

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Síntese de uma biblioteca de derivados de indole com
potencial actividade antioxidante e
inibição selectiva da COX-2**

Mónica Alexandra Silva Estevão

Dissertação apresentada na Faculdade de
Ciência e Tecnologia da Universidade Nova
de Lisboa para a obtenção do grau de
Mestre em Bioorgânica, especialidade em
Química Fina.

Orientador Científico: Doutora Maria Manuel Marques

Co-orientador Científico: Doutora Luísa Ferreira

Lisboa

2008

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar à minha orientadora, Doutora Maria Manuel Marques, pelo apoio e orientação científica, pela disponibilidade, pela motivação e pelo entusiasmo constantes ao longo da realização deste trabalho. Gostaria de agradecer, também, à minha co-orientadora, Doutora Luísa Ferreira, pela orientação e apoio dados ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À Doutora Eduarda Fernandes e à Mestre Ana Gomes, por todo o apoio, orientação e disponibilidade prestados aquando a realização do trabalho na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Um agradecimento especial ao Professor Doutor José Luís F. Costa Lima por ter financiado a minha estadia no Porto e, ainda, pela sua amabilidade e simpatia.

À Dra. Maria do Rosário Caras Altas pela sua simpatia e paciência pelas minhas incursões constantes ao laboratório de ressonância magnética nuclear.

À D. Margarida Patrício e D. Fernanda Alves pelo apoio no trabalho de laboratório.

A todos os meus colegas que fazem ou fizeram parte da família do laboratório 202, pela simpatia e pela ajuda e apoio nos bons e maus momentos da “química”.

Ao Matos e ao Rosa pelo perfeccionismo e discussões inteligentes. Ao Rui por todos os dias me lembrar as minhas obrigações. E, a todos os meus amigos, um agradecimento muito especial por serem quem são e permitirem que eu seja quem sou.

A toda a minha família, em especial à minha mãe por sempre me apoiar.

Ao Dimitri.

Ao Artur, Nina e Zeca por serem absolutamente fantásticos.

Gostaria de agradecer à Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo apoio financeiro PTDC/QUI/65187/2006.

RESUMO

Os compostos indólicos constituem uma extensa e larga família de compostos presentes em bactérias, plantas e animais, sendo alvo de especial interesse nas áreas tanto da química biológica como na da química medicinal. O triptofano, aminoácido essencial para o Homem, constitui um importante exemplo de derivados de indole. Outros exemplos, derivados desta importante estrutura, são o ácido indole-3-acético (hormona presente nas plantas) e a melatonina (hormona segregada pela glândula pineal). Uma importante característica dos compostos derivados do indole é que estes podem ser úteis como fármacos usados no tratamento da inflamação (por exemplo, indometacina, acetaminofeno, etodolac), assim como no tratamento de doenças associadas ao stress oxidativo, como o cancro e doenças neurodegenerativas.

Com o intuito de estudar a relação estrutura-actividade sintetizou-se uma biblioteca de derivados de indole e, posteriormente, avaliou-se a actividade antioxidante dos compostos preparados usando como espécie reactiva de oxigénio o radical peróxido.

Todos os compostos testados, à excepção de um, revelaram actividade. Os resultados obtidos contribuirão para o *design* racional de futuras gerações de bibliotecas.

Foram, ainda, desenvolvidos estudos sintéticos para a preparação de um potencial inibidor selectivo da COX-2.

ABSTRACT

Natural products incorporating an indole moiety are part of a broad chemical family found in microorganisms, plants and animals. This type of compounds is mainly related with the tryptophan metabolism, and exhibits structure-dependent particularities. The most important members of the family are the plant hormone, indole-3-acetic acid, and the animal hormone, melatonin. An important characteristic of indole-containing compounds is that they may be useful as chemical preventive agents against inflammation (e.g. indomethacin, acemetacin, etodolac) and oxidative stress related diseases, like cancer and neurodegenerative diseases.

In order to study the structure-activity relationship an indole based library was synthesised and the antioxidant properties of the synthesized compounds was evaluated by studying their scavenging activity against the reactive oxygen species ROO^{\bullet} .

All except one of the tested compounds demonstrated activity against ROO^{\bullet} . The obtained results will contribute to the rational design of future library generations.

Synthetic studies were developed towards the synthesis of a potential selective COX-2 inhibitor.

ABREVIATURAS

ν	Frequência
$[M]^+$	Íon molecular
^{13}C -RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono
^1H -RMN	Ressonância magnética nuclear de protão
4-DMAP	4-dimetilaminopiridina
AAPH	2,2'-Azobis(2-metilpropionamida)
Ac	Acetilo
AINE	Anti-inflamatório não esteróide
AOX	Antioxidante
Ar	Aromático
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
c	Concentração
c.c.	Cromatografia em coluna
c.c.f.	Cromatografia em camada fina
c.c.p.	Cromatografia em camada preparativa
CAT	Catalase
COX	Ciclooxigenase
d	Dupleto
DCC	<i>N,N</i> -diciclo-hexilcarbodiimida
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E.M.	Espectrometria de massa
E.M.A.R.	Espectrometria de massa de alta resolução
E^+	Electrófilo
ERA	Espécies reactivas de azoto
ERO	Espécies reactivas de oxigénio
Et	Etilo

F	Forte
f	fraca
Fl	Forte larga
Ftal	Ftalimida
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa reduzida
h	Hora
I.E.	Impacto electrónico
<i>i</i> -Pr	<i>iso</i> -propilo
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LDA	Sal de lítio da <i>N,N</i> -di-isopropilamina
Lit.	Literatura
M	Média
m	Multiplete
m/z	Relação carga/massa
máx	Máxima
Me	Metilo
MF	Muito forte
min	Minuto
ml	Média larga
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NOS	Sintetase do óxido nítrico
Nu	Nucleófilo
ORAC	Capacidade de absorção de radicais oxigénio
p.f.	Ponto de fusão
Ph	Fenilo
ppm	Partes por milhão
rfx	Refluxo
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	Singuleto

SOD	Superóxido dismutase
t	Tripleto
ta	Temperatura ambiente
^t Bu	<i>terc</i> -butilo
THF	Tetra-hidrofurano
UV	Ultravioleta
δ	Desvio químico

ÍNDICE DE MATÉRIAS

Capítulo I – Introdução	12
I.1 – A actividade antioxidante	13
I.1.1 – ERO, ERA e stress oxidativo/nitrosativo	13
I.1.2 – Fontes endógenas de ERO e ERA	15
I.1.3 – Espécies reactivas de oxigénio/azoto	16
I.1.4 – Antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos	18
I.1.5 – Patologias associadas ao stress oxidativo	19
I.2 – A actividade anti-inflamatória	20
I.2.1 – Ciclooxygenase	20
I.2.2 – Fármacos AINEs e inibidores selectivos	22
I.3 – Núcleo indólico em sistemas biológicos	24
Capítulo II – Discussão de Resultados	27
II.1 – Antioxidantes	28
II.1.1 – Síntese e preparação de uma biblioteca de derivados de indole para a descoberta de novos fármacos antioxidantes	28
II.1.1.1 – Derivados da triptamina	30
II.1.1.2 – Derivados do L-triptofano	34
II.1.1.2.1 – Derivados do <i>N</i> -ftaloil-L-triptofano metil éster	34
II.1.1.2.2 – Derivados do <i>N</i> -acetil-L-triptofano metil éster	38
II.1.2 – Estudos de capacidade de absorção do radical peroxilo	41
II.2 – Estudos sintéticos para a preparação de um potencial candidato a fármaco AINE inibidor selectivo da COX-2	46
II.2.1 – Arilação do grupo amina	47
II.2.2 – Estudos de introdução do grupo mesilo na posição 5 do anel indólico	50
II.3 – Conclusões	56
Capítulo III – Descrição Experimental	58
III.1 – Preâmbulo	59
III.2 – Sínteses prévias	61
III.2.1 – Síntese do propanoato de metilo 2-acetamido-3-(1-(metilsulfonyl)-1 <i>H</i> -indol-3-yl)	61
III.2.2 – Síntese do <i>N</i> -Boc-5-bromoindole	62

III.3 – Antioxidantes	63
III.3.1 – Derivados da triptamina.....	63
III.3.1.1 – Síntese de <i>N</i> -ftaloiltriptamina	63
III.3.1.2 – Síntese de <i>N</i> -ftaloil-1-(3'-metil-2'-butenil)triptamina	64
III.3.1.3 – Síntese de 1-(3'-metil-2'-butenil)triptamina	65
III.3.2 – Derivados do L-triptofano	66
III.3.2.1 – Síntese de <i>N</i> -ftaloiltriptofano metil éster	66
III.3.2.2 – Síntese de <i>N</i> -ftaloil-1-(3'-metil-2'-butenil)triptofano metil éster ..	67
III.3.2.3 – Síntese de <i>N</i> -ftaloil-2-(3'-metil-2'-butenil)triptofano metil éster ..	68
III.3.2.4 – Síntese de <i>N</i> -acetil-L-triptofano metil éster	68
III.3.2.5 – Síntese de <i>N</i> -acetil-1-(3'-metil-2'-butenil)triptofano metil éster...	69
III.3.2.6 – Síntese de <i>N</i> -acetil-1-(3'-fenil-2'-butenil)triptofano metil éster....	70
III.4 – Estudos da capacidade de absorção do radical peróxido (ORAC)	71
III.5 – Estudos sintéticos para a preparação de um potencial candidato a inibidor da COX-2	72
III.5.1 – Estudos de <i>N</i> -arilação.....	72
III.5.1.1 – A partir do L-triptofano metil éster	72
III.5.1.2 – A partir do L-triptofano	73
III.5.2 – Reacção de <i>O</i> -metilação.....	74
III.5.3 – Estudos de introdução do grupo mesilo na posição 5 do anel indólico	75
III.5.3.1 – Reacção com tricloreto de alumínio.....	75
III.5.3.2 – Reacção com irradiação de UV	75
III.5.3.3 – Reacção a partir do 5-bromoindole.....	76
III.5.3.4 – Reacção a partir do <i>N</i> -Boc-5-bromoindole.....	77
Capítulo IV – Bibliografia	78

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – STRESS OXIDATIVO/NITROSATIVO RESULTANTE DO DESEQUILÍBRIO ENTRE OS NÍVEIS DE ANTIOXIDANTES (AOX) E AS ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO (ERO) E/OU AZOTO (ERA) (ADOPTADO DE SCANDALIOS, 2005).....	14
FIGURA 2 – FONTES E RESPOSTAS CELULARES ÀS ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO (ERO) (ADAPTADO DE FINKEL, 2000).....	15
FIGURA 3 – FONTES ENDÓGENAS DE ERO/ERA (ADAPTADO DE OXFORD BIOMEDICAL RESEACH: NEWS & VIEWS, 2007).....	16
FIGURA 4 – PRODUÇÃO E ACÇÕES DAS PROSTAGLANDINAS E TROMBOXANO (ADAPTADO DE FITZGERALD, 2001).....	20
FIGURA 5 – ESTRUTURA DO CENTRO ACTIVO DAS ISOFORMAS COX-1 E COX-2 (ADAPTADO DE BLOBAUM, 2007).....	21
FIGURA 6 – EXEMPLOS DE INIBIDORES: NÃO SELECTIVOS (INDOMETACINA, ACETMETACINA, TOLMETINA, KETOROLAC); SELECTIVOS DA COX-1 (OXAPROZINA, ASPIRINA); E, SELECTIVOS DA COX-2 (ETODOLAC, CELECOXIB, ROFECOXIB, VALDECOXIB).....	23
FIGURA 7 – ESTRUTURA DO INDOLE.....	24
FIGURA 8 – EXEMPLOS DE ESTRUTURAS INDÓLICAS PRESENTES EM SERES VIVOS.....	24
FIGURA 9 – ALGUNS DERIVADOS DE INDOLE QUE APRESENTAM ACTIVIDADE NO TRATAMENTO DE DOENÇAS NEUROLÓGICAS.....	25
FIGURA 10 – ALGUNS DERIVADOS DE INDOLE QUE APRESENTAM CAPACIDADE CAPTADORA DE RADICAIS.....	25
FIGURA 11 – EXEMPLOS DE FÁRMACOS AINÉS QUE TÊM NA SUA ESTRUTURA A UNIDADE INDÓLICA.....	26
FIGURA 12 – NÚCLEO DE INDOLE COM AS DIFERENTES POSIÇÕES DE SUBSTITUIÇÃO.....	28
FIGURA 13 – ESTRUTURAS DAS TRIPROSTATINAS A E B.....	29
FIGURA 14 – FAMÍLIA DE COMPOSTOS PREPARADOS DERIVADOS DA TRIPTAMINA.....	30
FIGURA 15 – FAMÍLIA DE COMPOSTOS PREPARADOS DERIVADOS DO L-TRIPTOFANO.....	34
FIGURA 16 – DIFERENTES MÉTODOS DESCRITOS NA LITERATURA PARA A REACÇÃO DE REARRANJO DA CADEIA 3,3-DIMETILALÍLICA.....	36
FIGURA 17 – DERIVADOS DA TRIPTAMINA E DO TRIPTOFANO TESTADOS PARA A AVALIAR A SUA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE NA CAPTAÇÃO DO RADICAL PEROXILO.....	41
FIGURA 18 – ESTRUTURAS DO AAPH (29), DA FLUORESCÉINA (30) E DO TROLOX (31).....	43
FIGURA 19 – CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO DO ROO [•] DA BIBLIOTECA DE DERIVADOS DE INDOLE.....	44
FIGURA 20 – ESTRUTURA DO POTENCIAL CANDIDATO A INIBIDOR SELECTIVO DA COX-2.....	46
FIGURA 21 – ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS PREPARADOS MAIS E MENOS ACTIVO, 18 E 19, RESPECTIVAMENTE.....	56
FIGURA 22 – ESTRUTURA DO POTENCIAL CANDIDATO A INIBIDOR SELECTIVO DA COX-2.....	72

ÍNDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1 – PLANO SINTÉTICO UTILIZADO PARA A PREPARAÇÃO DOS DERIVADOS DA TRIPTAMINA (18, 19 E 20).....	31
ESQUEMA 2 – MECANISMO PROPOSTO PARA A FORMAÇÃO DO COMPOSTO 22 A PARTIR DE 21.	32
ESQUEMA 3 – MECANISMO PROPOSTO PARA A FORMAÇÃO DE 20 A PARTIR DE 19.	33
ESQUEMA 4 – ESTRATÉGIA SINTÉTICA UTILIZADA PARA A PREPARAÇÃO DOS DERIVADOS DO <i>N</i> -FTALOILTRIPTOFANO METIL ÉSTER (23, 24, E 25).....	35
ESQUEMA 5 – MECANISMO PROPOSTO PARA A FORMAÇÃO DE 24 A PARTIR DE 25.	38
ESQUEMA 6 – ESTRATÉGIA SINTÉTICA UTILIZADA PARA A PREPARAÇÃO DOS DERIVADOS DO <i>N</i> -ACETIL-L-TRIPTOFANO METIL ÉSTER (26, 27 E 28).	39
ESQUEMA 7 – MECANISMO PROPOSTO PARA A FORMAÇÃO DO RADICAL PEROXILO.	42
ESQUEMA 8 – PLANO RETROSSINTÉTICO DO COMPOSTO 29.	47
ESQUEMA 9 – HIPÓTESE MECANISMO PROPOSTA POR BUCHWALD E COLABORADORES, EM QUE L É O LIGANDO, X = I OU BR E NU CORRESPONDE AO NUCLEÓFILO.	48
ESQUEMA 10 – <i>N</i> -ARILAÇÃO DO L-TRIPTOFANO METIL ÉSTER.	48
ESQUEMA 11 – REACÇÃO DE <i>N</i> -ARILAÇÃO DO L-TRIPTOFANO.	49
ESQUEMA 12 – REACÇÃO DE <i>O</i> -METILAÇÃO DE 31.	49
ESQUEMA 13 – PRODUTOS OBTIDOS POR HONG E COLABORADORES NA REACÇÃO DE <i>N</i> -DESSULFONILAÇÃO.....	51
ESQUEMA 14 – FORMAÇÃO DE 32 A PARTIR DE 26.	52
ESQUEMA 15 – REACÇÃO DESCRITA POR MOYER E COLABORADORES.....	53
ESQUEMA 16 – PRODUTO MAIORITÁRIO DA REACÇÃO DO 5-BROMOINDOLE COM <i>TERC</i> -BUTIL LÍCIO.	53
ESQUEMA 17 – FORMAÇÃO DE 35 A PARTIR 33.	53
ESQUEMA 18 – FORMAÇÃO DE 36 A PARTIR DE 35.....	54
ESQUEMA 19 – PROPOSTA PARA UM NOVO PLANO SINTÉTICO.	55

Capítulo I – Introdução

I.1 – A actividade antioxidante

Em resposta à exposição a radicais livres, nomeadamente “espécies reactivas de oxigénio” (ERO) e “espécies reactivas de azoto” (ERA), os organismos desenvolveram uma série de mecanismos de defesa. Estas espécies reactivas podem ter origem em fontes endógenas (metabolismo celular) assim como exógenas (radiação ionizante).^{1,2}

Os efeitos nocivos provocados em sistemas biológicos pelos radicais livres denominam-se de “stress oxidativo” e “stress nitrosativo” e estão associados a diversas patologias humanas, como por exemplo o cancro.¹ Consequentemente, nas últimas duas décadas tem havido um interesse crescente, pela medicina clínica e experimental, no papel das ERO e ERA nos sistemas biológicos.²

I.1.1 – ERO, ERA e stress oxidativo/nitrosativo

Como referido, as ERO e ERA podem ter origem em fontes exógenas, sendo geradas como resultado da irradiação por luz UV, raios-X ou raios-gama; ou endógenas, por exemplo, como parte integrante do processo inflamatório e como produto secundário da cadeia de transporte electrónico (mitocôndria).^{1,2}

No entanto, nos sistemas biológicos, estas espécies desempenham, também, funções benéficas. Estes efeitos ocorrem em concentrações baixas/moderadas, como por exemplo, na defesa contra agentes infecciosos e no funcionamento de inúmeros sistemas de sinalização celular.^{1,2} Assim, os efeitos nocivos destas espécies, podem ser considerados como o resultado de um desequilíbrio no balanço que consiste numa produção excessiva da ERO e/ou ERA, por um lado, e na incapacidade de contrariar essa produção, por outro (figura 1). Nomeadamente, devido a uma deficiência de antioxidantes (enzimáticos ou não-enzimáticos).^{1,2} Este desequilíbrio provoca danos nos lípidos, proteínas e/ou DNA alterando o metabolismo celular. Devido a isto, o stress oxidativo tem sido implicado em diversas doenças humanas assim como no processo de envelhecimento.^{1,2}

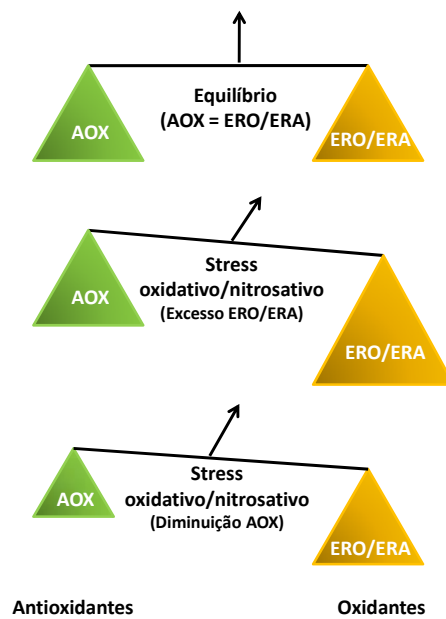


Figura 1 –Stress oxidativo/nitrosativo resultante do desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes (AOX) e as espécies reativas de oxigénio (ERO) e/ou azoto (ERA) (adoptado de Scandalios, 2005).³

O balanço delicado entre os efeitos benéficos e nocivos dos radicais livres é um aspecto crucial na regulação e desenvolvimento dos organismos vivos, sendo obtido por um mecanismo chamado de “regulação redox” (prooxidantes/antioxidantes). Este mecanismo protege os organismos vivos de variadas formas de stress oxidativo e mantém a “homeostasia redox” (figura 2).¹

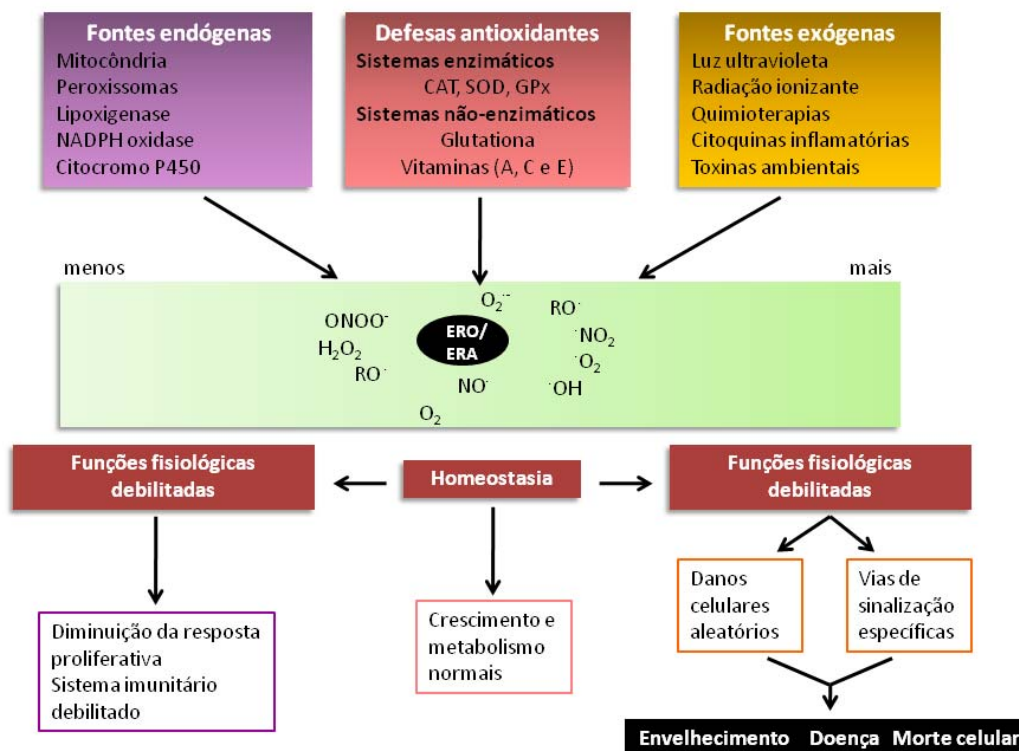


Figura 2 – Fontes e respostas celulares às espécies reativas de oxigênio e azoto (ERO/ERA) (adaptado de Finkel, 2000).⁴

I.1.2 – Fontes endógenas de ERO e ERA

Radicais livres podem ser definidos como moléculas ou fragmentos de moléculas que contêm um ou mais electrões desemparelhados nas orbitais moleculares ou atómicas. Este(s) electrão(ões) desemparelhado(s) conferem um grau considerável de reactividade ao radical livre. Os radicais derivados do oxigênio representam a classe mais importante de espécies radicalares gerados em sistemas vivos.^{1,2}

A cadeia de transporte electrónico mitocondrial é a principal fonte de ATP em células de mamíferos. As ERO resultam, maioritariamente, desta via metabólica através de uma redução prematura do oxigênio, que normalmente funciona como o aceitador final desta via (figura 3). Podem, também, resultar do metabolismo do citocromo P450, da activação celular inflamatória (neutrófilos, eosinófilos e macrófagos) e ainda de reacções enzimáticas tais como as obtidas através da

actividade da xantina oxidase (enzima altamente versátil, largamente distribuída entre espécies - da bactéria ao Homem).²

As ERA são geradas nos tecidos biológicos pela acção da enzima sintetase do óxido nítrico (NOS), que metabolizam a arginina a citrulina com a formação de NO[•].

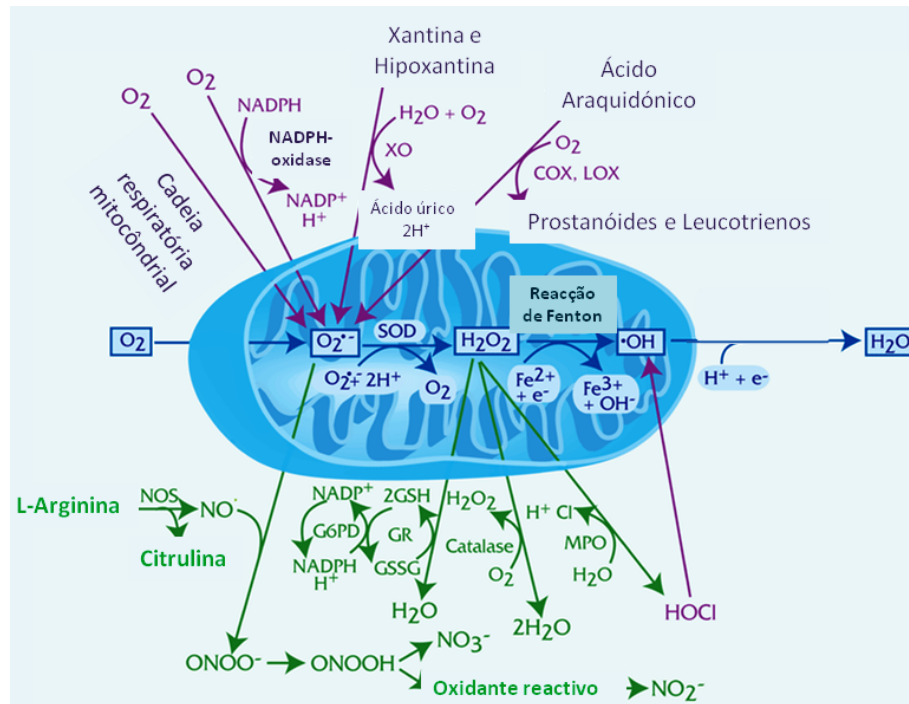


Figura 3 – Fontes endógenas de ERO/ERA (adaptado de Oxford Biomedical Research: News & Views, 2007).⁵

I.1.3 – Espécies reactivas de oxigénio/azoto

O oxigénio molecular tem duas configurações electrónicas, oxigénio triplete (estado de menor energia) e oxigénio singuleto (estado de maior energia). A adição de um electrão a formas dióxigenadas forma o radical anião superóxido (O₂^{•-}). O radical anião superóxido, originado através de processos metabólicos ou após “activação” do oxigénio por irradiação ionizante, é considerado a ERO “primária”, e pode posteriormente interagir com outras moléculas para gerar ERO “secundárias”, directamente (predominantemente) através de processos catalisados por enzimas ou metais. A produção deste radical anião ocorre principalmente no interior das mitocôndrias. O O₂^{•-} não reage directamente com polipéptidos, açúcares nem com ácidos nucleicos e a sua capacidade de peroxidar lípidos é controversa.^{1,2}

O radical hidroxilo, $\cdot\text{OH}$, é altamente reactivo com um tempo de meia-vida muito curto em meios aquosos. Deste modo, quando produzido *in vivo* o radical hidroxilo reage perto do seu local de formação, podendo ser gerado por inúmeros mecanismos: i) a radiação ionizante causa a decomposição de H_2O , resultando na formação de $\cdot\text{OH}$ e $\cdot\text{H}$; ii) por decomposição fotolítica de alquil-hidroperóxidos. A formação do radical hidroxilo *in vivo* deve-se maioritariamente à redução do peróxido de hidrogénio por um metal de transição, através da reacção de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$).^{1,2} O radical anião superóxido, também, pode desempenhar o papel do metal redutor, através da reacção de Haber-Weiss ($\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$).^{1,2} A produção de $\cdot\text{OH}$ perto do DNA pode levar à reacção deste radical com a estrutura do DNA provocando danos nas bases ou quebras nas cadeias.^{1,2}

Outras espécies reactivas derivadas do oxigénio, que podem ser formadas em sistemas vivos, são os radicais peróxilo ($\text{ROO}\cdot$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HOCl). O radical peróxilo mais simples é o $\text{HOO}\cdot$, que é o ácido conjugado do superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e é normalmente chamado de radical hidroperóxido ou radical per-hidroxilo. A química deste tipo de moléculas varia de acordo com a natureza do grupo R, do meio envolvente e da concentração de oxigénio.² A característica mais interessante neste radical é a diversidade de reacções biológicas em que participa, entre elas, a clivagem de DNA e modificações na estrutura das proteínas.^{1,2}

O óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) é uma pequena molécula que possui um electrão desemparelhado na orbital anti-ligante $2\pi_y^*$. Esta é uma espécie radicalar abundante, que possui um papel importante em vários processos de sinalização biológica (neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, mecanismos de defesa, relaxação dos músculos lisos e regulação imune).

O stress nitrosativo pode conduzir a reacções de nitrosilação que podem alterar a estrutura de proteínas ou inibir as suas funções normais.^{1,2}

No entanto, em sistemas biológicos a toxicidade da espécie $\text{NO}\cdot$ está predominantemente associada à facilidade de reagir com aniões superóxido. Por exemplo, o anião peroxinitrito (ONOO^-), resultante da reacção entre o $\text{O}_2^{\cdot-}$ e o $\text{NO}\cdot$, é um potente agente oxidante produzido durante o *burst* oxidativo iniciado pelo processo inflamatório nas células do sistema imunitário, que, devido ao seu elevado

potencial oxidativo, pode causar fragmentações no DNA, oxidação lipídica e provocar alterações em estruturas proteicas.^{1,2}

I.1.4 – Antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos

Uma definição ampla de antioxidante é “qualquer substância que, presente em concentrações reduzidas, quando comparada com as do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz”.⁶

De modo a manter a homeostasia redox existe um sistema de equilíbrio de defesa antioxidante que utiliza diversas estratégias, enzimáticas e não enzimáticas.⁶ Estes componentes fundamentais (antioxidantes) possuem determinadas características chave que medeiam a sua acção. Um bom antioxidante deve: eliminar, especificamente, radicais livres; quelar metais redox; interagir (regenerar) com outros antioxidantes dentro da “rede antioxidante”; ser absorvido facilmente; existir num nível de concentração fisiologicamente relevante em tecidos e biofluidos; funcionar tanto em meio aquoso como em domínios membranares.²

A capacidade de regenerar outros antioxidantes, repondo assim as suas funções originais, é um processo fundamental e designa-se “rede antioxidante”. Esta capacidade é definida pelos potenciais redox do par [Red/OX].²

Os antioxidantes enzimáticos mais eficientes são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx). Os não-enzimáticos mais relevantes englobam a Vitamina C (ácido ascórbico), a Vitamina E (α -tocoferol), carotenóides, tióis antioxidantes (glutathione (GSH), tioredoxina e ácido lipóico), flavonóides naturais, melatonina (produto hormonal da glândula pineal).

Como referido, uma importante característica dos antioxidantes é a sua capacidade de actuar em diversos meios. Por exemplo, a Vitamina C reage com o superóxido no meio aquoso enquanto que, a Vitamina E fá-lo em meio lipofílico. Já o ácido lipóico é tanto hidro- como lipossolúvel.²

I.1.5 – Patologias associadas ao stress oxidativo

O stress oxidativo tem sido associado a várias condições patológicas incluído doenças cardiovasculares, cancro, isquémia/reperfusão, artrite reumatóide, diabetes, distúrbios neurológicos (doença de Alzheimer e doença de Parkinson).^{1,2}

Estas doenças separam-se em dois grupos: o primeiro grupo envolve doenças associadas ao “stress oxidativo mitocondrial” (cancro e diabetes *melitus*); o segundo grupo envolve doenças relacionadas com “condições inflamatórias oxidativas” (aterosclerose e inflamação crónica, isquémia e reperfusão).¹

O processo de envelhecimento é um processo extenso relacionado com as consequências dos danos causados pelos radicais livres (peroxidação lipídica, danos no DNA, oxidação de proteínas), sendo que os distúrbios neurológicos se podem considerar uma aceleração deste processo (doença de Alzheimer e doença de Parkinson).¹

I.2 – A actividade anti-inflamatória

I.2.1 – Ciclooxygenase

A ciclooxygenase (COX) é uma importante enzima envolvida na transformação do ácido araquidónico em prostaglandinas e tromboxano.⁷ As prostaglandinas e o tromboxano têm um papel importante na homeostasia, como por exemplo a regulação da função renal, a agregação de plaquetas ou a protecção do revestimento do estômago. Tem ainda um papel relevante na mediação da resposta inflamatória (figura 4).⁸

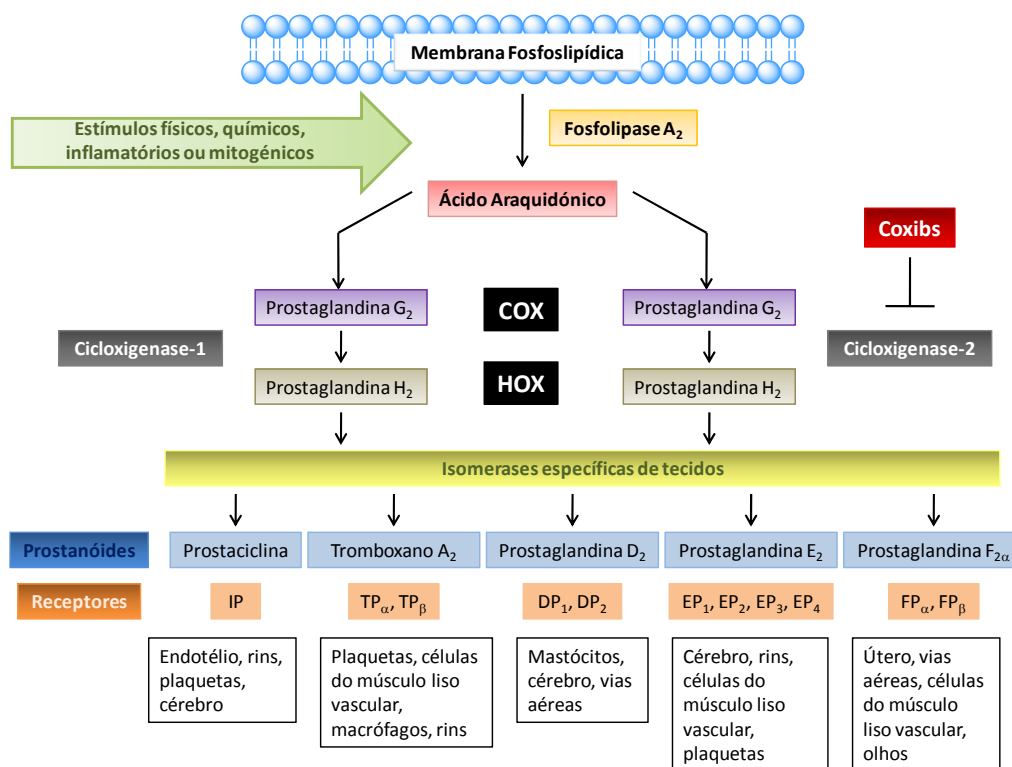


Figura 4 – Produção e ações das prostaglandinas e tromboxano (adaptado de FitzGerald, 2001).⁹

Em 1991 foi descrita a existência de duas isoformas desta enzima (codificadas por genes distintos) com grande homologia na sequência de aminoácidos (60%), mas com perfis de expressão diferentes.^{10,11} Apresentam ainda uma diferença chave a nível do aminoácido 523 do centro activo. Na COX-1, o aminoácido 523 é uma isoleucina enquanto que na COX-2 é uma valina, esta diferença de apenas um grupo metilo, traduz-se numa alteração conformacional, formando-se um *side pocket* na estrutura da COX-2 (figura 5).¹²

Ambas as isoformas são bifuncionais, membranares e localizam-se no lúmen do retículo endoplasmático e na membrana nuclear (interna e externamente). Presente na maioria dos tecidos, a COX-1 é expressa constitutivamente e é a isoforma predominante no tracto gastrointestinal. A inibição desta isoforma pelos anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs) convencionais é reconhecida actualmente como a causa dos efeitos laterais destes fármacos, como a toxicidade renal e gastrointestinal.¹³

Inicialmente pensou-se que a COX-2 seria apenas induzida em patofisiologias agudas, como a resposta inflamatória, no entanto, estudos posteriores demonstraram que desempenha um papel fisiológico importante em alguns tecidos.¹² A COX-2 é, de facto, expressa constitutivamente no cérebro e nos rins, sendo, contudo, principalmente uma enzima de carácter indutível, cuja expressão está associada a activação por citocinas, endotoxinas e alguns promotores tumorais de vários tecidos.^{12,14}

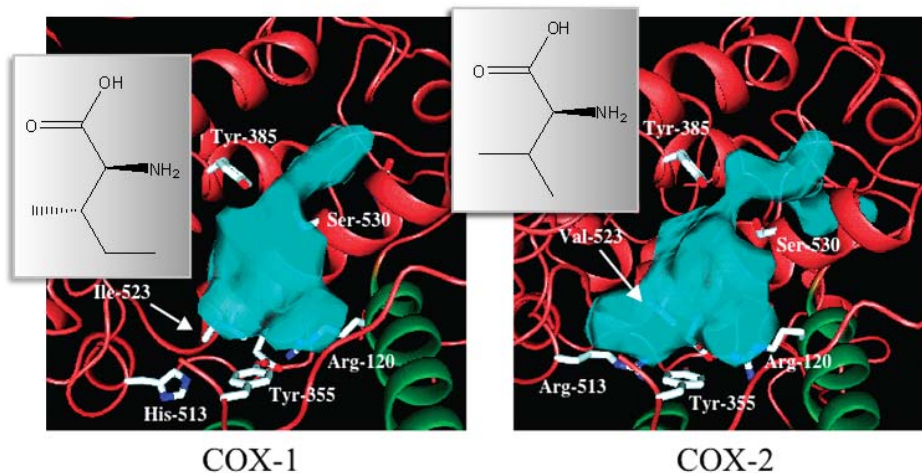


Figura 5 – Estrutura do centro activo das isoformas COX-1 e COX-2 (adaptado de Blobaum, 2007).¹²

Estudos recentes mostraram que a inibição selectiva da COX-2 pode resultar numa redução dos efeitos secundários associados aos fármacos anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs) não selectivos (que inibem a produção de prostaglandinas na generalidade dos tecidos), tendo mesmo sido proposto que poderá induzir apoptose em algumas linhas de células tumorais (como no cancro da mama e do cólon).¹⁵

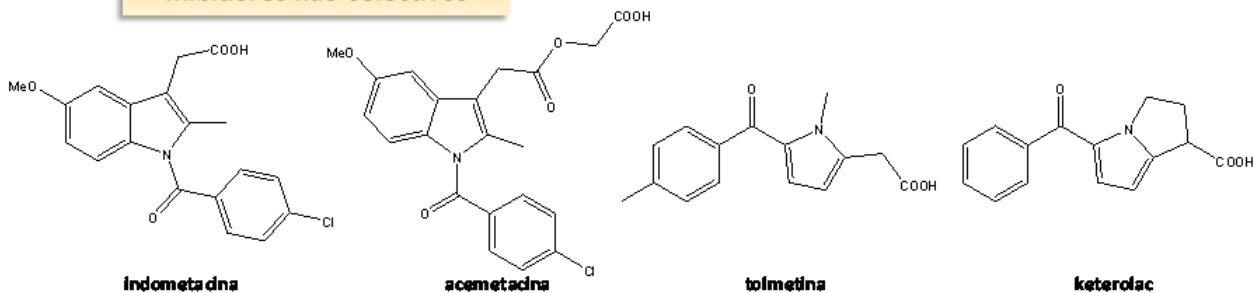
I.2.2 – Fármacos AINEs e inibidores selectivos

Os fármacos AINEs são ferramentas poderosas no tratamento da inflamação, dor e febre, embora apresentem efeitos laterais consideráveis. A descoberta da isoforma COX-2 abriu a possibilidade de desenvolver inibidores selectivos da COX-2 que sejam AINEs eficientes mas que não provoquem efeitos secundários.¹⁴

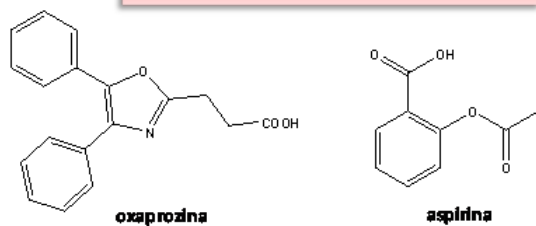
Em menos de uma década após a descoberta da COX-2 ensaios clínicos demonstraram que o tratamento com inibidores altamente selectivos para esta isoforma reduz significativamente efeitos adversos no sistema gastrointestinal comparativamente com o tratamento AINEs tradicionais.⁹ No entanto, a comercialização de novos AINEs inibidores selectivos da COX-2 (celecoxib, rofecocib), precursores desta nova geração de fármacos, foi associada a quadros clínicos de problemas cardiovasculares. Esta associação levou à remoção destes fármacos do mercado contribuindo para uma lacuna na administração de AINEs eficientes selectivos para a COX-2.

Estão representados na figura 6 alguns fármacos AINEs que estão, ou estiveram, disponíveis no mercado.

Inibidores não selectivos



Inibidores selectivos COX-1



Inibidores selectivos COX-2

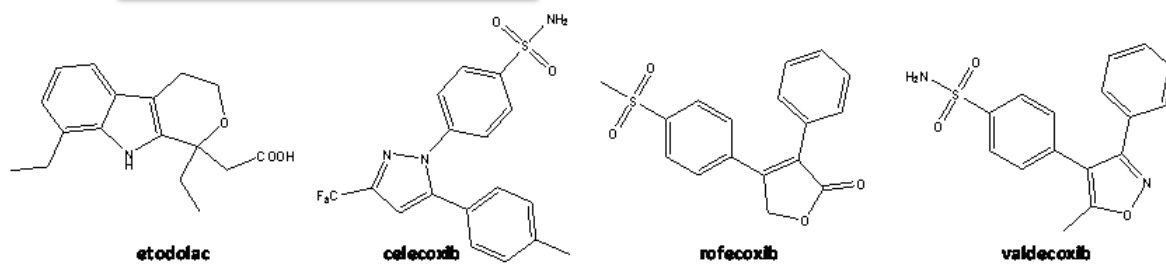


Figura 6 – Exemplos de inibidores: não selectivos (indometacina, acemetacina, tolmetina, ketorolac); selectivos da COX-1 (oxaprozina, aspirina); e, selectivos da COX-2 (etodolac, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib).^{16,17}

I.3 – Núcleo indólico em sistemas biológicos

O indole (**1**) resulta da “fusão” do anel de benzeno com as posições 2 e 3 do anel de pirrole e é um dos mais importantes sistemas de anéis heterocíclicos (figura 7).

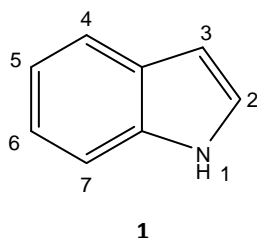


Figura 7 – Estrutura do indole.

Os indoles são uma extensa e larga família de compostos presentes em bactérias, plantas e animais, sendo alvo de especial interesse nas áreas tanto da química biológica como na da química medicinal.

O triptofano (**2**), aminoácido essencial para o Homem, constitui um importante exemplo de derivados de indole. Outros exemplos, derivados desta importante estrutura, são a melatonina (**3**), o 5-metoxitriptofol (**4**), a 5-metoxitriptamina (**5**) (hormonas segregadas pela glândula pineal) e o ácido indole-3-acético (**6**) (hormona presente nas plantas) (figura 8).^{18,19}

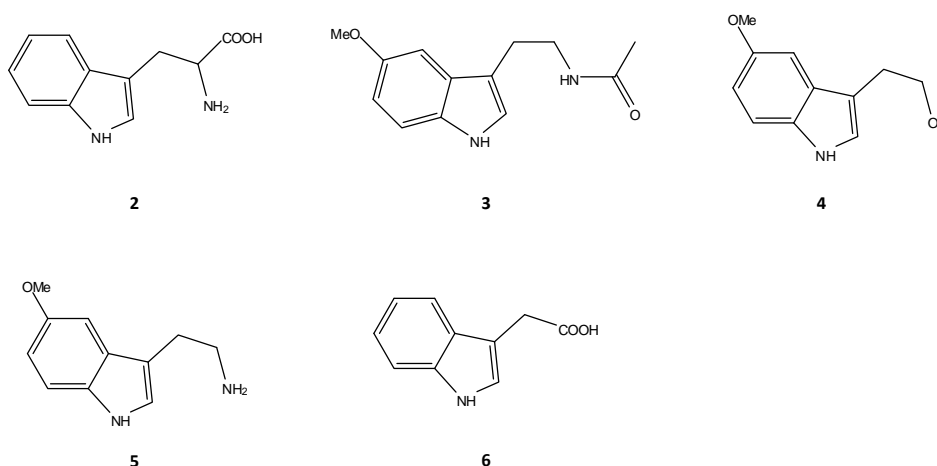


Figura 8 – Exemplos de estruturas indólicas presentes em seres vivos.

Alguns derivados de indole são capazes de proteger os tecidos do sistema nervoso em várias patologias crónicas ou agudas nas quais o stress oxidativo tem um papel determinante. Os seus efeitos podem estar ligados à sua capacidade de captar ERO e/ou a sua acção antioxidante. Isto parece ter uma relação directa com a estrutura indólica, pois, alguns derivados de indole, por exemplo, melatonina (**3**), carvedilol (**7**), alguns pirimidoindoles, β -carbolinas (**8**), bem como a γ -carbolina, stobadina (**9**), parecem ter um grande potencial para serem usados na prevenção e/ou tratamento de diversas doenças neurológicas (figura 9).²⁰

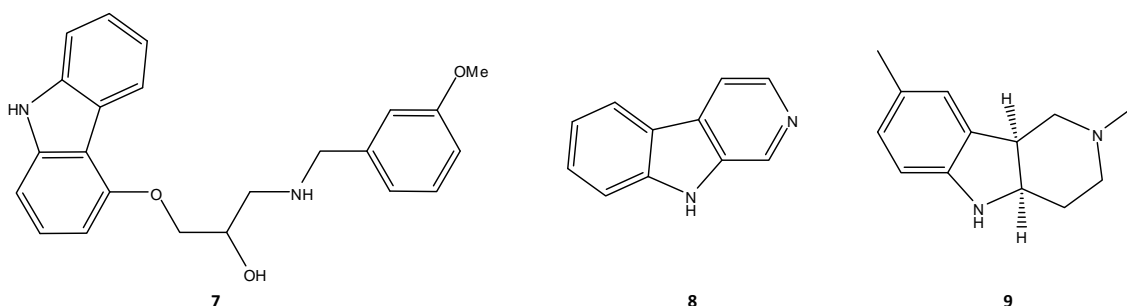


Figura 9 – Alguns derivados de indole que apresentam actividade no tratamento de doenças neurológicas.

Além das doenças associadas ao sistema nervoso, os compostos derivados desta estrutura podem ser úteis no tratamento de outras doenças associadas ao stress oxidativo/nitrosativo, pois estudos descritos na literatura mostram a sua importância como unidade captadora de radicais, como por exemplo derivados de 2-fenilindole²¹ (**10**), radicais nitróxidos indólicos²² (**11**) e indole-2-carboxamidas *N*-substituídas²³ (**12**) (figura 10).

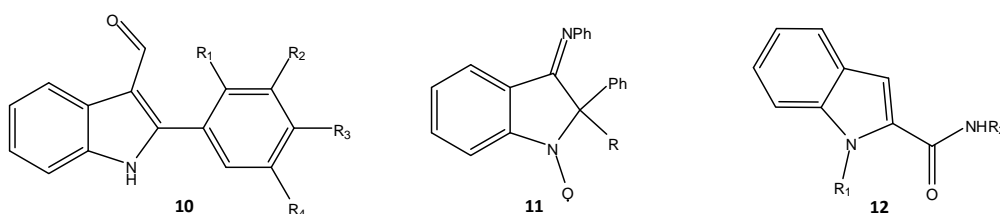


Figura 10 – Alguns derivados de indole que apresentam capacidade captadora de radicais.

A unidade indólica está, ainda, presente em fármacos AINEs, tais como a indometacina (**13**), o indoxole (**14**), a acemetacina (**15**) e o etodolac (**16**) (figura 11).

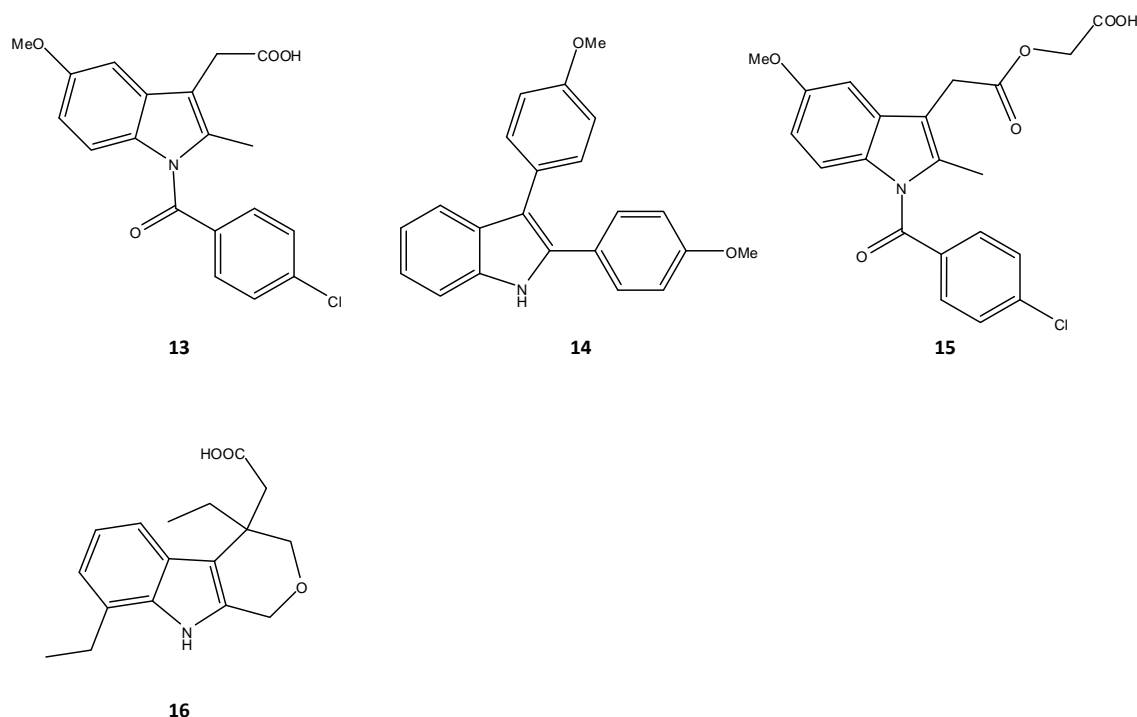


Figura 11 – Exemplos de fármacos AINEs que têm na sua estrutura a unidade indólica.

Devido às suas propriedades, o indole é uma subestrutura privilegiada, na química medicinal moderna. Sendo utilizada como *scaffold* no desenvolvimento de novas bibliotecas de antioxidantes e anti-inflamatórios com o intuito descobrir fármacos (antioxidantes ou AINEs) que apresentem maior actividade e efeitos laterais mínimos.^{20,21}

A compreensão das patologias que afectam os seres humanos foi, e continua a ser um dos motores do desenvolvimento científico, sendo imprescindível, cada vez mais, a descoberta de novas moléculas com actividade biológica que as contrariem.

Neste trabalho serão apresentadas as vias sintéticas utilizadas para a construção de uma biblioteca de compostos derivados de indole e posterior avaliação da actividade antioxidante para a ERO ROO[•]. E, ainda, estudos sintéticos para a preparação de potencial inibidor selectivo da COX-2.

Capítulo II – Discussão de Resultados

Este capítulo encontra-se dividido em duas secções. Na primeira, referente aos antioxidantes, serão apresentadas: *i)* as vias sintéticas utilizadas, e descrição dos respectivos produtos obtidos, na preparação de uma biblioteca de derivados de indole; *ii)* os estudos de capacidade de absorção do radical peróxido dos compostos sintetizados. Na segunda, respeitante aos compostos inibidores selectivos da COX-2, serão apresentados os estudos sintéticos para a preparação de um potencial candidato a fármaco AINE inibidor selectivo da COX-2.

II.1 – Antioxidantes

II.1.1 – Síntese e preparação de uma biblioteca de derivados de indole para a descoberta de novos fármacos antioxidantes

Como referido anteriormente, o indole é uma subestrutura privilegiada em sistemas biológicos, por conseguinte, a primeira parte deste trabalho teve como objectivo a síntese de uma biblioteca de derivados de indole, mais concretamente derivados da triptamina e do L-triptofano, com o intuito de desenvolver novos candidatos a fármacos com actividade antioxidante. A figura **12** mostra as diversas substituições feitas no núcleo de indole assim como na cadeia lateral.

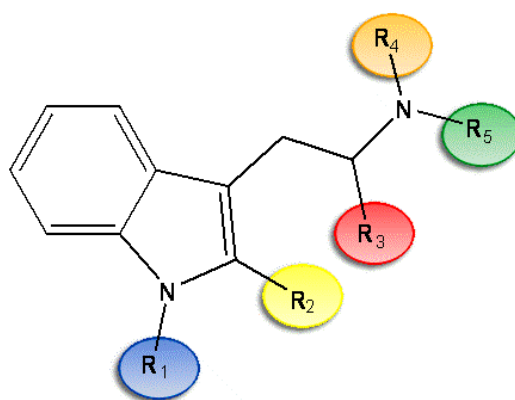


Figura 12 – Núcleo de indole com as diferentes posições de substituição.

A escolha dos grupos e a sua posição, nas quais se pensa terem um papel chave na captação de espécies radicalares, foi definida com base na literatura¹⁷ e resultados experimentais preliminares.* Assim sendo, foram introduzidas as seguintes modificações: R₁ e R₄/R₅ – substituição no átomo de azoto indólico e no átomo de azoto da cadeia lateral, respectivamente; R₃ – presença do grupo carboxilato de metilo; R₂ – substituição na posição 2 do anel indólico, uma vez que a presença de uma cadeia 3,3-dimetilalílica nesta posição está presente em vários compostos que apresentam uma relevante actividade biológica, como por exemplo, as triprostatinas (A e B) (figura 13). Estes compostos foram isolados de uma estirpe particular (BM939) do fungo *Aspergillus fumigatus* e funcionam como inibidores do ciclo celular dos mamíferos na barreira G2/M, podendo apresentar vantagens no tratamento de tumores malignos que apresentam uma proliferação celular rápida e anormal.^{24,25}

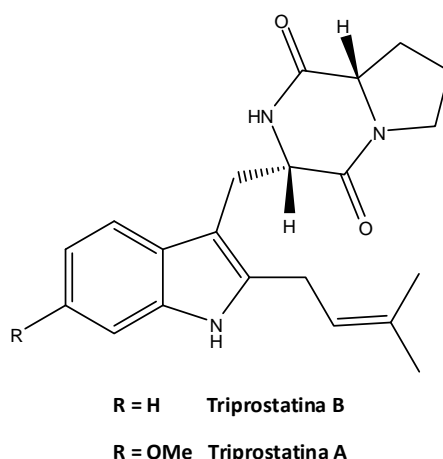


Figura 13 – Estruturas das Triprostatinas A e B.

A escolha dos diversos grupos substituintes foram elaborados tendo em consideração diversos critérios: estabilização do radical; volume do grupo (impedimento estereoquímico); reactividade. Por conseguinte, estes resultados contribuirão para uma racionalização da relação estrutura/actividade e elucidação dos mecanismos de acção de compostos desta família.

* Resultados não publicados.

II.1.1.1 – Derivados da triptamina

Para a geração de compostos derivados da triptamina (**17**) focou-se a atenção em duas posições, o átomo de azoto indólico e o átomo de azoto da cadeia lateral, como se pode ver na figura **14**.

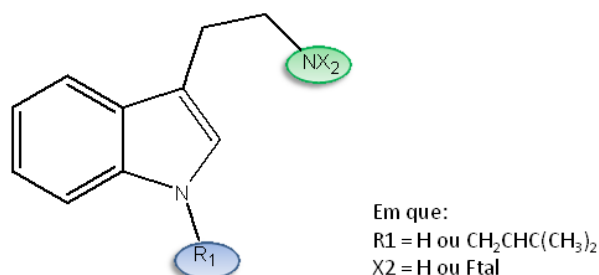
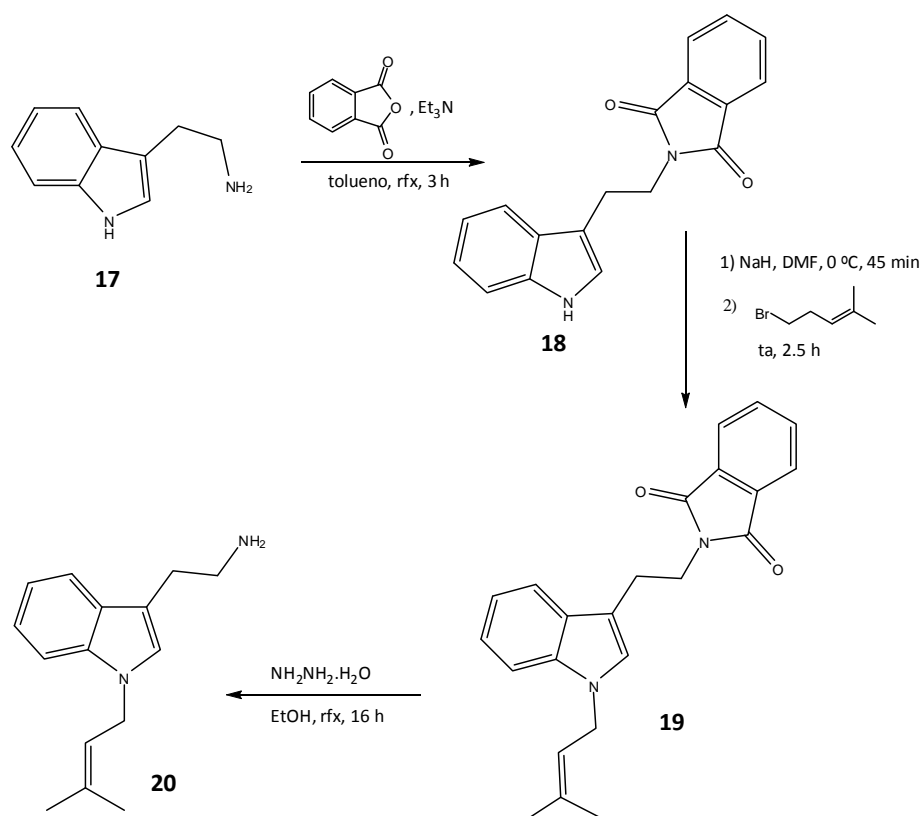


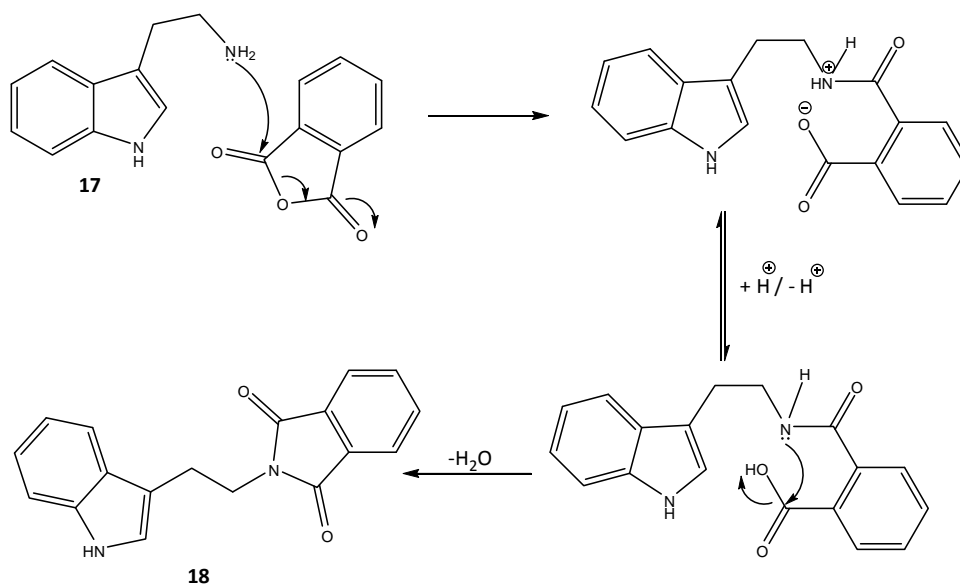
Figura 14 – Família de compostos preparados derivados da triptamina.

A estratégia utilizada na síntese destes compostos envolveu os seguintes passos: *i*) protecção do grupo amina com a ftalimida; *ii*) introdução da cadeia 3,3-dimetilalílica no átomo de azoto indólico e; *iii*) desprotecção do grupo amina. No esquema **1** está representado o plano sintético utilizado na preparação destes derivados e as respectivas condições reaccionais.



Esquema 1 – Plano sintético utilizado para a preparação dos derivados da triptamina (**18**, **19** e **20**).

Na protecção do grupo amina recorreu-se a um método directo de síntese do anel de ftalimida, usando-se como solvente o tolueno, a refluxo, na presença de anidrido ftálico e trietilamina.²⁶ Este método permitiu isolar a *N*-ftaloiltryptamina (**18**) com um rendimento de 88%. O seu intervalo de fusão, $175\text{-}177\text{ }^\circ\text{C}$, encontra-se de acordo com o da literatura ($173\text{-}174\text{ }^\circ\text{C}$)²⁷ e no seu espectro de IV pode encontrar-se uma banda a 1702 cm^{-1} correspondente à distensão da ligação $\text{C}=\text{O}$ da ftalimida. O espectro de ^1H -RMN apresenta sinais a $7,84\text{-}7,81\text{ ppm}$ e a $7,71\text{-}7,69\text{ ppm}$ que correspondem aos prótons do anel aromático da ftalimida. O mecanismo proposto para a protecção do grupo amina encontra-se representado no esquema 2.



Esquema 2 – Mecanismo proposto para a formação do composto 22 a partir de 21.

Uma vez protegido o átomo de azoto da cadeia lateral, procedeu-se à introdução da cadeia 3,3-dimetilalilica no átomo de azoto do anel indólico. Neste procedimento usou-se como base o hidreto de sódio e como agente alquilante o brometo de 3,3-dimetilalilo, obtendo-se o produto **19** com 53% de rendimento. O intervalo de fusão, 131-133 °C, encontra-se de acordo com o da literatura (130-132 °C).²⁸ No espectro de IV verifica-se a ausência da banda a cerca de 3400 cm⁻¹, correspondente à distensão da ligação N-H indólica, confirmando a substituição no átomo de azoto. A existência da cadeia 3,3-dimetilalilica pode ser verificada no espectro de ¹H-RMN pela presença do tripleto a 5,34 ppm (CH=C(CH₃)₂), do duplete a 4,62 ppm (CH₂CH=C(CH₃)₂) e dos dois singletos a 1,80 e 1,75 ppm (CH=C(CH₃)₂). Verifica-se, ainda, a ausência do protão ligado ao átomo de azoto do anel indólico.

O último passo na preparação destes derivados da triptamina é a desprotecção do grupo amina. Neste passo utilizou-se um método descrito na literatura²⁹ para a remoção do grupo ftalimida em que se usou como solvente EtOH, a refluxo, na presença de hidrato de hidrazina. Este método permitiu obter o composto **20** com um rendimento de 63%. No espectro de IV encontra-se a banda referente à distensão N-H, a 3300 cm⁻¹, que confirma a presença do grupo amina livre, e observa-se, também, o desaparecimento da banda a cerca de 1700 cm⁻¹, correspondente à distensão da

II.1.1.2 – Derivados do L-triptofano

Tal como na triptamina, as substituições foram efectuadas em ambos os átomos de azoto e, ainda, na posição 2 do anel de indole (figura 15).

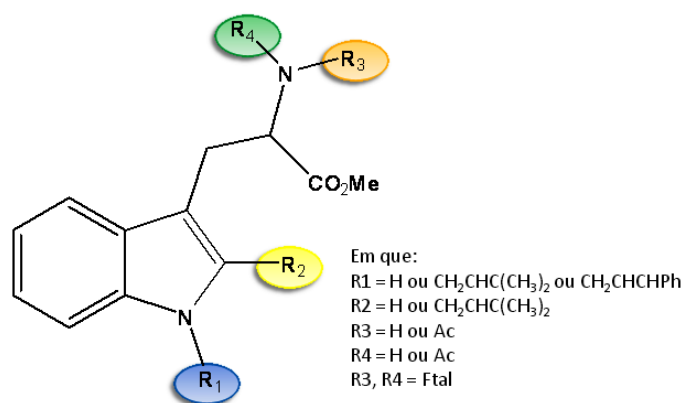
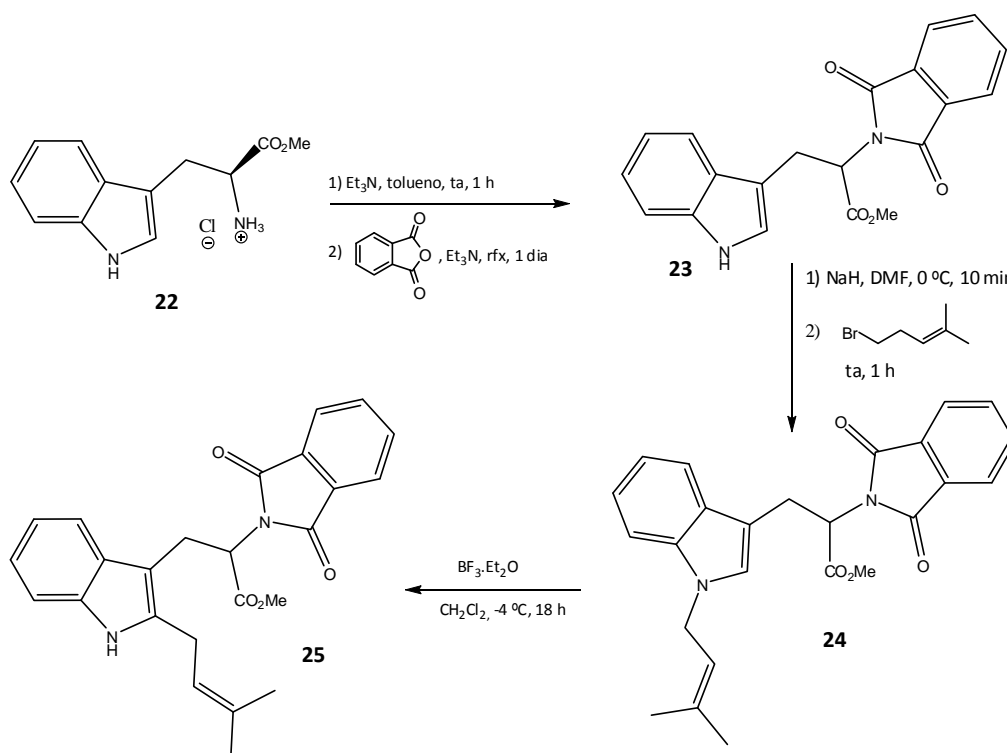


Figura 15 – Família de compostos preparados derivados do L-triptofano.

Seguiram-se duas vias sintéticas diferentes para os derivados do L-triptofano: os derivados do *N*-ftaloiltriptofano metil éster e os derivados do *N*-acetil-L-triptofano metil éster. Na primeira família, em que $\text{R}_3=\text{R}_4=\text{Ftal}$, as substituições foram feitas em R_1 e R_2 , que podem ser -H ou $-\text{CH}_2\text{CHC}(\text{CH}_3)_2$. Na segunda família, em que $\text{R}_3=\text{Ac}$ e $\text{R}_4=\text{H}$, variou-se, apenas, R_1 , podendo ser -H, $-\text{CH}_2\text{CHC}(\text{CH}_3)_2$ ou $-\text{CH}_2\text{CHCHPh}$.

II.1.1.2.1 – Derivados do *N*-ftaloil-L-triptofano metil éster

Os métodos utilizados na síntese destes compostos envolvem os seguintes passos: *i*) protecção do grupo amina com a ftalimida; *ii*) introdução da cadeia 3,3-dimetilalílica no átomo de azoto indólico e; *iii*) rearranjo da cadeia 3,3-dimetilalílica para a posição 2. No esquema 4 está representada a estratégia sintética utilizada para a preparação destes derivados e as respectivas condições reaccionais.



Esquema 4 – Estratégia sintética utilizada para a preparação dos derivados do *N*-ftaloiltryptofano metil éster (**23**, **24**, e **25**).

Tal como na preparação da *N*-ftaloiltryptamina (**18**), a via sintética escolhida para a protecção do grupo amina do L-tryptofano metil éster (**22**), foi um método directo, utilizando-se como solvente o tolueno, a refluxo, na presença de anidrido ftálico e trietilamina. Uma vez que o L-tryptofano metil éster se encontrava sob a forma de sal de hidrocloreto, deixou-se este na presença de trietilamina de forma a promover a libertação da amina. Este método permitiu obter o *N*-ftaloiltryptofano metil éster (**23**) com rendimento de 79%. O intervalo de fusão, 59-61 °C, encontra-se de acordo com o da literatura (56-58 °C)²⁸ e no seu espectro de IV pode encontrar-se uma banda a 1712 cm⁻¹ correspondente à distensão da ligação C=O da ftalimida. O espectro de ¹H-RMN apresenta sinais a 7,77-7,75 ppm e a 7,68-7,65 ppm que correspondem aos protões do anel aromático da ftalimida.

Está descrito na literatura que a utilização deste método pode resultar na racemização parcial do produto final.³⁰ Apesar dos métodos enantioselectivos para a preparação dos compostos se encontrarem descritos na literatura,³⁵ optou-se por uma via racémica (método menos moroso), uma vez que a avaliação da actividade

antioxidante envolve reacções radiculares para as quais a estereoquímica não é determinante.

Uma vez protegido o átomo de azoto da cadeia lateral, procedeu-se à introdução da cadeia 3,3-dimetilalílica no átomo de azoto do anel indólico. Neste procedimento usou-se como base o hidreto de sódio, em DMF seca, e, como agente alquilante, o brometo de 3,3-dimetilalilo, obtendo-se o produto **24** com 43% de rendimento. A existência da cadeia 3,3-dimetilalílica pode ser verificada no espectro de $^1\text{H-RMN}$ pela presença do multiplete entre 5,26 ppm e 5,23 ppm ($\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$), do duplete a 4,51 ppm ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$) e dos dois singuletos a 1,68 ppm e 1,65 ppm ($\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$). Verifica-se, ainda, a ausência do protão do azoto do anel indólico.

O último passo consiste no rearranjo do grupo prenilo da posição 1 para a posição 2. Existem vários métodos descritos na literatura para este tipo de reacção, os quais estão representados na figura 16.

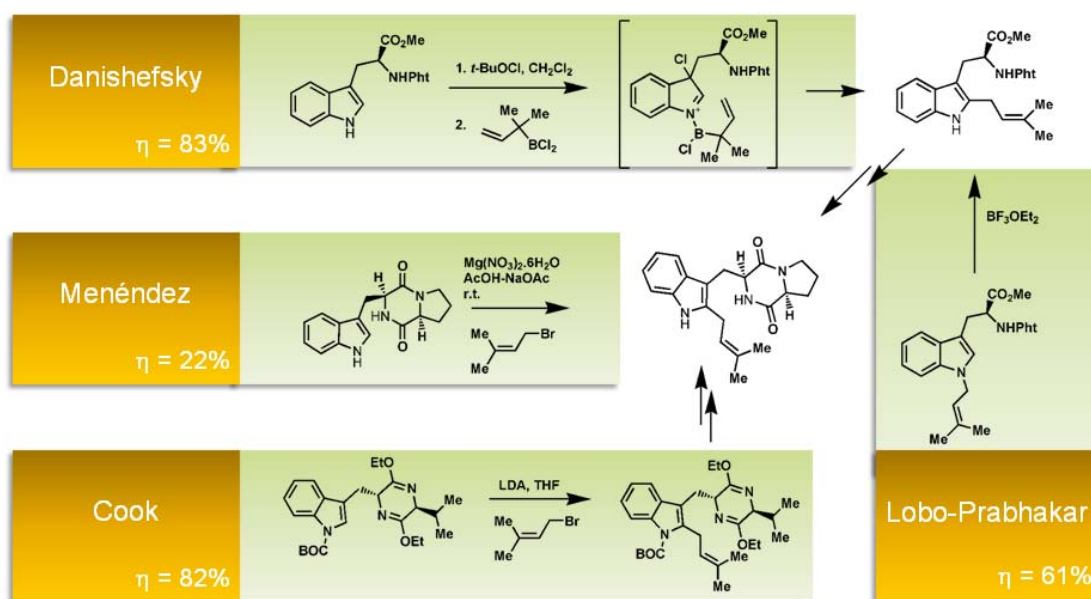


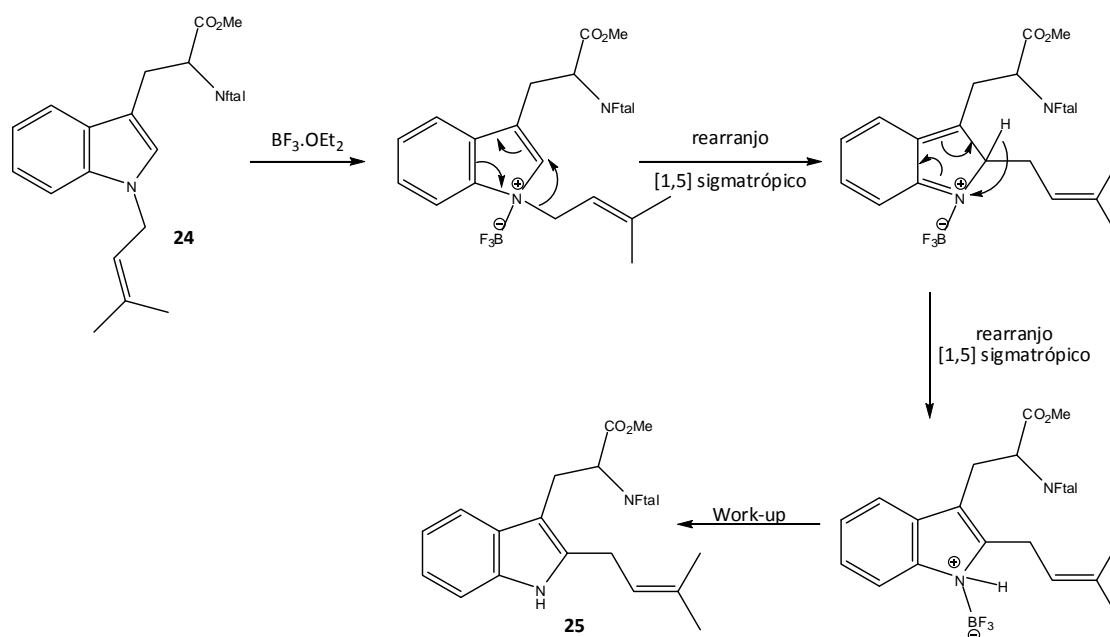
Figura 16 – Diferentes métodos descritos na literatura para a reacção de rearranjo da cadeia 3,3-dimetilalílica.³¹⁻³⁴

Os métodos descritos por Danishefsky³³ e por Cook³⁴ são os que apresentam melhores rendimentos, sendo estes de 83% e 82%, respectivamente. No entanto, estes

são mais morosos, uma vez que no primeiro caso, é necessária a preparação prévia do borano, e no segundo caso a protecção (e consequente desprotecção) do átomo de azoto indólico com o grupo *terc*-butoxicarbonilo. Por outro lado, tanto o método desenvolvido pelo grupo Lobo-Prabhakar,³² assim como o descrito por Menéndez,³¹ apesar de apresentarem rendimentos inferiores aos anteriores (61% e 22%, respectivamente), têm a vantagem de serem directos.

Tendo estes factos em consideração optou-se pelo método descrito pelo grupo Lobo-Prabhakar, obtendo-se o composto **25** com um rendimento de 39%. Pelo espectro de ¹H-RMN verifica-se a presença do protão do anel indólico, que aparece juntamente com os protões do anel da ftalimida, no multiplete entre 7,77-7,72 ppm. A ausência do protão da posição 2 do anel indólico pode ser confirmada pela integração da zona entre 7,03-6,86 ppm que corresponde a dois protões, sendo que a integração da zona dos protões aromáticos (7,77-6,86 ppm) corresponde a nove protões. A presença da cadeia 3,3-dimetilalílica na posição 2, também, pode ser confirmada pelo desvio químico dos protões ligados ao carbono secundário. Sendo que no composto **25** se encontram a campo mais alto comparativamente ao composto **24**.

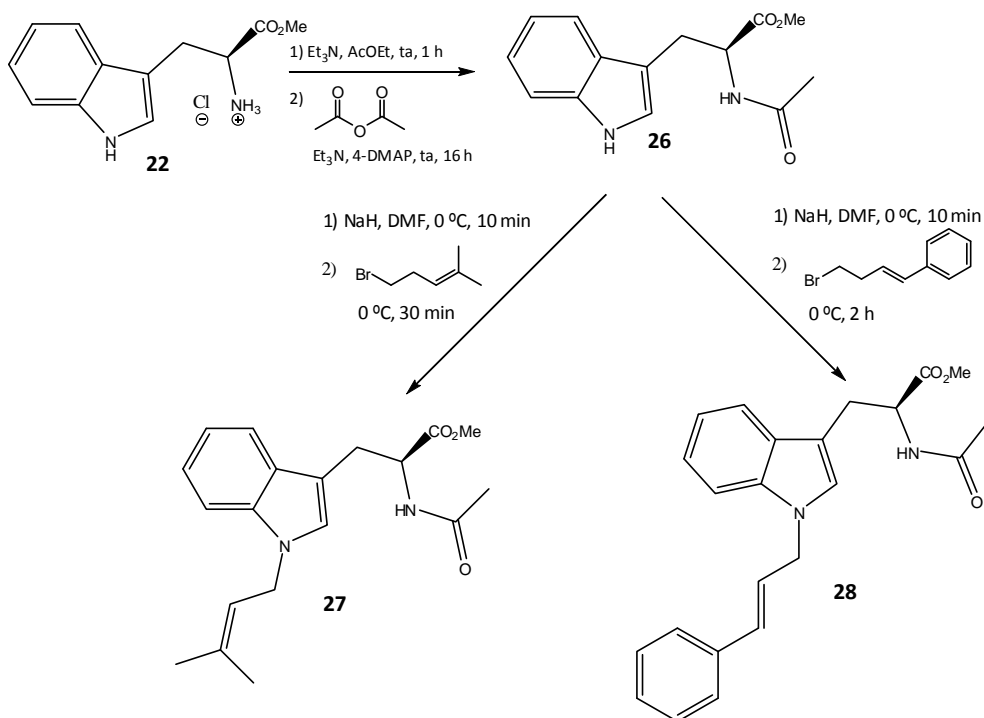
O mecanismo proposto pelos autores para esta reacção encontra-se no esquema 5.³⁵



Esquema 5 – Mecanismo proposto para a formação de 25 a partir de 24.³⁵

II.1.1.2.2 – Derivados do *N*-acetil-*L*-triptofano metil éster

Os métodos utilizados na síntese destes compostos envolvem os seguintes passos: *i*) protecção do grupo amina com o grupo acetilo e; *ii*) introdução do grupo alquilo no átomo de azoto indólico. No esquema 6 está representado a estratégia, e as respectivas condições reaccionais, seguida para a síntese destes derivados.



Esquema 6 – Estratégia sintética utilizada para a preparação dos derivados do *N*-acetil-L-triptofano metil éster (**26**, **27** e **28**).

Na protecção do grupo amina com o grupo acetilo fez-se reagir o L-triptofano metil éster (**22**), em acetato de etilo, à temperatura ambiente, com anidrido acético, na presença de trietilamina e 4-DMAP, obtendo-se o *N*-acetil-L-triptofano metil éster (**26**) com rendimento de 81%. Tal como na protecção com o anel de ftalimida, uma vez que o L-triptofano metil éster se encontra na forma de sal hidrocloreto, deixou-se este na presença de trietilamina, durante uma hora. O intervalo de fusão medido (152-153 °C) encontra-se de acordo com o da literatura (152 °C)³⁶ e no espectro de ¹H-RMN verifica-se a presença do grupo acetilo pelo singuleto a 1.96 ppm, referente aos prótons metílicos deste grupo.

Uma vez feita a protecção procedeu-se à *N*-alquilação. Tal como nos casos anteriores esta reacção foi realizada usando-se como base o hidreto de sódio, em DMF, e como agentes alquilantes o brometo de 3,3-dimetilalilo ou o brometo de 3-fenilalilo, obtendo-se os compostos **27** e **28**, com rendimentos de 57% e 72%, respectivamente.

No caso do composto **27**, a existência da cadeia 3,3-dimetilalílica pode ser verificada no espectro de ¹H-RMN pela presença do multiplete entre 5,35 ppm e 5,32

ppm ($\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$), do duplete a 4,63 ppm ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$) e dos dois singuletos a 1,81 ppm e 1,76 ppm ($\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$). Verifica-se, ainda, a ausência do próton ligado ao átomo indólico. No espectro de massa é possível observar-se o pico do ião molecular, confirmando esta estrutura.

No caso do composto **28**, pode verificar-se a presença da cadeia 3-fenilalílica no espectro de ^1H -RMN pela existência de dez prótons na zona aromática, sendo que cinco correspondem ao anel de indole e cinco ao anel da cadeia 3-fenilalílica, e pela presença do duplete a 6,43 ppm ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$), do duplo triplete a 6,32 ppm ($\text{CH}=\text{CHCH}_2$) e do duplete a 4,86 ppm (NCH_2). Verifica-se, também, a ausência do próton ligado ao átomo indólico. Esta estrutura é, também, confirmada pelo espectro de massa uma vez que se observa o pico do ião molecular.

Com a diversidade estrutural criada nesta biblioteca, conseguiu-se abranger os critérios propostos para avaliação da actividade dos compostos. As modificações estruturais utilizadas envolveram alquilação do átomo de azoto indólico com cadeias alílicas com diferentes extensões de conjugação com o intuito de avaliar a estabilização do radical, caso haja formação do mesmo nesta cadeia. Com o objectivo de entender se a posição da cadeia é relevante para esta estabilização, foram preparados compostos possuindo a cadeia em diferentes posições.

De igual modo, foram preparados derivados com diferentes grupos protectores do átomo de azoto da cadeia lateral com o objectivo de avaliar se a actividade encontrada é dependente do volume do grupo e/ou da estabilidade do radical formado nesta cadeia. Ainda na cadeia lateral, foram introduzidos grupos funcionais, na posição adjacente ao grupo amina com a finalidade de testar a reactividade nesta posição.

II.1.2 – Estudos de capacidade de absorção do radical peróxido

Os radicais livres podem exercer uma influência perniciosa em sistemas biológicos, podendo provocar doenças associadas ao stress oxidativo. Este facto estimulou a comunidade científica a desenvolver compostos com actividade antioxidante. Neste trabalho testou-se a actividade antioxidante dos compostos sintetizados e correspondentes materiais de partida na captação do radical peróxido. As estruturas dos compostos testados estão representadas na figura 17.

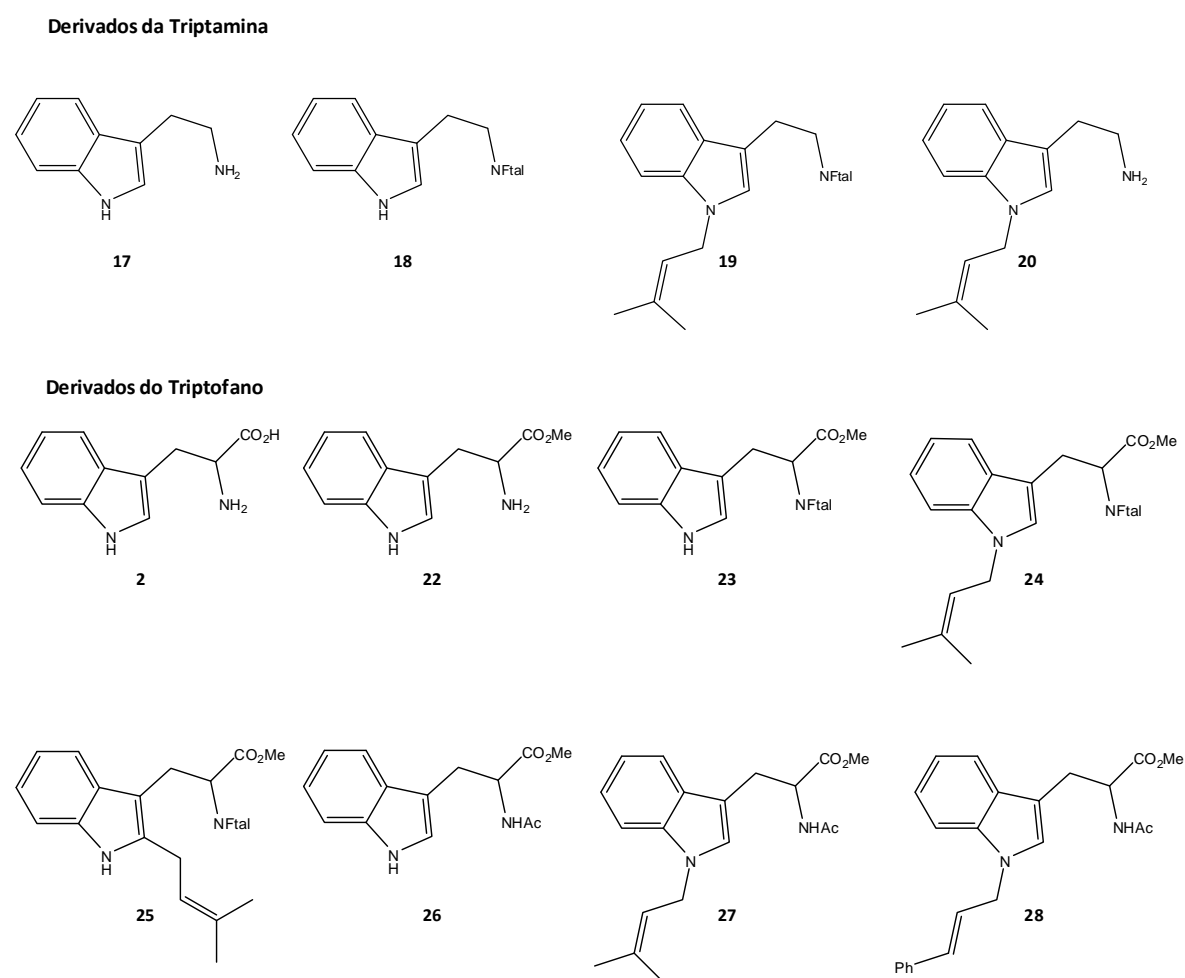
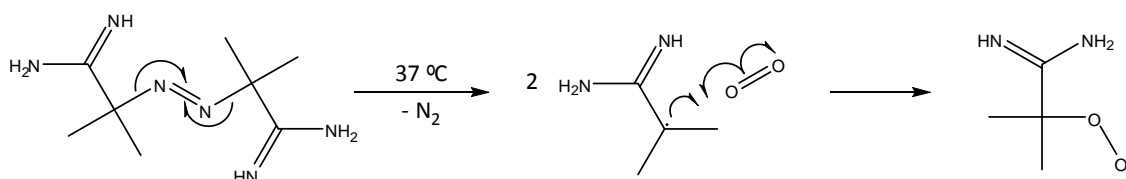


Figura 17 – Derivados da triptamina e do triptofano testados para a avaliar a sua capacidade antioxidante na captação do radical peróxido.

O método utilizado para medir a actividade antioxidante contra o radical peróxido foi o ORAC (capacidade de absorção de radicais oxigénio), descrito na literatura.¹⁷

O radical peróxido (ROO[•]) foi gerado por termodecomposição do AAPH (29) (figura 18) num leitor de microplacas, à temperatura de 37 °C. Desta termodecomposição resulta o radical R[•] que, ao reagir com O₂, dá origem a ROO[•] (esquema 7).



Esquema 7 – Mecanismo proposto para a formação do radical peróxido.

A capacidade captadora de ROO[•] foi medida pela monitorização do decaimento da fluorescência devido à oxidação da fluoresceína (30) (figura 18).

O valor de ORAC, relativo a equivalentes de trolox (31) (figura 18), foi calculado de acordo com a equação 1:

$$\text{Valor de ORAC relativo} = \frac{AUC_{\text{composto}} - AUC_{\text{branco}}}{AUC_{\text{trolox}} - AUC_{\text{branco}}} \times \frac{\text{Molaridade}_{\text{trolox}}}{\text{Molaridade}_{\text{composto}}} \quad \text{Equação 1}$$

Em que, AUC_{composto}, corresponde ao valor da área sob a curva realizado na presença do composto em estudo; AUC_{branco}, ao valor da área sob a curva do ensaio realizado na ausência do composto em estudo; e, AUC_{trolox}, ao valor da área sob a curva do ensaio realizado na presença de trolox 1 μM.

Cada estudo corresponde a um mínimo de quatro experiências realizadas em triplicado.

Foram, também, realizados ensaios de fluorescência para cada composto, na concentração máxima, na ausência de fluoresceína e AAPH. E, ainda, efectuados ensaios de absorção, na gama de comprimentos de onda de 300 a 600 nm. Verificou-se

que nenhum dos compostos emitia fluorescência, nem absorvia na gama de comprimentos de onda em estudo. Deste modo eliminaram-se possíveis interferências que pudessem alterar os valores em estudo.

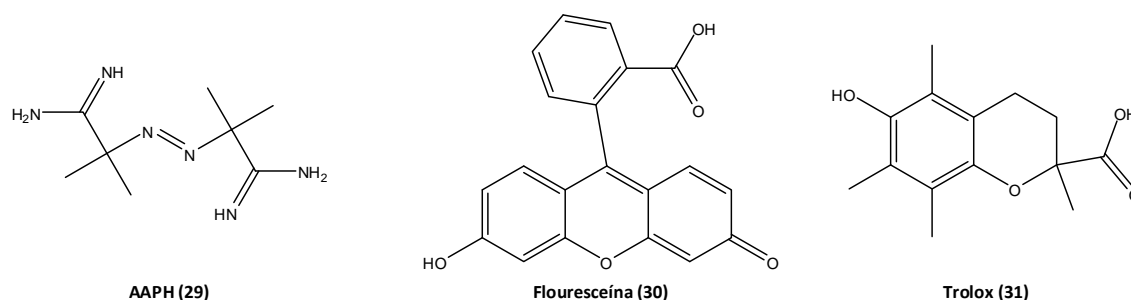


Figura 18 – Estruturas do AAPH (29), da fluoresceína (30) e do trolox (31).

Os valores de ORAC obtidos nos ensaios realizados para avaliar a captação do radical peróxido são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Valores de ORAC (média \pm erro padrão) obtidos nos ensaios realizados para avaliar a captação do ROO^\bullet para os compostos sintetizados e respectivos materiais de partida.

Composto	ORAC _{ROO} [•] \pm erro padrão (μM equivalentes trolox/ μM composto)
Trolox	1
2	2,74 \pm 0,07
17	1,86 \pm 0,03
18	1,46 \pm 0,08
19	-----
20	0,96 \pm 0,07
22	2,60 \pm 0,16
23	1,09 \pm 0,13
24	0,361 \pm 0,004
25	0,45 \pm 0,05
26	1,21 \pm 0,06
27	0,21 \pm 0,03
28	0,44 \pm 0,01

A figura 19 corresponde a uma representação gráfica dos resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a captação do radical peróxido dos compostos preparados (e respectivos materiais de partida). Cada ponto representa os valores obtidos em quatro ensaios (mínimo), realizados em triplicado.

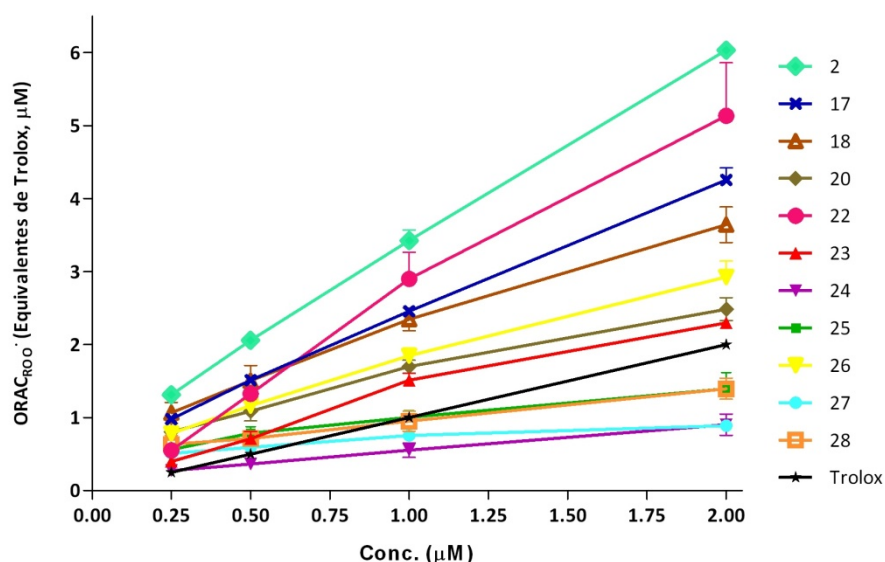


Figura 19 – Capacidade de captação do ROO^\bullet da biblioteca de derivados de indole.

Verifica-se que o ROO^\bullet é, eficientemente, captado pelos compostos **2**, **17**, **18**, **22**, **23** e **26** cuja actividade é superior à do trolox. Os outros compostos testados são menos activos contra esta ERA, sendo que o composto **19** não apresenta actividade. Todavia, a actividade observada de todos os compostos testados (excepto o composto **19**) é dependente da concentração. A ordem de actividade é: $2 > 22 > 17 > 18 > 26 > 23 > 20 > 25 \approx 28 > 24 > 27$ (valores de ORAC de $2,74 \pm 0,07$, $2,60 \pm 0,16$, $1,86 \pm 0,03$, $1,46 \pm 0,08$, $1,21 \pm 0,06$, $1,09 \pm 0,13$, $0,96 \pm 0,07$, $0,45 \pm 0,05$, $0,44 \pm 0,01$, $0,361 \pm 0,004$, $0,21 \pm 0,03$, respectivamente).

De um modo geral verifica-se que os compostos mais activos são aqueles que apresentam o átomo de azoto livre. Pode constatar-se que o composto mais activo, triptofano (**2**), é o que apresenta todas as posições livres (átomos de azoto, indólico e do grupo amina, e grupo ácido carboxílico). A transformação de ácido carboxílico a grupo éster metílico (**22**) faz com que haja uma diminuição na capacidade de captação

do ROO[•], no entanto, a presença deste grupo é fundamental, uma vez que quando este se encontra ausente (**17**) ocorre uma diminuição da actividade. Este facto, também, é comprovado quando comparados os valores de ORAC dos compostos **19** e **24**, em que os átomos de azoto estão protegidos (com grupos iguais) e a única diferença é a presença/ausência do grupo éster metílico.

Quanto ao grupo protector do átomo de azoto da cadeia lateral, pode concluir-se que quando o átomo de azoto indólico está livre, (**23/26**) as actividades são semelhantes. No entanto, quando este está alquilado (**24/27**) verifica-se que o derivado *N*-ftaloilo é mais activo que o derivado *N*-acetilo. Sugerindo que o volume do grupo não é determinante para a actividade antioxidante contra esta ERO, atribuindo-se a actividade observada à estabilização do radical formado conferida pelo anel da ftalimida.

No que diz respeito à cadeia 3,3-dimetilalílica, verifica-se que a sua presença traduz-se numa diminuição da actividade (**24** e **25** relativamente a **23**). Quanto à sua posição verifica-se que a posição 2 confere maior actividade ao composto do que a substituição no átomo de azoto indólico (**25/24**).

Relativamente aos grupos *N*-alquilo, observa-se um maior valor de ORAC (cerca do dobro) para a cadeia 3-fenilalílica (**28**) relativamente à cadeia 3,3-dimetilalílica (**27**), isto poderá dever-se ao facto da cadeia 3-fenilalílica apresentar uma extensão da conjugação relativamente à cadeia 3,3-dimetilalílica, conferindo, assim, uma maior estabilização ao radical formado.

Comparando de compostos **18** e **20** e verifica-se que a presença do átomo de azoto indólico livre confere uma actividade mais elevada do que o átomo de azoto do grupo amina.

II.2 – Estudos sintéticos para a preparação de um potencial candidato a fármaco AINE inibidor selectivo da COX-2

Dada a importância (e urgência) da descoberta de novos fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) inibidores selectivos da COX-2, procedeu-se, numa segunda fase deste trabalho, ao estudo de uma aproximação sintética um potencial inibidor desta isoforma.

Com base na literatura existente¹⁶ e em resultados experimentais preliminares[†] da relação estrutura/actividade, foi proposta uma estrutura modelo **29** (figura 20) que tem como base o esqueleto indólico, funcionalizado com grupos que se têm revelado determinantes na inibição selectiva da COX-2, em particular, a unidade $-\text{SO}_2\text{Me}$, uma vez que esta se encontra profundamente inserida no *pocket* selectivo desta isoforma; e, ainda, as unidades $-\text{CF}_3$; $-\text{Ph-4-Cl}$; e $-\text{CO}_2\text{Me}$.

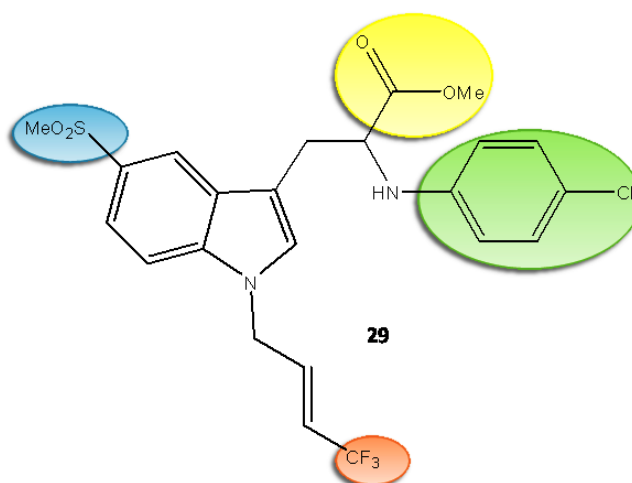
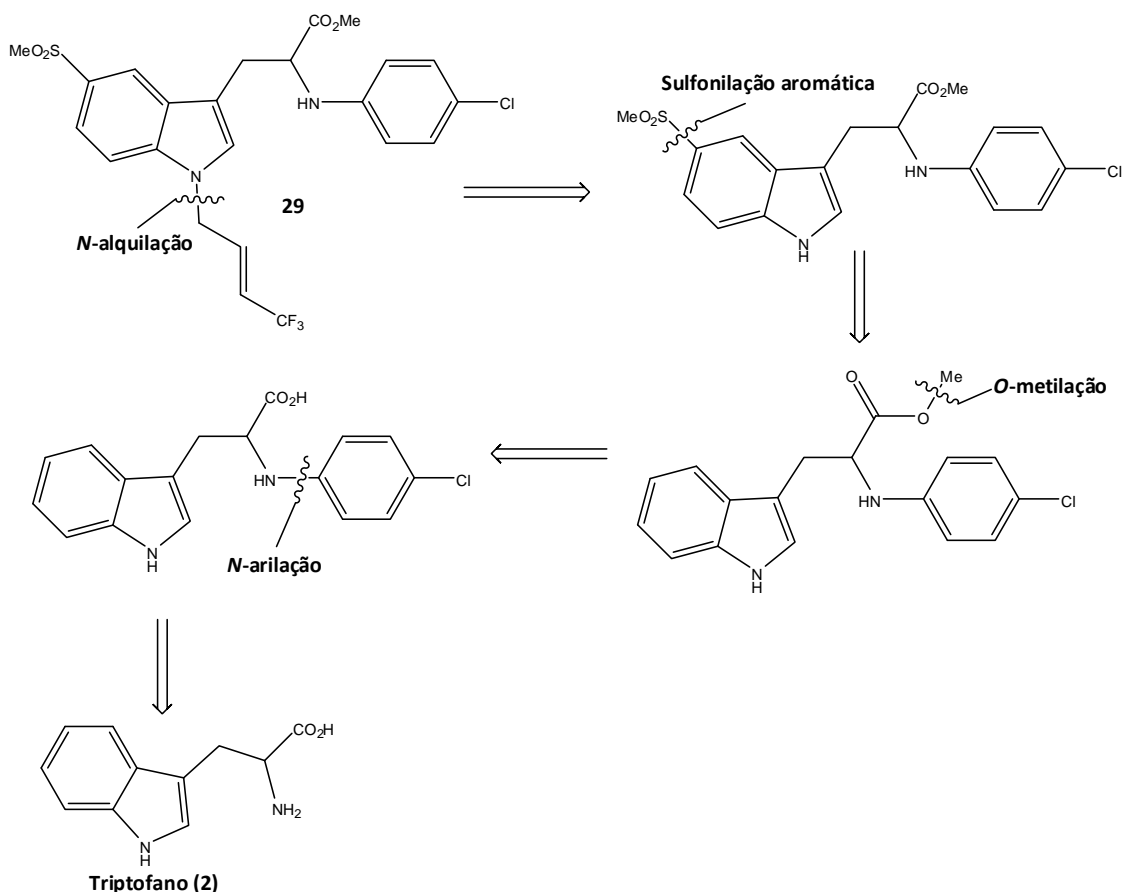


Figura 20 – Estrutura do potencial candidato a inibidor selectivo da COX-2.

De forma a definir uma estratégia de síntese do composto **29** procedeu-se à análise retrossintética (esquema 8).

[†] Resultados não publicados.



Esquema 8 – Plano retrosintético do composto 29.

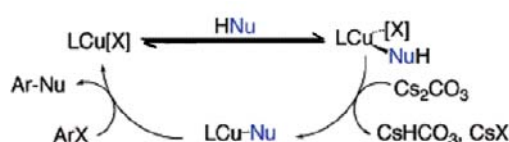
Pela análise retrosintética definiu-se um plano de síntese, tendo como material de partida o triptofano (**2**), que envolve os seguintes passos: *i*) arilação do grupo amina; *ii*) metilação do grupo ácido carboxílico; *iii*) mesilação da posição 5 do anel indólico; e *iv*) alquilação do átomo de azoto do indole.

II.2.1 – Arilação do grupo amina

Embora, pela análise retrosintética, o primeiro passo de síntese fosse a *N*-arilação do L-triptofano, a primeira abordagem foi a arilação do L-triptofano metil éster (**22**) (disponível comercialmente).

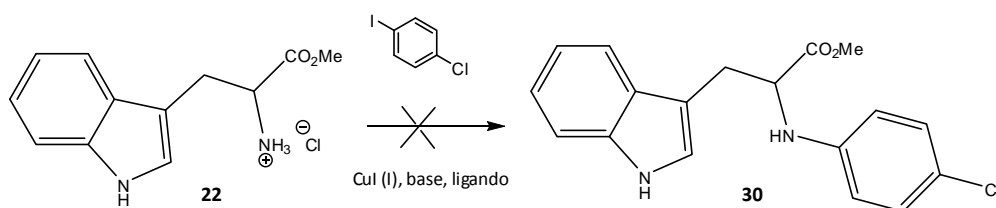
Existem dois métodos de *N*-arilação de aminoácidos, um com irradiação microondas³⁷ e outro sem.³⁸ Este último sugere que a presença do grupo hidroxilo do ácido carboxílico é crucial para que haja uma coordenação com o catalisador (iodeto de cobre I). No entanto, foram encontrados outros métodos de *N*-arilação de aminas que

não aminoácidos (por exemplo, pirroles, imidazoles, triazoles, amins alifáticas, etc) que utilizam um ligando com a função de coordenar com este mesmo catalisador (reacção de acoplamento de Ullmann modificada). Buchwald e colaboradores propuseram o seguinte mecanismo para esta reacção (esquema 9).³⁹



Esquema 9 – Hipótese mecanismo proposta por Buchwald e colaboradores, em que L é o ligando, X = I ou Br e Nu corresponde ao nucleófilo.³⁹

Em consequência desta análise foram realizados vários ensaios, na tentativa de arilar o grupo amina do L-triptofano metil éster, de modo a evitar um passo de síntese ao inicialmente previsto pela análise retrossintética. No entanto, apesar de se terem realizados vários ensaios em diferentes condições reaccionais,[‡] não se isolou o produto desejado (esquema 10).



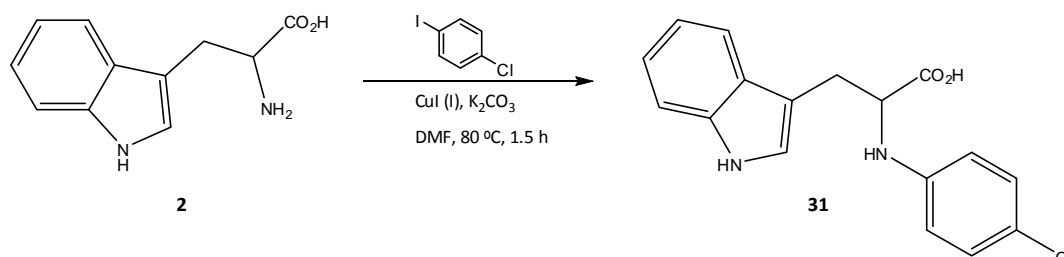
Esquema 10 – N-arilação do L-triptofano metil éster.

Devido ao insucesso da N-arilação do grupo amina do L-triptofano metil éster, procedeu-se à N-arilação do L-triptofano, como inicialmente previsto.

Esta reacção foi executada de acordo com o método descrito na literatura de N-arilações de aminoácidos, sem irradiação microondas.³⁸ Para tal, fez-se reagir o L-

[‡] Ver tabela 2 do capítulo III.

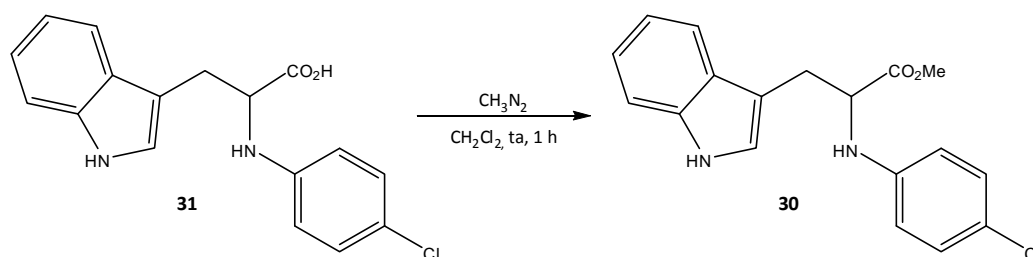
triptofano com o 4-cloriodobenzeno, na presença de iodeto de cobre (I) e carbonato de potássio. Como solvente usou-se DMF, a 80 °C (esquema 11).



Esquema 11 – Reacção de *N*-arilação do L-triptofano.

Nestas condições foi possível obter o composto **31** com rendimento de 83%. O intervalo de fusão medido, 145-147 °C, encontra-se de acordo com o da literatura (142-146 °C)⁴⁰ e no espectro de ¹H-RMN verifica-se a presença do anel aromático clorado pelo duplete a 6,48 ppm correspondentes a dois prótons do anel aromático, encontrando-se os restantes prótons junto com um próton do anel indólico no multiplete entre 7,09-7,06 ppm.

Uma vez feita a arilação do grupo amina procedeu-se, em seguida, à metilação do ácido carboxílico. Para tal, utilizou-se o diazometano como agente metilante (esquema 12).



Esquema 12 – Reacção de *O*-metilação de 31.

Este método permitiu obter o produto **30** quantitativamente. No espectro de IV observa-se o deslocamento da banda correspondente à distensão da ligação C=O para comprimento de onda superior (1736 cm^{-1}), relativamente ao material de partida (1710 cm^{-1}), indicativo de que ocorreu a transformação do ácido carboxílico a éster. Pode confirmar-se a presença do grupo metilo, no espectro de $^1\text{H-RMN}$, pelo singuleto a 3,68 ppm. No espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ observa-se, também, o sinal correspondente ao carbono metílico, a 52,1 ppm.

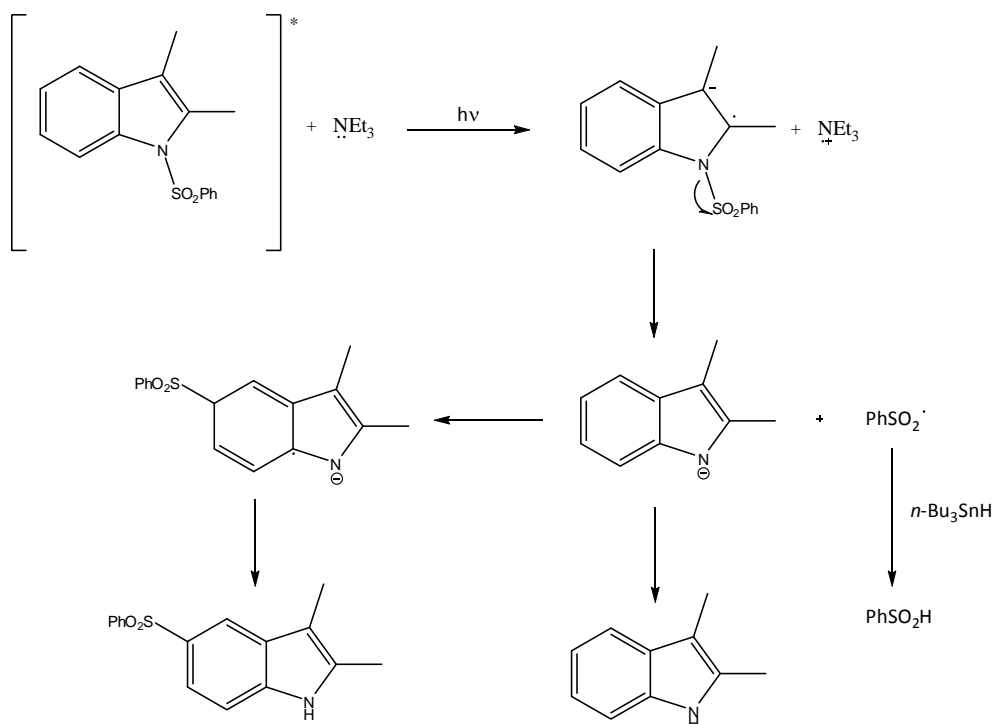
II.2.2 – Estudos de introdução do grupo mesilo na posição 5 do anel indólico

Para a introdução do grupo mesilo na posição 5 do anel indólico foram ensaiados várias aproximações sintéticas, uma vez que não foram encontrados métodos directos descritos na literatura para esta transformação.

A primeira abordagem consistiu numa reacção de Friedel-Crafts. Para fazer este ensaio utilizou-se como molécula modelo, o *N*-acetil-L-triptofano metil éster (**26**), uma vez que nesta reacção se usa um ácido de Lewis muito forte, o tricloreto de alumínio, sendo necessário ter o grupo amina e ácido carboxílico protegidos.

Por conseguinte, fez-se reagir o composto **26** em diclorometano seco, na presença de tricloreto de alumínio e cloreto de mesilo. A reacção foi deixada durante um dia, a refluxo mas não se verificou o consumo do material de partida nem formação de novos produtos.

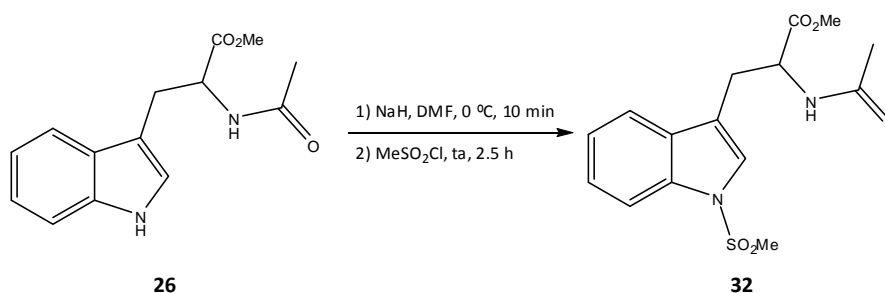
Como esta aproximação se revelou ineficaz para o propósito deste passo reaccional a abordagem seguinte foi a tentativa de rearranjo do grupo mesilo da posição 1 para a posição 5 do anel indólico. Para tal adoptou-se o método descrito na literatura por Hong e colaboradores.⁴¹ Estes autores descrevem um método de *N*-dessulfonilação de indoles, por fotólise, obtendo o indole dessulfonilado como produto maioritário e como produtos secundários os produtos de rearranjo, *orto*- e *para*- (esquema **13**).



Esquema 13 – Produtos obtidos por Hong e colaboradores na reacção de *N*-dessulfonilação.⁴¹

Esta reacção é iniciada pela transferência de um electrão da trietilamina para o indole com a formação do catião radical da trietilamina e do anião radical do indole. A formação deste enfraquece a ligação *N*-SO₂Ph facilitando a clivagem desta ligação. Podendo, o radical fenilsulfonilo formado, reagir com o anel indólico nas posições *orto*- e *para*-. Nestes estudos foi verificado o consumo total do material de partida após uma hora de irradiação.

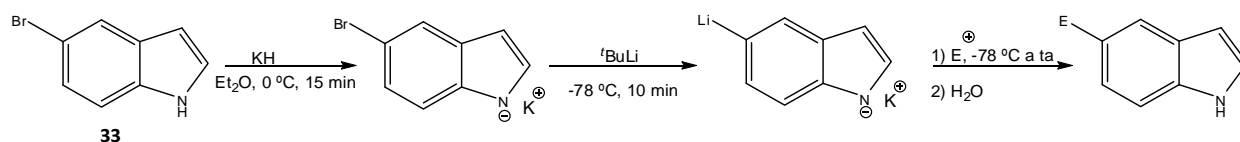
Apesar de o radical mesilo não apresentar a estabilização presente no radical tosilo (utilizado pelos autores), diminuindo a probabilidade de sucesso desta via, fez-se um ensaio para averiguar a viabilidade do método. Deste modo, procedeu-se preparação prévia do propanoato de metilo 2-acetamido-3-(1-(metilsulfonil)-1H-indol-3-il) (**32**), fazendo-se reagir o *N*-acetil-L-triptofano metil éster (**26**), dissolvido em DMF, na presença de hidreto de sódio e cloreto de mesilo. Tal como na abordagem anterior esta reacção foi testada utilizando uma molécula modelo (composto **26**) (esquema **14**).

Esquema 14 – Formação de **32** a partir de **26**.

Uma vez tendo o composto mesilado na posição 1, procedeu-se à tentativa de rearranjo do grupo mesilo desta posição para a posição 5 do anel indólico. Para tal, dissolveu-se o produto **32** em acetonitrilo, numa célula de quartzo, sendo adicionados cinco equivalentes de trietilamina. Esta mistura foi irradiada com uma lâmpada de 254 nm durante uma hora e meia não se tendo observado o consumo do material de partida nem a formação de novos produtos. Estas observações vêm confirmar a necessidade de utilizar um iniciador de radicais mais forte do que a trietilamina para que haja a quebra da ligação *N*-SO₂Me. Este via foi abandonada tendo sido adoptada uma nova estratégia.

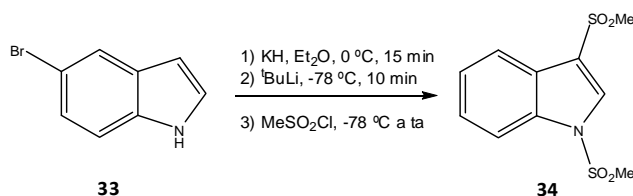
Moyer e colaboradores descrevem um método de substituição da posição 5 do anel indólico por reacção do 5-bromoindole (**33**) com *tert*-butil lítio.⁴²

Neste método, o 5-bromoindole (**33**) é previamente desprotonado com hidreto de potássio, formando o anião 5-bromoindole tendo como contra ião o catião potássio. Deste modo, garante-se que o *tert*-butil lítio é usado na trans-metalacção e não na desprotonação (esquema **15**).



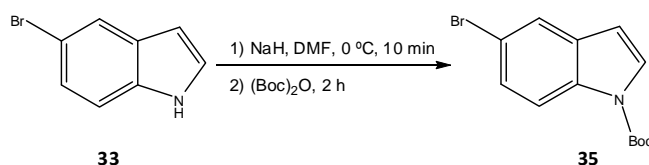
Esquema 15 – Reacção descrita por Moyer e colaboradores.⁴²

Consequentemente, fez-se reagir o 5-bromoindole com hidreto de potássio, em éter etílico, à temperatura de 0 °C, de modo a formar o anião. Posteriormente, adicionou-se o *terc*-butil lítio, a – 78 °C, e após dez minutos, adicionou-se o cloreto de mesilo, a esta temperatura. O produto maioritário desta reacção foi o composto mesilado na posição 1 e 3 do anel indólico (**34**) (esquema 16).



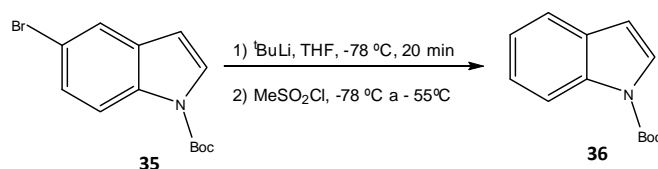
Esquema 16 – Produto maioritário da reacção do 5-bromoindole com *terc*-butil lítio.

Uma vez que a substituição não ocorreu na posição desejada, procedeu-se à protecção prévia do átomo de azoto com o grupo *terc*-butoxicarbonilo. Esta reacção foi efectuada fazendo reagir o composto **33**, em DMF, com hidreto de sódio, sendo adicionado, posteriormente o anidrido de *terc*-butoxicarbonilo (esquema 17).



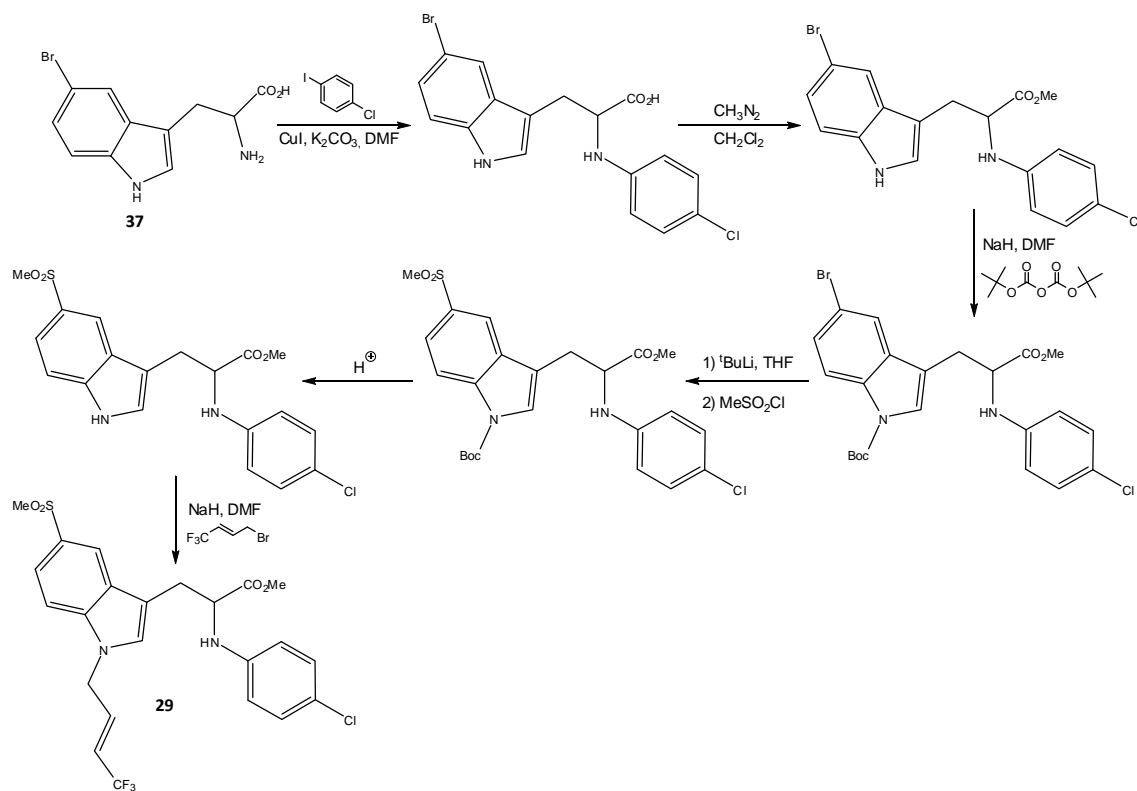
Esquema 17 – Formação de 35 a partir 33.

Com o átomo de azoto protegido fez-se reagir o composto **35** com *tert*-butil lítio, a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. O produto maioritário obtido foi o composto desbromado (**36**) (esquema **18**), o que significa que ocorreu a *trans*-metalação mas que não houve o reacção com o cloreto de mesilo.



Esquema 18 – Formação de **36** a partir de **35**.

Fazendo uma análise a todos os estudos efectuados é apresentado um novo plano sintético (esquema **19**), em que, se utilizará como material de partida o 5-bromo-DL-triptofano (**37**). Sendo que o primeiro passo, tal como inicialmente proposto, corresponderá à arilação do grupo amina. Em seguida, será feita a metilação do grupo ácido carboxílico com posterior protecção do átomo de azoto indólico. A protecção prévia do átomo de azoto indólico é necessária para evitar a introdução do grupo mesilo nessa posição. O passo seguinte corresponderá à *trans*-metalação com o *tert*-butil lítio e consequente mesilação na posição 5 do anel indólico. Feita a introdução do grupo mesilo, proceder-se-á à desprotecção do átomo de azoto indólico. Sendo o último passo deste plano sintético a alquilação do átomo de azoto indólico.



Esquema 19 – Proposta para um novo plano sintético.

II.3 – Conclusões

Neste trabalho foi preparada uma biblioteca de nove compostos usando como *scaffold* o anel indólico, mais precisamente derivados da triptamina e do triptofano, com o objectivo de avaliar a sua actividade antioxidante na captação da ERO radical peroxilo. Foram utilizadas diversas vias sintéticas envolvendo diversos passos: protecção e desprotecção de grupos funcionais; reacções de *N*-alquilação e, ainda, um rearranjo induzido por um ácido de Lewis da cadeia 3,3-dimetilalílica da posição 1 para a posição 2 do anel indólico.

Todos os compostos testados possuem actividade antioxidante à excepção do composto **19**. Sendo a ordem de actividade encontrada para a biblioteca: $2 > 22 > 17 > 18 > 26 > 23 > 20 > 25 \approx 28 > 24 > 27$ (valores de ORAC de $2,74 \pm 0,07$, $2,60 \pm 0,16$, $1,86 \pm 0,03$, $1,46 \pm 0,08$, $1,21 \pm 0,06$, $1,09 \pm 0,13$, $0,96 \pm 0,07$, $0,45 \pm 0,05$, $0,44 \pm 0,01$, $0,361 \pm 0,004$, $0,21 \pm 0,03$, respectivamente).

Os compostos **18**, **23** e **26** apresentaram uma actividade superior, e o composto **20** uma actividade semelhante à do trolox. Com base nos resultados obtidos pode concluir-se que os átomos de azoto (indólico e do grupo amina da cadeia lateral) quando livres conduzem a um aumento da actividade. Os resultados experimentais sugerem que o átomo de azoto indólico poderá constituir o centro redox activo do anel. Na figura **21** estão representadas as estruturas do composto preparado mais activo (**18**) e menos activo (**19**), respectivamente.

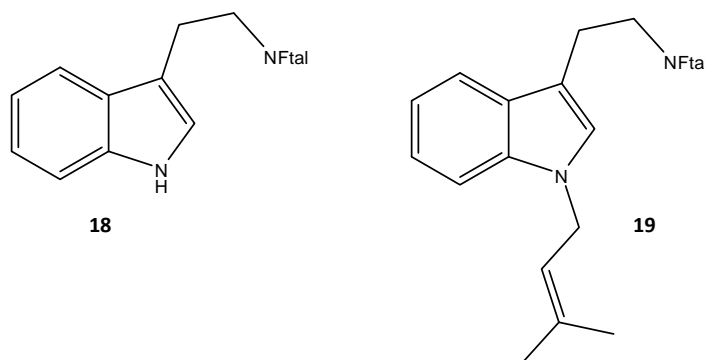


Figura 21 – Estruturas dos compostos preparados mais e menos activo, **18** e **19**, respectivamente.

Estes resultados poderão contribuir para uma racionalização no *design* de futuras gerações de bibliotecas optimizadas de potenciais candidatos a fármacos anti-oxidantes.

Nesta dissertação foram ainda desenvolvidos estudos sintéticos para preparação de um potencial inibidor selectivo da COX-2, a partir do L-triptofano. Tendo sido apresentada uma nova estratégia sintética para preparação desta molécula alvo.

Capítulo III – Descrição Experimental

III.1 – Preâmbulo

A parte experimental deste trabalho envolveu a utilização de alguns procedimentos gerais, descritos em seguida:

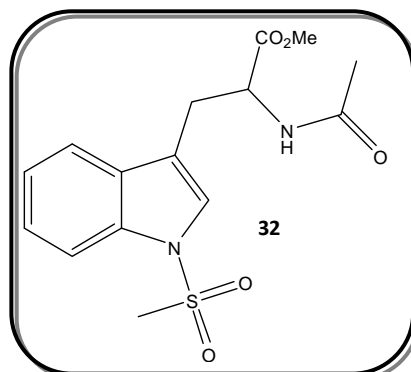
- Os solventes utilizados foram, sempre que necessário, destilados e secos por métodos padrão descritos na literatura.⁴³
- Os reagentes adquiridos comercialmente não foram purificados salvo indicação em contrário.
- As cromatografias em camada fina (c.c.f.) foram efectuadas em placas de sílica Merck Kieselgel GF 254 com 0,2 mm de espessura, em suporte de alumínio.
- As cromatografias em camada preparativa (c.c.p.) foram efectuadas em placas de sílica Merck Kieselgel GF 254 com espessura de 0,5 mm ou 1 mm.
- As cromatografias em camada fina foram reveladas com luz ultravioleta (UV) a 254 nm e/ou 366 nm ou recorrendo a pulverização com o revelador indicado a cada situação.
- As cromatografias em coluna (c.c.) foram efectuadas utilizando sílica Kieselgel 60 (Merck), de granulometria 70 – 230 “mesh” como fase estacionária.
- Os pontos de fusão, não corrigidos, superiores a 120 °C, foram determinados num aparelho de placa aquecida Kofler, modelo Reichert Thermovar; os inferiores a essa temperatura foram determinados num aparelho BIBBY, Stuart Scientific, Melting Point SMP1.
- Os desvios ópticos foram medidos num polarímetro Perkin-Elmer 241 MC, linha D do sódio, à temperatura ambiente.
- Os espectros de Infravermelho (IV) foram traçados num espectrómetro Perkin-Elmer, modelo Spectrum 1000 FT-IR. Na descrição dos espectros são indicadas apenas as frequências mais intensas ou características. Os dados são apresentados pela seguinte ordem: suporte de amostra utilizado: KBr (em pastilha de brometo de potássio para compostos sólidos), NaCl (em discos de cloreto de sódio para compostos líquidos e óleos); frequência do máximo de uma banda de absorção (ν_{\max} em cm^{-1}); tipo de banda: MF (muito forte), F (forte), Fl (forte larga), M (média), ml (média larga), f (fraca); atribuição a um grupo funcional na molécula (quando possível).

- Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram traçados num espectrómetro Bruker ARX 400 (400 MHz). Os espectros de ^1H -RMN foram efectuados a 400 MHz e de ^{13}C -RMN a 100 MHz. Na descrição dos espectros os dados são apresentados pela seguinte ordem: solvente deuterado utilizado; desvio químico de cada sinal (δ , em ppm); intensidade relativa do sinal (nH, nº de prótons); multiplicidade do sinal; constante de acoplamento (J , em Hertz); atribuição na molécula (sempre que possível).
- Os espectros de massa de alta resolução (E.M.A.R.) foram obtidos na Unidade de Espectrometria de Masas da Universidade de Santiago de Compostela (Micromass; modelo: AutoSpecQ). Na descrição dos espectros os dados são apresentados pela seguinte ordem: [m/z (alta resolução)] razão massa/carga do ião molecular; fórmula molecular e massa exacta teórica do ião molecular correspondente.
- Os espectros de massa de baixa resolução foram obtidos no Laboratório de Espectrometria de Massa da Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa (GC-TOF Micromass; modelo GTC). Na descrição dos espectros os dados são apresentados pela seguinte ordem: método ionização; razão massa/carga (m/z); atribuição do ião ou fragmento molecular (quando possível); intensidade do pico relativa à do pico base (%).
- As leituras de fluorescência foram efectuadas num leitor de microplacas H.T. Synergy, modelo BIO-TEK.
- A irradiação UV foi realizada com uma lâmpada de alta pressão de mercúrio (150 W).

III.2 – Sínteses prévias

III.2.1 – Síntese do propanoato de metilo 2-acetamido-3-(1-(metilsulfonil)-1H-indol-3-il) (32)

A uma solução contendo *N*-acetil-L-triptofano metil éster (**26**) (200 mg, 0,77 mmol), em DMF seca (2 mL), foi adicionado NaH (46 mg, 1,15 mmol, 60% dispersão em óleo mineral) sendo a mistura resultante deixada em agitação, durante 10 min, em banho de gelo. Decorrido esse tempo, adicionou-se MeSO₂Cl (0,12 mL, 1,54 mmol) e a mistura reaccional foi deixada em agitação, durante 2,5 h, à temperatura ambiente.

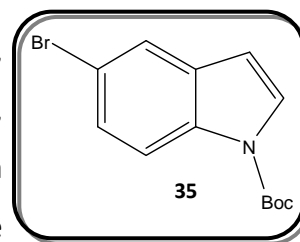


A mistura foi dissolvida em AcOEt (25 mL) e extraída, cinco vezes, com água destilada (25 mL). A fase orgânica foi seca sobre Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada à secura, a pressão reduzida. A mistura bruta obtida foi purificada por c.c. (AcOEt, sílica) e o composto **32** foi obtido sob a forma de óleo amarelo, com rendimento de 7% (17,6 mg).

¹H-NMR (CDCl₃) δ(ppm): 7,89 (1H, d, *J* 8,1 Hz, Ar-H), 7,56 (1H, d, *J* 7,6 Hz, Ar-H), 7,37 (1H, t, *J* 7,5 Hz, Ar-H), 7,31 (1H, t, *J* 7,5 Hz, Ar-H), 7,20 (1H, s, NCH=C), 6,14 (1H, d, *J* 6,8 Hz, NHCOCH₃), 4,97-4,92 (1H, m, CHCOOCH₃), 3,71 (3H, s, OCH₃), 3,33 (1H, dd, *J* 5,6 Hz *J* 14,7 Hz, CH₂), 3,21 (1H, dd, *J* 5,2 Hz *J* 14,7 Hz, CH₂), 3,04 (3H, s, SO₂CH₃), 1,97 (3H, s, NCOCH₃).

III.2.2 – Síntese do *N*-Boc-5-bromoindole (**35**)

A uma solução contendo 5-bromoindole (**33**) (150 mg, 0,76 mmol), em DMF seca (4,5 mL), foi adicionado NaH (46 mg, 1,15 mmol, 60% dispersão em óleo mineral) sendo a mistura resultante deixada em agitação, durante 10 min, em banho de gelo. Decorrido esse tempo, adicionou-se (Boc)₂O (0,3 mL, 1,15 mmol) e a mistura reaccional foi deixada em agitação, durante 2 h, à temperatura ambiente.



A mistura foi dissolvida em AcOEt (25 mL) e extraída, cinco vezes, com água destilada (25 mL). A fase orgânica foi seca sobre Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente removido a pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por c.c. (*n*-hexano/AcOEt 4:1, sílica) e o composto **35** foi obtido sob a forma de sólido bege, com rendimento de 86% (196 mg).

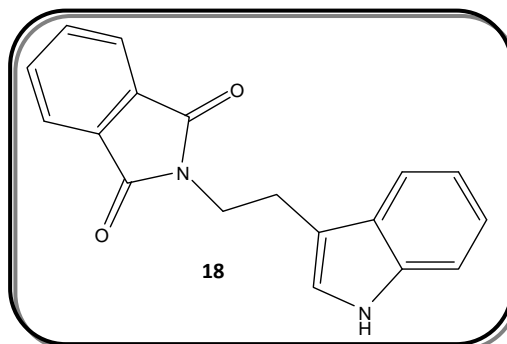
¹H-NMR (CDCl₃) δ(ppm): 8,02 (1H, d, *J* 8,4 Hz, Ar-H), 7,69 (1H, d, *J* 1,6 Hz, Ar-H), 7,59 (1H, d, *J* 3,5 Hz, Ar-H), 7,41 (1H, d, *J* 1,7 Hz, Ar-H), 7,38 (1H, d, *J* 1,7 Hz, Ar-H), 6,50 (1H, d, *J* 3,5 Hz, Ar-H), 1,67 (9H, s, CH₃).

III.3 – Antioxidantes

III.3.1 – Derivados da triptamina

III.3.1.1 – Síntese de *N*-ftaloiltriptamina (**18**)²⁸

A uma solução contendo triptamina (**17**) (2,0 g, 12.48 mmol), em tolueno (40 mL), foi adicionado anidrido ftálico (2,8 mL, 18,90 mmol) e Et₃N (2,6 mL, 16,65 mmol). A mistura reaccional foi deixada em agitação, a refluxo, durante 3 h, verificando-se o consumo total do material de partida, por c.c.f. (CH₂Cl₂, sílica), ao fim desse tempo.



O solvente foi removido por pressão reduzida e a mistura bruta obtida dissolvida em CH₂Cl₂ (80 mL) e extraída, três vezes, com solução saturada de NaCl (80 mL). A fase orgânica foi filtrada sobre carvão activado e celite, seca sobre Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada à secura, a pressão reduzida.

O produto **18** foi recristalizado de EtOH e isolado sob a forma de cristais amarelos, com rendimento de 88% (3,2 g).

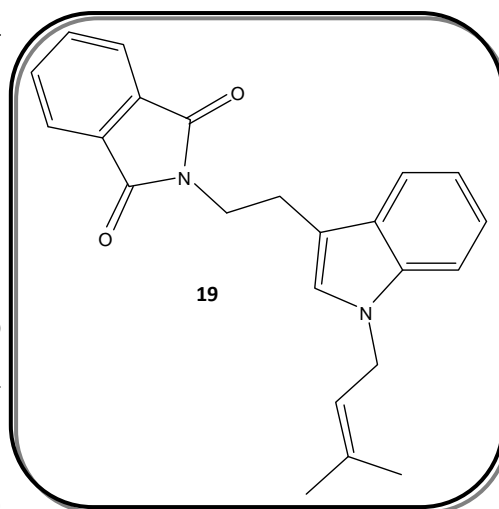
p.f. 175-177 °C (EtOH) (Lit.²⁷ 173-174 °C).

IV (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3383 (F, N-H), 1771 (M), 1702 (F, C=O), 1398 (F, C=C), 1360 (m, C-N).

¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 8,02 (1H, s, N-H), 7,84-7,81 (2H, m, Ar-H), 7,75 (1H, d, *J* 7,8 Hz, Ar-H), 7,71-7,69 (2H, m, Ar-H), 7,36 (1H, d, *J* 8,0 Hz, Ar-H), 7,19 (1H, t, *J* 7,3 Hz, Ar-H), 7,14-7,10 (2H, Ar-H e NCH=C), 4,01 (2H, t, *J* 7,8 Hz, NCH₂CH₂), 3,16 (2H, t, *J* 7,8 Hz, NCH₂CH₂).

III.3.1.2 – Síntese de *N*-ftaloil-1-(3'-metil-2'-butenil)triptamina (**19**)²⁸

A uma solução contendo *N*-ftaloiltriptamina (**18**) (50 mg, 0,17 mmol), em DMF seca (0,5 mL), foi adicionado NaH (10 mg, 0,24 mmol, 60% dispersão em óleo mineral) e a mistura resultante foi deixada em agitação, durante 45 min, em banho de gelo. Decorrido esse tempo, adicionou-se brometo de 3,3-dimetilalilo (19 µL, 0,17 mmol) e a mistura reaccional foi deixada em agitação, durante 2,5 h, à temperatura ambiente.



A mistura foi dissolvida em AcOEt (25 mL) e extraída, cinco vezes, com água destilada (25 mL). A fase orgânica foi seca sobre Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada à secura, a pressão reduzida. A mistura bruta obtida foi purificada por recristalização (CH₂Cl₂, éter de petróleo) e o composto **19** foi obtido sob a forma de cristais amarelos, com rendimento de 53% (33 mg).

p.f. 131-133 °C (CH₂Cl₂, éter de petróleo) (Lit.²⁸ 130-132 °C).

IV (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 1765 (M), 1705 (F, C=O), 1398 (F, C=C), 1355 (m, C-N).

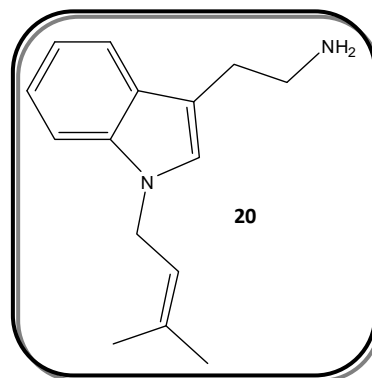
¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 7,80-7,83 (2H, m, Ar-H), 7,73 (1H, d, *J* 7,6 Hz, Ar-H), 7,69-7,66 (2H, m, Ar-H), 7,28 (1H, d, *J* 8,0 Hz, Ar-H), 7,19 (1H, t, *J* 7,4 Hz, Ar-H), 7,11 (1H, t, *J* 7,2 Hz, Ar-H), 6,99 (1H, s, NCH=C), 5,34 (1H, t, *J* 6,2 Hz, CH=C(CH₃)₂), 4,62 (2H, d, *J* 6,7 Hz, CH₂CH=C(CH₃)₂), 3,97 (2H, t, *J* 7,9 Hz NCH₂CH₂), 3,12 (2H, t, *J* 7,9 Hz, NCH₂CH₂), 1,80 (3H, s, CH=C(CH₃)₂), 1,75 (3H, s, CH=C(CH₃)₂).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 168,3 (C=O), 136,3, 136,2, 133,8, 132,3, 128,1, 125,4, 123,1, 121,5, 120,0, 119,0, 119,0, 110,8, 109,5, 43,9 (CH₂CH=C(CH₃)₂), 38,7 (NCH₂CH₂), 25,7 (CH=C(CH₃)₂), 24,5 (NCH₂CH₂), 18,0 (CH=C(CH₃)₂).

EMAR-ESI-TOF [M+1]⁺ *m/z* 359,1754 (C₂₃H₂₂N₂O₃ requer. 358,16813).

III.3.1.3 – Síntese de 1-(3'-metil-2'butenil)triptamina (20)²⁹

Uma solução contendo *N*-ftaloil-1-(3'-metil-2'butenil)triptamina (**19**) (300 mg, 0,84 mmol), em EtOH absoluto (29 mL) foi aquecida a refluxo até dissolução completa do sólido. A solução foi arrefecida e adicionado hidrato de hidrazina (153 μ L, 4,21 mmol). A mistura resultante foi deixada a refluxo durante a noite, verificando-se o consumo total do material de partida, por c.c.f. ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{Et}_3\text{N}$, 10:1:0,5, sílica).



O solvente foi evaporado a pressão reduzida e a mistura bruta dissolvida numa solução aquosa de NaOH 2M (40 mL) sendo, em seguida, extraído, três vezes, com $\text{CHCl}_3/i\text{-PrOH}$ (4:1) (40 mL). A fase orgânica foi seca sobre MgSO_4 anidro, filtrada e evaporada à secura, a pressão reduzida. A mistura bruta foi purificada por c.c. ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{Et}_3\text{N}$, 10:1:0,5, sílica), obtendo-se o composto **20** sob a forma de óleo amarelo, com rendimento de 63% (119 mg).

IV (NaCl) v_{max} (cm^{-1}): 3300 (ml, N-H), 1466 (F, C=C), 1372 (M, C-N).

¹H-NMR (CDCl_3) δ (ppm): 7,57 (1H, d, *J* 7,8 Hz, Ar-H), 7,28 (1H, d, *J* 8,0 Hz, Ar-H), 7,18 (1H, t, *J* 7,3 Hz, Ar-H), 7,07 (1H, t, *J* 7,3 Hz, Ar-H), 6,90 (1H, s, NCH=C), 5,34 (1H, t, *J* 6,5 Hz, CH=C(CH₃)₂), 4,61 (2H, d, *J* 6,8 Hz, CH₂CH=C(CH₃)₂), 2,97 (2H, t, *J* 6,5 Hz, NCH₂CH₂), 2,86 (2H, t, *J* 6,5 Hz, NCH₂CH₂), 1,87 (2H, sl, NH₂ troca com D₂O), 1,79 (3H, s, CH=C(CH₃)₂), 1,74 (3H, s, CH=C(CH₃)₂).

¹³C-NMR (CDCl_3) δ (ppm): 136,4, 135,9, 128,1, 125,4, 121,4, 120,1, 118,9, 118,6, 112,1, 109,4, 43,7 (CH₂CH=C(CH₃)₂), 42,2 (NCH₂CH₂), 29,1 (CH=C(CH₃)₂), 25,4 (NCH₂CH₂), 17,7 (CH=C(CH₃)₂).

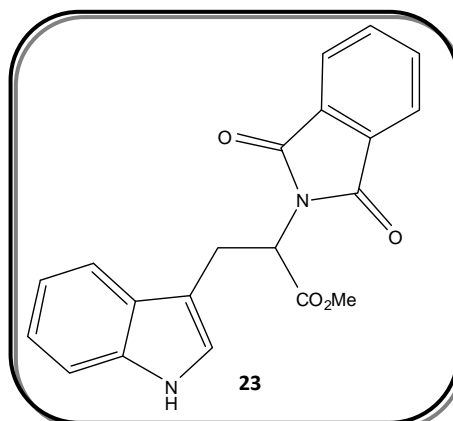
EMAR-ESI-TOF [M+1]⁺ *m/z* 229,1699 (C₁₅H₂₀N₂O₂ requer. 228,16265).

Os dados espectroscópicos estão de acordo com a literatura.²⁸

III.3.2 – Derivados do L-triptofano

III.3.2.1 – Síntese de *N*-ftaloiltriptofano metil éster (**23**)²⁸

A uma solução contendo hidrocloreto de L-triptofano metil éster (**22**) (1,5 g, 5,9 mmol), em tolueno (37,5 mL), sob atmosfera de árgon, foi adicionada Et₃N (0,8 mL, 5,9 mmol). A mistura reaccional foi deixada em agitação, à temperatura ambiente, durante 1 h. Decorrido este tempo, foram adicionados Et₃N (1,2 mL, 8,8 mmol) e anidrido ftálico



(975 mg, 6,6 mmol). A mistura reaccional foi deixada em agitação, a refluxo, durante 1 dia, verificando-se o consumo total do material de partida, por c.c.f. (CH₂Cl₂, sílica), decorrido esse tempo.

O solvente foi removido por pressão reduzida sendo o resíduo obtido dissolvido em CH₂Cl₂ (50 mL) e extraído, duas vezes, com solução aquosa de HCl 1 M (40 mL). A fase orgânica foi seca sobre Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada a pressão reduzida. A mistura bruta foi purificada por c.c. (CH₂Cl₂), obtendo-se o composto **23** sob a forma de cristais amarelos, com rendimento de 79% (1,6 g).

p.f. 59-61 °C (CH₂Cl₂) (Lit.²⁸ 56-58 °C).

IV (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3407 (ml, N-H), 1744 (m, C=O éster), 1712 (F, C=O ftalimida), 1390 (F, C=C).

¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 7,89 (1H, s, N-H), 7,77-7,75 (2H, m, Ar-H), 7,68-7,65 (2H, m, Ar-H), 7,61 (1H, d, *J* 7,8 Hz, Ar-H), 7,28 (1H, d, debaixo do pico do CHCl₃, Ar-H), 7,13 (1H, t, *J* 7,5 Hz, Ar-H), 7,07 (1H, t, *J* 7,4 Hz, Ar-H), 7,01 (1H, s, NCH=C), 5,27 (1H, dd, *J* 9,5, 6,5 Hz, CHCOOCH₃), 3,80 (3H, s, OCH₃), 3,76-3,74 (2H, m, CH₂).

III.3.2.2 – Síntese de *N*-ftaloil-1-(3'-metil-2'-butenil)triptofano metil éster (**24**)²⁸

A uma solução contendo *N*-ftaloil-L-triptofano metil éster (**23**) (500 mg, 1,5 mmol) em DMF seca (7,5 mL), em atmosfera de árgon, foi adicionado NaH (90 mg, 2,25 mmol, 60% dispersão em óleo mineral), em banho de gelo, e deixada em agitação durante 10 min. Decorrido esse tempo, adicionou-se brometo de 3,3-dimetilalilo (330 µL, 3,00 mmol). A mistura resultante foi deixada em agitação, à



temperatura ambiente, durante 1 h, sendo controlada por c.c.f. (Et₂O/*n*-hexano 7:3, sílica). Verificando-se consumo do material de partida ao fim decorrido esse tempo.

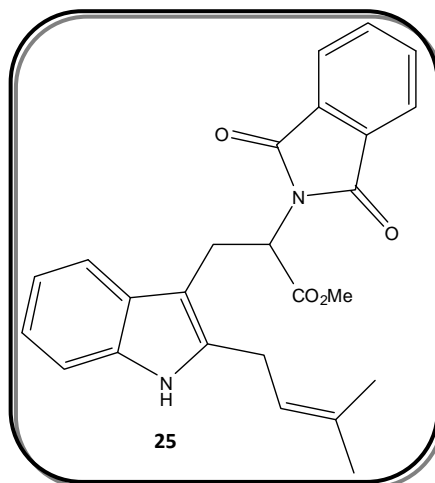
A mistura reaccional foi diluída em água destilada (15 mL) e extraída com AcOEt (15 mL). A fase orgânica foi lavada, cinco vezes, com água destilada (15 mL), seca sobre MgSO₄ anidro, filtrada e o solvente removido a pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por c.c. (gradiente *n*-hexano/Et₂O partindo de 2:1 até 7:3). O composto **24** foi obtido sob a forma de óleo amarelo com rendimento de 43% (264 mg).

¹H-NMR (CDCl₃) δ(ppm): 7,77-7,74 (2H, m, Ar-H), 7,69-7,66 (2H, m, Ar-H), 7,58 (1H, d, *J* 7,9 Hz, Ar-H), 7,20 (1H, d, *J* 8,2 Hz, Ar-H), 7,13 (1H, t, *J* 7,3 Hz, Ar-H), 7,04 (1H, t, *J* 7,3 Hz, Ar-H), 6,87 (1H, s, NCH=C), 5,26-5,23 (1H, m, CH=(CH₃)₂), 5,16-5,13 (1H, m, CHCO₂CH₃), 4,51 (2H, d, *J* 6,8 Hz, CH₂CH=C(CH₃)₂), 3,79 (3H, s, OCH₃), 3,72 (2H, d, *J* 8,4 Hz, CH₂CHCO₂CH₃), 1,68 (3H, s, CH=C(CH₃)₂), 1,65 (3H, s, CH=C(CH₃)₂).

Os dados espectroscópicos estão de acordo com a literatura.³⁵

III.3.2.3 – Síntese de *N*-ftaloil-2-(3'-metil-2'-butenil)triptofano metil éster (**25**)³⁵

A uma solução contendo *N*-ftaloil-1-(3'-metil-2'-butenil)triptofano metil éster (**24**) (300 mg, 0,72 mmol), em CH₂Cl₂ seco (30 mL), sobre atmosfera de árgon, foi adicionado BF₃.Et₂O (2,15 mL, 17 mmol), a -4 °C. A mistura reaccional foi mantida a esta temperatura, durante 18 h, sendo controlada por c.c.f. (Et₂O, sílica). Decorrido este tempo foi adicionada numa solução saturada de NaHCO₃ e



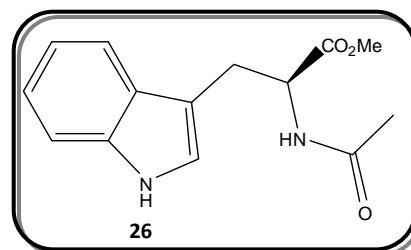
extraída com Et₂O. A fase orgânica foi seca sobre Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente removido a pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por c.c. (Et₂O/*n*-hexano 1:1, sílica), obtendo-se o composto **25** sob a forma de sólido amarelo, com rendimento de 39% (117 mg).

¹H-NMR (CDCl₃) δ(ppm): 7,77-7,72 (3H, m, Ar-H e N-H), 7,70-7,63 (2H, m, Ar-H), 7,48 (1H, d, *J* 7,64 Hz, Ar-H), 7,16 (1H, d, *J* = 7,8 Hz, Ar-H), 7,03-6,86 (2H, m, Ar-H), 5,24 (1H, m, CH=C(CH₃)₂), 5,14-5,10 (1H, m, CHCO₂CH₃), 3,79 (3H, s, OCH₃), 3,73-3,62 (2H, m, CH₂CHCO₂CH₃), 3,40 (2H, ddd, *J* 7,0, 14,7, 49,7 Hz, CH₂CH=C(CH₃)₂), 1,67 (6H, s, C(CH₃)₂).

Os dados espectroscópicos estão de acordo com a literatura.⁴⁴

III.3.2.4 – Síntese de *N*-acetil-L-triptofano metil éster (**26**)²⁸

A uma solução contendo hidrocloreto de L-triptofano metil éster (**22**) (2 g, 7,8 mmol), em AcOEt seco (32 mL), sobre atmosfera inerte, foi adicionada Et₃N (1,1 mL, 7,8 mmol). A mistura resultante foi



deixada em agitação, à temperatura ambiente, durante 1 h. Decorrido esse tempo adicionou-se anidrido acético (1,6 mL, 16,9 mmol), Et₃N (2,4 mL, 17,2 mmol) e 4-DMAP (160 mg, 1,3 mmol). A mistura reaccional foi deixada em agitação, à temperatura

ambiente, durante a noite, observando-se o consumo completo do material de partida, por c.c.f. ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 5%), ao fim desse tempo.

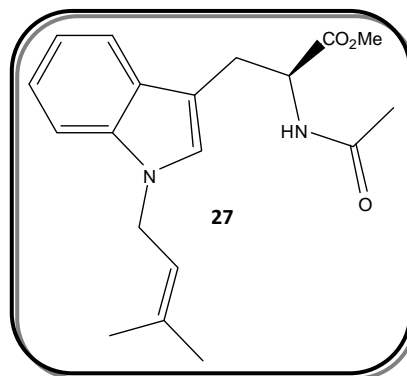
A mistura reaccional foi dissolvida em AcOEt (50 mL), extraída, duas vezes, com uma solução de HCl 1M (100 mL), duas vezes com uma solução saturada de NaHCO_3 (100 mL) e uma vez com água destilada (100 mL). A fase orgânica foi seca sobre Na_2SO_4 anidro, filtrada e o solvente removido a pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por recristalização (AcOEt), obtendo-se o composto **26** com rendimento de 81% (1,6 g).

p.f. 152-153 °C (AcOEt) (Lit.³⁶ 152 °C).

¹H-NMR (CDCl_3) δ (ppm): 8,16 (1H, s, N-H), 7,54 (1H, d, *J* 7,9 Hz, Ar-H), 7,37 (1H, d, *J* 8,1 Hz, Ar-H), 7,20 (1H, t, *J* 7,5 Hz, Ar-H), 7,12 (1H, t, *J* 7,4 Hz, Ar-H), 6,98 (1H, s, NCH=C), 6,00 (1H, d, *J* 7.1 Hz, NHCOCH_3), 4,98-4,94 (1H, m, CHCOOCH_3), 3,70 (3H, s, OCH_3), 3,38-3,28 (2H, m, CH_2), 1,96 (3H, s, NCOCH_3).

III.3.2.5 – Síntese de *N*-acetil-1-(3'-metil-2'-butenil)triptofano metil éster (**27**)

A uma solução de *N*-acetil-L-triptofano metil éster (**26**) (500 mg, 1,9 mmol), em DMF seca (5 mL), foi adicionado NaH (93 mg, 2,3 mmol, 60% dispersão em óleo mineral). A mistura resultante foi deixada em agitação, em banho de gelo, durante 10 min. Decorrido esse tempo, adicionou-se brometo de 3,3-dimetilalilo



(0,41 mL, 3,5 mmol) e deixou-se a mistura reaccional em agitação durante 30 min, a 0 °C. A reacção foi controlada por c.c.f. (Et_2O , sílica), verificando-se o consumo do material de partida decorrido esse tempo.

A mistura reaccional foi dissolvida em AcOEt (25 mL) e extraída, cinco vezes, com água destilada (25 mL). A fase orgânica foi seca sobre Na_2SO_4 anidro, filtrada e o solvente removido a pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por c.c. (Et_2O , sílica), obtendo-se o composto **27**, como um óleo amarelo, com rendimento de 57% (360 mg).

$[\alpha]_D^{20} = +27,8$ (c 3,8, Et₂O).

IV (NaCl) ν_{\max} (cm⁻¹): 3283 (ml, N-H), 2929 (M, C-H alifáticos), 1743 (F, C=O éster), 1657 (F, C=O amida), 1468 (m, C=C).

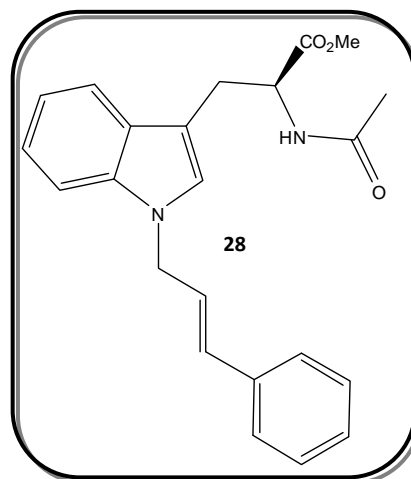
¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 7,50 (1H, d, *J* 7,8 Hz, Ar-H), 7,29 (1H, d, *J* 8,2 Hz, Ar-H), 7,19 (1H, t, *J* 7,4 Hz, Ar-H), 7,09 (1H, t, *J* 7,3 Hz, Ar-H), 6,85 (1H, s, Ar-H), 5,99 (1H, d, *J* 7,2 Hz, NH, troca com D₂O), 5,35-5,32 (1H, m, CH=C(CH₃)₂), 4,94-4,90 (1H, m, CHCO₂CH₃), 4,63 (2H, d, *J* 6,8 Hz, CH₂CH=C(CH₃)₂), 3,69 (3H, s, OCH₃), 3,35-3,25 (2H, m, CH₂CHCO₂CH₃), 1,96 (3H, s, NCOCH₃), 1,81 (3H, s, CH=C(CH₃)₂), 1,76 (3H, s, CH=C(CH₃)₂).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 172,4 (C=O éster), 169,7 (C=O amida), 136,5, 136,2, 128,5, 126,0, 121,7, 119,8, 119,3, 118,7, 109,7, 108,5, 53,3 (CHCOOCH₃), 52,3 (OCH₃), 44,0 (CH₂N), 27,6 (CH₂CH), 25,6 (CH=C(CH₃)₂), 23,3 (NCOCH₃), 18,0 (CH=C(CH₃)₂).

EMAR-EI m/z: 328,177956 (C₁₉H₂₄N₂O₃ requer. 328,178693).

III.3.2.6 – Síntese de N-acetil-1-(3'-fenil-2'-butenil)triptofano metil éster (**28**)

A uma solução de *N*-acetil-L-triptofano metil éster (**26**) (50 mg, 0,2 mmol), em DMF seca (0,5 mL), foi adicionado NaH (10 mg, 0,24 mmol, 60% dispersão em óleo mineral). A mistura resultante foi deixada em agitação, em banho de gelo, durante 10 min. Decorrido esse tempo, adicionou-se 3-bromo-1-fenil-1-propeno (45 mg, 0,24 mmol) e deixou-se a mistura reaccional em agitação durante 2 h, a 0 °C. A reacção foi controlada por c.c.f. (Et₂O, sílica), verificando-se o consumo do material de partida decorrido esse tempo.



A mistura reaccional foi dissolvida em AcOEt (25 mL) e extraída, cinco vezes, com água destilada (25 mL). A fase orgânica foi seca sobre Na₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente removido a pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por c.c. (Et₂O, sílica), obtendo-se o composto **28**, sob a forma de cristais brancos, com rendimento de 72% (52 mg).

p.f. 76-77 °C

$[\alpha]_D^{20} = +15,4$ (c 4,8, Et₂O).

IV (NaCl) ν_{\max} (cm⁻¹): 3399 (F, N-H), 2853 (f, C-H alifáticos), 1742 (F, C=O éster), 1652 (F, C=O amida), 1432 (M, C=C).

¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 7,56 (1H, d, *J* 7,8 Hz, Ar-H), 7,38-7,01 (8H, m, Ar-H), 6,94 (1H, s, Ar-H), 6,43 (1H, d, *J* 16 Hz, CH=CHCH₂), 6,32 (1H, dt, *J* 15,8, 6,0 Hz, CH=CHCH₂), 6,14 (1H, d, *J* 7,3 Hz, NH, troca com D₂O), 4,99-4,95 (1H, m, CHCO₂CH₃), 4,86 (2H, d, *J* 5,3 Hz, NCH₂), 3,68 (3H, s, OCH₃), 3,40-3,29 (2H, m, CH₂CHCO₂CH₃), 1,97 (3H, s, NCOCH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 172,4 (C=O éster), 169,7 (C=O amida), 136,3, 136,1, 132,3, 128,6, 128,5, 127,9, 126,4, 126,3, 124,7, 121,9, 119,4, 118,7, 109,7, 109,2, 53,2 (CHCOOCH₃), 52,3 (OCH₃), 48,2 (CH₂N), 27,6 (CH₂CH), 23,2 (NCOCH₃).

EMAR-ESI-TOF [M+1]⁺ *m/z* 377,1860 (C₂₃H₂₄N₂O₃ requer. 376,17869).

III.4 – Estudos da capacidade de absorção do radical peroxilo (ORAC)

A mistura reaccional continha, num volume final de 200 µl, os seguintes reagentes, dissolvidos em tampão fosfato de potássio 75mM pH 7,4/acetona (9:1), às concentrações finais indicadas: fluoresceína (61 nM), compostos teste a várias concentrações e AAPH (19 nM).

O radical peroxilo (ROO[·]) foi gerado por termodecomposição do AAPH no leitor de microplacas, à temperatura de 37°C.

As leituras de fluorescência foram efectuadas a comprimentos de onda de excitação e emissão de 485 nm e 528 nm, respectivamente, com intervalos de 1 min, até que o valor da fluorescência fosse menor ou igual a 0,5% da fluorescência inicial.

Cada estudo corresponde a um mínimo de quatro experiências realizadas em triplicado.

Foram, ainda, realizados ensaios de fluorescência para cada composto, na concentração máxima, na ausência de fluoresceína e AAPH. E, também, ensaios de absorção, na gama de comprimentos de onda de 300 a 600 nm. Verificou-se que nenhum dos compostos emitia fluorescência, nem absorvia na gama de comprimentos

de onda em estudo. Deste modo eliminaram-se possíveis interferências que pudessem alterar os valores em estudo.

III.5 – Estudos sintéticos para a preparação de um potencial candidato a inibidor da COX-2

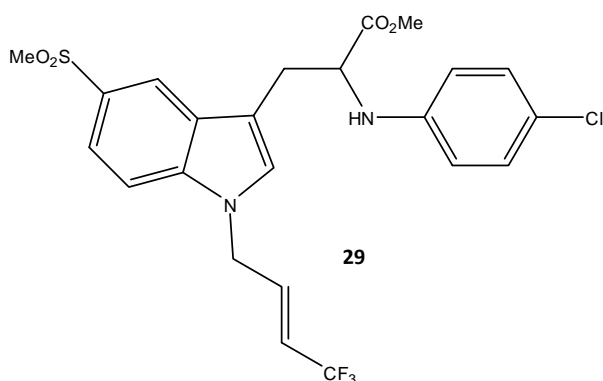


Figura 22 – Estrutura do potencial candidato a inibidor selectivo da COX-2.

III.5.1 – Estudos de *N*-arilação

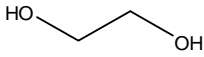
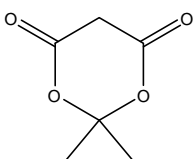
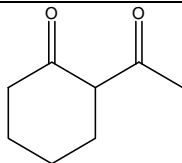
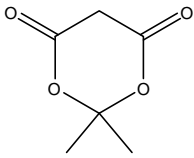
III.5.1.1 – A partir do L-triptofano metil éster

Procedimento geral:^{39,45}

Num balão de duas tubuladuras, sobre atmosfera de árgon, contendo CuI (5 mol%), base (2 mmol), L-triptofano metil éster (**22**) (1,5 mmol) e 4-cloriodobenzeno (1 mmol), adicionou-se, via seringa, o solvente (2 mL). Por fim, adicionou-se o ligando (20 mol%). A mistura resultante foi deixada em agitação, sobre atmosfera de árgon, durante o tempo e à temperatura indicados na tabela **2**.

A mistura reaccional foi diluída em AcOEt (25 mL) e lavada, cinco vezes, com água destilada (25 mL). A fase orgânica foi seca sobre Na₂SO₄, filtrada e o solvente removido a pressão reduzida.

Tabela 2 – Condições reaccionais utilizadas na *N*-arilação do L-triptofano metil éster.

Ensaio	Solvente	Base	Ligando	Temperatura (°C)	T reacção	Observações
1	<i>i</i> PrOH	K ₃ PO ₄		80	21 h	Recuperação de material de partida
2	DMF				72 h	Mistura complexa
3	MeOH				72 h	Mistura complexa
4	DMF	Cs ₂ CO ₃		t.a. até 70	70 h	Recuperação de material de partida
5				t.a.	5 dias	Recuperação de material de partida
6				65	24 h	Mistura complexa
7				t.a.	26 h	Mistura complexa
8	DMF	Cs ₂ CO ₃		t.a.	72 h	Recuperação de material de partida
9				70	24 h	Recuperação de material de partida
10			-----	90	36 h	Mistura complexa

III.5.1.2 – A partir do L-triptofano³⁸

Num balão, sob atmosfera de árgon, contendo L-triptofano (**2**) (150 mg, 0,73 mmol), 4-cloriodobenzeno (175 mg, 0,73 mmol), K₂CO₃ (152 mg, 1,09 mmol) e CuI (14 mg, 0,073 mmol), adicionou-se, via seringa, DMF seca (4 mL). A



mistura resultante foi deixada em agitação, a 80 °C, durante 1,5 h. A reacção foi controlada por c.c.f. (AcOEt/*n*-hexano 5:1, sílica), não se tendo observado material de partida decorrido esse tempo.

A mistura reaccional foi deixada arrefecer até atingir a temperatura ambiente, sendo, então, dissolvida em AcOEt (10 mL) e água destilada (5 mL). Acidificou-se a solução a pH 3 com uma solução aquosa de HCl 10%. A fase orgânica foi separada e a fase aquosa extraída, cinco vezes, com AcOEt (20 mL). As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com solução saturada de NaCl, secas sobre Na₂SO₄ anidro, filtradas e solvente evaporado à secura, a pressão reduzida.

Obteve-se um resíduo na forma de óleo castanho (374 mg). Sendo este purificado por c.c.p. (47 mg) (AcOEt/*n*-hexano 5:1, sílica), obtendo-se o composto **31**, sob a forma de sólido cinzento, com rendimento de 83% (24,2 mg).

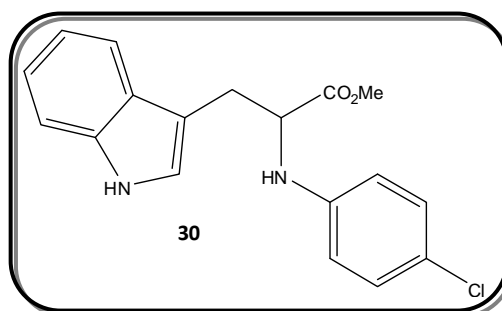
p.f. 145-147 °C (AcOEt/*n*-hexano) (Lit.⁴⁰ 142-146 °C).

IV (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3400 (F, N-H), 1710 (F, C=O), 1494 (F, C=C).

¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 8,02 (1H, s, N-H), 7,58 (1H, d, *J* 7,9 Hz, Ar-H), 7,27 (1H, d, *J* 8,1 Hz, Ar-H), 7,16 (1H, t, *J* 7,4 Hz, Ar-H), 7,09-7,06 (3H, m, Ar-H), 6,97 (1H, s, NCH=C), 6,74 (2H, sl, NHArCl e COOH), 6,48 (1H, d, *J* 8,7 Hz, Ar-H), 4,37-4,34 (1H, m, CHCOOH), 3,41-3,36 (1H, dd, *J* 5,2 Hz, *J* 14,6 Hz, CH₂), 3,32-3,26 (1H, dd, *J* 6,2 Hz, *J* 14,6 Hz, CH₂).

III.5.2 – Reacção de *O*-metilação

A uma solução de ácido 2-(4-clorofenilamino)-3-(1*H*-indol-3-il)propanóico (**31**) (100 mg, 0,32 mg), em CH₂Cl₂ seco (6 mL), sob atmosfera de árgon, adicionou-se uma solução etérea de diazometano (previamente preparado de acordo com o método descrito na literatura)⁴⁶ (0,84 mL, 0,48 mol).



A mistura resultante foi deixada em agitação, durante 1h. A reacção foi controlada por c.c.f. (CH₂Cl₂, sílica), não se tendo observado material de partida decorrido esse tempo.

Evaporou-se o solvente a pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por c.c. (CH₂Cl₂, sílica), obtendo-se o composto **30**, sob a forma de óleo castanho, quantitativamente (105 mg).

IV (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3400 (ml, N-H), 2924 (C-H alifáticos), 1736 (F, C=O), 1499 (F, C=C).

¹H-NMR (CDCl₃) δ(ppm): 8,16 (1H, s, N-H), 7,58 (1H, d, *J* 7,8 Hz, Ar-H), 7,33 (1H, d, *J* 8,0 Hz, Ar-H), 7,22 (1H, t, *J* 7,4 Hz, Ar-H), 7,17-7,11 (3H, m, Ar-H), 6,96 (1H, s, NCH=C), 6,50 (1H, d, *J* 8,7 Hz, Ar-H), 4,44-4,39 (1H, m, CHCOOCH₃), 4,29 (1H, d, *J* 7,8 Hz, NHArCl), 3,68 (3H, s, OCH₃), 3,41-3,28 (2H, m, CH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ(ppm): 173,8 (C=O), 145,2 (C-Ar), 136,0 (C-Ar), 129,1 (CH-Ar), 127,4 (C-Ar), 122,9 (CH-Ar), 122,7 (C-Ar), 122,1 (CH-Ar), 119,6 (CH-Ar), 118,4 (CH-Ar), 114,5 (CH-Ar), 111,3 (CH-Ar), 110,0 (C-Ar), 57,0 (CH), 52,1 (CH₃), 28,2 (CH₂).

III.5.3 – Estudos de introdução do grupo mesilo na posição 5 do anel indólico

III.5.3.1 – Reacção com tricloreto de alumínio

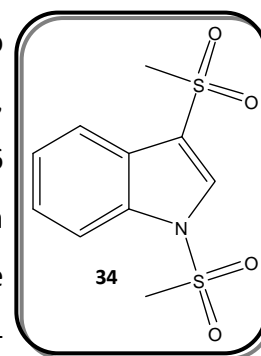
A uma solução de *N*-acetil-*L*-triptofano metil éster (**26**) (100 mg, 0,38 mmol) em CH₂Cl₂ seco (3 mL), sob atmosfera de árgon, adicionou-se AlCl₃ (96 mg, 0,72 mmol) e CH₃SO₂Cl (37 µL, 0,48 mmol). A mistura resultante foi deixada a refluxo, sob agitação, durante 24 h. A reacção foi controlada por c.c.f. (Et₂O, sílica) não se observando consumo do material de partida nem formação de novos produtos.

III.5.3.2 – Reacção com irradiação de UV⁴¹

Numa célula de quartzo contendo uma solução de propanoato de metilo 2-acetamido-3-(1-(metilsulfonyl)-1*H*-indol-3-il) (**32**) (17 mg, 0,05 mmol), em CH₃CN seco (3 mL), adicionou-se Et₃N (35 µL, 0,25 mmol). A mistura resultante foi irradiada com uma lâmpada de 254 nm durante 1,5 h. A reacção foi controlada por c.c.f. (AcOEt, sílica) não se observando consumo do material de partida nem formação de novos produtos.

III.5.3.3 – Reacção a partir do 5-bromoindole⁴²

A uma suspensão de KH (102 mg, 0,76 mmol, 30% dispersão em óleo mineral) em Et₂O seco (1,5 mL), em banho de gelo, adicionou-se uma solução de 5-bromoindole (**33**) (150 mg, 0,76 mmol) em Et₂O (1,5 mL). A mistura resultante foi deixada em agitação durante 15 min, em banho de gelo, sobre atmosfera de



árgon. Decorrido esse tempo a mistura reaccional foi arrefecida a -78 °C e o ^tBuLi adicionado (0,66 mL, 1,15 mmol). Após 10 min adicionou-se uma solução de MeSO₂Cl (89 µL, 1,15 mmol) em Et₂O (0,3 mL). A mistura resultante foi deixada aquecer, lentamente, até atingir a temperatura ambiente. A reacção foi controlada por c.c.f. (*n*-hexano/AcOEt 3:1, sílica) verificando-se o consumo total do material de partida. Adicionou-se uma solução aquosa H₃PO₄ 1M (5 mL), em banho de gelo, e extraiu-se com AcOEt. As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com uma solução saturada de NaHCO₃, secas sobre MgSO₄, filtradas e o solvente removido a pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por c.c. (gradiente, *n*-hexano/AcOEt 3:1, 3:2, 1:1, sílica) obtendo-se o produto **34** sob a forma de sólido castanho com rendimento de 15% (31,3 mg).

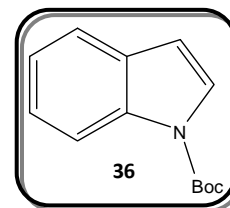
IV (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3024 (f, C-H aromáticos), 2930 (f, C-H alifáticos), 1446 (M, C=C), 1372 (F, SO₂Me), 1134 (F, SO₂Me).

¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 8,13 (1H, s, Ar-H), 7,98-7,94 (2H, m, Ar-H), 7,54-7,46 (2H, m, Ar-H), 3,29 (3H, s, CH₃), 3,20 (3H, s, CH₃).

TOF MS EI+ [M]⁺ m/z 273,0105 (C₁₀H₁₁NO₄S₂ requer. 273,3286).

III.5.3.4 – Reacção a partir do *N*-Boc-5-bromoindole

A uma solução contendo *N*-Boc-5-bromoindole (**35**) (184 mg, 0,62 mmol) em THF seco (1,2 mL), sob atmosfera de árgon, a -78 °C, foi adicionado ^tBuLi (0,73 mL, 1,24 mmol). Após 20 min, a esta temperatura, adicionou-se uma solução de MeSO₂Cl (96 µL, 1,24 mmol) em THF seco (0,3 mL). A mistura resultante foi deixada aquecer até -55 °C, sendo controlada por c.c.f. (*n*-hexano, sílica) verificando-se o consumo total do material de partida ao atingir essa temperatura. Adicionou-se uma água destilada (5 mL), a -55 °C, e extraiu-se com AcOEt. As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com uma solução saturada de NaHCO₃, secas sobre MgSO₄, filtradas e o solvente removido a pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por c.c.p. (*n*-hexano/CH₂Cl₂ 9:1, sílica) obtendo-se o produto **36** sob a forma de óleo incolor com rendimento de 16% (22,5 mg).



¹H-NMR (CDCl₃) δ(ppm): 8,16 (1H, d, *J* 7,6 Hz, Ar-H), 7,61 (1H, d, *J* 3,4 Hz, Ar-H), 7,57 (1H, d, *J* 7,7 Hz, Ar-H), 7,33 (1H, t, *J* 7,6 Hz, Ar-H), 7,24 (1H, t, *J* 7,6 Hz, Ar-H), 6,58 (1H, d, *J* 3,4 Hz, Ar-H), 1,69 (9H, s, CH₃).

Os dados espectroscópicos estão de acordo com a literatura.⁴⁷

Capítulo IV – Bibliografía

- (1) Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T. D.; Mazur, M.; Telser, J. *Int. J. Biochem. Cell B.* **2007**, *39*, 44-84 e referências citadas.
- (2) Valko, M.; Rhodes, C. J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. *Chem-Biol. Interact.* **2006**, *160*, 1-40 e referências citadas.
- (3) Scandalios, J. G. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2005**, *38*, 995-1014.
- (4) Finkel, T.; Holbrook, N. J. *Nature* **2000**, *408*, 239-247.
- (5) *Oxford Biomedical Research: News & Views* **2007**.
- (6) Sies, H.; Stahl, W. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *62*, 1315-1321.
- (7) Hamberg, M.; Samuelss.B P. *Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70*, 899-903.
- (8) Furse, K. E.; Pratt, D. A.; Porter, N. A.; Lybrand, T. P. *Biochemistry* **2006**, *45*, 3189-3205.
- (9) FitzGerald, G. A.; Patrono, C. *New Engl. J. Med.* **2001**, *345*, 1709-1709.
- (10) Kujubu, D. A.; Fletcher, B. S.; Varnum, B. C.; Lim, R. W.; Herschman, H. R. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 12866-12872.
- (11) Xie, W. L.; Chipman, J. G.; Robertson, D. L.; Erikson, R. L.; Simmons, D. L. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 2692-2696.
- (12) Blobaum, A. L.; Marnett, L. J. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1425-1441.
- (13) Nikolic, D.; van Breemen, R. B. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 351-354.
- (14) Smith, W. L.; DeWitt, D. L.; Garavito, R. M. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 145-182.
- (15) Moore, B. C.; Simmons, D. L. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 1131-1144.
- (16) Cruz-Lopez, O.; Diaz-Mochon, J. J.; Campos, J. M.; Entrena, A.; Nunez, M. T.; Labeaga, L.; Orjales, A.; Gallo, M. A.; Espinosa, A. *Chemmedchem* **2007**, *2*, 88-100.
- (17) Fernandes, E.; Costa, D.; Toste, S. A.; Lima, J. L. F. C.; Reis, S. *Free Radical Bio. Med.* **2004**, *37*, 1895-1905.
- (18) Cano, A.; Alcaraz, O.; Arnao, M. B. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *376*, 33-37.
- (19) Ng, T. B.; Liu, F.; Zhao, L. *J. Neural. Transm.* **2000**, *107*, 1243-1251.
- (20) Stolc, S. *Life Sci.* **1999**, *65*, 1943-1950.
- (21) Suzen, S.; Bozkaya, P.; Coban, T.; Nebioglu, D. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.* **2006**, *21*, 405-411.
- (22) Antosiewicz, J.; Damiani, E.; Jassem, W.; Wozniak, M.; Orena, M.; Greci, L. *Free Radical Bio. Med.* **1997**, *22*, 249-255.
- (23) Bozkaya, P.; Olgen, S.; Coban, T.; Nebioglu, D. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.* **2007**, *22*, 319-325.
- (24) Usui, T.; Kondoh, M.; Cui, C. B.; Mayumi, T.; Osada, H. *Biochem. J.* **1998**, *333*, 543-548.
- (25) Zhao, S.; Smith, K. S.; Deveau, A. M.; Dieckhaus, C. M.; Johnson, M. A.; Macdonald, T. L.; Cook, J. M. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1559-1562.
- (26) Bose, A. K.; Greer, F.; Price, C. C. *J. Org. Chem.* **1958**, *23*, 1335-1338.
- (27) Desilva, S. O.; Snieckus, V. *Can. J. Chem.* **1978**, *56*, 1621-1627.
- (28) Cardoso, A. S., *Síntese de Alcalóides Indólicos: Desbromoflustramina B e Triprostatina B*; Universidade Nova de Lisboa, **2001**.
- (29) Sheehan, J. C.; Bolhofer, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 2786-2788.
- (30) Hoffmann, E.; Schiffsh.H J. *Org. Chem.* **1962**, *27*, 4686-&.
- (31) Caballero, E.; Avendano, C.; Menendez, J. C. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6944-6951.
- (32) Cardoso, A. S.; Lobo, A. M.; Prabhakar, S. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 3611-3613.
- (33) Schkeryantz, J. M.; Woo, J. C. G.; Siliphaivanh, P.; Depew, K. M.; Danishefsky, S. *J. J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11964-11975.
- (34) Zhao, S.; Gan, T.; Yu, P.; Cook, J. M. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7009-7012.
- (35) Cardoso, A. S. P.; Marques, M. M. B.; Srinivasan, N.; Prabhakar, S.; Lobo, A. M.; Rzepa, H. S. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3966-3972.

- (36) Huang, H. T.; Macallister, R. V.; Thomas, D. W.; Niemann, C. J. *Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 3231-3234.
- (37) Rottger, S.; Sjoberg, P. J. R.; Larhed, M. *J. Comb. Chem.* **2007**, *9*, 204-209.
- (38) Ma, D. W.; Zhang, Y. D.; Yao, J. C.; Wu, S. H.; Tao, F. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12459-12467.
- (39) Shafir, A.; Lichtor, P. A.; Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3490-3491.
- (40) Apparao, S.; Singh, G.; Ila, H.; Junjappa, H. *Indian J. Chem. B* **1984**, *23*, 15-17.
- (41) Hong, X. C.; Mejia-Oneto, J. M.; France, S.; Padwa, A. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2409-2412.
- (42) Moyer, M. P.; Shiurba, J. F.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 5106-5110.
- (43) Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; Perrin, D. R. *Purification of Laboratory Chemicals*; Pergamon Press, **1965**.
- (44) Depew, K. M.; Danishefsky, S. J.; Rosen, N.; SeppLorenzino, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12463-12464.
- (45) Kwong, F. Y.; Klapars, A.; Buchwald, S. L. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 581-584.
- (46) Furniss, B. S.; Hannaford, A. J.; Smith, P. W. G.; Tatchell, A. R. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*; 5 ed.; Longman Scientific & Technical, **1991**.
- (47) Hasan, I.; Marinelli, E. R.; Lin, L. C. C.; Fowler, F. W.; Levy, A. B. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 157-164.