

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudos de síntese total de peptídeos cíclicos naturais

Gabriela Bianchi dos Santos

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudos de síntese total de peptídeos cíclicos naturais

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientado: Gabriela Bianchi dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Flavio da Silva Emery

Ribeirão Preto

2016

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.

Santos, Gabriela Bianchi

Estudos de síntese total de peptídeos cíclicos naturais. Ribeirão Preto, 2016.

127 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: **Emery, Flavio da Silva.**

1. Peptídeos cíclicos. 2. Síntese de peptídeos. 3. desotamide B. 4. chayaphumine A. 5. ciclozantoxilano A. 6. rufomicina B.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gabriela Bianchi dos Santos

Estudos de síntese total de peptídeos cíclicos naturais

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Flavio da Silva Emery

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedicado ao meu parceiro Paulo e a
nossa pequena Elis.*

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Flavio Emery, pelo convite há 6 anos para realizar o mestrado sob sua orientação, o que mudou profundamente o rumo da minha história. Obrigada pela dedicação e companheirismo.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Arasu Ganesan pelos ensinamentos em síntese orgânica e pela oportunidade em realizar estágio de doutorado sanduíche em seu laboratório de pesquisa na UEA – Inglaterra.

Aos colegas do QHETEM pelos momentos de descontração e pelos aprendizados. Em especial às estudantes de iniciação científica Jéssica Dornelas, Fernanda Nomizo e Bruna Massarioli que me trouxeram grande experiência sobre a incrível tarefa de ensinar.

Aos professores, técnicos e funcionários da FCFRP que me ajudaram direta ou indiretamente no desenvolvimento desse trabalho. Especialmente ao técnico Murilo Helder, Tomás, Jackeline e Vinicius, pela realização de análises durante esses anos na FCFRP.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por ter financiado esta tese de doutorado por meio do processo 12/20990-2.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado e a CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche por meio do processo projeto PVE 119/2012.

Aos meus pais que, mesmo à distância, se dedicaram e me apoiaram e tornaram possível a elaboração dessa tese.

Aos amigos Kariane Nunes, Vanessa Muller, Mirna Medeiros, Verônica Santana, Paulina Glowacka e Júlia Menezes. Vocês foram essenciais nessa jornada.

Ao meu companheiro Paulo, por toda dedicação e cuidado.

Resumo

Santos, G. B. **Estudos de síntese total de peptídeos cíclicos naturais**. 2016. 127f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O uso de peptídeos na terapêutica apresenta inúmeras limitações, desde características físico-químicas até perfil farmacocinético inadequado para absorção oral. Entretanto, novas estratégias sintéticas para redução de custos e aumento da estabilidade química e metabólica de peptídeos, associada a vias alternativas de administração foram desenvolvidas e permitiram o acesso a essas moléculas no mercado farmacêutico. Diante disso, peptídeos naturais bioativos, subexplorados do ponto de vista químico medicinal, são considerados bons protótipos para o desenvolvimento de biblioteca de análogos não-naturais, gerando informações relevantes para a compreensão da relação entre a estrutura química e a atividade biológica destes compostos. No presente estudo, os peptídeos cíclicos rufomicina B (tuberculostático), chaiyaphumine A (anti-malárico), ciclozantoxilano A e desotamide B (antibiótico) foram estudados do ponto de vista sintético sob diferentes metodologias. Para tal, os aminoácidos Fmoc-*N*-Metil-L-Leucina e Fmoc-L-crotil-glicina foram sintetizados com rendimentos satisfatórios para síntese do antibiótico rufomicina B. O aminoácido Fenil-acetil-L-treonina foi obtido em bons rendimentos e a síntese de chaiyaphumine A e derivado foi testada em fase sólida, em solução e empregando combinação dos dois métodos. O peptídeo desotamide B e ciclozantoxilano A foram sintetizados, mesmo que em baixo rendimentos, em fase sólida com ciclização solução. Ainda, a síntese de desotamide B também foi possível através da metodologia “safety-catch”. Por fim, realizamos análise sistemática das propriedades físico-químicas e estruturais dos peptídeos no mercado e em fase clínica e comparamos os resultados obtidos com os alvos desse estudo.

Palavras-chave: Peptídeos cíclicos, síntese de peptídeos, rufomicina B, chaiyaphumine A, ciclozantoxilano A, desotamide B.

Abstract

Santos, G. B. **Total Synthesis Studies of Natural Cyclic Peptides**. 2016. 127f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The use of peptides in therapy presents several limitations, from physicochemical characteristics to inadequate pharmacokinetic profile for oral absorption. However, new synthetic strategies for cost reduction and increase of the chemical and metabolic stability of peptides associated with alternative routes of administration were developed and allowed access to these molecules in the pharmaceutical market. Therefore, natural bioactive peptides, is an underexploited class from the medicinal chemist's point of view, are considered good prototypes for the development of similar series, generating information relevant to understanding the relationship between chemical structure and biological activity of these compounds. In the present study, cyclic peptides rufomycin B (antituberculosis activity), chaiyaphumine A (anti-malarial), cyclozanthoxylane A and desotamide were studied from the synthetic point of view, through different methodologies. In this sense, the amino acids Fmoc-*N*-Methyl-*L*-Leu and Fmoc-*L*-crotyl-Gly were synthesized in good yields for the total synthesis of rufomycin B. The amino acid Phenyl-acetyl-*L*-threonine was obtained in high yield and the synthetic studies on the chaiyaphumine A and analogue has been performed in solution and solid phase peptide synthesis and also through the combination of the 2 methods. The peptides desotamide B and cyclozanthoxylane A were synthesized, in low yields, in solid phase and in solution cyclization. Desotamide B could also be synthesized through safety-catch solid phase method. At end, we performed a systematic review of the physical chemical properties of all market and on clinical trial peptide drugs and we compared the results with the target molecules in this study.

Key words: Cyclic peptides, peptide synthesis, rufomycin B, chaiyaphumine A, cyclozanthoxylane A, desotamide B.

Lista de Figuras

Figura 1. Exemplos de fármacos peptídicos com alto faturamento no mercado.	2
Figura 2. Distribuição de fármacos peptídicos por classe terapêutica.	3
Figura 3. Antibióticos empregados atualmente na clínica desenvolvidos nas décadas de 1940-1960. ¹	4
Figura 4. Antibióticos aprovados pelo FDA entre 2010-2015.	5
Figura 5. Peptídeos antibióticos aprovados entre 2012-2016 pelo FDA.	6
Figura 6. Peptídeo natural isolado de <i>Streptomyces roseosporus</i> aprovado em 2003 pelo FDA.	7
Figura 7. Peptídeos antimicrobianos isolados de bactéria do gênero <i>Entotheonella</i> , comensal da esponja <i>Theonella swinhoei</i>	8
Figura 8. Estrutura dos peptídeos Ominagan® e batenecin.	10
Figura 9. Antibiótico peptídico plectasin em fase de estudos pré-clínicos.	11
Figura 10. Estrutura do peptídeo natural enfuvirtide obtido pela Roche por via biotecnológica.	11
Figura 11. Fármacos peptídicos recentemente lançados ao mercado.	12
Figura 12. Representação das quatro possibilidades de ciclização de peptídeos	13
Figura 13. Representação esquemática da síntese em solução de peptídeos.	14
Figura 14. Grupos com baixos rendimentos na etapa da ciclização destacados em laranja.	15
Figura 15. Formação das ligações de hidrogênio bidentadas entre resíduos de Lys(Boc) e Arg(Pbf).	16
Figura 16. Reagentes de acoplamento usualmente empregados em SPPS.	22
Figura 17. Éster ativado do HOBt e com HOAt, evidenciando o efeito do grupo pirídínico que confere maior reatividade do HOAt.	23
Figura 18. Exemplos peptídeos naturais sintetizados com emprego da resina “safety-catch”.	26
Figura 19. Estrutura dos peptídeos naturais desotamide A-D.	27
Figura 20. Estrutura química do peptídeo cíclico desotamide B.	28
Figura 21. Estrutura do pentapeptídeo natural ciclozantoxilano A.	29
Figura 22. Depsipeptídeos em fase clínica para tratamento de diversos tumores.	30
Figura 23. Estruturas dos depsipeptídeos da nova classe das chaiyaphumines.	31
Figura 24. Estrutura do depsipeptídeo natural chaiyaphumine A.	32
Figura 25. Peptídeo cíclico natural Rufomicina B.	33
Figura 26. Estratégias empregadas para estudo sintético dos peptídeos naturais.	34

Figura 27. Aminoácidos necessários à síntese total do antibiótico rufomicina B.	35
Figura 28. Sobreposição dos espectros de RMN de ¹ H realizado à temperatura ambiente (vermelho) e à 70°C (azul) com ampliação da região dos hidrogênios aromáticos.	38
Figura 29. Espectro de massas (MALDI-TOF) do peptídeo 6 obtido após tentativa de síntese da desotamida B por método “safety-catch”.	44
Figura 30. Espectro MALDI-TOF do peptídeo sintético desotamida B (7).	45
Figura 31. Espectro de massas com ionização por elétron spray (ESI-MS) do composto 10	51
Figura 32. Espectro de ESI-MS com fragmentações de 10	52
Figura 33. MALDI-TOF e estrutura proposta para o peptídeo formado 11	55
Figura 34. Espectro de massas ESI-MS do produto após microclivagem.	64
Figura 35. Exemplos de fármacos peptídicos cíclicos disponíveis por via oral.	65
Figura 36. Distribuição de fármacos aprovados pelo FDA por espécie química.	66
Figura 37. Distribuição dos fármacos peptídicos por classificação terapêutica.	69
Figura 38. Distribuição dos fármacos peptídicos por via de administração.	70
Figura 39. Representação esquemática da absorção intestinal de peptídeos.	71
Figura 40. Vias de administração distribuídas entre fármacos cíclicos e lineares.	72
Figura 41. Fármacos lineares e sua distribuição terapêutica relacionada à via de administração.	73
Figura 42. Fármacos cíclicos e sua distribuição farmacológica relacionada à via de administração.	74
Figura 43. Distribuição dos fármacos peptídicos por número de aminoácidos.	75
Figura 44. Esquerda: Gráfico evidenciando a divisão entre fármacos lineares e cíclicos. Direita: Correlação entre fármacos lineares (losângulo) e cíclicos (círculo) e sua distribuição em termos de PM e LogP.	76
Figura 45. Distribuição dos fármacos peptídicos entre cíclicos (verde) e lineares (laranja) dentro das diferentes classes terapêuticas.	77

Lista de Esquemas

Esquema 1. Depsipeptídeos naturais obtidos por macrolactamização.	17
Esquema 2. Depsipeptídeos naturais obtidos por macrolactonização.....	17
Esquema 3. Representação esquemática de Fmoc/ <i>t</i> -Bu SPPS empregando ligante e grupos de proteção das cadeias laterais ácido lábeis.....	19
Esquema 4. Macroclivagem do fármaco vaniprevir.....	23
Esquema 5. Uso da combinação de Fmoc-SPPS e ciclização em solução para obtenção do peptídeo PMX205.....	24
Esquema 6. Método geral de síntese e ciclização na resina Kenner.....	25
Esquema 7 Síntese total do hexapeptídeo natural kahalalide A	26
Esquema 8. Estratégia para obtenção do aminoácido Fmoc- <i>N</i> -metil- <i>L</i> -leucina.	35
Esquema 9. Mecanismo de formação da oxazolidinona (superior) e clivagem reductiva (inferior).....	36
Esquema 10. Principais rotâmeros observados em carbamatos.	37
Esquema 11. Representação esquemática para obtenção da glicina alquilada.....	39
Esquema 12. Representação mecanística da alquilação estereoseletiva de 3	40
Esquema 13. Representação esquemática de obtenção do aminoácido modificado 5	41
Esquema 14. Mecanismo de formação do aduto dibenzofulveno.	42
Esquema 15. Síntese total do peptídeo desotamide B na resina "safety-catch"	43
Esquema 16. Etapa de ciclização "safety-catch" na tentativa de obtenção de desotamide B...44	
Esquema 17. Mecanismo de acoplamento de aminoácidos com PyBOP.....	46
Esquema 18 Fmoc-SPPS de desotamide B.....	47
Esquema 19. Estratégia de ciclização do precursor linear da desotamide B.	48
Esquema 20. Mecanismo de formação da ligação amida com emprego de HBTU.	48
Esquema 21. Fmoc-SPPS do peptídeo ciclozantoxilano A	50
Esquema 22. Síntese total do peptídeo chaiyaphumine A na resina "safety-catch".....	54
Esquema 23. Análise retrossintética de análogo da chaiyaphumine A em solução.	56
Esquema 24. Obtenção do fragmento 13 para síntese de chaiyaphumine A.....	56
Esquema 25. Mecanismo de formação da ligação amida com tratamento com EDCI.....	57
Esquema 26. Rota sintética para para síntese de chaiyaphumine A.....	58
Esquema 27. Rota sintética para obtenção de análogo de Chaiyaphumine A em solução.....	59
Esquema 28. Esquema reacional para formação da ligação éster no depsipeptídeo chaiyaphumine A empregando as condições de Yamaguchi.....	60

Esquema 29. Esquema reacional para formação da ligação éster no depsipeptídeo chaiyaphumine A empregando PyBOP como reagente de acoplamento.	60
Esquema 30. Estratégia sintética para acoplamento de 19 e L-Trp-Boc.	61
Esquema 31. Estratégias sintéticas para tentativa de acoplamento de 19 e L-Trp-Boc.	62
Esquema 32. Análise retrossintética de desconexão do anel de chaiyaphumine A.....	62
Esquema 33.	64

Lista de Tabelas

Tabela 1. Fármacos peptídicos aprovados de 2012-2016 pelo FDA.....	9
Tabela 2. Ligantes empregados em Fmoc SPPS.	20
Tabela 3. Propriedades calculadas dos principais descritores físico-químicos de fármacos orais e os respectivos percentis 80 ^o , 90 ^o e 95 ^o	81
Tabela 4. Propriedades calculadas dos peptídeos alvos desse estudo.	82

Lista de Abreviaturas e Siglas

Boc: tert-Butiloxicarbonil

CCDC: Cromatografia em camada delgada comparativa

DCC: *N,N'*-Diciclohexilcarbodiimida

DIC: *N,N'*-Diisopropilcarbodiimida

DIPEA: diisopropiletilamina

DMF: dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

EDCI: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EI: Electron ionization

ESI: Electrospray ionization

Fmoc: Fluorenilmetiloxicarbonil

Fmoc-SPPS: Fmoc solid phase peptide synthesis

Fsp³: Fração de carbono sp³

HBA: Grupos aceptores de ligação de hidrogênio

HBD: Grupos doadores de ligação de hidrogênio

HATU: 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate

HBTU: 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate

HOAt: 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole

HOBt: Hydroxybenzotriazole

HOPO: 1-Hydroxy-2-pyridone

HRMS: High-resolution mass spectrometry

LogP: Lipofilicidade

MALDI-TOF: Matrix-assisted laser desorption/ionization - time-of-flight mass spectrometer

MIC: Concentração inibitória mínima

PM: Peso molecular

PyBOP: Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate

PyBROP: Bromo(tri-1-pyrrolidiny)phosphonium hexafluorophosphate

RMN: Ressonância magnética nuclear

SAR: Structure and activity relationship

t.a.: temperatura ambiente

TEA: trietilamina

TFA: ácido trifluoroacético

THF: tetrahidrofurano

TIS: Triisopropilsilano

TPSA: Total polar surface area

UV: Ultravioleteta

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Esquemas.....	v
Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.2 Peptídeos naturais antibióticos.....	3
1.3 Estratégias sintéticas para obtenção de peptídeos cíclicos.....	11
<i>1.3.1 Síntese de peptídeos e depsipeptídeos em solução</i>	<i>13</i>
<i>1.3.2 Síntese do peptídeo linear em resina e ciclização em solução.....</i>	<i>18</i>
<i>1.3.3 Síntese e ciclização em resina: Emprego da resina “safety-catch”</i>	<i>24</i>
2. OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo geral.....	34
2.2 Objetivos específicos.....	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1 Estabelecimento de métodos de síntese de modificação de aminoácidos.....	35
3.1.1 <i>Rufomicina B</i>	35
3.1.1.1 Fmoc-N-metil-L-Leucina	35
3.1.1.2 Fmoc-L-Crotilglicina.....	38
3.1.2 Síntese do Bloco de construção da chaiyaphumine A.....	40
3.2. Estabelecimento de métodos de síntese total dos peptídeos naturais.....	41
3.2.2 <i>Desotamide B</i>.....	41
3.2.2.1 Síntese e ciclização na resina – Método “Safety-Catch”.....	41
3.2.2.2 Síntese em fase sólida e ciclização em solução	46
3.2.3 <i>Ciclozantoxilano A</i>	49
3.2.3.1 Síntese em fase sólida e ciclização em solução.....	49
3.2.1 <i>Chaiyaphumine A</i>	53
3.2.1.1 Síntese e ciclização na resina – Método “Safety-Catch”.....	53
3.2.1.2 Síntese e ciclização em solução	55
3.2.1.3 Síntese em fase sólida e ciclização em solução.....	62
3.3 Análise sistemática dos fármacos no mercado e em fase clínica	64
3.3.1 <i>Distribuição dos fármacos aprovados pelo FDA nos últimos 5 anos (2011-2016)</i>	66
3.3.2 <i>Revisão sistemática - Base de dados de fármacos peptídicos</i>	67
3.3.4 <i>Características dos fármacos peptídicos</i>	68

3.3.5 Caracterização terapêutica dos fármacos peptídicos	68
3.3.6 Classificação dos fármacos peptídicos em vias de administração.....	70
3.3.7 Classificação das propriedades estruturais	74
3.3.8 Correlação entre peptídeos lineares Vs cíclicos e Propriedades Físico-Químicas	75
3.3.9 Propriedades Químicas Vs Administração oral.....	78
3.3.10 Estudo comparativo das propriedades físico-químicas dos alvos desse estudo e peptídeos orais.....	81
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	83
5. EXPERIMENTAL	84
5.1 Síntese	84
5.1.1 Procedimentos gerais	84
5.1.2 Síntese e descrição espectroscópica.....	84
5.1.3 Síntese de desotamida B em resina “safety-catch”	91
5.1.4 Síntese de análogo linear de Desotamida B em resina e ciclização em solução....	92
5.1.5 Síntese de cyclozantoxilano A em resina e ciclização em solução	93
5.1.6 Estudo sintético de Chaiyaphumina A em resina “safety-catch”	94
5.1.7 Estudo análogo linear sintético de chaiyaphumina A em resina.....	94
5.1.2 Monitoramento de acoplamento das reações em fase sólida	95
5.1.2.1 O Teste de Kaiser (ou teste da ninidrina).....	95
5.1.2.2 Teste de absorção UV do grupo dibenzofulveno	96
6. REFERÊNCIAS	97
APÊNDICES.....	105

1. INTRODUÇÃO

As limitações do uso de peptídeos e proteínas na terapêutica envolvem o alto custo de produção, a rápida metabolização dessas moléculas por proteases *in vivo*, e a baixa estabilidade às variações de pH e temperatura.⁴ Além disso, a via de administração oral de fármacos peptídicos continua desafiadora, de maneira geral, devido a propriedades físico-químicas incompatíveis à permeabilidade e hidrossolubilidade necessárias para absorção oral.^{5;6}

Entretanto, novas estratégias sintéticas para redução de custos e aumento da estabilidade química e metabólica de peptídeos, associada a vias alternativas de administração e liberação de fármacos, foram desenvolvidas recentemente, o que possibilitou a inúmeros fármacos baseados em peptídeos alcançarem o mercado.⁷ Atualmente, cerca de 110 fármacos peptídicos estão disponíveis para aplicação terapêutica, sendo alguns considerados “block-busters” em vendas, como o etanercept/Enbrel® (artrite reumatoide/\$8 bilhões em 2011)⁸, rituximab/Rituxan® (linfoma não-Hodgkin de células B/\$7 bilhões em 2011)⁹, glargine/Lantus® (diabetes tipo I e II/\$4,8 bilhões em 2011)¹⁰, pegfrilgrastim/Neulasta® (mielossupressão/\$3,5 bilhões em 2011)¹¹ e o dipeptídeo bortezomib (linfoma) (Figura 1).¹² Ainda, estima-se que a taxa de aprovação de fármacos peptídicos foi duas vezes maior comparado a pequenas moléculas em 2010,¹³ evidenciando o potencial terapêutico de fármacos peptídicos. Mais recente, a taxa de aprovação de fármacos biológicos, entre eles enzimas, peptídeos e anticorpos, foi de um terço do total de fármacos aprovados em 2015, um significativo aumento comparado com o um quarto aprovado em 2014.¹⁴

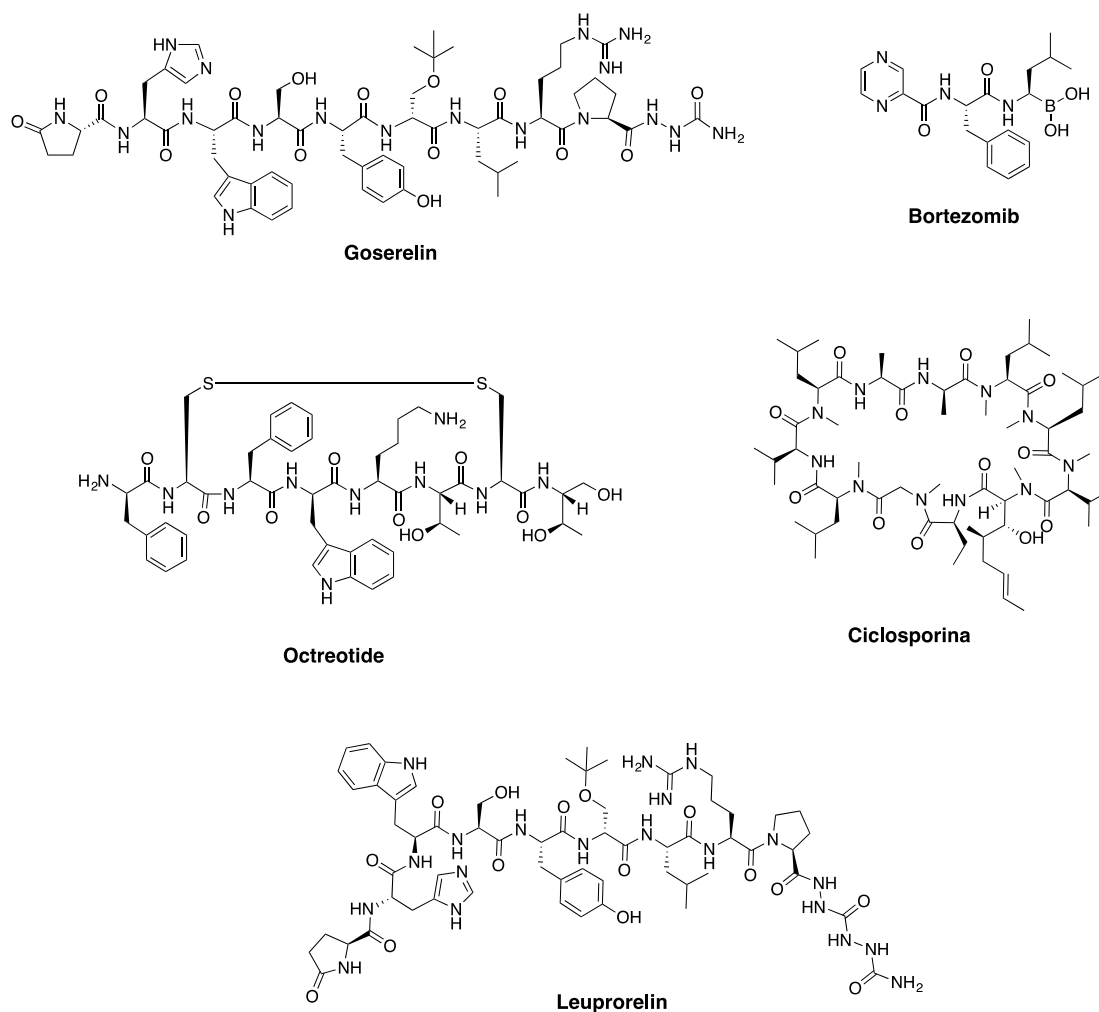


Figura 1. Exemplos de fármacos peptídicos com alto faturamento no mercado.

Acredita-se que pesos moleculares no intervalo entre 500-2000 Da seja ideal para que peptídeos atuem em novos alvos biológicos, desafiadores para pequenas moléculas, como os que envolvem interações proteína-proteína.¹⁵ É conhecido que apenas 20-30% dos alvos terapêuticos possam ser acessados por classes de fármacos usuais, como pequenas moléculas ou anticorpos terapêuticos. A grande parte das proteínas continua considerada como "undruggable", como por exemplo fatores de transcrição e proteínas, os quais possuem papel importante em diferentes enfermidades. Esses alvos não-enzimáticos apresentam na sua maioria uma superfície plana, o que dificulta a alta afinidade de pequenas moléculas por estes alvos.¹⁶

Neste trabalho, definimos fármacos peptídicos como pequenas moléculas que não compartilham qualquer característica com peptídeos que ocorrem naturalmente em mamíferos, ou peptídeos hormonais, a fim de distinguir fármacos peptídicos de peptidomiméticos, miméticos hormonais ou anticorpos.

Devido ao alto índice de fármacos peptídicos aprovados para comercialização nos últimos 5 anos (11% do total) e considerando o reduzido número de grupos na academia e indústria dedicados a essa síntese, podemos concluir que os fármacos peptídicos tem sido muito mais prósperos quando comparado a pequenas moléculas. Dentre as classes em que se distribuem, fármacos peptídicos se concentram principalmente no tratamento de doenças infecciosas, oncologia, hematorreguladores e imunomodulatórios (Figura 2). Dois fatores importantes que contribuem para o sucesso de fármacos peptídicos é a alta especificidade e afinidade com o alvo, e a baixa toxicidade dessas moléculas e seus metabólitos.^{17,18}

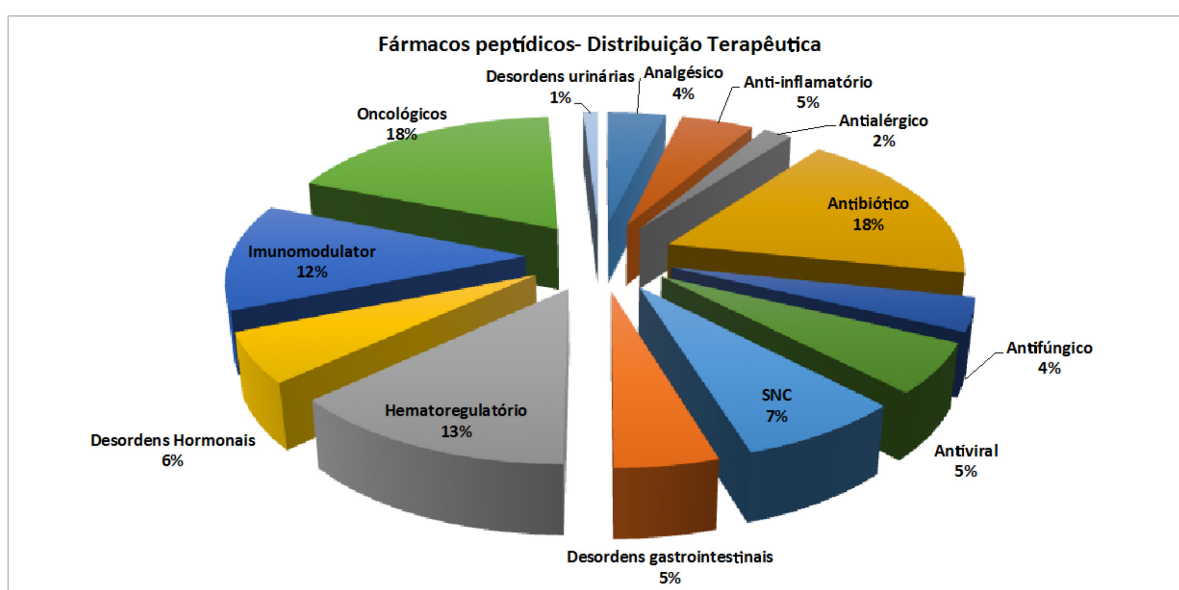


Figura 2. Distribuição de fármacos peptídicos por classe terapêutica.

1.2 Peptídeos naturais antibióticos

A força motriz para desenvolvimento de novos fármacos anti-infecciosos é, na maioria dos casos, o inevitável surgimento de resistência bacteriana aos antibióticos, consequência do uso indiscriminado na clínica e na produção de alimentos de origem animal.¹⁹ Adicionalmente, inúmeras indústrias farmacêuticas deixaram de realizar pesquisa e desenvolvimento em novos antibióticos devido ao mercado econômico desafiador para esse setor. A antibióticoterapia normalmente é de curto prazo, com duração de apenas alguns dias, sendo menos lucrativa que fármacos de uso crônico (anti-hipertensivos, hipoglicemiantes e hipocolesterolêmicos, por exemplo).²⁰ Ainda, o custo para o desenvolvimento não é recompensado pela sua vida útil limitada, devido à eventual resistência adquirida pelos

microorganismos.²¹ Porém, existe outro fator importante - a dificuldade intrínseca em descobrir novos antibióticos.²²

Praticamente todos os agentes anti-infecciosos utilizados hoje foram descobertos durante a "era de ouro" dos antibióticos, entre 1940-1960, sendo a maioria desses compostos identificada por meio de triagem de actinomicetos e streptomicetos de solo (Figura 3).¹

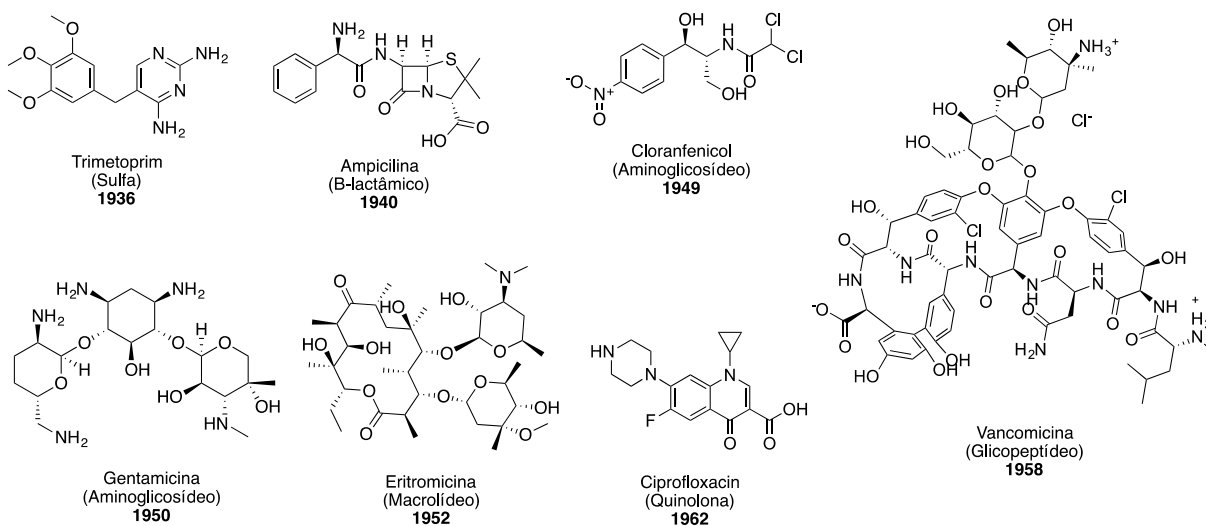


Figura 3. Antibióticos empregados atualmente na clínica desenvolvidos nas décadas de 1940-1960.¹

Desde 1987, nenhuma nova classe de antibiótico foi descoberta e a aprovação de novos fármacos antibióticos no últimos anos se tornou um fenômeno raro. Antibióticos aprovados pelo FDA entre 2010-2015 são da classes das oxazolidinonas, cefalosporinas e β -lactâmicos (Figura 4).

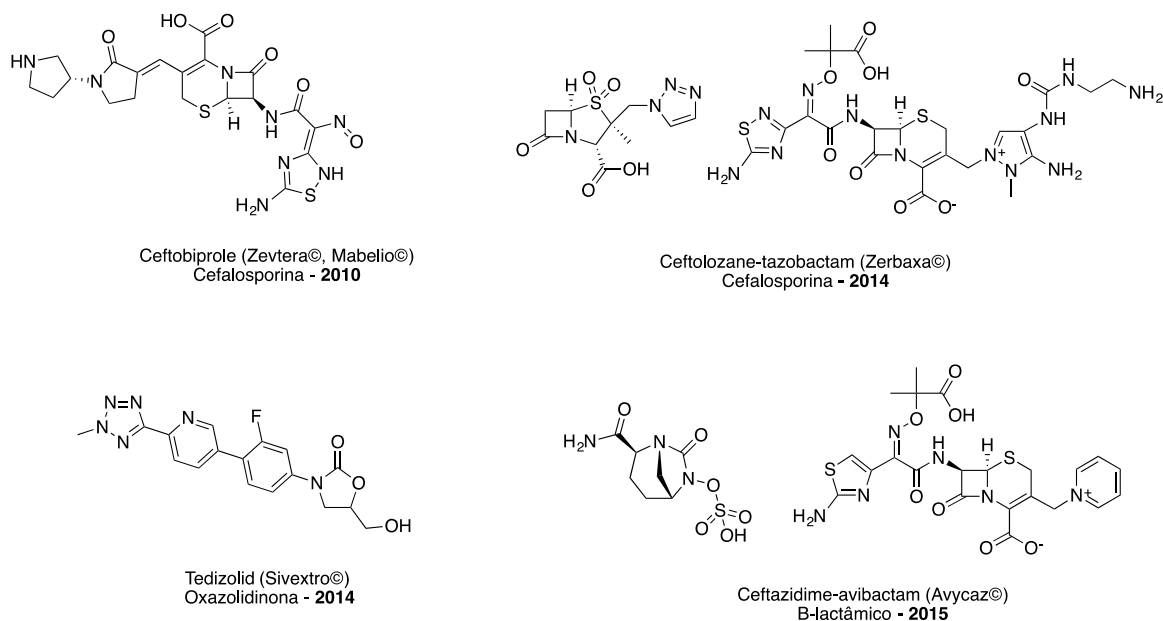


Figura 4. Antibióticos aprovados pelo FDA entre 2010-2015.

Dentre as razões que justificam a baixa taxa de inovação de fármacos desta classe terapêutica destaca-se a adoção de novas plataformas para a descoberta de fármacos, desenvolvidas a partir dos anos 90. Tais estratégias, que envolvem o desenho racional de fármacos, a química combinatória e a triagem de alta eficiência (*high-throughput screening*) mostraram-se ineficazes para obtenção de moléculas sintéticas com espectro de atividade contra patógenos importantes clinicamente.²¹ Além disso, a adoção da "Regra de Lipinski" - (Ro5) pelas indústrias farmoquímicas também contribuiu para a limitação no desenvolvimento de antibióticos, uma vez que exclui moléculas capazes de atravessar membranas de procaríotos. De fato, a excepcionalidade da aplicação da Ro5 a antibióticos já foi relatada por vários autores, incluindo Lipinski.²³ Foi demonstrado mais recentemente, que antibióticos apresentam maior polaridade e peso molecular comparado a outras classes de fármacos, o que sugere a necessidade de propriedades diferentes para penetrar células não humanas.²⁴

A exemplo dessas propriedades físico-químicas diferenciadas, quando analisamos os peptídeos antibióticos aprovados nos últimos cinco anos pelo FDA, dalbavancina, telavancina e oritavancina, por exemplo, apresentam propriedades que violam 3 ou 4 das regras de Lipinski, todos com peso molecular e número de grupos aceptores e doadores de ligação hidrogênio acima do estabelecido pela regra (Figura 5). Essa constatação reforça a necessidade de plataformas diferenciadas para triagem de novos antibióticos.

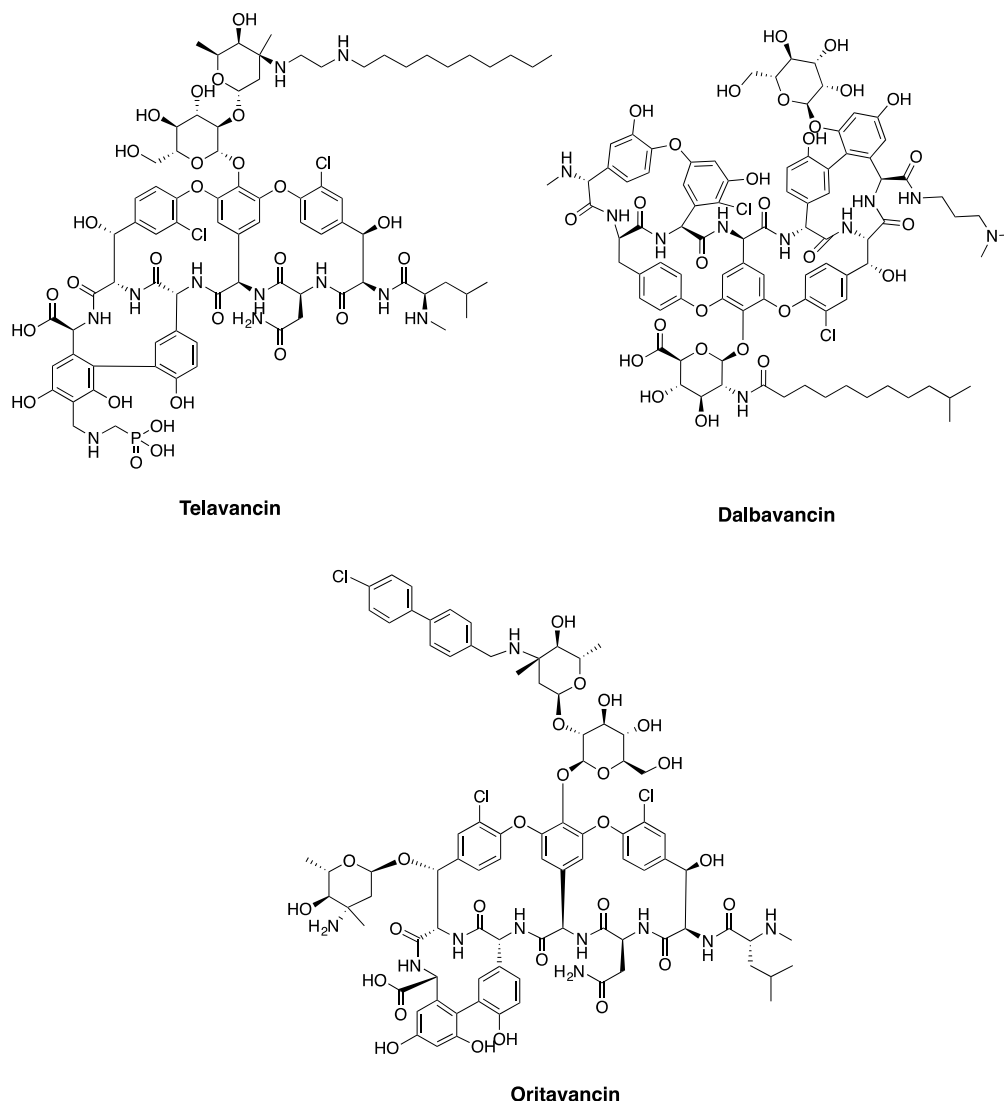


Figura 5. Peptídeos antibióticos aprovados entre 2012-2016 pelo FDA.

O antibiótico daptomicina, aprovado em 2003 pelo FDA – peptídeo cíclico anfifílico isolado de *Streptomyces roseosporus* – destaca-se pela alta seletividade para bactérias gram positivas, sendo empregado em infecções por bactérias multi-resistentes, criando oportunidade para descoberta de novos antibióticos peptídicos.²¹ Este fármaco apresenta propriedades físico-químicas que violam todas as regras de Lipinski (Figura 6), entretanto, sua investigação e aprovação no mercado, garantiu uma alternativa para o tratamento de infecções contra cepas de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), atuando com novo mecanismo de ação. A morte celular é induzida por efluxo de potássio por canais de cálcio dependente, seguida de inserção da cauda apolar do antibiótico na membrana celular do microorganismo.²⁵

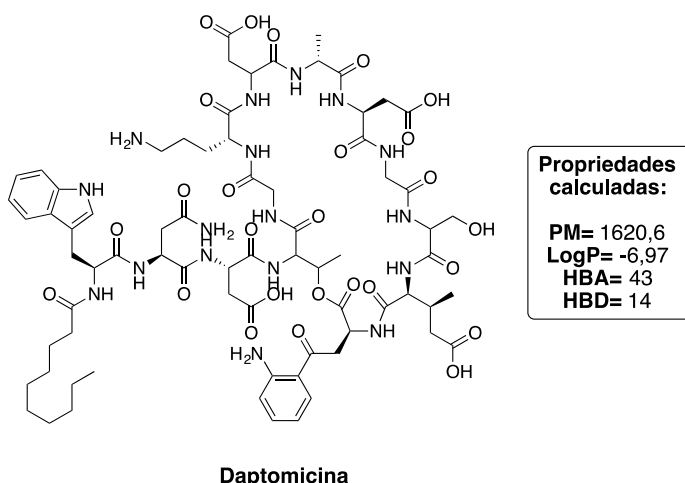


Figura 6. Peptídeo natural isolado de *Streptomyces roseosporus* aprovado em 2003 pelo FDA.

O exemplo da daptomicina demonstra a necessidade de alternativas para o acesso à diversidade química na descoberta de novos fármacos antibióticos, a fim de alcançar classes estruturais inovadoras, com novos mecanismos de ação contra microorganismos multiresistentes. O isolamento de novos produtos naturais, por exemplo, de microorganismos até então incultiváveis ou de fontes pouco exploradas, como microorganismos marinhos, pode fornecer uma saída para o desenvolvimento de nova geração de antibióticos.²² Exemplo dessa nova abordagem, foi a descoberta de bactéria do gênero *Entotheonella*, microorganismo que vive em simbiose com a esponja marinha *Theonella swinhoei*, e o isolamento a partir deste organismo, de enorme gama de compostos bioativos, muitos peptídeos, hoje em fase inicial de estudos (Figura 7).²⁶ Nota-se, portanto, uma fonte ainda pouco explorada de microorganismos e comensais marinhos.²⁷

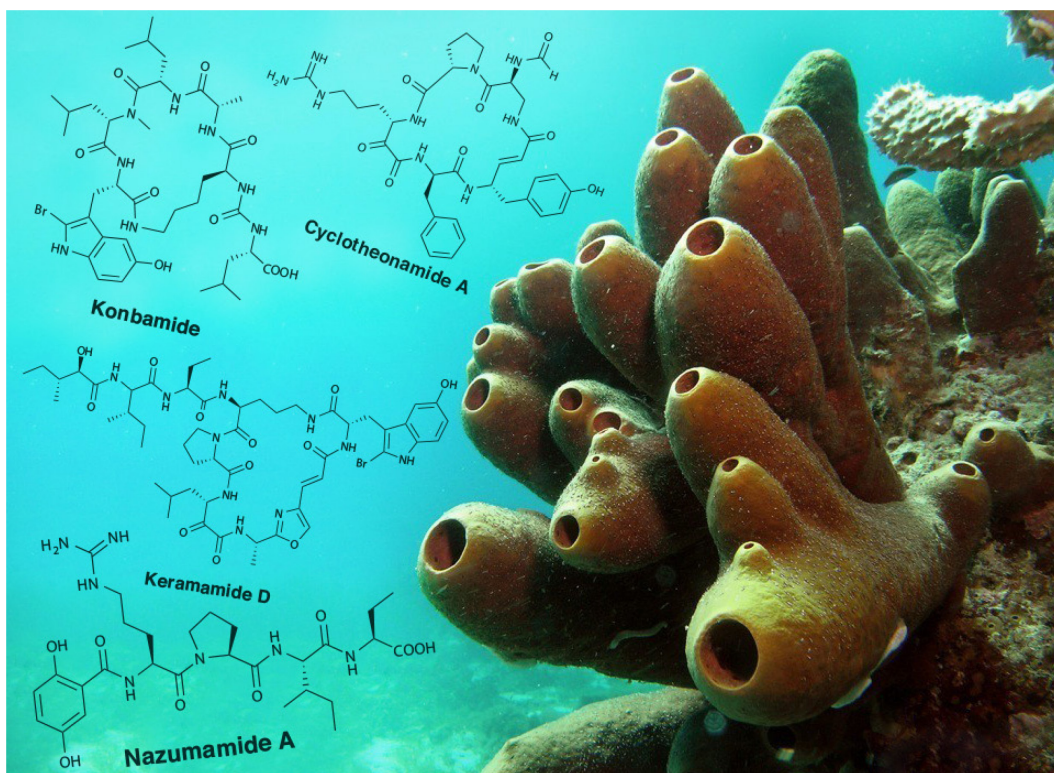


Figura 7. Peptídeos antimicrobianos isolados de bactéria do gênero *Entotheonella*, comensal da esponja *Theonella swinhoei*. **Foto:** Guido Poppe.

Assim, a busca por novos antibióticos em estruturas peptídicas mostra-se como uma alternativa para essa falta de perspectivas no desenvolvimento de antibióticos. Através de análise dos fármacos que foram lançados ao mercado nos últimos 5 anos, observamos que 20 destes são peptídeos, sendo que 10 são novos anti-infecciosos, entre antibióticos e antivirais (Tabela 1).

Tabela 1. Fármacos peptídicos aprovados de 2012-2016 pelo FDA.

Nome Comercial	Nome Genérico	Aprovação	Financiador	Indicação
Gattex	Teduglutide	2012	NPS Pharmaceuticals	Síndrome do intestino curto
Saxenda	Liraglutide	2014	Novo Nordisk	Controle de peso
Bydureon	Exenatide	2012	Amylin	Controle glicêmico em adultos com diabetes tipo II
Signifor	Pasireotide diaspartate	2012	Novartis	Síndrome de Cushing'
Dalvance	Dalbavancin	2014	Durata Therapeutics	Infecção dérmica bacteriana
Entresto	Sacubitril e valsartan	2015	Novartis	Insuficiência cardíaca crônica
Kyprolis	Carfilzomib	2012	Onyx Pharmaceuticals	Mieloma múltiplo
Daklinza	Daclatasvir	2015	Bristol-Myers Squibb	HCV crônica - genotipo 3
Technivie	Ombitasvir, paritaprevir e ritonavir	2015	Abbvie	HCV crônica - genotipo 4
Zepatier	Elbasvir and grazoprevir	2016	Merck	HCV crônica - genotipos 1 e 4
Evotaz	Atazanavir and cobicistat	2015	Bristol-Myers Squibb	Infecção HIV-1
Genvoya	Elvitegravir, cobicistat, emtricitabine e tenofovir alafenamide	2015	Gilead Sciences	Infecção HIV-1
Prezcobix	Darunavir e cobicistat	2015	Janssen	Infecção HIV-1
Linzess	Linaclotide	2012	Forest Labs and Ironwood Pharmaceuticals	Síndrome do intestino curto e constipação idiopática crônica
Vibativ	Telavancin	2013	Theravance	Pneumonia causada por <i>S. aureus</i>
Harvoni	Ledipasvir and sofosbuvir	2014	Gilead	Hepatite C
Viekira Pak	Ombitasvir, paritaprevir, ritonavir and dasabuvir	2014	Abbvie	Hepatite C crônica - genotipo 1
Surfaxin	Lucinactant	2012	Discovery Laboratories	Síndrome do desconforto respiratório neonatal
Savaysa	Edoxaban	2015	Daiichi Sankyo	Trombose venosa profunda, embolia pulmonar
Orbactiv	Oritavancin	2014	The Medicines Company	Infecção dérmica bacteriana

Peptídeos antimicrobianos são produzidos por organismos diversos como mamíferos, artrópodes, plantas e bactérias. A biossíntese de peptídeos representa papel importante do sistema imune inato destes organismos, e atua como mecanismo de defesa a microorganismos patogênicos. Usualmente, são compostos de 10-50 resíduos de aminoácidos, sendo de configuração -D e -L, usuais ou não-usuais.²¹ Apesar dos relatos da existência de mais de 140 aminoácidos encontrados em peptídeos naturais, apenas 20 são considerados usuais, e todos os outros são, portanto, derivados pós-traducionais destes, denominados não-usuais ou não-proteogênicos.²⁸

Antimicrobianos peptídicos naturais são catiônicos, anfífilos ou hidrofóbicos, propriedades que facilitam a interação destes com membranas bacterianas, carregadas negativamente. Nas membranas, os peptídeos formam poros, levando ao desequilíbrio eletrolítico e morte celular.²⁹ Exemplo de peptídeo antibiótico catiônico anfílico é o derivado sintético do indolicidina, Ominagan®,³⁰ e de peptídeo catiônico hidrofóbico, o peptídeo natural batenecina (Figura 8).³¹

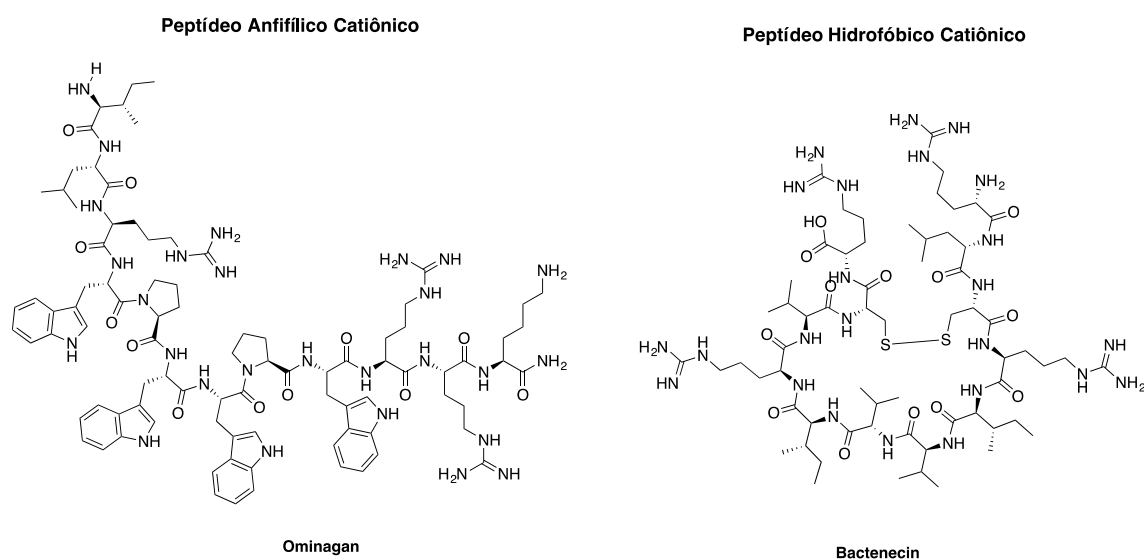


Figura 8. Estrutura dos peptídeos Ominagan® e batenecina.

Nesse sentido, peptídeos antimicrobianos naturais constituem agentes terapêuticos promissores, devido sua seletividade, mecanismos de ação que se diferenciam de antibióticos usuais, o que os torna menos suscetíveis à resistência bacteriana e, portanto, excelentes compostos líderes para o desenvolvimento de novos fármacos antibióticos.³²

Devido à dificuldade no processo de extração e obtenção sintética de antimicrobianos peptídicos, a engenharia genética é ainda a estratégia mais amplamente utilizada para

produção em larga escala desses compostos. Uma das alternativas com menor custo para produção de peptídeos é a expressão recombinante empregando micro-organismos resistentes ao antibiótico produzido. Um exemplo, é o antimicrobiano peptídico plectasin, primeira defensina obtida de fungo saprotítico com interesse terapêutico, produzido por expressão fúngica em altos rendimentos.³³ Hoje, esse mesmo sistema é empregado para produção industrial de outros peptídeos antimicrobianos de interesse farmacêutico (Figura 9).³⁴

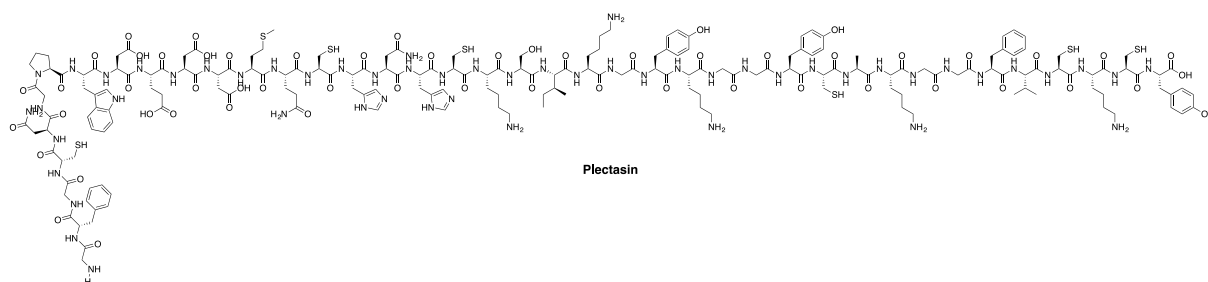


Figura 9. Antibiótico peptídico plectasin em fase de estudos pré-clínicos.

Mesmo com custos elevados, muitos peptídeos antimicrobianos são obtidos sinteticamente pela indústria, dentre eles podemos citar o enfuvirtide (Fuzeon®), fármaco anti-HIV produzido pela Roche e aprovado pelo FDA em março de 2003.³⁵ Esse peptídeo, composto por 36 aminoácidos, é obtido sinteticamente através da combinação de Fmoc-SPPS e síntese em solução em um total de 106 etapas, com produção anual de mais de 3 toneladas e faturamento estimado de U\$ 700-800 milhões de dólares por ano (Figura 10).³⁶

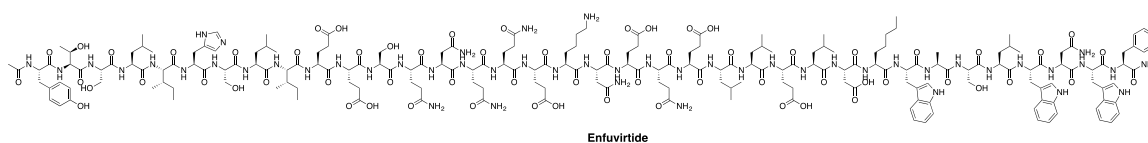


Figura 10. Estrutura do peptídeo natural enfuvirtide obtido pela Roche por via biotecnológica.

1.3 Estratégias sintéticas para obtenção de peptídeos cíclicos

Restringir uma cadeia peptídica em uma conformação definida por meio de reações de ciclização é uma estratégia adotada pela natureza e pela química sintética, esta última tendo destaque apenas nas últimas décadas. Apesar de intensos esforços e desenvolvimento de novos métodos, a ciclização de macrociclos continua sendo considerada uma etapa desafiadora da síntese de peptídeos cíclicos.

A restrição conformacional gerada pela ciclização pode aumentar a estabilidade enzimática de peptídeos e também afinidade/especificidade destes por bioreceptores, e portanto, nota-se grande esforço sintético em desenvolver novas metodologias para obtenção de peptídeos e depsipeptídeos cíclicos.¹⁵ Nos últimos anos, diversos peptídeos cíclicos alcançaram o mercado, dentre eles, os antibióticos anfomicina e basifungina e o modulador hormonal atosiban (Figura 11). O sucesso dos peptídeos cíclicos em fase clínica de testes tem inspirado pesquisadores na síntese e triagem de biblioteca de análogos cíclicos de produtos naturais.

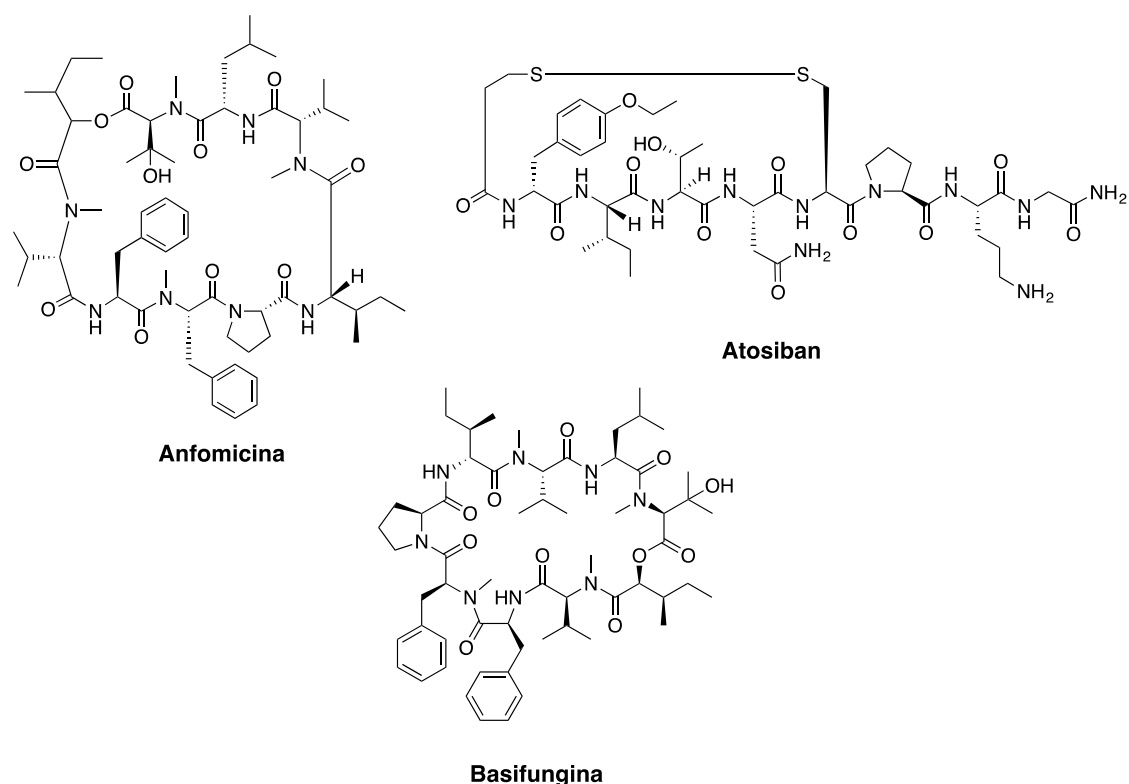


Figura 11. Fármacos peptídicos recentemente lançados ao mercado.

O custo da síntese de peptídeos cíclicos é muitas vezes proibitivo devido ao emprego de reagentes e equipamentos de alto custo. Entretanto, nos últimos anos com a otimização dos rendimentos de ciclização e dos métodos cromatográficos de separação, criou-se um ambiente favorável para síntese em detrimento de outros métodos de obtenção de peptídeos, à exemplo da sintética em escala industrial do imunossupressor ciclosporina.³⁷

Dependendo dos grupos funcionais presentes, peptídeos podem ser ciclizados em quatro formas diferentes: Cabeça-cauda (C-terminal ao N-terminal), cadeia lateral-cauda, cabeça-cadeia lateral e cadeia lateral-cadeia lateral (Figura 12).²

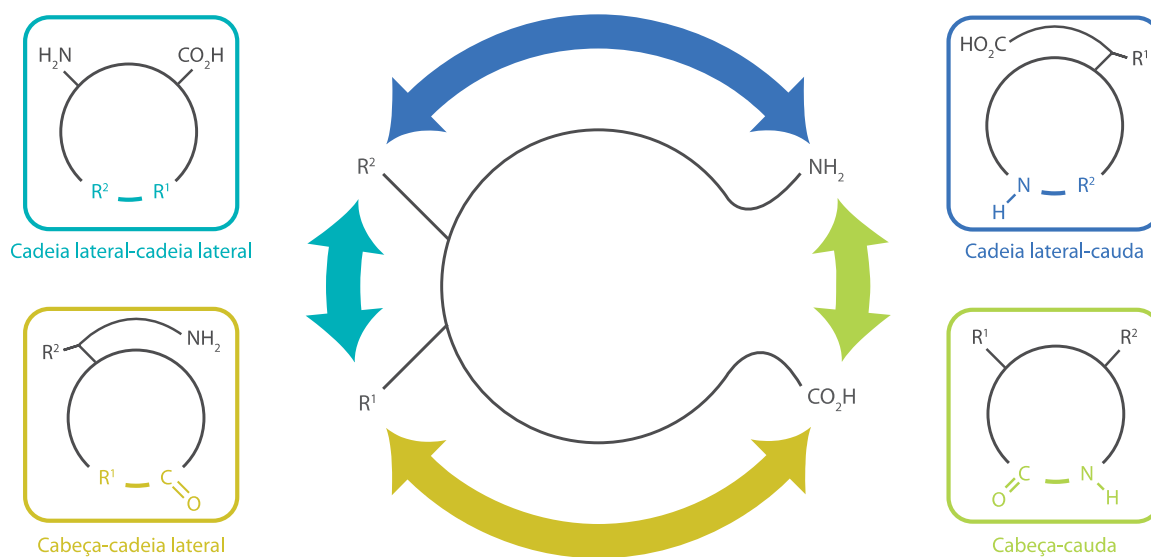


Figura 12. Representação das quatro possibilidades de ciclização de peptídeos (Adaptado de White et al).²

Neste trabalho, o enfoque principal envolve a estratégia cabeça-cauda e os respectivos métodos empregados para essa finalidade. Dentre os métodos empregados para síntese de peptídeos, iremos abordar a síntese total em solução, a síntese em fase sólida com ciclização em solução e o método de síntese e ciclização em resina “safety-catch”.³⁸

1.3.1 Síntese de peptídeos e depsipeptídeos em solução

Peptídeos lineares podem ser sintetizados eficientemente em solução, empregando sistema de proteção ortogonal, que permite a construção do peptídeo com cadeias laterais reativas protegidas.³⁵ De maneira geral, os fragmentos protegidos podem ser combinados em solução para dar origem a peptídeos maiores, e assim, após a remoção dos grupos protetores das cadeias laterais e clivagem da resina, obtém-se o peptídeo desejado (Figura 13).

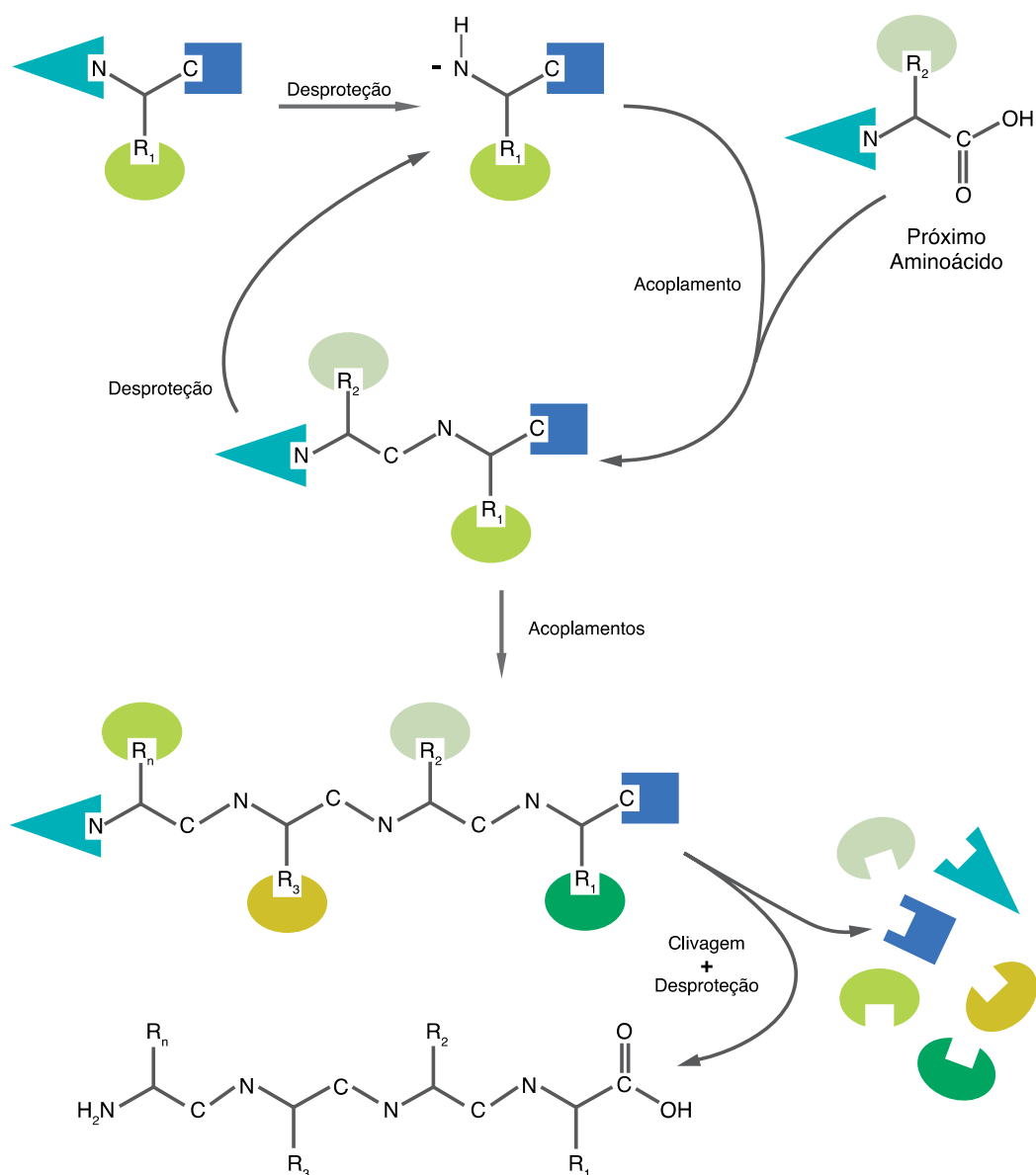


Figura 13. Representação esquemática da síntese em solução de peptídeos.

Apesar do surgimento de inúmeras novas abordagens na síntese de peptídeos cíclicos, a síntese do peptídeo linear com ciclização cabeça-cauda em solução, na presença de reagentes de acoplamento, continua sendo a estratégia mais empregada. Neste caso, o resultado da ciclização é majoritariamente influenciada pela conformação adotada pelo precursor linear na solução. Portanto, o planejamento retrossintético e o desenho da síntese em solução é essencial para escolha racional dos grupos de proteção e dos reagentes de acoplamento, bem como do ponto de desconexão do anel.³⁹

A seleção adequada do ponto de desconexão do anel facilita significativamente a reação

de macroclicização, evitando reações de polimerização e/ou epimerização do resíduo C-terminal. Por exemplo, baixos rendimentos são observados, caso o ponto da macroclicização envolva aminoácidos estericamente impedidos, como *N*-alquil, α,α -substituídos ou valina/isoleucina, ou aminoácidos de mesma estereoquímica.² Por outro lado, melhores rendimentos podem ser obtidos na macroclicização que envolva aminoácidos com estereoquímica opostas (Figura 14).^{40,41}

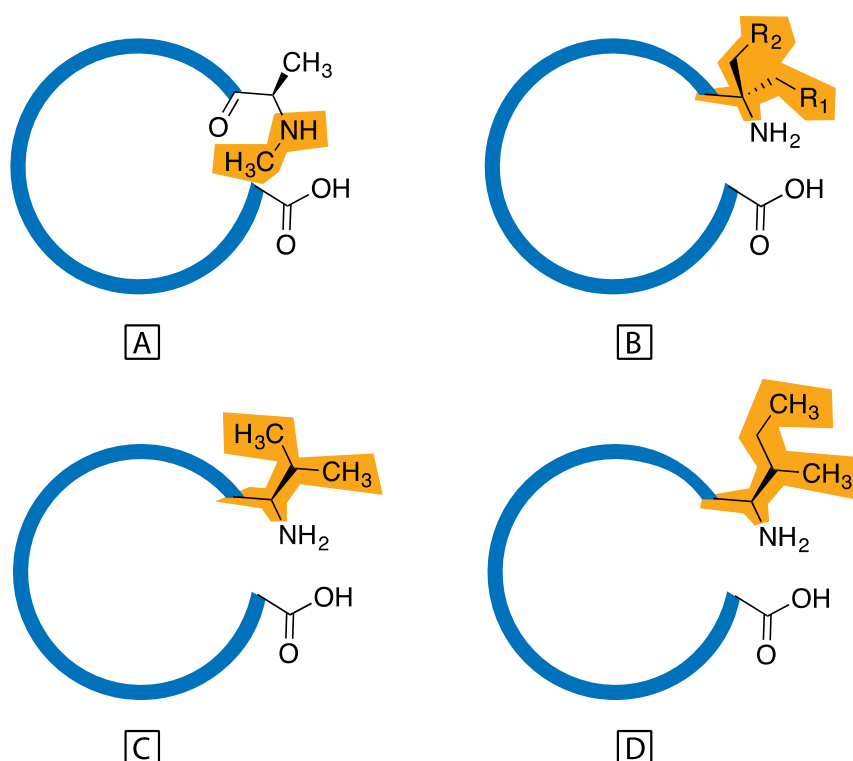


Figura 14. Grupos com baixos rendimentos na etapa da ciclização destacados em laranja. A= Grupo amino terminal *N*-metilado; B=resíduo α,α -substituído; C=resíduo terminal valina D=resíduo terminal isoleucina.

Estudos envolvendo ciclização de peptídeos mostram que o rendimento dessa etapa é fortemente dependente da sequência e do tamanho do anel.⁴² Estes estudos levaram a conclusões importantes, como a observação de que sequências lineares, contendo os grupos N e C-terminais próximos, no conformero mais estável, apresentam alta eficiência de ciclização.³³ Ainda, estudo realizado por Meutermans e colaboradores demonstrou que na ciclização de tetrapeptídeos, a presença do aminoácido glicina é essencial em sequência contendo apenas aminoácidos $-L$.⁴³ Similarmente, peptídeos contendo D e L-aminoácidos alternados, apresentam maiores rendimentos de ciclização devido aos menores confrontos estéricos entre as cadeias laterais.⁴² Ainda, tetra e pentapeptídeos são mais difíceis para

ciclizar e, quando efetiva, a ciclização normalmente é acompanhada por oligo- ou polimerizações. Observa-se também que peptídeos ricos em resíduos de Arg, Lys e Thr são mais difíceis de ciclizar devido à formação de ligações de hidrogênio bidentadas intermoleculares, reduzindo sua reatividade (Figura 15).⁴⁴

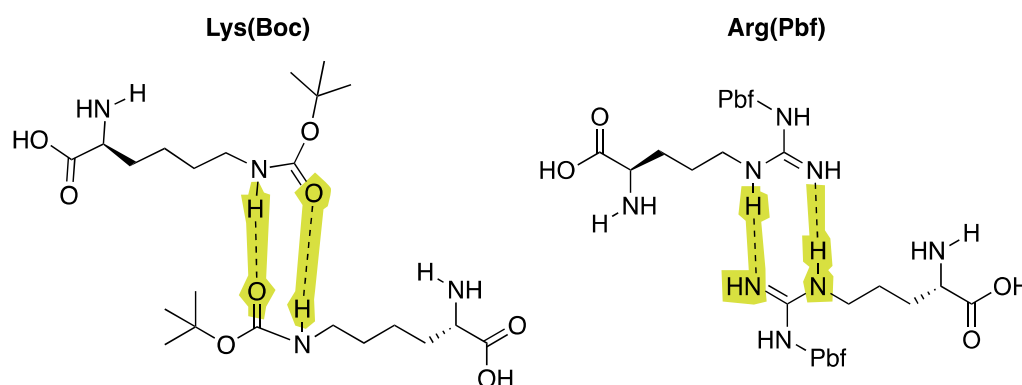
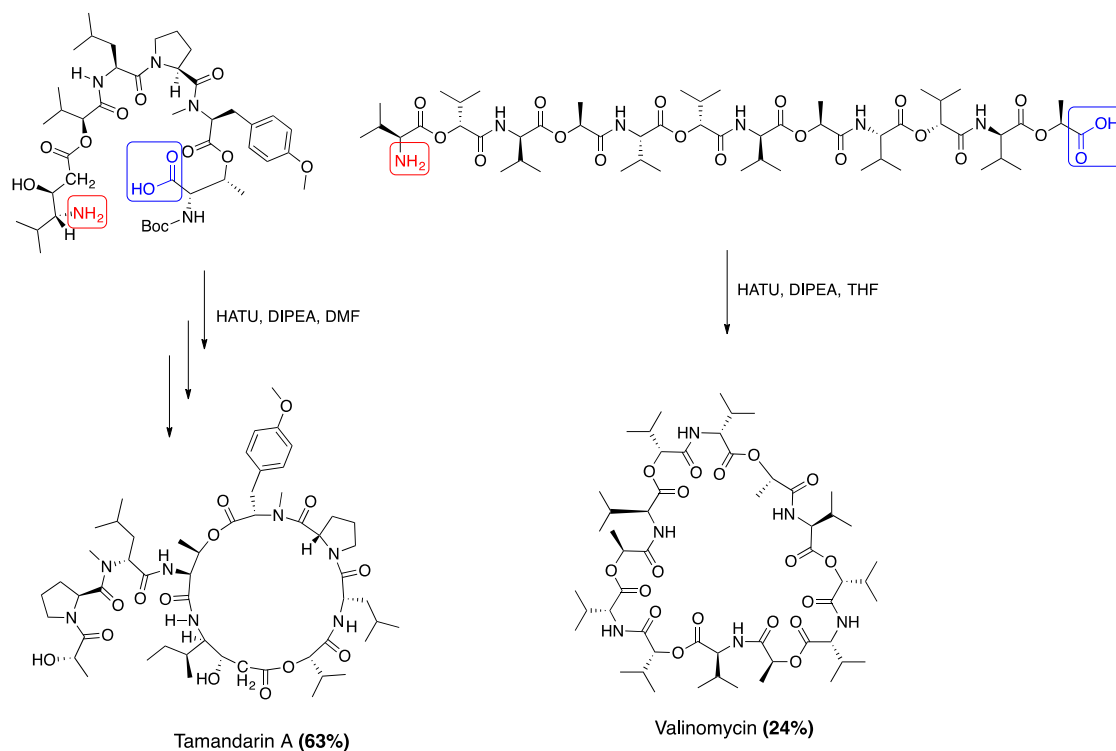


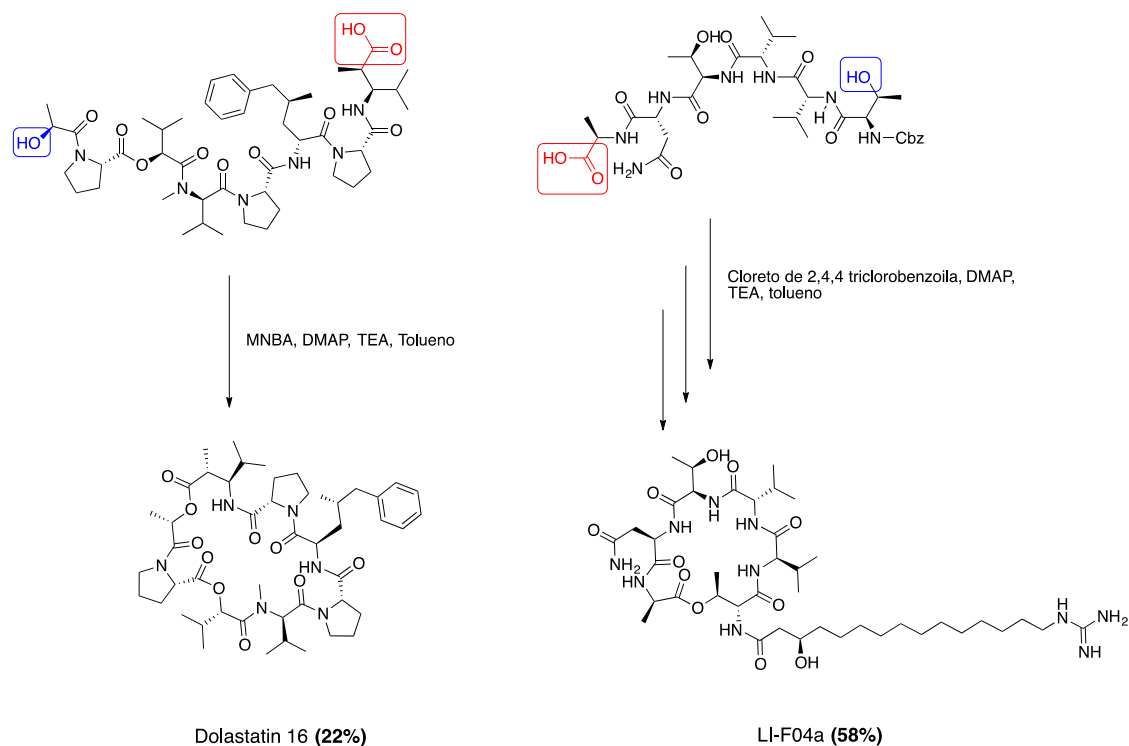
Figura 15. Formação das ligações de hidrogênio bidentadas entre resíduos de Lys(Boc) e Arg(Pbf).

No tocante a depsipeptídeos, o fechamento do anel atende aos mesmos requisitos anteriormente citados. A ciclização, nesse caso, pode ocorrer tanto na ligação éster (macrolactonização) como na formação da ligação amida (macrolactamização).⁴⁵ A síntese total do metabólito fúngico valinomycin⁴⁶ e do produto natural marinho tamandarin A (Esquema 1) são exemplos de macrolactamização de depsipeptídeos.⁴²



Esquema 1. Depsipeptídeos naturais obtidos por macrolactamização.

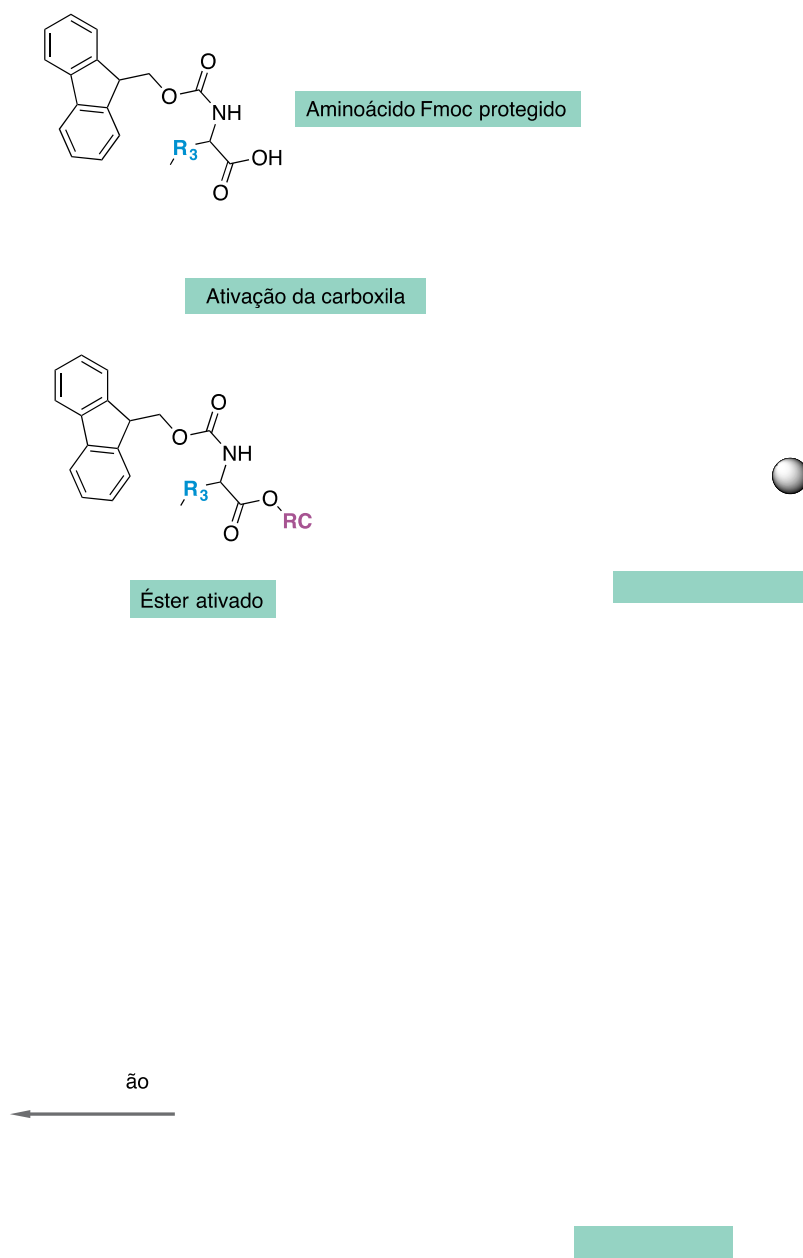
Exemplos de macrolactonização incluem a síntese total do depsipeptídeo LI-F04a⁴⁷ da classe das fusaridicinas, e do depsipeptídeo natural Dolastatin 16 (Esquema 2).⁴⁸



Esquema 2. Depsipeptídeos naturais obtidos por macrolactonização. TEA= trietilamina; DMAP=dimetilamino piridina; MNBA=anidrido 2-metil-6 nitrobezóico.

1.3.2 Síntese do peptídeo linear em resina e ciclização em solução

Com o advento da síntese de peptídeos em fase sólida (SPPS), desenvolvida por Merrifield em 1963,⁴⁹ descortinou-se a oportunidade para o desenvolvimento de peptídeos estruturalmente mais complexos e em maior quantidade. Essa nova técnica sintética ganhou ainda maior aplicabilidade com o desenvolvimento do grupo amino protetor 9-Fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc) por Carpino et al em 1972,⁵⁰ que apresenta maior facilidade de remoção quando comparado ao grupo Boc usado à priori por Merrifield. Ainda, esse grupo é de fácil eliminação por extrações e filtração, e apresenta possibilidade de monitorização de sua remoção por absorção UV do aduto dibenzofulveno. Nas últimas décadas, inúmeros aprimoramentos dessa técnica, como novas resinas, grupos protetores, reagentes de acoplamento e ligantes, permitiram a automatização da SPPS, levando ao desenvolvimento da síntese de peptídeos completamente automatizada e eficiente, onde dezenas de peptídeos podem ser construídos simultaneamente.⁵¹ Hoje, a SPPS, baseada nos grupos de proteção Fmoc/*t*-But representa o método mais amplamente empregado na síntese de peptídeos, devido a facilidade do monitoramento das reações e uso de condições de desproteção brandas e a possibilidade de clivagem e total desproteção das cadeias laterais do peptídeo em uma única etapa reacional (Esquema 3).⁵²






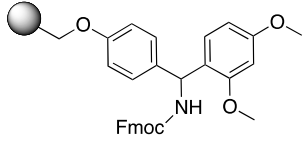

Esquema 3. Representação esquemática de Fmoc/*t*-Bu SPPS empregando ligante e grupos de proteção das cadeias laterais ácido lábeis. GP=Grupo de proteção; RC=Reagente de acoplamento.

As vantagens do emprego da síntese do precursor linear em fase sólida são, dentre outras, a possibilidade do uso de reagentes em excesso, aumentado a velocidade das reações, a viabilidade de automatização das etapas de acoplamentos e desproteções, a purificação através de extrações e filtração, e a possibilidade de uso de reações em fluxo contínuo.⁵¹ O

acompanhamento das reações, neste caso, é realizado através de testes qualitativos, como detecção de grupo amina livre com o teste de Kaiser e cloranil. Também é possível realizar testes quantitativos como a detecção por absorção no ultravioleta do grupo dibenzofulveno, liberado durante a desproteção do grupo Fmoc, conforme citado anteriormente.⁵³ Em geral, nota-se maior pureza do peptídeo linear clivado da resina quando comparado ao obtido em solução, uma vez que as lavagens da resina são realizadas após cada etapa de acoplamento e desproteção.

Diante do exposto, o precursor linear pode ser sintetizado por meio de emprego de ligantes diversos, de acordo com os grupos funcionais desejados ao final da síntese, dos aminoácidos presentes e dos grupos de proteção empregados. Na Fmoc-SPPS, a ligação peptídeo-ligante pode ser clivada, na maioria das vezes, por meio de tratamento com ácido trifluoroacético (TFA). Alguns ligantes podem ainda ser clivados na presença de nucleófilos ou de luz (Tabela 2).

Tabela 2. Ligantes empregados em Fmoc SPPS.⁵¹

Ligante	Clivagem	Características
	90-95% de TFA v/v, 1-2h	Ao final da clivagem, fornece peptídeo com cadeias laterais livres, com grupo C-terminal ácido.
	1-5% de TFA em DCM, 5 min	Ao final da clivagem, fornece peptídeo com cadeias laterais protegidas.
	90% v/v TFA; 1-5% TFA em DCM, 1 min.	Pode ser empregada para obter peptídeos com cadeias laterais protegidas ou livres, dependendo das condições de clivagem.
	50% TFA em DCM, 1h; 90-95% v/v TFA, 1h.	Após clivagem, fornece o peptídeo com C-terminal amida.
	Amônia em MeOH, 24 h	Clivagem em meio básico ocorre com formação de peptídeo com C-terminal modificado, dependendo do nucleófilo usado.

●	$h\nu$ (350 nm), 12-24 h	A fotoclivagem leva ao peptídeo C-terminal amida.
●	(i) Iodoacetoneitrila-DIPEA (20:5) em NMP, 24h. (ii) DIPEA em THF, 24h (2x).	Fornece o peptídeo ciclizado, onde o grupo amino terminal atua como nucleófilo e ocorre clivagem simultânea à ciclização.

A estratégia mais empregada para macrociclicização, como mencionado no item anterior, é a ciclização em solução. As macrociclicizações em solução são, em geral, realizadas em alta diluição (10^{-3} - 10^{-4} M) para evitar as reações intermoleculares, como oligo e polimerizações.² Normalmente, essas reações são lentas, o que possibilita reações de decomposição da carboxila ativada, anterior ao ataque da amina.³⁷ No entanto, a vantagem da síntese do precursor linear seguida de ciclização em solução é a possibilidade da caracterização e purificação desse análogo antes da etapa final de síntese, podendo ser identificada alguma dificuldade sintética antes da etapa de ciclização.

Diante da diversidade de reagentes de acoplamento para síntese de peptídeos, nota-se o emprego de carbodiimidas, anidridos mistos, ésteres ativos, sais de fosfônio, urônio e imônio com maior frequência em acoplamentos e macrociclicizações, tanto em fase sólida quanto em solução (Figura 16).

A escolha do reagente de acoplamento é feita de acordo com a dificuldade do acoplamento, por exemplo, se há aminoácido *N*-metilado ou estericamente impedido, se a reação é em solução ou em fase sólida e se a etapa é uma macrociclicização ou formação de ligação éster. É importante notar que nenhum reagente de acoplamento será eficiente para a formação de todas as ligações peptídicas e muitas vezes, para uma mesma reação, múltiplas tentativas com diferentes reagentes poderão ser necessárias para o realização do acoplamento desejado.

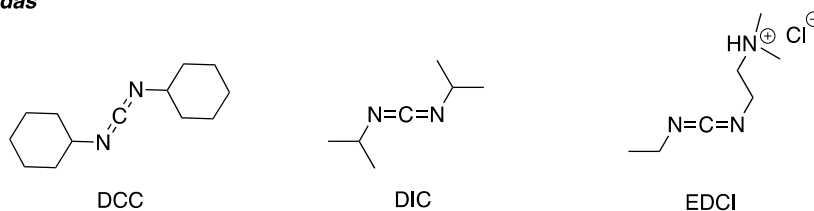
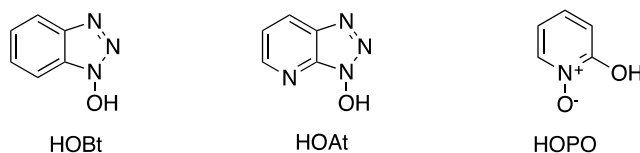
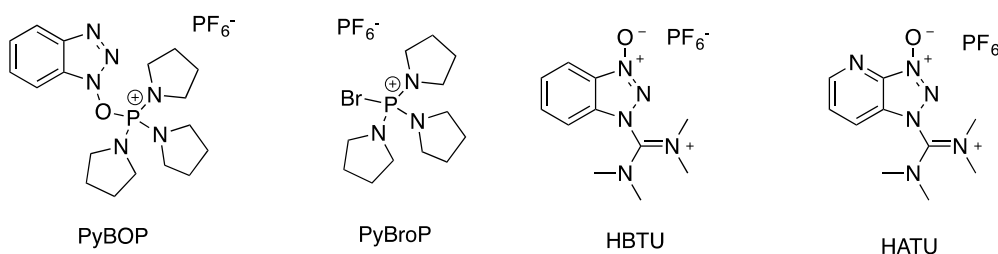
Carbodiimidas**Aditivos utilizados com Carbodiimidas****Sais de fosfônio e urônio**

Figura 16. Reagentes de acoplamento usualmente empregados em SPPS e síntese em solução.

Entretanto, é importante evidenciar que, em reações em solução, o uso de carbodiimidas, como o EDCI:HCl, torna-se mais viável diante da facilidade da sua remoção do meio reacional com extração aquosa, devido a solubilidade do seu subproduto e da própria carbodiimida em água.⁵⁴

Por outro lado, em Fmoc-SPPS, a carbodiimida mais empregada é *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC), devido a sua alta solubilidade em DMF e DCM, solventes utilizados nesta estratégia, e também pela fácil remoção através de extrações com estes solventes.⁵⁵ Ainda, em reações em fase sólida empregam-se comumente sais de fosfônio como PyBOP e PyBroP e sais de urônio, como HBTU e HATU (Figura 16). A ordem de eficiência dos reagentes de acoplamento mais comumente empregados em SPPS é: ésteres OPfp/HOBt < DIC/HOBt < HBTU ≈ PyBOP < HATU.⁵¹

Carpino demonstrou, em estudos comparativos, que acoplamentos com emprego de HOAt, eram mais eficientes, com menor taxa de epimerização e mais rápidos do que os que utilizavam HOBt,⁵⁶ portanto, o desenvolvimento de muitos reagentes de acoplamento foram baseados no HOAt, como o HATU e TATU.⁵⁷ A maior reatividade de HOAt e derivados se

deve ao efeito do grupo piridínico vizinho ao éster ativado, que forma uma ligação de hidrogênio com a amina a ser acoplada, facilitando a reação (Figura 17).⁵⁶

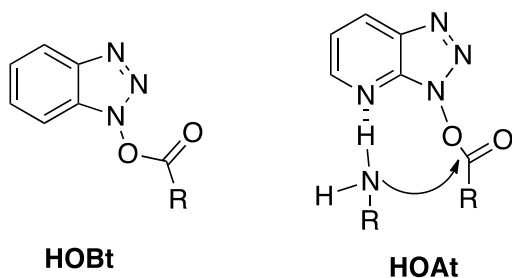
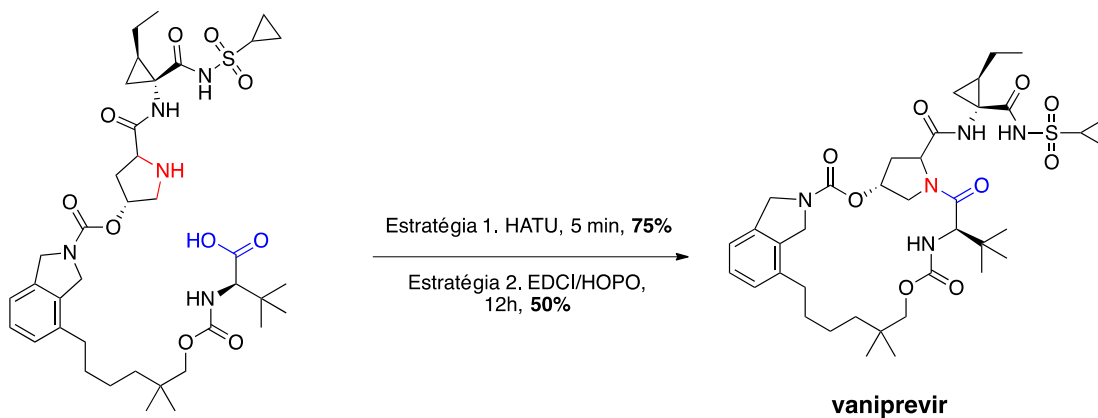


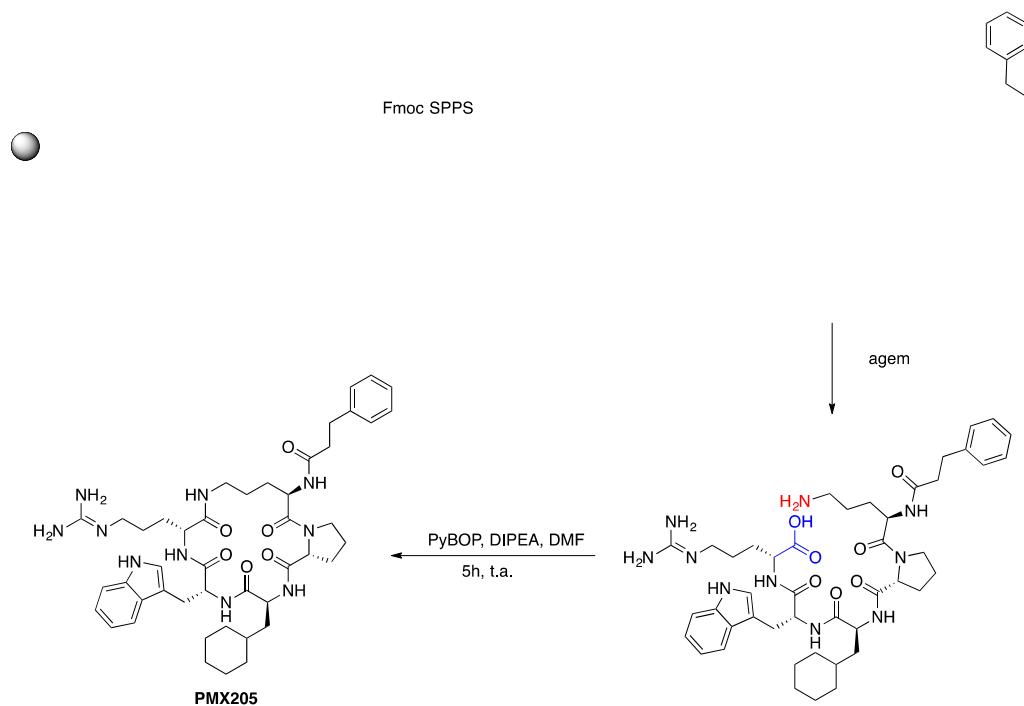
Figura 17. Éster ativado do HOBt e com HOAt, evidenciando o efeito do grupo piridínico que confere maior reatividade do HOAt.

Assim, muitas vezes, reações de macroclicização e acoplamentos envolvendo aminoácidos estericamente impedidos, requerem reagentes de acoplamento altamente eficientes, como HATU.⁵⁴ Exemplos do emprego do HATU na macroclicização de peptídeos de difícil obtenção incluem fármacos, como o inibidor de protease de vírus de hepatite C, vaniprevir (MK-7009).⁵⁸ Neste caso, a etapa de ciclização com HATU fornece o macrociclo com 100% de conversão e 75% de rendimento em apenas 5 minutos, muito superior aos 50% de rendimento obtidos após 12 horas de reação com a combinação de EDCI/HOPO (Esquema 4).⁵⁹



Esquema 4. Macroclicização do fármaco vaniprevir no tratamento com HATU e na combinação EDCI/HOPO.

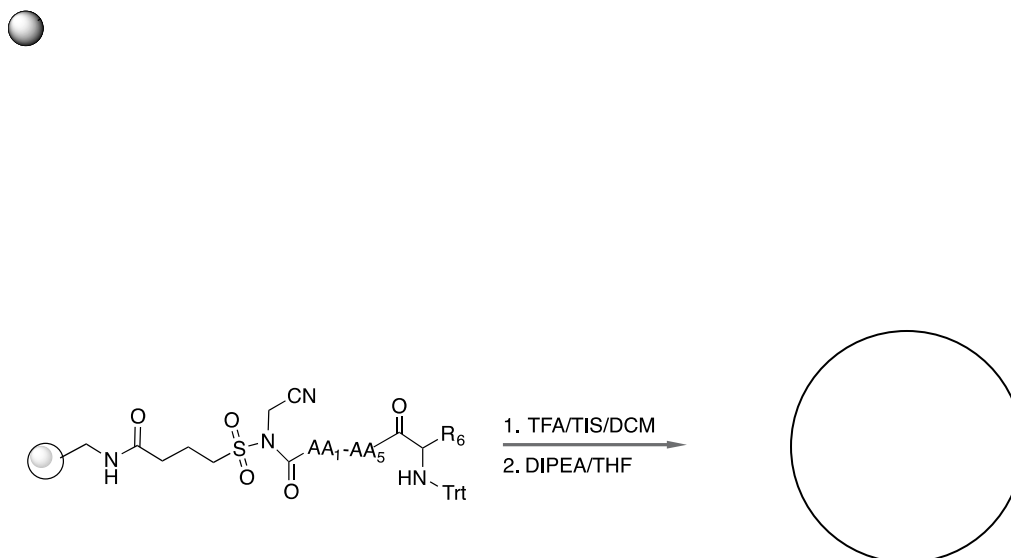
Um exemplo do emprego da técnica de Fmoc-SPPS para obtenção do precursor linear, com posterior ciclização em solução, é a obtenção do antagonista de receptor C5a, o composto PMX205, empregado no tratamento de Alzheimer (Esquema 5).⁶⁰



Esquema 5. Uso da combinação de Fmoc-SPPS e ciclização em solução para obtenção do peptídeo PMX205.

1.3.3 Síntese e ciclização em resina: Emprego da resina “safety-catch”

Ancorar uma molécula em um polímero insolúvel para realizar a ciclização pode criar um ambiente de pseudo-diluição, uma vez que o grupo reativo teria menor probabilidade de encontrar o grupo reativo de outra molécula, evitando as reações intermoleculares. A maior vantagem em se empregar um suporte polimérico na ciclização é que extrações e filtrações são normalmente suficientes para a purificação.² Dentre os métodos empregados na síntese e ciclização em resina, o método "safety-catch" desenvolvido por Yang & Morriello³⁸ apresenta a possibilidade de ciclização cabeça-cauda simultânea à clivagem. Neste método, a ligação ligante-peptídeo, formando um grupo sulfonamida, é estável em todas condições de síntese de peptídeos, em meio básico ou ácido. Ao final da síntese da sequência linear, o grupo de proteção Fmoc deve ser substituído por grupo que seja estável em meio básico, empregado na cianoalquilação. Para tal, o grupo Fmoc é substituído pelo grupo tritila e em seguida é realizada a cianoalquilação na presença de iodoacetnitrila e DIPEA. Nessa etapa, conhecida como etapa de ativação, a alquilação com iodoacetnitrila leva a uma maior eletrofilicidade do grupo carboxila, que pode sofrer mais facilmente um processo de adição nucleofílica pelo grupo amino terminal³⁹ (Esquema 6).



Esquema 6. Método geral de síntese e ciclização na resina Kenner (Adaptado de Yang&Morriello).⁴²

O ligante sulfamilbutiril já foi empregado com sucesso na síntese de diversos peptídeos cíclicos, como o peptídeo natural cherimolacyclopeptide E e análogos⁶¹, e dos peptídeos phakellistatin 12⁶², polymyxin B1⁶³ e brachystemin A⁶⁴ (Figura 18).

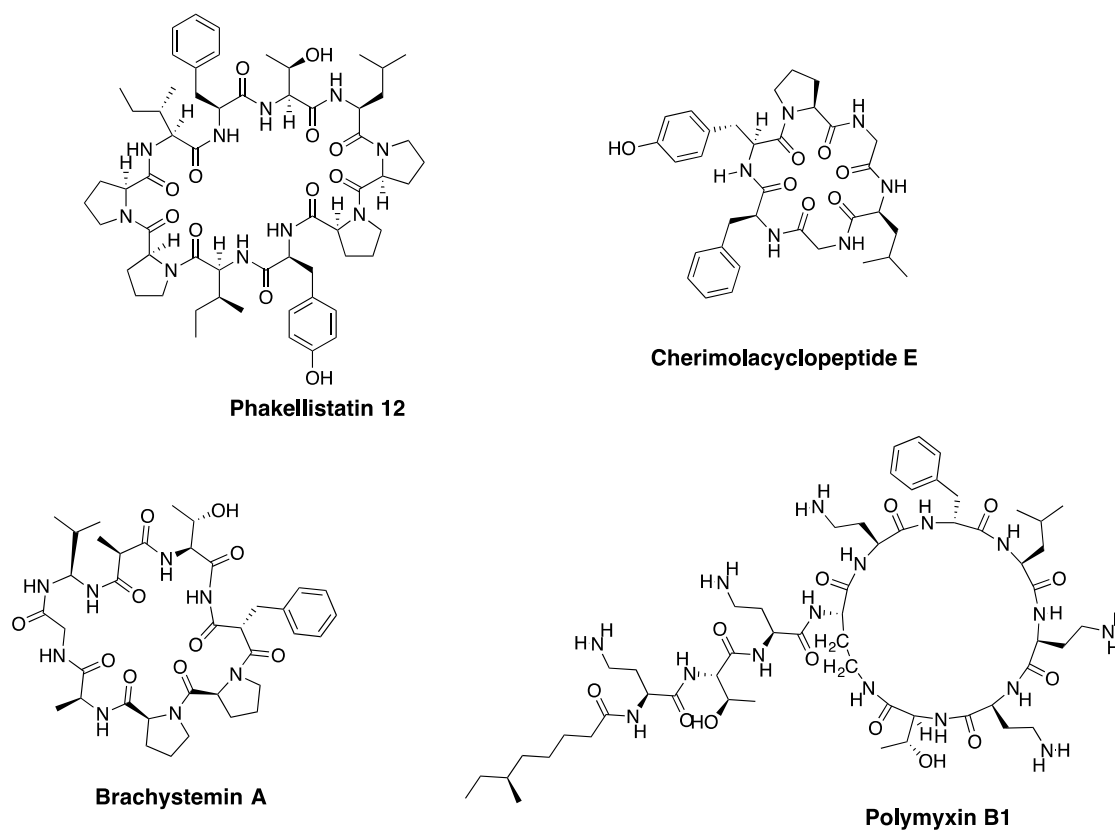
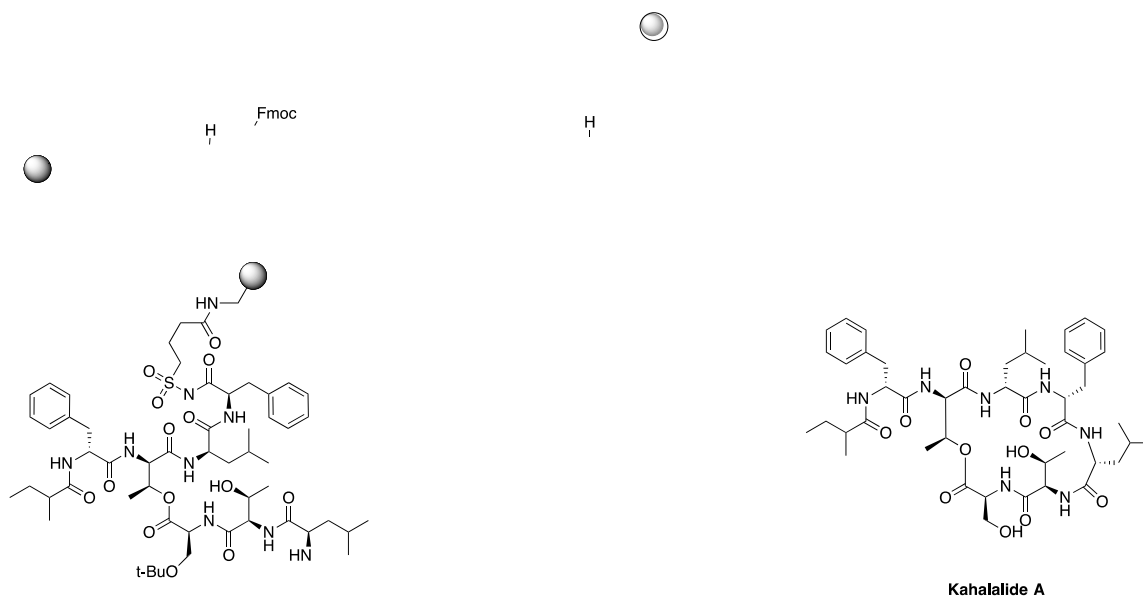


Figura 18. Exemplos peptídeos naturais sintetizados com emprego da resina “safety-catch”.

A síntese total do hexapeptídeo natural kahalalide A⁶⁵, com emprego da resina “safety-catch” é exemplificada no esquema 7.



Esquema 7. Reagentes: (a) piperidina/DMF 20%; (ii) Fmoc-D-Leu-OH, DIC, HOBt (equiv.); (iii) piperidina/DMF 20%; (iv) Fmoc-L-Thr(t-Bu)-OH, DIC, HOBt (4 equiv.); (v) piperidina/DMF 20%; (vi) Fmoc-D-Phe-OH, DIC, HOBt (4 equiv.); (vii) piperidina/DMF 20%; (b) (S)-2 ácido metilbutírico, DIC, HOBt (4 equiv.); (c) (i) TFA/*i*Pr₃SiH/H₂O: 95:2,5:2,5%; (ii) Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH, DIC, (4 equiv.), 0,4 equiv. DMAP; (iii) piperidina/DMF 20%; (iv) Fmoc-L-Thr(t-Bu)-OH, DIC, HOBt, (4 equiv.); (v) piperidina/DMF 20%; (vi) Fmoc-D-Leu, DIC, HOBt (4 equiv.); (d) (i) piperidina/DMF 20%; (ii) Trt-Cl 4 equiv.; DIPEA 8 equiv.; (iii) ICH₂CN 10 equiv., DIPEA 12 equiv. (iv) TFA/CH₂Cl₂; DIPEA 3 equiv. (e) TFA/*i*-Pr₃SiH/H₂O.

O presente trabalho propõe estudos sintéticos envolvendo penta e hexapeptídeos antimicrobianos cíclicos naturais empregando as metodologias “safety-catch”, a síntese em fase sólida com ciclização em solução e a síntese total em solução. Abaixo, descrevo os produtos naturais estudados nesta tese de doutorado.

1.2.2 Desotamide B

Desotamide A foi descrita pela primeira vez em 1997, isolada de solo de *Streptomyces* coletada próxima à DeSota Falls, GA, como co-metabólito com o peptídeo bicíclico salinamide e o nucleosídeo herbicidin A.⁶⁶ Em 2014, o extrato de fermentação do actinomiceto *Streptomyces scopuliridus* SCSIO ZJ46 encontrado no mar profundo ao sul da

China, mostrou inibição dos micro-organismos patogênicos *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus epidermidis* resistente a metilina, de grande interesse clínico. Deste extrato, foi isolado desotamide A, juntamente com três outros novos peptídeos cíclicos (desotamide B-D, Figura 19).⁶⁷

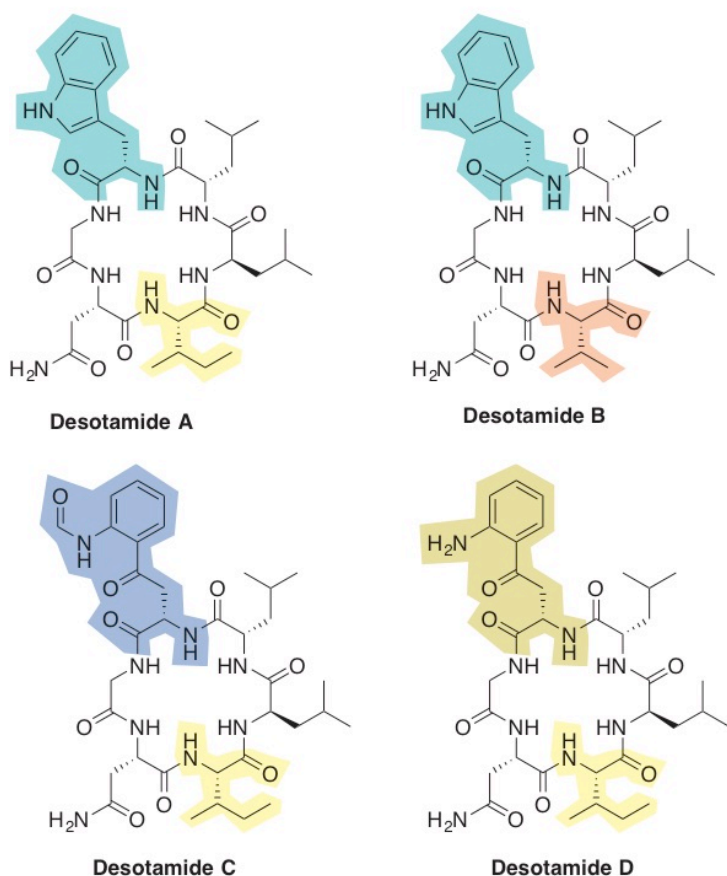
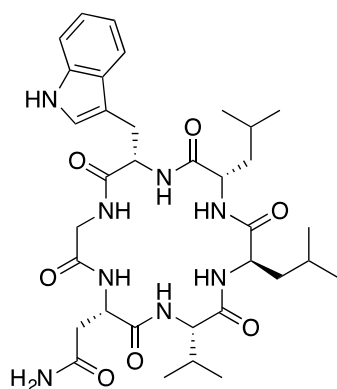


Figura 19. Estrutura dos peptídeos naturais desotamide A-D.

Após isolamento, a desotamide B foi caracterizada por métodos de RMN e sua configuração absoluta definida como sendo do peptídeo ciclo-(L-Trp-Gly-L-Ans-L-Val-D-Leu-L-Leu) (Figura 20). A triagem contra uma variedade de micro-organismos patogênicos, revelou que a desotamide B apresenta notável atividade antimicrobiana frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MIC=16,0 µg/mL) e *Streptococcus pneumoniae* (MIC=12,5 µg/mL), sem apresentar citotoxicidade em células humanas (IC₅₀ >100 µM). *S. aureus* se tornou um dos microorganismos mais prevalentes em

infecções *S. pneumoniae* é agente etiológico de diversas infecções invasivas, como sepse, meningite e pneumonia. A descoberta de novas estruturas contra estas espécies pode fornecer um modelo inovador para desenvolvimento de antibióticos contra sepas multirresistentes.

Diante da possibilidade de síntese total de peptídeos naturais com alto valor terapêutico, por meio de síntese em fase sólida, síntese em solução e combinação das duas estratégias, vislumbra-se a oportunidade para o estudo químico-medicinal dessas moléculas. Cujas síntese é estudada neste trabalho.



Desotamide B

Figura 20. Estrutura química do peptídeo cíclico desotamide B.

1.2.3 Ciclozantoxilano A

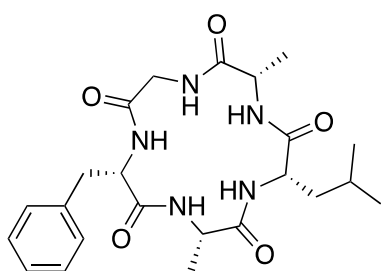
O gênero *Zanthoxylum* (Rutaceae) compreende mais de 200 espécies e é caracterizado quimicamente pela presença de alcalóides, cumarinas, flavonóides, lignanas, amidas e terpenos. São atribuídas a este gênero diversas atividades farmacológicas, como antiplasmódica, anti-HIV, antiinflamatória, anti-helmíntica, entre outras.⁶⁸

A espécie *Zanthoxylum rigidum* Humb. & Bonpl. ex Willd. é conhecida popularmente como mamica-de-cadela ou mamica-de-porca, e pode ser encontrada na região do pantanal brasileiro.⁶⁸ É empregada na medicina popular contra parasitoses (esquistossomose e doença de Chagas), vitiligo, entre outras enfermidades.⁶⁸ Desta forma, despertou-se o interesse quanto aos componentes desta planta, em busca do isolamento e caracterização das substâncias presentes nessa espécie.

No primeiro estudo fitoquímico do extrato das folhas desta espécie, foram isoladas e identificadas substâncias como isoquercetina, duas lignanas, cis- e trans-metilpluviatolídeo, mistura de derivados de ácido benzóico e cinâmico, e um novo pentapeptídeo cíclico

denominado ciclozantoxilano A (Figura 21).⁶⁹ De acordo com a literatura, apenas um número restrito de peptídeos cíclicos foram isolados de plantas superiores, como por exemplo, os encontrados na espécie de *Citrus* (evolidine e citrusins), na *Clausena anisum-olens* (clausenain B), e *Pseudostellaria heterophylla* (pseudostellarins).⁷⁰

Apesar da atividade pronunciada contra diversos patógenos, o novo pentapeptídeo ainda não foi sintetizado e avaliado quanto sua atividade biológica, e por isso, despertou nosso interesse para estudos químicos medicinais envolvendo esse peptídeo cíclico.



Ciclozantoxilano A

Figura 21. Estrutura do pentapeptídeo natural ciclozantoxilano A.

1.2.1 Chaiyaphumine A

Depsipeptídeos cíclicos - peptídeos que contém uma ou mais ligações éster em substituição à ligação peptídica - destacam-se como importante classe de moléculas farmacologicamente ativas e compostos líderes promissores para o desenvolvimento de novos fármacos sintéticos. Esta classe de produtos naturais apresenta ampla atividade biológica e, dentre elas, atividades antitumoral,⁷¹ antiviral,⁷² antibiótica⁷³ e antiparasitária.⁷⁴ Amplamente comercializados para o combate de infecções bacterianas, daptomicina e oriptamicina são exemplos da importância desta classe de compostos na terapêutica atual.⁷⁴ Recentemente, quatro novos depsipeptídeos entraram em triagem de fase clínica como promissores antitumorais: didemnin B, dehydroidemnin B, dolastatin 10, e FR901228.⁷⁵

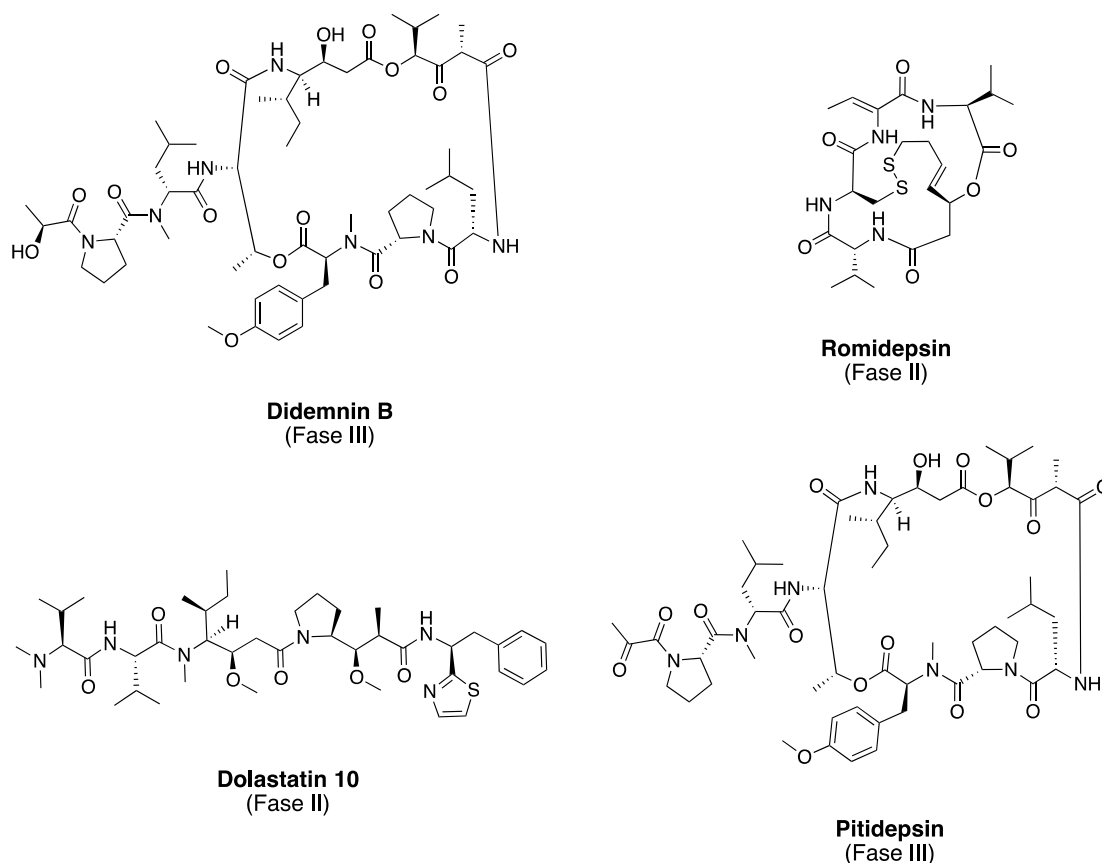


Figura 22. Depsipeptídeos em fase clínica para tratamento de diversos tumores.

Apesar do potencial terapêutico, a dificuldade no isolamento e purificação limitam o acesso a seus derivados sintéticos e sua exploração químico-medicinal. Alternativas para acesso a estes compostos são a síntese em solução e síntese fase sólida de peptídeos,⁷⁶ que também podem ser empregadas para elucidação da relação estrutura e atividade biológica dessa classe de produtos naturais.

Chaiyaphumines A-D é uma nova classe de depsipeptídeos, recém isolados de bactérias do gênero *Xenorhabdus*, microorganismos que vivem em simbiose com nematódeos do gênero *Steinernema* (Figura 23).⁷⁷

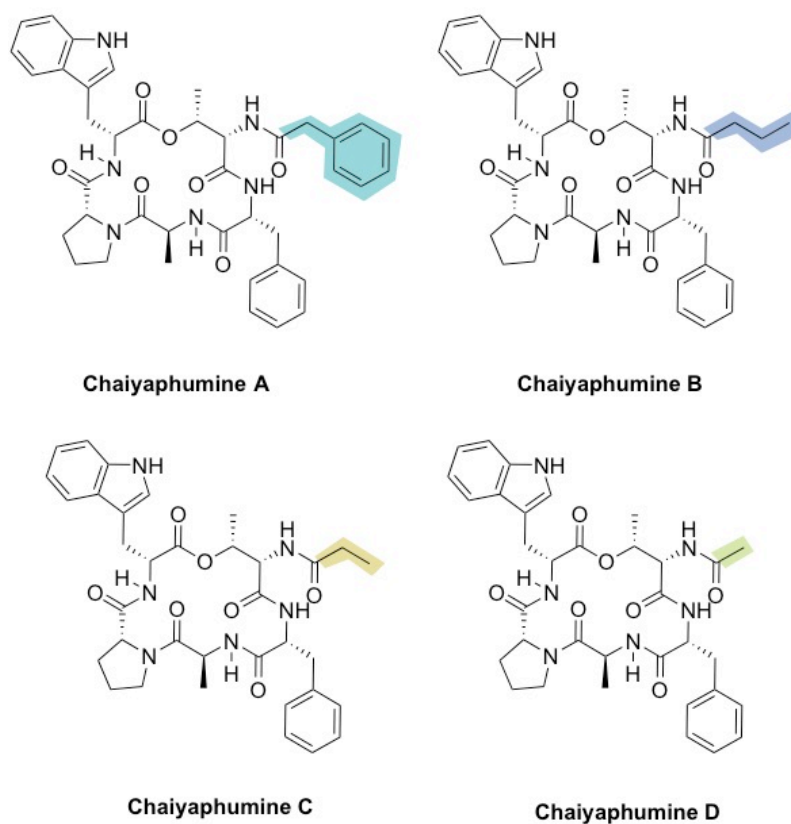


Figura 23. Estruturas dos depsipeptídeos da nova classe das chaiyaphumines.

Dentre estes depsipeptídeos, chaiyaphumine A (Figura 24) destacou-se principalmente pela atividade antimalárica (*P. falciparum* IC_{50} = 0,61 mM) e alta seletividade contra células do *P. falciparum* (índice de seletividade maior que 150 - IC_{50} contra células L6/ IC_{50} *P. falciparum*).

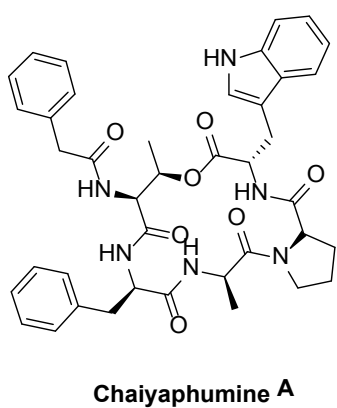


Figura 24. Estrutura do depsipeptídeo natural chaiyaphumine A.

A busca por novos agentes antimaláricos ainda continua desafiadora. Nos últimos 40 anos, vários compostos sintéticos e naturais foram testados contra *P. falciparum*, porém poucos compostos evoluíram para estudos clínicos. Ainda, parcerias público-privadas envolvendo grupos de pesquisa internacionais estabeleceram critérios para garantir que séries de compostos mais promissoras fossem selecionadas para otimização e desenvolvimento. Esses critérios atuais incluem índice de seletividade maior ou igual a 50 (célula do parasita/célula de mamífero). Compostos que induzem pelo menos de 50% de morte celular podem ser triados em modelos animais. O estabelecimento desses critérios, juntamente com propriedades químicas e moleculares apropriadas, destes novos compostos *leads* e *hits*, favorecem o aumento da velocidade e de redução do fracasso na descoberta de fármacos contra malária e outras doenças tropicais. Entretanto, com objetivo de desenvolver candidatos inovadores, eficazes, seguros e disponíveis por via oral, é essencial a expansão de bibliotecas químicas, sintéticas ou naturais. Apenas assim será possível expandir para novas classes, ainda não empregadas nas terapias antimaláricas atuais.

Diante do exposto, e considerando que o peptídeo natural chaiyaphumine A obedece aos critérios estabelecidos para potencial composto líder contra malária, vislumbramos estudos sintéticos deste depsipeptídeo e de análogos para a investigação em busca de novos agentes antimaláricos.

Dentre os métodos empregados para realizar SARs de peptídeos, a substituição sistemática dos resíduos de aminoácidos por alanina (*alanine scanning*), permite avaliar a contribuição individual de cada aminoácido na atividade biológica do peptídeo natural.⁷ A substituição por alanina elimina as interações entre o alvo e a cadeia lateral sem alterar a conformação da cadeia principal e sem causar efeitos estéricos ou eletrostáticos adicionais.⁷⁸ *Alanine scanning* já foi empregado na identificação de resíduos-chave para atividade biológica de diversos peptídeos naturais, gerando informações valiosas para o desenho racional de novos fármacos.⁴²

Portanto, no presente trabalho realizamos estudos de síntese total de chaiyaphumine A e análogo com substituinte alanina, sob diferentes métodos sintéticos.

1.2.4 Rufomicina

O heptapeptídeo cíclico, Rufomicina B, caracterizado pela presença de resíduos de

aminoácidos não usuais, foi primeiramente isolado do actinomiceto *Streptomyces atratus* em 1961.⁷⁹ Farmacologicamente, foi caracterizado por sua atividade inibitória seletiva contra *Mycobacterium tuberculosis* variação *hominis*, agente etiológico da tuberculose no homem.⁸⁰

Em função das diferentes propriedades químicas e estruturais em comparação aos antibióticos tuberculostáticos, descritos na literatura e disponíveis comercialmente, o padrão estrutural da rufomicina B constitui um interessante protótipo para o desenvolvimento de novos agentes para o tratamento de tuberculose. Dentre suas características bactericidas, a principal delas é a capacidade de inibir o crescimento de cepas resistentes à eritromicina e neomicina, tornando-se, à época, um promissor candidato ao tratamento da tuberculose para cepas resistentes. Apesar dos bons resultados em estudos clínicos iniciais, a rufomicina não avançou para o *status* de fármaco. Provavelmente, a limitação terapêutica se deve às suas propriedades físico-químicas, como baixa solubilidade em água.⁸¹

Na tentativa de aumentar a hidrossolubilidade da rufomicina, sais e derivados esterificados do peptídeo foram obtidos por meio de semi-síntese. Tais modificações não alteraram a atividade tuberculostática do peptídeo de origem, entretanto, nunca avançaram para a fase clínica, possivelmente devido à presença de alertas estruturais de toxicidade, como o resíduo nitrobenzeno, do aminoácido L-nitrotirosina (Figura 25).⁴² Entretanto, considerando que os fármacos de escolha para o tratamento da tuberculose apresentados pela OMS, em muito estão associados à resistência microbiana, a busca de novos agentes terapêuticos é, *per se*, valiosa.⁸²

Portanto, no presente trabalho realizamos estudos para obtenção dos blocos de construção do peptídeo rufomicina, visando futuros estudos de síntese total.

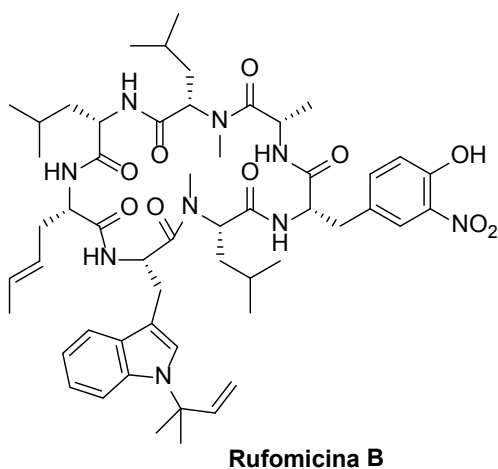
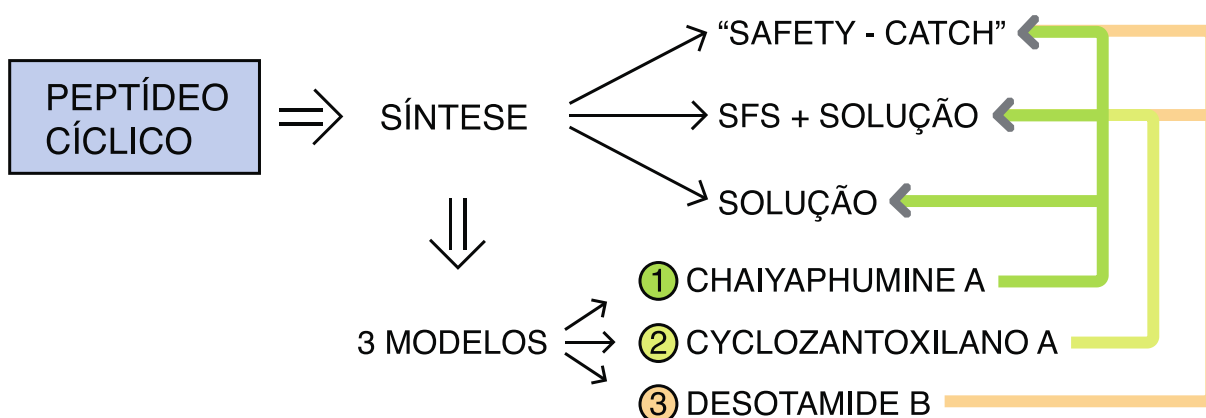


Figura 25. Peptídeo cíclico natural Rufomicina B.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho envolve o estudo metodológico de peptídeos cíclicos naturais, com enfoque na etapa de macrociclização, empregando três abordagens distintas: Síntese em resina “safety-catch”; síntese em fase sólida do precursor linear com ciclização em



solução e síntese total em solução (Figura 26).

Figura 26. Estratégias empregadas para estudo sintético dos peptídeos naturais.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar a modificação de aminoácidos utilizados como bloco de construção para Rufomicina B e chaiyaphumine A

- Realizar estudos sintéticos do hexapeptídeo cíclico natural desotamida B, do pentadepsipeptídeo chaiyaphumine A e do pentapeptídeo cíclico ciclozantoxilano A, com diferentes abordagens de macrociclização (síntese em resina safety-catch, síntese em solução, e síntese em fase sólida com ciclização em solução).

- Realizar estudo sistemático de fármacos peptídicos no mercado e em fase clínica, suas propriedades físico-químicas e sua correlação com a via de administração e com os alvos desse estudo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estabelecimento de métodos de síntese de modificação de aminoácidos

3.1.1 Rufomicina B

Diante da estratégia retrossintética adotada para síntese da Rufomicina B (Figura 25), é necessária obtenção dos aminoácidos modificados Fmoc-*N*-metil-L-Leu, Fmoc-*N*-isopentenil-L-Trp e Fmoc-L-crotil-Gly (Figura 27). Os outros aminoácidos presentes na rufomicina B foram adquiridos comercialmente da Sigma Aldrich®. Após obtenção dos blocos de construção, a síntese total da Rufomicina envolveria a técnica de síntese em fase sólida, empregando a resina Kenner, amplamente utilizada para síntese de peptídeos cíclicos,⁴² uma vez que, a macroclicização ocorre concomitante à clivagem, levando a formação do peptídeo cíclico na solução.

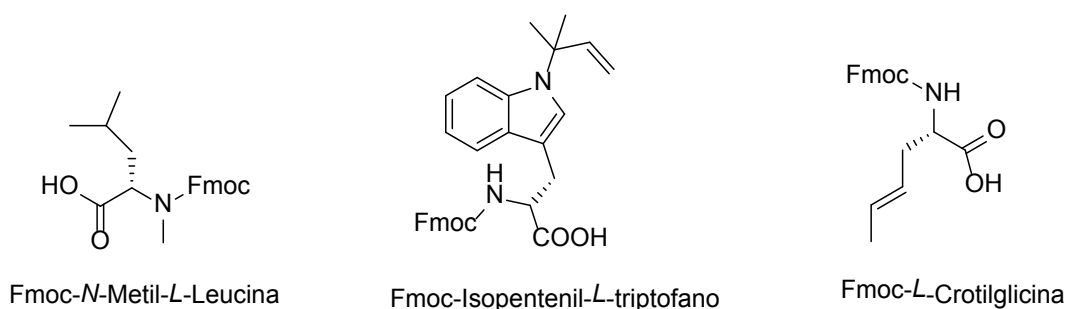
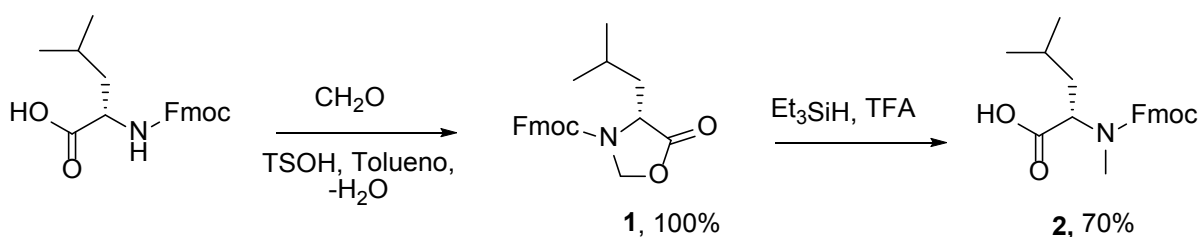


Figura 27. Aminoácidos necessários à síntese total do antibiótico rufomicina B.

3.1.1.1 Fmoc-*N*-metil-L-Leucina

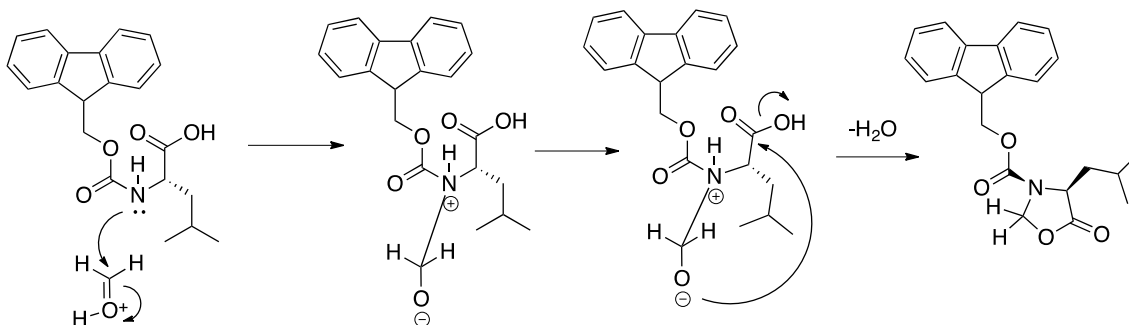
A *N*-metil-L-leucina foi obtida a partir da alquilação do aminoácido protegido por meio de formação de oxazolidina (**1**), de acordo com método estabelecido na literatura, formando o aminoácido *N*-metilado desejado (**2**) com 70% de rendimento global (Esquema 8).⁸³⁻⁸⁴



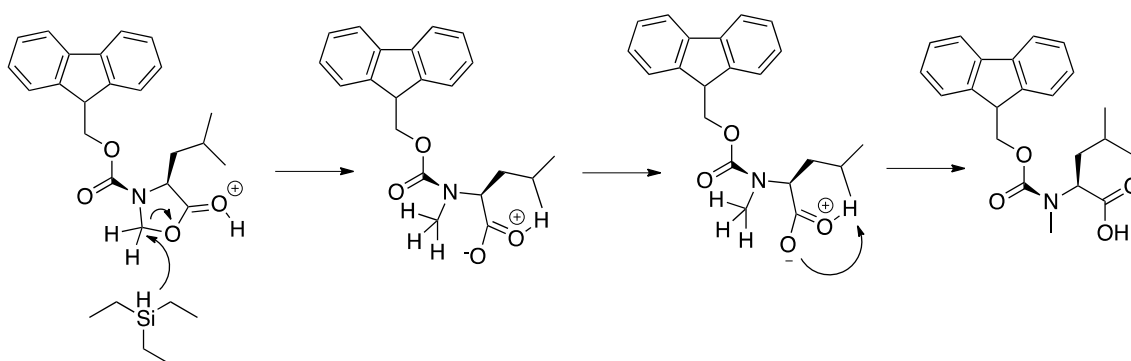
Esquema 8. Estratégia para obtenção do aminoácido Fmoc-*N*-metil-L-leucina.

Nessa reação, a Fmoc-L-leucina é primeiramente condensada com o formaldeído na presença de ácido para-tolueno sulfônico, em refluxo, seguida de eliminação de água e formação do ciclo. Na segunda etapa reacional, a oxazolidinona é tratada com trietilsilano em solução 1:1 de TFA-CHCl₃, onde o hidreto ataca o carbono metilênico do anel, levando à clivagem redutiva, com formação do aminoácido *N*-metilado (Esquema 9).

Formação da oxazolidinona



Clivagem redutiva

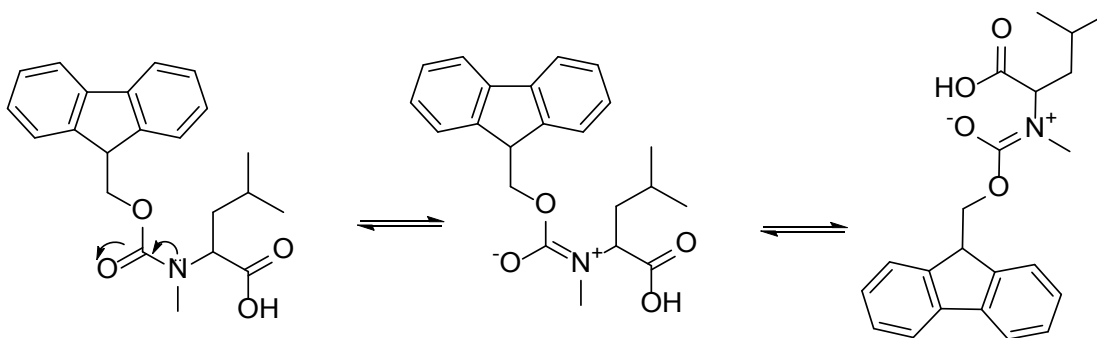


Esquema 9. Mecanismo de formação da oxazolidinona (superior) e clivagem redutiva (inferior).

A análise do espectro de RMN de ¹H confirmou a formação do aminoácido desejado, devido a presença dos sinais δ2,89 (s, 2H) e δ2,86 (s, 1H) referentes aos hidrogênios *N*-metílicos (Apêndice 1). Nota-se, entretanto, que o sinal simpleto esperado para estes hidrogênios metílicos aparece no espectro RMN de ¹H como dois sinais simpletos, com diferentes integrais. Isso se deve a uma peculiaridade observada em compostos contendo grupos funcionais carbamatos ou amidas, que podem formar rotâmeros, observados pela presença de sinais duplicados ou com baixa resolução nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C (Apêndices 1 e 2).

Carbamatos e amidas apresentam uma alta barreira rotacional na ligação C(O)-N. Essa

barreira é a energia necessária para a interconversão entre os rotâmeros, e que pode levar a sinais pouco definidos ou duplicados no espectro de RMN, dependendo da longevidade dos rotâmeros majoritários. Neste caso, devido às diferenças em ambiente químico, consequência da barreira rotacional conferida pelo par de elétrons do nitrogênio em ressonância com a carboxila (Esquema 10), observa-se sinais duplos nos espectros de RMN.⁸⁵



Esquema 10. Principais rotâmeros observados em carbamatos.

A fim de atestar a pureza do composto obtido, o espectro de massas de alta resolução acoplado à cromatografia líquida de alta eficiência LC-MS demonstram a formação apenas do composto desejado (Apêndice 3 e 4).

Ainda, foi também realizado o experimento de VT-RMN (Ressonância Magnética Nuclear em temperatura variável), técnica aplicada à identificação de rotâmeros, uma vez que a altas temperaturas (superiores a 50-100°C) a energia rotacional é reduzida, resultando em espectro com sinais únicos em caso de rotâmeros. Portanto, foi realizada a técnica de VT-RMN (à 70°C em DMSO) a fim de verificar se os sinais duplicados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C era consequência da presença de rotâmeros ou de impurezas. A sobreposição dos espectros (Figura 8) demonstra que o espectro obtido à 70°C (em azul) apresenta melhor resolução dos sinais, e onde antes eram observados sinais duplicados, como nos hidrogênios N-metílicos em $\delta 2,89$ (s, 2H) e $\delta 2,86$ (s, 1H) no espectro obtido à temperatura ambiente, é observado apenas um sinal em $\delta 2,73$ ppm no espectro à 70°C. Da mesma forma, os sinais aromáticos referentes ao grupo de proteção Fmoc ($\delta 7,31$ - $7,79$) antes duplicados, apresentam-se como dois dupletos e dois tripletos (ampliação), esperados para o grupo Fmoc, o que confirma a presença de rotâmeros para o aminoácido Fmoc-N-metil-L-Leucina (Figura 28).

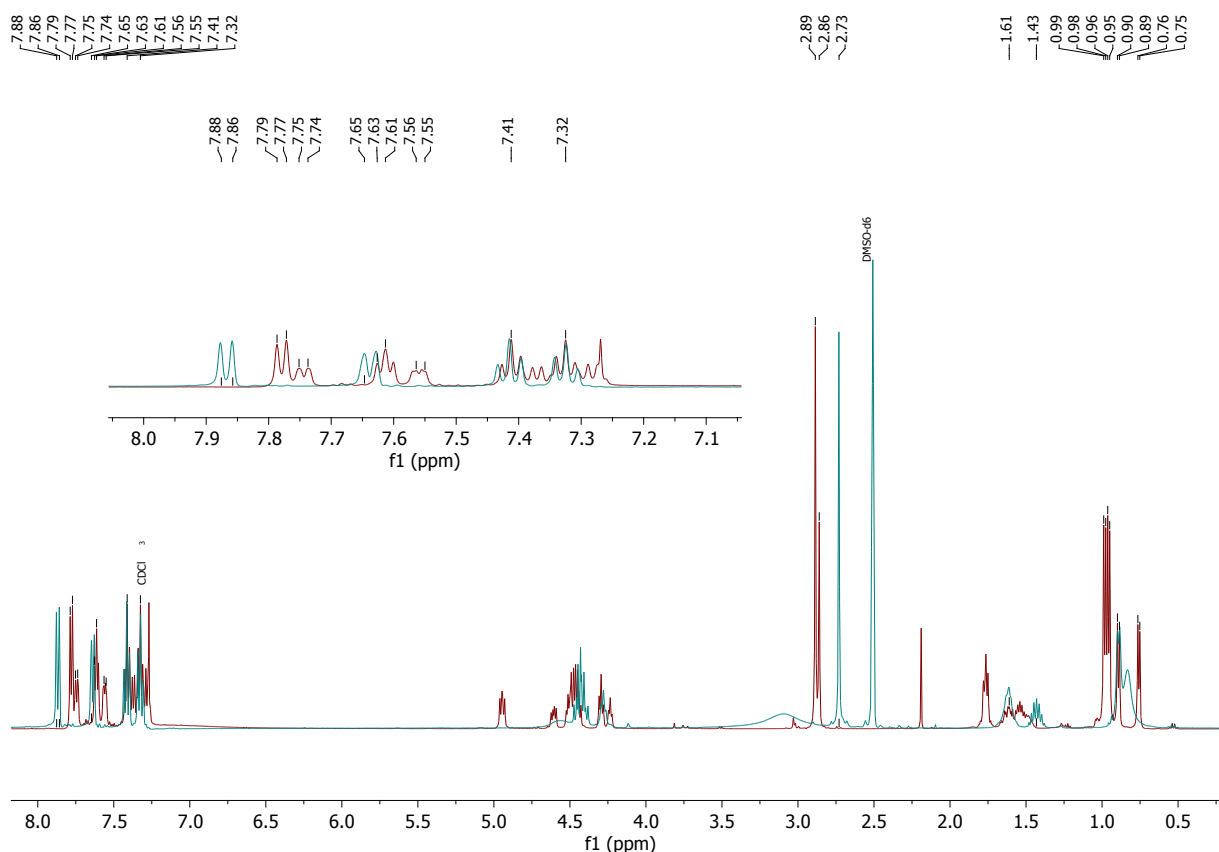


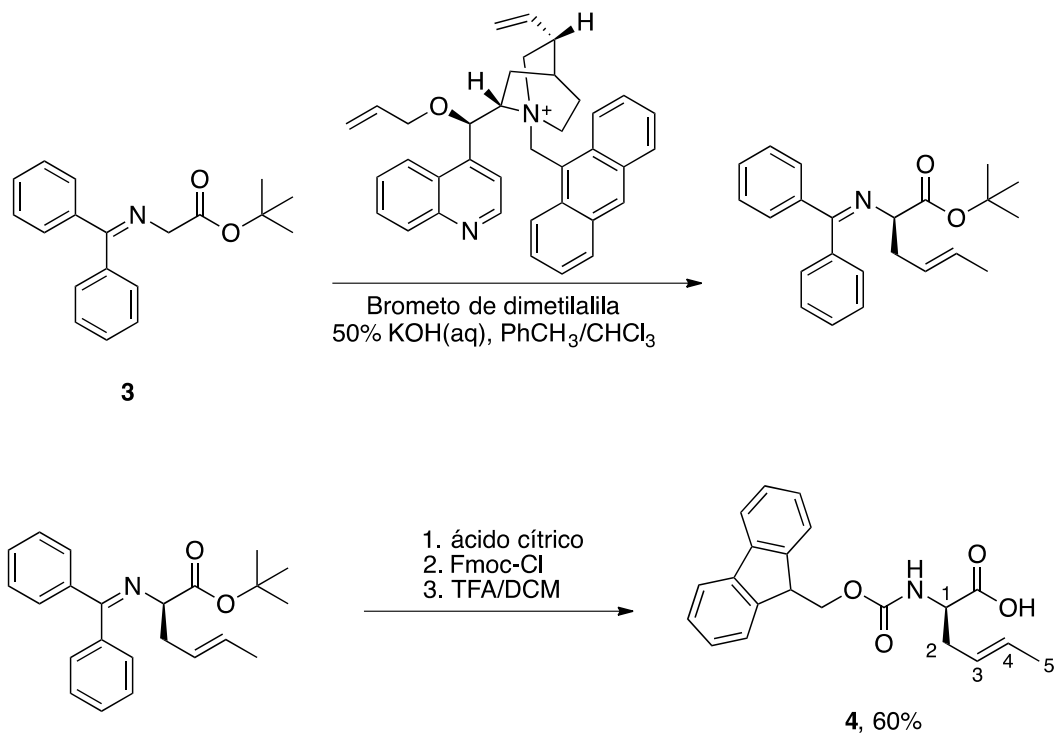
Figura 28. Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H realizado à temperatura ambiente (vermelho) e à 70°C (azul) com ampliação da região dos hidrogênios aromáticos.

3.1.1.2 Fmoc-L-Crotilglicina

Primeiramente, a formação do aminoácido *tert*-butil 2-((difenilmetileno)amino)acetato **3** foi obtido a partir da reação de bromo acetato de *tert*-butila e benzophenona imina, na presença de DIPEA em acetonitrila, sob refluxo (Esquema 11). O produto obtido com 90% de rendimento, foi confirmado por RMN de ^1H pela presença dos sinais $\delta 7,64\text{-}7,16$ (m, 10H), referentes aos hidrogênios aromáticos, o sinal simpleto em $\delta 4,12$ (s, 2H), referente aos hidrogênios α -carbonílicos e o sinal simpleto em $\delta 1,46$ (s, 9H) referente ao grupo *tert*-butila (Apêndice 5).

A alquilação de **3** foi realizada na presença de catalisador quiral em transferência de fase como descrito na literatura,⁴² seguida de reações de desproteção com ácido cítrico, proteção com Fmoc-Cl e desproteção do éster *tert*-butílico, foi possível obter o aminoácido desejado **4**. A purificação e caracterização foi realizada somente na última etapa, a fim de minimizar perdas de produto nas diferentes etapas da rota sintética. A formação da Fmoc-L-

crotil-glicina foi confirmada pela análise do espectro de RMN de ^1H , pela presença dos sinais $\delta 7,31-7,77$ (8H) referentes ao grupo de proteção Fmoc, o sinal em $\delta 5,36$ (m, 2H), referente aos hidrogênios metilênicos em C-3 e C-4 e do sinal em $\delta 1,68$ (m, 3H) referente aos hidrogênios metílicos em C-5, como observado na literatura⁸⁶ (Apêndice 6). A formação do enantiômero desejado foi verificada por análise do desvio da luz polarizada, onde foi observada rotação ótica $+8,2^\circ$, comparável à padrão interno do laboratório.



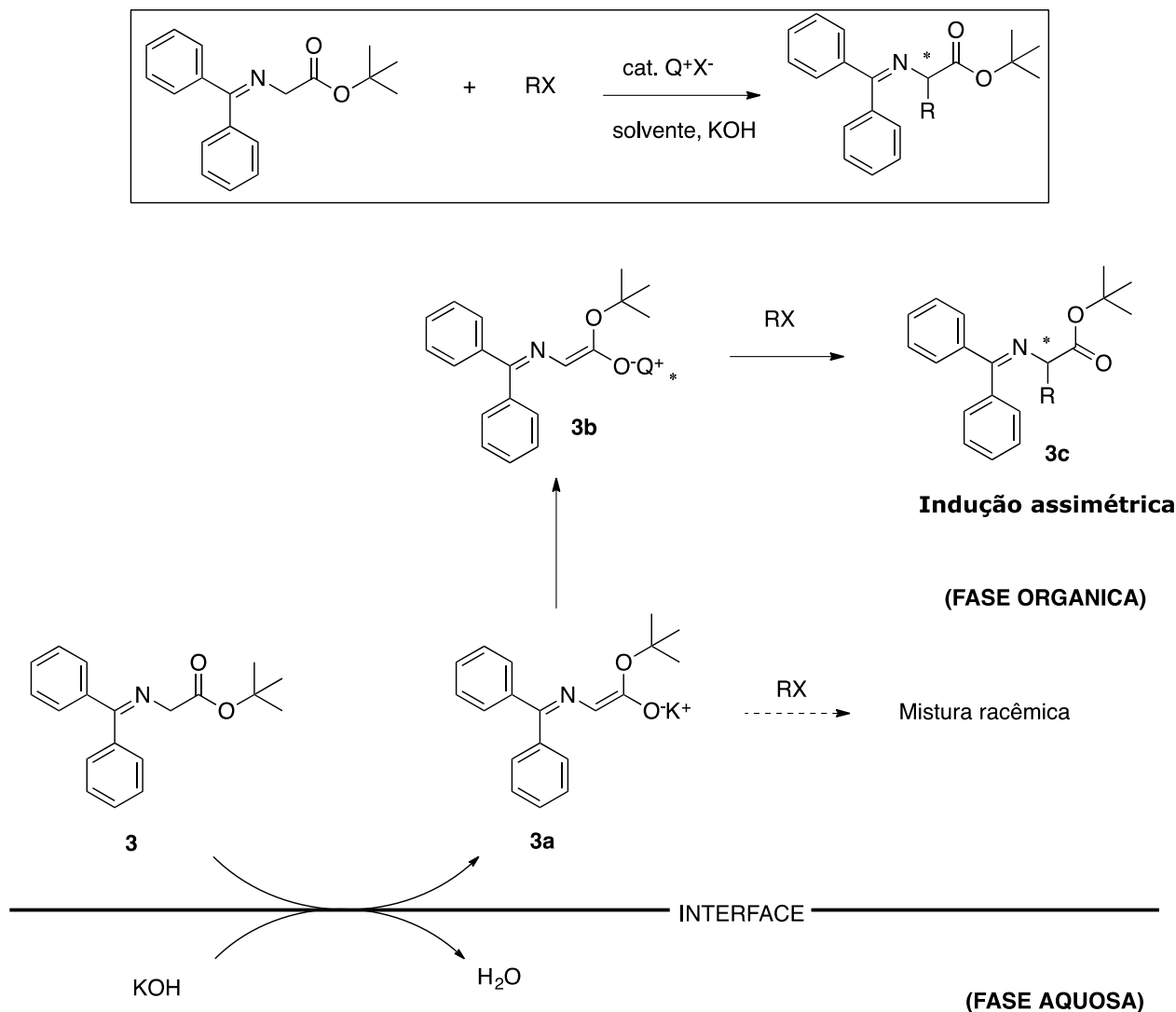
Esquema 11. Representação esquemática para obtenção da glicina alquilada.

A alquilação estereoseletiva da base de Schiff **3** foi realizada sob catálise em transferência de fase, empregando o alcalóide cinchona (brometo O-Allil-N-(9-anthracenilmetil) cinchonidinium). A primeira etapa da alquilação ocorre pela desprotonação interfacial do próton α de **3** na presença de base (KOH) fornecendo o metal enolato **3a**, que se mantém na interface entre as camadas aquosa e orgânica. Em seguida, ocorre troca iônica do enolato **3a** com o catalisador, formando um ôniun quiral lipofílico (Q^{*+}X^-) **3b**, que se afasta da interface, penetrando no solvente orgânico, onde reage com o brometo de dimetilalila. Assim, ocorre a monoalquilação do aminoácido enantiomericamente puro **3c**, com concomitante regeneração do catalisador.

Essa reação só é bem sucedida quando o onium quiral (Q^{*+}) leva a formação de um enolato altamente reativo através da troca iônica rápida o suficiente para blindar uma das

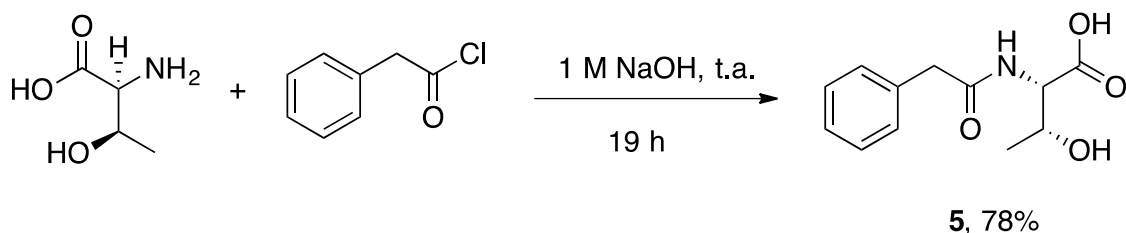
faces enantiotópicas do ânion enolato. Isso minimiza a intervenção da alquilação direta do metal enolato **3a**, o que acarretaria em uma mistura racêmica, controlando assim a estereoquímica.⁸⁷ (Esquema 12)

Esquema 12. Representação mecanística da alquilação estereoseletiva de **3** (Adaptado de⁸⁷).



3.1.2 Síntese do Bloco de construção da chaiyaphumine A

A tentativa de obtenção de chaiyaphumine A iniciou-se com a síntese de fenil-acetil-L-treonina (**5**), por meio de uma reação de substituição nucleofílica, com eliminação do haleto do ácido cloro-fenil acético pela L-treonina, formando **5** com 78% de rendimento (Esquema 13). A formação de **5** foi confirmada pela análise do espectro de RMN de ¹H, pela presença dos sinais em δ7,20-7,29 (m, 5H) referente aos hidrogênios aromáticos, δ3,61 (d, *J*=14,2 Hz) referente aos hidrogênios benzílicos, δ3,54 (d, *J*=14,2 Hz) e do sinal em δ1,02 (d, *J*=6,3 Hz, 3H) aos hidrogênios metílicos (Apêndice 7).



Esquema 13. Representação esquemática de obtenção do aminoácido modificado 5.

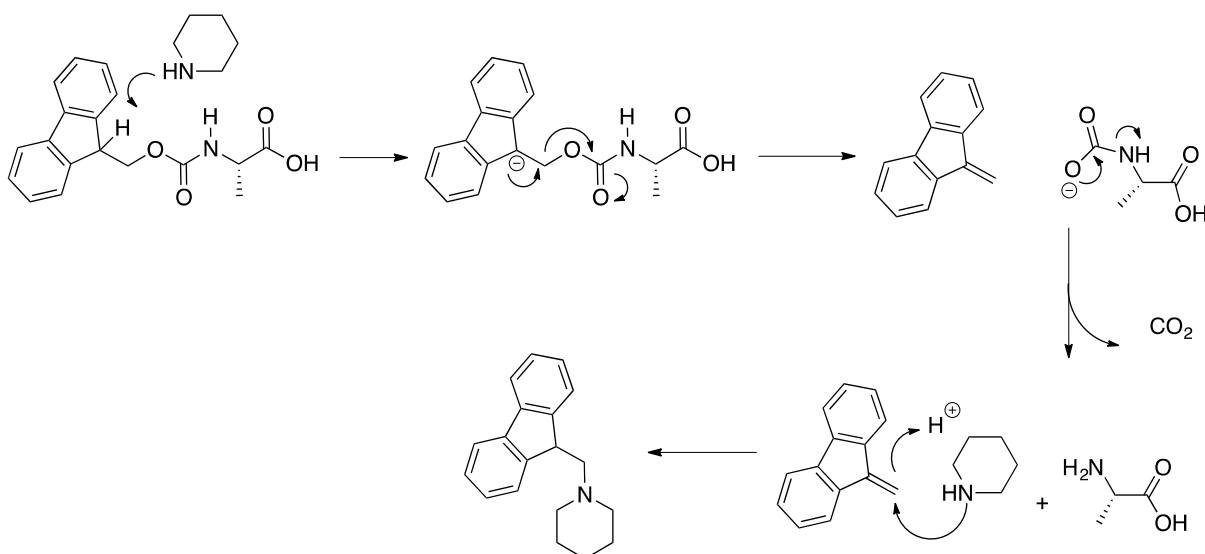
3.2. Estabelecimento de métodos de síntese total dos peptídeos naturais

3.2.2 Desotamide B

3.2.2.1 Síntese e ciclização na resina – Método “Safety-Catch”

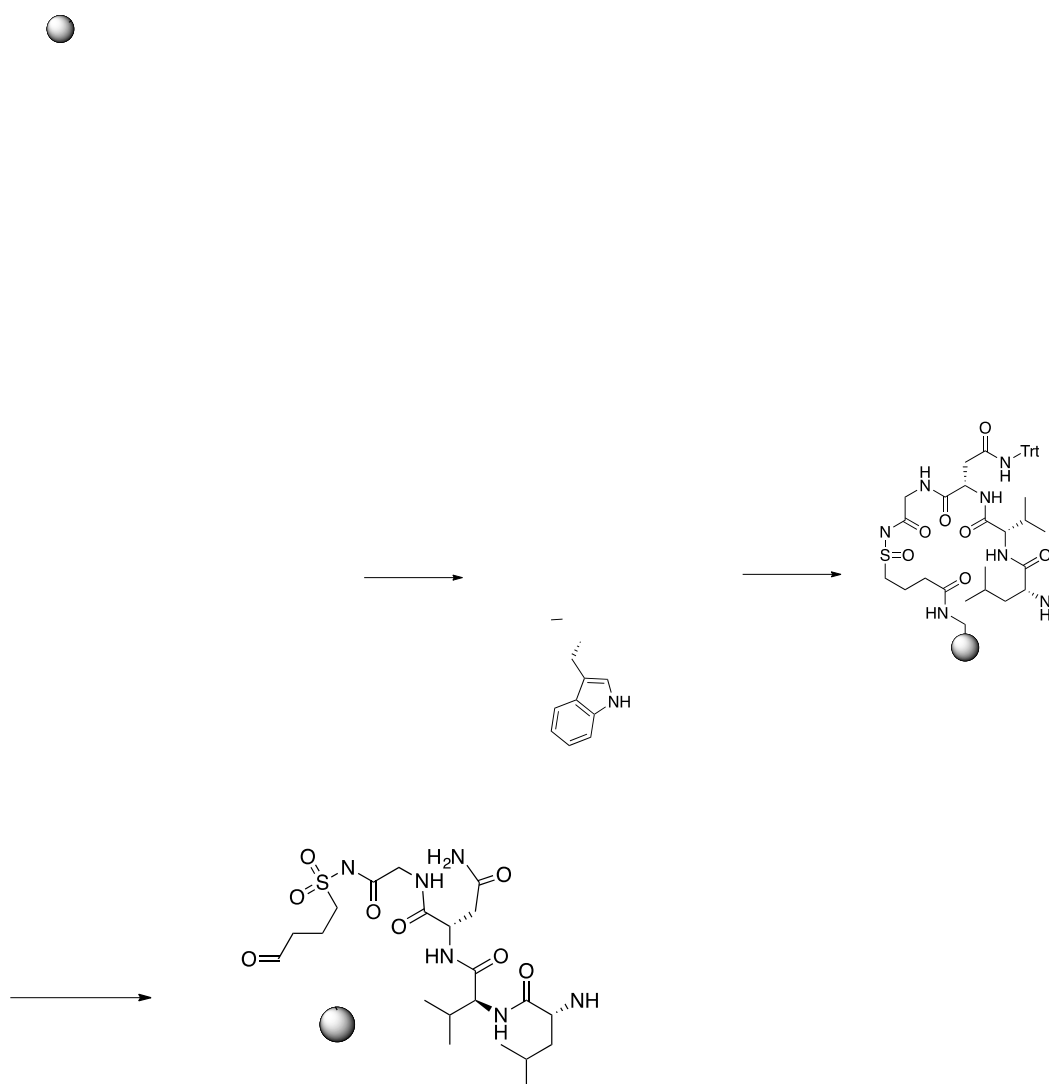
A síntese total do peptídeo desotamide B iniciou-se com o acoplamento de aminoácido Fmoc-L-Gly à resina sulfamilbutiril AM (resina Kenner), empregando os reagentes PyBOP e DIPEA.

O procedimento clássico de desproteção do grupo N-Fmoc envolve o tratamento do aminoácido com piperidina 20% ou piperazina 5% em DMF. O mecanismo da clivagem é E1cb e ocorre via formação do ânion dibenzofulveno estabilizado. O grupo Fmoc é desprotonado pela base piperidina para fornecer o ânion ciclopentadienílico, o qual se rearranja formando o derivado dibenzofulveno. O ânion carboamida se decompõe imediatamente para fornecer dióxido de carbono e o grupo amino livre. Posteriormente, a molécula de dibenzofulveno sofre ataque da piperidina, formando o aduto dibenzofulveno-piperidina (Esquema 14). O derivado dibenzofulveno é passível de ser detectado no UV à 290 nm, tornando possível, portanto, a monitorização mais detalhada das reações de acoplamento.



Esquema 14. Mecanismo de formação do aduto dibenzofulveno durante a deproteção do aminoácido Fmoc-L-alanina com piperidina.

As etapas seguintes seguiram em ciclos de desproteção-extrações-acoplamento até a formação do peptídeo linear. O último acoplamento foi realizado com aminoácido protegido com Boc uma vez que é necessário emprego de grupo que seja estável nas condições de ativação da resina, etapa seguinte. Esta etapa de ativação é realizada através de alquilação do grupo sulfonamida com iodoacetonitrila e DIPEA, o que aumenta a eletrofilicidade deste grupo. A remoção do grupo Boc é realizada na presença de TFA em diclorometano (Esquema 15).



Esquema 15. Reagentes: (a) Fmoc-Gly, PyBOP, DIPEA (3 equiv); (b) (i) 20% piperidina/DMF; Fmoc-L-Asn-Trt, PyBOP, DIPEA (3 equiv), (c) (i) 20% piperidina/DMF; (ii) Fmoc-L-Val, PyBOP, DIPEA (3 equiv.), (d) (i) 20% piperidina/DMF; Fmoc-D-Leu, PyBOP, DIPEA (3 equiv.); (e) (i) 20% piperidina/DMF; Fmoc-L-Leu, PyBOP, DIPEA (3 equiv.); (f) (i) 20% piperidina/DMF; (ii) Boc-L-Trp, PyBOP, DIPEA (3 equiv.); (g) (i) 10 equiv. ICH₂CN, 12 equiv. DIPEA, NMP (h) TFA/CH₂Cl₂.

A amina livre na presença de DIPEA em THF resultou na clivagem simultânea à macroclicização do peptídeo em solução (Esquema 16).



Esquema 16. Etapa de ciclização “safety-catch” na tentativa de obtenção de desotamide B.

À priori, foi obtido peptídeo com massa $m/z=569,12$ na análise por espectrometria de massas MALDI-TOF, o que após observação detalhada do produto, nos fez concluir que seria referente ao peptídeo truncado, sem o aminoácido asparagina, como destacado na figura 29.

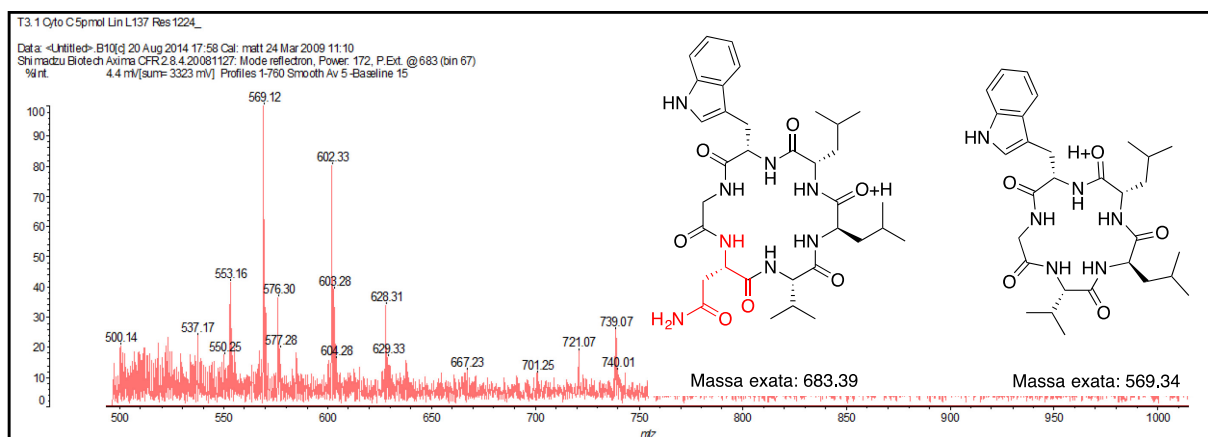


Figura 29. Espectro de massas (MALDI-TOF) do peptídeo **6** obtido após tentativa de síntese da desotamide B por método “safety-catch”.

Em segunda tentativa para obtenção da desotamide B, empregando as mesmas condições reacionais, foi obtida então a massa esperada para o composto desejado, como evidenciado na figura 30.

O peptídeo obtido (**7**) foi purificado em coluna clássica de sílica gel eluído isopropanol:CHCl₃ (45:10:45) e a estrutura do peptídeo confirmada por MALDI-TOF (Figura 30).

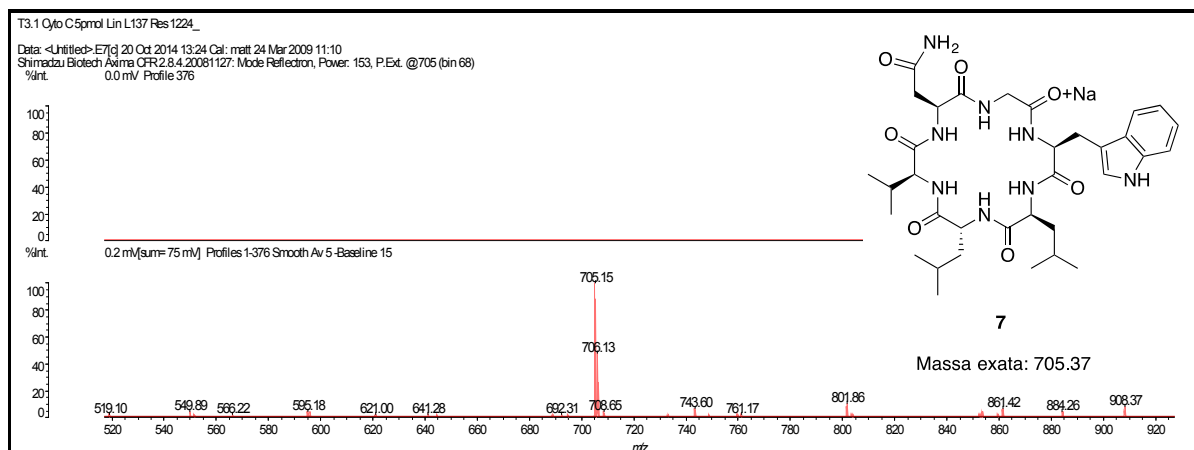
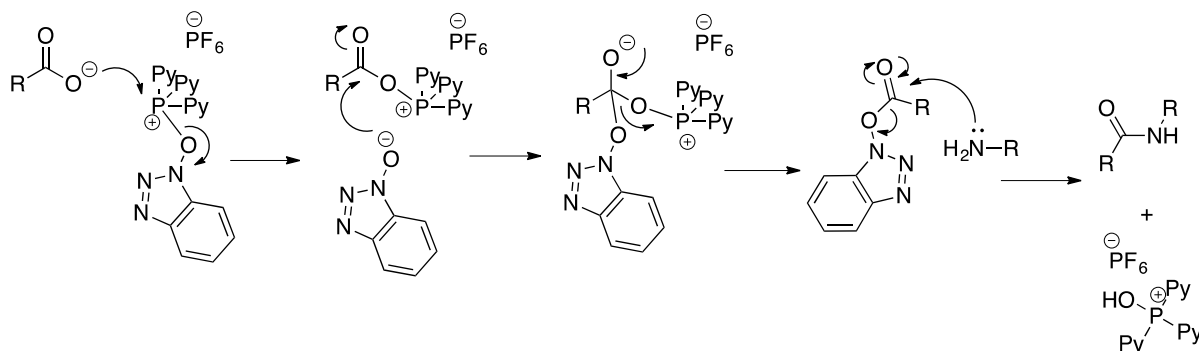


Figura 30. Espectro MALDI-TOF do peptídeo sintético desotamide B (**7**).

O acoplamento dos aminoácidos e blocos de construção, para alongamento da cadeia peptídica, foram efetuados em DMF, na presença do reagente de acoplamento PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tripirrolidinofosfônio), e DIPEA como base.⁵³ O mecanismo da reação de acoplamento envolve inicialmente a desprotonação do ácido carboxílico, correspondente ao aminoácido a ser introduzido na cadeia. O átomo de oxigênio do ácido, negativamente carregado, ataca o íon fosfônio da molécula de PyBOP, liberando o grupo hidróxi-benzotriazol e ficando na forma de éster tripirrolidinofosfônio. A esterificação do grupo carboxilato é facilitada devido à polarização da ligação fósforo-oxigênio. O caráter nucleofílico do grupo hidróxi-benzotriazol liberado força o ataque no carbono carbonílico do aminoácido, deslocando o grupo oxitripirrolidinofosfônio. O éster resultante contém o grupo abandonador necessário, que será ativado durante o ataque nucleofílico do grupo amino terminal do aminoácido ligado à resina (Esquema 17).

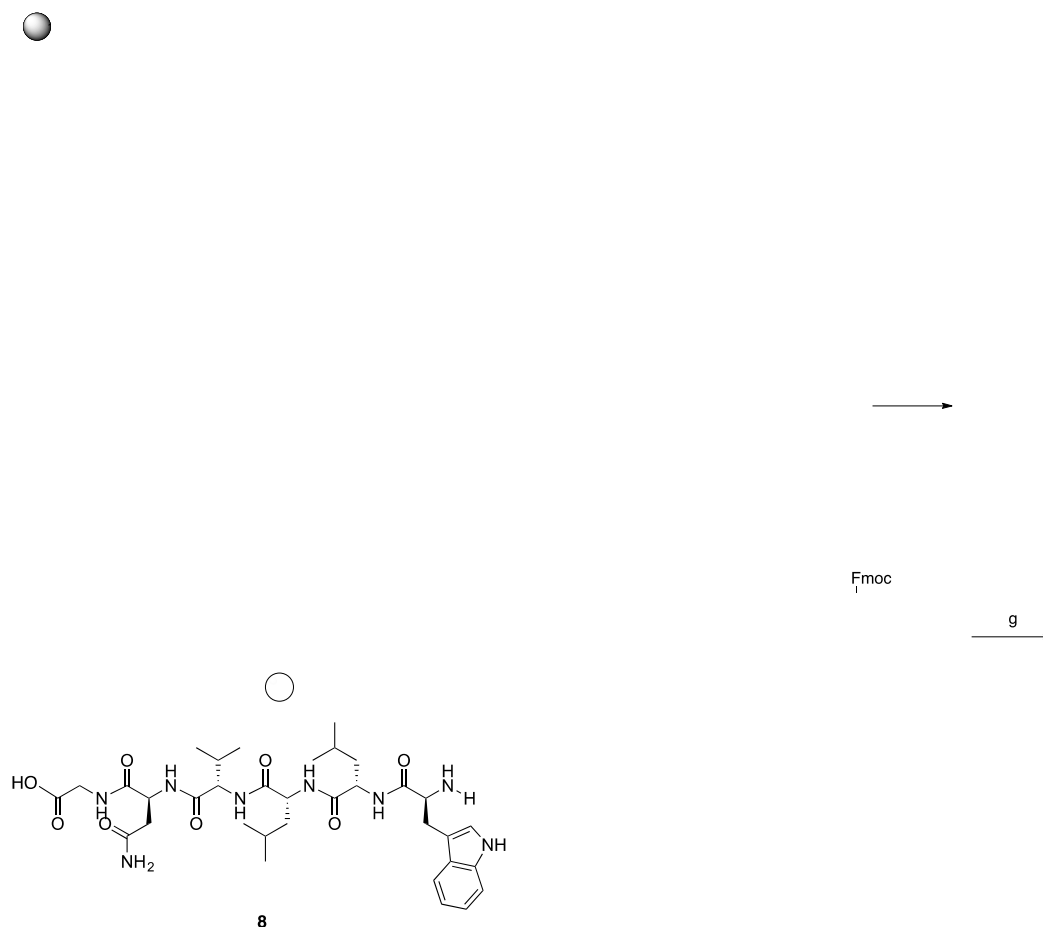


Esquema 17. Mecanismo de acoplamento de aminoácidos com PyBOP.

3.2.2.2 Síntese em fase sólida e ciclização em solução

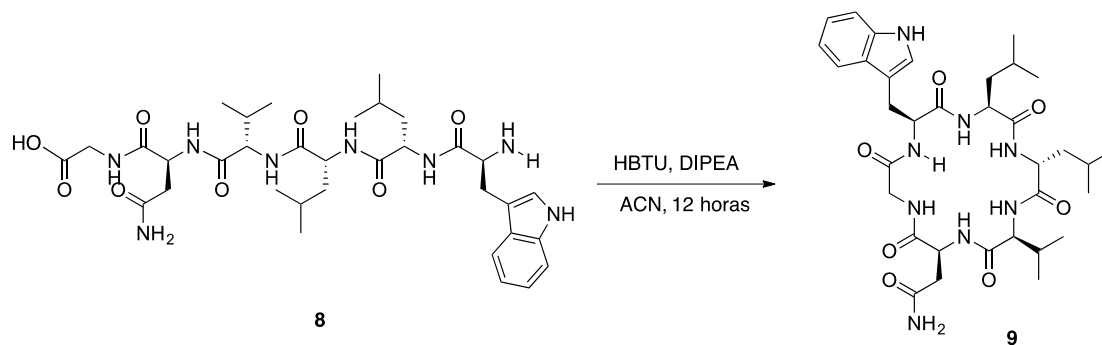
A fim de obter maior rendimento reacional, visando a realização as análises espectroscópicas necessárias para elucidação do peptídeo desotamide B, nova estratégia sintética foi adotada.

Nesta estratégia, realizada em colaboração com o Prof. Dr. Eduardo M. Cilli (Instituto de Química - UNESP - Campus Araraquara) empregamos a resina Wang-Gly-Fmoc 1,33 g com grau de substituição (0,4 mmol/g) (Esquema 18). A sequência peptídica $\text{NH}_2\text{-L-Trp-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asn-Gly-OH}$ foi sintetizada em síntese em fase sólida, utilizando as cadeias laterais dos aminoácidos asparagina e triptofano protegidas com os grupos Trt e Boc, respectivamente. Os acoplamentos foram realizados com excesso de 2x do aminoácido correspondente, empregando N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il) uranium hexafluorofosfato (HBTU)/N-metilmorfolina (NMM). A identidade do peptídeo linear foi confirmado pela análise de ESI-MS, onde observou-se a formação do aduto característico $701,4 [\text{M}+\text{H}]^+$ (Apêndice 8). O processo de purificação do peptídeo foi realizado empregando HPLC preparativo, com coluna de fase reversa C18 (25 x 2,12 cm). O fluxo foi de 5mL/min e a detecção no ultravioleta de 220 nm. Após a purificação, a pureza do peptídeo foi avaliada em HPLC analítico em coluna de fase reversa (25x0,46 cm, 300 Å) e um gradiente linear 5%-95% (v/v) de 0,035% TFA/acetonitrila (solvente B) por 30 minutos, em fluxo de 1,0 mL/min com detecção de UV à 220 nm. A pureza do peptídeo linear foi de 93% de acordo com a área sob a curva (Apêndice 9) e, assim, decidimos realizar a ciclização em solução do peptídeo linear (**9**).



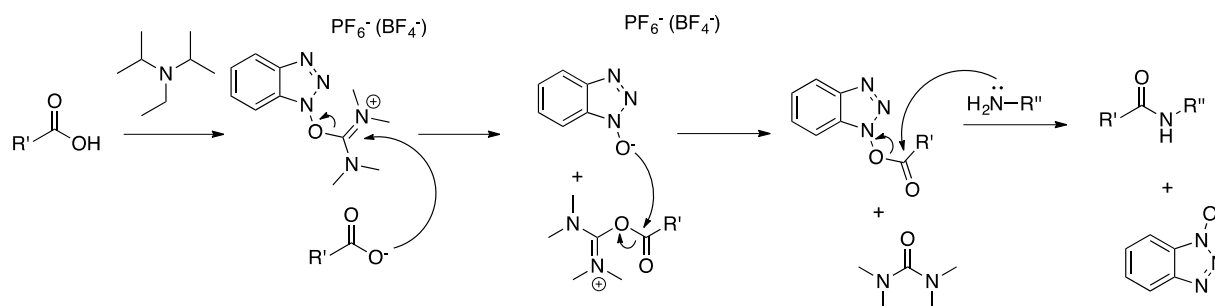
Esquema 18. Reagentes: (a) 20% piperidina/DMF (b) Fmoc-L-Asn-Trt, HBTU, N-morfolina (3 equiv); (c) (i) 20% piperidina/DMF; (ii) Fmoc-L-Val, HBTU, N-morfolina (3 equiv.), (d) (i) 20% piperidina/DMF; Fmoc-D-Leu, HBTU, N-morfolina (3 quiv.); (e) (i) 20% piperidina/DMF; Fmoc-L-Leu, HBTU, N-morfolina (3 equiv.); (f) (i) 20% piperidina/DMF; (ii) Fmoc-L-Trp(Boc), HBTU, N-morfolina (3 equiv.); (g) TFA/TIS/H₂O (95%: 2,5%: 2,5%).

O processo de ciclização do peptídeo **8** foi realizado em solução diluída com acetonitrila (10^{-3} mol/L), contendo 1,5 equivalentes de HBTU e 10 equivalentes de DIPEA em agitação ao abrigo de luz por 12 horas (Esquema 19). Após esse período, a mistura reacional foi evaporada sob pressão reduzida e o resíduo formado foi liofilizado, formando um sólido branco. A fim de detectar a formação do peptídeo cíclico (**9**), foi realizado ESI-MS, a partir do qual foi possível observar o pico característico do aduto $(M+H)^+$, calculado para $[C_{34}H_{51}N_8O_7] = 683,39$, obtido 683,4 (Apêndice 10).



Esquema 19. Estratégia de ciclização do precursor linear da desotamide B.

Nessa estratégia, as etapas de alongação da cadeia peptídica foram realizadas com o reagente HBTU. O mecanismo da reação de acoplamento com o HBTU se inicia com a desprotonação da carboxila do aminoácido que será introduzido à cadeia, seguida do ataque do carboxilato correspondente ao carbono metilênico do HBTU. Após a formação da O-acil ureia, ocorre o ataque do benzotriazol à carboxila deste, formando ureia e o éster ativado com benzotriazol. O éster ativo sofre ataque da amina, liberando a amida e regenerando o benzotriazol. A força motriz nessa reação é a formação do sub-produto ureia (Esquema 20).⁸⁸



Esquema 20. Mecanismo de formação da ligação amida com emprego de HBTU.

Entretanto, durante o processo de purificação de **9**, obtivemos dificuldade de realizar a solubilização deste em solvente com até 30% de ACN em água, uma vez que o programa iria de 31% de ACN até 61%. Assim, percebemos grande perda do material durante a filtragem prévia injeção no HPLC. O material solubilizado foi injetado no HPLC preparativo num programa de 31% de B até 61% em 120 minutos. A identidade do peptídeo cíclico foi confirmada por ESI-MS. Após purificação, foi possível obter **9** com pureza de 80% (Apêndice 11), porém, a quantidade em massa não foi satisfatória para realização das análises necessárias e da avaliação biológica.

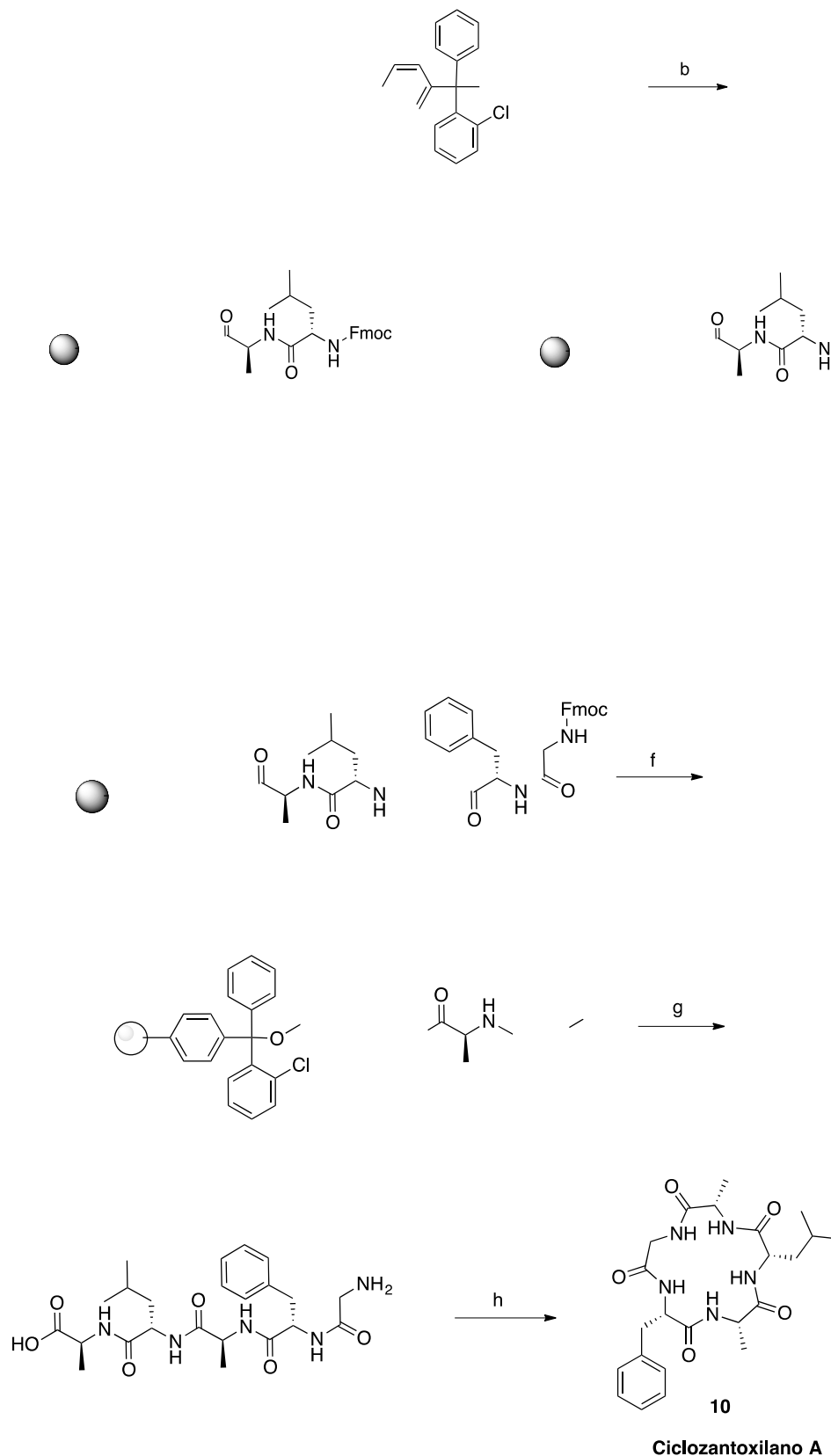
3.2.3 Ciclozantoxilano A

3.2.3.1 Síntese em fase sólida e ciclização em solução

A síntese total do peptídeo ciclozantoxilano A iniciou-se com o acoplamento de aminoácido Fmoc-L-Ala à resina cloreto 2-cloro tritila. Para isso, foram utilizados 8 equivalentes deste aminoácido protegido pelo grupamento Fmoc, 16 equivalentes de DIPEA (N,N-diisopropiletilamina), em 5 mL de DCM (diclorometano). Após a incorporação do aminoácido à resina, esta foi filtrada e lavada com DCM, DMF e metanol para a retirada os subprodutos. Em seguida, o grupo protetor Fmoc foi removido com piperidina 20% em DMF, com a adição de 5 mL desta solução e agitação durante 5 minutos, seguida de lavagem, e novamente adição de 5 mL desta solução e agitação durante 20 minutos. Para realização do acoplamento do aminoácido seguinte, adicionou-se 4 equivalentes do aminoácido protegido, 8 equivalentes de DIPEA, e 4 equivalentes de PyBOP((benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino-fosfônio hexafluorofosfato). Este ciclo foi repetido até que a sequência desejada de aminoácidos do peptídeo.

Após a formação do peptídeo linear, este foi clivado da resina com solução de TFA, o produto obtido precipitado com éter etílico à baixa temperatura e o sobrenadante decantado. Por fim, a solução contendo o peptídeo linear foi submetida a ciclização, utilizando PyBOP e DIPEA, em alta diluição para evitar polimerização do peptídeo.

O esquema 21 ilustra todo o processo de síntese do peptídeo ciclozantoxilano A, desde a primeira incorporação do primeiro aminoácido à resina, até a ciclização do peptídeo.



Esquema 21. Reagentes: (a) (i) Fmoc-L-Ala (8 equiv.), DIPEA (16 equiv.) (b) (i) 20% piperidina/DMF (ii) Fmoc-L-Leu, PyBOP, DIPEA (4 equiv) (c) (i) 20% piperidina/DMF (ii) Fmoc-L-Ala, PyBOP, DIPEA (4 equiv.), (d) (i) 20% piperidina/DMF; Fmoc-L-Phe, PyBOP, DIPEA (4 equiv.); (e) (i) 20% piperidina/DMF; Fmoc-Gly, PyBOP, DIPEA (4 equiv.); (f) 20% piperidina/DMF; (g) TFA/TIS/H₂O (95%: 2,5%: 2,5%), (h) EDCI, DMAP.

Após a realização do processo de síntese, o produto obtido foi submetido à espectrometria de massas com ionização por elétron spray. O pico de $[M+H]^+$ calculado para

o ciclozantoxilano A, o qual possui fórmula molecular $[C_{23}H_{34}N_5O_5]^+$, é 460. Os resultados obtidos por análise por espectrometria de massas, solubilizado em ACN e água (1:1), mais 1% ácido acético, corroborou com a estrutura proposta, obtendo-se m/z 460, conforme figura 31. MS (70 eV) m/z 460 (M^+ , 72), 461 (64).

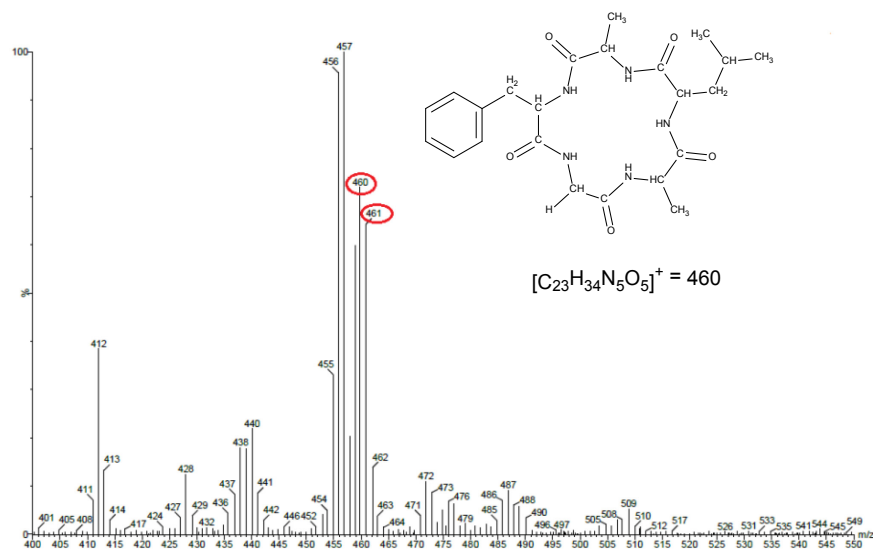


Figura 31. Espectro de massas com ionização por elétron spray (ESI-MS) do composto 10.

A figura 32, referente ao espectro de fragmentação do peptídeo obtido (m/z 460), apresentou padrões de fragmentação semelhantes aos do trabalho elaborado por Ribeiro *et al*, em 2012, possuindo em evidência os picos 389 m/z ($CH_2CONH^+Phe-Ala-Leu-NH_2$), 259 m/z ($[H_3N-Phe-Gly-Ala]^+$), 177 m/z ($[C_6H_5-CH_2-CH=NH-Gly]^+$), 276 m/z ($[H_2N-Ala-Phe-CO-CH_2]^+$), 287 m/z ($[Ala-Leu-Ala-NH_2-Me]^+$), 347 m/z ($[H_2N=Phe-Ala-Leu-NH_2]^+$) (Figura 32).

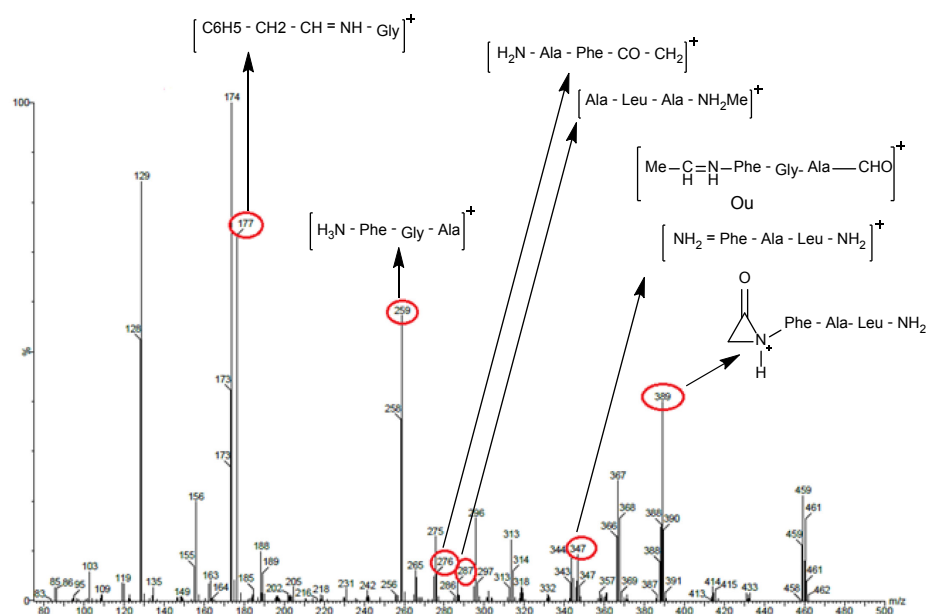


Figura 32. Espectro de ESI-MS com fragmentações de **10**.

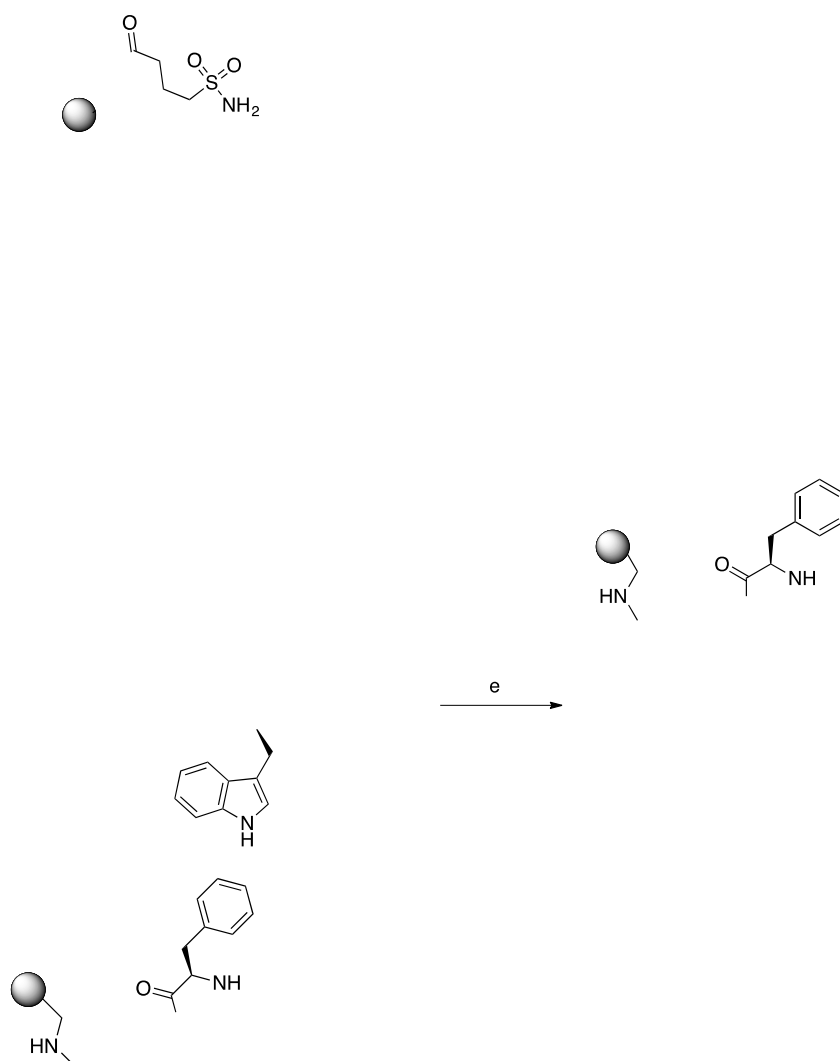
Desta forma, os resultados obtidos com o espectro de massas com ionização por elétron spray, e MS-MS, corroboram a estrutura proposta do ciclozantoxilano A. O peptídeo **10** está em processo de purificação, a fim de realizar outras análises, como RMN de ¹H e ¹³C e MALDI, e confirmar a estrutura do produto obtido através da síntese realizada

3.2.1 Chaiyaphumine A

3.2.1.1 Síntese e ciclização na resina – Método “Safety-Catch”

Tentativas de síntese total do depsipeptídeo chaiyaphumine A, foi realizada empregando-se a resina 4-sulfamilbutiril AM (resina Kenner) comercialmente disponível (Novabiochem). A primeira etapa se deu pelo acoplamento do primeiro aminoácido (Fmoc-*D*-Phe) na presença de PyBOP e diisopropiletilamina (Esquema 6), em DMF. Este procedimento foi repetido mais duas vezes com objetivo de garantir alta taxa de incorporação e, após cada acoplamento, as reações foram monitoradas empregando o teste de Kaiser ou cloranil e teste quantitativo de remoção do grupo Fmoc (Esquema 22).⁸⁷

(2-fenilacetil)-*L*-treonina (**5**) foi incorporado ao peptídeo sob as mesmas condições empregadas para os demais aminoácidos. A partir desse resíduo, a esterificação foi realizada sob condições clássicas, com emprego de 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) e *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC). O alongamento da cadeia foi realizado após sucessivas reações de acoplamento e desproteções, fornecendo o peptídeo linear. A alquilação da sulfonamida com iodoacetnitrila, seguida da desproteção do grupo Boc da alanina terminal, resultou na clivagem macrocíclica do depsipeptídeo **11**.



Esquema 22. Reagentes: (a) Fmoc-D-Phe, PyBOP, DIPEA (3 equiv); (b) (i) 20% piperidina/DMF; Composto **5**, PyBOP, DIPEA (3 equiv), (c) (i) 20% piperidina/DMF; (ii) Fmoc-D-Trp, DIC (3 equiv.), DMAP (0,4 equiv.); (d) (i) 20% piperidina/DMF; Fmoc-L-Pro, PyBOP, DIPEA (3 equiv.); (e) (i) 20% piperidina/DMF; Boc-D-Ala, PyBOP, DIPEA (3 equiv.); (f) 10 equiv. ICH₂CN, 12 equiv. DIPEA, (ii) TFA/CH₂Cl₂; (g) 3 equiv. DIPEA/THF.

Ao final da macrociclicação, entretanto, a massa esperada para o peptídeo natural chaiyaphumine A (massa calc. 720,32) não foi observada na análise de espectrometria de massas MADI-TOF (Figura 31). A massa observada (M+14) sugere a formação de um produto alquilado (MALDI-TOF: 734,55). É possível que ocorra hidrólise da nitrila formada em meio básico, formando o resíduo *N*-metil-Trp, sugerido na estrutura da Figura 33. Aquilação e oxidação do nitrogênio indólico do triptofano já foi observado em trabalhos anteriores empregando a resina Kenner, onde sugere-se, portanto, o emprego do aminoácido protegido (Fmoc-Trp-Boc-OH) a fim de evitar reações indesejadas durante ativação da

resina.⁸⁹ Realizamos novamente a reação, nas mesmas condições, dessa vez com o aminoácido Fmoc-Trp-Boc-OH, entretanto, foi observado o mesmo resultado de MALDI-TOF.

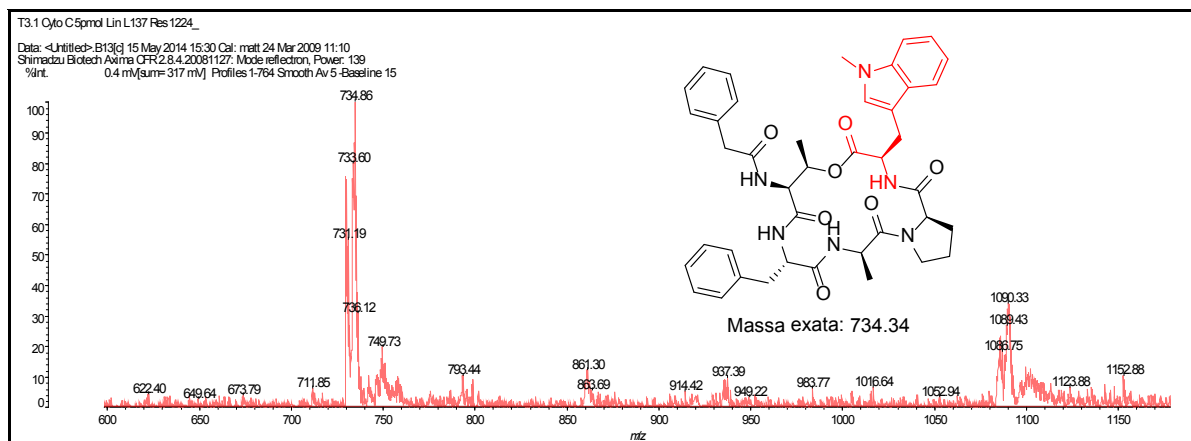
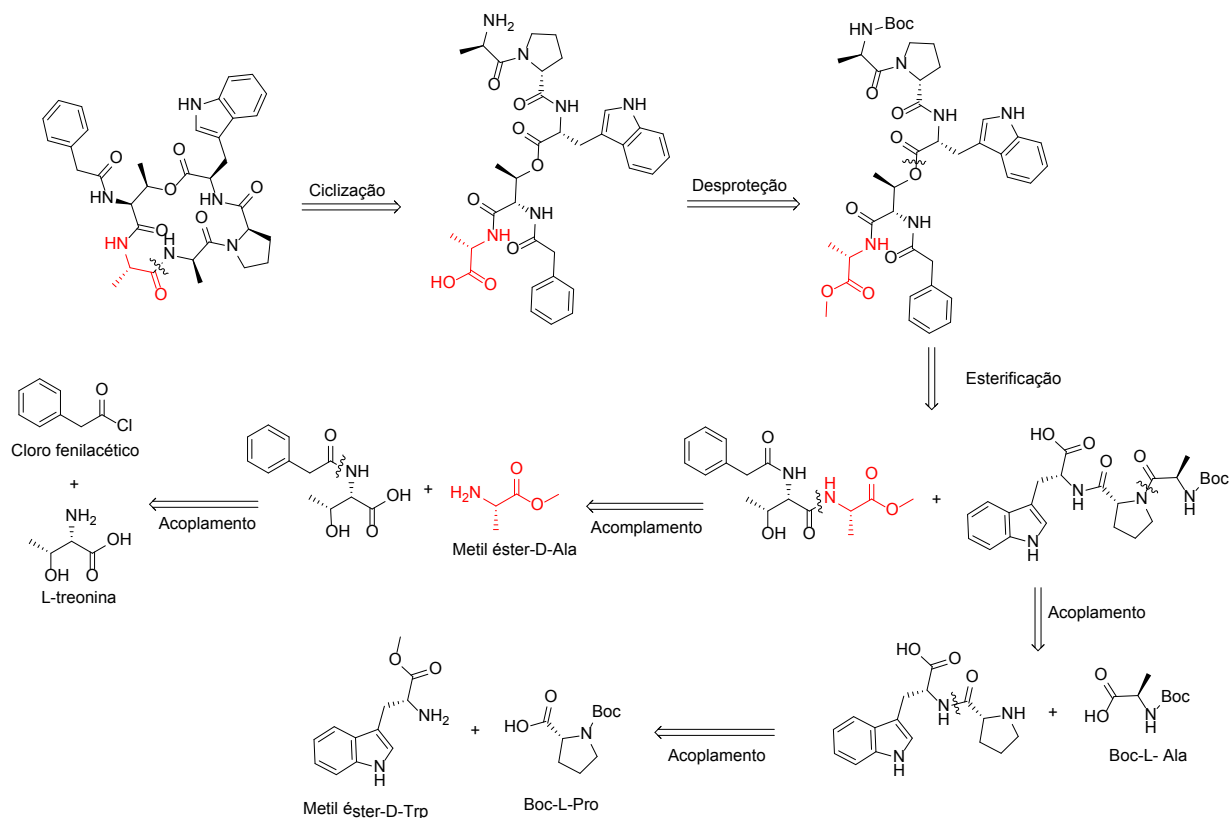


Figura 33. MALDI-TOF e estrutura proposta para o peptídeo formado **11**.

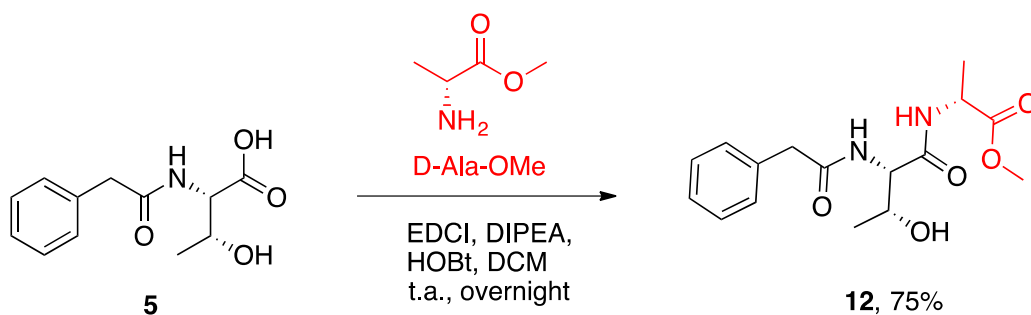
3.2.1.2 Síntese e ciclização em solução

Diante da dificuldade encontrada na síntese de chayaphumine A em resina Kenner, A síntese de análogos “alanine scan” da chayaphumine A foi idealizada em solução para formação de dois fragmentos lineares, seguida de esterificação e posterior ciclização (Esquema 23).



Esquema 23. Análise retrossintética de análogo da chaiyaphumine A em solução.

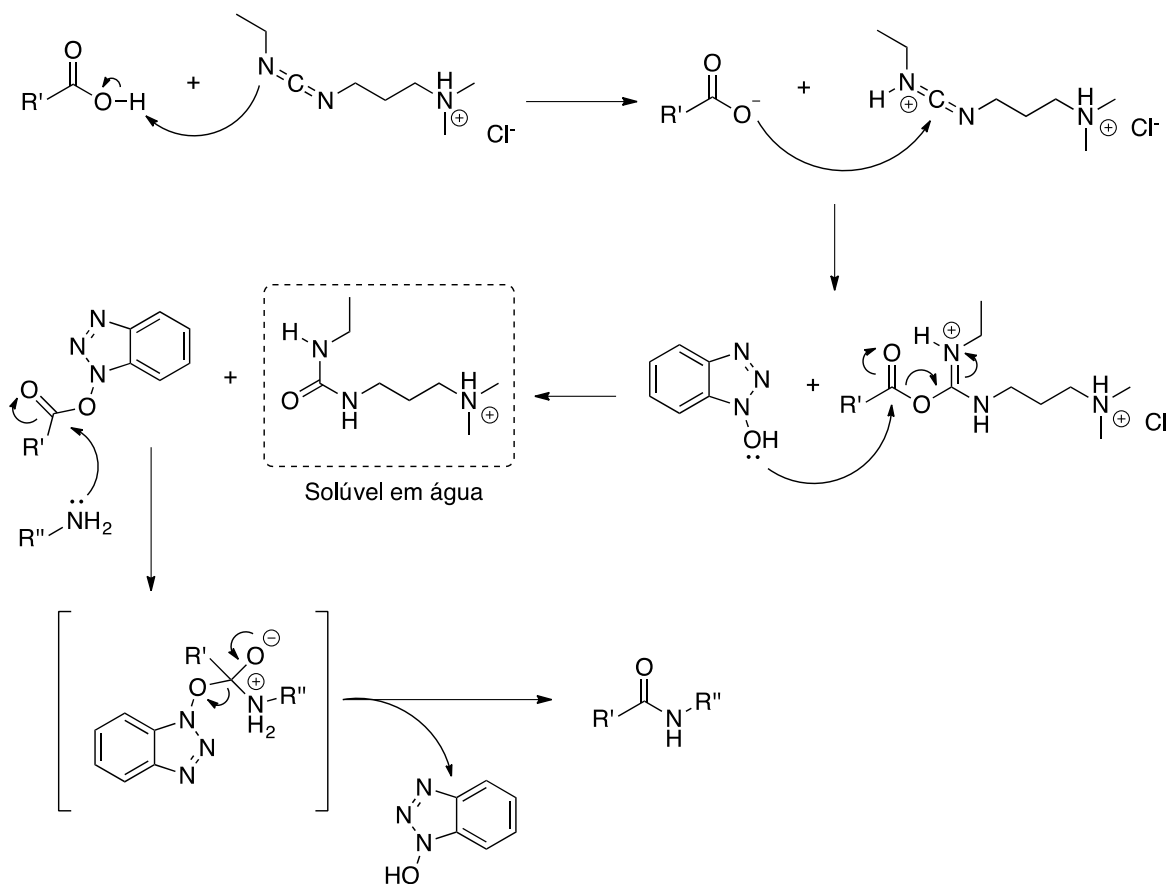
Para tal, o aminoácido modificado **5** foi então submetido ao acoplamento com metil éster-D-Ala na presença de EDCI, HOBT e DIPEA, formando o fragmento **12** com 75% de rendimento (Esquema 24). A formação deste fragmento foi confirmada pelo espectro de RMN de ^1H pela presença dos sinais $\delta 7,17-7,27$ (m, 5H) referentes ao grupo arila, $\delta 4,49$ (m, 1H) referente ao hidrogênio metínico α -carboxílico, e ao sinal em $\delta 3,64$ (m, 3H) referente ao grupo de proteção metil éster do resíduo D-Ala-OMe (Apêndice 12).



Esquema 24. Obtenção do fragmento **12** para síntese de chaiyaphumine A.

A reação de formação de amida com o 1-etil-3-(3 dimetilaminopropil)carbodiimida-EDCI apresenta mecanismo similar a outras carbodiimidias, com a vantagem do EDCI e

subproduto da reação serem solúveis em água, sendo removido facilmente durante o *work up*, como destacado no esquema 25. Nessa reação, a primeira etapa envolve a desprotonação do ácido pela carbodiimida. Posteriormente, ocorre o ataque do ácido ao carbono carregado positivamente do EDCI. Em seguida, o 1-hidroxibenzotriazol ataca o grupo carboxila, levando a ativação deste e, simultaneamente, forma-se uma ureia solúvel em água. Por fim, ocorre o ataque da amina ao grupo carboxila ativado, seguida de regeneração do HOBt, e formação da ligação amida (Esquema 25). Outra vantagem do emprego do EDCI é sua menor toxicidade quando comparada à carbodiimida DCC.



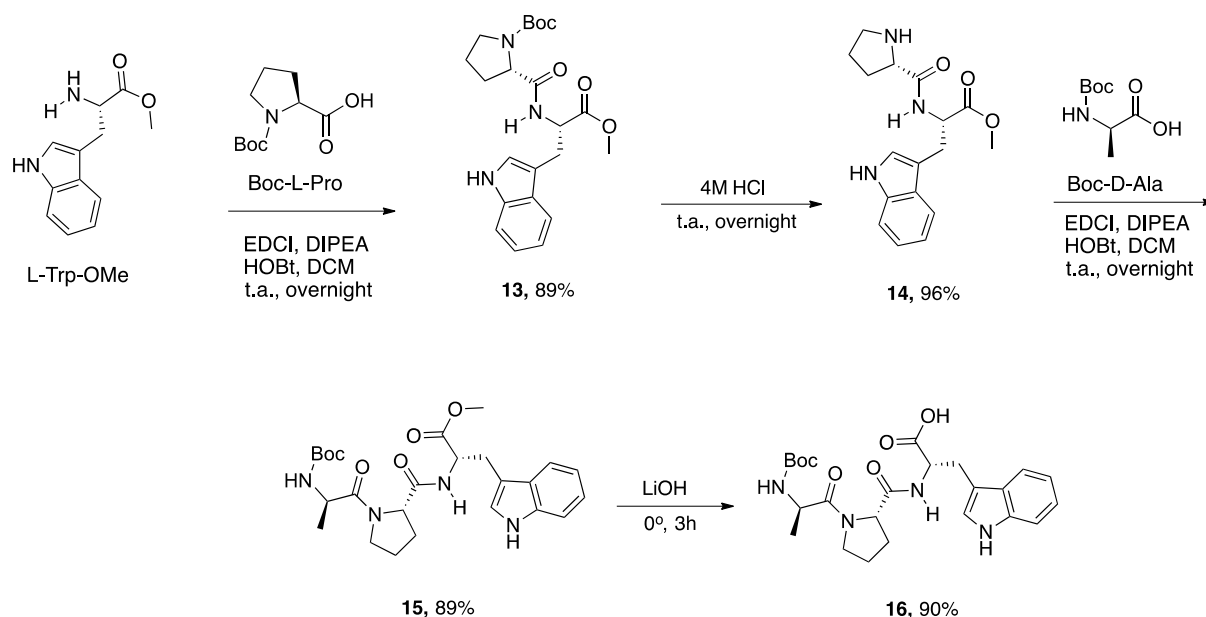
Esquema 25. Mecanismo de formação da ligação amida com emprego da carbodiimida EDCI.

Para obtenção do segundo fragmento, iniciamos com o acoplamento do aminoácido L-Trp-OMe e Boc-L-Pro nas mesmas condições descritas para o acoplamento anterior, formando o dipeptídeo **13** com 89% de rendimento. A formação do composto desejado foi confirmada pelo espectro de RMN de 1H (Apêndice 13), pela presença dos sinais dos hidrogênios aromáticos em $\delta 7,54$ (d, 1H, $J=7,5$ Hz, 1H, H-4'), 7,34 (d, $J=7,5$ Hz, 1H, H-7'), 7,01-7,20 (m, 3H, H-2', H-5', H-6') e os sinais referentes à pirrolidina em $\delta 4,90$ (sl, 1H, CHCH₂) e 3,22-3,47 (m, 4H, NCH₂CH₂CH₂). Ainda, observamos os sinais dos grupos

protetores metil éster em δ 3,63 (s, 3H, CO_2CH_3) e Boc em δ 1,34-1,45 (m, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$). Realizamos então a remoção do grupo protetor Boc com 4M HCl em dioxano formando **14**, (96% de rendimento), seguida do acoplamento de **14** e Boc-D-Ala, na presença de EDCI e HOBt (89% de rendimento) formando o fragmento **15**. A formação de **15** foi confirmada por RMN de ^1H , pela presença dos sinais referentes à metila da alanina, em δ 1,30 (*sl*, 3H) e em δ 1,44 (*sl*, 9H) referente ao grupo protetor Boc (Apêndice 14).

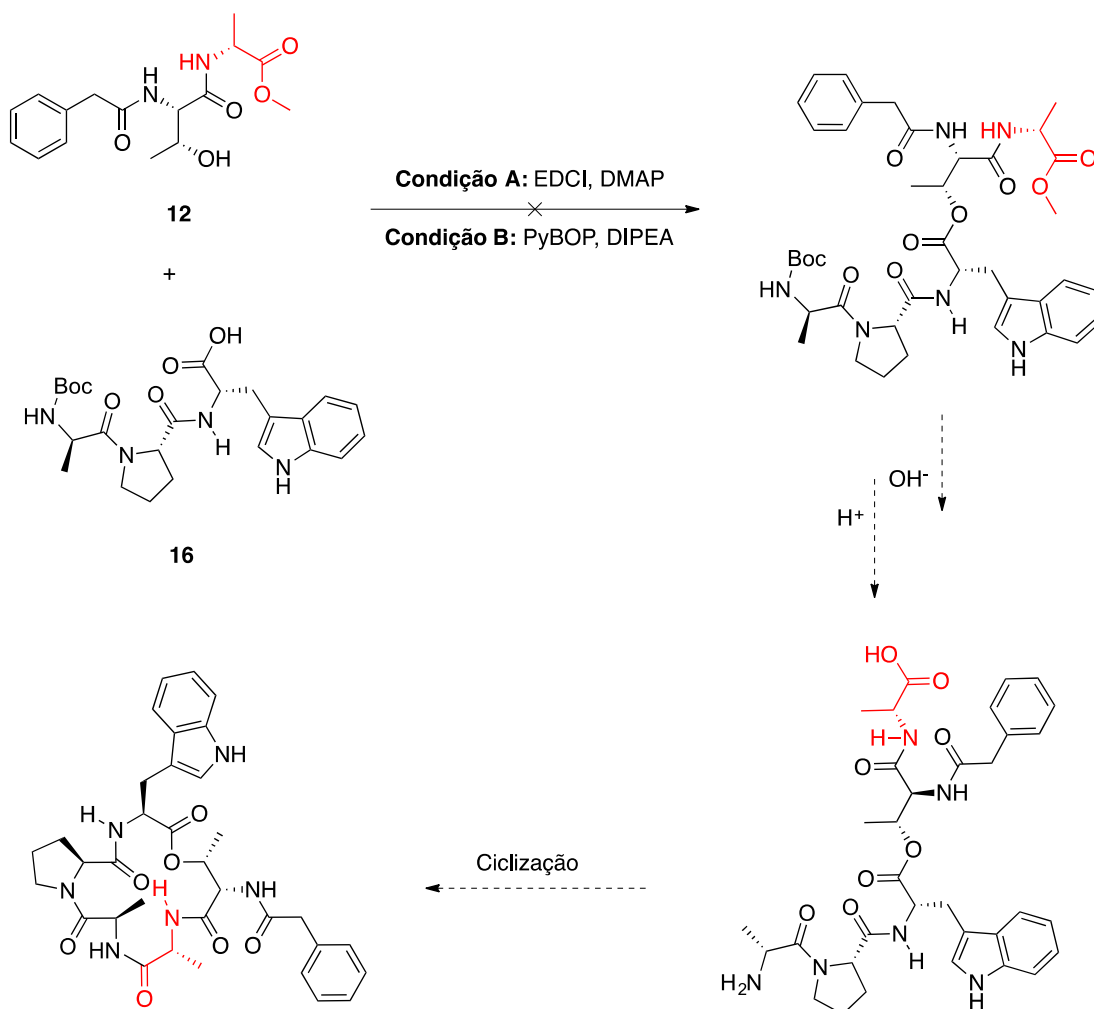
Posteriormente, a remoção do grupo metil éster na presença de LiOH, formou o fragmento **16** com 90% de rendimento (Esquema 26). Análise de RMN de ^1H confirmou a formação de **16** pela presença dos sinais δ 1,42 (*sl*, 9H), δ 1,27 (*sl*, 3H) referentes ao grupo Boc e à metila do aminoácido Boc-D-Ala, respectivamente, e à ausência do sinal em δ 3,73 (s, 3H) referente ao grupo protetor metil éster (Apêndice 15).

Esquema 26. Rota sintética para obtenção do fragmento **16** para síntese de chalyphumine A.



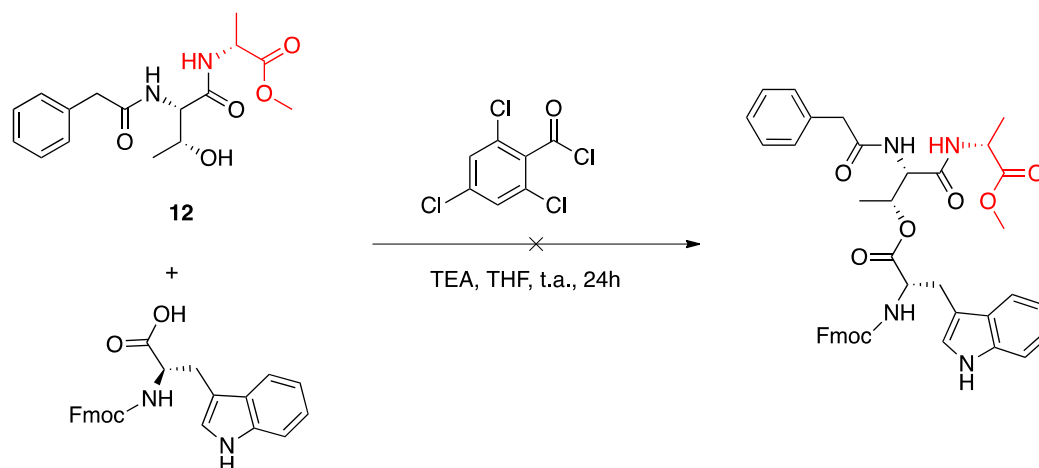
Na primeira tentativa de formação do peptídeo linear, os fragmentos **12** e **16** foram submetidos a esterificação em condições de acoplamento (Esquema 27) empregando *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida- EDCI e dimetilamino piridina – DMAP em diclorometano, onde apenas recuperamos os materiais de partida.

Em uma segunda tentativa, os fragmentos recuperados na reação anterior foram tratados com PyBOP e DIPEA em diclorometano, sem nenhuma formação de produto ao final de 24 horas (Esquema 27).



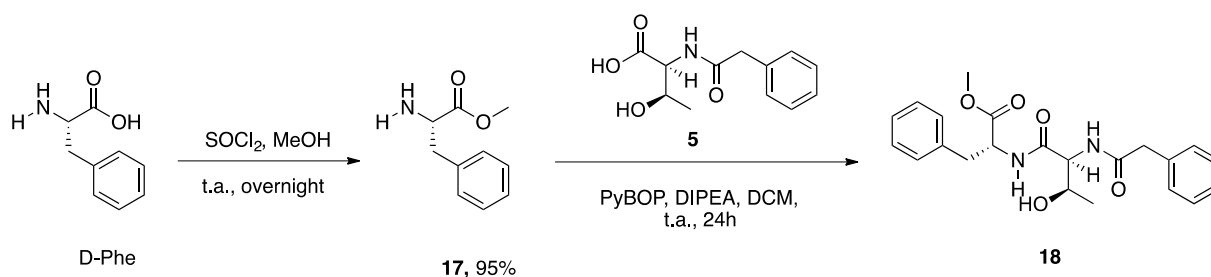
Esquema 27. Rota sintética para obtenção de análogo de chaiyaphumine A em solução.

Ainda na tentativa de formar o éster linear do depsipeptídeo chaiyaphumine A em solução, foi empregado as condições da esterificação de Yamaguchi⁸⁹ do composto **5** e Fmoc-L-Trp-OH (Esquema 28). Entretanto, foi formada uma mistura complexa de produtos, o que não permitiu o isolamento do composto desejado. Isso se deve possivelmente à formação de anidrido assimétrico antes do ataque pelo álcool, formando diferentes ésteres, o que pode explicar a formação de vários produtos observados na CCDC.



Esquema 28. Esquema reacional para formação da ligação éster no depsipeptídeo chaiyaphumine A empregando as condições de Yamaguchi.

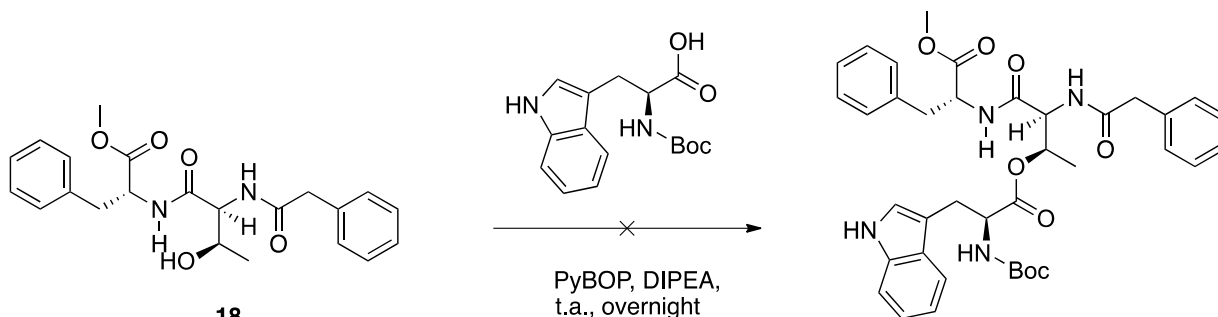
Baseando-se em nova estratégia para obtenção de chaiyaphumine A, foi realizada a proteção do aminoácido D-Phe-OH com o grupo metil éster na presença de cloreto de tionila em metanol formando **17**, confirmado pela presença do sinal em $\delta 3,80$ (s, 3H) no espectro de RMN de ^1H , referente aos hidrogênios da metoxila (Apêndice 16). Em seguida, foi realizado o acoplamento entre o aminoácido modificado **5** e Phe-D-metil éster, formando o fragmento **18** (Esquema 29). A formação de **18** foi confirmada pela análise do espectro de RMN de ^1H , pela presença dos sinais em $\delta 7,15$ - $7,31$ (m, 10H), referente aos hidrogênios aromáticos, $\delta 0,99$ (d, $J=10$ Hz, 3H) referentes aos hidrogênios metílicos de 2-fenilacetil-*L*-treonina e, $\delta 3,67$ (s, 3H) referentes aos hidrogênios metílicos da metoxila (Apêndice 17). Nota-se, entretanto, a presença dos sinais $\delta 7,49$ (dt, 1,5H), $7,56$ (dt, 1,5H), $7,76$ (d, 1,5H), $7,89$ (d, 1,5H), o que sugere a presença de hidroxibenzotriazol, formado no meio reacional durante o acoplamento na presença de PyBOP (Apêndice 18).



Esquema 29. Esquema reacional para formação da ligação éster no depsipeptídeo chaiyaphumine A empregando PyBOP como reagente de acoplamento.

Considerando que na próxima etapa da síntese também seria empregado PyBOP, mostra-se desnecessário a remoção completa do HOBt para continuar a estratégia sintética para alcançar chaiyaphumine A. A esterificação entre **18** e o aminoácido Boc-*L*-Trp evitaria

possíveis subprodutos, uma vez que o ácido de **18** estará protegido, permitindo apenas o ataque do álcool secundário ao ácido ativado de Boc-L-Trp. Dessa forma, espera-se uma reação seletiva entre o álcool do fragmento **18** com o ácido livre do Fmoc-L-Trp (Esquema 30).



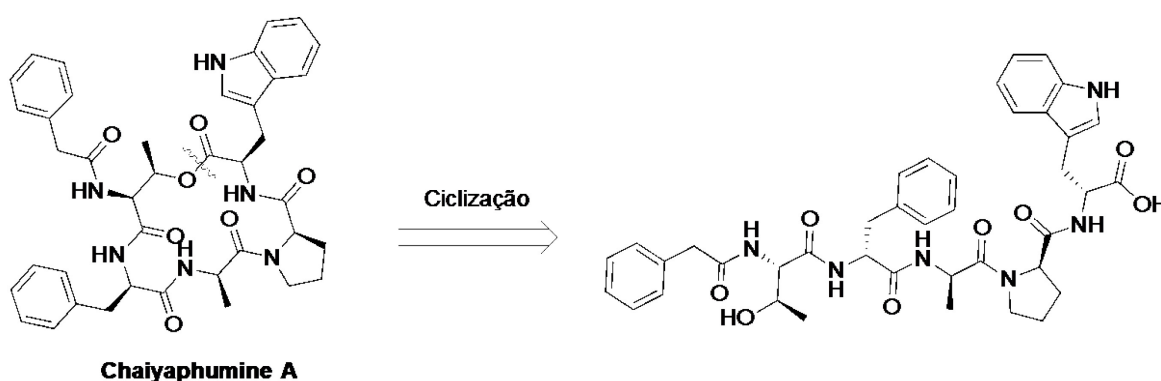
Outra tentativa para formao do dipeptdeo envolveu o reagente de acoplamento EDCI, na presena de DMAP cataltico em DMF, anteriormente descrito para formao de ligao do tipo ster em sntese de depsipeptdeos.⁴² Ainda na tentativa de obter este dipeptdeo, realizamos o emprego do anidrido misto 2-metil-6-nitrobenzico/MNBA (1,3 equiv.) na presena de DMAP cataltico (0,5 equiv.), trietilamina (3,2 equiv.) e diclorometano em ambiente inerte, empregado em macrociclizao de depsipeptdeos.⁴⁸ Como apenas isolamos os materiais de partida, optamos por realizar uma quarta metodologia sinttica. Neste novo mtodo, empregamos o 1,1'-carbonildiimidazol/CDI como reagente de acoplamento, sem sucesso. Na ltima tentativa para formao da ligao ster, empregamos o reagente trifosgnio, tambm sem sucesso (Esquema 31).



Esquema 31. Estratégias sintéticas para tentativa de acoplamento de **18** e L-Trp-Boc.

3.2.1.3 Síntese em fase sólida e ciclização em solução

Em face das dificuldades encontradas durante a síntese em solução e por meio do método “safety catch” para obtenção do depsipeptídeo chayyaphumine A, foi empregada terceira estratégia metodológica, empregando a síntese em fase sólida do peptídeo linear e, após clivagem do peptídeo da resina, seguida da ciclização em solução diluída. Nessa estratégia, decidimos realizar a primeira desconexão do anel pela ligação éster, a fim de caracterizar o análogo linear, e posteriormente, testar diferentes metodologias para macrolactonização do anel com métodos já descritos para essa reação (Esquema 32).



Esquema 32. Análise retróssintética de desconexão do anel de chayyaphumine A.

Para tal, empregamos a resina Wang-Trp(Boc)-Fmoc 0,450 mg (0,3 mmol) com taxa de acoplamento de 0,7 mmol/g. A sequência peptídica OH-L-Thr-D-Phe-D-Ala-L-Pro-L-Trp-COOH foi sintetizada em fase sólida, empregando 2 equivalentes de N,N,N',N'-tetrametil-O-

(1H-benzotriazol-1-il) uranium hexa-fluorofosfato (HBTU)/*N*-metilmorfolina (NMM) e do aminoácido correspondente em DMF (Esquema 33).

O grupo Fmoc foi removido com solução 20% piperidina/DMF, como nas reações com emprego da resina Kenner. Após realização dos acoplamentos, o teste de kaiser positivo indicou a presença de grupos amino livres, o que seria indicativo da ausência do acoplamento do aminoácido modificado **5**.

Realizamos então a microclivagem do peptídeo formado para realização de espectrometria de massas, a fim de detectar ausência de algum aminoácido da sequência. No espectro de ESI-MS observou-se a formação do aduto 520,3 $[M+H]^+$ (Figura 34), indicando assim a ausência do acoplamento do aminoácido **5**.

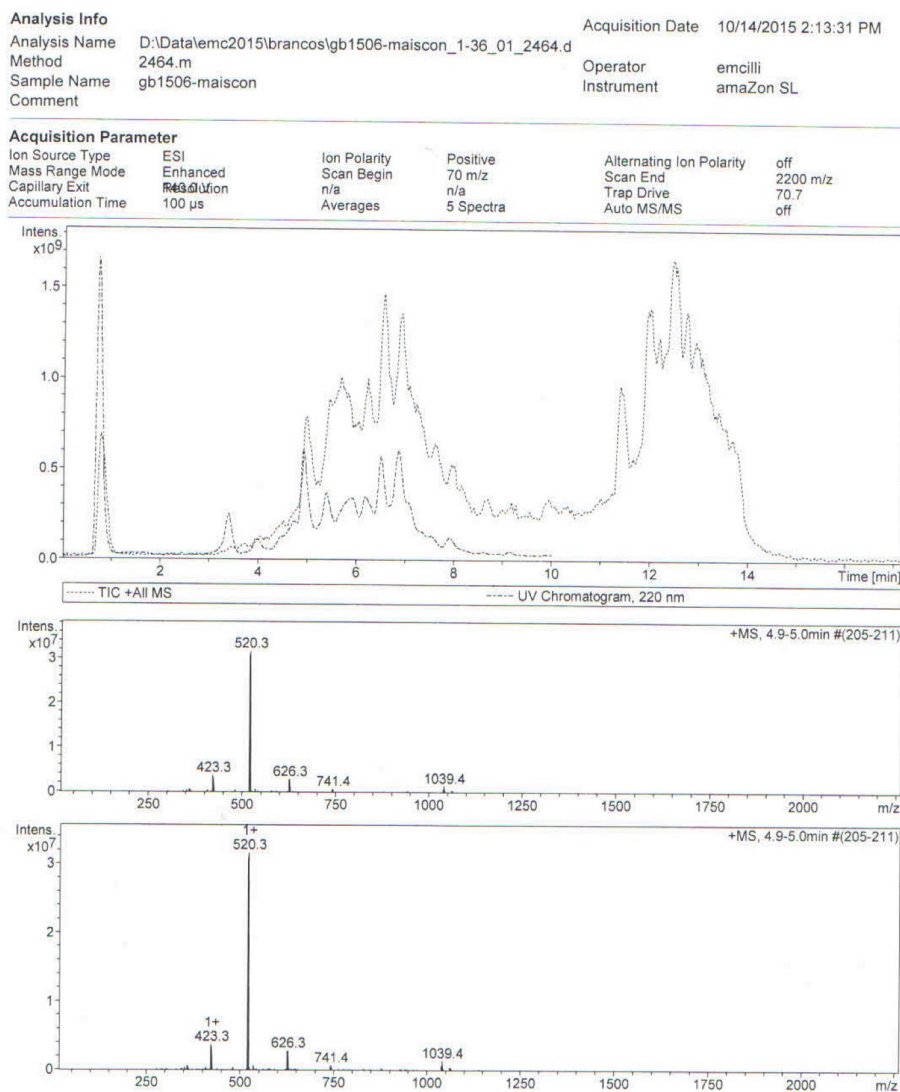
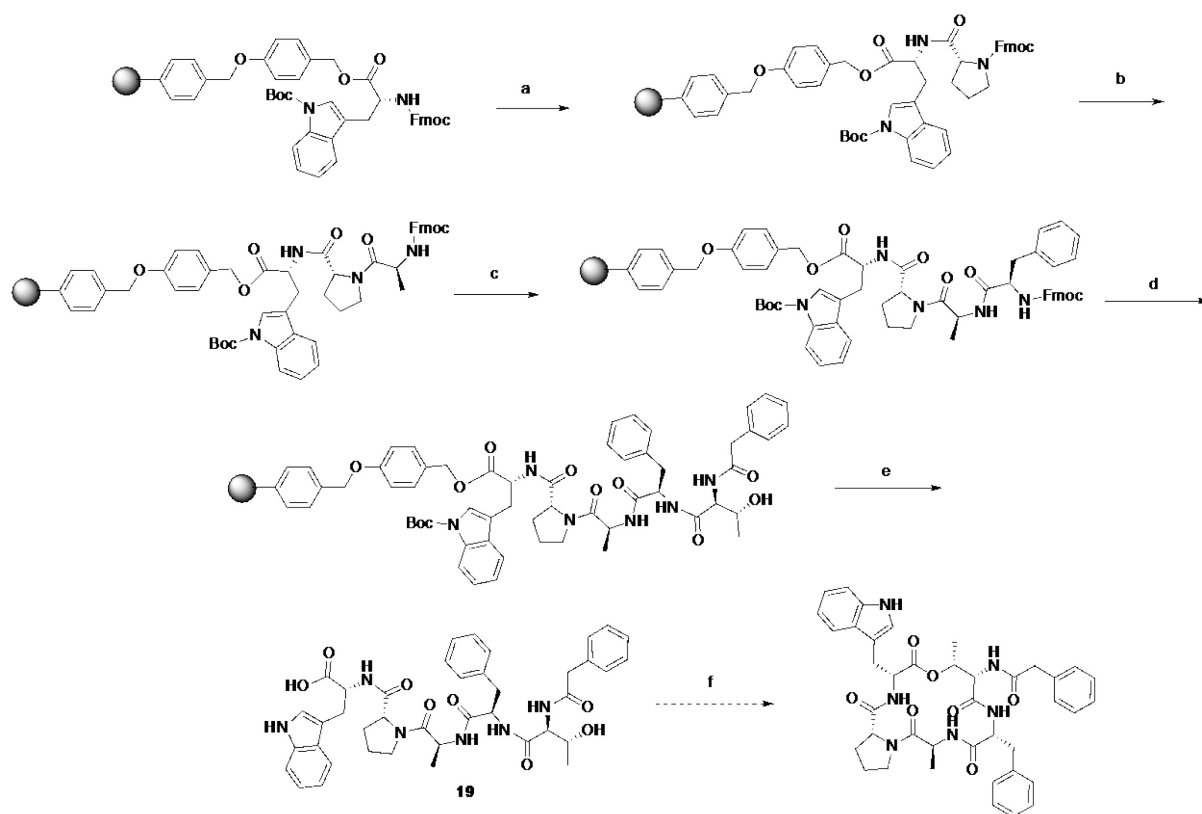


Figura 34. Espectro de massas ESI-MS do produto após microclivagem.

Portanto, realizamos novamente o último acoplamento, empregando 4 equivalentes do aminoácido **5**, HBTU e *N*-morfolina, e com o teste de kaiser negativo, seguimos para a clivagem do peptídeo (Esquema 35). No espectro de ESI-MS do peptídeo clivado, observou-se o aduto característico 739,4 [M+H]⁺ referente ao peptídeo linear desejado (Apêndice 19). Entretanto, pela análise do cromatograma, observamos que devido a formação de diferentes produtos, seria necessária realizar previamente a purificação do peptídeo linear. Contudo, o material apresentou baixa solubilidade em solventes polares, o que dificultara o processo de purificação em cromatografia em fase reversa.



Esquema 33. Reagentes: (a) (i) 20% piperidina/DMF (ii) Fmoc-L-Pro, HBTU, *N*-morfolina (3 equiv); (b) (i) 20% piperidina/DMF (ii) Fmoc-D-Ala, HBTU, *N*-morfolina (3 equiv); (c) (i) 20% piperidina/DMF (ii) Fmoc-D-Phe, HBTU, *N*-morfolina (3 equiv.); (d) (i) 20% piperidina/DMF (ii) Composto 5, HBTU, *N*-morfolina (3 equiv.); (e) TFA:TIS:H₂O (95%:2,5%:2,5%); (f) HBTU, DIPEA, ACN.

3.3 Análise sistemática dos fármacos no mercado e em fase clínica

Apesar dos avanços em termos de aprimoramento de propriedades farmacocinética dos

fármacos, uma série de trabalhos questionando a aplicação estrita da regra de Lipinski emergiram, levando a conclusões de que a aplicação dessa regra *per se* pode ter resultado em filtro não adequado para peptídeos.⁹⁰ A fim de caracterizar o espaço químico e físico-químico de fármacos peptídicos, realizamos uma extensa análise de todas as estruturas de peptídeos no mercado, de candidatos a fármacos conhecidos, bem como daqueles em fases clínicas de desenvolvimento, tentando correlacionar aqueles de administração oral à Ro5.

Como outros produtos naturais, especialmente os da família policetídeo, peptídeos cíclicos tendem a ter propriedades moleculares (por exemplo PM, número de grupos aceptores e doares de ligação de hidrogênio, área de superfície polar) que não aderem aos limites para descritores convencionais de "druglikeness", como a Regra dos 5 ou outros filtros mais recentemente publicados.⁹¹ Apesar do fato de a maioria dos peptídeos não obedecerem a Ro5, diversos exemplos de fármacos peptídicos oralmente disponíveis estão em testes clínicos e no mercado, tais como o imunossupressor alisporivir, utilizado no tratamento da hepatite C; o agonista de receptor de guanilato ciclase C, linaclotide, usado no tratamento do síndrome do intestino irritável e o análogo sintético da vasopressina, desmopressina, usado no tratamento de hemofilia A (Figura 35).

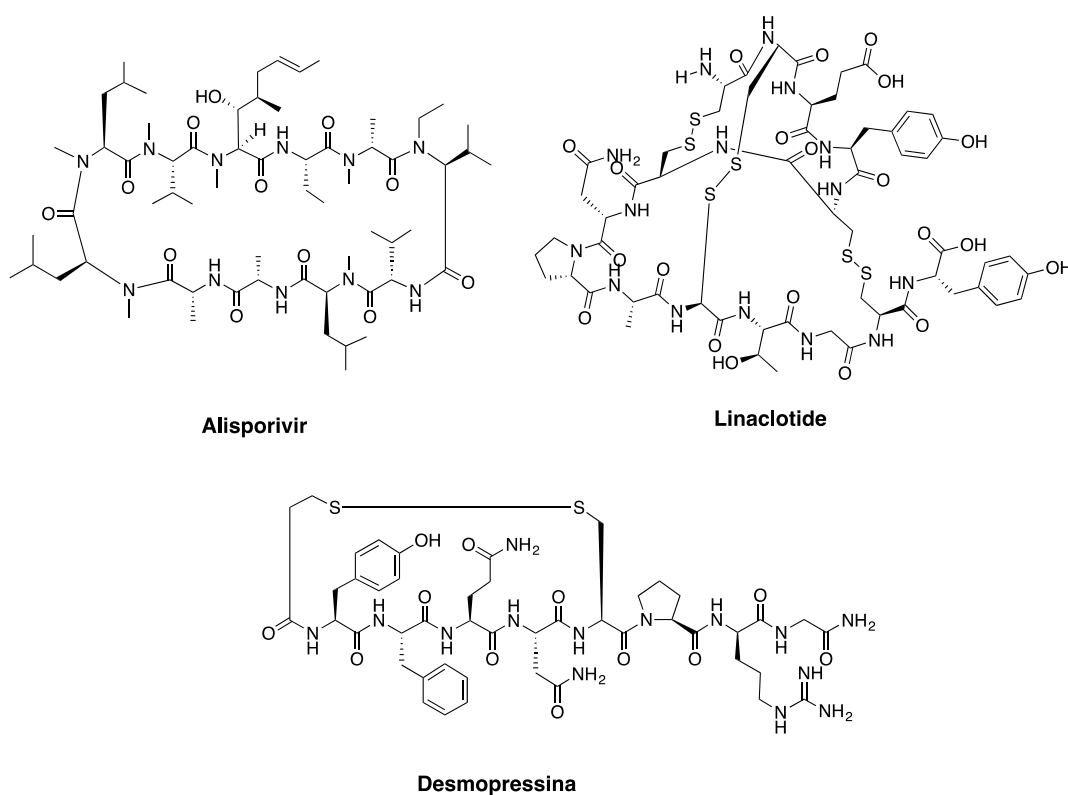


Figura 35. Exemplos de fármacos peptídicos cíclicos disponíveis por via oral.

Estes fármacos têm em comum a estrutura cíclica, o que tem sido descrito como propriedade que favorece a farmacocinética, aumentando a permeabilidade através de

membranas e a estabilidade metabólica dessas moléculas, permitindo a administração por via oral. Assim, no presente estudo, foi realizada uma revisão sistemática e análise das propriedades de todos os peptídeos de mercado e em fase clínica, suas propriedades físico-químicas calculadas e a correlação com a via de administração, número de aminoácidos e mecanismo de ação. Por fim, as propriedades destes compostos foram comparadas com os produtos naturais sintetizados e selecionados neste trabalho.

3.3.1 Distribuição dos fármacos aprovados pelo FDA nos últimos 5 anos (2011-2016)

Neste estudo, coletamos todos os fármacos aprovados pelo FDA de 2011-2016, a fim de avaliar a distribuição das espécies químicas presentes nessa compilação. Observamos que de um total de 269 fármacos, 131 (49%) são pequenas moléculas, seguidas de 29 (11%) de anticorpos monoclonais. Fármacos peptídicos representam um total de 20 (7%) de novas entidades químicas e 24 (9%) de proteínas, porcentagem similar ao observado por Alberico & Kruger em 2012 (Figura 36).⁹²

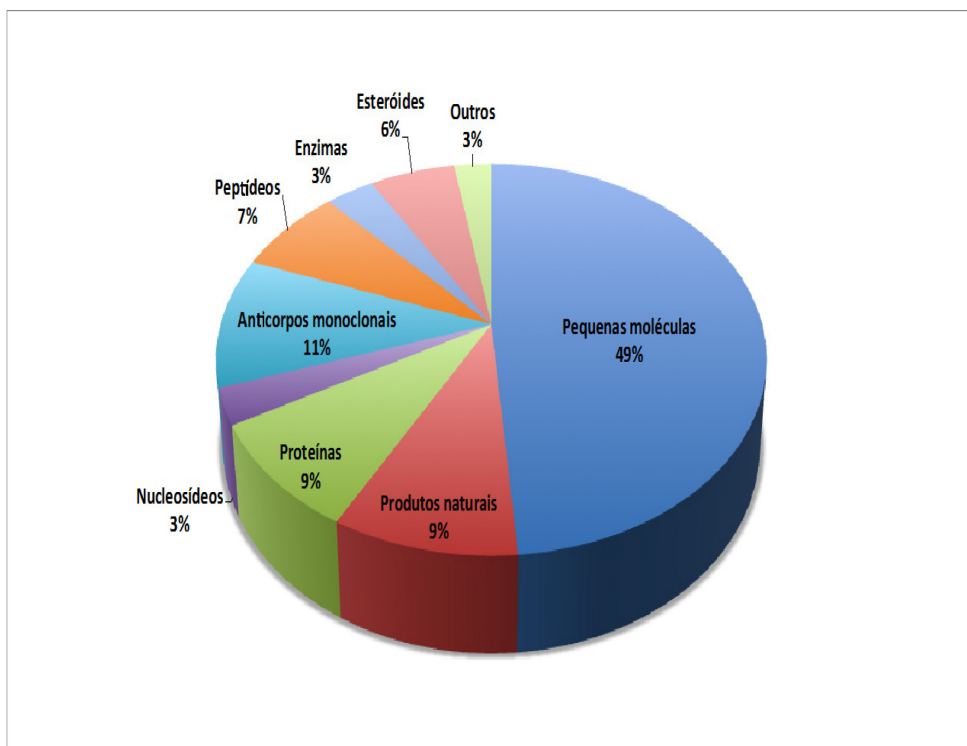


Figura 36. Distribuição de fármacos aprovados pelo FDA por espécie química.

Além disso, na tabela 1 podemos observar que as análises destes fármacos revela uma tendência em termos de propriedades farmacológicas destes fármacos. Daklinza, Technivie, Zepatier, Evotaz Genvoya, Prezcobix, Vibativ, Harvoni e Viekira Pak são antivirais, enquanto Dalvance, Linzess e Orbactiv são antibióticos. Juntos, eles correspondem a 55% dos fármacos peptídicos aprovados com propriedades anti-infecciosas. Isto reforça a grande capacidade dos peptídeos para alcançar alvos de difícil acesso para pequenas moléculas, tais como interações proteína-proteína intracelulares. Para o mesmo período de tempo, os medicamentos anti-infecciosos correspondem apenas a 7% do total aprovado os fármacos (Figura 2). É também evidente que apenas 44 medicamentos foram aprovados como anti-infecciosos, onde 45,4% desse montante são peptídeos.

3.3.2 Revisão sistemática - Base de dados de fármacos peptídicos

Fármacos peptídicos são arbitrariamente definidos como moléculas que contêm menos de 50 aminoácidos, como forma de diferenciá-los de proteínas, tais como anticorpos ou outros produtos biológicos. Neste trabalho, nós adicionalmente definimos fármacos peptídicos como pequenas moléculas que não compartilham qualquer característica com peptídeos que ocorrem naturalmente em mamíferos ou peptídeos hormonais, a fim de distinguir fármacos peptídicos de peptidomiméticos ou miméticos hormonais.

Nossa análise iniciou com o emprego da palavra-chave "peptides", na campo "Search" da aba "Browse Drugs", na base de dados "ChEMBL". ChEMBL⁹³ é um banco de dados livre contendo informações vinculativas, funcionais e de ADMET para um grande número de compostos bioativos. Atualmente, o banco de dados contém 5,4 milhões de medições de bioatividade para mais de 1 milhão de compostos. O acesso está disponível através da Web em: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/db>. Obtivemos um total de 541 compostos a partir de 10,507 entradas totais. Dentre essas entradas, verificou-se que apenas 108 compostos mostraram mecanismo de ação diferente do que ocorre naturalmente em mamíferos ou hormônios peptídicos e proteínas recombinantes, assim, decidimos que estes compostos têm uma atividade biológica diferente de produtos biofarmacêuticos, e assim foram classificados como fármacos peptídicos (Apêndice 21). Os dados dos medicamentos aprovados nos últimos 5 anos pela agência FDA foram coletados na base de dados CenterWatch⁹⁴ e distribuídos de acordo com a classificação química (Figura 2).

As propriedades químicas dos peptídeos selecionados foram calculadas utilizando o software Vortex[®]. As informações referentes ao mecanismo de ação, via de administração e estrutura química foram coletadas nas bases de dados da base Integrity, da Thomson Reuters^{sm95} e Truven Health Analytics Micromedex[®] Solutions⁹⁶.

De maneira geral, estruturalmente, os peptídeos selecionados podem ser divididos em cíclicos e lineares, atendendo aos requisitos de tamanho previamente estabelecidos.

3.3.4 Características dos fármacos peptídicos

Da nossa compilação de 108 fármacos peptídicos, 37 (33,95%) são cíclicos, enquanto 72 (66,05%) são lineares. O número de aminoácidos destes peptídeos varia entre 2 e 43 (média=8,12 aminoácidos), podendo ser usuais ou não-usuais. O peso molecular varia entre 163,2 Da, referente ao fármaco tiopronin, até 5036,6 Da (média=1060,7) referente ao fármaco tifuvirtide.

3.3.5 Caracterização terapêutica dos fármacos peptídicos

A partir da análise e filtros descritos no item anterior, classificamos estes peptídeos por classe terapêutica, como observado na figura 37.

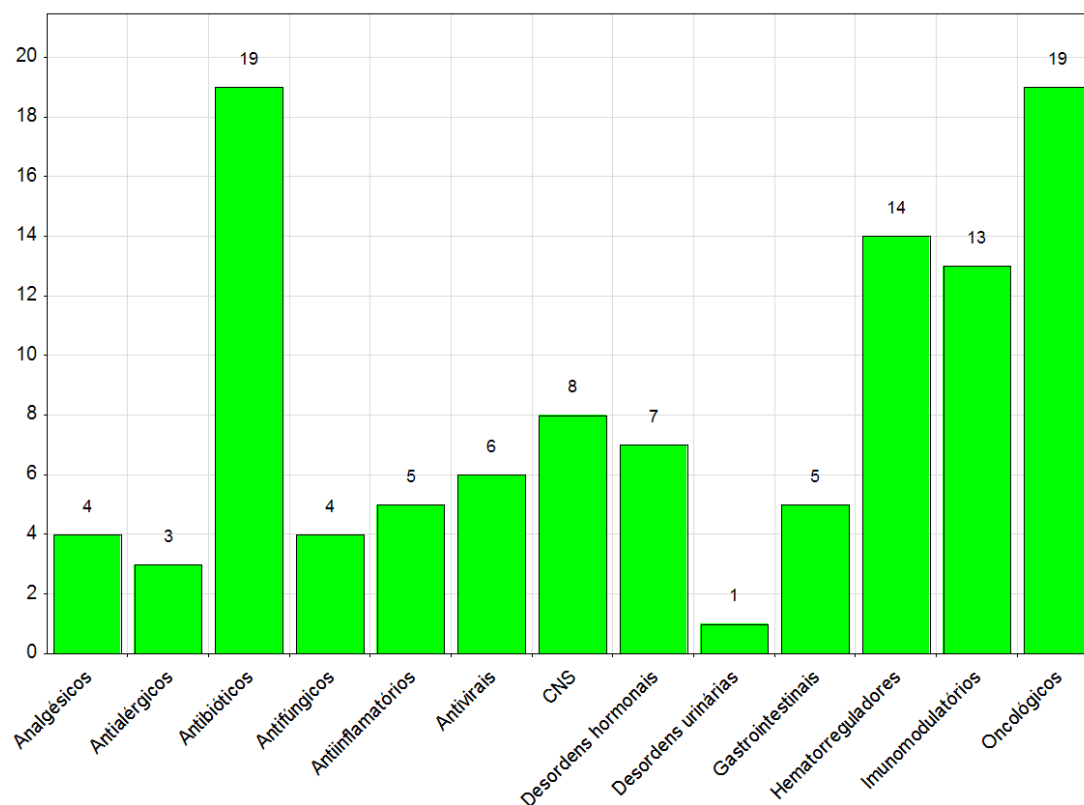


Figura 37. Distribuição dos fármacos peptídicos por classificação terapêutica.

É possível notar que a distribuição terapêutica de fármacos peptídicos é dividida principalmente em 4 classes: oncológicos (18%), antibióticos (18%), hematorreguladores (13%) e imunomodulatórios (12%), juntos correspondem ao total de 61% de todos os fármacos peptídicos. Em menor porcentagem, há fármacos que atuam no sistema nervoso central (7%), para o tratamento de desordens hormonais e antivirais (7% e 6%, respectivamente), antiinflamatórios e gastrointestinais (5%), analgésicos e antifúngicos (4%), antialérgicos (3%), e fármacos empregados no tratamento de distúrbios urinários (1%).

A divisão foi realizada agrupando os fármacos da seguinte maneira:

Fármacos que atuam no SNC: Inclui antidepressivos, hipnóticos sedativos, antiparkinson e fármacos que atuam em desordens cognitivas.

Hematorreguladores: Inclui hipotensores, estimuladores de mielopoiese, antiplaquetários, antiarrítmicos, estimuladores de eritropoietina, anticoagulantes, vasodilatadores e inibidores de trombose.

Gastrointestinais: Antiúlcera, tratamento de síndrome do intestino irritável.

Imunomoduladores: Imunossupressores, imunoestimulantes, tratamento de doença pulmonária crônica obstrutiva.

Desordens hormonais: Tratamento de hiperparatiroidismo, infertilidade, distúrbios de crescimento e tocolíticos.

Anti-inflamatórios: Inclui AINEs, tratamento de lúpus esritematoso sistêmico e tratamento de cicatrização.

Ainda, do total de 108 fármacos, 21 são considerados “fármacos órfãos”, que são fármacos destinados ao tratamento de condições raras. Essa informação reafirma o potencial de peptídeos em atuar em alvos difíceis para pequenas moléculas, bem como proteínas G-acopladas, enzimas bacterianas ou DNA.

3.3.6 Classificação dos fármacos peptídicos em vias de administração

Dos 108 fármacos peptídicos, 32 são de administração exclusivamente oral e 51 são de administração unicamente parenteral, o que corresponde à 83 (77%) dos fármacos em análise. (Figura 38). Ainda, são observadas outras vias de administração, como nasal, oftálmica, tópica e retal, sendo mais de uma via comum para muitos fármacos.

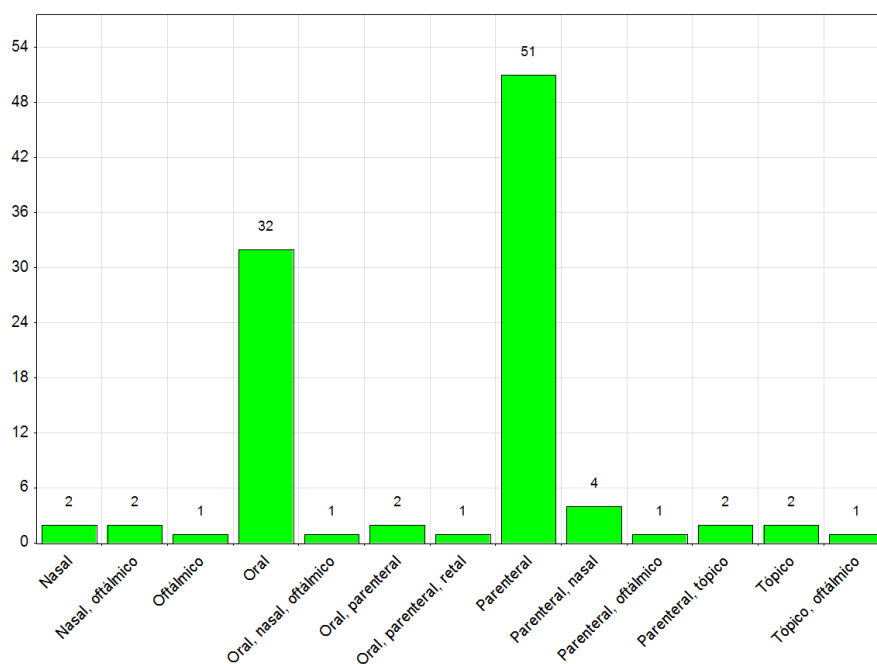


Figura 38. Distribuição dos fármacos peptídicos por via de administração.

A via de administração oral de peptídeos e proteínas pode levar a diferentes formas de absorção, são elas:

- Absorção intestinal transcelular - ativo e passivo: Estudos demonstraram que o mecanismo da absorção de peptídeos ocorre de forma ativa pela mucosa intestinal por sistemas de transporte específicos, diferentes dos que ocorrem para o transporte de aminoácidos.
- Absorção intestinal paracelular – O emprego de materiais poliméricos nessas partículas pode induzir a abertura das junções intersticiais entre as células intestinais, o que permite a absorção paracelular (Figura 39).⁹⁷

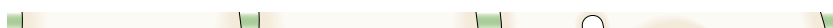


Figura 39. Representação esquemática da absorção intestinal de peptídeos: A: Transporte transcelular; B: Transporte paracelular; C: Transcitose e endocitose; D: Transporte mediado por células M (Adaptado de Goldberg et al).⁹⁷

A via de administração nasal de peptídeos e proteínas tem chamado atenção, principalmente para o transporte alternativo destes compostos para o cérebro. Algumas vantagens da administração nasal de peptídeos que atuam no CNS são o acesso direto dessas moléculas ao cérebro, sem ter que permear a BHE, a redução da exposição de outros órgãos e tecidos a essas moléculas causando efeitos sistêmicos e, por último, a redução do metabolismo dos peptídeos por enzimas plasmáticas, o que é uma desvantagem da administração intravenosa.⁹⁸ Além disso, o transporte nasal de peptídeos e proteínas ocorre

principalmente por via paracelular e transcelular, portanto, não necessariamente apresentam propriedades estabelecidas por Lipinski.

Ainda, quando observamos a distribuição das vias de administração em peptídeos cíclicos ou lineares (Figura 40), nota-se que os peptídeos cíclicos apresentam 56,7% de administração exclusivamente parenteral, enquanto que nos lineares 46,1% apresentam essa via de administração. Dos cíclicos, 21,6% apresenta via de administração exclusivamente oral, enquanto que para os lineares essa relação é de 36,9%. Estes dados desmistificam a ideia de que fármacos lineares apresentam menor propensão à administração por via oral.

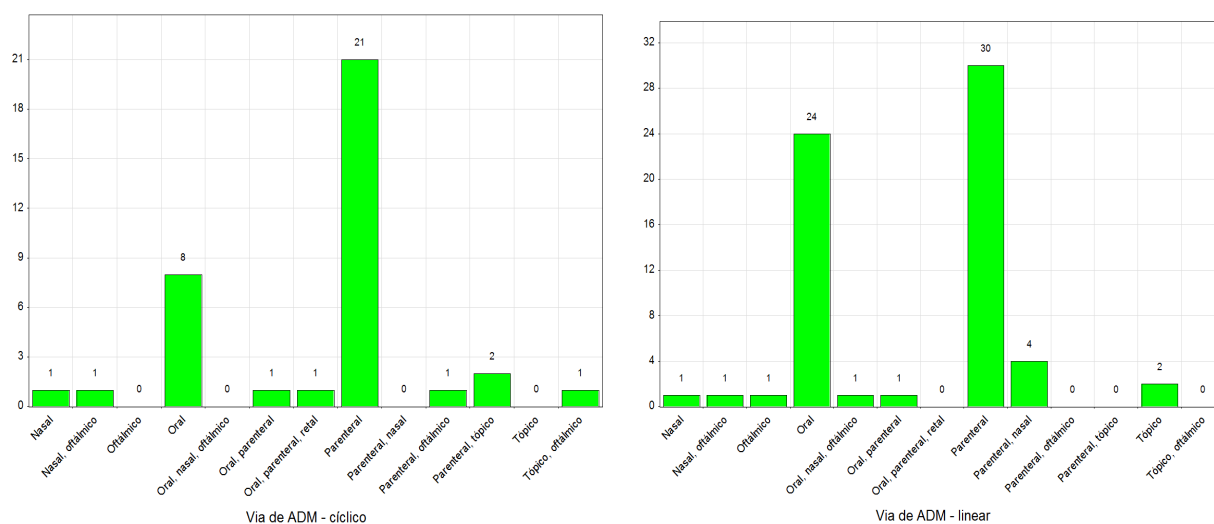


Figura 40. Vias de administração distribuídas entre fármacos cíclicos (esquerda) e lineares (direita).

Realizamos também a distribuição dos fármacos por via de administração, correlacionado-nas com as classes terapêuticas. Nota-se que os fármacos lineares (Figura 41), são amplamente distribuídos entre diversas classes, com maior ocorrência de hematorreguladores (13), oncológicos (13), imunomodulatórios (10) e fármacos que atuam no SCN (8). As vias de administração de hematorregulares, se divide principalmente em orais e parenterais, bem como para oncológicos. Interessantemente, os fármacos cíclicos (Figura 42) são principalmente antibióticos (18), seguido de fármacos oncológicos (6). As vias de administração de antibióticos cíclicos é principalmente parenteral e o mesmo é observado para oncológicos cíclicos. É importante destacar que existe um consenso de que peptídeos cíclicos são mais facilmente absorvidos por via oral, porém a comparação entre os gráficos

nos permite concluir que entre os peptídeos orais, apenas 21% é administrado por via oral, enquanto que entre os lineares este percentual é de 43%.

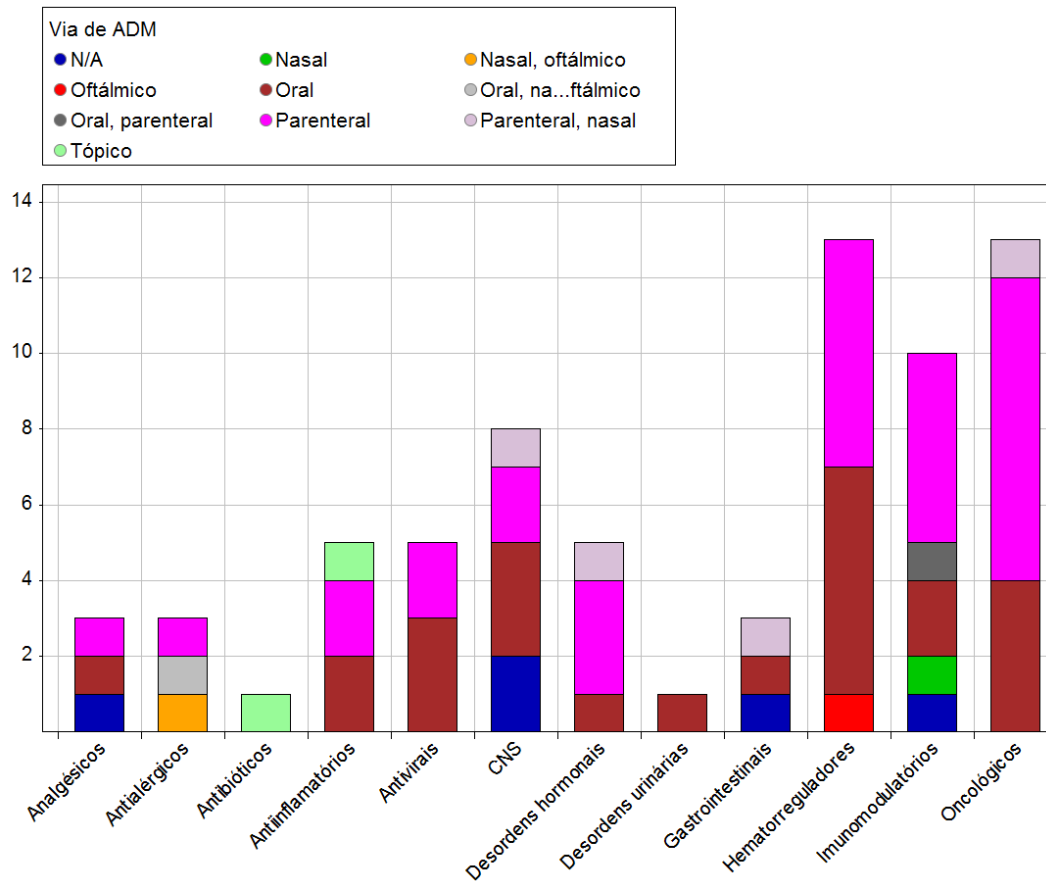


Figura 41. Fármacos lineares e sua distribuição terapêutica relacionada à via de administração.

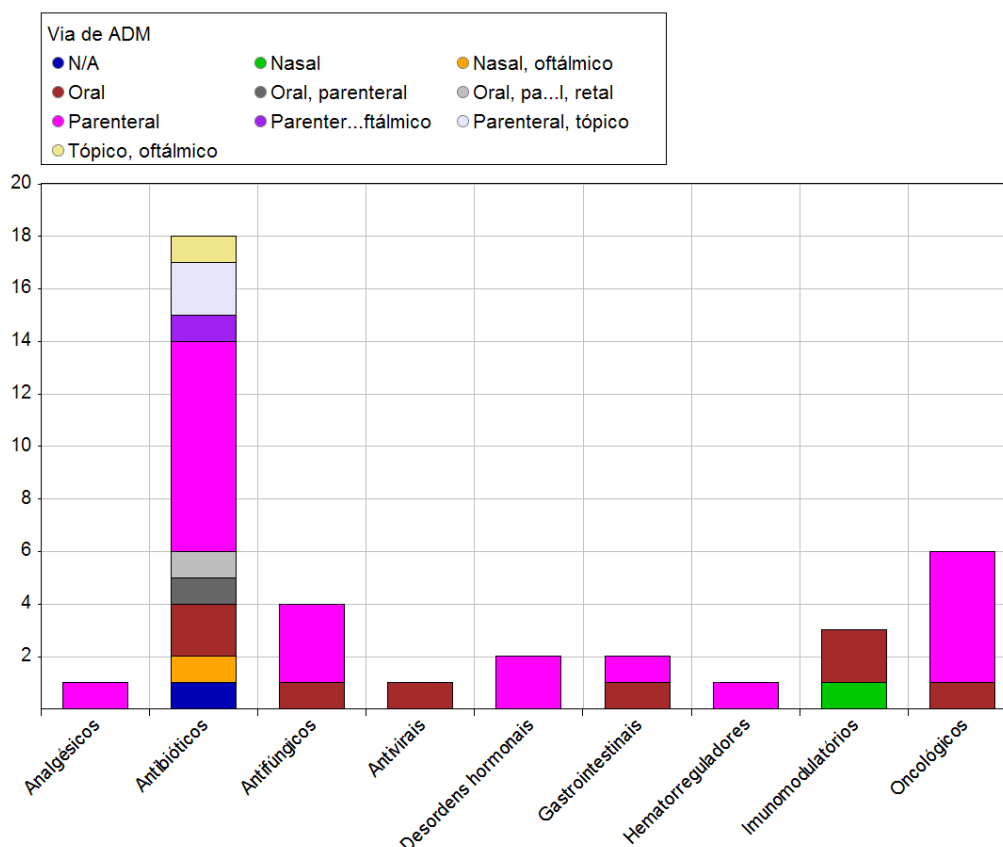


Figura 42. Fármacos cíclicos e sua distribuição farmacológica relacionada à via de administração.

3.3.7 Classificação das propriedades estruturais

Do ponto de vista estrutural, peptídeos apresentam ampla distribuição e esta análise comprova que o tamanho e complexidade não prejudicaram seu acesso à clínica. Por exemplo, o antiviral tifuvirtide apresenta 43 aminoácidos, o antibiótico gramicidin D com 32 aminoácidos e o analgésico zigonotide com 27 aminoácidos, demonstram a ampla distribuição terapêutica e estrutural dos peptídeos no mercado. Na figura 43, observamos ainda que 53 (49%) dos fármacos peptídicos apresentam de 2-5 aminoácidos, e 33 (30,5%) apresentam de 5-10 aminoácidos. Juntos, correspondem a 80% dos fármacos peptídicos. Considerando que cada resíduo contribui em média com 110 Da no peso molecular, concluímos que 80% dos fármacos apresentam PM <1100 Da.

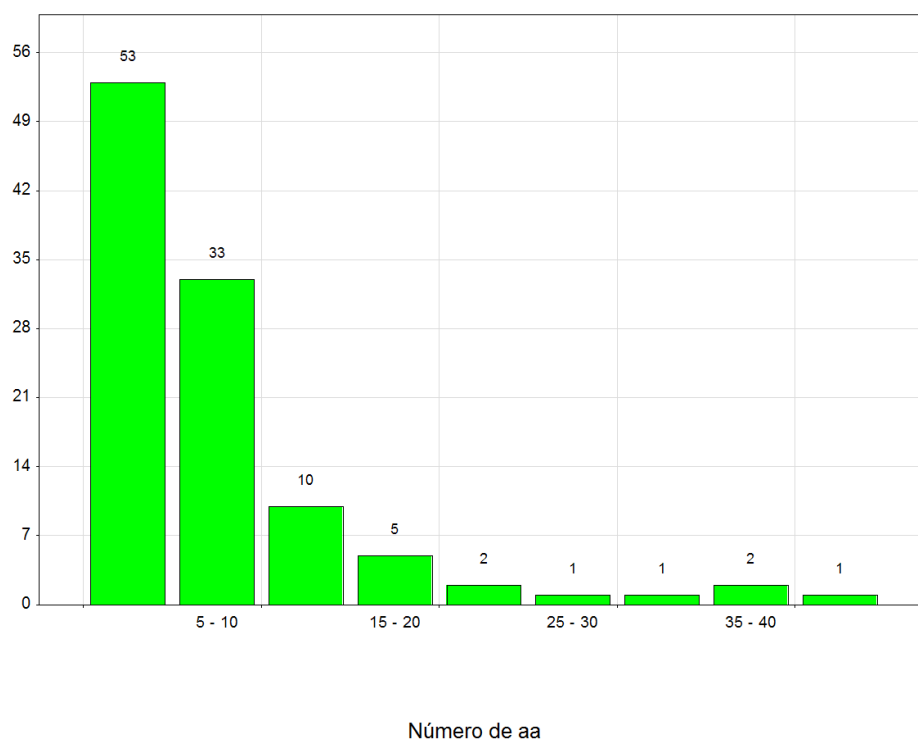


Figura 43. Distribuição dos fármacos peptídicos por número de aminoácidos.

3.3.8 Correlação entre peptídeos lineares Vs cíclicos e Propriedades Físico-Químicas

Como já observado, peptídeos cíclicos correspondem a 35% das moléculas em estudo, enquanto peptídeos lineares contribuem com 65% do total. Quando distribuimos essas moléculas em suas propriedades físico-químicas e estruturais, observamos que peptídeos cíclicos e lineares apresentam ampla distribuição em termos de LogP e PM, como evidenciado na figura 44. Entretanto, nas faixas de até 1800 Da e LogP -10 até 0, observamos maior concentração dessas moléculas. É interessante notar que os peptídeos cíclicos não apresentam maiores valores de lipofilicidade, conforme esperado.

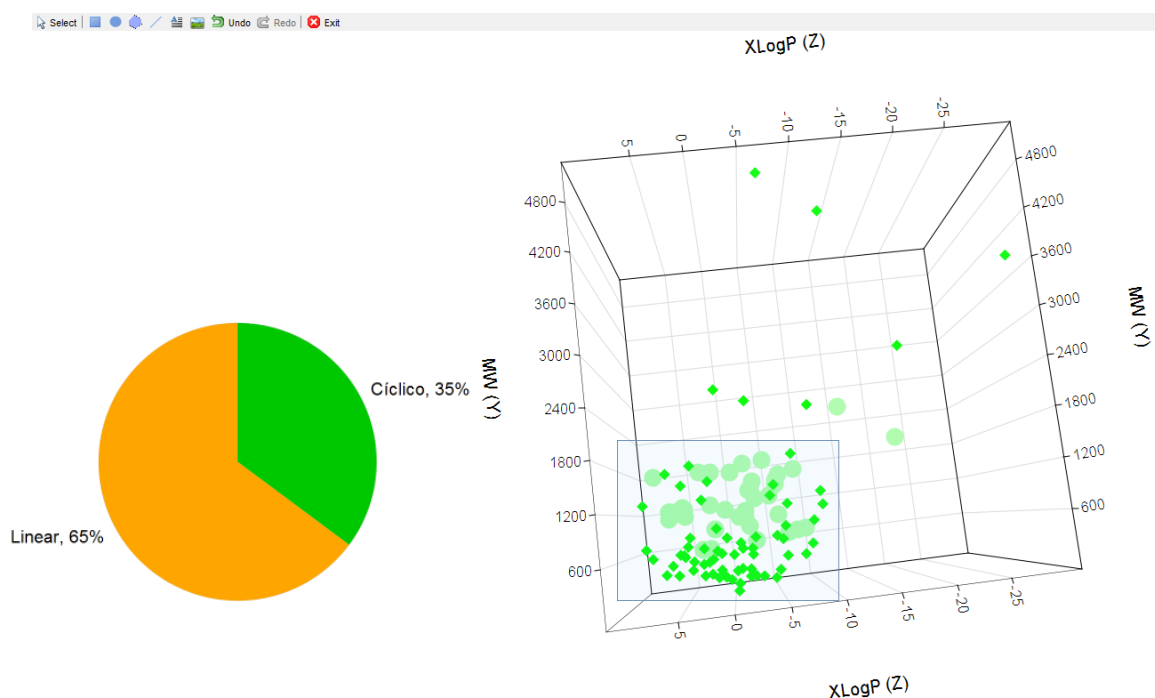


Figura 44. **Esquerda:** Gráfico evidenciando a divisão entre fármacos lineares e cíclicos. **Direita:** Correlação entre fármacos lineares (losângulo) e cíclicos (círculo) e sua distribuição em termos de PM e LogP.

Realizamos também a correlação entre classes terapêuticas com a distribuição entre fármacos lineares e cíclicos. Uma informação que chama atenção é a expressiva porcentagem (95%) de peptídicos antibióticos com estrutura cíclica e apenas 5% de antibióticos lineares. Ainda, fármacos antifúngicos são exclusivamente cíclicos, o pode estar relacionado com a capacidade de peptídeos cíclicos apresentam em permear células não humanas. Em contrapartida, fármacos que atuam no SNC, fármacos anti-inflamatórios e antialérgicos são exclusivamente lineares. Adicionalmente, hematorreguladores e imunomodulatórios são em grande parte lineares (Figura 45). Como os alvos moleculares para essas enfermidades normalmente se encontram no ambiente extracelular, os peptídeos lineares conseguem alcança-los sem a necessidade de permear membranas.

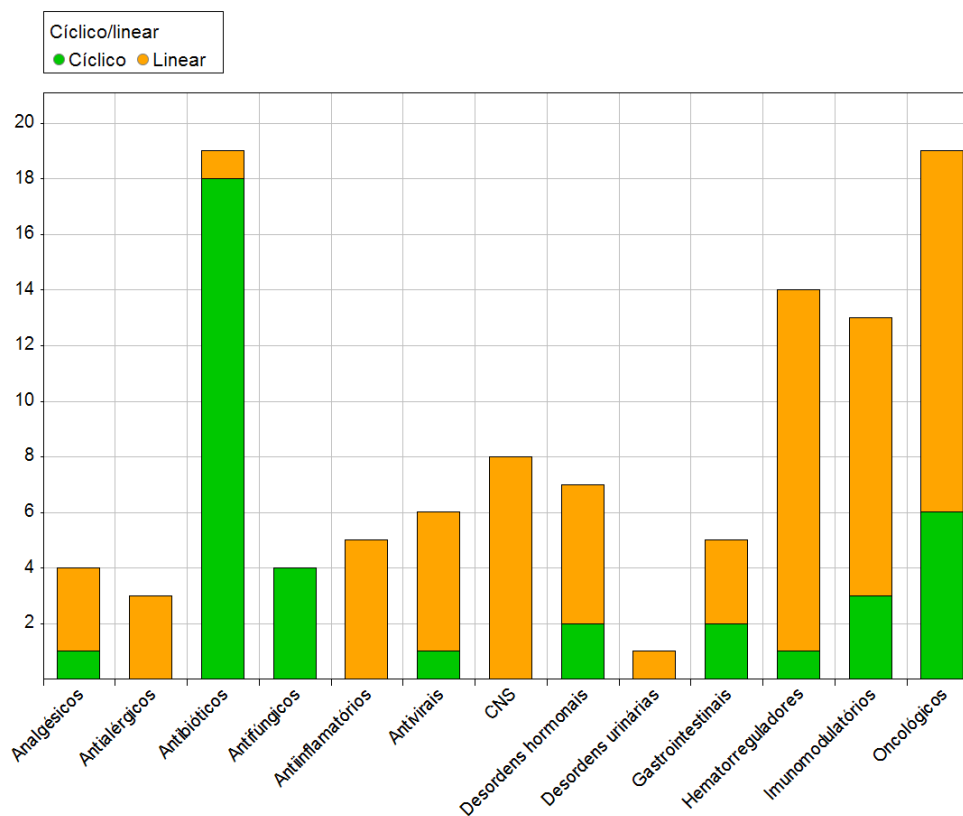


Figura 45. Distribuição dos fármacos peptídicos entre cíclicos (verde) e lineares (laranja) dentro das diferentes classes terapêuticas.

O potencial antibiótico de peptídeos cíclicos contendo D,L- α -aminoácidos é destacada por diversos autores, que afirmam que a estrutura plana e cíclica tem a capacidade de se organizar em nanotubos na membrana de bactérias, levando à lise celular (Figura 46).³

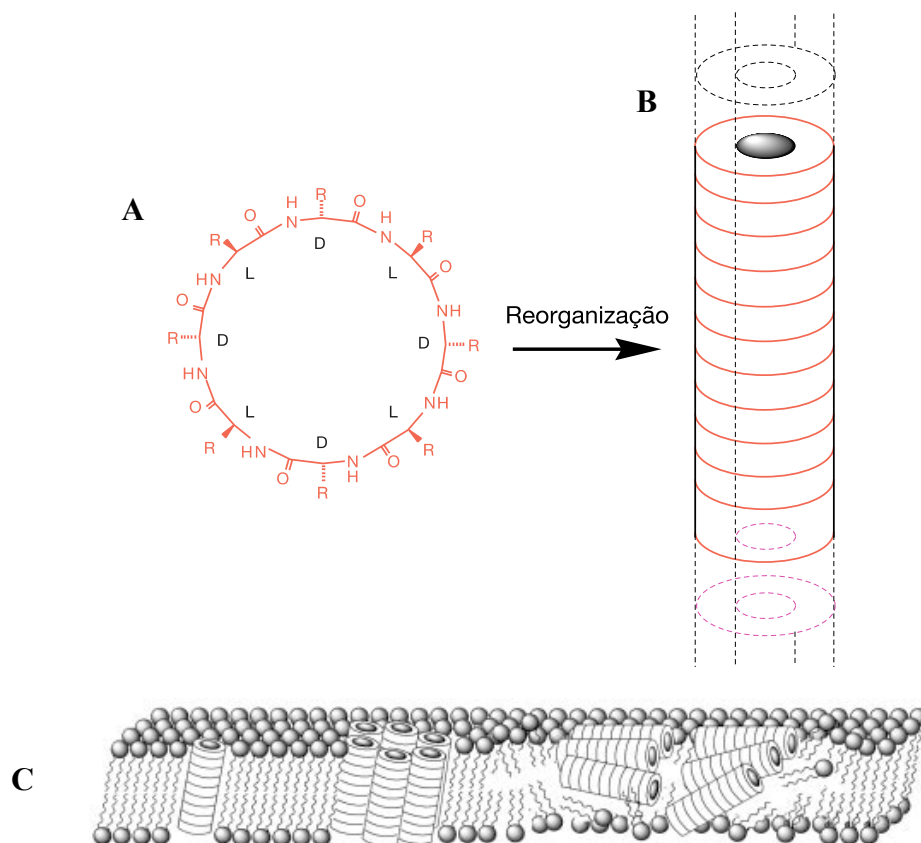


Figura 46. **A**: Peptídeo cíclico com aminoácidos em configuração D e L alternados; **B**: Representação da organização dos peptídeos em túbulos ocios; **C**: Formação de poros na membrana bacteriana pela à inserção dos túbulos de peptídeo (Adaptado de Fernandez-Lopez et al).³

3.3.9 Propriedades Químicas Vs Administração oral

Como destacado no item anterior, dos 108 compostos que classificamos como fármacos peptídicos, apenas 35 apresentam administração por via oral. Isso se deve principalmente à rápida metabolização por proteólise dessas moléculas, levando a curto tempo de meia vida e rápida depuração renal.⁹⁹

A avaliação das propriedades físico-químicas e estruturais dos peptídeos orais demonstrou ampla distribuição de suas propriedades químicas, e também a disparidade entre estas propriedades e os filtros estabelecidos para triagem de pequenas moléculas visando biodisponibilidade oral. Para ilustrar essa constatação, realizamos a correlação entre os descritores mais utilizados para triagem de compostos com biodisponibilidade oral e a distribuição de peptídeos orais e não-orais.

Na figura 47A, relacionamos o peso molecular (PM) e lipofilicidade (LogP) de fármacos administrados por via oral e não-oral. A partir dessa análise, notamos que a grande

maioria de fármacos orais (azul) estão distribuídos em um intervalo de PM de 200 a 1400 Da, e LogP entre -8 e 8.

Na figura 47B é possível observar a correlação entre número de grupos aceptores e doadores de ligação de hidrogênio com a distribuição de fármacos orais e não-orais. Nessa análise observamos que a maior parte dos fármacos orais estão concentrados em faixa de até 32 HBA e até 15 HBD, exatamente 3 vezes maior estabelecido por Lipinski para pequenas moléculas.

Outros descritores que avaliam a chance de um fármaco apresentar biodisponibilidade oral incluem o número de ligações rotacionais, área de superfície polar e fração de carbono sp^3 . Esses descritores levam em consideração a flexibilidade de uma molécula, e a relação diretamente proporcional entre a flexibilidade e a dificuldade do fármaco em permear membranas de forma passiva. Já foi descrito anteriormente por Veber e colaboradores a propriedade indesejada de complexação de água com o grupo funcional amida e o impacto negativo na biodisponibilidade oral e na permeação pelas membranas.¹⁰⁰ Neste mesmo trabalho, Veber e colaboradores estabeleceram que um bom candidato à biodisponibilidade por via oral deveria apresentar número de ligações rotacionais inferior a 10 (NRB<10). Ainda, tomados em conjunto, a fração de aromaticidade (Ar/HA), a fração de carbono sp^3 (Fsp3) e a presença de carbono quirais sugerem que quanto menor a planaridade e maior tridimensionalidade maior a probabilidade de “drugability” de um candidato fármaco.¹⁰¹ Compostos com Fsp3 em uma média de 0,47 são mais susceptíveis de serem absorvidos oralmente. Assim, a partir desta análise, foi avaliada a correlação entre o Fsp3 e o NRB, e nossos dados revelaram que a maior concentração de drogas por via oral disponíveis depende até 20 títulos rotativos e Fsp3 uma média igual a 0,55 (Figura 47C). A Fsp3 é o único descritor que se assemelha ao parâmetro obtidos anteriormente por Veber para pequenas moléculas orais.

Ainda, Veber e co-autores observaram que fármacos orais apresentam área de superfície polar menor que 140 \AA^2 (PSA< 140 \AA^2). No entanto, em nosso estudo a correlação entre PM vs PSA revelou que entre peptídeos, a maior parte dos fármacos orais (azul) se concentra em até 400 \AA^2 (Figura 47D).

Essa amplitude de valores nos principais descritores é uma das explicações que tem permitido a peptídeos a acessar e modular alvos considerados difíceis para pequenas

moléculas, como alvos intracelulares bacterianos, modular proteínas G-acopladas ou interagir com DNA.

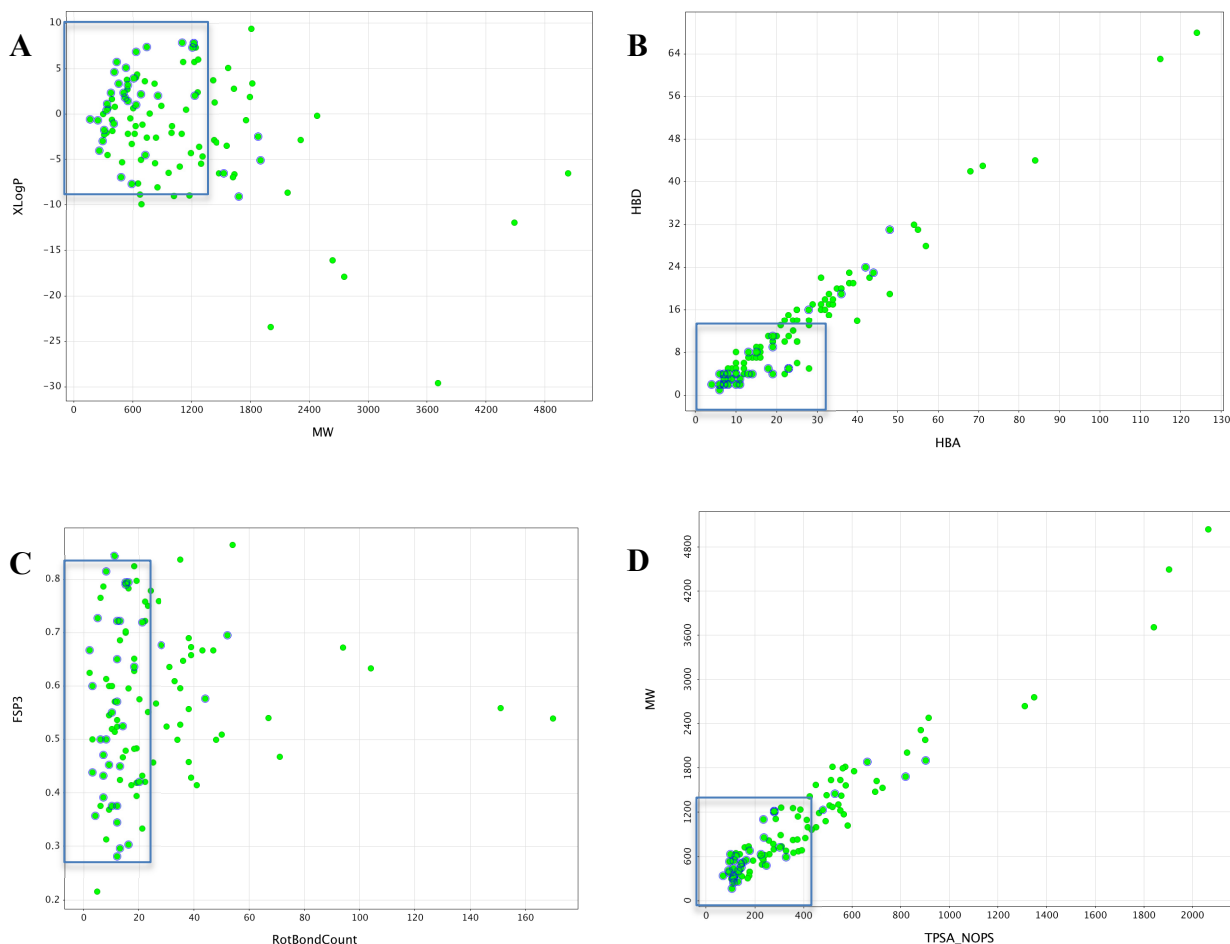


Figura 47. Gráficos de relação entre A: PM e Log P; B: HBA e HBD; C: Fsp3 e NRB; D: TPSA e PM com destaque para distribuição dos fármacos peptídicos não-orais (verde) e orais (azul).

A fim de gerar valores limites para cada descritor, calculamos o percentil 80^o, 90^o e 95^o dos principais descritores utilizados como filtros para biodisponibilidade oral de fármacos (Tabela 3). Esta análise demonstrou que os peptídeos orais diferem de pequenas moléculas orais, em todas as propriedades, com destaque para o TPSA, com o percentil 90^o de 596,4, valor 4,3 vezes maior do que o descrito por Veber. Já os valores de HBA, HBD, NRB e PM aumentaram em aproximadamente 2 vezes comparado aos valores já estabelecidos para esses descritores. Essas informações reafirmam que fármacos peptídicos ocupam espaço químico

particular, e os coloca entre pequenas moléculas e fármacos biológicos. Portanto, o emprego de filtros convencionais para triagem de pequenas moléculas não se aplicam necessariamente a potenciais fármacos peptídicos orais.

Tabela 3. Propriedades calculadas dos principais descritores físico-químicos de fármacos orais e os respectivos percentis 80^o, 90^o e 95^o.

Descritor	80^o	90^o	95^o
PM	1216,64	1487,99	1731,33
TPSA	301,3	596,4	749,1
Fsp3	0,722	0,792	0,799
NRB	16	20,5	32
LogP	5,12	7,36	7,80
HBA	23	34,5	42,5
HBD	9	19	23,2

3.3.10 Estudo comparativo das propriedades físico-químicas dos alvos desse estudo e peptídeos orais

Diante dos resultados do estudo das análises físico-químicas de peptídeos administrados por via oral, decidimos aplicar as mesmas análises para os alvos desse estudo. Dessa forma, é possível avaliar a possibilidade de administração oral dessas moléculas, de acordo com os novos parâmetros que estabelecemos para estruturas peptídicas nesse estudo.

Empregamos o software Vortex(r) para calcular as propriedades: PM, LogP, HBA, HBD, número de ligações rotacionáveis, TPSA, Fsp3 dos alvos chaiyaphumine A, desotamide B, cyclozatoxilano A e rufomicina B, e os valores obtidos são mostrados na tabela 4.

Tabela 4. Propriedades calculadas dos peptídeos alvos desse estudo.

Peptídeo	PM	XLogP	HBA	HBD	TPSA	NRB	Fsp ³
<i>Média dos Peptídeos orais</i>	<i>1068,7</i>	<i>-1,56</i>	<i>24,7</i>	<i>12,4</i>	<i>407,74</i>	<i>24,4</i>	<i>0,571</i>
Chaiyaphumine A	720,81	4,09	13	5	178,8	7	0,35
Ciclozantoxilano A	459,54	0,41	10	5	145,5	4	0,522
Desotamide B	682,81	1,45	15	8	233,5	9	0,559
Rufomicina B	1012,24	8,22	19	6	254,4	15	0,537

Chaiyaphumine A apresenta valores de LogP= 4,09, HBD= 5, NRB= 7 e Fsp³= 0,35, que a coloca como possível molécula administrada por via oral, de acordo com os parâmetros já estabelecidos por Lipinski e Veber. Entretanto, os valores de PM=720,81, HBD=13 e TPSA=178,8, o colocam fora desses parâmetros. Ainda assim, todos esses valores se encontram dentro do percentil 90^o dos valores que observamos para peptídeos disponíveis por via oral. Similarmente, desotamide B e rufomicina B apresentaram valores, para alguns dos descritores, fora da faixa estabelecida, porém ainda dentro dos valores adequados de acordo com nosso estudo. Rufomicina B, como esperado, apresenta alto valor de LogP, (LogP=8,22), uma vez que possui em sua estrutura aminoácido *N*-metil-leucina, nitrogênio indólico alquilado e glicina modificada com grupo hidrofóbico.

Ciclozantoxilano A apresentou todas as propriedades, incluindo TPSA e NRB dentro dos valores adequados de acordo com os parâmetros vigentes. Apenas o descritor Fsp³ apresentou valor acima da faixa adequada (0,522), mas ainda dentro do percentil 90^o obtido nesse estudo.

É possível observar que apesar da violação da regra de Lipinski por todos os alvos, com exceção do ciclozantoxilano A, esses compostos ainda se encontram dentro das faixas observadas para o espaço químico de peptídeos administrados por via oral.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Os blocos de construção para síntese da rufomicina B, Fmoc-*N*-metil-L-Leucina e Fmoc-L-crotil-glicina foram obtidos em rendimentos satisfatórios para realização da síntese do peptídeo natural.

Para síntese da chaiyaphumine A foi realizada a síntese do aminoácido modificado (2-fenilacetil)-L-treonina **5** em bons rendimentos, e a síntese do produto natural e análogos está sendo estudada sob diferentes metodologias uma vez que a síntese em fase sólida com emprego da resina “safety-catch” não forneceu o peptídeo desejado. A síntese em solução tem se mostrado uma estratégia promissora, permitindo obter os dois fragmentos principais para a síntese do primeiro análogo “alanina scan” da chaiyaphumine A. Diante dos insucessos para formação da ligação éster do depsipeptídeo, uma nova estratégia foi adotada para formação do peptídeo linear e macrolactonização em solução.

A síntese de desotamida B e ciclozantoxilano A se mostraram viáveis em fase sólida com ciclização em solução. Ainda, a síntese de desotamida B pode ser realizada também pela estratégia “safety-catch”.

Através da análise sistemática dos peptídeos no mercado, observamos novo perfil físico químico de peptídeos orais em comparação aos filtros já empregados para pequenas moléculas.

5. EXPERIMENTAL

Nesta seção serão detalhados os procedimentos sintéticos no qual os compostos com estrutura química elucidada foram obtidos com melhores rendimentos. Os dados espectroscópicos também estão descritos.

5.1 Síntese

5.1.1 Procedimentos gerais

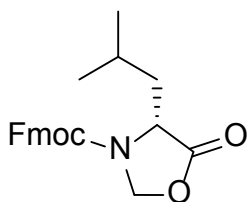
Os procedimentos sintéticos em solução foram realizados em balões de vidro sob agitação com barras magnéticas, utilizando solventes e reagentes obtidos comercialmente. O monitoramento das reações foi realizado por cromatografia em camada delgada (CCD) com visualização sob luz ultravioleta, e evaporação de solventes foi realizada em evaporadores rotatórios a temperaturas entre 40 e 50°.

As reações em fase sólida foram realizadas em frasco cilíndrico, com placa sinterizada para filtração e torneira de 3 saídas na parte inferior para agitação da mistura reacional através de borbulhamento de ar comprimido.

A estrutura dos produtos foi confirmada por métodos espectroscópicos e espectrométricos. As análises realizadas incluem espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H (300, 400, 500 ou 600 MHz) e de ^{13}C (75 ou 101 MHz). Foram utilizados ainda métodos de espectrometria de massas da baixa resolução (LRMS) e/ou de alta resolução (HRMS), com ionização por elétrons (EI), por eletrospray (ESI) ou MALDI-TOF.

5.1.2 Síntese e descrição espectroscópica

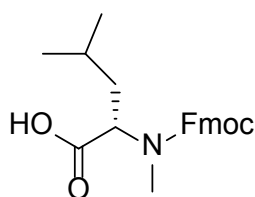
Síntese de **1**



A uma suspensão de Fmoc-L-Leucina (2g, 5,66 mmol) em 20 mL de tolueno, foi adicionado formaldeído (1 mL – 0,033 mmol) e ácido *para*-tolueno sulfônico (100 mg, 0,581

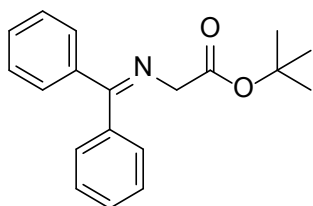
mmol). A reação foi mantida em refluxo à 125°C por 1 hora. O conteúdo reacional foi lavado com NaHCO₃ e extraído com acetato de etila (3x). A solução foi mantida com Na₂SO₄, filtrada e o solvente eliminado sob pressão reduzida. O resíduo formado foi suspenso em acetato de etila e o solvente foi eliminado sob pressão para fornecer um óleo utilizado na etapa seguinte sem purificação.

Síntese de 2



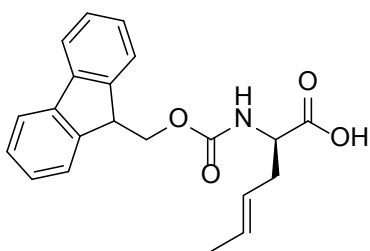
A uma solução da oxazolidina (2,835g, 7,7mmol) em 7 mL de clorofórmio foi adicionado TFA (7,31 mL, 0,3677 mol) e trietilsilano (2,697 mL, 0,16 mmol). A mistura reacional foi agitada em temperatura ambiente por 24 horas. Ao final desse período, o solvente eliminado sob pressão reduzida em rotaevaporador, com a formação de um óleo, solubilizado em CH₂Cl₂ e reconcentrado 3 vezes. Os cristais formados foram solubilizados em éter, concentrados e novamente lavados com 5% de éter em hexano. O produto foi purificado em coluna “flash” (1:1, AcOEt:Hex), formando o composto desejado. Sólido amarelado, 70%. ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz): δ 7,79-7,74 (m, 2H) 7,61-7,55 (m, 2H), 7,43-7,36 (m, 2H), 7,34-7,29 (m, 2H), 4,96 (m, 0,6H), 4,61 (m, 0,4H), 4,46 (m, 2H), , 4,29 (t, 0,6H), 4,23 (t, 0,4 H), 2,89 (s, 2H), 2,86 (s, 1H), 1,78 (m, 1H), 1,55 (m, 2H), , 0,96 (m, 4H), 0,90 (d, J=, 1H), 0,76 (d, J=, 1H). ¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz): δ 177,48, 157,17, 156,53, 144,03, 143,89, 141,41, 127,78, 127,14, 125,13, 124,81, 120,05, 67,87, 67,27, 56,75, 56,41, 47,33, 37,56, 37,25, 30,61, 30,44, 24,92, 24,72, 23,32, 23,13, 21,32. IES-EM (m/z): calculado para C₂₂H₂₅NO₄Na [M+Na]⁺: 390,1681 encontrado: 390,1693.

Síntese de 3



Uma solução de acetato de 2 bromo *tert*-butila (2,75 mmol, 660 μ L), benzofenona imina (2,75 mmol, 580 μ L) e diisopropiletilamina (2,75 mmol, 480 μ L) em 3 mL de acetonitrila foi agitada sob refluxo por 24 horas. Ao final da reação, observado por cromatografia em camada delgada, o solvente foi eliminado em vácuo e o resíduo solubilizado em éter etílico e lavado com água. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio, filtrada e o solvente eliminado em vácuo fornecendo o produto desejado **3**. Sólido branco, 90%. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7,64-7,48 (m, 2H), 7,46-7,44 (m, 3H), 7,38-7,30 (m, 3H), 7,19-7,16 (m, 2H), 4,12 (s, 2H), 1,46 (s, 9H).

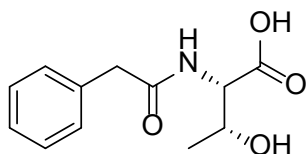
Síntese de 4



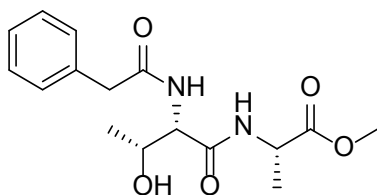
Uma suspensão de brometo de dimetilalila (0,347 mmol, 300 μ L) e brometo O-Alilil-N-(9-antracênilmetil) cinchonidinium (0,034 mmol, 20 mg) em solução aquosa 50% KOH (5 mL) foi adicionada a uma solução de **3** (1 eq, 0.34 mmol, 100 mg) em tolueno (10 mL) à 0°C. A mistura foi agitada por 6 horas à 0°C e por mais 20 horas à temperatura ambiente. Ao final da reação, a mistura foi vertida em água e extraída com hexano (3x), seca com Mg_2SO_4 , filtrada e evaporada em vácuo, fornecendo um óleo amarelo empregado na etapa seguinte sem purificação. O composto alquilado formado (1g, 1,98 mmol) foi solubilizado em THF (10 mL) e tratado com solução de ácido cítrico 10% (10 mL) por 3 horas. Ao final da reação, observado por CCDC, a mistura foi neutralizada com NaHCO_3 (5,96 mmol, 507 mg), tratada

com Fmoc-Cl (3,87 mmol, 1 g) e a solução foi agitada por 4 horas. Ao final da reação, a mistura foi vertida em água (30 mL), extraída com acetato de etila (3x) e seca com Mg_2SO_4 . O solvente foi removido sob pressão reduzida e o óleo formado foi tratado com solução de TFA/DCM 50% (10 mL) por 24 horas à temperatura ambiente. Após eliminação do solvente sob pressão reduzida, o produto foi purificado por precipitação em éter etílico, fornecendo um sólido branco. 60%. 1H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 7,31-7,77 (m, 8H), 5,59 (m, 1H), 5,26-5,36 (m, 2H), 4,42 (m, 3H), 4,24 (m, 1H), 2,54 (m, 2H), 1,68 (m, 3H). Rotação ótica +8,2° (Conc: 0,2g/100 mL; DMC; Comprimento de onda: 589,3 nm; Temperatura: 25°C).

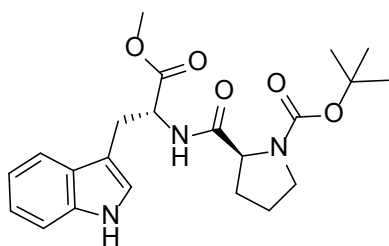
Síntese de 5



A uma solução de L-treonina (4,2 mmol, 500 mg) em solução aquosa 1 M de NaOH à 0°C foi adicionado ácido fenil acético (5,4 mmol, 722 μ L). A reação foi mantida por 1 hora à 0°C e 18 horas à temperatura ambiente sob constante agitação. Após este período, a mistura reacional foi extraída com acetato de etila, lavada com solução 2 M de HCl e extraída com acetato de etila (3x). A combinação das fases orgânicas foi seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada e evaporada. O sólido amarelo formado foi lavado com éter etílico, fornecendo o composto **5**. Sólido branco, 78%. 1H RMN (400 MHz, DMSO) δ 12,50 (*sl*, 1H, COOH), 8,01 (d, $J=9,50$ Hz, 1H, NH), 7,20-7,29 (m, 5H, Ar), 4,92 (*sl*, 1H, OH), 4,22 (dd, $J=3,6; 8,8$ Hz, $CHCOOH$), 4,12 (m, CH_3CHOH), 3,61 (d, $J=14,2$ Hz, CH_2Ar), 3,54 (d, $J=14,2$ Hz, CH_2Ar), 1,02 (d, $J=6,3$ Hz, 3H, CH_3).

Síntese de **12**

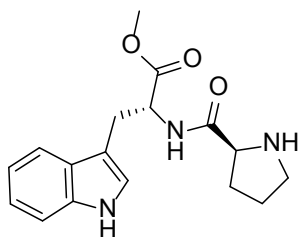
A uma solução do composto **5** (2 mmol, 474 mg) em diclorometano anidro (10 mL) foi adicionado metil éster-D-Ala (2,4 mmol, 334 mg), EDCI (2,4 mmol, 372 mg), HOBt (0,6 mmol, 80mg) e DIPEA (4 mmol, 696 μ L) e mantida sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. A mistura reacional foi lavada com 2 M HCl e extraída com diclorometano e a fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaHCO₃. A fase orgânica foi seca com Mg₂SO₄, filtrada e o solvente foi eliminado sob pressão reduzida em rotaevaporador, fornecendo **12**. Sólido amorfo amarelo, 75%. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,17-7,27 (m, 5H, Ar), 6,43 (m, 1H, NH), 4,49 (m, 1H), 4,03-4,26 (m, 1H), 3,64 (m, 3H), 3,50-3,56 (m, 2H), 1,93 (s, 1H), 0,85 (m, 1H), 1,28 (m, 3H), 0,84-1,17 (m, 3H).

Síntese de **13**

Uma solução de metil éster-L-Trp (2 mmol, 510 mg) em diclorometano (10 mL) foi tratada com Boc-L-Pro (2,4 mmol, 517 mg), EDCI (2,4 mmol, 372 mg), HOBt (0,6 mmol, 80 mg) e DIPEA (4 mmol, 696 μ L). A reação foi mantida por 24 horas em temperatura ambiente em constante agitação. Após este período, o conteúdo reacional foi lavado com solução 2 M de HCl e a fase orgânica coletada foi lavada com solução saturada de NaHCO₃, filtrada e o solvente eliminado sob pressão reduzida, fornecendo o dipeptídeo **13**. Sólido amorfo branco, 89%. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,27 (*dl*, 1H, H-1'), 7,54 (d, 1H, *J*=7,5 Hz, 1H, H-4'), 7,34 (d, *J*=7,5 Hz, 1H, H=7'), 7,01-7,20 (m, 3H, H-2', H-5', H-6'), 6,52 (*sl*, 1H, NH), 4,90 (*sl*, 1H, CHCH₂), 4,19-4,33 (m, 1H, NCHCO), 3,63 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,22-3,47 (m, 4H,

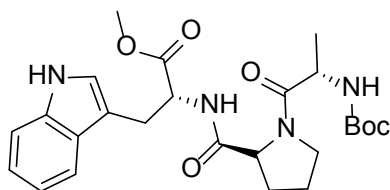
$NCH_2CH_2CH_2$), 2,06-2,24 (m, 2H, $NCH_2CH_2CH_2$), 1,81 (*sl*, 2H, $NCH_2CH_2CH_2$), 1,34-1,45 (m, 9H, $C(CH_3)_3$).

Síntese de **14**



A uma solução 4 M HCl em dioxano anidro (10 mL) foi adicionado o composto **13** (1,78 mmol, 740 mg) à 0°C. Após adição, a reação foi aquecida até temperatura ambiente e mantida sob agitação por 4 horas. Após este período, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo formado lavado com acetonitrila (3x) e diclorometano (3x) e evaporado. O filtrado formado foi seco em alto vácuo fornecendo sólido branco amorfo com 96% de rendimento que foi utilizado na etapa seguinte sem caracterização.

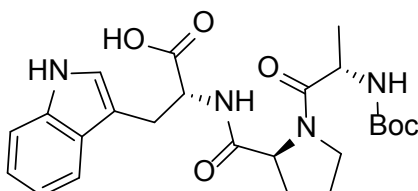
Síntese de **15**



Uma solução do composto **14** (2 mmol, 756 mg) em diclorometano (10 mL) foi tratada com Boc-D-Ala (2,4 mmol, 543 mg), EDCI (2,4 mmol, 372 mg) e HOBT (0,6 mmol, 80 mg) e DIPEA (4 mmol, 696 μ L). A reação foi mantida em temperatura ambiente por 24 horas e a mistura reacional foi lavada com solução 2 M HCl e solução saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi seca com Mg_2SO_4 , filtrada e o solvente eliminado sob pressão reduzida. O resíduo formado foi seco em alto vácuo fornecendo o composto **15**. Sólido amorfo amarelo, 89%. 1H NMR ($CDCl_3$) δ 8,46 (*sl*, 1H), 7,35-7,19 (m, 2H), 6,94-7,16 (m,

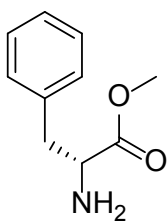
3H), 5,29-5,45 (m, 1H), 4,80 (*sl*, 1H), 4,55-4,64 (m, 1H), 3,65-3,73 (m, 4H), 3,24-3,39 (m, 3H), 2,26 (*sl*, 2H), 1,73-1,93 (m, 4H), 1,44 (s, 9H), 1,30 (*sl*, 3H).

Síntese de **16**

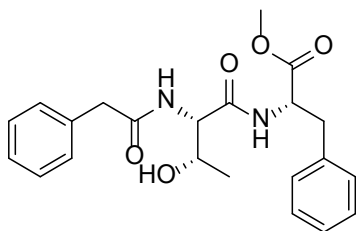


Uma solução do composto **15** (1,79 mmol, 873 mg) em THF/H₂O 3:1 (12 mL) à 0°C foi tratada com LiOH (5,37 mmol, 129 mg) e mantida sob agitação por 3 horas. Após este período, a mistura reacional foi diluída com água (10 mL) e o pH foi trazido à 2 com solução 2 M HCl. A mistura foi extraída com acetato de etila (3x), seca com Mg₂SO₄, filtrada e o solvente foi eliminado sob pressão reduzida. O resíduo formado foi seco em alto vácuo fornecendo **16**. Sólido amorfo amarelo, 90%. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,62 (*sl*, 1H), 6,97-7,56 (m, 5H), 5,57 (*sl*, 1H), 4,78 (m, 1H), 4,44 (s, 1H), 4,13 (m, 2H), 3,56-3,76 (m, 1H), 3,31 (m, 2H), 2,05-2,09 (m, 4H), 1,95 (m, 2H), 1,42 (*sl*, 9H), 1,27 (*sl*, 3H).

Síntese de **17**



Uma solução de D-Phe-OH (5,58 mmol, 1g) em metanol anidro (7 mL) foi tratada com (27,9 mmol, 2 mL) de cloreto de tionila previamente tratado e a reação foi mantida à 0°C por 24 horas em atmosfera de nitrogênio. Ao final da reação, o solvente foi eliminado sob pressão reduzida e o sólido formado foi suspenso em metanol e evaporado (3x), fornecendo o composto desejado **17**. Sólido amorfo branco, 95%. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 7,24-7,39 (m, 5H), 4,31 (m, 1H), 3,80 (s, 3H), 3,13-3,25 (m, 2H).

Síntese de **18**

À uma solução de **5** (1,8 mmol, 427 mg), PyBOP (1,8 mmol, 936 mg) e DIPEA (2 mmol, 313 μ L) em diclorometano (10 mL), foi adicionado **17** (1,5 mmol, 268,83 mg) e a reação foi mantida sob agitação por 2 horas. Ao final da reação, observado por CCDC, a mistura reacional foi lavada com solução aquosa HCl 2M e solução saturada de NaHCO₃. A fase orgânica foi seca com Mg₂SO₄ anidro, filtrada e o solvente eliminado sob pressão reduzida. O sólido formado foi purificado em cromatografia “flash” fornecendo **18**. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,15-7,31 (m, 10H), 4,67 (m, 1H), 4,29 (m, 1H), 4,03 (m, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,60 (d, $J=5$ Hz, 2H), 3,16 (m, 1H), 3,02 (m, 1H), 1,30 (s, 2H), 0,99 (d, $J=10$ Hz, 3H).

5.1.3 Síntese de desotamide B em resina “safety-catch”

Acoplamento do primeiro aminoácido: À 400 mg de resina 4-sulfamilbutiril AM (taxa de acoplamento= 0,8 mmol/g; 0,320 mmol), foi adicionado Fmoc-Gly-OH (143 mg, 0,48 mmol), PyBOP (296 mg, 0,57 mmol) e diisopropiletilamina-DIPEA (200 μ L, 1,15 mmol) em 5 mL de DMF. A mistura reacional foi mantida overnight e o procedimento foi repetido mais duas vezes.

Reações de acoplamento: A Fmoc-resina foi desprotegida com solução de 20 % de piperidina em DMF (5 mL) por 2 minutos e a desproteção foi repetida por 20 minutos. A resina foi lavada com CH₂Cl₂ (5x), MeOH (5x) e DMF (5x) e a eficiência do acoplamento foi realizada pelo teste de Kaiser e avaliação da absorção UV do dibenzofulveno. O mesmo procedimento foi utilizado nos acoplamentos seguintes.

Ativação da resina e clivagem cíclica do peptídeo: A Boc-resina foi ativada com iodoacetonitrila (4,48 mmol, 324 μ L) e DIPEA (2,65 mmol, 1384 μ L) em 3 mL de NMP por 12 horas. O procedimento foi repetido sob as mesmas condições reacionais. Após lavagens da resina com diclorometano (5x), THF (5x) e 1% DIPEA em THF (1x) a resina foi encubada em

THF (5 mL) e DIPEA (0,382 mmol, 200 μ L) e a ciclização foi mantida overnight fornecendo o peptídeo cíclico.

5.1.4 Síntese de análogo linear de Desotamide B em resina e ciclização em solução

Desproteção da resina: 1,33 g de resina Wang-Gly-Fmoc com grau de substituição (0,4 mmol/g) foi encubada com piperidina/DMF 20% por 20 minutos (2x). Após remoção do grupo Fmoc, a resina foi lavada sucessivas vezes com DCM e DMF.

Reações de acoplamento: Fmoc-L-Trp(Boc) (422 mg, 0,8 mmol), HBTU (303,0 mg, 0,8 mmol) e DIPEA (50% v/v) em 5 mL de NMP. Após o ciclo de acoplamento, a avaliação da taxa de acoplamento é realizada através de detecção UV do grupo dibenzofulveno (290 nm). Os acoplamentos seguintes seguiram o mesmo procedimento, seguidos de desproteção e lavagens, até a formação da sequência peptídica NH₂-L-Trp-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asn-Gly-Resina, onde as cadeias laterais dos aminoácidos asparagina e triptofano mantiveram-se protegidas com os grupos Trt e Boc, respectivamente.

Clivagem da resina: A clivagem do peptídeo linear foi realizada na presença de 10 mL de solução de TFA:H₂O:TIS (95%:2,5%:2,5%) por duas horas de agitação em temperatura ambiente. Após esse período, a fração peptídica foi precipitada com 10 mL de éter anidro gelado, e a fração não peptídica foi separada do precipitado por centrifugação. A fração etérea foi decantada e o precipitado obtido foi extraído com uma mistura de H₂O/ACN 50%. Essa solução foi liofilizada para formar 82 mg de um sólido branco.

Ciclização em solução: O peptídeo linear (82 mg, 0,12 mmol) foi diluído em 1000 mL de acetonitrila (solução 0,1 mmol/L) e tratado com HBTU (45,5 mg, 0,12 mmol) e DIPEA (41 μ L, 0,24 mmol). A reação foi mantida por 25 horas, sob abrigo da luz, em temperatura ambiente. Após esse período, a mistura reacional foi liofilizada e o sólido branco (90mg) formado foi submetido às análises.

Purificação: O peptídeo cíclico foi purificado em HPLC semi-preparativo (Shimadzu), utilizando coluna C₁₈ com gradiente linear de um programa de 31% de B até 61% em 120 minutos de solvente B (0,0036% (v/v) TFA/acetonitrila). O fluxo empregado foi de 5 mL/minuto. A detecção UV foi realizada à 220 nm. A avaliação da pureza do material foi

realizada em HPLC analítico (Varian, USA), empregando os solventes A e B por 30 minutos, em gradiente linear de 5-95%, em fluxo de 1,5 mL/min e detecção UV em 220 nm. A identidade do peptídeo foi confirmada por ESI-MS calculado para $[M+H]^+ = 683,39$, encontrado 683,4.

5.1.5 Síntese de cyclozantoxilano A em resina e ciclização em solução

Esterificação do 1º aminoácido à resina: (300 mg, 0,3 mmol) de resina cloreto de 2-cloro tritila (com grau de substituição 1-1,5 mmol/g em 5mL de DCM foi tratada com Fmoc-L-Ala (746,0 mg, 2,4 mmol) e DIPEA (2,5 mL, 4,8 mmol). A reação foi mantida por 30 minutos e o procedimento repetido mais uma vez. Após esse período, a resina foi lavada com DCM e DMF (5x). O grupo Fmoc foi removido com solução de piperidina/DMF 20% por 20 minutos (2x). Após remoção do grupo Fmoc, a resina foi lavada sucessivas vezes com DCM (5x) e DMF (5x).

Reações de acoplamento: A resina-Ala foi tratada com solução de Fmoc-L-Ala (424 mg, 1,2 mmol), PyBOP (624,4 mg, 1,2 mmol) e DIPEA (1,2 mL, 2,4 mmol) em 5 mL de DMF por 2 horas (2x). Ao final da reação, a avaliação da taxa de acoplamento foi realizada através de detecção UV do grupo dibenzofulveno (290 nm) e teste de ninidrina. Os acoplamentos seguintes seguiram o mesmo procedimento, seguidos de desproteção, até a formação da sequência peptídica NH_2 -L-Phe-L-Gly-L-Ala-L-Leu-L-Ala-Resina.

Clivagem da resina: A clivagem do peptídeo linear foi realizada na presença de solução de TFA/DCM 5% v/v por 20 minutos, sob agitação em temperatura ambiente. Após esse período, a fração peptídica foi precipitada com 5 mL de éter anidro gelado, e a fração não peptídica foi separada do precipitado por centrifugação. A fração etérea foi decantada e o precipitado obtido foi extraído com uma mistura de H_2O /ACN 50% e a solução resultante foi liofilizada, formando sólido branco (180 mg).

Ciclização em solução: O peptídeo linear bruto (180 mg, 0,376 mmol) foi diluído em 3770 mL de DCM (solução 0,1 mmol/L) e tratado com PyBOP (195,5 mg, 0,376 mmol) e DIPEA (197 μ L, 0,752 mmol). A reação foi mantida por 36 horas, sob abrigo da luz, em temperatura ambiente. Após esse período, a mistura reacional foi evaporada sob pressão reduzida e o sólido branco formado foi submetido às análises. A identidade do peptídeo foi confirmada por

ESI-MS calculado para $[M+H]^+ = 460,55$, encontrado 460.

5.1.6 Estudo sintético de Chaiyphumine A em resina “safety-catch”

Acoplamento do primeiro aminoácido: À 200 mg de resina 4-sulfamilbutiril AM (Novabiochem, 200 mg, 0,224 mmol), foi adicionado Fmoc-D-Phe-OH (278mg, 0,72 mmol), PyBOP (374 mg, 0,72 mmol) e DIPEA (376 μ L, 0,72 mmol) em 5 mL de DMF. A mistura reacional foi mantida overnight e o procedimento foi repetido mais duas vezes.

Reações de acoplamento: A Fmoc-resina foi desprotegida com solução de 20 % de piperidina em DMF (5 mL) por 2 minutos e a desproteção foi repetida por 20 minutos. A resina foi lavada com CH_2Cl_2 (5x), MeOH (5x) e DMF (5x) e a eficiência do acoplamento foi realizada pelo teste de Kaiser.

Reação de esterificação: A resina-álcool foi encubada com DMAP (27 mg, 0,24 mmol), Fmoc-D-Trip (327 mg, 0,72 mmol) e diisopropilcarbodiimida - DIC (351 μ L, 0,74 mmol) em THF (5 mL). A reação foi mantida por 2 horas e repetida overnight. Após lavagens da resina com THF (5x) e DMF (3x) a elongação do peptídeo linear foi realizada até o acoplamento do último aminoácido.

Ativação da resina e clivagem cíclica do depsipeptídeo: A Boc-resina e ativada com iodoacetoneitrila (2,24 mmol, 162 μ L) e DIPEA (2,68 mmol, 692 μ L) em 1,5 mL de NMP por 12 horas. O procedimento foi repetido sob as mesmas condições reacionais. Após lavagens da resina com diclorometano (5x), THF (5x) e 1% DIPEA em THF (1x) a resina foi encubada com THF (5 mL) e DIPEA (0,67 mmol, 117 μ L) e a ciclização foi mantida overnight fornecendo o depsipeptídeo.

5.1.7 Estudo análogo linear sintético de chaiyaphumine A em resina

Desproteção da resina: A resina Wang-Fmoc-L-Trp(Boc) 0,300 mg (0,3 mmol) com taxa de substituição de 0,7 mmol/g, foi encubada com piperidina/DMF 20% por 20 minutos (2x). Após remoção do grupo Fmoc, a resina foi lavada sucessivas vezes com DCM e DMF.

Reações de acoplamento: Fmoc-L-Pro (202,4 mg, 0,72 mmol), HBTU (227,5 mg, 0,6 mmol) e DIPEA (50% v/v) em 5 mL de NMP. Após o ciclo de acoplamento, a avaliação da taxa de acoplamento é realizada através de detecção UV do grupo (312 nm). Os

acoplamentos seguintes seguiram o mesmo procedimento de acoplamento seguida de desproteção, até a formação da sequência peptídica OH-L-Thr-D-Phe-D-Ala-L-Pro-L-Trp-COOH.

Clivagem da resina: A clivagem do peptídeo linear foi realizada na presença de 6 mL de solução de TFA:H₂O:TIS (95%:2,5%:2,5%) por duas horas de agitação em temperatura ambiente. Após esse período, a mistura reacional foi filtrada, a resina foi lavada com TFA e a solução concentrada em vácuo. O resíduo formado foi solubilizado em mistura de H₂O/ACN 50% e concentrado em liofilizador. Após liofilização, foi obtido 474 mg de sólido branco, que foi submetido a análises. A identidade do peptídeo linear foi confirmada por ESI-MS calculado para [M+H]⁺ 739,34, encontrado 739,4.

5.1.2 Monitoramento de acoplamento das reações em fase sólida

5.1.2.1 O Teste de Kaiser (ou teste da ninidrina)

Este teste qualitativo, empregado no acompanhamento das reações em fase sólida, consiste em três soluções reagentes:

Reagente A: 16,5 mg de KCN serão dissolvidos em 25 mL de água destilada. Em seguida, 1 mL desta solução é diluída em 49 mL de piridina.

Reagente B: Dissolve-se 1,0 g de ninidrina em 20 mL de n-butanol.

Reagente C: Dissolve-se 40g de phenol em 20 mL de n-butanol.

Procedimento: De 10-15 *beads* da resina são adicionadas em um tubo de ensaio. Para cada tubo, adiciona-se 3 gotas de cada reagente. Os frascos são então aquecidos a 110 °C durante 5 minutos.

As cores são então comparadas com a referência. Se estiver incolor ou com coloração azul fraca, o acoplamento está completo, então, a síntese é continuada. Caso a solução esteja azul escura, mas as *beads* incolores, o acoplamento está quase completo, podendo estender o acoplamento, ou cobrir as cadeias que não reagiram. Se a solução estiver com coloração azul clara, mas as *beads* com coloração azul escura, o acoplamento está incompleto, devendo ser repetido. Por fim, se a solução estiver com uma coloração intensa de azul e todas os *beads* estiverem azul, o acoplamento falhou, devendo-se então avaliar o aminoácido, reagentes e então reacoplar.^{51; 53}

5.1.2.2 Teste de absorção UV do grupo dibenzofulveno

Esse método fornece grau de substituição em qualquer resina funcionalizada com N-Fmoc. O grau de substituição teórica é calculado com base na equação a seguir:

$$\text{Grau de substituição (mmol/g)} = (\text{Abs}_{\text{amostra}}) / (\text{mg de amostra} \times 1,75)$$

Procedimento: Aproximadamente 5 *beads* da resina são adicionadas em cubeta de quartzo (3 x 10 mm) juntamente com 3 mL de solução 20% de piperidina/DMF. Agitar por 5-10 a mistura e ler em espectrofotômetro à 290 nm.⁵³

6. REFERÊNCIAS

- 1 WALSH, C. Where will new antibiotics come from? **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 65-70, 2003.
- 2 WHITE, C. J.; YUDIN, A. K. Contemporary strategies for peptide macrocyclization. **Nature Chemistry**, v. 3, n. 7, p. 509-524, 2011.
- 3 FERNANDEZ-LOPEZ, S. et al. Antibacterial agents based on the cyclic D,L-alpha-peptide architecture. **Nature**, v. 412, n. 6845, p. 452-455, 2001.
- 4 HANCOCK, R. E. W.; CHAPPLE, D. S. Peptide antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 6, p. 1317-1323, 1999.
- 5 LIPINSKI, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n. 1, p. 235-249, 2000.
- 6 THAPA, P. et al. The Emergence of Cyclic Peptides: The Potential of Bioengineered Peptide Drugs. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 20, n. 4, p. 545-551, 2014.
- 7 Vlieghe, P. et al. Synthetic therapeutic peptides: science and market. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 1-2, p. 40-56, 2010.
- 8 SCHEINBERG, M. A.; AZEVEDO, V. F. Biosimilars in rheumatology: perspective and concerns. **Rheumatology**, v. 53, n. 3, p. 389-390, 2014.
- 9 STORZ, U. Rituximab How approval history is reflected by a corresponding patent filing strategy. **Mabs**, v. 6, n. 4, p. 820-837, 2014.
- 10 GIMENEZ, B. G. et al. Evaluation of blockbuster drugs under the Rule-of-five. **Pharmazie**, v. 65, n. 2, p. 148-152, 2010.
- 11 CRAIK, D. J. et al. The Future of Peptide-based Drugs. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 81, n. 1, p. 136-147, 2013.
- 12 KANE, R. C. et al. Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 18, p. 5291-5294, 2007.
- 13 SUN, L. Peptide-Based Drug Development. **Modern Chemistry & Applications**, 1:e103, 2012.

- 14 JARVIS, L. M. The year in new drugs. **Chemical & Engineering News**, v. 94, n. 5, p. 12-17, 2016.
- 15 THAKKAR, A.; THI BA, T.; PEI, D. Global Analysis of Peptide Cyclization Efficiency. **Acs Combinatorial Science**, v. 15, n. 2, p. 120-129, 2013.
- 16 HENNEMANN, H.; WIRTHS, S.; CARL, C. Cell-based peptide screening to access the undruggable target space. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 94, p. 489-496, 2015.
- 17 FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 122-128, 2015.
- 18 LOFFET, A. Peptides as drugs: Is there a market? **Journal of Peptide Science**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2002.
- 19 SPELLBERG, B. et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections: A call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 2, p. 155-164, 2008.
- 20 LIVERMORE, D. M.; BRITISH SOC, A. Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 9, p. 1941-1944, 2011.
- 21 LEWIS, K. Platforms for antibiotic discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 5, p. 371-387, 2013.
- 22 COOPER, M. A. A community-based approach to new antibiotic discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 9, p. 587-588, 2015.
- 23 FRANTZ, S. Better antibiotics through chemistry. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 900-901, 2004.
- 24 O'SHEA, R.; MOSER, H. E. Physicochemical properties of antibacterial compounds: Implications for drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2871-2878, 2008.
- 25 SEATON, R. A. Daptomycin: rationale and role in the management of skin and soft tissue infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 15-23, 2008.
- 26 WILSON, M. C. et al. An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. **Nature**, v. 506, n. 7486, p. 58-62, 2014.
- 27 GAMMON, K. Drug discovery: Leaving no stone unturned. **Nature**, v. 509, n. 7498,

- p. 10-12, 2014.
- 28 AMBROGELLY, A.; PALIOURA, S.; SOLL, D. Natural expansion of the genetic code. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 1, p. 29-35, 2007.
- 29 HASSAN, M. et al. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 4, p. 723-736, 2012.
- 30 FJELL, C. D. et al. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 1, p. 37-51, 2012.
- 31 ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389-395, 2002.
- 32 CRUZ, J. et al. Antimicrobial Peptides: Promising Compounds Against Pathogenic Microorganisms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 20, p. 2299-2321, 2014.
- 33 MYGIND, P. H. et al. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. **Nature**, v. 437, n. 7061, p. 975-980, 2005.
- 34 GIULIANI, A.; PIRRI, G.; NICOLETTO, S. F. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. **Central European Journal of Biology**, v. 2, n. 1, p. 1-33, 2007.
- 35 BRAY, B. L. Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 7, p. 587-593, 2003.
- 36 LABONTE, J.; LEBBOS, J.; KIRKPATRICK, P. Enfuvirtide. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 5, p. 345-345, 2003.
- 37 DAVIES, J. S. The cyclization of peptides and depsipeptides. **Journal of Peptide Science**, v. 9, n. 8, p. 471-501, 2003.
- 38 YANG, L. H.; MORRIELLO, G. Solid phase synthesis of 'head-to-tail' cyclic peptides using a sulfonamide 'safety-catch' linker: the cleavage by cyclization approach. **Tetrahedron Letters**, v. 40, n. 47, p. 8197-8200, 1999.
- 39 JIANG, S. et al. Recent Progress of Synthetic Studies to Peptide and Peptidomimetic Cyclization. **Current Organic Chemistry**, v. 12, n. 17, p. 1502-1542, 2008.
- 40 HUMPHREY, J. M.; CHAMBERLIN, A. R. Chemical synthesis of natural product peptides: Coupling methods for the incorporation of noncoded amino acids into peptides. **Chemical Reviews**, v. 97, n. 6, p. 2243-2266, 1997.

- 41 BRADY, S. F. et al. Practical synthesis of cyclic-peptides, with an example of dependence of cyclization yield upon linear sequence. **Journal of Organic Chemistry**, v. 44, n. 18, p. 3101-3105, 1979.
- 42 LI, P.; ROLLER, P.P. Cyclization strategies in peptide derived drug design. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 325-341.
- 43 MEUTERMANS, W. D. F. et al. Difficult macrocyclizations: New strategies for synthesizing highly strained cyclic tetrapeptides. **Organic Letters**, v. 5, n. 15, p. 2711-2714, 2003.
- 44 PERLMAN, Z. E. et al. Geometric diversity through permutation of backbone configuration in cyclic peptide libraries. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 23, p. 5329-5334, 2005.
- 45 LAMBERT, J. N.; MITCHELL, J. P.; ROBERTS, K. D. The synthesis of cyclic peptides. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1**, n. 5, p. 471-484, 2001.
- 46 LI, W.; SCHLECKER, A.; MA, D. Total synthesis of antimicrobial and antitumor cyclic depsipeptides. **Chemical Communications**, v. 46, n. 30, p. 5403-5420, 2010.
- 47 COCHRANE, J. R. et al. A macrolactonization approach to the total synthesis of the antimicrobial cyclic depsipeptide LI-F04a and diastereoisomeric analogues. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 8, p. 1344-1351, 2012.
- 48 PETTIT, G. R. et al. Antineoplastic Agents. 599. Total Synthesis of Dolastatin 16. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 3, p. 476-485, 2015.
- 49 MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. 1. Synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963.
- 50 CARPINO, L. A.; HAN, G. Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 37, n. 22, p. 3404-3409, 1972.
- 51 CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis**. United States, New York: Oxford University Press, 2004.
- 52 AMBLARD, M. et al. Methods and Protocols of modern solid phase peptide synthesis. **Molecular Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 239-254, 2006.
- 53 WENG, C.; PETER, W. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach**. New York: Oxford University Press: 371 p. 2000.

- 54 EL-FAHAM, A.; ALBERICIO, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 11, p. 6557-6602, 2011.
- 55 HAN, S. Y.; KIM, Y. A. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. **Tetrahedron**, v. 60, n. 11, p. 2447-2467, 2004.
- 56 CARPINO, L. A. 1-HYDROXY-7-AZABENZOTRIAZOLE - AN EFFICIENT PEPTIDE COUPLING ADDITIVE. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 10, p. 4397-4398, 1993.
- 57 VALEUR, E.; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 606-631, 2009.
- 58 YU, X.; SUN, D. Macrocyclic Drugs and Synthetic Methodologies toward Macrocycles. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 6230-6268, Jun 2013.
- 59 SONG, Z. J. et al. Synthesis of Vaniprevir (MK-7009): Lactamization To Prepare a 22-Membered Macrocycle. **Journal of Organic Chemistry**, v. 76, n. 19, p. 7804-7815, 2011.
- 60 FONSECA, M. I. et al. Treatment with a C5aR Antagonist Decreases Pathology and Enhances Behavioral Performance in Murine Models of Alzheimer's Disease. **Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 1375-1383, 2009.
- 61 SHAHEEN, F. et al. Solid-Phase Total Synthesis of Cherimolacyclopeptide E and Discovery of More Potent Analogues by Alanine Screening. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 11, p. 1882-1887, 2012.
- 62 ALI, L.; MUSHARRAF, S. G.; SHAHEEN, F. Solid-phase total synthesis of cyclic decapeptide phakellistatin 12. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 6, p. 1059-1062, 2008.
- 63 DE VISSER, P. C. et al. Solid-phase synthesis of polymyxin B-1 and analogues via a safety-catch approach. **Journal of Peptide Research**, v. 61, n. 6, p. 298-306, 2003.
- 64 SHAH, Z. A. et al. Solid-phase total synthesis of cyclic peptide brachystemin A and its immunomodulating activity. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 39, n. 5, p. 930-938, 2015.
- 65 BOUREL-BONNET, L. et al. Solid-phase total synthesis of kahalalide A and related analogues. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 5, 2005.
- 66 KHALIL, Z. G. et al. Wollamides: Antimycobacterial Cyclic Hexapeptides from an

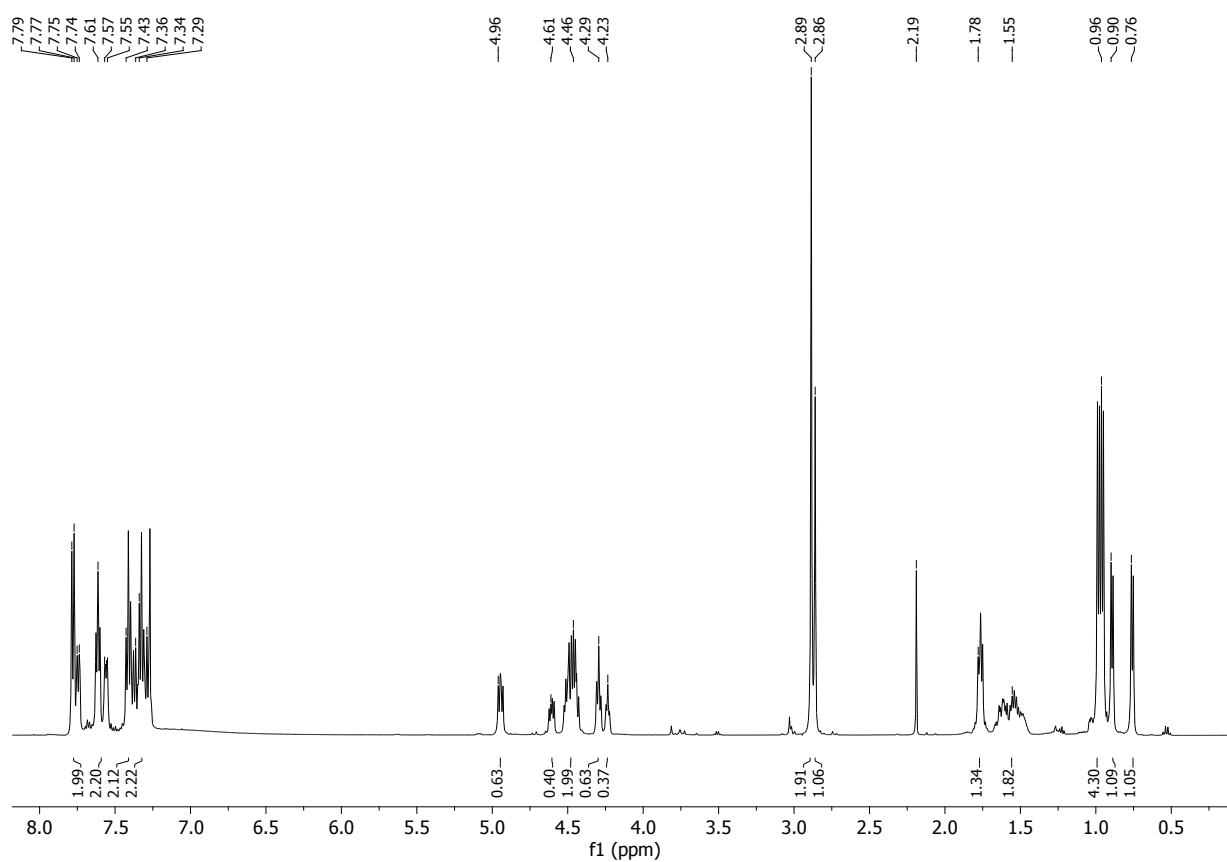
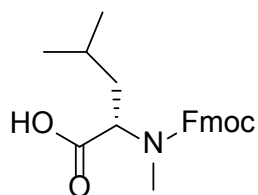
- Australian Soil Streptomyces. **Organic Letters**, v. 16, n. 19, p. 5120-5123, 2014.
- 67 SONG, Y. et al. Cyclic Hexapeptides from the Deep South China Sea-Derived Streptomyces scopuliridis SCSIO ZJ46 Active Against Pathogenic Gram-Positive Bacteria. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 8, p. 1937-1941, 2014.
- 68 MOCCELINI, S. K. et al. Phytochemical study from root barks of Zanthoxylum rigidum Humb. & Bonpl. ex Willd (Rutaceae). **Quimica Nova**, v. 32, n. 1, p. 131-133, 2009.
- 69 NASCIMENTO RIBEIRO, T. A. et al. A New Cyclopeptide and Other Constituents from the Leaves of Zanthoxylum rigidum Humb. & Bonpl. ex Willd. (Rutaceae). **Helvetica Chimica Acta**, v. 95, n. 6, p. 935-939, 2012.
- 70 MORITA, H. et al. Cyclic peptides from higher-plants from pseudostellaria-heterophylla. **Journal of Natural Products-Lloydia**, v. 58, n. 6, p. 943-947, 1995.
- 71 TRAN, T. D. et al. Cytotoxic Cyclic Depsipeptides from the Australian Marine Sponge Neamphius huxleyi. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 12, p. 2200-2208, 2012.
- 72 GUSTAFSON, K. R. HIV Inhibitory Cyclic Depsipeptides from Marine Sponges: New Structural Features, Biological Activity Profiles, and Stereochemical Challenges. **Biopolymers**, v. 96, n. 4, p. 422-422, 2011.
- 73 MANSSON, M. et al. Inhibition of Virulence Gene Expression in Staphylococcus aureus by Novel Depsipeptides from a Marine Photobacterium. **Marine Drugs**, v. 9, n. 12, p. 2537-2552, 2011.
- 74 FOTIE, J.; MORGAN, R. E. Depsipeptides from Microorganisms: A New Class of Antimalarials. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 11, p. 1088-1094, 2008.
- 75 BALLARD, C. E.; YU, H.; WANG, B. Recent developments in depsipeptide research. **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 471-498, 2002.
- 76 NGUYEN, M. M.; ONG, N.; SUGGS, L. A general solid phase method for the synthesis of depsipeptides. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 7, p. 1167-1170, 2013.
- 77 GRUNDMANN, F. et al. Antiparasitic Chaiyaphumines from Entomopathogenic Xenorhabdus sp PB61.4. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 4, p. 779-783, 2014.
- 78 BERDOUGO, E.; DORANZ, B. J. High-Throughput Alanine Scanning. **Genetic**

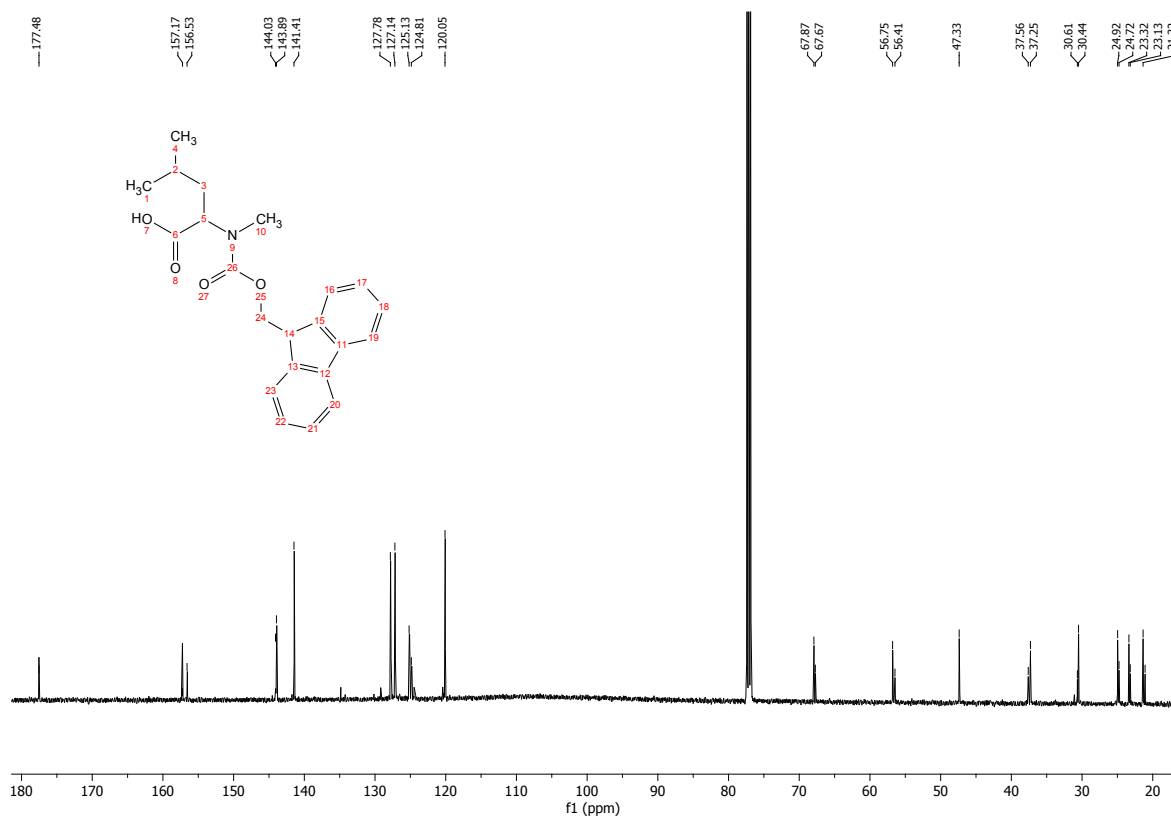
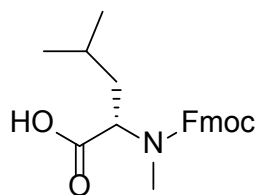
- Engineering & Biotechnology News**, v. 32, n. 12, p. 30-31, 2012.
- 79 SHIBATA, M. et al. Studies on Streptomycetes. 1. Streptomyces atratus nov. sp., producing new antituberculosis antibiotics rufomycin A and B. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 26, n. 4, 1962.
- 80 LILLY & CO ELI. **Rufomycins and derivatives thereof useful as inhibitors of multi-drug resistance associated protein-1 (mrp-1)**. WO2000078795 A2, 28 Dez. 2000.
- 81 TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD. (United States). Eiji Higashide. **Rufomycin**. 3,655,879, 11 abr. 1972.
- 82 ATIF, M. et al. WHO guidelines for treatment of tuberculosis: the missing links. **International Journal of Clinical Pharmacy**, v. 34, n. 4, p. 506-509, 2012.
- 83 FREIDINGER, R. M. et al. Synthesis of 9-fluorenylmethyloxycarbonyl-protected N-alkyl amino-acids by reduction of oxazolidinones. **Journal of Organic Chemistry**, v. 48, n. 1, 1983.
- 84 ZHANG, S. et al. An improved synthesis of Fmoc-N-methyl-alpha-amino acids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, n. 17, 2005.
- 85 HU, D. X.; GRICE, P.; LEY, S. V. Rotamers or Diastereomers? An Overlooked NMR Solution. **Journal of Organic Chemistry**, v. 77, n. 11, 2012.
- 86 WANG, Z. J. et al. Tandem Ru-alkylidene-catalysed cross metathesis/hydrogenation: synthesis of lipophilic amino acids. **Journal of Peptide Science**, v. 19, n. 8, p. 470-476, 2013.
- 87 OOI, T.; MARUOKA, K. Recent advances in asymmetric phase-transfer catalysis. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 46, n. 23, p. 4222-4266, 2007.
- 88 MONTALBETTI, C.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, n. 46, p. 10827-10852, 2005.
- 89 KUMARN, S.; CHIMNOI, N.; RUCHIRAWAT, S. Synthesis of integerrimide A by an on-resin tandem Fmoc-deprotection-macrocyclisation approach. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 44, p. 7760-7767, 2013.
- 90 DOAK, B. C. et al. Oral Druggable Space beyond the Rule of 5: Insights from Drugs and Clinical Candidates. **Chemistry & Biology**, v. 21, n. 9, p. 1115-1142, 2014.
- 91 BOCKUS, A. T.; MCEWEN, C. M.; LOKEY, R. S. Form and Function in Cyclic

- Peptide Natural Products: A Pharmacokinetic Perspective. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 821-836, 2013.
- 92 ALBERICIO, F.; KRUGER, H. G. Therapeutic peptides. **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 12, p. 1527-1531, 2012.
- 93 ChEMBL - European Bioinformatics Institute. Disponível em <<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>>. Acesso em 10 de Jan. 2016.
- 94 CENTERWATCH: Clinical Research and Drug Information. Disponível em <<http://www.centerwatch.com>>. Acesso em 10 de Jan. 2016.
- 95 THOMSON REUTERS – Integrity. Disponível em <https://integrity.thomson-pharma.com/integrity/xmlxsl/pk_qcksrch.form_pr?query=thom>. Acesso em 12 de Jan. 2016.
- 96 MICROMEDEX SOLUTIONS: Truven Health Analytics. Disponível em <<http://www-micromedexsolutions-com.ez67.periodicos.capes.gov.br/micromedex2/librarian>>. Acesso em 12 de Jan. de 2016.
- 97 GOLDBERG, M.; GOMEZ-ORELLANA, I. Challenges for the oral delivery of macromolecules. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 4, p. 289-295, 2003.
- 98 MEREDITH, M. E.; SALAMEH, T. S.; BANKS, W. A. Intranasal Delivery of Proteins and Peptides in the Treatment of Neurodegenerative Diseases. **Aaps Journal**, v. 17, n. 4, p. 780-787, 2015.
- 99 KATSILA, T.; SISKOS, A. P.; TAMVAKOPOULOS, C. Peptide and protein drugs: The study of their metabolism and catabolism by mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 31, n. 1, p. 110-133, 2012.
- 100 VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 6 2002.
- 101 LOVERING, F.; BIKKER, J.; HUMBLET, C. Escape from Flatland: Increasing Saturation as an Approach to Improving Clinical Success. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 21, p. 6752-6756, 2009.

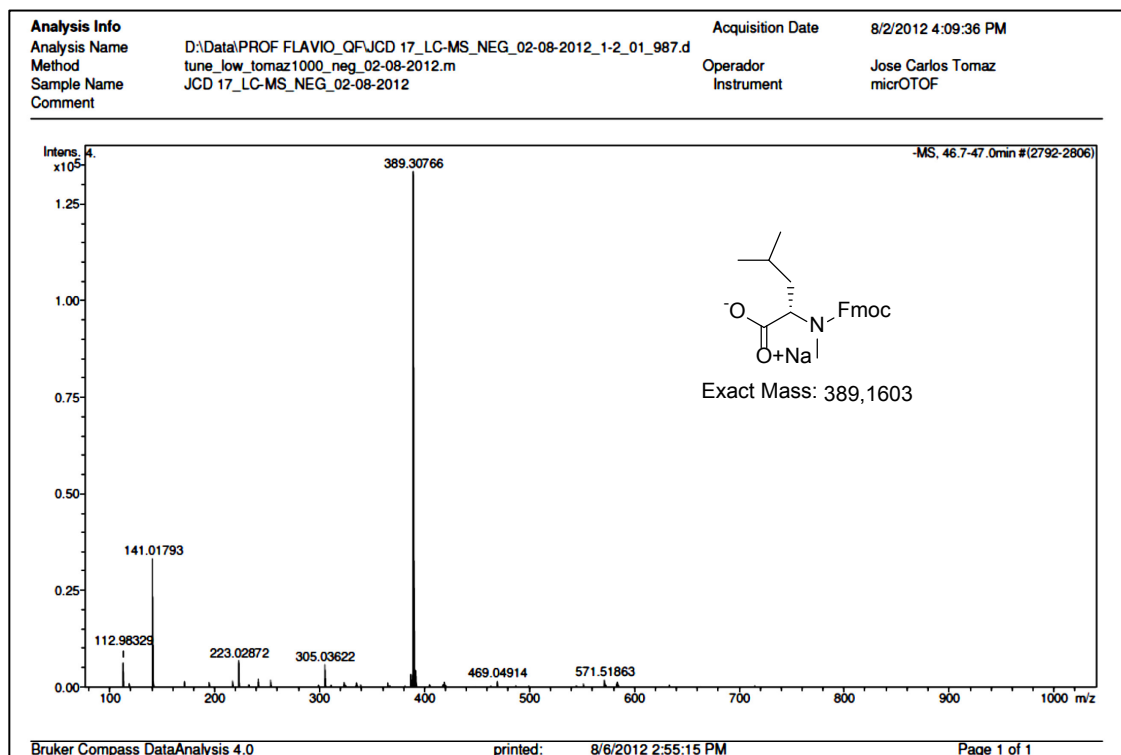
APÊNDICES

Apêndice 1: Espectro de ^1H RMN (CD_3OD , 500 MHz) – composto 2

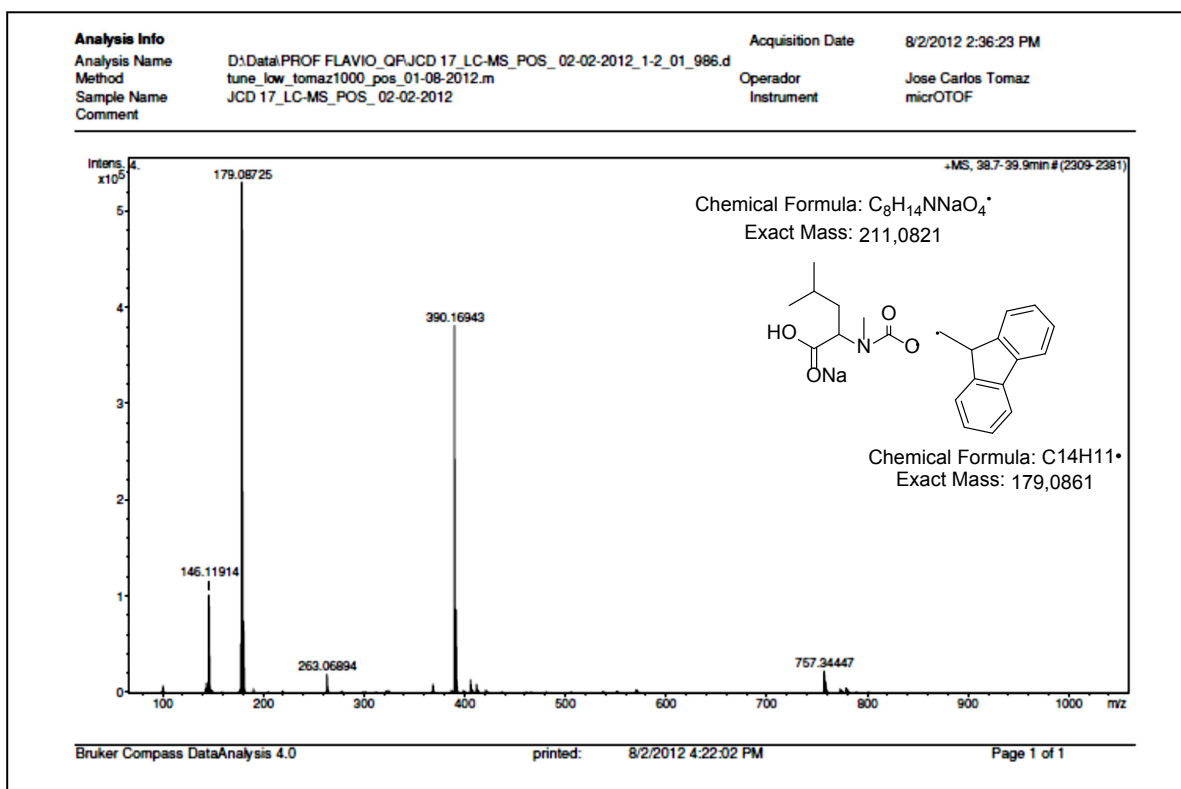


Apêndice 2: Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) - composto 2

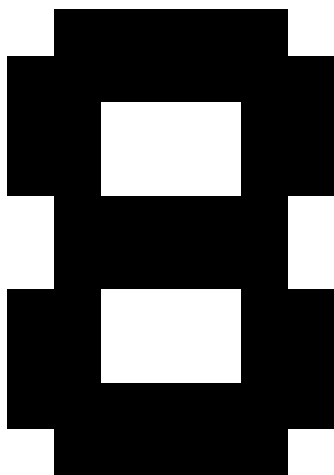
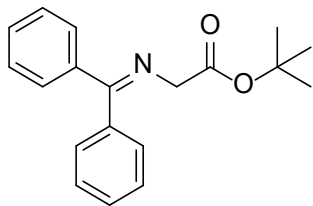
Apêndice 3: Espectro de IES-EM - composto 2

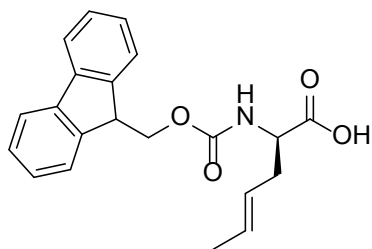


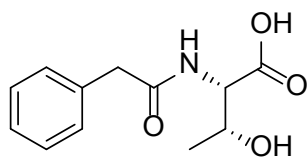
Apêndice 4: Espectro de LC-MS - composto 2



Apêndice 5: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto **3**



Apêndice 6: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) – composto **4**

Apêndice 7: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) – composto **5**

Apêndice 8: Espectro de ESI - composto 6

Analysis Info

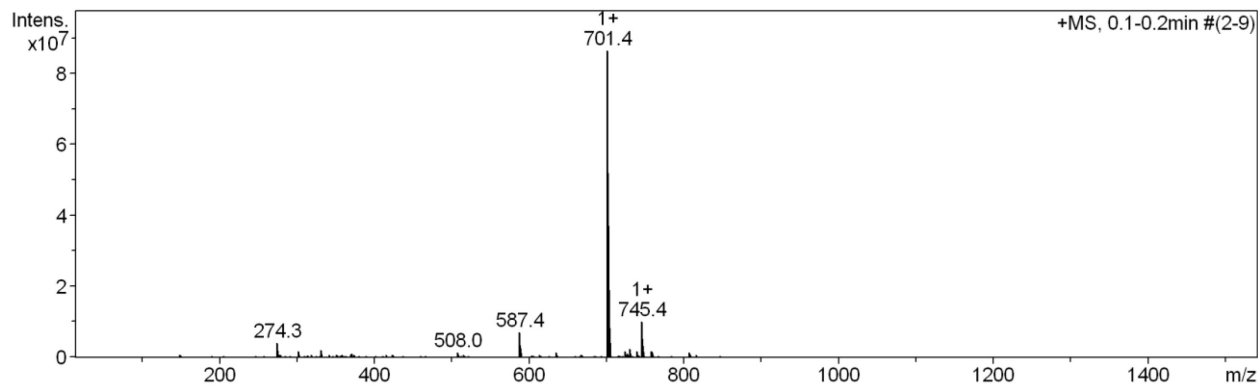
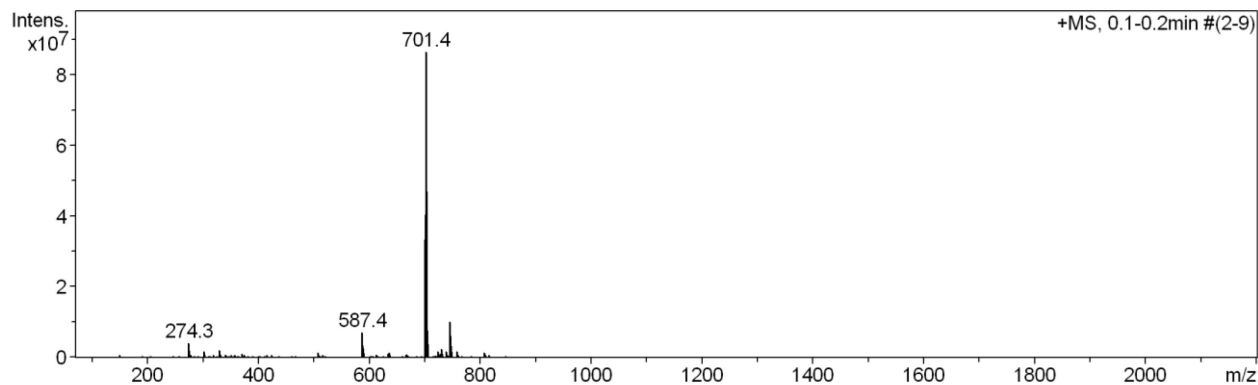
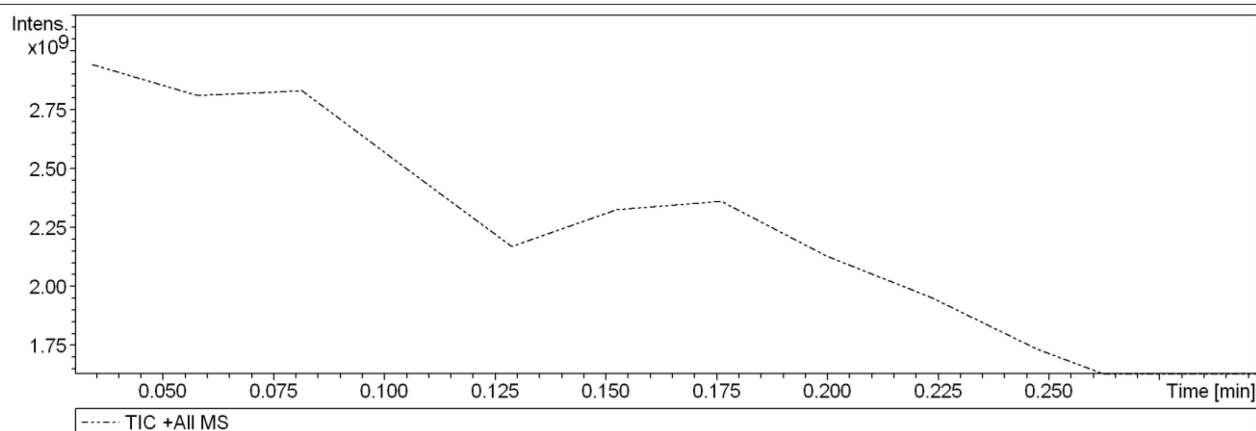
Analysis Name D:\Data\emc2015\gb1503-linear.d
 Method esi-inj.m
 Sample Name gb1503-linear
 Comment

Acquisition Date 7/29/2015 5:55:32 PM

Operator emcilli
 Instrument amaZon SL

Acquisition Parameter

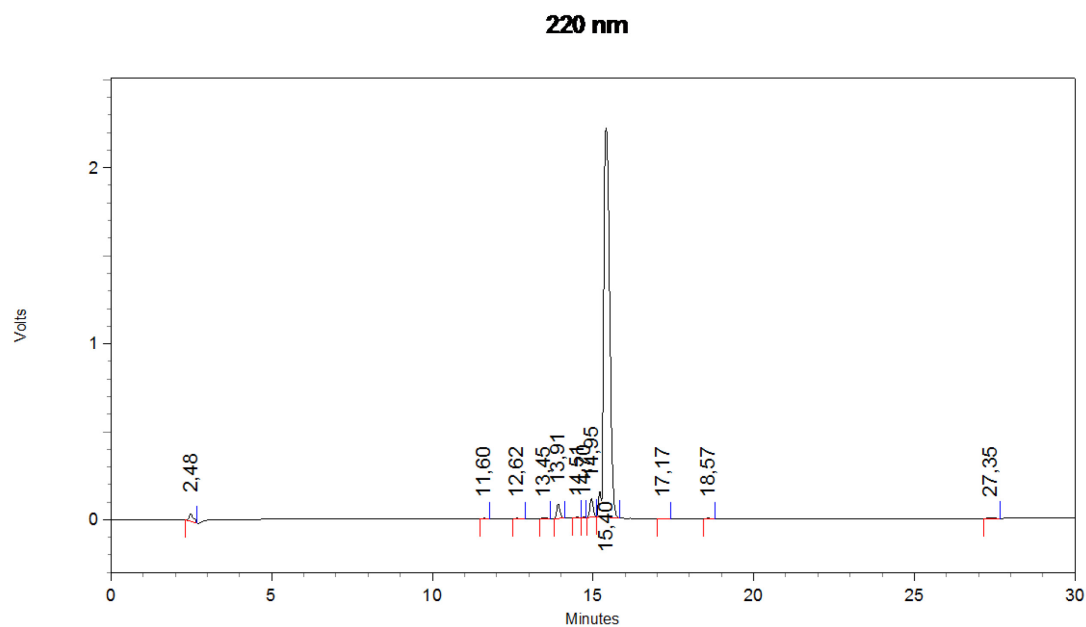
Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Enhanced	Scan Begin	70 m/z	Scan End	2200 m/z
Capillary Exit	Resolution	n/a	n/a	Trap Drive	59.6
Accumulation Time	100 μ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off



Apêndice 9: Perfil cromatográfico - composto 8

vial 12 programa 5 a 95% B em 30 minutos coluna Kromasil 300 partícula de 5µm tamanho 0,46 x 150 mm volume de injeção 50

(A) 0,045% TFA em água (B) 0,036% TFA em ACN fluxo de 1,0



UV (220nm)

Pk #	Retention Time	Area	Area Percent
1	2,477	406716	1,3
2	11,601	29279	0,1
3	12,618	39641	0,1
4	13,447	44764	0,1
5	13,912	554454	1,8
6	14,508	50664	0,2
7	14,700	32165	0,1
8	14,948	737298	2,4
9	15,403	28366028	93,4
10	17,171	32416	0,1
11	18,571	41048	0,1
12	27,347	45058	0,1

Totals		30379530	100,0
--------	--	----------	-------

Apêndice 10: Espectro de ESI – composto 9

Analysis Info

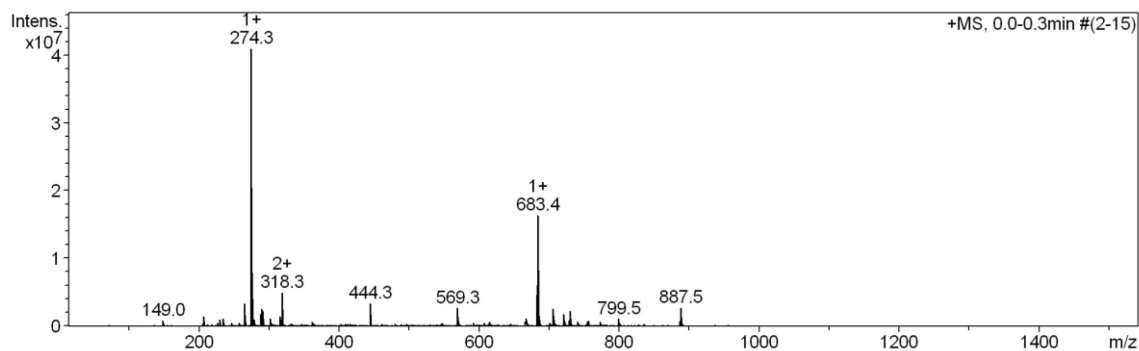
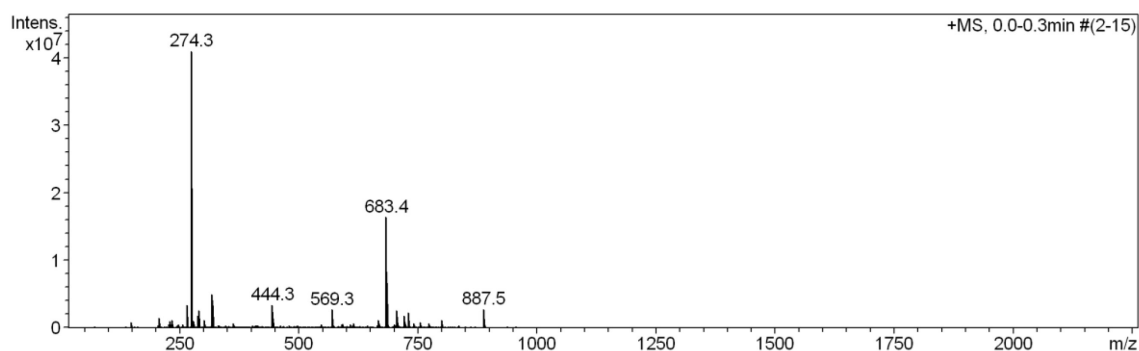
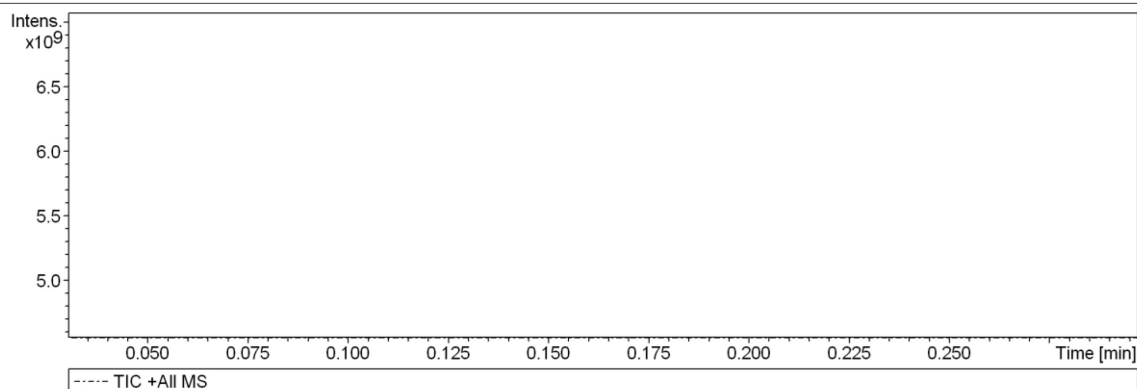
Analysis Name D:\Data\emc2014\gb15023-ciclico.d
 Method metodo29-07-2015.m
 Sample Name gb1503-ciclico
 Comment

Acquisition Date 8/6/2015 12:02:50 PM

Operator emcilli
 Instrument amaZon SL

Acquisition Parameter

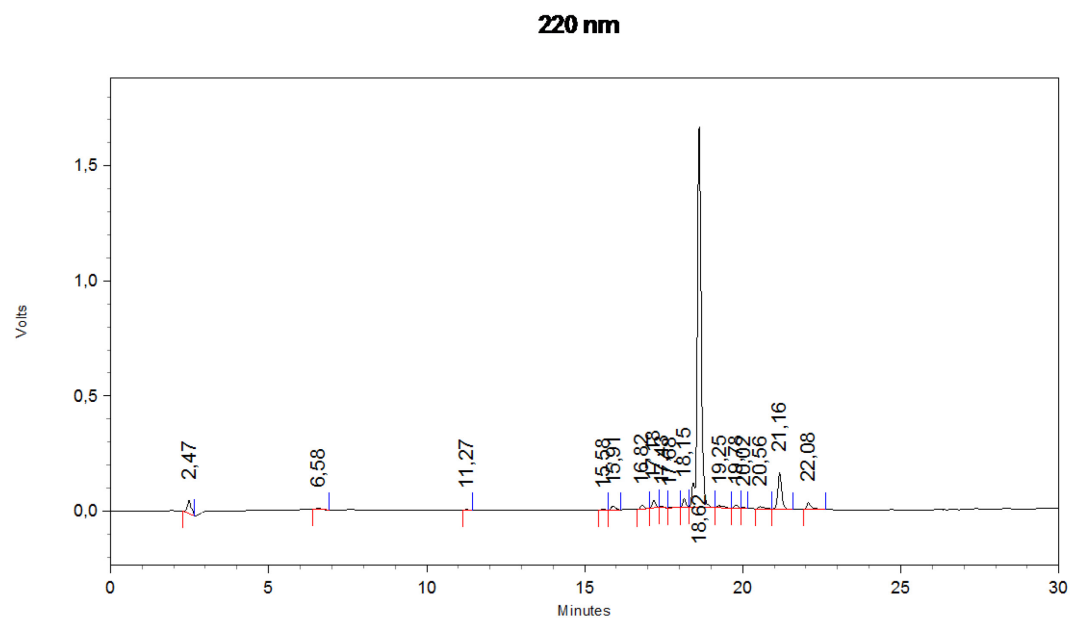
Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Enhanced	Scan Begin	50 m/z	Scan End	1500 m/z
Capillary Exit	Resolution	n/a	n/a	Trap Drive	59.6
Accumulation Time	100 μ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off



Apêndice 11: Perfil cromatográfico – composto 9

vial 10 programa 5 a 95% B em 30 minutos coluna Kromasil 300 partícula de 5um tamanho 0,46 x 150 mm volume de injeção 50

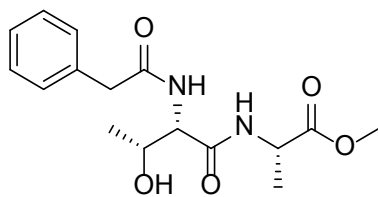
(A) 0,045% TFA em água (B) 0,036% TFA em ACN fluxo de 1,0

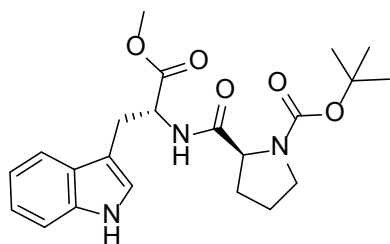


UV (220nm)

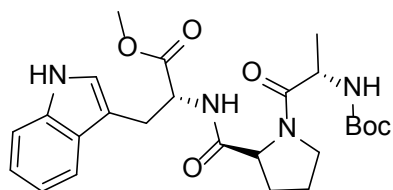
Pk #	Retention Time	Area	Area Percent
1	2,475	497256	2,8
2	6,580	60352	0,3
3	11,268	15621	0,1
4	15,578	31022	0,2
5	15,905	146014	0,8
6	16,816	141093	0,8
7	17,183	244909	1,4
8	17,434	37710	0,2
9	17,683	13016	0,1
10	18,145	256830	1,5
11	18,619	14162897	80,3
12	19,253	129595	0,7
13	19,784	101456	0,6
14	20,020	29982	0,2
15	20,555	126755	0,7
16	21,165	1359130	7,7
17	22,082	277842	1,6

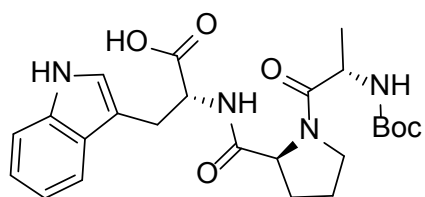
Totals		17631481	100,0
--------	--	----------	-------

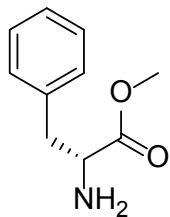
Apêndice 12: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) – composto **12**

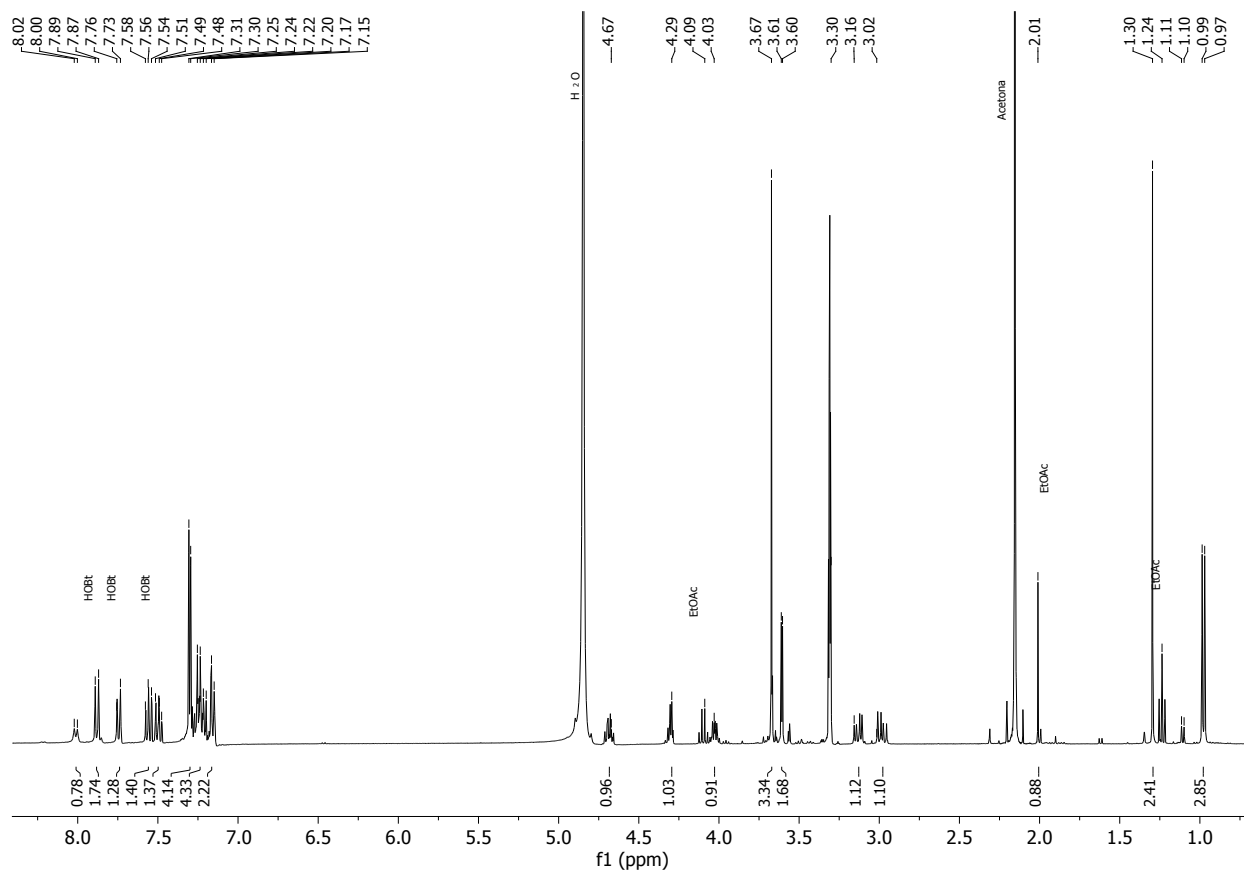
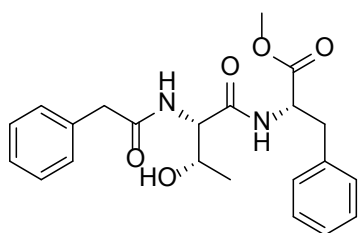
Apêndice 13: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) - composto **13**

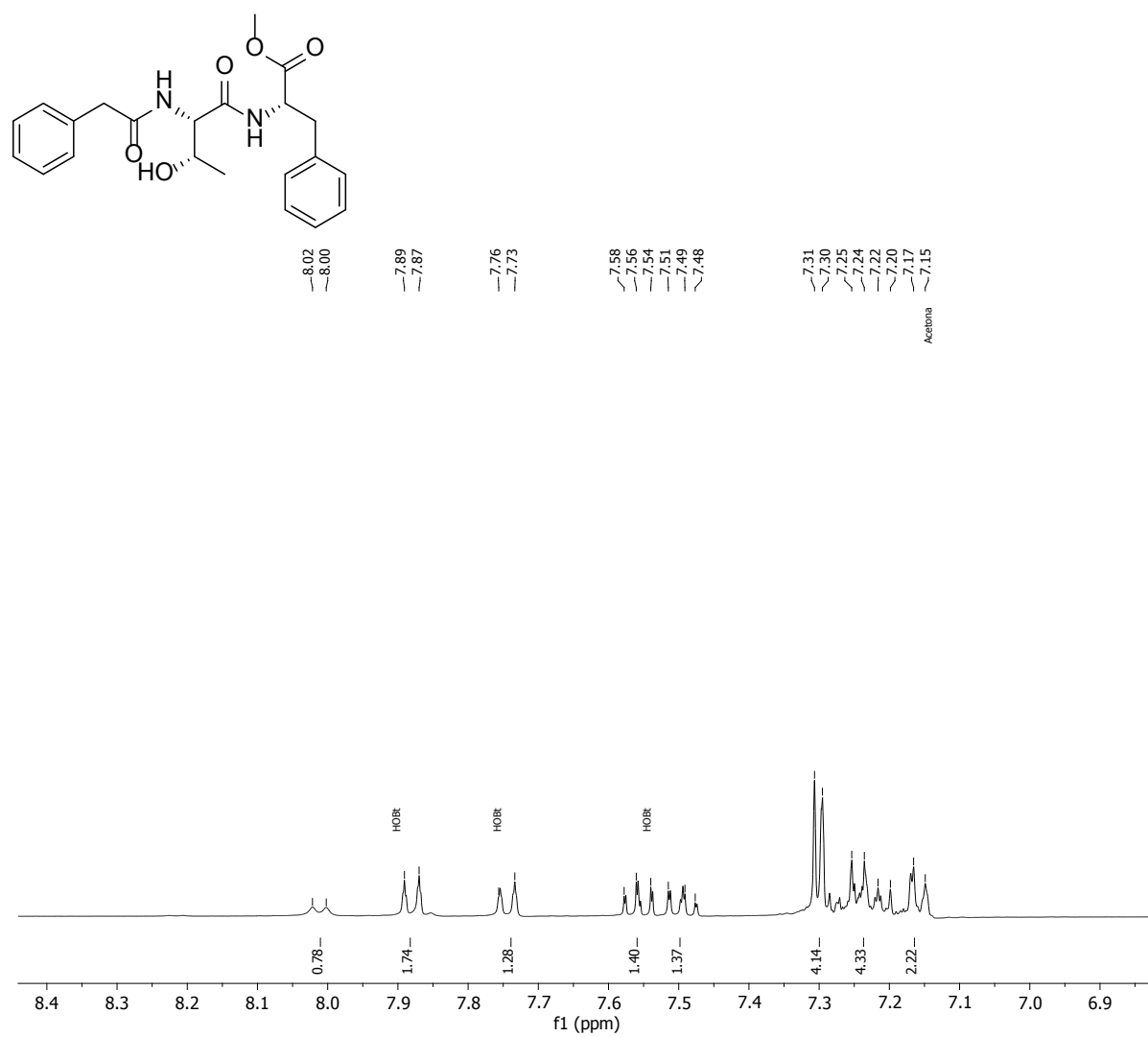
Apêndice 14: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) - composto **15**



Apêndice 15: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) - composto **16**

Apêndice 16: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) - composto **17**

Apêndice 17: Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) - composto 18

Apêndice 18: Espectro ampliado de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) - composto **18**

Apêndice 19: Espectro LC-ESI - composto 19

Display Report

Analysis Info

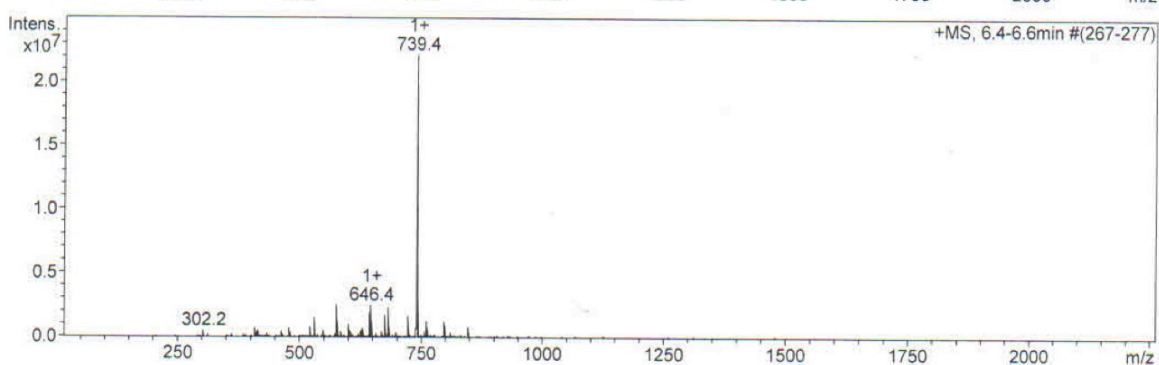
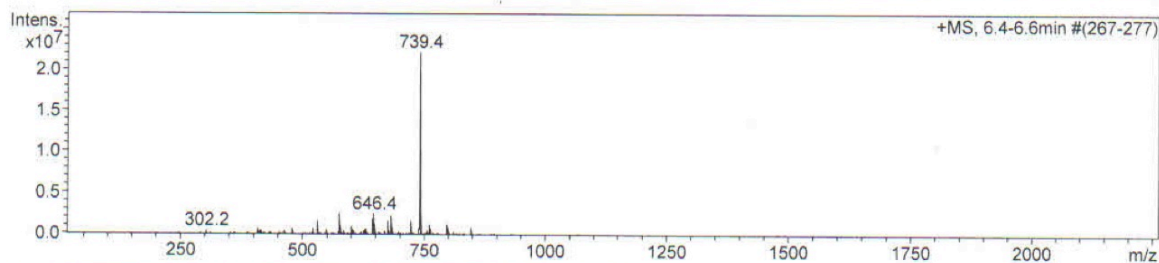
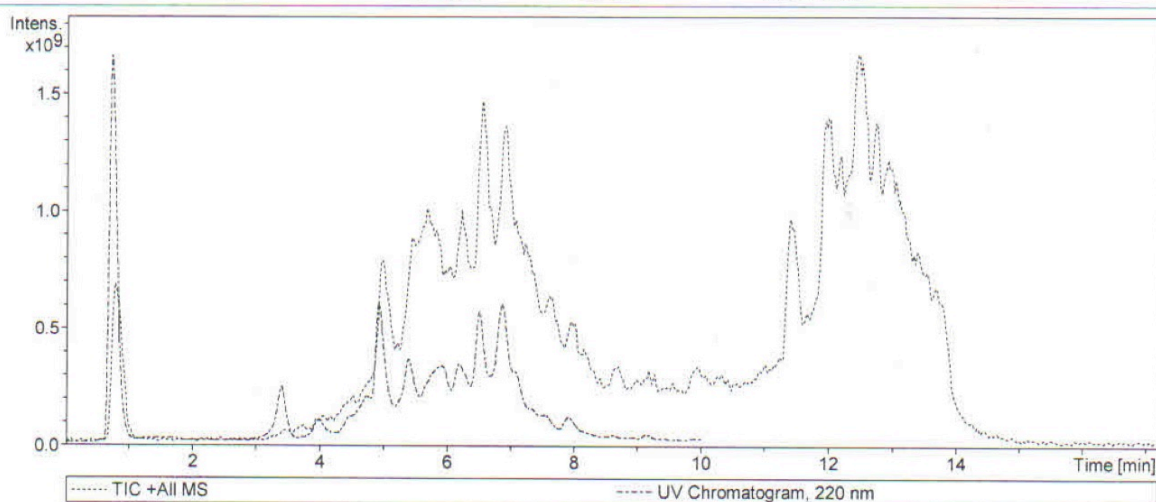
Analysis Name D:\Data\emc2015\brancos\gb1506-maiscon_1-36_01_2464.d
 Method 2464.m
 Sample Name gb1506-maiscon
 Comment

Acquisition Date 10/14/2015 2:13:31 PM

Operator emcilli
 Instrument amaZon SL

Acquisition Parameter

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Enhanced	Scan Begin	70 m/z	Scan End	2200 m/z
Capillary Exit	Resolution	n/a	n/a	Trap Drive	70.7
Accumulation Time	100 μ s	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off



Apêndice 20: Propriedades físico-químicas de peptídeos no mercado e em fase clínica. **NRB:** Número de ligações rotacionáveis; **Nº aa:** Número de aminoácidos; **Via de ADM:** Via de administração.

Peptídeo	PM	LogP	HBA	HBD	TPSA	NOPS	FSP3	NRB	Nº aa	Via de ADM	Estrutura	Classificação
abarelix	1416,06	3,74	28	13	425,0	0,458	38	10	Parenteral	Linear	Oncológicos	
afamelanotide	1636,77	-6,61	40	14	552,6	0,5	34	13	Parenteral	Linear	Hematorreguladores	
alisporivir	1216,64	7,81	23	5	278,8	0,794	15	11	Oral	Cíclico	Antivirais	
almurtide	478,45	-6,97	15	8	246,8	0,722	12	2	Oral	Linear	Imunomodulatórios	
ambamustine	629,61	4,04	8	3	139,1	0,483	19	3	Parenteral	Linear	Oncológicos	
Amphomycin	1290,42	-5,48	33	15	506,8	0,69	38	10	parenteral	Cíclico	Antibióticos	
anamorelin	546,7	3,19	9	3	114,8	0,452	9	2	Oral	Linear	Oncológicos	
anidulafungin	1140,24	0,47	24	14	377,4	0,466	14	7	Parenteral	Cíclico	Antifúngicos	
aspartocin	993,16	-2,09	24	12	450,1	0,595	16	8	Parenteral	Cíclico	Desordens hormonais	
atosiban	994,19	-1,3	23	11	416,3	0,628	18	9	Parenteral	Cíclico	Desordens hormonais	
bacitracin	1422,69	-2,86	33	17	556,2	0,636	31	11	parenteral	Cíclico	Antibióticos	
basifungin	1101,42	7,89	19	4	235,4	0,65	12	9	Oral	Cíclico	Antifúngicos	
bestatin	308,37	-1,76	6	4	112,7	0,5	8	2	Oral	Linear	Oncológicos	
bivalirudin	2180,29	-8,66	57	28	901,6	0,541	67	20	Parenteral	Linear	Hematorreguladores	
boceprevir	519,68	1,84	10	4	150,7	0,815	8	3	Oral	Linear	Antivirais	
Bortezomib	384,24	1,66	8	4	124,4	0,368	9	2	Parenteral	Linear	Oncológicos	
capreomycinA	668,71	-8,87	22	14	378,4	0,6	10	6	Parenteral	Cíclico	Antibióticos	
CapreomycinB	652,71	-7,65	21	13	358,2	0,6	9	6	Parenteral	Cíclico	Antibióticos	
carfilzomib	719,91	3,61	12	4	158,5	0,575	20	4	Parenteral	Linear	Oncológicos	
casokefamide	632,71	1,01	13	8	226	0,303	16	5	Oral	Linear	Analgésicos	
caspofungin	1093,31	-2,19	25	16	412	0,75	23	7	Parenteral	Cíclico	Antifúngicos	
cebaracetam	335,79	1,11	6	1	69,7	0,438	3	2	Oral	Linear	CNS	
cemadotin	640,86	4,36	11	2	122,4	0,686	13	5	Parenteral	Linear	Oncológicos	
cetrorelix	1431,04	1,3	31	17	495,7	0,429	39	10	Parenteral	Linear	Desordens hormonais	

cilengitide	588,66	-3,3	15	8	235,9	0,519	10	5	Parenteral	Cíclico	Oncológicos
cyclosporine	1202,61	7,35	23	5	278,8	0,79	15	11	Oral	Cíclico	Imunomodulatórios
Daclatasvir	738,88	7,37	14	4	174,6	0,45	13	4	Oral	Linear	Antivirais
dactinomycin	1255,42	2,38	28	5	355,5	0,613	8	12	Parenteral	Cíclico	Oncológicos
dalbavancin	1816,69	3,35	38	21	572,5	0,42	22	5	Parenteral	Cíclico	Antibióticos
danegaptide	291,3	-2,95	7	3	112,7	0,357	4	2	Oral	Linear	Hematorreguladores
daptomycin	1620,67	-6,97	43	22	702	0,528	35	14	Parenteral	Cíclico	Antibióticos
davunetide	824,92	-5,41	22	10	355,8	0,722	22	8	Parenteral/Nasal	Linear	CNS
degarelix	1632,26	2,79	34	17	512,9	0,415	41	10	Parenteral	Linear	Oncológicos
delmitide	1228,57	2,01	28	16	480	0,695	52	10	Oral	Linear	Antiinflamatórios
Doreptide	332,4	0,44	7	4	113,3	0,471	7	3	Oral	Linear	CNS
Edoxaban											
tosilate	548,06	1,45	11	3	164,9	0,5	6	3	Oral	Linear	Hematorreguladores
Edratide	2309,53	-2,88	55	31	883,2	0,468	71	19	Parenteral	Linear	Antiinflamatórios
Efegatran	416,52	0,78	9	5	140,4	0,524	12	3	Parenteral	Linear	Hematorreguladores
Efeprestin	852,93	2,02	18	5	236,8	0,432	7	8	Oral	Cíclico	Antibióticos
Egaptivon Pegol	3709,57	-29,6	84	44	1840,9	0,633	104	40	Parenteral	Linear	Hematorreguladores
Elagolix	631,59	6,85	8	2	99,2	0,281	12	2	Oral	Linear	Oncológicos
Eledoisin	1188,4	-4,28	28	14	463,3	0,648	36	11	Oftálmico	Linear	Hematorreguladores
Elpamotide	1073,21	-5,77	29	17	491,5	0,596	35	9	Parenteral	Linear	Oncológicos
Emideltide	848,81	-8,06	25	14	406,7	0,457	25	9	-	Linear	CNS
enalapril maleate	376,45	2,33	7	2	95,9	0,55	10	3	Oral	Linear	Hematorreguladores
enfuvirtide	4491,88	-11,97	115	63	1902,9	0,559	151	36	Parenteral	Linear	Antivirais
EntrestoA(TM)	411,49	4,64	6	2	92,7	0,375	12	4	Oral	Linear	Hematorreguladores
EntrestoB(TM)	435,52	5,76	8	2	112,1	0,375	10	3	Oral	Linear	Hematorreguladores
Enviomycin	685,69	-9,91	23	15	392,9	0,6	10	5	Parenteral	Cíclico	Antibióticos
Eptifibatide	831,96	-2,62	20	11	374,5	0,514	11	7	Parenteral	Cíclico	Hematorreguladores
Freselestat	452,51	3,36	10	2	144,1	0,391	7	2	Oral	Linear	Imunomodulatórios
Ganirelix	1570,32	5,05	31	16	451,5	0,5	48	10	Parenteral	Linear	Desordens hormonais
Geclosporin	1216,64	7,8	23	5	278,8	0,794	16	11	Oral	Cíclico	Imunomodulatórios
Glaspimod	1171,17	-8,96	34	18	566,8	0,667	43	10	Parenteral	Linear	Hematorreguladores
Glufanide	333,34	-2,04	8	5	145,5	0,313	8	2	Parenteral, nasal	Linear	Oncológicos

Goralatide	487,5	-5,31	14	7	228,5	0,7	15	4	Parenteral Tópico,	Linear	Imunomodulatórios
Gramicidin D	1811,22	9,35	35	20	519,9	0,51	50	32	oftálmico	Cíclico	Antibióticos
Gusperimus	387,52	-0,63	10	8	178,4	0,824	18	3	Parenteral	Linear	Imunomodulatórios
Icatibant	1304,52	-4,69	32	18	544,5	0,61	33	10	Parenteral	Linear	Antialérgicos
Isenagan	1900,29	-5,11	48	31	903,7	0,577	44	17	Oral	Cíclico	Antibióticos
Lagatide	738,88	-2,57	19	10	310,3	0,758	22	7	- Nasal,	Linear	Gastrointestinais
Lancovutide	2007,23	-23,45	48	19	826,8	0,551	23	17	Oftálmico	Cíclico	Antibióticos
Larazotide	725,83	-4,53	19	9	301,3	0,719	21	7	Oral	Linear	Antiinflamatórios
Leconotide	2756,23	-17,9	71	43	1347,7	0,673	39	27	Parenteral	Linear	Analgésicos
Linaclotide	1526,74	-6,54	36	19	725,7	0,525	14	14	Oral	Cíclico	Gastrointestinais
lisinopril	405,49	-1,08	8	4	133	0,571	12	3	Oral	Linear	Hematorreguladores
Metkefamide	600,73	0,64	12	6	222,3	0,414	17	5	-	Linear	Analgésicos
Micafungin	1270,27	-3,62	32	16	518,8	0,482	18	7	Parenteral	Cíclico	Antifúngicos
Mifamurtide	1237,5	7,34	25	10	385,9	0,864	54	3	Parenteral	Linear	Oncológicos
Murabutide	548,58	-2,18	15	7	235,8	0,783	16	3	Nasal	Linear	Imunomodulatórios
Nemifitide	694,76	-1,17	16	9	277,1	0,394	19	5	Parenteral	Linear	CNS
Nosiheptide	1222,36	5,75	25	10	552,3	0,216	5	5	Parenteral	Cíclico	Antibióticos
Orientiparcin	1557,99	-3,52	36	20	575	0,479	15	6	-	Cíclico	Antibióticos
Oritavancin	1793,1	1,89	36	20	561	0,419	19	5	Parenteral	Cíclico	Antibióticos
Orotirelin	389,37	-1,84	12	5	179,4	0,375	6	3	-	Linear	CNS
Oxeclosporin	1262,66	6,01	25	6	308,3	0,797	19	11	Nasal	Cíclico	Imunomodulatórios
Pareptide	298,38	0,01	7	3	104,5	0,786	7	3	Parenteral Nasal,	Linear	Antiinflamatórios
Pentagastrin	767,89	0,04	16	8	276,2	0,432	21	5	parenteral Oftálmico,	Linear	Gastrointestinais
Pentigetide	588,57	-7,71	19	11	327,7	0,636	18	5	Oral, nasal	Linear	Antialérgicos
Peplomycin	1473,59	-6,52	39	21	695,6	0,557	38	6	Parenteral	Cíclico	Oncológicos
Pexiganan	2477,17	-0,18	54	32	914,4	0,672	94	22	Topical Oral,	Linear	Antibióticos
Pidotimod	244,27	-0,71	6	2	112	0,667	2	2	Parenteral	Linear	Imunomodulatórios
Pimelautide	628,76	-1,3	15	8	260,1	0,759	27	5	Parenteral	Linear	Imunomodulatórios
Plecanatide	1681,89	-9,07	44	23	819,3	0,677	28	16	Oral	Cíclico	Oncológicos
Plitidepsin	1110,34	5,72	22	4	284,7	0,702	15	8	Parenteral	Cíclico	Oncológicos

Polymyxin B	963,13	-6,45	25	16	432,5	0,651	18	9	Parenteral, oftálmico	Cíclico	Antibióticos
Posatirelin	352,43	0,62	8	3	121,6	0,765	6	3	Parenteral	Linear	CNS
Pralmorelin	817,97	3,35	15	9	256,4	0,333	21	7	Parenteral, nasal	Linear	Desordens hormonais
Prezotide	340,38	-4,5	10	6	176,2	0,571	11	3	Topical	Linear	Antiinflamatórios
romidepsin	540,7	2,73	10	4	193,3	0,625	2	5	Parenteral	Cíclico	Oncológicos
romurtide	887,11	0,91	19	10	305	0,837	35	2	Parenteral	Linear	Imunomodulatórios
Rotigaptide	617,65	-2,17	16	7	240,6	0,536	12	6	Parenteral	Linear	Hematorreguladores
Spaglumat	304,25	-2,26	10	5	170,1	0,545	9	2	Nasal, oftálmico	Linear	Antialérgicos
Tabilautide	571,71	-0,46	13	7	231	0,778	24	4	-	Linear	Imunomodulatórios
Tabimorelin	528,68	5,12	7	2	95,7	0,344	12	2	Oral	Linear	Desordens hormonais
Talaglumetad	256,26	-4,05	7	4	129,7	0,727	5	2	Oral	Linear	CNS
Tasidotin	606,84	3,94	11	2	122,4	0,844	11	5	Oral	Linear	Oncológicos
teicoplanin	1879,66	-2,51	42	24	662,4	0,42	20	7	Oral, parenteral	Cíclico	Antibióticos
telaprevir	679,85	2,19	13	4	179,6	0,722	13	5	parenteral	Linear	Antivirais
telavancin	1755,63	-0,71	38	23	607,9	0,525	30	6	Oral	Cíclico	Antibióticos
Thymopentin	679,76	-5,05	18	11	327,7	0,567	26	5	Parenteral	Linear	Imunomodulatórios
Tifuvirtide	5036,56	-6,53	124	68	2064,8	0,54	170	43	Parenteral	Linear	Antivirais
Tiopronin	163,19	-0,56	4	2	105,2	0,6	3	2	Parenteral	Linear	Desordens urinárias
Triletide	505,57	2,35	10	4	142,3	0,296	13	3	Oral	Linear	Gastrointestinais
Ulimorelin	538,65	3,78	8	3	99,8	0,5	3	4	Oral, parenteral, retal	Cíclico	Gastrointestinais
Vancomycin	1449,25	-3,15	33	19	530,5	0,424	13	7	Oral, parenteral, retal	Cíclico	Antibióticos
Velcalcetide	1016,19	-9,03	31	22	583	0,658	39	7	parenteral	Linear	Desordens hormonais
ziconotide	2639,13	-16,1	68	42	1310,9	0,667	47	25	Parenteral	Cíclico	Analésicos