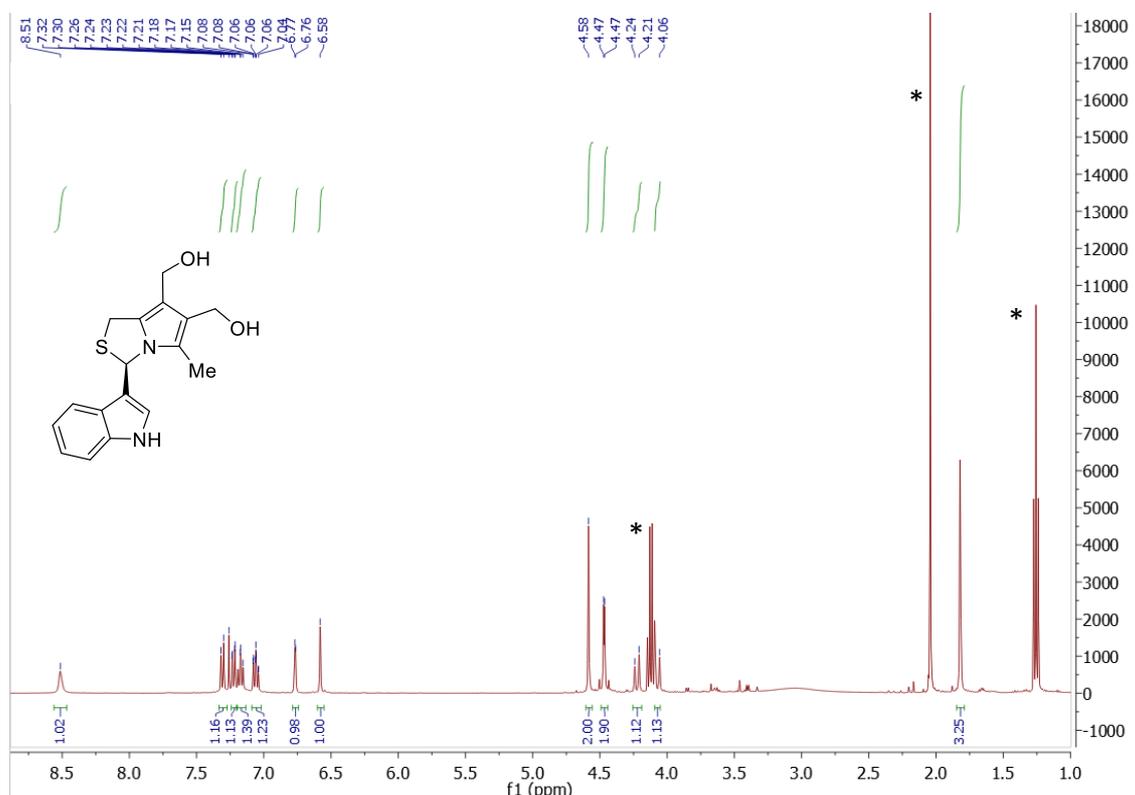
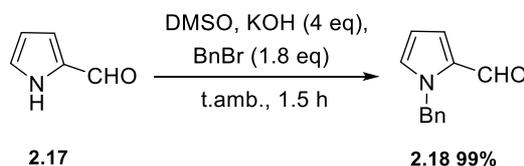


Figura 2.5: Espectro de RMN ^1H do composto **2.16** (CDCl_3 , 400 MHz). * Sinais correspondentes a acetato de etilo presente na amostra.

Seguidamente foi tentada a síntese de um análogo do MANIO contendo um anel pirrole na posição 3. Tal como mencionado anteriormente, houve necessidade de proteger o nitrogénio do pirrole-2-carbaldeído precursor. Neste caso a proteção foi efetuada com o grupo benzilo usando condições descritas na literatura (**esquema 2.9**).^{30,62} A proteção do aldeído **2.17** foi realizada mediante reação com brometo de benzilo utilizando KOH

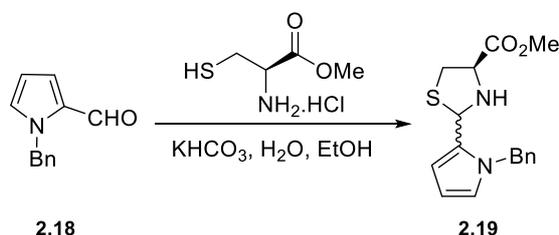
como base. A reação, efetuada à temperatura ambiente durante 1.5 h em dimetilsulfóxido (DMSO), conduziu à obtenção do composto **2.18** com rendimento elevado (99%).



Esquema 2.9: Síntese do 1-benzil-1*H*-pirrole-2-carbaldeído (**2.18**).

Procedeu-se à reação de síntese da tiazolidina por reação do aldeído **2.18** com *L*-cisteína, seguindo as condições descritas na literatura.³³ Estas condições permitiram o isolamento de um produto, contudo o espectro de RMN ¹H suscitou a dúvida da formação efetiva da tiazolidina. De forma a contornar esta situação foi utilizada uma estratégia alternativa, em que se partiu do hidrocloreto do éster metílico de *L*-cisteína em vez da *L*-cisteína (**figura 2.6, esquema 2.10**).

Pretendia-se deste modo obter um composto menos polar, passível de ser facilmente purificado por cromatografia em coluna. As condições de reação utilizadas nesta síntese já se encontram descritas na literatura, mas para outras tiazolidinas.^{32,35} A uma solução aquosa contendo o hidrocloreto do éster metílico de *L*-cisteína e hidrogenocarbonato de potássio (KHCO₃) foi adicionada uma solução do aldeído **2.18** em etanol. A reação, realizada à temperatura ambiente e controlada por TLC, foi isolada ao fim de 4 h. Nestas condições a tiazolidina **2.19** foi obtida com um rendimento de 53% (**figura 2.6, tabela 2.4, ensaio 1**).



Ensaio	L-cisteína metil éster / eq	KHCO ₃ / eq	Temperatura (°C)	Tempo Reação (h)	Rendimento (%)
1	0.9	0.9	25	4	53
2	1	1	25	24	34
3	1	1	40	48	a

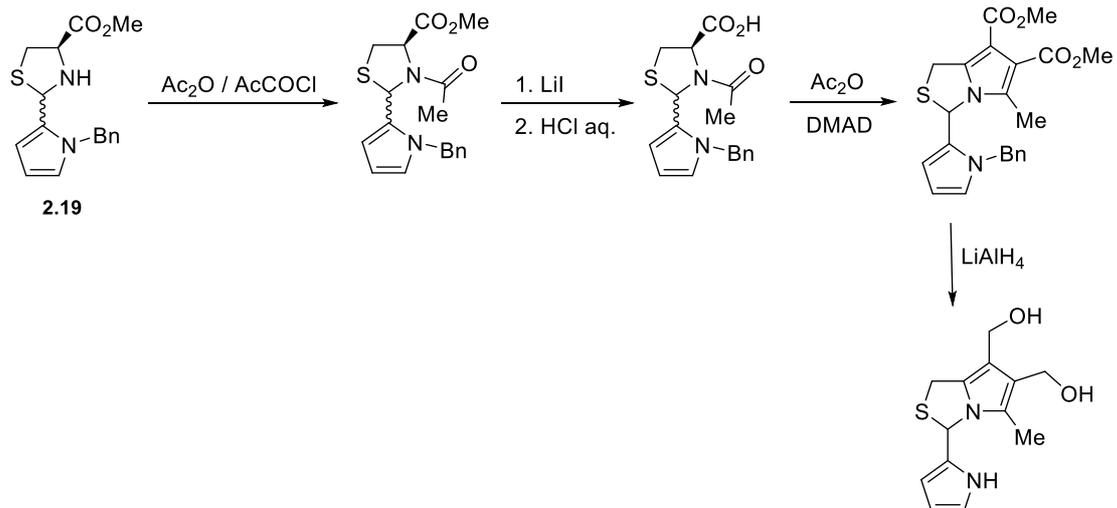
a) foi isolado reagente de partida.

Figura 2.6: i) **Esquema 2.10:** Síntese do 2-(1-benzil-1H-pirrol-2-il)-4-carboxilato de metilo (**2.19**); ii) **Tabela 2.4:** Tentativas de otimização da reação de síntese da tiazolidina éster **2.19**.

Como forma de tentar otimizar a reação foram experimentadas outras condições que envolveram a alteração do número de equivalentes de éster metílico de *L*-cisteína / base utilizado, temperatura e tempo de reação, representadas na **tabela 2.4**.

No entanto, quer o aumento do tempo de reação de 4 h para 24 h quer o aumento de forma simultânea de temperatura e do tempo de reação, não se mostraram mais eficientes (**tabela 2.4**, ensaios 2 e 3). Adicionalmente, foram testados outros métodos, nomeadamente utilizando um procedimento descrito na literatura para a síntese de tiazolidinas em que se usa trietilamina (NEt₃) e ácido trifluoroacético (TFA),⁶³ que se revelou infrutífero. Efetivamente, as condições que se mostraram mais eficientes foram as inicialmente testadas. O facto da reação não ser completa poderá estar relacionado com o equilíbrio existente entre o produto **2.19** e o composto de partida **2.18**.

Tendo em conta os esforços dedicados à tentativa de otimização desta reação e de forma a priorizar outros objetivos que se encontravam em fases de desenvolvimento mais avançado e promissor, não foi possível avançar mais com a síntese do derivado do MANIO contendo o núcleo pirrólico. A estratégia sintética que se pretendia explorar para a síntese de um composto análogo ao MANIO com um substituinte pirrólico na posição 3 encontra-se ilustrada no **esquema 2.11**.^{33,53} Assim, esta abordagem constitui uma das perspetivas futuras deste trabalho.

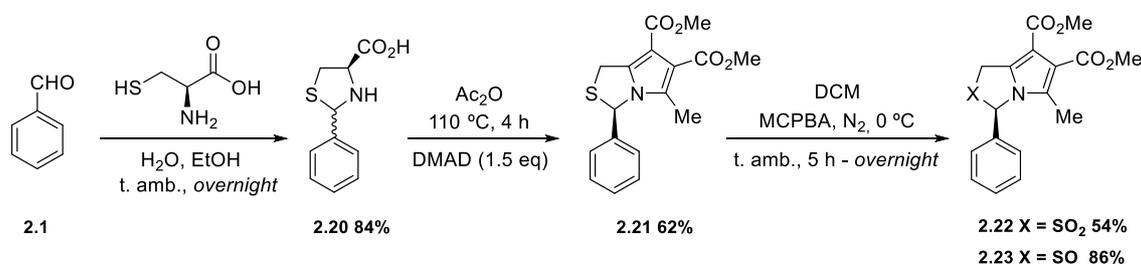


Esquema 2.11: Possível estratégia sintética para obtenção do álcool com o núcleo pirrole, partindo do composto **2.19**.

2.4. Síntese de sulfonas e sulfóxidos derivados do enantiómero do MANIO

Outro objetivo do projeto científico apresentado nesta dissertação envolvia a síntese de sulfonas e sulfóxidos do MANIO e do seu enantiómero. A incorporação de grupos funcionais contendo enxofre, como as sulfonas e os sulfóxidos, tem sido cada vez mais utilizada na área da química medicinal para obtenção de compostos com propriedades farmacológicas melhoradas, uma vez que estes grupos em particular funcionam como importantes farmacóforos, responsáveis pela atividade biológica numa grande variedade de alvos em diversas áreas terapêuticas.^{64,65}

As sulfonas e os sulfóxidos apresentam polaridade na ligação enxofre-oxigênio e, sendo os sulfóxidos mais polares do que as sulfonas, esse aspeto pode permitir a modulação da lipofilicidade e, portanto, contribuir para aumentar a solubilidade em meios aquosos do MANIO e derivados. De forma a explorar o efeito destes grupos funcionais, começou por se explorar a síntese dos derivados oxidados enantiómero do MANIO, o (3*R*)-6,7-bis(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole. A estratégia utilizada para a síntese da sulfona **2.22** e sulfóxido **2.23** encontra-se ilustrada no **esquema 2.12**.



Esquema 2.12: Estratégia de síntese utilizada na obtenção do (3*R*)-3-fenil-5-metil-2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (**2.22**) e do (3*R*)-3-fenil-5-metil-2-oxo-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (**2.23**).

A tiazolidina **2.20** foi obtida como uma mistura de diastereoisómeros (2*R*,4*S*) e (2*S*,4*S*), através da reação de condensação do benzaldeído **2.1** com a *L*-cisteína com rendimento de 84%. A reação de ciclo-adição 1,3-dipolar da espécie mesoiónica gerada a partir da tiazolidina **2.20** com DMAD, a uma temperatura de 110 °C durante 4 h, conduziu à formação seletiva do composto (3*R*)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (**2.21**), com um rendimento de 62%.

Para a oxidação do 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole **2.21** foi utilizado o ácido 3-cloroperoxibenzóico (MCPBA), por adaptação de um procedimento descrito na literatura.^{22,31} O composto **2.21** foi dissolvido em diclorometano e a reação foi realizada à temperatura ambiente, em atmosfera inerte. Atendendo ao facto de que na reação de oxidação o sulfóxido é um intermediário que se forma sempre, é necessário adaptar o tempo de reação e o número de equivalentes de agente oxidante, caso o objetivo pretendido seja a formação do sulfóxido ou da sulfona. Assim, no caso da sulfona **2.22**, foram utilizados 4 equivalentes de MCPBA e a reação foi deixada a reagir *overnight*, tendo sido obtido um rendimento de 54%. Para a obtenção do sulfóxido **2.23** foram utilizados 1.1 equivalentes de MCPBA e o controlo da reação por TLC mostrou que a maior quantidade de sulfóxido se formava 5 h após o início da reação. Com estas condições, foi possível obter um rendimento de 86 % para a formação do composto **2.23**. De referir que a adição do agente oxidante à reação foi feita em banho de gelo.

Nas **figuras 2.7** e **2.8** são apresentados os espectros de infravermelho (IV) da sulfona **2.22** e do sulfóxido **2.23**, respetivamente, onde é possível observar as respetivas bandas características que comprovam a presença destes grupos no 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole **2.21**. As sulfonas apresentam duas bandas características no espectro de IV nas zonas a 1120-1160 e 1310-1350 cm⁻¹, sendo que para a sulfona **2.22** é possível observar estas bandas a 1216 e 1349 cm⁻¹, respetivamente (**figura 2.7**).

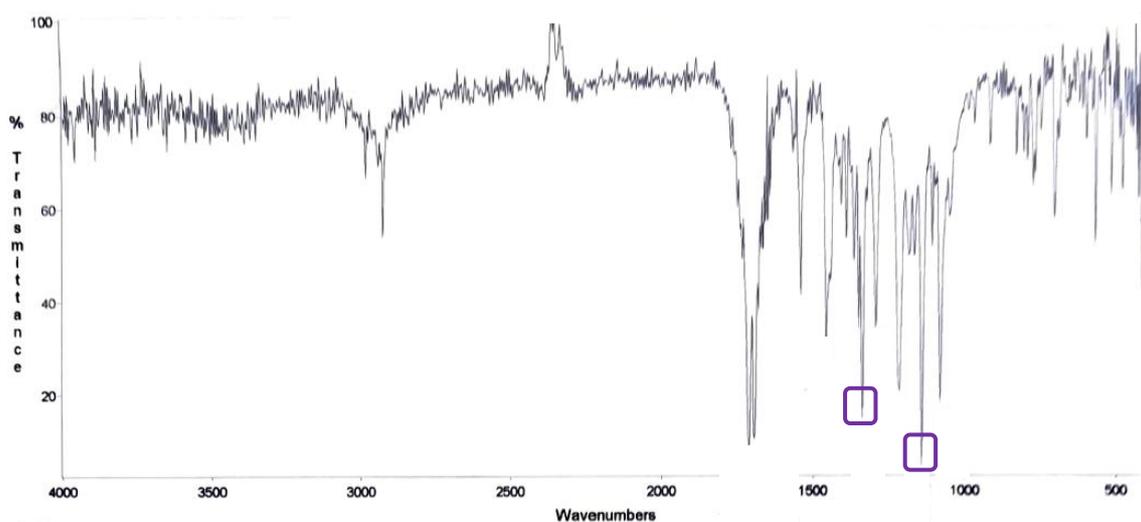


Figura 2.7: Espectro IV do composto **2.22**.

Os sulfóxidos caracterizam-se por apresentar no espectro de IV uma banda intensa correspondente ao grupo S=O na região a 1040-1060 cm^{-1} . No espectro do sulfóxido **2.23** é possível observar esta banda a 1058 cm^{-1} (**figura 2.8**).

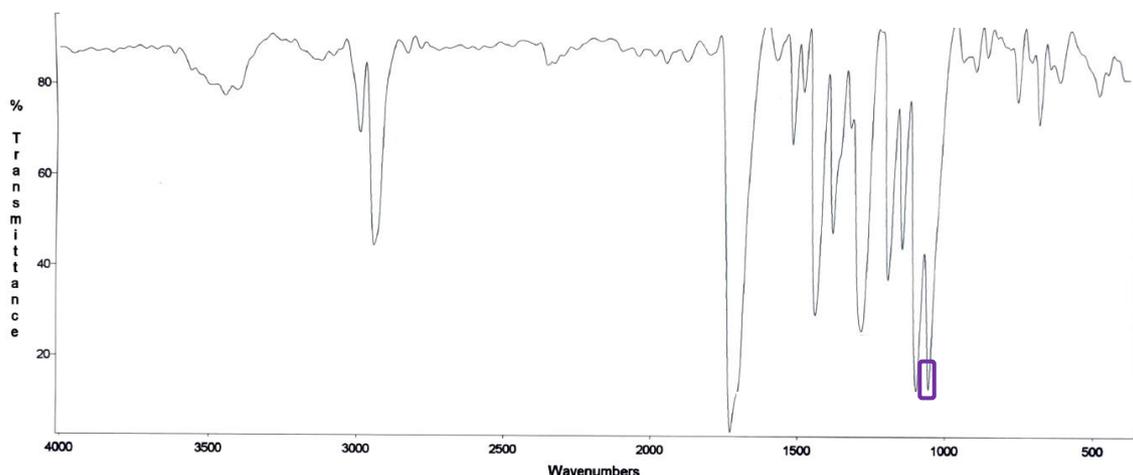
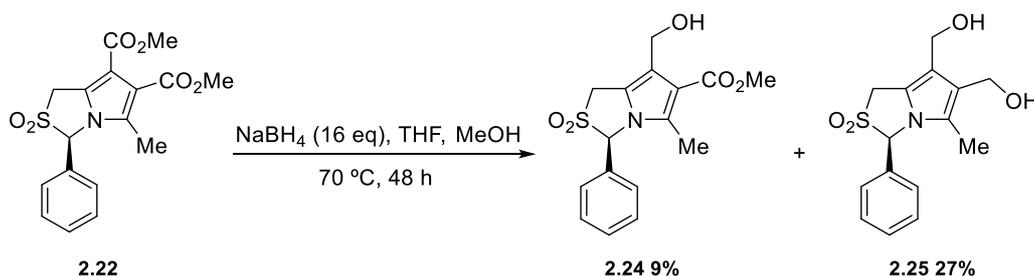


Figura 2.8: Espectro IV do composto **2.23**.

A reação de redução dos compostos **2.22** e **2.23** não foi efetuada através do método habitualmente usado, isto é, utilizando o LiAlH_4 como agente redutor, uma vez que estudos preliminares realizados no grupo de investigação demonstraram que este reagente, para além da redução dos grupos éster, promovia também a redução da sulfona. Assim, foi utilizado um agente redutor menos forte, o NaBH_4 , num sistema com metanol, e a reação foi adaptada de um procedimento descrito na literatura (**esquema 2.13**).⁵⁶



Esquema 2.13: Síntese do (3*R*)-6,7-bis(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole (**2.25**), onde se observou também a formação do composto (3*R*)-7-(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6-carboxilato de metilo (**2.24**).

Para a síntese do (3*R*)-6,7-bis(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole (**2.25**) foram utilizados 16 equivalentes de NaBH_4 e a reação foi feita em THF a 70 °C. O controlo da reação por TLC permitiu o seu isolamento após 48 h,

depois de todo o reagente ter sido consumido. A purificação da mistura reacional por cromatografia em coluna levou ao isolamento de dois compostos, o (3*R*)-7-(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6-carboxilato de metilo (**2.24**), ou seja, o produto mono-reduzido, e a sulfona **2.25**, o produto pretendido. Os rendimentos obtidos não foram muito satisfatórios, visto que o composto mono-reduzido foi obtido com um rendimento de 9% e o composto desejado com um rendimento de 27%, no entanto observou-se que as condições de reação experimentadas conduziram à formação preferencial do produto final **2.25**.

Nas **figuras 2.9 e 2.10** estão apresentados os espectros de RMN ¹H dos compostos **2.25** e **2.24**, respectivamente. A sua análise permite inferir que ambos os compostos possuem o grupo metilo (a 2.0 e a 2.3 ppm), os dois prótons metilénicos do anel de tiazolidina (a 4.2 e a 4.4 ppm), o próton em C-3, a 5.9 ppm e os prótons aromáticos, entre os 7.0 e os 7.5 ppm. No entanto, a presença de dois sinais alargados, a integrarem dois prótons no total (a 2.5 e 2.8 ppm), e de um sinal com integração quatro (a 4.6 ppm), que dizem respeito aos prótons dos grupos hidroxilo e aos prótons metilénicos dos grupos hidroximetilo, respectivamente, permitem confirmar a estrutura da sulfona totalmente reduzida **2.25**. Por outro lado, na **figura 2.10** é possível observar a 3.9 ppm um singlete a integrar para três prótons, característico de um grupo éster metílico, e a 4.2 e 4.5 ppm dois dubletos característicos do sistema AB do grupo metileno no substituinte hidroximetilo, confirmando assim a obtenção do produto mono-reduzido **2.24**.

Na **figura 2.11** é apresentado o espectro bidimensional HMBC do composto **2.24**, no qual é possível observar uma correlação a longa distância entre os prótons metilénicos do grupo hidroximetilo e o carbono 1 (⁴*J*), que permite confirmar que ocorreu redução do grupo éster da posição 7. Por fim, na **figura 2.12** está representado o espectro bidimensional HSQC do composto **2.24**, que confirma a presença do sistema AB pela correlação existente entre os dois prótons com o mesmo carbono.

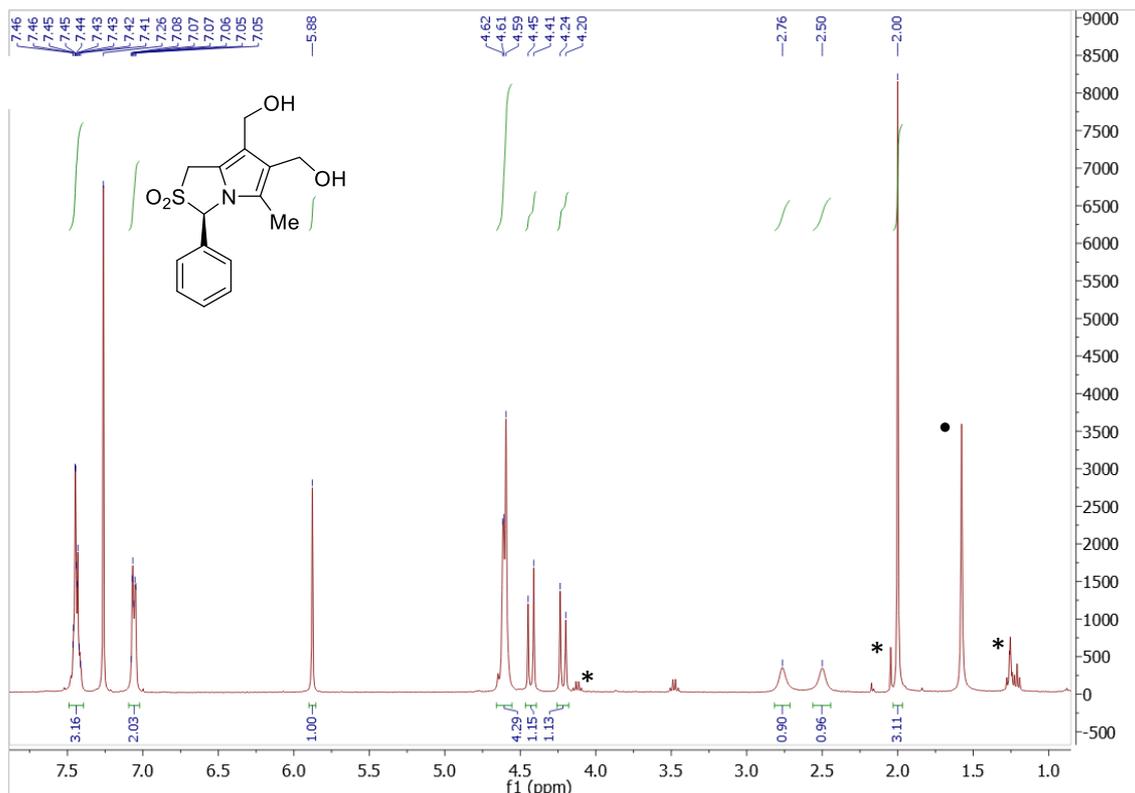


Figura 2.9: Espectro de RMN ^1H do composto **2.25** (CDCl_3 , 400 MHz). * Sinais correspondentes a acetato de etilo presente na amostra; • Sinal correspondente a água presente na amostra.

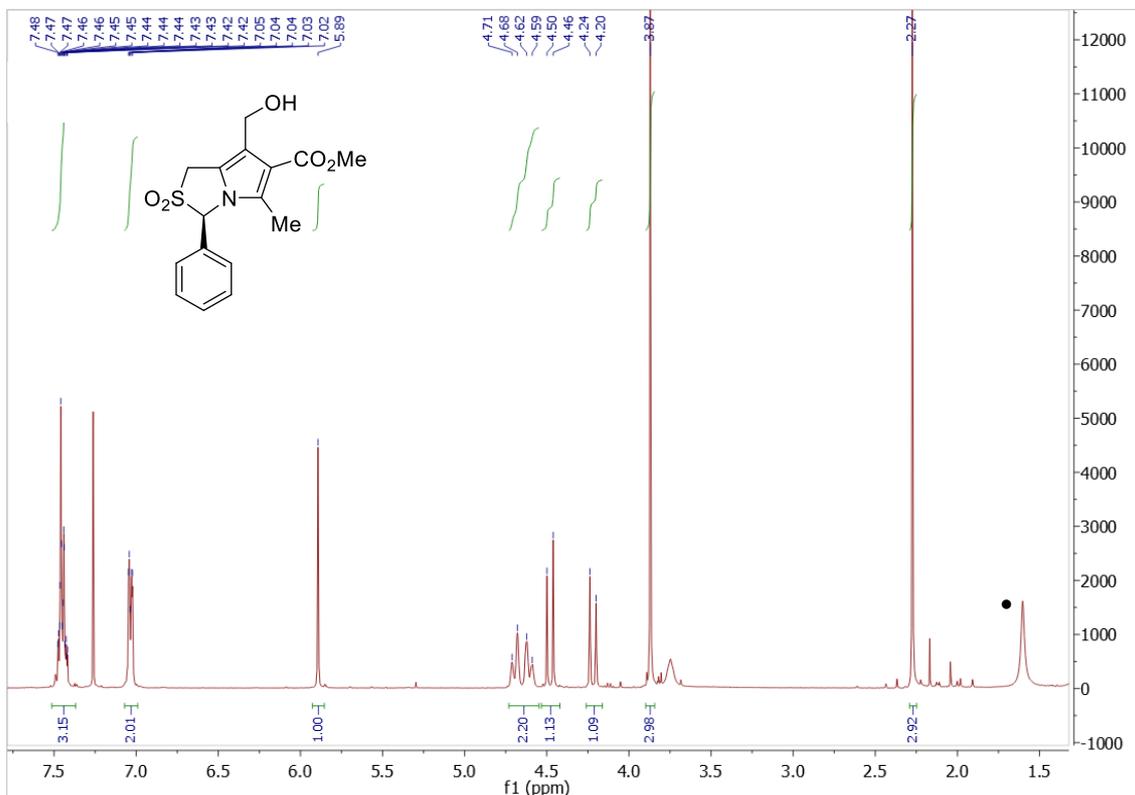


Figura 2.10: Espectro de RMN ^1H do composto mono-reduzido **2.24** (CDCl_3 , 400 MHz). • Sinal correspondente a água presente na amostra.

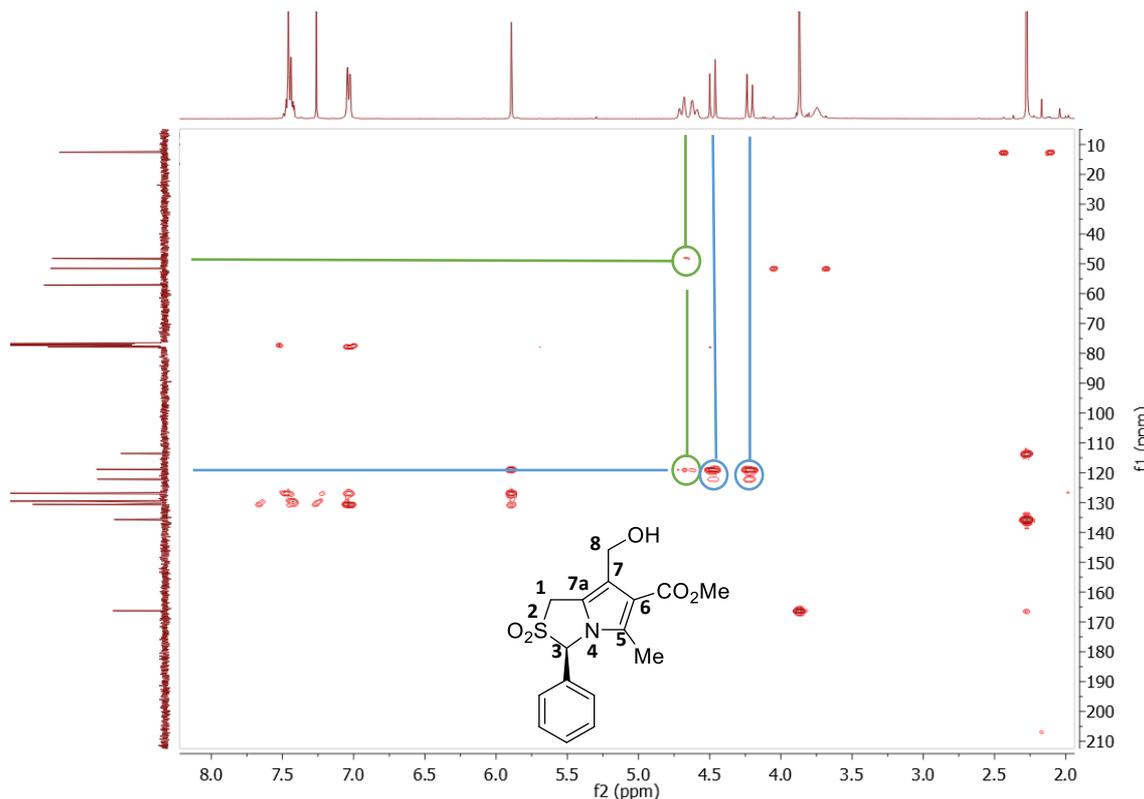


Figura 2.11: Espectro HMBC do composto mono-reduzido **2.24** (CDCl₃, 400 MHz).

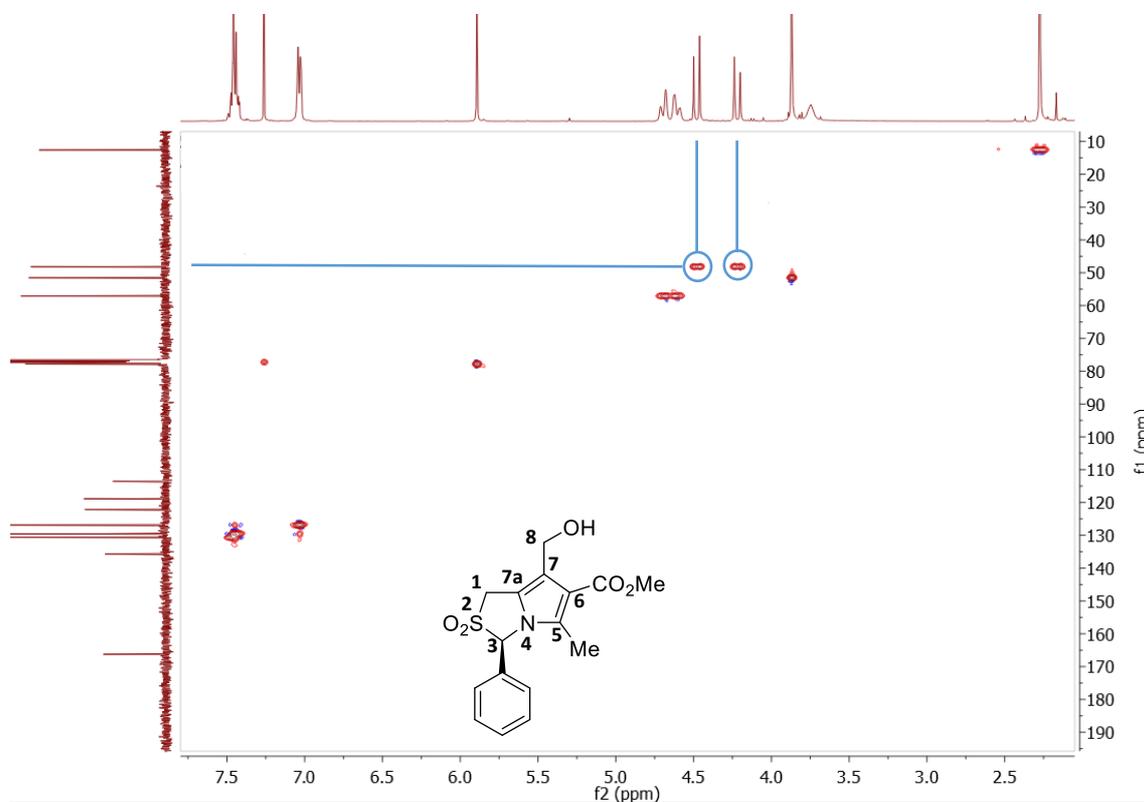
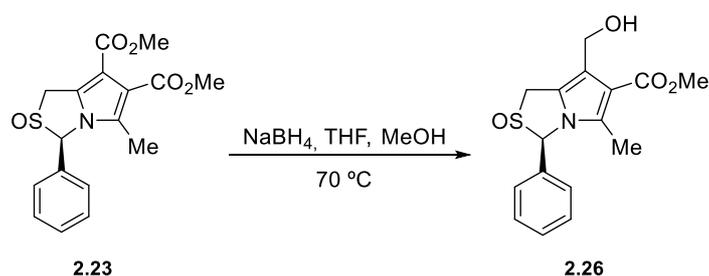


Figura 2.12: Espectro HSQC do composto mono-reduzido **2.24** (CDCl₃, 400 MHz).

Seguidamente procedeu-se à reação de redução do sulfóxido **2.23**, de acordo com o apresentado na **figura 2.13** (**esquema 2.14** e **tabela 2.5**). Começou por realizar-se a reação utilizando as mesmas condições experimentais usadas para a redução da sulfona **2.22**, com exceção do tempo de reação, que foi reduzido de 48 para 24 h (**tabela 2.5**, ensaio 1). Nestas condições foi possível isolar um composto por cromatografia em coluna que corresponde ao composto mono-reduzido **2.26**. Este composto foi obtido com um rendimento de 25% e não houve qualquer evidência da formação do produto resultante da redução dos dois grupos éster.



Ensaio	NaBH ₄ / eq	Tempo Reação (h)	Rendimento (%)
1	16	24	25
2	16	72	a
3	32	48	b

a) **2.26** + produto não identificado; b) **2.26** + produto não identificado.

Figura 2.13: i) Esquema 2.14: Síntese do (3*R*)-7-(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-2-oxo-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6-carboxilato de metilo (**2.26**); **ii) Tabela 2.5:** Otimização das condições de redução para síntese do composto (3*R*)-7-(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-2-oxo-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6-carboxilato de metilo (**2.26**).

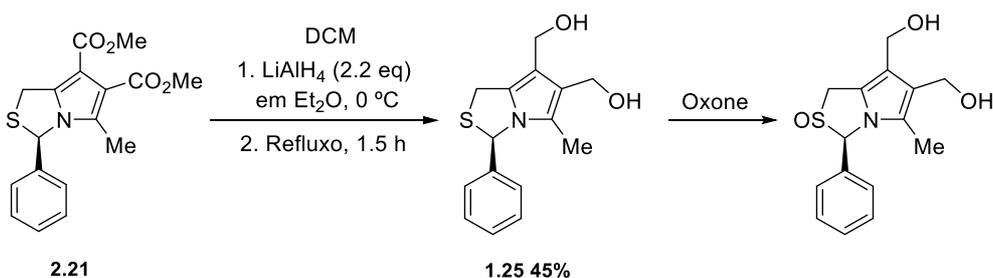
De seguida, manteve-se o número de equivalentes usado no ensaio 1 e aumentou-se o tempo de reação com o objetivo de obter o derivado totalmente reduzido (**tabela 2.5**, ensaio 2). A reação foi controlada por TLC e isolada ao fim de 72 h, com todo o reagente de partida consumido. A mistura reacional foi purificada por cromatografia em coluna, tendo conduzido à obtenção do produto mono-reduzido **2.26** com rendimento de 10% e de um outro produto. A análise por espectroscopia de RMN ¹H mostrou que não se tratava do produto esperado, resultante da redução total dos dois grupos éster.

Foi realizado um último ensaio, no qual foi utilizado o dobro do número de equivalentes de agente redutor NaBH₄, ou seja, um total de 32 equivalentes, durante 48 h

(tabela 2.5, ensaio 3). Ao fim de 24 h todo o reagente já tinha sido consumido, porém tendo em conta que a mancha mais intensa presente no TLC correspondia ao produto mono-reduzido, deixou-se a reação durante mais tempo, até atingir as 48 h. Tal como no ensaio 2, a mistura reacional foi purificada por cromatografia em coluna e conseguiu obter-se novamente o produto mono-reduzido **2.26**, contudo o outro produto isolado foi obtido de forma bastante impura e também não correspondia ao (3*R*)-6,7-bis(hidroxi metil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole pretendido.

Visto que nenhum dos ensaios realizados conduziu à obtenção do diálcool do sulfóxido que se pretendia, foi experimentada uma abordagem alternativa, que consistia em partir do MANIO (ou do seu enantiómero) e depois proceder à oxidação do sulfóxido correspondente (esquema 2.15). Deste modo, procedeu-se à reação de redução do 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole **2.21**, que levou à obtenção do enantiómero do MANIO **1.25**, de acordo com o procedimento já descrito na literatura,⁵² com um rendimento de 45%.

Anteriormente, tinha sido explorada no grupo de investigação a utilização de MCPBA para promover a oxidação do enantiómero do MANIO **1.25**. No entanto, as condições utilizadas não conduziram à obtenção do composto oxidado, tendo sido apenas recuperado reagente de partida. No presente trabalho foi experimentada a oxidação utilizando o peroximonossulfato de potássio (KHSO₅), conhecido como oxone, um agente oxidante versátil e barato, por adaptação de um procedimento descrito na literatura.^{66,67}



Esquema 2.15: Metodologia sintética para obtenção do composto (3*R*)-6,7-(bishidroxi metil)-3-fenil-5-metil-2-oxo-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole.

A uma solução do composto **1.25** em metanol a 0 °C foi adicionada uma solução aquosa contendo 1.3 equivalentes de agente oxidante. A reação, efetuada à temperatura ambiente e controlada por TLC, foi isolada ao fim de 2 h, após todo o reagente de partida ter sido consumido. O TLC da mistura reacional mostrava a presença de dois compostos que foram isolados por cromatografia em coluna. Infelizmente, nenhum destes compostos

correspondia ao (3*R*)-6,7-bis(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-2-oxo-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole pretendido.

Na **figura 2.14** está apresentado o espectro de RMN ^1H do composto mono-reduzido **2.26**. O singlete a 3.8 ppm que integra para três prótons e os dois dubletos que integram para dois prótons (a 3.9 e 4.1 ppm, com $J = 13.1$ Hz), correspondentes ao éster metílico e ao grupo metilênico do hidroximetilo, tal observado no espectro do composto **2.24** (**figura 2.10**), permitem concluir que se trata do sulfóxido mono-reduzido **2.26**. Também se obteve um espectro bidimensional HMBC para este composto e, tal como para o composto mono-reduzido **2.24**, é possível observar a correlação a longa distância entre os prótons metilênicos do hidroximetilo e o carbono C-1, o que indica que a redução envolveu a conversão do grupo éster do carbono 7 no correspondente grupo hidroximetilo (**figura 2.15**).

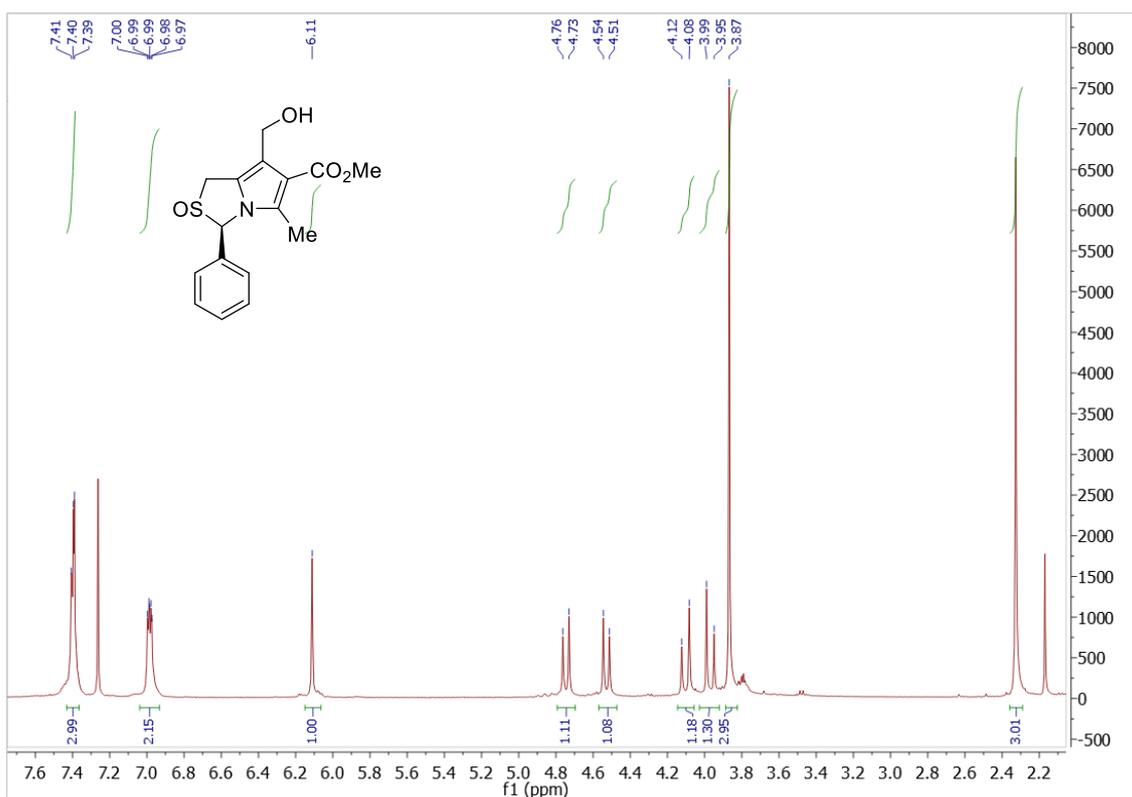


Figura 2.14: Espectro de RMN ^1H do composto mono-reduzido **2.26** (CDCl_3 , 400 MHz).

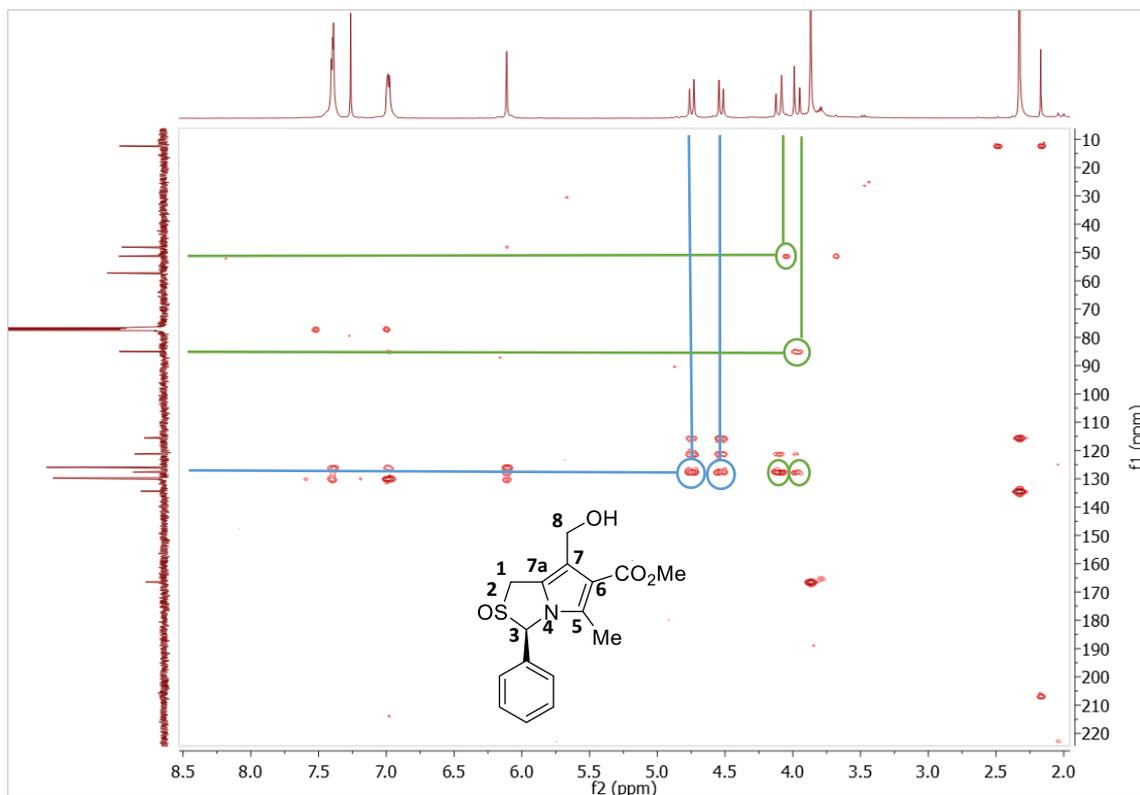


Figura 2.15: Espectro HMBC do composto mono-reduzido **2.26** (CDCl_3 , 400 MHz).

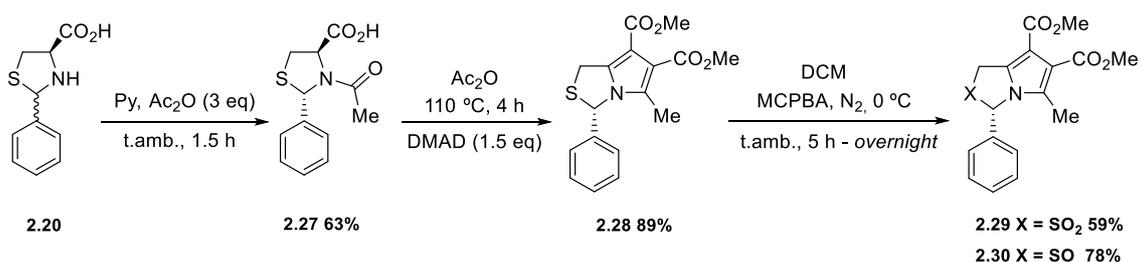
Foi ainda possível obter os derivados oxidados do éster precursor do MANIO, sulfona e sulfóxido, respetivamente o (3*S*)-3-fenil-5-metil-2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (**2.29**) e o (3*S*)-3-fenil-5-metil-2-oxo-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (**2.30**).

A síntese destes compostos seguiu a metodologia sintética apresentada no **esquema 2.16**. A tiazolidina **2.20** foi gerada por condensação da *L*-cisteína com o benzaldeído **2.1** e obtida como uma mistura diastereoisomérica (2*S*,4*R*) e (2*R*,4*R*). A acetilação da tiazolidina **2.20** com anidrido acético em piridina conduziu à obtenção diastereosseletiva da *N*-acetil-tiazolidina **2.27** com configuração absoluta (2*S*,4*R*) e rendimento de 63%. A tiazolidina acetilada **2.27** gera *in situ* um sistema mesoiónico, 5*H*,7*H*-tiazol[3,4-*c*][1,3]oxazol-4-*io*-1-olato, que atua como 1,3-dipolo na reação de ciclo-adição 1,3-dipolar com DMAD, permitindo a formação do 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole quiral **2.28** após eliminação de dióxido de carbono.

A oxidação do composto **2.28** segue a mesma estratégia do **esquema 2.12**: para a sulfona **2.29** foram utilizados 4 equivalentes de MCPBA e a reação foi deixada a reagir *overnight*. O composto isolado por cromatografia em coluna foi obtido com um

rendimento de 59%; para a obtenção do sulfóxido **2.30** foram utilizados 1.1 equivalentes de MCPBA e a reação foi isolada igualmente ao fim de 5 h. Com estas condições, o composto **2.30** foi obtido com um rendimento de 78%. A adição do agente oxidante à reação foi feita em banho de gelo, tal como no passo de oxidação anterior.

A síntese da sulfona e sulfóxido do MANIO não foi efetuada, como estava programado inicialmente. No entanto, foram lançadas as bases para a concretização desse objetivo em trabalhos futuros.



Esquema 2.16: Via sintética para obtenção do (3*S*)-3-fenil-5-metil-2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (**2.29**) e do (3*S*)-3-fenil-5-metil-2-oxo-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (**2.30**).

CAPÍTULO 3

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
6,7-BIS(HIDROXIMETIL)-1*H*,3*H*-
PIRROLO[1,2-*c*]TIAZÓIS**

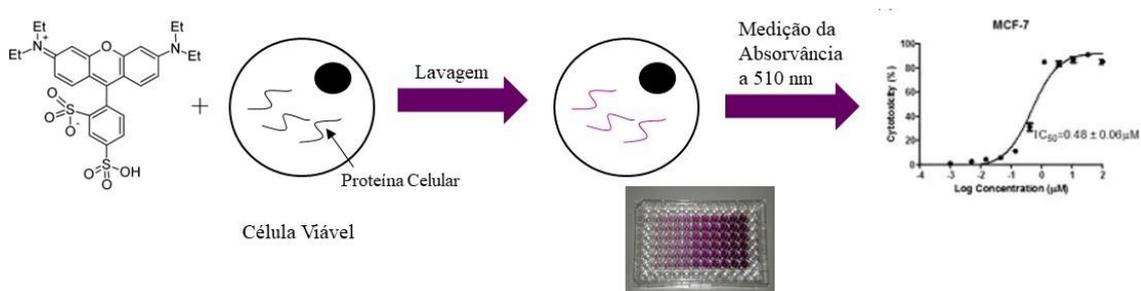
Ensaio Sulforodamina B e Atividade Biológica de 6,7-bis(hidroximetil)-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazóis

A atividade antiproliferativa de alguns 6,7-bis(hidroximetil)-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazóis foi avaliada em linhas celulares do cancro colorretal HCT116 p53^{+/+} e HCT116 p53^{-/-}, com recurso ao ensaio da sulforodamina B (SRB).

O ensaio SRB foi desenvolvido em 1990 e nos dias de hoje é um dos métodos mais comumente usados para avaliar o efeito citotóxico *in vitro* de pequenas moléculas. Assim, este método baseia-se na quantificação colorimétrica de proteína celular em culturas de células coradas com SRB.⁶⁸

A SRB é um corante aniônico brilhante de cor púrpura, solúvel em água, que contém dois grupos sulfônicos, com a capacidade de se ligarem aos resíduos de aminoácidos da proteína sob condições fracamente ácidas, e de se dissociarem em condições básicas. Desta forma, o ensaio SRB baseia-se na capacidade desta molécula se ligar, de forma eletrostática, a componentes proteicos das células, que foram previamente fixadas a placas de cultura com ácido tricloroacético (TCA).^{68,69} O corante ligado é solubilizado e é medida a sua absorvância em solução a 510 nm. A absorvância correlaciona-se com o conteúdo proteico, na medida em que será proporcional ao número de proteínas e, conseqüentemente, ao número de células presentes no poço. O corante libertado terá uma cor mais intensa e um maior valor de absorvância quanto maior for o número de células.^{68,69} De referir que a SRB incorporada é libertada a partir das células através de um processo de tripsinização, no qual existe uma dissociação das células com a utilização de tripsina, uma enzima proteolítica que degrada proteínas.

No **esquema 3.1** estão ilustrados os vários passos do ensaio SRB.



Esquema 3.1: Ensaio SRB para avaliação da atividade antiproliferativa.

O ensaio SRB apresenta várias vantagens, nomeadamente o facto de ser um método rápido e sensível, compatível com aplicações *screening* em larga escala, independente do metabolismo celular e possui em alto grau de reprodutibilidade. Para além disso, requiere equipamento simples e reagentes não dispendiosos.^{68,69}

O trabalho apresentado nesta dissertação apenas permitiu o estudo da atividade biológica de dois dos 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis sintetizados, os compostos **2.4** e **2.25**. Existem outros quatro compostos que não foram estudados, nomeadamente os compostos **2.8a** e **2.8b** por aparente falta de estabilidade, e os compostos **2.11** e **2.16** uma vez que não foi possível obtê-los com o grau de pureza necessário para o estudo da sua atividade biológica.

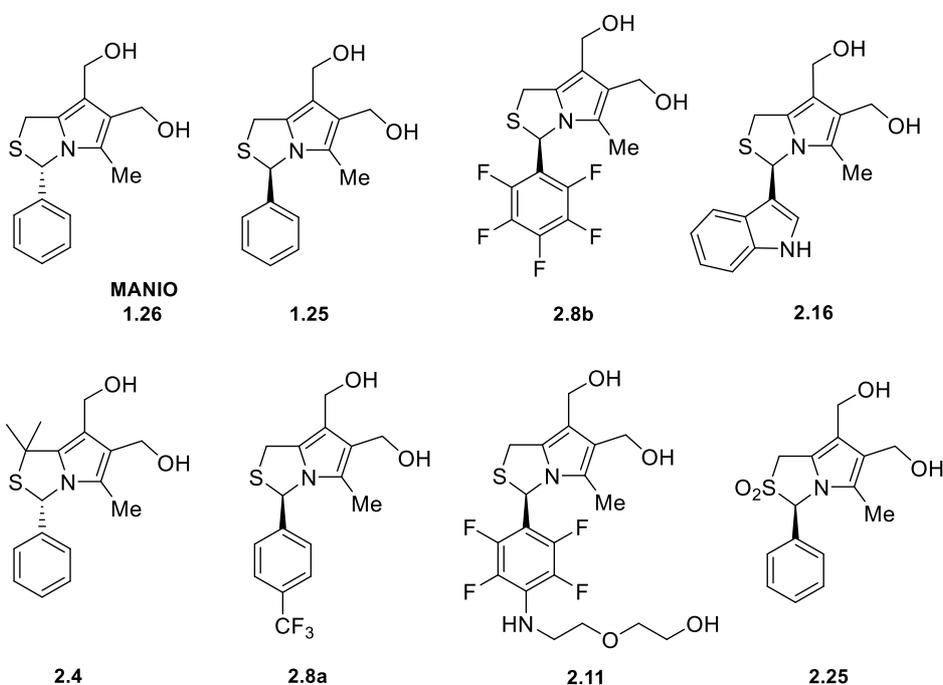


Figura 3.1: Estrutura do MANIO, do seu enantiómero e dos derivados preparados no âmbito do presente projeto.

Assim, tem-se que os valores de IC_{50} do MANIO **1.26** e do seu enantiómero **1.25** foram obtidos em estudos anteriores, enquanto que os valores de IC_{50} dos compostos **2.4** e **2.25** são apresentados nesta dissertação pela primeira vez. Os resultados obtidos encontram-se na **tabela 3.1**.

Tabela 3.1: Valores de IC₅₀ dos compostos **1.25**, **1.26**, **2.4** e **2.25** em linhas celulares do cancro colorretal HCT116 p53^{+/+} e HCT116 p53^{-/-}.

Compound	IC ₅₀ (μM)	
	HCT ^{+/+}	HCT ^{-/-}
1.26	0.93	46.50
1.25	5.11	>50
2.4	24.34	22.15
2.25	>15	>50

Os resultados obtidos permitem inferir que o 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole **2.4** não se mostrou mais ativo do que o MANIO **1.26**, uma vez que o valor de IC₅₀ obtido para este composto aumentou significativamente quando comparado com o valor de IC₅₀ de 0.93 μM apresentado pelo MANIO. Isto significa que a introdução de dois grupos metilo em C-1 não contribuiu de forma positiva para um bom resultado da atividade antitumoral na linha celular do cancro colorretal HCT116 p53^{+/+} e, para além disso, o valor de IC₅₀ = 22.15 μM obtido na linha celular do cancro colorretal HCT116 p53^{-/-} mostra uma perda de seletividade do composto **2.4** relativamente ao MANIO **1.26**.

A sulfona **2.25**, obtida por oxidação do 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6,7-dicarboxilato e posterior redução com NaBH₄, não se mostrou mais potente do que o enantiómero do MANIO **1.25**. Os valores obtidos para a linha celular do cancro colorretal HCT116 p53^{-/-} são ambos superiores a 50 μM, no entanto, na linha celular do cancro colorretal HCT116 p53^{+/+}, a introdução do grupo sulfona ao 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole não se revelou benéfica, tendo sido obtido um derivado com menor atividade.

Apesar de nenhum dos 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis estudados ter sido melhor do que os já existentes, o seu estudo foi relevante na medida em que possibilitou estabelecer relações estrutura-atividade, mencionadas acima, importantes para a compreensão do mecanismo de ação dos derivados do MANIO.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Os objetivos do projeto de investigação apresentado nesta dissertação incluíam a modulação estrutural do composto líder MANIO, a fim de obter novos derivados com propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas melhoradas.

No capítulo 2 foram descritas todas as metodologias sintéticas e respetivas otimizações, que conduziram à obtenção de novos derivados 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole quirais estruturalmente análogos ao MANIO.

O trabalho desenvolvido permitiu a síntese de um 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole com configuração absoluta *S*, derivado da *D*-penicilamina. Foram também sintetizados novos 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole derivados da *L*-cisteína com configuração absoluta *R*, contendo na posição 3 substituintes aromáticos fluorados e heteroaromáticos.

No caso dos derivados fluorados, as alterações efetuadas envolveram a substituição do grupo fenilo em C-3 pelos grupos 4-(trifluorometil)fenilo e pentafluorofenilo. Os ésteres 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6,7-dicarboxilatos, precursores dos álcoois, foram obtidos com rendimentos moderados, contudo foi no passo de redução aos correspondentes álcoois que foram encontradas algumas dificuldades. O 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole contendo um grupo *para*-(trifluorometil)fenilo demonstrou ser pouco estável, motivo pelo qual não foi estudada a sua atividade como agente antitumoral. Por sua vez, a síntese do álcool com o substituinte pentafluorofenilo em C-3 revelou ser uma reação muito pouco eficiente. No entanto, a síntese deste último derivado permitiu que também fosse explorada a preparação de um composto contendo um grupo amino-PEG no substituinte aromático do carbono C-3, com o objetivo de obter um composto com características mais hidrofílicas. A síntese eficiente deste 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6,7-dicarboxilato contendo o substituinte amino-PEG foi conseguida via substituição nucleófila aromática no grupo pentafluorofenilo. Foi também possível efetuar a redução deste composto, tendo sido confirmada a conversão dos grupos éster nos correspondentes grupos hidroximetilo por espectroscopia de RMN, no entanto persistem algumas dúvidas acerca do grau de pureza do produto obtido.

O estudo foi estendido à síntese de análogos do MANIO contendo grupos heteroarilo em substituição do grupo fenilo em C-3, concretamente o pirrole e o indole. No caso do pirrole o trabalho desenvolvido apenas permitiu alcançar a síntese da tiazolidina éster devido aos desafios enfrentados na obtenção da tiazolidina ácida inicial.

No caso do indole toda a estratégia sintética desenvolvida resultou com sucesso na obtenção do 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole pretendido.

O trabalho desenvolvido envolveu o estudo da síntese de sulfonas e sulfóxidos derivados do enantiómero do MANIO (com configuração absoluta *R*). O trabalho permitiu obter a sulfona correspondente, mas não foi possível a obtenção do sulfóxido, tendo apenas sido possível o isolamento de um composto mono-reduzido, apesar de testadas várias condições de reação e abordadas diferentes estratégias. O trabalho iniciado para a síntese de sulfona e sulfóxido do MANIO (configuração absoluta *S*), permitiu a obtenção dos respetivos 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis-6,7-dicarboxilatos oxidados.

No capítulo 3 foram apresentados os resultados preliminares da atividade antiproliferativa de alguns 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis, que foi avaliada em linhas celulares do cancro colorretal HCT116 p53^{+/+} e HCT116 p53^{-/-}, através do ensaio SRB.

Foram obtidos os valores de IC₅₀ para apenas dois 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis, o derivado do MANIO alquilado em C-1 e a sulfona do enantiómero do MANIO. Infelizmente nenhum destes compostos se revelou mais ativo do que o MANIO e o seu enantiómero, o que significa que é necessário continuar a investir na procura por novos derivados, que se mostrem mais promissores e com melhores valores de atividade antitumoral para as linhas celulares do cancro colorretal. Ainda assim, os resultados obtidos foram importantes, na medida em que foi possível estabelecer relações estrutura-atividade, nomeadamente o impacto da presença dos grupos alquilo em C-1 e a introdução do grupo sulfona, contribuindo para uma melhor compreensão do mecanismo de ação dos derivados do MANIO como agentes anticancerígenos e como ativadores da proteína p53.

Um dos objetivos a curto prazo do trabalho de investigação a desenvolver consiste em aprofundar o estudo de 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis contendo grupos heteroaromáticos em C-3, de forma a avaliar o seu potencial como ativadores da proteína p53. Sulfonas e sulfóxidos 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis-6,7-dicarboxilatos são igualmente moléculas alvo que justificam estudos adicionais. Em particular, a obtenção de sulfóxidos e o estudo do impacto deste grupo na atividade antitumoral apresentada pelos 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis deverá ser explorada, principalmente pela questão da hidrofiliabilidade que é acrescentada ao produto final com a entrada deste grupo.

CAPÍTULO 5

PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo estão descritos os vários procedimentos experimentais que foram utilizados para a síntese dos compostos ao longo do trabalho, bem como a aparelhagem utilizada. Para a caracterização das moléculas foram efetuados pontos de fusão, espectroscopia de infravermelho (IV), espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton (RMN ^1H), de carbono (RMN ^{13}C) e de flúor (RMN ^{19}F), espectrometria de massa de alta resolução (EMAR) e rotação específica $[\alpha]$, quando necessário.

5.1. Aparelhagem Utilizada

Pontos de fusão

Os pontos de fusão foram obtidos através de um medidor de ponto de fusão digital Falc pelo método de capilar de vidro aberto e os seus valores não são corrigidos.

Espectroscopia de Infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos num espectrómetro FTIR modelo 6700 da Nicolet (para pastilhas de KBr) ou Cary 630 FTIR da Agilent Technologies (para ATR).

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos num espectrómetro 400 MHz Bruker Avance III, operando a 400 MHz (RMN ^1H), 100 MHz (RMN ^{13}C) e 376 MHz (RMN ^{19}F), ou 400 MHz Bruker Avance III HD, operando a 500 MHz (RMN ^1H) e 125 MHz (RMN ^{13}C). Os espectros bidimensionais foram obtidos no mesmo equipamento.

Os solventes utilizados foram clorofórmio deuterado (CDCl_3), dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) ou metanol deuterado (CD_3OD). Os valores dos desvios químicos são apresentados em ppm relativamente ao padrão interno tetrametilsilano (TMS) e os valores das constantes de acoplamento (J) são expressas em Hertz (Hz).

Espetrometria de Massa de Alta Resolução

Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos num espectrômetro Thermo Orbitrap Q-Exactive Focus, no qual o método utilizado foi ionização por eletrospray (ESI).

Rotação Específica

Os valores da rotação específica foram determinados num polarímetro Optical Activity AA-5.

Cromatografia

Foram utilizadas placas de sílica 60 F₂₅₄ em suporte de alumínio fornecidas pela Merck nas reações cuja evolução foi acompanhada por cromatografia em camada fina. A maior parte dos compostos foi purificada por cromatografia em coluna de sílica, onde foi usado gel de sílica 60Å (0.035-0.070 mm) como fase estacionária.

Micro-ondas

Reações com irradiação por micro-ondas foram realizadas num equipamento Discover S-Class, da marca CEM.

5.2. Solventes e Reagentes

Acetato de Etilo

Foi refluxado durante 3 horas na presença de carbonato de potássio e de seguida destilado.

Diclorometano

Foi refluxado na presença de cloreto de cálcio durante 3 horas, destilado e guardado sobre peneiros moleculares 4Å.

Etanol e Metanol

Foram aquecidos a refluxo durante 2 horas com magnésio (5g/l) na presença de palhetas de iodo (0,5g/l), seguindo-se a destilação a partir do alcóxido de sódio, e guardados sobre peneiros moleculares 3Å.

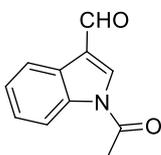
Éter Etílico, Hexano e Tetra-hidrofurano

Foram refluxados na presença de pequenos pedaços de sódio, utilizando benzofenona como indicador, destilados e guardados sobre peneiros moleculares 4Å.

Todos os outros solventes e reagentes foram fornecidos pela Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, Acros Organics ou Fluorochem e utilizados diretamente, ou seja, sem qualquer purificação adicional.

5.3. Síntese e Caracterização

5.3.1. Proteção de Aldeídos Heteroaromáticos



Síntese do 1-acetil-1*H*-indole-3-carbaldeído (2.13)

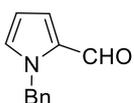
O composto **2.13** foi preparado de acordo com um procedimento já descrito na literatura.⁶¹

A uma solução de 1*H*-indole-3-carbaldeído (2.00 g, 13.80 mmol) em DCM seco (95 mL) a 0 °C foi adicionado DMAP (0.17 g, 1.38 mmol) e NEt₃ (3.49 g, 34.45 mmol). Após colocar a mistura reacional em atmosfera inerte, adicionou-se, de forma lenta, Ac₂O (2.11 g, 20.67 mmol). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 3 h.

A solução obtida foi lavada com uma solução saturada de NaHCO₃, H₂O e uma solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e, após filtração e evaporação do solvente a pressão reduzida, o composto **2.13** foi obtido como um sólido branco, tal como se encontra descrito.

p.f.: 163.0 °C (literatura:⁶¹ 165.0 °C).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.75 (s, 3H), 7.44 (ddd, *J* = 1.5, 7.6 e 9.1 Hz, 2H), 8.08 (s, 1H), 8.28 (dd, *J* = 1.7 e 7.1 Hz, 1H), 8.41 (dd, *J* = 1.4 e 7.7 Hz, 1H), 10.14 (s, 1H) ppm.



Síntese do 1-benzil-1*H*-pirrole-2-carbaldeído (2.18)

O composto **2.18** foi preparado de acordo com um procedimento já descrito na literatura.^{30,62}

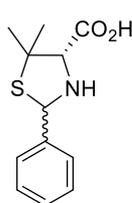
Uma solução de KOH (2.36 g, 42.06 mmol) em DMSO (21 mL) foi colocada a agitar à temperatura ambiente durante 5 minutos, em atmosfera inerte. Seguidamente adicionou-se o 1*H*-pirrole-2-carbaldeído (1.00 g, 10.52 mmol) e a mistura reacional foi agitada durante mais 45 minutos. Após esse tempo, colocou-se a reação a 0 °C e foi adicionado brometo de benzilo (3.24 g, 18.93 mmol). Após a adição, a mistura reacional foi colocada a agitar à temperatura ambiente por mais 45 minutos.

Foi obtida uma mistura de cor amarelada, à qual se adicionou 21 mL de H₂O e se fez uma extração com éter etílico. A fase orgânica obtida foi seca com Na₂SO₄ anidro e, após filtração e evaporação do solvente a pressão reduzida, o produto da reação foi purificado por cromatografia em coluna [AcOEt: Hex (1:3)].

O composto **2.18** foi obtido como um óleo amarelo (1.93 g, 99%).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.52 (s, 2H), 6.22-6.23 (m, 1H), 6.93 – 6.94 (m, 2H), 7.10 – 7.12 (m, 2H), 7.22 – 7.30 (m, 3H), 9.53 (s, 1H) ppm.

5.3.2. Síntese de Ácidos 1,3-tiazolidina-4-carboxílicos



Ácido 2-fenil-5,5-dimetil-1,3-tiazolidina-4-carboxílico (2.2)

A síntese do ácido 2-fenil-5,5-dimetil-1,3-tiazolidina-4-carboxílico foi realizada com base num procedimento já descrito na literatura.⁵³

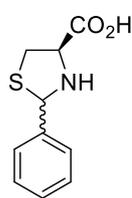
A uma solução de *D*-penicilamina (2.98 g, 20.00 mmol) em metanol (250 mL) foi adicionada, de forma lenta, uma solução de benzaldeído (2.36 g, 22.20 mmol) em metanol (30 mL). Depois da mistura reacional ter sido deixada a agitar à temperatura ambiente durante a noite, foi concentrada a pressão reduzida e o resíduo foi lavado e filtrado com éter etílico, onde foi possível obter o composto 2.2 como um sólido branco (1.96 g, 66%).

p.f.: literatura:⁵³ 160.0 – 162.0 °C.

O espectro de RMN ¹H mostra a presença de dois diastereoisómeros (razão 38:62):

Isómero minoritário - RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ = 1.51 (s, 3H), 1.73 (s, 3H), 3.97 (s, 1H), 5.94 (s, 1H, *CHPh*), 7.55 – 7.58 (m, 5H, *ArH*) ppm.

Isómero maioritário - RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ = 1.47 (s, 3H), 1.76 (s, 3H), 3.84 (s, 1H), 5.69 (s, 1H, *CHPh*), 7.37 – 7.41 (m, 5H, *ArH*) ppm.



Ácido 2-fenil-1,3-tiazolidina-4-carboxílico (2.20)

A síntese do composto pretendido foi efetuada utilizando um procedimento já descrito na literatura.³³

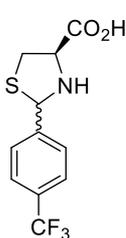
A uma solução de *L*-cisteína (6.06 g, 50.00 mmol) em água (50 mL) foi adicionada uma solução de benzaldeído (5.31 g, 50.00 mmol) em etanol (38 mL). A reação foi colocada à temperatura ambiente e deixada a reagir durante a noite. Após lavagem e filtração a vácuo com éter etílico, o produto 2.20 foi obtido como um sólido branco (8.79 g, 84 %).

p.f.: 158.0 – 160.0 °C (literatura:²⁶ 154.0 – 155.0 °C).

O espectro de RMN ^1H mostra a presença de dois diastereoisômeros (razão 38:62):

Isômero minoritário - RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 3.09 (dd, $J = 8.7$ e 10.1 Hz, 1H), 3.39 (dd, $J = 7.2$ e 10.1 Hz, 1H), 4.25 (pseudo-t, 1H), 5.51 (s, 1H, *CHPh*), 7.24 – 7.42 (m, 3H, *ArH*), 7.42 – 7.55 (m, 2H, *ArH*) ppm.

Isômero maioritário - RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 3.15 (dd, $J = 4.5$ e 10.2 Hz, 1H), 3.32 (dd, $J = 7.1$ e 10.3 Hz, 1H), 3.91 (pseudo-t, 1H), 5.68 (s, 1H, *CHPh*), 7.24 – 7.42 (m, 3H, *ArH*), 7.42 – 7.55 (m, 2H, *ArH*) ppm.



Ácido 2-(4-(trifluorometil)fenil)-1,3-tiazolidina-4-carboxílico (2.6a)

A síntese deste composto foi efetuada utilizando um procedimento descrito na literatura.⁷⁰

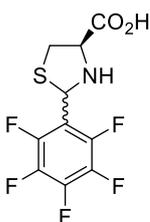
A uma solução de L-cisteína (4.85 g, 50.00 mmol) em água (40 mL) foi adicionada uma solução de aldeído (6.96 g, 40.00 mmol) em etanol (30 mL).

A reação foi colocada à temperatura ambiente e deixada a reagir durante a noite. Após lavagem e filtração a vácuo com éter etílico, foi obtido o composto **2.6a** como um sólido branco (10.26 g, 93%).

O espectro de RMN ^1H mostra a presença de dois diastereoisômeros (razão 42:58):

Isômero minoritário - RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD): 3.26 (dd, $J = 8.4$ e 10.4 Hz, 1H), 3.53 (dd, $J = 7.2$ e 10.4 Hz, 1H), 4.09 (dd, $J = 7.2$ e 8.4 Hz, 1H), 5.65 (s, 1H, *CHPh*), 7.65 – 7.78 (m, 4H, *ArH*) ppm.

Isômero maioritário - RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD): 3.33 (dd, $J = 5.0$ e 10.6 Hz, 1H), 3.46 (dd, $J = 7.1$ e 10.6 Hz, 1H), 4.34 (dd, $J = 5.0$ e 7.1 Hz, 1H), 5.84 (s, 1H, *CHPh*), 7.65 – 7.78 (m, 4H, *ArH*) ppm.



Ácido 2-pentafluorofenil-1,3-tiazolidina-4-carboxílico (2.6b)

A uma solução de L-cisteína (2.42 g, 20.00 mmol) em água (20 mL) foi adicionada uma solução de pentafluorobenzaldeído (3.92 g, 20.00 mmol) em etanol (15 mL). Deixou-se a mistura reacional em agitação durante a noite à temperatura ambiente. O produto foi isolado por evaporação do

solvente, seguido da recristalização com etanol. Após lavagens com éter etílico, obteve-se um sólido branco (2.51 g, 42%).

p.f.: 135.0 – 137.0 °C.

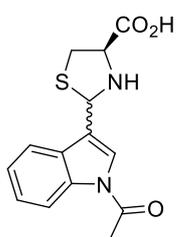
IV: $\nu_{\text{máx}} = 2973, 1519, 1502, 884, 970 \text{ cm}^{-1}$.

O espectro de RMN ^1H mostra a presença de dois diastereoisômeros (razão 44:56):

Isômero minoritário - RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 3.15$ (pseudo-t, $J = 9.8 \text{ Hz}$, 1H), 3.53 (dd, $J = 6.8$ e 10.1 Hz , 1H), 3.95 – 3.99 (m, 1H), 5.88 (s, 1H, CHAr) ppm.

Isômero maioritário - RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 3.35$ (dd, $J = 4.4$ e 10.6 Hz , 1H), 3.47 (dd, $J = 6.5$ e 10.5 Hz , 1H), 4.49 (dd, $J = 4.4$ e 6.4 Hz , 1H), 6.09 (s, 1H, CHAr) ppm.

EMAR (ESI) m/z : calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{F}_5\text{NO}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 300.0112, encontrado 300.0107.



Ácido 2-(1-acetil-1H-indol-3-il)-1,3-tiazolidina-4-carboxílico (2.14)

A uma solução de *L*-cisteína (1.48 g, 12.25 mmol) em água (12 mL) foi adicionada uma solução de 1-acetil-1H-indole-3-carbaldeído (2.29 g, 12.25 mmol) em diclorometano (25 mL). Deixou-se a mistura reacional em agitação durante a noite à temperatura ambiente. O produto foi isolado

por evaporação do solvente, seguida de lavagem e filtração do sólido obtido com éter etílico. A tiazolidina **2.14** foi obtida como um sólido branco (2.22 g, 63 %).

p.f.: 144.0 – 146.0 °C.

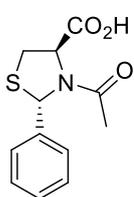
IV: $\nu_{\text{máx}} = 3046, 1718, 1377, 1204, 746 \text{ cm}^{-1}$.

O espectro de RMN ^1H mostra a presença de dois diastereoisômeros (razão 44:56):

Isômero minoritário - RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) $\delta = 2.66$ (s, 3H), 3.08 (dd, $J = 9.2$ e 9.8 Hz , 1H), 3.44 (dd, $J = 7.0$ e 10.0 Hz , 1H), 3.97 (dd, $J = 7.0$ e 9.0 Hz , 1H), 5.80 (s, 1H, CHAr), 7.27 – 7.39 (m, 2H), 7.65 – 7.69 (m, 1H), 8.04 (s, 1H), 8.31 – 8.36 (m, 1H) ppm.

Isômero maioritário - RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 2.64$ (s, 3H), 3.14 (dd, $J = 5.3$ e 10.3 Hz , 1H), 3.35 (dd, $J = 7.1$ e 10.2 Hz , 1H), 4.28 (dd, $J = 5.4$ e 7.0 Hz , 1H), 5.97 (s, 1H, CHAr), 7.27 – 7.39 (m, 2H), 7.65 – 7.69 (m, 1H), 7.78 (s, 1H), 8.31 – 8.36 (m, 1H) ppm.

EMAR (ESI) m/z : calculado para $C_{14}H_{15}N_2O_3S$ $[M+H]^+$ 291.0798, encontrado 291.0792.



Ácido (2*S*,4*R*)-3-acetil-2-feniltiazolidina-4-carboxílico (2.27)

A síntese do composto apresentado já se encontra descrita na literatura.³³

O reagente utilizado foi o ácido 2-fenil-1,3-tiazolidina-4-carboxílico **2.20**, sintetizado e descrito acima, ao qual foi adicionado piridina (50 mL).

A mistura foi colocada em agitação à temperatura ambiente e de seguida foi adicionado Ac_2O , gota a gota. A duração da reação foi de 1.5 h. A mistura reacional foi diluída em água (76 mL) e a solução foi acidificada a pH 3 com HCl concentrado.

A fase aquosa foi extraída com acetato de etilo (x3). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e, após filtração a vácuo e evaporação do solvente a pressão reduzida, foi obtido um sólido branco. A recristalização com etanol conduziu à obtenção da tiazolidina **2.27** como diastereoisómero (3.16 g, 63%).

p.f.: literatura:²⁶ 189.0 – 190.0 °C.

No espectro de RMN 1H a 25 °C observa-se uma mistura de rotâmeros, e por isso todos os sinais surgem duplicados.

RMN 1H (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 1.76 e 2.03 (2 x s, 3H), 3.20 – 3.46 (2 x m, 1H), 5.12 e 5.36 (2 x d, J = 6.1 e 7.2 Hz, 1H), 6.15 e 6.38 (2 x s, 1H), 7.18 – 7.41 (2 x m, 5 H, ArH).

5.3.3. Síntese da 2-(1-benzil-1*H*-pirrol-2-il)tiazolidina-4-carboxilato de metilo (2.19)



A uma solução de hidrocloreto do éster metílico da *L*-cisteína (0.84 g, 4.90 mmol) em água (3.7 mL) e $KHCO_3$ (0.49 g, 4.90 mmol) foi adicionado o 1-benzil-1*H*-pirrole-2-carbaldeído (**2.18**) (1.00 g, 5.40 mmol), previamente dissolvido em etanol (3.7 mL).

A reação foi colocada em agitação à temperatura ambiente e controlada por TLC. Após 4 h de reação a mistura foi diluída em água e a fase aquosa foi extraída com DCM (x3). A fase orgânica foi recolhida e seca com Na_2SO_4 anidro e, depois de uma filtração a vácuo e da evaporação do solvente a pressão reduzida, o óleo obtido foi purificado por cromatografia em coluna [$AcOEt$: Hex (1:3)], de onde resultou a formação de um sólido bege, correspondente ao produto pretendido **2.19** (0.86 g, 53%).

p.f.: 58.2 – 58.9 °C.

IV: $\nu_{\text{máx}} = 3286, 2949, 1722, 1232, 726 \text{ cm}^{-1}$.

O espectro de RMN ^1H mostra a presença de dois diastereoisómeros (razão 39:61):

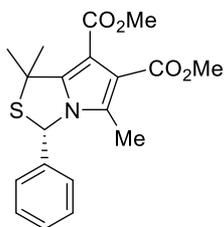
Isómero minoritário - RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 2.55 - 2.57$ (m, 1H), 3.09 (dd, $J = 6.1$ e 10.5 Hz, 1H), 3.39 (dd, $J = 7.7$ e 10.5 Hz, 1H), 3.74 (s, 1H), 4.17 (pseudo-t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 5.12 (s, 1H), 5.37 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 5.59 (s, 1H), 6.09 – 6.10 (m, 1H), 6.34 – 6.36 (m, 1H), 6.68 – 6.69 (m, 1H), 7.01 – 7.06 (m, 2H), 7.24 – 7.33 (m, 2H) ppm.

Isómero maioritário - RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.55 - 2.57$ (m, 1H), 3.01 (dd, $J = 9.5$ e 10.0 Hz, 1H), 3.34 (dd, $J = 7.1$ e 10.2 Hz, 1H), 3.77 (s, 1H), 3.83 – 3.90 (m, 1H), 5.16 (s, 1H), 5.31 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 5.41 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.15 – 6.17 (m, 1H), 6.46 – 6.48 (m, 1H), 6.68 – 6.69 (m, 1H), 7.01 – 7.06 (m, 2H), 7.24 – 7.33 (m, 2H) ppm.

5.3.4. Síntese de 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis-6,7-dicarboxilatos de dimetilo

Procedimento geral ⁵³

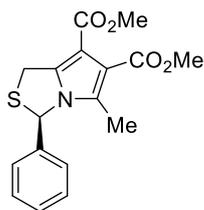
Foi preparada uma suspensão do ácido 1,3-tiazolidina-4-carboxílico apropriado (4.00 mmol) e DMAD (6.00 mmol, 0.77 mL) em Ac_2O (13 mL). A mistura reacional foi colocada em agitação à temperatura de aproximadamente 110 °C durante 4 h. Após arrefecer à temperatura ambiente, diluiu-se a mistura reacional com DCM (40 mL) e a fase orgânica foi lavada com uma solução saturada de NaHCO_3 e água. Depois de secar a fase orgânica com Na_2SO_4 anidro, evaporou-se o solvente e os produtos foram purificados por cromatografia em coluna [AcOEt : Hex].



(3*S*)-3-Fenil-1,1,5-trimetil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (2.3)

O produto isolado foi obtido a partir da tiazolidina **2.2** como um óleo amarelado (64%), tal como na literatura.⁵³

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.84$ (s, 3H), 1.90 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 6.34 (s, 1H, *CHPh*), 7.06 – 7.10 (m, 2H, *ArH*), 7.34 (m, 3H, *ArH*) ppm.

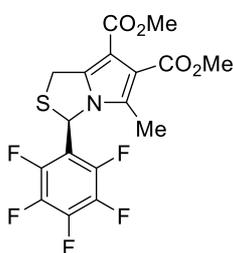


(3R)-3-Fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (2.21)

O produto foi obtido a partir da tiazolidina **2.20** como um sólido branco (62%), tal como na literatura.²⁹

p.f.: literatura:²⁹ 149.0 – 151.0 °C.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 2.01 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 4.32 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H), 4.48 (dd, *J* = 1.8 e 14.9 Hz, 1H), 6.28 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, *CHPh*), 7.04 – 7.07 (m, 2H, *ArH*), 7.31 – 7.37 (m, 3H, *ArH*) ppm.



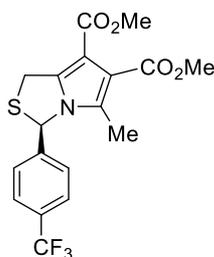
(3R)-3-(Pentafluorofenil)-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (2.7b)

O produto isolado foi obtido a partir da tiazolidina **2.6b** como um sólido branco (56%).

p.f.: 157.3 – 158.3 °C (recristalizado com AcOEt / Hex).

IV (KBr): $\nu_{\text{máx}} = 1693, 1505, 1226, 987 \text{ cm}^{-1}$.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.13 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 4.41 (d, *J* = 14.5 Hz, 1H), 4.56 (d, *J* = 14.5 Hz, 1H), 6.62 (s, 1H) ppm; EMAR (ESI) *m/z*: calculado para C₁₇H₁₃NO₄F₅S [M+H]⁺ 422.0480, encontrado 422.0475; $[\alpha]_D^{20} = +15$ (*c* 1, DCM).



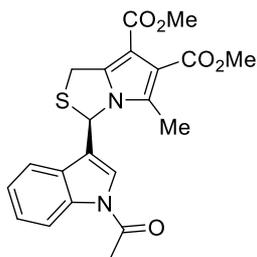
(3R)-3-(4-(Trifluorometil)fenil)-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (2.7a)

O produto foi obtido a partir da tiazolidina **2.6a**, como um sólido bege (49%).

p.f.: 104.5 – 105.8 °C (recristalizado com AcOEt / Hex).

IV: $\nu_{\text{máx}} = 2950, 1705, 1437, 1323, 1204, 1126, 1090, 1065 \text{ cm}^{-1}$.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.03 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 4.34 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H), 4.47 (dd, *J* = 1.5 e 14.9 Hz, 1H), 6.32 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.62 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H) ppm; RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ = 11.5, 30.1, 51.5, 51.6, 64.1, 107.3, 117.8, 123.7 (q, ¹*J*_{C-F} = 272.0 Hz), 125.9, 126.4 (q, ³*J*_{C-F} = 3.7 Hz), 130.4, 131.2 (q, ²*J*_{C-F} = 32.7 Hz), 140.3, 144.2, 163.9, 165.1 ppm; RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃): δ = - 62.79 ppm; EMAR (ESI) *m/z*: calculado para C₁₈H₁₇F₃NO₄S [M+H]⁺ 400.0825, encontrado 400.0822; $[\alpha]_D^{20} = +210$ (*c* 0.5, DCM).



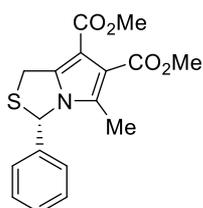
(3R)-3-(1-acetil-1H-indol-3-yl)-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (2.15)

O produto isolado foi obtido a partir da tiazolidina **2.14** como um sólido bege (31%).

p.f.: 204.4 – 207.5 °C (recristalizado com AcOEt / Hex).

IV: $\nu_{\text{máx}} = 3113, 2941, 1694, 1529, 1295, 1090 \text{ cm}^{-1}$.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.12$ (s, 3H), 2.61 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 4.39 (d, $J = 14.9$ Hz, 1H), 4.49 (dd, $J = 1.8$ e 14.9 Hz, 1H), 6.59 (s, 1H, CHAr), 7.09 (dt, $J = 1.0$ e 7.9 Hz, 1H), 7.18 – 7.31 (m, 3H, ArH), 7.40 (ddd, $J = 1.2, 7.3$ e 8.5 Hz, 1H), 8.42 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H) ppm; RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 11.3, 24.0, 30.1, 51.5, 51.6, 58.3, 116.9, 118.9, 120.9, 122.2, 124.4, 126.3, 126.7, 130.9, 136.5, 140.2, 164.0, 165.2, 168.3$ ppm; EMAR (ESI) m/z : calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{N}_2\text{NaS}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 435.0985, encontrado 435.0976. $[\alpha]_D^{20} = +180$ (c 1, DCM).



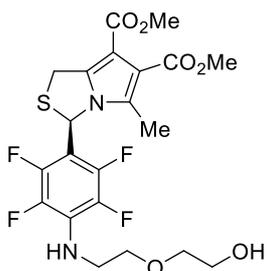
(3S)-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (2.28)

O produto foi obtido como um sólido branco (79%), tal como na literatura.³³

p.f.: literatura:³³ 160.0 – 162.0 °C.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.01$ (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 4.32 (d, $J = 14.9$ Hz, 1H), 4.48 (dd, $J = 1.8$ e 14.9 Hz, 1H), 6.28 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, CHPh), 7.03 – 7.08 (m, 2H, ArH), 7.31 – 7.38 (m, 3H, ArH) ppm.

5.3.5. Reação de Peguilação do (3R)-3-(pentafluorofenil)-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo



Esta reação foi realizada em condições de irradiação por micro-ondas. Num tubo de micro-ondas de 10 mL foram colocados o 1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazole **2.7b** (0.36 g, 0.85 mmol), NMP (3.6 mL) e amino-PEG (0.31 g, 2.98 mmol). A reação foi efetuada à temperatura de 200 °C durante 13 minutos.

Após arrefecimento à temperatura ambiente, a solução foi diluída em AcOEt e a fase orgânica foi lavada com uma solução saturada de NaHCO₃ e água. Depois de secar a fase orgânica com Na₂SO₄ anidro, evaporou-se o solvente e o produto foi purificado por cromatografia em coluna, onde o eluente utilizado foi [AcOEt: Hex (3:1) e AcOEt: Hex (5:1)]. No final obteve-se um sólido bege, correspondente ao produto pretendido (3*R*)-3-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-((2-(2-hidroxietoxi)etil)amino)fenil)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (**2.10**) – (0.57 g, 66%).

p.f.: 83.1 – 84.7 °C (recristalizado com AcOEt / Éter de petróleo).

IV: $\nu_{\text{máx}} = 3374, 2946, 2867, 1686, 1654, 1507, 1228 \text{ cm}^{-1}$.

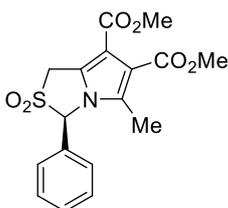
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.95$ (sl, 1H), 2.13 (s, 3H), 3.59 – 3.62 (m, 4H), 3.66 – 3.67 (m, 2H), 3.76 – 3.77 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 4.36 (d, $J = 14.5$ Hz, 1H), 4.44 (sl, 1H), 4.55 (dd, $J = 2.0$ e 14.5 Hz, 1H), 6.57 (s, 1H, CHAr) ppm; EMAR (ESI) m/z : calculado para C₂₁H₂₃F₄N₂O₆S [M+H]⁺ 507.1208, encontrado 507.1203); $[\alpha]_D^{20} = 0$ (c 1, DCM).

5.3.6. Síntese de 2-oxo-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis-6,7-dicarboxilatos de dimetilo e 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis-6,7-dicarboxilatos de dimetilo

Procedimento geral da oxidação com MCPBA ²²

A uma solução do 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo apropriado (1.30 mmol) em DCM seco (9 mL), sob atmosfera inerte e a uma temperatura de 0 °C, adicionou-se lentamente o MCPBA (4 eq, 5.20 mmol). Colocou-se a mistura reacional à temperatura ambiente e a agitar durante 4 h. Terminada a reação, lavou-se a fase orgânica com uma solução aquosa de NaHSO₃ 10% (m/v) (2 x 20 mL) e com uma solução aquosa de NaHCO₃ 10% (m/v) (2 x 20 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e evaporou-se o solvente. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna [AcOEt: Hex].

As alterações das condições experimentais relativamente ao descrito acima, nomeadamente no que se refere à quantidade de oxidante e ao tempo de reação, encontram-se devidamente assinaladas.



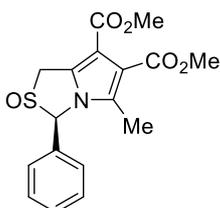
(3R)-3-fenil-5-metil-2,2-dioxo-1H,3H-pirrólo[1,2-c]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (2.22)

O produto isolado foi obtido a partir do composto **2.21**. A sua preparação foi efetuada de acordo com o procedimento geral descrito, com exceção de que a mistura reacional ficou a agitar durante a noite e foi feita uma lavagem com éter etílico frio para retirar impurezas, ao invés de uma cromatografia em coluna. No final foi obtido um sólido branco, correspondente ao produto pretendido **2.22** (54%).

p.f.: 174.0 – 175.0 °C (literatura:²² 174.0 – 176.0 °C).

IV (KBr): $\nu_{\text{máx}} = 1711, 1693, 1349, 1216, 1081 \text{ cm}^{-1}$.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 2.16$ (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 4.39 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 4.71 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 5.90 (s, 1H, *CHPh*), 7.01 – 7.05 (m, 2H, *ArH*), 7.44 – 7.51 (m, 3H, *ArH*) ppm.

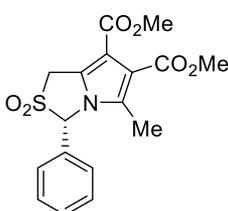


(3R)-3-fenil-5-metil-2-oxo-1H,3H-pirrólo[1,2-c]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (2.23)

O produto isolado foi obtido a partir do composto **2.21**. A sua preparação foi efetuada de acordo com o procedimento geral descrito, exceto que o número de equivalentes de MCPBA utilizado foi 1.1 e não 4. Na sua purificação foi utilizado o eluente [AcOEt: Hex (1:1) e AcOEt: Hex (2:1)] e o produto **2.23** foi isolado como um sólido branco (86%).

IV (KBr): $\nu_{\text{máx}} = 1729, 1445, 1289, 1099, 1058 \text{ cm}^{-1}$.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 2.24$ (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 4.25 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H), 4.31 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H), 6.14 (s, 1H, *CHPh*), 6.94 – 6.98 (m, 2H, *ArH*), 7.39 – 7.44 (m, 3H, *ArH*) ppm; RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 11.3, 50.7, 51.6, 51.6, 85.7, 110.7, 117.9, 125.9, 129.6, 129.8, 130.2, 132.4, 136.5, 163.5, 164.7$ ppm; EMAR (ESI) m/z : calculado para C₁₇H₁₈O₅NS [M+H]⁺ 348.0900, encontrado 348.0892); $[\alpha]_D^{20} = +340$ (c 1, DCM).



(3S)-3-fenil-5-metil-2,2-dioxo-1H,3H-pirrólo[1,2-c]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (2.29)

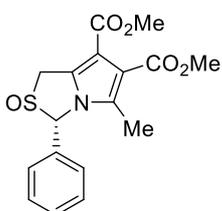
O produto isolado foi obtido a partir do 1H,3H-pirrólo[1,2-c]tiazole **2.28**. As alterações efetuadas em relação ao procedimento descrito

foram as mesmas do que as efetuadas para o seu isômero **2.22**. No final foi igualmente feita uma lavagem do produto com éter etílico frio, onde foi obtido um sólido branco, correspondente ao composto **2.29** (59%).

p.f.: 171.3 – 172.5 °C (triturado com éter etílico frio).

IV: $\nu_{\text{máx}} = 2925, 1708, 1691, 1335, 1208, 1137, 1080 \text{ cm}^{-1}$.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.16$ (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 4.39 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 4.71 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 5.90 (s, 1H, *CHPh*), 7.01 – 7.05 (m, 2H, *ArH*), 7.43 – 7.50 (m, 3H, *ArH*) ppm; RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 11.4, 50.3, 51.8, 51.9, 78.0, 112.2, 116.0, 126.9, 127.4, 129.7, 129.8, 130.9, 133.7, 163.1, 164.7$ ppm; EMAR (ESI) m/z : calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{O}_6\text{NNaS}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ 386.0669, encontrado 386.0658; $[\alpha]_D^{20} = -135$ (c 1, DCM).



(3S)-3-fenil-5-metil-2-oxo-1H,3Hpirrolo[1,2-c]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (2.30)

O produto isolado foi obtido a partir do 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole **2.28**. O procedimento utilizado para a sua preparação foi o descrito acima, exceto que o número de equivalentes de MCPBA utilizado foi 1.1 e não 4. Na sua purificação foi utilizado o eluente [AcOEt: Hex (1:1) e AcOEt: Hex (2:1)] e o produto **2.30** foi isolado como um sólido branco (78%).

p.f.: 203.3 – 206.6 °C.

IV: $\nu_{\text{máx}} = 2952, 2932, 1723, 1702, 1289, 1095, 1057 \text{ cm}^{-1}$.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.23$ (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 4.25 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H), 4.31 (d, $J = 17.4$ Hz, 1H), 6.14 (s, 1H, *CHPh*), 6.94 – 6.99 (m, 2H, *ArH*), 7.38 – 7.43 (m, 3H, *ArH*) ppm; RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 11.3, 50.7, 51.6, 51.6, 85.7, 110.7, 117.9, 125.9, 129.6, 129.8, 130.2, 132.4, 136.5, 163.5, 164.7$ ppm; EMAR (ESI) m/z : calculado para $(\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{NS})$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 348.0900, encontrado 348.0894; $[\alpha]_D^{20} = -365$ (c 1, DCM).

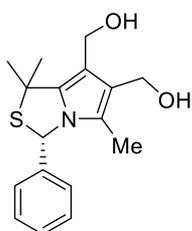
5.3.7. Síntese de 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis

Procedimento geral da redução com LiAlH₄⁵³

Uma solução do 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo apropriado (2.40 mmol) em DCM seco (25 mL) foi adicionada lentamente a uma suspensão de LiAlH₄ (2.2 eq, 5.35 mmol) em éter etílico anidro (40 mL), sob atmosfera inerte e a uma temperatura de 0 °C. Após a adição, a mistura reacional foi colocada em refluxo durante 1.5 h à temperatura de 40 °C. No final, a reação foi arrefecida num banho de gelo para destruir o excesso de hidreto presente, mediante adição lenta de AcOEt (20 mL), seguida de adição de água (0.3 mL), solução aquosa de NaOH 15% (0.3 mL) e água (0.9 mL). A mistura foi filtrada por celite e o resíduo inorgânico foi lavado várias vezes com uma mistura de AcOEt e DCM.

O filtrado foi seco com Na₂SO₄ e o solvente evaporado. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna [AcOEt: Hex].

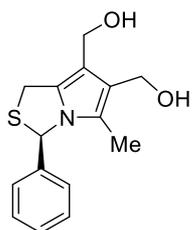
As alterações das condições experimentais relativamente ao descrito acima, no que diz respeito ao número de equivalentes de hidreto, temperatura e tempo de reação encontram-se devidamente assinaladas.



(3*S*)-6,7-bis(hidroximetil)-3-fenil-1,1,5-trimetil-1*H*,3*H*pirrolo[1,2-*c*]tiazole (2.4)

O produto foi purificado por cromatografia em coluna [AcOEt: Hex (1:1) e AcOEt: Hex (2:1)] e foi obtido como um óleo incolor (59%), tal como se encontra na literatura.⁵³

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.78 (s, 3H), 1.83 (s, 3H), 1.85 (s, 3H), 2.50 (sl, 1H), 2.60 (sl, 1H), 4.49 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 4.53 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 4.64 (s, 2H), 6.30 (s, 1H, *CHPh*), 7.03 – 7.10 (m, 2H, *ArH*), 7.26 – 7.33 (m, 3H, *ArH*) ppm; [α]_D²⁰ = - 215 (c 0.5, DCM) (literatura:⁴⁷ [α]_D²⁰ = - 205 (c 1, DCM).

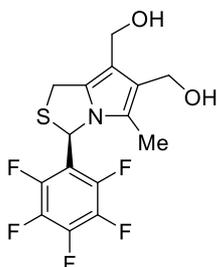


(3*R*)-6,7-bis(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*pirrolo[1,2-*c*]tiazole (1.25)

O produto foi purificado por cromatografia em coluna [AcOEt: Hex (2:1)] e foi obtido como um sólido branco (25%), tal como se encontra na literatura.⁵²

p.f.: literatura:⁵² 91.0 – 93.0 °C.

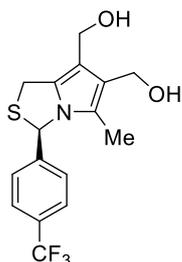
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.85 (s, 3H), 4.08 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 4.29 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H), 4.49 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.51 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.59 (s, 2H), 6.22 (s, 1H, *CHPh*), 7.00 – 7.10 (m, 2H, *ArH*), 7.28 – 7.35 (m, 3H, *ArH*) ppm.



(3R)-6,7-bis(hidroximetil)-3-(pentafluorofenil)-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazole (2.8b)

O produto foi obtido a partir do procedimento geral descrito, exceto que a reação foi feita à temperatura ambiente em vez de em refluxo a 40 °C. Após purificação por cromatografia em coluna [AcOEt: Hex (3:1)], foi obtido um sólido branco correspondente ao composto **2.8b** (4%).

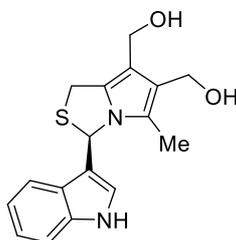
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.95 (s, 3H), 2.78 (sl, 2H), 4.13 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 4.40 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 4.46 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 4.51 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 4.53 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 4.57 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H), 6.56 (s, 1H, *CHAr*) ppm.



(3R)-6,7-bis(hidroximetil)-3-(4-(trifluorometil)fenil)-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazole (2.8a)

O produto foi separado por cromatografia em coluna [AcOEt: Hex (2:1)]; [AcOEt: Hex (3:1)] e foi obtido como um óleo incolor (3%).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.87 (s, 3H), 4.10 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 4.29 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 4.39 – 4.60 (m, 4H), 6.25 (s, 1H), 7.14 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.59 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H) ppm; RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃): δ = – 62.76 ppm.



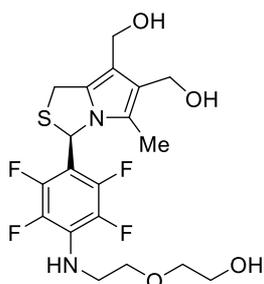
(3R)-6,7-bis(hidroximetil)-3-(1H-indol-3-il)-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazole (2.16)

O composto foi obtido a partir do procedimento acima referido, com exceção do número de equivalentes de LiAlH₄ utilizados. Neste caso foram utilizados 3.3 eq em vez dos 2.2 habitualmente usados. A purificação foi feita por cromatografia em coluna [AcOEt: Hex (3:1), AcOEt: Hex (5:1) e 100% AcOEt], e o produto **2.16** foi obtido como um sólido amarelado após trituração com éter etílico (30%).

p.f.: > 200.0 °C (com decomposição).

IV: $\nu_{\text{máx}}$ = 3262, 2916, 2862, 1420, 1340, 976, 739 cm⁻¹.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.82 (s, 3H), 3.03 (sl, 2H), 4.07 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 4.22 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 4.45 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 4.49 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 4.58 (s, 2H), 6.58 (s, 1H, CHAr), 6.77 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.06 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.17 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.51 (s, 1H) ppm; EMAR (ESI) *m/z*: calculado para C₁₇H₁₈O₂N₂NaS [M+Na]⁺ 337.0981, encontrado 337.0974.



(3R)-6,7-bis(hidroximetil)-3-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-((2-(2-hidroxi)etil)amino)fenil)-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazole (2.11)

Para a síntese deste composto foram utilizados 3.3 equivalentes de LiAlH₄ e a reação foi realizada à temperatura ambiente, durante 4 h. A purificação por cromatografia em coluna [AcOEt: Hex (3:1), AcOEt: Hex (5:1 e 100% AcOEt] seguida de trituração com éter etílico levou à obtenção do produto **2.11** como um sólido bege (39%).

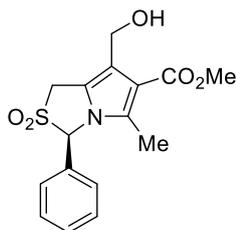
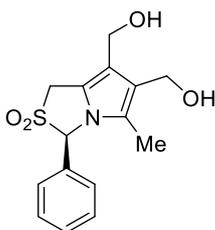
p.f.: 97.0 °C (com decomposição).

IV: $\nu_{\text{máx}}$ = 3294, 2923, 2860, 1653, 1503, 968 cm⁻¹.

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.88 (s, 3H), 3.39 – 3.48 (m, 6H), 3.54 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 4.14 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H), 4.22 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.28 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 4.34 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 4.42 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.58 (q, *J* = 5.4 Hz, 1H), 6.04 (sl, 1H) 6.67 (s, 1H) ppm; EMAR (ESI) *m/z*: calculado para C₁₉H₂₁F₄N₂O₄S [M-H]⁺, 449.1153, encontrado 449.1167); $[\alpha]_D^{20}$ = +180 (*c* 0.5, DCM).

Procedimento geral da redução com NaBH₄ ⁵⁶

A uma suspensão contendo NaBH₄ (16 eq, 11.23 mmol) em THF (14 mL) foi adicionado o 2-oxo ou o 2,2-dioxo-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo (0.70 mmol) apropriado. A mistura reacional foi colocada em agitação durante 15 minutos a 65 °C sob atmosfera inerte, seguindo-se a adição lenta de metanol (1.4 mL). Após a adição, a mistura reacional foi mantida sob agitação durante 48 h. Seguidamente, a reação foi arrefecida à temperatura ambiente, adicionou-se solução saturada de NH₄Cl (2 mL) e a agitação foi continuada por mais 1 h. A fase aquosa foi extraída com AcOEt (3x). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente evaporado. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna [AcOEt: Hex]. As alterações das condições experimentais, quando necessário, encontram-se devidamente assinaladas.



(3R)-6,7-bis(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-2,2-dioxo-1H,3H-pirrólo[1,2-c]tiazole e (3R)-7-(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-2,2-dioxo-1H,3H-pirrólo[1,2-c]tiazole-6-carboxilato de metilo

Os produtos foram separados por cromatografia em coluna [AcOEt: Hex (3:1), AcOEt: Hex (5:1)] e 100% AcOEt] para dar, por ordem de eluição, o (3R)-7-(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-2,2-dioxo-1H,3H-pirrólo[1,2-c]tiazole-6-carboxilato de metilo (**2.24**) (9%) e o (3R)-6,7-bis(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-2,2-dioxo-1H,3H-pirrólo[1,2-c]tiazole (**2.25**) (27%), ambos como sólidos brancos.

- ✓ (3R)-7-(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-2,2-dioxo-1H,3H-pirrólo[1,2-c]tiazole-6-carboxilato de metilo (**2.24**)

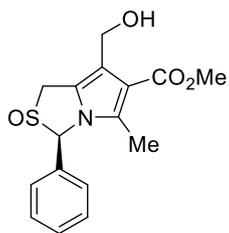
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.27 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 4.22 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 4.48 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 4.61 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H), 4.69 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H), 5.91 (s, 1H, *CHPh*), 6.99 – 7.07 (m, 2H, *ArH*), 7.37 – 7.51 (m, 3H, *ArH*) ppm; RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ = 12.6, 48.2, 51.5, 57.1, 77.8, 118.9, 122.2, 126.8, 129.6, 130.6, 130.6, 135.7, 166.2 ppm.

- ✓ (3R)-6,7-bis(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-2,2-dioxo-1H,3H-pirrólo[1,2-c]tiazole (**2.25**)

p.f.: 170.0 °C (com decomposição).

IV: $\nu_{\text{máx}}$ = 3526, 3447, 2919, 2868, 1304, 1128, 984, 698 cm⁻¹.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.00 (s, 3H), 2.50 (sl, 1H), 2.76 (sl, 1H), 4.22 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H), 4.43 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H), 4.59 – 4.65 (m, 4H), 5.88 (s, 1H, *CHPh*), 7.05 – 7.07 (m, 2H, *ArH*), 7.41 – 7.45 (m, 3H, *ArH*) ppm; RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ = 10.1, 48.4, 55.9, 56.6, 78.2, 118.2, 119.2, 121.6, 126.2, 127.1, 129.4, 130.4, 131.3 ppm; EMAR (ESI) *m/z*: calculado para C₁₅H₁₇NO₄NaS [M+Na]⁺ 330.0771, encontrado 330.0764; [α]_D²⁰ = +20 (*c* 0.25, DCM).



(3R)-7-(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-2-oxo-1H,3H-pirrólo[1,2-c]tiazole-6-carboxilato de metilo (2.26)

O produto foi obtido a partir do procedimento geral descrito, exceto que o tempo de reação foi de 24 h.

Após purificação por cromatografia em coluna [AcOEt: Hex (3:1), AcOEt: Hex (5:1) e 100% AcOEt], o produto **2.26** foi obtido como um sólido branco (25%).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.33 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.97 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 4.10 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 4.53 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H), 4.75 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H, *CHPh*), 6.93 – 7.04 (m, 2H, *ArH*), 7.35 – 7.44 (m, 3H, *ArH*) ppm; RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ = 12.4, 48.1, 51.3, 57.2, 85.0, 121.2, 126.0, 127.6, 129.7, 130.0, 130.3, 134.4, 166.4 ppm.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] World Health Organization. Cancer. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Consultado em 10/07/2023.
- [2] Chhikara, B. S., & Parang, K. (2022). Chemical Biology LETTERS Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. *Chem. Biol. Lett.*, *10*(1).
- [3] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.*, *71*(3), 209–249.
- [4] Amersi, F., Agustin, M., & Ko, C. Y. (2005). Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Health Services. *Clin. Colon Rectal Surg.*, *18*(3), 133-140.
- [5] Cancro online. Disponível em: <https://www.cancro-online.pt/cancro-colorretal/informacao-basica/fatores-de-risco/>. Consultado em 10/07/2023.
- [6] Van Der Jeught, K., Xu, H. C., Li, Y. J., Lu, X. Bin, & Ji, G. (2018). Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.*, *24* (34), 3834–3848.
- [7] Xie, Y. H., Chen, Y. X., & Fang, J. Y. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.*, *5* (1).
- [8] National Cancer Institute. Colon Cancer (PDQ): treatment. National Cancer Institute. 2023. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/colon/patient>. Consultado em 11/07/2023.
- [9] Stop Cancer Portugal. P53: a guardiã do genoma. Disponível em: <https://stopcancerportugal.com/2017/04/18/p53-guardia-do-genoma/>. Consultado em 11/07/2023.
- [10] Duffy, M. J., Synnott, N. C., O’Grady, S., & Crown, J. (2022). Targeting p53 for the treatment of cancer. *Semin. Cancer Biol.*, *79*, 58-67.
- [11] Li, Y., Wang, Z., Chen, Y., Petersen, R. B., Zheng, L., & Huang, K. (2019). Salvation of the fallen angel: Reactivating mutant p53. *Br. J. Pharmacol.*, *76* (7), 817-831.
- [12] Gomes, A. S., Ramos, H., Inga, A., Sousa, E., & Saraiva, L. (2021). Structural and drug targeting insights on mutant p53. *Cancers*, *13* (13).
- [13] Muller, P. A. J., & Vousden, K. H. (2014). Mutant p53 in cancer: New functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell.*, *25* (3), 304-317.

- [14] Huang, J. (2021). Current developments of targeting the p53 signaling pathway for cancer treatment. *Pharmacol. Ther.*, 220.
- [15] Ramos, H., Soares, M. I. L., Silva, J., Raimundo, L., Calheiros, J., Gomes, C., Reis, F., Monteiro, F. A., Nunes, C., Reis, S., Bosco, B., Piazza, S., Domingues, L., Chlapek, P., Vlcek, P., Fabian, P., Rajado, A. T., Carvalho, A. T. P., Veselska, R., & Saraiva, L. (2021). A selective p53 activator and anticancer agent to improve colorectal cancer therapy. *Cell Rep.*, 35 (2).
- [16] Zawacka-Pankau, J., & Selivanova, G. (2015). Pharmacological reactivation of p53 as a strategy to treat cancer. *J. Intern. Med.*, 277 (2), 248–259.
- [17] Song, Y., Liu, Y., Pan, S., Xie, S., Wang, Z. W. & Zhu, X. (2020). Role of the COP1 protein in cancer development and therapy. *Semin. Cancer Biol.*, 67, 43-52.
- [18] Chen, D., Brooks, C. L., & Gu, W. (2006). ARF-BP1 as a potential therapeutic target. *Br. J. Cancer.*, 94 (11), 1555-1558.
- [19] Daks, A., Fedorova, O., Parfenyev, S., Nevzorov, I., Shuvalov, O., & Barlev, N. A. (2022). The Role of E3 Ligase Pirh2 in Disease. *Cells*, 11 (9).
- [20] Kane, J. M. (1980). Pyrrolo[1,2- c]thiazole, a Ring-Fused Nonclassical Thiazole System. *J. Org. Chem.*, 45, 5396-5397.
- [21] Nagasawa, H. T., Goon, D. J. W., & Shirota, F. N. (1981). Epimerization at C-2 of 2 Substituted Thiazolidine-4-carboxylic Acids. *J. Heterocyclic Chem.*, 18, 1047-1051.
- [22] Anderson, W. K., & Mach, R. H. (1987). Synthesis, Chemical Reactivity, and Antileukemic Activity of 5-Substituted 6,7-Bis(hydroxymethyl)pyrrolo[1,2-c]thiazole Biscarbamates and the Corresponding Sulfoxides and Sulfones. *J. Med. Chem.*, 30, 2109-2115.
- [23] Ladurée, D., Lancelot, J.-C., Robba, M., Chenu, E., & Mathé, G. (1989). Synthesis and evaluation of antileukemic activity of 5-thienyl- or 5-(2-furyl)-2,3-dihydro-6,7-bis(hydroxymethyl)-1H-pyrrolizinebis(alkylcarbamates) and derivatives. *J. Med. Chem.*, 32, 456-461.
- [24] Padwa, A., Fryxell, G. E., Gasdaska, J. R., Venkatramanan, M. K., & K Wong, G. S. (1989). 3-Dipolar Cycloaddition Chemistry. *J. Org. Chem.*, 54(2), 644-653.
- [25] Szilágyi, L., Györgydeák, Z., Kajtár, J., Argay G., & Kálmán A. (1994). *Monatsh. Chem.*, 125, 189-208.

- [26] Szilágyi, L., & Györgydeák, Z. (1979). Comments on the putative stereoselectivity in cysteine-aldehyde reactions. Selective C(2) inversion and C(4) epimerization in thiazolidine-4-carboxylic acids. *J. Am. Chem. Soc.*, *101*(2), 427–432.
- [27] Györgydeák, Z., Kajtár-Peredy, M., Kajtár, J., & Kajtár, M. (1987) *Liebigs Ann. Chem.*, 927-934.
- [28] Benedini, F., Ferrario, F., Sala, A., Sala, L., & Soresinetti P. A. (1994). ChemInform Abstract: Synthesis and NMR Studies of Thiazolidine-4-carboxylic Acid Derivatives Containing a Nitro Ester Function. *J. Heterocyclic Chem.*, *31*, 1343-1347.
- [29] Pinho e Melo, T. M. V. D., Soares, M. I. L., Barbosa, D. M., d'A Rocha Gonsalves, A. M., Matos Beja A., Paixão, J. A., Ramos Silva, M. & Alte da Veiga, L. (2000). Intermolecular Dipolar Cycloaddition Reactions of 5*H*,7*H*-Thiazolo[3,4-*c*]oxazol-4-ium-1-olates. *Tetrahedron*, *56*, 3419-3424.
- [30] Soares, M. I. L., Lopes, S. M. M., Cruz, P. F., Brito, R. M. M., & Pinho e Melo, T. M. V. D. (2008). Flash vacuum pyrolysis of 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pyrrolo[1,2-*c*]thiazoles and 2-vinyl-1*H*-pyrroles. *Tetrahedron*, *64*(41), 9745–9753.
- [31] Soares, M. I. L., Gomes, C. S. B., & Pinho e Melo, T. M. V. D. (2011). Nitrogen-bridged heterocycles via cycloaddition of non-classical heterocyclic-fused-*[c]*thiazoles. *Tetrahedron*, *67*(43), 8392–8403.
- [32] Pinho e Melo, T. M. V. D., Gomes, C. S. B., d'A Rocha Gonsalves, A. M., Paixão, J. A., Beja, A. M., Ramos Silva, M., & Alte da Veiga, L. (2002). Cycloaddition reactions of 3-aryl-5-phenyl-5*H*,7*H*-thiazolo[3,4-*c*]oxazol-4-ium-1-olates. *Tetrahedron*, *58*(25), 5093–5102.
- [33] Soares, M. I. L., Brito, A. F., Laranjo, M., Paixão, J. A., Botelho, M. F. & Pinho e Melo, T. M. V. D. (2013). Chiral 6,7-bis(hydroxymethyl)-1*H*,3*H*-pyrrolo[1,2-*c*]thiazoles with anti-breast cancer properties. *Eur. J. Med. Chem.*, *60*, 254–262.
- [34] Pinho e Melo, T. M. V. D., Barbosa, D. M., Ramos, P. J. R. S., Rocha Gonsalves, A. M. d'A., Gilchrist, T. L., Beja, A. M. & Alte da Veiga, L. (1999). Intramolecular dipolar cycloaddition reaction of 5*H*,7*H*-thiazolo[3,4-*c*]oxazol-4-ium-1-olates: synthesis of chiral 1*H*-pyrrolo[1,2-*c*]thiazole derivatives. *J. Chem. Soc., Perkin Transactions 1*, (9), 1219-1223.
- [35] Pinho e Melo, T. M. V. D., Soares, M. I. L., d'A Rocha Gonsalves, A. M., Paixão, J. A., Beja, A. M., Ramos Silva, M., Alte da Veiga, L., & Costa Pessoa, J. (2002). Synthesis of chiral pyrrolo[1,2-*c*]thiazoles via intramolecular dipolar cycloaddition of münchnones: An interesting rearrangement to pyrrolo[1,2-*c*]thiazines. *J. Org. Chem.*, *67*(12), 4045–4054.

- [36] Huisgen, R. (1963). 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 2(10), 565–598.
- [37] Padwa, A. (1991). Intermolecular 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Comprehensive Organic Synthesis*; Ed. B. M. Trost; Pergamon Press: Oxford; Vol. 4, p. 1069-1110.
- [38] Huisgen, R. (1984). 1,3-Dipolar Cycloadditions-Introduction, Survey, Mechanism. Em *1,3-Dipolar Cycloadditions Chemistry*; Ed. A. Padwa; John Wiley & Sons, Wiley-Interscience Publication: New York; Vol. 1, p. 1-163.
- [39] Curtius, T. (1883). *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 16, 2230-2231.
- [40] Wade, P. A. (1991). Intramolecular 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Comprehensive Organic Synthesis*; Ed. B. M. Trost; Pergamon Press: Oxford; Vol. 4, p. 1111-1168.
- [41] Huisgen, R. (1968). Mechanism of 1,3-dipolar cycloadditions. *J. Org. Chem.*, 33(6), 2291–2297.
- [42] Houk, K. N., Firestone, R. A., Munchausen, L. L., Mueller, P. H., Arison, B. H., & Garcia, L. A. (1985). Stereospecificity of 1,3-dipolar cycloadditions of p-nitrobenzoxirane to cis- and trans-dideuterioethylene. *J. Am. Chem. Soc.*, 107(24), 7227–7228.
- [43] Huisgen, R. (1988). Steric Course and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. Em *Advances in Cycloaddition*; Ed. Dennis P. Curran; JAI Press inc.: London; Vol. 1, p. 1-31.
- [44] Sustmann, R. (1971). A simple model for substituent effects in cycloaddition reactions. I. 1,3-dipolar cycloadditions. *Tetrahedron Lett.*, 12(29), 2717–2720.
- [45] Sustmann, R. (1974). Orbital energy control of cycloaddition reactivity. *Pure Appl. Chem.*, 40(4), 569-593.
- [46] Houk, K. N., Sims, J., Duke, R. E., Strozier, R. W., & George, J. K. (1973). Frontier molecular orbitals of 1,3 dipoles and dipolarophiles. *J. Am. Chem. Soc.*, 95(22), 7287–7301.
- [47] Houk, K. N., Sims, J., Watts, C. R., & Luskus, L. J. (1973). Origin of reactivity, regioselectivity, and periselectivity in 1,3-dipolar cycloadditions. *J. Am. Chem. Soc.*, 95(22), 7301–7315.
- [48] Houk, K. N., & Yamaguchi, K. (1984). Theory of 1,3-Dipolar Cycloadditions. *1,3-Dipolar Cycloadditions Chemistry*; Ed. A. Padwa; John Wiley & Sons, Wiley-Interscience Publication: New York; Vol. 2, p. 407-447.

- [49] Carruthers, W. (1990) 1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions. *Cycloaddition Reactions in Organic Synthesis* (Tetrahedron Organic Chemistry Series); Ed. J. E. Baldwin; Pergamon Press: Oxford; Vol. 8, p. 269-331.
- [50] Fascio, M. L., Errea, M. I., & D'Accorso, N. B. (2015). Imidazothiazole and related heterocyclic systems. Synthesis, chemical and biological properties. *Eur. J. Med. Chem.*, *90*, 666–683.
- [51] Kaur, H. (2014). A Review: Synthesis Schemes of Antimicrobial and Anticancer Thiazole Derivatives. *J. Glob. Trends Pharm. Sci.*, *5*(2), 1684 –1691.
- [52] Soares, M. I. L., Brito, A. F., Laranjo, M., Abrantes, A. M., Botelho, M. F., Paixão, J. A., Beja, A. M., Silva, M. R., & Pinho e Melo, T. M. V. D. (2010). Chiral 6-hydroxymethyl-1*H*,3*H*-pyrrolo[1,2-*c*]thiazoles: Novel antitumor DNA monoalkylating agents. *Eur. J. Med. Chem.*, *45*(10), 4676–4681.
- [53] Santos, K., Laranjo, M., Abrantes, A. M., Brito, A. F., Gonçalves, C., Sarmiento Ribeiro, A. B., Botelho, M. F., Soares, M. I. L., Oliveira, A. S. R. & Pinho e Melo, T. M. V. D. (2014). Targeting triple-negative breast cancer cells with 6,7-bis(hydroxymethyl)-1*H*,3*H*-pyrrolo[1,2-*c*]thiazoles. *Eur. J. Med. Chem.*, *79*, 273–281.
- [54] Christopher, A. L, F. L., Beryl, W. D., & Paul, J. F. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, *23*(1-3), 3–25.
- [55] Inoue, M., Sumii, Y., & Shibata, N. (2020). Contribution of Organofluorine Compounds to Pharmaceuticals. *J. Am. Chem. Soc.*, *5*, 10633-10640.
- [56] Boechat, N., Santos da Costa, J. C., Souza Mendonça, J., Oliveira, P. S. M. & Souza, M. V. N. (2004). A simple reduction of methyl aromatic esters to alcohols using sodium borohydride–methanol system. *Tetrahedron Lett.*, *45*(31), 6021–6022.
- [57] Turecek, P. L., Bossard, M. J., Schoetens, F., & Ivens, I. A. (2016). PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs. *J. Pharm. Sci.*, *105* (2), 460-475.
- [58] Santagada, V., Perissutti, E., & Caliendo, G. (2002). The Application of Microwave Irradiation as New Convenient Synthetic Procedure in Drug Discovery. *Curr. Med. Chem. y*, *9*(13), 1251–1283.
- [59] Pineiro, M., & Pinho e Melo, T. M. V. D. (2009). Microwave-Assisted 1,3-Dipolar Cycloaddition: an Eco-Friendly Approach to Five-Membered Heterocycles. *Eur. J. Org. Chem.*, *2009*(31), 5287–5307.

- [60] Pereira, N. A. M., Laranjo, M., Nascimento, B. F.O., Simões, J. C. S., Pina, J., Costa, B. D. P., Brites, G., Braz, J., Seixas de Melo, J. S., Pineiro, M., Botelho, M. F., & Pinho e Melo, T. M. V. D. (2021). Novel fluorinated ring-fused chlorins as promising PDT agents against melanoma and esophagus cancer. *RSC Med. Chem.*, *12*(4), 615–627.
- [61] Dai, J., Dan, W., Li, N., & Wang, J. (2018). Computer-aided drug discovery: Novel 3,9-disubstituted eudistomin U derivatives as potent antibacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.*, *157*, 333–338.
- [62] Heaney, H., & Ley, S. V. (1973). N-Alkylation of indole and pyrroles in dimethyl sulphoxide. *J. Chem. Soc., Perkin Transactions 1*, 499–500.
- [63] Serra, M. E. S., Costa, D., Murtinho, D., Tavares, N. C. T., & Pinho e Melo, T. M. V. D. (2016). d-Penicillamine and l-cysteine derived thiazolidine catalysts: an efficient approach to both enantiomers of secondary alcohols. *Tetrahedron*, *72*, 5923-5927.
- [64] Mustafa, M. & Winum, J. Y. (2022). The importance of sulfur-containing motifs in drug design and discovery. *Expert Opin Drug Discov.* *17*(5), 501-512.
- [65] Ren-R, A. (2021). Cyclic sulfoxides and sulfones in drug design. *Adv Heterocycl Chem.* *134*, 1-30.
- [66] Yu, B., Liu, A. H., He, L. N., Li, B., Diao, Z. F., & Li, Y. N. (2012). Catalyst-free approach for solvent-dependent selective oxidation of organic sulfides with oxone. *Green Chem.*, *14*(4), 957–962.
- [67] Trost, B. M., & Curran', D. P. (1981). Chemoselective oxidation of sulfides to sulfones with potassium hydrogen persulfate. *Tetrahedron Lett.*, *22*(14).
- [68] Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.*, *1*(3), 1112–1116.
- [69] Houghton, P., Fang, R., Techatanawat, I., Steventon, G., Hylands, P. J., & Lee, C. C. (2007). The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*, *42*(4), 377–387.
- [70] Yang, S., Wang, T. N., Zhou, Y. A., Shi, L., Lu, A. D., & Wang, Z. W. (2021). Discovery of cysteine and its derivatives as novel antiviral and antifungal agents. *Molecules*, *26*(2).