UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Ariane Fernandes Bertonha

**Isolamento, síntese de análogos e estudo da relação estrutura
atividade de metabólitos secundários bioativos.**

São Carlos

2018

ARIANE FERNANDES BERTONHA

**Isolamento, síntese de análogos e estudo da relação estrutura atividade de
metabólitos secundários bioativos.**

Volume 1

Versão Corrigida

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

São Carlos

2018

Dedicatória

*Dedico este trabalho a minha família, em especial,
ao meu pai e minha mãe, Laerte e Tania, e ao meu irmão Arian.*

Pois sempre acreditaram em mim e me deram asas.

E, ao Jorge, por todo amor, apoio e compreensão.

Agradecimentos

Aos meus pais, Laerte e Tania, ao meu esposo, Jorge, ao meu irmão, Arian, e a minha cunhada, Ariane. Obrigado pelo amor e apoio incondicionais.

Aos docentes das escolas EMEF “João Casella”, EE “Maestro Antônio Amato”, EE “Achiles Malvezzi” e do Instituto de Química de São Carlos-USP, por todo conhecimento compartilhado. Especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck, pelos ensinamentos e pela oportunidade em realizar o doutorado em seu grupo de pesquisa.

Aos técnicos, alunos e ex-alunos do grupo de pesquisa orientado pelo Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck. Agradeço a ajuda e os incentivos que contribuíram para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Daniel Romo (Baylor University, USA), por me receber em seu laboratório e contribuir com seu conhecimento para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio G. Ferreira (DQ – UFSCar), pela obtenção de alguns dos espectro de RMN deste trabalho.

À Prof. Dra. Lara D. Sette (CPQBA-UNICAMP), pela concessão das linhagens fúngicas estudadas.

Ao Prof. Dr. Rafael V. C. Guido e ao Prof. Dr. Glaucius Oliva do IFSC-USP, ao Prof. Dr. Danilo C. Miguel e à Profa. Dra. Fernanda R. Gadelha do DB-UNICAMP, à Prof. Dra. Raquel Santos e ao Prof. Dr. Carlos Martins da UNIFRAN-Franca, pela realização dos bioensaios.

Ao Instituto de Química de São Carlos e ao Departamento de Química da Baylor University, pela infraestrutura disponibilizada.

À CAPES e ao programa Ciências sem Fronteiras do CNPq, pelas bolsas de estudo concedidas.

Aos amigos e familiares, pelo companheirismo e felicidade presentes na minha vida. Em especial, à Karen Nicacio, Renata Torres, Fabiana Tessari e Raquel Urano, pelo apoio no desenvolvimento desse trabalho.

Ao grupo de corrida “Pelotão” organizado pela educadora física Gizele Martins (CEFER-USP, São Carlos-SP), pela amizade e pelo incentivo na busca e concretização de novos desafios.

Resumo

BERTONHA, Ariane Fernandes. **Isolamento, síntese de análogos e estudo da relação estrutura atividade de metabólitos secundários bioativos**. 2018, 498 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São carlos, 2018.

Metabólitos secundários de organismos vivos constituem uma fonte promissora para a descoberta de compostos biologicamente ativos, em particular para o tratamento de doenças como câncer, malária e doenças infecciosas. O capítulo 1 desta tese descreve a síntese e a avaliação da relação estrutura *versus* atividade de análogos da pseudoceratidina. A pseudoceratidina e sete de seus análogos apresentaram boa atividade contra *P. falciparum*, cepa 3D7, sensível à cloroquina. Os análogos apresentaram alto índice de seletividade, sugerindo que pequenas modificações estruturais exercem influência na redução da citotoxicidade. A pseudoceratidina também apresentou atividade antiplasmodial de ação rápida contra linhagens resistentes de *P. falciparum*, cepa K1 ($IC_{50} = 1,1 \pm 0,1 \mu M$). Outro metabólito secundário de destaque é o alcaloide citotóxico, agelastatina A. No capítulo 2 é descrita a síntese racêmica do esqueleto central ABC da 7-hidroxi agelastatina A. O sistema tricíclico de 5, 6 e 5 membros foi obtido em 4 etapas e com rendimento global de 8% a partir de reagentes comerciais. O capítulo 3 descreve o isolamento de peptaibóis produzidos pelo fungo *Hypocrea* sp., oriundo da Antártica. Foram isolados seis peptaibóis: a trichogina GA IV, os isômeros AT1M3I-4 e AT1M3I-5, a AT1M3I-3, de esqueleto semelhante à trikoningina KB, a trichokonina VI e a trichokonina VIII. Foram realizados estudos estruturais completos destes peptídeos de massa molecular maior do que 800 Da, inclusive estudos conformacionais por dicróismo circular. A trichokonina VI e a trichokonina VIII foram ativas contra bactérias Gram-positivas, linhagens de células cancerígenas (MCF-7, MCF-10A, ACP01, HELA e A549) e contra o parasita *P. falciparum*, cepa 3D7, com IC_{50} de $0,6 \pm 0,2$ e $0,5 \pm 0,2 \mu M$, respectivamente.

Palvaras-chaves: pseudoceratidina, agelastatina A, paptaibols, malária.

Abstract

BERTONHA, Ariane Fernandes. **Isolation, synthesis of analogues and structure activity relationship studies of bioactive secondary metabolites.** 2018, 498 p. Thesis (PhD in Organic and Biological Chemistry) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Secondary metabolites of living organisms constitute a promising source for the discovery of biologically active compounds, in particular for the treatment of diseases such as cancer, malaria and infectious diseases. Chapter 1 of this thesis describes the synthesis and the evaluation of the structure *versus* activity relationship of pseudoceratidine analogs. Pseudoceratidine and seven of its analogues showed good activity against *P. falciparum*, strain 3D7, sensitive to chloroquine. Synthetic analogues showed a high selectivity index, suggesting that small structural modifications influence the reduction of cytotoxicity. Pseudoceratidine also showed fast-acting antiplasmodial activity against resistant strains of *P. falciparum*, strain K1 ($IC_{50} = 1.1 \pm 0.1 \mu M$). Another important secondary metabolite is the cytotoxic alkaloid, agelastatin A. In Chapter 2 the racemic synthesis of the central ABC core of 7-hydroxy agelastatin A is reported. The tricyclic ring system of 5, 6 and 5 membered was obtained in 4 steps and with an overall yield of 8% from commercial reagents. Chapter 3 describes the isolation of peptaibols produced by the fungus *Hypocrea* sp., from Antarctica. Six peptaibols have been isolated: trichogin GA IV, isomers AT1M3I-4 and AT1M3I-5, AT1M3I-3, with a similar skeleton to trikoningin KB, trichokonin VI and trichokonin VIII. A complete structural investigation of these peptides has been performed, including conformational analyses by circular dichroism spectroscopy. These peptides have a molecular weight higher than 800 Da. Trichokonin VI and trichokonin VIII were active against Gram-positive bacteria, cancer cells lines (MCF-7, MCF-10A, ACP01, HELA and A549) and against *P. falciparum*, 3D7 strain, with an IC_{50} value of 0.6 ± 0.2 , 2 and $0.5 \pm 0.2 \mu M$, respectively.

Keywords: pseudoceratidine, agelastatin A, peptaibols, malaria.

Lista de Figuras

Figura 1. Produtos naturais com atividade anti-tumoral.....	27
Figura 2. Distribuição global das Tripanossomíases, Leishmanioses e Malária de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS). O mapa mostra 5 regiões diferentes do mundo de acordo com a OMS: África, Américas, Mediterrâneo Ocidental, Europa e Sudoeste Asiático.....	28
Figura 3. Estrutura do antimoniato de meglumina, utilizado no tratamento das leishmanioses.	29
Figura 4. Fármacos de segunda escolha utilizados no tratamento das leishmanioses.	30
Figura 5. Fármacos utilizados no tratamento da Doença de Chagas.....	31
Figura 6. Fármacos comumente utilizados no tratamento da Malária.....	32
Figura 7. Estruturas de alguns representantes da classe dos alcaloides marinhos bromopirrólicos.....	35
Figura 8. Estrutura da oroidina (22).....	35
Figura 9. Valores de inibição da <i>PfFabI</i> para componentes isolados da esponja <i>Agelas oroides</i> por Tasdemir <i>et al.</i> (2007) ²⁴	36
Figura 10. Estrutura de alguns dos alcaloides estudados por Scala <i>et al.</i> (2010) ²¹	37
Figura 11. Estrutura da pseudoceratidina.....	38
Figura 12. Bioatividade reportada por Ponasik <i>et al.</i> ^{27,28} (a) e Behrens <i>et al.</i> ²⁹ (b) contra <i>Staphylococcus aureus</i> para os compostos como concentração mínima inibitória (MIC).	39
Figura 13. Estrutura da pseudoceratidina e análogos isolados a partir da esponja <i>Tedania brasiliensis</i>	40
Figura 14. Espectro de massas de alta resolução da pseudoceratina (28).....	43

Figura 15. Modificações propostas para três principais características estruturais da pseudoceratina (28).....	44
Figura 16. Rota de biossíntese da espermidina e espermina.....	49
Figura 17. Espectro de massas de alta resolução do derivado 53	53
Figura 18. Expansão do espectro de RMN de ^1H do derivado 53 (MeOH- d_4 , 600 MHz).....	53
Figura 19. Mecanismo geral para as reações de acoplamento utilizando HBTU56	
Figura 20. Estruturas, valores de IC_{50} (μM) e índice de seletividade da pseudoceratidina e análogos ativos contra <i>P. falciparum</i>	62
Figura 21. Morfologia das células HepG2 antes (esquerda) e depois (direita) do tratamento com a pseudoceratidina (28) a $10\ \mu\text{M}$	64
Figura 22. Microscopia dos parasitas sincronizados tratados continuamente com pseudoceratidina (28) em uma concentração de 10 vezes o valor de IC_{50} (linha superior) e DMSO (controle, linha de fundo). As imagens são representativas de três experiências independentes.....	65
Figura 23. Gráfico de isoblograma para análise da interação medicamentosa da pseudoceratidina (28) e do artesunato de sódio (20).....	66
Figura 24. Estruturas e valores de EC_{50} (μM) dos análogos da pseudoceratidina ativos contra <i>L. (L.) infantum</i> , <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>T. cruzi</i>	67
Figura 25. Atividade <i>in vitro</i> para 49 , 61 e 65 contra amastigotas intracelulares de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> . Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> por 1 h ($\text{MOI} = 10$). Após 24 h, as células infectadas foram incubadas com 6,125; 25; 50 ou $100\ \mu\text{M}$ de cada composto por 24 h. Células fixadas em MeOH foram coradas e a infecção foi determinada contando 300 células/lamela. As experiências foram realizadas em triplicata. Os resultados apresentados são representativos de duas experiências independentes. (A) Barras indicam o número de amastigotas intracelulares. Os números acima de cada barra indicam a percentagem de redução em relação aos macrófagos infectados do controle não tratados. (B) Exemplos de fotomicrografias mostrando macrófagos infectados não tratados (a) e macrófagos infectados incubados com	

o composto 42 a 100 mM (b). Setas apontam para amastigotas intracelulares. Barra = 10.....	68
Figura 26. Agelastatinas isoladas até o momento.....	94
Figura 27. Propostas de biossíntese para a agelastatina A (67).....	95
Figura 28. Visão geral da relação estrutura atividade da agelastatina A.....	96
Figura 29. Conformação de menor energia da agelastatina A utilizando-se o protocolo MM2 do Software Chem3D (Cambridge Softwares). Fonte: autoria própria.	97
Figura 30. Comparação estrutural da agelastatina A (67) e do derivado inédito 7-hidroxi agelastatina A (7-OH agelastatina A) (73).....	98
Figura 31. Estrutura tetracíclica da agelastatina A (67).....	99
Figura 32. Análise retrosintética da rota proposta para a obtenção do esqueleto ABC presente no derivado 7-OH agelastatina A (57).....	102
Figura 33. Expansão do espectro de IV dos compostos 86 e 85 , respectivamente.	103
Figura 34. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C da amida 88 (MeOH- <i>d</i> ₄ , 151 MHz).....	107
Figura 35. Expansão do espectro de IV dos compostos 88 e 95 , respectivamente.....	108
Figura 36. Espectro de RMN de ^1H do composto 95 (MeOH- <i>d</i> ₄ , 600 MHz).....	109
Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 95 (MeOH- <i>d</i> ₄ , 151 MHz)....	110
Figura 38. Espectro de RMN de ^1H do composto 98 (MeOH- <i>d</i> ₄ , 600 MHz).....	112
Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 98 (MeOH- <i>d</i> ₄ , 151 MHz)....	113
Figura 40. Espectro de RMN de ^1H da reação de formação da monobromo carbinolamina 98	114
Figura 41. Exemplos de produtos naturais bioativos de fungos marinhos: aigialomicina D e ascosalipirrolidinona A.....	125

Figura 42. Estruturas de peptaibóis de cadeia longa (18 a 20 resíduos de aminoácidos), média (11 a 16 resíduos de aminoácidos) e curta (6 a 10 resíduos de aminoácidos).	128
Figura 43. Procedimento geral para extração, fracionamento e análise dos extratos de fungos. Fonte: autoria própria.	137
Figura 44. Procedimento realizado para a extração e o fracionamento do meio de cultivo em escala semi-preparativa para a linhagem AT1. Fonte: autoria própria.....	139
Figura 45. Resumo do procedimento geral para extração, fracionamento e análise dos extratos de fungos. Fonte: autoria própria.....	146
Figura 46. Gráficos da inibição do crescimento do protozoário <i>L. (L.) amazonensis</i> para a linhagem AT1.	148
Figura 47. Cromatograma exploratório da fração AT1M3, monitorado no comprimento de onda de 305 nm (Análise realizada em coluna XTerra RP18 (4,6 x 250 mm; 5µm, Waters®) e gradiente de eluição de MeOH em H ₂ O (0,1% de ácido fórmico): 10% à 100% de MeOH de 1-30 min, permanecendo nesta condição por 5 min e voltando-se a condição inicial de eluição em 5 min).....	150
Figura 48. Fluxograma da separação da fração AT1M3.....	150
Figura 49. Cromatograma de separação da fração AT1M3I, monitorado por ELSD.	151
Figura 50. Fluxograma da separação da fração AT1M3I.	151
Figura 51. Cromatograma exploratório da fração AT1M3, monitorado no comprimento de onda de 305 nm (Análise realizada em coluna XTerra RP18 (4,6 x 250 mm; 5µm, Waters®) e gradiente de eluição de MeOH em H ₂ O (0,1% de ácido fórmico): 10% à 100% de MeOH de 1-30 min, permanecendo nesta condição por 5 min e voltando-se a condição inicial de eluição em 5 min).....	152
Figura 52. Fluxograma da separação da fração AT1M5.	153
Figura 53. Cromatograma da fração AT1M5O, monitorado por ELSD, e espectros de massas dos picos em 27.12 e 27.58 min (Análise realizada em coluna XTerra RP18 (4,6 x 250 mm; 5µm, Waters®) e gradiente de eluição de MeOH em H ₂ O (0,1% de ácido fórmico): 10% à 100% de MeOH de 1-30 min,	

permanecendo nesta condição por 5 min e voltando-se a condição inicial de eluição em 5 min).	154
Figura 54. Cromatograma de separação da fração AT1M5O, monitorado no comprimento de onda de 210 nm.	155
Figura 55. Fluxograma da separação da fração AT1M5O.....	155
Figura 56. Espectro de massas de alta resolução do composto AT1M3I-6 (HRMS ESI ⁺ , intervalo 500–1200 Da).	157
Figura 57. Espectro de RMN de ¹³ C do composto AT1M3I-6 (151 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	158
Figura 58. Espectro de RMN de ¹ H do composto AT1M3I-6 (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	159
Figura 59. Análise do espectro de massas de alta resolução obtido para a fragmentação do íon <i>m/z</i> 1066,87 do composto AT1M3I-6 (ESI ⁺ , EC 30 V).....	160
Figura 60. Estrutura do lipopetaibol trichogina A IV, composto AT1M3I-6.....	161
Figura 61. Expansão dos espectros de massas de alta resolução obtidos para os compostos AT1M3I-4 e AT1M3I-5 (HRMS ESI ⁺ , intervalo 500–1200 Da)....	166
Figura 62. Espectro de RMN de ¹³ C do composto AT1M3I-4 (151 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	167
Figura 63. Espectro de RMN de ¹³ C do composto AT1M3I-5 (151 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	168
Figura 64. Análise do espectro de massas de alta resolução obtido para a fragmentação do íon <i>m/z</i> 1052,78 do composto AT1M3I-4 (ESI ⁺ , EC 30 V).....	169
Figura 65. Análise do espectro de massas de alta resolução obtido para a fragmentação do íon <i>m/z</i> 1052,78 do composto AT1M3I-5 (ESI ⁺ , EC 35 V).....	170
Figura 66. Análise do espectro DEPT-135 do composto AT1M3I-4 (151 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	172
Figura 67. Atribuição dos sinais de carbono para a cadeia lateral do AT1M3I-4.....	172
Figura 68. Expansão do espectro de ROESY para o composto AT1M3I-5 (DMSO- <i>d</i> ₆).	179
Figura 69. Expansão do espectro de ROESY para o composto AT1M3I-4 (DMSO- <i>d</i> ₆).	180

Figura 70. Espectro de massas de alta resolução do composto AT1M3I-3 6 (HRMS ESI ⁺ , intervalo 500–1200 Da).	181
Figura 71. Análise do espectro de massas de alta resolução obtido para a fragmentação do íon m/z 1038,83 do composto AT1M3I-3 (ESI ⁺ , EC 30 V).....	182
Figura 72. Espectros de massas de alta resolução dos compostos AT1M5O-4 e AT1M5O-5 (HRMS ESI ⁺ , intervalo 500–1200 Da).....	184
Figura 73. Espectro de RMN de ¹³ C do composto AT1M5O-4 (MeOH- <i>d</i> ₄ , 151 MHz).....	185
Figura 74. Expansão dos espectros de massas de alta resolução dos compostos AT1M5O-4 e AT1M5O-5 no intervalo de 200-5000 Da (HRMS ESI ⁺).....	186
Figura 75. Análise do espectro de massas de alta resolução obtido para a fragmentação do íon complementar m/z 1163,77 do composto AT1M5O-4 (ESI ⁺ , 35 V).	187
Figura 76. Análise do espectro de massas de alta resolução obtido para a fragmentação do íon complementar m/z 1177,79 do composto AT1M5O-5 (ESI ⁺ , 35 V).	188
Figura 77. Atribuição dos fragmentos carregados complementares, b_{13} e y_7 , obtidos no espectro de massas de alta resolução do composto AT1M5O-4 (HRMS ESI ⁺). Fonte: autoria própria.....	189
Figura 78. Atribuição dos fragmentos carregados complementares, b_{13} e y_7 , obtidos no espectro de massas de alta resolução do composto AT1M5O-5 (HRMS ESI ⁺). Fonte: autoria própria.	190
Figura 79. Espectros de dicroísmo circular para os peptaibóis AT1M3I-3, AT1M3I-4, AT1M3I-5, AT1M3I-6, AT1M5O-4 e AT1M5O-5 em MeOH ($c = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$).....	192
Figura 80. Espectros de dicroísmo circular para os peptaibóis AT1M3I-3, AT1M5O-4 e AT1M5O-5 em MeOH ($c = 0,15 \text{ mg mL}^{-1}$).....	193
Figura 81. Espectros de dicroísmo circular para os peptaibóis AT1M3I-4, AT1M3I-5 e AT1M3I-6 em MeOH ($c = 0,15 \text{ mg mL}^{-1}$).	193
Figura 82. Comparação dos cromatogramas obtidos das reações de Marfey para o composto AT1M3I-6 (em preto) hidrolisado e para a mistura 1 (em azul, 280 nm). Tempo de retenção: (L)-Ile-FDAA - 22,03 min, (L)-Leu-FDAA - 22,36 min.....	197

Figura 83. Expansão da comparação dos cromatogramas obtidos das reações de Marfey para o composto AT1M3I-6 (em preto) hidrolisado e para a mistura 1 (em azul, 280 nm). Tempo de retenção: (L)-Ile-FDAA - 22,03 min, (L)-Leu-FDAA - 22,36 min.197

Figura 84. Comparação dos cromatogramas obtidos das reações de Marfey para o composto AT1M3I-5 hidrolisado (em preto) e para a mistura 2 (em azul, 280 nm). Tempo de retenção: (L)-Val-FDAA - 20,31 min, (L)-Ile-FDAA - 22,05 min, (L)-Leu-FDAA - 22,38 min.198

Figura 85. Expansão da comparação dos cromatogramas obtidos das reações de Marfey para o composto AT1M3I-5 hidrolisado (em preto) e para a mistura 2 (em azul, 280 nm). Tempo de retenção: (L)-Val-FDAA - 20,31 min, (L)-Ile-FDAA - 22,05 min, (L)-Leu-FDAA - 22,38 min.198

Figura 86. Comparação dos cromatogramas obtidos das reações de Marfey para o composto AT1M3I-4 hidrolisado (em preto) e para a mistura 2 (em azul, 280 nm). Tempo de retenção: (L)-Val-FDAA - 20,31 min, (L)-Ile-FDAA - 22,05 min, (L)-Leu-FDAA - 22,38 min.198

Figura 87. Expansão da comparação dos cromatogramas obtidos das reações de Marfey para o composto AT1M3I-4 hidrolisado (em preto) e para a mistura 2 (em azul, 280 nm). Tempo de retenção: (L)-Val-FDAA - 20,31 min, (L)-Ile-FDAA - 22,05 min, (L)-Leu-FDAA - 22,38 min.199

Figura 88. Estruturas dos peptaibóis AT1M3I-6, AT1M3I-5 e AT1M3I-4.....199

Figura 89. Comparação dos cromatogramas obtidos das reações de Marfey para o composto AT1M5O-4 hidrolisado (em azul) e para a mistura 3 (em preto, 280 nm). Tempo de retenção: (L)-Gln-FDAA - 15,28 min, (L)-Pro-FDAA - 19,92 min, (L)-Ala-FDAA - 17,36 min (L)-Val-FDAA - 20,30 min, (L)-LeuFDAA - 22,36 min.....200

Figura 90. Expansão da comparação dos cromatogramas obtidos das reações de Marfey para o composto AT1M5O-4 hidrolisado (em azul) e para a mistura 3 (em preto, 280 nm). Tempo de retenção: (L)-Gln-FDAA - 15,28 min, (L)-Pro-FDAA - 19,92 min, (L)-Ala-FDAA - 17,36 min (L)-Val-FDAA - 20,30 min, (L)-LeuFDAA - 22,36 min.....200

Figura 91. Comparação dos cromatogramas obtidos das reações de Marfey para o composto AT1M5O-5 hidrolisado (em azul) e para a mistura 3 (em preto, 280 nm). Tempo de retenção: (L)-Gln-FDAA - 15,28 min, (L)-Pro-FDAA - 19,92 min,

(L)-Ala-FDAA - 17,36 min (L)-Val-FDAA - 20,30 min, (L)-LeuFDAA - 22,36 min.....201

Figura 92. Expansão da comparação dos cromatogramas obtidos das reações de Marfey para o composto AT1M5O-5 hidrolisado (em azul) e para a mistura 3 (em preto, 280 nm). Tempo de retenção: (L)-Gln-FDAA - 15,28 min, (L)-Pro-FDAA - 19,92 min, (L)-Ala-FDAA - 17,36 min (L)-Val-FDAA - 20,30 min, (L)-LeuFDAA - 22,36 min.....201

Figura 93. Estruturas dos peptaibóis AT1M5O-4 e AT1M5O-5.203

Figura 94. Compostos isolados do fungo *Hypocrea* sp. oriundo da Antártica.....208

Lista de Tabelas

Tabela 1. Atividade antileishmanial, anti- <i>T. cruzi</i> , antiplasmodial e citotocidade da pseudoceratidina e análogos.....	59
Tabela 2. Atividade antiplasmodial da pseudoceratidina (28) e de antimaláricos usados no tratamento de <i>P. falciparum</i> sensível (cepa 3D7) e resistente (cepa K1).....	65
Tabela 3. Identificação das linhagens fúngicas avaliadas neste estudo.....	135
Tabela 4. Frações das linhagens fúngicas oriundas da Antártica ativas nos bioensaios contra <i>L. (L.) infantum</i> e citotóxico.	147
Tabela 5. Frações ativas no bioensaio contra <i>L. (L.) amazonensis</i> da linhagem AT1.....	147
Tabela 6. Comparação dos deslocamentos químicos (δ) dos ^{13}C dos aminoácidos da trichogina AIV e AT1M3I-6 (MeOH- d_4) ⁸²	162
Tabela 7. Comparação dos deslocamentos químicos (δ) dos ^1H ligados aos carbonos α da trichogina AIV e AT1M3I-6 (MeOH- d_4) ⁸²	164
Tabela 8. Comparação dos deslocamentos químicos dos ^1H das cadeias laterais dos aminoácidos da trichogina AIV e AT1M3I-6 (MeOH- d_4) ⁸²	165
Tabela 9. Deslocamentos químicos (δ) dos ^{13}C dos aminoácidos do peptídeo AT1M3I-4 (DMSO- d_6).	173
Tabela 10. Deslocamentos químicos (δ) dos ^1H das cadeias laterais dos aminoácidos do peptídeo AT1M3I-4 (DMSO- d_6).	174
Tabela 11. Deslocamentos químicos (δ) dos ^{13}C dos aminoácidos do peptídeo AT1M3I-5 (DMSO- d_6).	176
Tabela 12. Deslocamentos químicos (δ) dos ^1H das cadeias laterais dos aminoácidos do peptídeo AT1M3I-5 (DMSO- d_6).	177
Tabela 13. Avaliação da mínima concentração inibitória (MIC) frente a bactérias multirresistentes dos peptaibóis AT1M5O-4 e AT1M5O-5.....	203
Tabela 14. Concentração inibitória de 50% (IC_{50}) contra células cancerígenas.....	205

Tabela 15. Concentração inibitória de 50% (IC ₅₀) contra <i>P. falciparum</i> , cepa 3d7, sensível a cloroquina.	206
Tabela 16. Avaliação da atividade citotóxica contra células HepG2 e cálculo de índice de seletividade (MDL ₅₀ / IC ₅₀).	207

Índice de Esquemas

Esquema 1. Síntese do 4,5-dibromo-1-tricloroacetil pirrol (43).	42
Esquema 2. Síntese da pseudoceratidina (28).	42
Esquema 3. Reação de Eschweiler-Clarke para síntese do derivado 44	45
Esquema 4. Mecanismo geral para a reação de Eschweiler-Clarke. Fonte: autoria própria.	45
Esquema 5. Síntese do derivado 44	45
Esquema 6. Síntese do derivado 45	46
Esquema 7. Estratégia para obtenção dos análogos 46 , 47 , 48 , 49 e 50 . ^a THF, 19°C; ^b Et ₃ N, THF, 110 °C, micro-ondas (300 W).	48
Esquema 8. Síntese do derivado 51	51
Esquema 9. Síntese do derivado 52	51
Esquema 10. Síntese do derivado 53	52
Esquema 11. Síntese do derivado 56	54
Esquema 12. Síntese do derivado 58	55
Esquema 13. Compostos sintetizados a partir de ácidos carboxílicos análogos de indol, benzimidazol, furanos, tiofenos e piridinas.	56
Esquema 15. Síntese racêmica da Agelastatina A desenvolvida por Weireb e colaboradores ⁶⁰	100
Esquema 16. Síntese enantiosseletiva da agelastatina A (67) e da agelastatina B (68) desenvolvida por Feldman e colaboradores ^{61,62}	100
Esquema 17. Síntese do cloridrato de (±) - α-amino ciclopentanona (85).....	103
Esquema 18. Condições reacionais avaliadas utilizando como agente de acilação tricloroacetil pirrol (87).....	104

Esquema 19. Condições reacionais avaliadas para a redução de Staudinger seguido da reação de aza-Wittig.	105
Esquema 20. Síntese do anidrido misto pirrólico (92).	106
Esquema 21. Condições reacionais avaliadas para a formação da amida (88) utilizando o anidrido misto (92).	106
Esquema 22. Síntese da ($\pm$)-amida (88).	107
Esquema 23. Condições reacionais para a síntese da ($\pm$)-carbinolamina (95).	108
Esquema 24. Avaliação da formação da ($\pm$)-carbinolamina (95) em meio ácido.....	110
Esquema 25. Síntese do ácido 4-monobromopirrol-2-carboxílico (96).....	111
Esquema 26. Síntese do esqueleto tetracíclico (98).	112
Esquema 27. Possível reação para a síntese do derivado 7-OH agelastatina A (73).	114
Esquema 28. Novas perspectivas para a aplicação da rota sintática desenvolvida.....	115
Esquema 29. Reação de derivatização da (<i>L</i>)-Val com o reagente de Marfey (FDAA) sob condições alcalinas.	198

Lista de Abreviaturas

[α]^D	Rotação óptica específica
AcOEt	Acetato de etila
AcOH	Ácido acético
APAO	<i>Acetylpolyamine oxidase</i>
CC₅₀	Concentração citotóxica que causa a morte de 50% das células do hospedeiro
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE-UV-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Ultravioleta e Espectrometria de Massas
CLEU-qtof-EM	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplado à Espectrometria de Massas com analisador híbrido quadrupolo-tempo de voo
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
D	Dupleto
DC	Dicroísmo circular
dd	Duplo dupleto
DIEA	Diisopropiletilamina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNP	<i>Dictionary of Natural Products</i>
dt	Duplo tripleto
EC₅₀	Máxima concentração inibitória de 50%
Eq.	Equivalente
ELSD	<i>Evaporative Light Scattering Detector</i>
Et₂O	Éter dietílico
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
FIC	Concentração inibitória fracionária
HBTU	Hexafluorofosfato de <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-O-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)urônio
HepG2	Linhagem celular de câncer de fígado humano
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence Spectroscopy</i>
HRMS	<i>High-resolution mass spectrometry</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy</i>

HSQC-TOCSY	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence-Total Correlation Spectroscopy</i>
Hz	Hertz
IC₅₀	Concentração necessária para inibir 50% da atividade
IDH	Índice de deficiência de hidrogênios
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
M	Multiplete
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
MIC	Concentração inibitória mínima
M/z	Razão massa/carga
NRPS	<i>Non-ribosomal peptide synthetase</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Spectroscopy</i>
ODC	Ornitina descarboxilase
R_f	Fator de retenção
RMN de ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
S	Singleto
SelectFluor	Bis(tetrafluoroborato) de 1-clorometil-4-fluor-1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octano
SES	2-(trimetilsilil)etano sulfonil cloreto
SI	Índice de seletividade
S/	Singleto largo
SSAT	<i>Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase</i>
t	Tripleto
THF	Tetraidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda

Sumário

Introdução geral.....	25
O câncer e seus impactos na sociedade.....	26
Doenças parasitárias e seus impactos na sociedade.....	27
Capítulo 1: Síntese e estudos da relação estrutura <i>versus</i> atividade de análogos da pseudoceratidina.....	33
1.1. Introdução.....	34
1.1.1. Alcaloides bromopirrólicos.....	34
1.1.2. Pseudoceratidina.....	37
1.2. Objetivos.....	41
1.3. Resultados e discussão.....	41
1.3.1. Síntese da pseudoceratidina.....	41
1.3.2. Planejamento dos análogos sintéticos da pseudoceratidina.....	43
1.3.3. Substituição da amina central da pseudoceratidina.....	44
1.3.4. Alteração do tamanho e da composição da cadeia poliamina nos análogos da pseudoceratidina.....	47
1.3.5. Alteração do grupo aromático da pseudoceratidina.....	50
1.3.6. Atividade antiparasitária e investigação da relação estrutura atividade dos análogos sintéticos da pseudoceratidina.....	57
1.3.6.1. Atividade antiplasmodial.....	62
1.3.6.2. Atividade leishmanicida e anti- <i>T. cruzi</i>	66
1.4. Conclusões.....	69
1.5. Material e métodos.....	71
1.5.1. Procedimentos experimentais.....	72
1.5.2. Bioensaios.....	89
1.5.2.1. Ensaios leishmanicida e tripanossomicida <i>in vitro</i>	89
1.5.2.2. Ensaios antiplasmodiais <i>in vitro</i> contra parasitas sanguíneos de <i>P. falciparum</i>	91

1.5.2.3. Testes de citotoxicidade utilizando células imortalizadas.....	91
1.5.2.4. Associação <i>in vitro</i> com artesunato.....	92
Capítulo 2: Síntese de análogos do alcaloide agelastatina A.....	93
2.1. Introdução.....	94
2.1.1. Isolamento e bioatividade da agelastatina A.....	94
2.1.2. Desafios sintéticos da agelastatina A.....	98
2.2. Objetivos.....	101
2.3. Resultados e discussão.....	102
2.3.1. Estudo modelo.....	102
2.3.2. Influência do átomo de bromo no esqueleto ABC da 7-hidroxi agelastatina A.....	111
2.4. Conclusões.....	115
2.5. Material e métodos.....	115
2.5.1. Procedimentos experimentais.....	117
Capítulo 3: Isolamento e identificação de peptaibóis bioativos do fungo Hypocrea sp., oriundo da Antártica.....	123
3.1. Introdução.....	124
3.1.1. Ambientes subglaciais e os psicrófilos.....	125
3.1.2. Gênero <i>Hypocrea/Trichoderma</i>	126
3.1.3. Peptaibóis.....	127
3.1.4. Biossíntese dos peptaibóis.....	129
3.2. Objetivos.....	130
3.3. Procedimentos experimentais.....	130
3.3.1. Informações gerais.....	130
3.3.2. Técnicas espectroscópicas.....	132
3.3.3. Origem e identificação das linhagens fúngicas avaliadas.....	134

3.3.4. Procedimento geral para fracionamento dos meios de cultivos das linhagens fúngicas.....	136
3.3.5. Fracionamento do crescimento em escala semi-preparativa da linhagem AT1 (<i>Hypocrea</i> sp.)	138
3.3.6. Análises de Marfey.....	140
3.3.7. Protocolo dos bioensaios.....	141
3.3.7.1. Ensaio de atividade leishmanicida.....	141
3.3.7.2. Ensaio de atividade antimicrobiana.....	142
3.3.7.3. Ensaio de avaliação do potencial antiproliferativo de células tumorais (citotoxicidade).....	143
3.3.7.4. Ensaio de atividade plasmodial.....	144
3.4. Resultados e discussão.....	145
3.4.1. Investigação e avaliação da bioatividade das linhagens fúngicas provenientes da Antártica.....	145
3.4.2. Isolamento dos metabólitos produzidos pelo fungo AT1 (<i>Hypocrea</i> sp.)	149
3.4.3. Análise dos dados espectroscópicos e identificação dos metabólitos secundários isolados da linhagem fúngica AT1 (<i>Hypocrea</i> sp.).....	156
3.4.3.1. Determinação estrutural dos compostos da fração AT1M3I.....	156
3.4.3.2. Determinação estrutural dos compostos da fração AT1M5O.....	183
3.4.4. Análise conformacional dos peptaibóis isolados.....	191
3.4.4.1. Dicroísmo circular (DC)	191
3.4.4.2. Determinação da configuração absoluta dos aminoácidos por derivatização com o reagente de Marfey.....	194
3.4.5. Bioatividade dos compostos AT1M5O-4 e AT1M5O-5.....	202
3.5. Conclusões.....	207
4. Referências.....	208

Introdução geral

Produtos naturais são comumente utilizados como inspiração para o desenvolvimento de fármacos. O uso de metabólitos secundários na descoberta de fármacos ajudou a dobrar a expectativa de vida humana no século XX¹. Entretanto, o aumento da incidência de resistência a medicamentos para o tratamento de doenças como câncer, malária e doenças inflamatórias, são fatores que impulsionam a necessidade de procurar novas fontes para a obtenção de possíveis fármacos. Os metabólitos secundários de organismos vivos constituem uma fonte promissora para a descoberta de compostos biologicamente ativos².

Mais de 70% da superfície do planeta é coberta por oceanos. Os metabólitos secundários de origem marinha adquiriram grande destaque ao longo de 50 anos de pesquisas³. Dentre as diversas classes de metabólitos secundários de organismos marinhos, os alcaloides de esponjas marinhas apresentam expressiva diversidade química e potentes atividades biológicas³. Os capítulos 1 e 2 dessa tese apresentam como tema estudos realizados com alcaloides bromopirrólicos e análogos encontrados em esponjas marinhas. O capítulo 1 descreve a síntese e a avaliação da relação estrutura atividade de análogos da pseudoceratidina. Esse alcaloide demonstrou possuir uma potente atividade anti-plasmodial. No capítulo 2, descreve-se a elaboração de um estudo modelo para a síntese de um derivado sintético da agelastatina A. O derivado da agelastatina A foi elaborado a fim de avaliar seu potencial terapêutico no tratamento de patologias cancerígenas.

Outra fonte de produtos naturais que também têm desempenhado um papel fundamental na descoberta de novas moléculas químicas bioativas no último século são os micro-organismos. Em 2015, cerca de 500 novos compostos foram isolados de micro-organismos marinhos, 17% a mais que em 2014⁴. Destacam-se os micro-organismos de ambientes poucos explorados, tais como o Antártico. A Antártida é um habitat inóspito e isolado, com condições climáticas extremas. Essas características peculiares podem levar os micro-organismos que nela habitam a produzir metabólitos secundários únicos e incomuns⁵. Essas espécies de micro-organismos constituem potenciais fontes

para se encontrar novos metabólitos secundários⁶. Este é o caso das linhagens fúngicas estudadas no capítulo 3. Avaliou-se a bioatividade de 16 linhagens fúngicas provenientes de ambiente marinho da Antártica. Dessas linhagens, selecionou-se uma para avaliação química, a qual produziu 6 peptídeos da classe dos peptaibóis, sendo 2 deles peptídeos inédito. Dois desses compostos apresentaram potente atividade anti-plasmodial, desconhecida até o presente momento.

O câncer e seus impactos na sociedade

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública em países desenvolvidos. É a segunda principal causa de morte associada ao envelhecimento da população e seu estilo de vida¹. Sua incidência mundial têm atingido mais de 7 milhões de casos ao ano⁷. Apenas doenças coronárias apresentam um índice de mortalidade maior do que o câncer entre a população norte-americana e a brasileira. O tratamento destas enfermidades está associado a elevados custos de manutenção hospitalar de doentes com tumores malignos. Diante deste cenário, é de primordial importância que se busque novas formas para o tratamento de tumores malignos, bem como a aplicação de intensos programas educativos para a prevenção do desenvolvimento dessa doença.

Produtos naturais constituem os mais importantes protótipos de fármacos anti-câncer. Três quartos dos compostos anti-tumorais usados na medicina são produtos naturais ou análogos⁸. Dentre 140 agentes anti-câncer aprovados desde 1940 e disponíveis para uso, mais de 60% são produtos naturais⁸. Em 2000, 57% de todos os medicamentos em ensaios clínicos para câncer eram produtos naturais ou seus análogos⁹.

Há uma grande diversidade estrutural de produtos naturais com atividade anti-tumoral. Dentre elas, destacam-se os terpenos (taxol **(1)** e análogos), alcalóides (rhizoxina, vincristina **(2)**, vimblastina **(3)** e análogos), peptídeos (criptoficinas e dolastatinas **(4)**), lignanas (podofilotoxinas **(5)**), policetídeos (discodermolida **(6)**), bem como substâncias de origem biogenética mista (curacinas **(7)**, epotilonas e colchicina)¹⁰. Os compostos antitumorais atuam por

vários mecanismos, como a indução de apoptose (morte celular programada) através da clivagem do DNA mediada pela inibição da topoisomerase I ou II, permeabilização mitocondrial, inibição de enzimas chave envolvidas na transdução de sinais (tais como as kinases) ou metabolismo celular, entre outros⁸. A aprovação do uso clínico do taxol, o uso dos análogos de vincristina já há vários anos, e a avaliação pré-clínica de vários outros agentes anti-mitóticos de origem natural têm servido de contínuo estímulo à descoberta de novos agentes anti-mitóticos a partir de fontes naturais.

Figura 1. Produtos naturais com atividade anti-tumoral.

Doenças parasitárias e seus impactos na sociedade

Alguns parasitas são responsáveis por causar algumas das principais doenças humanas negligenciadas. Os parasitas utilizam os seres humanos como seu hospedeiro¹¹. Com cerca de 11.000 espécies, 70 afetando humanos, os protozoários parasitários são um grupo diversificado de organismos eucarióticos unicelulares que apresentam ciclos de vida complexos, alternando frequentemente entre diferentes hospedeiros. Doenças como a malária,

tripanosomíases africanas e americanas, bem como as leishmanioses são responsáveis pela infecção de centenas de milhões de pessoas todos os anos em diferentes países do mundo¹¹ (Figura 2).

Figura 2. Distribuição global das Tripanossomíases, Leishmanioses e Malária de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS). O mapa mostra 5 regiões diferentes do mundo de acordo com a OMS: África, Américas, Mediterrâneo Oriental, Europa e Sudoeste Asiático.

Modificada a partir de: MARCILLA, A.; *et al.* Extracellular vesicles in parasitic diseases. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, 25040, 2014¹¹.

As leishmanioses são causadas por diferentes espécies do parasita da família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. São consideradas Doenças Tropicais Negligenciadas (NTDS) pela Organização Mundial de Saúde¹². As leishmanioses são endêmicas em 88 países¹², e são responsáveis pela morte de cerca de 50 mil pessoas todos os anos, sendo uma das endemias parasitárias mais graves no Brasil¹³. Várias espécies de *Leishmania*, específicas de cada área geográfica, são capazes de infectar humanos e podem resultar em diversas manifestações clínicas¹⁴.

As formas mais comuns da doença são: visceral ou calazar, e cutânea¹⁴. A leishmaniose visceral (LV ou calazar), a forma mais grave de leishmaniose, é

normalmente causada pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum*, com uma taxa de mortalidade de 100% em indivíduos não tratados¹⁴. As lesões cutâneas ulceradas típicas da leishmaniose cutânea (LC) são causadas principalmente pelas espécies *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. mexicana*¹⁴.

Não há vacinas disponíveis para o tratamento das leishmanioses¹⁵. O controle é fundamentado principalmente em medidas profiláticas de combate ao vetor e no controle de animais contaminados. A utilização dos fármacos disponíveis no tratamento dos indivíduos infectados apresenta limitações, como: resistência do parasita, diferenças na eficácia dos fármacos entre as áreas geográficas e indução de efeitos adversos¹⁵.

Os fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses LV e LC são, desde sua descoberta em 1940, os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}). No Brasil, o fármaco utilizado é o antimoniato de meglumina (**8**), um antimonial pentavalente (Glucantime®, Aventis, França, figura 3)¹⁵. Estes fármacos apresentam diversos efeitos adversos, como: tosse, dores no peito e depressão¹⁶. Aliado às dificuldades de administração e à longa duração do tratamento, a utilização desta classe de fármaco vem se restringindo ao longo dos anos.

Figura 3. Estrutura do antimoniato de meglumina, utilizado no tratamento das leishmanioses.

A anfotericina B (**9**), a pentamidina (**10**), a paromomicina (**11**) e a miltefosina (**12**, figura 4) são utilizados como fármacos de segunda escolha no tratamento das leishmanioses¹⁵. Esses fármacos são empregados em casos não responsivos aos antimoniais pentavalentes. A anfotericina B (**9**) é um antibiótico poliênico com atividade antifúngica e leishmanicida. Já a pentamidina (**10**) é um derivado aromático com duas amidinas que apresenta atividade biológica variada. A paromomicina (**11**) é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos

de amplo espectro de atividade. Dentre os tratamentos disponíveis, a miltefosina (12) é o único tratamento via oral. Entretanto, estudos indicam que o mesmo também pode apresentar atividade teratogênica¹⁴. Em algumas situações, esses fármacos podem se apresentar mais tóxicos que os fármacos de primeira escolha¹⁵.

Figura 4. Fármacos de segunda escolha utilizados no tratamento das leishmanioses.

Trypanosoma (T.) cruzi e *T. brucei* são responsáveis por duas das principais doenças humanas negligenciadas, doença de Chagas e tripanossomíase Africana. Duas subespécies do *T. brucei*, *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense* (*Glossina* spp.), transmitidos por moscas tsé-tsé, são os causadores da doença do sono¹¹. Esta doença é letal quando não tratada e afeta 60 milhões de pessoas nos países da África subsaariana.

A doença de Chagas é uma importante causa de doenças de coração no Brasil e em outros países da América. Aproximadamente 20 milhões de pessoas estão infectadas pelo protozoário *T. cruzi*¹⁷. Nos Estados Unidos da América, principalmente no estado do Texas, a doença de Chagas vem sendo identificada como uma importante doença negligenciada¹⁸. A transmissão ocorre

principalmente pela picada do inseto conhecido como barbeiro. Outras formas de transmissão menos comuns incluem: transmissão congênita, ingestão de alimentos contaminados, transfusão de sangue e transplante de órgãos¹⁸.

Desde 1950, a solução de violeta genciana é usada como agente quimioprofilático para a esterilização do sangue para evitar contaminações. Mas, devido à sua toxicidade a alguns dos componentes presentes no próprio sangue, seu uso é feito com restrições. Os dois principais fármacos existentes para o tratamento da doença de Chagas são: benznidazol (**13**) e nifurtimox (**14**). Esses compostos reduzem eficientemente a severidade da fase aguda da doença, mas não possuem qualquer efeito terapêutico na fase crônica da infecção¹⁷. Ambos devem ser administrados por longos períodos e causam severos efeitos colaterais¹⁷.

Figura 5. Fármacos utilizados no tratamento da Doença de Chagas.

A malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e é transmitida pela picada do mosquito fêmea *Anopheles*¹¹. De acordo com as estimativas da OMS, em 2012 houve cerca de 207 milhões de casos clínicos e cerca de 627 mil mortes¹¹. Estima-se que mais de 3,4 bilhões de pessoas em todo o mundo correm risco de infecção, sendo considerada uma das doenças humanas mais devastadoras. No Brasil, a doença é causada pelas espécies *Plasmodium* (*P.*) *vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum*, sendo a última espécie responsável pela forma mais grave e letal da doença¹⁹. O quadro clínico da malária pode variar entre: leve, moderado ou grave. Isso depende da espécie do parasita infectante, do tempo da infecção, da quantidade de parasitas presentes no organismo e do nível de imunidade adquirida pela pessoa infectada²⁰.

Até o momento, não há vacinas disponíveis para a malária. Há uma série de medicamentos que podem ser utilizados em seu tratamento. A escolha

entre eles depende da espécie do protozoário, da gravidade da doença, bem como da zona de infecção. Dentre eles, destacam-se: a cloroquina (15), a primaquina (16), o artemeter (17), a lumefantrina (18), a doxiciclina (19), o artesunato (20) e a mefloquina (21, figura 6)²⁰. A cloroquina foi extensivamente usada nos anos 80, o que levou ao surgimento de resistência do *P. falciparum* frente a sua ação¹⁹. O surgimento de resistência do parasita é um problema crescente no século 21. O tratamento mais eficaz para a infecção por *P. falciparum* é o uso de artemisininas em combinação com outros antimaláricos (conhecido como terapia de combinação de artemisinina ou ACT), o que diminui a resistência a qualquer componente de fármaco.

Considerando-se o quadro descrito acima, fica clara a necessidade da busca de novos e efetivos agentes antiparasitários para o controle destas doenças de grande influência no cenário mundial. Sendo assim, o desenvolvimento de estudos estratégicos eficazes que tenham como finalidade o controle desta doença, são de grande interesse para a sociedade.

Figura 6. Fármacos comumente utilizados no tratamento da Malária.

Capítulo 1:

**Síntese e estudos da relação estrutura
versus atividade de análogos da
pseudoceratidina**

1.1. Introdução

1.1.1. Alcaloides bromopirrólicos

Os alcaloides, termo introduzido em 1818 pelo químico alemão Wilhelm Meissner, são compostos de caráter básico que possuem normalmente um átomo de nitrogênio básico pertencente a um anel. A IUPAC *Recommendations* (1995) define o termo alcaloides como: *Um alcaloide é um composto básico contendo um átomo de nitrogênio (principalmente heterocíclico) ocorrendo principalmente no reino vegetal (mas não excluindo os de origem animal). Aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos, ácidos nucleicos, açúcares aminados e os antibióticos não são normalmente considerados como alcaloides. Por extensão, certos compostos neutros biogeneticamente relacionados com alcaloides básicos estão incluídos.*

Esta classe de compostos possui uma vasta variabilidade em sua estrutura e ação farmacológica³. Entre os alcaloides de origem exclusiva marinha, destacam-se os alcaloides bromopirrólicos. Esses são amplamente distribuídos em esponjas pertencentes aos gêneros *Agelas*, *Axinella*, *Acanthella*, *Pseudoaxinyssa* e *Hymeniacidon*²¹.

Os alcaloides bromopirrólicos (figura 7) se caracterizam pela presença de subunidades mono- ou dibromopirrólica, carboxamida ou imidazólica funcionalizada, conectadas por meio de uma cadeia espaçadora alifática, geralmente propílica, funcionalizada ou não²². Esses compostos podem existir como monômeros ou dímeros²². Os alcaloides bromopirrólicos são conhecidos por possuir uma ampla gama de atividades biológicas tais como: anti-histamínica, anti-serotoninérgica, antimicrobiana, antiviral, anti-incrustante, antituberculose e citotóxico²³.

Figura 7. Estruturas de alguns representantes da classe dos alcaloides marinhos bromopirrólicos.

O primeiro alcaloide desta classe a ser isolado foi a oroidina (**22**, figura 8) em 1971, primariamente da esponja *Agelas oroides* e então de várias outras esponjas²². Este alcaloide é considerado o principal precursor biogenético dos demais alcaloides mais complexos desta classe. Este grupo de alcaloides representa um clássico exemplo de biossíntese combinatória e de diversidade orientada de que os organismos podem biossintetizar.

Figura 8. Estrutura da oroidina (**22**).

Agelas oroides
(Schmidt, 1864)

Oroidina (22)

Figura obtida em: <http://www.european-marine-life.org>.

Tasdemir *et al.* (2007)²⁴ reportaram que a oroidina na sua forma livre (**22**) e na forma de sal de TFA (**23**), obtidos a partir da esponja *Agelas oroides*,

possuem pronunciada atividade antiparazitária, com valores de IC_{50} de 0,77 e 9,94 μM , respectivamente (figura 9). Ambas as formas da oroidina isoladas demonstraram atividade inibitória a enzima plasmodial *PfFabI* (enoil-ACP reductase), a qual é essencial na biossíntese de ácidos graxos do tipo II. A rota de biossíntese de ácidos graxos do tipo II está presente em vários parasitas, incluindo o agente etiológico da malária, *Plasmodium falciparum*.

Figura 9. Valores de inibição da *PfFabI* para componentes isolados da esponja *Agelas oroides* por Tasdemir *et al.* (2007)²⁴.

Estimulados por esses resultados, Scala *et al.* (2010)²¹ realizaram um estudo da bioatividade de vários alcaloides bromopirrólicos naturais contra quatro espécies de protozoários em seu estágio de infecção em mamíferos: *Trypanosoma brucei rhodesiense* (forma sanguínea), *T. cruzi* (amastigotas), *Leishmania donovani* (amastigotas) e *P. falciparum* (fase eritrocítica). Foram testados 15 compostos no total. As estruturas químicas dos compostos que demonstram maiores potências são mostradas na figura 10. A maior atividade de inibição contra o parasita *T. brucei rhodesiense* foi observada para a dibromopalau'amina (**24**) ($IC_{50} = 0,80 \mu M$) e para a longamida B (**25**) ($IC_{50} = 4,35 \mu M$). Esses compostos também apresentaram os melhores valores de atividade contra *L. donovani*: dibromopalau'amina (**24**) ($IC_{50} = 1,87 \mu M$) e longamida B (**25**) ($IC_{50} = 10,94 \mu M$). Para o protozoário *P. falciparum*, os alcaloides mais potentes são: spongiacidina B (**26**) ($IC_{50} = 3,36 \mu M$), dispacamida B (**27**) ($IC_{50} = 3,31 \mu M$) e dibromopalau'amina (**24**) ($IC_{50} = 2,57 \mu M$). Não houve resultados significativos para *T. cruzi*. Com exceção da spongiacidina B (**26**), todos os compostos que apresentaram atividade antiprotozoária pronunciada possuem 2 átomos de bromo no sistema pirrol.

Figura 10. Estrutura de alguns dos alcaloides estudados por Scala *et al.* (2010)²¹.

1.1.2. Pseudoceratidina

A pseudoceratidina (**28**, figura 11) foi isolada em 1996 por Fusetani *et al.*²⁵ a partir do extrato da esponja marinha *Pseudoceratina purpurea* coletadas na Ilha Hachijo-jima, no Japão. A atividade anti-incrustante foi observada para os extratos desta esponja marinha. O isolamento guiado por bioensaio resultou no isolamento e identificação da pseudoceratidina^{25,26}. Agentes anti-incrustantes são utilizados para bloquear a corrosão e melhorar a eficiência de navegação, impedindo cracas, moluscos e outros organismos de se prenderem a cascos de navios, estacas marinhas e equipamentos de construção de portos formando incrustações²⁶.

Figura 11. Estrutura da pseudoceratidina.

Ponasik *et al.* (1996)^{27,28} e Behrens *et al.* (1997)²⁹ realizaram as sínteses da pseudoceratidina e de alguns de seus análogos para sua avaliação como agentes ant-incrustação. Uma vez que bactérias são os primeiros organismos a se fixarem durante a formação da incrustação, eles testaram esses análogos contra diferentes espécies de bactérias.

Nestes estudos, observou-se que a presença de um segundo átomo de bromo na unidade pirrol-5-carbamoila (figura 12, composto **28** e **29**) é importante para a verificação da atividade biológica. Bem como a segunda unidade pirrol-5-carbomoil ligada a cadeia de espermidina (figura 12, compostos **30** e **31**). Ambos os estudos indicaram que a presença de um átomo de nitrogênio bem como o tamanho da cadeia espaçadora entre as unidades pirrónicas são importantes para a atividade (figura 12, compostos **32** e **33**). Ponasik *et al.* observou que a atividade biocida é mais pronunciada com *bis*-amidas de poliaminas que possuem pelo menos uma carga positiva.

Figura 12. Bioatividade reportada por Ponasik *et al.*^{27,28} (a) e Behrens *et al.*²⁹ (b) contra *Staphylococcus aureus* para os compostos como concentração mínima inibitória (MIC).

Em estudo recente realizado no grupo de pesquisa do Prof. Dr. Roberto Berlinck, verificou-se que compostos isolados do extrato metanólico da esponja marinha *Tedania brasiliensis*, endêmica do Brasil, era composto da pseudoceratidina (28) e análogos (figura 13). Estas substâncias foram isoladas e identificadas como: a 4,19-dibromopseudoceratidina (34), a tedamida A (35), a tedamida B (36), a tedamida C (37), a tedamida D (38), bem como a 4-bromopseudoceratidina (39), a 19-bromopseudoceratidina (40), a 20-desbromopseudoceratidina (41) e a 3-desbromopseudoceratidina (42). Posteriormente ao isolamento, verificou-se que a pseudoceratidina, bem como a mistura de seus análogos 20-desbromopseudoceratidina (41) e 3-desbromopseudoceratidina (42), demonstraram uma interessante atividade antiplasmodial. Esses resultados indicaram que este grupo de compostos de estrutura simples possui um promissor potencial terapêutico que pode ser utilizado no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças parasitárias.

Figura 13. Estrutura da pseudoceratidina e análogos isolados a partir da esponja *Tedania brasiliensis*.

Levando-se em conta este resultado, este estudo objetivou a síntese e a avaliação da atividade antiparasitária da pseudoceratidina e análogos contra as espécies: *L. (L.) infantum*, *L. (L.) amazonensis*, *T. cruzi* e *P. falciparum*. Obtidos os resultados dos bioensaios, um perfil inicial da relação entre estrutura e atividade (em inglês, *structure-activity relationship* (SAR)) foi estabelecido.

A etapa de síntese foi realizada no laboratório do Prof. Dr. Daniel Romo (Baylor University), no qual a aluna realizou o doutorado sanduíche. Os bioensaios foram realizados pelos pesquisadores: Dr. Fernanda Ramos Gadelha do Instituto de Biologia da UNICAMP (*T. cruzi*), Prof. Danilo Ciccone Miguel do Instituto de Biologia da UNICAMP (*L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*) e Prof. Dr. Rafael V. C. Guido do Instituto de Física de São Carlos (*P. falciparum*).

1.2. Objetivos

O objetivo geral deste sub-projeto do doutorado foi avaliar a relação entre estrutura e atividade do produto natural pseudoceratidina e análogos em bioensaios contra: *Leishmania (L.) infantum*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania (L.) amazonensis* e *Plasmodium falciparum*. Para que tais resultados sejam alcançados, propomos as seguintes metas específicas:

1. Síntese da pseudoceratidina e análogos. Estes análogos serão obtidos variando-se a cadeia poliamina bem como a estrutura dos grupamentos aromáticos.
2. Avaliação da bioatividade dos compostos sintetizados.

1.3. Resultados e discussão

1.3.1. Síntese da pseudoceratidina

A pseudoceratidina (**28**), foi sintetizada utilizando-se a estratégia descrita por Ponasik, *et al.* (1996)²⁸ e Behrens, *et al.* (1997)²⁹. A melhor condição encontrada para a síntese da unidade 4,5-dibromo-1-tricloroacetil pirrol (**43**) foi pela reação de substituição eletrofílica aromática do anel pirrólico utilizando 2,2 equivalentes de Br₂ em CHCl₃ a -10°C³⁰ (esquema 1). Também foi avaliado a reação de bromação utilizando *N*-bromosuccinimida (NBS) (esquema 1). Nesse caso obteve-se uma mistura inseparável dos produtos oriundos da reação de mono e dibromoção do anel pirrólico. O composto **43** foi obtido com 87% de rendimento. A reação de acoplamento do composto **43** com a espermidina em THF, à temperatura ambiente, levou à obtenção do produto natural **28** com 72% de rendimento (esquema 2).

Esquema 1. Síntese do 4,5-dibromo-1-tricloroacetil pirrol (**43**).

Esquema 2. Síntese da pseudoceratidina (**28**).

O espectro de massas de alta resolução da pseudoceratidina (**28**) sintética apresentou um agregado de íon pseudomolecular $[M+H]^+$ em m/z 643,8504/ 645,8482/ 647,8460/ 649,8436/ 651,8408 de intensidade relativa 1:3:5:3:1 (figura 14), indicando a presença de quatro átomos de bromo compatível com a formula molecular esperada. De posse do produto natural, iniciou-se o planejamento dos análogos que deveriam ser sintetizados de maneira paralela.

Figura 14. Espectro de massas de alta resolução da pseudoceratina (28).

1.3.2. Planejamento dos análogos sintéticos da pseudoceratidina

De maneira a se obter uma compreensão mais completa do perfil de atividade da pseudoceratidina, elegemos sintetizar uma pequena biblioteca de análogos, a maioria inédita. O estudo da relação estrutura-atividade foi delineado de acordo com os resultados dos bioensaios da atividade anti-parasitária desses análogos contra as espécies de protozoários estudadas. Essas moléculas devem possuir uma base estrutural relacionada ao produto natural e serem obtidos por meio de uma sequência reacional curta (duas a três etapas).

Esta biblioteca foi construída pela variação sistemática de três regiões dentro do modelo estrutural da pseudoceratidina. Essas modificações estruturais são: substituição da amina central, variação da cadeia poliamina e variação do anel aromático (figura 15).

Figura 15. Modificações propostas para três principais características estruturais da pseudoceratina (**28**).

Caso a bioatividade apresentada esteja relacionada a uma interação específica com uma proteína, do tipo droga-receptor, pequenas modificações estruturais no esqueleto da pseudoceratina devem causar grandes variações na bioatividade. A expressão da atividade biológica de proteínas está confinada em pequenas partes, possuem específicas estruturas tridimensionais, denominadas sítio de ligação³¹.

1.3.3. Substituição da amina central da pseudoceratina

A primeira hipótese avaliada foi a substituição da amina central. Essa substituição tem como fundamento a investigação da influência da presença de cargas e ligações hidrogênio para a bioatividade da pseudoceratina. Para tal, realizou-se a síntese dos análogos **44** e **45** (esquema 5 e 6, respectivamente).

Primeiramente, avaliou-se sua obtenção da amina terciária **44** através da reação de Eschweiler-Clarke, na qual aminas primárias e secundárias são transformadas em aminas terciárias utilizando excesso de ácido fórmico e formaldeído³² (esquema 3). A força motriz desta reação é a formação de gás carbônico pela transferência de hidreto do ácido fórmico para o intermediário

imina (esquema 4). Entretanto, essa reação não resultou na formação do produto de interesse.

Esquema 3. Reação de Eschweiler-Clarke para síntese do derivado **44**.

Esquema 4. Mecanismo geral para a reação de Eschweiler-Clarke. Fonte: autoria própria.

A síntese da amina terciária **44** foi realizada satisfatoriamente por meio de uma reação de aminação reductiva a partir do produto natural³³. Utilizou-se como agente redutor cianoborohidreto de sódio. A reação levou à formação da amina terciária com 70% de rendimento (esquema 5).

Esquema 5. Síntese do derivado **44**.

A adição de um grupo metila ao átomo de nitrogênio central, além de afetar o poder doador de ligação de hidrogênio, também pode causar alterações nas propriedades conformacionais e físico-químicas da pseudoceratidina. Essas

alterações podem conduzir a mudanças significativas em suas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas, modificando o seu efeito farmacológico³⁴.

A acilação do nitrogênio central da pseudoceratidina pode provocar alterações tanto em suas propriedades eletrônicas, como estéricas. A presença de um grupo carbonila provoca uma deslocalização do par de elétrons não ligantes do nitrogênio, diminuindo sua densidade eletrônica. Para avaliar esta influência realizou-se a síntese do derivado **45**. Para esta reação utilizou-se o composto comercial, ácido 2-azido acético, o qual foi acoplado a pseudoceratidina pela reação com hexafluorofosfato de *N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-il)urônio (HBTU) e DIEA (base de Hünig). A escolha pelo reagente de acoplamento HBTU foi feita devido ao fato de este necessitar de condições brandas para sua ativação e suas reações são normalmente limpas e apresentam elevado rendimento³⁵. O derivado **45** foi obtido com 72% de rendimento (esquema 6).

Esquema 6. Síntese do derivado **45**.

Caso o derivado apresentasse bioatividade contra as espécies de protozoários estudadas, este poderia ser utilizado para estudos de localização celular utilizando microscopia fluorescente. A presença do grupo azida na extremidade na porção acetila, pode ser utilizada para a incorporação de grupos fluorescentes ao derivado. Esta incorporação pode ser realizada por meio de reação de Staudinger ou reação de Huisgen³⁶. Caso o átomo de nitrogênio da cadeia espermidina exerça um papel fundamental na bioatividade dos análogos da pseudoceratidina (**28**), análogos metilados ou acetilados deverão eventualmente apresentar bioatividade reduzida.

1.3.4. Alteração do tamanho e da composição da cadeia poliamina nos análogos da pseudoceratidina

A pseudoceratidina tem como esqueleto central uma cadeia espermidina. A espermidina, juntamente com outras poliaminas naturais, desempenha importante papel nos processos celulares³⁷. Em pH fisiológico (entre 7,35 e 7,45) os átomos de nitrogênio da espermidina estão na sua forma protonada, o que confere carga positiva a essas poliaminas. Esses cátions, por sua vez, se ligam fortemente aos componentes celulares aniônicos modulando sua atividade biológica³⁷. Devido a essa forte influência nos processos celulares, modificações sintéticas na estrutura de poliaminas naturais vêm sendo frequentemente explorada na busca de novos agentes quimioterápicos. O uso dessas poliaminas pode melhorar a importação celular, aumentar a afinidade pela cromatina ou, ainda, servir como transportadores³¹.

Com base nesses precedentes, avaliamos como a cadeia poliamina pode influenciar na atividade biológica do produto natural, a pseudoceratidina. Esses análogos foram obtidos utilizando a estratégia descrita no esquema 2. Esta rota simples e versátil permite a obtenção de diversos outros compostos que possuem a mesma base estrutural: dois anéis aromáticos ligados entre si por ligações peptídicas e uma cadeia poliamina.

Para esses compostos, variou-se a cadeia poliamínica e foi mantida a porção 4,5-dibromo pirrol. Foram sintetizados os análogos **46**, **47**, **48**, **49** e **50** (esquema 7), pela substituição da espermidina por cadaverina, 2,2-tiobisetilamina, octano 1,8-diamina, espermina e bis(hexametileno)triamina, respectivamente.

Diferentemente dos outros exemplos, para a síntese dos análogos **47**, foi necessário o uso de micro-ondas à temperatura de 110°C e de 3 equivalentes de Et₃N.

Esquema 7. Estratégia para obtenção dos análogos **46**, **47**, **48**, **49** e **50**. ^aTHF, 19°C; ^bEt₃N, THF, 110 °C, micro-ondas (300 W).

Os compostos **46** e **48** foram sintetizados com o objetivo de avaliar a influência da carga positiva na bioatividade da pseudoceratidina. A ausência de nitrogênios centrais (aminas) leva à obtenção de compostos neutros. O composto **46** possui uma cadeia central menor que a da pseudoceratidina (5 átomos de carbono) e o composto **48** possui uma cadeia de tamanho similar (8 átomos de carbono).

Já a síntese do composto **49** teve como objetivo avaliar a influência de uma carga positiva adicional à atividade anti-parasitária. Para a síntese deste composto utilizou-se como material de partida a espermina. Tanto a espermina quanto a espermidina são cátions em pH fisiológico e estão amplamente distribuídos em sistemas vivos, interagindo extensivamente com fosfolipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Ambas são obtidas a partir da mesma rota

biosintética, a partir da ornitina (figura 16). A ornitina é um aminoácido não-essencial que se transforma na putrescina pela ação da enzima ornitind Descarboxilase. Subsequentemente a putrescina é transformada em espermidina pela ação da enzima propilaminotransferase na presença de S-adenosilmetionina descarboxilada e a espermidina em espermina pela ação da mesma enzima³⁸.

Figura 16. Rota de biossíntese da espermidina e espermina.

Modificada a partir de: BOWMAN, W. H.; *et al.* Spermidine biosynthesis. Purification and properties of propylamine transferase from *Escheria coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 48, p. 2480 - 2486, 1973³⁸.

O composto **50** possui um nitrogênio central ligado às amidas por 6 átomos de carbono. Esse derivado foi proposto para a avaliação da influência que o tamanho da cadeia de átomos de carbono exerce na bioatividade. Já a preparação do composto **47**, objetivou avaliar a influência de um heteroátomo diferente do átomo de nitrogênio: o enxofre. Os valores do raio de Van Der Waals para esses átomos são: 1.80 Å para o enxofre e 1.55 Å para o nitrogênio. A influência da diferença de tamanho entre esses dois átomos, pode ser avaliada pela comparação dos valores de bioatividade que serão obtidos para os compostos **46** e **47**.

1.3.5. Alteração do grupo aromático da pseudoceratidina

Vários produtos naturais isolados a partir de organismo marinhos, insetos, fungos e bactérias apresentam um anel pirrólico em sua estrutura²³. Esses variam com relação à sua complexidade estrutural e sua atividade biológica²³. Como blocos estruturais, os pirróis são essenciais à bioquímica. Sua estrutura plana e rica em elétrons os torna susceptíveis a ataques eletrofílicos, a interações do tipo π - π e ligações de hidrogênio²³.

No estudo preliminar realizado em nosso grupo de pesquisa pela Dra. Parra, foram isolados juntamente com a pseudoceratidina vários outros análogos naturais. Esses compostos possuíam diferentes graus de bromação do anel pirrólico. Devido a isso, dentro desta categoria esse foi o primeiro elemento estrutural avaliado.

O primeiro derivado pirrólico não-bromado sintetizado foi o composto **51** (esquema 8). Este foi obtido pelo acoplamento do tricloroacetil pirrol com a cadaverina, em THF à temperatura ambiente, com 60% de rendimento. O composto **51** não apresenta a função amina central, bem como os anéis pirrólico não substituídos por átomos de bromo.

Esquema 8. Síntese do derivado **51**.

Outro derivado pirrólico não-bromado sintetizado foi o composto **52**. Esse composto foi obtido pelo acoplamento do tricloroacetil pirrol com espermidina, em THF à temperatura ambiente, com 70% de rendimento (esquema 9). A diferença deste derivado com relação à pseudoceratidina é a ausência de átomos de bromo nos anéis pirrólicos.

Esquema 9. Síntese do derivado **52**.

Outro ponto importante a ser avaliado em nosso estudo é a importância para a atividade da presença de dois átomos de bromo, bem como a sua posição. Com esse objetivo, foi sintetizado o composto **53** (esquema 10). Este foi obtido com 57% de rendimento por meio da reação de acoplamento entre o pirrol 5-bromo tricloroacetila (**54**) e a espermidina. O composto **54**, por sua vez, foi obtido pela reação do pirrol tricloroacetila com *bis*(tetrafluoroborato) de 1-clorometil-4-fluor-1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octano (Selectfluor®, F-TEDA- BF_4), na presença de brometo de potássio em DMF à temperatura ambiente³⁹. A reação de bromação ocorre pela transferência de íon bromônio oriundo do intermediário formado pela troca de halogênios entre o sal de potássio e um dos nitrogênios do sistema bicíclico. O reagente Selectfluor® é conhecido como um agente eletrofílico brando (não-gasoso, não-explosivo e menos tóxico) e seletivo de fluoração³⁰. Além de Br^+ e F^+ , este reagente também pode ser utilizado para a geração de Cl^+ , SCN^+ e NO_2^+ a partir da reação com seus respectivos sais de potássio ou sódio.

Esquema 10. Síntese do derivado **53**.

A figura 17 traz o espectro de massas de alta resolução para esse composto. Nota-se que nesse caso o padrão de intensidade relativa dos picos verificado é de 1:2:1, o que confirma a presença de dois átomos de bromo em **53**. Sua estrutura também pode ser facilmente verificada pelo RMN de ^1H , já que este apresenta sinais referentes a quatro ^1H aromáticos com δ 6,75; 6,76; 6,90 e 6,91 (figura 18). Esses hidrogênios se apresentam na forma de dupletos, com $J = 1,4$ Hz, indicando o acoplamento do $^1\text{H}_5$ com o N- ^1H do anel pirrólico.

Figura 17. Espectro de massas de alta resolução do derivado **53**. **Figura 18.** Expansão do espectro de RMN de ^1H do derivado **53**(MeOH- d_4 , 600 MHz).

A exigência de um halogênio em particular no anel pirrólico para a expressão das bioatividades também será verificada através da substituição de

ambos os átomos de bromo por átomos de cloro. Os átomos de cloro são mais eletronegativos e apresentam menores efeitos estéricos (valores do raio de van der Waals para o bromo 1,85 Å e o cloro 1,75 Å;). O pirrol 4,5-dicloro tricloroacetila (**55**) foi obtido com 30% de rendimento pela reação de substituição aromática eletrofílica do pirrol tricloroacetila com cloreto de sulfurila (SO_2Cl_2) em CHCl_3 , sob refluxo⁴⁰. Este composto foi então utilizado para a reação de acoplamento com a espermidina em THF à temperatura ambiente. Esta reação levou a formação do composto **56** com 65% de rendimento (esquema 11).

Esquema 11. Síntese do derivado **56**.

Também foi avaliada a influência de átomos de flúor na posição 5 do anel pirrólico. Para esta reação, o 5-fluorotricloroacetil pirrol (**57**) foi sintetizado com 20% de rendimento utilizando como agente de fluoração selectfluor®. A reação foi realizada em DMF, aquecida a 72°C em micro-ondas por 5 min⁴¹ (esquema 12). Com o composto **57** em mãos, esse foi reagido com a espermidina para a formação do derivado **58** (esquema 16). Primeiramente a reação de acoplamento foi realizada utilizando a metodologia padrão, THF e temperatura ambiente. Porém, após 48 h de reação, o derivado **58** foi obtido com um rendimento de 10%. Com o objetivo de se melhorar o rendimento dessa reação, uma outra metodologia foi empregada utilizando Na_2CO_3 e DMF. Essa reação também foi realizada à temperatura ambiente e com um tempo reacional de 12 h levou a formação do derivado de interesse com 65 % de rendimento.

Esquema 12. Síntese do derivado 58.

Um outro aspecto importante para esse trabalho, é a substituição do anel pirrólico por outros anéis aromáticos nitrogenados ou não. Como há uma grande diversidade de ácidos carboxílicos aromáticos comerciais a preços acessíveis, optou-se por realizar a síntese desses análogos por meio de reações de acoplamento com a espermidina. Para a síntese desses análogos, utilizou-se novamente como reagente de acoplamento o HBTU e a diisopropiletilamina, pelas razões mencionadas anteriormente. O mecanismo geral para a reação de acoplamento utilizando HBTU é descrito na figura 19.

Figura 19. Mecanismo geral para as reações de acoplamento utilizando HBTU. Fonte: autoria própria.

Foram sintetizados os análogos **59**, **60**, **61**, **62**, **63**, **64**, **65** e **66** a partir dos ácidos: indol, benzimidazol, 5-bromotiofeno, 5-metiltiofeno, 6-cloropiridina, 6-metilpiridina, 4,5-dibromofurano e 5-metilfurano respectivamente (esquema 13).

Esquema 13. Compostos sintetizados a partir de ácidos carboxílicos análogos de indol, benzimidazol, furanos, tiofenos e piridinas.

Em um estudo realizado em 2016, Meisel *et al.* (2016)⁴² descobriram que o grupo indol pode funcionar como uma “cabeça” anfifílica, sendo este bom candidato a derivado estrutural. Assim, compostos com esses grupos em suas extremidades podem formar canais na bicamada lipídica das membranas celulares. O grupo indol possui uma grande densidade de elétrons e, assim como o pirrol, pode atuar como estabilizador de ânions através de interações do tipo

ligações de hidrogênio. Triptofanos são frequentemente encontrados em proteínas transmembranares na interface da bicamada⁴². O grupo benzimidazol possui estrutura bastante semelhante ao do indol, sendo que a única diferença é a presença de outro átomo de nitrogênio no anel de 5 membros.

Compostos anfífilos são conhecidos por aumentar a permeabilidade da membrana celular⁴². Assim, caso seja verificada bioatividade semelhante à da pseudoceratidina para os análogos **59** e **60**, podemos sugerir que há a possibilidade de que a bioatividade verificada para a pseudoceratidina possa estar relacionada à sua interação com a(s) membrana(s) do(s) protozoário(s). Estudos recentes desenvolvidos por Wang *et al.*⁴³ colaboradores demonstraram que diaminas com estrutura similar à da pseudoceratidina interagem efetivamente com a membrana de bactérias gram negativas. Os autores sugerem que a carga positiva das diaminas interage com a carga negativa da membrana celular da bactéria aumentando a permeabilidade da membrana externa.

A síntese dos análogos **61**, **62**, **65** e **66** possibilitou a avaliação da influência de heteroátomos diferentes de nitrogênio no sistema aromático e estas mudanças no perfil de atividades anti-parasitárias destes compostos. Os compostos **62**, **64** e **66** são substituídos com grupos doadores de elétrons e os compostos **61**, **63** e **65** grupos retiradores de elétrons. Como os análogos **63** e **64** são aceptores de ligações de hidrogênio, com esses análogos também foi avaliado a importância da ligação de hidrogênio do anel pirrol para a bioatividade.

Em geral, modificações estruturais sutis podem exercer grandes mudanças no perfil de atividades biológicas de um composto.

1.3.6. Atividade antiparasitária e investigação da relação estrutura atividade dos análogos sintéticos da pseudoceratidina

A pseudoceratidina (**28**) e análogos foram testadas contra quatro espécies de parasitas protozoários: *P. falciparum*, *L. (L.) amazonensis* (agente etiológico de leishmaniose cutânea na América do Sul), *L. (L.) infantum* (agente

etiológico de leishmaniose visceral no Mediterrâneo e na América Latina) e *T. cruzi*. Os resultados dos bioensaios são apresentados na tabela 1.

Para avaliação contra *P. falciparum*, 6 análogos dos 23 compostos sintetizados (26%) apresentaram valores de IC₅₀ inferiores a 8 µM. Destes, 2 compostos apresentaram IC₅₀ na faixa de 2 µM. Na avaliação contra a forma amastigota do *T. cruzi*, 2 análogos (8,7%) apresentaram IC₅₀ inferiores a 25 µM. Para *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*, os mesmos 5 compostos apresentaram bioatividade (21,7%). Sendo que os valores de IC₅₀ para *L. (L.) infantum* estavam abaixo de 25 µM e para *L. (L.) amazonensis* abaixo de 80 µM. De maneira geral, os parasitas da espécie *L. (L.) infantum* se mostraram mais sensíveis a presença dos compostos.

Tabela 1. Atividade antileishmanial, anti-*T. cruzi*, antiplasmodial e citotoxicidade da pseudoceratidina e análogos.

	<i>L. (L.) infantum</i> Promastigotas	<i>L. (L.) amazonensis</i> promastigotas	<i>T. cruzi</i> Epimastigotas	Macrófagos derivados da medúla óssea	<i>P. falciparum</i> (3D7)	HepG2	
Compostos	EC ₅₀ ± S.D. (µM)	EC ₅₀ ± S.D. (µM)	EC ₅₀ ± S.D. (µM)	EC ₅₀ ± S.D. (µM)	IC ₅₀ (µM)	MCL ₅₀ (µM)	Índice de seletividade ¹
28	>100	>100	> 100	-	1 ± 0,1 (0,96 – 1,24)	16 ± 1 (14,6 – 17,4)	15
44	>100	>100	> 100	-	4 ± 1 (3-6)	160 ± 23 (128 – 192)	35
45	>100	>100	>50	-	>10	-	-
46	24 ± 3 (20 – 27)	19 ± 1 (18 – 20)	7 ± 1 (5 - 7)	52 ± 3 (49 – 55)	> 10	-	-
47	24 ± 3 (21 – 28)	43 ± 2 (41 – 45)	24 ± 4 (21 - 27)	66 ± 5 (61 – 72)	> 10	-	-
48	>100	>100	>100	-	>10	-	-

	<i>L. (L.) infantum</i> Promastigotas	<i>L. (L.) amazonensis</i> promastigotas	<i>T. cruzi</i> Epimastigotas	Macrófagos derivados da medúla óssea	<i>P. falciparum</i> (3D7)	HepG2	
Compostos	EC ₅₀ ± S.D. (μM)	EC ₅₀ ± S.D. (μM)	EC ₅₀ ± S.D. (μM)	EC ₅₀ ± S.D. (μM)	IC ₅₀ (μM)	MDL ₅₀ (μM)	Índice de seletividade ¹
49	19 ± 1 (17 – 20)	44 ± 5 (38 – 49)	> 100	> 100	2 ± 1 (0.20 – 3)	99 ± 12 (82 – 116)	52
50	>100	>100	>100	-	3 ± 1 (2 – 3)	263 ± 43 (203 – 323)	101
51	>100	>100	> 50	-	> 10	-	-
52	>100	>100	>100	-	>10	-	-
53	>100	>100	> 100	-	7 ± 1 (6 – 8)	≥400	≥54
56	>100	>100	>100	-	>10	-	-
58	>100	>100	>100	-	>10	-	-
59	>100	>100	>100	-	>10	-	-

	<i>L. (L.) infantum</i> Promastigotas	<i>L. (L.) amazonensis</i> promastigotas	<i>T. cruzi</i> Epimastigotas	Macrófagos derivados da medúla óssea	<i>P. falciparum</i> (3D7)	HepG2	
Compostos	EC ₅₀ ± S.D. (µM)	EC ₅₀ ± S.D. (µM)	EC ₅₀ ± S.D. (µM)	EC ₅₀ ± S.D. (µM)	IC ₅₀ (µM)	MDL ₅₀ (µM)	Índice de seletividade ¹
60	>100	>100	>100	-	>10	-	-
61	20 ± 3 (17 – 24)	76 ± 2 (72 – 80)	> 100	> 100	> 100	-	-
62	>100	>100	> 100	-	> 100	-	-
63	>100	>100	> 100	-	> 100	-	-
64	>100	>100	> 100	-	> 100	-	-
65	23 ± 5 (17 – 28)	18 ± 2 (16 – 19)	> 100	82 ± 4 (78 – 87)	3,2 ± 1 (2 – 4)	≥400	≥125
66	>100	>100	> 100	-	> 100	-	-

EC₅₀: concentração que induz metade do efeito máximo; CC₅₀: concentração que induz metade da citotoxicidade máxima; S.D.: *standard deviation*, desvio padrão; CI95%: 95% intervalo de confiança; “-”: não foi determinado; ¹Índice de seletividade: MDL₅₀/IC₅₀ para *P. falciparum*.

1.3.6.1. Atividade antiplasmodial

A pseudoceratidina (**28**) apresentou uma boa atividade antiplasmodial ($1,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$) contra *P. falciparum*. Os análogos **44**, **49**, **50**, **53** e **65** (tabela 1 e figura 20) também apresentaram uma potente atividade contra o *P. falciparum*, com boa seletividade. A *N*-metilpseudoceratidina (**44**) mostrou boa atividade antiplasmodial ($4 \pm 1 \mu\text{M}$). O composto **49**, com uma cadeia maior de poliamina e com dois nitrogênios básicos, apresentou atividade antiplasmodial similar à aquela do produto natural ($3 \pm 1 \mu\text{M}$). Já o composto **50**, com uma cadeia de poliamina de comprimento semelhante, mas com apenas um nitrogênio básico, apresentou uma diminuição de 2 vezes na atividade antiplasmodial ($2 \pm 1 \mu\text{M}$). O derivado 2,21-debromopseudoceratidina (**53**) mostrou uma diminuição na atividade antiplasmodial ($7 \pm 1 \mu\text{M}$) em relação à pseudoceratidina (**28**). O derivado de furano **65**, contendo quatro átomos de bromo, também mostrou boa atividade antiplasmodial ($3 \pm 1 \mu\text{M}$).

Figura 20. Estruturas, valores de IC_{50} (μM) e índice de seletividade da pseudoceratidina e análogos ativos contra *P. falciparum*.

É evidente a importância dos átomos de bromo nas extremidades aromáticas dos análogos da pseudoceratidina para a atividade antiplasmodial. A pseudoceratidina sem os átomos de bromo no anel pirrólico (**52**) é completamente inativa, assim como os análogos onde os átomos de bromo

foram substituídos por átomos de cloro (**56**) ou de flúor (**58**). Embora os grupos metil representem uma variação estrutural semelhante aos átomos de bromo em termos dos raios de van der Waals⁴⁴, o derivado di-metilado bis-furano pseudoceratidina **66** é completamente inativo. Assim, a bromação em análogos pirrolícos e furanólicos é essencial para a atividade antiplasmodial contra o *P. falciparum*. Esse resultado sugere que a bioatividade está relacionada ao efeito eletrônico do átomo de bromo nos anéis aromáticos e não ao seu raio de van der Waals. Ou, ainda, devido a um aumento no caráter lipofílico promovido pelos átomos de bromo⁴⁴.

A natureza da cadeia poliamina é uma característica estrutural adicional que caracteriza a atividade antiplasmodial dos análogos da pseudoceratidina. Os compostos **46** e **48**, que são desprovidos de nitrogênio básico, mas têm um comprimento de cadeia semelhante ao da pseudoceratidina, são inativos como agentes antiplasmodiais. O derivado contendo enxofre (**47**) também é inativo. Por outro lado, os compostos **49** e **50**, com maiores cadeias de poliamina, são tão potentes quanto a pseudoceratidina (**28**). O derivado *N*-metílico (**44**) apesar de ativo, apresenta uma bioatividade 4 vezes menor que a da pseudoceratidina. Esses resultados indicam que a presença de pelo menos um nitrogênio básico na cadeia de poliamina desempenha um papel importante para a atividade antiplasmodial. O derivado com um grupo *N*-acil (**45**) não apresentou atividade antiplasmodial, o que corrobora com a proposta acima. Entretanto, a ausência de atividade para o derivado *N*-acil (**45**) impossibilitou a realização de estudos de localização celular. A *N*-acilação da pseudoceratidina para o acesso de sondas celulares leva a inativação do composto frente ao *P. falciparum*.

Para avaliação do índice de seletividade dos compostos **28**, **44**, **49**, **50**, **53** e **65**, determinou-se a citotoxicidade utilizando a linhagem celular HepG2, (células cancerígenas do fígado humano, figura 21). A pseudoceratidina (**28**) foi o composto mais citotóxico ($16 \pm 1 \mu\text{M}$), com um índice de seletividade de 15. Os compostos **28**, **44**, **49**, **50**, **53** e **65** apresentaram pouca citotoxicidade, com índices de seletividade entre 35 e 125. Pequenas alterações estruturais no esqueleto da pseudoceratidina resultaram em uma drástica redução da toxicidade para as células (figura 21).

Para melhor caracterizar a atividade antiplasmodial da pseudoceratidina (**28**), o composto mais potente, seu impacto na morfologia das células HepG2

também foi avaliado após 24 horas de tratamento. Adicionou-se ao parasita uma concentração 10 vezes maior do que o valor de IC_{50} . A pseudoceratidina (**28**) não apresentou toxicidade para as células HepG2 nessa concentração. As células tratadas não apresentaram alterações morfológicas em comparação com as células não tratadas (figura 21).

Figura 21. Morfologia das células HepG2 antes (esquerda) e depois (direita) do tratamento com a pseudoceratidina (**28**) a 10 μ M.

A pseudoceratidina (**28**) também foi avaliada contra a cepa multirresistente de *P. falciparum* (cepa K1), apresentando um valor IC_{50} de $1,1 \pm 0,1 \mu$ M (tabela 2). Com o objetivo de avaliar o estágio específico da atividade inibitória da pseudoceratidina (**28**), foram incubados parasitas altamente sincronizados com uma concentração 10 vezes maior que o valor de IC_{50} . As alterações morfológicas celulares foram observadas por microscopia às 0, 8, 16 e 32 h após a sincronização (figura 22). A pseudoceratidina (**28**) apresentou atividade inibitória nos estágios iniciais do anel, induzindo alterações na morfologia do *P. falciparum* entre 8 e 16 h após a incubação. Esses dados sugerem uma velocidade de ação rápida, no qual as formas jovens de *P. falciparum* no ciclo intra-eritrocitário são altamente suscetíveis à atividade antiparasitária da pseudoceratidina.

Tabela 2. Atividade antiplasmodial da pseudoceratidina (**28**) e de antimaláricos usados no tratamento de *P. falciparum* sensível (cepa 3D7) e resistente (cepa K1).

Compostos	<i>P. falciparum</i> IC ₅₀ (μM)	
	Cepa 3d7	Cepa K1
pseudoceratidina (28)	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1
cloroquina (15)	0,013 ± 0,002	0,167 ± 0,002
pirimetamina	0,03 ± 0,01	3,9 ± 0,1
cicloguanil	0,010 ± 0,002	0,54 ± 0,02
artesanato (20)	0,004 ± 0,001	0,003 ± 0,001

Figura 22. Microscopia dos parasitas sincronizados tratados continuamente com pseudoceratidina (**28**) em uma concentração de 10 vezes o valor de IC₅₀ (linha inferior) e DMSO (controle, linha superior). As imagens são representativas de três experimentos independentes. Nos parasitas tratados com DMSO, pode-se observar o rompimento da célula em 32 h. Nos parasitas tratados com pseudoceratidina, observa-se um acúmulo de cromatina em 16 h, seguido de apoptose em 32 h.

As potenciais interações medicamentosas da pseudoceratidina (**28**) com artesunato de sódio (**20**) contra o *P. falciparum* também foram testadas, a fim de elucidar potenciais benefícios e limitações da sua utilização em combinação com outras drogas antimaláricas⁴⁵. A análise isobolográfica é um

método experimental aplicável na determinação farmacológica de interações entre fármacos, independentemente de seu mecanismo de ação ou da natureza das relações dose-resposta. O índice FIC (*fractional inhibitory concentration*), juntamente com o gráfico isoblograma, pode indicar se a interação é de sinergismo ($FIC \leq 0,5$), de antagonismo ($FIC > 4$) ou de adição ($0,5 > FIC \leq 1,0$). Neste caso, a análise de isoblograma e o índice FIC ($1,0 \pm 0,2$) indicam um efeito de interação aditiva da pseudoceratidina (**28**) em combinação com artesunato. Este dado sugere que os análogos da pseudoceratidina poderiam ser utilizados no tratamento da malária em terapias combinadas à base de artemisinina (figura 23).

Figura 23. Gráfico de isoblograma para análise da interação medicamentosa da pseudoceratidina (**28**) e do artesunato de sódio (**20**).

1.3.6.2. Atividade leishmanicida e anti-*T. cruzi*

A pseudoceratidina foi inativa contra *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum*, e *T. cruzi*. Apenas o composto **46** apresentou boa atividade antiparasitária contra epimastigotas de *T. cruzi* (figura 24).

Apesar da inatividade da pseudoceratidina (**28**) frente aos promastigotas de *L. (L.) infantum*, os análogos **46**, **47**, **49**, **61** e **65** mostraram um aumento, porém moderado e semelhante, da atividade leishmanicida (EC_{50} na

faixa entre 19 e 24 μM , figura 24). Os mesmos análogos foram ativos, mas consideravelmente menos potentes, contra *L. (L.) amazonensis*. No entanto, esses resultados não levaram a uma imagem clara dos requisitos estruturais para a atividade leishmanicida dos análogos da pseudoceratidina. Os compostos **46** e **47** têm cadeias de poliamina mais curtas desprovidas de nitrogênio básico, mas o oposto é verdadeiro para os compostos **49**, **61** e **65**. Apesar da bromação ser importante, a natureza do anel aromático é aparentemente menos relevante para a atividade antileishmanial. Portanto, outras variações dessa série de compostos necessitam ser exploradas para esclarecer as relações entre a estrutura e a atividade.

Figura 24. Estruturas e valores de EC_{50} (μM) dos análogos da pseudoceratidina ativos contra *L. (L.) infantum*, *L. (L.) amazonensis* e *T. cruzi*.

Os compostos apresentaram efeitos distintos para as leishmanioses e o *T. cruzi*, quando comparados aos apresentados para o *P. falciparum*. Essa observação não é surpreendente, pois esses dois grupos de parasitas são filogeneticamente distantes. As espécies *Leishmania* e *Trypanosoma* são parasitas pertencentes ao filo Euglenozoa, ordem Kinetoplastea. Já o *P. falciparum*, pertence a ordem Haemospororida dentro do filo Apicomplexa⁴⁶.

Avaliações *in vitro* foram realizadas com o objetivo de avaliar a atividade dos compostos **49**, **61** e **65** contra amastigotas intracelulares de leishmania. Como os amastigotas se localizam no interior dos macrófagos, determinamos primeiro a citotoxicidade dos análogos ativos de pseudoceratidina contra macrófagos do osso de camundongos BALB/c (tabela 1). Os compostos **49** e **61** mostraram baixa toxicidade ($CC_{50} > 100 \mu M$). A concentração citotóxica semi-máxima para o composto **65** foi de $83 \pm 4 \mu M$.

As atividades em amastigotas intracelulares dos compostos **49**, **61** e **65** foram investigadas. Macrófagos derivados de medula óssea foram infectados com promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* (MOI = 10) por 24 h e depois incubados com concentrações crescentes dos compostos **49**, **61** e **65**. Posteriormente, realizou-se a contagem dos amastigotas intracelulares. Verificou-se que o parasitismo intracelular foi reduzido de uma maneira dependente da concentração após 24 h para **49**, **61** e **65** (figura 25). Houve uma redução de aproximadamente 80% do número de amastigotas sobre o grupo controle em altas concentrações. O efeito intracelular contra amastigotas de leishmania foi quase equivalente para os compostos **49**, **61** e **65**.

Figura 25. Atividade *in vitro* para **49**, **61** e **65** contra amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) amazonensis*. Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* por 1 h (MOI = 10). Após 24 h, as células infectadas foram incubadas com 6,125; 25; 50 ou 100 μ M de cada composto por 24 h. Células fixadas em MeOH foram coradas e a infecção foi determinada contando 300 células/lamela. As experiências foram realizadas em triplicata. Os resultados apresentados são representativos de duas experiências independentes. (A) Barras indicam o número de amastigotas intracelulares. Os números acima de cada barra indicam a percentagem de redução em relação aos macrófagos infectados do controle não tratados. (B) Exemplos de fotomicrografias mostrando macrófagos infectados não tratados (a) e macrófagos infectados incubados com o composto 49 a 100 μ M (b). Setas apontam para amastigotas intracelulares. Barra = 10 μ m.

1.4. Conclusão

A pseudoceratidina (**28**) e seus análogos foram obtidos com rendimentos satisfatórios e em poucas etapas. A estratégia utilizada para a síntese é uma rota simples e versátil, que permite a obtenção de diversos outros compostos de mesma base estrutural: dois anéis aromáticos ligados entre si por ligações peptídicas e uma cadeia poliamina. A pseudoceratidina apresentou atividade antimalárica muito boa e justificou a elaboração de seus 20 análogos, visando estabelecer relações iniciais da relação estrutura-atividade.

Dentre os bioensaios avaliados, os resultados mais promissores foram obtidos frente ao *P. falciparum*. A pseudoceratidina e sete análogos sintéticos indicaram que o comprimento da cadeia de poliamina, com pelo menos 1 átomo de nitrogênio básico, bem como a presença de átomos de bromo ligados aos anéis pirrólicos e furânicos, representam características estruturais essenciais para a expressão da atividade antiplasmodial. Os análogos sintéticos ativos apresentaram baixa citotoxicidade frente a células HepG2, com alto índice de seletividade frente ao *P. falciparum*. Esses resultados indicaram que pequenas modificações estruturais na pseudoceratidina exercem grande influência na redução de sua citotoxicidade.

Verificou-se ainda que a pseudoceratidina (**28**) apresentou boa atividade antiplasmodial contra linhagens resistentes (K1) de *P. falciparum* (IC₅₀ de 1,1 ± 0,1 µM), com um mecanismo de ação rápida. A pseudoceratidina (**28**) demonstrou um efeito de interação aditiva em combinação com artesunato, indicando que seus análogos podem ser utilizados em combinação com artemisinina para o tratamento da malária.

Os resultados descritos demonstram que a estrutura da pseudoceratidina, que é facilmente obtido por síntese total, constitui uma vantagem útil a ser desenvolvida como potenciais agentes antiplasmodiais. Novos análogos podem ser sintetizados, combinando as características de maior seletividade, com o objetivo de se obter compostos mais ativos, menos citotóxicos e com maior solubilidade. Além disso, esses análogos poderão ser facilmente obtidos utilizando o método padrão já estabelecido neste estudo para as reações de acoplamento (esquema 14).

Esquema 14. Planejamento de novos análogos sintéticos da pseudoceratidina.

1.5. Material e métodos

Todos os reagentes utilizados foram adquiridos de fontes comerciais e usados sem prévia purificação, provenientes das marcas Sigma Aldrich, Across Chemical, BTC Chemical e Oakwood Chemical. Para os experimentos utilizou-se nitrogênio gasoso como atmosfera inerte. Todos os solventes utilizados foram purificados utilizando o sistema JC Meyer Solvent System Phoenix SDS. As reações com micro-ondas foram realizadas utilizando CEM Microwave Intellivent Reactor. As reações foram monitoradas por cromatografia em camada fina (placa CCD, Fluka, matriz sílica gel, suporte de vidro, com indicador fluorescente 254 nm e espessura de 200µm), utilizando-se os reveladores KMnO₄ (permanganato de potássio em solução aquosa de NaOH), ninidrina (em solução de AcOH em EtOH), vanilina (em solução de ácido sulfúrico em EtOH), e lâmpada de UV (luz ultravioleta em 254 nm). Para purificação utilizou-se coluna cromatográfica do tipo flash empacotada com sílica gel 60 Å (tamanho de partícula 0,063-0,210 mm) e cromatografia líquida de média pressão (CLMP ou MPLC, em inglês) CombiFlash Rf-200 no caso de purificações com gradiente. Todos os rendimentos referem-se a produtos isolados após purificação. As misturas de solventes empregadas nas análises por CCD e em purificações por cromatografia são apresentadas como volume/volume e em percentagens. Para análise estrutural dos produtos obtidos, utilizou-se a técnica de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C (Bruker Ascend, Campo 500/54 e 400/52) à temperatura ambiente, com os valores de deslocamento químico reportados em δ. Para RMN ¹H foram utilizados equipamentos de 400 ou 600 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) são referenciados em relação ao resíduo do solvente não-deuterado. As constantes de acoplamento (J) são reportadas em Hz. As multiplicidades são apresentadas como: s, singleto, d, duplete, t, tripleto, q, quarteto, m, multiplete; dd, duplo duplete; sl, singleto largo; dt, duplo tripleto. Os espectros de RMN ¹³C foram registrados usando equipamentos de 101 ou 151 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) são indicados a partir dos sinais de solventes residuais não-deuterados, ou parcialmente deuterados em CDCl₃ (77,0 ppm), MeOH-*d*₄ (49,0 ppm) ou DMSO-*d*₆ (39,52 ppm). Os espectros de RMN foram tratados utilizando o *Software MestreNova 6.0*. Para a

caracterização dos compostos também se utilizou espectrometria de massas de alta resolução (Thermo Orbitrap Discovery, método de ionização por eletrospray ESI) e cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (Brucker Amazon LC-MS).

1.5.1. Procedimentos experimentais

4,5-dibromo-1-tricloroacetil pirrol (43). Em balão de 50 mL, adicionou-se tricloroacetil pirrol (**S0**, 5,0 g, 23,60 mmol, 1,00 equiv) em 20 mL de CHCl_3 . Esta solução foi resfriada a -10°C . Adicionou-se Br_2 gota a gota (2,64 mL, 51,80 mmol, 2,20 equiv). Após a adição, a temperatura da reação foi lentamente elevada à temperatura ambiente (19°C). A mistura reacional foi agitada por 30 min adicionais. Após, a reação foi terminada pela adição de 40 mL de H_2O . A fase aquosa foi extraída com CHCl_3 (3 X 20 mL). As fases orgânicas foram combinadas e então lavadas com solução saturada de NaHCO_3 (2 x 30 mL) e brine (1x 20 mL) e secas com NaSO_4 . O solvente foi removido sob vácuo. obtendo-se um sólido residual branco. Este sólido foi recristalizado em hexano. Obteve-se o 4,5-dibromo-1-tricloroacetil pirrol (**43**, 7.66 g, 87%) como cristais cinza: CCD (15% AcOEt /hexano): R_f : 0,57; RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3): δ 7,33 – 7,34 (d, J = 6.0 Hz, 1H); 9,54 (s, 1H); RMN de ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) δ 93,9; 102,5; 112,8; 123,0; 124,0; 171,9.

Pseudoceratidina (28). Em balão de 5 mL, adicionou-se 4,5-dibromo-1-tricloroacetil pirrol (**43**, 100 mg, 0.27 mmol, 2,00 equiv) e 1 mL de THF. A esta

solução à temperatura ambiente (19 °C), foi adicionada espermidina (**S2**, 21 µL, 0,14 mmol, 1,00 equiv) gota a gota. A mistura reacional foi agitada por 48 h a esta mesma temperatura. Concluída a reação, o solvente foi removido sob vácuo. O sólido residual amarelo, purificado utilizando-se cromatografia em coluna do tipo flash (SiO₂, MeOH/NH₄OH/CH₂Cl₂ (20:5:75)). Obteve-se a pseudoceratidina (**28**, 60,80 mg, 72%) como um sólido branco: CCD (MeOH/NH₄OH/CH₂Cl₂ (20:5:75)): Rf: 0,42; RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,49 (s, 4H); 1,65, 1,68 (sobreposição de t, *J* = 6,7 Hz, 2H); 2,67 (t, *J* = 6,7 Hz, 4H); 3,11 – 3,30 (m, 4H); 6,73 (s, 1H); 6,77 (s, 1H); 7,94 – 7,97 (m, 2H) (3 NH's permutáveis não foram observados); RMN de ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25,7; 27,3; 28,6; 36,6; 38,5; 46,3; 48,4; 96,7; 97,3; 106,0; 107,0; 112,8; 112,9; 129,6; 129,8; 160,1; 161,0; IR (ATR): 3114, 2932, 1618, 1565, 1524 cm⁻¹; HRMS (ESI⁺) *m/z* calcd. para C₁₇H₂₂Br₄N₅O₂ [M+H]⁺: 647.8461; encontrado 647.8460.

N¹²-Metil pseudoceratidina (44). Em balão de 5 mL, foi adicionada pseudoceratidina (**28**, 25 mg, 0,04 mmol, 1,00 equiv) e 1 mL EtOH com uma solução 37% de formaldeído (80 µL, 2,14 mmol, 55 equiv). À esta solução à temperatura ambiente (19 °C), adicionou-se AcOH (0,12 mL), seguido de NaBH₃CN (41 mg, 0,68 mmol, 17,00 equiv). A mistura reacional foi agitada a esta temperatura por 14 h. Concluída a reação, esta foi terminada pela adição de uma solução de Na₂CO₃ até cessar a efervescência. O meio reacional foi extraído com CH₂Cl₂ e a fase orgânica foi seca com NaSO₄ anidro. O solvente foi removido sob vácuo. O sólido residual amarelo foi purificado por cromatografia em colunado tipo flash (SiO₂, MeOH/NH₄OH/CH₂Cl₂ (20:5:75)). Obteve-se a N¹²-metil pseudoceratidina (**44**, 21,80 mg, 70%) como um sólido branco: CCD (MeOH/NH₄OH/CH₂Cl₂ (20:5:75)): Rf: 0,63; RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,39 - 1,48 (m, 4H); 1,69 – 1,52 (m, 2H); 2,12 (s, 3H); 2,28 - 2,33 (m, 4H); 3,16 – 3,20 (m, 4H); 6,85 (d, *J* = 12,3 Hz, 2H); 8,07 (s, 2H); (2 NH's permutáveis não foram observados); RMN de ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24,3; 25,6; 27,2; 27,5;

37,5; 38,9; 42,0; 55,2; 57,1; 67,5; 98,0 (2); 112,8 (2); 128,9 (2); 159,6 (2); IR (ATR): 3116, 2929, 1625, 1565, 1524 cm^{-1} ; HRMS (ESI⁻) m/z calcd. para $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{Br}_4\text{N}_5\text{O}_2$ [M-H]⁻ : 655,8512; encontrado 655,8524.

***N*¹²-(2-azidoacetil)pseudoceratidina (45).** Em balão de 5 mL, adicionou-se 2-azido ácido acético (4,40 μL , 0,06 mmol, 1,50 equiv), HBTU (22 mg, 0,06 mmol, 1,50 equiv), DIEA (17 μL , 0,10 mmol, 2,50 equiv) e 0,5 mL THF. A esta solução à temperatura ambiente (19°C), adicionou-se uma solução de pseudoceratidina (28, 25 mg, 0,04 mmol, 1,00 equiv) em 0,5 mL de THF. A mistura reacional foi agitada por 7 h a esta mesma temperatura. Concluída a reação, o solvente foi removido sob vácuo e o sólido residual foi redissolvido em 10 mL de AcOEt. A fase orgânica foi lavada com uma solução de 0,5 M HCl (5 mL), seguida de uma solução saturada de NaHCO_3 (5 mL) e brine (5 mL). O sólido amarelo residual foi purificado utilizando-se cromatografia em coluna do tipo flash (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5)). Obteve-se a *N*¹²-(2-azidoacetil)pseudoceratidina (45, 20,40 mg, 72%) como um sólido branco: CCD ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5)): Rf: 0,73; RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 1,42 - 1,53 (m, 4H); 1,66 - 1,75 (m, 2H); 3,17 - 3,20 (m, 6H); 3,28 (dd, $J = 15,6, 9,1$ Hz, 2H); 4,07 (s, 1H); 4,11 (s, 1H); 6,89 (d, $J = 5,8$ Hz, 2H); 8,10 (s, 2H); 12,67 (s, 2H); RMN de ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, mistura de rotâmeros): δ 24,7; 25,7; 26,5; 26,7; 27,6; 28,3; 36,1; 36,5; 38,2; 38,3; 43,5; 44,1; 45,1; 46,2; 49,4; 49,5; 97,7 (2); 104,5; 104,6; 112,4; 112,5; 128,3 (2); 158,9 (2); 167,0; 167,1; IR (ATR): 2926, 2483, 2104, 1621, 1452 cm^{-1} ; HRMS (ESI⁻) m/z calcd. para $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{Br}_4\text{N}_8\text{O}_3$ [M-H]⁻ : 728,8435; encontrado 728,8442.

***N,N'*-(pentano-1,5-diil)bis(4,5-dibromo-1*H*-pirrol-2-carboxamida) (46).**

Em balão de 5 mL, adicionou-se 4,5-dibromo-1-tricloroacetil pirrol (**43**, 100 mg, 0,27 mmol, 2,00 equiv) e 1 mL de THF. À esta solução à temperatura ambiente (19°C), adicionou-se gota a gota cadaverina (16 µL, 0,14 mmol, 1,00 equiv). A mistura reacional foi agitada por 48 h a esta mesma temperatura. O solvente foi removido sob vácuo. O sólido amarelo residual foi purificado utilizando-se cromatografia líquida de média pressão (gradiente SiO₂, 0 → 10% MeOH/CH₂Cl₂). Obteve-se a carboxamida (**46**, 43,00 mg, 50%) como um sólido branco: CCD (30% MeOH/CH₂Cl₂): R_f: 0,72; RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,30 - 1,33 (m, 2H); 1,47 - 1,52 (m, 4H); 3,19 (dd, *J* = 12,9, 6,8 Hz, 4H); 6,91 (d, *J* = 2,8 Hz, 2H); 8,05 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H); 12,63 (s, 2H); RMN de ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 23,8 (2); 28,9 (2); 38,5 (2); 97,7 (2); 104,3 (2); 121,4 (2); 128,3 (2); 158,8 (2); IR (ATR): 3116, 2932, 1629, 1561, 1517 cm⁻¹; HRMS (ESI⁻) *m/z* calcd. para C₁₅H₁₅Br₄N₄O₂ [M-H]⁻: 602,7893; encontrado 602,7898.

***N,N'*-(tiobis(etano-2,1-diil))bis(4,5-dibromo-1*H*-pirrol-2-carboxamida) (47).**

Em tubo específico de micro-ondas de 10 mL, adicionou-se 4,5-bromo-1-tricloroacetil pirrol (**43**, 260 mg, 0,70 mmol, 2,50 equiv) e 1,4 mL de THF. À esta solução, adicionou-se gota a gota 2,2-tiobis(etilamina) (32 µL, 0,28 mmol, 1,00 equiv) seguido pela adição de Et₃N (0,10 mL, 0,7 mmol, 2,5 equiv). A mistura reacional foi aquecida e agitada no micro-ondas à temperatura de 90 °C por 5 h. O solvente foi removido sob vácuo. O sólido marrom residual foi purificado por cromatografia líquida de média pressão (gradiente SiO₂, 0 → 10% MeOH/CH₂Cl₂). Obteve-se a carboxamida (**47**, 81,50 mg, 47%) como um sólido branco: CCD (5% MeOH/CH₂Cl₂): R_f: 0,36; RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ

2,67 (t, $J = 7,0$ Hz, 4H); 3,38 (q, $J = 6,4$ Hz, 4H); 6,90 (s, 2H); 8,28 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H); 12,69 (s, 2H); RMN de ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6): δ 30,5 (2); 38,5 (2); 97,8 (2); 104,6 (2); 112,6 (2); 128,1 (2); 158,9 (2); IR (ATR): 3116, 2924, 1619, 1561, 1517 cm^{-1} ; HRMS (ESI $^-$) m/z calcd. para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{Br}_4\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 620,7457; encontrado 620,7458.

***N,N'*-(octano-1,8-diil)bis(4,5-dibromo-1*H*-pirrol-2-carboxamida) (48).**

Em balão de 5 mL, adicionou-se 4,5-tricloroacetil pirrol (**43**, 100 mg, 0,27 mmol, 2,00 equiv) e 1 mL de THF. À esta solução à temperatura ambiente (20 °C), adicionou-se gota a gota 1,8-diamino octano (15 mg, 0,14 mmol, 1,00 equiv). A mistura reacional foi agitada por 72 h a esta mesma temperatura. O solvente foi removido sob vácuo. O sólido residual amarelo foi purificado por cromatografia líquida de média pressão (gradiente SiO_2 , 0 $\rightarrow$ 5% MeOH/ CH_2Cl_2). Obteve-se a carboxamida (**48**, 62,10 mg, 74%) como um sólido branco: CCD (5% MeOH/ CH_2Cl_2): Rf: 0,43; RMN de ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): δ 1,27 (s, 4H); 1,41 - 1,52 (m, 4H); 3,17 (dd, $J = 13,0, 6,8$ Hz, 4H); 6,90 (s, 2H); 8,04 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H); 12,61 (s, 2H); RMN de ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6): δ 26,4 (2); 28,7 (2); 29,2 (2); 38,5 (2); 97,7 (2); 104,3 (2); 112,3 (2); 128,3 (2); 158,7 (2); IR (ATR): 2925, 1611, 1563, 1521 cm^{-1} , HRMS (ESI $^-$) m/z calcd. para $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{Br}_4\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 640,8403; encontrado 640,8428.

***N,N'*-(butano-1,4-diilbis(azanodiil))bis(propano-3,1-diil))bis(4,5-dibromo-1*H*-pirrol-2-carboxamida) (49).** Em balão de 5 mL, adicionou-se 4,5-dibromo-1-tricloroacetil pirrol (**43**, 100 mg, 0,28 mmol, 2,00 equiv) e 1 mL de THF. À esta solução à temperatura ambiental (19°C), foi adicionada espermina (28

mg, 0,14 mmol, 1,00 equiv). A mistura reacional foi agitada por 36 h a esta mesma temperatura. O solvente foi removido sob vácuo. O sólido residual branco foi purificado utilizando-se cromatografia em coluna do tipo flash (SiO_2 , 25% MeOH/5% $\text{NH}_4\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$). Obteve-se a carboxamida (**49**, 31,90 mg, 60%) como um sólido branco: CCD (20% MeOH/ 5% $\text{NH}_4\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$): Rf: 0,44; RMN de ^1H (600 MHz, $\text{MeOD}-d_4$): δ 1,58 – 1,60 (m, 4H); 1,77 – 1,82 (m, 4H); 2,64 – 2,66 (m, 4H); 2,69 (t, $J = 6,6$ Hz, 4H); 3,38 (t, $J = 6,6$ Hz, 4H); 6,79 (s, 2H), (6 NH permutáveis não foram observados); RMN de ^{13}C (151 MHz, $\text{MeOD}-d_4$): δ 27,7 (2); 29,9 (2); 37,9 (2); 47,4 (2); 50,0 (2); 99,6 (2); 107,0 (2); 114,4 (2); 129,1 (2); 162,5 (2); IR (ATR): 3102, 2929, 1622, 1566, 1521 cm^{-1} ; HRMS (ESI $^+$) m/z calcd. para $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{Br}_4\text{N}_6\text{O}_2$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 698,8934; encontrado 698,8950.

***N,N'*-(azanodiilbis(hexano-6,1-diil))bis(4,5-dibromo-1H-pirrol-2-carboxamida) (50).** Em balão de 5 mL, adicionou-se 4,5-dibromo-1-tricloroacetil pirrol (**43**, 50 mg, 0,13 mmol, 2,00 equiv) e 1 mL de THF. À esta solução à temperatura ambiente (19°C), adicionou-se gota a gota bis(hexametileno)triamina (17 μL , 0,07 mmol, 1,00 equiv). A mistura reacional foi agitada por 36 h a esta mesma temperatura. O solvente foi removido sob vácuo. O sólido residual branco foi purificado utilizando-se cromatografia em coluna do tipo flash (SiO_2 , 15% MeOH/5% $\text{NH}_4\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$). Obteve-se a carboxamida (**50**, 31,90 mg, 68%) como um sólido branco: CCD (30% MeOH/ $\text{NH}_4\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$): Rf: 0,72; RMN de ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 1,26 – 1,32 (m, 8H); 1,43 – 1,48 (m, 8H); 2,63 (t, $J = 7,4$ Hz, 4H); 3,17 (m, $J = 6,7$ Hz, 4H); 3,45 (s, 1H); 6,77 (s, 2H); 7,84 (t, $J = 5,3$ Hz, 2H) (3 NH permutáveis não foram observados); RMN de ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 26,4 (2); 26,5 (2); 27,3 (2); 29,6 (2); 38,8 (2); 48,0 (2); 96,9 (2); 106,3 (2); 112,8 (2); 129,9 (2); 160,3 (2); IR (ATR): 3102, 2929, 1622, 1566, 1521 cm^{-1} ; HRMS (ESI $^+$) m/z calcd. para $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{Br}_4\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 717,9243; encontrado 717,9243.

***N,N'*-(pentano-1,5-diil)bis(1*H*-pirrol-2-carboxamida) (51).** Em balão de 5 mL, adicionou-se tricloroacetil pirrol (363 mg, 1,71 mmol, 2,00 equiv) e 2 mL de THF. À esta solução à temperatura ambiente (19°C), adicionou-se gota a gota cadaverina (100 μ L, 0,85 mmol, 1,00 equiv). A mistura reacional foi agitada por 48 h a esta mesma temperatura. Concluída a reação, o solvente foi removido sob vácuo. O líquido viscoso residual amarelo, purificado utilizando-se cromatografia em coluna do tipo flash (SiO_2 , 25% AcOEt/Et₂O). Obteve-se a carboxamida (**51**, 147,00 mg, 60%) como um líquido viscoso claro: CCD (25% AcOEt/Et₂O): Rf: 0,45; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,20 - 1,41 (m, 2H); 1,39 - 1,60 (m, 4H); 3,20 (dd, *J* = 13,0, 6,8 Hz, 4H); 6,05 (dd, *J* = 3,6, 2,4 Hz, 2H); 6,74 (ddd, *J* = 3,8, 2,6, 1,5 Hz, 2H); 6,82 (dd, *J* = 2,6, 1,5 Hz, 2H); 7,94 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H); 11,37 (s, 2H); RMN de ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24,1 (2); 29,2 (2); 38,4 (2); 108,4 (2); 109,6 (2); 121,0 (2); 126,5 (2); 160,0 (2); IR (ATR): 3282, 2935, 1610, 1565, 1526 cm⁻¹, HRMS (ESI⁻) *m/z* calcd. para C₁₅H₁₉N₄O₂ [M-H]⁻: 287,1513; encontrado 287,1514.

***N*-(3-((4-(1*H*-pirrol-2-carboxamido)butil)amina)propil)-1*H*-pirrol-2-carboxamida (52).** Em balão de 5 mL, adicionou-se tricloroacetil pirrol (212 mg, 1,00 mmol, 2,00 equiv) e 4 mL de THF. À esta solução à temperatura ambiente (19°C), foi adicionada, gota a gota, espermidina (80 μ L, 0,50 mmol, 1,00 equiv). A mistura reacional foi agitada por 48 h a esta mesma temperatura. Concluída a reação, o solvente foi removido sob vácuo. O líquido viscoso residual não necessitou de purificação. Obteve-se a desbromopseudoceratidine (**52**, 115,90 mg, 70%) como um líquido viscoso claro: CCD (10% MeOH/AcOEt): Rf: 0,67; RMN de ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,55 - 1,63 (m, 2H); 1,65 - 1,71 (m, 2H); 1,75 - 1,79 (m, 2H); 2,63 - 2,73 (m, 4H); 3,36 (dd, *J* = 12,9, 6,8 Hz, 2H); 3,40 (dd, *J* =

12,7, 6,7 Hz, 2H); 6,21 (s, 2H), 6,86 – 6,88 (m, 1H); 6,88 – 6,90 (m, 1H); 6,97 (s, 2H); 8,11 (t, $J = 5,6$, 1H); 8,17 (t, $J = 5,6$, 1H); 11,53 (s, 2H); (1 NH permutável não foi observado); RMN de ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 27,0; 27,4; 29,6; 36,8; 38,4; 47,0; 49,1; 108,4; 108,4; 109,5; 109,6; 121,0; 121,0; 126,4; 126,5; 160,5; 160,6. IR (ATR): 3279, 2937, 1617, 1566, 1527 cm^{-1} , HRMS (ESI⁺) m/z calcd. para $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 332,2081; encontrado 332,2081.

5-Bromo-1-tricloroacetil pirrol (54). Em balão de 25 mL, adicionou-se tricloroacetil pirrol (0,20 g, 0,94 mmol, 1,00 equiv) e 9,4 mL de DMF. Esta solução foi resfriada a 0°C e adicionou-se KBr (0,47 g, 3,76 mmol, 4,00 equiv) seguido de selctfluor® (1,00 g, 2,82 mmol, 3,00 equiv) em uma única porção. Após a adição, a reação tornou-se amarela. A reação foi, lentamente, elevada a temperatura ambiente (19°C). A mistura reacional foi agitada por 3 h a esta mesma temperatura. Concluída a reação, o solvente foi removido sob vácuo. O sólido residual marrom foi purificado por cromatografia líquida de média pressão (gradiente SiO_2 , 0 $\rightarrow$ 15% AcOEt /hexano). Obteve-se o 5-bromo-1-tricloroacetila (**54**, 0,12 g, 44%) como um sólido branco: CCD (15% AcOEt /hexano): R_f : 0,47; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7,16 (dd, $J = 2,7$, 1,4 Hz, 1H); 7,36 (dd, $J = 3,2$, 1,4 Hz, 1H); RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 94,5; 99,4; 122,3; 123,1; 126,9; 172,9.

5-bromo-N-(3-((4-(5-bromo-1H-pirrol-2-carboxamida)butyl)amina)propil)-1H-pirrol-2-carboxamida (53). Em balão de 5 mL, adicionou-se 5-bromo-1-tricloroacetil pirrol (**54**, 40 mg, 0,13 mmol, 2,00 equiv) e 1 mL de THF. A esta solução à temperatura ambiente (20°C), foi adicionada gota a gota

espermidina (10 μ L, 0,06 mmol, 1,00 equiv). A mistura reacional foi agitada por 48 h a esta mesma temperatura. Concluída a reação, o solvente foi removido sob vácuo. O sólido residual amarelo foi purificado utilizando-se cromatografia em coluna do tipo flash (SiO_2 , $\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (20:5:75)). Obteve-se a carboxamida (**53**, 14,30 mg, 65%) como um sólido branco: CCD ($\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (20:5:75)): Rf: 0,22; RMN de ^1H (600 MHz, $\text{MeOH}-d_4$): δ 1,66 – 1,56 (m, 4H); 1,83 – 1,77 (m, 2H); 2,70 (q, $J = 7,4$ Hz, 4H); 3,33 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H); 3,38 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H); 6,76 (dd, $J = 4,1, 1,4$ Hz, 2H); 6,90 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H); 6,91 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H) (5 NH permutáveis não foram observados); RMN de ^{13}C (151 MHz, $\text{MeOH}-d_4$): δ 27,1; 28,3; 29,8; 37,8; 39,9; 47,5; 9,9; 97,4; 97,5; 113,1; 113,2; 122,7; 122,8; 127,4; 127,6; 162,6; 162,8; IR (ATR): 32333, 1630, 1567, 1527, 1429 cm^{-1} , HRMS (ESI $^+$) m/z calcd. para $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{Br}_4\text{N}_5\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 490,0271; encontrado 490,0279.

4,5-Dicloro-1-tricloroacetil pirrol (55). Em balão de 10 mL coberto com papel alumínio, adicionou-se tricloroacetil pirrol (0,42 g, 2,00 mmol) e 5 mL de CHCl_3 . A esta solução à temperatura ambiente (20°C), adicionou-se gota a gota cloreto de sulfurila (0,32 mL, 4,00 mmol, 2,00 equiv). A mistura reacional foi refluxada por 36 h. Concluída a reação, esta foi finalizada pela adição de uma solução aquosa 2 mol L^{-1} de NaOH (7,5 mL). A fase aquosa foi extraída com DCM (3 X 15 mL) e as fases orgânicas foram combinadas e secas com MgSO_4 . O sólido residual amarelo foi purificado por cromatografia líquida de média pressão (gradiente SiO_2 , 0 $\rightarrow$ 20% AcOEt /hexano). Obteve-se o 4,5-dicloro-1-tricloroacetil pirrole (**55**, 77,00 mg, 14%) como um sólido branco: CCD (10% AcOEt /Hexanes): Rf: 0,42; RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3): δ 7,28 (s, 1H); (1 NH permutável não foi observado); RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3): δ 95,7; 112,7; 120,8; 121,6; 124,3; 172,8.

4,5-dicloro-*N*-(3-((4-(4,5-dicloro-1*H*-pirrol-2-carboxamida)butil)amina)propil)-1*H*-pirrol-2-carboxamida (56). Em balão de 5 mL, adicionou-se 4,5-dicloro-1-tricloroacetil pirrol (**55**, 77 mg, 0,28 mmol, 2,00 equiv) e 1 mL de THF. A esta solução à temperatura ambiente (19°C), foi adicionada gota a gota espermidina (22 µL, 0,14 mmol, 1,00 equiv). A mistura reacional foi agitada por 48 h a esta mesma temperatura. Concluída a reação, o solvente foi removido sob vácuo. O sólido residual amarelo foi purificado por cromatografia em coluna do tipo flash (SiO₂, 20% MeOH/5% NH₄OH/CH₂Cl₂). Obteve-se a carboxamida (**56**, 24,10 mg, 37%) como um líquido viscoso amarelo: CCD (20% MeOH/ 5% NH₄OH/CH₂Cl₂): R_f: 0,44; RMN de ¹H (600 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1,74 – 1,60 (m, 4H); 1,94 – 1,81 (m, 2H); 2,84 (s, 4H); 3,34 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H); 3,39 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H); 6,76 (d, *J* = 1,8 Hz, 2H); (5 NH permutáveis não foram observados); RMN de ¹³C (151 MHz, MeOD-*d*₄) δ 26,0; 28,0; 28,9; 37,4; 39,7; 47,0; 49,1; 110,6; 110,7; 111,3; 111,5; 117,3; 117,6; 125,2; 125,5; 162,0; 162,5. IR (ATR): 3186, 16300, 1554, 1518, 1431 cm⁻¹, HRMS (ESI⁺) *m/z* calcd. para C₁₇H₂₂Cl₄N₅O₂ [M+H]⁺: 470,0493; encontrado 470,0497.

5-Flúor-1-tricloroacetil pirrol (57). Em tubo específico para micro-ondas de 10 mL, adicionou-se tricloroacetil pirrol (0,43 g, 2,00 mmol) e 20 mL de acetonitrila. A esta solução à temperatura ambiente (20°C), adicionou-se em uma única porção selectfluor® (0,71 g, 2,00 mmol). A mistura reacional foi aquecida e agitada no micro-ondas à temperatura de 72°C por 5 min. Após esse período a reação apresentou uma coloração roxa e foi finalizada pela adição de H₂O (50 mL) seguida pela adição de CHCl₃ (50 mL). A fase aquosa foi extraída com CHCl₃ (3 X 50 mL) e as fases orgânicas foram secas com MgSO₄. O solvente foi removido sob vácuo. O sólido marrom residual foi purificado por cromatografia

líquida de média pressão (gradiente SiO₂, 0 → 10% TBME/pentane). Obteve-se o 5-flúor-1-tricloroacetil pirrol (**57**, 94,00 mg, 20%) como um sólido branco: CCD (10% TBME/pentane): Rf: 0,44; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 5,79 (td, 4,5, 3,0 Hz, 1H); 7,31 (td, *J* = 4,5, 3,0 Hz, 1H); 9,60 (s, 1H); RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ 92,1 (d, *J* = 12,1 Hz); 94,2; 115,0; 122,4 (d, *J* = 3,0 Hz); 152,4 (d, *J* = 275,8 Hz); 172,86 (d, *J* = 2,9 Hz).

5-Flúor-N-(3-((4-(5-flúor-1H-pirrol-2-carboxamida)butil)amina)propil)-1H-pirrol-2-carboxamida (58**).** Em balão de 5 mL, adicionou-se 5-flúor-1-tricloroacetil pirrol (**57**, 93,70 mg, 0,41 mmol, 2,00 equiv) e 2,5 mL de DMF. A esta solução à temperatura ambiente (20°C), foi adicionada gota a gota espermidina (**S2**, 32 µL, 0,20 mmol, 1,00 equiv), seguido pela adição de Na₂CO₃ (0,10 g, 1,00 mmol, 5,00 equiv). A mistura reacional foi agitada por 12 h a esta mesma temperatura. Concluída a reação, o solvente foi removido sob vácuo. O sólido residual amarelo foi purificado utilizando-se cromatografia em coluna do tipo flash (SiO₂, MeOH/NH₄OH/CH₂Cl₂ (20:5:75)). Obteve-se a carboxamida (**58**, 29,70 mg, 40%) como um sólido branco: CCD (MeOH/NH₄OH/CH₂Cl₂ (20:5:75)): Rf: 0,42; RMN de ¹H (600 MHz, MeOH-*d*₄): δ, 1,49 (dt, *J* = 14,1, 8,3 Hz, 4H); 1,68 (q, *J* = 6,9 Hz, 2H); 2,55 (dt, *J* = 14,3, 7,0 Hz, 4H); 3,22 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H); 3,29 – 3,24 (m, 2H), 5,42 (td, *J* = 3,9, 1,8 Hz, 2H); 6,53 (q, *J* = 4,4 Hz, 2H); (5 NH permutáveis não foram observados); RMN de ¹³C (151 MHz, MeOH-*d*₄): δ 27,5; 28,5; 30,2; 37,9; 39,9; 47,7; 50,1; 88,1; 88,2; 110,9; 110,9; 118,5 (*J* = 30,2); 150,0 (*J* = 15,1); 151,6 (*J* = 15,1); 163,4 (15,1); IR (ATR): 3233,3; 1630, 1567, 1527, 1429 cm⁻¹, HRMS (ESI⁺) *m/z* calcd. para C₁₇H₂₄Br₄N₅O₂ [M+H]⁺: 490,0271; encontrado 490,0279.

***N*-(3-((4-(1*H*-indol-2-carboxamida)butil)amina)propil)-1*H*-indol-2-carboxamida (59).** Em balão de 10 mL, adicionou-se ácido indol-2-carboxílico (150 mg, 0,93 mmol, 2,00 equiv) e 3 mL de THF. A esta solução à temperatura ambiente (20°C), adicionou-se HBTU (353 mg, 0,93 mmol, 2,00 equiv) seguido de DIEA (0,24 mL, 1,40 mmol, 3,00 equiv). Então, foi adicionada uma solução de espermidina (73 µL, 0,46 mmol, 1,0 equiv) em 2 mL de THF. A mistura reacional foi agitada por 7 h a esta mesma temperatura. Concluída a reação, o solvente foi removido sob vácuo e o resíduo foi redissolvido em DCM. A reação foi lavada com uma solução aquosa de HCl 0,5 mol L⁻¹ (5 mL), seguido por solução saturada de NaHCO₃ (5 mL) e brine (5 mL). A fase orgânica foi seca com NaSO₄ anidro e o solvente foi removido sob vácuo. O sólido residual branco foi purificado por cromatografia em coluna do tipo flash (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (80:17:3)). Obteve-se a carboxamida (**59**, 89,30 mg, 45%) como um sólido branco: CCD (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (80:17:3): R_f: 0,18; RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,16 - 1,18 (m, 4H); 1,48 - 1,70 (m, 4H); 1,75 - 1,96 (m, 2H); 2,95 (dd, *J* = 10,8, 4,3 Hz, 4H); 6,97 - 7,06 (m, 2H); 7,10 (t, *J* = 1,9 Hz, 2H); 7,14 - 7,21 (m, 2H); 7,41 (dd, *J* = 1,9, 0,9 Hz, 1H); 7,43 (dd, *J* = 1,9, 0,9 Hz, 1H); 7,60 (dd, *J* = 7,9, 4,4 Hz, 2H); 8,53 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H); 8,65 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H); 11,56 (s, 1H); 11,59 (s, 1H); (1 NH permutável não foi observado); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ 23,5; 26,4; 26,4; 36,0; 38,1; 45,0; 46,8; 102,3; 102,5; 112,3; 112,3; 119,7; 119,8; 121,4; 121,5; 123,2; 123,4; 127,0; 127,1; 131,5; 131,8; 136,4; 136,4; 161,1; 161,4; IR (ATR): 3251; 1619; 1551; 1418; 1308 cm⁻¹; HRMS (ESI⁺) *m/z* calcd. para C₂₅H₃₀N₅O₂ [M+H]⁺ : 423.2394; encontrado 432.2396.

***N*-(3-((4-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-carboxamida)butil)amina)propil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-carboxamida (60).** Em tubo específico para micro-ondas

de 10 mL, adicionou-se ácido 1*H*-benzimidazol-2-carboxílico (150 mg, 0.92 mmol, 2.00 equiv) e 2.6 mL de DMF. A esta solução à temperatura ambiente (20°C), adicionou-se HBTU (350 mg, 0.92 mmol, 2.00 equiv) seguido de DIEA (0.24 mL, 1.39 mmol, 3.00 equiv). Então, foi adicionada uma solução de espermidina (73 µL, 0.46 mmol, 1.00 equiv) em 2 mL de DMF. A mistura reacional foi aquecida e agitada no micro-ondas à temperatura de 50°C por 6 h. Concluída a reação, o solvente foi removido sob vácuo e o resíduo foi redissolvido em DCM. A reação foi lavada com uma solução aquosa de HCl 0.5 mol L⁻¹ (5 mL), seguido por solução saturada de NaHCO₃ (5 mL) e brine (5 mL). A fase orgânica foi seca com NaSO₄ anidro e o solvente foi removido sob vácuo. O sólido residual branco foi purificado por cromatografia em coluna do tipo flash (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (80:17:3)). Obteve-se a carboxamida (**60**, 67.80 mg, 35%) como um sólido branco: CCD (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (70:25:5): R_f: 0.42; RMN de ¹H (400 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1,62 - 1,73 (m, 4H); 1,89; 1,93 (sobreposição de t, *J* = 6,9 Hz, 2H); 2,83 (dt, *J* = 8 Hz, 4H); 3,46 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H); 3,52 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H); 7,29 (ddd, *J* = 6,2, 3,2, 1,4 Hz, 4H), 7,61 (dd, *J* = 6,2, 3,2 Hz, 4H) (5 NH permutáveis não foram observado); RMN de ¹³C (101 MHz, MeOH-*d*₄): δ 26,1; 27,7; 28,8; 37,8; 39,9; 47,1; 49,3; 117,2; 125,1; 139,7; 146,4; 146,6; 160,9; 161,3; IR (ATR): 3197; 1655; 1560; 1427; 1314 cm⁻¹; HRMS (ESI⁺) *m/z* calcd. para C₂₃H₂₈N₇O₂ [M+H]⁺ : 434,2299; encontrado 434,2302.

5-bromo-*N*-(3-((4-(5-bromotiofeno-2-carboxamida)butil)amina)propil)tiofeno-2-carboxamida (61**)**. Em tubo específico para micro-ondas de 10 mL, adicionou-se ácido 5-bromotiofeno-2-carboxílico (150 mg, 0,72 mmol, 2,00 equiv) e 2 mL de DMF. A esta solução à temperatura ambiente (20°C), adicionou-se HBTU (270 mg, 1,00 mmol, 0,72 equiv) seguido de DIEA (0,19 mL, 1,08 mmol, 3,0 equiv). Então, foi adicionada uma solução de espermidina (56 µL, 0,36 mmol, 1,00 equiv) em 1,8 mL de DMF. A mistura reacional foi aquecida e agitada no micro-ondas à temperatura de 50°C por 6 h. Concluída a reação, o solvente foi

removido sob vácuo e o resíduo foi redissolvido em DCM. A reação foi lavada com uma solução aquosa de HCl 0,5 mol L⁻¹ (5 mL), seguido por solução saturada de NaHCO₃ (5 mL) e brine (5 mL). A fase orgânica foi seca com NaSO₄ anidro e o solvente foi removido sob vácuo. O sólido residual amarelo foi purificado por cromatografia em coluna do tipo flash (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (80:17:3)). Obteve-se a carboxamida (**61**, 18,80 mg, 10%) como um líquido viscoso incolor: CCD (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (80:17:3): R_f: 0,54; RMN de ¹H (600 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1,68 – 1,80 (m, 4H); 1,92 – 2,03 (m, 2H); 3,08 (q, *J* = 6,5 Hz, 2H); 3,38 – 3,44 (m, 2H); 3,47 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H); 7,17 – 7,19 (m, 2H); 7,47 – 7,49 (m, 2H); (3 NH permutáveis não foram observados); RMN de ¹³C (151 MHz, MeOH-*d*₄): δ 24,6; 27,6; 27,8; 37,4; 39,8; 46,4; 50,0; 119,0; 119,4; 129,9; 130,3; 132,3; 132,4; 141,4; 142,0; 163,4; 164,1; IR (ATR): 3319; 1625; 1548; 1515; 1419 cm⁻¹; HRMS (ESI⁺) *m/z* calcd. para C₁₇H₂₂Br₂N₃O₂S₂ [M+H]⁺: 523,9494; encontrado 523,950.

5-metil-N-(3-((4-(5-metiltiofeno-2-carboxamida)butil)amina)propil)tiofeno-2-carboxamida (62). Em tubo específico para micro-ondas de 10 mL, adicionou-se ácido 5-metiltiofeno-2-carboxílico (150 mg, 1,00 mmol, 2,00 equiv) e 2 mL de DMF. A esta solução à temperatura ambiente (20°C), adicionou-se HBTU (400 mg, 1,00 mmol, 2,00 equiv) seguido de DIEA (0,26 mL, 1,50 mmol, 3,00 equiv). Então, foi adicionada uma solução de espermidina (78 µL, 0,50 mmol, 1,00 equiv) em 2 mL de DMF. A mistura reacional foi aquecida e agitada no micro-ondas à temperatura de 50°C por 6 h. Concluída a reação, o solvente foi removido sob vácuo e o resíduo foi redissolvido em DCM. A reação foi lavada com uma solução aquosa de HCl 0,5 mol L⁻¹ (5 mL), seguido por solução saturada de NaHCO₃ (5 mL) e brine (5 mL). A fase orgânica foi seca com NaSO₄ anidro e o solvente foi removido sob vácuo. O sólido residual amarelo foi purificado por cromatografia em coluna do tipo flash (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (80:17:3)). Obteve-se a carboxamida (**62**, 39,50 mg, 10%)

como um líquido viscoso incolor: CCD (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (80:17:3): R_f: 0,48; RMN de ¹H (600 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1,60 – 1,65 (m, 4H); 1,79, 1,82 (sobreposição de t, *J* = 6,8 Hz, 2H); 2,67 - 2,71 (m, 2H); 3,34 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H); 3,39 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H); 6,79 (d, *J* = 2,8 Hz, 2H); 7,45 (d, *J* = 3,9 Hz, 2H); (3 NH permutáveis não foram observados); RMN de ¹³C (151 MHz, MeOH-*d*₄): δ 27,3; 28,2; 29,9; 38,4; 40,4; 47,7; 50,0; 127,3; 127,4; 129,8; 129,9; 137,5; 137,7; 146,9; 147,0; 164,6; 164,7; IR (ATR): 3294; 1620; 1552; 1526; 1459 cm⁻¹; HRMS (ESI⁺) *m/z* calcd. para C₁₉H₂₈N₃O₂S₂ [M+H]⁺: 394,1617; encontrado 394,1621.

6-Cloro-*N*-((4-(6-cloropicolinamida)butil)amina)propil)

picolinamida (63). Em balão de 10 mL, adicionou-se ácido 6-cloropicolínico (150 mg, 0,95 mmol, 2,00 equiv) e 3 mL de THF. A esta solução à temperatura ambiente (20°C), adicionou-se HBTU (360 mg, 0,95 mmol, 2,00 equiv) seguido de DIEA (0,25 mL, 1,43 mmol, 3,0 equiv). Então, foi adicionada uma solução de espermidina (75 µL, 0,48 mmol, 1,00 equiv) em 2 mL de THF. A mistura reacional foi agitada por 14 h a esta mesma temperatura. Concluída a reação, o solvente foi removido sob vácuo e o resíduo foi redissolvido em DCM. A reação foi lavada com uma solução aquosa de HCl 0,5 mol L⁻¹ (5 mL), seguido por solução saturada de NaHCO₃ (5 mL) e brine (5 mL). A fase orgânica foi seca com NaSO₄ anidro. O sólido residual branco foi purificado por cromatografia em coluna do tipo flash (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (80:17:3)). Obteve-se a carboxamida (**63**, 89,30 mg, 24%) como um líquido viscoso incolor: CCD (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (80:17:3): R_f: 0,43; RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 1,68 (s, 4H); 1,87, 1,88 (sobreposição de t, *J* = 6,4 Hz, 2H); 2,81 (m, 2H); 2,85 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H); 3,41 – 3,44 (m, 2H); 3,53 (sl, 2H); 4,19 (sl, 1H); 7,39 (d, *J* = 0,8 Hz, 1H); 7,41 (d, *J* = 0,8 Hz, 1H); 7,75 – 7,79 (m, 2H); 7,98 – 8,04 (m, 2H); 8,45 (s, 1H); (1 NH permutável não foi observado); RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ 26,0; 27,0; 28,3; 37,6; 39,1; 47,2; 49,0; 121,0; 121,1; 127,0; 127,2; 140,2 (2); 150,0 (2); 150,1; 150,3; 163,2;

164,0; IR (ATR): 3391; 1667; 1561; 1537; 1432 cm^{-1} ; HRMS (ESI⁺) m/z calcd. para $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 424,1302; encontrado 424,1308.

6-Metil-*N*-(3-((4-(6-metilpicolinamida)butil)amina)propil)picolinamida

(64). Em balão de 10 mL, adicionou-se ácido 6-metilpiridina-2-carboxílico (150 mg, 1,10 mmol, 2,00 equiv) e 3,7 mL de THF. A esta solução à temperatura ambiente (20°C), adicionou-se HBTU (415 mg, 1,1 mmol, 2,0 equiv) seguido de DIEA (0,28 mL, 1,64 mmol, 3,00 equiv). Então, foi adicionada uma solução de espermidina (86 μL , 0,55 mmol, 1,00 equiv) em 2 mL de THF. A mistura reacional foi agitada por 16 h a esta mesma temperatura. Concluída a reação, o solvente foi removido sob vácuo e o resíduo foi redissolvido em DCM. A reação foi lavada com uma solução aquosa de HCl 0,5 mol L^{-1} (5 mL), seguido por solução saturada de NaHCO_3 (5 mL) e brine (5 mL). A fase orgânica foi seca com NaSO_4 anidro. O sólido residual branco foi purificado por cromatografia em coluna do tipo flash (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (80:17:3)). Obteve-se a carboxamida **(64)**, 62,30 mg, 29%) como um líquido viscoso incolor: CCD ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (80:17:3): Rf: 0,45; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 1,57 - 1,67 (m, 4H); 1,78 - 1,83 (m, 2H); 2,64 (t, J = 8 Hz, 2H); 2,70 (t, J = 8 Hz, 2H); 3,41 (q, J = 8 Hz, 2H); 3,50 (q, J = 8 Hz, 2H); 7,18 (d, J = 4 Hz, 1H); 7,20 (d, J = 4 Hz, 1H); 7,63 - 7,67 (m, 2H); 7,91 (s, 1H); 7,93 (s, 1H); 8,16 (s, 1H); 8,42 (s, 1H); (1 NH permutável não foi observado); RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3): δ 24,2; 24,3; 27,2; 27,4; 29,6; 37,6; 39,1; 47,5; 49,4; 119,2; 119,3; 125,8 (2); 137,4 (2); 149,2; 149,3; 157,1 (2); 164,6; 164,8; IR (ATR): 3378; 1656; 1592; 1527; 1453 cm^{-1} ; HRMS (ESI⁺) m/z calcd. para $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 384,2394; encontrado 384,2405.

4,5-Dibromo-*N*-(3-((4-(4,5-dibromofurano-2-carboxamida)butil)amina)propil)furano-2-carboxamida (65). Em balão de 10 mL, adicionou-se ácido 4,5-dibromo-2-furóico (150 mg, 0,56 mmol, 2,00 equiv) e 1,5 mL de THF. A esta solução à temperatura ambiente (20°C), adicionou-se HBTU (210 mg, 0,56 mmol, 2,00 equiv) seguido de DIEA (0,15 mL, 0,84 mmol, 3,00 equiv). Então, foi adicionada uma solução de espermidina (44 µL, 0,28 mmol, 1,00 equiv) em 1,5 mL de THF. A mistura reacional foi agitada por 14 h a esta mesma temperatura. Concluída a reação, o solvente foi removido sob vácuo e o resíduo foi redissolvido em DCM. A reação foi lavada com uma solução aquosa de HCl 0,5 mol L⁻¹ (5 mL), seguido por solução saturada de NaHCO₃ (5 mL) e brine (5 mL). A fase orgânica foi seca com NaSO₄ anidro. O sólido residual branco foi purificado por cromatografia em coluna do tipo flash (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (80:17:3)). Obteve-se a carboxamida (**65**, 61,60 mg, 29%) como um líquido viscoso incolor: CCD (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (80:17:3): R_f: 0,43; RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃): δ 1,63 (dq, *J* = 18,0, 6,0, 5,2 Hz, 4H); 1,72 - 1,76 (m, 2H); 2,64 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H); 2,77 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H); 3,40 (q, *J* = 6,5 Hz, 2H); 3,48 (q, *J* = 5,7 Hz, 2H); 6,94 (t, *J* = 5,4 Hz, 1H); 7,05 (s, 1H); 7,07 (s, 1H); 8,10 (s, 1H); RMN de ¹³C (151 MHz, CDCl₃): δ 27,3; 27,4; 28,2; 39,1; 39,2; 48,5; 49,3; 104,2; 104,4; 118,3; 118,5; 124,9; 125,0; 149,5; 149,7; 156,6 (2); IR (ATR): 2923; 1631; 1534; 1480; 1304 cm⁻¹; HRMS (ESI⁺) *m/z* calcd. para C₁₇H₂₀Br₄N₃O₄ [M+H]⁺: 649,8141; encontrado 649,8138.

5-Metil-*N*-(3-((4-(5-metillfurano-2-carboxamida)butil)amina)propil)furano-2-carboxamida (66). Em balão de 10 mL, adicionou-se ácido 5-metil-2-furóico (150 mg, 1,19 mmol, 2,00 equiv) e 3,5 mL de THF. A esta solução à temperatura ambiente (19°C), adicionou-se HBTU (451 mg, 1,19 mmol, 2,00

equiv) seguido de DIEA (0,31 mL, 1,78 mmol, 3,0 equiv). Então, foi adicionada uma solução de espermidina (93 µL, 0,48 mmol, 1,00 equiv) em 2 mL de THF. A mistura reacional foi agitada por 14 h a esta mesma temperatura. Concluída a reação, o solvente foi removido sob vácuo e o resíduo foi redissolvido em DCM. A reação foi lavada com uma solução aquosa de HCl 0,5 mol L⁻¹ (5 mL), seguido por solução saturada de NaHCO₃ (5 mL) e brine (5 mL). A fase orgânica foi seca com NaSO₄ anidro. O sólido residual branco foi purificado por cromatografia em coluna do tipo flash (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (80:17:3)). Obteve-se a carboxamida (**66**, 52,00 mg, 30%) como um líquido viscoso incolor: CCD (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (80:17:3): R_f: 0,52; RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃): δ, 1,64 (s, 4H); 1,81, 1,83 (sobreposição de t, *J* = 6,0 Hz, 2H); 2,28 (s, 6H); 2,77 (s, 2H); 2,82 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H); 3,37 – 3,38 (m, 2H); 3,44 – 3,46 (m, 2H); 3,83 (s, 1H); 6,04 (d, *J* = 2,7 Hz, 2H); 6,74 (t, *J* = 5,6 Hz, 1H); 6,85 – 6,98 (m, 2H); 7,39 (s, 1H); RMN de ¹³C (151 MHz, CDCl₃): δ 13,8; 25,9; 27,1; 28,1; 37,2; 38,6; 47,0; 48,8; 108,5; 108,6; 115,4; 115,7; 145,9; 146,2; 154,8; 155,1; 159,1; 159,7; IR (ATR): 3416; 1637; 1555; 1515; 1309 cm⁻¹; HRMS (ESI⁺) *m/z* calcd. para C₁₉H₂₈Cl₂N₃O₄ [M+H]⁺: 362,2074; encontrado 362,2002.

1.5.2. Bioensaios

Os bioensaios foram realizados pelos pesquisadores: Dr. Fernanda Ramos Gadelha do Instituto de Biologia da UNICAMP (*T. cruzi*), Prof. Danilo Ciccone Miguel do Instituto de Biologia da UNICAMP (*L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*) e Prof. Dr. Rafael V. C. Guido do Instituto de Física de São Carlos (*P. falciparum*).

1.5.2.1. Ensaios leishmanicida e tripanossomicida *in vitro*

Os cultivos dos promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) foram mantidas a 26°C em Meio 199 (Sigma-Aldrich) suplementado com 5% de penicilina/estreptomicina, 0,1% de hemina (25 mg mL⁻¹

¹ em 50% trietanolamina), 20% de soro fetal de bovino inativado pelo calor, 10 mM de adenina (pH 7,5) e 5 mM de *L*-glutamina⁴⁷. Os promastigotas de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD) foram cultivados como descrito acima, com a exceção de que 5% de urina estéril humana foi adicionada ao meio de cultura. Epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram cultivadas em meio de triptose de infusão hepática suplementado com 20 mg L⁻¹ de hemina e 10% de soro bovino fetal a 28°C, como descrito anteriormente⁴⁸. A atividade antiparasitária dos análogos de pseudoceratidina foi avaliada contra tripanossomatídeos utilizando-se o ensaio de viabilidade MTT⁴⁹. Após 24 h de incubação com a série de análogos da pseudoceratidina, os valores da concentração meiomaximal efetiva (EC₅₀) para as populações de *Leishmania* spp. e de *T. cruzi* foram calculadas a partir da regressão sigmoidal das curvas de concentração-resposta utilizando-se o programa *Scientific Graphing and Analysis Software Origin 5.0*. Cada experimento foi realizado em triplicata, e foi repetido duas ou três vezes. Experimentos para a avaliação da citotóxicidade foram conduzidos usando macrófagos de medula óssea de camundongos fêmeas BALB/c. Células diferenciadas foram cultivadas em placas de 96 poços a 37°C, para posterior incubação com concentrações crescentes de análogos de pseudoceratidina por 24 h. O método de MTT também foi realizado, e os valores de CC₅₀ foram calculados⁴⁹.

Infecções intracelulares foram obtidas pela infecção de macrófagos derivados de células ósseas com promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* (10 parasitas: 1 macrófago; MOI = 10). Após 1 h de incubação com os parasitas, as culturas foram lavadas três vezes com PBS 1X e mantidas a 33°C, 5% de CO₂, durante 24 h. Após esse período, as infecções foram estabelecidas e diferentes concentrações de compostos de pseudoceratidina foram adicionadas às culturas, que permaneceram a 33°C por 24 h. As células foram então lavadas três vezes com solução morna de PBS 1X e fixadas com MeOH para subsequente coloração utilizando o kit Instant Prov (Newprov). O número de amastigotas intracelulares foi obtido pela contagem, em triplicatas, de 300 células em lamelas. Fotomicrografias de infecções foram registradas usando o sistema de microscópio Leica LAS Core. Experimentos utilizando camundongos BALB/c foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP (4535-1/2017).

1.5.2.2. Ensaios antiplasmodiais *in vitro* contra parasitas sanguíneos de *P. falciparum*

Parasitas sanguíneos de *P. falciparum* (3D7, cepa sensível; e K1, cepa resistente à cloroquina, cicloguanil e pirimetamina) foram cultivadas como descrito anteriormente⁵⁰. Estágios de anel⁵¹ recém-sincronizados com sorbitol foram incubados com as amostras de teste em várias concentrações, previamente solubilizados em 0,05% de DMSO (v/v). Cada ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados foram comparados com culturas de controle em meio completo sem as amostras de ensaio. Pirimetamina, cloroquina, cicloguanil e artesunato de sódio foram usados em cada experimento como controles antimaláricos. As atividades das amostras em teste foram determinadas utilizando o ensaio SYBR *green*⁵². As placas foram centrifugadas a 700 g por 5 min em temperatura ambiente para remover o meio, em seguida foram lavadas com PBS 1 X e incubadas durante 30 min com uma solução tampão para lise [2.4228 g de TRIS, ultrapuro (20 mM), pH 7,5; 1,8612 g de EDTA, ultrapuro (5 mM); 80 µg de saponina (0,008% m/v); 800 µL de Triton X-100 (0,08% v/v); H₂O tipo I] e corante SYBR verde I (1:20 000). A fluorescência dos eritrócitos não infectados foi utilizada como branco. A fluorescência foi medida num fluorímetro SpectraMax340PC384 a 485/535 nm. A metade da concentração inibitória dos compostos (IC₅₀) foram estimadas por ajuste de curvas utilizando o software da *OriginLab Corporation* e comparando com o crescimento do parasita em meio isento da amostra em teste.

1.5.2.3. Testes de citotoxicidade utilizando células imortalizadas

A citotoxicidade dos compostos em teste foi avaliada utilizando células de uma linhagem celular de hepatoma humano (HepG2). As células foram cultivadas em frascos estéreis de 75 cm² contendo meio RPMI-1640 (suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor e 40 mg L⁻¹ de gentamicina) sob uma atmosfera de 5 % de CO₂, a 37°C. Quando confluyente, a monocamada de células foi lavada com meio de cultura, tripsinizada, distribuída em uma placa de 96 poços de fundo chato (5 X 10³ células/poço) e incubada por 18 horas, a 37°C, para adesão celular⁵³. Os compostos (em 20 µL de solução),

em concentrações variadas (de 1000 a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$), foram colocados em placas de 96 poços e incubados com as células em cultura por 24 h, sob uma atmosfera de 5% de CO_2 e a 37°C. Em seguida, utilizou-se uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (5 mg mL^{-1} ; 20 μL /poço por 3 h) para avaliar a viabilidade mitocondrial. Os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos e adicionou-se 100 μL de DMSO em cada poço para solubilizar os cristais de formazan formados. A densidade óptica foi determinada a 570 e 630 nm. A viabilidade celular foi expressa como porcentagem em relação a absorbância das células controle não tratadas, depois de subtrair o branco apropriado.

1.5.2.4. Associação *in vitro* com artesunato

O isoblograma foi construído para analisar os efeitos da combinação de drogas, com o objetivo de determinar se o efeito é aditivo, sinérgico ou antagônico. A concentração inibitória semi-máxima fraccional (FIC_{50}) foi calculada para cada combinação de pares de fármacos. Preparou-se uma solução estoque para cada fármaco utilizando meios completos, de tal forma que a concentração final se aproximasse do IC_{50} após três ou quatro diluições. Utilizando as soluções estoque, foram preparadas misturas volume-volume (v/v) de artesunato e pseudoceratidina (**28**) nas proporções de 0:5, 1:4, 2:3, 1:4 e 5:0. Estas misturas foram 2 vezes diluídas em série para gerar uma gama de sete concentrações em cada caso. Os ΣFIC_{50} foram calculados utilizando a seguinte equação: $\text{FIC}_{50} \text{ artesunato} (\text{IC}_{50} \text{ do artesunato quando combinado com pseudoceratidina} / \text{IC}_{50} \text{ artesunato}) + \text{FIC}_{50} \text{ pseudoceratidina} (\text{IC}_{50} \text{ da pseudoceratidina quando combinada com artesunato} / \text{IC}_{50} \text{ pseudoceratidina})$. As curvas do isoblograma foram construídas plotando-se FIC_{50} da pseudoceratidina contra FIC_{50} do artesunato. Uma linha diagonal linear ($\Sigma\text{FIC}_{50} = 1$) indica um efeito aditivo entre o artesunato e a pseudoceratidina, uma curva côncava abaixo da diagonal ($\text{FIC}_{\text{index}} < 1$) indica um efeito sinérgico, e uma curva convexa acima da diagonal ($\text{FIC}_{\text{index}} > 1$) indica antagonismo⁵⁴.

Capítulo 2:

Síntese de análogos do alcaloide agelastatina A

2.1. Introdução

2.1.1. Isolamento e bioatividade da agelastatina A

As esponjas marinhas constituem uma rica fonte de produtos naturais. Entre seus vários metabólitos secundários estruturalmente complexos, destacam-se os alcaloides pirrol-imidazólicos⁵⁵. Como exemplo podemos citar as agelastatinas, com esqueleto tetracíclico complexo e potente atividade anticancerígena⁵⁵.

Os alcaloides da classe da agelastatina constituem um subconjunto de alcaloides marinhos da família pirrol-2-imidazóis. As agelastatinas são derivados biossintéticos da oroidina⁵⁶. O primeiro isolamento da (-)-agelastatina A (**67**, figura 26, agelastatina A) foi realizado por Pietra em 1993 a partir da esponja *Agelas dendromorpha* coletada na Nova Caledônia⁵⁷. Juntamente com a agelastatina A, Pietra também obteve seu congênero agelastatina B (**68**), o qual possui um átomo de bromo adicional ligado ao C14⁵⁶. As agelastatinas C (**69**) e D (**70**) foram isoladas da esponja *Cymbastela sp.* por Molinski e colaboradores em 1998⁵⁵. A agelastatina C contém um grupo hidroxila adicional ligado ao C4 enquanto a agelastatina D não possui o grupo metila ligado ao N1⁵⁵. As agelastatinas E (**71**) e F (**72**) foram isoladas como componentes minoritários da esponja *A. dendromorpha*⁵⁵. A agelastatina E é formalmente a O-metil-agelastatina A, enquanto a agelastatina F é 14-bromoagelastatina D.

Figura 26. Agelastatinas isoladas até o momento.

Duas propostas de biossíntese foram feitas para a agelastatina A (figura 27). A primeira foi proposta por Ambrosio *et al.* (1993)⁵⁷ e consiste de uma reação em cascata a qual é iniciada por uma reação de adição intramolecular do precursor oroidina. Este, segundo a proposta, possui estrutura similar ao precursor da himenidina. A segunda foi proposta por Mourabit *et al.* (2001)²² e consiste de uma reação de oxidação do precursor himenidina, a qual prossegue através de uma reação de ciclização para a formação do anel de 5 membros. Após sua formação, ocorre uma adição conjugada mediada pelo anel pirrólico a qual leva a formação do esqueleto tetracíclico.

Figura 27. Propostas de biossíntese para a agelastatina A (67).

(A) Pietra, 1993

(B) Mourabit, 2001

Dentre os alcaloides bromopirrólicos já isolados, a agelastatina A (67) exibe excepcional citotoxicidade contra linhagens de células cancerígena, incluindo células de câncer nasofaríngeo KB ($IC_{50} = 0,075 \mu g mL^{-1}$)⁵⁵. Outras bioatividades reportadas são variadas, incluindo: inibição da proteína β -catenin,

supressão da transformação maligna da osteopontina e inibição da glicogênio sintase quinase (GSK-3b)⁵⁸. A agelastatina A e análogos também demonstraram apresentar boa atividade contra leucemia⁵⁹.

Estudos da relação estrutura atividade para a agelastatina A (**67**) indicaram que as funcionalidades 5-OH, 3-NH e 9-NH são essenciais para sua citotoxicidade (figura 28), já que alquilações e acilações dessas posições levam a perdas significantes da atividade⁵⁵. A presença do átomo de bromo em C13 também é considerada importante, já que sua remoção também resulta em diminuição da atividade⁵⁵. Outros estudos recentes, revelaram que substituições em C13, C14 e C15 do anel pirrólico são toleradas⁵⁸.

Figura 28. Visão geral da relação estrutura atividade da agelastatina A.

As outras agelastatinas de ocorrência natural não apresentam atividade biológica significativa, indicando que a agelastatina A (**67**) apresenta um padrão único de funcionalidades. E acredita-se que até mesmo suas propriedades conformacionais podem exercer um papel decisivo na sua bioatividade⁵⁵.

Enquanto a agelastatina A (**67**) vem sendo considerada um alvo interessante para estudos sintéticos e biológicos nas últimas 2 décadas, nenhum estudo em nível molecular da descrição de seus efeitos nas células, incluindo suas células alvo, foi realizado. Para estes estudos, é necessário o desenvolvimento de sondas celulares funcionalizadas as quais podem auxiliar na identificação do alvo celular através de cromatografia de foto-afinidade ou

microscopia de fluorescência. Para isso seja possível, estas sondas devem possuir bioatividades semelhantes às do produto natural, ou seja, devem possuir propriedades eletrônicas e conformacionais semelhantes.

Um estudo recente da relação estrutura *versus* atividade foi desenvolvido por Romo e colaboradores⁵⁸, onde avaliou-se a funcionalização das posições C14 e C15 do anel pirrol da agelastatina A. Como resultado desse estudo, obteve-se o derivado 14-Cl-agelastatina A. Este derivado possui atividade citotóxica semelhante à da agelastatina A. Entretanto, as tentativas de desenvolvimento de uma sonda com bioatividades semelhantes da agelastatina A foram infrutíferas, pois a funcionalização da hidroxila em 5 leva à perda total da bioatividade.

Devido a este fato, surgiu a necessidade do desenvolvimento de uma rota sintética que possa levar a síntese da agelastatina A e de seu derivado inédito e não natural hidroxilado na posição 7 (**73**, figura 29) em um número reduzido de etapas. A obtenção desse derivado inédito abre o número de funcionalizações que podem ser empregadas para o desenvolvimento de novos análogos e assim pode-se avaliar a importância dessa posição ainda inexplorada. Além disso, a presença da hidroxila na posição 7 também pode ser utilizada para o desenvolvimento de novos candidatos a sondas celulares. Esses candidatos podem ser sintetizados por meio de reações de acilação ou alquilação da 7-OH.

Figura 29. Comparação estrutural da agelastatina A (**67**) e do derivado inédito 7-hidroxi agelastatina A (7-OH agelastatina A) (**73**).

2.1.1. Desafios sintéticos da agelastatina A

Além de suas propriedades biológicas atrativas, a estrutura da agelastatina A (**67**) também é bastante interessante do ponto de vista sintético. Ela é composta por um sistema tetracíclico não usual, o qual contém quatro anéis de 5-6-5-5 membros (figura 30). Esses são: um anel pirrólico (A), um anel piperazinona (B), um ciclopentano (C) e um anel imidazolona (D). O anel C, o qual contém todos os 4 centros estereogênicos da molécula, é o de síntese mais desafiadora.

Figura 30. Estrutura tetracíclica da agelastatina A (**67**).

A primeira síntese descrita para a agelastatina A (**67**) foi realizada por Weinreb em 1999⁶⁰. Desde então, diversas sínteses totais racêmicas e enantiosseletivas foram reportadas⁵⁵. Devido ao objetivo desse trabalho consistir na construção do sistema tetracíclico ABC presente no esqueleto da agelastatina A, será descrita, a seguir, a primeira estratégia racêmica e a primeira estratégia enantiosseletiva utilizadas para a construção desse sistema.

Na estratégia empregada por Weinreb e colaboradores⁶⁰, o anel B é construído no final da síntese via adição de Michael com a participação do anel pirrólico presente no precursor bicíclico (esquema 15). O anel C polifuncionalizado é construído por uma sequência de reações pericíclicas. Essas são: reação de Diels-Alder *N*-sufinil-mediada, seguido de um rearranjo [2,3] sigmatrópico e por última reação do tipo Kresze eno. A partir do intermediário (**74**), a acilação com cloreto de 2-trimetilsilil pirrol acila, seguido da

hidrólise seletiva do carbamato e oxidação com dicromato de piridina (PDC) leva a formação da enona (**75**). O tratamento da enona (**75**) com carbonato de cério leva a formação do tetraciclo ABC (**76**). O TMS foi empregado estrategicamente no anel pirrólico, pois, como observado em estudos anteriores⁵⁷, o átomo de bromo nesta posição apresenta pronunciada labilidade. A rota sintética desenvolvida por Weinreb é um marco para a síntese total da agelastatina A (**67**) e sua estratégia, principalmente o uso da reação de adição 1,4 para a formação do anel B, foi empregada em muitas sínteses subsequentes⁵⁵.

Esquema 15. Síntese racêmica da Agelastatina A desenvolvida por Weinreb e colaboradores⁶⁰.

A primeira síntese enantiosseletiva para a (-)-agelastatina A (**67**) e B (**68**) foi realizada por Feldman e colaboradores em 2002^{61,62}. De maneira similar à estratégia empregada por Weinreb, o anel B é construído no final da rota sintética via uma sequência reacional *one-pot* de oxidação, eliminação e adição de Michael (esquema 16). A rota desenvolvida por Feldman pode ser destacada pela utilização de sal de alquiniliodônio. Esse reagente é utilizado para a

formação do esqueleto das agelastatinas via eno-carbeno. Utilizando como reagente de partida o epóxido quiral (**77**), o sal de alquiniliodônio (**79**) pode ser preparado pelo tratamento do composto de estanho (**78**) usando o reagente de Stang. A adição nucleofílica do sal *p*-toluenosulfonato, leva a formação do alquilideno-carbeno (**80**) o qual foi submetido a uma reação de inserção C-H diastereoseletiva levando à formação do anel C (**82**). Este produto foi obtido juntamente com um subproduto oriundo da migração-1,2 (**81**). Na sequência, a sulfona vinílica reage como um aceptor de Michael permitindo a instalação do grupo N9. Após as reações de acilação e hidrólise, o tratamento do álcool (**83**) sobre as condições de oxidação de Moffat-Swern leva a formação do sistema tricíclico ABC (**84**), o qual pode ser transformado tanto em agelastatina A (**67**) como agelastatina B (**68**), com mais 2 etapas adicionais.

Esquema 16. Síntese enantiosseletiva da agelastatina A (**67**) e da agelastatina B (**68**) desenvolvida por Feldman e colaboradores^{61,62}.

2.2. Objetivos

Este sub-projeto do doutorado apresentou como objetivo a avaliação de um estudo modelo para a síntese racêmica do esqueleto tricíclico ABC, presente no derivado inédito 7-OH agelastatina A (**73**, figura 31). Essa rota sintética simples, tem como etapa principal a formação da ligação amida entre o anel pirrólico e uma ($\pm$)- α -amino ciclopentanona. Avaliou-se se a formação do anel B ocorre de forma espontânea, pela formação da carbinolamina em equilíbrio com a amida formada. O anel pirrólico pode ser obtido a partir do tricloroacetil pirrol e a α -amino ciclopentanona a partir do α -cloro ciclopentanona, ambos reagentes comerciais.

Figura 31. Análise retrossintética da rota proposta para a obtenção do esqueleto ABC presente no derivado 7-OH agelastatina A (**57**).

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. Estudo modelo

O cloridrato da ($\pm$) - α -amino ciclopentanona (**85**) pôde ser obtida satisfatoriamente na forma de cloridrato em 2 etapas a partir do reagente comercial ($\pm$) - α -cloro ciclopentanona (esquema 17). Primeiramente, o átomo de cloro é substituído por um grupo azida (**86**) por meio de uma reação substituição nucleofílica (S_N2) utilizando-se azida de sódio em MeOH por 48 h⁶³. Após, avaliou-se a reação de redução do grupo azida à amina livre utilizando hidrogênio gasoso e como catalisador paládio sobre carbono. Entretanto, observou-se decomposição do produto durante seu isolamento e, devido a isso, optou-se pela formação do cloridrato da amina pela a adição de ácido clorídrico no meio reacional. Essas duas etapas levaram a obtenção do cloridrato da amina (**85**) com um rendimento global de 56%. A redução do grupo azida presente no composto **86** pode ser facilmente identificada pelo desaparecimento da banda em 2107 cm^{-1} , referente ao seu estiramento no espectro de IV (figura 32).

Esquema 17. Síntese do cloridrato de ($\pm$) - α -amino ciclopentanona (**85**).

Figura 32. Expansão do espectro de IV dos compostos **86** e **85**, respectivamente.

Após a obtenção do cloridrato (**85**) iniciou-se a avaliação da reação de acoplamento com o tricloroacetil pirrol (**87**). Para a avaliação da reação de formação da amida (**88**), optou-se por realizar um estudo modelo utilizando o reagente comercial sem o átomo de bromo na posição 5. O esquema 18 traz as condições reacionais avaliadas para o acoplamento com a cetona. Ambas as reações foram aquecidas a temperatura de 60°C. Primeiramente, avaliou-se a utilização de Et₃N e NaHCO₃ como bases e acetonitrila como solvente. A proposta neste caso seria induzir a formação direta do intermediário carbinolamina pela reação entre a forma protonada da Et₃N e o NaHCO₃, levando a desprotonação da amina e a formação de gás CO₂ e H₂O no meio reacional. Entretanto, não foi observada a formação do produto de interesse (**88**).

Também foi avaliado a reação utilizando Et₃N como solvente bem como a utilização de Et₃N em DMF. Em nenhuma das reações, foi verificado a presença do composto de interesse (**88**) dentre os compostos isolados.

Esquema 18. Condições reacionais avaliadas utilizando como agente de acilação tricloroacetil pirrol (**87**).

Devido ao insucesso do acoplamento do cloridrato **85** com o reagente comercial, o tricloroacetil pirrol (**87**), foi proposta uma nova estratégia *one-pot* para a formação da amida **88** (esquema 19). A estratégia consistia na redução *in situ* do grupo azida do composto **86** por uma reação de Staudinger, que pode ser realizada utilizando-se trifetilfosfina ($P(Ph)_3$) ou tributilfosfina ($P(nBu)_3$). Em seguida, a iminofosforana (**89** e **90**, respectivamente para $P(Ph)_3$ ou $P(nBu)_3$) formada reagiria com o tricloroacetil pirrol (**87**) em uma reação do tipo de Aza-Wittig levando a formação da imina **91**. O produto formado poderia ser hidrolisado para a formação da amida de interesse. Essa nova estratégia foi proposta baseada no trabalho de Huang, *et al.* (2008)⁶⁴. Como a porção triclorometila é um bom grupo abandonador, avaliou-se a possibilidade de formação de amidas utilizando essa estratégia. Em ambos os casos foi verificada por RMN a formação do intermediário imino-fósforo. Entretanto, não foi observada a formação do produto da reação de aza-Wittig.

Esquema 19. Condições reacionais avaliadas para a redução de Staudinger seguido da reação de aza-Wittig.

Levando-se em conta os insucessos anteriores, foi proposta como alternativa para a formação da amida **88**, a preparação de um anidrido misto pirrólico como reagente de acoplamento (**92**, esquema 20). Esse composto foi proposto com base no trabalho desenvolvido por Fukata *et al.* (2015)⁶⁵. Para a síntese desse reagente, utilizou como material de partida o ácido pirrólico-2-carboxílico (**93**), o qual reagiu com cloroformato de isopropila na presença de DIEA. O composto **92** foi obtido com 11% de rendimento.

Esquema 20. Síntese do anidrido misto pirrólico (**92**).

A amina livre (**94**) foi obtida pela reação do cloridrato (**85**) com Na_2CO_3 em CH_2Cl_2 , à temperatura ambiente (esquema 21). Então foi reagida com o anidrido misto (**92**) utilizando 0,1 equivalentes de Et_3N e CH_2Cl_2 como solvente.

Apenas quantidades catalíticas de base são necessárias para o acoplamento entre o anidrido misto e a amina, pois um dos subprodutos gerados pelo acoplamento é o alcóxido de isopropila. Esse alcóxido age como base no meio reacional levando à formação de *i*-PrOH ($pK_a \sim 16,5$). Porém, apesar do consumo do reagente de acilação, não foi observada a formação do produto de interesse.

Esquema 21. Condições reacionais avaliadas para a formação da amida (88) utilizando o anidrido misto (92).

Outra estratégia avaliada para a formação da amida **88**, foi a reação de acoplamento entre ácidos carboxílicos e aminas. Foi escolhido como reagente auxiliar de acoplamento o hexafluorofosfato de *O*-bezotriazol-*N,N,N',N'*-terametilurônio (HBTU), que requer condições brandas para sua ativação, com reações limpas e elevado rendimento³⁵. Para a reação de acoplamento entre o ácido pirrol-2-carboxílico (93) e o cloridrato de ($\pm$)- α -amina ciclopentanona (85) utilizou-se, além do HBTU, 3.5 equivalentes de DIEA em THF à temperatura ambiente (esquema 22). Após 6 h de reação, foi obtido a amida **88** com 30% de rendimento.

Esquema 22. Síntese da ($\pm$)-amida (88).

Na figura 33, pode-se observar uma expansão do espectro de ^{13}C para o composto **88**. Destaca-se a presença dos ^{13}C das funções cetona em δ 217,6 e amida em δ 157,6; bem como dos carbonos pirrólicos em δ : 126,5; 123,1; 112,0 e 110,2.

Figura 33. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C da amida **88** (MeOH- d_4 , 151 MHz).

Não foi observada a formação do produto de ciclização, a carbinolamina **95**. Isso indica que sua formação não é espontânea, a qual era uma das questões iniciais desse estudo. Para a formação da carbinolamina **95**, a amida **88** foi tratada com 3 equivalentes de Et_3N em CH_2Cl_2 e THF (esquema 23). Ambas as reações resultaram na formação do composto de interesse, com rendimentos de 30 e 20%, respectivamente (com recuperação do material de partida).

Esquema 23. Condições reacionais para a síntese da (±)-carbinolamina (**95**).

A formação do produto de ciclização pôde ser detectada utilizando-se a análise por espectroscopia no infravermelho. Com a formação da carbinolamina **95**, a banda em 1748 cm^{-1} referente ao estiramento ($\text{C}=\text{O}$) da cetona do composto (**88**) não é mais observado (figura 34).

Figura 34. Expansão do espectro de IV dos compostos **88** e **95**, respectivamente.

O assinalamento dos sinais dos espectros de RMN de ^1H (figura 35) e ^{13}C (figura 36) para o composto **95** podem ser observados abaixo. No espectro de ^1H , destaca-se a presença do ^1H ligado ao carbono C1, em δ 3.38. E no espectro de ^{13}C , destaca-se o desaparecimento do ^{13}C carbonílico em δ 217.6 e o deslocamento do ^{13}C em C5 para δ 90.5.

Figura 35. Espectro de RMN de ^1H do composto **95** (MeOH- d_4 , 600 MHz).

Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **95** ($\text{MeOH-}d_4$, 151 MHz).

Nessas reações, apesar do longo período reacional, uma parte da amida utilizada como material de partida foi recuperada, o que sugere a existência de um equilíbrio entre a forma ciclizada (**95**) e a forma aberta (**88**). De maneira a se verificar se o equilíbrio também é atingido em condições ácidas, a amida **88** foi submetida a condições reacionais para ciclização utilizando-se ácido *p*-TSA em MeOH (esquema 24). Porém, não foi observada a formação da carbinolamina **95**, sendo recuperado o material de partida.

Esquema 24. Avaliação da formação da (±)-carbinolamina (**95**) em meio ácido.

Com o sucesso obtido pela formação do sistema tricíclico para o estudo modelo, iniciou-se os estudos para o emprego da estratégia no modelo substituído com um átomo de bromo.

2.3.2. Influência do átomo de bromo no esqueleto ABC da 7-hidroxi agelastatina A

A fim de se obter um modelo mais próximo do modelo real, realizou-se a síntese do ácido 4-bromopirrol-2-carboxílico (**96**, esquema 25). A utilização desse composto possibilita a avaliação da influência do átomo de bromo na reação de ciclização. O 4-bromopirrol-2-carboxílico foi obtido satisfatoriamente a partir do reagente comercial tricloroacetil pirrol. Para a reação de bromação utilizou-se o reagente selectfluor®. Essa metodologia consiste na reação da cetona com selectfluor® na presença de brometo de potássio em DMF (como descrito no capítulo 1). A cetona **54** é então hidrolisada pela reação com solução aquosa de NaOH em THF. Após 30 minutos de reação, o ácido 4-bromopirrol-2-carboxílico (**96**) foi obtido com 100% de rendimento.

Esquema 25. Síntese do ácido 4-monobromopirrol-2-carboxílico (**96**).

De posse ácido pirrólico monobromado **96**, foi avaliada a formação do esqueleto ABC. Esse foi submetido ao acoplamento com o cloridrato ($\pm$)- α -amina ciclopentanona (**85**) utilizando-se as mesmas condições reacionais utilizadas para o estudo modelo sem o átomo de bromo. A reação de acoplamento levou à obtenção da monobromo amida **97** com 30% de rendimento. A amida **97** foi transformada na carbinolamina **98**, com 50% de rendimento utilizando Et_3N em

CH₂Cl₂ (esquema 26). Parte da amida foi recuperada após a reação de ciclização.

Esquema 26. Síntese do esqueleto tetracíclico (98).

O assinalamento dos sinais dos espectros de RMN de ¹H (figura 37) e ¹³C (figura 38) para o composto **98** podem ser observados abaixo. No espectro de ¹H, destaca-se a presença do ¹H ligado ao carbono C1, em δ 3.88. E no espectro de ¹³C, destaca-se o desaparecimento do ¹³C carbonílico em δ 217.6 e os deslocamentos dos ¹³C em: C5 e C11 para, respectivamente, δ 90.9 e 99.3.

Figura 37. Espectro de RMN de ¹H do composto **98** (MeOH-*d*₄, 600 MHz).

Figura 38. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **98** (MeOH- d_4 , 151 MHz).

A análise do espectro de RMN de ^1H do composto **98** sem purificação (figura 39), pode dar uma ideia da extensão do equilíbrio pela análise do átomo de hidrogênio ligada ao carbono α . Na amida, esse ^1H apresenta δ 4.25. Na forma ciclizada, o mesmo ^1H apresenta δ 3.88. Quando se analisa as integrais destes sinais, verifica-se que cerca de 17% do material inicial ainda permanece na forma de amida.

Figura 39. Espectro de RMN de ^1H da reação de formação da monobromo carbinolamina **98**.

Desenvolvida a rota para a formação do sistema tricíclico ABC da agelastatina A, este poderá ser empregado na síntese formal do derivado 7-OH agelastatina A utilizando o 5-monobromopirrol-2-carboxílico para a reação de acoplamento. Já o anel D, por exemplo, pode ser acessado a partir de uma reação de ciclização espontânea do intermediário enona (**99**, esquema 27).

Esquema 27. Possível reação para a síntese do derivado 7-OH agelastatina A (**73**).

2.4. Conclusões

O modelo do sistema tricíclico de 5, 6 e 5 membros presente no derivado da agelastatina A foi obtido em 4 etapas e com rendimento global de 8% a partir de reagentes comerciais. A etapa principal para a formação desse sistema é a reação de acoplamento entre aminas e ácidos carboxílicos utilizando HBTU como reagente ativante.

Essa nova estratégia pode ser utilizada em futuros trabalhos para a síntese de diversos outros sistemas de anéis fundidos. Utilizando apenas aminoácidos comerciais, como os listados no esquema 28, e o cloridrato de α -amino ciclopentanona (**85**), pode-se ter acesso a sistemas tricíclicos com diferentes tamanhos para os anéis B e C.

Esquema 28. Novas perspectivas para a aplicação da rota sintética desenvolvida.

2.5. Material e métodos

Todos os reagentes utilizados foram adquiridos de fontes comerciais e usados sem prévia purificação, provenientes das marcas Sigma Aldrich, Across Chemical, BTC Chemical e Oakwood Chemical. Para os experimentos utilizou-

se nitrogênio gasoso como atmosfera inerte. Todos os solventes utilizados foram purificados utilizando o sistema JC Meyer Solvent System Phoenix SDS. As reações foram monitoradas por cromatografia em camada fina (placa CCD, Fluka, matriz sílica gel, suporte de vidro, com indicador fluorescente 254 nm e espessura de 200µm), utilizando-se os reveladores KMnO₄ (permanganato de potássio em solução aquosa de NaOH), ninidrina (em solução de AcOH em EtOH), vanilina (em solução de ácido sulfúrico em EtOH), e lâmpada de UV (luz ultravioleta em 254 nm). Para purificação utilizou-se coluna cromatográfica do tipo flash empacotada com sílica gel 60 Å (tamanho de partícula 0,063-0,210 mm) e cromatografia líquida de média pressão (CLMP ou MPLC, em inglês) CombiFlash Rf-200 no caso de purificações com gradiente. Todos os rendimentos referem-se a produtos isolados após purificação. As misturas de solventes empregadas nas análises por CCD e em purificações por cromatografia são apresentadas como volume/volume e em percentagens. Para análise estrutural dos produtos obtidos, utilizou-se a técnica de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C (Bruker Ascend, Campo 500/54 e 400/52) à temperatura ambiente, com os valores de deslocamento químico reportados em δ. Para RMN ¹H foram utilizados equipamentos de 400 ou 600 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) são referenciados em relação ao resíduo do solvente não-deuterado. As constantes de acoplamento (J) são reportadas em Hz. As multiplicidades são apresentadas como: s, singleto, d, duplete, t, tripleto, q, quarteto, m, multiplete; dd, duplo duplete; sl, singleto largo; dt, duplo tripleto. Os espectros de RMN ¹³C foram registrados usando equipamentos de 101 ou 151 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) são indicados a partir dos sinais de solventes residuais não-deuterados, ou parcialmente deuterados em CDCl₃ (77,0 ppm), MeOH-*d*₄ (49,0 ppm) ou DMSO-*d*₆ (39,52 ppm). Os espectros de RMN foram tratados utilizando o *Software MestreNova 6.0*. Para a caracterização dos compostos também se utilizou espectrometria de massas de alta resolução (Thermo Orbitrap Discovery, método de ionização por eletrospray ESI) e cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (Brucker Amazon LC-MS).

2.5.1. Procedimentos experimentais

2-azidociclopentan-1-ona (86). Em balão de 100 mL, adicionou-se α -cloro ciclopentanona (5 mL, 50 mmol, 1,0 equiv) e 50 mL de MeOH. A esta solução à temperatura de 0°C, foi adicionada NaN_3 (9,75 g, 150 mmol, 3,0 equiv) em uma única porção. Após a adição, a temperatura da reação foi lentamente elevada à temperatura ambiente (19°C). A mistura reacional foi agitada por 48 h a esta mesma temperatura. O solvente foi removido sob vácuo. O sólido residual marrom foi purificado por cromatografia líquida de média pressão (gradiente SiO_2 , 0 $\rightarrow$ 30% AcOEt /hexano). Obtendo-se a α -azido ciclopentanona (**86**, 3,43 g, 56%) como um líquido incolor: CCD (15% AcOEt /hexano): Rf: 0,38; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$): δ 1,65 – 1,70 (m, 1H); 1,80 – 1,92 (m, 1H); 2,01 – 2,03 (m, 1H); 2,20 (dt, $J = 19,0, 9,4$ Hz, 1H); 2,26 – 2,40 (m, 2H); 3,97 (ddd, $J = 9,9, 8,1, 1,3$ Hz, 1H); RMN de ^{13}C (101 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) δ 19,2; 30,0; 36,3; 49,2; 65,5; 215,9; IR (ATR): 2971, 2107, 1749, 1225, 10463 cm^{-1} .

Hidrocloreto de 2-oxociclopentan-1-amônio (85). Em balão de 50 mL, adicionou-se α -azido ciclopentanona (**86**, 200 mg, 1,6 mmol, 1,0 equiv) e 15 mL de MeOH. A esta solução à temperatura ambiente (20°C), adicionou-se Pd/C (10% em massa, 170 mg, 0,16 mmol, 0,1 equiv) seguido de HCl (0,22 mL, 12,8 mmol, 8,0 equiv). Sob atmosfera de H_2 , a mistura reacional foi agitada por 14 h a esta mesma temperatura. Concluída a reação, o paládio foi removido pela filtração do meio reacional por um plug de celite. O solvente foi removido sob vácuo. Obtendo-se o hidrocloreto de α -amino ciclopentanona (**85**, 217 mg, 100%) como um sólido branco: CCD (10% MeOH/DCM): Rf: 0,15; RMN de ^1H

(400 MHz, MeOH- d_4): δ 1,78 – 1,89 (m, 1H); 1,92 – 2,06 (m, 1H); 2,20 – 2,31 (m, 1H); 2,41 – 2,55 (m, 2H); 3,84 (dd, J = 12,3, 8,6 Hz, 1H); RMN de ^{13}C (101 MHz, MeOH- d_4) δ 19,1; 28,4; 35,5; 57,3; 212,8; IR (ATR): 3370, 2924, 1750, 1626, 1509 cm^{-1} ; HRMS (ESI $^+$) m/z calcd. para $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 100,0757; encontrado 100,0757.

2-aminociclopentan-1-ona (94). Em balão de 5 mL, adicionou-se hidrocloreto de α -amino ciclopentanona (**85**, 7 mg, 0,05 mmol, 1,0 equiv) e 1,0 mL de DCM. A esta solução à temperatura ambiente (20°C), adicionou-se Na_2CO_3 (10 mg, 0,1 mmol, 2,0 equiv). A mistura reacional foi agitada por 3 h a esta mesma temperatura. A reação foi filtrada e o solvente foi removido sob vácuo. O sólido residual branco foi utilizado sem purificação.

Anidrido (isopropil carbônico)1H-pirrol-2-carboxílico (92). Em balão de 100 mL, adicionou-se ácido pirrol-2-carboxílico (**93**, 425 mg, 2,0 mmol, 1,0 equiv) e 2,8 mL de DCM. A esta solução à temperatura de 0°C , adicionou-se gota a gota DIEA (0,5 mL, 3,0 mmol, 1,5 equiv) seguido de clorofornato de isopropil (1,1 mL, 2,2 mmol, 1,1 equiv). A reação foi agitada por 30 min a esta mesma temperatura. Concluída a reação, esta foi terminada pela adição de 3 mL de H_2O e a fase aquosa foi extraída com DCM (3 X 5 mL). A fase orgânica foi lavada com brine (5 mL) e seca com NaSO_4 anidro. O solvente foi removido sob vácuo. O líquido residual foi purificado por cromatografia líquida de média pressão (gradiente SiO_2 , 0 $\rightarrow$ 30% AcOEt/hexano). Obteve-se o pirrol anidrido (**95**, 44,6 mg, 11%) como um líquido incolor: CCD (30% AcOEt/hexano): R_f : 0,44; RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 1,37 (s, 3H); 1,39 (s, 3H); 5,04 (hept, J = 6,3

Hz, 1H); 6,30 (dt, $J = 3,9, 2,5$ Hz, 1H); 7,07 (ddd, $J = 3,9, 2,4, 1,5$ Hz, 1H); 7,09 (td, $J = 2,8, 1,5$ Hz, 1H); 9,56 (sl, 1H) RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 21,6; 74,3; 111,4; 119,1; 120,4; 126,3; 148,9; 155,2; IR (ATR): 3133, 1789, 1753, 1542, 1441 cm^{-1} .

N-(2-oxociclopentil)-1H-pirrol-2-carboxamida (88). Em balão de 5 mL, adicionou-se ácido pirrol-2-carboxílico (**93** 62 mg, 0,56 mmol, 1,5 equiv), hidrocloreto de α -amino ciclopentanona (**85**, 51 mg, 0,38 mmol, 1,0 equiv) em 2 mL de THF. A esta solução à temperatura ambiente (20°C), adicionou-se HBTU (212 mg, 0,56 mmol, 1,5 equiv) seguido de DIEA (0,23 mL, 1,32 mmol, 3,5 equiv). A mistura reacional foi agitada por 6 h a esta mesma temperatura. O solvente foi removido sob vácuo e o resíduo foi redissolvido em DCM. A reação foi lavada com uma solução aquosa de HCl 0,5 mol L^{-1} (5 mL), seguido por solução saturada de NaHCO_3 (5 mL) e brine (5 mL). A fase orgânica foi seca com NaSO_4 anidro. O sólido residual marrom foi purificado por cromatografia líquida de média pressão (gradiente SiO_2 , 0 $\rightarrow$ 10% MeOH/DCM). Obteve-se a carboxamida (**88**, 21,9 mg, 30%) como um sólido branco: CCD ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (90:10): Rf: 0,52; RMN de ^1H (400 MHz, $\text{MeOH}-d_4$): δ 1,87 – 1,96 (m, 2H); 2,06 – 2,12 (m, 1H); 2,27 – 2,32 (m, 1H); 2,35 – 2,41 (m, 2H); 4,23 – 4,28 (m, 1H); 6,15 – 6,18 (m, 1H); 6,78 (dd, $J = 3,7, 1,3$ Hz, 1H); 6,91 (dd, $J = 2,3, 1,4$ Hz, 1H); RMN de ^{13}C (101 MHz, $\text{MeOH}-d_4$): δ 19,4; 30,3; 36,7; 58,1; 110,2; 112,0; 123,1; 126,5; 163,5; 217,6; IR (ATR): 3249, 1748, 1627, 1560, 1460 cm^{-1} .

(+/-) - Carbinolamina (95). Em balão de 5 mL, adicionou-se carboxamina (**88**, 5 mg, 0,03 mmol, 1,0 equiv) e 2 mL de DCM. A esta solução à temperatura

ambiente (20°C), foi adicionada Et₃N (10 µL, 0,08 mmol, 3,0 equiv). A mistura reacional foi agitada por 24 h a esta mesma temperatura. O solvente foi removido sob vácuo. O sólido residual branco foi purificado por cromatografia líquida de média pressão (gradiente SiO₂, 0 → 10% MeOH/DCM). Obteve-se a carbinolamina (**95**, 1,5 mg, 30%) como um sólido branco e parte do material de partido foi recuperado: CCD (CH₂Cl₂/MeOH (90:10): R_f: 0,24; RMN de ¹H (400 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1,63 – 1,69 (m, 1H); 1,72 – 1,82 (m, 1H); 1,83 – 1,92 (m, 1H); 2,15 – 2,29 (m, 2H); 2,29 – 2,36 (m, 1H); 3,97 – 3,80 (m, 1H); 6,29 (dd, *J* = 3,8, 2,7 Hz, 1H); 6,88 (dd, *J* = 3,8, 1,6 Hz, 1H); 7,21 (dd, *J* = 2,7, 1,6 Hz, 1H); RMN de ¹³C (101 MHz, MeOH-*d*₄): δ 20,5; 32,1; 38,2; 62,7; 90,5; 111,5; 115,3; 122,3; 123,4; 161,9; IR (ATR): 3246, 1632, 1555, 1461, 1334 cm⁻¹.

Ácido 4-bromopirrol-2-carboxílico (96). Em balão de 25 mL, adicionou-se 5-bromo-1-tricloroacetil pirrol (**54**, 100 mg, 0,34 mmol, 1,0 equiv) em 4 mL de THF. A esta solução à temperatura ambiente (20°C), adicionou-se 4 mL de uma solução aquosa de NaOH 0,2 mol L⁻¹. A mistura reacional foi agitada por 30 min a esta mesma temperatura. Concluída a reação, adicionou-se uma solução aquosa de HCl 1 mol L⁻¹ até pH igual a 1. O sólido formado foi então removido por filtração. Obteve-se o ácido 4-bromopirrol-2-carboxílico (**96**, 122 mg, 84%) como um sólido branco. Este composto foi utilizado sem etapas de purificação: CCD (10% MeOH/DCM): R_f: 0,52; RMN de ¹H (400 MHz, MeOH-*d*₄): δ 11,57 (sl, 1H); 6,95 (s, 1H); 6,79 (s, 1H) (1 NH permutável não foi observado); RMN de ¹³C (101 MHz, MeOH-*d*₄) δ 97,8; 117,7; 124,3; 124,8; 163,2.

4-bromo-N-(2-oxociclopentil)-1H-pirrol-2-carboxamida (97). Em balão de 5 mL, adicionou-se ácido 5-bromopirrol-2-carboxílico (**96**, 25 mg, 0,13 mmol, 1,2 equiv), hidrocloreto de α -amino ciclopentanona (**85**, 15 mg, 0,11 mmol, 1,0 equiv) em 0,6 mL de THF. A esta solução à temperatura ambiente (20°C), adicionou-se HBTU (50 mg, 0,13 mmol, 1,2 equiv) seguido de DIEA (c). A mistura reacional foi agitada por 6 h a esta mesma temperatura. O solvente foi removido sob vácuo e o resíduo foi redissolvido em DCM. A reação foi lavada com uma solução aquosa de HCl 0,5 mol L⁻¹ (5 mL), seguido por solução saturada de NaHCO₃ (5 mL) e brine (5 mL). A fase orgânica foi seca com NaSO₄ anidro. O sólido residual marrom foi purificado por cromatografia líquida de média pressão (gradiente SiO₂, 0 → 10% MeOH/DCM). Obteve-se a carboxamida (**97**, 7,6 mg, 30%) como um sólido branco: CCD (CH₂Cl₂/MeOH (90:10): R_f: 0,59; RMN de ¹H (600 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1,90 – 1,95 (m, 2H); 2,02 – 2,16 (m, 1H); 2,22 – 2,23 (m, 1H); 2,33 – 2,44 (m, 2H); 4,25 (dd, *J* = 11,1, 8,6 Hz, 1H); 6,78 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H); 6,92 (s, 1H); RMN de ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ 19,4; 30,2; 36,6; 58,0; 97,5; 113,5; 122,9; 127,1; 162,3; 217,3; IR (ATR): 3218, 1745, 1632, 1562, 1522 cm⁻¹; HRMS (ESI⁺) *m/z* calcd. para C₁₀H₁₁BrN₂O₂ [M-H]⁺: 268,9931; encontrado 268,9935.

(+/-)-Monobromo carbinolamina (98). Em balão de 5 mL, foi adicionada monobromo carboxamina (**97**, 7 mg, 0,03 mmol, 1,0 equiv) em 0,5 mL de DCM. A esta solução à temperatura ambiente (20°C), foi adicionada Et₃N (10 μ L, 0,04 mmol, 3,0 equiv). A mistura reacional foi agitada por 24 h a esta mesma temperatura. O solvente foi removido sob vácuo. O sólido residual branco foi purificado por cromatografia líquida de média pressão (gradiente SiO₂, 0 → 10%

MeOH/DCM). Obteve-se a carbinolamina (**98**, 3,3 mg, 50%) como um sólido branco e parte do material de partido foi recuperado: CCD (CH₂Cl₂/MeOH (90:10): Rf: 0,45; RMN de ¹H (600 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1,64 – 1,71 (m, 1H); 1,76 – 1,82 (m, 1H); 1,83 – 1,90 (m, 1H); 2,16 – 2,22 (m, 1H); 2,23 – 2,27 (m, 1H); 2,29 – 2,33 (m, 1H); 3,87 – 3,89 (m, 1H), 6,82 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H); 7,23 (dd, *J* = 1,8Hz, 1H); RMN de ¹³C (151 MHz, MeOH-*d*₄): δ 20,5; 32,1; 38,2; 62,6; 90,9; 119,3; 116,4; 121,9; 124,5; 160,5; IR (ATR): 3294, 1637, 1553, 1469, 1335 cm⁻¹; HRMS (ESI⁻) *m/z* calcd. para C₁₀H₁₁BrN₂O₂ [M-H]⁻: 268,9931; encontrado 268,9935.

Capítulo 3:

**Isolamento e identificação de peptaibóis
bioativos do fungo *Hypocrea* sp., oriundo da
Antártida**

3.1. Introdução

Produtos naturais microbianos tiveram, e ainda têm, papel fundamental na descoberta de novos fármacos durante o último século. Os oceanos representam um valioso recurso de organismos que produzem e/ou acumulam novos metabólitos com grande potencial farmacêutico, cosmético, agroquímico, entre outros⁶⁶. Dentre estes organismos destacam-se os fungos marinhos.

Os fungos marinhos podem ser agrupados em fungos marinhos obrigatórios e facultativos. Os fungos marinhos obrigatórios são aqueles que crescem e esporulam exclusivamente em um habitat marinho ou estuarino⁶⁶. Já os fungos marinhos facultativos são fungos de áreas de água doce ou terrestres também capazes de crescer no meio marinho natural⁶⁶.

Nos últimos 10 anos, a investigação de produtos naturais bioativos de micro-organismos marinhos ganhou força. Os fungos marinhos provaram ser uma fonte rica de novos agentes anticancerígenos, antibacterianos, antivirais, anti-inflamatórios e antiprototozóários⁶⁶. Como exemplos, podemos citar a aigialomicina D (**100**, figura 41), produzida pelo fungo *Aigialus parvus* BCC 5311, que apresentou um IC₅₀ *in vitro* contra *P. falciparum* de 12,1 µM⁶⁷. Outro exemplo é a ascosalipirrolidinona A (**101**, figura 41), produzida pelo fungo marinho obrigatório *Ascochyta salicorniae*, que apresenta atividade anti-parasitária contra *T. cruzi* e *T. brucei rhodesiense* com um MIC de 2,6 e 73 µM, respectivamente⁶⁸.

Figura 41. Exemplos de produtos naturais bioativos de fungos marinhos: aigialomicina D e ascosalipirrolidinona A.

A maioria desses micro-organismos crescem em um habitat único que levam à produção de metabólitos secundários incomuns⁶⁶. O potencial bioativo desses metabólitos secundários ilustra a necessidade em se investir na pesquisa com fungos marinhos, principalmente de ambientes pouco explorados, tais como o Antártico.

3.1.1. Ambientes subglaciais e os psicrófilos

Uma porção significativa da biosfera terrestre é encontrada em ambientes perenemente frios (temperaturas inferiores a 5°C), como: oceanos profundos, solos congelados, geleiras terrestres, lagos perenemente cobertos de gelo, o mar polar, entre outros⁶⁹. O gelo é uma característica dinâmica em nosso planeta e um dos principais reguladores do sistema climático global. Apesar da importância dos ecossistemas frios, pouco se sabe sobre a diversidade e a função de suas comunidades microbianas⁶⁹. Até recentemente, esses ambientes eram considerados desprovidos de vida. Este pensamento baseou-se em grande parte em nossa restrita compreensão sobre a capacidade de alguns organismos tolerarem ambientes extremos e com pouca luminosidade⁶⁹.

Organismos adaptados ao frio são conhecidos como psicrófilos. Richard Morita definiu o termo pela primeira vez em 1975⁷⁰. O autor diferenciou os psicrófilos, organismos que crescem otimamente a temperaturas inferiores a 15°C e não podem

crescer acima de 20°C, e psicrotolerantes, organismos capazes de crescer em temperaturas inferiores a 15°C, mas que apresentam aceleração no crescimento quando estão a temperaturas superiores a 25°C.

Aproximadamente 20% da superfície da Terra está atualmente coberta de gelo, o que torna os ambientes subglaciais o habitat mais amplo para organismos psicrófilos após o oceano profundo. Estima-se que os sedimentos subglaciais sob o gelo da Antártida variam de 10^4 a 10^6 km³ ⁶⁹. Sendo assim, os ambientes gelados são um repositório vasto e inexplorado de micro-organismos, os quais apresentam um metabolismo único resultante da adaptação às condições adversas e de estresse desse ecossistema.

3.1.2. Gênero *Hypocrea/Trichoderma*

Hypocrea é um gênero de fungos da família Hypocreaceae. Espécies de *Hypocrea*, e seu anamorfo *Trichoderma*, são comumente encontrados em florestas tropicais ou subtropicais úmidas, embora também ocorram em florestas áridas, temperadas ou boreais, mesmo nas latitudes mais extremas do norte e do sul⁷¹.

Anamorfo, ou em estado mitospórico, é a designação dada à forma reprodutiva assexual de um fungo. Esta forma, em conjunto com o correspondente teleomorfo, forma o holomorfo da espécie. Mais de 200 espécies de fungos do gênero *Hypocrea/Trichoderma* já foram descritas⁷¹.

O fungo mitospórico filamentoso do gênero *Trichoderma* (*Hypocrea*, Hypocreales, Ascomycota) contém diversas espécies de grande importância econômica. São utilizados como fonte de enzimas e antibióticos, como estimulante de crescimento de plantas, metabolizador de xenobióticos e biofungicidas comerciais⁷². Algumas espécies de *Trichoderma* produzem enzimas fungicidas degradadoras de parede celular, as quais foram adotadas como agentes de controle biológico de fungos patogênicos de plantas⁷³. Diferentes espécies de *Hypocrea/Trichoderma* produzem uma grande variedade de metabólitos secundários com atividades biológicas, incluindo peptaibóis⁷³. Embora o

gênero *Trichoderma* não seja o único gênero de fungos que produzem peptaibóis, a maioria dos compostos dessa classe são produzidos por fungos desse gênero⁷².

3.1.3. Peptaibóis

Os peptaibóis são uma classe de peptídeos lineares, anfifílicos, com 4 a 21 resíduos de aminoácidos (massa de 500 a 2000 Da, aproximadamente), biossintetizados por fungos⁷⁴. O primeiro isolamento de peptaibóis foi realizado em 1967, a partir de culturas de *Trichoderma viride*⁷⁵. Os peptaibóis são comumente produzidos por fungos patogênicos do solo e fitopatogênicos. Os principais gêneros de fungos produtores de peptaibóis são: *Acremonium*, *Paecilomyces*, *Emericellopsis*, bem como várias espécies de *Hypocrea/Trichoderma*⁷³. Esses compostos apresentam em sua estrutura vários aminoácidos não proteinogênicos: ácido α -aminoisobutírico (Aib), ácido isovalérico (Iva) e hidroxiprolina iminoácido (Hyp)⁷³. O grupo N-terminal do peptídeo é geralmente acetilado ou acilado, e o grupo C-terminal é um aminoálcool, como o fenilalaninol, o valinol, o leucinol, o isoleucinol ou o triptofanol⁷³. O nome peptaibol deriva da composição química em aminoácidos: **peptídeos** contendo resíduos de **Aib** (ácido α -aminoisobutírico) e contendo um aminoálcool como grupo C-terminal⁷⁵.

Os peptaibóis podem ser divididos em três grupos distintos, de acordo com a extensão de sua cadeia. Os peptaibóis de cadeia longa possuem de 18 a 20 resíduos de aminoácidos, como a alameticina F50 (**102**, figura 42); os de cadeia média apresentam 11 a 16 resíduos de aminoácidos, como a harzianina HB I (**103**); e os de cadeia curta contêm de 6 a 10 resíduos de aminoácidos, tais como a trikoningina KB I (**104**)⁷².

Figura 42. Estruturas de peptaibóis de cadeia longa (18 a 20 resíduos de aminoácidos), média (11 a 16 resíduos de aminoácidos) e curta (6 a 10 resíduos de aminoácidos).

Acredita-se que os fungos produzem os peptaibóis como um mecanismo de defesa passivo. Muitos peptaibóis são antibióticos, com potência variável e efeitos em diferentes micro-organismos⁷⁶. O mecanismo antibiótico dos peptaibóis parece residir na sua capacidade de permeabilizar bicamadas lipídicas. Formam poros e portadores transmembranares e também podem modificar a superfície da membrana. Quando os poros são formados em membranas, geralmente assumem a forma de canais iônicos dependentes de voltagem⁷⁶.

3.1.4. Biossíntese dos peptaibóis

Os peptaibóis de ocorrência natural são misturas de isoformas. Mais de 850 sequências já foram isoladas⁷³. Com exceção das modificações em N e C terminal, os peptaibóis possuem a estrutura de peptídeos. Sua biossíntese é similar à de outros peptídeos produzidos por micro-organismos⁷². Peptídeos de fungos e bactérias são em geral sintetizados por sintetases peptídicas não ribossomais (non-ribosomal peptide synthetase, NRPS)⁷⁷.

As NRPS são grandes enzimas multifuncionais⁷², de estruturas modulares com múltiplos módulos⁷⁷. Cada módulo é uma unidade semi-autônoma que reconhece, ativa e modifica um único resíduo de aminoácido, formando um novo peptídeo⁷⁷. Cada módulo pode ser subdividido em domínios distintos: adenilação (A), tiolação (T) e condensação (C), que juntos representam uma unidade de repetição mínima de uma NRPS⁷⁷.

Uma característica marcante das sintetases de peptaibóis é que, diferentemente de outras sintetases peptídicas, a terminação-C dos peptídeos é realizada por um domínio desidrogenase ao invés de um domínio tioesterase⁷². A presença da desidrogenase leva à formação de um amino-álcool, característica estrutural dos peptaibóis, e da liberação do produto natural por meio de uma clivagem redutiva⁷².

A primeira evidência genética do envolvimento de uma NRPS na biossíntese de peptaibóis veio dos estudos de Kenerley *et al.* de 2007⁷⁸. Kenerley demonstrou que a biosíntese do maior peptaibol produzido por *T. virens* é realizada por uma NRPS de 18 módulos e 2.3MDa, *Tex1*.

Não há um padrão nos peptaibóis produzidos pelo gênero *Trichoderma*. Os peptaibóis são heterogêneos tanto em sua composição, quanto em seu tamanho e sequência de resíduos de aminoácidos⁷². A cultura de uma única cepa geralmente pode levar ao isolamento de diferentes peptídeos⁷². Várias hipóteses foram feitas com relação a biossíntese desses compostos. Em uma delas, atribui-se a biossíntese de todos os peptaibóis de um micro-organismo a uma única NRPS. Essa hipótese reside no fato que a interrupção do *Tex1*, em *T. virens* cepa TV29-8, eliminou a produção de todos os peptaibóis identificados em seu extrato (peptaibóis de 18, 14 e 11 resíduos)⁷⁹. Isto

implicaria que *Tex1* não teria apenas uma especificidade de substrato muito ampla, mas também pode contornar certos domínios, produzindo assim os peptaibóis mais curtos⁷⁹. Entretanto, no fungo *T. virens* cepa G20, a ruptura do gene *Tex1* (o qual tem uma sequência de DNA 99% semelhante com *Tex1* da cepa TV29-8), resultou apenas na eliminação da produção do peptaibol de 18 resíduos, mas não dos compostos menores de 11 e 14 resíduos⁷². Na cepa G20 foram identificados domínios ativadores de AMP de NRPS adicionais, sugerindo a existência de uma segunda sintetase de peptaibóis⁷². Essas evidências sugerem que os peptaibóis mais curtos são formados por enzimas diferentes das responsáveis pela síntese de peptaibóis de cadeia longa⁷².

3.2. Objetivos

O objetivo geral deste sub-projeto do doutorado foi o isolamento e purificação de metabólitos secundários bioativos a partir de fungos isolados de fontes diversas provenientes da Antártica, com as seguintes metas específicas:

1. Selecionar linhagens fúngicas provenientes da Antártica para isolamento de metabólitos secundários, produzidos no meio de cultivo, por cromatografia líquida acoplada a detectores de ultravioleta e massas (CLAE-UV-EM) e comparar com os dados obtidos aos dados presentes no *Scifinder* e no *Dictionary of Natural Products* (DNP);
2. Isolar e identificar as substâncias puras por técnicas espectroscópicas e avaliar as mesmas em bioensaios de atividade biológica.

3.3. Procedimento experimentais

3.3.1. Informações gerais

Para concentração dos extratos e frações obtidas dos meios de cultura utilizou-se rotaevaporador da Fisatom 802D, sob pressão reduzida com auxílio de bomba de vácuo Brinkmann, modelo B-169 bem como speedvac da Thermo Scientific, modelo Savant SC 210A, acoplado a uma bomba de alto vácuo da Edwards, modelo RV8.

O fracionamento por cromatografia em coluna de permeação em gel foi realizado em uma coluna de vidro com dimensões de 170 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro de largura. A fase estacionária utilizada foi Sephadex® LH-20 (Pharmacia-Biotech®, 25-100 µm). Para a eluição utilizou-se MeOH grau P.A. em modo isocrático.

O fracionamento em colunas pré-empacotadas foi realizado utilizando-se colunas das marcas Sep-Pak® vac 35 cc e Phenomenex Strata® de diferentes dimensões (5 e 10 g) com as seguintes fases estacionárias: sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (C₁₈), cianopropila (CN), ou dihidroxilada (Diol). Foram utilizados solventes de grau analítico, das marcas: Panreac, QHemis e FMaia. A água purificada e deionizada foi obtida em sistema Milli-Q Millipore, equipado com resina de troca iônica e filtro biológico.

A avaliação por cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada utilizando-se como eluente a mistura dos solventes hexano/AcOEt e DCM/MeOH, nas proporções de 9:1 e 7:3. As amostras foram depositadas em cromatofolhas de sílica gel 60 sobre poliéster com indicador ultravioleta F254 (Aldrich, 20 x 20 cm). Após a aplicação e eluição das amostras, as placas foram observadas sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, sob a lâmpada Spectroline modelo ENF-240 C/FE, e reveladas em ácido fosfomolibdico para detecção de substâncias redutoras, vanilina para detecção de grupos amina e amino ácidos, e permanganato de potássio que é utilizado como um detector universal de ácidos orgânicos.

O equipamento utilizado nas separações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala analítica e semi-preparativa foi um cromatógrafo da Waters® com sistema quaternário de bombas e detector UV – visível de duplo feixe, modelo Waters® 2489. Para as separações utilizou-se colunas de sílica gel derivatizadas com grupo C₈ e C₁₈, tais como: Inertsil ODS-3 (250 x 4, mm, 5 µm), C8 InertSustain (250 x 4,6 mm, 5 µm) analítica, C8 InertSustain (250 x 10 mm, 5 µm) semi-preparativa e C18 InertSustain (250 x 4,6 mm, 5 µm) analítica.

Os meios de cultura utilizados para o crescimento das linhagens fúngicas foram: extrato de malte (Acumedia), meio de batata e dextrose (PDB, *potato dextrose broth*, e PDA, *potato dextrose agar*, Acumedia) e Saubouraud *dextrose broth* (SBD, composto por: glicose (Synth) e peptona S (Acumedia)) com extrato de levedura (Himedia). As resinas de adsorção utilizadas foram XAD-2, XAD-4 e XAD-7 (Amberlite®). O armazenamento e crescimento das linhagens fúngicas foram realizados em incubadora de crescimento (BOD, Tecnal), modelo TE-371, ou com agitação orbital (Tecnal), modelo TE-421. A preparação dos inóculos foi realizada em capela laminar da SPLabor, modelo Pa420.

3.3.2. Técnicas espectroscópicas

Os espectros de massas de baixa resolução foram adquiridos utilizando-se um sistema cromatográfico da marca Waters® com sistema de controle Alliance, modelo Waters 2695, acoplado com detector espectrofotométrico UV-visível, modelo Waters 2996, com detector de arranjo de fotodiodos (varredura entre λ_{max} 200 a 800nm) acoplado em série com um detector de espalhamento de luz (ELSD), modelo Waters 2424, também acoplado em série com um detector de espectrometria de massas modelo Waters Micromass ZQ 2000, operado utilizando-se plataforma Empower.

O espectrômetro de massa (EM) foi ajustado para seguintes condições específicas: voltagem do capilar 3,00 kV, temperatura na fonte 100°C, temperatura de dessolvatação 350°C, ionização por eletrospray (ESI) operando nos modos positivo e negativo, detecção na faixa de 100-1000 Da e 400-1400 Da aquisição com cromatograma de íons totais (TIC). O fluxo de gás no cone e na dessolvatação foram, respectivamente, de 50 e 350 L h⁻¹. A aquisição dos dados e processamento foram realizados utilizando a plataforma Empower 2.0.

As análises CLAE-UV-EM foram adquiridas utilizando uma coluna de fase reversa C18 (Waters® X-terra, 250 x 4,6 mm, 5 μ m) com fluxo móvel de 1 mL min⁻¹. A eluição foi realizada com fase móvel composta de (A) H₂O + 0,1% de ácido fórmico e (B) 1:1 (v/v) MeOH/MeCN + 0,1% de ácido fórmico. O gradiente utilizado foi: 0 - 1,0 min com

10% de B, gradiente linear até 100% de B de 1,0 – 30,0 min, de 30,0 – 35,0 min manteve-se 100% de B e de 35,0 – 40,0 min manteve-se 10% de B para acondicionamento da coluna, totalizando 40 minutos de análise. O volume de amostra injetado foi de 20 μ L de uma solução de concentração 1,0 a 2,5 mg L⁻¹.

As análises de alta resolução foram realizadas por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um espectrômetro de massas com analisador quadrupolo-tempo de voo UPLC-qTOF-EM, utilizando-se equipamento Waters® UPLC Xevo G2-XS Q-TOF e coluna de fase reversa C18 (Waters® ACQUITY UPLC BEH, 2,1 mm x 100 mm, 1,7 μ m). A eluição foi realizada com fase móvel composta de (A) H₂O + 0,1% de ácido fórmico e (B) MeCN + 0,1% de ácido fórmico. O gradiente utilizado foi: 0 – 9,0 min gradiente linear de 10 a 100% de B, de 9,0 – 10,0 min foi mantido 10% de B para acondicionamento da coluna. O espectrômetro de massas foi ajustado de acordo com os seguintes parâmetros: modo contínuo MS^E, faixa de detecção de m/z 200 – 5000 Da, modo de ionização por eletrospray ESI, tempo de aquisição de 0,2 s e rampa de energia de colisão de 20 - 30 V.

As frações purificadas foram analisadas por RMN de ¹H e ¹³C, em alíquotas diluídas em DMSO deuterado (DMSO-*d*₆) ou em MeOH deuterado (MeOH-*d*₄), utilizando-se tetrametilsilano (TMS) ou o sinal do solvente deuterado como padrão interno. Foram também realizadas análises de RMN do tipo COSY ¹H-¹H, DEPT135, HSQC, HMBC, HSQC-TOCSY e ROESY. O equipamento utilizado para a aquisição dos dados foi Bruker®, modelo AVANCE III 400, 14,1 Tesla, de 600 MHz na frequência do ¹H e de 151 MHz na frequência do ¹³C, equipado com cryo-sonda TCI (¹H/¹³C/¹⁵N) de 5 mm com ATMA® (Automatic Tuning Matching) e gradiente de campo em z.

As medidas de rotação óptica ($[\alpha]_D$) foram realizadas em polarímetro Polartronic H Schimidt+Haensch com cubeta de 10 dm, amostras solubilizadas em MeOH à concentração de 0,2 mg mL⁻¹. Os espectros no ultravioleta (UV) foram obtidos em equipamento Shimadzu UV-3600, e amostras foram solubilizadas em MeOH à concentração de 0,025 mg mL⁻¹. Os espectros de dicroísmo circular (DC) foram obtidos em espectropolarímetro Jasco J-815, amostras solubilizadas em MeOH à concentração de 0,15 mg mL⁻¹. Os espectros no infravermelho (IV) foram adquiridos em equipamento Shimadzu, modelo IRAffinity. Para as análises de IV, as amostras foram solubilizadas em

MeOH e as soluções resultantes foram aplicadas em pastilhas de sílica e o solvente evaporado com nitrogênio gasoso (N₂).

3.3.3. Origem e identificação das linhagens fúngicas avaliadas

As linhagens fúngicas estudadas neste trabalho foram provenientes de amostras marinhas e terrestres do continente Antártico. Foram fornecidas pelo grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Lara D. Sette do Instituto de Biociência da UNESP, campus Rio Claro. Essas linhagens fazem parte das coleções de pesquisa associadas à Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) e à Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP).

A coleção foi estruturada a partir de isolados recuperados de diferentes substratos oriundos do continente Antártico da expedição realizada em março de 2010⁸⁰. Neste estudo, foram avaliadas 16 linhagens fúngicas fornecidas pela Profa. Dra. Lara D. Sette (tabela 3).

Tabela 3. Identificação das linhagens fúngicas avaliadas neste estudo.

Linhagem	Código	Amostra	Identificação	Local da Coleta	Coletor
L2-2	AT1	Líquen	<i>Hypocrea</i> sp.	Punta Plaza	Fernando S. Nobre
E8	AT2	Estrela do mar	NID	Estação Antártica Comandante Ferraz	Eduardo Hajdu
M17	AT3	Madeira	NID	Punta Plaza	Fernando S. Nobre
C3	AT4	NIF	NID	NIF	Fernando S. Nobre
ITAE	AT5	Solo de pinguineira	<i>Thelebolus</i> sp.	NIF	Fernando S. Nobre
A1	AT6	Anfípode	<i>Geomyces</i> sp.	Punta Plaza	Fernando S. Nobre
L2-16B	AT7	Líquen	NID	Punta Plaza	Fernando S. Nobre
D3/S6	AT8	NIF	NID	NIF	Fernando S. Nobre
L2-14D	AT9	Líquen	<i>Geomyces</i> sp.	Punta Plaza	Fernando S. Nobre
ITA-1B	AT10	Solo de pinguineira	NI	NIF	Fernando S. Nobre
S2	AT11	<i>Salpa</i> sp.	<i>Geomyces</i> sp.	Punta Plaza	Fernando S. Nobre
L1-2A	AT12	Líquen	<i>Geomyces</i> sp.	Punta Plaza	Fernando S. Nobre
L1-1	AT13	Líquen	<i>Geomyces</i> sp.	Punta Plaza	Fernando S. Nobre
M6B	AT14	Madeira	<i>Cadophora</i> sp.	Punta Plaza	Fernando S. Nobre
L1-8	AT15	NIF	NID	NIF	Fernando S. Nobre
L1-12A	AT16	Líquen	<i>Geomyces</i> sp.	Punta Plaza	Fernando S. Nobre

- NIF = não informado; NID = não identificado

3.3.4. Procedimento geral para fracionamento dos meios de cultivos das linhagens fúngicas

Os 16 fungos filamentosos foram recebidos em meio de cultura ágar batata dextrose (PDA) e foram mantidos a 15°C. Além da preservação das mesmas pela CBMAI, essas linhagens também foram preservadas pelo método de ultracongelamento a -80°C no laboratório do Prof. Dr. Roberto Berlinck.

As linhagens fúngicas foram reativadas inicialmente em placas de Petri contendo o meio sólido PDA. Após o crescimento e a verificação da pureza de cada linhagem, essas foram cultivadas em pequena escala (100 mL) em três diferentes tipos de meios de cultura: PDB (P), malte 2% (M) e Saubouraud *dextrose broth* com 1 % de extrato de levedura (S). O tempo de incubação variou de acordo com cada linhagem. Para as linhagens fúngicas de crescimento rápido, este foi realizado em 7 dias. Para as linhagens de crescimento lento, este foi realizado em 14 dias. Para esta classificação, levou-se em consideração o crescimento das linhagens em placas de Petri. As linhagens que ocuparam mais de 50% do diâmetro da placa em até 7 dias foram consideradas linhagens de crescimento rápido. As demais, foram classificadas como de crescimento lento.

Para os três meios de crescimento, o cultivo seguiu o seguinte protocolo: as linhagens fúngicas foram transferidas para frascos Schott de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultivo. As linhagens foram cultivadas durante 7 ou 14 dias, de acordo com a classificação prévia, com agitação orbital moderada (150 rpm) e à temperatura de 15°C.

Após o período de crescimento, os meios de cultivos de cada linhagem foram reunidos, filtrados e fracionados de acordo com o fluxograma da figura 43.

Figura 43. Procedimento geral para extração, fracionamento e análise dos extratos de fungos.

Fonte: autoria própria.

Os extratos brutos obtidos da filtração de cada um dos meios de cultura para as 16 linhagens fúngicas foram particionados com AcOEt e evaporados em seguida, fornecendo a fração A do extrato. A fração A foi ressuspensa em MeOH e hexano (1:1) para serem desengorduradas por partição líquido-líquido. As frações polares (MeOH) dessas partições foram coletadas, evaporadas em evaporador rotativo e, em seguida, fracionadas. O fracionamento foi realizado utilizando-se colunas pré-empacotadas de sílica-gel derivatizada com grupos cianopropila. Como fase móvel, utilizou-se o seguinte

gradiente de eluição: 100% CH₂Cl₂ (fração A1), CH₂Cl₂:AcOEt 1:1 (fração A2), 100% AcOEt (fração A3), AcOEt:MeOH 1:1 (fração A4), e 100% MeOH (fração A5).

Já a fração aquosa, resultante da partição dos meios de cultura com AcOEt, foi extraída com uma mistura 1:1:1 de resinas poliméricas de adsorção XAD-2, XAD-4 e XAD-7 (10 g para cada 100 mL de meio de cultivo). As resinas foram adicionadas à fração aquosa do meio de cultura e a suspensão resultante permaneceu sob agitação em shaker por 12 h. Depois deste período, a mistura de resinas foi filtrada e dessorbida com: a) MeOH 100%; b) MeOH:acetona 1:1 (v/v); e c) acetona (2 x 100 mL em banho de ultrassom por 30 minutos para cada mistura). As frações obtidas, fração (B) do extrato, foram coletadas, evaporadas e, em seguida, fracionadas. O fracionamento foi realizado utilizando-se colunas pré-empacotadas de sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano. Como fase móvel, utilizou-se o seguinte gradiente de eluição: H₂O:MeOH 3:1 (fração B1); H₂O:MeOH 1:1 (fração B2); H₂O:MeOH 1:3 (fração B3); e 100% MeOH (fração B4).

Após a obtenção das frações dos meios de cultura das linhagens fúngicas, estas foram analisadas por CLAE-UV-EM para avaliação do perfil químico das frações. No total, foram geradas 144 frações. As frações foram avaliadas contra *L. (L.) infantum*, *L. (L.) amazonensis* e células tumorais.

3.3.5. Fracionamento do crescimento em maior escala da linhagem AT1 (*Hypocrea* sp.)

A linhagem *Hypocrea* sp. (AT1) foi transferida para 20 frascos Schott de 500 mL contendo cada um 200 mL do meio de cultivo. A linhagem foi cultivada durante 7 dias, com agitação orbital moderada (150 rpm) e à temperatura de 15°C. O fracionamento do meio de cultivo foi realizado conforme ilustrado na figura 44.

Figura 44. Procedimento realizado para a extração e o fracionamento do meio de cultivo em escala semi-preparativa para a linhagem AT1. Fonte: autoria própria.

As frações geradas foram analisadas por HPLC-PDA-MS para uma avaliação exploratória primária de seu perfil químico. As frações que apresentaram uma matriz com maior complexidade, e com compostos que apresentavam massa superior a 500 Da, foram as frações AT1M3 e AT1M5. Essas frações foram selecionadas para o estudo químico de sua composição e isolamento de metabólitos secundários.

3.3.6. Análises de Marfey

Separadamente, pesou-se 1,0 mg de cada padrão de aminoácido em frascos de vidro de 2 mL. Para cada padrão, adicionou-se 200 μL de H_2O , 80 μL de solução aquosa de NaHCO_3 1 M e 400 μL de uma solução de 1% do reagente de Marfey ($N\alpha$ -(2,4-dinitro-5-fluorofenil)-*L*-alaninamida) em acetona. As misturas reacionais foram agitadas a 40°C por 1 h. Após este período, as reações foram finalizadas pela adição de 40 μL de uma solução aquosa de HCl 2N. A mistura reacional resultante foi seca e, o sólido formado, foi dissolvido em 2,0 mL de MeOH. Das soluções formadas, transferiu-se 500 μL para vials e estes tiveram seus volumes completados para 1,0 mL com MeOH. Cada padrão derivatizado foi analisado individualmente por CLAE-UV-EM. As análises CLAE-UV-EM foram adquiridas utilizando uma coluna de fase reversa C18 (Waters® X-terra, 250 x 4,6 mm, 5 μm) com fluxo móvel de 1 mL min^{-1} . A eluição foi realizada com fase móvel composta de (A) H_2O + 0,1% de ácido fórmico e (B) 1:1 (v/v) MeOH/MeCN + 0,1% de ácido fórmico. O gradiente utilizado foi: 0 - 1,0 min com 10% de B, gradiente linear até 100% de B de 1,0 – 30,0 min, de 30,0 – 35,0 min manteve-se 100% de B e de 35,0 – 40,0 min manteve-se 10% de B para recondicionamento da coluna, totalizando 40 minutos de análise. O volume de amostra injetado foi de 10 μL de uma solução de concentração 1,0 a 2,5 mg L^{-1} .

Além disso, alíquotas de todos os padrões derivatizados foram combinadas para fornecer um padrão misto, que também foi injetado ((mistura 1: (*L*)-Leu e (*L*)-Ile; mistura 2: (*L*)-Val, (*L*)-Leu e (*L*)-Ile; mistura 3: (*L*)-Pro, (*L*)-Gln, (*L*)-Ala, (*L*)-Val e (*L*)-Leu). Neste caso, utilizou-se uma fase móvel de mesma composição, porém alterou-se seu gradiente. O gradiente utilizado foi: 0 - 1,0 min com 20% de B, gradiente linear até 100% de B de 1,0 – 30,0 min, de 30,0 – 35,0 min manteve-se 100% de B e de 35,0 – 40,0 min manteve-se 10% de B para recondicionamento da coluna, totalizando 40 minutos de análise. O volume de amostra injetado foi de 10 μL de uma solução de concentração 1,0 a 2,5 mg L^{-1} .

Para gerar peptaibóis hidrolisados e derivatizados, aproximadamente 0,3-0,5 mg dos compostos AT1M3I-4, AT1M3I-5, AT1M3I-6, AT1M5O-4 e AT1M5O-5 foram pesados

separadamente em frascos de 2 mL. A estes frascos, adicionou-se 0,5 mL de uma solução aquosa de HCl 6 N. A reação permaneceu sob agitação por 24h, à 90°C. Após, o solvente foi evaporado. A cada produto gerado pela reação de hidrólise, adicionou-se 100 mL de H₂O, 40 mL de solução aquosa de NaHCO₃ 1 M, e 200 mL de uma solução de 1% do reagente de Marfey em acetona. As misturas reacionais foram agitadas a 40°C durante 1 h. Após, as reações foram finalizadas pela adição de 20 µL de HCl 2N. As misturas reacionais foram secas e dissolvidas em 1,0 mL de MeOH. Cada composto hidrolisado e derivatizado foi analisado individualmente por CLAE-UV-EM usando as mesmas condições utilizadas para a análise das misturas (volume 2, apêndice 252 - 265).

3.3.7. Protocolo dos bioensaios

Alíquotas de 1 a 2 mg de frações e compostos puros foram enviadas para ensaios leishmanicida e tripanossomicida (Dr. Danilo Ciccone Miguel e Dra. Fernanda Gadelha, respectivamente, do Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP); citotoxicidade (Dra. Raquel Santos da UNIFRAN, Franca, SP); antibacteriano (Dr. Carlos Martins da UNIFRAN, Franca, SP); e antiplasmodial (Dr. Rafael V. C. Guido do Instituto de Física de São Carlos, USP, SP).

3.3.7.1. Ensaio de atividade leishmanicida

Promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD) e *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/1973/M2269) foram cultivados em meio M-199 suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 26 °C. Às culturas de *L. (L.) infantum* foram adicionados 2% de urina humana filtrada e mais 10% de soro fetal bovino. A sensibilidade dos promastigotas frente aos diferentes compostos ou frações foi avaliada utilizando-se o método MTT. A primeira fase dos testes constitui na avaliação da atividade dos compostos a partir de duas concentrações: 50 e 100 µg mL⁻¹ por 24 h. Como controle de diluente, foi acrescentado um grupo incubado com 1% de DMSO. Os ensaios para a

avaliação da sensibilidade *in vitro* foram realizados com promastigotas de fase logarítmica ($2,5$ a 5×10^6 por orifício em placas de 96 orifícios) incubados com concentrações crescentes dos compostos ou frações por 24 h. A seguir, adicionou-se 30 μL de 5 mg mL^{-1} de MTT preparado em PBS 1X estéril para incubação por 2 h à 26°C. Após a incubação com MTT, adicionou-se 30 μL de SDS 20% e a absorbância foi medida utilizando um espectrofotômetro (MultiSkan Synergy). As curvas concentração-resposta para a obtenção das concentrações efetivas para inibição de 50 e 90% de crescimento das culturas (EC50% e EC90%, respectivamente), assim como as concentrações letais (100%), foram determinadas utilizando-se o *software* Origin (OriginLab Corp.). Cada ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados foram apresentados como médias $\pm$ erro padrão da média (SEM) e analisados estatisticamente com o *software* GraphPad Prism 4.0, considerando-se o tipo de teste mais adequado para cada condição experimental. Os valores de concentração inibitória foram determinados para 50%, 90% e 100% das culturas. Apenas valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.3.7.2. Ensaio de atividade antimicrobiana

Para este ensaio foram utilizadas bactérias da coleção da *American Type Culture Collection* (ATCC/USA) e da *National Collection of Type Cultures* (NCTC/UK). Também foram utilizados isolados clínicos (IC) de pacientes com infecções causadas por bactérias multirresistentes, cedidas pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. A atividade antibacteriana foi avaliada pela técnica de micro diluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Para a determinação da CIM utilizou-se a técnica de micro diluição em microplaca, de acordo com a metodologia preconizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012).

Para a obtenção do inóculo, cepas armazenadas a -80°C foram repicadas em meio de cultura Ágar Sangue. As bactérias foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 h, a 37°C. Após a incubação, as cepas foram utilizadas para os ensaios de determinação

da CIM. A quantidade do inóculo foi padronizada para assegurar a reprodutibilidade dos ensaios. Para isto, preparou-se a escala 0,5 de McFarland segundo Bier (1981) e transferiu-se 500 μL para um tubo já contendo uma solução salina. Da solução, transferiu-se 2 mL para um tubo com 100 mL de caldo Mueller-Hinton (MHb). Para calibrar a transmitância a 100% em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625 nm, utilizou-se uma solução salina. A suspensão do padrão 0,5 da escala de McFarland foi medida, de modo a se obter uma transmitância de 96%, que corresponde a 10^6 UFC.mL^{-1} (CLSI, 2012). Todas as suspensões bacterianas foram ajustas para a mesma transmitância.

Os compostos foram diluídos em DMSO (1 mg de composto em 125 μL de DMSO) e 125 μL de cada solução foram adicionados em 500 μL de caldo Mueller-Hinton. Para a validação da técnica utilizou-se 4 μL de uma solução de tetraciclina, em concentrações que variaram entre 0,0115 e 5,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em água destilada esterilizada e 1,996 μL de caldo Mueller-Hinton.

A determinação da CIM para cada bactéria foi realizada em duplicata. Com o auxílio de uma alça de inoculação esterilizada, culturas das bactérias foram transferidas para tubos contendo solução salina a 0,9% e padronizadas em espectrofotômetro. Em uma microplaca esterilizada de 96 orifícios foram depositadas um total de 100 μL da mistura do caldo Mueller-Hinton, amostra teste e suspensão bacteriana, de forma a obter-se uma concentração das amostras de 0,048 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em um dos orifícios foi realizado o controle de cultura, em outro o controle de esterilidade do caldo e da amostra, e em outro o controle do solvente (DMSO). A placa foi incubada a 37°C em estufa bacteriológica, por 24 h. Após a incubação, 30 μL de resazurina em solução aquosa (0,02%) foram adicionados em cada orifício. As microplacas foram incubadas por 30 min e após este período foram analisadas. As amostras foram consideradas ativas, quando a CIM foi igual ou inferior a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.3.7.3. Ensaio de avaliação do potencial antiproliferativo de células tumorais (citotoxicidade)

A citotoxicidade foi determinada por meio da utilização do Cell Proliferation Kit (Roche Applied Science), baseado na reação das células metabolicamente ativas com o tetrazolium XTT. Foram semeadas 10^4 células por poços em placas de 96 poços e mantidas em estufa de CO₂ por 24 h, a 37°C. Após este período, o protocolo de tratamento consistiu na exposição das células às diferentes concentrações das substâncias em teste (0,1; 1; 10 e 100 µM) por 24 h. O controle negativo não recebeu tratamento e o controle positivo foi tratado com DMSO 10% (v/v). As células foram em seguida lavadas com PBS 1X e incubadas em meio DMEM sem fenol vermelho acrescido da solução XTT/elétron por 4 h. Após este período, realizou-se a leitura colorimétrica em espectrofotômetro (492-690 nm), sendo então determinada a proporção de células viáveis em razão das medidas de absorbância. O IC₅₀ foi calculado por meio de regressão não linear utilizando o *software* GraphPad Prism 3.0.

3.3.7.4. Ensaio de atividade plasmodial

As amostras foram recebidas na forma sólida e diluídas em DMSO para o preparo da solução estoque a 20 mM (armazenada a -20°C). Os compostos foram avaliados quanto à atividade antiplasmodial contra a cepa de *P. falciparum* 3D7 (sensível a cloroquina), utilizando a técnica de SYBR Green I. Foram testadas em diluições seriadas de fator 2 as doses de 10 – 0,152 µM. Neste ensaio, as diluições dos compostos são incubadas com o parasito por 72 h, e em seguida é adicionado o reagente SYBR green e ocorre a marcação do DNA dos parasitos viáveis. A redução de parasitemia em cada concentração é calculada em relação a controles de crescimento positivo (sem adição de compostos, 100% de viabilidade) e negativo (hemácias não-parasitadas, 0% de viabilidade). Gráficos concentração-resposta desses dados foram usados para determinar a concentração inibitória média (IC₅₀) de cada composto.

Os compostos tiveram sua atividade citotóxica avaliada contra células humanas da linhagem HepG2, utilizando-se o ensaio MTT. Para este ensaio, células HepG2 foram pré-incubadas por 24 h em placas de 96 poços. Em seguida, foram adicionadas diluições

seriadas de ordem 2 dos compostos (de forma a testar concentrações de 100-1,56 μM) por 24 h. Após a incubação, o sal de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) foi adicionado aos poços, seguido por 2 a 4 h adicionais de incubação. Após este período, o sal de MTT é reduzido a formazan (coloração roxa) em células vivas. O meio foi descartado e os sais de formazan formados foram solubilizados em DMSO, e realizou-se a leitura de absorbância da placa. As intensidades obtidas foram utilizadas para calcular a porcentagem de células viáveis em relação ao controle sem adição de composto (100% viabilidade). Gráficos concentração-resposta desses valores foram utilizados para obter a concentração letal média (MCL_{50}) de cada composto. Com os valores de IC_{50} e MCL_{50} , calculou-se o índice de seletividade (IS) de cada composto.

3.4. Resultados e discussão

3.4.1. Investigação e avaliação da bioatividade das linhagens fúngicas provenientes da Antártica

Como mencionado no item 3.3.4 deste estudo, o fracionamento dos meios de cultivo das 16 linhagens de fungos provenientes de amostras marinhas e terrestres do continente Antártico, forneceram 144 frações (figura 45). As frações que possuíam massa superior a 2 mg, tiveram suas bioatividades avaliadas com contra *L. (L.) infantum*, *L. (L.) amazonensis* e citotóxico.

As frações que demonstraram alguma atividade nos bioensaios contra *Leishmania infantum* e citotóxico estão descritas na tabela 4. Dentre as 16 linhagens fúngicas oriundas da Antártica, 11 linhagens (68,75%) forneceram extratos com atividade contra *L. (L.) infantum* e 10 linhagens (62,5%) forneceram extratos com boa atividade citotóxica.

Figura 45. Resumo do procedimento geral para extração, fracionamento e análise dos extratos de fungos. Fonte: autoria própria.

Onde ATX é AT1, ou AT2, ou AT3, ou AT4, ou AT5, ou AT6, ou AT7, ou AT8, ou AT9, ou AT10, ou AT11, ou AT12, AT13, AT14, AT15 ou AT16.

Tabela 4. Frações das linhagens fúngicas oriundas da Antártica ativas nos bioensaios contra *L. (L.) infantum* e citotóxico.

Código	Frações ativas <i>Leishmania</i>	Frações ativas <i>Citotóxica</i>	Código	Frações ativas <i>Leishmania</i>	Frações ativas <i>Citotóxica</i>
AT1	A1, A4 e A5	B2 e B4	AT9	B4	NA
AT2	NA	NA	AT10	B4	NA
AT3	NA	A2	AT11	B3	NA
AT4	NA	A2 e B3	AT12	B4	B4
AT5	A4 e B4	NA	AT13	B4	B2 e B3
AT6	NA	A1, A2 e A4	AT14	NA	A5
AT7	B4	NA	AT15	A1	A5
AT8	B4	NA	AT16	B4	B3

NA = não ativo

As frações que apresentaram atividade no bioensaio contra *L. (L.) infantum* também foram enviadas para avaliação no bioensaio contra *L. (L.) amazonensis*. Dentre as 14 frações, 3 frações foram ativas. Todas as frações ativas foram obtidas da fração orgânica da linhagem AT1 (*Hypocrea* sp.). Essas frações apresentaram valores de EC₅₀ na faixa de 6,25 a 23,20 µg mL⁻¹ (tabela 5).

Tabela 5. Frações ativas no bioensaio contra *L. (L.) amazonensis* da linhagem AT1.

Frações	EC₅₀ (µg mL⁻¹)	CI 95%	EC₉₀ (µg mL⁻¹)
AT1A1	23 ± 4	13 – 34	98,35
AT1A4	6 ± 3	0,04 – 12	22,11
AT1A5	14 ± 3	6 – 22	32,60

Uma vez obtidos os resultados das atividades biológicas dos extratos, algumas dessas linhagens foram selecionadas para serem avaliadas em detalhe. O objetivo foi a determinação de qual ou quais meios de cultivo de crescimento dos fungos são responsáveis pela produção dos metabolitos secundários bioativos e/ou aqueles que apresentam um esqueleto de carbono inédito. A continuidade deste estudo será realizada por outros alunos de doutorado e mestrado do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck.

No estudo aqui discutido, realizou-se a investigação da linhagem AT1 (*Hypocrea* sp.). A linhagem AT1 foi recultivada em 100 mL de PDB (P), malte 2% (M) e SDB com 1 % de extrato de levedura (S), seguindo o protocolo descrito no item 3.3.4. Entretanto, neste caso os três meios de cultivo foram fracionados separadamente. As frações que levaram a obtenção de pelo menos 2 mg, foram novamente enviadas para bioensaios contra *L. (L.) infantum*, *L. (L.) amazonensis* e citotóxico. A figura 46 traz o potencial de inibição de crescimento de *L. (L.) amazonensis* das frações da linhagem AT1.

Figura 46. Gráficos da inibição do crescimento do protozoário *L. (L.) amazonensis* para a linhagem AT1.

*Sendo que: P = PDB, M = M2% e S = SBD. A = A1, B = A2, C = A3, D = A4, E = A5, F = B1, G = B2, H = B3, I = B4.

Pelos gráficos da figura 46, observa-se que a linhagem AT1 (*Hypocrea* sp.) apresenta compostos responsáveis pela inibição de *L. (L.) amazonensis*, como já havia sido constatado previamente (tabela 5). O cultivo da linhagem no meio M2% (M), apresentou o maior número de frações com inibição de viabilidade celular superiores a 50%, sendo, portanto, escolhida para crescimento em escala semi-preparativa.

3.4.2. Isolamento dos metabólitos produzidos pelo fungo AT1 (*Hypocrea* sp.)

O crescimento em escala ampliada para a linhagem AT1 foi realizado conforme o protocolo descrito no item 3.3.5. Da avaliação exploratória do perfil químico, utilizando HPLC-PDA-MS, observou-se que, dentre as frações geradas, algumas apresentavam uma matriz de maior complexidade. Foram observados compostos com massa molecular superior a 500 Da. Essas frações, oriundas da fração solúvel em AcOEt, foram identificadas como AT1M3 e AT1M5.

Pela análise do cromatograma de UV obtido pela separação exploratória da fração AT1M3 (figura 47), foi possível observar uma concentração de compostos polares na fração. Portanto, optou-se pela utilização de uma coluna pré-empacotada com fase estacionária de sílica-gel derivatizada com grupos diol para um segundo fracionamento. A amostra foi eluída com 10 mL de soluções de concentração variada de AcOEt e hexano (onde a concentração de AcOEt variou de 20 a 100% na mistura), e 10 mL de soluções de concentração variada de MeOH e AcOEt (onde a concentração de MeOH variou de 20 a 100% na mistura). Foram coletadas frações de 2,5 mL. As frações obtidas foram agrupados de acordo com a polaridade dos compostos observados em análise por CCD (figura 48). Ao final, foram obtidas 11 frações, nomeadas de AT1M3A a AT1M3K.

Figura 47. Cromatograma exploratório da fração AT1M3, monitorado no comprimento de onda de 305 nm (Análise realizada em coluna XTerra RP18 (4,6 x 250 mm; 5µm, Waters®) e gradiente de eluição de MeOH em H₂O (0,1% de ácido fórmico): 10% à 100% de MeOH de 1-30 min, permanecendo nesta condição por 5 min e voltando-se a condição inicial de eluição em 5 min).

Figura 48. Fluxograma da separação da fração AT1M3.

Legenda: A – Coluna pré-empacotada com sílica-gel derivatizadas com grupos diol, eluição com: 20% de AcOEt em hexano, 40% de AcOEt em hexano, 60% de AcOEt em hexano, 80% de AcOEt em hexano, AcOEt 100%, 20% de MeOH em AcOEt, 40% de MeOH em AcOEt, 60% de MeOH em AcOEt, 80% de MeOH em AcOEt, e MeOH 100%.

As frações obtidas do fracionamento da fração AT1M3 foram analisadas por CLAE-UV-MS. Observou-se que a fração AT1M3I apresentava perfil químico de interesse, com compostos de massa molecular superior a 1000 Da e baixa absorção no UV-visível. A fração AT1M3I (13,7 mg) foi purificada em coluna analítica com

fase estacionária C8 (InertSustain, 250 x 4,6 mm, 5 μ m), eluente isocrático 76% de MeOH em H₂O com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 1 mL min⁻¹ (figura 49). Foram obtidas 7 frações (figura 50), as quais foram evaporadas e analisadas por CLAE-UV-EM. As frações AT1M3I-4 (1,6 mg), AT1M3I-5 (1,8 mg) e AT1M3I-6 (5,1 mg) apresentaram grau de pureza satisfatório e foram analisadas por RMN de ¹H, ¹³C, COSY, HSQC, HMBC, HSQC-TOCSY e NOESY, HRMS, UV, IV, CD e [α]_D.

Figura 59. Cromatograma de separação da fração AT1M3I, monitorado por ELSD.

Figura 50. Fluxograma da separação da fração AT1M3I.

Legenda: B – CLAE-UV, coluna analítica com fase estacionária C₈ (InertSustain, 250 x 4,6 mm, 5 μ m), eluente isocrático 76% de MeOH em H₂O com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 1 mL min⁻¹.

Para a fração AT1M5 (337,1 mg) observou-se pelo cromatograma de UV obtido durante a avaliação exploratória das frações, a presença de compostos polares de diferentes massas moleculares (figura 51). O fracionamento dessa fração foi realizado em coluna empacotada com Sephadex[®] LH-20 eluída com MeOH. Foram coletadas frações de 4,5 mL. As frações obtidas foram agrupadas de acordo com as polaridades de seus compostos observados em análise por CCD (figura 52). Ao final, foram obtidas 14 frações nomeadas de AT1M5A a AT1M5P.

Figura 51. Cromatograma exploratório da fração AT1M3, monitorado no comprimento de onda de 305 nm (Análise realizada em coluna XTerra RP18 (4,6 x 250 mm; 5µm, Waters[®]) e gradiente de eluição de MeOH em H₂O (0,1% de ácido fórmico): 10% à 100% de MeOH de 1-30 min, permanecendo nesta condição por 5 min e voltando-se a condição inicial de eluição em 5 min).

Figura 52. Fluxograma da separação da fração AT1M5.

Legenda: A – Coluna Sephadex® LH-20, MeOH.

As frações obtidas foram analisadas por CLAE-UV-MS. Observou-se que a fração AT1M5O apresentava 2 compostos, com massa molecular superior a 1000 Da (figura 53).

Figura 53. Cromatograma da fração AT1M5O, monitorado por ELSD, e espectros de massas dos picos em 27.12 e 27.58 min (Análise realizada em coluna XTerra RP18 (4,6 x 250 mm; 5µm, Waters®) e gradiente de eluição de MeOH em H₂O (0,1% de ácido fórmico): 10% à 100% de MeOH de 1-30 min, permanecendo nesta condição por 5 min e voltando-se a condição inicial de eluição em 5 min).

A fração AT1M5O (176,4 mg) foi purificada em coluna analítica com fase estacionária C₈ (InertSustain, 250 x 4,6 mm, 5 µm), eluente isocrático 82% de MeOH em H₂O com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 1 mL min⁻¹ (figura 54). Foram obtidas 5 frações (figura 55), as quais foram evaporadas e analisadas por CLAE-UV-EM. As frações AT1M5O-4 (69,5 mg) e AT1M5O-5 (52,3 mg) apresentaram grau de pureza satisfatório e foram analisadas por RMN de ¹H, ¹³C, COSY, HSQC, HMBC, HSQC-TOCSY e NOESY, HRMS, UV, IV, CD e [α]_D.

Figura 54. Cromatograma de separação da fração AT1M5O, monitorado no comprimento de onda de 210 nm.

Figura 55. Fluxograma da separação da fração AT1M5O.

Legenda: B – CLAE-UV, coluna semi-preparativa com fase estacionária C₈ (InertSustain, 250 x 10 mm, 5 µm), eluente isocrático 82% de MeOH em H₂O com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 2 mL min⁻¹.

3.4.3. Análise dos dados espectroscópicos e identificação dos metabólitos secundários isolados da linhagem fúngica AT1 (*Hypocrea* sp.)

3.4.3.1. Determinação estrutural dos compostos da fração AT1M3I

A separação cromatográfica da fração AT1M3I levou à obtenção de 6 frações, das quais 4 delas apresentavam compostos puros. O espectro de massas de alta resolução do composto AT1M3I-6 apresentou três íons pseudomoleculares: $[M+Na]^+$ em m/z 1088,7075, $[M+H]^+$ em m/z 1066,7257 e $[M+H+K]^{2+}$ em m/z 552,8388 (figura 56). Assim, pôde-se inferir que o composto apresenta massa molecular de 1065,72 Da e a fórmula molecular de $C_{52}H_{95}O_{12}N_{11}$.

Desreplicação utilizando o banco de dados *Dictionary of Natural Products*, com intervalo de massa de 1066 a 1064 Da, e o tipo de organismo o qual o produto natural é proveniente, Ascomycetos (Ascomycetes), indicou como resultado dois derivados da pneumocandina A0 (hipótese 1). Esse composto é um lipopeptídeo isolado do fungo *Zaleion arborícola*, e apresenta um esqueleto cíclico, formado por ligações peptídicas entre aminoácidos reduzidos, tais como: *di*-treonina, 4-hidroxi-prolina, *di*-hidroxihomotirosina, hidroxiglutamina, 3-hidroxi-4-metil prolina e hidroxiornitina, com uma cadeia lateral de 15 carbonos.

Figura 56. Espectro de massas de alta resolução do composto AT1M3I-6 (HRMS ESI⁺, intervalo 500–1200 Da).

O espectro de RMN de ¹³C do composto AT1M3I-6 apresentou 11 carbonos com deslocamentos químicos na região entre δ 165 e 190, característico de carbonos de ácidos carboxílicos e derivados (figura 57). A pneumocandina A0 apresenta 7 carbonos carboxílicos, sendo diferente do composto AT1M3I-6. Não foram observados sinais de carbonos aromáticos. E foi observado um sinal de carbono ligados a oxigênio, entre δ 60 e 70 (figura 57).

Figura 57. Espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-6 (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

A análise do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-6 (figura 58) indica que se trata de um peptídeo. São observados 11 hidrogênios na região de δ 7,0 a 9,0 que, combinada com a informação da presença de 11 carbonos carboxílicos, podem ser atribuídos a hidrogênios ligados a átomos de nitrogênio em ligações peptídicas. É possível observar a presença de 11 hidrogênios entre δ 4,5 e 3,5. Esses hidrogênios podem ser atribuídos a átomos de hidrogênios ligados a carbonos em posição α à carboxila de peptídeos. São observados sinais entre δ 2,0 e 1,0 característicos de hidrogênios presentes em aminoácidos alifáticos, e entre δ 1,0 e 1,5, característicos de aminoácidos contendo grupos metílicos.

Figura 58. Espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-6 (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

A análise por MS/MS do composto AT1M3I-6 foi realizada pela fragmentação do íon pseudomolecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 1066,7257 (figura 59). A fragmentação dos íons presentes em espectros de massas é essencial para o sequenciamento de peptídeos e proteínas. O espectro de massas da fragmentação apresentou extensiva série de íons, cobrindo todo o intervalo da massa molecular. Foram observados fragmentos acílios, provenientes da clivagem da ligação peptídica, em m/z 949,6093, 836,5244, 779,5035, 694,4498, 581,3664, 467,3232, 382,2687, 269,1863 e 212,1658. De posse dos dados de fragmentação, foi possível determinar quais aminoácidos estariam presentes no peptídeo. Verificou-se que o peptídeo AT1M3I-6 apresenta em sua composição 4 resíduos de glicina (Gly), 2 resíduos do ácido α -aminoisobutírico (Aib), 3 resíduos de leucina (Leu) ou isoleucina (Ileu), e 1 resíduo de leucinol (Leuol), na sequência: X-Gly-Leu(Ileu)-Aib-Gly-Gly-Leu(Ileu)-Aib-Gly-Leu(Ileu)-Leoul.

Figura 59. Análise do espectro de massas de alta resolução obtido para a fragmentação do íon m/z 1066,87 do composto AT1M3I-6 (ESI⁺, EC 30 V).

A presença de resíduos Aib, bem como de aminoácidos com o grupo ácido reduzido, tais como o leucinol, são elementos característicos da classe dos peptaibóis.

De posse desta informação, investigou-se a pré-existência da sequência de resíduos de aminoácidos obtida pela fragmentação utilizando a base de dados *Peptaibol Database* (<http://peptaibol.cryst.bbk.ac.uk/home.shtml>)⁸¹. Nesta base de dados é possível verificar informações relativas às sequências, fontes biológicas e dados bibliográficos para os peptaibóis de ocorrência natural. Verificou-se as 8 possibilidades (2^3) possíveis para a sequência X-Gly-Leu(Ileu)-Aib-Gly-Gly-Leu(Ileu)-Aib-Gly-Leu(Ileu)-Leou e obteve-se um resultado para a busca, a sequência Oc-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ileu-Leoul (figura 60). Esta sequência corresponde à trichogina A IV, um lipopetaibol de 11 resíduos de

aminoácido. Este peptaibol foi isolado pela primeira vez em 1992, por Auvin-Guette *et al.*⁸² a partir do fungo *Trichoderma longibrachiatum*.

Figura 60. Estrutura do lipopeptaibol trichogina A IV, composto AT1M3I-6.

Os dados obtidos de RMN de ^1H e ^{13}C do composto AT1M3I-6 foram comparados com os descritos por Auvin-Guette *et al.*⁸². Na tabela 6 é realizada a comparação dos deslocamentos químicos de ^{13}C , na tabela 7 é realizada a comparação dos deslocamentos químicos dos ^1H ligados a carbonos α , e na tabela 8 é realizada a comparação dos deslocamentos químicos de ^1H das cadeias laterais dos aminoácidos para a trichogina AIV e o AT1M3I-6 ($\text{MeOH}-d_4$)⁸². Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C (em $\text{MeOH}-d_4$ e $\text{DMSO}-d_6$), COSY, HMBC, HSQC, IV, HRMS, DC e UV para o composto AT1M3I-6 estão disponíveis no volume 2, apêndice 119 a 140.

Tabela 6. Comparação dos deslocamentos químicos (δ) dos ^{13}C dos aminoácidos da trichogina AIV e AT1M3I-6 ($\text{MeOH-}d_4$)⁸².

Resíduo	Carbono	trichogina AIV (δ)	AT1M3I-6 (δ)
Oc	$\text{C}_8'\text{CH}_3$	14,3	14,5
	$\text{C}_7'\text{CH}_2$	23,6	23,8
	$\text{C}_6'\text{CH}_2$	32,8	33,0
	$\text{C}_5'\text{CH}_2$	30,1	30,4
	$\text{C}_4'\text{CH}_2$	30,3	30,5
	$\text{C}_3'\text{CH}_2$	26,2	26,4
	$\text{C}_2'\text{CH}_2$	37,0	37,1
	$\text{C}=\text{O}$	176,6	176,7
Gly 2	$\alpha \text{ CH}_2$	44,8	44,9
	$\text{C}=\text{O}$	173,2	173,3
Leu 3	$\alpha \text{ CH}$	54,6	54,5
	$\beta \text{ CH}_2$	50,8	50,9
	$\gamma \text{ CH}$	26,4	26,5
	$\delta_1 \text{ CH}_3$	22,2	22,2
	$\delta_2 \text{ CH}_3$	23,4	23,7
	$\text{C}=\text{O}$	175,8	176,0
Gly 5	$\alpha \text{ CH}_2$	45,1	45,2
	$\text{C}=\text{O}$	173,4	173,6
Gly 6	$\alpha \text{ CH}_2$	44,4	44,4
	$\text{C}=\text{O}$	173,0	173,2
Leu 7	$\alpha \text{ CH}$	54,8	54,9
	$\beta \text{ CH}_2$	41,0	41,0
	$\gamma \text{ CH}$	25,8	25,8
	$\delta_1 \text{ CH}_3$	22,0	22,2
	$\delta_2 \text{ CH}_3$	23,3	23,5
	$\text{C}=\text{O}$	175,3	175,4
Gly 9	$\alpha \text{ CH}_2$	44,8	44,9
	$\text{C}=\text{O}$	172,5	172,6

Tabela 6. (continuação) Comparação dos deslocamentos químicos (δ) dos ^{13}C dos aminoácidos da trichogina AIV e AT1M3I-6 ($\text{MeOH-}d_4$)⁸².

Resíduo	Carbono	trichogina AIV (δ)	AT1M3I-6 (δ)
Ile 10	α CH	60,5	60,6
	β CH	37,6	37,7
	γ CH ₂	26,6	26,8
	γ' CH ₃	16,0	16,2
	δ CH ₃	11,6	11,8
	C=O	173,6	173,8
Leuol 11	α CH	51,0	51,0
	β' CH ₂	66,0	66,0
	β CH ₂	40,8	40,8
	γ CH	25,8	25,8
	δ_1 CH ₃	21,8	21,8
	δ_2 CH ₃	23,9	24,2
Aib 1, 4 e 8	α C	57,5	57,5
		58,0	58,0
		58,0	58,0
	β_1 CH ₂	24,6	24,8
		24,7	24,8
		24,9	25,1
	β_2 CH ₂	26,0	26,1
		26,1	26,1
		26,4	26,4
Aib 1	C=O	178,5	178,6
Aib 4	C=O	178,3	178,5
Aib 8	C=O	178,1	178,2

Tabela 7. Comparação dos deslocamentos químicos (δ) dos ^1H ligados aos carbonos α da trichogina AIV e AT1M3I-6 ($\text{MeOH}-d_4$)⁸².

Resíduo	trichogina AIV (δ)	AT1M3I-6 (δ)
Gly 2	3,71 (d, 17,2 Hz, 1H)	3,71 (d, 17,0 Hz, 1H)
	3,88 (d, 17,2 Hz, 1H)	3,88 (d, 17,0 Hz, 1H)
Leu 3	4,30 (dd, 4,6 e 10,4 Hz, 1H)	4,30 (dd, 4,8 e 10,7 Hz, 1H)
Gly 5	3,81 (d, 17,3 Hz, 1H)	3,82 – 3,85 (m, 1H)
	3,83 (d, 17,3 Hz, 1H)	3,82 – 3,85 (m, 1H)
Gly6	3,90 (d, 16,6 Hz, 1H)	3,90 (d, 16,6 Hz, 1H)
	3,94 (d, 16,6 Hz, 1H)	3,95 (d, 16,6 Hz, 1H)
Leu 7	4,26 (dd, 3,6 e 9,5 Hz, 1H)	4,25 (dd, 5,5 e 9,2 Hz, 1H)
Gly 9	3,78 (d, 16,7 Hz, 1H)	3,78 (d, 16,9 Hz, 1H)
	3,85 (d, 16,7 Hz, 1H)	3,82 – 3,85 (m, 1H)
Ile 10	4,21 (d, 7,5 Hz, 1H)	4,21 (d, 7,4 Hz, 1H)
Leuol 11	4,04 (m, 1H)	4,03 (m, 1H)

Como verificado nas tabelas 6, 7 e 8, o composto AT1M3I-6 possui os mesmos deslocamentos químicos que a trichogina A IV. Portanto, conclui-se que o composto isolado AT1M3I-6 é o peptaibol trichogina A IV. A trichogina A IV foi por nós isolada com um rendimento de 0,68%, a partir da fração AcOEt obtida do meio de cultivo do fungo AT1.

Com o objetivo de se avaliar se ambos compostos apresentam a mesma estereoquímica, determinou-se também o valor da rotação ótica para o composto AT1M3I-6. O valor medido foi de $[\alpha]_{\text{D}}^{21}$: -8.0° ($c = 0,02$, MeOH). Na literatura, é relatado que a trichogina A IV possui um valor de $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -4.8° ($c = 0,5$, MeOH)⁸³. Os valores próximos, indicam que ambos os compostos devem possuir a mesma estereoquímica. Além da medida do desvio da rotação ótica, também foram obtidos os dados de dicroísmo circular e realizou-se a análise de Marfey para a amostra. Ambos os dados serão descritos a seguir, em subitens específicos.

Tabela 8. Comparação dos deslocamentos químicos dos ^1H das cadeias laterais dos aminoácidos da trichogina AIV e AT1M3I-6 ($\text{MeOH-}d_4$)⁸².

Resíduo		trichogina AIV (δ)	AT1M3I-6 (δ)
Oc	$\text{CH}_3 (\text{C}_8')$	0,89 (t, 7,5 Hz, 3H)	0,90 (m, 3H)
	$\text{CH}_2 (\text{C}_7' \text{ até } \text{C}_4')$	1,32 (m, 8H)	1,28 - 1,37 (m, 8H)
	$\text{CH}_2 (\text{C}_3')$	1,60 (m, 2H)	1,58 - 1,65 (m, 2H)
	$\text{CH}_2 (\text{C}_2')$	2,26 (t, 7,6 Hz, 2H)	2,26 (t, 7,7 Hz, 2H)
Leu 3	$\text{CH } \beta_1$	1,64 (m, 1H)	1,58 - 1,65 (m, 1H)
	$\text{CH } \beta_2$	1,83 (m, 1H)	1,83 (m, 1H)
	$\text{CH } \gamma$	1,64 (m, 1H)	1,58 - 1,65 (m, 1H)
	$\text{CH}_3 \delta_1$	0,90 (d, 6,4 Hz, 3H)	0,88 - 0,91 (m, 3H)
Leu 7	$\text{CH}_3 \delta_2$	0,97 (d, 6,1 Hz, 3H)	0,97 (d, 6,2 Hz, 3H)
	$\text{CH } \beta_1$	1,69 (m, 1H)	1,66 - 1,77 (m, 1H)
	$\text{CH } \beta_2$	1,76 (m, 1H)	1,66 - 1,77 (m, 1H)
	$\text{CH } \gamma$	1,69 (m, 1H)	1,66 - 1,77 (m, 1H)
Ile 10	$\text{CH}_3 \delta_1$	0,90 (d, 6,4 Hz, 3H)	0,88 - 0,91 (m, 3H)
	$\text{CH}_3 \delta_2$	0,95 d (d, 6,0 Hz, 3H)	0,95 d (d, 6,1 Hz, 3H)
	$\text{CH } \beta$	2,02 (m, 1H)	2,03 (m, 1H)
	$\text{CH } \gamma_1$	1,29 (m, 1H)	1,28 - 1,37 (m, 1H)
Leuol 11	$\text{CH } \gamma_2$	1,57 (m, 1H)	1,58 - 1,65 (m, 1H)
	$\text{CH}_3 \gamma'$	0,96 (d, 6,7 Hz, 3H)	0,96 (d, 5,0 Hz, 3H)
	$\text{CH}_3 \delta$	0,89 (t, 7,6 Hz, 3H)	0,88 - 0,91 (m, 3H)
	$\text{CH } \beta_1$	1,34 (m, 1H)	1,28 - 1,37 (m, 1H)
Leuol 11	$\text{CH } \beta_2$	1,45 (m, 1H)	1,45 (m, 1H)
	$\text{CH } \beta_1'$	3,47 (dd, 3,7, 15,1 Hz, 1H)	3,47 (dd, 5,6, 11,3 Hz, 1H)
	$\text{CH } \beta_2'$	3,51 (dd, 4,1, 15,1 Hz, 1H)	3,51 (dd, 5,4, 11,2 Hz, 1H)
	$\text{CH}_3 \gamma'$	1,72 (m, 3H)	1,66 - 1,77 (m, 3H)
Leuol 11	$\text{CH}_3 \delta_1$	0,88 (d, 6,3 Hz, 3H)	0,88 - 0,91 (m, 3H)
	$\text{CH}_3 \delta_2$	0,89 (d, 6,3 Hz, 3H)	0,88 - 0,91 (m, 3H)

Além da trichogina A IV, dois outros compostos foram isolados da mesma fração. Esses compostos foram denominados AT1M3I-4 e AT1M3I-5. Os espectros de massas de alta resolução dos compostos isolados apresentam os mesmos íons pseudomoleculares: $[M+Na]^+$ em m/z 1074,688, $[M+H]^+$ em m/z 1052,706 e $[M+H+K]^{2+}$ em m/z 545,83 (figura 61). A partir desses dados, pôde-se inferir que esses compostos são isômeros, com massa molecular de 1051,70 Da e fórmula molecular de $C_{51}H_{93}O_{12}N_{11}$.

Figura 61. Expansão dos espectros de massas de alta resolução obtidos para os compostos AT1M3I-4 e AT1M3I-5 (HRMS ESI⁺, intervalo 500–1200 Da).

A desreplcação utilizando o banco de dados *Dictionary of Natural Products*, considerando-se o interalo de massa de 1052 a 1051 Da, e o tipo de organismo o qual os produtos naturais são provenientes, Ascomicetos (Ascomycetes), indicou como resultado o antibiótico S 31794F1. Esse composto é um lipopeptídeo isolado

do fungo *Acrophialophora lomonispora*, com esqueleto cíclico, formado por ligações peptídicas entre aminoácidos reduzidos, tais como a *di*-hidroxihomotirosina, e uma cadeia lateral de 13 carbonos. Entretanto, como no caso do composto AT1M3I-6, os compostos AT1M3I-4 e AT1M3I-5 não possuem sinais de carbonos entre δ 120 e 160, região característica de deslocamento químico para carbonos aromáticos (figura 62 e 63). A ausência desses sinais exclui a hipótese. As expansões dos espectros de ^{13}C para os compostos AT1M3I-5 e AT1M3I-4 encontram-se no volume 2, apêndices 162 -164 e 180 - 182, respectivamente.

Figura 62. Espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-4 (151 MHz, DMSO- d_6).

Figura 63. Espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-5 (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

A análise dos espectros de ^{13}C para os isômeros indica características semelhantes às do composto AT1M3I-6. Os isômeros também apresentam 11 sinais de carbonos carboxílicos, 1 sinal de carbono ligado a hidroxila (em δ 63,9), bem como vários sinais de carbono na região de deslocamento químico característico de carbonos de metila (δ 10 – 25). Logo, os isômeros são peptaibóis. A diferença de massa entre os isômeros AT1M3I-4 e AT1M3I-5 e o composto AT1M3I-6 é de 14 Da. Isso indica que as estruturas devem diferir entre si em apenas 1 resíduo de aminoácido.

Para verificar essa afirmação, realizou-se a fragmentação dos íons pseudomoleculares $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 1052,78 para ambos os isômeros. Os espectros de massas obtidos das fragmentações encontram-se nas figuras 64 e 65 para AT1M3I-4 e AT1M3I-5, respectivamente. A partir dos dados obtidos para o composto AT1M3I-6, considerou-se que o íon em m/z 212,1658 é o aminoácido Aib ligado a cadeia lateral alifática. A partir desses dados, foram propostas as seguintes

sequências de aminoácidos para os isômeros: Oc-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Val-Aib-Gly-Ileu-Leoul para o peptídeo AT1M3I-4 (figura 64), e a sequência Oc-Aib-Gly-Val-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ileu-Leoul para o peptídeo AT1M3I-5 (figura 65).

Figura 64. Análise do espectro de massas de alta resolução obtido para a fragmentação do íon m/z 1052,78 do composto AT1M3I-4 (ESI⁺, EC 30 V).

Figura 65. Análise do espectro de massas de alta resolução obtido para a fragmentação do íon m/z 1052,78 do composto AT1M3I-5 (ESI⁺, EC 35 V).

De posse destes dados, constatou-se que os compostos AT1M3I-4 e AT1M3I-5 diferem entre si na posição dos resíduos 3 e 7. No peptídeo AT1M3I-4, o resíduo 3 é uma Leu e o resíduo 7 é uma Val. Para o peptídeo AT1M3I-5, observa-se o inverso, o resíduo 3 é uma Val e o resíduo 7 é uma Leu. Ambos diferem do peptídeo AT1M3I-6 pela presença de um resíduo de Val, já que nesse composto resíduos de Leu estão em ambas as posições.

A existência das sequências de peptídeos semelhantes as propostas para os peptídeos isoméricos foi avaliada nos bancos de dados *Peptaibol Database* e *SciFinder*. Nenhum resultado foi encontrado em ambos os bancos de dados, o que indica que os peptaibóis AT1M3I-4 e AT1M3I-5 descritos nesse estudo são inéditos.

Para a identificação dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C dos aminoácidos, experimentos TOCSY-HSQC foram realizados (volume 2, apêndice

166 para AT1M3I-5, e apêndice 185 para AT1M3I-4). HSQC-TOCSY (**Heteronuclear Single Quantum Coherence-Total Correlation Spectroscopy**) é um TOCSY 2D resolvido na dimensão do espectro de ^{13}C . Essa técnica é extremamente útil para análise de compostos que possuem sobreposição de sinais de hidrogênios no espectro de ^1H . Os sinais de hidrogênios sobrepostos são resolvidos para cada sistema de spin. De posse destes dados, os aminoácidos foram identificados e as atribuições podem ser observadas nas tabela 9 e 10 para o composto AT1M3I-4, e nas tabelas 11 e 12 para o composto AT1M3I-5.

Outro experimento de RMN utilizado para auxiliar na identificação dos sinais dos compostos inéditos foi DEPT-135 (**Distortionless Enhancement by Polarization Transfer**). O DEPT é um método de transferência de polarização próton-carbono, no qual é obtido um conjunto de espectros com atrasos de pulso ajustados para $\pi/2$ (DEPT-90) ou $3\pi/4$ (DEPT-135). O espectro DEPT-135 apresenta sinais CH_3 e CH positivos e CH_2 negativos. Carbonos quaternários são invisíveis. Associado com o espectro de RMN de ^{13}C , o espectro DEP-135 auxiliou na identificação dos carbonos CH_2 das Gly 2, 5, 6 e 9, bem como os CH_2 presentes nos aminoácidos Leu, Ile e Leuol (figura 66). Além dos aminoácidos, a atribuição inequívoca dos carbonos da cadeia lateral dos peptídeos também pôde ser realizada (figura 67).

Figura 66. Análise do espectro DEPT-135 do composto AT1M3I-4 (151 MHz, DMSO- d_6). **Figura 67.** Atribuição dos sinais de carbono para a cadeia lateral do AT1M3I-4.

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, DEPT-135, HMBC, HSQC, HSQC-TOCSY, ROESY (DMSO- d_6), IV, HRMS, DC e UV para os compostos AT1M3I-5 e AT1M3I-4 estão disponíveis no volume 2, apêndices 157 - 174 e apêndices 175 - 193, respectivamente.

Tabela 9. Deslocamentos químicos (δ) dos ^{13}C dos aminoácidos do peptídeo AT1M3I-4 (DMSO- d_6).

Resíduo	Carbono	AT1M3I-4 (δ)	Resíduo	Carbono	AT1M3I-4 (δ)
Oc	$\text{C}_8'\text{CH}_3$	13,9	Gly 6	αCH_2	42,2
	$\text{C}_7'\text{CH}_2$	22,1		$\text{C}=\text{O}$	169,7
	$\text{C}_6'\text{CH}_2$	31,2	Val 7	αCH	58,7
	$\text{C}_5'\text{CH}_2$	28,5		βCH_2	29,9
	$\text{C}_4'\text{CH}_2$	28,7		$\text{Y}_1 \text{CH}_3$	18,6
	$\text{C}_3'\text{CH}_2$	24,8		$\text{Y}_2 \text{CH}_3$	19,0
	$\text{C}_2'\text{CH}_2$	35,3	Aib 8	$\text{C}=\text{O}$	169,5
	$\text{C}=\text{O}$	173,7		αC	56,0
Aib 1	αC	55,6		$\beta_1 \text{CH}_3$	24,5
	$\beta_1 \text{CH}_3$	24,1		$\beta_2 \text{CH}_3$	25,2
	$\beta_2 \text{CH}_3$	24,5		$\text{C}=\text{O}$	174,5
	$\text{C}=\text{O}$	175,4	Gly 9	αCH_2	43,2
Gly 2	αCH_2	43,0		$\text{C}=\text{O}$	168,8
	$\text{C}=\text{O}$	171,5	Ile 10	αCH	57,3
Leu 3	αCH	51,7		βCH	36,0
	βCH_2	39,2		$\text{Y} \text{CH}_2$	24,4
	$\text{Y} \text{CH}$	24,8		$\text{Y}'\text{CH}_3$	15,4
	$\delta_1 \text{CH}_3$	21,3		δCH_3	11,0
	$\delta_2 \text{CH}_3$	23,0		$\text{C}=\text{O}$	170,7
	$\text{C}=\text{O}$	172,6	Leuol 11	αCH	48,8
Aib 4	αC	56,0		$\beta' \text{CH}_2$	63,9
	$\beta_1 \text{CH}_3$	24,6		βCH_2	39,6
	$\beta_2 \text{CH}_3$	25,6		$\text{Y} \text{CH}$	24,1
	$\text{C}=\text{O}$	174,6		$\delta_1 \text{CH}_3$	21,7
Gly 5	αCH_2	42,8		$\delta_2 \text{CH}_3$	23,4
	$\text{C}=\text{O}$	169,8			

Tabela 10. Deslocamentos químicos (δ) dos ^1H das cadeias laterais dos aminoácidos do peptídeo AT1M3I-4 ($\text{DMSO}-d_6$).

Resíduo	Hidrogênios	AT1M3I-4 (δ)
Oc	$\text{CH}_3 (\text{C}_8')$	0,80 – 0,88 (m, 3H)
	$\text{CH}_2 (\text{C}_7' \text{ até } \text{C}_4')$	1,23 (m, 8H)
	$\text{CH}_2 (\text{C}_3')$	1,45 - 1,53 (m, 2H)
	$\text{CH}_2 (\text{C}_2')$	2,13 (t, 6 Hz, 2H)
Aib 1	$\text{CH}_3 \beta_1$	1,30 – 1,31 (m, 3H)
	$\text{CH}_3 \beta_2$	1,30 – 1,31 (m, 3H)
	NH	8,49 (s, 1H)
Gly 2	CH α	3,53 - 3,65 (m, 2H)
	NH	8,33 – 8,35 (m, 1H)
Leu 3	CH α	4,13 – 4,23 (m, 1H)
	$\text{CH}_2 \beta$	1,55 - 1,63 (m, 2H)
	CH γ	1,45 – 1,53 (m, 1H)
	$\text{CH}_3 \delta_1$	0,80 - 0,88 (m, 3H)
	$\text{CH}_3 \delta_2$	0,80 - 0,88 (m, 3H)
	NH	7,77 – 7,78 (m, 1H)
Aib 4	$\text{CH}_3 \beta_1$	1,33 – 1,34 (m, 3H)
	$\text{CH}_3 \beta_2$	1,33 – 1,34 (m, 3H)
	NH	7,78 (s, 1H)
Gly 5	CH α	3,53 - 3,65 (m, 2H)
	NH	7,82 – 7,94 (m, 1H)
Gly6	CH α	3,72 - 3,81 (m, 2H)
	NH	7,82 – 7,94 (m, 1H)
Val 7	CH α	4,03 – 4,07 (m, 1H)
	CH β	1,99 – 2,06 (m, 1H)
	$\text{CH}_3 \gamma_1$	0,80 - 0,88 (m, 3H)
	$\text{CH}_3 \gamma_2$	0,80 - 0,88 (m, 3H)
	NH	7,84 – 7,90 (m, 1H)

Tabela 10. (continuação) Deslocamentos químicos (δ) dos ^1H das cadeias laterais dos aminoácidos do peptídeo AT1M3I-4 ($\text{DMSO-}d_6$).

Resíduo	Hidrogênios	AT1M3I-4 (δ)
Aib 8	$\text{CH}_3 \beta_1$	1,35 – 1,37 (m, 3H)
	$\text{CH}_3 \beta_2$	1,35 – 1,37 (m, 3H)
	NH	8,33 – 8,35 (m, 1H)
Gly9	CH α	3,53 - 3,65 (m, 2H)
	NH	7,82 – 7,94 (m, 1H)
Ile 10	CH α	4,03 – 4,07 (m, 1H)
	CH β	1,79 – 1,82 (m, 1H)
	$\text{CH}_2 \gamma$	1,03 - 1,12 (m, 2H)
	$\text{CH}_3 \gamma'$	0,80 - 0,88 (m, 3H)
	$\text{CH}_3 \delta$	0,80 - 0,88 (m, 3H)
	NH	7,47 – 7,50 (m, 1H)
Leuol 11	CH α	3,72 - 3,81 (m, 1H)
	CH β_1	1,30 - 1,31 (m, 1H)
	CH β_2	1,23 (m, 1H)
	CH β_1'	3,16 (dd, 5,6, 11,3 Hz, 1H)
	CH β_2'	3,30 (m, 1H)
	$\text{CH}_3 \gamma'$	1,33 - 1,34 (m, 1H)
	$\text{CH}_3 \delta_1$	0,75 - 0,79 (m, 3H)
	$\text{CH}_3 \delta_2$	0,75 - 0,79 (m, 3H)
	NH	7,47 – 7,50 (m, 1H)

Tabela 11. Deslocamentos químicos (δ) dos ^{13}C dos aminoácidos do peptídeo AT1M3I-5 (DMSO- d_6).

Resíduo	Carbono	AT1M3I-5 (δ)	Resíduo	Carbono	AT1M3I-5 (δ)
Oc	$\text{C}_8'\text{CH}_3$	14,0	Gly 6	$\alpha \text{ CH}_2$	42,5
	$\text{C}_7'\text{CH}_2$	22,1		$\text{C}=\text{O}$	169,6
	$\text{C}_6'\text{CH}_2$	31,2	Leu 7	$\alpha \text{ CH}$	51,9
	$\text{C}_5'\text{CH}_2$	28,5		$\beta \text{ CH}_2$	40,0
	$\text{C}_4'\text{CH}_2$	28,6		$\gamma \text{ CH}$	24,0
	$\text{C}_3'\text{CH}_2$	24,8		$\delta_1 \text{ CH}_3$	21,7
	$\text{C}_2'\text{CH}_2$	35,3		$\delta_2 \text{ CH}_3$	22,9
	$\text{C}=\text{O}$	173,5		$\text{C}=\text{O}$	172,6
Aib 1	$\alpha \text{ C}$	55,7	Aib 8	$\alpha \text{ C}$	56,0
	$\beta_1 \text{ CH}_3$	24,9		$\beta_1 \text{ CH}_3$	25,6
	$\beta_2 \text{ CH}_3$	24,8		$\beta_2 \text{ CH}_3$	24,6
	$\text{C}=\text{O}$	175,2		$\text{C}=\text{O}$	174,7
Gly 2	$\alpha \text{ CH}_2$	43,2	Gly 9	$\alpha \text{ CH}_2$	43,1
	$\text{C}=\text{O}$	170,1		$\text{C}=\text{O}$	168,9
Val 3	$\alpha \text{ CH}$	59,0	Ile 10	$\alpha \text{ CH}$	57,5
	$\beta \text{ CH}_2$	29,3		$\beta \text{ CH}$	36,1
	$\gamma_1 \text{ CH}_3$	18,5		$\gamma \text{ CH}_2$	24,1
	$\gamma_2 \text{ CH}_3$	19,1		$\gamma' \text{ CH}_3$	15,4
	$\text{C}=\text{O}$	171,8		$\delta \text{ CH}_3$	11,1
Aib 4	$\alpha \text{ C}$	56,0	Leuol 11	$\text{C}=\text{O}$	170,5
	$\beta_1 \text{ CH}_3$	24,6		$\alpha \text{ CH}$	48,7
	$\beta_2 \text{ CH}_3$	24,9		$\beta' \text{ CH}_2$	63,9
	$\text{C}=\text{O}$	175,0		$\beta \text{ CH}_2$	39,9
Gly 5	$\alpha \text{ CH}_2$	43,1		$\gamma \text{ CH}$	23,5
	$\text{C}=\text{O}$	170,1		$\delta_1 \text{ CH}_3$	21,7
				$\delta_2 \text{ CH}_3$	23,5

Tabela 12. Deslocamentos químicos (δ) dos ^1H das cadeias laterais dos aminoácidos do peptídeo AT1M3I-5 ($\text{DMSO}-d_6$).

Resíduo	Hidrogênios	AT1M3I-5 (δ)
Oc	$\text{CH}_3 (\text{C}_8')$	0,78 – 0,87 (m, 3H)
	$\text{CH}_2 (\text{C}_7' \text{ até } \text{C}_4')$	1,22 – 1,25 (m, 8H)
	$\text{CH}_2 (\text{C}_3')$	1,44 - 1,49 (m, 2H)
	$\text{CH}_2 (\text{C}_2')$	2,13 (t, 6 Hz, 2H)
Aib 1	$\text{CH}_3 \beta_1$	1,30 – 1,37 (m, 3H)
	$\text{CH}_3 \beta_2$	1,30 – 1,37 (m, 3H)
	NH	8,43 (s, 1H)
Gly 2	CH α	3,59 - 3,65 (m, 2H)
	NH	8,26 (m, 1H)
Val 3	CH α	4,01 (dd, 6, 12 Hz, 1H)
	CH β	1,14 (m, 1H)
	$\text{CH}_3 \text{Y}_1$	0,78 - 0,87 (m, 3H)
	$\text{CH}_3 \text{Y}_2$	0,78 - 0,87 (m, 3H)
	NH	7,67 (d, 6Hz, 1H)
Aib 4	$\text{CH}_3 \beta_1$	1,30 – 1,37 (m, 3H)
	$\text{CH}_3 \beta_2$	1,30 – 1,37 (m, 3H)
	NH	7,94 (m, 1H)
Gly 5	CH α	3,59 - 3,65 (m, 2H)
	NH	7,94 (m, 1H)
Gly6	CH α	3,74 - 3,78 (m, 2H)
	NH	7,94 (m, 1H)
Leu 7	CH α	4,21 (dt, 6, 12 Hz, 1H)
	$\text{CH}_2 \beta$	1,51 - 1,54 (m, 2H)
	CH γ	1,22 – 1,25 (m, 1H)
	$\text{CH}_3 \delta_1$	0,78 – 0,87 (m, 3H)
	$\text{CH}_3 \delta_2$	0,78 – 0,87 (m, 3H)
	NH	7,94 (m, 1H)
Aib 8	$\text{CH}_3 \beta_1$	1,30 – 1,37 (m, 3H)
	$\text{CH}_3 \beta_2$	1,30 – 1,37 (m, 3H)
	NH	8,11 (s, 1H)

Tabela 12. (continuação) Deslocamentos químicos (δ) dos ^1H das cadeias laterais dos aminoácidos do peptídeo AT1M3I-5 ($\text{DMSO}-d_6$).

Resíduo	Hidrogênios	AT1M3I-5 (δ)
Gly 9	CH α	3,56 - 3,59 (m, 2H)
	NH	7,89 (m, 1H)
Ile 10	CH α	4,06 (dd, 6, 12 Hz, 1H)
	CH β	1,80 – 1,81 (m, 1H)
	CH ₂ Y ₁	1,44 - 1,49 (m, 1H)
	CH ₂ Y ₂	1,04 - 1,13 (m, 1H)
	CH ₃ Y'	0,78 – 0,87 (m, 3H)
	CH ₃ δ	0,78 – 0,87 (m, 3H)
	NH	7,41 (d, 6 Hz, 1H)
Leuol 11	CH α	3,76 - 3,79 (m, 1H)
	CH β_1	1,30 - 1,31 (m, 1H)
	CH β_2	1,22 – 1,25 (m, 1H)
	CH β_1'	3,16 (m, 1H)
	CH β_2'	3,29 (m, 1H)
	CH ₃ Y'	1,44 - 1,49 (m, 1H)
	CH ₃ δ_1	0,78 – 0,87 (m, 3H)
	CH ₃ δ_2	0,78 – 0,87 (m, 3H)
	NH	7,33 (d, 6 Hz, 1H)

As sequências de resíduos de aminoácidos obtidas pelas fragmentações dos íons pseudomoleculares para os isômeros AT1M3I-4 e AT1M3I-5 também puderam ser verificadas e comprovadas pelas análises de RMN. Após a atribuição dos sinais dos hidrogênios ligados aos átomos de nitrogênio dos aminoácidos, avaliou-se suas posições através da análise do espectro de ROESY. Na figura 68 podemos observar as correlações observadas para o peptídeo AT1M3I-5. Como os resíduos Aib 4, Gly 5 e Gly 6 possuem sinais de prótons N-H com o mesmo deslocamento químico, não foi possível observar suas correlações. Entretanto, observou-se claramente as correlações da sequência de aminoácidos 1-2-3-4 e 7-8-9-10-11. O mesmo foi verificado para o peptídeo AT1M3I-4 (figura 69). Esses dados corroboram com as

observações realizadas com relação a alteração da posição dos resíduos de Val e Leu nos dois isômeros.

A rotação específica também foi determinada para os isômeros. Sendo de $[\alpha]_D^{21}$: -9.0° ($c = 0,02$, MeOH) para o peptídeo AT1M3I-4, e de $[\alpha]_D^{21}$: -50.0° ($c = 0,02$, MeOH) para o peptídeo AT1M3I-5. O rendimento de isolamento a partir da fração AcOEt para os peptídeos AT1M3I-4 e AT1M3I-5 foi de 0,21% e 0,24%, respectivamente.

Figura 68. Expansão do espectro de ROESY para o composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6).

Figura 69. Expansão do espectro de ROESY para o composto AT1M3I-4 (DMSO- d_6).

Além dos compostos mencionados, isolou-se também um quarto composto da mesma fração, denominado AT1M3I-3. Obteve-se uma pequena quantidade do mesmo, cerca de 0,4 mg, que corresponde a um rendimento de 0,05% a partir da fração AcOEt. O espectro de massas de alta resolução do composto AT1M3I-3 apresentou três íons pseudomoleculares: $[M+Na]^+$ em m/z 1060,6727; $[M+H]^+$ em m/z 1038,6914; e $[M+H+K]^{2+}$ em m/z 538,8258 (figura 70). A partir desses dados, pôde-se inferir que o composto possui uma massa molecular de 1037,6849 Da e a fórmula molecular de $C_{50}H_{91}O_{12}N_{11}$.

Figura 70. Espectro de massas de alta resolução do composto AT1M3I-3 (HRMS ESI⁺, intervalo 500–1200 Da).

A diferença de massa entre os isômeros AT1M3I-4 e AT1M3I-5 e o composto AT1M3I-3 é de 14 Da. Isso indica que também neste caso as estruturas devem diferir entre si em apenas 1 resíduo de aminoácido. Para confirmar essa afirmação, realizou-se a fragmentação do íon pseudomolecular [M+H]⁺ em m/z 1038,83. O espectro de massas obtido da fragmentação encontra-se na figura 71. A partir das quebras observadas, foi proposta a sequência Oc-Aib-Gly-Val-Aib-Gly-Gly-Val-Aib-Gly-Ileu-Leoul para o peptídeo AT1M3I-3. Ou seja, para este peptídeo (AT1M3I-3) ambos aminoácidos nas posições 3 e 7 são Val.

A desreplicação utilizando o banco de dados *Peptaibol Database* indicou que este composto é o lipopetaibol trikoningina KB I. Este composto foi isolado em 1993 por Auvin-Guette *et al.*⁸⁴, a partir do extrato do fungo *Trichoderma koningii* coletado no Uruguai. Nesse estudo, o fungo *T. koningii* foi selecionado para a avaliação química devido às suas propriedades antagonistas frente a outros fungos.

Figura 71. Análise do espectro de massas de alta resolução obtido para a fragmentação do íon m/z 1038,83 do composto AT1M3I-3 (ESI⁺, EC 30 V).

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C ($\text{MeOH}-d_4$), IV, HRMS, DC e UV para o composto AT1M3I-3 estão disponíveis no volume 2, apêndices 194 – 1204.

Com o objetivo de avaliar se os compostos AT1M3I-3 e a trikoningina KB I apresentam a mesma estereoquímica, determinou-se também o valor da rotação ótica para o composto AT1M3I-3. O valor medido foi de $[\alpha]_D^{21}$: $+28.0^\circ$ ($c = 0,02$, MeOH). Na literatura, a trikoningina KB I apresenta $[\alpha]_D^{20}$: -22.3° ($c = 0,5$, MeOH)⁸⁵. Valores de rotação específica com sinais invertidos sugerem que os compostos devem possuir uma estereoquímica diferente entre si. Entretanto, devido à pouca massa obtida para o composto AT1M3I-3, a sua análise de Marfey ainda não foi realizada. Esta deverá ser realizada para a confirmação das observações realizadas até o momento.

A análise da estruturas dos quatro peptaibóis isolados da fração AT1M3I, indica que nossos dados estão em concordância com os dados da literatura. As peptaibóis sintetases são membros da família das NRPS caracterizadas por uma organização de domínio multimodular. Esses módulos são, em geral, bem conservados⁷². Porém, rearranjos genômicos podem levar a uma modificação na ordem sequencial desses domínios⁷². A transferência de domínio devido à

recombinação e, em parte, por transferência gênica horizontal contribuiu significativamente para a evolução das peptaibol sintetases⁷².

Transferências laterais de gene podem explicar o fato de que dois dos peptaibóis isolados neste estudo serem produzidos por outras espécies de fungos. Esses são a trichogina A IV, produzida por *T. longibrachiatum*⁸²; e a trikoningina KB I, produzida por *T. koningi*⁸³. Observamos correlação entre esses compostos, pois foi verificada alteração gradual dos resíduos de Leu nas posições 3 e 7 por resíduos de Val, sendo possível o isolamento dos compostos intermediários. Entretanto, nos casos mencionados acima, esses compostos foram isolados juntamente com outros peptaibóis que não apresentam correlações com os observados nesse estudo. Esses resultados concordam com a flexibilidade de substratos das peptaibóis sintetases.

3.4.3.2. Determinação estrutural dos compostos da fração AT1M5O

A separação cromatográfica da fração AT1M5O levou à obtenção de 5 frações, das quais 2 correspondiam a compostos puros. Os compostos AT1M5O-4 e AT1M5O-5 mostraram ser majoritários. Foram isolados com um rendimento de 9,3% para AT1M5O-4 e 7,0% para AT1M5O-5 com relação à fração AcOEt. O espectro de massas de alta resolução para esses compostos apresentou vários íons pseudomoleculares (figura 72). O íon de maior massa apresentava m/z de 1163,6742, para AT1M5O-4 (formula molecular de $C_{53}H_{91}O_{15}N_{14}$), e m/z 1177,6910 para AT1M5O-5 (formula molecular de $C_{54}H_{93}O_{15}N_{14}$), com diferença de massa de 14 Da entre os compostos.

Figura 72. Espectros de massas de alta resolução dos compostos AT1M5O-4 e AT1M5O-5 (HRMS ESI⁺, intervalo 500–1200 Da).

Entretanto, os espectros de RMN de ^{13}C dos dois compostos apresentavam um número de sinais de carbono maior do que o número indicado pelas fórmulas moleculares. A figura 73 mostra o espectro de carbono para o composto AT1M5O-4. Assim, considerou-se que os íons não eram os íons pseudomoleculares protonados, mas sim de fragmentos observados a baixa voltagem de ionização. Espectros de

massas de alta resolução adicionais foram obtidos, no intervalo de massa de 200 a 5000 Da (figura 74).

Figura 73. Espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-4 (MeOH- d_4 , 151 MHz).

O espectro de massas de alta resolução no modo negativo de ionização para o composto AT1M5O-4, apresentou um íon pseudomolecular $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ em m/z de 1982,1101. Com este resultado, pôde-se inferir que o composto apresenta uma massa molecular de 1936,3190 Da e fórmula molecular de $\text{C}_{90}\text{H}_{149}\text{O}_{24}\text{N}_{23}$. Para o composto AT1M5O-5, o espectro de massas de alta resolução no modo negativo de ionização apresentou íon pseudomolecular $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ em m/z de 1995,1285. Assim, AT1M5O-5 apresenta massa molecular de 1950,3460 Da e fórmula molecular de $\text{C}_{91}\text{H}_{151}\text{O}_{24}\text{N}_{23}$.

Figura 74. Expansão dos espectros de massas de alta resolução dos compostos AT1M5O-4 e AT1M5O-5 no intervalo de 200-5000 Da (HRMS ESI⁻).

A desreplicação para AT1M5O-4 no *Dictionary of Natural Products*, considerando o intervalo de massa entre 1936 e 1938 Da, e o tipo de organismo o qual o produto natural é proveniente, Ascomycetes (Ascomycetes), indicou como resultado três compostos da classe dos peptaibóis paracelsinas, dois da classe dos peptaibóis trichocelinas e o peptaibol trichokonina VI. Ambos são peptaibóis de cadeias longas, com 20 resíduos de aminoácidos.

Algumas características são típicas dos espectros de massas para os peptaibóis de 20 resíduos. Destacam-se íons com duplas e triplas cargas, assim como dímeros triplamente carregados. Outra característica importante é a observação de dois fragmentos principais. Resíduos de Pro são freqüentemente encontrados em peptaibóis longos (7% da composição). Usualmente, se localizam no centro das cadeias⁷³. Uma das características comuns dos espectros de massas de peptaibóis longos é a fragmentação da ligação da amina secundária entre Aib13-Pro14⁸⁶. A

clivagem dessa ligação leva à formação de fragmentos do tipo “íons acílio”, levando à formação de dois fragmentos principais. Esses picos diagnósticos são comumente utilizados para a caracterização de peptaibóis de cadeia longa.

Os espectros de massas de alta resolução no modo positivo dos peptídeos AT1M5O-4 e AT1M5O-5 têm como característica comum a presença de íons pseudomoleculares em m/z 774,45. Esse íon também foi observado nos espectros de massas dos peptaibóis: atroviridinas D, E, G, H e I, alamethicina F 50, polysporina B⁸⁷, algumas trichokonina e as paracelsinas. O pico diagnóstico em m/z 774,45⁸⁸ se refere a fragmentação no resíduo Pro na posição 14. O valor de massa de 774,45 corresponde à sequência C-terminal Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol.

Esses dados indicaram que os compostos AT1M5O-4 e AT1M5O-5 apresentam a mesma sequência C-terminal que os compostos descritos acima. Com o intuito de obter a sequência completa dos dois fragmentos carregados complementares, b_{13} e y_7 , dos peptídeos isolados, realizou-se então a fragmentação do íon pseudomolecular complementar. A fragmentação foi realizada no íon pseudomolecular em m/z de 1163,67 para AT1M5O-4 e no íon pseudomolecular em m/z de 1177,69 para AT1M5O-5 (figura 75 e figura 76).

Figura 75. Análise do espectro de massas de alta resolução obtido para a fragmentação do íon complementar m/z 1163,77 do composto AT1M5O-4 (ESI⁺, 35 V).

Figura 76. Análise do espectro de massas de alta resolução obtido para a fragmentação do íon complementar m/z 1177,79 do composto AT1M5O-5 (ESI⁺, 35 V).

A sequência de aminoácidos obtida pela fragmentação para o composto AT1M5O-4, foi Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib. Para o composto AT1M5O-5, a sequência de aminoácidos obtida pela fragmentação é Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Aib-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib. A diferença entre os dois peptaibóis consiste na substituição de um resíduo de Ala na posição 6 do peptídeo AT1M5O-4 por um resíduo de Aib no peptídeo AT1M5O-5.

Com a sequência de aminoácidos determinada, foi possível identificar os compostos utilizando a base de dados *Peptaibol Database*. Os compostos AT1M5O-4 e AT1M5O-5 foram identificados como a trichokonina VI (figura 77) e a trichokonina VIII (figura 78), respectivamente. As trichokoninas VI e VIII foram isoladas em 1995, por Huang *et al.*⁸⁹ a partir de culturas do fungo *T. koningii*. Esse mesmo fungo é produtor da trikoningina KBI (AT1M3I-3), também por nós isolada do meio de cultivo de *Hypocrea* sp. (AT1).

Figura 77. Atribuição dos fragmentos carregados complementares, b_{13} e y_7 , obtidos no espectro de massas de alta resolução do composto AT1M5O-4 (HRMS ESI⁺). Fonte: autoria própria.

Figura 78. Atribuição dos fragmentos carregados complementares, b_{13} e y_7 , obtidos no espectro de massas de alta resolução do composto AT1M5O-5 (HRMS ESI⁺). Fonte: autoria própria.

Os valores de rotação específica determinados para o composto AT1M5O-4 foi de $[\alpha]_D^{21}$: -9.0° (c = 0,02, MeOH). Na literatura, a trichokonina VI apresenta $[\alpha]_D^{20}$: -10.0° (c = 0,2, MeOH)⁹⁰. Para o composto AT1M5O-5, trichokonina VIII, o valor medido

foi de $[\alpha]_D^{21}$: -23.0° ($c = 0,02$, MeOH). Não foram encontrados valores de $[\alpha]_D$ para a trichokonina VIII na literatura.

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C (em MeOH- d_4 e DMSO- d_6), COSY, HMBC, HSQC, HSQC-TOCSY, ROESY, IV, HRMS, DC e UV para os compostos AT1M5O-4 e AT1M5O-5 estão disponíveis no volume 2, apêndices 189 – 218 e apêndices 219 – 248, respectivamente.

Os peptaibóis isolados do meio de cultura do fungo *Hypocrea* sp. apresentam considerável heterogeneidade, tanto em extensão quanto em composição e sequência de aminoácidos.

3.4.4. Análise conformacional dos peptaibóis isolados

3.4.4.1. Dicroísmo circular (DC)

Em geral, os peptaibóis apresentam espectros de dicroísmo circular típicos de peptídeos com estruturas helicoidais, apresentando bandas de efeito Cotton negativas em aproximadamente 205-209 e 221-226 nm e bandas de efeito Cotton positivas em aproximadamente 192-198 nm. Como os esqueletos são estruturados pela formação de ligações de hidrogênio, tendem a mostrar pouca dependência de solvente, embora seus espectros (especialmente as posições das bandas de efeito Cotton) exibem uma dependência da constante dielétrica de solvente. Na figura 79, são apresentados os espectros de dicroísmo circular em MeOH para os peptaibóis isolados. Os dados foram obtidos na mesma concentração para todos os compostos.

Figura 79. Espectros de dicroísmo circular para os peptaibóis AT1M3I-3, AT1M3I-4, AT1M3I-5, AT1M3I-6, AT1M5O-4 e AT1M5O-5 em MeOH ($c = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$).

Apesar das características comuns dos espectros de DC dos peptaibóis isolados, podemos observar 2 padrões para o conjunto de compostos. Os espectros de DC para os peptaibóis AT1M3I-3, AT1M5O-4 e AT1M5O-5 (figura 80) exibem um mínimo em 209-211 nm, um mínimo alargado em 220-222 nm referente à transição do tipo $n-\pi^*$, e um máximo positivo perto de 194 nm característico de uma conformação α -hélice⁸⁹. Os espectros de DC para os peptaibóis AT1M5O-4 e AT1M5O-5 são comparáveis tanto no formato da curva, como na posição e magnitude da banda.

Figura 80. Espectros de dicroísmo circular para os peptaibóis AT1M3I-3, AT1M5O-4 e AT1M5O-5 em MeOH ($c = 0,15 \text{ mg mL}^{-1}$).

Os espectros dos compostos AT1M3I-4, AT1M3I-5 e AT1M3I-6 (figura 81). Apresentam, por sua vez, duas bandas de efeito Cotton mínimas em torno de 205-209 nm referente a transições do tipo $\pi-\pi^*$, acompanhado de um mínimo discreto entre 220 nm referente a transição do tipo $n-\pi^*$. E um máximo positivo perto de 194 nm, característico de uma conformação α -hélice⁸².

Figura 81. Espectros de dicroísmo circular para os peptaibóis AT1M3I-4, AT1M3I-5 e AT1M3I-6 em MeOH ($c = 0,15 \text{ mg mL}^{-1}$).

O aminoácido mais comum em peptaibóis longos é o Aib. Cerca de 40% de todos os resíduos de peptaibóis são Aib⁹¹. Os peptaibóis de cadeia longa necessitam de uma maior porcentagem do aminoácido Aib para sua estabilização, já que este aminoácido confere uma maior hidrofobicidade devido aos efeitos estéricos promovidos pelas interações das suas metilas em β ⁹². Com base em estudos teóricos, o resíduo de Aib foi proposto como sendo um forte promotor de conformações helicoidais do tipo 3_{10} -hélices⁹². Sendo assim, acredita-se que os conteúdos de Aib nos peptaibóis seja determinante para suas conformações⁹¹. Dependendo da quantidade de resíduos Aib e de seu comprimento, os peptaibóis podem adotar uma conformação pura 3_{10} -, pura α -, ou uma mistura de 3_{10} -/ α -hélice⁹². Em peptaibóis de 8 ou mais resíduos, uma conformação do tipo α -hélice é observada se a composição de Aib não excede a 50% dos resíduos⁹². Assim, como observado pelos espectros de DC, os peptaibóis AT1M3I-3, AT1M3I-4, AT1M3I-5, AT1M3I-6, AT1M5O-4 e AT1M5O-5 possuem uma conformação do tipo α -hélice.

As diferenças verificadas para os espectros de DC do peptaibol AT1M3I-3 com relação aos dos peptaibóis AT1M3I-6, AT1M3I-5 e AT1M3I-4 (os lipopeptaibóis) podem ser atribuídas às diferenças estruturais pontuais entre eles. Essa diferença consiste na substituição dos resíduos de Leu das posições 3 e 7 por 2 resíduos de Val. A Leu tem uma maior preferência pela formação em α -hélice⁹³. Assim, a diferença notada entre os espectros de DC desses compostos deve estar relacionada com o microambiente observado na sequência peptídica do AT1M3I-3.

Os peptaibóis AT1M5O-4 e AT1M5O-5 possuem uma menor hidrofobicidade, já que apresentam em suas sequências resíduos de aminoácidos mais polares, como a Gln. Já os resíduos de Pro tendem a romper as estruturas helicoidais devido à ausência do grupo N-H, necessário para as interações de hidrogênio intramoleculares. Acredita-se que resíduos de Pro podem ser responsáveis por produzir torções do tipo β , curvas em hélices ou giros⁷⁶.

3.4.4.2. Determinação da configuração absoluta dos aminoácidos por derivatização com o reagente de Marfey

A alteração entre aminoácidos *L* e *D* em peptídeos pode provocar variações significativas em relação à sua estabilidade e atividade biológica⁹⁴. Em consequência disso, é essencial estabelecer a configuração absoluta de compostos biologicamente ativos. Entretanto, o exame da pureza ou racemização continua sendo um desafio analítico.

O método de Marfey é amplamente utilizado para caracterização estrutural de peptídeos, confirmação de racemização na síntese de peptídeos e detecção de *L* ou *D*-aminoácidos⁹⁴. No método de Marfey, os peptídeos e proteínas são hidrolisados. Em seguida, os aminoácidos resultantes reagem por meio de uma substituição nucleofílica aromática com o reagente quiral de Marfey (1-Fluoro-2,4-dinitrofenil-5-*L*-alaninamida, FDAA, **4**). O reagente de Marfey adiciona um grupo cromóforo de alta afinidade e introduz um novo centro quiral, tornando os aminoácidos derivatizados diastereoisômeros. Dessa forma, qualquer aminoácido proteinogênico apresentará, depois de derivatizado com o reagente de Marfey, diferente tempo de retenção em análise por HPLC.

Para o estabelecimento da estereoquímica dos aminoácidos dos peptídeos isolados neste estudo, foi realizada a análise de Marfey. Os aminoácidos provenientes das hidrólises dos peptídeos foram derivatizados com o reagente de Marfey para comparação com os padrões derivatizados. Foram utilizados como padrões os seguintes aminoácidos: (*L*)-Val, (*L*)-Leu, (*L*)-Ile, (*L*)-Pro, (*L*)-Gln e (*L*)-Ala. Cada aminoácido foi separadamente derivatizado com o reagente de Marfey, sob condições alcalinas, a 40°C por 1 h, como descrito no esquema 29 para a Val. Após as reações, alíquotas dos aminoácidos padrão derivatizados foram analisadas por CLAE-UV-EM utilizando uma coluna de fase reversa C18 (Waters® X-terra). Os cromatogramas e os espectros de massas para cada aminoácido, encontram-se no volume 2, apêndices de 265 a 270.

Esquema 29. Reação de derivatização da (L)-Val com o reagente de Marfey (FDAA) sob condições alcalinas.

Os peptaibóis isolados foram hidrolisados, sob condições ácidas, a 90°C por 24 h. Após a reação, sobre uma solução do produto das reações de hidrólise em água e NaHCO₃, adicionou-se uma solução do reagente de Marfey em acetona. A reação permaceu sob agitação, a 40°C, por 1 h. Após este período, as misturas reacionais resultates foram secas, redissolvidas em MeOH e analisadas por CLAE-UV-EM utilizando uma coluna de fase reversa C18 (Waters® X-terra). Os cromatogramas e os espectros de massas para cada peptaibol, encontram-se no volume 2, apêndices de 274 a 278. A análise de Marfey ainda não foi realizada para o composto AT1M3I-3 por este peptídeo ter sido obtido em pequena quantidade.

Foram também preparadas soluções padrões dos aminoácidos derivatizados de acordo com a composição de aminoácido de cada peptaibol. Para comparação com o peptaibol AT1M3I-6, preparou-se uma solução com (L)-Leu-FDDA e (L)-Ile-FDDA, denominada mistura 1. Para comparação com os peptaibóis AT1M3I-5 e AT1M3I-4, preparou-se uma solução com (L)-Val-FDDA, (L)-Leu-FDDA e (L)-Ile-FDDA, denominada mistura 2. Para comparação com os peptaibóis AT1M5O-4 e AT1M5O-5, preparou-se uma solução com (L)-Val-FDDA, (L)-Leu-FDDA, (L)-Pro-FDDA, (L)-Gln-FDDA e (L)-Ala-FDDA, denominada mistura 3. Os dados cromatograficos e de massas para cada uma dessas misturas também encontram-se disponíveis no volume 2, apêndices de 271 a 273. Todas as análises cromatográficas foram realizadas no mesmo dia para evitar alterações no tempo de retenção dos picos dos aminoácidos

De posse dos dados cromatograficos de cada mistura, esses foram comparados com os cromatogramas obtidos para os peptaibóis. As figuras 82, 83, 84,

85, 86 e 87 mostram a comparação dos dados cromatográficos dos peptaibóis AT1M3I-6, AT1M3I-5 e AT1M3I-4 e das misturas 1 e 2, respectivamente.

Figura 82. Comparação dos cromatogramas obtidos das reações de Marfey para o composto AT1M3I-6 (em preto) hidrolisado e para a mistura 1 (em azul, 280 nm). Tempo de retenção: (L)-Ile-FDAA - 22,03 min, (L)-Leu-FDAA - 22,36 min.

Figura 83. Expansão da comparação dos cromatogramas obtidos das reações de Marfey para o composto AT1M3I-6 (em preto) hidrolisado e para a mistura 1 (em azul, 280 nm). Tempo de retenção: (L)-Ile-FDAA - 22,03 min, (L)-Leu-FDAA - 22,36 min.

Figura 84. Comparação dos cromatogramas obtidos das reações de Marfey para o composto AT1M3I-5 hidrolisado (em preto) e para a mistura 2 (em azul, 280 nm). Tempo de retenção: (L)-Val-FDAA - 20,31 min, (L)-Ile-FDAA - 22,05 min, (L)-Leu-FDAA - 22,38 min.

Figura 85. Expansão da comparação dos cromatogramas obtidos das reações de Marfey para o composto AT1M3I-5 hidrolisado (em preto) e para a mistura 2 (em azul, 280 nm). Tempo de retenção: (L)-Val-FDAA - 20,31 min, (L)-Ile-FDAA - 22,05 min, (L)-Leu-FDAA - 22,38 min.

Figura 86. Comparação dos cromatogramas obtidos das reações de Marfey para o composto AT1M3I-4 hidrolisado (em preto) e para a mistura 2 (em azul, 280 nm). Tempo de retenção: (L)-Val-FDAA - 20,31 min, (L)-Ile-FDAA - 22,05 min, (L)-Leu-FDAA - 22,38 min.

Figura 87. Expansão da comparação dos cromatogramas obtidos das reações de Marfey para o composto AT1M3I-4 hidrolisado (em preto) e para a mistura 2 (em azul, 280 nm). Tempo de retenção: (L)-Val-FDAA - 20,31 min, (L)-Ile-FDAA - 22,05 min, (L)-Leu-FDAA - 22,38 min.

Nas comparações dos cromatogramas dos peptaibóis AT1M3I-6, AT1M3I-5 e AT1M3I-4 com os cromatogramas obtido para as misturas dos aminoácidos, foi possível observar que os tempo de retenção dos aminoácidos padrão estão muito próximos aos tempo de retenção dos aminoácidos dos produtos naturais. Esses dados indicam que o peptaibol AT1M3I-6 é formado por resíduos de (L)-Leu e (L)-Ile, como verificado pela comparação dos valores de $[\alpha]_D$ observado com os da literatura. Os peptaibóis AT1M3I-5 e AT1M3I-4, por sua vez, são formados por resíduos de (L)-Val, (L)-Leu e (L)-Ile (figura 88).

Figura 88. Estruturas dos peptaibóis AT1M3I-6, AT1M3I-5 e AT1M3I-4.

As figuras 89, 90, 91 e 92 mostram a comparação dos dados cromatográficos dos peptaibóis AT1M5O-4 e AT1M5O-5 com os obtidos para a mistura 3.

Figura 80. Comparação dos cromatogramas obtidos das reações de Marfey para o composto AT1M5O-4 hidrolisado (em azul) e para a mistura 3 (em preto, 280 nm). Tempo de retenção: (L)-Gln-FDAA - 15,28 min, (L)-Pro-FDAA - 19,92 min, (L)-Ala-FDAA - 17,36 min (L)-Val-FDAA - 20,30 min, (L)-LeuFDAA - 22,36 min.

Figura 90. Expansão da comparação dos cromatogramas obtidos das reações de Marfey para o composto AT1M5O-4 hidrolisado (em azul) e para a mistura 3 (em preto, 280 nm). Tempo de retenção: (L)-Gln-FDAA - 15,28 min, (L)-Pro-FDAA - 19,92 min, (L)-Ala-FDAA - 17,36 min (L)-Val-FDAA - 20,30 min, (L)-LeuFDAA - 22,36 min.

Figura 91. Comparação dos cromatogramas obtidos das reações de Marfey para o composto AT1M5O-5 hidrolisado (em azul) e para a mistura 3 (em preto, 280 nm). Tempo de retenção: (L)-Gln-FDAA - 15,28 min, (L)-Pro-FDAA - 19,92 min, (L)-Ala-FDAA - 17,36 min (L)-Val-FDAA - 20,30 min, (L)-LeuFDAA - 22,36 min.

Figura 92. Expansão da comparação dos cromatogramas obtidos das reações de Marfey para o composto AT1M5O-5 hidrolisado (em azul) e para a mistura 3 (em preto, 280 nm). Tempo de retenção: (L)-Gln-FDAA - 15,28 min, (L)-Pro-FDAA - 19,92 min, (L)-Ala-FDAA - 17,36 min (L)-Val-FDAA - 20,30 min, (L)-LeuFDAA - 22,36 min.

Nas comparações dos cromatogramas dos peptaibóis AT1M5O-4 e AT1M5O-5 e as misturas dos aminoácidos foi possível observar que os tempos de retenção dos aminoácidos padrão são bem próximos dos tempos de retenção dos aminoácidos dos produtos naturais. Portanto, pode-se concluir que os peptaibóis AT1M5O-4 e AT1M5O-5 são formados por resíduos de (L)-Val, (L)-Leu, (L)-Pro, (L)-Gln e (L)-Ala (figura 93).

Figura 9. Estruturas dos peptaibóis AT1M5O-4 e AT1M5O-5.

3.4.5. Bioatividade dos compostos AT1M5O-4 e AT1M5O-5

Os compostos AT1M5O-4 e AT1M5O-5 tiveram suas bioatividades avaliadas em bioensaios antimicrobiano, anticâncer e antimalárico. A tabela 13 traz os valores determinados para a concentração inibitória mínima (CIM) obtidos para o bioensaio antimicrobiano. Para este ensaio foram utilizadas cepas de bactérias multirresistentes da coleção da *American Type Culture Collection* (ATCC/USA) e da *National Collection of Type Cultures* (NCTC/UK). Também foram utilizados isolados clínicos (IC) de pacientes com infecções causadas por bactérias multirresistentes, cedidas pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

Tabela 13. Avaliação da mínima concentração inibitória (MIC) em μM , frente a bactérias multirresistentes dos peptaibóis AT1M5O-4 e AT1M5O-5.

Bactérias	AT1M5O-4	AT1M5O-5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	6,46	12,82
<i>Staphylococcus aureus</i> Isolado Clínico LaPeMA 209	6,46	6,41
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	12,91	12,82
<i>Staphylococcus epidermidis</i> Isolado Clínico LaPeMA 177	12,91	12,82
<i>Enterococcus faecalis</i> NCTC 775	3,23	3,20
<i>Enterococcus faecalis</i> Isolado Clínico LaPeMA 181	6,46	6,41
<i>Enterococcus faecium</i> NCTC7171	12,91	12,82
<i>Escherichia coli</i> BAA 198	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Isolado Clínico LaPeMA 136	>100	>100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Isolado Clínico LaPeMA 126	>100	>100
Bactérias	Tetraciclina	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1,66	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0,83	

*Concentrações das amostras avaliadas = 0,024 μM a 51,65 μM . Concentrações do controle positivo testado (Tetraciclina) = 0,025 μM a 13,27 μM . Controles para bactérias: *Escherichia coli* ATCC 25922 - Faixa de CIM: 1,12 - 4,50 μM ; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 - Faixa de CIM: 0,27 - 2,25 μM .

Os compostos AT1M5O-4 e AT1M5O-5 se mostraram ativos contra bactérias Gram-positivas. Para as bactérias, *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus aureus* (isolado Clínico LaPeMA 209), *Enterococcus faecalis* (isolado Clínico LaPeMA 181), observou uma inibição significativa, com valores de MIC abaixo de 7 μ M. Para *Enterococcus faecalis* (NCTC 775), a MIC foi ainda melhor, com valores inferiores a 3,5 μ M. Porém, os peptaibóis foram inativos frente à bactérias Gram-negativas.

Antibiose é uma estratégia amplamente utilizada para defesa por *Trichoderma* spp.⁹¹. Estes fungos produzem uma grande variedade de antibióticos, como a gliovirina, a gliotoxina, a viridina, as pironas e os peptaibóis, contra fitopatógenos fúngicos⁹¹. O efeito antimicrobiano das trichokoninas também foi avaliado⁹⁵. Os peptaibóis avaliados apresentaram um amplo espectro de ação, com inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas, leveduras e fungos. Porém, as trichokoninas se mostraram inativas contra bactérias Gram-negativas, incluindo *Escheria Coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Estes dados sugerem que o alvo das trichokoninas seja a parede celular da bactéria.

Em muitos estudos, as atividades biológicas observada para os peptaibóis é atribuída à sua capacidade de formação de canais nas bicamadas lipídicas das membranas celulares, devido as suas propriedades anfifílicas⁷⁰. Seja na forma de moléculas únicas, ou na forma de agregados como no caso dos peptaibóis de cadeia curta ou média⁷³. A trichokonina VI (AT1M5O-4), por exemplo, é conhecida por induzir a formação de canais artificiais permeáveis ao Ca^{2+} em membranas cardíacas⁷³.

A capacidade da formação de canais na bicamada lipídica se deve principalmente à presença dos aminoácidos aromáticos nos terminais N e C⁹¹. Isso os coloca na interface da bicamada, posição estratégica para a estabilização dos segmentos transmembranares pela interação com os grupos polares das cabeças dos lipídeos das membranas⁹¹. O resíduo de Gln na posição 7 também apresenta papel crucial no controle do fluxo iônico através de um poro transmembrana⁹¹. Além disso, acredita-se que os resíduos de Pro podem estar relacionados às propriedades de formação de canais iônicos desses peptaibóis⁷⁶. Os resíduos nas sequências que não são Aib ou Gln, são principalmente não polares ou alifáticos. Um grande conteúdo alifático seria esperado para os peptídeos transmembrana⁹¹. A maximização das interações hidrofóbicas fornece uma força motriz para a inserção na membrana.

Os peptaibóis AT1M5O-4 e AT1M5O-5 também se mostraram ativos em ensaios de citotoxicidade contra células tumorais (tabela 14). A citotoxicidade dos compostos foi avaliada frente às linhagens MCF-7 (câncer de mama), MCF-10A (células epiteliais da mama não tumorigênica), ACP01 (adenocarcinoma gástrico), HELA (câncer cervical) e A549 (carcinoma de pulmão caucasiano). Os compostos foram ativos frente à todas as linhagens. Ambos apresentaram valores de IC₅₀ na faixa de 4 a 1 µM. O peptaibol AT1M5O-5 (trichokonina VIII) apresentou os menores valores de IC₅₀ contra todas as linhagens.

Tabela 14. Concentração inibitória de 50% (IC₅₀) contra células cancerígenas.

	IC ₅₀ (µM)				
	MCF-7	MCF-10A	ACP01	HELA	A549
AT1M5O-4	3,8±1,6	1,2±0,5	2,8±0,4	4,0±1,1	4,1±0,6
AT1M5O-5	2,9±1,1	1,7±0,8	2,5±1,0	3,0±0,6	2,8±1,2

Ao contrário do AT1M5O-4, a atividade citotóxica do peptaibol AT1M5O-4 (trichokonina VI) é bem conhecida. Shi *et al.*⁹⁶ realizaram um estudo no qual a trichokonina VI induziu a inibição do crescimento de células de carcinoma hepatocelular de maneira dose-dependente, não influenciando a viabilidade das células sádias. A supressão da viabilidade celular resultou da morte celular programada (DCP) com características de apoptose e autofagia⁹⁶. Um influxo de Ca²⁺ desencadeou a ativação da µ-calpaína e procedeu à translocação de Bax para mitocôndrias e posterior promoção de apoptose⁹⁶. Estes resultados demonstraram que a trichokonina VI pode ser utilizada como regulador envolvido tanto na apoptose como na autofagia⁹⁶. E, como pôde ser avaliado neste estudo, a trichokonina VIII apresenta atividade citotóxica ainda mais pronunciada que a trichokonina VI. Assim, estes compostos apresentam um potencial promissor como supressores de células tumorais.

Esses compostos também foram avaliados quanto à sua atividade antiplasmodial. Ambos peptaibóis apresentaram valores de inibição abaixo de 1 μM frente a *P. falciparum*, cepa 3d7, sensível a cloroquina (tabela 15).

Tabela 15. Concentração inibitória de 50% (IC_{50}) contra *P. falciparum*, cepa 3d7, sensível a cloroquina.

IC_{50} (μM)	
AT1M5O-4	$0,6 \pm 0,2$
AT1M5O-5	$0,5 \pm 0,2$

Os compostos AT1M5O-4 e AT1M5O-5 foram ativos, com IC_{50} de $0,6 \pm 0,2$ e $0,5 \pm 0,2$ μM , respectivamente. Os peptaibóis também foram testados contra células humanas da linhagem HepG2 na concentração inicial de 100 μM . Os compostos foram visualizados em microscópio óptico após adição na placa com células, para avaliar se ocorreu precipitação dos compostos e para validar a dose inicial ideal de cada composto teste. As amostras apresentaram índices de seletividade de 27,1 e 13,6 (tabela 16). Valores de IS acima de 10 são indicativos a compostos razoavelmente bem tolerados por células normais.

Tabela 16. Avaliação da atividade citotóxica contra células HepG2 e cálculo de índice de seletividade ($\text{MDL}_{50}/\text{IC}_{50}$).

	IC_{50} μM <i>Pf</i> 3D7	MCL_{50} μM HepG2	Índice de Seletividade
AT1M5O-4	$0,6 \pm 0,2$	17 ± 3	27,9
AT1M5O-5	$0,5 \pm 0,2$	7,32	13,8

A bioatividade de peptaibóis frente a *P. falciparum* foi relatada em dois estudos. Um deles se refere ao extrato etanólico bruto do fungo *Trichoderma stromaticum*⁹⁷, e o outro a uma mistura de peptaibóis⁹⁸. Neste estudo, relatamos a atividade

antiplasmodial de peptaibóis isolados. Deverão ser realizados estudos futuros relativos ao mecanismo de ação, avaliação dos efeitos da interação combinatória dos peptaibóis com outros fármacos utilizados no tratamento da malária, bem como a avaliação da bioatividade dos peptaibóis minoritários.

Apesar do promissor potencial farmacológico, a utilização de peptídeos e proteínas como fármacos apresentam diversas limitações. Peptídeos e proteínas são susceptíveis a proteólise, sendo rapidamente metabolizados. Os peptidomiméticos são compostos orgânicos análogos a peptídeos e proteínas naturais, cujos elementos essenciais (farmacóforos) possuem a mesma capacidade de interagir com o alvo biológico⁹⁹. Estas moléculas sintéticas permitem que os fármacos peptideomiméticos sejam otimizadas para serem seletivas, biodisponíveis e possuírem as propriedades farmacocinéticas desejáveis⁹⁹. Estudos para a avaliação da relação estrutura-atividade devem ser realizados para definir quais são os elementos farmacóforos e identificar os principais resíduos de aminoácidos responsáveis pelo efeito biológico das trichokoninas.

3.5. Conclusões

Com esse estudo podemos concluir que os peptaibóis produzidos por espécies de *Trichoderma/Hypocrea* são consideravelmente heterogêneos, tanto em extensão quanto em composição e sequência de aminoácidos. Culturas de uma única linhagem podem ser compostas por vários peptaibóis, como observado. A partir da linhagem fúngica *Hypocrea* sp., oriunda da Antártica, foram isolados 6 peptaibóis.

Da fração AT1M3I, foram isolados os seguintes compostos: a trichogina GA IV (AT1M3I-6), os isômeros AT1M3I-4 e AT1M3I-5, e AT1M3I-3, de esqueleto semelhante à trikoningina KB (figura 99). Da fração AT1M5O, foram isoladas a trichokonina VI (AT1M5O-4) e a trichokonina VIII (AT1M5O-5, figura 94). Esses compostos são majoritários da fração AcOEt.

A trichokonina VI e a trichokonina VIII foram avaliadas em bioensaios contra bactérias multirresistentes, citotóxico e antimalárico. Mostraram ser ativos frente a bactérias Gram-positivas, algumas linhagens de células cancerígenas (MCF-7, MCF-

10A, ACP01, HELA e A549) e frente ao parasita *P. falciparum*, cepa 3D7, sensível a cloroquina. A trichokonina VI e a trichokonina VIII foram ativas contra *P. falciparum* com IC_{50} de $0,6 \pm 0,2$ e $0,5 \pm 0,2$ μM , respectivamente. As amostras foram toleradas pelas células HepG2, com IS de 27,9 e 13,8. Este é o primeiro estudo no qual as propriedades promissoras desses compostos para o desenvolvimento de novas drogas antimaláricas é relatado.

Figura 94. Compostos isolados do fungo *Hypocrea* sp. oriundo da Antártida.

4. Referências

1 URRUTICOECHEA, A.; ALEMANY, R.; BALART, J.; VILLANUEVA, A.; VIÑALS F.; CAPELLÁ, G. Recent advances in cancer therapy: an overview. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, p. 3-10, 2010.

2 NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311–335, 2012.

3 RANE, R.; SAHU, N.; SHAH, C.; KARPOORMATH, R. Marine bromopyrrole alkaloids: synthesis and diverse medical applications. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 253–273, 2014.

4 BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v. 34, n. 3, p. 235-294, 2017.

5 BHADURY, P. MOHAMMAD, B. T.; WRIGHT, P. C. The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 325–337, 2006.

6 KUSARI, S.; SPITELLER, M. Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities. **Natural Products Reports**, v. 28, p. 1203, 2011.

7 NACIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). **Cancer Statistic**. Washington, 2017. Disponível em: < <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>>. Acesso em: 03 de jun. de 2017.

8 DEMAİN, A. L.; VAISHNAV, P. Natural products for cancer chemotherapy. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 687–699, 2011.

9 CRAGG G. M., NEWMAN D. J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Expert Opinion Investigational Drugs**, v. 9, p. 2783–2797, 2000.

10 KINGHORN, A. D.; CHIN, Y.W.; SWANSON, S. M. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. **Current Opinion in Drug Discovery and Development**, v. 12, p. 189-196, 2009.

11 MARCILLA, A.; MARTIN-JAULAR, L.; TRELIS, M.; MENEZES-NETO, A.; OSUNA, A.; BERNAL, D.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; IGOR C. ALMEIDA, I. C.; PORTILLO, H. A. Extracellular vesicles in parasitic diseases. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, p. 25040, 2014.

12 TDR/WHO. **Leishmaniasis**. Geneva, 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/info/en/index.html>>. Acesso em: 28 Jan. 2015.

13 MISHRA, B. B.; SINGH, R. K.; SRIVASTAVA, A.; TRIPATHI, V. J.; TIWARI, V. K. Fighting against leishmaniasis: search of alkaloids as future true potential anti-leishmanial agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 107–123, 2009.

14 DORLO, T. P. C., BALASEGARAM, M, BEIJNEN, J. H., VRIES, P. J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 11, p. 2576-2597, 2012.

15 NAGLE, A. S.; KHARE, S.; KUMAR, A. B.; SUPEK, F.; BUCHYNSKY, A.; MATHISON, C. J. N.; CHENNAMANENI, N. K.; PENDEM, N.; BUCKNER, F. S.; GELB, M. H.; MOLTENI, V. Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human African trypanosomiasis. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 11305–11347, 2014.

16 SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 139–149, 2004.

17 TANOWITZ, H. B.; KIRCHHOFF, L. V.; SIMON, D.; MORRIS, S. A.; WEISS, L. M.; WITTNER, M. Chagas' disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, n. 4, p. 400-419, 1992.

18 GARCIA, M. N.; WOC-COLBURN, L.; AGUILAR, D.; HOTEZ, P. J.; MURRAY, K. O. Historical perspectives on the epidemiology of human Chagas disease in Texas and recommendations for enhanced understanding of clinical Chagas disease in the Southern United States. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 1, p. 1-15, 2015.

19 OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V. G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L. B.; TAUIL, L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v. 9, p. 115, 2010.

20 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 38 p.

21 SCALA, F.; FATTORUSSO, E.; MENNA, M.; SCAFATI, O. T.; TIERNEY, M.; KAISER, M. Bromopyrrole alkaloids as lead compounds against protozoan parasites. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2162–2174, 2010.

22 MOURABIT, A. A.; POTIER, P. Sponge's molecular diversity through the ambivalent reactivity of 2-aminoimidazole: a universal chemical pathway to the oroidina-based pyrrole-imidazole alkaloids and their palau'amine congeners. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 237–243, 2001.

23 DOMAGALA, A.; JAROSZ, T.; LAPKOWSKI, M. Living on pyrrolic foundations – Advances in natural and artificial bioactive pyrrole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 100, p. 176–187, 2015.

24 TASDEMIR, D.; TOPALOGLU, B.; PEROZZO, R.; BRUN, R.; O'NEILL, R.; CARBALLEIRA, N. M.; ZHANG, X.; TONGE, P. J.; LINDEN, A.; RUEDI, P. Marine natural products from the Turkish sponge *Agelas oroides* that inhibit the enoyl reductases from *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Escherichia coli*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 6834–6845, 2007.

25 TSUKAMOTO, S.; KATO, H.; HIROTA, H.; FUSETANI, N. Pseudoceratidine: a new antifouling spermidine derivative from marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 9, p. 1439–1440, 1996.

26 TSUKAMOTO, S.; KATO, H.; HIROTA, H.; FUSETANI, N. Ceratinamides A and B: new antifouling dibromotyrosine derivatives from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. **Tetrahedron**, v. 52, n. 24, p. 8181–8186, 1996.

27 PONASIK, J. A.; KASSAB, D. J.; GANEM, B. Synthesis of the antifouling polyamine pseudoceratidine and its analogs: factors influencing biocidal activity. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 34, p. 6041–6044, 1996.

28 PONASIK, J. A.; CONOVA, S.; KINGHORN, D. KINNEY, W. A.; RITTSCHOF, D.; GANEM, B. Pseudoceratidine, a marine natural product with antifouling activity: synthetic and biological studies. **Tetrahedron**, v. 54, p. 6977–6986, 1998.

29 BEHRENS, C.; CHRISTOFFERSEN, M. W.; GRAM, L.; NIELSEN, H. P. A convenient synthesis of pseudoceratidine and three analogs for biological evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 3, p. 321–326, 1997.

30 ESSA, A. H.; LERRICK, R. I.; TUNA, F.; HARRINGTON, R. W.; CLEGG, W.; HALL, M. J. Reduction of 2,2,2-trichloro-1-arylethanones by RMgX: mechanistic investigation and the synthesis of substituted α , α -dichloroketones. **Chemical Communications**, v. 49, p. 2756-2758, 2013.

31 MOOSA, B. A.; SAGAR, S.; LI, S.; ESAU, L.; KAUR, M.; KHASHAB, N. M. Synthesis and anticancer evaluation of spermatinamine analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p. 1629–1632, 2016.

32 PINE, S. H.; SANCHEZ, B. L. The formic acid-formaldehyde methylation of amines. **Journal of Organic Chemistry**, v. 36, n. 6, p. 829–832, 1971.

33 FOUDA, A. E.; PFLUM, M. K. H. A cell-permeable ATP analogue for kinase-catalyzed biotinylation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 54, p. 9618–9621, 2015.

34 BARREIRO, E. J.; KÜMMERLE, A. E.; FRAGA, C. A. M. The methylation effect in medicinal chemistry. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 5215–5246, 2011.

35 ADAM, S. HBTU: a mild activant agent of muramic acid. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, p. 571–574, 1992.

36 SCHILLING, C. I.; JUNG, N.; BISKUP, M.; SCHEPERS, U.; BRASE, S. Bioconjugation via azide–Staudinger ligation: an overview. **Chemical Society Review**, v. 40, p. 4840–4871, 2011.

37 BURNS, M. R.; CARLSON, C. L.; VANDERWERF, S. M.; ZIEMER, J. R.; WEEKS, R. S.; CAI, F.; WEBB, H. K.; GRAMINSKI, G. F. Amino acid/spermina conjugates: polyamine amides as potent spermidine Uptake inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 3632–3644, 2001.

38 BOWMAN, W. H.; TABOR, C. W.; TABOR, H. Spermidine biosynthesis. Purification and properties of propylamine transferase from *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 248, p. 2480–2486, 1973.

39 YE, C.; SHREEVE, J. M. Structure-dependent oxidative bromination of unsaturated c–c bonds mediated by selectfluor. **Journal of Organic Chemistry**, v. 24, p. 8561–8563, 2004.

40 RICHARDS, J. J.; BALLARD, T. E.; HUIGENS, R. W.; MELANDER, C. Synthesis and screening of an oroidin library against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **A European Journal of Chemical Biology**, v. 9, p. 1267–1279, 2008.

41 TROEGEL, B.; LINDEL, T. Microwave-assisted fluorination of 2-acylpyrroles: synthesis of fluorohymenidin. **Organic Letters**, v. 14, p. 468–471, 2012.

42 MEISEL, J. W.; PATEL, M. B.; GARRAD, E.; STANTON, R. A.; GOKEL, G. W. Reversal of tetracycline resistance in *Escherichia coli* by noncytotoxic bis(tryptophan)s. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n.33, p. 10571-10577, 2016.

43 WANG, B.; PACHAIYAPPAN, B.; GRUBER, J. D.; SCHIMIDT, M. G.; ZHANG, Y.; WOSTER, P. M. Antibacterial diamines targeting bacterial membranes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, p. 3140–3151, 2016.

44 BAZZINI, P.; WERMUTH, C. G.; D.; RABOISSON, P.; ROGNAN, D. **In the practice of medicinal chemistry**. 4. ed. Amsterdam: Elsevier, 2015. 338 p.

45 WELLS, T. N.; HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN, R.; VAN VOORHIS, W. C. Malaria medicines: a glass half full? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, p. 424–442, 2015.

46 BERMAN, J. J. **Taxonomic Guide to Infectious Diseases: Understanding the Biologic Classes of Pathogenic Organisms**. Amsterdam: Academic Press, 2012. p. 95–98.

47 MIGUEL, D. C.; FLANNERY, A. R.; MITTRA, B.; ANDREWS, N. W. Heme uptake mediated by LHR1 is essential for *Leishmania amazonensis* virulence. **Infection and Immunity**, v. 81, p. 3620–3626, 2013.

48 PELOSO, E. F.; DIAS, L.; QUEIROZ, R. M.; LEME, A. F.; PEREIRA, C. N.; CARNIELLI, C. M.; WERNECK, C. C.; SOUSA, M. V.; RICART, C. A.; GADELHA, F. R. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial trypanothione peroxidase is located throughout the cell and its pull down provides one step towards the understanding of its mechanism of action. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins Proteomics**, v. 1, p. 1–10, 2016.

49 MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K.; ANDREOLI, W. K.; MORTARA, R. A.; ULIANA, S. R. Tamoxifen is effective against *Leishmania* and induces a rapid alkalization of parasitophorous vacuoles harbouring *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 3, p. 526–34, 2007.

50 TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, p. 673–675, 1976.

51 LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **Journal of Parasitology**, v. 65, p. 418–420, 1979.

52 SMILKSTEIN, M.; SRIWILAIJAROEN, N.; KELLY, J. X.; WILAIRAT, P.; RISCOE, M. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, p. 1803–1806, 2004.

53 DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal Immunological Methods**, v. 89, p. 271–277, 1986.

54 GORKA, A. P.; JACOBS, L. M.; ROEPE, P. D. Cytostatic *versus* cytocidal profiling of quinoline drug combinations via modified fixed-ratio isobologram analysis. **Malaria Journal**, v. 12, p. 332, 2013.

55 DONG, G. Recent advances in the total synthesis of agelastatins. **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, n. 12, p. 2231–2246, 2010.

56 DUSPARA, P. A.; BATEY, R. A. A short synthesis of the marine sponge pyrrole-2-aminoimidazole alkaloid ($\pm$)-agelastatin A. **Angewandte Chemistry International Edition**, v. 52, p. 10862–10866, 2013.

57 AMBROSIO, M. D.; GUERRIERO, A.; DEBITUS, C.; RIBES, O.; PUSSET, J.; LEROY, S.; PIETRA, F. Agelastatin A, a new skeleton cytotoxic alkaloid of the oroidin Family. Isolation from the axinellid sponge *Agelas dendromorpha* of the coral sea. **Journal of Chemical Society**, p. 1305–1306, 1993.

58 JOUANNEAU, M.; MCCLARY, B.; REYES, J. C. P.; CHEN, R.; CHEN, Y.; PLUNKETT, W.; CHENG, X.; MILINICHIK, A. Z.; ALBONE, E. F.; LIU, J. O.; ROMO, D. Derivatization of agelastatin A leading to bioactive analogs and a trifunctional probe. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p. 2092–2097, 2016.

59 STOUT, E. P.; CHOI, M. Y.; CASTRO, J. E.; MOLINSKI, T. F. Potent fluorinated agelastatin analogues for chronic lymphocytic leukemia design, synthesis and pharmacokinetic studies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 5085–5093, 2014.

60 STIEN, D.; ANDERSON, G. T.; CHASE, C. E.; KOH, Y.; WEINREB, S. M. Total synthesis of the antitumor marine sponge alkaloid agelastatin A. **Journal of American Chemical Society**, v. 121, p. 9574–9579, 1999.

61 FELDMAN, K. S.; SAUNDERS, J. C. Alkynyliodonium salts in organic synthesis. Application to the total synthesis of (-)-agelastatin A and (-)-agelastatin B. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, p. 9060–9061, 2002.

62 FELDMAN, K. S.; SAUNDERS, J. C.; WROBLESKI, M. L. Alkynyliodonium salts in organic synthesis. Development of a unified strategy for the syntheses of (-)-agelastatin A and (-)-agelastatin B. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, p. 7096–7109, 2002.

63 SHIBATOMI, K.; SOGA, Y.; NARAYAMA, A.; FUJISAWA, I.; IWASA, S. Highly enantioselective chlorination of β -keto esters and subsequent S_N2 displacement of tertiary chlorides: a flexible method for the construction of quaternary stereogenic centers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, p. 9839–9839, 2012.

64 HUANG, N.; NIE, Y.; DING, M. New efficient synthesis of 5-ethoxyoxazoles and oxazolo[3,2-c]quinazolines via aza-Wittig Reactions. **Synlett**, n. 4, p. 0611–0614, 2009.

65 FUKATA, Y.; ASANO, K.; MATSUBARA, S. Facile net cycloaddition approach to optically active 1,5-benzothiazepines. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, p. 5320–5323, 2015.

66 BHADURY, P. MOHAMMAD, B. T.; WRIGHT, P. C. The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 325–337, 2006.

67 ISAKA, M.; SUYARNSESTAKORN, C.; TANTICHAROEN, M.; KONGSAEREE, P.; THEBTARANONTH Y. Aigialomycins A–E, new resorcylic macrolides from the marine mangrove fungus *Aigialus parvus*. **Journal of Organic Chemistry**, v, 67, p. 1561–1566, 2002.

68 OSTERHAGE, C.; KAMINSKY, R.; KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D. Ascosalipyrrolidinone A, an antimicrobial alkaloid, from the obligate marine fungus *Ascochyta salicorniae*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 65, p. 6412–6417, 2000.

69 MIKUCKI, J. A.; HAN S. K.; LANOIL B. D. Ecology of psychrophiles: subglacial and permafrost environments. In: HORIKOSHI, K. **Extremophiles handbook**. Tokyo: Springer, 2011. p. 755-775.

70 MORITA, R. Y. Psychrophilic bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 39, p. 144–167, 1975.

71 CHAVERRI, P.; SAMUELS, G. J. Hypocrea Trichoderma (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. **Studies in Mycology**, v. 48, p. 1–119, 2003.

72 KUBICEK, C. P.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; SÁNDOR, E.; DRUZHININA, I. S. Facts and challenges in the understanding of the biosynthesis of peptaibols by *Trichoderma*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, p. 1068-1082, 2007.

73 DANIEL, J. F. S.; RODRIGUES-FILHO, E. Peptaibols of *Trichoderma*. **Natural Products Report**, v. 24, p. 1128–1141, 2007.

74 BRUCKNER, H.; PRZYBYLSKI, M. Isolation and structural characterization of polypeptide antibiotics of the peptaibol class by high-performance liquid chromatography with field desorption and fast atom bombardment mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 296, p. 263-275, 1984.

75 REUSSER, F. Biosynthesis of antibiotic U-22, 324, a cyclic polypeptide. **The Journal of Biological Chemistry**, v.242, n. 2, p 243–247, 1967.

76 FUENTE-NÚÑEZ, C.; WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Peptaibols. In: **HANDBOOK of biologically active peptides: bacterial/antibiotic peptides**. Cambridge: Academic Press, 2013. p. 150–156.

77 WEI, X.; YANG, F.; STRANEY, D. C. Multiple non-ribosomal peptide synthetase gene determine peptaibol synthesis in *Trichoderma virens*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 423–429, 2005.

78 VITERBO, A.; WIEST, A.; BROTMAN, Y.; CHET, I.; KENERLEY, C. The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. **Molecular plant Pathology**, v. 8, p. 737–746, 2007.

79 MUKHERJEE, P. K.; WIEST, A.; RUIZ, N.; KEIGHTLEY, A.; MORAN-DIEZ, M. E.; MCCLUSKEY, K.; POUCHUS, Y. F.; KENERLEY, C. M. Two classes of new peptaibols are synthesized by a single non-ribosomal peptide synthetase of *Trichoderma virens*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 6, p. 4544–4554, 2011.

80 BARATO, Mariana Blanco. **Fungos derivados da Antártica: biodiversidade e produção de enzimas lignocelulíticas a baixas e médias temperaturas**. 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em microbiologia aplicada) – Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

81 WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. The Peptaibol Database: a database for sequences and structures of naturally occurring peptaibols. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. D593–D594, 2004.

82 AUVIN-GUETTE, C.; REBUFFAT, S.; PRIGENT, Y.; BODO, B. Trichogin A IV, an 11-residue lipopeptaibol from *Trichoderma longibrachiatum*. **Journal of American Chemical Society**, v. 114, p. 2170–2174, 1992.

83 ZOTTI, M.; BIONDI, B.; PEGGION, C.; FORMAGGIO, F.; PARK, Y.; HAHM, K.; TONIOLO, C. Trichogin GA IV: a versatile template for the synthesis of novel peptaibiotics. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.10, p 1285-1299, 2012.

84 AUVIN-GUETTE, C.; REBUFFAT, S.; VUIDEPOT, I.; MASSIAS, M.; BODO, B. Structural elucidation of trikoningins KA and KB, peptaibols from *Trichoderma koningii*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 249-255, 1993.

85 PEGGION, C.; PIAZZA, C.; FORMAGGIO, F.; CRISMA, M.; TONIOLO, C.; KAPTEIN, B.; BROXTERMAN, Q. B.; KAMPHUIS, J. Synthesis, conformation, and membrane modifying properties of the trikoningin KB lipopeptaibols: effect of hydrophobicity and chirality in position 1. **Letters in Peptide Science**, v. 7, p. 9-16, 2000.

86 SUWAN, S.; ISOBE, M.; S. KANOKMEDHAKUL, S.; LOURIT, N.; KANOKMEDHAKUL, K.; SOYTONG, K.; KOGA, K. Elucidation of high micro-heterogeneity of na acidic–neutral trichotoxin mixture from *Trichoderma harzianum* by electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 35, p. 1438–1451, 2000.

87 AYERS, S.; EHRMANN, B. M.; ADCOCK, A. F.; KROLL, D. J.; BLANCO, E. J. C.; SHEN, Q.; SWANSON, S. M.; FALKINHAM, J. O.; WANI, M. C.; MITCHELL, S. M.; PEARCEH, C. J.; OBERLIESA, N. H. Peptaibols from two unidentified fungi of the order *Hypocreales* with cytotoxic, antibiotic, and anthelmintic activities. **Journal of Peptide Science**, v. 18, p. 500–510, 2012.

88 RITIENI, A.; FOGLIANOD, V.; NANNO, D.; RANDAZZO, G. Paracelsin E, a new peptaibol from *Trichoderma saturnisporum*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 11, p. 1745-1748, 1995.

89 HUANG, Q.; TEZUKA, Y.; KIKUCHI, T.; NISHI, A.; TABAKI, K.; TANAKA, K. Studies on metabolites of mycoparasitic fungi. II. Metabolites of *Trichoderma koningii*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 43, p. 223–229, 1995.

90 RIVERA-CHÁVEZ, J.; RAJA, H. A.; = GRAF, T. N.; BURDETTE, J. E.; PEARCE, C. J.; OBERLIES, N. H. Biosynthesis of fluorinated peptaibols using a site-directed building block incorporation approach. **Journal of Natural Products**, v. 80, p. 1883–1892, 2017.

91 WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Analysis of peptaibol sequence composition: implications for in vivo synthesis and channel formation, **European Biophysics Journal**, v. 33, p. 233–237, 2004.

92 NGUYEN, O.; IMHOF, D.; KRONEN, M.; REISSMANN, S. Circular dichroism studies of ampullosporin-a analogues. **Journal of Peptide Science**, v. 9, p. 714–728, 2003.

93 URRY, D. W.; LUAN, C.; PARKER, T. M.; GOWDA, D. C.; PRASAD, K. U.; REID, M. C.; SAFAVY, A. Temperature of polypeptide inverse temperature transition depends on mean residue hydrophobicity. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 113, p. 4346–4348, 1991.

94 BHUSHAN, R.; BRUCKNER, H. Marfey's reagents for chiral amino acid analysis: a review. **Amino Acids**, v. 27, p. 231–247, 2004.

95 SU, H.; CHEN, Z.; SONG, S.; CHEN, X.; SHI, M.; ZHOU, B.; ZHAO, X.; ZHANG, Y. Antimicrobial peptide Trichokonin VI-induced alterations in the morphological and nanomechanical properties of *Bacillus subtilis*. **PLOS ONE**, v. 7 n. 9, 2012.

96 SHI, M.; WANG, H.; XIE, S.; YAN LUO, Y.; SUN, C.; CHEN, X.; ZHANG, Y. Antimicrobial peptaibols, novel suppressors of tumor cells, targeted calcium-mediated apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells. **Molecular Cancer**, v. 9, n. 26, p. 1–16, 2010.

97 CARIACO, Y.; LIMA, W. R.; SOUSA, R.; NASCIMENTO, L. A. C.; BRICEÑO, M. P.; FOTORAN, W. L.; WUNDERLICH, G.; SANTOS, J. L.; SILVA, N. M. Ethanollic extract of the fungus *Trichoderma stromaticum* decreases inflammation and ameliorates experimental cerebral malaria in C57BL/6 mice. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1-15, 2018.

98 NAGARAJ, G.; UMA, M. V.; SHIVAYOGI, M. S.; BALARAM¹, H. Antimalarial activities of peptide antibiotics isolated from fungi. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 145–149, 2001.

99 VAGNER, J.; QU, H.; HRUBY, V. J. Peptidomimetics, a synthetic toll of drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 13, n. 3, p. 292-296, 2008.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Ariane Fernandes Bertonha

**Isolamento, síntese de análogos e estudo da relação estrutura
atividade de metabólitos secundários bioativos.**

Volume 2

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Química.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza
Berlinck

São Carlos

2018

Índice

Apêndice 1. Espectro de RMN de ^1H do composto 43 (CDCl_3 , 600 MHz).	17
Apêndice 2. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 43 (CDCl_3 , 151 MHz).	18
Apêndice 3. Espectro de RMN de ^1H do composto 28 ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz).	19
Apêndice 4. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 28 ($\text{DMSO}-d_6$, 151 MHz).	20
Apêndice 5. Espectro de massas de alta resolução do composto 28 [ESI^+].	21
Apêndice 6. Espectro no infravermelho do composto 28 (cm^{-1}).	22
Apêndice 7. Espectro de RMN de ^1H do composto 44 ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz).	23
Apêndice 8. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 44 ($\text{DMSO}-d_6$, 151 MHz).	24
Apêndice 9. Espectro de massas de alta resolução do composto 44 [ESI^-].	25
Apêndice 10. Espectro no infravermelho do composto 44 (cm^{-1}).	26
Apêndice 11. Espectro de RMN de ^1H do composto 45 ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz).	27
Apêndice 12. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 45 ($\text{DMSO}-d_6$, 151 MHz).	28
Apêndice 13. Espectro de massas de alta resolução do composto 45 [ESI^-].	29
Apêndice 14. Espectro no infravermelho do composto 45 (cm^{-1}).	30
Apêndice 15. Espectro de RMN de ^1H do composto 46 ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz).	31
Apêndice 16. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 46 ($\text{DMSO}-d_6$, 151 MHz).	32
Apêndice 17. Espectro de massas de alta resolução do composto 46 [ESI^-].	33
Apêndice 18. Espectro no infravermelho do composto 46 (cm^{-1}).	34
Apêndice 19. Espectro de RMN de ^1H do composto 47 ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz).	35
Apêndice 20. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 47 ($\text{DMSO}-d_6$, 151 MHz).	36
Apêndice 21. Espectro de massas de alta resolução do composto 47 [ESI^-].	37
Apêndice 22. Espectro no infravermelho do composto 47 (cm^{-1}).	38

Apêndice 23.	Espectro de RMN de ^1H do composto 48 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	39
Apêndice 24.	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 48 (DMSO- d_6 , 151 MHz).....	40
Apêndice 25.	Espectro de massas de alta resolução do composto 48 [ESI].....	41
Apêndice 26.	Espectro no infravermelho do composto 48 (cm^{-1}).....	42
Apêndice 27.	Espectro de RMN de ^1H do composto 49 (MeOH- d_4 , 600 MHz).....	43
Apêndice 28.	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 49 (MeOH- d_4 , 151 MHz).....	44
Apêndice 29.	Espectro de massas de alta resolução do composto 49 [ESI].....	45
Apêndice 30.	Espectro no infravermelho do composto 49 (cm^{-1}).....	46
Apêndice 31.	Espectro de RMN de ^1H do composto 50 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	47
Apêndice 32.	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 50 (DMSO- d_6 , 151 MHz).....	48
Apêndice 33.	Espectro de massas de alta resolução do composto 50 [ESI $^+$].....	49
Apêndice 34.	Espectro no infravermelho do composto 50 (cm^{-1}).....	50
Apêndice 35.	Espectro de RMN de ^1H do composto 51 (MeOH- d_4 , 400 MHz).	51
Apêndice 36.	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 51 (MeOH- d_4 , 101 MHz).....	52
Apêndice 37.	Espectro de massas de alta resolução do composto 51 [ESI].....	53
Apêndice 38.	Espectro no infravermelho do composto 51 (cm^{-1}).....	54
Apêndice 39.	Espectro de RMN de ^1H do composto 52 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	55
Apêndice 40.	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 52 (DMSO- d_6 , 151 MHz).....	56
Apêndice 41.	Espectro de massas de alta resolução do composto 52 [ESI $^+$].....	57
Apêndice 42.	Espectro no infravermelho do composto 52 (cm^{-1}).....	58
Apêndice 43.	Espectro de RMN de ^1H do composto 54 (CDCl_3 , 400 MHz).....	59
Apêndice 44.	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 54 (CDCl_3 , 101 MHz).....	60
Apêndice 45.	Espectro de RMN de ^1H do composto 53 (MeOH- d_4 , 600 MHz).....	61

Apêndice 46.	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 53 (MeOH- <i>d</i> 4, 151 MHz).....	62
Apêndice 47.	Espectro de massas de alta resolução do composto 53 [ESI ⁺].....	63
Apêndice 48.	Espectro no infravermelho do composto 53 (cm ⁻¹).....	64
Apêndice 49.	Espectro de RMN de ^1H do composto 55 (CDCl ₃ , 600 MHz).....	65
Apêndice 50.	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 55 (CDCl ₃ , 151 MHz).....	66
Apêndice 51.	Espectro de RMN de ^1H do composto 56 (MeOH- <i>d</i> 4, 600 MHz).....	67
Apêndice 52.	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 56 (MeOH- <i>d</i> 4, 151 MHz).....	68
Apêndice 53.	Espectro de massas de alta resolução do composto 56 [ESI ⁺].....	69
Apêndice 54.	Espectro no infravermelho do composto 56 (cm ⁻¹).....	70
Apêndice 55.	Espectro de RMN de ^1H do composto 57 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	71
Apêndice 56.	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 57 (CDCl ₃ , 101 MHz).....	72
Apêndice 57.	Espectro de RMN de ^1H do composto 58 (MeOH- <i>d</i> 4, 600 MHz).....	73
Apêndice 58.	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 58 (MeOH- <i>d</i> 4, 151 MHz).....	74
Apêndice 59.	Espectro de massas de alta resolução do composto 58 [ESI ⁺].....	75
Apêndice 60.	Espectro no infravermelho do composto 58 (cm ⁻¹).....	76
Apêndice 61.	Espectro de RMN de ^1H do composto 59 (DMSO- <i>d</i> 6, 400 MHz).....	77
Apêndice 62.	Espectro de RMN de ^1H do composto 59 (DMSO- <i>d</i> 6, 101 MHz).....	78
Apêndice 63.	Espectro de massas de alta resolução do composto 59 [ESI ⁺].....	79
Apêndice 64.	Espectro no infravermelho do composto 59 (cm ⁻¹).....	80
Apêndice 65.	Espectro de RMN de ^1H do composto 60 (MeOH- <i>d</i> 4, 400 MHz).....	81
Apêndice 66.	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 60 (MeOH- <i>d</i> 4, 101 Hz).....	82
Apêndice 67.	Espectro de massas de alta resolução do composto 60 [ESI ⁺].....	83
Apêndice 68.	Espectro no infravermelho do composto 60 (cm ⁻¹).....	84

Apêndice 69.	Espectro de RMN de ^1H do composto 61 (CDCl_3 , 400 MHz).....	85
Apêndice 70.	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 61 (CDCl_3 , 101 MHz).....	86
Apêndice 71.	Espectro de massas de alta resolução do composto 61 [ESI $^+$].....	87
Apêndice 72.	Espectro no infravermelho do composto 61 (cm^{-1}).....	88
Apêndice 73.	Espectro de RMN de ^1H do composto 62 (CDCl_3 , 400 MHz).	89
Apêndice 74.	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 62 (CDCl_3 , 101 MHz).....	90
Apêndice 75.	Espectro de massas de alta resolução do composto 62 [ESI $^+$].....	91
Apêndice 76.	Espectro no infravermelho do composto 62 (cm^{-1}).	92
Apêndice 77.	Espectro de RMN de ^1H do composto 63 (CDCl_3 , 600 MHz).	93
Apêndice 78.	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 63 (CDCl_3 , 151 MHz).	94
Apêndice 79.	Espectro de massas de alta resolução do composto 63 [ESI $^+$].....	95
Apêndice 80.	Espectro no infravermelho do composto 63 (cm^{-1}).	96
Apêndice 81.	Espectro de RMN de ^1H do composto 64 (CDCl_3 , 600 MHz).	97
Apêndice 82.	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 64 (CDCl_3 , 151 MHz).	98
Apêndice 83.	Espectro de massas de alta resolução do composto 64 [ESI $^+$].....	99
Apêndice 84.	Espectro no infravermelho do composto 64 (cm^{-1}).	100
Apêndice 85.	Espectro de RMN de ^1H do composto 65 ($\text{MeOH-}d_4$, 600 MHz).....	101
Apêndice 86.	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 65 ($\text{MeOH-}d_4$, 151 MHz).....	102
Apêndice 87.	Espectro de massas de alta resolução do composto 65 [ESI $^+$].....	103
Apêndice 88.	Espectro no infravermelho do composto 65 (cm^{-1}).	104
Apêndice 89.	Espectro de RMN de ^1H do composto 66 ($\text{MeOH-}d_4$, 600 MHz).....	105
Apêndice 90.	Espectro de RMN de ^{13}C do composto 66 ($\text{MeOH-}d_4$, 151 MHz).....	106
Apêndice 91.	Espectro de massas de alta resolução do composto 66 [ESI $^+$].....	107

Apêndice 92. Espectro no infravermelho do composto 66 (cm ⁻¹).	108
Apêndice 93. Espectro de RMN de ¹ H do composto 86 (MeOH- <i>d</i> 4, 400 MHz).	109
Apêndice 94. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 86 (MeOH- <i>d</i> 4, 101 MHz).	110
Apêndice 95. Espectro no infravermelho do composto 86 (cm ⁻¹).	111
Apêndice 96. Espectro de RMN de ¹ H do composto 85 (MeOH- <i>d</i> 4, 400 MHz).	112
Apêndice 97. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 85 (MeOH- <i>d</i> 4, 101 MHz).	113
Apêndice 98. Espectro de massas de alta resolução do composto 85 [ESI ⁺].	114
Apêndice 99. Espectro no infravermelho do composto 85 (cm ⁻¹).	115
Apêndice 100. Espectro de RMN de ¹ H do composto 92 (CDCl ₃ , 400 MHz).	116
Apêndice 101. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 92 (CDCl ₃ , 101 MHz).	117
Apêndice 102. Espectro no infravermelho do composto 92 (cm ⁻¹).	118
Apêndice 103. Espectro de RMN de ¹ H do composto 88 (MeOH- <i>d</i> 4, 400 MHz).	119
Apêndice 104. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 88 (MeOH- <i>d</i> 4, 101 MHz).	120
Apêndice 105. Espectro no infravermelho do composto 88 (cm ⁻¹).	121
Apêndice 106. Espectro de RMN de ¹ H do composto 95 (MeOH- <i>d</i> 4, 400 MHz).	122
Apêndice 107. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 95 (MeOH- <i>d</i> 4, 101 MHz).	123
Apêndice 108. Espectro no infravermelho do composto 95 (cm ⁻¹).	124
Apêndice 109. Espectro de RMN de ¹ H do composto 96 (MeOH- <i>d</i> 4, 400 MHz).	125
Apêndice 110. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 96 (MeOH- <i>d</i> 4, 101 MHz).	126
Apêndice 111. Espectro de RMN de ¹ H do composto 97 (MeOH- <i>d</i> 4, 600 MHz).	127
Apêndice 112. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 97 (MeOH- <i>d</i> 4, 151 MHz).	128
Apêndice 113. Espectro de massas de alta resolução do composto 97 [ESI ⁻].	129
Apêndice 114. Espectro no infravermelho do composto 97 (cm ⁻¹).	130

Apêndice 115. Espectro de RMN de ^1H do composto 98 (MeOH- d_4 , 600 MHz).....	131
Apêndice 116. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 98 (MeOH- d_4 , 151 MHz).....	132
Apêndice 117. Espectro de massas de alta resolução do composto 98 [ESI].....	133
Apêndice 118. Espectro no infravermelho do composto 98 (cm^{-1}).	134
Apêndice 119. Espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-6 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M3I).....	135
Apêndice 120. Expansão 1 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-6 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M3I).....	136
Apêndice 121. Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-6 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M3I).....	137
Apêndice 122. Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-6 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M3I).....	138
Apêndice 123. Espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-6 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M3I).	139
Apêndice 124. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-6 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M3I)	140
Apêndice 125. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-6 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M3I).	141
Apêndice 126. Expansão 3 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-6 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M3I)	142
Apêndice 127. Espectro COSY obtido para o composto AT1M3I-6 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).	143
Apêndice 128. Espectro HSQC obtido para o composto AT1M3I-6 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).	144
Apêndice 129. Espectro HMBC obtido para o composto AT1M3I-6 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).	145

Apêndice 130. Espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-6 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M3I).	146
Apêndice 131. Expansão 1 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-6 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M3I).	147
Apêndice 132. Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-6 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M3I).	148
Apêndice 133. Espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-6 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M3I).	149
Apêndice 134. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-6 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M3I).	150
Apêndice 135. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-6 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M3I).	151
Apêndice 136. Expansão 3 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-6 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M3I).	152
Apêndice 137. Espectro de massas de alta resolução do composto AT1M3I-6 [ESI $^-$] e [ESI $^+$] (fração AT1M3I).	153
Apêndice 138. Espectro no infravermelho do composto AT1M3I-6 (cm^{-1} , fração AT1M3I).	154
Apêndice 139. Espectro de absorção no ultravioleta do composto AT1M3I-6 (MeOH, $c = 0,025 \text{ mg mL}^{-1}$, fração AT1M3I).	155
Apêndice 140. Espectro de dicroísmo circular do composto AT1M3I-6 (MeOH, $c = 0,15 \text{ mg mL}^{-1}$, fração AT1M3I).	156
Apêndice 141. Espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M3I).	157
Apêndice 142. Expansão 1 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M3I).	158

Apêndice 143. Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M3I).	159
Apêndice 144. Expansão 3 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M3I).	160
Apêndice 145. Espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M3I).	161
Apêndice 146. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M3I).	162
Apêndice 147. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M3I).	163
Apêndice 148. Expansão 3 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M3I).	164
Apêndice 149. Espectro COSY obtido para o composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).	165
Apêndice 150. Espectro HSQC-TOCSY obtido para o composto 1 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I-5).	166
Apêndice 151. Espectro HSQC obtido para o composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).	167
Apêndice 152. Espectro HMBC 1 obtido para o composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).	168
Apêndice 153. Espectro HMBC 2 obtido para o composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).	169
Apêndice 154. Espectro ROESY obtido para o composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).	170
Apêndice 155. Espectro de massas de alta resolução do composto AT1M3I-5 [ESI $^-$] e [ESI $^+$] (fração AT1M3I).	171

Apêndice 156. Espectro no infravermelho do composto AT1M3I-5 (cm^{-1} , fração AT1M3I).	172
Apêndice 157. Espectro de absorção no ultravioleta do composto AT1M3I-5 (MeOH, $c = 0,025 \text{ mg mL}^{-1}$, fração AT1M3I).	173
Apêndice 158. Espectro de dicroísmo circular do composto AT1M3I-5 (MeOH, $c = 0,15 \text{ mg mL}^{-1}$, fração AT1M3I).	174
Apêndice 159. Espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-4 ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz, fração AT1M3I).	175
Apêndice 160. Expansão 1 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-4 ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz, fração AT1M3I).	176
Apêndice 161. Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-4 ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz, fração AT1M3I).	177
Apêndice 162. Expansão 3 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-4 ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz, fração AT1M3I).	178
Apêndice 163. Espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-4 ($\text{DMSO-}d_6$, 151 MHz, fração AT1M3I).	179
Apêndice 164. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-4 ($\text{DMSO-}d_6$, 151 MHz, fração AT1M3I).	180
Apêndice 165. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-4 ($\text{DMSO-}d_6$, 151 MHz, fração AT1M3I).	181
Apêndice 166. Expansão 3 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-4 ($\text{DMSO-}d_6$, 151 MHz, fração AT1M3I).	182
Apêndice 167. Espectro DEPT135 obtido para o composto AT1M3I-4 ($\text{DMSO-}d_6$, fração AT1M3I).	183
Apêndice 168. Espectro COSY obtido para o composto AT1M3I-4 ($\text{DMSO-}d_6$, fração AT1M3I).	184

Apêndice 169. Espectro HSQC-TOCSY obtido para o composto AT1M3I-4 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).	185
Apêndice 170. Espectro HSQC obtido para o composto AT1M3I-4 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).	186
Apêndice 171. Espectro HMBC 1 obtido para o composto AT1M3I-4 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).	187
Apêndice 172. Espectro HMBC 2 obtido para o composto AT1M3I-4 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).	188
Apêndice 173. Espectro ROESY obtido para o composto AT1M3I-4 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).	189
Apêndice 174. Espectro de massas de alta resolução do composto AT1M3I-4 [ESI ⁻] e [ESI ⁺] (fração AT1M3I).	190
Apêndice 175. Espectro no infravermelho do composto AT1M3I-4 (cm ⁻¹ , fração AT1M3I).	191
Apêndice 176. Espectro de absorção no ultravioleta do composto AT1M3I-4 (MeOH, c = 0,025 mg mL ⁻¹ , fração AT1M3I)	192
Apêndice 177. Espectro de dicroísmo circular do composto AT1M3I-4 (MeOH, c = 0,15 mg mL ⁻¹ , fração AT1M3I).	193
Apêndice 178. Espectro de RMN de ¹ H do composto AT1M3I-3 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M3I).	194
Apêndice 179. Expansão 1 do espectro de RMN de ¹ H do composto AT1M3I-3 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M3I).	195
Apêndice 180. Expansão 2 do espectro de RMN de ¹ H do composto AT1M3I-3 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M3I).	196
Apêndice 181. Espectro de RMN de ¹³ C do composto AT1M3I-3 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M3I).	197
Apêndice 182. Expansão 1 do espectro de RMN de ¹³ C do composto AT1M3I-3 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M3I).	198
Apêndice 183. Expansão 2 do espectro de RMN de ¹³ C do composto AT1M3I-3 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M3I).	199

Apêndice 184. Expansão 3 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-3 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M3I).	200
Apêndice 185. Espectro de massas de alta resolução do composto AT1M3I-3 [ESI $^-$] e [ESI $^+$] (fração AT1M3I).	201
Apêndice 186. Espectro no infravermelho do composto AT1M3I-3 (cm^{-1} , fração AT1M3I).	202
Apêndice 187. Espectro de absorção no ultravioleta do composto AT1M3I-3 (MeOH, $c = 0,025 \text{ mg mL}^{-1}$, fração AT1M3I).	203
Apêndice 188. Espectro de dicroísmo circular do composto AT1M3I-3 (MeOH, $c = 0,15 \text{ mg mL}^{-1}$, fração AT1M3I).	204
Apêndice 189. Espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M5O).	205
Apêndice 190. Expansão 1 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M5O).	206
Apêndice 191. Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M5O).	207
Apêndice 192. Expansão 3 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M5O).	208
Apêndice 193. Espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M5O).	209
Apêndice 194. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M5O).	210
Apêndice 195. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M5O).	211
Apêndice 196. Expansão 3 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M5O).	212
Apêndice 197. Expansão 4 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M5O).	213

Apêndice 198. Espectro COSY obtido para o composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , fração AT1M5O).	214
Apêndice 199. Espectro HSQC-TOCSY obtido para o composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , fração AT1M5O).	215
Apêndice 200. Espectro HSQC obtido para o composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , fração AT1M5O)	216
Apêndice 201. Espectro HMBC obtido para o composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , fração AT1M5O).	217
Apêndice 202. Espectro NOESY obtido para o composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , fração AT1M5O).	218
Apêndice 203. Espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-4 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M5O).	219
Apêndice 204. Expansão 1 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-4 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M5O).	220
Apêndice 205. Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-4 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M5O).	221
Apêndice 206. Expansão 3 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-4 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M5O).	222
Apêndice 207. Espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-4 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M5O).	223
Apêndice 208. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-4 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M5O).	224
Apêndice 209. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-4 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M5O).	225
Apêndice 210. Expansão 3 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-4 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M5O).	226

Apêndice 211. Expansão 4 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-4 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M5O).....	227
Apêndice 212. Espectro COSY obtido para o composto AT1M5O-4 (MeOH- d_4 , fração AT1M5O).	228
Apêndice 213. Espectro HSQC obtido para o composto AT1M5O-4 (MeOH- d_4 , fração AT1M5O).	229
Apêndice 214. Espectro HMBC obtido para o composto AT1M5O-4 (MeOH- d_4 , fração AT1M5O).	230
Apêndice 215. Espectro de massas de alta resolução do composto AT1M5O-4 [ESI $^-$] e [ESI $^+$] (fração AT1M5O).	231
Apêndice 216. Espectro no infravermelho do composto AT1M5O-4 (cm^{-1} , fração AT1M5O).	232
Apêndice 217. Espectro de absorção no ultravioleta do composto AT1M5O-4 (MeOH, $c = 0,025 \text{ mg mL}^{-1}$, fração AT1M5O).	233
Apêndice 218. Espectro de dicroísmo circular do composto AT1M5O-4 (MeOH, $c = 0,15 \text{ mg mL}^{-1}$, fração AT1M5O).	234
Apêndice 219. Espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M5O).	235
Apêndice 220. Expansão 1 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M5O).	236
Apêndice 221. Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M5O).	237
Apêndice 222. Expansão 3 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M5O).	238
Apêndice 223. Espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M5O).	239

Apêndice 224. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M5O).	240
Apêndice 225. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M5O).	241
Apêndice 226. Expansão 3 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M5O).	242
Apêndice 227. Expansão 4 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M5O).	243
Apêndice 228. Espectro COSY obtido para o composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , fração AT1M5O).	244
Apêndice 229. Espectro HSQC-TOCSY obtido para o composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , fração AT1M5O).	245
Apêndice 230. Espectro HSQC obtido para o composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , fração AT1M5O).	246
Apêndice 231. Espectro HMBC obtido para o composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , fração AT1M5O).	247
Apêndice 232. Espectro ROESY obtido para o composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , fração AT1M5O).	248
Apêndice 233. Espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-5 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M5O).	249
Apêndice 234. Expansão 1 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-5 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M5O).	250
Apêndice 235. Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-5 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M5O).	251
Apêndice 236. Expansão 3 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-5 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M5O).	252

Apêndice 237. Espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-5 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M5O).	253
Apêndice 238. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-5 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M5O).	254
Apêndice 239. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-5 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M5O).	255
Apêndice 240. Expansão 3 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-5 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M5O).	256
Apêndice 241. Expansão 4 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-5 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M5O).	257
Apêndice 242. Espectro COSY obtido para o composto AT1M5O-5 (MeOH- d_4 , fração AT1M5O).	258
Apêndice 243. Espectro HSQC obtido para o composto AT1M5O-5 (MeOH- d_4 , fração AT1M5O).	259
Apêndice 244. Espectro HMBC obtido para o composto AT1M5O-5 (MeOH- d_4 , fração AT1M5O).	260
Apêndice 245. Espectro de massas de alta resolução do composto AT1M5O-5 [ESI $^-$] e [ESI $^+$] (fração AT1M5O).....	261
Apêndice 246. Espectro no infravermelho do composto AT1M5O-5 (cm^{-1} , fração AT1M5O).	262
Apêndice 247. Espectro de absorção no ultravioleta do composto AT1M5O-5 (MeOH, $c = 0,025 \text{ mg mL}^{-1}$, fração AT1M5O).	263
Apêndice 248. Espectro de dicroísmo circular do composto AT1M5O-5 (MeOH, $c = 0,15 \text{ mg mL}^{-1}$, fração AT1M5O).	264
Apêndice 249. Cromatograma da reação de Marfey para a valina (280 nm), espectro de ultravioleta e de massas (ESI $^-$)......	265

Apêndice 250. Cromatograma da reação de Marfey para a isoleucina (280 nm), espectro no ultravioleta e de massas (ESI ⁻).....	266
Apêndice 251. Cromatograma da reação de Marfey para a leucina (280 nm), espectro no ultravioleta e de massas (ESI ⁻).....	267
Apêndice 252. Cromatograma da reação de Marfey para a prolina (280 nm), espectro no ultravioleta e de massas (ESI ⁻).	268
Apêndice 253. Cromatograma da reação de Marfey para a alanina (280 nm), espectro no ultravioleta e de massas (ESI ⁻).	269
Apêndice 254. Cromatograma da reação de Marfey para a glutamina (280 nm), espectro no ultravioleta e de massas (ESI ⁻).....	270
Apêndice 255. Cromatograma da mistura 1, contendo: Leu-Ile, em 280 nm. Espectro no ultravioleta e de massas (ESI ⁻).....	271
Apêndice 256. Cromatograma da mistura 2, contendo: Val-Leu-Ile, em 280 nm. Espectro no ultravioleta e de massas (ESI ⁻).....	272
Apêndice 257. Cromatograma da mistura 3, contendo: Val-Leu-Pro-Ala-Gln, em 280 nm. Espectro no ultravioleta e de massas (ESI ⁻).....	273
Apêndice 258. Cromatograma da reação de Marfey para o composto AT1M3I-4 hidrolisado (280 nm) e espectro de massas (ESI ⁻).....	274
Apêndice 259. Cromatograma da reação de Marfey para o composto AT1M3I-5 hidrolisado (280 nm) e espectro de massas (ESI ⁺).....	275
Apêndice 260. Cromatograma da reação de Marfey para o composto AT1M3I-6 hidrolisado (280 nm) e espectro de massas (ESI ⁺).....	276
Apêndice 261. Cromatograma da reação de Marfey para o composto AT1M5O-4 hidrolisado (280 nm) e espectro de massas (ESI ⁺).....	277
Apêndice 262. Cromatograma da reação de Marfey para o composto AT1M5O-5 hidrolisado (280 nm) e espectro de massas (ESI ⁺).....	278

Apêndice 1. Espectro de RMN de ^1H do composto **43** (CDCl_3 , 600 MHz).

Apêndice 2. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **43** (CDCl_3 , 151 MHz).

Apêndice 3. Espectro de RMN de ^1H do composto **28** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

Apêndice 4. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **28** (DMSO- d_6 , 151 MHz).

Apêndice 5. Espectro de massas de alta resolução do composto **28** [ESI⁺].

abb-i-37_ESH_ESH #1-13 RT: 0.01-0.11 AV: 13 NL: 7.36E6
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1000.00]

Chemical Formula: C₁₇H₂₂Br₄N₅O₂⁺

Exact Mass: 643.8502

m/z: 647.8461 (100.0%), 645.8481 (68.5%), 649.8440 (64.9%), 648.8494 (18.4%), 643.8502 (17.6%), 651.8420 (15.8%), 646.8515 (12.6%), 650.8474 (11.9%), 644.8535 (3.2%), 652.8453 (2.9%), 648.8431 (1.8%), 646.8451 (1.3%), 649.8528 (1.2%), 650.8410 (1.2%), 647.8548 (1.1%), 651.8507 (1.0%)

Apêndice 6. Espectro no infravermelho do composto **28** (cm⁻¹).

Apêndice 7. Espectro de RMN de ^1H do composto **44** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

Apêndice 8. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **44** (DMSO- d_6 , 151 MHz).

Apêndice 9. Espectro de massas de alta resolução do composto **44** [ESI⁻].

abb-i-43_ftms_full_orbi_-ESI#1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 6.79E5

T: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1000.00]

Chemical Formula: $C_{18}H_{22}Br_4N_5O_2^-$

Exact Mass: 655.8512

m/z: 659.8472 (100.0%), 657.8492 (68.5%), 661.8451 (64.9%), 660.8505 (18.4%),
655.8512 (17.6%), 663.8431 (15.8%), 658.8526 (13.3%), 662.8485 (12.6%),
656.8546 (3.4%), 664.8464 (3.1%), 660.8442 (1.8%), 658.8462 (1.3%),
661.8539 (1.2%), 659.8559 (1.2%), 662.8421 (1.2%), 663.8518 (1.2%), 660.8505 (1.1%)

Apêndice 10. Espectro no infravermelho do composto **44** (cm^{-1}).

Apêndice 11. Espectro de RMN de ^1H do composto **45** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

Apêndice 12. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **45** (DMSO- d_6 , 151 MHz).

Apêndice 13. Espectro de massas de alta resolução do composto **45** [ESI⁻].

ABB-I64_-ESI_orbi-ESI #1-12 RT: 0.01-0.12 AV: 12 NL: 4.82E5
T: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1000.00]

Chemical Formula: $C_{19}H_{21}Br_4N_8O_3^-$

Exact Mass: 724.8476

m/z: 728.8435 (100.0%), 726.8455 (68.5%), 730.8414 (64.9%), 729.8468 (18.4%),
724.8476 (17.6%), 732.8394 (15.8%), 727.8489 (14.1%), 731.8448 (13.3%),
725.8509 (3.6%), 733.8427 (3.2%), 729.8405 (3.0%), 729.8468 (2.2%), 727.8425 (2.0%),
730.8502 (2.0%), 731.8385 (1.9%), 728.8522 (1.4%), 732.8481 (1.3%)

Apêndice 14. Espectro no infravermelho do composto **45** (cm⁻¹).

Apêndice 15. Espectro de RMN de ^1H do composto **46** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

Apêndice 16. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **46** (DMSO- d_6 , 151 MHz).

Apêndice 17. Espectro de massas de alta resolução do composto **46** [ESI⁻].

ABB-I15_-ESI_orbi-ESI #2-11 RT: 0.01-0.10 AV: 10 NL: 1.79E6

T: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1000.00]

Chemical Formula: $C_{15}H_{15}Br_4N_4O_2^-$

Exact Mass: 598.7934

m/z: 602.7893 (100.0%), 600.7914 (68.5%),
604.7873 (64.9%), 598.7934 (17.6%),
603.7927 (16.2%), 606.7852 (15.8%).

Apêndice 18. Espectro no infravermelho do composto **46** (cm⁻¹).

Apêndice 19. Espectro de RMN de ^1H do composto **47** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

Apêndice 20. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **47** (DMSO- d_6 , 151 MHz).

Apêndice 21. Espectro de massas de alta resolução do composto **47** [ESI⁻].

abb-29_6ppm_Orbi_-ESI #2-11 RT: 0.01-0.09 AV: 10 NL: 5.23E6
T: FTMS - p ESI Full ms [75.00-800.00]

Chemical Formula: C₁₄H₁₃Br₄N₄O₂S⁻

Exact Mass: 616.7498

m/z: 620.7457 (100.0%), 618.7478 (68.5%), 622.7437 (64.9%), 616.7498 (17.6%), 624.7416 (15.8%), 621.7491 (15.1%), 619.7511 (10.4%), 623.7470 (9.8%), 622.7415 (4.5%), 620.7436 (3.1%), 624.7395 (2.9%), 617.7532 (2.7%), 625.7450 (2.4%), 621.7428 (1.5%), 622.7524 (1.1%)

Apêndice 22. Espectro no infravermelho do composto **47** (cm⁻¹).

Apêndice 23. Espectro de RMN de ^1H do composto **48** ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz).

Apêndice 24. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **48** (DMSO- d_6 , 151 MHz).

Apêndice 25. Espectro de massas de alta resolução do composto **48** [ESI⁻].

abb-i-79_2-ESI-ESI #1-10 RT: 0.01-0.11 AV: 10 NL: 2.59E6
T: FTMS - p ESI Full ms [100.00-1000.00]

Chemical Formula: $C_{18}H_{21}Br_4N_4O_2^-$

Exact Mass: 640.8403

m/z: 644.8363 (100.0%), 642.8383 (68.5%), 646.8342 (64.9%), 645.8396 (18.4%),
640.8403 (17.6%), 648.8322 (15.8%), 643.8417 (13.3%), 647.8376 (12.6%),
641.8437 (3.4%), 649.8355 (3.1%), 645.8333 (1.5%), 646.8430 (1.2%), 644.8450
(1.2%), 648.8409 (1.2%), 645.8396 (1.1%), 643.8353 (1.0%)

Apêndice 26. Espectro no infravermelho do composto **48** (cm⁻¹).

Apêndice 27. Espectro de RMN de ^1H do composto **49** (MeOH- d_4 , 600 MHz).

Apêndice 28. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **49** (MeOH- d_4 , 151 MHz).

Apêndice 29. Espectro de massas de alta resolução do composto **49** [ESI⁻].

abb-i-81_-ESI_-ESI #2-9 RT: 0.01-0.10 AV: 8 NL: 1.93E6
T: FTMS - p ESI Full ms [175.00-1000.00]

Chemical Formula: $C_{20}H_{27}Br_4N_6O_2^-$

Exact Mass: 698.8934

m/z: 702.8894 (100.0%), 700.8914 (68.5%), 704.8873 (64.9%),
703.8927 (18.4%), 698.8934 (17.6%), 706.8853 (15.8%), 701.8948 (14.8%),
705.8907 (14.0%), 699.8968 (3.8%), 707.8886 (3.4%), 703.8927 (3.2%),
703.8864 (2.2%), 702.8981 (1.5%), 701.8884 (1.5%), 706.8940 (1.4%),
705.8843 (1.4%), 704.8961 (1.3%)

Apêndice 30. Espectro no infravermelho do composto **49** (cm⁻¹).

Apêndice 31. Espectro de RMN de ^1H do composto **50** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

Apêndice 32. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **50** (DMSO- d_6 , 151 MHz).

Apêndice 33. Espectro de massas de alta resolução do composto **50** [ESI⁺].

abb-i-61_2_ESI+-ESI+ #2-13 RT: 0.01-0.10 AV: 12 NL: 1.03E8
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1000.00]

Chemical Formula: $C_{22}H_{32}Br_4N_5O_2^+$

Exact Mass: 713.9284

m/z: 717.9243 (100.0%), 715.9264 (68.5%), 719.9223 (64.9%), 718.9277 (18.4%),
713.9284 (17.6%), 716.9297 (16.3%), 721.9202 (15.8%), 720.9256 (15.4%),
718.9277 (5.4%), 714.9318 (4.2%), 722.9236 (3.8%), 717.9331 (1.9%),
718.9213 (1.8%), 721.9290 (1.8%), 719.9310 (1.4%), 719.9310 (1.3%),
716.9234 (1.3%), 720.9193 (1.2%)

Apêndice 34. Espectro no infravermelho do composto **50** (cm^{-1}).

Apêndice 35. Espectro de RMN de ^1H do composto **51** ($\text{MeOH-}d_4$, 400 MHz).

Apêndice 36. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **51** (MeOH- d_4 , 101 MHz).

Apêndice 37. Espectro de massas de alta resolução do composto **51** [ESI].

abb-i-04-ESI_-ESI #2-12 RT: 0.01-0.10 AV: 11 NL: 1.69E7
T: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1000.00]

Chemical Formula: $C_{15}H_{19}N_4O_2^-$

Exact Mass: 287.1513

m/z: 287.1513 (100.0%), 288.1547 (16.2%), 288.1484 (1.5%), 289.1581 (1.2%)

Apêndice 38. Espectro no infravermelho do composto **51** (cm^{-1}).

Apêndice 39. Espectro de RMN de ^1H do composto **52** ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz).

Apêndice 40. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **52** (DMSO- d_6 , 151 MHz).

Apêndice 41. Espectro de massas de alta resolução do composto **52** [ESI⁺].

ABB-I09_+ESI_orbi+ESI#1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 6.32E7

T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-1000.00]

Chemical Formula: $C_{17}H_{26}N_5O_2^+$

Exact Mass: 332.2081

m/z: 332.2081 (100.0%), 333.2115 (18.4%).

Apêndice 42. Espectro no infravermelho do composto **52** (cm⁻¹).

Apêndice 43. Espectro de RMN de ^1H do composto **54** (CDCl_3 , 400 MHz).

Apêndice 44. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **54** (CDCl_3 , 101 MHz).

Apêndice 45. Espectro de RMN de ^1H do composto **53** (MeOH- d_4 , 600 MHz).

Apêndice 46. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **53** ($\text{MeOH-}d_4$, 151 MHz).

Apêndice 47. Espectro de massas de alta resolução do composto **53 [ESI⁺].**

abb-i-76_+ESI_+ESI#2-12 RT: 0.01-0.09 AV: 11 NL: 3.09E7
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-1000.00]

Chemical Formula: C₁₇H₂₄Br₂N₅O₂⁺

Exact Mass: 488,0291

m/z: 490.0271 (100.0%), 488.0291 (51.4%), 492.0250 (48.6%), 491.0304 (9.7%), 493.0284 (8.9%), 491.0304 (8.7%), 489.0325 (5.0%), 489.0325 (4.4%), 491.0241 (1.8%), 492.0338 (1.0%)

Apêndice 48. Espectro no infravermelho do composto **53** (cm⁻¹).

Apêndice 49. Espectro de RMN de ^1H do composto **55** (CDCl_3 , 600 MHz).

Apêndice 50. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **55** (CDCl_3 , 151 MHz).

Apêndice 51. Espectro de RMN de ^1H do composto **56** (MeOH- d_4 , 600 MHz).

Apêndice 52. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **56** ($\text{MeOH-}d_4$, 151 MHz).

Apêndice 53. Espectro de massas de alta resolução do composto **56** [ESI⁺].

abb-ii-23_160913190218 #2-13 RT: 0.01-0.11 AV: 12 NL: 2.14E7

T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]

Chemical Formula: $C_{17}H_{22}Cl_4N_5O_2^+$

Exact Mass: 468.0522

Molecular Weight: 470.1955

m/z: 468.0522 (100.0%), 470.0493 (63.9%), 470.0493 (63.9%), 472.0463 (51.1%), 471.0526 (23.5%), 469.0556 (18.4%), 474.0434 (13.1%), 472.0463 (10.2%), 473.0497 (9.4%), 473.0497 (1.9%), 469.0492 (1.8%), 470.0589 (1.6%), 475.0467 (1.2%), 475.0467 (1.2%), 471.0463 (1.2%), 471.0463 (1.2%), 476.0404 (1.0%), 472.0560 (1.0%), 472.0560 (1.0%)

Apêndice 54. Espectro no infravermelho do composto **56** (cm⁻¹).

Apêndice 55. Espectro de RMN de ^1H do composto **57** (CDCl_3 , 400 MHz).

Apêndice 56. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **57** (CDCl_3 , 101 MHz).

Apêndice 57. Espectro de RMN de ^1H do composto **58** (MeOH- d_4 , 600 MHz).

Apêndice 58. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **58** (MeOH- d_4 , 151 MHz).

Apêndice 59. Espectro de massas de alta resolução do composto **58** [ESI⁺].

abb-ii-46_+ESI#2-18 RT: 0.01-0.16 AV: 17 NL: 7.47E6
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-800.00]

Chemical Formula: C₁₇H₂₄F₂N₅O₂⁺

Exact Mass: 368.1893

m/z: 368.1893 (100.0%), 369.1926 (18.4%), 369.1863 (1.8%), 370.1960 (1.6%)

Apêndice 60. Espectro no infravermelho do composto **58** (cm⁻¹).

Apêndice 61. Espectro de RMN de ^1H do composto **59** ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz).

Apêndice 62. Espectro de RMN de ^1H do composto **59** ($\text{DMSO}-d_6$, 101 MHz).

Apêndice 63. Espectro de massas de alta resolução do composto **59** [ESI⁺].

abb-ii-16_+ESI+ESI #2-10 RT: 0.01-0.09 AV: 9 NL: 3.97E8

T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-1000.00]

Chemical Formula: C₂₅H₃₀N₅O₂⁺

Exact Mass: 432.2394

m/z: 432.2394 (100.0%), 433.2428 (27.0%), 434.2461 (2.7%), 433.2364 (1.8%)

Apêndice 64. Espectro no infravermelho do composto **59** (cm⁻¹).

Apêndice 65. Espectro de RMN de ^1H do composto **60** (MeOH- d_4 , 400 MHz).

Apêndice 66. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **60** (MeOH- d_4 , 101 Hz).

Apêndice 67. Espectro de massas de alta resolução do composto **60** [ESI⁺].

abb-ii-50_161005155744 #2-18 RT: 0.01-0.16 AV: 17 NL: 1.21E7
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-800.00]

Chemical Formula: C₂₃H₂₈N₇O₂⁺

Exact Mass: 434.2299

m/z: 434.2299 (100.0%), 435.2333 (24.9%), 436.2366 (2.7%), 435.2269 (2.6%)

Apêndice 68. Espectro no infravermelho do composto **60** (cm⁻¹).

Apêndice 69. Espectro de RMN de ^1H do composto **61** (CDCl_3 , 400 MHz).

Apêndice 70. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **61** (CDCl_3 , 101 MHz).

Apêndice 71. Espectro de massas de alta resolução do composto **61** [ESI⁺].

abb-ii-38_ESI+ #2-13 RT: 0.01-0.10 AV: 12 NL: 2.69E8
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1000.00]

Chemical Formula: C₂₁H₃₀N₅O₂⁺

Exact Mass: 384.2394

m/z: 384.2394 (100.0%), 385.2428 (22.7%), 386.2461 (2.5%), 385.2364 (1.8%)

Apêndice 72. Espectro no infravermelho do composto **61** (cm⁻¹).

Apêndice 73. Espectro de RMN de ^1H do composto **62** (CDCl_3 , 400 MHz).

Apêndice 74. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **62** (CDCl_3 , 101 MHz).

Apêndice 75. Espectro de massas de alta resolução do composto **62** [ESI⁺].

abb-ii-37_ESI+ #2-14 RT: 0.01-0.11 AV: 13 NL: 8.78E7

T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1000.00]

Apêndice 76. Espectro no infravermelho do composto **62** (cm⁻¹).

Apêndice 77. Espectro de RMN de ^1H do composto **63** (CDCl_3 , 600 MHz).

Apêndice 78. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **63** (CDCl_3 , 151 MHz).

Apêndice 79. Espectro de massas de alta resolução do composto **63** [ESI⁺].

abb-ii-25_+ESI#2-10 RT: 0.01-0.09 AV: 9 NL: 2.86E8

T: FTMS + p ESI Full ms [145.00-2000.00]

Chemical Formula: C₁₉H₂₈N₃O₄⁺

Exact Mass: 362.2074

m/z: 362.2074 (100.0%), 363.2108 (20.5%), 364.2141 (2.0%), 363.2045 (1.1%)

Apêndice 80. Espectro no infravermelho do composto **63** (cm⁻¹).

Apêndice 81. Espectro de RMN de ^1H do composto **64** (CDCl_3 , 600 MHz).

Apêndice 82. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **64** (CDCl_3 , 151 MHz).

Apêndice 83. Espectro de massas de alta resolução do composto **64** [ESI⁺].

abb-ii-32_+ESI#2-14 RT: 0.01-0.11 AV: 13 NL: 3.88E7

T: FTMS + p ESI Full ms [145.00-2000.00]

Chemical Formula: $C_{17}H_{20}Br_4N_3O_4^+$

Exact Mass: 645.8182

m/z: 649.8141 (100.0%), 647.8161 (68.5%), 651.8120 (64.9%), 650.8174 (18.4%), 645.8182 (17.6%), 653.8100 (15.8%), 648.8195 (12.6%), 652.8154 (11.9%), 646.8215 (3.2%), 654.8134 (2.9%), 651.8208 (1.2%), 650.8111 (1.1%), 649.8228 (1.1%), 653.8188 (1.0%)

Apêndice 84. Espectro no infravermelho do composto **64** (cm⁻¹).

Apêndice 85. Espectro de RMN de ^1H do composto **64** (MeOH- d_4 , 600 MHz).

Apêndice 86. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **65** (MeOH- d_4 , 151 MHz).

Apêndice 87. Espectro de massas de alta resolução do composto **65** [ESI⁺].

abb-ii-57_161005154435 #2-15 RT: 0.02-0.16 AV: 14 NL: 2.13E7

T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-800.00]

Chemical Formula: $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2^+$

Exact Mass: 394.1617

m/z: 394.1617 (100.0%), 395.1651 (20.5%), 396.1575 (9.0%), 396.1685 (2.0%), 397.1609 (1.9%), 395.1611 (1.6%), 395.1588 (1.1%)

Apêndice 88. Espectro no infravermelho do composto **65** (cm⁻¹).

Apêndice 89. Espectro de RMN de ^1H do composto **66** (MeOH- d_4 , 600 MHz).

Apêndice 90. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **66** (MeOH- d_4 , 151 MHz).

Apêndice 91. Espectro de massas de alta resolução do composto **66** [ESI⁺].

abb-ii-55_+ESI#2-16 RT: 0.02-0.15 AV: 15 NL: 3.50E6
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-800.00]

Chemical Formula: $C_{17}H_{22}Br_2N_3O_2S_2^+$

Exact Mass: 521.9515

m/z: 523.9494 (100.0%), 521.9515 (51.4%), 525.9474 (48.6%), 524.9528 (18.4%), 526.9507 (8.9%), 522.9548 (5.0%), 523.9473 (4.6%), 525.9452 (4.5%), 525.9452 (4.5%), 522.9548 (4.4%), 527.9432 (2.2%), 527.9432 (2.2%), 525.9561 (1.3%), 526.9486 (1.3%), 524.9465 (1.1%)

Apêndice 92. Espectro no infravermelho do composto **66** (cm⁻¹).

Apêndice 93. Espectro de RMN de ^1H do composto **86** ($\text{MeOH-}d_4$, 400 MHz).

Apêndice 94. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **86** (MeOH- d_4 , 101 MHz).

Apêndice 95. Espectro no infravermelho do composto **86** (cm⁻¹).

Apêndice 96. Espectro de RMN de ^1H do composto **85** ($\text{MeOH-}d_4$, 400 MHz)

Apêndice 97. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **85** ($\text{MeOH-}d_4$, 101 MHz).

Apêndice 98. Espectro de massas de alta resolução do composto **85** [ESI⁺].

abb-i-99_+ESI_+ESI #2-11 RT: 0.01-0.10 AV: 10 NL: 1.63E6

T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-800.00]

Apêndice 99. Espectro no infravermelho do composto **85** (cm^{-1}).

Apêndice 100. Espectro de RMN de ^1H do composto **92** (CDCl_3 , 400 MHz).

Apêndice 101. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **92** (CDCl_3 , 101 MHz).

Apêndice 102. Espectro no infravermelho do composto **92** (cm⁻¹).

Apêndice 103. Espectro de RMN de ^1H do composto **88** (MeOH- d_4 , 400 MHz).

Apêndice 104. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **88** (MeOH- d_4 , 101 MHz).

Apêndice 105. Espectro no infravermelho do composto **88** (cm⁻¹).

Apêndice 106. Espectro de RMN de ^1H do composto **95** (MeOH- d_4 , 400 MHz).

Apêndice 107. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **95** (MeOH- d_4 , 101 MHz).

Apêndice 108. Espectro no infravermelho do composto **95** (cm⁻¹).

Apêndice 109. Espectro de RMN de ^1H do composto **96** ($\text{MeOH-}d_4$, 400 MHz).

Apêndice 110. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **96** (MeOH- d_4 , 101 MHz).

Apêndice 111. Espectro de RMN de ^1H do composto **97** (MeOH- d_4 , 600 MHz).

Apêndice 112. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **97** (MeOH- d_4 , 151 MHz).

Apêndice 113. Espectro de massas de alta resolução do composto **97** [ESI⁻].

abb-ii-45_ESI- #2-7 RT: 0.02-0.09 AV: 6 NL: 7.18E5

T: FTMS - p ESI Full ms [113.00-1000.00]

Apêndice 114. Espectro no infravermelho do composto **97** (cm⁻¹).

Apêndice 115. Espectro de RMN de ^1H do composto **98** (MeOH- d_4 , 600 MHz).

Apêndice 116. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **98** (MeOH- d_4 , 151 MHz).

Apêndice 117. Espectro de massas de alta resolução do composto **98** [ESI⁻].

abb-ii-50_ESI#2-9 RT: 0.02-0.11 AV: 8 NL: 1.23E6

T: FTMS -p ESI Full ms [100.00-1000.00]

Chemical Formula: $C_{10}H_{10}BrN_2O_2^-$

Exact Mass: 268,9931

m/z: 268.9931 (100.0%), 270.9911 (97.3%), 269.9965 (10.8%), 271.9944 (10.5%)

Apêndice 118. Espectro no infravermelho do composto **98** (cm⁻¹).

Apêndice 119. Espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-6 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 120. Expansão 1 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-6 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 121. Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-6 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 122. Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-6 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 123. Espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-6 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 124. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-6 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 125. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-6 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 126. Expansão 3 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-6 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 127. Espectro COSY obtido para o composto AT1M3I-6 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).

Apêndice 128. Espectro HSQC obtido para o composto AT1M3I-6 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).

Apêndice 129. Espectro HMBC obtido para o composto AT1M3I-6 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).

Apêndice 130. Espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-6 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 131. Expansão 1 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-6 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 132. Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-6 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 133. Espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-6 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 134. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-6 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 135. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-6 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 136. Expansão 3 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-6 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 137. Espectro de massas de alta resolução do composto AT1M3I-6 [ESI-] e [ESI+] (fração AT1M3I).

Apêndice 138. Espectro no infravermelho do composto AT1M3I-6 (cm^{-1} , fração AT1M3I).

Apêndice 139. Espectro de absorção no ultravioleta do composto AT1M3I-6 (MeOH, $c = 0,025 \text{ mg mL}^{-1}$, fração AT1M3I).

Apêndice 140. Espectro de dicroísmo circular do composto AT1M3I-6 (MeOH, $c = 0,15 \text{ mg mL}^{-1}$, fração AT1M3).

Apêndice 141. Espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 142. Expansão 1 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 143. Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 144. Expansão 3 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 145. Espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 146. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 147. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 148. Expansão 3 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 149. Espectro COSY obtido para o composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).

Apêndice 150. Espectro HSQC-TOCSY obtido para o composto 1 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I-5).

Apêndice 151. Espectro HSQC obtido para o composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).

Apêndice 152. Espectro HMBC 1 obtido para o composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).

Apêndice 153. Espectro HMBC 2 obtido para o composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).

Apêndice 154. Espectro ROESY obtido para o composto AT1M3I-5 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).

Apêndice 155. Espectro de massas de alta resolução do composto AT1M3I-5 [ESI-] e [ESI+] (fração AT1M3I).

Apêndice 156. Espectro no infravermelho do composto AT1M3I-5 (cm^{-1} , fração AT1M3I).

Apêndice 157. Espectro de absorção no ultravioleta do composto AT1M3I-5 (MeOH, $c = 0,025 \text{ mg mL}^{-1}$, fração AT1M3I).

Apêndice 158. Espectro de dicroísmo circular do composto AT1M3I-5 (MeOH, $c = 0,15 \text{ mg mL}^{-1}$, fração AT1M3I).

Apêndice 159. Espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-4 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 160. Expansão 1 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-4 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 161. Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-4 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 162. Expansão 3 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-4 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 163. Espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-4 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 164. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-4 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 165. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-4 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 166. Expansão 3 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-4 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 167. Espectro DEPT135 obtido para o composto AT1M3I-4 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).

Apêndice 168. Espectro COSY obtido para o composto AT1M3I-4 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).

Apêndice 169. Espectro HSQC-TOCSY obtido para o composto AT1M3I-4 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).

Apêndice 170. Espectro HSQC obtido para o composto AT1M3I-4 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).

Apêndice 171. Espectro HMBC 1 obtido para o composto AT1M3I-4 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).

Apêndice 172. Espectro HMBC 2 obtido para o composto AT1M3I-4 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).

Apêndice 173. Espectro ROESY obtido para o composto AT1M3I-4 (DMSO- d_6 , fração AT1M3I).

Apêndice 174. Espectro de massas de alta resolução do composto AT1M3I-4 [ESI-] e [ESI+] (fração AT1M3I).

Apêndice 175. Espectro no infravermelho do composto AT1M3I-4 (cm⁻¹, fração AT1M3I).

Apêndice 176. Espectro de absorção no ultravioleta do composto AT1M3I-4 (MeOH, $c = 0,025 \text{ mg mL}^{-1}$, fração AT1M3I).

Apêndice 177. Espectro de dicroísmo circular do composto AT1M3I-4 (MeOH, $c = 0,15 \text{ mg mL}^{-1}$, fração AT1M3I).

Apêndice 178. Espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-3 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 179. Expansão 1 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-3 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 180. Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M3I-3 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 181. Espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-3 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 182. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-3 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 183. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-3 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 184. Expansão 3 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M3I-3 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M3I).

Apêndice 185. Espectro de massas de alta resolução do composto AT1M3I-3 [ESI-] e [ESI+] (fração AT1M3I).

Apêndice 186. Espectro no infravermelho do composto AT1M3I-3 (cm^{-1} , fração AT1M3I).

Apêndice 187. Espectro de absorção no ultravioleta do composto AT1M3I-3 (MeOH, $c = 0,025 \text{ mg mL}^{-1}$, fração AT1M3I).

Apêndice 188. Espectro de dicroísmo circular do composto AT1M3I-3 (MeOH, $c = 0,15 \text{ mg mL}^{-1}$, fração AT1M3I).

Apêndice 189. Espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 190. Expansão 1 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 191. Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 192. Expansão 3 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 193. Espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 194. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 195. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 196. Expansão 3 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 197. Expansão 4 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 198. Espectro COSY obtido para o composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , fração AT1M5O).

Apêndice 199. Espectro HSQC-TOCSY obtido para o composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , fração AT1M5O).

Apêndice 200. Espectro HSQC obtido para o composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , fração AT1M5O).

Apêndice 201. Espectro HMBC obtido para o composto AT1M5O-4 (DMSO- d_6 , fração AT1M5O).

Apêndice 202. Espectro NOESY obtido para o composto AT1M50-4 (DMSO- d_6 , fração AT1M50).

Apêndice 203. Espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-4 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 204. Expansão 1 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-4 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 205. Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-4 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 206. Expansão 3 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-4 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 207. Espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-4 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 208. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-4 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 209. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-4 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 210. Expansão 3 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-4 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 211. Expansão 4 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-4 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 212. Espectro COSY obtido para o composto AT1M5O-4 (MeOH-*d*₄, fração AT1M5O).

Apêndice 213. Espectro HSQC obtido para o composto AT1M5O-4 (MeOH-*d*₄, fração AT1M5O).

Apêndice 214. Espectro HMBC obtido para o composto AT1M5O-4 (MeOH- d_4 , fração AT1M5O).

Apêndice 215. Espectro de massas de alta resolução do composto AT1M5O-4 [ESI-] e [ESI+] (fração AT1M5O).

Apêndice 216. Espectro no infravermelho do composto AT1M5O-4 (cm^{-1} , fração AT1M5O).

Apêndice 217. Espectro de absorção no ultravioleta do composto AT1M5O-4 (MeOH, $c = 0,025 \text{ mg mL}^{-1}$, fração AT1M5O).

Apêndice 218. Espectro de dicroísmo circular do composto AT1M5O-4 (MeOH, $c = 0,15 \text{ mg mL}^{-1}$, fração AT1M5O).

Apêndice 219. Espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 220. Expansão 1 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 221. Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 222. Expansão 3 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , 600 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 223. Espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 224. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 225. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 226. Expansão 3 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 227. Expansão 4 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , 151 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 228. Espectro COSY obtido para o composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , fração AT1M5O).

Apêndice 229. Espectro HSQC-TOCSY obtido para o composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , fração AT1M5O).

Apêndice 230. Espectro HSQC obtido para o composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , fração AT1M5O).

Apêndice 231. Espectro HMBC obtido para o composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , fração AT1M5O).

Apêndice 232. Espectro ROESY obtido para o composto AT1M5O-5 (DMSO- d_6 , fração AT1M5O).

Apêndice 233. Espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-5 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 234. Expansão 1 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-5 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 235. Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-5 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 236. Expansão 3 do espectro de RMN de ^1H do composto AT1M5O-5 (MeOH- d_4 , 600 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 237. Espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-5 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 238. Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-5 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 239. Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-5 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 240. Expansão 3 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-5 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 241. Expansão 4 do espectro de RMN de ^{13}C do composto AT1M5O-5 (MeOH- d_4 , 151 MHz, fração AT1M5O).

Apêndice 242. Espectro COSY obtido para o composto AT1M5O-5 (MeOH- d_4 , fração AT1M5O).

Apêndice 243. Espectro HSQC obtido para o composto AT1M5O-5 (MeOH-*d*₄, fração AT1M5O).

Apêndice 244. Espectro HMBC obtido para o composto AT1M5O-5 (MeOH- d_4 , fração AT1M5O).

Apêndice 245. Espectro de massas de alta resolução do composto AT1M5O-5 [ESI-] e [ESI+] (fração AT1M5O).

Apêndice 246. Espectro no infravermelho do composto AT1M5O-5 (cm^{-1} , fração AT1M5O).

Apêndice 247. Espectro de absorção no ultravioleta do composto AT1M5O-5 (MeOH, $c = 0,025 \text{ mg mL}^{-1}$, fração AT1M5O).

Apêndice 248. Espectro de dicroísmo circular do composto AT1M5O-5 (MeOH, $c = 0,15 \text{ mg mL}^{-1}$, fração AT1M5O).

Analises de Marfey

Apêndice 249. Cromatograma da reação de Marfey para a valina (280 nm), espectro no ultravioleta e de massas (ESI⁻).

(S)-Val-FDAA
Exact Mass: 368,12

Apêndice 250. Cromatograma da reação de Marfey para a isoleucina (280 nm), espectro de ultravioleta e de massas (ESI⁺).

Apêndice 251. Cromatograma da reação de Marfey para a leucina (280 nm), espectro no ultravioleta e de massas (ESI⁻).

Apêndice 252. Cromatograma da reação de Marfey para a prolina (280 nm), espectro no ultravioleta e de massas (ESI⁻).

(S)-Pro-FDAA

Exact Mass: 366,11

Apêndice 253. Cromatograma da reação de Marfey para a alanina (280 nm), espectro no ultravioleta e de massas (ESI⁻).

Apêndice 254. Cromatograma da reação de Marfey para a glutamina (280 nm), espectro no ultravioleta e de massas (ESI⁻).

(S)-Gln-FDAA

Exact Mass: 397,11

Apêndice 255. Cromatograma da mistura 1, contendo: Leu-Ile, em 280 nm. Espectro no ultravioleta e de massas (ESI⁻).

Apêndice 256. Cromatograma da mistura 2, contendo: Val-Leu-Ile, em 280 nm. Espectro no ultravioleta e de massas (ESI).

Apêndice 257. Cromatograma da mistura 3, contendo: Val-Leu-Pro-Ala-Gln, em 280 nm. Espectro no ultravioleta e de massas (ESI).

Apêndice 258. Cromatograma da reação de Marfey para o composto AT1M3I-4 hidrolisado (280 nm) e espectro de massas (ESI⁻).

Apêndice 259. Cromatograma da reação de Marfey para o composto AT1M3I-5 hidrolisado (280 nm) e espectro de massas (ESI⁺).

Apêndice 260. Cromatograma da reação de Marfey para o composto AT1M3I-6 hidrolisado (280 nm) e espectro de massas (ESI+).

Apêndice 261. Cromatograma da reação de Marfey para o composto AT1M5O-4 hidrolisado (280 nm) e espectro de massas (ESI⁺).

Apêndice 262. Cromatograma da reação de Marfey para o composto AT1M5O-5 hidrolisado (280 nm) e espectro de massas (ESI+).