

**SÍNTESE DE TRIPEPTÍDEOS LINEARES
N-MONO E *N,N*-DIMETILADOS**

Vinicius Ilha

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA

Dissertação de Mestrado

**SÍNTESE DE TRIPEPTÍDEOS LINEARES
N-MONO E N,N-DIMETILADOS**

Vinicius Ilha

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Santa Maria, RS – Brasil

2004

**SÍNTESE DE TRIPEPTÍDEOS LINEARES
N-MONO E N,N-DIMETILADOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do
Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Química
Orgânica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,
RS) como requisito parcial para obtenção do grau de
MESTRE EM QUÍMICA

PPGQ

Santa Maria, RS – Brasil

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

SÍNTESE DE TRIPEPTÍDEOS LINEARES
***N*-MONO E *N,N*-DIMETILADOS**

elaborada por
Vinicius Ilha

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ademir Farias Morel - UFSM
(Presidente/Orientador)

Prof^a. Dr.^a. Ionara Irion Dalcol - UFSM

Prof. Dr. Ubiratan Flores da Silva - UPF

Santa Maria, 20 de outubro de 2004.

Aos meus pais José e Olívia, dedico
esta dissertação pelo seu amor,
carinho e incentivo.

Aos meus irmãos, ofereço esta
dissertação pelo seu apoio,
incentivo e compreensão.

Ao Prof. Dr. Ademir F. Morel,
agradeço pela sua orientação,
paciência e amizade.

AGRADECIMENTOS

Em memória à Prof^ª. Dr^ª. Emília C. M. Dessooy, pela amizade, incentivo e co-orientação.

À Prof^ª. Dr^ª. Ionara I. Dalcol, pelo incentivo, apoio e co-orientação durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ubiratan F. da Silva pela colaboração e interesse com que acompanhou este trabalho.

Ao Prof. Dr. Marco A. Mostardeiro pela amizade, apoio, incentivo e ensinamentos durante minha iniciação científica.

Aos amigos Adriana Flach, Adriana Zago, Eduardo Ethur, Enrique Larghi, Fabiana Missau, Fabio Gonçalves, Ilmar Graebner, Leonardo Fantinel, Martin Nin Brauer, Solange Martins e Wellington Gonzaga, por compartilhar das alegrias e pelos incentivos nos momentos mais difíceis deste trabalho.

Aos colegas e amigos do laboratório: Adari, Álvaro, Anderson, Andréia, Carla, Cláudia, Caroline, Irene, Juliano, Larissa, Euclésio, Graciela, Gilvan, Sandro, Vanessa, Veridiana e Vinicius pela amizade, auxílio e companheirismo durante estes anos.

A Prof^ª. Dr^ª. Maria da Graça Nascimento pela doação da enzima α -quimotripsina.

A funcionária, Maria Angélica, pela sua amizade, profissionalismo e dedicação demonstrada na obtenção dos espectros de RMN.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da UFSM, em especial aos funcionários Ademir Sartóri e Valéria Velasque, pela atenção dispensada.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

**SÍNTESE DE TRIPEPTÍDEOS LINEARES
N-MONO E N,N-DIMETILADOS**

Autor: Vinicius Ilha

Orientador: Ademir Farias Morel

Santa Maria, Outubro de 2004.

Peptídeos contendo um único aminoácido *N*-mono ou *N,N*-dimetilado são partes importantes da estrutura química de vários produtos naturais, incluindo alcalóides ciclopeptídicos de 14-membros, aos quais tem-se relatado potentes atividades biológicas como hipnóticas, sedativas, antibacterial e antifúngicas.

Assim, pela possibilidade de que pequenos fragmentos peptídicos, apresentem algumas das propriedades biológicas desses alcalóides, realizou-se a síntese em solução dos tripeptídeos lineares *N*-mono e *N,N*-dimetilados, precursores dos alcalóides ciclopeptídicos Condalina-A (**6**), Scutianina-M (**7**), Adoutina-Y (**8**) e Scutianina-L (**9**), por duas rotas sintéticas distintas.

As rotas sintéticas (figura 7 e 8), diferenciam-se apenas pela presença do aminoácido (*S*)-fenilalanina com sua função amino protegida e *N*-metilada desde o início da síntese, pela primeira rota, enquanto que pela segunda este aminoácido só foi *N,N*-dimetilado na última etapa sintética, após sua desproteção.

O acoplamento dos aminoácidos (*Z*-L-Phe-OH) e (*Z*-Me-L-Phe-OH) com os ésteres metílicos (*Treo*-D,L-Pheser-OMe) e (*Eritro*-D,L-Pheser-OMe) pela metodologia (DCCI/HOBt), forneceu os dipeptídeos que após a liberação de suas carboxilas terminais, foram acoplados com o aminoácido H-L-Ile-OMe possibilitando a síntese dos tripeptídeos **(59)**, **(60)**, **(61)** e **(62)**.

Como estratégia para determinar a importância de cada aminoácido, nas possíveis atividades biológicas dos peptídeos sintéticos e avaliar o grau de epimerização nas reações de acoplamento, realizou-se a síntese de di e tripeptídeos com estruturas análogas a dos peptídeos precursores dos alcalóides.

Dos peptídeos sintetizados, **(60)**, **(63a)**, **(65)** e **(73)** foram os que apresentaram os melhores resultados em relação à atividade antimicrobiana, contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella setubal*) e fungos (*Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*).

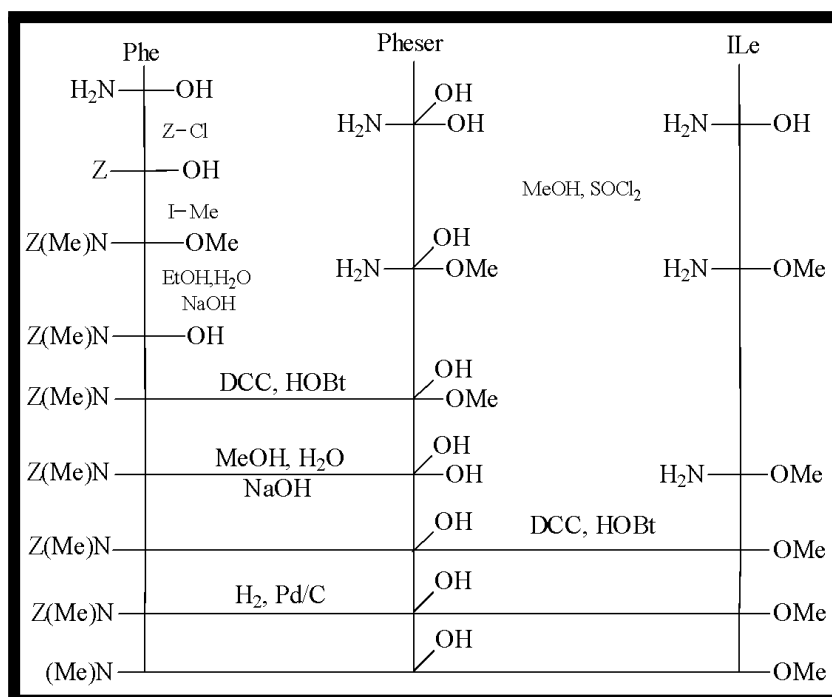


Figura 7– Estratégia de síntese utilizada para obtenção dos tripeptídeos N-Me-L-Phe-Pheser-L-Ile-OMe.

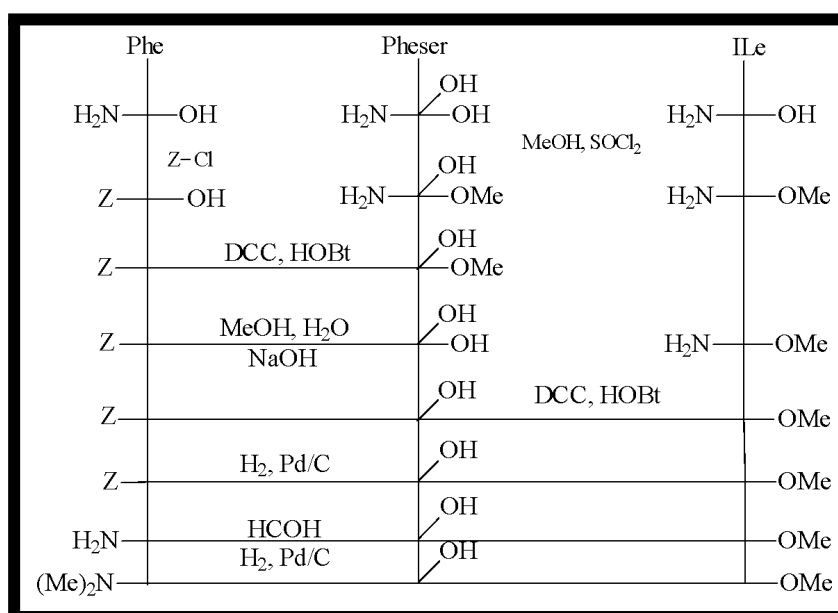


Figura 8– Estratégia de síntese utilizada para obtenção dos tripeptídeos N,N-(Me)₂-L-Phe-Pheser-L-Ile-OMe.

ABSTRACT

Master Dissertation in Chemistry
Post-Graduate Program of Chemistry
Federal University of Santa Maria

**SYNTHESIS OF TRIPEPTIDES LINEARS
N-MONO AND *N,N*-DIMETHYLATEDS**

Author: Vinicius Ilha

Advisor: Ademir Farias Morel

Santa Maria, October 2004.

Peptides containing a unique amino acid *N*- Mono or *N,N*-dimethylated are important parts of chemical structures in various natural products including 14-membered cyclopeptides alkaloids, which have been reported potent biological activities such as hypnotic, sedative, antibacterial and antifungal.

Because of the possibilities of a short peptides fragments maintain some biological properties from those alkaloids, were accomplished the synthesis in solution-phase of linear tripeptides *N*-mono and *N,N*-dimethylated, precursory from cyclopeptides alkaloids Condaline-A (**6**), Scutianine-M (**7**), Adoutine-Y (**8**) and Scutianine-L (**9**), by two distinctes routes synthetics.

This synthetic routes (figure 7 e 8), differ for presence of amino acid (*S*)-phenylalanine with amino group protected and *N*-methylated since start synthesis in first route, while in second route this amino acid lone was *N,N*-dimethylated in last synthetic steps, after to remove protector group.

The coupling of amino acids (*Z*-L-Phe-OH) and (*Z*-Me-L-Phe-OH) with methyl esters (*Treo*-D,L-Pheser-OMe) and (*Eritro*-D,L-Pheser-OMe) by method (DCCI/HOBt) gave the dipeptides, which after hydrolysis basic gave the corresponding acids and were coupling with amino acid H-L-Ile-OMe to make possible the synthesis of the tripeptides **(59)**, **(60)**, **(61)** and **(62)**.

The strategies for determine the importance of each amino acid, in possible biological activities of synthetic peptides and evaluate degree of epimerization in coupling reactions, were synthesized di and tripeptides, with analogs structures the peptides precursors of cyclopeptide alkaloids.

The synthesized peptides, **(60)**, **(63a)**, **(65)** and **(73)** exhibited the greatest antibacterial activity against the tested Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella setubal*) and fungus (*Sacaromyces cerevisiae* e *Candida albicans*).

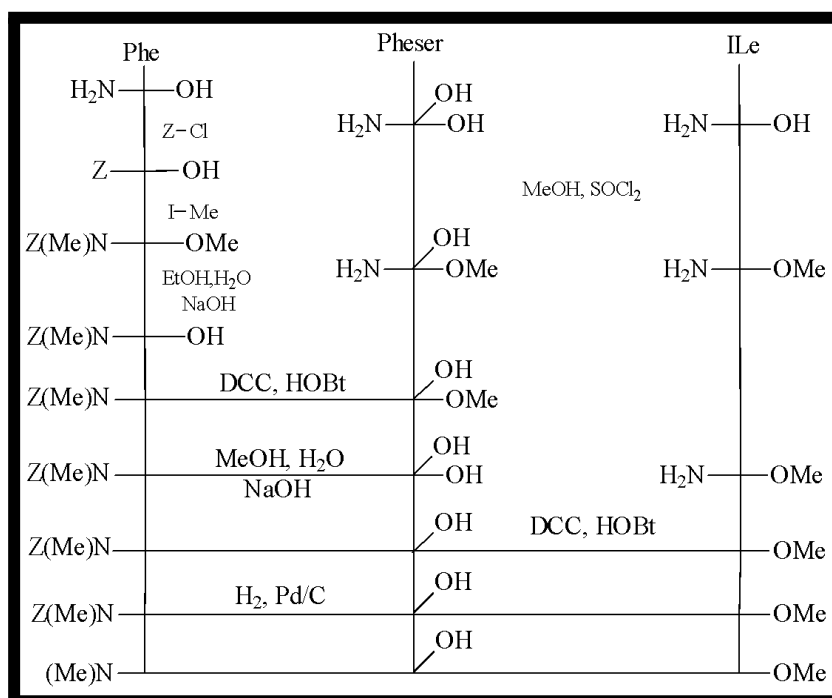


Figure 7– Synthetic strategy utilized for synthesis of tripeptides N-Me-L-Phe-Pheser-L-Ile-OMe.

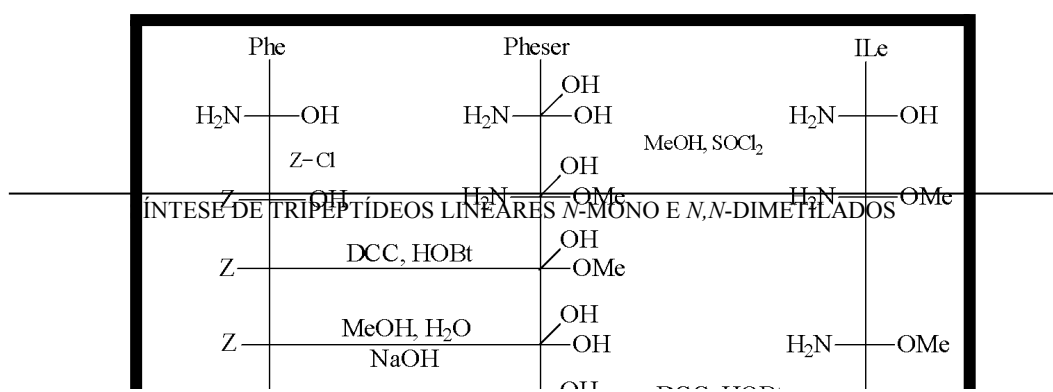


Figure 8– Synthetic strategy utilized for synthesis of tripeptides
 N,N -(Me)₂-L-Phe-Pheser-L-Ile-OMe.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xx
LISTA DE TABELA	xxiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxix
CAPÍTULO I:	
1- INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
CAPÍTULO II:	
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1- Princípios gerais da síntese peptídica:	7
2.2- Métodos de proteção da função amino:	8
2.3- Métodos de <i>N</i>-metilação da função amino:	11
2.4- Métodos de proteção da função carboxila:	13
2.5- Métodos de ativação e acoplamento:	15
2.6- Métodos de síntese de alcalóides ciclopeptídicos e seus precursores:	21
2.7- Atividade Biológica de Alcalóides Ciclopeptídicos de 14-membros e peptídeos.	30
CAPÍTULO III :	

3- ESTRATÉGIAS SINTÉTICAS	33
 CAPÍTULO IV :	
4- DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	36
4.1- Preparação dos derivados uretana Z-L-Phe-OH (41) e do análogo Z-Me-L-Phe-OH (43)	36
4.1.1- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	41
4.2- Obtenção dos β-hidróxi-aminoácidos <i>Treo</i> e <i>Eritro</i> fenilserina	44
4.2.1- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	46
4.3- Preparação dos Dipeptídeos Z-L-Phe-<i>Treo</i> (D,L) e <i>Eritro</i> (D,L)-Pheser-OMe e Z-Me-L-Phe-<i>Treo</i> (D,L) e <i>Eritro</i> (D,L)-Pheser-OMe.....	46
4.3.1- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	50
4.4- Reação de hidrólise básica para a obtenção dos dipeptídeos Z-L-Phe-<i>Treo</i>-D,L-Pheser-OH (54), Z-L-Phe-<i>Eritro</i>-D,L-Pheser-OH (55), Z-Me-L-Phe-<i>Treo</i>-D,L-Pheser-OH (56) e Z-Me-L-Phe-<i>Eritro</i>-D,L-Pheser-OH (57)	61
4.5- Reação de acoplamento dos dipeptídeos com o aminoácido L-Isoleucina-OMe	62

4.5.1-	Síntese	do	tripeptídeo	
	<i>Z-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe</i>		(59a)	63
.....				
4.5.1.1-	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear ...			63
4.5.2-	Síntese	do	tripeptídeo	
	<i>Z-L-Phe-Treo-D-Pheser-L-Ile-OMe</i>		(59b)	69
.....				
4.5.2.1-	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear ...			69
4.5.3-	Síntese	do	tripeptídeo	
	<i>Z-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-OMe</i>		(60)	72
.....				
4.5.4-	Síntese	dos	tripeptídeos <i>N</i> -metilados	
	<i>Z-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-L-Ile-OMe</i>	(61)	e	
	<i>Z-Me-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-OMe</i>	(62)	.	73
.....				
4.5.4.1-	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear ...			73
4.6-	Desproteção do grupamento <i>Z</i> (Carbobenzoxi) dos tripeptídeos			78
4.6.1-	Preparação	dos	tripeptídeos	
	<i>NH₂-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe</i>	(63a)	e	
	<i>NH₂-L-Phe-Treo-D-Pheser-L-Ile-OMe</i>	(63b)		78
.....				
4.6.1.1-	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear....			79

4.6.2-	Obtenção	do	tripeptídeo	
	NH ₂ -L-Phe- <i>Eritro</i> -D,L-Pheser-L-Ile-OMe			(64) 81
.....				
4.6.3-	Obtenção	do	tripeptídeo	
	N-Me-L-Phe- <i>Treo</i> -D,L-Pheser-L-Ile-OMe			(65) 81
.....				
4.6.3.1-	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear ...			82
4.7-	Reação de <i>N,N</i> -dimetilação dos tripeptídeos			85
4.7.1-	Preparação	dos	tripeptídeos	
	N,N-(Me) ₂ -L-Phe- <i>Treo</i> -L-Pheser-L-Ile-OMe			(66a) e
	N,N-(Me) ₂ -L-Phe- <i>Treo</i> -D-Pheser-L-Ile-OMe			(66b) 86
.....				
4.7.1.1-	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear ...			88
4.7.2-	Síntese	do	tripeptídeo	
	N,N-(Me) ₂ -L-Phe- <i>Eritro</i> -D,L-Pheser-L-Ile-OMe			(67) 92
.....				
4.7.2.1-	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear ...			92
5-	Análise da Configuração absoluta do aminoácido			
	<i>β</i> -fenilserina, por cromatografia gasosa enantiosseletiva.			95
5.1-	Análise da Configuração absoluta do aminoácido			
	<i>Treo-β</i> -fenilserina, nos hidrolisados dos tripeptídeos			
	(59a)	e	(59b)	96
.....				

6- Síntese de peptídeos com estruturas correlatas as moléculas alvos	98
6.1- Espectroscopia de Ressonância magnética nuclear	99
7- Estudo de uma metodologia alternativa para inversão do β-hidróxi aminoácido	102
8- Determinação da atividade biológica antimicrobiana dos peptídeos obtidos	103
CAPÍTULO V:	
5- PARTE EXPERIMENTAL	107
5.1- MATERIAL E MÉTODOS	107
5.1.1- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	107
5.1.2- Aparelho de ponto de fusão	108
5.1.3- Cromatografia	108
5.1.3.1- Cromatografia Gasosa (CG)	108
5.1.3.2- Cromatografia em Coluna (CC)	108
5.1.3.3- Cromatografia em Placa Preparativa (CPP)	109
5.1.3.4- Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	109
5.1.4- Reagentes e solventes	110
5.2- PROCEDIMENTOS GERAIS	111
5.2.1- Obtenção do Carbobenzoxi-L-Fenilalanina (Z-L-Phe-OH (41))^{77,78}	111
5.2.2- Preparação do Carbobenzoxi-N-Metil-L-Fenilalaninato de metila (Z-Me-L-Phe-OMe (42))	112

5.2.3- Obtenção do Carbobenzozi-N-Metil-L-Fenilalanina	
(Z-Me-L-Phe-OH (43))³⁶	114
5.2.4- Preparação da <i>Treo</i>-D,L-β-Fenilserina (44)	115
5.2.5- Preparação do Éster Etilico da	
<i>Eritro</i>-D,L-β-Fenilserina (45)	116
.....	
5.2.6- Preparação da <i>Eritro</i>-D,L-β-Fenilserina (46)⁸¹	117
5.3- Esterificação de Aminoácidos: Método Geral	118
5.3.1- Éster metílico do <i>Treo</i>-D,L-β-fenilserina cloridrato	
(47)	118
5.3.2- Éster metílico do <i>Eritro</i>-D,L-β-fenilserina cloridrato	
(48)	118
5.3.3. Éter metílico da L-Isoleucina cloridrato (58)	119
5.4- Síntese dos Dipeptídeos: Método Geral^{86, 50}	120
5.4.1- Obtenção de	
Carbobenzozi-L-fenilalanil-<i>Treo</i>-D,L-β-Fenilserina-	
OMe (49)	120
5.4.2- Obtenção de	
Carbobenzozi-L-fenilalanil-<i>Eritro</i>-D,L-β-Fenilserina	
-OMe (50)	122
5.4.3- Obtenção de	
Carbobenzozi-N-Metil-L-fenilalanil-<i>Treo</i>-D,L-β-Fe	
nilserina-OMe (51)	124

5.4.4-	Obtenção	de	
	Carbobenzoxi-N-Metil-L-fenilalanil- <i>Eritro</i> -D,L- β -F		126
	enilserina-OMe (<u>52</u>)		
5.5-	Método geral de hidrólise básica dos dipeptídeos (<u>49</u>		
	- <u>52</u>)		127
5.5.1-	Síntese do Dipeptídeo Z-L-Phe- <i>Treo</i> -D,L-Pheser-OH		128
	(<u>54</u>).....		
5.5.2-	Síntese do Dipeptídeo		
	Z-L-Phe- <i>Eritro</i> -D,L-Pheser-OH	(<u>55</u>)	129
5.5.3-	Síntese do Dipeptídeo		
	Z-Me-L-Phe- <i>Treo</i> -D,L-Pheser-OH	(<u>56</u>)	129
5.5.4-	Síntese do Dipeptídeo		
	Z-Me-L-Phe- <i>Eritro</i> -D,L-Pheser-OH	(<u>57</u>)	130
5.6-	Síntese dos Tripeptídeos: Método Geral		130
5.6.1-	Síntese do Tripeptídeo		
	Z-L-Phe- <i>Treo</i> -L-Pheser-L-Ile-OMe	(<u>59a</u>)	131
5.6.2-	Síntese do Tripeptídeo		
	Z-L-Phe- <i>Treo</i> -D-Pheser-L-Ile-OMe	(<u>59b</u>)	132

5.6.3-	Síntese	do	Tripeptídeo	
	Z-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-OMe		(60)	133
.....				
5.6.4-	Síntese	do	Tripeptídeo	
	Z-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-L-Ile-OMe		(61)	133
.....				
5.6.5-	Síntese	do	Tripeptídeo	
	Z-Me-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-OMe		(62)	135
.....				
5.7-	Desproteção do Grupamento Carbobenzozi dos tripeptídeos formados: Método Geral			138
5.7.1-	Síntese	dos	tripeptídeos	
	NH₂-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe		(63a)	e
	NH₂-L-Phe-Treo-D-Pheser-L-Ile-OMe		(63b)	138
.....				
5.7.2-	Síntese	do	tripeptídeo	
	NH₂-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-OMe		(64)	140
.....				
5.7.3-	Síntese	do	tripeptídeo	
	N-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-L-Ile-OMe		(65)	141
.....				
5.8-	Reação de N,N-Dimetilação: Método Geral			142
5.8.1-	Síntese	dos	tripeptídeos	
	N,N-(Me)₂-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe			(66a) e
				143

N,N-(Me) ₂ -L-Phe- <i>Treo</i> -D-Pheser-L-Ile-OMe (66b)	
.....	
5.8.2-	Síntese do tripeptídeo
	N,N-(Me) ₂ -L-Phe- <i>Eritro</i> -D,L-Pheser-L-Ile-OMe (67) 145
.....	
5.9-	Determinação da configuração absoluta dos tripeptídeos 147
5.9.1-	Hidrólise ácida dos peptídeos: 147
5.9.2-	Esterificação dos aminoácidos 147
5.9.3-	<i>N-O</i> - Trifluoracetilação 148
5.9.4-	Reação de <i>N</i> - Acetilação do éster metílico da <i>Treo</i> -D,L-β-Fenilserina (68). 148
.....	
5.9.5-	Reação do N-Acetil- <i>Treo</i> -D,L-β-Fenilserina-OMe com a enzima α-Quimotripsina 149
6.	CONCLUSÕES..... 150
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: 152
CAPÍTULO VI:	
1-	ESPECTROS SELECIONADOS 163

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema geral de alcalóides ciclopeptídicos com representantes de diferentes tipos	4
Figura 2- Principais metodologias citadas na literatura para <i>N</i> -metilação de aminoácidos	12
Figura 3- Alguns dos mais importantes reagentes de urônio	18
Figura 4- Alguns dos reagentes de acoplamento do tipo imônio	20
Figura 5- Possíveis sítios de ciclização de um alcalóide ciclopeptídico de 14-membros	22
Figura 6- Retrosíntese dos alcalóides ciclopeptídicos de 14-membros	33
Figura 7- Estratégia de síntese idealizada para obtenção dos tripeptídeos <i>N</i> -Me- <i>L</i> -Phe-Pheser- <i>L</i> -Ile-OMe	34
Figura 8- Estratégia de síntese idealizada para obtenção dos tripeptídeos <i>N,N</i> -(Me) ₂ - <i>L</i> -Phe-Pheser- <i>L</i> -Ile-OMe....	35
Figura 9- Projeção de Newman idealizada para os rotâmeros <i>E/Z</i>	38
Figura 10- Experimentos de RMN ¹ H (a) e ¹³ C (b) com temperatura variada para determinação da barreira rotacional	39

- Figura 11-** Espectros de RMN de ^1H (a) e ^{13}C (b) de
Z-Me-L-Phe-OH **(43)** 41

- Figura 12-** Espectros de RMN de ^1H (a) e de ^{13}C (b) do
 dipeptídeo *Z*-L-Phe-*Treo*-L-Pheser-OMe **(49b)**. 48
- Figura 13-** Espectros de RMN ^1H (a) e ^{13}C (b) da mistura
 diastereoisomérica dos dipeptídeos
Z-Me-L-Phe-*Treo*-D,L-Phesr-OMe **(51)**..... 52
- Figura 14-** Espectros de RMN ^1H (a) e ^{13}C (b) da mistura
 diastereoisomérica dos dipeptídeos
 N-Me-L-Phe-*Treo*-D,L-Pheser-OMe **(53)** 58

- Figura 15-** Espectro de ^1H do tripeptídeo
Z-L-Phe-*Treo*-L-Pheser-L-Ile-OMe **(59a)** 64

- Figura 16-** Espectro de RMN ^{13}C do tripeptídeo
Z-L-Phe-*Treo*-L-Pheser-L-Ile-OMe **(59a)** 65

- Figura 17-** Espectro de HMQC ^1H - ^{13}C do tripeptídeo
Z-L-Phe-*Treo*-L-Pheser-L-Ile-OMe **(59a)** 67
- Figura 18-** Espectro de COSY45 $^\circ$ ^1H - ^1H do tripeptídeo
Z-L-Phe-*Treo*-L-Pheser-L-Ile-OMe **(59a)** 68
- Figura 19-** Espectro de RMN ^{13}C da mistura diastereoisomérica
 dos tripeptídeos

- Z-Me-L-Phe-*Treo*-D,L-Pheser-L-Ile-OMe **(61)** 75
-
- Figura 20-** Espectro de RMN de ^1H da mistura diatereoisomérica dos tripeptídeos N-Me-L-Phe-*Treo*-D,L-Pheser-L-Ile-OMe **(65)** 83
-
- Figura 21-** Espectro de RMN de ^{13}C da mistura diatereoisomérica dos tripeptídeos N-Me-L-Phe-*Treo*-D,L-Pheser-L-Ile-OMe **(65)** 84
-
- Figura 22-** Espectros de RMN ^1H e ^{13}C do tripeptídeo N,N-(Me)₂-L-Phe-*Treo*-L-Pheser-L-Ile-OMe **(66a)** 87
-
- Figura 23-** Espectros de COSY 45° ^1H - ^1H do tripeptídeo N,N-(Me)₂-L-Phe-*Treo*-L-Pheser-L-Ile-OMe **(66a)** 90
-
- Figura 24-** Expansões dos cromatogramas da determinação da ordem de eluição e da configuração absoluta do aminoácido *Treo*- β -fenilserina, CCSF, 25m, 2,6-Pe-3-Bu- γ -CD, 50%/OV1701, 90°C-170°C a 2°C/min 96
- Figura 25-** Expansões dos cromatogramas da determinação da configuração absoluta do aminoácido β -fenilserina participante dos tripeptídeos **(59a)** e

	(59b), CCSF, 25m, 2,6-Pe-3-Bu- γ -CD, 50%/OV1701, 90°C-170°C a 2°C/min.	97
Figura 26 (a) -	Espectro de RMN ^1H do Z-L-Phe-OH (41)	163
Figura 26 (b) -	Espectro de RMN ^{13}C do Z-L-Phe-OH (41)	163
Figura 27 (a) -	Espectro de RMN ^1H do Z-Me-L-Phe-OMe (42)	164
Figura 27 (b) -	Espectro de RMN ^1H do Z-Me-L-Phe-OMe (42)	164
Figura 28 (a) -	Espectro de RMN ^1H do <i>Treo</i> -D,L-Pheser-OMe (47)	165
Figura 28 (b) -	Espectro de RMN ^{13}C do <i>Treo</i> -D,L-Pheser-OMe (47)	165
Figura 29 (a) -	Espectro de RMN ^1H do H-L-Ile-OMe (58)	166
Figura 29 (b) -	Espectro de RMN ^{13}C do H-L-Ile-OMe (58)	166
Figura 30 (a) -	Espectro de RMN ^1H do Z-L-Phe- <i>Eritro</i> -L-Pheser-OMe (50b)	167
Figura 30 (b) -	Espectro de RMN ^{13}C do Z-L-Phe- <i>Eritro</i> -L-Pheser-OMe (50b)	167
Figura 31 (a) -	Espectro de RMN ^1H do Z-Me-L-Phe- <i>Eritro</i> -D,L-Pheser-OMe (52)	168

- Figura 31 (b)-** Espectro de RMN ^{13}C do
Z-Me-L-Phe-*Eritro*-D,L-Pheser-OMe **(52)** 168
.....
- Figura 32 (a)-** Espectro de RMN ^1H do
Z-L-Phe-*Treo*-L-Pheser-OH **(54a)** 169
.....
- Figura 32 (b)-** Espectro de RMN ^{13}C do
Z-L-Phe-*Treo*-L-Pheser-OH **(54a)** 169
.....
- Figura 33 (a)-** Espectro de RMN ^1H do
Z-L-Phe-*Treo*-D-Pheser-L-Ile-OMe **(59b)** 170
.....
- Figura 33 (b)-** Espectro de RMN ^{13}C do
Z-L-Phe-*Treo*-D-Pheser-L-Ile-OMe **(59b)** 170
.....
- Figura 33 (c)-** Espectro de RMN DEPT 135° do
Z-L-Phe-*Treo*-D-Pheser-L-Ile-OMe **(59b)** 171
.....
- Figura 33 (d)-** Espectro de RMN HMBC do
Z-L-Phe-*Treo*-D-Pheser-L-Ile-OMe **(59b)** 171
.....
- Figura 34 (a)-** Espectro de RMN ^1H do
 NH_2 -L-Phe-*Treo*-L-Pheser-L-Ile-OMe **(63a)** 172
.....

- Figura 34 (b)-** Espectro de RMN ^{13}C do $\text{NH}_2\text{-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe}$ (**63a**) 172

- Figura 35 (a)-** Espectro de RMN ^1H do $\text{Z-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-L-Ile-OMe}$ (**62**) 173

- Figura 35 (b)-** Espectro de RMN ^{13}C do $\text{Z-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-L-Ile-OMe}$ (**62**) 173

- Figura 36 (a)-** Espectro de RMN ^1H do $\text{Z-Me-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-OMe}$ (**64**) 174
- Figura 36 (b)-** Espectro de RMN ^{13}C do $\text{Z-Me-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-OMe}$ (**64**) 174
- Figura 37 (a)-** Espectro de RMN ^1H do $\text{N-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-L-Ile-OMe}$ (**65**) 175

- Figura 37 (b)-** Espectro de RMN ^{13}C do $\text{N-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-L-Ile-OMe}$ (**65**) 175

- Figura 38 (a)-** Espectro de RMN ^1H do $\text{N,N-(Me)}_2\text{-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe}$ (**66a**) 176

-
- Figura 38 (b)-** Espectro de RMN ^{13}C do
 $\text{N,N-(Me)}_2\text{-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe}$ 176
(66a)
- Figura 38 (c)-** Espectro de RMN DEPT 135° do
 $\text{N,N-(Me)}_2\text{-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe}$ 177
(66a)
- Figura 38 (d)-** Espectro de RMN COSY 45° do
 $\text{N,N-(Me)}_2\text{-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe}$ 177
(66a)
- Figura 38 (e)-** Espectro de RMN HMQC do
 $\text{N,N-(Me)}_2\text{-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe}$ 178
(66a)
- Figura 38 (f)-** Espectro de RMN HMBC do
 $\text{N,N-(Me)}_2\text{-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe}$ 178
(66a)
- Figura 39 (a)-** Espectro de RMN ^1H do
 $\text{N,N-(Me)}_2\text{-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-O}$ 179
 Me (67)
- Figura 39 (b)-** Espectro de RMN ^{13}C do
 $\text{N,N-(Me)}_2\text{-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-O}$ 179
 Me (67)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: – Alguns representantes de alcalóides ciclopeptídicos de 14- membros e seus tripeptídeos precursores.....	6
TABELA 2: – Atividades biológicas de alcalóides ciclopeptídicos de 14-membros:	31
TABELA 3.1: – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para os rotâmeros majoritário e minoritário do Z-Me-L-Phe-OMe (42)	42
TABELA 3.2: – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para os rotâmeros majoritário e minoritário do Z-Me-L-Phe-OH (43)	43
TABELA 4: – Rendimentos e condições reacionais da obtenção dos dipeptídeos	49
TABELA 5.1.1: – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para o dipeptídeo Z-L-Phe-Treo-D-Pheser-OMe (49a)	53
TABELA 5.1.2: – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para o dipeptídeo Z-L-Phe-Treo-L-Pheser-OMe (49b)	54

TABELA 5.2.1: – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para o dipeptídeo <i>Z-L-Phe-Eritro-D-Pheser-OMe</i> (50a)	55
.....	
TABELA 5.2.2: – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para o dipeptídeo <i>Z-L-Phe-Eritro-L-Pheser-OMe</i> (50b)	56
.....	
TABELA 5.3: – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para a mistura diatereoisomérica dos dipeptídeos <i>Z-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-OMe</i> (51)	57
TABELA 5.3.1: – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para a mistura diatereoisomérica dos dipeptídeos <i>N-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-OMe</i> (53)	59
TABELA 5.4: – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para a mistura diatereoisomérica dos dipetideos <i>Z-Me-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-OMe</i> (52)	60
TABELA 6: – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para os tripeptídeos <i>Z-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe</i> (59a) e <i>Z-L-Phe-Treo-D-Pheser-L-Ile-OMe</i> (59b)	71
.....	

TABELA 7: – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para a mistura diastereoisomérica dos tripeptídeos

Z-Me-L-Phe-*Treo*-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (**61**) 76

.....

TABELA 8: – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para a mistura diastereoisomérica dos tripeptídeos

Z-Me-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (**62**) 77

.....

TABELA 9: – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para os tripeptídeos

NH_2 -L-Phe-*Treo*-L-Pheser-L-Ile-OMe (**63a**) e

NH_2 -L-Phe-*Treo*-D-Pheser-L-Ile-OMe (**63b**) 80

.....

TABELA 10: – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para a mistura diastereoisomérica dos tripeptídeos

N-Me-L-Phe-*Treo*-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (**65**) 85

.....

TABELA 11: – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para os tripeptídeos

N,N-(Me) ₂ -L-Phe- <i>Treo</i> -L-Pheser-L-Ile-OMe (66a)	e 91
N,N-(Me) ₂ -L-Phe- <i>Treo</i> -D-Pheser-L-Ile-OMe (66b)	
TABELA 12: – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ¹ H e ¹³ C para a mistura diatereoisomérica dos tripeptídeos	
N,N-(Me) ₂ -L-Phe- <i>Eritro</i> -D,L-Pheser-L-Ile-OMe (67)	94
TABELA 13: – Rendimentos e condições reacionais da obtenção dos peptídeos	98
TABELA 14: – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ¹ H e ¹³ C para os peptídeos análogos	100
TABELA 15: – Produtos e Rendimentos da inversão pelo método de Mitsunobu	103
TABELA 16: – Substâncias testadas que apresentaram atividade pelo método de bioautografia, utilizando 75 μ g	105
TABELA 17: – Teste da quantidade de substância ativa (QSA) pelo método de bioautografia	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	Deslocamento químico
$\Delta\delta$	Variação de deslocamento químico
Boc	<i>tert</i> -butiloxicarbonil
BOP	Benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfônio hexafluorofosfato
Bop-Cl	Cloreto de N,N'-bis-(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfinio
°C	Graus Celsius
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CPP	Cromatografia em Placa Preparativa
COSY	Correlated spectroscopy
DCCI	N,N-diciclohexilcarbodiimida
DCCU	Diciclohexiluréia
DEAD	Dietilazodicarboxilato
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
DIBAL	Hidreto de diisobutilaluminio
DIEA	Diisopropiletilamina
DMPA	4-dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido

d	Dubleto	
dd	Duplo dubleto	
EDAC	1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida hidrocloreto	
EDC	1-Etil-3-[3-(dimetilaminopropil)]carbodiimida	
EC	<i>Escherichia coli</i>	
Fmoc	9-fluorenilmetiloxicarbonila	
HATU	Hexafluorofosfato	de
	O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3,-tetrametilurônio	
HBTU	Hexafluorofosfato	de
	2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3,tetrametilurônio	
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation	
HMQC	Heteronuclear multiple-quantum correlation	
HOAt	7-aza-1-hidroxibenzotriazol	
HOBt	1-hidroxibenzotriazol	
Hz	Hertz	
Ile	Isoleucina	
J	Constante de acoplamento	
K	Kelvin	
KP	<i>Klebsiella pneumoniaea</i>	
m	Multiplete	
NOE	Nuclear Overhauser Effect	
pág	Página	
Phe	Fenilalanina	
PF	Ponto de fusão	
PheSer	β -Fenilserina	

PPTS	<i>p</i> -Toluenosulfonato piridinium
PyAOP	Hexafluorofosfato de 7-azabenzotriazol-1-iloxitris (pirrolidino) fosfônio
ppm	Partes por milhão
QSA	Quantidade de substância ativa
RMN	Ressonância magnética nuclear
Rf	Fator de retenção
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SS	<i>Salmonella setubal</i>
s	Singleto
seg.	Segundo
t	Tripleto
t.a.	Temperatura ambiente
TBAF	Fluoreto de tetrabuliamônio
TBDMS	Tert-butil dimetilsilano
TBDMSCl	Cloreto de tert-butil-dimetilsilano
TFAA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
Z	Carbobenzoxi (Cbz)

CAPÍTULO I:

1- INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Entre todos os compostos químicos de origem natural, os peptídeos biologicamente ativos merecem um lugar de destaque, pois estes estão envolvidos em um grande número de processos fisiológicos, sendo muitas vezes, o primeiro meio de comunicação intracelular, descrita por suas interações com receptores e enzimas. Dessa forma, o seu estudo tem despertado grande interesse de pesquisadores das mais diversas áreas e originado uma série de trabalhos ao longo dos anos.¹

Peptídeos fazem parte da estrutura de várias substâncias, como proteínas, enzimas, alcalóides, e são também amplamente versáteis no aspecto funcional, atuando como aditivos em alimentos, hormônios, toxinas, neuropeptídeos e antibióticos.²

Com o isolamento e a determinação da fórmula estrutural exata da insulina (1953)³, dá-se início a uma nova era no campo da química medicinal. Além disso, a descoberta e síntese da vasopressina⁴, um dos primeiros hormônios peptídicos a ser sintetizado, e da bradiquinina⁵, deu origem ao que pode ser considerado de era moderna da síntese de peptídeos, marcando o estudo desta classe de compostos como agentes farmacológicos.

Em geral, plantas possuem uma variedade de classes de metabólitos secundários, sendo que muitos destes metabólitos apresentam atividades biológicas e farmacológicas bem definidas. Uma destas classes, que vem sendo estudada pelo Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais da Universidade Federal de Santa Maria (NPPN), são bases poliamídicas, classificadas como alcalóides ciclopeptídicos.

Esses alcalóides são constituídos de um esqueleto básico formado essencialmente por aminoácidos unidos através de ligações peptídicas (CONH), geralmente na forma de um tripeptídeo que cicliza através de uma unidade não aminoácido, para formação de um macrociclo de 13- 14- ou 15-membros.

Possuem, ainda em sua estrutura, um resíduo aminoácido terminal com sua função amino *N*-mono ou dimetilada, sendo esta considerada a responsável pela basicidade e possivelmente pela atividade biológica dessas moléculas.⁶

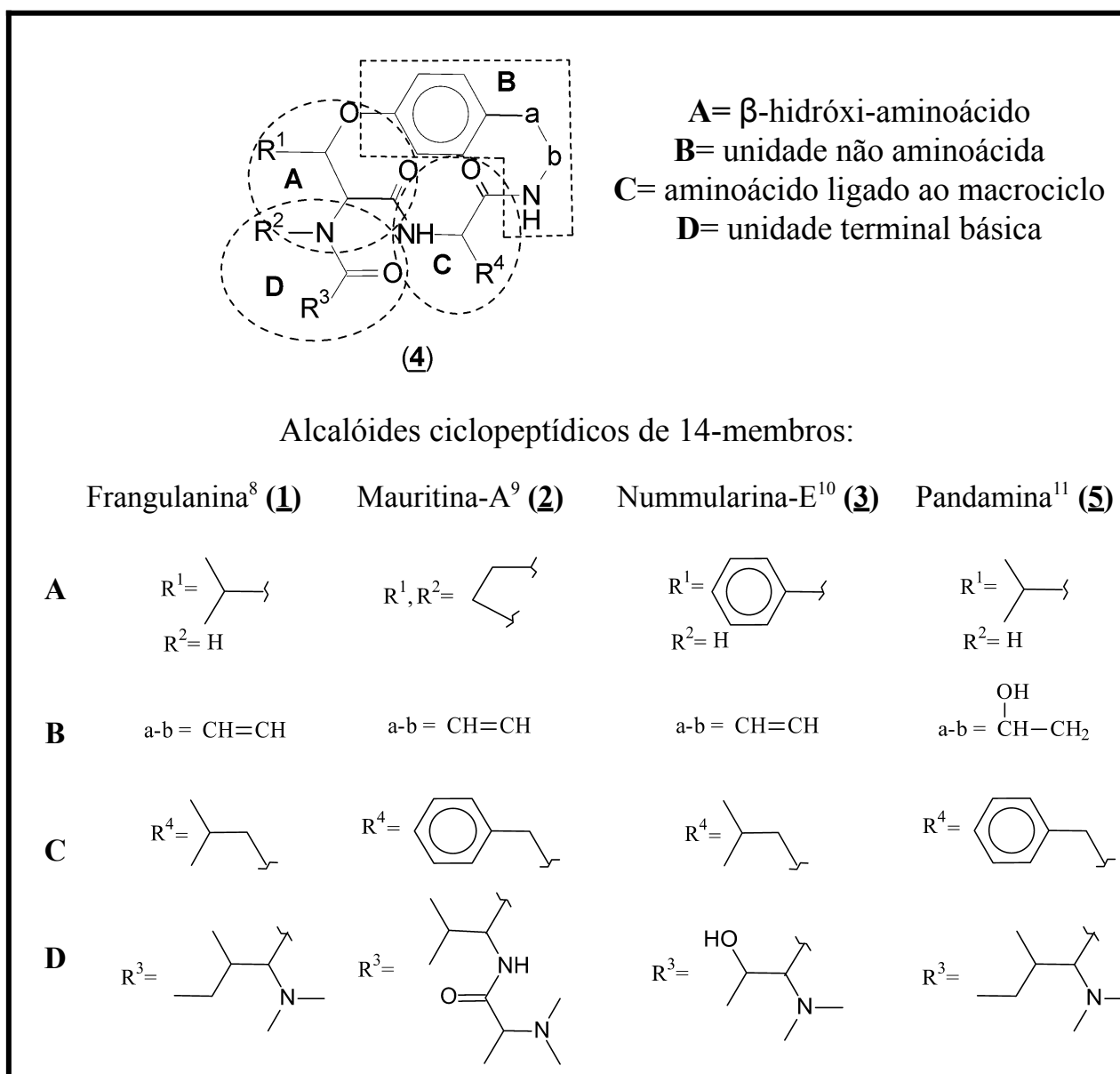
Todos os alcalóides ciclopeptídicos isolados até o momento pelo nosso grupo de pesquisa (NPPN)^{7a-n} pertencem ao grupo dos macrociclos de 14-membros, e apresentam variações estruturais principalmente na cadeia lateral das unidades que o constituem.

Sua principal característica é a presença de um β -hidróxi-aminoácido, cujo oxigênio participa do macrociclo através de uma ligação etérea alquil-aril. Esta unidade é a *3-hidroxi-leucina*, nos alcalóides do tipo Frangulanina⁸(**1**), a *3-hidróxi-prolina* nos alcalóides do tipo Mauritina-A⁹(**2**), e a *3-hidróxi-fenilalanina* em alcalóides do tipo

Nummularina-E¹⁰(**3**). Estes β -hidróxi-aminoácidos estão ligados à unidade *p*-hidróxiestirilamina, que através da ligação enamida com um outro aminoácido, forma o sistema cíclico (*ansa*) (**4**) de 14-membros, como demonstrado na figura 1.

Ainda podemos citar os alcalóides do tipo Pandamina¹¹⁻¹²(**5**) onde tem-se a 2-(*p*-hidróxifenil)-2-hidróxi-etilamina (ou um dos seus derivados *O*-metilados ou acilados) como unidades não aminoácida designadora do subtipo.

Figura 1- Esquema geral de alcalóides ciclopeptídicos com representantes de diferentes tipos.



Alguns alcalóides ciclopeptídicos apresentam diferentes atividades fisiológicas, como ações sedativas¹³, antibacterianas¹⁴, antifúngicas¹⁵, antibióticas e antidesintéricas¹⁶, além de funcionarem como ionóforos¹⁷. São excelentes protótipos para a síntese de novas

moléculas de interesse para a química medicinal e biologia molecular, pois suas estruturas possuem fortes atributos para este fim, tais como alta estabilidade e rigidez conformacional do seu esqueleto, a presença de importantes grupos farmacofóricos como β -hidróxi-aminoácidos e aminoácidos *N*-mono ou *N,N*-dimetilados, unidos através de ligações amídicas na forma de tripeptídeos, os quais sabidamente formam uma classe de importantes compostos biologicamente ativos.¹⁸

A baixa biodisponibilidade natural (menos de 1% da mistura de alcalóides em relação ao peso do material seco), juntamente com o alto grau de pureza em quantidades suficientes para testes mais aprimorados e usos como agentes terapêuticos, fazem da síntese química em solução o método mais viável para obtenção dessas moléculas, embora problemas intrínsecos ao trabalho sintético de macrociclos, como o grande número de etapas requeridas e os baixos rendimentos em alguns casos, tornam esta tarefa trabalhosa e demorada.

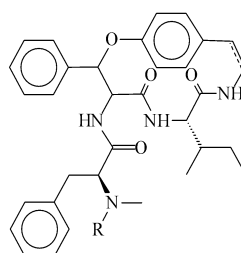
Portanto, a obtenção de pequenos fragmentos, como os tripeptídeos lineares precursores das estruturas dos alcalóides ciclopeptídicos, que possam apresentar as mesmas ou até melhores propriedades biológicas que os alcalóides, justifica a realização deste estudo.

Para tanto, este trabalho tem como objetivo principal à síntese de tripeptídeos lineares *N*-mono e *N,N*-dimetilados (TABELA 1), precursores dos alcalóides ciclopeptídicos de 14-membros,

Condalina-A^{7-m} (**6**) (Aralionina-B¹⁹), Scutianina-M²⁰ (**7**) (AM-2²¹), Adoutina-Y²² (**8**) e Scutianina-L⁷⁻ⁱ (**9**).

Objetivou-se ainda, a realização de uma análise comparativa das atividades biológicas dos tripeptídeos *N*-metilados com seus análogos dimetilados, testando-os frente a bactérias e fungos e através da síntese e atividade de estruturas correlatas, tentar estabelecer uma pré-relação entre a estrutura e a atividade biológica desta classe de compostos, o que pode vir a facilitar futuros estudos a respeito do seu potencial farmacológico.

TABELA 1: – Alguns representantes de alcalóides ciclopeptídicos de 14- membros e seus tripeptídeos precursores:



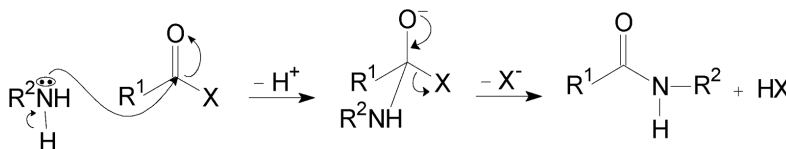
ALCALÓIDES	R	Peptídeos precursores
Condalina-A ^{7-m} (6)	H	(CH ₃)-N-L-Phe- <i>Treo</i> -D-Pheser-L-Ile-OMe (CH ₃)-N-L-Phe- <i>Treo</i> -L-Pheser-L-Ile-OMe
Scutianina-M ²⁰ (7)	H	(CH ₃)-N-L-Phe- <i>Eritro</i> -D-Pheser-L-Ile-OMe (CH ₃)-N-L-Phe- <i>Eritro</i> -L-Pheser-L-Ile-OMe
Adoutina-Y ²² (8)	CH ₃	(CH ₃) ₂ -N-L-Phe- <i>Treo</i> -D-Pheser-L-Ile-OMe (CH ₃) ₂ -N-L-Phe- <i>Treo</i> -L-Pheser-L-Ile-OMe
Scutianina-L ⁷⁻ⁱ (9)	CH ₃	(CH ₃) ₂ -N-L-Phe- <i>Eritro</i> -D-Pheser-L-Ile-OMe (CH ₃) ₂ -N-L-Phe- <i>Eritro</i> -L-Pheser-L-Ile-OMe

CAPÍTULO II: 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Princípios gerais da síntese peptídica:

Os compostos classicamente chamados de peptídeos são basicamente formados por aminoácidos unidos covalentemente através de ligações amídicas entre o grupamento amina de um aminoácido e a função carboxila de um segundo aminoácido ou segmento peptídico (Esquema 1).

Para o propósito da síntese peptídica, temos que considerar que estas duas funcionalidades distintas e essenciais estão presentes na cadeia de cada aminoácido, o que constitui um dos principais problemas da formação desta ligação, pois, para que tenhamos a união em uma seqüência definida sem outros produtos de acoplamento, é necessário proteger os grupamentos não participantes, de maneira que apenas um centro eletrofílico e um nucleofílico estejam livres no meio reacional.^{23 (a)}



Esquema 1

A literatura é amplamente vasta em metodologias de proteção e acoplamento de aminoácidos. A seguir, procura-se demonstrar uma pequena parcela destes e os que melhor se enquadram em nossa proposta de síntese.

2.2- Métodos de proteção da função amino:

A proteção da função amino (NH_2) de um aminoácido parte do princípio da diminuição da reatividade nucleofílica pela deslocalização de sua densidade eletrônica ou pelo impedimento estérico, através da inserção de grupos apropriados. Para ser usado na proteção, de acordo com um ou ambos princípios, nada pode ser mais simples e óbvio que a formação de uma amida.²⁴

No entanto, muitas metodologias diferentes e sutis têm sido propostas, como alquilações, acilações, formação de bases de schiff, uretanas e grupos derivados do enxofre e fósforo, sendo estes apenas alguns dos exemplos.²⁵

Deve-se ter cuidado com as proteções na forma de grupos *N*-alquilas e *N*-acilas, que requerem condições drásticas de desproteção, como ácidos fortes e altas temperaturas, as quais podem levar também a destruição da ligação peptídica recém formada, ou ainda favorecer reações laterais como ciclizações, além de levar a racemizações.²⁵

Deste modo, os grupos α -amino protetores do tipo uretana (derivados alcoxycarbonil) que possuem ambas propriedades, de

amidas (baixa nucleofilicidade) e de ésteres (fácil clivagem da ligação *O*-acil), são os mais utilizados por serem de fácil remoção.^{23 (b)}

O primeiro deste grupo, o benzilóxicarbonil ou Z, descoberto em 1932 por M. Bergmann e L. Zervas²⁶ é ainda um dos mais empregado na síntese peptídica.

O grupamento é facilmente obtido em sua forma original de cloroformiato (**10**) (reação entre o álcool benzílico e fosgênio em tolueno) e nesta mesma forma é introduzido aos aminoácidos sob as condições de Schotten-Baumann, produzindo, muitas vezes, derivados cristalinos. Estes derivados podem ser rapidamente desprotegidos pela hidrogenação catalítica à pressão atmosférica com Pd/C ou por acidólise com HBr/AcOH, liberando assim o grupo amino (Esquema 2).

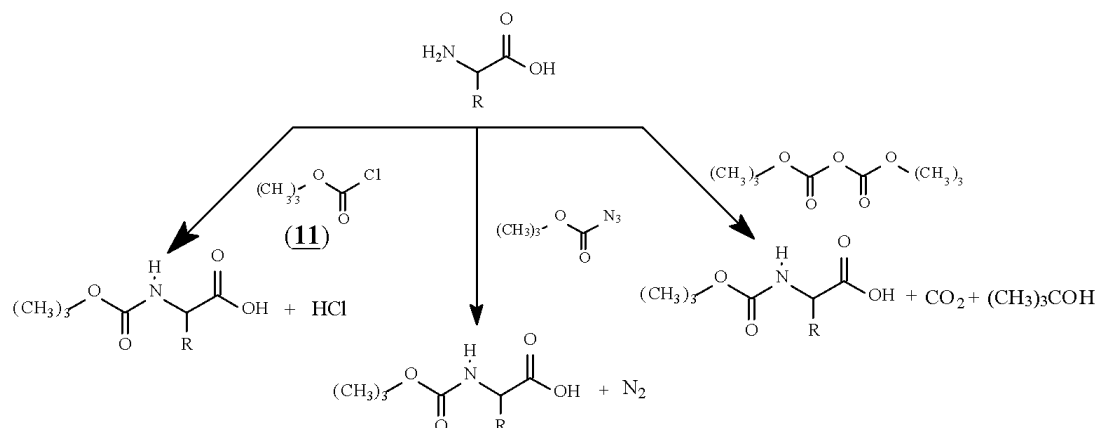
EMBED ChemWindow.Document

Esquema 2

Em 1957 F. Mckay e N. Albertson²⁷ produziram um grupo do tipo uretana derivado do álcool t-butílico, o t-butiloxicarbonil (**11**) (Boc), que tem como vantagens: a estabilidade em condições de hidrogenação catalítica e a extrema facilidade de desproteção por HCl anidro, HBr ou ácido trifluoracético.

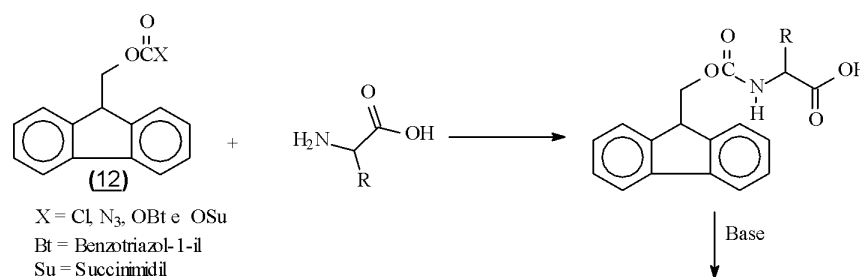
O reagente Boc-Cl, semelhante a todos os alquil cloroformiatos, pode desintegrar-se gerando um íon carbônio, que facilmente

decompõe-se, tornando-os instáveis para preparação de Boc derivados. No entanto, a Boc-azida²⁸ e o seu anidrido (di-t-butildicarbonato)²⁹ têm demonstrado bons rendimentos em reações de proteção da função amino de aminoácidos (Esquema 3).



Esquema 3

O grupo 9-Fluorenilmetiloxicarbonil (**12**) (Fmoc), desenvolvido por L. Carpino e G. Han em 1972²⁹ é muito estável a reagentes ácidos e à hidrogenação catalítica, mas é rapidamente removido sob certas condições fracamente básicas (piperidina 20% em DMF)³⁰, características estas que facilitam seu uso em combinação com outros grupos (Z e Boc). Embora seja empregado principalmente na forma de cloreto, várias outras formas menos reativas, como ésteres succinimídicos, têm sido investigadas e recomendadas por fornecerem melhores resultados (Esquema 4).



Esquema 4

Mesmo que estes exemplos citados tenham dominado o campo da proteção de grupos amino na síntese peptídica, a família dos alcóxicarbonil contém outros exemplos, como o alilóxicarbonil²¹, adamantilóxicarbonil³² e *t*-amilóxicarbonil³³.

2.3- Métodos de *N*-metilação da função amino:

Para a obtenção de amino derivados *N*-alquilados, principalmente aminoácidos *N*-metilados, que são freqüentemente encontrados ou incorporados a vários peptídeos naturais e sintéticos, de interessantes propriedades biológicas e físicas, várias metodologias têm sido pesquisadas desde 1915³⁴.

A mais comumente utilizada foi introduzida por P. Quitte, J. Helleerbach e K. Vogler somente em 1963³⁵ e, posteriormente, uma série de outros métodos (Figura 2) foram aceitos como fornecedores de produtos opticamente puros, requisito essencial para a *N*-metilação de aminoácidos.

Dentre estes métodos, os que apresentam melhores resultados, por serem rápidos e de fácil preparação, destacam-se o descrito por R. Olsen em 1970, o de N. Benoiton e B. Stoochnoff em 1973 e o de R. Freidinger, J. Hinkle, D. Perlow e B. Arison em 1983. O método de Olsen³⁶ envolve a metilação de aminoácidos protegidos com Boc ou Z

pelo uso de iodeto de metila e óxido de prata em DMF e apresenta como vantagens uma menor quantidade de agente alquilante e o pequeno tempo reacional sem a necessidade de condições especiais, sendo uma excelente alternativa para a produção de material em escala preparativa, salvo a desvantagem da possibilidade de racemização durante a saponificação dos ésteres formados.

A metilação de derivados Boc ou Z, proposta por N. Benoiton e B. Stoochnoff em 1973^{37(b)}, é realizada em THF utilizando hidreto de sódio e o agente alquilante (CH₃I), com a possibilidade da obtenção direta do *N*-metil aminoácido, sem a formação de ésteres e a obtenção de material em grande quantidade, o que o torna melhor método para fins sintéticos. Porém, o longo tempo reacional e as grandes quantidades de reagente alquilante constituem as principais desvantagens do método.

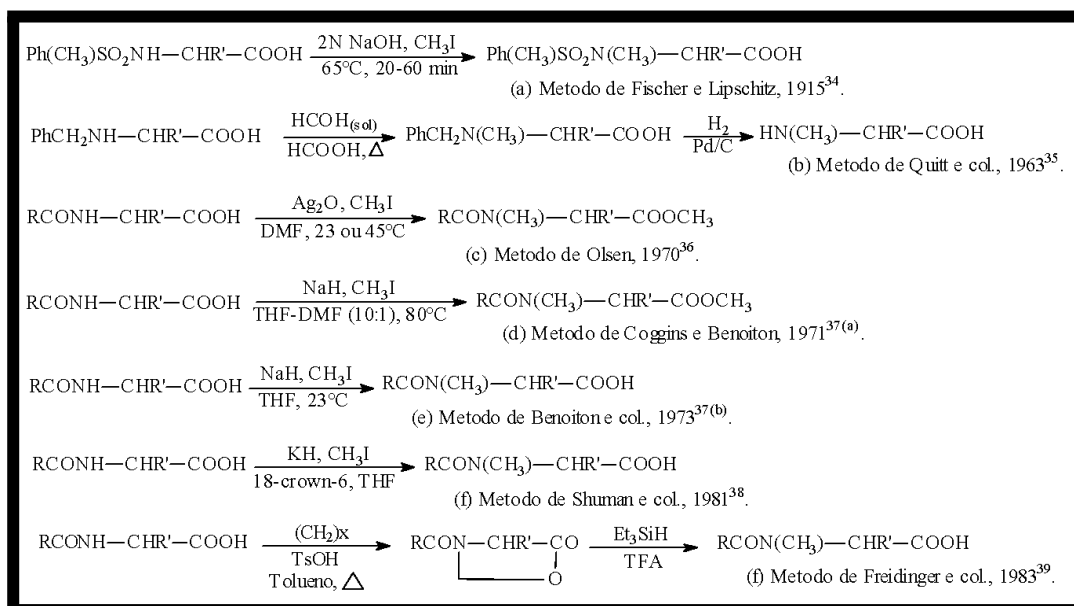


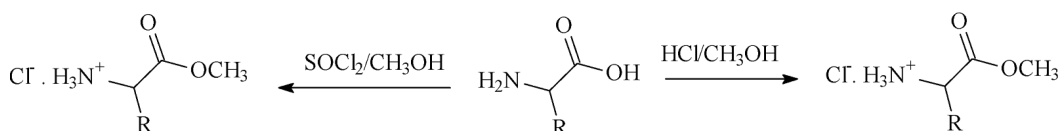
Figura 2- Principais metodologias citadas na literatura para *N*-metilação de aminoácidos.

Em 1983 R. Freidinger, J. Hinkle, D. Perlow e B. Arison³⁹, desenvolveram um novo método geral para obtenção de aminoácidos *N*-alquilados protegidos com 9-Fluorenilmetilóxicarbonil (Fmoc) (grupo sensível à presença de bases), onde através da formação de uma oxazolidinona, pela condensação de um aldeído com o aminoácido protegido, seguido pela redução deste intermediário com trietil silano e ácido trifluorácetico, pode-se obter uma série de derivados *N*-alquilados com menos de 0,1% de racemização.

2.4- Métodos de proteção da função carboxila:

A proteção do grupo carboxila de aminoácidos é necessária por três razões principais: i) aumentar a sua solubilidade e dos produtos a serem isolados em solventes orgânicos; ii) evitar a formação de anidridos em presença de aminoácidos ativados; iii) permitir a ativação em presença de reagentes de acoplamento (unicamente o grupo carboxila desprotegido pode ser ativado).²³

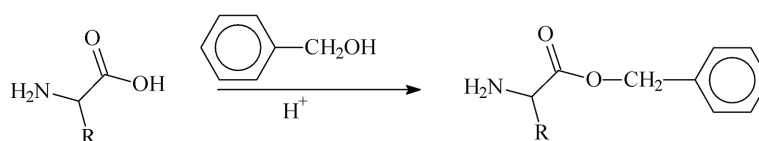
O meio usual de proteção está baseado na conversão da função carboxila em seus ésteres alquílicos, devido a sua fácil preparação (metanol ou etanol em HCl anidro)⁴⁰ ou, alternativamente, pelo tratamento com cloreto de tionila em álcool anidro⁴¹(Esquema 5). Os ésteres metílicos e etílicos têm sido bastante utilizados na síntese de peptídeos.



Esquema 5

A maior dificuldade encontrada no uso deste grupo protetor é a sua desproteção, que ocorre sob condições de hidrólise alcalina ou ácida, o que pode causar racemização e outras reações laterais (como β -eliminações) no peptídeo, mas que quando conduzida de maneira controlada e cautelosa é um procedimento satisfatório.

Aminoácidos e peptídeos podem ainda, ter sua função carboxila protegida através da esterificação com álcool benzílico em meio ácido clorídrico⁴¹ ou por catálise com ácido 4-toluenosulfônico^{21(c)} (Esquema 6), com a vantagem da não necessidade do uso de álcali para sua desproteção, pois os ésteres benzílicos podem ser clivados sob ação de hidrogenação catalítica (Pd/C).



Esquema 6

Assim como estes grupos, vários outros foram criados em resposta a necessidade de suavizar a etapa de desproteção ou aumentar a sua estabilidade frente a certos reagentes, entre estes grupos podemos citar os *t*-butílicos⁴², 4-(metóxi)⁴³ e 4-(nitro)⁴⁴ benzílicos.

Alternativamente a estas metodologias tradicionais de proteção e desproteção de aminoácidos, o processo enzimático (seja por catalise

com enzimas isoladas ou por microorganismos) surge como um excelente método para a realização destas transformações de maneira seletiva e sob condições reacionais mais brandas.⁴⁵

2.5- Métodos de ativação e acoplamento:

Com poucas exceções, o único procedimento para formação da ligação peptídica envolve a ativação de um grupo carboxila para facilitar o ataque pelo grupo amino. Isso porque, ordinariamente, ácidos carboxílicos simples formam sais com aminas à temperatura ambiente e a transformação destes sais diretamente em amidas requer condições que são incompatíveis com a presença de outras funcionalidades ou sutilezas estruturais.

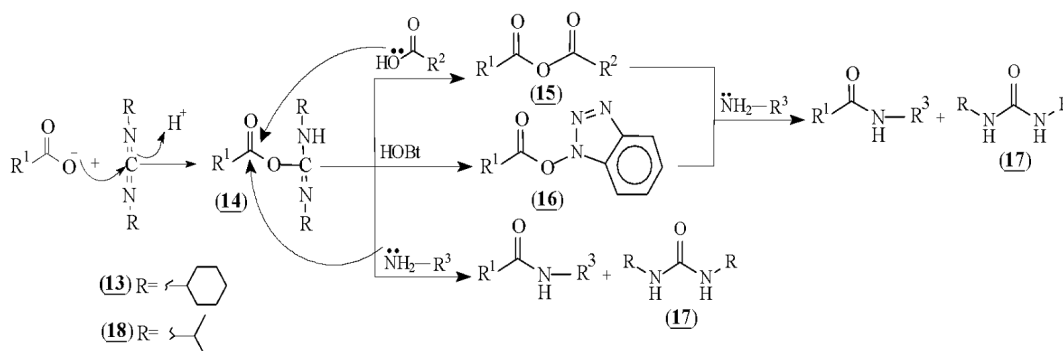
Nesta mesma linha de fundamentos químicos, a literatura fornece diferentes reagentes eletrofilícos para a ativação da função carboxila e obtenção de acoplamentos com rendimentos quantitativos sem a presença de reações laterais e com a manutenção da integridade quiral dos centros adjacentes, sendo que o método a ser escolhido depende em muito da espécie de amida a ser formada.⁴⁶

As carbodiimidas, um dos mais importantes reagentes para a ativação de funções carboxílicas durante a síntese peptídica, vêm

sendo utilizadas desde 1959, quando J.Schechan e G. Hess⁴⁷ divulgaram seus resultados com a diciclohexilcarbodiimida (DCCI) **(13)** que pode gerar tanto derivados carbóxiativados, como anidridos simétricos e ésteres ativos, além de ser usada diretamente como reagente de acoplamento.

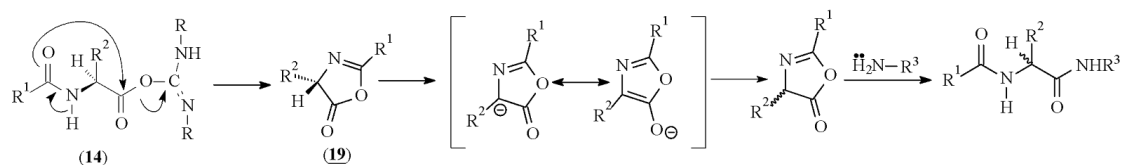
Em todos os casos, a primeira etapa da reação é a formação de um derivado *O*-acilisouréa **(14)**, o qual é um potente agente acilante e, por rápida aminólise, via anidridos simétricos **(15)** ou ésteres ativos **(16)**, leva à formação do peptídeo e de um subproduto derivado uréia **(17)**, como demonstrado no esquema 7.

Devido a grande semelhança de solubilidade entre o peptídeo formado e este derivado uréia de igualmente elevado peso molecular, pode-se gerar certos problemas durante a etapa de purificação, ocasionando em muitos casos a redução do rendimento reacional. Estas dificuldades podem ser minimizadas pelo emprego de carbodiimidas como a diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) **(18)**⁴⁸, que fornece subprodutos solúveis em água e sendo assim, de fácil separação durante as extrações com água.



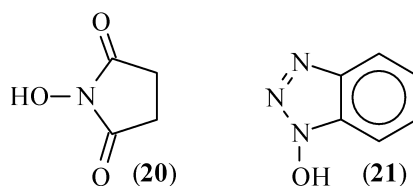
Esquema 7

Algumas vezes, através de uma ciclização intramolecular do derivado *O*-acilisouréa (**14**), tem-se uma competição com o desejado ataque por nucleófilos externos, levando a formação de oxazolonas (**19**), que são altamente ativadas em direção a aminólise. Sua reação com aminocomponentes pode levar a peptídeos racemizados, pois a velocidade de formação dos ânions estabilizados é amplamente mais rápida se comparada à formação da ligação peptídica (Esquema 8).



Esquema 8

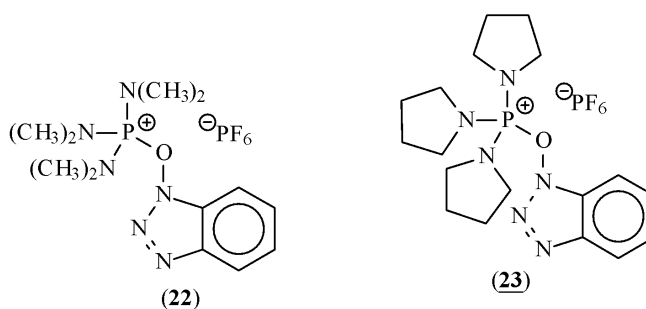
Têm sido investigadas numerosas possibilidades de aditivos auxiliares que evitam essas reações laterais pela geração de ésteres ativos diretamente no meio reacional. O primeiro a ser proposto foi a *N*-hidróxisuccinimida (HOSu) (**20**)⁴⁹, mas o 1- hidróxibenzotriazol (HOBt) (**21**)^{50,51} tem sido o mais regularmente usado para a formação de ésteres que sofrem aminólise 10³ vezes mais rápido que os demais.



Em 1969, G. Gawne, G. W. Kenner e R. C. Sheppard⁵², propuseram o uso de sais de fosfônio estabilizados por ressonância como agentes acilantes particularmente apropriados à síntese

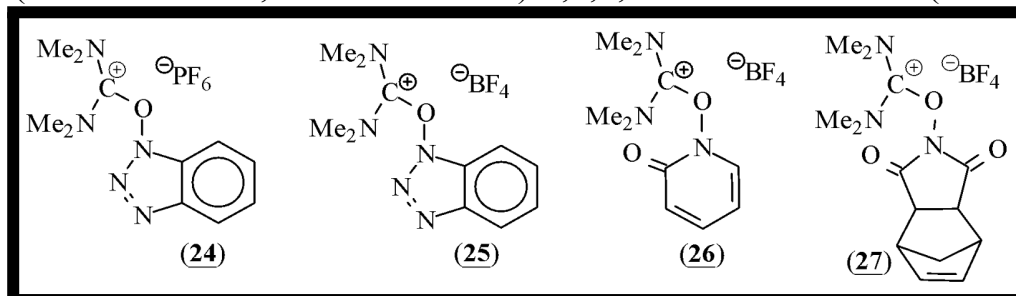
peptídica, pois pouca ou quase nenhuma racemização pode ser evidenciada através deste método.

Tendo em vista os excelentes resultados já obtidos, B. Castro (1975)⁵³, em continuação a seus estudos, desenvolveu entre outros, dois novos reagentes de acoplamento do tipo fosfato, o 1-H-benzotriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)fosfônio (Bop) (**22**) e o 1-H-benzotriazol-1-iloxi-tris(pirrolidino)fosfônio hexafluorofosfato (PyBop) (**23**), sendo este preferido por formar subprodutos menos tóxicos.



Assim como ocorrido anteriormente para os sais de fosfônio, em 1978 J. C. Ziegler, V. Dourtoglou e B. Gross⁵⁴ propuseram o uso de sais de urônio como novos reagentes de acoplamento para a síntese de peptídeos, principalmente em suporte sólido, com a vantagem de que possuem uma rápida velocidade de acoplamento e baixa taxa de racemização. O principal representante destes reagentes é o hexafluorofosfato de *O*-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HBTU) (**24**), que devido a sua grande popularidade gerou uma série de derivados⁵⁵ (Figura 3), dos quais podemos citar: o tetrafluoroborato de *O*-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (TBTU (**25**)), tetrafluoroborato de 2-(2-oxo-1-(2H)-piridil)-1,1,3,3-tetrametilurônio

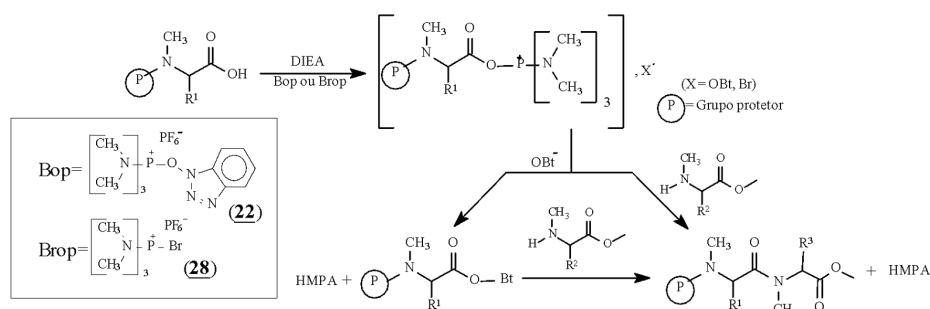
(TPTU **(26)**), tetrafluoroborato de 2-(5-norborneno-2,3-dicarboximido)-1,1,3,3-tetrametilurônio (TNTU



(27)).

Figura 3- Alguns dos mais importantes reagentes de urônio.

Já em 1990, J. Coste, M-N. Dufour, A. Pantaloni e B. Castro⁵⁶ introduziram na síntese peptídica o hexafluorfosfato de bromo tris-dimetilaminofosfônio (Brop) **(28)** como um reagente particularmente apropriado para o acoplamento de *N*-metil-aminoácidos, já que muitos dos reagentes existentes são ineficientes ou apresentam certas desvantagens, como longo tempo e instabilidades reacionais durante o acoplamento destes (Esquema 9).



Esquema 9

Em combinação há uma série de aditivos e métodos de acoplamento (carbodiimida mais aditivos, sais de urônio, cloroformiato de isobutila, etc.), Y. V. Mitin, M. G. Ryadanov, L. V. Klimenko⁵⁷, propõem um sistema livre de racemização (< 0,1%), para o acoplamento de peptídeos *N*- protegidos com aminoácidos livres, pela adição de íons inorgânicos (como Cu²⁺) diretamente ao meio reacional, o que potencializa em muito o uso de tais métodos.

Mais recentemente (2000), J.-C. Xu e P. Li⁵⁸ em estudos para reduzir o nível de racemização e melhorar a eficiência dos acoplamentos com os reagentes do tipo fosfônio e urônio derivados do HOBT e HOAt, desenvolveram uma série de novos reagentes de acoplamento do tipo imônio, tais como: (hexafluoroantimoniato de *N*-óxi-*N*-metilmetanoaminium-*N* (1H-Benzotriazol-1-il-metileno) (BOMI **(29)**), hexafluoroantimoniato de 5-(1H-benzotriazol-1-iloxi) -1-metil-3,4-diidro-2H-pirrolium (BDMP **(30)**), hexafluoroantimoniato de 1-(1H-benzotriazol-1-iloxi) fenilmetileno pirrolidinium (BPMP **(31)**) e hexafluoroantimoniato de 5-(1H-7-azabenzotriazol-1-iloxi)-1-metil-3,4-diidro-2H-pirrolium (AOMP**(32)**) (Figura 4), os quais são altamente eficiente e apresentam diminuição substancial da racemização.

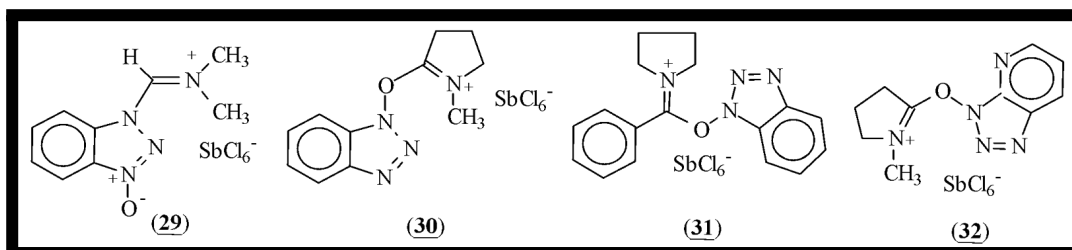


Figura 4- Alguns dos reagentes de acoplamento do tipo imônio.

Embora estes métodos de acoplamento sejam muito eficientes para a síntese em solução, poucos mantêm tal característica quando aplicados à síntese peptídica em fase sólida, principalmente para aminoácidos *N*-alquilados⁵⁹. Tendo esta dificuldade em mente, G. Jung, J. Rudolph e B. Thern⁵⁹, propõem na síntese em fase sólida do ciclosporin-O, o uso do tri-fosgênio, como um novo e altamente eficiente reagente de acoplamento de aminoácidos *N*-metilados.

Ainda no contexto do acoplamento de aminoácidos para a formação de ligações peptídicas, pode-se citar a síntese enzimática ou biocatalisada^{60,61}, onde a formação da ligação é mediada por uma enzima (livre ou imobilizada) de maneira termodinâmica ou cineticamente controlada, com as seguintes vantagens sobre a síntese química: apresentar uma alta estereosseletividade, possibilidade de ser realizada em solução aquosa, ocorrer sem racemização e a não obrigatoriedade da proteção das cadeias laterais dos aminoácidos participantes.

2.6- Métodos de síntese de alcalóides ciclopeptídicos e seus precursores:

Durante décadas, grupos de pesquisa (País⁶², Rapoport⁶³, Schimdt⁶⁴, Joullié⁶⁵, Lipshutz⁶⁶, Zhu⁶⁷ e B. H Han⁶⁸) têm se destacado por seus incansáveis esforços no desenvolvimento de metodologias adequadas à síntese de alcalóides ciclopeptídicos, sejam estas lineares ou convergentes, as quais basicamente dependem da estrutura do alcalóide que se deseja sintetizar.

Do esquema de síntese mais simples ao mais complexo, algumas etapas são bem distintas, como a formação de ligações peptídicas e a união etérea alquil-aril. Contudo, a etapa de formação do sistema macrocíclico (*ansa*) (**4**), de 14-membros é a que apresenta o maior grau de dificuldade e, por isso, tem recebido especial atenção.

De forma genérica, podemos representar os vários sítios e suas estratégias de ciclização baseadas em reações do tipo: adição intramolecular de Michael (posição 1), macrolactamização nas posições 2 e 3, condensações intramoleculares do tipo aldol e reações de substituição eletrofilica aromática intramolecular (posição 4), que podem ser usadas para o fechamento do ciclo (Figura 5).

EMBED ChemWindow.Document

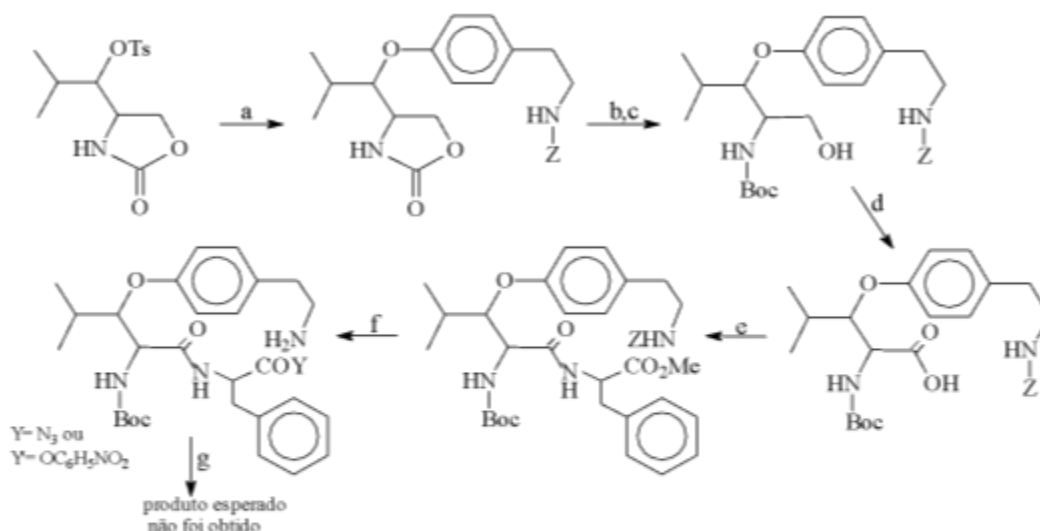
Figura 5- Possíveis sítios de ciclização de um alcalóide ciclopeptídico de 14-membros.

A ciclização pelas rotas (a) e (b) posição 1, requer a condensação de um íon fenolato a um resíduo diidroaminoácido ou um ataque nucleofílico de um íon fenolato a um sistema heterocíclico de 3 membros. Enquanto que, para formação do ciclo nas posições 2 e 3 (rotas (c) e (d)) faz-se necessária a formação de uma ligação amídica, convencionalmente com ésteres ativos e em condições de altas diluições (10^{-3} - 10^{-4} mol.L⁻¹).

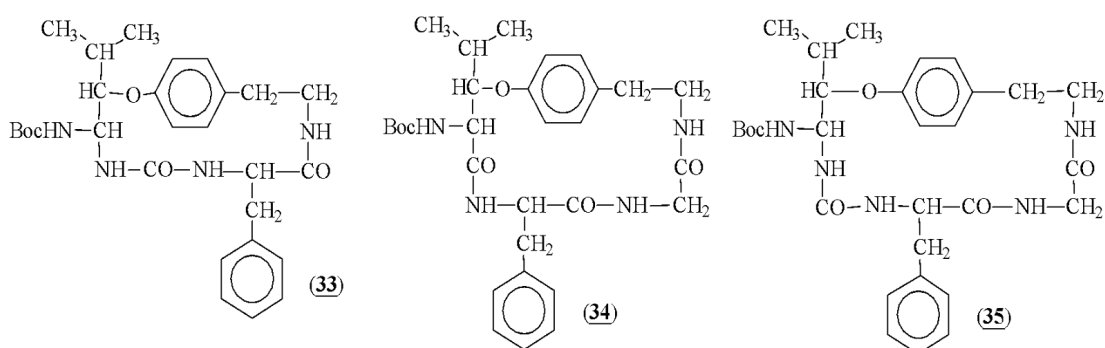
Para a formação do ciclo pelas duas últimas rotas (e) e (f) (posição 4), tem-se que realizar um ataque ao anel benzênico

(substituição eletrofílica aromática) por meio de uma reação do tipo Friedel-Crafts ou, alternativamente, pode-se ciclizar via uma reação do tipo aldol com precursores específicos. Esta posição é a menos adequada para o fechamento do anel, pois requer condições vigorosas de reação.

Os primeiros exemplos de síntese aplicados a formação de macrociclos e síntese total de alcalóides ciclopeptídicos foram descritos por M. País e col.^{62(b)} em 1978. Em seu trabalho, os autores não foram bem sucedidos na construção de alcalóides ciclopeptídicos de 14-membros do tipo hidrofrangulanina, mas obtiveram macrociclos de 15 (**33**) 17 (**34**) e 18-membros (**35**) (esquema 10).

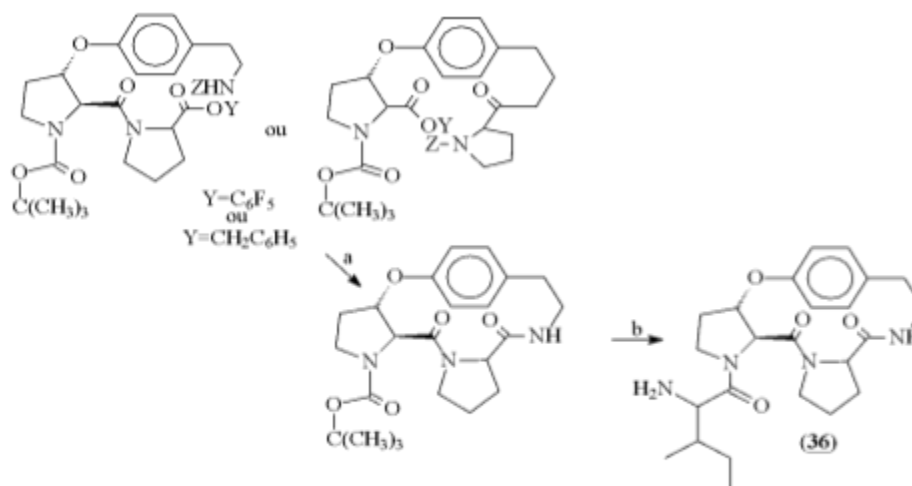


a) N-Z-tiramina, NaH, THF, DMF, 120°C; b) Dioxano:NaOH 1N (1:1), 100°C; c) Dioxano:H₂O (1:1), NaHCO₃, BocN₃; d) Reagente de Jones, acetona, NH₄OH; e) L-Phe-OMe, DMF, HOBt, N-Metilmorfolina, DCCl, 0°C para t.a.; f) (1) EtOH, 10% Pd/C, AcOH, 25°C, (2).EtOH, NH₂NH₂.H₂O, t.a.; g) DMF, AcOH, HCl 1N, NaNO₂ 1N, piridina, -10°C a 0°C, 60h.



Esquema 10

Embora este trabalho tenha impulsionado a síntese dos alcalóides ciclopeptídicos, pode-se dizer que a maior contribuição a este tipo de síntese está nos resultados obtidos por Schimidt e col.^{64 (a)}, que em 1981 implementaram o uso do pentafluorfenol como ativante do grupo carboxila na metodologia de macrolactamização, durante a síntese da diidroizifina-G (**36**), conforme esquema 11.

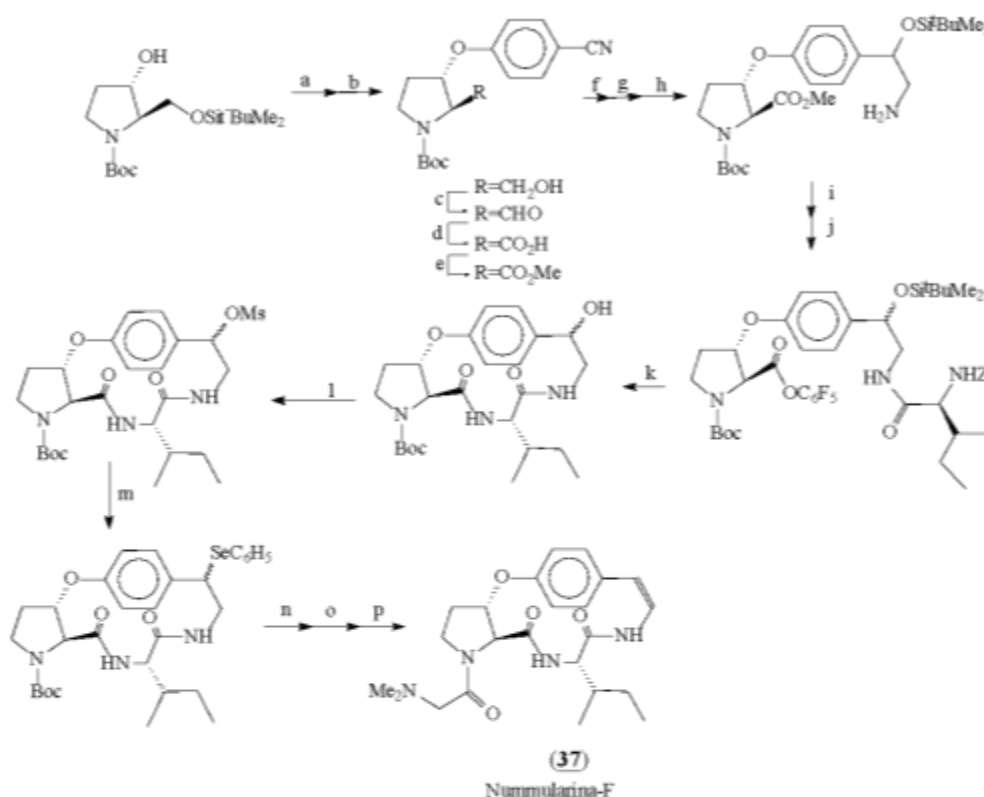


a) H_2 , Pd/C, Dioxano, 90°C, 4-pirrolidinopiridina, EtOH (alta diluição); b) (1) TFA, 1,3-Dimetóxi-benzeno, 3h, 20°C, (2) Acoplamento pelo método do DCC, Boc-Isoleucina, (3) Remoção do grupo Boc

Esquema 11

Dando continuidade a estes estudos, este mesmo grupo tem realizado a síntese total dos alcalóides zizifina-A^{64-(b)}, mucronina-B^{64-(c)} e finalmente o *para*-ciclofano de 14-membros frangulanina.^{64-(d)}

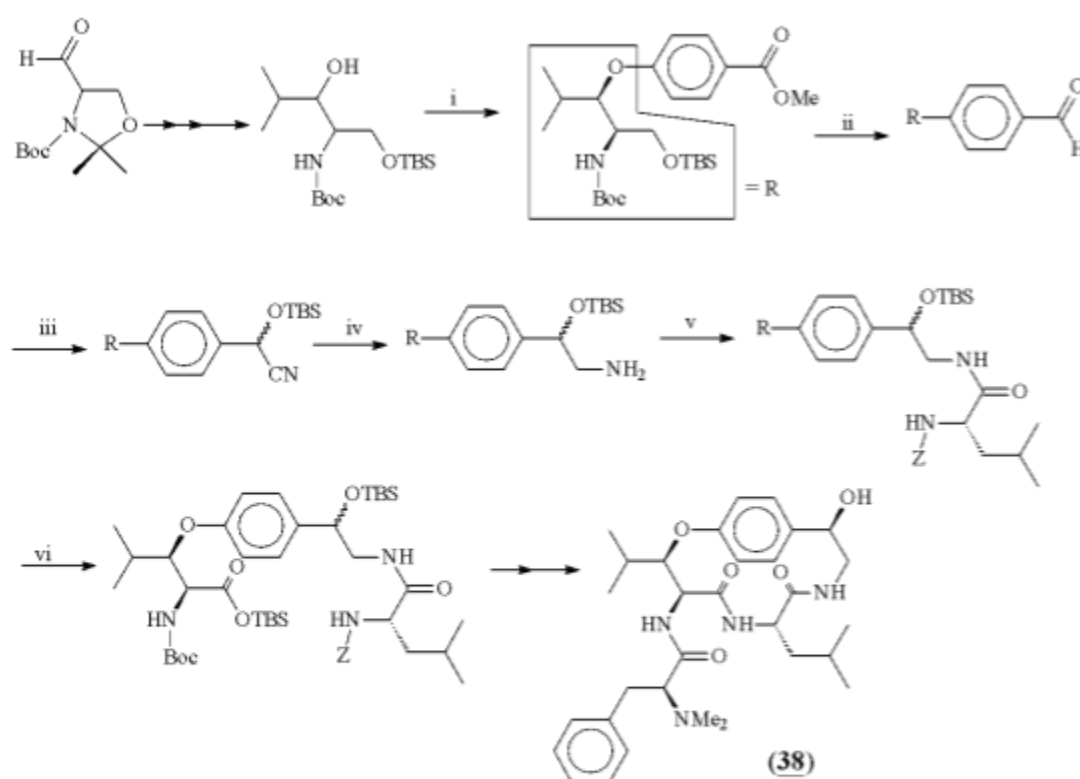
Subseqüentemente, outros produtos naturais têm sido sintetizados por metodologias muito semelhantes, como a síntese da Nummularina-F(**37**), realizada em 1992 por Joullié e col.^{65-(d)} através da estratégia de síntese demonstrada no esquema 12 a seguir.



- (a) *p*-Cianofenol, Ph_3P , DEAD, THF, 10-25°C, 78%. (b) AcOH, $\text{H}_2\text{O}:\text{THF}$ (3:1:1), 45°C, 91%. (c) TFAA, DMSO, CH_2Cl_2 , Et_3N , -78°C, 85%. (d) KMnO_4 , NaH_2PO_4 , *t*-BuOH, 5°C, 93%. (e) DCC, DMAP, MeOH, CH_2Cl_2 . (f) Ni Raney, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, piridina: $\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O}$ (2:1:1), 40°C, 78% (g) (1) MeNO_2 , MeONa, 0-25°C, 93%; (2) *t*-BuMe₂SiCl, DMF, imidazol, 25°C, 72%. (h) HCO_2NH_4 , MeOH, 10% Pd/C, 25°C, 91%. (i) Z-L-Isoleucina, DCC, THF, HOBT, 91%. (j) (1) LiOH·H₂O, H₂O, MeOH, 5°C; (2) $\text{C}_6\text{F}_5\text{OH}$, DCC. CH_2Cl_2 , 87% (2 etapas). (k) (1) 10% Pd/C, Ciclohexano, Dioxano, 4-pirrolidinopiridina, 95°C, 1,5h, 60-75% (2) TBAF, THF, 25°C, 90%. (l) MsCl, NEt_3 , CH_2Cl_2 , -5°C. (m) Difenildiselenio, NaBH_4 , EtOH, 5°C-80°C, 67% (2 etapas). (n) H_2O_2 , piridina, CH_2Cl_2 , 25°C, 80%. (o) Benzeno, 60°C, 53%. (p) (1) TFA, CH_2Cl_2 , 5°C; (2) N,N-Dimetillicina, 25°C, DCC, 17% (2 etapas).

Esquema 12

Em 1995, Byung H. Han e col⁶⁸ sintetizaram a Sanjoinina-G1 (**38**) (esquema13) um alcalóide do tipo frangulanina, utilizando a estratégia de ciclização na posição 2. Nesta síntese, Han reduziu o número de etapas necessárias para 17.

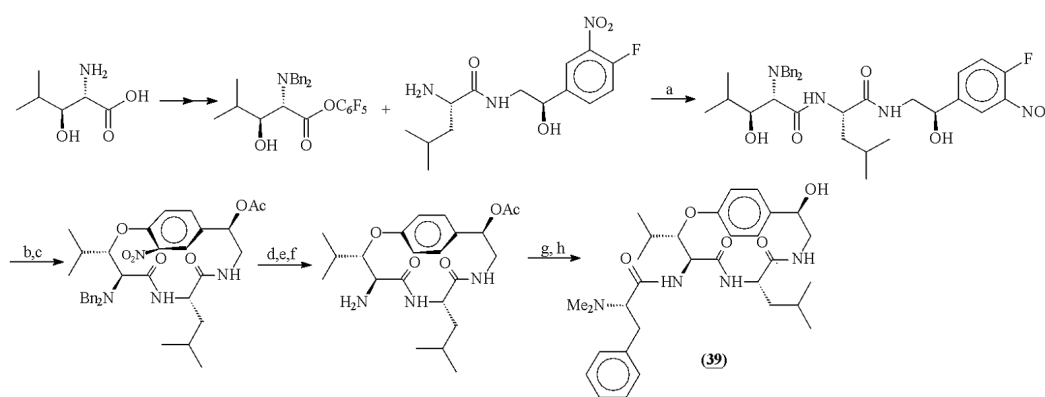


i) PPh₃, DEAD, 4-hidroxibenzoato de metila, THF, 25°C; ii)a) DIBAL-H, THF, 0°C; b) PDC, CH₂Cl₂, 25°C; iii) KCN, ZnI₂, TBS-Cl, MeCN, 25°C; iv) HCO₂NH₄, 10% Pd/C, MeOH, 70°C; v) isobutil cloroformiato, N-metilmorfolina, L-Z-leucina, THF, 0°C; vi) Reagente de Jones, acetona, 0°C.

Esquema 13

Zhu e col.^{67-(a)}, com base em uma metodologia muito utilizada na obtenção de macrociclos de 16 membros⁶⁹, realizaram via uma reação S_NAr intramolecular a ciclização na posição 1 (ligação éτέρα alquil-áril) durante a síntese total assimétrica da Sanjoinina-G1 (**39**)⁶⁷ (b) (d) e, mais recentemente, na síntese total da mauritina-A^{67-(c)} como demonstrado no esquema 14.

A sanjoinina-G1 também foi sintetizada anteriormente por Han⁶⁸ e Joullié^{65(e)}, porém evitando etapas que envolvessem separações diastereoisoméricas.



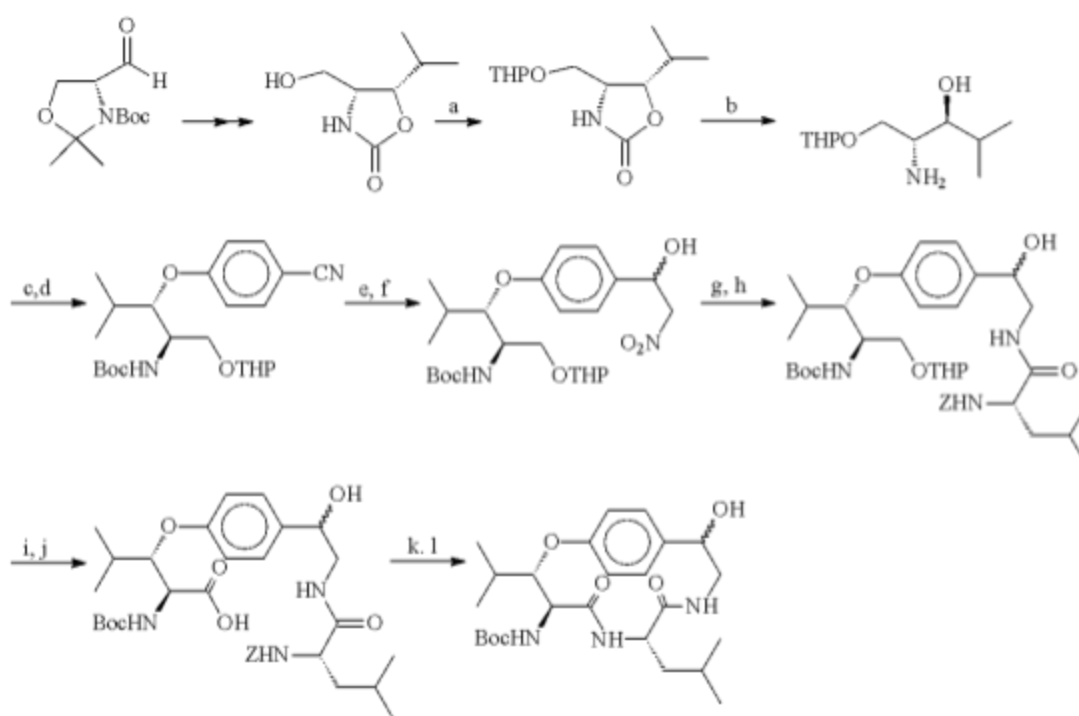
a) DMF, 60°C ; b) TBAF, DMSO, 85°C; c) Ac₂O, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂; d) SnCl₂, DMF, 60°C; e) NaNO₂, H₃PO₂, Cu₂O, THF-H₂O; f) Pd(OH)₂, THF-*t*-BuOH, quantitativo;

g) *L*-*N,N'*-dimetil-fenitatanina, EDC, HOBT; h) K₂CO₃, MeOH-H₂O

Esquema 14

Em 1998 Joullié e col.^{65-(f)} estudaram a obtenção de alcalóides ciclopeptídicos de 14 membros, utilizando β -hidroxileucina, com estereoquímica definida, via oxazolidinona. Dessa maneira,

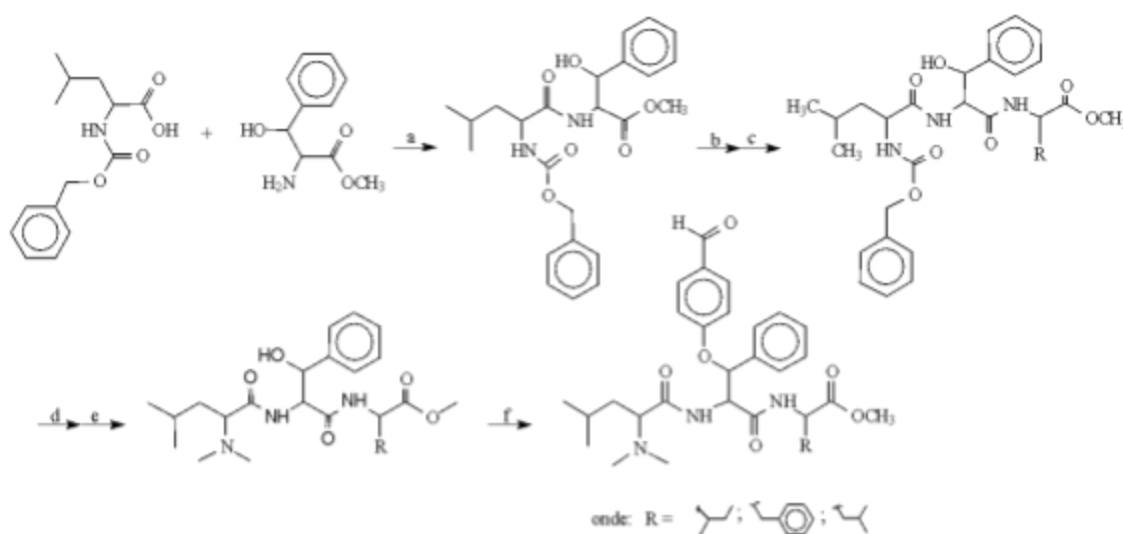
obtiveram, como precursor de vários alcalóides o anel macrociclo sem o aminoácido mono ou dimetilado (Esquema 15).



a) 2,3-Dihidro-2h-pirano, PPTS, CH_2Cl_2 ; b) KOH, $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (4:1), refluxo;
 c) 4-fluorobenzonitrila, NaH, DMSO; d) Boc_2O , Et_3N , CH_2Cl_2 , 0°C para t.a. e) Ni
 Raney, $\text{NaH}_2\text{PO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, piridina: $\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O}$ (2:1:1); f) CH_3NO_2 , NaOMe, 0°C ; g) Pd/C,
 HCO_2NH_4 , MeOH; h) N-Z-Leucina, BOP, DIPEA, CH_2Cl_2 , 0°C para t.a.; i) Reagente de
 Jones, acetona; j) NaBH_4 , LiCl, THF, EtOH; k) pentafluorofenol, EDAC, DMAP(cat.); l)
 Pd, α -terpineno,
 1,4-dioxano, t-BuOH, 4-pirrolidinopiridina, refluxo.

Esquema 15

Em 2001, M. A. Mostardeiro⁷⁰ em continuidade ao seu trabalho de síntese de fragmentos tripeptídicos de alcalóides ciclopeptídicos de 14 membros^{7(h)} do tipo nummularina-E relatou a formação da ligação etérea alquil-aril entre os devidos precursores lineares e o *para*-hidróxi-benzaldeído sob condições de Mitsunobu, conforme o demonstrado no esquema 16 .

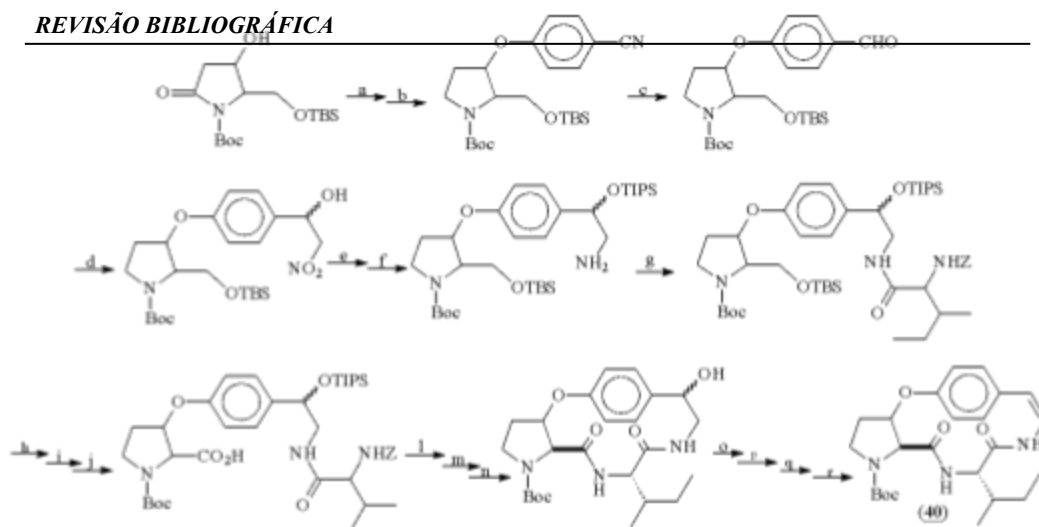


a) HOBt, 4-Metil-Morfolina, DCCI, THF, 0 a 25°C; b) 1) NaOH 1N, MeOH , 25°C;
 2) HCl 2N, 5°C; c) H-aa-OCH₃, HOBt, 4-Metil-Morfolina, DCCI, THF, 0 a 25°C;
 d) 10% Pd/C, MeOH, ta; e) HCOH, 10% Pd/C, 3 Kp/cm² de H₂, MeOH, ta; f)
 PPh₃, DEAD, 4-hidroxi-benzaldeido, THF, 25°C

Esquema 16

Embora não tenha realizado a macrocliclização, seus estudos a respeito da atividade biológica destes precursores, denotam um grande avanço no uso de derivados de alcalóides ciclopeptídicos como agentes antimicrobianos.

Em 2003, S-Y. Han e col.⁷¹ obtiveram uma enamida cíclica de 14-membros (C3-epimemauritina-D) (**40**) pela macrolactamização na posição 2 de um intermediário linear preparado por uma reação de substituição nucleofílica aromática (S_NAr) entre um derivado da pirrolidina e a *para*-NO₂-benzonitrila.



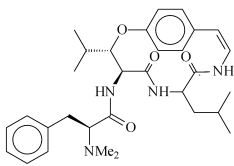
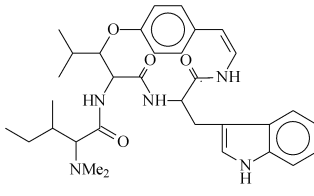
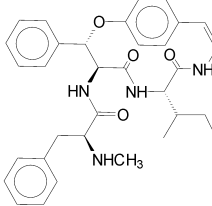
a) BH_3SMe_2 , THF, refluxo; b) 4- NO_2 -benzonitrila, NaH, DMF, -30°C ; c) Ni Raney, NaH_2PO_2 , piridina: $\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O}$ (2:1:1), $40\text{-}45^\circ\text{C}$; d) Na, CH_3NO_2 , MeOH, 0°C , 30 min (com recuperação do material de partida); e) TIPSOTf, 2,6-lutidine, CH_2Cl_2 , 0°C ; f) HCO_2NH_4 , MeOH, 10% Pd/C, 40°C ; g) Z-Ile-OH, DCC, HOBT, NMM, CH_2Cl_2 , 0°C - t.a; h) $\text{AcOH}:\text{THF}:\text{H}_2\text{O}$ (3:1:1), $45\text{-}50^\circ\text{C}$; i) DMSO, TFAA, Et_3N , CH_2Cl_2 , -78°C ; j) KMnO_4 1M, NaH_2PO_4 1,25M (pH 4,12), t-BuOH, t.a; l) 10% Pd/C, MeOH, t.a, 1h; m) TFFH, HOAt, DIEA, CH_2Cl_2 , 0°C ; n) TBAF, THF, 0°C - t.a; o) MsCl, Et_3N , CH_2Cl_2 , -10°C , 30min ; p) Difenildiselenio, NaBH_4 , EtOH, 80°C , 30 min; q) NaIO_4 , MeOH, 40 min; r) benzeno, 60°C , 40 min, com rendimento total 1,4%.

Esquema 17

2.7- Atividade Biológica de Alcalóides Ciclopeptídicos de 14 membros e peptídeos .

Cada vez mais, a medicina moderna vem buscando em moléculas de origem natural e seus derivados as atividades biológicas necessárias para combater microrganismos causadores de patologias e doenças que vem assolando a humanidade há anos. Na tabela 2 podemos visualizar alguns exemplos de alcalóides ciclopeptídicos de 14-membros e as atividades biológicas intrínsecas a suas estruturas.

TABELA 2: – Atividades biológicas de alcalóides ciclopeptídicos de 14-membros:

composto	Frangufolina ^{13(a)}	Discarina-B ⁷ⁿ	Condalina-A ^{7m}
estrutura			
atividades biológicas	atividade sedativa (3 mg Kg ⁻¹)	Atividade contra <i>Klebsiella pneumoniae</i> (6,75µg)	Atividade contra <i>Staphylococcus epidermidis</i> (3,12 µg)

Embora peptídeos exibam baixa estabilidade estrutural para serem utilizados como agentes farmacológicos, uma grande variedade deles tem sido isolada e sintetizada como (potenciais ou já bem definidos) analgésicos (encefalina⁷²) e inibidores de enzimas (análogos *N*-metilados da bradiquinina⁷³).

Com seu mecanismo de ação ainda não bem esclarecido, peptídeos antibacteriais têm recebido especial atenção devido a sua baixa toxicidade celular e seu único mecanismo de perturbação a membrana lipídica dos microorganismos. Estes peptídeos são em sua grande maioria representados por ciclopeptídeos como o antibiótico vancomicina⁷⁴ ou peptídeos lineares com longas seqüências de aminoácidos como o decapeptídeo KSL⁷⁵ e seus derivados, aos quais é designada atividade contra *Candida albicans* de até 1,56 µg /mL.

Os pequenos peptídeos (di, tri ou tetrapeptídeos) e os fragmentos peptídicos de moléculas maiores, embora sejam menos estudados, são também possuidores de atividades biológicas, dentre os quais pode-se ressaltar, o tripeptídeo M1⁷⁶ (fragmento do alcalóide ciclopeptídico Frangufolina) especulado como sendo até mesmo mais ativo que o próprio alcalóide e os tripeptídeos sintéticos⁷⁰ (precursores dos alcalóides Discarina-D e Myriantina-A) que possuem atividade de até 1,5 µg/mL para bactérias como a *Escherichia coli*.

CAPÍTULO III :

3- ESTRATÉGIAS SINTÉTICAS

Através de uma análise retróssintética (Figura 6) das moléculas alvo deste estudo, bem como da literatura afim, pôde-se elaborar uma proposta de trabalho que, resumidamente, segue as etapas:

a) Preparação do aminoácido terminal básico *N*-alquilado, sem racemizações.

b) Obtenção do β -hidróxi-aminoácido (fenilserina) racêmico nas suas duas formas diastereoisoméricas separadas (*Treo* e *Eritro*), com bons rendimentos.

c) Proteção da carboxila do aminoácido terminal isoleucina, de maneira simples, estável e de posterior fácil desproteção.

d) Acoplamento destas unidades aminoácidas sem provocar a epimerização dos peptídeos formados.

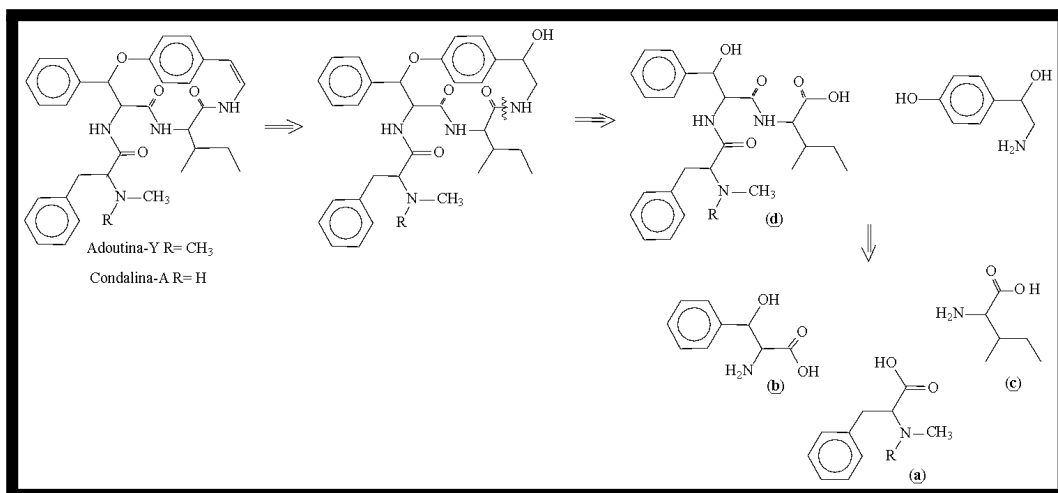


Figura 6- Retrosíntese dos alcalóides ciclopeptídicos de 14-membros

As figuras 7 e 8 abaixo, mostram as estratégias de síntese utilizadas neste trabalho para a obtenção de tripeptídeos lineares. Nessa estratégia, todos os peptídeos possuem como hidroxiaminoácido do ciclo a β -fenilserina e como aminoácido *N,N*-dimetilado ou *N*-metilado lateral a fenilalanina. O aminoácido *C*-terminal dos peptídeos é a isoleucina na forma de seu éster metílico, quando precursores dos alcalóides Condalina-A^{7-m} (**6**), Scutianina-M²⁰ (**7**), Adoutina-Y²² (**8**) e Scutianina-L⁷⁻ⁱ (**9**).

Estratégias sintéticas dos tripeptídeos *N*-Me-L-Phe-*Treo* (D,L) e *Eritro* (D,L)-Pheser-L-Ile-OMe e *N,N*-(Me)₂-L-Phe-*Treo* (D,L) e *Eritro* (D,L)-Pheser-L-Ile-OMe

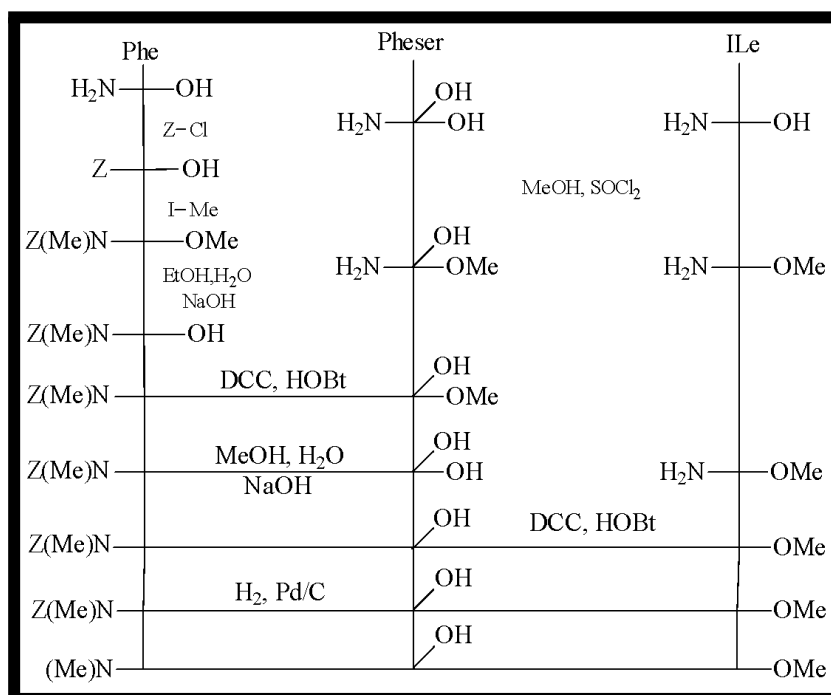
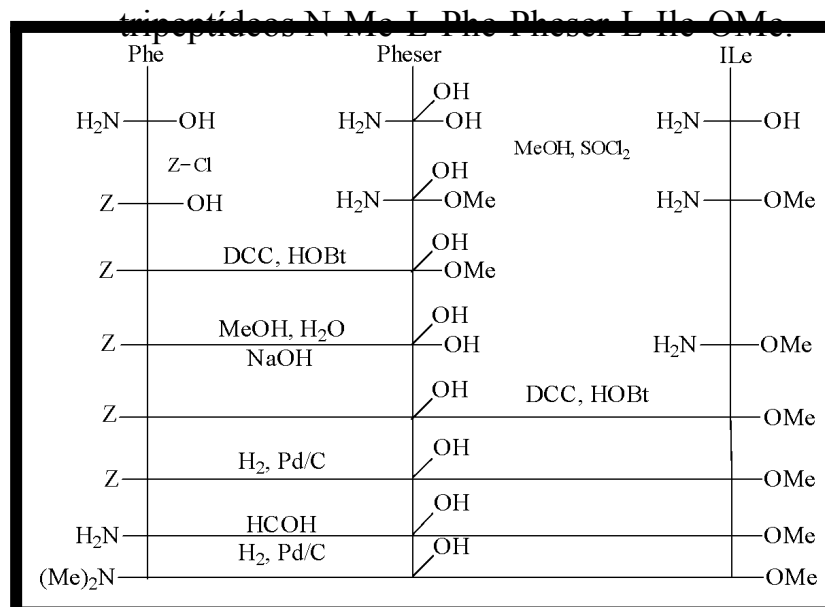


Figura 7- Estratégia de síntese utilizada para obtenção dos**Figura 8-** Estratégia de síntese utilizada para obtenção dos tripeptídeos N,N-(Me)₂-L-Phe-Pheser-L-Ile-OMe.

Para um melhor esclarecimento da escolha do procedimento de síntese em solução e da realização deste de duas maneiras pouco diferenciadas, cabe mencionar que a síntese em solução parece ser a metodologia mais viável para a obtenção dos tripeptídeos em grau de pureza e quantidades condizentes com as análises biológicas pretendidas. Já a preferência pela reação de dimetilação a partir de um peptídeo com função amino totalmente livre e não a partir do que já possui uma unidade metílica, é devida principalmente a grande possibilidade da ocorrência de reações laterais como eliminações e permetilação pelas condições requeridas para a reação de alquilação ou ainda a formação de imidazolidinonas⁷⁰, pelo ataque nucleofílico

ao carbono da imina formada, pelo procedimento escolhido de condensação redutiva com aldeído fórmico, catalisada por (Pd/C).

CAPÍTULO IV :

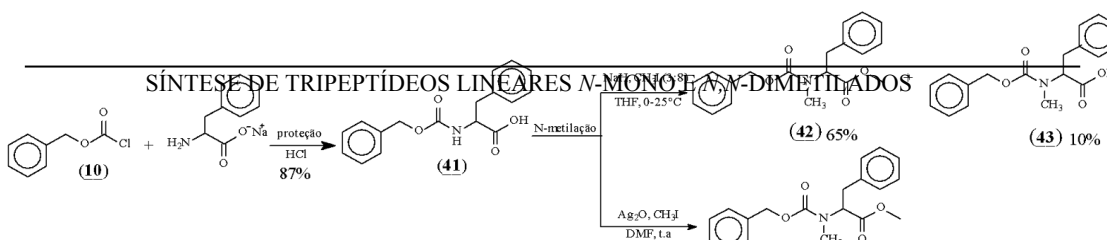
4- DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante a realização do trabalho. Seguindo as estratégias sintéticas idealizadas anteriormente, discutiremos a proteção e subsequente *N*-metilação do aminoácido terminal L-fenilalanina e a obtenção dos β -hidróxi-aminoácidos *Treo* e *Eritro* fenilserina. Na seqüência, discutir-se-á a aplicação destes precursores durante a síntese dos peptídeos, objetivo deste estudo, bem como, aspectos relacionados às análises de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, cromatografia gasosa e atividades biológicas.

4.1- Preparação dos derivados uretana Z-L-Phe-OH (**41**) e do análogo Z-Me-L-Phe-OH (**43**).

A preparação do derivado uretana Z-L-Phe-OH (**41**)⁷⁷ é realizada pela reação do cloroformiato de benzila (**10**) com o aminoácido L-Fenilalanina dissolvido em água e solução de NaOH 5N, seguindo a clássica metodologia de proteção de aminoácidos descrita por Bodanszky.⁷⁸

Para posterior obtenção do análogo *N*-metilado (**43**) (esquema 18), utilizou-se das metodologias descritas anteriormente



por Benoiton^{37(c)} e Olsen³⁶, para metilação de aminoácidos protegidos na forma de uretanas.

Esquema 18

Pelo fato de a reação do aminoácido protegido (**41**) com iodeto de metila, nas condições de Benoiton^{37(c)}, fornecer diretamente o aminoácido com a função carboxila livre (**43**), com rendimentos de apenas 10%, optou-se por utilizar a técnica de Olsen³⁶ que através de condições menos drásticas (Ag₂O, CH₃I, DMF, ta.) gera melhores resultados (rendimento de 95%) para formação do aminoácido *N*-metil-*O*-metil éster (**42**), o qual poderá então ser hidrolisado fornecendo o desejado *Z*-Me-L-Phe-OH (**43**).

Após purificação por coluna cromatográfica eluída com éter de petróleo/AcOEt (15:2), confirmou-se a pureza do produto (**42**) através da comparação dos valores literários³⁶ e experimentais, de rotação óptica e fator de retenção, *Lit.*: $[\alpha]_D^{24} = -77^\circ$ (c=1.6, EtOH) *Rf*= 0,33 (em éter de petróleo/AcOEt (15:2)) *Exp.*: $[\alpha]_D^{25} = -74^\circ$ (c=1, CHCl₃) de *Rf*= 0,30 no mesmo sistema eluente.

No entanto, é interessante notar que com a reação de alquilação, tem-se um possível aumento na barreira rotacional da molécula, possibilitando assim, através das análises de RMN de ¹H e ¹³C, a visualização dos rotâmeros *E/Z* (Figura 9), assim como os evidenciados por Lipshutz, B. H. e col.^{66(c)} para o derivado protegido e *N*-metilado do fenilserinol.

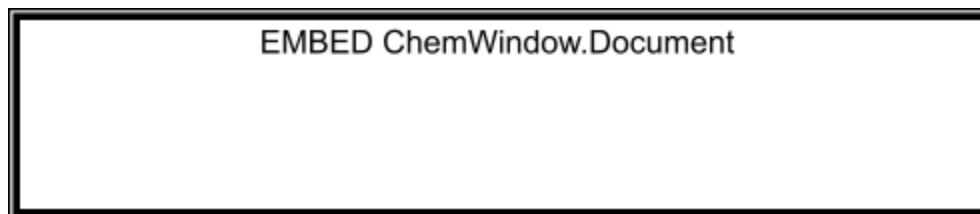


Figura 9- Projeção de Newman idealizada para os rotâmeros E/Z.

Embora se saiba que fatores como o efeito estérico, ressonância, hibridização e o efeito do solvente influenciem na magnitude da barreira rotacional de ligações (C-N), é difícil prever o real efeito de cada fator sobre a energia livre de ativação para a rotação. Porém, alguns métodos aproximados como o da coalescência de sinais de absorção de RMN, podem ser utilizados para determinar a variação desta energia através de cálculos cinéticos.^{79,80}

A tentativa de elucidar esses rotâmeros deu-se através de experimentos de RMN com temperatura variada (Figura 10). Contudo, não foi possível estabelecer uma relação estrutural para E/Z nem tampouco a sua velocidade de interconversão, diferenciando-se somente seus sinais pela proporção aproximada de (1,3:1), pôde-se confirmar a temperatura de transformação (minoritário em majoritário) pela elevação da temperatura a 330K.

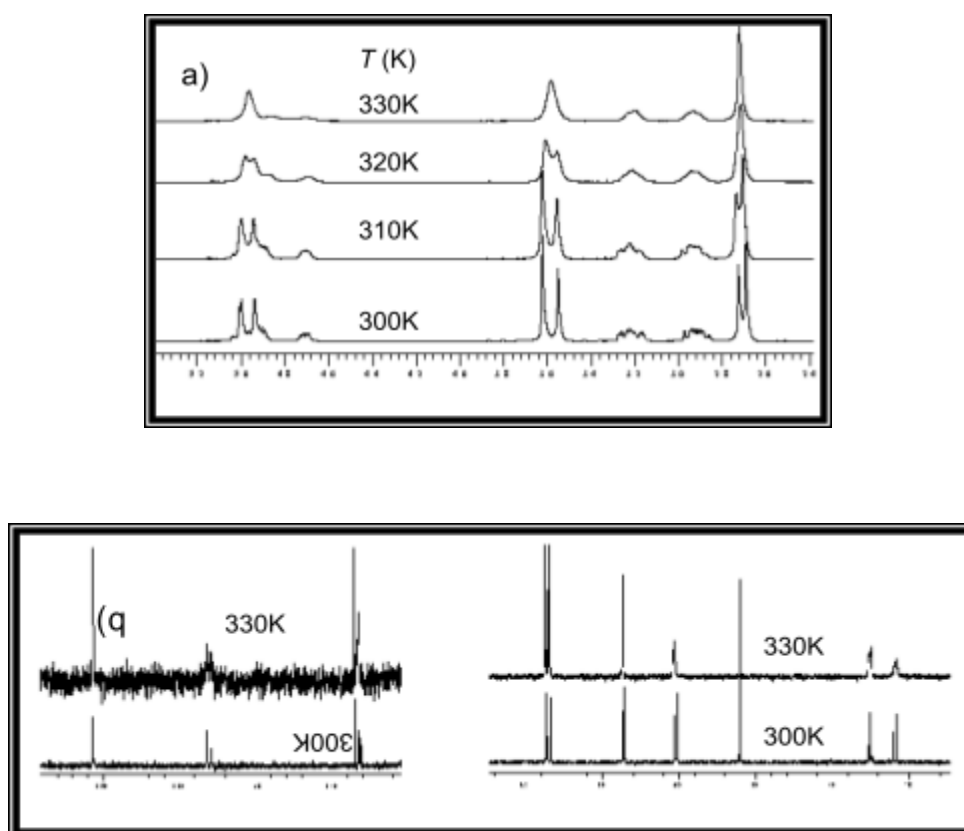
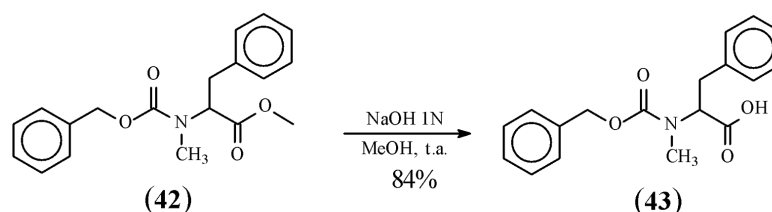


Figura 10- Experimentos de RMN ¹H (a) e ¹³C (b) com temperatura variada para determinação da barreira rotacional do Z-Me-L-Phe-OMe (**42**).

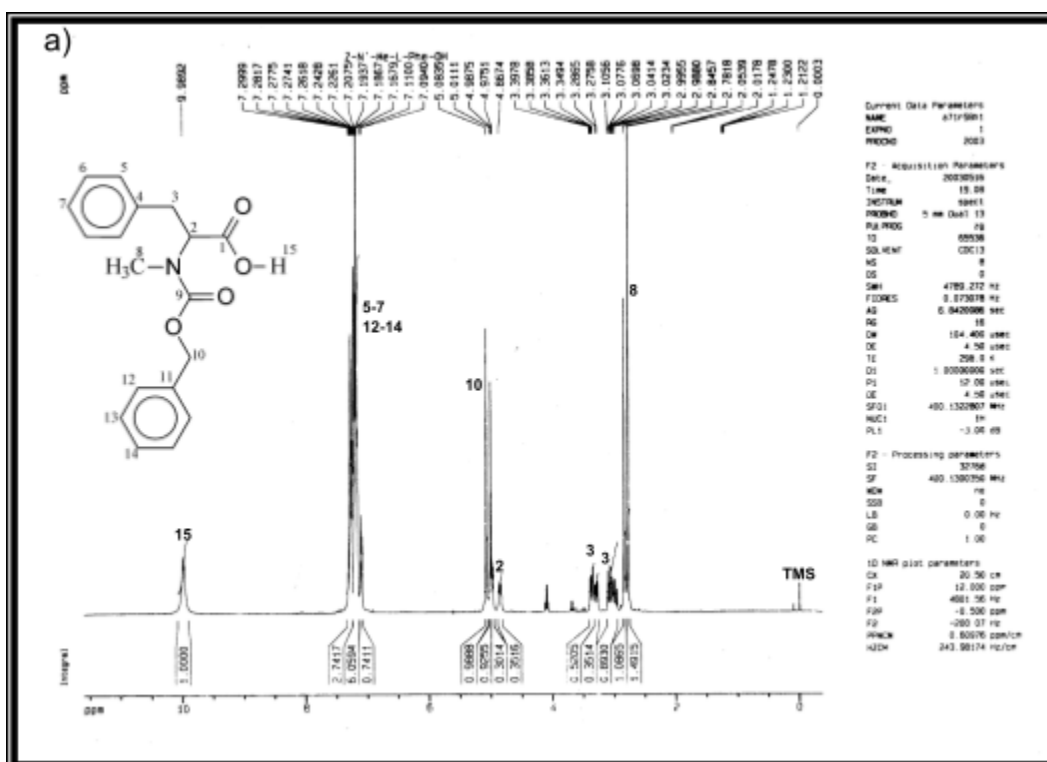
Em razão da necessidade do grupo carboxila apresentar-se na forma livre para o progresso da síntese, realizou-se a saponificação do éster metílico de (**42**) (esquema 19), utilizando uma solução aquosa de NaOH 1N em MeOH, o que levou a formação de um produto oleoso, o qual se solidifica lentamente, tendo apresentado rendimento de 84 %. Assim como na etapa anterior, a reação foi acompanhada por CCD a qual mostrou uma diferença de *R_fs* entre as formas protegidas

$R_f = 0,65$ e a desprotegida $R_f = 0,47$ em sistema de solvente clorofórmio / ácido acético (95:5).



Esquema 19

Intrinsecamente ao reagente de partida **(42)**, o produto da reação de hidrólise mantém as características rotaméricas mencionadas anteriormente, mostrando apenas a ausência dos sinais correspondentes ao grupo metoxila ($-\text{OCH}_3$) em deslocamentos químicos (δ) de 3,62; 3,55 e 52,089 ppm nos respectivos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Figura 11).



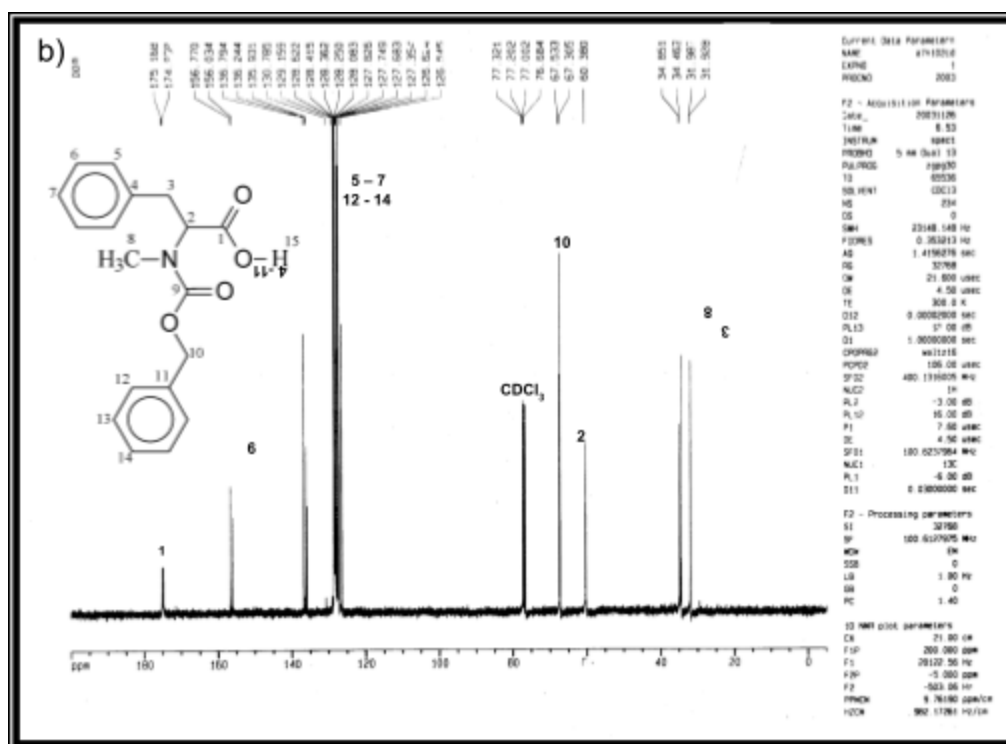


Figura 11- Espectros de RMN de ^1H (a) e ^{13}C (b) do Z-Me-L-Phe-OH (43).

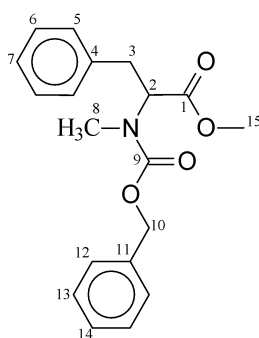
4.1.1- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

A caracterização espectroscópica por RMN dos compostos (41), (42) e (43) realizada no trabalho, é igualmente descrita na literatura³⁶. Porém, a mesma nada menciona a respeito dos rotâmeros E/Z

encontrados dentre os resultados obtidos, fato que aparentemente esta ligado à frequência dos aparelhos utilizados para as análises.

As tabelas 3.1 e 3.2 a seguir, mostram os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C para os rotâmeros majoritário e minoritário de **(42)** e **(43)**.

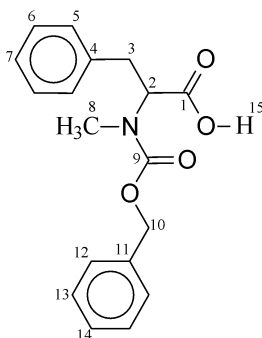
TABELA 3.1: - Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para os rotâmeros majoritário e minoritário do Z-Me-L-Phe-OMe **(42)**.



Rotâmero majoritário				Rotâmero minoritário		
átomo	$\delta^1\text{H}^{\text{a}}$ (ppm)	multiplicidade J(Hz)	$\delta^{13}\text{C}^{\text{b}}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}^{\text{a}}$ (ppm)	multiplicidade J(Hz)	$\delta^{13}\text{C}^{\text{b}}$ (ppm)
1	-	-	171,309	-	-	171,073
2	4,90	dd	60,173	4,70	dd	60,573
3	2,95 - 3,25	2dd	34,773	2,89 - 3,19	2dd	35,169
4	-	-	136,579	-	-	136,273
5, 6, 7	6,99 - 7,21	m, Sinais sobrepostos	126,528 128,713 128,282	6,99 - 7,21	m, Sinais sobrepostos	126,606 128,713 128,282
8	2,70	s	31,577	2,73	s	32,058
9	-	-	156,407	-	-	155,710
10	4,99	s	67,044	4,92	s	67,234
11	-	-	136,975	-	-	137,033
12, 13, 14	6,99 - 7,21	m, Sinais sobrepostos	127,729 128,364 127,394	6,99 - 7,21	m, Sinais sobrepostos	127,772 128,422 127,847
15	3,62	s	52,089	3,55	s	52,089

^{a)}Espectro obtido em CDCl₃ a 400 MHz ^{b)} Espectro obtido em CDCl₃ a 100 MHz.

TABELA 3.2: - Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para os rotâmeros majoritário e minoritário do Z-Me-L-Phe-OH (**43**).



Rotâmero majoritário				Rotâmero minoritário		
átomo	$\delta^1\text{H}^a$ (ppm)	multiplicidade J(Hz)	$\delta^{13}\text{C}^b$ (ppm)	$\delta^1\text{H}^a$ (ppm)	multiplicidade J(Hz)	$\delta^{13}\text{C}^b$ (ppm)
1	-	-	175,188	-	-	174,882
2	4,99	dd	60,375	4,85	dd	60,375
3	3,06 - 3,37	2dd	34,458	2,98 - 3,29	2dd	34,847
4	-	-	136,794	-	-	136,794
5, 6, 7	7,03 - 7,30	m, sinais sobrepostos	126,545 128,624 128,252	7,03 - 7,30	m, sinais sobrepostos	126,624 128,624 128,252
8	2,77	s	31,924	2,84	s	31,983
9	-	-	156,770	-	-	156,034
10	5,07	s	67,303	5,00	s	67,531
11	-	-	136,244	-	-	135,931
12, 13, 14	7,03 - 7,30	m, sinais sobrepostos	127,749 128,364 127,355	7,03 - 7,30	m, sinais sobrepostos	127,826 128,417 127,682
15	9,87	s	-	9,87	s	-

^aEspectro obtido em CDCl_3 , a 400 MHz. ^bEspectro obtido em CDCl_3 , a 100 MHz.

4.2- Obtenção dos β -hidróxi-aminoácidos *Treo* e *Eritro* fenilserina

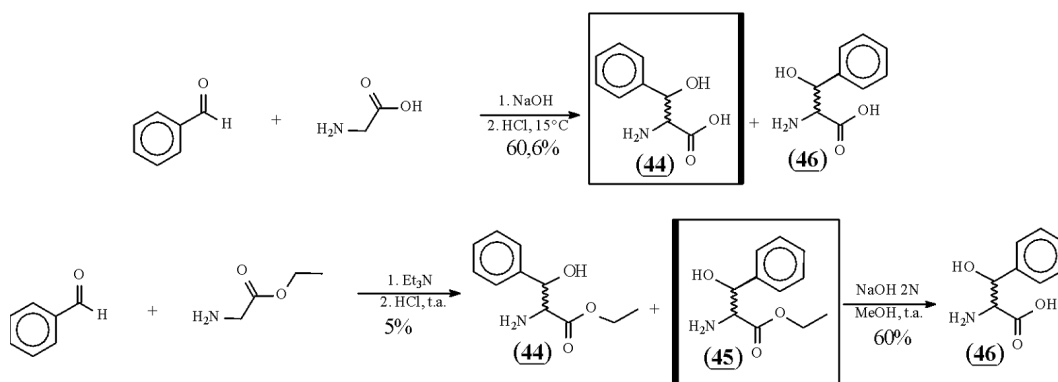
Partindo-se da condensação do benzaldeído com o aminoácido glicina em meio básico, como descreve a literatura⁸¹, obteve-se um par de aminoácidos diastereoisoméricos (*Treo* e *Eritro*), que após a recristalização com etanol, possibilitou o isolamento da forma *Treo* (enantiomeros, D e L) (**44**), com rendimento de 60,6%. Embora a *Eritro* fenilserina tenha sido obtida como um subproduto durante a síntese da forma *Treo*, não foi possível separá-la de forma pura da mistura residual.⁸²

Assim, para a obtenção da *Eritro*-D,L-fenilserina pura e em quantidades aplicáveis à síntese, fez-se necessário o uso de uma metodologia alternativa, realizada pela condensação do benzaldeído com o aminoácido glicina protegido na forma de seu éster etílico em meio à trietilamina.^{83,84}

Dessa forma, obteve-se a formação de um excesso do éster etílico da *eritro* fenilserina (**45**), que pode então ser isolado por recristalização em acetona com rendimento aproximado de 5%.

Como ésteres etílicos de aminoácidos são mais difíceis de se trabalhar durante a síntese peptídica, realizou-se a hidrólise alcalina da *Eritro*-Pheser-OEt (**45**), gerando cristais da forma *eritro* fenilserina (enantiomeros D e L) (**46**).

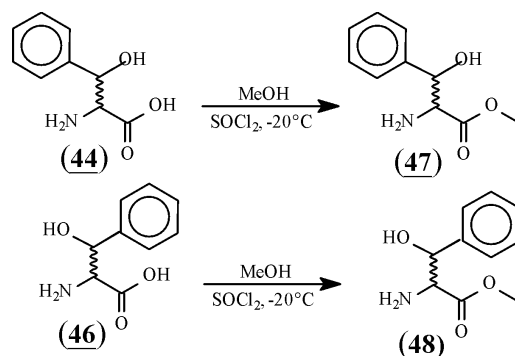
O esquema 20, ilustra as reações de condensação para a obtenção da *Treo* e *Eritro* fenilserina, bem como esta última etapa de hidrólise que ocorre com rendimento de 60%.



Esquema 20

A diferenciação das formas *Treo* e *Eritro* fenilserina deu-se pela comparação dos valores experimentais e literários de ponto de fusão, e foi confirmada pelo tempo de retenção dos derivados (*N,O*-trifluoracetil, *O*-Me) em análises por cromatografia gasosa, empregando as fases estacionárias aquiral (SE-54) (diastereoisômeros *Treo/Eritro*) e quiral (Lipodex-E) (enantiômeros D,L).

Tanto *Treo* quanto *Eritro* fenilserina participam da formação dos dipeptídeos com seu grupamento carboxílico protegido na forma de ésteres metílicos⁸⁵ (esquema 21). Esta reação foi facilmente realizada pelo tratamento dos respectivos aminoácidos em (MeOH/ SOCl₂) à -20°C, com rendimentos superiores a 80% e obtenção de produtos cristalinos para as formas *Treo* e *Eritro* fenilserina.



Esquema 21

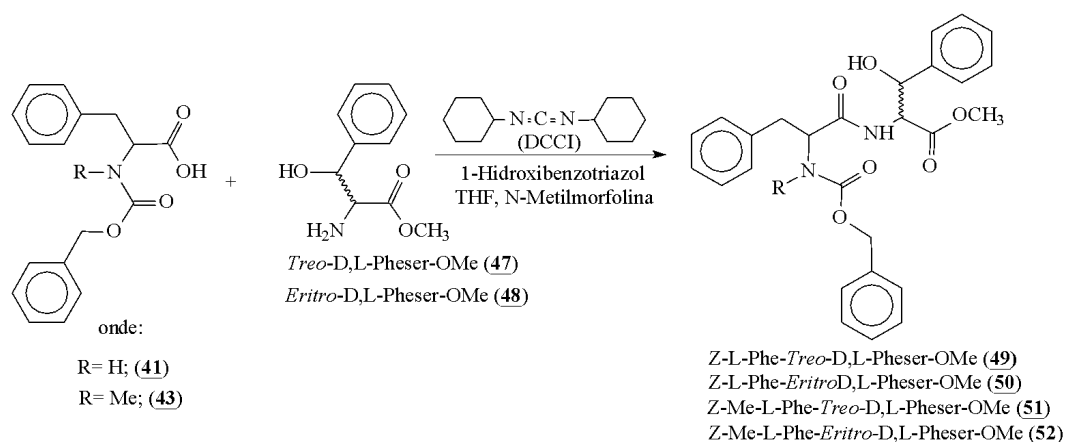
4.2.1- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Nos experimentos de RMN de ¹H e ¹³C de (44) e (46), não foi possível a identificação de qualquer diferença relativa as suas características diastereoisoméricas. No entanto, os espectros de ¹H dos ésteres metílicos (47) e (48) apresentam os sinais característicos da ligação (O-CH₃) em (δ) 3.66 e 3.61ppm, respectivamente, e os dubletos dos seus prótons metínicos, com constantes de acoplamento ($J_{\alpha-\beta}$) bem diferenciadas. Já no espectro de ¹³C em aproximadamente 165 ppm temos os típicos carbonos carbonílicos dos ésteres de ambas as formas, confirmando-se assim, a reação de esterificação.

4.3- Preparação dos Dipeptídeos *Z-L-Phe-Treo* (D,L) e *Eritro* (D,L)-Pheser-OMe e *Z-Me-L-Phe-Treo* (D,L) e *Eritro* (D,L)-Pheser-OMe.

Levando-se em consideração as estratégias demonstradas nas figuras 7 e 8, pôde-se obter de maneira independente, os dipeptídeos

(49) e (50), bem como os seus análogos *N*-metilados (51) e (52), através dos acoplamentos de quantidades equimolares dos aminoácidos β-fenilserina (47) e (48) com os derivados da L-fenilalanina (41) e (43) pelo método da carbodiimida⁸⁶, utilizando-se a DCCI como reagente de acoplamento e o HOBT como aditivo auxiliar⁵⁰ (Esquema 22).



Esquema 22

Como resultado das reações de acoplamento entre o Z-L-Phe-OH (41) com a *Treo*-D,L-Pheser-OMe (47), e do Z-L-Phe-OH (41) com a *Eritro*-D,L-Pheser-OMe (48), obteve-se produtos na forma de sólidos brancos que quando aplicados em CCD (eluída com *i*-Pr₂O/ MeOH 1%) se apresentam na forma de duas manchas de *R_f*s muito próximos, mas de possível separação por CPP e como são identicamente reativas frente a *o*-toluidina, acredita-se serem estes os pares

diastereoisoméricos (*L(D)*, *L(L)*) devido aos aminoácidos esterificados *Treo* e *Eritro* fenilserina, componentes dos dipeptídeos formados.

Esses, por sua vez, tiveram suas estruturas confirmadas através das análises dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , como os demonstrados para o dipeptídeo *Z-L-Phe-Treo-L-Pheser-OMe* (**49b**) (figura 12). Nestes espectros, nota-se a presença dos sinais característicos para os seus aminoácidos formadores, além do sinal do carbono carbonílico em RMN de ^{13}C a 170 ppm, que confirma a formação da ligação amídica, sendo suas estereoquímica definidas posteriormente, através de análises por cromatografia gasosa.

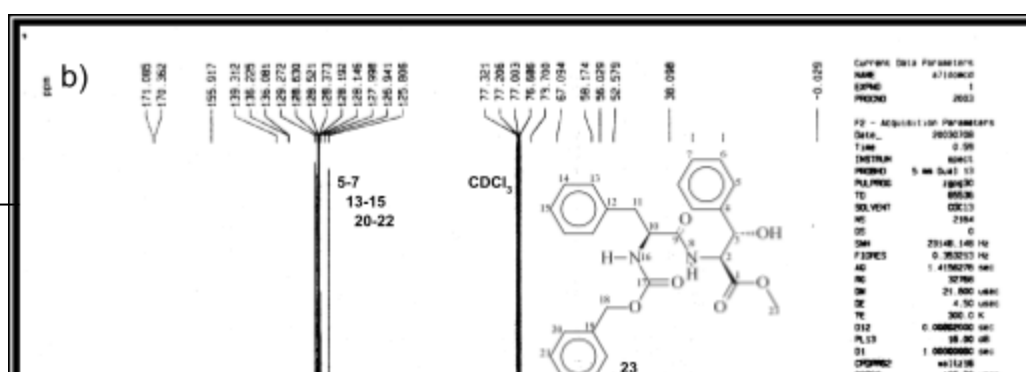
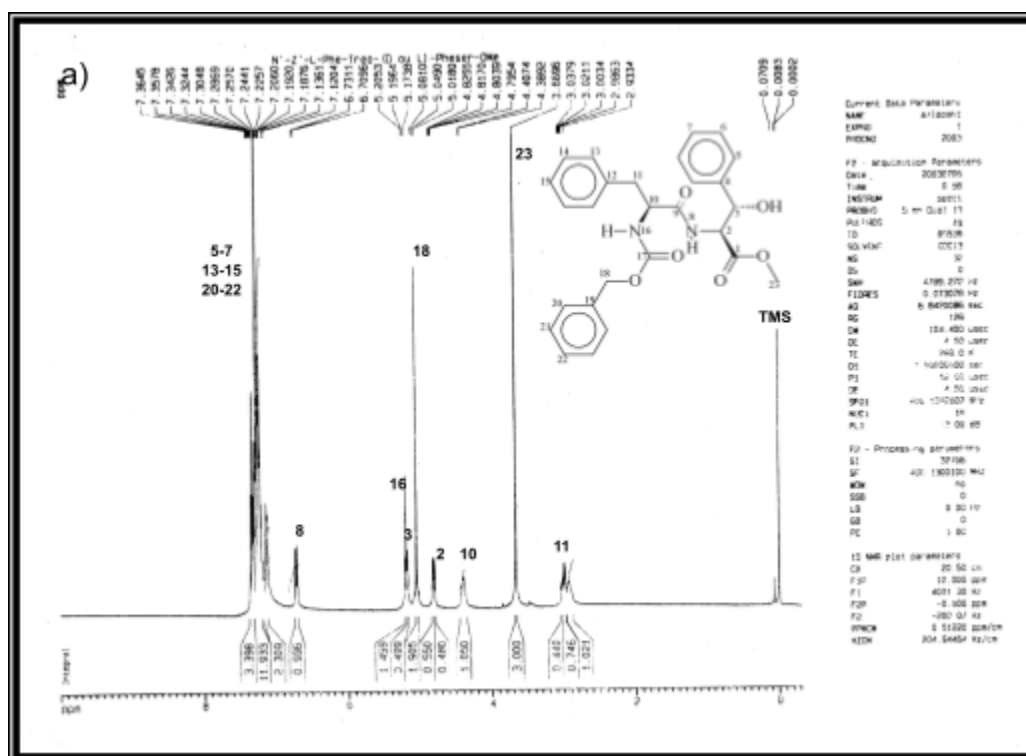


Figura 12- Espectros de RMN de ^1H (a) e de ^{13}C (b) do dipeptídeo Z-L-Phe-Treo-L-Pheser-OMe (**49b**).

Da mesma forma, durante o acoplamento do aminoácido Z-Me-L-Phe-OH (**43**) primeiramente com a *Treo*-D,L-Pheser-OMe (**47**), e após com a *Eritro*-D,L-Pheser-OMe (**48**), obteve-se produtos oleosos que são homogêneos em CCD e constituídos pela mistura dos dois diastereoisômeros. Essa reação foi confirmada pelos experimentos de RMN de ^1H e de ^{13}C , os quais aparentemente não apresentam bons espectros.

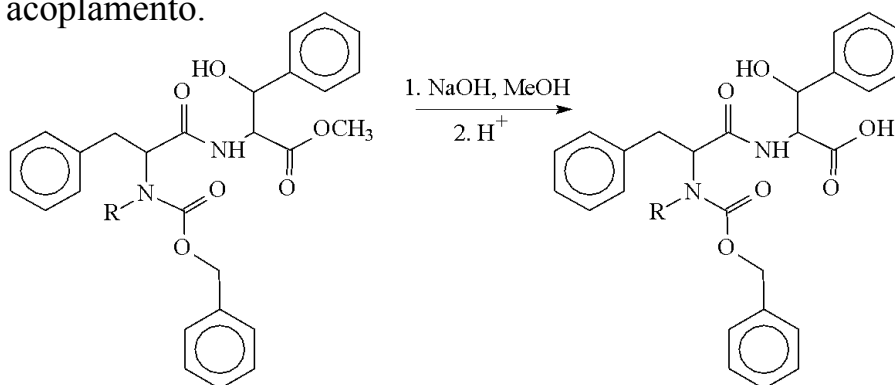
Considerando-se que, no trabalho publicado por R. H. Mazur e col.⁷³, durante a síntese de derivados *N*-metilados da bradiquinina, o mesmo problema é relatado e presumido como sendo devido a problemas estéricos associados ao aminoácido *N*-metil, acredita-se que esta também seja a possível causa da baixa resolução dos

espectros de RMN. Os dados e condições reacionais referentes à formação de cada um dos dipeptídeos podem ser vistos na Tabela 4.

TABELA 4: - Rendimentos e condições reacionais da obtenção dos dipeptídeos.

Produto	Reagentes	Solvente	t (h)	Rendimento (%)
Z-L-Phe- <i>Treo</i> -D,L-Pheser-OMe (49)	DCCI/HOBt	THF	16	65
Z-L-Phe- <i>Eritro</i> -D,L-Pheser-OMe (50)	DCCI/HOBt	THF	20	70
Z-Me-L-Phe- <i>Treo</i> -D,L-Pheser-OMe (51)	DCCI/HOBt	THF	21	66
Z-Me-L-Phe- <i>Eritro</i> -D,L-Pheser-OMe (52)	DCCI/HOBt	THF	18	60

Posteriormente, tanto as misturas diastereoisoméricas dos dipeptídeos (**49**) e (**50**), quanto às dos dipeptídeos *N*-metilados (**51**) e (**52**) foram submetidas à hidrólise básica⁸⁷ (esquema 23), com a finalidade de liberar o grupo carboxila para outra reação de acoplamento.



Onde:

R= H; Z-L-Phe-*Treo*-D,L-Pheser-OMe (**49**)

R= H; Z-L-Phe-*Eritro*-D,L-Pheser-OMe (**50**)

R= Me; Z-Me-L-Phe-*Treo*-D,L-Pheser-OMe (**51**)

R= Me; Z-Me-L-Phe-*Eritro*-D,L-Pheser-OMe (**53**)

Z-L-Phe-*Treo*-D,L-Pheser-OH (**54**)

Z-L-Phe-*Eritro*-D,L-Pheser-OH (**55**)

Z-Me-L-Phe-*Treo*-D,L-Pheser-OH (**56**)

Z-Me-L-Phe-*Eritro*-D,L-Pheser-OH (**57**)

Esquema 23

4.3.1-Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Embora os dipeptídeos *N*-metilados **(51)** e **(52)** se apresentem de uma forma homogênea em CCD, impossibilitando a separação por técnicas cromatográficas convencionais (CC e CPP), as análises de RMN de ^1H e ^{13}C possibilitam a distinção de alguns dos sinais de cada par diastereoisomérico, pela sua diferença de intensidade. Isso ocorre devido aos aminoácidos **(47)** e **(48)** apresentarem um leve excesso (aproximadamente 7%) do enantiômero L, este excesso foi quantificado por análise em CG (figura 24) empregando uma coluna com fase estacionária quiral Lipodex-E.

Nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do dipeptídeo *Z*-Me-L-Phe-*Treo*-D,L-Pheser-OMe **(51)** (figura 13), os sinais que mais facilmente se diferenciam, estão sob a forma de singletos, típicos para grupamentos *N*-metil e em (δ) 2,38 e 2,77 ppm, o duplo dubleto em (δ) 4,79 ppm e o dubleto em 5,29 ppm, são considerados como pertencentes aos hidrogênios (CH- α) e (CH- β) de um dos enantiômeros do aminoácido esterificado *Treo*-fenilserina que compõe o dipeptídeo diastereoisomérico, enquanto que os sinais em (δ) 4,90 e 5,33 ppm parecem ser os mesmos (CH- α) e (CH- β) para o outro enantiômero da *Treo*-fenilserina, que forma o segundo par diastereoisomérico.

Além disso, nos espectros de RMN de ^{13}C existem algumas diferenças nos deslocamentos químicos (δ), tanto entre os dipeptídeos **(51)** e **(51')**, quanto entre os **(52)** e **(52')**.

DISCUÇÃO DOS RESULTADOS

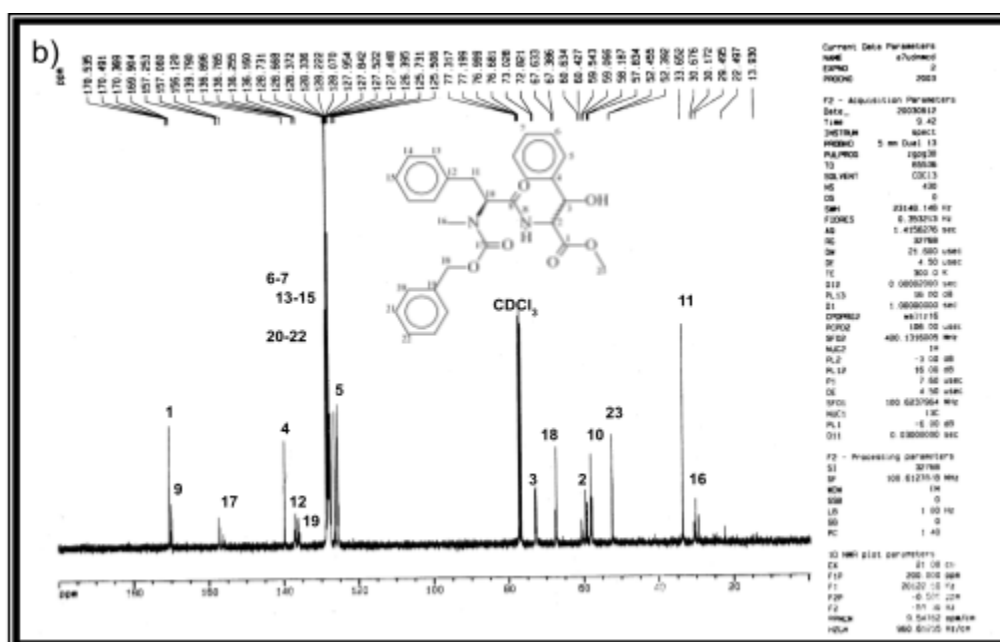
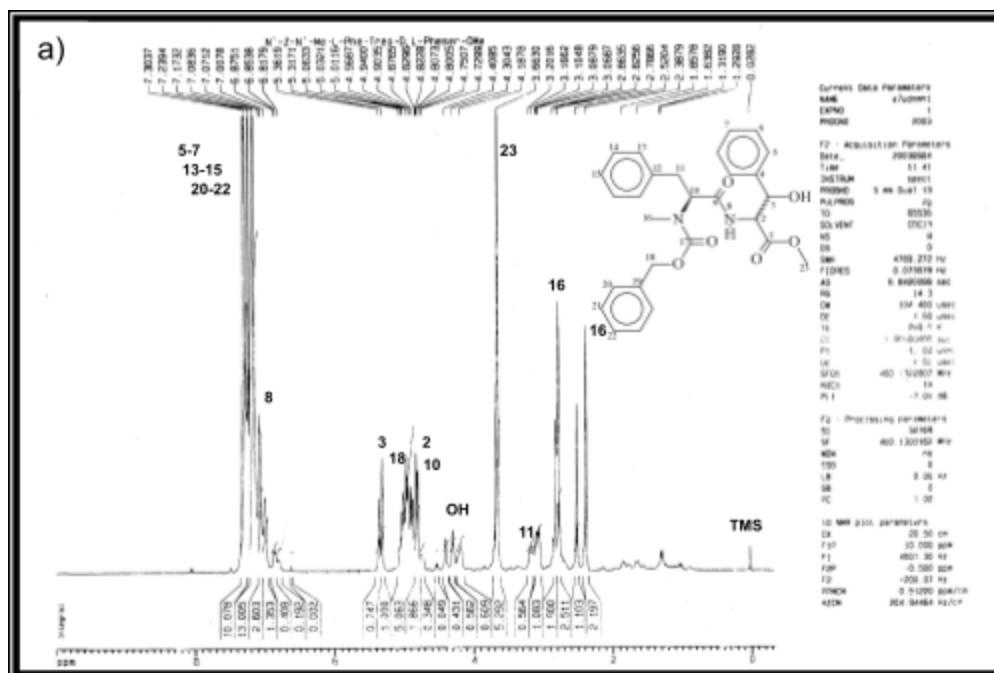
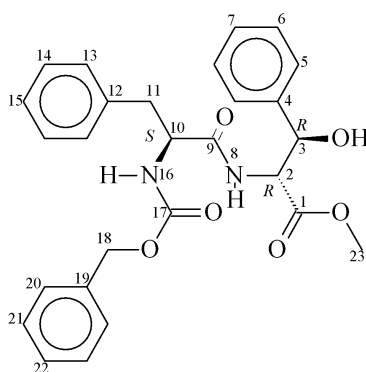


Figura 13- Espectros de RMN ^1H (a) e ^{13}C (b) da mistura diastereoisomérica dos dipeptídeos *Z*-Me-L-Phe-*Treo*-D,L-Pheser-OMe (**51**).

Todas as diferenças notadas para as formas diastereoisoméricas dos dipeptídeos *N*-metilados são melhor visualizadas nos dipeptídeos (**49**) e (**50**), pois seus espectros apresentam uma maior resolução dos sinais de ^1H , onde se nota, principalmente, a variação no (δ) do (**CH- α**) do aminoácido fenilalanina, efeito da substituição do (**NH** em $\approx 5,17$ ppm) pelo grupamento *N*-metil. Cabe ainda mencionar, de maneira geral, que os deslocamentos (δ) vão para campo mais alto em relação aos devidos análogos *N*-metilados. Nas tabelas a seguir estão listados os deslocamentos químicos referentes aos espectros de ^1H ^{13}C dos dipeptídeos.

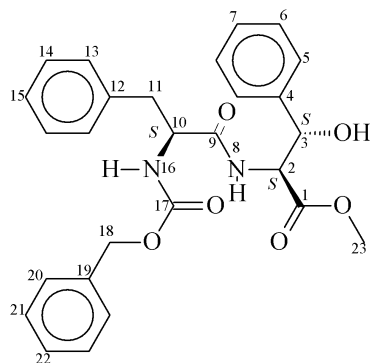
TABELA 5.1.1: - Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para o dipeptídeo *Z*-L-Phe-*Treo*-D-Pheser-OMe (**49a**)



Átomo	δ $^1\text{H}^a$ (ppm)	multiplicidade J (Hz)	δ $^{13}\text{C}^b$ (ppm)
1	-	-	171,505
2	4,64	dd; ($J_{2,3}=3,20$; $J_{2,8}=8,76$)	57,556
3	5,29	d; ($J_{3,2}=3,08$)	71,829
4	-	-	139,527
5, 6, 7	7,15-7,30	m	125,764 128,282 128,119
8	6,91	d; ($J_{8,2}=8,76$)	-
9	-	-	170,875
10	4,48	dd; ($J_{10,11}=7,36$; $J_{11,10}=5,32$)	55,596
11	2,78; 2,96	dd; ($J_{11,10}=7,36$; $J_{11,10}=5,32$; $J_{11,11}=14,10$)	38,224
12	-	-	136,260
13, 14, 15	7,15-7,30	m	127,884 128,465 128,436
16	5,20	d	-
17	-	-	155,955
18	5,00	dd	66,963
19	-	-	136,049
20, 21, 22	7,15-7,30	m	126,818 129,244 128,513
23	3,67	s	52,517

^{a)}Espectro obtido em CDCl_3 a 400 MHz. ^{b)} Espectro obtido em CDCl_3 a 100 MHz.

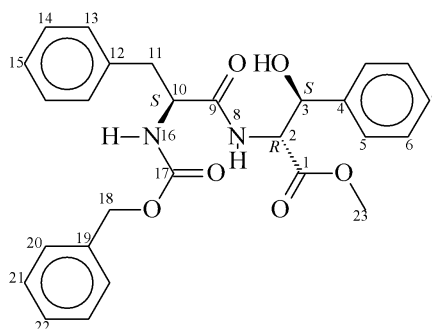
TABELA 5.1.2: - Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para o dipeptídeo *Z*-L-Phe-*Treo*-L-Pheser-OMe (**49b**)



Átomo	$\delta^1\text{H}^{\text{a}}$ (ppm)	multiplicidade J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}^{\text{b}}$ (ppm)
1	-	-	171,085
2	4,71	dd; ($J_{2,3}= 3,40$; $J_{2,8}= 8,64$)	58,268
3	5,33	d; ($J_{3,2}= 3,40$)	732,060
4	-	-	139,312
5, 6, 7	7,05-7,29	m,	125,806 128,192 128,146
8	6,72	d; ($J_{8,2}=8,64$)	-
9	-	-	170,362
10	4,39	dd; ($J_{10,11}= 6,78$)	56,029
11	2,78; 3,01	dd; ($J_{11,10}= 6,78$; $J_{11,11'}= 13,88$)	38,098
12	-	-	136,225
13,14, 15	7,05-7,29	m,	127,998 128,521 128,373
16	5,17	d	-
17	-	-	155,917
18	5,04	s	67,094
19	-	-	136,081
20, 21, 22	7,05-7,29	m	126,941 129,272 128,630
23	3,66	s	52,579

^{a)}Espectro obtido em CDCl_3 a 400 MHz. ^{b)} Espectro obtido em CDCl_3 a 100 MHz.

TABELA 5.2.1: - Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para o dipeptídeo *Z-L-Phe-Eritro-D-Pheser-OMe* (**50a**)

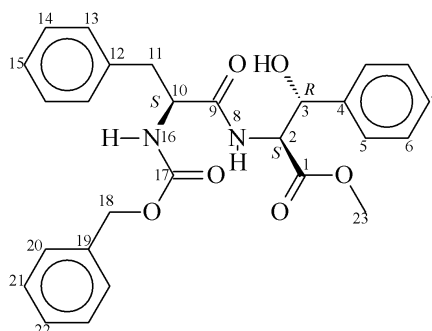


Átomo	δ $^1\text{H}^{\text{a}}$ (ppm)	multiplicidade J (Hz)	δ $^{13}\text{C}^{\text{b}}$ (ppm)
1	-	-	172,000
2	4,81	dd; ($J_{2,3}=3,48$; $J_{2,8}=6,76$)	59,044
3	5,16	d; ($J_{3,2}=3,48$)	74,670
4	-	-	138,823
5, 6, 7	7,07-7,26	m	125,876 128,278 128,125
8	6,47	d*; ($J_{8,2}=6,76$)	-
9	-	-	169,276
10	4,32	q*; ($J_{10,11}=6,4$; $J_{10,11'}=7,20$; $J_{10,16}=14,20$)	56,339
11	2,98	dd*; ($J_{11,10}=6,4$)	38,128
12	-	-	135,904
13, 14, 15	7,07-7,26	m	128,079 128,566 128,308
16	5,16	d*; ($J_{16,10}=14,20$)	-
17	-	-	155,828
18	5,09	s	67,285
19	-	-	135,904
20, 21, 22	7,07-7,26	m	127,209 129,230 128,833
23	3,57	s	52,492

^a) Espectro obtido em CDCl_3 a 400 MHz. ^b) Espectro obtido em CDCl_3 a 100 MHz.

* Sinais sobrepostos ou distorcidos

TABELA 5.2.2: - Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para o dipeptídeo *Z-L-Phe-Eritro-L-Pheser-OMe* (**50b**)



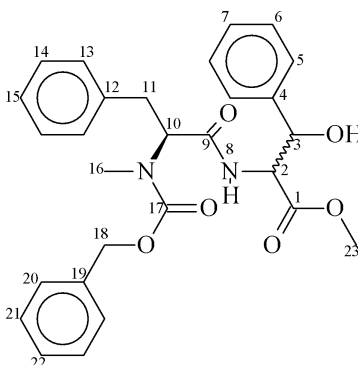
Átomo	δ $^1\text{H}^{\text{a}}$ (ppm)	multiplicidade J (Hz)	δ $^{13}\text{C}^{\text{b}}$ (ppm)
1	-	-	171,620
2	4,90	dd; ($J_{2,3}=3,80$; $J_{2,8}=7,60$)	58,795
3	5,25	d; ($J_{3,2}=3,80$)	74,297
4	-	-	138,792
5, 6, 7	7,14-7,32	m	125,755 128,249 128,125
8	6,53	d; ($J_{8,2}=7,60$)	-
9	-	-	169,421
10	4,45	dd*; ($J_{10,11}=7,26$; $J_{10,16}=14,56$)	56,323
11	3,03	d*; ($J_{11,10}=7,26$)	38,538
12	-	-	136,148
13, 14, 15	7,14-7,32	m	128,082 128,546 128,332
16	5,25	d*; ($J_{16,10}=14,56$)	-
17	-	-	155,828
18	5,07	s	67,213
19	-	-	135,992
20, 21, 22	7,14-7,32	m	127,244 129,303 128,857
23	3,61	s	52,403

^{a)}Espectro obtido em CDCl_3 a 400 MHz.

^{b)}Espectro obtido em CDCl_3 a 100 MHz.

* Sinais sobrepostos ou distorcidos

TABELA 5.3: - Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para mistura diatereoisomérica dos dipeptídeos
Z-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-OMe (**51**)



(51)				(51')		
Átomo	δ $^1\text{H}^a$ (ppm)	multiplicidade	δ $^{13}\text{C}^b$ (ppm)	$\delta^1\text{H}^a$ (ppm)	multiplicidade	δ $^{13}\text{C}^b$ (ppm)
1	-	-	170,538	-	-	170,494
2	4,795	dd	59,550	4,90	-	58,072
3	5,29	d	72,825	5,33	d	73,034
4	-	-	139,797	-	-	139,797
5, 6, 7	7,00-7,30	m	125,513 127,961 127,455	7,00-7,30	m	125,738 128,077 127,529
8	7,07	d	-	6,76	d	-
9	-	-	169,911	-	-	170,376
10	4,77	q*	58,193	4,68	q*	57,841
11	3,08	dd*	33,658	3,19	dd*	33,658
12	-	-	136,903	-	-	136,792
13, 14, 15	7,00-7,30	m	127,894 128,343 128,229	7,00-7,30	m	127,849 128,343 128,229
16	2,38	s	30,179	2,77	s	29,502
17	-	-	157,260	-	-	157,067
18	5,02	d	67,393	4,93	d	67,639
19	-	-	136,262	-	-	136,167
20, 21, 22	7,00-7,30	m	126,402 128,675 128,379	7,00-7,30	m	126,402 128,738 128,379
23	3,66	s	52,462	3,69	s	52,399

^{a)}Espectro obtido em CDCl_3 a 400 MHz.

^{b)} Espectro obtido em CDCl_3 a 100 MHz.

* Sinais sobrepostos ou distorcidos

Com o objetivo de complementar a determinação estrutural do dipeptídeo Z-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-OMe (**51**) e obter melhores

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

resultados durante as análises por RMN ^1H e ^{13}C (figura 14), realizou-se a hidrogenação catalítica para remoção do grupamento

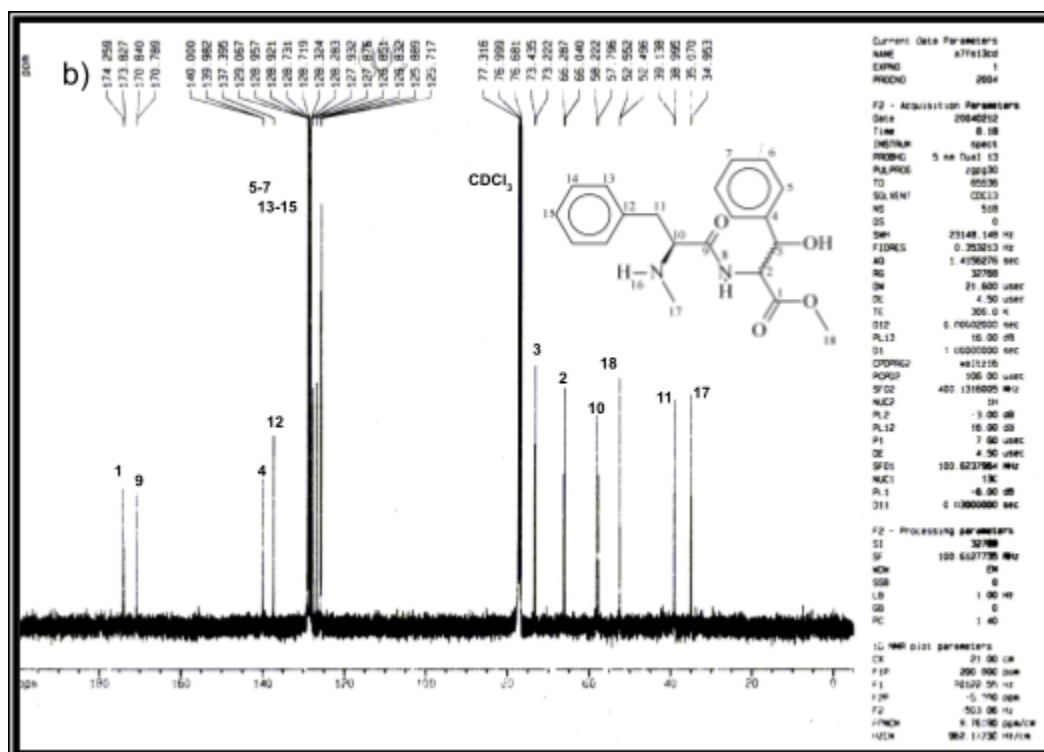
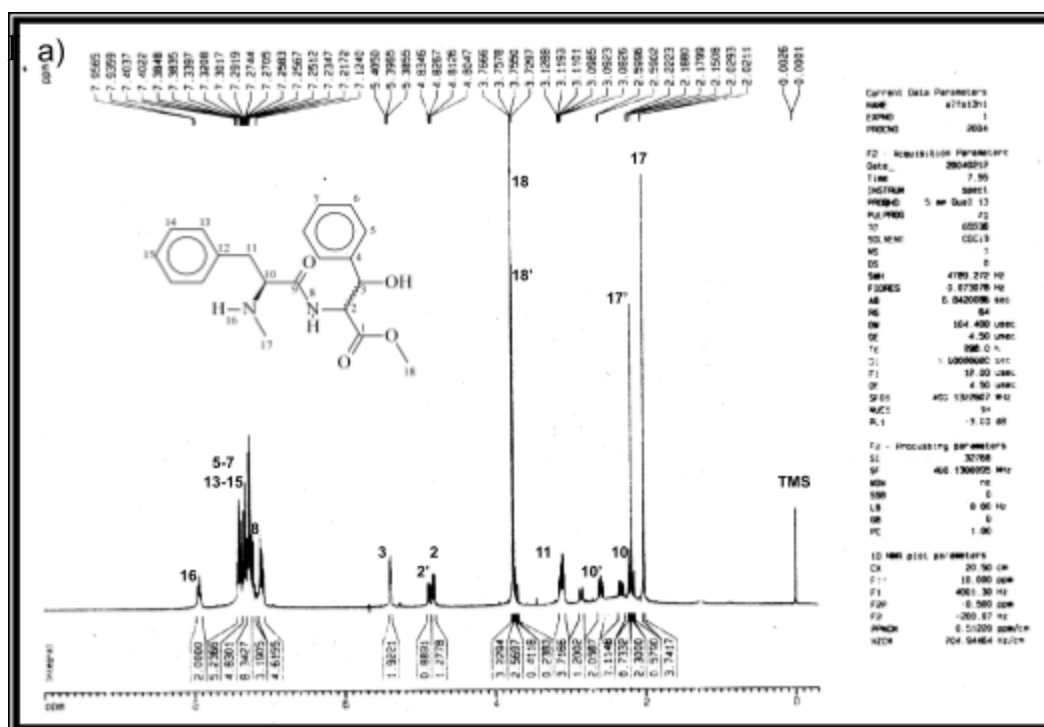
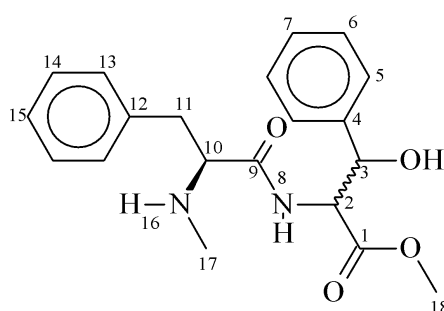


Figura 14- Espectros de RMN ^1H (a) e ^{13}C (b) da mistura diastereoisomérica dos dipeptídeos N-Me-L-Phe-*Treo*-D,L-Pheser-OMe (**53**).

TABELA 5.3.1: - Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para a mistura diastereoisomérica dos dipeptídeos N-Me-L-Phe-*Treo*-D,L-Pheser-OMe (**53**)



(53)				(53')		
Átomo	$\delta^1\text{H}^a$ (ppm)	Multiplicidade J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}^b$ (ppm)	$\delta^1\text{H}^a$ (ppm)	multiplicidade J(Hz)	$\delta^{13}\text{C}^b$ (ppm)
1	-	-	174,259	-	-	173,827
2	4,81	dd; ($J_{2,3}=3,16$; $J_{2,8}=8,80$)	66,040	4,88	dd; ($J_{2,3}=3,12$; $J_{2,8}=9,28$)	66,287
3	5,39	d; ($J_{3,2}=3,16$)	73,222	5,39	d; ($J_{3,2}=3,12$)	73,435
4	-	-	140,000	-	-	139,982
5, 6, 7	7,12-7,40	m	125,717 128,719 127,876	7,12-7,40	m	125,889 128,731 127,932
8	7,08	d; ($J_{8,2}=8,80$)	-	7,08	d; ($J_{2,8}=9,28$)	-
9	-	-	170,840	-	-	170,789
10 [#]	2,59	dd*; ($J_{10,11}=11,08$; $J_{10,16}=14,00$)	58,222	2,22	dd*; ($J_{10,11}=10,20$; $J_{10,16}=13,92$)	57,796
11 [#]	3,11	dd*	38,995	3,19	dd*	39,138
12	-	-	137,395	-	-	137,395
13, 14, 15	7,12-7,40	m	126,832 128,957 128,324	7,12-7,40	m	126,831 128,921 128,283
16	7,94	d*	-	7,94	d*	-
17	2,02	s	35,070	2,18	s	34,953
18	3,76	s	52,552	3,75	s	52,496

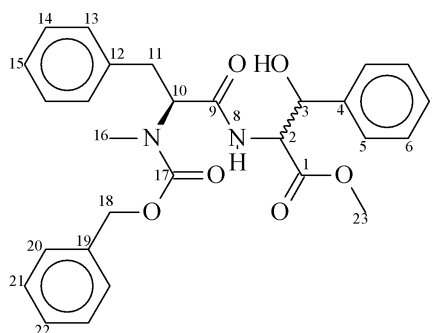
^a) Espectro obtido em CDCl_3 a 400 MHz.

^b) Espectro obtido em CDCl_3 a 100 MHz.

Sinais podem estar trocados

* Sinais sobrepostos ou distorcidos

TABELA 5.4: - Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para a mistura diastereoisomérica dos dipéptidos *Z*-Me-L-Phe-*Eritro*-D,L-Pheser-OMe (**52**)



(52)				(52')		
Átomo	δ $^1\text{H}^a$ (ppm)	Multiplicidade	δ $^{13}\text{C}^b$ (ppm)	δ $^1\text{H}^a$ (ppm)	multiplicidade	δ $^{13}\text{C}^b$ (ppm)
1	-	-	170,874	-	-	171,120
2	4,92	dd	60,434	4,92	dd	60,237
3	5,16	d	74,438	5,16	d	74,438
4	-	-	138,871	-	-	139,078
5, 6, 7	7,12-7,34	m	125,893 128,092 127,631	7,12-7,34	m	126,00 128,077 127,529
8	6,81	d	-	6,81	d	-
9	-	-	169,672	-	-	169,967
10	4,89	q*	58,885	4,89	q*	58,695
11	3,30; 2,95	dd*	34,098	3,30; 2,95	dd*	33,881
12	-	-	136,922	-	-	136,922
13, 14, 15	7,12-7,34	m	128,299 128,554 128,501	7,12-7,34	m	127,849 128,343 128,229
16	2,62	s	30,854	2,62	s	30,724
17	-	-	157,002	-	-	157,002

18	5,08	d	67,526	5,08	s	67,718
19	-	-	136,328	-	-	136,328
20, 21, 22	7,12-7,34	m	126,725 129,018 128,889	7,12-7,34	m	126,725 129,018 128,889
23	3,64	s	52,415	3,69	s	52,562

^{a)} Espectro obtido em CDCl₃ a 400 MHz.

^{b)} Espectro obtido em CDCl₃ a 100 MHz.

* Sinais sobrepostos ou distorcidos

4.4- Reação de hidrólise básica para a obtenção dos dipeptídeos

Z-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-OH (54),

Z-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-OH (55),

Z-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-OH (56) e

Z-Me-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-OH (57)

Os dipeptídeos diastereoisoméricos, quando submetidos a uma hidrólise básica (esquema 23) com solução aquosa de NaOH em MeOH, forneceram produtos de reações na forma de uma massa oleosa para (56) e (57); enquanto que, para (54) e (55) formou-se um sólido branco, sendo que a mistura diastereoisomérica do dipeptídeo (54) pode ser precipitada seletivamente em CHCl₃/MeOH, possibilitando assim a separação dos dipeptídeos diastereoisoméricos Z-L-Phe-Treo-L-Pheser-OH (54a) e Z-L-Phe-Treo-D-Pheser-OH (54b), cujas stereoquímicas foram atribuídas após a análise (por CG enantiosseletiva) dos tripeptídeos provenientes desses dipeptídeos.

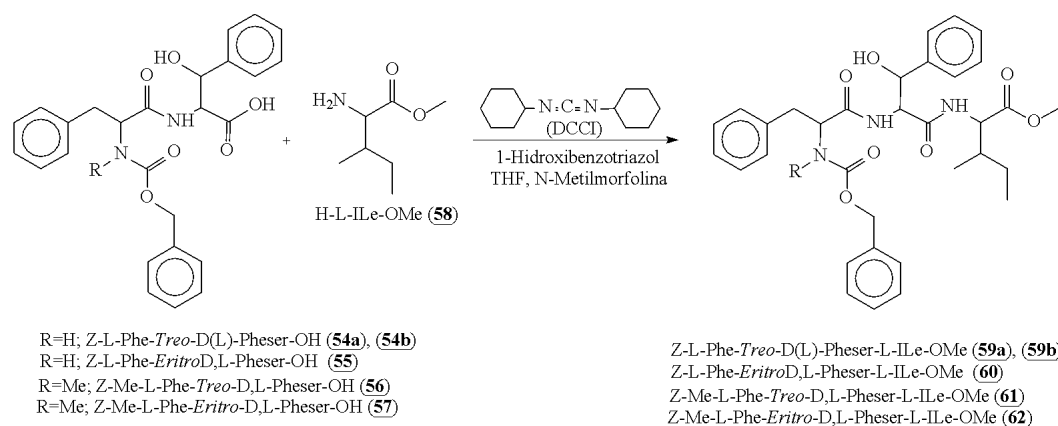
Estas reações ocorreram com rendimentos que variaram de 70 a 90 %, e pela comparação dos *R_f*s do material de partida com os

produtos reacionais confirmou-se a eficiência da desproteção, a qual foi posteriormente analisada através dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , onde apenas o dipeptídeo (**54a**) apresentou bons resultados. Neste primeiro experimento, observou-se o desaparecimento dos sinais correspondentes as metilas dos ésteres ($-\text{OCH}_3$) em 3,67 ppm e 3,66 ppm da mistura diastereoisomérica. Já no espectro de ^{13}C , além do desaparecimento do sinal do ($-\text{OCH}_3$) em aproximadamente 52 ppm, temos a mudança no deslocamento químico de (C-1) para campo mais baixo (≈ 171 ppm), característico de grupamentos ácidos.

Estes dipeptídeos foram utilizados como estruturas chaves para a obtenção dos tripeptídeos, através do acoplamento de seu extremo C-terminal com o aminoácido L-Isoleucina.

4.5- Reação de acoplamento dos dipeptídeos com o aminoácido L-Isoleucina-OMe^{70,86}.

Para obtenção dos tripeptídeos (**59**), (**60**), (**61**) e (**62**) realizou-se o acoplamento dos dipeptídeos diastereoisoméricos (**54**), (**55**), (**56**) e (**57**) com o respectivo aminoácido protegido H-L-Ile-OMe (**58**), pelo método da DCCI (esquema 24), igualmente ao realizado para obtenção dos dipeptídeos.



Esquema 24

As reações ocorreram com rendimentos que variam entre 60-72%, fornecendo produtos na forma de sólidos brancos amorfos (tripeptídeos protegidos (**59a**), (**59b**) e (**60**)) e massas oleosas levemente amareladas (tripeptídeos *N*-metilados (**61**) e (**62**)), sendo confirmadas tanto por CCD quanto por RMN ^1H e de ^{13}C .

4.5.1- Síntese do tripeptídeo Z-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe (**59a**)

Com a forma diastereoisomérica do dipeptídeo Z-L-Phe-Treo-L-Pheser-OH (**54a**) separada por precipitação em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (primeiro diastereoisômero a precipitar), pode-se realizar o acoplamento com o éster metílico da isoleucina, nas condições anteriormente descritas, obtendo-se assim a síntese do respectivo tripeptídeo (**59a**) na forma de um sólido branco de $\text{pf} = 144-145^\circ\text{C}$ e com um rendimento de 72%.

4.5.1.1- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Ao analisarmos o espectro de ^1H do tripeptídeo (**59a**) (figura 15), observamos na região entre 0,87-0,92 ppm um sinal no formato de um dubleto sobreposto a um tripleto, cuja integração de 6 prótons refere-se aos dois grupamentos metílicos do resíduo isoleucina. Em campo um pouco mais baixo 2,81 e 2,98 temos dois duplos dubletos característicos do grupo (CH_2) metilênico da fenilalanina, os quais aparecem desdobrados, devido à vizinhança com o centro quiral, o que faz com que sejam quimicamente não equivalentes e, por isso, acoplam entre si. Já os prótons referentes ao grupamento metoxila da isoleucina absorvem na região de 3,74 ppm, apresentando-se no formato de um singlete.

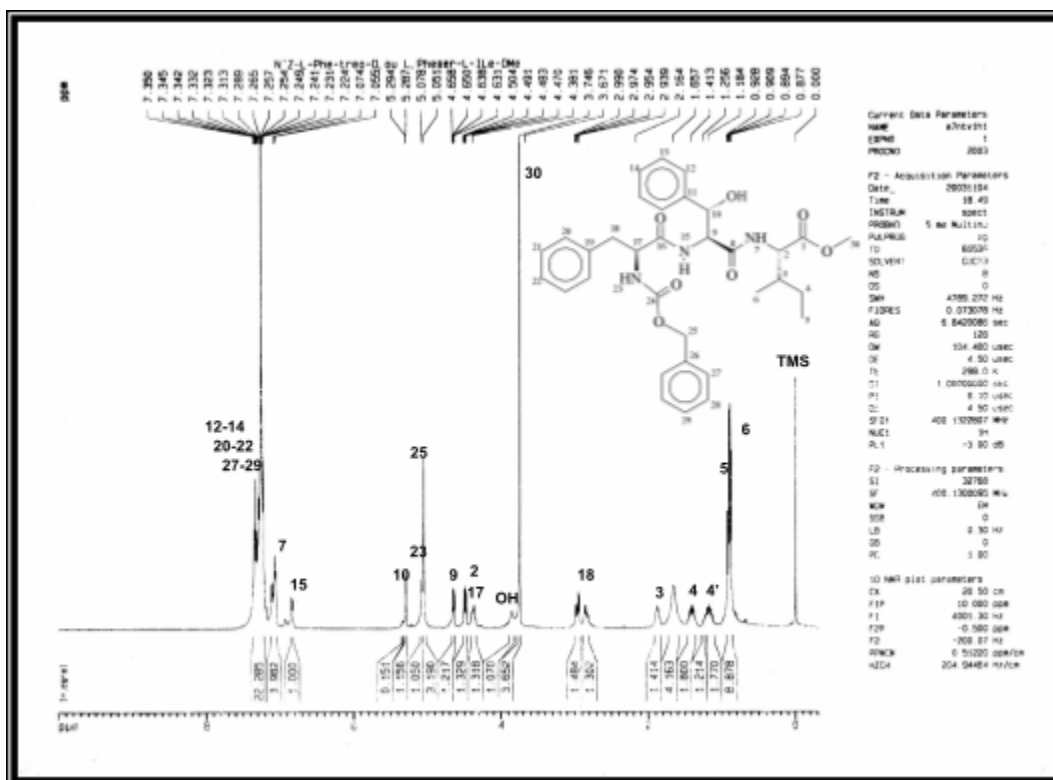


Figura 15- Espectro de ^1H do tripeptídeo *Z-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe* (**59a**).

Nas regiões de (δ) 4,37, 4,48, 4,64 e 5,29 ppm, têm-se os sinais dos respectivos grupos metínicos (CH-17) (CH-2) (CH-9) e (CH-10), apresentando-se sob a forma de duplo dubletos e dubletos, enquanto que entre as regiões de 7,09 e 7,37 ppm têm-se os sinais característicos dos hidrogênios aromáticos na forma de multipletos, com integração correspondente a 15 hidrogênios.

No espectro de RMN ^{13}C (figura 16) observamos a presença de todos os carbonos referentes a esse composto, sendo que nas regiões de 171,606, 170,136, 171,799 e 155,960 ppm encontram-se os sinais referentes às respectivas carbonilas (C-1), (C-8), (C-16) e (C-24) Já entre 125 a 138 ppm, encontramos vários sinais referentes aos

carbonos aromáticos, sendo que os que se encontram completamente desidrogenados apresentam intensidades significativamente reduzidas.

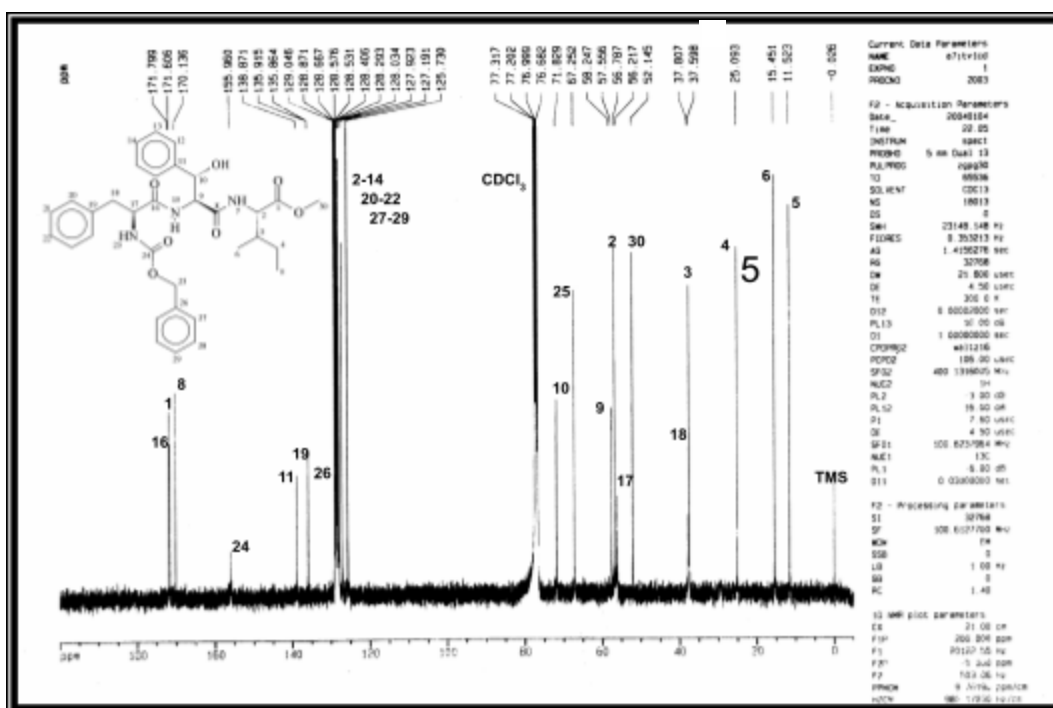


Figura 16- Espectro de RMN ^{13}C do tripeptídeo *Z*-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe (**59a**).

Pela análise do espectro de DEPT 135° teve-se a confirmação dos sinais em deslocamentos 25,093, 37,806 e 67,252 referentes aos grupos metilênicos (C-4), (C-18) e (C-25), os quais aparecem com intensidade negativa neste experimento. Todas essas atribuições de sinais de RMN ^1H e RMN ^{13}C podem ser confirmadas através dos espectros de correlações bidimensionais COSY 45° ^1H - ^1H , HMQC ^1H - ^{13}C e HMBC ^1H - ^{13}C . Sendo que com a espectroscopia bidimensional correlacionada heteronuclear ^1H - ^{13}C , pode-se fornecer

tanto as correlações dos hidrogênios e dos carbonos ligados diretamente entre si (HMQC), como as correlações entre hidrogênios e carbonos a longas distâncias via ${}^2J_{C-H}$ e ${}^3J_{C-H}$ (HMBC), facilitando assim a atribuição dos sinais.

Dessa forma, a análise através de projeções ortogonais do experimento de HMQC ${}^1H - {}^{13}C$ (figura 17) mostra claramente a estéreo-diferenciação entre os hidrogênios diastereotópicos (H-4; H-4') e (H-18; H-18') do composto (**59a**).

Pode-se observar ainda, entre outros sinais, a diferenciação entre os hidrogênios ligados aos carbonos C-5 e C-6. No caso observa-se a correlação do carbono C-5 ($\delta = 11,523$ ppm) com o sinal de hidrogênios em forma de tripleto $\delta = 0,91$ ppm e a correlação do carbono C-6 ($\delta = 15,451$ ppm) com o sinal na forma de dubleto $\delta = 0,89$ ppm. O carbono C-9 ($\delta = 57,556$ ppm) se correlaciona com o sinal de hidrogênio que aparece na forma de duplo dubleto na região de $\delta = 4,64$ ppm. Já no carbono C-10 ($\delta = 71,829$ ppm), há correlação com o dubleto na região de $\delta = 5,29$ ppm e na região dos aromáticos, vê-se as correlações desses carbonos com os respectivos hidrogênios.

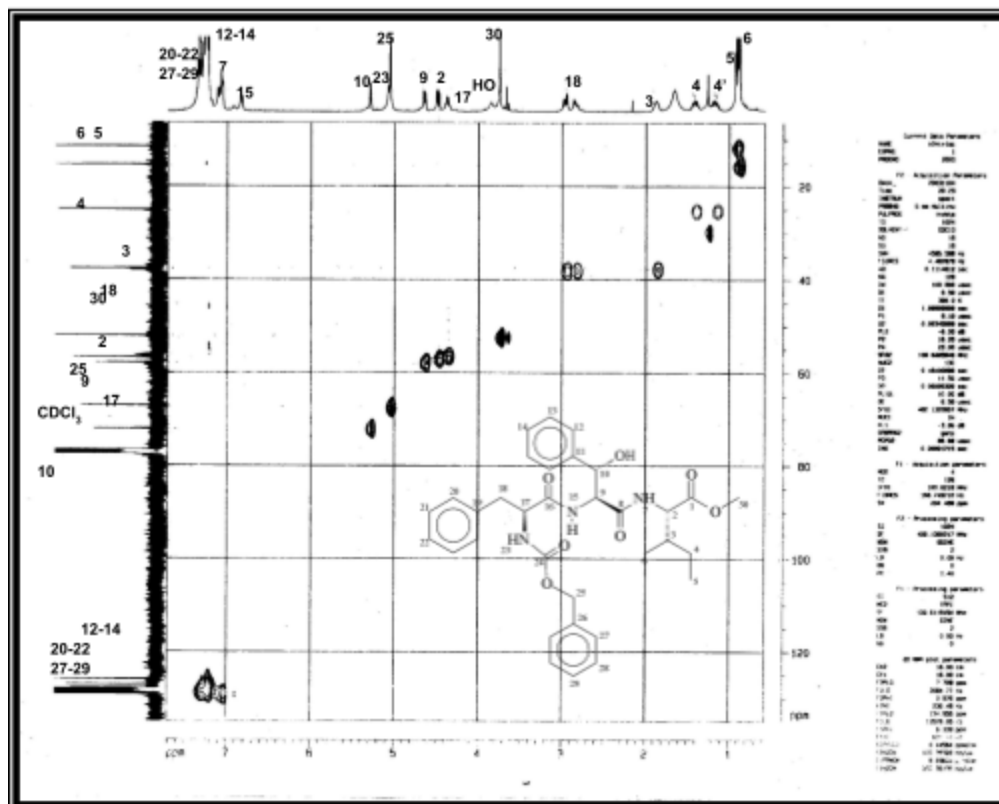


Figura 17- Espectro de HMQC ^1H - ^{13}C do tripeptideo Z-L-Phe-Treo-L-Phe-ser-L-Ile-OMe (**59a**).

Na análise de um espectro de correlação COSY homonuclear ^1H - ^1H (figura 18) realizada através de projeções, relacionando-se sinais pertencentes a uma diagonal com os de fora dela, pode-se atribuir os hidrogênios que se correlacionam entre si e com os seus vizinhos, formando sistemas de spins, para cada unidade aminoácida formadora da estrutura. Através desse pode-se realizar a correlação do sinal atribuído ao hidrogênio do grupamento oxidrila (OH), que

absorve em $\delta=3,98$ ppm com o sinal referente a (H-10) em $\delta=5,29$ ppm. Este, por sua vez, apresenta um cruzamento com o sinal de H-9 que esta na forma de duplo dubleto em $\delta=4,71$ ppm, que se correlaciona com o sinal do hidrogênio amídico NH-15 completando assim o sistema de spins do aminoácido fenilserina do tripeptídeo (**59a**).

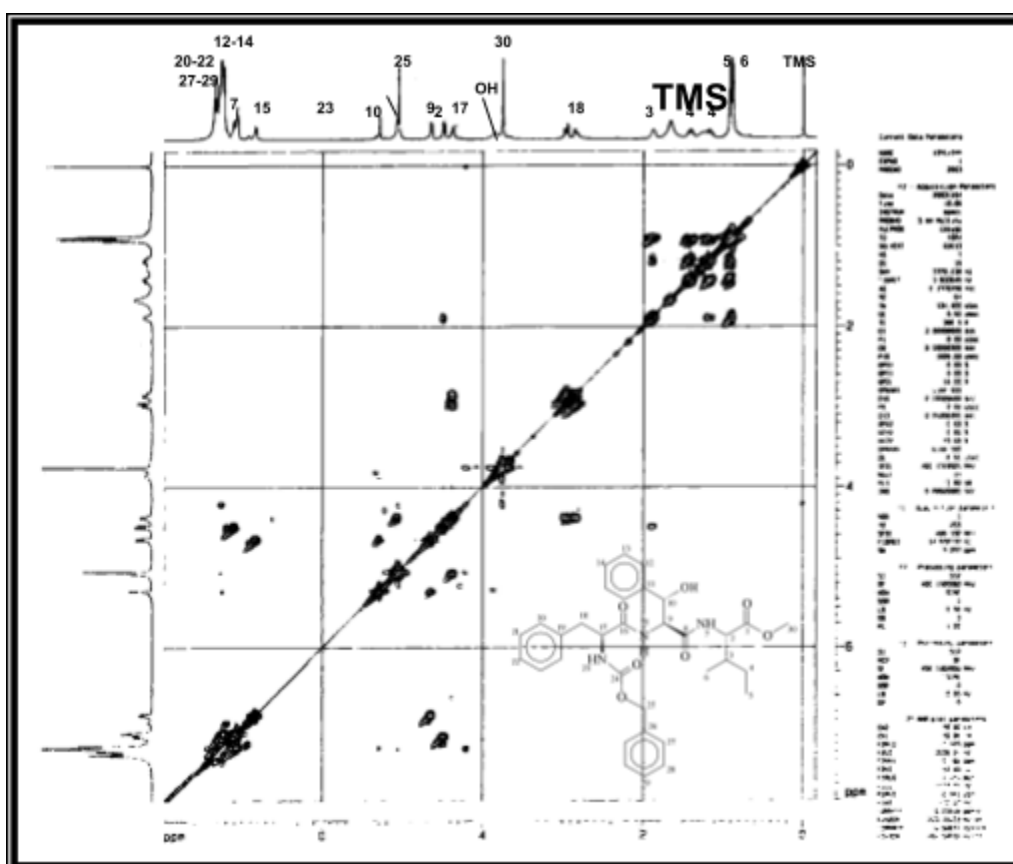


Figura 18- Espectro de COSY45^oH-¹H do tripeptídeo Z-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe (**59a**).

O experimento mostra ainda, a correlação do hidrogênio H-4' um multipeto em $\delta=0,90$ ppm com o multipeto de H-4 em $\delta=1,24$ ppm e deles com o sinal de H-3 em $\delta=2,16$ ppm. O mesmo acontece com os

hidrogênios ligados ao carbono C-18, cujos hidrogênios correlacionam entre si (18 e 18') e com o hidrogênio do carbono C-17, provando que os hidrogênios pertencentes aos grupos metilênicos dos resíduos isoleucina e fenilalanina são realmente quimicamente não equivalentes e que acoplam entre si e com o vizinho, possuindo duas ou mais constantes de acoplamento. Exemplo disso, é o caso do H-18 que possui ($J_{18-17} = 6,34$ Hz; $J_{18'-17} = 7,40$ Hz e $J_{18-18'} = 14,00$ Hz).

4.5.2- Síntese do tripeptídeo *Z-L-Phe-Treo-D-Pheser-L-Ile-OMe* (**59b**)

Do mesmo modo que (**59a**) foi sintetizado a partir do dipeptídeo (**54a**) puro, o tripeptídeo (**59b**) foi obtido a partir de (**54b**) pelo método da DCCI/HOBt na forma de um óleo viscoso com um rendimento de 69%, o qual após pré-purificação por cromatografia em coluna, pode ser cristalizado pela dissolução em clorofórmio e adição de éter etílico, formando um sólido branco de $pf = 167-168^{\circ}C$, cujas análises de RMN de 1H e ^{13}C (figuras 33 (a) e 33 (b)) confirmaram a estrutura do tripeptídeo (**59b**).

4.5.2.1- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

A atribuição dos sinais de prótons referentes ao tripeptídeo (**59b**) demonstra pouca diferença quando comparada ao seu diastereoisômero (**59a**). No que se refere aos deslocamentos químicos destes núcleos, nota-se na região entre 2,74-2,98 ppm (duplos dubletos

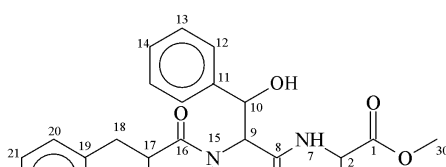
característicos do grupo metileno CH₂-18) um melhor desdobramento dos sinais, possivelmente devido a sua conformação adotada, embora para CH-9 e CH-10 (núcleos responsáveis pela formação dos dois diastereoisômeros) que absorvem em 4,71 e 5,33 ppm seja observada uma pior resolução de seus sinais.

Ainda referente a esta unidade, observou-se que o duplo dubleto característico do CH-9, apresenta uma constante de acoplamento

($J_{9,15} = 6,60$ Hz; $J_{9,10} = 2,12$ Hz); enquanto que para **(59a)** este mesmo CH-9 apresenta ($J_{9,15} = 7,60$ Hz; $J_{9,10} = 2,96$ Hz). Já o CH-10 encontra-se na forma de um sinal largo, não permitindo a observação do desdobramento entre CH-10 e CH-9. Em (δ)5,03 ppm encontramos também, um quarteto (que na verdade é um dubleto de dubleto), relativo aos hidrogênios do grupo metileno CH₂-25 que em **(59a)** está na forma de um singlete bem distinto, pode-se encontrar ainda, entre 7,17 e 7,34 ppm os sinais característicos dos hidrogênios aromáticos que aparecem na forma de um multipletto, com integração correspondente a 15 hidrogênios.

Na análise do espectro de RMN de ¹³C, pôde-se visualizar as diferenças entre os deslocamentos químicos dos tripeptídeos **(59a)** e **(59b)**, principalmente para as carbonilas (C-1), (C-8) e (C-16) que se encontram deslocadas em aproximadamente 0,450 ppm para campos mais baixos no espectro do tripeptídeo **(59b)**, cujos valores encontram-se na tabela 6 a seguir.

TABELA 6: - Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para os tripeptídeos Z-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe (**59a**) e Z-L-Phe-Treo-D-Pheser-L-Ile-OMe (**59b**).



	(59a)	(59b)	
Átomo	δ ^1H ^a ; multiplicidade J(Hz)	δ ^{13}C ^b	δ ^1H ^a ; multiplicidade J(Hz)
1	-	171,606	-
2	4,48 dd; $J_{2,7}=8,30$; $J_{2,3}=5,12$	56,787	4,49 dd; $J_{2,7}=8,24$; $J_{2,3}=4,88$
3	2,16 m	37,598	1,87 m
4; 4'	1,24 m; 0,90 m	25,093	1,38 m; 1,15 m
5	0,91 t; sinal sobreposto	11,523	0,88 t; $J_{5,4}=7,4$
6	0,89 d; sinal sobreposto	15,451	0,91 d; $J_{6,3}=6,8$
7	7,10 d; $J_{7,2}=8,30$	-	7,10 d; $J_{7,2}=8,30$
8	-	170,136	-
9	4,64 dd; $J_{9,15}=7,68$; $J_{9,10}=2,96$	57,556	4,71 dd*; $J_{9,10}=2,12$; $J_{9,15}=6,60$
10	5,29 d; $J_{10,9}=2,96$	71,829	5,33 d*
11	-	138,871	-
12; 13; 14	7,09-7,37 sinais difíceis atribuição	125,730 128,293 127,932	7,18-7,34 sinais difíceis atribuição
15	6,83 d; $J_{15,9}=7,68$	-	6,98 d; $J_{15,9}=7,9$
16	-	171,799	-
17	4,37dd; $J_{17,23}=13,68$; $J_{17,18}=6,34$	56,217	4,30 dd; $J_{17,18}=5,68$; $J_{17,23}=6,80$; $J_{17,18}=7,90$
18, 18'	2,96dd; 2,83dd; $J_{18,17}=6,34$; $J_{18',17}=7,40$; $J_{18,18'}=14,00$	37,806	2,96 dd; 2,77 dd; $J_{18,17}=5,68$; $J_{18',17}=7,90$; $J_{18,18'}=14,00$
19	-	135,864	-
20; 21; 22	7,09-7,37 sinais difíceis atribuição	127,191 128,871 128,576	7,18-7,34 sinais difíceis atribuição
23	5,07d [#] ; $J_{23,17}=13,68$	-	5,28 d; $J_{23,17}=6,80$
24	-	155,960	-
25	5,28 s	67,252	5,03q [#] ; $J_{25,25'}=12,30$
26	-	135,915	-
27; 28; 29	7,09-7,37 sinais difíceis atribuição	128,034 129,046 128,406	7,18-7,34 sinais difíceis atribuição
30	3,74 s	52,145	3,66 s

^a) Espectro obtido em CDCl_3 a 400 MHz. ^b) Espectro obtido em CDCl_3 a 100 MHz.

Todas as atribuições dos núcleos de ^1H e ^{13}C feitas para o tripeptídeo (**59b**), foram confirmadas, assim como realizado para

(**59a**), através dos espectros de correlações bidimensionais COSY 45° ¹H-¹H, HMQC ¹H-¹³C e HMBC ¹H-¹³C. No entanto em ambos os casos (tripeptídeos (**59a**) e (**59b**)), a configuração do β-hidróxi aminoácido (*Treo*-fenilserina) só foi definida após a análise do hidrolisado desses por cromatografia gasosa enantiosseletiva que será discutida mais adiante.

4.5.3- Síntese do tripeptídeo *Z-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-OMe* (**60**)

O acoplamento entre o dipeptídeo (**55**) e o éster metílico do aminoácido isoleucina, seguiu a mesma metodologia adotada durante síntese do tripeptídeo (**59**), obtendo-se porém o tripeptídeo (**60**) na forma de sua mistura diastereoisômérica *Z-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-OMe* com um rendimento de 60%.

Contudo, devido à pequena quantidade do dipeptídeo (**55**) (causada pelos baixos rendimentos da reação de obtenção do aminoácido *eritro* fenilserina), optou-se por reduzir possíveis perdas, evitando-se ao máximo as etapas de separação e purificação. Para isso, os subseqüentes passos da síntese foram realizados com a mistura diastereoisomérica e sem a completa elucidação dos seus intermediários (confirmados apenas pelas análises de CCD, realizadas após cada reação), sendo que as análises de RMN foram realizadas somente em sua última etapa de dimetilação, sendo esse um procedimento pouco comum à síntese peptídica em solução.

**4.5.4- Síntese dos tripeptídeos *N*-metilados
Z-Me-L-Phe-*Treo*-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (**61**) e
Z-Me-L-Phe-*Eritro*-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (**62**).**

Com base nos excelentes resultados obtidos durante a formação tanto dos dipeptídeos *N*-metilados (**56**) e (**57**), quanto dos tripeptídeos (**59**) e (**60**) pela utilização do método da DCCI/HOBt, preferiu-se por utilizar essa mesma metodologia para o acoplamento dos dipeptídeos *N*-metilados (**56**) e (**57**) com o éster metílico do aminoácido isoleucina (**58**), formando os tripeptídeos (**61**) e (**62**) com os respectivos rendimentos de 65% e 48% na forma de óleos amarelados de difícil separação da DCCU (sub produto das reações de acoplamento).

Essa mistura diastereoisomérica dos tripeptídeos *N*-metilados (**61**) e (**62**), assim como seus precursores dipeptídicos, apresenta-se homogênea em CCD, mas com sinais distinguíveis por experimentos de ressonância magnética nuclear.

4.5.4.1- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

A análise dos tripeptídeos (**61**) e (**62**) por experimentos de RMN de ¹H (figuras 35 e 36 em anexos) foi pouco elucidativa no que se refere a uma completa caracterização desses núcleos, pois apresenta uma grande sobreposição dos sinais da mistura diastereoisomérica.

Entre os sinais característicos de cada aminoácido formador dos pares

(L-D-L e L-L-L), os mais facilmente distinguíveis são um dubleto em 0,74 ppm com ($J_{6,3} = 6,80$ Hz) pertencente a metila (CH_3 -6) do diastereoisômero que se encontra em maior proporção. Os singletos referentes aos hidrogênios metílicos são igualmente bem diferenciados, encontrando-se em deslocamentos químicos de (δ) 2,24 e 2,57 ppm para os grupos N-CH_3 e 3,61 e 3,66 ppm para o O-CH_3 do tripeptídeo que contém a forma *Treo*-fenilserina; enquanto que, para o que possui a forma *Eritro* temos (δ) de 2,31 e 2,74 ppm para os grupos N-CH_3 e o O-CH_3 3,70 e 3,74 ppm.

A análise dos núcleos de ^{13}C (figura 19) do tripeptídeo *Z*-Me-L-Phe-*Treo-D,L*-Pheser-L-Ile-OMe (**61**) (a exemplo), por experimentos de ressonância magnética nuclear facilita em muito a distinção entre os sinais diastereoisoméricos por sua proporcionalidade. Dentre as diferenças verificadas, nota-se em comparação ao tripeptídeo (**59**) a presença do sinal referente ao grupamento *N*-metil (N-CH_3 , C-23), que absorve na região de (δ) ≈ 30 ppm, o qual influencia mais sobre o carbono metilênico (CH_2 -18), que se desloca para campo mais alto entre (δ) de 33,7 a 33,8ppm, deixando clara a desblindagem causada pelo efeito estérico desse grupamento *N*-metil.

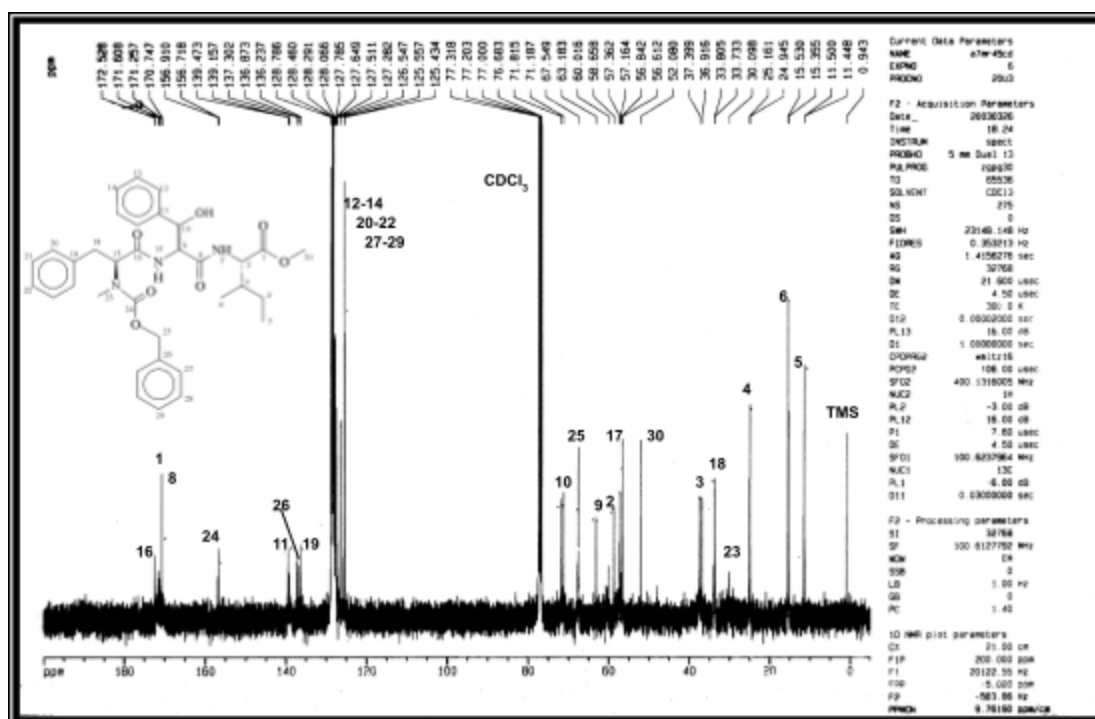
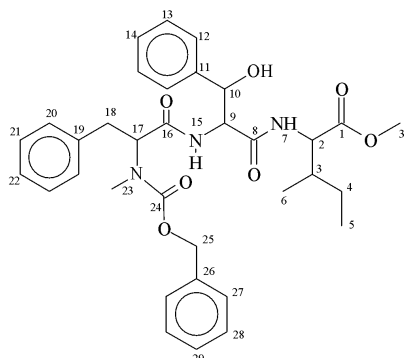


Figura 19- Espectro de RMN ^{13}C da mistura diastereoisomérica dos tripeptídeos *Z*-Me-L-Phe-*Treo*-*D,L*-Pheser-L-Ile-OMe (**61**).

Ainda visualiza-se, o carbono carbonílico (C-16) em (δ) de 172,528 ppm que também poderia sofrer com o forte efeito de (C-23) e no entanto parece não variar muito em relação aos seus análogos (**59a**) e (**59b**), os quais podem realizar pontes de hidrogênio com o próton amídicos (NH-23).

A comparação dos dados espectrais de deslocamentos químicos dos sinais de próton e carbono de cada tripeptídeo *N*-metilado, é facilmente visualizada nas tabelas 7 e 8 a seguir.

TABELA 7: - Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para a mistura



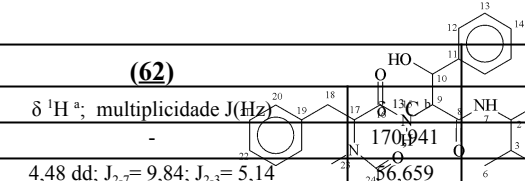
diastereoisomérica dos tripeptídeos
Z-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (**61**).

Átomo	(61)		(61')	
	δ ^1H ^a ; multiplicidade J(Hz)	δ ^{13}C ^b	δ ^1H ^a ; multiplicidade J(Hz)	δ ^{13}C ^b
1	-	171,608	-	171,257
2	4,60 dd*; $J_{2,7} = 7,60$	57,164	4,56 dd*; $J_{2,7} = 8,00$, $J_{2,3} = 2,40$	57,362
3	1,77 m	37,399	1,87 m	36,916
4; 4'	1,28 m; 0,99 m	24,945	1,38 m; 1,15 m	25,161
5	0,82 t*	11,500	0,82 t*	11,448
6	0,74 d*	15,530	0,84 d*	15,355
7	7,05 d*; $J_{7,2} = 7,60$	-	7,05 d* $J_{7,2} = 8,00$	-
8	-	170,747	-	170,747
9	4,85 dd*	58,658	4,85 dd*	60,016
10	5,30 d*	71,187	5,32 d*	71,815
11	-	139,473	-	139,157
12; 13; 14	7,09-7,26 sinais difíceis atribuição	125,557 127,785 127,282	7,09-7,26 sinais difíceis atribuição	125,434 127,785 127,282
15	6,95 d*	-	6,98 d*	-
16	-	172,528	-	172,528
17	4,42 dd; $J_{17,18} = 8,00$; $J_{17,18'} = 13,20$	56,612	4,42 dd; $J_{17,18} = 8,00$; $J_{17,18'} = 13,20$	56,842
18; 18'	3,18, 3,15, 3,11; ddd; $J_{18,17} = 5,20$; $J_{18',17} = 5,60$; $J_{18,18'} = 6,00$	33,733	3,18, 3,15, 3,11; ddd; $J_{18,17} = 5,20$; $J_{18',17} = 5,60$; $J_{18,18'} = 6,00$	33,805
19	-	136,237	-	136,237
20; 21; 22	7,09-7,26 sinais difíceis atribuição	126,547 128,460 128,291	7,09-7,26 sinais difíceis atribuição	126,547 128,460 128,291
23	2,57 s	30,089	2,24 s	30,089
24	-	156,718	-	156,910
25	5,08 q*	67,549	5,05 q [#]	67,549
26	-	137,302	-	136,873
27; 28; 29	7,09-7,26 sinais difíceis atribuição	127,649 128,786 128,066	7,09-7,26 sinais difíceis atribuição	127,649 128,786 128,066
30	3,61 s	52,080	3,66 s	52,080

^a) Espectro obtido em CDCl_3 a 400 MHz. ^b) Espectro obtido em CDCl_3 a 100 MHz.

* Sinais sobrepostos ou distorcidos

TABELA 8: - Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para a mistura diastereoisomérica dos tripeptídeos Z-Me-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (**62**) .

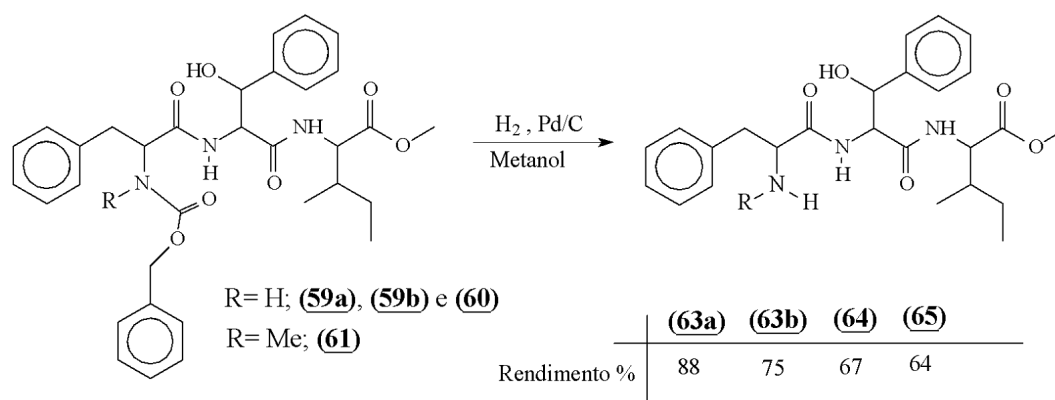
Átomo			$\delta^{13}\text{C}^b$
	$\delta^1\text{H}^a$; multiplicidade J(Hz)	$\delta^1\text{H}^a$; multiplicidade J(Hz)	
1	-	170,123	170,123
2	4,48 dd; $J_{2,7}=9,84$; $J_{2,3}=5,14$	56,659	56,659
3	1,84 m	36,851	36,851
4; 4'	1,31 m; 1,10 m	25,017	25,017
5	0,90 t*	11,554	11,554
6	0,81 d; $J_{6,3}=6,80$	15,635	15,635
7	7,10 d; $J_{7,2}=9,84$	-	-
8	-	169,551	169,551
9	4,93 dd*	57,275	57,203
10	5,37 d*	71,213	71,213
11	-	139,117	139,117
12; 13; 14	7,24-7,45 sinais difíceis atribuição	125,438 128,314 127,840	125,553 128,314 127,630
15	5,35 d*	-	-
16	-	171,613	171,613
17	4,71 dd*; $J_{17,18}=10,24$, $J_{17,18}=6,16$	55,937	55,937
18, 18'	3,19; 2,96* dd $J_{18,17}=6,16$; $J_{18',17}=10,24$; $J_{18,18'}=15,96$	33,772	33,878
19	-	136,606	136,140
20; 21; 22	7,24-7,45 sinais difíceis atribuição	126,523 128,529 128,444	126,523 128,523 128,444
23	2,74 s	29,611	29,893
24	-	156,278	155,428
25	5,07 q*	67,293	67,619
26	-	137,684	137,298
27; 28; 29	7,24-7,45 sinais difíceis atribuição	128,165 129,328 128,364	128,165 129,328 128,364
30	3,74 s	52,137	52,137

^a) Espectro obtido em CDCl_3 , a 400 MHz. ^b) Espectro obtido em CDCl_3 , a 100 MHz.

* Sinais sobrepostos ou distorcidos

4.6- Desproteção do grupamento Z (Carbobenzoxi) dos tripeptídeos

Objetivando a remoção do grupamento (Z)⁸⁸, protetor da função amino da fenilalanina, os tripeptídeos foram submetidos a uma reação de hidrogenação catalítica (H₂, 10% Pd/C) individualmente (esquema 25). Essas reações forneceram os tripeptídeos *N*-metilados e aqueles com a função amino totalmente livre (NH₂) necessária para a futura reação de dimetilação.



Esquema 25

4.6.1- Obtenção dos tripeptídeos NH₂-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe **(63a)** e NH₂-L-Phe-Treo-D-Pheser-L-Ile-OMe **(63b)**

A remoção do grupamento (Z) dos tripeptídeos puros **(59a)** e **(59b)** pela passagem de hidrogênio (por borbulhamento) à temperatura ambiente em uma solução metanólica desses tripeptídeos com quantidades catalíticas de Pd/C forneceu após purificação em coluna de celite (para remoção do Pd/C) os tripeptídeos **(63a)**, na forma de

um sólido branco e **(63b)**, na forma de um óleo transparente, com rendimentos de 88 e 75% respectivamente.

O progresso da reação pôde ser acompanhado por CCD, eluídas em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ e reveladas com solução de ninidrina a 0,2% em EtOH (reagente seletivo para a função amino), sendo confirmada a completa desproteção, pelos experimentos de RMN ^1H e ^{13}C , onde nota-se o desaparecimento dos sinais característicos do grupamento (Cbz).

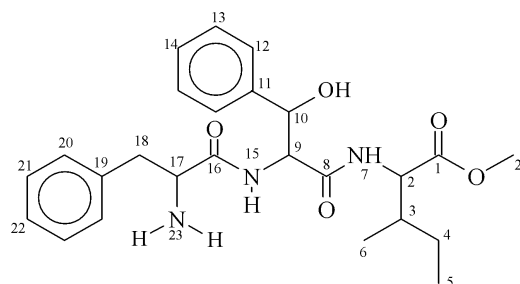
4.6.1.1- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

O espectro de RMN ^1H dos tripeptídeos **(63a)** e **(63b)** revela além dos valores de deslocamentos químicos (tabela 10), o efeito do grupamento (NH_2) sobre o hidrogênio ($\text{CH-}\alpha$) da fenilalanina, o qual apresenta um ($\Delta\delta$) de 0,70 ppm para campo alto, quando comparado ao tripeptídeo **(59)**.

Já no espectro de ^{13}C tem-se a confirmação das estruturas pelo desaparecimento dos sinais a aproximadamente 156 ppm típicos carbonos carbonílicos (C-24), o mesmo acontece com os carbonos aromáticos (C-26,27,28 e 29) e metilênicos (C-25), todos pertencentes ao grupo protetor Cbz que compunha os tripeptídeos **(59a)** e **(59b)**.

Aparentemente o carbono metilênico (C-18) é o que sofre maior efeito da presença da função amino (NH_2) livre, pois passa a absorver em campo mais alto, cerca de 2 ppm em relação aos peptídeos protegidos.

TABELA 9: - Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para os tripeptídeos $\text{NH}_2\text{-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe}$ (**63a**) e $\text{NH}_2\text{-L-Phe-Treo-D-Pheser-L-Ile-OMe}$ (**63b**)



Átomo	(63a)		(63b)	
	δ ^1H ^a ; multiplicidade J(Hz)	δ ^{13}C ^b	δ ^1H ^a ; multiplicidade J(Hz)	δ ^{13}C ^b
1	-	171,660	-	171,229
2	4,48 dd; $J_{2-7}=8,30$; $J_{2-3}=3,16$	56,704	4,44 dd; $J_{2-7}=7,44$; $J_{2-3}=5,04$	56,963
3	1,90 m	37,602	1,84 m	37,193
4; 4'	1,44 m; 1,16 m	25,073	1,25 m; 1,18 m	25,191
5	0,90 t; $J_{5-4}=6,52$	11,529	0,91 t; $J_{5-4}=7,8$	11,499
6	0,88d; $J_{6-3}=6,84$	15,480	0,81 d; $J_{6-3}=6,8$	15,622
7	7,30 d*	-	7,15 d; $J_{7-2}=7,44$	-
8	-	171,035	-	170,737
9	4,63 dd; $J_{9-15}=7,84$; $J_{9-10}=2,60$	57,339	4,60 dd*; $J_{9-10}=2,32$; $J_{9-15}=6,04$ (sinal alargado)	58,190
10	5,36 d; $J_{10-9}=2,60$	71,921	5,35 d; $J_{10-9}=2,32$	72,243
11	-	139,165	-	139,463
12; 13; 14	7,24 - 7,33 sinais difícil atribuição	125,874 128,296 127,804	7,19-7,49 sinais de difícil atribuição	126,036 128,337 128,779
15	8,21 d; $J_{15-9}=7,84$	-	8,31 d; $J_{15-9}=6,04$	-
16	-	175,466	-	172,219
17	3,58 dd; $J_{17-18}=3,85$; $J_{17-23}=9,44$	56,224	3,60 d; $J_{17-18}=3,76$; $J_{17-18'}=7,90$	56,194
18, 18'	3,00; 2,27; dd; $J_{18-17}=4,00$; $J_{18'-17}=9,50$; $J_{18-18'}=13,70$	40,411	3,20; 2,67; dd; $J_{18-17}=3,76$; $J_{18'-17}=7,90$; $J_{18-18'}=14,00$	39,890
19	-	137,227	-	136,889
20; 21; 22	7,06-7,32 sinais de difícil atribuição	126,894 129,141 128,740	7,19-7,49 sinais de difícil atribuição	127,028 129,319 128,774
23	-	-	-	-
24	3,75 s	52,144	3,65s	52,165

^a) Espectro obtido em CDCl_3 a 400 MHz.

^b) Espectro obtido em CDCl_3 a 100 MHz.

* Sinais sobrepostos ou distorcidos

4.6.2- Obtenção do tripeptídeo NH₂-L-Phe-*Eritro*-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (**64**)

Embora a reação de hidrogenação catalítica (H₂, 10% Pd/C) do tripeptídeo (**60**), tenha ocorrido com um rendimento consideravelmente bom (67%), formando um produto oleoso que se solidifica muito lentamente após a filtração em celite, este só foi analisado por CCD (ver item 4.5.3), onde apresenta após revelação com o reagente seletivo, duas manchas com (*R_f*= 0,20 e 0,25) e de coloração característica da função amino livre, consideradas como sendo devido a mistura diastereoisomérica do tripeptídeo (**64**).

4.6.3- Obtenção dos tripeptídeos N-Me-L-Phe-*Treo*-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (**65**)

Seguindo a metodologia geral de desproteção (item 4.6), a mistura diastereoisomérica do tripeptídeo (**61**), foi cataliticamente hidrogenada com (H₂, 10% Pd/C), fornecendo assim o tripeptídeo *N*-metilado (**65**), com um rendimento de 64%, na forma de uma massa oleosa amarelada e que quando aplicado em CCD (eluída em vários sistemas de solventes) apresenta-se como uma mancha homogênea que revela com o reagente modificado de Dragendorff.

Com o objetivo de separar os pares diastereoisoméricos do tripeptídeo (**65**), de maneira a obtê-los de forma pura, realizou-se a tentativa de uma precipitação seletiva (dissolução em uma mistura de

clorofórmio e acetona com a adição lenta de éter de petróleo), pela qual gerou-se um floculado branco de difícil separação, que se solidifica após secar a pressão reduzida, mas que mantém-se na forma de mistura.

4.6.3.1- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Mesmo estando na forma de mistura, pode-se perfeitamente distinguir os sinais de cada componente, principalmente pela análise de RMN de ^{13}C . Contudo alguns sinais de hidrogênio, podem além de ajudar na diferenciação, complementar caracterização do tripeptídeo.

Entre os sinais diferenciáveis, a análise (do campo baixo ao mais alto) do espectro de RMN ^1H (figura 20), mostra um sinal na forma de um dubleto com área de integração para um hidrogênio e que absorve em $(\delta) = 8,75\text{ppm}$ e possui ($J_{15,9} = 7,88\text{ Hz}$) característico do (NH-15) de um dos diastereoisômeros, enquanto que para o outro, este mesmo (NH-15) esta em $(\delta) = 7,69\text{ ppm}$ e possui ($J_{15,9} = 7,84\text{ Hz}$). Na região compreendida entre os valores de $(\delta) 7,16$ e $7,70\text{ ppm}$, temos vários sinais sobrepostos, mas com integração para vinte hidrogênios aromáticos.

Os hidrogênios CH-10 e CH-9 pertencentes ao aminoácido central treó β -fenilserina encontram-se desdobrados em dubletos a $(\delta) 5,24$ ($J_{10,9} = 4,20\text{ Hz}$) e $5,19\text{ ppm}$ ($J_{10,9} = 3,64\text{ Hz}$) e duplo dubletos em $(\delta) 4,98$ ($J_{9,15} = 8,08$ e $J_{9,10} = 4,20\text{ Hz}$) e $4,85\text{ ppm}$ ($J_{9,15} = 7,60$ e $J_{9,10} = 3,64\text{ Hz}$) respectivamente.

Seguindo em direção a campo alto encontramos os demais sinais, como os singletos dos hidrogênios metílicos (CH_3 -24) em (δ)= 3,65 e 3,64 ppm) e (CH_3 -23) a (δ)= 2,57 e 2,26 ppm), os outros sinais cujos valores podem ser vistos na tabela 10, se sobrepõem de maneira que não se pode diferencia-los totalmente.

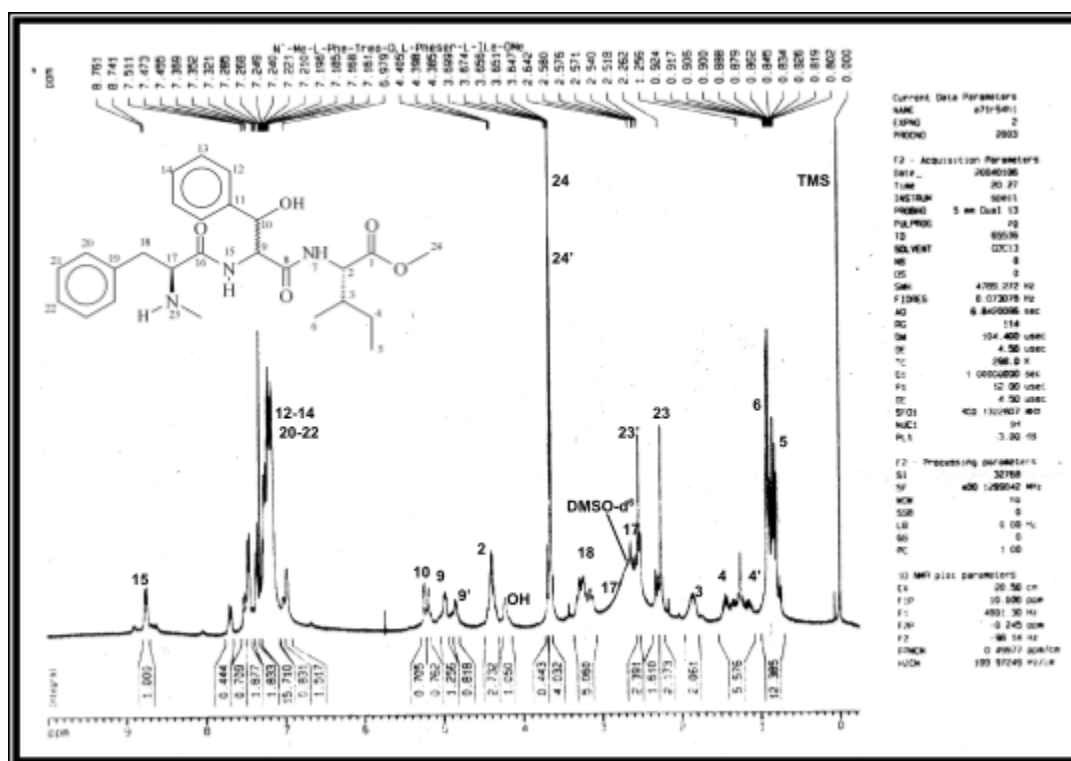


Figura 20- Espectro de RMN de ^1H da mistura diastereoisomérica dos tripeptídeos $\text{N-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-L-Ile-OMe}$ (**65**).

Pelos experimentos de RMN de ^{13}C (figura 21) e DEPT 135° , tem-se igualmente ao item 4.6.1.1, a confirmação da completa desproteção do tripeptídeo (**65**), podendo-se ainda constatar o efeito diferenciado do carbono metílico (C-23), que aparece com intensidade

bem inferior aos carbonos igualmente metílicos (C-5, C-6 e C-24), este fato é decorrente de um provável tempo de relaxação (T_1) mais longo ou a um fraco efeito de NOE⁹⁰.

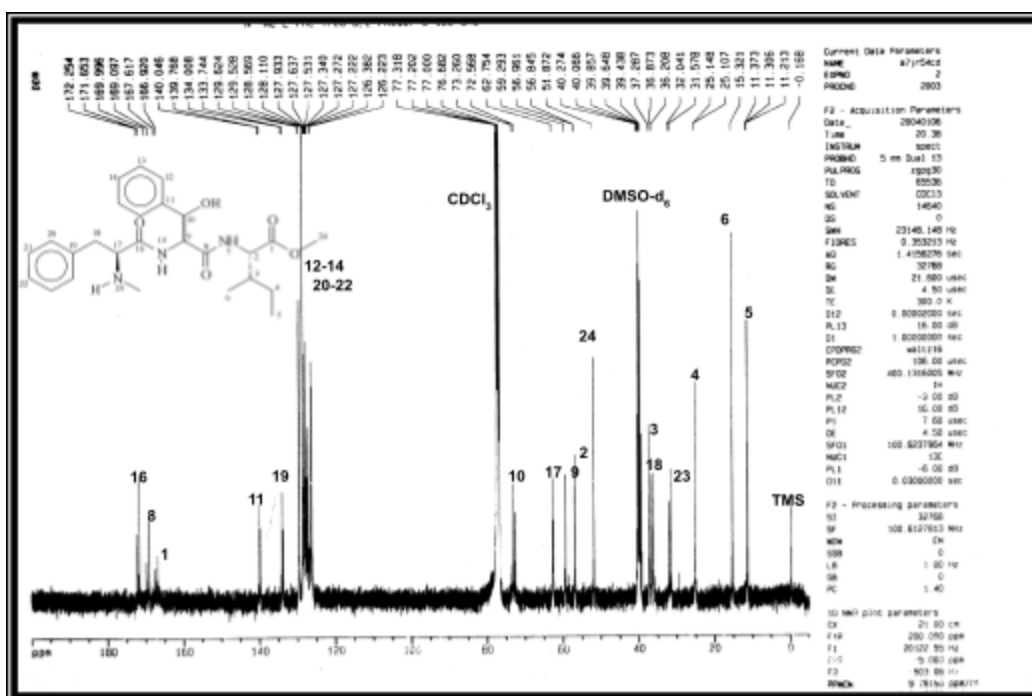
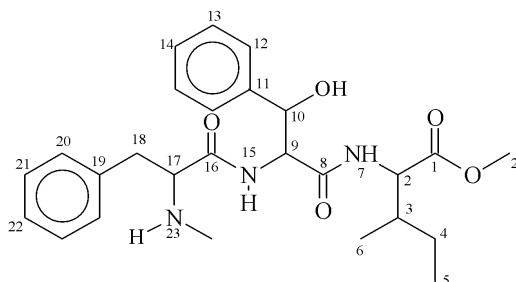


Figura 21- Espectro de RMN de ^{13}C da mistura diastereoisomérica dos tripeptídeos N-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (**65**).

TABELA 10: - Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para a mistura diastereoisomérica dos tripeptídeos N-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (**65**)



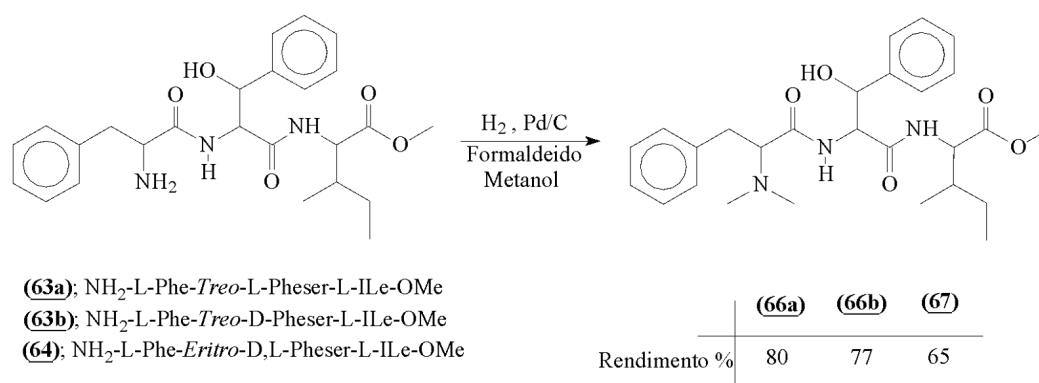
Átomo	(65)		(65')	
	δ ^1H ^a ; multiplicidade J(Hz)	δ ^{13}C ^b	δ ^1H ^a ; multiplicidade J(Hz)	δ ^{13}C ^b
1	-	166,920		167,617
2	4,44 dd*	56,845	4,44 dd*	56,960
3	1,86 m	37,287	1,86 m	36,873
4; 4'	1,43 m; 1,28 m	25,107	1,43 m; 1,28 m	25,147
5	0,80-0,92 t*	11,373	0,80 t*	11,306
6	0,80-0,92 d*	15,321	0,92 d*	15,321
7	6,98d*	-	6,98 d*	-
8	-	169,996	-	169,097
9	4,98 dd; $J_{9,15}=7,88$; $J_{9,10}=4,24$	59,292	4,85 dd; $J_{9,15}=7,60$; $J_{9,10}=3,64$	59,292
10	5,24 d; $J_{10,9}=4,24$	73,260	5,18 d; $J_{10,9}=3,64$	72,568
11	-	140,046	-	139,768
12; 13; 14	7,16 - 7,70 sinais difícil atribuição	126,382 127,845 127,585	7,16-7,70 sinais de difícil atribuição	126,223 127,646 127,533
15	8,75 d; $J_{15,9}=7,88$	-	8,75 d; $J_{15,9}=7,88$	-
16	-	171,653	-	172,254
17	2,31; 2,58; d*	62,753	2,31; 2,58; d*	62,490
18, 18'	3,25; dd*	36,208	3,25dd*	36,208
19	-	134,208	-	133,744
20; 21; 22	7,16-7,70 sinais de difícil atribuição	126,837 129,528 128,569	7,16-7,70 sinais de difícil atribuição	127,222 129,624 128,569
23	2,26 s	31,577	2,57 s	32,040
24	3,65 s	51,872	3,64s	51,872

^a) Espectro obtido em CDCl_3 a 400 MHz. ^b) Espectro obtido em CDCl_3 a 100 MHz.

*Sinais sobrepostos ou distorcidos

4.7- Reação de *N,N*-dimetilação dos tripeptídeos

A reação de *N,N*-dimetilação dos tripeptídeos **(63a)**, **(63b)** e **(64)**, foi realizada através da condensação redutiva do aldeído fórmico com a função amino (NH_2)⁹¹ dos respectivos tripeptídeos em presença de hidrogênio (sob pressão de 3 psi) e catalisador (10% Pd/C) como demonstrado no esquema 26.



Esquema 26

4.7.1- Preparação dos tripeptídeos $\text{N,N}-(\text{Me})_2$ -L-Phe-*Treo*-L-Pheser-L-Ile-OMe **(66a)** e $\text{N,N}-(\text{Me})_2$ -L-Phe-*Treo*-D-Pheser-L-Ile-OMe **(66b)**

Os tripeptídeos NH_2 -L-Phe-*Treo*-L-Pheser-L-Ile-OMe **(63a)** e NH_2 -L-Phe-*Treo*-D-Pheser-L-Ile-OMe **(63b)**, foram submetidos as condições de di-alquilação mencionadas anteriormente, fornecendo após 24 horas de reação, acompanhada por CCD, um único produto de $R_f = 0,4$ e que assim como os tripeptídeos *N*-metilados, revela com coloração alaranjada frente ao reagente modificado de Dragendorff.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Tanto o tripeptídeo (**66a**) quanto o (**66b**), apresenta-se na forma de um óleo que após purificação por cromatografia em coluna pode ser caracterizado pelas análises de RMN ^1H e ^{13}C .

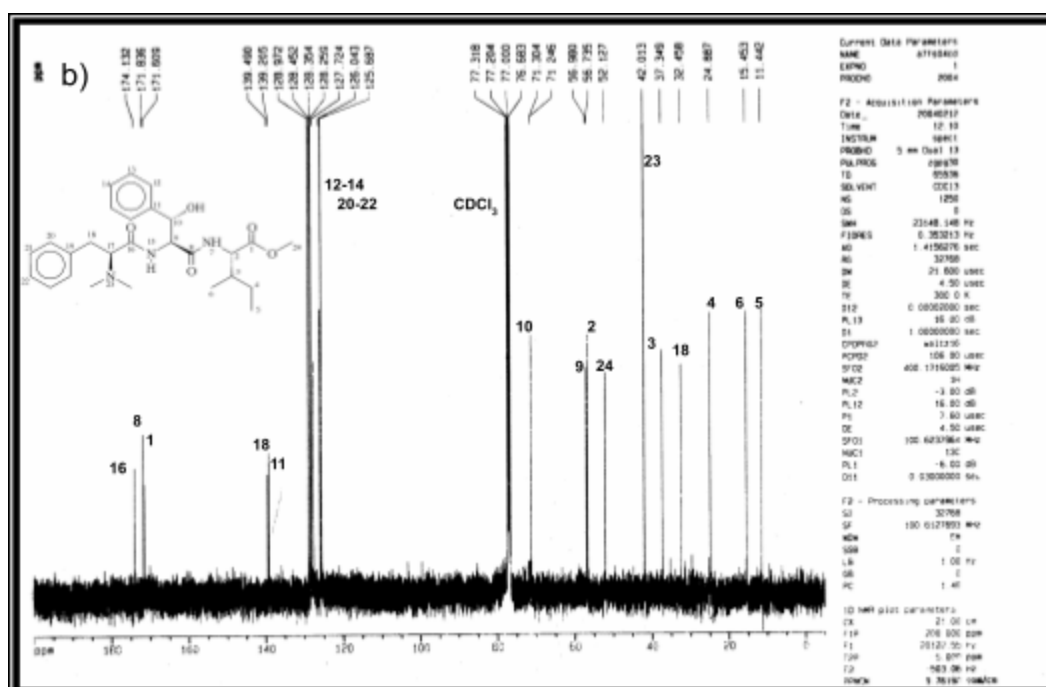
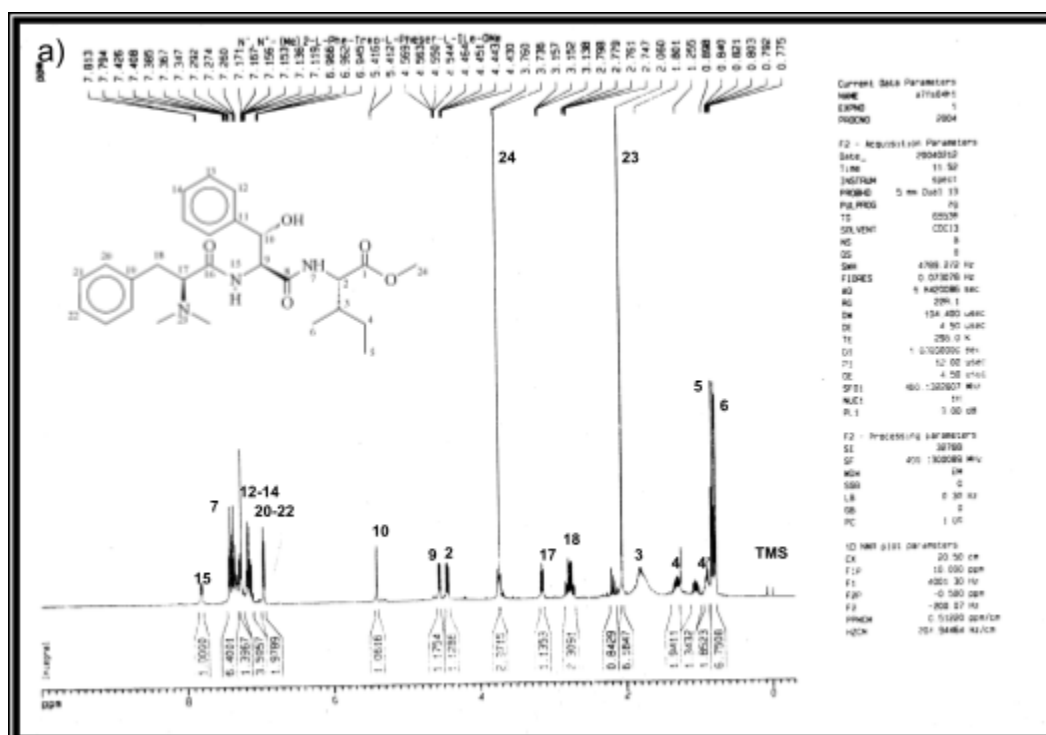


Figura 22- Espectros de RMN ^1H (a) e ^{13}C (b) do tripeptídeo
N,N-(Me) $_2$ -L-Phe-*Treo*-L-Pheser-L-Ile-OMe (**66a**).

4.7.1.1- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

A tabela 11 mostra os resultados obtidos através dos experimentos de RMN ^1H e ^{13}C os quais podem ser confirmados por técnicas bidimensionais, como as de COSY 45° ^1H - ^1H (figura 23), HMQC ^1H - ^{13}C e HMBC ^1H - ^{13}C (figuras 38 (d) e 38 (e)) realizadas para o tripeptídeo N,N-(Me) $_2$ -L-Phe-*Treo*-L-Pheser-L-Ile-OMe (**66a**).

No espectro de ^1H do tripeptídeo (**66a**) (figura 22), observa-se na região entre 0,78 e 0,82 ppm, um sinal com a forma de um tripleto, sobreposto a um dubleto, esse sinal possui integração para seis hidrogênios, sendo caracterizados como pertencentes as metilas do resíduo isoleucina. Já em 2,06 ppm temos um sinal singleto com igual integração de seis hidrogênios, sugerindo assim a completa dimetilação da função (NH $_2$) do aminoácido terminal fenilalanina, e ainda na forma de singleto, tem-se em 3,73 ppm o sinal dos três hidrogênios da metoxila do éster da isoleucina.

Observa-se também entre 6,94-7,38 ppm vários sinais correspondentes aos dez hidrogênios aromáticos dos aminoácidos β -fenilserina e fenilalanina, e como sinal em campo mais baixo (δ) = 7,80 ppm, tem-se o dubleto referente ao hidrogênio amídico (NH-15).

O experimento de ^{13}C (figura 22), fornece como principal diferença entre esse mesmo tripeptídeo (**66a**) e seu precursor desprotegido, a presença do sinal em (δ) = 42,013 ppm característico do grupo metílico (C-23), e ainda se comparado aos análogos

N-metilados, temos uma considerável variação nos valores de (δ) dos carbonos (C-1), (C-8), (C-9), (C-10) e (C-16).

No espectro de COSY 45° do tripeptídeo dimetilado (**66a**), pode-se observar os três sistemas de “*spins*” característicos dos seus aminoácidos formadores, destacando-se os sistemas dos aminoácidos fenilalanina (terminal) e β -fenilserina (central), pelos quais, confirma-se a atribuição do hidrogênio amídico (NH-15) (δ) = 7,80 ppm que possui correlação com o hidrogênio metínico (CH-9) (δ) = 4,55 ppm, o qual por sua vez tem correlação com o dubleto do (CH-10) que se encontra a (δ) = 5,41 ppm. Já no sistema de “*spins*” da fenilalanina tem-se a correlação do (CH-17) (δ) = 3,15 ppm com o duplo dubleto em (δ) = 2,77 ppm pertencente ao grupo metilênico (CH₂-18), ainda pode-se notar um pequeno sinal de correlação a longa distância do sinal em forma de singlete (δ) = 2,06 ppm, com estes mesmos sinais dos hidrogênios (CH-17) e (CH₂-18).

Nos espectros de HMQC e HMBC, tem-se além da confirmação dos hidrogênios diastereotópicos, descrita anteriormente, a correta atribuição dos sinais de ¹³C, principalmente dos sinais referentes as carbonilas (C-1), (C-8), (C-16) pelas suas correlações a longas distâncias via ²J_{C-H} e ³J_{C-H} no experimento HMBC.

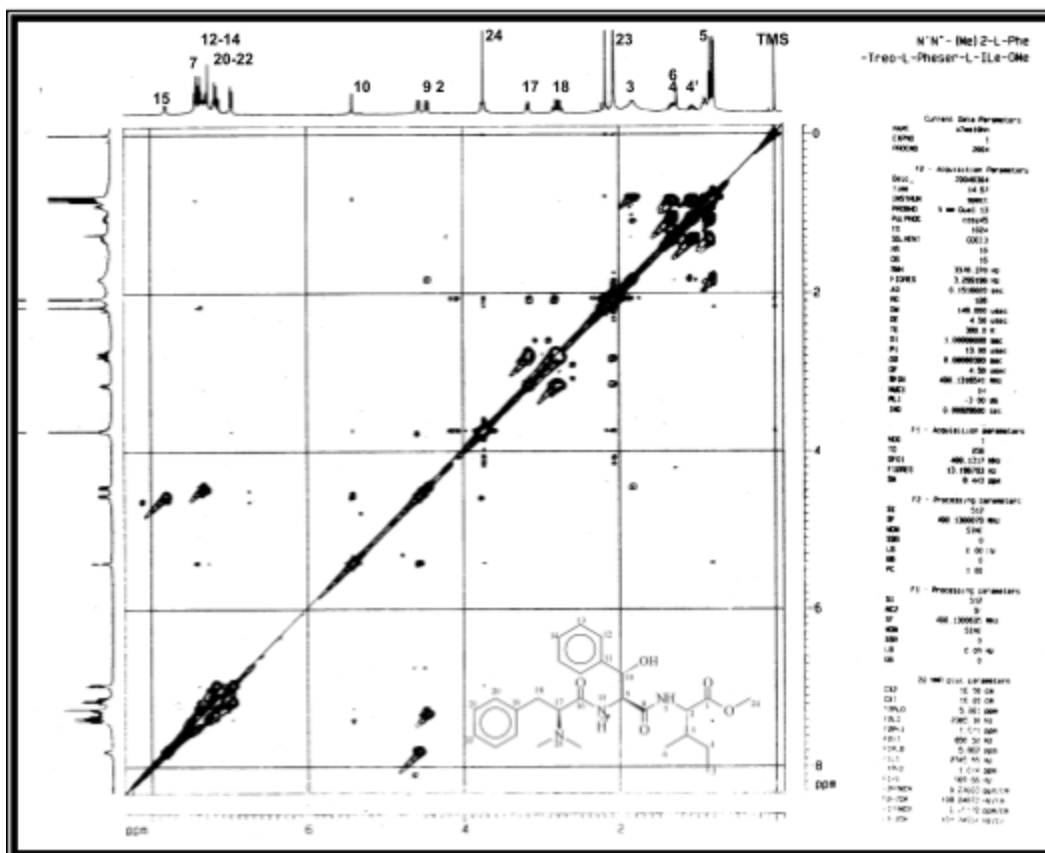
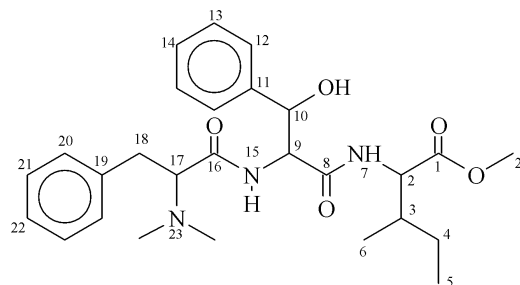


Figura 23- Espectros de COSY 45° ^1H - ^1H do tripeptídeo $\text{N},\text{N}-(\text{Me})_2\text{-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe}$ (**66a**).

TABELA 11: - Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para os tripeptídeos N,N -(Me) $_2$ -L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe (**66a**) e N,N -(Me) $_2$ -L-Phe-Treo-D-Pheser-L-Ile-OMe (**66b**)



Átomo	(66a)		(66b)	
	δ ^1H ^a ; multiplicidade J(Hz)	δ ^{13}C ^b	δ ^1H ^a ; multiplicidade J(Hz)	δ ^{13}C ^b
1	-	171,609	-	171,076
2	4,44 dd; $J_{2,7}=8,32$; $J_{2,3}=5,12$	56,735	4,40 dd; $J_{2,7}=8,2$; $J_{2,3}=4,82$	56,829
3	1,81 m	37,349	1,84 m	37,377
4; 4'	1,30 m; 1,06 m	24,887	1,33 m; 1,12 m	25,191
5	0,82 t; $J_{5,4}=7,38$	11,442	0,84 t; $J_{5,4}=7,08$	11,547
6	0,78d; $J_{6,3}=6,88$	15,453	0,81 d; $J_{6,3}=6,84$	15,579
7	7,33 d; $J_{7,2}=8,32$	-	7,08 d; $J_{7,2}=8,2$	-
8	-	171,836	-	171,805
9	4,55 dd; $J_{9,15}=7,6$; $J_{9,10}=2,16$.	56,980	4,56 dd; $J_{9,10}=2,92$; $J_{9,15}=7,76$	57,865
10	5,41 d; $J_{10,9}=2,16$	71,304	5,23 d; $J_{10,9}=2,88$	71,848
11	-	139,205	-	139,202
12; 13; 14	7,18 – 7,38 sinais difíceis atribuição	125,687 128,259 127,724	7,13-7,27 sinais difíceis atribuição	125,720 128,319 127,712
15	7,80 d; $J_{15,9}=7,6$	-	7,73 d; $J_{15,9}=7,5$	-
16	-	174,132	-	171,076
17	3,15 dd; $J_{17,18}=5,76$; $J_{17,18'}=7,78$	71,246	3,19 dd*	70,142
18, 18'	2,77; dd; $J_{18,17}=5,76$; $J_{18',17}=7,78$; $J_{18,18'}=14,00$	32,458	3,06; 2,81; dd; $J_{18,17}=6,08$; $J_{18',17}=6,92$; $J_{18,18'}=14,08$	32,824
19	-	139,490	-	139,202
20; 21; 22	6,94-7,17 sinais difíceis atribuição	126,043 128,972 128,452	7,13-7,27 sinais difíceis atribuição	126,224 129,011 128,388
23	2,06 s	42,013	2,18 s	41,984
24	3,73 s	52,127	3,64 s	52,076

^a)Espectro obtido em CDCl_3 a 400 MHz. ^b) Espectro obtido em CDCl_3 a 100 MHz.

* Sinais sobrepostos ou distorcidos

4.7.2- Síntese do tripeptídeo *N,N*-(Me)₂-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (**67**)

A síntese do tripeptídeo *N,N*-dimetilado (**67**), segue o método geral de dimetilação, descrito anteriormente, só que em escala reduzida (ver item 4.5.3). E fornece após purificação por cromatografia em placa preparativa uma massa oleosa homogênea em CCD de $R_f = 0,3$ que não é suscetível de separação, por esta metodologia.

4.7.2.1- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

A análise do espectro de RMN ¹H (figura 39 (a)) da mistura diastereoisomérica dos tripeptídeos *N,N*-dimetilados (**67**) fornece vários sinais em sobreposição, de forma que se torna difícil à realização de uma análise detalhada do mesmo.

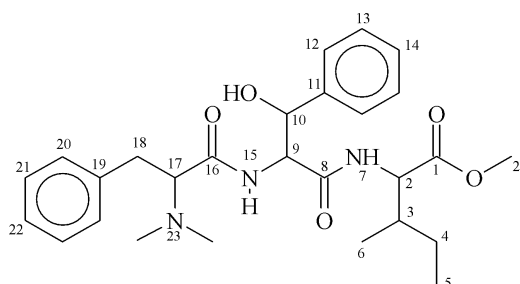
Entre os sinais que mais facilmente se distinguem, está o do duplo dubleto a (δ) = 0,63 ppm pertencente a metila (CH₃-6) do aminoácido isoleucina de um dos diastereoisômeros, juntamente com o sinal tripleto de sua outra metila (CH₃-5) a (δ) = 0,72 ppm e o singleto da metoxila a 3,60 ppm.

Pode-se também visualizar o duplo dubleto pertencente ao CH-9 que se encontra em (δ) = 4,55 ppm e com valores de constante de acoplamento ($J_{9-10} = 3,20$ e $J_{9-15} = 3,72$ Hz), ainda tem-se o sinal em

forma de dubleto do CH-10 absorvendo em $(\delta) = 5,21$ ppm; ambos sinais, são pertencentes ao aminoácido β -fenilserina responsável pelas características de diastereoisômeros do tripeptídeo dimetilado (**67**).

O espectro de RMN ^{13}C (figura 39 (b)), foi em muito prejudicado pela alta diluição da amostra, mas mesmo assim algumas diferenças entre os tripeptídeos dimetilados (**66a**), (**66b**) (*Treo*) e a mistura diastereoisomérica dos tripeptídeos dimetilados (**67**) (*Eritro*) são bem evidentes, sendo que a principal parece ser uma pequena variação nos valores dos deslocamentos químicos desses núcleos para campo mais baixo, assim como o ocorrido para o carbono (C-10) que se encontra a $(\delta) = 74,032$ ppm. Os valores para os demais átomos, podem ser visualizados pela tabela 12 a seguir.

TABELA 12: - Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para a mistura diastereoisomérica dos tripeptídeos N,N-(Me)₂-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (**67**)



Átomo	(67)		(67')	
	δ ^1H ^a , multiplicidade J(Hz)	δ ^{13}C ^b	δ ^1H ^a , multiplicidade J(Hz)	δ ^{13}C ^b
1	-	171,660	-	171,229
2	4,30 dd; J _{2,7} = 7,6; J _{2,3} = 4,9	56,574	4,38 dd; J _{2,7} = 7,6; J _{2,3} =4,8	56,744
3	1,80 m	37,444	1,75m	37,338
4; 4'	1,16 m; 0,85 m	24,966	1,16 m; 0,85 m	25,225
5	0,72 t; J _{5,4} = 7,4; J _{5,4'} = 3,4	11,433	0,82 t; J _{5,4} = 7,3; J _{5,4'} = 3,5	11,443
6	0,63 d; J _{6,3} = 6,8	15,271	0,77 d; J _{6,3} =6,8	15,589
7	6,90 d; J _{7,2} = 7,6	-	6,90 d; J _{7,2} = 7,6	-
8	-	171,532	-	171,532
9	4,55 dd; J _{9,15} =7,7; J _{9,10} = 3,2	56,874	4,86 dd*; J _{9,15} =7,7; J _{9,10} =2,0	57,315
10	5,21 d; J _{10,9} = 3,2	74,032	5,32 d; J _{10,9} = 2,0	74,032
11	-	135,904	-	135,904
12; 13; 14	7,14 – 7,27 sinais difíceis atribuição	125,749 128,120 127,735	7,14-7,27 sinais difíceis atribuição	125,839 128,347 127,883
15	7,80 d; J _{15,9} =7,7	-	7,80 d; J _{15,9} =7,7	-
16	-	172,000	-	172,000
17	3,43 dd; J _{17,18} =3,2; J _{17,18'} = 8,2	58,047	3,56 dd*;	58,047
18; 18'	3,08; 2,95; dd; J _{18,17} =3,2; J _{18',17} =8,2; J _{18,18'} =13,5	33,260	2,84; 2,77; dd*;	32,704
19	-	139,673	-	139,673
20; 21; 22	7,14 – 7,27 sinais difíceis atribuição	125,960 128,972 128,468	7,14 – 7,27 sinais difíceis atribuição	126,593 129,016 128,514
23	2,34 s	41,775	2,25 s	41,877
24	3,60 s	52,097	3,65s	52,019

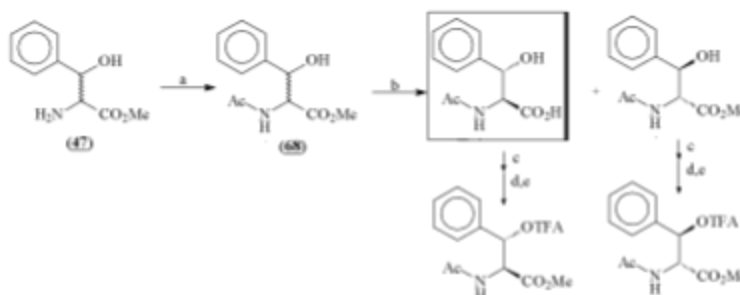
^a)Espectro obtido em CDCl₃ a 400 MHz. ^b) Espectro obtido em CDCl₃ a 100 MHz.

* Sinais sobrepostos ou distorcidos

5- Análise da Configuração absoluta do aminoácido β -fenilserina, por cromatografia gasosa enantiosseletiva.

Tendo-se as estruturas dos tripeptídeos confirmadas pelos experimentos de RMN, realizou-se então a determinação da configuração absoluta dos enantiômeros *D* e *L* do aminoácido central *Treo*- β -fenilserina através da cromatografia gasosa enantiosseletiva.

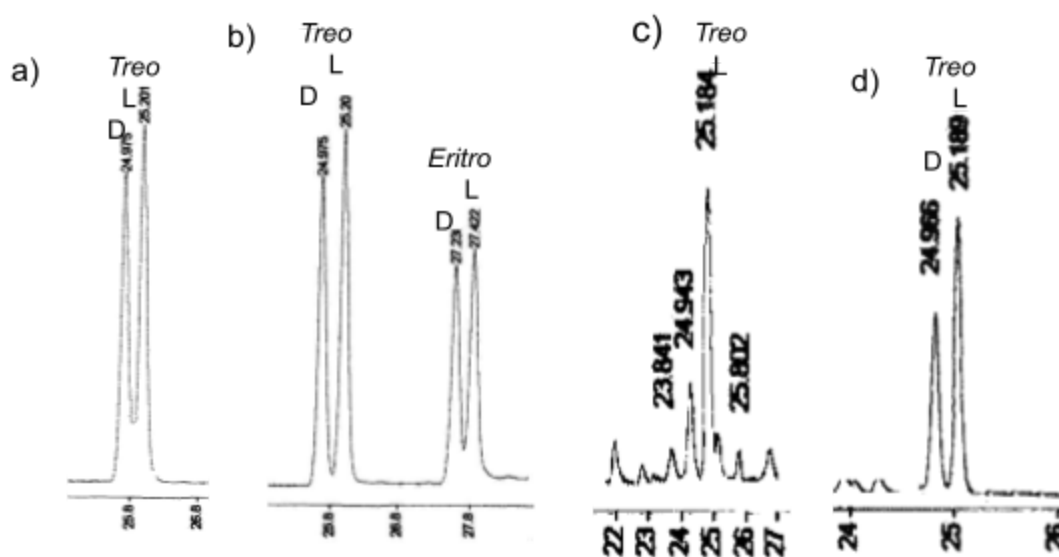
A ordem de eluição dos enantiômeros em cromatografia gasosa quiral, foi definida através da obtenção de padrões enantioméricamente puros pela reação de hidrólise do éster do aminoácido *N*-Ac-*Treo*-*D,L*-Pheser-OMe (**68**) catalisada com a enzima α -quimotripsina (400 unid. com grau de pureza Sigma-Aldrich)^{92,93} (esquema 27) (nesta reação o enantiômero *L* é hidrolisado mais rapidamente que o *D*). Após a separação (extração com acetato de etila) dos enantiômeros da *Treo*-*D(L)*-fenilserina (resolvida), esses poderam ser derivatizados (esquema 27 etapas (c), (d) e (e)) para ser analisados por cromatografia gasosa, utilizando-se a fase estacionária quiral 2,6-Pe-3-Bu- γ -CD (Lipodex-E) (90°C-170°C a 2°C/min e pressão de 7psi).



a) Ac_2O (3 equiv.), aq. AcONa (4 equiv.), 5°C-t.a, 16h; b) α -quimotripsina (56 unid./mg proteína), 0,05M solução aq. fosfato (buffer pH 7,70), 3,5h t.a; c) HCl (6M) refluxo, 5h; d) CH_2N_2 (1mL), 30 min, t.a; e) TFA (50 L), CH_2Cl_2 (200 L), 30 min, t.a

ESQUEMA 27

Esquema 27



a) *N,O*-TFA-*Treo* –D,L-Pheser-OMe

b) Coinj. *N,O*-TFA-*Treo*-D,L-Pheser-OMe e *N,O*-TFA-*Eritro*-D,L-Pheser-OMe

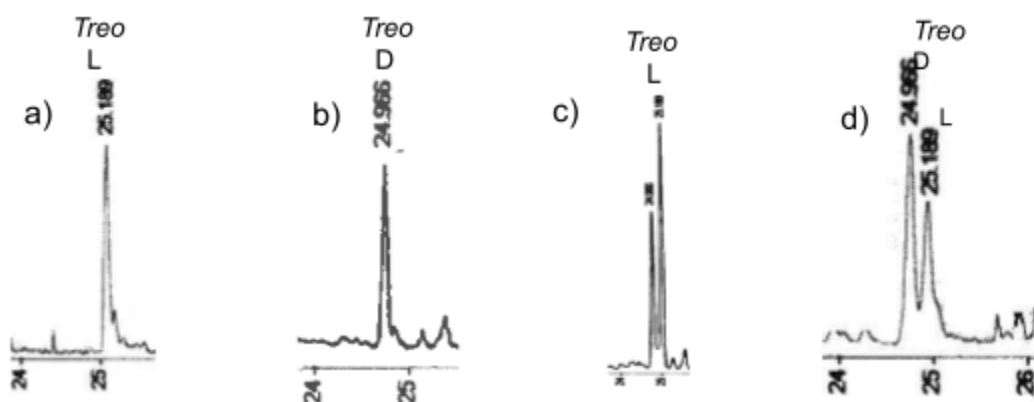
c) *N,O*-TFA-*Treo*-L-Pheser-OMe obtido pela hidrólise enzimática com a -quimotripsina.

d) Coinj. *N,O*-TFA-*Treo* –D,L-Pheser-OMe e *N,O*-TFA-*Treo*-L-Pheser-OMe.

Figura 24- Expansões dos cromatogramas da determinação da ordem de eluição e da configuração absoluta do aminoácido *Treo*- β -fenilserina, CCSF, 25m, 2,6-Pe-3-Bu- γ -CD, 50%/OV1701, 90°C-170°C a 2°C/min.

5.1- Análise da Configuração absoluta do aminoácido *Treo*- β -fenilserina, nos hidrolisados dos tripeptídeos (59a) e (59b).

Com a separação dos pares diastereoisoméricos do dipeptídeo (**54**), pode-se obter de forma pura os tripeptídeos *Z*-L-Phe-*Treo*-L-Pheser-L-Ile-OMe (**59a**) e *Z*-L-Phe-*Treo*-D-Pheser-L-Ile-OMe (**59b**), os quais foram submetidos a uma hidrólise ácida, conforme descrito na parte experimental, sendo seus aminoácidos resultantes derivatizados e analisados por cromatografia gasosa enantiosseletiva, através da qual, pela co-injeção dos padrões com os hidrolisados dos peptídeos (figura 25), pode-se confirmar, com certeza, a estereoquímica absoluta do aminoácido (*Treo*)- β -fenilserina.



a) Hidrolisado do peptídeo (**59a**)

b) Hidrolisado do peptídeo (**59b**)

c) Coinj. *N,O*-TFA-*Treo* -D,L-Pheser-OMe e Hidrólise do peptídeo (**59a**)

d) Coinj. *N,O*-TFA-*Treo* -D,L-Pheser-OMe e Hidrólise do peptídeo (**59b**)

Figura 25- Expansões dos cromatogramas da determinação da configuração absoluta do aminoácido β -fenilserina participante dos tripeptídeos (**59a**) e (**59b**), CCSF, 25m, 2,6-Pe-3-Bu- γ -CD, 50%/OV1701, 90°C-170°C a 2°C/min.

6- Síntese de peptídeos com estruturas correlatas as moléculas alvos

Com o objetivo de avaliar o real papel de cada resíduo de aminoácido que compõem os tripeptídeos, para a obtenção de dados que forneçam alguma relação entre as estruturas e suas possíveis atividades biológicas, de maneira a proporcionar um melhor entendimento das mesmas, realizou-se a síntese de alguns di e tripeptídeos (tabela 13), pelos procedimentos descritos anteriormente.

TABELA 13: - Rendimentos e condições reacionais da obtenção dos peptídeos.

Peptídeos e derivados	Reagentes	Solvente	t (h)	Rendimento (%)
Z-L-Phe-L-Val-OMe (69a)	DCCI/HOBt	THF	14	70
Z-Me-L-Phe-L-Val-OMe (69b)	DCCI/HOBt	THF	16	65
Z-L-Phe-L-Phe-OMe (70a)	DCCI/HOBt	THF	12	85
Z-Me-L-Phe-L-Phe-OMe (70b)	DCCI/HOBt	THF	14	55
Z-Me-L-Phe-L-Phe-L-Ile-OMe (71)	DCCI/HOBt	THF	16	60
Z-L-Phe-L-Phe-L-Ile-OMe (72)	DCCI/HOBt	THF	16	75

Z-Me-L-Phe-L-Val-L-Ile-OMe (73)	DCCI/HOBt	THF	12	58
N-Cinamil- <i>Treo</i> -D,L-Pheser-OMe (74)	DCCI/HOBt	THF	24	78
N-Cinamil- <i>Treo</i> -L-Pheser-L-Ile-OMe (75)	DCCI/HOBt	THF	16	83
Z-L-Leu- <i>Treo</i> -L-Pheser-L-Trp-OMe (76)	DCCI/HOBt	THF	14	40

Assim, para verificar os efeitos dos grupamentos Ar. e .OH, que compõem o aminoácido central β -fenilserina, primeiramente idealizou-se as sínteses dos peptídeos com os aminoácidos centrais L-valina (que em substituição a estes grupos possui duas metilas) e L-fenilalanina (onde em substituição ao grupamento .OH, tem-se um hidrogênio). Estes peptídeos foram sintetizados igualmente aos objetivados por este trabalho, em suas formas com o aminoácido *N*-terminal protegido e *N*-metilado e somente protegido, com o intuito de também verificar o efeito da unidade *N*-alquilada.

Ainda no sentido de avaliar o efeito do grupamento amino terminal, realizou-se a síntese dos peptídeos contendo o resíduo não aminoácido (*Cinamil*), proveniente do acoplamento com o ácido cinâmico.

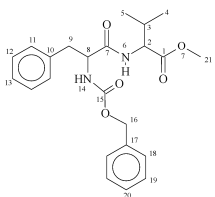
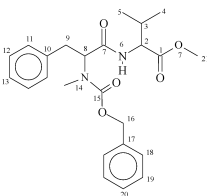
Já para determinar a importância do resíduo *C*-terminal, realizou-se a síntese do tripeptídeo contendo o aminoácido L-triptofano, a partir de um dipeptídeo de outra série, mas que contém o mesmo aminoácido central β -fenilserina.

Ainda cabe ressaltar, que, todos estes peptídeos sintetizados fazem parte de alguma forma, da estrutura química de moléculas naturais que possuem potencial biológico.

6.1- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

A caracterização dos peptídeos sintetizados, bem como a elucidação de suas estruturas foi realizada através das análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear ^1H e ^{13}C (tabela 14), mesmo daqueles que já são bem conhecidos da literatura.

TABELA 14: - Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H e ^{13}C para os peptídeos análogos sintetizados.

Composto	Estruturas	RMN de ^1H (CDCl_3 , δ)	RMN de ^{13}C (CDCl_3 , δ)
(69a)		0,80 (d, 3H, CH_3 -CH); 0,85 (d, 3H, CH_3 -CH); 2,08 (m, 1H, CH - CH_3); 3,06 (dd*, 2H, Ph-CH_2 -CH); 3,68 (s, 3H, CH_3 -O); 4,44 (dd, 1H, CH -CH); 4,46 (dd, 1H, CH-CH_2); 5,08 (s, 2H, CH_2 -O); 5,40 (d, 1H, NH -14); 6,35 (d, 1H, NH -6); 7,10-7,33 (m, 10H, 2x (C_6H_5))	17,724 (C-4); 18,731 (C-5); 31,160 (C-3); 38,305 (C-9); 52,026 (C-21); 56,213 (C-2); 57,295 (C-8); 67,042 (C-16); 126,974 (C-11); 127,974 (C-18); 128,135 (C-13); 128,480 (C-20); 128,641 (C-12); 129,288 (C-19); 136,136 (C-17); 136,277 (C-10); 155,904 (C-15); 170,761 (C-7); 171,681 (C-1)
(69b)		0,79 (d, 3H, CH_3 -CH); 0,85 (d, 3H, CH_3 -CH); 2,10 (m, 1H, CH - CH_3); 2,85 (s, 3H, CH_3 -N); 3,03, 3,27 (dd*, 2H, Ph-CH_2 -CH); 3,66 (s, 3H, CH_3 -O); 4,50 (dd, 1H, CH -CH); 4,97 (dd*, 1H, CH-CH_2); 5,07 (q*, 2H, CH_2 -O); 6,67 (d, 1H, NH -6); 7,10-7,30 (m, 10H, 2x (C_6H_5))	17,339 (C-4); 18,683 (C-5); 30,793 (C-14); 31,279 (C-3); 33,717 (C-9); 51,783 (C-21); 56,844 (C-2); 59,982 (C-8); 67,208 (C-16); 126,341 (C-11); 127,429 (C-18); 127,761 (C-13); 127,880 (C-20); 128,253 (C-12); 128,643 (C-19); 136,227 (C-17); 136,937 (C-10); 156,908 (C-15); 169,907 (C-7); 171,627 (C-1)

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

(70a)		<p>3,02 (ddd*, 4H, CH₂-CH₂); 3,65 (s, 3H, CH₃-O); 4,40 (dd, 1H, CH-CH₂); 4,77 (dd, 1H, CH-COOCH₃); 5,06 (s, 2H, CH₂-O); 5,27 (d*, 1H, NH-COOCH₃); 6,27 (d*, 1H, NH-CHCOOCH₃); 6,96-7,32 (m, 15H, 3x(C₆H₅))</p>	<p>37,878 (C-11); 38,286 (C-3); 52,242 (C-23); 53,289 (C-2); 56,020 (C-10); 67,052 (C-18); 127,018 (C-5); 127,092 (C-13); 127,967 (C-20); 128,163 (C-22); 128,511 (C-7); 128,660 (C-6); 129,166 (C-14); 129,315 (C-21); 135,557 (C-4); 136,133 (C-19); 136,210 (C-12); 155,818 (C-17); 170,356 (C-9); 171,296 (C-1).</p>
(70b)		<p>2,59 (s, 3H, CH₃-N); 2,92 (dd, 2H, CH₂-CH-COOCH₃); 3,23, 3,15 (dd*, 2H, CH₂-CH-N(CH₃)); 3,70 (s, 3H, O-CH₃); 4,82 (dd*, 1H, CH₂-CH-N(CH₃)); 4,92 (dd*1H, CH-COOCH₃); 5,07 (q*, 2H, CH₂-O); 7,00 (d*, 1H, NH-8); 7,18-7,31 (m, 15H, 3x(C₆H₅))</p>	<p>30,131 (C-16); 33,904 (C-11); 37,843 (C-3); 52,995 (C-23); 59,774 (C-2); 67,420 (C-18); 126,519 (C-5); 126,954 (C-13); 127,573 (C-20); 128,106 (C-22); 128,466 (C-7); 128,824 (C-15); 129,025 (C-6); 135,586 (C-4); 135,907 (C-19); 137,046 (C-12); 156,990 (C-17); 169,699 (C-9); 171,579 (C-1)</p>
(71)		<p>0,80 (d, 3H, CH₃-CH); 0,87 (t, 3H, CH₃-CH₂); 1,09, 1,34 (m, 2H, CH-CH₂-CH₃); 1,81 (m, 1H, CH-COOCH₃); 2,53 (s, 3H, N-CH₃); 2,93 (m, 2H, Ph-CH₂-CH); 3,23 (dd*, 2H, Ph-CH₂-CH-N(CH₃)); 3,69 (s, 3H, O-CH₃); 4,47 (dd, 1H, NH-CH-COOCH₃); 4,67 (q*, 1H, NH-CH-CH₂); 4,88 (dd*, 1H, CH₂-CH-N(CH₃)); 5,07 (q*, 2H, CH₂-O); 6,53 (d, 1H, NH-15); 7,12-7,33 (m, 15H, 3x(C₆H₅))</p>	<p>11,452 (C-5); 15,298 (C-6); 25,079 (C-4); 30,472 (C-23); 33,874 (C-18); 37,615 (C-10); 51,989 (C-30); 54,308 (C-2); 56,584 (C-9); 60,269 (C-17); 67,474 (C-25); 126,548 (C-12); 126,828 (C-20); 127,621 (C-27); 128,049 (C-29); 128,464 (C-14); 128,541 (C-22); 128,797 (C-13); 129,077 (C-25); 136,295 (C-11); 136,525 (C-26); 136,996 (C-19); 156,964 (C-24); 169,983 (C-16); 170,349 (C-8); 171,696 (C-1)</p>
(72)		<p>0,82 (t, 3H, CH₃-CH₂); 0,85 (d, 3H, CH₃-CH); 1,17, 1,11 (m, 2H, CH-CH₂-CH₃); 1,75 (m, 1H, CH-COOCH₃); 2,99 (m, 4H, 2x(Ph-CH₂-CH)); 3,66 (s, 3H, O-CH₃); 4,45 (dd, 2H, 2x(NH-CH-CH₂)); 4,68 (q*, 1H, NH-CH-COOCH₃); 5,01 (d, 2H, CH₂-O); 5,44 (d, 1H, NH-23); 6,54 (d, 1H, NH-15); 6,79 (d, 1H, NH-7); 7,10-7,31 (m, 15H, 3x(C₆H₅))</p>	<p>11,430 (C-5); 15,262 (C-6); 25,085 (C-4); 33,587 (C-3); 37,640 (C-10); 38,152 (C-18); 49,484 (C-2); 51,919 (C-17); 54,420 (C-9); 56,562 (C-30); 67,022 (C-25); 126,238 (C-20); 127,013 (C-12); 127,925 (C-14); 128,130 (C-28); 128,465 (C-27); 128,515 (C-29); 128,642 (C-13); 129,211 (C-21); 129,238 (C-22); 136,175 (C-11, C-19, C-26); 155,904 (C-24); 170,163 (C-8); 170,852 (C-16); 171,533 (C-1)</p>
(73)		<p>0,80 (d*, 3H, CH₃-CH-CH₂); 0,90 (t*, 3H, CH₃-CH₂); 0,87 (d*, 3H, CH₃-CH); 0,89 (d*, 3H, CH₃-CH); 1,07 (m, 1H, CH₃-CH₂-CH); 1,41 (m, 1H, CH₃-CH₂-CH); 1,87 (m, 1H, CH₃-CH-CH); 2,15 (m, 1H, CH₃-CH-CH₂); 2,83 (s, 3H, CH₃-N); 3,04 (dd*, 1H, Ph-CH₂-CH); 3,30 (dd, 1H, Ph-CH₂-CH); 3,72 (s, 3H, O-CH₃); 4,23 (q*, 1H, CH-COOCH₃); 4,54 (dd, 1H, NH-CH-CH-CH₃); 4,95 (dd*, 1H, CH₂-CH-N(CH₃)); 5,10 (d*, 2H, CH₂-O); 6,43 (d*, 1H, NH-7); 6,73 (d*, 1H, NH-13); 7,10-7,43 (m, 10H, 2x(C₆H₅))</p>	<p>11,519 (C-5); 15,410 (C-6); 17,712 (C-11); 19,120 (C-12); 25,147 (C-4); 30,455 (C-21); 33,884 (C-16); 37,644 (C-3); 52,039 (C-28); 56,446 (C-2); 58,643 (C-9); 60,547 (C-15); 67,557 (C-23); 126,609 (C-18); 127,740 (C-25); 128,043 (C-20); 128,479 (C-27); 128,526 (C-19); 128,848 (C-26); 136,343 (C-17); 137,101 (C-24); 157,155 (C-22); 170,390 (C-14); 170,545 (C-8); 172,007 (C-1)</p>

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

(74)		<p>3,70 (s, 3H, CH₃-O); 4,51 (d, 1H, OH); 5,00 (dd, 1H, CH-α); 5,31 (d, 1H, CH-β); 6,38 (d, 1H, CH=CHCO); 6,94 (d, 1H, NH-CH-α); 7,20-7,45 (m, 10H, 2x(C₆H₅)); 7,48 (d, 1H, Ph-CH=CH)</p>	<p>52,534 (C-16); 63,809 (C-2); 73,530 (C-3); 119,763 (C-10); 125,803 (C-7); 127,823 (C-6); 127,907 (C-5); 128,308 (C-14); 128,645 (C-13); 129,713 (C-15); 134,513 (C-12); 139,849 (C-4); 141,848 (C-11); 166,347 (C-9); 171,133 (C-1).</p>
(75)		<p>0,81 (d, 3H, CH₃-CH); 0,85 (t, 3H, CH₃-CH₂); 1,12, 1,35 (m, 2H, CH₃-CH₂-CH); 1,84 (m, 1H, CH₃-CH-CH₂); 3,70 (s, 3H, CH₃-O); 4,45 (dd, 1H, CHCOOCH₃); 4,78 (dd, 1H, CH-α); 5,35 (d, 1H, CH-β); 6,29 (d, 1H, CH=CHCO); 6,52 (d, 1H, NH-CH-α); 7,17-7,41 (m, 10H, 2x(C₆H₅)); 7,49 (d, 1H, Ph-CH=CH)</p>	<p>11,492 (C-5); 15,501 (C-6); 25,009 (C-4); 37,652 (C-3); 52,165 (C-23); 56,835 (C-2); 57,178 (C-9); 71,703 (C-10); 119,360 (C-17); 125,811 (C-7); 127,938 (C-6); 128,484 (C-5); 128,514 (C-14); 128,852 (C-13); 130,053 (C-15); 134,403 (C-12); 138,821 (C-4); 142,328 (C-18); 166,793 (C-16); 171,011 (C-8); 171,692 (C-1).</p>
(76)		<p>0,89 (d, 6H, CH₃-CH); 1,92 (m, 1H, CH-(CH₃)₂); 1,11, 1,33 (m, 2H, CH-CH₂-CH); 2,16 (dd, 2H, CH₂-CH); 3,30 (d, 2H, CH₂-CH); 3,66 (s, 3H, CH₃-O); 4,23 (dd*, 1H, CH-COOCH₃); 4,18 (dd*, 1H, CH-CH₂); 4,89 (dd, 1H, CH-α); 5,07 (d, 2H, CH₂-O); 5,11 (d*, 1H, CH-β); 6,44 (NH-COOCH₃); 6,97 (d, 1H, NH-28); 7,10 - 7,35 (m, 14H, 2x(C₆H₅), C₆H₄); 7,51 (d, 1H, C=CH-NH); 7,94 (d*, 1H, NH-21).</p>	<p>21,853 (C-26); 22,841 (C-27); 24,592 (C-25); 27,477 (C-3); 41,451 (C-24); 52,323 (C-23); 53,046 (C-35); 54,166 (C-2); 60,128 (C-15); 66,913 (C-30); 71,889 (C-16); 109,431 (C-4); 111,292 (C-8); 118,410 (C-11); 119,514 (C-10); 122,077 (C-9); 123,214 (C-5); 127,084 (C-20); 127,455 (C-33); 127,962 (C-12); 128,129 (C-32); 128,384 (C-34); 128,496 (C-19); 128,585 (C-18); 136,055 (C-29); 139,144 (C-7); 156,115 (C-29); 172,017 (C-1, C-14, C-22).</p>

^a) Espectro obtido em CDCl₃ a 400 MHz.

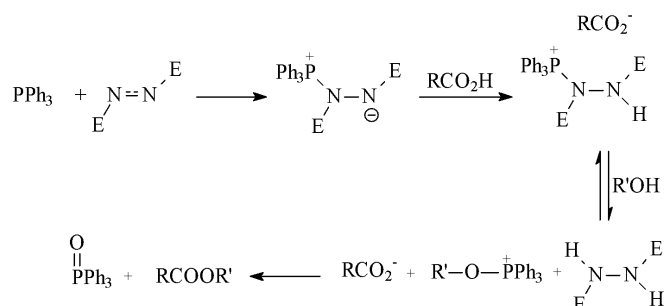
^b) Espectro obtido em CDCl₃ a 100 MHz.

* Sinais sobrepostos ou distorcidos

7- Estudo de uma metodologia alternativa para inversão do β -hidróxi aminoácido.

Devido aos resultados, obtidos durante a síntese dos peptídeos onde o β -hidróxi aminoácido fenilserina encontrava-se sob a forma diastereoisomérica *Eritro*, realizou-se um estudo para a inversão da estereoquímica do *C*- β pertencente à forma *Treo*- β -fenilserina.

Como metodologia de inversão optou-se pelo método de Mitsunobu⁹⁴, onde por uma reação de (SN_2), tem-se a inversão do álcool secundário quiral (C_β -OH), pela substituição deste por grupamentos ácidos carboxílicos, fenólicos ou álcoois (esquema 28).



Esquema 28

Embora essa metodologia pareça ser a maneira mais viável para realização da inversão, não foi possível a transformação da forma *Treo* em *Eritro*, pelos modelos e condições^{95,96,97} testadas até então (tabela 15). Este fato se justifica pela má escolha do modelo (*Z-Treo*-D,L-Pheser-OMe) utilizado para os testes, já que em trabalho publicado por H. Wojciechowska e col.⁹⁸, os autores relatam a

obtenção de diidroaminoácidos a partir de Z-Ser-OMe e Z-Thr-OMe sob condições de Mitsunobu.

TABELA 15: - Produtos e Rendimentos da inversão pelo método de Mitsunobu.

Modelo	Reagente	Produto	t (h)	Rendimento (%)
Z-Treo-D,L-Pheser-OMe (77)	(4)-(HO)-Ph-COH	N-Z-diidro-fenilalanina-OMe (78)	3	60
Z-Treo-D,L-Pheser-OMe (77)	(2)-Cl-CH ₂ -CO ₂ H	Mistura complexa de difícil separação	24	-
Z-Treo-D,L-Pheser-OMe (77)	HCO ₂ H	Mistura complexa de difícil separação	1	-
Z-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (59)	(4)-(NO ₂)-Ph-CO ₂ H	Mistura do material de partida e um produto separado mas não identificado	16	20

*Condições reacionais de Mitsunobu: 10mL THF (seco), (3,3 mmol) PPh₃, (3,3 mmol) RCO₂H, (3,3 mmol) R'OH, (4,2 mmol) DEAD.

8- Determinação da atividade biológica antimicrobiana dos peptídeos obtidos

Como parte deste estudo, realizou-se a avaliação das possíveis atividades antimicrobianas dos peptídeos e amino derivados sintetizados, proporcionando através da comparação dos resultados obtidos com os fornecidos pela literatura^{7 (m), 20} para as substâncias naturais e sintéticas^{99,100}, a definição dos prováveis sítios ativos das moléculas.

Para essa avaliação utilizou-se do método da bioautografia¹⁰¹, testando as substâncias frente a microrganismos certificados como as

bactérias Gram-positivas “*Staphylococcus aureus* (ATCC 6538p); *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228)”, Gram-negativas “*Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031); *Salmonella setubal* (ATCC 19796); *Escherichia coli* (ATCC 9341)” e os fungos “*Candida albicans* (ATTC 10231); *Saccharomyces cerevisiae* (ATTC 2601)”. Onde os meios de cultura utilizados (Agar Muller Hinton (Merck) para bactérias e Agar sabourand (Merck) para fungos) foram inoculados com os microorganismos e depositados em placas de Petri, recobrando as cromatoplasas.

Através de um pré “screening” (tabela 16) onde 75µg de substâncias puras, foram aplicadas de maneira uniforme em cromatoplasas, sobre as quais se depositou os devidos meios de cultura inoculados com cada microorganismo, pode-se determinar após etapas de incubação (24 horas a 35°C (bactérias) e 48 horas a 27°C (fungos)) e revelação com TCC (cloreto de trifeniltetrazólio), quais substâncias apresentavam halos de inibição “atividade”.

A partir dos resultados do pré “screening” realizou-se o teste da quantidade inibitória mínima (QSA) (tabela 17) com as substâncias que haviam demonstrado inibição do crescimento microbiano.

TABELA 16: - Substâncias testadas que apresentaram atividade pelo método de bioautografia, utilizando 75 µg.

Peptídeos e Alcalóides	Microorganismos*									
	Bactérias G (+)			Bactérias G (-)				Fungos		
	S	S	S	E	K	P	B	C	C	S
	a	e	s	c	p	a	s	a	d	c
Z-L-Leu-Treo-L-Pheser-L-Trp-OMe (76)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Z-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (60)	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
NH ₂ -L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe (63a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Z-L-Phe-L-Phe-L-Ile-OMe (72)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Z-Me-L-Phe-L-Val-L-Ile-OMe (73)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
N,N-(Me) ₂ -L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe (66a)	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
N-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (65)	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
N,N-(Me) ₂ -L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (67)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Adoutina-Y (8)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Condalina-A (6)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

(*) Padrão antibiótico Cloranfenicol para bactérias e Nistatina para fungos;

(-)= ausência de halo de inibição;

(+)= presença de halo de inibição.

Peptídeos e Alcalóides	Microorganismos*								
	Bactérias G (+)			Bactérias G (-)				Fungos	
	Sa	Se	Ss	Ec	Kp	Pa	Bs	Cd	Sc
Z-L-Leu-Treo-L-Pheser-L-Trp-OMe (76)	-	-	-	[75]	-	-	-	-	-
Z-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (60)	-	-	-	-	-	[75	-	[75	[75]
NH ₂ -L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe (63a)	-	-	-	-	-	-	-	-	[3,12
Z-L-Phe-L-Phe-L-Ile-OMe (72)	[75]	-	-	-	-	-	-	-	-
Z-Me-L-Phe-L-Val-L-Ile-OMe (73)	-	-	-	-	-	[75	-	-	-
N,N-(Me) ₂ -L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe (66)	[75]	-	-	[75]	-	-	-	-	-
N-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (65)	[6,25	-	-	[6,25	-	[25	[75	-	-
N,N-(Me) ₂ -L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (67)	-	-	-	[75]	-	-	-	-	-
Condalina-A (6)	[12,5	[3,12	[6,25	[6,25	[3,12	-	-	-	-

(*) Padrão antibiótico Cloranfenicol para bactérias e Nistatina para fungos;

(-)= ausência de halo de inibição;

[]=concentração de substância ativa em µg

TABELA 17: - Teste da quantidade de substância ativa (QSA) pelo método de bioautografia.

Embora estes estudos preliminares não sejam conclusivos na definição das atividades dos peptídeos sintéticos, pode-se dizer que os peptídeos *N*-mono metilados apresentam uma atividade superior à dos *N,N*-dimetilados, e ainda contrariando as expectativas, os amino derivados da β -fenilserina demonstraram pouca atividade antimicrobiana.

Estes resultados não condizentes com os obtidos para as substâncias naturais isoladas, levam a crer que a unidade estirilamina e a rígida conformação adotada pelo sistema macrocíclico, são de papel fundamental para a atividade dessas moléculas naturais.

CAPÍTULO V: 5- PARTE EXPERIMENTAL

5.1- Material e Métodos

5.1.1- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear uni e bidimensional foram obtidos em espectrômetro Bruker DPX-400 operando a 400.13 MHz para ^1H e 100.62 MHz para ^{13}C , realizados em tubos de 5 mm de diâmetro a 300K.

Os deslocamentos químicos (δ) são medidos em ppm em relação a um padrão interno de Me_4Si ($\delta = 0$) para espectros de hidrogênio e nos espectros de ^{13}C o próprio solvente serve para este fim (CDCl_3 ($\delta = 77$) ou DMSO-d_6 ($\delta = 39,5$)).

Os espectros 2D Homonuclear (**COSY**) e heteronuclear (**HMQC** e **HMBC**) foram realizados conforme os parâmetros de aquisição fornecidos pelo aparelho e processados pelo *software* XwinNmr 1.3 da Bruker.

Nos experimentos 2D ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ e $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$) foram utilizadas para as aquisições, larguras espectrais SW_H (determinadas no espectro de ^1H) e SW_C (estimadas pelo espectro de ^{13}C) dependentes de cada amostra.

5.1.2- Aparelho de ponto de fusão

Os valores dos pontos de fusão (não corrigidos) das substâncias foram determinados em um aparelho MQAPF-301 da Micro Química.

5.1.3- Cromatografia

5.1.3.1- Cromatografia Gasosa (CG)

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo gasoso Variam CP-3800, com detector de ionização de chama (DIC), utilizando hidrogênio como gás de arraste, equipado com modo de injeção split-splitless (operando em modo split) e colunas capilares de sílica fundida (CCSF), recheadas com fases estacionárias quirais e aquirais.

As colunas cromatográficas utilizadas foram a (2,6-*O*-pentil-3-Butiril)- γ -ciclodextrina (Lipodex-E) (fase quiral) e SE-54, nas respectivas condições: 90°C-170°C a 2°C/min e pressão de H₂ igual a 7psi e 50°C-250°C a 4°C/min e pressão de H₂ igual a 7psi.

5.1.3.2- Cromatografia em Coluna (CC)

A cromatografia em coluna (CC) foi realizada com sílica gel (230-400 mesh), produzida pela Merck, e, eluída por solventes puros

ou em sistema de gradientes; sendo este o método utilizado para a purificação da grande maioria das substâncias sintetizadas.

5.1.3.3- Cromatografia em Placa Preparativa (CPP)

A cromatografia em placa preparativa foi realizada pela deposição de uma lâmina de 0,75 mm de sílica gel 60 GF₂₅₄ (marca Merck) em placas de vidro de 20 cm², sendo utilizada para separação de compostos em pouca quantidade e de *R_fs* muito próximo.

5.1.3.4- Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A técnica de cromatografia em camada delgada do tipo ascendente foi realizada em cromatoplasas comerciais de sílica gel 60 GF₂₅₄ e utilizada a título de acompanhamento das reações e avaliação do grau de pureza dos produtos.

A identificação dos componentes sucedeu-se através da irradiação por luz UV ($\lambda = 254$ e 365 nm) e detecção direta com reagentes específicos como: reagente modificado de Dragendorff (seletivo para alcalóides e nitrogênios substituídos), solução de *orto*-toluídina em atmosfera de cloro (para peptídeos) e solução de ninidrina a 0,2% em EtOH (para aminas e aminoácidos *N*-metilados).

5.1.4- Reagentes e solventes

Todos os reagentes utilizados durante a síntese peptídica como a dicitlohexilcarbodiimida, 1-hidróxi-benzotriazol e a *N*-metil-morfolina, assim como o reagente de proteção dos aminoácidos cloroformiato de benzila são de marca Sigma, aldrich ou Merck, e não foram purificados.

Ao contrário, o cloreto de tionila (SOCl₂) foi purificado por destilação a pressão normal em presença de quinolina. Por sua vez, o benzaldeido foi purificado por destilação sob pressão reduzida

O THF, Et₂O e éter de petróleo, foram refluxados sobre Na^o/benzofenona, até o aparecimento de coloração azul e, em seguida, destilados.

Os solventes clorados (CHCl₃ e CH₂Cl₂) e demais solventes e reagentes foram tratados e purificados conforme descrito por D.D. Perrin¹⁰².

Já o iodeto de metila foi obtido pelo tratamento do álcool metílico com ácido iodídrico sob fósforo vermelho e purificado por tratamento e destilação, conforme mencionado pela literatura.¹⁰³

5.2- Procedimentos Gerais

5.2.1- Obtenção do Carbobenzozi-L-Fenilalanina (Z-L-Phe-OH (41))^{77,78}

Seguindo a clássica metodologia de proteção de aminoácidos descrita por Bodansky⁷⁸, partiu-se de 20 g (121,072 mmol) do aminoácido L-Fenilalanina dissolvidos em 36,32 mL de água e 24,25 mL de solução de NaOH 5N, ao qual foi adicionado sob forte agitação magnética e resfriamento em banho de água e gelo 18,88 mL (133,179 mmol, 22,72 g) de cloroformiato de benzila (Z-Cl) e 66,58 mL de solução de NaOH 2N.

Depois de completada a adição agitou-se por mais trinta minutos e a alcalinidade da mistura foi ajustada a pH 10, sendo então submetida aos procedimentos de extração descritos na literatura, fornecendo assim um produto na forma de sólido branco amorfo com rendimento de 87%.

Dados físicos: sólido branco amorfo; (*Exp*: p.f.= 84 -85°C $[\alpha]_D^{25} = +4,8$ (c= 1 em CHCl₃)) (*Lit*¹⁰⁴: p.f.= 85-87°C, $[\alpha]_D^{25} = +5$ (c= 5 em AcOH))

RMN de ¹H (CDCl₃, δ): 2,97; 3.09 (dd, 2H, CH₂-CH, J₃₋₂= 6,46 Hz, J_{3-3'} = 14,1 Hz, J_{3'-2}= 5,28 Hz), 4,58 (dd, 1H, CH, J₂₋₃= 6,38 Hz, J_{2-3'} = 5,28, J₂₋₈= 7,08 Hz), 4,97 (d, 2H, CH₂-O,

$J_{10-10'} = 6,12$ Hz), 5,26 (d, 1H, NH, $J_{8-2} = 8,12$ Hz), 7,03 - 7,25 (m, 10H, $C_6H_5-CH_2-O$ e $C_6H_5-CH_2-CH$).

RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, δ): 37,639 (C-3, CH_2), 54,597 (C-2, CH), 67,110 (C-10, CH_2), 127,089 (C-5, CH), 128,000 (C-14, CH), 128,152 (C-12, CH), 128,451 (C-7, CH), 128,558 (C-13, CH), 129,269 (C-6, CH), 135,551 (C-4, C), 135,993 (C-11, C), 155,968 (C-9, O-C=O), 175,563 (C-15, COOH).

5.2.2- Preparação do Carbobenzoil-N-Metil-L-Fenilalaninato de metila (Z-Me-L-Phe-OMe (**42**))

Método A^{37(e)}: Em um balão flambado, sob atmosfera de argônio, adicionou-se 100 mL de THF seco e, em seguida 2,40g (100,227 mmol) de NaH e 10g de Z-L-Phe-OH (**41**) (33,409 mmol), seguido da adição de 16,631 mL (267,272 mmol, 37,936 g) de iodeto de metila.

Após o término da reação acompanhado por CCD, se realizou o procedimento de extração descrito na literatura, fornecendo assim uma massa oleosa de coloração amarelada com rendimento de 65%.

O extrato aquoso primeiramente formado é acidificado a pH 2 com HCl 5N e recebe o mesmo tratamento dado a fração etérea, com o objetivo de recuperar produtos não esterificados, obtendo-se assim uma massa também oleosa com rendimento de 10%.

Método B³⁶: Uma solução de Z-L-Phe-OH (**41**) 7,00g (23,386 mmol) em 105 mL de DMF anidra é agitada à temperatura

ambiente, com 5,93 mL (96,336 mmol, 2,31 g) de iodeto de metila e 16,26 g (70,158 mmol) de óxido de prata, durante 8 horas. A mistura reacional foi então filtrada e o sólido lavado com igual volume de DMF, fornecendo após extração, um produto na forma de óleo levemente amarelado com 95% de rendimento e que, quando submetido às análises de RMN e CG, assim como o produto obtido pelo *método A*, demonstrou ser constituído de dois rotâmeros.

Dados físicos: óleo amarelado; (*Exp*: $[\alpha]_D^{25} = -74^\circ$ (c=1 em CHCl_3), $R_f = 0,30$ (éter de petróleo/acetato de etila 15:2)); (*Lit*³⁶: $[\alpha]_D^{24} = -77^\circ$ (c=1.6 em EtOH), $R_f = 0,33$ (éter de petróleo/acetato de etila 15:2))

Rotâmero majoritário:

RMN de ^1H (CDCl_3 δ): 2,70 (s, 3H, N- CH_3); 2,95, 3,25 (dd, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}$, $J_{3,2} = 10,80$ Hz, $J_{3,3'} = 14,58$ Hz, $J_{3',2} = 5,24$ Hz), 3,62 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$); 4,90 (dd, 1H, CH , $J_{2,3} = 10,80$ Hz, $J_{2,3'} = 5,24$ Hz), 4,99 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$); 6,99 - 7,21 (m, 10H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-O}$ e $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-CH}$).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 δ): 31,577 (C-8, $\text{CH}_3\text{-N}$); 34,773 (C-3, CH_2), 52,089 (C-15, $\text{CH}_3\text{-O}$); 60,173 (C-2, CH); 67,044 (C-10, CH_2); 126,528 (C-5, CH); 127,394 (C-14, CH); 127,729 (C-12, CH); 128,282 (C-7, CH); 128,364 (C-13, CH); 128,713 (C-6, CH); 136,579 (C-4, C); 136,975 (C-11, C); 156,407 (C-9, O-C=O); 171,309 (C-1, COOH).

Rotâmero minoritário:

RMN de ^1H (CDCl_3 δ): 2,73 (s, 3H, N- CH_3); 2,89, 3,19 (dd, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}$, $J_{3,2} = 10,52$ Hz, $J_{3,3'} = 14,60$ Hz, $J_{3',2} = 4,80$ Hz); 3,55 (s, 3H,

CH₃-O); 4,70 (dd, 1H, CH, J_{2,3}= 10,52 Hz, J_{2,3'} = 4,80 Hz), 4,92 (s, 2H, CH₂-O); 6,99 - 7,21 (m, 10H, C₆H₅-CH₂-O e C₆H₅-CH₂-CH).

RMN de ¹³C (CDCl₃ δ): 32,058 (C-8, CH₃-N); 35,169 (C-3, CH₂), 52,089 (C-15, CH₃-O); 60,573 (C-2, CH); 67,234 (C-10, CH₂); 126,606 (C-5, CH); 127,772 (C-14, CH); 127,847 (C-12, CH); 128,282 (C-7, CH); 128,422 (C-13, CH); 128,713 (C-6, CH); 136,273 (C-4, C); 137,033 (C-11, C); 155,710 (C-9, O-C=O); 171,073 (C-1, COOH).

5.2.3- Obtenção do Carbobenzozi-N-Metil-L-Fenilalanina (Z-Me-L-Phe-OH (**43**))³⁶

Em um balão dissolveu-se 14,382 g (43,930 mmol) de Z-Me-L-Phe-OMe (**42**) em 100 mL de metanol, ao qual, sob agitação à temperatura ambiente, adicionou-se 49,35 mL de NaOH 1N. Após a adição a solução foi mantida em repouso durante uma hora, evaporando-se, em seguida, a maior parte do solvente a vácuo. Adicionou-se então aproximadamente 20mL de água e sob resfriamento em banho de água e gelo acidifica-se a solução a pH = 3 com HCl 1N. A solução, é então extraída três vezes com acetato de etila e água, a fase orgânica é logo em seguida seca com MgSO₄ e filtrada, rendendo 84% de um produto na forma de um óleo transparente que solidifica lentamente.

Dados físicos: sólido branco (*Exp*: p.f.= 64 °C, *Rf*= 0,47 (clorofórmio/ácido acético 95:5)); (*Lit*³⁶: p.f.= 67-71°C, *Rf*= 0,45 (clorofórmio/ácido acético 95:5))

Rotâmetro majoritário:

RMN de ¹H (CDCl₃ δ): 2,77 (s, 3H, N-CH₃); 3,06, 3,37 (dd, 2H, CH₂-CH, J₃₋₂= 11,28 Hz, J_{3-3'}= 14,40 Hz, J_{3'-2}= 4,80 Hz); 4,99 (dd, 1H, CH, J₂₋₃= 11,28 Hz, J_{2-3'}= 4,80 Hz), 5,07 (s, 2H, CH₂-O); 7,03 - 7,30 (m, 10H, C₆H₅-CH₂-O e C₆H₅-CH₂-CH); 9,98 (s, 1H, COOH).

RMN de ¹³C (CDCl₃ δ): 31,577 (C-8, N-CH₃); 34,773 (C-3, CH₂), 52,089 (C-15, CH₃-O); 60,173 (C-2, CH); 67,044 (C-10, CH₂);

126,528 (C-5, CH); 127,394 (C-14, CH); 127,729 (C-12, CH); 128,282 (C-7, CH); 128,364 (C-13, CH); 128,713 (C-6, CH); 136,579 (C-4, C); 136,975 (C-11, C); 156,407 (C-9, O-C=O); 171,309 (C-1, COOH).

Rotâmetro minoritário:

RMN de ^1H (CDCl_3 , δ): 2,84 (s, 3H, N- CH_3); 2,98, 3,29 (dd, 2H, CH_2 -CH, $J_{3,2} = 10,80$ Hz, $J_{3,3'} = 14,38$ Hz, $J_{3',2} = 4,28$ Hz); 4,85 (dd, 1H, CH, $J_{2,3} = 10,80$ Hz, $J_{2,3'} = 4,28$ Hz), 5,00 (s, 2H, CH_2 -O); 7,08 - 7,30 (m, 10H, C_6H_5 - CH_2 -O e C_6H_5 - CH_2 -CH); 9,98 (s, 1H, COOH).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , δ): 32,058 (C-8, CH_3 -N); 35,169 (C-3, CH_2), 52,089 (C-15, CH_3 -O); 60,573 (C-2, CH); 67,234 (C-10, CH_2); 126,606 (C-5, CH); 127,772 (C-14, CH); 127,847 (C-12, CH); 128,282 (C-7, CH); 128,422 (C-13, CH); 128,713 (C-6, CH); 136,273 (C-4, C); 137,033 (C-11, C); 155,710 (C-9, O-C=O); 171,073 (C-1, COOH).

5.2.4- Preparação da *Treo-D,L*- β -Fenilserina (**44**)⁸¹

Em um balão de duas bocas com fundo redondo, equipado com um agitador mecânico, adicionou-se 45,5 g (0,60 mol) de glicina, 36 g (0,90 mol) de hidróxido de sódio e 150 mL de água e resfriou-se a reação a 15°C com banho de água e gelo. Após, adicionou-se 127,5 mL (1,2 mol) de benzaldeído recém destilado, mantendo-se a temperatura a 15°C. A reação permaneceu a temperatura ambiente por 24 horas, resultando em um sólido, que foi fragmentado com adição

lenta de 35 mL de ácido clorídrico concentrado e agitação mecânica, sob resfriamento de banho de gelo, mantendo-se a temperatura de 15°C. O produto permaneceu em repouso por 24 horas a temperatura de 5°C, e o precipitado formado foi filtrado e lavado com 3 porções de 130 mL de éter etílico. Recristalizou-se o produto em etanol 95% obtendo-se a *Treo-D,L-β*-fenilserina com um rendimento de 60,6%.

Dados físicos : (*Exp*: p.f.= 191-192°C) (*Lit*⁷⁸ p.f.= 192-193°C)

RMN de ¹H (D₂O δ): 3,70(d, 1H, CH-α, J₂₋₃= 4,28 Hz); 5,10 (d, 1H, CH-β, J₃₋₂= 4,28 Hz); 7,27 (s, 5H, C₆H₅)

5.2.5- Preparação do Éster Etílico da *Eritro-D,L-β*-Fenilserina (45)^{83,84}

A uma mistura de 6,26g (44,87 mmol) do éster etílico da glicina e 6,24 mL (44,89 mmol, 4,54 g) de Et₃N em 45 mL de etanol absoluto, adiciona-se 9,13 mL (89,87 mmol) de benzaldeído, são agitados durante 8 horas a temperatura ambiente, quando então esta mistura reacional é resfriada a 5°C e saturada com cloreto de hidrogênio seco.

Após varias horas de repouso a 5°C forma-se um precipitado branco na forma de pequenas laminas de uma mistura do éster etílico de *Treo* e *Eritro* fenilserina, este precipitado, que contém um excesso da forma *Eritro* fenilserina é filtrado, lavado com etanol 95% a frio e recristalizado em acetona, obtendo-se assim o éster etílico da *Eritro* fenilserina de forma pura por CCD, com um rendimento de 5%.

Dados físicos: (*Exp*: p.f. =172-174°C); (*Lit*^{83,84}: p.f.= 175-176°C)

RMN de ^1H (D_2O δ): 0,98 (t, 3H, CH_3CH_2 , $J_{9,8}=7,20$ Hz); 4,07 (q, 2H, OCH_2CH_3 , $J_{8,9}=7,00$ Hz); 4,36 (d, 1H, $\text{CH-}\alpha$, $J_{2,3}=4,00$ Hz); 5,28 (d, 1H, $\text{CH-}\beta$, $J_{3,2}=4,00$ Hz); 7,31 (m, 5H, C_6H_5).

5.2.6- Preparação da *Eritro-D,L-}\beta*-Fenilserina (**46**)⁸¹

Em um balão dissolveu-se 0,500 g (2,035 mmol) de *Eritro-D,L-Pheser-OEt* (**45**) em 0,100 mL de metanol seco ao qual sob agitação a temperatura ambiente adicionou-se 2,08 mL de NaOH 2N, após a adição deixou-se à solução em repouso durante uma hora e trinta minutos, evaporando-se em seguida a maior parte do solvente a vácuo, adiciona-se então aproximadamente 5mL de água e sob resfriamento em banho de água e gelo acidifica-se a solução a pH = 5 com 0,17 mL de HCl (concentrado), após armazenamento a 5°C por 18 horas, ocorre a formação de cristais que são logo em seguida filtrados, lavados com água gelada e então secos, fornecendo *Eritro-D,L-Pheser-OH* (**46**) com rendimento de 60%.

Dados físicos: (*Exp*: pf.=186-187°C); (*Lit*⁷⁸: p.f. = 189-193°C)

RMN de ^1H (D_2O δ): 3,78(d, 1H, $\text{CH-}\alpha$, $J_{2,3}=4,24$ Hz); 5,04 (d, 1H, $\text{CH-}\beta$, $J_{3,2}=4,24$ Hz); 7,23 (s, 5H, C_6H_5)

5.3- Esterificação de Aminoácidos: Método Geral⁸⁵

Em um balão de fundo redondo, adicionou-se 100 ml de metanol destilado, e resfriou-se a -20°C e adicionou-se 26 ml de SOCl_2 (temperatura inferior a -10°C). Após adicionou-se 100 mmol do

aminoácido a ser esterificado, deixando-se a reação sob agitação à temperatura de 25°C por 12 horas. Evaporou-se completamente o solvente e recristalizou-se com metanol/éter etílico.

5.3.1- Ester metílico do *Treo*-D,L-β-fenilserina cloridrato (**47**)

O aminoácido *Treo*-D,L-β-fenilserina (**44**) foi esterificado como no item acima, usando-se 18,12 g (100 mmol) do aminoácido, obtendo-se um sólido branco. Após a recristalização com metanol/éter etílico a 5°C, obteve-se o éster desejado com um rendimento de 90%.

Dados físicos: (*Exp*: pf.= 153-154 °C); (*Lit.*⁸¹ p.f.= 156°C)

RMN de ¹H (D₂O δ): 3,66 (s, 3H, O-CH₃); 4,24(d, 1H, CH-α, J₂₋₃= 4,00 Hz); 5,26 (d, 1H, CH-β, J₃₋₂= 4,00 Hz); 7,28 (m, 5H, C₆H₅)

RMN de ¹³C (D₂O δ): 53,691 (C-8, O-CH₃); 58,965 (C-2, CH-α), 70,519 (C-3, CH-β); 125,880 (C-5, CH); 128,971 (C-6, CH); 129,047 (C-7, CH); 137,539 (C-4, C); 168,467 (C-1, COOCH₃).

5.3.2- Ester metílico do *Eritro*-D,L-β-fenilserina cloridrato (**48**)

Assim como para a forma (*Treo*), 0,200 g (0,918mmol) do aminoácido *Eritro*-D,L-β-fenilserina (**46**) foram esterificados com MeOH/SOCl₂, obtendo-se após a recristalização com metanol/éter etílico a 5°C um sólido branco, com um rendimento de 85%

Dados físicos: (*Exp*: pf. =176-178°C); (*Lit.*⁸¹ p.f.= 180°C)

RMN de ^1H (D_2O δ): 3,61 (s, 3H, O- CH_3); 4,37(d, 1H, $\text{CH-}\alpha$, $J_{2,3} = 8,40$ Hz); 5,25 (d, 1H, $\text{CH-}\beta$, $J_{3,2} = 8,40$ Hz); 7,31 (m, 5H, C_6H_5)

RMN de ^{13}C (D_2O δ): 53,691 (C-8, O- CH_3); 58,965 (C-2, $\text{CH-}\alpha$), 70,519 (C-3, $\text{CH-}\beta$); 125,880 (C-5, CH); 128,971 (C-6, CH); 129,047 (C-7, CH); 137,539 (C-4, C); 168,467 (C-1, COOCH_3).

5.3.3. Ester metílico da L-Isoleucina cloridrato (58)

Utilizou-se 100 mmol (13,11 g) de L-isoleucina conforme a técnica geral de esterificação de aminoácido, obtendo-se um sólido branco que foi recristalizado com metanol/éter etílico, com rendimento de 80%.

Dados físicos: (*Exp*: p.f.= 98,7-99,6°C); (*Lit.*¹⁰⁴ p.f.= 100,5-101°C)

RMN de ^1H (D_2O δ): 0,83 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$, $J_{5,4} = 7,40$ Hz); 0,92 (d, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}$, $J_{6,3} = 6,80$ Hz); 1,24 e 1,35 (m, 1H, CH_2); 1,96 (m, 1H, CH-CH_2); 3,73 (s, 3H, O- CH_3); 4,02 (d, 1H, $\text{CH-}\alpha$, $J_{2,3} = 4,08$ Hz)

RMN de ^{13}C (D_2O δ): 11,089 (C-5, CH_3); 14,194 (C-6, CH_3), 24,943 (C-4, CH_2); 36,064 (C-3, CH); 57,340 (C-2, CH); 170,284 (C-1, COOCH_3).

5.4- Síntese dos Dipeptídeos: Método Geral^{86,50}

Em um balão sob atmosfera de argônio, dissolveu-se em 50 mL de THF seco, 75 mmois do aminoácido fenilserina (*Treo ou Eritro*), 75 mmois de 1-Hidróxibenzotriazol (HOBt) e 75 mmois do aminoácido protegido (Z-L-Phe-OH ou Z-Me-L-Phe-OH) a esta mistura reacional, adiciona-se 75 mmois de *N*-metilmorfolina.

A solução é mantida sob agitação e resfriamento de água/gelo, em seguida adiciona-se 80 mmois de DCCI. Deixa-se a solução por 1 hora a 0°C e após por aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente. Filtra-se a DCCU formada e o solvente é eliminado à vácuo. O resíduo é então redissolvido em acetato de etila ou clorofórmio e lavado sucessivamente com uma solução saturada de NaHCO₃, água, solução aquosa de ácido cítrico a 10 % (p/v), novamente com solução saturada de NaHCO₃ e finalmente com água. A fase orgânica foi seca com NaSO₄ e o solvente evaporado a pressão reduzida.

5.4.1- **Obtenção de Carbobenzoxi-L-fenilalanil-*Treo*-D,L-β-Fenilserina-OMe (49)**

Dissolveram-se, em 20 ml de THF seco, 7,00 g (31,071 mmol) de *Treo*-D,L-β-Pheser-OMe, 4,19 g (31,071 mmol) de HOBt, 9,30 g (31,071 mmol) de Z-L-Phe-OH e 3,42 mL (31,071 mmol, 3,14 g) de *N*-metilmorfolina. A mistura foi agitada e a solução formada, resfriada em banho de gelo, adicionando-se em seguida 6,83 g (33,142 mmol) de diciclohexilcarbodiirrida (DCCI). A reação permaneceu sob

agitação por 1 hora a 0°C e 16 horas a temperatura ambiente. Filtrou-se a DCCU formada e evaporou-se o solvente a vácuo, obtendo-se após o procedimento de extração descrito anteriormente, um produto na forma de um sólido branco, constituído pelos pares diastereoisoméricos (L(D) e L(L)), com rendimento de 65 %.

Dados físicos de (49a): sólido branco, $R_f=0,44$ (com $i\text{-Pr}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 1%); (*Exp*: p.f.= 120-122°C)

RMN de ^1H (CDCl_3 δ): 2,78, 2,96 (dd, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}$, $J_{11-10}=7,36$ Hz, $J_{11'-10}=5,32$ Hz $J_{11-11'}=14,10$ Hz); 3,67 (s, 3H, O-CH_3); 4,48 (dd*; 1H, CH-CH_2 , $J_{10-11}=7,36$); 4,64 (dd, 1H, $\text{CH-}\alpha$, $J_{2-3}=3,20$ Hz, $J_{2-8}=8,76$ Hz); 5,00 (q*, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$); 5,20 (d*, 1H, NH-16); 5,29 (d, 1H, $\text{CH-}\beta$, $J_{3-2}=3,08$ Hz); 6,91 (d*, 1H, NH-8 , $J_{8-2}=8,76$ Hz); 7,15 - 7,30 (m, 15H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-O}$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-CH}$ e $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}$).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 δ): 38,224 (C-11, $\text{CH}_2\text{-CH}$); 52,517 (C-23, $\text{CH}_3\text{-O}$); 55,596 (C-10, CH-CH_2); 57,556 (C-2, $\text{CH-}\alpha$); 66,963 (C-18, $\text{CH}_2\text{-O}$); 71,829 (C-3, $\text{CH-}\beta$); 125,764 (C-5, CH); 126,818 (C-20, CH); 127,884 (C-13, CH); 128,119 (C-7, CH); 128,282 (C-6, CH); 128,436 (C-15, CH); 128,465 (C-14, CH); 128,513 (C-22, CH); 129,244 (C-21, CH); 136,049 (C-19, C); 136,260 (C-12, C); 139,527 (C-4, C); 155,955 (C-17, O-C=O); 170,875 (C-9, CONH) 171,505 (C-1, COOCH_3).

Dados físicos de (49b): sólido branco cristalino, $R_f=0,42$ (com *i*-Pr₂O/ MeOH 1%); (*Exp*: pf.=119-120°C).

RMN de ¹H (CDCl₃ δ): 2,93, 3,01 (dd, 2H, CH₂-CH, $J_{11-10}= 6,78$ Hz, $J_{11-11'} = 13,88$ Hz); 3,66 (s, 3H, O-CH₃); 4,39 (q; 1H, CH-CH₂, $J_{10-11}= 6,78$ Hz; $J_{10-16}= 7,28$ Hz); 4,71 (dd, 1H, CH-α, $J_{2-3}= 3,40$ Hz, $J_{2-8}= 8,64$ Hz); 5,04 (s, 2H, CH₂-O); 5,17 (d, 1H, NH-16, $J_{16-10} = 7,28$ Hz); 5,33 (d, 1H, CH-β, $J_{3-2}= 3,40$ Hz); 6,72 (d, 1H, NH-8, $J_{8-2} = 8,64$ Hz); 7,05 - 7,29 (m, 15H, C₆H₅-CH₂-O, C₆H₅-CH₂-CH e C₆H₅-CH).

RMN de ¹³C (CDCl₃ δ): 38,098 (C-11, CH₂-CH); 52,579 (C-23, CH₃-O); 56,029 (C-10, CH-CH₂); 58,268 (C-2, CH-α); 67,094 (C-18, CH₂-O); 72,060 (C-3, CH-β); 125,806 (C-5, CH); 126,941 (C-20, CH); 127,998 (C-13, CH); 128,146 (C-7, CH); 128,192 (C-6, CH); 128,373 (C-15, CH); 128,521 (C-14, CH); 128,630 (C-22, CH); 129,272 (C-21, CH); 136,081 (C-19, C); 136,225 (C-12, C); 139,312 (C-4, C); 155,917 (C-17, O-C=O); 170,362 (C-9, CONH) 171,085 (C-1, COOCH₃).

5.4.2- Obtenção de Carbobenzoxi-L-fenilalanil-Eritro-D,L-β-Fenilserina-OM e (50)

Uma mistura de 0,080 g (0,345 mmol) de Eritro-D,L-Pheser-OMe (48) com 0,046 g (0,345 mmol) de HOBt, 0,103 g (0,345 mmol) de Z-L-Phe-OH, 0,038 mL (0,345 mmol, 0,034

g) de NMM e 0,075 g (0,368 mmol) DCCI em 1 mL de THF seco, forneceu após 20 horas de reação nas condições descritas anteriormente (item 4.4), o dipéptido (**50**) com rendimento de 70 %.

Dados físicos de (50a): sólido branco, $R_f=0,40$ (com *i*-Pr₂O/MeOH 1%); (*Exp*: pf.=148-149°C).

RMN de ¹H (CDCl₃ δ): 2,98 (dd*, 2H, CH₂-CH, $J_{11-10}=6,40$ Hz); 3,57 (s, 3H, O-CH₃); 4,32 (q*; 1H, CH-CH₂, $J_{10-11}=6,40$ Hz; $J_{10-11}=7,20$ Hz, $J_{10-16}=14,20$ Hz); 4,81 (dd, 1H, CH-α, $J_{2-3}=3,48$ Hz, $J_{2-8}=6,76$ Hz); 5,09 (s, 2H, CH₂-O); 5,16 (d*, 1H, NH-16, $J_{16-10}=14,20$ Hz); 5,16 (d, 1H, CH-β, $J_{3-2}=3,48$ Hz); 6,47 (d*, 1H, NH-8, $J_{8-2}=6,76$ Hz); 7,07 - 7,26 (m, 15H, C₆H₅-CH₂-O, C₆H₅-CH₂-CH e C₆H₅-CH).

RMN de ¹³C (CDCl₃ δ): 38,128 (C-11, CH₂-CH); 52,492 (C-23, CH₃-O); 56,339 (C-10, CH-CH₂); 59,049 (C-2, CH-α); 67,285 (C-18, CH₂-O); 74,670 (C-3, CH-β); 125,876 (C-5, CH); 127,209 (C-20, CH); 128,079 (C-13, CH); 128,125 (C-7, CH); 128,278 (C-6, CH); 128,308 (C-15, CH); 128,566 (C-14, CH); 128,833 (C-22, CH); 129,230 (C-21, CH); 135,904 (C-19, C); 135,904 (C-12, C); 138,823 (C-4, C); 155,828 (C-17, O-C=O); 169,276 (C-9, CONH); 172,000 (C-1, COOCH₃).

Dados físicos de (50b): sólido branco amorfo, $R_f=0,38$ (com *i*-Pr₂O/MeOH 1%); (*Exp*: p.f.=145-147°C).

RMN de ¹H (CDCl₃ δ): 3,03 (d*, 2H, CH₂-CH, $J_{11-10}=7,26$ Hz); 3,61 (s, 3H, O-CH₃); 4,45 (dd*; 1H, CH-CH₂, $J_{10-11}=7,26$ Hz, $J_{10-16}=14,56$ Hz); 4,90 (dd, 1H, CH-α, $J_{2-3}=3,80$ Hz, $J_{2-8}=7,60$ Hz);

5,07 (s, 2H, CH₂-O); 5,25 (d*, 1H, NH-16, J₁₆₋₁₀= 14,56 Hz); 5,25 (d*, 1H, CH-β, J₃₋₂ = 3,80 Hz); 6,53 (d, 1H, NH-8, J₈₋₂= 7,60 Hz); 7,14 - 7,32 (m, 15H, C₆H₅-CH₂-O, C₆H₅-CH₂-CH e C₆H₅-CH).

RMN de ¹³C (CDCl₃ δ): 38,538 (C-11, CH₂-CH); 52,403 (C-23, CH₃-O); 56,323 (C-10, CH-CH₂); 58,795 (C-2, CH-α); 67,213 (C-18, CH₂-O); 74,297 (C-3, CH-β); 125,755 (C-5, CH); 127,244 (C-20, CH); 128,082 (C-13, CH); 128,125 (C-7, CH); 128,249 (C-6, CH); 128,322 (C-15, CH); 128,546 (C-14, CH); 128,857 (C-22, CH); 129,303 (C-21, CH); 135,992 (C-19, C); 136,148 (C-12, C); 138,792 (C-4, C); 155,828 (C-17, O-C=O); 169,421 (C-9, CONH) 171,620 (C-1, COOCH₃).

5.4.3- Obtenção de Carbobenzoxi-N-Metil-L-fenilalanil-*Treo*-D,L-β-Fenilserina-OMe (**51**)

Obteve-se o dipeptídeo (**51**), através do acoplamento de 7,00g (31,071 mmol) de *Treo*-D,L-β-Pheser-OMe com 9,736 g (31,071 mmol) de *Z*-Me-L-Phe-OH dissolvidos em 20 mL de THF seco e adição de 4,19 g (31,071 mmol) de HOBt, e 3,42 mL (31,071 mmol, 3,14 g) de *N*-metilmorfolina. A mistura foi agitada a uma temperatura aproximada de 0°C (em banho de gelo), adicionando-se em seguida 6,83 g (33,142 mmol) de diciclohexilcarbodiirrida (DCCI). A reação permaneceu sob agitação por 1 hora a 0°C e 20 horas a temperatura ambiente. Filtrou-se a DCCU formada e

evaporou-se o solvente a vácuo, obtendo-se após os procedimentos de extrações, uma massa oleosa levemente amarelada, com rendimento de 66 %.

Dados físicos de (51): óleo amarelado

RMN de ^1H (CDCl_3 , δ) (diastereoisômero em maior proporção): 2,38 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}$); 3,08 (dd*, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}$); 3,66 (s, 3H, O-CH_3); 4,77 (q*; 1H, CH-CH_2); 4,79 (dd, 1H, $\text{CH-}\alpha$); 5,02 (d, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$); 5,29 (d*, 1H, $\text{CH-}\beta$); 7,07 (d*, 1H, NH-8); 7,00 - 7,30 (m, 15H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-O}$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-CH}$ e $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}$).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , δ): 30,179 (C-16, $\text{CH}_3\text{-N}$); 33,658 (C-11, $\text{CH}_2\text{-CH}$); 52,462 (C-23, $\text{CH}_3\text{-O}$); 58,193 (C-10, CH-CH_2); 59,550 (C-2, $\text{CH-}\alpha$); 67,393 (C-18, $\text{CH}_2\text{-O}$); 72,825 (C-3, $\text{CH-}\beta$); 125,513 (C-5, CH); 126,402 (C-20, CH); 127,455 (C-7, CH); 127,894 (C-13, CH); 127,961 (C-6, CH); 128,229 (C-15, CH); 128,343 (C-14, CH); 128,379 (C-22, CH); 128,675 (C-21, CH); 136,262 (C-19, C); 136,903 (C-12, C); 139,797 (C-4, C); 157,260 (C-17, O-C=O); 169,911 (C-9, CONH) 170,538 (C-1, COOCH_3).

RMN de ^1H (CDCl_3 , δ): (diastereoisômero em menor proporção) 2,77 (s, 3H, N-CH_3); 3,19 (dd, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}$); 3,69 (s, 3H, O-CH_3); 4,68 (q*; 1H, CH-CH_2); 4,90 (dd*, 1H, $\text{CH-}\alpha$); 4,93 (d*, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$); 5,33 (d, 1H, $\text{CH-}\beta$); 6,76 (d, 1H, NH-8); 7,00 - 7,30 (m, 15H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-O}$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-CH}$ e $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}$).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , δ): 29,502 (C-16, $\text{CH}_3\text{-N}$); 33,658 (C-11, $\text{CH}_2\text{-CH}$); 52,399 (C-23, $\text{CH}_3\text{-O}$); 57,841 (C-10, CH-CH_2); 58,072 (C-2, $\text{CH-}\alpha$); 67,639 (C-18, $\text{CH}_2\text{-O}$); 73,034 (C-3, $\text{CH-}\beta$); 125,738

(C-5, CH); 126,402 (C-20, CH); 127,529 (C-7, CH); 127,849 (C-13, CH); 128,077 (C-6, CH); 128,229 (C-15, CH); 128,343 (C-14, CH); 128,379 (C-22, CH); 128,738 (C-21, CH); 136,167 (C-19, C); 136,792 (C-12, C); 139,797 (C-4, C); 157,067 (C-17, O-C=O); 170,376 (C-9, CONH) 170,494 (C-1, COOCH₃).

5.4.4- Obtenção de Carbobenzoxi-N-Metil-L-fenilalanil-Eritro-D,L-β-Fenilserina-OMe (**52**)

Partindo-se de 0,080 g (0,345 mmol) de *Eritro-D,L*-Pheser-OMe (**48**) dissolvidos em 1mL de THF, realizou-se o acoplamento com 0,108 g (0,345 mmol) de *Z*-Me-L-Phe-OH (**43**), com a adição de 0,046 g (0,345 mmol) de HOBT, 0,038 mL (0,345 mmol, 0,034 g) de NMM e 0,075 g (0,368 mmol) DCCI, obteve-se após 18 horas de reação nas condições descritas no item 4.4, o dipetideo (**52**) como uma massa oleosa, que após ser seca a vácuo fornece um rendimento de 60 %.

Dados físicos: óleo amarelado pastoso;

RMN de ¹H (CDCl₃ δ) (diastereoisômero em maior proporção): 2,62 (s, 3H, CH₃-N); 2,95-3,30 (dd*, 2H, CH₂-CH); 3,64 (s, 3H, O-CH₃); 4,89 (q*; 1H, CH-CH₂); 4,92 (dd, 1H, CH-α); 5,08 (d, 2H, CH₂-O); 5,16 (d*, 1H, CH-β); 6,81 (d*, 1H, NH-8); 7,12 - 7,34 (m, 15H, C₆H₅-CH₂-O, C₆H₅-CH₂-CH e C₆H₅-CH).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , δ): 30,854 (C-16, $\text{CH}_3\text{-N}$); 34,098 (C-11, $\text{CH}_2\text{-CH}$); 52,415 (C-23, $\text{CH}_3\text{-O}$); 58,885 (C-10, CH-CH_2); 60,434 (C-2, $\text{CH-}\alpha$); 67,526 (C-18, $\text{CH}_2\text{-O}$); 74,438 (C-3, $\text{CH-}\beta$); 125,893 (C-5, CH); 126,725 (C-20, CH); 127,631 (C-7, CH); 128,092 (C-13, CH); 128,299 (C-6, CH); 128,501 (C-15, CH); 128,554 (C-14, CH); 128,889 (C-22, CH); 129,018 (C-21, CH); 136,328 (C-19, C); 136,922 (C-12, C); 138,871 (C-4, C); 157,002 (C-17, O-C=O); 169,672 (C-9, CONH) 170,854 (C-1, COOCH_3).

RMN de ^1H (CDCl_3 , δ): (diastereoisômero em menor proporção) 2,62 (s, 3H, N-CH_3); 3,30-295 (dd*, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}$); 3,69 (s, 3H, O-CH_3); 4,89 (q*; 1H, CH-CH_2); 4,92 (dd, 1H, $\text{CH-}\alpha$); 5,08 (d, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$); 5,16 (d*, 1H, $\text{CH-}\beta$); 6,81 (d*, 1H, NH-8); 7,12 - 7,34 (m, 15H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-O}$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-CH}$ e $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}$).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , δ): 30,724 (C-16, $\text{CH}_3\text{-N}$); 33,881 (C-11, $\text{CH}_2\text{-CH}$); 52,562 (C-23, $\text{CH}_3\text{-O}$); 58,695 (C-10, CH-CH_2); 60,237 (C-2, $\text{CH-}\alpha$); 67,718 (C-18, $\text{CH}_2\text{-O}$); 74,438 (C-3, $\text{CH-}\beta$); 126,000 (C-5, CH); 126,725 (C-20, CH); 127,529 (C-7, CH); 127,849 (C-13, CH); 128,077 (C-6, CH); 128,229 (C-15, CH); 128,343 (C-14, CH); 128,889 (C-22, CH); 129,018 (C-21, CH); 136,328 (C-19, C); 136,922 (C-12, C); 139,078 (C-4, C); 157,002 (C-17, O-C=O); 169,967 (C-9, CONH) 171,120 (C-1, COOCH_3).

5.5- Método geral de hidrólise básica dos dipeptídeos (49-52)

Os ésteres metílicos das misturas diastereoisoméricas dos dipeptídeos **(49)**, **(50)**, **(51)** e **(52)** foram dissolvidas em metanol e com o auxílio de um banho de gelo controlou-se a temperatura do sistema reacional a aproximadamente 5°C e adicionou-se lentamente sob agitação magnética uma solução aquosa de NaOH 1N.

Esta mistura reacional foi deixada em repouso a 25°C por 2 horas e após adicionou-se uma solução de HCl 1N, sendo o metanol removido a vácuo. Resfriou-se a solução aquosa acidificando a pH 2-3 com solução de HCl 2N. Após armazenou-se a mistura reacional por 14 horas em geladeira, formando uma massa sólida branca para os dipeptídeos **(54)** e **(55)** e oleosa para **(56)** e **(57)**, esta foi decantada, redissolvida em clorofórmio e seca com Na₂SO₄ anidro, evaporando-se o solvente logo em seguida.

5.5.1- Síntese do Dipeptídeo *Z-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-OH* (**54**)

Para obtenção do dipeptídeo **(54)**, partiu-se de 8,00 g (16,788 mmol) de **(49)**, dissolvidos em 34,26 mL de MeOH com adição de 37,11 mL de NaOH 1N e 17,13 mL de HCl 1N, podendo-se após a realização etapas descritas no item (4.4.5), obter o dipeptídeo hidrolisado com um rendimento de 83%, sendo a separação das formas diastereoisoméricas realizada pela precipitação com CHCl₃/MeOH.

Dados físicos de **(54a)**: sólido branco, (*Exp*: p.f.= 140-142°C).

RMN de ¹H (DMSO-d₆ δ): 2,96-2,66 (dd, 2H, CH₂-CH, J₁₁₋₁₀ = 3,58 Hz, J_{11'-10} = 11,10 Hz J_{11-11'} = 13,78 Hz); 4,22 (dd*, 1H,

CH-CH₂); 4,30 (dd, 1H, CH- α , $J_{2,3} = 4,14$ Hz, $J_{2,8} = 7,24$ Hz); 4,93 (s, 2H, CH₂-O) 5,07 (d, 1H, CH- β , $J_{3,2} = 4,14$ Hz); 7,17 - 7,32 (m, 15H, C₆H₅-CH₂-O, C₆H₅-CH₂-CH e C₆H₅-CH).

RMN de ¹³C (DMSO-d₆ δ): 37,191 (C-11, CH₂-CH); 56,570 (C-10, CH-CH₂); 57,503 (C-2, CH- α); 65,142 (C-18, CH₂-O); 71,554 (C-3, CH- β); 126,098 (C-5, CH); 126,465 (C-15, CH); 127,234 (C-20, CH); 127,244 (C-7, CH); 127,551 (C-6, CH); 127,891 (C-21, CH); 127,954 (C-22, CH); 128,236 (C-14, CH); 129,106 (C-13, CH); 136,955 (C-19, C); 138,238 (C-12, C); 142,513 (C-4, C); 155,689 (C-17, O-C=O); 171,478 (C-9, CONH) 171,059 (C-1, COOH).

Dados físicos de (54b): massa oleosa branca, que não fornece bons espectros de ressonância.

5.5.2- Síntese do Dipeptídeo Z-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-OH (55)

A hidrólise de 0,100 g (0,209 mmol) do dipeptídeo (50) foi realizada pela dissolução em 0,42 mL de MeOH com a adição de 0,46 mL de NaOH 1N e 0,21 mL de HCl 1N, assim como descrito no método geral, obtendo-se um sólido branco com rendimento de 77%, que só foi analisado por CCD.

5.5.3- Síntese do Dipeptídeo Z-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-OH (56)

Dissolvendo-se 9,00 g (18,346 mmol) do dipeptídeo (**51**) em 37,44 mL de MeOH, e se adicionando 40,56 mL de NaOH 1N e 18,72 mL de HCl 1N, pode-se hidrolisar este peptídeo obtendo-se uma massa oleosa esverdeada, que quando liofilizada solidifica-se, com um rendimento de 87%. Igualmente ao peptídeo (**54b**) esse não fornece boas análises por RMN.

5.5.4- Síntese do Dipeptídeo *Z-Me-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-OH* (**57**)

Partindo-se de 0,100 g (0,203 mmol) do dipeptídeo (**53**) dissolvidos em 0,41 mL de MeOH, com a adição de 0,44 mL de NaOH 1N e 0,20 mL de HCl 1N, obteve-se o dipeptídeo hidrolisado (**57**) na mesma forma de massa oleosa amarelada, com um rendimento de 70% que por estar em pouca quantidade só foi analisado por CCD.

5.6- Síntese dos Tripeptídeos: Método Geral

Uma mistura dos dipeptídeos com a função carboxila livre, e quantidades equimolares de HOBt, do aminoácido isoleucina esterificado (**58**) e NMM são dissolvidos em THF seco a 0°C, sob

atmosfera de argônio, adicionando-se em seguida um excesso de 0,27 mmol de DCCI.

Essa mistura foi deixada sob agitação a 0°C por 1 h e por mais 24 h a temperatura ambiente. A DCCU formada foi então removida por filtração e o solvente evaporado, resíduo formado foi redissolvido em acetato de etila e lavado com uma solução saturada de NaHCO₃. Extraiu-se a fase aquosa com acetato de etila (3 x 20 mL). A fase orgânica foi extraída com solução aquosa de ácido cítrico a 10 % (p/v), seguida de solução NaHCO₃ e água. Secou-se a fase orgânica e evaporou-se o solvente.

5.6.1- Síntese do Tripeptídeo *Z-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe* (**59a**)

Obtido a partir de 2,50 g (5,40mmol) do dipeptídeo *Z-L-Phe-Treo-L-Pheser-OH* (**54a**), 0,729 g (5,40 mmol) HOBt, 0,595 mL (0,546 g, 5,40 mmol) de NMM, 0,784 g (5,40 mmol) do aminoácido esterificado isoleucina e 1,16 g (5,67 mmol) de DCCI dissolvidos em 5mL de THF seco e com um rendimento de 72%.

Dados físicos: sólido branco; (*Exp*: p.f.= 144 - 145°C)

RMN de ¹H (CDCl₃ δ) (**59a**): 0,89 (d*; 3H, CH₃-CH); 0,91 (t*; 3H, CH₃-CH₂); 0,90 - 1,24 (m, 2H, CH₃-CH₂-CH); 2,16 (m, 1H, CH₃-CH-CH₂); 2,83 - 2,96 (dd; 2H, Ph-CH₂-CH J₁₈₋₁₇=6,34 Hz; J₁₈₋₁₇=7,40 Hz; J_{18-18'}=14,00 Hz); 3,74 (s, 3H, CH₃-O); 4,37 (dd; 1H, CH-CH₂, J₁₇₋₂₃=13,68 Hz; J₁₇₋₁₈= 6,34 Hz); 4,48 (dd; 1H,

NH-CH-COOCH₃, J_{2,7}= 8,30 Hz; J_{2,3}= 5,12 Hz); 5,07 (d*, 2H, NH-23, J₂₃₋₁₇= 13,68 Hz); 5,28 (s, 2H, CH₂-O); 4,64 (dd; 1H, CH-α, J₉₋₁₅=7,68 Hz; J₉₋₁₀= 2,96 Hz); 5,29 (d; 1H, CH-β, J₁₀₋₉= 2,96 Hz); 6,83 (d, 1H, NH-CH-α, J₁₅₋₉= 7,68 Hz); 7,09 - 7,37(m*, 15H, C₆H₅-CH, C₆H₅-CH₂, C₆H₅-CH₂-O); 7,10 (d; 1H, NH-7, J₇₋₈= 8,30 Hz).

RMN de ¹³C (CDCl₃, δ) (**59a**): 11,523 (C-5, CH₃-CH₂); 15,451 (C-6, CH₃-CH); 25,093 (C-4, CH₃-CH₂-CH); 37,598 (C-3, CH₃-CH-CH); 37,806 (C-18, (Ph-CH₂-CH); 52,145 (C-30, CH₃-O); 56,217 (C-17, CH-CH₂); 56,787 (C-2, CH-CHCOOCH₃); 57,556 (C-9, CH-α); 67,252 (C-25, CH₂-O); 71,829 (C-10, CH-β); 125,730 (C-12, CH); 127,191 (C-20, CH); 127,932 (C-14, CH); 128,034 (C-27, CH); 128,293 (C-13, CH); 128,406 (C-29, CH) 128,576 (C-22, CH); 128,871 (C-21, CH); 129,046 (C-28, CH); 135,864(C-19, C); 135,915 (C-26, C); 138,871 (C-11, C); 155,960 (C-24, COOCH₂); 170,136 (C-8, CO-NH); 171,606 (C-1, CO-OCH₃); 171,799 (C-16, CO-NH).

5.6.2- Síntese do Tripeptídeo Z-L-Phe-Treo-D-Pheser-L-Ile-OMe (**59b**)

Obtido a partir de 2,50 g (5,40mmol) do dipeptídeo Z-L-Phe-Treo-D-Pheser-OH (**54b**), 0,729 g (5,40 mmol) HOBt, 0,595 mL (0,546 g, 5,40 mmol) de NMM, 0,784 g (5,40 mmol) do aminoácido esterificado isoleucina e 1,16 g (5,67 mmol) de DCCI dissolvidos em 5mL de THF seco e com um rendimento de 69%.

Dados físicos: sólido branco; (*Exp*: p.f.= 167-168°C)

RMN de ^1H (CDCl_3 δ) (**59b**): 0,88 (t*; 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$, $J_{5-4}= 7,4$ Hz); 0,91 (d; 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}$, $J_{6-3}= 6,8$ Hz); 1,15 - 1,38 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}$); 1,87 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_2$); 2,77 - 2,96 (dd; 2H, $\text{Ph-CH}_2\text{-CH}$ $J_{18-17}=5,68$ Hz, $J_{18'-17}=7,90$ Hz; $J_{18-18'}=14,00$ Hz); 3,66 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$); 4,30 (dd; 1H, CH-CH_2 , $J_{17-18}=5,68$ Hz, $J_{17-18'}= 7,90$ Hz, $J_{17-23}= 6,80$ Hz); 4,49 (dd; 1H, NH-CH-COOCH_3 , $J_{2-7}= 8,24$ Hz; $J_{2-3}= 4,88$ Hz); 4,71 (dd, 1H, $\text{CH-}\alpha$, $J_{9-15}= 6,60$ Hz, $J_{9-10}= 2,12$ Hz); 5,03 (q*, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$, $J_{25-25'}=12,30$ Hz); 5,28 (d, 2H, NH-23 , $J_{23-17}= 6,80$ Hz); 5,33 (d*; 1H, $\text{CH-}\beta$, $J_{10-9}= 2,12$ Hz); 6,98 (d, 1H, $\text{NH-CH-}\alpha$, $J_{15-9}= 7,9$ Hz); 7,18 - 7,34(m*, 15H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-O}$); 7,10 (d; 1H, NH-7 , $J_{7-8}= 8,30$ Hz).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 δ) (**59b**): 11,535 (C-5, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$); 15,557 (C-6, $\text{CH}_3\text{-CH}$); 25,175 (C-4, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}$); 37,137 (C-3, $\text{-CH}_3\text{-CH-CH}$); 37,600 (C-18, ($\text{Ph-CH}_2\text{-CH}$); 52,117 (C-30, $\text{CH}_3\text{-O}$); 56,411 (C-17, CH-CH_2); 57,059 (C-2, CH-CHCOOCH_3); 58,268 (C-9, $\text{CH-}\alpha$); 67,094(C-25, $\text{CH}_2\text{-O}$); 72,060 (C-10, $\text{CH-}\beta$); 125,792 (C-12, CH); 127,0,38 (C-20, CH); 127,896 (C-14, CH); 127,983 (C-27, CH); 128,203 (C-13, CH); 128,460 (C-29, CH) 128,514 (C-22, CH); 128,639 (C-21, CH); 129,092 (C-28, CH); 135,934 (C-19, C); 136,020 (C-26, C); 139,221 (C-11, C); 156,056 (C-24, COOCH_2); 170,737 (C-8, CO-NH); 172,025 (C-1, CO-OCH_3); 172,130 (C-16, CO-NH).

5.6.3- Síntese do Tripeptídeo *Z-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-OMe* (**60**)

Obtido a partir de 0,070 g (0,151mmol) do dipeptídeo *Z-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-OH* (**55**), 0,020 g (0,151 mmol) HOBt, 0,016 mL (0,015 g, 0,151 mmol) de NMM, 0,021 g (0,151 mmol) do aminoácido esterificado isoleucina e 0,032 g (0,158 mmol) de DCCI dissolvidos em 0,5 mL de THF seco e com um rendimento de 60%.

Dados físicos de: sólido branco

5.6.4- Síntese do Tripeptídeo *Z-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-L-Ile-OMe* (**61**)

Obtido a partir de 6,00 g (12,591 mmol) do dipeptídeo *Z-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-OH* (**56**), 1,70 g (12,591 mmol) HOBt, 1,38 mL (1,273 g, 12,591 mmol) de NMM, 1,82 g (12,591 mmol) do aminoácido esterificado isoleucina e 2,72 g (13,205 mmol) de DCCI dissolvidos em 10 mL de THF seco com um rendimento de 65%.

Dados físicos: óleo pastoso e amarelado

RMN de ^1H (CDCl_3 δ) (diastereoisômero em maior proporção): 0,74 (d*, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}$); 0,82 (t*, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$); 0,99 – 1,28 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1,77 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_2$); 2,57 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}$); 3,11-3,15-3,18 (ddd, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}$, $J_{18-17} = 5,20$ Hz, $J_{18'-17} = 5,60$ Hz, $J_{18-18'} = 6,00$ Hz); 3,61 (s, 3H, O-CH_3); 4,42 (dd; 1H, CH-CH_2 , $J_{17-18} = 8,00$ Hz, $J_{17-18'} = 13,20$ Hz); 4,60 (dd*, 1H, CH-COOCH_3 ,

$J_{2-7} = 7,60$ Hz); 4,85 (dd*, 1H, CH- α); 5,08 (q*, 2H, CH₂-O); 5,30 (d*, 1H, CH- β); 6,95 (d*, 1H, NH-15); 7,05 (d*, NH-7, $J_{7-2} = 7,60$ Hz); 7,09 - 7,26 (m, 15H, C₆H₅-CH₂-O, C₆H₅-CH₂-CH e C₆H₅-CH).

RMN de ¹³C (CDCl₃ δ): 11,500 (C-5, CH₃-CH); 15,530 (C-6, CH₃-CH₂); 24,945 (C-4, CH₂-CH₃); 30,089 (C-23, CH₃-N); 33,733 (C-18, CH₂-CH); 37,399 (C-3, CH₃-CH-CH₂); 52,080 (C-30, CH₃-O); 56,612 (C-17, CH-CH₂); 57,164 (C-2, CH-COOCH₃); 58,658 (C-9, CH- α); 67,549 (C-25, CH₂-O); 71,187 (C-10, CH- β); 125,577 (C-12, CH); 126,547 (C-20, CH); 127,282 (C-14, CH); 127,649 (C-27, CH); 127,785 (C-13, CH); 128,066 (C-29, CH); 128,291 (C-22, CH); 128,460 (C-21, CH); 128,786 (C-28, CH); 136,237 (C-19, C); 137,302 (C-26, C); 139,473 (C-11, C); 156,718 (C-24, N-COOCH₂); 170,747 (C-8, CONH) 171,608 (C-1, COOCH₃); 172,528 (C-16, CONH).

RMN de ¹H (CDCl₃ δ): (diastereoisômero em menor proporção) 0,84 (d*, 3H, CH₃-CH); 0,82 (t*, 3H, CH₃-CH₂); 1,15 - 1,38 (m, 2H, CH₂-CH₃); 1,87 (m, 1H, CH₃-CH-CH₂); 2,24 (s, 3H, CH₃-N); 3,11-3,15-3,18 (ddd, 2H, CH₂-CH, $J_{18-17} = 5,20$ Hz, $J_{18'-17} = 5,60$ Hz, $J_{18-18'} = 6,00$ Hz); 3,66 (s, 3H, O-CH₃); 4,42 (dd; 1H, CH-CH₂, $J_{17-18} = 8,00$ Hz, $J_{17-18'} = 13,20$ Hz); 4,56 (dd*, 1H, CH-COOCH₃, $J_{2-7} = 8,00$ Hz, $J_{2-3} = 2,40$ Hz); 4,85 (dd*, 1H, CH- α); 5,05 (q*, 2H, CH₂-O); 5,32 (d*, 1H, CH- β); 6,98 (d*, 1H, NH-15); 7,05 (d*, NH-7, $J_{7-2} = 8,00$ Hz); 7,09 - 7,26 (m, 15H, C₆H₅-CH₂-O, C₆H₅-CH₂-CH e C₆H₅-CH).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 δ): 11,448 (C-5, $\text{CH}_3\text{-CH}$); 15,355 (C-6, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$); 25,161 (C-4, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 30,089 (C-23, $\text{CH}_3\text{-N}$); 33,805 (C-18, $\text{CH}_2\text{-CH}$); 36,916 (C-3, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_2$); 52,080 (C-30, $\text{CH}_3\text{-O}$); 56,842 (C-17, CH-CH_2); 57,362 (C-2, CH-COOCH_3); 60,016 (C-9, $\text{CH-}\alpha$); 67,549 (C-25, $\text{CH}_2\text{-O}$); 71,815 (C-10, $\text{CH-}\beta$); 125,434 (C-12, CH); 126,547 (C-20, CH); 127,282 (C-14, CH); 127,649 (C-27, CH); 127,785 (C-13, CH); 128,066 (C-29, CH); 128,291 (C-22, CH); 128,460 (C-21, CH); 128,786 (C-28, CH); 136,237 (C-19, C); 136,873 (C-26, C); 139,157 (C-11, C); 156,910 (C-24, N-COOCH_2); 170,747 (C-8, CONH) 171,257 (C-1, COOCH_3); 172,528 (C-16, CONH).

5.6.5- Síntese do Tripeptídeo *Z-Me-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-OMe* (**62**)

Obtido a partir de 0,061 g (0,130 mmol) do dipeptídeo *Z-Me-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-OH* (**57**), 0,017 g (0,130 mmol) HOBt, 0,014 mL (0,013 g, 0,130 mmol) de NMM, 0,018 g (0,130 mmol) do aminoácido esterificado isoleucina e 0,028 g (0,136 mmol) de DCCI dissolvidos em 0,5 mL de THF seco e com um rendimento de 48%.

Dados físicos: óleo amarelado pastoso

RMN de ^1H (CDCl_3 δ) (diastereoisômero em maior proporção): 0,81 (d, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}$, $J_{6-3} = 6,80$ Hz); 0,90 (t*, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$); 1,10 – 1,31 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 1,84 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_2$); 2,74 (s, 3H,

CH₃-N); 2,96-3,19 (dd*, 2H, CH₂-CH, J₁₈₋₁₇= 6,16 Hz, J_{18'-17}= 10,24 Hz, J_{18-18'}= 15,96 Hz); 3,74 (s, 3H, O-CH₃); 4,48 (dd; 1H, CH-COOCH₃, J₂₋₃= 5,15 Hz, J₂₋₇= 9,84 Hz); 4,71 (dd*, 1H, CH-CH₂, J_{17-18''}= 10,24 Hz, J₁₇₋₁₈=6,16 Hz); 4,93 (dd*, 1H, CH-α); 5,07 (q*, 2H, CH₂-O); 5,37 (d*, 1H, CH-β); 5,35 (d*, 1H, NH-15); 7,10 (d*, NH-7, J₇₋₂= 9,84 Hz); 7,24 - 7,45 (m, 15H, C₆H₅-CH₂-O, C₆H₅-CH₂-CH e C₆H₅-CH).

RMN de ¹³C (CDCl₃ δ): 11,484 (C-5, CH₃-CH); 15,429 (C-6, CH₃-CH₂); 25,017 (C-4, CH₂-CH₃); 29,611 (C-23, CH₃-N); 33,772 (C-18, CH₂-CH); 37,485 (C-3, CH₃-CH-CH₂); 52,137 (C-30, CH₃-O); 55,937 (C-17, CH-CH₂); 56,659 (C-2, CH-COOCH₃); 57,275 (C-9, CH-α); 67,293 (C-25, CH₂-O); 71,213 (C-10, CH-β); 125,438 (C-12, CH); 126,523 (C-20, CH); 127,840 (C-14, CH); 128165 (C-27, CH); 128,314 (C-13, CH); 128,364 (C-29, CH); 128,444 (C-22, CH); 128,529 (C-21, CH); 129,328 (C-28, CH); 136,606 (C-19, C); 137,684 (C-26, C); 139,117 (C-11, C); 156,278 (C-24, N-COOCH₂); 169,551 (C-8, CONH) 170,941 (C-1, COOCH₃); 171,613 (C-16, CONH).

RMN de ¹H (CDCl₃ δ): (diastereoisômero em menor proporção)

0,81 (d, 3H, CH₃-CH, J₆₋₃= 6,80); 0,90 (t*, 3H, CH₃-CH₂); 1,10 – 1,31 (m, 2H, CH₂-CH₃); 1,84 (m, 1H, CH₃-CH-CH₂); 2,31 (s, 3H, CH₃-N); 2,96-3,19 (dd*, 2H, CH₂-CH, J₁₈₋₁₇= 6,16 Hz, J_{18'-17}= 10,24 Hz, J_{18-18'}= 15,96 Hz); 3,74 (s, 3H, O-CH₃); 4,50 (dd; 1H,

CH-COOCH₃, J₂₋₃= 5,24 Hz, J₂₋₇= 9,84 Hz); 4,66 (dd*, 1H, CH-CH₂, J₁₇₋₁₈= 10,24 Hz, J₁₇₋₁₈=6,16 Hz); 4,93 (dd*, 1H, CH-α); 5,07 (q*, 2H, CH₂-O); 5,37 (d*, 1H, CH-β); 5,19 (d*, 1H, NH-15); 7,10 (d*, NH-7, J₇₋₂= 9,84 Hz); 7,24 - 7,45 (m, 15H, C₆H₅-CH₂-O, C₆H₅-CH₂-CH e C₆H₅-CH).

RMN de ¹³C (CDCl₃ δ): 11,554 (C-5, CH₃-CH); 15,635 (C-6, CH₃-CH₂); 25,017 (C-4, CH₂-CH₃); 29,893 (C-23, CH₃-N); 33,878 (C-18, CH₂-CH); 36,851 (C-3, CH₃-CH-CH₂); 52,137 (C-30, CH₃-O); 55,937 (C-17, CH-CH₂); 56,659 (C-2, CH-COOCH₃); 57,203 (C-9, CH-α); 67,619 (C-25, CH₂-O); 71,213 (C-10, CH-β); 125,553 (C-12, CH); 126,523 (C-20, CH); 127,630 (C-14, CH); 128165 (C-27, CH); 128,314 (C-13, CH); 128,364 (C-29, CH); 128,444 (C-22, CH); 128,523 (C-21, CH); 129,328 (C-28, CH); 136,140 (C-19, C); 137,298 (C-26, C); 139,117 (C-11, C); 155,428 (C-24, N-COOCH₂); 169,551 (C-8, CONH) 170,123 (C-1, COOCH₃); 171,613 (C-16, CONH).

5.7- Desproteção do Grupamento Carbobenzozi dos tripeptídeos formados: Método Geral

Em um balão de duas bocas, dissolveu-se cada um dos tripeptídeos (**59**), (**60**) e (**61**) em metanol absoluto e se adicionou, quantidades catalíticas de 10% Pd/C, a esta mistura, foi então passado um fluxo contínuo de H₂ (por borbulhamento) sob agitação magnética a temperatura ambiente. Sendo esses interrompidos somente ao término da reação acompanhado por CCD.

Depois de completada a reação, filtrou-se a mesma em coluna cromatográfica empacotada com celite e utilizando-se metanol como fase móvel, obtendo-se após a evaporação do solvente, rendimentos que variam de 88-64%.

5.7.1- Síntese dos tripeptídeos NH₂-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe (**63a**) e NH₂-L-Phe-Treo-D-Pheser-L-Ile-OMe (**63b**).

Partindo-se de 1,50 g (2,543 mmol) dos tripeptídeos protegidos Z-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe (**59a**) e Z-L-Phe-Treo-D-Pheser-L-Ile-OMe (**59b**), dissolvidos em 20 mL de MeOH, obteve-se os tripeptídeos hidrogenados (**63a**) e (**63b**) pelo borbulhamento de H₂ a essa solução contendo quantidades catalíticas de 10% Pd/C durante

5 horas a temperatura ambiente, com os respectivos rendimentos de 88 e 75%.

Dados físicos de (63a): sólido branco

RMN de ^1H (CDCl_3 δ): 0,88 (d; 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}$, $J_{6-3}=6,84$ Hz); 0,90 (t; 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$, $J_{5-4}=6,52$ Hz); 1,16 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}$); 1,44 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}$); 1,90 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_2$); 2,27; 3,00 (dd; 1H, $\text{Ph-CH}_2\text{-CH}$; $J_{18-17}=4,00$ Hz; $J_{18'-17}=9,50$ Hz; $J_{18-18'}=13,70$ Hz); 3,58 (dd; 1H, CH-CH_2 , $J_{17-18}=3,85$ Hz; $J_{17-23}=9,44$ Hz); 3,75 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$); 4,63 (dd; 1H, $\text{CH-}\alpha$, $J_{9-15}=7,84$ Hz; $J_{9-10}=2,60$ Hz); 4,48 (dd; 1H, NH-CH-COOCH_3 , $J_{2-7}=8,30$ Hz; $J_{2-3}=3,16$ Hz); 5,36 (d; 1H, $\text{CH-}\beta$, $J_{10-9}=2,60$ Hz); 7,30 (d*, 1H, NH-CH-COOCH_3) 7,06 - 7,33(m*, 10H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$); 8,21 (d; 1H, $\text{NH-CH-}\alpha$, $J_{15-9}=7,84$ Hz).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 δ) (63a): 11,529 (C-5, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$); 15,480 (C-6, $\text{CH}_3\text{-CH}$); 25,073 (C-4, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}$); 37,602 (C-3, $\text{-CH}_3\text{-CH-CH}$); 40,411 (C-18, ($\text{Ph-CH}_2\text{-CH}$); 52,144 (C-24, $\text{CH}_3\text{-O}$); 56,704 (C-2, CH-CH); 56,224 (C-17, CH-NH_2); 57,339 (C-9, $\text{CH-}\alpha$); 71,921 (C-10, $\text{CH-}\beta$); 125,874 (C-12, CH); 126,894 (C-20, CH); 127,804 (C-14, CH); 128,296 (C-13, CH); 128,740 (C-22, CH); 129,141 (C-21, CH); 137,227(C-19, C); 139,165(C-11, C); 171,035 (C-8, CO-NH); 171,660 (C-1, CO-OCH₃); 175,466 (C-16, CO-NH).

Dados físicos de (63b): óleo pastoso

RMN de ^1H (CDCl_3 , δ): 0,81 (d; 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}$, $J_{6,3}=6,80$ Hz); 0,91 (t; 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$, $J_{5,4}=7,80$ Hz); 1,18 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}$); 1,25 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}$); 1,84 (m, 1H, $\text{CH}_3\text{-CH-CH}_2$); 2,67; 3,20 (dd; 1H, $\text{Ph-CH}_2\text{-CH}$ $J_{18-17}=3,76$ Hz; $J_{18',-17}=7,90$ Hz; $J_{18-18'}=14,00$ Hz); 3,60 (dd; 1H, CH-CH_2 , $J_{17-18}=3,76$ Hz; $J_{17-18'}=7,90$ Hz); 3,65 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$); 4,44 (dd; 1H, NH-CH-COOCH_3 , $J_{2,7}=7,44$ Hz; $J_{2,3}=5,04$); 4,60 (dd; 1H, $\text{CH-}\alpha$, $J_{9-15}=6,04$ Hz; $J_{9-10}=2,32$ Hz); 5,35 (d; 1H, $\text{CH-}\beta$, $J_{10-9}=2,32$ Hz); 7,15 (d, 1H, NH-CH-COOCH_3 , $J_{7-2}=7,44$ Hz) 7,19 - 7,49(m*, 10H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$); 8,31 (d; 1H, $\text{NH-CH-}\alpha$, $J_{15,9}=6,04$ Hz).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , δ) (**63b**): 11,499 (C-5, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$); 15,622 (C-6, $\text{CH}_3\text{-CH}$); 25,191 (C-4, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}$); 37,193 (C-3, $\text{-CH}_3\text{-CH-CH}$); 39,890 (C-18, ($\text{Ph-CH}_2\text{-CH}$); 52,165 (C-24, $\text{CH}_3\text{-O}$); 56,963 (C-2, CH-CH); 56,194 (C-17, CH-NH_2); 58,190 (C-9, $\text{CH-}\alpha$); 72,243 (C-10, $\text{CH-}\beta$); 126,036 (C-12, CH); 127,028 (C-20, CH); 128,779 (C-14, CH); 128,337 (C-13, CH); 128,774 (C-22, CH); 129,319 (C-21, CH); 136,889 (C-19, C); 139,463 (C-11, C); 170,737 (C-8, CO-NH); 171,229 (C-1, CO-OCH_3); 172,219 (C-16, CO-NH).

5.7.2- Síntese do tripeptídeo $\text{NH}_2\text{-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-OMe}$ (**64**)

Obtido a partir de uma mistura de 0,045 g (0,0763 mmol) do tripeptídeo $Z\text{-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-OMe}$ (**60**) dissolvidos

em 1 mL de MeOH, com quantidades catalíticas de 10% Pd/C (proporcionais à reação), pelo borbulhamento de H₂ por 2 horas, com rendimento de 67% na forma de um óleo pastoso.

5.7.3- Síntese do tripeptídeo N-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (**65**)

Pode-se obter tripeptídeo hidrogenado (**65**), a partir de 4,00 g (6,625 mmol) do tripeptídeo Z-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (**61**), dissolvido em 20 mL de MeOH e com a adição de quantidades catalíticas de 10% Pd/C pela passagem de H₂ por borbulhamento durante 6 horas, fornecendo um rendimento de 64%.

Dados físicos: sólido levemente amarelado

RMN de ¹H (CDCl₃ δ): (diastereoisômero em maior proporção) 0,80 (d*; 3H, CH₃-CH); 0,92 (t*; 3H, CH₃-CH₂); 1,28 (m, 1H, CH₃-CH₂-CH); 1,43 (m, 1H, CH₃-CH₂-CH); 1,86 (m, 1H, CH₃-CH-CH₂); 2,26 (s, 3H, N-CH₃); 2,31; 2,58 (d*; 1H, CH-CH₂); 3,25 (dd*; 1H, Ph-CH₂-CH); 3,65 (s, 3H, CH₃-O); 4,44 (dd; 1H, NH-CH-COOCH₃); 4,98 (dd; 1H, CH-α, J₉₋₁₅=7,88 Hz; J₉₋₁₀= 4,24 Hz); 5,24 (d; 1H, CH-β, J₁₀₋₉= 4,24 Hz); 6,98 (d*, 1H,

NH-CH-COOCH₃) 7,16 - 7,70 (m*, 10H, C₆H₅-CH, C₆H₅-CH₂); 8,75 (d; 1H, NH-CH- α , J₁₅₋₉= 7,88 Hz).

RMN de ¹³C (CDCl₃ δ): 11,373 (C-5, CH₃-CH₂); 15,321 (C-6, CH₃-CH); 25,107 (C-4, CH₃-CH₂-CH); 31,577 (C-23, N-CH₃); 36,208 (C-18, (Ph-CH₂-CH)); 37,287 (C-3, -CH₃-CH-CH); 51,872 (C-24, CH₃-O); 56,845 (C-2, CH-CH); 62,753 (C-17, CH-NH-CH₃); 59,292 (C-9, CH- α); 73,260 (C-10, CH- β); 126,382 (C-12, CH); 126,837 (C-20, CH); 127,585 (C-14, CH); 127,845 (C-13, CH); 128,569 (C-22, CH); 129,528 (C-21, CH); 134,208 (C-19, C); 140,046 (C-11, C); 169,996 (C-8, CO-NH); 166,920 (C-1, CO-OCH₃); 171,653 (C-16, CO-NH).

RMN de ¹H (CDCl₃ δ): (diastereoisômero em menor proporção)
0,80 (t*; 3H, CH₃-CH₂); 0,92 (d*; 3H, CH₃-CH); 1,28-1,43 (m, 1H, CH₃-CH₂-CH); 1,86 (m, 1H, CH₃-CH-CH₂); 2,31; 2,58 (d*; 1H, CH-CH₂); 2,57 (s, 3H, N-CH₃); 3,25 (dd*; 1H, Ph-CH₂-CH); 3,64 (s, 3H, CH₃-O); 4,44 (dd*; 1H, NH-CH-COOCH₃); 4,85 (dd; 1H, CH- α , J₉₋₁₅=7,60 Hz; J₉₋₁₀= 3,64 Hz); 5,18 (d; 1H, CH- β , J₁₀₋₉= 3,64 Hz); 6,98 (d*, 1H, NH-CH-COOCH₃) 7,16 - 7,70 (m*, 10H, C₆H₅-CH, C₆H₅-CH₂); 8,75 (d; 1H, NH-CH- α , J₁₅₋₉= 7,88 Hz).

RMN de ¹³C (CDCl₃ δ): 11,306 (C-5, CH₃-CH₂); 15,321 (C-6, CH₃-CH); 25,147 (C-4, CH₃-CH₂-CH); 32,040 (C-23, N-CH₃); 36,208 (C-18, (Ph-CH₂-CH)); 36,873 (C-3, -CH₃-CH-CH); 51,872 (C-24, CH₃-O); 56,960 (C-2, CH-CH); 62,490 (C-17, CH-NH-CH₃); 59,292 (C-9, CH- α); 72,568 (C-10, CH- β); 126,223 (C-12, CH); 127,222

(C-20, CH); 127,533 (C-14, CH); 127,646 (C-13, CH); 128,569 (C-22, CH); 129,624 (C-21, CH); 133,744 (C-19, C); 139,768 (C-11, C); 169,097 (C-8, CO-NH); 167,617 (C-1, CO-OCH₃); 172,254 (C-16, CO-NH).

5.8- Reação de *N,N*-Dimetilação: Método Geral

Os tripeptídeos (**63a**), (**63b**) e (**64**) foram dissolvidos em metanol absoluto e transferidos para o frasco de vidro do hidrogenador, sendo adicionado a esta solução pequenas quantidades (catalíticas) de catalisador Pd/C e para cada equivalente dos peptídeos adicionou-se dois de formaldeído. O recipiente de vidro foi adaptado ao hidrogenador e a solução foi então submetida a degasamento por vácuo e pela passagem de um fluxo de H₂.

Aplica-se uma pressão de 3 Kp/cm² de H₂ e mantém-se o meio reacional sob agitação a temperatura ambiente aproximadamente 12 horas. Acompanhou-se a evolução da reação pela diminuição da pressão de H₂ no recipiente e por CCD. Após o término da reação eliminou-se o excesso de catalizador, por filtração em coluna empacotada com fase estacionária de celite e evaporou-se o solvente.

5.8.1- Síntese dos tripeptídeos N,N-(Me)₂-L-Phe-*Treo*-L-Pheser-L-Ile-OMe (**66a**) e N,N-(Me)₂-L-Phe-*Treo*-D-Pheser-L-Ile-OMe (**66b**)

Partindo-se de 0,650 g (1,426 mmol) dos tripeptídeos (**63a**) e (**63b**) dissolvidos em 10 mL de MeOH que pela adição de 0,078 mL (0,085 g, 2,852 mmol) de solução aquosa formaldeído (37%) e quantidades catalíticas de 10% Pd/C sob pressão de H₂ igual a 3 Kp/cm², por aproximadamente 10 horas, fornece os tripeptídeos dimetilados (**66a**) e (**66b**) com os respectivos rendimentos de 80% e 77%.

Dados físicos de (**66a**): óleo amarelado

RMN de ¹H (CDCl₃ δ): 0,78 (d; 3H, CH₃-CH, J₆₋₃= 6,88); 0,82 (t; 3H, CH₃-CH₂, J₅₋₄=7,38); 1,06 (m, 1H, CH₃-CH₂-CH); 1,30 (m, 1H, CH₃-CH₂-CH); 1,81 (m, 1H, CH₃-CH-CH₂); 2,06 (s, 6H, N-(CH₃)₂); 2,77 (dd; 2H, Ph-CH₂-CH J₁₈₋₁₇=5,76 Hz; J_{18'-17}=7,78 Hz; J_{18-18'}=14,00 Hz); 3,15 (dd; 1H, CH-CH₂, J₁₇₋₁₈=5,76 Hz; J_{17-18'}= 7,78 Hz); 3,73 (s, 3H, CH₃-O); 4,55 (dd; 1H, CH-α, J₉₋₁₅=7,60 Hz; J₉₋₁₀= 2,16 Hz); 4,44 (dd; 1H, NH-CH-COOCH₃, J₂₋₇= 8,32 Hz; J₂₋₃= 5,12 Hz); 5,41 (d; 1H, CH-β, J₁₀₋₉= 2,16 Hz); 7,33 (d, 1H, NH-CH-COOCH₃, J₂₋₇= 8,32 Hz); 6,94 - 7,17(m*, 10H, C₆H₅-CH, C₆H₅-CH₂); 7,80 (d; 1H, NH-CH-α, J₁₅₋₉= 7,6 Hz).

RMN de ¹³C (CDCl₃ δ): 11,442 (C-5, CH₃-CH₂); 15,453 (C-6, CH₃-CH); 24,887 (C-4, CH₃-CH₂-CH); 32,458 (C-18, (Ph-CH₂-CH)); 37,349 (C-3, -CH₃-CH-CH); 42,013 (C-23, N-(CH₃)₂); 52,127 (C-24, CH₃-O); 56,735 (C-2, CH-CH); 56,980 (C-9, CH-α); 71,246 (C-17, CH-N(CH₃)₂); 71,304 (C-10, CH-β); 125,687 (C-12, CH); 126,043 (C-20, CH); 127,724 (C-14, CH); 128,259 (C-13, CH); 128,452 (C-22, CH); 128,972 (C-21, CH); 139,490 (C-19, C); 135,904

(C-11, C); 171,836 (C-8, CO-NH); 171,609 (C-1, CO-OCH₃); 174,132 (C-16, CO-NH).

Dados físicos de (66b): óleo amarelado

RMN de ¹H (CDCl₃ δ): 0,81 (d; 3H, CH₃-CH, J₆₋₃= 6,84 Hz); 0,84 (t; 3H, CH₃-CH₂, J₅₋₄=7,08 Hz); 1,12 (m, 1H, CH₃-CH₂-CH); 1,33 (m, 1H, CH₃-CH₂-CH); 1,84 (m, 1H, CH₃-CH-CH₂); 2,18 (s, 6H, N-(CH₃)₂); 2,81-3,06 (dd; 2H, Ph-CH₂-CH J₁₈₋₁₇=6,08 Hz; J_{18'-17}= 6,92 Hz; J_{18-18'}=14,08 Hz); 3,19 (dd*; 1H, CH-CH₂); 3,64 (s, 3H, CH₃-O); 4,56 (dd; 1H, CH-α, J₉₋₁₅=7,76 Hz; J₉₋₁₀= 2,92 Hz); 4,40 (dd; 1H, NH-CH-COOCH₃, J₂₋₇= 8,20 Hz; J₂₋₃= 4,82 Hz); 5,23 (d; 1H, CH-β, J₁₀₋₉= 2,88 Hz); 7,08 (d, 1H, NH-CH-COOCH₃, J₇₋₂= 8,20 Hz); 7,13 - 7,27 (m*, 10H, C₆H₅-CH, C₆H₅-CH₂); 7,73 (d; 1H, NH-CH-α, J₁₅₋₉= 7,50 Hz).

RMN de ¹³C (CDCl₃ δ): 11,547 (C-5, CH₃-CH₂); 15,579 (C-6, CH₃-CH); 25,191 (C-4, CH₃-CH₂-CH); 32,824 (C-18, (Ph-CH₂-CH)); 37,377 (C-3, -CH₃-CH-CH); 41,984 (C-23, N(CH₃)₂); 52,076 (C-24, CH₃-O); 56,829 (C-2, CH-CH); 57,865 (C-9, CH-α); 70,142 (C-17, CH-N(CH₃)₂); 71,848 (C-10, CH-β); 125,720 (C-12, CH); 126,224 (C-20, CH); 127,712 (C-14, CH); 128,319 (C-13, CH); 128,388 (C-22, CH); 129,011 (C-21, CH); 139,202 (C-19, C); 139,202 (C-11, C); 171,805 (C-8, CO-NH); 171,076 (C-1, CO-OCH₃); 171,076 (C-16, CO-NH).

5.8.2- Síntese do tripeptídeo N,N-(Me)₂-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (67)

Obtido com um rendimento de 65%, a partir da reação de 0,020 g (0,043 mmol) do tripeptídeo (**64**) dissolvido em 0,5 mL de MeOH, com 0,0023 mL (0,0025 g, 0,086 mmol) de solução aquosa formaldeído (37%) e quantidades catalíticas de 10% Pd/C sob pressão de H₂ igual a 3 Kp/cm², por aproximadamente 12 horas.

Dados físicos de: óleo amarelado

RMN de ¹H (CDCl₃ δ): (diastereoisômero em maior proporção)

0,63 (d; 3H, CH₃-CH, J₆₋₃= 6,80 Hz); 0,72 (t; 3H, CH₃-CH₂, J₅₋₄=7,4 Hz; J₅₋₄'= 3,4 Hz); 0,85 (m, 1H, CH₃-CH₂-CH); 1,16 (m, 1H, CH₃-CH₂-CH); 1,80 (m, 1H, CH₃-CH-CH₂); 2,34 (s, 6H, N-(CH₃)₂); 2,95-3,08 (dd; 2H, Ph-CH₂-CH J₁₈₋₁₇=3,20 Hz; J_{18'-17}=8,20 Hz; J_{18-18'}=13,50 Hz); 3,43 (dd; 1H, CH-CH₂, J₁₇₋₁₈=3,20 Hz; J_{17-18'}= 8,2 Hz); 3,60 (s, 3H, CH₃-O); 4,55 (dd; 1H, CH-α, J₉₋₁₅=7,70 Hz; J₉₋₁₀= 3,2 Hz); 4,30 (dd; 1H, NH-CH-COOCH₃, J₂₋₇= 7,60 Hz; J₂₋₃= 4,90 Hz); 5,21 (d; 1H, CH-β, J₁₀₋₉= 3,2 Hz); 6,90 (d, 1H, NH-CH-COOCH₃, J₇₋₂= 7,6 Hz); 7,14 - 7,27 (m*, 10H, C₆H₅-CH, C₆H₅-CH₂); 7,80 (d; 1H, NH-CH-α, J₁₅₋₉= 7,7 Hz).

RMN de ¹³C (CDCl₃ δ): 11,433 (C-5, CH₃-CH₂); 15,271 (C-6, CH₃-CH); 24,966 (C-4, CH₃-CH₂-CH); 33,260 (C-18, (Ph-CH₂-CH)); 37,444 (C-3, -CH₃-CH-CH); 41,775 (C-23, N-(CH₃)₂); 52,097 (C-24, CH₃-O); 56,574 (C-2, CH-CH); 56,874 (C-9, CH-α); 58,047 (C-17, CH-N(CH₃)₂); 74,032 (C-10, CH-β); 125,749 (C-12, CH); 125,960 (C-20, CH); 127,735 (C-14, CH); 128,120 (C-13, CH); 128,468 (C-22, CH); 128,972 (C-21, CH); 139,673 (C-19, C); 139,205 (C-11,

C); 171,532 (C-8, CO-NH); 171,660 (C-1, CO-OCH₃); 172,000 (C-16, CO-NH).

RMN de ¹H (CDCl₃ δ): (diastereoisômero em menor proporção) 0,77 (d; 3H, CH₃-CH, J₆₋₃= 6,80 Hz); 0,82 (t; 3H, CH₃-CH₂, J₅₋₄=7,3 Hz, J₅₋₄= 3,5 Hz); 0,85 (m, 1H, CH₃-CH₂-CH); 1,16 (m, 1H, CH₃-CH₂-CH); 1,75 (m, 1H, CH₃-CH-CH₂); 2,25 (s, 6H, N-(CH₃)₂); 2,77-2,84 (dd*; 2H, Ph-CH₂-CH); 3,56 (dd*; 1H, CH-CH₂); 3,65 (s, 3H, CH₃-O); 4,86 (dd; 1H, CH-α, J₉₋₁₅=7,7 Hz; J₉₋₁₀= 2,0 Hz); 4,38 (dd; 1H, NH-CH-COOCH₃, J₂₋₇= 7,60 Hz; J₂₋₃= 4,80 Hz); 5,32 (d; 1H, CH-β, J₁₀₋₉= 2,0 Hz); 6,90 (d, 1H, NH-CH-COOCH₃, J₇₋₂= 7,6 Hz); 7,14 - 7,27 (m*, 10H, C₆H₅-CH, C₆H₅-CH₂); 7,80 (d; 1H, NH-CH-α, J₁₅₋₉= 7,7 Hz).

RMN de ¹³C (CDCl₃ δ): 11,433 (C-5, CH₃-CH₂); 15,589 (C-6, CH₃-CH); 25,225 (C-4, CH₃-CH₂-CH); 32,704 (C-18, (Ph-CH₂-CH)); 37,338 (C-3, -CH₃-CH-CH); 41,877 (C-23, N-(CH₃)₂); 52,019 (C-24, CH₃-O); 56,744 (C-2, CH-CH); 57,315 (C-9, CH-α); 58,047 (C-17, CH-N(CH₃)₂); 74,032 (C-10, CH-β); 125,839 (C-12, CH); 126,593 (C-20, CH); 127,883 (C-14, CH); 128,347 (C-13, CH); 128,514 (C-22, CH); 129,016 (C-21, CH); 139,673 (C-19, C); 135,904 (C-11, C); 171,532 (C-8, CO-NH); 171,229 (C-1, CO-OCH₃); 172,000 (C-16, CO-NH).

5.9- Determinação da configuração absoluta dos tripeptídeos

5.9.1- Hidrólise ácida dos peptídeos:

Em uma ampola de vidro, adicionou-se 2 a 3 mg do peptídeo juntamente com 2 mL de HCl (tridestilado) \approx 6N (3-6 mL). O tubo de vidro foi selado sob vácuo e mantido a 90-120 °C por 24h. Após evaporação do solvente, o produto foi deixado sob vácuo em dessecador contendo KOH por mais 12 horas para ser então derivatizado conforme itens 5.1.2 e 5.1.3.

5.9.2- Esterificação dos aminoácidos

A reação de esterificação foi realizada colocando-se em frasco de 2 mL 1-2 mg do aminoácido padrão (ou produto da hidrólise de cada tripeptídeo), com 1 mL de solução de diazometano em éter etílico. Após 30 minutos a temperatura ambiente, a reação é terminada pela remoção do solvente em corrente de gás nitrogênio.

5.9.3- *N-O*- Trifluoracetilação

O produto da esterificação foi dissolvido em um vidro com 200 μL de diclorometano e 50 μL de anidrido trifluoracético. Após 30 minutos, a temperatura ambiente, o solvente pode ser removido em corrente de gás nitrogênio e o produto analisado por C.G.

5.9.4- Reação de *N*- Acetilação do éster metílico da *Treo-D,L*- β -Fenilserina (**68**).

Em um balão de fundo redondo, contendo 0,300 g (1,33 mmol) do cloridrato do éster metílico da *Treo-D,L*- β -Fenilserina (**48**) e 0,724 g (5,32 mmol) de AcONa dissolvidos em 6,65 mL de água, adicionou-se gota a gota 0,37 mL (3,99 mmol) de Ac₂O mantendo-se a temperatura em aproximadamente de 5°C.

A reação permaneceu sob agitação a temperatura ambiente durante a noite, formando-se como produto um sólido branco que foi então filtrado e recristalizado com água, com um rendimento de 80%.

Dados físicos: sólido branco cristalino (*Exp*: pf.= 168°C); (*Lit*⁹²: p.f.= 181-182°C)

RMN de ¹H (DMSO-d₆ δ): 1,77(s, 3H, N-COCH₃), 3,60 (s, 3H, O-CH₃); 4,56 (dd, 1H, CH- α , J₂₋₃= 3,68 Hz, J₂₋₈= 8,76 Hz); 5,09 (dd*, 1H, CH- β , J₃₋₂= 3,68 Hz); 5,82 (d, 1H, OH, J₁₂₋₃= 4,92 Hz); 7,31 (m, 5H, C₆H₅); 8,12 (d, 1H, N-H, J₈₋₂= 8,76 Hz).

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 δ): 22,600 (C-10, N-COCH $_3$); 52,288 (C-11, O-CH $_3$); 58,936 (C-2, CH- α), 72,747 (C-3, CH- β); 126,690 (C-5, CH); 127,675 (C-6, CH); 128,229 (C-7, CH); 142,239 (C-4, C); 170,239 (C-1, COOCH $_3$); 171,373 (C-9, COCH $_3$).

5.9.5- Reação do N-Acetil-Treo-D,L- β -Fenilserina-OMe com a enzima α -Quimotripsina

Com a finalidade de se identificar a ordem de eluição dos enantiômeros da Treo-D,L-fenilserina, em CG quiral, o aminoácido sofreu o seguinte procedimento:

Em balão de fundo redondo, 1 mmol do aminoácido N-Ac-Treo-D,L-Pheser-OMe (**68**) é suspenso em 50 mL de uma solução aquosa tamponada (fosfato pH=7,70), adiciona-se então 20 mg da enzima α -quimotripsina (56 und./mg de proteína).

Após a adição da enzima, mantém-se o pH da solução ao seu valor inicial pela adição de solução 0,1M de NaOH e cerca de 3,5 horas após o início da reação à mesma é extraída com acetato de etila para remoção do éster não hidrolisado.

A solução é então acidificada a pH = 2 com HCl 2N (resfriado) e novamente extraída com acetato de etila, que remove o produto ácido, a solução orgânica é seca com MgSO $_4$ e o solvente evaporado a vácuo.

A seguir os produtos são submetidos a uma reação de hidrólise ácida com HCl 6N sob refluxo por 5 horas (reação acompanhada por

CCD revelada com solução de ninidrina). Após, o produto da reação pode ser derivatizado com diazometano seguido de anidrido trifluoracético, sendo possível então analisa-los por CG-quiral.

6. CONCLUSÕES

Conforme as prédisposições de síntese em solução de tripeptídeos *N*-monometilados e *N,N*-dimetilados, precursores de alcalóides ciclopeptídicos e avaliação de suas atividades biológicas, objetivos desse trabalho, pode-se concluir que:

1. Os métodos adotados para a obtenção do aminoácido *N*-metilado, foram efetivos no sentido de reações livres de racemizações, fornecendo ótimos rendimentos, mesmo que empregando uma etapa reacional a mais.

2. A metodologia (DCCI/HOBT) utilizada para o acoplamento dos aminoácidos, foi eficiente mesmo para os aminoácidos *N*-metilados, cujos acoplamentos são ainda uma tarefa muito desafiadora.

3. Ainda no sentido da obtenção dos tripeptídeos *N*-metilados, pode-se dizer que tanto a rota sintética adotada como os métodos de purificação e separação, não foram os mais adequados já que impossibilitaram a separação dos diastereoisômeros formados.

4. Apesar da síntese dos tripeptídeos com o aminoácido central β -fenilserina na forma *Treo* ter apresentado bons resultados, a obtenção desses na forma diastereoisomérica *Eritro*, não foi

igualmente bem sucedida, já que rendeu pouca quantidade desse material.

5. Embora o alcalóide ciclopeptídico Condalina-A (**6**) tenha excepcional atividade antimicrobiana, os tripeptídeos sintetizados não corresponderam às expectativas em torno de suas atividades, indicando a necessidade de maiores estudos a este respeito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. a) Gante, J.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1994**, 33, 1699.
b) Seebach, D.; Abele, S.; Schreiber, J. V.; Martimoni, B.; *Chimia*, **1998**, 52, 734.
2. Gutte, B.; “*Peptides-Synthesis, Structures and applications*”, **1995**, Academic Press, San Diego 1st edition.
3. Sanger, F.; *Nature*, **1953**, 171, 1025.
4. Hase, S.; Sakakibara, S.; Wahrenburger, M.; Schwartz, I.; Walter, R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 3590.
5. Boissomas, R.; St. Guttman, Jaquenoud, P., *Helv. Chim. Acta* **1960**, 43, 1349.
6. a) Tschesche, R.; Kausmann, E. U.; “*In The Alkaloids*”; Manske, R. H. F.; Ed.; Academic: New York, **1975**; vol. 15, chapter 4, 165-205.
b) Jun, Z.; Ninghua, T.; “*Chinese. Science Bulletin*”, **2000**, vol. 45, 1825-1831.
7. a) Morel, A. F.; Bravo, R. V. F.; Reis, F. D. A. M.; and Ruveda, E. A., *Phytochemistry*, **1979**, 18, 473.
b) Morel, A. F., Diegel, M.; Layer, H.; Biermann, J. and Voelter, W., *Z. Physiol. Chem.*, **1983**, 364, 1641.
c) Morel, A. F.; Herzog, R. Biermann, J. and Voelter, W., *Z. Naturforsch.* **1984**, 39b, 1825-1827.

- d) Morel, A. F.; Henning, P. and Voelter, E., *Chimia*, **1985**, 4, 98-99.
- e) Morel, A. F.; Mostardeiro, M. A.; Menezes, A. S. and Zanatta, N., *Phytochemistry*, **1995**, 39(2), 431.
- f) Morel, A. F.; Menezes, A. S.; Mostardeiro, M. A.; and Zanatta, N., *Phytochemistry*, **1995**, 38(3), 783-786.
- g) Morel, A. F., Machado, E. C.; Alvares, A. F., *J. Nat. Prod.*, **1995**, 58, 548.
- h) Mostardeiro, M. A.; Ethur, E. M.; Morel, A. F. and Wessjohann, L. A., *J. Prakt. Chem.*, **1997**, 339, 467-72.
- i) Morel, A. F., Machado, E. C.; Moreira, J. J.; Menezes, A. S.; Mostardeiro, M. A.; Zanatta, N. and Wessjohann, L. A., *Phytochemistry*, **1998**, 47 (1), 125-129.
- j) Morel, A. F., Flach, A.; Zanatta, N.; Ethur, E. M.; Mostardeiro, M. A. and Gehrke, I. T. S., *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 9205-9209.
- k) Morel, A. F.; Gehrke, I. T. S.; Mostardeiro, M. A.; Ethur, E. M.; Zanatta, N.; Machado, E. C., *Phytochemistry*, **1999**, 51, 473-477.
- l) Giacomelli, S.R.; Missau, F. C.; Mostardeiro, M.A.; Silva, U. F.; Dalcol, I. I.; Zanatta, N. and Morel A. F., *J. Nat. Prod.*, **2001**, 64 (7), 997-999.
- m) Morel, A. F.; Araujo, C. A.; Silva, U. F.; Hoelzel, S.C.S.M.; Záchia, R.; Bastos, N.R.; *Phytochemistry*, **2002**, 61, 561-566.

- n) Morel, A. F.; Giacomelli, S.R.; Maldamer, G.; Gonzaga, W.A.; Garcia, C. M.; Silva, U. F.; Dalcol, I. I.; .; *Phytochemistry*, **2004**, 65, 933-937.
8. Tschesche, R.; Last, H.; Fehlhaber, H. -W.; *Chem. Ber.*, **1967**, 100, 3237-3943.
9. Tschesche, R.; Wilhelm, H.; Fehlhaber, H. -W.; *Tetrahedron Lett.*, **1972**, 13, (26), 2609-2612.
10. Tschesche, R.; Elgamal, M.; Miana, G. A. and Legler, G.; *Ber.*, **1975**, 100, 294.
11. Pais, M.; Monseur, X.; Lusinchi, X.; Goutarel, R.; *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1964**, 817.
12. Pais, M.; Marchand, J.; Jarreau, F.-X.; Goutarel, R.; *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1968**, 1145.
13. a) Blanpin, O.; Pais, M. and Quevauviller, M., *Ann. Pharm. Fr.*, **1963**, 21, 147
b) Han, B. H.; Park, M. H.; Park, J. H.; *Pure & Appl. Chem.*, **1989**, 61, 443-448.
c) Han, B. H.; Park, M. H.; Han, Y. N.; *Phytochemistry*, **1990**, 29, 3315-3319.
14. Tschesche, R. and Ammermann, E.; *Chem. Ber.*; **1974**, 107, 2274.
15. Jung, G.; Sartor, J. R.; Rebelato, J. F., *Rev. Inst. Antib.*, **1986**, 23, 27.
16. Bertho, A.; Liang, W. S.; *Arch. Pharm. (weinhein)*, **1973**, 271, 273.

17. Kwai, K.; Nozawa, Y.; Ogihara, Y.; *Experientia*, **1977**, 33, 1454.
18. Mazur, R. H.; James, P. A.; Tymes, D. A.; Hallinan, E. A.; Sanner, J. H. and Schulze, R.; *J. Med. Chem.*, **1980**, 23, 758-763.
19. Tschesche, R.; Frohberg, E.; Fehlhaber, H.-W.; *Chem. Ber.*; **1970**, 103, 2501-2504.
20. Missau, F. C.; “*Dissertação de Mestrado*”, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal de Santa Maria, **2003**.
21. Arbain, D.; Taylor, W.C.; *Phytochemistry*, **1993**, 33, 1263-1266.
22. Servis, R.E.; Kosak, A. I.; Tschesche, R.; Frohberg, E.; Fehlhaber, H.-W.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, 91, 5619-5624.
23. a) Jones, J.; “*Amino Acid and Peptide Synthesis*”, Oxford University Press, **1994**; chapter 5, 25-26.
b) Jones, J.; “*Amino Acid and Peptide Synthesis*”, Oxford University Press, **1994**; chapter 3, 14-15.
c) Jones, J.; “*Amino Acid and Peptide Synthesis*”, Oxford University Press, **1994**; chapter 4, 22-24.
24. Bailey, P. D.; “*An Introduction to Peptide Chemistry*”, John Wiley & Sons, **1990**, chapter 6, 116.
25. Bodansky, M.; “*Principles of Peptide Synthesis*”, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **1984**.
26. Bergmann, M.; Zervas, L., *Chem. Ber.*, **1932**, 65, 1192.
27. McKay, F. and Albertson, N.; *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 4686.
28. Tarbell, D. S.; Yamamoto, Y.; Pope, B. M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1972**, 69, 730.

29. Carpino, L. Hann, G.; *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 3404
30. Greene, T. W., Wuts, P.G. M; “*Protective Groups in Organic Synthesis*”, 2nd Edition, John Wiley & Sons, INC , **1991**, p 351, 362.
31. Kunz, H. and Unversagt, C., *Angw. Chem. Int. Ed. Engl.*; **1984**, 23, 436-437.
32. Haas, W. L., Krumkalns, E. V., and Gerzon, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, 88, 1988.
33. Sakakibara, S. and Fujino, M., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1966**, 39, 947.
34. Fischer, E.; Lipschitz, W.; *Ber.*, **1915**, 48, 360.
35. Quitt, P.; Hellerbach, J.; Vogler, K.; *Helv.Chim. Acta*, **1963**, 46, 327.
36. Olsen, R. K.; *J. Org. Chem.* **1970**, 35, 1912-1915.
37. a) Coggins, J. R.; Benoiton, N. L.; *Can. J. Chem.*, **1971**, 49, 1968.
b) Stoochnoff, B. A.; Benoiton, N. L.; *Tetrahedron Lett.*, **1973**, 21-24.
c) McDermott, J. R.; Benoiton, N. L.; *Can. J. Chem.*, **1973**, 51, 1915-1919.
38. Shumman, R. T.; Smithwick, E. L.; Frederickson, R. C. A.; Gesellchen, P. D.; “*Peptides: Proceedings of the 7th American Peptide Symposium*”, Rich, D., Gross, E., Eds.; Pierce Chemical Co.: Rockford, IL, **1981**, 617.

39. Freidinger, R. M.; Hinkle, J.S.; Perlow, S. D.; Arison, B. H.; *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 77-81.
40. Davis, N.; *J. Biol. Chem.*, **1956**, 233, 935.
41. Inouye, K., Otsuka, H. *J. Org. Chem.*, **1962**, 27, 2440.
42. Anderson, G.; Callahan, F., *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 3359-3563.
43. Mckay, F. and Albertson, N.; *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 4686.
44. Schwarz, H.; Arakawa, K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 5691.
45. Roberts, S. M.; “*Biocatalysts for Fine Chemicals Synthesis*” John Wiley & Sons. Ltda., **1999**.
46. Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E.; “*Chemical Approaches to the Synthesis of peptides and proteins*”, CRC Pres, New York, **1997**, p. 4; 15.
47. Schechan, J. C.; Hess, G. P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1067.
48. Schechan, J. C.; Hlavka, J.; *J. Org. Chem.*, **1956**, 21, 439.
49. Wünsch, E and Dress, E.; *Chem. Ber.*; **1966**, 99 110.
50. König, W.; Geiger, R; *Chem. Ber.*; **1970**, 103, 788.
51. König, W. and Geiger, R. in *Chemistry and Biology of peptides proceedings of the 3rd American peptides Symposium*. Meienhofer, J.; Ann. Arbor Science Publisher. Ann Arbor. MI. **1972**, 343.
52. Gawne, G.; Kenner, G. and Sheppard, R. C.; *J. Am.. Chem. Soc.* **1969**, 91, 5669.
53. Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G. and Selve, C.; *Tetrahedron Lett.* **1975**, 16, (14), 1219-1222.

54. Dourtoglou, V.; Ziegler, J. C. and Gross, B.; *Tetrahedron Lett.* **1978**, 19, (15), 1269-1272.
55. Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillessen, D.; *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927-1930.
56. Coste, J.; Dufour, M.-N.; Pantaloni, A.; Castro, B.; *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 669-672.
57. Mitin, Y. V.; Ryadnov, M. G.; Klimenko, L. V.; *J. Peptide Res.* **1998**, 53, 322-328.
58. Li, P.; Xu, J.-C.; ; *Tetrahedron* **2000**, 56, 4437-4445.
59. Thern, B.; Rudolph, J.; Jung, G.; *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 5013-5016.
60. Bongers, J.; Heimer, E. P.; *Peptides* **1994**, 15, 183-193.
61. Miranda, M. T.; Machado, A.; Liria, C. W.; Proti, P. B.; Remuzgo, C.; *Quim. Nova* **2004**, 27, 781-789.
62. a) Païs, M.; Jarreau, F.-X.; Rocchiccioli, F.; Frappier, F.; *Tetrahedron*, **1978**, 34, 2911-2916.
b) Païs, M.; Jarreau, F.-X.; Rocchiccioli, F., *Tetrahedron*, **1978**, 34, 2917-2926.
63. a) Rapoport, H.; Lagarias, J. C. and Houghten, R. A., *J. Amer. Chem. Soc.*, **1978**, 100, 8202-8209.
b) Rapoport, H.; Lagarias, J. C.; Goff, D. G.; Shih, W. C.; Klein, M. P.; *J. Org. Chem.*, **1980**, 45, 4813-4817.
64. a) Schmidt, U.; Lieberknecht, A.; Griesser, H. and Häusler, J., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1981**, 20, 281-282.

- b) Schmidt, U.; Lieberknecht, A.; Bökens, H.; Griesser, H.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1981**, 20, 1026-1027.
- c) Schmidt, U.; Schanbacher, U.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1983**, 22, 152-153.
- d) Schmidt, U.; Zäh, M.; Lieberknecht, A.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 1002-1004.
- e) Schmidt, U.; Lieberknecht, A.; BöKens, H.; Griesser, H.; *J. Org. Chem.*, **1983**, 48, 2680-2685.
65. a) Joullié, M. M.; Nutt, R., *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 5852-5853.
- b) Joullié, M. M.; Bhat, K. L.; Flanagan, D. M.; *J. f. prakt.Chem.*, **1987**, 329, 915-922.
- c) Joullié, M. M.; Heffner, R. J., *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 7021-7024.
- d) Joullié, M. M.; Jiang, J.; Heffner, R. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 10181.
- e) Joullié, M. M.; East, S. P.; Shao, F.; Williams, L.; *Tetrahedron*, **1998**, 54, 13371-13390.
- f) Joullié, M. M.; East, S. P.; *Tetrahedron Lett.*; **1998**, 39, 7211-7214.
66. a) Lipshutz, B. H.; Hungate, R. W.; Mc Carthy, K. E., *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 24, (47), 5155-5158.
- b) Lipshutz, B. H.; Hungate, R. W.; Mc Carthy, K. E., *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 7703.

- c) Lipshutz, B. H.; Huff, B. E.; Mc. Carthy, K. E.; Miller T. A.; Mukarram, S. M. J.; Siahaan, T. J.; Vaccaro, W. D.; Webb, H.; Falick, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 7032.
67. a) Zhu, J.; Laïb, T.; Chastanet, J. and Beuglmans, R., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, 35, 2517-2519.
- b) Zhu, J.; Laïb, T.; *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 83-86.
- c) Zhu, J.; Laïb, T.; Bois-Choussy, M.; *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 7645-7649.
- d) Zhu, J.; Temal-Laïb, T.; Chastanet, J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 583-590.
68. Han, B. H.; Kim, Y. C.; Park, M. K.; Park, J. H.; Go, H.J.; Yang, H. O.; Suh, D. Y. and Kang, Y. H., *Heterocycles*, **1995**, 41(9), 1909-1914.
69. Rao, A. V. R.; Reddy, K.L.; Rao, A. S.; Vittal, T. V. S.; Reddy, M. M. and Pathi, P. L., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 3023-3026.
70. Mostardeiro, M. A.; “*Tese de Doutorado*” Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal de Santa Maria, **2001**.
71. Han, S.-Y.; Kim, Y.-A.; Shin, H.-N.; Park, M.-S.; Cho, S.-H.; *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 2557-2560.
72. Roemer, D.; Buescher, H. H.; Hill, R. C.; Pless, J.; Bauer, W.; Cardinaux, F.; Clossé, A. Hauser, D., Huguenin, R., *Nature*, **1977**, 268, 547-549.
73. Mazur, R. H.; James, P. A. Tyner, D. A.; Hallinan, E. A.; Sanner, J. H.; Schulze, R., *J. Med. Chem.*, **1980**, 23, 758-763.

74. Rao, A. V. R.; Reddy, K.L.; Rao, A. S.; Chakraborty, T. K.; *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 5043.
75. Lee, K.-H.; Hong, S. Y.; Park, T. G.; *Peptides*, **2001**, 22, 1669-1674.
76. Han, B. H.; Suh, D.-Y.; Kim, Y. C.; Kang, Y.-H.; Han, Y. N.; *J. Nat. Prod.*, **1997**, 60, 265-269.
77. Byrn, R. S.; Shieh, T.-L.; *J. Med. Chem.* **1982**, 25, 403-408.
78. Bodansky, M; “*Principles of Peptide Synthesis*”, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **1984**, 12-13.
79. Szarek, W. A.; Pinto, B. M.; Grindley, T. B.; *Org. Magn. Reson.*, **1984**, 22, 676-692.
80. Pinto, B. M.; Grindley, T. B.; Szarek, W. A.; *Magn. Reson. In Chem.*, **1986**, 24, 323-331.
81. Shaw, K.N.F.; Fox, S.W.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, 75, 3417-3421.
82. Shaw, K.N.F.; Fox, S.W.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, 75, 3421-3424.
83. Moersch, G. W.; Rebstock, M. C.; Moore, A. C.; Hylander, D. P.; *Ber.*, **1952**, 74, 565-566.
84. Bolhofer, W. A.; *Ber.*, **1952**, 74, 5459-5461.
85. Carrara, K. N. F. and Witnauer, W., *Gazz. Chim. Ital.*, **1949**, 79, 856.
86. Carpino, L. A.; El-Faham, A.; *Tetrahedron*, **1999**, 55, 6813-6830.
87. Bodansky, M; “*Principles of Peptide Synthesis*”, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **1984**, 177-178.

88. Homer, R. B., Moodie, R. B. and Rydon, H. N., *J. Chem. Soc.* **1965**, 4403-4409.
89. Gowda, D. C.; *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 311-313.
90. Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C.; "Identificação espectrométrica de compostos orgânicos", 5.^a edição, Alencastro, R. B., Ed. Guanabara Koogan, cap.4-6.
91. Bowman, R. E.; Stroud, H. H.; *J. Chem. Soc.*, **1950**, I,II,III, 1342-1349.
92. Chenevert, R.; Létourneau, M.; Thiboutot, S.; *Can. J. Chem.*, **1990**, 68, 960-963.
93. Chan, W. C.; Atkinson, G. E.; Cowan, A.; McInnes, C.; Zheleva, D. I.; Fischer, P. M.; *Biorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, 12, 2501-2505.
94. Mitsunobu, O., *Synthesis*, **1981**, 1-28.
95. Camp, D.; Jenkins, I. D.; *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 3045-3049.
96. Hughes, D. L.; Reamer, R. A.; Bergman, J. J.; Grabowski, J. J. E.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 6487-6491.
97. Doi, M.; Nishi, Y.; Kiritoshi, N.; Iwata, T.; Nagô, M.; Nakano, H.; Uchiyama, S.; Nakazawa, T.; Wakamiya, T.; Kobayashi, Y.; *Tetrahedron*, **2002**, 58, 8453-8459
98. Wojciechowska, H.; Pawlowicz, R.; Andruszkiewicz, R.; Grzybowska, J.; *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 42, 4063-4064.
99. Billet, D.; *Compt. Rend.*, **1950**, 230, 1074-1076.
100. (a) Butkus, E.; Straukas, J.; Dirvianskyte, N.; Astrauskas, V.; *IL Farmaco*, **2002**, 57, 803-808.

- (b) Butkus, E.; Straukas, J.; Dirvianskyte, N.; Razumas, V.;
Z. Naturforsch, **2003**, 58c, 366-370.
101. Hostettman, K; Ralyalinson, L.; Hamburger, M., *Phytochemical Analysis*, **1991**, 2, p199-203.
102. Perrin, D. D.; Amarego, W. L. F.; “*Purification of Laboratory Chemicals*”, Pergamon Press, New York, Third Edition, **1988**.
103. Vogel, A. I., “*Química Orgânica – Análise orgânica qualitativa*”,
Ao Livro Técnico S. A., Rio de Janeiro, **1980**, cap.III, 311.
104. Fluka; “*Laboratory Chemicals and analytical reagents*”, Brasil,
2001/2002, p.1572.

CAPÍTULO VI:

1-ESPECTROS SELECCIONADOS

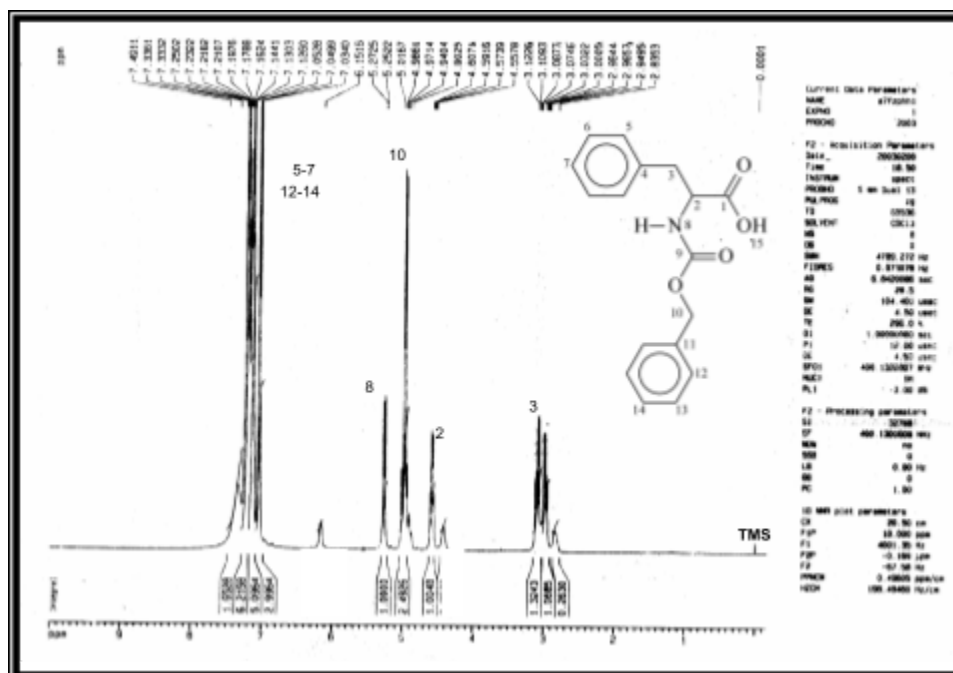
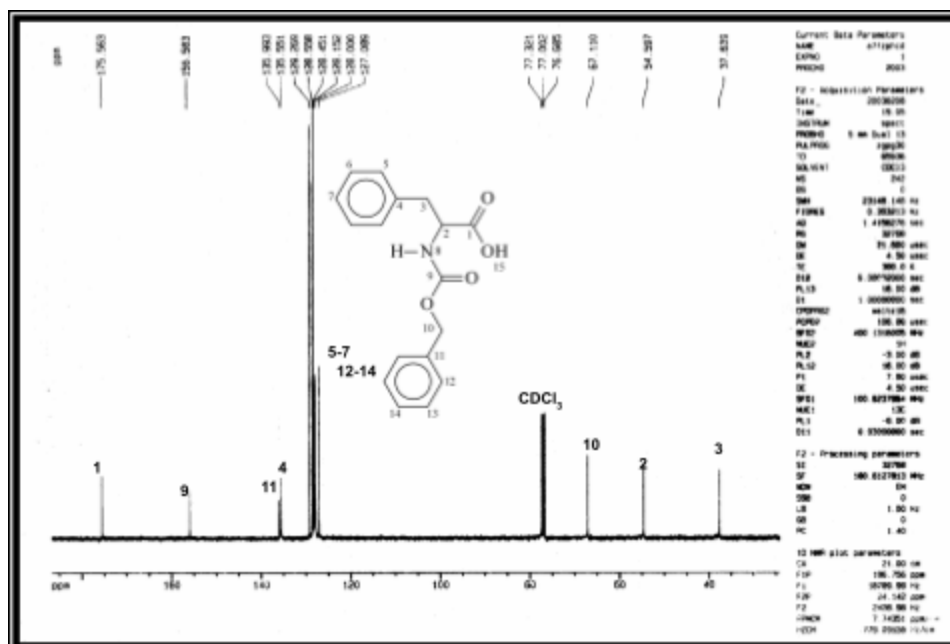
Figura 26 (a)- Espectro de RMN ^1H do Z-L-Phe-OH (41).

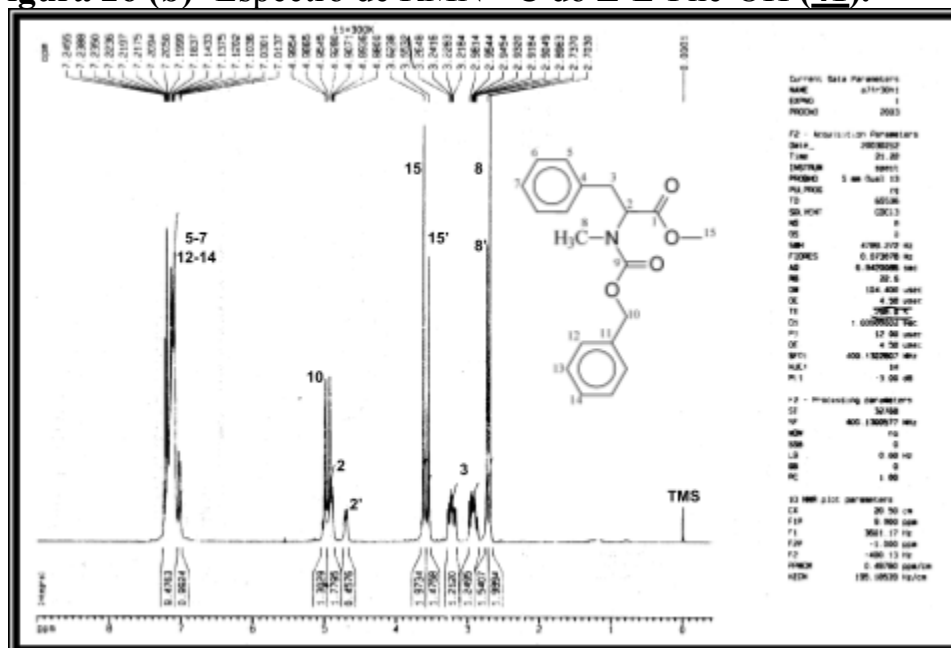
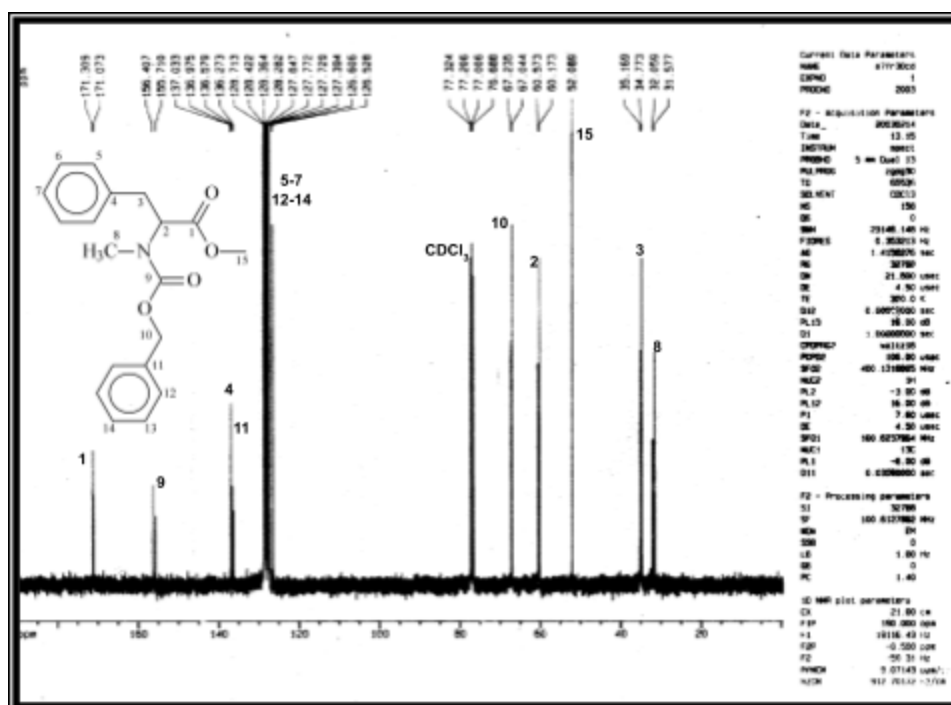
Figura 26 (b)- Espectro de RMN ^{13}C do Z-L-Phe-OH (41).Figura 27 (a)- Espectro de RMN ^1H do Z-Me-L-Phe-OMe (42).

Figura 27 (b)- Espectro de RMN ¹³C do Z-Me-L-Phe-OMe (42).

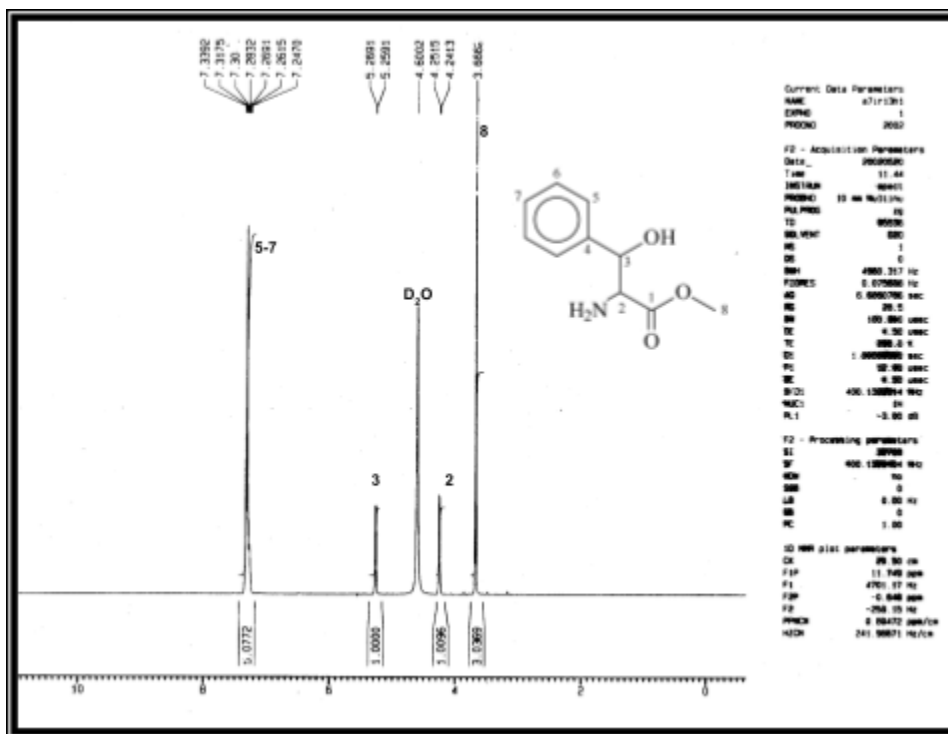


Figura 28 (a)- Espectro de RMN ¹H do Treo-D,L-Pheser-OMe (47).

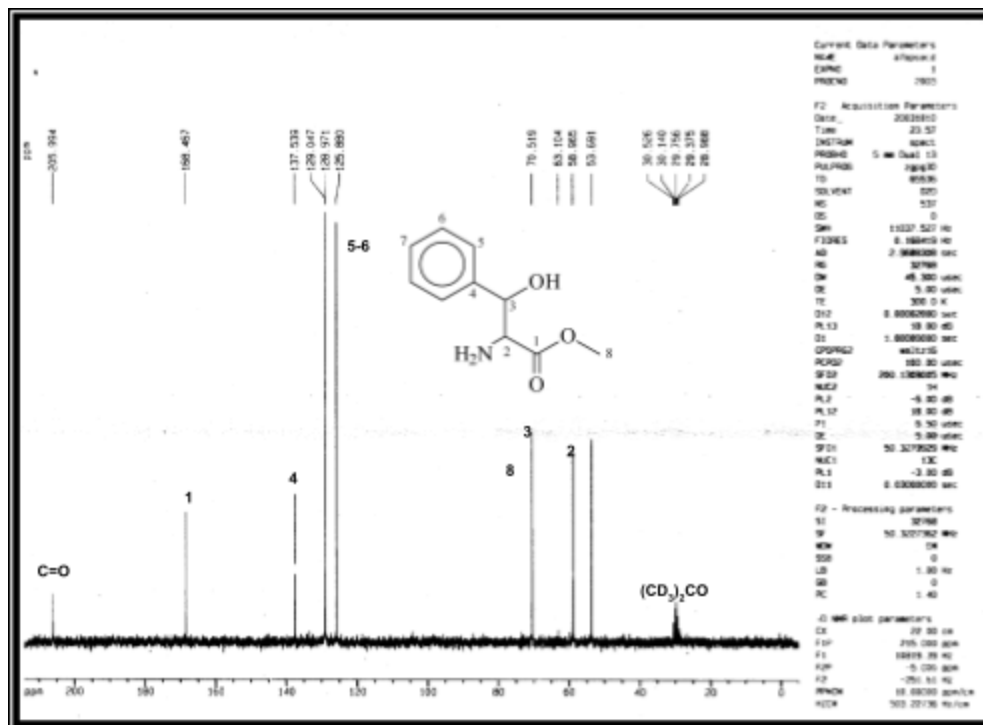


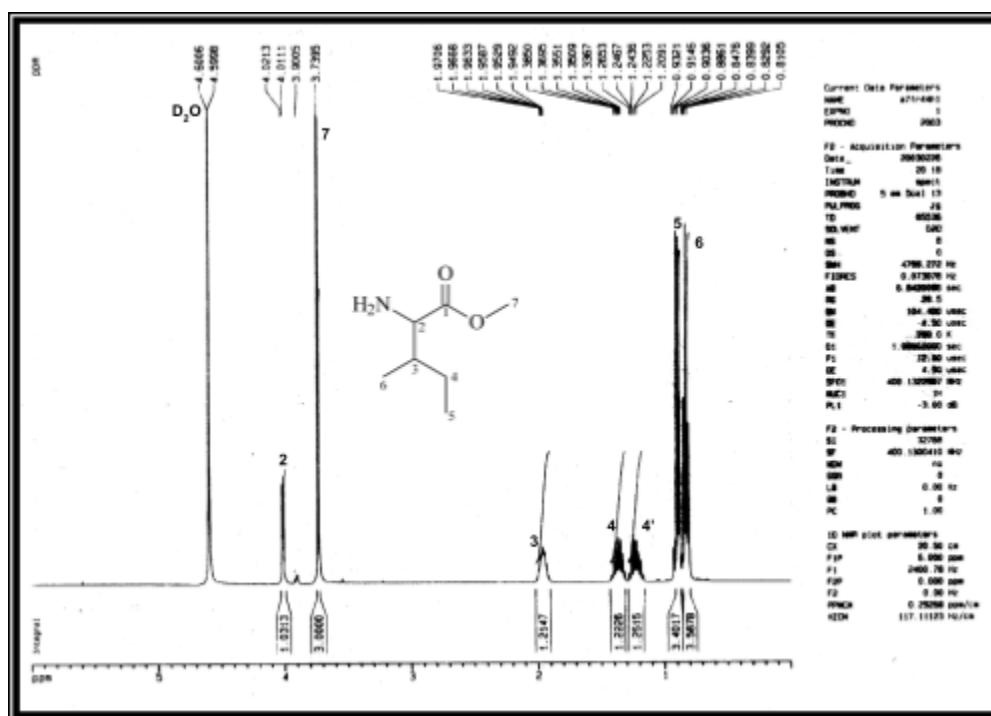
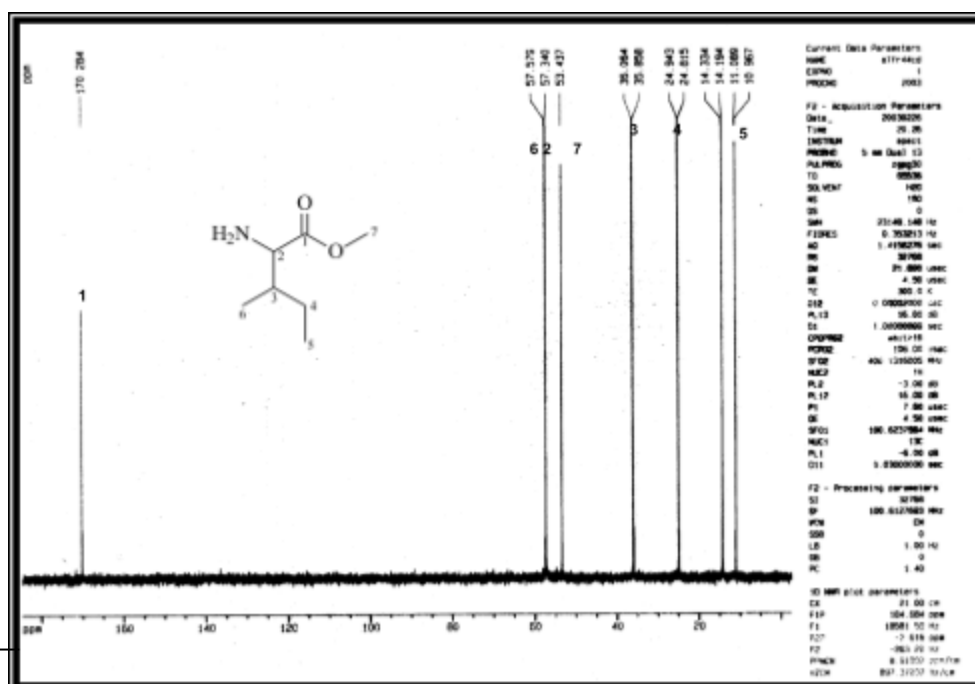
Figura 28 (b)- Espectro de RMN ^{13}C do *Treo*-D,L-Pheser-OMe (47).Figura 29 (a)- Espectro de RMN ^1H do L-ILe-OMe (58).

Figura 29 (b)- Espectro de RMN ¹³C do L-ILe-OMe (58).

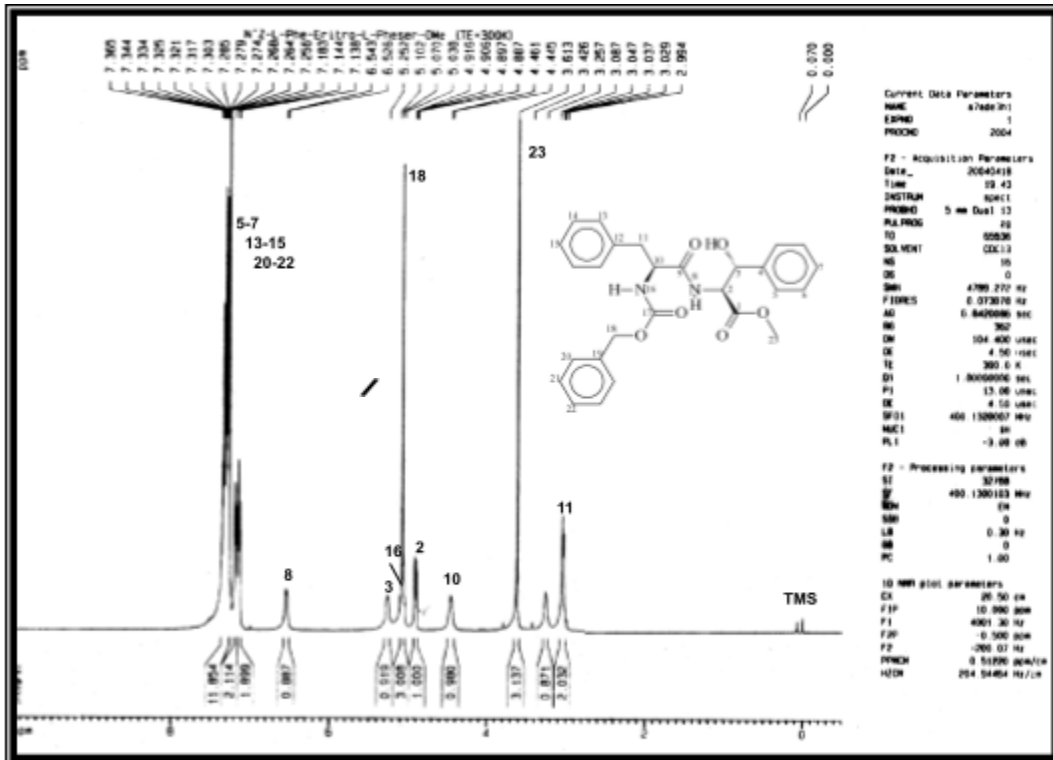
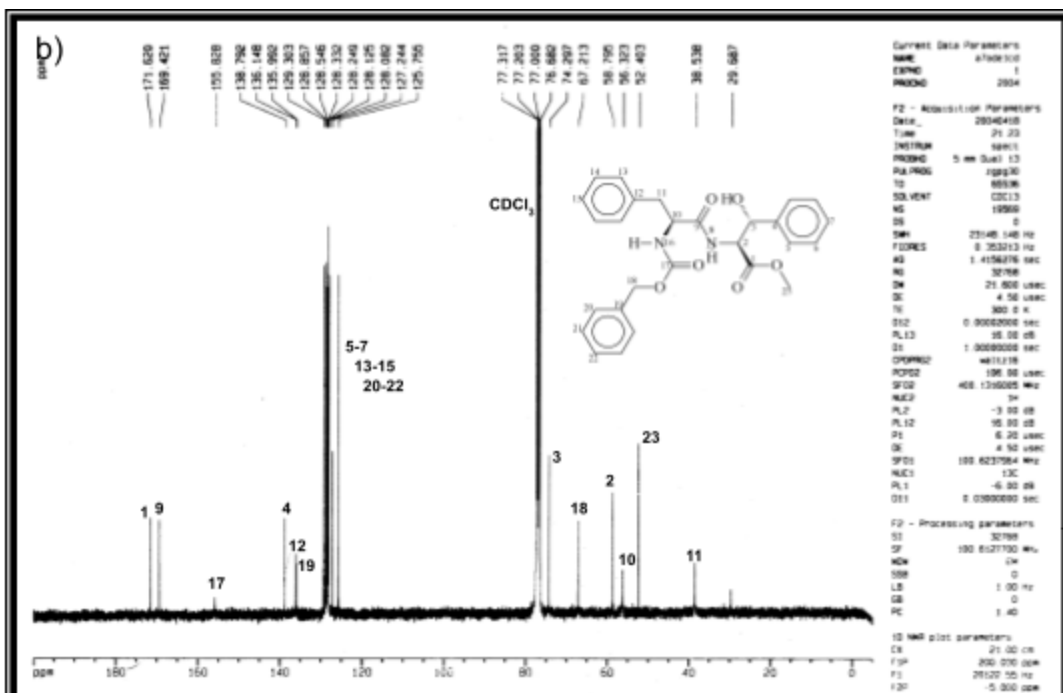


Figura 30 (a)- Espectro de RMN ¹H do Z-L-Phe-Eritro-L-Pheser-OMe (50b).



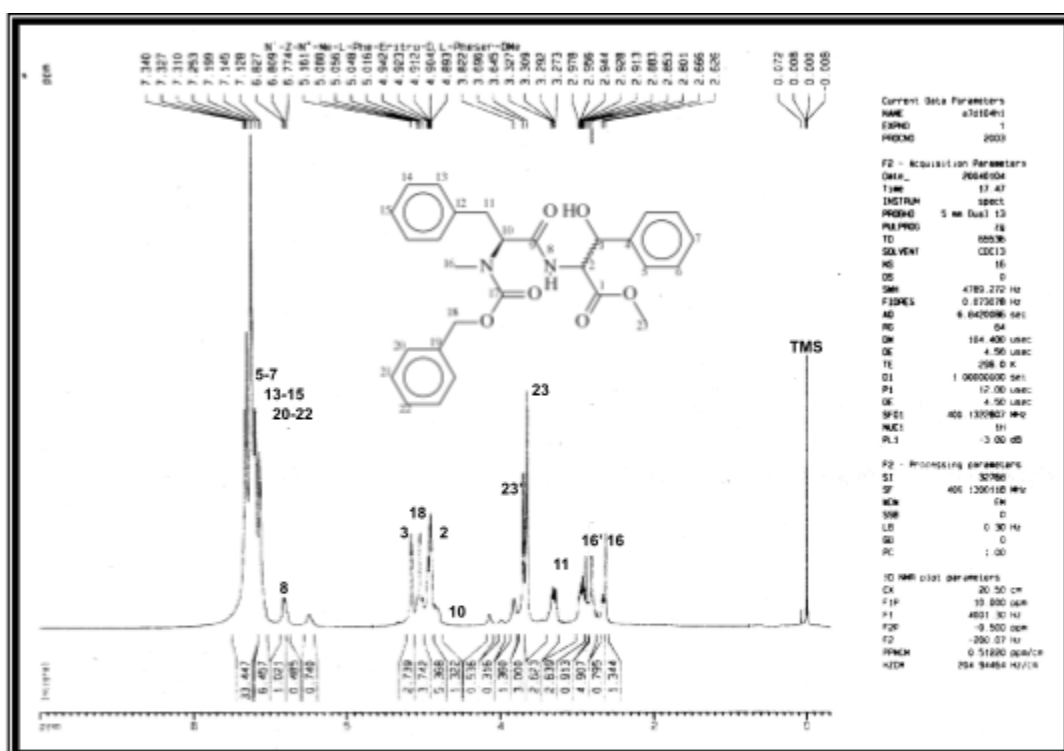
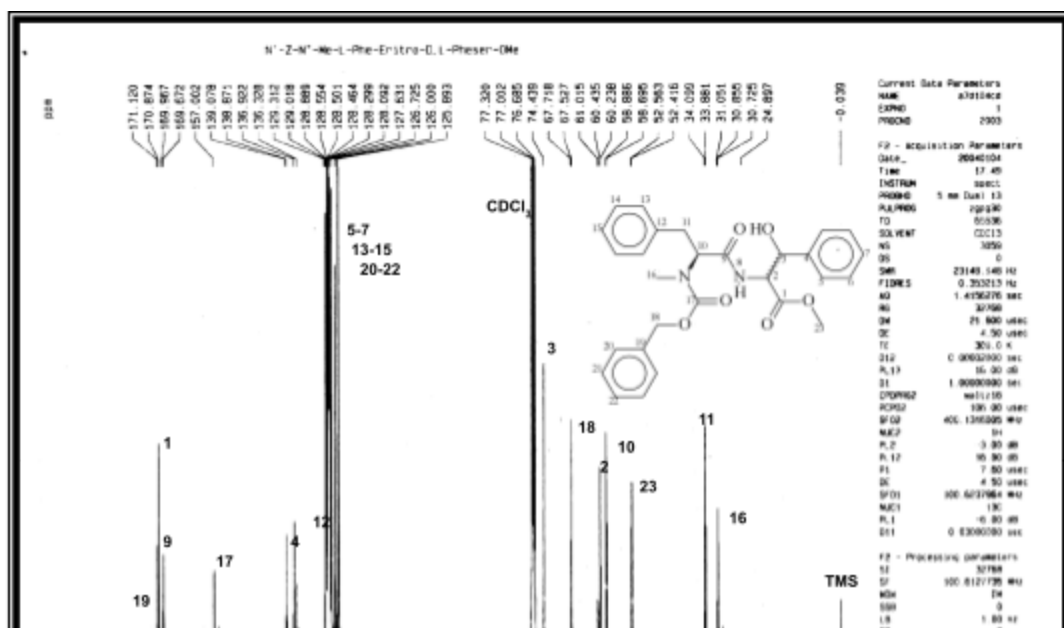


Figura 31 (a)- Espectro de RMN ^1H do
Z-Me-L-Phe-Eritro-D,L-Pheser-OMe (**52**)



ESPECTROS SELECCIONADOS

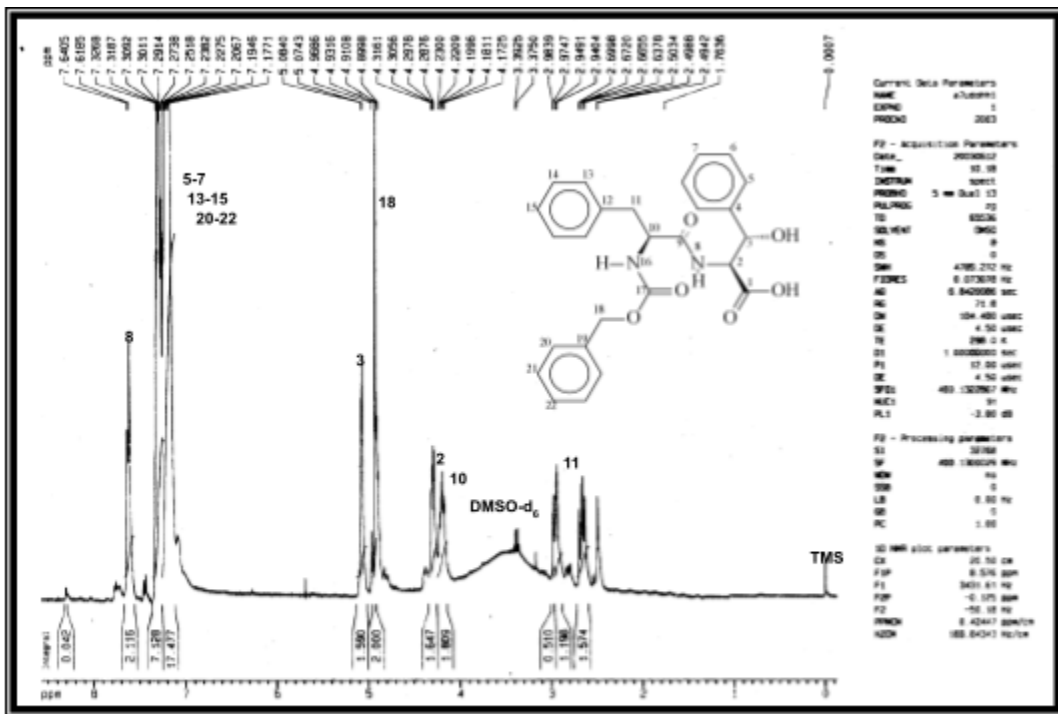
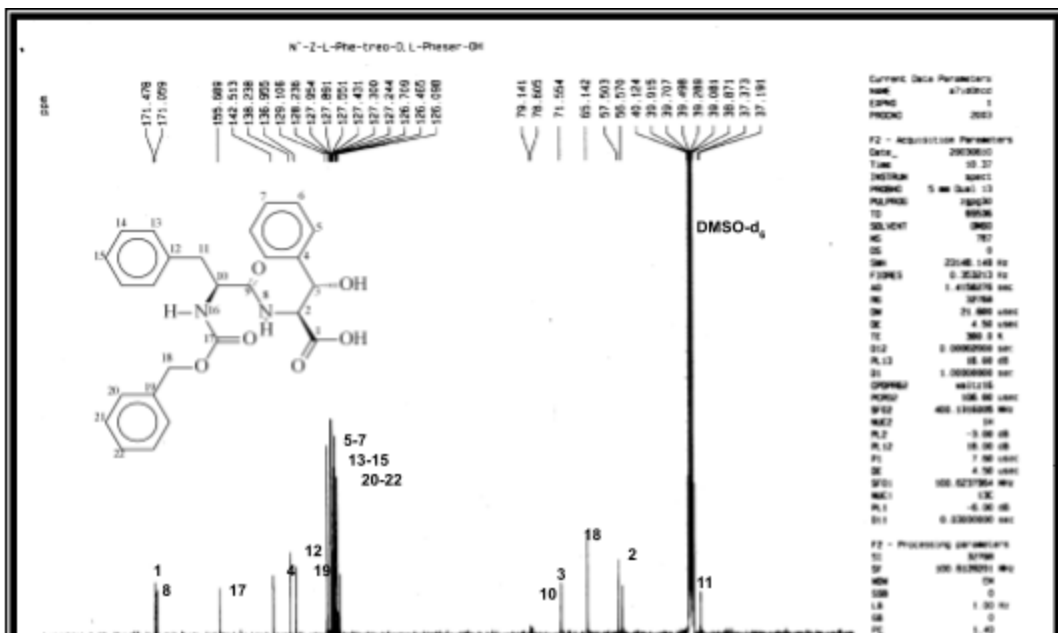


Figura 32 (a)- Espectro de RMN ¹H do Z-L-Phe-Treo-L-Phenser-OH (54a)



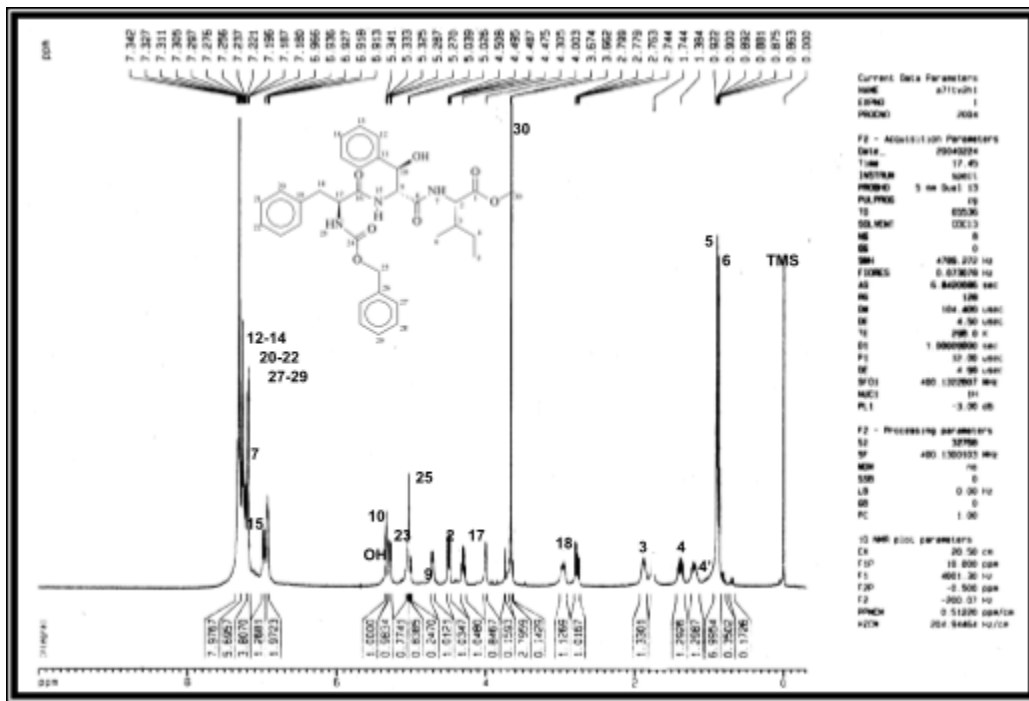
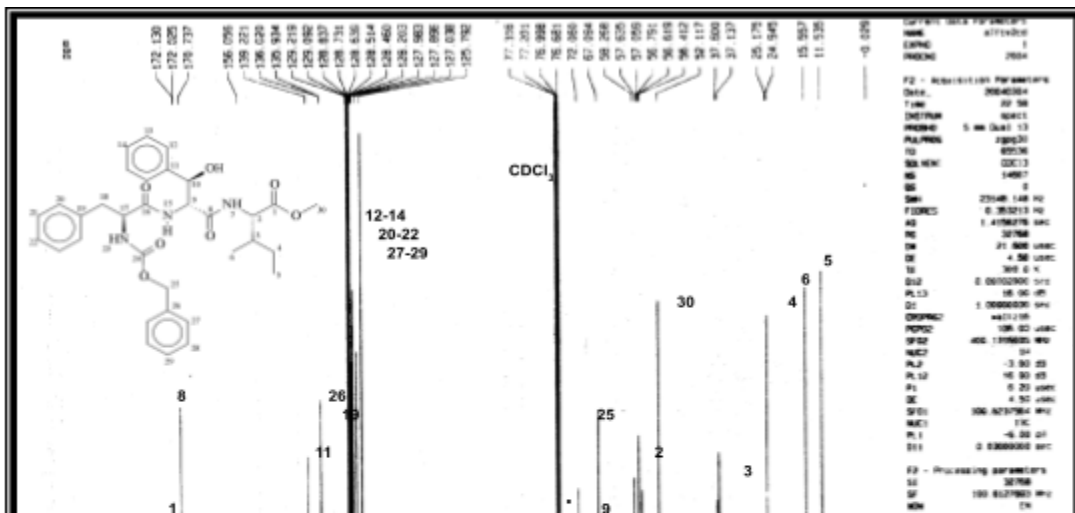


Figura 33 (a)- Espectro de RMN ¹H do
 Z-L-Phe-Treo-D-Pheser-L-Ile-OMe (**59b**).



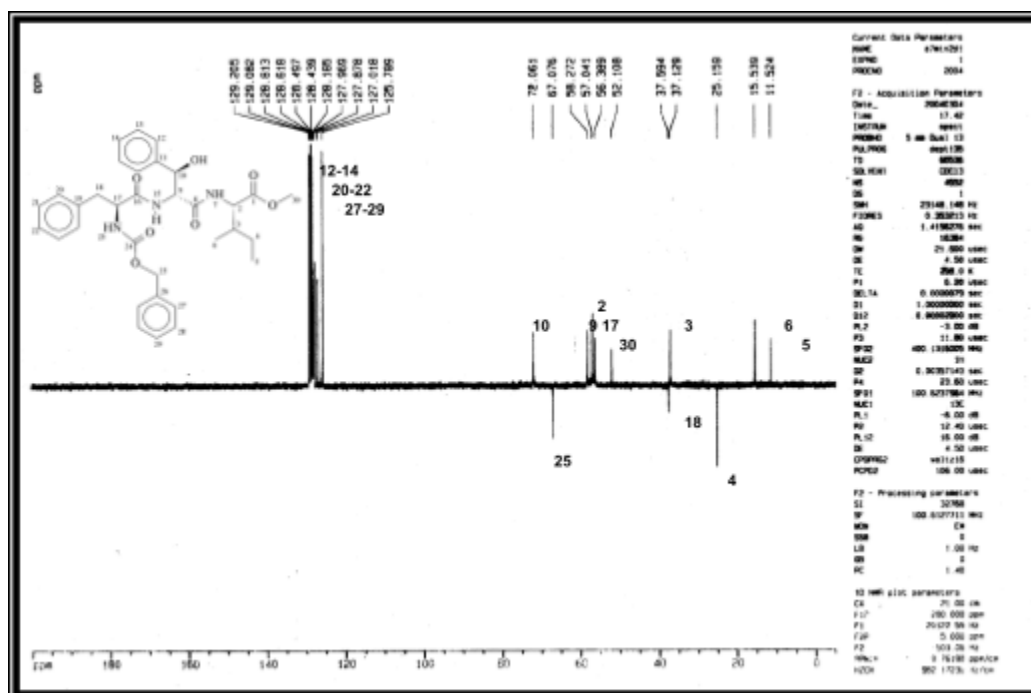
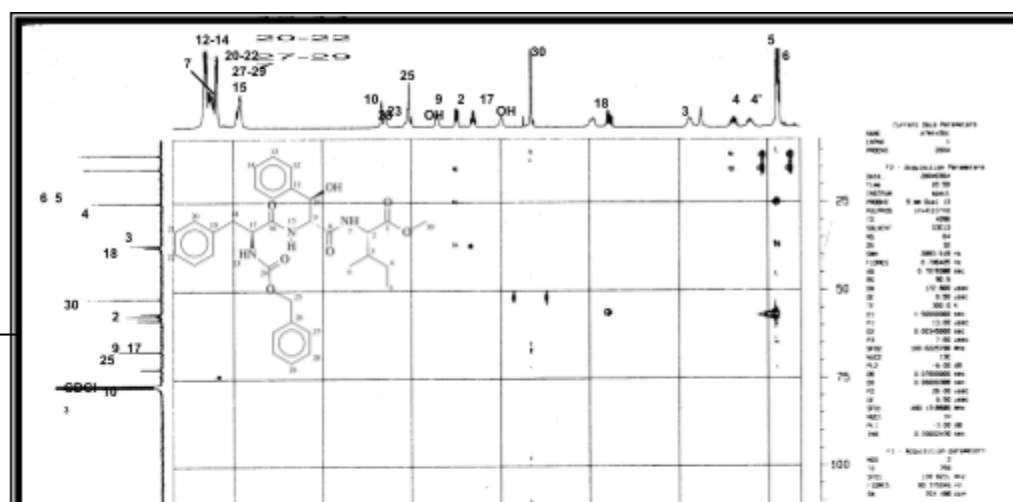


Figura 33 (c)- Espectro de RMN DEPT 135 do Z-L-Phe-Treo-D-Phenser-L-Ile-OMe (**59b**).



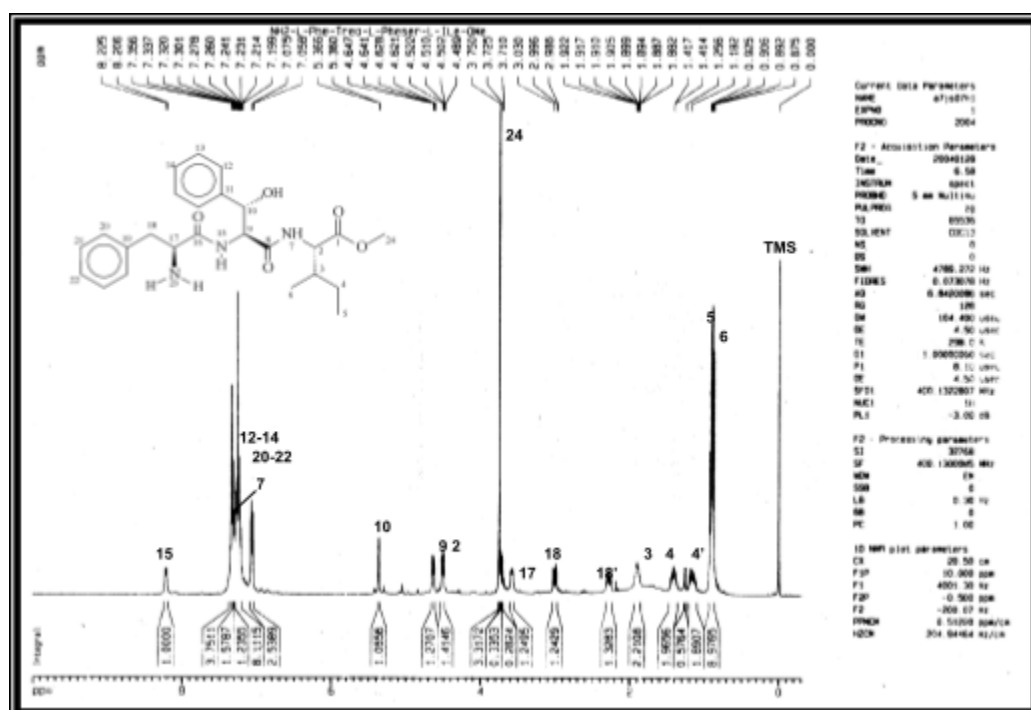


Figura 34 (a)- Espectro de RMN ^1H do

$\text{NH}_2\text{-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OME}$ (**63a**).

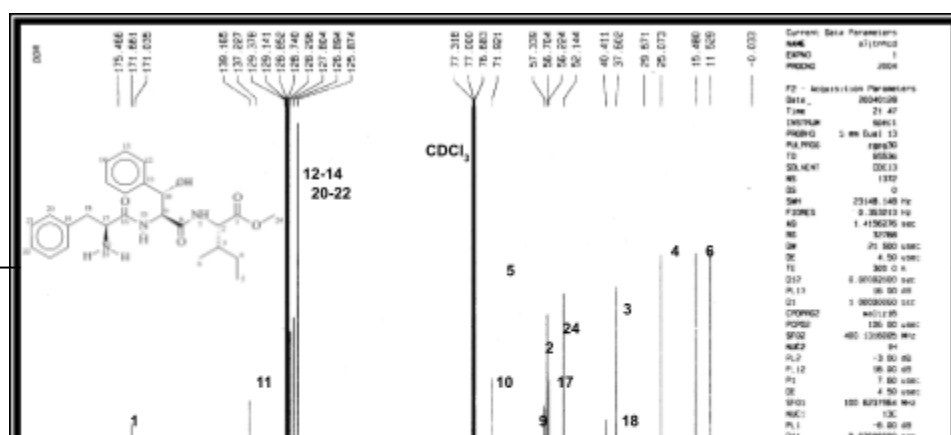


Figura 34 (b)- Espectro de RMN ^{13}C do $\text{NH}_2\text{-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe}$ (**63a**).

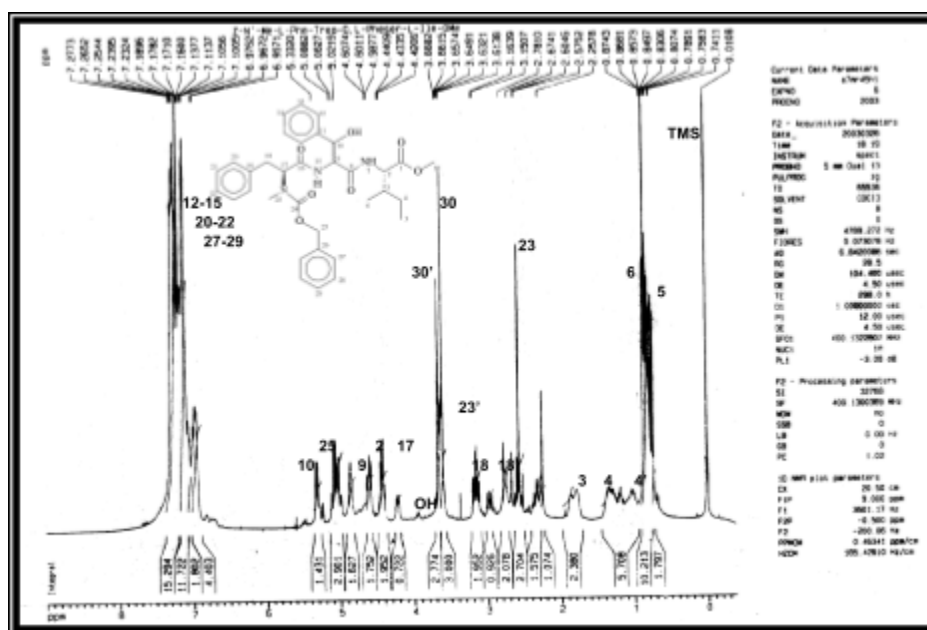


Figura 35 (a)- Espectro de RMN ^1H do $\text{-Z-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-L-Ile-OMe}$ (**62**).

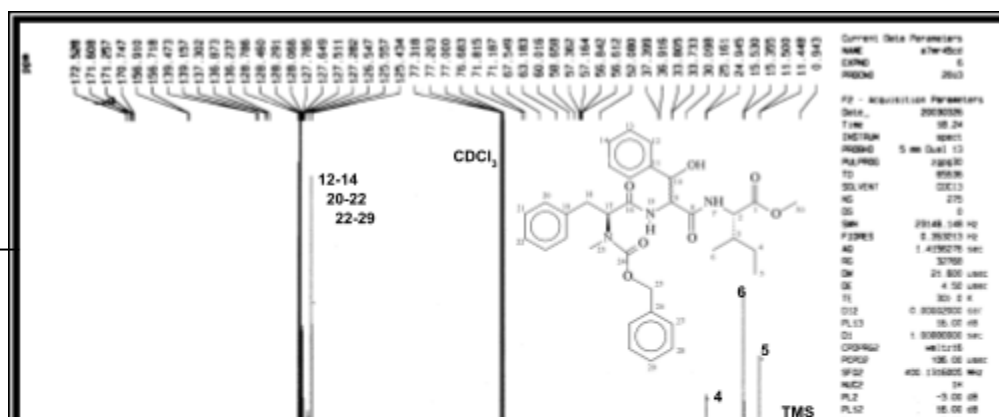


Figura 35 (b)- Espectro de RMN ^{13}C do

Z-Me-L-Phe-*Treo*-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (**62**).

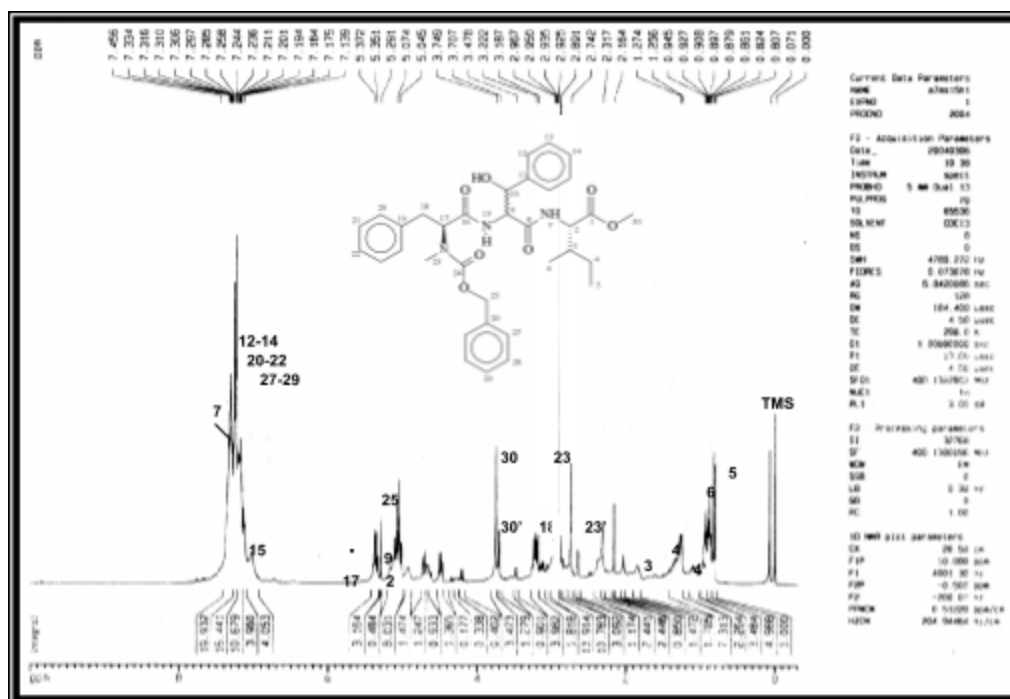


Figura 36 (a)- Espectro de RMN ^1H do

Z-Me-L-Phe-*Eritro*-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (**64**).



ESPECTROS SELECCIONADOS

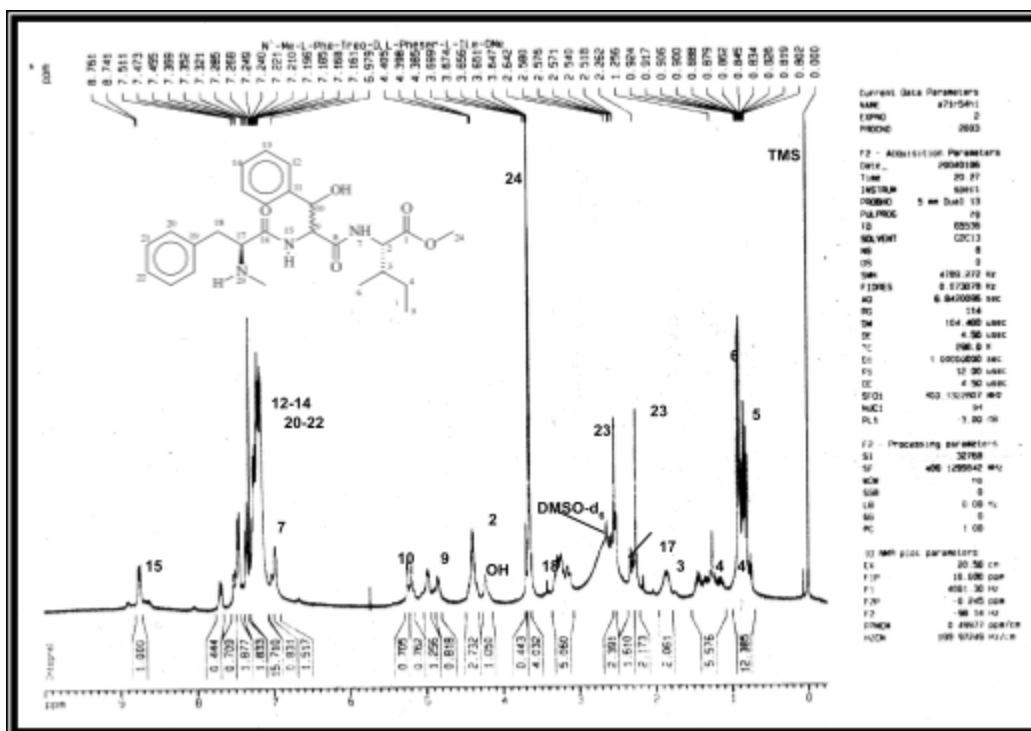
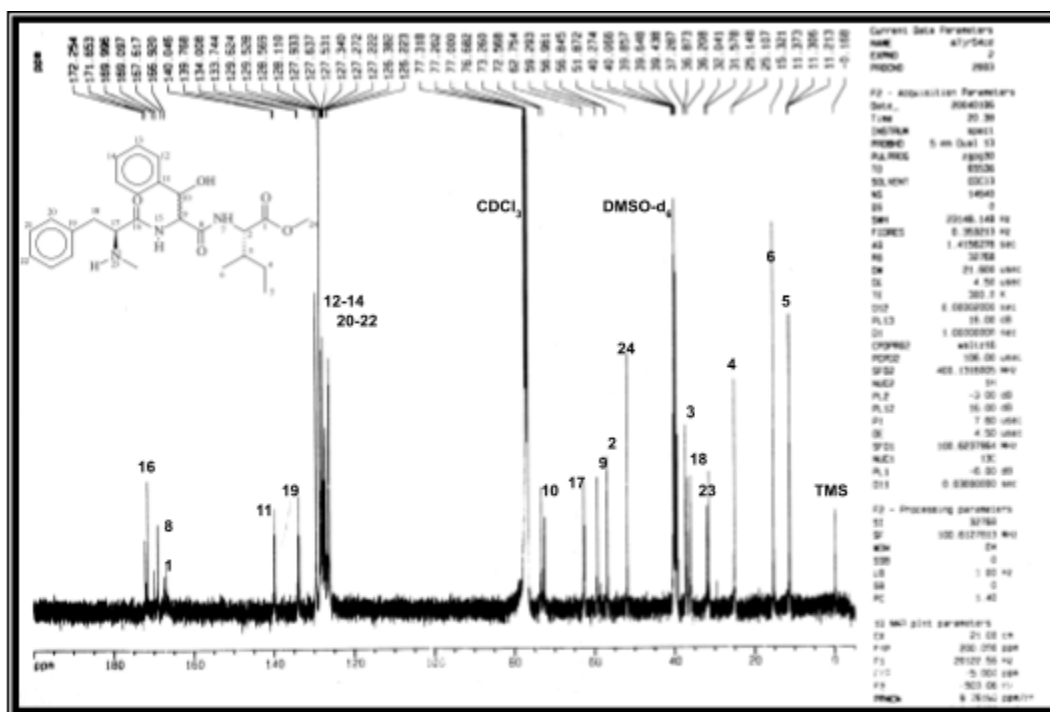
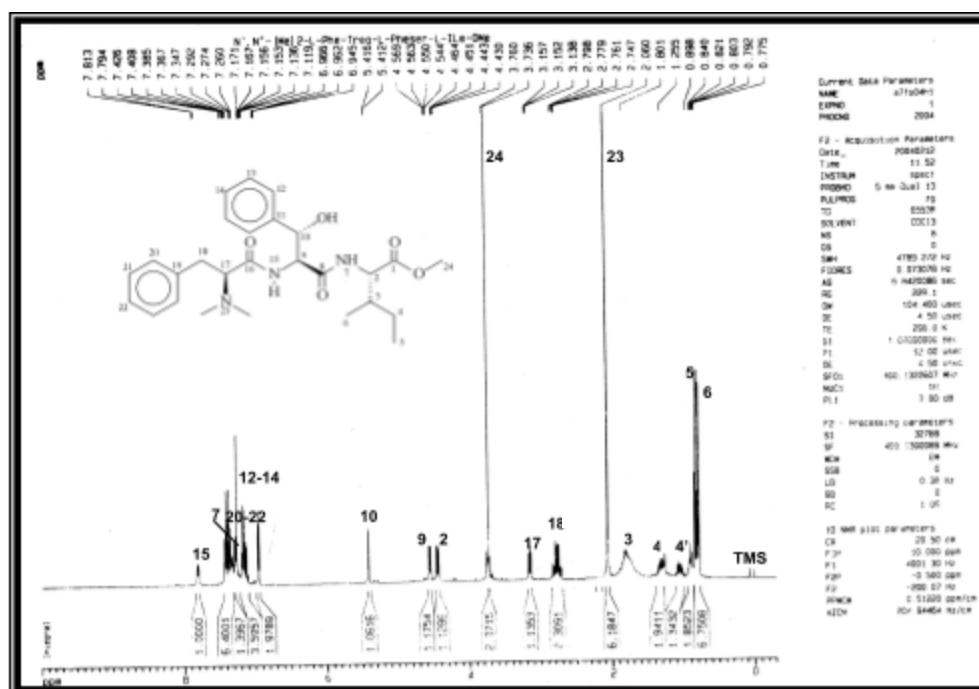


Figura 37 (a)- Espectro de RMN ^1H doN-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (**65**).Figura 37 (b) - Espectro de RMN ^{13}C do N-Me-L-Phe-Treo-D,L-Pheser-L-Ile-OMe (**65**).Figura 38 (a) - Espectro de RMN ^1H do
SÍNTESE DE TRÍPEPTÍDEOS LINEARES *N*-MONO E *N,N*-DIMETILADOS
N,N-(Me)₂-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe
(**66a**).

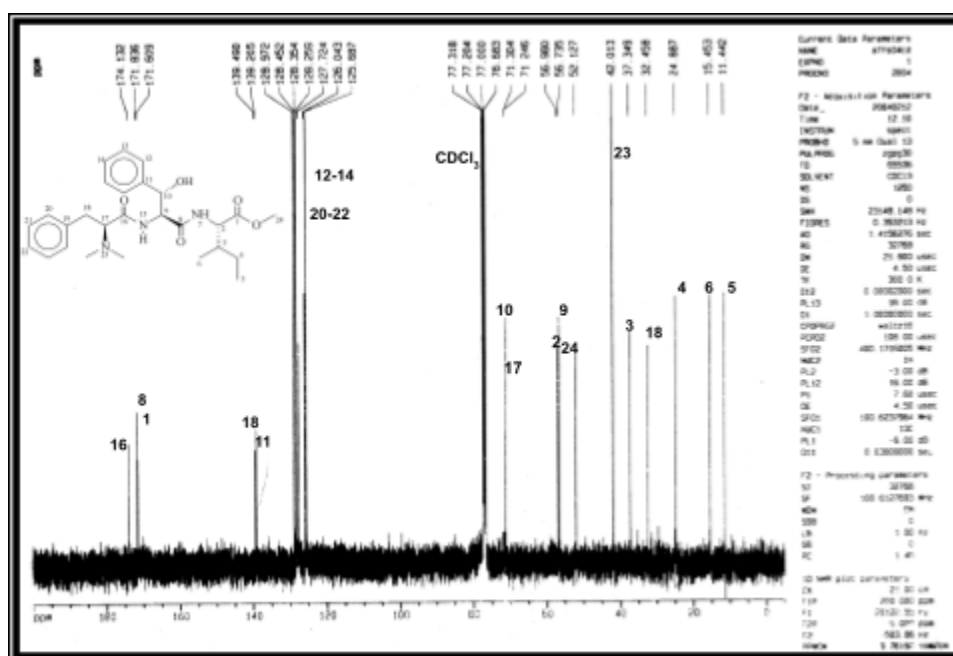


Figura 38 (b)- Espectro de RMN ^{13}C do

$\text{N,N}-(\text{Me})_2\text{-L-Phe-Treo-L-Pheser-L-Ile-OMe}$ (**66a**).

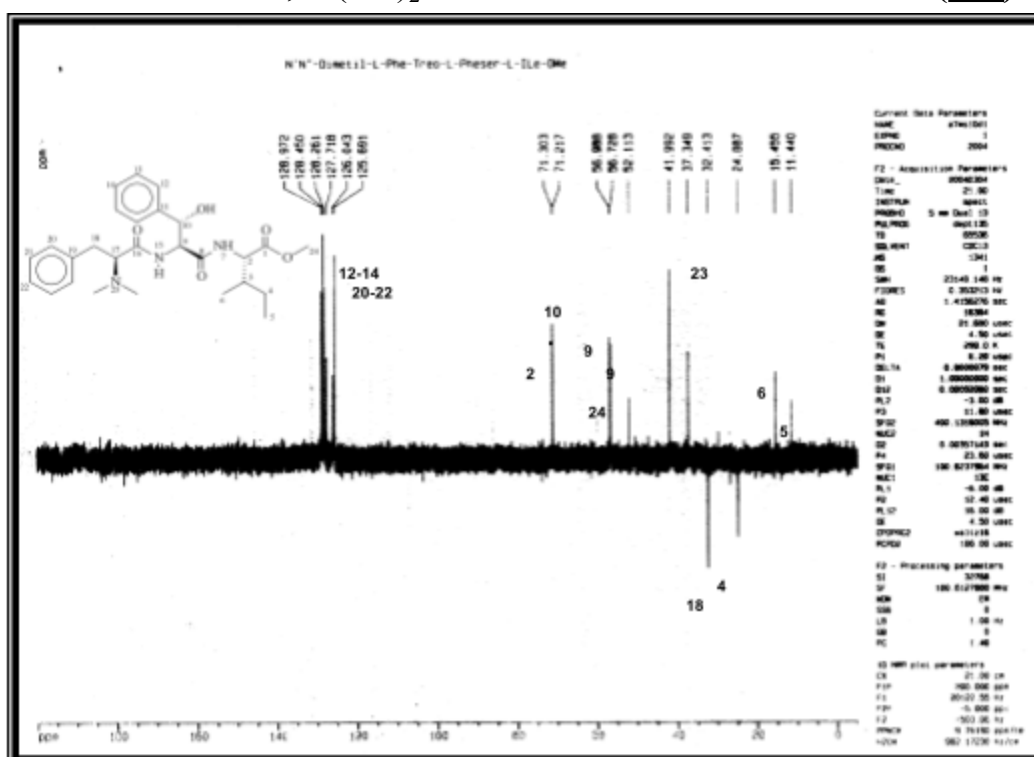
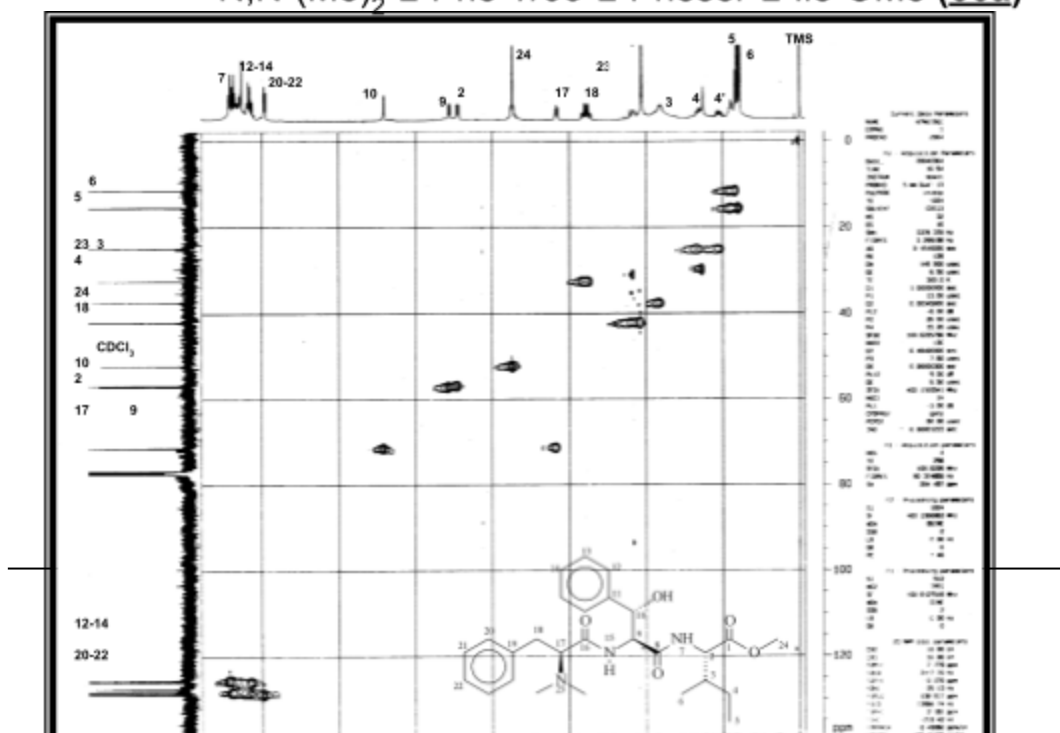
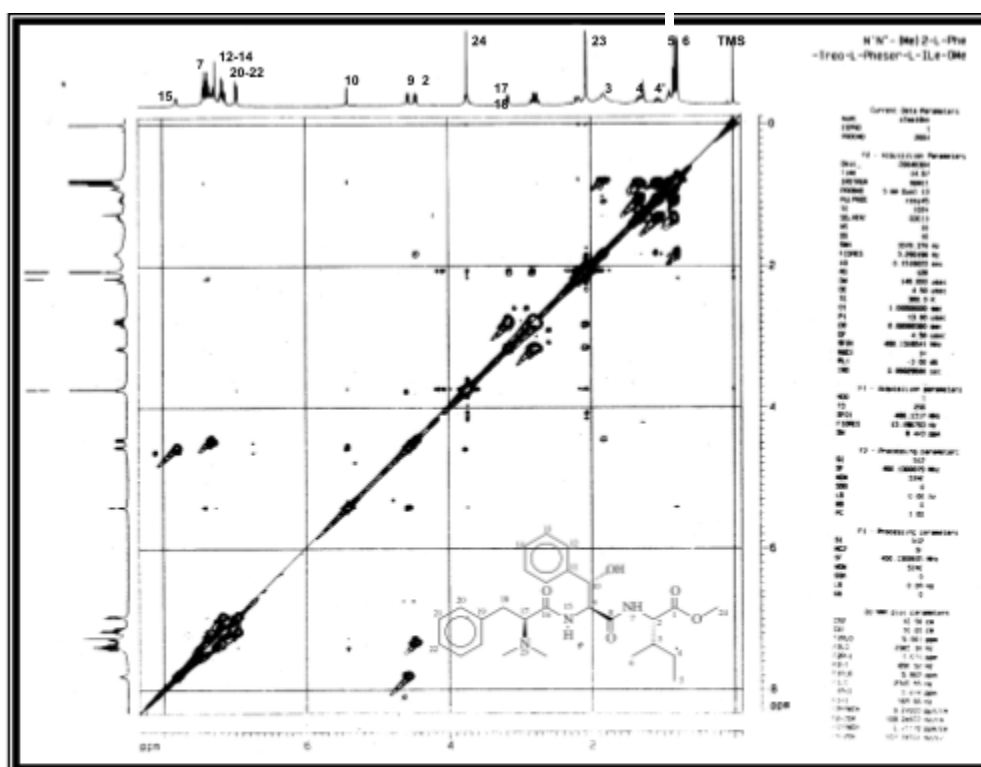


Figura 38 (c)- Espectro de RMN DEPT 135 do

$\text{N,N}-(\text{Me})_2\text{-L-Phe-Treo-}$



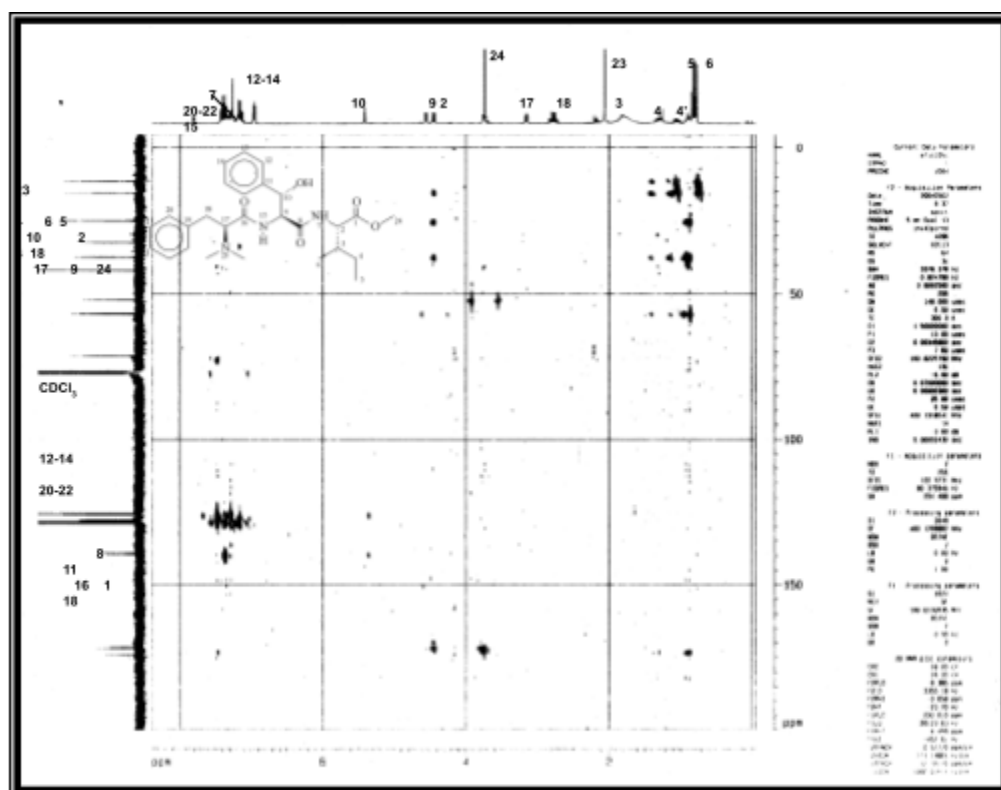


Figura 38 (f)- Espectro de RMN HMBC do $N,N-(Me)_2-L-Phe-Treo-L-Phe-ser-L-Ile-OMe$ (66a)

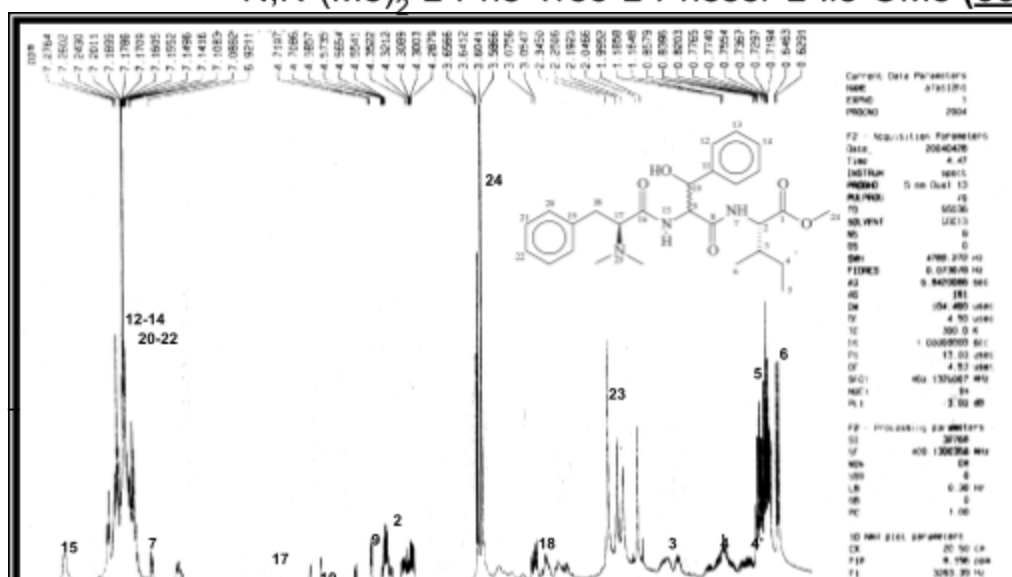


Figura 39 (a)- Espectro de RMN ^1H do $\text{N,N}'\text{-(Me)}_2\text{-L-Phe-Eritro- D,L-Phe-ser-L-Ile-OMe}$ (**67**).

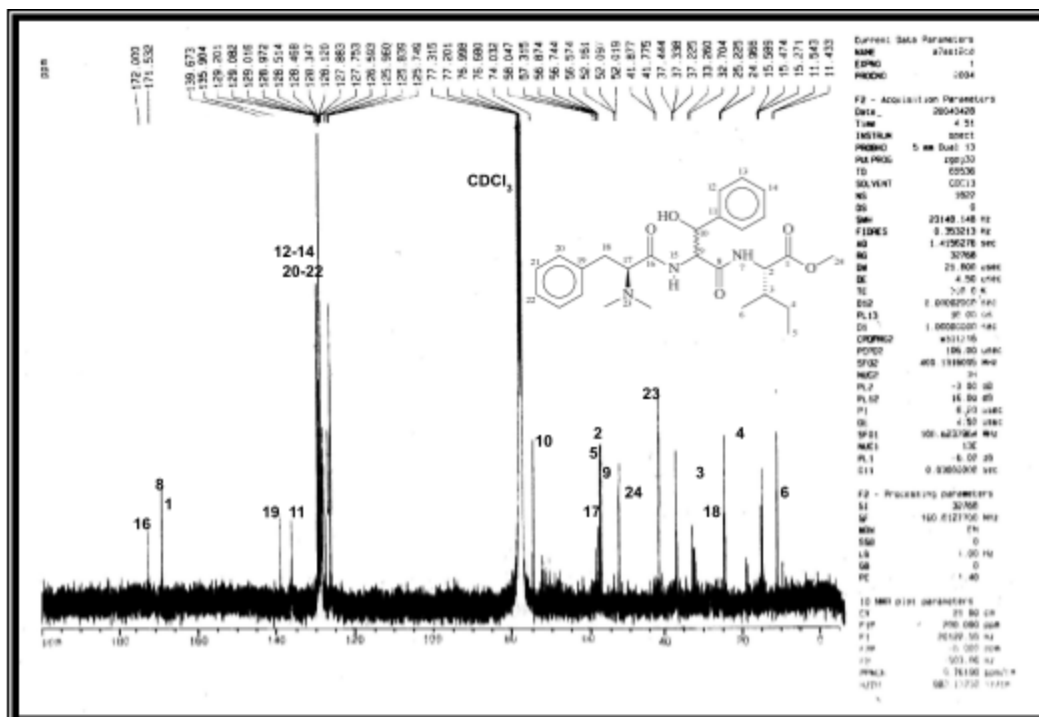


Figura 39 (b)- Espectro de RMN ^{13}C do $\text{N,N}'\text{-(Me)}_2\text{-L-Phe-Eritro- D,L-Phe-ser-L-Ile-OMe}$ (**67**).