UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Síntese de peptídeo modificado contendo grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído

Milena Moreira Lima

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Síntese de peptídeo modificado contendo grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientado(a): Milena Moreira Lima

Orientador(a): Profa. Dra. Ivone Carvalho

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas em 28/06/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Lima, Milena Moreira
Síntese de peptídeo modificado contendo grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído. Ribeirão Preto, 2013.
140 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.
Orientador: Carvalho, Ivone.

1. Peptídeos. 2. Click Chemistry. 3. Peptídeos modificados.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Milena Moreira Lima
Título do trabalho: Síntese de peptídeo modificado contendo grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador(a): Profa. Dra. Ivone Carvalho

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

À minha mãe Conceição e ao meu noivo Getúlio
pelo incentivo, dedicação e apoio incondicionais.

Agradecimentos

À Deus, pelas bençãos e alegrias vividas até aqui e por Sua proteção.

À minha família, sempre presente, mesmo que distante alguns bons quilômetros.

À minha orientadora Ivone Carvalho pela oportunidade de maior aprendizado e crescimento, pelos grandiosos ensinamentos e pela perseverança no ensinar.

Aos técnicos Luís Otávio, Marcelo Rodrigues, Vinícius Palaretti, José Carlos Tomaz, Clóvis Júnior e à Claudia Castania pela ajuda durante o trabalho e pela paciência com as amostras urgentes.

Ao meu noivo, Getulio, também colega de laboratório, pelos ensinamentos e pela paciência nos momentos mais difíceis.

Aos técnicos Luís Otávio e Marcelo, Daniel, Pedro e Peterson por todo conhecimento transmitido e por todo auxílio prestado durante a execução deste trabalho.

À Vanessa Leiria Campo pela gentileza em ensinar o protocolo da síntese de peptídeos em fase sólida, de grande valia para a realização do trabalho.

Aos amigos do laboratório de Química Farmacêutica pelos momentos de descontração durante os “lanches vespertinos” Ana, Daniel, Galo, Evandro, Jonathan, Ricardo, Marcelo, Pedro, Peterson, Valquíria, Paulo, Vanessa e Susi. Em especial, Luis e Talita pelos maravilhosos brigadeiros a qualquer hora.

À todos aqueles que de alguma maneira contribuíram neste projeto e para o meu desenvolvimento profissional.

À FCFRP-USP pela competência em manter a excelente qualidade da Unidade, contribuindo para a formação de excelentes profissionais e pesquisadores

À CAPES pelo apoio financeiro concedido durante este trabalho

"Só o que está morto não muda! Repito por pura alegria de viver: A salvação é pelo risco, sem o qual a vida não vale a pena!"

Clarice Lispector

LIMA, M. L. **Síntese de peptídeo modificado contendo grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído**. 2013. 136f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Peptídeos são biomoléculas que apresentam extensa variedade estrutural e funcional, atuando em diversos processos biológicos relevantes. Estas moléculas são amplamente utilizadas na terapêutica, constituindo, atualmente, um campo investigativo bastante promissor para o desenvolvimento de novos fármacos, especialmente no desenvolvimento de vacinas sintéticas. Os avanços científicos relacionados às técnicas de identificação, análise e purificação tem estimulado diversas pesquisas na busca por fármacos baseados em peptídeos, os quais podem ser obtidos a partir de fontes naturais ou por métodos químicos (em solução ou em fase sólida), enzimático ou combinação de ambos (semi-síntese) e via tecnologia do DNA recombinante. Entretanto, devido às limitações próprias dos peptídeos naturais, tais como, suscetibilidade proteolítica, toxicidade e baixa biodisponibilidade, torna-se necessária a síntese de peptídeos modificados. Como a função biológica de um peptídeo é definida por sua conformação estrutural, a inserção de modificação em uma estrutura peptídica deve ser capaz de manter ou estabilizar esta conformação estrutural. O desenvolvimento de novas e eficientes rotas de síntese de peptídeos modificados torna-se necessário para superar as limitações relacionadas à suscetibilidade proteolítica, toxicidade e baixa biodisponibilidade, afim de contribuir para novas estratégias terapêuticas, em especial no desenvolvimento de vacinas. Desta forma, a inserção de grupo 1,2,3-triazol tem fornecido propriedades físico-químicas desejáveis no desenvolvimento de fármacos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de síntese de peptídeos contendo grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído, como o peptídeo **1**, o qual é constituído por dezesseis resíduos de treonina e um grupo 1,2,3-triazol 1-4-dissubstituído entre os resíduos Thr8 e Thr9 (NH_2-$(Thr)_7$-Thr-(ciclo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído)-Thr-$(Thr)_7$-OH). Adicionalmente, devido à semelhança com mucinas de *T. cruzi*, as quais apresentam rica composição em resíduos de treonina, **1** poderá ser empregado na preparação de peptideomiméticos destas mucinas e no desenvolvimento de vacinas relacionadas à processos infecciosos causados por *T. cruzi*. A preparação de **1** envolveu uma associação entre síntese de peptídeo em fase sólida e reações de ciclo-adição azido-alcino 1,3 dipolar catalisada por cobre (I) (CuAAC). Inicialmente, o método utilizado foi padronizado a partir da síntese do modelo dipeptídeo de treonina (**8**), cuja ligação peptídica foi substituída pelo grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído (*N*HFmoc-Thr-(ciclo 1,2,3-triazol 1,4 dissubstituído)-Thr-OH). A estratégia via CuAAC conduziu à obtenção do dipeptídeo modificado em excelente rendimento (98%) e permitiu estabelecer as condições a serem empregadas na obtenção do peptídeo mais complexo de cadeia longa **1**. A reação de CuAAC gerou o peptídeo **1** com rendimento bruto satisfatório (70%). A obtenção de **1** foi confirmada pela análise de Ressonância Magnética Nuclear de próton (RMN ^{1}H), a qual permitiu identificar a presença do grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído. Adicionalmente, análises posteriores por espectrometria de massas (ESI-MS) sugerem a obtenção do peptídeo **1**.

Palavras-chave: peptídeos; “Click Chemistry”; peptídeos modificados; grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído; peptideomiméticos.

LIMA, M. M. **Synthesis of modified peptide containing 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole group**. 2013. 136f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Peptides are biomolecules which present great structural and functional variety, acting in several biological processes. These molecules are widely used in therapeutics, and recently represent a very promising field for development of novel drugs, specially on synthetic vaccines. Scientific advances related to identification techniques, analysis and purification stimulate researches in attempt to produce peptides-based drugs, which can be extracted from natural sources or chemically synthesized (in liquid or solid phase), enzymatic process or both (semi-synthesis) and recombinant DNA technology. However, due to limitations concerning natural peptides, such as, proteolytic liability, toxicity and low bioavailability, becomes necessary the synthesis of modified peptides. Being biological function of a peptide defined by its structural conformation, adding a modification in a peptide structure must be able to maintain or stabilize it. The development of novel and efficient synthetic route of modified peptides is necessary to overcome the limitations related to proteolytic liability, toxicity and low bioavailability, to contribute with novel therapeutic strategies, mostly development of vaccines. So, adding a 1,2,3-triazole group can afford desirable chemical-physical properties in drug discovery. The objective was develop a method to synthesize peptides containing 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole group, such as peptide **1**, which is constituted by sixteen threonine residues and one 1,4 disubstituted 1,2,3-triazole group (NH_2-$(Thr)_7$-Thr-(1,4-disubstituted 1,2,3-triazole cycle)-Thr-$(Thr)_7$-OH). Moreover, due to the similarity with *T. cruzi* mucins that present great composition of threonine, **1** can be employed in development of vaccines related to infectious processes caused by *T. cruzi*. The preparation of **1** envolved an association between the solid-phase synthesis of peptide and reactions of copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC). Initially, the method was standardized from synthesis of threonine dipeptide (**8**), whose peptide bond was replaced by 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole group (*N*HFmoc-Thr-(1,4-disubstituted 1,2,3-triazole cycle)-Thr-OH). The strategy via CuAAC gave the modified dipeptide in good yield (98%) and allowed to establish the conditions to prepare the more complex peptide with long chain **1**. The CuAAC reaction gave the peptide **1** with good yield (70%). Compound **1** was confirmed by NMR proton analysis which showed the presence of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole group. Additionally, further analysis of mass spectrometry (ESI-MS) suggest the achievement of peptide **1**.

Keywords: peptides; “Click Chemistry”; modified peptides; 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole group; peptidomimetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Os vinte aminoácidos comumente encontrados em proteínas, ocorrendo sob a forma de L-aminoácidos nos organismos vivos..... 2

Figura 2: Aminoácidos incomuns. 5-hidroxilisina e 4-hidroxiprolina são alguns dos aminoácidos incomuns encontrados em proteínas, enquanto ornitina e citrulina, que não constituem proteínas, são intermediários na biossíntese de arginina e no ciclo da uréia..... 3

Figura 3: Reconhecimento molecular. As glicoproteínas presentes na membrana plasmática interagem com diversas biomoléculas como, por exemplo, anticorpos e hormônios. Adicionalmente, medeiam interações célula-célula e patógeno-célula do hospedeiro..... 5

Figura 4: Antígenos carboidratos associados à tumor..... 13

Figura 5: *Clusters* de Tn conjugados a KLH como vacina contra câncer prostático..... 14

Figura 6: Representação da estrutura de MUC1..... 14

Figura 7: Comparação entre mucinas em células normais e em células tumorais..... 15

Figura 8: Representação de mucina de *T. cruzi* (TcMUC), contendo unidades multigalactosiladas ligadas à unidade repetitiva $Thr_8LysPro_2$..... 16

Figura 9: Modelo estrutural de moléculas de mucina de *T. cruzi* sialiladas. O processo de sialilação confere proteção parasitária e permite a adesão e invasão celular..... 17

Figura 10: Relação isostérica entre grupos 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído e amida..... 25

Figura 11: Peptídeo Smac AVPI e seus derivados miméticos contendo grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído..... 26

Figura 12: Vacinas antitumorais baseadas em glicopeptídeos cujas moléculas de açúcar encontram-se ligadas ao peptídeo por meio de grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído..... 27

Figura 13: (**A**) Sequência de resíduos de aminoácidos da cistatina A humana. (**B**) Análogo mimético de cistatina A contendo grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído na cadeia principal..... 27

Figura 14: Estrutura geral idealizada inicialmente para o bloco de construção azido..... 36

Figura 15: Análises espectroscópicas referentes ao sólido obtido após filtração da reação em sílica. (**A**) RMN ^{1}H, (**B**) RMN ^{13}C, (C) Espectroscopia de infravermelho..... 40

Figura 16: Análise comparativa entre **7** e L-treonina a partir dos dados de RMN ^{1}H e ^{13}C. (**A**) RMN ^{1}H de **7**, (**B**) RMN ^{1}H de L-treonina, (**C**) RMN ^{13}C do composto **7**, (**D**) RMN ^{13}C de L-treonina..... 41

Figura 17: Análise RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) de **9** evidenciando os sinais característicos do produto **9**, tripleto (*t*) referente ao hidrogênio acetilênico em 2.20 ppm e simpleto referente à –NH da ligação amida em 6.78 ppm..... 44

Figura 18: Resina Wang-FmocThr(*t*Bu)..... 49

Figura 19: Visualização progressiva da resina Wang, a partir de uma unidade macroscópica, representada por uma esfera, até a estrutura química do polímero..... 49

Figura 20: Resinas derivadas de polivinilbenzeno/poliestireno mais comumente empregadas..... 50

Figura 21: Frasco utilizado para síntese em fase sólida..... 51

Figura 22: Procedimento realizado para as reações de acoplamento empregando frasco cilíndrico..... 52

Figura 23: (**A**) cromatograma do sólido bruto obtido após clivagem do peptídeo **4** da resina, (**B**) cromatograma de **4** após purificação, (**C**) cromatograma do sólido bruto obtido após clivagem do peptídeo **6** da resina fornecendo **6A**, (**D**) cromatograma de **6A** após purificação..... 57

Figura 24: Espectro de RMN ^{1}H de **4**. Acima, empregando DMSO-d_6 e abaixo DMSO-d_6 com uma gota de água deuterada..... 58

Figura 25: (**A**) Cromatograma da mistura bruta da reação (t=24h) e (**B**) Cromatograma do peptídeo **2**, tempo de retenção de 25,2 min. Análise empregando-se coluna analítica de fase reversa C18 CLC-ODS (M) (150

mm x 4.6 mm), fluxo de 1 mL/min e gradiente 5-50% CH_3CN: 0,1% aq. TFA. Todas as análises foram conduzidas à temperatura ambiente..... 59

Figura 26: Espectro de RMN ^1H (D_2O, 500 MHz) do peptídeo **1** bruto indicando os sinais característicos da molécula e impurezas como solvente DMF em 7.82, 2.87, 2.71 e 2.57 ppm..... 64

Figura 27: Espectro de ESI-MS, modo positivo, para o peptídeo bruto **1**..... 65

Figura 28: Sugestão de formação de dímero do peptídeo **1** com um íon Na^+ durante análise por ESI-MS..... 66

Figura 29: Espectro de ESI-MS, modo negativo, para o peptídeo bruto **1**..... 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diversidade funcional e química dos peptídeos..... 4

Tabela 2: Alguns dos fármacos baseados em peptídeos em uso clínico atualmente..... 8

Tabela 3: Tipos de MUC para mucinas humanas..... 15

Tabela 4: Remoção de grupo Fmoc de **12** realizada sob diferentes condições..... 37

Tabela 5: Dados ESI-MS referentes aos peptídeos **4** e **6**..... 57

Tabela 6: Acompanhamento da reação de acoplamento entre **6** e **7** por meio do teste de *kaiser*..... 61

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Formação de peptídeos a partir de aminoácidos..... 2

Esquema 2: O princípio da síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS)..... 20

Esquema 3: Síntese de peptídeos em fase sólida – Metodologia de Merrifield.. 22

Esquema 4: Síntese de peptídeos em fase sólida – Emprego de Fmoc..... 23

Esquema 5: Reação de Ciclo-adição azido-alcino 1,3 dipolar. Reação entre grupos azido (N_3) e alcino terminal ligados ao Peptídeo(1) e Peptídeo(2), respectivamente, na presença do catalisador Cu(I), formando a cadeia peptídica com o grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído..... 25

Esquema 6: Preparação de peptideomiméticos de Smac AVPI..... 27

Esquema 7: Preparação do análogo mimético de cistatina A..... 28

Esquema 8: Retrossíntese do peptídeo **1**..... 32

Esquema 9: Retrossíntese do peptídeo **2**..... 33

Esquema 10: Retrossíntese do peptídeo **3**..... 33

Esquema 11: Modelo dipeptídeo para padronização do método de obtenção do peptídeo **1**..... 34

Esquema 12: Retrossíntese do dipeptídeo **8**..... 35

Esquema 13: Rota sintética para gerar **10**..... 36

Esquema 14: Descrição da literatura para preparar **7** a partir de ácido 2-amino-3-O-*t*Bu-butanóico..... 38

Esquema 15: Preparação do bloco de construção **7**..... 38

Esquema 16: Mecanismo da reação de diazo-transferência , para a formação de **7**, proposto por Nyffeler e cols. (2002)..... 39

Esquema 17: Representação da síntese de **9**..……..... 42

Esquema 18: Mecanismo de reação para formação de **9** na presença de DCC e HOBt..... 43

Esquema 19: Síntese do modelo dipeptídeo de treonina contendo grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído (**8**)..... 44

Esquema 20: Mecanismo reacional proposto para a reação de cicloadição 1,3 dipolar formando 1,2,3-triazóis 1,4-dissubstituídos..... 45

Esquema 21: Síntese em fase sólida dos compostos **4** e **6**..... 51

Esquema 22: Mecanismo da reação de acoplamento envolvendo os reagentes PyBOP, HOBt e DIPEA..... 52

Esquema 23: Mecanismo da reação entre ninidrina e grupo amino livre gerando o composto conhecido como púrpura de Ruhemann o qual apresenta coloração púrpura ou azul, dependendo da intensidade do produto de condensação..... 53

Esquema 24: Mecanismo da reação de clivagem de grupo *N*-Fmoc por morfolina, levando à formação de dibenzofulveno-morfolina..... 54

Esquema 25: Clivagem do peptídeo **4** da resina..... 55

Esquema 26: Clivagem do peptídeo **6** da resina fornecendo o análogo **6A**..... 55

Esquema 27: Preparação do peptídeo contendo grupo acetilênico terminal na região C-terminal, intermediário **2**..... 59

Esquema 28: Estratégia inicial para preparação de **3**..... 60

Esquema 29: Reação de acoplamento entre **6** e **7** para formar o peptídeo **3**, contendo a função azido na sua posição *N*-terminal..... 61

Esquema 30: Clivagem do peptídeo **3** da resina..... 62

Esquema 31: Preparação do peptídeo modificado **1** a partir da reação de CuAAC entre os peptídeo **2** e **3**..... 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS: síndrome da imunodeficiência humana

AMPs: peptídeos antimicrobianos

BSA: albumina sérica bovina

Boc: *t*-butiloxicarbonila

$CDCl_3$: clorofórmio deuterado

CH_3CN: acetonitrila

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CuAAC: ciclo-adição azido-alcino 1,3 dipolar catalisada por cobre (I) (*Copper(I)-catalyzed azide alkyne cycloaddition*)

DCC: diciclo-hexilcarbodiimida

DCM: diclorometano

DCU: diciclo-hexiluréia

DIPEA: *N*,*N*-diisopropiletilamina

cDNA: DNA complementar

DMF: *N,N*-dimetilformamida

DMSO-d_6: dimetilsulfóxido deuterado

D_2O: água deuterada

DNA: ácido desoxirribonucléico

ESI-MS: ionização por Electrospray

FDA: Agência norte-americana reguladora de fármacos e alimentos (*Food and Drug Administration*)

Fmoc: 9-fluorenil-metiloxicarbonila

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

HOBt: 1-hidróxi-benzotriazol

KLH: hemocianina do carangueijo (*keyhole limpet hemocyanin)*

MeOH: metanol

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

MUC1: mucina tipo I

GalNAc: *N*-acetil-galactosamina

GlcNAc: α-*N*-acetil-glicosamina

Pfp: pentafluorfenol

PyBOP: hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tripirrolidinofosfônio

RMN: ressonância magnética nuclear

RNA: ácido ribonucléico

SPFS: síntese de peptídeos em fase sólida

T $CD4^+$: linfócitos auxiliares

T $CD8^+$: linfócitos citolíticos

TcMuc: mucinas parasitárias de *T. cruzi*

TFA: ácido trifluoracético

Thr: treonina

TNF: Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de figuras iii
Lista de tabelas vi
Lista de esquemas vii
Lista de abreviaturas e siglas ix

1. INTRODUÇÃO 1

1.1 Peptídeos 1
1.2 Desenvolvimento de vacinas sintéticas 9
1.3 Síntese de peptídeos 18
1.3.1 Síntese de peptídeos em fase sólida 19
1.4 Síntese de peptídeos modificados a partir da estratégia "Click Chemistry" 24

2. OBJETIVO 30

3. COMPOSTOS SINTETIZADOS 31

4. PLANEJAMENTO SINTÉTICO 32

4.1 Preparação do peptídeo 1 32
4.1.1 Preparação de derivado alcino 2 32
4.1.2 Preparação de derivado azido 3 33

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 34

5.1 Preparação do modelo dipeptídeo 8 35

5.1.1 Síntese do bloco de construção contendo grupo azido: ácido 2-azido-3-hidróxibutanóico 36

5.1.2 Síntese do bloco de construção contendo grupo alcino: 2-(*N*-9-fluorenilmetoxicarbonil)-amino-3-hidróxibutan-(propin-2'-il)amida (9) 41

5.1.3 Síntese do dipeptídeo 8 a partir da reação de ciclo-adição azido-alcino 1,3-dipolar catalisada por cobre (I) entre 7 e 9 44

5.2 Síntese do peptídeo 1 47

5.2.1 Síntese dos peptídeos N*H*-Fmoc-(Thr)$_8$-OH (4) e N*H*$_2$-(Thr)$_6$-Thr(tBu)-Resina Wang (6) 48

5.2.2 Síntese do peptídeo 2 58

5.2.3 Síntese do peptídeo N$_3$-(Thr)$_7$-Thr(tBu)-Resina Wang (3) 60

5.2.4 Síntese do peptídeo 1 a partir da reação CuAAC entre 2 e 3 62

6. MATERIAIS E MÉTODOS 68

6.1 Materiais..... 68

6.2 Métodos..... 69

7. CONCLUSÕES 80

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 82

ANEXOS 90

1. INTRODUÇÃO

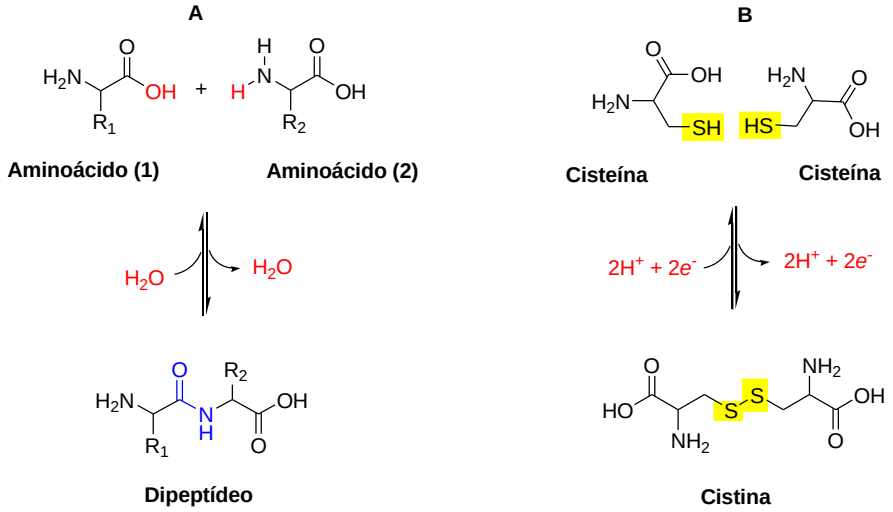
Peptídeos são biomoléculas relevantes em distintos processos biológicos, cuja variedade estrutural e funcional proporciona ampla aplicabilidade em diferentes campos de pesquisa. A seguir serão abordadas as características básicas desta classe de moléculas, bem como sua relevância biológica e aplicações terapêuticas. Adicionalmente, maior ênfase será destinada à aplicação de peptídeos e seus glicoconjugados no desenvolvimento de vacinas, um recente e promissor campo investigativo. Por fim, serão discutidos métodos de obtenção destas biomoléculas, com especial enfoque para a síntese de peptídeos em fase sólida e a síntese de peptídeos modificados a partir da estratégia "Click Chemistry".

1.1 Peptídeos

O maior conhecimento sobre a estrutura química de peptídeos a partir da década de 50 permitiu a descoberta de novas biomoléculas, muitas delas ativas, as quais tiveram suas estruturas químicas determinadas como, por exemplo, os hormônios insulina, glucagon, ocitocina e vasopressina, dentre outros. Estas biomoléculas são constituídas por resíduos de aminoácidos unidos por um tipo específico de ligação covalente denominada ligação peptídica, a qual é formada a partir da reação de condensação entre os grupos α–carboxílico e α–amino de diferentes aminoácidos. Os aminoácidos constituintes de peptídeos são denominados resíduos de aminoácidos, uma vez que perderam um hidrogênio do grupo α–amino e uma hidroxila do grupo α–carboxílico (Esquema **1**). Em um peptídeo, o resíduo de aminoácido na extremidade com um grupo α-amino livre é denominado resíduo aminoterminal (*N*-terminal), enquanto o resíduo da extremidade contendo grupo carboxil livre é denominado resíduo carboxiterminal (*C*-terminal). Adicionalmente, peptídeos podem ser formados a partir de pontes de enxofre ou ligações dissulfeto entre aminoácidos cisteína, originando uma ligação S-S e formando o dipeptídeo cistina (Esquema **1**) (NELSON; COX, 2008).

Oligopeptídeos são formados desta forma a partir de poucos aminoácidos, enquanto o termo polipeptídeo é designado para estruturas formadas pela união de diversos aminoácidos. Por vezes os termos polipeptídeos e proteínas são utilizados como sinônimos, entretanto, polipeptídeos possuem massa molecular abaixo de 10.000, enquanto proteínas possuem massa molecular maior (NELSON; COX, 2008).

A existência de vinte tipos diferentes de aminoácidos, conforme observado na Figura **1**, e a possibilidade de inúmeros rearranjos entre estes, conforme Esquema **1**, demonstra a extensa variedade estrutural dos peptídeos, que por sua vez, reflete em uma ampla diversidade funcional.



Esquema 1 – Formação de peptídeos a partir de aminoácidos. Em (**A**) reação de condensação entre os grupos α–carboxílico e α–amino de diferentes aminoácidos gerando uma ligação peptídica (representada em azul) e liberando uma molécula de água; Em (**B**) formação do dipeptídeo cistina por meio de uma ligação dissulfeto entre dois aminoácidos cisteína. Os grupos R_1 e R_2 correspondem à cadeia lateral de cada tipo de aminoácido.

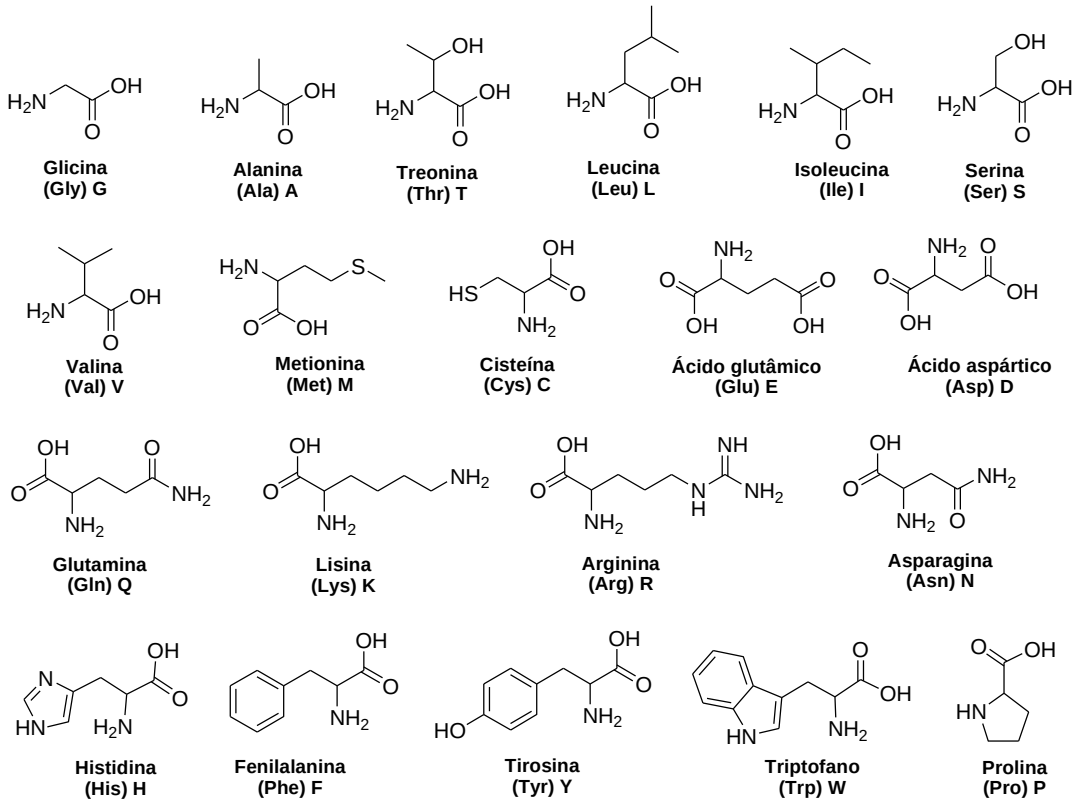
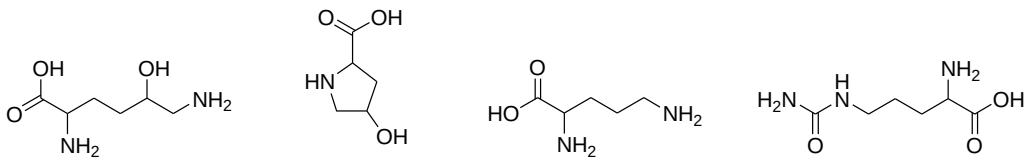


Figura 1. Os vinte aminoácidos comumente encontrados em proteínas, ocorrendo sob a forma de L-aminoácidos nos organismos vivos.

Adicionalmente, existem cerca de 300 outros aminoácidos menos comuns que desempenham diversas funções nas células, mas nem todos são constituintes de peptídeos (Figura **2**) (NELSON; COX, 2008).



5-hidroxilisina **4-hidroxiprolina** **Ornitina** **Citrulina**

Figura 2. Aminoácidos incomuns. 5-hidroxilisina e 4-hidroxiprolina são alguns dos aminoácidos incomuns encontrados em proteínas, enquanto ornitina e citrulina, que não constituem proteínas, são intermediários na biossíntese de arginina e no ciclo da uréia.

Os peptídeos de ocorrência natural variam em tamanho entre dois a várias dezenas de resíduos de aminoácidos como, por exemplo, o neurotransmissor encefalina (cinco resíduos), o antibiótico gomesina (dezoito resíduos) e o hormônio calcitonina (trinta e dois resíduos), o que caracteriza a extensa variedade funcional desta classe, a qual atua em processos biológicos relevantes (Tabela **1**).

Muitas cadeias polipeptídicas, sob a forma de proteínas, contêm apenas resíduos de aminoácidos, porém algumas contem estruturas mais complexas denominadas de proteínas conjugadas. A região que não contém aminoácido é denominada grupo prostético o qual pode ser um carboidrato (glicoproteína), lipídio (lipoproteína), grupo fosfato (fosfoproteína), grupo heme (hemeproteína), nucleotídeo de flavina (flavoproteína) ou um metal (metaloproteína) (NELSON; COX, 2008). Geralmente o grupo prostético tem importante função na atividade biológica como demonstrado por Campo et al. (2007) e Doores, Gamblin e Davis (2006).

Diversos polipeptídeos sob a forma de glicoproteínas são expressos na superfície celular e estão envolvidos na maioria dos processos fisiológicos e patológicos, principalmente nos processos de reconhecimento biológico, incluindo adesão celular, diferenciação e crescimento, transdução de sinal, resposta imune, infecção por protozoários, bactérias e vírus, transporte intracelular e intercelular de produtos genéticos e controle da permeabilidade da membrana celular (Figura **3**) (CAMPO et al., 2007; 2010; DAVIS, 2002; DOORES; GAMBLIN; DAVIS, 2006).

Tabela 1 – Diversidade funcional e química dos peptídeos.

Nome	Sequência	Função
Encefalinas	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met e Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu.	Indução de analgesia em células do cérebro (HUGHES et al., 1975)
Angiotensina II	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe	Hormônio hipertensor (ARAKAMA et al., 1967)
Somatostatina	ciclo(3-14) Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys	Hormônio inibidor da secreção dos hormônios pancreáticos, do crescimento e estimulante da tireóide (BRAZEAU et al., 1973)
α -Conotoxina	ciclo(2-8,3-14) Gly-Cys-Cys-Ser-Asp-Pro-Arg-Cys-Ala-Trp-Arg-Cys-NH_2	Peptídeo neurotóxico, bloqueador do receptor nicotínico de acetilcolina no sistema nervoso central (ADAMS; BERECKI, 2013)
Fragmento 22-52 da adrenomedulina humana	Thr-Val-Gln-Lys-Leu-Ala-His-Gln-Ile-Tyr-Gln-Phe-Thr-Asp-Lys-Asp-lys-Asp-Asn-Val-Ala-Pro-Arg-ser-Lys-Ile-Ser-Pro-Gln-Gly-Tyr-NH_2	Antagonista do peptídeo hipotensor adrenomedulina (KITAMURA et al., 1993)
Gomesina	ciclo(2-15,6-11) p-Glu-Cys-Arg-Arg-Leu-Cys-Tyr-Lys-Gln-Arg-Cys-Val-Thr-Tyr-Cys-Arg-Gly-Arg-NH_2	Peptídeo antibiótico de amplo espectro de ação (SILVA; DAFFRE; BULET, 2000)
Grelina	NH_2-Gly- Ser-Ser(octanoíla)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Ly-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg	Hormônio gastrointestinal estimulador da liberação do hormônio do crescimento e relacionado ao controle da ingestão de alimentos (BEDNAREK et al., 2000)
Calcitonina	Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH_2	Diminui a reabsorção de cálcio e fósforo inorgânico nos túbulos renais, e inibe a desmineralização óssea (BRAIN; CAMBRIDGE, 1996)
Catestatina	Ser-Ser-Met-Lys-Leu-Ser-Phe-Arg-Ala-Arg-Ala-Tyr-Gly-Phe-Arg-Gly-Pro-Gly-Pro-Gln-Leu	Antagonista colinérgico nicotínico. Antagoniza a secreção de catecolaminas e induz vasodilatação e inotropismo miocárdico negativo (PENNA et al., 2012)

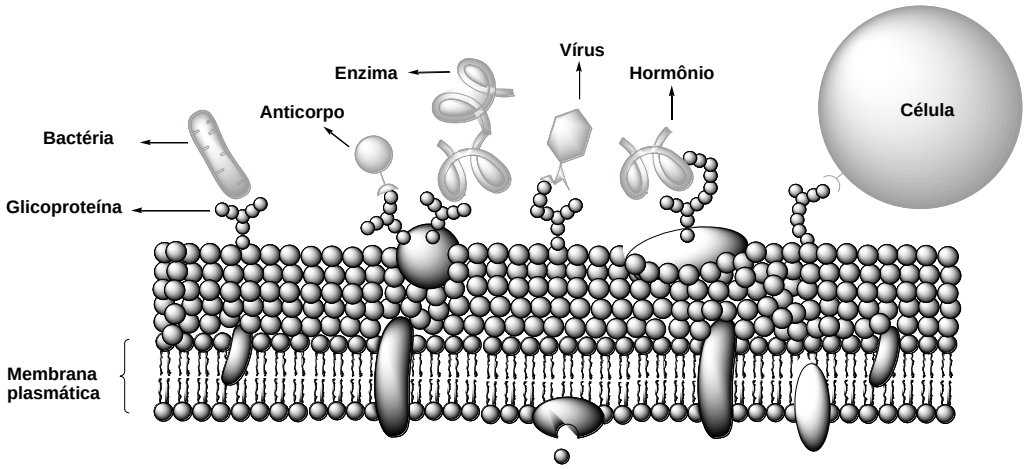


Figura 3 – Reconhecimento molecular. As glicoproteínas presentes na membrana plasmática interagem com diversas biomoléculas como, por exemplo, anticorpos e hormônios. Adicionalmente, medeiam interações célula-célula e patógeno-célula do hospedeiro.

A maioria dos conjugados glicoprotéicos apresenta os carboidratos ligados à cadeia protéica por meio de ligações *N*-glicosídicas com resíduos de asparagina ou *O*-glicosídicas com resíduos de treonina ou serina. Adicionalmente, e bem menos comum, pode haver ligações *O*-glicosídicas com aminoácidos tirosina e hidroxilisina e ligações *C*-glicosídicas com resíduos de triptofano (DOORES; GAMBLIN; DAVIS, 2006). O processo de glicosilação de proteínas possui relevante importância, uma vez que como mencionado anteriormente, carboidratos presentes nas glicoproteínas são essenciais para a bioatividade destes conjugados (CAMPO et al., 2007; DOORES; GAMBLIN; DAVIS, 2006; WONG, 2003). De fato, determinadas doenças estão relacionadas com anormalidades no processo de glicosilação. O acúmulo de produtos finais de glicosilação avançados (AGEs - do inglês: Advanced glycation end products) em diabéticos e o subsequente nível elevado de glicose disponível para várias proteínas, são o elo de ligação entre a hiperglicemia característica desta doença metabólica e as complicações que surgem ao longo do tempo, como a retinopatia e a insuficiência renal crônica (VLASSARA; PALACE, 2003).

Ainda, cadeias peptídicas sob a forma de lipoproteínas desempenham importante função no transporte de lipídeos apolares no plasma sanguíneo devido à natureza hidrofílica do grupo proteico (MORRISETT et al., 1987). Adicionalmente, a fosforilação de proteínas, a qual gera fosfoproteínas, é responsável pela regulação de processos celulares diversos, tais como sinalização, diferenciação, sobrevivência, metabolismo, regulação e proliferação. Estes processos podem aumentar ou reduzir a atividade biológica e alterar a localização da proteína e as interações proteína-proteína. Devido à importância da fosforilação de proteínas e ao fato de que muitas proteínas podem ser fosforiladas, disfunções relacionadas a estes processos por

vezes estão implicadas em doenças como câncer, diabetes tipo II, fibrose cística e Alzheimer (CASS; TEPE, 2011).

Em consequência desta variedade funcional, peptídeos tem sido investigados como potenciais fármacos e alvos terapêuticos intensificando a sua busca e a de seus derivados miméticos (ALBA et al., 2012; ALDRICH; MCLAUGHLIN, 2012; CRAIK et al., 2013; EICHLER, 2008; LEE et al., 2011; LI et al., 2012; 2012a; LIANG, YANG, 2005; REICHERT, 2010; SCHMIDTKO et al., 2010). De fato, diversos peptídeos naturais endógenos são empregados na terapêutica, tais como, ocitocina para indução do trabalho de parto e lactação, insulina para tratamento de diabetes, calcitonina para tratamento de hipercalcemia e osteoporose, e ciclosporina para imunossupressão.

O aumento do número de casos de resistência microbiana à terapêutica antibiótica convencional tem estimulado o interesse na aplicação farmacológica de peptídeos antimicrobianos (AMPs) naturais. Geralmente, AMPs são pequenos peptídeos (cerca de 30 a 60 resíduos de aminoácidos) termoestáveis (100 °C, 15 minutos), os quais se encontram carregados positivamente em meio fisiológico. Adicionalmente, podem ser sintetizados ou isolados de diversos organismos vivos, desde procariotos a humanos. Estes peptídeos possuem amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, parasitas, vírus e células tumorais por meio de um mecanismo notavelmente distinto dos demais antimicrobianos, tornando vantajoso o uso de AMPs na terapêutica (LI et al., 2012).

Leite et al (2005) isolaram alguns peptídeos AMPs, denominados de Filoseptinas, a partir da pele dos sapos brasileiros *Phyllomedusa hypochondrialis* e *Phyllomedusa oreades*. O peptídeo NH_2-Asn-His-Lys-Ala-Ile-Ala-Ser-Val-Ala-Asn-Ile-Ala-His-Pro-Ile-Leu-Ser-Leu-Phe, denominado de PS-1 e isolado do sapo *Phyllomedusa hypochondrialis*, apresentou potente atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (concentração inibitória mínima variando entre 3-7,9 $\mu mol.L^{-1}$). Adicionalmente, os peptídeos PS-4 (NH_2-Gly-Ser-His-His-Val-Leu-Thr-Ser-Val-Ala-Asn-Ile-Ala-His-Pro-Ile-Leu-Ser-Leu-Phe) e PS-5 (NH_2-Ser-His-Lys-Ala-Ile-Ala-Ser-Val-Ala-Asn-Ile-Ala-His-Pro-Ile-Leu-Ser-Leu-Phe), isolados do sapo *Phyllomedusa oreades* demonstraram atividade antiparasitária para *Trypanossoma cruzi* bastante interessante (IC_{50} em torno de 5 $\mu mol.L^{-1}$) (LEITE et al., 2005).

Na terapêutica para dor crônica, interessante aplicação farmacológica encontra-se na analgesia proporcionada por alguns peptídeos denominados conotoxinas. Conotoxina envolve um grupo de peptídeos neurotóxicos isolados a partir do veneno do caracol marinho da espécie *Conus*. Estes peptídeos são constituídos por cerca de 10 a 30 resíduos de aminoácidos, tipicamente com uma ou mais ligações dissulfeto. Certas conotoxinas produzidas por algumas

espécies de *Conus* demonstraram atividade 1000 vezes superior à morfina (SCHMIDTKO et al., 2010).

Ziconotida (Prialt®) é um exemplo atual de conotoxina utilizada como analgésico intratecal desde 2004, quando seu uso foi liberado pelo FDA (*Food and Drug Administration*). Este fármaco corresponde ao análogo sintético de uma substância natural denominada ômega-conopeptídeo MV11A, o qual é encontrado no veneno da espécie *Conus magus*, um molusco gastrópode marinho. Outros fármacos encontram-se em estudos clínicos e pré-clínicos tais como, compostos de toxinas que podem ser usados no tratamento da doença de Alzheimer, Parkinson e epilepsia (SCHMIDTKO et al., 2010).

Como pode ser observado no Gráfico **1**, embora peptídeos tenham sido investigados há décadas como fármacos, o índice daqueles empregados na clínica era bem menor antes da década de 80 (Gráfico **1**) (REICHERT, 2010). Atualmente, vários peptídeos bioativos são empregados como fármacos antimicrobianos, antiinflamatórios, antitumorais, imunomoduladores e sinalizadores neuronais (Tabela **2**) (CRAIK et al., 2013; REICHERT, 2010).

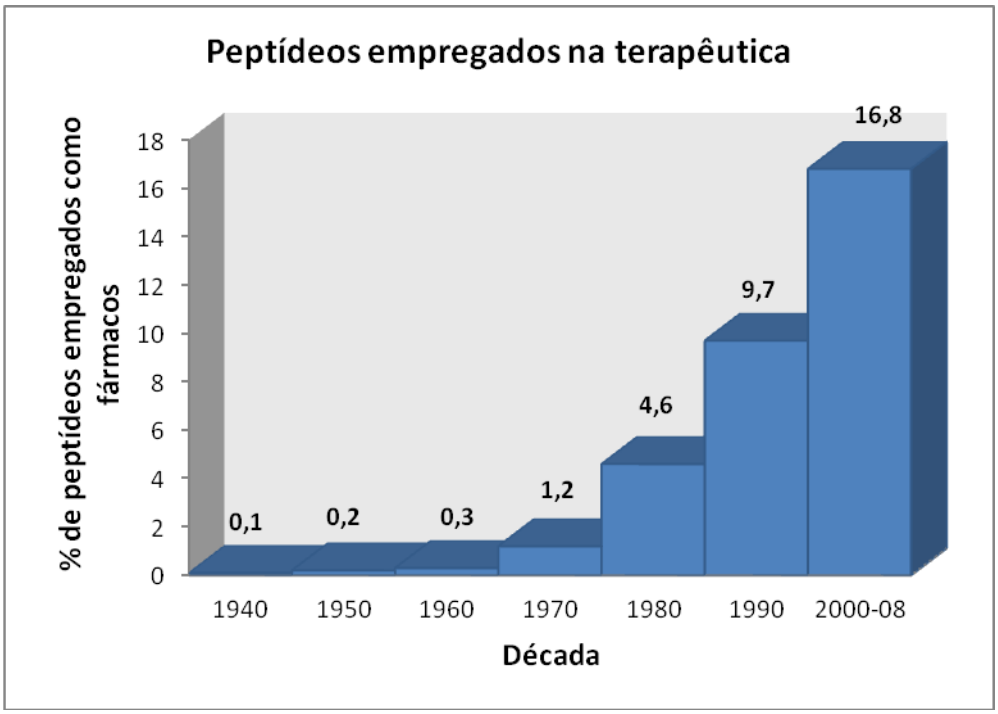


Gráfico 1. Peptídeos em uso clínico nas últimas décadas (REICHERT, 2010).

Tabela 2 – Alguns dos fármacos baseados em peptídeos em uso clínico atualmente.

Nome	Ação farmacológica	Emprego terapêutico	Via de adm.
Adalimumab (Humira®)	Anticorpo monoclonal inibidor do fator de necrose tumoral (TNF)	Doenças auto-imunes	Subcutânea
Infliximabe (Remicade®)	Anticorpo monoclonal inibidor de TNFα	Doenças auto-imunes	Intravenosa
Rituximab (Rituxan®)	Anticorpo citolítico para proteína CD20	Linfoma não Hodgkin´s, granulomatose de Wegener (WG), poliangeíte microscópica (MPA) e leucemia linfocítica crônica de células B.	Intravenosa
Bevacizumabe (Avastin®)	Anticorpo monoclonal que neutraliza a atividade biológica do fator de crescimento do endotélio vascular humano (VEGF)	Antineoplásico	Intravenosa
Trastuzumabe (Herceptin®)	Anticorpo monoclonal que atinge o domínio extracelular da proteína do receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2)	Câncer de mama metastático	Intravenosa
Insulina (Lantus®)	Equipotente à insulina humana	Diabetes I e II	Subcutânea
Pegfilgrastim (Neulasta®)	Estimulador de glóbulos brancos	Mielossupressão	Subcutânea
Epoetina alfa (Epogen®)	Glicoproteína estimuladora de eritropoiese	Anemia	Intravenosa, Subcutânea
Interferon beta-1a (Avonex®)	Indutor de proteínas específicas, as quais ainda não foram claramente definidas	Esclerose múltipla	Intramuscu-lar
Acetato de glatirâmer (Copaxone®)	Alteração de funções imunológicas por mecanismos ainda não esclarecidos	Esclerose múltipla	Subcutânea
Goserelina (Zoladex®)	Supressão do sistema pituitário-gonadal	Câncer de mama e próstata, endometriose	Subcutânea
Acetato de Octreotida (Sandostatin®)	Derivado sintético da somatostatina, inibe a liberação do hormônio de crescimento, do glucagon e da insulina	Acromegalia e câncer	Intramuscu-lar
Enfuvirtida (Fuzeon®)	Inibidor do rearranjo estrutural da gp41 do vírus HIV, bloqueando a entrada do vírus na célula	Infecção por HIV	Subcutânea
Ziconotida (Prialt®)	Bloqueador dos canais de cálcio de tipo N (NCCB), os quais regulam a liberação de neurotransmissores em populações neuronais específicas responsáveis pelo processamento espinhal da dor	Dor crônica e intensa	Intratecal

Fonte: (CRAIK et al., 2013)

O emprego de peptídeos na terapêutica oferece muitas vantagens, uma vez que estes possuem propriedades desejáveis, tais como, potente bioatividade, alta especificidade e afinidade de ligação com o receptor e toxicidade relativamente baixa. Entretanto, o emprego desta classe na terapêutica é limitado devido a algumas desvantagens, a saber: (i) baixa estabilidade sistêmica, (ii) rápida metabolização em função da suscetibilidade proteolítica resultando em baixa biodisponibilidade, (iii) baixa permeabilidade através de membranas celulares, limitando as vias de administração, (iv) alto custo de produção. Geralmente, esta nova classe de fármacos não está disponível por via oral, necessitando de administração por injeção ou via intranasal. Entretanto, surpreendentemente, anticorpos têm persistido *in vivo* por semanas após uma única administração, tornando-os um dos alvos mais estudados (CRAIK et al., 2013). Adicionalmente, este fato tem estimulado o interesse na síntese de glicopeptídeos devido ao emprego bastante promissor no desenvolvimento de vacinas para o controle de alergias, doenças infecciosas e crescimento de determinados tumores (PURCELL et al., 2003; SIRSKYJ et al., 2011; SLOVIN; KEDING; RAGUPATHI, 2005).

1.2 Desenvolvimento de vacinas sintéticas

O emprego de vacinas na saúde pública representa uma das melhores estratégias para erradicação e controle de doenças infecciosas, reduzindo a morbidade e mortalidade, como é o caso da varíola, erradicada há mais de duas décadas. A maioria das vacinas disponíveis até o momento é de aplicação profilática, existindo a necessidade de pesquisas direcionadas para impedir o desenvolvimento de processos infecciosos crônicos, tais como tripanossomíases e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). De maneira geral, complicações destas doenças surgem devido à inadequada ou insuficiente resposta imunológica para a eliminação de patógenos intracelulares ou pela indução de tolerância imunológica (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

Adicionalmente, a utilização de vacinas encontra importante aplicação quando (i) não existe tratamento disponível ou eficaz contra um patógeno ou doença, (ii) agentes antimicrobianos não erradicam o patógeno, selecionando cepas resistentes, (iii) os agentes antimicrobianos são tóxicos para uso por longos períodos, (iv) a baixa carga de patógenos, em portadores crônicos, é precedida por um conjunto de sintomas que reflete na proliferação do patógeno, inflamação crônica ou transformação maligna de lesões induzidas pelo patógeno, e (iv) algum grau de resposta imune é demonstrado durante o curso natural da infecção (AUTRAN et al., 2004).

Mais comumente, vacinas consistem de microorganismos vivos atenuados ou microorganismos inativados, administrados via injeção. Porém, muitos microorganismos são difíceis de obter por cultura *in vitro*, tornando inviável a produção de vacinas para estes patógenos. Adicionalmente, muitos fatores relacionados aos microorganismos atenuados podem induzir resposta imune insuficiente ou indesejada. Alternativamente, a possibilidade da utilização de vacinas sintéticas em um futuro próximo é sustentada pelos recentes avanços no conhecimento a respeito dos mecanismos de resposta imunológica (PURCELL; MCCLUSKEY; ROSSJOHN, 2007).

Para melhor entendimento das ferramentas envolvidas no desenvolvimento de vacinas sintéticas, a seguir será abordado, sucintamente, o processo de imunidade adquirida, também denominada adaptativa, o qual se divide em dois tipos, a saber: imunidade celular e imunidade humoral. Na imunidade celular, linfócitos T citotóxicos (T $CD8^+$) eliminam células infectadas e tumorais por meio de uma ação citotóxica direta nestes alvos. Diferentemente, na resposta imune humoral, linfócitos B produzem anticorpos que reconhecem diretamente antígenos microbianos, neutralizando a infecciosidade destes e preparando-os para serem eliminados. Enquanto a imunidade celular está voltada contra microorganismos intracelulares, a imunidade humoral é o principal mecanismo de defesa contra microorganismos extracelulares e suas toxinas. Adicionalmente, ambos os tipos são dependentes de linfócitos T auxiliares (T $CD4^+$), os quais secretam proteínas chamadas de citocinas, cuja função é estimular a proliferação e diferenciação de células T, assim como a ativação de outras células, tais como, células B, macrófagos e outros leucócitos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; PURCELL; MCCLUSKEY; ROSSJOHN, 2007).

Os receptores de antígenos de linfócitos T $CD8^+$ e T $CD4^+$ só reconhecem antígenos que sejam apresentados por outras células, em contraste com linfócitos B e anticorpos, os quais reconhecem tanto antígenos solúveis quanto os associados a outras células. Linfócitos T $CD8^+$ identificam células infectadas ou malignas por meio de peptídeos antigênicos apresentados pelas moléculas de classe I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC classe I), enquanto moléculas de classe II (MHC classe II) apresentam peptídeos antigênicos aos linfócitos T $CD4^+$ (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; PURCELL; MCCLUSKEY; ROSSJOHN, 2007). Este processo de reconhecimento dependente de peptídeos resulta na propagação da resposta imune a qual controla a infecção e o tumor em humanos.

Diante deste contexto, a elucidação dos mecanismos envolvidos na resposta imune tem estimulado o desenho racional e a otimização de agentes para a preparação de vacinas sintéticas. Adicionalmente, estas podem ser desenvolvidas a partir da elucidação estrutural de

epitopos, bem como a partir do estudo das interações epitopos/anticorpos, epitopos/MHC classe I e epitopos/MHC classe II, considerando que (i) anticorpos são glicoproteínas circulantes produzidas pelos linfócitos B em resposta à exposição a estruturas estranhas conhecidas como antígenos e (ii) epitopos são regiões peptídicas destes antígenos que, uma vez reconhecidas especificamente por linfócitos e anticorpos, desencadeiam o processo de resposta imunológica (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; PURCELL; MCCLUSKEY; ROSSJOHN, 2007; ROBINSON, 2007*)*. Patarroyo et al. (1988) demonstraram pioneiramente a eficácia de vacinas sintéticas na indução de uma forte atividade estimuladora das células linfóides por meio de peptídeos, sendo-lhes atribuído o mérito pela criação da primeira vacina sintética (AMADOR et al., 1992; PATARROYO et al., 1988; VALERO et al., 1993).

Vacinologia designa a caracterização de epitopos para um determinado antígeno visando direcionar o desenvolvimento de candidatos efetivos a vacinas. Desta forma, uma vez estabelecido o antígeno, estruturas menores e sinteticamente acessíveis podem ser construídas para mimetizar apenas regiões epitópicas importantes, permitindo a focalização da reação imunológica (ROBINSON, 2007). Os imunógenos sintéticos são desenhados para estimular uma resposta imune apropriada, incluindo epitopos para células B e T relevantes e excluindo aquelas regiões da proteína que poderiam atuar estimulando a atividade de mecanismos supressores, alérgicos e/ou auto-imunes. Os potenciais candidatos a vacinas já preparados, geralmente, estão relacionados à (i) fragmentos derivados de epitopos de proteínas antigênicas específicas; (ii) peptídeos que induzem resposta imune *in vitro* e *in vivo* frente a carboidratos ou, ainda, (iii) peptídeos ramificados compostos de um esqueleto de lisinas ou de β-Ala-Lys, cujos grupos ε-amino se ligam a fragmentos de epitopos de proteínas antigênicas específicas (MACHADO et al., 2004).

A seleção de antígenos contra agentes infecciosos pode ser realizada por meio da pesquisa do soro de indivíduos previamente expostos ao patógeno, já que suas estruturas são estranhas ao organismo humano e, portanto imunogênicas (KEDING; ENDO; DANISHEFSKY, 2003; SLOVIN; KEDING; RAGUPATHI, 2005). Dentre estes antígenos, carboidratos e glicoconjugados são essenciais no desenvolvimento de vacinas antiparasitárias devido a vários fatores, tais como: i) possuem características estruturais distintas de glicanas de mamíferos; ii) grande parte destes glicoconjugados estão presentes nas superfícies parasitárias, tornando-os alvos altamente disponíveis para interações diretas com agentes efetores da imunidade; iii) uma única glicoproteína pode conter vários epítopos de glicanas, aumentando a multiplicidade de antígenos-alvo frente a anticorpos específicos; iv) finalmente, glicoconjugados complexos de agentes infecciosos podem ser preparados por métodos de

síntese químio-enzimática e a seguir conjugados a proteínas carreadoras (NYAME; KAWAR; CUMMINGS, 2004). Como exemplos, vacinas sintéticas contra *Haemophilus influenzae* B, representada por um polissacarídeo capsular sintético conjugado à proteína carreadora de toxina *diphtheria*, e contra *Plasmodium falciparum*, obtida a partir da síntese de âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), estão, respectivamente, em uso corrente e em testes clínicos avançados. No Quadro **1** está representada uma lista de alguns parasitas, cujas glicanas antigênicas são amplamente investigadas, uma vez que se encontram parcialmente caracterizadas (NYAME; KAWAR; CUMMINGS, 2004).

Quadro 1 – Exemplos de parasitas cujas glicanas antigênicas estão parcialmente caracterizadas.

Protozoários	**Helmínticos**
Entamoeba histolytica (amebíase humana) *Plasmodium falciparum* (malária humana) *P. berghe*i (malária em roedores) *P. cynomolgi* (malaria em macacos) *Leishmania donovani, L. major, L. mexicana* *Trypanosoma cruzi* (Doença de Chagas) *T. brucei gambiense* (doença do sono) *T. brucei rhodesiense* (doença do sono)	Trematodas *Schistosoma mansoni, S. haematobium, S. japonicum, Fasciola hepatica* Cestodas *Echinococcus granulosus, Taenia crassiceps* Nematodas *Haemonchus contortus, Onchocerca volvulus Trichinella spiralis, Dictyocaulus viviparus Ascaris suum, Setaria digitata, Litomosoides sigmodonti*

Fonte: (NYAME; KAWAR; CUMMINGS, 2004).

Adicionalmente, vacinas antitumorais têm sido desenvolvidas, embora, devido ao caráter próprio das células cancerígenas, imunoglobulinas naturais (anticorpos) contra antígenos tumorais não são geralmente encontradas em indivíduos com câncer. Dentre os antígenos tumorais já identificados, carboidratos são considerados os alvos mais apropriados e clinicamente relevantes para indução de imunidade ativa (KEDING; ENDO; DANISHEFSKY, 2003; NYAME; KAWAR; CUMMINGS, 2004; SLOVIN; KEDING; RAGUPATHI, 2005). Isoladamente, carboidratos antigênicos desencadeiam resposta imune através da ativação direta de linfócitos B, resultando na produção de anticorpos unicamente IgM (Imunoglobulina tipo M) com baixa afinidade, os quais ocorrem na fase aguda inicial da infecção e são característicos de resposta imunológica primária. Conforme discutido, linfócitos T (CD4+ e CD8+) reconhecem apenas antígenos peptídicos apresentados pelas moléculas MHC classe I e MHC classe II, então, para viabilizar sua aplicação como vacinas,

estes carboidratos antigênicos desprovidos de ação imunogênica (haptenos sacarídicos livres) são conjugados a proteínas ou peptídeos carreadores imunogênicos, como albumina sérica bovina (BSA) e hemocianina do caranguejo *Megathura crenulata* (KLH,"*keyhole limpet hemocyanin"*). Assim, o complexo hapteno-carreador pode atuar como imunógeno estimulando linfócitos T. Linfócitos citotóxicos e anticorpos direcionados contra antígenos tumorais sintéticos são capazes de reconhecer os correspondentes epitopos nativos em células malignas circulantes e metastáticas, promovendo a erradicação das mesmas e protegendo contra crescimento e recorrência tumoral, o que comprova o potencial de vacinas sintéticas de carboidratos para o combate ao câncer (BROCKE; KUNZ, 2002; KEDING; ENDO; DANISHEFSKY, 2003; MEINJOHANNS et al., 1997; NYAME; KAWAR; CUMMINGS, 2004; SLOVIN; KEDING; RAGUPATHI, 2005; VICHIER-GUERRE et al., 2004).

Muitos antígenos glicoprotéicos e glicolipídicos associados a tumor tais como aqueles contendo moléculas de Tn, sialil-Tn (STn) e TF além de ácido de Lewis (Le^y), têm sido adotados como alvos para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra o câncer, uma vez que sua ocorrência em tecidos normais é restrita (Figura **4**) (NYAME; KAWAR; CUMMINGS, 2004; VICHIER- GUERRE et al., 2004).

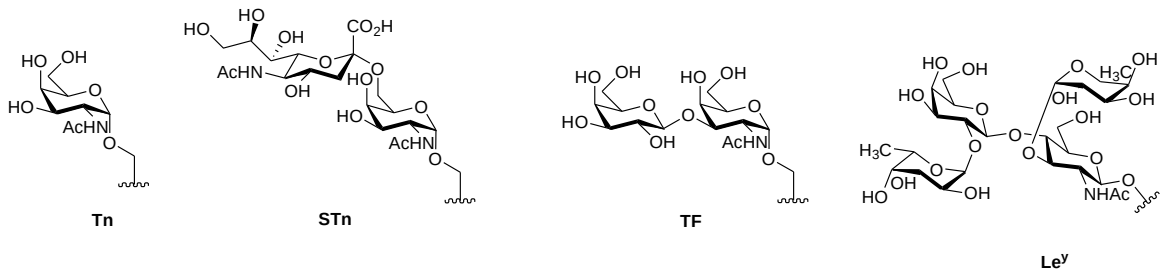


Figura 4. Antígenos carboidratos associados à tumor.

Elevado nível de expressão de tais antígenos na superfície de células cancerosas correlaciona-se com prognóstico alarmante; assim, a vacinação baseada em epitopos sintéticos associados a tumor explora exatamente esta característica para dirigir o sistema imune a fim de gerar uma reação tumor-seletiva (HOLEMANN; SEEBERGER, 2004). Como exemplo, vacinas sintéticas conjugadas contendo o antígeno Tn têm obtido sucesso em testes clínicos, entre os quais se destaca um ensaio de fase I em que pacientes com câncer prostático reincidente foram imunizados com *clusters* de Tn conjugados a KLH (Figura **5**) (SLOVIN; KEDING; RAGUPATHI, 2005).

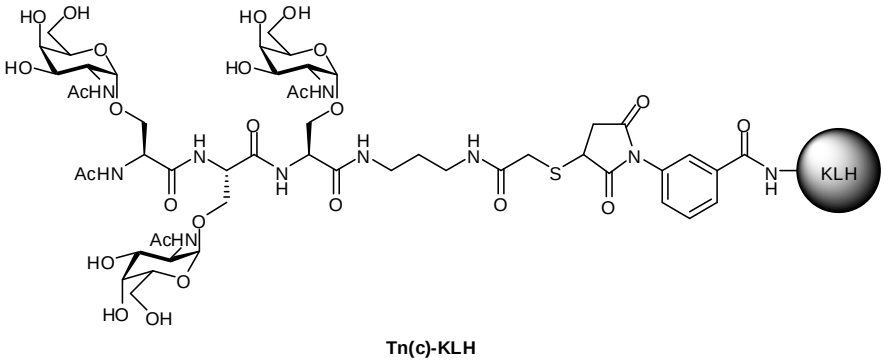


Figura 5. *Clusters* de Tn conjugados a KLH como vacina contra câncer prostático.

Um dos imunógenos em potencial mais amplamente estudados no desenvolvimento de vacinas são mucinas. Mucinas são glicoproteínas presentes na superfície de células do tecido epitelial, cuja estrutura em forma de bastonete deve-se às unidades de repetição de serina e treonina, que são *O*-glicosiladas (Figura **6**) (ANDRIANIFAHANANA; MONIAUX; BATRA, 2006; HUANG et al., 2012). Adicionalmente, a composição de carboidratos corresponde a cerca de 50-80% do peso destas glicoproteínas (BALDUS; HANISCH, 2000; SEITZ, 2000).

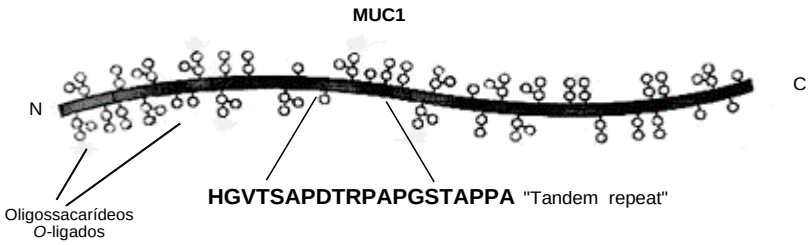


Figura 6. Representação da estrutura de MUC1.

As mucinas encontram-se envolvidas em diversos processos biológicos relevantes, tais como, proteção, hidratação e lubrificação dos epitélios, renovação, diferenciação, sinalização e adesão celulares, fertilização, infecções e inflamação (BROCKE; KUNZ, 2002; BUSCAGLIA et al., 2006). Em consequência, processos patológicos por vezes encontram-se associados ao metabolismo desregulado destas mucinas, o que as tornam marcadores relevantes, principalmente marcadores tumorais (ANDRIANIFAHANANA; MONIAUX; BATRA, 2006).

Diversos genes foram encontrados codificando oito tipos de mucinas, sendo que a maior proporção do peptídeo de mucina é caracterizada por extensas sequências de peptídeos repetidas em *tandem*. Estas seqüências de repetição são individuais para cada mucina (Tabela **3**) (BALDUS; HANISCH, 2000).

Tabela 3 – Tipos de MUC para mucinas humanas.

Tipos de MUC	Repetições em Tandem	
	Número	**Sequência**
MUC1	Polimórfico	AHGVTSAPDTRPAPGSTAPP
MUC2	Polimórfico	PTTTPITTTTTVTPTPPTPTGTQT
	16	PPTTTPSPPTTTTTTP
MUC3	Polimórfico	HSTPSFTSSOTTTETTS
MUC4	Polimórfico	TSSASTGHATPLPVTD
MUC5AC	Polimórfico	TTSAPTTS
MUC5B	11	Repetição irregular de 29 aminoácidos
MUC6	Polimórfico	169 aminoácidos repetidos
MUC7	6	TTAAPPTPSATTPAPPSSSAPPE
MUC8	?	TSCPRPLQEGTRV e TSCPRPLQEGTPGSRAAHALSRRGHRVHELP TSSPGGDTGF

MUC1, que tem uma unidade de repetição de 20 aminoácidos, é o imunógeno mais amplamente estudado (TAYLOR-PAPADIMITRIOU; FINN, 1997). Notadamente, a expressão de mucinas do tipo MUC1 está dramaticamente aumentada em casos de câncer de mama e ovário (BALDUS; HANISCH, 2000). Em células epiteliais normais, mucinas são expressas na superfície celular voltadas para o lúmen. Diferentemente, em células malignas, as mucinas perdem sua topologia e polarização conduzindo à expressão de mucinas fora da superfície celular, bem como à secreção de mucinas solúveis na corrente sanguínea (Figura **7**) (TAYLOR-PAPADIMITRIOU et al., 1999). A presença de mucinas na matriz extracelular pode ocasionar produção de células tumorais metastáticas.

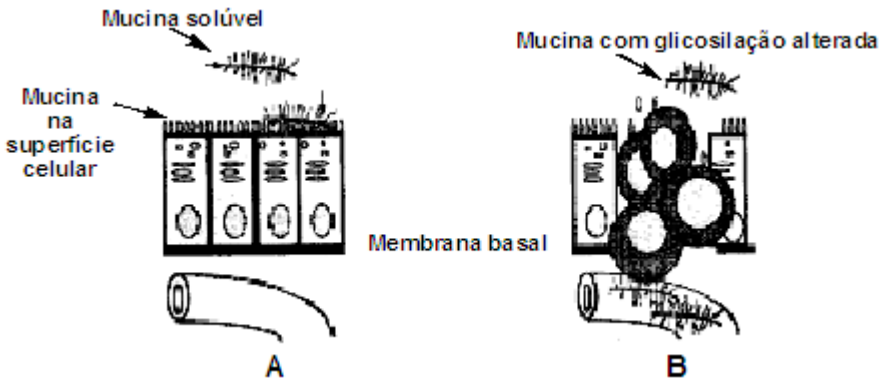


Figura 7. Comparação entre mucinas em células normais e em células tumorais. (**A**) Tecido normal contendo mucinas solúveis e na superfície celular; (**B**) Mucinas com padrão de glicosilação alterado e secreção de mucinas

para corrente sanguinea em casos de células tumorais. Reproduzido de *Essentials in Glycobiology* por Varki et al (2009).

Adicionalmente, mucinas podem ser encontradas na superfície de parasitas, sendo responsáveis por processos de reconhecimento celular, invasão celular e evasão da resposta imune. Como exemplo, tem-se as mucinas parasitárias de *T. cruzi* (TcMUC), as quais estão envolvidas em processos de evasão da resposta imune, reconhecimento e invasão celular (AGRELOS et al., 2003). Ainda, constituem uma barreira protetora na superfície do parasita contendo cerca de 60% de carboidratos. Tais mucinas parasitárias são moléculas polianiônicas altamente glicosiladas formadas por cadeias peptídicas com sequências ricas em serina e principalmente, treonina como sítios aceptores para *O*-glicosilação (Figura **8**) (DI-NOIA et al., 1996; PREVIATO et al., 1995).

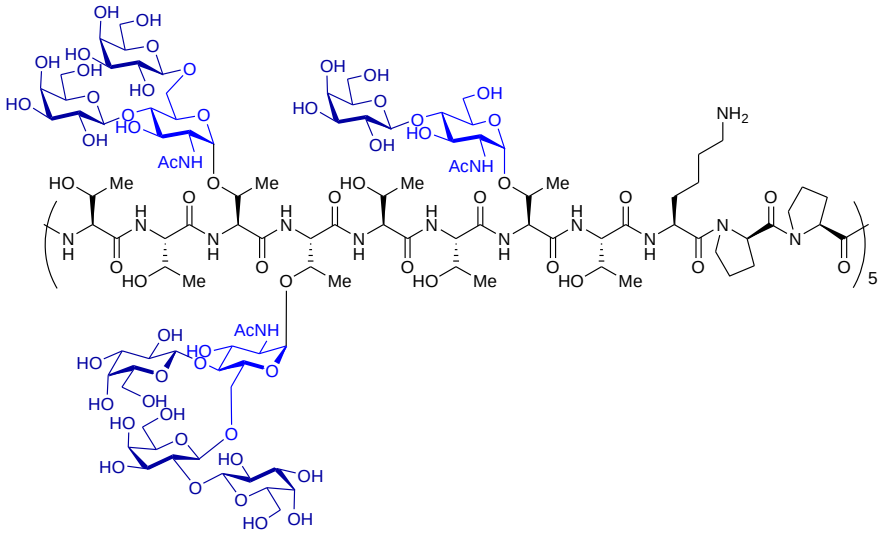


Figura 8 – Representação de mucina de *T. cruzi* (TcMUC), contendo unidades multigalactosiladas ligadas à unidade repetitiva $Thr_8LysPro_2$.

As moléculas de mucina de *T. cruzi* assemelham-se às de mamíferos, embora as unidades oligossacarídicas estejam ligadas à cadeia peptídica pela unidade de α-*N*-acetil-glicosamina (GlcNAc) e não *N*-acetil-galactosamina (GalNAc), como ocorre nos vertebrados (DI-NOIA et al., 1996).

Durante o processo de reconhecimento e invasão celular, sabe-se que este parasita, por meio de uma enzima denominada *trans*-sialidase, realiza a transferência e incorporação de ácido siálico às mucinas TcMUC a partir de ácido siálico presente em glicoconjugados das células do hospedeiro. Isto, porque *T. cruzi* é incapaz de sintetizar ácido siálico. Essa constitui a única via de captação de resíduos de ácido siálico pelo parasita. Este processo corresponde à etapa inicial chave no processo de infecção, uma vez que, a sialilação de mucinas de *T. cruzi*

as torna insensíveis à ação de protease. Ainda, as moléculas de mucina sialiladas estão envolvidas no processo de aderência e subseqüente penetração do parasita nas células do hospedeiro (AGRELOS et al., 2003).

Adicionalmente, as glicoproteínas de mucinas das formas tripomastigotas infectantes de *T. cruzi* possuem resíduos terminais de α-galactose, além de β-galactose, os quais atuam como epitopos, sendo reconhecidos por anticorpos líticos anti-α-Gal. Uma vez sialiladas, as mucinas tornam-se resistentes a ação de anticorpos líticos anti-α-Gal, o que protege o parasita contra os mecanismos de defesa do hospedeiro (Figura **9**) (PEREIRA et al., 2000).

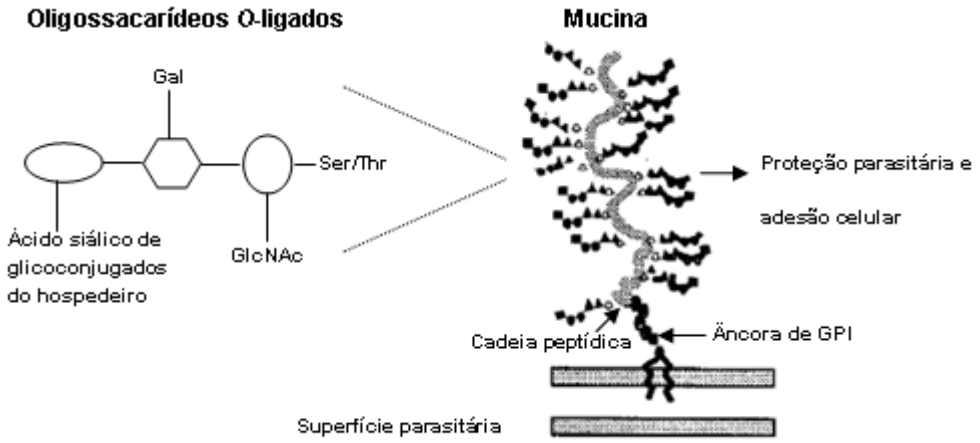


Figura 9. Modelo estrutural de moléculas de mucina de *T. cruzi* sialiladas. O processo de sialilação confere proteção parasitária e permite a adesão e invasão celular

Em função disto, e embora indiretamente relacionado à glicanas antigênicas e ao desenvolvimento de vacinas, estes dados sugerem que vacinas efetivas podem ser geradas para interferir na biossíntese de glicanas do parasita. De fato, dados da literatura demonstram que animais imunizados com anticorpos, capazes de reconhecer e inibir a enzima *trans-sialidase,* apresentaram parasitemia reduzida (COSTA et al., 1998; NYAME; KAWAR; CUMMINGS, 2004; PEREIRA-CHIOCCOLA et al., 1999).

Ainda, a diferença existente entre mucinas TcMUC e aquelas encontradas em mamíferos sugerem que modelos experimentais, tais como substratos sintéticos, podem ser gerados para melhor entendimento da interação entre as mucinas de *T. cruzi* e a enzima *trans*-sialidase.

1.3 Síntese de peptídeos

A obtenção de peptídeos a partir de fontes naturais muitas vezes fornece baixa quantidade do produto, apesar de muitos destes poderem ser isolados no seu estado puro e com significativo rendimento. A baixa concentração de peptídeos dificulta o isolamento em quantidades suficientes para o emprego terapêutico e para a realização de estudos fisiológicos, químicos, físicos, farmacológicos, bioquímicos e clínicos; logo, há a necessidade de sintetizá-los em escalas variadas (BAILEY, 1990). Atualmente, estima-se que os fármacos baseados em peptídeos e proteínas movimentarão 160,1 bilhões de dólares em 2013, sendo a maioria destes obtido por métodos químicos (em solução ou em fase sólida), enzimático ou combinação de ambos (semi-síntese). Adicionalmente, peptídeos podem ser obtidos via tecnologia do DNA recombinante (CRAIK et al., 2013; REICHERT, 2010).

A síntese química de peptídeos é caracterizada pelo uso de reagentes químicos cuja função é ativar o grupo carboxílico do aminoácido doador de grupo acila para a formação da ligação peptídica. Esta via permite o emprego de aminoácidos usuais, não usuais e modificados desde que haja proteção total de cadeias laterais reativas dos aminoácidos. Ainda assim, reações secundárias são passíveis de ocorrer. A síntese química pode ser realizada por síntese em solução ou síntese em fase sólida. Na síntese em solução os reagentes e produtos estão dissolvidos no meio reacional enquanto na síntese em fase sólida, o peptídeo formado, ou seja, o produto encontra-se acoplado a um suporte polimérico que é insolúvel no meio reacional (KENT, 1988).

A síntese em solução requer o isolamento e caracterização do peptídeo formado a cada etapa de acoplamento entre aminoácidos ou desproteção, diferentemente da síntese em fase sólida, o que representa uma desvantagem em relação à esta, justificando o emprego cada vez maior da síntese em fase sólida a qual será abordada detalhadamente mais adiante (CHAN; WHITE, 2000; KENT, 1988; MERRIFIELD, 1963;).

A síntese enzimática de peptídeos destaca-se pela ausência de racemização, proteção parcial das cadeias laterais e alta quimio-, regio-, e enantioespecificidades. Apesar destas vantagens, este método é pouco empregado devido à termodinâmica desfavorável de enzimas em água pura, à estreita especificidade destas e à possibilidade de hidrólise secundária do peptídeo em crescimento quando o biocatalisador é uma protease (MACHADO et al., 2004).

A obtenção de peptídeos via tecnologia do DNA recombinante consiste na produção de peptídeos ou proteínas em células de microorganismos, insetos ou mamíferos a partir de (i)

sequências de DNA sintetizados quimicamente, (ii) segmentos de DNA clivados por endonucleases de restrição (as quais clivam o DNA em sequências específicas), ou ainda (iii) DNA complementar (cDNA) obtido a partir de sequências de RNA mensageiro por transcrição reversa. Estas sequências são incorporadas por meio da enzima DNA ligase à um vetor, que poderá ser um plasmídeo, fago, cosmídeo ou cromossomo artificial de levedura. Em seguida, estes vetores são inseridos na célula apropriada (sistema de expressão) para expressar o peptídeo ou a proteína de interesse. Geralmente, os sistemas de expressão mais empregados são bactérias quando o peptídeo ou a proteína a ser expressa não possui aminoácidos modificados, uma vez que estas não realizam modificação pós-traducional. Para as sequências contendo aminoácidos modificados empregam-se leveduras e células de animais ou insetos como sistemas de expressão (MACHADO et al., 2004).

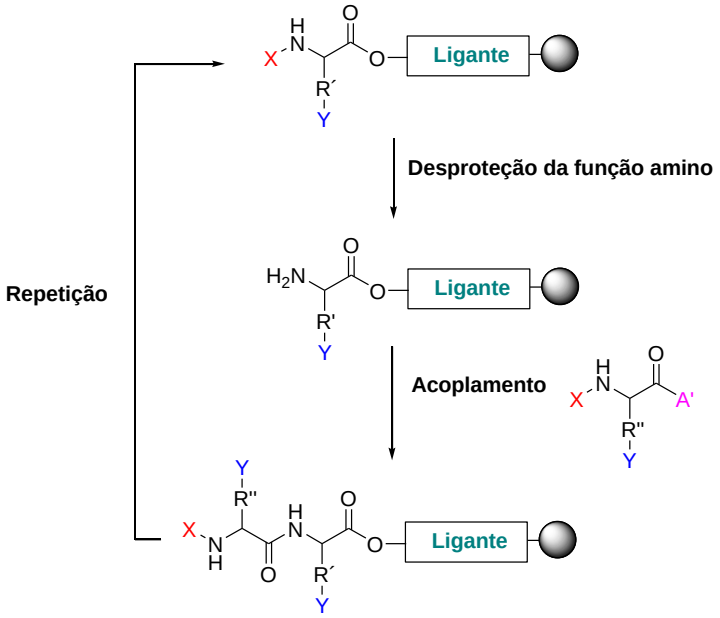
Grandes quantidades de peptídeos são sintetizadas por meio da tecnologia do DNA recombinante, entretanto os peptídeos de tamanho médio são preferencialmente obtidos via síntese em fase sólida (MACHADO et al., 2004).

1.3.1 Síntese de peptídeos em fase sólida

O conceito de síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS) foi desenvolvido e apresentado à sociedade científica por Bruce Merrifield em 1963, resultando em uma grande mudança nas perspectivas de síntese de peptídeos (MERRIFIELD, 1963). Atualmente, é um dos métodos mais utilizados para reproduzir e criar peptídeos e proteínas em laboratórios de uma maneira sistemática, principalmente daqueles (i) naturais pouco abundantes e difíceis de serem sintetizados em bactérias, (ii) modificados contendo aminoácidos não naturais e *D*-aminoácidos, (iii) modificados na cadeia principal e (iv) modificados nas extremidades amino e carboxiterminais (AMBLARD et al., 2006; CHAN; WHITE, 2000).

Na SPFS é empregado um suporte polimérico, também denominado resina, o qual consiste em pequenos grãos, porosos e insolúveis tanto em solução aquosa quanto em solventes orgânicos. Estes grãos são polímeros com grupamentos funcionais que se encontram ligados ao peptídeo que está sendo sintetizado. O peptídeo permanece ligado covalentemente ao suporte polimérico durante toda a síntese. Este método tem grandes vantagens: separação de peptídeos intermediários de reagentes solúveis, retirada de solventes por filtração simples, lavagem em menor tempo e a capacidade de suportar condições mais agressivas do que as utilizadas na síntese em solução. Muitas destas operações tornam possível o emprego de excesso de reagente a fim de garantir rendimentos altos e minimizar perdas físicas do

peptídeo, uma vez que este se encontra preso ao suporte sólido durante o processo (AMBLARD et al., 2006; CHAN; WHITE, 2000). O princípio geral de SPFS está ilustrado no Esquema **2** e consiste em ciclos repetidos de reações de acoplamento e de etapas de desproteção.



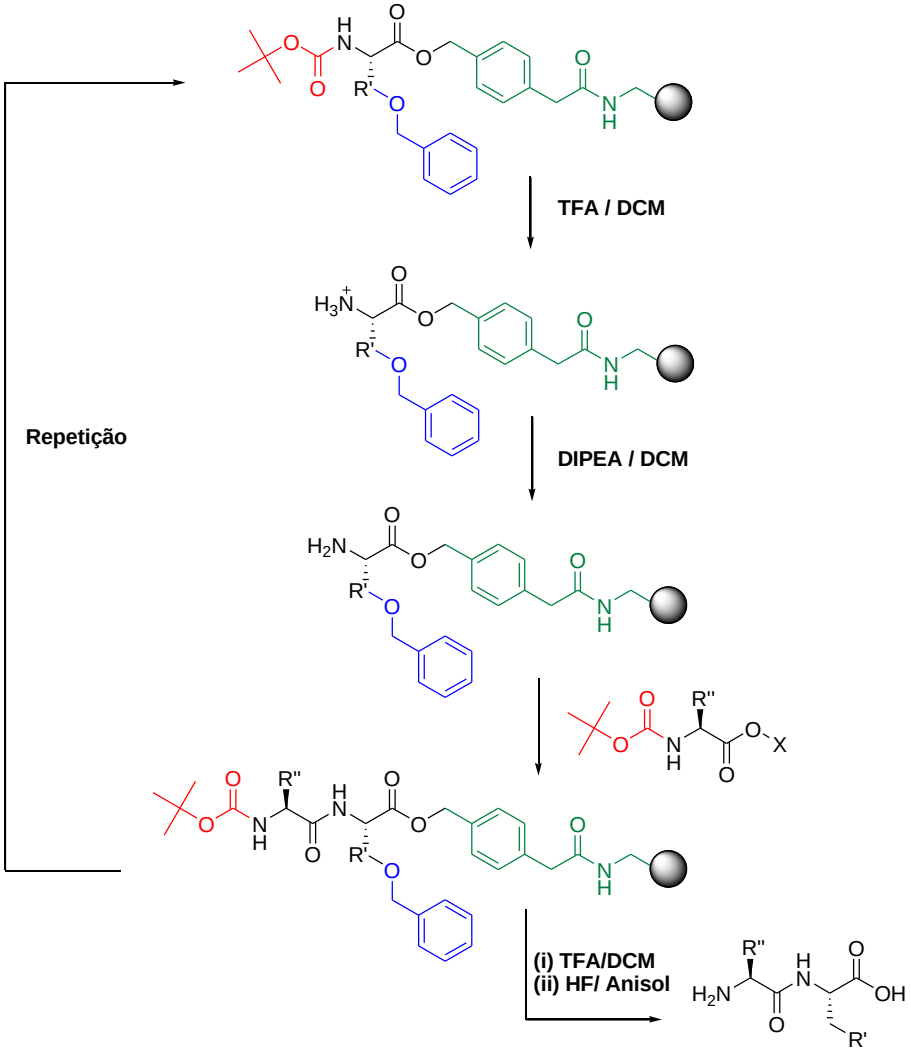
Esquema 2. O princípio da síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS). Em vermelho está representado o grupo *N*-protetor do resíduo de aminoácido. Em azul o grupo protetor de cadeias laterais de resíduos de aminoácidos. Figura modificada de Amblard et al. (2006).

O peptídeo é fixado pela extremidade *C*-terminal a um ligante da fase sólida (grupo amino terminal livre, halogênio ou hidroxila). O processo de síntese inicia-se a partir de um aminoácido acoplado à fase sólida pela extremidade *C*-terminal e contendo grupo amino protegido. O grupo amino deste aminoácido é, então, desprotegido, gerando um novo grupo amino *N*-terminal ao qual será acoplado outro aminoácido. Todos os aminoácidos empregados nesta síntese possuem as cadeias laterais, quando reativas, também protegidas, garantindo sua integridade durante toda a síntese da cadeia peptídica. As etapas de acoplamento e desproteção do grupamento *N*-terminal são repetidas, alternadamente, até que o peptídeo seja obtido, obedecendo à sequência desejada. Na etapa final, o peptídeo é liberado de seu suporte sólido e os grupos protetores das cadeias laterais também são removidos. Geralmente, a resina e os grupos protetores das cadeias laterais são escolhidos de forma que sejam removidos sob as mesmas condições (CHAN; WHITE, 2000).

O fator limitante deste método é alcançar rendimentos extremamente altos em cada etapa de acoplamento. Por exemplo, se em cada etapa o rendimento for de 99%, um peptídeo de 26 resíduos seria sintetizado com 77% de rendimento final (considerando 100% de

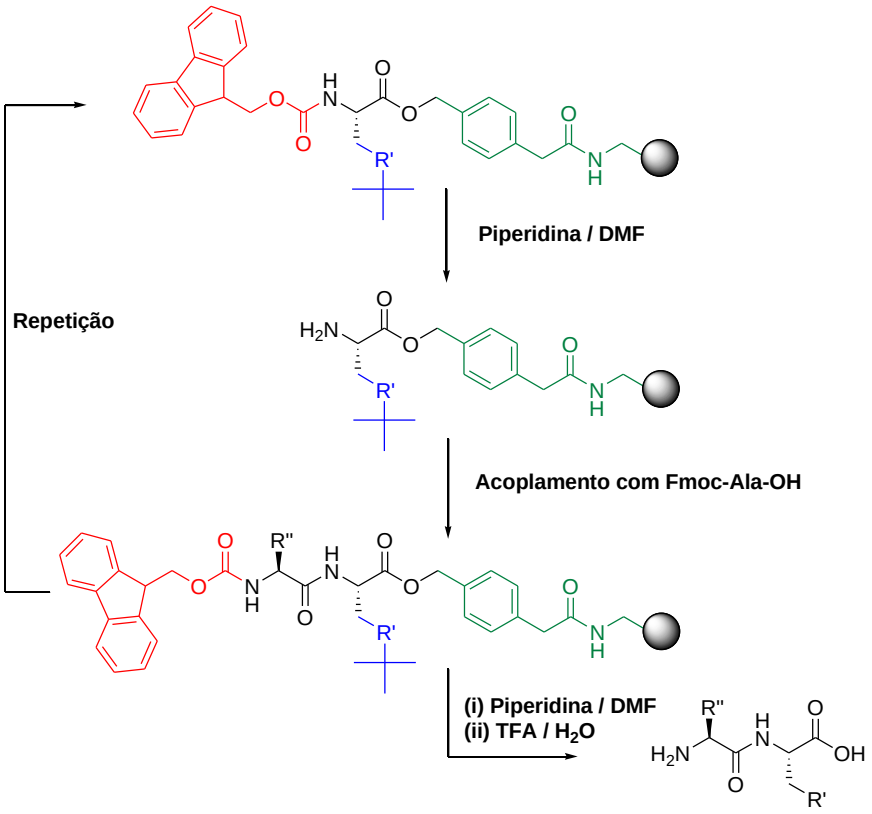
rendimento em cada desproteção). Entretanto, se em cada etapa o rendimento for de 95%, o mesmo peptídeo seria sintetizado com 25% de rendimento. Em função disto, devem ser empregados (i) excesso de aminoácido em cada etapa de acoplamento para garantir o rendimento máximo, (ii) métodos muito eficientes de ativação da carboxila e de formação da ligação peptídica e (iii) grupamentos protetores apropriados (ISIDRO-LLOBET; ALVAREZ; ALBERICIO, 2009; MONTALBETTI; FALQUE, 2005) .

O método de SPFS geralmente utiliza *t*-butiloxicarbonila (Boc) ou 9-fluorenil-metiloxicarbonila (Fmoc) como protetores do grupo amino. Ao empregar Boc, como ilustrado no Esquema **3**, o derivado Boc-aminoácido (grupo Boc em vermelho) é ligado à resina por meio da formação de um éster benzílico. Nesta ilustração, a resina representada em verde, corresponde à resina PAM, um copolímero funcionalizado de estireno e divinilbenzeno com grupo hidroximetilfenilacetamidometil poliestirenol (Esquema **3**). Outros ligantes ou tipos de funcionalização da resina podem ser empregados para modular a labilidade da ligação entre o peptídeo e a resina em meio ácido ou para produzir peptídeos com modificações no grupamento carbóxi-terminal. A próxima etapa da síntese é a remoção do grupo protetor da extremidade *N*-terminal seguida de neutralização do grupo amino. Nesta técnica, o grupo protetor *N*-terminal Boc é removido em meio ácido, empregando-se normalmente solução de ácido trifluoracético (TFA) em diclorometano (DCM) ou em *N*,*N*-dimetilformamida (DMF). Em seguida, para a etapa de acoplamento empregam-se anidridos simétricos pré-formados, ésteres ativos (ativação com 1-hidroxibenzotriazol ou reagentes derivados deste representado por “X”) em DMF ou *N*- metilpirrolidona (NMP) em DMF. A liberação do peptídeo da resina e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais são conduzidas também em meio ácido, porém em condições mais agressivas como, por exemplo, ácido fluorídrico (Esquema **3**) (AMBLARD et al., 2006; CHAN; WHITE, 2000; MERRIFIELD, 1963).



Esquema 3. Síntese de peptídeos em fase sólida – Metodologia de Merrifield. Grupo protetor Boc em vermelho, e grupo protetor de cadeia lateral em azul. Em verde, a resina PAM, um dos tipos de resina existentes para emprego na SPFS.

O emprego do grupo 9-fluorenil-metiloxicarbonila (Fmoc) como protetor do grupo amino, estratégia escolhida neste trabalho, está representado no Esquema **4**. Este método se inicia com a ligação do derivado de Fmoc-aminoácido ao suporte sólido (resina PAM representada em verde). A próxima etapa da síntese envolve a remoção do grupo Fmoc (representado em vermelho) em meio básico empregando, mais comumente, solução de piperidina 20% (DMF) ou morfolina 50% (DMF) (Esquema **4**) (AMBLARD et al., 2006; CHAN; WHITE, 2000).



Esquema 4. Síntese de peptídeos em fase sólida – Emprego de Fmoc. Em vermelho está representado o grupo protetor Fmoc e em azul o grupo protetor da cadeia lateral. Em verde, a resina PAM, um dos tipos de resina existentes para emprego na SPFS.

A troca do grupo protetor *N*-terminal de Boc para Fmoc proporciona consideráveis vantagens à síntese em fase sólida. Diferentemente do método de Merrifield, o qual utiliza um regime de acidólise graduado para conseguir a seletividade na remoção da proteção temporária (proteção do grupo amino) e permanente (proteção das cadeias laterais), o uso do grupo Fmoc fornece uma estratégia de remoção destes em meios completamente diferentes. Enquanto o grupo Fmoc é removido facilmente em meio básico, todos os demais grupos protetores (representados em azul no Esquema **4**) são removidos em meio ácido (AMBLARD et al., 2006; CHAN; WHITE, 2000; MERRIFIELD, 1963).

Na prática, são usados normalmente grupos *t*-butila e tritila para proteção das cadeias laterais e alcoxibenzila para fixação do peptídeo à resina, pois todos estes grupos podem ser removidos com o emprego de TFA. Este último reagente é também um excelente solvente para peptídeos, além de poder ser removido por evaporação simples, o que é conveniente para a reação de clivagem. A facilidade deste método de síntese de peptídeos é, indubitavelmente, a razão para o amplo uso de Fmoc/*t*-butila (Esquema **4**). Sintetizadores automatizados estão disponíveis para ambas as técnicas, entretanto muitos grupos de pesquisa continuam

executando SPFS manualmente. A limitação da SPFS surge quando se propõem sínteses de peptídeos e proteínas com números de resíduos de aminoácidos superiores a sessenta ou quando se depara com uma sequência de síntese difícil, usualmente por apresentar tendências agregantes. Nestes casos, são necessárias sínteses convergentes (CHAN; WHITE, 2000).

De modo geral, a síntese em fase sólida oferece muitas vantagens em relação à síntese convencional em solução quanto à eficiência, à conveniência dos procedimentos de aplicabilidade e de purificação. Em contrapartida, reações secundárias envolvendo resíduos de aminoácidos presentes no peptídeo crescente, racemização de aminoácidos e acúmulo de subprodutos gerados durante as distintas etapas do processo sintético reduzem o rendimento do peptídeo final, e quanto maior é o peptídeo, mais estes problemas se agravam. Adicionalmente, o enovelamento do peptídeo crescente dificulta as reações de acoplamento entre grupos α-carboxílico e α-amino (AMBLARD et al., 2006; CHAN; WHITE, 2000; MERRIFIELD, 1963).

1.4 Síntese de peptídeos modificados a partir da estratégia "Click Chemistry"

Processos sintéticos variados vêm sendo desenvolvidos sobre vários aspectos com a finalidade de otimizar a síntese de peptídeos. Outros processos, porém, visam à obtenção de peptídeos modificados que superem limitações próprias dos peptídeos naturais, tais como, suscetibilidade proteolítica, toxicidade e baixa biodisponibilidade. Uma estratégia que pode ser empregada para melhorar o perfil biológico de peptídeos é a inserção de heterociclos de nitrogênio que possam desempenhar importantes funções em sistemas biológicos. Entre estes, o anel 1,2,3 triazol tem demonstrado propriedades físico-químicas desejáveis no desenvolvimento de fármacos. A substituição da ligação peptídica pelo anel triazol tem sido explorada na literatura porque são considerados bioisósteros não-clássicos (CELENTANO et al., 2012; FRANKE; DOLL; EICHLER, 2005; GUELL, 2012; HARIDAS; LAL; SHARMA, 2007; KE et al., 2012; LIU et al., 2008; ZENG et al., 2011).

A unidade triazol mantém os átomos de carbono ligados nas posições 1,4 a uma distância de 5 Å mimetizando a ligação amida que apresenta distância de 3,8 Å, e diferentemente do grupo amida, o anel triazol não é clivado por hidrólise química ou enzimática, oxidado ou reduzido, sendo relativamente resistente à degradação metabólica e proteolítica. Adicionalmente, os átomos de nitrogênio nas posições 2 e 3 agem como aceptores de ligações de hidrogênio (Figura **10**) (ARAGÃO-LEONETI et al., 2010).

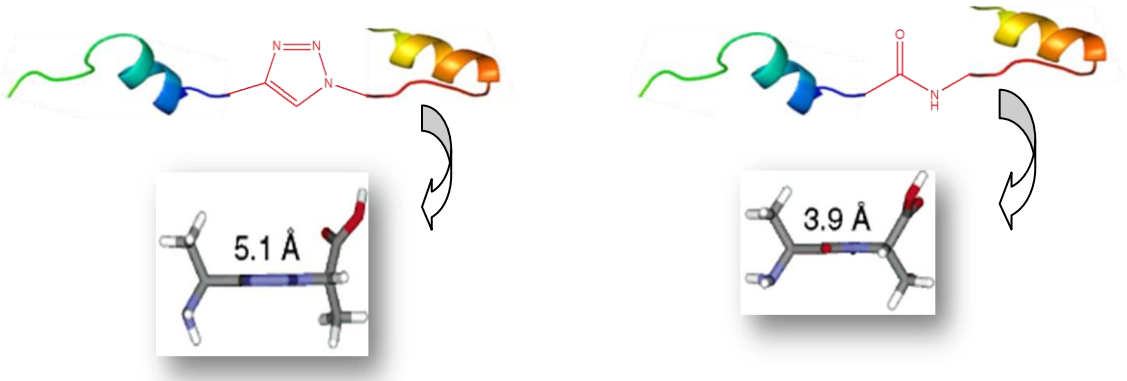
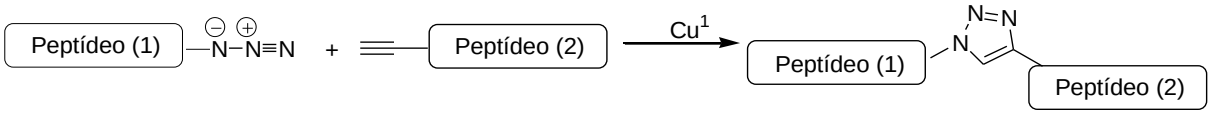


Figura 10. Relação isostérica entre grupos 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído e amida.

A formação de peptídeos contendo anel 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído foi realizada pela combinação da síntese em fase sólida com a estratégia de *Click Chemistry* por reações de ciclo-adição azido-alcino 1,3 dipolar catalisada por cobre (I) (CuAAC) (Esquema **5**) (ARAGÃO-LEONETI et al., 2010; KOLB; FINN; SHARPLESS, 2001; LIU et al., 2008; ZENG et al., 2011)



Esquema 5 – Reação de Ciclo-adição azido-alcino 1,3 dipolar. Reação entre grupos azido (N_3) e alcino terminal ligados ao Peptídeo(1) e Peptídeo(2), respectivamente, na presença do catalisador Cu(I), formando a cadeia peptídica com o grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído.

A estratégia de *Click Chemistry* utiliza uma transformação química mais rápida e prática pela ligação de dois reagentes ou blocos de construção, azido e alcino terminal, gerando seletivamente o produto desejado em altas concentrações, sendo explorada em todos os aspectos nas diversas áreas desde a descoberta de fármacos até o desenvolvimento de materiais empregados na indústria (ARAGÃO-LEONETI et al., 2010; KOLB; FINN; SHARPLESS, 2001; TORNOE; CHRISTENSEN; MELDAL, 2002).

O conceito de *Click Chemistry* foi introduzido por Sharpless e colaboradores no ano de 2001. O intuito desta estratégia é atender às novas demandas da química moderna, principalmente para a descoberta de novos fármacos. Facilidade de execução, versatilidade, seletividade, desnecessária proteção de grupos funcionais, rendimentos elevados, ausência de subprodutos e aceleração pelo uso de irradiação microondas são algumas das vantagens proporcionadas por esta estratégia (KOLB; FINN; SHARPLESS, 2001).

Reações em fase sólida associadas à estratégia *Click Chemistry* consistem em realizar as condensações clássicas entre os grupos carboxílicos e amino dos aminoácidos e modificar cadeias peptídicas com moléculas contendo as funções azido e alcino para acoplamento via CuAAC. Esta combinação demonstra grandes vantagens, tais como (i) otimização da síntese de peptídeos e aumento de rendimento, uma vez que a reação entre derivados azido e alcino é quase total, não ocorrendo reações secundárias, (ii) geração de peptídeo modificado com propriedades físico-químicas desejáveis para o desenvolvimento de fármacos, (iii) não reatividade de grupos laterais, incluindo aqueles desprotegidos, e (iv) compatibilidade com a síntese de peptídeos em fase sólida (FRANKE; DOLL; EICHLER, 2005; HARIDAS; LAL; SHARMA, 2007; LIU et al., 2008; TORNOE; CHRISTENSEN; MELDAL, 2002).

Le Quement et al. (2011) relataram a síntese de uma biblioteca de compostos miméticos do peptídeo Smac AVPI, o qual é investigado devido à atividade pró-apoptótica e promissor emprego em terapias antitumorais. Na Figura **11** pode ser obsevado que o grupo triazol foi inserido na cadeia lateral destes peptideomiméticos Tal biblioteca foi preparada a partir da associação entre síntese de peptídeos em fase sólida e reações CuAAC, a qual forneceu peptídeos biologicamente ativos (LE QUEMENT et al., 2011).

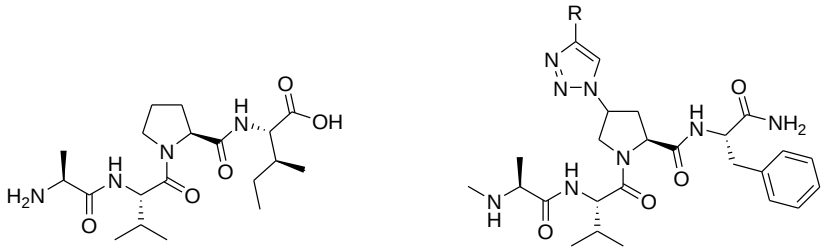
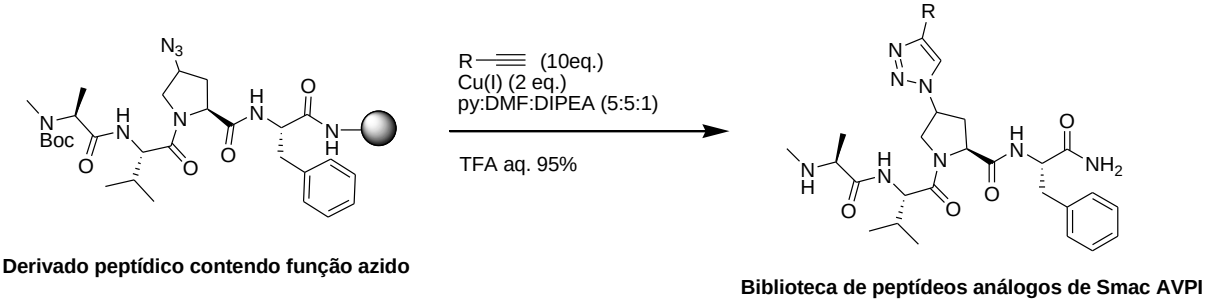


Figura 11. Peptídeo Smac AVPI e seus derivados miméticos contendo grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído. (R) varia de acordo com cada peptídeo mimético da biblioteca sintetizada.

Inicialmente, Le Quement et al. (2011) prepararam o peptídeo contendo função azido via síntese de peptídeo em fase sólida empregando resina $PEGA_{800}$, TBTU (tetrafluoroborato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio) como reagente de acoplamento e Fmoc como grupo protetor da função amino. Este derivado foi submetido à reação de CuAAC com diversos compostos alcinos disponíveis comercialmente, fornecendo a biblioteca de peptídeos análogos aos Smac AVPI. A reação de CuAAC, após uma série de otimizações, foi realizada empregando-se cobre (I), piridina, DIPEA e DMF, com tempo reacional de 48 horas (Esquema **6**).



Esquema 6 – Preparação de peptideomiméticos de Smac AVPI.

Wan et al. (2006) descreveram a preparação de potenciais vacinas antitumorais baseadas em glicopeptídeos, cuja cadeia peptídica encontra-se ligada às moléculas de açúcar por meio de um espaçante contendo grupo triazol (Figura **12**).

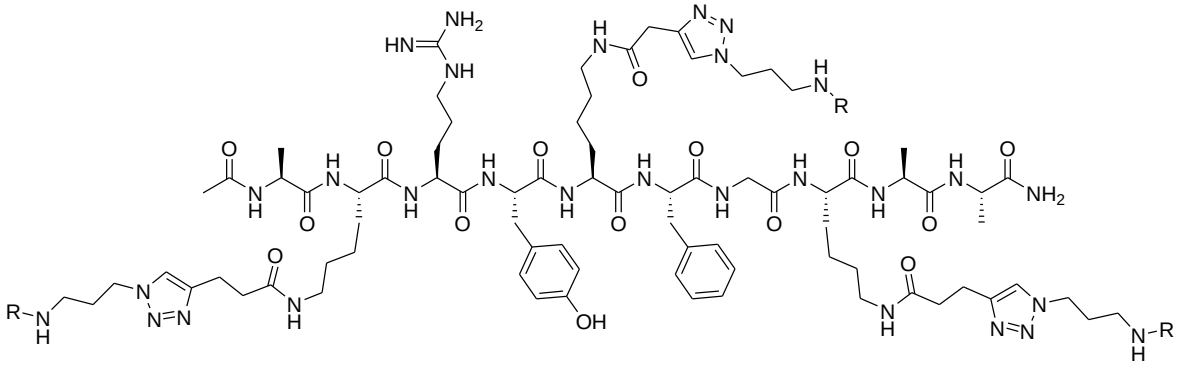


Figura 12. Vacinas antitumorais baseadas em glicopeptídeos cujas moléculas de açúcar encontram-se ligadas ao peptídeo por meio de grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído. (R) corresponde às moléculas de açúcar de cada glicopeptídeo.

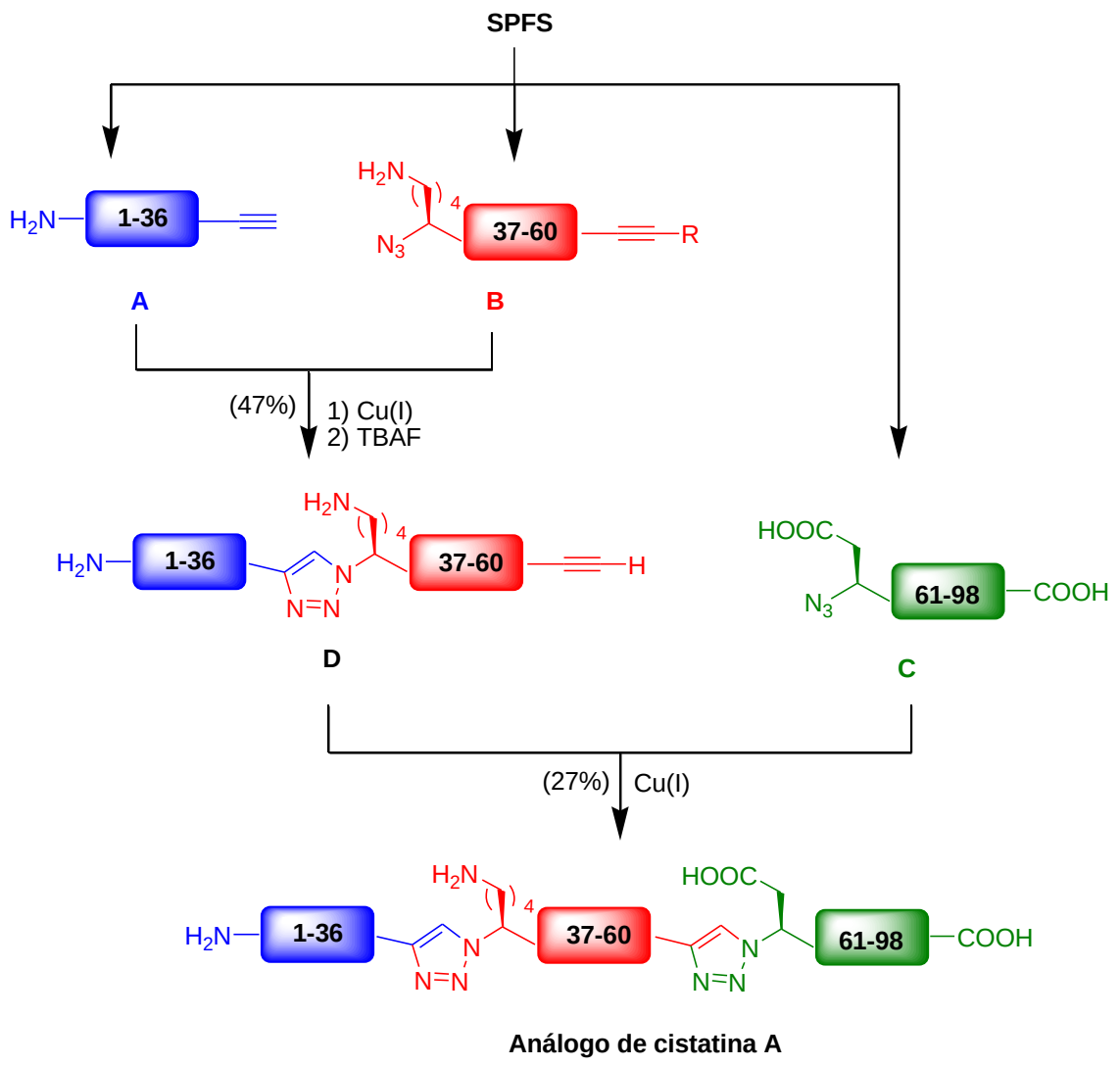
Diferentemente de Le Quement et al. (2011) e Wan et al. (2006), Valverde e cols. (2012) sintetizaram um análogo mimético da cistatina A contendo grupo triazol na cadeia principal (Figura **13**).

(A) ^{1}MIPGGLSEAKPATPEIQEIVDKVKPQLEEKTNETYG^{37}KLEAVQYKTQVVAG TNYYIKVRAG^{61}DNKYMHLKVFKSLPGQNEDLVLTGYQVDKNKDDELTG^{98}F

(B)

Figura 13. (**A**) Sequência de resíduos de aminoácidos da cistatina A humana. (**B**) Análogo mimético de cistatina A contendo grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído na cadeia principal.

O análogo mimético foi obtido por meio da associação entre síntese de peptídeo em fase sólida e reações de ciclo-adição azido-alcino 1,3-dipolar catalisada por Cu (I). Conforme observado no Esquema **7**, Valverde et al. (2012) prepararam inicialmente os peptídeos representados por **A**, **B** e **C** por meio de síntese em fase sólida (SPFS). A obtenção dos peptídeos contendo função alcino terminal (**A** e **B**) envolveu a substituição de glicina por propargilamina devido à semelhança estrutural entre estas e à facilidade de acesso, enquanto a preparação dos peptídeos contendo função azido (**B** e **C**) envolveu modificação da região N-terminal com grupo azido. Posteriormente, reação de CuAAC entre **A** e **B** originou o peptídeo **D**. Em seguida reação de CuAAC entre o peptídeo **C** e o peptídeo **D** forneceu o desejado análogo de cistatina A (Esquema **7**).



Esquema 7 – Preparação do análogo mimético de cistatina A. R: Si(iPr)$_3$; TBAF: fluoreto de tetrabutilamônio.

Os resultados mostraram que este análogo foi biologicamente ativo. Adicionalmente, foram observados que cistatina A e seu análogo mimético apresentavam estrutura tridimensional semelhante e resistência à inativação térmica (VALVERDE et al., 2012).

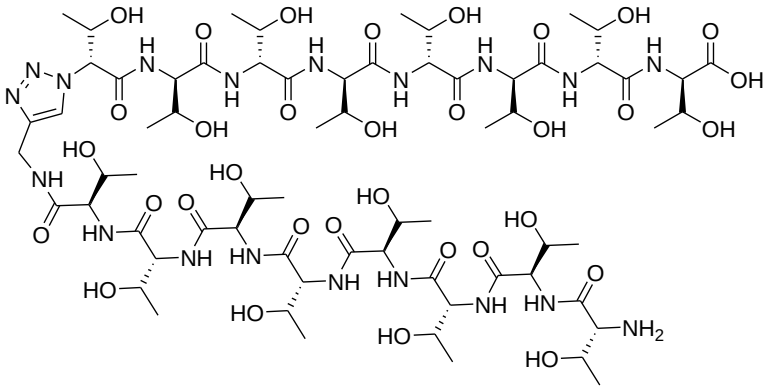
A superação das dificuldades das reações de acoplamento convencionais em fase sólida e a síntese de peptídeos modificados são relevantes para a busca de estratégias sintéticas mais eficientes e para melhoria no perfil biológico de peptídeos. Adicionalmente, o desenvolvimento do método de síntese de peptídeos de cadeia longa, combinando acoplamento em fase sólida e a estratégia de *Click Chemistry* abrirá novas perspectivas para a síntese de glicopeptídeos modificados relacionados a vacinas de interesse para o grupo de pesquisa.

Portanto, devido às múltiplas aplicações de peptídeos, em especial, à aplicação no desenvolvimento de vacinas e substratos para estudos de modelos biológicos, torna-se importante o desenvolvimento de estratégias de síntese de peptídeos mais rápidas, práticas e com melhores rendimentos. Além disto, esta abordagem sintética contribuirá para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas associadas a diversas condições patológicas como câncer, auto-imunidade, doenças parasitárias e processos infecciosos.

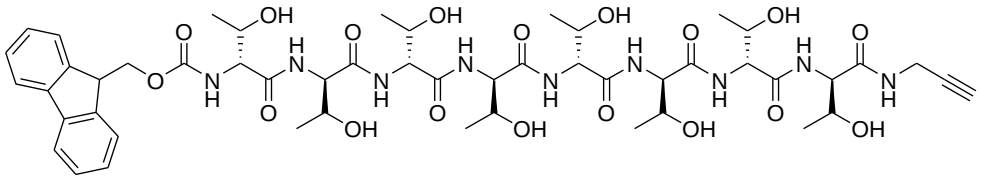
2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é desenvolver um método de síntese de peptídeos contendo grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído, como o peptídeo (**1**), o qual poderá ser empregado na preparação de peptideomiméticos de mucinas de *T. cruzi*, ricas em sequências de treonina, e no desenvolvimento de vacinas relacionadas à processos infecciosos causados por *T. cruzi*.

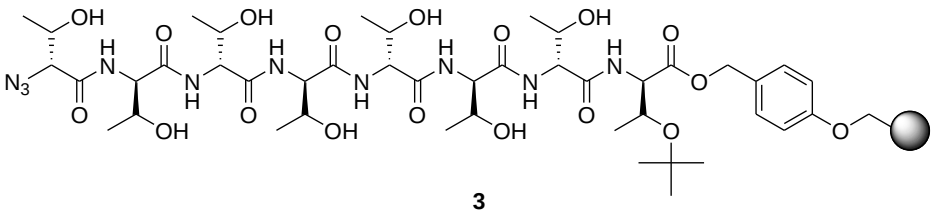
A obtenção da cadeia peptídica contendo grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído (**1**) foi planejada a partir de reações de ciclo-adição azido-alcino 1,3 dipolar catalisada por cobre (I) entre os precursores **2** e **3**.



1

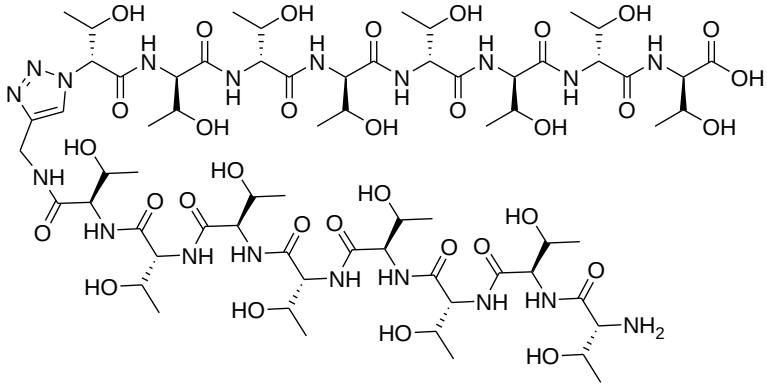


2

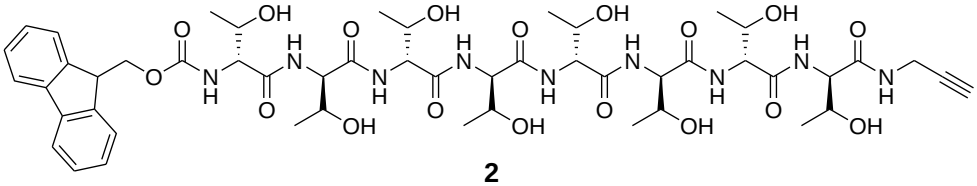


3

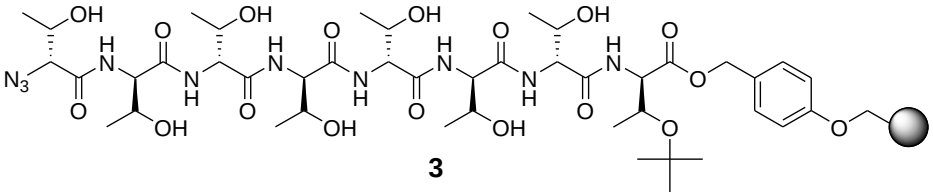
3 COMPOSTOS SINTETIZADOS



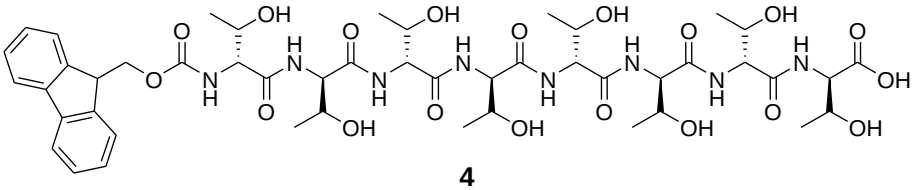
1



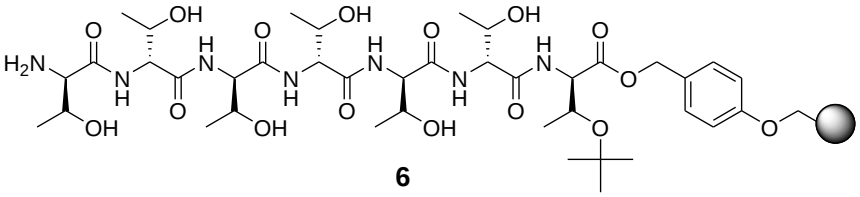
2



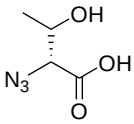
3



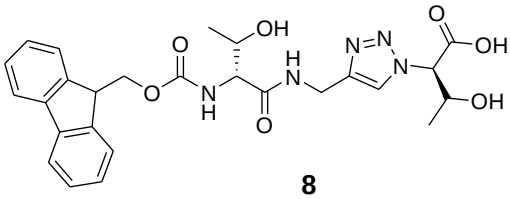
4



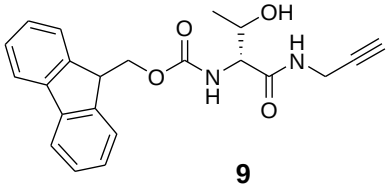
6



7



8

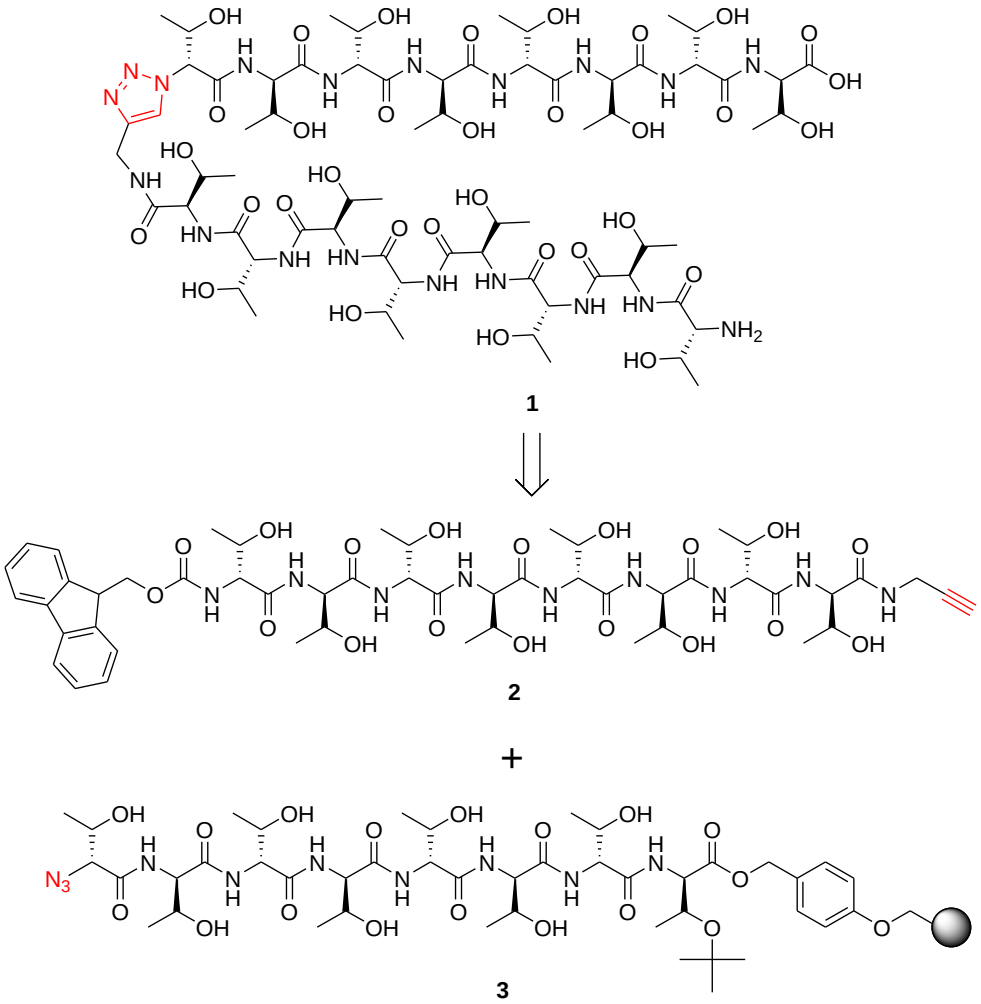


9

4 PLANEJAMENTO SINTÉTICO

4.1 Preparação do peptídeo 1

A síntese do peptídeo de cadeia longa contendo anel 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído **1** foi planejada a partir de reações de ciclo-adição azido-alcino 1,3 dipolar catalisada por cobre (I) entre os peptídeos **2** e **3** (Esquema **8**).

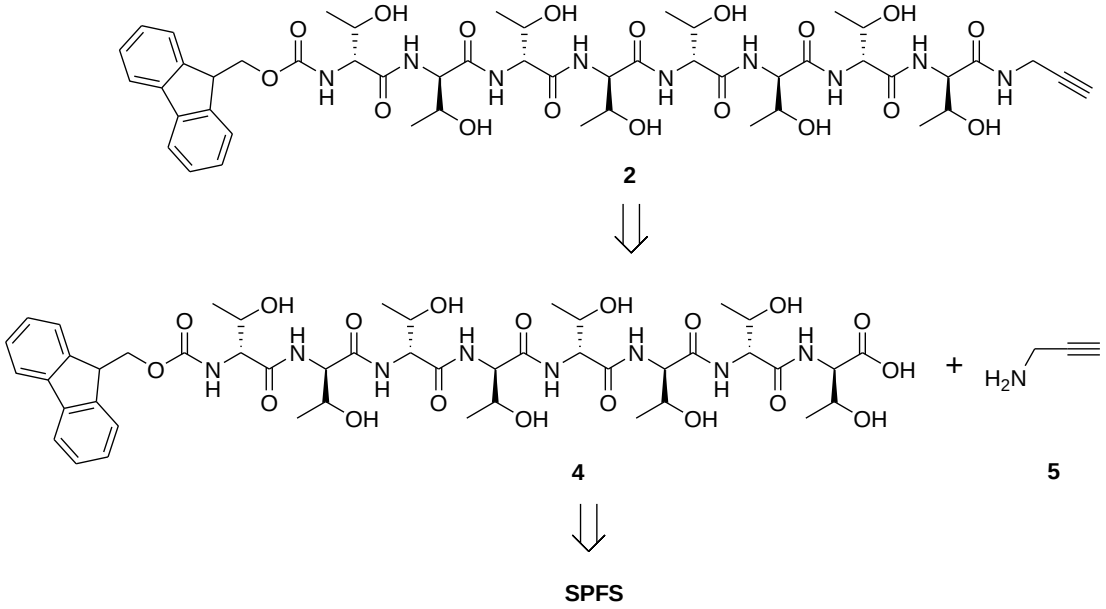


Esquema 8. Retrossíntese do peptídeo **1**.

4.1.1 Preparação de derivado alcino 2

O peptídeo **2**, contendo grupo carboxílico terminal ligado a grupo propargílico, foi planejado a partir da modificação da região C-terminal do peptídeo **4** com grupo alcino de

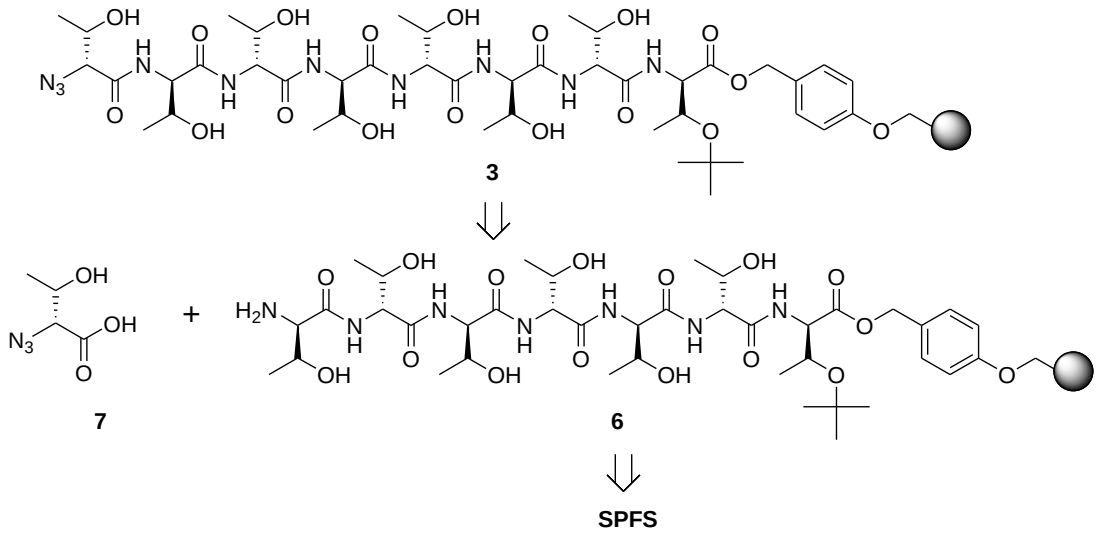
propargilamina **5**. O método de síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS) foi escolhido para obtenção de **4** (Esquema **9**).



Esquema 9. Retrossíntese do peptídeo **2**.

4.1.2 Preparação de derivado azido 3

O peptídeo **3**, contendo grupo carboxílico acoplado à resina, foi planejado a partir da reação de acoplamento entre o peptídeo **6** e o bloco de construção **7**. Como para o peptídeo **4**, o método de síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS) foi escolhido para obtenção de **6** (Esquema **10**).

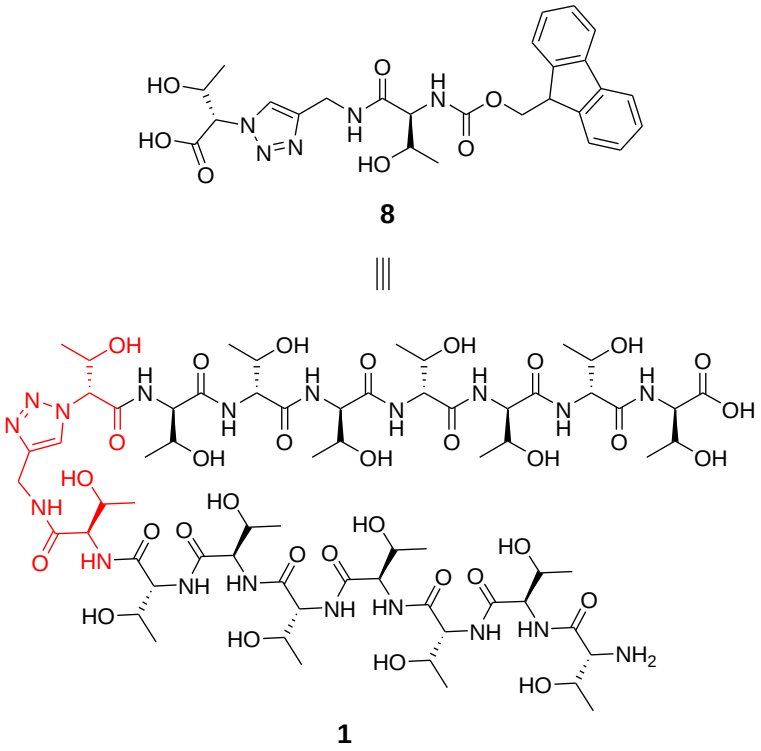


Esquema 10. Retrossíntese do peptídeo **3**.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As primeiras etapas do trabalho envolveram a preparação de blocos de construção contendo grupos alcino e azido, uma vez que, a obtenção da cadeia peptídica contendo anel 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído (**1**) foi planejada a partir de reações de ciclo-adição azido-alcino 1,3 dipolar catalisada por cobre (I).

Inicialmente foi planejada a preparação do dipeptídeo de treonina contendo grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído (**8**) como modelo para padronização do método e posterior extrapolação na obtenção dos peptídeos modificados **1**, **2** e **3** (Esquema **11**).



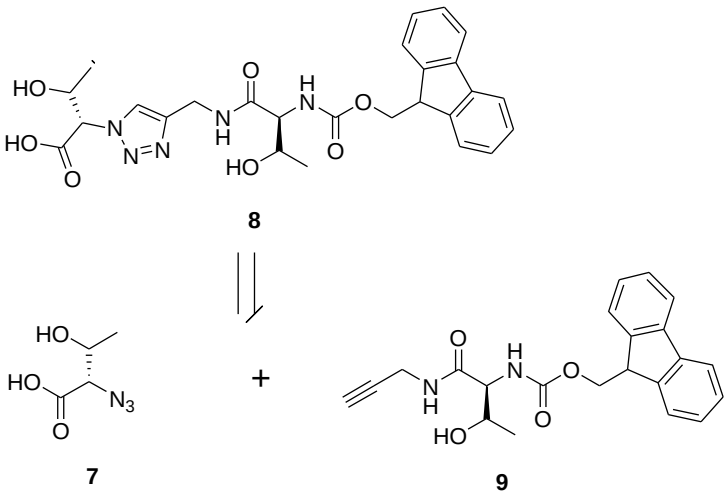
Esquema 11. Modelo dipeptídeo para padronização do método de obtenção do peptídeo **1**.

Portanto, serão abordados, primeiramente, a preparação de blocos de construção alcino e azido envolvidos na obtenção do dipeptídeo **8**. Posteriormente, serão discutidos os resultados obtidos na preparação dos peptídeos contendo grupos alcino **2** e azido **3** e finalmente, do peptídeo **1**.

5.1 Preparação do modelo dipeptídeo 8

A capacidade de sintetizar pequenos peptideomiméticos de estrutura secundária de proteínas é uma área de investigação em constante expansão, possuindo como desafio, a busca por aqueles capazes de mimetizar, sob condições fisiológicas, epitopos de proteínas (PEDERSEN; ABELL, 2011; WAN et al., 2006). A síntese de peptídeos modificados com grupo 1,2,3-triazol a partir de reações CuAAC, conforme mencionado durante a introdução deste trabalho, tem sido amplamente explorada na construção de peptideomiméticos biologicamente relevantes, sendo a estratégia de escolha para obter o dipeptídeo **8**. A inserção do grupo 1,2,3 triazol em peptídeos pode ser explorada por diferentes meios conforme descrito na literatura. Sendo assim, o grupo 1,2,3-triazol pode ser incorporado à cadeia principal como realizado neste trabalho, ou, mais comumente, ser incorporado à cadeia lateral do peptídeo. Adicionalmente pode ser utilizado como estratégia para obtenção de peptídeos cíclicos (BOCK et al., 2007; LE QUEMENT et al., 2011; PEDERSEN; ABELL; 2011; WAN et al., 2006; VALVERDE et al., 2012).

A obtenção do dipeptídeo **8** envolveu a preparação dos blocos de construção azido **7** e alcino **9**, os quais serão abordados inicialmente (Esquema **12**).



Esquema 12. Retrossíntese do dipeptídeo **8**.

5.1.1 Síntese do bloco de construção contendo grupo azido: ácido 2-azido-3-hidróxibutanóico (7)

Inicialmente, o bloco de construção contendo grupo azido foi idealizado a partir do aminoácido L-treonina modificado nas regiões N- e C-terminal com grupos azido e protetor para carboxila, respectivamente (Figura **14**).

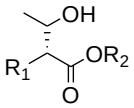
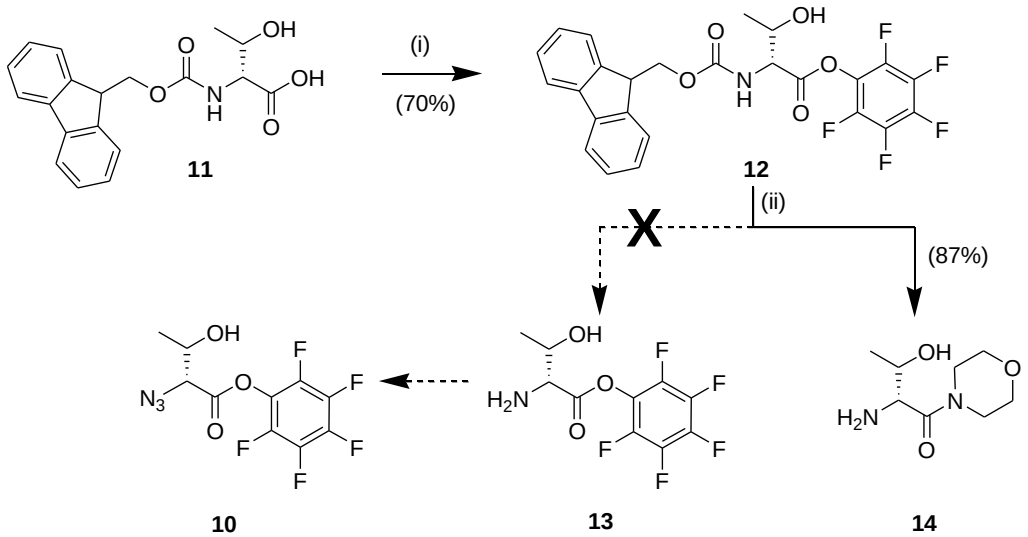


Figura 14. Estrutura geral idealizada inicialmente para o bloco de construção azido. R_1: N_3 e R_2: grupo protetor para carboxila.

Pentafluorfenila foi o grupo de escolha para proteção da região *C*-terminal devido à diversos fatores, a saber: (1) atua como um excelente grupo abandonador facilitando as reações de acoplamento, (2) protege temporariamente o grupo carboxílico durante a introdução do grupo azido e (3) evita uma etapa de desproteção. Desta maneira, foi planejada a preparação do composto 2-azido-3-hidróxi-butanoato de pentafluorfenila (10) como o bloco de construção contendo grupo azido.

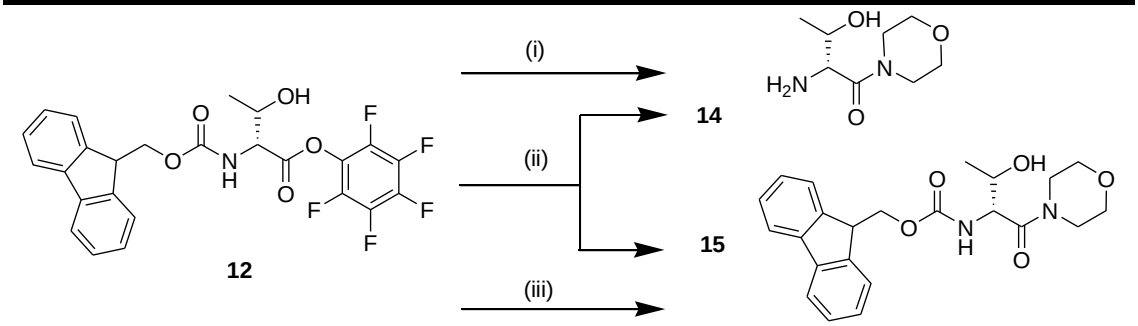
Para a preparação de **10**, a região C-terminal de *N*-9-fluorenilmetoxicarbonil-treonina (**11**) foi inicialmente protegida com o grupo pentafluorfenila, na presença de pentafluorfenol e diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) gerando o éster *N*-9-fluorenilmetoxicarbonil-treonina pentafluorfenílico (**12**) (70% de rendimento) (SLÓSARCZYK et al., 2012). A etapa seguinte correspondeu à remoção do grupo Fmoc com morfolina, porém em vez de formar o desejado éster de treonina pentafluorfenílico (**13**), gerou *N*-(morfolin-4'-il)-2-amino-3-hidroxibutanamida (**14**) (87% de rendimento) (Esquema **13**).



Esquema 13 – Rota sintética para gerar **10**. (i) DCC, Pfp; (ii) Morfolina.

Diferentes condições para a etapa de remoção do grupo Fmoc foram testadas com o objetivo de obter o composto **13** e assim prosseguir na preparação de **10** (Tabela **4**).

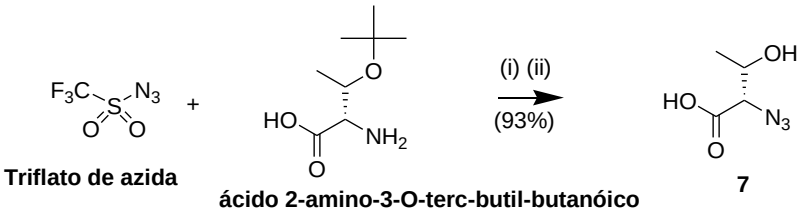
Tabela 4 – Remoção de grupo Fmoc de **12** realizada sob diferentes condições.



Condição	Base	Equivalente
i	Morfolina	4
ii	Morfolina	2
iii	Morfolina	0.9

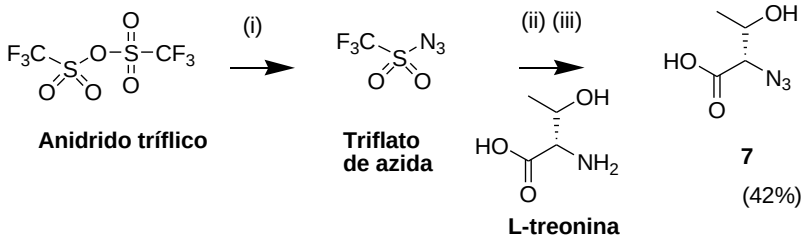
Os dados da Tabela **4** demonstram que para o composto **12**, o emprego de excesso de morfolina resultou na remoção do grupo Fmoc e deslocamento do grupo pentafluorfenila gerando o composto não desejado **14** (Tabela **4** – condições (i) e (ii)). Com intuito de gerar o composto **13**, ou seja, promover apenas a remoção de Fmoc, 0.9 equivalentes de morfolina foram utilizados (Tabela **4** – condição (iii)). Entretanto, obteve-se o composto não desejado **15**, evidenciando que a base morfolina realiza preferencialmente o deslocamento do grupo pentafluorfenila. Adicionalmente, diisopropiletilamina e trietilamina foram empregadas, sem êxito, na tentativa de remoção do grupo Fmoc. Adicionalmente, o protocolo padrão para a remoção de grupo Fmoc com a base piperidina não pode ser realizado devido à dificuldade de aquisição deste reagente em função da proibição de comercialização de piperidina no Brasil pela Polícia Federal. A partir destes dados concluiu-se a inviabilidade desta rota sintética e optou-se por outro bloco de construção contendo grupo azido.

Como estratégia alternativa, foi planejado a preparação do bloco de construção ácido 2-azido-3-hidroxibutanóico (**7**) a partir da modificação na região *N*-terminal de L-treonina com grupo azido. Existem poucos dados na literatura sobre a síntese do composto **7** (HALKES et al., 2000). De acordo com estes, a obtenção de **7** é descrita a partir da reação entre ácido 2-amino-3-O-terc-butil-butanóico e triflato de azida, seguido por remoção do grupo terc-butil (HALKES et al., 2000) (Esquema **14**).



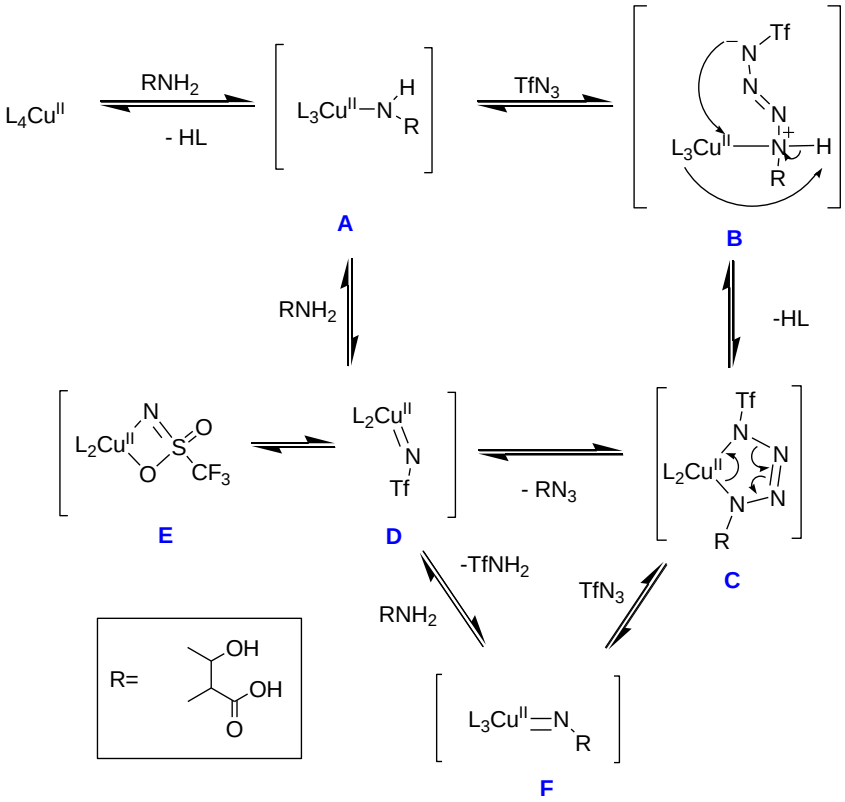
Esquema 14 – Descrição da literatura para preparar **7** a partir de ácido 2-amino-3-O-terc-butil-butanóico. (i) $CuSO_4$, K_2CO_3, H_2O, MeOH, DCM, pH 10, 16 h, TA., (ii) TFA aq. 95%.

Diferentemente da literatura, o bloco **7** foi preparado a partir do aminoácido L-treonina isento de qualquer grupo protetor. Para tal, inicialmente foi gerado triflato de azida a partir da reação entre azida de sódio e anidrido tríflico (ALPER; HUNG; WONG, 1996). Posteriormente, foi realizada a reação de diazo-transferência entre L-treonina e triflato de azida, a qual forneceu o produto desejado **7** com 42% de rendimento (Esquema **15**) (ALPER; HUNG; WONG, 1996). Apesar do menor rendimento em comparação com a estratégia descrita pela literatura, este método apresenta vantagens, uma vez que a ausência de grupo protetor poupa etapas de proteção e desproteção, gerando o produto em menor número de etapas.



Esquema 15 – Preparação do bloco de construção **7**. (i) NaN_3, DCM, H_2O, 2,5 h, 0 °C; (ii) $NaHCO_3$, $CuSO_4$, MeOH, H_2O, DCM, 48h, TA; (iii) resina Dowex® H^+ (50WX8-400).

O mecanismo da reação de diazo-trasnferência é desconhecido, porém Nyffeler e cols. (2002) o propuseram conforme Esquema **16**. Segundo esta proposta, inicialmente, sob condições básicas, ocorre complexação do amino com o cobre catalítico (**A**). Devido à extrema eletrofilicidade do triflato de azida, o nitrogênio do amino realiza ataque nucleofílico no nitrogênio do triflato de azida (**B**), seguido por uma desprotonação e formação de um tetrazeno estabilizado pelo cobre (**C**). O rompimento do complexo representado em **C**, via ciclo-adição dipolar reversa, forma o imino complexo de cobre-triflilila (**D**) e o produto **7** representado por RN_3 (Esquema **16**) (NYFFELER et al., 2002).



Esquema 16 - Mecanismo da reação de diazo-transferência , para a formação de **7**, proposto por Nyffeler e cols. (2002).

Após o término da reação, a mesma foi concentrada e o sólido obtido foi submetido a uma filtração rápida em pequena camada de sílica para retenção dos sais de cobre, fornecendo um sólido branco. Devido à presença de grupos carboxila e hidroxila livres no material de partida e produto **7**, e as análises posteriores de dados espectroscópicos, suspeitou-se da possibilidade de complexação do produto **7** com o cobre utilizado na reação. A espectroscopia de infravermelho confirmou a presença do grupo azido devido à banda de absorção intensa em 2108 cm^{-1}, porém os dados de RMN ^{1}H e massas (ESI-MS) foram inconclusivos devido à presença de cobre o qual altera o tempo de relaxação de complexos orgânicos. Adicionalmente, RMN ^{13}C e ESI-MS indicaram a formação do subproduto triflato de amida (Esquema **16** – $TfNH_2$) (Figura **15**).

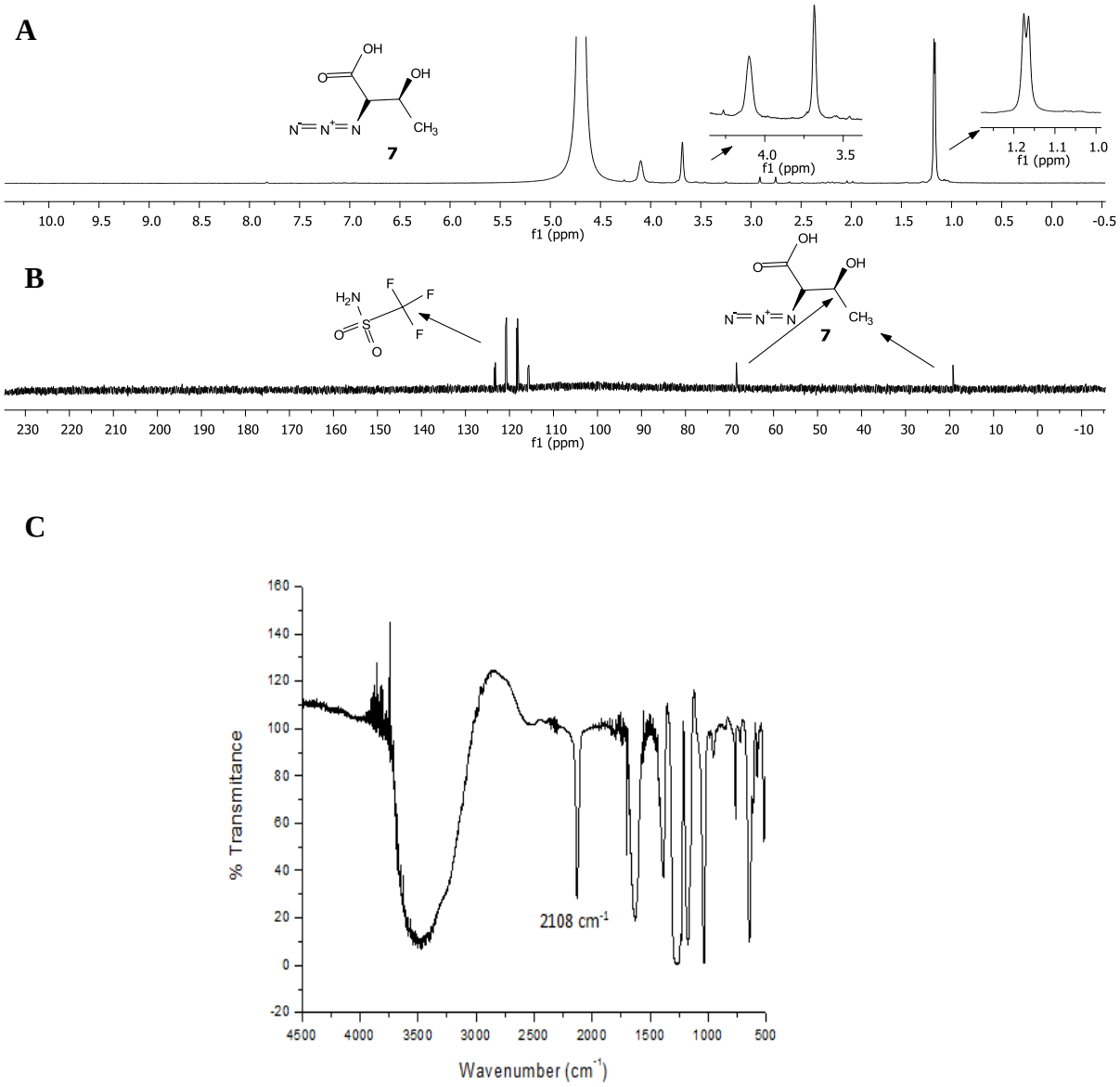


Figura 15. Análises espectroscópicas referentes ao sólido obtido após filtração da reação em sílica. (**A**) RMN ^{1}H, (**B**) RMN ^{13}C, (C) Espectroscopia de infravermelho.

Com intuito de investigar a possibilidade de complexação do cobre ao produto **7**, o sólido branco obtido após filtragem em sílica foi submetido ao tratamento com a resina catiônica Dowex® (50WX8-400) visando a troca de cobre complexado com o produto por H^+ da resina. Após este tratamento, obteve-se um óleo pálido, o qual confirmou ser o produto desejado **7** por meio de análises espestroscópicas.

O espectro de infravermelho de **7** indicou a banda intensa em 2118 cm^{-1}, característico do grupo N_3. A análise de Ressonância Magnética Nuclear de ^{1}H de **7** apresentou um quarteto de dupleto referente ao hidrogênio de Cβ (1H) na região de 4.11 ppm, dupleto na região de 3.87 ppm referente ao hidrogênio de Cα (1H) e dupleto referente à metila em 1.07 ppm. Conforme esperado, a presença do grupo azido promoveu a desblindagem do hidrogênio Cα

de **7** em relação ao do material de partida L-treonina, o qual é observado na região de 3.4 ppm. O efeito de desblindagem também ocorre para o carbono Cα conforme observado no espectro de RMN ^{13}C (Figura **16**).

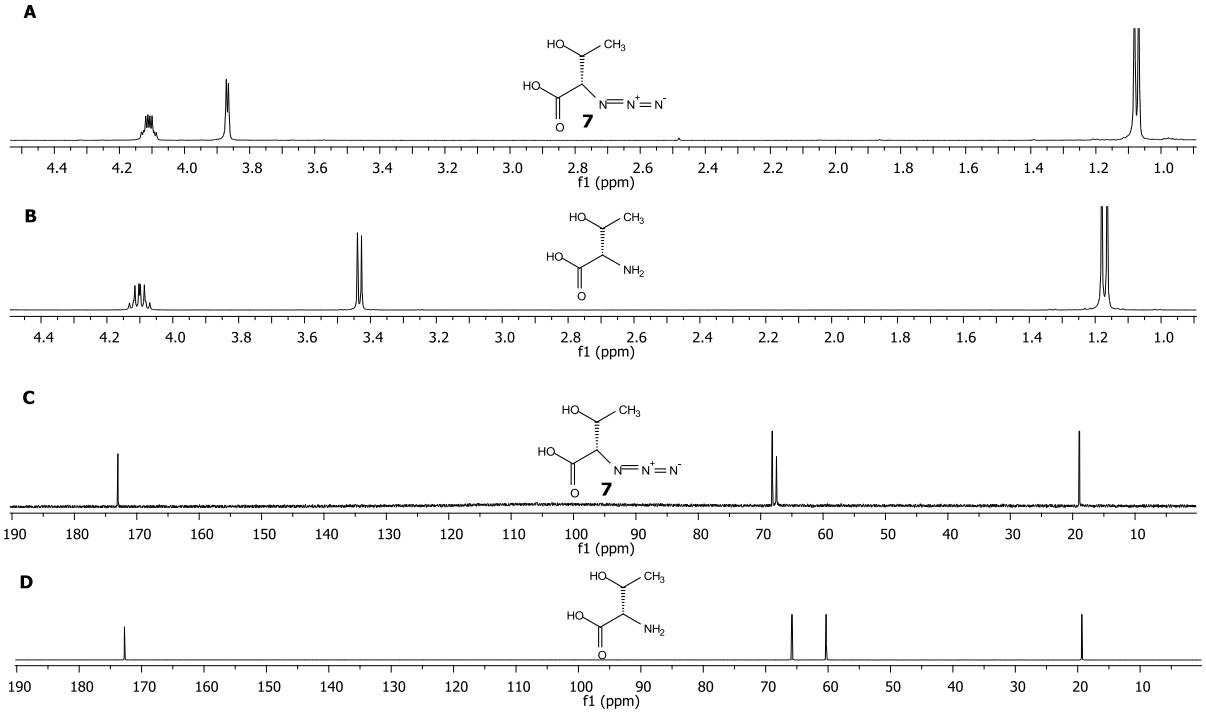
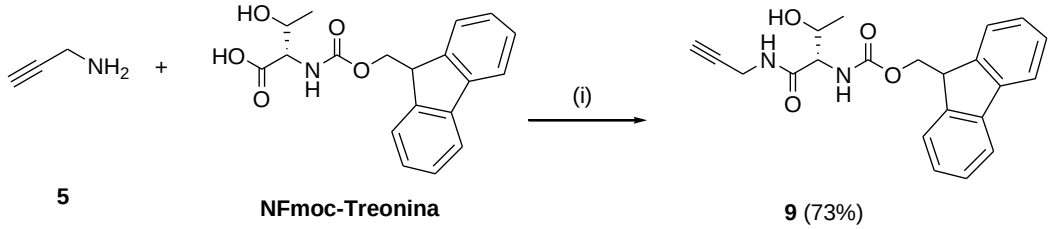


Figura 16. Análise comparativa entre **7** e L-treonina a partir dos dados de RMN ^{1}H e ^{13}C. (**A**) RMN ^{1}H de **7**, (**B**) RMN ^{1}H de L-treonina, (**C**) RMN ^{13}C do composto **7**, (**D**) RMN ^{13}C de L-treonina.

Adicionalmente, a análise de ESI-MS indicou o íon molecular $C_4H_7N_3O_3Na^+$ [M + Na^+] = 168,0380 de **7**, sendo 168,0287 o valor calculado.

5.1.2 Síntese do bloco de construção contendo grupo alcino: 2-(*N*-9-fluorenilmetoxicarbonil)-amino-3-hidróxibutan-(propin-2'-il)amida (9)

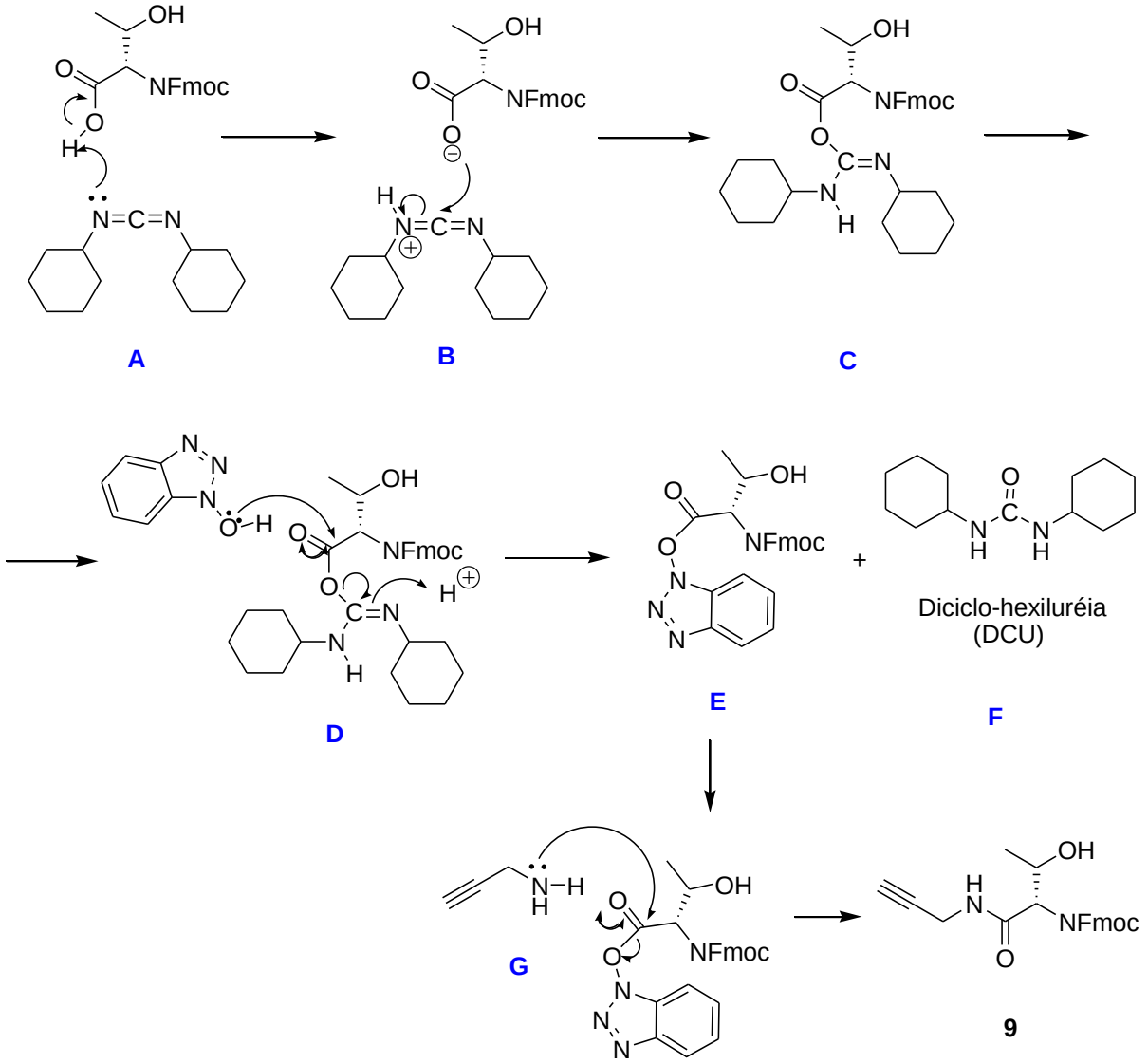
O bloco de construção contendo grupo acetilênico terminal foi planejado a partir do aminoácido *N*Fmoc-L-treonina modificado na região C-terminal com grupo alcino. Para tal, o reagente escolhido foi a propargilamina (**5**) facilmente acoplada à região carbóxi-terminal por intermédio do reagente de acoplamento diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) na presença de HOBt (Esquema **17**).



Esquema 17 – Representação da síntese de **9**. (i): DCC, HOBt, TA, 4h.

O reagente DCC é frequentemente utilizado na síntese de peptídeos por apresentar boa reatividade, além de ser economicamente mais acessível. Entretanto, a formação do subproduto diciclo-hexiluréia (DCU), insolúvel na maioria dos solventes orgânicos, inviabiliza seu emprego na síntese em fase sólida. Normalmente utiliza-se DCC acompanhado de um aditivo, tal como HOBt, com o objetivo de aumentar a taxa de acoplamento e reduzir a racemização do carbono central do aminoácido. Na reação, HOBt atua como nucleófilo auxiliar, formando um intermediário altamente reativo que rapidamente reage com o N-terminal do aminoácido, aumentando a eficiência da síntese e sumprimindo a racemização (HAM; KIM, 2004).

O mecanismo da reação envolve inicialmente a ativação da carboxila pelo reagente DCC. Inicialmente, o par de elétrons do nitrogênio do reagente DCC desprotona a hidroxila do grupo carboxílico (**A**) de *N*Fmoc-L-treonina. Em **B**, o átomo de oxigênio deste aminoácido, carregado negativamente, realiza ataque nucleofílico no carbono da ligação carbono-nitrogênio do DCC, a qual é fortemente polar, formando um intermediário correspondente ao derivado do aminoácido com a carboxila ativada (**C**). O átomo de oxigênio do HOBt realiza então um ataque nucleofílico no carbono desta carboxila ativada (**D**), resultando na formação de um segundo intermediário do aminoácido com carboxila ativada (**E**) e liberação do subproduto DCU (**F**). O carbono carbonílico de **D** sofre o ataque nucleofílico do grupo amino da propargilamina (**G**), levando a liberação do HOBt e a formação do produto acetilênico **9** (Esquema **18**) (CLAYDEN; GREEVS; WARREN, 2012).



Esquema 18 – Mecanismo de reação para formação de **9** na presença de DCC e HOBt.

O rendimento da reação de acoplamento de *N*Fmoc-L-treonina com propargilamina empregando-se DCC/HOBt foi comparado com a reação envolvendo outros reagentes de acoplamento mais comumente utilizados em fase sólida (PyBOP/HOBt/DIPEA) (CHAN; WHITE, 2000). O emprego de DCC/HOBt resultou em maior rendimento de **9** (73%), quando comparado à PyBOP/HOBt/DIPEA (50% de rendimento).

A estrutura de **9** foi confirmada por RMN ^{1}H, RMN ^{13}C, e ESI-MS. O espectro de RMN ^{1}H indicou, além dos sinais comuns entre **9** e o material de partida, a presença de tripleto (1H) na região de 2.20 ppm, característico do hidrogênio acetilênico (H-4'), e de simpleto (1H) referente ao grupo –NH da ligação amida (H-1') na região 6.78 ppm (Figura **17**). Adicionalmente, a formação da ligação amida também pode ser confirmada por RMN ^{13}C devido à presença do sinal em 170,87 ppm referente à carbonila de grupo amida.

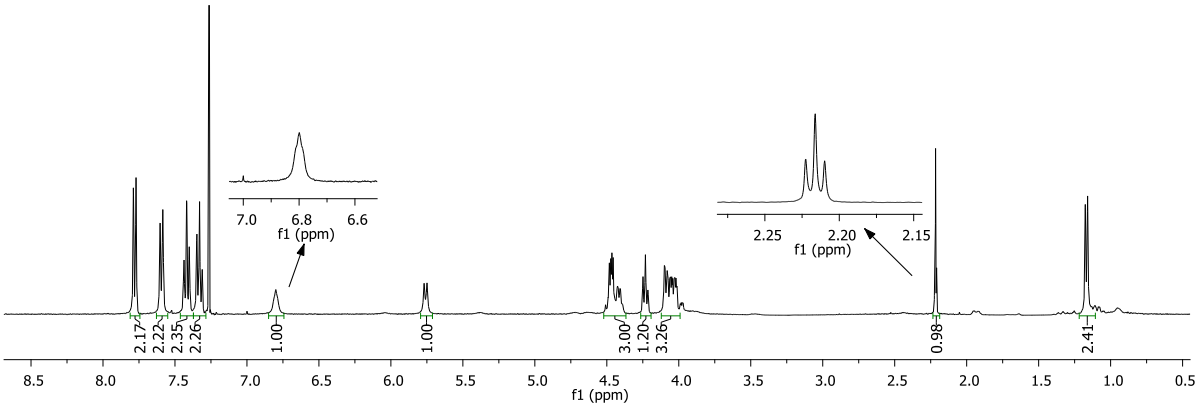
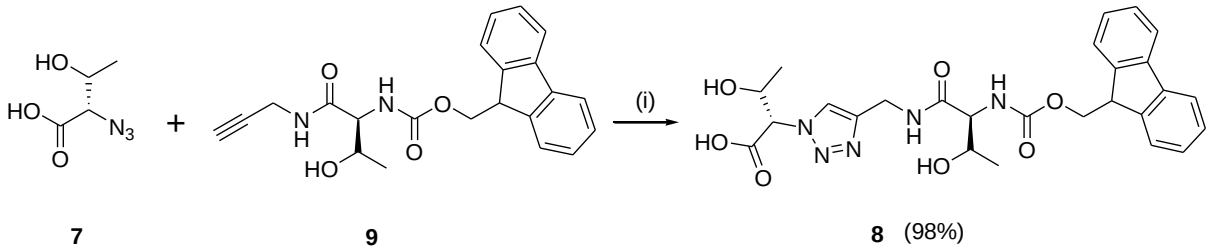


Figura 17. Análise RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) de **9** evidenciando os sinais característicos do produto **9**, tripleto (*t*) referente ao hidrogênio acetilênico em 2,20 ppm e simpleto referente à –NH da ligação amida em 6,78 ppm.

A análise de ESI-MS indicou os íons moleculares $C_{22}H_{22}N_2O_4H^+$ [M + H$^+$] = 379,1583; $C_{22}H_{22}N_2O_4Na^+$ [M + Na$^+$] = 401,1402; e $C_{22}H_{22}N_2O_4K^+$ [M + K$^+$] = 417,1132.

5.1.3 Síntese do dipeptídeo 8 a partir da reação de ciclo-adição azido-alcino 1,3 dipolar catalisada por cobre (I) entre 7 e 9

O dipeptídeo **8** foi preparado a partir da reação de ciclo-adição azido-alcino 1,3 dipolar catalisada por cobre I entre os precursores azido **7** e alcino **9** de treonina. A reação ocorreu sob radiação microondas (150W/70 °C) em 5 minutos, gerando o produto **8** com excelente rendimento (98%) (Esquema **19**) (ARAGÃO-LEONETTI et al., 2010).

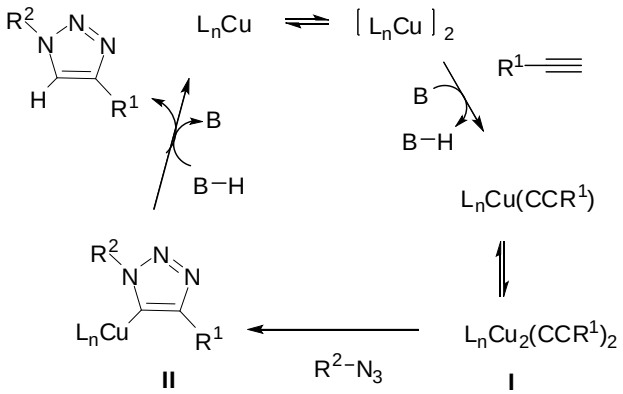


Esquema 19 – Síntese do modelo dipeptídeo de treonina contendo grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído (**8**). (i) $CuSO_4$, Ascorbato de sódio, DMF, 150W, 70 °C, 5 min.

A ciclo-adição 1,3-dipolar é uma reação que envolve um dipolarófilo, neste caso, o alcino terminal, com um composto 1,3-dipolar, grupo azido, resultando em heterociclo de 5-membros. Nesta reação há a participação de 2 elétrons π do grupo azido e 4 elétrons do alcino em um periciclo concertado. Sendo assim, diz-se reação de ciclo-adição [2_s+4_s], em relação ao número de elétrons envolvidos, ou [2+3], em relação ao número de átomos participantes

(BOCK et al., 2006; HIMO et al., 2005; MELDAL; TORNOE; 2008; RODIONOV et al., 2005).

O cobre é um metal de transição, o qual possui configuração eletrônica [Ar] $3d^{10}$ $4s^{1}$. Espécies de Cu(I) geradas *in situ*, a partir de ascorbato de sódio e Cu (II), formam um complexo π com a tripla ligação de um alcino terminal. Estudos têm demonstrado que a reação é de segunda ordem com relação ao Cu. Os ligantes utilizados são instáveis e fracamente coordenados. As três etapas gerais do mecanismo da reação de ciclo-adição 1,3-dipolar catalisada por Cu(I) é apresentada no Esquema **20** e envolve: ativação do alcino terminal tal como Cu·acetileno **I**, cliclização formal para fornecer um intermediário Cu·C(triazol) **II** e quebra da ligacão Cu-C para dar o composto triazólico e regenerar o catalisador. Sendo que, cada etapa pode envolver espécies de cobre multinucleares (RODIONOV et al., 2007). Adicionalmente, é proposto que a formação de **II** envolva, inicialmente, a substituição de um dos ligantes de Cu pelo átomo de nitrogênio interno do grupo azido, ligado a R^2 e, posteriormente, o nitrogênio terminal do azido ataque o C-2 (ligado a R^1) do acetileno (BOCK et al., 2006; HIMO et al., 2005; RODIONOV et al., 2005). No entanto, este mecanismo envolveria a formação de um metalociclo de 6 membros pouco comum, o qual não é considerado na descrição mais recente para formação da espécie **II** (RODIONOV et al., 2007).



Esquema 20: Mecanismo reacional proposto para a reação de cicloadição 1,3 dipolar formando 1,2,3-triazóis 1,4-dissubstituídos.

Na literatura, a maioria dos métodos envolvendo reações CuAAC não empregam radiação microondas. Geralmente, reações CuAAC submetidas à radiação microondas apresentam tempo reacional de poucos minutos a cerca de 1 hora, enquanto a ausência de radiação microondas resulta em tempo reacional superior à 16 horas (KAPPE, 2004). De fato, a reação para obtenção de **8** completou-se em apenas cinco minutos.

O emprego de radiação microondas em síntese orgânica foi descrito primeiramente por Gedey et al. (1986) e Majetich et al. (1986). Entretanto, a aplicação desta nova ferramenta enfrentou lento processo de desenvolvimento devido à falta de controle, reprodutibilidade, e de conhecimentos sobre a inflamabilidade de solventes em radiação microondas. A partir do final da década de 90 houve aumento considerável de trabalhos empregando radiação microondas como uma ferramenta útil na síntese orgânica e com comprovada eficácia em reduzir o tempo reacional e a formação de subproduto, aumentar o rendimento e melhorar a reprodutibilidade (KAPPE, 2004).

Radiação microondas é uma radiação eletromagnética com frequência de 0,3 à 300 GHz, sendo empregado na síntese orgânica a frequência de 2,5 GHz . A aplicação de radiação microondas em reações químicas justifica-se pelo aquecimento eficiente de materiais por meio do efeito "aquecimento dielétrico". Em outras palavras, depende da capacidade de um material específico, no caso reagente ou solvente, de absorver energia microondas e convertê-la em calor. Este aquecimento ocorre por dois mecanismos: polarização dipolar e condução iônica. Desta maneira, a radiação de uma reação, sob frequência microondas, resulta em dipolos ou íons alinhados ao campo elétrico aplicado. Como o campo elétrico oscila, os dipolos ou íons tendem a se realinhar ao campo elétrico oscilante e neste processo perdem energia sob a forma de calor, devido aos choques moleculares e perdas dielétricas. Portanto, a quantidade de calor gerada neste processo está diretamente relacionada com a capacidade da matriz de se realinhar com a frequência do campo aplicado. Se o dipolo não possuir tempo suficiente para se alinhar ou se reorientar rapidamente com o campo aplicado, o aquecimento não ocorre. Os reatores microondas, empregados atualmente, ao operarem na frequência de 2,5 GHz, garantem ao dipolo molecular o tempo suficiente para se realinhar ao campo aplicado e consequentemente gerar calor (KAPPE, 2004).

O aquecimento característico de um material sob radiação microondas depende das propriedades dielétricas do mesmo e é dado pela seguinte equação (KAPPE, 2004):

$$\tan\delta = \varepsilon'' / \varepsilon'$$

Onde:

$\tan\delta$ = fator de perda (capacidade de conversão de energia eletromagnética em calor a uma dada temperatura e frequência)

ε'' = perda dielétrica (eficiência para conversão da radiação eletromagnética em calor)

ε' = constante dielétrica (capacidade da molécula de ser polarizada por um campo elétrico)

O solvente empregado na preparação de **8**, DMF, apresenta tanδ = 0,161, valor considerado como médio na absorção de microondas (KAPPE, 2004).

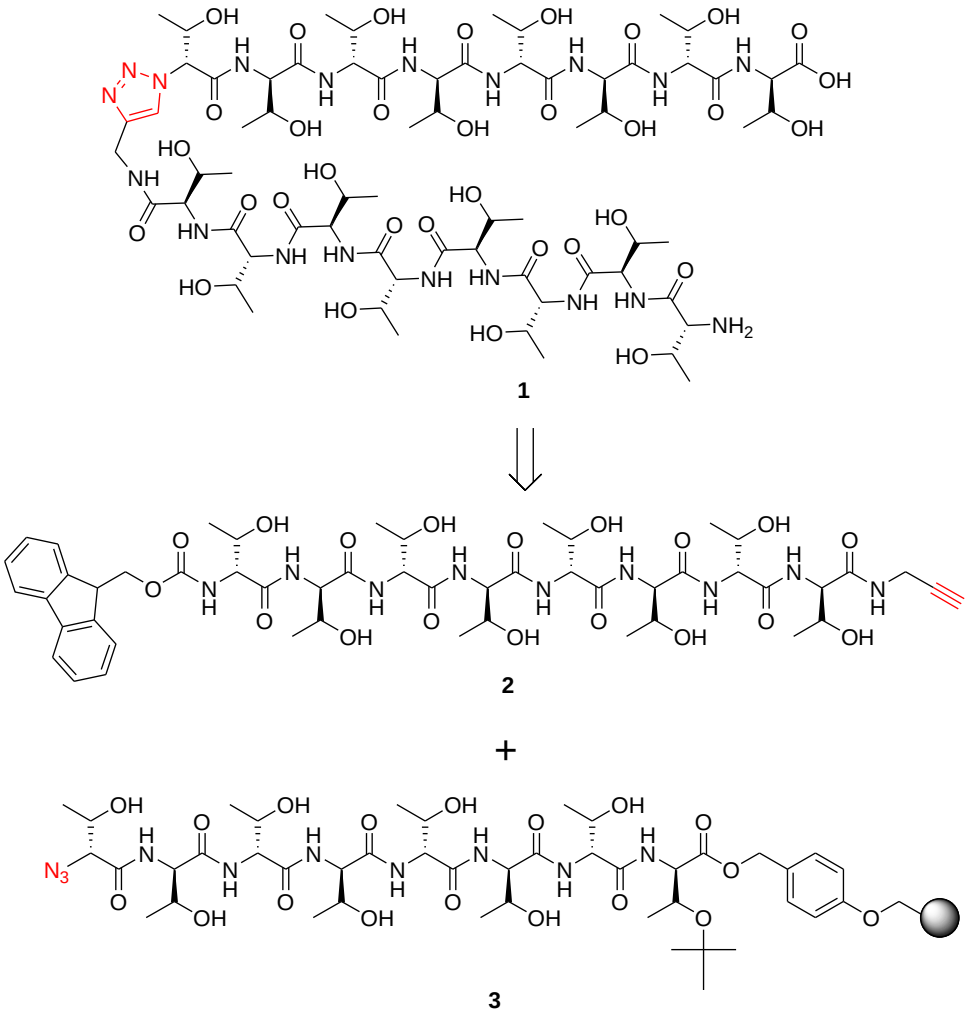
A purificação do composto **8** foi realizada por cromatografia em coluna clássica (CCC) com fase móvel DCM:MeOH (8:2/v:v). Posteriormente, a estrutura química de **8** foi confirmada pelos dados espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear e Massas (ESI-MS).

Os espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C de **8** revelaram sinais característicos do produto desejado por meio da análise comparativa com os espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C dos blocos de construção **7** e **9**. A análise de RMN ^{1}H confirmou a formação do anel 1,2,3-triazol devido à presença de um tripleto (1H) na região de 8,31 ppm referente ao hidrogênio do grupo triazólico (H-9). Ainda, deslocamentos químicos distintos entre os dois grupos metila da molécula (0,97 ppm e 0,8 ppm) também foram observados. Adicionalmente, a análise por espectrometria de massas (ESI-MS) indicou o íon molecular $C_{26}H_{29}N_5O_7H^+$ [M + H^+] = 524,2139 (valor calculado para $C_{26}H_{29}N_5O_7H^+$ [M + H^+] = 524,2137), referente à **8**.

A estabilidade dos precursores **7** e **9** e do produto dipeptídeo **8**, sob as condições empregadas, demonstrou promissora aplicabilidade deste método na preparação de peptideomiméticos, especificamente do peptídeo de interesse **1**.

5.2 Síntese do peptídeo 1

A preparação do modelo dipeptídeo **8** e de seus precursores azido **7** e alcino **9**, permitiu estabelecer as condições a serem empregadas na preparação dos peptídeos **1**, **2** e **3**. Conforme Esquemas **9** e **10** descritos na Seção **4** (Planejamento sintética), os precursores **4** e **6**, respectivamente relacionados aos peptídeos alcino **2** e azido **3**, foram preparados pelo método de síntese em fase sólida e serão abordados primeiramente. Posteriormente, os resultados obtidos na preparação de **2** e **3** serão discutidos. Por fim, a preparação do peptídeo **1**, cuja retrossíntese está descrita no Esquema **8**, será abordada.



Esquema 8. Retrossíntese do peptídeo **1**.

5.2.1 Síntese dos peptídeos *N*H-Fmoc-(Thr)$_8$-OH (4) e *N*H$_2$-(Thr)$_6$-Thr(tBu)-Resina Wang (6)

A síntese dos peptídeos *N*H-Fmoc-(Thr)$_8$-OH (**4**) e *N*H$_2$-(Thr)$_6$-Thr(tBu)-Resina Wang (**6**) foi realizada em fase sólida, uma vez que, esta estratégia apresenta vantagens em relação à síntese em solução. A síntese em fase sólida permite obter o produto utilizando excesso de reagentes para aumentar o rendimento e este mesmo excesso junto aos subprodutos da reação são facilmente removidos durante as sucessivas etapas de lavagens da resina. Adicionalmente, há perda mínima de produto o qual permanece ligado à resina, além de diversas outras vantagens como melhora da quimiosseletividade de determinadas reações e obtenção de compostos análogos em série. Entretanto, para obter bons resultados, devem ser observados alguns fatores, tais como, a resina a ser empregada e o primeiro aminoácido a ser acoplado. A

resina empregada foi de Wang, a qual é um suporte padrão para síntese de peptídeos em fase sólida devido à facilidade de manipulação e à clivagem seletiva em presença de ácido trifluoracético. A resina Wang-FmocThr(*t*Bu), comercializada pela NovaBiochem e com capacidade para acoplar 0,54 mmol de aminoácido por grama de resina foi a resina escolhida para preparar **4** e **6** (Figura **18**). A opção de se empregar esta resina com um aminoácido treonina, previamente acoplado, baseia-se no fato de que a etapa de acoplamento do primeiro aminoácido à resina é bastante importante para se garantir bons rendimentos. A taxa de acoplamento do primeiro aminoácido a ser ligado à resina pode ser baixa devido ao impedimento estéreo imposto pelo polímero, ocasionando no comprometimento do rendimento global do peptídeo (AMBLARD et al., 2006; CHAN; WHITE, 2000).

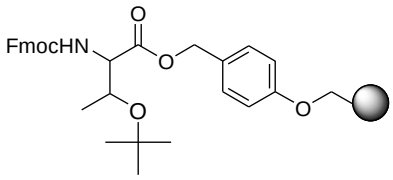


Figura 18. Resina Wang-FmocThr(*t*Bu).

O suporte polimérico é descrito por Marquardt e Lima (2001) como uma rede complexa formada por polímeros retilíneos compostos por unidades monoméricas constantes. Os feixes desta rede estão interligados transversalmente através de um monômero bi-funcional (ligações cruzadas, cross-linking) formando, na maioria delas, uma esfera (bead), de tamanho padronizado, conforme Figura **19**, a qual ilustra a resina Wang (MARQUARDT; LIMA, 2001).

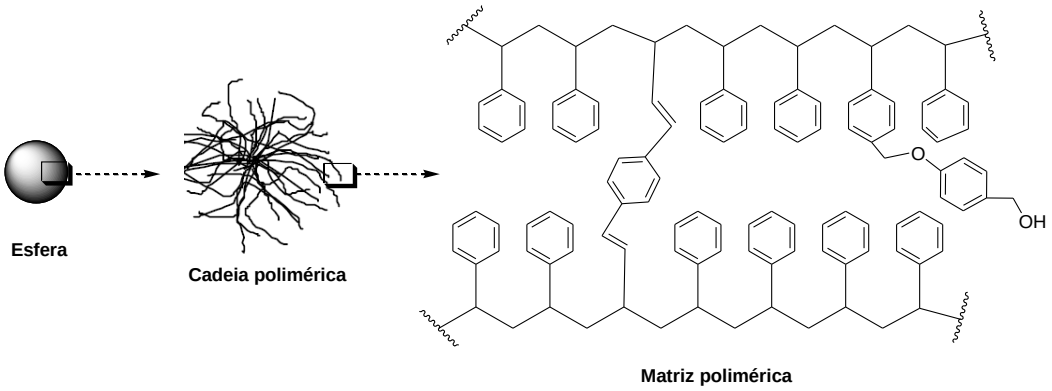


Figura 19. Visualização progressiva da resina Wang, a partir de uma unidade macroscópica, representada por uma esfera, até a estrutura química do polímero. Adaptado de Marquardt e lima (2002).

Os polímeros mais empregados são aqueles derivados de um arcabouço constituído por poliestireno-divinilbenzeno (PS/DVB), poliestireno-polietilenoglicol (PS/PEG) e poliestireno-poliamida (PolyHipe). A resina Wang é constituída pelo polímero polivinilbenzeno/poliestireno, bem como as resinas Merrifield, DHP e tritil (MARQUARDT; LIMA, 2001) (Figura **20**).

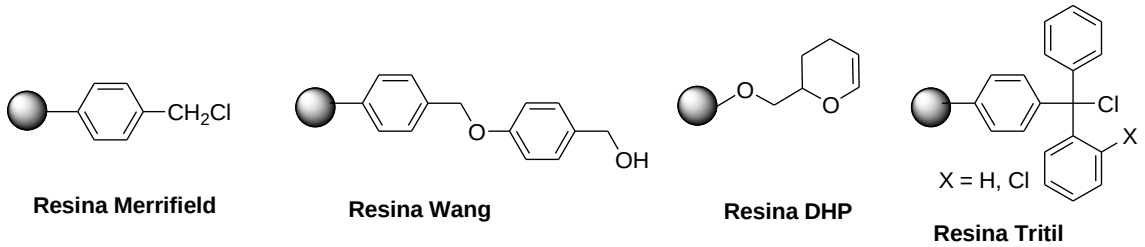


Figura 20. Resinas derivadas de polivinilbenzeno/poliestireno mais comumente empregadas.

As etapas da síntese em fase sólida foram realizadas manualmente com auxílio de um frasco cilíndrico representado pela Figura **21**. Este frasco apresenta uma placa sinterizada a qual retém a resina utilizada e torneira de três saídas na parte inferior para agitação da mistura reacional por meio de borbulhamento e, posteriormente, para filtração e remoção dos excessos reacionais e impurezas.

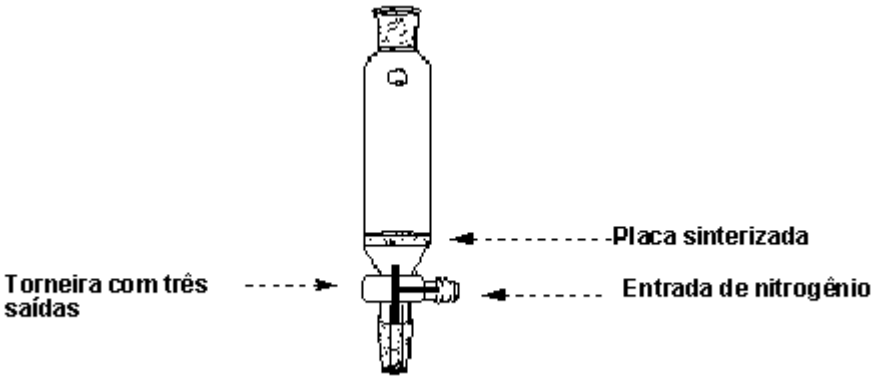
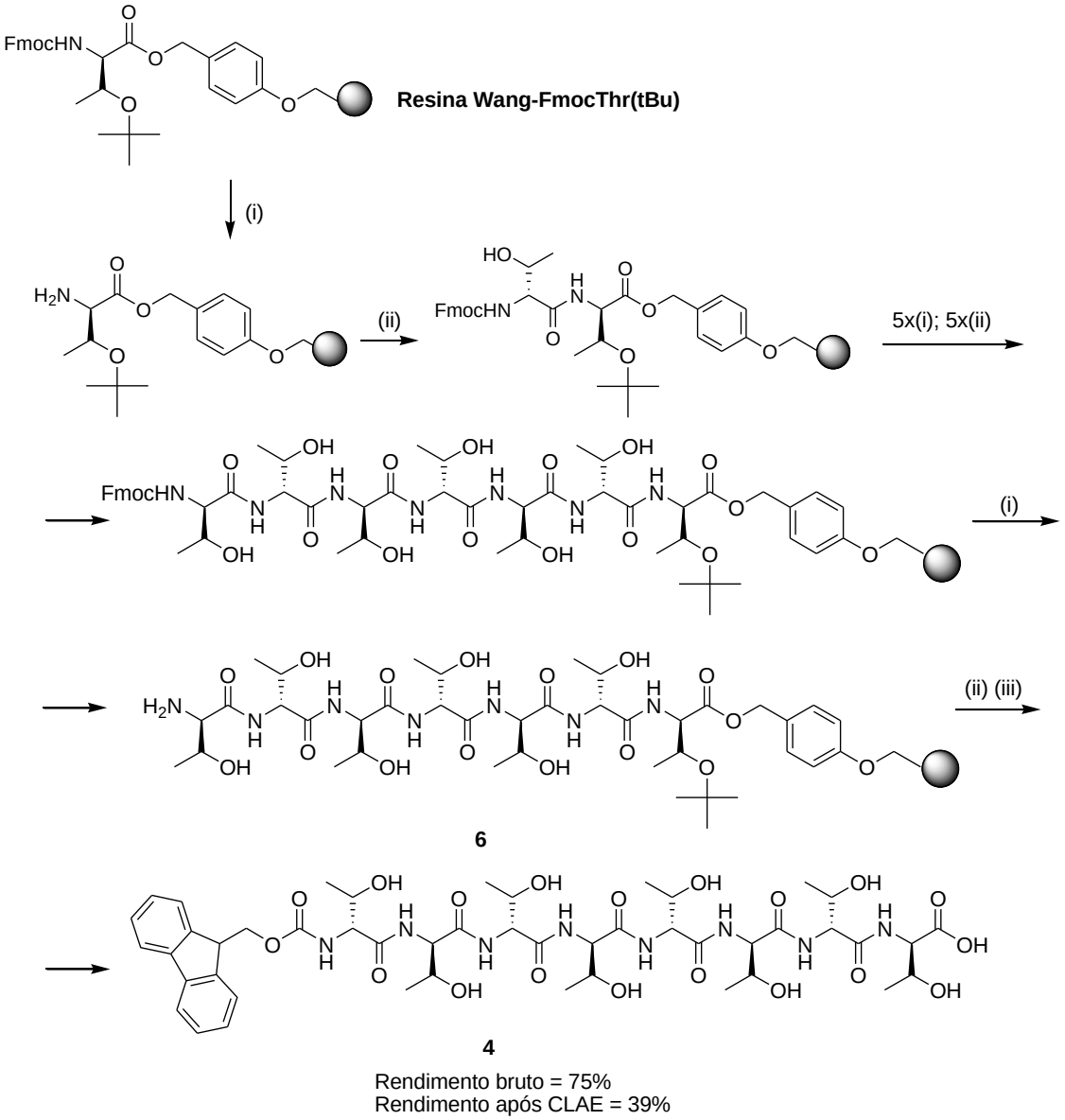


Figura 21. Frasco utilizado para síntese em fase sólida

Reação de acoplamento

Para o acoplamento dos aminoácidos à cadeia nascente do peptídeo foi empregado DMF, o reagente de acoplamento PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tripirrolidinofosfônio), o aditivo HOBt (1-hidróxi-benzotriazol) para evitar reação de enantiomerização do aminoácido e a base DIPEA (*N*,*N*-diisopropiletilamina) (Esquema **21**). O procedimento utilizado para as reações de acoplamento empregando o frasco cilíndrico está ilustrado na Figura **22**.



Esquema 21 – Síntese em fase sólida dos compostos **4** e **6**. (i) Morfolina; (ii) PyBOP, HOBt, DMF, DIPEA e aminoácido *N*-Fmoc-treonina; (iii) TFA 80% em água.

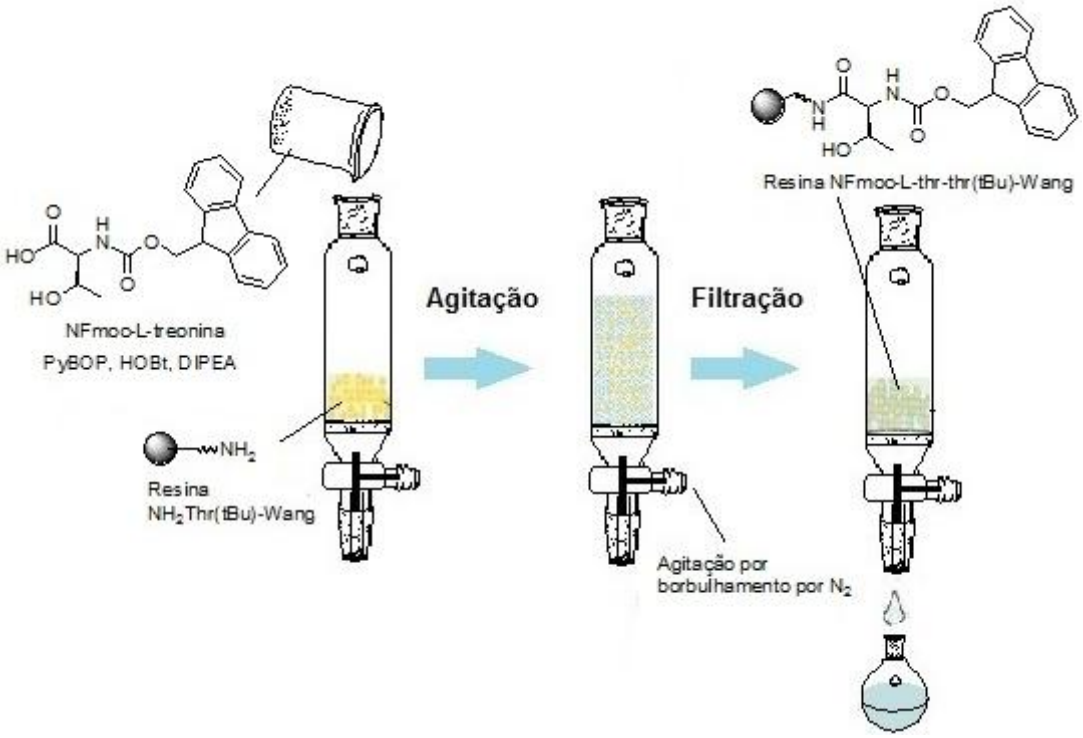
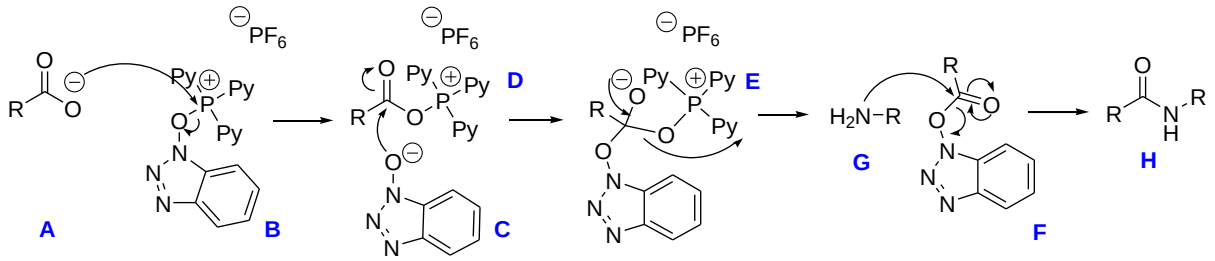


Figura **22**. Procedimento realizado para as reações de acoplamento empregando frasco cilíndrico.

O mecanismo da reação de acoplamento envolve, primeiramente, a desprotonação pela base DIPEA do ácido carboxílico do aminoácido a ser introduzido no elongamento da cadeia peptídica (**A**), levando o átomo de oxigênio deste aminoácido, carregado negativamente, a atacar o íon fosfônio da molécula de PyBOP (**B**). Em seguida, o grupo hidróxibenzotriazol da molécula de PyBOP é liberado (**C**) permanecendo a forma de éster tripirrolidinofosfônio (**D**). O grupo hidróxi-benzotriazol (**C**), anteriormente liberado, possui caráter nucleofílico suficiente para atacar o carbono carbonílico do aminoácido, deslocando o grupo oxitripirrolidinofosfônio (**E**). O éster resultante formado entre o aminoácido e o hidróxibenzotriazol (**F**) desloca o grupo tripirrolidinofosfônio e o grupo amino terminal do aminoácido ligado à resina (**G**) realiza ataque nucleofílico no carbono carbonílico liberando o grupo hidróxibenzotriazol com consequente formação da ligação amida (**H**) (CAMPO, 2007) (Esquema **22**).



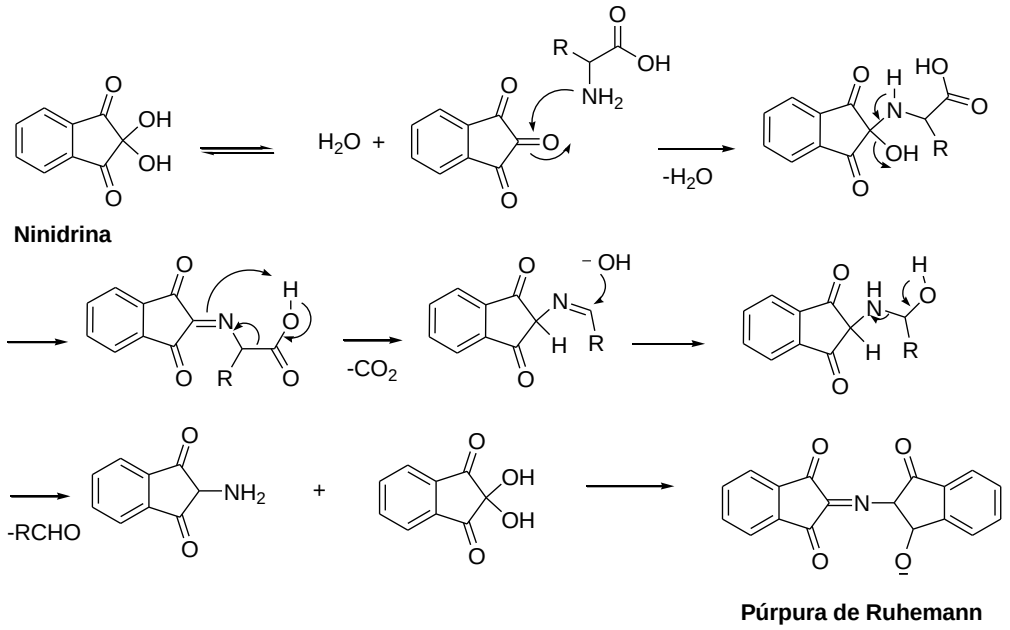
Esquema 22 – Mecanismo da reação de acoplamento envolvendo os reagentes PyBOP, HOBt e DIPEA.

Os peptídeos *N*H-Fmoc-$(Thr)_8$-OH (**4**) e NH_2-$(Thr)_6$-Thr(tBu)-Resina Wang (**6**) foram sintetizados desta forma a partir de sete e seis etapas de acoplamento, respectivamente. Em ambos foram empregados resina Wang-FmocThr(*t*Bu) e o aminoácido *N*H-Fmoc-L-treonina. O tempo médio para cada reação de acoplamento, monitorada pelo teste de *kaiser*, foi 2,5 horas.

Testes de acompanhamento da Reação de acoplamento

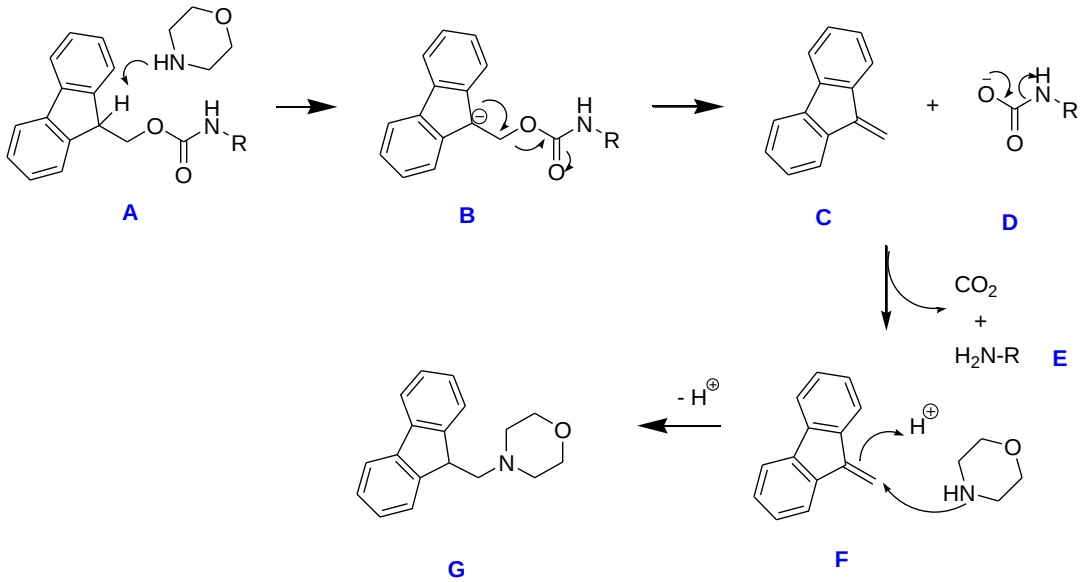
Durante a síntese de peptídeos o emprego do teste de *kaiser* e de análise por espectrofotômetro torna-se relevante para otimizar a síntese e melhorar o rendimento, sendo fundamental principalmente em acoplamento de aminoácidos contendo grupos laterais volumosos, os quais dificultam as reações de acoplamento em função do impedimento estéreo (AMBLARD et al., 2006; CHAN; WHITE, 2000).

A reação de acoplamento foi acompanhada por meio do teste de *kaiser*, a fim de detectar reações incompletas. Este teste colorimétrico de Kaiser, também conhecido como teste de ninidrina, consiste na reação do grupo amino livre com ninidrina, resultando na formação de um composto com coloração púrpura ou azulada, a depender da quantidade do produto de condensação formado (Esquema **23**). Logo, a reação de acoplamento foi finalizada depois de verificada ausência de grupo amino livre, ou seja, pela ausência de coloração azulada da resina (JELLY et al., 2010).



Esquema 23 – Mecanismo da reação entre ninidrina e grupo amino livre gerando o composto conhecido como púrpura de Ruhemann o qual apresenta coloração púrpura ou azul, dependendo da quantidade do produto de condensação.

Adicionalmente, as taxas de acoplamento foram obtidas por análise em espectrofotômetro realizada após cada etapa do elongamento da cadeia. A quebra de grupo *N*-Fmoc por morfolina, do último aminoácido acoplado à resina, leva a formação de dibenzofulveno-morfolina. Este derivado dibenzofulveno pode ser detectado à 290 nm, tornando possível a monitorização mais detalhada da reação e a identificação da taxa de acoplamento. O mecanismo de clivagem do grupo Fmoc na presença de morfolina é E1 com formação do ânion dibenzofulveno-morfolina estabilizado. Inicialmente, a base morfolina desprotona o grupo Fmoc (**A**) originando o ânion ciclopentadienílico (**B**) o qual se rearranja para o derivado dibenzofulveno (**C**) eliminando o aminoácido na forma de ânion carboamida (**D**). O ânion carboamida instável (**D**) se decompõe fornecendo dióxido de carbono e o aminoácido com grupo amino livre (**E**). Posteriormente, morfolina ataca a molécula dibenzofulveno (**F**) formando o derivado dibenzofulveno-morfolina (**G**) (CAMPO, 2007) (Esquema **24**).



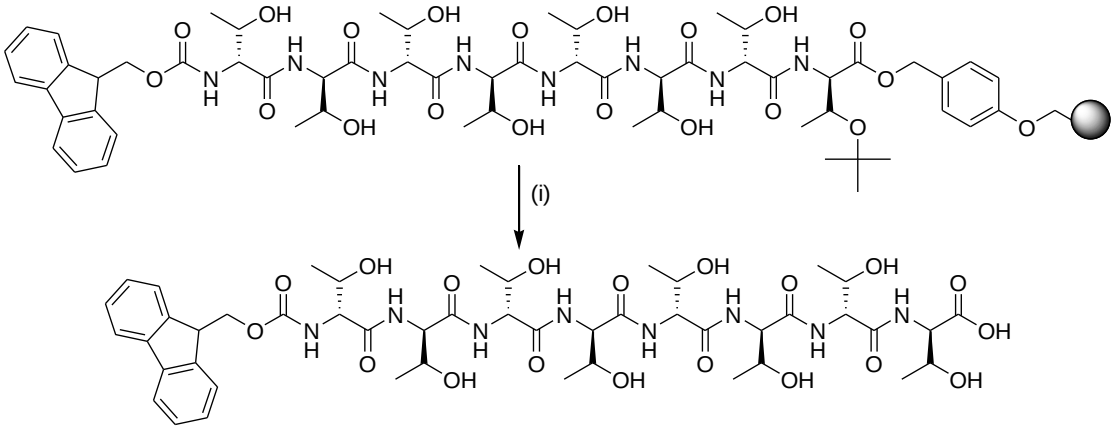
Esquema 24 – Mecanismo da reação de clivagem de grupo *N*-Fmoc por morfolina, levando à formação de dibenzofulveno-morfolina.

Para os peptídeos **4** e **6**, as taxas de acoplamento apresentaram, respectivamente, média de 0,40 mmol/g e 0,45 mmol/g durante 2,5 h de acoplamento sob agitação por borbulhamento de nitrogênio ou argônio.

Clivagem dos peptídeos da resina

Os peptídeos **4** e **6** foram clivados da resina por tratamento da resina com TFA 80% (em água). O tempo para clivagem foi 2,5 horas repetido por mais 1 hora, fornecendo um sólido

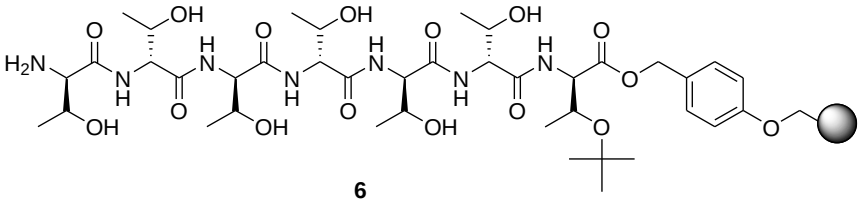
branco com rendimento bruto de 75% para **4** e 85% para **6** (Esquemas **25** e **26**). O peptídeo **6** foi clivado da resina em mínima quantidade para fins de análise, uma vez que este é precursor do derivado azido **3**, cuja preparação foi realizada em fase sólida. Por outro lado, o peptídeo **4** foi clivado da resina para liberação do seu terminal *C*-carboxílico e posterior funcionalização com propargilamina, mas mantendo o grupo protetor *N*-Fmoc na outra extremidade N-terminal para evitar reações paralelas e cruzadas entre os grupos funcionais de diversas moléculas do mesmo peptídeo.



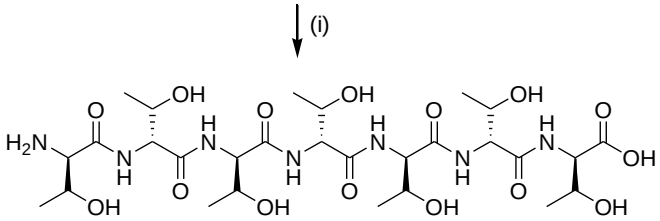
4

Rendimento bruto = 75%
Rendimento após CLAE = 39%

Esquema 25 – Clivagem do peptídeo **4** da resina. (i) TFA aq. 80%, 3,5 h.



6



6A

Rendimento bruto = 85%
Rendimento após CLAE = 61%

Esquema 26 – Clivagem do peptídeo **6** da resina fornecendo o análogo **6A**. (i) TFA aq. 80%, 3,5 h.

Análise e purificação dos peptídeos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A análise e purificação de peptídeos requer o emprego de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) devido à complexidade e ao grande peso molecular destas biomoléculas. O emprego de cromatografia líquida de fase reversa (RP-HPLC), com matriz estacionária hidrofófica *n*-octadecila (C18), tem sido a técnica de escolha. Geralmente, empregam-se dois eluentes como solventes, a saber, solvente A: água acidulada (com ácido trifluoroacético, fosfórico, perclórico, acético ou hepta-fluorobutírico) e solvente B: metanol ou acetonitrila. O ácido utilizado determina o contra-íon do sal formado entre os grupos NH_3^+ do(s) peptídeo(s), auxiliando na sua eluição. Para a detecção, o uso de 210-225 ou 275-280 nm é recomendado (CARR, 2002; MACHADO et al., 2004).

Desta forma, os peptídeos **4** e **6A** foram analisados em CLAE empregando-se coluna analítica de fase reversa C18 CLC-ODS (M) (150 mm x 4,6 mm), fluxo de 1 mL/min e gradiente 5-50% CH_3CN: 0,1% aq. TFA. Empregou-se detector de ultravioleta (UV), sendo utilizado $\lambda_{máx}$ de 214 nm e temperatura ambiente.

A análise do sólido bruto para ambos os peptídeos, por CLAE, indicou a necessidade de purificação. O tempo de retenção foi de 24,5 minutos para o peptídeo **4** e 4,5 minutos para o peptídeo **6** (Figura **23**). Diferentemente do método de análise, as purificações de **4** e **6** em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em coluna semi-preparativa de fase reversa Phenomenex Luna C18 (250 x 10 mm), fluxo de 4 mL/min e gradiente 5-50% CH_3CN: 0,1% aq. TFA. O peptídeo **4** foi obtido com 39 % de rendimento e o peptídeo **6** com 61 % .

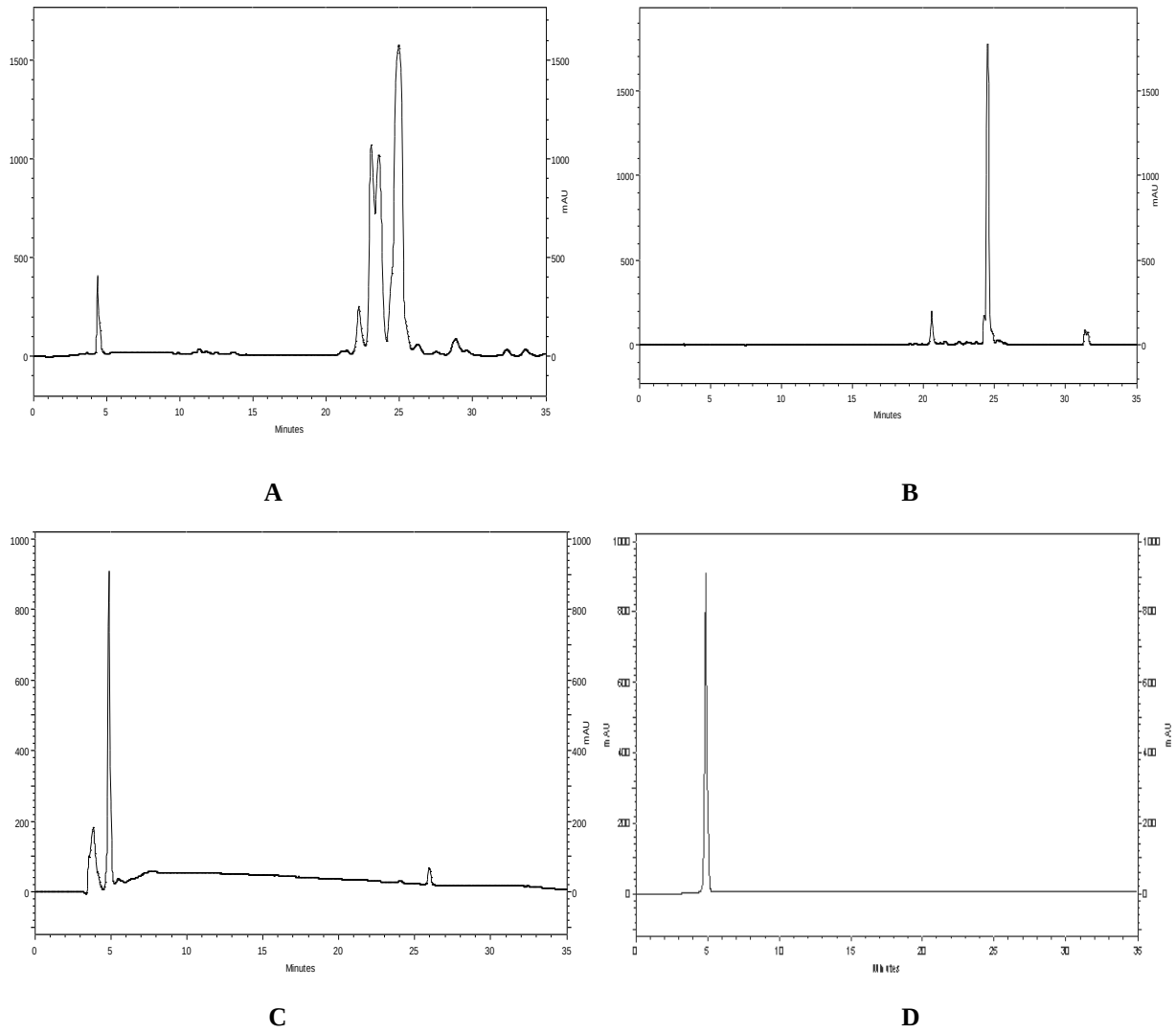


Figura 23. (**A**) cromatograma do sólido bruto obtido após clivagem do peptídeo **4** da resina, (**B**) cromatograma de **4** após purificação, (**C**) cromatograma do sólido bruto obtido após clivagem do peptídeo **6** da resina fornecendo **6A**, (**D**) cromatograma de **6A** após purificação.

Os peptídeos **4** e **6** tiveram suas estruturas confirmadas por RMN ^{1}H e espectrometria de massas (ESI-MS). Os espectros de RMN ^{1}H de **4** e **6** revelaram os sinais característicos dos produtos relacionados aos hidrogênios do grupo metila e dos correspondentes hidrogênios dos carbonos α e β de treonina. As análises por espectrometria de massas (ESI-MS) indicaram os respectivos íons moleculares, conforme descrito na Tabela **5**.

Tabela 5 - Dados ESI-MS referentes aos peptídeos **4** e **6**

	MM (g/mol)	**[M + H^{+}] calculado**	**[M + H^{+}] encontrado**	**[M + Na^{+}] calculado**	**[M + Na^{+}] encontrado**
*Peptídeo **4***	1048,4601	1049,4671	1049,4638	1071,4401	1071,4447
*Peptídeo **6***	725,3443	726,3513	726,3518	748,3243	748,3320

O espectro de RMN ^{1}H de **4**, empregando DMSO-d_6, indicou os sinais de hidrogênio referentes aos grupos -OH desblindados na região de 7.80-7.70 ppm, provavelmente devido às ligações de hidrogênio intramoleculares. Observou-se que a inserção de uma gota de água deuterada nesta amostra, preparada em DMSO-d_6, promoveu o desaparecimento dos sinais referentes à –OH (Figura **24**). Os sinais referentes aos hidrogênios de Cα e Cβ são observados sob a forma de multipleto na região de 4.40-3.90 ppm e os hidrogênios referentes aos grupos metila são observados sob a forma de dupleto em 0,95 ppm. Os hidrogênios referentes aos grupos –NH também são visualizados e estão sob a forma de multipleto em 5.05-4.85 ppm.

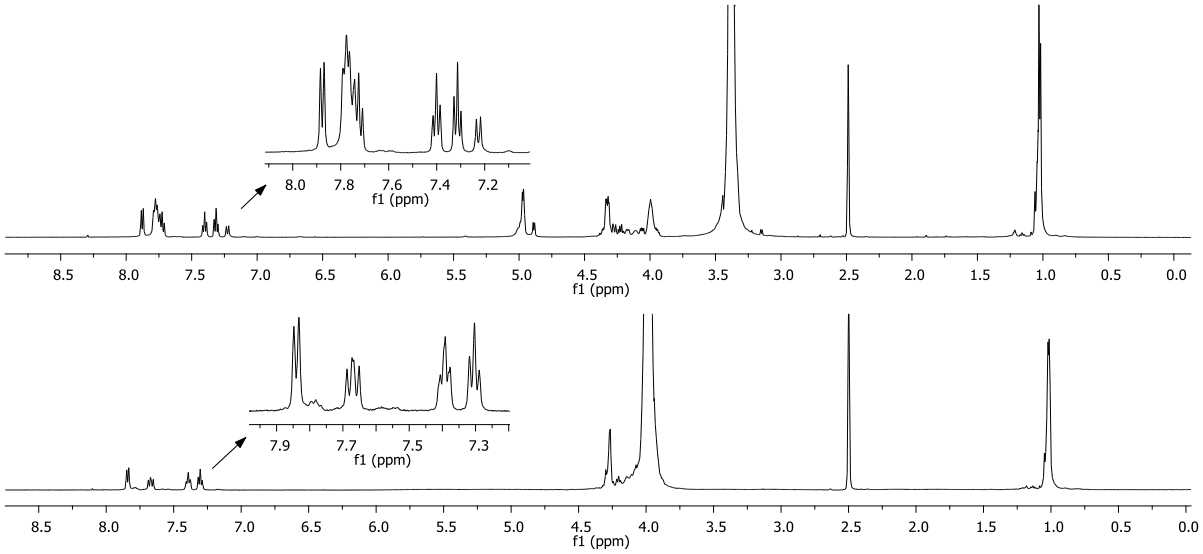
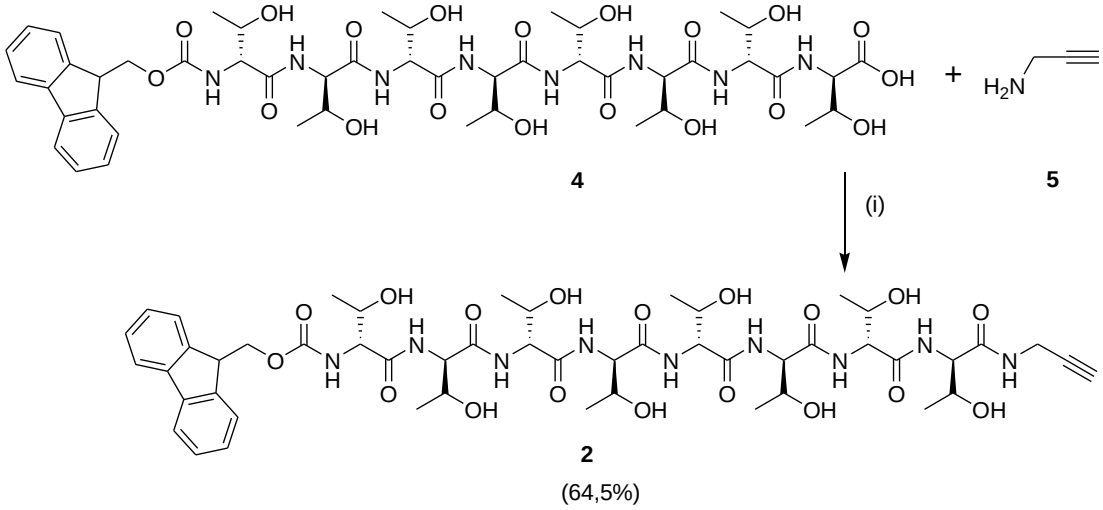


Figura 24. Espectro de RMN ^{1}H de **4**. Acima, empregando DMSO-d_6 e abaixo DMSO-d_6 com uma gota de água deuterada.

O espectro de RMN ^{1}H de **6A**, empregando água deuterada, indicou multipleto (14H) referente aos hidrogênios de Cα e Cβ em 4,42-3,86 ppm e multipleto (21H) referente aos hidrogênios dos grupos metila em 1,32-0,99 ppm.

5.2.2 Síntese do peptídeo 2

Conforme o método padronizado na preparação de **9**, o peptídeo modificado **2** foi obtido pela condensação de propargilamina (**5**) à região C-terminal do peptídeo **4**, contendo oito unidades de treonina protegido em sua extremidade *N*-terminal com grupo Fmoc, utilizando DCC/HOBt. O derivado propargílico **2** foi obtido com 64,5 % de rendimento e tempo reacional de 24 horas (Esquema **27**).



Esquema 27. Preparação do peptídeo contendo grupo acetilênico terminal na região C-terminal, intermediário **2**.(i) DCC, HOBt, TA, 24 h.

O peptídeo **2** foi purificado em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando coluna semi-preparativa de fase reversa Phenomenex Luna C18 (250 x 10 mm), fluxo de 4 mL/min, gradiente 5-50% CH_3CN: 0,1% aq. TFA, detector de ultravioleta (UV) e $\lambda_{máx}$ de 217 nm. A purificação foi conduzida à temperatura ambiente e forneceu o peptídeo **2** como um sólido branco (64,5 %). Na figura **25** está ilustrado o cromatograma da mistura bruta da reação (t=24h) e de **2**, após purificação.

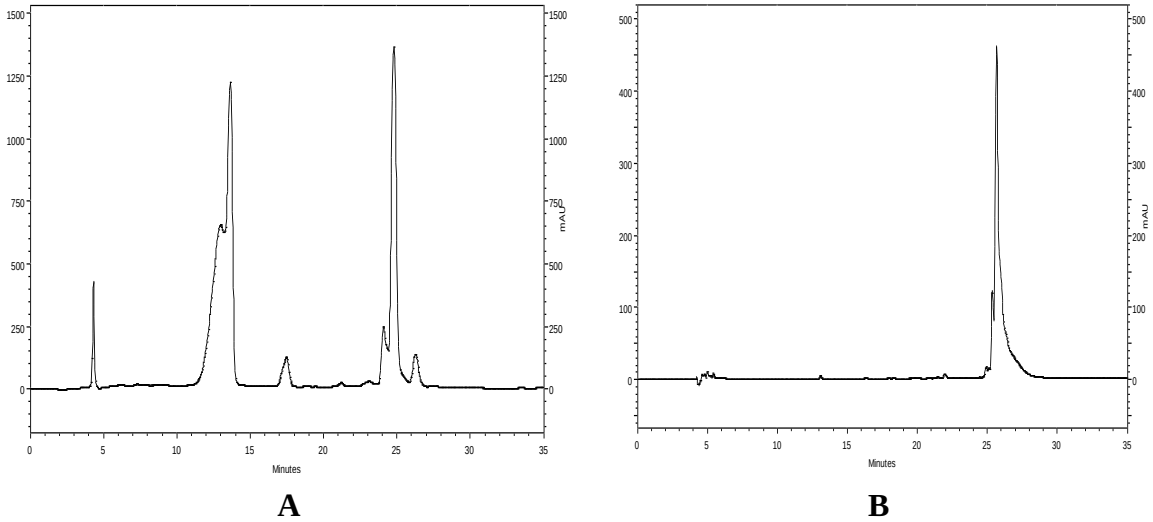


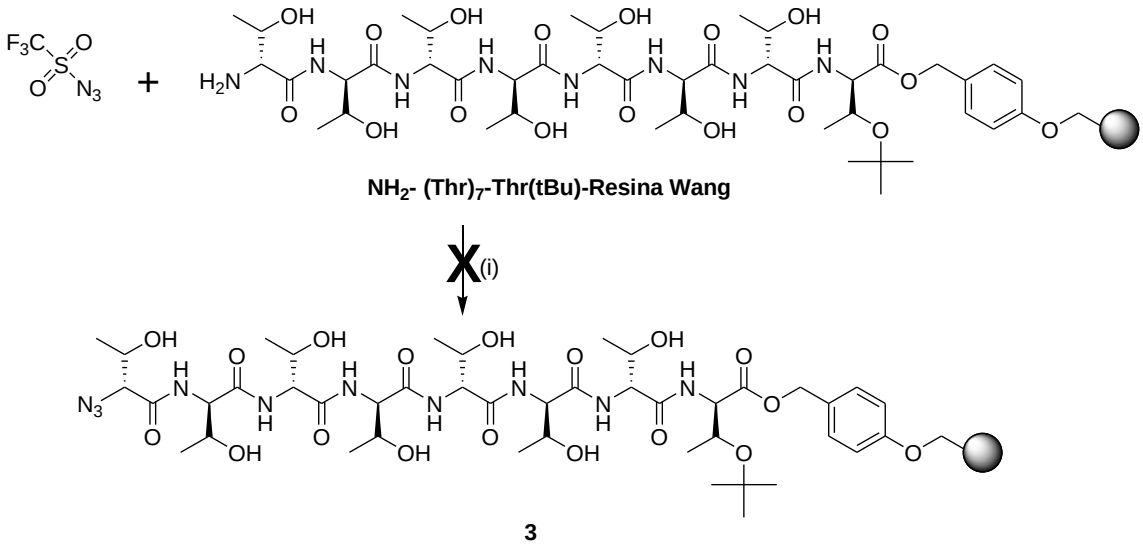
Figura 25. (**A**) Cromatograma da mistura bruta da reação (t=24h) e (**B**) Cromatograma do peptídeo **2**, tempo de retenção de 25,2 min. Análise empregando-se coluna analítica de fase reversa C18 CLC-ODS (M) (150 mm x 4,6 mm), fluxo de 1 mL/min e gradiente 5-50% CH_3CN: 0,1% aq. TFA. Todas as análises foram conduzidas à temperatura ambiente.

As análises de RMN ^1H e massas (ESI-MS) confirmaram a estrutura do peptídeo **2**. Por meio do espectro de RMN ^1H, além dos sinais comuns ao peptídeo de partida **4**, foi

possível confirmar a presença do grupo acetilênico terminal ao tripleto na região de 3,08 ppm, integrando para 1 hidrogênio. Adicionalmente, o espectro de ESI-MS indicou o íon molecular $[M + H^+]$ = 1086,4986 (valor calculado = 1086,4996) e $[M + Na^+]$ =1108,4807 (valor calculado = 1108,4814).

5.2.3 Síntese do peptídeo N_3-$(Thr)_7$- Thr(tBu)- Resina Wang (3)

Para preparar **3**, a estratégia inicialmente utilizada foi a substituição do grupo amino terminal da cadeia peptídica ligada à resina por grupo azido. Inicialmente, o método selecionado foi a reação de diazo-transferência entre triflato de azida e o peptídeo contendo oito resíduos de treonina ligado à resina de Wang (Esquema **28**).

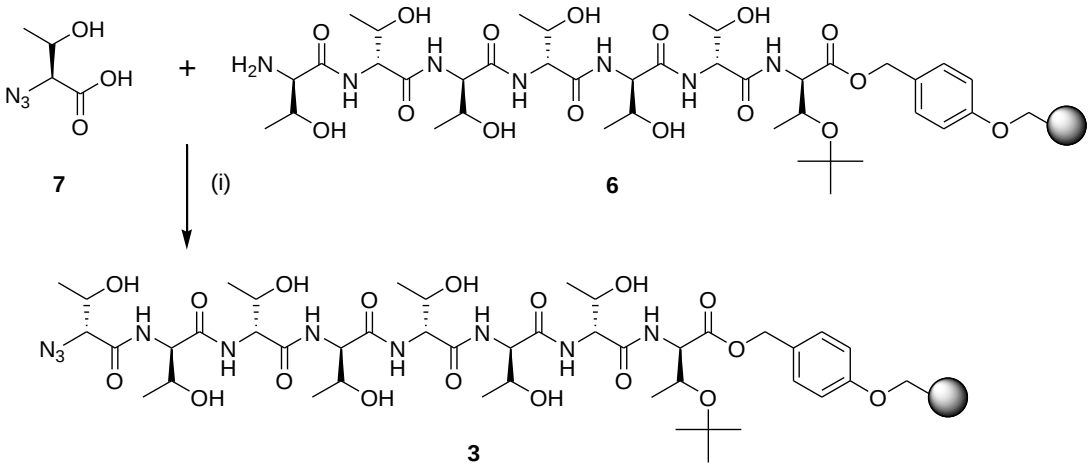


Esquema 28 – Estratégia inicial para preparação de **3**. (i) $NaHCO_3$, $CuSO_4$, MeOH, H_2O, DCM, 48 h, TA.

Entretanto, este método não foi satisfatório para preparação do peptídeo **3**. O insucesso provavelmente está relacionado com a incompatibilidade entre os solventes utilizados e a resina Wang. Dados da literatura indicam baixo índice de solvatação do polímero da resina Wang quando em solventes como diclorometano, água e metanol, os quais foram empregados na reação de diazo-transferência (MARQUARDT; LIMA, 2001). Adicionalmente, poderia haver impedimento estéreo do polímero na resina durante a reação de diazo-transferência. Com a finalidade de investigar a influência do polímero da resina na reação de substituição de grupo amino por azido, foram realizadas algumas tentativas envolvendo reações de diazo-transferência com um, dois e quatro resíduos de aminoácidos ligados à resina. No entanto, estas tentativas também não foram bem sucedidas, e a hipótese questionada acerca da

influência da resina na reação de diazo-transferência por impedimento estéreo pode ser menos relevante.

Para contornar este problema, a proposta foi alterada priorizando por adicionar o último aminoácido treonina já modificado com grupo azido à cadeia peptídica **6**. O bloco de construção ácido 2-azido-3-hidroxibutanóico (**7**), anteriormente sintetizado para obtenção do dipeptídeo modelo **8**, foi selecionado para ser incorporado à cadeia peptídica **6**, contendo sete resíduos de treonina, durante a síntese em fase sólida (Esquema **29**).



Esquema 29 – Reação de acoplamento entre **6** e **7** para formar o peptídeo **3,** contendo a função azido na sua posição *N*-terminal. (i): PyBOP, HOBt, DIPEA , 24 h, TA.

A reação de acoplamento entre **6** e **7** envolveu os reagentes PyBOP, HOBt e a base DIPEA, os quais também foram empregados na síntese dos peptídeos **4** e **6**.

Duas condições reacionais diferentes foram testadas na preparação do peptídeo **3**, sendo que, por meio do teste de *kaiser*, foi possível analisar a eficácia de cada, conforme a Tabela **6**.

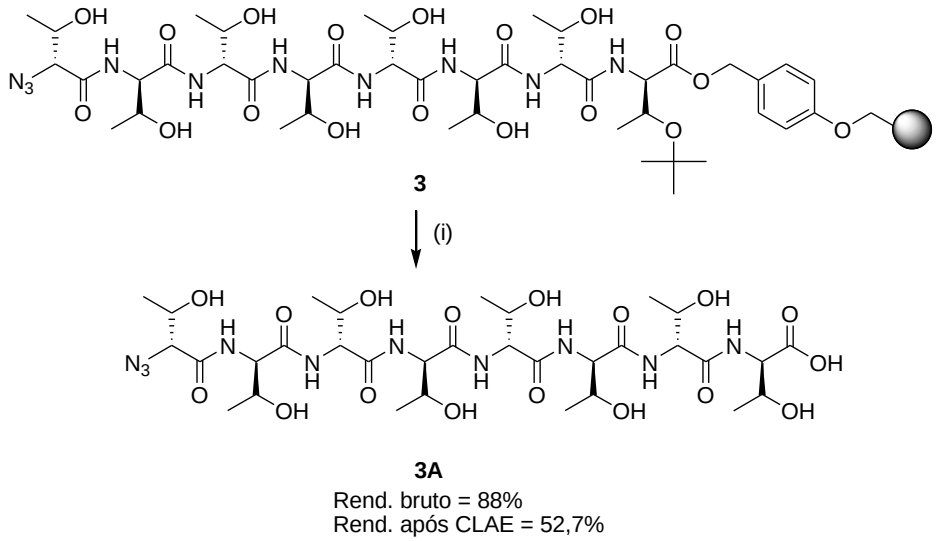
Tabela 6 – Acompanhamento da reação de acoplamento entre **6** e **7** por meio do teste de *kaiser*.

	7	**PyBOP/HOBt**	**DIPEA**	**Tempo**	**Teste de *kaiser****
Condição 1	2 eq	3 eq	4 eq	24h	Positivo
Condição 2	3 eq	6 eq	8 eq	24h	Negativo

*O teste de *kaiser* positivo indica presença de grupo amino livre e portanto reação de acoplamento incompleta. Teste negativo, ou seja, ausência de grupo amino livre, indica reação de acoplamento completa.

Para efeitos de cálculo de rendimento e análise do peptídeo **3**, certa quantidade de N_3-$(Thr)_7$- Thr(tBu)- Resina Wang foi submetida ao tratamento com TFA aq. 80% fornecendo o

peptídeo livre da resina N_3-$(Thr)_7$- Thr(tBu)-OH, identificado como **3A**, com rendimento bruto de 88% (Esquema **30**). Este mesmo peptídeo foi submetido à análise e purificação por CLAE, utilizando-se coluna analítica de fase reversa C18 CLC-ODS (M) (150 mm x 4,6 mm) e fluxo de 1 mL/min ou semi-preparativa de fase reversa Phenomenex Luna C18 (250 x 10 mm) e fluxo de 4 mL/min com gradiente 5-50% acetonitrila (CH_3CN) em 0,1% aq. TFA. O peptídeo **3** foi obtido como sólido branco, tempo de retenção de 5,3 min e com 52,7% de rendimento.



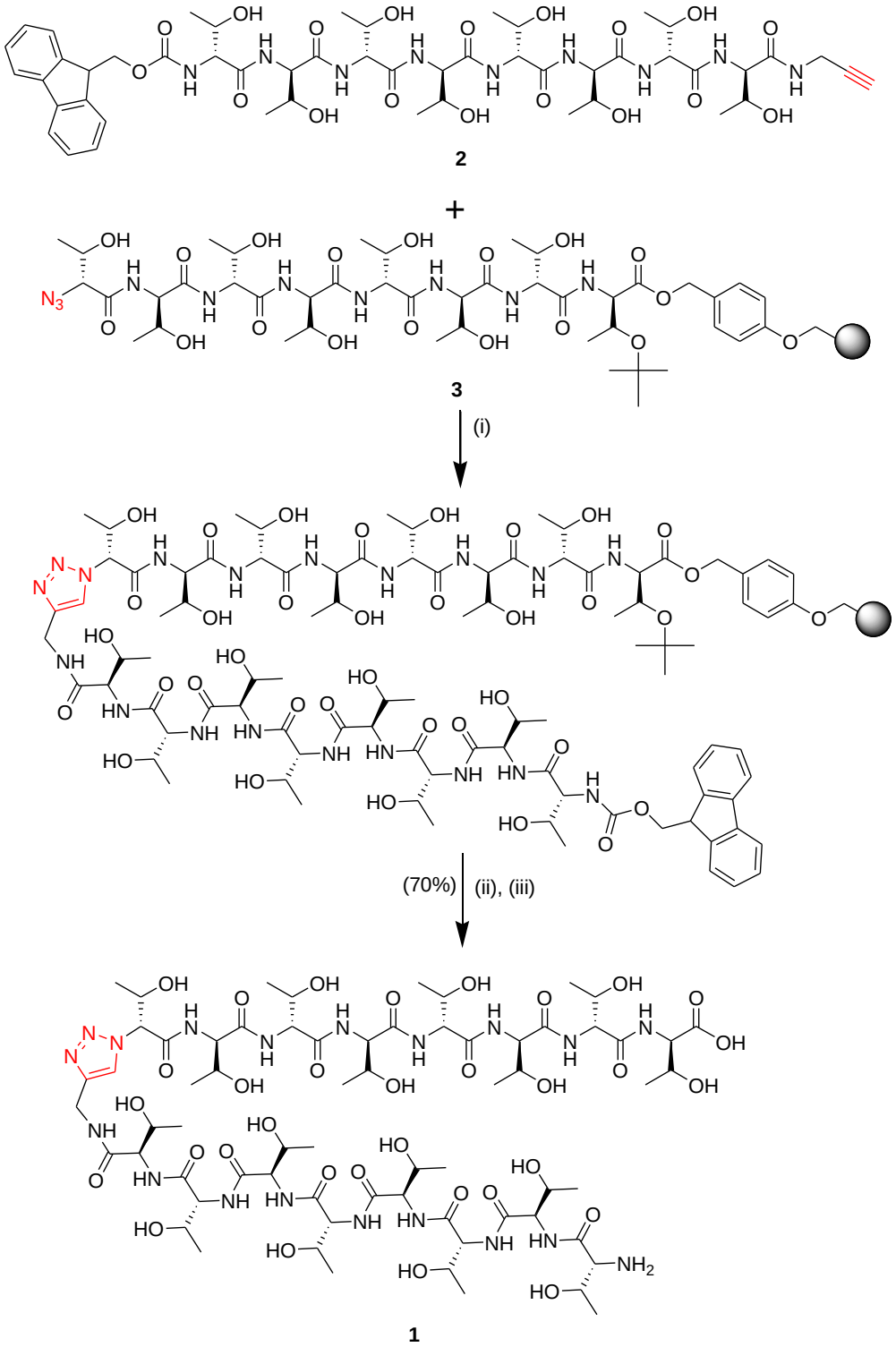
Esquema 30. Clivagem do peptídeo **3** da resina. (i) TFA aq. 80% 3,5 h.

A identificação e análise do peptídeo **3A** considerou o conjunto das técnicas IV, ESI-MS e RMN ^{1}H. A análise de infravermelho confirmou a presença de grupo azido devido à banda de absorção em 2117 cm^{-1}. Adicionalmente a espectrometria de massas (ESI-MS) confirmou a obtenção do peptídeo **3** devido aos íons moleculares $[M + H^+]$ = 853,3897 (valor calculado = 853,3895) e $[M + Na^+]$ = 875,3694 (valor calculado = 875,3722). Adicionalmente, no espectro RMN ^{1}H foram identificados os sinais característicos do produto, a saber: multipleto (16H) em 4,30-3,91 ppm referente aos hidrogênios de Cα e Cβ e multipleto (24H) em 1,15-0,92 ppm referente aos hidrogênios dos grupos metila.

5.2.4 Síntese do peptídeo 1 a partir da reação CuAAC entre 2 e 3

A síntese do peptídeo modificado contendo grupo 1,2,3-triazol foi realizada conforme o método padronizado na preparação do dipeptídeo **8**. O peptídeo **1** foi gerado a partir da

reação de ciclo-adição azido-alcino 1,3 dipolar catalisada por cobre (I) entre os peptídeos alcino **2** e azido **3**. A reação ocorreu sob radiação microondas (150W/70 °C) em 5 minutos, e após remoção de grupo Fmoc e liberação do peptídeo da resina, foi obtido o produto **1** (70% de rendimento bruto) (Esquema **31**).



Esquema 31. Preparação do peptídeo modificado **1** a partir da reação de CuAAC entre os peptídeo **2** e **3**. (i) $CuSO_4$, Ascorbato de sódio, DMF, 150W, 70 °C, 5 min; (ii) Morfolina; (iii) TFA aq. 80%, 3,5 h.

A estabilidade da resina Wang sob radiação microondas e altas temperaturas (até 155 °C), conforme descrito na literatura, viabilizou a estratégia adotada para obtenção do peptídeo **1**. O emprego de radiação microondas para a reação de CuAAC provou ser uma ferramenta útil na obtenção de peptídeos modificados contendo grupo 1,2,3-triazol, mantendo as vantagens anteriormente discutidas na preparação do dipeptídeo **8**, tais como reduzido tempo reacional. Diferentemente, Le Quement et al. (2011) não empregaram radiação microondas durante as reações CuAAC e obteve a biblioteca de compostos miméticos do peptídeo Smac AVPI com tempos reacionais variando entre 20-48 horas.

Adicionalmente, em função da possibilidade de acúmulo de cobre na rede polimérica, tornou-se necessário, após a reação de CuAAC, a etapa de lavagem com *N*-dietilditiocarbamato de sódio, o qual se complexa com o cobre e consequentemente elimina traços deste metal ainda retidos na resina. Por fim, a etapa de clivagem procedeu com o emprego de TFA aq. 80% durante 3,5 horas, fornecendo o peptídeo **1** bruto (70%).

A análise de RMN ^{1}H (D_2O, 500 MHz) do peptídeo **1** bruto indicou a formação do produto desejado devido a presença de um multipleto na região de 8,12 ppm referente ao hidrogênio triazólico, possivelmente devido ao acoplamento a longa distância com o grupo metilênico ligado ao triazol, cuja integral (1H) foi proporcional aos demais sinais característicos do peptídeo **1**. Adicionalmente, na região de 4,40-3,97 ppm estão os hidrogênios referentes aos carbonos Cα, Cβ e CH_2-triazol (34H). Os grupos metila (48H) são observados sob a forma de dupletos na região de 1,21-1,01 ppm. Ainda são observados outros sinais referentes à impurezas e solvente DMF (7,82; 2,87; 2,71; e 2,57 ppm) (Figura **26**).

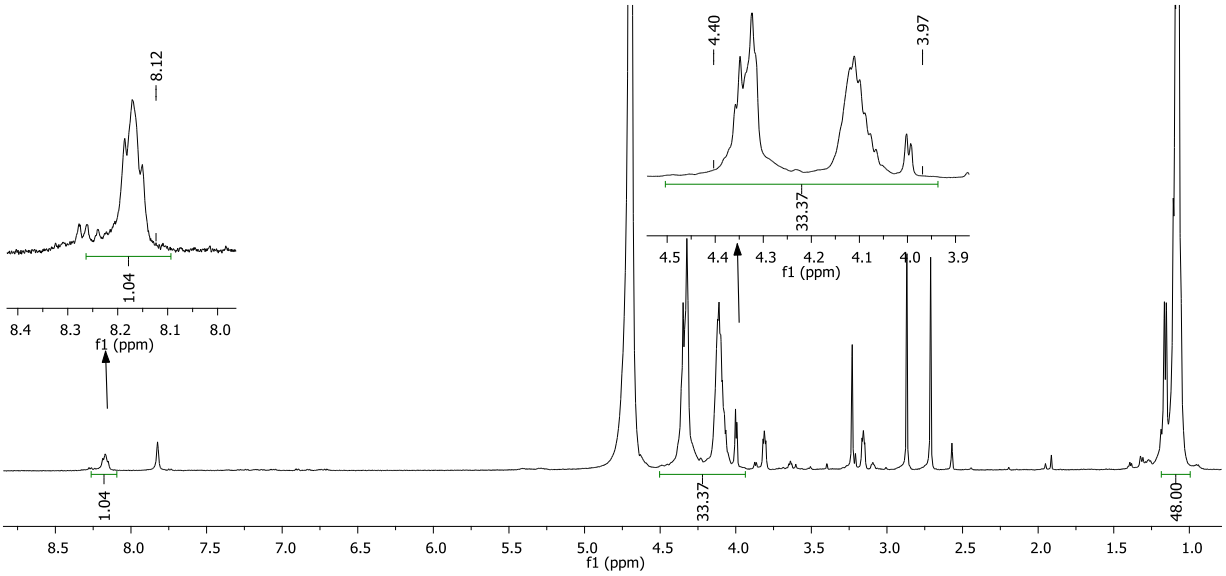


Figura 26. Espectro de RMN ^{1}H (D_2O, 500 MHz) do peptídeo **1** bruto indicando os sinais característicos da molécula e impurezas como solvente DMF em 7,82; 2,87; 2,71 e 2,57 ppm.

A amostra bruta foi submetida à análise e purificação por cromatografia líquida de alta eficiência empregando permeação em gel com coluna TSKGEL G20COPW (300 x 7,5 mm ID, Sigma Aldrich), gradiente 5% CH_3CN: 0,1% TFA em água e fluxo de 1 mL/min. Porém os resultados não foram satisfatórios e a análise ainda está sendo padronizada.

Adicionalmente, a análise de ESI-MS, modo positivo, não indicou os seguintes íons moleculares referente ao peptídeo **1**: $[M + H^+]$ = 1716,8133, $[M + Na^+]$ = 1738,7953 e $[M + K^+]$ = 1754,7692. O pico observado mais próximo foi $[M+12H^+]$ = 1727,7445 (Figura **27**).

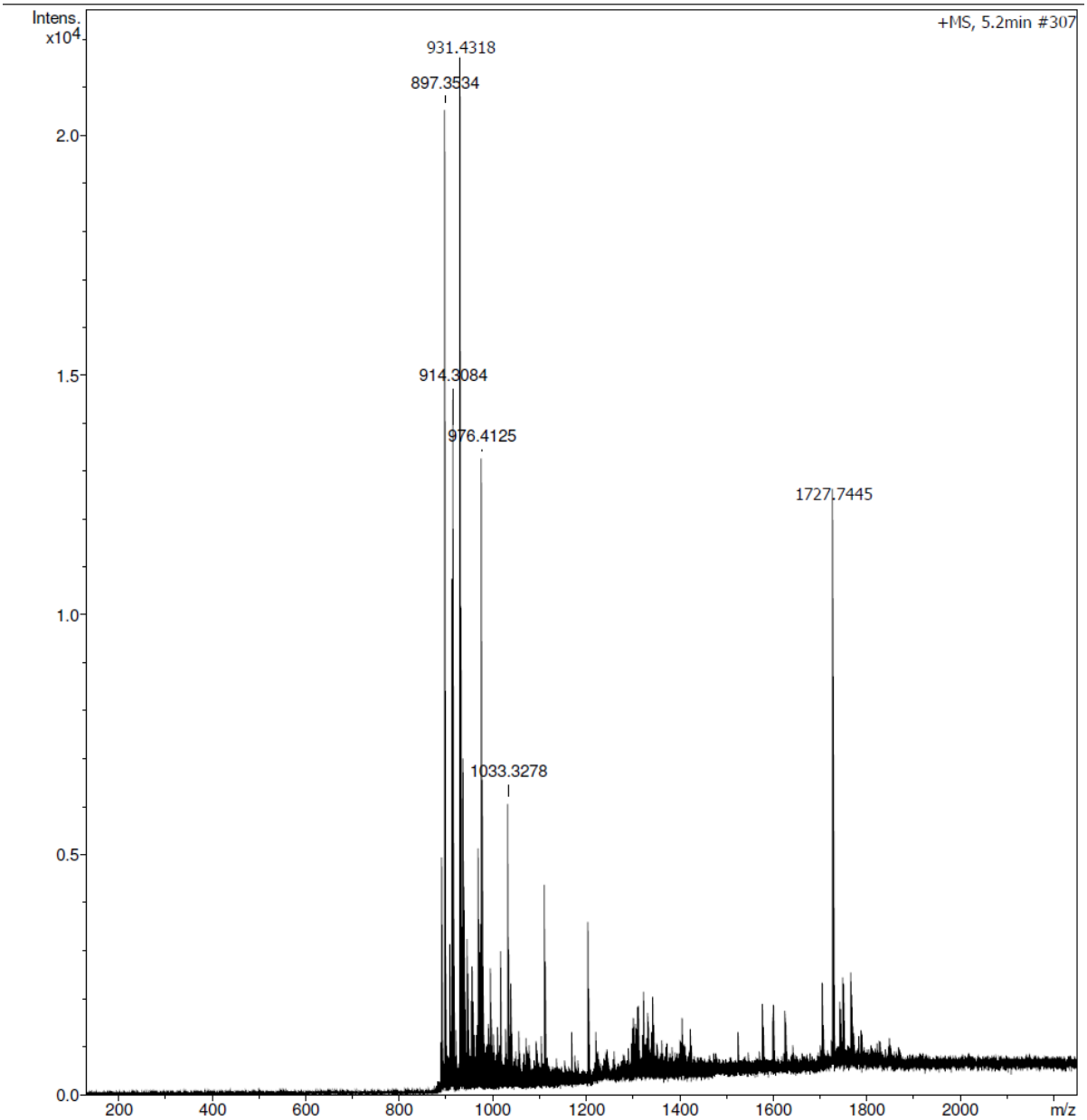


Figura 27. Espectro de ESI-MS, modo positivo, para o peptídeo bruto **1**.

Devido à complexidade estrutural do peptídeo **1**, sugere-se a possibilidade do íon molecular referente à 1727,7445, corresponder ao dímero de **1** unido à um íon Na^+, cuja relação massa/carga (m/z) é 1727,301, conforme Figura **28**. Ainda, cobre residual poderia complexar-se à estrutura peptídica, interferindo nas etapas de purificação e análise.

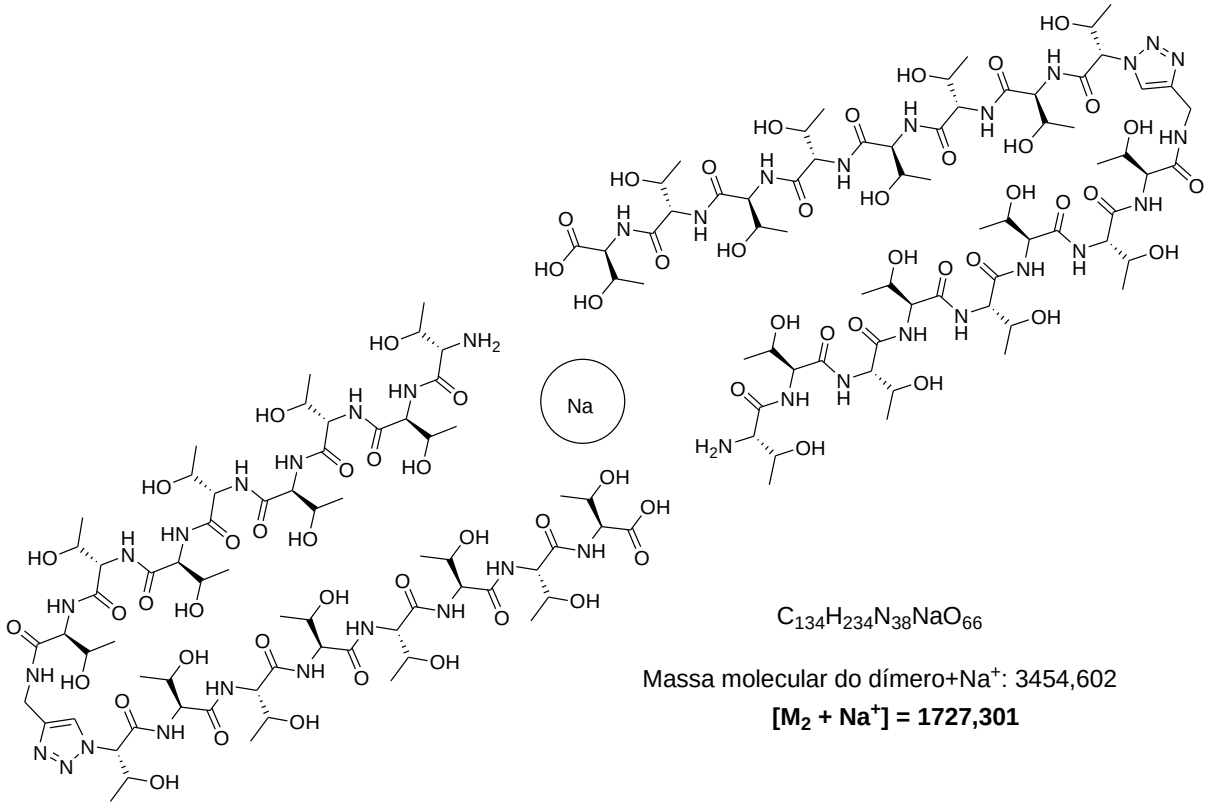


Figura 28. Sugestão de formação de dímero do peptídeo **1** com um íon Na^+ durante análise por ESI-MS.

A análise de ESI-MS, modo negativo, não demonstrou resultados conclusivos que pudessem auxiliar na investigação e identificação do peptídeo **1** (Figura **29**). O resultado inconclusivo da análise por ESI-MS não descartou a possibilidade de formação do peptídeo **1**, o qual foi confirmado por RMN ^1H conforme discutido anteriormente.

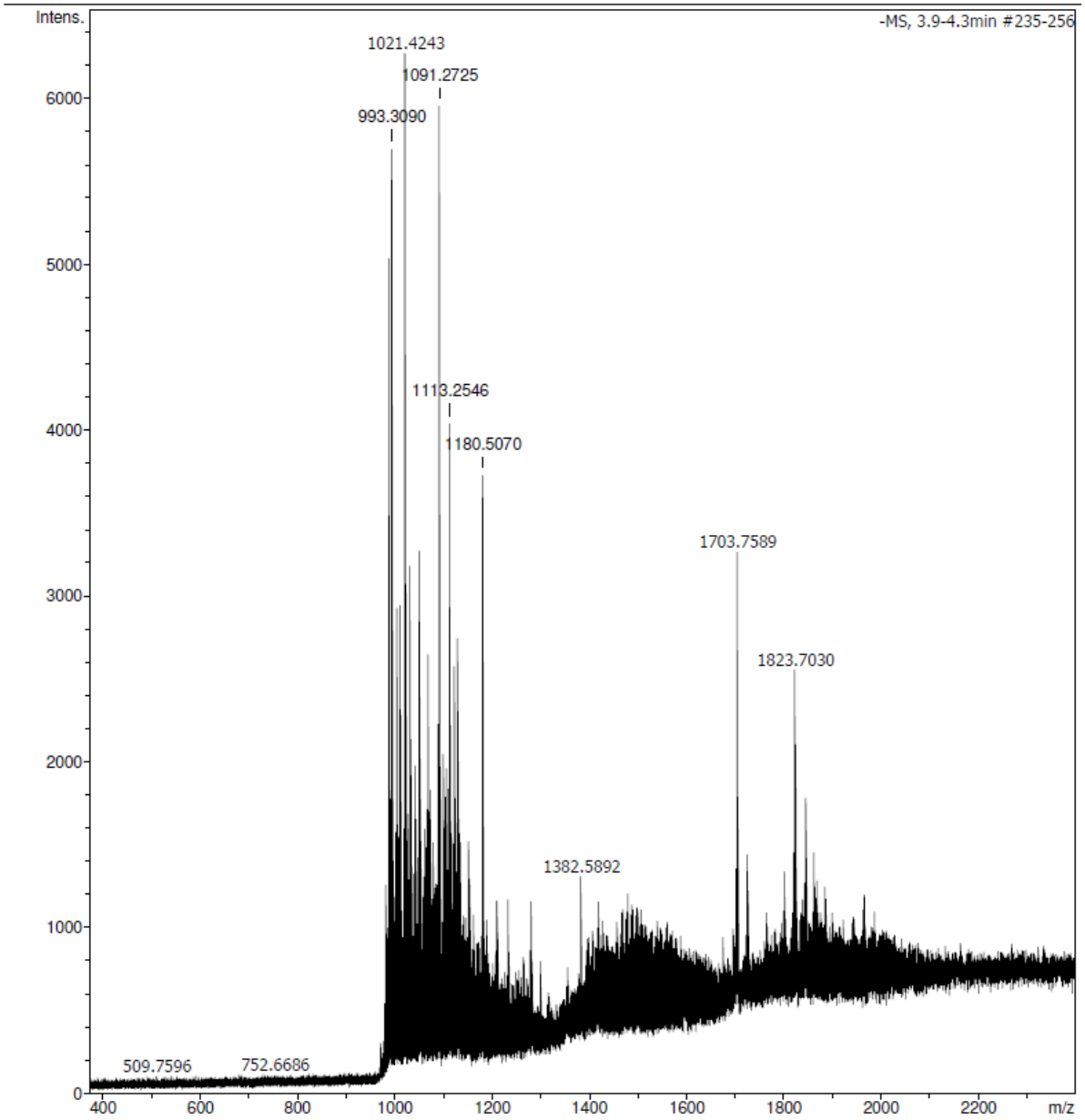


Figura 29. Espectro de ESI-MS, modo negativo, para o peptídeo bruto **1**.

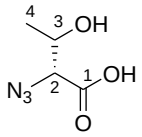
6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Materiais

- Espectrômetros Bruker Advance DPX-300, DRX-400 e DRX-500 da Universidade de São Paulo foram empregados na obtenção de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^{1}H) e Carbono (RMN ^{13}C). Os deslocamentos químicos (δ) estão descritos em parte por milhão em relação ao tetrametilsilano (TMS) e o número de hidrogênios deduzidos da integral relativa.
- Os espectros de massas foram obtidos em aparelho Bruker Daltonics ULTRO-Q-TOF, empregando ionização por electrospray (ESI) e analisadores de quadrupolo (Q) e tempo de voo (TOF).
- Espectrômetro de Infravermelho IVFT Nicollet Modelo protege 460.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu SCL-10AVP e o software Class-VP 5.0.
- Espectrofotômetro Shimadzu UV-1650PC.
- Agitador magnético: IKA RCT Basic e Corning PC-320
- Balanças: Mettler PE 400/ Sartorius BP 121S
- Bomba de alto vácuo: Precision Model D 150
- Cromatógrafo Biotage HorizonTM para realização de cromatografia em coluna Flash
- Evaporador rotatório: Büchi RE-121
- Evaporador rotatório com controlador de vácuo: Büchi R-215
- Luz ultravioleta: Spectroline CM-10
- Reator para radiação de microondas CEM® Discover
- Os solventes e reagentes comerciais, quando necessário, foram convenientemente purificados, conforme métodos padronizados na literatura (PERRIN, 1980).
- As Cromatografias em Camada Delgada Analítica (CCDA) foram realizadas utilizando placas de sílica-gel 60 GF254 da MERCK® e Cromatografias em Coluna foram realizadas utilizando sílica gel (40-63 μm) da MERCK®.
- Coluna analítica de fase reversa C18 CLC-ODS (M) (150 mm x 4,6 mm), coluna analítica de permeação em gel TSKGEL G20COPW (300 x 7,5 mm ID, Sigma Aldrich) e Coluna semi-preparativa de fase reversa Phenomenex Luna C18 (250 x 10 mm) foram utilizadas durante a análise e purificação por CLAE.

6.2 Métodos

Ácido 2-azido-3-hidróxibutanóico (7)



7

Em um balão, após dissolver azida de sódio (487,6 mg; 7,5 mmol) em água destilada (2 mL), foi adicionado diclorometano (2 mL) e a mistura resfriada em banho de gelo por 20 minutos. Posteriormente, anidrido tríflico (423 mg; 1,5 mmol) foi adicionado lentamente ao longo de 5 minutos, e então, a reação foi mantida sob agitação por 2,5 horas. Após, a fase orgânica foi separada e a fase aquosa extraída com diclorometano. As fases orgânicas foram combinadas e neutralizadas com solução saturada de $NaHCO_3$. A fração orgânica, contendo triflato de azida, foi então reservada para posterior uso. Após a preparação do doador de grupo azido, triflato de azida, procedeu-se a reação de diazo-transferência. Aminoácido L-treonina (100 mg; 1 mmol) foi solubilizado com água (3,5 mL) e metanol (0,5 mL) em um balão, seguido pela adição de $NaHCO_3$ (84 mg; 1 mmol) e $CuSO_4$ (100 µL sol. 1 mol/L; 0,1 mmol). Posteriormente, foi adicionado a fração orgânica contendo triflato de azida e mais quantidade de metanol (3 mL). A reação permaneceu sob agitação durante 48 horas. Após, a mistura reacional foi concentrada e filtrada em fina camada de sílica comum com fase móvel DCM:MeOH/ 8:2 (5% ácido acético). Foi obtido um sólido branco (155,3 mg), o qual foi diluído em metanol (2 mL) e tratado com resina Dowex® H^+ (50WX8-400), fornecendo o produto **7** como um óleo pálido e com 42 % de rendimento (61 mg; 0,42 mmol).

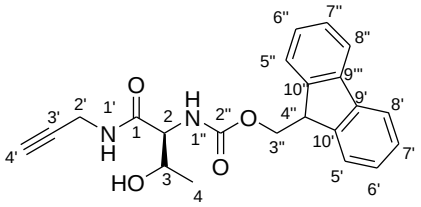
^{1}H RMN (500 MHz, D_2O) (**ANEXO 1**): 4,11 (*qd*, 1H, $J_{3,2}$ 3,3 Hz; $J_{3,4}$ 6,5 Hz, H-3); 3,87 (*d*, 1H, $J_{2,3}$ 3,3 Hz, H-2); 1,07 (*d*, 3H, $J_{4,3}$ 6,5 Hz, H-4).

RMN ^{13}C (500 MHz, D_2O) (**ANEXO 1.2**): 173,03 C1; 68,12 C3; 67,47 C2; 18,92 C4.

ESI-MS (**ANEXO 1.3**): calculado para $C_4H_7N_3O_3Na^+$ [M + Na^+]: 168,0287; encontrado: 168,0380.

IV (**ANEXO 1.4**): 2118 cm^{-1} (N_3).

_N_-9-fluorenilmetoxicarbonil-2-propragil-treonina amida (9)



9

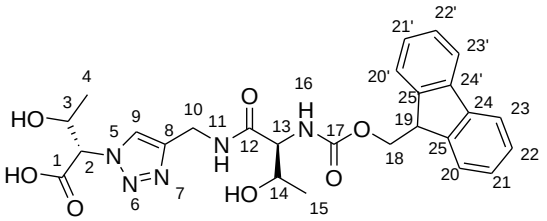
N-9-fluorenilmetoxicarbonil-L-treonina (50 mg; 0,15 mmol), 1-hidróxi-benzotriazol (81 mg; 0,6 mmol), diciclo-hexilcarbodiimida (123 mg; 0,6 mmol) e peneira molecular foram solubilizados em 2 mL de dimetilformamida (DMF) anidro e mantidos sob agitação a temperatura ambiente e atmosfera inerte. Em seguida foi adicionado propargilamina (8,6 mg; 0,15 mmol) e a reação foi mantida sob agitação durante 4 horas. Após este período, foi realizada filtração simples para remover o subproduto diciclo-hexiluréia e a peneira molecular. Em seguida, a mistura foi concentrada para eliminação de DMF, diluída em acetato de etila (AcOEt) e lavada com solução aquosa saturada de $NaHCO_3$. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila e as frações orgânicas foram combinadas e concentradas. O sólido obtido foi purificado em aparelho Biotage HorizonTM (AcOEt : hexano 7,5:2,5/v:v) fornecendo o produto **9** puro como um sólido branco (43,7 mg; 0,11 mmol; 73%).

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) (**ANEXO 2**): 7,76 (*d*, 2H, $J_{5,6}$ 7,6 Hz, H-5, H-5’); 7,56 (*d*, 2H, $J_{7,8}$ 7,3 Hz, H-8, H-8’); 7,38 (*t*, 2H, $J_{6,5}$ 7,6 Hz, H-6, H-6’); 7,30 (*t*, 2H, $J_{7,8}$ 7,3 Hz, H-7, H-7’); 6,78 (*s*, 1H, H-1’); 5,73 (*d*, 1H, $J_{1'',2}$ 8 Hz, H-1’’); 4,50-4,38 (*m*, 3H, H-3, H-3’’), 4.20 (*t*, 1H, $J_{4'',3''}$ 6,8 Hz, H-4’’); 4,12-4,00 (*m*, 3H, H-2, H-2’); 2,20 (*t*, 1H, $J_{1,3}$ 2,5 Hz, H-4’); 1,15 (*d*, 3H, $J_{4,3}$ 6,5, H-4).

RMN ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) (**ANEXO 2.2**): 170,87 C1; 157,05 C2’’; 143,57 C9’/C9’’; 141,35 C10’/C10’’; 127,84 C6’/C6’’; 127,13 C7’/C7’’; 125,01 C8’/C8’’; 120,09 C5’/C5’’; 78,88 C3’; 71,84 C4’; 67,28 C3’’; 66,46 C3; 58,12 C2; 47,14 C4’’; 29,14 C2’’; 18,12 C4.

ESI-MS (**ANEXO 2.3**) calculado para $C_{22}H_{22}N_2O_4H^+$ [M + H^+]: 379,1580; encontrado: 379,1583; calculado para $C_{22}H_{22}N_2O_4Na^+$ [M + Na^+]: 401,1380; encontrado: 401,1402; calculado para $C_{22}H_{22}N_2O_4K^+$ [M + K^+]: 417,2480; encontrado 417,1132.

Dipeptídeo 8



8

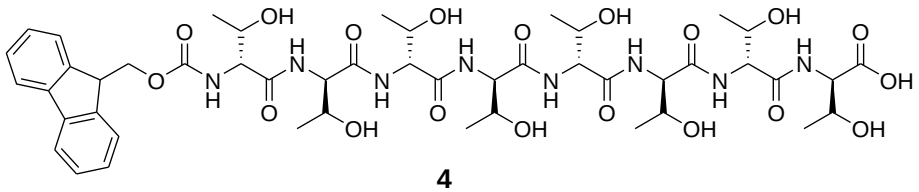
Em tubo de microondas foram dissolvidos, em 0,5 mL de DMF, os compostos **7** (4 mg; 0,027 mmol), **9** (11,24 mg; 0,03 mmol) e ascorbato de sódio (2,7 mg; 0,013 mmol). Posteriormente foi adicionado sulfato de cobre (II) (0,4 mg; 0,002 mmol) e a reação foi submetida à radiação microondas 150W/70ºC por 5 minutos. Após, a mistura reacional foi concentrada e purificada por coluna cromatográfica clássica (CCC) (DCM : MeOH 8:2/v:v) fornecendo o produto **8** como um óleo pálido e rendimento de 98 % (13,9 mg; 0,026 mmol).

^{1}H RMN (500 MHz, DMSO) (**ANEXO 3**): 8,31 (*t*, 1H, $J_{9,10}$ 5,2 Hz, H-9); 7,87 (*m*, 3H,H-11, H-20, H-20'); 7,72 (*d*, 2H, $J_{23,22}$ 6,9 Hz, H-23, H-23'); 7,38 (*t*, 2H, $J_{21,22}$ 7,4 Hz, H-21, H-21'); 7,29 (*t*, 2H, $J_{22,21}$ 7,4 Hz, H-22, H-22'); 7,09 (*d*, 1H, $J_{16,13}$ 8,3 Hz, H-16); 4,37-4,19 (*m*, 7H, H-2, H-3, H-10, H-18, H-19); 3,81 (*m*, 2H, H-13, H-14); 0,97 (*d*, 3H, $J_{15,14}$ 5,8 Hz, H-15); 0,80 (*d*, 3H, $J_{4,3}$ 6,1 Hz, H-4).

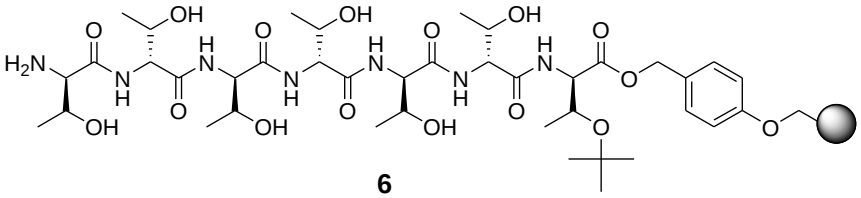
RMN ^{13}C (500 MHz, DMSO) (**ANEXO 3.2, 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4**): 170,80 C1, C12; 156,62 C17; 144,28 C8, C8'; 143,94 C24, C24'; 141,22 C23, C23';128,61 C21, C21'; 127,61 C22, C22'; 125,90 C25, C25'; 123,78 C9; 120,61 C20, C20'; 67,62 C2, C3, C13, C14; 66,64 C10, C18; 47,16 C19; 20,39 C4, C15.

ESI-MS (**ANEXO 3.3**): calculado para $C_{26}H_{29}N_5O_7H^+$ [M + H^+]: 524,2137; encontrado: 524,2139.

Peptídeos *N*H-Fmoc-(Thr)$_8$- OH (4) e *N*H$_2$-(Thr)$_6$-Thr(tBu)-Resina Wang (6)



4



6

Os peptídeos **4** e **6** foram sintetizados de acordo com a metodologia padrão de síntese de peptídeo em fase sólida empregando o radical *N*-9-fluorenilmetoxicarbonila como grupo protetor da função amino (CHAN, WHITE, 2000). A resina Fmoc-Thr(*t*Bu)-Wang (NovaBiochem) com grau de substituição 0,54 mmol/g foi empregada como suporte sólido. Todos os derivados de aminoácidos empregados foram *N*-Fmoc-L-treonina (NovaBiochem).

Preparação da resina para a Síntese de Peptídeos em fase sólida e desproteção ortogonal do grupo N-Fmoc para posterior acoplamento

Inicialmente, a resina Wang, previamente ligada a resíduo de *N*-Fmoc treonina (NovaBiochem) (Fmoc-Thr(tBu)-Wang resina) foi intumescida com diclorometano (3mL) durante 3 horas, e em seguida o solvente foi removido por filtração. Sobre a resina foi introduzido *N*,*N*-Dimetilformamida (DMF) (2 mL) mantendo-se a mistura em agitação por borbulhamento de nitrogênio durante 2 minutos. Após, removeu-se o solvente DMF por filtração e este processo foi realizado por mais duas vezes. Na etapa seguinte, foi introduzido solução de morfolina 50% em DMF (2 mL) para remover o grupo Fmoc do resíduo de treonina *N*-Fmoc protegido. A mistura foi agitada pelo borbulhamento de N_2 por cerca de 10 minutos e o reagente removido por filtração. Esta última etapa foi realizada três vezes e ao final a resina foi lavada três vezes com DMF.

Reação de acoplamento

Os reagentes *N*-Fmoc-treonina, *N*-hidroxibenzotriazol (HOBt) e hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris(pirrolidino) fosfônio (PyBOP), (3 equivalentes de cada em relação ao grau de substituição da resina), foram pesados em um frasco e dissolvidos em quantidade mínima de DMF. Esta mistura foi então adicionada sobre a resina ligada ao aminoácido treonina contendo grupo amino livre e mantida em agitação através de fluxo de nitrogênio. Em seguida, foi adicionado *N*,*N*-diisopropiletilamina (DIPEA) (4 equivalentes em relação ao grau de substituição da resina) mantendo-se a agitação através de fluxo de N_2 por cerca de 2 horas. Ao término deste período foi verificado a presença ou ausência de grupo amino livre por meio do teste de Kaiser. Quando positivo, a reação de acoplamento foi repetida e mantida até verificação de resultado negativo. Finalizado o acoplamento, a mistura foi filtrada e a resina lavada 3 vezes com DMF, DCM e MeOH. Em seguida, duas amostras de resina foram retiradas para determinação da taxa de ligação do aminoácido à resina, sendo 0,54 mmol/g o valor fornecido pelo fabricante.

Testes de acompanhamento da reação de acoplamento

Para realizar o *Teste de kaiser*, 2 mg de resina foram tratadas sucessivamente com duas gotas de cada um dos reagentes: ninidrina 5% em etanol, fenol 80% em etanol e cianeto de potássio em piridina (2 ml de solução de KCN 0,001 mol/L em 98 ml de piridina). A mistura foi aquecida a 120 ºC por 1 a 2 minutos. A presença de grupo amino livre ligado à resina (acoplamento incompleto), teste positivo, foi indicada pelo desenvolvimento de coloração azul intensa da resina. A ausência de grupo amino livre (acoplamento completo), teste negativo, foi indicada pelo desenvolvimento de coloração castanha ou não alteração de cor da resina.

Para determinação da taxa de ligação do aminoácido à resina, uma amostra de resina (cerca de 1 μmol em relação ao grupo Fmoc) foi introduzida em duas cubetas de quartzo, juntamente com 3mL de solução de morfolina 50% em DMF. A mistura foi agitada com auxílio de pipeta Pasteur por cerca de 5 a 10 minutos e a quantidade de grupo benzofulveno liberado foi medido em espectrofotômetro a 290 nm, contra o branco de morfolina 50% em DMF. A partir da média dos resultados das duas amostras foi calculada a taxa de ligação do aminoácido pela fórmula: mmol/g= (Abs amostra)/(mg amostra) x 1,75.

Clivagem do peptídeo da resina

A clivagem do peptídeo **4** ocorreu após o acoplamento do oitavo resíduo de *N*Fmoc-treonina, enquanto do peptídeo **6**, ocorreu após a remoção de grupo Fmoc do sétimo resíduo de treonina acoplado à cadeia crescente. Adicionalmente, a remoção do peptídeo da resina foi realizada somente após sucessivas lavagens da resina com DCM e MeOH para eliminação de traços de DMF. A clivagem foi realizada na presença de solução de ácido trifluoracético (TFA) 80% em água. A mistura foi agitada sob fluxo de N_2 por 2 horas e filtrada para um frasco coletor. A operação foi repetida por mais 1 hora e as frações de TFA 80% foram concentradas em rotaevaporador. Os peptídeos **4** e **6A** foram obtidos com rendimento bruto de, respectivamente, 75% e 85%.

Purificação dos peptídeos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os peptídeos **4** e **6A** foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em aparelho Shimadzu ShimPak, utilizando-se coluna analítica de fase reversa C18 CLC-ODS (M) (150 mm x 4,6 mm) e fluxo de 1 mL/min. ou semi-preparativa de fase reversa Phenomenex Luna C18 (250 x 10 mm) e fluxo de 4 mL/min. Foram utilizados gradientes de dois eluentes: água acidulada com ácido trifluoroacético (0,1% TFA, fase A) e 5-50% acetonitrila grau UV/HPLC (fase B). Empregou-se detector de ultravioleta (UV), sendo utilizado λmáx de 214 nm (210-215 nm, faixa de absorção do grupo amida). Todas as análises foram conduzidas à temperatura ambiente.

Peptídeo **4**

^{1}H RMN (500 MHz, DMSO) (**ANEXO 4**): 7,90-7,70 (*m*, 11H, C*H* Fmoc Ph, H-1, H-1', H-4, H-4', 7x O*H*); 7,37 (*t*, 2H, J_{CH-CH} 7,6 Hz, C*H*Fmoc Ph, H-2, H-2'); 7,29 (*t*, 2H, J_{CH-CH} 7,3 Hz, C*H*Fmoc Ph, H-3, H-3'); 7,21 (*d*, 1H, *J* 8,7 Hz, O*H*); 5,05-4,85 (*m*, 8H, N*H*); 4,40-3,90 (*m*, 19H, CH_2Fmoc, 8x αC*H*Thr, C*H*Fmoc, 8x βC*H*Thr); 0,95 (*d*, 24H, *J* 6,4 Hz, 8x CH_3-Thr).

ESI-MS (**ANEXO 4.2**): calculado para $C_{47}H_{68}N_8O_{19}H^+$ [M + H^+]: 1049,4671, encontrado: 1049,4638; calculado para $C_{47}H_{68}N_8O_{19}Na^+$ [M + Na^+]: 1071,4401, encontrado 1071,4447.

CLAE (Shimadzu ShimPak, C18 CLC-ODS (M) (150 mm x 4.6 mm), 5-50% CH_3CN: 0,1% TFA aq., 1 mL/min) (**ANEXO 4.3**). t_R= 24,5 min (39%).

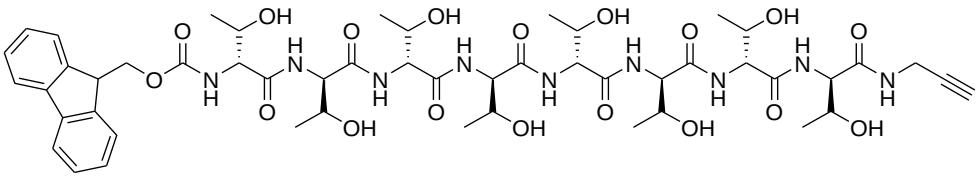
Peptídeo **6** clivado da resina (**6A**):

^{1}H RMN (500 MHz, DMSO) (**ANEXO 5**): 4,42-3,86 (*m*, 14H, 7x αC*H*Thr, 7x βC*H*Thr); 1,32-0,99 (*m*, 21H, 7x CH_3-Thr).

ESI-MS (**ANEXO 5.1**): calculado para $C_{28}H_{51}N_7O_{15}H^+$ [M + H^+]: 726,3513, encontrado: 726,3518; calculado para $C_{28}H_{51}N_7O_{15}Na^+$ [M + Na^+]: 748,3243 ,encontrado 748,3320.

CLAE (Shimadzu ShimPak, C18 CLC-ODS (M) (150 mm x 4,6 mm), 0-50% CH_3CN: 0,1% TFA aq., 1 mL/min) (**ANEXO 5.2**). t_R= 4,5 min (61%).

Peptídeo 2



2

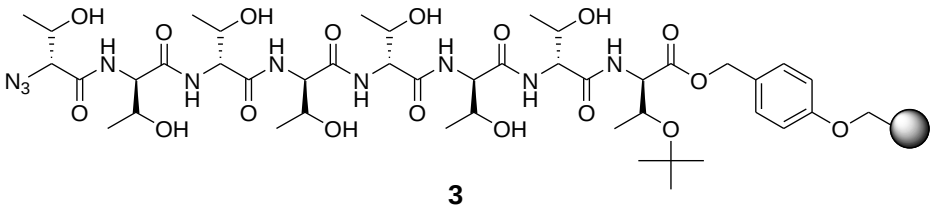
N-9-fluorenilmetoxicarbonil-Thr_8-OH (**4**) (16,1 mg; 0,015 mmol), 1-hidróxi-benzotriazol (6,07 mg; 0,045 mmol), diciclo-hexilcarbodiimida (9,28 mg; 0,045 mmol) e peneira molecular foram solubilizados em 1 mL de DMF anidro e mantidos sob agitação a temperatura ambiente e atmosfera inerte. Em seguida foi adicionado propargilamina (2,47 mg; 0,045 mmol) e a reação foi mantida sob agitação durante 24 horas. Após este período, foi efetuada filtração simples, para remover a peneira molecular, seguido por eliminação de DMF em rotaevaporador. O sólido obtido foi diluído em água:acetonitrila 1:1 (v/v) e purificado por CLAE (Phenomenex Luna C18 (250 x 10 mm), Shimadzu Shim-PaK, gradiente 5-50% acetonitrila (CH_3CN) em 0,1% TFA aq. por 35 min e fluxo de 4 mL/min.) fornecendo o produto **2** como um sólido branco (10,5 mg; 0,009 mmol); 64,5 % de rendimento.

^{1}H RMN (500 MHz, DMSO) (**ANEXO 6**): 7,91-7,24 (*m*, 16H, C*H* Fmoc Ph, H-1, H-1’, H-4, H-4’, H-2, H-2’, H-3, H-3’, 8x O*H*); 5,16-4,85 (*m*, 9H, N*H*); 4,40-3,93 (*m*, 21H, CH_2Fmoc, 8x αC*H*Thr, C*H*Fmoc, 8x βC*H*Thr, CH_2); 3,08 (*t*, 1H, J_{CH2-CH} 2.4 Hz, C*H*); 1,22-1,01 (*m*, 24H, 8x CH_3-Thr).

ESI-MS (**ANEXO 6.1**): calculado para [M + H^+]: 1086,4996; encontrado: 1086,4986; calculado para [M + Na^+]: 1108,4814; encontrado: 1108,4807.

CLAE (Shimadzu ShimPak, C18 CLC-ODS (M) (150 mm x 4,6 mm), 1 mL/min). (**ANEXO 6.2**) t_R= 25,2 min.

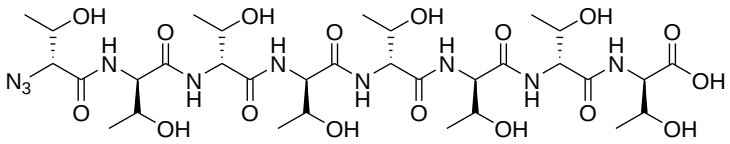
Peptídeo N_3-(Thr)$_7$- Thr(tBu)- Resina Wang (3)



3

Sob NH_2-Thr$_6$-Thr(tBu)-Resina Wang (**6**) (0,054 mmol) foram adicionados 1-hidróxi-benzotriazol (HOBt) (43,74 mg; 0,324 mmol), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris(pirrolidino) fosfônio (PyBOP) (168 mg; 0,324 mmol) e azido-treonina (**7**) (23,5 mg; 0,162 mmol) previamente solubilizados em DMF. Em seguida, foi adicionado sobre a mistura *N*,*N*-diisopropiletilamina (DIPEA) (55,83 mg; 0,432 mmol) mantendo-se a agitação através de fluxo de N_2 por cerca de 24 h. Após o término do acoplamento, foram realizadas sucessivas lavagens da resina com DMF, DCM, MeOH, três vezes para cada solvente.

Peptídeo 3 clivado da resina: Peptídeo N_3-(Thr)$_8$-OH (3A)



3A

Sob N_3-(Thr)$_7$-Thr(tBu)-Resina Wang (**3**) (0,027 mmol) foi adicionado solução de ácido trifluoracético (TFA) 80% em água. A mistura foi agitada sob fluxo de N_2 por 2 horas e filtrada para um frasco coletor. A operação foi repetida por mais 1 hora e as frações de TFA 80% foram concentradas em rotaevaporador, fornecendo um sólido branco com rendimento bruto de 88%. Este sólido foi analisado e purificado por CLAE em aparelho Shimadzu ShimPak utilizando-se coluna analítica de fase reversa C18 CLC-ODS (M) (150 mm x 4,6 mm) e fluxo de 1 mL/min. ou semi-preparativa de fase reversa Phenomenex Luna C18 (250 x 10 mm) e fluxo de 4 mL/min. com gradiente 5-50% acetonitrila (CH_3CN) em 0,1% TFA aq. por 35 min. O peptídeo **3A** foi obtido com 52,7% de rendimento.

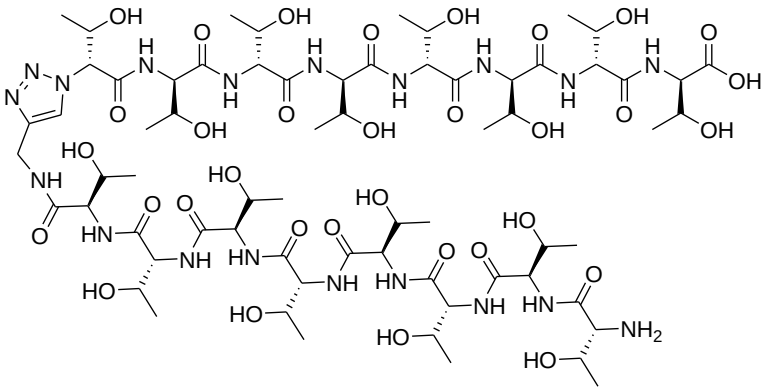
^{1}H RMN (500 MHz, D_2O) (**ANEXO 7**): 4,30-3,91 (*m*, 16H, 8x αC*H*Thr, 8x βC*H*Thr); 1,15-0,92 (*m*, 24H, 8x CH_3-Thr).

ESI-MS (**ANEXO 7.1**): calculado para [M + H^+]: 853,3895; encontrado: 853,3897; calculado para [M + Na^+]: 875,3722; encontrado: 875,3694.

IV (**ANEXO 7.2**): 2117 cm^{-1} (N_3).

CLAE (Shimadzu ShimPak, C18 CLC-ODS (M) (150 mm x 4,6 mm), 1 mL/min) (**ANEXO 7.3**) t_R= 5,3 min.

Peptídeo 1



1

Em um balão foram solubilizados, em 2 mL de DMF, os peptídeos **2** (11,3 mg; 0,01 mmol), **3** (quantidade de resina equivalente à 8,52 mg; 0,01 mmol) e ascorbato de sódio (1 mg; 0,005 mmol). Posteriormente foi adicionado sulfato de cobre (II) (0,1 mg; 0,001 mmol) e a reação foi submetida à radiação microondas 150W/70ºC por 5 minutos, no modo de operação *open vessel*. Após, a mistura reacional foi transferida para o frasco cilíndrico contendo torneira de três saídas, a solução foi filtrada e a resina foi submetida à etapa de lavagem. A etapa de lavagem foi realizada três vezes para cada um dos seguintes solventes e na seguinte ordem: DMF, DIPEA 0,5% (DMF), *N*-dietilditiocarbamato de sódio 0,05% (DMF) e DMF. As próximas etapas foram a remoção do grupo Fmoc e a clivagem do peptídeo da resina, conforme procedimento padrão empregado na síntese em fase sólida de **4** e **6**. O peptídeo **1** bruto foi obtido com 70% de rendimento (12,2 mg; 0,007 mmol).

^{1}H RMN (500 MHz, D_2O) (**ANEXO 8**): 8,12 (*m*, 1H, *H*-triazol); 4,40-3,97 (*m*, 34H, CH_2-triazol, 16x αC*H*Thr, 16x βC*H*Thr); 1,21-1,04 (*d*, 48H, *J* 6,3 Hz, 16x CH_3Thr).

ESI-MS (**ANEXO 8.1**): calculado para [M + H^+] = 1716,8133, encontrado: 1727,7445.

7 CONCLUSÕES

Inicialmente, a estratégia empregada na preparação do dipeptídeo **8** via CuAAC envolveu a preparação de blocos de construção contendo função azido e alcino. A preparação do bloco de construção **7**, precursor azido do dipeptídeo **8**, conduziu à elaboração de uma rota sintética inédita, a qual permitiu obter o composto **7** em menor número de etapas a partir do aminoácido polifuncionalizado L-treonina desprovido de grupos protetores na região C-terminal e na cadeia lateral. O desenvolvimento desta estratégia permitiu aperfeiçoar a síntese de **8** e abrirá novas perspectivas para a elaboração de aminoácidos funcionalizados com grupo azido, e consequentemente, para a inserção de grupo 1,2,3-triazol em estruturas peptídicas via reações de ciclo-adição azido-alcino 1,3-dipolar. Adicionalmente, o bloco de construção **7** possibilitou a preparação do peptídeo **3**. O bloco de construção contendu função alcino **9** foi obtido partir do emprego dos reagentes DCC e HOBt, os quais proporcionaram rendimento superior (73%), quando comparados aos reagentes empregados para reações de acoplamento PyBOP/HOBt/DIPEA (50% de rendimento). Adicionalmente, a estratégia utilizada foi aplicada na preparação do peptídeo **2**.

A preparação do dipeptídeo **8**, a partir da reação de ciclo-adição azido-alcino 1,3 dipolar catalisada por cobre (I) entre **7** e **9**, representou uma estratégia útil para inserção de grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído em estruturas peptídicas e permitiu a obtenção do dipeptídeo **8** em excelentes rendimentos (98%) e reduzido tempo reacional (5minutos). A utilização de irradiação microondas durante a reação de CuAAC possibilitou otimizar a síntese do dipeptídeo **8**, provando ser uma útil e compatível ferramenta de síntese relacionada à aminoácidos e peptídeos. Conforme descrito pela literatura, o emprego desta ferramenta permitiu reduzir o tempo reacional, aumentar o rendimento e prevenir reações secundárias. Adicionalmente, a preparação do dipeptídeo **8** permitiu estabelecer as condições a serem empregadas na obtenção do peptídeo **1** e de seus precursores alcino **2** e azido **3**.

A obtenção do peptídeo **1** ocorreu via CuAAC e portanto, necessitou da preparação dos peptídeos modificados contendo função alcino **2** e azido **3**. Inicialmente, os precursores **4** e **6**, respectivamente relacionados aos peptídeos alcino **2** e azido **3**, foram preparados pelo método de síntese em fase sólida. O procedimento padrão para síntese de peptídeos em fase sólida foi empregado na preparação de **4** e **6** provando ser um método prático e eficiente, o qual possibilitou a obtenção dos peptídeos **4** e **6** com rendimentos satisfatórios de 39% e 61%, respectivamente, após purificação por CLAE. Porém, como mencionado no trabalho, este método ainda apresenta algumas desvantagens e limitações que precisam ser superadas como

o fato de ocorrer redução de rendimento à medida que o número de resíduos de aminoácidos incorporados à cadeia aumenta. Os peptídeos **4** e **6** foram analisados e purificados por CLAE e tiveram suas estruturas confirmadas por meio das análises IV, RMN ^{1}H e ESI-MS.

A preparação do peptídeo **2**, envolvendo a reação de acoplamento entre propargilamina e região C-terminal do peptídeo **4**, possibilitou à obtenção do peptídeo **2** em rendimento satisfatório (64,5%, sendo rendimento global de 25%), representando um método rápido, prático e eficiente de inserção de grupo acetilênico terminal em peptídeos.

A preparação do peptídeo **3** a partir da reação de acoplamento entre o bloco **7** e a região N-terminal de **6**, permitiu a obtenção de **3** em rendimento satisfatório de 52,7%. Esta estratégia provou ser um método mais eficiente para inserção de grupo azido em peptídeo ainda ligado à resina, quando comparado à realização de reação de diazo-transferência entre doador de azido e grupo amino do peptídeo ligado à resina.

A reação de CuAAC entre **2** e **3** foi realizada sob as mesmas condições empregadas na síntese do modelo dipeptídeo **8** e forneceu o peptídeo **1** com 70% de rendimento bruto. A análise por RMN ^{1}H indicou a formação do peptídeo **1** e análises por CLAE e ESI-MS não apresentaram dados conclusivos.

A obtenção do peptídeo **1** e do dipeptídeo **8** permitiu concluir que, conforme descrito na literatura, reações CuAAC podem ser exploradas para inserção de grupo 1,2,3-triazol em peptídeos. Adicionalmente, o emprego de irradiação microondas possibilitou a geração de **1** e **8** com rendimento e tempo reacional satisfatórios. Estes resultados demonstram que irradiação microondas representa uma ferramenta útil na geração de peptídeos modificados contendo grupo 1,2,3-triazol, podendo inclusive ser utilizada em reações envolvendo peptídeos ligados à resina, como foi o caso do peptídeo **3**.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular.** 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

ADAMS, D.J.; BERECKI G. Mechanisms of conotoxin inhibition of N-type (Cav2.2) calcium channels. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1828, p. 1619–1628, 2013.

AGRELOS, O. A.; JONES, C.; TODESCHINI, A. R.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. A novel sialylated and galactofuranose-containing *O*-linked glycan, Neu5Acα2→3Gal*p*β1→6(Gal*f*β1→4)GlcNAc, is expressed on the sialoglycoprotein of *Trypanosoma cruzi* Dm28c. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 126, p. 93-96, 2003.

ALBA, A.; LÓPEZ-ABARRATEGUI, C.; OTERO-GONZÁLEZ, A. J. Host Defense Peptides: An Alternative as Antiinfective and Immunomodulatory Therapeutics. **Biopolymers**, v. 98, p.251-67, 2012.

ALDRICH, J. V.; MCLAUGHLIN, J. P. Opioid peptides: potential for drug development. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 9, n. 1, 2012.

ALPER, P. B.; HUNG, S.; WONG, C. Metal Catalyzed Diazo Transfer for the Synthesis of Azides From Amines. **Tetrahedron Letters**, v. 37, p. 6029-6032, 1996.

AMADOR, R.; MORENO, A.; VALERO, V.; MURILLO, L.; MORA, A. L.; ROJAS, M.; ROCHA, C.; SALCEDO, M.; GUZMAN, F.; ESPEJO, F.; NUNES, F.; PATARROYO, M. E. The first Field Trials of the Chemically Synthesized Malaria Vaccine Spf66 - Safety, Immunogenicity and Protectivity. **Vaccine**, v. 10, p. 179-184, 1992.

AMBLARD, M.; FEHRENTZ, J. A.; MARTINEZ, J.; SUBRA, G.."Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis". **Molecular Biotechnology**, v. 33, p. 239-254, 2006.

ANDRIANIFAHANANA, M.; MONIAUX, N.; BATRA, S. K. Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. **Biochimica et Biophysica Acta, Reviews on Cancer**, v. 1765, p. 189-222, 2006.

ARAGÃO-LEONETI, V.; CAMPO, V. L.; GOMES, A. S.; FIELD, R. A.; CARVALHO, I. Application of copper(I)-catalysed azide/alkyne cycloaddition (CuAAC) ‘click chemistry’ in carbohydrate drug and neoglycopolymer synthesis. **Tetrahedron**, v. 66, p. 9475-9492, 2010.

ARAKAMA, M.; NAKATANI, A.; MINOHARA, A.; NAKAMURA, M. Isolation and amino acid composition of human angiotensin I. **Biochemical Journal**, v. 104, p. 900-6, 1967.

AUTRAN, B.; CARCELAIN, G.; COMBADIERI, B.H.; DEBRE, P. Therapeutic vaccines for chronic infections. **Science**, v. 305, p. 205-208, 2004.

BAILEY, P. D. **An Introduction to Peptide Chemistry**. 1 ed. Wiley and Sons: New York. 1990.

BALDUS, S. E.; HANISCH, F-G. Biochemistry and pathological importance of mucin-associated antigens in gastrointestinal neoplasia. **Advances in Cancer Research.**, v. 79, p. 201-248, 2000.

BEDNAREK, M. A.; FEIGHNER, S. D.; PONG, S. S.; MCKEE, K. K.; HRENIUK, D. L.; SILVA, M. V.; WARREN, V. A.; HOWARD, A. D.; VAN DER PLOEG, L. H.; HECK, J. V. Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 4370-4376, 2000.

BOCK, V. D.; HIEMSTRA, H.; VAN MAARSEVEEN, J. H. Cu(I)-catalyzed alkyne-azide click cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 1, p. 51-68, 2006.

BOCK, V. D.; SPEIJER, D.; HIEMSTRA, H.; VAN MAARSEVEEN, J. H. 1,2,3-Triazoles as peptide bond isosteres: synthesis and biological evaluation of cyclotetrapeptide mimics. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 5, p. 971–975, 2007.

BRAIN, S. D.; CAMBRIDGE, H. Calcitonin Gene-Related Peptide: Vasoactive Effects and Potential Therapeutic Role. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 27, p. 607–611, 1996.

BRAZEAU, P.; VALE, W.; BURGUS, R.; LING, N.; BUTCHER, M.; RIVIER, J.; GUILLEMIN, R. Hypothalamic Polypeptide That Inhibits the Secretion of Immunoreactive Pituitary Growth Hormone. **Science**, v. 179, p. 77-9, 1973.

BROCKE, C.; KUNZ, H. Synthesis of tumor-associated glycopeptide antigens. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 3085-3112, 2002.

BUSCAGLIA, C. A.; BUSCAGLIA, C. A.; CAMPO, V. A.; FRASCH, A. C.; DI NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 229-236, 2006.

CAMPO, V. L. **Síntese e atividade de glicopeptídeos de interesse no planejamento de fármacos inibidores de *trans*-sialidase de *Trypanosoma***. 2007. 200 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I.; ALLMAN, S.; DAVIS, B. G.; FIELD, R. A. Chemical and chemoenzymatic synthesis of glycosyl-amino acids and glycopeptides related to *Trypanosoma cruzi* mucins. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 5, p. 2645-2657, 2007.

CAMPO, V. L.; ARAGÃO-LEONETI, V.; MARTINS, M. B.; CARVALHO, I Carbohydrates and Glycoproteins: Cellular Recognition and Drug Design. In: Carlton Anthony Taft and Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva. (Org.). **New Developments in Medicinal Chemistry**. 1 ed. Bentham Science Publishers, v. 1, p. 133-151, 2010.

CARR, D. **The Handbook of Analysis and Purification of Peptides and Proteins by Reversed-Phase HPLC**. 3 ed. W.R. Grace & Co.-Conn. 2002.

CASS, S. M. F.; TEPE, J. J. Identification of Phosphoproteins and their Impact as Biomarkers in Cancer Therapeutics. **Current Signal Transduction Therapy**, v. 6, p. 113-140, 2011.

CELENTANO, V.; DIANA, D.; DE ROSA, L.; ROMANELLI, A.; FATTORUSSO, R.; D'ANDREA, L. D. β-Hairpin stabilization through an interstrand triazole bridgew. **Chemical Communications**, v. 48, p. 762-764, 2012.

CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach**, Oxford University Press**,** 2000.

CLAYDEN, J.; GREEVS, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**. 2 ed. Oxford: Oxford University Press. 2012.

COSTA, F.; FRANCHIN, G.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; RIBEIRAO, M.; SCHENKMAN, S.; RODRIGUES, M. M. Immunization with a plasmid DNA containing the gene of *trans*-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice**. Vaccine**, v. 16, p**.** 768–774**,** 1998.

CRAIK, D. J.; FAIRLIE, D. P.; LIRAS, S.; PRICE, D. The Future of Peptide-based Drugs. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 81, p. 136–147, 2013.

DAVIS, B. G. Synthesis of Glycoproteins. **Chemical Reviews**., v. 102, p. 579, 2002.

DI-NOIA, J. M.; POLLEVICK, G. D.; XAVIER, M. T.; PREVIATO, J. O.; MENDOÇA-PREVIATO, L.; SÁNCHEZ, D. O.; FRASCH, A. C. High diversity in mucin genes and mucin molecules in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 32078-32083, 1996.

DOORES, K. J.; GAMBLIN, D. P.; DAVIS, B. G. Exploring and Exploiting the Therapeutic Potential of Glycoconjugates. **Chemistry - A European Journal**, v. 12, p. 656-665, 2006.

EICHLER, J. Peptides as protein binding site mimetics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, p. 707–713, 2008.

FRANKE, R; DOLL, C.; EICHLER, J. Peptide ligation through click chemistry for the generation of assembled and scaffolded peptides. **Tetrahedron letters**, v. 46, p. 4479-4482, 2005.

GEDYE, R.; SMITH, F.; WESTAWAY, K.; ALI, H.; BALDISERA, L.; LABERGE, L.; ROUSELL, J. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 27, p. 279-282, 1986.

GIGUERE,R. J.; BRAY, T. L.; DUNCAN, M. S.; MAJETICH, G.. Application of commercial microwave ovens to organic synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 27, p. 4945-4948,1986.

GUELL, I. Peptidotriazoles with antimicrobial activity against bacterial and fungal plant Pathogens. **Peptides**, v. 33, p. 9-17, 2012.

HALKES, K. M.; HILAIRE, P. M. ST.; JANSSON, A. M.; GOTFREDSEN, C. H.; MELDAL, M. Synthesis and application of sialic acid-containing building blocks for glycopeptide libraries. Establishing glycosylation condition**. Journal of the Chemical. Society, Perkin Transactions**, v. 1, p. 2127–2133, 2000.

HAM, S.; KIM, Y. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. **Tetrahedron**, v. 60, p. 2447-2467, 2004.

HARIDAS, V.; LAL, K.; SHARMA, Y. K. Design and synthesis of triazole-based peptide dendrimers. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 4719–4722, 2007.

HIMO, F.; LOVELL, T.; HILGRAF, R.; ROSTOVTSEV, V. V.; NOODLEMAN, L.; SHARPLESS, K. B.; FOKIN, V. V. Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, p. 210-216, 2005.

HOLEMANN, A.; SEEBERGER, P. H. Carbohydrate diversity: synthesis of glycoconjugates and complex carbohydrates**. Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, p. 615, 2004.

HUANG, Z. H; SHI, L.; MA, J.; SUN, Z.; CAI, H.; CHEN, Y.; ZHAO, Y.; LI, Y. A Totally Synthetic, Self-Assembling, Adjuvant-Free MUC1 Glycopeptide Vaccine for Cancer Therapy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, p. 8730−8733, 2012.

HUGHES, J.; SMITH, T. W.; KOSTERLITZ, H. W.; FOTHERGILL, LINDA A.; MORGAN, B. A.; MORRIS, H. R. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. **Nature**, v. 258, p. 577-9, 1975.

ISIDRO-LLOBET, A.; ALVAREZ, M. E ALBERICIO, F. "Amino Acid-Protecting Groups". **American Chemical Society**, v. 109, p. 2455-2504, 2009.

JELLY, R.; LEWISA, S. W.; LENNARDB, C.; LIM, K. F.; ALMOG, J. Substituted naphthoquinones as novel amino acid sensitive reagents for the detection of latent fingermarks on paper surfaces. **Talanta**, v. 82, p. 1717–1724, 2010.

KAPPE, C. O. Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, p. 6250 –6284, 2004.

KE, Z.; CHOW, H. F.; CHAN, M. C.; LIU, Z.; SZE, K. H. Head-to-Tail Dimerization and Organogelating Properties of Click Peptidomimetics. **Organic Letters**, v. 14, p. 394-397, 2012.

KEDING, S. J.; ENDO, A.; DANISHEFSKY, S. J. Synthesis of non-natural glycosylamino acids containing tumor-associated carbohydrate antigens. **Tetrahedron**, v. 59, p. 7023-7031, 2003.

KENT, S. B. H."Chemical synthesis of peptides and proteins". **Annual Review of Biochemistry**, v. 57, p. 957-989, 1988.

KITAMURA, K.; KANGAWA, K.; KAWAMOTO, M.; ICHIKI, Y.; NAKAMURA, S.; MATSUO, H.; ETO, T. Adrenomedullin: A novel hypotensive peptide isolated from human

pheochromocytoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 192, p. 553-60, 1993.

KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 40, p. 2004-2021, 2001.

LEE, S-H, KIM, S. J.; LEE, Y. S.; SONG, M. D.; KIM, I. H.; WON, H. S. De novo generation of short antimicrobial peptides with simple amino acid composition. **Regulatory Peptides**, v. 166, p. 36–41, 2011.

LEITE, J. R. S. A.; SILVA, L. P.; RODRIGUES, M. I. S.; PRATES, M. V.; BRAND G. D.; LACAVA, B. M.; AZEVEDO, R. B.; BOCCA, A. L.; ALBUQUERQUE, S.; BLOCH, C. J. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. **Peptides**, v. 26, p. 565-573, 2005.

LE QUEMENT, S. T.; ISHOEY, M.; PETERSEN, M. T.; THASTRUP, J.; HAGEL, G.; NIELSEN, T. E. Solid-Phase Synthesis of Smac Peptidomimetics Incorporating Triazoloprolines and Biarylalanines. **ACS Combinatiorial Science**, v. 13, p. 667-675, 2011.

LI, Y.; XIANGA, Q.; ZHANGA, Q.; HUANGA, Y.; SUA, Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides**, v. 37, p. 207–215, 2012.

LI, J. F.; ZHANG, J.; XU, X. Z.; HAN, Y. Y.; CUI, X. W.; CHEN, Y.; ZHANG, S. Q. The antibacterial peptide ABP-CM4: the current state of its production and applications. **Amino Acids**, v. 42, p. 2393–2402, 2012a.

LIANG, J. F.; YANG, V. C. Synthesis of doxorubicin-peptide conjugates with multidrug resistant tumor cell killing activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.15,p. 5071–5075, 2005.

LIU, Y.; ZHANG, L.; WAN, J.; LI, Y.; Xu, Y.; PAN, Y. Design and synthesis of cyclo[-Arg-Gly-Asp-Ψ (triazole)- Gly-Xaa-] peptide analogues by click chemistry. **Tetrahedron**, v. 64, p. 10728-10734, 2008.

MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C.; M. MIRANDA, T. M. Síntese química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 781-789, 2004.

MARQUARDT, M.; LIMA, V. L. E. Síntese orgânica em fase sólida e seus suportes poliméricos mais empregados. **Química Nova**, v. 24, p. 846-855, 2001.

MEINJOHANNS, E.; MELDAL, M.; JENSEN, T.; WERDELIN, O.; GALLI-STAMPINO, L.; MOURITSEN, S.; BOCK, K. Versatile solid-phase thiolytic reduction of azido and N-Dts groups in the synthesis of haemoglobin (67–76) O-glycopeptides and photoaffinity labelled analogues to study glycan T-cell specificity. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v. 6, p. 871-884, 1997.

MELDAL, M.; TORNOE, C. W. Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 2952–3015, 2008.

MERRIFIELD, B. Solid phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, p. 2149-2154, 1963.

MONTALBETTI, C.; FALQUE, V. "Amide bond formation and peptide coupling". **Tetrahedron**, v. 61, p. 10827-10852, 2005.

MORRISETT, J. D.; GUYTON, T. R.; GAUBATZ, J. W.; GOTTO, A. M. "Lipoprotein (a): struture, metabolism and epidemiology". In: **Plasma lipoproteins.** Amsterdam : Elsevier, 1987.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5 ed. New York : W.H. Freeman, 2008.

NYAME, A. K.; KAWAR, Z. S.; CUMMINGS, R. D. Antigenic glycans in parasitic infections: implications for vaccines and diagnostics. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 426, p. 182-200, 2004.

NYFFELER, P. T.; LIANG, C.; KOELLER, K. M.; WONG, C. The Chemistry of Amine-Azide Interconversion: Catalytic Diazotransfer and Regioselective Azide Reduction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, p. 10773-10778, 2002.

PATARROYO, M. E.; AMADOR, R.; CLAVIJO, P.; MORENO, A.; GUZMAN, F.; ROMERO, P.; TASCON, R.; FRANCO, A.; MURILLO, L. A.; PONTON, G.; TRUJILLO, G. A Synthetic Vaccine Protects Humans against Challenge with Asexual Blood Stages of Plasmodium-Falciparum Malaria. **Nature**, v. 332, p. 158-161, 1988.

PEDERSEN, D. S.; ABELL, A. 1,2,3-Triazoles in Peptidomimetic Chemistry. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 2399–2411, 2011.

PENNA, C.; TULLIO, F.; PERRELLI, M.-G.; MANCARDI, D.; PAGLIARO, P. Cardioprotection Against Ischemia/Reperfusion Injury and Chromogranin A Derived Peptides. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p.4074-4085, 2012.

PEREIRA, V. L.; SERRANO, A.; ALMEIDA, I. C.; RODRIGUES, M. M. Mucin-like molecules from a negatively charged coat that protects Trypanosoma cruzi trypomastigostes form from killing by human anti-α-galatosyl antibodies. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 1299-1307, 2000.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; COSTA, F.; RIBEIRAO, M.; SOARES, I. S.; ARENA, F.; SCHENKMAN, S.; RODRIGUES, M. M. Comparison of antibody and protective immune responses against *Trypanosoma cruzi* infection elicited by immunization with a parasite antigen delivered as naked DNA or recombinant protein. **Parasite Immunology.**, v. 21, p. 103–110, 1999.

PREVIATO, L. M.; JONES, C.; XAVIER, M. T.; WAIT, R.; TRAVASSOS, L. R.; PARODI, A. J.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Structural Characterization of the Major

Glycosylphosphatidylinositol Membrane-anchored Glycoprotein from Epimastigote Forms of *Trypanosoma cruzi* Y-strain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 7241, 1995.

PURCELL, A. W.; MCCLUSKEY, J.; ROSSJOHN, J. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. **Nature**, v. 6, p.404-4014, 2007.

PURCELL, A. W.; ZENG, W.; MIFSUD, N. A.; ELY, L. K.; MACDONALD, W. A.; JACKSON, D. C. Dissecting the Role of Peptides in the Immune Response: Theory, Practice and the Application to Vaccine Design. **Journal of Peptide Science**., v. 9, p. 255–281, 2003.

REICHERT, J. Development Trends for Peptide Therapeutics (2010 Report Summary). **Peptide Therapeutics Foundation**: 1-10, 2010.

ROBINSON, J. A. Horizons in Chemical Immunology - Approaches to Synthetic Vaccine Design. **Chimia**, v. 61, p. 84-92, 2007.

RODIONOV, V. O.; PRESOLSKI, S. I.; DIAZ, D. D.; FOKIN, V. V.; FINN, M. G. Ligand-Accelerated Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition: A Mechanistic Report. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p. 12705-12712, 2007.

RODIONOV, V. O.; FOKIN, V. V.; FINN, M. G. Mechanism of the Ligand-Free Cui-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, p. 2215-2220, 2005.

SCHMIDTKO, A.; LÖTSCH, J.; FREYNHAGEN, R.; GEISSLINGER, G. Ziconotide for treatment of severe chronic pain. **The Lancet**, v. 375, p. 1569–77, 2010.

SEITZ, O. Glycopeptide Synthesis and the Effects of Glycosylation on Protein Structure and Activity. **ChemBioChem**, v. 1, p. 214-246, 2000.

SILVA, P. I. JR.; DAFFRE, S.; BULET, P. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider Acanthoscurria gomesiana hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. **The Journal of Biological Chemistry, v.** 275**,** p. 33464-70**,** 2000**.**

SIRSKYJ, D.; DIAZ-MITOMA, F.; GOLSHANI, A.; KUMAR, A.; AZIZI, A. Innovative bioinformatic approaches for developing peptide-based vaccines against hypervariable viruses. **Immunology and Cell Biology**, v. 89, p. 81–89, 2011.

SLÓSARCZYK, A. T.; RAMAPANICKER, R.; NORBERGA, T.; BALTZER, L. Mixed pentafluorophenyl and o-fluorophenyl esters of aliphatic dicarboxylic acids: efficient tools for peptide and protein conjugation. **RSC Advances**, v. 2, p. 908–914, 2012.

SLOVIN, S. F.; KEDING, S. J.; RAGUPATHI, G. Carbohydrate vaccines as immunotherapy for cancer. **Immunology and Cell Biology**, v. 83, p. 418-28, 2005.

TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J.; BURCHELL, J.; MILES, D. W.; DALZIEL, M. MUC1 and cancer. **Biochimica et Biophysical Acta**, v. 1455, p. 301-313, 1999.

TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J.; FINN, O. J. Biology, biochemistry and immunology of carcinoma-associated mucins. **Immunology Today**, v. 18, p. 105-107, 1997.

TORNOE, C. W; CHRISTENSEN, C.; MELDAL, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 67, p. 3057-3064, 2002.

VALERO, M. V.; AMADOR, L. R.; GALINDO, C.; FIGUEROA, J.; BELLO, M. S.; MURILLO, L. A.; MORA, A. L.; PATARROYO, G.; ROCHA, C. L.; ROJAS, M. Vaccination with Spf66, a Chemically Synthesized Vaccine, against Plasmodium-Falciparum Malaria in Colombia. **The Lancet**, v. 341, p. 705-710, 1993.

VALVERDE, I. E.; LECAILLE, F.; LALMANACH, G.; AUCAGNE, V.; DELMAS, A. F. Synthesis of a Biologically Active Triazole-Containing Analogue of Cystatin A Through Successive Peptidomimetic Alkyne–Azide Ligation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, p. 718-722, 2012.

VARKI, A.; CUMMINGS, R.; ESKO, J.; FREEZE, H.; HART G.; MARTH, J. **Essentials in Glycobiology**. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York. 2009.

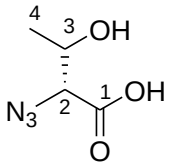
VICHIER-GUERRE, S.; LO-MAN, R.; HUTEAU, V.; DERIAUD, E.; LECLERC, C.; BAY, S. Synthesis and immunological evaluation of an antitumor neoglycopeptide vaccine bearing a novel homoserine Tn antigen. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 3567-3570, 2004.

VLASSARA, H.; M. R. PALACE. “Glycoxidation: the menace of diabetes and aging”. **Mount Sinai Journal of Medicine**, v. 70, p. 232-41, 2003.

WAN, Q.; CHEN, J.; CHEN, G.; DANISHEFSKY, S. J. A potentially valuable advance in the synthesis of carbohydrate-based anticancer vaccines through extended cycloaddition chemistry. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 71, p. 8244-9, 2006.

WONG, C-H. **Carbohydrate-based Drug Discovery**. 1 ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA: Weinheim, 2003.

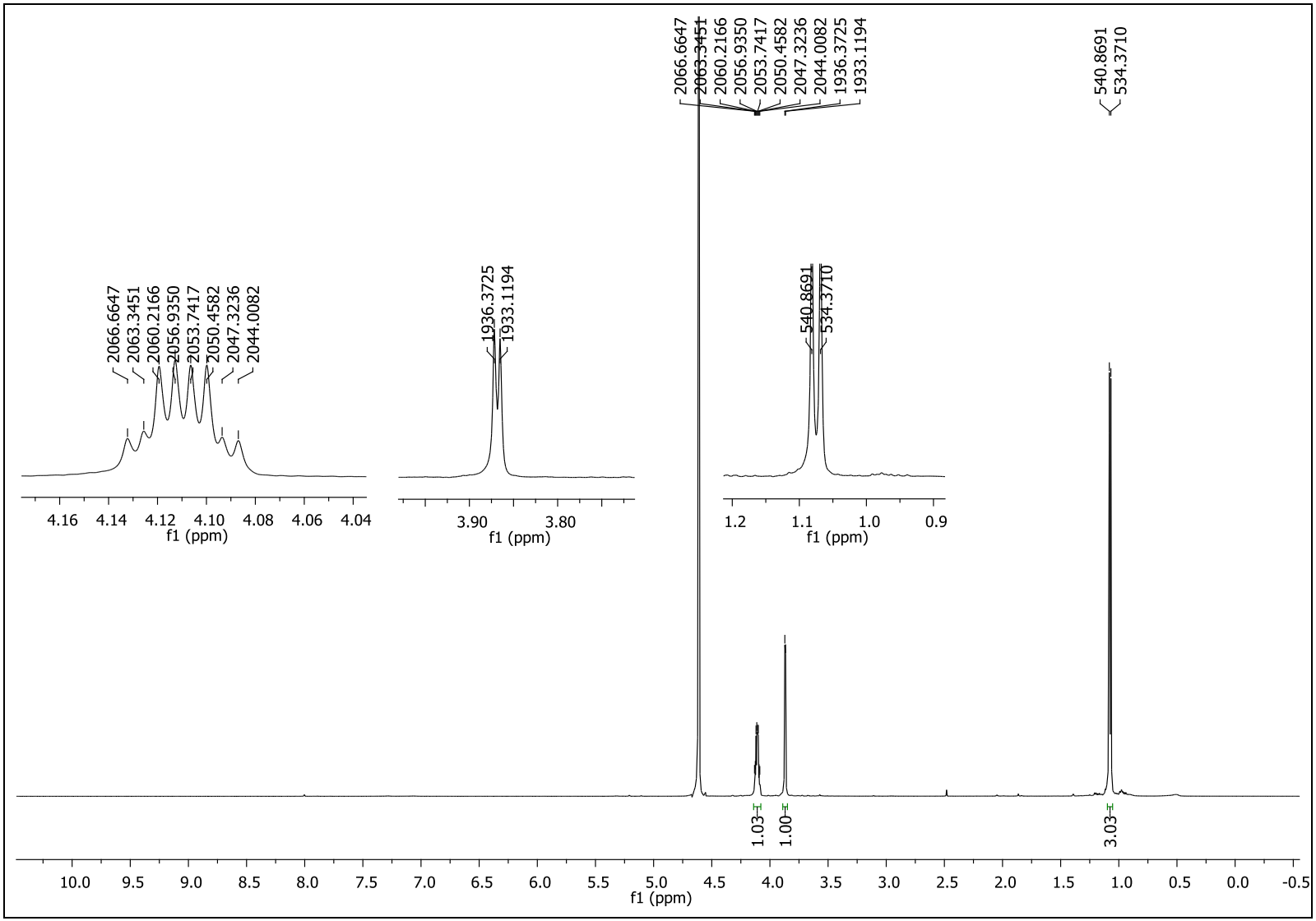
ZENG, Q.; SAHA, S.; LEE, L. A.; BARNHILL, H.; OXSHER, J.; DREHER, T.; WANG, Q. Chemoselective Modification of Turnip Yellow Mosaic Virus by Cu(I) Catalyzed Azide-Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction and Its Application in Cell Binding. **Bioconjugate Chemistry**, v. 22, p. 58-66, 2011.



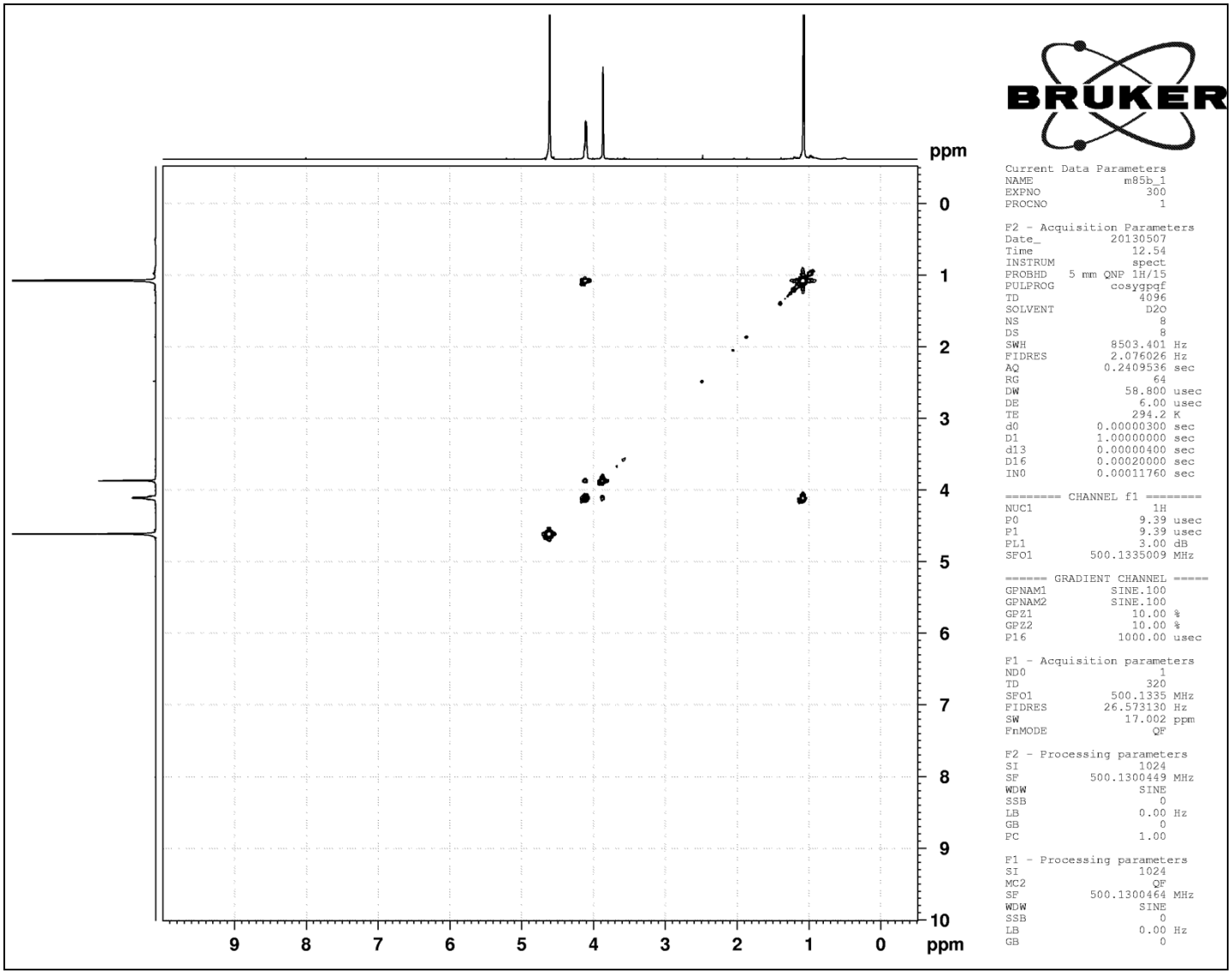
7

Tabela 7– Dados espectroscópicos do composto **7** referentes à RMN ^{1}H (D_2O, 500 MHz) e RMN ^{13}C (D_2O, 500 MHz).

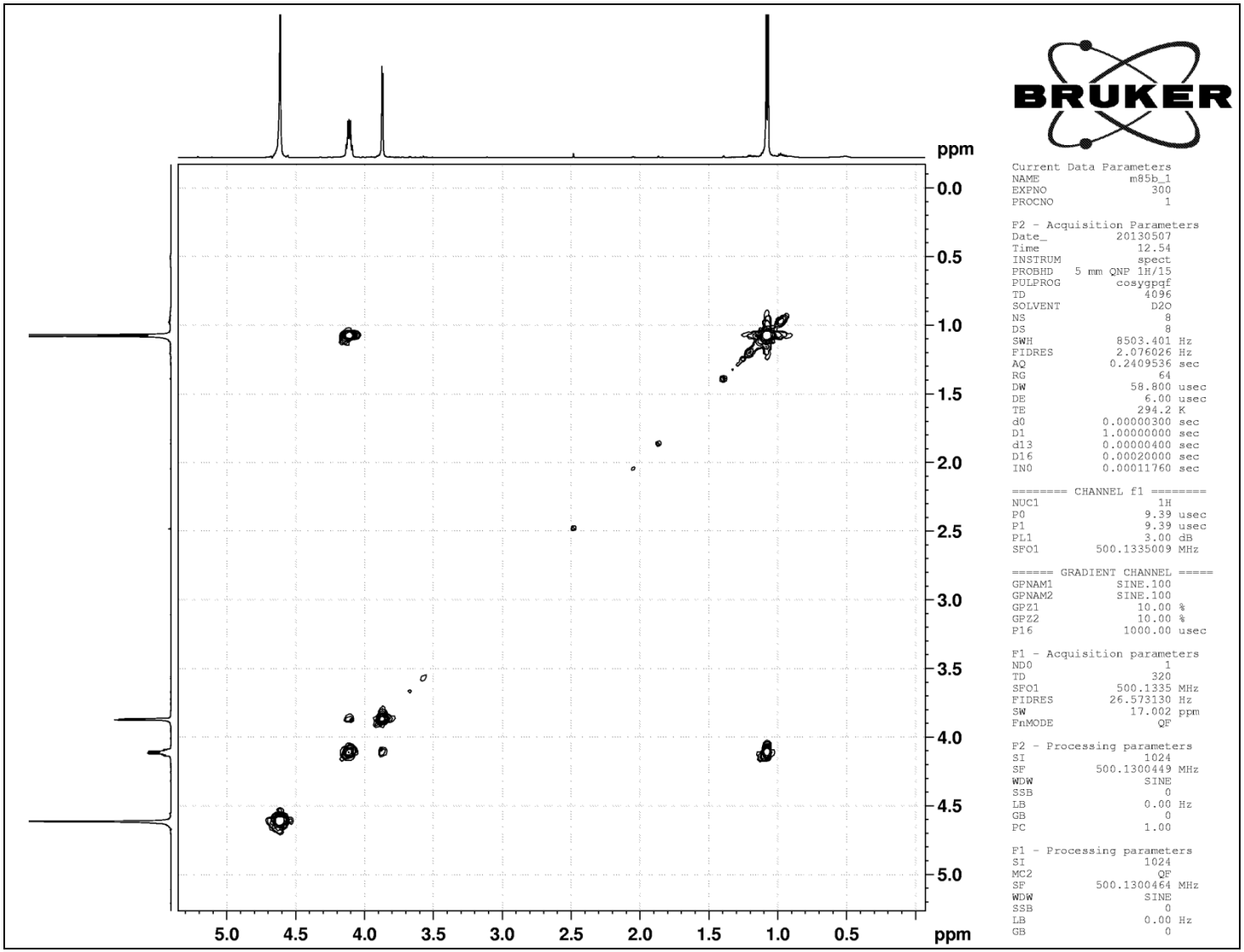
Número	**δ ^{1}H (ppm)**	**δ ^{13}C (ppm)**	**Integral relativa**	**Multiplicidade**	**Constante de acoplamento (Hz)**
1	-	173,03	-	-	-
2	3,87	67,47	1	d	$J_{2,3}$ 3,3
3	4,11	68,12	1	qd	$J_{3,2}$ 3,3; $J_{3,4}$ 6.5
4	1,07	18,92	3	d	$J_{4,3}$ 6.5



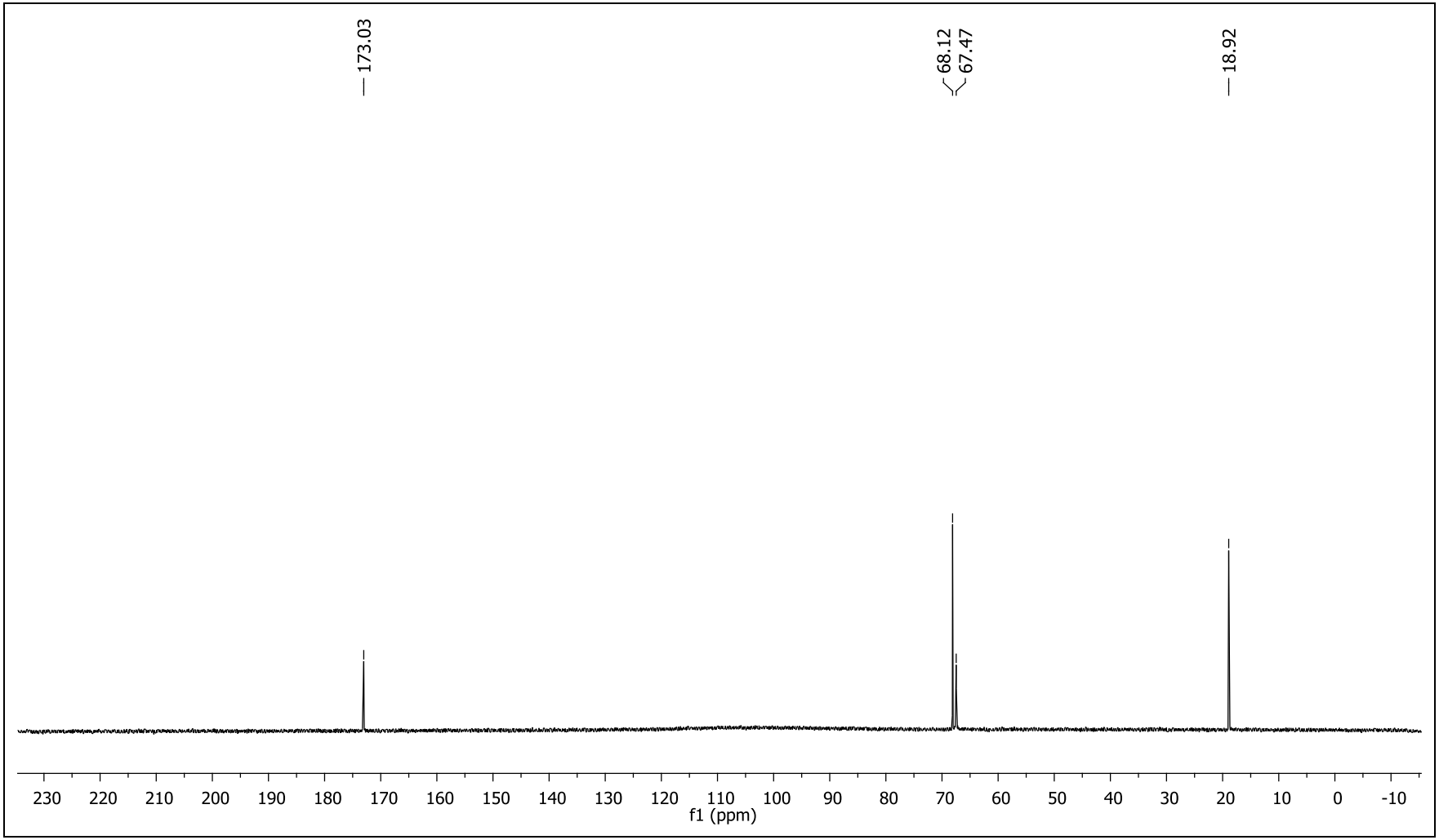
Anexo 1. Espectro de RMN ^{1}H (D_2O, 500 MHz) de **7**.



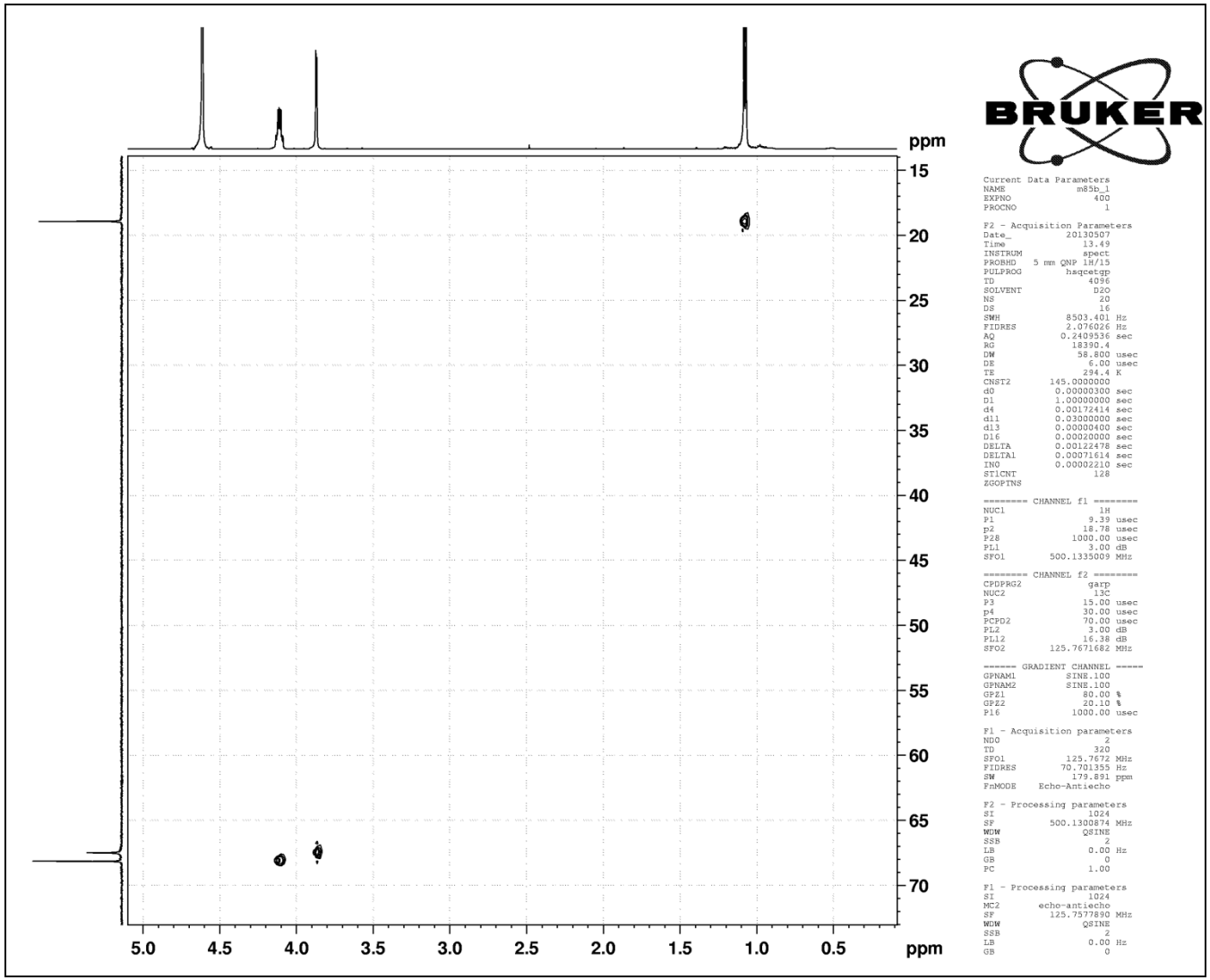
Anexo 1.1. Espectro de RMN ^{1}H COSY (D_2O, 500 MHz) de **7**.



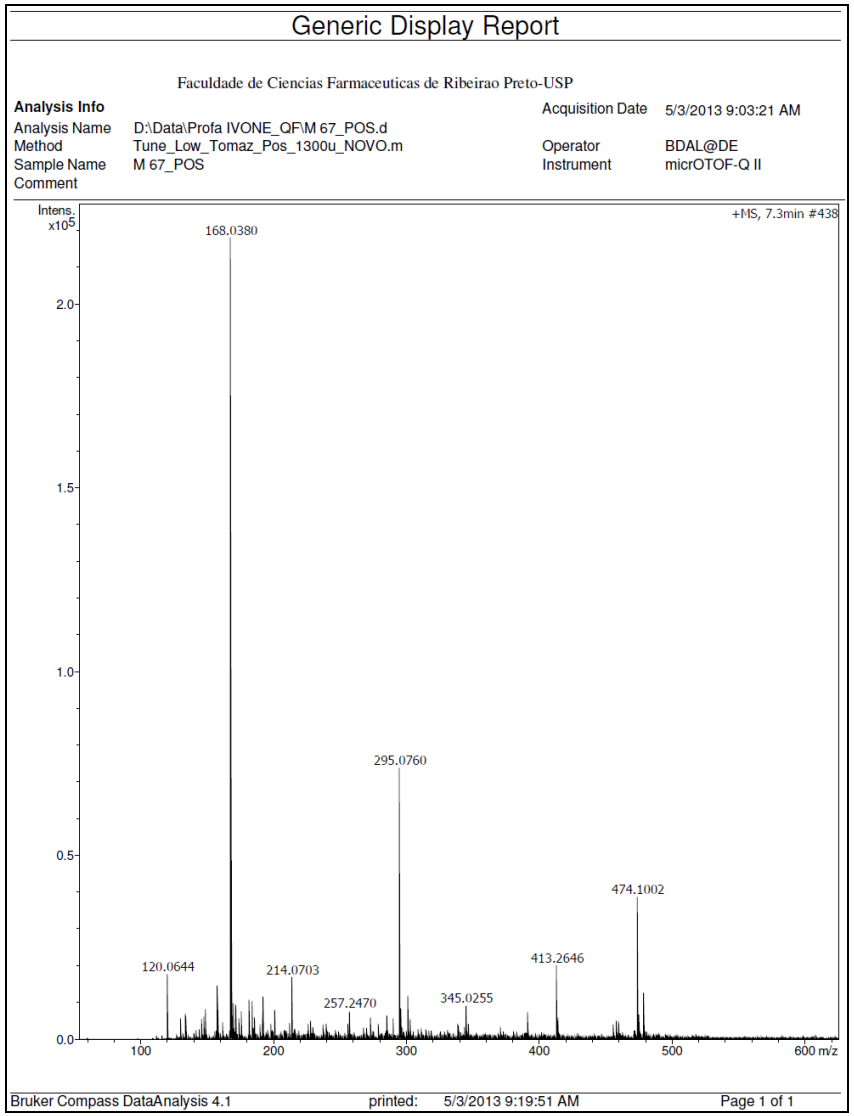
Anexo 1.1.1. Espectro de RMN ^{1}H COSY ampliado (D_2O, 500 MHz) de **7**.



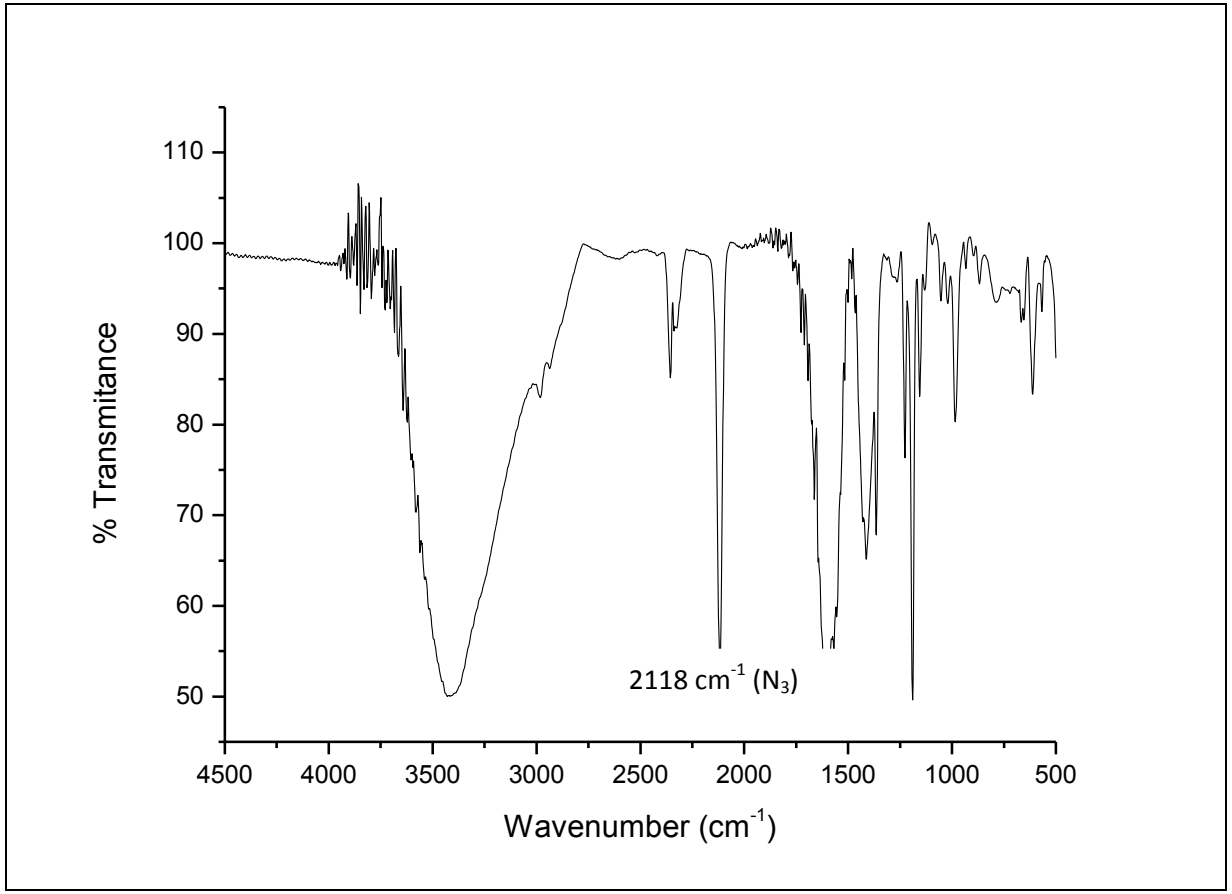
Anexo 1.2. Espectro de RMN ^{13}C (D_2O, 500 MHz) de **7**.



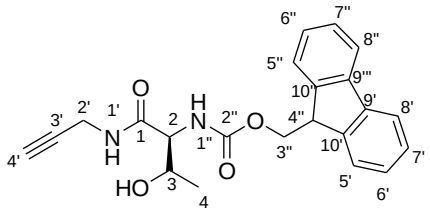
Anexo 1.2.1. Espectro de RMN HMQC ampliado (D_2O, 500 MHz) de **7**.



Anexo 1.3. Espectro de Massas de **7.** ESI-MS calculado para $C_4H_7N_3O_3Na^+$ [M + Na^+]: 168,0287; encontrado: 168,0380.



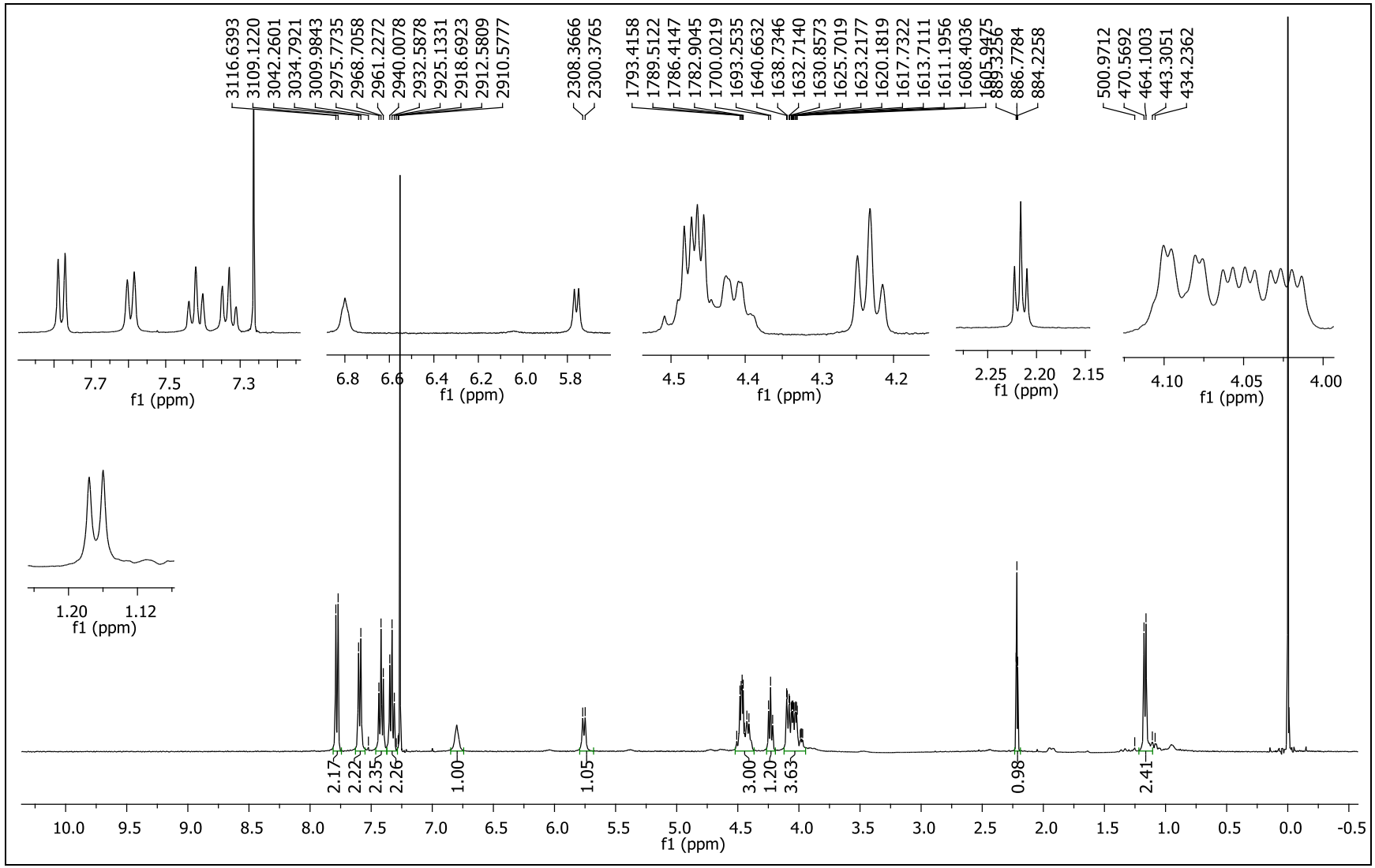
Anexo 1.4. Espectroscopia de infravermelho de **7**.



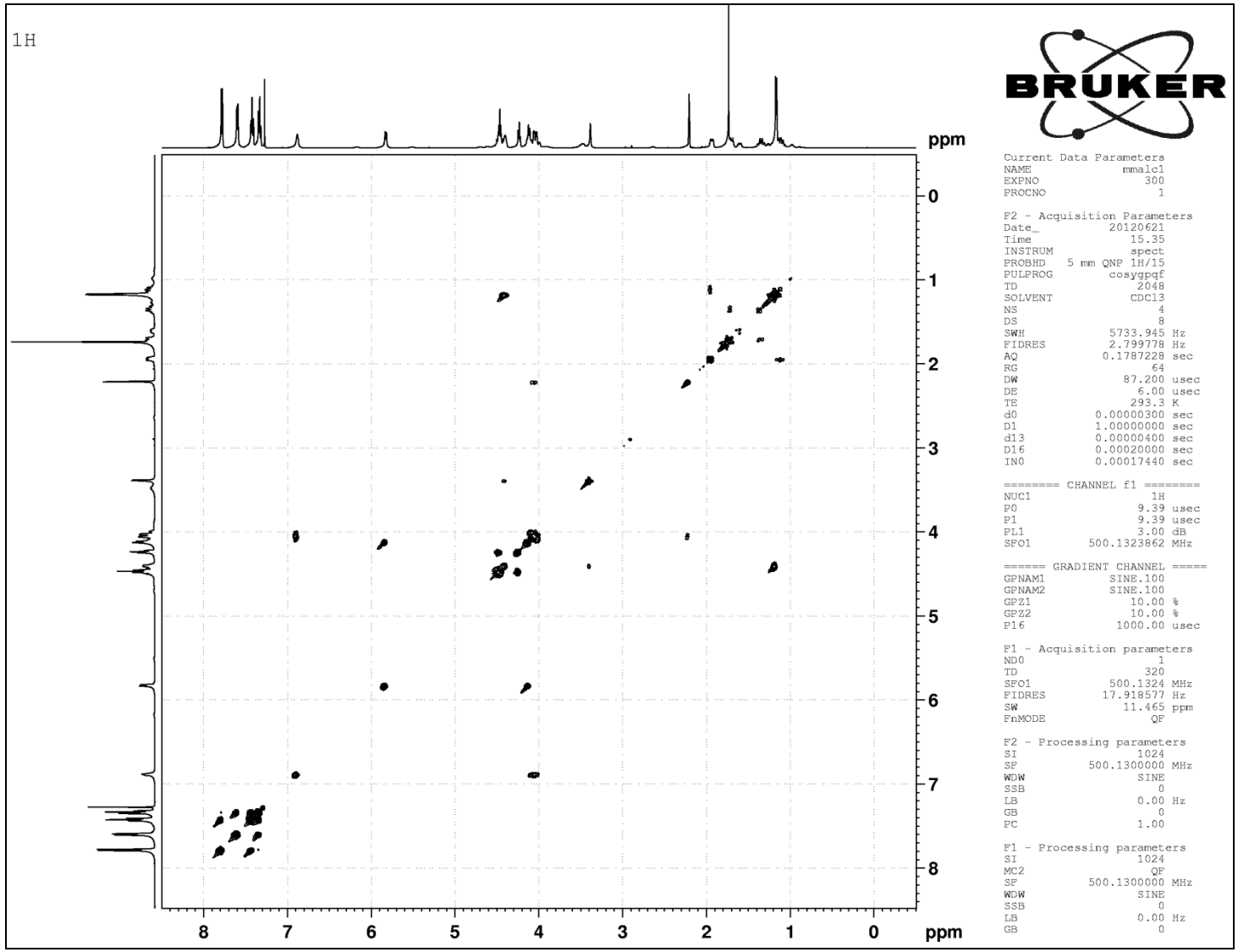
9

Tabela 8 – Dados espectroscópicos do composto **9** referentes à RMN ^{1}H e RMN ^{13}C.

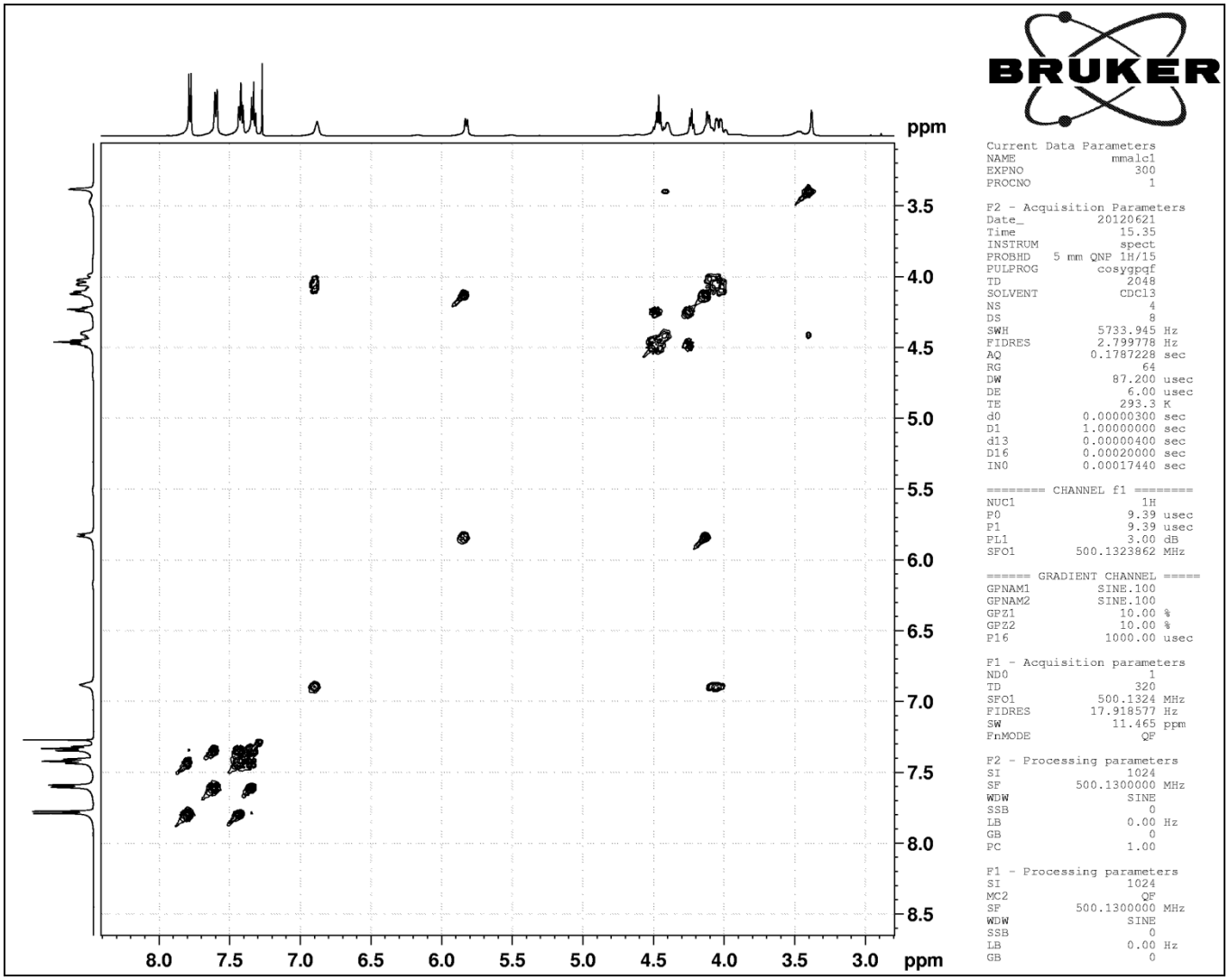
Número	δ ^{1}H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	-	170,87	-	-	-
2	4,12-4,00	58,12	3	m	-
3	4,50-4,38	66,46	3	m	-
4	1,15	18,12	3	d	$J_{4,3}$ 6,5
1'	6,78	-	1	s	-
2'	4,12-4,00	29,14	3	m	-
3'	-	78,88	-	-	-
4'	2,20	71,84	1	t	$J_{4',2'}$ 2,5
1''	5,73	-	1	d	$J_{1'',2}$ 8
2''	-	157,05	-	-	-
3''	4,50-4,38	67,28	3	m	-
4''	4,20	47,14	1	t	$J_{4'',3''}$ 6,8
5/5'	7,76	120,09	2	d	$J_{5,6}$ 7,6
6/6'	7,38	127,84	2	t	$J_{6,5}$ 7,6
7/7'	7,30	127,13	2	t	$J_{7,8}$ 7,3
8/8'	7,56	125,01	2	d	$J_{7,8}$ 7,3
9/9'	-	143,57	-	-	-
10/10'	-	141,35	-	-	-



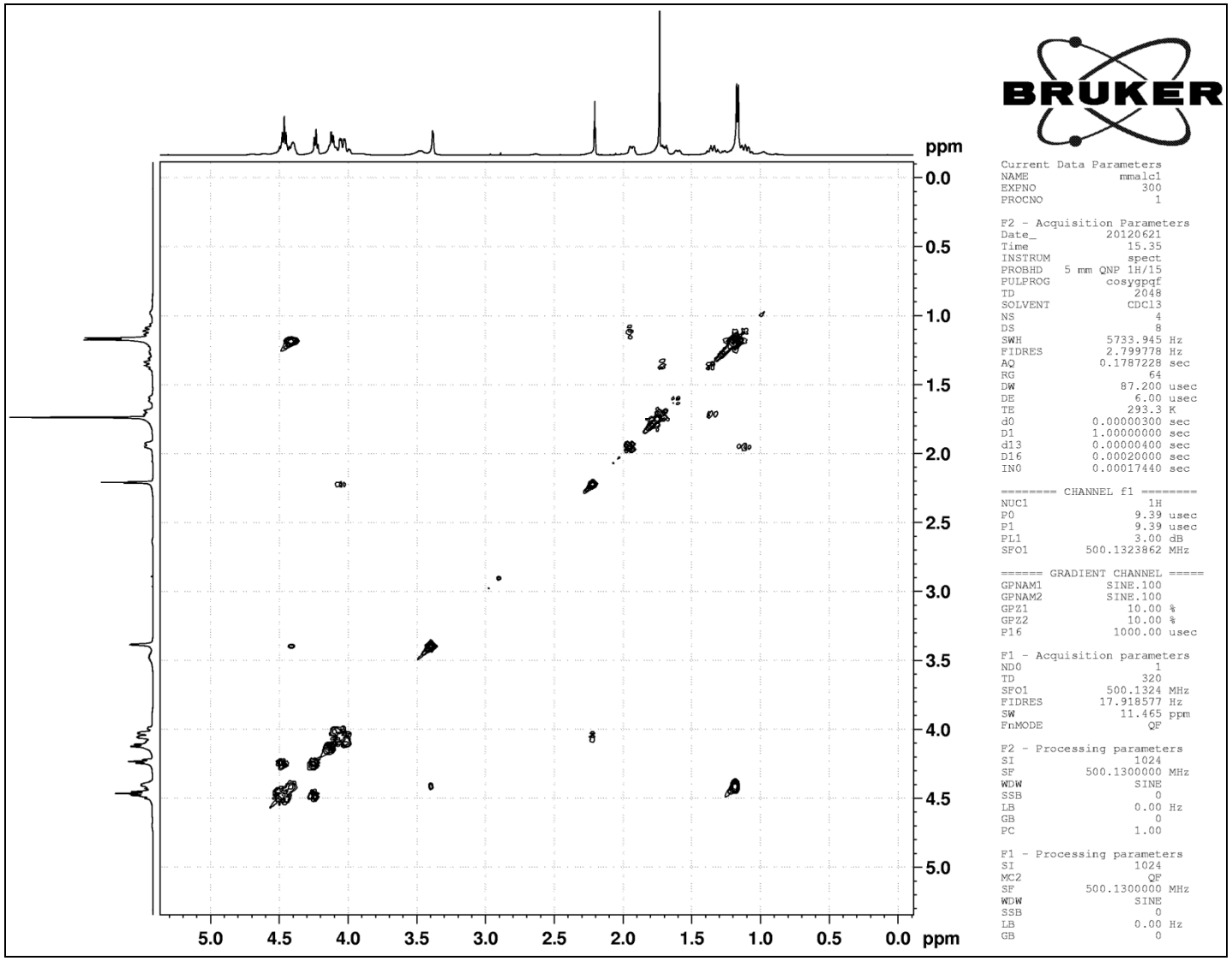
Anexo 2. Espectro de RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) de **9**.



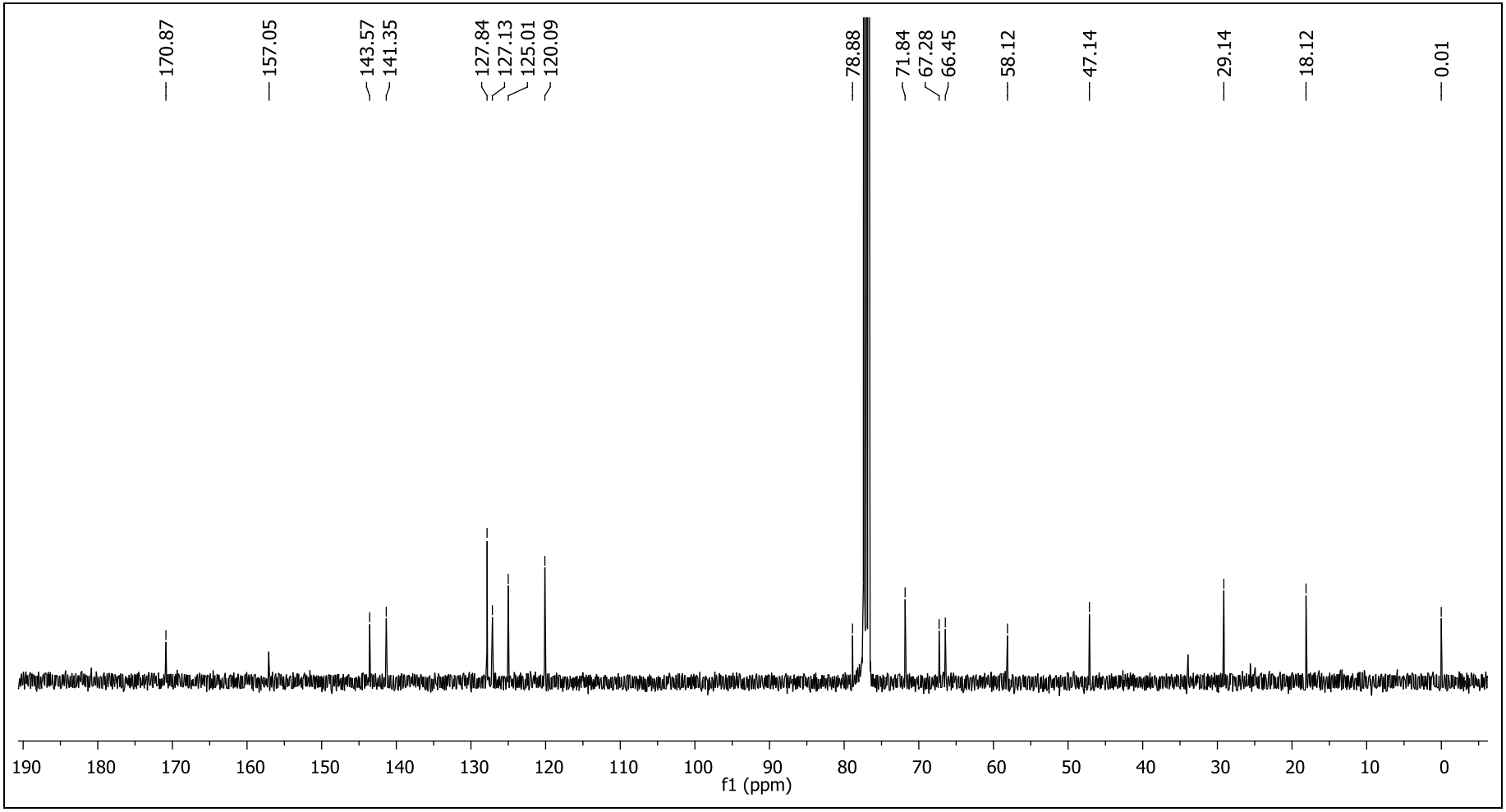
Anexo 2.1. Espectro de RMN ^{1}H COSY ($CDCl_3$, 400 MHz) de **9**.



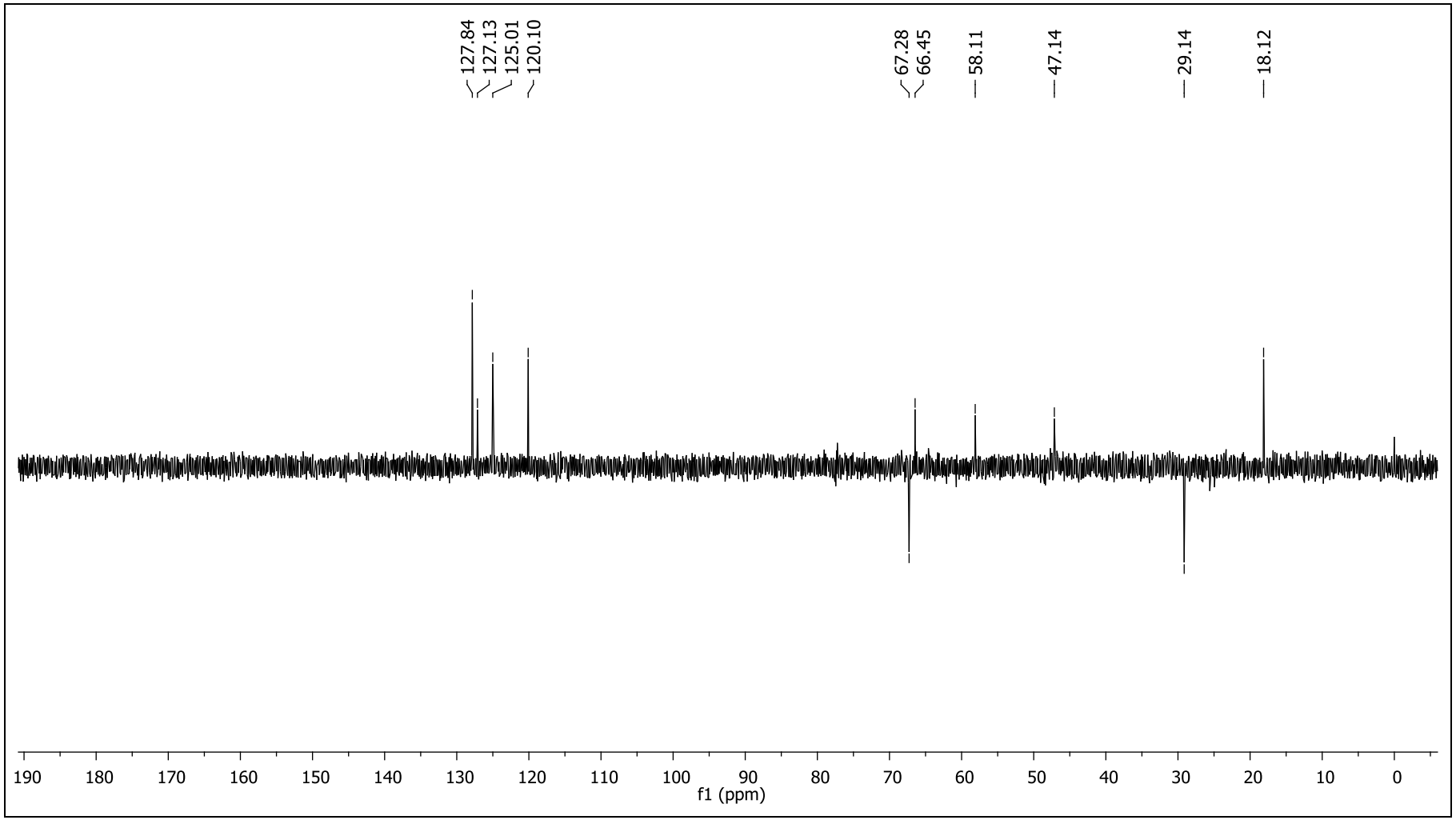
Anexo 2.1.1. Espectro de RMN ^{1}H COSY ampliado entre 9-2,5 ppm ($CDCl_3$, 400 MHz) de **9**.



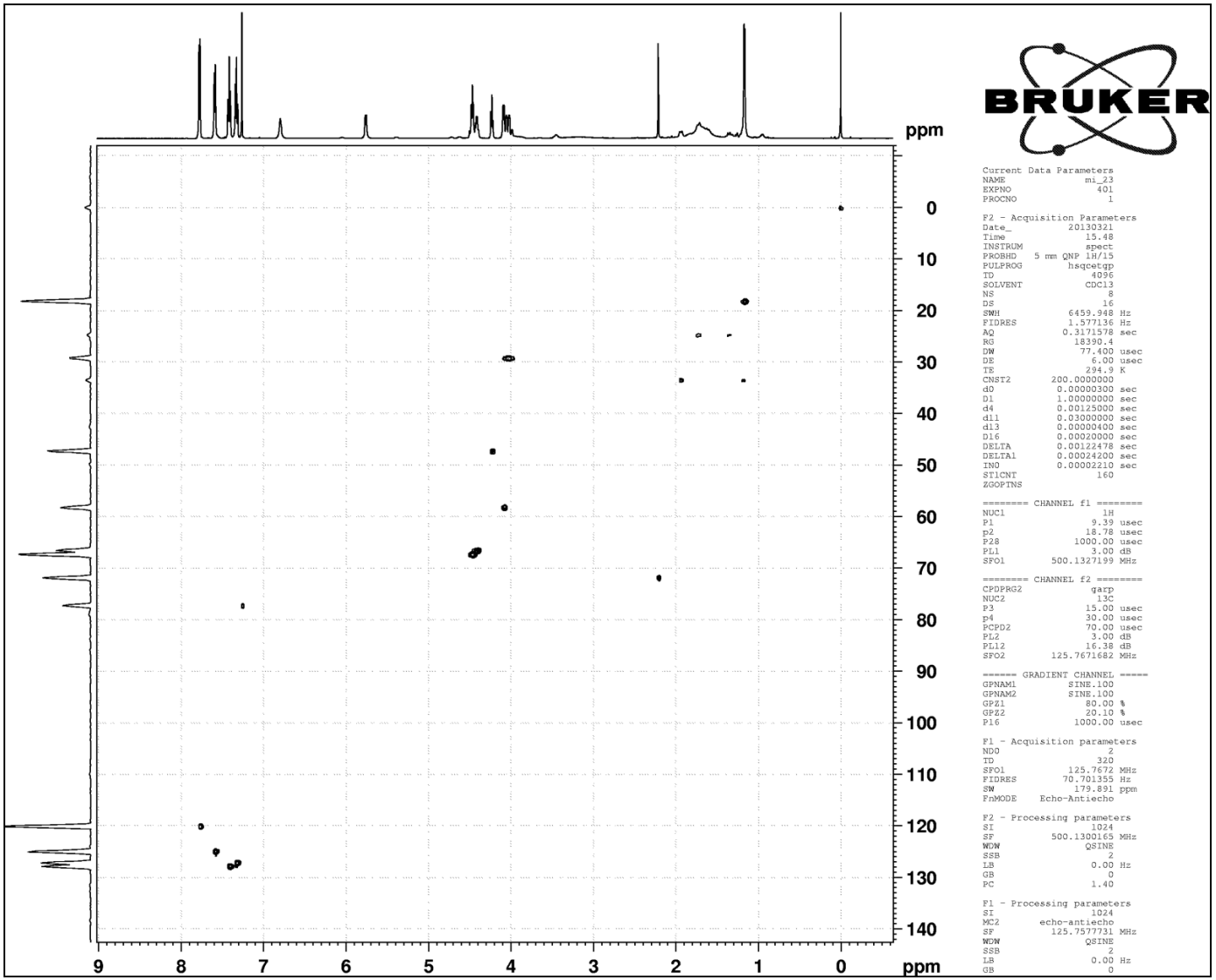
Anexo 2.1.2. Espectro de RMN ^{1}H COSY ampliado entre 6- 0ppm ($CDCl_3$, 400 MHz) de **9**.



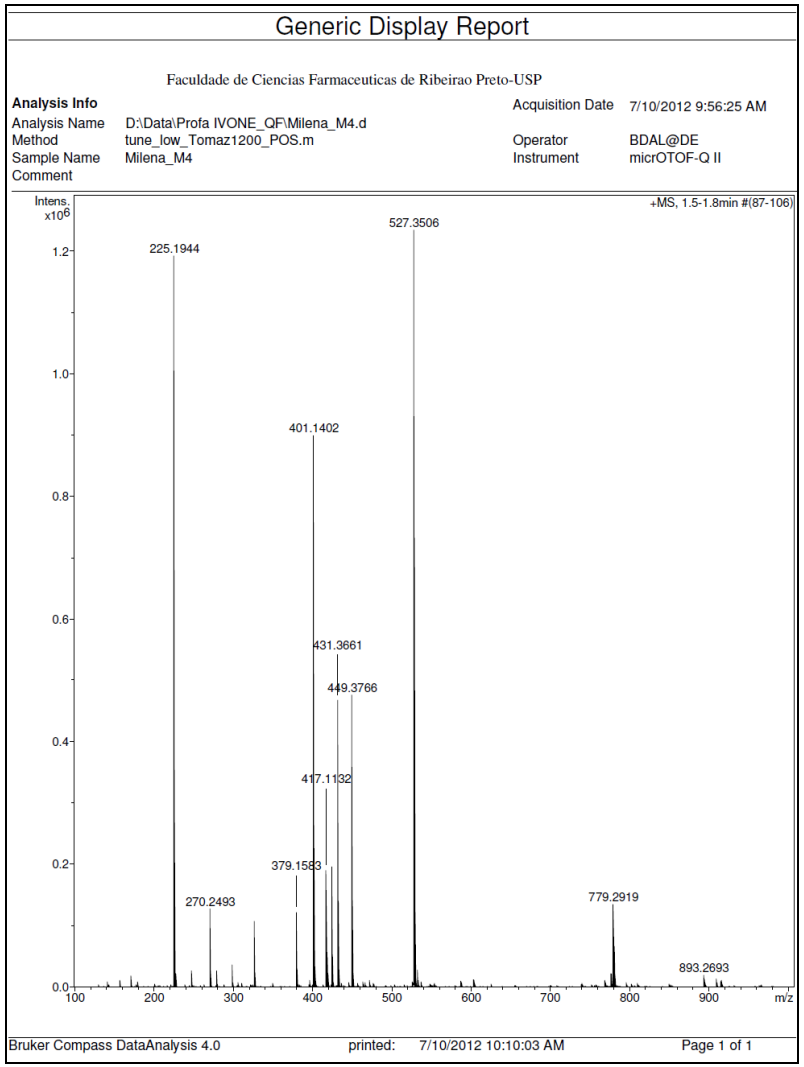
Anexo 2.2. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 400 MHz) de **9**.



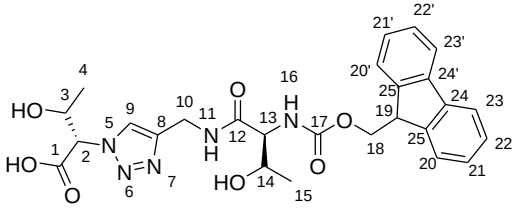
Anexo 2.2.1. Espectro de RMN ^{13}C DEPT ($CDCl_3$, 400 MHz) de **9**.



Anexo 2.2.2. Espectro de HMQC ($CDCl_3$, 400 MHz) de **9**.



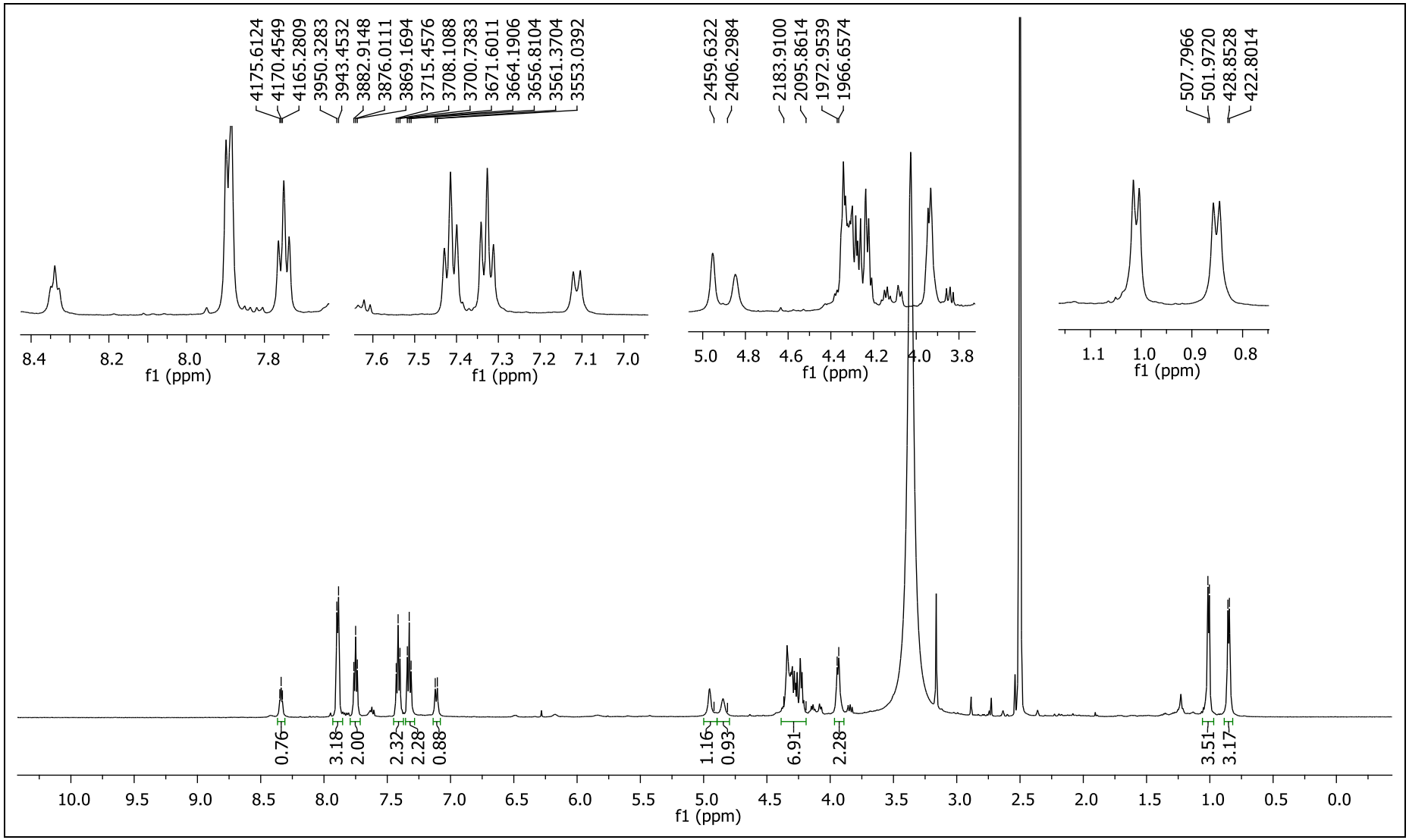
Anexo 2.3. Espectro de Massas de **9**. ESI-MS calculado para $C_{22}H_{22}N_2O_4H^+$ [M + H^+]: 379,1580; encontrado: 379,1583; calculado para $C_{22}H_{22}N_2O_4Na^+$ [M + Na^+]: 401,1380; encontrado: 401,1402; calculado para $C_{22}H_{22}N_2O_4K^+$ [M + K^+]: 417,2480; encontrado 417,1132.



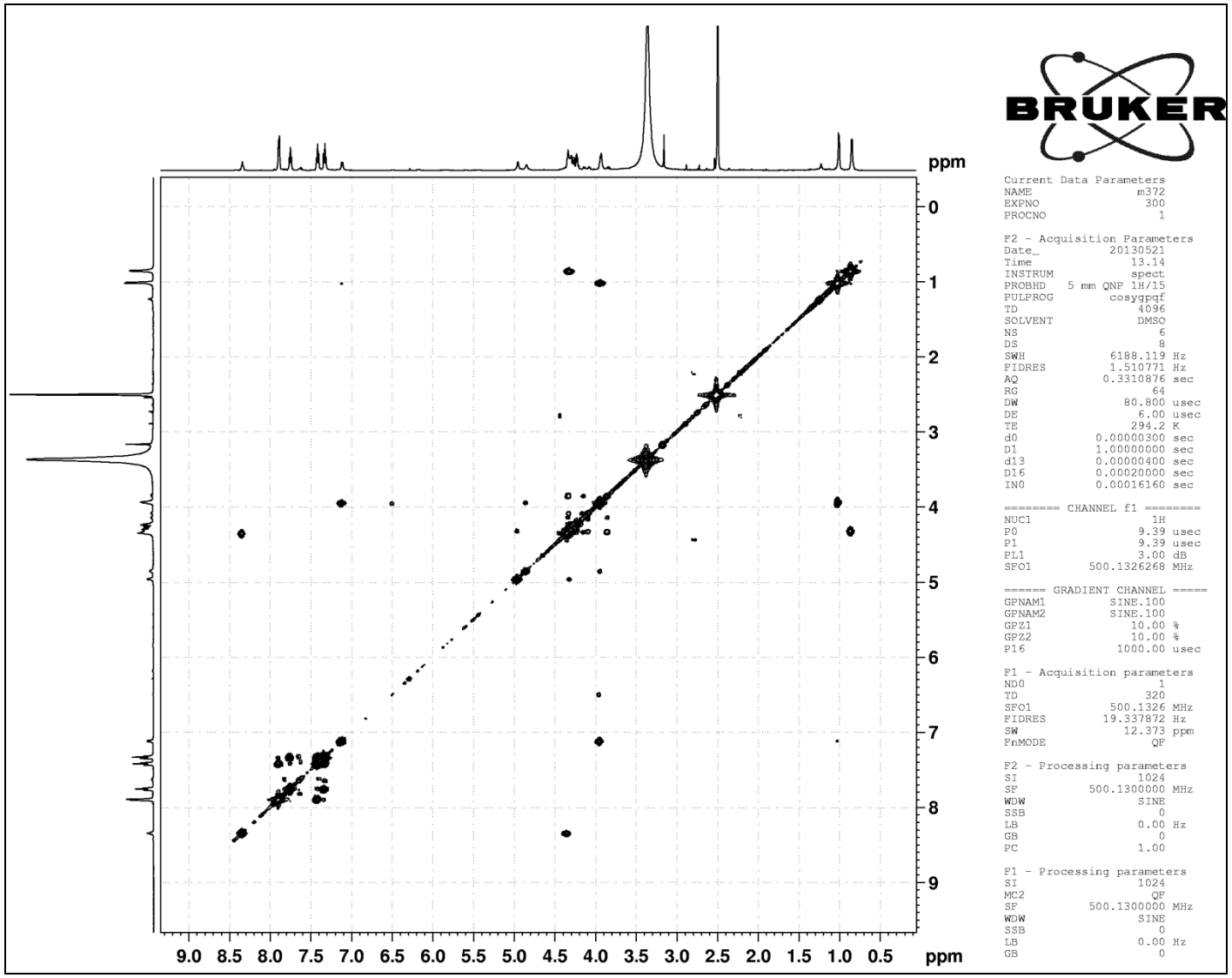
8

Tabela 9 – Dados espectroscópicos do composto **8** referentes à RMN ^{1}H (DMSO, 500 MHz) e RMN ^{13}C (DMSO, 500 MHz).

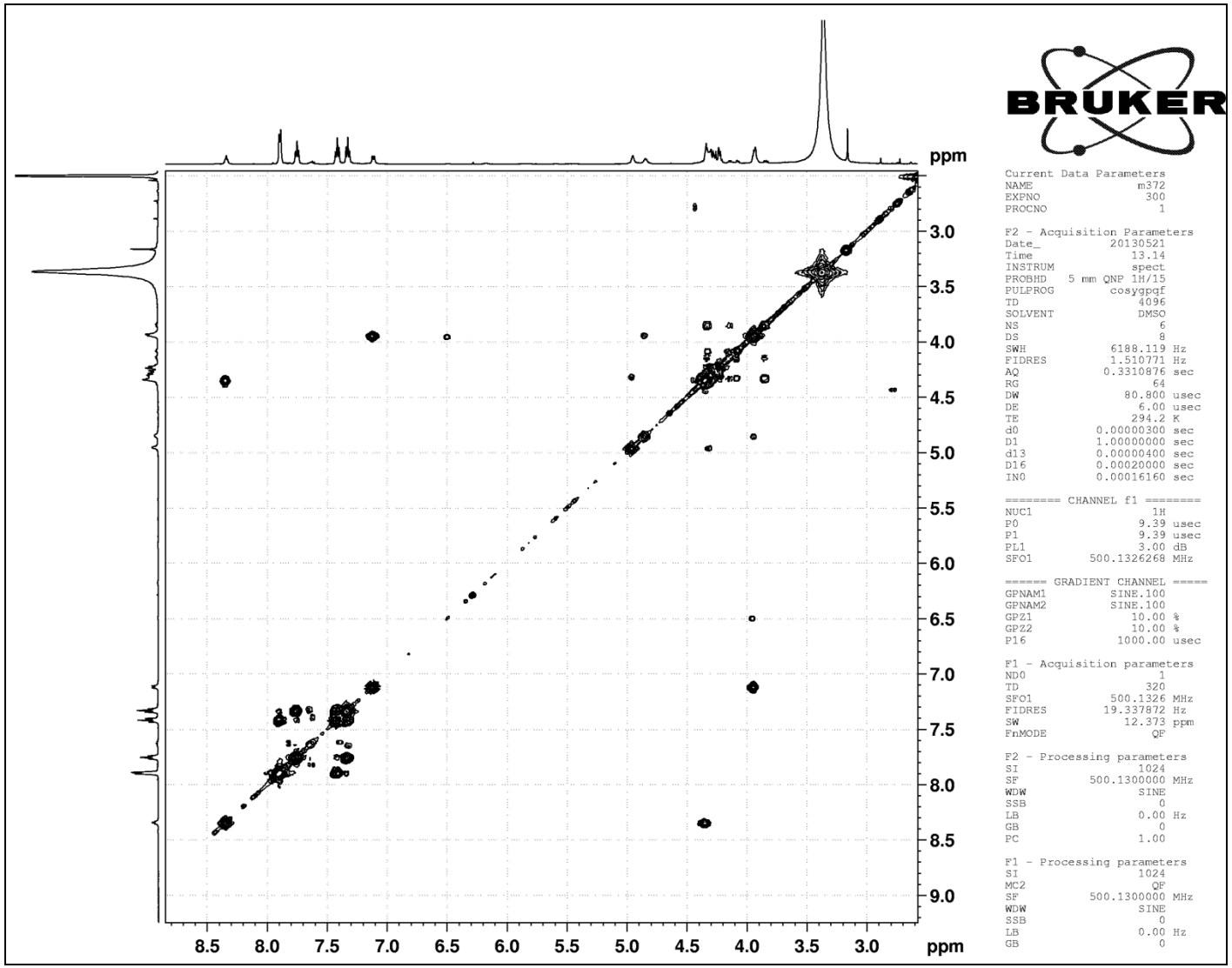
Número	δ ^{1}H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)
1	-	170,80	-	-	-
2	4,37-4,19	67,62	7	m	-
3	4,37-4,19	67,62	7	m	-
4	0,80	20,39	3	d	$J_{4,3}$ 6,1
8	-	144,28	-	-	-
9	8,31	123,78	1	t	$J_{9,10}$ 5,2
10	4,37-4,19	66,64	7	m	-
11	7,87	-	3	m	-
12	-	170,80	-	-	-
13	3,81	67,62	2	m	-
14	3,81	67,62	2	m	-
15	0,97	20,39	3	d	$J_{15,14}$ 5,8
16	7,09	-	1	d	$J_{16,13}$ 8,3
17	-	156,62	-	-	-
18	4,37-4,19	66,64	7	m	-
19	4,37-4,19	47,16	7	m	-
20/20’	7,87	120,61	3	m	-
21/21’	7,38	128,61	2	t	$J_{21,22}$ 7,4
22/22’	7,29	127,61	2	t	$J_{22,21}$ 7,4
23/23’	7,72	125,90	2	t	$J_{23,22}$ 6,9
24/24’	-	143,94	-	-	-
25/25’	-	141,22	-	-	-



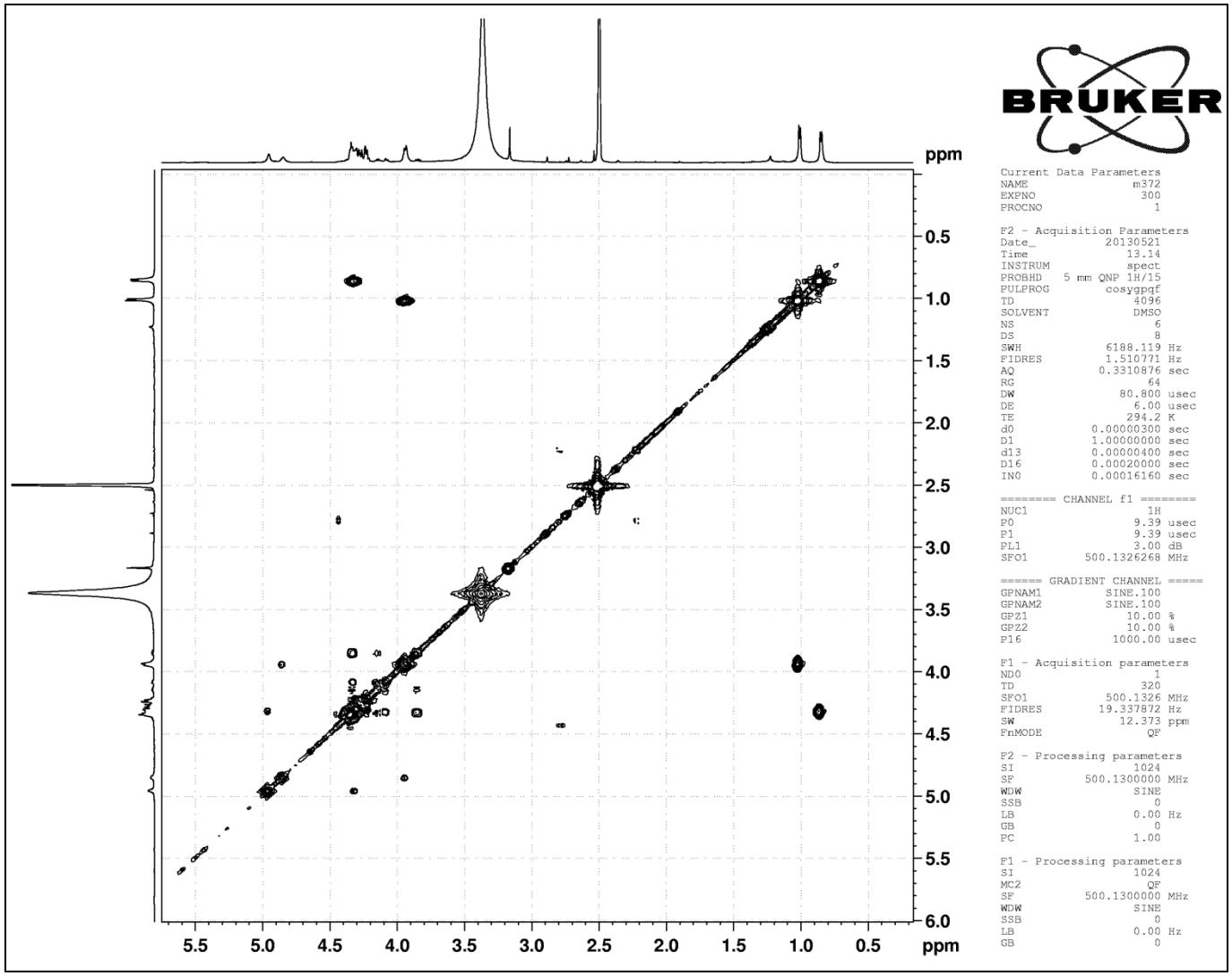
Anexo 3. Espectro de RMN ^{1}H (DMSO, 500 MHz) de **8**.



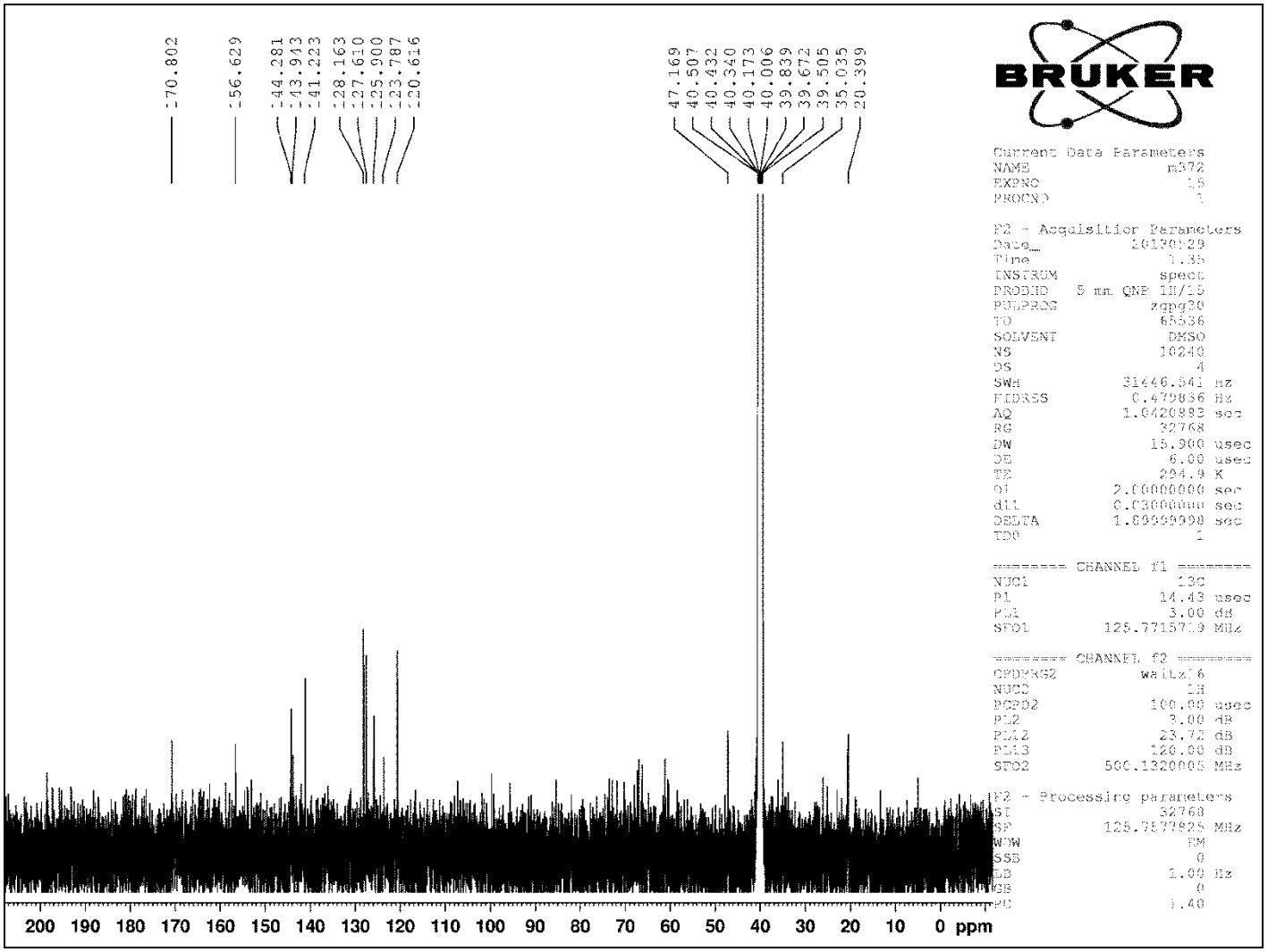
Anexo 3.1. Espectro de RMN ^{1}H COSY (DMSO, 500 MHz) de **8**.



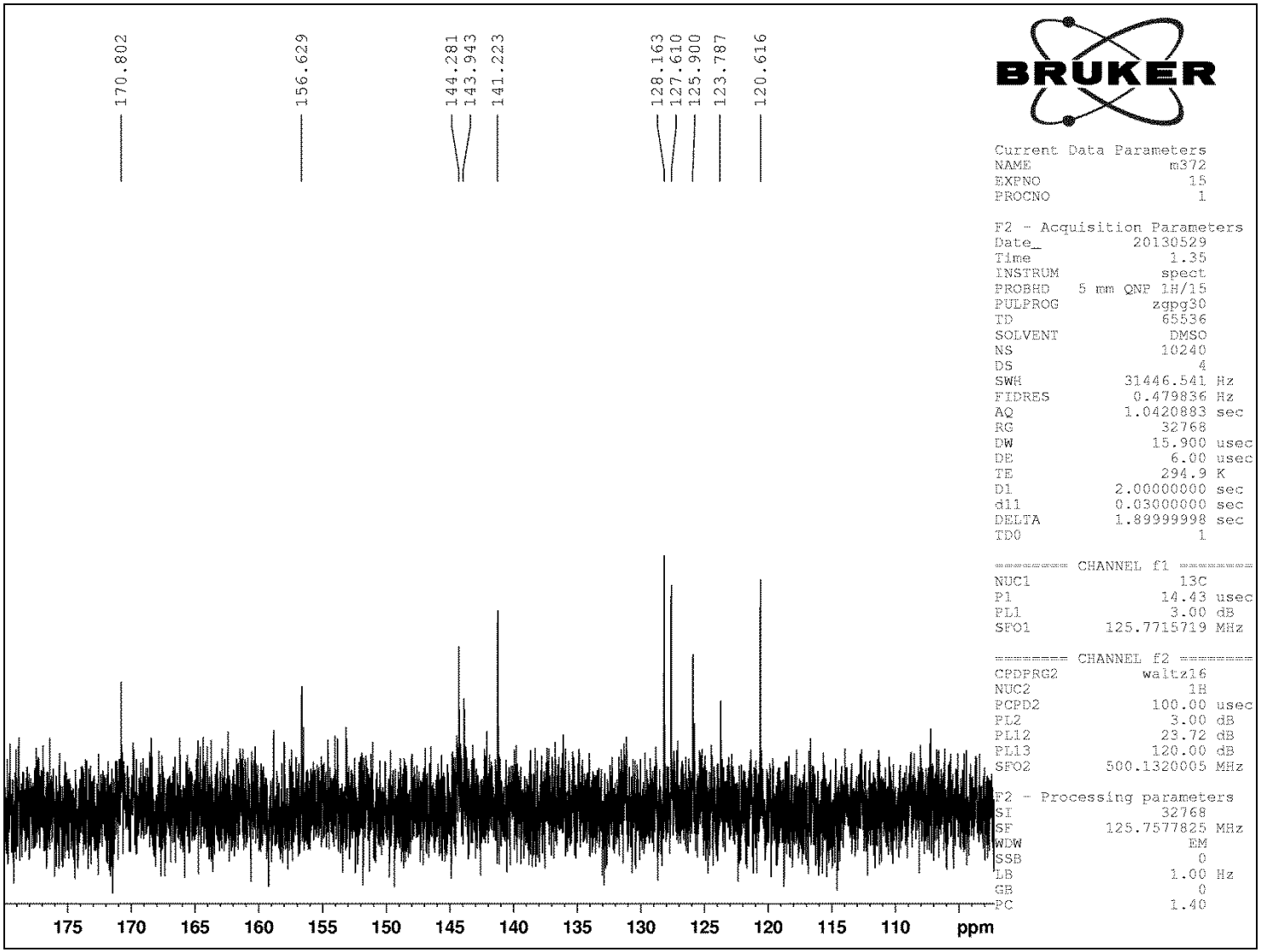
Anexo 3.1.1. Espectro de RMN ^{1}H COSY ampliado entre 9-2ppm (DMSO, 500 MHz) de **8**.



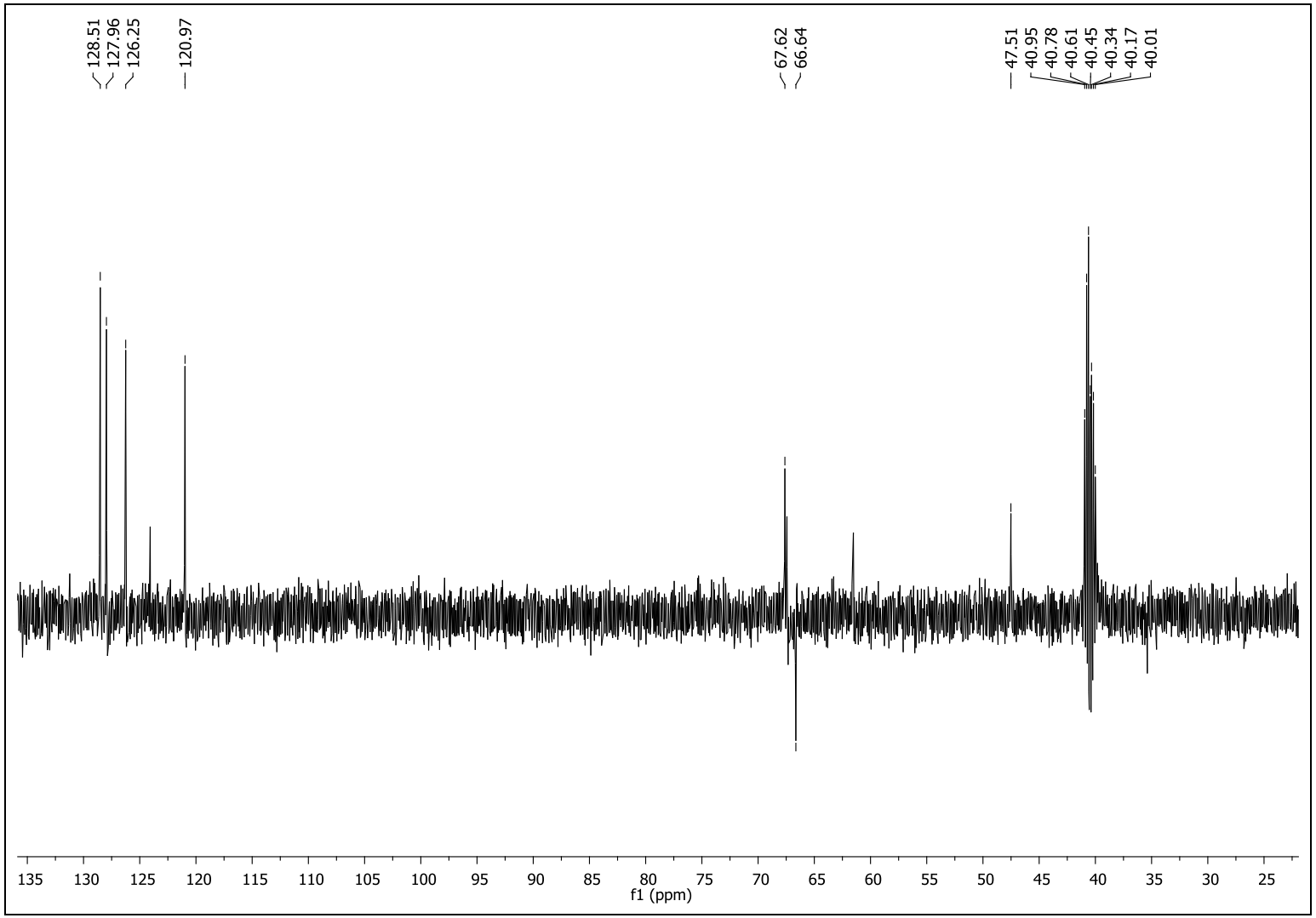
Anexo 3.1.2. Espectro de RMN ^{1}H COSY ampliado entre 6-0 ppm (DMSO, 500 MHz) de **8**.



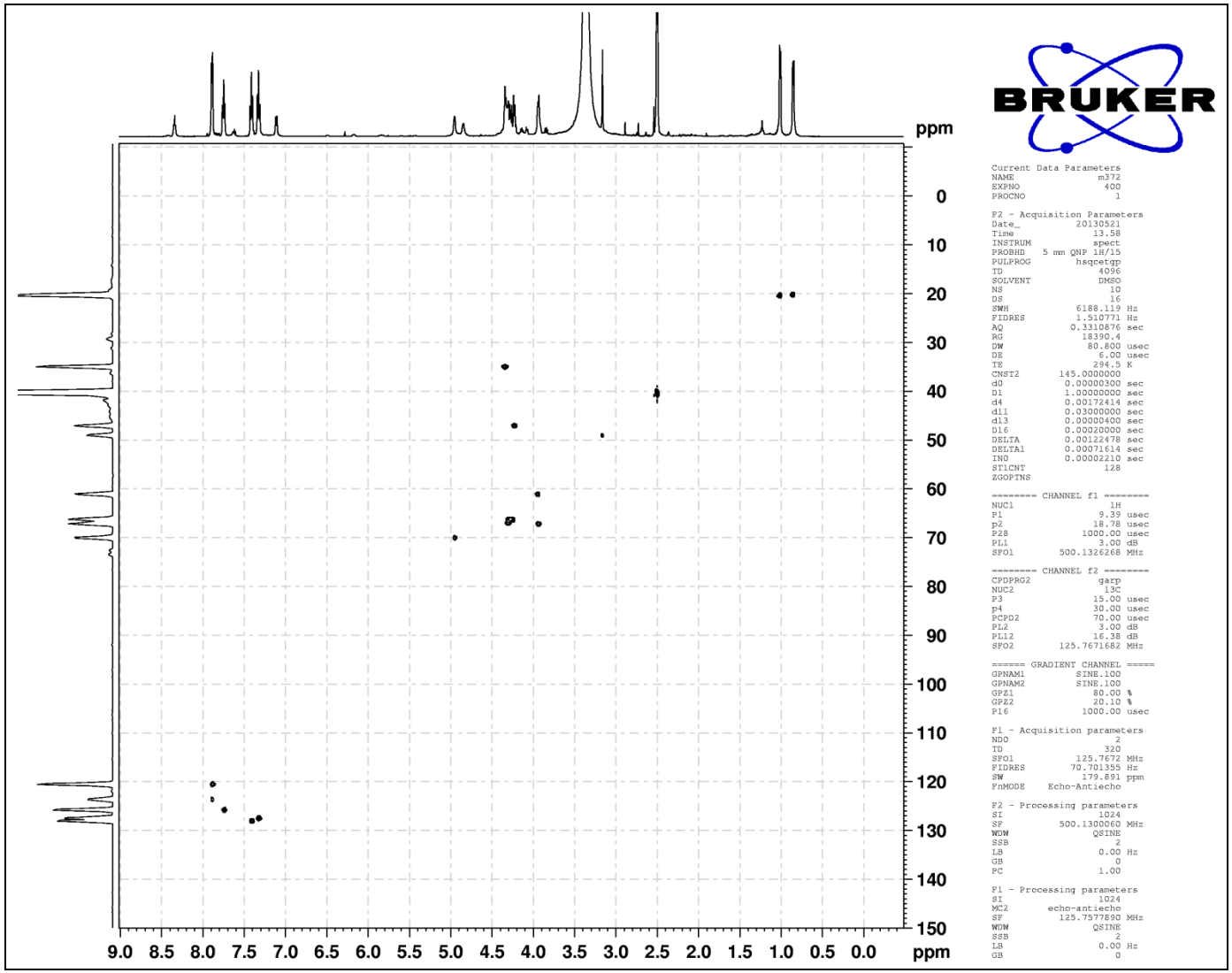
Anexo 3.2. Espectro de RMN ^{13}C (DMSO, 500 MHz) de **8**.



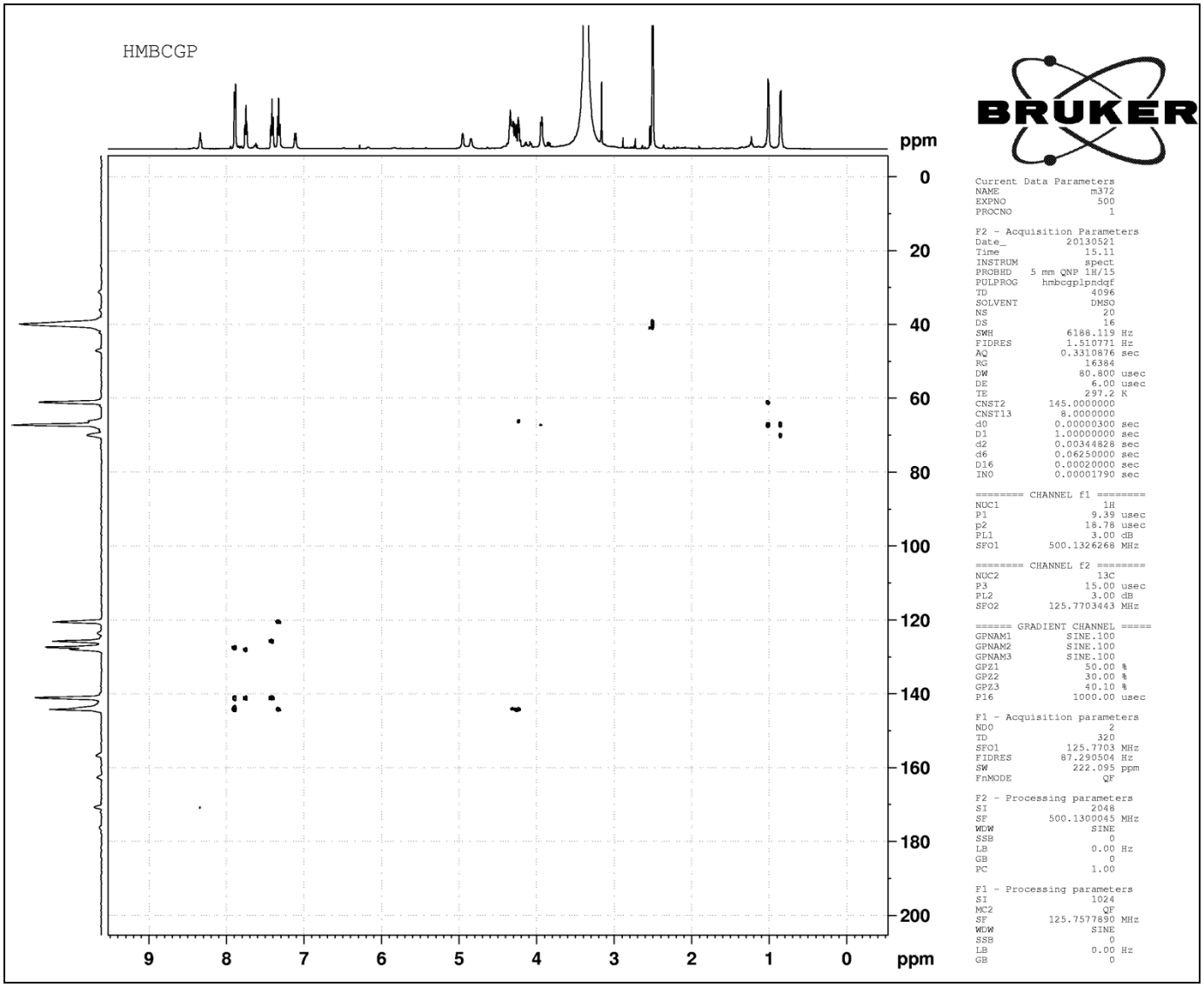
Anexo 3.2.1. Espectro de RMN ^{13}C ampliado (DMSO, 500 MHz) de **8**.



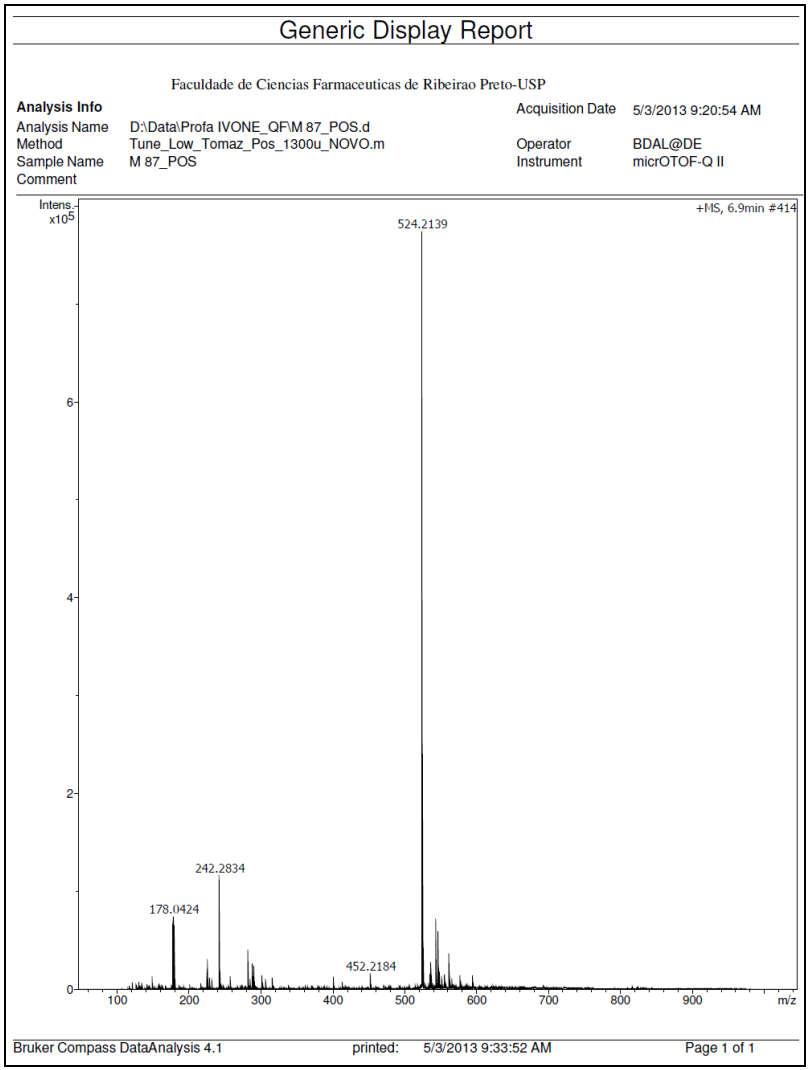
Anexo 3.2.2. Espectro de RMN ^{13}C DEPT (DMSO, 500 MHz) de **8**.



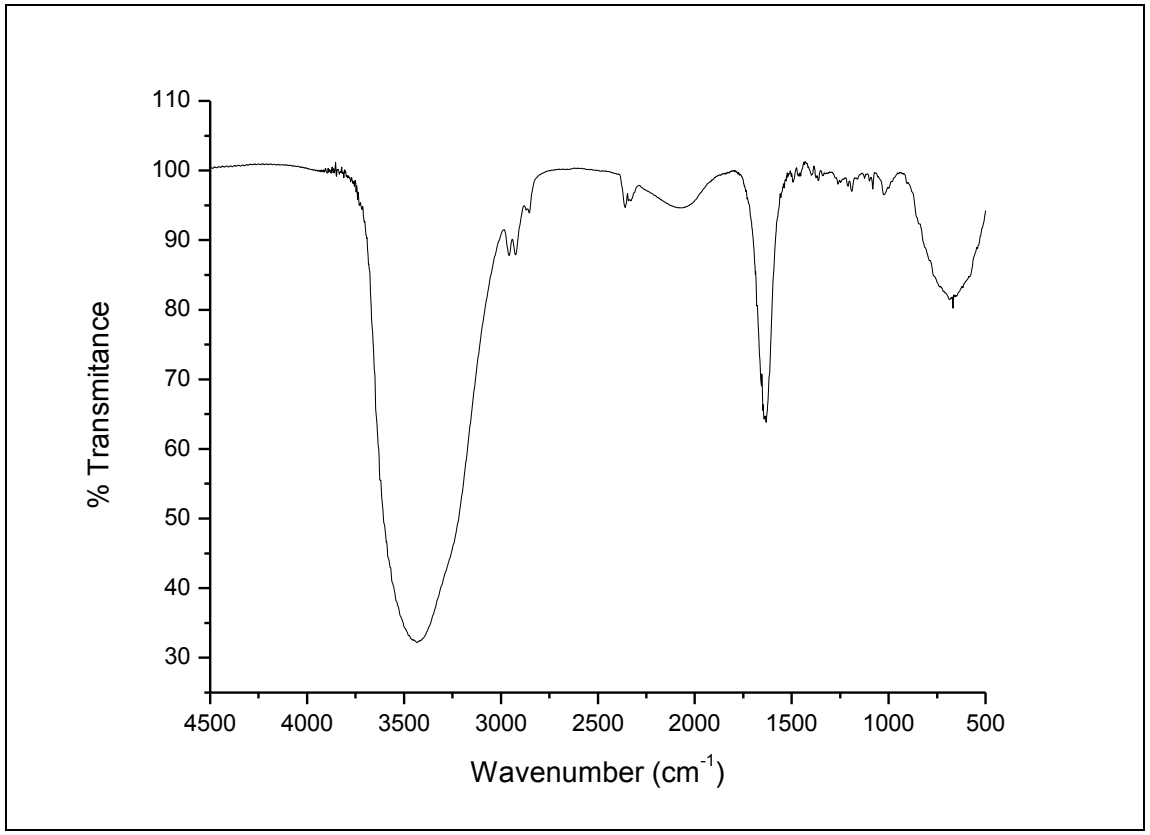
Anexo 3.2.3. Espectro de RMN HMQC (DMSO, 500 MHz) de **8**.



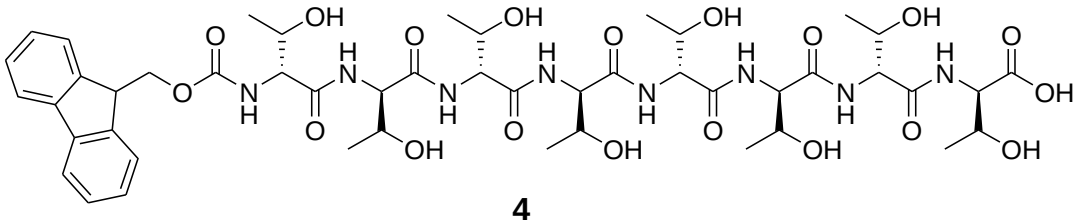
Anexo 3.2.4. Espectro de RMN HMBC (DMSO, 500 MHz) de **8**.



Anexo 3.3. Espectro de Massas de **8**. ESI-MS calculado para $C_{26}H_{29}N_5O_7H^+$ [M + H^+]: 524,2137; encontrado: 524,2139.



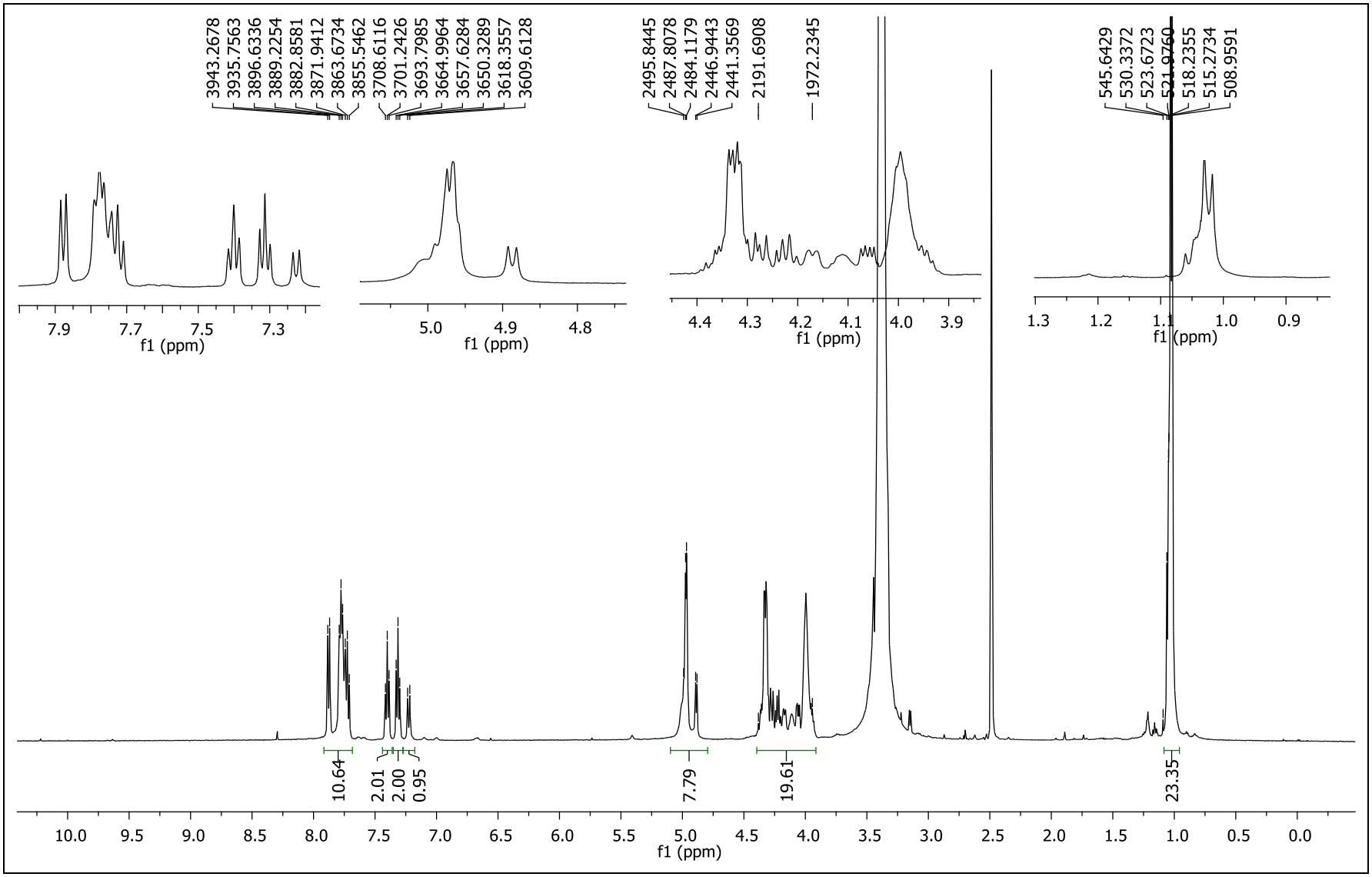
Anexo 3.4. Espectroscopia de infravermelho de **8**.



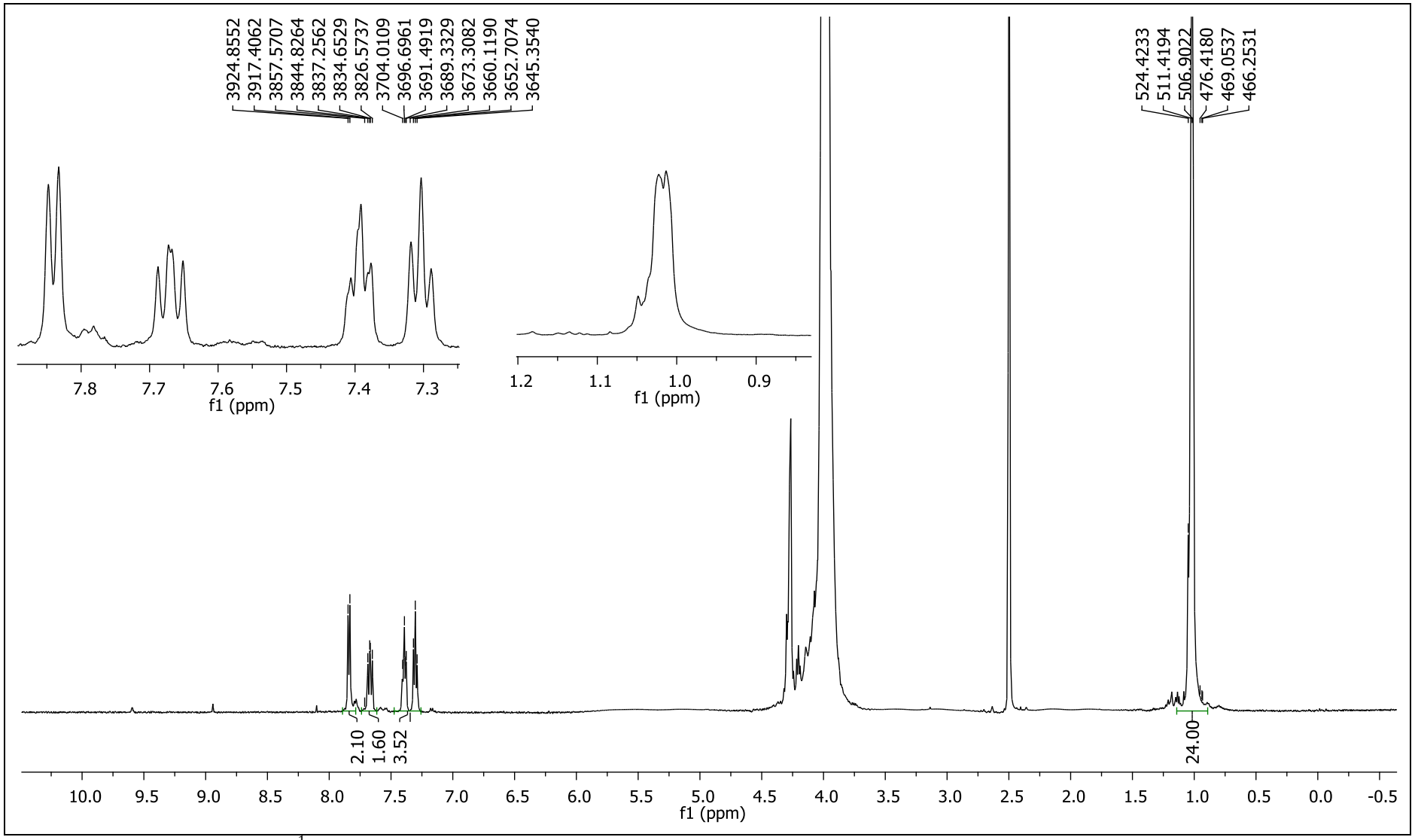
4

Tabela 10 – Dados espectroscópicos do composto **4** referentes à RMN ^{1}H (DMSO, 500 MHz).

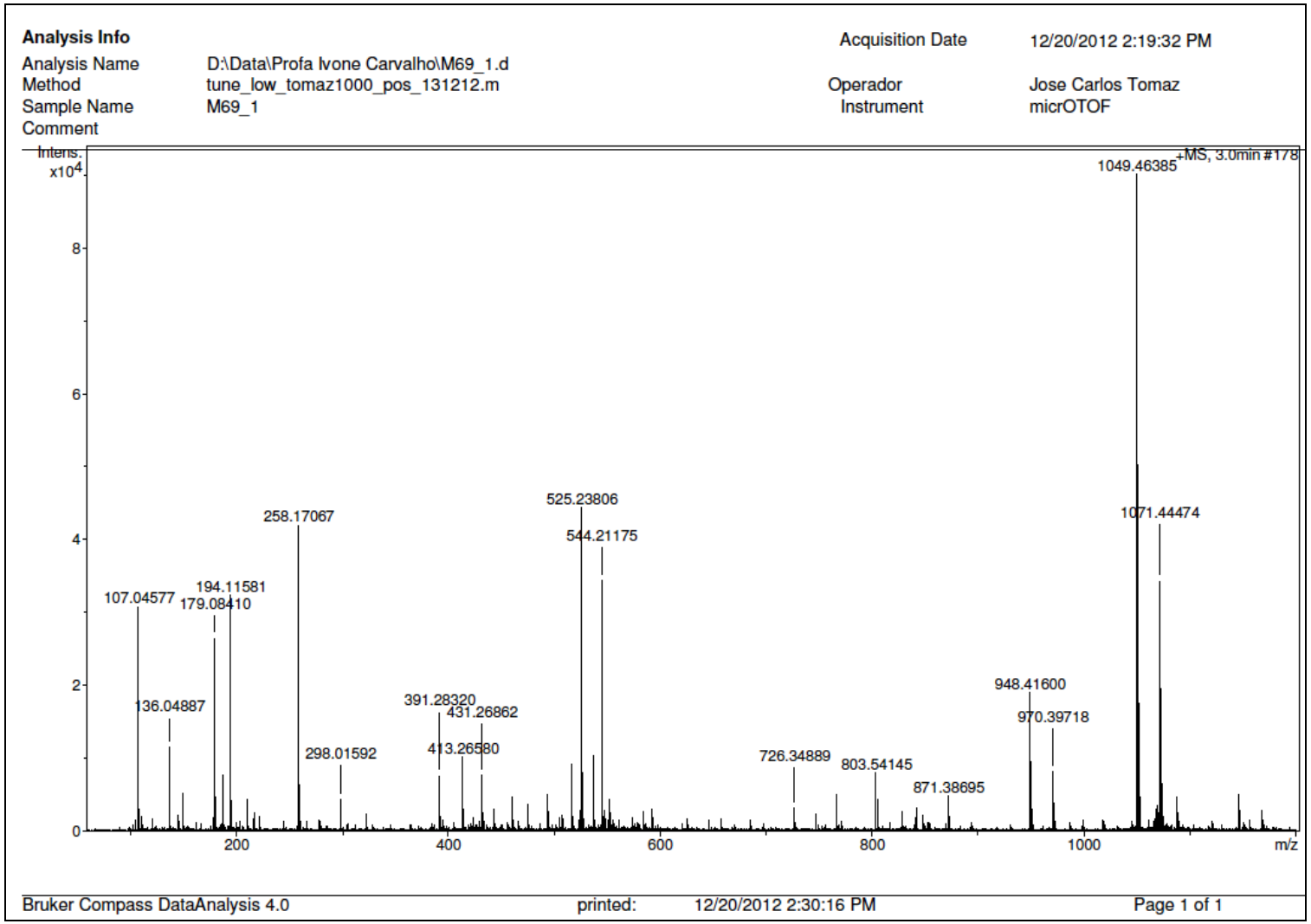
δ ^{1}H (ppm)	**Integral relativa**	**Multiplicidade**	**Constante de acoplamento (Hz)**	**Hidrogênios referentes**
7,90-7,70	11	m	-	C*H* Fmoc Ph, H-1, H-1', H-4, H-4', 7x O*H*
7,37	2	t	*J* 7,6	C*H* Fmoc Ph, H-2, H-2'
7,29	2	t	*J* 7,3	C*H* Fmoc Ph, H-3, H-3'
7,21	1	d	*J* 8,7	O*H*
5,05-4,85	8	m	-	N*H*
4,40-3,90	19	m	-	CH_2 Fmoc,8x αC*H*Thr, 8x βC*H*Thr, C*H* Fmoc
0,95	24	d	*J* 6,4	8x CH_3Thr



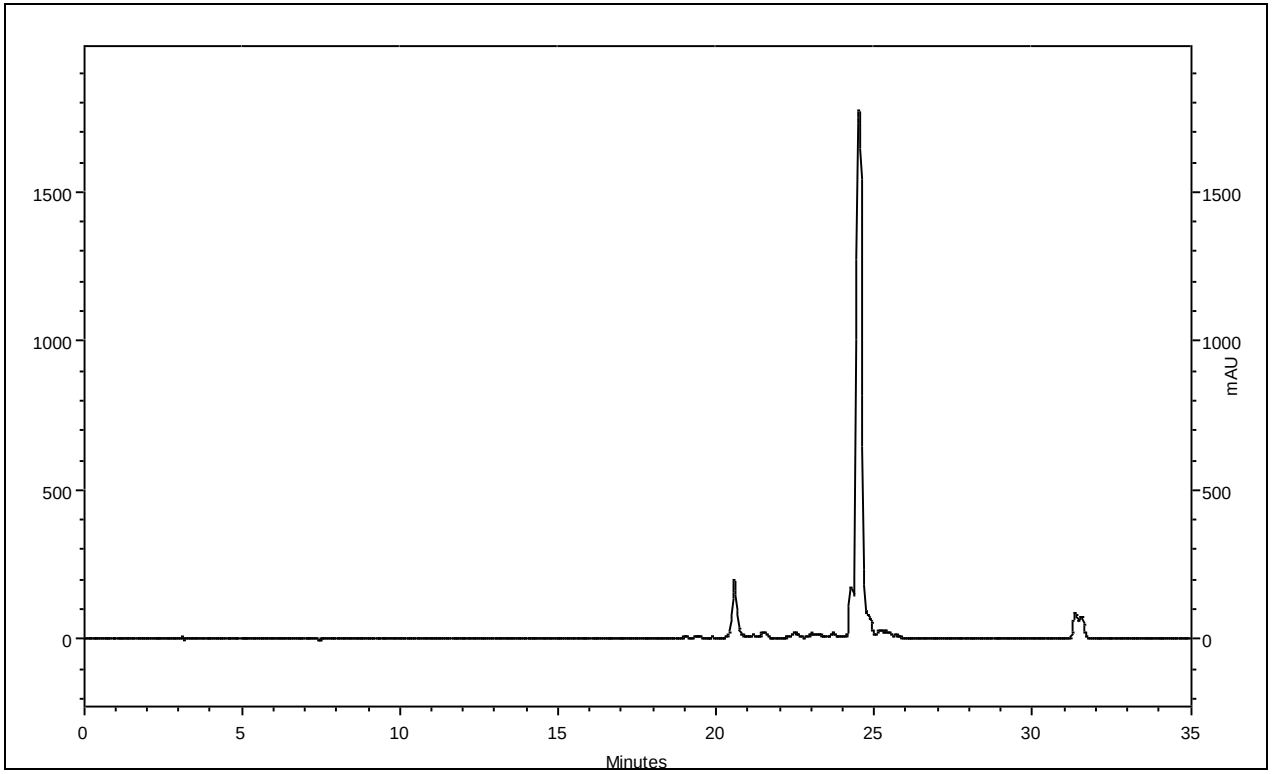
Anexo 4.. Espectro de RMN ^{1}H (DMSO, 500 MHz) de **4**.



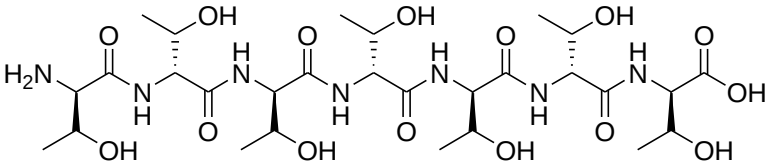
Anexo 4.1. Espectro de RMN ^{1}H (DMSO, D_2O, 500 MHz) de **4**.



Anexo 4.2. Espectro de Massas de **4.** ESI-MS calculado para $C_{47}H_{68}N_8O_{19}H^+$ [M + H^+]: 1049,4671, encontrado: 1049,4638; calculado para $C_{47}H_{68}N_8O_{19}Na^+$ [M + Na^+]: 1071,4401, encontrado 1071,4447.



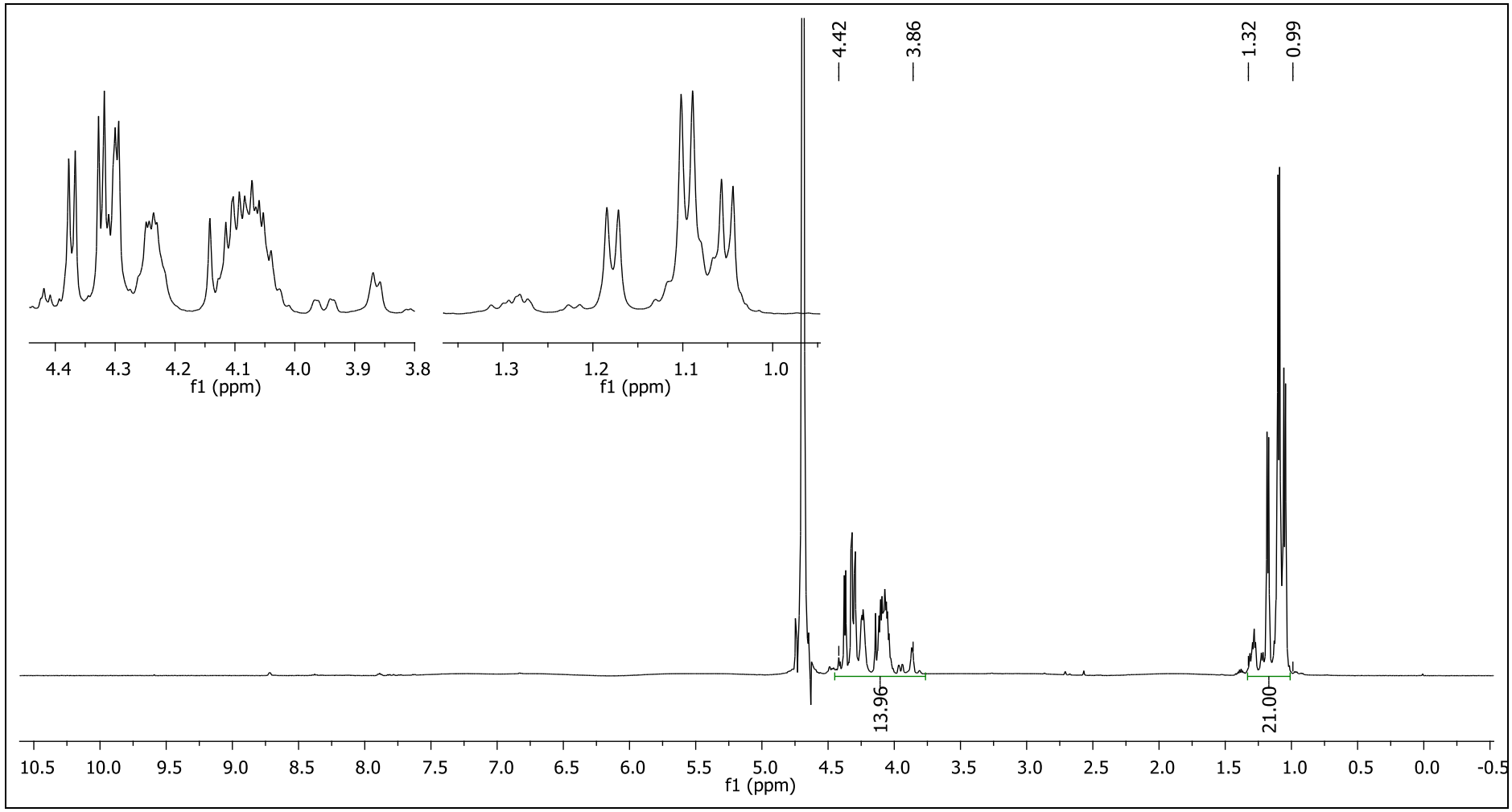
Anexo 4.3. Cromatograma de **4**, tempo de retenção de 24,5 min. Análise empregando-se coluna analítica de fase reversa C18 CLC-ODS (M) (150 mm x 4.6 mm), fluxo de 1 mL/min, gradiente 5-50% CH_3CN: 0,1% aq. TFA e temperatura ambiente.



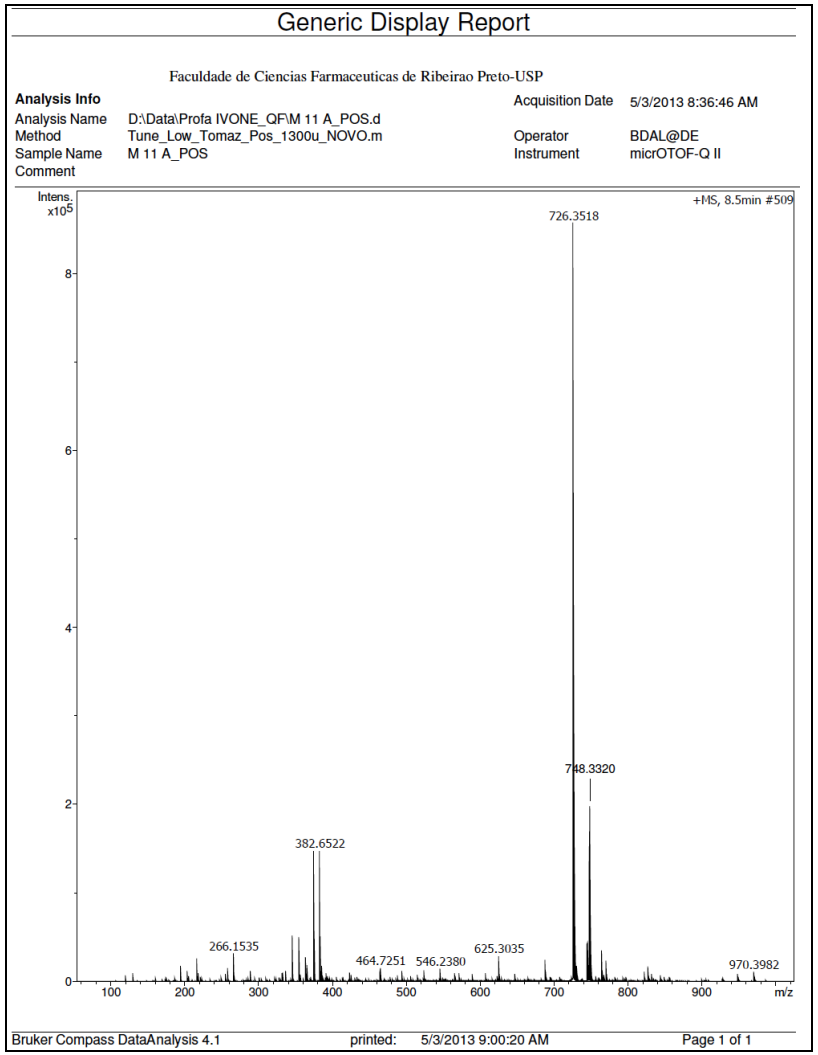
6A

Tabela 11 – Dados espectroscópicos do composto **6A** referentes à RMN ^{1}H (D_2O, 500 MHz).

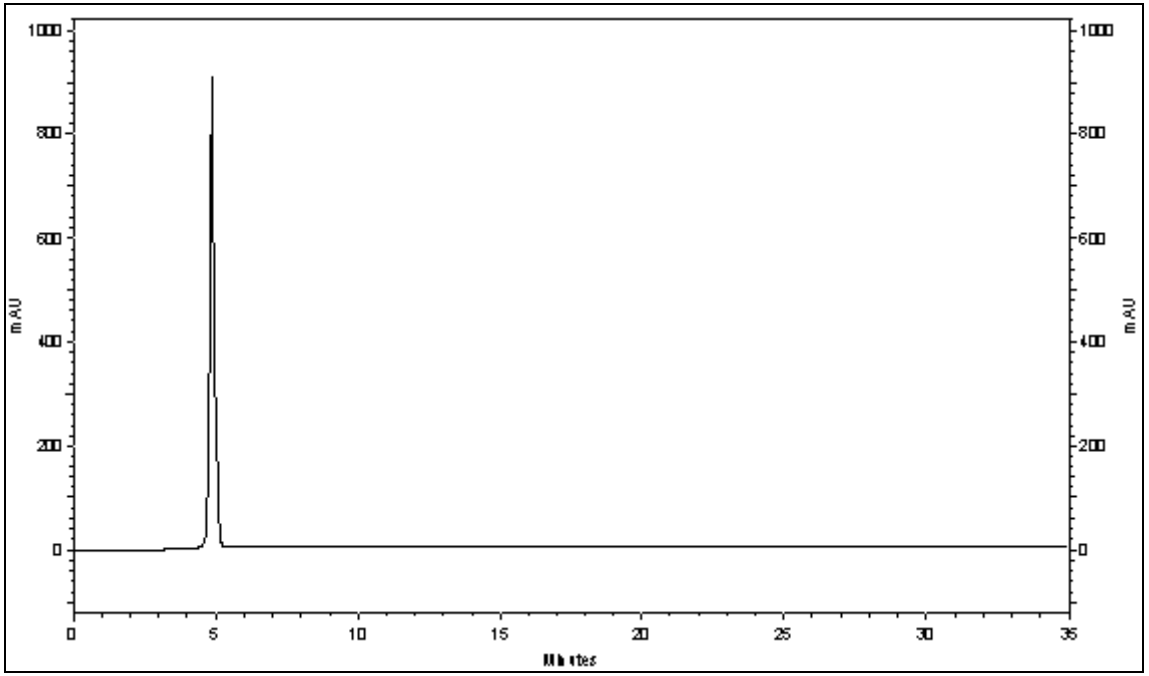
δ ^{1}H (ppm)	Integral relativa	Multiplicidade	Constante de acoplamento (Hz)	Hidrogênios referentes
4,42-3,86	14	m	-	7x αC*H*Thr, 7x βC*H*Thr
1,32-0,99	21	m	-	7x CH_3Thr



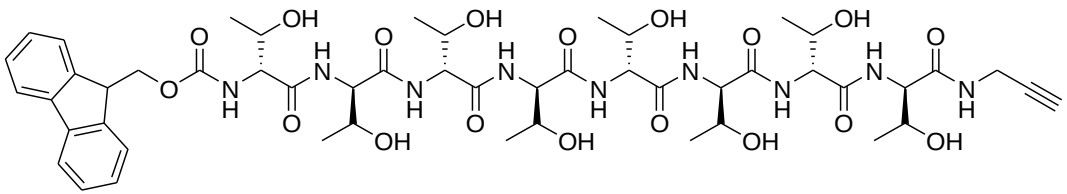
Anexo 5. Espectro de RMN ^{1}H (D_2O, 500 MHz) de **6A**.



Anexo 5.1. Espectro de Massas de **6A**. ESI-MS calculado para $C_{28}H_{51}N_7O_{15}H^+$ [M + H^+]: 726,3513, encontrado: 726,3518; calculado para $C_{28}H_{51}N_7O_{15}Na^+$ [M + Na^+]: 748,3243 ,encontrado 748,3320.



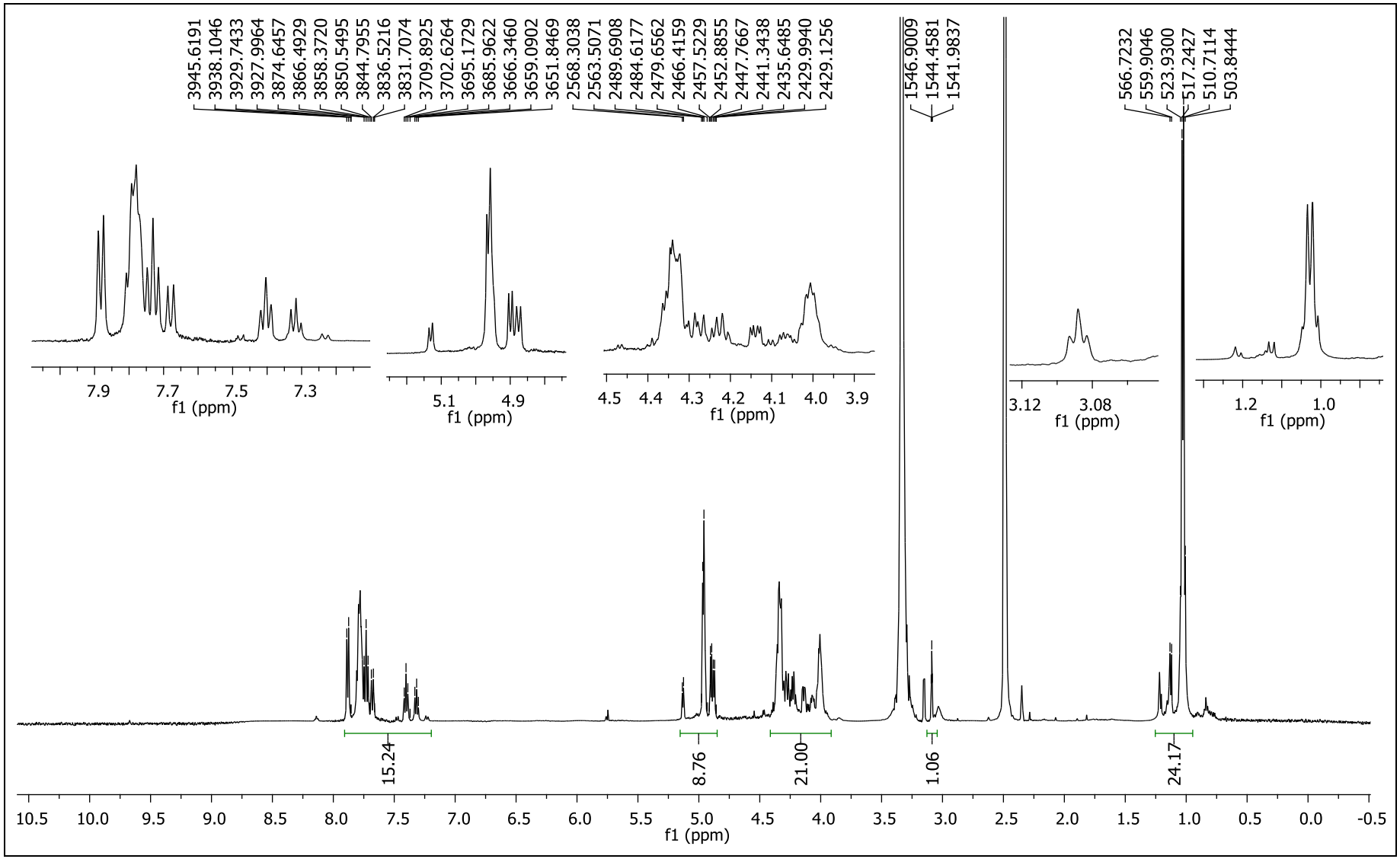
Anexo 5.2. Cromatograma de **6A**, tempo de retenção de 4,5 min. Análise empregando-se coluna analítica de fase reversa C18 CLC-ODS (M) (150 mm x 4.6 mm), fluxo de 1 mL/min, gradiente 5-50% CH_3CN: 0,1% aq. TFA e temperatura ambiente.



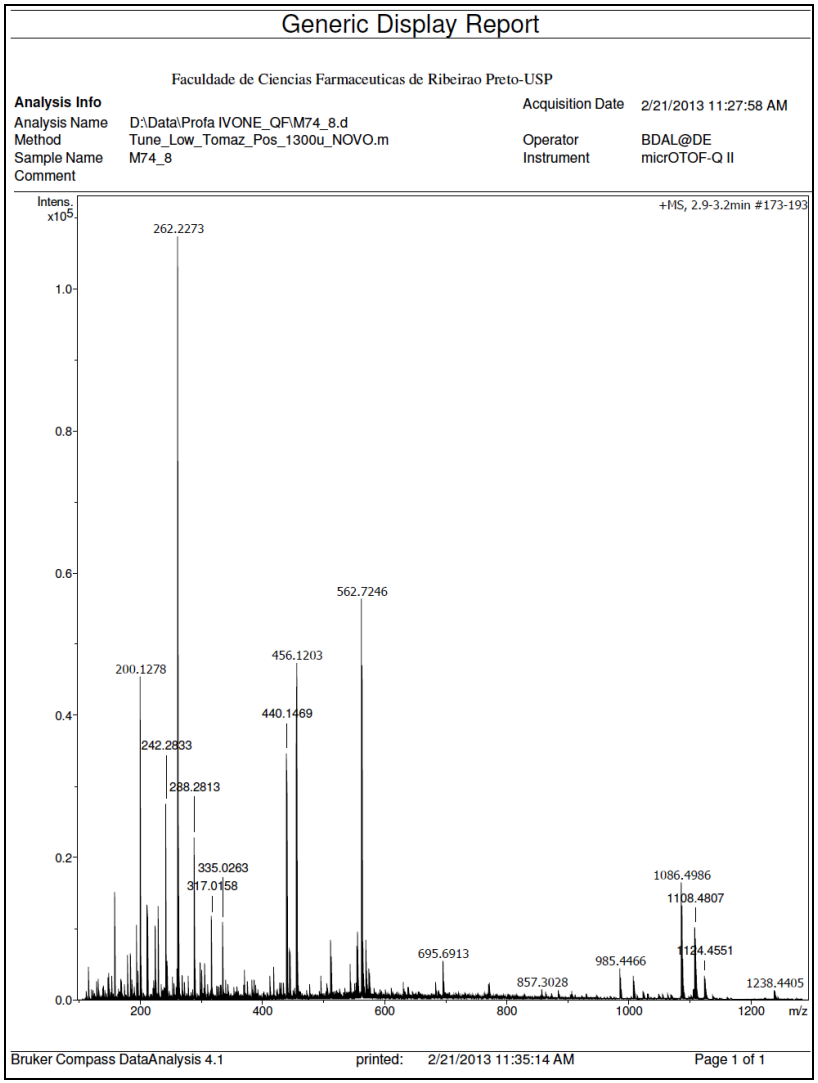
2

Tabela 12 – Dados espectroscópicos do composto **2** referentes à RMN ^{1}H (DMSO, 500 MHz).

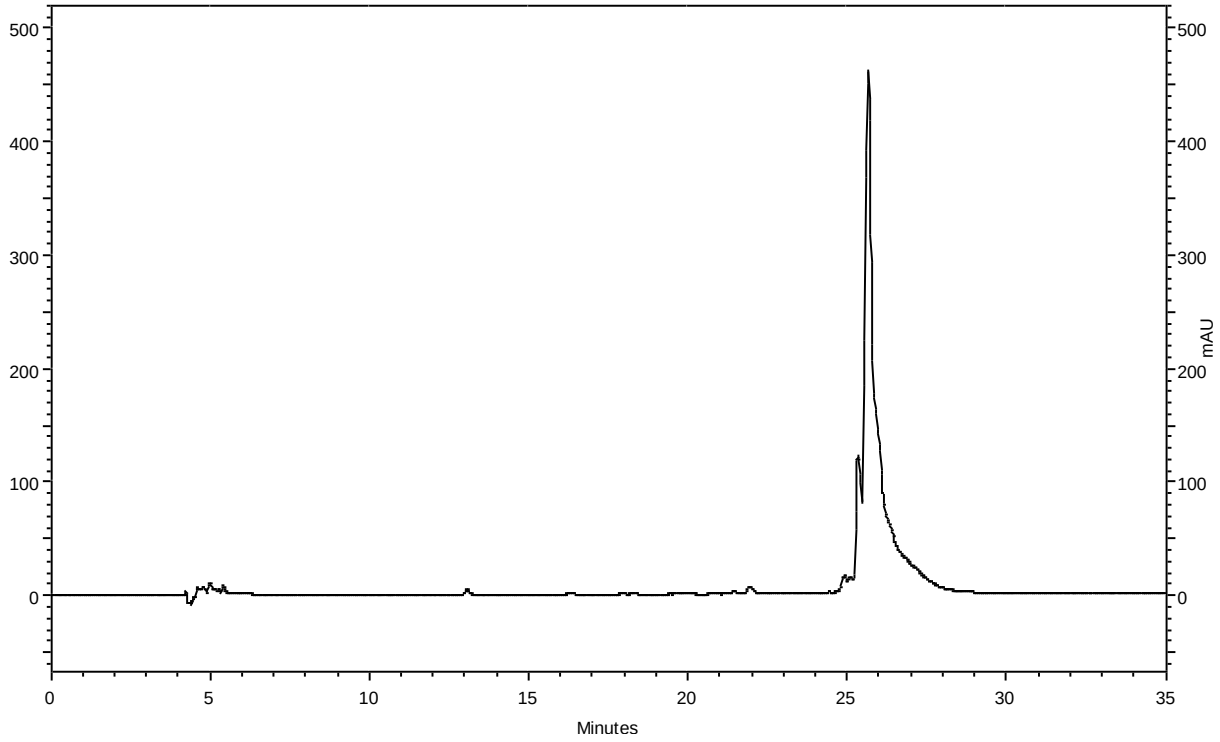
δ ^{1}H (ppm)	**Integral relativa**	**Multiplicidade**	**Constante de acoplamento (Hz)**	**Hidrogênios referentes**
7,91-7,24	16	m	-	C*H* Fmoc Ph, H-1, H-1', H-4, H-4', H-2, H-2', H-3, H-3', 8x O*H*
5,16-4,85	9	m	-	N*H*
4,40-3,93	21	m	-	CH_2 Fmoc,8x αC*H*Thr, 8x βC*H*Thr, C*H* Fmoc, CH_2C≡C*H*
3,08	1	t	*J* 2,4	C≡C*H*
1,22-1,01	24	m	-	8x CH_3Thr



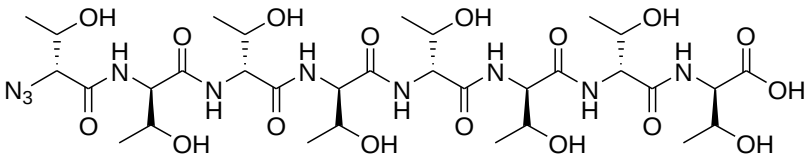
Anexo 6. Espectro de RMN ^{1}H (DMSO, 500 MHz) de **2**.



Anexo 6.1. Espectro de Massas de **2.** ESI-MS calculado para calculado para [M + H^+]: 1086,4996; encontrado: 1086,4986; calculado para [M + Na^+]: 1108,4814; encontrado: 1108,4807.



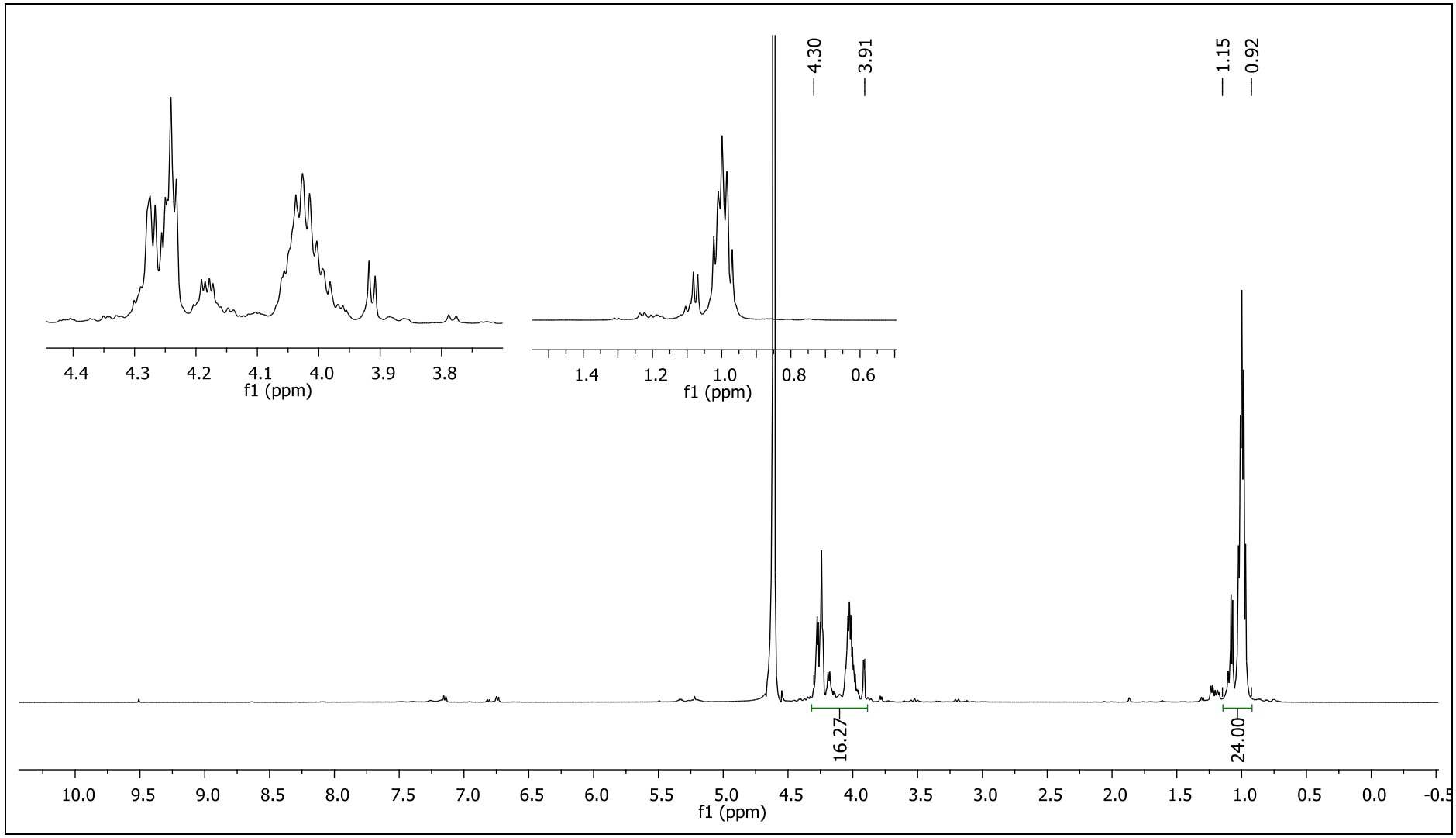
Anexo 6.2. Cromatograma de **2**, tempo de retenção de 25,2 min. Análise empregando-se coluna analítica de fase reversa C18 CLC-ODS (M) (150 mm x 4.6 mm), fluxo de 1 mL/min, gradiente 5-50% CH_3CN: 0,1% aq. TFA e temperatura ambiente.



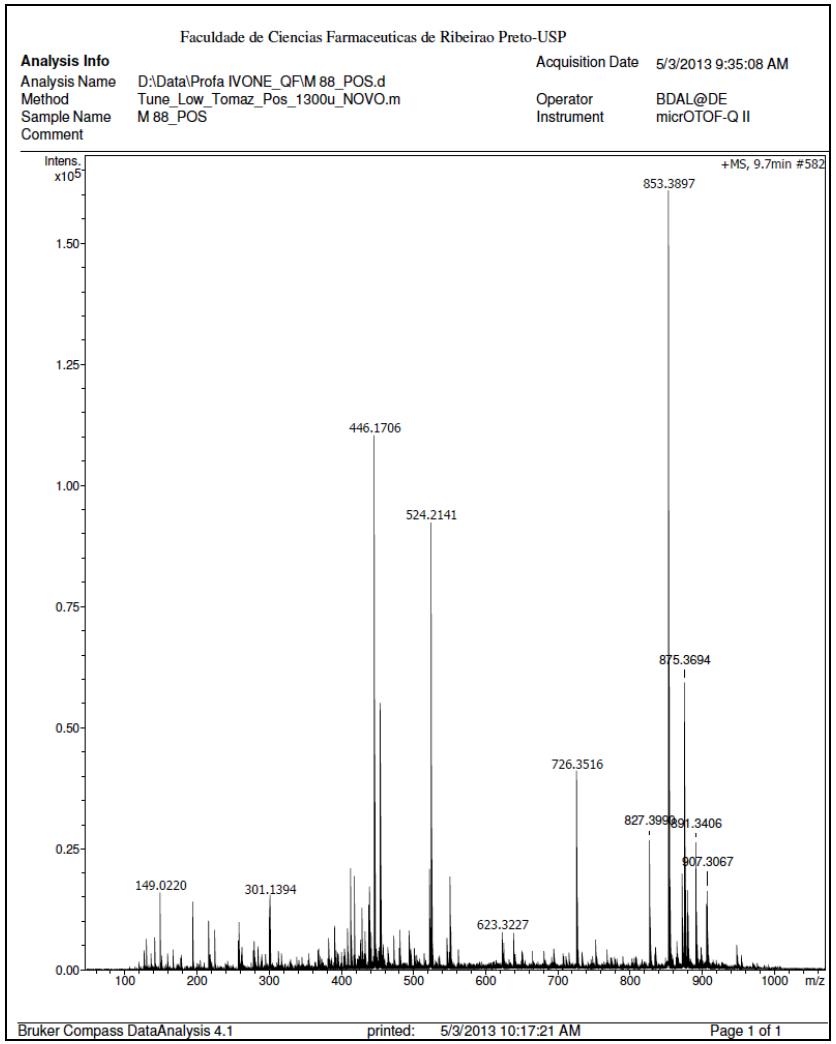
3A

Tabela 13 – Dados espectroscópicos do composto **3A** referentes à RMN ^{1}H (D_2O, 500 MHz).

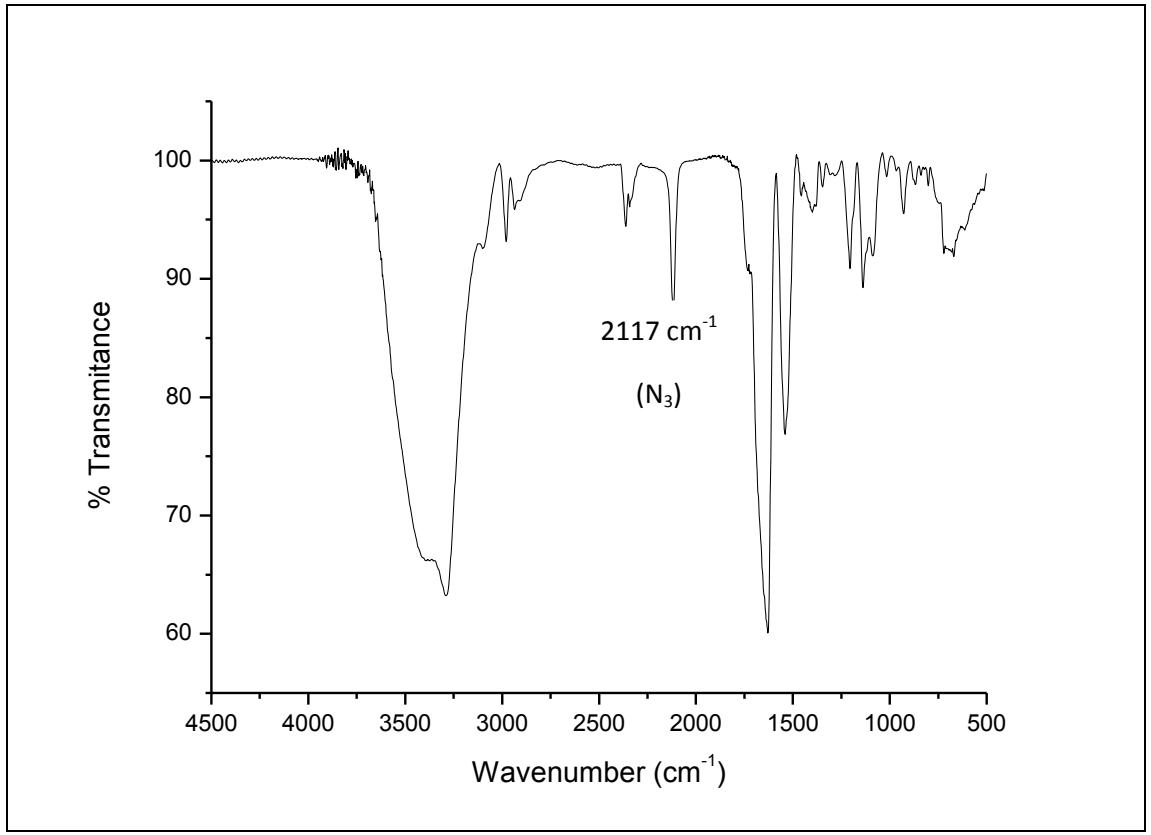
δ ^{1}H (ppm)	**Integral relativa**	**Multiplicidade**	**Constante de acoplamento (Hz)**	**Hidrogênios referentes**
4,30-3,91	16	m	-	8x αC*H*Thr, 8x βC*H*Thr
1,15-0,92	24	m	-	8x CH_3Thr



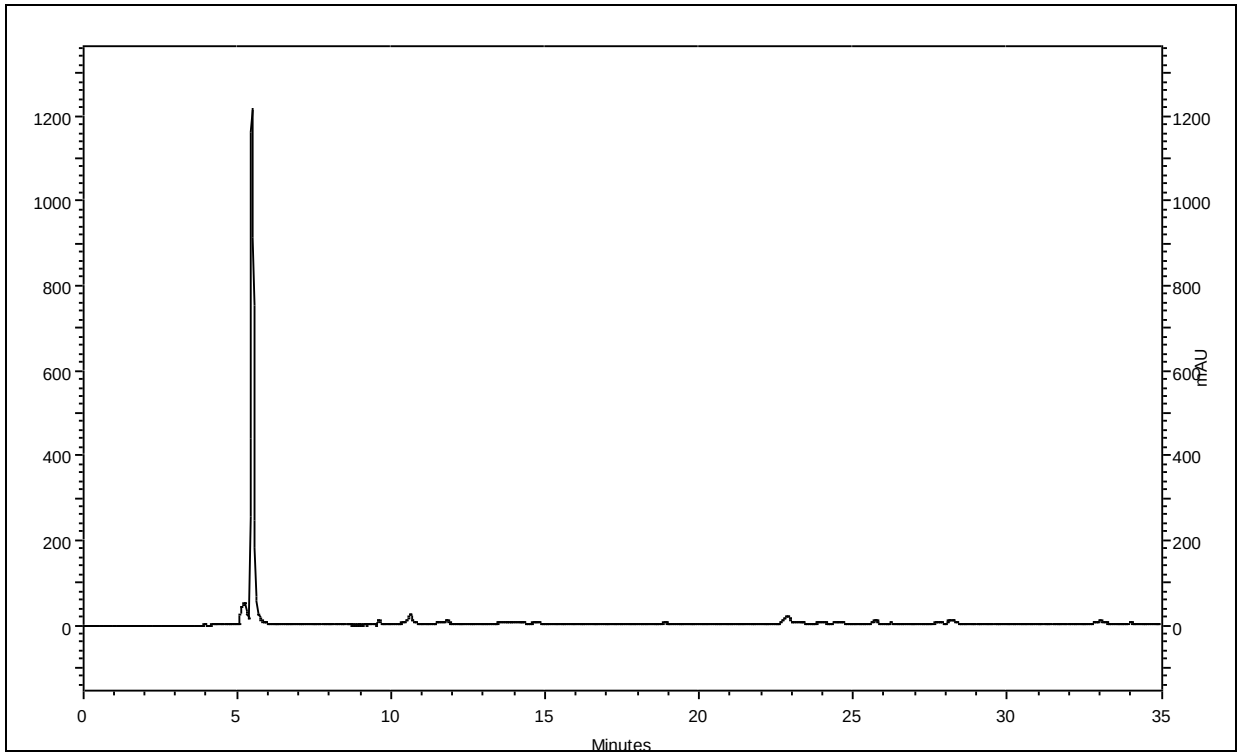
Anexo 7. Espectro de RMN ^{1}H (D_2O, 500 MHz) de **3A**.



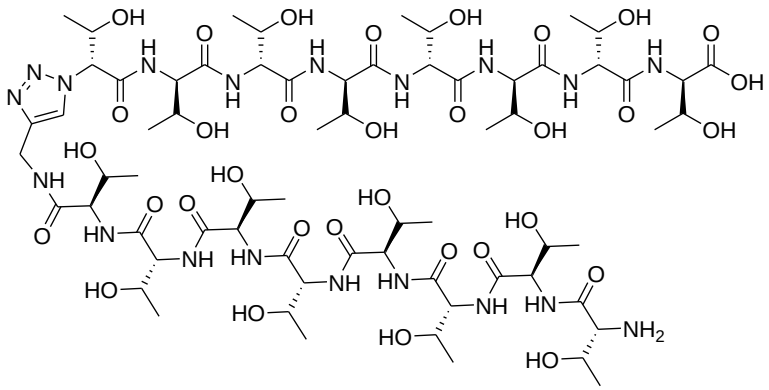
Anexo 7.1. Espectro de Massas de **3.** ESI-MS calculado para [M + H^+]: 853,3895; encontrado: 853,3897; calculado para [M + Na^+]: 875,3722; encontrado: 875,3694.



Anexo 7.2. Espectroscopia de infravermelho de **3**.



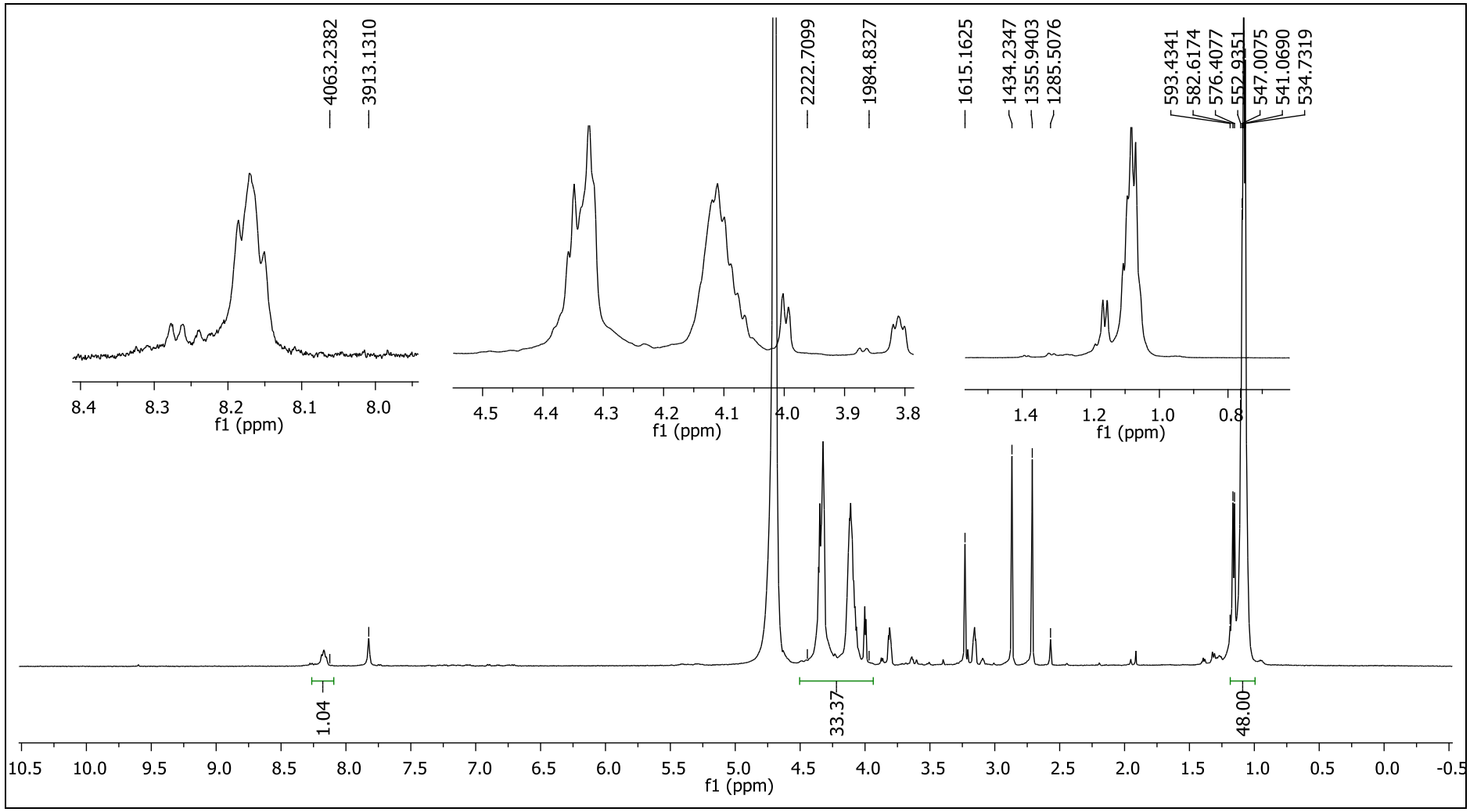
Anexo 7.3. Cromatograma de **3**, tempo de retenção de 5,3 min. Análise empregando-se coluna analítica de fase reversa C18 CLC-ODS (M) (150 mm x 4.6 mm), fluxo de 1 mL/min, gradiente 5-50% CH_3CN: 0,1% aq. TFA e temperatura ambiente.



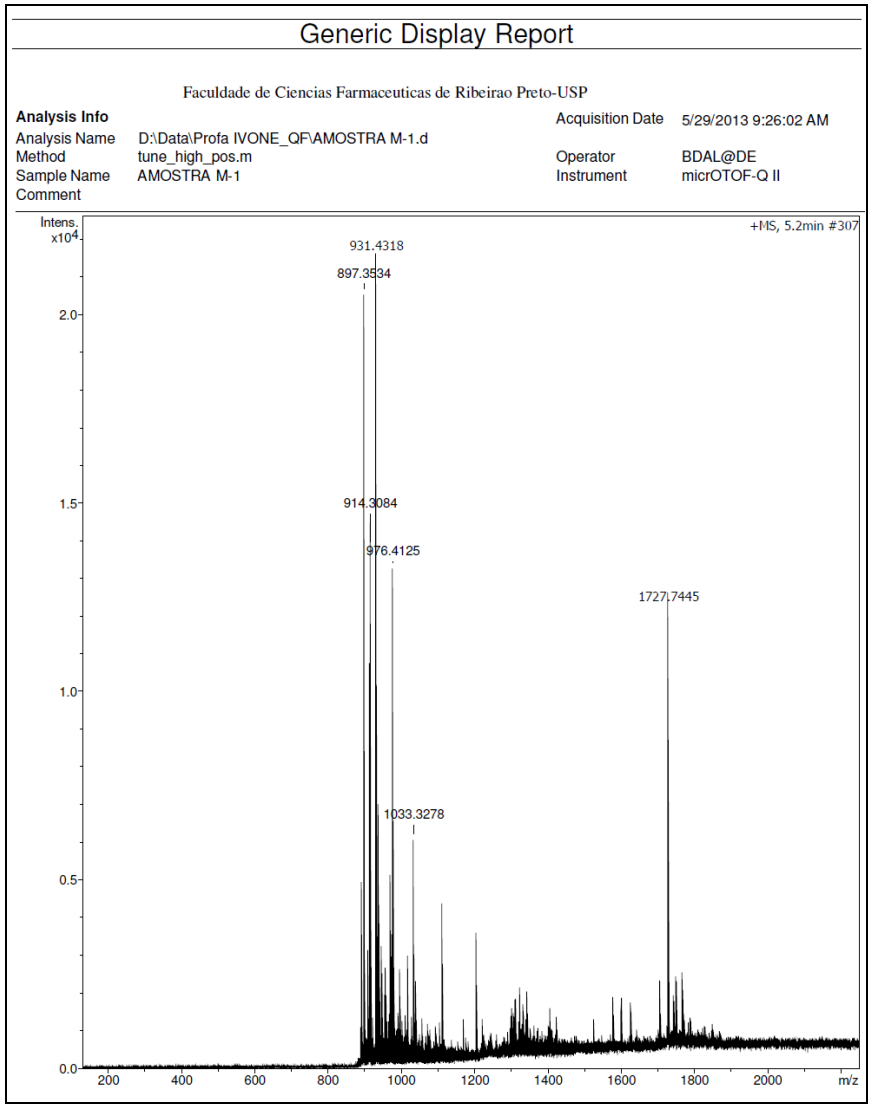
1

Tabela 14 – Dados espectroscópicos do composto **1** referentes à RMN ^{1}H (D_2O, 500 MHz).

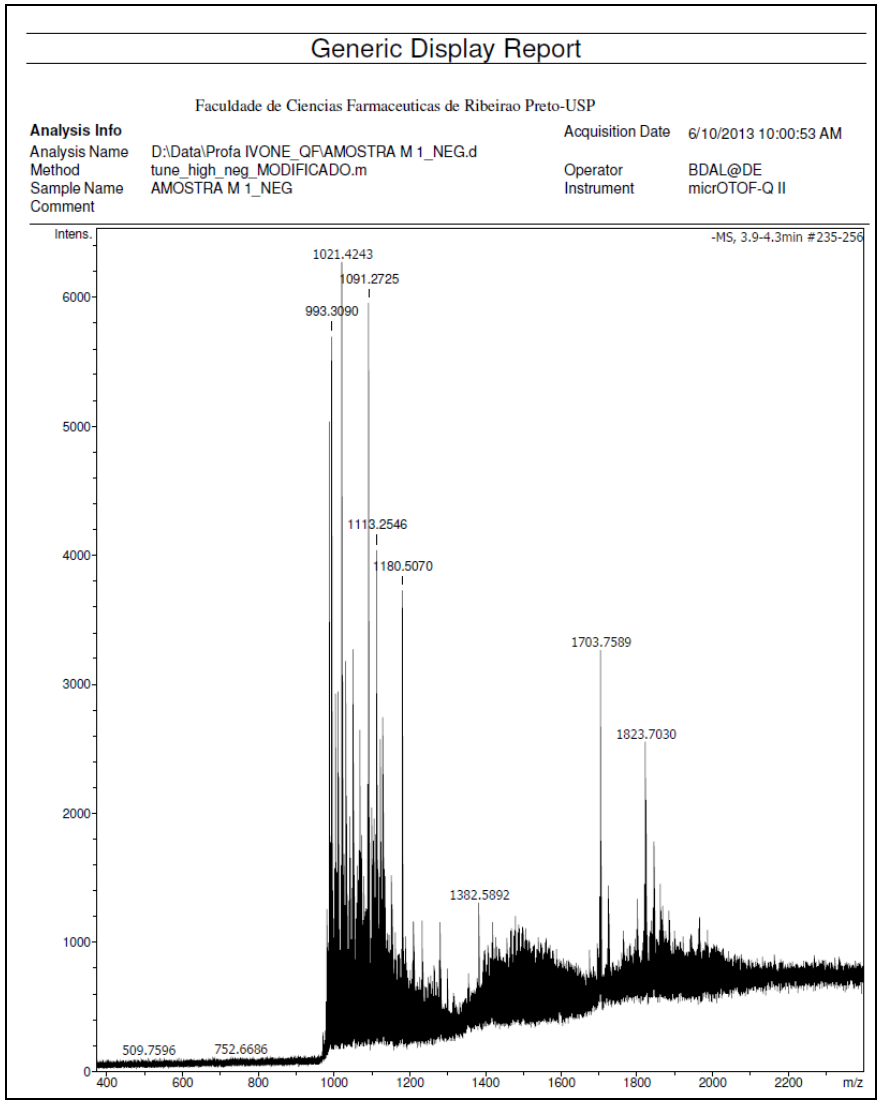
δ ^{1}H (ppm)	**Integral relativa**	**Multiplicidade**	**Constante de acoplamento (Hz)**	**Hidrogênios referentes**
8,12	1	m	-	*H*-triazol
4,40-3,97	34	m	-	CH_2-triazol, 16x αC*H*Thr, 16x βC*H*Thr
1,21-1,04	48	d	*J* 6,3	16x CH_3Thr



Anexo 8. Espectro de RMN ^{1}H (D_2O, 500 MHz) de **1**.



Anexo 8.1. Espectro de Massas de **1.** ESI-MS, modo positivo, calculado para [M + H^+] = 1716,8133, encontrado: 1727,7445.



Anexo 8.2. Espectro de Massas de **1.** ESI-MS, modo negativo, calculado para [M - H^+] = 1714,8133, encontrado: 1703,7589.