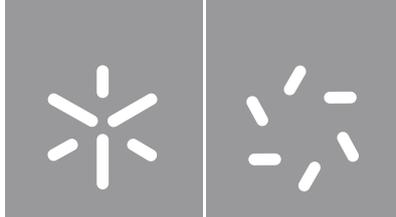


**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Ana Morgana Gonçalves Pereira da Silva

**Síntese de novos conjugados de  
S- e N,S-heterociclos-dipéptidos potencialmente  
antitumorais; formação e caracterização de um  
hidrogel**





**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Ana Morgana Gonçalves Pereira da Silva

**Síntese de novos conjugados de  
S- e N,S-heterociclos-dipéptidos potencialmente  
antitumorais; formação e caracterização de um  
hidrogel**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Química Medicinal

Trabalho efetuado sob a orientação da  
**Doutora Maria João R. P. Queiroz**

## **DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS**

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos. Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada. Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

### **Licença concedida aos utilizadores deste trabalho**



**Atribuição-Compartilhual**  
**CC BY-SA**

<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Doutora Maria João R. P. Queiroz, pelo seu imenso apoio, os seus inúmeros ensinamentos, o seu constante acompanhamento do trabalho, assim como a sua resiliência e paciência em relação a mim.

Aos meus colegas do Laboratório 2.11 – Carlos Oliveira, André Carvalho, Carolina Amorim e Valéria Gomes – pela ajuda em relação aos hidrogéis.

Ao Centro de Química da Universidade do Minho (CQUM, UID/QUI/686/2020), financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e ao Departamento de Química, pelas facilidades concedidas à realização deste trabalho. À Escola de Ciências da Universidade do Minho, pelo apoio administrativo e logístico.

À rede nacional de Ressonância Magnética Nuclear (PT NMR) e à Dr<sup>a</sup> Elisa Pinto, técnica superior do Departamento de Química, pela simpatia e prontidão com que executou todos os espetros de RMN necessários à caracterização dos compostos.

Ao Dr. João Amorim, pela sua ajuda e orientações que me mantiveram concentrada e positiva sobre a finalização deste longo trabalho.

Aos meus familiares, principalmente à minha mãe, em certos momentos a minha única fonte de esperança nesta fase crítica da minha vida.



## **DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE**

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração. Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

# Síntese de novos conjugados de *S* e *N,S* heterociclos-dipéptidos potencialmente antitumorais; formação e caracterização de um hidrogel

## Resumo

A conjugação de um heterociclo bioativo com péptidos biocompatíveis vai atuar como uma restrição conformacional, sendo usada para preparar conjugados de heterociclo-péptidos, com atividade biológica e reconhecimento celular aumentados.

Neste trabalho, foram sintetizados conjugados de heterociclo-dipéptidos, usando *S* (benzo[*b*]tiofeno) e *N,S* (tieno[2,3-*b*]piridina e tieno[2,3-*b*]quinolina) heterociclos como grupos potencialmente antitumorais e *N*-protetores de dipéptidos de L-Phe-L-Phe e de L-Phe-L-Leu. Prepararam-se os ácidos tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxílico e tieno[2,3-*b*]quinolina-2-carboxílico, como componentes de acoplamento, a partir das reações da 2-cloro-piridina-3-carbaldeído e 2-cloro-quinolina-3-carbaldeído, respetivamente, com tioglicolato de metilo em meio básico, formando anéis de tiofeno fundidos, substituídos com éster metílico na posição 2, que foram depois hidrolisados. O ácido benzo[*b*]tiofeno-2-carboxílico foi adquirido comercialmente. O acoplamento dos ácidos carboxílicos heterocíclicos com sais de trifluoroacetato de L-fenilalanil-L-fenilalaninato de etilo e de L-fenilalanil-L-leucinato de etilo ocorreu usando HBTU e Et<sub>3</sub>N, tendo originado os correspondentes ésteres etílicos, que foram hidrolisados aos ácidos carboxílicos correspondentes – *N*-(tieno[2,3-*b*]piridina-2-carbonil)-L-fenilalanil-L-fenilalanina, *N*-(tieno[2,3-*b*]quinolina-2-carbonil)-L-fenilalanil-L-fenilalanina, *N*-(benzo[*b*]tiofeno-2-carbonil)-L-fenilalanil-L-fenilalanina, *N*-(tieno[2,3-*b*]piridina-2-carbonil)-L-fenilalanil-L-leucina, *N*-(tieno[2,3-*b*]quinolina-2-carbonil)-L-fenilalanil-L-leucina e *N*-(benzo[*b*]tiofeno-2-carbonil)-L-fenilalanil-L-leucina. Os conjugados heterociclo-dipéptido (ésteres e ácidos) foram completamente caracterizados por p.f., <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C RMN e massa de alta resolução no ião [M+H]<sup>+</sup>.

Péptidos pequenos protegidos com núcleos aromáticos no *N*-terminal mostraram originar hidrogéis peptídicos supramoleculares bioativos, biocompatíveis e biodegradáveis. Deste modo, os seis conjugados preparados, com o ácido carboxílico livre, foram submetidos a estudos de gelificação em água, pelo método de abaixamento de pH, usando glucono- $\delta$ -lactona. Apenas o conjugado de benzo[*b*]tiofeno com L-Phe-L-Phe formou um hidrogel, com concentração crítica de 0,15 wt% e pH final de 6,85, que foi caracterizado por STEM, formando uma rede 3D de fibras entrelaçadas (espessura média de 17 nm), e reologia, mostrando um comportamento viscoelástico semelhante à matriz extracelular de alguns tecidos humanos.

**Palavras-chave:** Antitumorais, conjugados heterociclo-dipéptidos, dipéptidos, heterociclos, hidrogéis.

# Synthesis of novel potentially antitumor *S* and *N,S* heterocycle-dipeptide conjugates; formation and characterization of a hydrogel

## Abstract

The conjugation of a bioactive heterocycle with biocompatible peptides will act as a conformational constraint, which is used to prepare heterocycle-peptide conjugates with increased biological activity and cellular recognition.

In this work, heterocycle-dipeptide conjugates were synthesized using *S* (benzo[*b*]thiophene) and *N,S* (thieno[2,3-*b*]pyridine and thieno[2,3-*b*]quinoline) heterocycles as potentially antitumor and *N*-protective groups of L-Phe-L-Phe and L-Phe-L-Leu dipeptides. The thieno[2,3-*b*]pyridine-2-carboxylic acid and thieno[2,3-*b*]quinoline-2-carboxylic acid precursors were prepared as coupling components from the reactions of 2-chloro-pyridine-3-carbaldehyde and 2-chloro-quinoline-3-carbaldehyde, respectively, with methyl thioglycolate in a basic medium, forming fused thiophene rings, substituted with methyl esters in position 2, that were hydrolyzed. Benzo[*b*]thiophene-2-carboxylic acid was obtained commercially. Coupling of heterocyclic carboxylic acids with trifluoroacetate salts of ethyl L-phenylalanyl-L-phenylalaninate and of ethyl L-phenylalanyl-L-leucinate took place using HBTU and Et<sub>3</sub>N, giving rise to the corresponding ethyl esters, which were hydrolyzed to the carboxylic acids – *N*(thieno[2,3-*b*]pyridine-2-carbonyl)-L-phenylalanyl-L-phenylalanine, *N*(thieno[2,3-*b*]quinoline-2-carbonyl)-L-phenylalanyl-L-phenylalanine, *N*(benzo[*b*]thiophene-2-carbonyl)-L-phenylalanyl-L-phenylalanine, *N*(thieno[2,3-*b*]pyridine-2-carbonyl)-L-phenylalanyl-L-leucine, *N*(thieno[2,3-*b*]quinoline-2-carbonyl)-L-phenylalanyl-L-leucine and *N*(benzo[*b*]thiophene-2-carbonyl)-L-phenylalanyl-L-leucine. The heterocycle-dipeptide conjugates (esters and acids) were fully characterized by m.p., <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR and high-resolution mass in the [M+H]<sup>+</sup> ion.

Small peptides with aromatic nuclei at the *N*-terminus have been shown to yield bioactive, biocompatible and biodegradable supramolecular peptide hydrogels. Thus, the six conjugates prepared, with free carboxylic acids, were subjected to gelation studies in water, by the pH lowering method, using glucono-δ-lactone. Only the conjugate of benzo[*b*]thiophene with L-Phe-L-Phe formed a hydrogel, with a critical concentration of 0.15 wt% and final pH 6,85, which was characterized by STEM, forming a 3D fiber network (average thickness of 17 nm), and rheology, showing a viscoelastic behavior similar to the extracellular matrix of human tissues.

**Keywords:** Antitumoral, dipeptides, heterocycle-dipeptide conjugates, heterocycles, hydrogels.

## Índice

<b>1. Introdução</b> .....	2
1.1 Peptidomiméticos baseados em heterociclos .....	2
1.2 Hidrogéis peptídicos supramoleculares .....	5
1.3 Seleção dos sistemas heterocíclicos com propriedades antitumorais para grupos <i>N</i> -protetores de péptidos .....	10
<b>2. Apresentação de resultados e discussão</b> .....	15
2.1 Síntese dos precursores ésteres metílicos heterocíclicos <b>2a</b> e <b>2b</b> e dos correspondentes ácidos carboxílicos <b>3a</b> e <b>3b</b> para acoplamento com dipéptidos.....	15
2.2 Síntese do éster etílico dipeptídico <i>N</i> -Boc protegido <b>6b</b> e dos sais de trifluoroacetato dos ésteres etílicos dipeptídicos <b>7a</b> e <b>7b</b> .....	17
2.3 Acoplamento dos compostos heterocíclicos <b>3a-c</b> com sais de trifluoroacetato dos dipéptidos <b>7a</b> e <b>7b</b> .....	19
2.3.1 Acoplamento dos compostos heterocíclicos <b>3a-c</b> com o sal de trifluoroacetato do L-fenilalanil-L-fenilalaninato de etilo ( <b>7a</b> ).....	19
2.3.2 Acoplamento dos compostos heterocíclicos <b>3a-c</b> com o sal de trifluoroacetato do L-fenilalanil-L-leucinato de etilo ( <b>7b</b> ) .....	20
2.4 Síntese dos ácidos carboxílicos dos dipéptidos <i>N</i> -protegidos <b>10a-c</b> e <b>11a-c</b> .....	21
2.5 Estudos de gelificação por abaixamento de pH usando GdL .....	34
2.5.1 Caracterização do hidrogel por reologia.....	36
<b>4. Parte experimental</b> .....	42
4.1 Geral .....	42
4.1.1 Síntese dos ésteres metílicos dos precursores heterocíclicos <b>2a</b> e <b>2b</b> .....	42
4.1.2 Síntese dos ácidos carboxílicos dos precursores heterocíclicos <b>3a</b> e <b>3b</b> .....	43
4.1.3 Síntese dos ésteres etílicos dipeptídicos <i>N</i> -protegidos por Boc <b>6a</b> e <b>6b</b> .....	44
4.1.4 Síntese dos sais trifluoroacetato de L-fenilalanil-L-fenilalaninato de etilo e de L-fenilalanil-L-leucinato de etilo, <b>7a</b> e <b>7b</b> , respetivamente .....	45
4.1.5 Acoplamento dos compostos heterocíclicos <b>3a-c</b> com o sal de trifluoroacetato do L-fenilalanil-L-fenilalaninato de etilo <b>7a</b> e com o sal de trifluoroacetato do L-fenilalanil-L-leucinato de etilo <b>7b</b> .....	46
4.1.6 Síntese dos ácidos carboxílicos dos dipéptidos <i>N</i> -protegidos por heterociclos <b>10a-c</b> e <b>11a-c</b> .....	52
<b>5. Referências</b> .....	59

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> – (A) Reação de click para formação de 1,2,3-triazoles 1,4-dissubstituídas. (B) Representação de dipéptidos com uma ligação amida ou com um anel de 1,2,3-triazole 1,4-dissubstituído como isómero. ....	3
<b>Figura 2</b> – (A) Representação da ligação cis-amida e do mimético tetrazole 1,5-dissubstituído. (B) Estrutura do dipeptidomimético com uma unidade de restrição $\alpha$ -metilenotetrazole <b>1</b> e dos conjugados de quinolina-péptidos <b>IIa-c</b> , e resultados dos estudos de inibição da HIV protease dos últimos. ....	4
<b>Figura 3</b> – Peptidomiméticos obtidos por acoplamento do ácido 2-amino-4-pirrolidinotieno[2,3- <i>d</i> ]pirimidina-6-carboxílico com o <i>N</i> -terminal de diferentes aminoácidos ou péptidos. ....	5
<b>Figura 4</b> – Estruturas gerais de hidrogeladores peptídicos supramoleculares e exemplos de grupos <i>N</i> -protetores aromáticos. ....	6
<b>Figura 5</b> – Hidrólise da GdL em ácido glucónico. ....	7
<b>Figura 6</b> – Fotografia de hidrogéis preparados a partir de Fmoc-L-Leu-Gly-OH, através da adição de HCl ou de GdL. Em ambos os casos o pH final é 3,9. ....	7
<b>Figura 7</b> – Estrutura do conjugado Npx-L-Ala-Z- $\Delta$ Phe-OH. ....	8
<b>Figura 8</b> – Imagem de TEM do hidrogel obtido a partir do hidrogelador representado na Figura 7 ....	9
<b>Figura 9</b> – Estrutura do fármaco Raloxifene, baseado no núcleo de benzo[ <i>b</i> ]tiofeno. ....	10
<b>Figura 10</b> – Exemplo de um composto derivado de benzo[ <i>b</i> ]tiofeno que apresentou atividade antiproliferativa pela inibição da polimerização da tubulina. ....	11
<b>Figura 11</b> – Estruturas dos compostos derivados tieno[2,3- <i>b</i> ]piridina que mostraram atividade antitumoral promissora em diferentes linhas celulares. ....	11
<b>Figura 12</b> – Estrutura das tienoquinolina-2-carboxamida-chalconas mais promissoras na atividade antiproliferativa de várias células tumorais. ....	12
<b>Figura 13</b> – Estrutura dos núcleos heterocíclicos base usados neste trabalho. ....	13
<b>Figura 14</b> – Espetro de $^1\text{H}$ RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) do composto <b>10c</b> . ....	23
<b>Figura 15</b> – Espetro 2D de COSY do composto <b>10c</b> . ....	24
<b>Figura 16</b> – Espetro de $^{13}\text{C}$ RMN (100,6 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) do composto <b>10c</b> . ....	25
<b>Figura 17</b> – Espetro de DEPT $\theta = 135^\circ$ do composto <b>10c</b> . ....	25
<b>Figura 18</b> – Expansão da zona alifática do espectro de HSQC do composto <b>10c</b> . ....	26
<b>Figura 19</b> – Expansão da zona aromática do espectro de HSQC do composto <b>10c</b> . ....	27
<b>Figura 20</b> – Espetro de $^1\text{H}$ RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) do composto <b>11a</b> . ....	29
<b>Figura 21</b> – Expansão da zona alifática do espectro 2D de COSY do composto <b>11a</b> . ....	30
<b>Figura 22</b> – Expansão do espectro 2D de COSY do composto <b>11a</b> . ....	30
<b>Figura 23</b> – Espetro de $^{13}\text{C}$ RMN (100,6 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) do composto <b>11a</b> . ....	31
<b>Figura 24</b> – Espetro de DEPT $\theta = 135^\circ$ do composto <b>11a</b> . ....	32
<b>Figura 25</b> – Expansão da zona alifática do espectro de HSQC do composto <b>11a</b> . ....	32
<b>Figura 26</b> – Expansão da zona aromática do espectro de HSQC do composto <b>11a</b> . ....	33

<b>Figura 27</b> – Estudos de gelificação realizados A (0,15 wt%), B (0,3 wt%) e C (0,4 wt%) para determinar a CGC do hidrogelador <b>10c</b> , usando o método de inversão do frasco. ....	34
<b>Figura 28</b> – Imagens de STEM, com diferentes ampliações, do hidrogel formado pelo composto <b>10c</b> (0,15 wt%) com GdL (0,6 wt%). ....	35
<b>Figura 29</b> – Imagens de STEM da solução do composto <b>10b</b> (0,4 wt%) com GdL (0,6 wt%) em água. ....	35
<b>Figura 30</b> – Imagens de TEM do hidrogel do composto <b>IX</b> . ....	36
<b>Figura 31</b> – Imagens de TEM do hidrogel do composto <b>X</b> . ....	36
<b>Figura 32</b> – Variação de $G'$ e $G''$ durante o processo cinético de gelificação do composto <b>10c</b> . ....	37
<b>Figura 33</b> – Dependência da frequência dos módulos $G'$ e $G''$ do composto <b>10c</b> a 0,4 wt%. ....	37
<b>Figura 34</b> – Gráfico obtido a partir do varrimento de frequência do hidrogel do composto <b>X</b> . ....	38
<b>Figura 35</b> – Dependência da tensão dos módulos $G'$ e $G''$ do composto <b>10c</b> a 0,4 wt%. ....	38

## Índice de esquemas

<b>Esquema 1</b> – Síntese dos ésteres metílicos heterocíclicos <b>2a</b> e <b>2b</b> . .....	15
<b>Esquema 2</b> – Mecanismo da reação de síntese do composto <b>2a</b> . .....	16
<b>Esquema 3</b> – Síntese dos ácidos carboxílicos heterocíclicos <b>3a</b> e <b>3b</b> . .....	16
<b>Esquema 4</b> – Síntese dos ésteres etílicos dipeptídicos <i>N</i> -Boc protegidos <b>6a</b> e <b>6b</b> . .....	17
<b>Esquema 5</b> – Mecanismo de acoplamento de um ácido carboxílico com uma amina usando HBTU. 18	
<b>Esquema 6</b> – Síntese dos sais de trifluoroacetato <b>7a</b> e <b>7b</b> . .....	19
<b>Esquema 7</b> – Síntese dos ésteres etílicos dipeptídicos <i>N</i> -protegidos por heterociclos, <b>8a-c</b> . .....	20
<b>Esquema 8</b> – Síntese dos ésteres etílicos dipeptídicos <i>N</i> -protegidos por heterociclos, <b>9a-c</b> . .....	21
<b>Esquema 9</b> – Síntese dos ácidos carboxílicos dipeptídicos <i>N</i> -protegidos por heterociclos, <b>10a-c</b> . ....	22
<b>Esquema 10</b> – Síntese dos ácidos carboxílicos dipeptídicos <i>N</i> -protegidos por heterociclos, <b>11a-c</b> . .	28

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> – Valores de $G'$ e $G''$ do hidrogel obtido a partir do composto <b>10c</b> . .....	38
--	----

## Lista de abreviaturas, acrónimos e símbolos

$\Delta$ AA(s) – Desidroaminoácido(s)

3D – Tridimensional

AA(s) – Aminoácido(s)

ACN – Acetonitrilo

AcOEt – Acetato de etilo

AINE – Anti-inflamatório não-esteróide

ATPC – 2-Amino-4-pirrolidinotieno[2,3-*d*]pirimidina-6-carbonilo

Bn – Grupo benzilo

Boc – Grupo *tert*-butoxicarbonilo

Boc-Phe-OH – *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-L-fenilalanina

Boc-Phe-Leu-OEt – *N*-(*tert*-butoxicarbonil)fenilalanilfenilalaninato de etilo

BPM – Baixo peso molecular

BtO – 1-*N*-óxido de benzotriazolilo

Cbz – Grupo benziloxicarbonilo

CGC – Concentração de Gelificação Crítica

COSY – *Homonuclear Correlation Spectroscopy*

COX – Ciclo-oxigenase

DEPT – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*

DMF – *N,N'*-dimetilformamida

EGFR – *Epidermal Growth Factor Receptor*

ESI – *Electron Spray Ionization*

Et<sub>3</sub>N – Trietilamina

Fmoc – Grupo protetor fluorenilmetoxicarbonilo

GdL – Glucono- $\delta$ -lactona

HBTU – 2-(1-*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronium hexafluorofosfato

H-Leu-OEt – L-leucinato de etilo

H-Leu-OEt, HCl – Cloridrato de L-leucinato de etilo

HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

H-Phe-Leu-OEt – L-fenilalanil-L-leucinato de etilo

H-Phe-OEt, HCl – Cloridrato de L-fenilalaninato de etilo

H-Phe-Phe-OEt – L-fenilalanil-L-fenilalaninato de etilo

HRMS – *High Resolution Mass Spectrometry*  
HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Correlation*  
Leu – Leucina  
LOX – Lipo-oxigenase  
Nap – Naftaleno  
Npx – Naproxeno  
Pa – Pascal  
Phe – Fenilalanina  
p.f. – Ponto de fusão  
PLC – Fosfolipase C  
RMN – Ressonância Magnética Nuclear  
SERMs – Moduladores Seletivos dos Recetores de Estrogénio  
SNC – Sistema Nervoso Central  
TFA – Ácido trifluoroacético  
TKIs – Inibidores do domínio de tirosina-cinase  
TLC – Cromatografia de camada fina  
vHTS – *Virtual High Throughput Screening*  
Wt% – Concentração g/100 mL

## **Capítulo 1**

# Introdução

## 1. Introdução

### 1.1 Peptidomiméticos baseados em heterociclos

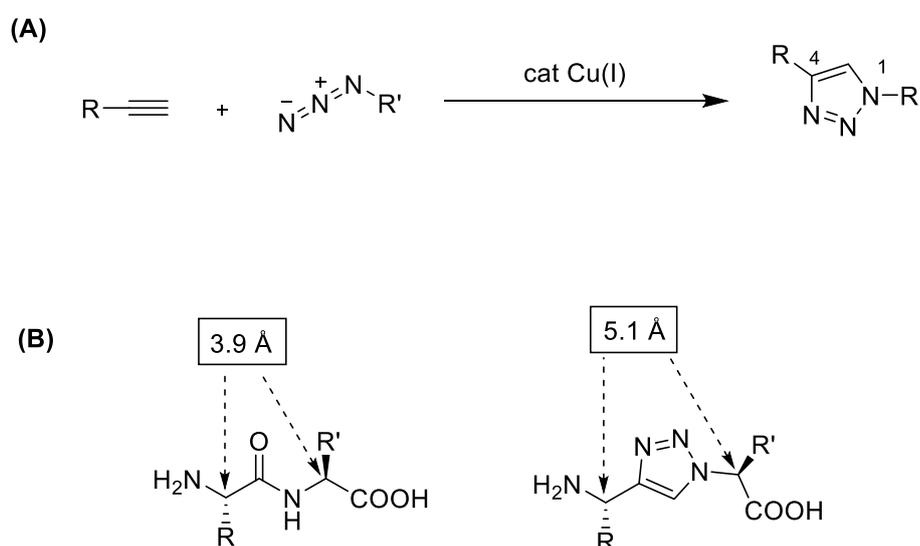
Os péptidos e proteínas possuem uma grande diversidade de estruturas químicas e desempenham um papel importante na maioria dos processos fisiológicos associados à vida. São biopolímeros flexíveis, cuja estrutura e conformação são fortemente influenciadas pelas características dos aminoácidos constituintes e pelo ambiente biofísico. Estes aspetos contribuem para que se tornem um ponto de partida particularmente atrativo para o desenho e descoberta de novos fármacos. Contudo, a elevada flexibilidade conformacional dos péptidos gera um potencial problema no desenvolvimento de novos fármacos, visto que um péptido ativo, para se ligar ao seu alvo biológico, necessita de adquirir uma conformação específica. Para isto, a introdução de uma restrição conformacional estrutural pode melhorar a ligação do péptido ao seu alvo e conseqüentemente o seu potencial terapêutico. Outras desvantagens associadas aos péptidos naturais ativos incluem: a sua inerente instabilidade face à degradação proteolítica, reduzida biodisponibilidade oral e a impossibilidade de atravessarem a barreira hematoencefálica.<sup>1</sup>

Os peptidomiméticos – compostos cujos constituintes estruturais essenciais (farmacóforo) mimetizam tridimensionalmente um péptido natural ou proteína, interagindo da mesma forma com o seu alvo, produzindo o mesmo efeito biológico – são desenhados para ultrapassar os problemas associados ao péptido natural. Algumas propriedades, como estabilidade em relação à proteólise, solubilidade, seletividade para o alvo ou potência podem ser, assim, substancialmente melhoradas. Nos últimos anos, o campo dos peptidomiméticos tem vindo a suscitar um enorme interesse na obtenção de análogos não-naturais de péptidos como moléculas biologicamente ativas. A incorporação ou substituição de um sistema heterocíclico em péptidos, que atua como uma restrição conformacional e que pode conferir uma atividade biológica efetiva, tem sido utilizada para preparar péptidos modificados como híbridos de heterociclo-péptido, com melhor eficácia *in vivo* do que o péptido natural.<sup>1,2</sup>

Uma técnica usada para introduzir uma restrição conformacional consiste na substituição das ligações amida da estrutura principal por substitutos ou isósteros destas, que possam inibir atividade proteolítica *in vivo*. Grupos isósteros da ligação amida posicionados estrategicamente podem também aumentar a biodisponibilidade e o transporte de péptidos. Pensa-se que a conformação *cis* das ligações amida é importante para a atividade biológica de alguns péptidos e proteínas. Assim, têm sido dirigidos esforços para preparar peptidomiméticos que mimetizem uma ligação peptídica numa conformação *cis*.

Pequenos anéis heteroaromáticos, incluindo pirroles, tetrazoles, triazoles e pirazoles, têm sido usados com este objetivo.<sup>2</sup>

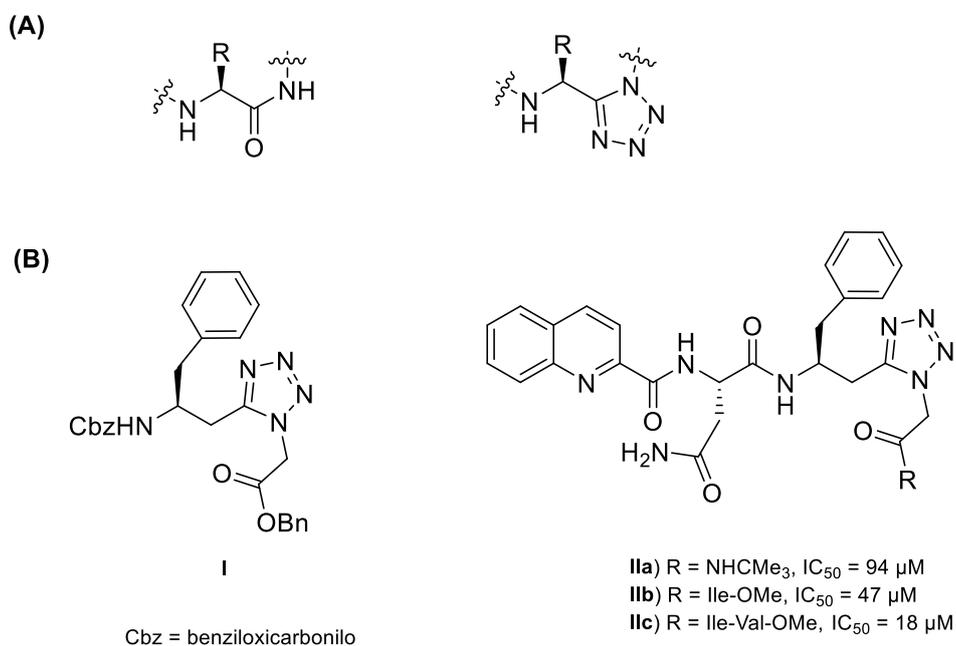
A reação de química de *click* de 1,3-cicloadição de azida-alquino catalizada por Cu(I) gera regioselectivamente 1,2,3-triazoles 1,4-dissubstituídas (**Figura 1A**). Esta reação é muito importante na síntese de peptidomiméticos com potencial em química medicinal, devido a vários atributos: origina o núcleo 1,2,3-triazole que pode apresentar atividade biológica; é compatível com as cadeias laterais de todos os aminoácidos, pelo menos nas formas protegidas; os produtos são originados em altos rendimentos e as dimensões moleculares das 1,2,3-triazoles 1,4-dissubstituídas são de alguma maneira semelhantes às das ligações amida em termos de distância e planaridade (**Figura 1B**).<sup>3</sup>



**Figura 1** – (A) Reação de *click* para formação de 1,2,3-triazoles 1,4-dissubstituídas. (B) Representação de dipéptidos com uma ligação amida ou com um anel de 1,2,3-triazole 1,4-dissubstituído como isóstero.

O anel de tetrazole 1,5-dissubstituído também é conhecido como sendo um excelente mimético da ligação *cis*-amida (**Figura 2A**). Em 2002, May e Abell sintetizaram um dipeptidomimético **I** (**Figura 2B**), baseado num  $\alpha$ -metilenotetrazole, como uma unidade de restrição conformacional não-hidrolisável para introdução em péptidos. A obtenção de peptidomiméticos baseados em heterociclos pode também envolver a introdução de um sistema heterocíclico que lhes confira propriedades biológicas e físico-químicas a ele associadas. Os autores prepararam, assim, os peptidomiméticos **Ila-c** (**Figura 2B**), contendo a unidade de  $\alpha$ -metilenotetrazole e um anel de quinolina (também presente no Saquinivir, um potente inibidor da HIV protease), que foram estudados como inibidores da HIV protease. Os resultados

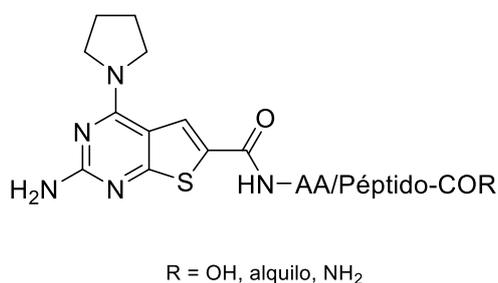
dos estudos demonstraram que a atividade dos ligandos é afetada pela complementaridade entre a conformação *cis-like* conferida pela unidade de restrição de  $\alpha$ -metileno-tetrazole e a extensão dos resíduos de aminoácidos no C-terminal (**Figura 2B**).<sup>4</sup>



**Figura 2** – (A) Representação da ligação *cis*-amida e do mimético tetrazole 1,5-dissubstituído. (B) Estrutura do dipeptidomimético com uma unidade de restrição  $\alpha$ -metileno-tetrazole **I** e dos conjugados de quinolina-péptidos **IIa-c**, e resultados dos estudos de inibição da HIV protease dos últimos.

A substituição de uma sequência de aminoácidos por um sistema heterocíclico em péptidos também dá origem a peptidomiméticos. O octapéptido angiotensina II (H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH, All) é um dos mais antigos péptidos conhecidos por uma multiplicidade de ações biológicas. Estudos de relações estrutura-atividade efetuados por diferentes laboratórios revelaram a contribuição topológica individual de cada resíduo de aminoácido na molécula ativa All. Em 2005, Cordopatis, Varvournis *et al.*, baseados no seu conhecimento da química de tienopirimidinas e de All, desenvolveram protocolos para gerar novos peptidomiméticos de All com heterociclos, usando um derivado de tienopirimidina apropriado como um bloco molecular. Através de estudos teóricos, chegaram à estrutura híbrida mais promissora, substituindo os resíduos de His-Pro pelo grupo 2-amino-4-pirrolidinotieno[2,3-*d*]pirimidina-6-carbonilo (ATPC), H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-ATPC-Phe-OH. Os autores consideraram que este bloco heterocíclico de substituição podia funcionar também como grupo protetor do N-terminal no desenho de vários

peptidomiméticos biologicamente ativos, tendo preparado diferentes estruturas híbridas de heterociclo-AA/péptidos ácidos carboxílicos, ésteres ou amidas (**Figura 3**).<sup>5</sup>



**Figura 3** – Peptidomiméticos obtidos por acoplamento do ácido 2-amino-4-pirrolidinotieno[2,3-*d*]pirimidina-6-carboxílico com o *N*-terminal de diferentes aminoácidos ou péptidos.

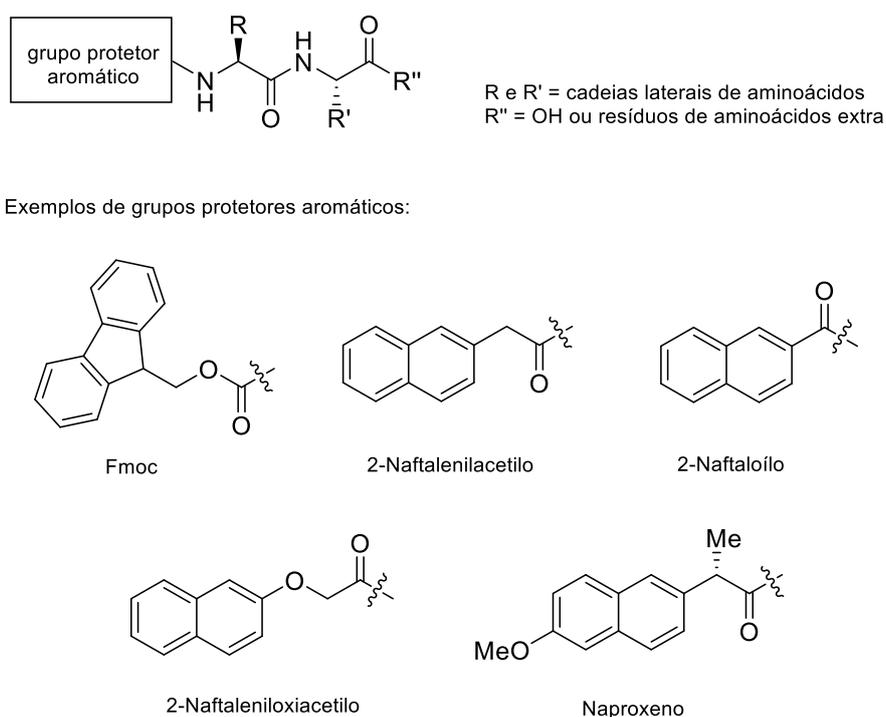
## 1.2 Hidrogéis peptídicos supramoleculares

Os hidrogéis supramoleculares têm atraído uma atenção considerável devido às suas potenciais aplicações biotecnológicas e biomédicas como, por exemplo, distribuição de fármacos,<sup>6</sup> cultura de células,<sup>7</sup> engenharia de tecidos<sup>8</sup> e cicatrização de feridas,<sup>9</sup> entre outras.

Após receberem um impulso externo, péptidos curtos *N*-protegidos com sistemas aromáticos, – hidrogeladores de baixo peso molecular (BPM) – podem sofrer auto-associação para formar redes tridimensionais (3D) altamente ordenadas, formando longas fibras que podem reter moléculas de água, originando hidrogéis supramoleculares biocompatíveis e biodegradáveis. O processo de auto-associação ocorre através de interações não-covalentes, tais como pontes de hidrogênio, empilhamento  $\pi$ - $\pi$ , interações hidrofóbicas, iônicas e de Van der Waals. Vários métodos têm sido reportados como efetivos para desencadear a gelificação, como por exemplo, mudança de pH, mudança de temperatura e modificação enzimática do hidrogelador. Para uma hidrogelação efetiva, é crucial existir um equilíbrio de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, de modo a estabelecer as interações intermoleculares necessárias à formação de uma rede fibrosa e à imobilização de moléculas de água. Em termos gerais, a incorporação de resíduos de aminoácidos muito polares tem de ser compensada pela incorporação de hidrofobicidade noutro ponto da molécula.<sup>10</sup>

Existem, na literatura, inúmeros exemplos de hidrogéis supramoleculares peptídicos, nomeadamente constituídos por di- e tripéptidos. Tipicamente, o *N*-terminal encontra-se funcionalizado por um sistema aromático volumoso, como por exemplo, fluorenometilmetoxicarbonilo (Fmoc),<sup>11</sup>

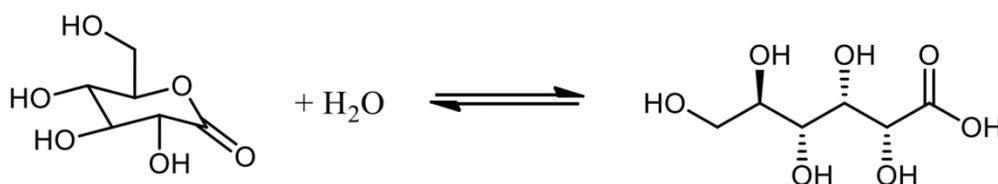
derivados de naftaleno (Nap)<sup>12</sup> e de naproxeno (Npx)<sup>13</sup> (**Figura 4**), entre outros,<sup>14</sup> enquanto o C-terminal se encontra livre na forma de ácido carboxílico. Um potencial problema é o facto da ligação covalente de uma molécula aromática biologicamente ativa a um péptido hidrogelador efetivo poder impedir a gelificação do conjugado. Assim, estes conjugados devem reter a capacidade de gelificação do péptido hidrogelador quando a molécula aromática do fármaco atua como um grupo N-protetor.



**Figura 4** – Estruturas gerais de hidrogeladores peptídicos supramoleculares e exemplos de grupos N-protetores aromáticos.

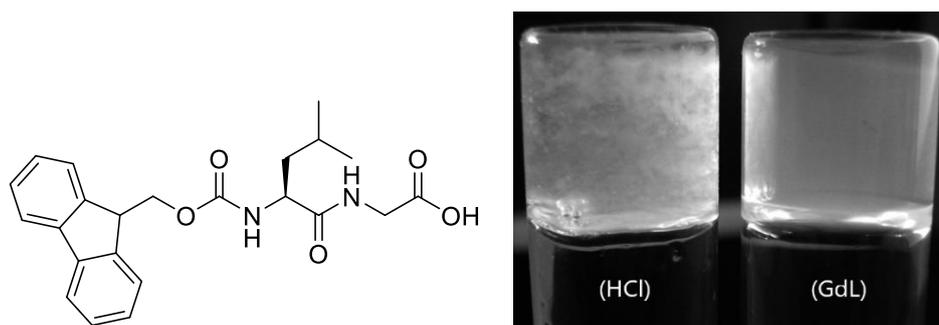
Diversos estudos confirmaram que péptidos contendo um C-terminal na forma de ácido carboxílico originam hidrogéis quando o pH de uma solução alcalina do hidrogelador diminui em direção ao  $pK_a$  do ácido carboxílico, o que significa que o grupo carboxilato fica protonado. Várias estratégias foram desenvolvidas para induzir a formação de hidrogéis através de uma diminuição controlada do pH. Em 2009, Sanderson *et. al.* reportaram pela primeira vez uma técnica genérica para ajustar com precisão o pH da solução do hidrogelador BPM, usando a hidrólise da glucono- $\delta$ -lactona (GdL) a ácido glucónico, em água (**Figura 5**). A hidrólise lenta da GdL, associada a uma rápida dissolução, permite uma mudança de pH uniforme em toda a amostra, resultando na formação de hidrogéis homogêneos com propriedades mecânicas reprodutíveis, o que é crítico para as aplicações. O pH final atingido pode ser determinado regulando a quantidade de GdL adicionada. Usando este método, o processo de gelificação pode ser

monitorizado ao longo do tempo, permitindo ter uma visão mais aprofundada do mecanismo pelo qual a gelificação ocorre.<sup>15</sup>



**Figura 5** – Hidrólise da GdL em ácido glucónico.

Na Figura 6, mostra-se a formação de hidrogéis a partir de Fmoc-L-Leu-Gly-OH usando HCl, com o qual se formou um hidrogel heterogêneo e turvo, e GdL, que originou um hidrogel homogêneo e transparente.

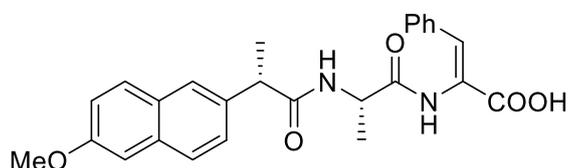


**Figura 6** – Fotografia de hidrogéis preparados a partir de Fmoc-L-Leu-Gly-OH, através da adição de HCl ou de GdL. Em ambos os casos o pH final é 3,9.<sup>15</sup>

Os hidrogéis estão a atrair particular atenção como sistemas para libertação de fármacos, como pro-fármacos para libertação sustentada de moléculas terapêuticas ligadas covalentemente, e como materiais *smart* que tenham a capacidade de serem manipulados remotamente em resposta a um estímulo externo.<sup>16</sup> Hidrogéis formados por conjugados de péptidos com naproxeno – um anti-inflamatório não-esteróide (AINE) – mostraram-se promissores para aplicação nestas três áreas. Quando o grupo aromático *N*-protetor é um AINE (por exemplo, o naproxeno), originando hidrogeladores híbridos, alguns conjugados exibem retenção ou aumento das propriedades anti-inflamatórias do sistema aromático usado e, por vezes, são observadas novas e não esperadas atividades biológicas. A conjugação do Npx com péptidos frequentemente origina seletividade para a inibição da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) relativamente à da COX-1, enzimas envolvidas nos processos inflamatórios, o que constitui a chave para

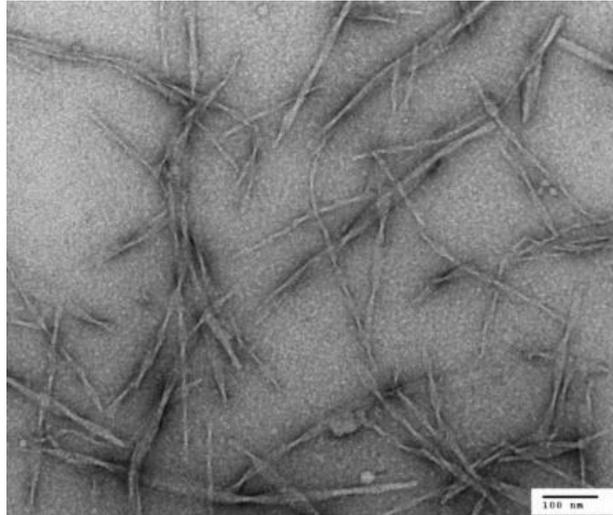
reter os benefícios dos anti-inflamatórios não-esteroides, minimizando os efeitos colaterais gástricos. É desejável que estes conjugados possuam uma alta estabilidade *in vivo*, o que é normalmente conseguido trocando L-aminoácidos por aminoácidos não-proteinogénicos, como D-aminoácidos,  $\beta$ -aminoácidos e desidroaminoácidos ( $\Delta$ AAs).<sup>10</sup>

Num estudo recente, foram estudadas as propriedades anti-inflamatórias de alguns conjugados de *N*-naproxeno-péptidos incluindo desidroaminoácidos na estrutura peptídica. O conjugado Npx-L-Ala-Z- $\Delta$ Phe-OH (**Figura 7**) mostrou inibir seletivamente a COX-2, tendo mostrado também poder inibitório da lipo-oxigenase (LOX), enzima envolvida na regulação das respostas inflamatórias, o que o torna num potencial anti-inflamatório com propriedades inibitórias duais LOX/COX-2. Alguns estudos de atividade antitumoral também foram feitos neste tipo de conjugados, não tendo os resultados sido promissores.<sup>17</sup>



**Figura 7** – Estrutura do conjugado Npx-L-Ala-Z- $\Delta$ Phe-OH.

Em estudos anteriores do mesmo grupo de investigação, o conjugado representado na Figura 7 mostrou formar um hidrogel à concentração de gelificação crítica (CGC) 0,8 wt% e um pH de transição de fase sol-gel = 5, tendo a sua análise morfológica sido levada a cabo por microscopia de transmissão eletrónica (TEM) (**Figura 8**). As nanofibras do hidrogelador são curtas (comprimento entre 170-750 nm) e não uniformes, exibindo uma largura mínima de 12 nm e uma máxima de 16 nm.<sup>18</sup>



**Figura 8** – Imagem de TEM do hidrogel obtido a partir do hidrogelador representado na Figura 7 (barra de escala de 100 nm).

A inversão do frasco constitui o método mais simples para avaliar inicialmente a formação de um hidrogel supramolecular e fornece uma impressão intuitiva da forma e da força do hidrogel. Técnicas de microscopia eletrônica – incluindo microscopias de transmissão (TEM), *scanning* (SEM) e de *scanning* e transmissão (STEM) – fornecem informação valiosa sobre a morfologia dos agregados moleculares/nanofibras que conduzem à hidrogelação. Estas microscopias utilizam um feixe de elétrons acelerados como fonte, sendo possível observar estruturas extremamente pequenas, na ordem dos nanómetros, em resoluções elevadas.<sup>19</sup>

As propriedades macroscópicas dos hidrogéis supramoleculares podem ser estudadas usando reologia (viscosimetria). Esta técnica consiste no estudo da deformação e da fluidez da matéria sob a aplicação de stresse, e permite avaliar a cinética de formação do hidrogel, calculando os módulos  $G'$  (medida da elasticidade) e  $G''$  (medida da viscosidade) em função de uma força aplicada.<sup>20</sup>

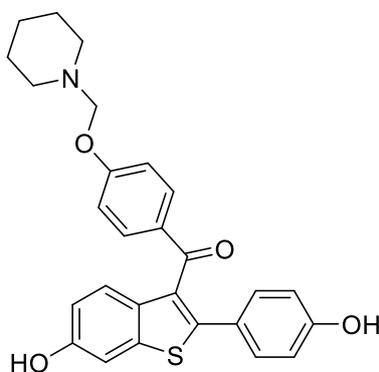
Como exemplo, apresentam-se os parâmetros reológicos do hidrogel obtido a partir do hidrogelador representado na Figura 7 (Npx-L-Ala-Z $\Delta$ Phe-OH) com CGD = 0,8 wt%, tendo apresentado valores de  $G'$  ( $5,9 \times 10^2$  Pa) significativamente superiores a  $G''$  ( $1,1 \times 10^2$  Pa), o que indica um comportamento viscoelástico.<sup>18</sup>

### 1.3 Seleção dos sistemas heterocíclicos com propriedades antitumorais para grupos *N*-protetores de péptidos

Os heterociclos são um grupo de moléculas orgânicas muito importantes em química medicinal, ocupando uma posição fulcral na síntese orgânica. Sistemas de anéis heterocíclicos com substituições específicas em posições apropriadas constituem estruturas-base para estudos de diversas atividades biológicas. Os compostos heterocíclicos encontram-se amplamente distribuídos na natureza e são simultaneamente sintetizados em laboratório, sendo inúmeros utilizados com sucesso como agentes terapêuticos.

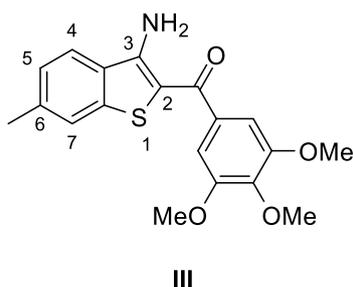
Compostos heterocíclicos contendo nitrogênio são os mais abundantes, estando presentes em vários produtos naturais biologicamente ativos, fármacos sintéticos e produtos agroquímicos. Na indústria farmacêutica, a presença de sistemas heterocíclicos em fármacos é muito prevalente, sendo que mais de 60% dos fármacos mais comercializados para o tratamento de diversas doenças apresentam, pelo menos, um anel heterocíclico.

Nas últimas décadas, entre os heterociclos de enxofre, o benzo[*b*]tiofeno mostrou ser um núcleo singular como importante farmacóforo de algumas moléculas biologicamente ativas. Derivados de benzo[*b*]tiofeno atraíram o interesse dos químicos medicinais para o desenvolvimento de fármacos antitumorais, apresentando-se o Raloxifene, como exemplo, na Figura 9. Este fármaco pertence à categoria dos moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (SERMs), sendo antagonista destes no tecido mamário, podendo ser utilizado como antitumoral em câncros de mama ER positivos, e agonista nos ossos, sendo usado no tratamento de osteoporose na mulher pós-menopáusia. Pode ainda ser usado para reduzir o risco de cancro de mama invasivo em mulheres pós-menopáusias com osteoporose.<sup>21</sup>



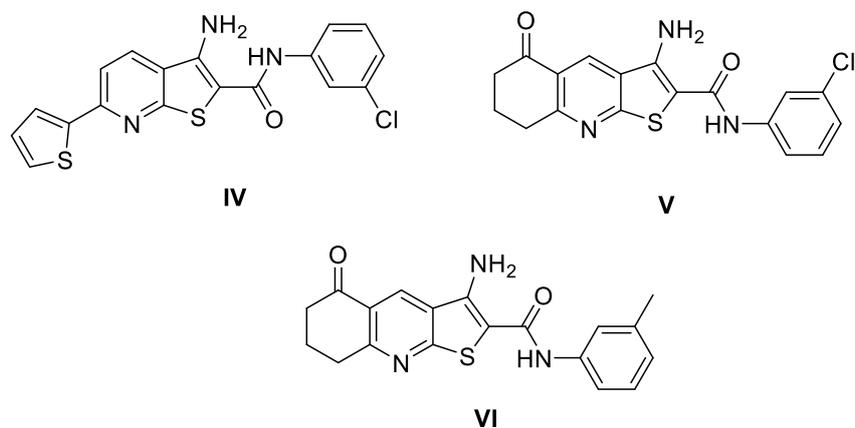
**Figura 9** – Estrutura do fármaco Raloxifene, baseado no núcleo de benzo[*b*]tiofeno.

Outros derivados de benzo[*b*]tiofeno têm sido desenvolvidos como antitumorais, atuando em diferentes alvos. Por exemplo, Romagnoli *et al.* reportaram a síntese de duas séries de compostos baseadas em 3-amino-2-(3,4,5-trimetoxibenzoil)benzo[*b*]tiofeno e nos isômeros posicionais 2-amino, e avaliaram a sua atividade antiproliferativa pela inibição da polimerização da tubulina e efeitos no ciclo celular, tendo o composto **III** (**Figura 10**) mostrado ser o mais promissor entre os compostos preparados.<sup>22</sup>



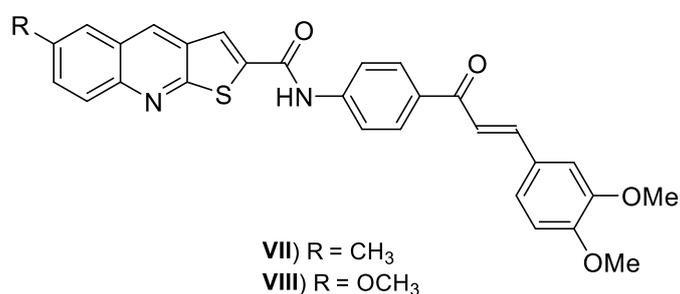
**Figura 10** – Exemplo de um composto derivado de benzo[*b*]tiofeno que apresentou atividade antiproliferativa pela inibição da polimerização da tubulina.

Heterociclos fundidos com anel de tiofeno têm adquirido considerável interesse na área da química medicinal e na descoberta de novos fármacos. As tieno[2,3-*b*]piridinas foram inicialmente descobertas como potenciais inibidores da fosfolipase C (PLC) por *virtual screening* (vHTS), tendo Reynisson *et al.*<sup>23</sup> em 2009 identificado os compostos **IV** e **V** (**Figura 11**) e em 2016<sup>24</sup> o composto **VI** (**Figura 11**). Estes compostos mostraram atividade antitumoral muito promissora em células melanoma MDA-MB-435.<sup>24,25</sup> O composto **V** também se mostrou ativo em células de cancro da mama MD-MB-231.<sup>26</sup>



**Figura 11** – Estruturas dos compostos derivados tieno[2,3-*b*]piridina que mostraram atividade antitumoral promissora em diferentes linhas celulares.

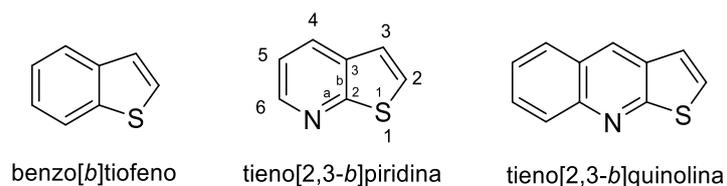
As quinolinas constituem um dos sistemas heterocíclicos mais importantes, devido às suas propriedades biológicas, e podem ser encontradas em produtos naturais e em fármacos. As tienoquinolinas são também conhecidas por possuírem variadas atividades biológicas e, recentemente, também mostraram atividade antiproliferativa promissora contra células de cancro. Num estudo de 2019, Abuo-Rahma *et al.* desenharam, usando *docking* molecular, e sintetizaram novas tienoquinolina-2-carboxamida-chalconas como inibidores do domínio de tirosina-cinase (TKIs) do *epidermal growth factor receptor* (EGFR), envolvido na proliferação celular. Os compostos **VII** e **VIII** (**Figura 12**) mostraram-se os mais promissores na atividade antiproliferativa de várias linhas de células tumorais.<sup>27</sup>



**Figura 12** – Estrutura das tienoquinolina-2-carboxamida-chalconas mais promissoras na atividade antiproliferativa de várias células tumorais.

Conforme já referido na secção 1.1 desta introdução, a conjugação de AA/péptidos não-tóxicos biocompatíveis com sistemas heterocíclicos biologicamente ativos constitui uma abordagem promissora para aumentar a potência destes, uma vez que a sua entrada nas células pode ser facilitada pelo reconhecimento celular dos AA/péptidos. A presença do heterociclo também confere uma restrição conformacional ao péptido, o que pode ser vantajoso. Para além disso, existem diversas evidências de sucesso representando a importância da conjugação de AA/péptidos com heterociclos no aumento da solubilidade, seletividade, estabilidade e permeabilidade celular aumentada à molécula biologicamente ativa.<sup>28</sup>

Neste trabalho, decidiu-se utilizar os núcleos de benzo[*b*]tiofeno, tieno[2,3-*b*]piridina e tieno[2,3-*b*]quinolina como moléculas potencialmente antitumorais (**Figura 13**).



**Figura 13** – Estrutura dos núcleos heterocíclicos base usados neste trabalho.

Estes sistemas heterocíclicos constituíram os grupos *N*-protetores dos dipéptidos na formação de novos conjugados heterociclo-péptidos. Estes conjugados foram usados em estudos de gelificação para formação de hidrogéis supramoleculares como potenciais hidrogéis bioativos.

Prepararam-se inicialmente ácidos carboxílicos derivados dos referidos sistemas heterocíclicos para efetuar reações de acoplamento com sais de trifluoroacetato de dipéptidos protegidos, no *C*-terminal, como ésteres etílicos, que depois deram origem aos ácidos livres, como apresentado no capítulo seguinte.

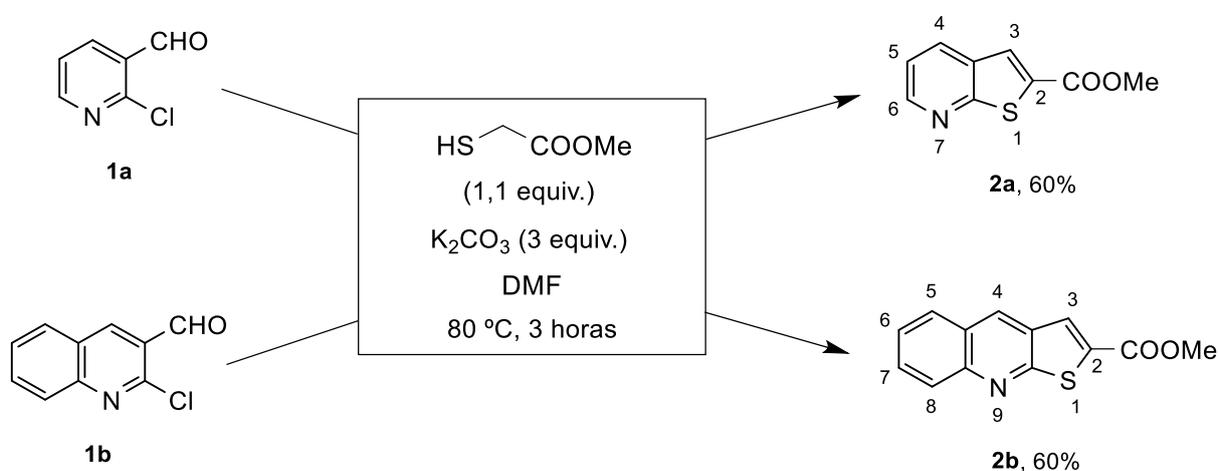
## **Capítulo 2**

# Apresentação de resultados e discussão

## 2. Apresentação de resultados e discussão

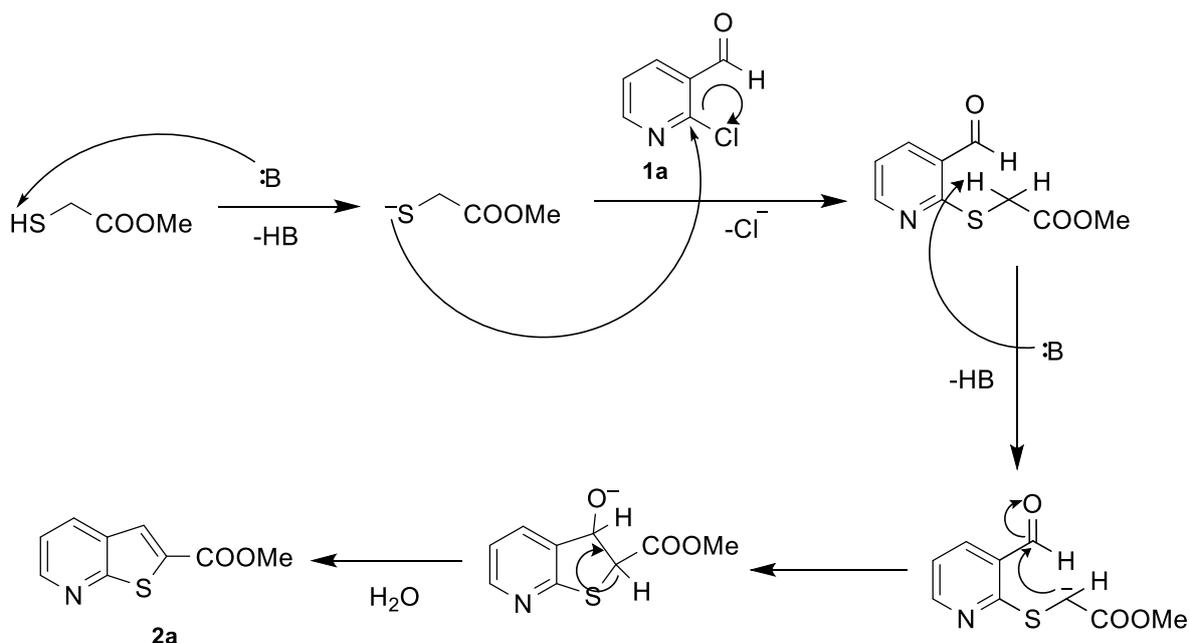
2.1 Síntese dos precursores ésteres metílicos heterocíclicos **2a** e **2b** e dos correspondentes ácidos carboxílicos **3a** e **3b** para acoplamento com dipéptidos

As reações do 2-cloropiridina-3-carbaldeído (**1a**) e do 2-cloroquinolina-3-carbaldeído (**1b**) com tioglicolato de metilo em meio básico, usando DMF como solvente, originaram, em bons rendimentos, o tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxilato de metilo (**2a**) e o tieno[2,3-*b*]quinolina-2-carboxilato de metilo (**2b**), respetivamente (**Esquema 1**).



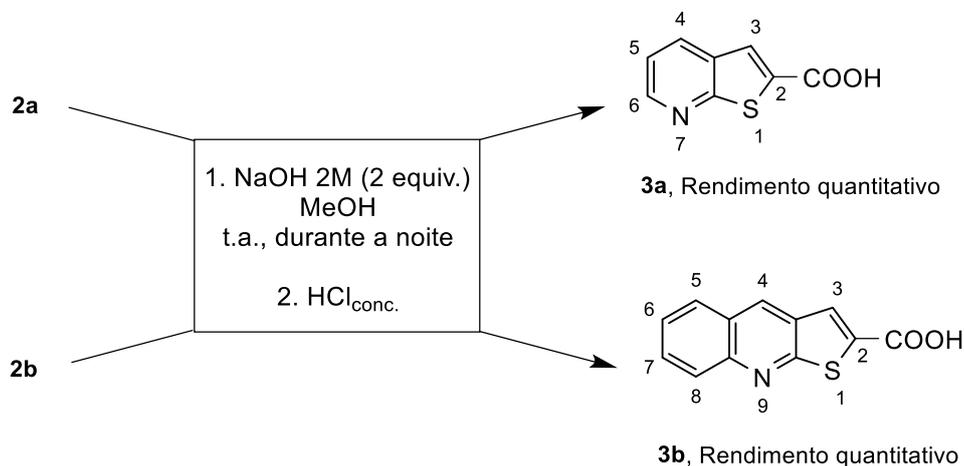
**Esquema 1** – Síntese dos ésteres metílicos heterocíclicos **2a** e **2b**.

No Esquema 2, apresenta-se o mecanismo da reação de formação dos compostos **2a** e **2b**, usando como exemplo a síntese do composto **2a**. A base retira o protão do tioglicolato de metilo, permitindo o ataque nucleofílico do anião tiolato formado ao carbono 2 da piridina, com saída do anião cloreto. Forma-se ainda um carbanião no carbono adjacente ao enxofre, que ataca o carbono do carbonilo do aldeído, formando o anel de tiofeno fundido, com o éster metílico na posição 2, após aromatização e precipitação, por adição de água.



**Esquema 2** – Mecanismo da reação de síntese do composto **2a**.

Os ésteres metílicos **2a** e **2b** foram hidrolisados aos respectivos ácidos carboxílicos, **3a** e **3b**, usando NaOH 2M (2 equiv.) em metanol durante a noite, à temperatura ambiente, seguido de acidificação com HCl<sub>conc.</sub>, em rendimentos quantitativos (**Esquema 3**).

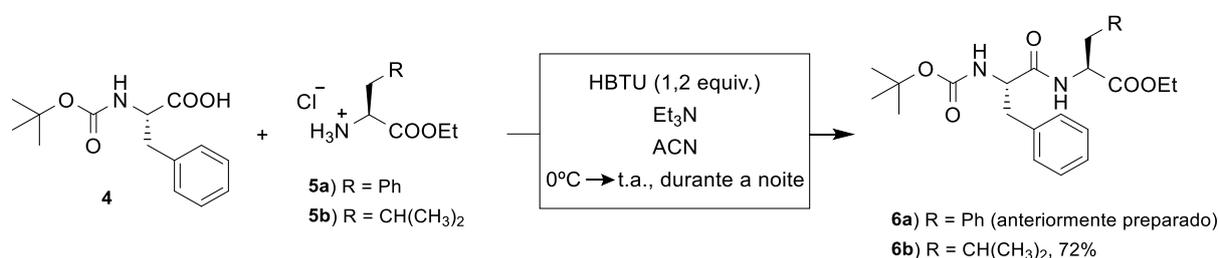


**Esquema 3** – Síntese dos ácidos carboxílicos heterocíclicos **3a** e **3b**.

Os compostos **2a** e **3a** já tinham sido sintetizados e o espectro de <sup>1</sup>H RMN de **2a** é idêntico ao da literatura.<sup>29</sup> O composto **3a** é comercializado, mas foi caracterizado por p.f. e <sup>1</sup>H RMN. Os compostos **2b** e **3b** foram caracterizados por p.f., <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C RMN.

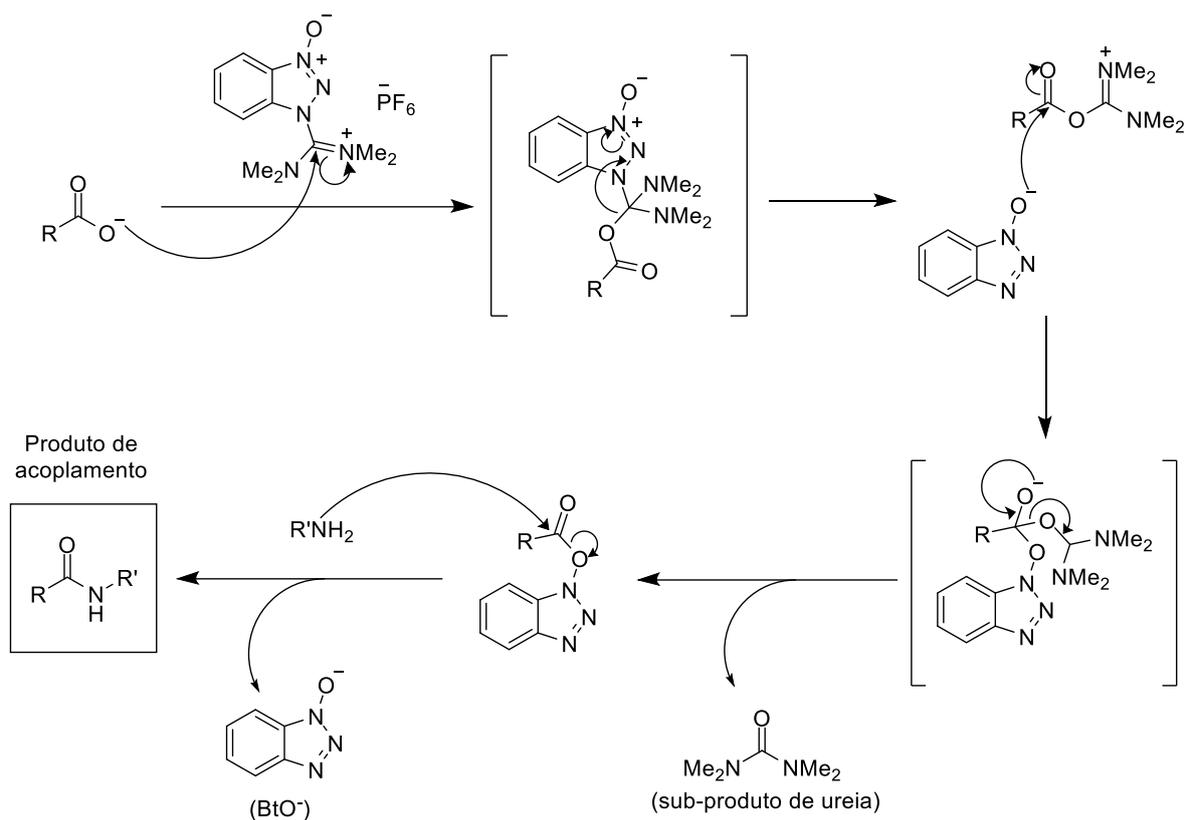
## 2.2 Síntese do éster etílico dipeptídico *N*-Boc protegido **6b** e dos sais de trifluoroacetato dos ésteres etílicos dipeptídicos **7a** e **7b**

A *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-L-fenilalanina (Boc-Phe-OH) (**4**) foi acoplada com os cloridratos de L-fenilalaninato de etilo (H-Phe-OEt, HCl) e L-leucinato de etilo (H-Leu-OEt, HCl), tendo-se obtido os dipéptidos *N*-protegidos com o grupo *tert*-butoxicarbonilo (Boc), usando como agente de acoplamento HBTU (2-(1*H*-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio hexafluorofosfato) e Et<sub>3</sub>N (triethylamina) como base em ACN (acetonitrilo) (**Esquema 4**). O dipéptido Boc-Phe-Phe-OEt **6a** já tinha sido preparado no nosso grupo de investigação, enquanto o dipéptido Boc-Phe-Leu-OEt **6b** foi preparado neste trabalho em alto rendimento (72%).



**Esquema 4** – Síntese dos ésteres etílicos dipeptídicos *N*-Boc protegidos **6a** e **6b**.

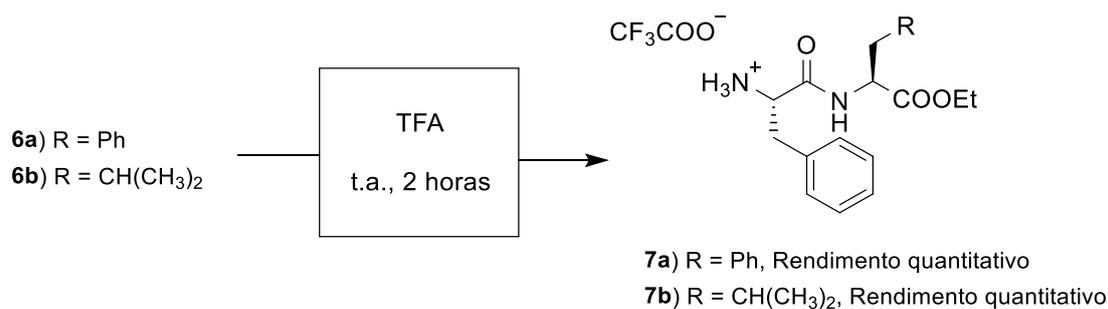
O HBTU é um agente de acoplamento frequentemente usado na ativação de ácidos carboxílicos em síntese peptídica. O mecanismo envolve a desprotonação do ácido carboxílico pela Et<sub>3</sub>N, seguida de um ataque rápido no carbono da imina do HBTU, originando uma *O*-acilureia e o anião BtO<sup>-</sup> (1-*N*-óxido de benzotriazolilo). Este último reage com a *O*-acilureia formada para originar um éster ativo de HOBT e *N,N'*-tetrametilureia. Finalmente, o éster ativo reage com a amina livre para produzir uma amida e BtO<sup>-</sup> (**Esquema 5**).<sup>30</sup>



**Esquema 5** – Mecanismo de acoplamento de um ácido carboxílico com uma amina usando HBTU.

Para além do HBTU ser mais reativo e impedir a racemização dos aminoácidos, comparando com o uso de outros agentes de acoplamento, como carbodiimidas ( $RN=C=NR'$ ) ou combinação destas com HOBt, também apresenta como vantagem a formação do derivado solúvel de  $N,N'$ -tetrametilureia como subproduto, que é facilmente eliminado no tratamento da reação, constituindo um melhoramento no isolamento do produto de acoplamento.<sup>30</sup>

Os compostos **6a** e **6b** foram depois  $N$ -desprotegidos usando TFA, tendo-se obtido os sais de trifluoroacetato correspondentes **7a** e **7b** em rendimentos quantitativos (**Esquema 5**), depois da remoção do excesso de TFA no evaporador rotativo, usando éter etílico múltiplas vezes.



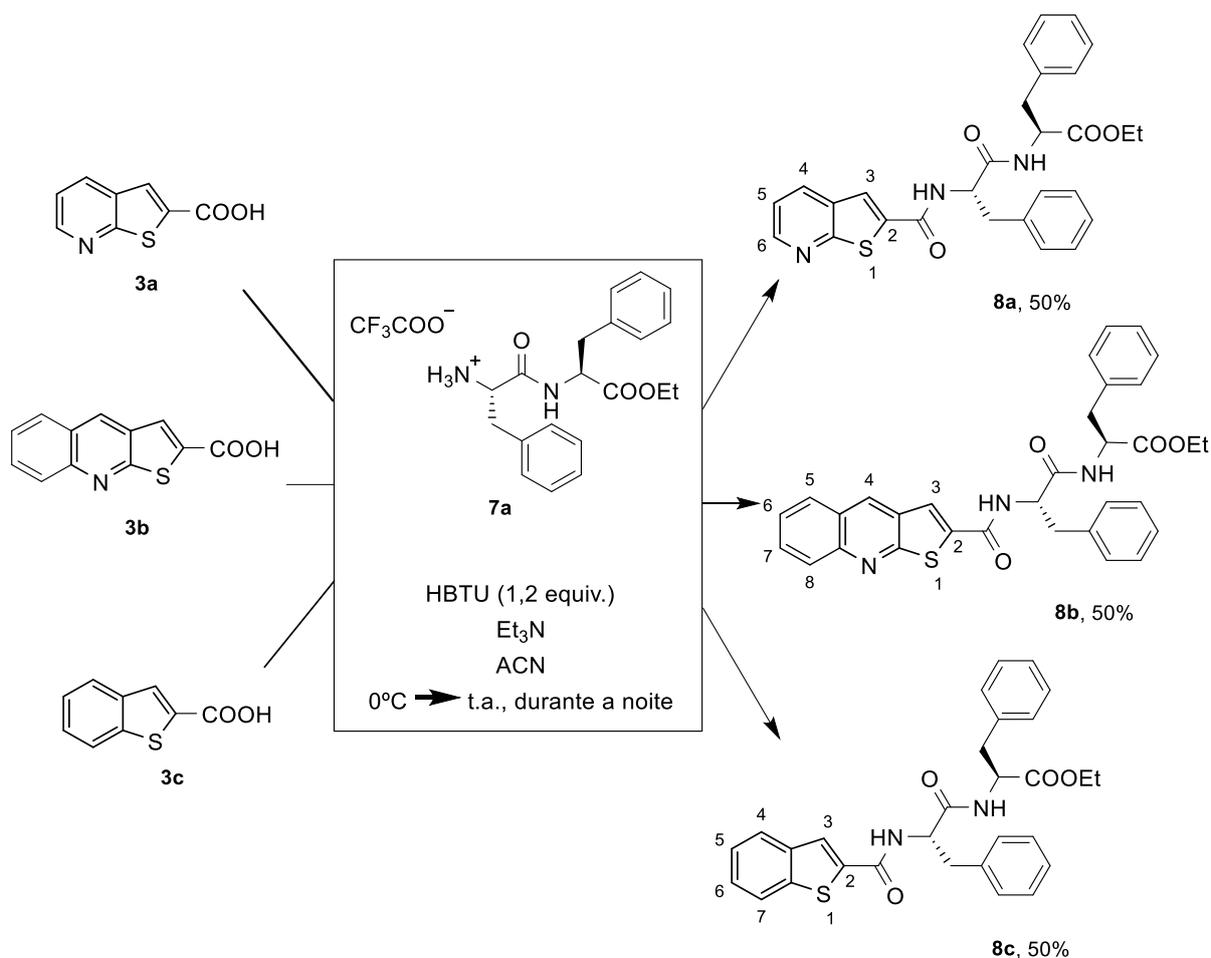
**Esquema 6** – Síntese dos sais de trifluoroacetato **7a** e **7b**.

Os compostos **7a** e **7b** obtidos foram usados diretamente nas reações de acoplamento com os ácidos carboxílicos heterocíclicos preparados **3a** e **3b** e o ácido benzo[*b*]tiofeno-2-carboxílico (**3c**) comercial.

2.3 Acoplamento dos compostos heterocíclicos **3a-c** com sais de trifluoroacetato dos ésteres etílicos dipeptídicos **7a** e **7b**

2.3.1 Acoplamento dos compostos heterocíclicos **3a-c** com o sal de trifluoroacetato do L-fenilalanil-L-fenilalaninato de etilo (**7a**)

Os compostos **3a-c** foram acoplados com o composto **7a**, tendo-se obtido os dipéptidos *N*-protegidos pelos heterociclos correspondentes, **8a-c**, em 50% de rendimento, usando como agente de acoplamento HBTU e Et<sub>3</sub>N como base em ACN (**Esquema 7**).

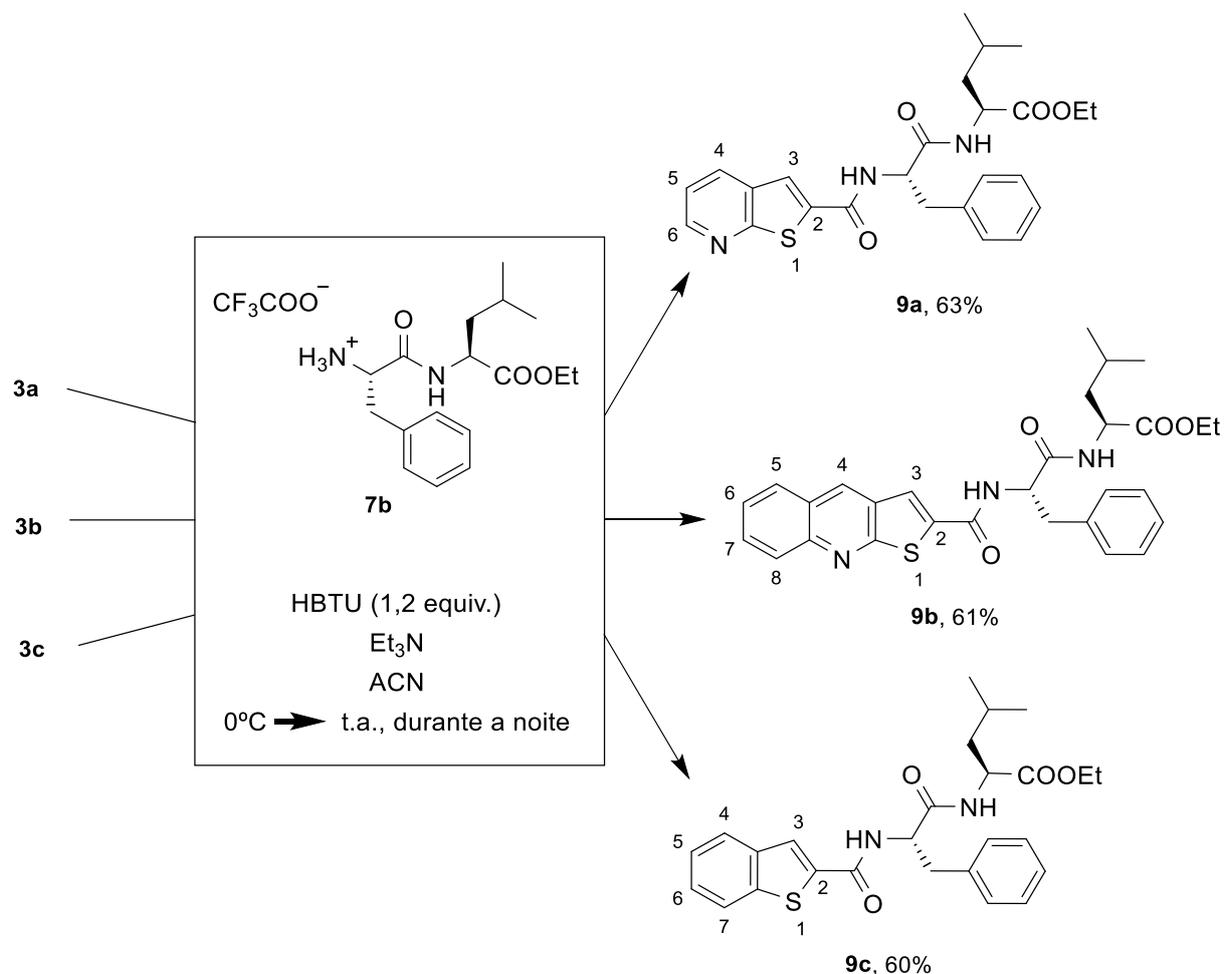


**Esquema 7** – Síntese dos ésteres etílicos dipeptídicos *N*-protegidos por heterocícos, **8a-c**.

Os produtos obtidos **8a-c** foram completamente caracterizados por p.f., <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C RMN, incluindo DEPT  $\theta = 135^\circ$  e espectros bidimensionais de correlações homonucleares <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (COSY) e heteronucleares <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (HSQC) e massa de alta resolução ESI no íão [M+H]<sup>+</sup>.

### 2.3.2 Acoplamento dos compostos heterocíclicos **3a-c** com o sal de trifluoroacetato do L-fenilalanil-L-leucinato de etilo (**7b**)

Os compostos **3a-c** foram acoplados com o composto **7b**, tendo-se obtido os dipéptidos *N*-protegidos pelos heterocícos correspondentes, **9a-c**, em bons rendimentos (60-63%), usando como agente de acoplamento HBTU e Et<sub>3</sub>N como base em ACN (**Esquema 8**).

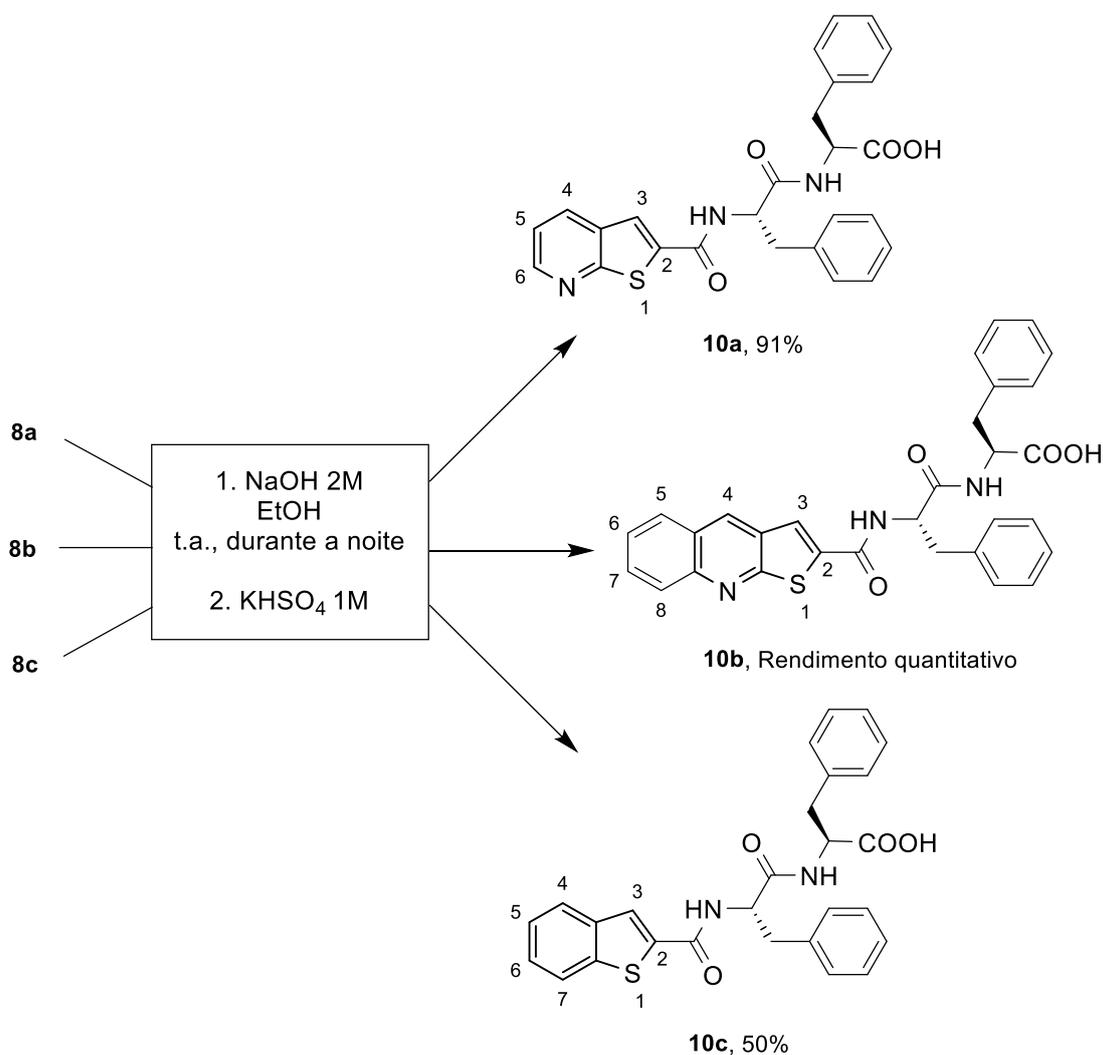


**Esquema 8** – Síntese dos ésteres etílicos dipeptídicos *N*-protegidos por heterocícos, **9a-c**.

Os produtos obtidos **9a-c** foram completamente caracterizados por p.f.,  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN, incluindo espectros de DEPT  $\theta = 135^\circ$  e espectros bidimensionais de correlações homonucleares  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  e heteronucleares  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  e massa de alta resolução ESI no ião  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### 2.4 Síntese dos ácidos carboxílicos dos dipéptidos *N*-protegidos **10a-c** e **11a-c**

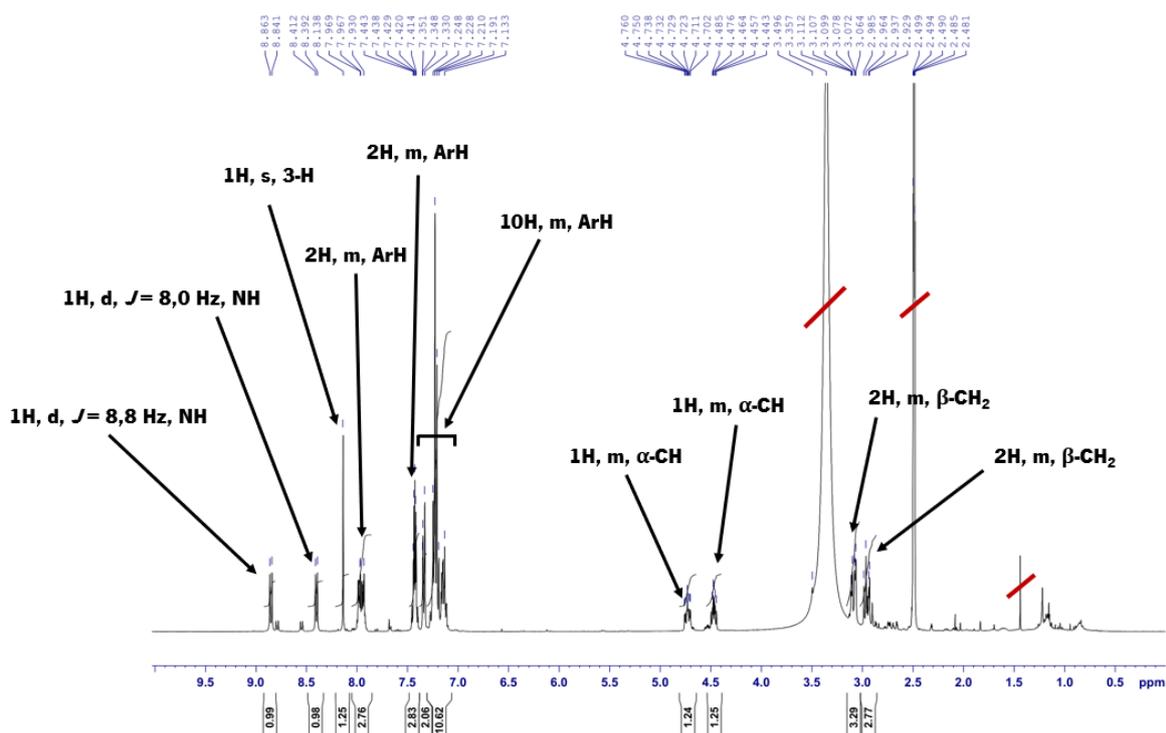
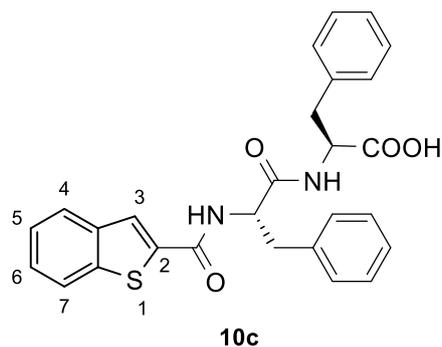
Os ésteres etílicos **8a-c** foram hidrolisados aos respectivos ácidos carboxílicos, **10a-c**, usando NaOH 2M em etanol durante a noite, à temperatura ambiente, seguido de acidificação com  $\text{KHSO}_4$  1M, em rendimentos bons a quantitativos (**Esquema 9**).



**Esquema 9** – Síntese dos ácidos carboxílicos dipeptídicos *N*-protegidos por heterocícos, **10a-c**.

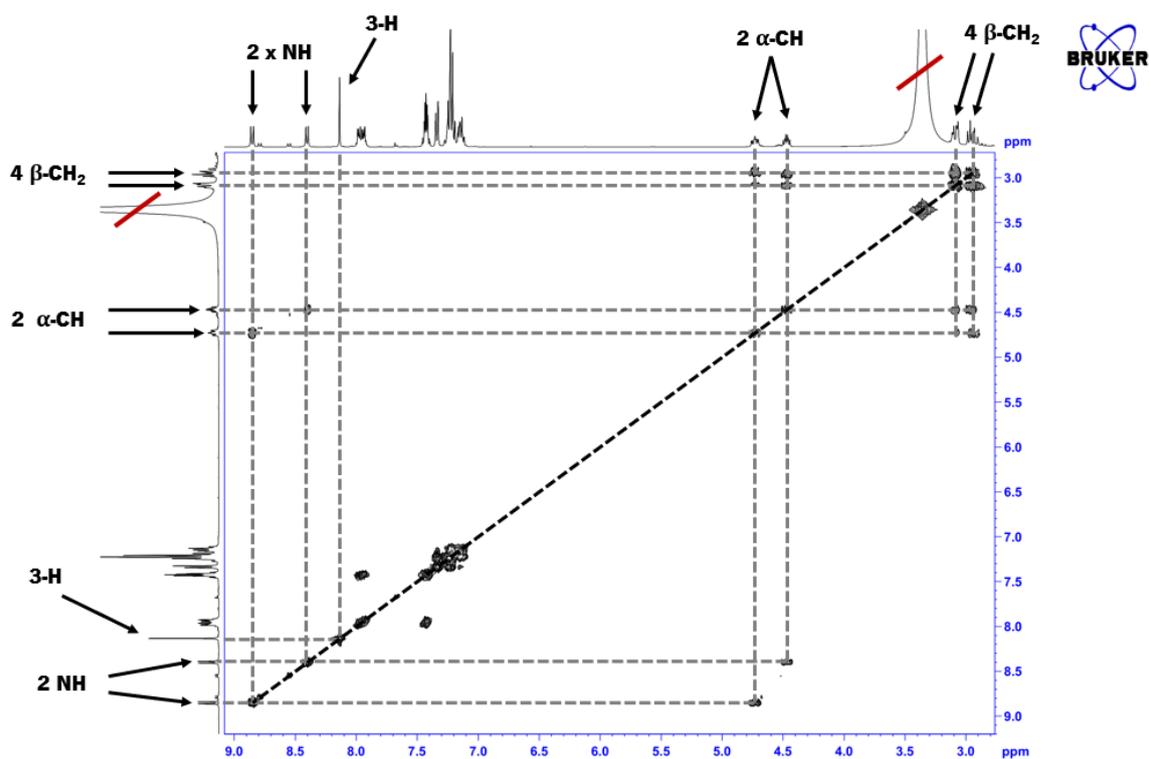
Os produtos obtidos (**10a-c**) foram completamente caracterizados por p.f.,  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN, incluindo espectros de DEPT  $\theta = 135^\circ$  e espectros bidimensionais de correlações homonucleares  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  e heteronucleares  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , e massa de alta resolução no ião  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

Como exemplo da caracterização por  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN, apresentam-se espectros do composto **10c**, incluindo correlações bidimensionais COSY e HSQC (**Figuras 14-19**). No espectro de  $^1\text{H}$  RMN apresentado na Figura 14, podem ser observados, na zona alifática, os dois sinais correspondentes aos dois multipletos de  $\beta\text{-CH}_2$ , entre 2,93-2,99 e 3,06-3,11 ppm, e os dois multipletos correspondentes aos  $\alpha\text{-CH}$ , entre 4,44-4,49 e 4,70-4,76 ppm. Na zona aromática, são visíveis os sinais dos 15H aromáticos, destacando-se o singlete correspondente ao 3-H, a 8,14 ppm. Observa-se ainda os dois dupletos correspondentes aos sinais dos NH, a 8,40 e 8,55 ppm, com  $J = 8,0$  e 8,8 Hz, respectivamente.



**Figura 14** – Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto **10c**.

Na Figura 15 está representado o espectro de COSY do composto **10c**, realçando-se o acoplamento entre os prótons  $\beta\text{-CH}_2$  e entre estes e os adjacentes  $\alpha\text{-CH}$ . Estes últimos estão a acoplar também com os NH adjacentes.

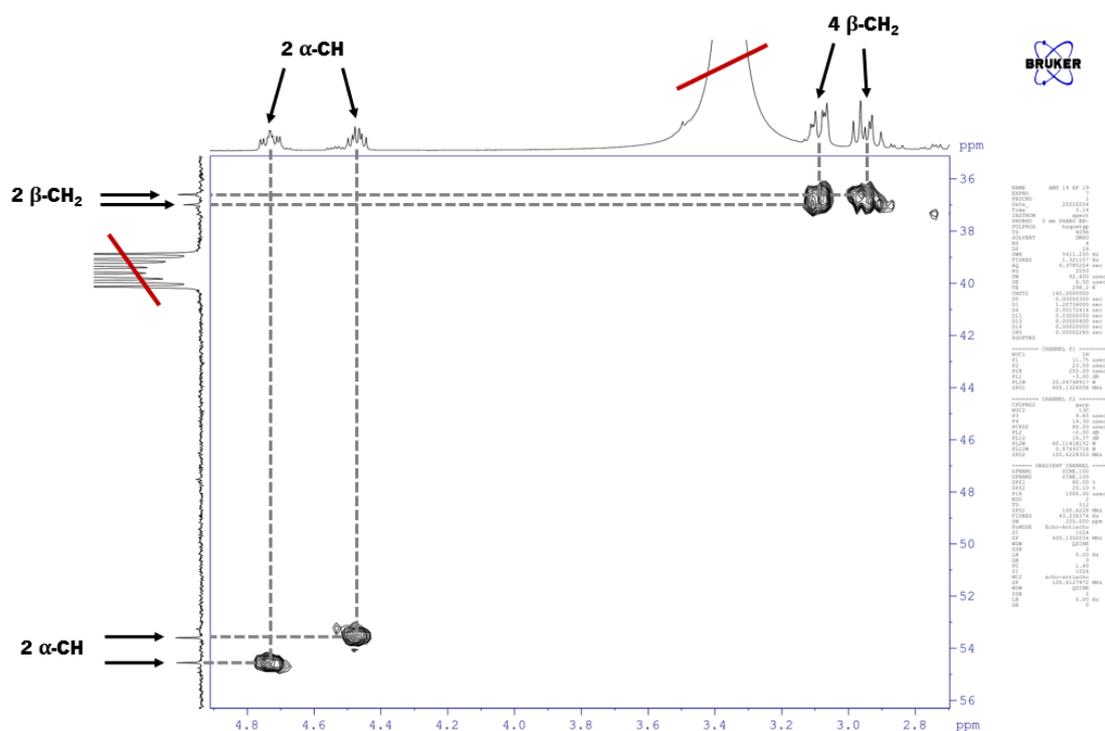


**Figura 15** – Espetro 2D de COSY do composto **10c**.

A Figura 16 representa o espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto **10c**. Pela análise diferencial do último, usando DEPT  $\theta = 135^\circ$  (**Figura 17**), é possível atribuir os sinais dos  $\beta\text{-CH}_2$  (a 36,6 e 37,0 ppm), os sinais dos  $\alpha\text{-CH}$  (a 53,6 e 54,6 ppm) e os CH aromáticos, sendo que 8 são equivalentes dois a dois e outros aparecem sobrepostos. Os 8 carbonos quaternários do composto **10c** observam-se na Figura 16, sendo o primeiro a 137,4 e o último, a 172,7 ppm.

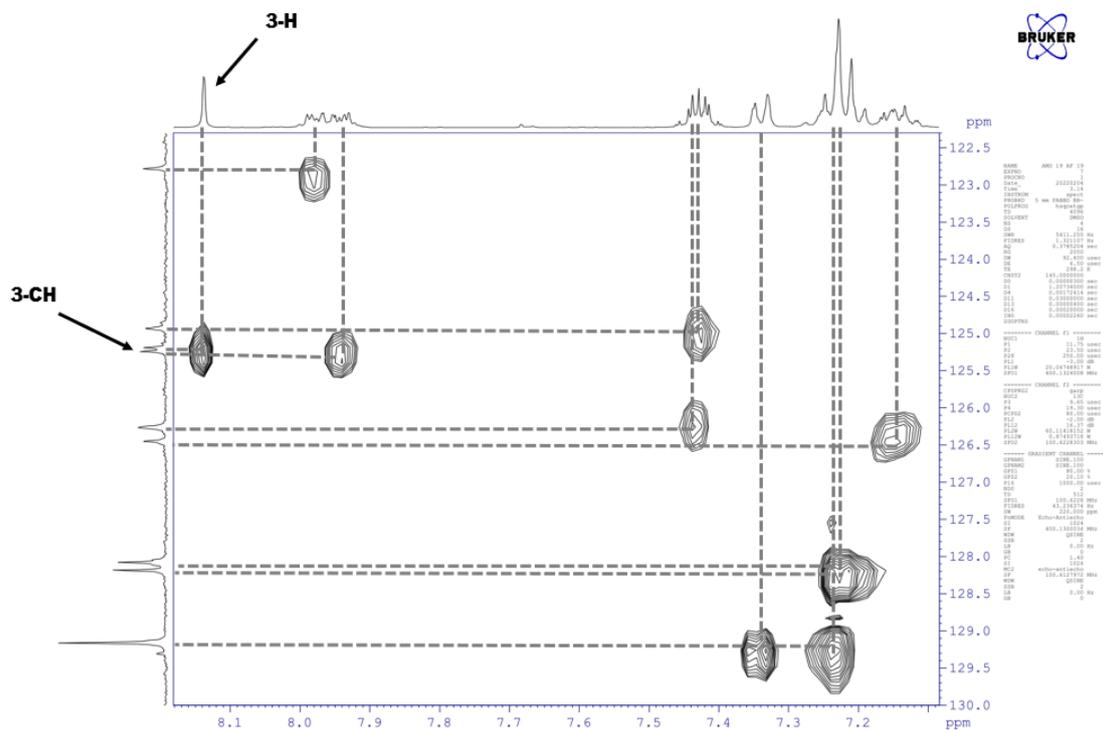


Na Figura 18, está representada uma expansão das correlações HSQC da zona alifática. Pode concluir-se que o primeiro multipletto de  $\beta\text{-CH}_2$  no espectro de  $^1\text{H}$  correlaciona com o carbono a 36,6 ppm, e o segundo conjunto correlaciona com o carbono a 37,0 ppm. O primeiro multipletto do  $\alpha\text{-CH}$  em  $^1\text{H}$  RMN correlaciona com o carbono a 53,6 ppm, e o segundo multipletto correlaciona com o carbono a 54,6 ppm.



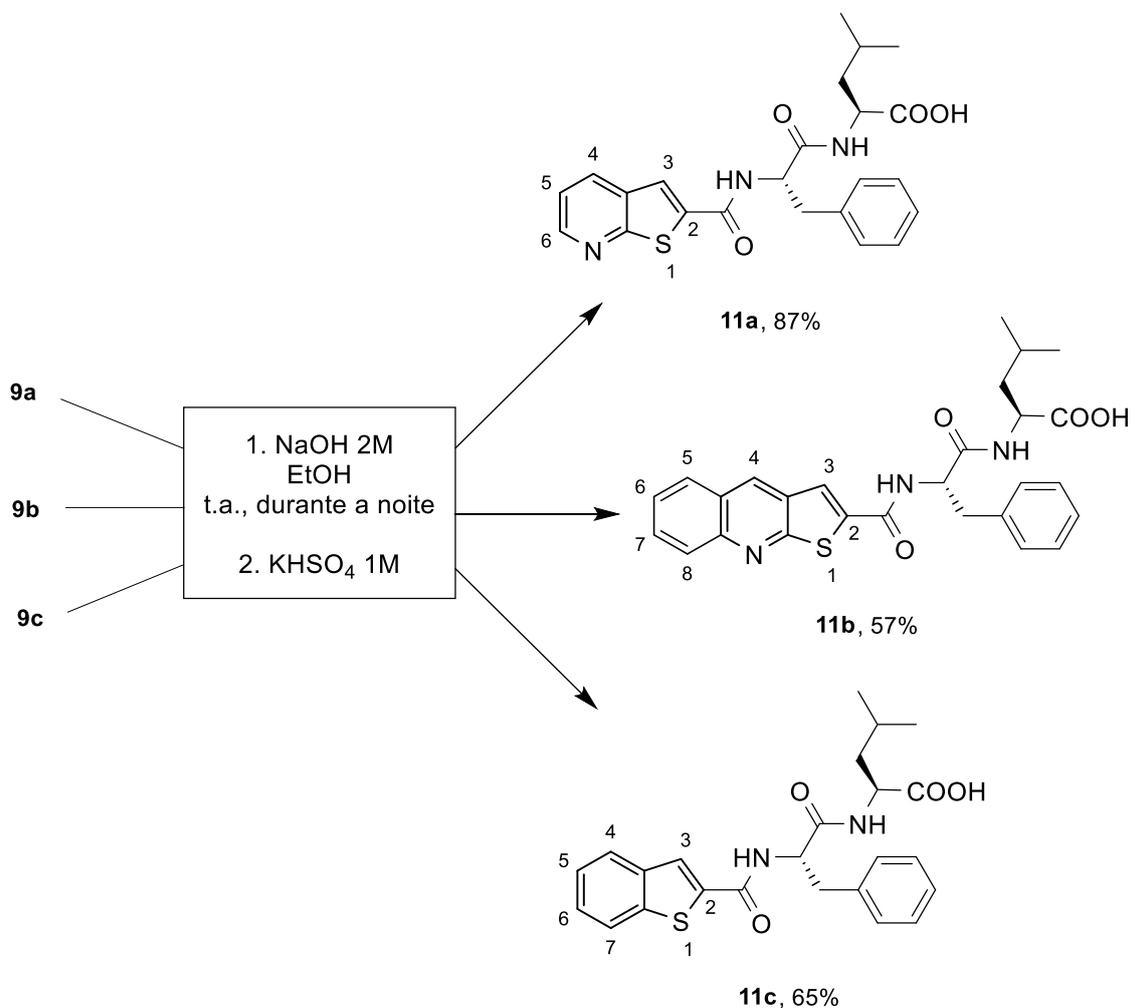
**Figura 18** – Expansão da zona alifática do espectro de HSQC do composto **10c**.

A Figura 19 representa a expansão da zona aromática do espectro de HSQC do composto **10c**. Nela se observa 5 sinais para as correlações dos prótons do benzo[*b*]tiofeno com os carbonos a eles ligados – sendo possível identificar o 3-CH a 125,2 ppm – e outros sinais que correspondem aos 10 prótons dos fenilos.



**Figura 19** – Expansão da zona aromática do espectro de HSQC do composto **10c**.

Os ésteres etílicos **9a-c** foram hidrolisados aos respectivos ácidos carboxílicos, **11a-c**, usando NaOH 2M em etanol durante a noite, à temperatura ambiente, seguido de acidificação com KHSO<sub>4</sub> 1M, em bons a altos rendimentos (**Esquema 10**).



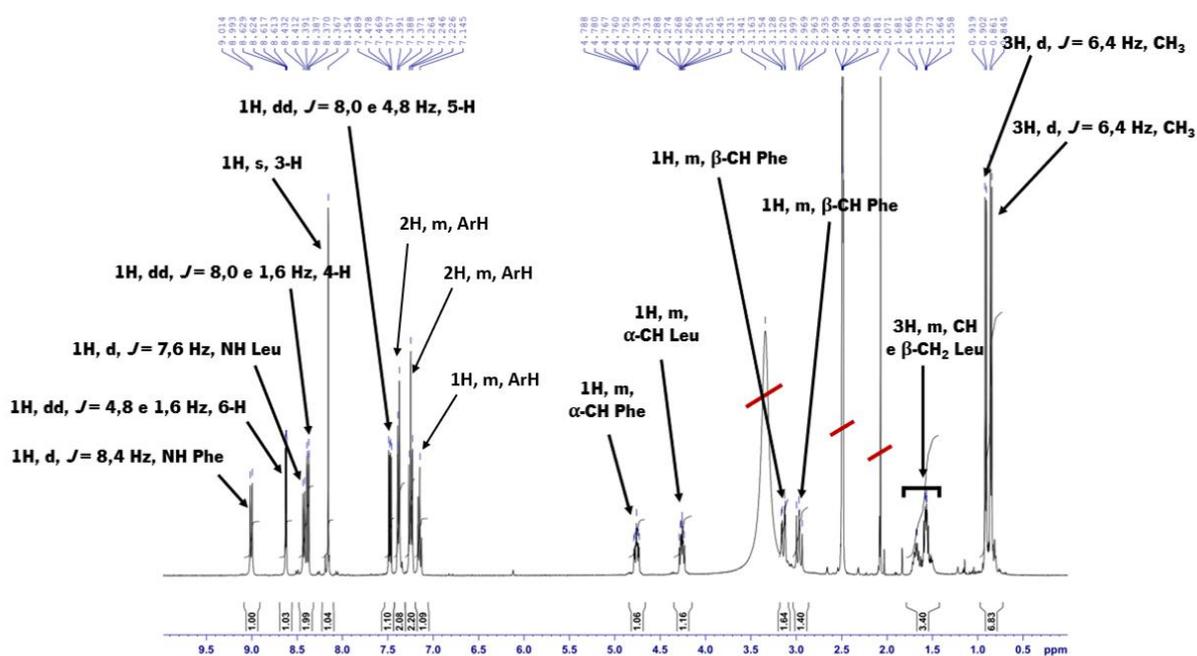
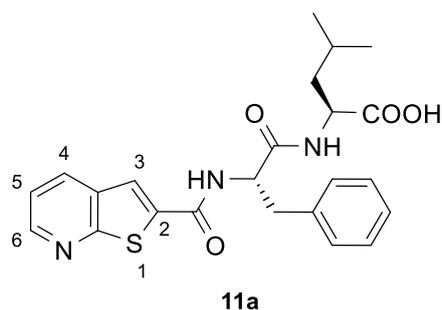
**Esquema 10** – Síntese dos ácidos carboxílicos dipeptídicos *N*-protegidos por heterociclos, **11a-c**.

Os produtos obtidos (**11a-c**) foram completamente caracterizados por p.f.,  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN, incluindo espectros de DEPT  $\theta = 135^\circ$  e espectros bidimensionais de correlações homonucleares  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  e heteronucleares  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , e massa de alta resolução no íon  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

Como exemplo da caracterização por  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN, apresentam-se espectros do composto **11a**, incluindo correlações bidimensionais COSY e HSQC (**Figuras 20-26**). Na Figura 20, observa-se os dois dupletos correspondentes aos dois sinais de  $\text{CH}_3$  da Leu, a 0,85 e 0,91 ppm, ambos com  $J = 6,4$  Hz. Entre 1,50-1,73 ppm, observa-se um multipletto que integra para 3H, incluindo os  $\beta$ - $\text{CH}_2$  da Leu e o H do carbono adjacente aos grupos metilo. Entre 2,94-3,00 e 3,12-3,16 ppm, observa-se dois multipletos integrados para 1H cada, correspondentes aos dois  $\beta$ - $\text{CH}_2$  da Phe. Observa-se os multipletos de  $\alpha$ -CH de Leu, entre 4,23-4,29 ppm, e os de Phe, entre 4,73-4,79 ppm. As atribuições destes sinais foram possíveis através da análise da expansão da zona alifática do espectro de COSY (**Figura 21**).

Na zona aromática da Figura 20, observa-se 9H aromáticos, incluindo os duplos dupletos centrados a 7,47 (1H, dd,  $J = 8,0$  e  $4,8$  Hz, 5-H) ppm, 8,38 (1H, dd,  $J = 8,0$  e  $1,6$  Hz, 4-H) ppm e 8,62 (1H, dd,  $J = 4,8$  e  $1,6$  Hz, 6-H) ppm – caraterísticos do anel de piridina fundido com o tiofeno – e o singlete a 8,15 ppm correspondente ao 3-H.

A partir da expansão do espectro de COSY do composto **11a** (Figura 22) consegue-se atribuir os sinais dos NH da Leu, a 8,42 ppm, e o da Phe, a 9,00 ppm.



**Figura 20** – Espetro de  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto **11a**.

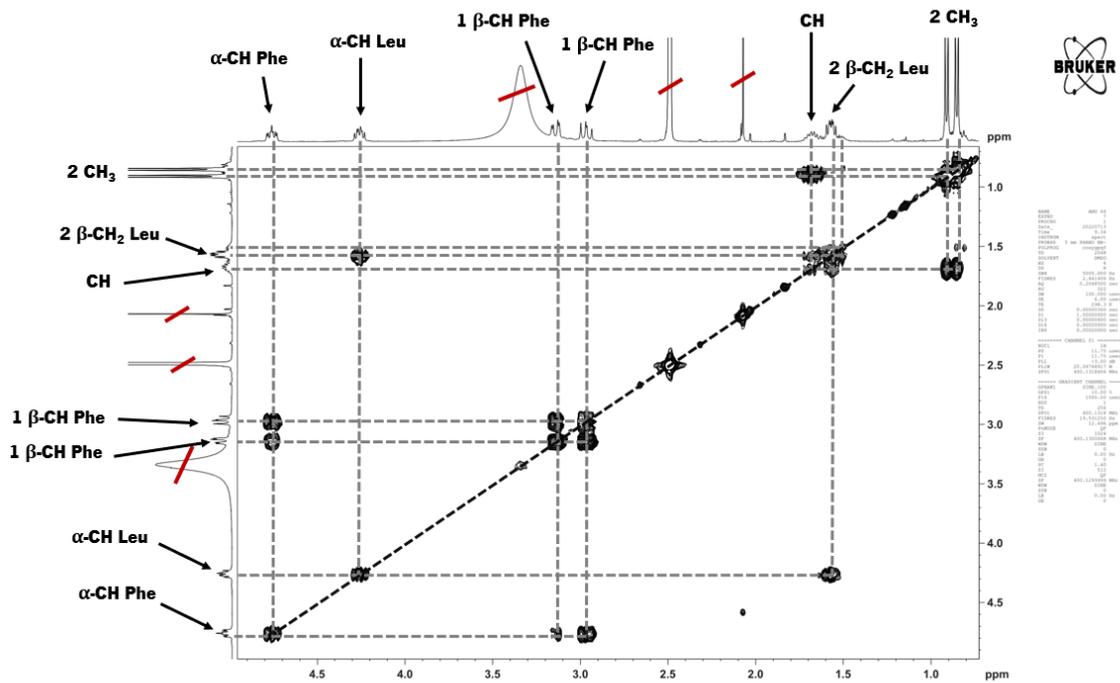


Figura 21 – Expansão da zona alifática do espectro 2D de COSY do composto **11a**.

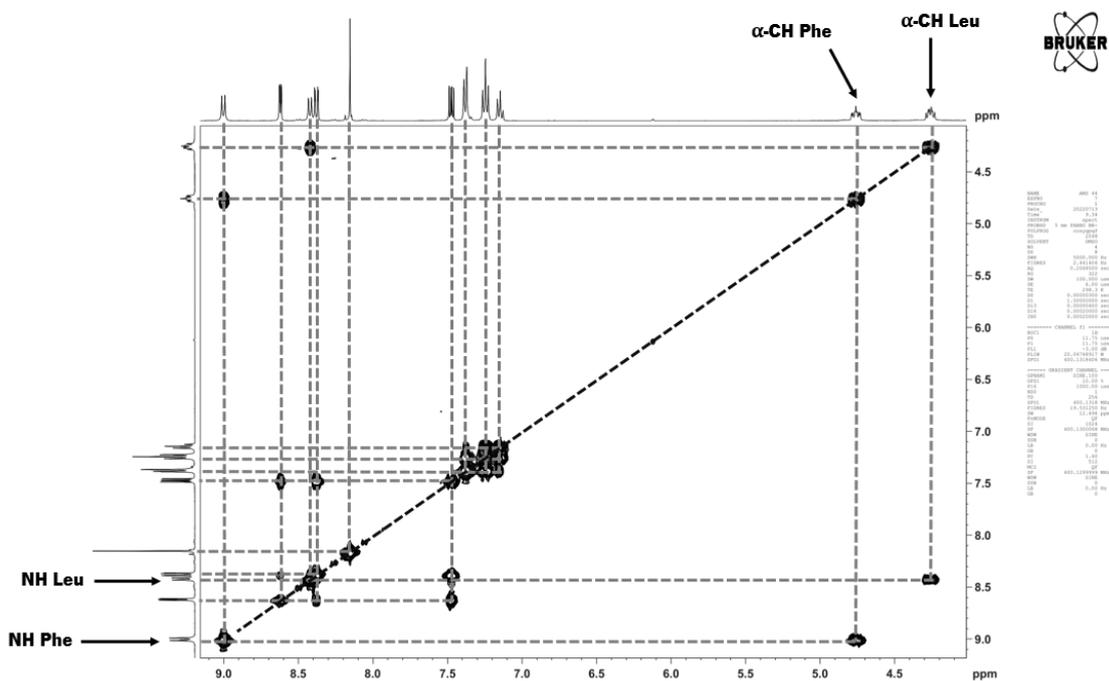
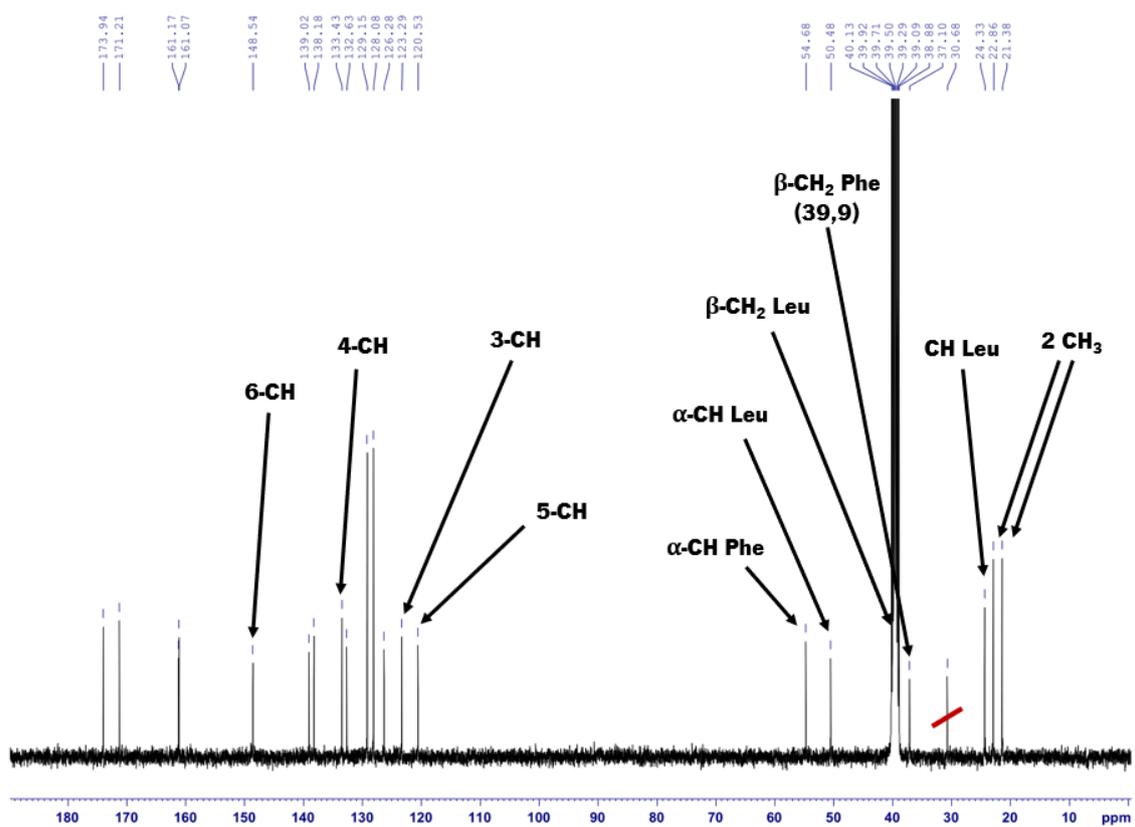


Figura 22 – Expansão do espectro 2D de COSY do composto **11a**.

Na Figura 23 apresenta-se o espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do composto **11a**. As atribuições dos sinais de carbono foram realizadas juntamente com a análise do espectro de DEPT  $\theta = 135^\circ$  (**Figura 24**) e com as expansões do espectro de HSQC (**Figuras 25 e 26**).



**Figura 23** – Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (100,6 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) do composto **11a**.

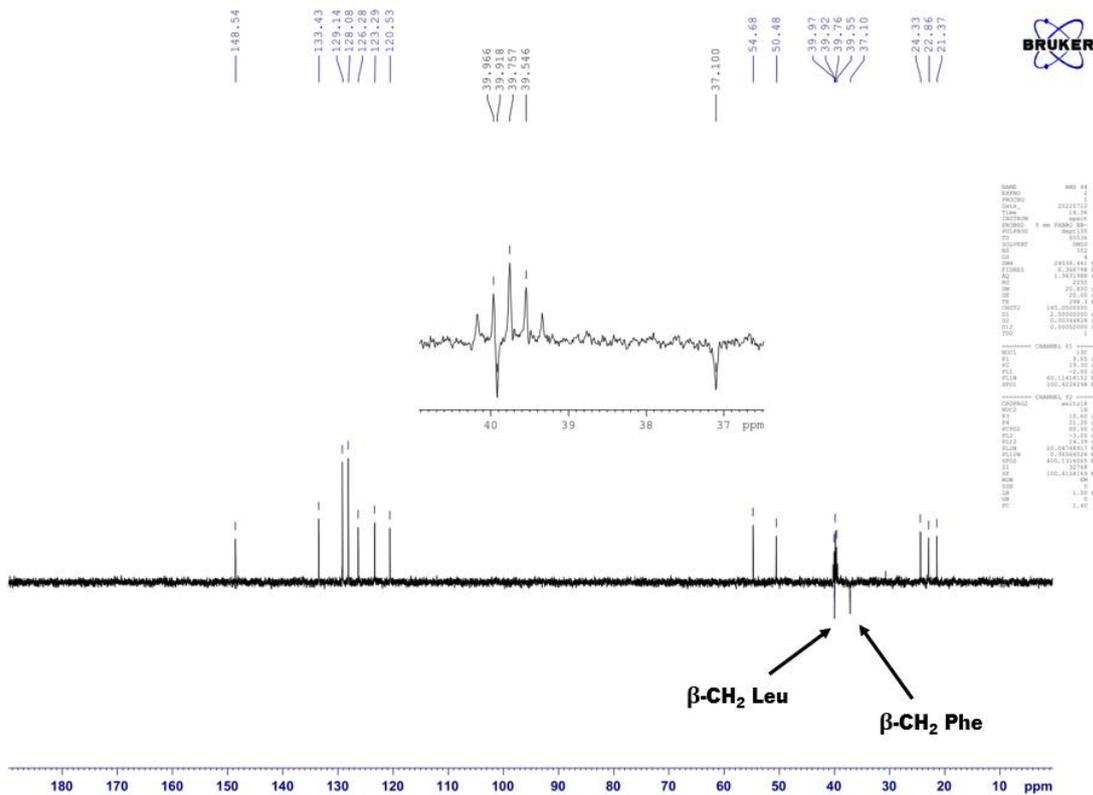


Figura 24 – Espectro de DEPT  $\theta = 135^\circ$  do composto **11a**.

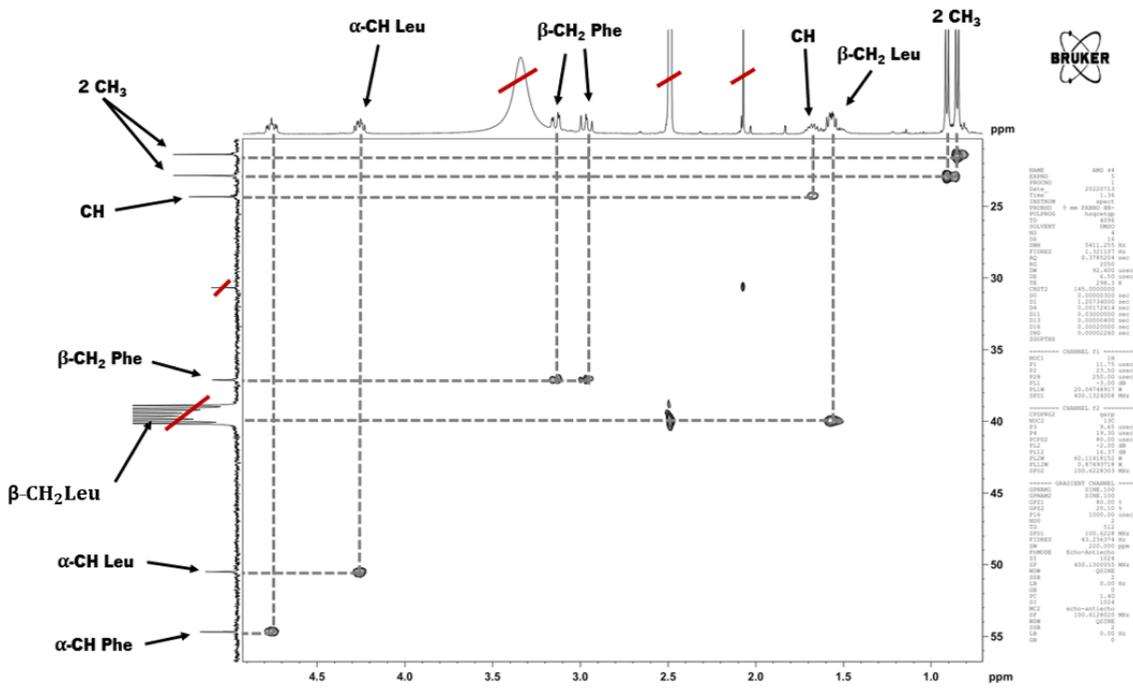
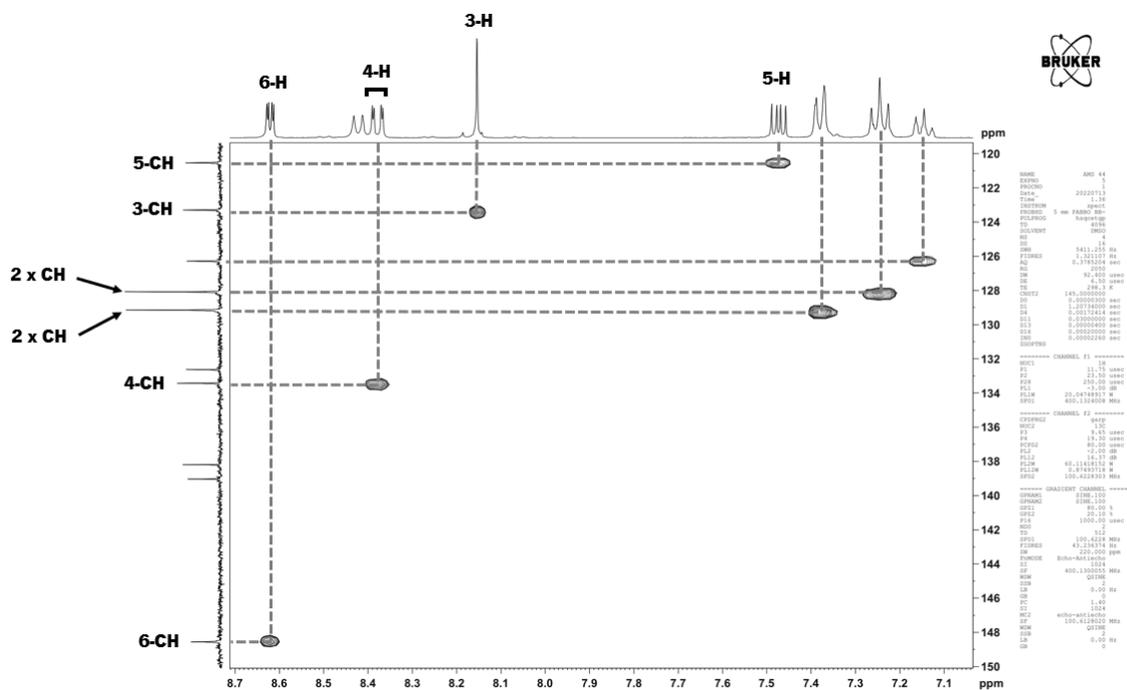


Figura 25 – Expansão da zona alifática do espectro de HSQC do composto **11a**.

A partir da expansão da zona aromática do espectro HSQC foi possível atribuir os sinais de carbono da tieno[2,3-*b*]piridina, conforme assinalado (**Figura 26**).

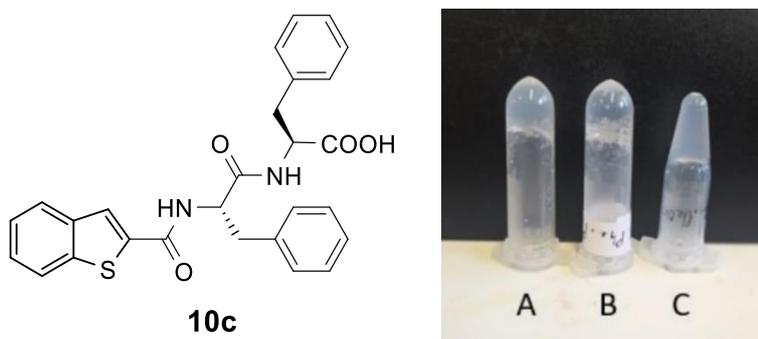


**Figura 26** – Expansão da zona aromática do espectro de HSQC do composto **11a**.

## 2.5 Estudos de gelificação por abaixamento de pH usando GdL

Como mencionado na secção 1.2 da introdução, hidrogeladores de BPM auto-organizam-se devido à presença de múltiplas interações não-covalentes, que permitem a associação dos blocos monoméricos em estruturas fibrilares que se entrecruzam e interagem umas com as outras para formar a rede 3D do hidrogel. O processo de hidrogelação de péptidos pequenos depende do equilíbrio entre hidrofobicidade e hidrofiliçidade. Diversos métodos têm sido descritos e usados para promover gelificação, entre os quais o método de abaixamento de pH. Neste trabalho, a hidrogelação foi conseguida por um abaixamento lento e controlado do pH, através da adição de GdL, que é hidrolisada a ácido glucónico.<sup>15</sup>

Os conjugados **10a-c** e **11a-c** foram submetidos a estudos de gelificação, dissolvendo inicialmente 4 mg, de cada um, em 1 mL de água (0,4 wt%), com NaOH (1M, 30 µL). A esta solução foi adicionada GdL (0,4 wt%), deixando em repouso durante a noite. Nestas condições, nenhum composto formou gel, tendo os compostos **11a** e **11c** precipitado. Quando se adicionou mais 2 mg de GdL (0,6 wt%) às soluções aquosas dos outros compostos e se deixou em repouso durante a noite, somente o composto **10c** formou gel (**Figura 27C**). Estudos posteriores (**Figura 27A, B**) revelaram uma concentração crítica de gelificação (CGC) de 0,15 wt% (pH 6,85), sendo que a 0,1 wt% já não se formou gel.

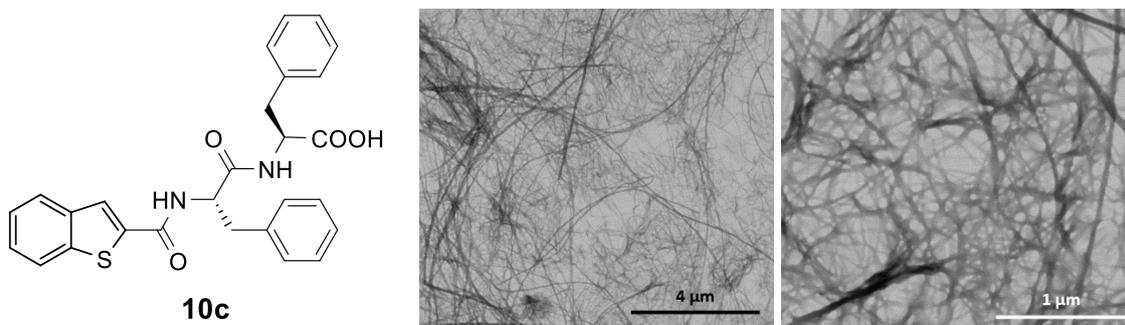


**Figura 27** – Estudos de gelificação realizados A (0,15 wt%), B (0,3 wt%) e C (0,4 wt%) para determinar a CGC do hidrogelador **10c**, usando o método de inversão do frasco.

Como, nas condições estudadas, apenas o composto **10c** formou hidrogel, este foi caracterizado por STEM e estudos reológicos. Para verificar se, mesmo não formando gel, os restantes compostos sintetizados se auto-associavam, estudou-se também o composto **10b** por STEM.

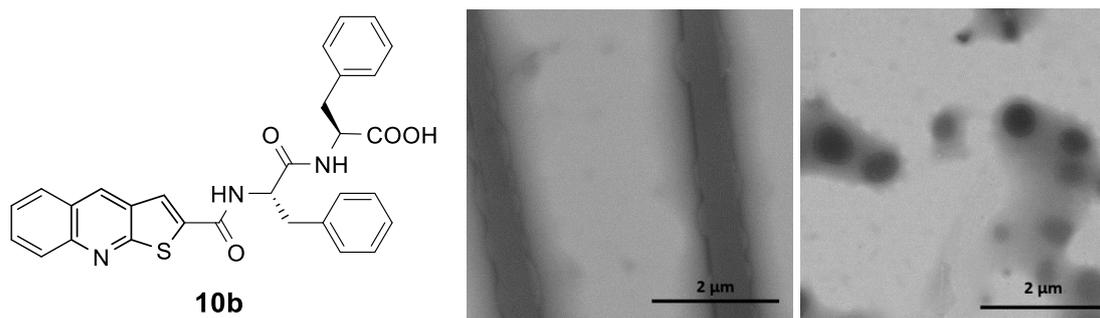
### 2.5.1 Caracterização do hidrogel por STEM

O hidrogel originado pelo composto **10c** apresentou as seguintes imagens em STEM, nas quais se observa uma auto-associação em nanofibras entrelaçadas com uma espessura média de 17 nm (**Figura 28**).



**Figura 28** – Imagens de STEM, com diferentes ampliações, do hidrogel formado pelo composto **10c** (0,15 wt%) com GdL (0,6 wt%).

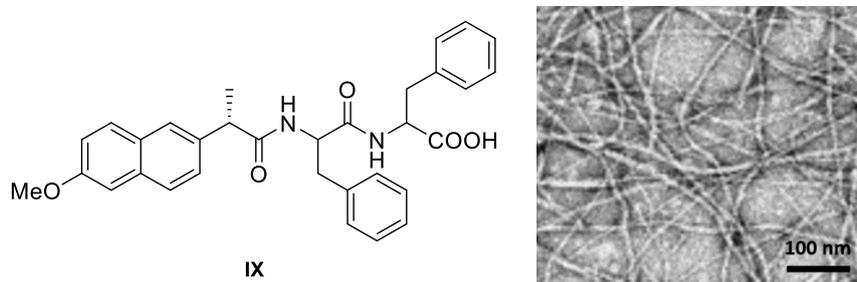
No caso do composto **10b**, que não formou hidrogel, obtiveram-se também as imagens de STEM (**Figura 29**). De acordo com as imagens obtidas, o composto **10b** agrega para formar nanoestruturas tipo vesículas, que parecem unir-se para dar origem a fibras. No entanto, as fibras não são em número suficiente para se entrecruzarem e darem origem a um hidrogel. Deverão ser efetuados outros estudos, nomeadamente estudos de dinâmica molecular, de modo a justificar os resultados obtidos.



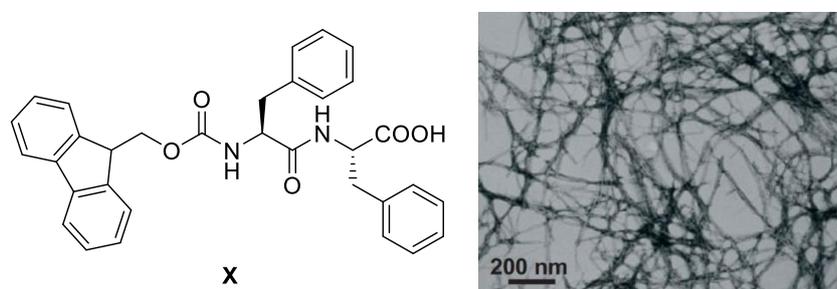
**Figura 29** – Imagens de STEM da solução do composto **10b** (0,4 wt%) com GdL (0,6 wt%) em água.

As imagens de STEM da Figura 28 são semelhantes a imagens microscópicas de hidrogéis encontradas na literatura. Como exemplo, apresentam-se abaixo as imagens de TEM de outros hidrogéis cujo hidrogelador consiste num dipéptido de difenilalanina conjugado com um grupo protetor aromático:

Npx-Phe-Phe-OH **IX**<sup>31</sup> (**Figura 30**) e Fmoc-Phe-Phe-OH **X**<sup>32</sup> (**Figura 31**). Em ambos os exemplos, foi determinada a CGC, cujos valores obtidos foram 0,2 e 0,5 wt%, respetivamente.



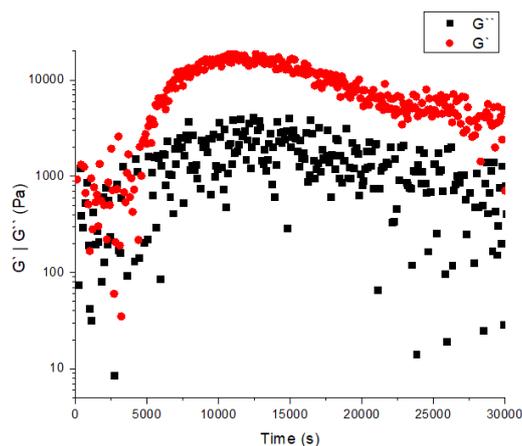
**Figura 30** – Imagens de TEM do hidrogel do composto **IX**.



**Figura 31** – Imagens de TEM do hidrogel do composto **X**.

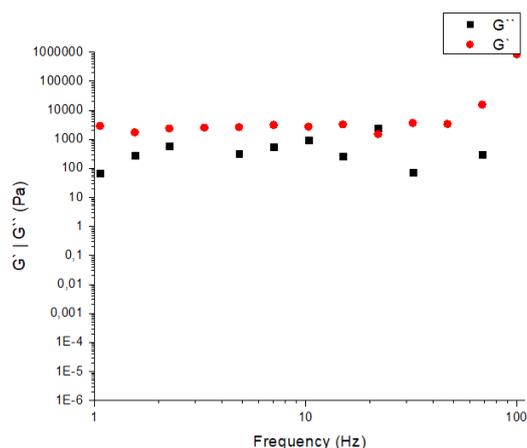
### 2.5.1 Caraterização do hidrogel por reologia

Como referido na secção 1.2 da introdução, os estudos reológicos dão informação sobre a deformação e fluidez da matéria sob a aplicação de stress e permitem avaliar a cinética de deformação do hidrogel e os módulos  $G'$  (elasticidade) e  $G''$  (viscosidade) em função da força aplicada. Da Figura 32, pode concluir-se que o gel tem uma cinética de 6 horas, usando uma concentração de 0,4 wt%.



**Figura 32** – Variação de  $G'$  e  $G''$  durante o processo cinético de gelificação do composto **10c**.

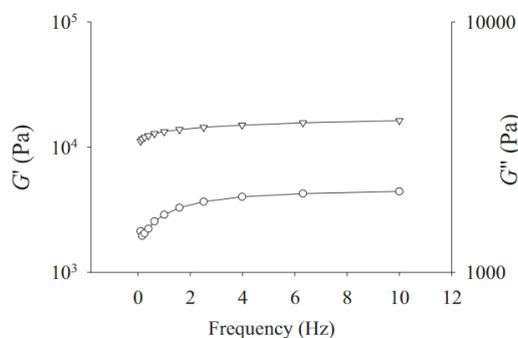
Quando se atingiu o equilíbrio estrutural estabelecido pela leitura dos módulos  $G'$  e  $G''$ , realizou-se um varrimento de frequência de 100 Hz até 0,1 Hz, com uma deformação de 0,01%, para se obter o espectro mecânico da Figura 33. O valor de  $G'$  é aproximadamente 10 vezes superior ao valor de  $G''$  (**Tabela 1**), como verificado para outros hidrogéis com uma sequência de fenilalanilfenilalanina na literatura. Por exemplo, Li *et al.* formaram e caracterizaram um hidrogel a partir do composto **IX**, tendo-se obtido um valor de  $G'$  máximo semelhante ( $1,7 \times 10^3$  Pa)<sup>31</sup> ao hidrogel do composto **10c**. Mahler *et al.* produziram também resultados, para o hidrogel do composto **X**, semelhantes com  $G'$  aproximadamente 10 vezes superiores a  $G''$  (**Figura 34**).



**Figura 33** – Dependência da frequência dos módulos  $G'$  e  $G''$  do composto **10c** a 0,4 wt%.

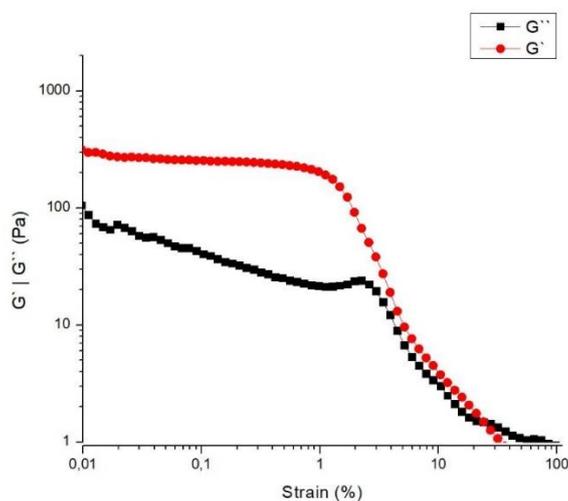
**Tabela 1** – Valores de  $G'$  e  $G''$  do hidrogel obtido a partir do composto **10c**.

Hidrogel	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)
<b>10c</b>	$3,03 \times 10^3$	$3,28 \times 10^2$



**Figura 34** – Gráfico obtido a partir do varrimento de frequência do hidrogel do composto **X**.

De seguida, realizou-se um varrimento de tensão a uma frequência de 1 Hz, aumentando a deformação de 0,01 a 100%, tendo-se obtido o gráfico mostrado na Figura 35.



**Figura 35** – Dependência da tensão dos módulos  $G'$  e  $G''$  do composto **10c** a 0,4 wt%.

Num hidrogel, o módulo  $G'$  é independente da tensão de oscilação aplicada, até ser atingida a chamada tensão crítica, que leva à deformação do hidrogel e à queda dos valores de  $G'$  e  $G''$ . O hidrogel do composto **10c** apresenta uma baixa tensão crítica, semelhante ao hidrogel do composto **IX**, com uma tensão crítica de 0,6%.<sup>31</sup>

### **Capítulo 3**

# Conclusões e perspectivas

### 3. Conclusões e perspectivas

Sintetizaram-se seis conjugados de dipéptidos Phe-Phe-OH e Phe-Leu-OH com *S* e *N,S* heterociclos como grupos *N*-protetores a partir dos correspondentes ésteres etílicos.

Os compostos *S* e *N,S* heterocíclicos usados foram o ácido benzo[*b*]tiofeno-2-carboxílico, o ácido tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxílico e o ácido tieno[2,3-*b*]quinolina-2-carboxílico, tendo sido estes dois últimos preparados neste trabalho. Estes temas heterocíclicos foram escolhidos para conferir atividades antitumorais aos conjugados.

Os ácidos heterocíclicos foram acoplados com sais de trifluoroacetato dos dipéptidos L-fenilalanil-L-fenilalaninato de etilo ou L-fenilalanil-L-leucinato de etilo, usando HBTU como agente de acoplamento e Et<sub>3</sub>N como base, tendo-se obtido, após hidrólise dos conjugados heterociclo-dipéptido na forma de ésteres etílicos, os ácidos carboxílicos correspondentes – *N*(tieno[2,3-*b*]piridina-2-carbonil)-L-fenilalanil-L-fenilalanina, *N*(tieno[2,3-*b*]quinolina-2-carbonil)-L-fenilalanil-L-fenilalanina, *N*(benzo[*b*]tiofeno-2-carbonil)-L-fenilalanil-L-fenilalanina, *N*(tieno[2,3-*b*]piridina-2-carbonil)-L-fenilalanil-L-leucina, *N*(tieno[2,3-*b*]quinolina-2-carbonil)-L-fenilalanil-L-leucina e *N*(benzo[*b*]tiofeno-2-carbonil)-L-fenilalanil-L-leucina. Os conjugados heterociclo-dipéptido (ésteres e ácidos) foram completamente caracterizados por p.f., <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C RMN e massa de alta resolução no íão [M+H]<sup>+</sup>.

Os seis ácidos carboxílicos conjugados heterociclo-dipéptido foram submetidos a estudos de gelificação em água, através de abaixamento do pH usando GdL, NaOH para dissolução do composto, e deixando em repouso durante a noite. Nestas condições, somente o ácido de **10c** formou gel quando se inverteu o frasco, tendo posteriormente sido determinada a CGC, com valor de 0,15 wt%, e o pH final de 6,85. Os outros compostos ou precipitaram ou não formaram hidrogel, mesmo depois de se ter adicionado mais GdL.

Desta forma, o único hidrogel formado foi caracterizado por STEM – onde foi possível a visualização de uma rede 3D de fibras entrelaçadas, com espessura média de 17 nm – e, por reologia, tendo mostrado um comportamento viscoelástico ( $G' = 3,03 \times 10^3$  Pa;  $G'' = 3,28 \times 10^2$  Pa) semelhante à matriz extracelular de alguns tecidos humanos. Adicionalmente, de modo a verificar se, mesmo não formando gel, os restantes compostos sintetizados se auto-associavam, estudou-se, como exemplo, a solução do ácido de *N*(tieno[2,3-*b*]quinolina-2-carbonil)-L-fenilalanil-L-fenilalanina por STEM, tendo-se observado nanoestruturas fibrilares tipo vesículas, mas em número insuficiente para formar um hidrogel.

As propriedades antitumorais dos conjugados preparados serão posteriormente estudadas em colaboração com outro grupo de investigação.

## **Capítulo 4**

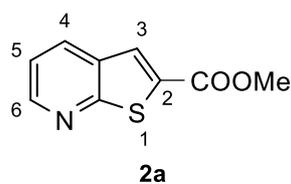
# Parte experimental

## 4. Parte experimental

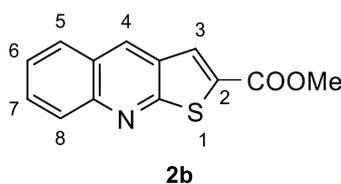
### 4.1 Geral

As reações foram monitorizadas por cromatografia de camada fina (TLC). Os pontos de fusão foram determinados utilizando o SPM3-Stuart apparatus. Os espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN foram feitos num Bruker Avance III a 400 e 100,6 MHz, respetivamente. Usou-se DEPT  $\theta = 135^\circ$  e espectros de correlações homonucleares  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) e heteronucleares  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC e HMBC). Os compostos novos foram também caracterizado por espectrometria de massa de alta resolução usando a técnica de ESI, no serviço de espectrometria de massa do CACTI da Universidade de Vigo.

#### 4.1.1 Síntese dos ésteres metílicos dos precursores heterocíclicos **2a** e **2b**



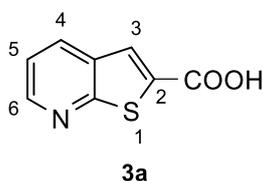
**Tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxilato de metilo (**2a**)** – Adicionou-se ao 2-cloropiridina-3-carbaldeído (**1a**) (0,650 g, 4,57 mmol) em DMF (5,2 mL), tioglicolato de metilo (0,450 mL, 5,03 mmol) e carbonato de potássio (3 equiv., 1,900 g, 13,7 mmol) e deixou-se a agitar a 80 °C durante 3 horas. De seguida, colocou-se a mistura reacional em gelo, com agitação, tendo-se formado um precipitado. Filtrou-se, usando vácuo, tendo-se obtido o composto **2a** como um sólido branco (0,530 g, 60%).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 3,97$  (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 7,37 (1H, dd,  $J = 8,0$  e 4,4 Hz, 5-H), 8,01 (1H, s, 3-H), 8,16 (1H, dd,  $J = 8,0$  e 1,6 Hz, 4-H), 8,69 (1H, dd,  $J = 4,4$  e 1,6 Hz, 6-H) ppm. Este espectro é idêntico ao descrito na literatura.<sup>29</sup>



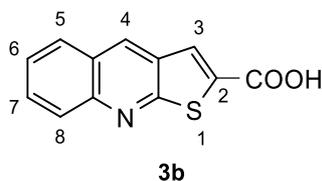
**Tieno[2,3-*b*]quinolina-2-carboxilato de metilo (**2b**)**<sup>33</sup> – Adicionou-se ao 2-cloroquinolina-3-carbaldeído (**1b**) (0,700 g, 2,15 mmol) em DMF (18,0 mL), tioglicolato de metilo (0,360 mL, 4,02 mmol) e carbonato de potássio (3 equiv., 1,51 g, 1,10 mmol) e deixou-se agitar a 80 °C durante 3 horas. De

seguida colocou-se a mistura reacional em gelo, com agitação, tendo-se formado um precipitado. Filtrou-se, usando vácuo, tendo-se obtido o composto **2b** como um sólido branco (0,524 g, 60%).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 4,01 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 7,60-7,66 (1H, m, ArH), 7,83-7,88 (1H, m, ArH), 8,03 (1H, d largo,  $J$  = 8,4 Hz, ArH), 8,14 (1H, s, ArH), 8,25 (1H, d largo,  $J$  = 8,4 Hz, ArH), 8,75 (1H, s, ArH) ppm.  $^{13}\text{C}$  RMN (100,6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 53,0 ( $\text{OCH}_3$ ), 125,7 (C), 126,3 (CH), 127,5 (CH), 127,9 (CH), 128,7 (CH), 131,2 (CH), 131,4 (C), 134,0 (CH), 134,9 (C), 147,0 (C), 163,0 (C) ppm.

#### 4.1.2 Síntese dos ácidos carboxílicos dos precursores heterocíclicos **3a** e **3b**



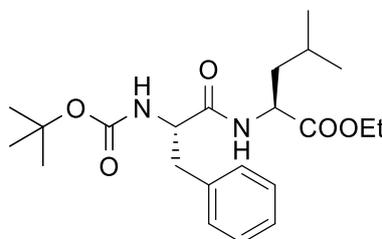
**Ácido tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxílico (3a)** – A uma solução de tieno[2,3-*b*]piridina-2-carboxilato de metilo (**2a**) (0,530 g, 2,74 mmol) em MeOH (20,0 mL) adicionou-se NaOH 2M (2 equiv.) e a mistura ficou a agitar à temperatura ambiente durante a noite. Evaporou-se o solvente e ao resíduo obtido adicionou-se  $\text{H}_2\text{O}$  e algumas gotas de  $\text{HCl}_{\text{conc.}}$  até pH = 1. Formou-se um precipitado que se filtrou, tendo-se obtido o composto **3a** como um sólido branco (0,488 g, rendimento quantitativo), p.f. 314-316 °C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 7,52 (1H, dd,  $J$  = 8,2 e 4,4 Hz, 5-H), 8,09 (1H, s, 3-H), 8,40 (1H, dd,  $J$  = 8,2 e 1,6 Hz, 4-H), 8,69 (1H, dd,  $J$  = 4,4 e 1,6 Hz, 6-H) ppm.



**Ácido tieno[2,3-*b*]quinolina-2-carboxílico (3b)** – Uma mistura de tieno[2,3-*b*]quinolina-2-carboxilato de metilo (**2b**) (0,524 g, 2,15 mmol) em MeOH (28,0 mL) e NaOH 2M (2 equiv., 0,778 mL) foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. Evaporou-se o solvente e ao resíduo obtido adicionou-se  $\text{H}_2\text{O}$  e algumas gotas de  $\text{HCl}_{\text{conc.}}$  até pH = 1. Formou-se um precipitado que se filtrou, tendo-se obtido o composto **3b** como um sólido branco (0,457 g, 93%), p.f. 335-337 °C.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 7,63-7,67 (1H, m, ArH), 7,84 -7,89 (1H, m, ArH), 8,07 - 8,10 (1H, m, ArH), 8,16 - 8,19 (1H, m, ArH), 8,22 (1H, s, ArH), 9,04 (1H, s, ArH) ppm.  $^{13}\text{C}$  RMN (100,6 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  = 125,5 (C), 126,0

(CH), 127,9 (CH), 128,4 (CH), 129,2 (CH), 131,0 (CH), 131,3 (C), 134,1 (CH), 135,4 (C), 147,4 (C), 163,0 (C), 163,2 (C) ppm.

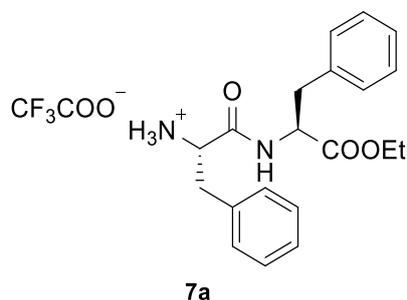
#### 4.1.3 Síntese dos ésteres etílicos dipeptídicos *N*-protegidos por Boc **6a** e **6b**



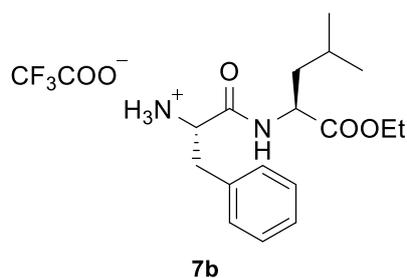
**6b**

***N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-L-fenilalanil-L-leucinato de etilo (**6b**)** – A *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-L-fenilalanina **4** (0,265 g, 1 mmol) adicionou-se ACN (10 mL) e deixou-se a agitar. Dissolveu-se, a 0°C, o agente de acoplamento HBTU (1,2 equiv., 0,477 g), seguido por sal de cloreto de H-Leu-OEt **5b** (1 equiv., 0,196 mmol). Finalmente adicionou-se à mistura reacional Et<sub>3</sub>N (4 equiv., 4,00 mmol), e deixou-se a agitar à temperatura ambiente durante a noite. No dia seguinte evaporou-se o ACN, usando o evaporador rotativo, e adicionou-se AcOEt (20 mL). A lavagem foi efetuada utilizando KHSO<sub>4</sub> (3 × 15 mL), NaHCO<sub>3</sub> (3 × 15 mL) e solução saturada de NaCl (3 × 15 mL). Secou-se usando sulfato de magnésio, filtrou-se por gravidade, e evaporou-se o AcOEt. Deixou-se a secar durante a noite, obtendo-se assim o composto **6b** como um sólido branco (0,290 g, 72%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 0,84 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>), 0,90 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>), 1,16 (3H, t, *J* = 7,2 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,28 (9H, s, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,49-1,57 (2H, m, β-CH<sub>2</sub> Leu), 1,64-1,65 (1H, m, CH Leu), 2,71-2,74 (1H, m, β-CH Phe), 2,92-2,96 (1H, m, β-CH Phe), 4,05-4,08 (3H, m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4,18-4,19 (1H, m, α-CH Leu), 4,27-4,29 (1H, m, α-CH Phe), 6,86 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, NH), 7,17-7,30 (5H, m, ArH), 8,22 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, NH) ppm.

4.1.4 Síntese dos sais trifluoroacetato de L-fenilalanil-L-fenilalaninato de etilo e de L-fenilalanil-L-leucinato de etilo, **7a** e **7b**, respetivamente

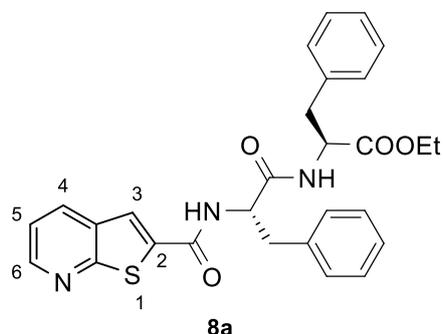


**Sal de trifluoroacetato de L-fenilalanil-L-fenilalaninato de etilo (7a)** – Ao composto **6a** (0,220 g, 0,500 mmol) adicionou-se TFA (1,5 ml) e deixou-se a agitar à temperatura ambiente durante 2 horas. Evaporou-se o TFA no evaporador rotativo com o auxílio de éter dietílico, obtendo-se um sólido branco (rendimento quantitativo).

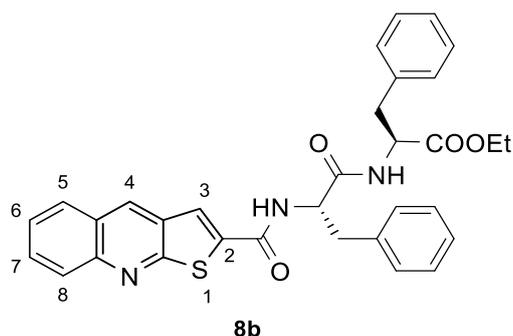


**Sal trifluoroacetato de L-fenilalanil-L-leucinato de etilo (7b)** – Ao composto **6b** (0,290 g, 0,713 mmol) adicionou-se TFA (2,1 mL) e deixou-se a agitar à temperatura ambiente durante 2 horas. Evaporou-se o TFA no evaporador rotativo com o auxílio de éter dietílico, obtendo-se um sólido branco (rendimento quantitativo).

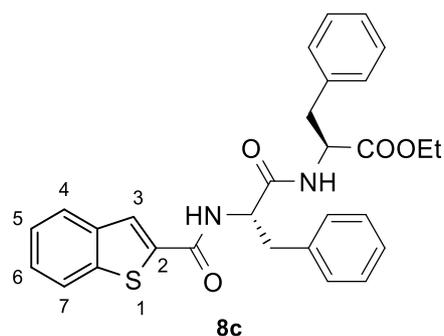
4.1.5 Acoplamento dos compostos heterocíclicos **3a-c** com o sal de trifluoroacetato do L-fenilalanil-L-fenilalaninato de etilo **7a** e com o sal de trifluoroacetato do L-fenilalanil-L-leucinato de etilo **7b**



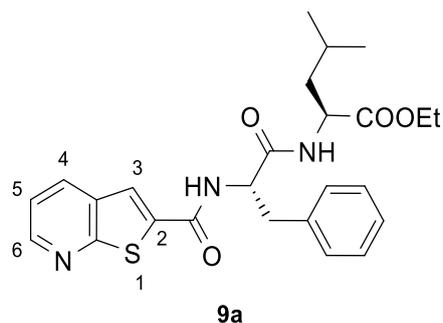
***N*-(tieno[2,3-*b*]piridina-2-carbonil)-L-fenilalanina-L-fenilalaninato de etilo (8a)** – Ao composto **3a** (0,0890 g, 0,500 mmol) adicionou-se ACN (15 mL) e deixou-se a agitar. Dissolveu-se o sal de trifluoroacetato **7a** (1 equiv., 0,500 mmol) em ACN (2 mL) e juntou-se à mistura reacional. Adicionaram-se depois, a 0°C, o agente de acoplamento HBTU (1,2 equiv., 0,228 g) e Et<sub>3</sub>N até pH = 7, e a mistura ficou a agitar durante a noite à temperatura ambiente. Evaporou-se o ACN e adicionou-se AcOEt (20 mL). Foram efetuadas lavagens da fase orgânica utilizando KHSO<sub>4</sub> (3 × 15 mL), NaHCO<sub>3</sub> (3 × 15 mL) e solução saturada de NaCl (3 × 15 mL). Secou-se a fase orgânica usando sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e evaporou-se o AcOEt, tendo-se obtido um sólido amarelado que, depois de lavado com éter etílico, originou o composto **8a** como um sólido branco (0,126 g, 50%). P.f. 135-137 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 1,08 (3H, t, *J* = 7,2 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,00-3,07 (4H, m, β-CH<sub>2</sub>), 4,02 (2H, q, *J* = 7,2 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4,47-4,50 (1H, m, α-CH), 4,75-4,76 (1H, m, α-CH), 7,13-7,28 (8H, m, ArH), 7,33-7,36 (2H, m, ArH), 7,48 (1H, dd, *J* = 8,0 e 4,8 Hz, 5-H), 8,15 (1H, s, 3-H), 8,37 (1H, dd, *J* = 8,0 e 1,6 Hz, 4-H), 8,63 (1H, dd, *J* = 4,8 e 1,6 Hz, 6-H), 8,67 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, NH), 9,05 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, NH) ppm. <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 13,9 (CH<sub>3</sub>), 36,6 (β-CH<sub>2</sub>), 37,0 (β-CH<sub>2</sub>), 53,9 (α-CH), 54,6 (α-CH), 60,5 (CH<sub>2</sub>), 120,5 (5-CH), 123,3 (3-CH), 126,3 (CH), 126,5 (CH), 128,1 (CH), 128,2 (CH), 129,1 (CH), 132,6 (C), 133,4 (4-CH), 137,1 (C), 138,1 (C), 139,0 (C), 148,6 (6-CH), 161,0 (C), 162,0 (C), 171,2 (C), 171,3 (C) ppm. MS ESI valor teórico para [M+H]<sup>+</sup> C<sub>28</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 502,1795. Valor encontrado 502,1802.



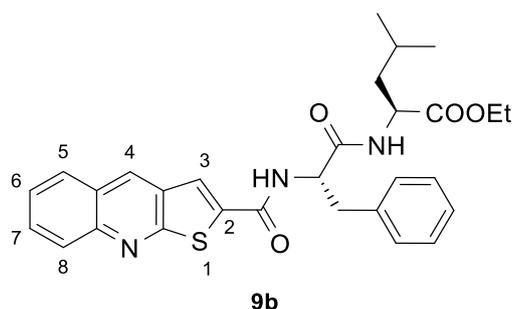
***N*-(tieno[2,3-*b*]quinolina-2-carbonil)-L-fenilalanina-L-fenilalaninato de etilo (8b)** – Ao composto **3b** (0,115 g, 0,500 mmol) adicionou-se ACN (20 mL) e deixou-se a agitar. Dissolveu-se o sal de trifluoroacetato **7a** (0,95 equiv., 0,475 mmol) em ACN (5 mL) e juntou-se à mistura reacional. Adicionaram-se depois, a 0°C, o agente de acoplamento HBTU (1,2 equiv., 0,228 g) e Et<sub>3</sub>N até pH = 7, e a mistura ficou a agitar durante a noite à temperatura ambiente. Evaporou-se o ACN e adicionou-se AcOEt (20 mL). Foram efetuadas lavagens da fase orgânica utilizando KHSO<sub>4</sub> (3 × 15 mL), NaHCO<sub>3</sub> (3 × 15 mL) e solução saturada de NaCl (3 × 15 mL). Secou-se a fase orgânica usando sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e evaporou-se o AcOEt, tendo-se obtido um sólido amarelado que, depois de lavado com éter etílico, originou o composto **8b** como um sólido branco (0,137 g, 50%). P.f. 196-198 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 1,10 (3H, t, *J* = 6,8 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,97-3,25 (4H, m, 2 × β-CH<sub>2</sub>), 4,03 (2H, q, *J* = 6,8 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4,49-4,51 (1H, m, α-CH), 4,75-4,90 (1H, m, α-CH), 7,15-7,39 (10H, m, ArH), 7,62-7,66 (1H, m, ArH), 7,81-7,86 (1H, m, ArH), 8,05-8,06 (1H, d largo, ArH), 8,15-8,16 (1H, d largo, ArH), 8,27 (1H, s, ArH), 8,67 (1H, d, *J* = 7,2 Hz, NH), 9,04 (1H, s, ArH), 9,10 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, NH) ppm. <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 13,9 (CH<sub>3</sub>), 36,5 (β-CH<sub>2</sub>), 37,1 (β-CH<sub>2</sub>), 54,0 (α-CH), 54,5 (α-CH), 60,5 (CH<sub>2</sub>), 123,2 (CH), 125,5 (C), 125,8 (CH), 126,3 (CH), 126,5 (CH), 127,8 (CH), 128,1 (CH), 128,2 (CH), 129,0 (CH), 129,1 (CH), 129,12 (CH), 130,5 (CH), 131,7 (C), 133,3 (CH), 137,0 (C), 138,0 (C), 140,0 (C), 147,0 (C), 161,0 (C), 162,0 (C), 171,2 (C) ppm. MS ESI valor teórico para [M+H]<sup>+</sup> C<sub>32</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 552,1952. Valor encontrado 552,1963.



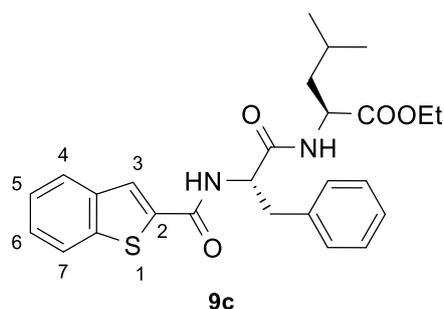
***N*-(benzo[*b*]tiofeni-2-carbonil)-*L*-fenilalanina-*L*-fenilalaninato de etilo (8c)** – Ao composto **3c** (0,890 g, 0,500 mmol) adicionou-se ACN (15 mL) e deixou-se a agitar. Dissolveu-se o sal de trifluoroacetato **7a** (0,500 mmol) em ACN (5 mL) e juntou-se à mistura reacional. Adicionaram-se depois, a 0°C, o agente de acoplamento HBTU (1,2 equiv., 0,228 g) e Et<sub>3</sub>N até pH = 7, e a mistura ficou a agitar durante a noite à temperatura ambiente. Evaporou-se o ACN e adicionou-se AcOEt (20 mL). Foram efetuadas lavagens da fase orgânica utilizando KHSO<sub>4</sub> (3 × 15 mL), NaHCO<sub>3</sub> (3 × 15 mL) e solução saturada de NaCl (3 × 15 mL). Secou-se a fase orgânica usando sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e evaporou-se o AcOEt, tendo-se obtido um sólido amarelado que, depois de lavado com éter etílico, originou o composto **8c** como um sólido branco (0,125 g, 50%), p.f. 120-122 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 1,09 (3H, t, *J* = 7,2 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,94-3,07 (4H, m, 2 × β-CH<sub>2</sub>), 4,03 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4,45-4,51 (1H, m, α-CH), 4,71-4,77 (1H, m, α-CH), 7,14-7,26 (8H, m, ArH), 7,34-7,36 (2H, m, ArH), 7,42-7,44 (2H, m, ArH), 7,93-8,00 (2H, m, ArH), 8,15 (1H, s, 3-H), 8,60 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, NH), 8,87 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, NH) ppm. <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 14,0 (CH<sub>3</sub>), 36,6 (β-CH<sub>2</sub>), 37,0 (β-CH<sub>2</sub>), 54,0 (α-CH), 54,5 (α-CH), 60,5 (CH<sub>2</sub>), 122,7 (CH), 124,9 (CH), 125,1 (3-CH), 125,2 (CH), 126,3 (CH), 126,5 (CH), 128,1 (CH), 128,2 (CH), 129,1 (CH), 137,0 (C), 138,1 (C), 139,1 (C), 139,4 (C), 140,2 (C), 161,3 (C), 171,2 (C), 171,4 (C) ppm. MS ESI valor teórico para [M+H]<sup>+</sup> C<sub>29</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S 501,1843. Valor encontrado 501,1859.



***N*-(tieno[2,3-*b*]piridina-2-carbonil)-L-fenilalanina-L-leucinato de etilo (9a)** – Ao composto **3a** (0,128 g, 0,713 mmol) adicionou-se ACN (8 mL) e deixou-se a agitar. Juntou-se o agente de acoplamento HBTU (1,2 equiv., 0,340 g), a 0 °C, o sal de trifluoroacetato **7b** (1 equiv., 0,713 mmol) dissolvido em ACN (3 mL) e Et<sub>3</sub>N até pH = 7. A mistura reacional ficou a agitar durante a noite à temperatura ambiente. Evaporou-se o ACN e juntou-se AcOEt (20 mL). Foram efetuadas lavagens da fase orgânica utilizando KHSO<sub>4</sub> (3 × 15 mL), NaHCO<sub>3</sub> (3 × 15 mL) e solução saturada de NaCl (3 × 15 mL). Secou-se a fase orgânica usando sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e evaporou-se o AcOEt, tendo-se obtido um sólido amarelado que, depois de lavado com éter etílico, originou o composto **9a** como um sólido branco (0,210 g, 63%), p.f. 210-212 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 0,86 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>), 0,91 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>) 1,17 (3H, t, *J* = 7,2 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,48-1,73 (3H, m, CH e β-CH<sub>2</sub> Leu), 2,94-3,00 (1H, m, β-CH Phe), 3,11-3,16 (1H, m, β-CH Phe), 4,02-4,14 (2H, m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4,26-4,32 (1H, m, α-CH Leu), 4,73-4,79 (1H, m, α-CH Phe), 7,13-7,17 (1H, m, ArH), 7,23-7,27 (2H, m, ArH), 7,37-7,39 (2H, m, ArH), 7,47 (1H, *J* = 8,0 e 4,8 Hz, 5-H), 8,16 (1H, s, 3-H), 8,38 (1H, dd, *J* = 8,0 e 1,6 Hz, 4-H), 8,56 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, NH Leu), 8,62 (1H, dd, *J* = 4,8 e 1,6 Hz, 6-H), 9,03 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, NH Phe) ppm. <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 14,0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 21,4 (CH<sub>3</sub>), 22,7 (CH<sub>3</sub>), 24,3 (CH Leu), 37,1 (β-CH<sub>2</sub> Phe), 39,6 (β-CH<sub>2</sub> Leu), 50,6 (α-CH Leu), 54,6 (α-CH Phe), 60,5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 120,5 (5-CH), 123,3 (3-CH), 126,3 (CH), 128,1 (2 × CH), 129,1 (2 × CH), 132,6 (C), 133,4 (4-CH), 138,1 (C), 139,0 (C), 148,6 (6-CH), 161,1 (C), 161,2 (C), 171,4 (C), 172,3 (C) ppm. MS ESI valor teórico para [M+H]<sup>+</sup> C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 468,1952. Valor encontrado 468,1958.



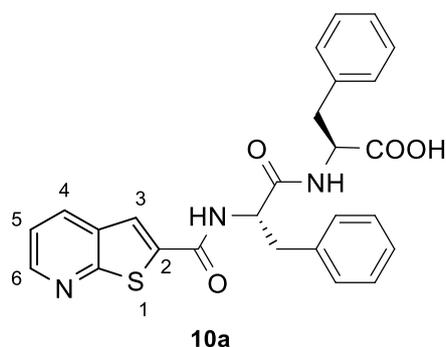
***N*-(tieno[2,3-*b*]piridina-2-carbonil)-L-fenilalanina-L-leucinato de etilo (9b)** – Ao composto **3b** (0,330 g, 0,785 mmol) adicionou-se ACN (10 mL) e deixou-se a agitar. Juntou-se o agente de acoplamento HBTU (1,2 equiv., 0,478 g), a 0°C, e o sal de trifluoroacetato **7b** (1 equiv., 0,785 mmol) dissolvido em ACN (3 mL). Adicionou-se à mistura reacional Et<sub>3</sub>N até pH = 7, e deixou-se a agitar durante a noite à temperatura ambiente. Evaporou-se o ACN e adicionou-se AcOEt (20 mL). Foram efetuadas lavagens da fase orgânica utilizando KHSO<sub>4</sub> (3 × 15 mL), NaHCO<sub>3</sub> (3 × 15 mL) e solução saturada de NaCl (3 × 15 mL). Secou-se a fase orgânica usando sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e evaporou-se o AcOEt, tendo-se obtido um sólido amarelado que, depois de lavado com éter etílico, originou o composto **9b** como um sólido branco (0,249 g, 61%), p.f. 189-191 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 0,86 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>), 0,92 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>), 1,17 (3H, t, *J* = 6,8 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,48-1,73 (3H, m, CH e β-CH<sub>2</sub> Leu), 2,97-3,03 (1H, m, β-CH Phe), 3,14-3,18 (1H, m, β-CH Phe), 4,03-4,14 (2H, m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4,28-4,34 (1H, m, α-CH Leu), 4,75-4,90 (1H, m, α-CH Phe), 7,14-7,18 (1H, m, ArH), 7,25-7,29 (2H, m, ArH), 7,40-7,42 (2H, m, ArH), 7,61-7,65 (1H, m, ArH), 7,81-7,85 (1H, m, ArH), 8,06 (1H, d largo, *J* = 7,6 Hz, ArH), 8,16 (1H, d largo, *J* = 7,6 Hz, ArH), 8,29 (1H, s, ArH), 8,59 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, NH Leu), 9,03 (1H, s, ArH), 9,13 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, NH Phe) ppm. <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 14,0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 21,3 (CH<sub>3</sub>), 22,7 (CH<sub>3</sub>), 24,3 (CH Leu), 37,1 (β-CH<sub>2</sub> Phe), 39,6 (β-CH<sub>2</sub> Leu), 50,6 (α-CH Leu), 54,6 (α-CH Phe), 60,5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 123,2 (CH), 125,5 (C), 125,8 (CH), 126,3 (CH), 127,8 (CH), 128,1 (2 × CH), 128,9 (CH), 129,1 (2 × CH), 130,5 (CH), 131,7 (C), 133,3 (CH), 138,1 (C), 140,0 (C), 146,9 (C), 161,1 (C), 162,0 (C), 171,4 (C), 172,3 (C) ppm. MS ESI valor teórico para [M+H]<sup>+</sup> C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 518,2108. Valor encontrado 518,2109.



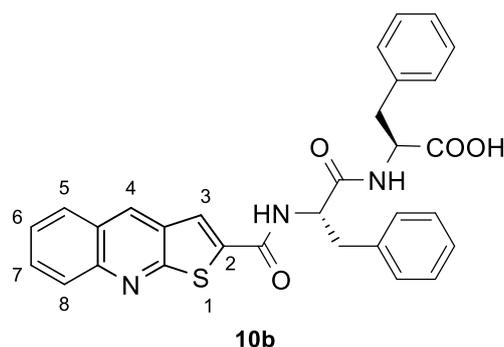
***N*-(benzo[*b*]tiofeno-2-carbonil)-*L*-fenilalanina-*L*-leucinato de etilo (**9c**)** – Ao composto **3c** (0,120 g, 0,644 mmol) adicionou-se ACN (7 mL) e deixou-se a agitar. Juntou-se o agente de acoplamento HBTU (1,2 equiv., 0,318 g), a 0 °C, e o sal de trifluoroacetato **7b** (1 equiv., 0,664 mmol) dissolvido em ACN (3 mL). Adicionou-se à mistura reacional Et<sub>3</sub>N até pH = 7, e deixou-se a agitar a durante a noite à temperatura ambiente. Filtrou-se o sólido branco precipitado e evaporou-se o ACN, tendo-se adicionado depois AcOEt (20 mL). Foram efetuadas lavagens da fase orgânica utilizando KHSO<sub>4</sub> (3 × 15 mL), NaHCO<sub>3</sub> (3 × 15 mL) e solução saturada de NaCl (3 × 15 mL). Secou-se a fase orgânica usando sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e evaporou-se o AcOEt, tendo-se obtido um sólido amarelado que, depois de lavado com éter etílico, originou o composto **9c** como um sólido branco (total: 0,242 g, 60%), p.f. 212-214 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 0,85 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>), 0,93 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>), 1,17 (3H, t, *J* = 7,2 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,50-1,73 (3H, m, CH e β-CH<sub>2</sub> Leu), 2,94-3,00 (1H, m, β-CH Phe), 3,11-3,15 (1H, m, β-CH Phe), 4,02-4,14 (2H, m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4,26-4,32 (1H, m, α-CH Leu), 4,72-4,78 (1H, m, α-CH Phe), 7,13-7,17 (1H, m, ArH), 7,23-7,27 (2H, m, ArH), 7,37-7,39 (2H, m, ArH), 7,41-7,46 (2H, m, ArH), 7,92-7,98 (2H, m, ArH), 8,17 (1H, s, 3-H), 8,53 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, NH Leu), 8,90 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, NH Phe) ppm. <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 14,0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 21,4 (CH<sub>3</sub>), 22,7 (CH<sub>3</sub>), 24,3 (CH Leu), 37,1 (β-CH<sub>2</sub> Phe), 39,6 (β-CH<sub>2</sub> Leu), 50,6 (α-CH Leu), 54,6 (α-CH Phe), 60,5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 122,8 (CH), 124,9 (CH), 125,2 (CH), 125,3 (3-CH), 126,2 (CH), 126,3 (CH), 128,1 (2 × CH), 129,1 (2 × CH), 138,2 (C), 139,1 (C), 139,5 (C), 140,2 (C), 161,4 (C), 171,5 (C), 172,3 (C) ppm. MS ESI valor teórico para [M+H]<sup>+</sup> C<sub>26</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S 467,1999. Valor encontrado 467,1998.

#### 4.1.6 Síntese dos ácidos carboxílicos dos dipéptidos *N*-protegidos por heterociclos

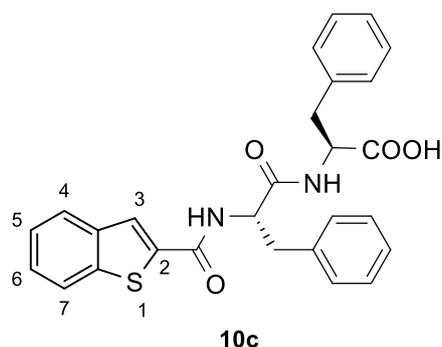
##### **10a-c e 11a-c**



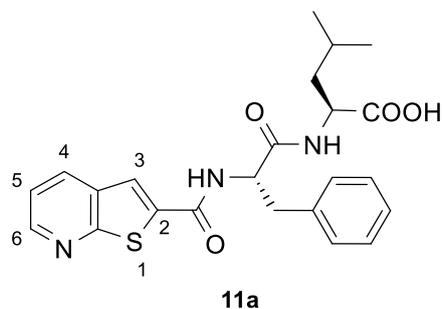
**Ácido *N*-(tieno[2,3-*b*]piridina-2-carbonil)-L-fenilalanina-L-fenilalanina (10a)** – A uma solução do composto **8a** (0,0860 g, 0,171 mmol) em EtOH (10 mL) adicionou-se NaOH 2M até pH = 10-12 e a mistura ficou a agitar à temperatura ambiente durante a noite. Evaporou-se o solvente e ao resíduo obtido adicionou-se H<sub>2</sub>O e algumas gotas de KHSO<sub>4</sub> 1M até pH = 1. Precipitou um sólido, que foi filtrado, tendo-se obtido o composto **10a** como um sólido branco (0,074 g, 91%), p.f. 235-237 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 2,93-2,99 (2H, m, β-CH<sub>2</sub>) 3,07-3,12 (2H, m, β-CH<sub>2</sub>), 4,42-4,48 (1H, m, α-CH), 4,71-4,77 (1H, m, α-CH), 7,14-7,25 (8H, m, ArH), 7,33-7,35 (2H, m, ArH), 7,47 (1H, dd, *J* = 8,0 e 4,8 Hz, 5-H), 8,13 (1H, s, 3-H), 8,36-8,41 (2H, m, 4-H e NH), 8,62 (1H, dd, *J* = 4,8 e 1,6 Hz, 6-H), 8,99 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, NH) ppm. <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 36,6 (β-CH<sub>2</sub>), 37,0 (β-CH<sub>2</sub>), 53,8 (α-CH), 54,7 (α-CH), 120,6 (5-CH), 123,3 (3-CH), 126,3 (CH), 126,4 (CH), 128,1 (CH), 128,2 (CH), 129,15 (CH), 129,2 (CH), 132,6 (C), 133,5 (4-CH), 137,5 (C), 138,1 (C), 138,9 (C), 148,6 (6-CH), 161,0 (C), 162,0 (C), 171,0 (C), 172,7 (C) ppm. MS ESI valor teórico para [M+H]<sup>+</sup> C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 474,1482. Valor encontrado 474,1485.



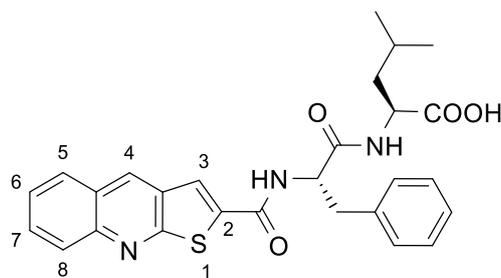
**Ácido *N*-(tieno[2,3-*b*]quinolina-2-carbonil)-L-fenilalanina-L-fenilalanina (10b)** – A uma solução do composto **8b** (0,0680 g, 0,123 mmol) em EtOH (10 mL) adicionou-se NaOH 2M até pH = 10-12 e a mistura ficou a agitar à temperatura ambiente durante a noite. Evaporou-se o solvente e ao resíduo obtido adicionou-se H<sub>2</sub>O e algumas gotas de KHSO<sub>4</sub> 1M até pH = 1. Precipitou um sólido, que foi filtrado, tendo-se obtido o composto **10b** como um sólido branco (0,0640 g, rendimento quantitativo), p.f. 206-208 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 2,93-3,00 (2H, m, β-CH<sub>2</sub>), 3,09-3,13 (2H, m, β-CH<sub>2</sub>), 4,44-4,49 (1H, m, α-CH), 4,75-4,81 (1H, m, α-CH), 7,14-7,37 (8H, m, ArH), 7,36-7,37 (2H, m, ArH), 7,62-7,66 (1H, m, ArH), 7,82-7,86 (1H, m, ArH), 8,07 (1H, d largo, *J* = 8,8 Hz, ArH), 8,17 (1H, d largo, *J* = 8,0 Hz, ArH), 8,26 (1H, s, ArH), 8,44 (1H, d, *J* = 7,2 Hz, NH), 9,04 (1H, s, ArH), 9,10 (1H, *J* = 8,4 Hz, NH) ppm. <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 36,6 (β-CH<sub>2</sub>), 37,0 (β-CH<sub>2</sub>), 53,7 (α-CH), 54,7 (α-CH), 123,1 (CH), 125,5 (C), 125,8 (CH), 126,3 (CH), 126,4 (CH), 127,8 (CH), 128,0 (CH), 128,1 (CH), 129,0 (CH), 129,1 (CH), 129,2 (CH), 130,5 (CH), 131,7 (C), 133,3 (CH), 137,5 (C), 138,1 (C), 140,0 (C), 146,9 (C), 160,9 (C), 162,0 (C), 171,0 (C), 172,7 (C) ppm. MS ESI valor teórico para [M+H]<sup>+</sup> C<sub>30</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 524,1639. Valor encontrado 524,1644.



**Ácido *N*-(benzo[*b*]tiofeno-2-carbonil)-L-fenilalanina-L-fenilalanina (10c)** – A uma solução do composto **8c** (0,166 g, 0,331 mmol) em EtOH (15 mL) adicionou-se NaOH 2M até pH = 10-12 (2 ml), e a mistura ficou a agitar à temperatura ambiente durante a noite. Evaporou-se o solvente e ao resíduo obtido adicionou-se H<sub>2</sub>O e algumas gotas de KHSO<sub>4</sub> 1M até pH = 1. Precipitou um sólido, que foi filtrado, tendo-se obtido o composto **10c** como um sólido branco (0,780 g, 50%), p.f. 231-233 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 2,93-2,99 (2H, m, β-CH<sub>2</sub>), 3,06-3,11 (2H, m, β-CH<sub>2</sub>), 4,44-4,49 (1H, m, α-CH), 4,70-4,76 (1H, m, α-CH), 7,13-7,35 (10H, m, ArH), 7,41-7,44 (2H, m, ArH), 7,93-7,97 (2H, m, ArH), 8,14 (1H, s, 3-H), 8,40 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, NH), 8,85 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, NH) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100,6 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 36,6 (β-CH<sub>2</sub>), 37,0 (β-CH<sub>2</sub>), 53,6 (α-CH), 54,6 (α-CH), 122,8 (CH), 124,9 (CH), 125,2 (3-CH), 125,24 (CH), 126,3 (CH), 126,5 (CH), 128,1 (CH), 128,2 (CH), 129,2 (CH), 137,4 (C), 138,2 (C), 139,1 (C), 139,4 (C), 140,2 (C), 161,3 (C), 171,2 (C), 172,7 (C) ppm. MS ESI valor teórico para [M+H]<sup>+</sup> C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S 473,1530. Valor encontrado 473,1533.

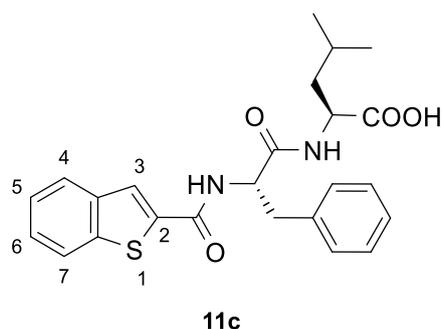


**Ácido *N*-(tieno[2,3-*b*]piridina-2-carbonil)-L-fenilalanina-L-leucina (11a)** – A uma solução do composto **9a** (0,185 g, 0,396 mmol) em EtOH (13 mL) adicionou-se NaOH 2M até pH = 10-12 e a mistura ficou a agitar à temperatura ambiente durante a noite. Evaporou-se o solvente e ao resíduo obtido adicionou-se H<sub>2</sub>O e algumas gotas de KHSO<sub>4</sub> 1M até pH = 1. Precipitou um sólido, que foi filtrado, tendo-se obtido o composto **11a** como um sólido branco (0,152 g, 87%), p.f. 168-170 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 0,85 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>), 0,91 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>), 1,50-1,73 (3H, m, CH e β-CH<sub>2</sub> Leu), 2,94-3,00 (1H, m, β-CH Phe), 3,12-3,16 (1H, m, β-CH Phe), 4,23-4,29 (1H, m, α-CH Leu), 4,73-4,79 (1H, m, α-CH Phe), 7,13-7,16 (1H, m, ArH), 7,23-7,26 (2H, m, ArH), 7,37-7,39 (2H, m, ArH), 7,47 (1H, dd, *J* = 8,0 e 4,8 Hz, 5-H), 8,15 (1H, s, 3-H), 8,38 (1H, dd, *J* = 8,0 e 1,6 Hz, 4-H), 8,42 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, NH Leu), 8,62 (1H, dd, *J* = 4,8 e 1,6 Hz, 6-H), 9,00 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, NH Phe) ppm. <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 21,4 (CH<sub>3</sub>), 22,9 (CH<sub>3</sub>), 24,3 (CH Leu), 37,1 (β-CH<sub>2</sub> Phe), 39,9 (β-CH<sub>2</sub> Leu), 50,5 (α-CH Leu), 54,7 (α-CH Phe), 120,5 (5-CH), 123,3 (3-CH), 126,3 (CH), 128,1 (2 × CH), 129,2 (2 × CH), 132,6 (C), 133,4 (4-CH), 138,2 (C), 139,0 (C), 148,5 (6-CH), 161,1 (C), 161,2 (C), 171,2 (C), 173,9 (C) ppm. MS ESI valor teórico para [M+H]<sup>+</sup> C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 440,1639. Valor encontrado 440,1637.



**11b**

**Ácido *N*-(tieno[2,3-*b*]quinolina-2-carbonil)-L-fenilalanina-L-leucina (11b)** – A uma solução do composto **9b** (0,233 g, 0,431 mmol) em EtOH (19 mL) adicionou-se NaOH 2M até pH = 10-12 e a mistura ficou a agitar à temperatura ambiente durante a noite. Evaporou-se o solvente e ao resíduo obtido adicionou-se H<sub>2</sub>O e algumas gotas de KHSO<sub>4</sub> 1M até pH = 1. Precipitou um sólido, que foi filtrado, tendo-se obtido o composto **11b** como um sólido branco (0,120 g, 57%), p.f. 228-230 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 0,85 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>), 0,90 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>), 1,50-1,62 (2H, m, β-CH<sub>2</sub> Leu), 1,63-1,74 (1H, m, CH), 2,97-3,03 (1H, m, β-CH Phe), 3,15-3,20 (1H, m, β-CH Phe), 4,23-4,28 (1H, m, α-CH Leu), 4,76-4,81 (1H, m, α-CH Phe), 7,13-7,16 (1H, m, ArH), 7,23-7,27 (2H, m, ArH), 7,39-7,41 (2H, m, ArH), 7,61-7,65 (1H, m, ArH), 7,81-7,85 (1H, m, ArH), 8,05 (1H, d largo, *J* = 8,0 Hz, ArH), 8,15 (1H, d largo, *J* = 8,4 Hz, ArH), 8,29 (1H, s, ArH), 8,41 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, NH Leu), 9,01 (1H, s, ArH), 9,18 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, NH Phe) ppm. <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 21,5 (CH<sub>3</sub>), 23,0 (CH<sub>3</sub>), 24,4 (CH Leu), 37,2 (β-CH<sub>2</sub> Phe), 40,3 (β-CH<sub>2</sub> Leu), 50,9 (α-CH Leu), 54,9 (α-CH Phe), 123,2 (CH), 125,5 (C), 125,8 (CH), 126,3 (CH), 127,8 (CH), 128,1 (2 × CH), 128,9 (CH), 129,2 (2 × CH), 130,5 (CH), 131,8 (C), 133,2 (CH), 138,2 (C), 140,1 (C), 146,9 (C), 161,1 (C), 162,0 (C), 171,0 (C), 174,1 (C) ppm. MS ESI valor teórico para [M+H]<sup>+</sup> C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S 490,1795. Valor encontrado 490,1796.



**Ácido *N*-(benzo[*b*]tiofeno-2-carbonil)-L-fenilalanina-L-leucina (11c)** – A uma solução do composto **9c** (0,0760 g, 0,163 mmol) em EtOH (10 mL) adicionou-se NaOH 2M até pH = 10-12 e a mistura ficou a agitar à temperatura ambiente durante a noite. Evaporou-se o solvente e ao resíduo obtido adicionou-se H<sub>2</sub>O e algumas gotas de KHSO<sub>4</sub> 1M até pH = 1. Precipitou um sólido, que foi filtrado, tendo-se obtido o composto **11c** como um sólido branco (0,046 g, 65%), p.f. 221-223 °C. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 0,85 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>), 0,90 (3H, d, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>), 1,50-1,72 (3H, m, CH e β-CH<sub>2</sub> Leu), 2,94-3,00 (1H, m, β-CH Phe), 3,12-3,16 (1H, m, β-CH Phe), 4,23-4,28 (1H, m, α-CH Leu), 4,71-4,77 (1H, m, α-CH Phe), 7,12-7,16 (1H, m, ArH), 7,22-7,26 (2H, m, ArH), 7,37-7,44 (4H, m, ArH), 7,92-7,99 (2H, m, ArH), 8,17 (1H, s, 3-H), 8,38 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, NH Leu), 8,89 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, NH Phe) ppm. <sup>13</sup>C RMN (100,6 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 21,4 (CH<sub>3</sub>), 22,9 (CH<sub>3</sub>), 24,3 (CH Leu), 37,1 (β-CH<sub>2</sub> Phe), 39,8 (β-CH<sub>2</sub> Leu), 50,5 (α-CH Leu), 54,7 (α-CH Phe), 122,8 (CH), 124,9 (CH), 125,17 (3-CH), 125,2 (CH), 126,2 (CH), 126,3 (CH), 128,1 (2 × CH), 129,2 (2 × CH), 138,3 (C), 139,1 (C), 139,5 (C), 140,2 (C), 161,4 (C), 171,3 (C), 174,0 (C) ppm. MS ESI valor teórico para [M+H]<sup>+</sup> C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S 439,1686. Valor encontrado 439,1689.

## **Capítulo 5**

# Referências

## 5. Referências

1. Abell AD. Heterocyclic-based peptidomimetics. *Let. Pept. Sci.* **2001**, 8: 267-72. <https://doi.org/10.1007/BF02446527>
2. Vagner J., Qu H., Hruby VJ. Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12(3): 292-26. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.03.009>
3. Angell YL., Burgess K. Peptidomimetics via copper-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36(10): 1674-89. <https://doi.org/10.1039/B701444A>
4. May BCH., Abell AD.  $\alpha$ -Methylene tetrazole-based peptidomimetics: Synthesis and inhibition of HIV protease. *J. Chem. Soc. Perkin 1.* **2002**, 2(2): 172-8. <https://doi.org/10.1039/B109128J>
5. Bissyris EE., Belekos D., Magafa V., Tsoungas PG., Varvounis G., Cordopatis P. 2-Amino-4-pyrrolidinothieno[2,3-*d*]pyrimidine-6-carboxylic acid as an N-terminal surrogate in amino acid and peptide analogues. *Synthesis (Stuttg).* **2005**, 18: 3159-66. <https://doi.org/10.1055/s-2005-918426>
6. Song Y., Gao J., Xu X., Zhao H., Xue R., Zhou J., Hong W., Qiu H. Fabrication of thermal sensitive folic acid based supramolecular hybrid gels for injectable drug release gels. *Mater. Sci. Eng. C.* **2017**, 75: 706-13. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.118>
7. Jayawarna V., Richardson SM., Hirst AR., Hodson NW., Saiani A., Gough JE., Ulijn RV. Introducing chemical functionality in Fmoc-peptide gels for cell culture. *Acta Biomater.* **2009**, 5(3): 934-43. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.01.006>
8. Zhao H., Liu M., Zhang Y., Yin J., Pei R. Nanocomposite hydrogels for tissue engineering applications. *Nanoscale.* **2020**, 12(28): 14976-95. <https://doi.org/10.1039/D0NR03785K>
9. Yadav N., Chauhan MK., Chauhan VS. Short to ultrashort peptide-based hydrogels as a platform for biomedical applications. *Biomater. Sci.* **2020**, 8(1): 84-100. <https://doi.org/10.1039/C9BM01304K>
10. Jervis PJ., Amorim C., Pereira T., Martins JA., Ferreira PMT. Exploring the properties and potential biomedical applications of NSAID-capped peptide hydrogels. *Soft Matter.* **2020**, 16(44): 10001-12. <https://doi.org/10.1039/D0SM01198C>
11. Draper ER., Adams DJ. Controlling the Assembly and Properties of Low-Molecular-Weight Hydrogelators. *Langmuir.* **2019**, 35 (20): 6506-21. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b00716>
12. Yang Z., Liang G., Ma M., Gao Y., Xu B. Conjugates of naphthalene and dipeptides produce molecular hydrogelators with high efficiency of hydrogelation and superhelical nanofibers. *J. Mater. Chem.* **2007**, 17(9): 850-4. <https://doi.org/10.1039/B611255B>
13. Vilaça H., Hortelão ACL., Castanheira SEM., Queiroz MJRP., Hilliou L., Hamley IW, Martins JA., Ferreira PMT. Dehydrodipeptide Hydrogelators Containing Naproxen N-Capped Tryptophan: Self-Assembly, Hydrogel Characterization, and Evaluation as Potential Drug Nanocarriers. *Biomacromolecules.* **2015**, 16(11): 3562-73. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b01006>
14. Martin AD., Thordarson P. Beyond Fmoc: A review of aromatic peptide capping groups. *J. Mater. Chem. B.* **2020**, 8(5): 863-77. <https://doi.org/10.1039/C9TB02539A>
15. Adams DJ., Butler MF., Frith WJ., Kirkland M., Mullen L., Sanderson P. A new method for maintaining homogeneity during liquid-hydrogel transitions using low molecular weight hydrogelators. *Soft Matter.* **2009**, 5(9): 1856-62. <https://doi.org/10.1039/B901556F>
16. Shah A., Malik MS., Khan GS., Nosheen E., Iftikhar FJ., Khan FA., Shukla SS., Akhter MS., Kraatz HB., Aminabhavi TM. Stimuli-responsive peptide-based biomaterials as drug delivery systems. *Chem. Eng. J.* **2018**, 353: 559-83. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.07.126>

17. Moreira R., Jervis PJ., Carvalho A., Ferreira PMT., Martins JA., Valentão P., Andrade PB., Pereira DM. Biological evaluation of naproxen–dehydrodipeptide conjugates with self-hydrogelation capacity as dual LOX/COX inhibitors. *Pharmaceutics*. **2020**, 12(2): 122-139.  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020122>
18. Vilaça H, Pereira G, Castro TG, Hermenegildo BF., Shi J., Faria TQ., Micaêlo N., Brito RMM., Xu B., Castanheira EMS., Martins JA., Ferreira PMT. New self-assembled supramolecular hydrogels based on dehydropeptides. *J. Mater. Chem. B*. **2015**, 3(30): 6355-67.  
<https://doi.org/10.1039/C5TB00501A>
19. Du X., Zhou J., Shi J., Xu B. Supramolecular Hydrogelators and Hydrogels: From Soft Matter to Molecular Biomaterials. *Chem. Rev.* **2015**, 115(24): 13165-307.  
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00299>
20. Yu G., Yan X., Han C., Huang F. Characterization of supramolecular gels. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42(16):6697-6722. <https://doi.org/10.1039/C3CS60080G>
21. Keri RS, Chand K, Budagumpi S, Balappa Somappa S, Patil SA, Nagaraja BM. An overview of benzo[*b*]thiophene-based medicinal chemistry. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 138: 1002-33.  
<https://doi.org/10.1039/C3CS60080G>
22. Romagnoli R., Baraldi PG., Carrion MD., Cara CL., Fruttarolo F., Pavani MG., Tabrizi MA., Tolomeo M., Grimaudo S., Cristina AD., Balzarini J., Hadfield JA., Brancale A., Hamel E. Synthesis and biological evaluation of 2- and 3-aminobenzo[*b*]thiophene derivatives as antimetabolic agents and inhibitors of tubulin polymerization. *J. Med. Chem.* **2007**, 50(9): 2273-7.  
<https://doi.org/10.1021/jm070050f>
23. Reynisson J., Court W., O'Neill C., Day J., Patterson L., McDonald E., Workman P., Katan M., Eccles SA. The identification of novel PLC- $\gamma$  inhibitors using virtual high throughput screening. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17(8): 3169-76. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.02.049>
24. Eurtivong C., Reynisdóttir I., Kuczma S., Furkert DP., Brimble MA., Reynisson J. Identification of anticancer agents based on the thieno[2,3-*b*]pyridine and 1H-pyrazole molecular scaffolds. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, 24(16): 3521-6. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.05.061>
25. Feng L., Reynisdóttir I., Reynisson J. The effect of PLC- $\gamma$ 2 inhibitors on the growth of human tumour cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 54: 463-9.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.05.029>
26. Leung E., Hung JM., Barker D., Reynisson J. The effect of a thieno[2,3-*b*]pyridine PLC- $\gamma$  inhibitor on the proliferation, morphology, migration and cell cycle of breast cancer cells. *MedChemComm.* **2014**, 5(1): 99-106. <https://doi.org/10.1039/C3MD00290J>
27. Abdelbaset MS., Abdel-Aziz M., Ramadan M., Abdelrahman MH., Bukhari SNA., Ali TFS., Abu-Rahma GEDA. Discovery of novel thienoquinoline-2-carboxamide chalcone derivatives as antiproliferative EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, 27(6): 1076-86.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.02.012>
28. Wang M., Rakesh KP., Leng J., Fang WY., Ravindar L., Gowda DC., Qin HL. Amino acids/peptides conjugated heterocycles: A tool for the recent development of novel therapeutic agents. *Bioorg. Chem.* **2018**, 76: 113-29. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.11.007>
29. Branum ST., Coldburn RW., Dax SL., Flores CM., Jetter MC., Liu Y., Ludovici D., Macielag MJ., Matthews JM., McNally JJ., Reaney LM., Russel RK., Qin N., Wells KM., Youells SC., Youngman MA. Sulfonamides as TRPM8 modulators. WO 2009/012430 A1. **2009**.
30. Valeur E., Bradley M. PS-IIDQ: An efficient polymer-supported amide coupling reagent. *Chem. Commun.* **2005**, 9: 1164-6. <https://doi.org/10.1039/B414889D>
31. Li J., Kuang Y., Shi J., Gao Y., Zhou J., Xu B. The conjugation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) to small peptides for generating multifunctional supramolecular nanofibers/hydrogels. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, 9: 908-17.

- <https://doi.org/10.3762/bjoc.9.104>
32. Mahler A., Reches M., Rechter M., Cohen S.O, Gazit E. Rigid, self-assembled hydrogel composed of a modified aromatic dipeptide. *Adv. Mater.* **2006**, 18(11): 1365-70.  
<https://doi.org/10.1002/adma.200501765>
33. Bhat B., Prasad BA. A Novel One-Step Synthesis of 2-Methoxycarbonylthieno[2,3-*b*]quinolines and 3-Hydroxy-2-methoxycarbonyl-2,3-dihydrothieno[2,3-*b*]quinolines. *Synthesis*. **1984**, 8: 673-6.  
<https://doi.org/10.1055/s-1984-30929>