

**SÍNTESE DE PEPTÍDEOS LINEARES PRECURSORES DOS  
ALCALÓIDES CONDALINA-A, SCUTIANINA-M,  
SCUTIANINA-L E ADOUETINA-Y: ESTUDOS ESTRUTURAIIS  
E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICA**

Vinicius Ilha



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

**Síntese de Peptídeos Lineares Precursores dos Alcalóides  
Condalina-A, Scutianina-M, Scutianina-L e Adouetina-Y:  
Estudos Estruturais e suas Atividades Biológicas**

TESE DE DOUTORADO

**Vinicius Ilha**

**PPGQ**

Santa Maria, RS – Brasil.

2011

**Síntese de Peptídeos Lineares Precursores dos Alcalóides  
Condalina-A, Scutianina-M, Scutianina-L e Adouetina-Y: Estudos  
Estruturais e suas Atividades Biológicas**

por

**VINICIUS ILHA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, área de Química Orgânica, da Universidade Federal de Santa Maria (RS), como requisito parcial para obtenção do grau de DOUTOR EM QUÍMICA.

Santa Maria, RS – Brasil.

2011

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**Síntese de Peptídeos Lineares Precusores dos Alcalóides  
Condalina-A, Scutianina-M, Scutianina-L e Adouetina-Y:  
Estudos Estruturais e suas Atividades Biológicas**

elaborada por

**Vinicius Ilha**

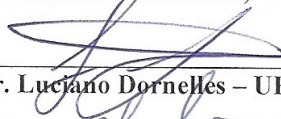
como requisito parcial para obtenção do grau de

**Doutor em Química**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

  
\_\_\_\_\_

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

  
\_\_\_\_\_

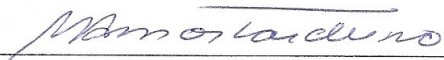
Prof. Dr. Luciano Dornelles – UFSM

  
\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro – UFSC

  
\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Ionara Irion Dalcol – UFSM

  
\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Marco Aurélio Mostardeiro – UFS

Santa Maria, 10 de agosto de 2011.

*Aos meus pais Olivia e José pelo incentivo, amor, carinho e apoio durante toda minha vida. Com muito carinho dedico esta Tese de Doutorado.*

*Meu eterno amor!!*

*Aos meus irmãos Lisandra, Liese e Mauricius, pelo carinho, apoio e pelas alegrias compartilhadas.*

*A minha noiva, Luciana C. Tavares, pelo amor, carinho, paciência e incentivo, que dedicou durante os períodos mais difíceis deste trabalho.*

*Ao Prof. Dr. Ademir Farias Morel, meu sincero agradecimento pela sua orientação, dedicação, paciência, estímulo e amizade, no decorrer do trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Aos Professores, Dr. Marco Aurélio Mostardeiro - UFS, Dr. Miguel Soriano Balparada Caro – UFSC, Dr<sup>a</sup>. Ionara Irion Dalcol – UFSM, Dr. Ubiratan Flores da Silva - UFSM e Dr. Luciano Dornelles – UFSM pelo auxílio para a melhoria deste trabalho como membros da banca examinadora.

A funcionária e amiga Maria Angélica, pelas risadas, brincadeiras e pelo incentivo na busca do conhecimento.

Aos colegas e amigos, Graciela, Juliano, Anderson e Carla, que mesmo de longe sempre me apoiaram no decorrer deste trabalho, agradeço pelos momentos de descontração e troca de idéias.

Aos colegas e amigos Carol, Karine, Graciane, Janice, Tanise, Alexandre, Patrícia, Alessandra, Carolina, Felipe, Ilaine, Marcelo, Lú, Nalin, pelo convívio nestes anos.

Ao Professor Mushtaq Ahmed pelo auxílio nos ensaios de inibição da enzima Acetilcolinesterase.

Ao Professor Ernest Giralt e aos integrantes do seu grupo Tere, Txell, Sol e Laura pela acolhida e hospitalidade, e pelo auxílio nas análises com as enzimas POP e DPP-IV.

À Professora Ionara pelas longas conversas nos passeios ao Maremagnum e pelos ensinamentos que ficarão para vida.

À Coordenação de Pós-Graduação em Química da UFSM que proporcionou a realização deste curso.

Aos funcionários da Pós-Graduação em Química, Ademir e Valéria, que muito colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos colegas dos laboratórios vizinhos, pelo convívio e pelos reagentes emprestados.

Aos demais colegas de laboratório que já não estão mais em nosso convívio, e todos que de uma forma ou de outra contribuíram para realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.



## RESUMO

O presente trabalho de tese descreve a síntese de uma série de peptídeos precursores dos alcalóides ciclopeptídicos Condalina-A, Scutianina-M, Scutianina-L e Adouetina-Y. Além disso, a atividade antimicrobiana foi avaliada a fim de se realizar um estudo das relações estrutura-atividade (REA). Ainda foi avaliada sua ação frente a algumas enzimas envolvidas em doenças degenerativas do Sistema Nervoso Central (SNC), bem como a atividade antioxidante destes precursores.

Para a síntese destes peptídeos, o aminoácido não proteinogênico  $\beta$ -fenilserina foi obtido nas suas formas diastereoisomérica (D,L-*treo* e D,L-*eritro*) e separados por recristalização.

A estratégia geral de síntese empregou técnicas clássicas de proteção e desproteção dos aminoácidos com reagentes de acoplamento usuais à síntese peptídica em solução, o que possibilitou a construção de di-, tri- e tetrapeptídeos de forma pura. Esta estratégia possibilitou ainda a obtenção dos tripeptídeos com a extremidade *N*-terminal protegida, livre, *N,N*-dimetilada e *N*-metilada, com suas estruturas confirmadas por experimentos de RMN, e ainda para o dipeptídeo *Z*-L-Phe-L-*treo*-Pheser-OMe e o tripeptídeo *N,N*-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-D-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe, sendo possível obter cristais que foram submetidos à análise por difração de raios-X, com a finalidade de confirmação estrutural e suporte na determinação das estereoquímicas.

Para o estudo de REA, os peptídeos e os metabólitos naturais foram submetidos à análise das possíveis atividades antimicrobianas pelo método da micro-diluição, empregando diferentes microrganismos: duas bactérias Gram-positivas [*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*], três bactérias Gram-negativas [*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*] e dois fungos [*Sacharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*].

Adicionalmente, foi realizada uma triagem com estes compostos a fim de identificar alguns possíveis inibidores das enzimas acetilcolinesterase (AChE), prolil-oligopeptidase (POP) e dipeptidilpeptidase-IV (DPP-IV), bem como algum composto com a capacidade de capturar radicais livres (atividade antioxidante).

Tese de Doutorado em Química  
Santa Maria, 10 de agosto de 2011.

## ABSTRACT

This thesis describes the synthesis of a series of peptides precursors of cyclopeptide alkaloids Condaline-A, Scutianine-M, Scutianine-L e Adouetine-Y. Their antimicrobial activity was evaluated to conduct a study of their structure-activity relationships (SAR). In addition, we can evaluate their action against some enzymes involved in degenerative diseases of the central nervous system (CNS), as well as the antioxidant activity of these precursors.

For the synthesis of these peptides, the non-proteinogenic amino acid  $\beta$ -Phenylserine was obtained in its diastereoisomeric forms (D, L-*threo* and D, L-*erythro*) and separated by recrystallization.

The general strategy of synthesis employed the classical techniques of protection and deprotection of the amino acids with the usual coupling reagents to the peptide synthesis in solution, what enabled the construction of di-, tri- and tetrapeptides in pure forms. This strategy enabled the achievement of the tripeptides with the *N*-terminal, protected, free, *N*, *N*-dimethyl and *N*-methylated, with their structures confirmed by NMR experiments, and also for the dipeptide Z-L-Phe-L-*threo*-Pheser-OMe, and the tripeptide and *N*, *N*-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-D-*threo*-Pheser-L-Ile-OMe, it was possible to obtain crystals that were analyzed by X-ray diffraction, in order to achieve structural confirmation and support in determining the stereochemistry.

To study the SAR, the natural peptides and metabolites were subjected to analysis of their antimicrobial activity through the micro-dilution method using different microorganisms: two Gram-positive bacteria [*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*], three Gram-negative bacteria [*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*] and two fungi [*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*].

Additionally, a screening was conducted with these compounds to identify some possible inhibitors of acetylcholinesterase (AChE), prolyl-oligopeptidase (POP) and dipeptidylpeptidase-IV (DPP-IV), as well as some compound capable of capture free radicals (antioxidant activity).

Doctor Thesis in Chemistry.  
Santa Maria, August 5<sup>th</sup>, 2011.

---

## Sumário

<b>Capítulo I: Introdução e Objetivos:</b> .....	1
1.1.Introdução:.....	1
1.2.Objetivos:.....	2
<b>Capítulo II: Revisão Bibliográfica:</b> .....	5
2.1 Alcalóides ciclopeptídicos.....	5
2.2. Classificação.....	6
2.2. Biossíntese de Alcalóides Ciclopeptídicos.....	7
2.3. Síntese Total de Alcalóides Ciclopeptídicos:.....	9
2.4. Atividades Biológicas de Alcalóides ciclopeptídicos:.....	19
2.4.1.Atividade Antimicrobiana:.....	19
2.4.2. Atividade Antiplasmodica.....	21
2.4.3. Atividade Sedativa.....	22
2.4.4. Atividade Antinociceptiva.....	24
2.5. Atividades Biológicas de Pequenos Peptídeos.....	24
<b>Capítulo III: Apresentação e Discussão dos Resultados:</b> .....	29
3.1. Estratégias Sintéticas Adotadas:.....	30
3.2- Preparação dos Intermediários Sintéticos.....	31
3.2.1- Proteção do Aminoácido L-fenilalanina.....	31
3.2.2- Obtenção dos $\beta$ -OH-aminoácidos <i>treo</i> e <i>eritro</i> $\beta$ -fenilserina e seus éster metílicos.....	32
3.2.3- Preparação dos Intermediários Dipeptídicos.....	33
3.2.4- Obtenção dos dipeptídeos com carboxilas terminais livres.....	38
3.2.5- Reações de Acoplamento dos Dipeptídeos Livres com o Aminoácido L-Isoleucina- OMe.....	40
3.2.6 - Reações de remoção do grupamento Cbz (benziloxicarbonil) dos tripeptídeos.....	44
3.2.7 - Reações de N,N-dimetilação dos tripeptídeos.....	46
3.2.8 - Reações de N-Monometilação dos tripeptídeos.....	51
3.2.9 - Preparação de Derivados Tetrapeptídicos.....	54
3.3.- Estudo da Reação de Inserção da Unidade Alquil-Aril Éter.....	58
3.3.1- Inserção da Unidade Alquil-Aril Éter por reação de $S_NAR$ .....	58
3.3.2- Inserção da Unidade Alquil-Aril Éter Metodologia de Mitsunobu.....	60
3.3.3- Inserção da Unidade Alquil-Aril Éter pela Metodologia de Ullmann.....	64
3.4 - Resultados das Análises de Atividades Biológicas.....	67
3.4.1 - Testes da Atividade Antimicrobiana.....	67

---

3.4.2 -Testes das Atividades Inibitórias de Enzimas Envolvidas no SNC.....	71
3.4.2.1 -Teste da Atividade Inibitória de Enzima Acetilcolinesterase (AChE).....	71
3.4.2.2 - Testes da atividade inibitória das enzimas Prolil oligopeptidase (POP) e dipeptidil peptidase (DPP-IV).....	75
3.4.3 –Teste da Atividade Antioxidante.....	79
<b>Capítulo IV: Parte Experimental:</b> .....	82
4- Parte Experimental:.....	82
4.1 - Material e Métodos: .....	82
4.1.1 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear .....	82
4.1.2 - Aparelho de ponto de fusão .....	82
4.1.3 - Cromatografia .....	82
4.1.3.1- Cromatografia Gasosa (CG) .....	82
4.1.3.2- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	83
4.1.3.3- Cromatografia em Coluna (CC).....	83
4.1.3.4- Cromatografia em Placa Preparativa (CPP) .....	83
4.1.3.5- Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	83
4.1.4-Aparelho de Difração de raios -X .....	83
4.1.5-Espectrofluorímetro .....	84
4.1.6- Reagentes e solventes.....	84
4.2- Procedimentos Gerais .....	84
4.2.1- Obtenção do carbobenzoxi-L-fenilalanina ( <b>51</b> ).....	84
4.2.2- Preparação da $\beta$ -fenilserina .....	85
4.2.3- Esterificação de Aminoácidos: Método Geral.....	86
4.2.3.1- Obtenção do éster metílico da D,L- <i>treo</i> - $\beta$ -fenilserina ( <b>54</b> ).....	86
4.2.3.2- Obtenção do éster metílico da D,L- <i>eritro</i> - $\beta$ -fenilserina ( <b>55</b> ) .....	86
4.2.3.3- Obtenção do éster metílico da L-isoleucina .....	87
4.2.4- Síntese dos Dipeptídeos: Método Geral.....	87
4.2.4.1- Síntese do carbobenzoxi-L-fenilalanil-D,L- <i>treo</i> - $\beta$ -fenilserina-OMe ( <b>56</b> ) .....	87
4.2.4.2- Síntese do carbobenzoxi-L-fenilalanil-D,L- <i>eritro</i> - $\beta$ -fenilserina-OMe ( <b>57</b> ).....	88
4.2.5- Método geral de hidrólise básica dos dipeptídeos .....	89
4.2.5.1- Síntese do carbobenzoxi-L-fenilalanil-L- <i>treo</i> - $\beta$ -fenilserina-OH ( <b>58a</b> ) .....	90
4.2.5.2- Síntese do carbobenzoxi-L-fenilalanil-D- <i>treo</i> - $\beta$ -fenilserina-OH ( <b>58b</b> ).....	90
4.2.5.3- Síntese do carbobenzoxi-L-fenilalanil-L- <i>eritro</i> - $\beta$ -fenilserina-OH ( <b>59a</b> ).....	90

---

4.2.5.4- Síntese do carbobenzoxi-L-fenilalanil-D- <i>eritro</i> - $\beta$ -fenilserina-OH ( <b>59b</b> ) .....	91
4.2.6- Síntese dos Tripeptídeos: Método Geral .....	91
4.2.6.1- Síntese do carbobenzoxi-L-fenilalanil-L- <i>treo</i> - $\beta$ -fenilseril-L-isoleucina-OMe ( <b>60a</b> ) .....	91
4.2.6.2- Síntese do carbobenzoxi-L-fenilalanil-D- <i>treo</i> - $\beta$ -fenilseril-L-isoleucina-OMe ( <b>60b</b> ) .....	92
4.2.6.3- Síntese do carbobenzoxi-L-fenilalanil-L- <i>eritro</i> - $\beta$ -fenilseril-L-isoleucina-OMe ( <b>61a</b> ) .....	93
4.2.6.4- Síntese do carbobenzoxi-L-fenilalanil-D- <i>eritro</i> - $\beta$ -fenilseril-L-isoleucina-OMe ( <b>61b</b> ) .....	93
4.2.7- Desproteção do Grupamento Carbobenzoxi dos tripeptídeos formados: Método Geral .....	94
4.2.7.1- Síntese do NH <sub>2</sub> -L-fenilalanil-L- <i>treo</i> - $\beta$ -fenilseril-L-isoleucina-OMe ( <b>62a</b> ), NH <sub>2</sub> -L- fenilalanil-D- <i>treo</i> - $\beta$ -fenilseril-L-isoleucina-OMe ( <b>62b</b> ), NH <sub>2</sub> -L-fenilalanil-L- <i>eritro</i> - $\beta$ - fenilseril-L-isoleucina-OMe ( <b>63a</b> ) e NH <sub>2</sub> -L-fenilalanil-D- <i>eritro</i> - $\beta$ -fenilseril-L-isoleucina- OMe ( <b>63b</b> ) .....	94
4.2.8 - Reações de N-Alquilação do Aminoácido Terminal .....	95
4.2.8.1- Reação de N,N-Dimetilação: Método Geral.....	95
4.2.8.1.1- Síntese do N,N-(Me) <sub>2</sub> -L-fenilalanil-L- <i>treo</i> - $\beta$ -fenilseril-L-isoleucina-OMe ( <b>64a</b> ). .....	95
4.2.8.1.2- Síntese do N,N-(Me) <sub>2</sub> -L-fenilalanil-D- <i>treo</i> - $\beta$ -fenilseril-L-Isoleucina-OMe ( <b>64b</b> ) .....	96
4.2.8.1.3- Síntese do N,N-(Me) <sub>2</sub> -L-fenilalanil-L- <i>eritro</i> - $\beta$ -fenilseril-L-Isoleucina-OMe ( <b>65a</b> ) .....	97
4.2.8.1.4- Síntese do N,N-(Me) <sub>2</sub> -L-fenilalanil-D- <i>eritro</i> - $\beta$ -fenilseril-L-Isoleucina-OMe ( <b>65b</b> ) .....	97
4.2.8.2- Reação de N-Monometilação: Método Geral .....	98
4.2.8.2.1- Síntese do N-(Me)-L-fenilalanil-L- <i>treo</i> - $\beta$ -fenilseril-L-Isoleucina-OMe ( <b>66a</b> )... 98	
4.2.8.2.2- Síntese do N-(Me)-L-fenilalanil-D- <i>treo</i> - $\beta$ -fenilseril-L-Isoleucina-OMe ( <b>66b</b> ) .. 99	
4.2.8.2.3- Síntese do N-(Me)-L-fenilalanil-L- <i>eritro</i> - $\beta$ -fenilseril-L-Isoleucina-OMe ( <b>67a</b> ). 99	
4.2.8.2.4- Síntese do N-(Me)-L-fenilalanil-D- <i>eritro</i> - $\beta$ -fenilseril-L-Isoleucina-OMe ( <b>67b</b> ) .....	100
4.2.9. Síntese dos Tetrapeptídeos: Método Geral .....	100

---

4.2.9.1- Síntese do carbobenzoxi-L-fenilalanil-L- <i>treo</i> - $\beta$ -fenilseril-L-isoleucil-L-tirosina-OMe ( <b>72a</b> ) .....	100
4.2.9.2- Síntese do carbobenzoxi-L-fenilalanil-D- <i>treo</i> - $\beta$ -fenilseril-L-isoleucil-L-tirosina-OMe ( <b>72b</b> ) .....	101
4.2.9.3- Síntese do carbobenzoxi-L-fenilalanil-D- <i>treo</i> - $\beta$ -fenilseril-L-isoleucil-L-(4-iodo)-fenilalaniana-OMe ( <b>73b</b> ) .....	102
4.2.10- Determinação da configuração absoluta dos dipeptídeos.....	102
4.2.10.1- Hidrólise ácida dos peptídeos: .....	102
4.2.10.2- Esterificação dos aminoácidos .....	103
4.2.10.3- N-O- Trifluoracetilação .....	103
4.2.11. Metodologia de Substituição Nucleofílica Aromática: Método Geral .....	103
4.2.12. Metodologia de Mitsunobu: Método Geral .....	103
4.2.13. Metodologia de Ullmann: Método Geral.....	104
4.2.14 Metodologias Empregadas nas Atividades Biológicas.....	104
4.2.14.1- Atividade Antimicrobiana .....	104
4.2.14.2. Ensaio da Acetilcolinesterase de <i>Electrophorus electricus</i> pelo método de Bioautografia .....	105
4.2.14.3. Ensaio da Acetilcolinesterase de <i>Bungarus sindanus</i> pelo método de Ellman ...	106
4.2.14.4. - Método fluorimétrico para a enzima Prolil Oligopeptidase (usando o ZGP-AMC como substrato fluorescente para POP): .....	106
4.2.14.5. - Método fluorimétrico para a enzima dipeptídil peptidase-IV (utilizando o GP-AMC como substrato fluorescente para a DPP- IV):.....	107
4.2.14.6. – Método empregado na determinação da atividade Antioxidante .....	107
<b>Capítulo V: Conclusões:</b> .....	108
5. Conclusões.....	108
<b>Capítulo VI: Anexos:</b> .....	110
ANEXO I.....	110
Estruturas Obtidas e Respetivos Nomes Químicos e Dados Cristalográficos .....	110
ANEXO II .....	116
Caderno de Cromatogramas e de Espectros .....	116
Cromatogramas em CLAE/DAD:.....	117
Cromatogramas em CLAE/EM: .....	119
Espectros de RMN Selecionados .....	121

### Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Estrutura com estereoquímica dos quatro alcalóides alvos deste estudo.....	3
<b>Figura 2:</b> Estruturas de alcalóides peptídicos lineares exceção a regra dos macro ciclos. ....	5
<b>Figura 3:</b> Estrutura geral de alcalóides ciclopeptídicos <i>sensu stricto</i> de 4(13)-, 5(13)-, 4(14)- e 4(15)-membros. ....	6
<b>Figura 4:</b> Proposta de Baig para a formação biogenética dos precursores dos alcalóides ciclopeptídicos. ....	7
<b>Figura 5:</b> Alcalóides ciclopeptídicos com atividades antifúngicas. ....	21
<b>Figura 6:</b> Alcalóides ciclopeptídicos com atividades antifúngicas. ....	21
<b>Figura 7:</b> Alcalóides ciclopeptídicos com atividades frente à enzima calmodulin-dependente da proteína Kinase II. ....	23
<b>Figura 8:</b> Alcalóides ciclopeptídicos com atividades analgésicas.....	24
<b>Figura 9:</b> Representação esquemática do mecanismo de ação do tipo de detergente ( <i>detergent-like</i> ) a parede celular de microrganismos por um peptídeo antimicrobiano catiônico. Figura retirada e modificada de Bechinger e col. (2006) <sup>56</sup> e Wimley (2010).....	26
<b>Figura 10:</b> Exemplos de conhecidos peptídeos com atividades antimicrobianas. ....	27
<b>Figura 11:</b> Peptídeos isolados de <i>Ixora coccínea</i> Linn. com atividades antitumorais.....	28
<b>Figura 12:</b> Fragmentos peptídicos precursores de alcalóides ciclopeptídicos com atividades antibacterianas. ....	28
<b>Figura 13:</b> Ampliações dos cromatogramas de CGFQ, dos derivados <i>N,O</i> -TFA-D,L <i>treo</i> -Pheser-OMe e <i>N,O</i> -TFA-D,L <i>eritro</i> -Pheser-OMe, CCSF, 25m, 2,6-Pe-3-Bu- $\gamma$ -CD, 50%/OV1701, 90 °C-170 °C a 2°C/min. ....	33
<b>Figura 14:</b> Perfil de CLAE-DAD, para os compostos (a) Z-L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-OMe ( <b>56a</b> ), (b) Z-L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-OMe ( <b>56b</b> ), (c) Z-L-Phe-L- <i>eritro</i> -Pheser-OMe ( <b>57a</b> ) e (d) Z-L-Phe-D- <i>eritro</i> -Pheser-OMe ( <b>57b</b> ). ....	35
<b>Figura 15:</b> Estrutura cristalina obtida por difração de raios-X do monocristal de Z-L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-OMe ( <b>56a</b> ). ....	36
<b>Figura 16:</b> Ampliações dos cromatograma do hidrolisado do dipeptídeo Z-L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-OMe ( <b>56b</b> ) e co-injeção com o padrão, obtidos por CGFQ. ....	36
<b>Figura 17:</b> Ampliações do espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>60b</b> em CDCl <sub>3</sub> . ....	42
<b>Figura 18:</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto <b>60b</b> em CDCl <sub>3</sub> , com ampliações da região de $\delta$ 125-173 ppm.....	43
<b>Figura 19:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>62b</b> em CD <sub>3</sub> OD a T= 323 K. ....	45

<b>Figura 20:</b> (a) Cromatograma de CLAE-DAD; (b) Espectro de Massas (m/z) obtido por CLAE-EM para os compostos <i>N,N</i> -(Me) <sub>2</sub> -L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe ( <b>64b</b> ). .....	47
<b>Figura 21:</b> Ampliações do espectro de RMN <sup>1</sup> H para o composto <b>64b</b> . .....	48
<b>Figura 22:</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C para o composto <b>64b</b> , em CDCl <sub>3</sub> a 298K. ....	48
<b>Figura 23:</b> Ampliações do mapa de contornos de RMN 2D ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY 45, 400 MHz, CDCl <sub>3</sub> , 298 K) das regiões de (a) δ 4,5 a 8,5 ppm e (b) δ 0,5 a 4,5 ppm, para o composto <b>64b</b> . .....	50
<b>Figura 24:</b> Estruturas obtidas por difração de raios-X do monocristal do tripeptídeo <b>64b</b> , com as duas conformações adotadas pela molécula no estado cristalino. ....	51
<b>Figura 25:</b> Ampliações do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> , 298 K) das regiões de (a) δ 7,0 a 8,2 ppm, (b) δ 2,5 a 5,5 ppm e (c) δ 0,5 a 2,5 ppm para o composto <b>66b</b> . ....	53
<b>Figura 26:</b> Ampliações do espectro de RMN <sup>1</sup> H do tetrapeptídeo Z-L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-L-(4-iodo)-Phe-OMe ( <b>73b</b> ). .....	56
<b>Figura 27:</b> Ampliações do espectro de RMN <sup>13</sup> C do tetrapeptídeo Z-L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-L-(4-iodo)-Phe-OMe ( <b>73b</b> ). .....	57
<b>Figura 28:</b> Espectro de ESI-EM para o tetrapeptídeo Z-L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-L-(4-iodo)-Phe-OMe ( <b>73b</b> ). .....	57
<b>Figura 29:</b> Requisitos estruturais observados para a atividade antimicrobiana. ....	69
<b>Figura 30:</b> a) Gráfico mostrando a % de atividade residual e a % de inibição residual da AChE pela concentração do peptídeo. b) Inibição da AChE de <i>Bungarus sindanus</i> em diferentes concentrações do Z-L-Leu-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Phe-OMe. ....	74
<b>Figura 31:</b> Acetilcolinesterase (AChE) na presença e ausência de diferentes concentrações de Z-L-Leu-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Phe-OMe. (n=4) com o mesmo resultado. ....	74
<b>Figura 32:</b> Inibidores covalentes e não covalentes da POP. ....	76
<b>Figura 33:</b> Estrutura cristalográfica das enzimas POP e DPP-IV. Fonte: PDB (2009). ....	76
<b>Figura A1:</b> Cromatograma de CLAE-DAD do NH <sub>2</sub> -L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe ( <b>62b</b> ) .....	117
<b>Figura A2:</b> Cromatograma de CLAE-DAD do <i>N,N</i> -(Me) <sub>2</sub> -L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe ( <b>64a</b> ) .....	117
<b>Figura A3:</b> Cromatograma de CLAE-DAD do <i>N,N</i> -(Me) <sub>2</sub> -L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe ( <b>64b</b> ) .....	118
<b>Figura A4:</b> Cromatograma de CLAE-DAD do <i>N</i> -(Me)-L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe ( <b>66b</b> ) .....	118



---

<b>Figura A5:</b> Cromatograma de CLAE-EM do <i>N,N</i> -(Me) <sub>2</sub> -L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (64b).....	119
<b>Figura A6:</b> Cromatograma de CLAE-EM do Z-L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-L-Tyr-OMe (72b) .....	120
<b>Figura A7:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do <i>N</i> -Boc-L-Ile-L-(4-iodo)-Phe-OMe (69).....	122
<b>Figura A8:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do <i>N</i> -Boc-L-Ile-L-4-(iodo)-Phe-OMe (69).....	123
<b>Figura A9:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do Z-L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (60b).....	124
<b>Figura A10:</b> Espectro de HMQC do Z-L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (60b) .....	125
<b>Figura A11:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do Z-L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (60a).....	126
<b>Figura A12:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do Z-L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (60a) .....	127
<b>Figura A13:</b> Espectro de HMQC do Z-L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (60a).....	128
<b>Figura A14:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do NH <sub>2</sub> -L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (62b) em CD <sub>3</sub> OD a T= 323 K. ....	129
<b>Figura A15:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do NH <sub>2</sub> -L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (62b) em CD <sub>3</sub> OD a T= 323 K. ....	130
<b>Figura A16:</b> Espectro de <sup>1</sup> H do <i>N,N</i> -(Me) <sub>2</sub> -L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (64a) .....	131
<b>Figura A17:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do <i>N,N</i> -(Me) <sub>2</sub> -L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (64a) .....	132
<b>Figura A18:</b> Espectro de HMQC do <i>N,N</i> -(Me) <sub>2</sub> -L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (64a) ....	133
<b>Figura A19:</b> Espectro de HMBC do <i>N,N</i> -(Me) <sub>2</sub> -L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (64a) ....	134
<b>Figura A20:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H do <i>N,N</i> -(Me) <sub>2</sub> -L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (64b) .	135
<b>Figura A21:</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C do <i>N,N</i> -(Me) <sub>2</sub> -L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (64b)	136
<b>Figura A22:</b> Espectro de HMQC do <i>N,N</i> -(Me) <sub>2</sub> -L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (64b) ...	137
<b>Figura A23:</b> Espectro de HMBC do <i>N,N</i> -(Me) <sub>2</sub> -L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (64b)....	138
<b>Figura A24:</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C do N-(Me)-L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (66b).....	139
<b>Figura A25:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do N-Me-L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (66b)....	140
<b>Figura A26:</b> Espectro de <sup>1</sup> H do N-(Me)-L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (66a) .....	141
<b>Figura A27:</b> Ampliação do Espectro de HMQC do N-Me-L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (66a).....	142
<b>Figura A28:</b> Espectro de COSY 45 do N-Me-L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (66a).....	143
<b>Figura A29:</b> Espectro de HSQC do N-Me-L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (66a).....	144
<b>Figura A30:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H do N-Me-L-Phe-L- <i>eritro</i> -Pheser-L-Ile-OMe (67a) .....	145
<b>Figura A31:</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C do Z-L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-L-Tyr-OMe (72b) . .	146
<b>Figura A32:</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H do Z-L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-L-Tyr-OMe (72a) . ....	147

---

<b>Figura A33:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do Z-L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-L-Tyr-OMe ( <b>72a</b> ). ...	148
<b>Figura A34:</b> Espectro de COSY 45 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ do Z-L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-L-Tyr-OMe ( <b>72a</b> ).....	149
<b>Figura A35:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ do Z-L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-L-(4-iodo)-Phe-OMe ( <b>73a</b> ).....	150
<b>Figura A36:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do Z-L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-L-(4-iodo)-Phe-OMe ( <b>73a</b> ).....	151

### *Lista de Esquemas*

<b>Esquema 1:</b> Rota retrossintética planejada para a construção do macrociclo.....	4
<b>Esquema 2:</b> Proposta do mecanismo biogenético para a macrociclização de alcalóides ciclopeptídicos de 13-, 14-, e 15-membros. ....	8
<b>Esquema 3:</b> Síntese total do alcalóide Zizifina-A ( <b>13</b> ) á partir do intermediário ( <b>12</b> ), desenvolvida por Schmidt e col.....	9
<b>Esquema 4:</b> Síntese total do alcalóide frangulanina ( <b>10</b> ), desenvolvida por Schmidt e col..	10
<b>Esquema 5:</b> Síntese total do alcalóide Sanjoinina-G1 ( <b>15</b> ), desenvolvida por Han e col.....	11
<b>Esquema 6:</b> Novas metodologias de ciclização para alcalóides ciclopeptídicos. ....	12
<b>Esquema 7:</b> Síntese total do alcalóide Sanjoinina-G1 ( <b>15</b> ), desenvolvida por Zhu e col.....	13
<b>Esquema 8:</b> Síntese total do alcalóide [C3- <i>epi</i> -mauritina D ( <b>16</b> )] desenvolvida por Han e col. ....	14
<b>Esquema 9:</b> Síntese de ciclofanos desenvolvida por Zhu e col.....	15
<b>Esquema 10:</b> Síntese de Ma e col. para o alcalóide zizifina-N ( <b>17</b> );.....	15
<b>Esquema 11:</b> Síntese realizada por Evano e col. para o alcalóide abissenina A ( <b>18</b> ).....	16
<b>Esquema 12:</b> Síntese de Evano e col. para o alcalóide mucronina E ( <b>19</b> ).....	17
<b>Esquema 13:</b> Síntese de Evano para paliurina E ( <b>20</b> ).....	18
<b>Esquema 14:</b> Metabolismo do alcalóide Sanjoinina A ( <b>32</b> ) sugerido por Han e col.,.....	22
<b>Esquema 15:</b> Estratégia sintética utilizada para síntese peptídica.....	30
<b>Esquema 16:</b> Preparação do derivado Z-L-Phe-OH ( <b>51</b> ).....	31
<b>Esquema 17:</b> Preparação dos aminoácidos D,L- <i>treo</i> -Pheser-OH ( <b>52</b> ) e D,L- <i>eritro</i> -Pheser-OH ( <b>53</b> ) e seus ésteres metílicos D,L- <i>treo</i> -Pheser-OMe ( <b>54</b> ) e D,L- <i>eritro</i> -Pheser-OMe ( <b>55</b> )	32
<b>Esquema 18:</b> Reação de formação dos dipeptídeos Z-L-Phe-D,L- <i>treo</i> -Pheser-OMe ( <b>56</b> ) e Z-L-Phe-D,L- <i>eritro</i> -Pheser-OMe ( <b>57</b> ). ....	34
<b>Esquema 19:</b> Reação de hidrólise básica para obtenção dos dipeptídeos livres. ....	39
<b>Esquema 20:</b> Reação de acoplamento para obtenção dos tripeptídeos.....	40
<b>Esquema 21:</b> Reação de desproteção da função amino dos tripeptídeos.....	44
<b>Esquema 22:</b> Reação de <i>N,N</i> -dimetilação dos tripeptídeos. ....	46
<b>Esquema 23:</b> Esquema geral da obtenção dos tripeptídeos <i>N</i> -monometilados. ....	52
<b>Esquema 24:</b> Esquema geral da obtenção dos dipeptídeos ( <b>70</b> ) e ( <b>71</b> ). ....	54
<b>Esquema 25:</b> Reações para preparação dos tetrapeptídeos. ....	55
<b>Esquema 26:</b> Mecanismo da reação de Mitsunobu. ....	60
<b>Esquema 27:</b> Mecanismo da reação de Ullmann.....	65
<b>Esquema 28:</b> Reação de formação da imidazolidinona ( <b>74</b> ).....	68

*Lista de Siglas, Abreviaturas e Símbolos*

<b><math>\delta</math></b>	Deslocamento químico
<b><math>\Delta\delta</math></b>	Varição de deslocamento químico
<b>Ac<sub>2</sub>O</b>	Anidrido Acético
<b>AChE</b>	Acetil Colinesterase
<b>AcOH</b>	Ácido acético
<b>AMC</b>	Aminocumarina
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection ( <i>Coleção de Tipos de Cultura da América</i> )
<b>BChE</b>	Butirilcolinesterase
<b>Boc</b>	<i>tert</i> -butiloxicarbonil
<b>BOP</b>	Benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfônio hexafluorofosfato
<b>Bop-Cl</b>	Cloreto de <i>N,N'</i> -bis-(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfinio
<b>CC</b>	Cromatografia em Coluna
<b>CCD</b>	Cromatografia em camada delgada
<b>CSSF</b>	Coluna capilar de sílica fundida
<b>CDI</b>	1,1'-Carbonildiimidazol
<b>CG</b>	Cromatografia Gasosa
<b>CGFQ</b>	Cromatografia gasosa com fase quiral
<b>CIM</b>	Concentração inibitória mínima
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>CLAE-DAD</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
<b>CLAE-EM</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas
<b>CLM</b>	Concentração letal mínima
<b>COSY</b>	Correlated spectroscopy
<b>CPP</b>	Cromatografia em placa preparativa
<b>d</b>	Dubleto
<b>DAD</b>	Detector de arranjo de diodos
<b>DCC</b>	<i>N,N</i> -diciclohexilcarbodiimida
<b>DCU</b>	Diciclohexiluréia
<b>dd</b>	Duplo dubleto
<b>DEAD</b>	Dietilazodicarboxilato
<b>DEPT</b>	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
<b>DIAD</b>	Diisopropilazodicarboxilato
<b>DIBAL-H</b>	Hidreto de diisobutilalumínio
<b>DIC</b>	Diisopropilcarbodiimida
<b>DIPEA</b>	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
<b>DMAP</b>	4-dimetilaminopiridina
<b>DME</b>	Dimetil éter
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DPPA</b>	Difenil fosforil-azida

---

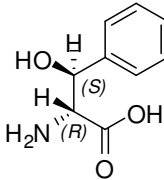
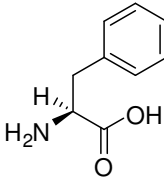
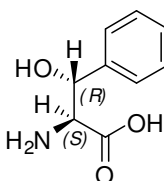
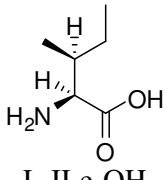
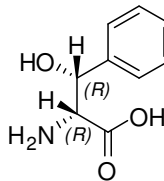
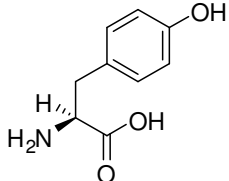
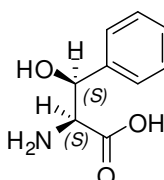
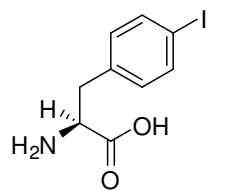
<b>DPPH</b>	Radical 2,2-difenil-1-picril hidrazila
<b>DPP-IV</b>	Dipeptidil peptidase-IV
<b>DTNB</b>	bis(3-O-[N-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one]-yl)-5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoate
<b>E.C.</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDAC</b>	1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida hidrocloreto
<b>EDC</b>	1-Etil-3-[3-(dimetilaminopropil)]carbodiimida
<b>ee</b>	Excesso enantiomérico
<b>Et<sub>3</sub>N</b>	Trietilamina
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>Fmoc</b>	9-fluorenil-metiloxycarbonil
<b>GABA<sub>a</sub></b>	Receptor do ácido gama-aminobutirico
<b>GLP-1</b>	glucagon-like peptide-1
<b>Glu</b>	Glutamina
<b>GP-AMC</b>	Glicil-Prolil-Aminocumarina
<b>h</b>	hora
<b>HATU</b>	Hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3,-tetrametilurônio
<b>HBTU</b>	Hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3,tetrametilurônio
<b>His</b>	Histidina
<b>HMBC</b>	Heteronuclear multiple-bond correlation
<b>HMPT</b>	Hexametil-fosforil-triamida
<b>HMQC</b>	Heteronuclear multiple-quantum correlation
<b>HOAt</b>	7-aza-1-hidroxibenzotriazol
<b>HOBt</b>	1-hidroxibenzotriazol
<b>HSQC</b>	Heteronuclear single-quantum correlation
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória de 50%
<b>Ile</b>	Isoleucina
<b>J</b>	Constante de acoplamento
<b>λ</b>	Comprimento de onda
<b>K</b>	Kelvin
<b>K<sub>i</sub></b>	Constante de dissociação do complexo enzima-inibidor
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michaelis-Menten. É a concentração de substrato requerida para produzir uma velocidade igual a V <sub>max</sub> /2.
<b>KPa</b>	Kilo Pascal
<b>Leu</b>	Leucina
<b>m</b>	Multiplete
<b>Me</b>	Metila
<b>μg</b>	Micro grama
<b>mg</b>	Miligramas
<b>MsCl</b>	Cloreto de Mesila
<b>NA</b>	Não ativa
<b>NaHMDS</b>	Hexametildisilazida de sódio

---

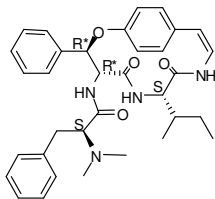
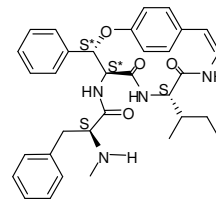
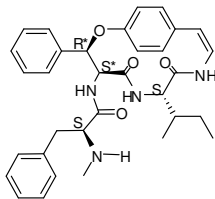
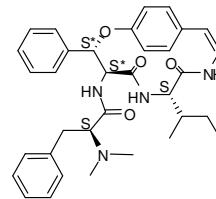
<b>NMM</b>	<i>N</i> -metimorfolina
<b>NOE</b>	Efeito Overhauser Nuclear
<b>NOESY</b>	Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy (Espectroscopia pelo Aumento do efeito Nuclear Overhauser)
<b>NOSYL</b>	(4-NO <sub>2</sub> )-benzenosulfonil
<b>NPPN</b>	Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>PACs</b>	Peptídeos Antimicrobianos catiônicos
<b>pág</b>	Página
<b>PDC</b>	Dicromato de Piridiniun
<b>PF</b>	Ponto de fusão
<b>Ph</b>	Fenila
<b>Phe</b>	Fenilalanina
<b>Pheser</b>	$\beta$ -Fenilserina
<b>POP</b>	Prolil oligopeptidase
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b>PPTS</b>	Piridinium p-Toluenosulfonato
<b>Pro</b>	Prolina
<b>PyAOP</b>	Hexafluorofosfato de 7-azabenzotriazol-1-iloxitris (pirrolidino) fosfônio
<b>Pyr</b>	Piridina
<b>QSA</b>	Quantidade de substância ativa
<b>Quant.</b>	Quantitativo
<b>RCM</b>	Ring-Closing Metathesis
<b>REA</b>	Relação Estrutura Atividade
<b>Rend.</b>	Rendimento
<b>Rf</b>	Fator de retenção
<b>RMN</b>	Ressonância magnética nuclear
<b>s</b>	Singleto
<b>seg.</b>	Segundo
<b>Ser</b>	Serina
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>t</b>	Tripleto
<b>t.a.</b>	Temperatura ambiente
<b>TBAF</b>	Fluoreto de tetrabuliamônio
<b>TBDMS</b>	Terc-butildimetilsilano
<b>TBDMSCI</b>	Cloreto de terc-butildimetilsilano
<b>TBS-Cl</b>	Cloreto de terc-butilsilano
<b>TFAA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>TFFH</b>	Tetrametilfluorformamidiniun hexafluorofosfato
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>TMSEOH</b>	Trimetil-silil-etanol
<b>TMSOTf</b>	Trimetil-silil-trifluor-metanosulfonato
<b>Trp</b>	Triptofano
<b>TSA</b>	Trypticase Soy Agar (Agar Triptico de Soja)

<b>Tyr</b>	Tirosina
<b>UFSM</b>	Universidade Federal de Santa Maria
<b>UI</b>	Unidades Internacionais
<b><math>V_{max}</math></b>	Velocidade máxima
<b>Z</b>	Carbobenzoxi (Cbz)
<b>ZGP-AMC</b>	Carbobenzoxi-Glicil-Prolil-aminocumarina
<b>ZPP</b>	Carbobenzoxi-prolil-Prolinal

*Lista de Aminoácidos Utilizados e suas Estruturas*

<i>Aminoácidos</i>	<i>Estruturas e siglas</i>	<i>Aminoácidos</i>	<i>Estruturas e siglas</i>
<b>D-<i>treo</i>-fenilserina</b>	 <p>D-<i>treo</i>-Pheser-OH</p>	<b>L-fenilalanina</b>	 <p>L-Phe-OH</p>
<b>L-<i>treo</i>-fenilserina</b>	 <p>L-<i>treo</i>-Pheser-OH</p>	<b>L-Isoleucina</b>	 <p>L-Ile-OH</p>
<b>D-<i>eritro</i>-fenilserina</b>	 <p>D-<i>eritro</i>-Pheser-OH</p>	<b>L-Tirosina</b>	 <p>L-Tyr-OH</p>
<b>L-<i>eritro</i>-fenilserina</b>	 <p>L-<i>eritro</i>-Pheser-OH</p>	<b>L-(4-Iodo)-fenilalanina</b>	 <p>L-(4-iodo)-Phe-OH</p>



*Lista de Alcalóides Trabalhados e suas Estruturas***Adouetina-Y****Scutianina-M****Condalina-A****Scutianina-L**

---

---

*Capítulo I*

---

## **Capítulo I: Introdução e Objetivos:**

### **1.1.Introdução:**

Um dos grandes desafios enfrentados pela medicina moderna é sem dúvida o tratamento de doenças infecciosas, causadas tanto por vírus como por microrganismos clinicamente patogênicos ao homem e que vem se tornando cada vez mais resistentes aos tradicionais agentes antivirais e antimicrobianos,<sup>1</sup> fato este que chama muito atenção por se tratar de um processo natural da evolução. Outra preocupação ainda mais recentemente em foco, e também de crescente avanço, são as doenças degenerativas do sistema nervoso central (SNC), cujo completo entendimento dos seus mecanismos de instalação e progressão através de interações entre as superfícies enzimáticas e receptores permanecem desconhecidos.

Estes fatos despertam o interesse de pesquisadores das mais diversas áreas, os quais têm dedicado especial atenção à descoberta de novas drogas e novos modos de ação para torná-las mais eficientes. Em geral, a natureza é a principal contribuinte ou a fonte inspiradora destas moléculas, sendo de particular destaque as substâncias provenientes de plantas superiores utilizadas tradicionalmente na medicina popular, destacando-se de longe entre estes “produtos naturais”, o grupo dos metabólitos secundários pelo seu vasto leque de compostos biologicamente ativos.<sup>2</sup>

Neste contexto, o Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais (NPPN) da Universidade Federal de Santa Maria, tornou-se um dos principais grupos na área de pesquisa em produtos naturais do Rio Grande do Sul, e durante anos tem desenvolvido trabalhos que denotam grandes avanços em fitoquímica clássica e na pesquisa de novos agentes antimicrobianos, bem como potenciais inibidores enzimáticos.<sup>3</sup>

Uma classe de metabólitos secundários que há anos vem sendo estudado por este grupo de pesquisa é a dos alcalóides ciclopeptídicos de 14 membros, os quais são bases poliamídicas

---

1 a) Austin, D. J.; Kristinsson, K. G.; Anderson, R. M.; *Proc. Natl., Acad. Sci. USA*, **1999**, 96, 1152. b) Urakawa, H.; Yamada, K.; Komagoe, K.; Ando, S.; Oku, H.; Katsu, T.; Matsuo, I.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 1771.

2 a) Schmidt, B.; Ribnick, D. M.; Poulev, A.; Logendra, S.; Cefalu, W. T.; Raskin, I.; *Met. Clin. Exp.*, **2008**, 57,(Suppl.1) S3. b) Rishton, G.M. *Am. J. Cardiol.* **2008**, 101, (Suppl.) 43D.

3 a) Marques, M. R.; Stuker, C. Z.; Tarrago, T.; Giralt, E.; Morel, A. F.; Dalcol, I. L.; *Fitoterapia*, **2010**, 81, 552. b) Morel, A. F.; Bravo, R. V. F.; Reis, F. A. M.; Ruveda, E. A.; *Phytochemistry*, **1979**, 18, 473. c) Morel, A. F.; Bravo, R. V. F.; Reis, F. D. A. M.; Ruveda, E. A.; *Phytochemistry*, **1979**, 18, 473. d) Morel, A. F.; Diegel, M.; Layer, H.; Biermann, J.; Voelter, W.; *Z. Physiol. Chem.*, **1983**, 364, 1641. e) Morel, A. F.; Herzog, R.; Biermann, J.; Voelter, W.; *Z. Naturforsch.* **1984**, 39b, 1825. f) Morel, A. F.; Henning, P.; Voelter, E.; *Chimia*, **1985**, 4, 98. g) Morel, A. F.; Mostardeiro, M. A.; Menezes, A. S.; Zanatta, N.; *Phytochemistry*, **1995**, 39, 431. h) Morel, A. F.; Menezes, A. S.; Mostardeiro, M. A.; Zanatta, N.; *Phytochemistry*, **1995**, 38, 783. i) Morel, A. F.; Machado, E. C.; Alvares, A. F.; *J. Nat. Prod.*, **1995**, 58, 548.

macrocíclicas compostas por um fragmento tripeptídico formado por um  $\alpha$ -aminoácido, um  $\beta$ -OH-aminoácido ( $\beta$ -hidroxiprolina,  $\beta$ -hidroxileucina ou  $\beta$ -fenilserina) e um aminoácido N-terminal básico geralmente mono ou dimetilado, e formando o sistema macro ciclo uma unidade não aminoácida derivada da tirosina (*p*-hidroxi estililamina).

Estes alcalóides são de baixa abundância natural (rendimentos das plantas secas menores que 1% dependendo de suas origens e outros fatores ambientais) e aos quais têm sido relatadas potentes atividades hipnóticas,<sup>4</sup> sedativas,<sup>5</sup> antifúngicas, antibacterianas,<sup>6</sup> antinociceptivas,<sup>3j</sup> antiplasmódica e ionóforas.<sup>7</sup>

### 1.2. Objetivos:

A baixa biodisponibilidade natural, 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 dispendiosa, demorada e trabalhosa.

Neste contexto, visando-se a possibilidade de que pequenos fragmentos peptídicos lineares precursores da estrutura desses alcalóides ciclopeptídicos, mantenham as mesmas ou até possuam melhores propriedades biológicas que estes alcalóides, o presente trabalho de tese desenvolvido junto a este grupo de pesquisa, tem como objetivo a realização de um estudo da relação estrutura atividade (REA), através da construção da porção peptídica constituinte desses alcalóides e o confronto dos dados obtidos, a fim de determinar qual o principal componente responsável por tais atividades na estrutura destes alcalóides.

Com base neste proposto, selecionaram-se os alcalóides ciclopeptídicos de 14 membros condalina A (1),<sup>8</sup> scutianina M (2),<sup>9</sup> adouetina Y (3)<sup>10</sup> e scutianina L (4)<sup>11</sup> (Figura 1), por se tratarem de dois pares compostos diastereoisoméricos, cuja presença do grupo (*N,N*-dimetil)

4 Ma, Y.; Han, H.; Nam, S.-Y.; Kim, Y.-B.; Hong, J.-T.; Yun, Y.-P.; Oh, K.-W.; *J. Ethnopharmacol.* **2008**, 117, 318.

5 Suh, D.-Y.; Kim, Y. C.; Han, B. H.; *Heterocycles*, **1996**, 43, 2347.

6 Emile, A.; Waikedre, J.; Herrenknecht, C.; Fourneau, C.; Gantier, J.-C.; Hnawia, E.; Cabalion, P.; Hocquemiller, R.; Fournet, A.; *Phytother. Res.*, **2007**, 21, 398

7 Suksamram, N.; Suwannapoch, N.; Aunchai, N.; Kuno, M.; Ratananukul, P.; Haritakun, R.; Jansakul, C.; Ruchirawat, S.; *Tetrahedron*, **2005**, 61, 1175.

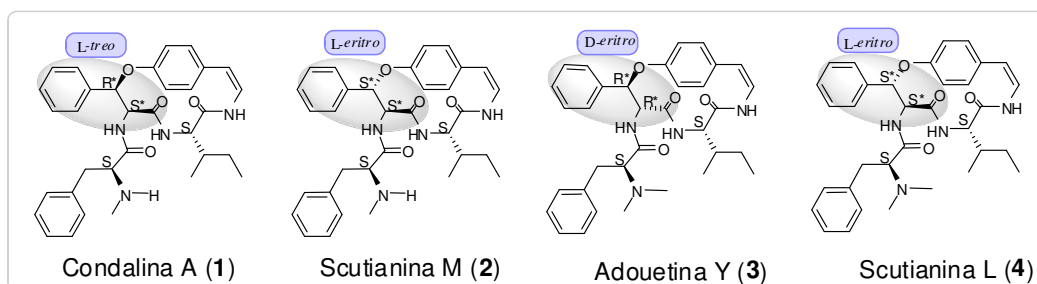
8 Morel, A. F.; Araujo, C. A.; Silva, U. F.; Hoelzel, S. C. S. M.; Záchia, R.; Bastos, N. R.; *Phytochemistry*, **2002**, 61, 561.

9 Morel, A. F.; Maldaner, G.; Ilha, V.; Missau, F.; Silva, U. F.; Dalcol, I. I.; *Phytochemistry*, **2005**, 66, 2571.

10 Servis, R. E.; Kosak, A. I.; Tschesche, R.; Frohberg, E.; Fehlhaber, H.-W.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, 91, 5619.

11 Morel, A. F.; Machado, E. C. S.; Moreira, J. J.; Menezes, A. S.; Mostardeiro, M. A.; Zanatta, N.; Wessjohann, L. A.; *Phytochemistry*, **1998**, 47, 125.

no aminoácido básico terminal (L-fenilalanina) dos compostos **3** e **4** junto às diferenças nas estereoquímicas do seu  $\beta$ -OH-aminoácido  $\beta$ -fenilserina, parecem ser fatores determinantes de suas atividades biológicas.

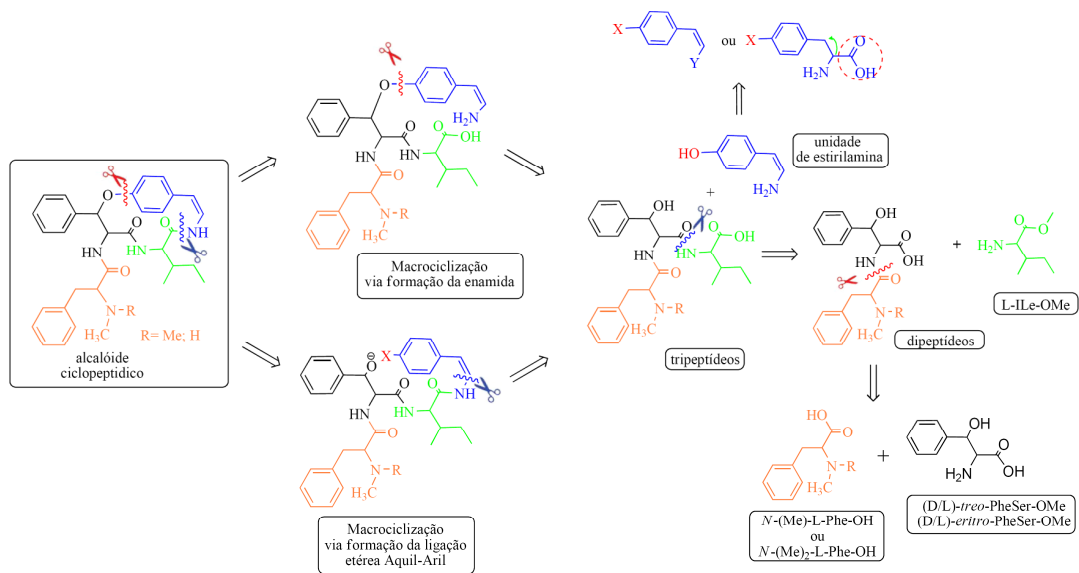


**Figura 1:** Estrutura com estereoquímica dos quatro alcalóides alvos deste estudo.

Deste modo propõe-se como objetivo principal deste trabalho, a síntese em solução de fragmentos tripeptídicos lineares, que contenham o aminoácido terminal L-fenilalanina com sua função amino *N*-monometilada ou *N,N*-dimetilada e o  $\beta$ -OH-aminoácido não proteinogênico  $\beta$ -fenilserina nas suas duas configurações e formas diastereoisoméricas (D,L-*treo*/D,L-*eritro*), juntamente com a completa caracterização estrutural destes peptídeos.

Pode-se estabelecer ainda como objetivo deste trabalho, além da avaliação da atividade antimicrobiana destes compostos frente a uma coleção de microrganismos patogênicos, necessária para a realização do estudo da REA, a avaliação de sua ação inibitória frente a uma série de enzimas (AChE, POP) envolvidas em doenças degenerativas do Sistema Nervoso Central, e a avaliação da capacidade de capturar radicais livres nas atividades anti-oxidantes.

Com estes objetivos em mente, projetou-se a partir de algumas desconexões (Esquema 1) a seguinte rota sintética para a preparação dos peptídeos; primeiramente pela desconexão em dois pontos principais, na função enamida e na ligação alquil-aril éter, gerando assim o bloco tripeptídico desejado para este estudo, em seguida este pode então ser clivado em suas ligações amídicas levando a seus aminoácidos constituintes, L-isoleucina, L-fenilalanina e o aminoácido não proteinogênico  $\beta$ -fenilserina.



**Esquema 1:** Rota retrosintética planejada para a construção do macrociclo.

No entanto, durante o decorrer do trabalho pode-se estabelecer como um dos objetivos a realização de um estudo de algumas das reações encontradas na literatura para a construção da ligação alquil-aryl éter na síntese destes alcalóides, visto ser esta a etapa chave na obtenção destes macrociclos. Existem poucos relatos para a construção da ligação alquil-aryl éter utilizando-se o  $\beta$ -OH-aminoácido  $\beta$ -fenilserina.

---

---

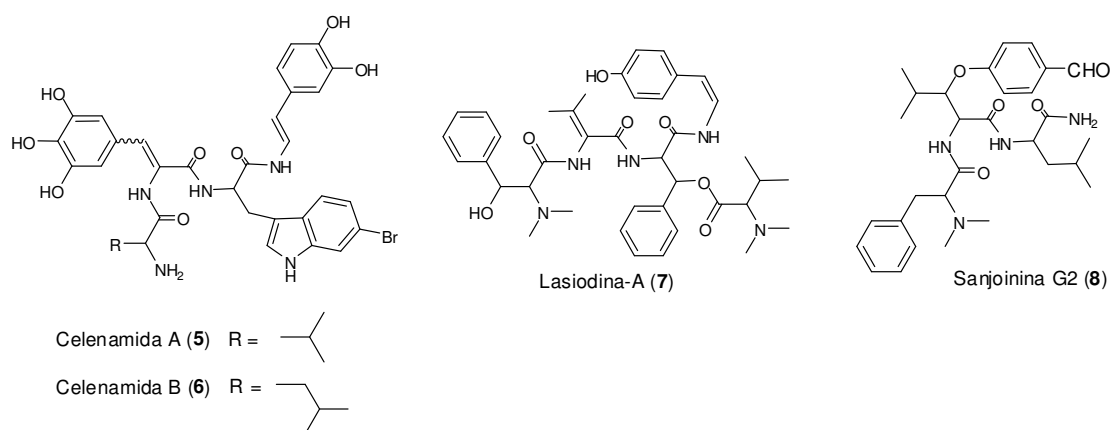
*Capítulo II*

---

## Capítulo II: Revisão Bibliográfica

### 2.1 Alcalóides ciclopeptídicos

Alcalóides ciclopeptídicos [alcalóides peptídicos,<sup>12</sup> bases peptídicas,<sup>13</sup> *ansa*-peptídeos<sup>14</sup> e fenilciclopeptinas<sup>15</sup>] são definidos como bases poliamídicas encontradas em plantas de muitas famílias e espécies, mas principalmente nas pertencentes à família das *Rhamnaceae*. Estas moléculas são constituídas basicamente por um macro ciclo de 13-, 14- ou 15-membros, com a estrutura em forma de um laço e alguns elementos estruturais gerais como a presença de dois aminoácidos e uma unidade de estirilamina. Uma exceção a estrutura destes alcalóides ciclopeptídicos, são as celenamidas A (5) e B (6) (provenientes da esponja *Cliona celata*), a Lasiodina A (7) e a Sanjoinina G2 (8), cujo esqueleto básico não é constituído por um macrociclo, mas sim por um fragmento peptídico linear.



**Figura 2:** Estruturas de alcalóides peptídicos lineares exceção a regra dos macrociclos.

12 Warnhoff, E. W.; in: “*Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*” (Herz, W.; Grisebach, H.; Scott, A. I.; eds.), **1970**, 28, 162. Springer Verlag, New York.

13 Schmidt, U.; Lieberknecht, A.; Haslinger, E.; in: “*The Alkaloids, Chemistry and Pharmacology*” (Brossi, A.; ed.), **1985**, 26, 299. Academic Press, New York.

14 Joullie, M. M.; Nutt, R. F.; in: “*Alkaloids, Chemical and Biological Perspectives*” (Pelletier, S. W.; ed.), **1985**, 3, 113. Wiley Interscience, New York.

15 Lagarias, J. C.; Goff, G.; Klain, F. K.; Rapoport, H.; *J. Nat. Prod.*, **1979**, 42, 541.



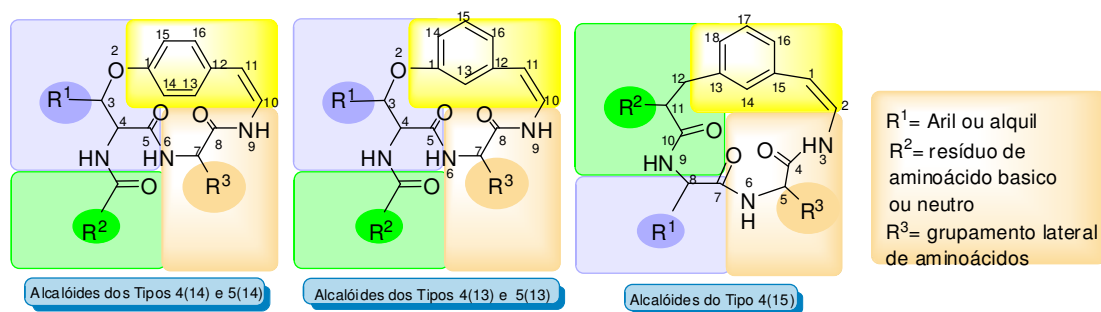
## 2.2. Classificação

Alcalóides ciclopeptídicos são geralmente compostos de uma unidade derivada da tirosina (*p*- ou *m*-) OH estirilamina, um aminoácido comum (Phe, Leu, Ile, Pro, Trp) como resíduo de aminoácido ligado ao anel, e uma unidade de  $\beta$ -OH-aminoácido que pode ser  $\beta$ -fenilserina,  $\beta$ -hidroxileucina ou a  $\beta$ -hidroxiprolina, que se encontra ligada ao fragmento estirilamina via uma ligação alquil-aril éter. Ligado a função amino deste aminoácido encontra-se geralmente outro aminoácido com sua função amino terminal *N*-mono metilada ou *N,N*-dimetilada, responsável pela basicidade destas moléculas.

Alguns representantes desta classe de metabólitos são, no entanto, uma exceção a esta regra, como exemplo alguns membros do grupo dos alcalóides do tipo Pandamina<sup>16</sup> que contém um 2-alcóxi-2-(4-hidroxi-fenil)-etilamina, e alguns alcalóides de 15 membros que contém a 2-metoxi-5-( $\beta$ -aminovinil)-fenilalanina, no lugar da unidade de estirilamina, e os alcalóides ciclopeptídicos neutros que não apresentam o nitrogênio básico terminal.

Devido as dificuldades encontradas em termos de uma padronização a ser adotada à nomenclatura destas moléculas, Joullie e Richard<sup>17</sup> desenvolveram um sistema que classifica os alcalóides peptídicos como (i) alcalóides ciclo peptídicos *sensu stricto*, (ii) alcalóides peptídicos lineares, e (iii) ciclo peptídeos neutros.

Alcalóides ciclopeptídicos *sensu stricto* (Figura 3) são classificados de acordo com o número de unidades constituintes (fora do parênteses) e tamanho (dentro do parênteses) do macro ciclo como alcalóides do tipo 4(13)-, 5(13)-, 4(14)-, 5(14)-, e 4(15), sendo os de 14 membros, encontrados em maior número nesta classe de metabólitos, e por isso são alvos de estudo e interesse de pesquisadores das mais diversas áreas.



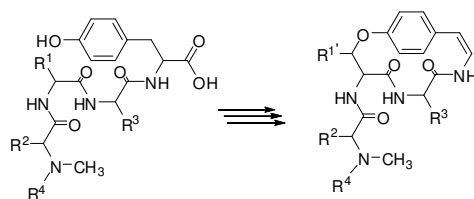
**Figura 3:** Estrutura geral de alcalóides ciclopeptídicos *sensu stricto* de 4(13)-, 5(13)-, 4(14)- e 4(15)-membros.

16 Pais, M.; Jarreau, F. X.; Lusinchi, X.; Goutarel, R.; *Ann. Chim.*, **1966**, 13, 83.

17 Joullie, M. M; Richard, D. J.; *Chem. Commun.*, **2004**, 2011.

## 2.2. Biossíntese de Alcalóides Ciclopeptídicos

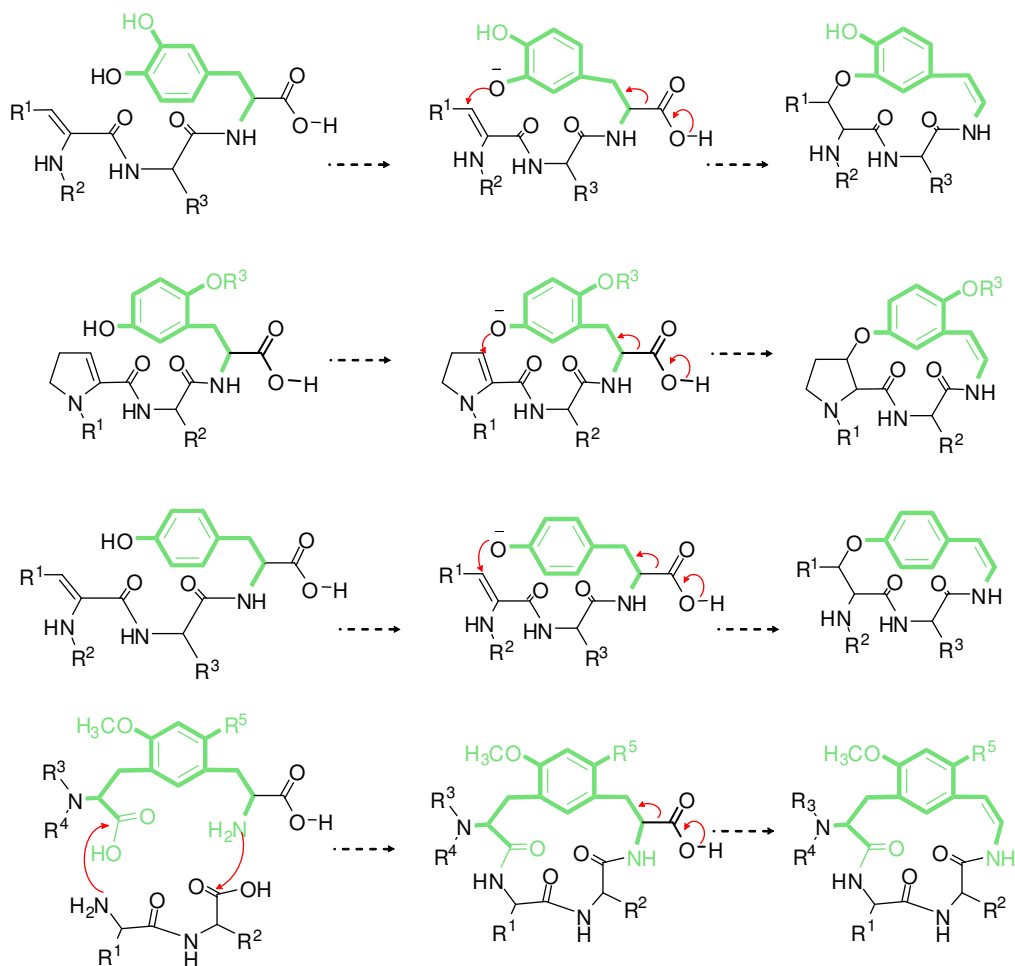
Não existem, na literatura, relatos experimentais que demonstrem um real mecanismo para a biossíntese de alcalóides ciclopeptídicos, porém algumas evidências conseguidas através dos seus supostos precursores nos fazem acreditar que o caminho biossintético pelo qual os alcalóides ciclopeptídicos são formados, passa em uma primeira etapa pela formação dos respectivos tetrapeptídeos, seguido por sua macrociclicização. Em 1993, Baig e col.<sup>18</sup> relataram, pela primeira vez, que em culturas de tecidos de plantas da espécie *Ceanothus americanus* (Rhamnaceae) através de um estudo de seu metabolismo secundário, a formação de tetrapeptídeos. Eles usaram uma mistura dos aminoácidos valina, leucina, isoleucina, tirosina, fenilalanina e triptofano, isolando assim uma série de novos tetrapeptídeos Val-Leu-Leu-Tyr, Ile-Leu-Leu-Tyr, Phe-Phe-Leu-Tyr e Phe-Phe-Ile-Tyr, como prováveis precursores dos alcalóides ciclopeptídicos americana (**9**), frangulanina (**10**), adouetina Y (**3**), e ceanotina E (**11**), respectivamente (Figura 4).



Alcalóides	R <sup>1</sup>	R <sup>1'</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
Americina ( <b>9</b> )	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CHCH <sub>2</sub> C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> N	H
Frangulanina ( <b>10</b> )	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CHCH <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
Adouetina Y ( <b>3</b> )	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Ceanotina E ( <b>11</b> )	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CHCH <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>

**Figura 4:** Proposta de Baig para a formação biogenética dos precursores dos alcalóides ciclopeptídicos.

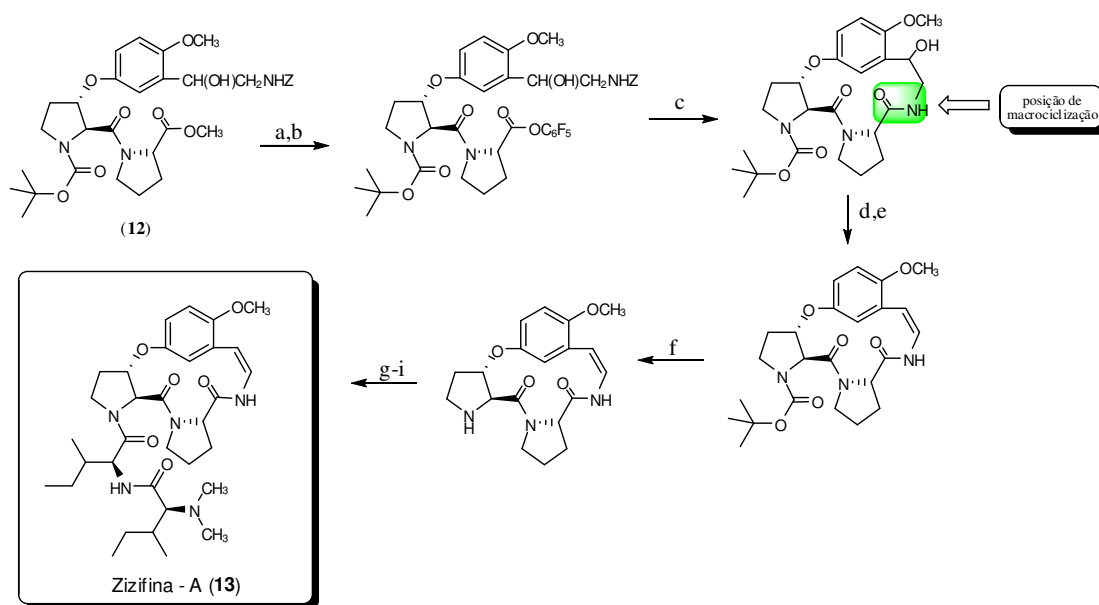
Como esperado, o aminoácido tirosina é usado como bloco na biossíntese da unidade estirilamina dos alcalóides de 13 e 14-membros, mas na biogênese de alcalóides ciclopeptídicos de 15 membros tem-se uma unidade 2-metoxi-5-( $\beta$ -aminovinil)-fenilalanina como a precursora do correspondente dehidrocomposto (Esquema 2).



**Esquema 2:** Proposta do mecanismo biogenético para a macroclicização de alcalóides ciclopeptídicos de 13-, 14-, e 15-membros.

### 2.3. Síntese Total de Alcalóides Ciclopeptídicos:

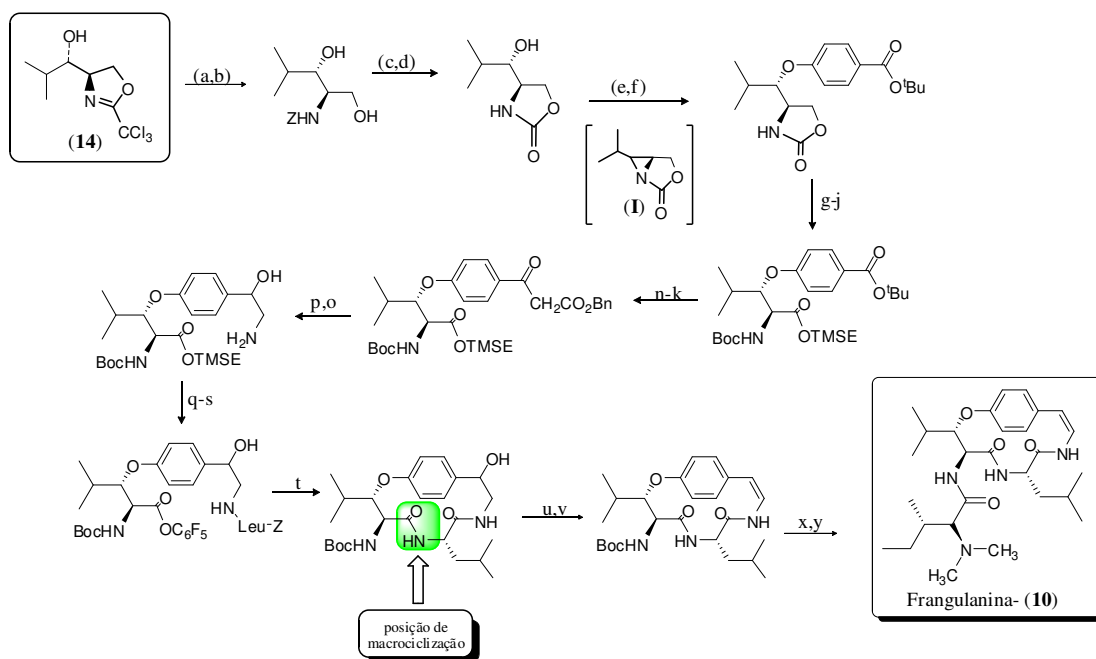
A primeira síntese total de alcalóides ciclopeptídicos foi descrita em 1983, por Schmidt e col.<sup>19a-d</sup> quando estes após a obtenção do intermediário dipeptídico (12) (15 etapas reacionais) realizaram a síntese total do alcalóide ciclopeptídico de 13 membros zizifina A<sup>19a,b</sup> (13) (Esquema 3) (9 etapas reacionais) com o uso do reagente pentafluorfenol como ativante dos grupamentos carboxila em sua metodologia de macro-lactamização, com o fechamento do macrociclo através da formação da ligação enâmida, o emprego deste reagente foi considerado por muito tempo como um dos principais avanços a síntese destes alcalóides.



**Esquema 3:** Síntese total do alcalóide Zizifina-A (13) a partir do intermediário (12), desenvolvida por Schmidt e col..*Reagentes e condições:* a) LiOH 1M, dioxano, KHSO<sub>4</sub> 1M, 83% b) C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>-HO, DCC, 1h, 0 °C, 1h, t.a., 90% c) dioxano, 90 °C, EtOH, 4-pirido-pirrolidina, H<sub>2</sub>, Pd/C, 4h, 60% d) PBu<sub>3</sub>, *p*-(NO<sub>2</sub>)C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-Se-CN, THF, 2h, t.a., e) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, pyr, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, t.a., 90% f) TFAA, t.a. *m*-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(OMe)<sub>2</sub>, então KHCO<sub>3</sub> 1M, 92% g) *N*-Boc-L-Ile, 0 °C, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, DCC, 4h, t.a., 71% h) TFAA, *m*-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(OMe)<sub>2</sub>, 0,5h, t.a., (100%), i) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4-(*N,N*-dimetil)amino piridina (DMAP), *N,N*(Me)<sub>2</sub>-L-Ile-O-C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>, dioxano, 80 °C, 7h; 54%.(rendimento total da síntese 0,18 %).

19 a) Schmidt, U.; Lieberknecht, A.; BöKens, H.; Griesser, H.; *J. Org. Chem.*, **1983**, 48, 2680, b) Schmidt, U.; Lieberknecht, A.; BöKens, H.; Griesser, H.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1981**, 20, 1026, c) Schmidt, U.; Schanbacher, U.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1983**, 22, 152, d) Schmidt, U.; Zäh, M.; Lieberknecht, A.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 1002.

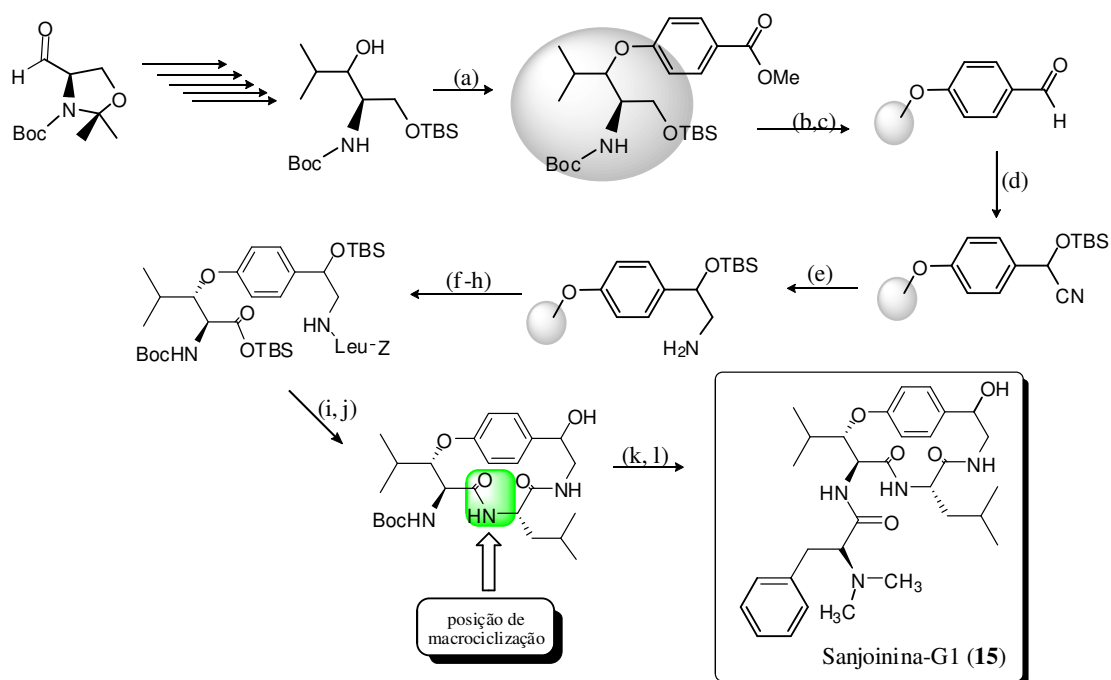
Em 1991, o mesmo grupo realizou, ainda empregando esta metodologia, a síntese total do alcalóide ciclopeptídico de 14 membros frangulanina<sup>19d</sup> (**10**) (Esquema 4), onde após várias etapas de síntese, partindo do derivado **14** obteve-se a formação da ligação alquil-aril éter com retenção da configuração, pelo ataque do arilóxido a um intermediário aziridina (**I**) e subsequentemente através do uso do reagente ativante de grupamentos carboxila (C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>-OH), obteve macroclicização intramolecular através da formação da ligação amídica central entre a carboxila do β-OH-aminoácido e o grupamento amino do α-aminoácido do macrociclo.



**Esquema 4:** Síntese total do alcalóide frangulanina (**10**), desenvolvida por Schimdt e col.

*Reagentes e condições:* a) HCl 2 M, H<sub>2</sub>O, 80 °C, 20h; b) Cbz-Cl, dioxano, NaHCO<sub>3</sub>, 20 °C, 12h, 90%; c) Tos-Cl, pyr, -10 to 20 °C, 24h, 86%; d) dioxane, 100 °C, 16h, 78% ; e) Tos-Cl, pyr, -10 to 20 °C, 3 dias, 71% ; f) (Na<sup>+</sup>) OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(p)CO<sub>2</sub>Bu<sup>t</sup>, hexametilfosforo triamida (HMPT), 90 °C, 5h, 93%; g) (Boc)<sub>2</sub>O, 4-(*N,N*-dimetil)amino piridina (DMAP), Et<sub>3</sub>N, THF, 20 °C, 4h, 100% ; h) Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, 20 °C, 5h, 87%; i) PDC, DMF, 20 °C 40h; j) Me<sub>3</sub>SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH (TMSEOH), DMAP, diclohexilcarbodiimida (DCC), Et<sub>2</sub>O, -20 to 20 °C, 20h, então re-submetido as condições (i) e (j) 43%; k) HCl 6 M, dioxano, 0 a 20 °C, 5h, quantitativa; l) Boc<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub>, dioxano, 20 °C, 14h, 88%; m) carbonildiimidazole (Im<sub>2</sub>CO), THF, 20 °C, 4h; n) (O<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>Bn)<sub>2</sub> Mg<sup>2+</sup>, 50 °C, 4h, 20 °C, 14h; o) NaNO<sub>2</sub>, AcOH, H<sub>2</sub>O, 0 °C, 4h, 79%; p) H<sub>2</sub>, Pd/C, AcOH, 20 °C, 16h; q) Z-Leu-OSucc, dioxano, KHCO<sub>3</sub>, 20 °C, 14h; r) Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>F<sup>-</sup>, DMF, 20 °C, 2h, quantitativo; s) C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>OH, DCC, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -20 to 20 °C, 14h, 91%; t) dioxano, Bu<sup>t</sup>OH, 4- pirrolidinopiridina, H<sub>2</sub>, Pd/C, 90 °C, 40h, 44%; u) *p*-(NO<sub>2</sub>)C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-Se-CN, Bu<sub>3</sub>P, THF, 20 °C, 3h, 91%, v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, pyr, 20 °C, 1h, 85% 43%; x) CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H, *m*-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(OMe)<sub>2</sub>, 0 °C, 1h; y) (*S*)-*N,N*-dimetil-isoleucina e 3-cyano-4,6-dimetilpiridina-2- tiol, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20 °C, 14h, 20%.

Subsequentemente várias metodologias e sínteses muito semelhantes foram criadas, publicadas ou revisadas baseadas neste procedimento,<sup>20</sup> como a síntese da sanjoinina G1 (**15**) (Esquema 5) desenvolvida em 1995 por Han e col.<sup>21</sup> Utilizando esta estratégia de síntese, Han reduziu o número de etapas necessárias para apenas 17 etapas, sendo a macroclicização realizada na mesma posição da amida central, ressaltando-se ainda que após uma tentativa de macroclicização com o reagente C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>OH, utilizando-se o derivado cetona obtido da etapa de oxidação para obtenção da função carboxílica do β-OH-aminoácido, resultou na clivagem da ligação alquil aril éter, provavelmente devido o efeito elétron-retirador do grupamento benzofenona e a alta temperatura empregada.



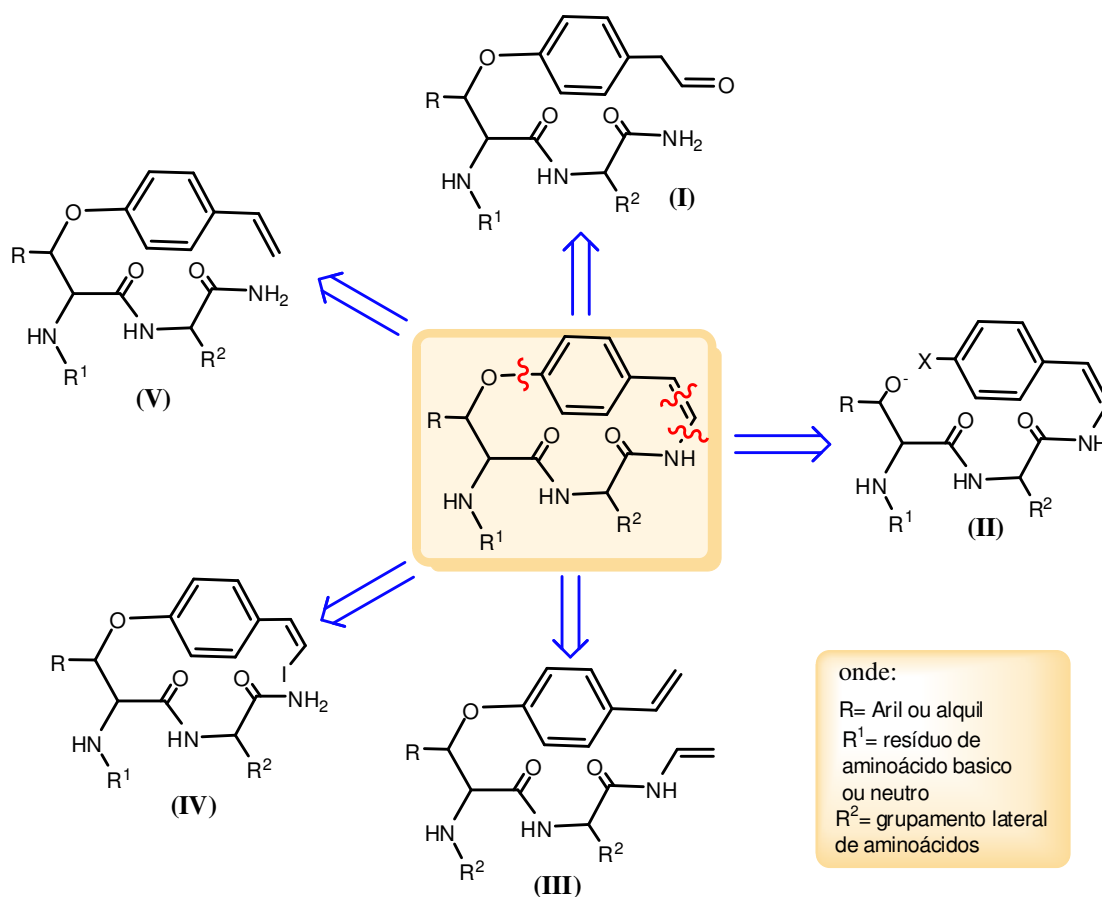
**Esquema 5:** Síntese total do alcalóide Sanjoinina-G1 (**15**), desenvolvida por Han e col.

*Reagentes e condições:* a) PPh<sub>3</sub>, DEAD, 4-hidroxibenzoato de metila, THF, 25 °C; b) DIBAL-H, THF, 0 °C; c) PDC, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 25 °C; d) KCN, ZnI<sub>2</sub>, TBS-Cl, MeCN, 25 °C, 80%; e) HCO<sub>2</sub>NH<sub>4</sub>, 10% Pd/C, MeOH, 70 °C, 70%; f) cloroformiato de isobutila, NMM, L-Z-leucina, THF, 0 °C, 78%; g) Reagente de Jones, acetona, 0 °C, 76%; h) NaBH<sub>4</sub>, MeOH, 0 °C; i) C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>OH, DCC, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C, 14h; j) dioxano, *t*-BuOH, 4-pirrolidinopiridina, H<sub>2</sub>, 10% Pd/C, 90 °C, 40h, 44%; k) CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H, *m*-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(OMe)<sub>2</sub>, 25 °C, 1h; l) (*S*)-*N,N*-dimetil-L-fenilalanina, DCC, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 25 °C, 14h, 63% (rendimento total 1,36%).

20 Joullié, M. M.; Jiang, J.; Heffner, R. J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 10181.

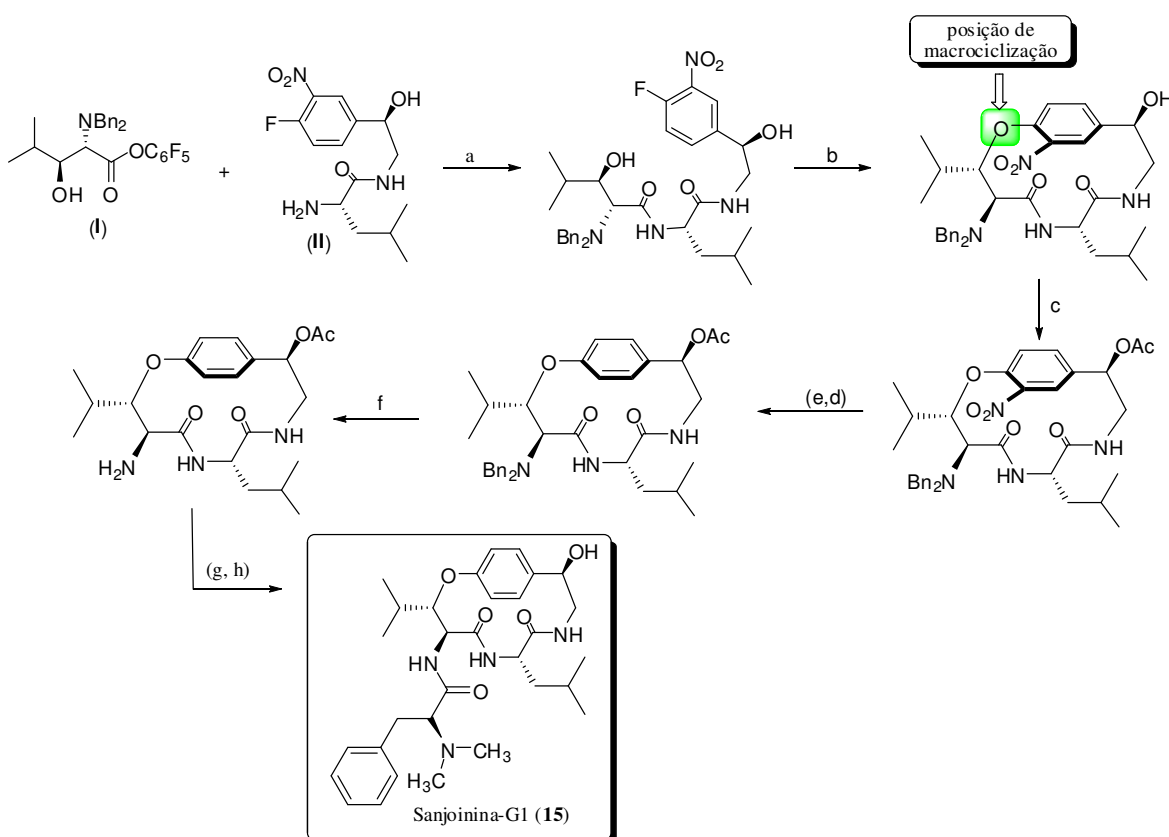
21 Han, B. H.; Kim, Y. C.; Park, M. K.; Park, J. H.; Go, H.J.; Yang, H. O.; Suh, D. Y.; Kang, Y. H.; *Heterocycles*, **1995**, 41, 1909.

Nesta mesma linha de fundamentos, as literaturas mais recentes fornecem uma variedade de novas metodologias, as quais têm sido planejadas com importantes mudanças sintéticas, principalmente inerentes as reações de macroclicização, de modo a possibilitar o surgimento de novos pontos de desconexões (etapa retrossintética envolvendo a quebra de uma ligação para gerar dois ou mais *synthons*) e novos *synthons* (unidade estrutural com a qual é possível construir uma nova molécula ou seu precursor). Dentre estes avanços sintéticos, por exemplo, pode-se incluir desde a macroclicização por meio de reações de ciclodesidratação (I), reações de substituições nucleofílicas aromáticas (S<sub>N</sub>AR) (II), reações de isomerização e ciclização através de metatase de ene/enamida (III), reações de amidação intra-moleculares mediadas por cobre (IV) e reações de amidação intra-moleculares oxidativas (V) como mostra (Esquema 6).



**Esquema 6:** Novas metodologias de ciclização para alcalóides ciclopeptídicos.

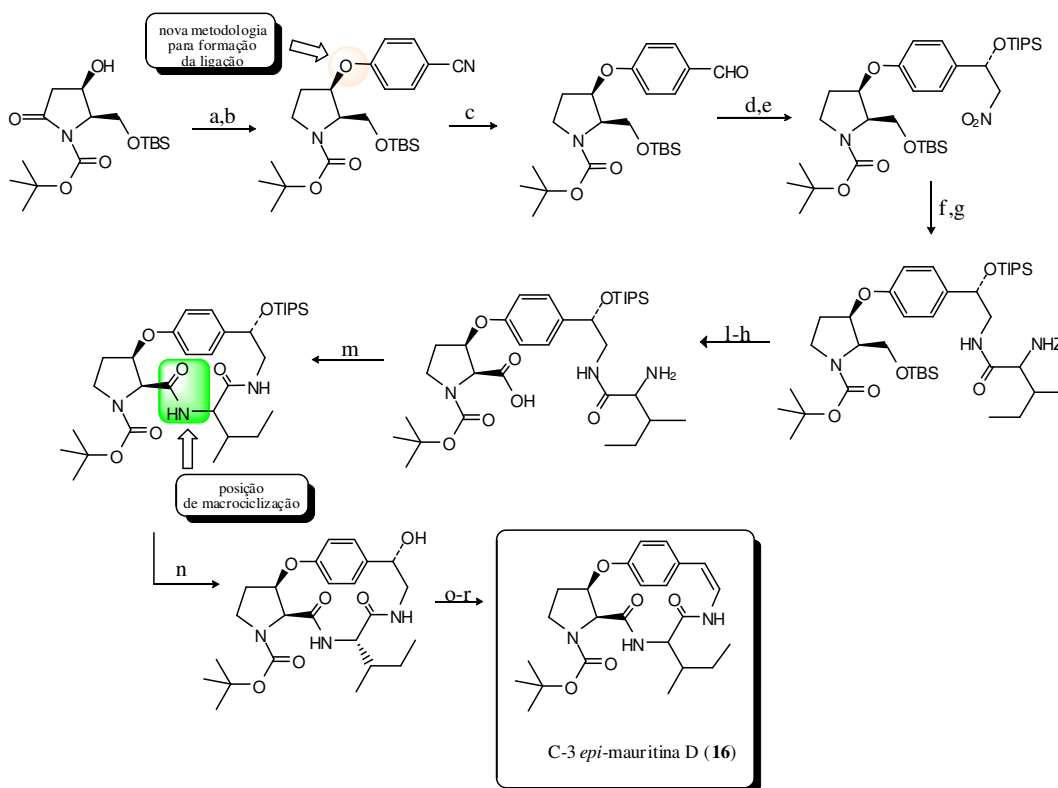
Em 2002, Zhu e col<sup>22</sup> desenvolveram uma nova metodologia para a ciclização destas moléculas via uma reação de ciclização intra-molecular por substituição nucleofílica aromática ( $S_NAr$ ), unindo duas importantes e difíceis etapas da síntese (formação da ligação etérea alquil-aryl e a macrociclização) em um único passo. Assim, partindo do éster ativo do  $\beta$ -OH-aminoácido (**I**) o qual foi acoplado ao derivado *orto*-NO<sub>2</sub>-fluorado (**II**) formando o dipeptídeo bloco básico para a construção do macrociclo, foi possível pelo uso do reagente fluoreto de tetrabutilamônio (TBAF) como base, obter a formação da ligação alquil-aryl éter gerando o macrociclo precursor da síntese total assimétrica do alcalóide sanjoinina G1 (**15**) (Esquema 7).



**Esquema 7:** Síntese total do alcalóide Sanjoinina-G1 (**15**), desenvolvida por Zhu e col. *Reagentes e condições:* a) DMF, 60 °C, 75%; b) TBAF, DMSO, 85 °C, 45%; c) Ac<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; d) SnCl<sub>2</sub>, DMF, 60 °C; e) NaNO<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>2</sub>, Cu<sub>2</sub>O, THF-H<sub>2</sub>O, 70%; f) Pd(OH)<sub>2</sub>, THF-<sup>t</sup>BuOH, quantitativo; g) L-N,N'-dimetil-fenilalanina, EDC, HOBt, 65%; h) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH-H<sub>2</sub>O, quantitativo. (rendimento total de 21%).



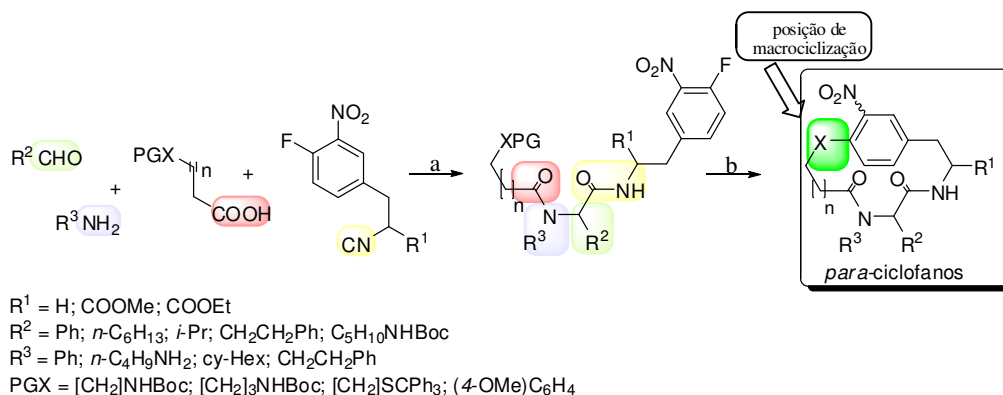
Em 2003, Han e col.<sup>23</sup> obtiveram uma enamida cíclica de 14-membros [C-3-*epi*-mauritina D (**16**)] pela macrolactamização de um intermediário linear através do reagente de acoplamento tetrametilfluorformamidin hexafluorfosfato (TFFH). Interessantemente, a preparação do intermediário linear deu-se por uma reação de substituição nucleofílica aromática ( $S_NAr$ ) entre um derivado da pirrolidina e a *p*-NO<sub>2</sub>-benzonitrila (Esquema 8).



**Esquema 8:** Síntese total do alcalóide [C3-*epi*-mauritina D (**16**)] desenvolvida por Han e col.

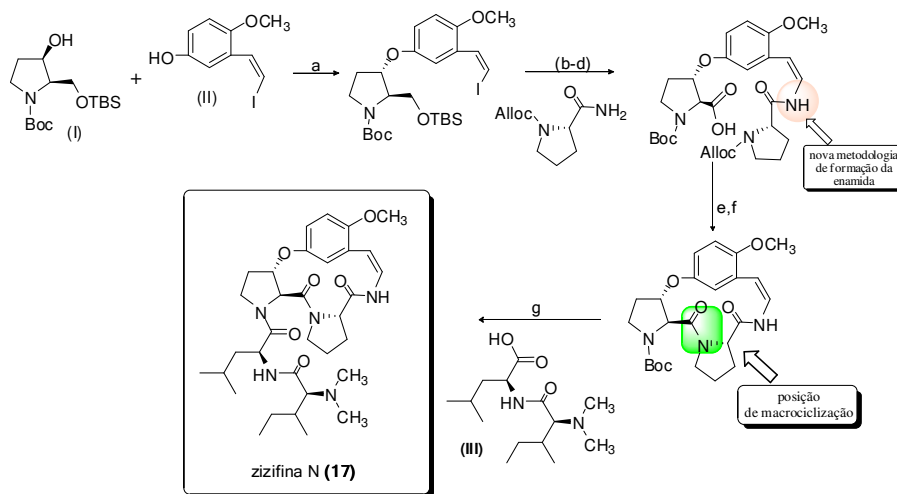
*Reagentes e condições:* a) BH<sub>3</sub>SMe<sub>2</sub>, THF, refluxo; b) 4-NO<sub>2</sub>-benzonitrila, NaH, DMF, -30°C; c) Ni Raney, NaH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>, piridina:AcOH:H<sub>2</sub>O (2:1:1), 40-45 °C; d) Na, CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>, MeOH, 0 °C, 30 min (com recuperação do material de partida); e) TIPSOTf, 2,6-lutidina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C; f) HCO<sub>2</sub>NH<sub>4</sub>, MeOH, 10% Pd/C, 40 °C; g) Z-Ile-OH, DCC, HOBT, NMM, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C - t.a.; h) AcOH:THF:H<sub>2</sub>O (3:1:1), 45-50°C; i) DMSO, TFAA, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C; j) KMnO<sub>4</sub> 1M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25M (pH 4,12), *t*-BuOH, t.a.; l) 10% Pd/C, MeOH, t.a, 1h; m) TFFH, HOAt, DIEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C; n) TBAF, THF, 0 °C - t.a.; o) MsCl, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -10 °C, 30min; p) disseleneto de difenila, NaBH<sub>4</sub> EtOH, 80 °C, 30 min; q) NaIO<sub>4</sub>, MeOH, 40 min; r) benzeno, 60 °C, 40 min, com rendimento total 1,4%

Em 2006, Zhu e col.<sup>24</sup> empregaram a metodologia Ugi-4CR combinada com a reação  $S_NAr$  intra-molecular para obter *p*-ciclofanos naturais e não naturais (Esquema 9).



**Esquema 9:** Síntese de ciclofanos desenvolvida por Zhu e col. *Reagentes e condições:* a) TFA em  $CH_2Cl_2$  (eventualmente); b)  $K_2CO_3$ , DMF, ta.

Em 2007, Ma e col.<sup>25</sup> relataram a síntese total do alcalóide de 13 membros zizifina N (**17**) através de uma rota sintética convergente (Esquema 10) com a construção da unidade alquil-aryl éter via uma reação do tipo Mitsunobu e a construção da unidade contendo a função enamida por uma reação de acoplamento catalisada por cobre {Cu(I)/*N,N*-dimetil glicina}, sendo a macrolactamização realizada com reagentes de acoplamento como FDDP e DPPA.

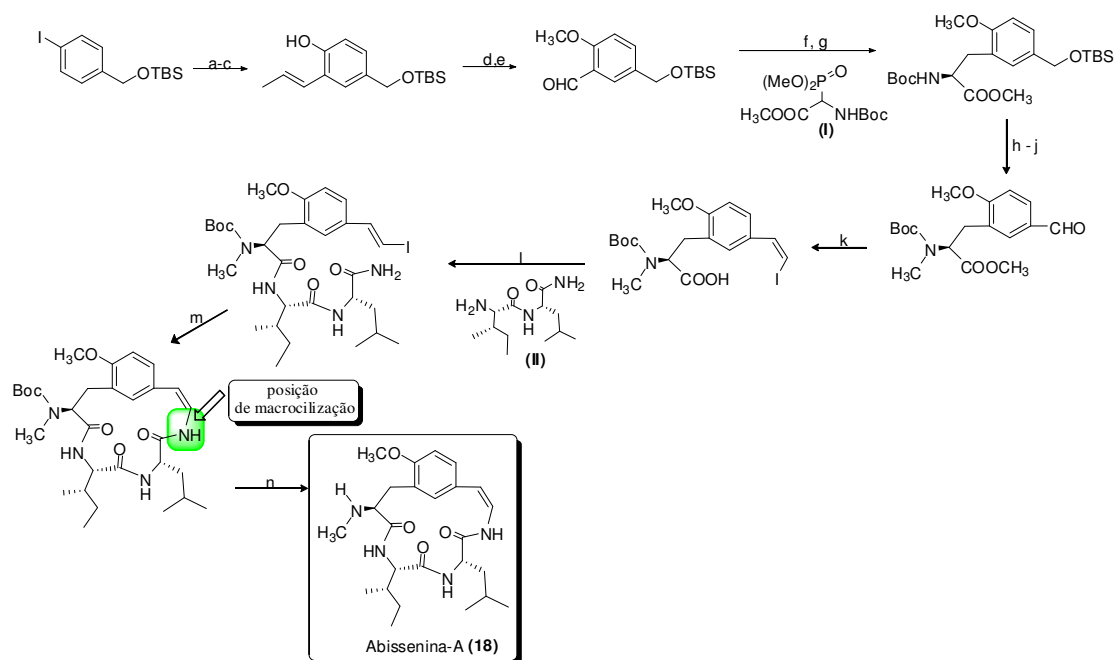


**Esquema 10:** Síntese de Ma e col. para o alcalóide zizifina-N (**17**); *Reagentes e condições:* a) DIAD,  $Ph_3P$ , THF, 80 °C, 54%; b) Cu(I),  $Me_2NCH_2CO_2H$ ,  $Cs_2CO_3$ , dioxano, 75%; c) TBAF, THF; oxidação de Dess–Martin, então  $NaClO_2/NaH_2PO_4$ ; d)  $(Ph_3P)_4Pd$ ,  $Et_2NH$ , 56%; e) FDPP,  $i-Pr_2NEt$ , DMF, 66%; f)  $ZnBr_2$ , então (III), HATU,  $K_2CO_3$ , DMF, 22% g)  $Et_2NH$ , HATU, *N,N*-dimetil-Isoleucina, 32% .

24 Cristau, P.; Vors, J.-P.; Zhu, J.; *QSAR Comb. Sci.*, **2006**, 25, 519.

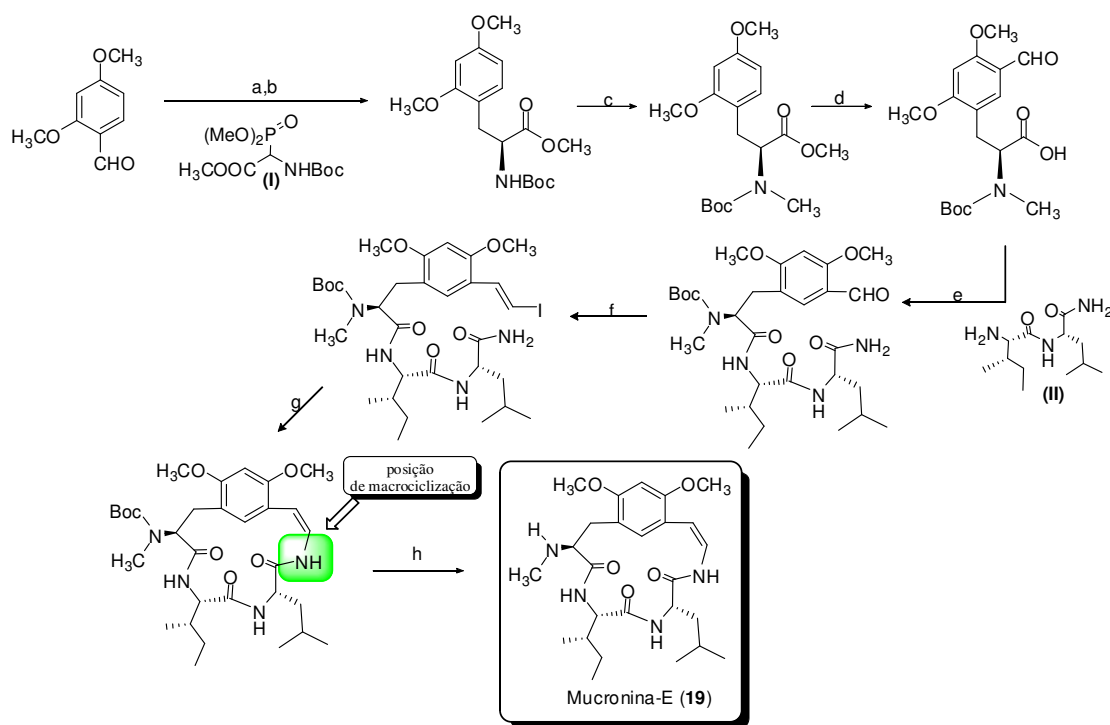
25 a) He, G.; Wang, J.; Ma, D.; *Org. Lett.*, **2007**, 7, 1367. b) Wang, J.; Schaeffler, L.; He, G.; Ma, D.; *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48, 6717.

A síntese de alcalóides ciclopeptídicos avançou notavelmente através de reações implementadas por Evano e col.<sup>26</sup> Durante a síntese total dos alcalóides abissenina A (**18**) (Esquema 11) e paliurina F, o grupo de pesquisa incluiu um original e eficiente acoplamento de Ullmann catalisado por cobre (I), e em sequência, um rearranjo de Claisen. Estas reações são seguidas por ambas as funcionalizações: *ipso* e *orto* de um iodeto aromático. A síntese foi realizada em 15 etapas com o excelente rendimento total (35%).



**Esquema 11:** Síntese realizada por Evano e col. para o alcalóide abissenina A (**18**). *Reagentes e condições:* (a) álcool alílico, Cu(I), 1,10-fenantrolina, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, tolueno, 110 °C; (b) 240 °C, 93% (para as duas etapas); c) RuClH(CO)(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, tolueno, 80 °C, 93%; d) Me<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, acetona, refluxo, 98%; e) OsO<sub>4</sub>, NaIO<sub>4</sub>, CCl<sub>4</sub>, t-BuOH/H<sub>2</sub>O, t.a., 88% (para as duas etapas); f) (I), então *N,N,N,N*-tetrametil-guanidina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a., 96%; g) [Rh(COD) {(S,S)-Et-DuPHOS}]<sup>+</sup>TfO<sup>-</sup>, H<sub>2</sub> (5 atm.), MeOH, 25 °C, 89%, 98% ee; h) NaH, MeI, DMF, t.a., 97%; i) TBAF, THF, t.a., quantitativo; j) Dess–Martin periodinana, 2,6-lutidina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C, 92%; k) PPh<sub>3</sub><sup>+</sup>(CH<sub>2</sub>I)I<sup>-</sup>, NaHMDS, HMPA, THF, -78 °C a t.a., 91%; l) LiOH, MeOH/THF, H<sub>2</sub>O, t.a., 97%; m) Bop, DIPEA, DMF, 0 °C, então (II) 0 °C a t.a., 92%; n) TMSOTf, 2,6-lutidina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -20 a 0 °C, 95%.

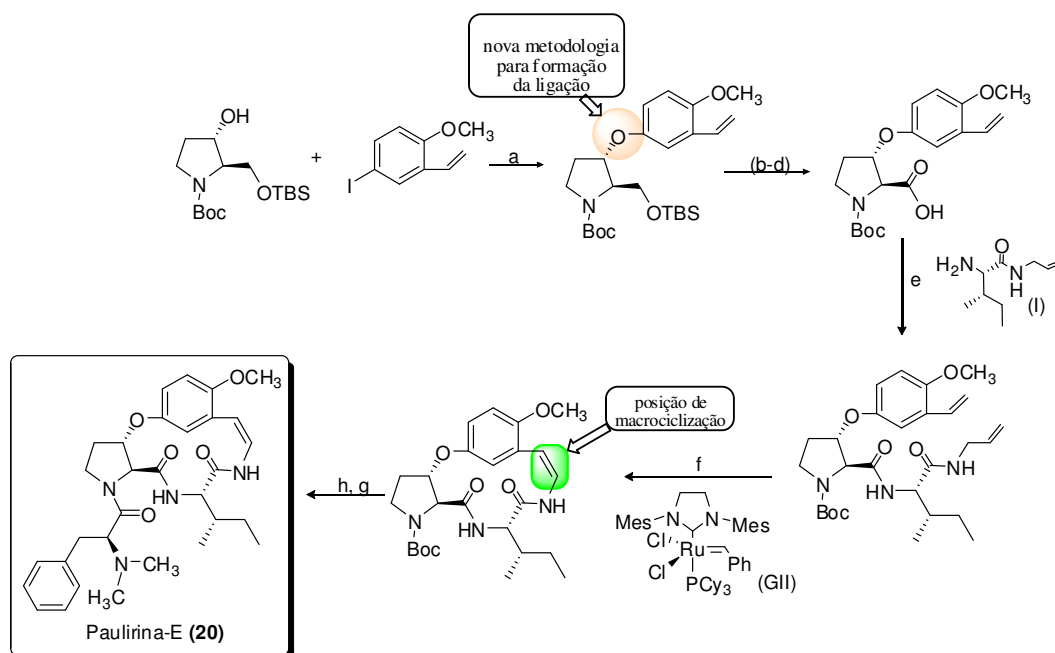
Em 2008 o mesmo grupo relatou a síntese total dos alcalóides mucronina E (**19**) (Esquema 12) e paliurina E (**20**)<sup>27</sup> (Esquema 13). A síntese de **19** foi realizada em quatorze etapas com um rendimento total de 10 %, a partir de um derivado aromático altamente substituído obtido por hidrogenação assimétrica do tipo formilação de Vilsmeier, com a etapa de macroclicização realizada na posição da ligação enamida pela metodologia de acoplamento catalisada por cobre.



**Esquema 12:** Síntese de Evano e col. para o alcalóide mucronina E (**19**). *Reagentes e Condições:*

(a) (I), então *N,N,N,N*-tetrametil-guanidina,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t.a., 89%; (b)  $\text{Rh}(\text{COD})\{(\text{S,S})\text{-Et-DuPHOS}\}^+\text{TfO}^-$ ,  $\text{H}_2$  (5 atm.), MeOH, 25 °C, 95%, rend 95% ee;(c) NaH, MeI, DMF, t.a., quantitativa; (d)  $\text{POCl}_3$ , DMF, 60 °C, então NaOH 3M, t.a., 68%; (e) Bop, DIPEA, DMF, 0 °C, então (II) 0 °C a t.a., 47%; (f)  $\text{PPh}_3^+(\text{CH}_2\text{I})\text{I}^-$ , NaHMDS, HMPA, THF, -78°C, 50% (g) Cu(I), *N,N*-dimetil etilenodiamina,  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , THF, 63 °C, 84%; (h) TMSOTf, 2,6-lutidina,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , -20 a 0 °C, 92%.

Já o alcalóide ciclopeptídico de 13 membros paliurina E (**20**) teve sua síntese realizada em oito etapas com rendimento de 11% (Esquema 13). De uma maneira interessante, Evano e col.<sup>28</sup> implementaram o uso de duas novas metodologias: na formação da ligação alquil-aril éter pelo emprego de uma reação tipo acoplamento de Ullmann mantendo a configuração de C-3, e na etapa de macroclicização, através da reação de metateses *ring-closing metathesis* (RCM), até então não utilizada na síntese destes alcalóides. Esta etapa foi realizada pela ciclização do intermediário linear via a isomerização eno-enamida de metateses através do reagente de Grubbs' de 2<sup>a</sup> geração (GII).



**Esquema 13:** Síntese de Evano para paliurina E (**20**). *Reagentes e condições:* (a) CuI (10%), 1,10-fenantrolina (20%), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, tolueno, 110 °C, 79%; (b) TBAF, THF, -20 °C a t.a, 89%; (c) DMSO, (COCl)<sub>2</sub>, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 a 0 °C; (d) NaClO<sub>2</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2-metilbut-2-eno, *t*-BuOH/THF/H<sub>2</sub>O, t.a, 86% (2 etapas); (e) (I) partindo-se (Boc-L-Ile-OH e etapas do cloroformiato de isobutila, NMM, DME, 0 °C, então alil amina, quantitativo; ZnBr<sub>2</sub> (4.5 equiv), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C a t.a, EDC, HOBt, NMM, DMF, 0 °C a t.a, 92%; (f) 1 eq. do reagente de Grubbs' de segunda geração (GII) (2 x 10%), 1,2-dicloroetano (0.005M), refluxo, 36% rendimento isolado; (g) TMSOTf, 2,6-lutidina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10 a 0 °C; (h) *N,N*-dimetil-L-fenilalanina, HATU, HOAt, DIPEA, DMF, 0 °C a t.a, 78% (duas etapas).

## 2.4. Atividades Biológicas de Alcalóides ciclopeptídicos:

Alcalóides ciclopeptídicos vêm sendo isolados de plantas usadas na medicina tradicional de várias regiões do mundo, por muitos anos. Por exemplo, algumas espécies de *Zizifus* que são fonte de aproximadamente 52 alcalóides ciclopeptídicos de 13 membros, 53 de 14 membros e 10 de 15 membros. Alguns destes alcalóides tem suas atividades biológicas comprovadas através de ensaios biológicos como agentes sedativos,<sup>29</sup> anti-microbiais,<sup>30</sup> hipoglicêmicos,<sup>31</sup> anti-plasmodial,<sup>7</sup> anti-infecciosos, anti-diabéticas, diuréticas,<sup>32</sup> analgésicas, anti-convulsivante,<sup>4</sup> anti-inflamatória<sup>33</sup> e anti-nociceptivos,<sup>34</sup> dentre estas pode-se destacar:

### 2.4.1. Atividade Antimicrobiana:

As atividades antimicrobianas dos alcalóides adouetina Y (**3**), scutianinas B (**21**), C (**22**), D (**23**), E (**24**), F (**25**) e M (**2**) e condalina A (**1**) foram avaliadas por meio do método de bioautografia direta<sup>35</sup> para uma série de cepas bacterianas, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, e *Micrococcus luteus* (gram-positivas), *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella setubal*, e *Escherichia coli* (gram-negativas), e dois fungos, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. Por meio destes experimentos, os alcalóides com maior espectro de ação foram condalina A (**1**) com atividade de 3,12 µg para *S. epidermidis* e *K. pneumoniae*, seguido pela scutianina E que possui atividade de 6,25 µg para *S. epidermidis*, *E. coli* e *M. luteus*, enquanto que o alcalóide scutianina D (**23**) (diastereoisômero do alcalóide scutianina E (**24**)), mostrou modesta atividade para as mesmas bactérias (50,0 µg e 25,0 µg, respectivamente). O alcalóide scutianina M (**2**), diastereoisômero de condalina A (**1**), foi inativo contra todos os microrganismos testados. O alcalóide scutianina B (**21**) foi ativo somente para *E. coli* (12,5 µg) e os alcalóides scutianina C (**22**), F (**25**), juntamente com ciclopeptídico neutro scutianeno D foram inativos contra todas as bactérias testadas.

29 Han, B. H.; Park, M. H.; *Arch. Pharm. Res.*, **1987**, 10, 208.

30 a) Shah, A. H.; Ageel, A. M.; Tariq, M.; Mossa, J. S.; Al-Yahya, M. A.; *Fitoterapia*, **1986**, 57, 452. b) Pandey, V. B.; Devi, S.; *Planta Med.*, **1990**, 56, 649.

31 a) Rahman, I.; Khan, M. A.; Arfan, M.; Akhtar, G.; Khan, L.; Ahmad, V. U.; *Nat. Prod. Res.*, **2007**, 21, 243. b) Erenmemisoglu, A.; Kelestimur, F.; Koker, A. H.; Ustun, H.; Tekol, Y.; Ustdal, M.; *J. Pharm. Pharmacol.*, **1995**, 47, 72.

32 Anand, K. K.; Chand, D.; Cahndan, B. K.; Gupta, V. N. J.; *J. Ethnopharmacol.*, **1989**, 27, 121.

33 Adzu, B.; Haruna, A. K.; *J. Afr. Biotechnol.*, **2007**, 6, 1317.

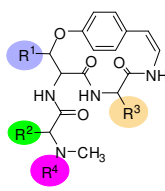
34 Trevisan, G.; Maldaner, G.; Velloso, N. A.; Sant'Anna, G. S.; Ilha, V.; Gewher, C. C. V.; Rubin, M. A.; Morel, A. F.; Ferreira, J.; *J. Nat. Prod.*, **2009**, 72, 608.

35 a) Morel, A. F.; Araújo, C. A.; Silva, U. F.; Hoelzel, S. C. S. M.; Záchia, R.; Bastos, N. R.; *Phytochemistry*, **2002**, 61, 561. b) Morel, A. F.; Maldaner, G.; Ilha, V.; Missau, F.; Silva, U. F.; Dalcol, I. I.; *Phytochemistry*, **2005**, 66, 2571.

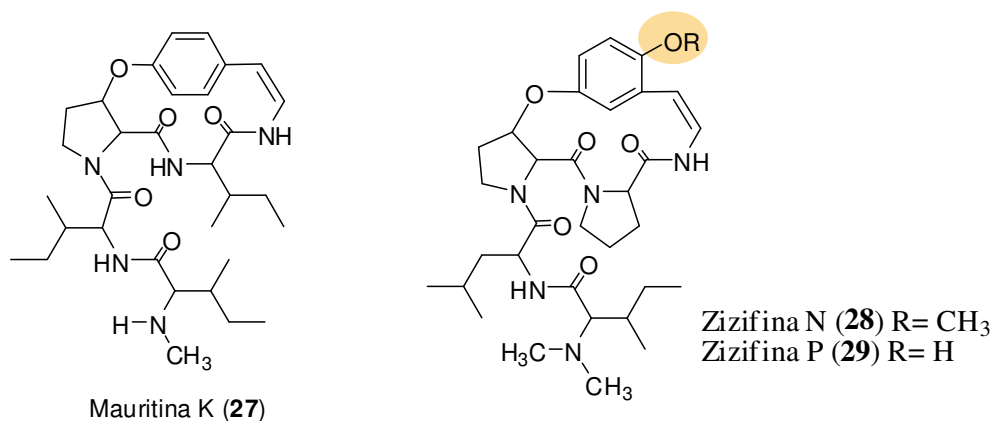
Estes resultados sugerem que a estereoquímica e a presença do resíduo de  $\beta$ -fenilserina na estrutura do alcalóide tem uma influência significativa na atividade destes alcalóides. Mais tarde, a importância da unidade *N,N*-dimetil ou *N*-metil na estrutura foi demonstrada por uma série de atividades testadas para o ciclopeptídeo neutro scutianeno D, quando comparado ao alcalóide scutianina D (**23**). Nenhum dos alcalóides testados mostrou atividade antifúngica contra *S. cerevisiae* e *C. albicans*, contudo em outro trabalho Emile e col.<sup>6</sup> demonstraram que o alcalóide frangulanina (**26**) isolado de *Melochia odorata*, exibiu moderada atividade contra os fungos *C. albicans* (25  $\mu$ g), *C. neoformans* (50  $\mu$ g) e *S. cerevisiae* (50  $\mu$ g) pelo mesmo método.

As estruturas de todos esses alcalóides ciclopeptídicos de 14 membros citados, como testados para suas atividades antimicrobianas, podem ser melhor visualizados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Alcalóides ciclopeptídicos de 14 membros com atividades antimicrobianas

					Alcalóides
	$R^1 \rightarrow \text{CH}_3$	$\text{CH} \rightarrow R^2 \text{C}_6\text{H}_5$	$\text{CH}(\text{CH}_3) \rightarrow R^3 \text{C}_2\text{H}_5$	$R^4 \rightarrow \text{H}$	Condalina A ( <b>1</b> )
	$\text{C}_6\text{H}_5$	$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$	H	Scutianina M ( <b>2</b> )
	$\text{C}_6\text{H}_5$	$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$	$\text{CH}_3$	Adouetina Y ( <b>3</b> )
	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	$\text{CH}_3$	Scutianina B ( <b>21</b> )
	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$	$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	$\text{CH}_3$	Scutianina C ( <b>22</b> )
	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	$\text{CH}(\text{OH})\text{C}_6\text{H}_5$	$\text{CH}_3$	Scutianina D ( <b>23</b> )
	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	$\text{CH}(\text{OH})\text{C}_6\text{H}_5$	$\text{CH}_3$	Scutianina E ( <b>24</b> )
	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	[Prolina]- $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	H	Scutianina F ( <b>25</b> )
	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$	$\text{CHCH}_2(\text{CH}_3)_2$	$\text{CH}_3$	Frangulanina ( <b>26</b> )

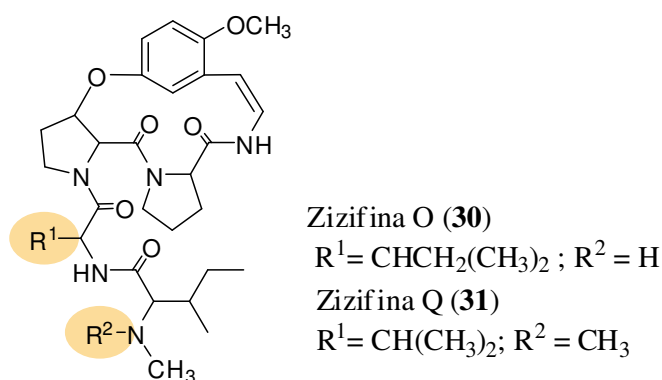
Em 2007, Pandey e col.<sup>36</sup> descreveram que o alcalóide ciclopeptídico mauritina K (**27**) isolado de *zizifus mauritiana*, exibiu uma significativa atividade contra o fungo *Botrytis cinérea*, já os alcalóides zizifina N (**28**) e zizifina P (**29**) (Figura 5), isolados de *zizifus oenoplia var. brunoniana*, exibiram moderada atividade inibitória para o *Mycobacterium tuberculosis* apresentando um valor de CIM de 200  $\mu$ g/mL.<sup>7</sup>



**Figura 5:** Alcalóides ciclopeptídicos com atividades antifúngicas.

#### 2.4.2. Atividade Antiplasmodica

Em 2005, Suksamrarn e col.<sup>7</sup> em um estudo com os extratos das raízes de *zizifus oenoplia var. brunoniana*, demonstraram que estes apresentavam significativa atividade antiplasmodica contra o parasita *Plasmodium falciparum*. A partir destes extratos, o mesmo grupo isolou os alcalóides de 13 membros zizifina N (**28**), O (**30**), P (**29**), Q (**31**), os quais foram também testados frente ao parasita, mas apenas os alcalóides zizifina N (**28**) e zizifina Q (**31**) (Figura 6) tiveram valores significativos de IC<sub>50</sub> 3,92 e 3,50 µg/mL, respectivamente.



**Figura 6:** Alcalóides ciclopeptídicos com atividades antifúngicas.

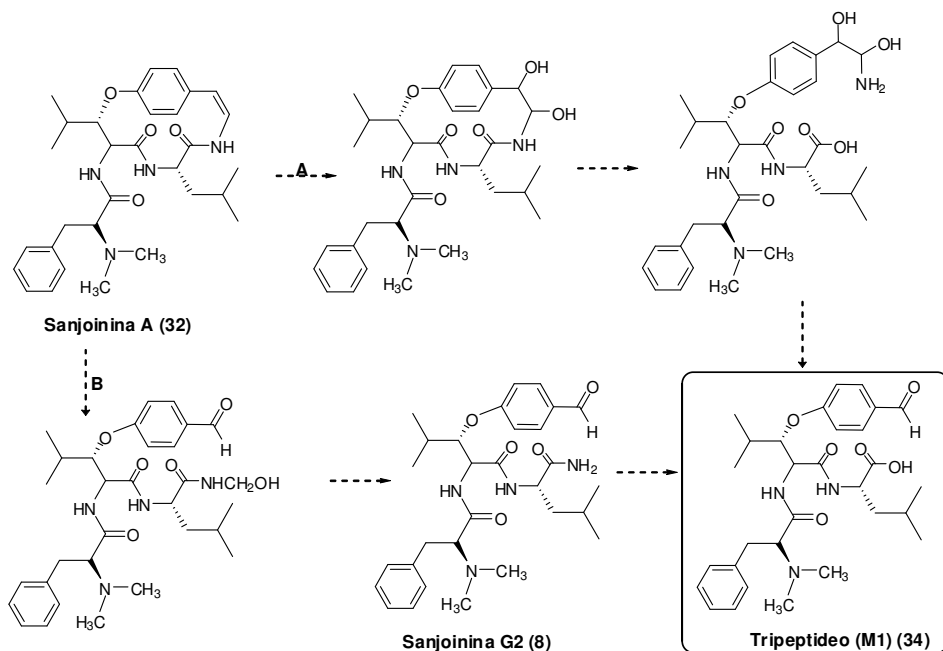


### 2.4.3. Atividade Sedativa

Os alcalóides ciclopeptídicos conhecidos como sanjoininas, isolados a partir de várias espécies de *Zizyphus*, são muito investigados por suas propriedades sedativas.<sup>37</sup> Sendo o alcalóide sanjoinina A (**32**) isolado da *Zizyphus jujuba* o composto com maior atividade sedativa (dose de 3 mg/Kg) podendo ser considerado o componente mais efetivo para esta atividade na planta.

Em outro estudo, sanjoinina A (**32**) e a sanjoinina G2 (**8**), foram efetivos inibidores de calmodulin induzindo a ativação dos canais de Ca<sup>2+</sup>ATPase, enquanto que a sanjoinina D (**33**) demonstra atividade como um inibidor dos canais de Ca<sup>2+</sup>ATPase pela ativação da fosfodiesterase.<sup>5</sup> Estas atividades das sanjoininas como inibidores dos canais de Ca<sup>2+</sup>ATPase vem confirmar o uso popular das plantas da espécie *Zizyphus* como sedativas na medicina tradicional chinesa.

Em 1997, Suh e col.<sup>38</sup> relataram que o alcalóide sanjoinina A (**32**) quando administrado em roedores foi convertido por enzimas gástricas para o tripeptídeo M1 {(S)-(N,N-dimetilfenilalanil)-(2S,3S)-3-[(4-formilfenoxi) leucil]-(S)-leucina} (**34**), assim como para o alcalóide linear sanjoinina G2 (**8**), em condições ácidas (HCl 2M, 55 °C, 10h) (Esquema 14).



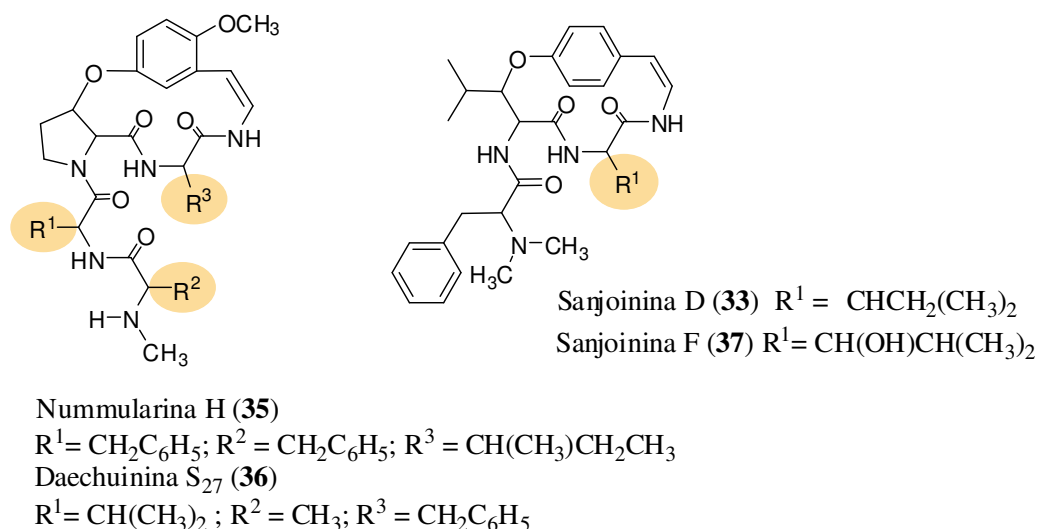
**Esquema 14:** Metabolismo do alcalóide Sanjoinina A (**32**) sugerido por Han e col., por duas vias (A) por enzimas do estômago de roedores e (B) em pH ácido (HCl 2M, 55 °C, 10h).

37 Han, B. H.; Park, M. H.; Park, J. H.; *Pure & Appl. Chem.*, **1989**, 61, 443.

38 Suh, D.-Y.; Kim, Y. C.; Han, B. H.; Kang, Y.-H.; *J. Nat. Prod.*, **1997**, 60, 265.

Com base nestes experimentos, os autores<sup>38</sup> sugerem que o alcalóide uma vez administrado, pode ser rapidamente absorvido e metabolizado sendo convertido no tripeptídeo M1 (**34**), que parece ser estável às enzimas proteolíticas e possivelmente represente o grupo farmacofórico desta molécula, podendo ser até mais ativo que o próprio alcalóide. Já o alcalóide nummularina H (**35**) isolado de *Paliurus ramosissimus*, tem o efeito contrário em camundongos, onde o sono foi induzido por metohexital.<sup>39</sup>

Em 2005, o mesmo grupo de Han e col.<sup>40</sup> investigou também o efeito sedativo dos alcalóides ciclopeptídicos e alcalóides lineares isolados de algumas espécies de *zizyphus* frente à enzima calmodulin-dependente da proteína Kinase II. Os alcalóides mais ativos (Figura 7) foram a Daechuinina S<sub>27</sub> (**36**) que apresentou uma IC<sub>50</sub> 2,95 µM, Sanjoinina F (**37**) com IC<sub>50</sub> 18,2 µM, e a Sanjoinina G2 (**8**) IC<sub>50</sub> 19,0 µM.



**Figura 7:** Alcalóides ciclopeptídicos com atividades frente à enzima calmodulin-dependente da proteína Kinase II.

Em 2007, Ma e col.<sup>41</sup> relataram que o alcalóide Sanjoinina A (**32**) isolado de sementes *Zizyphus jujube Mill. var. spinosa* prolonga o tempo e reduz a latência do sono induzido por fenobarbital de uma maneira dose dependente agindo nos receptores do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA<sub>A</sub>). Mais tarde o mesmo grupo<sup>4</sup> verificou que as frações que contém alcalóides ciclopeptídicos dos extratos das sementes dessa mesma planta, possuíam um efeito hipnótico em camundongos tratados com pentobarbital.

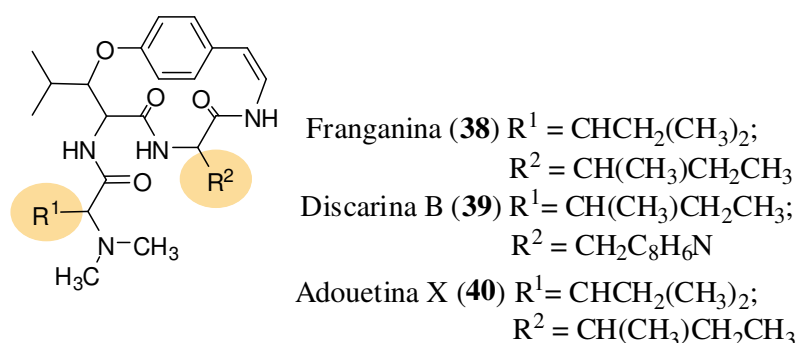
39 Lee, S.-S.; Su, W.-C.; Liu, K. C. S. C.; *Phytochemistry*, **2001**, 58, 1271.

40 Han, Y. N., Hwang, K. H., Han, B. H., *Arch. of Pharmac. Res.*, **2005**, 28, 159.

41 Ma, Y.; Han, H.; Eun, J. S.; Kim, H.C.; Hong, J.-T.; Oh, K.-W.; *Biol. Pharm. Bull.*, **2007**, 30, 1748.

#### 2.4.4. Atividade Antinociceptiva

Em 2009, Ferreira e col.<sup>34</sup> investigaram as atividades antinociceptivas de seis alcalóides ciclopeptídicos de 14 membros: franganina (**38**), discarina B (**39**), scutianina B (**21**), C (**22**), D (**23**) e adouetina X (**40**) (Figura 8). Através deste estudo foi possível construir um modelo do efeito antinociceptivo em camundongos para estes alcalóides sem efeitos indesejáveis, sendo demonstrado ainda que o alcalóide adouetina X (**40**) é um promissor agente analgésico capaz de produzir analgesia em camundongos com neuropatia crônica, e com decaimento das atividades de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase *in vitro*.



**Figura 8:** Alcalóides ciclopeptídicos com atividades analgésicas.

#### 2.5. Atividades Biológicas de Pequenos Peptídeos

Uma grande variedade de pequenos peptídeos vem cada vez mais sendo isolada e sintetizada como (potenciais ou já bem definidos) agentes analgésicos,<sup>42</sup> antibióticos,<sup>43</sup> anti-inflamatórios,<sup>44</sup> citotóxicos,<sup>45</sup> antivirais,<sup>46</sup> inibidores enzimáticos<sup>47</sup> e agentes antimicrobiais.<sup>48</sup>

Em 2009, Marastoni e col.<sup>49</sup> relatam a síntese de uma série de tripeptídeos com a sequência de aminoácidos (Leu-Leu-Leu e Val-Ser-Leu) protetores de proteossomas, cuja

42 Giordano, C.; Sansone, A.; Masi, A.; Lucente, G.; Punzi, P.; Mollica, A.; Pinnen, F.; Feliciane, F.; Cacciatore, I.; Davis, P.; Lai, J.; Ma, S.-H.; Porreca, F.; Hruby, V.; *Eur. Journ. Med. Chem.*, **2010**, 45, 4594.

43 Ajesh, K.; Sreejith, K.; *Peptides*, **2009**, 30, 999.

44 Yen, C.-T.; Hwang, T.-L.; Wu, Y.-C.; Hsieh, P.-W.; *Eur. Journ. Med. Chem.*, **2009**, 44, 1933.

45 Yen, C.-T.; Wu, Y.-C.; Wu, C.-C.; Lee, J.-C.; Shen, S.-L.; Morris-Natschke, S. L.; Hsieh, P.-W.; *Eur. Journ. Med. Chem.*, **2010**, 45, 2494.

46 Xu, B.; Huang, Z.; Liu, C.; Cai, Z.; Pan, W.; Cao, P.; Hao, X.; Liang, G.; *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 3118.

47 a) Choe, Y.; Brinen, L. S.; Price, M. M.; Engel, J. C.; Lange, M.; Grisostomi, C.; Weston, S. G.; Pallai, P. V.; Cheng, H.; Hardy, L. W.; Hartsough, D. S.; McMakin, M.; Tilton, R. F.; Baldino, C. M.; Craick, C. S.; *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, 13, 2141. b) Roemer, D.; Buescher, H. H.; Hill, R. C.; Pless, J.; Bauer, W.; Cardinaux, F.; Closse, A.; Hauser, D.; Huguenin, R.; *Nature*, **1977**, 268, 547.

48 Hong, S. Y.; Park, T. G.; Lee, K.-H.; *Peptides*, **2001**, 22, 1669.

49 Baldisserotto, A.; Destro, F.; Vertuani, G.; Marastoni, M.; Gavioli, R.; Tomatis, R.; *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 5535.

integridade funcional é fundamental para uma variedade de funções celulares, como adaptação metabólica, diferenciação celular, controle de ciclos celulares, degradação anormal das proteínas entre outras. Estes peptídeos podem agir em uma variedade de doenças como as neurodegenerativas, auto-imunes, desordens metabólicas e câncer, representando uma nova frente para a cura destas doenças.

Embora o estudo em peptídeos antimicrobianos seja relativamente recente, início dos anos 80 quando Boman e col.<sup>50</sup> descreveram que os peptídeos cecropins isolados a partir de *Hyalophora cecropia*, possuíam um amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, desde então milhares de exemplos vem sendo conhecidos e obtidos das mais diversas fontes seja por isolamento (plantas, animais, microorganismos) ou preparados sinteticamente e suas atividades investigadas e comprovadas.<sup>51</sup>

Estes peptídeos antimicrobianos são constituídos por uma cadeia normalmente composta por 15 a 20 resíduos de aminoácidos, na qual a sequência peptídica difere pela composição dos aminoácidos e podem apresentar propriedades físico-químicas comuns.<sup>52</sup> Dentre estes peptídeos antimicrobianos, o grupo dos peptídeos antimicrobianos catiônicos (PACs) têm recebido especial atenção, sendo conhecido atualmente cerca de mais de 700 exemplos de PACs, provenientes de vários organismos vivos como insetos, anfíbios e mamíferos com suas propriedades estruturais bem investigadas. Pode-se chegar a algumas características estruturais comuns, como alta densidade de carga positiva a pH fisiológico e uma estrutura anfipática em forma de hélice ou de folhas pregueadas ( $\beta$ -sheet) em associação com lipídeos biliares de microrganismos.

Embora o mecanismo de ação detalhado dos PACs não esteja completamente entendido, supõe-se que, diferente dos antibióticos clássicos, os quais se baseiam na inibição de enzimas, tornando-os relativamente lentos,<sup>53</sup> peptídeos antimicrobianos interagem com a superfície da célula bacteriana causando perturbações na estrutura da bicamada lipídica, levando a lise celular.<sup>54</sup> No entanto, vários modelos indicam que o mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos ocorre pela combinação de efeitos hidrofóbicos e eletrostáticos.<sup>55</sup> Estes peptídeos carregados positivamente são atraídos pela superfície aniônica das membranas

50 Steiner, H.; Hultmark, D.; Engstrom, A.; Bennich, H.; Boman, H. G.; *Nature*, **1981**, 292, 246.

51 a) Wang, G.; Li, X.; Wang, Z.; *Nucleic Acids Research*, **2008**, 37, 933. b) Hancock, R. E. W.; Scott, M. G.; *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2000**, 97, 8856. c) Garcia-Olmedo, F.; Molina, A.; Alamillo, J. M.; Rodriguez-Palenzuela, P.; *Biopolymers*, **1998**, 47, 479. d) Zasloff, M.; *Nature*, **2002**, 415, 395. e) Boman, H. G.; *J. Intern. Med.*, **2003**, 254, 197.

52 Brogden, K. A.; *Nat. Rev. Microbiol.*, **2005**, 3, 238.

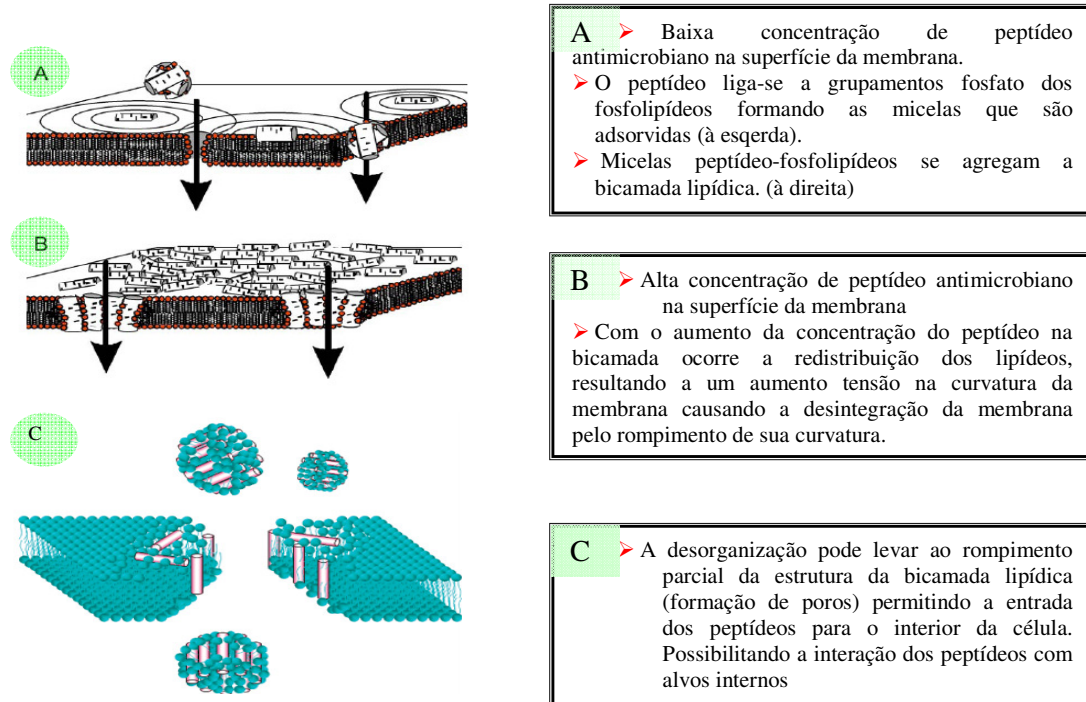
53 Lohner, K; Prenner, E. J.; *Biochim. Biophys. Acta, BBA, Biomembr.*, **1999**, 1462, 141.

54 Zasloff, M.; *N. Engl. J. Med.*, **2002**, 347, 1199.

55 Sanderson, J. M.; *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, 3, 201.

bacterianas, onde podem sofrer alterações conformacionais. Entretanto, o mecanismo pelo qual os peptídeos permeabilizam a membrana bacteriana e como exercem sua atividade antimicrobiana ainda não são completamente definidos, e vários mecanismos têm sido propostos para descrever este processo.

Um destes mecanismos, que se mostra de uma maneira geral, pois abrange um grande número destas moléculas é o denominado de mecanismo de detergente (*detergent-like*)<sup>56</sup> onde mesmo em concentrações baixas estes peptídeos podem desestabilizar a membrana, sendo o seu potencial de agregação o fator predominante para que isso ocorra, assim estes devem ser analisados de acordo com as características que influenciam diretamente neste potencial, como carga e caráter hidrofóbico (Figura 9).



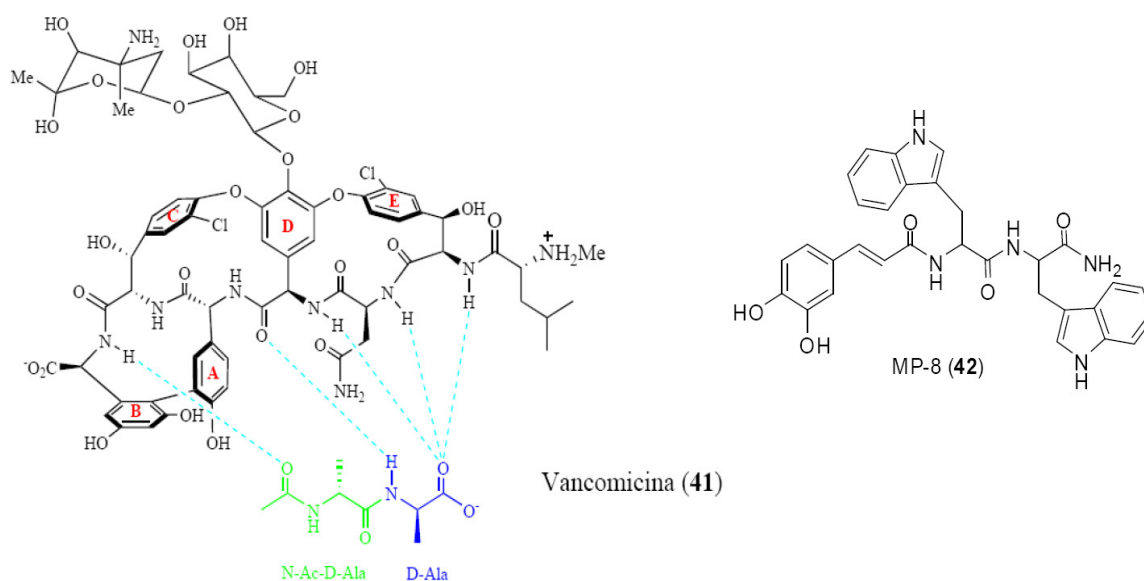
**Figura 9:** Representação esquemática do mecanismo de ação do tipo de detergente (*detergent-like*) a parede celular de microrganismos por um peptídeo antimicrobiano catiônico. Figura retirada e modificada de Bechinger e col. (2006)<sup>56</sup> e Wimley (2010).<sup>57</sup>

56 Bechinger, B.; Lohner, K.; *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, **2006**, 1758, 1529.

57 Wimley, W. C.; *Chem. Biol.*, **2010**, 5, 905.

Os PACs têm recebido especial atenção como agentes antimicrobianos por possuírem propriedades diferentes dos antibióticos tradicionais, como a sua baixa toxicidade celular, rápida ação, alta atividade bactericida e amplo espectro antimicrobial.

Estes peptídeos, em sua grande maioria, são representados por ciclopeptídeos como o antibiótico vancomicina (**41**)<sup>58</sup> ou peptídeos lineares com longas seqüências de aminoácidos como o decapeptídeo KSL<sup>48</sup> e seus derivados, aos quais é designada atividade inibitória contra o fungo *Candida albicans* de até 1,56 µg/mL, ou ainda as amidas dipeptídicas<sup>59</sup> como exemplo o MP-8 (Acido *cumarico*-Trp-Trp-NH<sub>2</sub>) (**42**) (Figura 10) que, surpreendentemente, mostra alta atividade contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *B. subtilis*), embora não apresente efeito contra bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*) sendo ainda de baixas citotoxicidades, onde 1000 µg/mL destes peptídeos realizam a lise de unicamente 0-2% de eritrócitos de mamíferos, os quais comparados a tetraciclina, estes peptídeos modificados são menos tóxicos a eritrócitos humanos.



**Figura 10:** Exemplos de conhecidos peptídeos com atividades antimicrobianas.

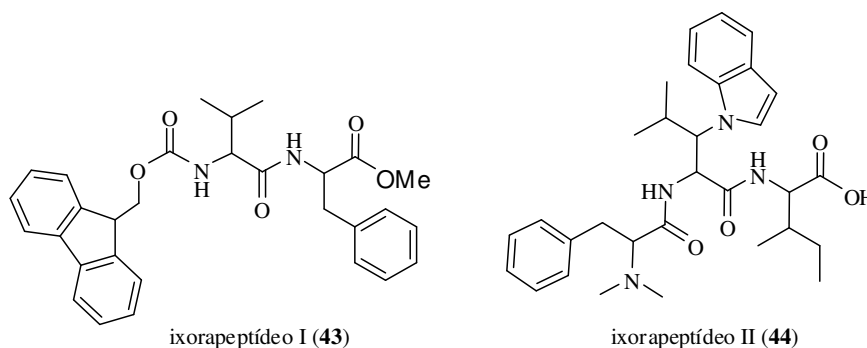
Interessantemente Wu e col.,<sup>60</sup> em 2010, relataram o isolamento e a identificação de dois novos peptídeos (ixorapeptídeo I **43** e ixorapeptídeo II **44**) (Figura 11) a partir de *Ixora*

58 Rao, A. V. R.; Reddy, K. L.; Rao, A. S.; Chakraborty, T. K.; *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 5043

59 Bisht, G. S.; Rawat, D. S.; Kumar, A.; Kumar, R.; Pasha, S.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 4343.

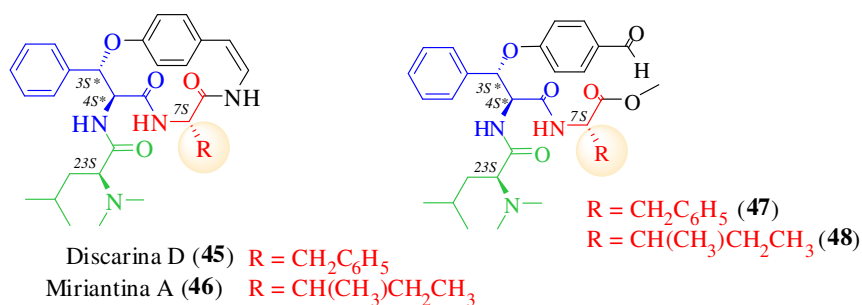
60 Lee, C.-L.; Liao, Y.-C.; Hwang, T.-L.; Wu, C.-C.; Chang, F.-R.; Wu, Y.-C.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*; **2010**, 20, 7354.

*coccínea* Linn., uma planta da família das rubiaceae, para os quais foi descrita seletiva potência contra células cancerígenas Hep3B com valor de IC<sub>50</sub> de 3,36 µg/mL.



**Figura 11:** Peptídeos isolados de *Ixora coccínea* Linn. com atividades antitumorais.

Dentre os fragmentos peptídicos destacam-se os precursores dos alcalóides, Discarina D (45) e Miriantina A (46), cujos respectivos tripeptídeos sintéticos<sup>61</sup> de sequência [(Me)<sub>2</sub>N–L-Leu–L-*eritro*-PheSer(OPhCHO)–L-Ile–OMe (47) e (Me)<sub>2</sub>N–L-Leu–L-*eritro*-PheSer(OPhCHO)–L-Phe–OMe (48)] (Figura 12), possuem atividade na quantidade de 12,5 µg para bactérias como a *S.epidermidis*, sendo mais ativos que os próprios alcalóides.



**Figura 12:** Fragmentos peptídicos precursores de alcalóides ciclopeptídicos com atividades antibacterianas.

---

---

*Capítulo III*

---



### **Capítulo III: Apresentação e Discussão dos Resultados:**

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante a realização do trabalho, desde a definição da metodologia adotada até a preparação dos precursores, seguindo uma estratégia sintética baseada nas desconexões demonstradas anteriormente (Esquema 15, pág. 30), onde após a clivagem das ligações alquil-aril éter e enamida, chega-se ao bloco tripeptídico alvo deste estudo, que por sua vez por meio das clivagens nas ligações amídicas, leva aos aminoácidos participantes da estrutura.

Assim, pode-se elaborar uma sequência de reações (item 3.1 deste capítulo) (Esquema 15) que engloba: i) a obtenção dos  $\beta$ -OH-aminoácido D,L-*treo* e D,L-*eritro* fenilserina, ii) a proteção dos grupamentos não participantes nas reações de acoplamento de cada aminoácido, de maneira que apenas um centro eletrofílico e um nucleofílico estejam livres no meio reacional. Isto se faz necessário para que se tenha a união em uma sequência definida sem sub-produtos de acoplamento.

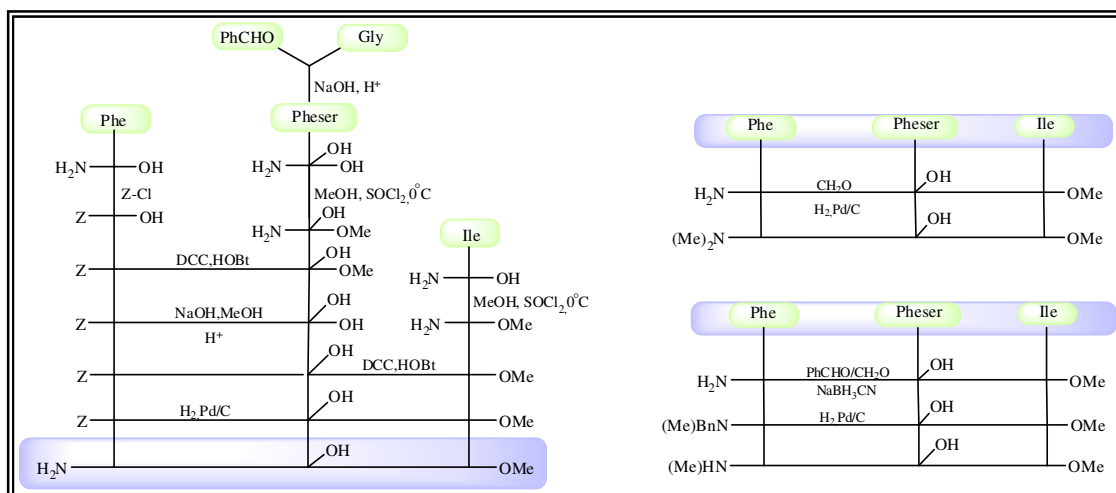
Na sequência, também será discutido a aplicação destes precursores em reações de acoplamento para formação dos peptídeos e as subsequentes reações de desproteção e *N*-alquilação do aminoácido terminal L-fenilalanina para construção da unidade básica terminal. Ainda em contribuição a estes tópicos serão discutidos os dados obtidos durante o estudo de algumas das reações de formação da ligação alquil-aril éter realizadas com  $\beta$ -OH-aminoácido ( $\beta$ -fenilserina) e com alguns dos peptídeos que contém esta unidade.

Como complementação nas discussões destes, serão apresentados os dados referentes às análises de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas, difração de raios-X, cromatografias líquida e gasosa utilizados durante o processo de caracterização dos compostos.

Em um tópico a parte, serão apresentados os resultados obtidos durante a avaliação das atividades biológicas dos compostos sintetizados e alguns metabólitos naturais com seus derivados frente a microrganismos patogênicos, fornecendo relevantes informações para a realização do estudo da relação estrutura atividade (REA), bem como os resultados do estudo de sua ação em alguns fatores envolvidas com doenças degenerativas do sistema nervoso central, através da avaliação de sua ação inibitória frente às enzimas (AChE, POP) e da avaliação da capacidade de capturar radicais livres na atividade anti-oxidantes.

### 3.1. Estratégias Sintéticas Adotadas:

Como demonstrado no Esquema 15, a seguinte estratégia sintética foi utilizada para a construção das moléculas alvo deste estudo e assim, resumidamente, pode-se elaborar uma proposta de trabalho que segue às etapas:



**Esquema 15:** Estratégia sintética utilizada para síntese peptídica.

a) Preparação do aminoácido básico terminal L-fenilalanina com a função amino *N*-Protegida.

b) Obtenção do  $\beta$ -OH-aminoácido nas duas formas diastereoisoméricas separadas *D,L-treo* e *D,L-eritro*- $\beta$ -fenilserina e subsequente proteção de suas carboxilas pela formação dos respectivos ésteres metílicos.

c) Acoplamento destas unidades de aminoácidos sem provocar a racemização do aminoácido fenilalanina durante a formação dos dipeptídeos.

d) Liberação da carboxila terminal dos dipeptídeos por uma reação de hidrólise básica.

e) Acoplamento dos ácidos carboxílicos destes dipeptídeos com a função amino do éster metílico do aminoácido terminal L-Isoleucina, para formação dos respectivos tripeptídeos.

f) Desproteção da função amino do aminoácido terminal L-fenilalanina na cadeia tripeptídica, que posteriormente será *N*-mono metilado ou *N,N*-dimetilado.

Para um melhor esclarecimento da escolha deste procedimento de síntese em solução e da sequência seguida nos acoplamentos, cabe mencionar que a síntese em solução condiz com as disposições viáveis e necessárias para a obtenção das moléculas alvo, por se tratar de uma metodologia eficiente para a obtenção de pequenos peptídeos, sendo possível o seu escalonamento em quantidades e grau de pureza necessária para as análises biológicas

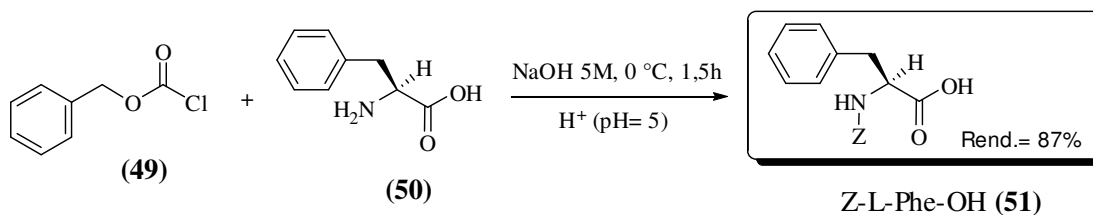
pretendidas, com baixo custo se comparado a outras metodologias. Entretanto a escolha pelo acoplamento dos aminoácidos na sequência definida deu-se puramente pela existência em nosso grupo de pesquisa de um “*Know-how*” no acoplamento do  $\beta$ -OH-aminoácido  $\beta$ -fenilserina com outros aminoácidos sem a necessidade da proteção de sua cadeia lateral.<sup>61</sup>

### 3.2- Preparação dos Intermediários Sintéticos

#### 3.2.1- Proteção do Aminoácido L-fenilalanina

A proteção da função amino ( $\text{NH}_2$ ) de um aminoácido parte do princípio da diminuição de sua reatividade nucleofílica pela deslocalização de sua densidade eletrônica ou pelo impedimento estérico, através da inserção de grupos apropriados.<sup>62</sup> Assim de acordo com estes princípios e a partir das diferentes metodologias existentes, nada mais simples e de prática, a desproteção posterior, que a preparação do derivado uretana.

Para esta reação, utilizou-se o cloroformiato de benzila (Z-Cl) (**49**) e o aminoácido L-fenilalanina (**50**) dissolvido em água e solução de NaOH 5M, seguindo a clássica metodologia de proteção de aminoácidos descrita por Bodanszky,<sup>63</sup> através da qual foi possível se obter o produto Z-L-Phe-OH (**51**)<sup>64</sup> (Esquema 16) na forma de um sólido branco amorfo em excelente rendimento de 87%, o qual foi caracterizado por experimentos de espectroscopia de RMN, dados comparados aos da literatura.<sup>64</sup>



**Esquema 16:** Preparação do derivado Z-L-Phe-OH (**51**).

62 Bailey, P. D.; in: “*An Introduction to Peptide Chemistry*”, John Wiley & Sons, **1990**, 6, 116.

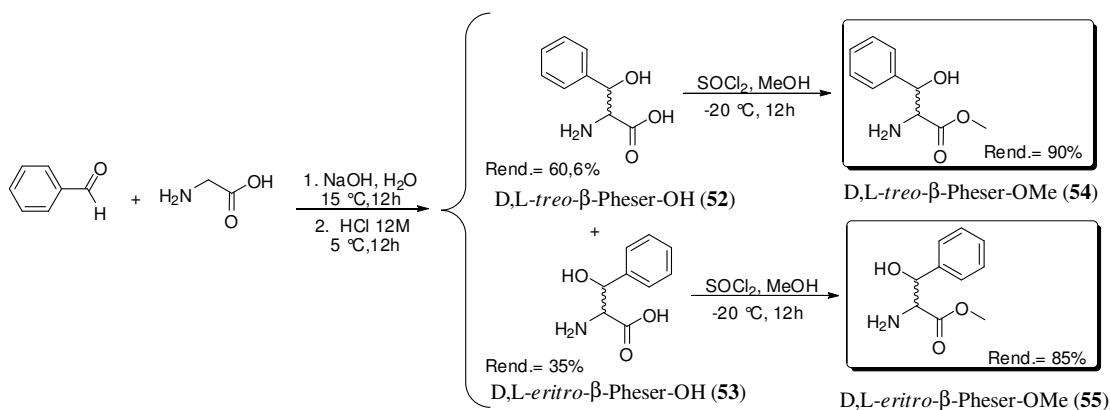
63 Bodansky, M; in: “*Principles of Peptide Synthesis*”, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **1984**, 12.

64 Byrn, R. S.; Shieh, T.-L.; *J. Med. Chem.*, **1982**, 25, 403.

### 3.2.2- Obtenção dos $\beta$ -OH-aminoácidos *treo* e *eritro* $\beta$ -fenilserina e seus éster metílicos

Vários estudos demonstram a importância, e descrevem a síntese de  $\beta$ -OH-aminoácidos,<sup>65</sup> muitas vezes fazendo uso de catalisadores e auxiliares quirais (sínteses assimétricas),<sup>65b</sup> que agregam um alto custo ao processo de síntese.

Assim, analisando a proposta de síntese dos peptídeos diastereoisoméricos e pela possibilidade de sua posterior separação, optou-se pelo uso da clássica condensação aldólica descrita por Shaw e Fox.,<sup>66</sup> entre benzaldeído e o aminoácido glicina em meio básico (Esquema 17), através da qual pode ser obtido pares de aminoácidos diastereoisoméricos (*treo* e *eritro*) em uma única etapa reacional, sendo que após a cristalização com etanol 95%, isolou-se a forma D,L-*treo*- $\beta$ -fenilserina (**52**), com rendimento de 60,6%. Enquanto que pela adição de acetona na água mãe de cristalização obteve-se a D,L-*eritro*- $\beta$ -fenilserina (**53**) de forma pura em rendimento de 35%. Os compostos foram caracterizados e diferenciados por cromatografia em camada delgada de celulose (*R<sub>f</sub>*), dados de ponto de fusão (p.f.)<sup>67</sup> e por espectroscopia de RMN.



**Esquema 17:** Preparação dos aminoácidos D,L-*treo*-Pheser-OH (**52**) e D,L-*eritro*-Pheser-OH (**53**) e seus ésteres metílicos D,L-*treo*-Pheser-OMe (**54**) e D,L-*eritro*-Pheser-OMe (**55**).

Na sequência, a proteção do grupo carboxila destes aminoácidos se fez 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

65 a) Williams, R. M.; Burnett, C. M.; in: "Asymmetric Synthesis and Application of R-Amino Acids", American Chemical Society: Washington, D.C., 2009; 1009, 420. b) Najera, C.; Sansano, J. M.; *Chem. Rev.*, 2007, 107, 4584.

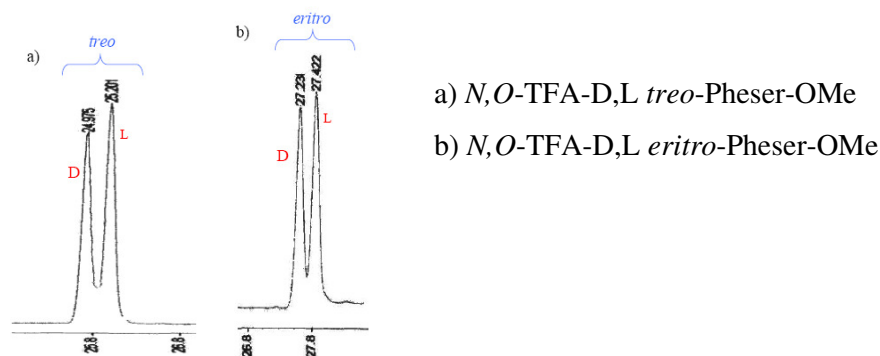
66 Shaw, K. N. F.; Fox, S. W.; *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 3417.

67 Shaw, K. N. F.; Fox, S. W.; *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 3421.

carboxila desprotegido pode ser ativado),<sup>68</sup> sendo o método mais usual para isto a conversão da função carboxila em seus ésteres alquílicos.

Assim como demonstrado no Esquema 17 (pág. 32), com os respectivos aminoácidos separados D,L-*treo*- $\beta$ -fenilserina (**52**) e D,L-*eritro*  $\beta$ -fenilserina (**53**), realizou-se a reação para proteção do grupamento carboxílico pelo tratamento com cloreto de tionila em metanol anidro (MeOH/ SOCl<sub>2</sub>) à -20<sup>0</sup>C,<sup>69</sup> obtendo-se os respectivos ésteres metílicos, D,L-*treo*- $\beta$ -fenilserinato de metila (**54**) e D,L-*eritro*- $\beta$ -fenilserinato de metila (**55**) na forma de produtos cristalinos com rendimentos superiores a 85%.

A diferenciação entre as formas *treo* e *eritro* da  $\beta$ -fenilserina deu-se pela comparação dos valores experimentais e da literatura de ponto de fusão, e pelas constantes de acoplamento entre os hidrogênios H $\alpha$ -H $\beta$  da forma *treo* ( $J_{H\alpha,H\beta} = 4,0$  Hz) e forma *eritro* ( $J_{H\alpha,H\beta} = 7,0$  Hz). Estes aminoácidos foram confirmados também através da coinjeção com padrões e pelo tempo de retenção dos derivados (N,O- trifluoracetil, O-Me) em análises por cromatografia gasosa com fase quiral (CGFQ), empregando a fase estacionária quiral 2,6-Pe-3-Bu- $\gamma$ -CD (Lipodex-E) (enantiômeros D,L) conforme a Figura 13.



**Figura 13:** Ampliações dos cromatogramas de CGFQ, dos derivados *N,O*-TFA-D,L *treo*-Pheser-OMe e *N,O*-TFA-D,L *eritro*-Pheser-OMe, CCSF, 25m, 2,6-Pe-3-Bu- $\gamma$ -CD, 50%/OV1701, 90 °C-170 °C a 2°C/min.

### 3.2.3- Preparação dos Intermediários Dipeptídicos

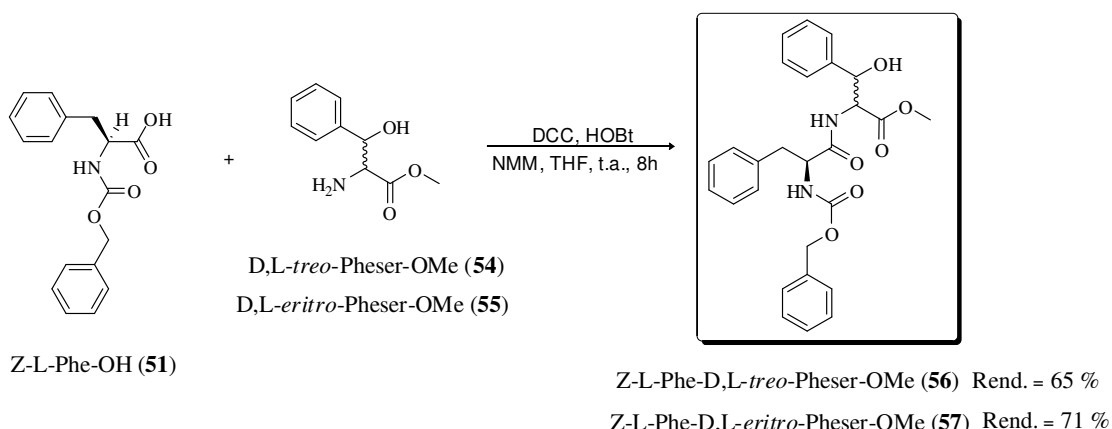
Levando-se em consideração as estratégias adotadas para obtenção dos compostos, faz-se necessário a construção de ligações peptídicas pelo acoplamento dos derivados de

68 a) Jones, J.; in: "Amino Acid and Peptide Synthesis", Oxford University Press, **1994**; 5, 25. b) Jones, J.; in: "Amino Acid and Peptide Synthesis", Oxford University Press, **1994**; 3, 14. c) Jones, J.; in: "Amino Acid and Peptide Synthesis", Oxford University Press, **1994**; 4, 22.

69 a) Carrara, K. N. F.; Witnauer, W.; *Gazz. Chim. Ital.*, **1949**, 79, 856. b) Inouye, K.; Otsuka, H.; *J. Org. Chem.*, **1962**, 27, 2440.

aminoácidos preparados anteriormente, procedimento que envolve a ativação de um grupo carboxila para facilitar o ataque pelo grupo amino. A literatura fornece diferentes reagentes eletrofílicos para a ativação da função carboxila e obtenção de acoplamentos com rendimentos quantitativos e com a manutenção da integridade quiral dos centros adjacentes, sendo o método das carbodiimidás, com a diciclohexilcarbodiimida (DCC)<sup>70</sup> e a diisopropilcarbodiimida (DIC)<sup>71</sup> os principais e mais importantes reagentes para a ativação destas funções durante a síntese.

Assim, de acordo com as disposições, foi possível obter os dipeptídeos diastereoisoméricos Z-L-Phe-D,L-*treo*-Pheser-OMe (**56**) e Z-L-Phe-D,L-*eritro*-Pheser-OMe (**57**) na forma de sólidos brancos com rendimentos de 65% e 70%, respectivamente, através do acoplamento de quantidades equimolares dos aminoácidos D,L-*treo*- $\beta$ -fenilserinato de metila (**54**) e D,L-*eritro*- $\beta$ -fenilserinato de metila (**55**) com o derivado Z-L-Phe-OH (**51**) pelo método da carbodiimida,<sup>72</sup> utilizando-se a DCC como reagente de acoplamento e o HOBT como aditivo auxiliar<sup>73</sup> (Esquema 18).



**Esquema 18:** Reação de formação dos dipeptídeos Z-L-Phe-D,L-*treo*-Pheser-OMe (**56**) e Z-L-Phe-D,L-*eritro*-Pheser-OMe (**57**).

Os dipeptídeos (**56**) e (**57**), foram cristalizados em éter etílico/ éter di-isopropílico/ éter de petróleo (1/2/3), e assim separados em suas formas diastereoisoméricas Z-L-Phe-L-*treo*-Pheser-OMe (**56a**), Z-L-Phe-D-*treo*-Pheser-OMe (**56b**), Z-L-Phe-L-*eritro*-Pheser-OMe (**57a**) e Z-L-Phe-D-*eritro*-Pheser-OMe (**57b**), cujas purezas diastereoisoméricas foram

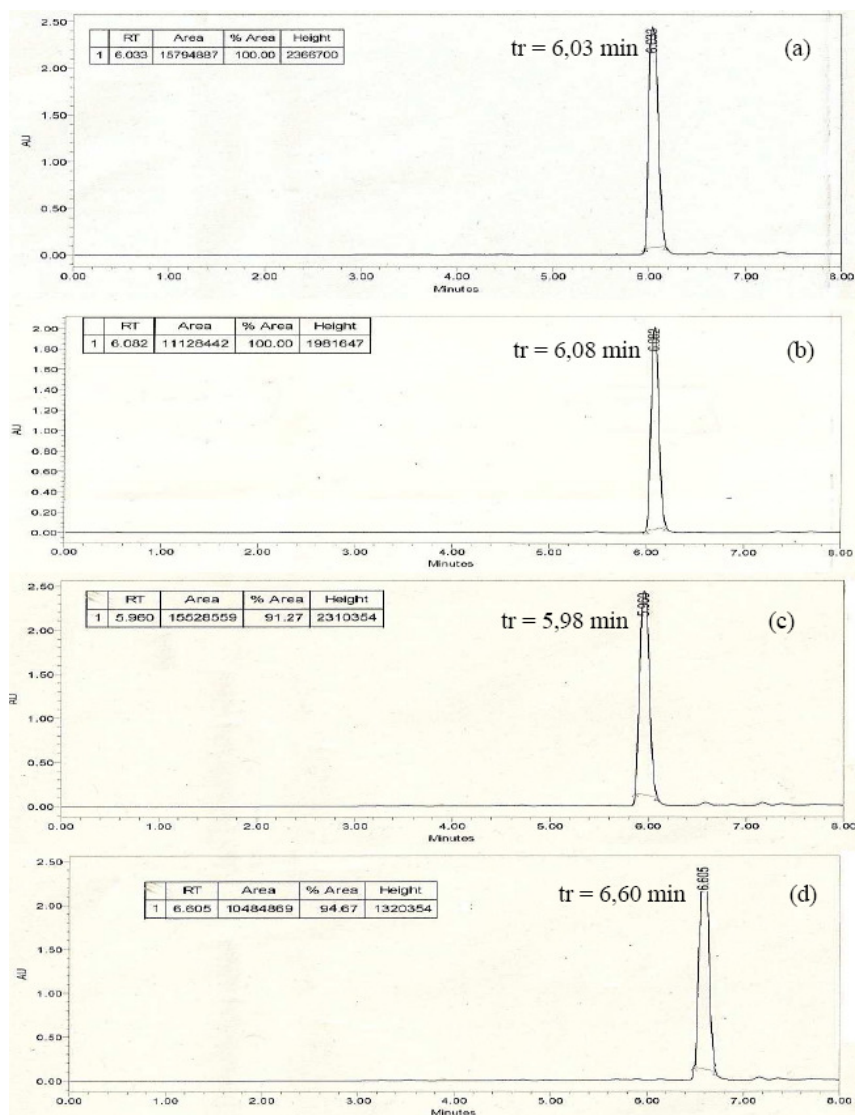
70 Schechan, J. C.; Hess, G. P.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, 77, 1067

71 Schechan, J. C.; Hlavka, J.; *J. Org. Chem.*, **1956**, 21, 439

72 Carpino, L. A.; El-Faham, A.; *Tetrahedron*, **1999**, 55, 6813.

73 König, W.; Geiger, R; *Chem. Ber.*; **1970**, 103, 788

determinadas pela presença de um único pico em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjos de diodos (DAD) conforme a Figura 14.

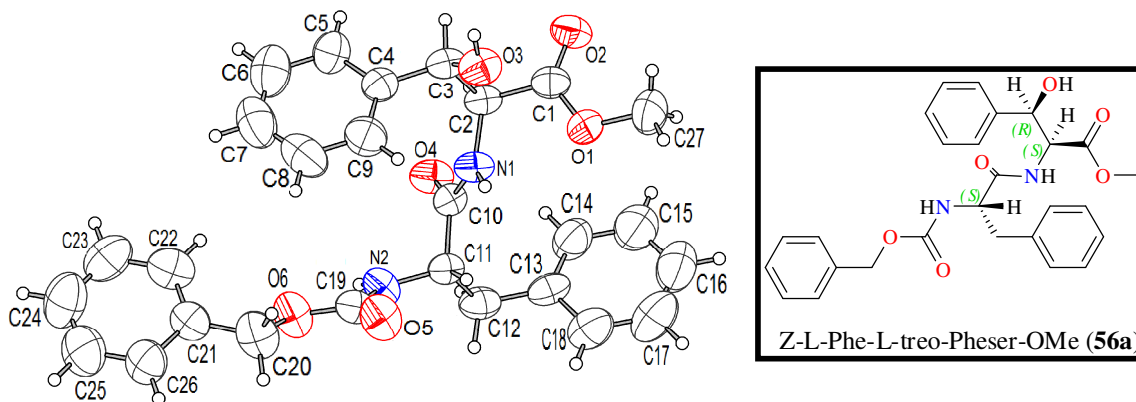


**Figura 14:** Perfil de CLAE-DAD, para os compostos (a) Z-L-Phe-L-*treo*-Pheser-OMe (**56a**), (b) Z-L-Phe-D-*treo*-Pheser-OMe (**56b**), (c) Z-L-Phe-L-*eritro*-Pheser-OMe (**57a**) e (d) Z-L-Phe-D-*eritro*-Pheser-OMe (**57b**).

Condições: coluna Symmetry- C18 (4.6 x 150 mm) 5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , fluxo de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , sistema eluente  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (80:20), detecção a 220 nm. vol. injetado: 2.0  $\mu\text{L}$  de uma sol. [0.5  $\text{mg}/\text{mL}$ ],  $\lambda_{\text{abs}} = 258 \text{ nm}$ .

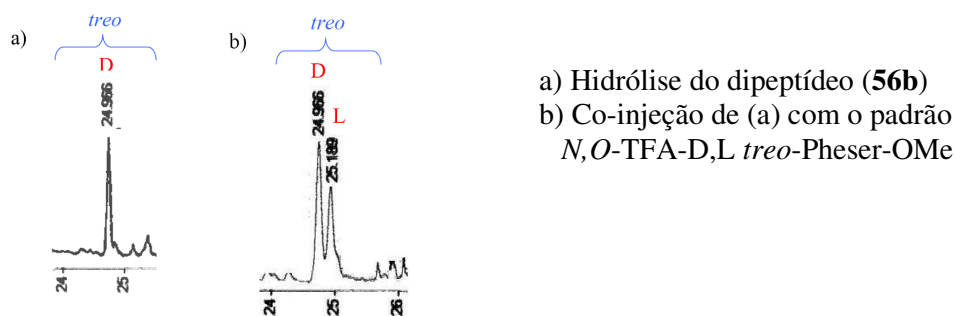
Para o dipeptídeo Z-L-Phe-L-*treo*-Pheser-OMe (**56a**) através da dissolução em clorofórmio seguido da adição de pequenas quantidades de éter di-isopropílico, foi possível obter pequenos cristais em forma de agulhas incolores, com dimensões aproximadas 0.03 mm x 0.13 mm x 0.73 mm, que quando submetidos à análise por difração de raios-X do mono

crystal, obteve-se sua estrutura cristalina (Figura 15). Os demais dados estruturais obtidos a partir da difração de raios-X para este composto estão descritos na Tabela A2 no Anexo I, pág. 115.



**Figura 15:** Estrutura cristalina obtida por difração de raios-X do monocristal de Z-L-Phe-L-treo-Pheser-OMe (**56a**).

A determinação das estereoquímicas absolutas dos dipeptídeos Z-L-Phe-L-treo-Pheser-OMe (**56a**), Z-L-Phe-D-treo-Pheser-OMe (**56b**), Z-L-Phe-L-eritro-Pheser-OMe (**57a**) e Z-L-Phe-D-eritro-Pheser-OMe (**57b**) foi realizada após estes serem submetidos à reação de hidrólise ácida, resultando nos aminoácidos constituintes os quais após a derivatização foram analisados por cromatografia gasosa com fase quiral (CGFQ) em coluna capilar de sílica fundida (CCSF) de 25m, com a fase estacionária 2,6-Pe-3-Bu- $\gamma$ -CD, 50%/OV1701, 90°C-170 °C a 2 °C/min, pela co-injeção com padrões, assim como para o **56b** (Figura 16).



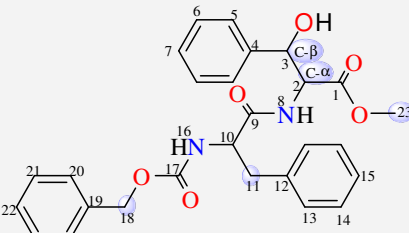
**Figura 16:** Ampliações dos cromatogramas do hidrolisado do dipeptídeo Z-L-Phe-D-treo-Pheser-OMe (**56b**) e co-injeção com o padrão, obtidos por CGFQ.

Através das análises de espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Tabela 2), em conjunto com os experimentos de DEPT-135 e 2D (COSY-45, HSQC e HMBC) foi possível



determinar as estruturas, e realizar a diferenciação entre os dipeptídeos por seus valores de deslocamentos químicos e constantes de acoplamento.

**Tabela 2:** Dados de constantes de acoplamentos e deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ; para os dipeptídeos Z-L-Phe-L-*treo*-Pheser-OMe (**56a**), Z-L-Phe-D-*treo*-Pheser-OMe (**56b**), Z-L-Phe-L-*eritro*-Pheser-OMe (**57a**) e Z-L-Phe-D-*eritro*-Pheser-OMe (**57b**).

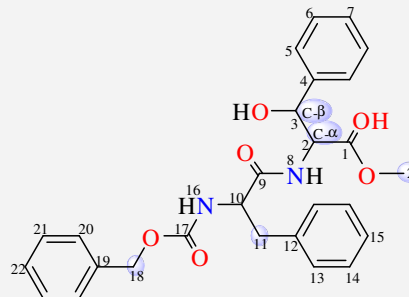


n <sup>o</sup>	-L- <i>treo</i> -Pheser ( <b>56a</b> )		-D- <i>treo</i> -Pheser ( <b>56b</b> )	
	$\delta$ $^1\text{H}^{(a)}$ (ppm); J(Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}^{(b)}$ (ppm)	$\delta$ $^1\text{H}^{(a)}$ (ppm), J(Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}^{(b)}$ (ppm)
C-1	-	171,08	-	171,50
C- $\alpha$ -2	4,81 (dd,1H); (J <sub>2,3</sub> = 3,4; J <sub>2,8</sub> = 8,6 Hz)	58,17	4,64 (dd,1H); (J <sub>2,3</sub> = 3,20; J <sub>2,8</sub> = 8,76 Hz)	57,55
C- $\beta$ -3	5,20 (d,1H); (J <sub>3,2</sub> = 3,4 Hz)	73,70	5,29 (d,1H); (J <sub>3,2</sub> = 3,08 Hz)	71,82
C-4	-	139,31	-	139,52
C-5	-	125,80	-	125,76
C-6	7,12-7,36 (m, 5H)	128,19	7,15-7,30 (m, 5H)	128,28
C-7	-	128,14	-	128,11
NH-8	6,72 (d,1H); (J <sub>8,2</sub> =8,6 Hz)	-	6,91 (d, 1H); (J <sub>8,2</sub> = 8,76 Hz)	-
C-9	-	170,36	-	170,87
C-10	4,39 (dd,1H); (J <sub>10,11</sub> = 7,2 Hz, J <sub>10,11'</sub> = 6,7Hz)	56,02	4,48 (dd,1H); (J <sub>10,11</sub> = 7,36; J <sub>10,11'</sub> = 5,32 Hz)	55,60
C-11	2,93; 2,99 (2 dd, 2H); (J <sub>11,10</sub> = 7,2; J <sub>11',10</sub> = 6,7; J <sub>11,11'</sub> = 13,8 Hz)	38,09	2,78; 2,96 (2 dd, 2H); (J <sub>11,10</sub> = 7,36; J <sub>11',10</sub> = 5,32; J <sub>11,11'</sub> = 14,10 Hz)	38,20
C-12	-	136,22	-	136,26
C-13	-	127,99	-	127,88
C-14	7,12-7,36 (m, 5H)	128,52	7,15-7,30 (m, 5H)	128,46
C-15	-	128,37	-	128,43
NH-16	5,17 (d,1H); (J <sub>16,10</sub> =9,0 Hz)	-	5,20 (d,1H)	-
C-17	-	155,91	-	155,95
C-18	5,04 (s, 2H)	67,09	5,00 (s, 2H)	66,96
C-19	-	136,08	-	136,05
C-20	-	126,94	-	126,82
C-21	7,12-7,36 (m, 5H)	129,27	7,15-7,30 (m, 5H)	129,24
C-22	-	128,63	-	128,51
C-23	3,66 (s, 3H)	52,57	3,67 (s, 3H)	52,51

<sup>a)</sup>Espectro obtido em CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.

<sup>b)</sup> Espectro obtido em CDCl<sub>3</sub> a 100 MHz.

Continuação da Tabela 2:



n <sup>o</sup>	<i>-L-eritro-Pheser (57a)</i>		<i>-D-eritro-Pheser (57b)</i>	
	$\delta^1\text{H}^{(a)}$ (ppm); J(Hz)	$\delta^{13}\text{C}^{(b)}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}^{(a)}$ (ppm); J(Hz)	$\delta^{13}\text{C}^{(b)}$ (ppm)
C-1	-	171,62	-	172,00
C <sub>α</sub> -2	4,90 (dd, 1H); (J <sub>2,3</sub> = 3,80; J <sub>2,8</sub> = 7,60 Hz)	58,79	4,81 (dd, 1H); (J <sub>2,3</sub> =3,48; J <sub>2,8</sub> =6,76 Hz)	59,04
C <sub>β</sub> -3	5,25 (d, 1H); (J <sub>3,2</sub> =3,80 Hz)	74,29	5,16 (d, 1H); (J <sub>3,2</sub> =3,48 Hz)	74,67
C-4	-	138,79	-	138,82
C-5	7,14-7,32 (m, 5H)	125,75	7,07-7,26 (m, 5H)	125,87
C-6		128,24		128,27
C-7		128,12		128,12
NH-8	6,53 (d, 1H); (J <sub>8,2</sub> = 7,60 Hz)	-	6,47 (d, 1H); (J <sub>8,2</sub> = 6,76 Hz)	-
C-9	-	169,42	-	169,27
C-10	4,45 (dd, 1H); (J <sub>10-11</sub> = 7,26; J <sub>10,16</sub> =14,56 Hz)	56,32	4,32 (dd, 1H); (J <sub>10-11</sub> = 6,4; J <sub>10-11'</sub> = 7,20; J <sub>10-16</sub> =14,20 Hz)	56,33
C-11	3,03 (d, 2H); (J <sub>11-10</sub> = 7,26 Hz)	38,53	2,98 (dd, 2H); (J <sub>11-10</sub> = 6,4 Hz)	38,12
C-12	-	136,14	-	135,90
C-13	7,14-7,32 (m, 5H)	128,08	7,07-7,26 (m, 5H)	128,08
C-14		128,54		128,56
C-15		128,33		128,30
NH-16	5,25 (d, 1H); (J <sub>16-10</sub> =14,56 Hz)	-	5,16 (d, 1H); (J <sub>16-10</sub> =14,20 Hz)	-
C-17	-	155,82	-	155,82
C-18	5,07 (s, 2H)	67,21	5,09 (s, 2H)	67,28
C-19	-	135,99	-	135,90
C-20	7,14-7,32 (m, 5H)	127,24	7,07-7,26 (m, 5H)	127,20
C-21		129,30		129,23
C-22		128,85		128,83
C-23	3,61 (s, 3H)	52,40	3,57 (s, 3H)	52,50

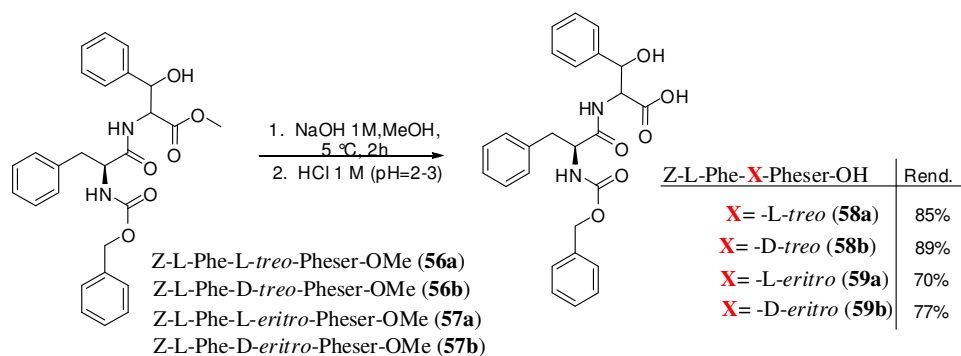
<sup>a</sup>Espectro obtido em CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.<sup>b</sup>Espectro obtido em CDCl<sub>3</sub> a 100 MHz.

### 3.2.4- Obtenção dos dipeptídeos com carboxilas terminais livres.

Para a construção dos respectivos tripeptídeos necessitou-se realizar a desproteção do grupamento carboxílico terminal dos dipeptídeos diastereoisoméricos **56a**, **56b**, **57a** e **57b**. Para isto, cada dipeptídeo foi submetido a uma reação de hidrólise básica (Esquema 19), com

solução aquosa de NaOH 1M em MeOH, seguido por acidificação com HCl 1M até pH 2-3, através da qual geraram os respectivos dipeptídeos livres Z-L-Phe-L-*treo*-Pheser-OH (**58a**), Z-L-Phe-D-*treo*-Pheser-OH (**58b**), Z-L-Phe-L-*eritro*-Pheser-OH (**59a**) e Z-L-Phe-D-*eritro*-Pheser-OH (**59b**).

Estas reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD), sendo que o seu término foi determinado pelo desaparecimento dos materiais de partida confirmando-se a eficiência das desproteções, que ocorreram com rendimentos que variaram de 70 a 90 %. Assim após o seu isolamento os produtos foram analisados através da espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , onde nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  observou-se o desaparecimento dos sinais em forma de singletos correspondentes as metilas dos ésteres ( $-\text{OCH}_3$ ) que se encontravam em deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de 3,66, 3,67, 3,61 ppm e 3,57 ppm nos respectivos dipeptídeos (**58-59**). Já nos espectros de  $^{13}\text{C}$ , além do desaparecimento dos sinais referentes aos carbonos das metoxilas (C-23) que apareciam em  $\delta \approx 52,0$  ppm, temos uma pequena mudança no deslocamento químico de C-1 para campo mais baixo  $\approx 172$  ppm, característicos de grupamentos ácidos.

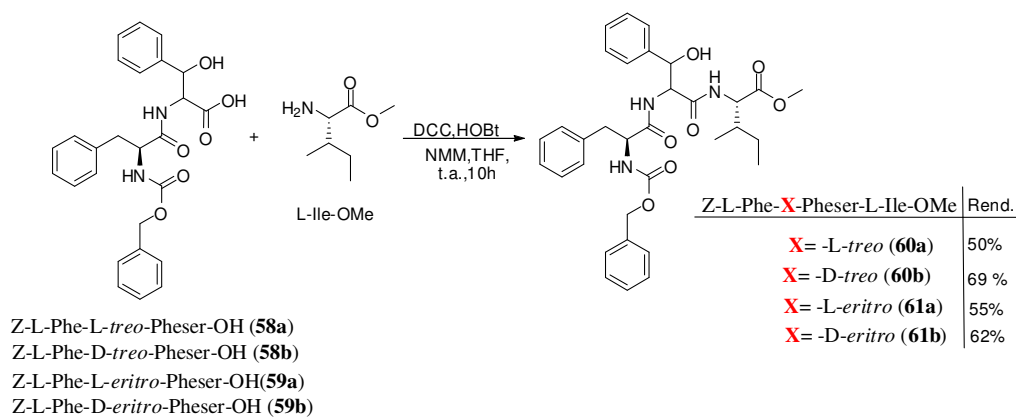


**Esquema 19:** Reação de hidrólise básica para obtenção dos dipeptídeos livres.

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.

### 3.2.5- Reações de Acoplamento dos Dipeptídeos Livres com o Aminoácido L-Isoleucina-OMe

Para a construção dos fragmentos tripeptídicos Z-L-Phe-L-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (**60a**), Z-L-Phe-D-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (**60b**), Z-L-Phe-L-*eritro*-Pheser-L-Ile-OMe (**61a**) e Z-L-Phe-D-*eritro*-Pheser-L-Ile-OMe (**61a**) como proposto na estratégia sintética, realizou-se o acoplamento dos respectivos dipeptídeos livres **58a**, **58b**, **59a** e **59b** com o aminoácido L-Ile-OMe, pelo método descrito anteriormente (item 3.2.3 deste capítulo) com os reagentes DCC/HOBt (Esquema 20), sendo estas reações monitoradas pelos *R<sub>f</sub>*s em CCD reveladas com o revelador de *orto*-toluidina, assim ao término das mesmas obteve-se após uma pré-purificação por cromatografia em coluna (CC) e precipitação pela dissolução em clorofórmio e adição de éter etílico/ éter de petróleo (1:4), com produtos na forma de uma massa viscosa para os peptídeos de configuração D-*treo* (**60b**) e D-*eritro* (**61b**) e sólidos brancos para L-*treo* (**60a**) e L-*eritro* (**61a**) e rendimentos que variaram de 50 a 69%.



**Esquema 20:** Reação de acoplamento para obtenção dos tripeptídeos.

As estruturas dos compostos **60(a,b)**-**61(a,b)** foram comprovadas por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135 e 2D (COSY 45, HMQC, HMBC), através dos quais pela presença de alguns sinais característicos pode-se verificar a formação dos tripeptídeos na sequência de aminoácidos desejada.

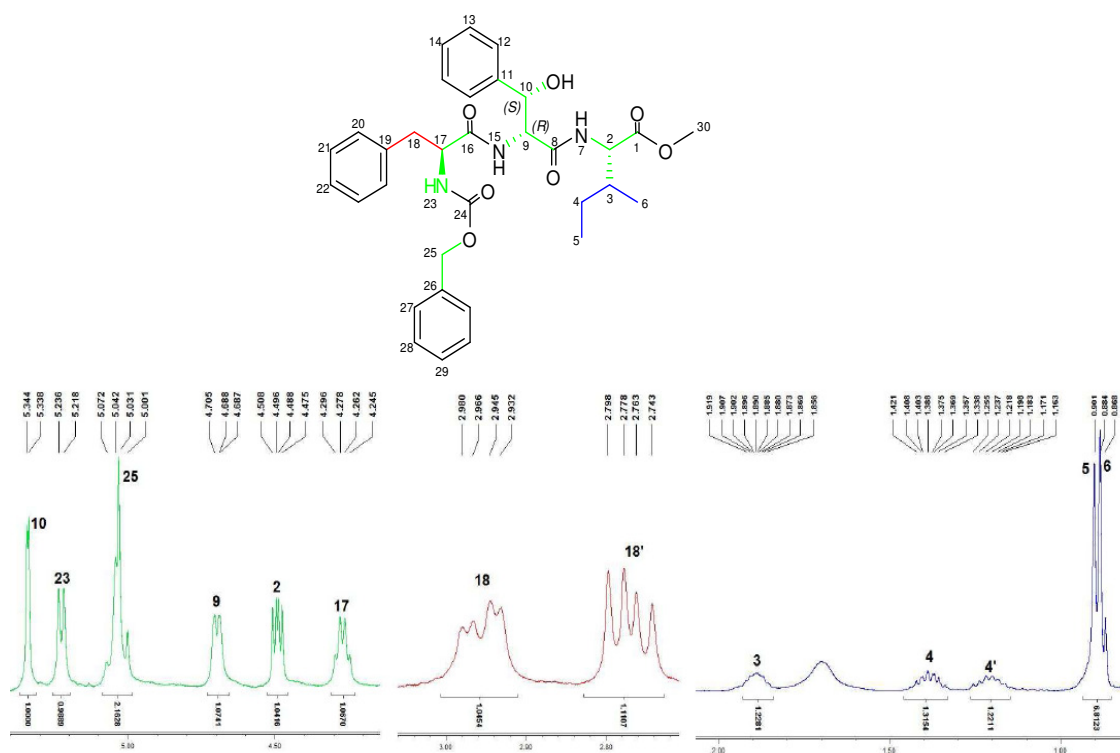
Assim a título de exemplificação serão discutidos os dados espectroscópicos de RMN do composto **60b**, como os demonstrados nas ampliações do espectro de  $^1\text{H}$  (Figura 17) onde podem ser visualizados os seguintes sinais: A presença de um tripleto em deslocamento químico de 0,85 ppm, parcialmente sobreposto ao sinal na forma de duplete que esta a  $\delta$  0,92

ppm e cujas integrais para 3 hidrogênios cada, identificados como sendo os dois grupamentos metílicos do aminoácido isoleucina. Em campo um pouco mais baixo, em  $\delta$  1,23, 1,42 e 1,87 ppm temos três multipletos, com integrais referentes a um hidrogênio cada, pertencentes aos dois hidrogênios diastereotópicos do grupamento metilênico ( $\text{CH}_2$ -4) e metínico ( $\text{CH}$ -3), respectivamente.

Ainda, pode-se observar em  $\delta$  2,77 e 2,96 ppm, dois duplos dubletos com integral para dois hidrogênios e com constantes de acoplamento de  $J_{18-17} = 5,20$ ;  $J_{18'-17} = 8,00$  e  $J_{18-18'} = 14,0$  Hz, característicos do grupo metilênico ( $\text{CH}_2$ -18) da unidade fenilalanina, estes hidrogênios aparecem desdobrados devido à vizinhança com o centro quiral  $\text{CH}$ -17, fato que faz com que sejam quimicamente não equivalentes e por isso, acoplam entre si além de acoplarem com o grupo metínico ( $\text{CH}$ -17) que aparece também na forma de um duplo dubleto em  $\delta$  4,26 ppm o qual acopla com o hidrogênio amídico  $\text{NH}$ -23 com uma constante de acoplamento de  $J_{17-\text{NH}-23} = 13,50$  Hz..

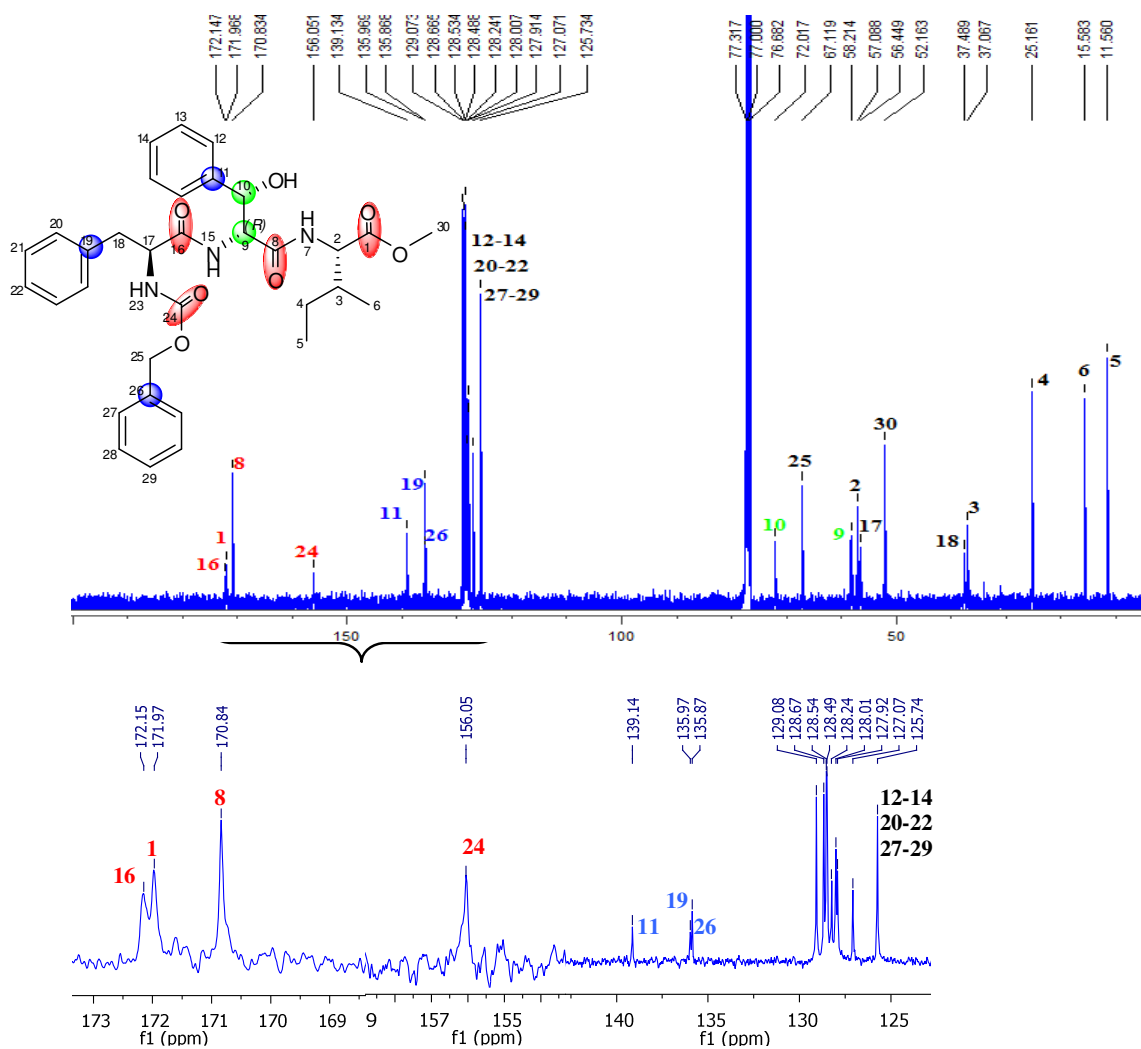
O hidrogênio metínico ( $\text{CH}$ -9) ( $\alpha$ -carbonílico) da unidade  $\beta$ -fenilserina absorve em  $\delta$  4,71 ppm e aparece na forma de duplo dubleto devido ao acoplamento com os hidrogênios do  $\text{CH}$ -10, constante de acoplamento de  $J_{9-10} = 2,60$  Hz e com o hidrogênio amídico  $\text{NH}$ -15 com uma constante de acoplamento de  $J_{9-\text{NH}-15} = 6,60$  Hz. Já o hidrogênio metínico ( $\text{CH}$ -10) ( $\beta$ -carbonílico) pode ser observado na região de  $\delta$  5,33 ppm na forma de dubleto com  $J_{10-9} = 2,60$  Hz, pelo acoplamento com o hidrogênio do  $\text{CH}$ -9.

Na região espectral de  $\delta$  7,10 ppm temos a presença de um dubleto referente ao  $\text{NH}$ -7 que possui constante de acoplamento  $J_{7-8} = 8,30$  Hz, este sinal está muito próximo aos sinais dos hidrogênios aromáticos que se apresentam distribuídos em uma faixa de  $\delta$  compreendida entre 7,18 - 7,34 ppm.



**Figura 17:** Ampliações do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **60b** em  $\text{CDCl}_3$ .

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 18) observamos a presença de todos os carbonos referentes a esse composto, dos quais destacam-se os visualizados nas ampliações como os carbonos com deslocamento químico 172,1, 171,9, 170,8 e 156,0 ppm, onde encontram-se os sinais referentes às respectivas carbonilas **C-1**, **C-8**, **C-16** e **C-24**. Já entre as regiões de  $\delta$  125 a 139 ppm, encontramos vários sinais referentes aos carbonos aromáticos, sendo que os que se encontram completamente desidrogenados apresentam intensidades significativamente reduzidas.



**Figura 18:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **60b** em  $\text{CDCl}_3$ , com ampliações da região de  $\delta$  125-173 ppm.

Pela análise do espectro de DEPT 135 obteve-se a confirmação dos sinais com deslocamentos químicos de 25,1, 37,4 e 67,1 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  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  foram confirmadas através dos espectros de correlações bidimensionais COSY 45  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , HMQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  e HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ .

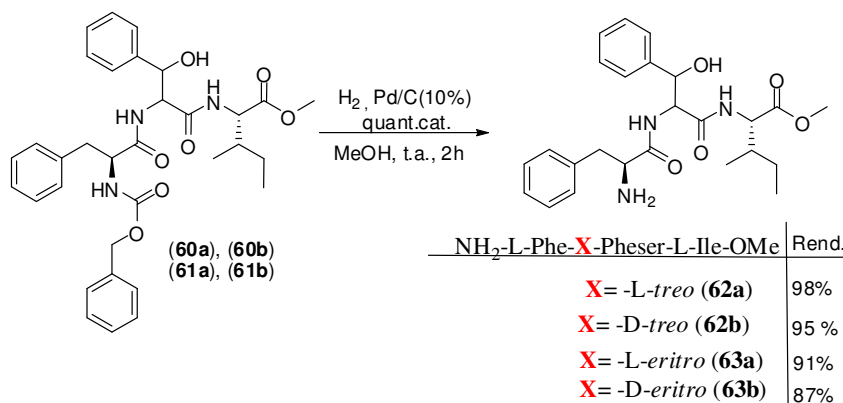
A espectroscopia bidimensional correlacionada heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  pode fornecer tanto as correlações dos hidrogênios e carbonos ligados diretamente entre si (HMQC), como as correlações entre hidrogênios e carbonos a longas distâncias via  $^2\text{J}_{\text{C-H}}$  e  $^3\text{J}_{\text{C-H}}$  (HMBC), facilitando assim a atribuição dos sinais.

Dessa forma, a análise através de projeções ortogonais do experimento de HMQC  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  (Figura A10 em anexo pág.125.) podemos ver claramente a estéreo-diferenciação entre os hidrogênios diastereotópicos (H-4; H-4') e (H-18; H-18') do composto **60b**.

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** em  $\delta$  de 11,5 ppm com o sinal de hidrogênios em forma de tripleto em  $\delta$  de 0,91 ppm e a correlação do carbono **C-6** em  $\delta$  de 15,4 ppm com o sinal na forma de dubleto à  $\delta$  de 0,88 ppm. O carbono **C-9** que aparece em  $\delta$  de 58,2 ppm se correlaciona com o sinal de hidrogênio que aparece na forma de um duplo dubleto na região de  $\delta$  4,68 ppm. Já no carbono **C-10** que está em um  $\delta$  de 72,0 ppm, há correlação com o dubleto na região de deslocamento químico de 5,33 ppm, e assim todas estas correlações juntamente com outras não citadas confirmam a estrutura do tripeptídeo.

### 3.2.6 - Reações de remoção do grupamento Cbz (benziloxicarbonil) dos tripeptídeos

A remoção do grupamento protetor Cbz<sup>74</sup> dos tripeptídeos puros **60(a,b)**-**61(a,b)** foi realizada pela passagem de hidrogênio (por borbulhamento) à uma solução dos respectivos peptídeos em MeOH com quantidades catalíticas de Pd/C (10%), sendo o progresso das reações monitorado por CCD eluídas em  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (2%) e reveladas com solução de ninidrina a 0,2% em EtOH (reagente seletivo para a função amino), assim após a purificação em coluna de celite para remoção do Pd/C, forneceram os tripeptídeos **62-63** em rendimentos que variaram de 87 a 98% (Esquema 21).

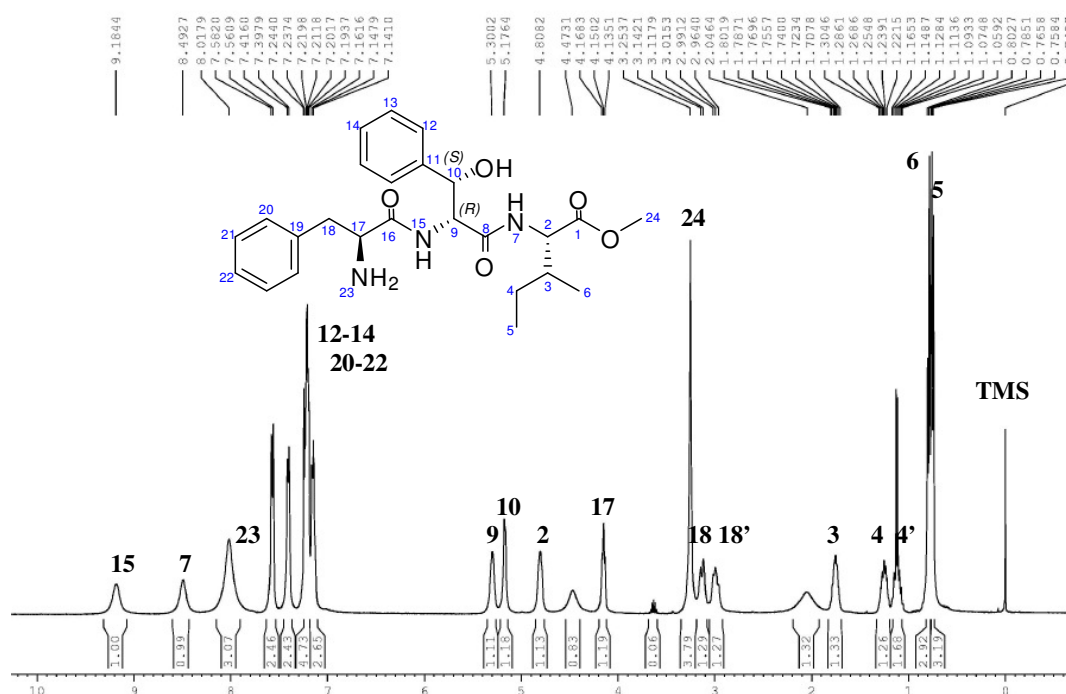


**Esquema 21:** Reação de desproteção da função amino dos tripeptídeos.



Estes compostos com o grupamento amino terminal livre variaram desde sólidos cristalinos a massas viscosas e tiveram suas estruturas confirmadas pelos experimentos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , onde nota-se o desaparecimento dos sinais característicos do grupamento Cbz.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  do tripeptídeo desprotegido  $\text{NH}_2\text{-L-Phe-D-treo-Phe-ser-L-Ile-OMe}$  (**62b**) (Figura 19), por exemplo, nota-se o desaparecimento dos sinais dos hidrogênios pertencentes ao  $\text{CH}_2\text{-25}$  e  $\text{NH-23}$  em  $\delta$  5,03 e 5,23 ppm respectivamente (Figura 17) além da diminuição na área de integração dos sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos, verificou-se também o surgimento de três sinais em campo baixo ( $\delta$  de 8,0 a 9,1 ppm) dois destes pertencentes aos  $\text{NH-7}$  e  $\text{NH-15}$  com integração para um hidrogênio cada e outro referente ao  $\text{NH}_2\text{-23}$  com integração para dois hidrogênios.

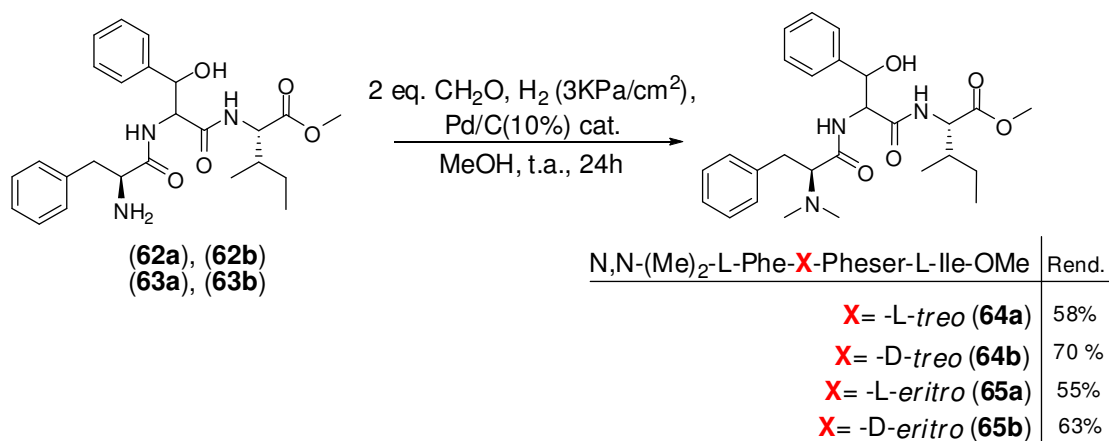


**Figura 19:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **62b** em  $\text{CD}_3\text{OD}$  a  $T = 323\text{ K}$ .

Já no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura A25 em anexo pág.130) tem-se a confirmação da estrutura pelo desaparecimento do sinal em aproximadamente 156 ppm típico do carbono carbonílico **C-24**, o mesmo acontece com os carbonos aromáticos (**C-26**, **27**, **28** e **29**) e metilênicos **C-25**, todos pertencentes ao grupamento protetor Cbz que compunha a estrutura do tripeptídeo **60b** (material de partida) descrito anteriormente (Figura 18, pág. 43).

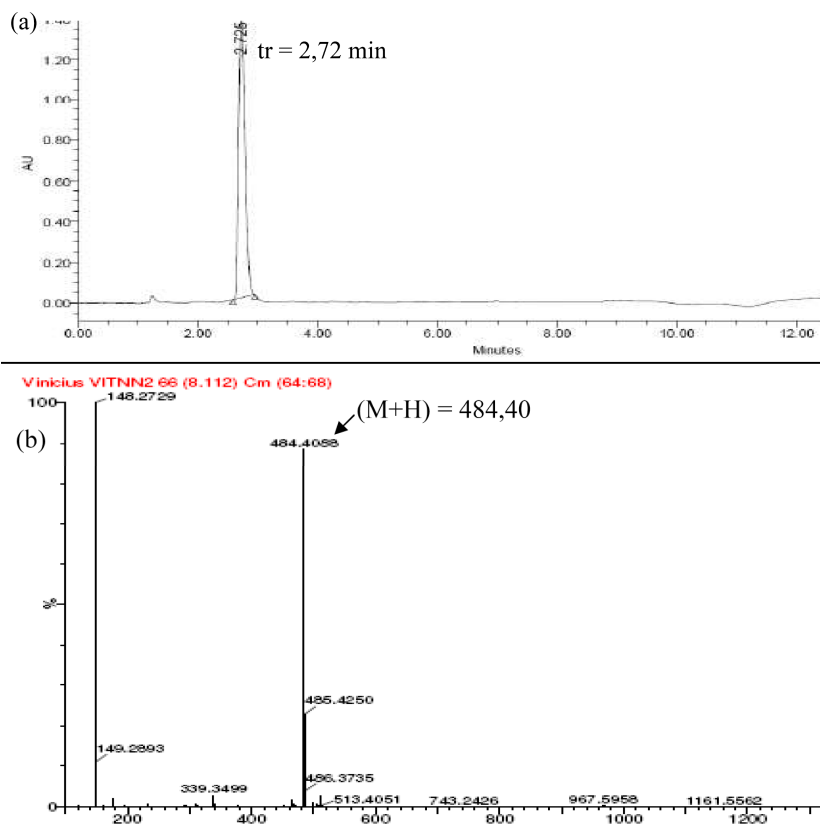
### 3.2.7 - Reações de *N,N*-dimetilação dos tripeptídeos

As reações de *N,N*-dimetilação dos tripeptídeos (**62-63**), foram realizadas através da condensação reductiva do aldeído fórmico com a função amino (NH<sub>2</sub>) dos respectivos tripeptídeos na presença de hidrogênio (sob pressão de 3 KPa/cm<sup>2</sup>) e catalisador (10% Pd/C)<sup>75</sup> como demonstrado no Esquema 22. Estas reações foram acompanhadas por CCD, reveladas com o reagente modificado de Dragendorff e após 24 horas forneceram um único produto.



**Esquema 22:** Reação de *N,N*-dimetilação dos tripeptídeos.

Os produtos **64-65** foram obtidos com rendimentos que variaram de 55 a 70%, após a purificação por CC utilizando como sistema eluente (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 1%) e pela análise por CLAE-DAD estes peptídeos se apresentam como um único pico, cuja massa fornecida pela análise por CLAE-EM íon molecular (M+H) = 484,40 confirma a dimetilação dos produtos como os apresentados para o *N,N*-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-D-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (**64b**) (Figura 20).



**Figura 20:** (a) Cromatograma de CLAE-DAD; (b) Espectro de Massas ( $m/z$ ) obtido por CLAE-EM para os compostos  $N,N$ -(Me) $_2$ -L-Phe-D-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (**64b**).

Condições: coluna Symmetry- C18 (4.6 x 150 mm) 5  $\mu$ m, 100  $\text{\AA}$ , fluxo de 1 mL.min $^{-1}$ , sistema eluente CH $_3$ CN/ H $_2$ O (80:20), detecção a 220 nm. vol. injetado: 2.0  $\mu$ L de uma sol. [0.5 mg/mL],  $\lambda_{\text{abs}}$ = 258 nm.

Ainda foi possível caracterizar as estruturas destes compostos por experimentos de RMN uni e bi-dimensionais, sendo que nas expansões do espectro de RMN  $^1\text{H}$ , por exemplo, para o tripeptídeo **64b** (Figura 21), se observam todos os sinais característicos dos aminoácidos que compõe a estrutura deste composto. Além de um singlete em  $\delta$  2,21 ppm com integração de seis hidrogênios, confirmando a completa dimetilação da função (NH $_2$ ) do aminoácido terminal da unidade fenilalanina, e ainda na forma de singlete, tem-se em  $\delta$  3,71 ppm o sinal dos três hidrogênios da metoxila do éster da isoleucina.

Observa-se também entre 7,13-7,29 ppm vários sinais correspondentes aos dez hidrogênios aromáticos dos aminoácidos  $\beta$ -fenilserina e fenilalanina, e um sinal em campo mais baixo  $\delta$  7,73 ppm, na forma de dubleto referente ao hidrogênio amídico (NH-15).

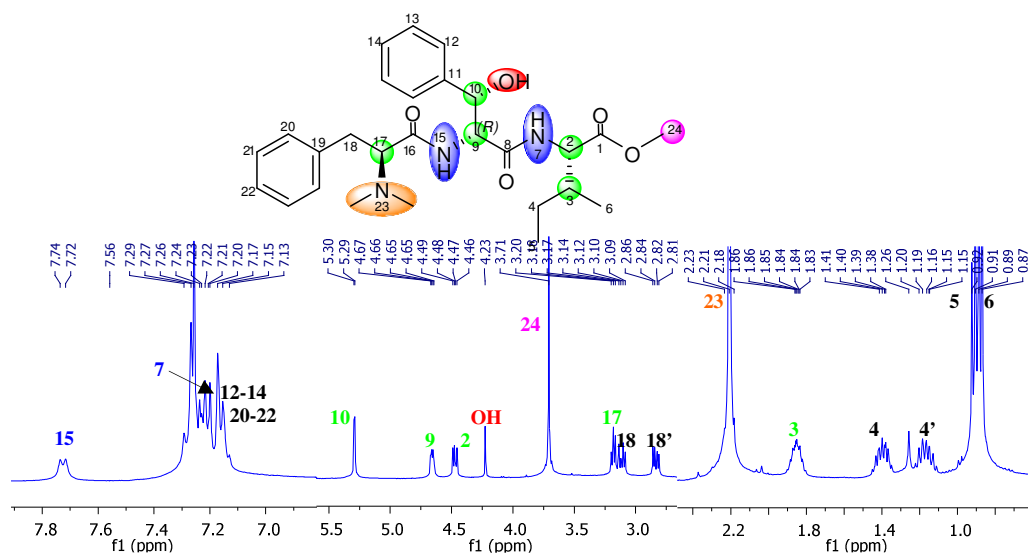


Figura 21: Ampliações do espectro de RMN  $^1\text{H}$  para o composto **64b**.

De maneira geral os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  dos tripeptídeos dimetilados **64-65** apresentam como principal diferença, quando comparados com seus precursores desprotegidos **62-63** a presença de um sinal em  $\delta \approx 42,0$  ppm, este sinal com maior intensidade é característico do grupo *N,N*-dimetil (**C-23,23'**), assim como o apresentado no experimento de  $^{13}\text{C}$  para os compostos *N,N*-(Me) $_2$ -L-Phe-D-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (**64b**) (Figura 22).

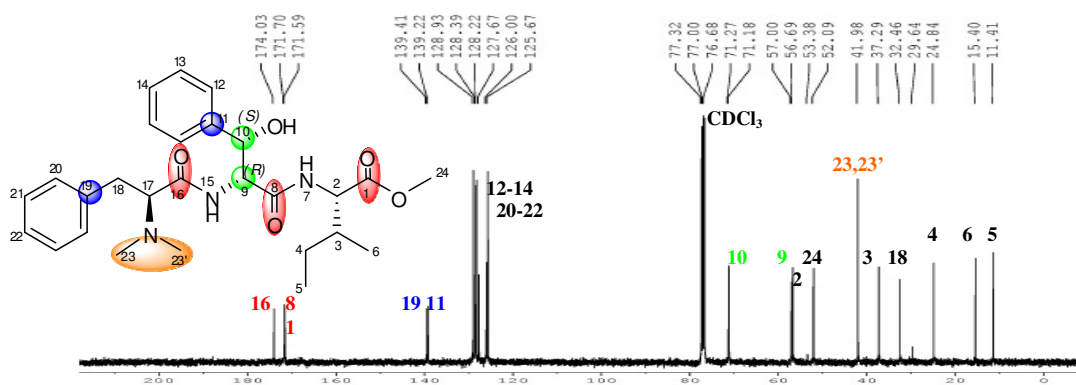
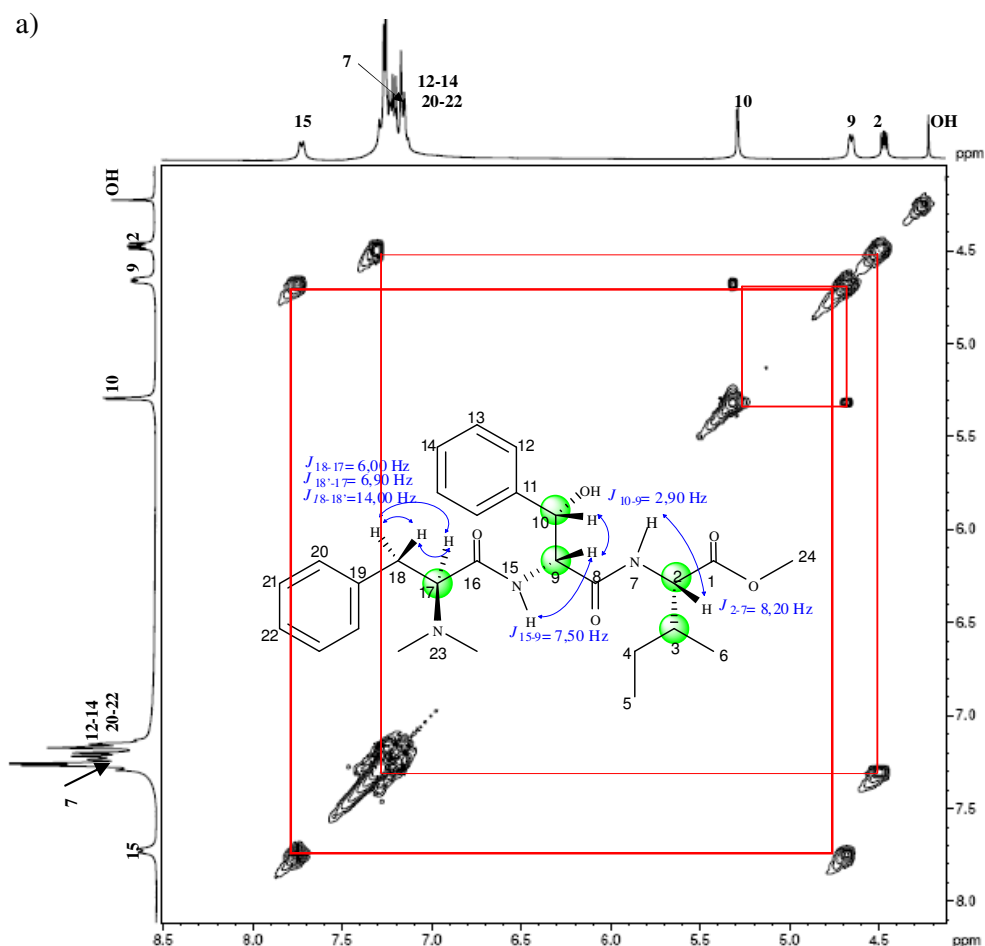
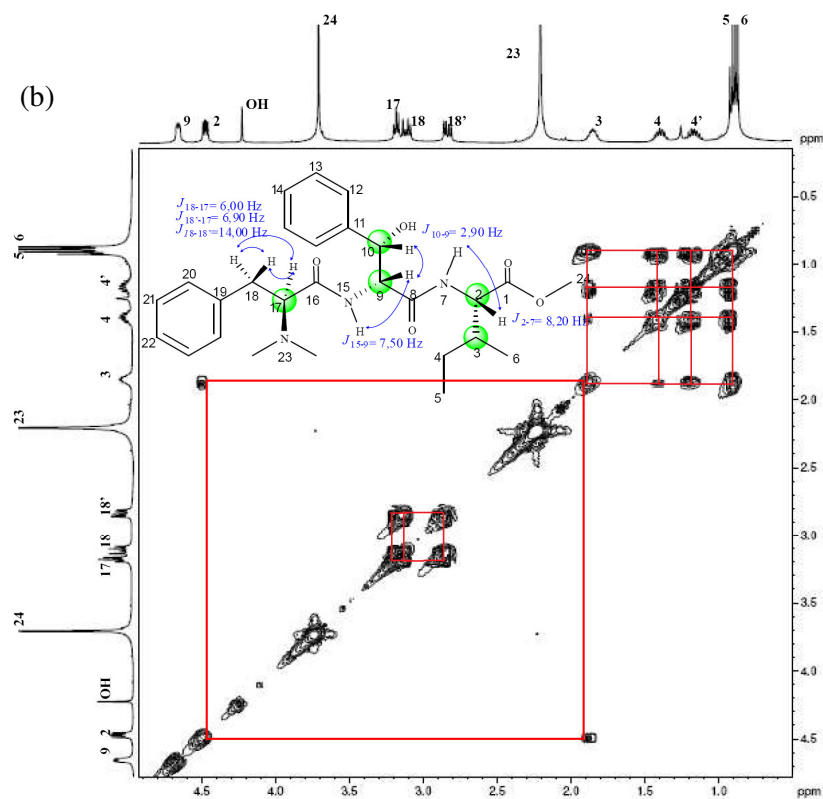


Figura 22: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para o composto **64b**, em  $\text{CDCl}_3$  a 298K.

No espectro de COSY 45 deste mesmo tripeptídeo dimetilado **64b**, (Figura 23), pode-se observar os três sistemas de “spins” característicos dos aminoácidos formadores da estrutura, destacando-se os sistemas da L-fenilalanina dimetilada (terminal) e da  $\beta$ -fenilserina (central), pelos quais, confirma-se a atribuição do hidrogênio amídico NH-15  $\delta$  7,73 ppm, pois este possui correlação com o hidrogênio metínico CH-9  $\delta$  4,66 ppm, o qual por sua vez tem correlação com o duplete do CH-10 que se encontra a  $\delta$  5,29 ppm. Já no sistema de “spins” da fenilalanina tem-se a correlação do CH-17 ( $\delta$  3,17 ppm) com os duplo dupletos em  $\delta$  3,12 e 2,83 ppm pertencentes ao grupo metilênico CH<sub>2</sub>-18.

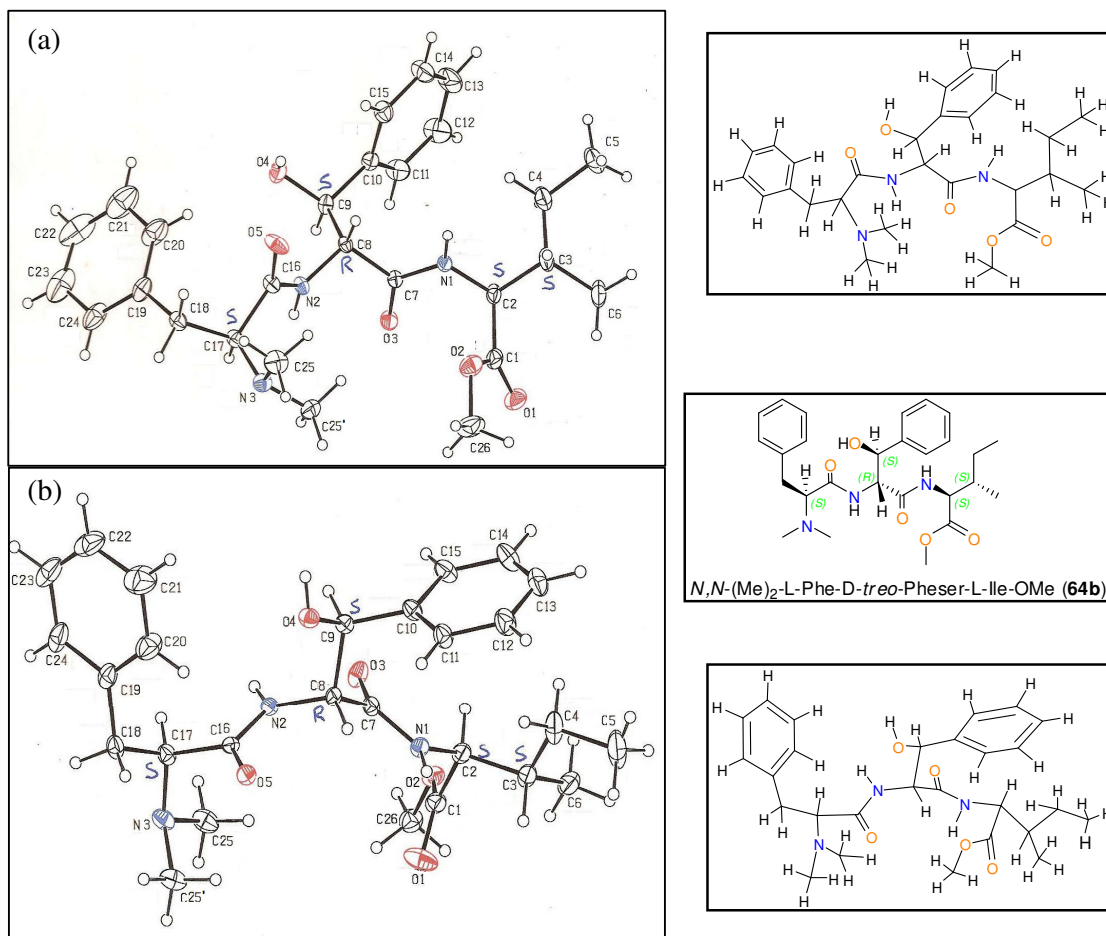




**Figura 23:** Ampliações do mapa de contornos de RMN 2D ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 45, 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) das regiões de (a)  $\delta$  4,5 a 8,5 ppm e (b)  $\delta$  0,5 a 4,5 ppm, para o composto **64b**.

Nos espectros de HMQC e HMBC (Figuras A22 e A23, em anexo nas págs.137 e 138) tem-se além da confirmação dos hidrogênios diastereotópicos, descrita anteriormente, a correta atribuição dos sinais de  $^{13}\text{C}$  (pelo experimento de RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC), mas principalmente dos sinais referentes às carbonilas **C-1**, **C-8**, **C-16** pelas suas correlações a longas distâncias via  $^2\text{J}_{\text{C-H}}$  e  $^3\text{J}_{\text{C-H}}$  no experimento HMBC.

Mesmo com a completa caracterização dos compostos realizada por espectroscopia de RMN, foi possível também, para o tripeptídeo **64b**, confirmar sua estereoquímica pelo experimento de difração de raios-X do monocristal (Figura 24) através da qual foi possível visualizar que a molécula mesmo em sua forma cristalina adota duas conformações, fato que não havia sido detectado pelos experimentos de RMN.



**Figura 24:** Estruturas obtidas por difração de raios-X do monocristal do tripeptídeo **64b**, com as duas conformações adotadas pela molécula no estado cristalino.

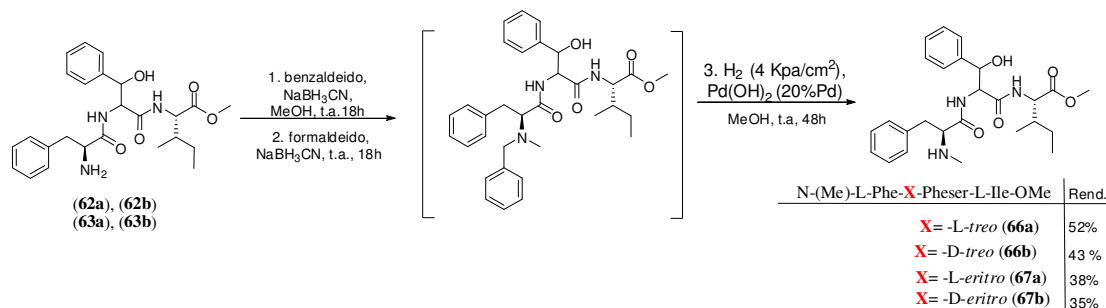
### 3.2.8 - Reações de *N*-Monometilação dos tripeptídeos

Das várias metodologias existentes para a *N*-alquilação de aminoácidos e peptídeos,<sup>76</sup> poucas são adequadas à obtenção de produtos *N*-monometilados principalmente a partir de peptídeos com funções amino totalmente livres como no caso dos tripeptídeos **62-63**. Assim a metodologia descrita por Konopelski e Withe<sup>77</sup> pela qual aminoácidos podem ser *N*-metilados por meio de uma condensação reductiva dos compostos em dois estágios, utilizando-se em um primeiro momento um equivalente do aldeído benzóico que após a formação e redução da base de Schiff com o agente redutor NaBH<sub>3</sub>CN, tem-se a formação do composto *N*-benzilado (grupo protetor). Este composto agora funciona como uma amina

76 Aurelio, L.; Brownlee, R. T. C.; Hughes, A. B.; *Chem. Rev.*, **2004**, 104, 5823.

77 Withe, K. N.; Konopelski, J. P.; *Org. Lett.*, **2005**, 7, 4111.

secundária que pode ser novamente condensada com um equivalente de aldeído fórmico seguido de redução com o mesmo tipo de agente redutor formando o intermediário *N*-benzil-*N*-monometilado que após desproteção do grupo benzil leva ao produto *N*-monometilado (Esquema 23).



**Esquema 23:** Esquema geral da obtenção dos tripeptídeos *N*-monometilados.

Seguindo a metodologia geral demonstrada, e acompanhando as reações por CCD (eluídas em éter di-isopropílico/MeOH à 1%), o produto reacional apresenta-se como uma mancha homogênea que revela fracamente com o reagente modificado de Dragendorff, sendo o término destas determinado pelo consumo do material de partida. Contudo, para o diastereoisômero *D-treo* a reação não foi completa, mesmo após várias horas de reação, recuperando-se parte do composto inicial, de maneira que após os procedimentos de extração e purificação por CC obteve-se os tripeptídeos *N*-monometilados (**66-67**) em rendimentos que variaram de 35 a 52%. Estes novos derivados tiveram suas estruturas caracterizados por espectroscopia de RMN monodimensional ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135) e bidimensional (COSY 45, HSQC, HMBC e NOESY), CLAE-DAD e CLAE-EM, como os apresentados a título de exemplificação para o composto **66b**.

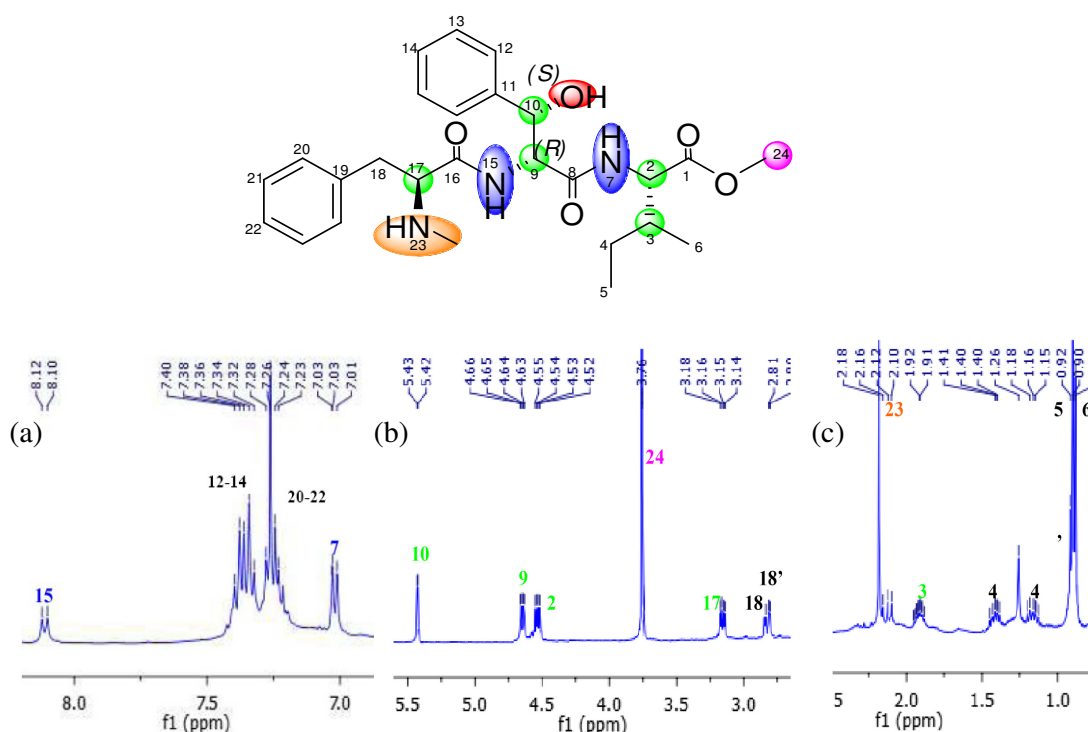
Pela análise por espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  dos tripeptídeos monometilados **66-67** observou-se alguns sinais característicos destas moléculas, assim como seus precursores desprotegidos **62-63** e seus análogos dimetilados **64-65**.

Como principal diferença, quando comparado aos compostos dimetilados, estes apresentam os sinais na forma de singletos, característicos do grupo *N*-metil ( $\text{N-CH}_3$ -23) em  $\delta \approx 2,18$  ppm, com área de integração para três hidrogênios. Além destes, outros sinais como os apresentados a título de exemplo nas ampliações do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto *N*-(Me)-L-Phe-*D-treo*-Pheser-L-Ile-OMe (**66b**) (Figura 25), onde observa-se um sinal na forma de um dubleto em  $\delta 8,11$  ppm com área de integração para 1 hidrogênio referente a amida



**NH-15.** Na região compreendida entre os valores de  $\delta$  7,12 e 7,42 ppm, temos vários sinais sobrepostos, mas com integração para dez hidrogênios aromáticos.

Seguindo em direção a campo alto, encontramos os demais sinais, como os singletos dos hidrogênios metílicos ( $\text{OCH}_3$ -24), em  $\delta$  3,76 ppm e ( $\text{NHCH}_3$ -23) a  $\delta$  2,18 ppm, bem como os sinais dos hidrogênios **CH-10** e **CH-9** pertencentes ao aminoácido central da unidade  $\beta$ -fenilserina cujos valores podem ser vistos na Tabela 3 de maneira a serem melhores comparados.



**Figura 25:** Ampliações do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) das regiões de (a)  $\delta$  7,0 a 8,2 ppm, (b)  $\delta$  2,5 a 5,5 ppm e (c)  $\delta$  0,5 a 2,5 ppm para o composto **66b**.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura A24 pág.139 anexos) observamos a presença de todos os carbonos referentes a esse composto, dos quais destacam-se os sinais em  $\delta$  175,1, 171,6 ppm e 171,3 ppm, referentes às respectivas carbonilas **C-1**, **C-8** e **C-16**. Já entre as regiões de  $\delta$  125,6 a 140,3 ppm, encontram-se os sinais dos carbonos aromáticos, e em  $\delta$  71,5; 57,6 ppm os sinais característicos dos carbonos **C-10**, **C-9**, respectivamente, e em deslocamento químico  $\delta$  33,3 ppm o pertencente ao grupo *N*-metil (**C-23**).

**Tabela 3:** Alguns dados de deslocamentos químicos e constantes de acoplamentos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ; da unidade central  $\beta$ -fenilserina para os tripeptídeos (**66a**, **66b**, **67a**, **67b**).

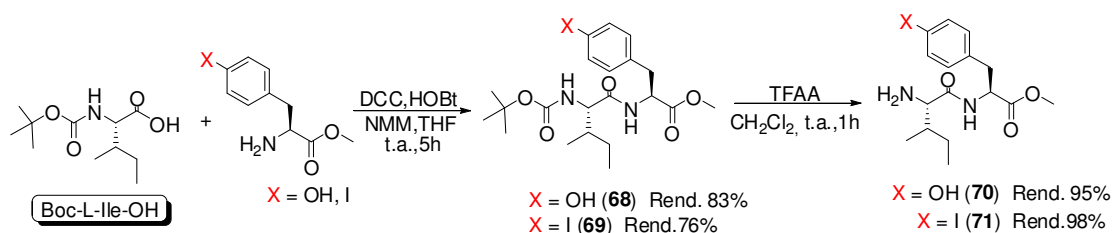
$\delta$ ppm ( $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ )	<i>treo</i> -L-Pheser ( <b>66a</b> )	<i>treo</i> -D-Pheser ( <b>66b</b> )	<i>eritro</i> -L-Pheser ( <b>67a</b> )	<i>eritro</i> -D-Pheser ( <b>67b</b> )
$\text{C}_9\text{H}-\alpha$	4,65 (dd, 1H); ( $J_{9-15}=8,0$ ;	4,64 (dd, 1H); ( $J_{9-15}=8,0$ ;	4,55 (dd, 1H); ( $J_{9-15}=7,70$ ;	4,86 (dd, 1H); ( $J_{9-15}=7,70$ ;
$\text{C}_{10}\text{H}-\beta$	$J_{9-10}=2,4$ Hz) 5,43 (d, 1H); ( $J_{10-9}=2,2$ Hz)	$J_{9-10}=2,2$ Hz) 5,39 (d, 1H); ( $J_{10-9}=1,3$ Hz)	$J_{9-10}=3,2$ Hz) 5,21 (d, 1H); ( $J_{10-9}=3,2$ Hz)	$J_{9-10}=2,0$ Hz) 5,32 (d, 1H); ( $J_{10-9}=2,0$ Hz)
$\text{C}_9-\alpha$	57,1	57,55	58,04	57,31
$\text{C}_{10}-\beta$	71,6	71,51	74,03	74,03
$\text{OCH}_3$	3,76 (s, 3H)	3,69 (s, 3H)	3,60 (s, 3H)	3,65 (s, 3H)

<sup>a</sup>Espectro obtido em  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz. <sup>b</sup>Espectro obtido em  $\text{CDCl}_3$  a 100 MHz.

### 3.2.9 - Preparação de Derivados Tetrapeptídicos.

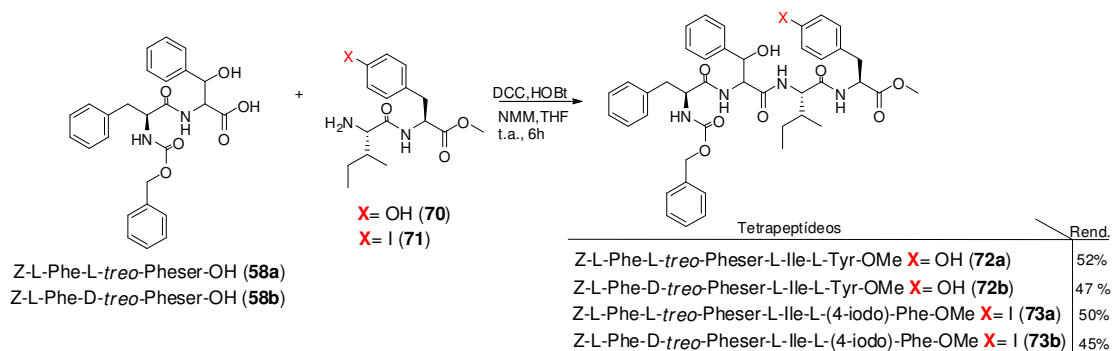
Em contribuição ao estudo de REA, planejado com os tripeptídeos precursores dos alcalóides, projetamos em contribuição a este, a construção por uma metodologia convergente de alguns tetrapeptídeos protegidos. Assim, realizou-se a obtenção dos derivados dipeptídicos (**68**) e (**69**), pelo acoplamento do aminoácido *N*-Boc-L-Isoleucina com os ésteres metílicos dos aminoácidos L-tirosina e L-(4-iodo)-fenilalanina pelo método da DCC/HOBt, os quais após purificação por CC ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  1%), deram os respectivos dipeptídeos em bons rendimentos (83 e 76%) e grau de pureza, com suas estruturas confirmados por espectroscopia RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ .

Estes dipeptídeos foram submetidos a uma reação de desproteção de suas funções amino, pelo tratamento com uma solução de ácido trifluor acético (40%) em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , sendo a desproteção considerada completa pelo desaparecimento das manchas referentes aos peptídeos de partida. Monitoramento por CCD, reveladas com a solução de ninidrina 1% em etanol, observou-se a formação dos respectivos dipeptídeos livres (**70**) e (**71**) (Esquema 24), de maneira quantitativa.



**Esquema 24:** Esquema geral da obtenção dos dipeptídeos (**70**) e (**71**).

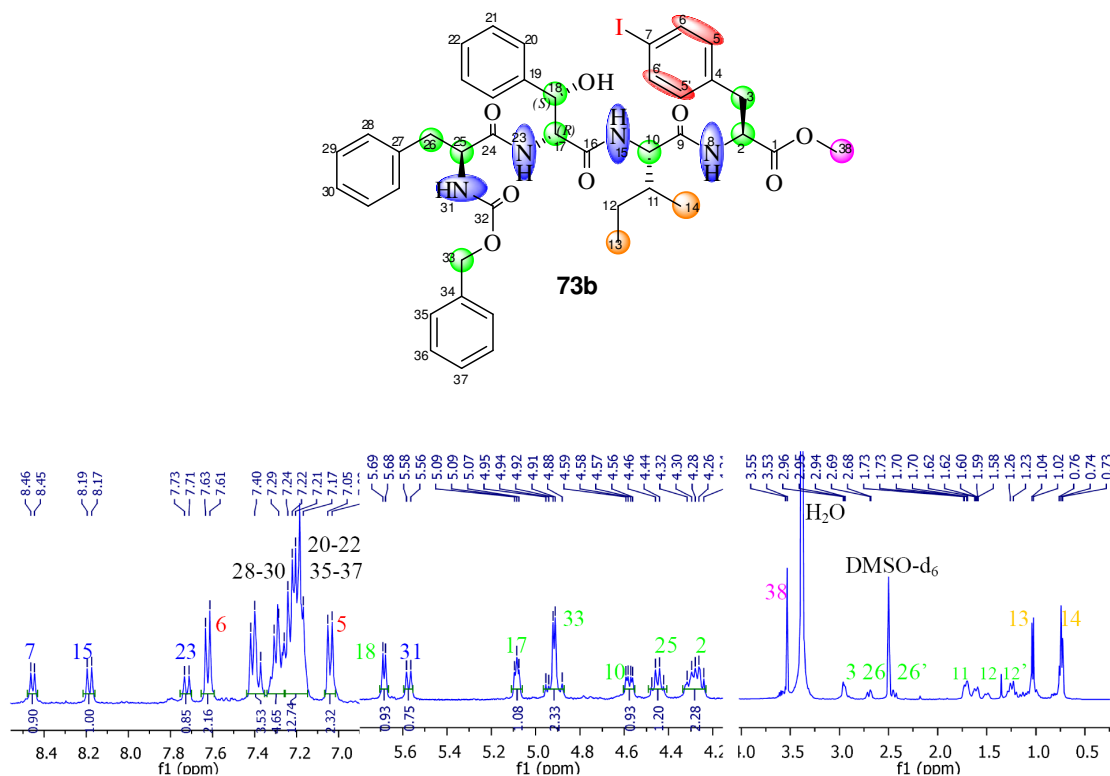
Com os respectivos dipeptídeos com suas funções aminos livres (**70**) e (**71**), e os dipeptídeos precursores (**58a**) e (**58b**) preparados anteriormente, com carboxilas terminais livres, realizou-se o acoplamento pela mesma metodologia (DCC/HOBt). Obteve-se os respectivos tetrapeptídeos (**72a**), (**72b**) e (**73a**), (**73b**), com rendimentos aproximados de 45 a 52% (Esquema 25).



**Esquema 25:** Reações para preparação dos tetrapeptídeos.

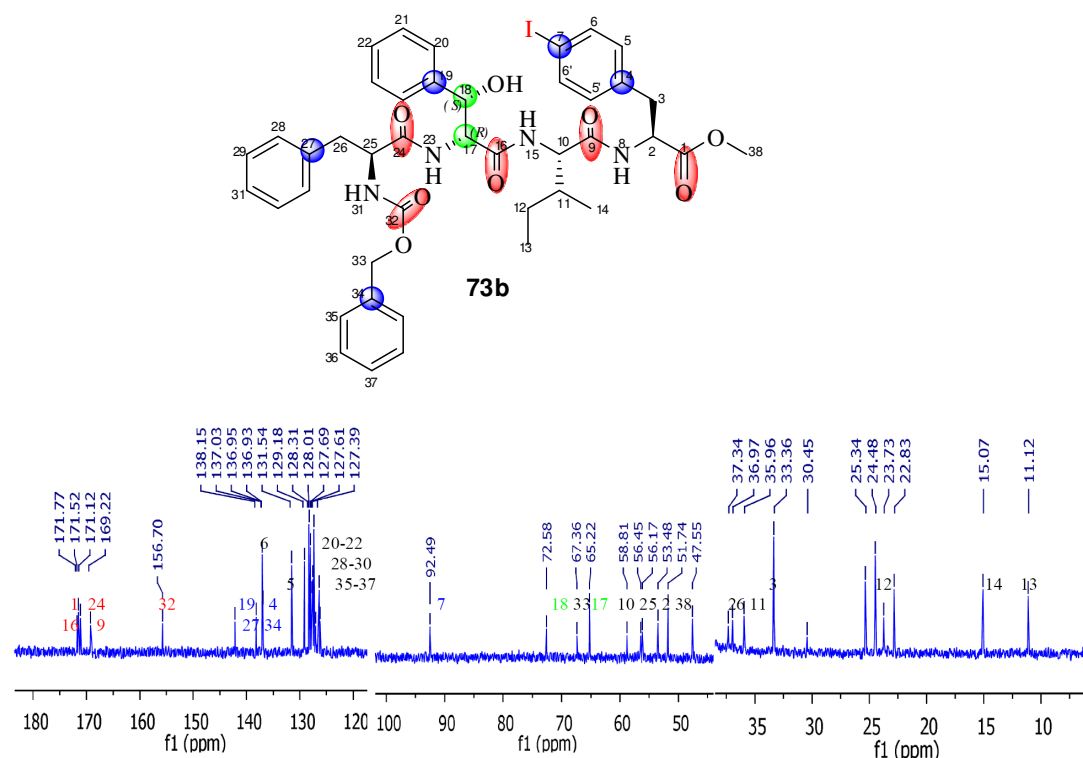
Estes tetrapeptídeos, após os procedimentos de extração das reações foram obtidos de forma pura por sucessivas precipitações com éter di-isopropílico e éter de petróleo (1:1). Pelas análises por espectroscopia de RMN os compostos tiveram suas estruturas confirmadas pela presença de alguns sinais como os apresentados a título de exemplo nas ampliações do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do tetrapeptídeo Z-L-Phe-D-*treo*-Pheser-L-Ile-L-(4-iodo)-Phe-OMe (**73b**) (Figura 26). Assim, pode-se observar os sinais na forma de dubletos em  $\delta = 8,45$ ,  $8,18$  ppm e  $\delta = 7,72$  ppm, com constantes de acoplamentos  $J_{8-2} = 7,20$  Hz,  $J_{15-10} = 8,80$  Hz e  $J_{23-17} = 9,20$  Hz respectivamente e com área de integração para um hidrogênio cada, referentes aos NH-8, NH-15 e NH-23 já em valores de  $\delta = 7,62$  e  $7,0$  ppm tem-se dois dubletos com integral para dois hidrogênios cada, com constante de acoplamento  $J_{5-6} = 8,0$  Hz, referentes aos hidrogênios aromáticos do aminoácido 4-iodo-L-fenilalanina. Além dos outros 15 hidrogênios aromáticos em  $\delta 7,40$  e  $7,17$  ppm, na região de  $\delta 5,68$  ppm temos um dubleto com constante de acoplamento de  $J_{18-17} = 4,0$  Hz referente ao CH-18, em  $\delta 5,09$  ppm um duplo dubleto com área de integração para um hidrogênio (CH-17) e em  $\delta 4,93$  ppm um dubleto com integração para dois hidrogênios referentes ao CH<sub>2</sub>-33.

Em campo alto encontramos os demais sinais, como o singlete dos hidrogênios metílicos ( $\text{OCH}_3$ -38) em aproximadamente  $\delta$  3,53 ppm, o dubleto em  $\delta$  1,03 ppm e o triplete em  $\delta$  0,74 ppm, referentes aos grupos metilas ( $\text{CH}_3$ -13 e  $\text{CH}_3$ -14) respectivamente, pertencentes a unidade do aminoácido isoleucina.



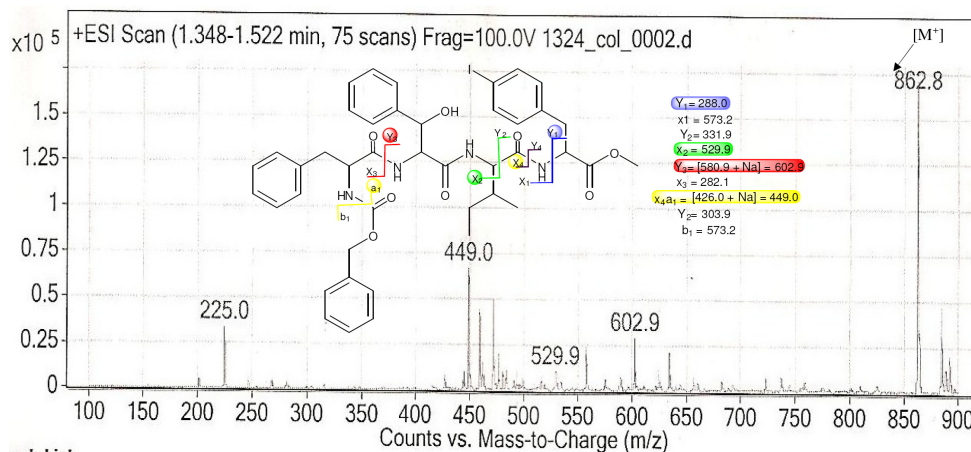
**Figura 26:** Ampliações do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do tetrapeptídeo Z-L-Phe-D-*treo*-Pheser-L-Ile-L-(4-iodo)-Phe-OMe (**73b**).

Pela análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , como exemplo do tetrapeptídeo (**73b**) pode-se visualizar alguns sinais que comprovam a formação dos tetrapeptídeos, assim como os visualizados nas ampliações (Figura 27), onde além da presença dos sinais característicos como as quatro carbonilas de amídicas C-1, C-8, C-15 e C-23 em  $\delta$  de 171,7; 171,5; 171,1 e 169,2 ppm respectivamente. Já entre as regiões de  $\delta$  142,1 a 126,2 ppm tem-se todos os sinais dos carbonos aromáticos, e em  $\delta$  = 92,5 ppm encontra-se o carbono C-7 (campo alto devido ao efeito de blindagem exercido pelo átomo de iodo), confirmando que este átomo permanece ligado a estrutura.



**Figura 27:** Ampliações do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do tetrapeptídeo Z-L-Phe-D-treo-Phe-L-Ile-L-(4-iodo)-Phe-OMe (**73b**).

Pela análise do espectro de massas ESI (Figura 28), desse composto, além do íon molecular a  $m/z$  862.2 Da  $[\text{M}^+]$  que está de acordo com a fórmula química  $\text{C}_{42}\text{H}_{47}\text{IN}_4\text{O}_8$ , visualiza-se alguns outros fragmentos característicos dos aminoácidos que compõe a estrutura deste tetrapeptídeo, como os  $[\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{IN}_3\text{O}_5]^{\bullet+\text{Na}}$   $m/z = 602,9$ ,  $[\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_5]^{\bullet}$   $m/z = 529$  entre outros.



**Figura 28:** Espectro de ESI-EM para o tetrapeptídeo Z-L-Phe-D-treo-Phe-L-Ile-L-(4-iodo)-Phe-OMe (**73b**).

### 3.3.- Estudo da Reação de Inserção da Unidade Alquil-Aril Éter

Como apontado na revisão da literatura, a construção da ligação alquil-aril éter é uma das principais etapas na construção destas moléculas, e consiste de um processo delicado que envolve metodologias e condições especiais de reação. Assim da variedade de métodos encontrados na literatura para construção desta ligação, decidiu-se por realizar um pequeno estudo no emprego destas condições de reação, para a construção desta unidade com o  $\beta$ -OH-aminoácido  $\beta$ -fenilserina presente nas estruturas dos peptídeos sintetizados, visto que a literatura se faz escassa em relatos da construção desta ligação com esta unidade.

Para este estudo da formação da ligação alquil-aril éter foram selecionados as seguintes metodologias:

- A formação da ligação via uma reação do tipo substituição nucleofílica aromática ( $S_NAR$ ) pela reação do álcool com *p*-nitro-benzonitrila.
- Pelo emprego da metodologia de Mitsunobu<sup>78</sup>, através de uma reação de substituição nucleofílica do álcool com o 4-hidroxi-benzaldeído (procedimento que ocorre com inversão da configuração).
- Por uma reação de acoplamento do tipo Ullmann, onde um derivado haleto de arila reage com o respectivo álcool por meio de uma reação catalisada por sais de cobre.

#### 3.3.1- Inserção da Unidade Alquil-Aril Éter por reação de $S_NAR$

Em um primeiro momento, nossos esforços sintéticos no estudo da construção da ligação alquil-aril éter deu-se pelo emprego da metodologia de substituição nucleofílica aromática ( $S_NAR$ ) baseando-se nos estudos desenvolvidos por Han e col.<sup>23</sup> na síntese da C<sub>3</sub>-*epi*-mauritina D (pág.14, revisão da literatura), onde a formação da ligação alquil-aril éter procedeu com excelente rendimento, pelo emprego do reagente (*p*-NO<sub>2</sub>-Ph-CN) e um derivado da  $\beta$ -hidroxi-prolina. Deste modo selecionou-se uma série de derivados da  $\beta$ -fenilserina e precursores peptídicos contendo esta unidade (Tabela 4) para a realização do estudo desta reação sob as condições descritas na literatura.

78 Mitsunobu, O.; *Synthesis*, **1981**, 1-28.

**Tabela 4.** Condições das tentativas de reações para formação da ligação alquil-aryl éter pela metodologia de S<sub>N</sub>AR.

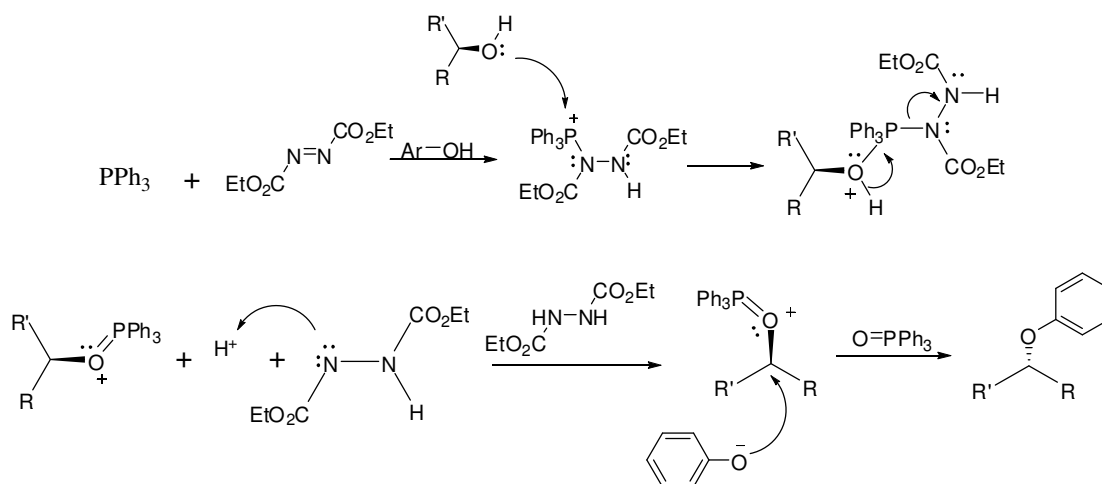
Reagente A	Reagente B	Condições	Proporção (A:B)	Resultado*
 D,L-treo-Pheser-OMe (54)	Y = CN	NaH, THF, -30°C, 12h NaH, DMF, t.a., 24h	(1:1) (1:1,5)	n.r. n.r.
	Y = CO <sub>2</sub> Me	NaH, DMF, 0°C, 24h	(1:1,5)	n.r.
	 Z-D,L-treo-Pheser-OMe	Y = CN	NaH, THF, -30°C, 12h	(1:1)
Y = CO <sub>2</sub> Me		NaH, THF, t.a., 48h	(1:1,5)	n.r.
 Z-L-Phe-D,L-treo-Pheser-OMe (56)		Y = CN	NaH, THF, -30°C, 12h NaH, DMF, t.a., 24h	(1:1) (1:1,5)
	Y = CO <sub>2</sub> Me	NaH, THF, 0°C, 24h	(1:1,5)	n.r.
	 Z-L-Phe-L-treo-Pheser-L-Ile-OMe (60a)	Y = CN	NaH, THF, -30°C, 12h NaH, DMF, t.a., 24h	(1:1) (1:1,5)
Y = CO <sub>2</sub> Me		NaH, THF, 0°C, 24h	(1:1,5)	n.r.

\*(onde n.r. = não reagiu, degradação por oxidações ou o produto não pode ser isolado).

Os resultados destas reações, após as etapas de extração e purificação, as quais se mostram como misturas complexas e de difícil identificação dos produtos, nos levam a supor que: ou os produtos reacionais esperados se formam, mas são muito instáveis às condições de trabalho, ou os reagentes testados até então não foram os mais adequados.

### 3.3.2- Inserção da Unidade Alquil-Aril Éter Metodologia de Mitsunobu

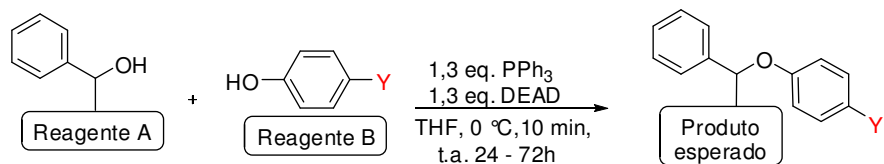
Devido não ter formado a ligação aril-álcool pela metodologia de  $S_NAr$ , optou-se por testar a metodologia de Mitsunobu,<sup>78</sup> a qual possibilita a conversão de álcoois primários e secundários a ésteres, éteres fenílicos, tioéteres entre outros compostos. Nesta reação a trifenilfosfina combinada com o dietilazodicarboxilato (DEAD) gera o intermediário fosfônio que se liga ao oxigênio do álcool, ativando esse como um bom grupo de saída que pode ser substituído pelo nucleófilo completando o processo reacional, com inversão da configuração (Esquema 26).



**Esquema 26:** Mecanismo da reação de Mitsunobu.

Assim, como realizado anteriormente para a  $S_NAr$ , selecionou-se uma série de derivados da  $\beta$ -fenilserina e precursores peptídicos contendo esta unidade (Tabela 5) para a avaliação da reação de Mitsunobu na construção da ligação aril-álcool destes compostos.



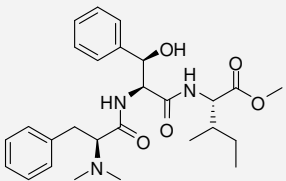
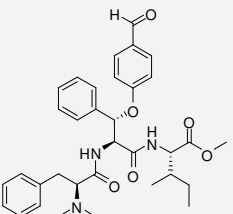
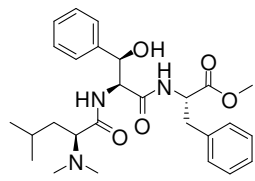
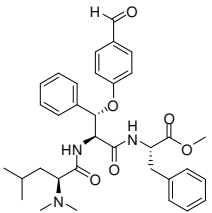
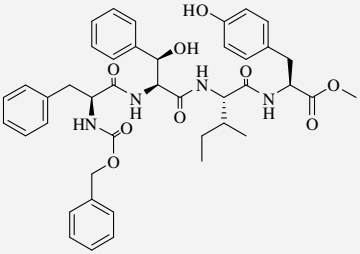
**Tabela 5.** Condição reacional testada na formação da ligação alquil-aryl éter pela metodologia de Mitsunobu.

Reação	Reagente A	Reagente B	Resultado	Tempo (h)	Rend.*
1	 D,L- <i>treo</i> -Pheser-OMe ( <b>54</b> )	Y = CHO	n.r.	72	-
2	 D,L- <i>eritro</i> -Pheser-OMe ( <b>55</b> )	Y = CHO	n.r.	48	-
3	 Z-D,L- <i>treo</i> -Pheser-OMe	Y = CHO	 Z-dehidro-Phe-OMe	24	60%

Continuação da Tabela 5.

4	<p>Z-L-Phe-D,L-treo-Pheser-OMe (<b>56</b>)</p>	Y = CHO	<p>Z-L-Phe-dihidro-Phe-OMe</p>	36	35%	
		Y = CH=CH <sub>2</sub>		48	23%	
		Y =		n.r.	72	-
5	<p>Z-L-Phe-L-treo-Pheser-L-Ile-OMe (<b>60a</b>)</p>	Y = CHO		n.r.	72	-
		Y = CH=CH <sub>2</sub>		n.r.	72	-

## Continuação da Tabela 5.

<p>6</p>  <p><i>N,N</i>-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-L-<i>treo</i>-Pheser-L-Ile-OMe (<b>64a</b>)</p>	<p>Y = CHO</p>	 <p><i>N,N</i>-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-L-<i>eritro</i>-Pheser(OPhCHO)-L-Ile-OMe</p>	<p>56</p>	<p>&lt;1%</p>
<p>7</p>  <p><i>N,N</i>-(Me)<sub>2</sub>-L-Leu-L-<i>treo</i>-Pheser-L-Phe-OMe ‡</p>	<p>Y = CHO</p>	 <p><i>N,N</i>-(Me)<sub>2</sub>-L-Leu-L-<i>eritro</i>-Pheser(OPhCHO)-L-Phe-OMe ‡</p>	<p>48</p>	<p>30%</p>
<p>8</p>  <p>Z-L-Phe-L-<i>treo</i>-Pheser-L-Ile-L-Tyr-OMe (<b>72a</b>)</p>	<p>-</p>	<p>n.r.</p>	<p>72</p>	<p>-</p>

\*(onde n.r. = não ocorreu reação ou produtos não indentificados, ‡ = reação repetida da literatura)

Como demonstrado (Tabela 5), as tentativas de inserção da ligação alquil-aril éter por meio da metodologia de Mitsunobu, não foram bem sucedidas, pois tanto para os derivados do aminoácido  $\beta$ -fenilserina, quanto para os precursores dipeptídicos e tripeptídicos protegidos, não houve a formação dos produtos esperados e em muitos casos simplesmente não ocorreu a reação. Estes resultados podem ser atribuídos aos materiais de partida possuírem uma alta acidez no hidrogênio alfa à função éster, o que estaria favorecendo a formação de produtos de eliminação.

A literatura<sup>79</sup> descreve a formação de compostos aziridínicos para substratos semelhantes aos investigados nas reações 1 e 2 deste trabalho, onde a estereoquímica parece ser um fator relevante para a obtenção desta classe de compostos.

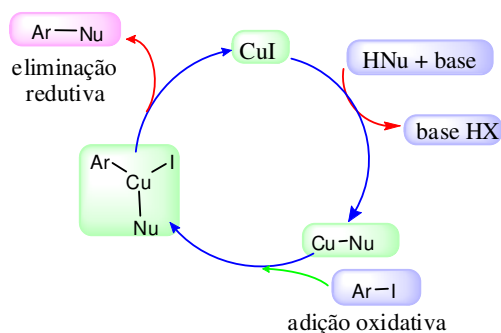
Outro fator importante observado nestes experimentos é a comparação dos rendimentos (<1% e 30%) das reações (6 e 7 da Tabela 5), onde aparentemente pode notar um efeito de impedimento estérico causado pelo aminoácido básico terminal *N,N*-dimetil-L-fenilalanina presente na estrutura do tripeptídeo **64a**. Este fato não é observado quando a unidade *N,N*-dimetil-L-leucina (reação 7). Além disso, cabe ressaltar ainda, que nas condições testadas, a metodologia de Mitsunobu não foi eficaz para a formação da ligação alquil aril-éter de maneira intramolecular (reação 8) com o tetrapeptídeo **72a**.

### 3.3.3- Inserção da Unidade Alquil-Aril Éter pela Metodologia de Ullmann

Outra metodologia empregada neste estudo da construção da ligação alquil-aril éter, é a da condensação de Ullmann, que basicamente inclui reações de adição oxidativas e eliminação reductiva catalisadas por sais de cobre. Nesta metodologia, nucleófilos podem ser condensados com haletos de arila, através de um ciclo catalítico no qual o cobre passa por um intermediário de estado de oxidação (III) (Esquema 27), sendo comum o seu emprego na síntese dos éteres de Ullmann.<sup>80</sup>

79 Olofsson, B.; Wijnmans, R.; Somfai, P.; *Tetrahedron*, **2002**, 58, 5979.

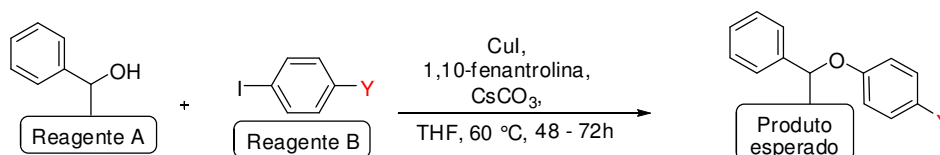
80 Altman, R. A.; Shafir, A.; Lichtor, P. A.; Buchwald, S. L.; *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 284.



**Esquema 27:** Mecanismo da reação de Ullmann.

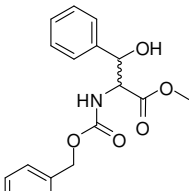
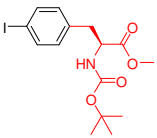
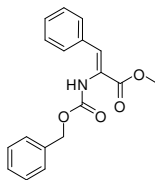
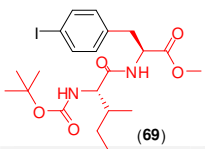
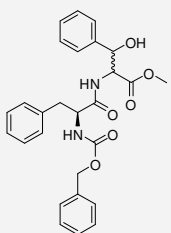
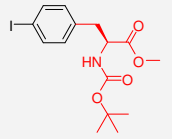
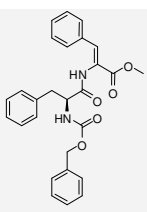
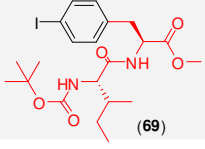
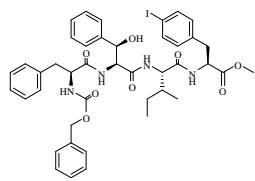
Assim, baseando-se na metodologia desenvolvida por Evano e col.<sup>28</sup> selecionou-se uma série de derivados da  $\beta$ -fenilserina e precursores peptídicos contendo esta unidade para serem avaliados na reação de construção da ligação aril-álcool éter pelo acoplamento com derivados do aminoácido L-(4-iodo)-fenilalanina (Tabela 6).

**Tabela 6.** Condições das tentativas de reações para formação da ligação álcool-áril éter pela metodologia de Ullmann.



Reação	Reagente A	Reagente B	Resultado	Tempo (h)	Rend.*
1			n.r.	48	—
2	D,L- <i>treo</i> -Phe-ser-OMe ( <b>54</b> )		n.r.	72	—

Continuação da Tabela 6.

3				72	45
4	Z-D,L-treo-Pheser-OMe		n.r.	56	—
5				56	37
6	Z-L-Phe-D,L-treo-Pheser-OMe (56)		n.r.	48	—
7		—	n.r.	72	—

Z-L-Phe-L-treo-Pheser-L-Ile-L-(4-iodo)-Phe-OMe (73a)

\*onde nr = não ocorreu reação, degradação ou produtos não identificados.

De modo geral, as tentativas de síntese dos compostos com a ligação alquil-aril éter pela metodologia de Ullmann apresentadas na Tabela 6, estão de acordo com os experimentos realizados por Evano e col.,<sup>81</sup> contudo não foi possível a partir dos precursores empregados neste estudo obter os produtos desejados.

Porém, baseando-se nestes resultados, podem-se fazer algumas associações entre produtos obtidos pelas condições empregadas nas metodologias descritas anteriormente, como a formação do dehidrocomposto derivado do  $\beta$ -OH-aminoácido protegido (reações 3 e 5, Tabela 6), obtido pelas três metodologias empregadas, fato que pode ser associado a elevada acidez do hidrogênio  $\alpha$  deste aminoácido, ou ainda a não ocorrência das reações que pode na verdade ser decorrente da degradação dos produtos formados, devido sua instabilidade as condições de trabalho.

81 Toumi, M.; Rincheval, V.; Young, A.; Gergeres, D.; Turos, E.; Couty, F.; Mignotte, B.; Evano, G., *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, 20, 3368.

A ciclização dos intermediários tetrapeptídicos pela formação de uma nova ligação alquil-aril éter (reação 7 da Tabela 6) por meio de reações intramoleculares [unindo-se as duas etapas chaves e críticas à formação destes macrociclos (macrociclização e formação da ligação alquil-aril éter) em uma única etapa], mesmo que não tenha ocorrido com sucesso neste experimento, parece ser um procedimento viável e requer mais estudos, já que é análogo aos descritos na literatura.<sup>22</sup>

### 3.4 - Resultados das Análises de Atividades Biológicas

#### 3.4.1 - Testes da Atividade Antimicrobiana

Peptídeos contendo aminoácidos não proteínogênicos, como a  $\beta$ -fenilserina, são conhecidos por possuírem várias atividades biológicas,<sup>82</sup> incluindo atividades antimicrobianas de modo que em conjunto com o fato do crescente aumento no número de bactérias resistentes aos tradicionais agentes antimicrobianos e ao declínio na descoberta de novas moléculas com expressivas atividades antimicrobiais (somente cinco aprovadas para usos clínicos nos EUA, entre 2003 e 2007),<sup>83</sup> de maneira que se torna interessante a análise dos compostos aqui obtidos para as atividades antimicrobianas.

Em atenção a estes fatos, e como um dos objetivos pré-dispostos deste trabalho, decidiu-se por avaliar as atividades antimicrobianas dos peptídeos sintetizados frente a uma coleção de microrganismos patogênicos, a fim de construir um modelo para explicar as possíveis atividades, bem como estabelecer um padrão no estudo de REA. Deste modo, para a análise das atividades antimicrobianas dos compostos, selecionou-se o método da microdiluição, pois este permite a obtenção de resultados quantitativos, indicando a concentração necessária de uma determinada substância para inibir (ou inviabilizar) os microrganismos.

A coleção de microrganismos usada para o teste, esta composta de duas bactérias Gram-positivas [*Staphylococcus aureus* - *S. aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* - *S. epidermidis* (ATCC 12228)] e três bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* - *E. coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* - *P. aeruginosa* (ATCC 9027), *Klebsiella pneumoniae* - *K. pneumoniae* (ATCC 13883)] e dois fungos [*Sacharomyces cerevisiae* - *S. cerevisiae* (ATCC 2601), *Candida albicans* - *C. albicans* (ATCC 10231)] com os quais se determinou as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e as concentrações letais mínimas (CLM),<sup>84</sup> pela

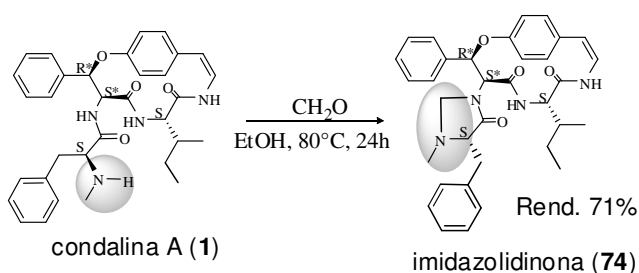
82 Tone, H.; Buchotte, M.; Mordant, C.; Guittet, E.; Ayad, T.; Ratovelomanana-Vidal, V.; *Org. Lett.*, **2009**, 11, 1995.

83 Moellering, J. R. C.; *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2010, 37, 2.

84 Hammer, K. A.; Carson, C.F.; Riley, T.V.; *J. Appl. Microb.*, **1999**, 86, 985.

visualização das zonas de inibição, tendo como controle os antibióticos padrões cloranfenicol e nistatina.

Tendo selecionado o método a ser utilizado, nosso primeiro ensaio foi para determinar a atividade antimicrobiana dos produtos naturais, alcalóides ciclopeptídicos condalina- A (**1**), scutianiana- M (**2**), adouetina-Y (**3**) (já que estes haviam sido testados anteriormente somente pelo método de bioautografia), e em conjunto a estes um derivado semi-sintético imidazolidinona (**74**), preparada pela reação do alcalóide condalina- A (**1**) com o aldeído fórmico, onde primeiramente tem-se a formação da imina e sua posterior ciclização intramolecular (Esquema 28).



**Esquema 28:** Reação de formação da imidazolidinona (**74**).

Dos alcalóides naturais, apenas o alcalóide **1** e seu derivado **74** apresentaram significativas atividades antimicrobianas (Tabela 7, 1 e 4, pág. 70), sendo o produto natural (alcalóide **1**), mais ativo pois apresenta atividade antimicrobiana com CIM de 25 µg/mL para as bactérias *S. epidermidis* e *K. pneumoniae* e CIM de 50 µg/mL contra *P. aeruginosa*, enquanto que o derivado **74**, apresenta atividade de apenas de CIM de 50 µg/mL para a bactéria *S. epidermidis*. Interessante foi a atividade observada para os fungos *S. cerevisiae* e *C. albicans* (50 µg/mL cada), não observada para os alcalóides. Este resultado mostra que a função NH(Me) é expressiva para a atividade frente a bactérias, e que o novo anel heterociclo formado foi importante para a atividade antifúngica.

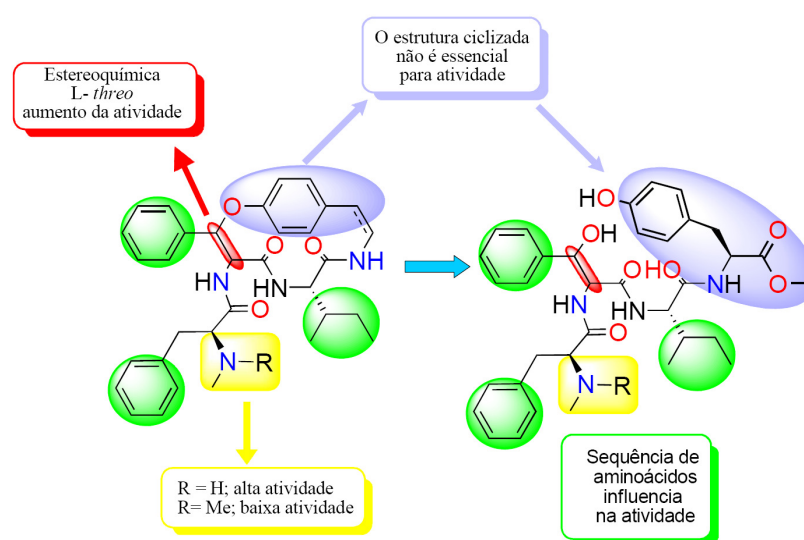
Com o propósito especificado anteriormente (avaliação da REA), todos os peptídeos sintetizados neste trabalho foram avaliados por um pré-ensaio de atividade antimicrobiana pelo método de bioautografia, sendo então submetidos à análise pelo método da microdiluição somente os compostos ativos e com a estrutura tripeptídica precursora dos alcalóides naturais (Tabela 7, 5-16, pág. 70).

Pela análise dos resultados das atividades antimicrobiana destes compostos, o tripeptídeo *N*-(Me)-L-Phe-L-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (**66a**) precursor do alcalóide



condalina-A, apresentou atividade antimicrobiana com CIM de 25  $\mu\text{g/mL}$  para as bactérias *S. epidermidis* e *K. pneumoniae* e CIM de 50  $\mu\text{g/mL}$  contra *P. aeruginosa* e de 50  $\mu\text{g/mL}$  para os fungos *S. cerevisiae* e *C. albicans*, enquanto que seu estereoisômero *N*-(Me)-L-Phe-D-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (**66b**) só apresentou atividade de 50  $\mu\text{g/mL}$  para a bactéria *S. epidermidis* e para os fungos *S. cerevisiae* e *C. albicans*, interessadamente os compostos *N,N*-dimetilados (**64-65**) (5-8 da Tabela 7) não apresentam atividades assim como os *N*-monometilados de configuração *eritro* **67a** e **67b** (11-12, Tabela 7). Dados estes que fornecem fortes evidências que as atividades destas moléculas estão diretamente ligada a estereoquímica das mesmas, bem como a existência da unidade básica terminal com função amino *N*-Metilada é um fator crucial nestas atividades investigadas.

Pela análise das atividades dos precursores tetrapeptídicos (**72-73**) (13-16, Tabela 7) observa-se novamente a influência da estereoquímica na atividade, pois os compostos mais ativos **72a** e **73a** possuem o  $\beta$ -OH-aminoácido na configuração *L-treo*, destacando-se entre estes o tetrapeptídeo *Z*-L-Phe-L-*treo*-Pheser-L-Ile-L-(4-iodo)-Phe-OMe (**73a**) com atividades de CIM de 50  $\mu\text{g/mL}$  para as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *K. pneumoniae* e CIM de até 25  $\mu\text{g/mL}$  para os fungos *C. albicans* e *S. cerevisiae*, esta pronunciada atividade de **73a** em relação a **72a** fornece indícios do efeito do átomo de iodo na molécula. Assim, pelas análises realizadas resumidamente se estabeleceu alguns requisitos estruturais, observados para a atividade antimicrobiana destes alcalóides (Figura 29).



**Figura 29:** Requisitos estruturais observados para a atividade antimicrobiana.

**Tabela 7:** Atividades antimicrobianas pelo método da micro-diluição para algumas substâncias alvo do deste estudo.

Entrada	compostos	Atividade antimicrobiana ( $\mu\text{g/mL}$ )													
		<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>S. cerevisiae</i>		<i>C. albicans</i>	
		CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
1	Condalina-A (1)	100	>200	25	25	100	>200	50	100	25	50	50	200	50	200
2	Scutianina-M (2)	200	>200	200	>200	100	>200	100	200	100	>200	100	>200	100	>200
3	Adouetina-Y (3)	200	>200	200	>200	200	>200	200	>200	200	>200	200	>200	200	>200
4	Imidazolidinona (74)	100	>200	50	100	100	>200	100	>200	100	200	50	>200	50	>200
5	N(Me) <sub>2</sub> -L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (64a)	200	>200	200	>200	200	>200	200	>200	200	>200	NT	NT	100	>200
6	N(Me) <sub>2</sub> -L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (64b)	200	>200	100	>200	100	>200	100	>200	200	>200	NT	NT	100	>200
7	N(Me) <sub>2</sub> -L-Phe-L- <i>eritro</i> -Pheser-L-Ile-OMe (65a)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
8	N(Me) <sub>2</sub> -L-Phe-D- <i>eritro</i> -Pheser-L-Ile-OMe (65b)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9	N(Me)-L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (66a)	100	>200	25	25	100	>200	50	100	25	50	50	200	50	200
10	N(Me)-L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe (66b)	100	>200	50	100	100	>200	100	>200	100	200	50	>200	50	>200
11	N(Me)-L-Phe-L- <i>eritro</i> -Pheser-L-Ile-OMe (67a)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
12	N(Me)-L-Phe-D- <i>eritro</i> -Pheser-L-Ile-OMe (67b)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
13	Z-L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-L-Tyr-OMe (72a)	>100	>100	>100	>100	100	>100	>100	>100	>100	>100	50	100	50	>100
14	Z-L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-L-Tyr-OMe (72b)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
15	Z-L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-L-(4-iodo)-Phe-OMe (73a)	50	>100	50	100	50	>100	NT	NT	50	>100	25	50	25	50
16	Z-L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-L-(4-iodo)-Phe-OMe (73b)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

\*Onde: NT= não testado por este método, porque em uma triagem inicial a 200  $\mu\text{g/mL}$  não apresentaram atividade; NA = não ativo;  
 Antibióticos controles utilizados: Cloranfenicol (bactérias) e Nistatina (fungos)  
 Testes realizados em triplicata para minimizar possíveis erros

### 3.4.2 - Testes das Atividades Inibitórias de Enzimas Envolvidas no SNC

O crescente avanço das doenças degenerativas do sistema nervoso central (SNC)<sup>85</sup>, juntamente com o pouco conhecimento a respeito dos reais mecanismos de sua instalação vem despertando o interesse na descoberta de novas drogas e novos modos de ação para torná-las mais eficientes, possibilitando seu uso no tratamento destas doenças. Nesse contexto os peptídeos apresentam um grande potencial para este propósito e devido a este fato decidiu-se avaliar as atividades dos peptídeos sintetizados nesse trabalho, juntamente com outros do nosso banco de peptídeos sintéticos, frente a algumas enzimas envolvidas com estas doenças.

#### 3.4.2.1 - Teste da Atividade Inibitória de Enzima Acetilcolinesterase (AChE)

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima reguladora dos níveis do neurotransmissor colinérgico acetilcolina, e o aumento de sua atividade nos organismos está diretamente relacionado a enfermidades como a doença de Alzheimer's (DA), que só no ano de 2006 atingiu um número de 26,6 milhões de casos no mundo e estima-se que este número suba para 106,8 milhões até 2050.<sup>86</sup> Esta é uma doença neurológica degenerativa, caracterizada pela perda de memória e cognição devido a uma massiva perda de neurônios colinérgicos, por isso a maioria das estratégias de tratamento, deste declínio cognitivo em pacientes com a DA, envolve o aumento da transmissão colinérgica através da inibição da atividade da enzima AChE.<sup>87</sup>

Em contextualização a este problema, e em atenção a um dos objetivos deste trabalho, em um primeiro momento realizou-se um pré-ensaio para avaliar uma possível atividade inibitória da AChE pelos alcalóides ciclopeptídicos condalina-A (**1**), adouetina-X (**40**) e frangulanina (**15**) conforme a Tabela 8, pág.72 (estes metabólitos foram selecionados puramente por sua disponibilidade no grupo), este ensaio foi realizado usando o método colorimétrico de Ellman's com a enzima extraída do estriado do cérebro de ratos.

Pela análise dos resultados destas atividades, nota-se que o alcalóide **40** apresenta uma inibição de 96% de maneira dose dependente, a uma concentração de 250  $\mu\text{M}$  enquanto que para a o alcalóide **15** a porcentagem de inibição é de apenas 55% e permanece constante independente das concentrações utilizadas, já o alcalóide condalina- A (**1**) requer uma alta concentração 800  $\mu\text{M}$  para uma inibição de 40% da atividade da enzima AChE.

85 In : "Atlas : country resources for neurological disorders"; World Health Organization, 2004.

86 Brookmeyer, R.; Johnson, E.; Ziegler-Graham, K.; Arrighi, H. M.; *Alzheimer's Dementia*, 2007, 3, 186.

87 Houghton, P. J.; Ren, Y.; Howes, M. J; *Nat. Prod. Rep.*, 2006, 23, 181.

**Tabela 8:** Atividade inibitória da enzima AChE pelos alcalóides ciclopeptídicos

	Alcalóides	Concentrações inibitórias (µM)	Inibição da enzima AChE (%)
1	Condalina- A (1)	100,00	27,00
		800,00	40,00
2	Frangulanina (15)	250,00	55,00
		500,00	55,00
3	Adouetina- X (40)	62,50	33,62
		125,00	62,06
		250,00	96,51

De posse destes resultados, planejou-se testar apenas os peptídeos sintéticos que de alguma forma apresentam homologia estrutural com o alcalóide mais ativo, selecionando-se neste caso, apenas os tripeptídeos presentes em nosso laboratório e cuja síntese está descrita na literatura.<sup>61</sup>

Para este ensaio, no entanto não foi possível utilizar a mesma metodologia empregada anteriormente, pois o número de compostos a serem ensaiados demandaria de maiores gastos, sendo então selecionado para este “screen” o método em bioautografia em CCD adaptado do método descrito por Marston e Hostettmann<sup>88</sup> empregando a enzima AChE de *Electrophorus electricus* (comercial). Para isto as amostras dos peptídeos selecionados foram aplicadas pontualmente em placas de CCD nas quantidades de 50,0; 25,0 e 12,5 µg estas placas cromatográficas foram tratadas conforme protocolo da literatura, de modo que após o período de incubação visualizou-se os halos de inibição da enzima AChE (mancha branca) contra o fundo púrpura da placa, provenientes da clivagem do 1-naftil acetato pela acetilcolinesterase, formando o 1-naftol que reage com o reagente *Fast Blue B salt*, formando um diazônio que possui a coloração púrpura.

A análise destes resultados revelou consideráveis atividades inibitórias para compostos com o grupamento protetor da função amino Cbz (1-6 da Tabela 9, pág. 73), destacando-se entre estes o peptídeo de sequência Z-L-Leu-D-*treo*-Pheser-L-Phe-OMe com atividade inibitória a uma quantidade de 25 µg, o qual em conjunto com o peptídeo N-(Me)<sub>2</sub>-L-Leu-D-*treo*-Pheser-L-Phe-OMe (8 desta Tabela) que também possui atividade inibitória de 25 µg, demonstram assim evidências da importância do aminoácido não proteinogênico β-fenilserina na configuração D-*treo* para estas atividades.

**Tabela 9:** Resultados da inibição da enzima AChE para peptídeos sintéticos.

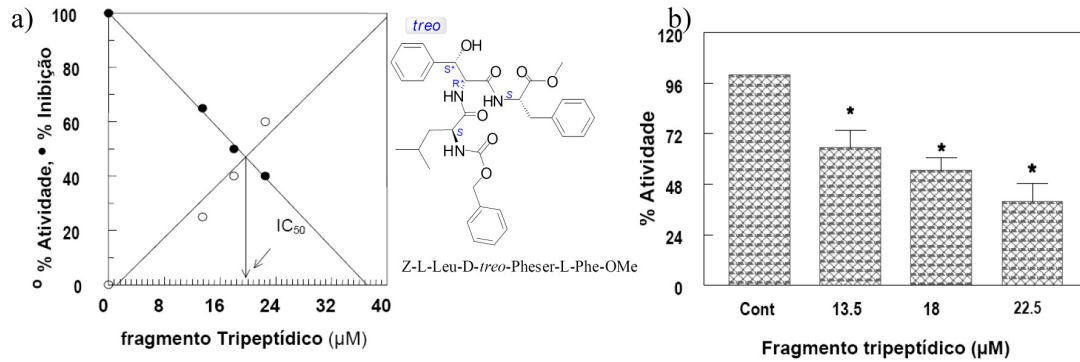
	Compostos <sup>‡</sup>	Quantidades testadas (µg)		
		50	25	12,5
1	Z-L-Leu-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Phe-OMe	+	-	-
2	Z-L-Leu-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Phe-OMe	+	+	-
3	Z-L-Leu-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Leu-OMe	+	+	-
4	Z-L-Leu-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Leu-OMe	+	-	-
5	Z-L-Leu-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe	+	+	-
6	Z-L-Leu-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe	+	-	-
7	N(Me) <sub>2</sub> -L-Leu-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Phe-OMe	-	-	-
8	N(Me) <sub>2</sub> -L-Leu-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Phe-OMe	+	+	-
9	N(Me) <sub>2</sub> -L-Leu-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Leu-OMe	-	-	-
10	N(Me) <sub>2</sub> -L-Leu-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Leu-OMe	-	-	-
11	N(Me) <sub>2</sub> -L-Leu-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe	+	-	-
12	N(Me) <sub>2</sub> -L-Leu-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe	-	-	-

\*Controle Positivo Fisostigmina; <sup>‡</sup>Peptídeos sintetizados previamente de acordo com a literatura<sup>61</sup>

Com estes promissores resultados, decidiu-se por testar os compostos (1, 2, 7 e 8) também pelo ensaio colorimétrico de Ellman's, porém com a enzima extraída do veneno da *Bungarus sindanus*, o qual é uma rica fonte de AChE, com cerca de 8 mg/g de veneno seco (0,8 % m/m).<sup>89</sup> Esta enzima apresenta uma homologia na sequência de aminoácidos com as enzimas de outras fontes e possui o sítio ativo composto pelos os mesmos aminoácidos (triade catalítica, Ser, His e Glu).<sup>90</sup> Assim, quando estes peptídeos foram submetidos a esta análise de atividade, apenas o composto Z-L-Leu-D-*treo*-Pheser-L-Phe-OMe apresentou atividade significativa inibindo a enzima de uma maneira dose dependente (Figura 30), na concentração de 13,5 µM, com um valor de  $IC_{50}$  de (19,5 µM) e  $K_i$  ( 17,5 µM), estes valores mostram que o tripeptídeo apresenta uma potente atividade quando comparado aos padrões huperzina e galantamina.

89 Frobert, Y.; Créminon, C.; Cousin, X.; Rémy, M.; Chatel, J.; Bon, S.; Bom, C.; Grassi, J.; *Biochim. Biophys. Acta.*, **1997**, 1339, 253.

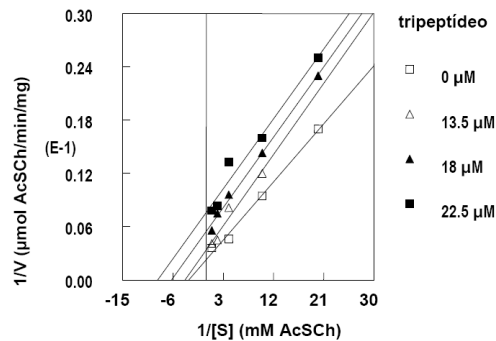
90 Chaliani, V.; Derr, D.; Earls, B.; Schmel, E.; *FEBS Lett.*, **1989**, 247, 279.



**Figura 30:** a) Gráfico mostrando a % de atividade residual e a % de inibição residual da AChE pela concentração do peptídeo. b) Inibição da AChE de *Bungarus sindanus* em diferentes concentrações do Z-L-Leu-D-treo-Pheser-L-Phe-OMe.

A velocidade de hidrólise  $V$  foi medida a 412 nm usando como substrato fixo 0,5 mM de (AcSCh) em 1mL de solução analisada com 62 mM tampão fosfato (pH 7,4) e 0,2 mM DTNB [5,5-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico)], pré-incubados por 10 min antes da adição do substrato. ( $n = 4$ ).

Ainda pela análise da cinética de reação para este composto, pode-se dizer que ele causa uma inibição não competitiva (Figura 31), e que ambos o  $K_m$  e  $V_{max}$  diminuem com o incremento de sua concentração, isto é uma clara indicação de uma inibição não competitiva. É demonstrado também (Tabela 10) que com o aumento da concentração (13,5-22,5 μM) a diminuição nos valores de  $K_m$  mudando a inibição de 17 para 64% e 32 para 69,8% com um  $V_{max}$  comparado ao controle. Todos estes resultados vêm a comprovar a estereoespecificidade da enzima frente aos fragmentos tripeptídicos, em função da estereoquímica do β-OH-aminoácido.



**Figura 31:** Acetilcolinesterase (AChE) na presença e ausência de diferentes concentrações de Z-L-Leu-D-treo-Pheser-L-Phe-OMe. ( $n=4$ ) com o mesmo resultado.

**Tabela 10:** Efeito do tripeptídeo no  $K_m$  e  $V_{max}$  da AChE do veneno de *Bungarus Sindanus*.

	Z-L-Leu-D-treo-Pheser-L-Phe-OMe ( $\mu\text{M}$ )	$K_m$ (mM)	(%) *	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol}$ AcSch/min/mg proteína)	(%)*
1	0,0	0,317	0,00	434,95	0,0
2	13,5	0,263	17,03	294,85	32,2
3	18,0	0,161	49,20	182,66	58,0
4	22,5	0,114	64,03	131,33	69,8

\* onde: (%) de decréscimo

### 3.4.2.2 - Testes da atividade inibitória das enzimas Prolil oligopeptidase (POP) e dipeptidil peptidase (DPP-IV)

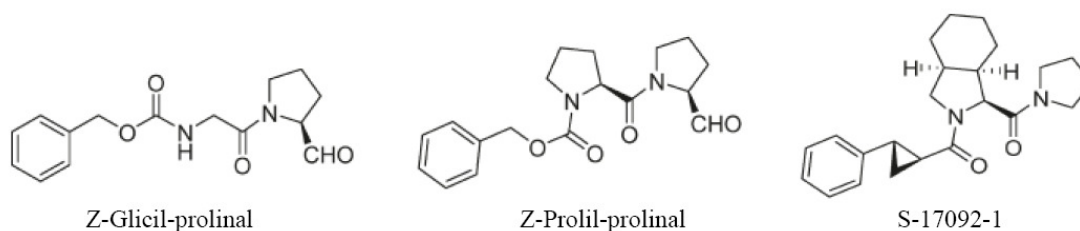
A prolil oligopeptidase (POP) é uma serina peptidase que hidrolisa principalmente peptídeos contendo o aminoácido prolina como resíduo C terminal. Estudos recentes indicam que a POP está envolvida em uma variedade de transtornos e patologias do sistema nervoso central (SNC) tais como a doença de Alzheimer's, amnésia, diferentes estágios da depressão e o transtorno bipolar.<sup>91</sup>

Em pacientes afetados, observou-se que o nível desta enzima no soro é maior que os níveis encontrados em pacientes não afetados. Como consequência, a POP vem se tornando cada vez mais um alvo (*target*) para o tratamento destas desordens neurodegenerativas e psiquiátricas, possuindo já um grande número de inibidores covalentes como Z-Glicil-prolinal, Z-Prolil-prolinal<sup>92</sup> e não covalentes como S-17092-1<sup>93</sup> (Figura 32), no entanto nenhum deles avançou para triagem clínica, para fornecer uma nova droga. Assim, o desenvolvimento de novos inibidores da POP, com diferentes modos de ação tornou-se um desafio importante, para desenvolver um melhor entendimento dos requerimentos na construção de inibidores seletivos e específicos.

91 a) Breen, G.; Harwood, A.; Gregory, K.; Sinclair, M.; Collier, D.; Clair, D.; Williams, R.; *Bipolar Disorders*, **2004**, 6, 156. b) Maes, M.; Goossens, F.; Scharpe, S.; Calabrese, J.; Desnyder, R.; Meltzer, H.; *Psychiatry Res.*, **1995**, 58, 217. c) Venäläinen, J.; Juvonen, R.; Garcia-Horsman, J.; Wallén, E.; Christiaans, J.; Jarho, E.; Gynther, J.; Männistö, P.; *Biochem. J.*, **2004**, 382, 1003. d) Roehrl, M. H. A.; Wang, J. Y.; Weiker, G.; *Biochemistry*, **2004**, 43, 16056. e) Schmuck, C.; Wienand, W.; Geiser, L.; *Highlights Bioorg. Chem.*, **2004**, 140. f) Heins, J.; P., Schonlein, C.; Born, I.; Hartrodt, B.; Neubert, K.; Tsuru, D.; Barth, A.; *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, 954, 161. g) Lawandi, J.; Toumieux, S.; Seyer, V.; Campbell, P.; Thielges, S.; Juillerat-Jeanneret, L.; Moitessier, N.; *J. Med. Chem.*, **2009**, 52, 6672.

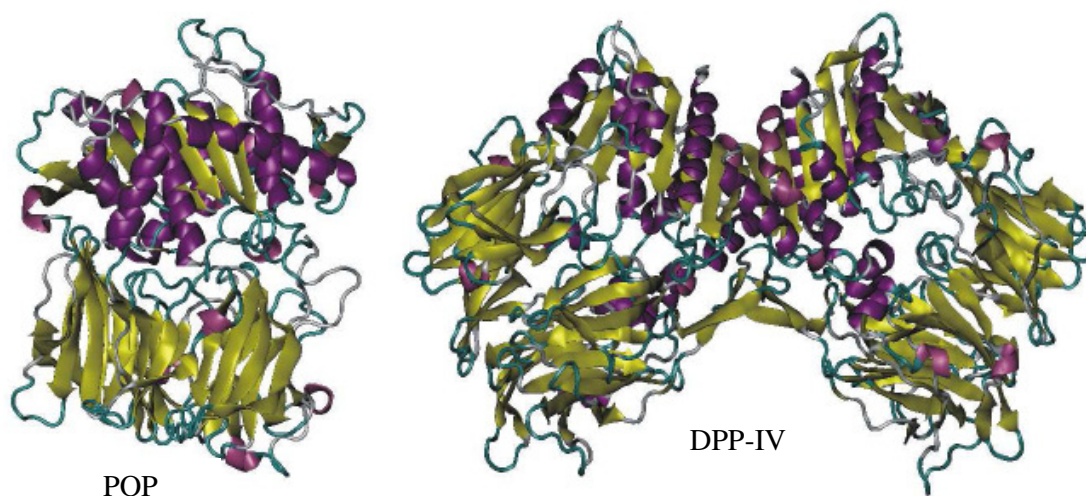
92 Cunningham, D. F.; O'Connor, B.; *Eur. J. Biochem.*, **1997**, 244, 900.

93 Barelli, H.; Petit, A.; Hirsch, E.; Wilk, S.; De Nanteuil, G.; Morain, P.; Checler, F.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1999**, 257, 657.



**Figura 32:** Inibidores covalentes e não covalentes da POP.

Assim como a POP, a enzima dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV, E.C. 3.4.14.5) é uma serina protease (exopeptidase), porém apresenta baixa homologia de sequência com a POP, estando relacionada com a mesma devido às similaridades apresentadas quanto à sua estrutura tri-dimensional (Figura 33).



**Figura 33:** Estrutura cristalográfica das enzimas POP e DPP-IV. Fonte: PDB (2009).

Esta enzima catalisa a quebra de dipeptídeos HX-Pro-Y ou H-X-Ala-Y- (onde X e Y são aminoácidos e  $Y \neq \text{Pro}$ ) a partir de peptídeos de proteínas N-terminais no qual o penúltimo aminoácido é um resíduo de prolina, podendo também hidrolisar resíduos de alanina mais lentamente.

A inibição da DPP-IV resulta na elevação dos níveis de glucagon endógeno circulante GLP-1 (glucagon-like peptide-1), o GLP-1 estimula a secreção de insulina de maneira glicose



dependente,<sup>94</sup> e induz a sensação de saciedade. Todas estas ações promovem um controle da homeostasis da glicose em pacientes com diabetes tipo II. A forma ativa do GLP-1 é rapidamente inativada pela DPP-IV do plasma, a qual quebra o dipeptídeo N-terminal. Desta forma a inibição da DPP-IV pode levar a um controle dos níveis de GLP-1 o que aumenta a secreção de insulina e promove à tolerância a glicose,<sup>95</sup> e por isso considerável atenção tem sido dada à inibidores da DPP-IV como pró-drogas e candidatos a fármacos.

A partir destes expostos, e como um dos objetivos deste trabalho, foram selecionados alguns alcalóides ciclopeptídicos (isolados pelo grupo) conforme a Tabela 11, bem como alguns peptídeos sintéticos preparados neste trabalho e outros preparados anteriormente,<sup>61</sup> para avaliar as possíveis atividades inibidoras das enzimas prolil oligopeptidase (POP) (Tabela 12) e dipeptidil peptidase (DPP-IV) (Tabela 13), estes experimentos foram realizados junto ao grupo do Prof. Ernest Giralt do Instituto para Pesquisa em Biomedicina do Parque Científico de Barcelona. Sendo que a enzima POP utilizada nas análises, foi expressa e purificada por pesquisadores do mesmo grupo e o método utilizado foi o descrito por Toide e col.,<sup>96</sup> já a enzima DPP-IV foi obtida comercialmente, e a metodologia empregada para as análises foi a descrita por Checler e col.<sup>97</sup> sendo que ambos os métodos empregam análise espectrofluorimétrica.

Na análise dos resultados obtidos para os alcalóides ciclopeptídicos selecionados, frente às enzimas POP e DPP- IV (Tabela 11) nota-se que estas moléculas não possuem atividade inibidora para estas enzimas, pois os valores apresentados para as porcentagens de inibição são muito baixos (17 a 33 %) em concentrações muito elevadas (100  $\mu$ M) tanto para a POP, quanto para a DPP-IV (2,5 a 5,4%) nesta mesma concentração.

**Tabela 11:** Atividades dos alcalóides ciclopeptídicos frente às enzimas POP e DPP-IV

	Alcalóides ciclopeptídicos	% inibição			
		POP		DPP- IV	
		10 nM	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M	100 $\mu$ M
1	Condalina-A ( <b>1</b> )	3,5	8,7	17,8	2,57
2	Adouetina-X ( <b>40</b> )	3,6	3,7	29,6	5,49
3	Discarina-D ( <b>45</b> )	18,8	26,5	33,1	4,18

94 a) Mcintosh, C. H.; Demuth, H.; Kim, S.; Pospisilik, J.; Pederson, R. A.; *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2006**, 38, 860; b) Maes, M.; Goossens, F.; Lin, A.; Meester, I.; Gastel, A.; Scharpé, S.; *Psychoneuroendocrinology*, **1998**, 23, 485.

95 Kondo, T.; Nekado, T.; Sugimoto, I.; Ochi, K.; Takai, S.; Kinoshita, A.; Tajima, Y.; Yamamoto, S.; Kawabata, K.; Nakai, H.; Toda, M.; *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 2631.

96 Toide, K.; Iwamoto, Y.; Fujiwara, T.; Abe, H.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1995**, 274, 1370.

97 Checler, F.; Vincent, J. P.; Kitabgi, P.; *J. Neurochem.*, **1985**, 45, 1509.

Os peptídeos sintéticos foram avaliados primeiramente frente enzima POP, onde através de uma triagem nas concentrações de 100, 50 e 1  $\mu\text{M}$  identificou-se os compostos mais promissores com demonstrado na Tabela 12, destes destacam-se o dipeptídeo Z-L-Phe-D-*treo*-Pheser-OMe (**56b**) (2 da Tabela 12), que apresentou uma inibição de maneira dose dependente de 41,7 a 19,4 % nas concentrações de 100 e 1  $\mu\text{M}$  respectivamente, interessante o Z-L-Phe-D-*treo*-Pheser-OH (**58b**) (6 da Tabela 12), apresenta inibição de 54,4 a 39,6 % nestas mesmas concentrações, as quais são superiores as encontradas para o peptídeo **56b** (seu precursor). Este fato demonstra uma melhora nas atividades destes compostos quando tem-se grupamentos ácidos livres, ainda de maneira geral, quando se compara as atividades dos estereoisômeros, assim como ocorrido para enzima AChE, há uma seletividade da enzima aos compostos com o  $\beta$ -OH-aminoácido na configuração D-*treo*.

**Tabela 12:** Atividades dos peptídeos frente a enzima POP.

Entradas	Compostos	(% inibição da POP)		
		1,0 $\mu\text{M}$	50,0 $\mu\text{M}$	100,0 $\mu\text{M}$
1	Z-L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-OMe ( <b>56a</b> )	1,0	9,2	12,6
2	Z-L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-OMe ( <b>56b</b> )	19,4	31,6	41,7
3	Z-L-Phe-L- <i>eritro</i> -Pheser-OMe ( <b>57a</b> )	3,0	7,2	26,3
4	Z-L-Phe-D- <i>eritro</i> -Pheser-OMe ( <b>57b</b> )	2,8	6,7	11,2
5	Z-L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-OH ( <b>58a</b> )	2,2	5,5	8,1
6	Z-L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-OH ( <b>58b</b> )	39,6	45,5	54,4
7	Z-L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe ( <b>60a</b> )	1,4	19,4	41,6
8	Z-L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe ( <b>60b</b> )	11,5	15,0	44,0
9	NH <sub>2</sub> -L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe ( <b>62a</b> )	6,4	17,5	31,0
10	NH <sub>2</sub> -L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe ( <b>62b</b> )	11,1	14,0	23,2
11	N(Me) <sub>2</sub> -L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe ( <b>64a</b> )	13,4	24,2	47,4
12	N(Me)-L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe ( <b>66a</b> )	5,6	19,2	25,2
13	N(Me)-L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe ( <b>66b</b> )	4,2	7,4	17,2
14	Z-L-Leu-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Phe-OMe <sup>‡</sup>	4,0	7,2	18,5
15	Z-L-Leu-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Phe-OMe <sup>‡</sup>	5,5	19,6	49,1
16	Z-L-Leu-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Leu-OMe <sup>‡</sup>	13,2	32,5	65,7
17	Z-L-Leu-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Leu-OMe <sup>‡</sup>	2,05	18,3	37,3
18	Z-L-Leu-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe <sup>‡</sup>	7,37	16,0	32,8
19	Nosyl-L-Phe-D,L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe <sup>‡</sup>	17,4	25,3	49,4
20	Nosyl-L-Phe-D,L- <i>treo</i> -Pheser-OMe <sup>‡</sup>	8,2	9,3	22,9
21	NH <sub>2</sub> -L-Leu-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Phe-OMe <sup>‡</sup>	1,2	12,5	27,0
22	NH <sub>2</sub> -L-Leu-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Phe-OMe <sup>‡</sup>	6,1	22,8	46,2
23	NH <sub>2</sub> -L-Leu-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Leu-OMe <sup>‡</sup>	0,7	7,5	13,3
24	NH <sub>2</sub> -L-Leu-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Leu-OMe <sup>‡</sup>	2,0	18,3	56,4
25	NH <sub>2</sub> -L-Leu-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe <sup>‡</sup>	0,9	14,3	46,4
26	N(Me) <sub>2</sub> -L-Leu-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Phe-OMe <sup>‡</sup>	0,6	3,4	6,4
27	N(Me) <sub>2</sub> -L-Leu-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Phe-OMe <sup>‡</sup>	6,3	12,4	27,6
28	N(Me) <sub>2</sub> -L-Leu-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Leu-OMe <sup>‡</sup>	31,5	39,6	63,0
29	N(Me) <sub>2</sub> -L-Leu-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe <sup>‡</sup>	3,8	28,5	55,4
30	N(Me) <sub>2</sub> -L-Leu-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe <sup>‡</sup>	0,1	3,8	8,2

\*Padrão= Z-Proilil-prolinal; controle negativo = tampão + DMSO;

<sup>‡</sup> peptídeos preparados anteriormente conforme literatura<sup>61</sup>

Ainda pode-se destacar os compostos tripeptídicos **60a** e **60b** (7 e 8, Tabela 12) com inibição de 41,6 e 44,0 % à 100  $\mu\text{M}$ , bem como os compostos das 11, 15, 19, 22, 24, 25, 29 desta Tabela, cujas atividades a 100  $\mu\text{M}$  estão entre 40 à 55% de inibição. Com os melhores resultados encontram-se os tripeptídeos *Z*-L-Leu-L-*treo*-Pheser-L-Leu-OMe (16) com atividade inibitória de 65,7 %, e o *N*-(Me)<sub>2</sub>-L-Leu-L-*treo*-Pheser-L-Leu-OMe (28) com 63,0 % de inibição nas concentrações de 100  $\mu\text{M}$ .

A partir dos resultados para a enzima POP, os peptídeos que apresentaram melhores atividades inibitórias, foram testados frente à enzima DPP-IV por meio de um pré-ensaio nas concentrações de 100,0, 50,0 e 1,0  $\mu\text{M}$  (Tabela 13), onde pela análise dos resultados apenas os peptídeos *Z*-L-Phe-D-*treo*-Pheser-OMe (**56b**), *Z*-L-Phe-D-*treo*-Pheser-OH (**58b**) e *N*(Me)<sub>2</sub>-L-Leu-D-*treo*-Pheser-L-Phe-OMe<sup>‡</sup> apresentaram atividade em todas as concentrações embora que com muito baixas porcentagens de inibição inferiores 26% a concentração de 100,0  $\mu\text{M}$ . De modo geral pode-se dizer que estes peptídeos não mostram atividade frente a esta enzima, o que de certa forma mostram um grau de seletividade destes compostos para a enzima POP.

**Tabela 13:** Resultados da inibição da enzima DPP-IV para alguns dos peptídeos sintetizados.

Compostos	(% inibição da DPP-IV)		
	1,0 $\mu\text{M}$	50,0 $\mu\text{M}$	100,0 $\mu\text{M}$
1 <i>Z</i> -L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-OMe ( <b>56b</b> )	9,4	13,4	26,0
2 <i>Z</i> -L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-OH ( <b>58a</b> )	NA	NA	10,9
3 <i>Z</i> -L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-OH ( <b>58b</b> )	12,3	14,5	15,6
4 <i>Z</i> -L-Leu-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Leu-OMe <sup>‡</sup>	NA	NA	0,6
5 <i>Z</i> -L-Leu-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe <sup>‡</sup>	NA	NA	17,2
6 Nosyl-L-Phe-D,L- <i>treo</i> -Pheser-L-Ile-OMe <sup>‡</sup>	NA	NA	6,7
7 NH <sub>2</sub> -L-Leu-L- <i>treo</i> -Pheser-L-Phe-OMe <sup>‡</sup>	NA	NA	4,2
8 N(Me) <sub>2</sub> -L-Leu-D- <i>treo</i> -Pheser-L-Phe-OMe <sup>‡</sup>	14,5	14,6	15,3

\*Padrão= Z-Protil-prolinal; controle negativo = tampão + DMSO; NA= não ativo;

<sup>‡</sup>peptídeos preparados anteriormente conforme literatura<sup>61</sup>

### 3.4.3 – Teste da Atividade Antioxidante

Doenças degenerativas como Alzheimer's, artrites, úlceras gástricas e o câncer, podem ser estimulados ou ter seus quadros clínicos favorecidos pela presença de espécies reativas de oxigênio e radicais livres, os quais podem atacar e modificar moléculas biológicas como, DNA, proteínas e lipídeos. Sendo a remoção destas espécies do sistema biológico, uma das

estratégias mais efetivas para manter o equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes o que provavelmente é uma das ações mais efetivas contra estas doenças.<sup>98</sup>

Neste contexto peptídeos contendo aminoácidos não naturais como  $\beta$ -OH- aminoácidos, os quais são importantes unidades estruturais encontradas em uma grande variedade de compostos biologicamente ativos como ciclopeptídeos, alcalóides ciclopeptídicos e alguns peptídeos lineares, surge como uma excelente estratégia para o desenvolvimento de novos agentes antioxidantes.

A partir destes expostos, e como planejado nos objetivos deste trabalho, foram selecionados alguns dos dipeptídeos sintetizados (Tabela 14), para avaliar suas possíveis atividades sequestradoras de radicais livres (atividade antioxidante), pelo método descrito por Hostettmann e col.,<sup>99</sup> empregando o ensaio qualitativo, baseado no método do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila), onde o ensaio é feito através de um “screening por bioautografia” das amostras aplicadas em CCD, frente a fonte de radicais livres.

**Tabela 14:** Resultados da atividade antioxidante para alguns dos dipeptídeos sintetizados.

Dipeptídeos	Quantidades testadas ( $\mu$ g)						
	200,0	100,0	50,0	25,0	12,5	6,2	3,1
1 Z-L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-OMe ( <b>56a</b> )	-	-	-	-	-	-	-
2 Z-L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-OMe ( <b>56b</b> )	-	-	-	-	-	-	-
3 Z-L-Phe-L- <i>eritro</i> -Pheser-OMe ( <b>57a</b> )	-	-	-	-	-	-	-
4 Z-L-Phe-D- <i>eritro</i> -Pheser-OMe ( <b>57b</b> )	+	-	-	-	-	-	-
5 Z-L-Phe-L- <i>treo</i> -Pheser-OH ( <b>58a</b> )	+	+	+	+	+	+	+
6 Z-L-Phe-D- <i>treo</i> -Pheser-OH ( <b>58b</b> )	+	+	+	+	+	-	-
7 Z-L-Phe-L- <i>eritro</i> -Pheser-OH ( <b>59a</b> )	-	-	-	-	-	-	-
8 Z-L-Phe-D- <i>eritro</i> -Pheser-OH ( <b>59b</b> )	-	-	-	-	-	-	-
9 Boc-L-Ile-L-Tyr-OMe ( <b>68b</b> )	+	+	+	+	+	+	+
10 Boc-L-Ile-L-(4-iodo)-Phe-OMe ( <b>69b</b> )	+	+	+	-	-	-	-
11 Nosyl-L-Phe-D,L- <i>treo</i> -Pheser-OMe <sup>‡</sup>	+	+	+	+	+	+	+
12 Nosyl-L-Phe-D,L- <i>treo</i> -Pheser-OH <sup>‡</sup>	+	+	+	+	-	-	-
13 Padrão*	+	+	+	+	+	+	+

\*Quercetina; <sup>‡</sup> Peptídeos sintéticos obtidos no grupo pela mesma metodologia de acoplamento descrita anteriormente.

Através da análise destes resultados pode-se notar que, os dipeptídeos Z-L-Phe-*treo*-L-Pheser-OH **58a**, possui atividade testada de 3,1  $\mu$ g, igual ao padrão, seguido do Z-L-Phe-D-

98 Debashis, D. D.; Bhattacharjee, B. M.; Banerjee, R. K.; *Free Radic. Biol. Med.*, **1997**, 23, 8.

99 Hostettmann, K.; Queiroz, E. F.; Vieira, P. C.; “*Princípios ativos de plantas superiores*”; Série de textos da Escola de Verão em Química, **2003**, IV Ed., UFSCar, São Carlos.

*treo*-Pheser-OH (**58b**) 12,5 µg, enquanto que seus precursores ésteres metílicos **56a** e **56b** não apresentam qualquer atividade, bem como os estereoisômeros **57a**, **59a** e **59b**.

Além destes, como esperado o dipeptídeo **68b** apresenta boa atividade (3,1 µg), já que possui um grupamento (OH) do aminoácido L-tirosina, enquanto seu análogo Boc-L-Ile-L-(4-iodo)-Phe-OMe (**69b**) que possui o átomo de iodo em substituição a este, apresenta atividade de somente 50 µg. Interessantemente, a presença de grupamento *p*-NO<sub>2</sub>-fenilsulfonamida nos compostos Nosyl-L-Phe-D,L-*treo*-Pheser-OMe e Nosyl-L-Phe-D,L-*treo*-Pheser-OMe (11 e 12 da Tabela 14) em substituição ao grupo protetor Cbz, incrementa a atividade destes peptídeos.

---

---

*Capítulo IV*

---

## **Capítulo IV: Parte Experimental:**

### **4- Parte Experimental:**

#### **4.1 - Material e Métodos:**

##### **4.1.1 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear**

Os espectros de RMN 1D e 2D foram obtidos em espectrômetro Bruker DPX-400 no Departamento de Química-UFSM operando a 400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ , as amostras foram preparadas em tubos de 5 mm de diâmetro e os experimentos adquiridos a temperatura entre 298-323 K.

Os deslocamentos químicos  $\delta$  foram medidos em ppm, em relação a um padrão interno de TMS ( $\text{Me}_4\text{Si}$ ,  $\delta = 0$  ppm) para espectros de hidrogênio, já nos espectros de  $^{13}\text{C}$  o próprio solvente serviu como padrão ( $\text{CDCl}_3$  ( $\delta = 77,0$  ppm),  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $\delta = 49,0$  ppm) ou  $\text{DMSO-d}_6$  ( $\delta = 39,5$  ppm).

Os espectros 2D Homonuclear (**COSY**) e heteronuclear (**HMQC** e **HMBC**) foram realizados conforme os parâmetros de aquisição fornecidos pelo aparelho e processados pelo *software* Top Spin 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  $\text{SW}_\text{H}$  (determinadas no espectro de  $^1\text{H}$ ) e  $\text{SW}_\text{C}$  (estimadas pelo espectro de  $^{13}\text{C}$ ) dependentes de cada amostra.

##### **4.1.2 - Aparelho de ponto de fusão**

Os valores dos pontos de fusão das substâncias foram determinados em um aparelho MQAPF-301 da marca Micro Química (Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais-NPPN-UFSM).

##### **4.1.3 - Cromatografia**

###### **4.1.3.1- Cromatografia Gasosa (CG)**

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo a gás Varian 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 de 10  $\mu\text{L}$ ) 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)- $\gamma$ -ciclodextrina (Lipodex-E) (fase quirál) e SE-54, nas respectivas condições: 90°C-170°C a 2°C/min e pressão de H<sub>2</sub> igual a 7psi e 50°C-250°C a 4°C/min e pressão de H<sub>2</sub> igual a 7psi (Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais-NPPN-UFSM).

#### **4.1.3.2- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

As amostras foram analisadas em aparelho de CLAE da marca: *Waters* modelo *Alliance 2695*, constituído por uma bomba quaternária e detector de arranjo de diodos modelo 966 com o programa de controle *Millenium* versão 3.5, equipado com uma coluna *Symmetry- C18* (4.6 x 150 mm) 5  $\mu$ m, 100 Å, sistema eluente CH<sub>3</sub>CN/ H<sub>2</sub>O (80:20) em fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> (Instituto para Pesquisa em Biomedicina do Parque Científico de Barcelona).

#### **4.1.3.3- Cromatografia em Coluna (CC)**

A grande maioria das substâncias sintetizadas foi purificada por cromatografia em coluna (CC), para as quais foi utilizado sílica gel 230-400 mesh e sistemas eluição por solventes puros ou em gradientes.

#### **4.1.3.4- 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 GF<sub>254</sub> (marca Merck) em placas de vidro de 20 cm<sup>2</sup>, sendo utilizada para separação de compostos em pouca quantidade e de *R<sub>f</sub>s* muito próximo.

#### **4.1.3.5- Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

A técnica de cromatografia em camada delgada do tipo ascendente foi realizada em cromatoplasas comerciais de sílica gel 60 GF<sub>254</sub> 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 365nm) e detecção direta com reagentes específicos como: reagente modificado de Dragendorff (seletivo para alcalóides e nitrogênios substituídos), solução de *orto*-toluidina em atmosfera de cloro (para peptídeos) e solução de ninidrina a 0,2% em EtOH (para aminas e aminoácidos *N*-metilados).

#### **4.1.4-Aparelho de Difração de Raios-X**

As análises de difração de raios-X foram realizadas em difratômetro Bruker SMART CCD, instalado no Departamento de Química-UFSM. Em média as intensidades de raios X

---



foram medidas, em um total de 719 arranjos, os quais foram coletados e integrados pelo software Bruker SAINT, fornecendo dados de refinamento.

#### **4.1.5-Espectrofluorímetro**

As leituras de fluorescência nas atividades com as enzimas POP e DPP-IV, foram realizadas em um espectrofluorímetro com leitor de microplacas da marca Bio-tek (Bio-Tek FL600 Fluorescence Plate Reader) utilizando os filtros de comprimentos de onda de excitação e emissão 360/40 e 485/20 respectivamente (Instituto para Pesquisa em Biomedicina do Parque Científico de Barcelona).

#### **4.1.6- Reagentes e solventes**

Todos os reagentes utilizados durante a síntese peptídica como a diciclohexilcarbodiimida, 1-hidroxi-benzotriazol e a *N*-metil-morfolina, assim como o reagente de proteção dos aminoácidos cloroformiato de benzila, são das marcas Sigma-Aldrich, Merck ou Fluka e não foram purificados.

No entanto o cloreto de tionila ( $\text{SOCl}_2$ ) empregado nas reações de esterificação, e o benzaldeído na obtenção do  $\beta$ -OH-aminoácido e na reação de *N*-metilação, foram purificados por destilação a pressão normal e sob pressão reduzida respectivamente.

Os solventes e reagentes foram tratados e purificados conforme descrito por Perrin e Armarego.<sup>100</sup>

### **4.2- Procedimentos Gerais**

#### **4.2.1- Obtenção do carbobenzoxi-*L*-fenilalanina (51)**

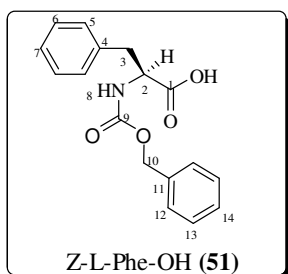
Seguindo a clássica metodologia de proteção de aminoácidos descrita por Bodansky,<sup>63</sup> partiu-se de 20 g (121,07 mmol) do aminoácido *L*-Fenilalanina dissolvidos em 36,3 mL de água e 24,2 mL de solução 5 mol.L<sup>-1</sup> de NaOH, ao qual foi adicionado sob forte agitação magnética e resfriamento em banho de água e gelo 18,8 mL (133,17 mmol, 22,7 g) de cloroformiato de benzila (*Z*-Cl) e 66,5 mL de solução de NaOH 2 mol.L<sup>-1</sup>.

Depois de completada a adição agitou-se por mais 30 min e a alcalinidade da mistura foi ajustada a pH 10, sendo então submetida aos procedimentos de extração descritos na

---

100 Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; in: "Purification of Laboratory Chemicals", Pergamon Press, New York, Third Edition, 1988.

literatura, fornecendo assim um produto na forma de sólido branco amorfo com rendimento de 87%.<sup>101</sup>



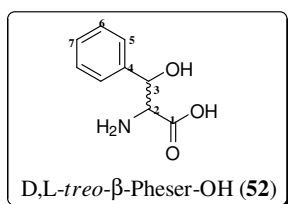
**Dados físicos:** Z-L-Phe-OH (51): sólido branco amorfo; [Exp: p.f.= 84-85°C [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup>= +4,8 (c= 1 em CHCl<sub>3</sub>)] [Lit<sup>102</sup>: p.f.=85-87°C, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup>= +5 (c= 5 em AcOH)]; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 2,97; 3,09 (dd, 2H, J<sub>3-2</sub>= 6,46 Hz, J<sub>3-3'</sub> = 14,1 Hz, J<sub>3'-2</sub>= 5,28 Hz); 4,58 (dd, 1H, J<sub>2-3</sub>= 6,38 Hz, J<sub>2-3'</sub> = 5,28, J<sub>2-8</sub>= 7,08 Hz); 4,97 (d, 2H, J<sub>10-10'</sub>= 6,12 Hz); 5,26 (d, 1H, J<sub>8-2</sub> = 8,12 Hz); 7,03 - 7,25 (m, 10H).

RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 37,6; 54,5; 67,1; 127,0; 128,0; 128,1; 128,4; 128,5; 129,2; 135,5; 135,9; 155,9; 175,5.

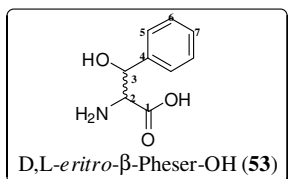
#### 4.2.2- Preparação da $\beta$ -fenilserina

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*- $\beta$ -fenilserina com um rendimento de 60,6%, e pela adição de acetona as águas mães de cristalização obteve-se a cristalização da *eritro-D,L*- $\beta$ -fenilserina com um rendimento aproximado de 35%.



**Dados físicos:** D,L-*treo*-Phenser-OH (52): (Exp: p.f.= 191-192°C) (Lit<sup>66</sup> p.f.= 192-193°C); RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 3,70(d, 1H, J<sub>2-3</sub>= 4,28 Hz); 5,10 (d, 1H, J<sub>3-2</sub>= 4,28 Hz); 7,27 (s, 5H).



**Dados físicos:** D,L-*eritro*-Phenser-OH (53): (Exp: p.f.=186-187°C); (Lit<sup>66</sup>: p.f. = 189-193°C); RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 3,78(d, 1H, J<sub>2-3</sub>= 4,24 Hz); 5,04 (d, 1H, J<sub>3-2</sub>= 4,24 Hz); 7,23 (s, 5H).

101 Szarek, W. A.; Pinto, B. M.; Grindley, T. B.; *Org. Magn. Reson.*, **1984**, 22, 676.

102 Fluka; in: "Laboratory Chemicals and analytical reagents", Brasil, **2002**, 1572.

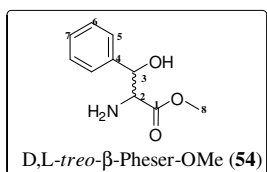
#### 4.2.3- Esterificação de Aminoácidos: Método Geral

Em um balão de fundo redondo, adicionou-se 100 mL de metanol destilado, e resfriou-se a  $-20^{\circ}\text{C}$  e adicionou-se 26 mL de  $\text{SOCl}_2$  (temperatura inferior a  $-10^{\circ}\text{C}$ ), Após adicionou-se 100 mmol do aminoácido a ser esterificado, deixando-se a reação sob agitação à temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  por 12 horas, Evaporou-se completamente o solvente e recristalizou-se com metanol/éter etílico (1/3).

##### 4.2.3.1- Obtenção do éster metílico da D,L-treo- $\beta$ -fenilserina (54)

O aminoácido D,L-treo- $\beta$ -fenilserina (**52**) foi esterificado como descrito no método geral, usando-se 18,12 g (100 mmol) do aminoácido, obtendo-se após a recristalização com metanol/éter etílico a  $5^{\circ}\text{C}$ , cristais na forma de pequenas lâminas, com um rendimento de 90%.

Dados físicos: D,L-treo-Pheser-OMe (**54**): (*Exp*: p.f.=  $153-154^{\circ}\text{C}$ ); (*Lit.*<sup>67</sup> p.f.=  $156^{\circ}\text{C}$ ); RMN

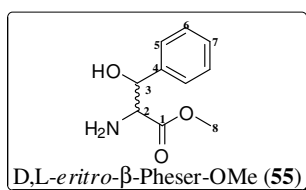


de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 3,66 (s, 3H); 4,24(d, 1H,  $J_{2-3} = 4,00$  Hz); 5,26 (d, 1H,  $J_{3-2} = 4,00$  Hz); 7,28 (m, 5H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 53,7; 58,9, 70,5; 125,8; 128,9; 129,0; 137,5; 168,4.

##### 4.2.3.2- Obtenção do éster metílico da D,L-eritro- $\beta$ -fenilserina (55)

Apartir de 18,12 g (100 mmol) do aminoácido D,L-eritro- $\beta$ -fenilserina (**53**), submetidos as condições gerais esterificação ( $\text{MeOH}/\text{SOCl}_2$ ), obteve-se após a recristalização com metanol/éter etílico a  $5^{\circ}\text{C}$  um sólido branco, com rendimento de 85%.

Dados físicos: D,L-eritro-Pheser-OMe (**55**): (*Exp*: p.f. =  $176-178^{\circ}\text{C}$ ); (*Lit.*<sup>67</sup> p.f.=  $180^{\circ}\text{C}$ ); RMN

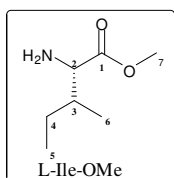


de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 3,61 (s, 3H); 4,37(d, 1H,  $J_{2-3} = 8,40$  Hz); 5,25 (d, 1H,  $J_{3-2} = 8,40$  Hz); 7,31 (m, 5H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 53,7; 58,9; 70,5; 125,8; 128,9; 129,0; 137,5; 168,5.

#### 4.2.3.3- Obtenção do éster metílico da L-isoleucina

Utilizando-se 100 mmol (13,11 g) de L-isoleucina conforme a técnica geral de esterificação de aminoácidos, obteve-se um sólido branco que foi recristalizado com metanol/éter etílico a -20 °C, com rendimento de 75%.

Dados físicos: (*Exp*: p.f.= 98,7-99,6°C); (*Lit.*<sup>102</sup>p.f.= 100,5-101°C); RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: 0,83 (t, 3H, J<sub>5-4</sub>= 7,40Hz); 0,92 (d, 3H, J<sub>6-3</sub>= 6,80 Hz); 1,24 e 1,35 (m, 1H); 1,96 (m, 1H); 3,73 (s, 3H); 4,02 (d, 1H, J<sub>2-3</sub>= 4,08 Hz); RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: 11,0; 14,1; 24,9; 36,0; 57,3; 170,3.



#### 4.2.4- Síntese dos Dipeptídeos: Método Geral

Em um balão sob atmosfera de argônio, dissolveu-se em 50 mL de THF seco, 75 mmols do aminoácido fenilserina (*treo* ou *eritro*), 75 mmols de 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt) e 75 mmols do aminoácido protegido (Z-L-Phe-OH) a esta mistura reacional, adicionou-se 75 mmols de *N*-metilmorfolina (NMM).

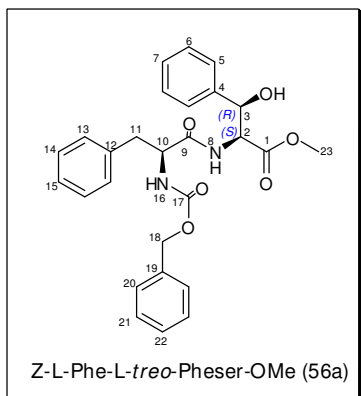
A solução é mantida sob agitação e resfriamento de água/gelo, em seguida adicionou-se 80 mmols de DCC, Deixa-se a solução por 1 hora a 0 °C e após por aproximadamente 7 horas a temperatura ambiente, Filtrou-se a DCU formada e o solvente é eliminado à vácuo. O resíduo é então re-dissolvido em acetato de etila e lavado sucessivamente com uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, água, solução aquosa de ácido cítrico a 10 % (p/v), novamente com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3 x 50 mL para cada lavagem) e finalmente com água, A fase orgânica é seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e o solvente evaporado em rota evaporador.

##### 4.2.4.1- Síntese do carbobenzoxi-L-fenilalanil-D,L-treo-β-fenilserina-OMe (56)

Dissolveu-se 6,50 g (33,33 mmol) da D,L-*treo*-β-Pheser-OMe (**54**) em 20 ml de THF seco, a esta solução foram adicionados 4,50 g (33,33 mmol) de HOBt, 9,97 g (33,33 mmol) de Z-L-Phe-OH (**51**) e 3,67 mL (33,33 mmol, 3,37 g) de *N*-metilmorfolina. A mistura foi agitada em banho de gelo, e então foram adicionados 7,35 g (35,55 mmol) de dicitlohexilcarbodiimida (DCC). A reação permanece sob agitação por 1 hora a 0°C e 7 horas a temperatura ambiente. A DCU formada foi removida por filtração e o solvente evaporado a vácuo, obtendo-se após os procedimentos de extração descritos anteriormente, um produto na forma de um sólido branco, constituído pelos pares diastereoisoméricos L(D) e L(L), com rendimento de 65%.

Esta mistura diastereoisomérica foi redissolvida em diclorometano, e pela adição de uma mistura de éter etílico/ éter di-isopropílico/ éter de petróleo (1/2/3), conseguiu-se a sua cristalização e com isso a separação das formas diastereoisoméricas *Z-L-Phe-L-treo-Pheser-OMe* (**56a**) e *Z-L-Phe-D-treo-Pheser-OMe* (**56b**).

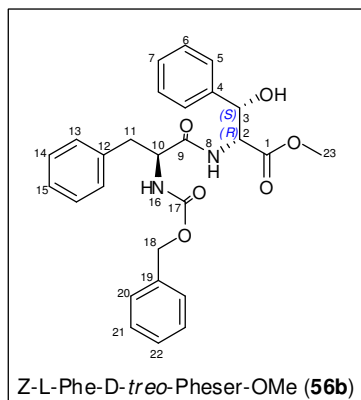
**Dados físicos:** *Z-L-Phe-L-treo-Pheser-OMe* (**56a**): sólido branco cristalino, p.f = 160-162°C;



RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2,93; 2,99 (dd, 2H,  $J_{11-10} = 6,7$  Hz,  $J_{11'-10} = 7,2$  Hz,  $J_{11-11'} = 13,8$  Hz); 3,66 (s, 3H); 4,39 (dd, 1H,  $J_{10-11} = 6,7$  Hz;  $J_{10-16} = 7,2$  Hz); 4,81 (dd, 1H,  $J_{2-3} = 3,40$  Hz,  $J_{2-8} = 8,6$  Hz); 5,04 (s, 2H); 5,17 (d, 1H,  $J_{16-10} = 7,2$  Hz); 5,20 (d, 1H,  $J_{3-2} = 3,40$  Hz); 6,72 (d, 1H,  $J_{8-2} = 8,6$  Hz); 7,12 - 7,36 (m, 15H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 38,1; 52,6; 56,0; 58,2; 67,1; 73,7; 125,8; 127,0; 128,0; 128,1; 128,2; 128,3; 128,5; 128,6; 129,3; 136,0; 136,2; 139,3; 155,9;

170,4; 171,1. ESI-MS ( $m/z$ ) = 476,52 [ $\text{M}^+$ ].

**Dados físicos:** *Z-L-Phe-D-treo-Pheser-OMe* (**56b**): sólido branco amorfo, p.f.=119-120°C;



RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2,78; 2,96 (dd, 2H,  $J_{11-10} = 7,36$  Hz;  $J_{11'-10} = 5,32$  Hz;  $J_{11-11'} = 14,10$  Hz); 3,67 (s, 3H,); 4,48 (dd; 1H,  $J_{10-11} = 7,36$  Hz,  $J_{10-11'} = 5,32$  Hz); 4,64 (dd, 1H,  $J_{2-3} = 3,20$  Hz,  $J_{2-8} = 8,76$  Hz); 5,00 (s, 2H); 5,20 (d, 1H); 5,29 (d, 1H,  $J_{3-2} = 3,08$  Hz); 6,91 (d, 1H,  $J_{8-2} = 8,76$  Hz); 7,15 - 7,30 (m, 15H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 38,2; 52,5; 55,6; 57,5; 67,0; 71,8; 125,8; 126,8; 127,9; 128,1; 128,2; 128,4; 128,5; 128,5; 129,2; 136,0; 136,3; 139,5; 155,9; 170,9; 171,5. ESI-MS ( $m/z$ ) = 476,0 [ $\text{M}^+$ ].

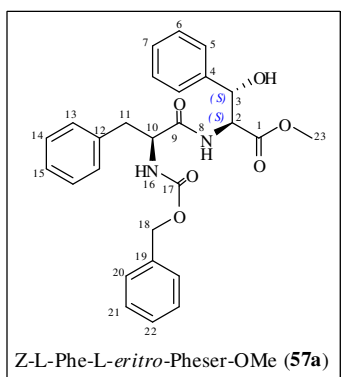
#### 4.2.4.2- Síntese do carbobenzoxi-*L*-fenilalanil-*D,L*-eritro- $\beta$ -fenilserina-OMe (**57**)

Dissolveu-se 3,01 g (13,36 mmol) de *D,L-eritro- $\beta$ -Pheser-OMe* (**55**) em 20 mL de THF seco, 1,80 g (13,36 mmol) de HOBT, 4,00 g (13,36 mmol) de *Z-L-Phe-OH* e 1,47 mL (13,36 mmol, 1,35 g) de *N*-metilmorfolina. A mistura foi agitada e a solução formada, resfriada em banho de gelo, onde adicionou-se em seguida 2,94g (14,25 mmol) de diclohexilcarbodiirrida (DCC). A reação permaneceu sob agitação por 1 hora a 0°C e 16 horas a temperatura ambiente. Filtrou-se a DCU formada e evaporou-se o solvente em rota evaporador, 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 70 %.

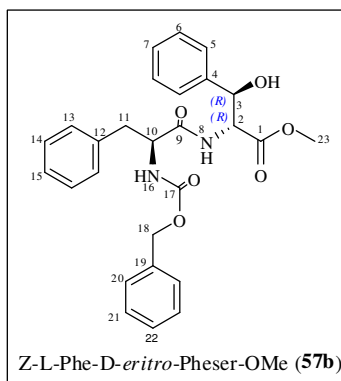
Esta mistura diastereoisomérica foi redissolvida em diclorometano, e pela adição de uma mistura de éter etílico/ éter di-isopropílico/ éter de petróleo (1/2/3), conseguiu-se a sua cristalização e com isso a separação das formas diastereoisoméricas Z-L-Phe-L-*eritro*-Pheser-OMe (**57a**) e Z-L-Phe-D-*eritro*-Pheser-OMe (**57b**).

**Dados físicos:** Z-L-Phe-L-*eritro*-Pheser-OMe (**57a**): sólido branco amorfo, p.f. = 148-149°C;



RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3,03 (d, 2H,  $J_{11-10}= 7,26$  Hz); 3,61 (s, 3H); 4,45 (dd, 1H,  $J_{10-11}= 7,26$  Hz,  $J_{10-16}= 14,56$  Hz); 4,90 (dd, 1H,  $J_{2-3}= 3,80$  Hz,  $J_{2-8}= 7,60$  Hz); 5,07 (s, 2H); 5,25 (d, 1H,  $J_{16-10}= 14,56$  Hz); 5,25 (d, 1H,  $J_{3-2}= 3,80$  Hz); 6,53 (d, 1H,  $J_{8-2}= 7,60$  Hz); 7,14 - 7,32 (m, 15H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 38,5; 52,4; 56,3; 58,8; 67,2; 74,3; 125,7; 127,2; 128,0; 128,1; 128,2; 128,3; 128,5; 128,8; 129,3; 135,9; 136,1; 138,7; 155,8; 169,4; 171,6. ESI-MS ( $m/z$ ) = 476,0 [ $\text{M}^+$ ].

**Dados físicos:** Z-L-Phe-D-*eritro*-Pheser-OMe (**57b**): sólido branco amorfo, p.f.=145-147°C;



RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2,98 (dd, 2H,  $J_{11-10}= 6,40$  Hz); 3,57 (s, 3H); 4,32 (dd, 1H,  $J_{10-11}= 6,40$  Hz,  $J_{10-16}= 7,20$  Hz,  $J_{10-16}= 14,20$  Hz); 4,81 (dd, 1H,  $J_{2-3}= 3,48$  Hz,  $J_{2-8}= 6,76$  Hz); 5,09 (s, 2H,); 5,16 (d, 1H,  $J_{16-10}= 14,20$  Hz); 5,16 (d, 1H,  $J_{3-2}= 3,48$  Hz); 6,47 (d, 1H,  $J_{8-2}= 6,76$  Hz); 7,07 - 7,26 (m, 15H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 38,1; 52,4; 56,3; 59,0; 67,2; 74,6; 125,8; 127,2; 128,0; 128,1; 128,2; 128,3; 128,5; 128,8; 129,2; 136,0; 135,9; 138,8; 155,8; 169,2; 172,0.

ESI-MS ( $m/z$ ) = 476,0 [ $\text{M}^+$ ].

#### 4.2.5- Método geral de hidrólise básica dos dipeptídeos

A uma solução de 29,4 mmols dos ésteres metílicos dos dipeptídeos dissolvidos em 60,0 mL de metanol, em um sistema resfriado a uma temperatura aproximada de 5°C, adicionou-se lentamente 65,0 mL de solução aquosa de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>. Esta mistura reacional foi deixada em repouso a 25 °C por 2 horas e após foram adicionados 30,0 mL de uma solução de HCl 1 mol.L<sup>-1</sup>, em seguida o metanol foi removido sob vácuo, e a reação

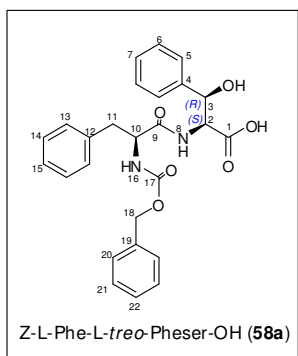
novamente resfriada em banho de gelo, sendo então acidificada a pH 2-3 com solução de HCl 2 mol.L<sup>-1</sup>.

Após acidificação, armazenou-se a mistura reacional por 14 horas em geladeira, formando uma massa sólida branca a qual foi decantada, re-dissolvida em clorofórmio e fase aquosa separada em funil de separação, então a fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e o solvente evaporado.

#### 4.2.5.1- Síntese do carbobenzoxi-L-fenilalanil-L-treo-β-fenilserina-OH (58a)

Para obtenção do dipeptídeo **58a**, partiu-se de 3,2 g (6,78 mmol) de **56a**, dissolvidos em 13,8 mL de MeOH com adição de 15,0 mL de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup> e 6,9 mL de HCl 1 mol.L<sup>-1</sup>, obtendo-se após os procedimentos de extração o dipeptídeo hidrolisado com um rendimento de 85%.

Dados físicos: Z-L-Phe-L-treo-Pheser-OH (**58a**): massa incolor que solidifica a vácuo, p.f. =



140-142°C; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 2,96-2,66 (dd, 2H, J<sub>11-10</sub> = 3,58 Hz, J<sub>11'-10</sub> = 11,10 Hz, J<sub>11-11'</sub> = 13,78 Hz); 4,22 (dd, 1H); 4,30 (dd, 1H, J<sub>2-3</sub> = 4,14 Hz, J<sub>2-8</sub> = 7,24 Hz); 4,93 (s, 2H); 5,07 (d, 1H, J<sub>3-2</sub> = 4,14 Hz); 7,17 - 7,32 (m, 15H). RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 37,1; 56,5; 57,5; 65,1; 71,5; 126,0; 126,4; 127,2; 127,2; 127,5; 127,9; 127,9; 128,2; 129,1; 136,9; 138,2; 142,5; 155,6; 171,4; 171,0. ESI-MS (m/z) = 476,0 [M<sup>+</sup>],

#### 4.2.5.2- Síntese do carbobenzoxi-L-fenilalanil-D-treo-β-fenilserina-OH (58b)

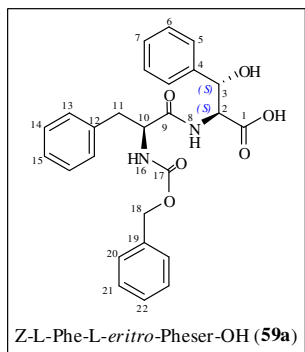
Partindo-se de 1,26 g (2,66 mmol) de **56b**, dissolvidos em 5,4 mL de MeOH com adição de 5,9 mL de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup> e 2,7 mL de HCl 1 mol.L<sup>-1</sup>, obteve-se o dipeptídeo hidrolisado **58b** com um rendimento de 89%.

Dados físicos: Z-L-Phe-D-treo- Pheser-OH (**58b**), massa oleosa branca.

#### 4.2.5.3- Síntese do carbobenzoxi-L-fenilalanil-L-eritro-β-fenilserina-OH (59a)

O dipeptídeo **59a** foi obtido a partir de 1,0 g (2,12 mmol) de **57a**, dissolvidos em 4,3 mL de MeOH e pela adição de 4,7 mL de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup> e 2,1 mL de HCl 1 mol.L<sup>-1</sup>, obtendo-se após a extração o dipeptídeo hidrolisado em rendimento de 70%.

**Dados físicos:** Z-L-Phe-L-*eritro*-Pheser-OH (**59a**): massa oleosa incolor; RMN de  $^1\text{H}$  (400



MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 2,86-2,66 (dd, 2H,  $J_{11-10}$ = 3,3 Hz,  $J_{11'-10}$ = 13,3 Hz,  $J_{11-11'}$  = 13,9 Hz); 4,32 (dd, 1H); 4,55 (dd, 1H,  $J_{2-3}$ = 2,11 Hz,  $J_{2-8}$  = 9,1Hz); 4,92 (s, 2H); 5,23 (d, 1H); 7,14 - 7,41 (m, 15H).  
RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 37,9; 56,2; 58,4; 65,6; 76,4; 126,6; 127,4; 127,7; 127,8; 128,0; 128,1; 128,4; 128,7; 129,6; 137,4; 138,6; 142,5; 156,0; 171,8; 172,07.

#### 4.2.5.4- Síntese do carbobenzoxi-L-fenilalanil-D-eritro- $\beta$ -fenilserina-OH (**59b**)

Pela reação de 2,62 g (5,50 mmol) de **57b**, dissolvidos em 11,2 mL de MeOH e pela adição de 12,2 mL de NaOH 1M e 5,6 mL de HCl 1M, obteve-se o dipeptídeo hidrolisado **59b** em rendimento de 77%

**Dados físicos:** Z-L-Phe-D-*eritro*-Pheser-OH (**59b**), massa oleosa branca.

#### 4.2.6- Síntese dos Tripeptídeos: Método Geral

A uma mistura dos dipeptídeos com a função carboxila livre, e quantidades equimolares de HOBt, do éster metílico do aminoácido isoleucina e de NMM dissolvidos em THF seco a 0°C, sob atmosfera de argônio, adicionou-se um excesso de 0,27 mmol de DCC.

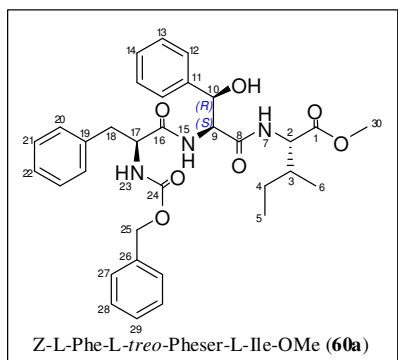
Essa mistura foi deixada sob agitação a 0°C por 1 h e por mais 24 h a temperatura ambiente, A DCU formada foi então removida por filtração e o solvente evaporado, o resíduo formado foi re-dissolvido em acetato de etila e lavado com uma solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , Extraiu-se a fase aquosa 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  $\text{NaHCO}_3$  e água, Secou-se a fase orgânica com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e evaporou-se o solvente em rota evaporador.

##### 4.2.6.1- Síntese do carbobenzoxi-L-fenilalanil-L-*treo*- $\beta$ -fenilseril-L-isoleucina-OMe (**60a**)

Obtido a partir de 2,7 g (5,77mmol) do dipeptídeo Z-L-Phe-L-*treo*-Pheser-OH (**58a**), 0,8 g (5,77 mmol) HOBt, 0,6 mL (0,6 g, 5,77 mmol) de NMM, 0,83 g (5,77 mmol) do aminoácido esterificado L-isoleucina e 1,2 g (6,05 mmol) de DCC dissolvidos em 5 mL de THF seco e com um rendimento de 50%.



**Dados físicos:** Z-L-Phe-L-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (**60a**): sólido branco amorfo, p.f.= 144 -



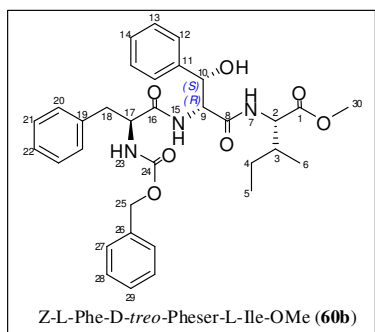
145°C, RMN de  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0,88 (t; 3H,  $J_{5-4}$ = 7,0 Hz); 0,91 (d, 3H,  $J_{6-3}$ = 7,0 Hz); 1,47 - 1,36 (m, 2H.); 1,88 (s, 1H); 2,88 - 2,96 (dd, 2H,  $J_{18-17}$ = 6,4 Hz,  $J_{18-18'}$ =14,4 Hz); 3,75 (s, 3H); 3,81 (d, 1H,  $J$  = 3,1 Hz); 4,36 (dd, 1H,  $J_{17-18}$ = 7,0 Hz,  $J_{17-23}$ = 13,7); 4,49 (dd, 1H,  $J_{2-7}$ = 8,3 Hz,  $J_{2-3}$ = 5,1 Hz); 4,63 (dd, 1H,  $J_{9-15}$ = 7,8 Hz,  $J_{9-10}$ = 2,8 Hz); 5,03 (d, 1H,  $J_{10-9}$ = 2,8 Hz); 5,06 (s, 2H); 5,30 (d, 1H.); 6,80 (d, 1H,  $J_{15-9}$ = 7,6 Hz); 7,08 (d, 1H,  $J_{7-8}$ = 8,1

Hz); 7,31 - 7,20 (m, 15H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 11,4; 15,3; 25,0; 29,6; 37,1; 37,6; 37,9; 50,5; 52,0; 56,1; 56,7; 58,0; 67,0; 72,2; 125,9; 126,0; 127,0; 127,8; 127,9; 128,1; 128,2; 128,4; 128,6; 129,0; 135,9; 136,0; 139,0; 156,0; 169,7; 171,7; 171,0. ESI-MS (m/z) =589,6  $[\text{M}]^+$ .

#### 4.2.6.2- Síntese do carbobenzoxi-L-fenilalanil-D-*treo*- $\beta$ -fenilseril-L-isoleucina-OMe (**60b**)

Obtido a partir de 0,92 g (2,0 mmol) do dipeptídeo Z-L-Phe-D-*treo*-Pheser-OH (**58b**), 0,27 g (2,0 mmol) HOBt, 0,2 mL (0,20 g, 2,0 mmol) de NMM, 0,29 g (2,0 mmol) do aminoácido esterificado isoleucina e 0,43 g (2,0 mmol) de DCC dissolvidos em 5,0 mL de THF seco e com um rendimento de 69%.

**Dados físicos:** Z-L-Phe-D-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (**60b**): sólido branco amorfo, p.f.=167-



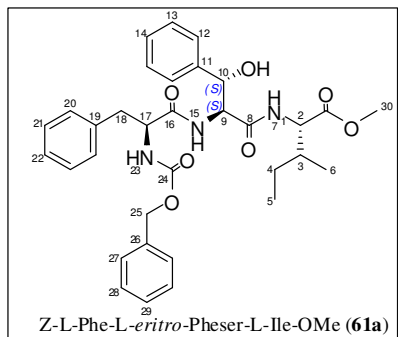
168°C; RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0,88 (t, 3H,  $J_{5-4}$ = 7,4 Hz); 0,91 (d, 3H,  $J_{6-3}$ = 6,8 Hz); 1,15 - 1,38 (m, 2H); 1,91 (m, 1H); 2,77 - 2,96 (dd, 2H,  $J_{18-17}$ =5,68 Hz,  $J_{18'-17}$ =8,0 Hz;  $J_{18-18'}$ =14,1 Hz); 3,66 (s, 3H); 4,30 (dd, 1H,  $J_{17-18}$ =5,68 Hz,  $J_{17-18'}$ = 7,90 Hz,  $J_{17-23}$ = 6,80 Hz); 4,49 (dd, 1H,  $J_{2-7}$ = 8,24 Hz,  $J_{2-3}$ = 4,88 Hz); 4,71 (dd, 1H,  $J_{9-15}$ = 6,60 Hz,  $J_{9-10}$ = 2,12 Hz); 5,03 (s, 2H); 5,28 (d, 2H,  $J_{23-17}$ = 6,80 Hz); 5,33 (d, 1H,  $J_{10-9}$ = 2,12 Hz); 6,98 (d, 1H,  $J_{15-9}$ = 7,9 Hz); 7,18 - 7,34(m,

15H); 7,10 (d, 1H,  $J_{7-8}$ = 8,30 Hz); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 11,5; 15,5; 25,1; 37,1; 37,6; 52,1; 56,4; 57,0; 58,2; 67,0; 72,0; 125,8; 127,0; 127,9; 128,0; 128,2; 128,4; 128,5; 128,6; 129,1; 135,9; 136,0; 139,1; 156,0; 170,8; 172,0; 172,1. ESI-MS (m/z) =589,2  $[\text{M}]^+$ .

#### 4.2.6.3- Síntese do carbobenzoxi-L-fenilalanil-L-eritro-β-fenilseril-L-isoleucina-OMe (61a)

Obtido a partir de 0,8 g (1,70 mmol) do dipeptídeo Z-L-Phe-L-eritro-Pheser-OH (**59a**), 0,2 g (1,70 mmol) HOBt, 0,2 mL (0,17 g, 1,70 mmol) de NMM, 0,2 g (1,70 mmol) do aminoácido esterificado isoleucina e 0,4 g (1,78 mmol) de DCC dissolvidos em 3,0 mL de THF seco, em rendimento de 55%.

**Dados físicos:** Z-L-Phe-L-eritro-Pheser-L-Ile-OMe (**61a**): sólido branco, RMN de  $^1\text{H}$  (400



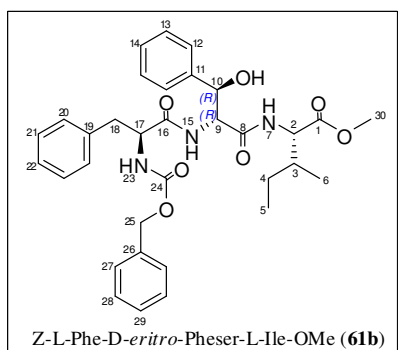
MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0,69 (d, 3H,  $J_{6-3}= 6,80$  Hz); 0,85 (t, 3H); 1,10 – 1,31 (m, 2H); 1,84 (m, 1H); 2,96-3,19 (dd, 2H,  $J_{18-17}= 6,16$  Hz,  $J_{18-17}= 10,24$  Hz,  $J_{18-18'}= 15,96$  Hz); 3,74 (s, 3H); 4,48 (dd, 1H,  $J_{2-3}= 5,15$  Hz,  $J_{2-7}= 9,84$  Hz); 4,71 (dd, 1H,  $J_{17-18'}= 10,24$  Hz,  $J_{17-18}=6,16$  Hz); 4,93 (dd, 1H); 5,07 (s, 2H); 5,37 (d, 1H); 5,35 (d, 1H); 7,10 (d,  $J_{7-2}= 9,84$  Hz); 7,24 - 7,45 (m, 15H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :

11,4; 15,4; 25,0; 29,6; 33,7; 37,4; 52,1; 55,9; 56,6; 57,2; 67,2; 71,2; 125,4; 126,5; 127,8; 128,1; 128,3; 128,3; 128,4; 128,5; 129,3; 136,6; 137,6; 139,1; 156,2; 169,5; 170,9; 171,6.

#### 4.2.6.4- Síntese do carbobenzoxi-L-fenilalanil-D-eritro-β-fenilseril-L-isoleucina-OMe (61b)

Obtido a partir de 2,2 (4,82 mmol) do dipeptídeo Z-L-Phe-D-eritro-Pheser-OH (**59b**), 0,65 g (4,82 mmol) HOBt, 0,5 mL (0,5 g, 4,82 mmol) de NMM, 0,7 g (4,82 mmol) do aminoácido esterificado isoleucina e 1,0 g (5,05 mmol) de DCC dissolvidos em 7,0 mL de THF seco e com um rendimento de 62%.

**Dados físicos:** Z-L-Phe-D-eritro-Pheser-L-Ile-OMe **61b**: RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :



0,81 (d, 3H,  $J_{6-3}= 6,80$ ); 0,90 (t, 3H); 1,10 – 1,31 (m, 2H); 1,84 (m, 1H); 2,96-3,19 (dd, 2H,  $J_{18-17}= 6,16$  Hz,  $J_{18-17}= 10,24$  Hz,  $J_{18-18'}= 15,96$  Hz); 3,74 (s, 3H); 4,50 (dd, 1H,  $J_{2-3}= 5,24$  Hz,  $J_{2-7}= 9,84$  Hz); 4,66 (dd, 1H,  $J_{17-18'}= 10,24$  Hz,  $J_{17-18}=6,16$  Hz); 4,93 (dd, 1H); 5,07 (s, 2H); 5,37 (d, 1H); 5,19 (d, 1H,); 7,10 (d,  $J_{7-2}= 9,84$  Hz); 7,24 - 7,45 (m, 15H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 11,5; 15,6; 25,0;

29,8; 33,8; 36,8; 52,1; 56,0; 56,6; 58,0; 67,6; 73,1; 125,5; 126,5; 127,6; 127,9; 128,2; 128,4; 128,6; 129,3; 136,1; 137,3; 139,1; 155,4; 169,5; 170,1; 171,6.

#### 4.2.7- Desproteção do Grupo Carboxi dos tripeptídeos formados: Método Geral

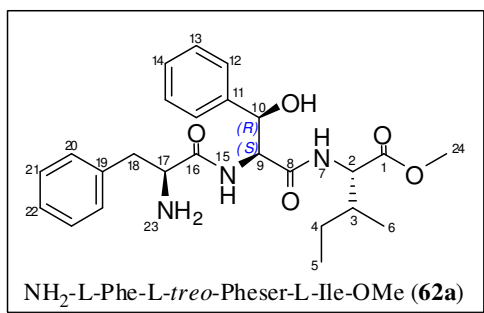
Em um balão de duas bocas dissolveu-se os respectivos tripeptídeos em metanol, em seguida foram adicionadas quantidades catalíticas de Pd/C (10%), e a esta mistura foi então borbulhado H<sub>2</sub> sob agitação magnética a temperatura ambiente. O término das reações foi monitorado por CCD.

Depois de completadas as reações, estas foram filtradas em coluna cromatográfica empacotada com celite, utilizando-se metanol como fase móvel, obtendo-se após a evaporação do solvente os produtos com rendimentos que variam de 87-98%.

##### 4.2.7.1- Síntese do NH<sub>2</sub>-L-fenilalanil-L-treo-β-fenilseril-L-isoleucina-OMe (62a), NH<sub>2</sub>-L-fenilalanil-D-treo-β-fenilseril-L-isoleucina-OMe (62b), NH<sub>2</sub>-L-fenilalanil-L-eritro-β-fenilseril-L-isoleucina-OMe (63a) e NH<sub>2</sub>-L-fenilalanil-D-eritro-β-fenilseril-L-isoleucina-OMe (63b)

Partindo-se de 1,4 g (2,44 mmol) do tripeptídeo protegido Z-L-Phe-L-treo-Pheser-L-Ile-OMe (**60a**), 0,70 g (1,18 mmol) do Z-L-Phe-D-treo-Pheser-L-Ile-OMe (**60b**), 0,50 g (0,84 mmol) do Z-L-Phe-L-eritro-Pheser-L-Ile-OMe (**61a**) e 1,50 g (2,54 mmol) do Z-L-Phe-D-eritro-Pheser-L-Ile-OMe (**61b**), dissolvidos em 10,0 mL de MeOH, obteve-se os tripeptídeos hidrogenados **62a**, **62b**, **63a** e **63b** pelo borbulhamento de H<sub>2</sub> a essas soluções contendo quantidades catalíticas de Pd/C (10%) durante 2 horas a temperatura ambiente, com os respectivos rendimentos de 98, 95, 91 e 87%.

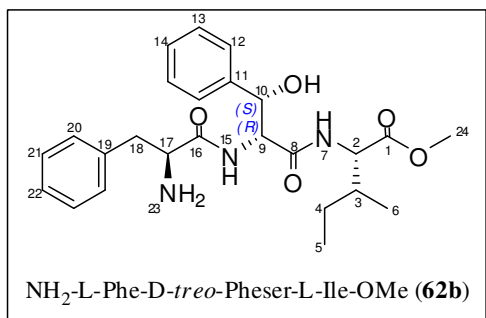
Dados físicos: NH<sub>2</sub>-L-Phe-L-treo-Pheser-L-Ile-OMe (**62a**): massa viscosa incolor; RMN de



<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0,88 (d, 3H, J<sub>6-3</sub>= 6,84 Hz); 0,90 (t, 3H, J<sub>5-4</sub>=6,52 Hz); 1,16 (m, 1H); 1,44 (m, 1H); 1,90 (m, 1H); 2,27; 3,00 (dd, 1H, J<sub>18-17</sub>=4,00 Hz, J<sub>18'-17</sub>=9,50 Hz, J<sub>18-18'</sub>=13,70 Hz); 3,58 (dd, 1H, J<sub>17-18</sub>=3,85 Hz, J<sub>17-23</sub>= 9,44 Hz); 3,75 (s, 3H); 4,63 (dd, 1H, J<sub>9-15</sub>=7,84 Hz, J<sub>9-10</sub>= 2,60 Hz); 4,48 (dd, 1H, J<sub>2-7</sub>= 8,30 Hz, J<sub>2-3</sub>= 3,16 Hz); 5,36 (d, 1H, J<sub>10-9</sub>= 2,60

Hz); 7,30 (d, 1H) 7,06 - 7,33(m, 10H); 8,21 (d, 1H, J<sub>15-9</sub>= 7,84 Hz). RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 11,5; 15,4; 25,0; 37,6; 40,4; 52,1; 56,7; 56,2; 57,3; 71,9; 125,9; 126,9; 127,8; 128,3; 128,7; 129,1; 137,2; 139,1; 171,0; 171,6; 175,4.

**Dados físicos:** NH<sub>2</sub>-L-Phe-D-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (**62b**): massa viscosa incolor; RMN de



<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0,81 (d, 3H, J<sub>6-3</sub>= 6,80 Hz); 0,91 (t, 3H, J<sub>5-4</sub>=7,80 Hz); 1,18 (m, 1H); 1,25 (m, 1H); 1,84 (m, 1H); 2,67; 3,20 (dd, 1H, J<sub>18-17</sub>= 3,76 Hz, J<sub>18'-17</sub> = 7,90 Hz; J<sub>18-18'</sub>=14,00 Hz); 3,60 (dd, 1H, J<sub>17-18</sub>=3,76 Hz, J<sub>17-18'</sub>= 7,90 Hz); 3,65 (s, 3H); 4,44 (dd, 1H, J<sub>2-7</sub>= 7,44 Hz, J<sub>2-3</sub>= 5,04); 4,60 (dd, 1H, J<sub>9-15</sub>= 6,04 Hz, J<sub>9-10</sub>= 2,32 Hz); 5,35 (d, 1H, J<sub>10-9</sub>= 2,32

Hz); 7,15 (d, 1H, J<sub>7-2</sub>= 7,44 Hz) 7,19 - 7,49(m, 10H); 8,31 (d, 1H, J<sub>15-9</sub>= 6,04 Hz). RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 11,6; 15,8; 26,3; 38,2; 38,4; 52,3; 55,4; 58,3; 60,6; 74,6; 127,7; 128,8; 128,9; 129,3; 130,0; 130,5; 135,3; 142,3; 169,8; 171,7; 173,3. ESI-MS (m/z) = 456,24 [M<sup>+</sup>],

#### 4.2.8 - Reações de N-Alquilação do Aminoácido Terminal

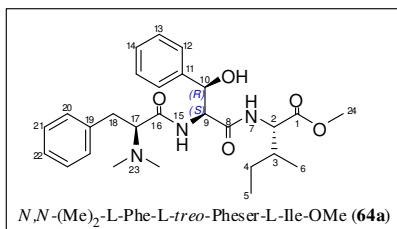
##### 4.2.8.1- Reação de N,N-Dimetilação: Método Geral

Aos tripeptídeos com função amino livre, dissolvidos em metanol absoluto e transferidos para o frasco reacional do hidrogenador “*tipo Parr*”, foi adicionado quantidades catalíticas de Pd/C (10%) e para cada equivalente de peptídeo adicionou-se dois equivalentes de formaldeído. O frasco foi adaptado ao hidrogenador e a solução foi então submetida a uma pressão de 3 KPa/cm<sup>2</sup> de H<sub>2</sub>, mantendo-se o meio reacional sob agitação a temperatura ambiente aproximadamente por 24 horas. A reação foi monitorada pela diminuição na pressão de H<sub>2</sub> no recipiente e por CCD e após o seu término eliminou-se o catalisador, por filtração em uma coluna empacotada com celite, onde evaporou-se em seguida o solvente.

##### 4.2.8.1.1- Síntese do N,N-(Me)<sub>2</sub>-L-fenilalanil-L-*treo*-β-fenilseril-L-isoleucina-OMe (**64a**).

Partindo-se de 0,65 g (1,426 mmol) do tripeptídeo **62a** dissolvido em 10,0 mL de MeOH adicionou-se 0,08 mL (0,085 g, 2,85 mmol) de solução aquosa formaldeído (37%) e uma quantidade catalítica de Pd/C (10%), a reação foi mantida sob pressão de H<sub>2</sub> igual a 3 KPa/cm<sup>2</sup>, por aproximadamente 24 horas, fornecendo após o término o tripeptídeo dimetilado **64a** com o rendimentos de 58%.

**Dados físicos:** *N,N*-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-L-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (**64a**): óleo amarelado, RMN de <sup>1</sup>H

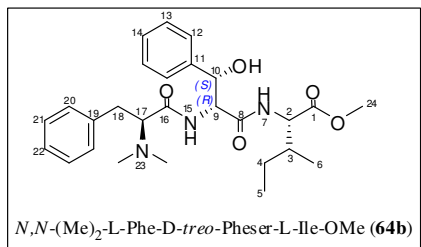


(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0,78 (d, 3H,  $J_{6-3}= 6,88$ ); 0,82 (t, 3H,  $J_{5-4}=7,38$ ); 1,06 (m, 1H); 1,30 (m, 1H); 1,81 (m, 1H); 2,06 (s, 6H); 2,77 (dd, 2H,  $J_{18-17}=5,76$  Hz,  $J_{18'-17}=7,78$  Hz,  $J_{18-18'}=14,00$  Hz); 3,15 (dd, 1H,  $J_{17-18}=5,76$  Hz,  $J_{17-18'}= 7,78$  Hz); 3,73 (s, 3H); 4,55 (dd, 1H,  $J_{9-15}=7,60$  Hz,  $J_{9-10}= 2,16$  Hz); 4,44 (dd, 1H,  $J_{2-7}= 8,32$  Hz,  $J_{2-3}= 5,12$  Hz); 5,41 (d, 1H,  $J_{10-9}= 2,16$  Hz); 7,33 (d, 1H,  $J_{2-7}= 8,32$  Hz); 6,94 - 7,17(m, 10H); 7,80 (d, 1H,  $J_{15-9}= 7,6$  Hz). RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 11,4; 15,4; 24,8; 29,6; 32,5; 37,3; 42,0; 52,0; 53,4; 56,7; 57,0; 71,2; 125,7; 126,0; 127,7; 128,2; 128,4; 128,9; 139,2; 139,4; 171,6; 171,7; 174,0. ESI-MS ( $m/z$ ) = 484,40 [ $M^+$ ].

#### 4.2.8.1.2- Síntese do *N,N*-(Me)<sub>2</sub>-L-fenilalanil-D-*treo*- $\beta$ -fenilseril-L-Isoleucina-OMe (**64b**)

Com 0,25 g (0,54 mmol) do tripeptídeo **62b** dissolvidos em 5,0 mL de MeOH, foram adicionados 0,03 mL (0,032 g, 1,08 mmol) de formaldeído (37%) e o Pd/C (10%) (catalítico), a pressão do sistema foi elevada para 3 KPa/cm<sup>2</sup> de H<sub>2</sub>, por aproximadamente 22 horas, rendendo o tripeptídeo dimetilado **64b** em 70%.

**Dados físicos:** *N,N*-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-D-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (**64b**): sólido cristalino. RMN de

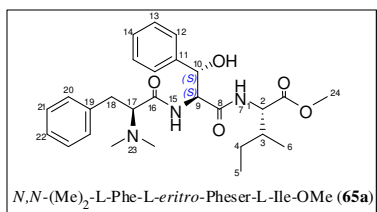


<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0,81 (d, 3H,  $J_{6-3}= 6,84$  Hz); 0,84 (t, 3H,  $J_{5-4}=7,08$  Hz); 1,12 (m, 1H); 1,33 (m, 1H); 1,84 (m, 1H); 2,18 (s, 6H); 2,81-3,06 (dd, 2H,  $J_{18-17}=6,08$  Hz;  $J_{18'-17}= 6,92$  Hz,  $J_{18-18'}=14,08$  Hz); 3,19 (dd, 1H); 3,64 (s, 3H); 4,56 (dd, 1H,  $J_{9-15}=7,76$  Hz,  $J_{9-10}= 2,92$  Hz); 4,40 (dd, 1H,  $J_{2-7}= 8,20$  Hz,  $J_{2-3}= 4,82$  Hz); 5,23 (d, 1H,  $J_{10-9}= 2,88$  Hz); 7,08 (d, 1H,  $J_{7-2}= 8,20$  Hz); 7,13 - 7,27 (m, 10H); 7,73 (d, 1H,  $J_{15-9}= 7,50$  Hz). RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 11,5; 15,5; 25,1; 32,8; 37,3; 41,9; 52,0; 56,8; 57,8; 70,1; 71,8; 125,7; 126,2; 127,7; 128,3; 128,3; 129,0; 139,2; 139,2; 171,8; 171,0; 171,0. ESI-MS ( $m/z$ ) = 484,40 [ $M^+$ ].

#### 4.2.8.1.3- Síntese do *N,N*-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-L-eritro-β-fenilseril-L-Isoleucina-OMe (65a)

A partir de 0,10 g (0,21 mmol) de **63a**, dissolvidos em 4,0 mL de MeOH foram adicionados 0,012 mL (0,012 g, 0,42 mmol) de formaldeído (37%) e uma quantidade catalítica de Pd/C. A pressão de H<sub>2</sub> empregada foi de 3 KPa/cm<sup>2</sup>, por um tempo aproximado 20 horas, fornecendo após o término o peptídeo **65a** com rendimento de 55%.

Dados físicos: *N,N*-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-L-eritro-Pheser-L-Ile-OMe (**65a**): massa oleosa amarelada,

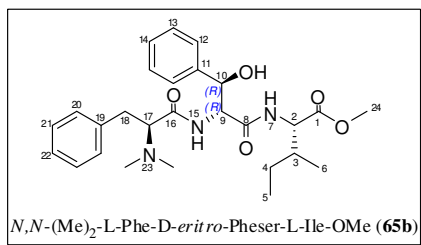


RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0,63 (d, 3H, J<sub>6-3</sub>= 6,80 Hz); 0,72 (t, 3H, J<sub>5-4'</sub>=7,4 Hz, J<sub>5-4</sub>= 3,4 Hz); 0,85 (m, 1H); 1,16 (m, 1H); 1,80 (m, 1H); 2,34 (s, 6H); 2,95-3,08 (dd, 2H, J<sub>18-17</sub>=3,20 Hz, J<sub>18'-17</sub>=8,20 Hz, J<sub>18-18'</sub>=13,50 Hz); 3,43 (dd, 1H, J<sub>17-18</sub>=3,20 Hz, J<sub>17-18'</sub>= 8,2 Hz); 3,60 (s, 3H); 4,55 (dd, 1H, J<sub>9-15</sub>=7,70 Hz, J<sub>9-10</sub>= 3,2 Hz); 4,30 (dd, 1H, J<sub>2-7</sub>= 7,60 Hz, J<sub>2-3</sub>= 4,90 Hz); 5,21 (d, 1H, J<sub>10-9</sub>= 3,2 Hz); 6,90 (d, 1H, J<sub>7-2</sub>= 7,60 Hz); 7,14 - 7,27 (m, 10H); 7,80 (d, 1H, J<sub>15-9</sub>= 7,7 Hz). RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 11,4; 15,2; 24,9; 33,2; 37,4; 41,7; 52,0; 56,5; 56,8; 58,0; 74,0; 125,7; 125,9; 127,7; 128,1; 128,4; 128,9; 139,6; 139,2; 171,5; 171,6; 172,0.

#### 4.2.8.1.4- Síntese do *N,N*-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-D-eritro-β-fenilseril-L-Isoleucina-OMe (65b)

Pela reação de 0,65 g (1,42 mmol) do tripeptídeo **63b** em 10,0 mL de MeOH, com de 0,08 mL (0,085 g, 2,85 mmol) de formaldeído (37%) e uma quantidades catalítica de Pd/C sob uma pressão de H<sub>2</sub> de 3KPa/cm<sup>2</sup>, por aproximadamente 24 horas, obteve-se o tripeptídeo dimetilados **65b** com rendimento de 63%.

Dados físicos: *N,N*-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-D-eritro-Pheser-L-Ile-OMe (**65b**): óleo amarelado; RMN de



<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0,77 (d, 3H, J<sub>6-3</sub>= 6,80 Hz); 0,82 (t, 3H, J<sub>5-4'</sub>=7,3 Hz, J<sub>5-4</sub>= 3,5 Hz); 0,85 (m, 1H); 1,16 (m, 1H); 1,75 (m, 1H); 2,25 (s, 6H); 2,77-2,84 (dd, 2H); 3,56 (dd, 1H); 3,65 (s, 3H); 4,86 (dd, 1H, J<sub>9-15</sub>=7,7 Hz, J<sub>9-10</sub>= 2,0 Hz); 4,38 (dd, 1H, J<sub>2-7</sub>= 7,60 Hz, J<sub>2-3</sub>= 4,80 Hz); 5,32 (d, 1H, J<sub>10-9</sub>= 2,0 Hz); 6,90 (d, 1H, J<sub>7-2</sub>= 7,6 Hz); 7,14 - 7,27 (m, 10H); 7,80 (d, 1H, J<sub>15-9</sub>= 7,7 Hz). RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 11,4; 15,5; 25,2; 32,7; 37,3; 41,8; 52,0; 56,7; 57,3; 58,0; 74,0; 125,8; 126,5; 127,8; 128,3; 128,5; 129,0; 139,6; 135,9; 171,5; 171,2; 172,0.

#### 4.2.8.2- Reação de *N*-Monometilação: Método Geral

Em um balão de 100 mL, devidamente flambado e sob atmosfera de argônio foram adicionados 0,18 mmol dos referidos tripeptídeos (NH<sub>2</sub>-livre), dissolvidos em MeOH absoluto. A estas soluções foram adicionados 0,18 mmol de benzaldeído recentemente destilado, com forte agitação por 1h a temperatura ambiente, então adicionou-se 0,19 mmol de NaBH<sub>3</sub>CN e as reações foram deixadas agitando por mais 18h. Após este período adicionou-se 0,20 mmol de formaldeído e a agitação foi continuada por mais 1h, quando se adicionou mais 0,19 mmol de NaBH<sub>3</sub>CN, as misturas reacionais permaneceram sobre forte agitação por mais 18h até completo consumo dos materiais de partida que foram acompanhados por CCD.

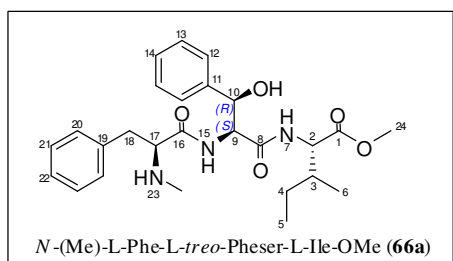
Estas misturas reacionais foram então passadas em um filtro de fundo sinterizado, preenchido com celite, onde após foram várias vezes lavadas com MeOH, o qual foi recolhido e evaporado sob vácuo, rendendo os produtos, na maioria óleos amarelados que foram redissolvidos em MeOH e transferidos para o frasco do hidrogenador, onde foram submetidos as condições de desproteção de grupos *N*-benzil, pelo tratamento com quantidades catalíticas de Pd/C a pressão de 4KPa/cm<sup>2</sup> de H<sub>2</sub>.

As reações foram mantidas no hidrogenador sob agitação a temperatura ambiente por aproximadamente 48 horas, acompanhando-se a sua evolução pela diminuição da pressão de H<sub>2</sub> no recipiente e por CCD, após o término estas tiveram o catalisador eliminado por filtração em celite e o solvente foi evaporado, rendendo os produtos *N*-monometilados em 35 a 52%.

##### 4.2.8.2.1- Síntese do *N*-(Me)-*L*-fenilalanil-*L*-treo-β-fenilseril-*L*-Isoleucina-OMe (66a)

Obtido de acordo com a metodologia geral, partindo-se de 0,65 g (1,426 mmol) do tripeptídeo **62a** fornecendo após o término das etapas de síntese o tripeptídeo monometilado **66a** com o rendimentos de 52%.

Dados físicos: *N*-(Me)-*L*-Phe-*L*-treo-Pheser-*L*-Ile-OMe (**66a**): óleo amarelado; RMN de <sup>1</sup>H



(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0,90 (t, *J* = 6,9 Hz, 10H); 1,21 – 1,07 (m, 3H); 1,45 – 1,36 (m, 2H); 1,95 – 1,89 (m, 2H); 2,18 (s, 3H); 2,82 (dd, *J* = 13,9, 4,1 Hz, 1H); 3,16 (dd, *J* = 10,0, 4,3 Hz, 1H); 3,76 (s, 3H); 4,54 (dd, *J* = 8,5, 5,1 Hz, 1H); 4,65 (dd, *J* = 8,0, 2,4 Hz, 1H); 5,43 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H); 7,04 – 7,00 (m, 3H);

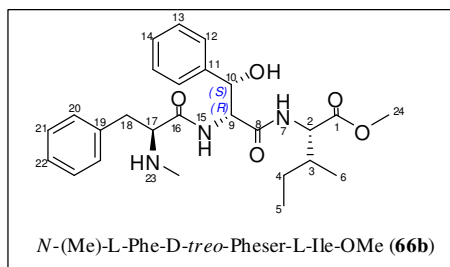
7,30 – 7,22 (m, 9H); 7,36 (dt, *J* = 15,2, 7,4 Hz, 10H); 8,11 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H). RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 11,5; 15,5; 24,9; 35,2; 37,3; 37,6; 38,8; 41,9; 52,2; 56,7; 57,1; 66,0;

71,6; 125,7; 125,8; 126,9; 127,7; 128,2; 128,3; 128,4; 128,7; 128,8; 128,9; 136,9; 139,2; 171,3; 171,6; 175,0.

#### 4.2.8.2.2- Síntese do *N*-(*Me*)-*L*-fenilalanil-*D*-*treo*- $\beta$ -fenilseril-*L*-Isoleucina-*OMe* (**66b**)

Pela reação de 0,25 g (0,54 mmol) do tripeptídeo **62b**, seguindo as etapas da metodologia geral obteve-se o tripeptídeo dimetilado **66b** em 43%.

**Dados físicos:** *N*-(*Me*)-*L*-Phe-*D* *treo*-Pheser-*L*-Ile-*OMe* (**66b**): óleo amarelado; RMN de  $^1\text{H}$



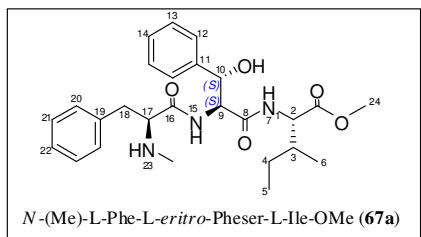
(400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0,95 – 0,90 (m, 6H); 1,21 (dd,  $J = 14,9, 6,1$  Hz, 2H); 1,50 – 1,38 (m, 2H); 1,90 (s, 2H); 2,30 (s, 4H); 2,92 (dd,  $J = 14,3, 6,6$  Hz, 1H); 3,24 (dd,  $J = 14,3, 6,3$  Hz, 2H); 3,42 – 3,34 (m, 2H); 3,51 (dd,  $J = 41,1, 14,6$  Hz, 3H); 3,69 (s, 3H); 3,98 (s, 1H); 4,49 (dd,  $J = 8,4, 4,7$  Hz, 1H); 4,64 (dd,  $J = 8,0,$

2,2 Hz, 1H); 5,39 (d,  $J = 1,3$  Hz, 1H); 7,37 – 7,08 (m, 24H); 7,99 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 11,6; 15,7; 25,2; 31,4; 37,3; 38,0; 52,0; 56,8; 57,5; 59,2; 66,8; 71,5; 125,7; 126,0; 127,3; 127,6; 128,3; 128,4; 128,7; 129,2; 138,3; 139,1; 140,1; 171,7; 171,8; 174,4.

#### 4.2.8.2.3- Síntese do *N*-(*Me*)-*L*-fenilalanil-*L*-eritro- $\beta$ -fenilseril-*L*-Isoleucina-*OMe* (**67a**)

Seguindo a metodologia geral descrita obteve-se ao término o peptídeo **67a** com rendimento de 38%, partindo-se de 0,10 g (0,21 mmol) de **63a**.

**Dados físicos:** *N*-(*Me*)-*L*-Phe-*L*-eritro-Pheser-*L*-Ile-*OMe* (**67a**): massa oleosa amarelada,



RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0,81 (d,  $J_{6-3} = 6,80$  Hz, 3H); 0,90 (t, 3H); 1,20 – 1,00 (m, 2H); 1,35 – 1,40 (m, 2H); 1,84 (m, 1H); 2,24 (s, 3H); 3,00 (dd, 2H,  $J_{18-17} = 6,16$  Hz,  $J_{18'-17} = 13,24$  Hz); 3,60 (s, 3H); 4,50 (dd, 1H,  $J_{2-3} = 5,15$  Hz,  $J_{2-7} = 9,10$  Hz); 4,55 (dd, 1H,  $J_{9-10} = 3,2$

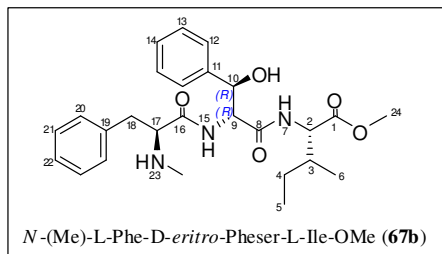
Hz,  $J_{9-15} = 7,70$  Hz); 4,70 (dd, 1H,  $J_{17-18''} = 8,5$  Hz,  $J_{17-18} = 6,16$  Hz); 5,21 (d, 1H,  $J_{10-9} = 3,2$  Hz); 7,10 (d); 7,24 - 7,35 (m, 10H); 8,0 (d,  $J = 7,6$  Hz, 1H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 11,4; 15,3; 24,9; 34,2; 37,4; 38,4; 38,7; 42,0; 52,2; 56,5; 56,8; 58,04; 66,4; 74,03; 125,7; 125,9; 127,7; 128,1; 128,4; 128,7; 128,8; 128,9; 139,2; 171,4; 171,6; 174,0.



#### 4.2.8.2.4- Síntese do *N*-(Me)-*L*-fenilalanil-*D*-eritro- $\beta$ -fenilseril-*L*-Isoleucina-OMe (**67b**)

Obtido de acordo com a metodologia geral a partir de 0,65 g (1,42 mmol) do tripeptídeo **63b** obteve-se o tripeptídeo dimetilados **67b** com rendimento de 35%.

Dados físicos: *N*-(Me)-*L*-Phe-*D*-eritro-Pheser-*L*-Ile-OMe (**67b**): óleo amarelado; RMN de  $^1\text{H}$



(400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0,83 (t, 3H); 0,85 (m, 1H); 0,87 (d, 3H); 1,24 (m, 1H); 1,45-1,53 (m, 1H); 1,95 (m, 2H); 2,35 (s, 3H); 2,87 (dd, 2H); 3,46 (dd, 1H); 3,50 (dd, 1H); 3,65 (s, 3H); 4,86 (dd, 1H,  $J_{9-15}=7,7$  Hz,  $J_{9-10}=2,0$  Hz); 4,48 (dd, 1H,  $J_{2-7}=7,60$  Hz,  $J_{2-3}=4,80$  Hz); 5,32 (d, 1H,  $J_{10-9}=2,0$  Hz); 6,90 (d, 1H,  $J_{7-2}=7,6$

Hz); 7,10 - 7,30 (m, 10H); 7,80 (d, 1H,  $J_{15-9}=7,7$  Hz). RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 11,5; 15,7; 25,2; 31,7; 37,3; 37,9; 52,0; 56,7; 57,31; 59,3; 66,7; 74,03; 125,8; 126,0; 127,4; 127,3; 128,5; 129,0; 138,1; 139,6; 142,1; 171,4; 171,6; 174,0.

#### 4.2.9. Síntese dos Tetrapeptídeos: Método Geral

A obtenção dos tetrapeptídeos ocorreu pela reação de uma mistura equimolar dos dipeptídeos com a função carboxila livre **58a** e **58b**, com os dipeptídeos com função amino livre **70** e **71**. Na mesma quantidade, adicionou-se o 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) e a *N*-metilmorfolina (NMM), dissolvidos em THF seco a  $0^\circ\text{C}$ , sob atmosfera de argônio, em seguida adicionou-se o reagente de acoplamento diciclohexilcarbodiimidade (DCC) em um excesso de 0,27 mmol.

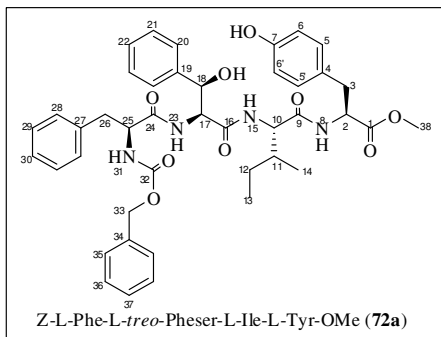
Essa mistura foi deixada sob agitação a  $0^\circ\text{C}$  por 1 h e por mais 5 h a temperatura ambiente. Deste modo, após completada a reação, filtrou-se a DCU formada e o solvente foi eliminado a vácuo, o resíduo foi re-dissolvido em acetato de etila e lavado sucessivamente com uma solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , água, solução aquosa de ácido cítrico a 10 % (m/v), novamente com solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (3 x 50 mL para cada lavagem) e finalmente com água. A fase orgânica foi seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e o solvente evaporado a pressão reduzida, rendendo após purificação os tetrapeptídeos em rendimentos que variam de 45 a 52%.

##### 4.2.9.1- Síntese do carbobenzoil-*L*-fenilalanil-*L*-treo- $\beta$ -fenilseril-*L*-isoleucil-*L*-tirosina-OMe (**72a**)

Obtido a partir de 0,30 g (0,64mmol) do dipeptídeo *Z*-*L*-Phe-*L*-treo-Pheser-OH (**58a**), 0,08 g (0,64 mmol) HOBt, 0,07 mL (0,064 g, 0,64 mmol) de NMM, 0,19 g (0,64 mmol) do

dipeptídeo NH<sub>2</sub>-L-Ile-L-Tyr-OMe (**70**) e 0,13 g (0,64 mmol) de DCC dissolvidos em 5mL de THF seco e com um rendimento de 52%.

**Dados físicos:** Z-L-Phe-L-*treo*-Pheser-L-Ile-L-Tyr-OMe (**72a**): sólido branco amorfo. RMN

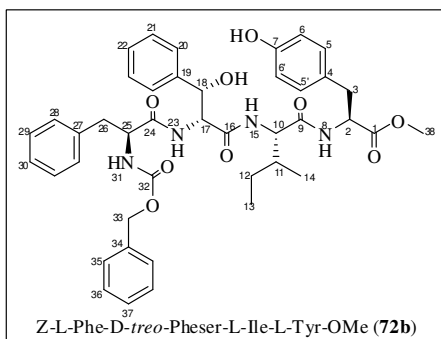


de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,79 (t, J<sub>5-4</sub>=7,0 Hz, J<sub>5-4</sub>= 3,0 Hz 3H); 0,83 (d, J= 6,7 Hz, 3H); 1,07 (dd, J = 14,2, 5,0 Hz, 10H); 1,45 – 1,37 (m, 4H); 1,24 (s, 8H); 1,07 (m, 2H); 1,43 (m, 1H); 1,63 (m, 1H); 2,89 – 2,69 (dd, 1H); 2,95 – 2,78 (dd, 4H); 3,54 (s, 3H); 4,32 (dd, J = 10,0, 5,0 Hz, 2H); 4,41 (dd, J = 6,2 Hz, 1H); 4,56 (d, 1H); 4,95 (s, 2H); 5,10 (d, J = 3,2 Hz, 1H); 5,71 (d, J = 4,4 Hz, 1H); 6,67 (d, J = 8,2 Hz, 2H); 6,98 (d, J = 8,3 Hz, 2H); 7,19 (m, 10H); 7,30 (m, 3H); 7,37 (d, 2H); 7,48 (d, J = 9,0 Hz, 2H); 7,84 (d, J = 7,9 Hz, 1H); 8,17 (d, J = 7,3 Hz, 1H); 9,05 (s, OH). RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 11,1; 15,1; 23,8; 35,9; 37,1; 37,3; 51,6; 54,2; 56,2; 56,4; 58,8; 65,2; 72,5; 115,1; 126,2; 126,4; 127,0; 127,4; 127,6; 127,7; 128,0; 128,3; 129,2; 130,0; 137,0; 138,1; 142,2; 155,8; 156,0; 169,2; 171,1; 171,8; 171,9. ESI-MS (m/z) =753,2 [M<sup>+</sup>],

#### 4.2.9.2- Síntese do carbobenzozi-L-fenilalanil-D-*treo*-β-fenilseril-L-*isoleucil*-L-tirosina-OMe (**72b**)

Obtido a partir de 0,30 g (0,64mmol) do dipeptídeo Z-L-Phe-D-*treo*-Pheser-OH (**58b**), 0,09 g (0,64 mmol) HOBt, 0,070 mL (0,064 g, 0,64 mmol) de NMM, 0,2 g (0,64 mmol) do dipeptídeo NH<sub>2</sub>-L-Ile-L-Tyr-OMe (**70**) e 0,13 g (0,64 mmol) de DCC dissolvidos em 5mL de THF seco e com um rendimento de 47%.

**Dados físicos:** Z-L-Phe-D-*treo*-Pheser-L-Ile-L-Tyr-OMe (**72b**): sólido branco amorfo, RMN



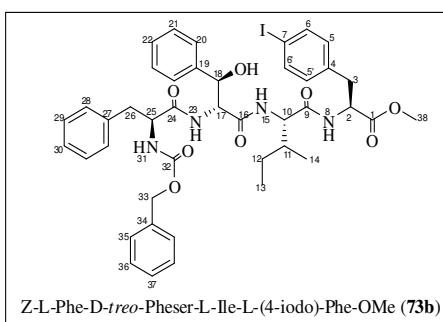
de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,71 (t, 3H); 1,11 (d, 3H); 1,07 (dd, J = 14,2, 5,0 Hz, 10H); 1,24 (s, 8H); 1,45 – 1,37 (m, 4H); 1,27 (m, 2H); 1,62 (m, 1H); 1,73 (m, 1H); 2,80 (dd, J= 14,0Hz, 3,6 Hz, 2H); 2,91 (dd, J= 6,9 Hz, 2,5 Hz, 2H); 3,55 (s, 3H); 4,31 (dd, J = 10,0, 5,0 Hz, 2H); 4,43 (dd, J = 14,4 Hz J = 7,3 Hz, 1H); 4,58 (d, J = 6,6 Hz, 1H); 4,96 (s, 2H); 5,18 (dd, 1H); 5,63 (d, J = 4,7 Hz, 1H); 6,68 (d, J = 8,4 Hz, 2H); 7,02 (d, J = 8,3 Hz, 2H); 7,35- 7,09 (m, 13H); 7,41 (d, J = 7,1 Hz, 2H); 8,06 (d, J = 8,3 Hz, 1H); 8,25 (d, J = 8,4 Hz, 1H); 9,07 (s, OH). RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 10,6; 14,8; 24,1; 24,3; 24,6; 25,4; 33,4; 36,5; 37,6; 51,7; 53,5; 56,2;

57,9; 58,4; 66,8; 71,9; 115,2; 125,7; 125,8; 126,2; 126,6; 126,8; 127,4; 127,8; 127,9; 128,2; 128,3; 128,8; 129,9; 135,9; 136,2; 139,7; 155,6; 156,2; 169,8; 170,9; 171,9; 172,0. ESI-MS (m/z) =753,2 [M<sup>+</sup>],

#### 4.2.9.3- Síntese do carbobenzoxi-L-fenilalanil-D-treo-β-fenilseril-L-isoleucil-L-(4-iodo)-fenilalaniana-OMe (73b)

Obtido a partir de 0,30 g (0,64mmol) do dipeptídeo Z-L-Phe-D-treo-Pheser-OH (**58b**), 0,09 g (0,64 mmol) HOBt, 0,07 mL (0,064 g, 0,64 mmol) de NMM, 0,3 g (0,64 mmol) do dipeptídeo NH<sub>2</sub>-L-Ile-L-(4-iodo)-Phe-OMe (**71**) e 0,13 g (0,64 mmol) de DCC dissolvidos em 5 mL de THF seco e com um rendimento de 45%.

Dados físicos:Z-L-Phe-D-treo-Pheser-L-Ile-L-(4-iodo)-Phe-OMe (**73b**): sólido branco, p.f. =



160-162°C; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,74 (t, *J* = 6,7 Hz, 7H); 1,03 (d, *J* = 6,1 Hz, 6H); 1,24 (d, *J* = 11,6 Hz, 3H); 1,95 – 1,49 (m, 5H); 2,70 (dd, *J* = 13,7, 2,8 Hz, 1H); 3,11 – 2,91 (m, 2H); 4,35 – 4,19 (m, 2H); 4,45 (dd, *J* = 14,5, 7,3 Hz, 1H); 4,58 (dd, *J* = 8,5, 3,4 Hz, 1H); 4,99 – 4,81 (m, 2H); 5,20 – 5,03 (m, 1H); 5,57 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); 5,68 (d, *J* = 4,9 Hz, 1H); 7,47 – 6,91 (m, 23H); 7,67 (dd, *J* = 39,8, 8,5 Hz, 3H); 8,18 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H); 8,45 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H). RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 11,1; 15,0; 22,8; 23,7; 24,5; 25,3; 30,4; 33,4; 35,9; 36,9; 37,3; 38,9; 39,1; 39,3; 39,5; 39,7; 39,9; 40,1; 47,5; 51,7; 53,5; 56,2; 58,8; 65,2; 67,3; 72,6; 92,5; 126,2; 126,4; 127,0; 127,4; 127,6; 127,7; 128,0; 128,3; 129,2; 131,5; 136,9; 136,9; 137,0; 138,1; 142,1; 155,7; 156,7; 169,2; 171,1; 171,5; 171,7. ESI-MS (m/z) =862,8 [M<sup>+</sup>],

#### 4.2.10- Determinação da configuração absoluta dos dipeptídeos

A determinação da configuração absoluta dos dipeptídeos (**56-57**) foi realizada por sua hidrólise ácida, seguido de derivatização e análise por cromatografia gasosa com fase quiral (CGFQ) (descrita no item 4.1.3.1), por comparação com os padrões dos aminoácidos.

##### 4.2.10.1- Hidrólise ácida dos peptídeos:

Em uma ampola de vidro, adicionou-se 2 a 3 mg dos respectivos peptídeos juntamente com 2 mL de HCl (tridestilado) ≈ 6M, esta ampola foi então selada sob vácuo e mantida a uma temperatura de 90-120 °C por 24h. Após este período o ácido foi evaporado e o produto

deixado sob vácuo em dessecador contendo KOH por mais 12 horas, para serem posteriormente derivatizados em seguida, (itens 4.10.2 e 4.10.3).

#### **4.2.10.2- Esterificação dos aminoácidos**

A reação de esterificação das amostras de peptídeos hidrolisadas e dos padrões de aminoácidos, foi realizada pela reação destas com 1 mL de solução de diazometano em éter etílico. Estas reações permaneceram em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente e foram terminadas pela remoção do solvente por evaporação com nitrogênio.

#### **4.2.10.3- N-O- Trifluoracetilação**

O produto da esterificação foi dissolvido em 200 µL de diclorometano e a esta solução foi adicionado 50 µL de anidrido trifluoracético. Sendo a reação parada após 30 minutos, a temperatura ambiente, pela remoção do solvente com nitrogênio. A seguir os produtos foram analisados por (CGFQ) como descrito anteriormente (item 4.1.3.1).

#### **4.2.11. Metodologia de Substituição Nucleofílica Aromática: Método Geral**

Para um balão de duas bocas, flambado sob atmosfera de argônio, contendo um equivalente dos respectivos alcoóis (nucleófilos) (Tabela 4, Reagente A, pág. 55) (em média para os testes utilizou-se 0,10 g de cada álcool), dissolvidos nos solventes secos (THF, DMF), e submetidos as condições como: bases (NaH), temperaturas reacionais (-30°C, 0 °C e t.a.) e proporção do composto aromático a ser substituído (Reagente B) especificadas na mesma Tabela, as reações foram mantidas sob agitação constante e após tempo que varia de acordo com a reação (24-72 h) sendo estas acompanhadas por CCD. Ao término, a base foi destruída por adição de metanol e de água, o solvente foi então evaporado e os resíduos extraídos como descrito na literatura<sup>23</sup> e purificados por cromatografia em coluna.

#### **4.2.12. Metodologia de Mitsunobu: Método Geral**

Para um balão de duas bocas, flambado sob atmosfera de argônio, foram adicionados para cada equivalente dos respectivos alcoóis (Tabela 5, Reagente A, 1-8, pág. 63) (em média para os testes utilizou-se 0,30 g de cada álcool) dissolvidos em THF seco, resfriou-se o sistema reacional a 0 °C, e em seguida adicionou-se (1,3 eq.) de trifetilfosfina (PPh<sub>3</sub>), e (1,0 eq.) dos respectivos nucleófilos (Tabela 5, Reagente B), sob agitação constante, então foram adicionados de uma só vez (1,3 eq.) de dietil azodicarboxilato (DEAD) mantendo-se a mesma temperatura por mais 10 min, após a reação permaneceu a temperatura ambiente por um

---

tempo que variou de acordo com a reação (24-72 h) sendo acompanhadas por CCD. Ao término o solvente foi evaporado e o resíduo purificado por cromatografia em coluna.

#### **4.2.13. Metodologia de Ullmann: Método Geral**

Em frascos âmbar com tampas, foram adicionados para cada equivalente dos respectivos alcoóis (em média 0,05 g de cada álcool) (Tabela 6, Reagente A, 1-7, pág. 65) dissolvidos em THF seco, foram adicionados (1,2 eq.) dos respectivos haletos de arila ((Tabela 6, Reagente B), (2,0 eqs.) de carbonato de céσιο (CsCO<sub>3</sub>), (0,1 eqs.) de 1,10-fenantrolina e (0,1 eqs.) de iodeto de cobre (CuI). Os frascos reacionais foram vedados e aquecidos a 60 °C por um tempo 48-72h, (dependendo da reação). Após o término das reações monitoradas por CCD, estas foram filtradas em sílica, e o solvente evaporado, sendo os resíduos formados purificados por cromatografia em coluna.

#### **4.2.14 Metodologias Empregadas nas Atividades Biológicas**

##### **4.2.14.1- Atividade Antimicrobiana**

Para as análises foram utilizados cepas padrão da American Type Culture Collection (ATCC), composta de duas bactérias Gram-positivas [*Staphylococcus aureus* - *S. aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* - *S. epidermidis* (ATCC 12228)] e três bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* - *E coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* P. *aeruginosa* (ATCC 9027), *Klebsiella pneumoniae* - *K. pneumoniae* (ATCC 13883)] e dois fungos [*Sacharomyces cerevisiae* - *S. cerevisiae* (ATCC 2601), *Candida albicans* - *C. albicans* - (ATCC 10231)].

As substâncias utilizadas como padrões foram o cloranfenicol para bactérias, potência (978.9 UI/mg); e a nistatina para fungos, potência (2464.38 UI /mg), preparados conforme FDA,<sup>103</sup> e para as análises de atividade nas amostras em estudo foi utilizado o meio de cultura Ágar Mueller-Hinton e o sal de tetrazóleo (metiltiazol tetrazóleo, MTT; *p*-iodo tetrazóleo, INT; 2,3,5-trifenil tetrazóleo, TTC) como revelador deste ensaio, sendo que os microrganismos quando ativos colorem este sal, e a substância testada cria assim, uma zona de inibição possível de ser visualizada.

Todos os microrganismos utilizados neste experimento foram mantidos em tubos de ensaios inclinados contendo de 5-8,0 mL de meio ágar nutriente inclinado, e para o

---

103 In: "Food and Drugs Administration": Code of Federal Regulations, 1991, 21, 300.

desenvolvimento dos ensaios foram efetivadas novas culturas, em tubos com os mesmos meios por 24 horas à temperatura de 32-35 °C.

O método selecionado para avaliar a atividade antimicrobiana foi o da microdiluição, que possibilitou determinar as concentrações inibitórias e letais mínimas (CIM) e (CLM), este método consiste em preparar diluições das amostras a serem testadas nos meios de culturas semeados com os respectivos microrganismos e após a incubação verificou-se a concentração mínima que inibiu o crescimento do mesmo.

Deste modo foram feitas as diluições seriadas (a partir de uma solução-estoque) dos compostos, (DMSO – 2,5 mg/mL) que continha 2% do surfactante Tween 80, que foram aplicadas em placas de cultura estéreis de 96 micro-poços, cada poço foi inoculado com os microrganismos ( $1 \times 10^6$  células viáveis) e homogeneizados, sendo então, as microplacas incubadas por 24 horas a 35 °C para bactérias e por 48 horas a 25 °C para as leveduras. Passado o tempo de incubação foi possível observar a turvação do meio, que indicou o crescimento microbiano, determinando-se a CIM.

Quando as culturas testadas para determinação da CIM não apresentam crescimento nos poços, são então testadas para verificar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) ou Concentração Fungicida Mínima (CFM). Elas são usadas para inocular placas de Petri (10 µL) que contenham meio ágar, sendo determinada a Concentração Letal Mínima (CLM – CBM e CFM), que é a menor concentração da substância que alcança uma redução maior que 99,9% do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), estes ensaios foram realizados em triplicata, de acordo com a literatura.<sup>104</sup>

#### ***4.2.14.2. Ensaio da Acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* pelo método de Bioautografia***

Este ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) em CCD foi adaptado do método descrito por Marston e Hostettmann,<sup>88</sup> a partir de uma solução estoque a 4 °C de AChE (250 U) e 37,5 mg de albumina de soro bovino dissolvida em 37,5 mL de tampão de Tris-ácido hidrocloreídrico a pH 7,8. As placas cromatográficas foram eluídas com acetona sendo então este solvente evaporado antes de serem usadas. As amostras foram previamente dissolvidas em MeOH, e aplicadas pontualmente nas placas de CCD nas concentrações de 50;

---

104 a) NCCLS. "Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically". 2000, Approved Standard, 5th ed, NCCLS document M7-A5. b) Hammer, K. A.; Carson, C. F.; Riley, T.; *J. App. Microbiol.*, **1999**, 86, 985. c) Burt, S.; *J. Food Microbiol.*, **2004**, 94, 223.

---

25,0 e 12,5 µg, a quais foram secas a uma temperatura inferior a 40°C até completa remoção do solvente. Após a aplicação das amostras, as placas cromatográficas foram borrifadas com a solução estoque de enzima e secas novamente, sendo então incubadas em atmosfera úmida por 20 min a 37 °C e reveladas com uma solução preparada imediatamente antes do uso de 12,5 mg de acetato de 1-naftila em 5 mL de etanol e 50 mg de sal Fast Blue B em 20 mL de água. Após 1-2 minutos da revelação, uma cor púrpura começa a aparecer nas placas de CCD, sendo os pontos onde houve inibição da enzima visualizada pelo aparecimento de manchas brancas.

#### **4.2.14.3. Ensaio da Acetilcolinesterase de *Bungarus sindanus* pelo método de Ellman**

Atividade da acetilcolinesterase *Bungarus sindanus* foi determinada pelo método de Ellman e col.<sup>105</sup> Onde as velocidades de hidrólise são medidas a várias concentrações (0,05-1 mM) de uma solução 62 mM de iodeto de acetilcolina em 1 mL de tampão fosfato, pH 7,5 e 0,2 mM DTNB a 25 °C, com 40 µL do veneno diluído [6 µg de proteína] que foram adicionados a mistura da reação e pré incubados por 10 min a 37 °C. A esta mistura ainda foram adicionados 0,06 mM de etopropazina (um clássico, potente e seletivo inibidor da BChE) para inibir a presença desta na amostra da proteína. Para iniciar o estudo diferentes concentrações de substrato foram adicionadas a enzima, sendo as medidas colorimétricas (coloração amarela desenvolvida com o tempo) monitoradas a um comprimento de onda de 412 nm após 15 seg. e durante 2–3 min usando um espectrofotômetro Hitachi 2001. Todas as amostras foram feitas em duplicata e repetidas quatro vezes.

#### **4.2.14.4. - Método fluorimétrico para a enzima Prolil Oligopeptidase (usando o ZGP-AMC como substrato fluorescente para POP):**

A reação da enzima com um substrato ZGP-AMC foi realizada em placas de 96 micropoços e monitorada pelas leituras de excitação e emissão de 360/40 e 485/20 nm, tal como descrito por Toide e col.<sup>96</sup>

Neste ensaio, a reação foi realizada em placas de 96 micro-poços, sendo que para cada poço da placa a mistura reacional continha 136 µL de tampão (100 mM, fosfato de Na/K, pH 8,0), 7,0 nM da enzima POP e 3 mL dos possíveis inibidores em várias concentrações (dissolvidos DMSO) ou com o tampão (controles), após pré incubação por 15 min a 30°C, o

---

105 Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, J.V.; *Biochem. Pharmacol.*, **1961**, 7, 88.

---

substrato ZGP-AMC (10  $\mu$ L, 3 mM em 40% de 1,4 dioxano) foi adicionado e a reação incubada por 1h a 37 °C. Finalmente a reação foi parada pela adição de acetato de sódio (150  $\mu$ L, 1M, pH 4) e a formação da AMC foi medida fluorimetricamente nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 360/40 e 485/20 nm, respectivamente.

**4.2.14.5. - Método fluorimétrico para a enzima dipeptídil peptidase-IV (utilizando o GP-AMC como substrato fluorescente para a DPP- IV):**

A atividade da enzima DPP-IV foi analisada pelo método descrito por Checler e col.<sup>97</sup>, em placas de 96 micro-poços, sendo que a mistura reacional em cada poço continha 136  $\mu$ L de tampão (100 mM, fosfato de Na/K, pH 8,0), 0,7 nM da enzima DPP-IV e 3  $\mu$ L dos possíveis inibidores em várias concentrações (dissolvidos DMSO) ou com o tampão (controles), após pré-incubação por 15 min a 30 °C. O substrato GP-AMC (10  $\mu$ L, 3 mM em 40% de 1,4-dioxano) foi adicionado e a reação incubada por 1h a 37 °C. Finalmente a reação foi parada pela adição de acetato de sódio (150  $\mu$ L, 1M, pH 4) e a formação da AMC foi medida fluorimetricamente nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 360/40 e 485/20 nm, respectivamente.

**4.2.14.6. – Método empregado na determinação da atividade Antioxidante**

O método fundamenta-se na redução do radical DPPH (avalia a capacidade dos compostos testados em ser doadores de hidrogênio - ação antioxidante). A solução do DPPH possui uma coloração violeta que descolore progressivamente tornando-se amarelada, permitindo assim, observar a ação antioxidante da amostra testada

Para a execução deste ensaio, as amostras a serem testadas foram solubilizadas em metanol e aplicadas pontualmente em cromatoplacas nas quantidades de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,2 e 3,5  $\mu$ g. O DPPH (solução metanólica de 0,2%) foi aplicado através de borrifamento sobre as cromatoplacas, que ficam com a coloração violeta do DPPH. Estas foram então, deixadas em repouso por 30 min. a 1 hora ao abrigo da luz. As amostras testadas, quando ativas, descolorem o DPPH, formando manchas claras sobre a placa violeta, que foram avaliadas como atividade antioxidante positiva.



---

## **Capítulo V**

---

## Capítulo V: Conclusões

### 5. Conclusões

Conforme os objetivos propostos para este trabalho de síntese em solução de tripeptídeos *N*-monometilados e *N,N*-dimetilados, precursores de alcalóides ciclopeptídicos, bem como a avaliação de suas atividades biológicas e a realização de um estudo da relação estrutura atividade, pode-se concluir que:

1. Os métodos adotados para a obtenção dos tripeptídeos *N*-monometilados e *N,N*-dimetilados foram efetivos no sentido de que essas reações forneceram produtos em bons rendimentos e grau de pureza desejado para as análises biológicas.

2. No sentido das atividades biológicas destes compostos foi possível se estabelecer alguns padrões a respeito da relação entre suas estruturas e as atividades, principalmente em termos das atividades antimicrobianas, onde foi possível verificar pela comparação das atividades dos produtos naturais com os peptídeos sintéticos que a presença da unidade *p*-hidroxi-estirilamina não é um fator determinante, já que os tripeptídeos lineares apresentaram atividades equiparáveis as do alcalóide.

Ainda neste contexto pode-se estabelecer que a presença do aminoácido terminal básico com sua função amino *N*-monometilada, em conjunto com a estereoquímica (*L-treo*) no  $\beta$ -OH-aminoácido é um dos fatores de maior relevância na composição de uma estrutura ativa para estes compostos. Contudo, um completo entendimento a respeito da estrutura e suas propriedades moleculares e atividades antimicrobianas podem ser realizados como um complemento no estudo de REA.

Quanto as atividades frente a algumas enzimas como a AChE, POP e DPP-IV, pode-se dizer que embora estes peptídeos não tenham apresentado atividades significativas frente a enzima POP e DPP-IV, um dos compostos, o *Z-L-Leu-D-treo-Pheser-L-Phe-OMe* apresentou uma boa atividade frente a AChE, podendo ser um indício de certa seletividade para esta enzima.

Ainda nos experimentos com a AChE, pode-se determinar a seletividade da enzima frente aos peptídeos estereoisômeros, onde apenas o peptídeo contendo o  $\beta$ -OH-aminoácido com configuração *D-treo* apresentou atividade, e pode-se constatar que os compostos com

---

função amino protegida, no caso pelo grupamento Cbz, apresentou maior atividade que os peptídeos com função amino livre ou *N*-alquilada.

Quanto às atividades antioxidantes, foi possível se estabelecer que pequenos peptídeos como os dipeptídeos que contém o  $\beta$ -OH-aminoácido fenilserina tem boa atividade antioxidante, principalmente os que contêm a estereoquímica *L-treo* com a função carboxila terminal livre ou com a função amino protegida pelo grupo *p*-NO<sub>2</sub>-fenilsulfonamida, sendo comparáveis aos peptídeos derivados do aminoácido tirosina, e ao flavonóide padrão (quercetina).

3. Estes precursores di, tri e tetrapeptídicos contendo o aminoácido  $\beta$ -fenilserina na forma *treo* apresentam bons resultados tanto como possíveis inibidores enzimáticos do SNC, como compostos antimicrobianos ou antioxidantes, fazendo destas moléculas interessantes alvos para a pesquisa de novos agentes potencialmente bioativos.

Portanto, neste contexto pode-se dizer que os objetivos propostos para esta parte do trabalho foram alcançados, visto que se sintetizaram compostos com melhores perfis de atividades ou equiparáveis aos dos metabólitos naturais. Estes metabólitos de acordo com a literatura encontram-se em baixa abundância natural (< 1%), e assim a sua extração torna-se pouco viável, pois geraria um alto custo tanto ambiental como material. Outra ferramenta utilizada para obtenção destas moléculas é a síntese total, porém esta também gera altos custos empregando reagentes de alto valor agregado com rendimentos que ainda são muito baixos. Desta forma, a síntese proposta neste trabalho, para preparação dos fragmentos peptídicos baseados nas estruturas destes metabólitos, se mostrou muito mais eficaz possibilitando a construção de moléculas a um baixo custo e com bons rendimentos.

4. No sentido do estudo das reações de inserção da ligação alquil-aril éter, através das metodologias de S<sub>N</sub>Ar, Mitsunobu e Ullmann, não foi possível a obtenção do produto desejado nas condições reacionais testadas, no entanto verificou-se que as três metodologias apresentam em comum o produto de eliminação.

---

---

---

## **Capítulo VI**

---

---

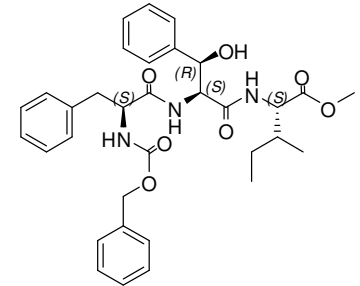
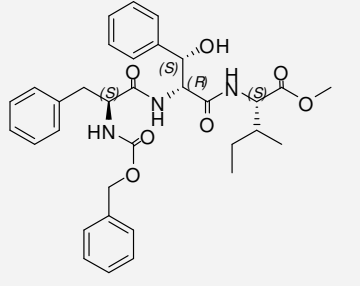
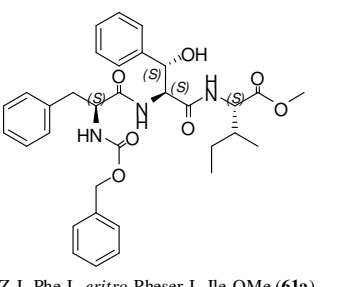

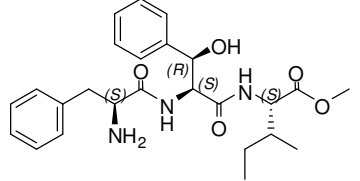
## **Capítulo VI: Anexos:**

### ***ANEXO I***

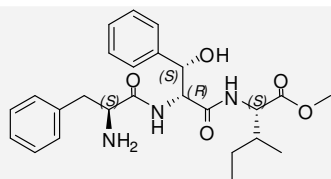
***Estruturas Obtidas e Respetivos Nomes Químicos e Dados Cristalográficos***

---

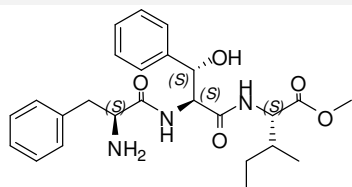
**Tabela A1:** Estruturas com estereoquímica e nomenclatura química, dos tri- e terapeptídeos sintetizados:

Estruturas	Nomes Químicos
 <p>Z-L-Phe-L-treo-Pheser-L-Ile-OMe (60a)</p>	<p>(5S,8S,11S)-metil-5-benzil-11-sec-butil-8-((R)-hidroxi(fenil)metil)-3,6,9-trioxo-1-fenil-2-oxa-4,7,10-triazadodecan-12-oato de metila</p>
 <p>Z-L-Phe-D-treo-Pheser-L-Ile-OMe (60b)</p>	<p>(5S,8R,11S)- metil-5-benzil-11-sec-butil-8-((S)-hidroxi(fenil)metil)-3,6,9-trioxo-1-fenil-2-oxa-4,7,10-triazadodecan-12-oato de metila</p>
 <p>Z-L-Phe-L-eritro-Pheser-L-Ile-OMe (61a)</p>	<p>(5S,8S,11S)-metil 5-benzil-11-sec-butil-8-((S)-hidroxi(fenil)metil)-3,6,9-trioxo-1-fenil-2-oxa-4,7,10-triazadodecan-12-oato de metila</p>
 <p>Z-L-Phe-D-eritro-Pheser-L-Ile-OMe (61b)</p>	<p>(5S,8R,11S)-metil 5-benzil-11-sec-butil-8-((R)-hidroxi(fenil)metil)-3,6,9-trioxo-1-fenil-2-oxa-4,7,10-triazadodecan-12-oato de metila</p>
 <p>NH<sub>2</sub>-L-Phe-L-treo-Pheser-L-Ile-OMe (62a)</p>	<p>(2S,3S)-metil 2-((2S,3R)-2-((S)-2-amino-3-fenilpropanamido)-3-hidroxi-3-fenilpropanamido)-3-metilpentanoato de metila</p>

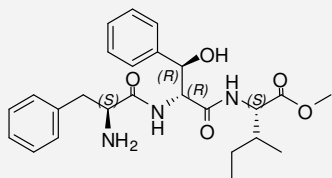
## Continuação da Tabela A1

NH<sub>2</sub>-L-Phe-D-*treo*-Phe-Ser-L-Ile-OMe (**62b**)

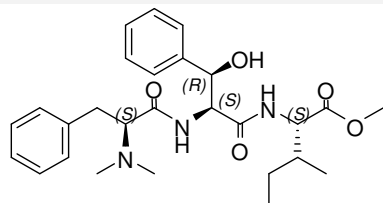
(2S,3S)-metil 2-((2R,3S)-2-((S)-2-amino-3-fenilpropanamido)-3-hidroxi-3-fenilpropanamido)-3-metilpentanoato de metila

NH<sub>2</sub>-L-Phe-L-*eritro*-Phe-Ser-L-Ile-OMe (**63a**)

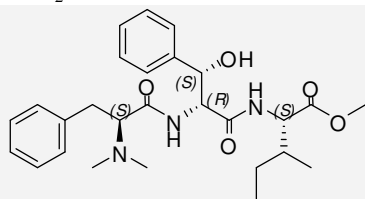
(2S,3S)-metil 2-((2S,3S)-2-((S)-2-amino-3-fenilpropanamido)-3-hidroxi-3-fenilpropanamido)-3-metilpentanoato de metila

NH<sub>2</sub>-L-Phe-D-*eritro*-Phe-Ser-L-Ile-OMe (**63b**)

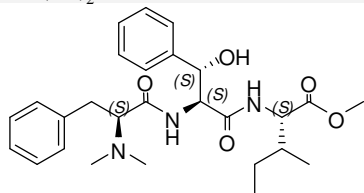
(2S,3S)-metil 2-((2R,3R)-2-((S)-2-amino-3-fenilpropanamido)-3-hidroxi-3-fenilpropanamido)-3-metilpentanoato de metila

N,N-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-L-*treo*-Phe-Ser-L-Ile-OMe (**64a**)

(2S,3S)-metil 2-((2S,3R)-2-((S)-2-(dimetilamino)-3-fenilpropanamido)-3-hidroxi-3-fenilpropanamido)-3-metilpentanoato de metila

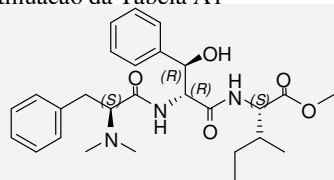
N,N-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-D-*treo*-Phe-Ser-L-Ile-OMe (**64b**)

(2S,3S)-metil 2-((2R,3S)-2-((S)-2-(dimetilamino)-3-fenilpropanamido)-3-hidroxi-3-fenilpropanamido)-3-metilpentanoato de metila

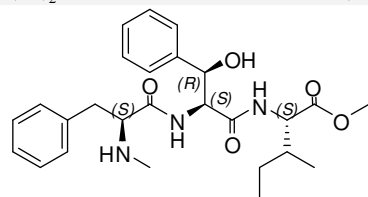
N,N-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-L-*eritro*-Phe-Ser-L-Ile-OMe (**65a**)

(2S,3S)-metil 2-((2S,3S)-2-((S)-2-(dimetilamino)-3-fenilpropanamido)-3-hidroxi-3-fenilpropanamido)-3-metilpentanoato de metila

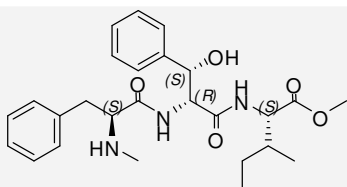
## Continuação da Tabela A1

*N,N*-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-D-eritro-Pheser-L-Ile-OMe (**65b**)

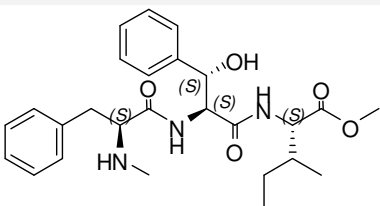
(2*S*,3*S*)-metil 2-((2*R*,3*R*)-2-((*S*)-2-(dimetilamino)-3-fenilpropanamido)-3-hidroxi-3-fenilpropanamido)-3-metilpentanoato de metila

*N*-(Me)-L-Phe-L-treo-Pheser-L-Ile-OMe (**66a**)

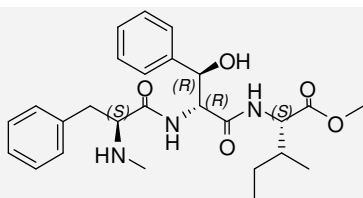
(2*S*,3*S*)-metil 2-((2*S*,3*R*)-3-hidroxi-2-((*S*)-2-(metilamino)-3-fenilpropanamido)-3-fenilpropanamido)-3-metilpentanoato de metila

*N*-(Me)-L-Phe-D-treo-Pheser-L-Ile-OMe (**66b**)

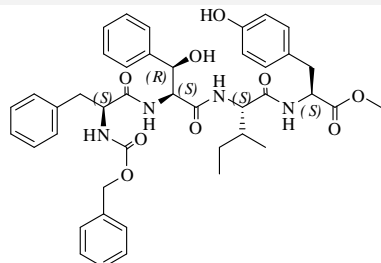
(2*S*,3*S*)-metil 2-((2*R*,3*S*)-3-hidroxi-2-((*S*)-2-(metilamino)-3-fenilpropanamido)-3-fenilpropanamido)-3-metilpentanoato de metila

*N*-(Me)-L-Phe-L-eritro-Pheser-L-Ile-OMe (**67a**)

(2*S*,3*S*)-metil 2-((2*S*,3*S*)-3-hidroxi-2-((*S*)-2-(metilamino)-3-fenilpropanamido)-3-fenilpropanamido)-3-metilpentanoato de metila

*N*-(Me)-L-Phe-D-eritro-Pheser-L-Ile-OMe (**67b**)

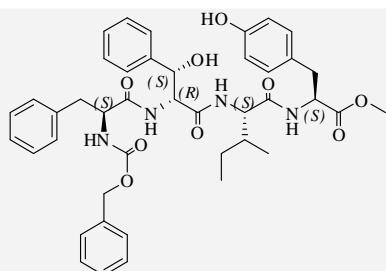
(2*S*,3*S*)-metil 2-((2*R*,3*R*)-3-hidroxi-2-((*S*)-2-(metilamino)-3-fenilpropanamido)-3-fenilpropanamido)-3-metilpentanoato de metila

*Z*-L-Phe-L-treo-Pheser-L-Ile-L-Tyr-OMe (**72a**)

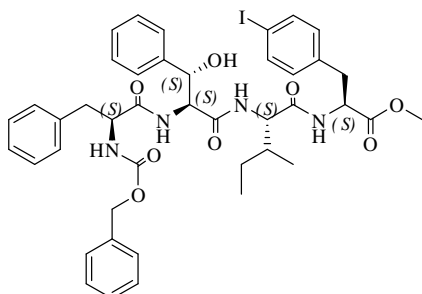
(5*S*,8*S*,11*S*,14*S*)-metil 5-benzil-11-sec-butil-8-((*R*)-hidroxi(fenil)metil)-14-(4-hidroxi-benzil)-3,6,9,12-tetraoxo-1-fenil-2-oxa-4,7,10,13-tetra-azapentadecan-15-oato de metila



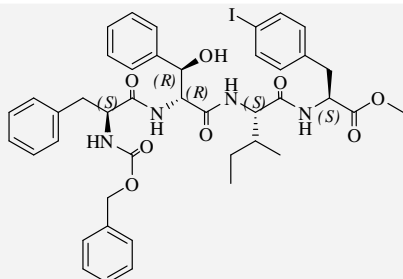
## Continuação da Tabela A1

Z-L-Phe-D-*treo*-Pheser-L-Ile-L-Tyr-OMe (**72b**)

(5S,8R,11S,14S)-metil 5-benzil-11-sec-butil-8-((S)-hidroxi(fenil)metil)-14-(4-hidroxi benzil)-3,6,9,12-tetraoxo-1-fenil-2-oxa-4,7,10,13-tetra-azapentadecan-15-oato de metila

Z-L-Phe-L-*treo*-Pheser-L-Ile-L-(4-iodo)-Phe-OMe (**73a**)

(5S,8S,11S,14S)-metil 5-benzil-11-sec-butil-8-((S)-hidroxi(fenil)metil)-14-(4-iodobenzil)-3,6,9,12-tetraoxo-1-fenil-2-oxa-4,7,10,13-tetraazapentadecan-15-oato de metila

Z-L-Phe-D-*treo*-Pheser-L-Ile-L-(4-iodo)-Phe-OMe (**73b**)

(5S,8R,11S,14S)-metil 5-benzil-11-sec-butil-8-((R)-hidroxi(fenil)metil)-14-(4-iodobenzil)-3,6,9,12-tetraoxo-1-fenil-2-oxa-4,7,10,13-tetra-azapentadecan-15-oato de metila

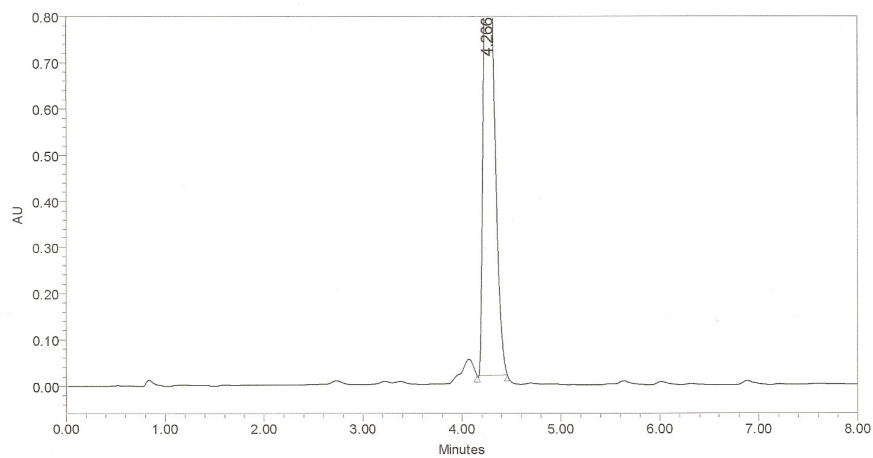
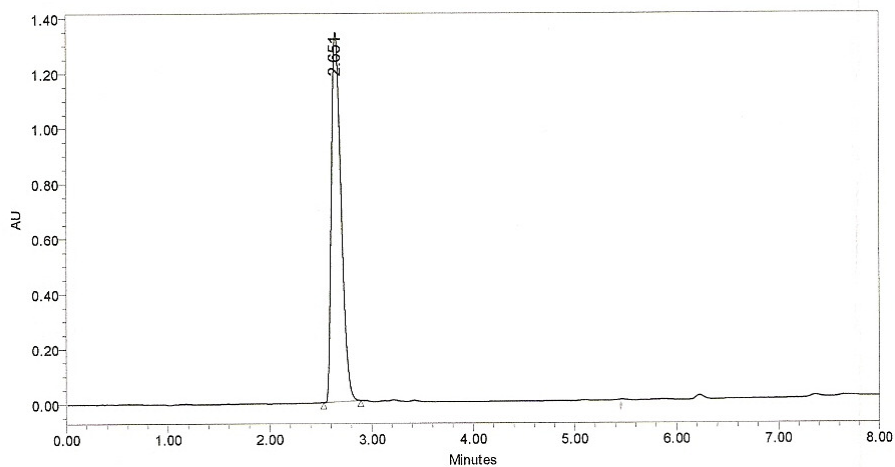
**Tabela A2:** Dados Cristalográficos e de Refinamento (desvio padrão entre parênteses) da Estrutura (56a).

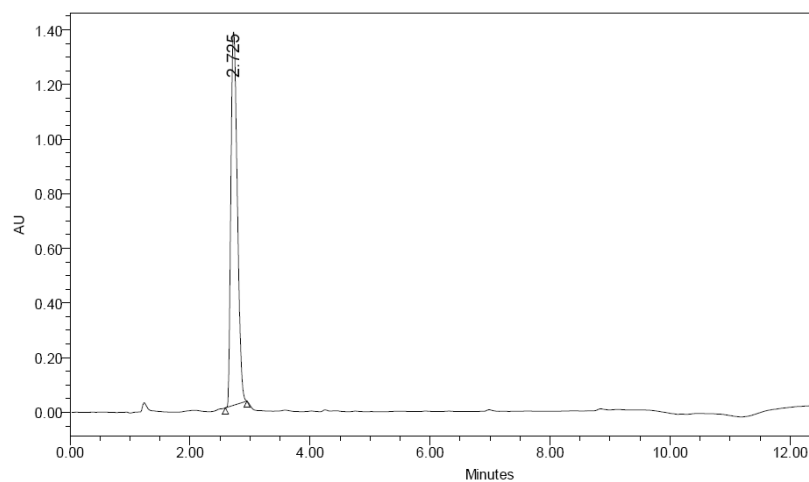
Código de identificação	rb_am_dom1	
Fórmula Empírica	$C_{27}H_{28}N_2O_6$	
Peso Molecular	476,51	
Temperatura	296(2) K	
Comprimento de onda	0,71073 Å	
Sistema Cristalino	Ortorrômbico	
Grupo Espacial	$P2_12_12_1$	
Dimensões da célula unitária	$a = 5,031(2)$ Å	$\alpha = 90^\circ$ ,
	$b = 18,074(11)$ Å	$\beta = 90^\circ$ ,
	$c = 27,410(16)$ Å	$\gamma = 90^\circ$ ,
Volume	$2492(2)$ Å <sup>3</sup>	
Z	4	
Densidade (calculada)	1,270 Mg/m <sup>3</sup>	
Coefficiente de Absorção	0,090 mm <sup>-1</sup>	
$F_{000}$	1008	
Tamanho do Cristal	0,74 x 0,13 x 0,03 mm <sup>3</sup>	
Região de varredura de $\theta$	3,18 to 28,56°,	
Índices limitantes	$-3 \leq h \leq 6, -24 \leq k \leq 24, -35 \leq l \leq 34$	
Reflexões Coletadas	13300	
Reflexões Independentes	3607 [ $R_{int} = 0,0868$ ]	
Perfeição para $\theta = 28,56^\circ$	98,1 %	
Correção da Absorção	Semi-empírico	
Transmissão Max, e min,	0,999 e 0,787	
Método de Refinamento	Full-matrix least-squares on $F^2$	
Dados / restrições / Parametros	3607 / 0 / 319	
Goodness-of-fit on $F^2$	0,902	
Índice Final R [ $I > 2\sigma(I)$ ]	$R_1 = 0,0483, wR_2 = 0,0896$	
Índice R (Todos dados)	$R_1 = 0,1863, wR_2 = 0,1277$	
Parametros Estruturais Absolutos	-4(2)	
Coefficiente de Extinção	0,0049(9)	
Densidade eletrônica residual	0,149 e -0,147 e·Å <sup>-3</sup>	

*ANEXO II*

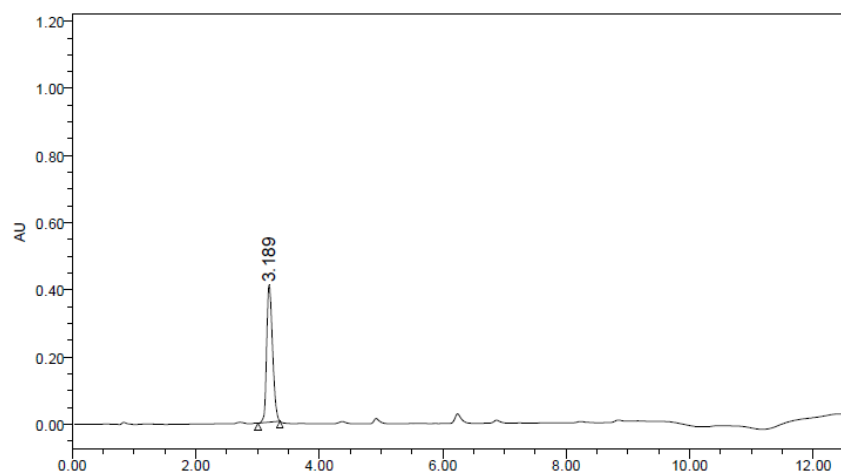
*Caderno de Cromatogramas e de Espectros*

---

**Cromatogramas em CLAE/DAD:****Figura A1:** Cromatograma de CLAE-DAD do  $\text{NH}_2\text{-L-Phe-D-treo-Phe-ser-L-Ile-OMe}$  (**62b**)**Figura A2:** Cromatograma de CLAE-DAD do  $N,N\text{-(Me)}_2\text{-L-Phe-L-treo-Phe-ser-L-Ile-OMe}$  (**64a**)

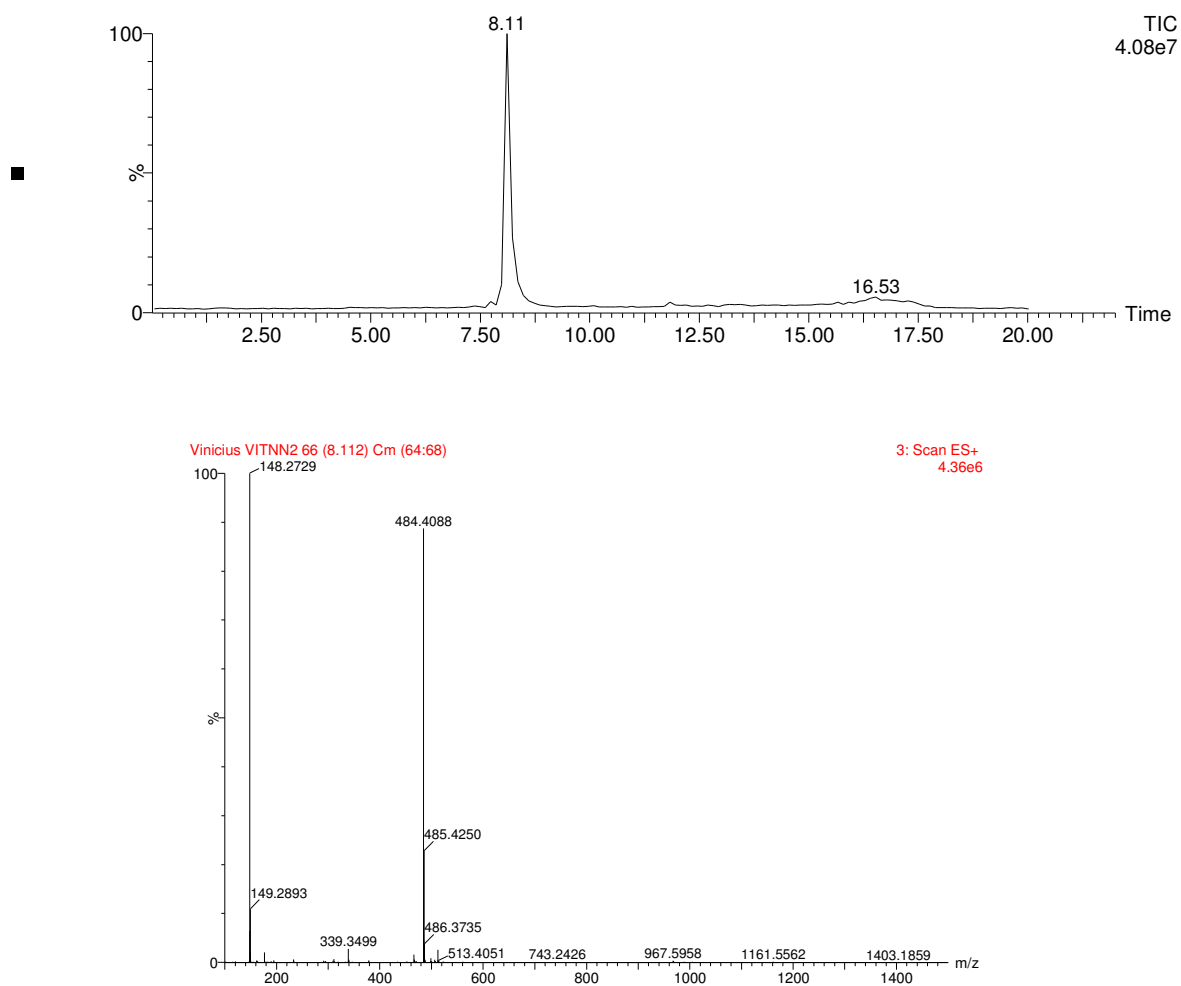


**Figura A3:** Cromatograma de CLAE-DAD do *N,N*-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-*D*-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (64b)

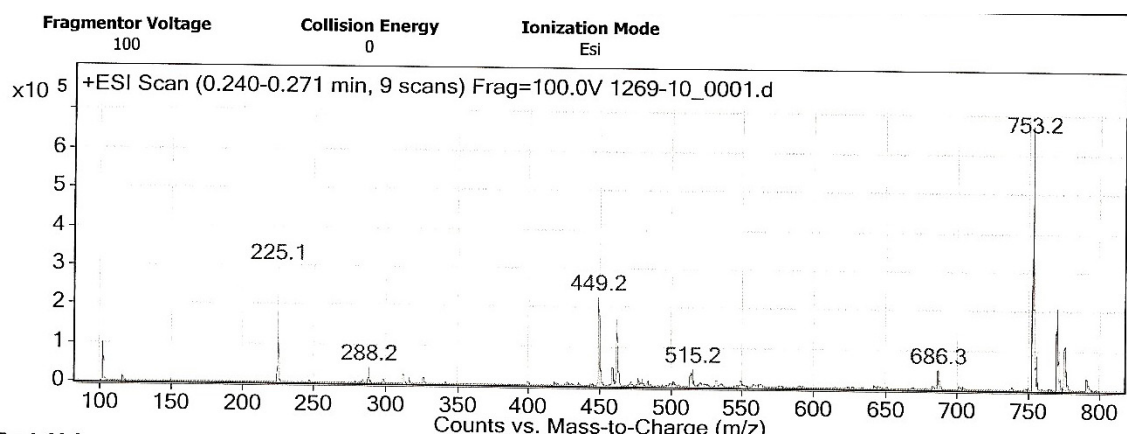


**Figura A4:** Cromatograma de CLAE-DAD do *N*-(Me)-L-Phe-*D*-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (66b)

## Cromatogramas em CLAE/EM:



**Figura A5:** Cromatograma de CLAE-EM do *N,N*-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-D-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (64b)



**Figura A6:** Cromatograma de CLAE-EM do Z-L-Phe-D-*treo*-Pheser-L-Ile-L-Tyr-OMe (**72b**)

*Espectros de RMN Seleccionados*

---



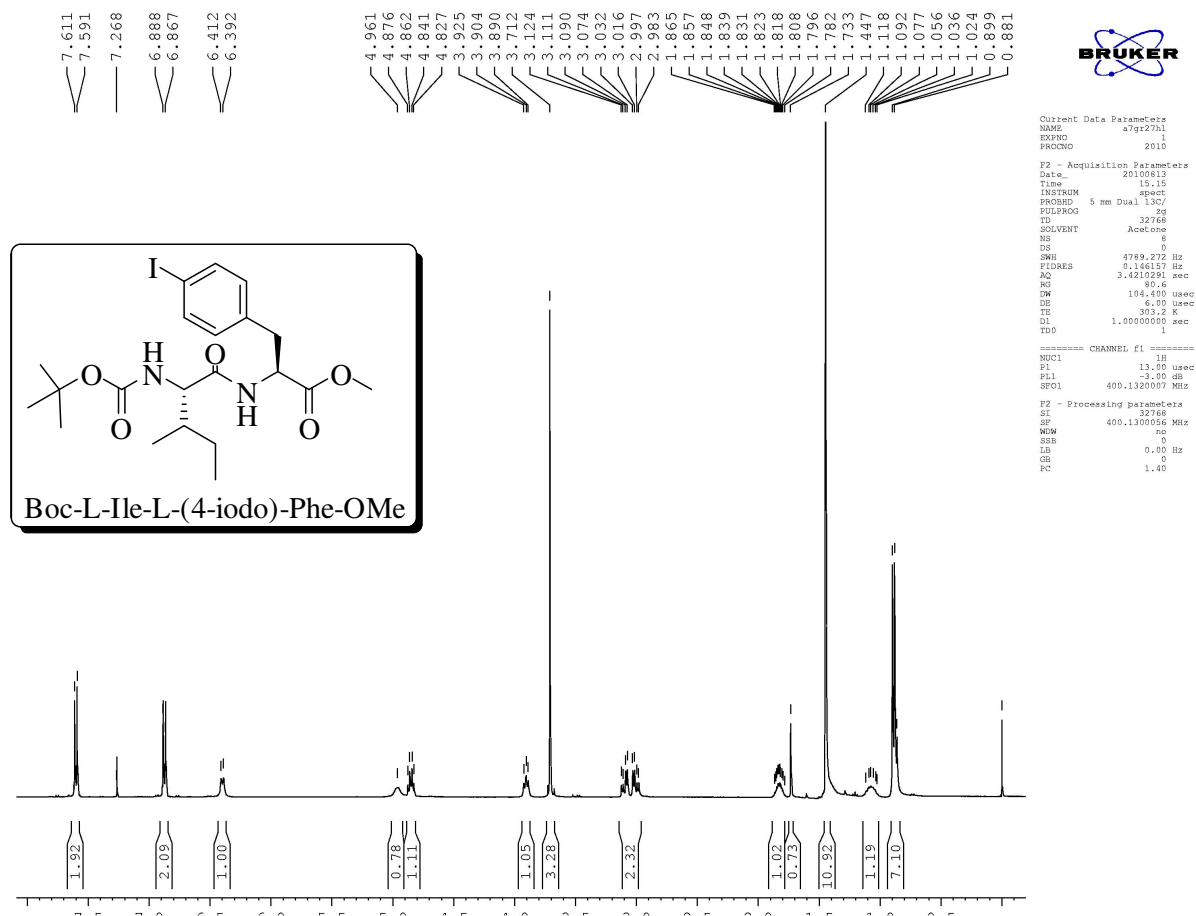


Figura A7: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do *N*-Boc-L-Ile-L-(4-iodo)-Phe-OMe (**69**).

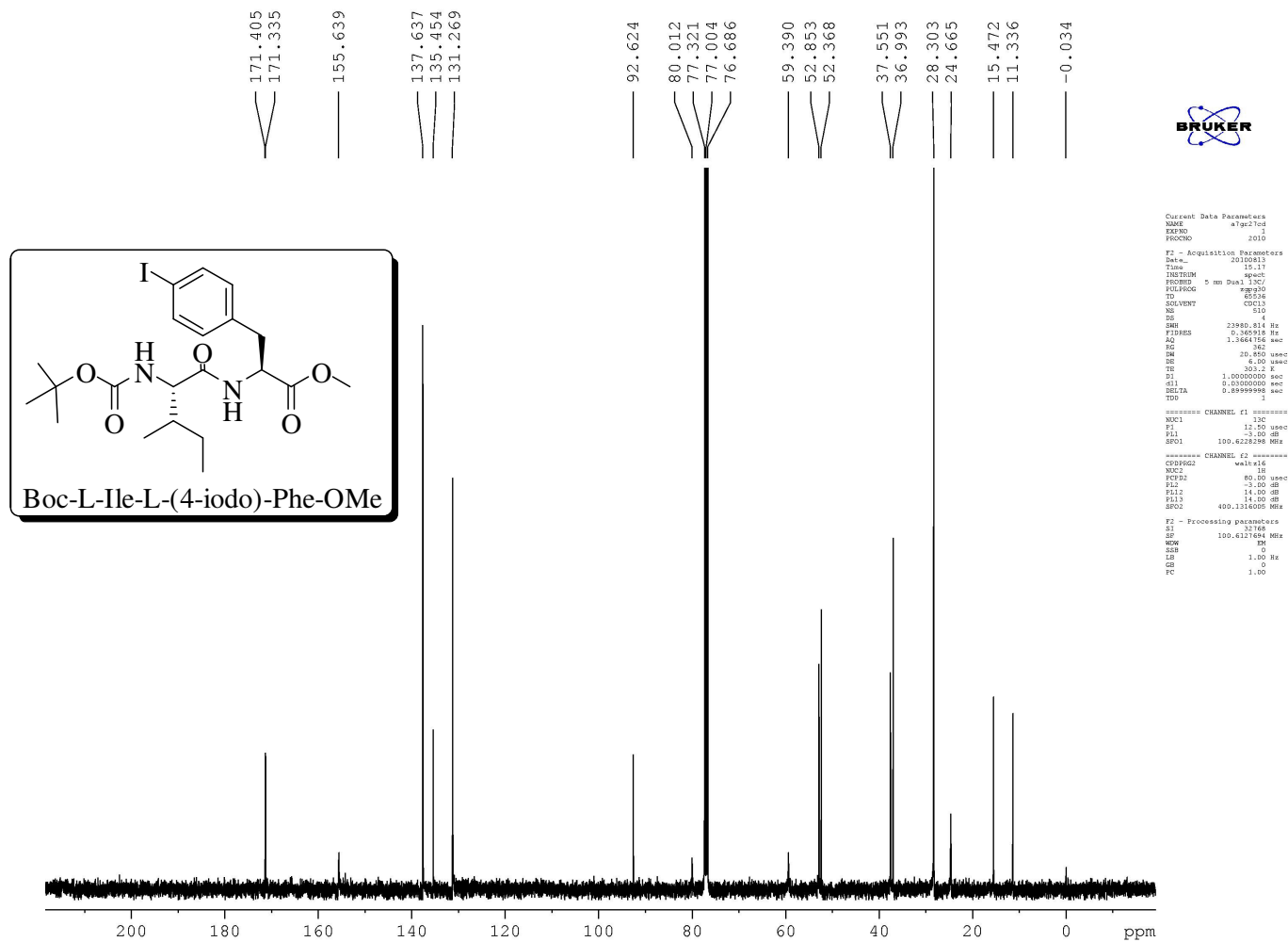


Figura A8: Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do *N*-Boc-L-Ile-L-4-(iodo)-Phe-OMe (69)

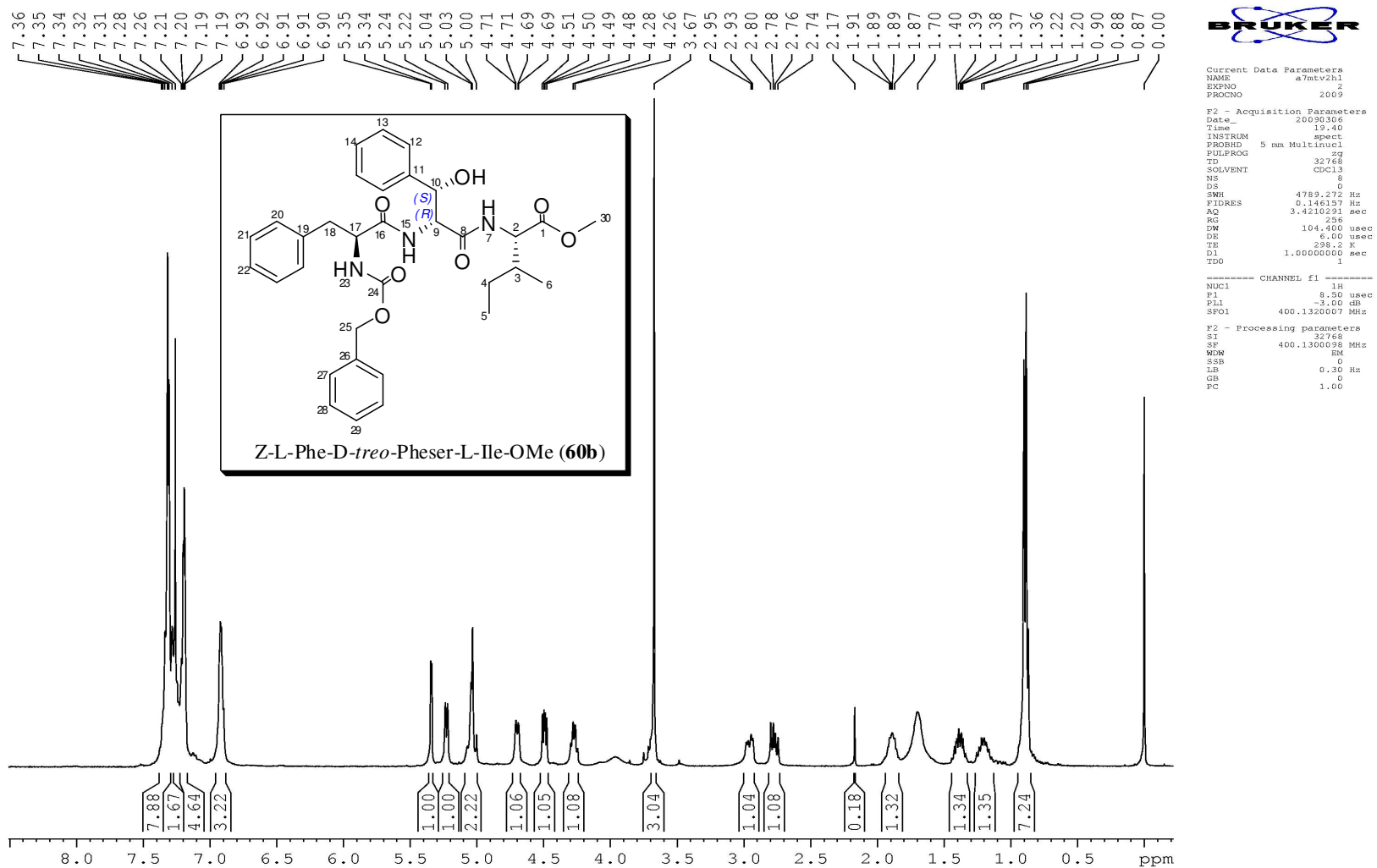


Figura A9: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do Z-L-Phe-D-treo-Pheser-L-Ile-OMe (60b)

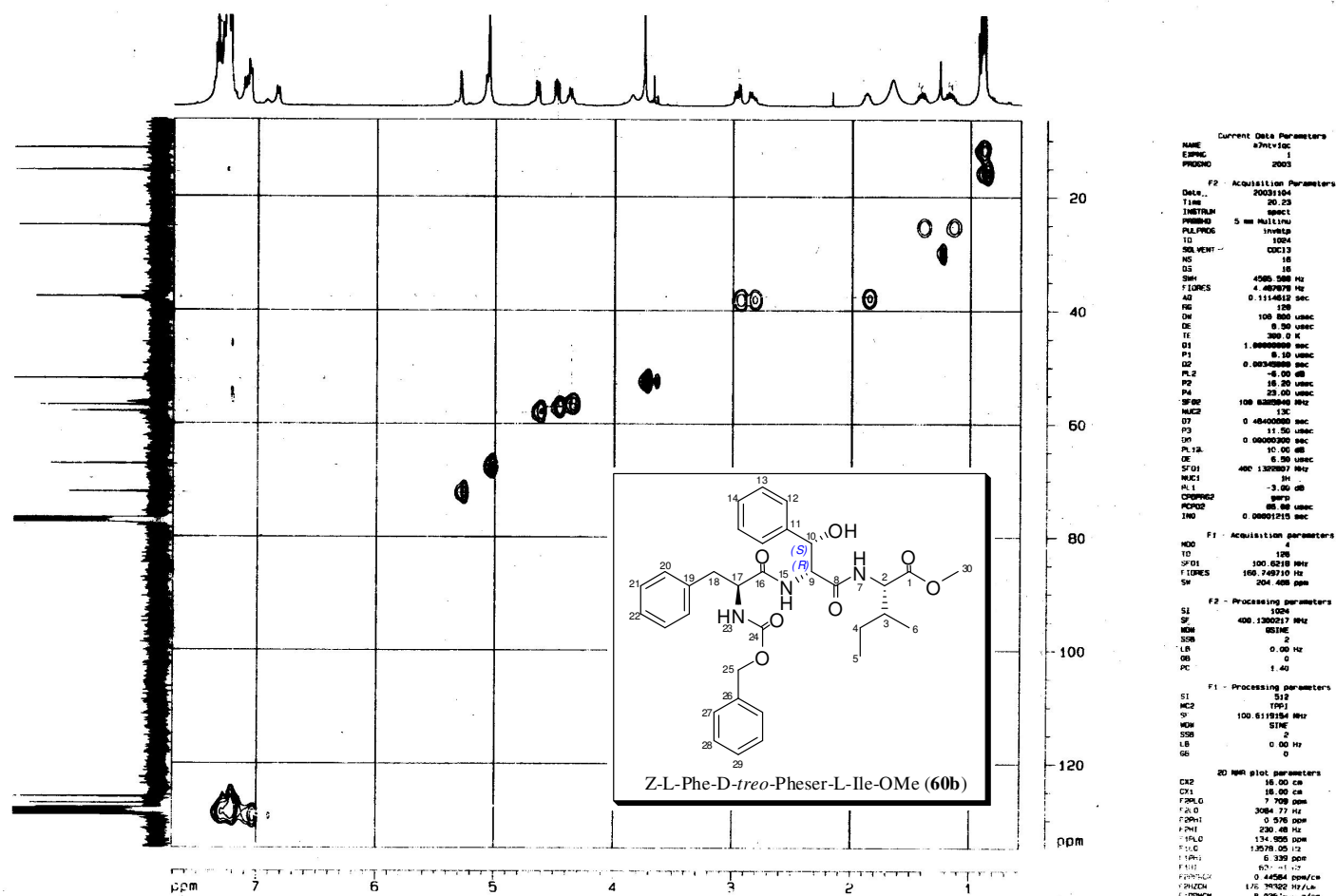


Figura A10: Espectro de HMQC do Z-L-Phe-D-treo-Pheser-L-Ile-OMe (60b)

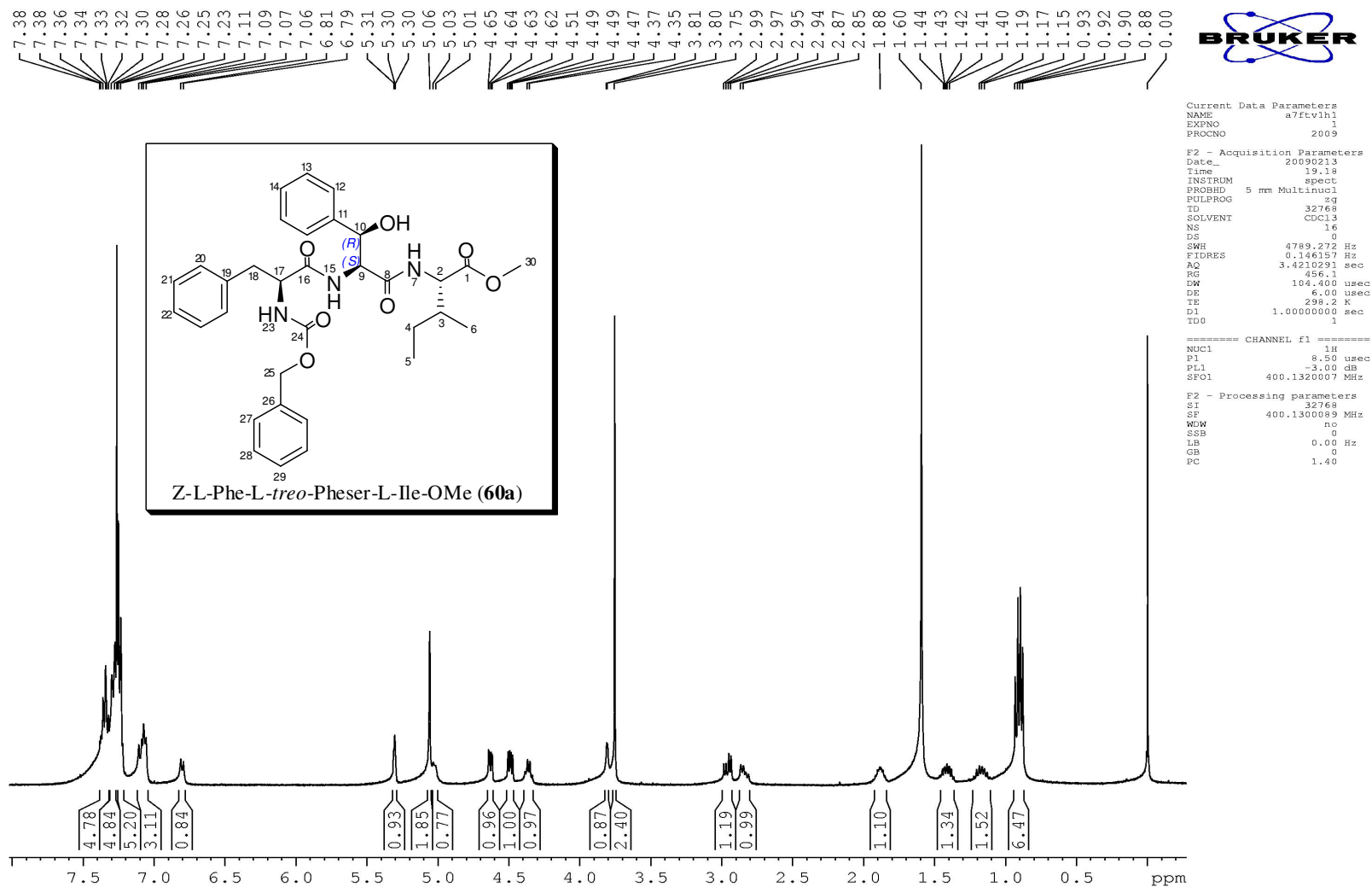


Figura A11: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do Z-L-Phe-L-treo-Pheser-L-Ile-OMe (60a)

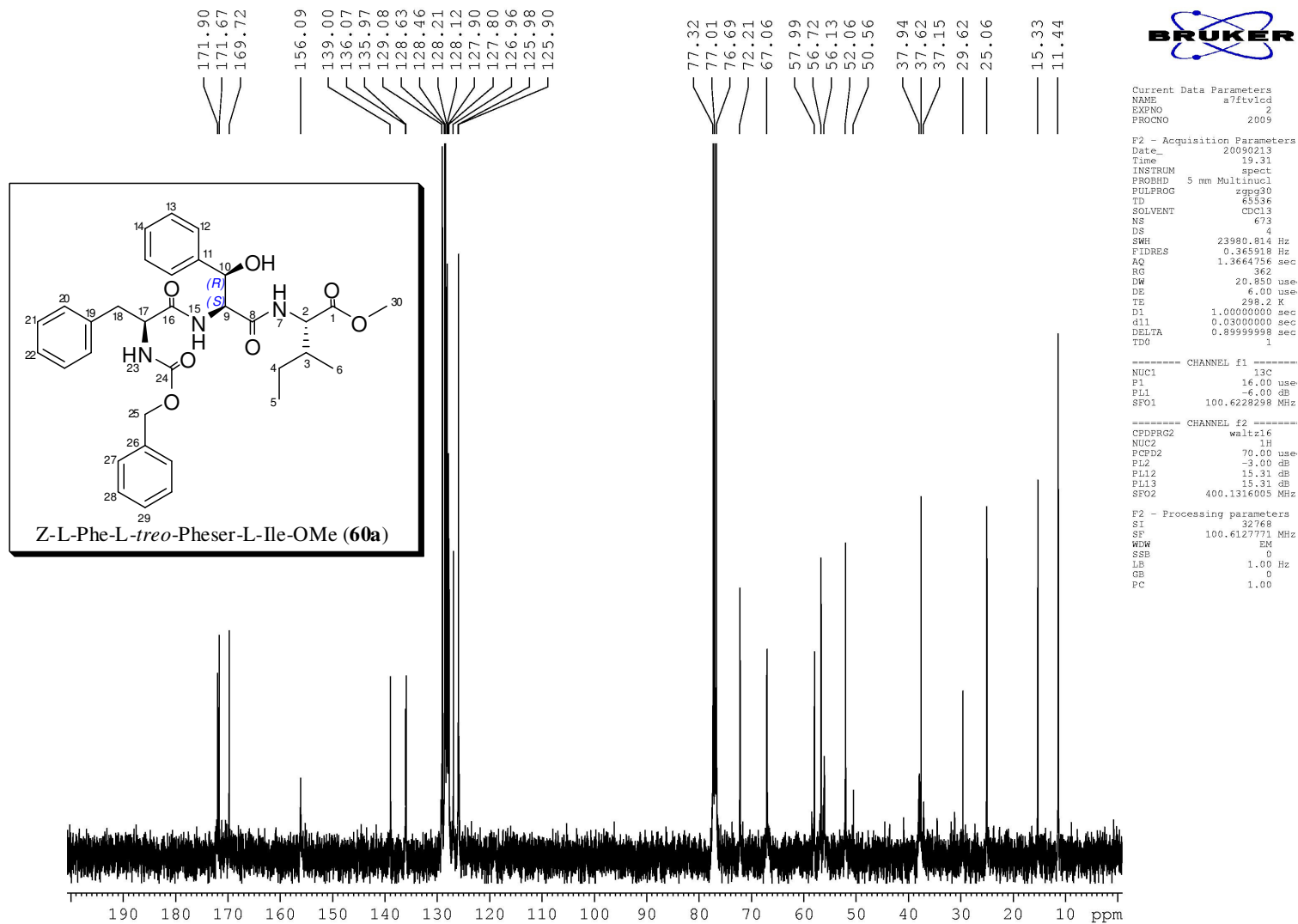


Figura A12: Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do Z-L-Phe-L-treo-Pheser-L-Ile-OMe (60a)

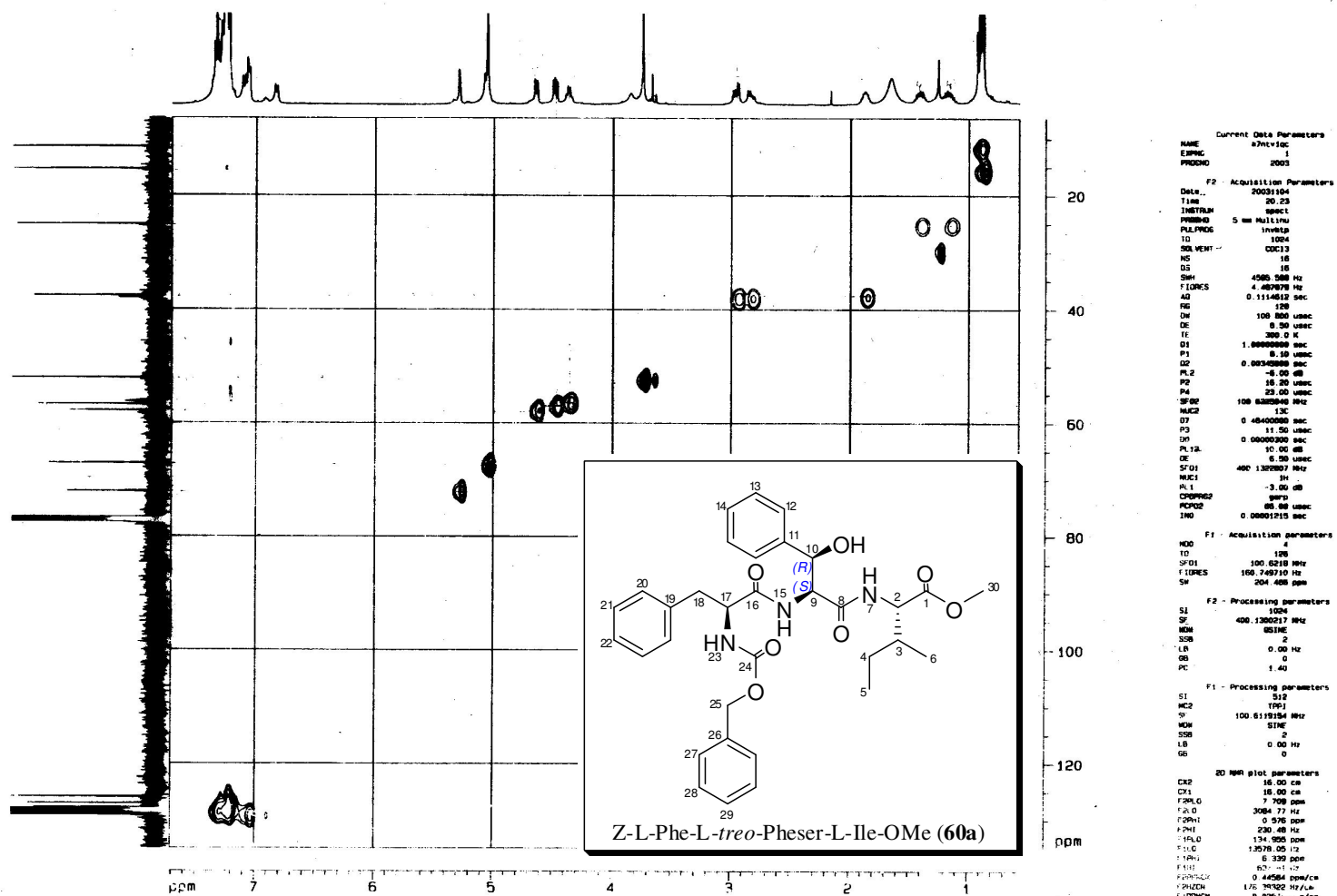


Figura A13: Espectro de HMQC do Z-L-Phe-L-treo-Pheser-L-Ile-OMe (60a)

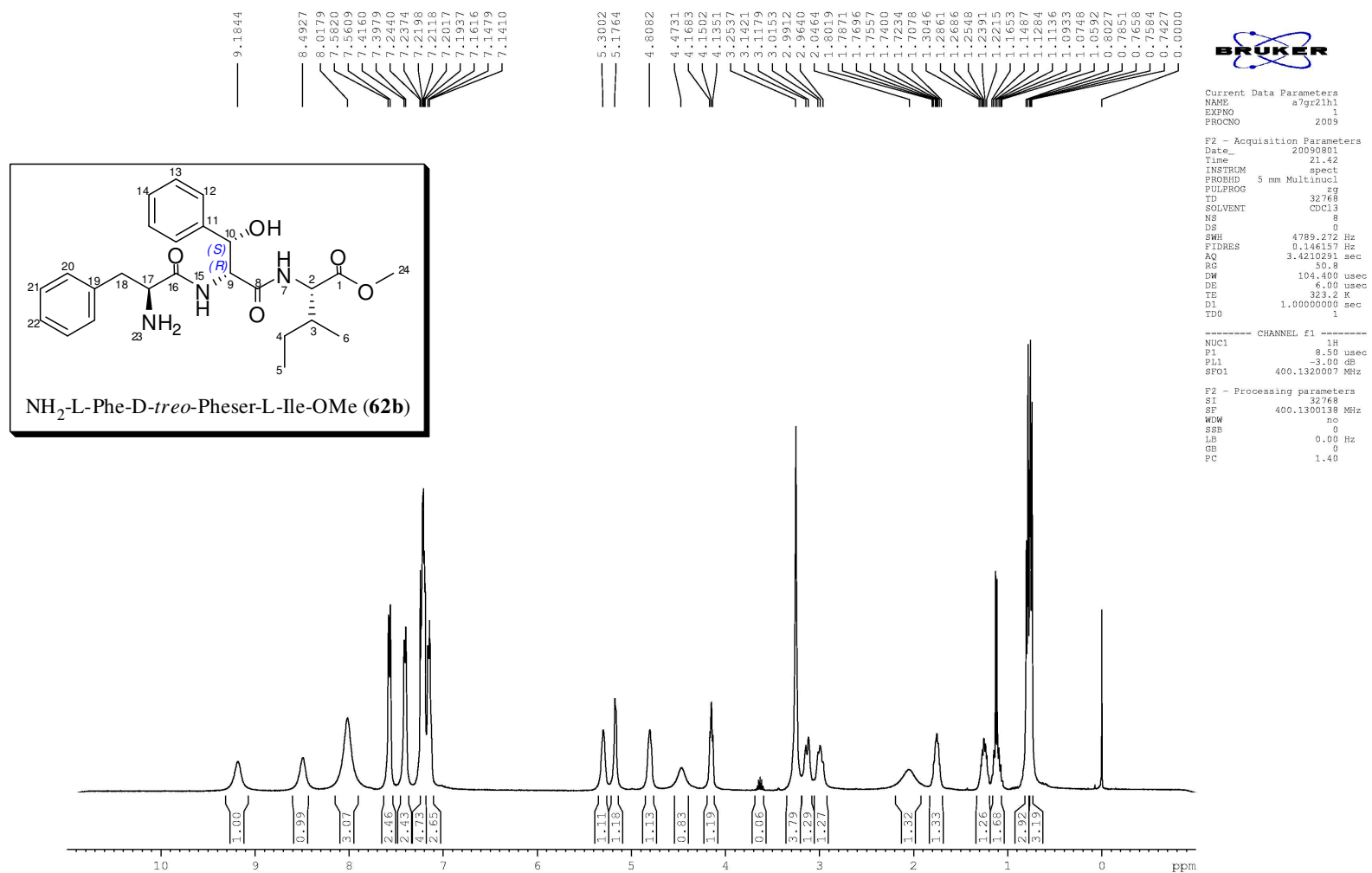


Figura A14: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do NH<sub>2</sub>-L-Phe-D-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (62b) em CD<sub>3</sub>OD a T= 323 K.



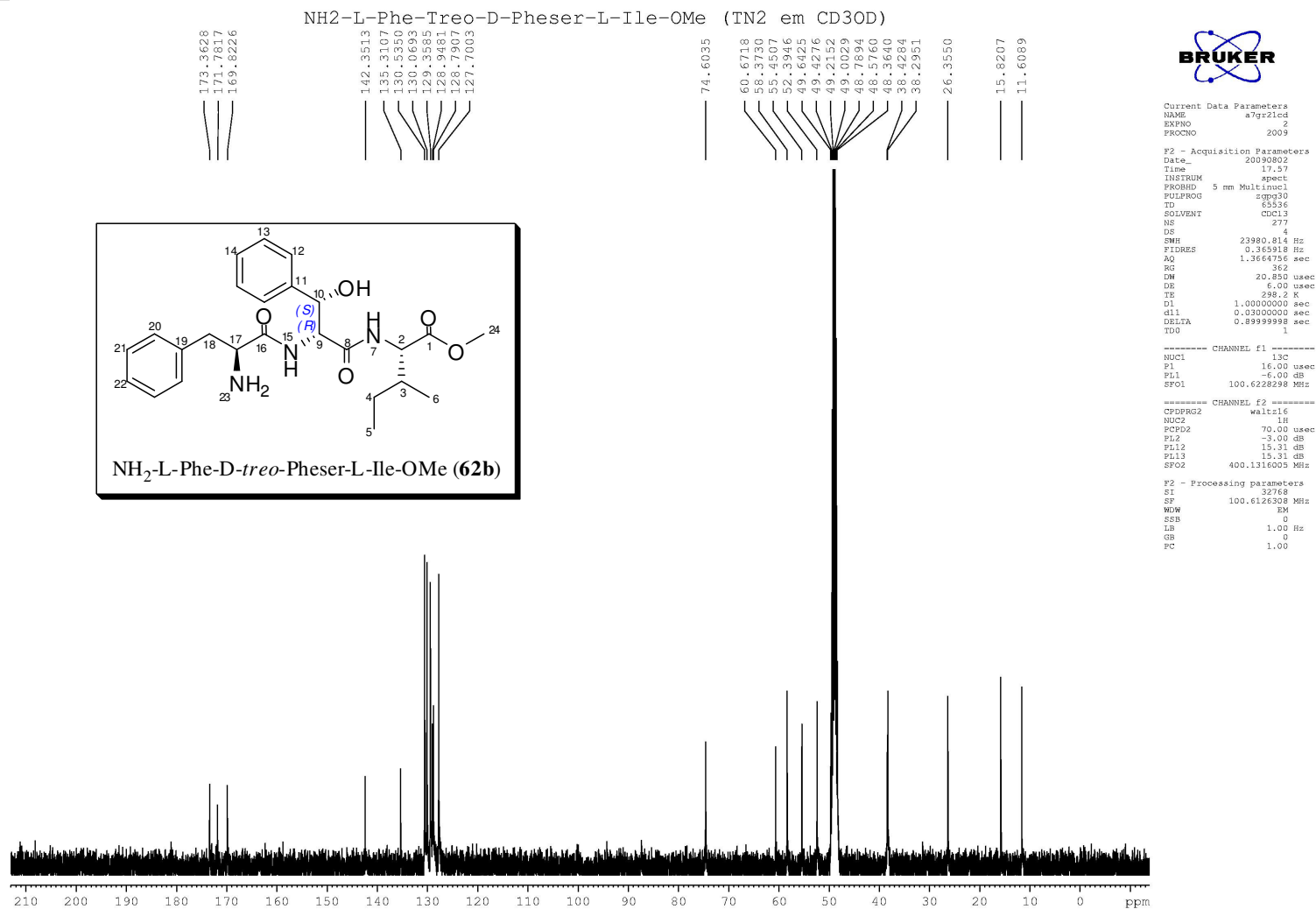


Figura A15: Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do NH<sub>2</sub>-L-Phe-D-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (**62b**) em CD<sub>3</sub>OD a T= 323 K.

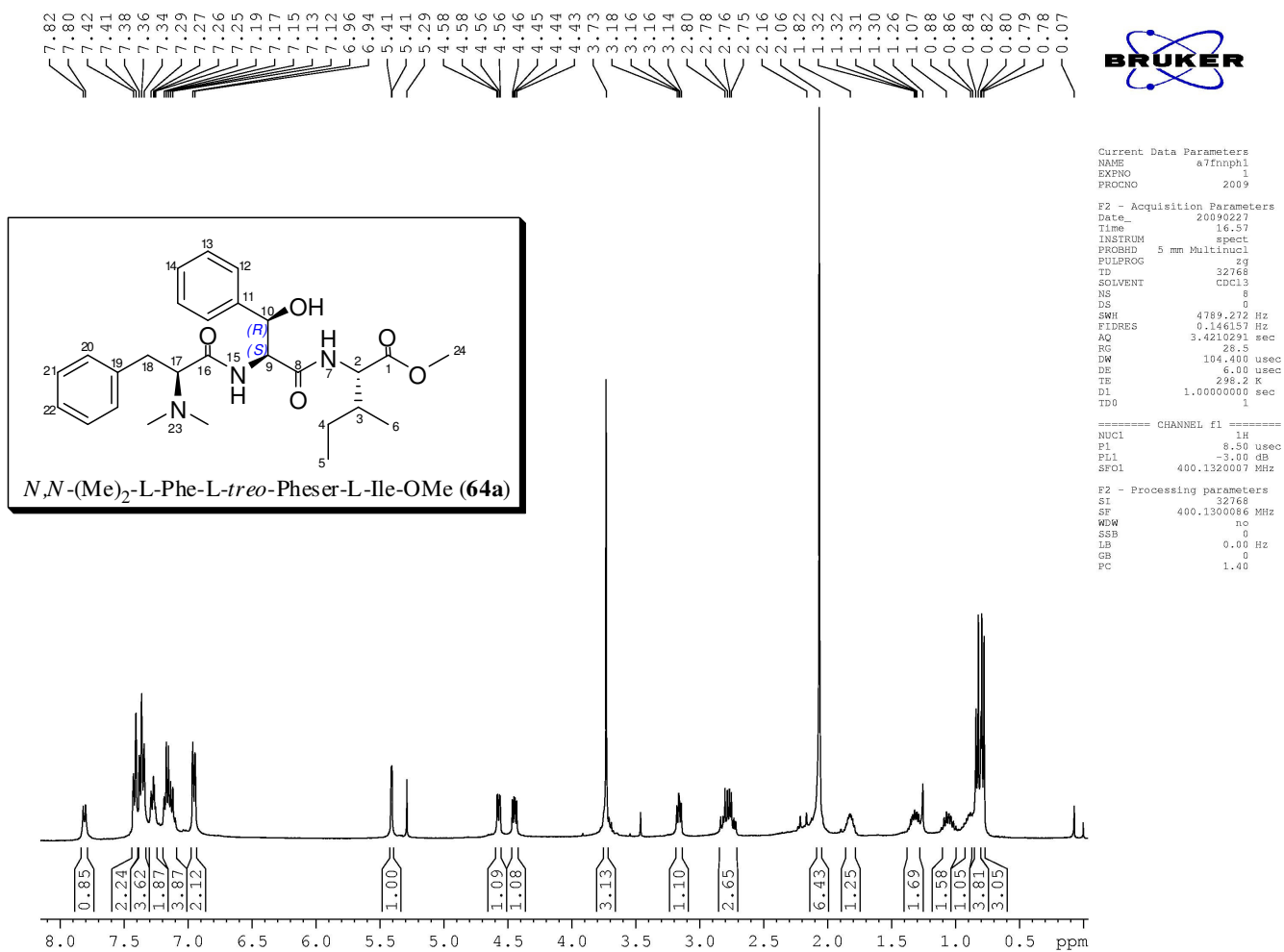


Figura A16: Espectro de <sup>1</sup>H do *N,N*-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-L-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (**64a**)

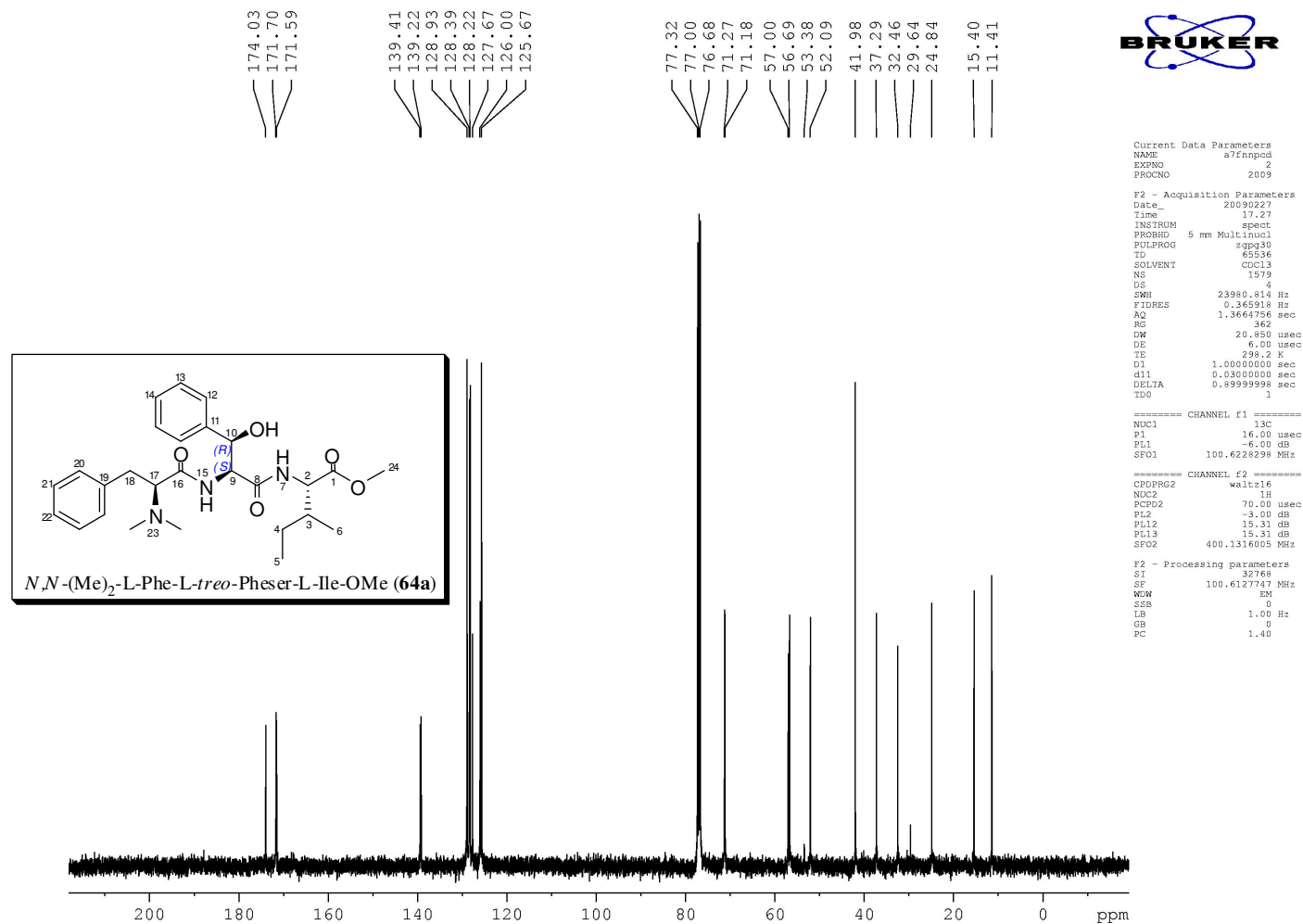


Figura A17: Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do *N,N*-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-L-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (64a)

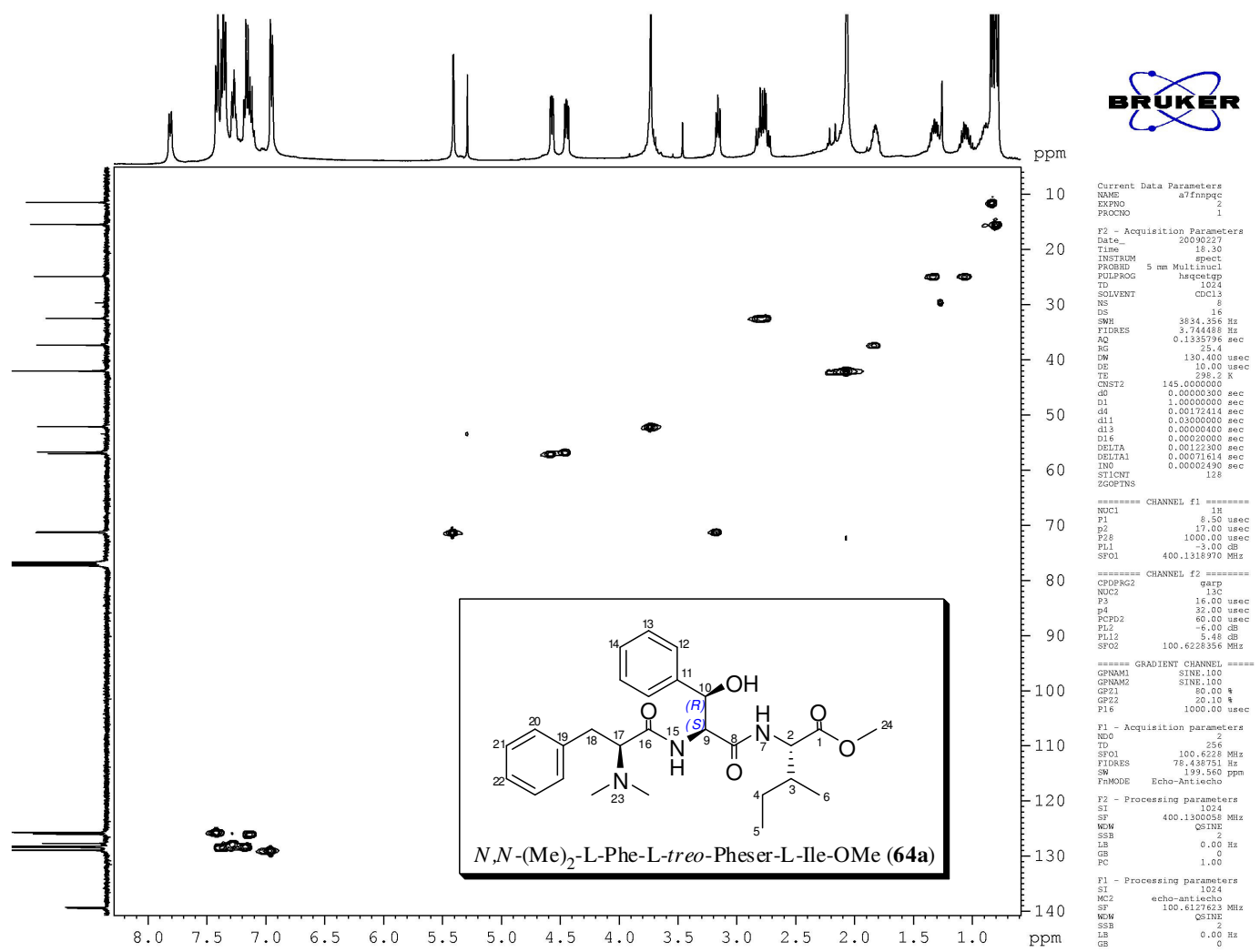


Figura A18: Espectro de HMQC do *N,N*-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-L-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (64a)

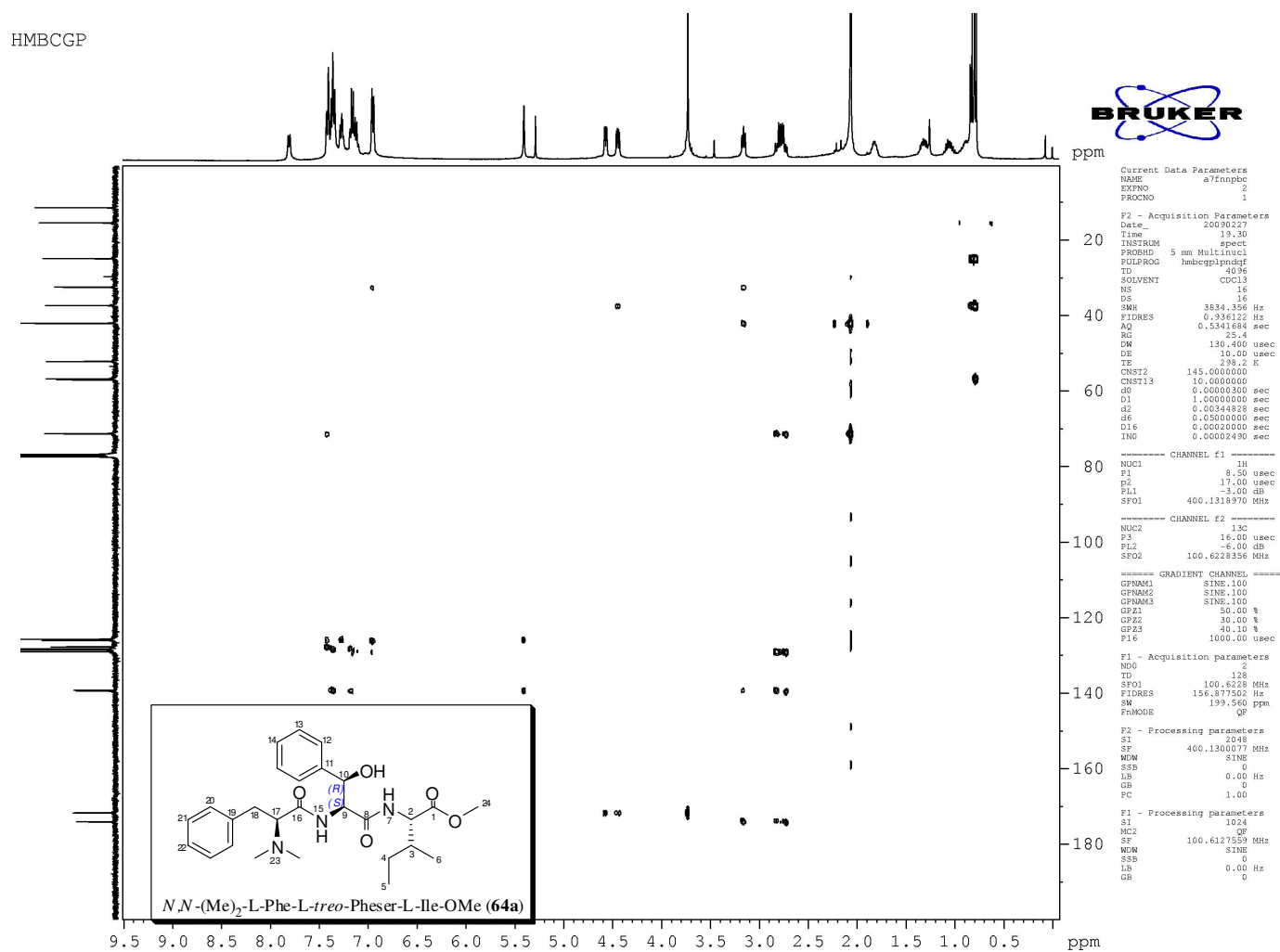


Figura A19: Espectro de HMBC do *N,N*-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-L-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (64a)

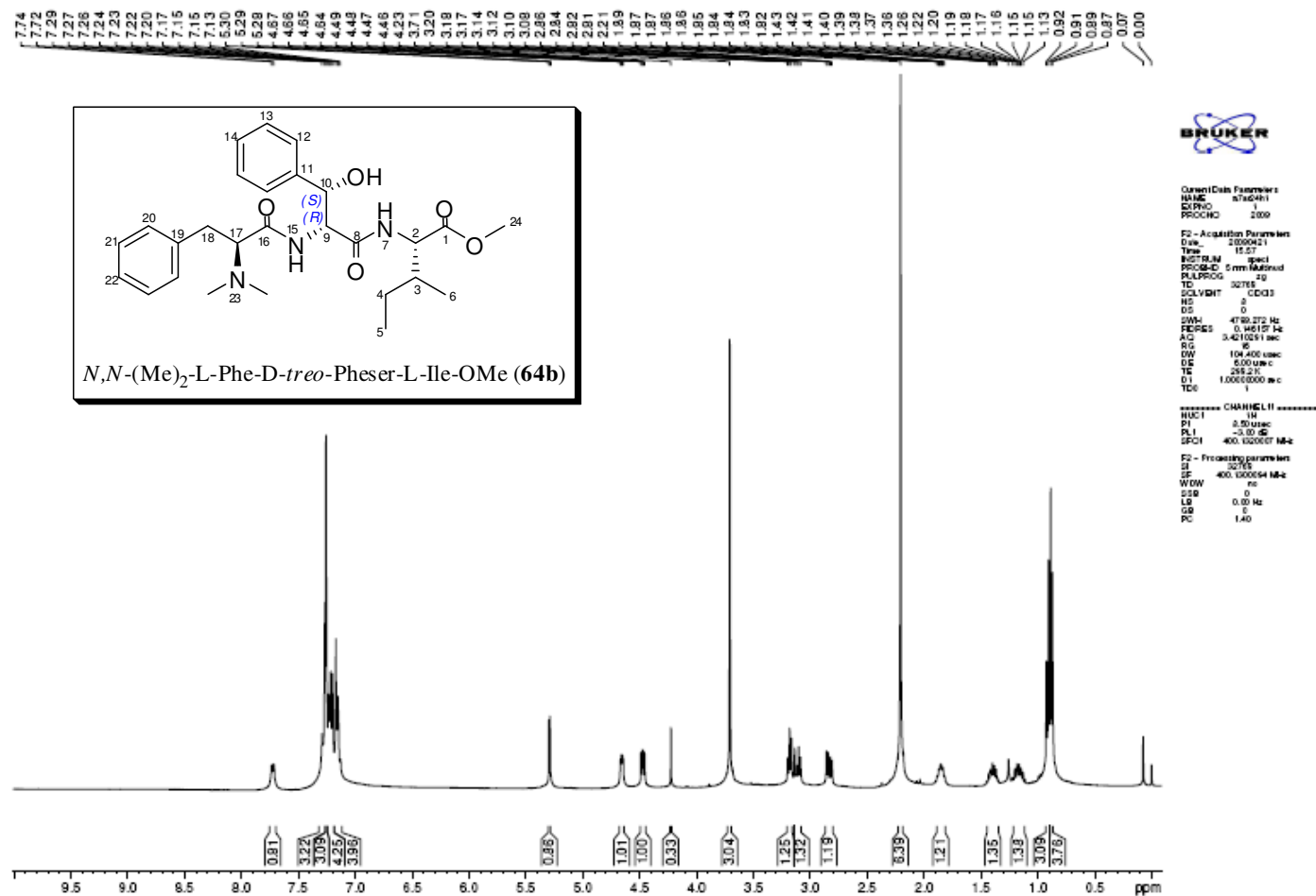


Figura A20: Espectro de RMN <sup>1</sup>H do *N,N*-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-D-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (**64b**)

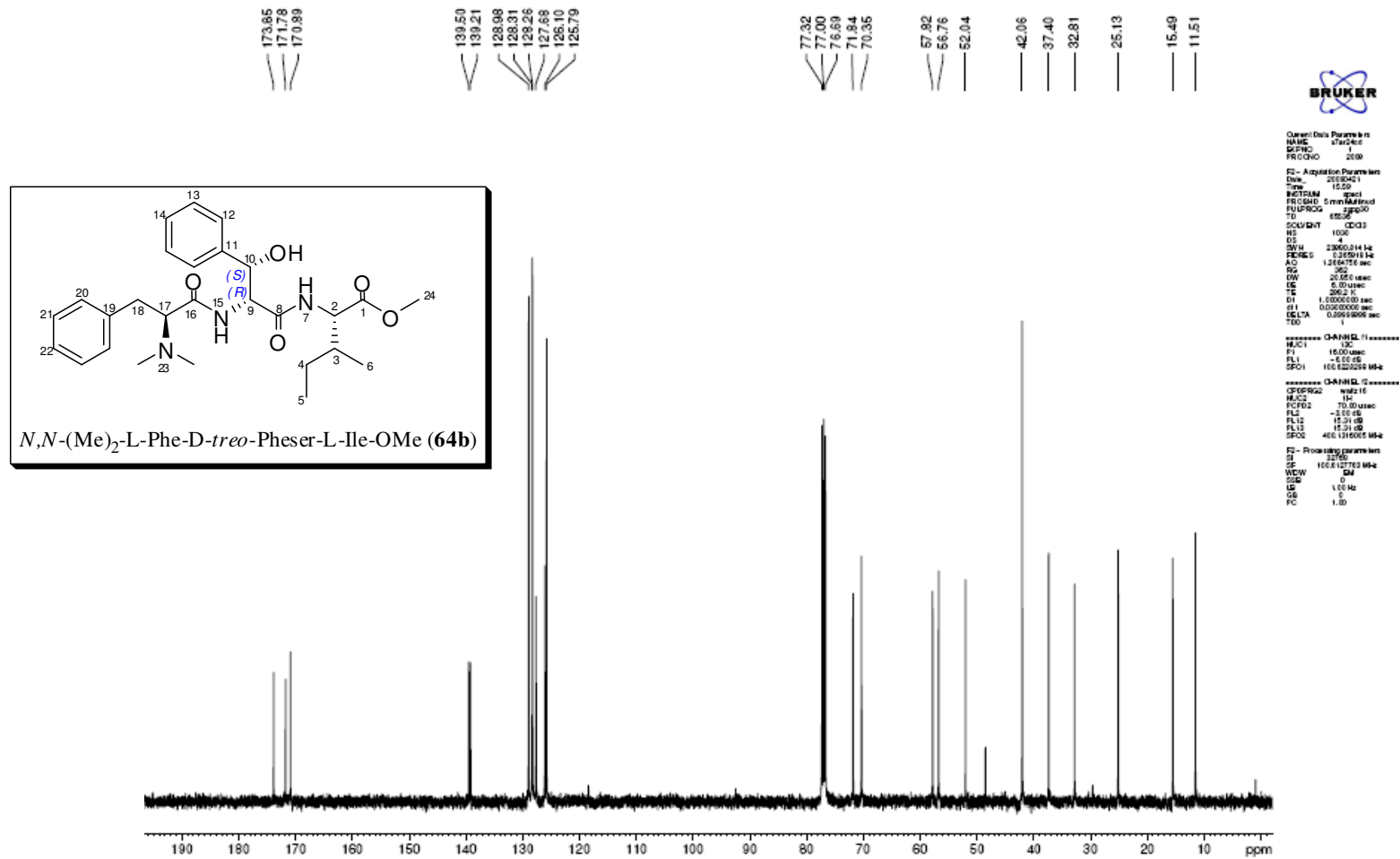
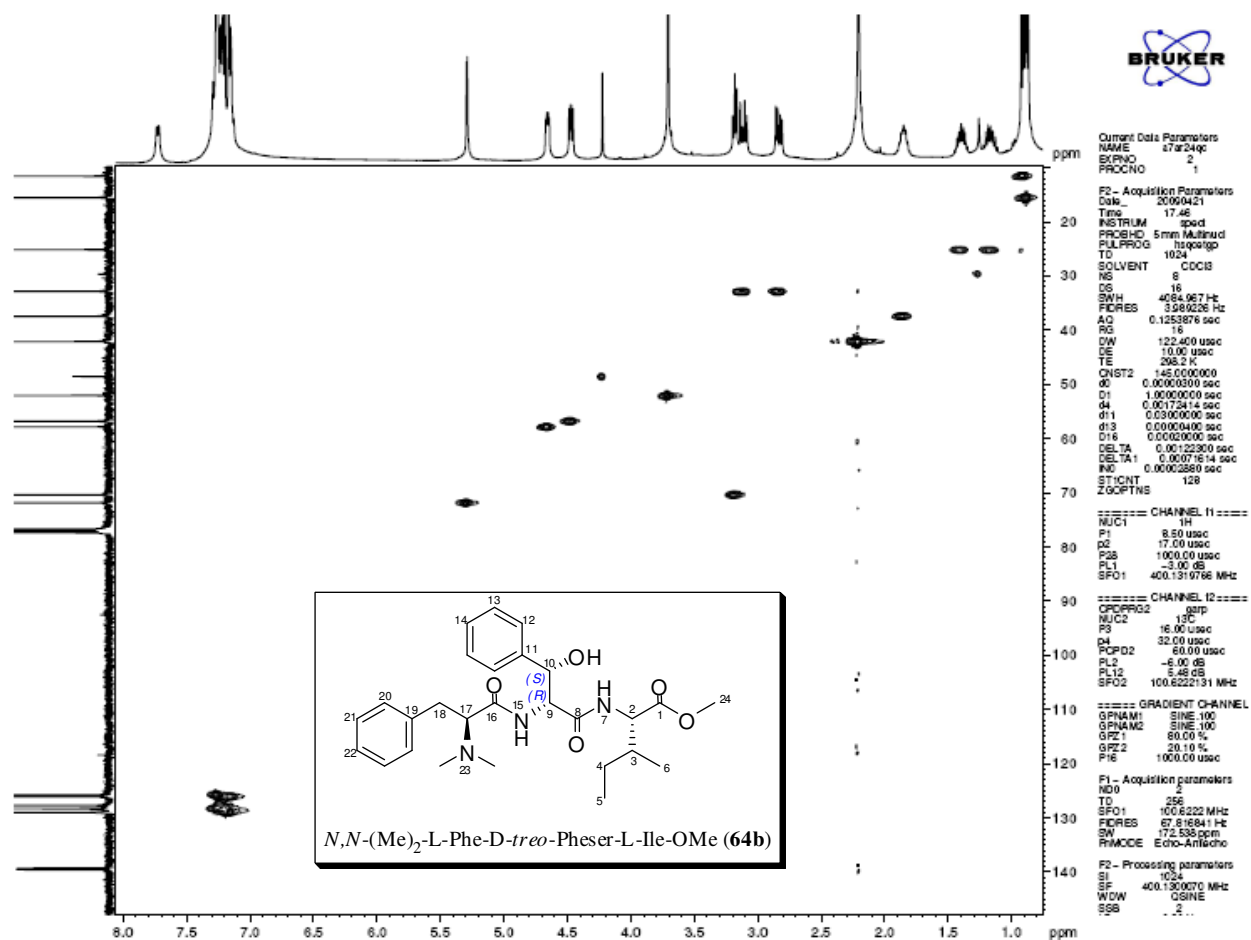


Figura A21: Espectro de RMN <sup>13</sup>C do *N,N*-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-D-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (64b)

Figura A22: Espectro de HMQC do *N,N*-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-D-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (64b)



HMBCGP

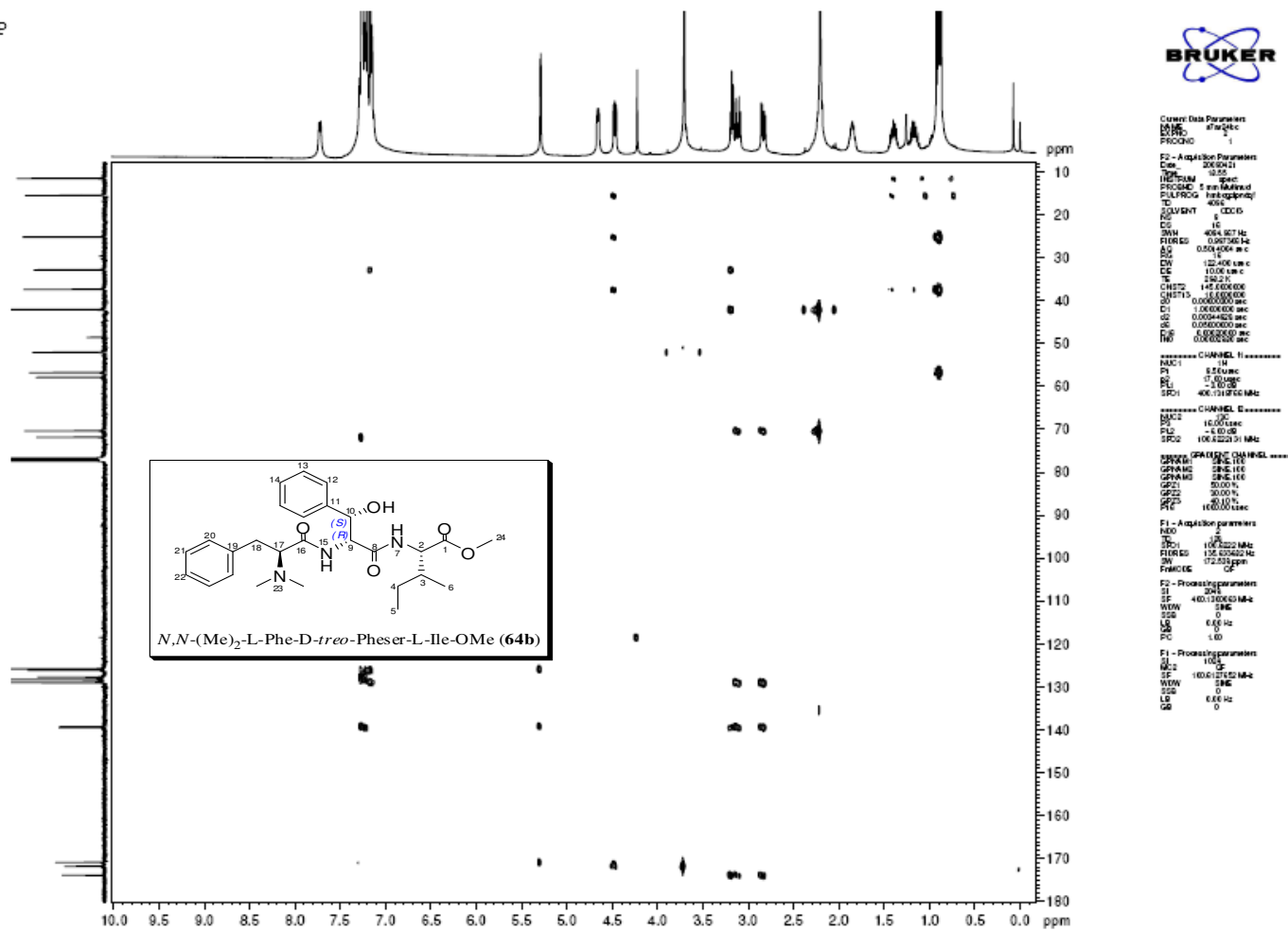


Figura A23: Espectro de HMBC do *N,N*-(Me)<sub>2</sub>-L-Phe-D-treo-Pheser-L-Ile-OMe (64b)

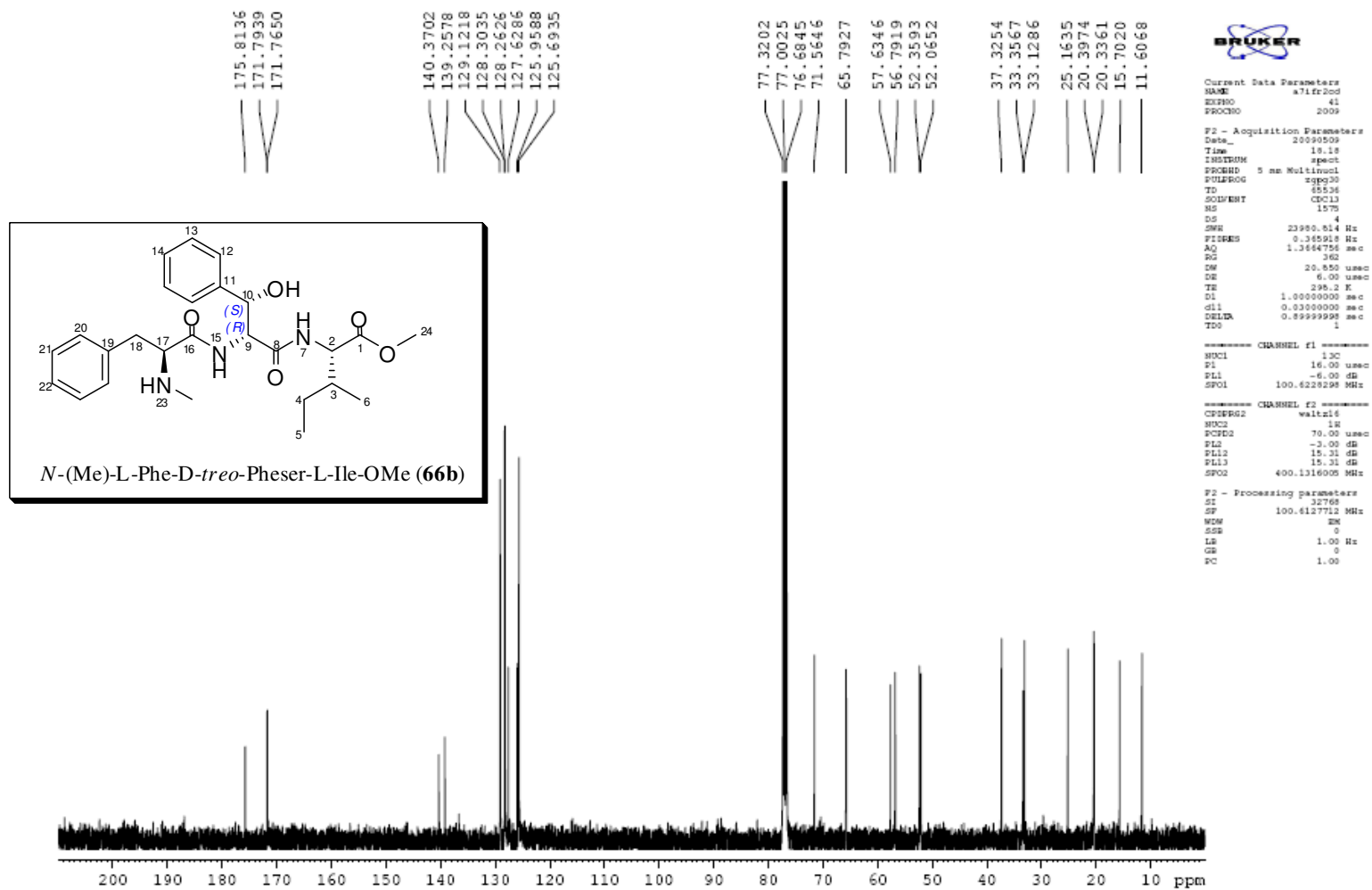


Figura A24: Espectro de RMN<sup>13</sup>C do N-(Me)-L-Phe-D-treo-Pheser-L-Ile-OMe (66b)

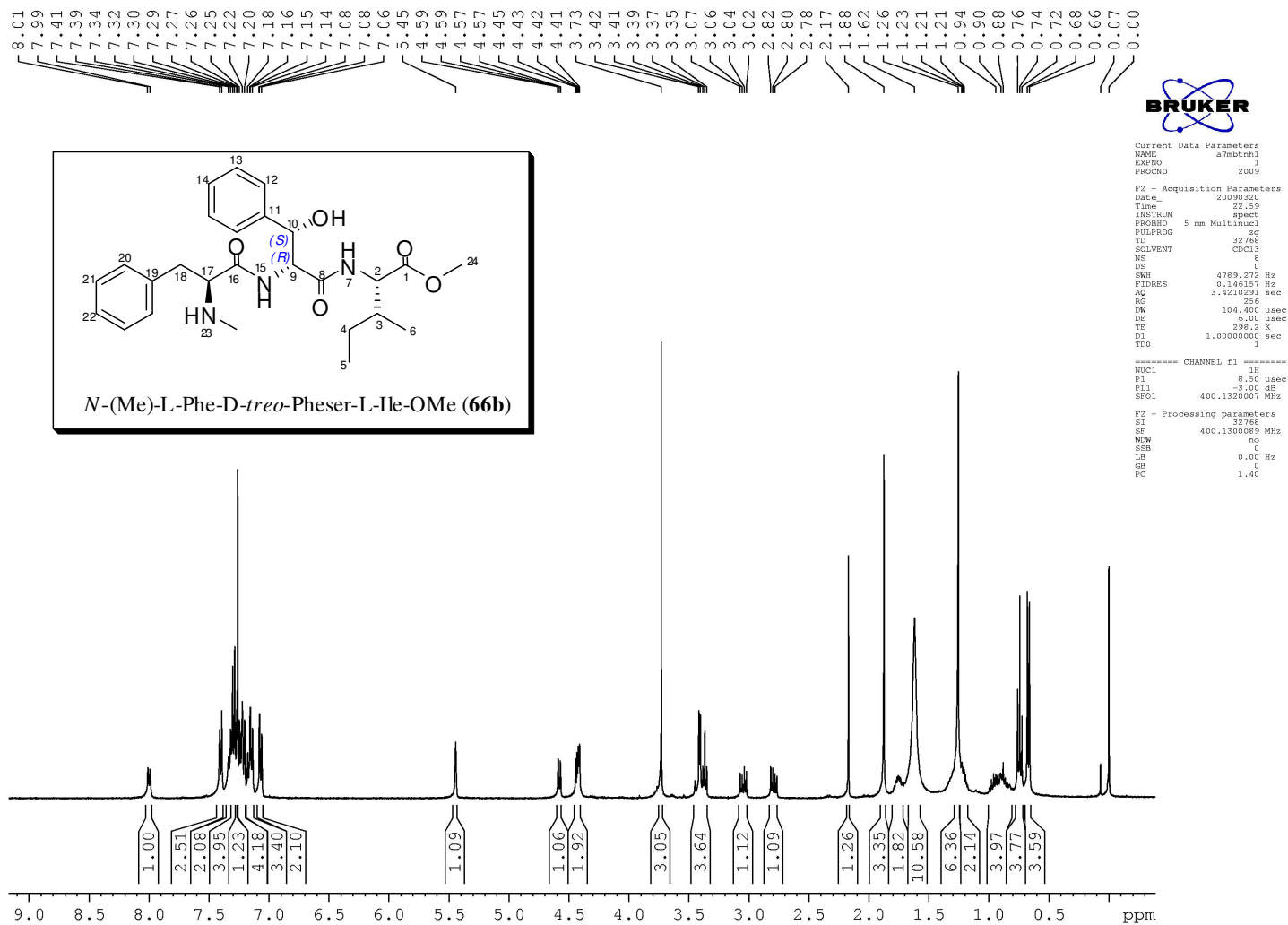


Figura A25: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do *N*-(Me)-L-Phe-D-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (66b)

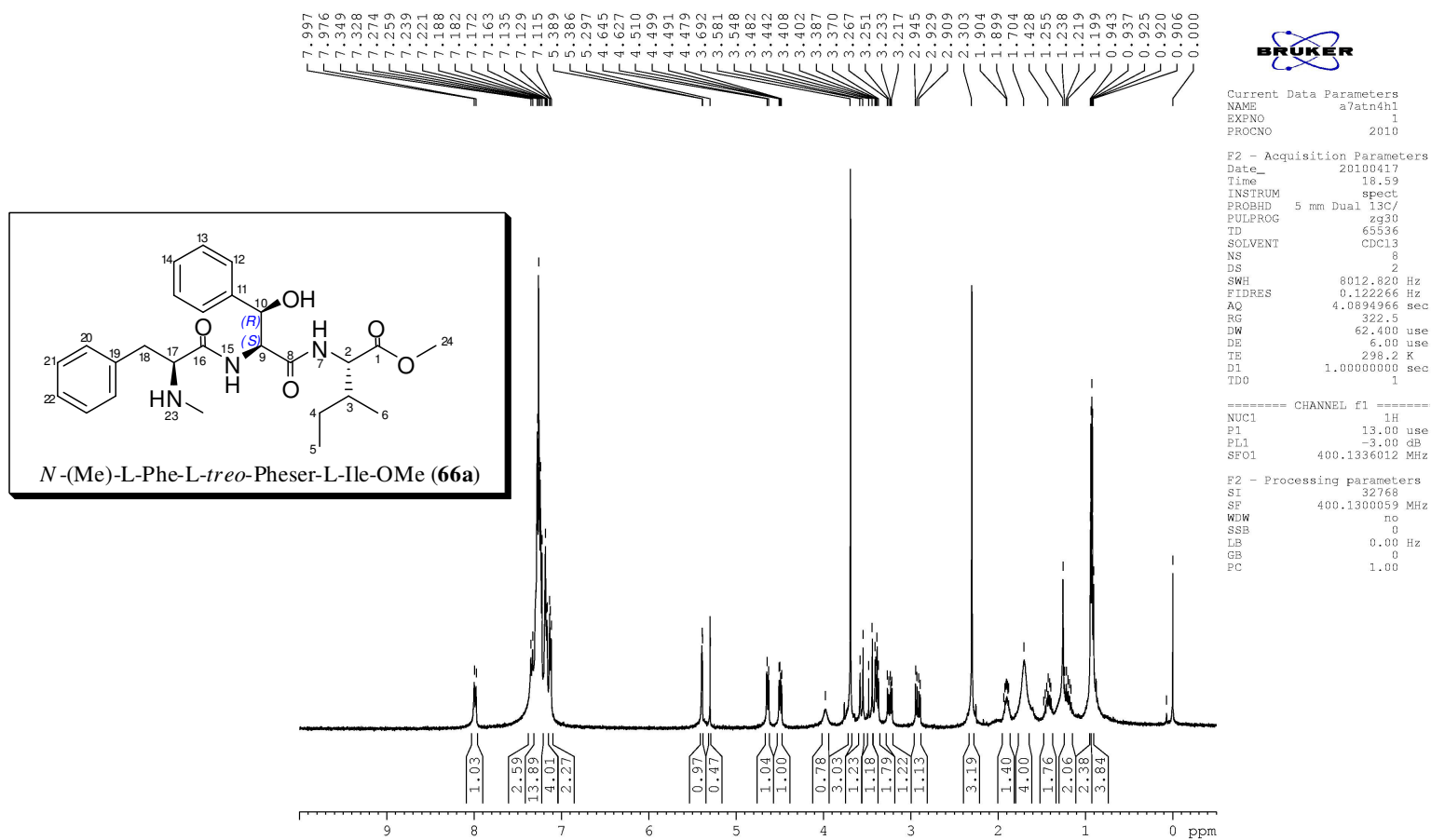


Figura A26: Espectro de <sup>1</sup>H do *N*-(Me)-L-Phe-L-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (66a)

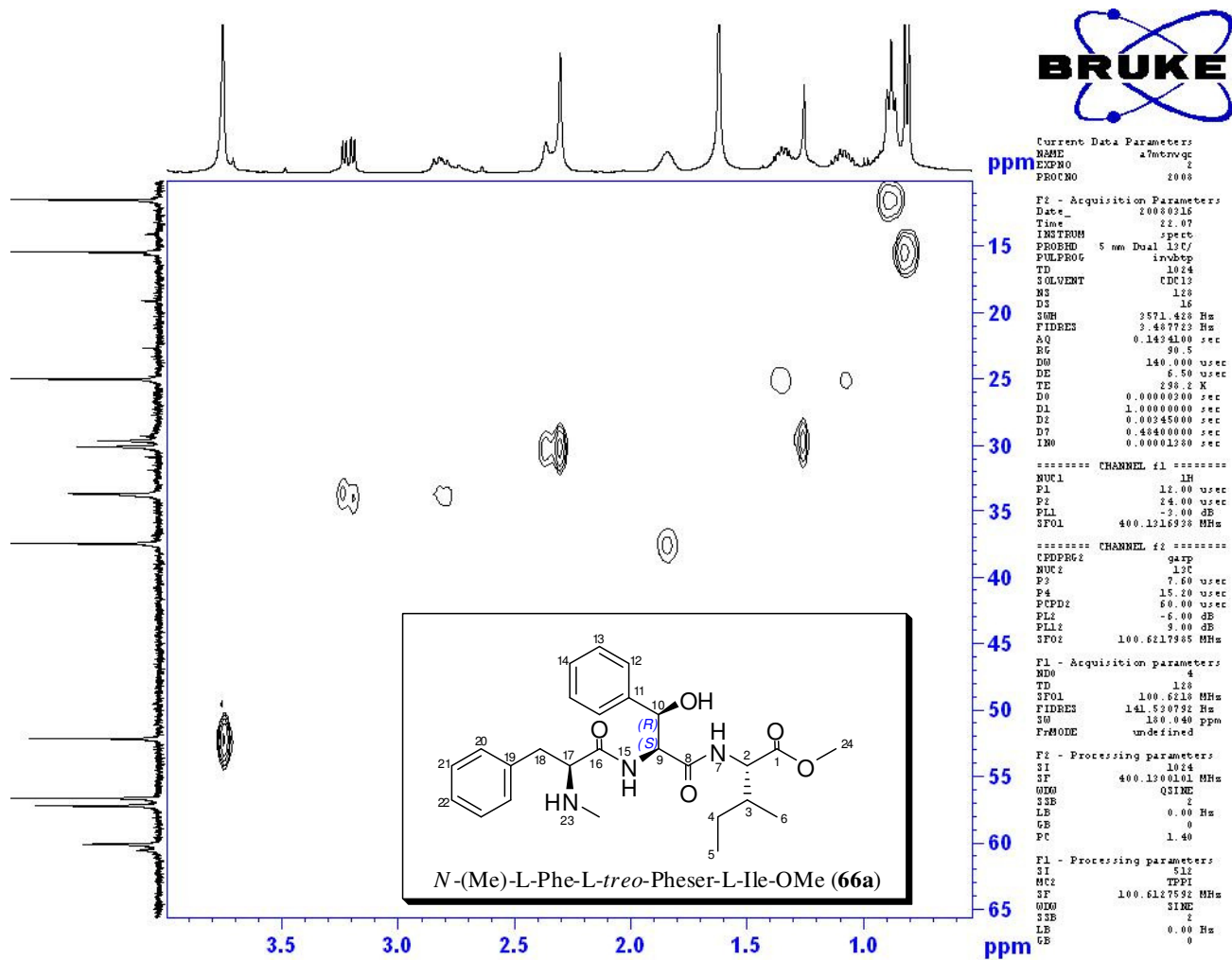


Figura A27: Ampliação do Espectro de HMQC do *N*-Me-L-Phe-L-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (66a)

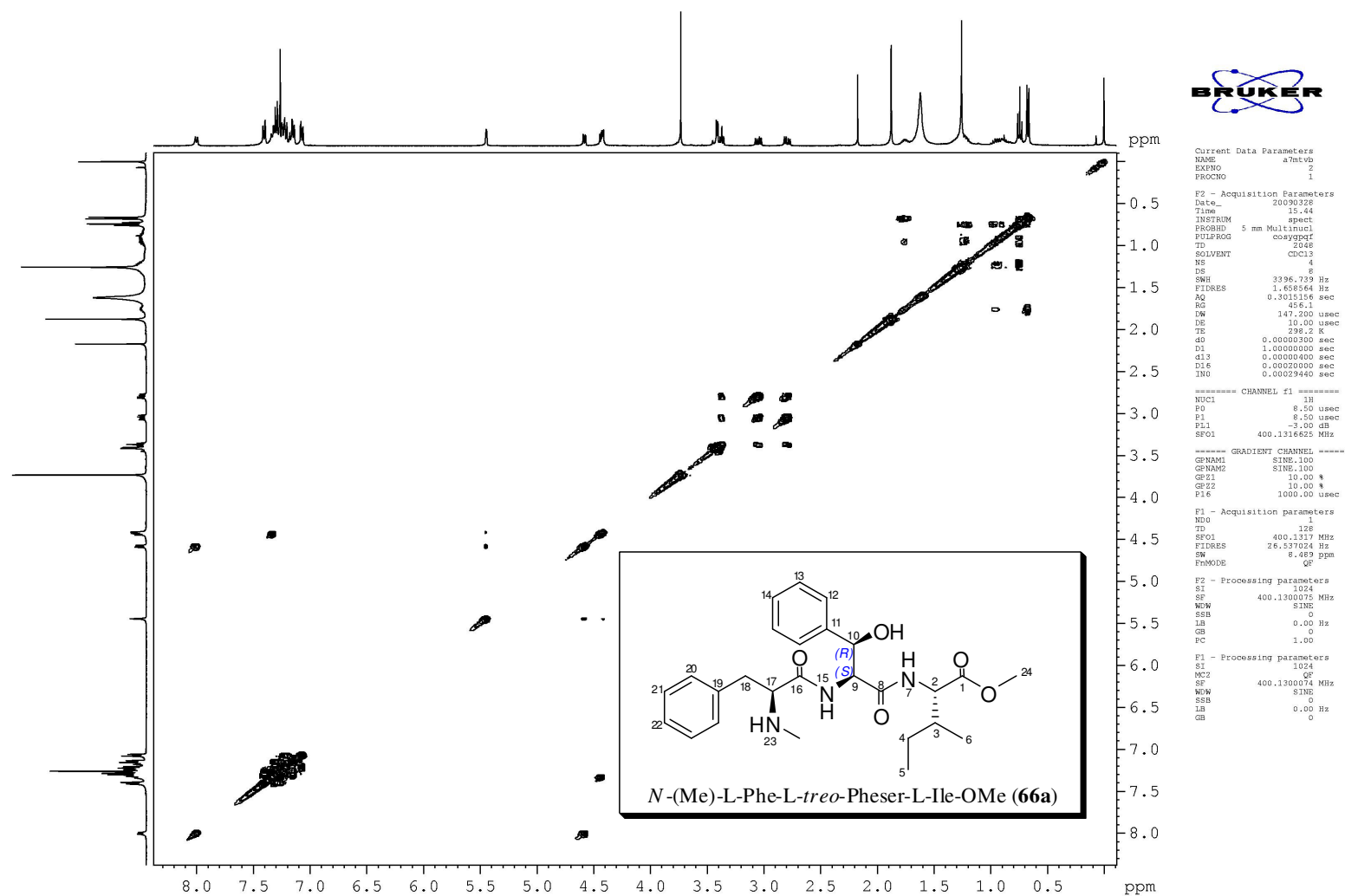


Figura A28: Espectro de COSY 45 do *N*-Me-L-Phe-L-*treo*-Pheser-L-Ile-OMe (66a).

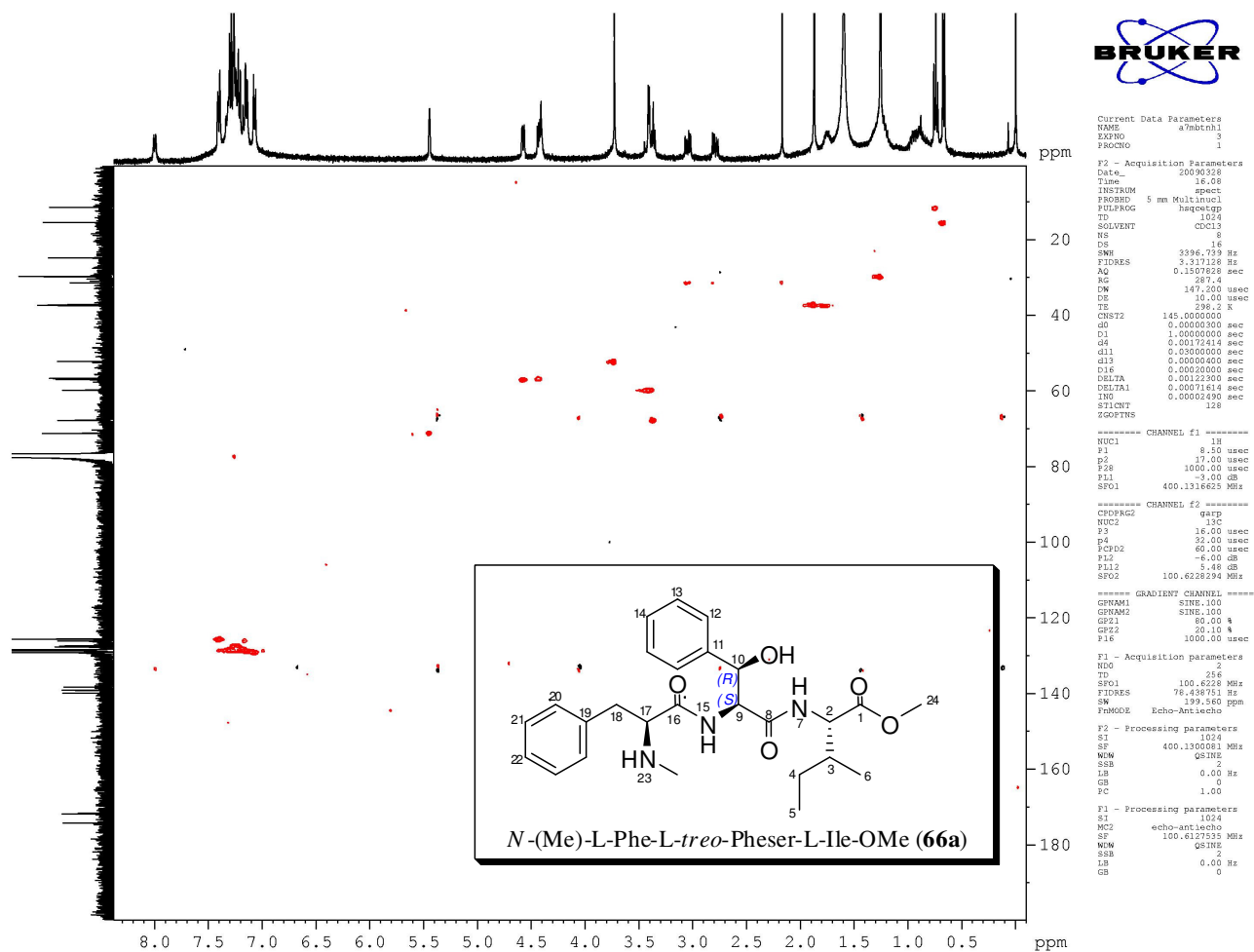


Figura A29: Espectro de HSQC do *N*-Me-L-Phe-L-treo-Pheser-L-Ile-OMe (66a).

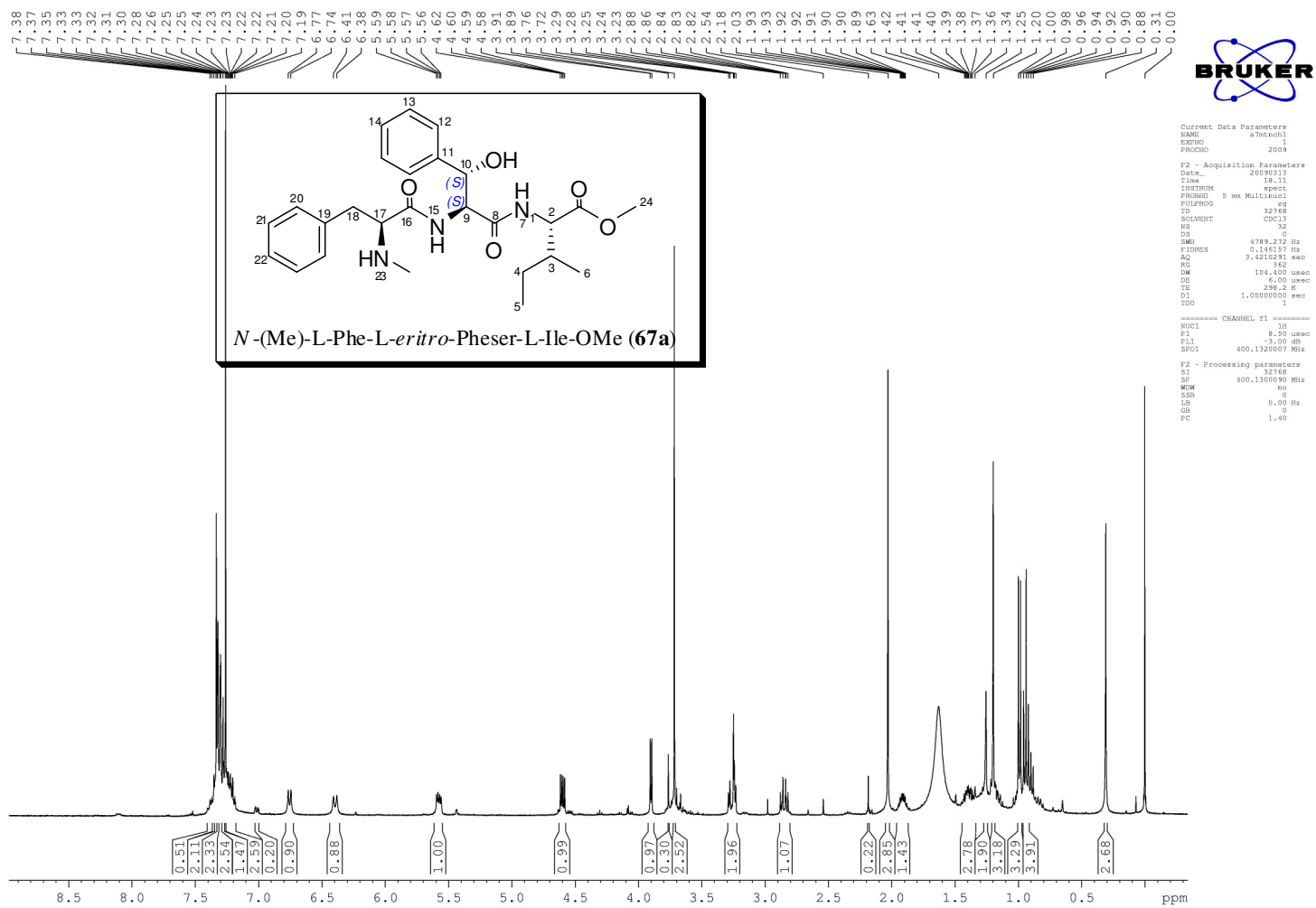


Figura A30: Espectro de RMN <sup>1</sup>H do *N*-(Me)-L-Phe-L-*eritro*-Pheser-L-Ile-OMe (**67a**).



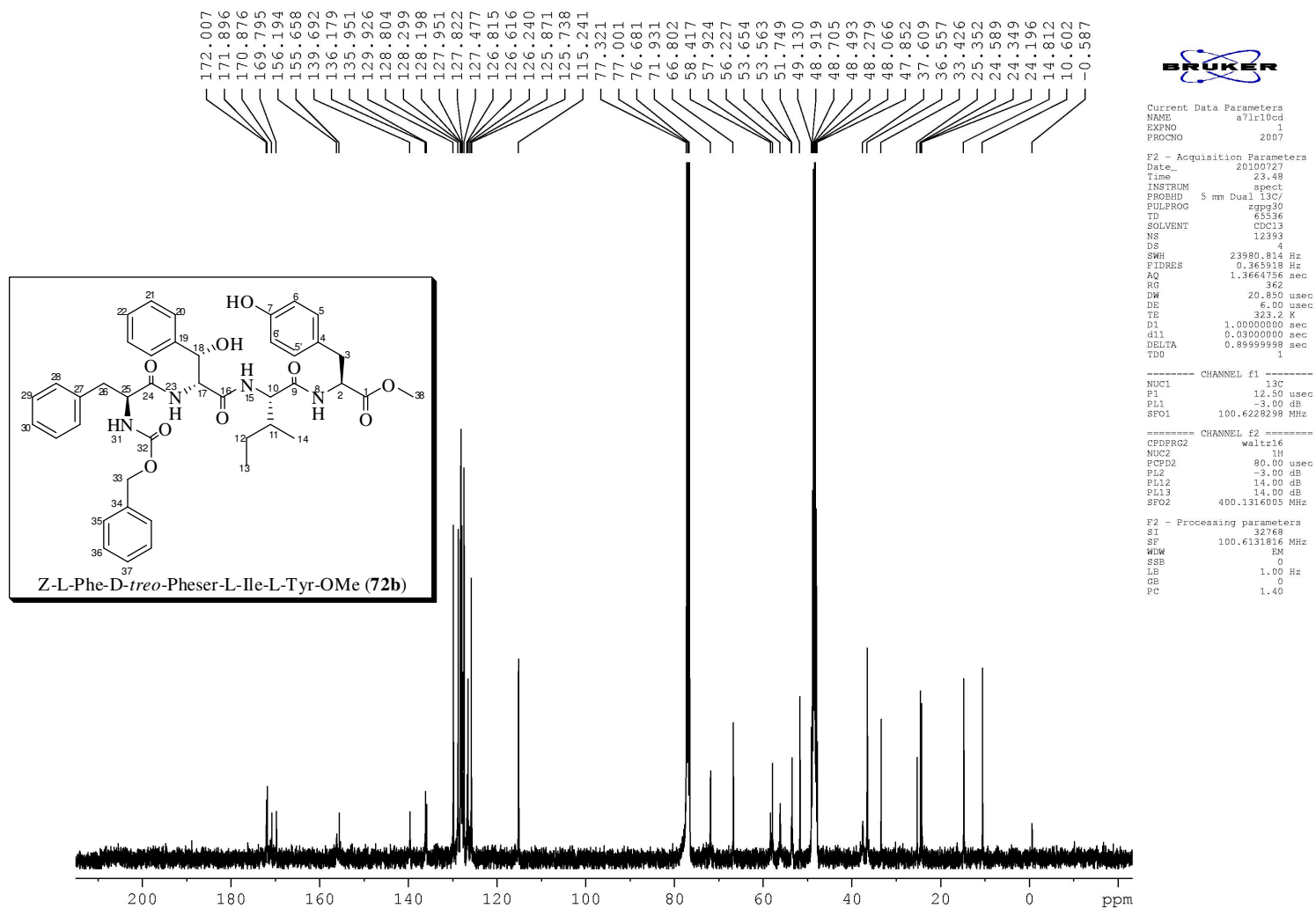


Figura A31: Espectro de RMN <sup>13</sup>C do Z-L-Phe-D-treo-Pheser-L-Ile-L-Tyr-OMe (72b).

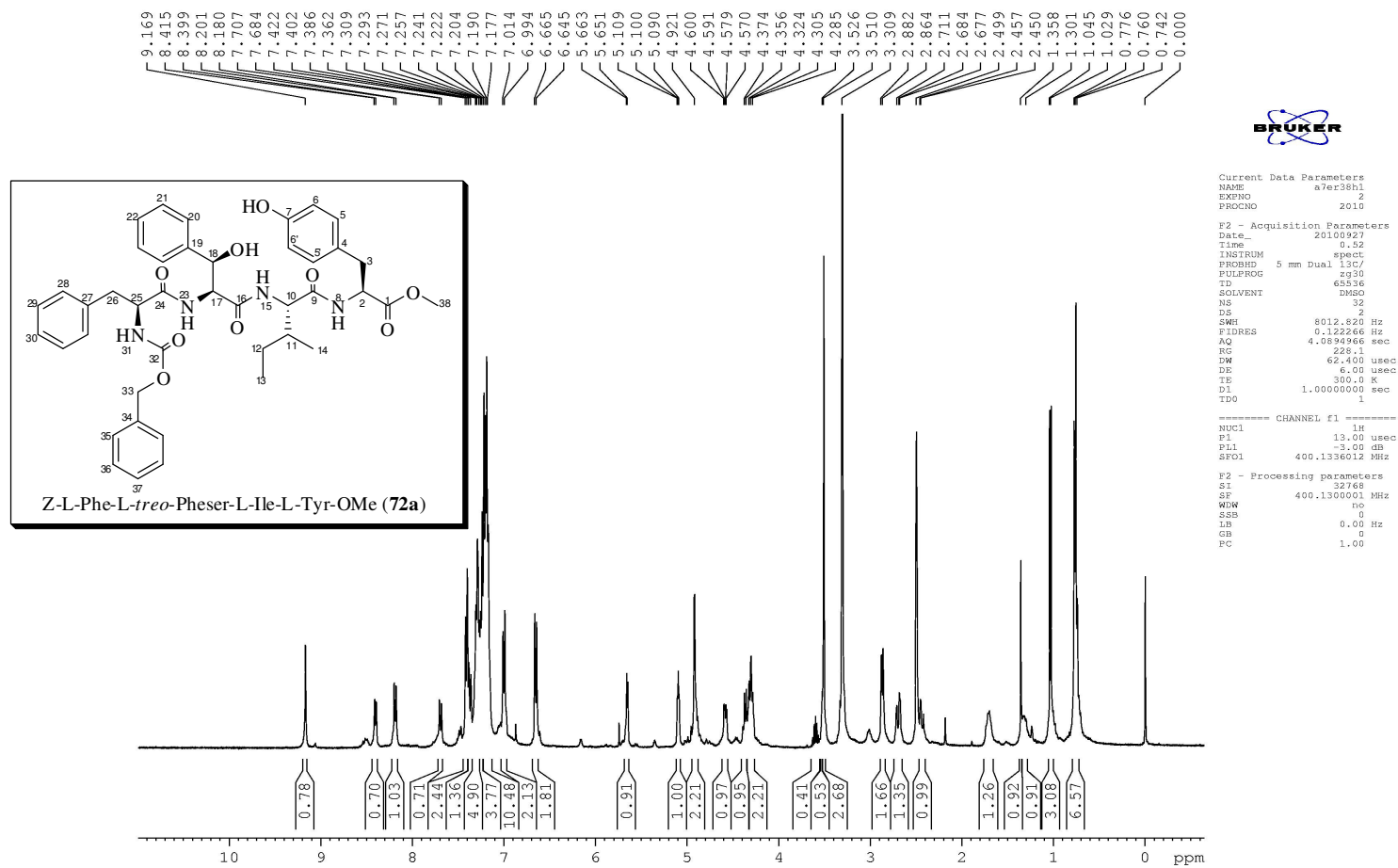


Figura A32: Espectro de RMN <sup>1</sup>H do Z-L-Phe-L-treo-Pheser-L-Ile-L-Tyr-OMe (72a).

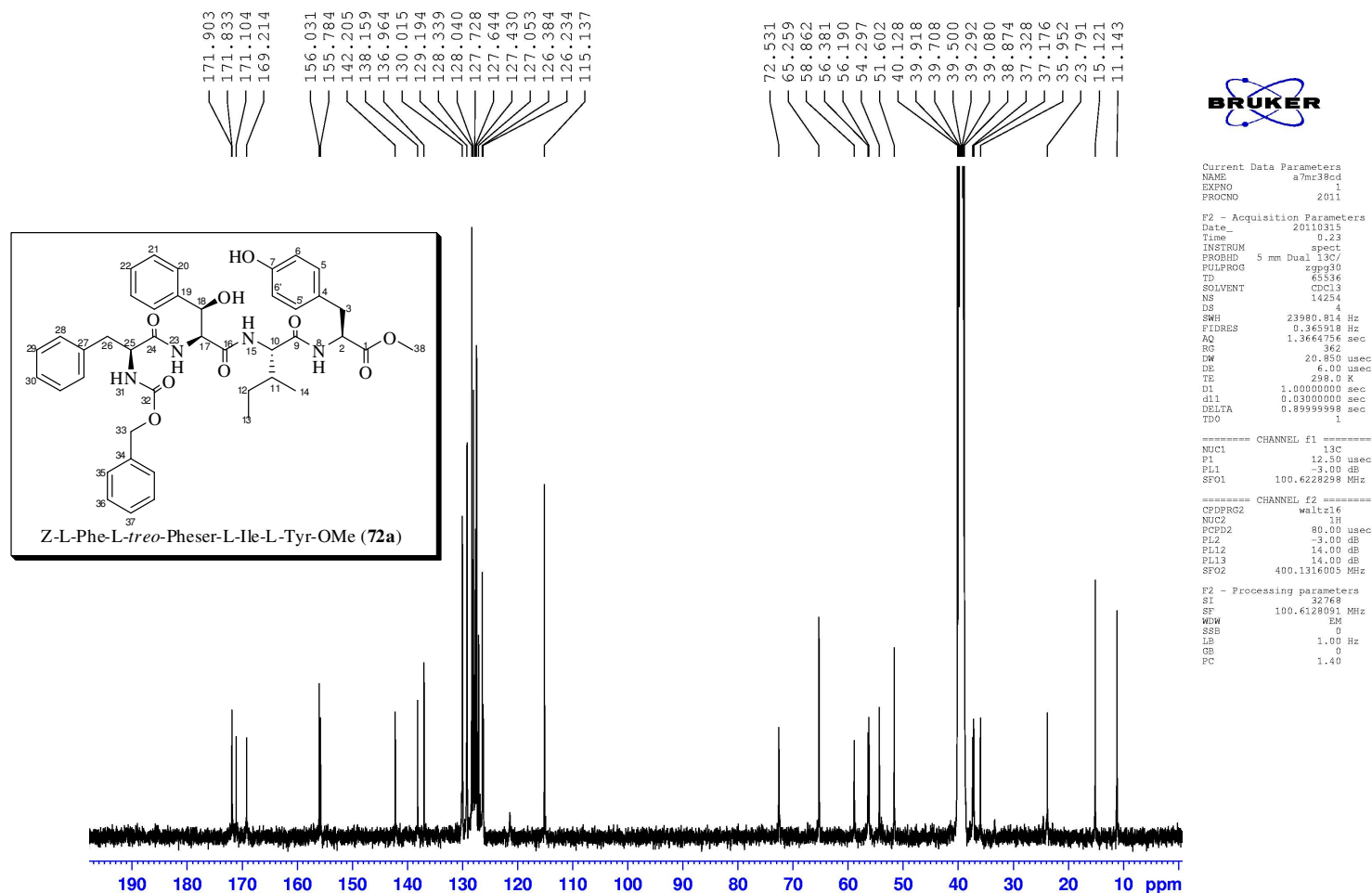


Figura A33: Espectro de RMN<sup>13</sup>C do Z-L-Phe-L-treo-Pheser-L-Ile-L-Tyr-OMe (72a).

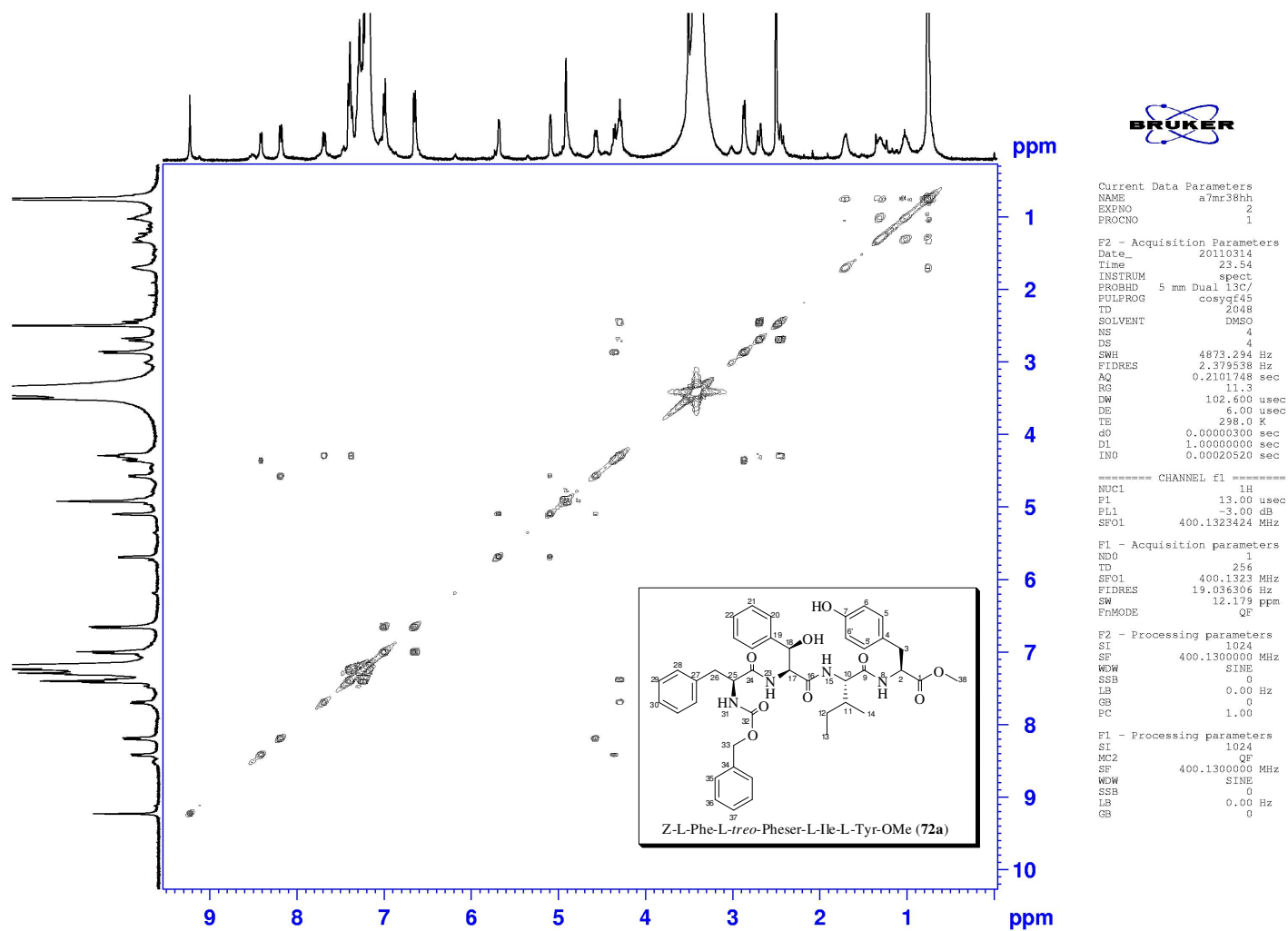


Figura A34: Espectro de COSY 45 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H do Z-L-Phe-L-treo-Pheser-L-Ile-L-Tyr-OMe (72a).

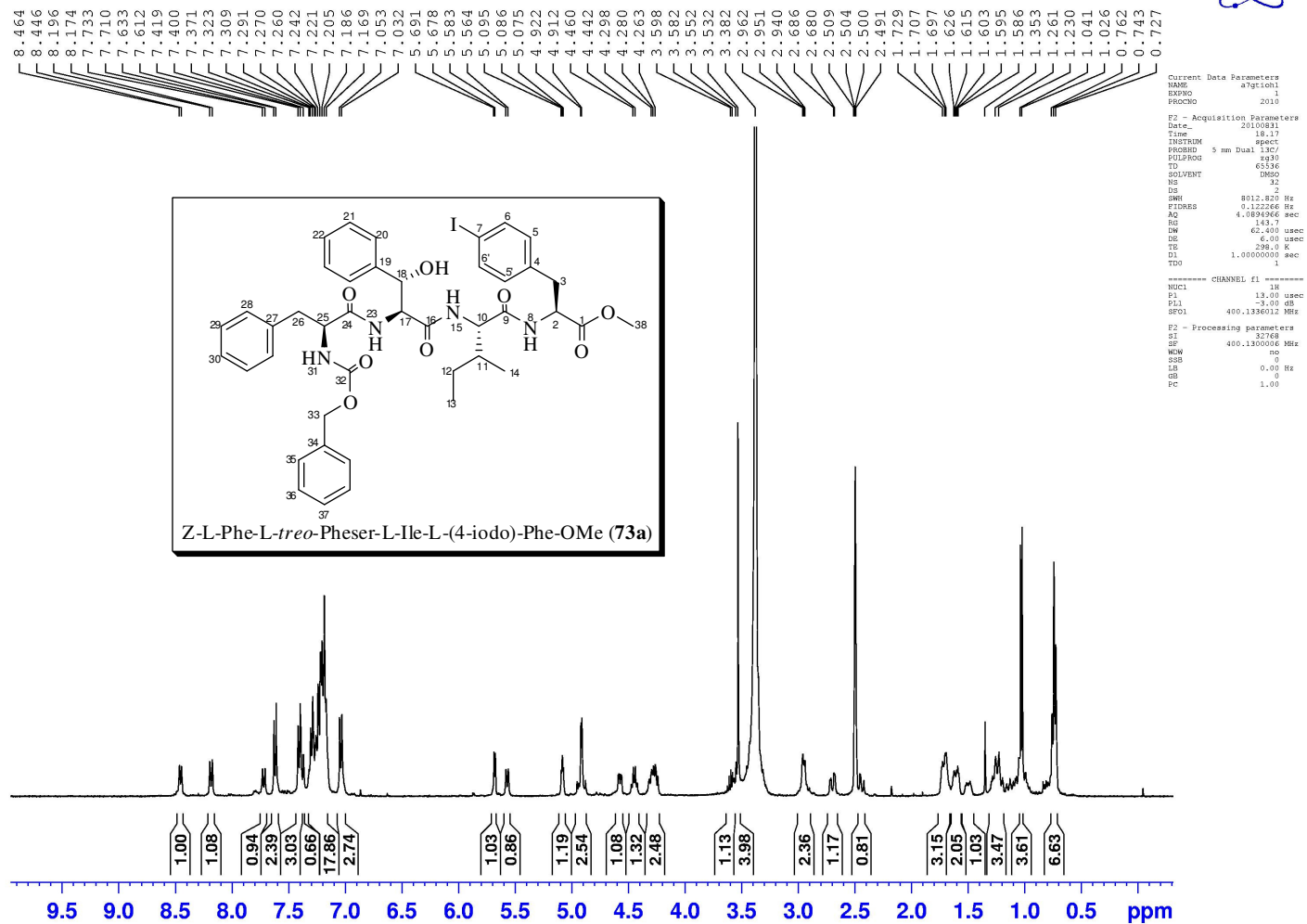


Figura A35: Espectro de RMN <sup>1</sup>H do Z-L-Phe-L-treo-Pheser-L-Ile-L-(4-iodo)-Phe-OMe (73a).

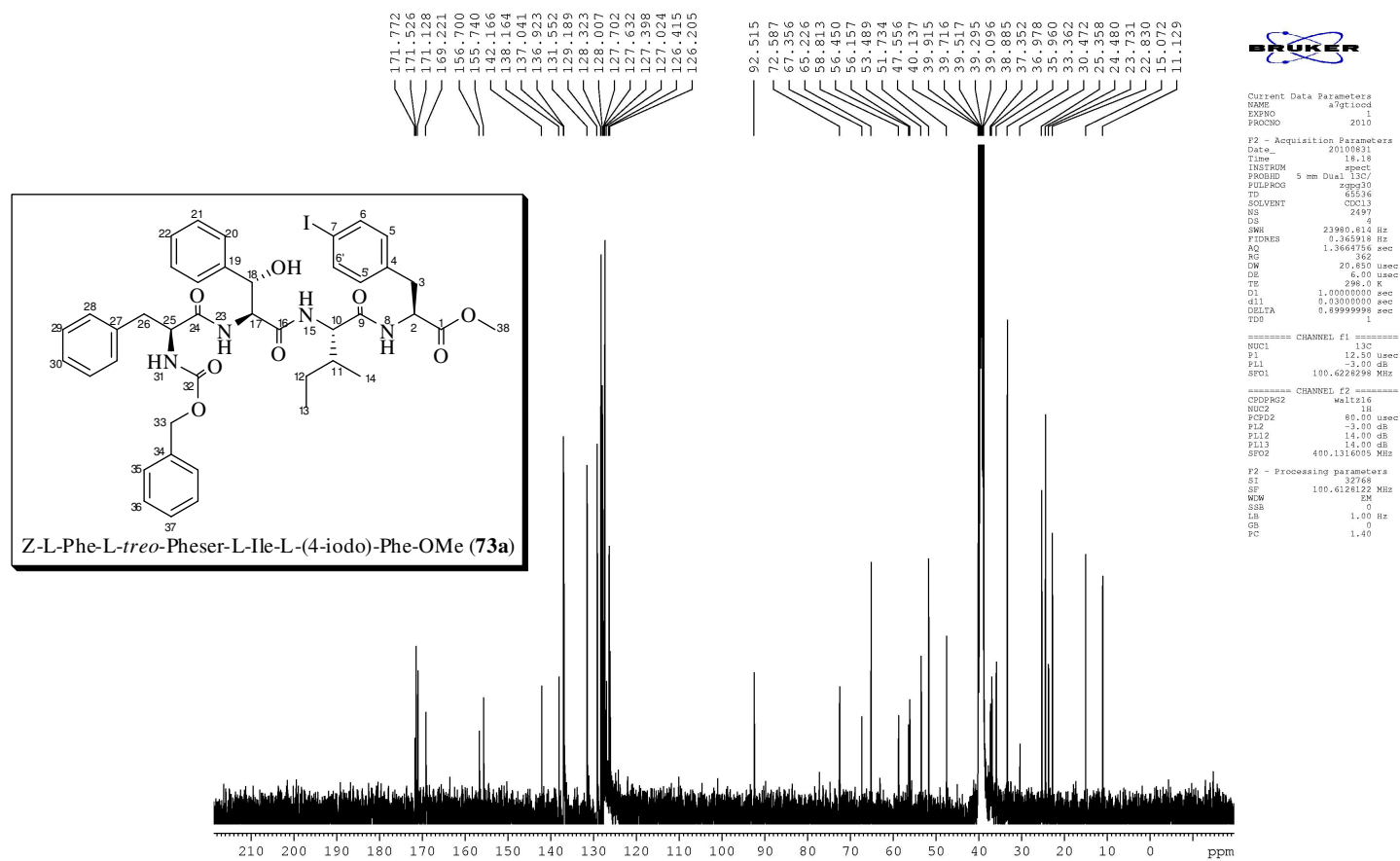


Figura A36: Espectro de RMN <sup>13</sup>C do Z-L-Phe-L-treo-Pheser-L-Ile-L-(4-iodo)-Phe-OMe (73a).