



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Adelino Manuel Reis Pereira

1H,3H-PIRROLO[1,2-*C*]TIAZÓIS QUIRAIS
NO TRATAMENTO DO CANCRO COLORRETAL:
SÍNTESE DE NOVOS DERIVADOS DO
COMPOSTO LÍDER MANIO

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal orientada pela Professora Doutora Teresa Pinho e Melo e pela Doutora Maria Isabel Soares e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2023

Adelino Manuel Reis Pereira

**1*H*,3*H*-PIRROLO[1,2-*c*]TIAZÓIS QUIRAIS NO
TRATAMENTO DO CANCRO COLORRETAL:
SÍNTESE DE NOVOS DERIVADOS DO
COMPOSTO LÍDER MANIO**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal orientada pela Professora Doutora Teresa Pinho e Melo e pela Doutora Maria Isabel Soares e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2023
FCTUC

“Failure is success in progress.”

Albert Einstein

Prefácio

O trabalho apresentado nesta dissertação foi realizado entre setembro de 2022 e agosto de 2023 no Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Todo o período de tempo referido foi dedicado à síntese química das moléculas no Grupo de Química Orgânica do Centro de Química de Coimbra, com exceção de uma semana durante o mês de fevereiro que foi utilizada para acompanhar o estudo de atividade antitumoral *in vitro*, na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Agradecimentos

O caminho para o sucesso não é feito na escuridão. No entanto, assemelha-se a uma fria noite de inverno repleta de obstáculos, que nos convidam a ultrapassá-los. Cada uma das nossas decisões permite-nos progredir em direção a um novo desafio, deixando um aprendizado que nos faz crescer não só como profissionais mas também como pessoas. Naturalmente, por vezes sentimo-nos desamparados e a luz ao fundo do túnel parece ser uma miragem. É nestas ocasiões que nos relembramos de que não estamos verdadeiramente sozinhos e que ao longo do nosso percurso tivemos a oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas, cujo apoio é imprescindível ao nosso sucesso. Assim, gostaria de imortalizar, recorrendo a algumas palavras de agradecimento, as pessoas que me apoiaram e permitiram a realização deste projeto de investigação.

Desejo expressar os meus agradecimentos à Professora Doutora Teresa Pinho e Melo, orientadora deste trabalho, pela oportunidade de desenvolver o trabalho apresentado nesta dissertação no grupo de investigação de Química Orgânica. Gostaria também de agradecer por todos os ensinamentos transmitidos, pela disponibilidade e incentivo concedido ao longo deste percurso.

À Doutora Isabel Soares um agradecimento especial pela orientação, tempo disponibilizado e ajuda prestada, sendo cruciais para a realização deste projeto de investigação. Agradeço também por toda a paciência, conhecimento transmitido, motivação, apoio concedido e sobretudo por toda a confiança depositada nas minhas capacidades.

À Professora Doutora Dina Murtinho, à Professora Doutora Elisa Serra, à Professora Doutora Marta Piñeiro, à Doutora Ana Lúcia Cardoso e à Doutora Susana Lopes gostaria de agradecer o acolhimento, ensinamentos transmitidos e apoio demonstrado.

Aos meus colegas de laboratório desejo expressar a minha profunda gratidão por me acolherem num grupo de investigação que mais tarde poderei recordar como uma família. Todos vós permitiram que a alegria, no laboratório e fora dele, nunca acabasse e transmitiram-me ferramentas poderosas para enfrentar o dia-a-dia. Apesar do nosso encontro ter sido breve, saibam que ficarão para sempre marcados no meu coração. Que não seja um adeus, mas sim um até já. Um obrigado especial ao Américo Alves, Beatriz

Pereira, Bruna Costa, Catarina Amorim, Cláudia Alves, João Ribeiro, João Simões, João Vítor, Mariana Costa e Soraia Ferreira.

Ao Mestre Pedro Cruz o meu muito obrigado por toda a prestabilidade e flexibilidade demonstrada durante a colaboração nos estudos de RMN.

À Professora Doutora Lucília Saraiva e a todo o seu grupo de investigação, em especial à Dra. Carla Carvalho, o meu agradecimento pela disponibilidade e hospitalidade demonstrada durante a colaboração nos estudos de atividade antitumoral.

A toda a minha família, em especial à minha madrinha Fátima, agradeço por todo o apoio e motivação dada ao longo desta jornada.

Aos meus pais não existe modo de expressar a minha gratidão por tudo aquilo que me proporcionaram. Amor, carinho, proteção e educação eram constantes e nunca faltaram. Obrigado por confiarem em mim e me darem a liberdade de cometer os meus próprios erros, sem nunca deixarem de estar disponíveis para me reerguer dos meus falhanços.

À Lara, minha irmã mais nova, obrigado por trazeres alegria à nossa família. És o principal motivo que me leva a querer ser uma melhor versão de mim a cada dia. Espero que olhes para mim com orgulho pois tento ser um modelo a seguir para ti.

Aos meus amigos de longa data, Carina, Helena, Joana e Sérgio, obrigado pelo apoio incondicional que sempre demonstraram e por ouvirem os meus desabafos ao longo deste percurso. Os anos passam mas a nossa amizade prevalece.

ÍNDICE

Índice de Figuras.....	xi
Índice de Esquemas	xiii
Índice de Tabelas	xv
Nomenclatura e Abreviaturas	xvii
Resumo	xix
Abstract	xxi
1. Introdução	1
1.1 Cancro colorretal	3
1.1.1 Tratamento atual e perspectivas futuras.....	4
1.2 1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -Pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazóis	6
1.2.1 1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -Pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazóis: Síntese e atividade biológica	7
1.2.2 MANIO: Atividade antitumoral.....	12
1.2.3 Modulação estrutural do MANIO	15
1.3 Objetivos do projeto.....	18
2. Síntese de novos derivados do MANIO.....	21
2.1 Introdução	23
2.2 Síntese de derivados hidroximetilo de 1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazóis	23
2.2.1 Síntese de (3 <i>S</i>)-6- e (3 <i>S</i>)-7-hidroximetil-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazol	23
2.2.2 Síntese de (3 <i>R</i>)-6,7-bis(hidroximetil)-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazol conjugado com ácido linoleico	26
2.3 Síntese de bioisósteros de derivados do MANIO	28
2.3.1 Síntese de (3 <i>R</i>)-6,7-bis(aminometil)-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazóis.....	28
2.3.2 Síntese de (3 <i>R</i>)-6- e (3 <i>R</i>)-7-aminometil-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazol	41
2.4 Conclusão	44
3. Atividade antitumoral	47
3.1 Introdução	49
3.2 Novos derivados do MANIO: Atividade antitumoral.....	50
3.3 Conclusão	51
4. Conclusão e Perspetivas Futuras.....	53
4.1 Conclusão	55
4.2 Perspetivas Futuras	56
5. Parte Experimental.....	57

5.1 Aparelhagem utilizada	59
5.2 Solventes e Reagentes	60
5.3 Procedimentos experimentais referentes ao Capítulo II	61
5.3.1 Preparação de ácidos tiazolidina-4-carboxílicos	61
5.3.2 Preparação de ácidos <i>N</i> -acetiltiazolidina-4-carboxílicos	64
5.3.3 Preparação de 1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazóis via ciclo-adição 1,3-dipolar	64
5.3.4 Redução de 1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazol carboxilatos	69
5.3.5 Esterificação de Steglich	72
5.3.6 Hidrólise de 1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazol carboxilatos	73
5.3.7 Amidação de 1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazol carboxilatos	74
5.3.8 Redução de 1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirrolo[1,2- <i>c</i>]tiazol-carboxamida secundária	79
Referências	81

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1- MOLÉCULAS ATIVADORAS DA PROTEÍNA P53 ATUALMENTE EM ENSAIOS CLÍNICOS.	5
FIGURA 1.2- A) ESTRUTURA QUÍMICA DO MANIO; B) ESTRUTURA QUÍMICA E NOMENCLATURA DE DIFERENTES NÚCLEOS PIRROLOTIAZOL.	6
FIGURA 1.3- CENTROS QUIRAIS POSSÍVEIS NO NÚCLEO 1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -PIRROLO[1,2- <i>c</i>]TIAZOL.	7
FIGURA 1.4- ESTRUTURA QUÍMICA E RESPECTIVO IC ₅₀ (μM) DO MANIO E DO SEU ENANTIÓMERO, EM LINHAS CELULARES DO CANCRO DA MAMA MCF7 (72 H DE INCUBAÇÃO).	11
FIGURA 1.5- A) ESTRUTURA QUÍMICA E IC ₅₀ DO MANIO, EM LINHAS CELULARES HCT116 P53 ^{+/+} E HCT116 P53 ^{-/-} (48 H DE INCUBAÇÃO); B) EXEMPLOS DE AGENTES CITOTÓXICOS ATUALMENTE UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE VÁRIOS TIPOS DE CANCRO.	13
FIGURA 1.6- INTERAÇÃO DO MANIO (REPRESENTADO A VERDE) COM O ADN (REPRESENTADO A AMARELO) ATRAVÉS DE INTERAÇÕES DE EMPILHAMENTO E COM A WTP53 (REPRESENTADA A AZUL) ATRAVÉS DE PONTES DE HIDROGÉNIO	14
FIGURA 1.7- ESTRUTURA QUÍMICA DO MANIO E DE ALGUNS DOS SEUS DERIVADOS.	16
FIGURA 1.8- RACIONALIZAÇÃO DE NOVOS DERIVADOS DO MANIO.	17
FIGURA 1.9- ESTRUTURAS PROPOSTAS PARA NOVOS DERIVADOS DO MANIO.....	18
FIGURA 2.1- ESTRUTURA QUÍMICA E ESPETRO DE RMN ¹ H DO COMPOSTO 2.16A (CDCl ₃).	33
FIGURA 2.2- PRODUTOS DA MONO-REDUÇÃO DO COMPOSTO (3 <i>R</i>)- <i>N</i> ⁶ , <i>N</i> ⁷ -DIBENZIL-3-FENIL-5-MÉTIL-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -PIRROLO[1,2- <i>c</i>]TIAZOL-6,7-DICARBOXAMIDA (2.16A).	35
FIGURA 2.3- ESTRUTURA QUÍMICA E ESPETRO DE RMN ¹ H DO COMPOSTO 2.15 (DMSO- <i>D</i> ₆).	40
FIGURA 2.4- ESTRUTURA QUÍMICA E ESPETRO DE RMN ¹ H DO COMPOSTO 2.25 (CDCl ₃).	43
FIGURA 2.5- ESTRUTURA QUÍMICA DOS NOVOS DERIVADOS DO MANIO SINTETIZADOS DURANTE ESTE PROJETO DE INVESTIGAÇÃO... ..	45
FIGURA 3.1- ESTRUTURA QUÍMICA DA SULFORODAMINA B.	49
FIGURA 3.2- ESTRUTURA QUÍMICA DOS NOVOS DERIVADOS DO MANIO CUJA ATIVIDADE ANTITUMORAL FOI ESTUDADA.	50
FIGURA 3.3- ESTRUTURA QUÍMICA E IC ₅₀ DO MANIO E DO NOVO DERIVADO 3.2.	52
FIGURA 4.1- ESTRUTURA QUÍMICA DE NOVOS DERIVADOS ÁLCOOL (A), AMIDA (B), AMINA (C) E ÁCIDO CARBOXÍLICO (D) DO MANIO SINTETIZADOS DURANTE ESTE PROJETO DE INVESTIGAÇÃO.	55

ÍNDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1.1	8
ESQUEMA 1.2	8
ESQUEMA 1.3	9
ESQUEMA 1.4	10
ESQUEMA 1.5	11
ESQUEMA 2.1	24
ESQUEMA 2.2	25
ESQUEMA 2.3	26
ESQUEMA 2.4	28
ESQUEMA 2.5	29
ESQUEMA 2.6	32
ESQUEMA 2.7	34
ESQUEMA 2.8	36
ESQUEMA 2.9	37
ESQUEMA 2.10	38
ESQUEMA 2.11	42
ESQUEMA 2.12	44

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1.1- IC ₅₀ (μM) DO MANIO E DE ALGUNS DOS SEUS DERIVADOS (REPRESENTADOS NA FIGURA 1.8), DETERMINADOS EM LINHAS CELULARES HCT116 (48 H DE INCUBAÇÃO).....	16
TABELA 2.1- ESTUDO DA AMIDAÇÃO DIRETA DO ÉSTER 2.11A USANDO BASES FORTES.....	30
TABELA 2.2- OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO PARA A AMIDAÇÃO DIRETA DO ÉSTER 2.11A USANDO LIHMDS COMO BASE.....	30
TABELA 2.3- CONDIÇÕES DE REAÇÃO TESTADAS PARA A REDUÇÃO DO COMPOSTO 2.16A.....	34
TABELA 2.4- OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS PARA A AMIDAÇÃO DIRETA DO DIÉSTER 2.11A COM SOLUÇÃO DE AMONÍACO EM METANOL 7 M (NH ₃ /MEOH).....	39
TABELA 3.1- IC ₅₀ (μM) DOS NOVOS DERIVADOS DO MANIO EM LINHAS CELULARES HCT116 (48 H DE INCUBAÇÃO).....	51

NOMENCLATURA E ABREVIATURAS

Nomenclatura

A nomenclatura utilizada nesta dissertação segue as regras gerais da nomenclatura IUPAC.¹ O sistema Hantzsch-Widman foi utilizado para a nomenclatura de anéis fundidos.²

Abreviaturas

ADMET	Absorção/Distribuição/Metabolismo/Excreção/Toxicidade
ADN	Ácido desoxirribonucleico
anti-EGFR	Anti recetor do fator de crescimento epidérmico (do inglês <i>anti epidermal growth factor receptor</i>)
anti-VEGF	Anti fator de crescimento do endotélio vascular (do inglês <i>anti vascular endotelium growth factor</i>)
APCI	Ionização química a pressão atmosférica (do inglês <i>atmospheric-pressure chemical ionization</i>)
ATR	Refletância total atenuada (do inglês <i>attenuated total reflection</i>)
CCR	Cancro colorretal
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
DCC	<i>N,N'</i> -díciclohexilcarbodiimida
DMAD	Acetilenodicarboxilato de dimetilo (do inglês <i>dimethyl acetylenedicarboxylate</i>)
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EMAR	Espetrometria de massa de alta resolução
ESI	Ionização por <i>electrospray</i> (do inglês <i>electrospray ionization</i>)

HCT116 p53 ^{-/-}	Linha celular do cancro colorretal humano que não expressa a proteína p53
HCT116 p53 ^{+/+}	Linha celular do cancro colorretal humano que expressa a proteína p53
IC ₅₀	Concentração inibitória média (do inglês <i>inibitory concentration</i>)
IV	Espetroscopia de infravermelho
LiHMDS	Bis(trimetilsilil)amida de lítio (do inglês <i>lithium hexamethyldisilazide</i>)
m	Multipeto
MANIO	(3S)-6,7-bis(hidroxiometil)-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolol[1,2-c]tiazol
MCF7	Linha celular do cancro da mama triplo negativo
miRNA	Micro ácido ribonucleico (do inglês <i>micro ribonucleic acid</i>)
mutp53	Proteína p53 mutada (do inglês <i>mutated p53</i>)
q	Quarteto
Rf	Fator de retenção (do inglês <i>retention factor</i>)
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	Singleto
SAR	Relação estrutura-atividade (do inglês <i>structure-activity relationship</i>)
t	Tripleto
THF	Tetra-hidrofurano
TLC	Cromatografia em camada fina (do inglês <i>thin layer chromatographi</i>)
TMS	Tetrametilsilano
WTp53	Proteína p53 nativa (do inglês <i>wild type p53</i>)

RESUMO

Atualmente, o cancro é uma das doenças mais incidentes e impactantes a nível mundial, afetando mais de vinte milhões de pessoas. É estimado que em 2040 haja um aumento de quase cinquenta por cento na incidência do cancro, passando a afetar cerca de trinta milhões de pessoas em todo o mundo. Um dos cancros com maior expressão a nível mundial é o cancro colorretal (CCR), que sendo o terceiro tipo de cancro mais comum, é o segundo mais mortífero. Assim, dada a sua elevada incidência e uma vez que o cancro pode ser muito heterogéneo, a descoberta de moléculas promissoras para o seu tratamento não é uma tarefa fácil, mas muito relevante.

O grupo de investigação onde foi desenvolvido o presente projeto de mestrado, em colaboração com o grupo da Prof. Filomena Botelho (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra) e posteriormente com o grupo da Prof. Lucília Saraiva (Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto), foi responsável pela identificação de um composto líder da família dos pirrolotiazóis quirais com atividade antitumoral. Inicialmente este composto foi estudado em linhas celulares humanas do cancro da mama, mas, rapidamente, avanços na compreensão do seu mecanismo de ação levaram a um redirecionamento para o estudo da sua utilização no CCR. O principal objetivo do projeto científico que deu origem a esta dissertação era a modulação estrutural do composto líder, **MANIO**, de forma a melhorar as suas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas, e a identificação de relações estrutura-atividade da família de pirrolotiazóis quirais.

Na introdução desta dissertação é feita uma breve revisão do estado da arte sobre o CCR e o seu tratamento atual. Neste contexto, é apresentada a atividade antitumoral do **MANIO** e de alguns dos seus derivados anteriormente sintetizados em linhas celulares do cancro colorretal que expressam a proteína p53 (HCT116 p53^{+/+}) e que não expressam a proteína p53 (HCT116 p53^{-/-}), de forma a avaliar o potencial uso de compostos da família dos pirrolotiazóis quirais no tratamento do CCR como ativadores da proteína p53.

No capítulo seguinte são contempladas as metodologias sintéticas, e respetivos processos de otimização, utilizadas para a obtenção de novos derivados de 1*H*,3*H*-pirrolo-[1,2-*c*]tiazóis quirais. O trabalho desenvolvido neste projeto de investigação permitiu a

síntese de dois novos derivados mono-hidroximetilo com configuração absoluta *S*, 6- e 7-hidroximetil-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol e de um conjugado do enantiómero do **MANIO** com o ácido linoleico. Adicionalmente, foi possível sintetizar derivados de 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis contendo ácidos carboxílicos, amidas primárias ou *N*-benzilamidas em C-6 e/ou C-7. Por fim, foi ainda demonstrado que apesar das dificuldades encontradas na redução de derivados bis(amida), era possível reduzir eficientemente os derivados contendo apenas um grupo funcional amida, o que culminou na síntese de um derivado mono-aminometilo protegido com o grupo benzilo, (3*R*)-6-(*N*-benzil-aminometil)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol.

No terceiro capítulo é apresentado o estudo da atividade antitumoral (na linha celular HCT116) de sete novos derivados sintetizados ao longo deste projeto. Os resultados obtidos permitem a identificação de um derivado com elevada atividade, o (3*S*)-7-hidroximetil-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol. Adicionalmente, é também demonstrada a importância do(s) grupo(s) hidroximetilo(s) em C-6/C-7 para garantir uma elevada atividade antitumoral e concluir que estes grupos possuem um elevado grau de sinergismo com a configuração absoluta em C-3.

No último capítulo desta dissertação são apresentadas todas as técnicas laboratoriais, protocolos de síntese e a caracterização dos novos derivados de 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol e respectivos precursores, mencionados ao longo deste projeto.

Palavras-chave: Cancro colorretal, 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol, MANIO, ativadores da proteína p53, ciclo-adução 1,3-dipolar.

ABSTRACT

Cancer is currently one of the world's most prevalent and devastating diseases, affecting more than twenty million people worldwide. It is estimated that the incidence of cancer will increase by almost fifty per cent by 2040, affecting around thirty million people worldwide. One of the most important is colorectal cancer (CRC), which is the third most common cancer and the second most deadly type of cancer worldwide. Given its high incidence and the fact that cancer can be very heterogeneous, the discovery of promising molecules for its treatment is not easy, but very relevant.

Our research group, in collaboration with the group of Prof. Filomena Botelho (Faculty of Medicine, University of Coimbra) and later with the group of Prof. Lucília Saraiva (Faculty of Pharmacy, University of Porto), was responsible for identifying a lead compound from the family of chiral pyrrolothiazoles with anti-tumour activity. This compound was initially studied in human breast cancer cell lines, but progress in understanding its mechanism of action soon led to a redirection to study its use in CRC. The main objective of this study was to structurally modulate the lead compound, **MANIO**, in order to improve its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and to identify structure-activity relationships of the chiral pyrrolothiazole family.

To begin with, this dissertation presents a brief review of the state of the art of CRC and its current treatment. In this context, the antitumour activity of **MANIO** and some of its previously synthesised derivatives in colorectal cancer cell lines expressing protein p53 (HCT116 p53^{+/+}) and cell lines not expressing protein p53 (HCT116 p53^{-/-}) is presented in order to evaluate the potential use of compounds from the chiral pyrrolothiazole family in the treatment of CRC as protein p53 activators.

The following chapter describes the synthetic methods and the respective optimisation processes used to obtain new chiral 1*H*,3*H*-pyrrolo[1,2-*c*]thiazole derivatives. The work carried out in this research project allowed the synthesis of two new mono-hydroxymethyl derivatives with absolute *S*-configuration, 6- and 7-hydroxymethyl-5-methyl-3-phenyl-1*H*,3*H*-pyrrolo[1,2-*c*]thiazole and a conjugate of the **MANIO** enantiomer with linoleic acid. It was also possible to synthesise 1*H*,3*H*-pyrrolo[1,2-*c*]thiazole derivatives containing

carboxylic acids, primary amides and *N*-benzyl amides at C-6 and/or C-7. Finally, despite the difficulties encountered in the reduction of bis(amide) derivatives, it was also possible to efficiently reduce derivatives containing only one amide functional group, culminating in the synthesis of a mono-aminomethyl derivative protected by the benzyl group, (3*R*)-6-(*N*-benzyl-aminomethyl)-5-methyl-3-phenyl-1*H*,3*H*-pyrrolo[1,2-*c*]thiazole.

The study of the antitumour activity (in the HCT116 cell line) of seven new derivatives synthesised during this project is presented in the third chapter. The results obtained allow the identification of a derivative with high activity, (3*S*)-7-hydroxymethyl-5-methyl-3-phenyl-1*H*,3*H*-pyrrolo[1,2-*c*]thiazole. Furthermore, the importance of the hydroxymethyl group(s) at C-6/C-7 in ensuring high antitumour activity is demonstrated and it is concluded that these groups have a high degree of synergism with the absolute configuration at C-3.

All the laboratory techniques, synthesis protocols and characterisation of the new 1*H*,3*H*-pyrrolo[1,2-*c*]thiazole derivatives and their precursors mentioned throughout this project are presented in the final chapter of this thesis.

Keywords: Colorectal cancer, 1*H*,3*H*-pyrrolo[1,2-*c*]thiazole, MANIO, protein p53 activators, 1,3-dipolar cycloaddition

1. INTRODUÇÃO

Simplificadamente, o cancro é uma doença genética multifatorial que pode ou não ser hereditária. Todavia, o cancro é caracterizado por possuir um elevado grau de heterogeneidade tanto inter- como intratumoral.³ Isto significa que para além de existirem vários tipos de cancro, o mesmo tipo de cancro também possui heterogeneidade individual, podendo o único fator causal comum ser o paciente possuir danos genéticos. Efetivamente, quando utilizado genericamente, o termo cancro pode referir-se a um conjunto com aproximadamente trezentos tipos de doença diferentes.⁴ Desta forma, o tratamento de um indivíduo com cancro é um processo complexo e extremamente dependente da heterogeneidade do seu tumor³, sendo frequentemente necessário recorrer a terapêuticas direcionadas.

No entanto, devido à elevada incidência do cancro, afetando mais de vinte milhões de pessoas e sendo uma das principais causas de morte em cerca de 75% dos países do mundo⁵, é de extrema importância que a comunidade científica não cesse esforços na busca de tratamentos eficazes para este conjunto de doenças.

1.1 Cancro colorretal

Em 2020, segundo dados da Organização Mundial de Saúde, o cancro colorretal (CCR) foi um dos cancros mais diagnosticados e mortais em todo o mundo, para ambos os sexos.⁵ Há várias décadas isto não era uma realidade, no entanto, devido à crescente adoção de um estilo de vida ocidental, as populações estão cada vez mais expostas a vários fatores de risco deste cancro, nomeadamente obesidade, sedentarismo e consumo de tabaco.⁶ Apesar deste conhecimento, a consciencialização para uma alteração do estilo de vida não será suficiente para reduzir eficientemente o número de incidências do CCR. Aliado a isto, os tratamentos atualmente existentes para o CCR não têm a eficácia desejada, uma vez que a elevada taxa de incidência, sendo atualmente o terceiro tipo de cancro mais diagnosticado, se traduz na segunda taxa de mortalidade mais elevada.^{5,7} Isto acontece porque a eficiência do tratamento atual é muito dependente do estágio de desenvolvimento do CCR. Em diagnósticos precoces, a primeira linha de tratamento é a cirurgia, uma terapêutica indesejada pelo facto de se tratar de um processo invasivo. Por outro lado, devido à metastização do tumor, esta terapia deixa de ser eficiente ao longo do desenvolvimento do CCR.⁶

Recentemente, desenvolvimentos no conhecimento da fisiopatologia do CCR mostraram que a disfunção da proteína p53 é um evento patológico crucial neste cancro.

Isto deve-se, maioritariamente a mutações no gene TP53 ou interações indesejadas com reguladores negativos desta proteína, nomeadamente outros fatores de transcrição e miRNAs.⁸

A proteína p53 é um fator de transcrição antitumoral, comumente designada guardiã do genoma, responsável pela regulação do ciclo celular através da deteção e reparação de erros do material genético.⁹ Sempre que a reparação de erros do material genético não é possível, a proteína p53 induz apoptose celular, impedindo que células com ácido desoxirribonucleico (ADN) mutado perpetuem, se dividam e gerem novas células. Assim, a inativação da proteína p53 leva à divisão celular de células com mutações genéticas, culminando na formação de tumores.⁸

Apesar da inativação da proteína p53 não ser exclusiva do CCR, estudos recentes demonstram inequivocamente que esta anomalia está subjacente à elevada agressividade do tumor, bem como à sua capacidade de metastização.⁸ Assim sendo, a restauração da homeostase na via da proteína p53 é uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento do cancro, especialmente para o CCR uma vez que a falta de eficácia do tratamento ocorre quando existe uma elevada taxa de metastização.^{8,10}

1.1.1 Tratamento atual e perspectivas futuras

O tratamento do CCR é extremamente dependente do estágio em que este se encontra. Se o CCR estiver num estágio inicial, sendo apenas local e não possuindo metástases, então a primeira linha de tratamento é a cirurgia. No entanto, em cerca de um quinto dos primeiros diagnósticos de CCR, as metástases já estão presentes.¹¹

Em estágios mais avançados o tumor principal local poderá ser removido maioritariamente por cirurgia ou ser necessário recorrer a quimiorradioterapia e terapêuticas biológicas. A quimioterapia envolve a administração sinérgica de uma dupla ou trio de agentes citotóxicos, incluindo com frequência o 5-fluoruracilo ou a capecitabina mas havendo ainda muitas dúvidas sobre quais as melhores combinações.¹² Outros tratamentos incluem terapias biológicas anti fator de crescimento do endotélio vascular (anti-VEGF) ou anti recetor do fator de crescimento epidérmico (anti-EGFR), recorrendo à utilização de anticorpos monoclonais e podendo também ser utilizados em sinergia com os agentes citotóxicos supramencionados.¹² Quando estas terapêuticas não surtem o efeito desejado são utilizados agentes citotóxicos mais agressivos, como é o caso dos derivados

da cisplatina. Também nestes casos, a administração sinérgica com agentes biológicos pode ser favorável.¹²

Atualmente, sendo largamente vista como uma estratégia promissora, ainda não existe nenhuma terapêutica clinicamente aprovada para o tratamento do CCR baseada na reativação da proteína p53. Apesar de existirem inúmeros ativadores desta proteína, com diferentes mecanismos de ação, a maioria destes compostos não chega a ser estudado em ensaios clínicos. Isto acontece porque, durante os ensaios não clínicos, estas moléculas demonstram problemas de farmacodinâmica, nomeadamente seletividade e toxicidade, ou farmacocinética como por exemplo baixa biodisponibilidade.^{9,10} Outros problemas incluem baixa solubilidade ou estabilidade.⁹ No entanto, também as moléculas que superam estas debilidades, como a PRIMA-1^{MET}, COTI-2 e Nutlin-3a, encontrando-se em ensaios clínicos de fase I/II ou até mesmo fase III^{13,14}, apresentam problemas (Figura 1.1). As Nutlinas e análogos, devido ao seu mecanismo de ação ser exclusivamente a inibição dos reguladores negativos da proteína p53, não são capazes de restaurar a atividade de mutantes da p53 (mutp53), potenciando apenas a atividade das formas nativas (WTp53).¹⁴ PRIMA-1^{MET}, em fase III dos ensaios clínicos, restaura a atividade da mutp53 mas não potencia a atividade da WTp53 e além disso possui também um mecanismo de ação independente da via da proteína p53 no CCR.^{10,15} O mecanismo de ação subjacente à atividade antitumoral de COTI-2 não é totalmente conhecido e similarmente ao PRIMA-1^{MET}, possui uma vertente independente da via da proteína p53.^{10,16}

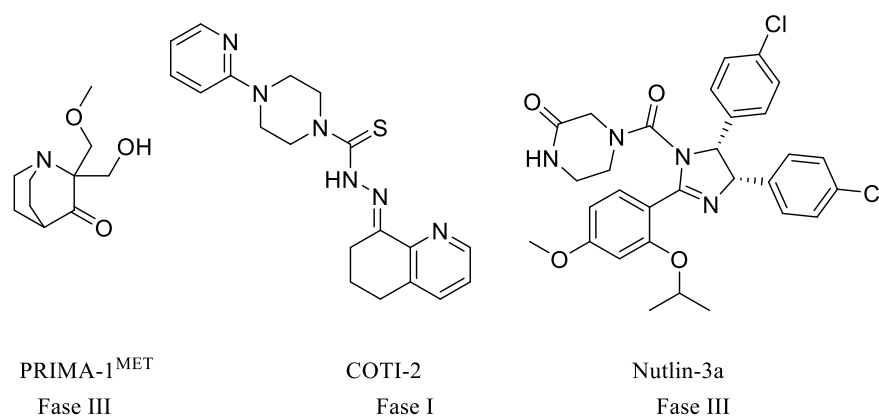


Figura 1.1- Moléculas ativadoras da proteína p53 atualmente em ensaios clínicos.

Por este motivo é imperativo desenvolver moléculas mais seletivas para a via da proteína p53, com mecanismos de ação conhecidos, e que sejam capazes de, sinérgicamente, reativar a mutp53 e potenciar a atividade da WTp53. A correta combinação

destas características permitirá maximizar a eficácia e minimizar os efeitos secundários de futuras terapêuticas.

1.2 1*H*,3*H*-Pirrolo[1,2-*c*]tiazóis

Recentemente foi identificado no grupo de investigação onde foi desenvolvido o projeto de investigação apresentado nesta dissertação um composto, o (3*S*)-6,7-bis(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol (**MANIO**) (**1.1**) como um agente anticancerígeno e um ativador seletivo da proteína p53 na terapia do CCR.^{17,18} O **MANIO** tem como estrutura base o núcleo pirrolotiazol (Figura 1.2a). Os pirrolotiazóis são sistemas bicíclicos caracterizados por possuírem dois heterociclos fundidos, um anel tiazol e um anel pirrol. Dependendo da posição de fusão destes dois heterociclos, é possível ter um sistema 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol ou pirrolo[2,1-*b*]tiazol, sendo o primeiro o núcleo base do **MANIO** (Figura 1.2b).

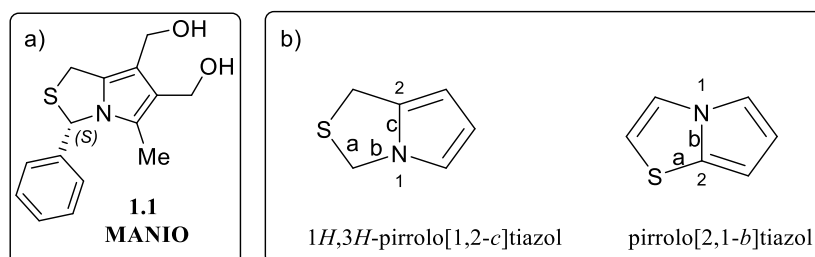


Figura 1.2- a) Estrutura química do **MANIO**; b) Estrutura química e nomenclatura de diferentes núcleos pirrolotiazol.

De acordo com estatísticas, mais de 85% dos compostos biologicamente ativos possuem na sua estrutura pelo menos um sistema heterocíclico. Efetivamente, a incorporação de heterociclos nas moléculas permite a otimização das suas propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), tornando os compostos heterocíclicos particularmente importantes em Química Medicinal.¹⁹ Individualmente, tanto os pirróis como os tiazóis são heterociclos largamente encontrados em produtos naturais e sintéticos, possuindo atividades biológicas variadas, nomeadamente propriedades anti-inflamatórias e antitumorais.^{20,21} Naturalmente, isto despertou o interesse do estudo da atividade biológica de pirrolotiazóis e na necessidade de otimizar métodos de síntese destes sistemas bicíclicos. Em 1960 foi descrita a primeira síntese de pirrolo[2,1-

b]tiazóis,²² e 20 anos depois, Kane descreveu pela primeira vez a síntese de moléculas contendo o núcleo *1H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol.²³

1.2.1 *1H,3H*-Pirrolo[1,2-*c*]tiazóis: Síntese e atividade biológica

Na ausência de substituintes nas posições saturadas, posições 1 e 3, os *1H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis são moléculas aquirais, no entanto a introdução de substituintes nessas posições permite criar um ou dois centros quirais (Figura 1.3).

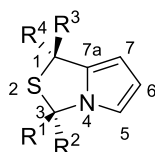
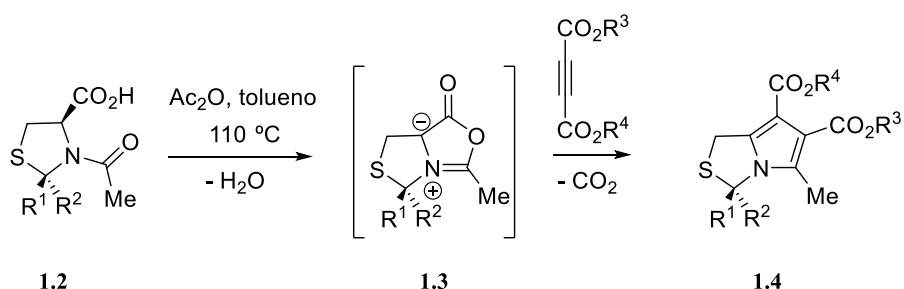


Figura 1.3- Centros quirais possíveis no núcleo *1H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol.

Um carbono quiral é caracterizado por possuir hibridização sp^3 e encontrar-se ligado a quatro substituintes diferentes, gerando duas estruturas tridimensionais não sobreponíveis, sendo a imagem do espelho uma da outra. Em Química Medicinal, a quiralidade é tão importante quanto os grupos funcionais presentes numa molécula, podendo ser fulcral para diferenciar um farmacóforo de um toxicóforo. Isto acontece porque os alvos farmacológicos, como proteínas e ADN, possuem uma estrutura tridimensional bem definida, o que os torna enantiosseletivos.²⁴

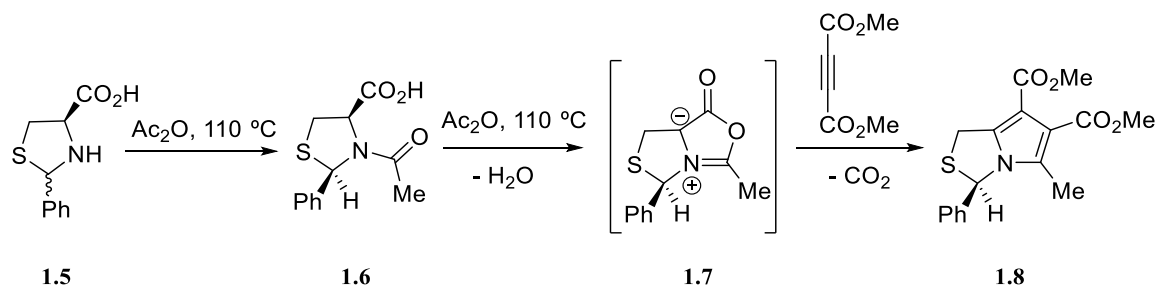
O trabalho inicial de Kane²³ permitiu a síntese de derivados não quirais de *1H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis e em 1987 foram descritos os primeiros estudos que demonstraram o potencial desta família de compostos como agentes antitumorais.²⁵ No entanto, os maiores progressos na síntese destes compostos foram descritos em 1994 por Györgydeák *et.al.*²⁶ Estes autores demonstraram ser possível obter *1H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis quirais com elevado excesso enantiomérico a partir de ácidos *N*-acetil-1,3-tiazolidina-4-carboxílicos **1.2** derivados da *L*-cisteína (Esquema 1.1). O aquecimento da tiazolidina **1.2** em anidrido acético conduz à geração *in situ* de sistemas mesoiônicos bicíclicos *5H,7H*-tiazol[3,4-*c*][1,3]oxazol-4-*io*-1-olatos **1.3** via ciclodesidratação. Estes sistemas mesoiônicos podem atuar como 1,3-dipolos na reação de ciclo-adição 1,3-dipolar com dipolarófilos ativados, conduzindo à formação de *1H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis **1.4** após eliminação concertada de dióxido de carbono. Neste processo é eliminado o centro quiral em C-4 na tiazolidina de

partida **1.2** e a quiralidade em C-2 (C-3 no produto) é mantida, conduzindo à obtenção de produtos opticamente puros.



Esquema 1.1

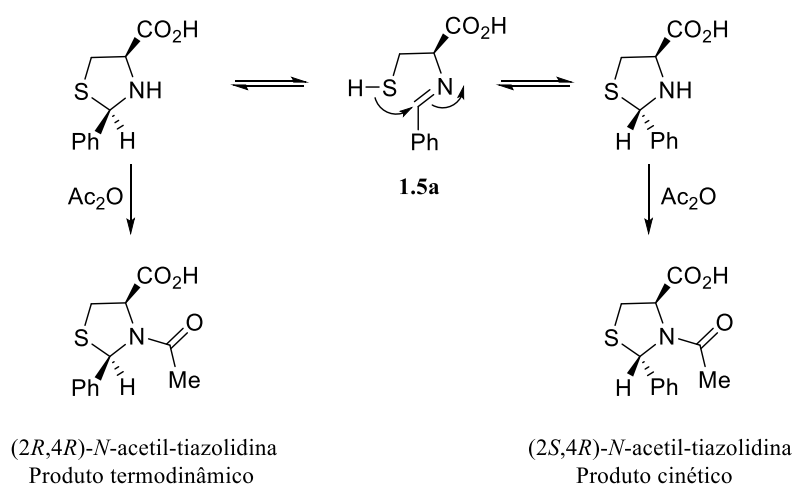
A reação de ciclo-adição 1,3-dipolar de *5H,7H*-tiazol[3,4-*c*][1,3]oxazol-4-íolo-1-olatos tem sido alvo de estudo no grupo de investigação de Química Orgânica. O trabalho desenvolvido permitiu demonstrar que era possível obter de forma seletiva e num único passo reacional, o (*3R*)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxilato de dimetila (**1.8**) partindo diretamente de ácido 2-feniltiazolidina-4-carboxílico (**1.5**) como uma mistura de diastereoisômeros (*2R,4R*) e (*2S,4R*) (Esquema 1.2).²⁷



Esquema 1.2

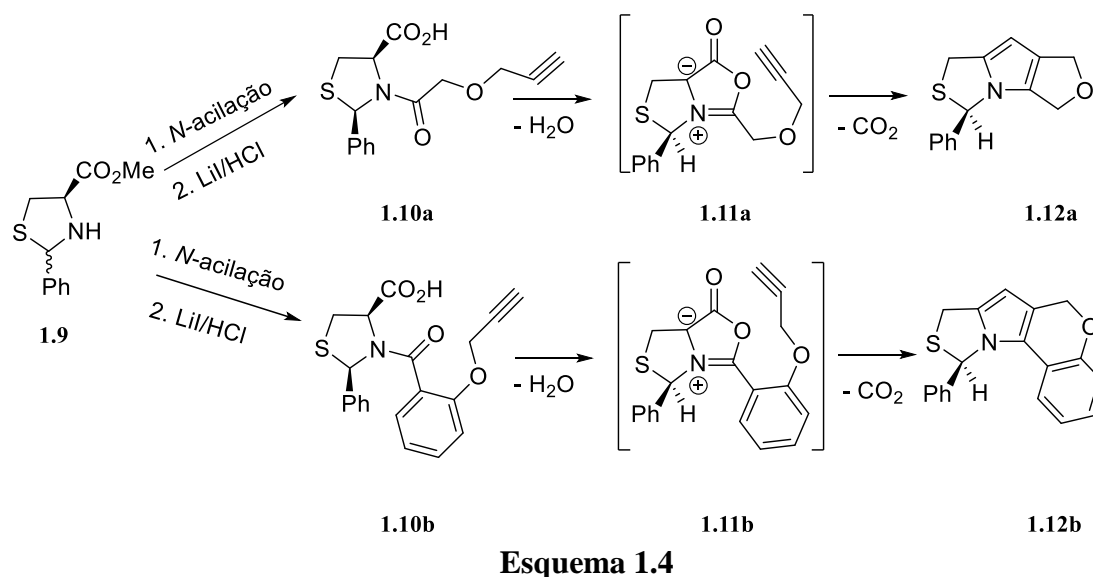
A tiazolidina **1.5** mediante aquecimento em anidrido acético, gera diastereosseletivamente a (*2R,4R*)-*N*-acetil-tiazolidina **1.6** *in situ*, que sofre ciclodesidratação para gerar o sistema mesoiônico bicíclico *5H,7H*-tiazol[3,4-*c*][1,3]oxazol-4-íolo-1-olato **1.7**. Este sistema mesoiônico atua como 1,3-dipolo na reação de ciclo-adição 1,3-dipolar com dipolarófilos ativados, como o acetileno dicarboxilato de dimetila (DMAD), conduzindo à formação seletiva do 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol **1.8** com configuração absoluta *R* na posição 3. Esta reação é possível num único passo reacional porque a (*2R,4R*)-*N*-acetil-tiazolidina **1.6** é o produto termodinâmico e está em equilíbrio com o produto cinético (*2S,4R*)-*N*-acetil-tiazolidina via imina **1.5a**. A proposta mecanística

para a formação do produto termodinâmico ou do produto cinético é apresentada no Esquema 1.3.²⁸ A inversão de quiralidade em C-2 do ácido 2-feniltiazolidina-4-carboxílico envolve a abertura do anel tiazolidina e consequente formação do intermediário base de Schiff **1.5a**. A *N*-acetilação impede a epimerização e permite a formação diastereosseletiva do produto termodinâmico ou cinético, através do controlo das condições reacionais. Em condições de temperatura elevada, o equilíbrio é deslocado no sentido da formação do produto termodinâmico.



Esquema 1.3

O nosso grupo de investigação desenvolveu também uma metodologia sintética para a obtenção de *1H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis quirais fundidos com outros sistemas heterocíclicos. O trabalho desenvolvido permitiu obter seletivamente pirrolo[1,2-*c*]tiazóis tricíclicos e tetracíclicos (ex. **1.12a** e **1.12b**) via reação de ciclo-adição 1,3-dipolar intramolecular de *5H,7H*-tiazol[3,4-*c*][1,3]oxazol-4-*io*-1-*olatos* derivados de ésteres tiazolidina-4-carboxílicos (Esquema 1.4).^{29,30}



A metodologia consistia na síntese de *5H,7H*-tiazol[3,4-*c*][1,3]oxazol-4-olatos contendo um dipolarófilo interno (ex. **1.11a** e **1.11b**), através da *N*-acetilação diastereosseletiva de uma mistura de diastereoisômeros (*2R,4R*)- e (*2S,4R*)-tiazolidina-4-carboxilato de metilo (ex. **1.9**) com o cloreto de ácido apropriado, seguida de conversão do grupo éster a ácido carboxílico por reação com iodeto de lítio, seguida de tratamento com HCl em solução aquosa. Os sistemas mesoiônicos **1.11a** e **1.11b** possuíam tanto o 1,3-dipolo como o dipolarófilo na sua estrutura, permitindo uma reação de ciclo-adição 1,3-dipolar intramolecular. Além da obtenção dos novos derivados **1.12a** e **1.12b**, este trabalho permitiu concluir que reações de ciclo-adição 1,3-dipolar intramolecular eram possíveis com dipolarófilos não ativados.

A alquilação do ADN é um dos mecanismos mais comuns entre os agentes antitumorais convencionais. Os agentes alquilantes, apesar de poderem ter estruturas químicas diferentes, são responsáveis por se ligar covalentemente ao ADN, levando a erros genéticos que culminam na morte celular, impedindo a proliferação do tumor. Alguns compostos heterocíclicos contendo substituintes hidroximetil mostraram ter propriedades alquilantes, especialmente quando possuíam dois centros reativos, permitindo a ligação covalente a ambas as cadeias do ADN.^{31,32} Neste contexto, o grupo de investigação de Química Orgânica conduziu a síntese e estudo da atividade antitumoral de novos derivados de *1H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis quirais, nomeadamente *6,7*-bis(hidroximetil)-*1H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis e *6*- ou *7*-hidroximetil-*1H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis, por redução dos correspondentes ésteres metílicos (ex. composto **1.8**). A atividade antiproliferativa foi estudada em linhas celulares humanas de cancro colorretal (WiDR), melanoma (A375) e

do cancro da mama triplo-negativo (HCC1806). Os resultados alcançados permitiram identificar alguns compostos com atividade antiproliferativa promissora na linha celular do cancro da mama MCF7, nomeadamente os compostos **1.1 (MANIO)** e **1.13** (Figura 1.4).³¹⁻

33

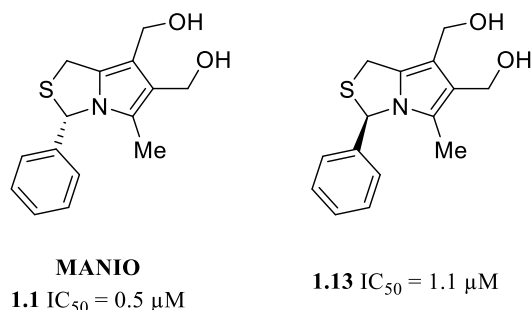
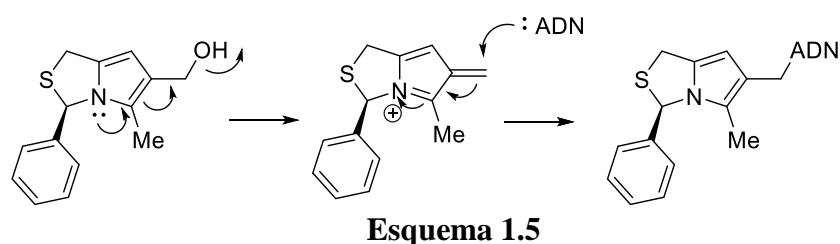


Figura 1.4- Estrutura química e respetivo IC₅₀ (μM) do **MANIO** e do seu enantiómero, em linhas celulares do cancro da mama MCF7 (72 h de incubação).

Naturalmente, uma vez que estes derivados de 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis apresentavam atividade antitumoral e a sua síntese tinha sido baseada em agentes alquilantes, foi proposto que possuísem um mecanismo de ação semelhante. Uma proposta de mecanismo para a alquilação do ADN pelos derivados de 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis é apresentada no Esquema 1.5, no entanto posteriormente confirmou-se que este não era o seu mecanismo de ação principal.³¹



A atividade antitumoral destas moléculas foi complementada com estudos sobre o seu mecanismo de ação.³³ Curiosamente, o ensaio de eletroforese em gel de célula única foi inconclusivo, levantando dúvidas sobre o mecanismo alquilante dos derivados de 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis. Este ensaio permite detetar danos do ADN através das diferentes mobilidades de cadeias de ADN com diferentes dimensões. É expectável que a ação de agentes alquilantes leve à fragmentação das cadeias de ADN, aumentando a sua mobilidade. Complementarmente, a realização de outros ensaios permitiu concluir que os derivados de 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis bloqueavam o ciclo celular, levavam a um

aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas, nomeadamente a proteína p53, e diminuíam a expressão de proteínas anti-apoptóticas.

Estes resultados sobre o mecanismo de ação dos derivados de 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis, levaram ao seu direcionamento para o tratamento do CCR.

1.2.2 MANIO: Atividade antitumoral

O **MANIO**, (3*S*)-6,7-bis(hidroximetil)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol (Figura 1.5, composto **1.1**), é um 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol quiral que demonstra propriedades antitumorais e elevada seletividade para a via da proteína p53 no CCR. Ensaio de viabilidade celular em células HCT116, linha celular do cancro colorretal humano, permitiram determinar uma concentração inibitória média (IC₅₀) de 0.97 µM em células que expressam a proteína p53 (HCT116 p53^{+/+}) e superior a 50 µM para o mesmo tipo de células mas que não expressam a proteína p53 (HCT116 p53^{-/-}).¹⁸ O estudo da viabilidade celular na linha celular SW837 e em células derivadas do paciente CCZ3, ambas células de cancro colorretal humano, permitiram concluir que o **MANIO (1.1)** potencia a atividade antitumoral de agentes citotóxicos atualmente utilizados no tratamento de cancros, como por exemplo doxorrubicina (**1.14**), cisplatina (**1.15**) e 5-fluorouracilo (**1.16**).¹⁸

Os agentes citotóxicos supramencionados são comumente relacionados com resistências do tumor ao seu tratamento. Isto leva a que, na tentativa, de superar os mecanismos de resistência, sejam administradas doses mais elevadas destes compostos, levando a problemas graves de toxicidade. Desta forma, o efeito sinérgico do **MANIO** é muito vantajoso uma vez que permite a utilização de doses mais baixas destes compostos, permitindo reduzir a sua citotoxicidade.

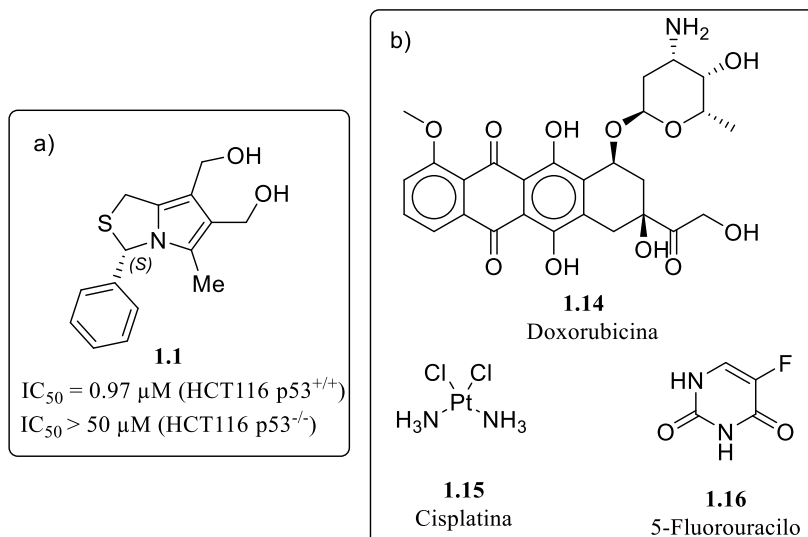


Figura 1.5- a) Estrutura química e IC_{50} do **MANIO**, em linhas celulares HCT116 p53^{+/+} e HCT116 p53^{-/-} (48 h de incubação); b) Exemplos de agentes citotóxicos atualmente utilizados no tratamento de vários tipos de cancro.

A interação entre o **MANIO** e o domínio de ligação ao ADN da proteína p53, nativa ou mutada, leva a um aumento da sua estabilidade térmica, permitindo a renaturação de alguns tipos de mutp53 prevalentes no CCR, nomeadamente a mutp53 R248W, R248Q ou R282W.^{8,18} Apesar deste mecanismo ainda não ser totalmente compreendido, a renaturação de diferentes mutp53s sugere que haja reduzida seletividade para as diferentes mutações da proteína p53, sendo vantajoso para o tratamento de CCRs que possuam heterogeneidade nestas mutações. Além disso, a estrutura tridimensional do **MANIO** permite-lhe interagir simultaneamente com a proteína p53 e o ADN, criando uma ponte entre as duas macromoléculas, o que potencia a interação entre estas e consequentemente a atividade transcricional da proteína p53.¹⁸ Assim, o **MANIO** caracteriza-se por possuir dois farmacóforos: enquanto os grupos hidroxilo permitem a interação do **MANIO** com a proteína p53 através de pontes de hidrogénio realizadas com resíduos de metionina, o grupo fenilo é o maior responsável pela interação com as bases de ADN através de interações de empilhamento (Figura 1.6).¹⁸

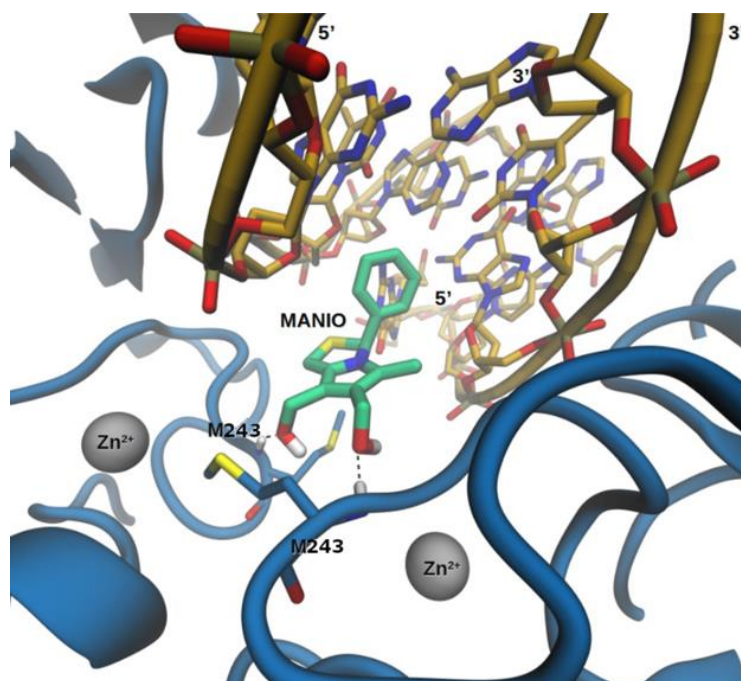


Figura 1.6- Interação do **MANIO** (representado a verde) com o ADN (representado a amarelo) através de interações de empilhamento e com a Wtp53 (representada a azul) através de pontes de hidrogénio. Adaptado de Helena Ramos *et al.*¹⁸

Desta forma, o **MANIO** tem a capacidade não só de restaurar a atividade da mutp53 como também de potenciar a atividade da Wtp53. Aliado a estas características, o **MANIO** apresenta sinergismo com outros agentes antitumorais convencionais e tem um perfil farmacocinético ideal para ser um bom candidato a ensaios clínicos.¹⁸

Destaca-se que o **MANIO** segue a regra 5 de Lipinski, tem boa permeabilidade intestinal, baixo metabolismo de primeira passagem, baixo grau de ligação às proteínas plasmáticas e um bom perfil de distribuição e excreção, distribuindo-se rapidamente por todo o organismo e sendo eliminado gradualmente ao longo do tempo. Todas estas características fazem do **MANIO** uma ótima molécula para administração oral, no entanto a sua baixa solubilidade aquosa a pH ácido e o facto de apresentar alguma afinidade para proteínas de efluxo pode limitar a sua biodisponibilidade oral. De forma a tentar superar estas limitações, e mantendo ou aumentando a atividade e seletividade do **MANIO**, foram sintetizados, no grupo de investigação de Química Orgânica, novos derivados contendo o núcleo base desta molécula. Foi estudado o efeito antiproliferativo destes compostos nas mesmas linhas celulares de CCR utilizadas para o **MANIO**, o que permitiu estabelecer relações estrutura-atividade (SAR).³⁴

1.2.3 Modulação estrutural do MANIO

A racionalização de novos derivados de um composto líder pode ser uma tarefa árdua, morosa e muito desafiante caso não se conheça o mecanismo de ação e a forma como o composto líder interage com o seu alvo farmacológico.

Atualmente, de forma a facilitar este processo, são utilizadas técnicas computacionais, recorrendo a modelos matemáticos treinados para um determinado conjunto de moléculas que permitem prever a atividade de alguns compostos baseado na sua estrutura química.³⁵ Desta forma, é possível prever a atividade de uma grande quantidade de novos derivados de um composto líder sem ser necessário sintetizar ou purificar os compostos. Apesar de interessante, esta abordagem requer muito poder computacional, um modelo matemático adequado para as moléculas de interesse e pode conduzir a falsos positivos ou falsos negativos, embora seja de grande utilidade quando é necessário estudar a atividade de uma grande biblioteca de compostos.³⁶

Previamente, no grupo de investigação de Química Orgânica, foram sintetizados e foi avaliado o efeito antiproliferativo nas linhas celulares humanas HCT116 p53^{+/+} e HCT116 p53^{-/-} de alguns compostos estruturalmente semelhantes ao **MANIO** (Figura 1.7, Tabela 1.1). Os resultados obtidos permitiram estabelecer algumas relações estrutura-atividade, e consequentemente confirmar quais os grupos mais importantes para a manutenção da atividade do **MANIO**.³⁴

O carbono na posição 3 corresponde ao único centro quiral do **MANIO** e como era expectável é de enorme importância para a sua atividade e poderá ser igualmente importante na seletividade para a proteína p53. Até à data, os resultados de estrutura-atividade mostram inequivocamente que, não só o substituinte em C-3 como também a configuração nessa posição são essenciais para manter a atividade do composto. A análise dos resultados expressos na tabela 1.1 permite concluir alguns aspetos importantes. Primeiro, os compostos com configuração absoluta *S* em C-3, **MANIO (1.1)** e composto **1.23**, têm atividade superior aos respetivos enantiómeros, composto **1.13** e composto **1.22**, respetivamente. Segundo, a atividade é relativamente melhor para derivados contendo grupos fenilo ou arilo para-substituídos em C-3 (ex. compostos **MANIO (1.1)**, **1.13**, **1.20**, **1.22** e **1.23**) ou um grupo heteroaromático (ex. composto **1.21**) relativamente a compostos contendo um grupo metilo (ex. compostos **1.26** e **1.27**) ou benzilo (composto **1.28**) nessa posição. Por outro lado, a remoção do substituinte em C-3 (compostos **1.29** e **1.30**) ou a

sua substituição por um grupo arilo para-substituído com um grupo volumoso (composto **1.24**) são alterações estruturais que não favorecem a atividade antitumoral dos derivados.

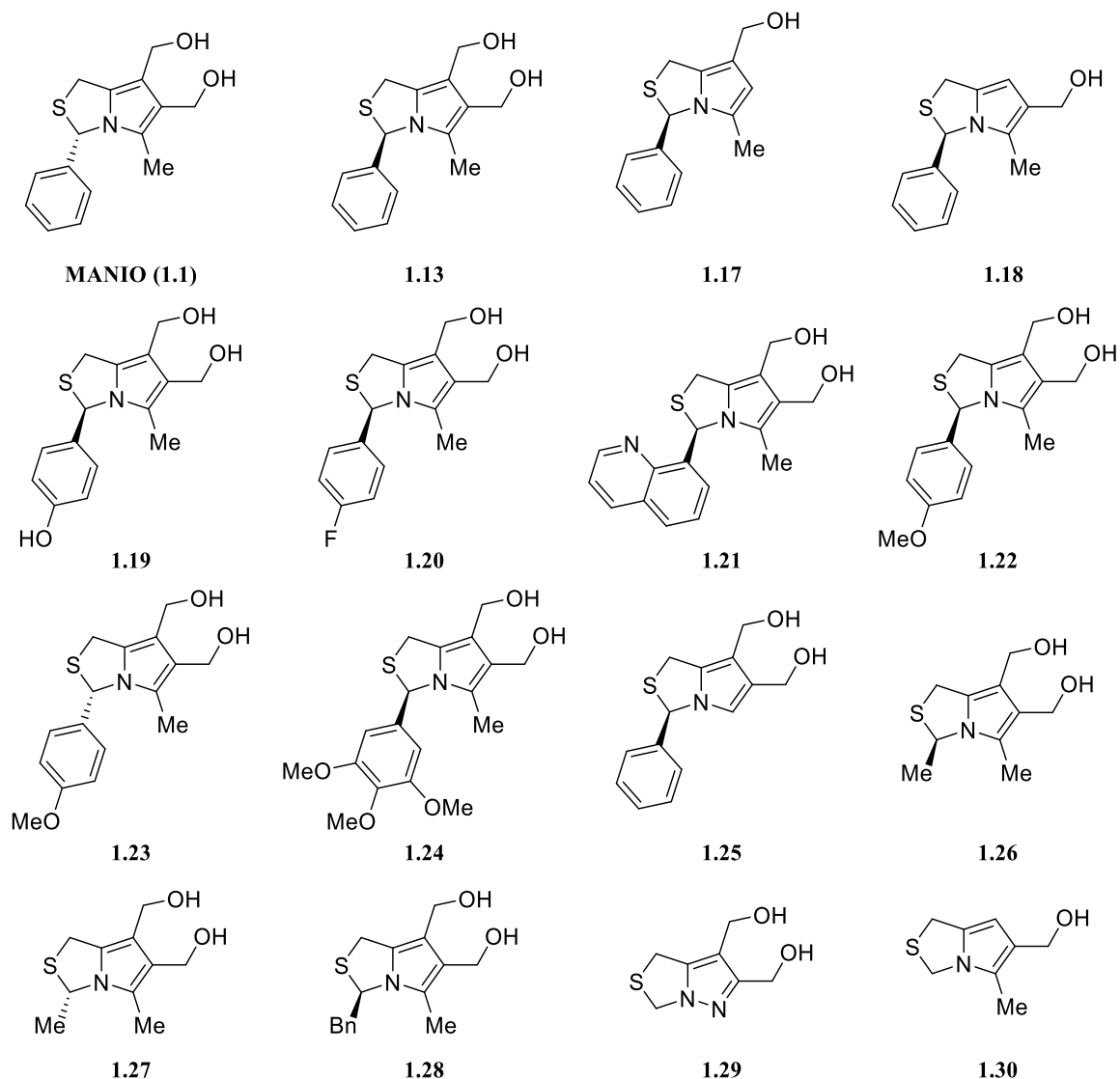


Figura 1.7- Estrutura química do **MANIO** e de alguns dos seus derivados.

Tabela 1.1- IC₅₀ (μM) do **MANIO** e de alguns dos seus derivados (representados na Figura 1.8), determinados em linhas celulares HCT116 (48 h de incubação).

Composto	IC ₅₀ (μM)	
	HCT116 p53 ^{+/+}	HCT116 p53 ^{-/-}
MANIO (1.1)	0.97	>50
1.13	5.10	>50
1.17	29.3	>50
1.18	6.68	>50
1.19	16.7	>50
1.20	4.43	33

1.21	7.50	>50
1.22	4.60	>50
1.23	1.47	24
1.24	>50	>50
1.25	20.3	>50
1.26	33.0	46
1.27	31.0	43
1.28	16.3	29
1.29	>50	>50
1.30	28.3	>50

Em relação aos grupos hidroximetilo nas posições 6 e 7, sabe-se que no **MANIO (1.1)** a presença destes grupos nestas posições é essencial para a interação por pontes de hidrogénio com os resíduos da proteína p53. Até à data, os resultados de estrutura-atividade apontam para uma maior importância do grupo hidroximetilo em C-6 (composto **1.18**) relativamente ao mesmo substituinte em C-7 (composto **1.17**), para a atividade dos derivados do **MANIO**. O estudo da atividade do composto **1.30**, com substituições tanto em C-3 como em C-7, permitiu confirmar a importância do substituinte em C-3 e aponta para a existência de sinergismo entre o substituinte em C-3 e os grupos hidroximetilo em C-6/C-7.

Relativamente à seletividade dos compostos, os dados da tabela 1.1 permitem concluir que nenhuma das modificações realizadas, quer em C-3 quer em C-6/C-7, levou à perda de seletividade para a via da proteína p53. No entanto é importante ressaltar que a comparação entre o composto **1.23** e o seu enantiómero **1.22** mostra uma diminuição da seletividade, algo que não é observável relativamente ao **MANIO (1.1)** e ao seu enantiómero **1.13**.

Com base na análise destes resultados, o foco do projeto de investigação apresentado nesta dissertação incide sobre a modulação das posições 3, 6 e 7 do **MANIO** (Figura 1.8).

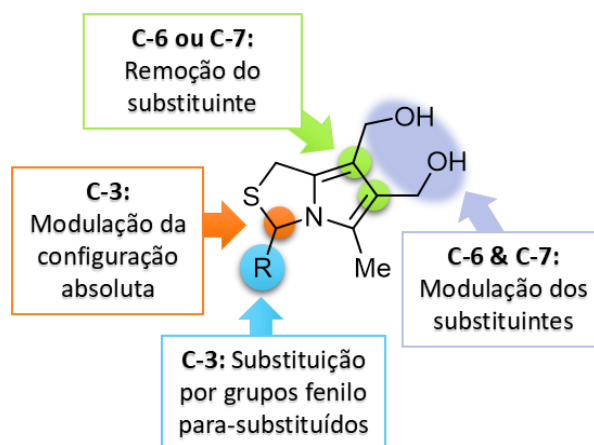


Figura 1.8- Racionalização de novos derivados do **MANIO**.

1.3 Objetivos do projeto

Baseado nas relações estrutura-atividade estabelecidas anteriormente, um conjunto de modificações estruturais do composto líder **MANIO** foram delineadas, resultando nas moléculas alvo apresentadas na Figura 1.9 como objeto de estudo do projeto de investigação apresentado nesta dissertação.

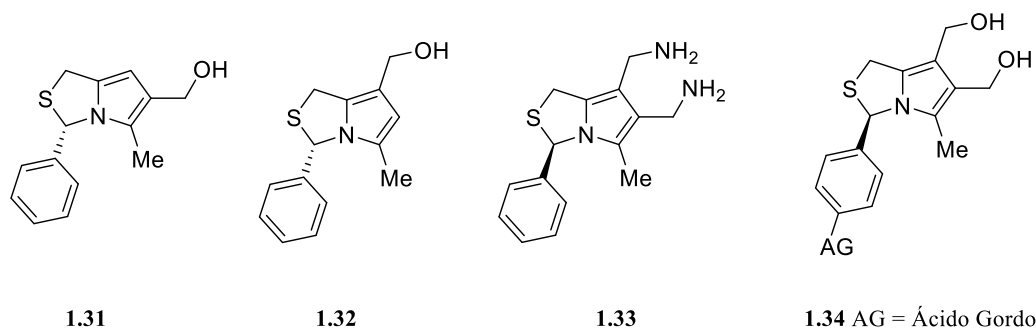


Figura 1.9- Estruturas propostas para novos derivados do **MANIO**.

Um dos tópicos de investigação deste projeto centrava-se na síntese dos 6- e 7-hidroxi-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis **1.31** e **1.32** com configuração absoluta *S*, enantiómeros dos compostos **1.18** e **1.17**, respetivamente. O objetivo da síntese destes derivados é confirmar o sinergismo existente entre a configuração absoluta em C-3 e os grupos hidroximetilo em C-6 ou C-7. Com base nos resultados anteriores, é expectável que haja um aumento da atividade de **1.31** e **1.32** relativamente aos seus enantiómeros, não sendo no entanto possível prever o impacto na seletividade para a via da proteína p53 no CCR.

A racionalização para o design do composto **1.33** tem por base o conceito de bioisosterismo. Bioisosterismo é uma abordagem utilizada em desenvolvimento de fármacos, onde um ou mais grupos de uma molécula são substituídos por bioisósteros.^{37,38} O conceito mais recente e abrangente de bioisósteros foi proposto por Burger e define-os como sendo “compostos ou grupos que possuem quase igual volume e formas moleculares, aproximadamente as mesmas distribuições eletrónicas e que apresentam propriedades físicas semelhantes (...) afetando os mesmos alvos biológicos e consequentemente produzindo respostas biológicas semelhantes”.³⁸ A modulação de uma molécula com base no bioisosterismo permite melhorar as suas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas sem interferir com a sua atividade no alvo biológico. Assim, a substituição do grupo hidroximetilo por um grupo aminometilo tinha como objetivo,

idealmente, manter ou aumentar a atividade antitumoral e modelar algumas das suas propriedades farmacocinéticas. Neste contexto, pretende-se com esta substituição resolver o problema da baixa solubilidade aquosa a pH ácido apresentado pelo **MANIO**, uma vez que a introdução do grupo amina irá permitir a fácil modulação da polaridade.

Outro dos tópicos deste projeto envolve a síntese de 6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis conjugados com ácidos gordos com a estrutura geral do composto **1.34**. A síntese destes conjugados do tipo **MANIO**-ácido gordo não tem como objetivo direto o melhoramento da atividade do **MANIO** mas sim da sua seletividade para as células cancerígenas. Ácidos gordos polinsaturados como por exemplo ácido linolénico, linoleico ou araquidónico, são bons candidatos para direcionarem o fármaco para as células do cancro.³⁹ Isto acontece porque as células cancerígenas caracterizam-se por possuir uma elevada taxa metabólica, uma vez que estão em constante e infinita divisão celular, e como tal necessitam de elevadas quantidades de energia. Uma vez que essa energia pode ser fornecida por estes ácidos gordos, então criar um pró-fármaco de um derivado do **MANIO** com o ácido linoleico pode ser uma boa estratégia para assegurar seletividade para as células cancerígenas. Associado a isto, a administração dos compostos na forma de pró-fármaco pode ser uma mais-valia para ultrapassar a afinidade dos compostos para proteínas de efluxo, que se encontram sobre expressas nas células cancerígenas.

2. SÍNTESE DE NOVOS DERIVADOS DO MANIO

2.1 Introdução

Neste capítulo são apresentadas as metodologias sintéticas, e respetivos processos de otimização, utilizadas na síntese de novos derivados do **MANIO**, seguindo procedimentos adaptados da literatura.^{31,33}

Na primeira secção será descrita a síntese de derivados hidroximetilo de *1H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis, concretamente o (3*S*)-6-hidroximetil-3-fenil-5-metil-*1H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol e (3*S*)-7-hidroximetil-3-fenil-5-metil-*1H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol. Ainda nesta secção, será apresentada a estratégia para a síntese de um derivado do enantiómero do **MANIO** conjugado com o ácido linoleico.

Na segunda secção será descrita a síntese de bioisósteros de (3*R*)-*1H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis contendo grupos hidroximetilo, através da sua substituição por grupos aminometilo. Com esta modulação estrutural pretende-se melhorar as propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas do composto sem interferir com a sua atividade biológica. Assim, esta secção contempla a síntese de um bioisótero do enantiómero do **MANIO**, (3*R*)-6,7-bis(aminometil)-3-fenil-5-metil-*1H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol e de bioisósteros mono-aminometilados, concretamente o (3*R*)-6-aminometil-3-fenil-5-metil-*1H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol e o (3*R*)-7-aminometil-3-fenil-5-metil-*1H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol.

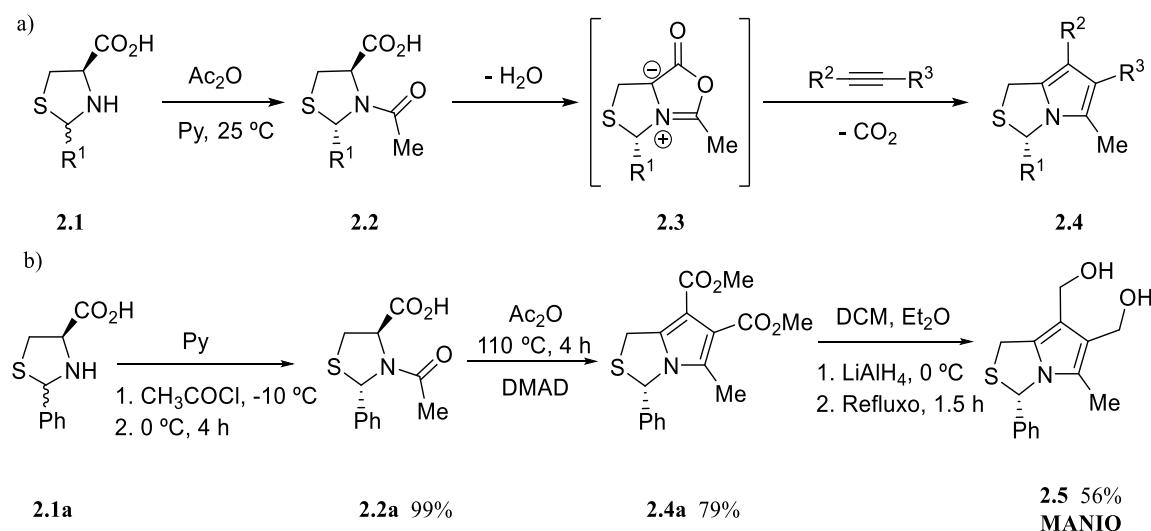
Com o intuito de obter mais informação sobre as relações estrutura-atividade dos derivados do **MANIO**, a atividade antitumoral de alguns dos novos compostos foi estudada em linhas celulares do cancro colorretal HCT116. Os resultados deste estudo podem ser consultados no capítulo 3.

2.2 Síntese de derivados hidroximetilo de *1H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis

2.2.1 Síntese de (3*S*)-6- e (3*S*)-7-hidroximetil-*1H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol

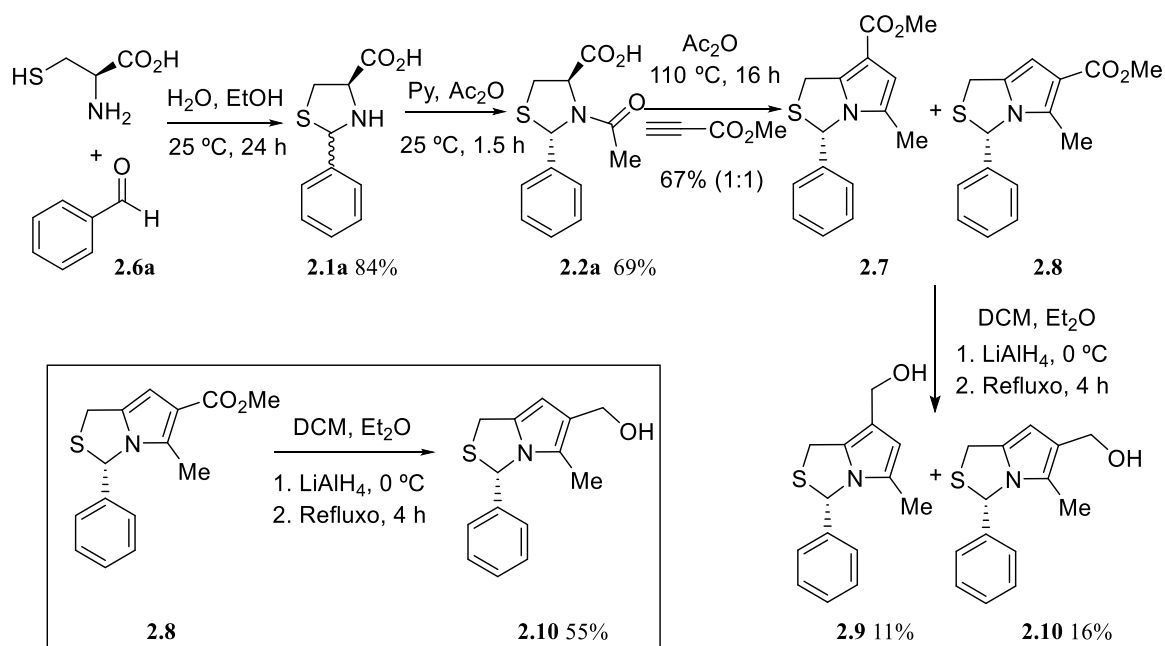
A síntese de *1H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis **2.4**, com configuração absoluta *S* em C-3, segue a estratégia sintética geral apresentada no Esquema 2.1a. Partindo das tiazolidinas **2.1**, obtidas como misturas diastereoisoméricas (2*S*,4*R*) e (2*R*,4*R*) por condensação de *L*-cisteína com aldeídos aromáticos, é possível obter de forma diastereosseletiva *N*-acetil-tiazolidinas com configuração absoluta (2*S*,4*R*) **2.2**. Esta seletividade é alcançada através

da *N*-acetilação das tiazolidinas **2.1** em piridina à temperatura ambiente. As tiazolidinas acetiladas **2.2** são posteriormente utilizadas para gerar *5H,7H*-tiazol[3,4-*c*][1,3]oxazol-4-*io*-1-olatos **2.3**. Estes sistemas mesoiônicos, gerados *in situ* pela ciclodesidratação das *N*-acetil-tiazolidinas **2.2**, 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 **2.4** após eliminação de dióxido de carbono. Analogamente à síntese dos enantiômeros *R* desta família de compostos (ex. composto **1.8**, ver Esquema 1.2), o centro quiral em C-4 é eliminado e a quiralidade em C-2 (C-3 no produto) é mantida, conduzindo à obtenção seletiva de produtos com configuração absoluta *S*. Esta estratégia foi utilizada anteriormente para a obtenção do (3*S*)-3-fenil-5-metil-1*H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxilato de dimetilo (**2.4a**), precursor do **MANIO** (**2.5**) (Esquema 2.1b).³²



Esquema 2.1

A estratégia sintética utilizada para a síntese do **MANIO** foi aplicada à síntese dos correspondentes derivados mono-hidroximetilados, (3*S*)-7-hidroximetil-3-fenil-5-metil-1*H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol (**2.9**) e (3*S*)-6-hidroximetil-3-fenil-5-metil-1*H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol (**2.10**) (Esquema 2.2).



Esquema 2.2

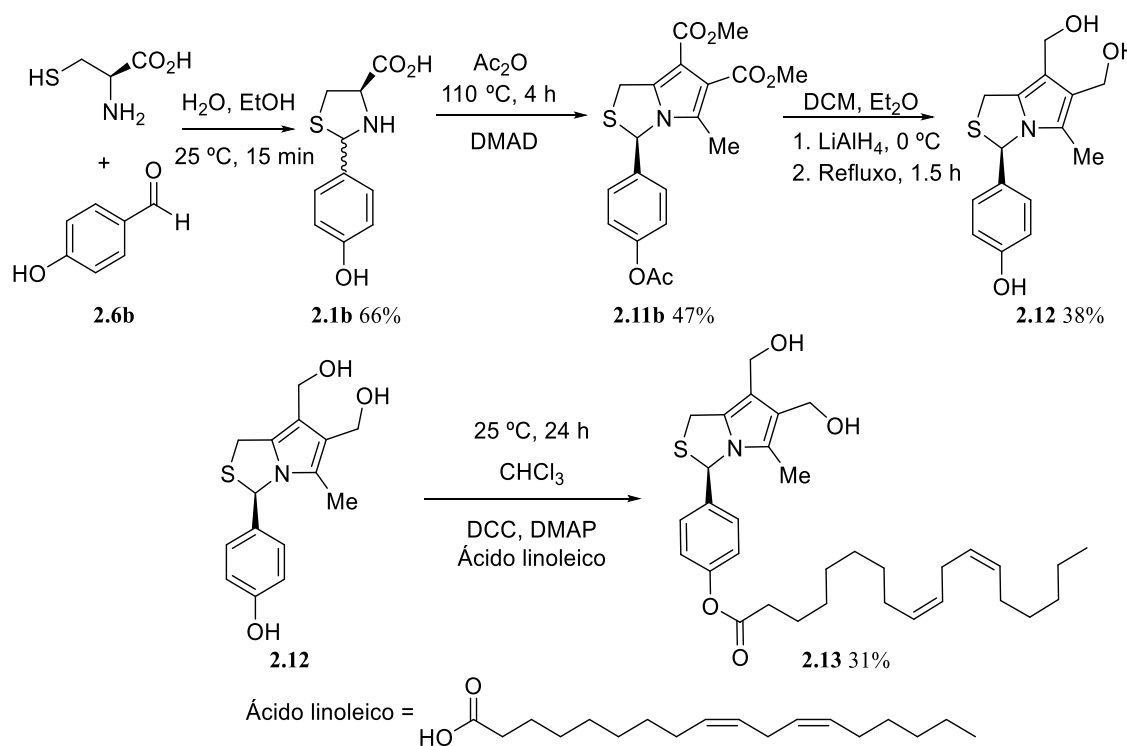
A tiazolidina **2.1a** foi obtida por condensação da *L*-cisteína e benzaldeído (**2.6a**). Esta reação foi efetuada à temperatura ambiente durante 24 h numa mistura de etanol e água, tendo conduzido à obtenção de uma mistura de diastereoisómeros (*2R,4R*) e (*2S,4R*) com um rendimento de 84%. A reação da tiazolidina **2.1a** com anidrido acético em piridina à temperatura ambiente conduziu à obtenção diastereosseletiva do ácido (*2S,4R*)-*N*-acetil-1,3-tiazolidina-4-carboxílico **2.2a**, com um rendimento de 69%. Mediante aquecimento em anidrido acético (110 °C), a tiazolidina **2.2a** gera *in situ* um sistema mesoiônico bicíclico, que pode participar como 1,3-dipolo em reações de ciclo-adição 1,3-dipolar. Para a síntese dos derivados mono-hidroximetilo de 1*H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis foi utilizado como dipolarófilo o propiolato de metilo. A reação de ciclo-adição 1,3-dipolar conduziu à obtenção, com um rendimento de 67%, de uma mistura 1:1 dos regioisómeros (*3S*)-3-fenil-5-metil-1*H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-7-carboxilato de metilo (**2.7**) e (*3S*)-3-fenil-5-metil-1*H,3H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6-carboxilato de metilo (**2.8**) cuja separação não é possível através de cromatografia em coluna. A redução do crude da mistura de regioisómeros **2.7** e **2.8** com hidreto de alumínio e lítio (LiAlH₄) permitiu a obtenção dos respetivos álcoois **2.9** e **2.10**. Contrariamente aos seus precursores, os álcoois regioisoméricos **2.9** e **2.10** puderam ser separados por cromatografia em coluna utilizando acetato de etilo:hexano (1:1) como eluente, tendo sido obtidos com um rendimento global (reação de ciclo-adição e de redução) de 11 e 16%, respetivamente. De realçar que o crude da mistura de regioisómeros **2.7** e **2.8** poderia ter sido purificado por cromatografia em coluna, o que

poderia ter conduzido a uma melhoria dos rendimentos para a síntese das moléculas alvo **2.9** e **2.10**.

Apesar da mistura de regioisómeros **2.7** e **2.8** não poder ser separada por cromatografia em coluna, é possível obter seletivamente o regioisómero **2.8** através de cristalização seletiva com éter etílico e hexano. A atribuição da sua regioquímica é inequívoca uma vez que o espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) ^1H do composto cristalizado **2.8** registrado em CDCl_3 era idêntico ao espectro RMN ^1H do seu enantiómero. O enantiómero do regioisómero **2.8** foi anteriormente sintetizado e purificado pelo grupo de investigação de Química Orgânica e a sua estrutura foi confirmada por cristalografia de raio-X.³¹ Desta forma, a redução do (3*S*)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6-carboxilato de metilo (**2.8**) através do mesmo procedimento permitiu a obtenção do álcool correspondente **2.10** com um rendimento moderado (55%).

2.2.2 Síntese de (3*R*)-6,7-bis(hidroximetil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol conjugado com ácido linoleico

A estratégia sintética para a obtenção do conjugado (3*R*)-6,7-bis(hidroximetil)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol **2.13** substituído em C-3 com o grupo *p*-linoleato de fenilo, está apresentada no Esquema 2.3.



Esquema 2.3

Neste estudo foi dada prioridade à síntese do conjugado com configuração absoluta *R* em C-3 uma vez que a estratégia sintética para a obtenção de 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis com esta estereoquímica envolve menos passos sintéticos comparativamente à dos seus enantiómeros.

A tiazolidina contendo um grupo 4-hidroxifenilo **2.1b** foi obtida por reação de *L*-cisteína e 4-hidroxibenzaldeído (**2.6b**) usando as mesmas condições de síntese da tiazolidina **2.1a**, com exceção que neste caso a reação se completou ao fim de 15 minutos. A tiazolidina **2.1b** foi obtida como uma mistura dos diastereoisómeros (*2R,4R*) e (*2S,4R*) com um rendimento de 66%. O aquecimento da tiazolidina **2.1b** em anidrido acético a 110 °C e na presença do dipolarófilo DMAD conduziu à obtenção seletiva do (*3R*)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxilato de dimetilo **2.11b** com um rendimento moderado (47%) . Nestas condições de reação, durante a formação do derivado 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol **2.11b** ocorre também a *O*-acetilação do grupo fenol da tiazolidina precursora **2.1b**. A redução do composto **2.11b** com LiAlH₄ à temperatura de refluxo do diclorometano, permitiu a obtenção do triálcool **2.12** com um rendimento de 38%. De salientar que na redução do composto **2.11b**, de forma a garantir a desproteção do grupo fenol, os equivalentes de agente redutor foram aumentados. Para a obtenção do conjugado **2.13** utilizou-se o triálcool **2.12** numa esterificação de Steglich.⁴⁰ A reação, efetuada à temperatura ambiente na presença de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) e do catalisador 4-dimetilaminopiridina (DMAP), conduziu à obtenção do conjugado (*3R*)-6,7-bis(hidroxi-metil)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol **2.13** substituído em C-3 com o grupo *p*-linoleato de fenilo com um rendimento de 31%.

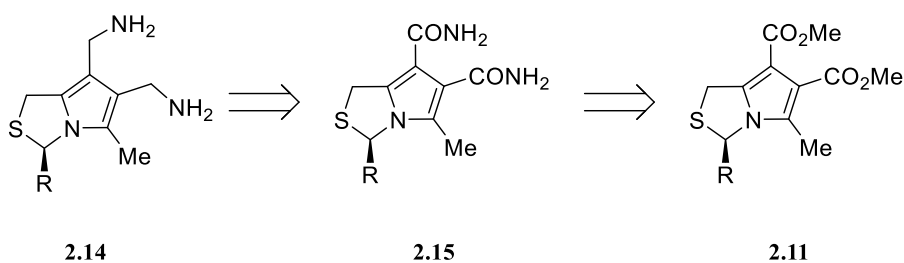
Uma vez que o composto **2.12** possui três grupos funcionais álcool é importante garantir a seletividade para a entrada do ácido linoleico no grupo fenol. Numa esterificação de Steglich, o ácido carboxílico é inicialmente ativado recorrendo a DCC e a posterior reação de esterificação com o álcool é catalisada por DMAP. O DMAP é um nucleófilo mais forte do que o álcool, e o seu rápido ataque nucleofílico ao carbonilo do ácido carboxílico ativado com DCC leva à obtenção de um intermediário altamente reativo. Posteriormente, este intermediário altamente eletrófilo reage com o álcool levando à formação do éster. Por outro lado, o DMAP também é uma base, logo o meio reacional é relativamente básico, fazendo com que o fenol esteja na forma de anião fenolato, tornando-o num bom nucleófilo e facilitando a entrada do ácido linoleico na posição fenólica. Desta forma, o DMAP além de funcionar como um catalisador nucleofílico permite aumentar a seletividade da reação. O RMN ¹H do conjugado **2.13** permitiu confirmar a entrada do

ácido linoleico no grupo fenol uma vez que os prótons aromáticos possuíam um padrão de desvios químicos diferente em relação ao seu precursor **2.12**. Esta diferença deve-se à alteração do ambiente químico dos prótons aromáticos, causado pela introdução do ácido linoleico no grupo fenol. Complementarmente, a análise do RMN ^1H do conjugado **2.13** permite a identificação de picos com desvios químicos característicos do ácido linoleico, como é o caso dos tripletos a 0.89, 2.54 e 2.77 ppm.

2.3 Síntese de bioisómeros de derivados do MANIO

2.3.1 Síntese de (3*R*)-6,7-bis(aminometil)-1*H*,3*H*-pirrólo[1,2-*c*]tiazóis

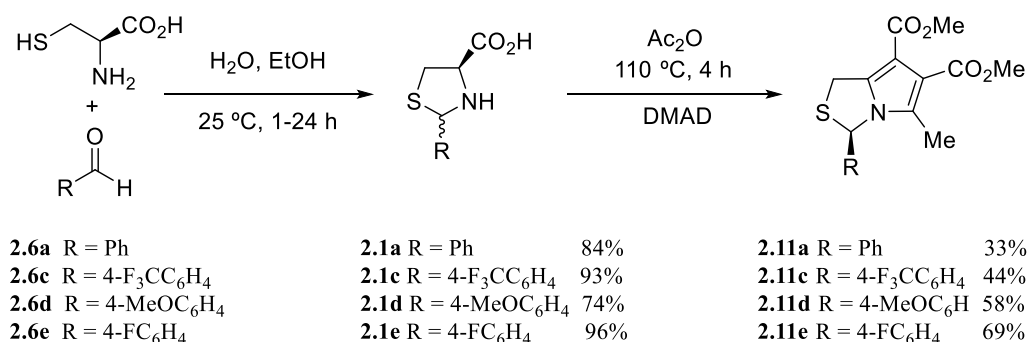
A estratégia sintética adotada neste projeto de investigação para a obtenção de derivados (3*R*)-6,7-bis(aminometil)-1*H*,3*H*-pirrólo[1,2-*c*]tiazóis **2.14** segue a análise retrossintética apresentada no Esquema 2.4. As amins **2.14** podem ser obtidas pela redução das respectivas amidas **2.15** que por sua vez podem ser sintetizadas a partir da amidação de ésteres, nomeadamente (3*R*)-1*H*,3*H*-pirrólo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxilatos de dimetilo **2.11**.



Esquema 2.4

A síntese dos (3*R*)-1*H*,3*H*-pirrólo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxilatos de dimetilo **2.16** necessários para a obtenção dos derivados aminometil seguiu a metodologia sintética já descrita nesta dissertação (Esquema 2.5).³³ As tiazolidinas **2.1** foram obtidas com rendimento elevado (74-96%) como misturas diastereoisoméricas com configuração absoluta 2*R*,4*R* e 2*S*,4*R* por reação de condensação da *L*-cisteína e o respetivo aldeído aromático **2.6**. O aquecimento das tiazolidinas **2.1**, durante 4 h em anidrido acético a 110 °C, permitiu gerar sistemas mesoiônicos bicíclicos *in situ*, que reagiram com DMAD via ciclo-adição 1,3-dipolar. Assim, num único passo reacional foram obtidos os respetivos

(3*R*)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxilatos de dimetilo **2.11** com rendimentos moderados (33-69%).

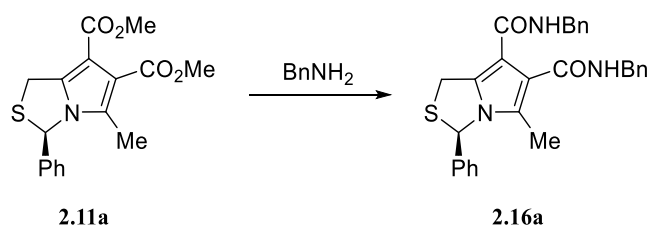


Esquema 2.5

A reatividade dos derivados de ácidos carboxílicos na substituição nucleofílica pode ser explicada com base na eficiência com que o átomo diretamente ligado ao grupo carbonilo lhe doa elétrons. Este fenómeno permite a estabilização do grupo carbonilo e a diminuição do seu carácter eletrofílico. Apesar de serem mais reativos do que os ácidos carboxílicos correspondentes, a amidação direta de ésteres, nomeadamente dos (3*R*)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxilatos de dimetilo **2.11**, requer a utilização de catalisadores ou aditivos, nomeadamente bases fortes^{41,42} e, idealmente, não nucleofílicas, de forma a evitar a formação de produtos secundários.

Numa fase inicial, foi projetada a síntese de amidas benzílicas **2.16**. Esta decisão deveu-se não só à facilidade de manipulação da benzilamina (BnNH₂), mas também ao facto do grupo benzilo ser um grupo protetor comumente utilizado para proteger amina e como tal pode ser posteriormente removido. Com esta finalidade, foi estudada a amidação direta de (3*R*)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxilato de dimetilo (**2.11a**) para a síntese da (3*R*)-*N*⁶,*N*⁷-dibenzil-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxamida (**2.16a**). Para tal foram testadas três bases fortes, seguindo procedimentos adaptados da literatura, nomeadamente *t*-butóxido de potássio (*t*-BuOK)⁴¹, butil lítio (*n*-BuLi)⁴¹ e bis(trimetilsilil)amida de lítio (LiHMDS)⁴² (Tabela 2.1).

A reação do éster **2.11a** com benzilamina em dimetilsulfóxido (DMSO) na presença de *t*-BuOK, realizada à temperatura ambiente, não conduziu à formação do produto desejado **2.16a**. O controlo da reação por cromatografia em camada fina (TLC) mostrou um consumo total do reagente de partida ao fim de 5 minutos de reação, contudo não foi possível isolar qualquer produto.

Tabela 2.1- Estudo da amidação direta do éster **2.11a** usando bases fortes.

Ensaio	Base	Temperatura (°C)	Tempo reacional	Solvente	Rendimento (%)
1	<i>t</i> -BuOK	25	5 min	DMSO	-
2	<i>n</i> -BuLi	0	3 h	THF	37
3	LiHMDS	25	15 h	Tolueno	34

Por outro lado, a síntese da amida **2.16a** foi realizada com sucesso quando se utilizaram *n*-BuLi ou LiHMDS como bases. Nestes casos, o tempo e temperatura da reação foram a principal diferença nas condições de reação. Apesar do rendimento da reação na presença de *n*-BuLi ser superior (37% de rendimento em 3 h de reação), a otimização das condições de reação foi efetuada com LiHMDS (34% de rendimento em 15 h de reação) (Tabela 2.2). Esta escolha deveu-se ao facto do LiHMDS ser uma base forte não nucleofílica e de mais fácil manuseamento, comparativamente ao *n*-BuLi. A natureza não nucleofílica do LiHMDS deve-se ao seu elevado impedimento estérico. Mecanicamente, o LiHMDS funciona não só como uma base muito forte, desprotonando e ativando a benzilamina, mas também como um ácido de Lewis que ativa os grupos carbonilo dos 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis **2.11**, deixando os respetivos carbonos mais eletrófilos e suscetíveis a um ataque nucleofílico.

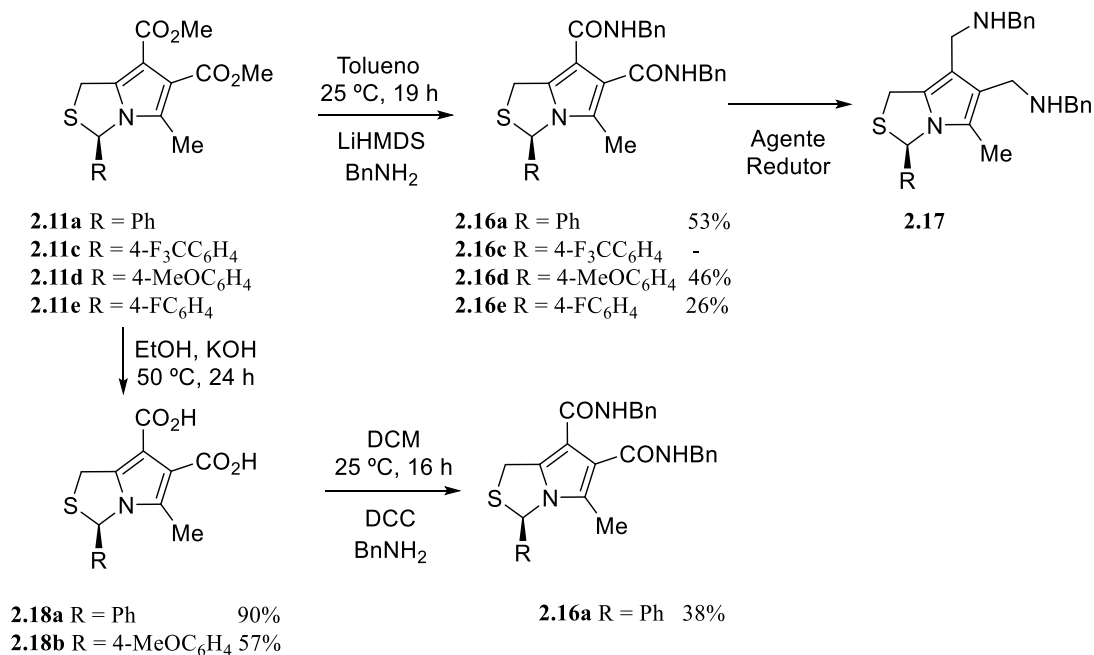
Tabela 2.2- Otimização das condições de reação para a amidação direta do éster **2.11a** usando LiHMDS como base.^a

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo reacional (h)	LiHMDS (equiv.)	Rendimento (%)
1	25	15	4	34
2	0	15	4	27
3	0	45	4	35
4	0 a 25	15	4	31
5	0 a 25	19	4	34
6	0 a 25	19	6	40
7	25	19	6	53

^a Em todos os ensaios foi usado o mesmo solvente (tolueno) e o mesmo número de moles de BnNH₂ (2.4 equiv.).

De forma a otimizar as condições reacionais para a amidação dos 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis **2.11** fizeram-se variações de temperatura, tempo de reação e/ou os equivalentes de LiHMDS. O uso de 4 equivalentes de LiHMDS (2 equivalentes por cada grupo éster) permitiu obter a molécula alvo **2.16a** com um rendimento de 34%, após 15 h de reação em tolueno à temperatura ambiente (Tabela 2.2, Ensaio 1). O rendimento pouco satisfatório obtido no primeiro ensaio levou ao estudo da influência da temperatura no rendimento da reação. Através dos ensaios 2-3 percebeu-se que a diminuição da temperatura de 25 para 0 °C não favorece a eficiência da reação, uma vez que para obter um rendimento semelhante ao do ensaio 1 era necessário triplicar o tempo de reação, mantendo todas as outras variáveis reacionais constantes. No entanto, a diminuição da temperatura tinha a vantagem aparente de produzir menos produtos secundários ou de degradação visíveis por TLC. Com base nesta observação, realizou-se o ensaio 4 onde foi utilizado um gradiente de temperatura, iniciando a reação a 0 °C e deixando-se progressivamente atingir os 25 °C. Neste caso o composto **2.16a** foi obtido um rendimento de 31%. Uma vez que a comparação deste ensaio com o ensaio 1 não mostrou uma diminuição significativa do rendimento, foi decidido manter o gradiente de temperatura e aumentar o tempo reacional de 15 para 19 h (Tabela 2.2, Ensaio 5). No entanto, a alteração do tempo de reação não conduziu ao aumento desejado do rendimento da reação. Em face destes resultados procedeu-se ao ajuste do número de equivalentes da base LiHMDS. A utilização de um excesso maior de LiHMDS, 6 equivalentes, com o gradiente de temperatura de 0-25 °C, durante 19 h, conduziu a um aumento do rendimento da reação para cerca de 40% (Tabela 2.2, Ensaio 6). Finalmente, o uso do mesmo número de equivalentes e mesmo tempo de reação, a temperatura constante (25 °C), permitiu obter a *N*⁶,*N*⁷-dibenzil-carboxamida **2.16a** com rendimento de 53% (Tabela 2.2, Ensaio 7).

Tendo as condições reacionais otimizadas, deu-se início à síntese de outros derivados (3*R*)-*N*⁶,*N*⁷-dibenzil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxamidas **2.16** através da ativação dos correspondentes precursores ésteres **2.11** com LiHMDS (Esquema 2.6). A amidação dos (3*R*)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxilatos **2.11** foi realizada com benzilamina em tolueno, na presença de LiHMDS, à temperatura ambiente durante 19 h. As (3*R*)-*N*⁶,*N*⁷-dibenzil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxamidas **2.16** foram obtidas com rendimentos a variar entre 26 a 53%. Não foi possível isolar o derivado **2.16b**, contendo o grupo *p*-(trifluorometil)fenilo na posição 3, devido a problemas de estabilidade.



Esquema 2.6

Apesar da otimização da reação de amidação direta através de (3*R*)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxilatos **2.11** ter permitido obter os compostos **2.16a**, **2.16d** e **2.16e** com sucesso, tentou-se uma abordagem alternativa para a síntese destes compostos. A estratégia envolvia a conversão dos ésteres **2.11** aos respectivos ácidos carboxílicos **2.18** seguida de amidação (Esquema 2.6). Para a hidrólise dos ésteres **2.11** foi utilizado um procedimento descrito na literatura.⁴³ O aquecimento de uma solução etanólica de **2.11a**, a 50 °C durante 24 h, na presença de uma solução aquosa saturada de hidróxido de potássio conduziu à obtenção do ácido carboxílico **2.18a** com rendimento elevado (90%). No entanto, a reação de amidação do ácido carboxílico **2.18a** com benzilamina, durante 16 h à temperatura ambiente, mediante ativação do primeiro com DCC, apenas permitiu o isolamento da amida correspondente **2.16a** com rendimento de 38%. Desta forma, além da introdução de um passo reacional adicional, o rendimento global (reação de hidrólise seguida de reação de amidação) desta reação é 34%, sendo bastante inferior ao rendimento otimizado para a amidação direta do 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxilato **2.11a**. Estes resultados levaram à seleção da amidação direta de (3*R*)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxilatos **2.11** como metodologia sintética principal para a obtenção dos derivados bis(amida) benzilados **2.16**. Contudo, foi ainda realizada a hidrólise do éster **2.11d** ao respetivo ácido carboxílico **2.18b** seguindo as mesmas condições de reação utilizadas para a obtenção do derivado **2.18a**. O rendimento da síntese do ácido carboxílico **2.18b** foi significativamente mais baixo do que o da síntese de **2.18a** (57%). De salientar que esta

estratégia permitiu a síntese de dois novos derivados, o ácido (3*R*)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxílico (**2.18a**) e o ácido (3*R*)-3-(4-metoxifenil)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxílico (**2.18b**) cuja atividade antitumoral pode ser estudada.

O RMN ¹H da bis(amida) benzilada **2.16a** é apresentado na Figura 2.1 e mostra todos os sinais correspondentes aos prótons da sua estrutura. Evidencia-se, por comparação com o RMN ¹H do seu precursor **2.11a**, o aparecimento de dois novos picos correspondentes aos grupos metileno (na região de 4.50-4.65 ppm) e ainda dois novos picos dos grupos NH (6.47 ppm e 9.15 ppm). A integração dos sinais aromáticos também é concordante com a introdução dos novos anéis aromáticos.

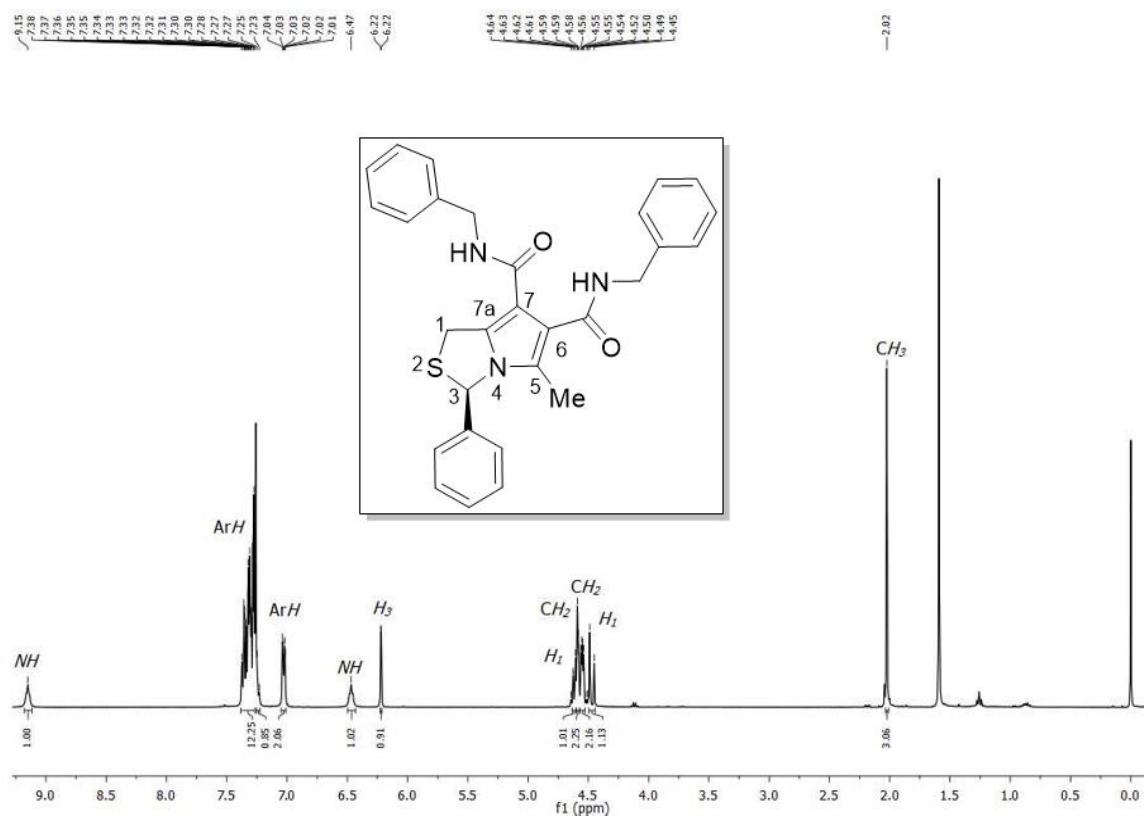


Figura 2.1- Estrutura química e espectro de RMN ¹H do composto **2.16a** (CDCl₃).

Tendo em mão vários derivados de *N*⁶,*N*⁷-dibenzil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxamidas **2.16**, o foco deste trabalho foi direcionado para a sua redução tendo como objetivo a preparação de derivados aminometila **2.17**. Todavia, apesar de terem sido utilizados vários agentes redutores (ex. LiAlH₄, dimetilsulfeto de borano (BH₃-SMe₂) e fenilsilano (PhSiH₃)) e condições de reação, não foi possível a obtenção dos compostos alvo, as amina **2.17** (Tabela 2.3).

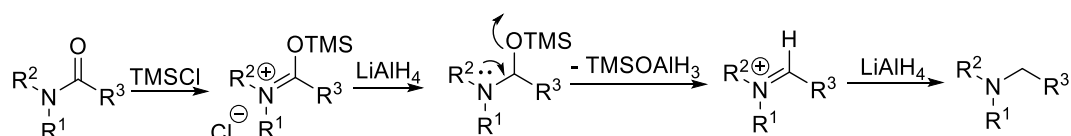
Tabela 2.3- Condições de reação testadas para a redução do composto **2.16a**.

Ensaio	Agente redutor + Ativador	Temperatura (°C)	Tempo reacional (h)	Produtos obtidos
1	LiAlH ₄ (2.8 equiv.)+ TMSCl (2.4 equiv.)	0	4	a
2	LiAlH ₄ (2.8 equiv.) + TMSCl (2.4 equiv.)	25	4	a
3	LiAlH ₄ (5.6 equiv.)+ TMSCl (4.8 equiv.)	25	4	a
4	LiAlH ₄ (5.6 equiv.)+ TMSCl (4.8 equiv.)	25	18	a
5	LiAlH ₄ (20 equiv.)+ TMSCl (20 equiv.)	25	24	a
6	BH ₃ -SMe ₂ (3.7 equiv.)	25	18	a
7	BH ₃ -SMe ₂ (8 equiv.)	25	18	b
8	BH ₃ -THF (3.5 equiv.)	65	72	b
9	NaBH ₄ (4.6 equiv.), I ₂ (2 equiv.)	70	26	a
10	PhSiH ₃ (5 equiv.) + Fe(OAc ₂) (0.1 equiv.)	100	24	b
11	PhSiH ₃ (5 equiv.) + PhB(OH) ₂ (0.8 equiv.)	110	48	b
12	LiAlH ₄ (2.2 equiv.)	70	4	c
13	LiAlH ₄ (2.2 equiv.)	40	48	c

^a mistura de produtos da mono-redução; ^b reagente intacto; ^c degradação.

As amidas são grupos funcionais caracterizados por possuírem elevada deslocalização eletrônica, tornando o carbono carbonílico pouco eletrofílico e conseqüentemente pouco suscetível a ataques nucleofílicos. Desta forma, frequentemente é necessário utilizar agentes redutores fortes, condições reacionais extremas e até mesmo catalisadores ou ativadores para permitir a redução de amidas a aminas.

Seguindo um protocolo anteriormente descrito na literatura,⁴⁴ as primeiras tentativas de redução da *N*⁶,*N*⁷-dibenzil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxamida **2.16a** foram realizadas utilizando como redutor o LiAlH₄ na presença de cloreto de trimetilsilano (TMSCl) (Tabela 2.3, Ensaio 1-5). Uma proposta mecanística para a redução de compostos ativados com TMSCl utilizando LiAlH₄ é apresentado no Esquema 2.7.

**Esquema 2.7**

O aumento da temperatura (até 25 °C), do tempo de reação (até 24 h) e/ou equivalentes de LiAlH_4 (até 20 equiv.) e TMSCl (até 20 equiv.) favoreceu o consumo do reagente **2.16a**, no entanto, não houve qualquer evidência da formação da bis(amina) **2.17**. Em todos os ensaios, mesmo recorrendo a tempos de reação extensos e ao uso de grande excesso do agente redutor e ativador (ex. Tabela 2.3, Ensaio 5), apenas foi possível isolar misturas de produtos mono-reduzidos (Figura 2.2). Naturalmente, os espectros de RMN ^1H e ^{13}C destas misturas são algo complexos. No entanto, através da sua análise é possível encontrar algumas características que suportam a ideia de que foram isoladas misturas de produtos da mono-redução. Destaca-se a existência de sinais duplicados e o aparecimento de picos na região característica do grupo metileno mas com manutenção da existência dos picos na região característica do carbonilo (no RMN ^{13}C).

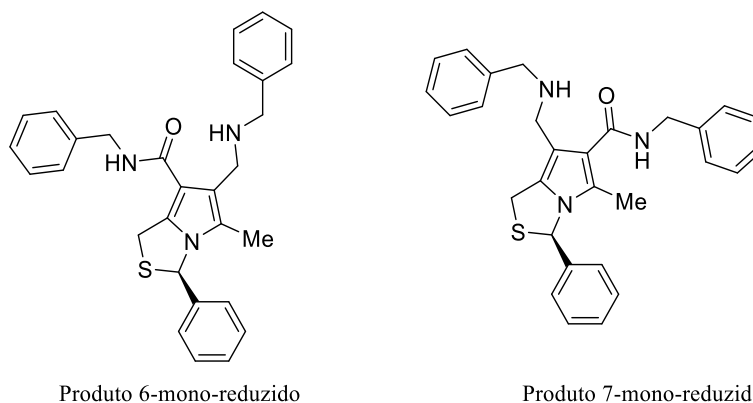
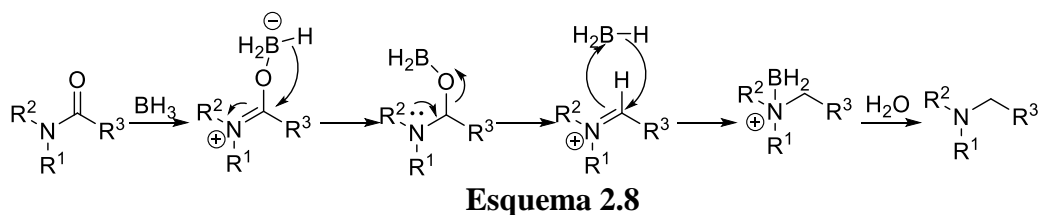


Figura 2.2- Produtos da mono-redução do composto (3*R*)-*N*⁶,*N*⁷-dibenzil-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxamida (**2.16a**).

Estes resultados indicam que, apesar da redução do primeiro grupo amida ser possível, aparentemente algo dificulta a redução do segundo grupo. Esta observação levantou a hipótese de existirem problemas de impedimento estéreo, devido à existência de grupos volumosos como é o caso dos grupos benzilo no reagente **2.16a** e trimetilo no TMSCl . Com base neste racional alterou-se a abordagem utilizada na redução do composto **2.16a**, recorrendo ao uso de boranos comercialmente disponíveis (Tabela 2.3, Ensaio 6-8) ou gerados *in situ* (Tabela 2.3, Ensaio 9), através de procedimentos anteriormente descritos na literatura.⁴⁵⁻⁴⁷

Os boranos são agentes redutores constituídos exclusivamente por boro e hidrogénio, sendo especialmente úteis na redução de grupos carbonilos ricos em eletrões, do qual fazem parte as amidas. Isto acontece porque o boro possui uma orbital atómica vazia, permitindo

a formação de complexos entre o borano e a amida, levando à sua ativação e consequente redução através do mecanismo apresentado no Esquema 2.8.



Teoricamente, a utilização de boranos permitiria resolver o problema do impedimento estérico uma vez que os boranos não são compostos volumosos. No entanto, os ensaios realizados com estes reagentes em tetra-hidrofurano (THF) não permitiram a síntese do composto pretendido **2.17** (Tabela 2.3, Ensaios 6-9). Tal como nos ensaios com $\text{LiAlH}_4/\text{TMSCl}$, o máximo observável foi evidência da formação de uma mistura de produtos mono-reduzidos (Tabela 2.3, Ensaios 1-5).

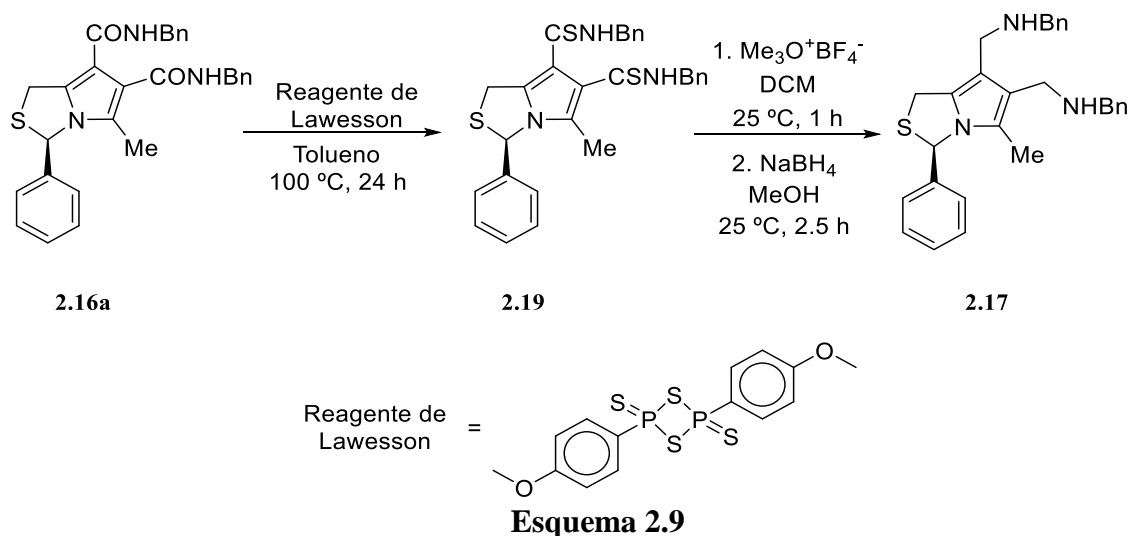
Ainda na tentativa de reduzir o composto **2.16a** foi tentada a reação utilizando PhSiH_3 como agente redutor. Embora o PhSiH_3 não seja um agente redutor forte, comumente utilizado na redução de amidas, existem alguns exemplos da literatura onde a redução de amidas com PhSiH_3 foi possível na presença de catalisadores, nomeadamente complexos de ferro e ácido borónicos.^{48,49} Mecanicamente, tanto os ácidos borónicos como os complexos de ferro são responsáveis por, direta ou indiretamente, tornar o carbono carbonílico mais eletrofílico e consequentemente suscetível de sofrer ataque nucleofílico pelo hidreto do PhSiH_3 . Foram realizados dois ensaios usando PhSiH_3 como agente redutor (Tabela 2.3, Ensaios 10-11). Contudo, em nenhum dos casos houve evidência do consumo do reagente de partida, quer usando temperaturas elevadas (100 °C) ou tempos de reação longos (24 e 48 h).

Uma vez que nenhum dos métodos descritos anteriormente se revelou eficaz, recorreu-se novamente ao uso de um agente redutor forte, LiAlH_4 , na ausência de ativador, mas utilizando temperaturas de reação mais elevadas (40 e 70 °C) (Tabela 2.3, Ensaio 12-13). Estas condições de reação também se revelaram infrutíferas, não tendo havido qualquer evidência de formação do composto desejado, com a agravante que foi observada muita degradação na mistura da reação.

Numa tentativa de explicação destes resultados, propõe-se que os derivados mono-reduzidos do composto (3*R*)-*N*⁶,*N*⁷-dibenzil-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-

6,7-dicarboxamida (**2.16a**) tenham a sua reatividade diminuída, devido à formação de uma ponte de hidrogénio entre o carbonilo da amida e o hidrogénio da amina recém formada. Propõe-se que o estabelecimento desta ponte de hidrogénio diminua a liberdade conformacional da molécula, resultando numa estrutura tridimensional com elevado grau de impedimento estéreo.

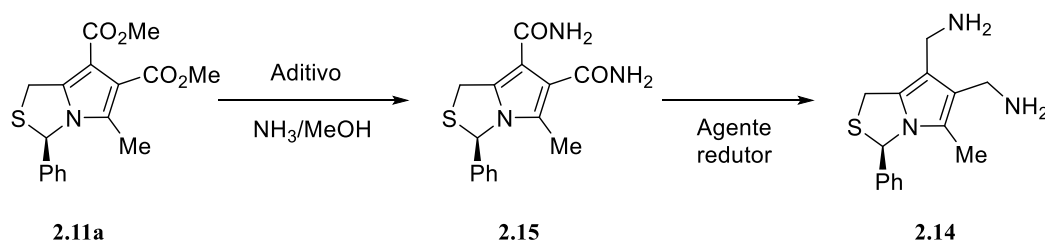
Foi ainda efetuada uma tentativa para a redução da N^6, N^7 -dibenzil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxamida **2.16a** recorrendo a um protocolo alternativo adaptado da literatura.⁵⁰ Este protocolo, que envolvia numa primeira fase a conversão dos grupos amida a grupos tioamida, poderia, em teoria, resolver o problema da existência de pontes de hidrogénio (Esquema 2.9). Os grupos tiocarbonilo são aceitadores de pontes de hidrogénio mais fracos do que os correspondentes grupos carbonilo, o que resulta na formação de pontes de hidrogénio menos direcionadas.⁵¹ Com esta modificação estrutural, pretendia-se aumentar a liberdade conformacional dos produtos mono-reduzidos de forma a resolver o problema de impedimento estéreo.



Assim, foi feita a tentativa de redução do composto **2.16a**, convertendo-o inicialmente na tioamida **2.19** através de uma reação com o reagente de Lawesson, em tolueno à temperatura de 100 °C durante 24 h. Este protocolo não envolve o isolamento efetivo do composto **2.19**, mas o controlo da reação por TLC deu indicação da sua formação. Com base nesta premissa, após 24 h de reação à temperatura de 100 °C, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e o crude da mistura reacional foi utilizado no passo seguinte. Após 1 h à temperatura ambiente, a reação com $\text{Me}_3\text{O}^+\text{BF}_4^-$ em diclorometano mostrava, através da monitorização por TLC, a formação de um sal que, identicamente ao passo sintético

anterior, foi isolado apenas por evaporação do solvente. Por fim, o crude do sal de **2.19** foi usado na redução à amina **2.17** mediante adição de pequenas porções de boro-hidreto de sódio (NaBH₄). No entanto, esta estratégia sintética não permitiu a obtenção da amina alvo **2.17**.

Objetivando ultrapassar o problema de impedimento estérico causado pela utilização da benzilamina, foi iniciada a síntese de (3*R*)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxamida (**2.15**). A síntese da bis(amida) primária **2.15** e posterior redução permitiria a obtenção do derivado final (3*R*)-6,7-bis(aminometil)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol (**2.14**). Com esse fim, procedeu-se à amidacção direta de (3*R*)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxilato de dimetilo (**2.11a**), preparado no decurso deste projeto de investigação, com uma solução orgânica de amoníaco em metanol (Esquema 2.10). Em adição a resolver o problema estérico causado pela utilização da benzilamina, esta metodologia sintética apresentava também a vantagem de ser obtido diretamente o derivado bis-aminometilo sem ser necessário um passo sintético adicional de *N*-desbenzilação.



Esquema 2.10

Na Tabela 2.4 são apresentadas as condições de reação exploradas para a síntese da amida **2.15**. Inicialmente foi tentada a amidacção do 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol **2.11a** com amoníaco por adaptação de um procedimento da literatura que utilizava cianeto de sódio (NaCN) como catalisador da reação.⁵² Os dois primeiros ensaios mostraram que apesar de esta metodologia funcionar, o tempo de reação era um fator crítico (Tabela 2.4, Ensaios 1 e 2). A reação do composto **2.11a** com amoníaco (2 mL de uma solução NH₃ 7 M em metanol) na presença de 1 equivalente de NaCN, em tubo selado à temperatura de refluxo, conduziu à obtenção do composto **2.15** com apenas 10% de rendimento, após seis dias de reação.

Tabela 2.4- Otimização das condições reacionais para a amidação direta do diéster **2.11a** com solução de amoníaco em metanol 7 M (NH₃/MeOH).

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo reacional (dias)	Volume NH ₃ /MeOH (mL)	Aditivo	Rendimento (%)
1	65	4	2	NaCN (1 equiv.)	-
2	65	6	2	NaCN (1 equiv.)	10
3	100	7	4	-	-
4	100	14	4	NaCN (1 equiv.)	38
5 ^b	100	14	16	NaCN (1 equiv.)	35
6	100	1	10	NaNH ₂ (1 equiv.)	7
7	100	1	10	NaNH ₂ (1 equiv.)	Vestigial
8	100	1	4	NaNH ₂ (1 equiv.)	-
9 ^c	100	1	20	NaNH ₂ (2 equiv.)	-

^a Em todos os ensaios o número de moles de **2.11a** foi 0.244 mol, exceto nos casos assinalados.

^b número de moles de **2.11a** = 0.978 mol; ^c número de moles de **2.11a** = 0.489 mol.

A primeira dúvida relativamente à otimização das condições reacionais correspondia à importância do íão cianeto na reação. Foi realizado um ensaio na ausência de NaCN, mas com recurso a uma temperatura mais elevada (100 °C) e com mais equivalentes de NH₃ do que os ensaios antecedentes (Tabela 2.3, Ensaio 3). A reação foi mantida durante sete dias e o controlo por TLC não mostrou evidência da formação do produto **2.15**, pelo que este ensaio demonstrou inequivocamente que a presença do NaCN era essencial para a reação ocorrer. Mantendo o uso de NaCN, e na tentativa de reduzir o tempo de reação, foi realizado um ensaio em que se aumentou a temperatura da reação para 100 °C e o número de equivalentes de NH₃, mantendo a quantidade de NaCN (Tabela 2.4, Ensaio 4). O controlo da reação por TLC permitiu concluir que a reação apenas estava completa ao fim de duas semanas de reação. O espetro de RMN ¹H da bis(amida) primária **2.15** está representado na **Figura 2.3**. A sua análise permite identificar todos os sinais correspondentes aos prótons da estrutura do composto **2.15**, destacando-se o seu elevado grau de pureza.

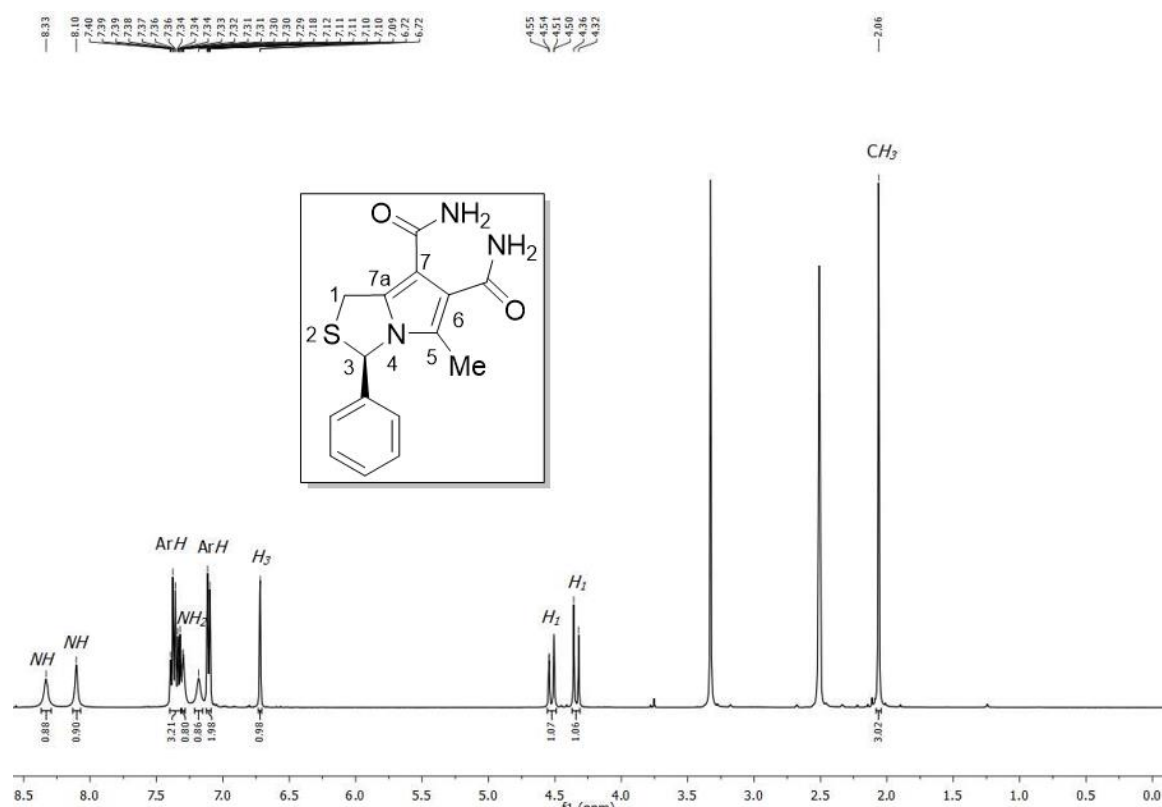


Figura 2.3- Estrutura química e espectro de RMN ¹H do composto **2.15** (DMSO-*d*₆).

Complementarmente, foi experimentada a utilização de amida de sódio (NaNH₂) como ativador da reação, adaptando um procedimento da literatura (Tabela 2.4, Ensaios 6-9).⁵³ O primeiro ensaio revelou que após um dia de reação já existia evidência da formação do composto **2.15** recorrendo a NaNH₂ (1 equiv.) num volume de 10 mL de uma solução 7 M de NH₃ em metanol mediante aquecimento (100 °C) (Tabela 2.4, Ensaio 6). No entanto, as tentativas de otimização desta reação não foram eficazes e não foi possível sintetizar o composto **2.15** de forma eficiente (Tabela 2.4, Ensaios 8-9). A utilização de NaNH₂, levantou alguns problemas, nomeadamente a sua reatividade com o solvente da reação (metanol) e o facto de ser uma base nucleofílica forte podendo levar à formação de produtos secundários indesejados. Curiosamente, foram detetados produtos secundários que possuem o mesmo fator de retenção (R_f) do que o composto alvo **2.15**, tornando impossível monitorizar a reação por TLC. Estes resultados levaram ao abandono desta metodologia sintética.

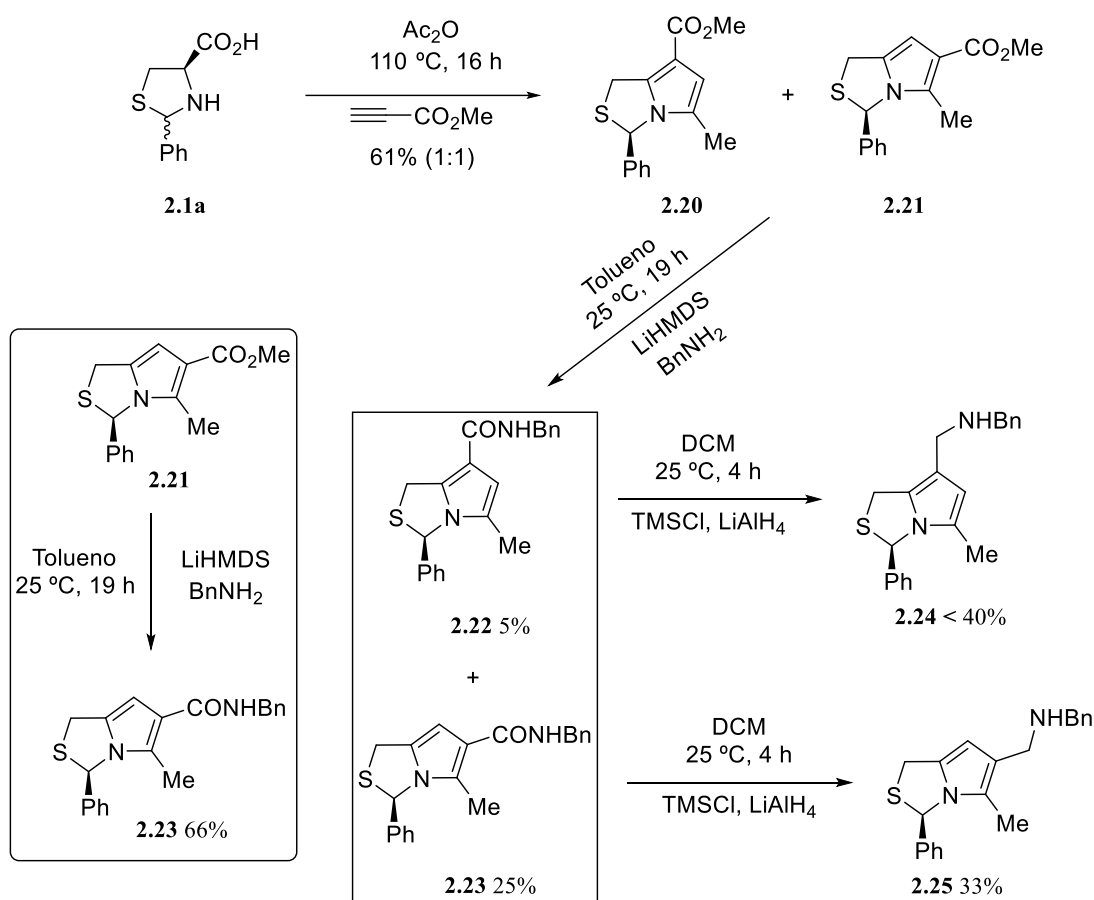
As dificuldades encontradas na síntese da bis(amida) primária **2.15**, aliadas ao insucesso na redução da bis(benzilamida) **2.16a**, impossibilitaram a realização de quaisquer tentativas de redução com vista à obtenção do composto alvo, o (3*R*)-6,7-bis(aminometil)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol (**2.14**).

2.3.2 Síntese de (3*R*)-6- e (3*R*)-7-aminometil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol

Os resultados pouco satisfatórios alcançados na tentativa de síntese de 6,7-bis(aminometil)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis, levaram à proposta de síntese de derivados mono-aminometilo. O sucesso na síntese destes derivados permitiria confirmar que as dificuldades na redução da bis(benzilamida) **2.16a** poderia estar relacionada com a existência de dois grupos funcionais amida em posição vicinal.

Os 6- e 7-aminometil-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis **2.25** ou **2.24** com configuração absoluta *R* e protegidos com grupo benzilo foram preparados de acordo com a estratégia sintética apresentada no Esquema 2.11. Os regioisómeros (3*R*)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6-carboxilato de metilo (**2.21**) e (3*R*)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-7-carboxilato de metilo (**2.20**) foram obtidos como uma mistura 1:1, com rendimento de 61%, mediante aquecimento em anidrido acético a 110 °C da tiazolidina **2.1a** na presença de propiolato de metilo. Os regioisómeros **2.20** e **2.21** não podem ser separados por cromatografia, contudo a mistura reacional foi purificada por cromatografia em coluna e posteriormente utilizada para a síntese das monoamidas correspondentes. A síntese das monoamidas **2.22** e **2.23** foi efetuada seguindo um protocolo otimizado ao longo deste projeto de investigação. A reação da mistura **2.20/2.21** com benzilamina na presença de LiHMDS à temperatura ambiente, durante 19 h, conduziu à obtenção de uma nova mistura regioisomérica constituída pelos compostos **2.22** e **2.23**. Contrariamente aos respetivos ésteres, as amidas **2.22** e **2.23** podem ser separadas por cromatografia em coluna, usando uma mistura de acetato de etilo:hexano (1:2) como eluente. A (3*R*)-*N*⁷-benzil-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-7-carboxamida (**2.22**) foi obtida com um rendimento de 5% e a (3*R*)-*N*⁶-benzil-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6-carboxamida (**2.23**) com rendimento de 25%. À semelhança do observado para os compostos **2.7** e **2.8** (ver Esquema 2.2), enantiómeros de **2.20** e **2.21**, respetivamente, também o composto **2.21** pode ser isolado por cristalização seletiva com uma mistura de éter etílico e hexano. Partindo do composto **2.21** puro, e utilizando as mesmas condições de reação da amidagem supramencionada, foi possível obter o composto **2.23** com um rendimento de 66%. Desta forma, uma vez que a estrutura do precursor monoéster **2.21** foi anteriormente determinado por cristalografia de raio-X,³¹ a atribuição inequívoca da

regioquímica dos compostos **2.22** e **2.23** pode ser feita recorrendo à comparação dos respetivos espectros de RMN ^1H .



Esquema 2.11

O (3*R*)-6-(*N*-benzil-aminometil)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol (**2.25**) foi obtido por redução do regioisómero **2.23** com LiAlH_4 na presença de TMSCl . A reação, efetuada à temperatura ambiente durante 4 h, conduziu à obtenção da monoamina benzílica **2.25** com rendimento de 33%. O (3*R*)-7-(*N*-benzil-aminometil)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol (**2.24**) foi sintetizado utilizando o mesmo procedimento, contudo não foi possível obtê-lo de forma pura, mesmo após várias tentativas de purificação por cromatografia (cromatografia em coluna e cromatografia em placa preparativa). A formação das monoaminas benzílicas **2.24** e **2.25** permitiu comprovar que a redução dos derivados *N*⁶-benzil-6- ou *N*⁷-benzil-7-carboxamida era possível através de um método previamente testado sem sucesso na redução do composto bis(benzilamida) **2.16a**. O espectro de RMN ^1H da monoamina benzílica **2.25** mostra todos os sinais expectáveis para os prótons da sua estrutura (**Figura 2.4**). A identificação do sistema de spin *AB*

característico dos 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis (dois dubletos a 4.03 e 4.28 ppm com uma constante de acoplamento de aproximadamente 12.8 Hz, típica deste tipo de sistemas) e a existência de dois picos correspondentes a grupos metileno (3.56 e 3.80 ppm) são a principal indicação de que o espectro corresponde efetivamente ao composto **2.25**.

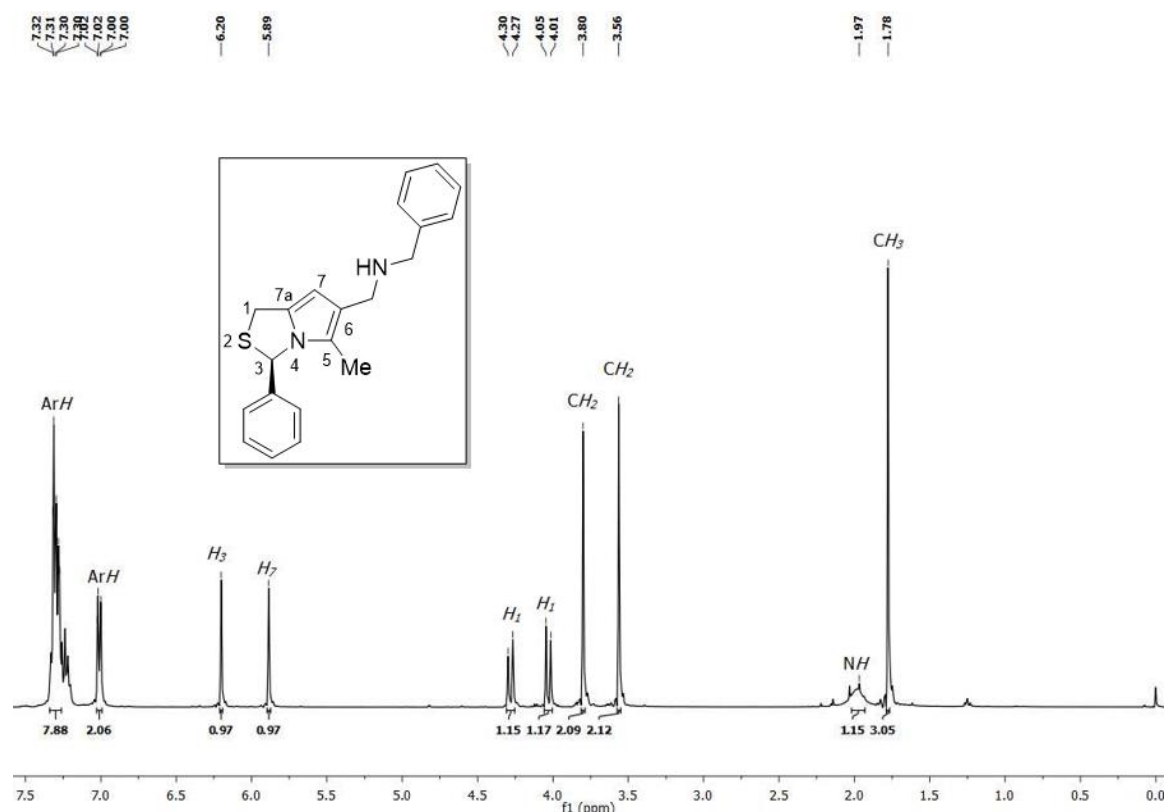
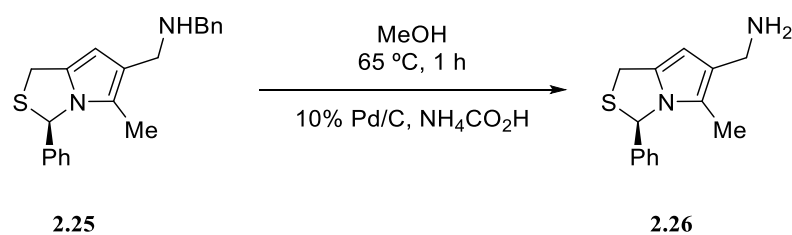


Figura 2.4- Estrutura química e espectro de RMN ^1H do composto **2.25** (CDCl_3).

Com o objetivo de preparar a amida primária (3*R*)-6-aminometil-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol (**2.26**) foi experimentada a *N*-desbenzilação da monoamina **2.25**, seguindo um procedimento descrito na literatura (Esquema 2.12).⁵⁴ O uso de formato de amônio como dador de hidrogénio permite obter a amina primária **2.26**, a partir de uma suspensão de igual massa de 10% Pd/C e composto **2.25** em refluxo de metanol. O controlo da reação por TLC pareceu indicar que a reação se completava após 1 h. Inesperadamente, o espectro de RMN ^1H do produto isolado mostra todos os sinais característicos dos prótons do reagente **2.25**, sugerindo que não ocorreu a formação do composto esperado. No entanto os desvios químicos observados são diferentes relativamente aos do espectro de RMN ^1H do reagente **2.25**, o que sugere a formação de um produto secundário, cuja estrutura não pôde ser determinada.



Esquema 2.12

2.4 Conclusão

No presente capítulo foram descritas todas as metodologias sintéticas, e respectivas otimizações, utilizadas durante este projeto de investigação para a obtenção de novos compostos estruturalmente relacionados com o **MANIO**.

O trabalho realizado permitiu a obtenção de dois novos derivados mono-hidroximetilo com configuração absoluta *S*, 6- e 7-hidroximetil-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol **2.10** e **2.9** respetivamente. A síntese eficiente destes compostos permitiu realizar o estudo da sua atividade antitumoral, cujos resultados podem ser consultados no capítulo 3. Adicionalmente, foi também possível sintetizar o conjugado do enantiómero do **MANIO** com o ácido linoleico **2.13**. A atividade antitumoral do conjugado **2.13** não está contemplada neste projeto, no entanto, a evidência da sua formação abre novas oportunidades relativamente à síntese de outros derivados, recorrendo a outros ácidos gordos ou até mesmo hidratos de carbono.

A estratégia sintética delineada para a obtenção de derivados bis-aminometilo de 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol baseou-se na amidação direta dos compostos diéster **2.11** com aminas, nomeadamente benzilamina ou amoníaco. A posterior redução das amidas formadas permitiria a obtenção dos derivados bis-aminometilo livres **2.14** ou protegidos com o grupo benzilo **2.17**. O trabalho desenvolvido ao longo deste projeto de investigação permitiu otimizar a formação de amidas **2.16** protegidas com o grupo benzilo partindo dos compostos diéster **2.11**. Adicionalmente foi também possível mostrar que as amidas **2.16** poderiam ser obtidas por uma via alternativa, através da amidação dos ácidos carboxílicos **2.18** obtidos pela hidrólise dos diéster **2.11**. Apesar de inúmeras tentativas de redução com diferentes agentes redutores, não foi possível obter derivados bis-aminometilo **2.17** protegidos com o grupo benzilo. Analogamente, também não foi possível sintetizar o derivado bis-aminometilo livre **2.14** uma vez que não se conseguiu obter o seu precursor **2.15** de forma eficiente.

No entanto, a utilização da mesma estratégia sintética aplicada à síntese de **2.17** levou à obtenção dos derivados mono-aminometilo **2.24** e **2.25** protegidos com o grupo benzilo. O sucesso na obtenção destes compostos mostrou que provavelmente a existência de dois grupos amida em posição vicinal impede a sua completa redução às amins correspondentes. Adicionalmente, foi ainda tentada a remoção do grupo benzilo do composto **2.25**, no entanto o resultado foi inconclusivo.

Em suma, o trabalho desenvolvido permitiu obter uma grande quantidade de novos compostos estruturalmente relacionados com o **MANIO**, contendo grupos funcionais álcool, ácido carboxílico, amida ou amina (Figura 2.5). A atividade antitumoral de alguns destes compostos foi estudada e permitiu identificar relações estrutura-atividade que irão permitir para um conhecimento mais aprofundado do mecanismo de ação do **MANIO** (ver capítulo 3).

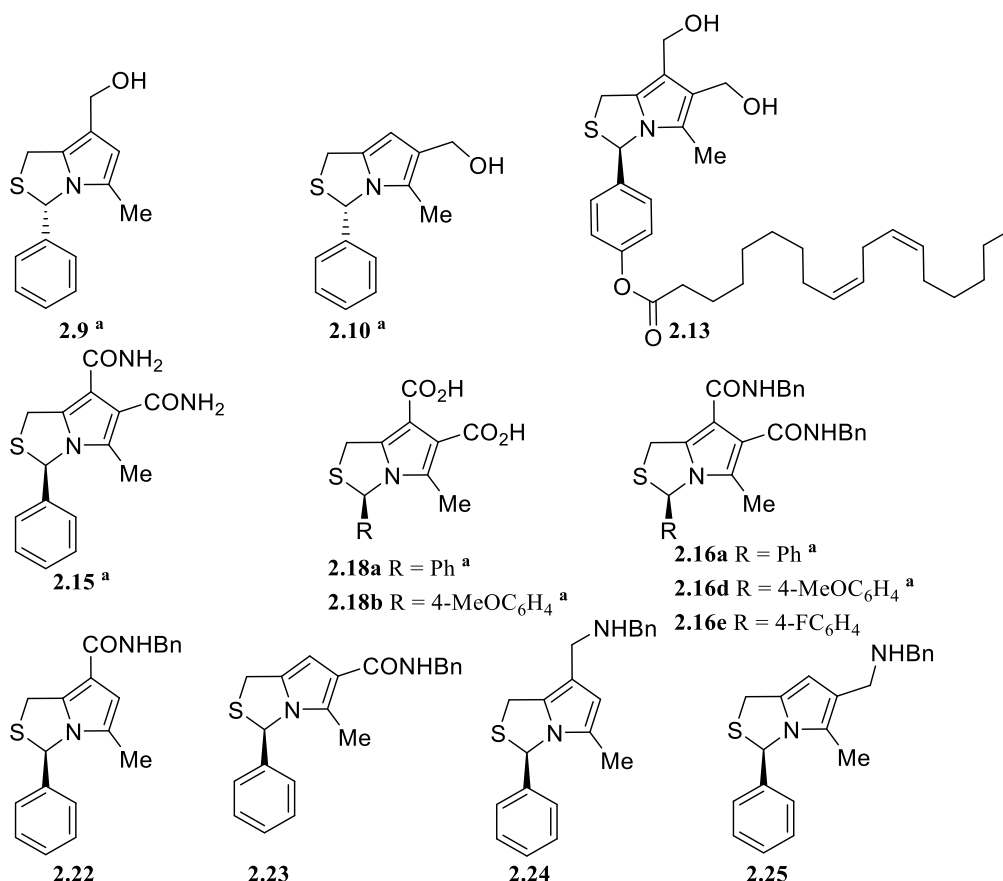


Figura 2.5- Estrutura química dos novos derivados do **MANIO** sintetizados durante este projeto de investigação. ^a Atividade antitumoral estudada (ver capítulo 3).

3. ATIVIDADE ANTITUMORAL

3.1 Introdução

A atividade antitumoral *in vitro* de alguns dos compostos sintetizados ao longo deste projeto de investigação foi estudada. Os resultados obtidos permitem detetar novas relações estrutura-atividade e descobrir novas moléculas com potencial terapêutico para o CCR, através da modulação da proteína p53. De forma a possibilitar uma correlação com a atividade do **MANIO** e dos seus derivados previamente estudados (ver Capítulo 1), foi estudada a atividade antitumoral dos novos derivados do **MANIO** na linha celular do cancro colorretal HCT116 (Tabela 3.1).¹⁸ Na avaliação da atividade antitumoral dos novos compostos, foi utilizado o ensaio da sulforodamina B, cuja estrutura química é representada na Figura 3.1. Este ensaio colorimétrico permite extrapolar a proliferação celular através da quantificação aproximada da massa total de proteína, devido à capacidade que a sulforodamina B tem de estabelecer, estequiometricamente, ligações eletrostáticas com as proteínas, em meio relativamente ácido (pH 2-5).^{55,56} Assim, uma vez que a sulforodamina B se liga estequiometricamente às proteínas, a quantificação do corante extraído das células pigmentadas será diretamente proporcional à massa total de proteína, permitindo determinar o número de células total e consequentemente a proliferação celular.

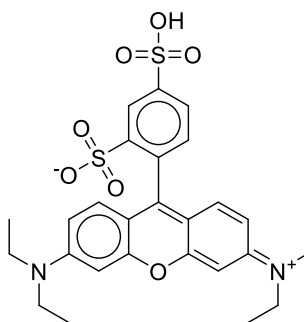


Figura 3.1- Estrutura química da sulforodamina B.

A realização do ensaio da sulforodamina B para um intervalo de concentrações dos novos compostos permite a construção de uma curva dose-resposta, através da qual é possível calcular a concentração inibitória média (IC₅₀). Assim, o valor de IC₅₀ calculado nas linhas celulares que expressam a p53 (HCT116 p53^{+/+}) permite avaliar a potência da molécula, enquanto a seletividade para a via da proteína p53 pode ser avaliada pelo valor de IC₅₀ nas linhas celulares que não expressam a p53 (HCT116 p53^{-/-}). Uma vez que valores baixos de IC₅₀ representam uma elevada atividade do composto nas células para os quais foram determinados, idealmente, os compostos devem ter baixo IC₅₀ para as células

HCT116 p53^{+/+} e elevado IC₅₀ para as células HCT116 p53^{-/-}. Esta combinação de IC₅₀ permite identificar derivados do **MANIO** com elevada atividade e seletividade para a via da proteína p53 no cancro colorretal.

3.2 Novos derivados do MANIO: Atividade antitumoral

As estruturas químicas dos derivados do **MANIO** sintetizados neste projeto de investigação e cuja atividade antitumoral foi estudada encontram-se ilustradas na Figura 3.2. Na Tabela 3.1 são apresentados os valores de IC₅₀ determinados nas linhas celulares HCT116 p53^{+/+} e HCT116 p53^{-/-} para um tempo de incubação de 48 h. Através da análise desta tabela é possível retirar algumas conclusões importantes sobre relações estrutura-atividade.

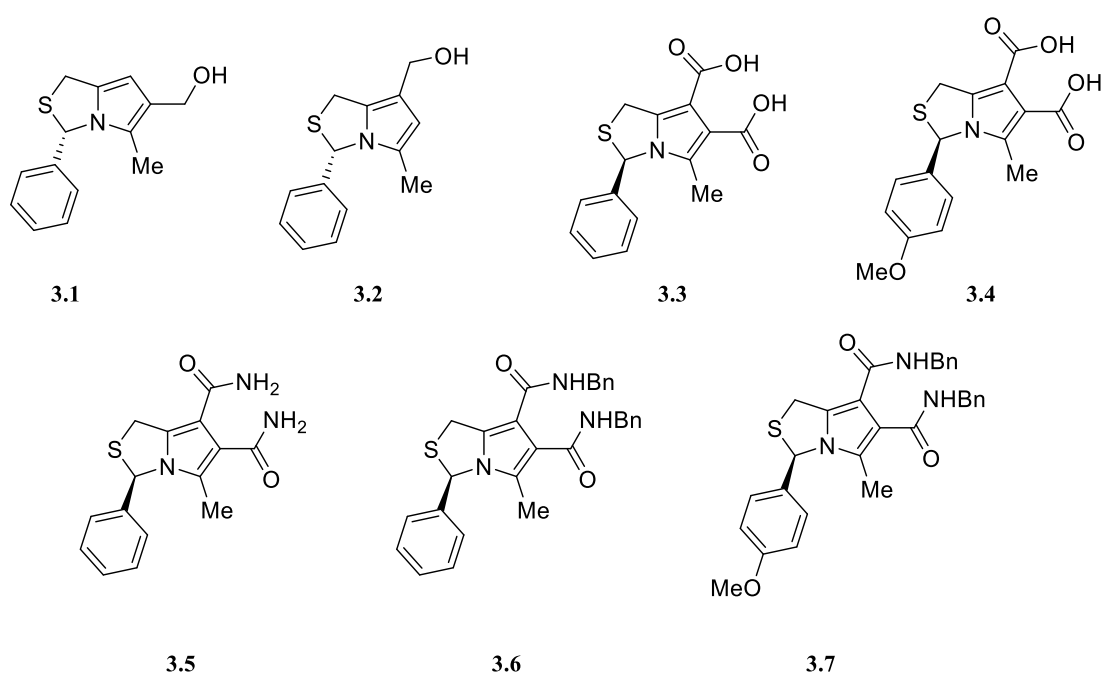


Figura 3.2- Estrutura química dos novos derivados do **MANIO** cuja atividade antitumoral foi estudada.

Como era expectável, a atividade na linha celular HCT116 p53^{+/+} dos derivados hidroximetilo **3.1** (0.99 μ M) e **3.2** (0.14 μ M) com configuração absoluta *S* é superior à dos respetivos enantiómeros, respetivamente **1.18** (6.68 μ M) e **1.17** (29.3 μ M), sendo comparável à atividade antitumoral do **MANIO** (0.97 μ M) (ver Capítulo 1). No entanto, o baixo valor de IC₅₀ calculado nas células HCT116 p53^{-/-}, 4.33 e 18.12 μ M, para **3.1** e **3.2**, respetivamente, permite concluir que estes derivados não têm uma seletividade ideal para

a via da proteína p53 no CCR. Curiosamente, a atividade antitumoral do derivado 7-hidroximetilo **3.2** é superior à atividade do derivado 6-hidroximetilo **3.1**, em contraste com o observado para os correspondentes enantiómeros **1.18** e **1.17**. Esta diferença nos perfis de atividade dos enantiómeros permite constatar que existe um elevado sinergismo entre a configuração absoluta em C-3 e os grupos hidroximetilo em C-6/C-7.

Tabela 3.1- IC₅₀ (μM) dos novos derivados do **MANIO** em linhas celulares HCT116 (48 h de incubação).

Composto	IC ₅₀ (μM)	
	HCT116 p53 ^{+/+}	HCT116 p53 ^{-/-}
3.1	0.99	4.33
3.2	0.14	18.12
3.3	>15	>50
3.4	>15	>50
3.5	>25	>50
3.6	ND	ND
3.7	ND	ND

ND: valor não determinado devido à insolubilidade dos compostos são no meio celular.

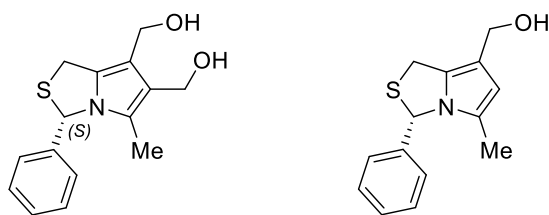
Relativamente aos restantes derivados estudados, nenhum deles apresenta uma atividade promissora, permitindo concluir que a presença do(s) grupo(s) hidroximetilo(s) é crucial para garantir uma atividade antitumoral elevada. Apesar dos ácidos **3.3** e **3.4**, bem como da bis(amida) primária **3.5**, poderem funcionar como dadores de ligações de hidrogénio, a baixa atividade destes compostos pode ser explicada pela substituição dos grupos hidroximetilo por grupos funcionais derivados do ácido carboxílico, alterando significativamente a densidade eletrónica da molécula e consequentemente afetando a interação com a proteína p53. Complementarmente, os resultados obtidos para as bis(benzilamidas) **3.6** e **3.7** permitem concluir que é necessária especial atenção na modificação estrutural dos compostos envolvendo a introdução de grupos muito apolares, que, consequentemente, tornam as moléculas insolúveis no meio celular.

3.3 Conclusão

Dos derivados cuja atividade antitumoral foi estudada neste projeto de investigação, destaca-se a atividade antitumoral do (3*S*)-7-hidroximetil-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol (**3.2**). Este composto possui uma atividade antitumoral superior à do

MANIO em quase 10 ordens de grandeza, no entanto possui menor seletividade para a via da proteína p53 no CCR (Figura 3.3).

Adicionalmente, os resultados de atividade antitumoral obtidos confirmaram a existência de sinergismo entre a configuração absoluta em C-3 e os grupos hidroximetilo em C-6/C-7. Esta conclusão sugere que, apesar da estratégia sintética para a obtenção de (3*S*)-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis ser mais complexa, a obtenção dos derivados com esta estereoquímica deve ser prioritária.



MANIO

$IC_{50} = 0.97 \mu M$ (HCT116 p53^{+/+})

$IC_{50} > 50 \mu M$ (HCT116 p53^{-/-})

3.2

$IC_{50} = 0.14 \mu M$ (HCT116 p53^{+/+})

$IC_{50} = 18.12 \mu M$ (HCT116 p53^{-/-})

Figura 3.3- Estrutura química e IC_{50} do **MANIO** e do novo derivado **3.2**.

4. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

4.1 Conclusão

O principal objetivo deste projeto de investigação era a modulação estrutural do composto líder, **MANIO**, de forma a melhorar as suas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas como ativador da proteína p53. Complementarmente, o trabalho desenvolvido permitiria identificar novas relações estrutura-atividade da família de 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazóis, fulcrais para o delineamento de futuras modificações.

O trabalho apresentado nesta dissertação permitiu a síntese de treze novos compostos estruturalmente relacionados com o **MANIO**, tendo sido possível estudar a atividade antitumoral de mais de metade destes derivados (Figura 4.1).

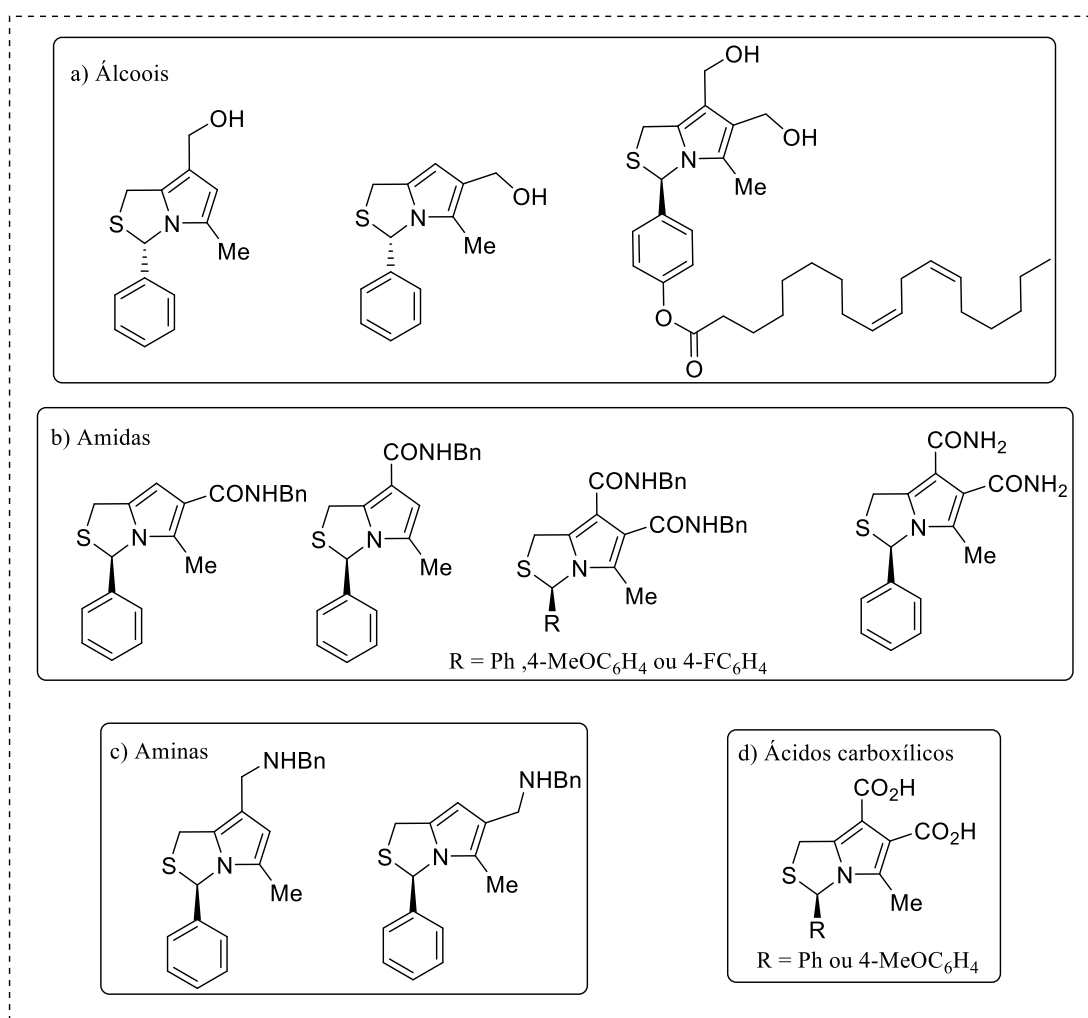


Figura 4.1- Estrutura química de novos derivados álcool (a), amida (b), amina (c) e ácido carboxílico (d) do **MANIO** sintetizados durante este projeto de investigação.

A síntese dos novos compostos mostrou-se eficaz para a obtenção de moléculas contendo diferentes grupos funcionais, nomeadamente ácidos carboxílicos, amidas primárias ou protegidas com o grupo benzilo, e álcoois, com especial ênfase para o conjugado do ácido linoleico, um ácido gordo polinsaturado que pode ser usado para fazer o direcionamento de fármacos para células do cancro. Adicionalmente, foi possível sintetizar eficientemente compostos contendo apenas um grupo funcional *N*-benzilamina, em contrapartida com os respetivos derivados bis(amina).

Através do estudo da atividade antitumoral dos compostos sintetizados foi possível estabelecer uma relação de sinergismo entre a configuração absoluta em C-3 e os grupos hidroximetilo em C-6/C-7 e identificar um derivado com elevada atividade e moderada seletividade para a via da proteína p53, o (3*S*)-7-hidroximetil-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol.

4.2 Perspetivas Futuras

Uma vez que este projeto de investigação permitiu a identificação de um composto com elevada atividade para a via da proteína p53 no cancro colorretal, é importante que no futuro sejam feitos esforços na tentativa de aumentar a seletividade deste derivado. Uma das hipóteses sugeridas é a substituição do grupo hidroximetilo pelo seu bioisómero aminometilo. Este projeto de investigação demonstrou que apesar das dificuldades encontradas na reação de redução de derivados bis(amida), foi possível reduzir eficientemente os compostos contendo apenas um grupo funcional amida, tornando esta hipótese exequível num futuro próximo.

Por fim, devido ao sinergismo existente entre a configuração absoluta em C-3 e os grupos substituintes em C-6/C-7 é importante que no futuro seja dada prioridade à síntese dos enantiómeros com configuração absoluta *S* em C-3, uma vez que são os compostos que consistentemente apresentam melhor atividade antitumoral *in vitro* para a via da proteína p53 no cancro colorretal.

5. PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo encontram-se descritos os procedimentos experimentais para a síntese dos compostos apresentados nos capítulos anteriores. São também incluídos os instrumentos utilizados na identificação e caracterização dos compostos sintetizados durante este projeto, bem como informação sobre os reagentes e solventes. Os compostos sintetizados foram identificados e caracterizados por algumas das seguintes técnicas: espectroscopia de ressonância magnética nuclear (^1H , ^{13}C , ^{19}F), espectroscopia de infravermelho (IV), ponto de fusão, espectrometria de massa de alta resolução (EMAR) e rotação específica $[\alpha]$.

5.1 Aparelhagem utilizada

Cromatografia

Nas reações cuja evolução foi acompanhada por cromatografia em camada fina, utilizaram-se placas de sílica 60 F₂₅₄ em suporte de alumínio fornecidas pela *Merck*.

Para a purificação de compostos através de cromatografia em coluna foi utilizado gel de sílica 60 (0.035-0.070 mm) fornecida pela *TermoFisher Scientific*.

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C e ^{19}F foram obtidos num espectrómetro *Brucker Avance III*, operando a 400 ou 500 MHz (^1H), a 100 MHz (^{13}C) e a 376 MHz (^{19}F). Todos os espectros foram obtidos a 25 °C, exceto quando devidamente referido.

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

Ponto de Fusão

Os pontos de fusão foram determinados, pelo método do capilar de vidro aberto, num aparelho de fase aquecida *Falc*.

Espectrometria de Massa de Alta Resolução

Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos num espectrómetro *Thermo Orbitrap Q-Exactive Focus* com ionização por *electrospray* (ESI) ou *Bruker MicroTOF* com ionização química a pressão atmosférica (APCI).

Rotação Específica

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

Espetroscopia de Infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos num espectrofotómetro *Agilent Technologies Cary 630 FTIR*, utilizando o método de refletância total atenuada (ATR).

5.2 Solventes e Reagentes

Foram utilizados reagentes comercialmente disponíveis com elevado grau de pureza fornecidos pela *Sigma-Aldirch*, *Alfa Aesar*, *Acros Organics* ou *Fluorochem*.

Todos os solventes foram usados secos e destilados, de acordo com os seguintes procedimentos, exceto em reações ou extrações com água, onde apenas foram usados solventes destilados.

Acetato de Etilo

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

Hexano, éter etílico, tolueno e tetra-hidrofurano

Refluxados na presença de fios de sódio, utilizando benzofenona como indicador, destilados e guardados sobre peneiros moleculares de 4 Å.

Diclorometano e Clorofórmio

Refluxados na presença de cloreto de cálcio durante 3 horas, destilados e guardados sobre peneiros moleculares de 4 Å.

Metanol e Etanol

Refluxado durante 2 horas com magnésio na presença de palhetas de iodo, destilado a partir do alcóxido de sódio e guardado sobre peneiros moleculares 3 Å.

Todos os outros solventes foram fornecidos pela *Labsolve*, *Carlo Erba* ou *Fisher Scientific* e utilizados diretamente sem purificação adicional.

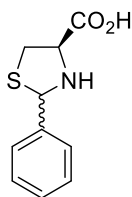
5.3 Procedimentos experimentais referentes ao Capítulo II

5.3.1 Preparação de ácidos tiazolidina-4-carboxílicos

Procedimento geral

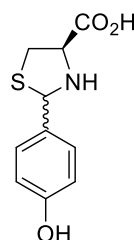
As tiazolidinas foram preparadas seguindo um procedimento experimental adaptado da literatura.⁵⁷ A uma solução de *L*-cisteína (2.42 g, 20.0 mmol) em água (20 mL), num balão de fundo redondo, adicionar uma solução de aldeído (20.0 mmol) em etanol (15 mL). Agitar a mistura reacional, à temperatura ambiente, pelo tempo indicado em cada caso. Filtrar e lavar o sólido formado com uma mistura de éter etílico e etanol (vestigial).

Ácido (2*R*,4*R*) e (2*S*,4*R*)-2-feniltiazolidina-4-carboxílico (2.1a)



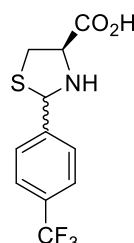
Tempo de reação: 24 h. Obtido um sólido branco como uma mistura de diastereoisómeros. Rendimento: 84%. Ponto de fusão (da literatura): 154-155 °C.²⁸ RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) *Componente secundário*: δ 3.24 (1H, dd, *J* = 5.1 e 10.2), 3.35-3.41 (1H, m), 4.21-4.25 (1H, m), 5.80 (1H, s), 7.25-7.40 (3H, m, Ar-H), 7.46-7.53 (2H, m, Ar-H); *Componente principal*: δ 3.14 (1H, pseudo-t), 3.48 (1H, dd, *J* = 7.2 e 10.2), 3.94 (1H, pseudo-t), 5.53 (1H, s), 7.25-7.40 (3H, m, Ar-H), 7.46-7.53 (2H, m, Ar-H).

Ácido (2*R*,4*R*) e (2*S*,4*R*)-2-(4-hidroxifenil)-tiazolidina-4-carboxílico (2.1b)

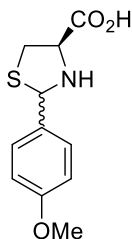


Tempo de reação: 15 minutos. Obtido um sólido branco como uma mistura de diastereoisómeros. Rendimento: 66%. Ponto de fusão (da literatura): 165-167 °C.³³ RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) *Componente secundário*: δ 3.04 (1H, dd, *J* = 8.6 e 10.1), 3.28 (1H, dd, *J* = 7.3 e 10.3), 4.25 (1H, dd, *J* = 4.0 e 7.2), 5.40 (1H, s), 6.70-6.73 (2H, m, Ar-H), 7.23-7.27 (2H, m, Ar-H); *Componente principal*: δ 3.15 (1H, dd, *J* = 4.1 e 10.3), 3.35 (1H, dd, *J* = 7.2 e 10.1), 3.83 (1H, dd, *J* = 7.2 e 8.6), 5.55 (1H, s), 6.77-6.73 (2H, m, Ar-H), 7.29-7.33 (2H, m, Ar-H).

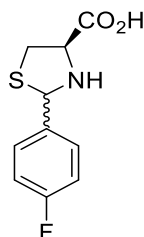
Ácido (2*R*,4*R*) e (2*S*,4*R*)-2-((4-trifluorometil)-fenil)-tiazolidina-4-carboxílico (2.1c)



Tempo de reação: 15 h. Neste caso foram utilizados 0.8 equivalentes de aldeído (40.0 mmol). Obtido um sólido branco como uma mistura de diastereoisómeros. Rendimento: 93%. Ponto de fusão (da literatura): 145-147 °C;⁵⁸ RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) *Componente secundário*: δ 3.26 (1H, dd, *J* = 8.4 e 10.4), 3.53 (1H, dd, *J* = 7.2 e 10.4), 4.09 (1H, dd, *J* = 7.3 e 8.3), 5.65 (1H, s), 7.65-7.78 (m, 4H, Ar-H). *Componente principal*: δ 3.33 (1H, dd, *J* = 5.0 e 10.6), 3.46 (1H, dd, *J* = 7.1 e 10.6), 4.34 (1H, dd, *J* = 5.0 e 7.0), 5.84 (1H, s), 7.65-7.78 (m, 4H, Ar-H).

Ácido (2*R*,4*R*) e (2*S*,4*R*)-2-(4-metoxifenil)-tiazolidina-4-carboxílico (2.1d)

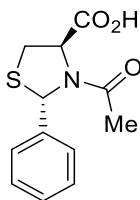
Tempo de reação: 1 h. Obtido um sólido branco como uma mistura de diastereoisómeros. Rendimento: 74%. Ponto de fusão (da literatura): 166-168 °C.³³ RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) *Componente secundário*: δ 3.05-3.10 (1H, m), 3.29-3.32 (1H, m), 3.75 (3H, s), 3.85-3.89 (1H, m), 5.46 (1H, s), 6.89 (2H, d, *J* = 8.6, Ar-H), 7.37 (2H, d, *J* = 8.5, Ar-H); *Componente principal*: δ 3.14-3.18 (1H, m), 3.35-3.39 (1H, m), 3.76 (3H, s), 4.23-4.26 (1H, m), 5.62 (1H, s), 6.93 (2H, d, *J* = 8.6, Ar-H), 7.44 (2H, d, *J* = 8.5, Ar-H).

Ácido (2*R*,4*R*) e (2*S*,4*R*)-2-(4-fluorofenil)-tiazolidina-4-carboxílico (2.1e)

Tempo de reação: 24 h. Obtido um sólido branco como uma mistura de diastereoisómeros. Rendimento: 96%. Ponto de fusão (da literatura): 153-155 °C.⁵⁸ RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) *Componente secundário*: δ 3.29 (1H, dd, *J* = 8.0 e 10.6), 3.48-3.50 (1H, m), 4.08 (1H, pseudo-t.), 5.59 (1H, s), 7.10-7.17 (2H, m, Ar-H), 7.58-7.65 (2H, m, Ar-H); *Componente principal*: δ 3.39 (1H, dd, *J* = 4.7 e 10.8), 3.48-3.54 (1H, m), 4.39 (1H, dd, *J* = 4.7 e 7.2), 5.76 (1H, s), 7.10-7.17 (2H, m, Ar-H), 7.58-7.65 (2H, m, Ar-H).

5.3.2 Preparação de ácidos *N*-acetiltiazolidina-4-carboxílicos

Ácido (*2S,4R*)-*N*-acetil-2-feniltiazolidina-4-carboxílico (2.2a)



A *N*-acetil-tiazolidina com configuração absoluta *2S,4R* foi preparada a partir do ácido 2-feniltiazolidina-4-carboxílico (**2.1a**) de acordo com um procedimento descrito na literatura.²⁸ A uma solução do composto **2.1a** (4.19 g, 20.0 mmol) em piridina (50 mL), num balão de fundo redondo, adicionar lentamente anidrido acético (5.67 mL, 60.0 mmol). Agitar a mistura reacional, à temperatura ambiente, durante 1.5 h. Diluir a mistura reacional com água (75 mL) e acidificar a pH 3 recorrendo a uma solução aquosa concentrada de ácido clorídrico. Extrair com acetato de etilo (4 x 30 mL). Combinar as fases orgânicas e lavar com água. Secar com agente secante (Na₂SO₄), filtrar e evaporar o solvente. Obtido um sólido branco após recristalização em etanol. Rendimento: 56%. Ponto de fusão (da literatura): 134-137 °C;²⁸ O espectro de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) obtido a 25 °C indica a presença de uma mistura de isómeros, conforme descrito abaixo; o espectro de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) obtido a 100 °C não apresenta duplicação de sinais, confirmando que se trata de isómeros rotacionais; RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.76 e 2.03 (3H, 2 x s), 3.17-3.48 (2H, m), 5.12 e 5.35 (1H, 2 x d, *J* = 6.9 e 6.0), 6.15 e 6.38 (1H, 2 x s), 7.21-7.40 (5H, m, Ar-H).

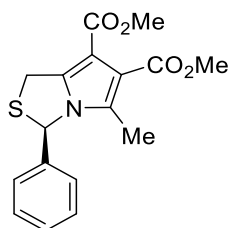
5.3.3 Preparação de 1*H,3H*-pirrólo[1,2-*c*]tiazóis via ciclo-adição 1,3-dipolar

Procedimento geral para a síntese de 1*H,3H*-pirrólo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxilatos de dimetilo

Os 1*H,3H*-pirrólo[1,2-*c*]tiazóis foram preparados segundo um procedimento descrito na literatura.³⁴ A uma solução do ácido tiazolidina-4-carboxílico apropriado (17.8 mmol) em anidrido acético (70 mL), num balão de fundo redondo, adicionar DMAD (3.27 mL, 26.7 mmol). Agitar a mistura reacional, à temperatura de 110-120 °C, durante 4 h. Arrefecer à temperatura ambiente e diluir com diclorometano (180 mL). Lavar com solução saturada

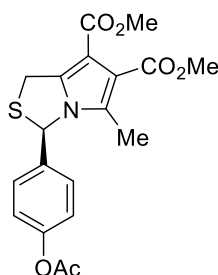
de hidrogenocarbonato de sódio e com água. Secar com agente secante (Na_2SO_4), filtrar e evaporar o solvente. Purificar o composto através de cromatografia em gel de sílica usando uma mistura de acetato de etilo:hexano como eluente.

(3R)-3-Fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-6,7-dicarboxilato de dimetilo (2.11a)



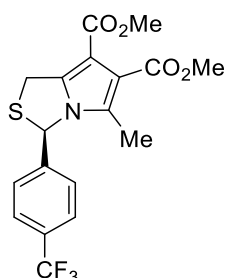
Obtido um sólido branco a partir do ácido 2-feniltiazolidina-4-carboxílico (**2.1a**). Rendimento: 33%. Ponto de fusão (da literatura): 149-151 °C;²⁷ RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 2.01 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.84 (3H, s), 4.31 (1H, d, $J = 14.9$), 4.47 (1H, dd, $J = 14.9$ e 1.8), 6.28 (1H, d, $J = 1.7$), 7.04-7.07 (2H, m, Ar-H), 7.32-7.35 (3H, m, Ar-H).

(3R)-3-(4-Acetoxifenil)-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-6,7-dicarboxilato de dimetilo (2.11b)



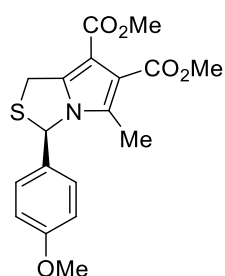
Obtido um sólido amarelo pálido a partir do ácido 2-(4-hidroxifenil)-tiazolidina-4-carboxílico (**2.1b**). Rendimento: 47%. Ponto de fusão (da literatura): 90-92 °C;³³ RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 2.03 (3H, s), 2.30 (3H, s), 3.83 (6H, s), 4.31 (1H, d, $J = 15.0$), 4.46 (1H, dd, $J = 14.9$ e 1.7), 6.28 (1H, d, $J = 1.7$), 7.08 (4H, s, Ar-H).

(3R)-3-((4-Trifluorometil)-fenil)-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-6,7-dicarboxilato de dimetilo (2.11c)

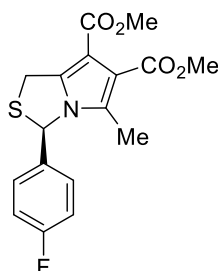


Obtido um sólido branco a partir do ácido 2-((4-trifluorometil)-fenil)-tiazolidina-4-carboxílico (**2.1c**). Rendimento: 44%. Ponto de fusão: 105-106 °C (recristalizado de acetato de etilo/hexano); $[\alpha]_D^{25} = +210$ (*c* 0.5, CH₂Cl₂); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 2.03 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.84 (3H, s), 4.34 (1H, d, *J* = 15.0), 4.47 (1H, dd, *J* = 1.5 e 14.9), 6.32 (1H, d, *J* = 1.2), 7.15 (2H, d, *J* = 8.1, Ar-H), 7.62 (2H, d, *J* = 8.1, Ar-H); 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), 125.9, 126.4 (q, ³*J*_{C-F} = 3.7), 130.4, 131.2 (q, ²*J*_{C-F} = 32.7), 140.3, 144.2, 163.9, 165.1; RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃): δ -62.8; IV (ATR) $\nu = 1704, 1618, 1436, 1323, 1204$ cm⁻¹; EMAR (ESI) *m/z*: 400.0822, (calculado para C₁₈H₁₇O₄NF₃S, [M+H]⁺): 400.0825.

(3R)-3-(4-Metoxifenil)-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-6,7-dicarboxilato de dimetilo (2.11d)



Obtido um sólido amarelo a partir do ácido 2-(4-metoxifenil)-tiazolidina-4-carboxílico (**2.1d**). Rendimento: 58%. Ponto de fusão (da literatura): 80-82 °C;³³ RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 2.00 (3H, s), 3.80 (3H, s), 3.82 (3H, s), 3.83 (3H, s), 4.30 (1H, d, *J* = 14.9), 4.47 (1H, dd, *J* = 14.9 e 1.7), 6.27 (1H, d, *J* = 1.6), 6.86 (2H, d, *J* = 8.6, Ar-H), 7.02 (2H, d, *J* = 8.6, Ar-H).

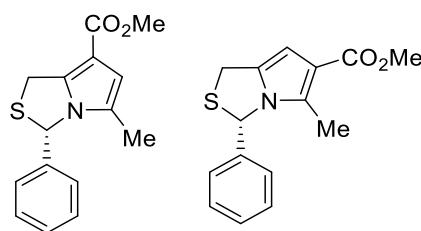
(3R)-3-(4-Fluorofenil)-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-6,7-dicarboxilato de dimetilo (2.11e)

Obtido um sólido amarelo pálido a partir do ácido 2-(4-fluorofenil)-tiazolidina-4-carboxílico (**2.1e**). Rendimento: 69%. Ponto de fusão: 102 °C (recristalizado de acetato de etilo/hexano); RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 2.00 (3H, s), 3.83 (6H, s), 4.32 (1H, d, $J = 15.0$), 4.47 (1H, dd, $J = 14.9$ e 1.6), 6.28 (1H, d, $J = 1.6$), 7.03-7.08 (4H, m, Ar-H); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 11.4, 30.0, 51.4, 51.6, 64.4, 107.0, 116.3 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 22.9$), 117.6, 127.6 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8.4$), 130.5, 136.0 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 3.2$), 140.3, 162.8 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 247$), 164.0, 165.2; RMN ^{19}F (376 MHz, CDCl_3): δ -114.5; IV (ATR) $\nu = 1773, 1603, 1436, 1359 \text{ cm}^{-1}$; EMAR (ESI) m/z : 350.0853, (calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{NF}_2$, $[\text{M}+\text{H}]^+$): 350.0857.

Procedimento geral para a síntese de 1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol carboxilatos de metilo

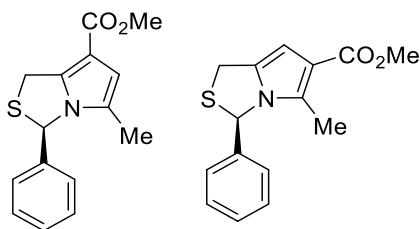
Os 1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol carboxilatos de metilo foram preparados segundo um procedimento descrito na literatura.³¹ A uma solução do ácido tiazolidina-4-carboxílico apropriado (7.96 mmol) em anidrido acético (40 mL), num balão de fundo redondo, adicionar propiolato de metilo (1.27 mL, 14.3 mmol). Agitar a mistura reacional, à temperatura de 110-120 °C, durante 15 h. Arrefecer à temperatura ambiente e diluir com diclorometano (95 mL). Lavar com solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio e com água. Secar com agente secante (Na_2SO_4), filtrar e evaporar o solvente.

(3S)-3-Fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-7-carboxilato de metilo (2.7) e (3S)-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-6-carboxilato de metilo (2.8)



Obtidos a partir do ácido *N*-acetil-2-feniltiazolidina-4-carboxílico (**2.2a**) como uma mistura de regioisômeros após purificação do crude por cromatografia em gel de sílica usando acetato de etilo:hexano (1:3) como eluente. Rendimento: 42% (mistura 1:1). O regioisômero **2.8** foi cristalizado seletivamente com uma mistura de éter etílico e hexano. *(3S)*-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-6-carboxilato de metilo (**2.8**): sólido amarelo pálido, ponto de fusão: 90-92 °C; $[\alpha]_D^{25} = -320$ (*c* 0.5, CH₂Cl₂); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 2.18 (3H, s), 3.78 (3H, s), 4.02 (1H, d, *J* = 13.1), 4.27 (1H, d, *J* = 13.1), 6.25 (1H, s), 6.33 (1H, s), 7.01 (2H, dd, *J* = 1.7 e 7.7, Ar-H), 7.29-7.35 (3H, m, Ar-H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 11.8, 28.2, 50.8, 64.0, 101.7, 116.6, 125.4, 128.6, 129.1, 132.0, 133.2, 141.1, 165.8; IV (ATR) $\nu = 2923, 1688, 1523, 1363, 1222, 1068$ cm⁻¹; EMAR (ESI) *m/z*: 274.0892, (calculado para C₁₅H₁₆O₂NS, [M+H]⁺): 274.0896. *(3S)*-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-7-carboxilato de metilo (**2.7**): RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 1.82 (3H, s), 3.81 (3H, s), 4.34 (1H, d, *J* = 14.7), 4.51 (1H, dd, *J* = 1.8 e 14.7), 6.27 (1H, d, *J* = 1.8), 6.36 (1H, s), 7.06 (2H, dd, *J* = 1.7 e 7.6, Ar-H), 7.30-7.35 (3H, m, Ar-H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 12.1, 30.4, 51.0, 65.0, 106.9, 112.2, 125.7, 125.8, 128.8, 129.1, 140.3, 140.4, 165.2.

(3R)-3-Fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-7-carboxilato de metilo (2.20) e (3R)-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-6-carboxilato de metilo (2.21)

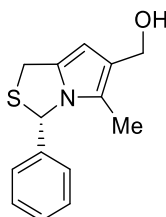


Obtidos a partir do ácido 2-feniltiazolidina-4-carboxílico (**2.1a**) como uma mistura regioisomérica após purificação do crude por cromatografia em gel de sílica usando acetato de etilo:hexano (1:3) como eluente. Rendimento: 61% (mistura 1:1). O regioisômero **2.21** foi cristalizado seletivamente com uma mistura de éter etílico e hexano. (*3R*)-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-6-carboxilato de metilo (**2.21**): sólido amarelo pálido, ponto de fusão (da literatura): 87-89 °C;³¹ RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 2.18 (3H, s), 3.78 (3H, s), 4.02 (1H, d, *J* = 13.1), 4.27 (1H, d, *J* = 13.1), 6.25 (1H, s), 6.33 (1H, s), 6.99-7.03 (2H, m, Ar-H), 7.29-7.33 (3H, m, Ar-H). (*3R*)-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-7-carboxilato de metilo (**2.20**): RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 1.82 (3H, s), 3.81 (3H, s), 4.34 (1H, d, *J* = 14.7), 4.51 (1H, dd, *J* = 1.8 e 14.7), 6.27 (1H, d, *J* = 1.8), 6.36 (1H, s), 7.06 (2H, dd, *J* = 1.7 e 7.6, Ar-H), 7.30-7.35 (3H, m, Ar-H).

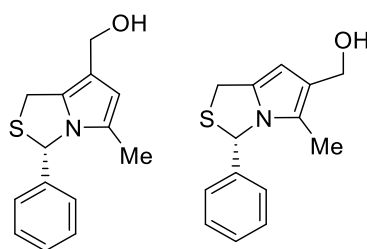
5.3.4 Redução de 1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol carboxilatos

Procedimento geral

Os derivados álcool de 1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol carboxilatos foram obtidos através de um procedimento adaptado da literatura.³¹ A uma suspensão de hidreto de alumínio e lítio (0.15 g, 3.94 mmol) em éter etílico seco (15 mL) a 0 °C, num balão de fundo redondo de duas tubuladuras sob atmosfera inerte, adicionar gota a gota uma solução do 1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol carboxilato correspondente (1.64 mmol) em diclorometano seco (25 mL). Agitar a mistura reacional, à temperatura de 40 °C, durante 4 h. Arrefecer a mistura reacional num banho de gelo e adicionar gota a gota acetato de etilo (45 mL), água (0.23 mL), solução aquosa de hidróxido de sódio 15% (0.23 mL) e novamente água (0.70 mL). Agitar durante 1 h. Filtrar através de celite e lavar o resíduo inorgânico com porções alternadas de acetato de etilo e diclorometano. Secar com agente secante (Na₂SO₄), filtrar e evaporar o solvente.

(3S)-6-Hidroximetil-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol (2.10)

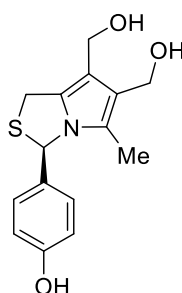
Obtido a partir do (3S)-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-6-carboxilato de metilo (**2.8**) como um sólido rosa pálido após cromatografia em gel de sílica usando acetato de etilo:hexano (1:1) como eluente, seguida de filtração com éter etílico frio. Rendimento: 55%. Ponto de fusão: 61-63 °C; $[\alpha]_D^{25} = -300$ (*c* 0.5, CH₂Cl₂); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 1.87 (3H, s), 4.05 (1H, d, *J* = 12.8), 4.30 (1H, d, *J* = 12.8), 4.45 (2H, s), 5.93 (1H, s), 6.22 (1H, d, *J* = 1.4), 7.03-7.05 (2H, m, Ar-H), 7.28-7.32 (3H, m, Ar-H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 10.0, 28.8, 58.2, 64.2, 100.1, 122.9, 124.9, 125.7, 128.4, 129.0, 133.0, 141.9; IV (ATR) $\nu = 3363, 2899, 1337, 1110, 986, 695$ cm⁻¹; EMAR (APCI+) *m/z*: 228.0843, (calculado para C₁₄H₁₄NS, [M-OH]⁺): 228.0841.

(3S)-7-Hidroximetil-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol (2.9) e (3S)-6-hidroximetil-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol (2.10)

Preparados, de acordo com o procedimento geral, a partir do crude de (3S)-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-7-carboxilato de metilo (**2.7**) e (3S)-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-6-carboxilato de metilo (**2.8**). Separação por cromatografia em gel de sílica usando acetato de etilo:hexano (1:1) como eluente. Obtêm-se, por ordem de eluição: (i) (3S)-7-hidroximetil-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol (**2.9**) como sólido branco após filtração com éter etílico frio. Rendimento: 11%. Ponto de fusão: 91-93 °C; $[\alpha]_D^{25} = -280$ (*c* 0.5, CH₂Cl₂); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 1.83 (3H, s), 4.09 (1H, d, *J* = 12.8), 4.31 (1H, d, *J* = 12.9), 4.52 (2H, s), 5.98 (1H, s), 6.22 (1H, d, *J* = 1.3),

7.03-7.08 (2H, m, Ar-H), 7.28-7.33 (3H, m, Ar-H); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 12.1, 27.9, 58.3, 64.3, 111.3, 114.1, 125.1, 125.7, 128.4, 129.0, 131.8, 141.7; IV (ATR) $\nu = 3369$, 2907, 1344, 1004, 989, 707 cm^{-1} ; EMAR (ESI) m/z : 268.0761, (calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{ONNaS}$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$): 268.0767. (ii) (3*S*)-6-hidroxi metil-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol (**2.10**) como sólido rosa pálido após filtração com éter etílico frio. Rendimento: 16%.

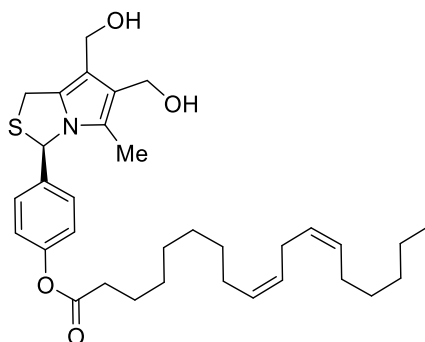
(3*R*)-6,7-Bis(hidroxi metil)-3-(4-hidroxi fenil)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol (2.12)



Preparado de acordo com o **procedimento geral** com exceção de que foram utilizados 9.9 equivalentes de hidreto de alumínio e lítio (25.0 mmol) e o tempo de reação foi 1.5 h. Neste caso, para o isolamento foram utilizadas as quantidades indicadas de acetato de etilo (150 mL), água (0.95 mL), solução aquosa concentrada de ácido clorídrico (0.95 mL) e novamente água (3.0 mL). Obtido um sólido castanho pálido após cromatografia em gel de sílica usando acetato de etilo:hexano (3:1) como eluente, seguida de evaporações alternadas com éter de petróleo e diclorometano. Rendimento: 38%. Ponto de fusão (da literatura) > 220 °C com decomposição;³³ RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD): δ 1.84 (3H, s), 4.08 (1H, d, $J = 13.5$), 4.28 (1H, d, $J = 12.9$), 4.43 (2H, s), 4.51 (1H, d, $J = 12.2$), 4.54 (1H, d, $J = 12.2$), 6.30 (1H, s), 6.70 (2H, d, $J = 8.6$, Ar-H), 6.92 (2H, d, $J = 8.6$, Ar-H).

5.3.5 Esterificação de Steglich

(3*R*)-6,7-Bis(hidroximetil)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol substituído em C-3 com o grupo *p*-linoleato de fenilo **2.13**



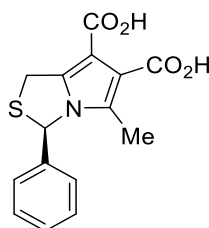
O conjugado de ácido linoleico **2.13** foi preparado segundo um procedimento experimental adaptado da literatura.⁴⁰ A uma solução de DCC (0.30 g, 1.44 mmol) em clorofórmio seco (5 mL), num balão de fundo redondo de duas tubuladuras sob atmosfera inerte e protegido da luz, adicionar ácido linoleico (0.30 mL, 0.96 mmol). Agitar a mistura reacional durante 1 h à temperatura ambiente. Adicionar uma solução de (3*R*)-6,7-bis(hidroximetil)-3-(4-hidroxifenil)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol (**2.12**) (0.28 g, 0.96 mmol) e de DMAP (0.06 g, 0.48 mmol) em clorofórmio seco (60 mL). Agitar a mistura reacional à temperatura ambiente durante 24 h. Filtrar a mistura reacional e lavar o filtrado com éter de petróleo. Secar com agente secante (Na₂SO₄), filtrar e evaporar o solvente. Purificação através de cromatografia em gel de sílica usando acetato de etilo:hexano (1:1) como eluente, seguida de filtração com éter etílico frio. Obtido como um óleo incolor. $[\alpha]_D^{25} = +175$ (*c* 0.2, CH₂Cl₂); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 0.89 (3H, t, *J* = 6.8), 1.25-1.43 (14H, m), 1.70-1.77 (2H, m), 1.86 (3H, s), 2.02-2.08 (4H, m), 2.54 (2H, t, *J* = 7.5), 2.77 (2H, t, *J* = 6.3), 4.07 (1H, d, *J* = 12.8), 4.28 (1H, d, *J* = 12.8), 4.48 (1H, d, *J* = 12.2), 4.53 (1H, d, *J* = 12.3), 4.58 (2H, s), 5.29-5.42 (4H, m), 6.22 (1H, d, *J* = 1.3), 7.02-7.07 (4H, m, Ar-H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 10.0, 14.0, 22.6, 24.9, 25.6, 27.17, 27.20, 27.6, 29.0, 29.1, 29.1, 29.3, 29.6, 31.5, 34.4, 56.4, 56.8, 63.9, 113.6, 122.1, 123.0, 123.6, 126.9, 127.9, 128.1, 130.0, 130.0, 131.5, 138.9, 150.7, 172.0.

5.3.6 Hidrólise de 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol carboxilatos

Procedimento geral

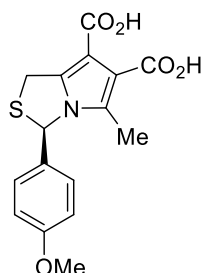
Os derivados ácido de 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol dicarboxilatos foram preparados com base num procedimento descrito na literatura.⁴³ A uma suspensão do 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxilato de dimetilo (3.05 mmol) em etanol (15 mL), num balão de fundo redondo, adicionar solução saturada de hidróxido de potássio (3.50 mL). Agitar a mistura reacional, à temperatura de 50 °C, durante 24 h. Evaporar o solvente, dissolver em água (20 mL) e lavar com diclorometano (3 x 20 mL). Acidificar a fase aquosa com uma solução 6 M de ácido clorídrico e extrair com acetato de etilo (3 x 60 mL). Secar com agente secante (Na₂SO₄), filtrar e evaporar o solvente.

Ácido (3*R*)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxílico (2.18a)



Obtido um sólido branco a partir do 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxilato de dimetilo **2.11a**. Rendimento: 90%. Ponto de fusão: 203-204 °C (filtrado com éter etílico frio); $[\alpha]_D^{25} = +190$ (*c* 0.5, MeOH); RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 2.11 (3H, s), 4.35 (1H, d, *J* = 15.8), 4.48 (1H, dd, *J* = 15.8 e 1.8), 6.57 (1H, d, *J* = 1.7), 6.98-7.00 (2H, m, Ar-H), 7.23-7.27 (3H, m, Ar-H); RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD): δ 13.0, 31.4, 65.9, 107.4, 115.4, 126.7, 130.0, 130.4, 137.8, 142.0, 145.6, 169.4, 169.9; IV (ATR) $\nu = 1594, 1457, 1222, 694$ cm⁻¹; EMAR (ESI) *m/z*: 326.0455, (calculado para C₁₅H₁₃O₄NNaS, [M+Na]⁺): 326.0458.

Ácido (3*R*)-3-(4-metoxifenil)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxílico (2.18b)



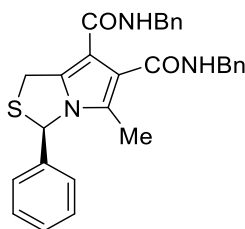
Obtido um sólido laranja pálido a partir do 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxilato de dimetilo **2.11d**. Rendimento: 57%. Ponto de fusão: 163-164 °C (filtrado com éter etílico frio); $[\alpha]_D^{25} = +210$ (*c* 0.5, MeOH); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 2.15 (3H, s), 3.75 (3H, s), 4.41 (1H, d, *J* = 15.8), 4.57 (1H, dd, *J* = 15.9 e 1.8), 6.83 (1H, d, *J* = 1.6), 6.93 (2H, d, *J* = 8.8, Ar-H), 7.08 (2H, d, *J* = 8.8, Ar-H); RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*6): δ 12.7, 30.6, 55.7, 63.8, 106.4, 114.7, 114.9, 127.6, 133.0, 135.5, 143.5, 159.8, 167.3; IV (ATR) $\nu = 1510, 1458, 1249, 1170, 695$ cm⁻¹; EMAR (ESI) *m/z*: 334.0740, (calculado para C₁₆H₁₆O₅NS, [M+H]⁺): 334.0744.

5.3.7 Amidação de 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol carboxilatos

Procedimento geral para a síntese de amidas secundárias

O procedimento utilizado para a obtenção de derivados benzilamida de 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol carboxilatos foi adaptado da literatura.⁴² A uma solução de 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxilato de dimetilo (1.96 mmol) em tolueno seco (16 mL) a 0 °C, num balão de fundo redondo de duas tubuladuras sob atmosfera inerte, adicionar benzilamina (0.51 mL, 4.71 mmol) e uma solução 1 M de LiHMDS em THF (11.7 mL, 11.7 mmol). Agitar a mistura reacional, à temperatura ambiente, durante 19 h. Adicionar uma solução aquosa de cloreto de amônio 1 M (23 mL) e extrair com acetato de etilo (3 x 30 mL). Combinar as fases orgânicas e lavar com uma solução aquosa de ácido clorídrico 2 M (2 x 30 mL), água (30 mL) e solução saturada de cloreto de sódio (30 mL). Secar com agente secante (Na₂SO₄), filtrar e evaporar o solvente. Purificar o composto por cromatografia em gel de sílica usando acetato de etilo:hexano (1:2) como eluente.

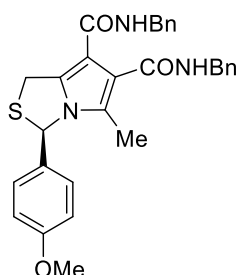
(3*R*)-*N*⁶,*N*⁷-dibenzil-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxamida (2.16a)



Obtido como um sólido amarelo pálido a partir de 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxilato de dimetilo **2.11a**. Rendimento: 53%. Ponto de fusão: 86-88 °C (recristalizado de acetato de etilo/hexano); $[\alpha]_D^{25} = +210$ (*c* 0.5, CH₂Cl₂); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 2.02 (3H, s), 4.47 (1H, d, *J* = 15.0), 4.54 (1H, d, *J* = 3.5), 4.56 (1H, d, *J* = 3.5), 4.57-4.66 (3H, m), 6.22 (1H, d, *J* = 1.8), 6.47 (1H, t, *J* = 5.8, NH), 7.01-7.04 (2H, m, Ar-H), 7.27-7.38 (13H, m, Ar-H), 9.15 (1H, t, *J* = 5.8, NH); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 12.3, 30.7, 43.3, 44.0, 64.7, 118.9, 125.6, 126.3, 127.0, 127.4, 127.9, 128.4, 129.4, 139.1, 140.3, 140.6, 164.6, 166.8; IV (ATR) $\nu = 3246, 1617, 1570, 1419, 1243, 695$ cm⁻¹; EMAR (ESI) *m/z*: 482.1891, (calculado para C₂₉H₂₈O₂N₃S, [M+H]⁺): 482.1897.

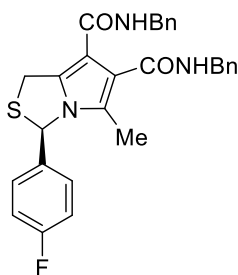
Alternativamente, o composto foi sintetizado a partir do ácido 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxílico **2.18a** segundo um procedimento descrito na literatura.⁵⁹ A uma solução de **2.18a** (0.40 g, 1.32 mmol) em diclorometano (5 mL) a 0 °C adicionar uma solução de DCC (0.55 g, 2.64 mmol) em diclorometano (2 mL). Agitar a mistura 30 minutos a 0 °C e de seguida adicionar lentamente benzilamina (0.29 mL, 2.64 mmol). Aquecer à temperatura ambiente e agitar durante 16 h. Filtrar o sólido e lavar com solução aquosa de ácido clorídrico 1 M e com água. Secar com agente secante (Na₂SO₄), filtrar e evaporar o solvente. Purificar o composto por cromatografia em gel de sílica usando acetato de etilo:hexano (1:2) como eluente. Rendimento: 38%.

(3*R*)-*N*⁶,*N*⁷-dibenzil-3-(4-metoxifenil)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxamida (2.16d)



Obtido como um sólido alaranjado a partir de 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxilato de dimetilo **2.11d**. Rendimento: 46%. Ponto de fusão: 70-72 °C (cristalização por evaporações sucessivas com éter de petróleo); $[\alpha]_D^{25} = +200$ (*c* 0.5, CH₂Cl₂); RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 2.01 (3H, s), 3.78 (3H, s), 4.44 (1H, d, *J* = 14.9), 4.54 (2H, pseudo-t), 4.56-4.64 (3H, m), 6.20 (1H, s), 6.49 (1H, s, NH), 6.83 (2H, d, *J* = 8.3, Ar-H), 6.98 (2H, d, *J* = 8.4, Ar-H), 7.27-7.36 (10H, m, Ar-H), 9.15 (1H, s, NH); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 12.8, 31.1, 43.7, 44.4, 55.8, 64.8, 110.6, 115.0, 119.3, 126.8, 127.4, 127.6, 128.0, 127.9, 128.2, 129.0, 129.2, 132.9, 138.4, 139.5, 140.6, 160.4, 165.1, 167.3; IV (ATR) $\nu = 3241, 1610, 1570, 1414, 1241, 694$ cm⁻¹; EMAR (ESI) *m/z*: 512.2000, (calculado para C₃₀H₃₀O₃N₃S, [M+H]⁺): 512.2002.

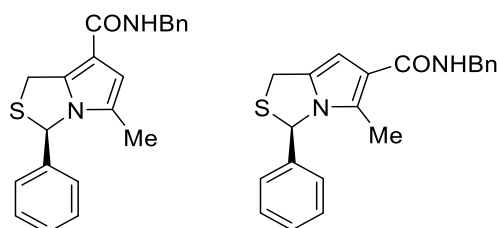
(3*R*)-*N*⁶,*N*⁷-dibenzil-3-(4-fluorofenil)-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxamida (2.16e)



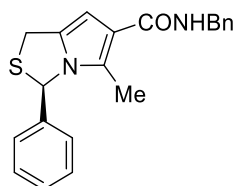
Obtido como um sólido alaranjado a partir de 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6,7-dicarboxilato de dimetilo **2.11e**. Rendimento: 26%. Ponto de fusão: 85-87 °C (cristalização por evaporações sucessivas com éter de petróleo); $[\alpha]_D^{25} = +160$ (*c* 0.5, CH₂Cl₂); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 2.00 (3H, s), 4.44 (1H, d, *J* = 15.0), 4.53-4.59 (5H, m), 6.20 (1H, d, *J* = 1.7), 6.58 (1H, t, *J* = 5.8, NH), 7.01-7.03 (4H, m), 7.26-7.36 (10H, m, Ar-H), 9.10

(1H, t, $J = 5.8$, NH); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 12.3, 30.6, 43.3, 44.0, 63.9, 110.4, 116.2 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 22.0$), 119.1, 126.3, 127.0, 127.5, 127.6 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 9.2$), 127.8, 128.5, 128.8, 136.5 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 3.1$), 137.9, 139.0, 140.0, 162.7 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 249$), 164.6, 166.7; RMN ^{19}F (376 MHz, CDCl_3): δ -112.2; IV (ATR) $\nu = 3243, 1573, 1505, 1414, 1223, 694 \text{ cm}^{-1}$; EMAR (ESI) m/z : 500.1791, (calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{O}_2\text{N}_3\text{FS}$, $[\text{M}+\text{H}]^+$): 500.1803.

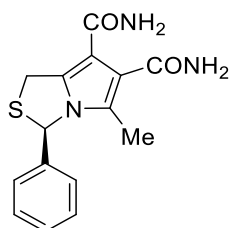
(3R)- N^7 -benzil-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-7-carboxamida (2.22) e (3R)- N^6 -benzil-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-6-carboxamida (2.23)



Preparados, de acordo com o **procedimento geral**, a partir da mistura regioisomérica purificada de (3R)-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-6-carboxilato de metilo (**2.21**) e (3R)-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-7-carboxilato de metilo (**2.20**). Foram utilizados 3 equivalentes de LiHMDS (16.9 mmol). Obtêm-se os produtos por ordem de eluição: (i) (3R)- N^7 -benzil-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-7-carboxamida (**2.22**) como sólido amarelo pálido após evaporação com éter de petróleo. Rendimento: 2%. Ponto de fusão: 48-50 °C; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 1.81 (3H, s), 4.44 (1H, d, $J = 14.6$), 4.58-4.62 (3H, m), 5.96 (1H, t, $J = 5.9$, NH), 6.06 (1H, s), 6.24 (1H, d, $J = 1.6$), 7.05-7.08 (2H, m, Ar-H), 7.28-7.35 (8H, m, Ar-H); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 12.1, 30.3, 43.3, 64.6, 108.4, 109.7, 125.4, 125.8, 127.4, 127.8, 128.7, 128.7, 129.1, 138.9, 139.1, 141.1, 164.5; EMAR (ESI) m/z : 349.1359, (calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{ON}_2\text{S}$, $[\text{M}+\text{H}]^+$): 349.1369. (ii) (3R)- N^6 -benzil-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-6-carboxamida (**2.23**) como sólido amarelo pálido após evaporação com éter de petróleo. Rendimento: 25%. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 2.22 (3H, s), 4.00 (1H, dd, $J = 13.1$ e 1.0), 4.26 (1H, d, $J = 13.1$), 4.57 (2H, d, $J = 5.7$), 5.96 (1H, s, NH), 6.03 (1H, s), 6.27 (1H, s), 7.01-7.03 (2H, m, Ar-H), 7.27-7.35 (8H, m, Ar-H); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 11.7, 28.3, 43.3, 64.1, 98.3, 119.5, 125.5, 127.3, 127.8, 128.6, 128.7, 129.1, 129.9, 133.1, 139.0, 141.1, 165.5; EMAR (ESI) m/z : 349,1360, (calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{ON}_2\text{S}$, $[\text{M}+\text{H}]^+$): 349,1369.

(3R)-N⁶-benzil-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-6-carboxamida (2.23)

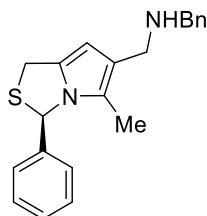
Preparado, de acordo com o procedimento geral, a partir do (3R)-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-7-carboxilato de metilo (**2.20**) puro. Foram utilizados 3 equivalentes de LiHMDS (2.42 mmol). Obtido como um sólido amarelo pálido após evaporação com éter de petróleo. Rendimento: 66%.

Procedimento para a síntese de uma amida primária**(3R)-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-6,7-dicarboxamida (2.15)**

A bis(amida) primária **2.15** foi preparada por adaptação de um procedimento descrito na literatura.⁵² Uma suspensão contendo (3R)-3-fenil-5-metil-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-6,7-dicarboxilato de dimetilo (**2.11a**) (0.32 g, 0.98 mmol), cianeto de sódio (0.05 g, 0.98 mmol) e uma solução de amoníaco 7 M em metanol (16 mL) foi colocada sob agitação em tubo selado à temperatura de 100 °C. Após 14 dias de reação, o sólido formado foi filtrado e lavado com diclorometano. Obtido um sólido bege. Rendimento: 38%. Ponto de fusão > 280 °C com decomposição; $[\alpha]_D^{25} = +170$ (c 0.5, DMSO); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.06 (3H, s), 4.34 (1H, d, *J* = 14.8), 4.53 (1H, d, *J* = 14.8), 6.72 (1H, s), 7.11 (2H, d, *J* = 7.4), 7.18 (1H, s, NH), 7.30 (1H, s, NH), 7.32-7.39 (3H, m, Ar-H), 8.10 (1H, s, NH), 8.33 (1H, s, NH); RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.3, 30.0, 63.2, 110.2, 119.0, 126.0, 128.4, 128.8, 129.5, 138.6, 142.0, 166.9, 168.2; IV (ATR) $\nu = 3312, 3159, 1577, 1441, 1404, 694 \text{ cm}^{-1}$; EMAR (ESI) *m/z*: 324.0770, (calculado para C₁₅H₁₅O₂N₃NaS, [M+Na]⁺): 324.0777.

5.3.8 Redução de 1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-carboxamida secundária

(3*R*)-6-(*N*-benzil-aminometil)-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol (2.25)



O derivado mono-aminometilo **2.25** protegido com o grupo benzilo foi preparado por adaptação de um procedimento descrito na literatura.⁴⁴ Uma solução de (3*R*)-*N*⁶-benzil-3-fenil-5-metil-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-6-carboxamida (**2.23**) (0.40 g, 1.13 mmol) em diclorometano (10 mL) foi agitada a 0 °C durante 15 minutos, num balão de fundo redondo de duas tubuladuras sob atmosfera inerte. Após decorrido esse tempo, adicionar de cloreto de trimetilsilano (0.35 mL, 2.72 mmol) e agitar a mistura reacional a 0 °C durante mais 45 minutos. Seguidamente, adicionar de uma solução de hidreto de alumínio e lítio em THF 2.4 M (1.35 mL, 3.18 mmol) a –10 °C. Agitar a mistura reacional à temperatura ambiente durante 4 h. Arrefecer a mistura reacional a 0 °C e adicionar, gota a gota, água (0.22 mL), solução aquosa de hidróxido de sódio 2 M (0.22 mL) e novamente água (0.65 mL). Agitar durante 30 minutos. Extrair a fase aquosa com diclorometano. Juntar os extratos orgânicos e lavar com solução saturada de cloreto de sódio. Secar com agente secante (Na₂SO₄), filtrar e evaporar o solvente. Obtido um óleo alaranjado após cromatografia em gel de sílica usando acetato de etilo como eluente. Rendimento: 33%. $[\alpha]_D^{25} = +240$ (*c* 0.25, CH₂Cl₂); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 1.78 (3H, s), 1.98 (1H, s, NH), 3.56 (2H, s), 3.80 (2H, s), 4.03 (1H, d, *J* = 12.7), 4.28 (1H, d, *J* = 12.8), 5.89 (1H, s), 6.20 (1H, s), 6.99-7.02 (2H, m, Ar-H), 7.20-7.34 (8H, m, Ar-H); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 10.0, 28.8, 44.6, 52.4, 64.3, 100.4, 122.4, 122.7, 125.6, 127.1, 128.3, 128.37, 128.40, 128.9, 132.9, 139.4, 142.2; IV (ATR) $\nu = 3025, 1492, 1452, 1330, 695 \text{ cm}^{-1}$.

REFERÊNCIAS

- (1) Fernandes, A. C.; Herold, B.; Maia, H.; Rauter, A. P.; Rodrigues, J. A. R. *Guia IUPAC para a nomenclatura de compostos orgânicos*; LIDEL: Lisboa, 2002.
- (2) McNaught, A. D.; Smith, P. A. S. Nomenclature of Heterocyclic Compounds. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*; Ed. Otto Meth-Cohn; Pergamon Press: Oxford, 1984; Vol. 1, pp 7–45.
- (3) Fisher, R.; Pusztai, L.; Swanton, C. Cancer Heterogeneity: Implications for Targeted Therapeutics. *Br. J. Cancer* **2013**, *108* (3), 479–485. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.581>.
- (4) Hassanpour, S. H.; Dehghani, M. Review of Cancer from Perspective of Molecular. *J. Cancer Res. Pract.* **2017**, *4* (4), 127–129. <https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.07.001>.
- (5) Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *71* (3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- (6) Rawla, P.; Sunkara, T.; Barsouk, A. Epidemiology of Colorectal Cancer: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Gastroenterol. Rev.* **2019**, *14* (2), 89–103. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>.
- (7) Dekker, E.; Tanis, P. J.; Vleugels, J. L. A.; Kasi, P. M.; Wallace, M. B. Colorectal Cancer. *The Lancet* **2019**, *394* (10207), 1467–1480. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32319-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0).
- (8) Li, X.-L.; Zhou, J.; Chen, Z.-R.; Chng, W.-J. p53 Mutations in Colorectal Cancer- Molecular Pathogenesis and Pharmacological Reactivation. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21* (1), 84. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i1.84>.
- (9) Li, Y.; Wang, Z.; Chen, Y.; Petersen, R. B.; Zheng, L.; Huang, K. Salvation of the Fallen Angel: Reactivating Mutant p53. *Br. J. Pharmacol.* **2019**, *176* (7), 817–831. <https://doi.org/10.1111/bph.14572>.
- (10) Duffy, M. J.; Synnott, N. C.; O’Grady, S.; Crown, J. Targeting p53 for the Treatment of Cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2022**, *79*, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.07.005>.
- (11) Kekelidze, M.; D’Errico, L.; Pansini, M.; Tyndall, A.; Hohmann, J. Colorectal Cancer: Current Imaging Methods and Future Perspectives for the Diagnosis, Staging and Therapeutic Response Evaluation. *World J. Gastroenterol.* **2013**, *19* (46), 8502. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i46.8502>.
- (12) Van Cutsem, E.; Cervantes, A.; Adam, R.; Sobrero, A.; Van Krieken, J. H.; Aderka, D.; Aranda Aguilar, E.; Bardelli, A.; Benson, A.; Bodoky, G.; Ciardiello, F.; D’Hoore, A.; Diaz-Rubio, E.; Douillard, J.-Y.; Ducreux, M.; Falcone, A.; Grothey, A.; Gruenberger, T.; Haustermans, K.; Heinemann, V.; Hoff, P.; Köhne, C.-H.; Labianca, R.; Laurent-

- Puig, P.; Ma, B.; Maughan, T.; Muro, K.; Normanno, N.; Österlund, P.; Oyen, W. J. G.; Papamichael, D.; Pentheroudakis, G.; Pfeiffer, P.; Price, T. J.; Punt, C.; Ricke, J.; Roth, A.; Salazar, R.; Scheithauer, W.; Schmoll, H. J.; Tabernero, J.; Taïeb, J.; Tejpar, S.; Wasan, H.; Yoshino, T.; Zaanan, A.; Arnold, D. ESMO Consensus Guidelines for the Management of Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Ann. Oncol.* **2016**, *27* (8), 1386–1422. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw235>.
- (13) Gomes, A. S.; Ramos, H.; Inga, A.; Sousa, E.; Saraiva, L. Structural and Drug Targeting Insights on Mutant p53. *Cancers* **2021**, *13* (13), 3344. <https://doi.org/10.3390/cancers13133344>.
- (14) Kocik, J.; Machula, M.; Wisniewska, A.; Surmiak, E.; Holak, T. A.; Skalniak, L. Helping the Released Guardian: Drug Combinations for Supporting the Anticancer Activity of HDM2 (MDM2) Antagonists. *Cancers* **2019**, *11* (7), 1014. <https://doi.org/10.3390/cancers11071014>.
- (15) Lu, T.; Zou, Y.; Xu, G.; Potter, J. A.; Taylor, G. L.; Duan, Q.; Yang, Q.; Xiong, H.; Qiu, H.; Ye, D.; Zhang, P.; Yu, S.; Yuan, X.; Zhu, F.; Wang, Y.; Xiong, H. PRIMA-1Met Suppresses Colorectal Cancer Independent of p53 by Targeting MEK. *Oncotarget* **2016**, *7* (50), 83017–83030. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12940>.
- (16) Salim, K. Y.; Maleki Vareki, S.; Danter, W. R.; San-Marina, S.; Koropatnick, J. COTI-2, a Novel Small Molecule That Is Active against Multiple Human Cancer Cell Lines *in Vitro* and *in Vivo*. *Oncotarget* **2016**, *7* (27), 41363–41379. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9133>.
- (17) Saraiva, L.; Soares, J. O. G.; Pinho e Melo, T. M. V. D.; Soares, M. I. L.; Rocha, H. I. N. R. (3S)- And (3R)-6,7-Bis(Hydroxymethyl)-1*H*,3*H*-Pyrrolo[1,2-*c*]Thiazoles as p53 Activators. WO 2019/243906 A1.
- (18) 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.; Inga, A.; Pinho e Melo, T. M. V. D.; Saraiva, L. Selective p53 Activator and Anticancer Agent to Improve Colorectal Cancer Therapy. *Cell Rep.* **2021**, *35* (2), 108982. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108982>.
- (19) Jampilek, J. Heterocycles in Medicinal Chemistry. *Molecules* **2019**, *24* (21), 3839. <https://doi.org/10.3390/molecules24213839>.
- (20) Bhardwaj, V.; Gumber, D.; Abbot, V.; Dhiman, S.; Sharma, P. Pyrrole: A Resourceful Small Molecule in Key Medicinal Hetero-Aromatics. *RSC Adv.* **2015**, *5* (20), 15233–15266. <https://doi.org/10.1039/C4RA15710A>.
- (21) Ali, S. H.; Sayed, A. R. Review of the Synthesis and Biological Activity of Thiazoles. *Synth. Commun.* **2021**, *51* (5), 670–700. <https://doi.org/10.1080/00397911.2020.1854787>.
- (22) Molloy, B. B. Studies in the Chemistry of Pyrrolo[2,1-*b*]Thiazole. University of St Andrews, **1963**. <http://hdl.handle.net/10023/14991>.
- (23) Kane, J. M. Pyrrolo[1,2-*c*]Thiazole, a Ring-Fused Nonclassical Thiazole System. *J. Org. Chem.* **1980**, *45* (26), 5396–5397. <https://doi.org/10.1021/jo01314a046>.
- (24) H. Brooks, W.; C. Guida, W.; G. Daniel, K. The Significance of Chirality in Drug Design and Development. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11* (7), 760–770. <https://doi.org/10.2174/156802611795165098>.
- (25) Anderson, W. K.; Mach, R. H. 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.* **1987**, *30* (11), 2109–2115. <https://doi.org/10.1021/jm00394a030>.
- (26) Gyorgydeák, Z.; Szilágyi, L.; Kajtár, J.; Argay, G.; Kálmán, A. Heterocyclische Verbindungen aus Zuckern, XV: Zur Konfiguration chiraler C-2-substituierter 4-Thiazolidincarbonsäuren. Chiralitätstransfer auf C-3 in 3,4-Dihydro-1*H*-pyrrolo[1,2-*c*]thiazolen. *Monatshefte Chem. Chem. Mon.* **1994**, *125* (2), 189–208. <https://doi.org/10.1007/BF00818164>.
- (27) Pinho e Melo, T. M. V. D.; Soares, M. I. L.; Barbosa, D. M.; Rocha Gonsalves, A. M. d'A.; Beja, A. M.; Paixão, J. A.; Silva, M. R.; Alte Da Veiga, L. Intermolecular Dipolar Cycloaddition Reactions of 5*H*,7*H*-Thiazolo[3,4-*c*]Oxazol-4-ylm-1-Olates. *Tetrahedron* **2000**, *56* (21), 3419–3424. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(00\)00243-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(00)00243-X).
- (28) Szilagy, L.; Gyorgydeak, Z. 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.* **1979**, *101* (2), 427–432. <https://doi.org/10.1021/ja00496a026>.
- (29) 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.; Paixão, J. A.; Silva, M. R.; Alte Da Veiga, L. Intramolecular Dipolar Cycloaddition Reaction of 5*H*,7*H*-Thiazolo[3,4-*c*]Oxazol-4-ylm-1-Olates: Synthesis of Chiral 1*H*-Pyrrolo[1,2-*c*]Thiazole Derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1999**, No. 9, 1219. <https://doi.org/10.1039/a807678b>.
- (30) Pinho e Melo, T. M. V. D.; Soares, M. I. L.; Rocha Gonsalves, A. M. d'A.; Paixão, J. A.; Beja, A. M.; Silva, M. R.; Alte Da Veiga, L.; Pessoa, J. C. 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.* **2002**, *67* (12), 4045–4054. <https://doi.org/10.1021/jo010807p>.
- (31) 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. Chiral 6-Hydroxymethyl-1*H*,3*H*-Pyrrolo[1,2-*c*]Thiazoles: Novel Antitumor DNA Monoalkylating Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (10), 4676–4681. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.07.029>.
- (32) Soares, M. I. L.; Brito, A. F.; Laranjo, M.; Paixão, J. A.; Botelho, M. F.; Pinho e Melo, T. M. V. D. Chiral 6,7-Bis(Hydroxymethyl)-1*H*,3*H*-Pyrrolo[1,2-*c*]Thiazoles with Anti-Breast Cancer Properties. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *60*, 254–262. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.11.036>.
- (33) 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. Targeting Triple-Negative Breast Cancer Cells with 6,7-Bis(Hydroxymethyl)-1*H*,3*H*-Pyrrolo[1,2-*c*]Thiazoles. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *79*, 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.04.008>.
- (34) Hendrikx, M. M.; Ribeiro, J. L. P.; Soares, M. I. L.; Saraiva, L.; Pinho e Melo, T. M. V. D. Chiral 6,7-Bis(Hydroxymethyl)-1*H*,3*H*-Pyrrolo[1,2-*c*]Thiazoles as Novel p53-Activating Agents to Improve Colorectal Cancer Targeted Therapy.
- (35) Bastikar, V.; Bastikar, A.; Gupta, P. Quantitative Structure–Activity Relationship-Based Computational Approaches. In *Computational Approaches for Novel Therapeutic and Diagnostic Designing to Mitigate SARS-CoV-2 Infection*; Elsevier, **2022**; pp 191–205. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91172-6.00001-7>.

- (36) Gedeck, P.; Kramer, C.; Ertl, P. Computational Analysis of Structure–Activity Relationships. In *Progress in Medicinal Chemistry*; Elsevier, **2010**; Vol. 49, pp 113–160. [https://doi.org/10.1016/S0079-6468\(10\)49004-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6468(10)49004-9).
- (37) Patani, G. A.; LaVoie, E. J. Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. *Chem. Rev.* **1996**, *96* (8), 3147–3176. <https://doi.org/10.1021/cr950066q>.
- (38) Burger, A. Isosterism and Bioisosterism in Drug Design. In *Progress in Drug Research / Fortschritte der Arzneimittelforschung / Progrès des recherches pharmaceutiques*; Jucker, E., Ed.; Birkhäuser Basel: Basel, **1991**; pp 287–371. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7139-6_7.
- (39) Kuznetsova, L.; Chen, J.; Sun, L.; Wu, X.; Pepe, A.; Veith, J. M.; Pera, P.; Bernacki, R. J.; Ojima, I. Syntheses and Evaluation of Novel Fatty Acid-Second-Generation Taxoid Conjugates as Promising Anticancer Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16* (4), 974–977. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.10.089>.
- (40) Siddiqui, R. A.; Zerouga, M.; Wu, M.; Castillo, A.; Harvey, K.; Zaloga, G. P.; Stillwell, W. Anticancer Properties of Propofol-Docosahexaenoate and Propofol-Eicosapentaenoate on Breast Cancer Cells. *Breast Cancer Res.* **2005**, *7* (5), R645. <https://doi.org/10.1186/bcr1036>.
- (41) Slavchev, I.; Ward, Jas. S.; Rissanen, K.; Dobrikov, G. M.; Simeonov, S. Base-Promoted Direct Amidation of Esters: Beyond the Current Scope and Practical Applications. *RSC Adv.* **2022**, *12* (32), 20555–20562. <https://doi.org/10.1039/D2RA03524C>.
- (42) Li, G.; Ji, C.-L.; Hong, X.; Szostak, M. Highly Chemoselective, Transition-Metal-Free Transamidation of Unactivated Amides and Direct Amidation of Alkyl Esters by N–C/O–C Cleavage. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (28), 11161–11172. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b04136>.
- (43) Laranjo, M.; Pereira, N. A. M.; Oliveira, A. S. R.; Campos Aguiar, M.; Brites, G.; Nascimento, B. F. O.; Serambeque, B.; Costa, B. D. P.; Pina, J.; Seixas de Melo, J. S.; Pineiro, M.; Botelho, M. F.; Pinho e Melo, T. M. V. D. Ring-Fused Meso-Tetraarylchlorins as Auspicious PDT Sensitizers: Synthesis, Structural Characterization, Photophysics, and Biological Evaluation. *Front. Chem.* **2022**, *10*, 873245. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.873245>.
- (44) Ravinder, B.; Rajeswar Reddy, S.; Panasa Reddy, A.; Bandichhor, R. Amide Activation by TMSCl: Reduction of Amides to Amines by LiAlH₄ under Mild Conditions. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54* (36), 4908–4913. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.06.144>.
- (45) Brown, H. C.; Heim, P. Selective Reductions. XVIII. The Fast Reaction of Primary, Secondary, and Tertiary Amides with Diborane. A Simple, Convenient Procedure for the Conversion of Amides to the Corresponding Amines. *J. Org. Chem.* **1973**, *38* (5), 912–916. <https://doi.org/10.1021/jo00945a015>.
- (46) Bannister, R. M.; Brookes, M. H.; Evans, G. R.; Katz, R. B.; Tyrrell, N. D. A Scaleable Route to the Pure Enantiomers of Verapamil. *Org. Process Res. Dev.* **2000**, *4* (6), 467–472. <https://doi.org/10.1021/op000059q>.
- (47) Prasad, A. S. B.; Kanth, J. V. B.; Periasamy, M. Convenient Methods for the Reduction of Amides, Nitriles, Carboxylic Esters, Acids and Hydroboration of Alkenes Using NaBH₄/I₂ System. *Tetrahedron* **1992**, *48* (22), 4623–4628. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)81236-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)81236-9).

- (48) Zhou, S.; Junge, K.; Addis, D.; Das, S.; Beller, M. A Convenient and General Iron-Catalyzed Reduction of Amides to Amines. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (50), 9507–9510. <https://doi.org/10.1002/anie.200904677>.
- (49) Li, Y.; Molina de La Torre, J. A.; Grabow, K.; Bentrup, U.; Junge, K.; Zhou, S.; Brückner, A.; Beller, M. Selective Reduction of Amides to Amines by Boronic Acid Catalyzed Hydrosilylation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (44), 11577–11580. <https://doi.org/10.1002/anie.201304495>.
- (50) Raucher, S.; Klein, P. A Convenient Method for the Selective Reduction of Amides to Amines. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21* (42), 4061–4064. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(80\)88066-X](https://doi.org/10.1016/0040-4039(80)88066-X).
- (51) Lenthall, J. T.; Foster, J. A.; Anderson, K. M.; Probert, M. R.; Howard, J. A. K.; Steed, J. W. Hydrogen Bonding Interactions with the Thiocarbonyl π -System. *CrystEngComm* **2011**, *13* (9), 3202. <https://doi.org/10.1039/c0ce00680g>.
- (52) Hoegberg, T.; Stroem, P.; Ebner, M.; Raemsby, S. Cyanide as an Efficient and Mild Catalyst in the Aminolysis of Esters. *J. Org. Chem.* **1987**, *52* (10), 2033–2036. <https://doi.org/10.1021/jo00386a025>.
- (53) Pathak, V. P. Selective Formation of Pyrrolo[3,2-*d*]Pyrimidines from Methyl[(*N*-Benzoyl-*S*-Methylisothiocarbamoyl)Amino]-1*H*-Pyrrole-2-Carboxylate. *Org. Process Res. Dev.* **2000**, *4* (2), 129–130. <https://doi.org/10.1021/op9901902>.
- (54) Lopes, S. M. M.; Palacios, F.; Lemos, A.; Pinho e Melo, T. M. V. D. Diels–Alder Reactions of 3-(1*H*-Tetrazol-5-yl)-Nitrosoalkenes: Synthesis of Functionalized 5-(Substituted)-1*H*-Tetrazoles. *Tetrahedron* **2011**, *67* (46), 8902–8909. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.09.051>.
- (55) Orellana, E.; Kasinski, A. Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. *BIO-Protoc.* **2016**, *6* (21). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1984>.
- (56) Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82* (13), 1107–1112. <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107>.
- (57) Gilchrist, T. L.; Rocha Gonsalves, A. M. d’A.; Pinho e Melo, T. M. V. D. Diels–Alder Reactions of 2-Azadienes Derived from Cysteine and Serine Methyl Esters and Aldehydes. *Tetrahedron* **1994**, *50* (48), 13709–13724. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)85683-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)85683-0).
- (58) Yang, S.; Wang, T.; Zhou, Y.; Shi, L.; Lu, A.; Wang, Z. Discovery of Cysteine and Its Derivatives as Novel Antiviral and Antifungal Agents. *Molecules* **2021**, *26* (2), 383. <https://doi.org/10.3390/molecules26020383>.
- (59) Asami, M. Asymmetric Transformation of Symmetrical Epoxides to Allylic Alcohols by Lithium (*S*)-2-(*N,N*-Disubstituted Aminomethyl)Pyrrolidide. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1990**, *63* (3), 721–727. <https://doi.org/10.1246/bcsj.63.721>.