



UnB

Universidade de Brasília - UnB

Instituto de Química - IQ, Programa de pós-graduação em Química-PPGQ

**Planejamento Racional e Síntese de Peptidomiméticos
Macrocíclicos para a Inibição de *Quorum Sensing* em
*Staphylococcus aureus***

José Feliciano Brango Vanegas

Tese de Doutorado em Química

Brasília, novembro de 2019

Universidade de Brasília - UnB
Instituto de Química - IQ, Programa de Pós-graduação em Química-PPGQ

**Planejamento Racional e Síntese de Peptidomiméticos
Macrocíclicos para a Inibição de *Quorum Sensing* em
*Staphylococcus aureus***

José Feliciano Brango Vanegas

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade de Brasília – UnB, como parte dos requisitos necessários para a obtenção
do título de Doutor em Química.

Orientador:
Prof. Dr. Ângelo Henrique de Lira Machado

Área de Concentração: Química Orgânica

Brasília, novembro de 2019

Folha de Aprovação

Comunicamos a aprovação da Defesa de Tese do (a) aluno (a) **José Feliciano Brango Vanegas**, matrícula nº **19/0141786**, intitulada “**Planejamento Racional e Síntese de Peptidomiméticos Macrocíclicos para a Inibição de Quorum Sensing em Staphylococcus aureus**”, apresentada no (a) Sala de Videoconferência do CDT da Universidade de Brasília (UnB) em 29 de novembro de 2019.

Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof.^a Dra. Talita de Almeida Fernandes
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof. Dr. Ezequiel Porta
Membro Titular (Durham University)

Prof. Dr. Rafael Oliveira Rocha
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof. Dr. Mauro Vicentini Correia
Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 29 de novembro de 2019.

Para mi família

Agradecimentos

Quero agradecer a Deus, que me deu forças para chegar até aqui; a minha família que me apoiam em tudo as coisas que decido fazer; à UnB pela formação recebida no PPGQ-UnB; ao professor Ângelo Machado, meu orientador, obrigado pela paciência, pelo aprendizagem e pelos momentos de discussão; a todos os professores do instituto de química da UnB e especialmente os professores de LITMO-UnB pelos ensinamentos; aos alunos do LAQMOS-UnB e LAQMET-UnB pelo auxílio com equipamentos e reagentes, agradeço também a colaboração do professor Guilherme Brand pelo suporte em alguns reagentes e materiais; ao pessoal de NuPMia-UnB: o professor José Roberto Leite, Andreanne, Daniel, Arianne, Anderson, Glorinha e demais pessoas pelo recebimento e colaboração com o equipamento de CLAE e os testes de viabilidade celular; a Lucinda Bessa do LAQV/REQUIMTE da Universidade do Porto, pelos teste com *S. aureus*; ao pessoal do Laboratório de Toxicologia (LabTox-FS-UnB) e do Laboratório de Controle de qualidade da FS-UnB pelo colaboração quando precisei de equipamentos e reagentes; ao Departamento de Polícia Federal (SEPLAB-INC-DPF), especialmente a Elvio pelo ajuda na aquisição de alguns espectros de massa; ao pessoal da CAIQ-UnB pelo aquisição dos espectros de RMN e EMAR.

Agradeço a meus companheiros de laboratório: Terezinha, Diana, Saulo, Fernanda, Robson, Eder, Charlley, Vinicius, Leandro, Tiago, Luan e Jhonata pela companhia, colaboração e aprendizagem; a meus amigos e demais pessoas que de alguma ou outra forma me ajudaram; ao CNPq pela bolsa de doutorado, à Capes, a FAP-DF (projeto 0193.001.560/2017), e DPG-UnB.

Resumo

A pesquisa de novas substâncias sintéticas peptidomiméticas análogas aos peptídeos autoindutores (PAI's) de *Staphylococcus aureus*, e moléculas estruturalmente relacionadas como as solonamidas, para a inibição de *quorum sensing* deste microrganismo, torna-se uma alternativa diferente aos antibióticos para o tratamento de doenças infecciosas causadas por este patógeno. Este trabalho expõe os resultados obtidos do planejamento e sínteses de peptídeos cíclicos racionalmente planejados para ter a dita propriedade. Para este planejamento, a natureza dos aminoácidos, estereoquímica, e número de átomos entre outras características anteriormente relatadas como importantes para esta propriedade, foram usadas, permitindo vislumbrar duas gerações de moléculas. Em uma desta gerações, foram usados resíduos ácidos de adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH), que foram compatíveis com a metodologia de sínteses de peptídeos em fase sólida (SPFS). Estes resíduos de AMBH permitiram a ciclização via uma reação de substituição nucleofílica alílica (S_N2'), uma nova, efetiva e simples metodologia que permitiu a síntese de oito novas moléculas peptidomiméticas. Estes novos peptídeos cíclicos não apresentaram efeito tóxico no crescimento de *S. aureus* e dois deles inibiram sua atividade hemolítica, sugerindo que eles interferem sobre *quorum sensing* da bactéria de maneira semelhante à relatada para as solonamidas. Ensaio de viabilidade celular com fibroblastos humanos também permitiram verifica que os análogos sintetizados não são citotóxicos frente a estas células.

Palavras chaves: *Quorum sensing*, *Staphylococcus aureus*, AMBH, SPFS

Abstract

Research about new synthetic peptidomimetics analogous to autoinducers peptides (AIPs) of *Staphylococcus aureus*, and structurally related to solonamidas has become a different alternative to antibiotics for the treatment of infectious diseases caused for this pathogen, since these kind of molecules can act as quorum sensing inhibitors. This work presents the results obtained from the synthesis of cyclic peptides designed to have this property. Two generations of molecules were rationally design based on amino acid nature, stereochemistry, and number of atoms, important structural features previously highlighted by others for the desired inhibitory activity. One of these generations used acid residues of Morita-Baylis-Hillman adduct (MBHA), that were compatible with the solid phase peptide synthesis (SPPS) methodology. This MBHA residues facilitated the allylic nucleophilic substitution (S_N2') reaction for the cyclization which provided a new, effective, and simple methodology to allow the synthesis of eight new peptidomimetic. These analogues didn't show toxic effect on *S. aureus* growth and two of them inhibited their hemolytic activity, suggesting that they interfered on bacterial quorum sensing in a similar fashion as those reported for solonamides. Cell viability assays with human fibroblasts also showed that the synthesized analogs are not cytotoxic to these cells.

Keywords: *Quorum sensing, Staphylococcus aureus, MBHA, SPPS*

Sumário

	Pag.
Introdução	1
1. <i>Quorum sensing</i> em <i>Staphylococcus aureus</i>: Inibição e perspectiva atual do tema	3
1.1 <i>Quorum sensing</i>	3
1.2 Patogênese e sistemas de <i>quorum sensing</i> em <i>Staphylococcus aureus</i>	5
1.3 <i>Screening</i> de peptídeos miméticos cíclicos como IQS de <i>Staphylococcus aureus</i> : Análogos sintéticos dos PAI's	9
1.4 Solonamidas A e B, análogos naturais dos PAI's	20
1.5 Síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) e a metodologia Fmoc (9-fluorenil-metiloxicarbonila)	23
2. Planejamento, sínteses e atividade biológica de peptídeos cíclicos	27
2.1 Desenho da primeira geração de novos peptídeos cíclicos	28
2.2 Sínteses do ácido mono- <i>tert</i> -butil malônico	30
2.3 Tentativas de síntese da primeira geração de peptídeos cíclicos	31
2.4 Desenho da segunda geração novos peptídeos cíclicos	33
2.5 Sínteses dos adutos de Morita-Baylis-Hillman e derivados ácidos dos mesmos	36
2.6 Sínteses em fase sólida das sequências lineares dos tetrapeptídeos	39
2.7 Reação de macrociclicação e purificação	40
2.8 Caracterização dos compostos sintetizados	41
2.9 Avaliação da inibição de crescimento e atividade hemolítica de <i>S. aureus</i> para os compostos	49
3. Conclusões e Perspectivas	53
4. Materiais e Métodos	55
4.1 Purificação de solventes e reagentes líquidos	55
4.2 Reagentes usados na síntese de peptídeos	55
4.3 Ciclos de síntese de peptídeos em fase sólida pela metodologia Fmoc (SPFS-Fmoc)	56
4.5 Técnicas de análise	57
4.5.1 Análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa	57
4.5.2 Análises e purificação por cromatografia líquida de alta eficiência	58
4.5.3 Análises por ressonância magnética nuclear	58
4.5.4 Análises por espectrometria de massa de alta resolução e massas em tandem	59
4.5.5 Análises por espectroscopia no infravermelho	59
4.6 Parte experimental	59
4.6.1 Tentativa de síntese de ácido mono- <i>tert</i> -butil malônico a partir de ácido Malônico	59
4.6.2 Síntese de ácido mono- <i>tert</i> -butil malônico via ácido de Meldrum	60
4.6.3 Tentativa de síntese do ácido 3-(etiltilio)-3-oxopropanoico via ácido de Meldrum	61
4.6.4 Procedimentos empregados para a sínteses de peptídeos da primeira geração	61

4.6.5 Síntese de adutos de Morita-Baylis Hillman	63
4.6.6 Reação de hidrolises dos adutos de Morita-Baylis Hillman	64
4.6.7 Procedimentos empregados para a sínteses dos ciclopeptídeos pertencentes a segunda geração	65
4.6.8 Ensaio de atividade sobre <i>Staphylococcus aureus</i> e fibroblastos humanos	76
5. Bibliografia	79
Anexos	

Lista de Esquemas

	Pag.
Esquema 1.1 Rota de síntese que emprega a SPFS-Fmoc usada por Otto <i>et al.</i> em 1999 para produzir análogos do PAI de <i>S. epidermidis</i> .	10
Esquema 1.2. Rota de síntese que emprega a SPFS-Fmoc/ <i>t</i> -Bu usada por Chan <i>et al.</i> em 2004 para produzir análogos do PAI-I de <i>S. aureus</i> .	12
Esquema 1.3. Rota de síntese que emprega a SPFS-Boc/Bzl usada por Chan <i>et al.</i> em 2004 para produzir análogos do PAI-I de <i>S. aureus</i> .	13
Esquema 1.4. Rota de síntese que emprega a SPFS-Fmoc/ <i>t</i> -Bu usada por Tal-Gan <i>et al.</i> em 2013 para produzir análogos do PAI-III de <i>S. aureus</i> .	15
Esquema 2.1. Rota de sínteses utilizada para a síntese do ácido mono- <i>tert</i> -butil malônico.	30
Esquema 2.2. Rota de síntese proposta para a síntese das macrolactonas (32) e (33) pertencentes à primeira geração. A rota faz uso do ácido mono- <i>tert</i> -butil malônico (34) . A: Rota de reação para ciclização em solução. B: Rota de reação para ciclização na resina.	32
Esquema 2.3. Rota de síntese proposta para a síntese dos ciclopeptídeos tiolactônicos pertencentes a primeira geração.	33
Esquema 2.4. Rota de reação propostos para a síntese dos ciclopeptídeos tiolactônicos pertencentes a primeira geração que contempla o uso do ácido 3-(etiltio)-3-oxopropanoico (35) .	33
Esquema 2.5. Rota de sínteses empregada para a produção dos ciclopeptídeos contendo uma ligação tioéter, pertencentes a segunda geração.	35
Esquema 2.6. Sínteses dos AMBH e seus respectivos ácidos.	36
Esquema 2.7. SPFS-Fmoc dos tetrapeptídeos; acoplamento dos ácidos de AMBH e acetilação dos mesmos	39
Esquema 2.8. Reação macrociclização em solução de alta diluição dos peptídeos lineares depois da clivagem.	40
Esquema 2.9. Padrão de fragmentações observado nos espectros de massa EMAR- <i>MS/MS</i> para todos os compostos, que mostra a abertura do anel macrocíclico a partir da perda de um, dois ou três resíduos de aminoácidos como fragmentos neutros. Os íons A, B e C são diagnósticos e indicam a nova ligação tioéter formada.	42
Esquema 2.10. Subestruturas do composto (41) , mostrando as correlações <i>COSY/TOCSY</i> , <i>NOESY</i> e <i>HMBC</i> mais importantes observadas. a) na cauda exocíclica, b) na nova ligação S-C entre a Cys e o resíduo do aduto e c) nos aminoácidos Ala, Leu e Phe.	47

Lista de Figuras

	Pag.
Figura 1.1. Sistema de <i>quorum sensing</i> LuxI/LuxR de <i>Vibrio fischeri</i> , semelhante para a maioria das bactérias Gram negativas. (1) é a moecula sinal de <i>V. fischeri</i> . (2) AI-2.	4
Figura 1.2. Peptídeos autoindutores (PAI's) cíclicos que atuam no QS nas diferentes cepas de <i>S. aureus</i> .	6
Figura 1.3. Sistema de <i>quorum sensing</i> tipo dois componentes na bactéria Gram positivas <i>S. aureus</i> .	7
Figura 1.4. Mapa da topologia do domínio sensor AgrC. H(1-6) são as hélice (1-6). Figura baseada de Novick e Geisinger, 2008.	9
Figura 1.5. Moléculas sintéticas análogas do PAI de <i>Staphylococcus epidermidis</i> , com variações na cauda e na estrutura cíclica sintetizadas por Otto <i>et al.</i> em 1999.	11
Figura 1.6. Moléculas sintéticas análogas do PAI-I de <i>Staphylococcus aureus</i> , que mostram trocas de aminoácidos na estrutura cíclica, sintetizadas por Chan <i>et al.</i> 2004.	13
Figura 1.7. Moléculas sintéticas análogas do PAI-II de <i>Staphylococcus aureus</i> . Estas moléculas também mostram trocas de aminoácidos na estrutura cíclica ou inserção de um resíduo S-(2,3)-diaminopropionila em vez da Cys para a formação de lactamas.	14
Figura 1.8. Moléculas sintéticas análogas do PAI-III de <i>Staphylococcus aureus</i> com modificações a partir de trocas de aminoácidos na estrutura cíclica. Uma dela consistiu em mudar a estereoquímica do resíduo da Cys.	17
Figura 1.9. Alguns componentes (estereoquímica do carbono α e resíduos de aminoácidos) no PAI-III (5), classificados segundo a sua contribuição pela cor na atividade cruzada frente os diferentes receptores AgrC (I, II e IV). vermelho: crítico; azul: contribui, mas não é crítico; verde: não é essencial.	18
Figura 1.10. Moléculas sintéticas análogas do PAI-II de <i>Staphylococcus aureus</i> , que apresentam modificações no resíduo aromático ou ausência de cauda. Outro corresponde a um híbrido que contém a cauda do PAI-III e a parte macrocíclica do PAI-II.	18
Figura 1.11. Estrutura de um peptoide.	20
Figura 1.12. Estruturas híbridas peptoide-peptídeo lineares inibidores de QS em <i>S. aureus</i> .	20
Figura 1.13. Estrutura das solonamidas A, B, e do PAI-III.	21
Figura 1.14. Estudo SAR de Hansen <i>et al.</i> 2018, que mostra as substituições de cadeias de aminoácidos nos análogos lactamas que indicam a influência na inibição de AgrC. verde: alto potencial; azul: potencial ligeiramente inferior; vermelho: prejudicial para o potencial.	22
Figura 1.15. Síntese de peptídeos em fase sólida pela metodologia Fmoc.	24
Figura 2.1. Primeira geração de moléculas cíclicas, baseadas nas solonamidas. Esta geração contemplou o uso de uma ligação éster e tioéster.	28
Figura 2.2. Estrutura dos dois derivados lactônicos propostos inicialmente.	29
Figura 2.3. Segunda geração de moléculas cíclicas, que contemplou o uso de ácidos de AMBH.	34

Figura 2.4. Estrutura dos ciclopeptídeos da segunda geração sintetizados e os seus rendimentos obtidos, calculados com base na carga inicial da resina.	35
Figura 2.5. Espectro de RMN- ¹ H do composto (41) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆ , com ampliações de algumas regiões.	43
Figura 2.6. Ampliação do espectro <i>HSQC</i> de multiplicidade editada do composto (41) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆ . As correlações em azul corresponde a metilenos, as vermelhas a metinos e metilas.	44
Figura 2.7. Ampliação do espectro <i>COSY</i> do composto (41) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆ . Observa-se na parte inferior esquerdas as correlações entre os hidrogênios NH dos aminoácidos e os seus respectivos prótons em C α . Na parte superior direita a correlação entre o tripleto em δ_H 6,21 (hidrogênio vinílico em C3) e o quarteto em δ_H 2.12 (hidrogênios de metilenos no C4).	45
Figura 2.8. Ampliação do espectro <i>TOCSY</i> do composto (41) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆ . Observa-se na parte esquerdas as correlações entre os hidrogênios NH dos aminoácidos e os seus respectivos prótons em C α , C β e C γ . Na parte direita as correlações entre os H-C α , e os respectivos hidrogênios nos C β e C γ .	46
Figura 2.9. Ampliação do espectro <i>HMBC</i> do composto (41) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆ . Observa-se a correlações entre os hidrogênios (δ_H 3,38 e 3,48) em C1 e o C β da <i>L</i> -Cys (δ_C 31,27).	46
Figura 2.10. Ampliação do espectro <i>NOESY</i> do composto 6 obtido em DMSO- <i>d</i> ₆ .	47
Figura 2.11. Efeito dos compostos (40) e (42) a três concentrações sobre a produção de hemólises por <i>S. aureus</i> ATCC 25923. Para o composto (40) não foi observado halo de hemólise ao redor do inoculo da bactéria. Inoc = inoculo.	50
Figura 2.12. Porcentagem de inibição de hemólise (%) em glóbulos vermelhos humanos causada por <i>S. aureus</i> ATCC 25923 após estar em presença de várias concentrações dos compostos (40) e (42).	51
Figura 2.13. Viabilidade celular de fibroblastos humanos quando expostos aos compostos (40) (A) e (42) (B) a 24 e 48 horas.	51
Figura 4.1. Balão de reação para SPFS.	56

Lista de Tabelas

	Pag.
Tabela 2.1. Diferentes condições de reação testadas para a inserção de ácido mono- <i>tert</i> -butil malônico a partir de 4 eq. ao tetrapeptídeo na resina.	29
Tabela 2.2. Sinais apresentadas no espectro de RMN- ¹ H do ácido de Meldrum e do ácido mono <i>tert</i> -butil malônico (34), obtidos em solução com CDCl ₃ .	31
Tabela 2.3. Dados espectroscópicos de RMN- ¹ H e ¹³ C dos AMBH (44-45) e ácidos de AMBH (44a-46a).	38
Tabela 2.4. Dados espectroscópicos de RMN (DMSO- <i>d</i> ₆) para o composto (41).	48
Tabela 2.5. Halos de hemólises ou inibição de hemólises de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 sobre placas de ágar com sangue de carneiro.	49
Tabela 2.6. Halos de hemólises ou inibição de hemólises de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 sobre ágar sangue para os compostos (40) e (42) a concentrações mais baixas.	50
Tabela 4.1. Dados espectroscópicos de RMN (DMSO- <i>d</i> ₆) para o composto (36).	68
Tabela 4.2. Dados espectroscópicos de RMN (DMSO- <i>d</i> ₆) para o composto (37).	69
Tabela 4.3. Dados espectroscópicos de RMN (DMSO- <i>d</i> ₆) para o composto (38).	70
Tabela 4.4. Dados espectroscópicos de RMN (DMSO- <i>d</i> ₆) para o composto (39).	71
Tabela 4.5. Dados espectroscópicos de RMN (DMSO- <i>d</i> ₆) para o composto (40).	72
Tabela 4.6. Dados espectroscópicos de RMN (DMSO- <i>d</i> ₆) para o composto (41).	73
Tabela 4.7. Dados espectroscópicos de RMN (DMSO- <i>d</i> ₆) para o composto (42).	74
Tabela 4.8. Dados espectroscópicos de RMN (DMSO- <i>d</i> ₆) para o composto (43).	75

Lista de Símbolos e Abreviaturas

6-Cl-HOBt	6-cloro-1-hidroxibenzotriazol
AA	Aminoácido
ACN	Acetonitrila
agr	<i>Accessory gene regulator</i>
AHLs	Acilhomoserinlactonas
AI	Autoindutor/ autoindutora
APT	<i>Attached proton test</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ATR	<i>Attenuated total reflectance</i>
Boc	Grupo protetor <i>tert</i> -butiloxicarbonila
bs	Simpleto largo
Bzl	Grupo protetor benzila
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
MIC	Concentração inibitória mínima
CGMS-IE	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
COSY	<i>Correlated spectroscopy</i>
CUR	<i>Curtain gas</i>
d.i.	Diâmetro interno
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
Dde	Grupo protetor <i>N</i> ^ε -1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)etil
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DO₆₀₀	Densidade optica a 600 nm
DP	<i>Declustering potential</i>
EC₅₀	Concentração do efeito observado médio
EM	Espectros/espectrometria de massa
EMAR	Espectrometria de massa de alta resolução
EtSH	Etanotiol
Fmoc	Grupo protetor 9-fluorenil-metiloxicarbonila
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Gnd HCl	Hidrocloreto de guanidina
GS1	<i>Ion source gas 1</i>
GS2	<i>Ion source gas 2</i>
HATU	Hexafluorofosfato do <i>N</i> -óxido de <i>N</i> -[(Dimetilamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-[4,5- <i>b</i>]piridin-1-ilmetilen]- <i>N</i> -metilmetanaminio
HBTU	Hexafluorofosfato de <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil- <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)urônio
HCTU	Hexafluorofosfato de <i>O</i> -(6-clorobenzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilurônio
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HOBt	hidroxibenzotriazol
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>
Hz	Hertz
IC₅₀	Concentração de inibição média
IES	Ionização por eletrospray

IQS	Inibidores de <i>quorum sensing</i> / Inibição de <i>quorum sensing</i>
ISVF	Ion spray voltage floating
IVTF	Infravermelho médio com transformada de Fourier
J	Constantes de acoplamento
m/z	Relação massa-carga
MBzl	Grupo protetor 4-metilbenzila
Mmt	Grupo protetor 4-metoxitritila
MS/MS	Espectrometria de massa em tandem
MsCl	Cloreto de mesila / cloreto de metanossulfonila
NMM	<i>N</i> -metilmorfolina
NOESY	<i>Nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
PAI's	Peptídeos autoindutores
ppm	Partes por milhão
Pyr	Piridina
q	quarteto
QS	<i>quorum sensing</i>
qt	quinteto
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	Simpleto
SAR	<i>Structure-activity relationship</i>
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SPFS	Síntese de peptídeos em fase sólida
t	triplete
t.a.	Temperatura ambiente
t.r.	Tempo de retenção
TBTU	Tetrafluoroborato de 2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio
<i>t</i>-Bu	Grupo protetor <i>tert</i> -butila
<i>t</i>-BuOH	<i>tert</i> -butanol
TEM	<i>Temperature</i>
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetraidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	<i>Total correlation spectroscopy</i>
TOF	<i>Time of flight mass spectrometry</i>
Trt	Grupo protetor tritila
u.m.a	Unidade de massa atômica
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda

Introdução

O aumento da resistência às substâncias antibacterianas em patógenos apresenta uma ameaça para a saúde humana, porque os antibióticos tradicionais estão se tornando ineficazes [1]. Nas últimas décadas, bactérias resistentes têm sido identificadas, enquanto o número de novas moléculas com propriedade antibiótica tem diminuído. Esta redução, consequência da ineficácia das substâncias, tem gerado uma crescente necessidade de descobrir novos antibióticos para combater cepas resistentes. Apesar de novas substâncias químicas antibacterianas terem sido recentemente identificadas, elas não têm as propriedades biológicas, por exemplo, o amplo espectro semelhante ao dos antibióticos pioneiros [2], resultando em esforços frustrados frente à pesquisa de substâncias bactericidas.

As bactérias são conhecidas por gerar uma matriz infecciosa através de um fenômeno de comunicação celular chamado *quorum sensing* (QS). Ou seja, as bactérias usam a linguagem química (moléculas autoindutoras: AI, ou de sinalização) para regular genes somente quando a densidade de células bacterianas é alta. Este fenômeno de monitorar a densidade populacional e sincronização da expressão gênica lhes permite coordenar as atividades, e fazendo agir como um grupo [3,4]. Dentre os fenótipos expressos e observados encontram-se a bioluminescência; a formação de biofilme; os tipos de motilidade bacteriana; a produção de compostos antimicrobianos e pigmentos; a esporulação, entre outros fatores de virulência, os quais variam de uma espécie de bactéria para outra [3,5-7].

A expressão de exopolissacarídeos para a formação e consolidação de biofilme bacteriano é considerada um importante fator de virulência de bactérias oportunistas em algumas doenças humanas crônicas e infecciosas. Nestes, os biofilmes contribuem para a resistência de bactérias aos antibióticos e sistemas de defesa do corpo, uma vez que as bactérias incorporadas nos biofilmes são dificilmente atacadas por antibióticos ou células do sistema imunológico [3,8].

Como estratégia alternativa para a atenuação deste problema está a utilização de substâncias antipatogênicas, também denominados inibidores de *quorum sensing* (IQS), alguns dos quais já foram identificados em fontes naturais e a partir de síntese no laboratório. Os IQS são compostos que ajudam a atenuar a virulência das bactérias, reduzir a formação de biofilme e aumentar a sensibilidade das bactérias à terapia com antibióticos. Um IQS não exerce um efeito bactericida, e tampouco bacteriostático, ele apenas interfere com a comunicação pelo antagonismo frente às moléculas autoindutoras (AI), ou altera as entidades moleculares envolvidas no sistema [7,9,10].

Uma vez que a interferência nos mecanismos de comunicação celular é uma estratégia racional para atenuar os fatores de virulência, os esforços neste domínio estão focados para o desenvolvimento de estratégias capazes de interferir em sistemas de QS e deter a resistência das bactérias aos antibióticos [11]. Globalmente, novas investigações estão sendo conduzidas neste campo científico e incluem trabalhos sobre mecanismos de sinalização de QS; fatores expressos por bactérias infecciosas (bactérias Gram negativas e Gram positivas); e a busca por substâncias com propriedades IQS [3].

Na literatura científica, a maioria dos trabalhos referentes aos IQS é realizada para sistemas de bactérias Gram negativas. No entanto, atualmente, a busca de IQS para bactérias Gram positivas torna-se mais que necessário devido às infecções crônicas e agudas que as bactérias desse tipo apresentam [12]. Uma bactéria Gram positiva é o *Staphylococcus aureus*, um patógeno oportunista altamente infeccioso, que regula a formação de biofilmes e outros fatores de virulência, tornando-se persistente para controle via antibióticos [13]. Esta bactéria utiliza quatro peptídeos cíclicos como moléculas AI, que tem inspirado o desenvolvimento de moléculas peptídicas não nativas para ser testadas como inibidores ou moduladores de QS. Assim, nos últimos anos, têm sido sintetizados, com base na estrutura química dos peptídeos autoindutores (PAI's), novos peptídeos que apresentam alterações no sistema tiolactônico macrocíclico e nas estruturas da cadeia exocíclicas.

Neste documento apresentam-se os resultados do trabalho de doutorado, que visou o desenho e a síntese de novos peptídeos cíclicos para a inibição de hemolisina promovida por *Staphylococcus aureus*, um importante patógeno que media a formação de biofilmes e outros fatores de virulência mediante QS.

1. *Quorum sensing* em *Staphylococcus aureus*: Inibição e perspectiva atual do tema

1.1 *Quorum sensing*

Compreende-se como *quorum sensing* (QS) a comunicação célula-célula que ocorre por meio da regulação do mecanismo de controle da expressão gênica em resposta à densidade celular, em que as bactérias trabalham em grupos, e onde cada indivíduo responde ao grupo para coordenar atividades [6]. Este processo é iniciado por moléculas nativas das células, produzidas constantemente e utilizadas como sinais reguladores na transcrição de genes específicos para promover, nas bactérias, uma mudança fisiológica e/ou morfológica, de forma a promover uma vantagem frente ao meio em que se desenvolvem [3,4]. O processo de comunicação consiste de dois programas distintos de expressão de genes que dependem do número de células. O primeiro deles acontece quando a concentração celular é baixa, no qual predomina um comportamento individual; e no segundo, quando há alta densidade populacional, que se reflete num comportamento social [6], e onde o conjunto de bactéria age de forma similar a um organismo multicelular. Acredita-se que o estabelecimento destas comunidades, em vez de eleger uma existência como células isoladas, proporcionam importantes vantagens adaptativas ao grupo de bactérias, dentre estas estão: melhorar o acesso a nichos ambientais e capacidades de defesa contra outros microrganismos procariotos e eucariotos, ou contra os mecanismos de defesa do hospedeiro; e facilitar a adaptação para novas condições [14].

As bactérias Gram negativas têm sido as mais estudadas em termos de sistemas QS. Dentre elas, a *Vibrio fischeri*, apresenta um sistema chamado LuxI/LuxR, cujo mecanismo é desenvolvido pelo envolvimento dessas duas proteínas. Em *V. fischeri* o QS é mediado pela *N*-3-oxo-hexanoil-homoserinlactona (**1**, na figura 1.1) como molécula sinal. Neste sistema, a primeira proteína, chamada LuxI sintase, codificada a partir do gene *luxI*, catalisa a reação de síntese de (**1**), molécula que é produzida na forma basal por cada bactéria. Uma vez que a população bacteriana chega à densidade suficiente, a molécula de sinalização atinge o limiar de concentração, momento no qual começa sua difusão (difusão passiva)

entre diferentes células. A segunda proteína, LuxR, atua recebendo a molécula de sinal para a formação de complexo estável LuxR-(1), regulador de transcrição, que opera para a expressão de genes objetivos: gene *luxI* (retroalimentação, por conseguinte, estas moléculas também denominados como autoindutor (AI)); e o operon *luxCDABEG* de luminescência, que formam a caixa *lux*, localizado acima do gene regulador de *quorum sensing* (*luxR*) (Figura 1.1) [6,8,15].

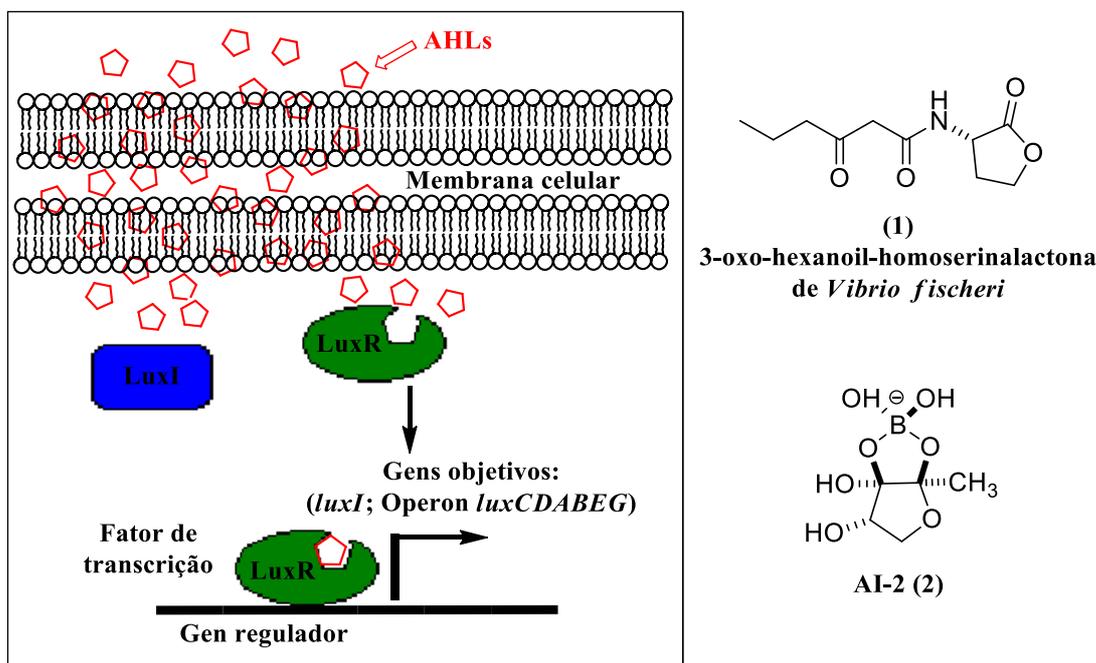


Figura 1.1. Sistema de *quorum sensing* LuxI/LuxR de *Vibrio fischeri*, semelhante para a maioria das bactérias Gram negativas. (1) é a molécula sinal de *V. fischeri*. (2) AI-2.

As moléculas de autoindutor variam estruturalmente dependendo do tipo de bactérias. As Gram negativas empregam acilhomoserinalactonas (AHLs) e as Gram positivas utilizam peptídeos autoindutores (PAI's). Existe uma molécula, conhecida como autoindutor dois (AI-2, (2)), um furanosil diesterborato, codificado a partir do gene *luxS*, que é capaz de induzir comunicação em ambos tipos de bactérias por ativação de genes em rotas diferentes envolvidas nos sistemas de QS conhecido. A essa molécula tem sido atribuído o papel de indutor interespecies [9,16,17].

A maioria dos sistemas de QS funciona de forma semelhante, independente se a bactéria é Gram negativa ou Gram positiva. Geralmente, esses sistemas de QS

compreendem a produção basal da molécula de sinalização, detecção e resposta a flutuações na concentração de autoindutor [6].

1.2 Patogênese e sistemas de *quorum sensing* em *Staphylococcus aureus*

Particularmente, *Staphylococcus aureus* é um coco Gram positivo e um agente patogênico cosmopolita, sendo considerado como parte da microbiota normal. Ele pode ser capaz de causar desde uma grande variedade de infecções não invasivas na pele e no tecido mole, até infecções agressivas e destrutivas, tais como endocardite, pneumonia e septicemia [10,18-20]. É considerado um dos causadores de infecções nosocomiais e algumas cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina -SARM- estão emergindo de forma alarmante [21].

A virulência de *S. aureus* é atribuída a fatores de adesão de superfícies como a proteína A, expressada pelo gene *spa* [12,21]; que promovem aderência ao tecido infectado, sendo produzidas perto da fase exponencial de crescimento; à toxinas extracelulares como α -hemolisina (codificada pelo gene *hla*), δ -hemolisina e toxina do síndrome do choque tóxico - 1 (*TSST-1*, *Toxic shock syndrome toxin - 1*) produzidas no final da fase de crescimento; e também a outras enzimas como proteases, lipases e hialuronato liase [22]. *S. aureus* também produz exopolissacarídeos que mediam a formação de biofilme o qual confere proteção às células das bactérias das terapias com antibióticos, e células de defesa do sistema imune [23,24]. Se estima que 80% das infecções bacterianas crônicas são associadas à formação de biofilme [13], e os patógenos quando o formam são entre 1000 a 1500 vezes mais resistentes a antibióticos em comparação a seu modo de vida planctônica [23]. Desde então, o interesse em estudar o biofilme desta bactéria tem aumentado nos últimos anos [24].

Esta patogenicidade é devida à ação coordenada de muitos sistemas de regulação de genes, incluindo o gene regulador acessório (*agr - accessory gene regulator*) central de QS, que é o mais importante [16,21,25]. O *agr* tem dois promotores, P2 que ativa os genes ARN-II, que codificam para as entidades moleculares envolvidas na comunicação celular (*AgrA*, *AgrB*, *AgrC*, e *AgrD*); já o promotor P3 é responsável do ARN-III que codifica para os fatores de virulência relacionados à patogênese [7].

A ativação de *agr* é dependente de um peptídeo autoindutor (PAI). Não obstante, a bactéria apresenta quatro cepas, tendo cada uma delas um peptídeo autoindutor cognato. Assim, para esta bactéria conhecem-se, de forma geral, os peptídeos cíclicos que contêm um macrocíclico tiolactona, tal como é mostrado na figura 1.2. Cada um é biossintetizado a partir de um peptídeo precursor linear (AgrD), que depois sofre uma modificação pós-traducional que leva à ciclização e formação da tiolactona [9,22].

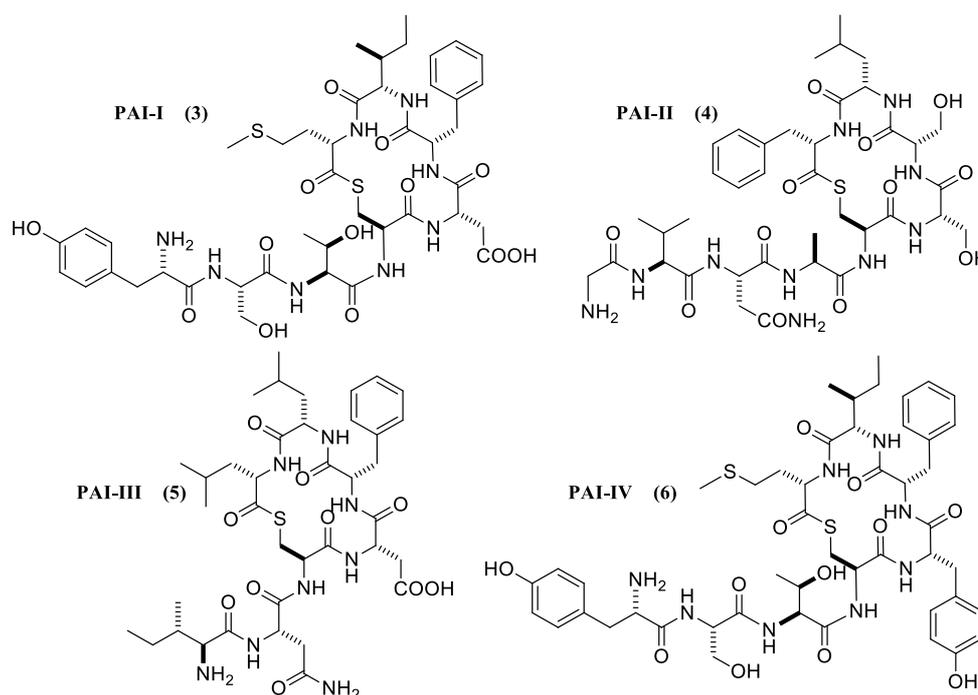


Figura 1.2. Peptídeos autoindutores (PAI's) cíclicos que atuam no QS nas diferentes cepas de *S. aureus*.

No caso de bactérias Gram positivas, estes peptídeos autoindutores (PAI's) não são permeáveis para as membranas. Devido a isto, a secreção deles, geralmente, é realizada por transporte ativo (AgrB). Os receptores destas moléculas não são encontrados no citoplasma, e sim nas membranas bacterianas. Assim, quando existe uma quantidade necessária para ser detectado, os peptídeos se ligam às proteínas de sinalização e ativam uma cascata de fosforilação. Estes receptores extramembranares, também chamados sistemas de dois componentes, consistem, geralmente, de um sensor de histidina quinase (AgrC) e de um receptor cognato citoplasmático regulador de resposta (AgrA), que funciona como um regulador da transcrição [6]. Quando o peptídeo está ligado extracelularmente, a histidina quinase é autofosforilada e transfere um grupo fosfato para o receptor de resposta, o qual atua como um fator de transcrição (Figura 1.3).

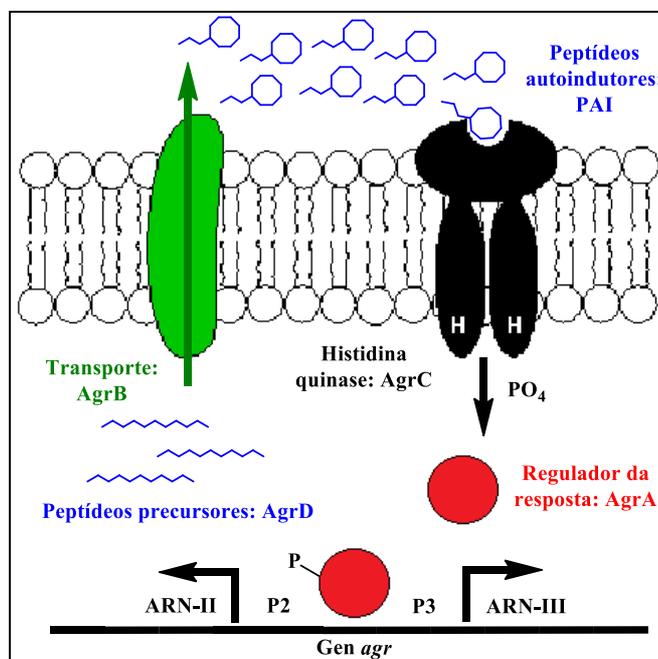


Figura 1.3. Sistema de *quorum sensing* tipo dois componentes na bactéria Gram positivas *S. aureus*. AgrC é o sensor de membrana histidina quinase; AgrA é o regulador de resposta que leva para a transcrição; AgrD é o peptídeo precursor linear (propeptídeo) do PAI; AgrB é uma endopeptidase de membrana essencial para a biossíntese do PAI, pois é responsável de fazer a modificação pós-traducional (ciclização).

Mas especificamente, AgrD consiste de cerca de 46 aminoácidos, podendo esse número variar de acordo com o autoindutor a ser biossintetizado, em que a porção *N*-terminal (cerca de 24 aminoácidos) é uma hélice anfipática responsável por dirigir o resto do propeptídeo à membrana celular (presumivelmente para AgrB). O centro do propeptídeo contém os aminoácidos (normalmente 7-9) do PAI final; e a porção *C*-terminal constituída por cerca de 14 aminoácidos, muitos dos quais mantêm uma carga negativa, formam outra hélice. A parte central do propeptídeo, na maioria das espécies de *Staphylococcus*, é variável, mas há uma porção preservada que contém a cisteína, que é essencial para a formação do anel de tiolactona [16,18]. Por outro lado, AgrB tem cerca de 22 kDa e apresenta funções enzimáticas (atividade de endopeptidase). Estudos sobre proteínas tipo AgrB em várias espécies de bactérias indicam sítios conservados responsáveis pela execução da quebra do propeptídeo, inicialmente removendo a parte *C*-terminal [16,18]. Além da remoção da parte *C*-terminal do peptídeo linear, AgrB também catalisa um ataque nucleofílico de um resíduo de cisteína para AgrD. A ruptura e remoção segue para a formação de um intermediário covalente entre AgrB-AgrD através de uma ligação tioéster. Para criar o anel tiolactona do PAI, uma cisteína interna de AgrD media a ruptura da ligação tioéster AgrB-AgrD, promovendo a ciclização e a eliminação do precursor. O peptídeo

precursor ciclizado é transportado para fora da célula, presumivelmente também por AgrB, e uma peptidase externa elimina a parte *N*-terminal [18,22].

AgrC e AgrA compõem um sistema de dois componentes responsável por receber o sinal e mediar a cascata de fosforilação, sendo mais especificamente AgrC uma histidina quinase de membrana e AgrA um regulador de resposta citoplasmática. Uma vez fosforilado, AgrA atua como um fator de transcrição de ativação dos promotores P2 e P3 e inicia a autoindução seguida da expressão do gene de virulência próprio do ARN-III [18,22]. Acredita-se que o receptor AgrC encontra-se formando dímeros, e onde cada monômero compreende dois domínios gerais, o domínio sensor integral da membrana (*N*-terminal) e um domínio histidina quinase citoplasmático [16, 26]. O *C*-terminal de histidina quinase é altamente conservado entre as espécies de *Staphylococcus*, enquanto o domínio *N*-terminal é bastante divergente. Isso reflete a diversificação que ocorreu entre os receptores AgrC que permite reconhecer sinais divergentes de PAI's, mantendo ao mesmo tempo a função conservada da fosforilação da AgrA a partir de reconhecimento do PAI [18,21].

A ligação do PAI na AgrC ocorre fora da célula, através do domínio sensor (*N*-terminal) (Figura 1.4). O domínio sensor é composto por seis hélices transmembranares e três *loops* extracelulares [16,26]. Acredita-se que o reconhecimento do PAI ocorre principalmente através dos *loops* um e dois. O primeiro *loop* parece interagir com a porção da cauda de PAI, enquanto que o segundo reconhece os resíduos do anel macrocíclico do PAI. O terceiro *loop*, e as hélices transmembranares cinco e seis, acredita-se que mediam a transferência do sinal ao longo da membrana para ativar o domínio histidina quinase. O PAI se une ao dímero de AgrC e, após ligação um monômero, uma alteração conformacional ativa os dois domínios histidina quinase à autofosforilação e, em seguida os grupos fosfato são transferidos à AgrA (o regulador da transcrição) [18,22].

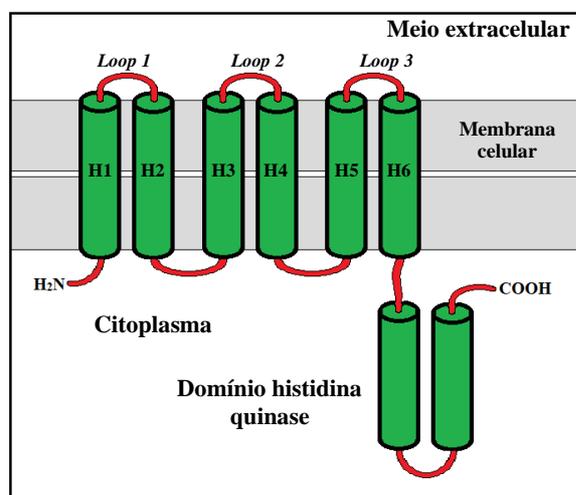


Figura 1.4. Mapa da topologia do domínio sensor AgrC. H(1-6) são as hélice (1-6). Figura baseada de Novick e Geisinger, 2008 [17].

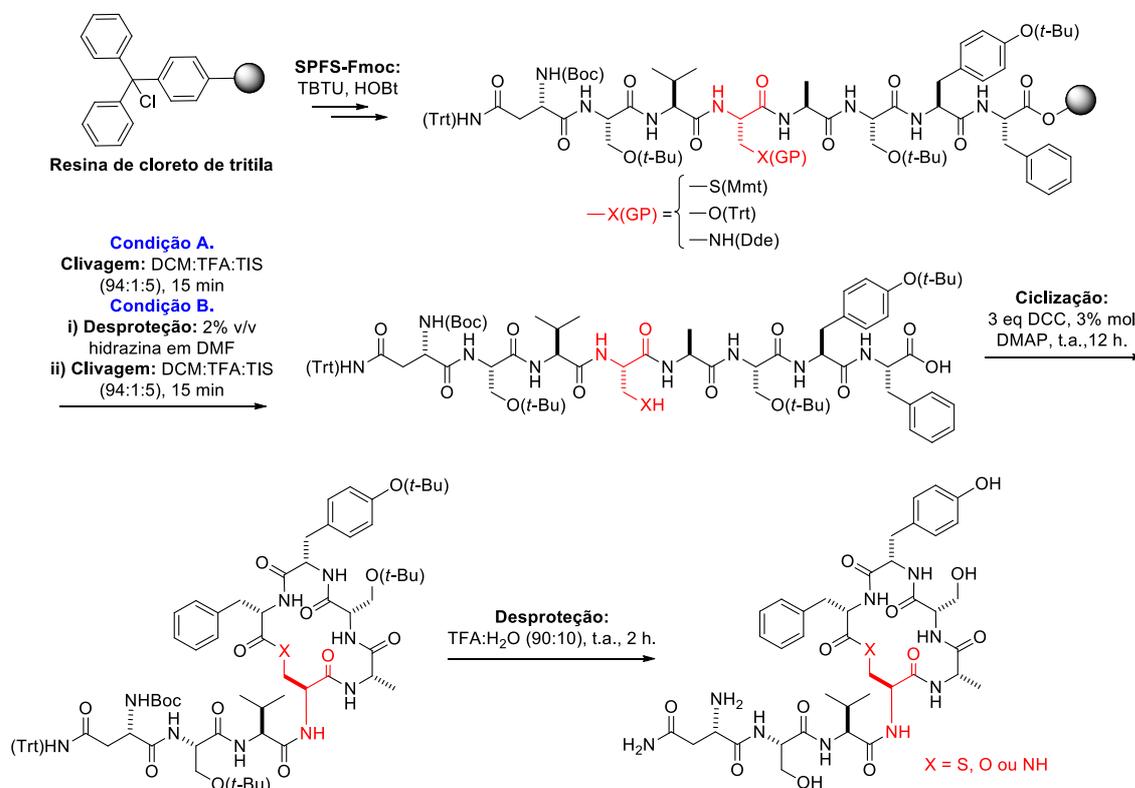
1.3 *Screening* de peptídeos miméticos cíclicos como IQS de *Staphylococcus aureus*: Análogos sintéticos dos PAI's

A divergência no domínio *N*-terminal AgrC é atraente e é essencial para encontrar substâncias antipatogênicas como as substâncias miméticas dos PAI's, que podem atuar como antagonistas dos sistemas QS dos diferentes grupos de *S. aureus*. Este antagonismo pode ser visto pela competição dos PAI's nos locais do AgrC, e retardar a resposta para AgrA. Um exemplo disto é o PAI cognato (7) de *Staphylococcus epidermidis*, que inibe os genes virulentos *agr* de *S. aureus*, frente os PAI's I-III, mas não pode inibir frente PAI-IV. Esta especificidade é devida à divergência dos AgrC nos diferentes grupos de *S. aureus* (quatro cepas cada com um PAI específico) [22].

Várias estratégias para a concepção de substâncias antagonistas de sistemas QS de *S. aureus* têm sido sugeridas e incluem aqueles que vão desde a substituição da ligação tioéster, e/ou ligações peptídicas, a incorporação de aminoácidos não naturais, α -aminoácidos *N*-metilados, β -aminoácidos e unidades peptóides nos derivados dos PAI's [27].

Em 1999, Otto e colaboradores já haviam estabelecido uma relação entre a estrutura do PAI (7) de *Staphylococcus epidermidis* e seu receptor de membrana AgrC através da preparação e ensaio da atividade de derivados sintéticos. Usando a metodologia de SPFS-

Fmoc a partir de uma resina de cloreto de tritila (esquema 1.1) [28], sintetizaram análogos que consistiram na adição de um resíduo de glicina (Gly) (**8**); remoção do resíduo de asparagina (Asn) terminal (**9**); a geração de uma lactona (**10**) e uma lactama (**11**), por substituição da cisteína (Cys) por uma serina (Ser) e o resíduo 2,3-diaminopropionila, respectivamente. Concluiu-se que a ativação do sistema *agr* é mediada pela interação de PAI (**7**) e o sensor quinase AgrC, que é muito específica e depende do resíduo *N*-terminal apropriado, assim como da tiolactona; uma vez que nenhum dos derivativos ativou o sistema *agr* de *Staphylococcus epidermidis* mas conseguiram inibir o sistema *agr* de *Staphylococcus aureus* [29], este é, claramente, um mecanismo de inibição cruzada entre autoindutores nativos e miméticos com receptores AgrC [7].



Esquema 1.1. Rota de síntese que emprega a SPFS-Fmoc usada por Otto *et al.* em 1999 para produzir análogos do PAI de *S. epidermidis*. Condição A é um passo usado para a produção dos peptídeos contendo Cys(Mmt) e Ser(Trt), uma vez que este tratamento promove a desproteção destes grupos assim como a clivagem da resina. Condição B é usada para produzir a lactama uma vez que no primeiro passo a hidrazina desproteger o grupo Dde do resíduo 2,3-diaminopropionila, e no segundo passo o tratamento com TFA 1% permite a clivagem. GP é grupo de proteção.

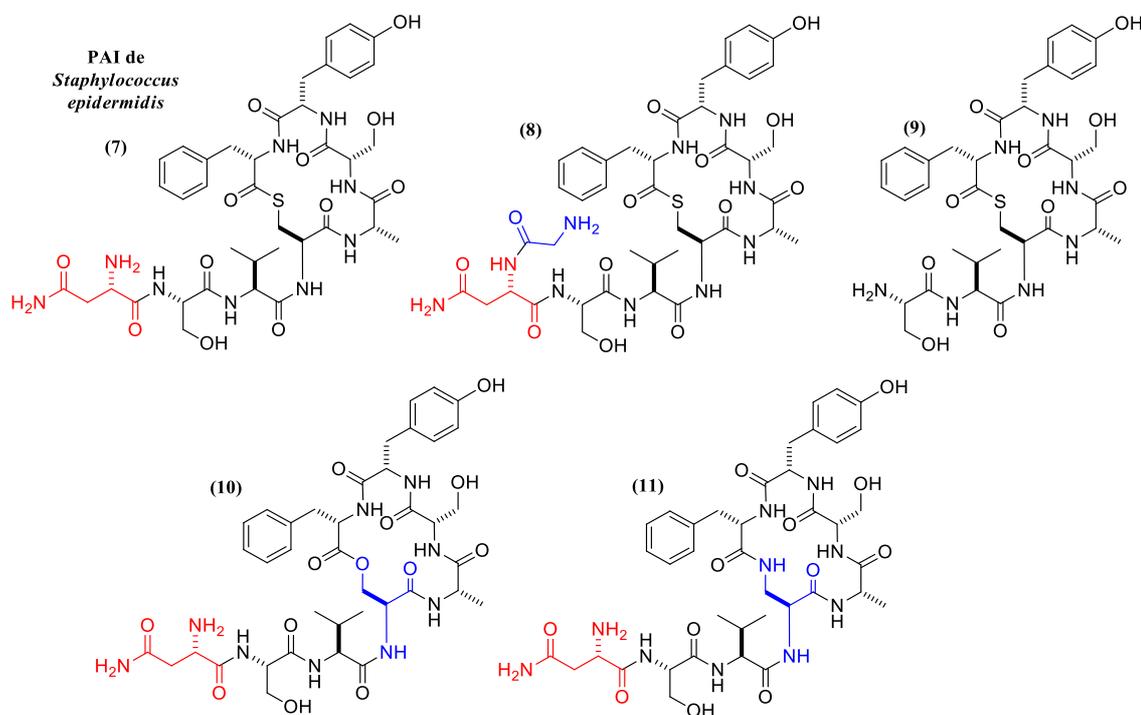
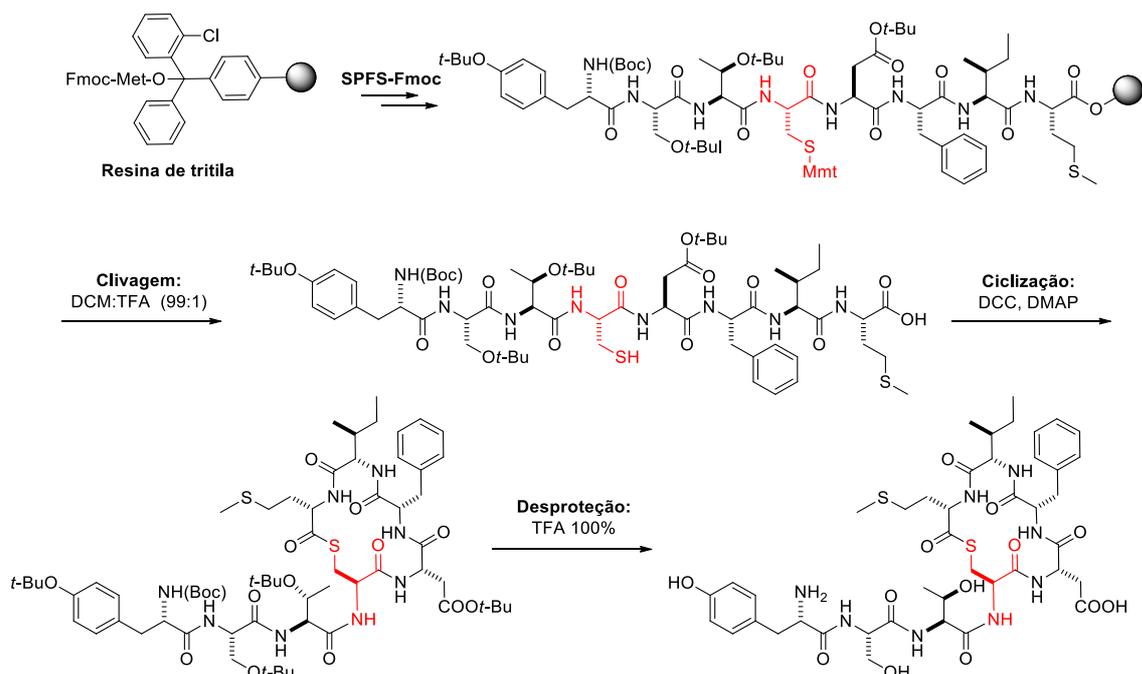


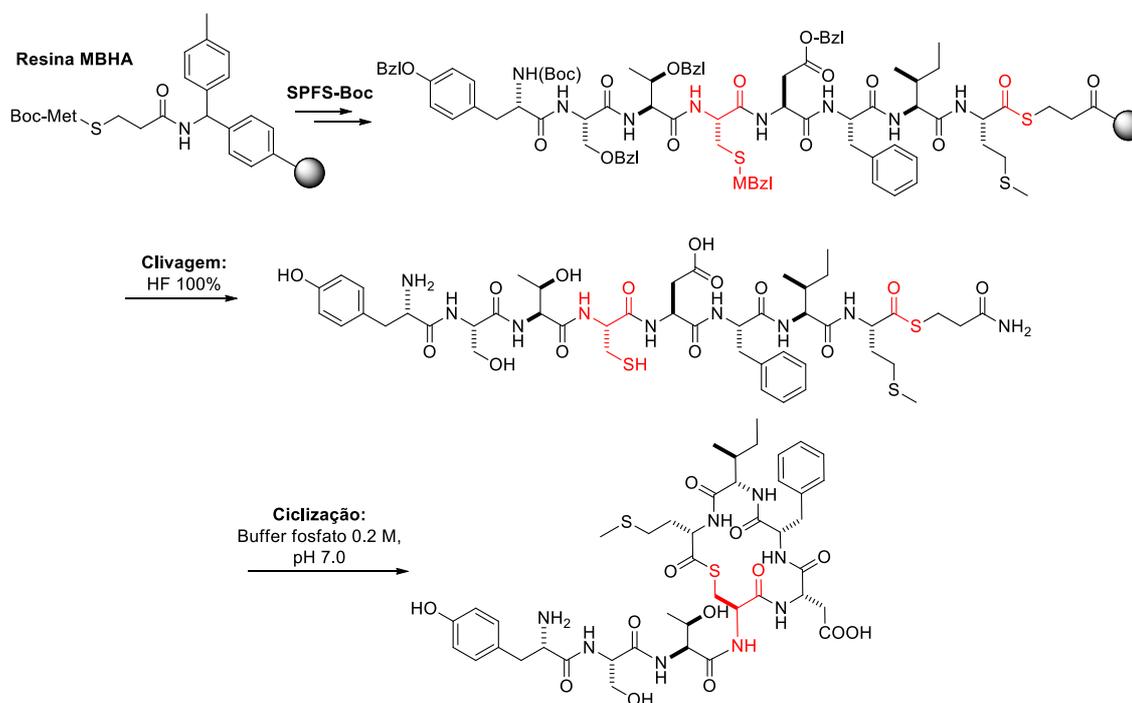
Figura 1.5. Moléculas sintéticas análogas do PAI de *Staphylococcus epidermidis*, com variações na cauda e na estrutura cíclica sintetizadas por Otto *et al.* em 1999.

Estudos de estrutura-atividade também têm sido realizados sobre o complexo PAI-I (**3**) /AgrC de *S. aureus*, estabelecendo que a estrutura macrocíclica do PAI é essencial para a união, e é encarregada de dirigir o reconhecimento molecular. Também tem sido sugerido que o tripeptídeo exocíclico, também denominado cauda, é necessário para a ativação do receptor [22,27]. Variações de aminoácidos em ambas partes (cauda exocíclica e macrocíclica) de PAI-I sugerem, na maioria dos casos, uma acentuada diminuição na IC₅₀ apresentada pelos análogos de PAI-I nos quatro receptores AgrC (muitos deles com IC₅₀ na escala de nanomolar, que são comparáveis às concentrações apresentadas pelo PAI-I frente aos receptores AgrC II-IV) [22]. Estes valores de IC₅₀ são os resultados obtidos para compostos análogos dos PAI's frente diferentes cepas de *Staphylococcus* usadas em testes reportes, e descrevem a concentração limiar requerida para desencadear a ativação no determinado receptor AgrC; assim como os dados de EC₅₀ expressam a concentração média para a qual um efeito é observado, neste caso, a redução da atividade ou inativação do receptor. Na pesquisa de Chan *et al.* em 2004, vários análogos do PAI-I foram sintetizados. Dois metodologias de SPFS que conduzem para a obtenção dos análogos tiolactônicos foram empregadas. A primeira baseada na estratégia Fmoc/*t*-Bu (esquema 1.2) permite obter um peptídeo linear parcialmente protegido, que posteriormente é ciclizado; por outro lado, a segunda metodologia que usou Boc/Bzl (esquema 1.3) permite a clivagem e

desproteção usando HF, para proporcionar o peptídeo linear que é ciclizado sob uma condição tampão. Os autores afirmam que dentre as duas metodologias, a última é mais robusta porque, na etapa de ciclização, os resíduos não contêm os grupos protetores que interagem para causar impedimento estéreo, efeito que acontece quando se tem resíduos protegidos como na metodologia baseada em Fmoc/*t*-Bu. Dentre os peptídeos, o composto (**12**), que apresenta um resíduo de alanina (Ala) no lugar do ácido aspártico (Asp) em PAI-I indicou, segundo dados de RMN para estudo de conformação, que esta substituição não afeta significativamente a conformação do anel macrocíclico, mas perturba a cauda, mostrando-se como um antagonista nos diferentes receptores AgrC de *S. aureus* (IC₅₀ entre 0.3 - 21 nM). Tanto a série de compostos sintéticos (**13-15**), na qual qualquer variação do resíduo do anel de PAI-I por uma Ala mostrou uma redução na ativação, apresentando valores de EC₅₀ numa faixa entre 9-11 µM; quanto o composto (**16**), constituído de PAI-I sem a cauda exocíclica e uma cisteína *N*-acetilada, apresentou-se como um antagonista competitivo (IC₅₀ = 4.5 ou 8 µM, nos diferentes testes reportes de AgrC-I), sugerem que o anel tiolactônico é uma região que conduz à ligação com o receptor e ao antagonismos [22].



Esquema 1.2. Rota de síntese que emprega a SPFS-Fmoc/*t*-Bu usada por Chan *et al.* em 2004 para produzir análogos do PAI-I de *S. aureus*.



Esquema 1.3. Rota de síntese que emprega a SPFS-Boc/Bzl usada por Chan *et al.* em 2004 para produzir análogos do PAI-I de *S. aureus*.

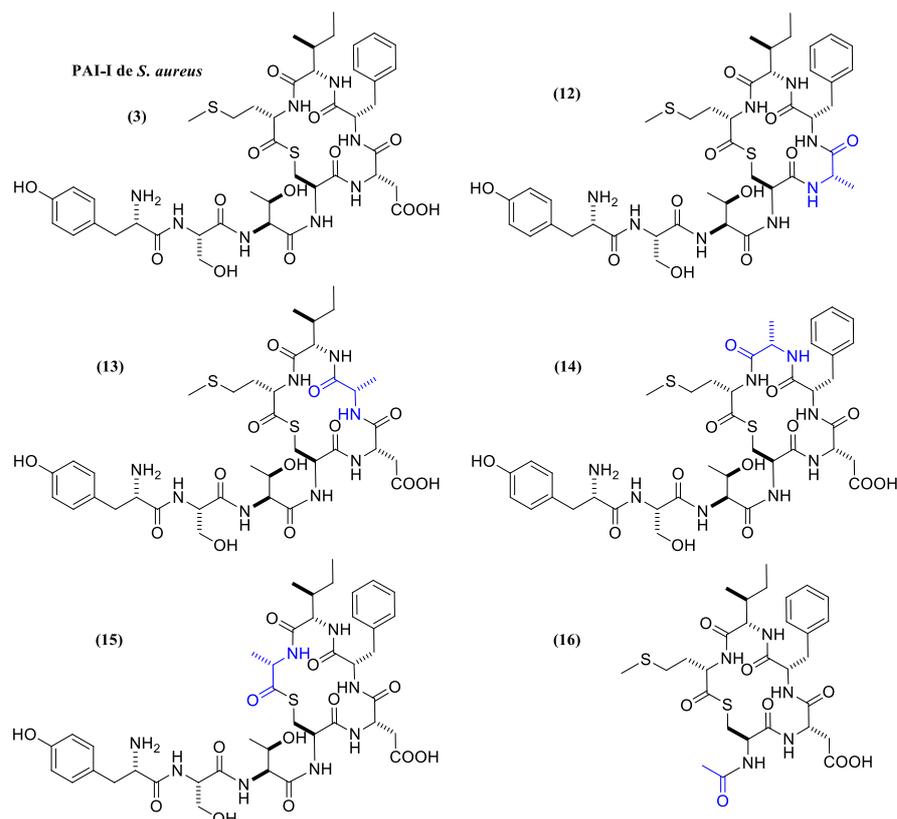


Figura 1.6. Moléculas sintéticas análogas do PAI-I de *Staphylococcus aureus*, que mostram trocas de aminoácidos na estrutura cíclica, sintetizadas por Chan *et al.* 2004.

De modo semelhante, as substituições de aminoácidos no anel de PAI-II (4) resultam em peptidomiméticos que atuam de forma diferente contra um receptor específico AgrC. Assim, os compostos (17) e (18) atuam como agonistas contra AgrC-II e como antagonistas contra AgrC-I. A substituição de resíduos de aminoácidos individuais por Ala, no PAI-II, tanto na parte macrocíclica como na cauda exocíclica, revelou que apenas a mudança nos resíduos do macrocíclico são essenciais para antagonismo [27]. As lactamas (19) e (20) obtidas a partir da macrociclização envolvendo um aminoácido com um resíduo *S*-(2,3)-diaminopropionila em lugar de Cys, do PAI-I (3) e PAI-II (4), respectivamente, mostram agonismo leve ($EC_{50} > 5 \mu\text{M}$) com seu respectivo homólogo (AgrC-I e AgrC-II). Esta atividade é baixa, presumivelmente, devido à conformação que adotam os ciclos lactâmicos [22].

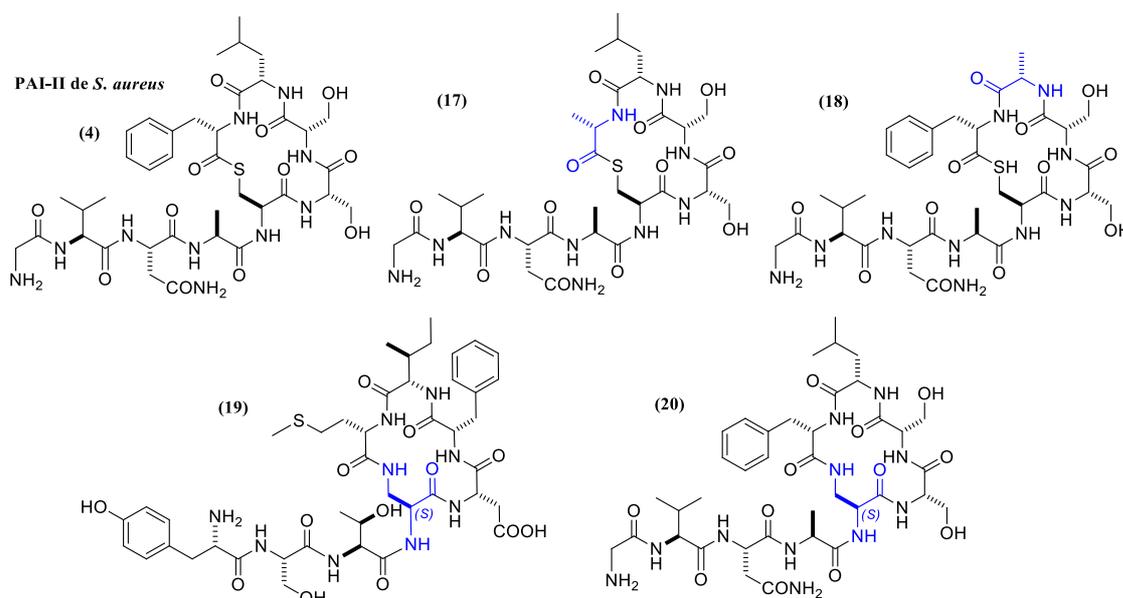
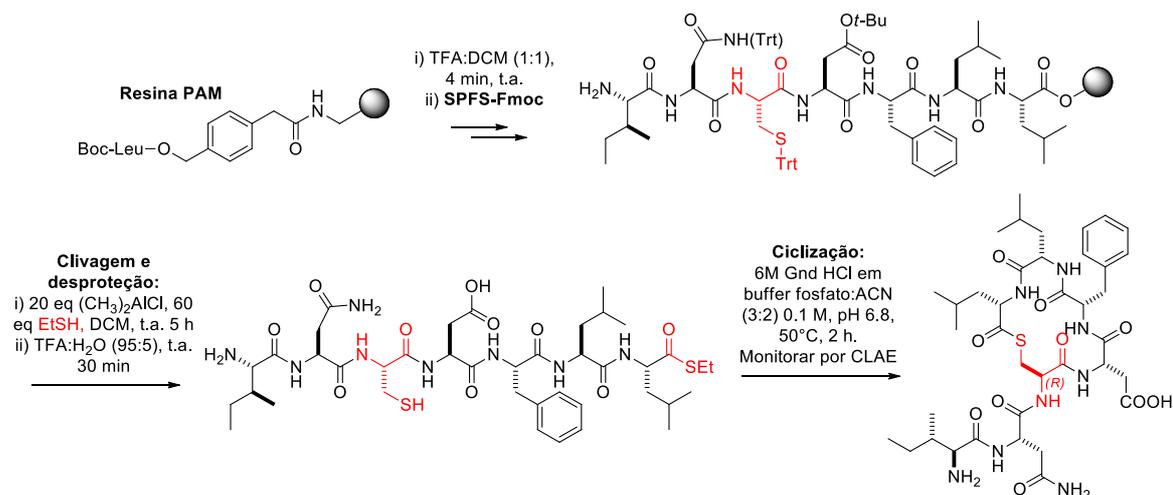


Figura 1.7. Moléculas sintéticas análogas do PAI-II de *Staphylococcus aureus*. Estas moléculas também mostram trocas de aminoácidos na estrutura cíclica ou inserção de um resíduo *S*-(2,3)-diaminopropionila em vez da Cys para a formação de lactamas.

Tal-Gan e colaboradores em 2013, desenvolveram a síntese e avaliaram a atividade IQS dos análogos de PAI-III (5) em relação aos receptores AgrC (I-IV) em cepas repórter de *S. aureus*. Este estudo pode ser considerado um dos mais completos pelos resultados obtidos ao identificar ciclopeptídeos tiolactônicos que agem inibindo em todos os quatro receptores AgrC (I-IV) e bloqueiam a hemólise em cepas de *S. aureus* à IC_{50} na escala picomolar, apresentando análogos ao PAI-III como moléculas com atividade de inibição cruzada. Dois gerações foram sintetizadas usando a metodologia de SPFS-Fmoc/*t*-Bu a partir de uma resina PAM, na qual a etapa de clivagem proporciona um tioéster linear

que, submetido a uma condição tampão, conduz para os peptídeos tiolactônicos (esquema 1.4) [7].



Esquema 1.4. Rota de síntese que emprega a SPFS-Fmoc/*t*-Bu usada por Tal-Gan *et al.* em 2013 para produzir análogos do PAI-III de *S. aureus*. A clivagem do peptídeo a partir da resina PAM usa $(\text{CH}_3)_2\text{AlCl}$, que em presença de EtSH, produz um tioéster.

A primeira geração consistiu na substituição de cada resíduo de aminoácido no PAI-III (**5**) por um resíduo da Ala (exceto Cys); e também a variação de cada *L*-aminoácido para o *D*-isômero. Treze peptídeos foram sintetizados, os que se mostraram inibidores globais com atividade comparável ou maior ao composto conhecido, (**16**), o que foi tomado como um controle positivo em todos os receptores AgrC (I-IV) testados. Nos testes, foram observadas alterações na intensidade da expressão de proteína verde fluorescente, resultado do controle de QS de uma cepa de *S. aureus GFP*. Os autores concluíram que, quando os aminoácidos que formam a parte endocíclica são substituídos por Ala, ocorre perda significativa da inibição, observada em cepas com receptores AgrC-I, II e IV. A substituição de cada um dos seus aminoácidos pelo isômero *D* resultou numa perda de inibição, compostos (**21**) e (**22**), indicando que a utilização de *D*-aminoácidos não é factível no desenho de IQS; no entanto, o composto (**23**), que mantém a *D*-Leu, apresentou atividade inibidora semelhante à de PAI-III, nas cepas com receptores AgrC-I, II e IV, sugerindo que este resíduo de Leu (*L*-Leu, em PAI-III) pode não satisfazer uma interação estereodefinida entre o PAI-III e esses receptores. Ao ser testado contra um sistema de QS *agr* mais fisiológico (através da inibição da produção de hemolisina), os resultados foram semelhantes aos obtidos com as cepas com o gene repórter da proteína verde fluorescente [7].

A segunda geração de peptídeos, também baseada no PAI-III, consentiu em incluir duplas e triplas mutações de alanina, introduzir resíduos aromáticos (Trp e/ou Tyr) no lugar da fenilalanina (Phe) e eliminar ou alargar a cauda exocíclica; tudo isto com o objetivo de explorar mais adiante um estudo de estrutura-atividade, ao integrar os resultados obtidos da primeira geração de peptídeos e moléculas análogas. De forma geral, a inclusão de duplas e triplas de Ala na estrutura foi feita com o objeto de observar se existe um efeito de adição sob a atividade dos compostos. A troca de isoleucina (Ile) e asparagina (Asn) exocíclicas por Ala gerou um peptídeo com valores de IC_{50} que ficou no intervalo de concentração mostrado pelos análogos com uma Ala (primeira geração). Dentre todos os peptídeos gerados, o análogo **(24)** se mostrou um potente inibidor contra AgrC-III ($IC_{50} = 2.6$ nM). De forma geral, nos dois ensaios, os resultados mais relevantes mostraram que aqueles peptídeos com dupla Ala na estrutura são inibidores semelhantes ou melhores que seus homólogos de um resíduo: compostos **(24)** e **(25)** [7].

Os resultados obtidos para os peptídeos com cauda comprida sugerem que esta não é vital na inibição cruzada e uma cauda alongada (adição de tirosina (Tyr), Ala e glicina (Gly)) apresentou atividade moderada, agonista e inativa, respectivamente contra AgrC-III, embora o grupo amino terminal livre seja importante para o reconhecimento na inibição. Mediante a geração de dois análogos com resíduos aromáticos diferentes de Phe no ciclo, observou-se que estes são ativos de forma pouco significativa, sendo a Phe crucial na inibição cruzada [7].

Outro dado observado que é digno de se salientar é a mudança na configuração da Cys no composto **(26)**, o que reduz significativamente a inibição. Isto pode ser devido à conformação gerada pelo centro estereogênico, forçando uma mudança na orientação dos resíduos hidrofóbicos chave no macrocíclico, impedindo a interação de reconhecimento.

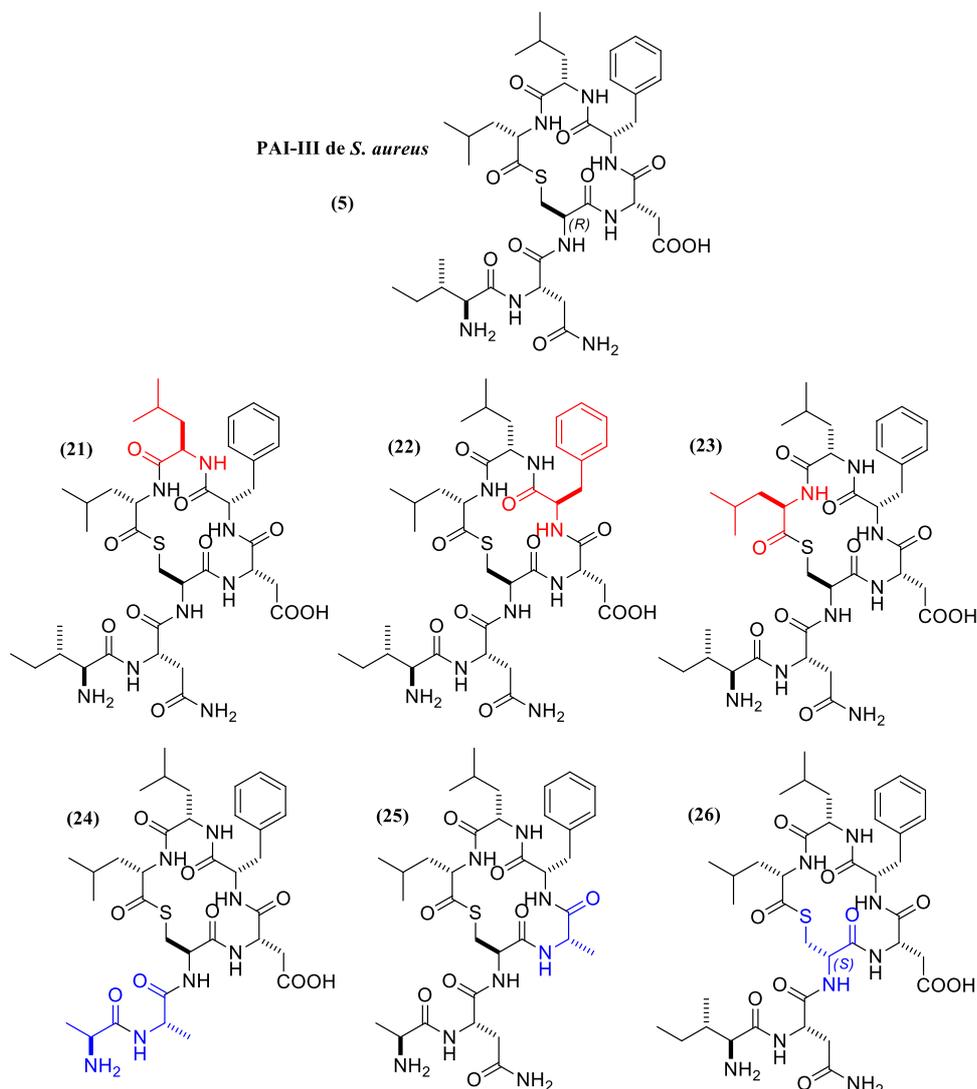


Figura 1.8. Moléculas sintéticas análogas do PAI-III de *Staphylococcus aureus* com modificações a partir de trocas de aminoácidos na estrutura cíclica. Uma delas consistiu em mudar a estereoquímica do resíduo da Cys.

O estudo de estrutura-atividade das duas gerações de peptídeos foi baseado em dois componentes da interação PAI-Receptor AgrC: o reconhecimento inicial do PAI pelo receptor AgrC e a indução resultante da troca alostérica dentro do AgrC que dirige à ativação. Com o objetivo de explicar estes dois componentes, duas tendências gerais foram tomadas em conta: inibição cruzada de AgrC-I, II e IV; e ativação de AgrC-III. De forma geral, o estudo sugere quais resíduos contribuem para a inibição cruzada de AgrC-I, II e IV no PAI-III (Figura 1.9) [7] e, ao mesmo tempo, sugere quais resíduos podem ser incorporados no desenho de peptídeos miméticos para atividade IQS nos diferentes receptores.

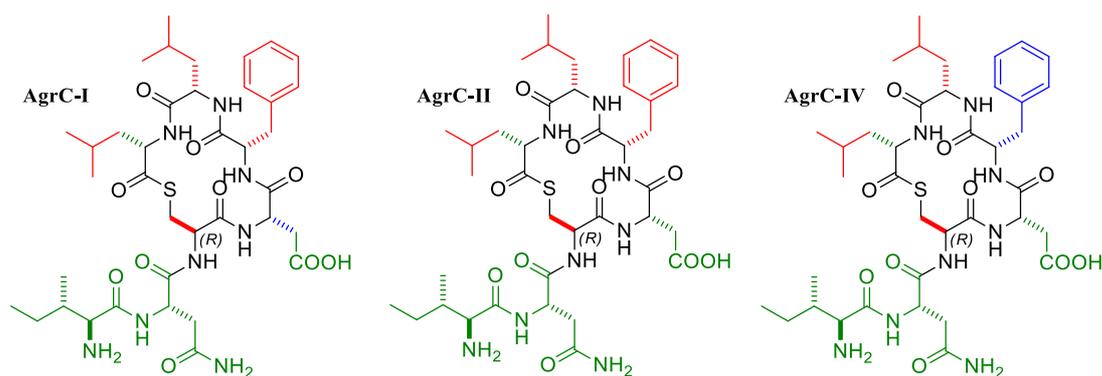


Figura 1.9. Alguns componentes (estereoquímica do carbono α e resíduos de aminoácidos) no PAI-III (5), classificados segundo a sua contribuição pela cor na atividade cruzada frente os diferentes receptores AgrC (I, II e IV). **vermelho:** crítico; **azul:** contribui, mas não é crítico; **verde:** não é essencial [7].

Sugeriu-se que, para a concepção de peptídeos miméticos, uma estratégia poderia consistir em incorporar resíduos com características mais hidrofóbicas na porção C-terminal (macrocíclico), a fim de aumentar a afinidade para a bolsa hidrofóbica do receptor AgrC, ou usar cadeias com substituintes halogenados. O composto (27) é um derivado de PAI-II (4), no qual foi substituída a fenilalanina por resíduo de naftilalanina, fazendo o anel mais hidrofóbico, o que mostra uma redução significativa da atividade inibidora. Outra opção tem sido fazer híbridos entre PAI's existente, como o composto (28), que consiste na cauda exocíclica de PAI-I (3) e o anel tiolactónico de PAI-II, que apresentou uma atividade muito maior do que o mesmo derivado sem cauda e o N-terminal acetilado (29) [27].

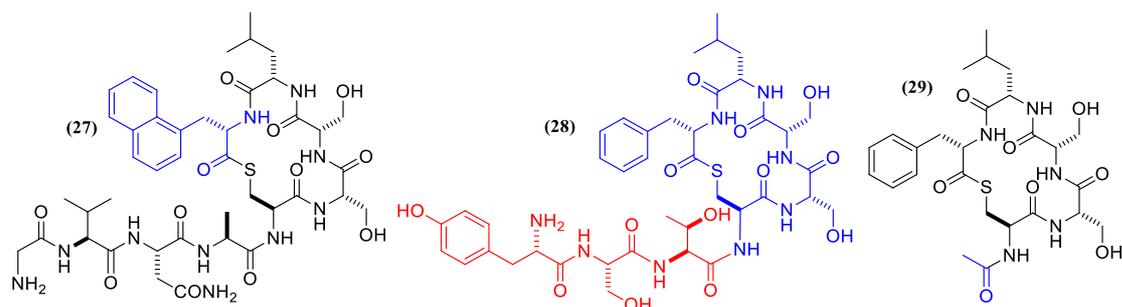


Figura 1.10. Moléculas sintéticas análogas do PAI-II de *Staphylococcus aureus*, que apresentam modificações no resíduo aromático ou ausência de cauda. A molécula (28) corresponde a um híbrido que contém a cauda do PAI-III e a parte macrocíclica do PAI-II.

Em relação ao tamanho da parte cíclica e à atividade de moléculas sintéticas análogas aos PAI's, pode-se mencionar o trabalho de Johnson e colaboradores em 2015, que baseando-se nas características do PAI-I desenharam análogos seja aumentando e/ou diminuindo a estrutura da tiolactona, por inserção de *L*-homocisteína, adição de β -homoaminoácidos, eliminação de resíduos (especificamente *L*-Phe e *L*-Ile), assim como também a mudança de estes dois últimos resíduos por *L*-Pro. Tudo o anterior para variar a conformação de dita estrutura cíclica e observar num teste desenvolvido a interação de ligação dos análogos e o receptor tipo AgrC. De forma geral os resultados mostram que a modificação do anel no PAI-I leva a compostos não ativos como IQS. Especificamente nos compostos onde a eliminação de aminoácido, assim como a troca dos mesmos pela Pro, não é tolerada para atividade. A presença de *L*-homocisteína nos análogos, que gera aumento num grupo metileno, leva a compostos que se ligam ao receptor de forma fraca, mas mostrando-se como agonistas. Por último, compostos contendo β -homoaminoácidos, também contendo um metileno a mais, se mostraram inativos [30].

Embora os análogos miméticos dos PAI's e alguns lactamas e lactonas, tenham mostrado uma atividade promissora, a desvantagem dos mesmos encontra-se principalmente na instabilidade da molécula devido à ligação de tioéster, amida e éster; bem como a pouca biodisponibilidade destes [27].

Peptóide é uma classe de substâncias peptideomiméticas formadas por resíduos de Gly *N*-substituídos, ou seja, o grupo *R* está ligado ao átomo de nitrogênio do peptídeo, em vez do carbono α (Figura 1.11) [31, 32]. Isso faz com que o átomo de nitrogênio tenha sua valência completa de uma forma diferente pela ligação ao carbono α , ao grupo *R* e à carbonila. O nitrogênio, por não ter a ligação com um átomo de hidrogênio, não apresenta a formação de estruturas secundárias definidas. O esqueleto dos peptoideos é mais flexível, fazendo com que possam adotar conformações *cis* ou *trans*, o estabelecer estruturas secundárias estáveis derivadas de interações estéricas e/o eletrônicas [31]. A alta estabilidade proteolítica dos peptóides torna esta classe de peptídeos miméticos um candidato atraente para as investigações em busca de IQS. Acredita-se que, ao ser altamente flexíveis e versáteis por escolher diferentes conformações, possam imitar os PAI's nativos. Embora não se saiba muito sobre as conformações de peptóides cíclicos, presume-se que essas moléculas podem ser uma alternativa, como inibidores de *quorum sensing* de sistemas de bactérias Gram positivas como *S. aureus* [27].

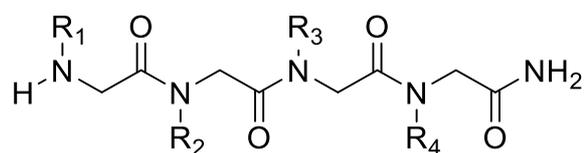


Figura 1.11. Estrutura de um peptídeo.

Karathanasi *et al.* em 2018, apresentaram a síntese de peptideomiméticos lineares híbridos de *L*-Lys, 3-(1-naftil)-*L*-alanina, assim como uma parte peptídica, constituída de *N*-butilglicina, *N*-1-naftilmetilglicina e *N*-4-metilbenzilglicina, alguns dos quais apresentaram atividade IQS quando testada a concentrações inferiores à MIC. Entre os compostos testados, **(30)** e **(31)** foram os mais ativos (Figura 1.12) [32].

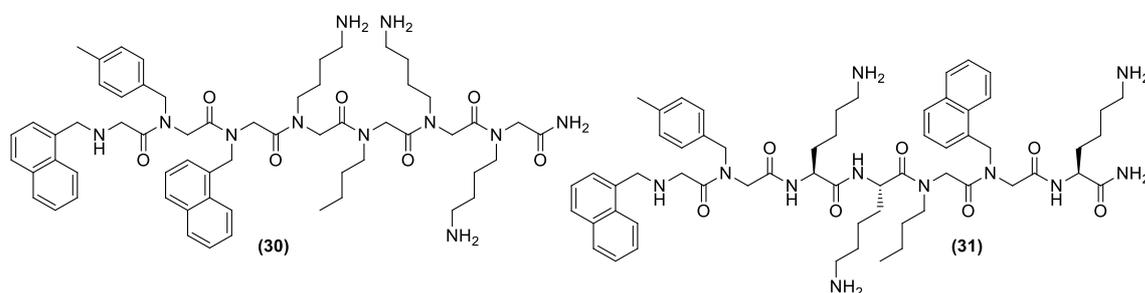


Figura 1.12. Estruturas híbridas peptídeo-peptídeo lineares inibidores de QS em *S. aureus*.

1.4 Solonamidas A e B, análogos naturais dos PAI's

Mansson *et al.* 2011, identificaram numa cepa da bactéria de origem marinha, *Photobacterium halotolerans*, as lactonas macrocíclicas que foram denominadas de solonamidas A **(30)** e B **(31)**. Estas moléculas, cuja síntese total foi realizada por Kitir *et al.* em 2014, estão constituídas por quatro resíduos de aminoácidos (*L*-Leu, *D*-Ala, *D*-Leu e *L*-Phe), além de conter uma cadeia exocíclica alquílica que as diferencia entre si [20,21]. Estes produtos naturais foram testados em um ensaio de difusão em ágar frente cepas reporter de *S. aureus* 8325-4 que contém os promotores de *hla*, *rnaIII* e *spa* para a expressão de *lacZ*. Neste ensaio usa-se X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-*D*-galactopiranosídeo), um glicosídeo análogo da lactose e um substrato para a enzima β-galactosidase. Em presença de substâncias peptidomiméticas que ativam os promotores nas diferentes cepas: PC322 (*hla::lacZ*), SH101F7 (*rnaIII::lacZ*), ou PC203 (*spa::lacZ*), expressasse a β-

galactosidase, que hidrolisa X-Gal para formar galactose e 5-bromo-4-cloro-3-indoxil. Este último se oxida em presença de ar para formar um composto de cor azul, o 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo. Os resultados mostraram que os compostos incrementam a expressão de *spa*, e reduzem a expressão de *hla* e *rnaIII* [21].

Adicionalmente o monitoramento e quantificação da expressão de mRNA por análises de *Northern blot* foram realizados com duas cepas de *S. aureus* (8325-4 e MRSA USA300) frente às solonomidas. Aqui se observaram resultados similares ao primeiro ensaio para ambos compostos, porém, destes dois, a solonomida B reduz dramaticamente a expressão de ambos genes *hla* e *rnaIII*, assim que aumenta a expressão de *spa*, indicando que esta substância interfere fortemente com a regulação do gen *agr*. Observou-se para esta solonomida em particular que a diminuição da expressão de *rnaIII* foi mais pronunciada na cepa virulenta MRSA USA300 para a qual se suspeita que a alta atividade do gen *agr* contribui para a virulência da mesma. É preciso mencionar que as solonomidas não afetaram o crescimento nas culturas de *S. aureus*, podendo ser considerados como inibidores competitivos do sistema *agr* [21].

Cabe fazer menção que estas moléculas são estruturalmente similares ao modelo apresentado por Tal-Gal *et. al.* em 2013 [7], que faz referência à contribuição de alguns resíduos no PAI-III. Claramente as solonomidas A e B apresentam em suas estruturas dois resíduos de Leu, e uma Phe, que são resíduos críticos na atividade de PAI-III frente os receptores AgrC; assim como não apresentam a cauda exocíclica peptídica que não faz contribuição crítica à atividade IQS.

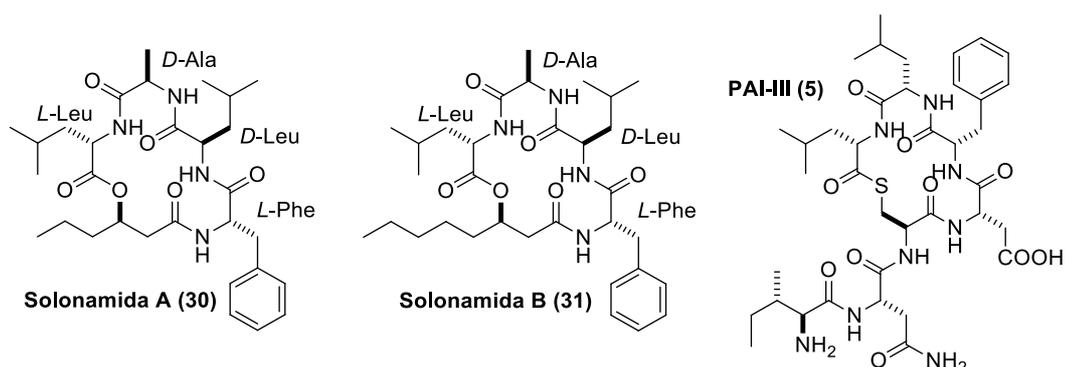


Figura 1.13. Estrutura das solonomidas A, B, e do PAI-III.

Hansen e colaboradores em 2018, realizaram a síntese de 25 lactamas análogas à solonomida B, mediante a metodologia SPFS-Fmoc e onde a troca da Cys também contou

com o resíduo de ácido (*S*)-2,3-diaminopropanoico. Neste trabalho sistemático se examinaram variações na estereoquímica dos resíduos de aminoácidos, o tamanho do anel e a substituição de aminoácidos, com o objetivo de identificar elementos chave para a inibição do receptor AgrC. As lactamas. As moléculas ativas foram identificadas num teste onde a inibição de β -lactamase é resultado da expressão do gen *blaZ*, unido ao promotor P3, numa cepa reporter de *S. aureus*, cuja ativação era induzida pela adição externa dos PAI's obtidos do sobrenadante da cepa *S. aureus* 8325-4. Com a otimização dos análogos, baseada na observação de que moléculas com a sequência de aminoácidos contendo a mesma estereoquímica apresentaram resultados de inibição mais satisfatórios que aquelas com estereoquímicas aleatórias, e onde especificamente moléculas com resíduos de aminoácidos de configuração *D* foram superiores que seus homólogos *L*, os autores sugerem em conjunto com o estudo SAR dos 25 análogos, que para ter estruturas com atividade IQS relacionadas à solonamida B assim como aos PAI's, alguns fatores devem ter-se em conta, entre eles: (i) o tamanho do anel deve ser idêntico ao dos PAI's; (ii) a cauda exocíclica deve ser relativamente curta; (iii) na posição R₂, o resíduo de Phe parece ser crucial; a presença de outros resíduos aromáticos ou alifáticos reduzem fortemente o potencial; e (iv) a Leu na posição R₅ parece ser também crucial para a inibição. Embora, o trabalho diga que os resíduos nas posições R₃ e R₄ constituem posições para uma otimização futura, já que estes resíduos não proporcionam conclusões claras, é possível observar que grupos alifáticos nestas posições conduzem para análogos ativos (Figura 1.14) [33].

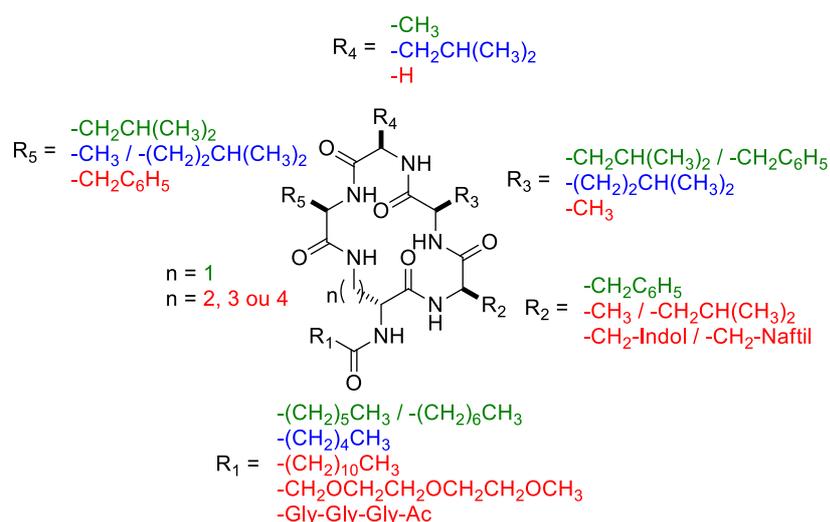


Figura 1.14. Estudo SAR de Hansen *et al.* 2018, que mostra as substituições de cadeias de aminoácidos nos análogos lactamas que indicam a influência na inibição de AgrC. verde: alto potencial; azul: potencial ligeiramente inferior; vermelho: prejudicial para o potencial [33].

1.5 Síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) e a metodologia Fmoc (9-fluorenil-metiloxicarbonila)

A síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) foi criada na década de 60 por Merrifield, e esta metodologia facilitou enormemente a síntese desse grupo de moléculas. Este método atualmente é um dos mais usados para sintetizar, de forma artificial, peptídeos e proteínas de origem natural. Uma das vantagens é a possibilidade de incorporar aminoácidos não naturais (sejam *D*-aminoácidos ou com cadeias laterais modificadas e funcionalizadas) [34].

Esta metodologia, como indica seu nome, consiste em um suporte sólido, poroso e insolúvel, tanto em água como em solventes orgânicos. A característica principal do suporte é manter grupos funcionais que propiciam a ligação peptídica, permitindo, mediante ciclos repetitivos, a construção e crescimento da cadeia peptídica, uma vez que um dos extremos do peptídeo nascente se encontra ligado covalentemente ao dito suporte. Nessa ordem de ideias, o peptídeo nascente é mantido todo o tempo ligado ao suporte durante a síntese e, uma vez esta finalizada, a ligação covalente que une o peptídeo à resina pode ser clivada. A clivagem do peptídeo na resina é feita de forma seletiva frente às ligações peptídicas, usualmente com hidrólise ácida, proporcionando o peptídeo de interesse.

A escolha do agente de acoplamento para a ativação da carboxila para a formação da ligação peptídica é muito importante e interfere diretamente no rendimento total da síntese, como também o excesso dos mesmos e dos aminoácidos (até 5 equivalentes) [35,36]. Apesar de usar excesso de reagentes (aminoácidos, agentes de acoplamentos e base) com o objetivo de garantir um alto rendimento [34,37], a SPFS garante peptídeos de pureza elevada, fazendo desta metodologia ótima para peptídeos de massa molecular elevada, uma vez que evita-se etapas de reação para obter intermediários em separado e, por conseguinte, reações não desejadas, além de evitar a purificação dos mesmos, os quais são passos chave na síntese em solução. Adicionalmente, são procedimentos simples os que acompanham a metodologia da SPFS (filtração e lavagem). Na figura 1.15 está ilustrado o ciclo repetitivo de formação da ligação peptídica (acoplamentos) e desproteção feita no suporte sólido, no qual a parte de lavagem entre cada um é fundamental para o sucesso da seguinte.

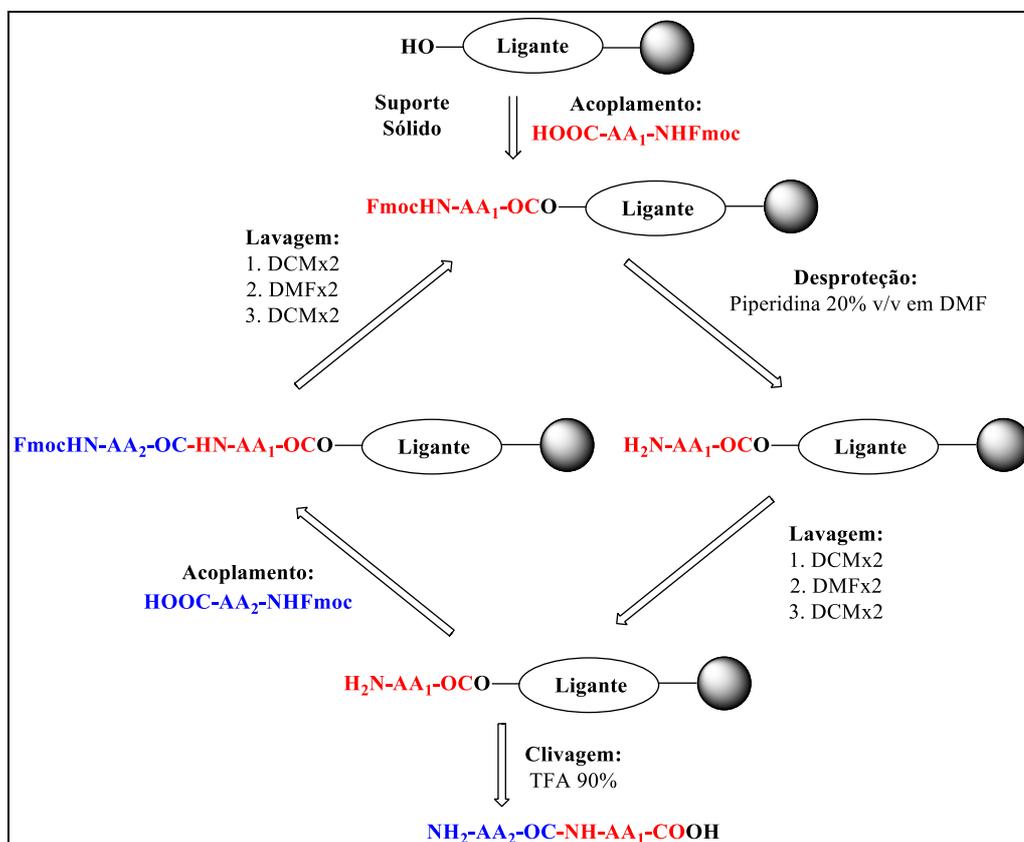


Figura 1.15. Síntese de peptídeos em fase sólida pela metodologia Fmoc.

De forma geral, o suporte sólido contém um sítio ligante (grupo amino terminal livre ou hidroxila), como também um grupo facilmente substituível (halogênio), que permite acoplar o grupo carboxílico do primeiro aminoácido *N*-protegido. Com a posterior desproteção do *N*-terminal do primeiro aminoácido acoplado, tem-se outro grupo amino disponível para fazer uma nova reação de acoplamento. Aminoácidos com cadeias laterais com grupos reativos têm que estar com estes protegidos e cuja desproteção não pode ocorrer com a desproteção do grupo amino terminal do peptídeo crescente, evitando, desta forma, reações não desejadas e garantindo a integridade da síntese [34,37].

Na atualidade, duas estratégias para fazer SPFS são as mais difundidas: a estratégia SPFS-Boc e a SPFS-Fmoc. Basicamente, o nome delas faz referência ao grupo de proteção da porção *N*-terminal dos aminoácidos empregados, o que permite que uma se diferencie da outra por meio das condições de reação utilizadas na desproteção destes grupos de proteção bem como para a clivagem final do peptídeo. Apesar das clivagens serem feitas com ácidos fortes nos dois casos, as resinas usadas na metodologia Boc (*tert*-butiloxicarbonila) requerem condições ácidas mais agressivas (por exemplo, HF anidro)

em comparação com o respectivo TFA usado para a desproteção seletiva do Boc. Não obstante, as resinas que são usadas na metodologia Fmoc, podem ser clivadas com TFA, porém as condições de desproteção do Fmoc são mais brandas, geralmente levada a cabo com solução de piperidina numa faixa de 20 – 25 % em DMF. A simples troca do grupo protetor *N*-terminal de Boc para Fmoc proporciona consideráveis vantagens à síntese em fase sólida e por isso, tem sido a metodologia empregada neste trabalho.

2. Planejamento, sínteses e atividade biológica de peptídeos cíclicos

Como mencionado, a ativação de *agr* em *Staphylococcus aureus* é dependente de quatro ciclopeptídeos tiolactínicos denominados PAI's, como também foi observado alguns estudos de moléculas sintéticas baseadas na estrutura dos PAI's que agem interferindo no QS. Então, pode-se esperar que novas estruturas cíclicas relacionadas possam ter um efeito como IQS em *S. aureus*, fazendo destas uma estratégia para a atenuação da virulência desta bactéria, por não exercer pressão nos mecanismos de desenvolvimento de resistência da bactéria. Os ciclopeptídeos constituem um grupo de substâncias encontradas em fontes naturais que se destacam pelas variadas atividades biológicas e entre as quais encontramos citotóxicas, antimalária, sedativa, antimicrobianos, imunossupressiva, inibidores de enzimas e outras [38,39]. Uma característica das estruturas cíclicas é a estabilidade em condições fisiológicas, bem como a sua resistência à degradação enzimática, algumas vezes atribuída à rigidez que o anel apresenta ao ter restrição de liberdade de conformação [39]. Isto torna interessante a síntese total de moléculas cíclicas peptídicas, porque, fazendo trocas ou mudanças a partir da estrutura das contrapartes naturais, podemos ter acesso a um número grande de entidades com diversificação estrutural, bem como chegar à potencialização das atividades. Diferentes formas de ciclização de macromoléculas que envolvem partes reativas em condições de diluição bem como metodologias que mostram a reação sobre os suportes sólidos permitem obter essas singulares estruturas.

O desenho de novos peptídeos, contendo estruturas cíclicas através de ligação éster, tioéster e tioeter, foram baseados nos PAI's e moléculas análogas apresentadas anteriormente. Para isto, se tiveram em conta os efeitos descritos de alguns aminoácidos na atividade antagonista e outros foram resultantes da observação direta das solonamidas, dando origem a moléculas estruturalmente relacionadas a estes produtos naturais. A continuação apresenta de forma detalhada como foram planejadas estas gerações de moléculas cíclicas, as rotas de síntese que foram propostas e os resultados obtidos ao empregar ditas rotas.

2.1 Desenho da primeira geração de novos peptídeos cíclicos

Inicialmente uma primeira geração (Figura 2.1), foi baseada exclusivamente nos produtos naturais, já que mantêm o mesmo número de átomos constituintes na estrutura macrocíclica, na mesma conectividade, assim como também três resíduos de aminoácidos típicos das estruturas base (Ala, Leu e Phe). Dois destes três resíduos hidrofóbicos são encontrados nos PAI's e estes são apresentados como indispensáveis para atividade IQS cruzada nas quatro cepas da bactéria [7]. Inicialmente, estes três aminoácidos foram contemplados na mesma sequência, mas também de forma invertida. Para alguns derivados foram mantidos os dois aminoácidos não naturais (*D*-Ala e *D*-Leu), e outros tem estes aminoácidos com configuração *L*. As moléculas desta geração têm a ligação éster nativa, assim como o seu análogo tioéster. Nesta última modificação, a inserção da ligação tioéster, foi feita com o objetivo de diversificar as estruturas, e produzir moléculas híbridas com características tanto dos PAI's como das solonamidas, já que a ligação tioéster é reportada como crucial na ativação e antagonismos no sistema *agr*.

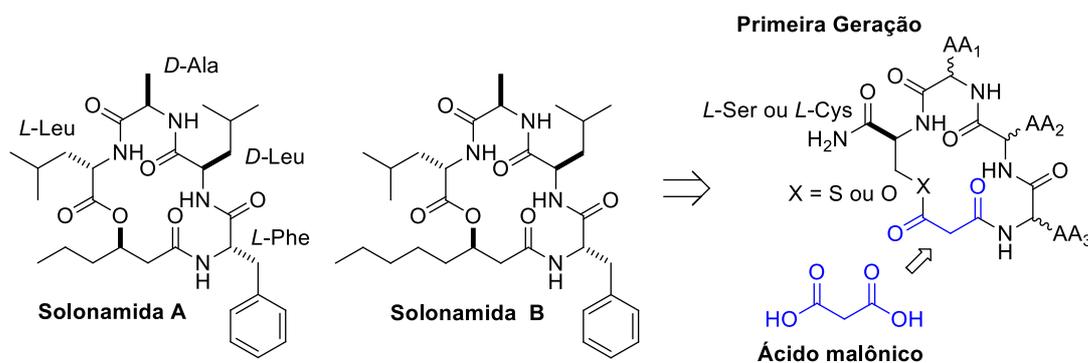


Figura 2.1. Primeira geração de moléculas cíclicas, baseadas nas solonamidas. Esta geração contemplou o uso de uma ligação éster e tioéster. AA₁, AA₂ e AA₃ podem ser Ala, Leu e Phe.

Como pode-se observar na figura 2.1, um número grande de moléculas pode ser gerado deste núcleo, uma vez considerada a aleatoriedade na inserção destes três aminoácidos de configuração *D* e/o *L*. Contudo, nós inicialmente focamos na preparação de dois derivados lactônicos, um deles contendo igual sequência, mas com aminoácidos naturais (*L*-aminoácidos) e o segundo com a sequência invertida, os compostos (32) e (33) (Figura 2.2), assim como também na síntese dos dois análogos tiolactônicos dos mesmos. Cabe mencionar que esta geração contém uma fração do ácido malônico dentro da

estrutura, porção que permite metodologicamente a etapa ciclização, assim como também a sua transformação para um tioéster intermediário chave na etapa de ciclização das tiolactonas. Interessantemente, a inserção do fragmento de ácido malônico permite obter análogos cíclicos representativos dos produtos naturais, pois completa até 16 o número de átomos que apresentam os produtos naturais assim como os PAI's na estrutura cíclica.

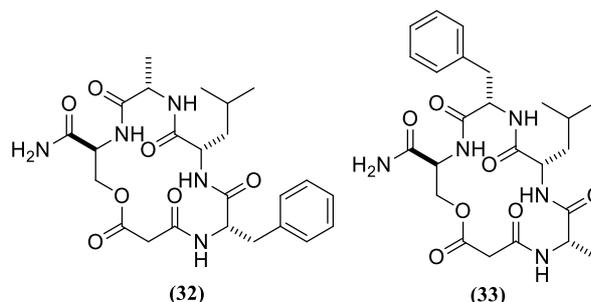


Figura 2.2. Estrutura dos dois derivados lactônicos propostos inicialmente.

A rota de síntese que se seguiu para estes dois derivados, se apresenta no esquema 2.2. Inicialmente foi feita a síntese em fase sólida de um tetrapeptídeo linear, com *L*-Ser na porção C terminal. O resíduo de malonato (esquema 2.1) foi inserido ao tetrapeptídeo como ácido mono-*tert*-butil malônico (**34**). Várias tentativas com diferentes condições de reagentes de acoplamento, base e tempo de reação foram feitas para lograr a inserção, monitorando mediante o teste de Kaiser depois do tratamento. Entre as tentativas, a que resultou como efetiva foi quando se usaram 4 eq. ácido e DIC, 10 eq. de DMAP em 2 ml de DCM seco, *overnight*, na qual se observou um acoplamento completo, uma vez que o teste de Kaiser resultou negativo para grupo amino livre. A tabela 2.1 apresenta as tentativas realizadas.

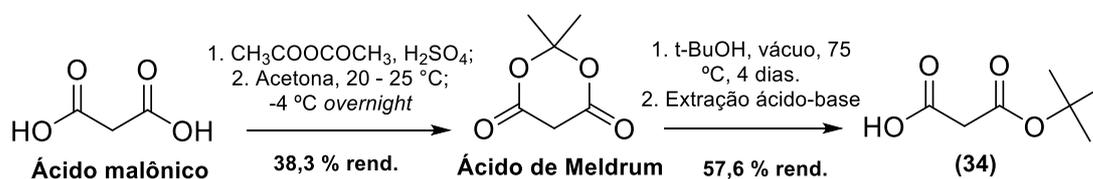
Tabela 2.1. Diferentes condições de reação testadas para a inserção de ácido mono-*tert*-butil malônico a partir de 4 eq. ao tetrapeptídeo na resina.

Agente de acoplamento	Base	Solvente	Tempo de reação	Teste de Kaiser (+ ou -)	Acoplamento (+ ou -)
HATU (4 eq.)	NMM (10 eq.)	DMF	2 h	+	-
HATU (4 eq.)	NMM (10 eq.)	DMF	<i>Overnight</i>	+	-
DIC (4 eq.)	DIPEA (10 eq.)	DMF	2 h	+	-
DIC (4 eq.)	DIPEA (10 eq.)	DMF	<i>Overnight</i>	+	-
DCC (4 eq.)	DIPEA (10 eq.)	DMF	<i>Overnight</i>	+	-
DIC (4 eq.)	DMAP (7 eq.)	DCM	2 h	+	-
DIC (4 eq.)	DMAP (10 eq.)	DCM	2 h	+	-
DIC (4 eq.)	DMAP (10 eq.)	DCM	<i>Overnight</i>	-	+

2.2 Sínteses do ácido mono-*tert*-butil malônico (34)

Inicialmente uma tentativa de preparação do ácido mono-*tert*-butil malônico (34), foi realizada usando a metodologia reportada por Gao *et. al.* 2006, que descreve a sua preparação a partir de ácido malônico, quando tratado com *t*-BuOH, MsCl, piridina e THF seco numa única etapa [40]. Os resultados foram desanimadores, porque nas tentativas realizadas, o produto identificado por RMN-¹H não correspondia ao produto desejado.

Como segunda opção optou-se pela metodologia que usa, como intermediário, o ácido de Meldrum em refluxo com *t*-Butanol seco reportada por Vitali *et al.*, 2006 [41]. O ácido de Meldrum, foi produzido pela metodologia empregada por Davidson e Bernhard em 1948, na que utiliza ácido malônico, ácido acético, acetona e H₂SO₄ [42]. O esquema 2.1 apresenta a rota de síntese, composta de duas etapas para a produção de (34) a partir do ácido malônico.



Esquema 2.1. Rota de sínteses utilizada para a síntese do ácido mono-*tert*-butil malônico (34).

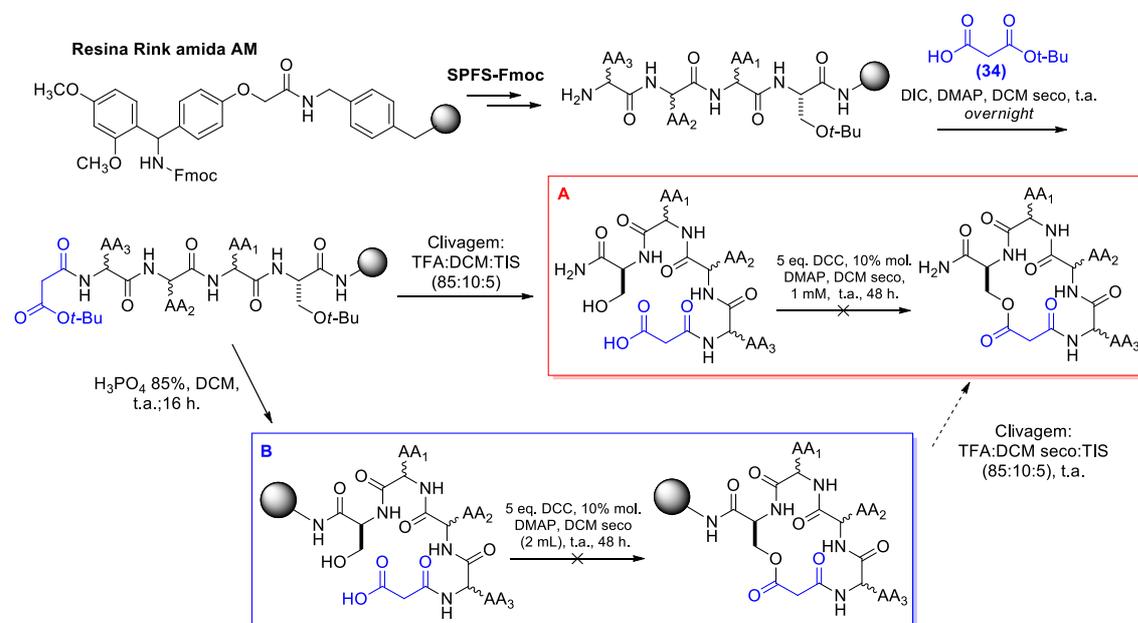
O tratamento de ácido malônico, com anidrido acético, H₂SO₄ e acetona, proporcionou o ácido de Meldrum como cristais em forma de agulhas de cor branca que, depois da filtração e cristalização, se obteve com 38,3% de rendimento. O espectro de RMN-¹H deste sólido (Anexo I), apresenta dois sinais simpletos: uma em δ_{H} 3,62 ppm (2 H, s), que correspondentes aos prótons de metilenos da estrutura cíclica, e outra em δ_{H} 1,78 ppm (6H, s) pertencentes aos prótons metílicos. Estes sinais permitem identificar a substância como o ácido de Meldrum. Na segunda etapa, a transesterificação do ácido de Meldrum com *t*-BuOH seco, obteve-se um composto oleoso de cor amarelo (57,6%). O espectro de RMN-¹H deste óleo, (Anexo I), apresenta dois sinais simpletos em δ_{H} 3,35 ppm (2H, s) e δ_{H} 1,49 ppm (9H, s) que correspondem com prótons de metilenos e de metilas respectivamente, sinais que permitiram identificar o composto como o ácido mono *tert*-butil malônico (34). A tabela 2.2 apresenta os sinais de RMN-¹H destes dois compostos.

Tabela 2.2. Sinais apresentadas no espectro de RMN-¹H do ácido de Meldrum e do ácido mono *tert*-butil malônico (**34**), obtidos em solução com CDCl₃.

Posição	Ácido de Meldrum	(34)
	δ_H (ppm) (n ^o Hs, multiplicidade)	
1	-	-
2	3,62 (2H, s)	3,35 (2H, s)
3	-	-
4	1,78 (6H, s)	-
5	-	1,49 (9H, s)

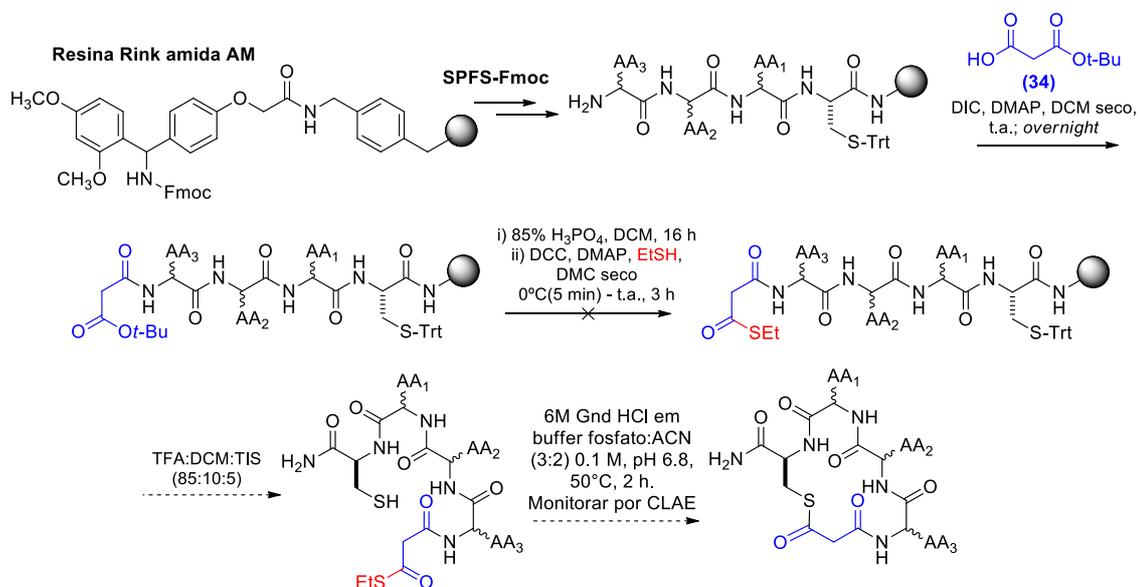
2.3 Tentativas de síntese da primeira geração de peptídeos cíclicos

Duas metodologias de ciclização foram propostas, uma em solução e outra na resina. Ambas metodologias não levaram a obtenção dos peptídeos cíclicos de interesse. De um lado, as tentativas de ciclização em solução altamente diluída (rota A, no esquema 2.1), apresentam problemas na pre-purificação da mistura de reação, pois a ureia formada a partir do DCC, foi difícil de extrair. Depois das análises de EMAR dos picos coletados em CLAE em modo analítico, as massas que se mostraram foram maiores que dos peptídeos lineares, os quais podem ser devidas à formação de dímeros. Em nenhuma amostra coletada foi observado o peptídeo cíclico. Já a metodologia de ciclização na resina (rota B) proporcionou resultados frustrantes, apesar da mistura de reação final se mostrar mais limpa. As análises de CLAE em modo analítico proporcionou picos com massas diferentes dos peptídeos desejados, algumas vezes encontrando as massas dos peptídeos lineares. Esta última metodologia, a ciclização na resina, tem como etapa final a clivagem do peptídeo de resina usando TFA ao 85%, esta condição pode facilmente favorecer a abertura do anel anteriormente formado.

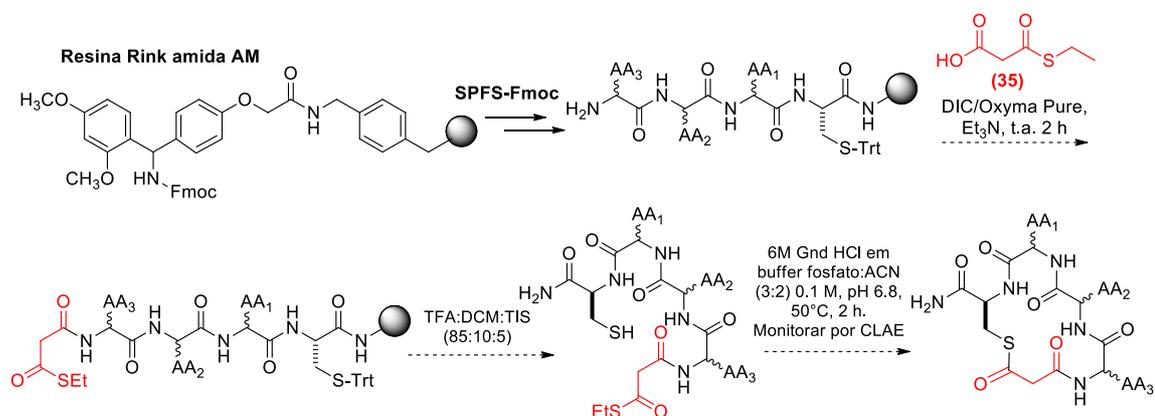


Esquema 2.2. Rota de síntese proposta para a síntese das macrolactonas (32) e (33) pertencentes à primeira geração. A rota faz uso do ácido mono-*tert*-butil malônico (34). **A:** Rota de reação para ciclização em solução. **B:** Rota de reação para ciclização na resina.

As tentativas de obtenção dos análogos tiolactônicos dos compostos (32) e (33), seguiram as rotas propostas nos esquemas 2.3 e 2.4. Os esquemas variam em relação ao esquema 2.2 (rota para os peptídeos lactônicos), pelo uso da *L*-Cys no início da síntese do tetrapeptídeo, além de usar, mais adiante, um tioéster peptídico linear como precursor para promover a ciclização em uma condição tampão. A utilização desta condição de reação tem sido usada para a síntese de moléculas análogas aos PAI's, ou seja, estruturas contendo um anel tiolactônico [7]. Os esquemas 2.3 e 2.4, se diferenciam pela forma que se propôs a formação deste tioéster peptídico linear. O esquema 2.3 consistiu de transformar a o resíduo do ácido malônico no respectivo tioéster na resina, já no esquema 2.4 se optou pela utilização do ácido 3-(etiltio)-3-oxopropanoico (35) como substrato para adicionar na SPFS. As duas tentativas não funcionaram, porque depois do tratamento do resíduo de ácido malônico na resina com DCC (4 eq.), DMAP (10 % mol.) e EtSH (60 eq.), e posterior clivagem com TFA (esquema 2.3), não observamos, nos espectros de massa, o peptídeo linear tioésterificados. A não produção do intermediário foi atribuída ao tratamento com TFA na etapa de clivagem, levando possivelmente à hidrólise nesta condição. No esquema 2.4, a tentativa de produzir (35) não foi lograda, o que não permitiu sua utilização.



Esquema 2.3. Rota de síntese proposta para a síntese dos ciclopeptídeos tiolactônicos pertencentes a primeira geração.



Esquema 2.4. Rota de reação propostos para a síntese dos ciclopeptídeos tiolactônicos pertencentes a primeira geração que contempla o uso do ácido 3-(etilthio)-3-oxopropanoico (35).

2.4 Desenho da segunda geração novos peptídeos cíclicos

Uma vez que as tentativas de síntese dos peptídeos de primeira geração não foram as melhores, e visando a sínteses de peptídeos cíclicos análogos as solonamidas e os PAI's, nos contemplamos a utilização de adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH), como intermediários para a produção de moléculas análogas. Os AMBH são compostos com uma rica variedade funcional e versatilidade em muitas reações [43], e para adutos provenientes

de ésteres acrílicos, o grupo éster é facilmente hidrolisável, obtendo um ácido carboxílico que pode ser acoplado ao tetrapeptídeo na resina, além do sistema carboxílico α,β -insaturado que é atraente para sua aplicação na metodologia de ciclização. Assim, a reação de adição tiol-Michael entre um resíduo de Cys e um aceptor de Michael (um resíduo de AMBH acetilado) proporciona a formação de uma ligação S-C que se tornou a estratégia de ciclização para a formação dos peptídeos da segunda geração, um novo tipo de macromoléculas contendo uma ligação tioéter, estruturalmente semelhante às solonamidas. Peptídeos cíclicos contendo uma ligação tioéter tem-se encontrado como esqueleto químico de produtos naturais e sintéticos que mostram uma ampla variedade de atividades, incluindo antibióticos [44], antagonistas da molécula 1 de adesão celular vascular [45] e anticorpos anticardiopina [46,47].

A segunda geração, contempla a troca do resíduo de mono *tert*-butil malonato da primeira geração, pelo resíduo de ácido do AMBH (Figura 2.3).

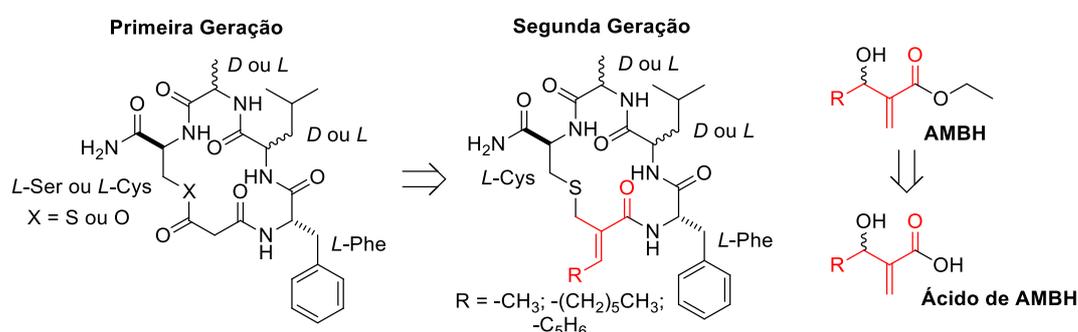
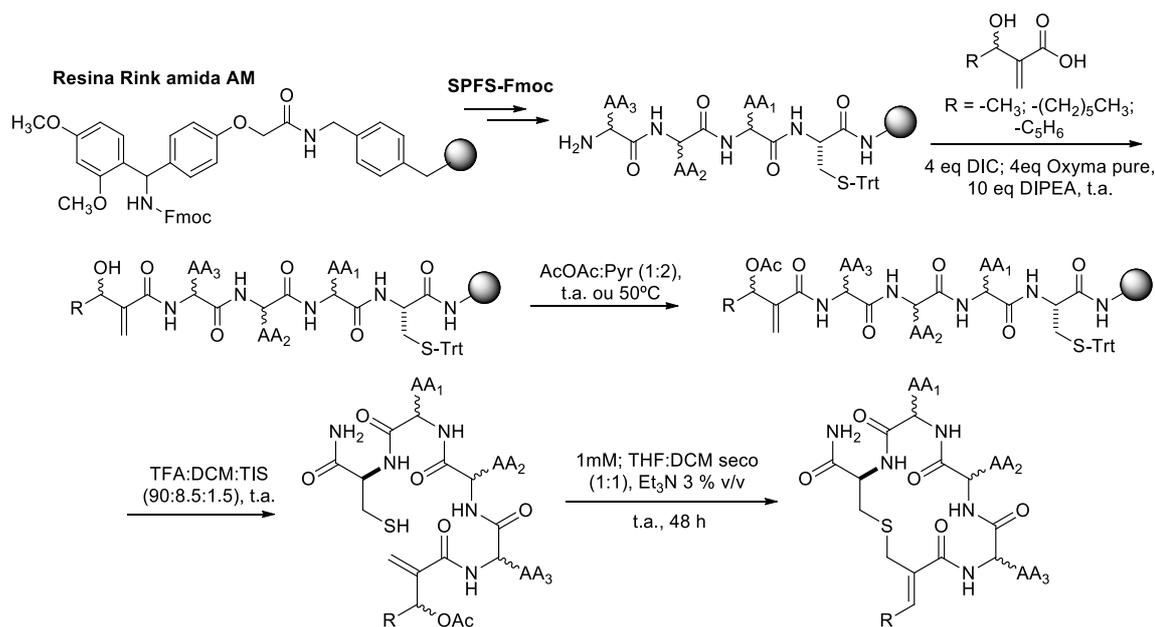


Figura 2.3. Segunda geração de moléculas cíclicas, que contemplou o uso de ácidos de AMBH.

Devido ao fato de o resíduo do aduto manter um aceptor de Michael, a *L*-Cys no início do peptídeo linear foi mantida em todas as moléculas, aproveitando sua reatividade frente ao aceptor numa adição conjugada – S_N2' , passo chave na ciclização intramolecular. Como resultado, obtém-se moléculas que ainda mantem 16 átomos na estrutura macrocíclica com a diferença da formação de uma ligação tioéter e não tioéster como os PAI's nativos. Nestes peptídeos, também decidimos usar os mesmos três aminoácidos apolares propostos na primeira geração (Ala, Leu e Phe), deixando a maioria deles com sequência idêntica à apresentada nas solonamidas, e fazendo trocas de configuração somente nos resíduos de Ala e Leu. Poucos deles mudam em aleatoriedade nos aminoácidos. Escolhemos três AMBH, dois dos quais são derivados de aldeídos alifáticos

(acetaldeído e heptanal), o outro é o aduto resultante do benzaldeído, porque se pretendia observar o efeito de cadeias laterais na etapa de ciclização assim como também observar o efeito destas cadeias nos testes de atividade biológica. Desta forma, novos peptídeos macrocíclicos contendo uma ligação tioéter e possuidores de uma cauda exocíclica com dupla ligação foram obtidos. A rota de síntese empregada e as moléculas sintetizadas que pertencem à segunda geração se apresentam no esquema 2.5 e figura 2.5.



Esquema 2.5. Rota de sínteses empregada para a produção dos ciclopeptídeos contendo uma ligação tioéter, pertencentes a segunda geração.

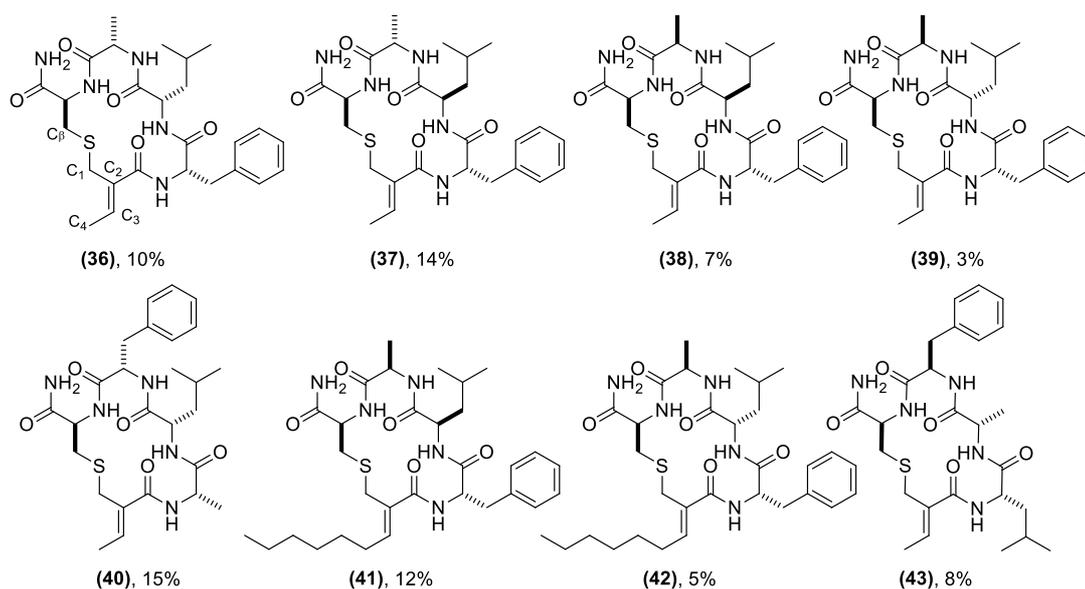
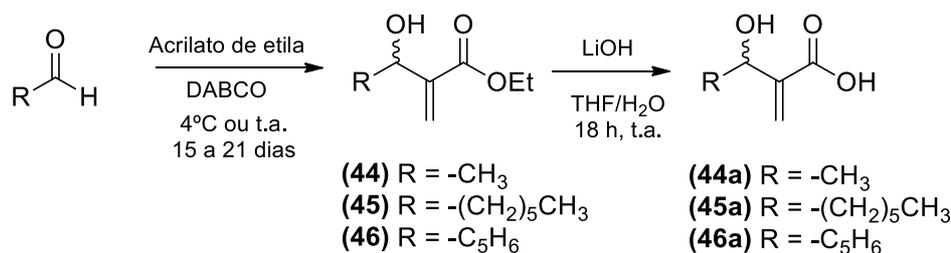


Figura 2.4. Estrutura dos ciclopeptídeos da segunda geração sintetizados e os seus rendimentos obtidos, calculados com base na carga inicial da resina.

2.5 Sínteses dos adutos de Morita-Baylis-Hillman e derivados ácidos dos mesmos



Esquema 2.6. Sínteses dos AMBH e seus respectivos ácidos.

Os adutos alifáticos de acetaldeído e heptaldeído foram sintetizados à temperatura ambiente e agitação por 20 dias; o aduto do benzaldeído foi sintetizado a uma temperatura de 4 ° C sob agitação durante 15 dias, segundo a metodologia de Silva *et al*, 2019 [48]. Depois do tratamento e purificação, os respectivos adutos foram submetidos a hidrólise usando solução de LiOH a 3,5 M em THF em agitação por 24 h. Os adutos de acetaldeído e heptaldeído foram obtidos com um rendimento de 90% e 46%, respectivamente, enquanto o aduto de benzaldeído foi obtido com eficiência de 53%. A reação de hidrólise forneceu os diferentes ácidos com bons rendimentos, sendo 98% para o derivado ácido do acetaldeído, 90% para o derivado ácido do heptaldeído e 80% para o derivado ácido do benzaldeído. As moléculas foram caracterizadas por dados de RMN-¹H, ¹³C, assim como espectros de EM-IE e EMAR-IES (Anexo II).

O espectro de RMN-¹H do composto **(44)** (Anexo II), apresenta dois simpletos largos em δ_H 6,20 (1H, s) e 5,80 (1H, s), cada um integrando para um hidrogênio, que pelo deslocamento químico são referidas aos prótons vinílicos do carbono β do aduto. Também se observa dois quartetos: o primeiro em δ_H 4,60 (1H; q; $J = 6,0$ Hz) que pela multiplicidade e integração correspondem ao hidrogênio carbínolico, e o segundo em δ_H 4,25 (2H; q; $J = 7,2$ Hz) que corresponde a hidrogênios metílicos. Adicionalmente, dois sinais de carbonos saturados ressonando como duplete e tripleto na região de campo alto do espectro em δ_H 1,38 (3H; d; $J = 6,6$ Hz) e 1,30 (3H; t; $J = 6,6$ Hz), características dos hidrogênios de metila, assignados à metila ligada ao carbono carbínolico e a metila do radical etila do grupo éster, respectivamente. O espectro de RMN-¹³C (Anexo II) para este composto apresenta a sinal de um carbono carbonila típico de éster em δ_C 166,9; dois carbonos olefínicos em δ_C 143,7

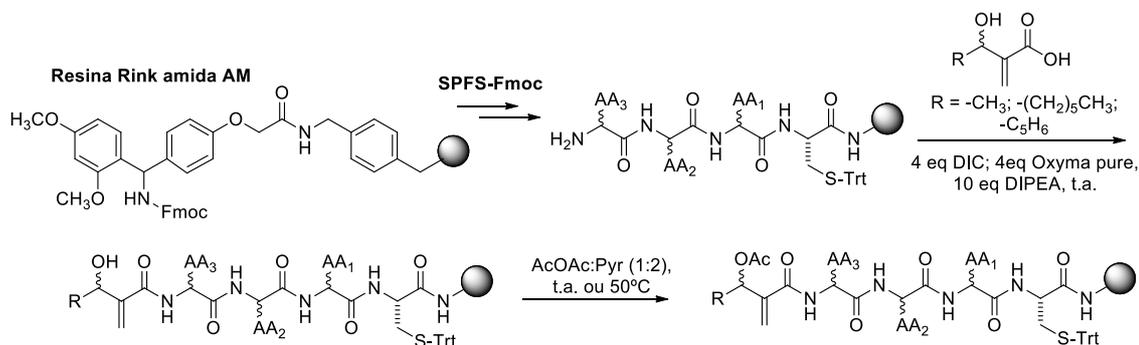
e 123,8; o sinal característico de carbono carbínolico em δ_C 67,4; o carbono metileno do grupo etila no éster em δ_C 60,9; e dois carbonos de metila em δ_C 22,1 e 14,3.

O espectro de RMN- 1H do ácido do AMBH do acetaldeído (**44a**), em anexo II, apresentou sinais diagnósticos, entre os que se observam dos sinais de simpletos em δ_H 6,38 (1H; s) e 5,95 (1H, s) atribuídas aos prótons vinílicos; um quarteto em δ_H 4,66 (1H; q; $J = 6,0$ Hz) correspondente ao hidrogênio carbínolico e um duplete em δ_H 1,42 (3H; d; $J = 6,6$ Hz) referente à metila ligada carbono carbínolico. O espectro de RMN- ^{13}C (em anexo II) apresenta cinco sinais de carbono. Um sinal de carbonila em δ_C 171,36; dois sinais de carbonos com hibridação sp^2 em δ_C 142,9 e 126,8; um sinal de carbono carbínolico em δ_C 67,1 e a sinal de carbono saturado para a metila em δ_C 22,1. Os dados de deslocamento químico para o aduto do acetaldeído e seu respectivo ácido, assim como para os demais compostos se mostra na tabela 2.3.

Tabela 2.3. Dados espectroscópicos de RMN-¹H e ¹³C dos AMBH (**44-45**) e ácidos de AMBH (**44a-46a**).

Posição	(44)		(44a)		(45)		(45a)		(46)		(46a)	
	δ_H (ppm) (multiplicidade; <i>J</i> (Hz))	δ_C (ppm)										
1'	4,25 (2H; q; 7,2)	60,88 (CH ₂)	-	-	4,24 (2H; q; 7,2)	60,95 (CH ₂)	-	-	4,18 (2H; q; 7,2)	61,07 (CH ₂)	-	-
2'	1,30 (3H; t; 6,6)	14,29 (CH ₃)	-	-	1,32 (3H; t; 7,2)	14,28 (CH ₃)	-	-	1,24 (3H; t; 7,2)	14,17 (CH ₃)	-	-
1	-	166,87 (C)	-	171,36 (C)	-	166,78 (C)	-	171,37 (C)	-	166,48	-	171,19 (C)
2	-	143,71 (C)	-	142,93 (C)	-	142,87 (C)	-	141,96 (C)	-	141,49 (C)	-	140,99 (C)
3	3a: 6,20 (1H, s) 3b: 5,80 (1H, s)	123,81 (CH ₂)	3a: 6,38 (1H, s) 3b: 5,95 (1H, s)	126,77 (CH ₂)	3a: 6,22 (1H, s) 3b: 5,77 (1H, s)	124,77 (CH ₂)	3a: 6,39 (1H, s) 3b: 5,92 (1H, s)	127,61 (CH ₂)	3a: 6,34 (1H, s) 3b: 5,81 (1H, s)	128,53 (CH ₂)	3a: 6,47 (1H, s) 3b: 5,94 (1H, s)	128,68 (CH ₂)
4	4,60 (1H; q; 6,0)	67,37 (CH)	4,66 (1H; q; 6,0)	67,06 (CH)	4,42 (1H; t; 6,6)	72,02 (CH)	4,42 (1H; dd; 5,4; 7,8)	71,70 (CH)	5,57 (1H, s)	73,50 (CH)	5,56 (1H, s)	72,95 (CH)
5	1,38 (3H; d; 6,6)	22,11 (CH ₃)	1,42 (3H; d; 6,6)	22,14 (CH ₃)	1,64 (2H, m)	36,40 (CH ₂)	1,68 (2H, m)	36,33 (CH ₂)	-	142,36 (C)	-	141,44 (C)
6	-	-	-	-	1,29 (2 H, m)	25,94 (CH ₂)	1,31 (2 H, m)	25,89 (CH ₂)	7,37 (2H, m)	126,00 (CH)	7,36 (2H, m)	126,77 (CH)
7	-	-	-	-	1,29 (2 H, m)	29,23 (CH ₂)	1,31 (2 H, m)	29,20 (CH ₂)	7,34 (2H, m)	127,91 (CH)	7,34 (2H, m)	128,65 (CH)
8	-	-	-	-	1,29 (2 H, m)	31,90 (CH ₂)	1,31 (2 H, m)	31,90 (CH ₂)	7,28 (1H, m)	126,71 (CH)	7,29 (1H, m)	128,15 (CH)
9	-	-	-	-	1,29 (2 H, m)	22,73 (CH ₂)	1,31 (2 H, m)	22,73 (CH ₂)	-	-	-	-
10	-	-	-	-	0,88 (3H; t; 6,6)	14,20 (CH ₃)	0,88 (3H; t; 6,6)	14,20 (CH ₃)	-	-	-	-

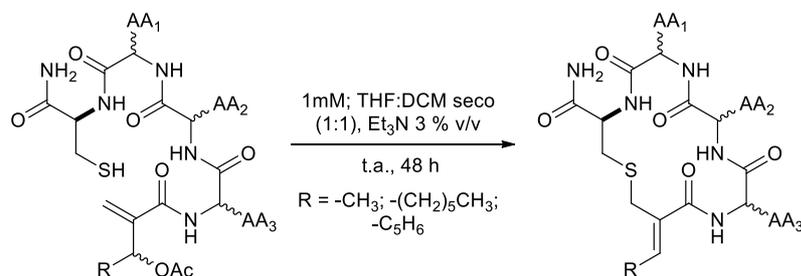
2.6 Sínteses em fase sólida das sequências lineares dos tetrapeptídeos



Esquema 2.7. SPFS-Fmoc dos tetrapeptídeos; acoplamento dos ácidos de AMBH e acetilação dos mesmos.

A síntese dos tetrapeptídeos foi realizada mediante a metodologia SPFS-Fmoc, usando como agentes de acoplamento HCTU ou HATU, 6-Cl-HOBt como agente para evitar racemização e DIPEA como base. Para isto, ciclos repetitivos de desproteção dos grupos Fmoc com solução a 20% de 4-metilpiridina em DMF, acoplamento dos AA e lavagem foram feitos. Depois da síntese dos tetrapeptídeos lineares por SPFS, os adutos foram acoplados com DIC/Oxyma Pure e DIPEA em agitação por 1 hora, e então a acetilação da hidroxila do resíduo de AMBH foi realizada na resina, usando uma mistura de piridina e anidrido acético (2:1) a temperatura ambiente. Embora a acetilação tenha se mostrado eficiente para peptídeos lineares contendo o resíduo de AMBH do acetaldeído (**44**), observou-se, pelos rendimentos muito baixos, que esta etapa não foi muito eficiente para os peptídeos homólogos contendo os resíduos de adutos oriundos de heptaldeído e benzaldeído. Para melhorar os resultados a etapa de acetilação nestas sequências, foram realizadas sob a mesma condição de reagentes a uma temperatura de 50 °C, em dois ciclos de reação. Esta mudança, referente ao aumento da temperatura, permitiu obter melhores rendimentos dos peptídeos lineares acetilados, observado nos EMAR para estes dois adutos quando comparado à condição a temperatura ambiente. Após a acetilação, as resinas com as sequências lineares foram clivadas com uma mistura de TFA: DCM: TIS (90: 8,5: 1,5) e depois precipitadas com uma mistura de hexano:éter etílico gelado.

2.7 Reação de macrociclicação e purificação



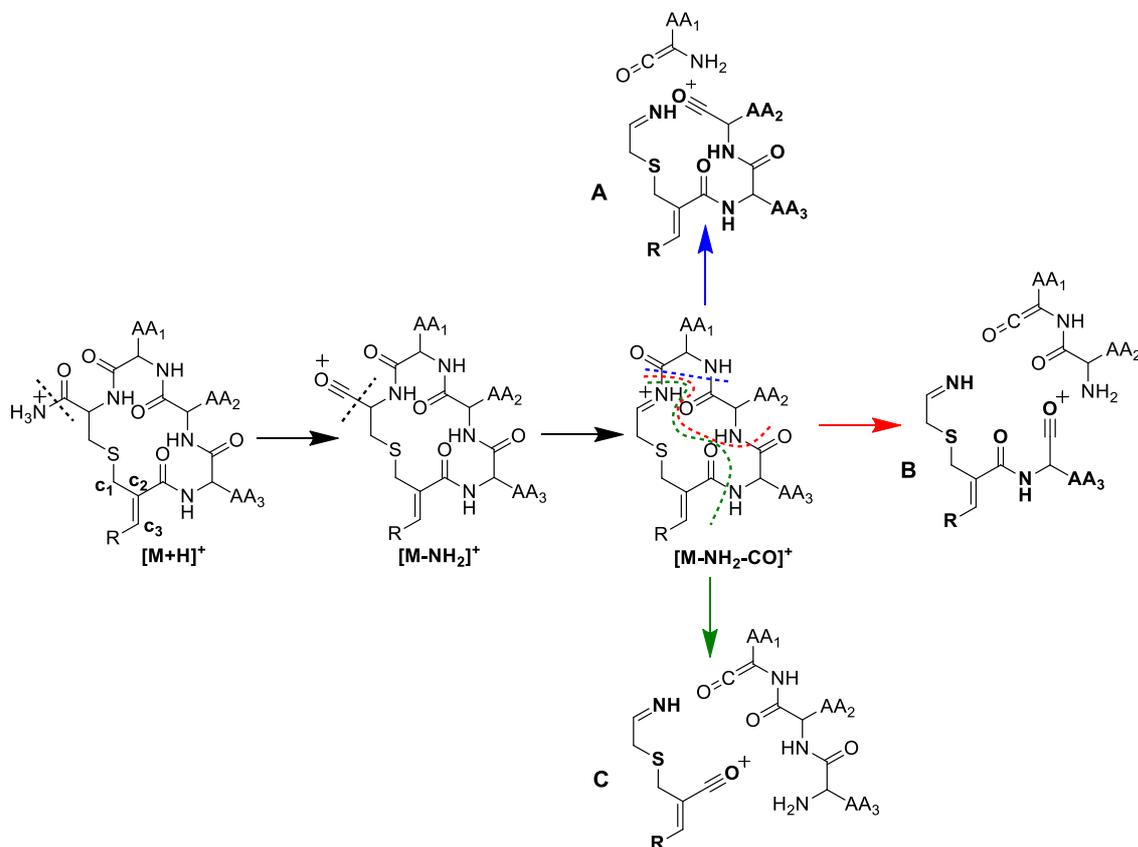
Esquema 2.8. Reação macrociclicação em solução de alta diluição dos peptídeos lineares depois da clivagem.

A etapa de ciclicação foi realizada imediatamente após o procedimento de clivagem, uma vez que amostras deixadas em geladeira sofreram decomposição, muito provavelmente pela formação oxidativa de ligações dissulfeto. Para isso, a mistura sólida de peptídeos obtida a partir da clivagem foi secada sob vácuo, pesada, solubilizada em THF:DCM (1:1) a uma concentração próxima de 1 mM e posta em agitação. Então quantidade suficiente de Et₃N foi adicionado gota a gota, de modo alcançar 3% v/v. A reação prosseguiu com agitação vigorosa durante 48 h a temperatura ambiente. No final do tempo, o solvente foi removido sob pressão reduzida e a mistura de reação foi purificada por CLAE preparativa, obtendo-se os peptídeos cíclicos **(36)** até **(43)**, que após liofilização, produziram entre 3-14% de rendimento sobre o total, estimado em relação à carga inicial da resina. Independentemente da cadeia lateral presente no resíduo de aduto, a reação ocorre, no entanto, observamos que quando os aminoácidos *D*-Ala e *L*-Leu foram inseridos, o rendimento percentual é menor. Atribuímos esse resultado à possível adoção de uma conformação instável no estado de transição da ciclicação, que não é favorecida devido à configuração desses dois aminoácidos, esta observação foi sugerida porque, para todos os compostos sintetizados contendo estes aminoácidos, os rendimentos foram baixos. Dois compostos contendo o resíduo de aduto oriundo do benzaldeído foram produzidos com baixos rendimentos ($\leq 4\%$). Apesar de que os experimentos de EMAR mostrar a massa dos compostos e o CLAE analítico apresentar um pico, a aquisição do espectro de RMN-¹H a diferentes temperaturas de um deles mostra uma mistura complexa, devida possivelmente a isômeros geométricos.

2.8 Caracterização dos compostos sintetizados

Cada um dos compostos foi caracterizado por dados de espectrometria de massa e espectros de RMN em uma e duas dimensões. Os espectros de massa mantêm um padrão de fragmentação que não coincide com o padrão de um peptídeo linear, onde observaríamos perdas sequenciais de aminoácidos a partir de quebras na ligação peptídica. De forma geral, para todos eles observou-se a perda de 17 u.m.a correspondente ao íon $[M-NH_2]^+$, e também a perda de 28 u.m.a (referente a perda de CO) a partir do íon $[M-NH_2]^+$, originando o íon $[M-NH_2-CO]^+$. Este último íon segue para uma fragmentação que inicia a abertura do macrocíclico a partir da eliminação por separado de um resíduo, de dois resíduos ou de três resíduos como fragmentos neutros (esquema 2.9). Este padrão de fragmentação concorda com o esperado para peptídeos cíclicos [49]. É digno de notar que os espectros de massas mostram os íons A, B e C que tem a porção $-CH_2-SCH_2CH=NH$, que confirma a formação da ligação tioeter. Os espectros de massa de alta resolução, estas fragmentações e outros ions são encontrados nos anexos para cada composto.

Os experimentos de RMN mono e bidimensionais (Anexo III) também confirmam a estruturas macrocíclicas. Os espectros de RMN- 1H dos compostos tem sinais característico em δ_H 3,2-3,6 ppm, ressoando como duplos dupletos (dd), atribuído a protons do metileno C1 (esquema 2.9); este sinal muda apenas na multiplicidade para os compostos (39) e (42) que é apresentado como um simpleto largo. Além disso, observamos outro sinal em torno de δ_C 5,8-6,5 ppm, que, dependendo do composto, pode ser quarteto (q) ou tripleto (t), integrando para um hidrogênio, atribuído ao hidrogênio do metino C3. Os espectros *HMBC* 1H - ^{13}C nos permitem observar uma importante e forte correlação entre os sinais atribuídos aos prótons em C1 e o carbono C β da cisteína, o que sugere a formação da nova ligação C-S. A configuração da ligação dupla pode ser atribuída como *Z* para todos os compostos devido às correlações *NOESY* 1H - 1H entre o hidrogênio em C3 e o hidrogênio NH do resíduo de aminoácido ligado ao resíduo de aduto.



Esquema 2.9. Padrão de fragmentações observado nos EMAR-*MS/MS* para todos os compostos, que mostra a abertura do anel macrocíclico a partir da perda de um, dois ou três resíduos de aminoácidos como fragmentos neutros. Os íons A, B e C são diagnósticos e indicam a nova ligação tioeter formada.

A continuação se mostra como modelo de análise a elucidação obtida dos dados espectroscópicos obtidos para um composto. O composto (**41**), obtido com um sólido amorfo de cor branco e uma porcentagem de rendimento de 12 %, mostra no espectro de massa de alta resolução os íons em m/z 602,3358 $[M+H]^+$ e m/z 624,3174 $[M+Na]^+$ (calculadas como 602,3371 para $[M+H]^+$ e 624,3190 para $[M+Na]^+$), que proporcionam a fórmula molecular $C_{31}H_{47}N_5O_5S$.

O espectro de RMN- 1H (figura 2.5) deste composto revelou deslocamentos químicos típicos de peptídeos, que sugerem um único conformero. Especificamente, observam-se quatro sinais de prótons em δ_H 8,50 ppm (1H; d; $J = 6,0$ Hz); 8,25 ppm (1H; d; $J = 7,8$ Hz); 8,00 ppm (1H; d; $J = 8,4$ Hz) e 7,60 ppm (1H; d; $J = 7,2$ Hz) que são devidas aos prótons dos nitrogênios das ligações peptídicas, e que sugerem o número de resíduos de aminoácidos que conformam a estrutura. Também apresenta três sinais de dupletos em δ_H 1,30 ppm (3H; d; $J = 7,2$ Hz); 0,75 ppm (3H; d; $J = 6,6$ Hz) e 0,67 ppm (3H; d; $J = 6,6$

Hz), as quais pelo deslocamento químico são atribuídas a grupos metilas. Adicionalmente observa-se sinais de metilenos entre δ_H 2,05-3,10 ppm que ressoam como multipletes, e os sinais muito definidos de sistema de dupletos em δ_H 3,38 ppm (1H; d; $J = 12,0$ Hz) e 3,48 (1H; d; $J = 12,6$ Hz), muito características de hidrogênios diastereotópicos. Outros sinais para destacar são o tripleto em δ_H 6,21 ppm (1H; t; $J = 7,8$ Hz), característico de um próton vinílico; assim como o conjunto de multipletes entre δ_H 4,5-3,9 ppm que são devido aos hidrogênios em C α dos aminoácidos.

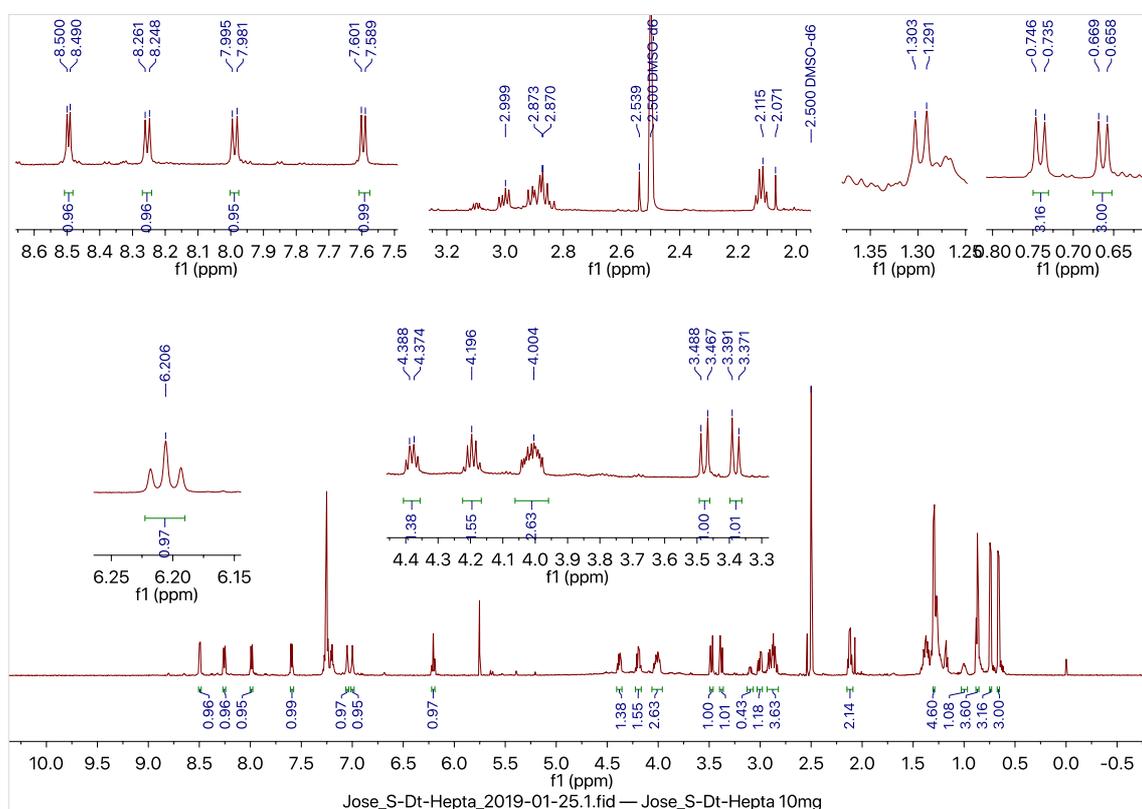


Figura 2.5. Espectro de RMN- ^1H do composto (41) obtido em DMSO- d_6 , com ampliações de algumas regiões.

O espectro de RMN- ^{13}C e o experimento APT apresentam 30 sinais, das quais 6 são de carbonos quaternários, 4 carbonos de metilas (δ_C 23,07; 21,10; 17,17; 13,96), 9 carbonos metilenos (δ_C 39,51; 36,63; 31,27; 31,11; 28,40; 28,40; 27,67; 27,42, 22,04) e 11 carbonos metinos (δ_C 137,96; 129,19; 129,19; 128,08; 126,30; 126,30, 56,13; 54,67; 51,88; 49,19, 23,58). Especificamente os sinais em δ_C 171,99; 171,96; 171,77; 171,70 e 169,15 ppm correspondem a carbonos carbonilas, sendo os 4 primeiros de carbonos de amidas e o último correspondente ao resíduo do aduto.

Na ampliação do espectro *HSQC* de multiplicidade editada (figura 2.6), que apresenta correlações de hidrogênio com carbonos metinos e metilas em vermelho, e correlações de hidrogênio com carbonos metilenos em azul, se podem observar quatro sinais de hidrogênios em $C\alpha$ de cada aminoácido δ_H 4,38; 4,20; 4,02 e 3,99 acoplado com os seus respectivos carbonos em δ_C 56,13; 49,19; 51,88 e 54,66. Adicionalmente, oito metilenos em δ_C 39,51; 36,63; 31,27; 31,11; 28,40; 27,67; 27,42, 22,04 que permitem determinar que quatro dos sinais de RMN- 1H são de metilenos diastereotópicos -entre elas a correlação do carbono em δ_C 27,67 e os seus prótons em δ_H 3,38 e 3,48-; assim como cinco sinais de carbonos, onde quatro correspondem a prótons de metilas e o restante a um metino.

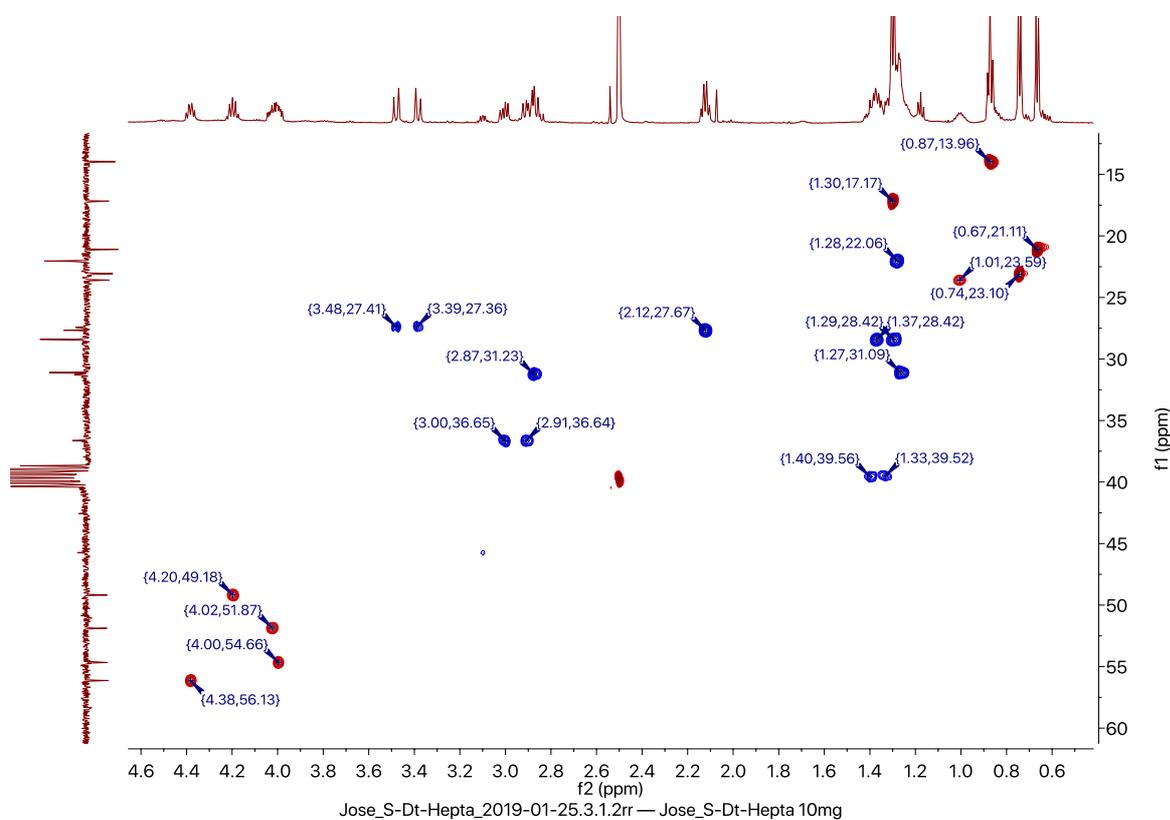


Figura 2.6. Ampliação do espectro *HSQC* de multiplicidade editada do composto (**41**) obtido em $DMSO-d_6$. As correlações em azul corresponde a metilenos, as vermelhas a metinos e metilas.

A interpretação de espectros de RMN-2D (*COSY*, *TOCSY* e *HMBC*), permite identificar os a natureza dos aminoácidos, pelos sistemas de spin que surgem das diferentes correlações. Mas detalhadamente, o espectro *COSY* nos permite atribuir os deslocamentos dos NH de cada aminoácido a seus respectivos prótons em $C\alpha$: δ_H (NH) em 7,60; 8,00; 8,25; 8,50 com δ_H (H- $C\alpha$) 3,99; 4,20; 4,02, 4,38; respectivamente (figura 2.7). No espectro

TOCSY conseguimos ver as correlações entre estes NH e os hidrogênios a mais de três ligações, ou seja enxergar os hidrogênios em C β para cada aminoácido: δ_H (NH) em 7,60; 8,00; 8,25; 8,50 com δ_H (H-C β) 2,85 e 2,87; 1,30; 1,33 e 1,40; 2,91 e 3,00, respectivamente (figura 2.8). Pela multiplicidade e deslocamentos químicos dos prótons nos C β podemos atribuir os dados de NH e C α para determinado aminoácido, pois sabemos que o peptídeo tem quatro aminoácidos com cadeias laterais totalmente diferentes entre si (Cys, Ala, Leu e Phe). As correlações no *HMBC* complementam esta análise, pois com ele podemos ver que carbonos se encontram correlacionando com um hidrogênio a duas e três ligações. Em particular este espectro mostra uma importante correlação, que se pode observar facilmente no espectro (figura 2.9), entre o sistema de dupletos diastereotópicos em δ_H 3,38 e 3,48, atribuídos ao C1 (δ_C 27,42 pelo espectro *HSQC*) como o C β da *L*-Cys (δ_C 31,27), que permite confirmar que a estrutura é cíclica.

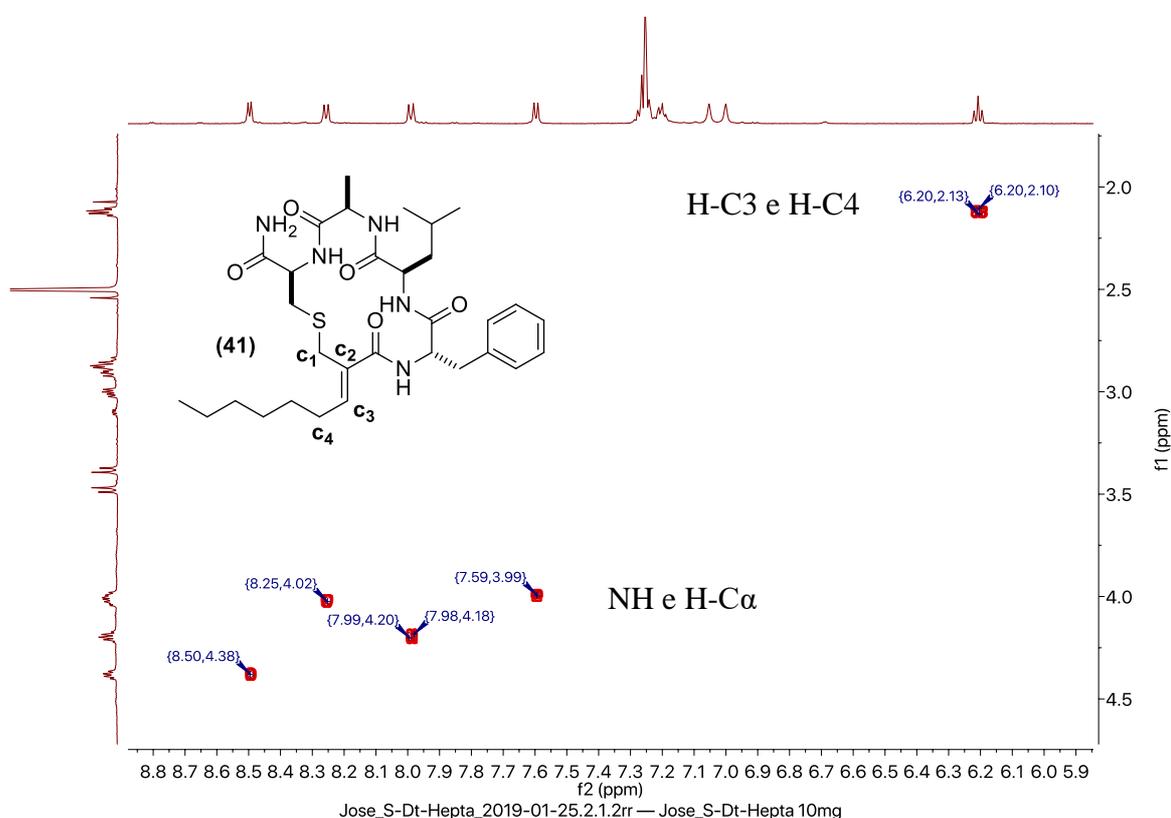


Figura 2.7. Ampliação do espectro *COSY* do composto (41) obtido em *DMSO-d₆*. Observa-se na parte inferior esquerdas as correlações entre os hidrogênios NH dos aminoácidos e os seus respectivos prótons em C α . Na parte superior direita a correlação entre o tripleto em δ_H 6,21 (hidrogênio vinílico em C3) e o quarteto em δ_H 2,12 (hidrogênios de metilenos no C4).

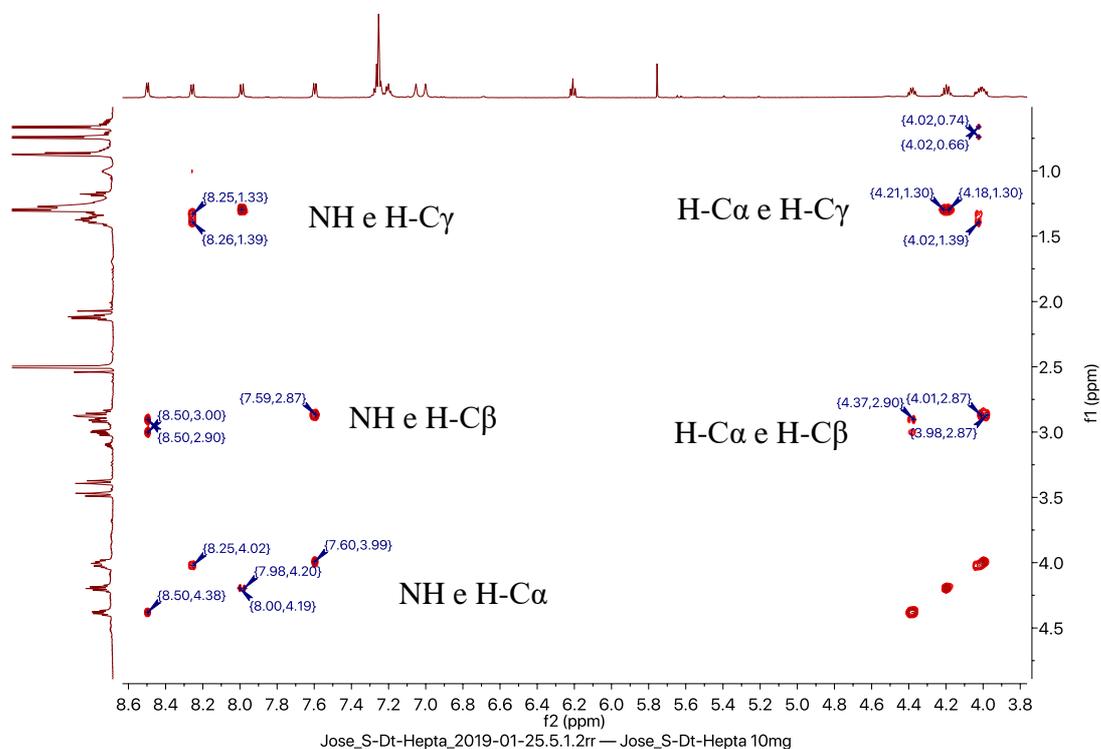


Figura 2.8. Ampliação do espectro *TOCSY* do composto (**41**) obtido em $\text{DMSO-}d_6$. Observa-se na parte esquerdas as correlações entre os hidrogênios NH dos aminoácidos e os seus respectivos prótons em $\text{C}\alpha$, $\text{C}\beta$ e $\text{C}\gamma$. Na parte direita as correlações entre os $\text{H-C}\alpha$, e os respectivos hidrogênios nos $\text{C}\beta$ e $\text{C}\gamma$.

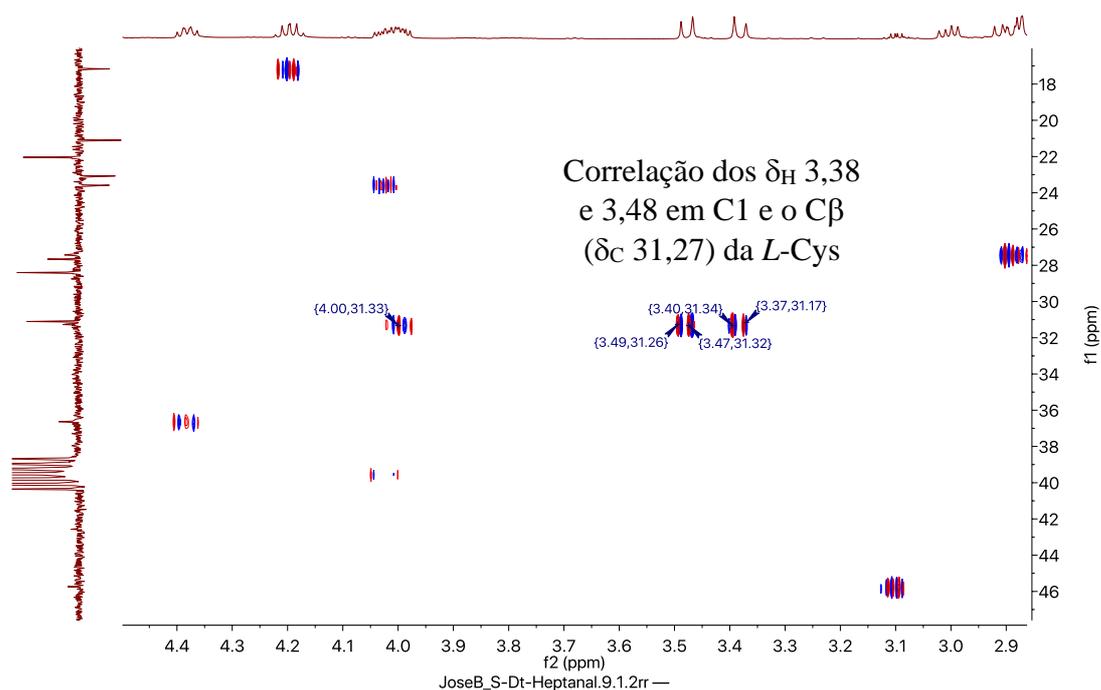


Figura 2.9. Ampliação do espectro *HMBC* do composto (**41**) obtido em $\text{DMSO-}d_6$. Observa-se a correlações entre os hidrogênios (δ_{H} 3,38 e 3,48) em C1 e o $\text{C}\beta$ da *L-Cys* (δ_{C} 31,27).

O espectro *NOESY* proporciona informação sobre correlações ^1H - ^1H no espaço. Na ampliação do espectro *NOESY* para o composto **(41)** (figura 2.10), pode-se observar uma outra importante correlação entre o hidrogênio do NH da Phe (δ_{H} 8,50) e o tripleto de hidrogênio do metino C3 (δ_{H} 6,21) que indica que a configuração da dupla ligação é *Z*. Com as análises de cada zona nos espectros de RMN-2D mencionados pode-se deduzir algumas subestruturas (esquema 2.10) que mostram as correlações observadas, as quais também são resumidas na tabela 2.4 para o composto **(41)**.

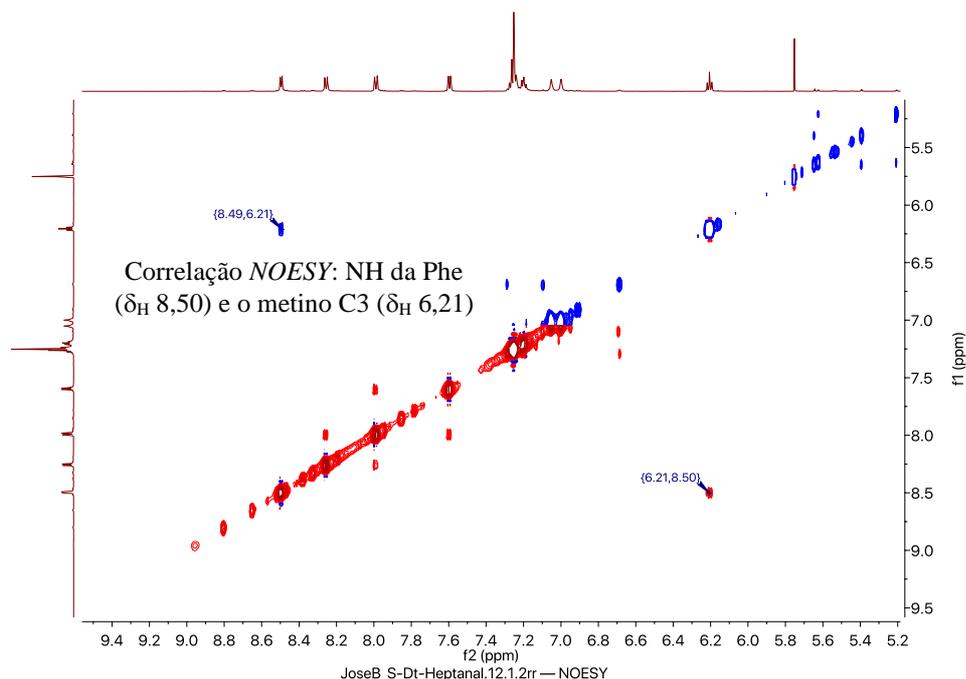
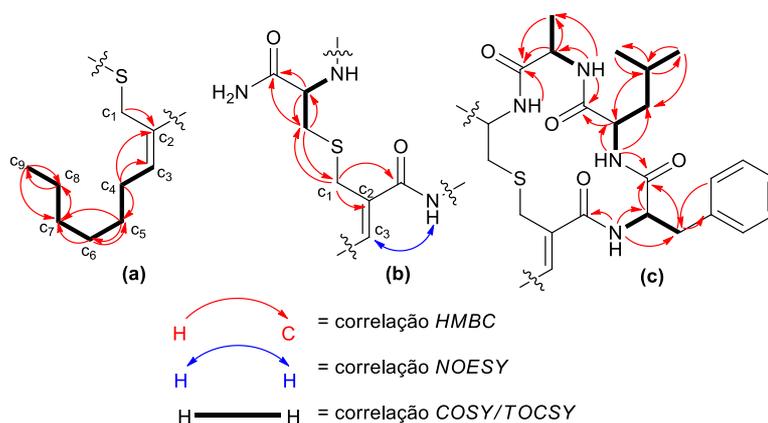


Figura 2.10. Ampliação do espectro *NOESY* do composto **(41)** obtido em $\text{DMSO-}d_6$.



Esquema 2.10. Subestruturas do composto **(41)**, mostrando as correlações *COSY/TOCSY*, *NOESY* e *HMBC* mais importantes observadas. a) na cauda exocíclica, b) na nova ligação S-C entre a Cys e o resíduo do aduto e c) nos aminoácidos Ala, Leu e Phe.

Tabela 2.4. Dados espectroscópicos de RMN (DMSO-*d*₆) para o composto (41).

Aminoácido	Posição	δ_H (ppm) (multiplicidade; <i>J</i> (Hz))	δ_C (ppm)	<i>COSY/TOCSY</i>	<i>HMBC</i>	<i>NOESY</i>
Cys	NH	7,60 (1H; d; 7,2)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Ala)	Hb-C1
	CO	-	171,70	-	C α ; C β	
	C α	3,99 (1H; m)	54,67 (CH)	NH; C β	CO; C β	
	C β	2,85 (1H; m) 2,87 (1H; m)	31,27 (CH ₂)	NH; C α	C α ; CO; C1	
Ala	NH	8,00 (1H; d; 8,4)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Leu)	C α (Leu);
	CO	-	171,77	-	C α ; C β	
	C α	4,20 (1H; qt; 7,2)	49,19 (CH)	NH; C β	CO; C β	
	C β	1,30 (3H; d; 7,2)	17,17 (CH ₃)	NH; C α	C α ; CO	
Leu	NH	8,25 (1H; d; 7,8)		C α ; C β ; C γ ; C δ_1 ; C δ_2	C α ; C β ; CO (Phe)	C α (Phe); C γ
	CO	-	171,99	-	C α ; C β	
	C α	4,02 (1H; m)	51,88 (CH)	NH; C β	CO; C β ; C γ	NH (Ala)
	C β	1,33 (1H; m)	39,51 (CH ₂)	NH; C α ; C γ ; C δ_1 ; C δ_2	CO; C α ; C δ_1	
		1,40 (1H; m)				
	C γ	1,00 (1H; m)	23,58 (CH)	C δ_1 ; C δ_2	C α ; C δ_1 ; C δ_2	NH
	C δ_1	0,67 (3H; d; 6,6)	21,10 (CH ₃)	C γ	C β ; C γ	
C δ_2	0,75 (3H; d; 6,6)	23,07 (CH ₃)	C γ	C β ; C δ_1 ; C γ		
Phe	NH	8,50 (1H; d; 6,0)		C α ; C β	C α ; C β ; CO (Aduto)	Ha-C1; C3
	CO	-	171,96	-	C α ; C β	
	C α	4,38 (1H; q; 7,2)	56,13 (CH)	NH; C β	CO; C β	NH (Leu)
	C β	2,91 (1H; m)	36,63 (CH ₂)	NH; C α	CO; C α ; C γ ; C m	
		3,00 (1H; dd; 13,2; 7,2)				
	C γ	-	137,26	-	C α ; C β	
	C o	7,26 (2H; m)	128,08 (CH)	n/o	C β ; C γ	
	C m	7,25 (2H; m)	129,19 (CH)	n/o	C p	
C p	7,20 (1H; m)	126,30 (CH)	n/o	C m		
CO	-	169,15	-	C1; C3		
Aduto	C1	3,38 (1H; d; 12,0)	27,42 (CH ₂)	-	CO; C2; C3; C β (Cys)	NH (Phe)
		3,48 (1H; d; 12,6)		-		NH (Cys)
	C2	-	131,75	-	C1; C4	
	C3	6,21 (1H; t; 7,8)	137,96 (CH)	C4	C1; C4; C6; CO	NH (Phe)
	C4	2,12 (2H; q; 7,2)	27,67 (CH ₂)	C3; C5; C6	C2; C3; C5	
	C5	1,29 (2H; m)	28,40 (CH ₂)	C4	C6; C7	
	C6	1,37 (2H; m)	28,40 (CH ₂)	C4, C7	C5; C7	
	C7	1,26 (2H; m)	31,11 (CH ₂)	C9, C6	C8	
	C8	1,28 (2H; m)	22,04 (CH ₂)	C9	C9	
C9	0,87 (3H; t; 6,6)	13,96 (CH ₃)	C7; C8	C7; C8		

n/o: não observado; Ha-C1: hidrogênio Ha no carbono metileno C1; Hb-C1: hidrogênio Hb no carbono metileno C1; qt: quinteto.

2.9 Avaliação da inibição de crescimento e atividade hemolítica de *S. aureus* para os compostos

Inicialmente, a atividade antibacteriana de todos os análogos foi testada pela determinação da concentração inibitória mínima contra duas cepas de referência de *S. aureus* suscetíveis a antibióticos, *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* ATCC 29213 [50]. Duas diluições seriadas foram realizadas, permitindo testar várias concentrações dentro da faixa de 300 – 0,3 μM . Nenhum dos compostos apresentou atividade antibacteriana contra *S. aureus*, uma vez que nenhum valor da MIC pôde ser obtido na faixa de concentrações testadas (MIC > 300 μM). Estes resultados se mostraram bons uma vez que os compostos não têm um efeito tóxico sobre a bactéria, permitindo então avaliar estas concentrações em testes específicos, como por exemplo observar o efeito na atividade hemolítica de *S. aureus*.

Posteriormente, em placas de ágar, um ensaio de triagem foi feito para avaliar o efeito dos compostos na hemólise sobre sangue desfibrinado de carneiro promovida por *S. aureus* ATCC 25923, uma cepa que produz hemolisinas sob o controle de QS [51]. Entre todos os compostos testados, os compostos (40) e (42) apresentaram os melhores resultados, inibindo a atividade hemolítica de *S. aureus* nas concentrações mais baixas testadas (tabela 2.5 e figura 2.11). Os análogos (40) e (42) foram então testados em concentrações mais baixas (300 - 5 μM), e o composto (40) foi capaz de dificultar a atividade hemólise da cepa a 10 μM (tabela 2.6).

Tabela 2.5. Halos de hemólises ou inibição de hemólises de *S. aureus* ATCC 25923 sobre placas de ágar com sangue de carneiro.^a

Análogo	20 mM	1 mM	300 μM
36	+	+	+
37	+	+	+
38	+	+	+
39	+	+	+
40	-	-	-
41	+	+	+
42	-	+*	+*
43	-	+	+

^a(+): halo de hemólises; (-): no ha halo de hemólises; * halo de hemólises visivelmente menor quando comparado ao controle.

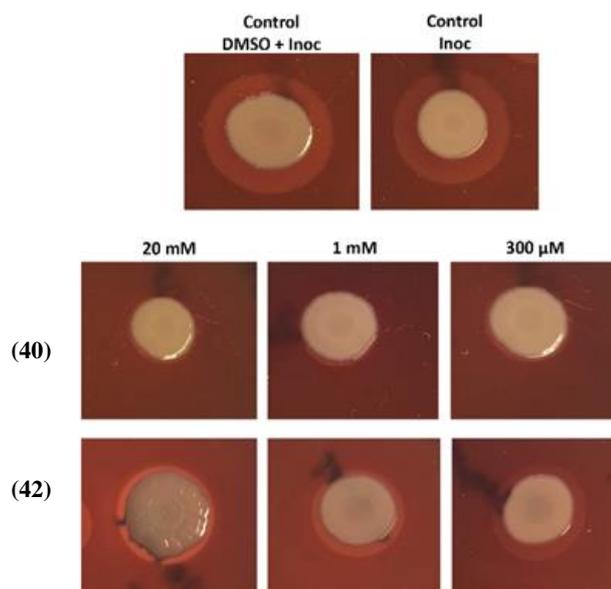


Figura 2.11. Efeito dos compostos **(40)** e **(42)** a três concentrações sobre a produção de hemólises por *S. aureus* ATCC 25923. Para o composto **(40)** não foi observado halo de hemólise ao redor do inoculo da bactéria. Inoc = inoculo.

Tabela 2.6. Halos de hemólises ou inibição de hemólises de *S. aureus* ATCC 25923 sobre ágar sangue para os compostos **(40)** e **(42)** a concentrações mais baixas.^a

Análogo	300 µM	100 µM	50 µM	10 µM	5 µM
40	-	-	-	-	+*
42	+*	+	nt	nt	nt

^a(+): halo de hemólises; (-): no ha halo de hemólises; * halo de hemólises visivelmente menor quando comparado ao control; nt; não testados.

Adicionalmente a atividade anti-hemolítica dos **(40)** e **(42)** foi também testada num ensaio quantitativo de microdiluição utilizando glóbulos vermelhos humanos [52]. O análogo **(40)** apresentou melhor capacidade de inibir a hemólise do que **(42)** na mesma concentração (figura 2.12). Nas concentrações de 10 e 200 µM de **(40)**, a produção de hemólises por *S. aureus* foi inibida em 63% e 84%, respectivamente.

Também foi realizado um ensaio de viabilidade celular em fibroblastos humanos (linha celular Detroit 551) para estes dois compostos de modo a observar a sua eventual citotoxicidade frente células normais. O intervalo de concentração testado foi de 200 - 6,25 µM para **(40)** e de 300 - 9,38 µM para **(42)**, escolhido com base na dose ótima observada no ensaio de inibição de hemólises. Aqui foi observado que estes dois compostos não

afetaram a viabilidade dos fibroblastos nas concentrações testadas (figura 2.13). Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos de exposição de 24 e 48 horas. Estes dados sugerem que (40) e (42) não são tóxicos para as células normais nas condições experimentais testadas.

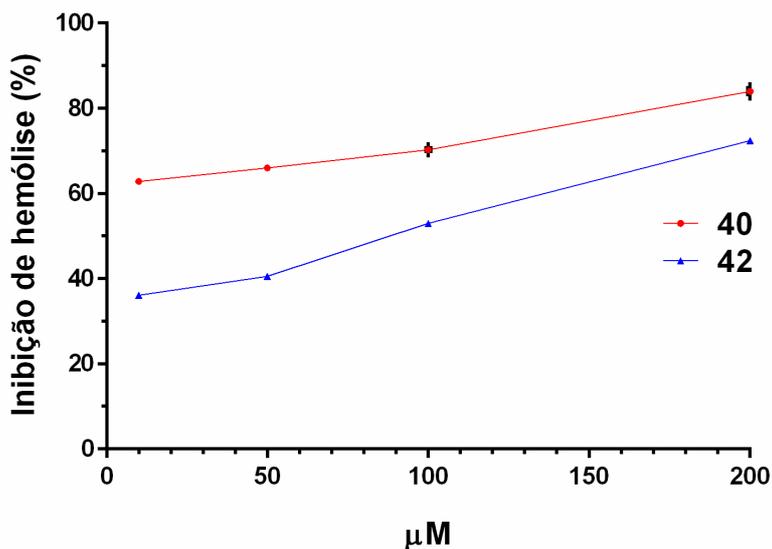


Figura 2.12. Porcentagem de inibição de hemólise (%) em glóbulos vermelhos humanos causada por *S. aureus* ATCC 25923 após estar em presença de várias concentrações dos compostos (40) e (42). A hemólise é pontuada em porcentagem de hemólise em relação à condição de controle (hemólise causada por *S. aureus* ATCC 25923 na ausência de qualquer composto; apenas DMSO), que foi definida como 100%. Dois experimentos independentes foram realizados em duplicata. Barras de erro representam desvios padrão.

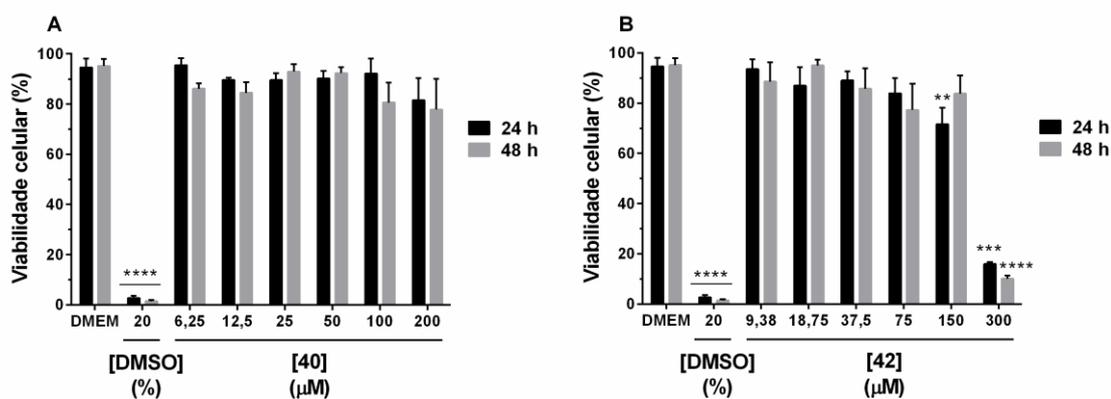


Figura 2.13. Viabilidade celular de fibroblastos humanos quando expostos aos compostos (40) (A) e (42) (B) a 24 e 48 horas. Os valores foram expressos como média \pm EPM. **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.005$ e *** $p < 0.001$ versus o grupo controle DMEM.

A solonamida B tem-se mostrado como inibidor dos fenótipos (incluindo hemólise) controlados por *agr* em *S. aureus* em concentrações que variam entre 8,5 μM e 17 μM [53]. Concentrações de inibição de hemólise (entre 10 e 20 μM) similares foram apresentadas pelo análogo (40), com a vantagem de que este composto tem uma ligação tioeter que é menos facilmente hidrolisável do que o éster encontrado nas solonamidas [31,54], que confere estabilidade, evitando assim a degradação e garantindo possivelmente interação molecular uma vez a estrutura se mantém cíclica por mais tempo. Comparando a estrutura química dos análogos (40), (41), (42) e (43) com os análogos relatados anteriormente de solonamidas e AIPs de *S. aureus*, algumas observações podem ser feitas: (i) (40) é o único entre todos os análogos derivados do aduto acetaldeído que, independentemente da configuração dos centros estereogênicos, possui a mesma sequência de resíduos de aminoácidos encontrada nas solonamidas; (ii) apesar da estreita semelhança na sequência de resíduos de aminoácidos exibida por (40) e (43), a estereoquímica do resíduo de Phe é fundamental à atividade anti-hemolítica; (iii) num sentido semelhante, para (41) e (42), diastereoisômeros no resíduo Ile, a configuração *L* neste resíduo é necessária para observar inibição da hemólise de *S. aureus*.

3. Conclusões e Perspectivas

Com relação ao desenho de peptídeos da primeira geração podemos dizer que estes constituem novas moléculas contendo elementos chave como aminoácidos e o número de átomos na estrutura cíclica, podendo-se considerá-los moléculas análogas das solonamidas. A síntese das moléculas propostas não teve sucesso, apesar de as condições de reação para à formação da ligação éster serem, em tese, estruturalmente favoráveis. Atribuímos estes resultados: (1) à ausência de condição anidra necessária para ciclização em solução, possivelmente esta não foi totalmente alcançada; (2) aos problemas de pré-purificação depois do tratamento; (3) também pode ser possível que as moléculas tenham sido produzidas em quantidades mínimas dificultando a sua identificação e, portanto, sua purificação. Em relação à metodologia de síntese sob resina, a formação da ligação éster não se torna uma metodologia viável já que a condição anidra desejada não é fácil de perceber, além de que também pode estar prejudicando a interação dos grupos reagentes na etapa de ciclização. Referente aos análogos tiolatônicos propostos, a produção do tioéster linear intermediário, em um dos casos, não foi obtida, possivelmente por problemas similares na obtenção de condição anidra antes mencionada, assim como também à posterior hidrólise na seguinte etapa de clivagem. Como perspectivas para a preparação futura destas moléculas, uma opção seria a utilização de resinas que precisem de condições de clivagem diferentes, tais como aquelas que usam ácidos de Lewis.

A utilização de ácidos de adutos de Morita-Baylis-Hillman para a sua inserção na SPFS dos peptídeos da segunda geração mostrou-se como uma alternativa compatível e interessante porque permitiu estabelecer uma nova, efetiva e simples estratégia de ciclização usando os ditos resíduos acetilados para a preparação de oito novos peptidomiméticos cíclicos contendo uma ligação tioéster estruturalmente semelhantes às solonamidas. Embora a metodologia de inserção de resíduos ácidos de AMBH de aldeídos alifáticos (acetaldeído e heptanal), assim como do aduto do benzaldeído se mostra viável para a preparação deste novo tipo de compostos, a preparação de compostos peptídicos contendo resíduos deste último aduto produzem uma mistura complexa de identificar por RMN, apesar dos análises de CLAE e EMAR parecem ser um único composto, sugerindo

que esta dificuldade se deva a uma mistura de diferentes isômeros. Neste sentido novos estudos usando este derivado de AMBH e de outros aldeídos aromáticos tem que ser realizados para determinar o porquê estes resultados. Dentre os compostos sintetizados, dois destes compostos tiveram a capacidade de inibir a atividade hemolítica de *S. aureus* ATCC 25923 sem afetar seu crescimento, um deles a concentrações muito baixas, a saber 10 μM ; assim como também os dois compostos não foram citotóxicos para fibroblastos humanos na mesma concentração. Devido à conhecida relação da expressão das α -hemolisinas com o gen *agr* do *S. aureus*, podemos sugerir que esses dois peptidomiméticos possam exercer um efeito sobre a *quorum sensing* de *S. aureus*.

Como perspectivas futuras, se faz necessário avaliar o potencial dos compostos aqui mostrados e outros isômeros não sintetizados bem como dos correspondentes sulfóxidos e sulfonas, na interferência de sistemas de QS frente cepas reporter de *S. aureus* que contenham genes envolvidos na expressão hemolisinas (*hla*), assim como dos genes *rnaIII* e *spa* também relacionados com a patogênese da bactéria. Desta forma, pode-se concluir um trabalho que permita informação sobre a relação estrutura atividade que este novo núcleo pode aportar sobre a inibição de QS deste importante agente infeccioso.

4. Materiais e Métodos

4.1 Purificação de solventes e reagentes líquidos

Todos os solventes orgânicos e reagentes líquidos usados nas reações de SPFS, foram disponibilizados de Sigma-Aldrich, Scharlau, J. T. Baker e Merck, e foram empregados sem previa purificação. Alguns solventes foram secados previamente antes da sua utilização, empregando-se como material secante CaH_2 para a secagem de Et_3N e DCM, sódio metálico em presença de benzofenona foi usado para secar THF [55].

4.2 Reagentes usados na síntese de peptídeos

Todos os peptídeos foram sintetizados manualmente de acordo com a metodologia padrão de síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS), via estratégia Fmoc. Como resina a resina Rink Amida AM (100-200 Mesh) com grau de substituição de 0,7 mmol/g da Novabiochem® (EMD Millipore Corporation – Merck) foi usada. Esta resina fornece os peptídeos amidados como produto final.

Usaram-se como aminoácidos Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ser(*t*-Bu)-OH, obtidos de Aldrich® (Sigma-Aldrich); Fmoc-(*D*)-Ala-OH, Fmoc-(*D*)-Leu, procedentes da 3PBioSystem e Fmoc-Cys(Trt)-OH da Novabiochem® (EMD Millipore Corporation - Merck).

Como agente de acoplamento para a formação da ligação peptídica utiliza-se os sais de guanidínio HATU, HBTU e/ou HCTU da Fluka® (Sigma-Aldrich), junto com o 6-Cl-HOBt da Acros® como agente para evitar racemização. Se empregou *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) (Fluka®, Sigma-Aldrich) em conjunto com etil(hidroximino)cianoacetato (Oxyrna Pure) da Merck para o acoplamento dos ácidos de AMBH. Como bases para os acoplamentos usou-se DIPEA.

4.3 Ciclos de síntese de peptídeos em fase sólida pela metodologia Fmoc (SPFS-Fmoc)

De forma geral, a síntese consistiu em ciclos de procedimentos repetitivos em uma ordem lógica, que são: desproteção, lavagem, acoplamento, lavagem e novamente desproteção, segundo as metodologias modificadas a partir de Kim *et al* 2011 [56], e o protocolo AAPPTeC para a SPFS [37]. A adaptação nas metodologias faz referência ao solvente empregado, em nosso caso DMF, as quantidades dos reagentes (AA, HATU ou HBTU ou HCTU, e base), e a utilização ou não do agente que evita a racemização (6-Cl-HOBt).

Inicialmente, para cada peptídeo, uma massa determinada de resina foi imersa no balão de reação para SPFS (Figura 4.1), então foi adicionada uma quantidade suficiente de DCM para cobri-la, e posta em agitação num shaker a 215 rpm por 15 min. Depois da remoção de DCM por filtração a vácuo, foi repetido o procedimento três vezes. Posteriormente, foi removido o grupo Fmoc do grupo amino terminal inicial com solução de piperidina ou 4-metil-piperidina em DMF (20% v/v), procedimento feito em agitação por 20 min, duas vezes. Este procedimento foi feito para cada etapa de desproteção para os aminoácidos depois de acoplados.



Figura 4.1. Balão de reação para SPFS.

Nas etapas de acoplamento, se empregaram excessos dos aminoácidos, do agente de acoplamento, do agente que evita racemização e de base. Os tempos de reação variaram entre 1 e 2 horas sob agitação.

As lavagens da resina após as etapas de acoplamento e desproteção foram realizadas sequencialmente, iniciando com 2 x DCM, seguida de 2 x DMF e, finalmente, com 2 x DCM. A quantidade dos solventes utilizados foi o suficiente para cobrir a resina. Cada lavagem com solvente foi deixada 1 min em agitação.

Com o objetivo de observar a eficiência de cada acoplamento e cada remoção do grupo Fmoc na etapa de desproteção, foi usado o teste de Kaiser (teste químico qualitativo para confirmação de grupo amina livre, também conhecido como teste de ninhidrina). Este teste usa três soluções de reagentes: Solução A (consiste numa solução de KCN 1,1 mg/ml de água, posteriormente diluída até 2% v/v em piridina fresca); solução B (solução de ninhidrina 50 mg/ml em BuOH ou etanol); e solução C (solução de fenol 2 g/ml em BuOH ou etanol). Para o teste, um pouco da resina seca foi retirado do balão de reação e colocada num tubo de ensaio e três gota de cada solução foram adicionadas. A mistura foi, então, aquecida por 5 min em banho termostaticado a 90 °C. Como resultado positivo de um acoplamento, não se observou a mudança de cor na resina (de amarelo-translucido para roxo), nem na solução. Para uma reação de acoplamento incompleta e desprotegida, a ninhidrina reage com os grupos amino terminais formando um complexo de cor roxo-preto, cor que se observa na resina e depois de um tempo na solução [37].

Para as reações de clivagem, usou-se um coquetel constituído entre 8 e 9 partes (v) de TFA e volumes de DCM e TIS conforme se apresenta na parte experimental específica para cada síntese realizada. O tempo transcorrido foi de 1 hora em agitação a temperatura ambiente. Depois da clivagem a resina foi lavada com coquetel e/ou TFA 100%.

A desproteção seletiva dos grupos *t*-butil éter e *t*-butil éster nas cadeia lateral do Fmoc-Ser(*t*-Bu)-OH e no resíduo de ácido malônico na resina, respetivamente, foram feitas usando ácido fosfórico concentrado (H₃PO₄ 85%) [57].

4.5 Técnicas de análise

4.5.1 Análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

Os espectros de massa dos AMBH do acetaldeído e do heptanal foram adquiridos num equipamento Shimadzu GCMS-QP2010 Plus, equipado com um autoinjeter AOC-

5000, uma coluna de sílica fundida Restek Rtx-5MS® (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) e um detector GCMS-QP5050A com uma fonte de ionização de 70 eV. No método utilizado, o injetor opera no modo split a 250 °C e hélio como gás carregador com vazão de 1.0 mL/min, como programa de temperatura foi feita com uma rampa de temperatura de 7 °C/min, iniciando em 50 °C até 290 °C. Os dados obtidos foram analisados usando o programa GCMSsolutionVersion 2.53 SU3 (Shimadzu Corporation).

4.5.2 Análises e purificação por cromatografia líquida de alta eficiência

Os experimentos de CLAE no modo analítico e semipreparativo foram feitos num aparelho Shimadzu, equipado com duas bombas independentes LC-20AR e um detector de arranjo de diodos modelo SPD-M20A. O comprimento de onda selecionada foi de 216 nm. O solvente A foi uma solução de 0,2 % de TFA em H₂O e o solvente B, a mesma concentração do ácido em ACN.

Os perfis CLAE no modo analítico foram obtidos usando-se uma coluna Shimadzu Shim-pack VP-ODS (C18) (250 mm (L) x 4.6 mm (d.i.), 5 µm). A corrida foi iniciada com um fluxo constante de 5% de B por 5 min, depois um gradiente por 40 min, iniciando em 5% até 100 % de B; a partir de 45 até 52 min um fluxo constante de 100% de B, e então em 3 min a concentração de B decresce de 100% até 5% para estabelecer a condição original, finalizando em 5% de B por 5 min a mais. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min.

A purificação dos compostos cíclicos no modo semipreparativo foram feitas usando uma coluna Vydac C18 (250 mm (L) x 10 mm (d.i.), 5 µm, 300 Å. A corrida foi iniciada com 25% da solução B por 2 min, depois foi feito um gradiente no qual a concentração do solvente B aumentava até 54% por 54 min, transcorrido este tempo o solvente B seguia um segundo gradiente até 100% por dois minutos e então ficava de forma isocrática 5 min a mais, para depois retornar em 2 minutos até 25% de B, estabelecendo-se a condição original de eluição. O fluxo utilizado foi de 2,5 mL/min.

4.5.3 Análises por ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN mono e dois dimensões foram realizados num equipamento Bruker Ascend 600 operando a 14 T (600 MHz para RMN-¹H). Os espectros *APT* e RMN-

^{13}C foram adquiridos em um espectrômetro Varian Oxford YH300 a 7,04 T (75 MHz para RMN- ^{13}C). Nos espectros de RMN- ^1H , TMS foi usado como referência interna, os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em hertz (Hz). Os deslocamentos químicos para os espectros de RMN- ^{13}C foram reportadas em ppm relativas ao pico do solvente. Os espectros foram processados no programa MestReNova 6.0.2.

4.5.4 Análises por espectrometria de massa de alta resolução e massas em tandem

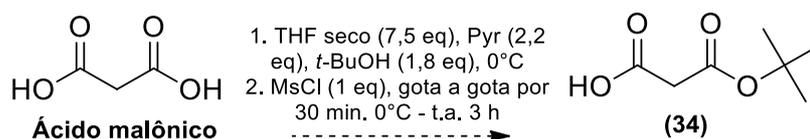
Os dados de EMAR-IES-*TOF* foram adquiridos em um Triplo *TOF* 5600-SCIEX por análise de injeção em fluxo utilizando um cromatógrafo Eksigent UltraLC 100-SCIEX ajustado para uma velocidade de fluxo de 0,3 mL/min. Uma fonte *DuoSpray Ion Source* (IES) foi utilizada e os EM foram adquiridos no modo positivo, empregando calibração externa, na escala de 100 – 1000 Da. Os parâmetros de aquisição foram: TEM 450, GS1 45, CUR 25, GS2 50, ISVF 5500 e DP 80. Os dados foram analisados usando o software mMass 5.5.0iew. (<http://www.mmass.org>).

4.5.5 Análises por espectroscopia no infravermelho

Os espectros de IVTF foram obtidos em um espectrofotômetro Jasco FT/IR-4100 operando em modo de reflectância total atenuada (*ATR*). Os espectros IVTF-*ATR* foram expressos em transmitância (% T) versus frequência (cm^{-1}).

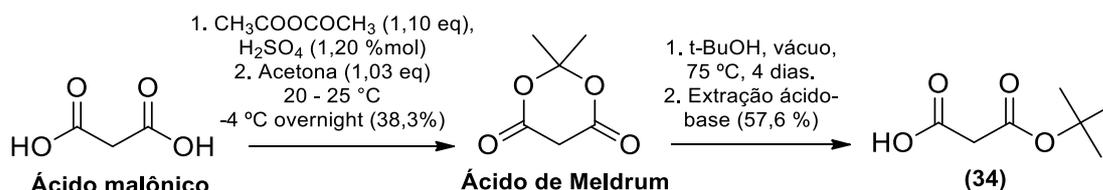
4.6 Parte experimental

4.6.1 Tentativa de síntese de ácido mono-*tert*-butil malônico (34) a partir de ácido Malônico [40]



Em um balão de três bocas de 100 mL, 5,6 g (56 mmol) de ácido malônico foram solubilizados em 10 mL (124 mmol) de piridina seca, 10 mL (105 mmol) de *tert*-butanol seco e 35 mL (444 mmol) de THF seco, em atmosfera de nitrogênio. A mistura foi resfriada até 0°C em banho de gelo e 4,5 ml (58 mmol) de cloreto de mesila (MsCl) foram adicionados, lentamente, por 30 min sob constante agitação. Terminada a adição, a mistura foi mantida sob agitação por 3,5 horas até alcançar a temperatura ambiente. Uma vez alcançado o tempo de reação, a mistura foi filtrada para retirar o cloreto de piridínio, e o sobrenadante foi evaporado à pressão reduzida até um volume aproximado de 10 mL. Depois, este volume foi solubilizado em 100 ml de água destilada, o pH ajustado até aproximadamente 11 com solução de NaOH 4,0 M, e a extração com DCM (2 x 10 mL) foi feita. A solução aquosa foi ajustada até pH 3 com HCl concentrado e uma nova extração com DCM foi realizada (4 x 25 mL). Estas fases de DCM foram reunidas, secada com Na₂SO₄ e concentrada à pressão reduzida. Nas tentativas realizadas, foi obtido um líquido amarelo (4,10 g) que foi analisado por RMN-¹H.

4.6.2 Síntese de ácido mono-*tert*-butil malônico (34) via ácido de Meldrum [41,42]

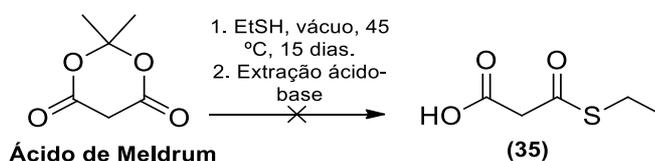


Num balão de 100 mL 14,5 g (140 mmol) de ácido malônico pulverizado foram misturados com 14,2 mL (150 mmol) de anidrido acético e mantidos como suspensão por agitação, e então 420 µL de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados. A mistura resultante foi enfiada e 10,66 mL (145,0 mmol) de acetona foram adicionados mantendo a temperatura entre 20 e 25 °C. A mistura de reação foi refrigerada em freezer *overnight*, subministrando a formação de cristais, os que foram filtrados a vácuo. Os cristais do produto foram lavados com água gelada (2 x 3 mL), secados à temperatura ambiente e recristalizados em acetona (7,60 g; 38,3%).

Para a segunda etapa, 7,5 g (52 mmol) do ácido de Meldrum e 8,0 mL (84 mmol) de *t*-BuOH, foram postos num *schlenk*, do qual o ar foi tirado com vácuo, permitindo uma

atmosfera de baixa pressão e livre de ar úmido. A mistura foi mantida em óleo a 75 °C sem agitação por 4 dias. Alcançado o tempo, a mistura foi concentrada até redução do volume à metade. Depois, este volume foi solubilizado em 200 mL de água destilada, o pH ajustado até aproximadamente 11 com solução de NaOH 4,0 M, e uma extração com éter etílico (2 x 10 mL) foi feita. A solução aquosa foi ajustada até pH 3 com HCl concentrado e uma nova extração com éter etílico foi realizada (4 x 25 mL). As últimas fases orgânicas da extração líquido-líquido ácida foram reunidas, secadas com Na₂SO₄ anidro e concentrada à pressão reduzida. Obtivesse um líquido oleoso de cor amarelo (4,80 g; 57,6%).

4.6.3 Tentativa de síntese do ácido 3-(etilíio)-3-oxopropanoico (35) via ácido de Meldrum



De maneira similar 5,0 g (0,035 mol) do ácido de Meldrum e 8,0 mL (0,11 mol) de EtSH, foram postos num *schlenk*, no qual o ar foi tirado com vácuo, permitindo uma atmosfera de baixa pressão e livre de ar úmido. A mistura foi mantida sob em óleo a 45 °C sim agitação por 15 dias. Depois a mistura foi colocada até evaporação na capela. A mistura de reação foi solubilizada em 100 mL de água destilada, o pH ajustado até aproximadamente 11 com solução de NaOH 4,0 M, e uma extração com éter etílico (2 x 10 mL) foi feita. A solução aquosa foi ajustada até pH 3 com HCl concentrado e uma nova extração com éter etílico foi realizada (4 x 25 mL). As últimas fases orgânicas da extração líquido-líquido ácida foram reunidas, secadas com Na₂SO₄ anidro e concentrada à pressão reduzida, obtendo-se uma mistura de um sólido branco e quantidades traços de um óleo incolor.

4.6.4 Procedimentos empregados para a sínteses de peptídeos da primeira geração

Em um balão de fundo redondo para SPFS, foram adicionados 60 mg de resina Rink amida AM (0,042 mmol). Depois da preparação da resina com DCM, foi removida a

proteção de grupo amino da resina com solução ao 20% v/v de piperidina em DMF. Uma vez lavada a resina com DCM e DMF, foram adicionados 5 eq. de Fmoc-Ser(*t*-Bu)-OH ou Fmoc-Cys(trt)-OH, 5 eq. de HCTU, 10 eq. de DIPEA e 2,0 mL de DMF. A mistura foi posta em agitação por 1,5 horas. Transcorrido o tempo, os reagentes em solução foram retirados por filtração, a resina foi lavada e o teste de Kaiser foi realizado. De maneira similar, este procedimento foi feito para a incorporação de todos os aminoácidos nas sequências, HO-Ser(*t*-Bu)-Ala-Leu-Phe-NHFmoc para o composto **(32)** e HO-Ser(*t*-Bu)-Phe-Leu-Ala-NHFmoc para o composto **(33)**; assim como também para os derivados tiolactônicos de **(32)** e **(33)**, cujas sequências foram: HO-Cys(Trt)-Ala-Leu-Phe-NHFmoc e HO-Cys(Trt)-Phe-Leu-Ala-NHFmoc.

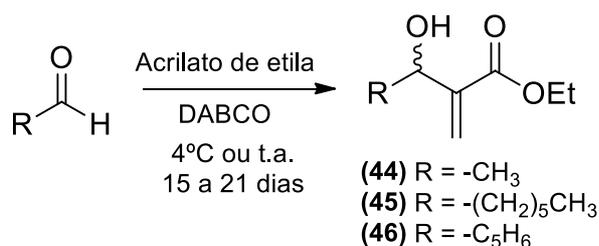
Depois da desproteção do grupo amino, o ácido mono-*tert*-butil malônico **(34)** (4 eq.) foi acoplado usando 4 eq. de DIC, 10 eq. de DMAP e 2 mL de DCM seco, em agitação *overnight*. A reação de desproteção seletiva sobre os grupos *t*-butil éter da serina e *t*-butil éster no resíduo do ácido malônico, foi feita usando 4 ml de ácido fosfórico a 85% em 1 ml de DCM, agitando a temperatura ambiente por 16 horas. Transcorrido o tempo, o H₃PO₄ foi filtrado a vácuo e a resina lavada com DCM quatro vezes. Finalmente, foi feita uma lavagem segundo o procedimento do ciclo de SPFS já mencionado.

O coquetel da clivagem consistiu de 3 mL da mistura de TFA:DCM_{seco}:TIS (85:10:5 v/v/v), que foram adicionados à resina seca, agitando a temperatura ambiente por 1 horas. O sobrenadante foi filtrado da resina, a resina foi lavada com 2 ml de coquetel de clivagem por 15 min, o sobrenadante foi adicionado ao coletado inicialmente e a resina foi adicionalmente lavada com 2 ml de TFA durante 10 min que também foram adicionados aos sobrenadantes anteriores. Posteriormente secado sob pressão reduzida sem aquecimento até se obter um óleo amarelo.

A etapa de ciclização em solução foi realizada imediatamente após o procedimento de clivagem. Para isso, a mistura de peptídeos obtidos a partir da clivagem foi secada em vácuo, depois pesada, e solubilizada DCM. De outro lado uma solução de 5 eq de DCC e 10% mol de DMAP em DCM foi adicionada gota a gota, com ajuda de um funil de adição à solução de peptídeos anteriormente preparada. A mistura das duas soluções contendo o peptídeo a uma concentração próxima de 1 mM foi colocada em agitação por 48 h. Depois do tempo, na mistura de reação os solventes foram removidos a pressão reduzida.

A reação de macrolactonização ainda no suporte sólido foi feita usando 5 eq. de DCC como agente ativador e 10% mol de DMAP como base, em 2 mL de DCM seco, a temperatura ambiente por 48 horas. Depois de este período se procedeu com a clivagem.

4.6.5 Síntese de adutos de Morita-Baylis Hillman



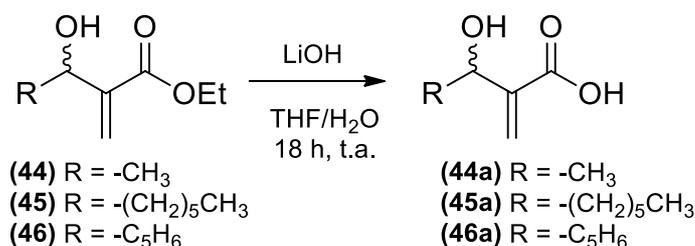
Os adutos foram sintetizados como relatado anteriormente por Silva *et al.* 2019 [48]. Em um fundo redondo foram adicionados aldeído (35 mmol), acrilato de etila (53 mmol) e DABCO (5 mmol). A mistura foi mantida protegida da luz à temperatura ambiente sob agitação durante 20 dias para adutos alifáticos. O aduto do benzaldeído foi sintetizado a uma temperatura de 4 ° C sob agitação durante 15 dias. A mistura de reação foi concentrada sob vácuo e o produto residual foi tratado com acetato de etilo (15 mL) e lavado com solução aquosa a 10% de ácido clorídrico (3 x 15 mL). A fase orgânica foi seca sobre Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada a vácuo para fornecer o produto desejado.

3-hidroxi-2-metilen-butanoato de etila (44). Óleo amarelo, 90%. RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃): δ_H 6,20 (1H, s); 5,80 (1H, s); 4,60 (1H; q; *J* = 6,0 Hz); 4,25 (2H; q; *J* = 7,2 Hz); 1,38 (3H; d; *J* = 6,6 Hz); 1,30 (3H; t; *J* = 6,6 Hz). RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ_C 166,87 (C); 143,71 (C); 123,81 (CH₂); 67,37 (CH); 60,88 (CH₂); 22,11 (CH₃); 14,29 (CH₃).

3-hidroxi-2-metilen-nonanoato de etila (45). Óleo amarelo, 46%. RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃): δ_H 6,22 (1H, s); 5,77 (1H, s); 4,42 (1H; t; *J* = 6,6 Hz); 4,24 (2H; q; *J* = 7,2 Hz); 1,64 (2H, m); 1,32 (3H; t; *J* = 7,2 Hz); 1,29 (2 H, m); 1,29 (2 H, m); 1,29 (2 H, m); 1,29 (2 H, m); 0,88 (3H; t; *J* = 6,6 Hz). RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ_C 166,78 (C); 142,87 (C); 124,77 (CH₂); 72,02 (CH); 60,95 (CH₂); 36,40 (CH₂); 31,90 (CH₂); 29,23 (CH₂); 25,94 (CH₂); 22,73 (CH₂); 14,28 (CH₃); 14,20 (CH₃).

2-(hidroxi(fenil)metil)acrilato de etila (46). Óleo amarelo, 53%. RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃): δ_H 7,37 (2H, m); 7,34 (2H, m); 7,28 (1H, m); 6,34 (1H, s); 5,81 (1H, s); 5,57 (1H, s); 4,18 (2H; q; *J* = 7,2 Hz); 1,24 (3H; t; *J* = 7,2 Hz). RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ_C 166,48 (C); 142,36 (C); 141,49 (C); 128,53 (CH₂); 127,91 (CH); 126,71 (CH); 126,00 (CH); 73,50 (CH); 61,07 (CH₂); 14,17 (CH₃).

4.6.6 Reação de hidrolises dos adutos de Morita-Baylis Hillman



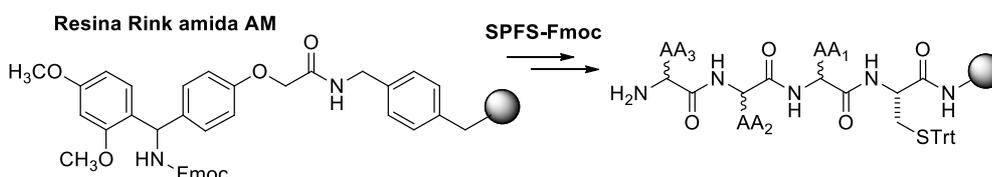
Os ácidos carboxílicos foram sintetizados como anteriormente relatado por Mateus *et al.* 2001 [58]. O respetivo aduto (23,3 mmol) foi dissolvido em THF (40 mL), em seguida 60 mL de solução 3,5 M de LiOH foram adicionados e vigorosamente agitados à temperatura ambiente durante 24 h. O THF foi removido sob vácuo e adicionou-se água (60 mL). A solução foi lavada com acetato de etilo (3 x 15 mL). A fase aquosa residual foi então acidificada para pH 1,0 com solução de ácido clorídrico a 20% e extraída com acetato de etilo (3 x 20 mL). Estas últimas fases orgânicas foram reunidas, secas sobre Na₂SO₄ anidro, filtradas e concentradas a vácuo para proporcionar o produto desejado.

Ácido 3-hidroxi-2-metilen-butanoico (44a). Óleo amarelo, 98%. RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃): δ_H 6,38 (1H, s); 5,95 (1H, s); 4,66 (1H; q; *J* = 6,0 Hz); 1,42 (3H; d; *J* = 6,6 Hz). RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ_C 171,36 (C); 142,93 (C); 126,77 (CH₂); 67,06 (CH); 22,14 (CH₃).

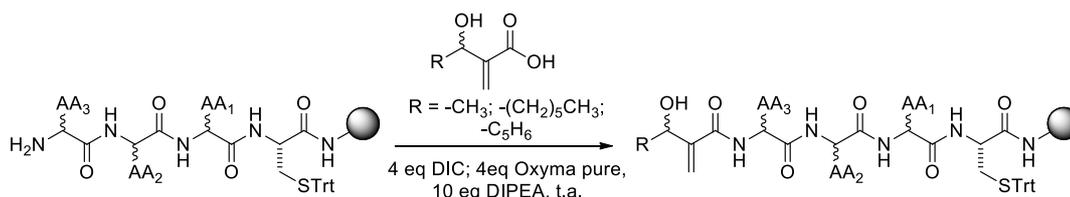
Ácido 3-hidroxi-2-metilen-nonanoico (45a). Óleo amarelo, 90%. RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃): δ_H 6,39 (1H, s); 5,92 (1H, s); 4,42 (1H; dd; *J* = 5,4 e 7,8 Hz); 1,68 (2H, m); 1,31 (2 H, m); 1,31 (2 H, m); 1,31 (2 H, m); 1,31 (2 H, m); 0,88 (3H; t; *J* = 6,6 Hz). RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ_C 171,37 (C); 141,96 (C); 127,61 (CH₂); 71,70 (CH); 36,33 (CH₂); 31,90 (CH₂); 29,20 (CH₂); 25,89 (CH₂); 22,73 (CH₂); 14,20 (CH₃).

Ácido 2-(hidroxi(fenil)metil)acrilato (46a). Óleo amarelo, 80%. RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃): δ_H 7,36 (2H, m); 7,34 (2H, m); 7,29 (1H, m); 6,47 (1H, s); 5,94 (1H, s); 5,56 (1H, s). RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ_C 171,19 (C); 141,44 (C); 140,99 (C); 128,68 (CH₂); 128,65 (CH); 128,15 (CH); 126,77 (CH); 72,95 (CH).

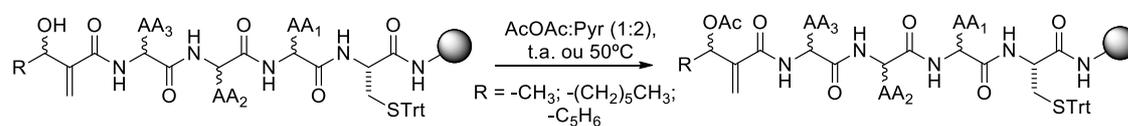
4.6.7 Procedimentos empregados para a síntese dos ciclopeptídeos pertencentes a segunda geração



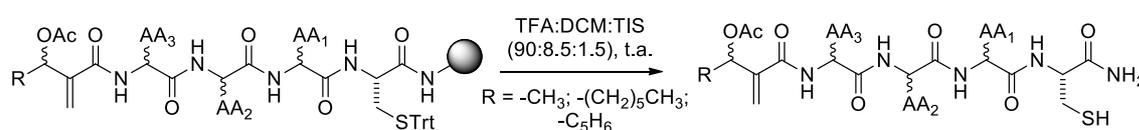
SPFS-Fmoc do tetrapeptídeo. Em um balão de fundo redondo para SPFS foram adicionados 400 mg da resina Rink amida AM (0,28 mmol). Ciclos repetitivos de desproteção com solução a 20% de 4-metilpiridina em DMF por 15 min e agitação, e acoplamentos usando 4 eq. do respectivo aminoácido, 4 eq. de HCTU ou HATU e 2 eq. de 6-Cl-HOBt e 10 eq. de DIPEA como base.



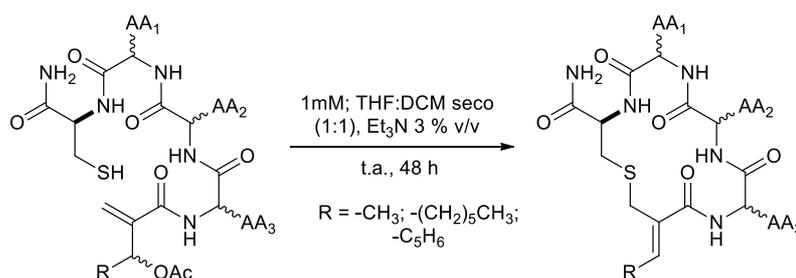
Acoplamento de ácidos de AMBH ao tetrapeptídeo. Os ácidos de AMBH foram adicionados na sequência linear, usando 4 eq. de respectivo ácido do AMBH e a mesma equivalência para DIC e Oxyma Pure em presença de 10 eq. de DIPEA. Todas as reações de acoplamento foram agitadas durante 1,5 h. Após este tempo, os reagentes em solução foram removidos por filtração, a resina foi sequencialmente lavada com DCM, DMF e mais DCM, cada lavagem foi realizada duas vezes.



Acetilação do resíduo de AMBH. O grupo hidroxila no resíduo de AMBH foi acetilado utilizando 10 ml de uma mistura de piridina: anidrido acético (2:1) durante 40 min a temperatura ambiente ou sob aquecimento a 50 °C para os compostos que continham o resíduo do aduto do heptanal e do benzaldeído. Este procedimento foi realizado duas vezes com renovação de reagente. Seguidamente a resina foi lavada.

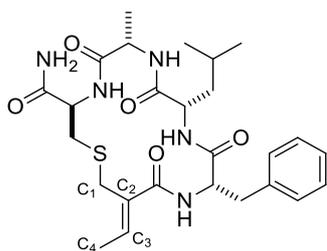


Clivagem. O peptídeo linear foi clivado da resina pela ação de 10 mL do coquetel de clivagem (TFA: DCM: TIS; 90:8,5:1,5 (v/v/v)) sob agitação por 1 h a temperatura ambiente. O sobrenadante foi filtrado da resina e conservado, a resina foi lavada com 5 mL de coquetel de clivagem por 15 min, o sobrenadante foi adicionado ao coletado inicialmente e a resina foi adicionalmente lavada com 5 mL de TFA (3x5 ml) durante 15 min. Estas últimas lavagens com TFA foram também adicionadas aos sobrenadantes anteriores e concentradas sob pressão reduzida sem aquecimento até se obter um óleo amarelo. Subsequentemente, 30 mL de hexano/éter etílico gelado (1:1) foram adicionados, se observou a formação de precipitado, que foi centrifugado e lavado com hexano/éter etílico (3 x 5 mL), obtendo-se a mistura em bruto de peptídeos lineares.



Macroclivagem. A etapa de ciclização foi realizada imediatamente após o procedimento de clivagem. Para isso, a mistura em bruto de peptídeos obtidos a partir da clivagem e centrifugação foi secada em vácuo, pesada, solubilizada em THF:DCM seco

(1:1) a uma concentração próxima de 1 mM e colocada em agitação. Então, suficiente Et₃N foi adicionado gota a gota de forma que atingisse 3% v/v. A reação prosseguiu com agitação vigorosa durante 48 h a temperatura ambiente. Depois do tempo, na mistura de reação os solventes foram removidos a pressão reduzida e o produto residual foi purificado por CLAE semi-preparativa.

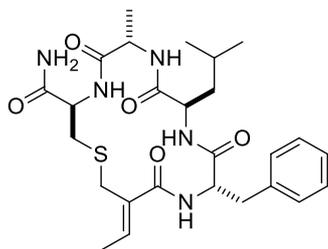
Composto (36)

Sólido branco; 10,2 % de rendimento; EMAR (IES-TOF):
 $[M+H]^+$ calculada para $C_{26}H_{37}N_5O_5S$ 532,2588; encontrada 532,2599 e $[M+Na]^+$ calculada para $C_{26}H_{36}N_5NaO_5S$ 554,2408; encontrada 554,2412.

Tabela 4.1. Dados espectroscópicos de RMN (DMSO- d_6) para o composto (36).

Aminoácido	Posição	δ_n (ppm) (multiplicidade; J (Hz))	δ_c (ppm)	COSY/TOCSY	HMBC	NOESY
Cys	NH	7,30 (1H; d; 7,2)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Ala)	NH (Ala)
	CO	-	171,79	-	C α ; C β	
	C α	4,34 (1H; td; 9,0; 6,0; 3,6)	55,05 (CH)	NH; C β	CO; C β	
	C β	2,73 (1H; dd; 13,8; 6,00) 2,78 (1H; dd; 13,8; 9,00)	31,68 (CH ₂)	NH; C α	C α ; CO; C1	
Ala	NH	7,95 (1H; d; 7,8)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Leu)	NH (Cys)
	CO	-	171,49	-	C α ; C β	
	C α	4,09 (1H; m)	49,45 (CH)	NH; C β	CO; C β	
	C β	1,33 (3H; d; 7,2)	16,34 (CH ₃)	NH; C α	C α ; CO	
Leu	NH	8,07 (1H; d; 6,6)	-	C α	C α ; C β ; CO (Phe)	NH (Phe)
	CO	-	172,52	-	C α	
	C α	4,04 (1H; m)	53,57 (CH)	NH; C β	CO; C β ; C γ	
	C β	1,49 (1H; m)	39,58 (CH ₂)	C α ; C γ ; C δ_1 ; C δ_2	C γ ; C α ; C δ_1 ; C δ_2	
		1,73 (1H; m)				
	C γ	1,57 (1H; m)	24,28 (CH)	C δ_1 ; C δ_2	C α ; C β	
	C δ_1	0,84 (3H; d; 6,6)	21,53 (CH ₃)	C β ; C γ	C β ; C γ ; C δ_2	
C δ_2	0,91 (3H; d; 6,6)	22,86 (CH ₃)	C β ; C γ	C β ; C δ_1 ; C γ		
Phe	NH	8,58 (1H; d; 7,8)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Aduto)	C3; NH (Leu)
	CO	-	172,32	-	C α ; C β	
	C α	4,10 (1H; m)	55,90 (CH)	NH; C β	CO; C γ ; C β ; CO (Aduto)	
	C β	3,14 (1 H; d; 8,4; 2,4)	35,50 (CH ₂)	NH; C α	C α ; CO; C m ; C γ	
		3,15 (1H; br, s; 8,4)				
	C γ	-	138,01	-	C α ; C β	
	C o	7,29 (2H; m)	128,22 (CH)	n/o	C γ	
C m	7,21 (2H; m)	129,05 (CH)	n/o	C p		
C p	7,22 (1H; m)	126,32 (CH)	n/o	C m		
Aduto	CO	-	169,08	-	C1; C3	
	C1	3,29 (1H; d; 13,8)	26,40 (CH ₂)	-	CO; C2; C3; C β (Cys)	
		3,51 (1H; d; 13,2)				
	C2	-	134,19	-	C1; C4	
	C3	6,04 (1H; q; 4,0)	132,02(CH)	C4	C1; C4; CO	NH (Phe)
C4	1,71 (3H; d; 6,60)	13,63 (CH ₃)	C3	C1; C2; C3		

n/o: não observado.

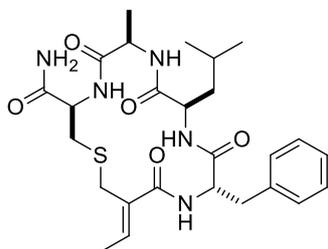
Composto (37)

Sólido branco; 14,4 % de rendimento; EMAR (IES-TOF):
 $[M+H]^+$ calculada para $C_{26}H_{37}N_5O_5S$ 532,2588; encontrada 532,2586 e $[M+Na]^+$ calculada para $C_{26}H_{36}N_5NaO_5S$ 554,2408; encontrada 554,2408.

Tabela 4.2. Dados espectroscópicos de RMN ($DMSO-d_6$) para o composto (37).

Aminoácido	Posição	δ_H (ppm) (multiplicidade; J (Hz))	δ_C (ppm)	COSY/TOCSY	HMBC	NOESY
Cys	NH	7,78 (d; 1H; 7,8)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Ala)	C α (Ala)
	CO	-	171,71	-	C α ; C β	
	C α	4,18 (1H; m)	52,80 (CH)	NH; C β	CO; C β	
	C β	2,73 (1H; dd; 12,6; 7,8) 2,80 (1H; dd; 12,6; 6,6)	32,76 (CH ₂)	NH; C α	C α ; CO; C1	
Ala	NH	8,33 (1H; d; 7,8)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Leu)	
	CO	-	171,20	-	C α ; C β	
	C α	4,26 (1H; q; 7,2)	48,28 (CH)	NH; C β	CO; C β	NH (Cys)
	C β	1,17 (3H; d; 7,2)	16,64 (CH ₃)	NH; C α	C α ; CO	
Leu	NH	8,26 (1H; d; 7,2)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Phe)	C α (Phe)
	CO	-	172,29	-	C α ; C γ	
	C α	4,16 (1H; m)	51,24 (CH)	NH; C β	CO; C β ; C γ	
	C β	1,40 (1H; m) 1,43 (1H; m)	39,27 (CH ₂)	NH; C α ; C γ ; C δ_1 ; C δ_2	CO; C γ ; C α ; C δ_1 ; C δ_2	
	C γ	1,33 (1H; m)	23,89 (CH)	C δ_1 ; C δ_2	C α ; C β ; C δ_1 ; C δ_2	
	C δ_1	0,75 (3H; d; 6,6)	21,92 (CH ₃)	C β ; C γ	C β ; C γ ; C δ_2	
	C δ_2	0,83 (3H; d; 6,0)	22,68 (CH ₃)	C β ; C γ	C β ; C δ_1 ; C γ	
Phe	NH	8,14 (1H; d; 7,8)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Aduto)	C3; Ha-C1
	CO	-	171,67	-	C α ; C β	
	C α	4,54 (1H; q; 7,8)	54,47 (CH)	NH; C β	CO; C γ ; C β ; CO (Aduto)	NH (Leu)
	C β	2,92 (1 H; dd; 13,2; 9,0) 2,97 (1H; dd; 13,2; 6,6)	36,76 (CH ₂)	NH; C α	C α ; CO; C m' ; C γ	
	C γ	-	137,98	-	C α ; C β ; C o ; C m ; C p	
	C o	7,25 (2H; m)	128,03 (CH)	n/o	C p ; C γ	
	C m	7,24 (2H; m)	129,16 (CH)	n/o	C p ; C γ	
C p	7,18 (1H; m)	126,19 (CH)	n/o	C o ; C m ; C γ		
Aduto	CO	-	168,00	-	C1; C3	
	C1	3,33 (1H; d; 13,2) 3,46 (1H; d; 13,2)	27,33 (CH ₂)	- -	CO; C2; C3; C β (Cys)	NH (Phe)
	C2	-	133,60	-	C1; C3; C4	
	C3	6,27 (1H; q; 7,2)	132,24 (CH)	C4	C1; C2; C4; CO	NH (Phe)
	C4	1,73 (3H; d; 6,6)	13,66 (CH ₃)	C3	C1; C2; C3	

n/o: não observado; Ha-C1: hidrogênio Ha no carbono metileno C1.

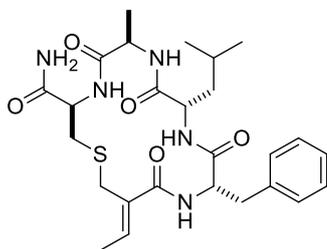
Composto (38)

Sólido branco; 7,3 % de rendimento; EMAR (IES-TOF):
 $[M+H]^+$ calculada para $C_{26}H_{37}N_5O_5S$ 532,2588; encontrada 532,2588 e $[M+Na]^+$ calculada para $C_{26}H_{36}N_5NaO_5S$ 554,2408; encontrada 554,2412.

Tabela 4.3. Dados espectroscópicos de RMN (DMSO- d_6) para o composto (38).

Aminoácido	Posição	δ_H (ppm) (multiplicidade; J (Hz))	δ_C (ppm)	COSY/TOCSY	HMBC	NOESY
Cys	NH	7,60 (1H; d; 7,2)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Ala)	
	CO	-	171,75	-	C α ; C β	
	C α	3,99 (1H; m)	54,73 (CH)	NH; C β	CO; C β	
		2,84 (1H; m) 2,87 (1H; m)	31,07 (CH ₂)	NH; C α	CO; C α ; C1	
Ala	NH	8,00 (1H; d; 9,0)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Leu)	
	CO	-	171,70	-	C α ; C β	
	C α	4,19 (1H; qt; 8,4; 7,2)	49,21 (CH)	NH; C β	CO; C β	
	C β	1,30 (3H; d; 6,6)	17,15 (CH ₃)	NH; C α	C α ; CO	
Leu	NH	8,27 (1H; d; 7,8)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Phe)	
	CO	-	171,98	-	C α	
	C α	4,02 (1H; m)	51,89 (CH)	NH; C β	CO; C β ; C γ	
		1,33 (1H; m) 1,40 (1H; m)	39,39 (CH ₂)	C α ; C δ_1 ; C δ_2	C γ ; C α ; C δ_1 ; C δ_2	
	C γ	1,02 (1H; m)	23,61 (CH)	C δ_1 ; C δ_2	C α ; C β ; C δ_1	
	C δ_1	0,67 (3H; d; 6,6)	21,09 (CH ₃)	C α ; C γ	C β ; C γ ; C δ_2	
	C δ_2	0,75 (3H; d; 6,6)	23,06 (CH ₃)	C α ; C γ	C β ; C δ_1	
Phe	NH	8,50 (1H; d; 5,4)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Aduto)	C3
	CO	-	171,98	-	C α ; C β	
	C α	4,39 (1H; q; 7,2)	56,09 (CH)	NH; C β	CO; C γ ; C β	
		2,89 (1H; m) 3,00 (1H; dd; 13,2; 7,2)	36,63 (CH ₂)	NH; C α	C α ; CO; C m ; C γ	
	C γ	-	137,25	-	C α ; C α ; C β	
	C o	7,27 (2H; m)	128,10 (CH)	n/o	C γ	
	C m	7,25 (2H; m)	129,15 (CH)	n/o	C p	
	C p	7,20 (1H; m)	126,29 (CH)	n/o	C β ; C m	
Aduto	CO	-	169,18	-	C1; C3; C4	
	C1	3,40 (1H; d; 12,60) 3,49 (1H; d; 12,60)	27,14 (CH ₂)	-	CO; C2; C3; C β (Cys)	
		-	132,85	-	C1; C4	
	C3	6,28 (1H; q; 7,2; 6,6)	132,64 (CH)	C4	C1; C4; CO	NH (Phe)
	C4	1,74 (3H; d; 6,6)	13,63 (CH ₃)	C3	CO; C1; C2	

n/o: não observado; qt: quinteto.

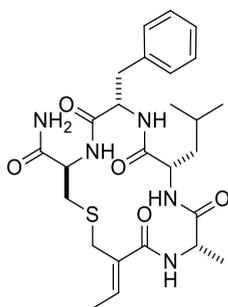
Composto (39)

Sólido branco; 2,7 % de rendimento; EMAR (IES-TOF):
 $[M+H]^+$ calculada para $C_{26}H_{37}N_5O_5S$ 532,2588; encontrada 532,2589 e $[M+Na]^+$ calculada para $C_{26}H_{36}N_5NaO_5S$ 554,2408; encontrada 554,2407.

Tabela 4.4. Dados espectroscópicos de RMN (DMSO- d_6) para o composto (39).

Aminoácido	Posição	δ_H (ppm) (multiplicidade; J (Hz))	δ_C (ppm)	COSY/TOCSY	HMBC	NOESY
Cys	NH	7,21 (1H; d; 8,4)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Ala)	
	CO	-	171,75	-	C α ; C β	
	C α	4,20 (1H; m)	52,12 (CH)	NH; C β	CO; C β	
	C β	2,72 (1H; dd; 11,4; 5,4) 2,85 (1H; dd; 12,0; 8,4)	33,10 (CH ₂)	NH; C α	CO; C α ; C1	
Ala	NH	8,55 (1H; d; 6,6)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Leu)	C α (Leu)
	CO	-	171,75	-	C β	
	C α	4,03 (1H; t; 6,6)	49,83 (CH)	NH; C β	C β	
	C β	1,23 (3H; d; 7,2)	17,00 (CH ₃)	NH; C α	C α ; CO	
Leu	NH	7,56 (1H; d; 7,2)	-	C α ; C β	C α ; CO (Phe)	NH (Phe)
	CO	-	171,22	-	C α	
	C α	4,33 (1H; m)	51,60 (CH)	NH; C β	CO; C β ; C γ	NH (Ala)
	C β	1,46 (1H; m)	41,32 (CH ₂)	C α ; C δ_1 ; C δ_2	C γ ; C α ; C δ_1 ; C δ_2	
		1,51 (1H; m)				
	C γ	1,46 (1H; m)	24,42 (CH)	C δ_1 ; C δ_2	C α ; C β ; C δ_1 ; C δ_2	
	C δ_1	0,87 (3H; d; 6,6)	22,50 (CH ₃)	C β ; C γ	C β ; C γ ; C δ_2	
C δ_2	0,92 (3H; d; 6,0)	22,73 (CH ₃)	C β ; C γ	C β ; C δ_1 ; C γ		
Phe	NH	8,25 (1H; d; 8,4)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Aduto)	C3; NH (Leu)
	CO	-	171,29	-	C α ; C β	
	C α	4,37 (1H; m)	56,13 (CH)	NH; C β	CO; C γ	
	C β	2,93 (1H; dd; 13,8; 11,4)	37,00 (CH ₂)	NH; C α	C α ; CO; C m ; C γ	
		3,04 (1H; dd; 13,8; 4,8)				
	C γ	-	138,04	-	C α ; C α ; C β	
	C o	7,27 (2H; m)	128,19 (CH)	n/o	C γ	
	C m	7,23 (2H; m)	128,92 (CH)	n/o	C p	
C p	7,20 (1H; m)	126,36 (CH)	n/o	C β ; C m		
Aduto	CO	-	167,81	-	C1; C3; C4	
	C1	3,38 (1H; <i>bs</i>)	26,98 (CH ₂)	-	CO; C2; C3; C β (Cys)	
		-	-	-	-	
	C2	-	134,15	-	C1; C4	
	C3	6,06 (1H; q; 7,2; 6,6)	130,65 (CH)	C4	C1; C4; CO	NH (Phe)
C4	1,71 (3H; d; 6,6)	13,55 (CH ₃)	C3	CO; C2; C3		

n/o: não observado; *bs*: simpleto largo.

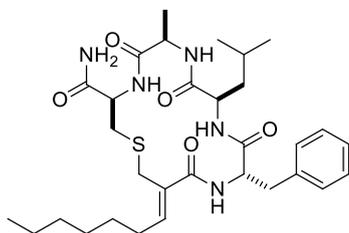
Composto (40)

Sólido branco; 14,8 % de rendimento; EMAR (IES-TOF): $[M+H]^+$ calculada para $C_{26}H_{37}N_5O_5S$ 532,2588; encontrada 532,2587 e $[M+Na]^+$ calculada para $C_{26}H_{36}N_5NaO_5S$ 554,2408; encontrada 554,2405,

Tabela 4.5. Dados espectroscópicos de RMN (DMSO- d_6) para o composto (40).

Aminoácido	Posição	δ_H (ppm) (multiplicidade; J (Hz))	δ_C (ppm)	<i>COSY/TOCSY</i>	<i>HMBC</i>	<i>NOESY</i>
Cys	NH	7,61 (1H; d; 9,0)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Phe)	
	CO	-	171,78	-	C α ; C β	
	C α	4,40 (1H; td; 9,0; 3,6)	55,62 (CH)	NH; C β	C α ; CO	
	C β	2,76 (1H; dd; 13,8; 3,0) 2,88 (1H; dd; 13,8; 9,6)	31,54 (CH ₂)	NH; C α	C1; C α ; CO	
Phe	NH	7,81 (1H; d; 8,4)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Leu)	
	CO	-	170,60	-	C β	
	C α	4,34 (1H; ddd; 14,4; 6,0; 4,2)	54,92 (CH)	NH; C β	C β ; C γ	
	C β	2,94 (1H; dd; 13,8; 10,8) 3,21 (1H; dd; 13,8; 4,2H)	36,22 (CH ₂)	NH; C α	C α ; C m ; C γ ; CO	
	C γ	-	137,95	-	C α ; C β ; C o ; C p	
	C o	7,27 (2H; m)	128,22 (CH)	n/o	C γ	
	C m	7,21 (2H; m)	128,91 (CH)	n/o	C p ; C β	
	C p	7,20 (1H; bs)	126,32 (CH)	n/o	C γ ; C m	
Leu	NH	7,90 (1H; d; 7,2)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Ala)	
	CO	-	172,60	-	C α ; C β	
	C α	4,02 (m; 1H)	53,26 (CH)	NH; C β ; C δ_1 ; C δ_2	C β ; C γ ; CO	
	C β	1,21 (1H; m) 1,44 (1H; m)	39,63 (CH ₂)	C α ; C δ_1 ; C δ_2	C α ; C γ ; C δ_1 ; C δ_2 ; CO	
	C γ	1,43 (1H; m)	24,22 (CH)	C δ_1 ; C δ_2	C α ; C β ; C δ_1 ; C δ_2	
	C δ_1	0,74 (3H; d; 6,0)	21,61 (CH ₃)	C γ	C δ_2 ; C γ ; C β	
	C δ_2	0,80 (3H; d; 6,0)	22,62 (CH ₃)	C γ	C δ_1 ; C γ ; C β	
Ala	NH	8,64 (1H; d; 6,6)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO; CO (Aduto)	C3
	CO	-	173,16	-	C α ; C β	
	C α	3,92 (1H; qt; 7,2)	50,65 (CH)	NH; C β	C β ; CO; CO (Aduto)	
	C β	1,37 (3H; d; 7,2)	16,80 (CH ₃)	NH; C α	C α ; CO	
Aduto	CO	-	169,35	-	C1; C3	
	C1	3,34 (1H; d; 13;2) 3,53 (1H; d; 13;8)	26,78 (CH ₂)	-	C β (Cys); CO; C2; C3	C4
	C2	-	134,31	-	C1; C4	
	C3	6,39 (1H; q; 7,2; 6,6)	132,78 (CH)	C4	C4; C1; CO	NH (Ala)
	C4	1,78 (3H; d; 7,2)	13,70 (CH ₃)	C3	CO; C1; C2; C3	

n/o: não observado; qt: quinteto; bs: simpleto largo.

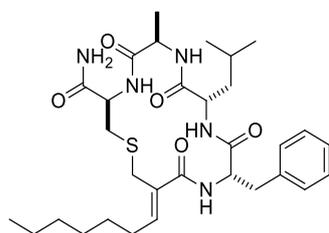
Composto (41)

Sólido branco; 11,8 % de rendimento; EMAR (IES-TOF):
 $[M+H]^+$ calculada para $C_{31}H_{47}N_5O_5S$ 602,3371;
 encontrada 602,3358 e $[M+Na]^+$ calculada para
 $C_{31}H_{46}N_5NaO_5S$ 624,3190; encontrada 624,3174.

Tabela 4.6. Dados espectroscópicos de RMN (DMSO- d_6) para o composto (41).

Aminoácido	Posição	δ_H (ppm) (multiplicidade; J (Hz))	δ_C (ppm)	COSY/TOCSY	HMBC	NOESY
Cys	NH	7,60 (1H; d; 7,2)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Ala)	Hb-C1
	CO	-	171,70	-	C α ; C β	
	C α	3,99 (1H; m)	54,67 (CH)	NH; C β	CO; C β	
	C β	2,85 (1H; m) 2,87 (1H; m)	31,27 (CH ₂)	NH; C α	C α ; CO; C1	
Ala	NH	8,00 (1H; d; 8,4)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Leu)	C α (Leu);
	CO	-	171,77	-	C α ; C β	
	C α	4,20 (1H; qt; 7,2)	49,19 (CH)	NH; C β	CO; C β	
	C β	1,30 (3H; d; 7,2)	17,17 (CH ₃)	NH; C α	C α ; CO	
Leu	NH	8,25 (1H; d; 7,8)		C α ; C β ; C γ ; C δ_1 ; C δ_2	C α ; C β ; CO (Phe)	C α (Phe); C γ
	CO	-	171,99	-	C α ; C β	
	C α	4,02 (1H; m)	51,88 (CH)	NH; C β	CO; C β ; C γ	NH (Ala)
	C β	1,33 (1H; m) 1,40 (1H; m)	39,51 (CH ₂)	NH; C α ; C γ ; C δ_1 ; C δ_2	CO; C α ; C δ_1	
	C γ	1,00 (1H; m)	23,58 (CH)	C δ_1 ; C δ_2	C α ; C δ_1 ; C δ_2	NH
	C δ_1	0,67 (3H; d; 6,6)	21,10 (CH ₃)	C γ	C β ; C γ	
	C δ_2	0,75 (3H; d; 6,6)	23,07 (CH ₃)	C γ	C β ; C δ_1 ; C γ	
Phe	NH	8,50 (1H; d; 6,0)		C α ; C β	C α ; C β ; CO (Aduto)	Ha-C1; C3
	CO	-	171,96	-	C α ; C β	
	C α	4,38 (1H; q; 7,2)	56,13 (CH)	NH; C β	CO; C β	NH (Leu)
	C β	2,91 (1H; m) 3,00 (1H; dd; 13,2; 7,2)	36,63 (CH ₂)	NH; C α	CO; C α ; C γ ; C m	
	C γ	-	137,26	-	C α ; C β	
	C o	7,26 (2H; m)	128,08 (CH)	n/o	C β ; C γ	
	C m	7,25 (2H; m)	129,19 (CH)	n/o	C p	
	C p	7,20 (1H; m)	126,30 (CH)	n/o	C m	
Aduto	CO	-	169,15	-	C1; C3	
	C1	3,38 (1H; d; 12,0) 3,48 (1H; d; 12,6)	27,42 (CH ₂)	-	CO; C2; C3; C β	NH (Phe) NH (Cys)
	C2	-	131,75	-	C1; C4	
	C3	6,21 (1H; t; 7,8)	137,96 (CH)	C4	C1; C4; C6; CO	NH (Phe)
	C4	2,12 (2H; q; 7,2)	27,67 (CH ₂)	C3; C5; C6	C2; C3; C5	
	C5	1,29 (2H; m)	28,40 (CH ₂)	C4	C6; C7	
	C6	1,37 (2H; m)	28,40 (CH ₂)	C4, C7	C5; C7	
	C7	1,26 (2H; m)	31,11 (CH ₂)	C9, C6	C8	
	C8	1,28 (2H; m)	22,04 (CH ₂)	C9	C9	
C9	0,87 (3H; t; 6,6)	13,96 (CH ₃)	C7; C8	C7; C8		

n/o: não observado; Ha-C1: hidrogênio Ha no carbono metileno C1; Hb-C1: hidrogênio Hb no carbono metileno C1; qt: quinteto.

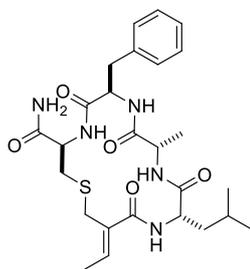
Composto (42)

Sólido branco; 4,7 % de rendimento; EMAR (IES-TOF):
 $[M+H]^+$ calculada para $C_{31}H_{47}N_5O_5S$ 602,3371; encontrada 602,3378 e $[M+Na]^+$ calculada para $C_{31}H_{46}N_5NaO_5S$ 624,3190; encontrada 624,3199.

Tabela 4.7. Dados espectroscópicos de RMN (DMSO- d_6) para o composto (42).

Aminoácido	Posição	δ_H (ppm) (multiplicidade; J (Hz))	δ_C (ppm)	COSY/TOCSY	HMBC	NOESY
Cys	NH	7,21 (1H; d; 8,4)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Ala)	
	CO	-	171,77	-	C α ; C β	
	C α	4,19 (1H; dt; 8,4; 4,8)	52,12 (CH)	NH; C β	CO; C β	
	C β	2,71 (1H; dd; 11,4; 5,4) 2,83 (1H; dd; 12,0; 8,4)	33,25 (CH ₂)	C α ; NH	CO; C α	
Ala	NH	8,56 (1H; d; 6,6)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Leu)	C α (Ala)
	CO	-	171,81	-	C α ; C β	
	C α	4,03 (1H; qt; 7,2)	49,88 (CH)	NH; C β	CO; C β	
	C β	1,23 (3H; d; 7,2)	17,00 (CH ₃)	NH; C α	C α ; CO	
Leu	NH	7,57 (1H; d; 7,2)	-	C α ; C β	C α ; CO (Phe)	NH (Phe)
	CO	-	171;26	-	C β	
	C α	4,33 (1H; m)	51,67 (CH)	NH; C β	CO; C β ; C γ	NH (Ala)
	C β	1,46 (1H; m)	41,33 (CH ₂)	NH; C α ; C δ_1 ; C δ_2	C α ; C δ_1 ; C δ_2	
		1,53 (1H; m)				
	C γ	1,47 (1H; m)	24,46 (CH)	C δ_1 ; C δ_2	C α ; CO; C δ_1 ; C δ_2	
	C δ_1	0,88 (3H; m)	22,77(CH ₃)	C γ ; C β	C β ; C γ	
C δ_2	0,92 (3H; d; 6,0)	22,51 (CH ₃)	C γ ; C β	C β ; C δ_1 ; C γ		
NH	8,20 (1H; d; 8,4)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Aduto)	C3; NH (Leu)	
CO	-	171,32	-	C α		
Phe	C α	4,35 (1H; m)	56,15 (CH)	NH; C β	C β ; C γ ; CO (Aduto)	
	C β	2,93 (1H; dd; 13,2; 10,8)	36,98 (CH ₂)	NH; C α	C α ; C γ	
		3,05 (1H; dd; m; 13,8; 4,8)				
	C γ	-	138,06	-	C α ; C β ; C δ	
	C δ	7,26 (m)	128,16 (CH)	n/o	C m ; C γ	
	C m	7,23 (m)	129,01 (CH)	n/o	C p ; C β	
	C p	7,19 (m)	126,38 (CH)	n/o	C m	
CO	-	167,97	-	C1; C3		
Aduto	C1	3,36 (2H; bs)	27,34 (CH ₂)	-	CO; C2; C3; C β (Cys)	C4
	C2	-	133,17 (CH)	-	C1; C4	
	C3	5,91 (1H; t; 7,8)	135,99 (CH)	C4; C6	C1; C4; C6; CO	NH (Phe)
	C4	2,08 (2H; m)	27,34 (CH ₂)	C3; C6	C2; C3; C5	C1
	C5	1,25 (2H; m)	28,29 (CH ₂)	C6	C1; C8	
	C6	1,32 (2H; m)	28,51 (CH ₂)	C4; C5	C5; C7	
	C7	1,25 (2H; m)	31,10 (CH ₂)	C9	C6; C9	
	C8	1,27 (2H; m)	22,07(CH ₂)	C9	C5; C7; C9	
	C9	0,87 (3H; t)	13,98 (CH ₃)	C6; C7; C8	C7; C8	

n/o: não observado; dt: duplo-triplete; qt: quinteto.

Composto (43)

Sólido branco; 7,6 % de rendimento; EMAR (IES-TOF):
 $[M+H]^+$ calculada para $C_{26}H_{37}N_5O_5S$ 532,2588; encontrada 532,2587 e $[M+Na]^+$ calculada para $C_{26}H_{36}N_5NaO_5S$ 554,2408; encontrada 554,2413.

Tabela 4.8. Dados espectroscópicos de RMN (DMSO-*d*₆) para o composto (43).

Aminoácido	Posição	δ_H (ppm) (multiplicidade; <i>J</i> (Hz))	δ_C (ppm)	COSY/TOCSY	HMBC	NOESY
Cys	NH	7,74 (1H; d; 7,2)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Phe)	
	CO	-	171,63	-	C α ; C β	
	C α	4,00 (1H; ddd; 9,0; 7,2; 4,2)	54,48 (CH)	NH; C β	C β ; CO; CO (Phe)	
	C β	2,84 (1H; dd; 13,2; 9,0) 2,88 (1H; dd; 13,2; 4,8)	31,06 (CH ₂)	NH; C α	C1; C α ; CO	
Phe	NH	8,00 (1H; d; 9,0)	-	C α ; C β	C α ; CO (Ala)	
	CO	-	170,74	-	C α ; C β	
	C α	4,28 (1H; m)	55,33 (CH)	NH; C β	C β ; C γ ; CO	NH (Ala)
	C β	2,99 (1H; dd; 13,8; 11,4) 3,15 (1H; dd; 13,8; 4,2)	36,30 (CH ₂)	NH; C α	C α ; C m ; C γ ; CO	
	C γ	-	138,02	-	C o	
	C o	7,27 (2H; m)	128,14 (CH)	n/o	C γ	
	C m	7,21 (2H; m)	129,00 (CH)	n/o	C p ; C β	
C p	7,20 (1H; <i>bs</i>)	126,24 (CH)	n/o	C m		
Ala	NH	8,44 (1H; d; 6,6)	-	C α ; C β	C α ; C β ; CO (Leu)	C α (Phe)
	CO	-	172,43	-	C α ; C β	
	C α	3,94 (1H; q; 6,6)	49,85 (CH)	NH; C β	C β ; CO; CO (Leu)	
	C β	1,03 (3H; d; 7,2)	16,83 (CH ₃)	NH; C α	C α ; CO	
Leu	NH	8,17 (1H; d; 6,0)	-	C α ; C β	C α ; CO (Aduto)	C3
	CO	-	172,98	-	C α ; C β	
	C α	4,30 (1H; m)	52,10 (CH)	NH; C β ; C δ_1 ; C δ_2	C β ; C γ ; CO; CO (Aduto)	
	C β	1,41 (1H; m) 1,58 (1H; m)	39,96 (CH ₂)	C β ; C α ; C δ_1 ; C δ_2	C α ; C γ ; C δ_1 ; C δ_2 ; CO	
	C γ	1,63 (1H; m)	24,30 (CH)	C δ_1 ; C δ_2	C α ; C β ; C δ_1 ; C δ_2	
	C δ_1	0,88 (3H; d; 6,6)	21,75 (CH ₃)	C γ	C δ_2 ; C γ ; C β	
	C δ_2	0,90 (3H; d; 6,6)	23,03 (CH ₃)	C γ	C δ_1 ; C γ ; C β	
Aduto	CO	-	168,72	-	C1; C3	
	C1	3,44 (1H; d; 13,2) 3,55 (1H; d; 13,2)	26,96 (CH ₂)	-	C β (Cys); CO; C2; C3	
	C2	-	132,85	-	C1; C4	
	C3	6,37 (1H; q; 7,2)	132,55 (CH)	C4	C4; C1; CO	C4; NH (Leu)
	C4	1,73 (3H; d; 6,6)	13,55 (CH ₃)	C3	CO; C1; C2; C3	C3

n/o: não observado; *bs*: simpleto largo

4.6.8 Ensaios de atividade sobre *Staphylococcus aureus* e fibroblastos humanos

Ensaio 1. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC). A atividade antibacteriana de cada ciclopeptídeo foi avaliada contra duas cepas de referência de *Staphylococcus aureus*: *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* ATCC 29213. O teste de microdiluição foi realizado de acordo com o protocolo M07-A do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) [59], utilizando o meio MHB-II (Sigma-Aldrich). Uma solução estoque de 20 mM em DMSO de cada análogo (oito compostos) foi usada para preparar diluições por duplicado numa faixa de concentração entre 300 e 0,3 μ M. O DMSO foi utilizado como controle para garantir que não interferisse no crescimento bacteriano. As microplacas foram inoculadas com 5×10^5 UFC/mL da cepa e incubadas a 37 ° C por 24 h. Após esse período, a MIC, definida como a menor concentração que inibiu completamente o crescimento de bactérias quando detectado a olho nu.

Ensaio 2. Avaliação da atividade hemolítica de *S. aureus* ATCC 25923 em ágar sangue. A metodologia utilizada foi adaptada de Nakayama *et al.* 2009 [51]. Resumidamente, 5 μ L de três concentrações de cada ciclopeptídeo em DMSO (300 μ M, 1 mM e 20 mM) foram colocadas sobre uma placa de ágar sangue de carneiro e deixadas secar. DMSO (5 μ L) foi utilizado como controle de solvente. Então, sobre cada local de aplicação anterior, 1 μ L de um inóculo de *S. aureus* ATCC 25923, previamente preparado a partir de colônias frescas e padronizado para uma DO_{600} igual a 0,1 (aproximadamente 1×10^8 UFC/mL), foi adicionado. Um ponto de controle de apenas 1 μ L do inóculo também foi usada para observar o halo da hemólise produzido pela cepa. Cada placa foi incubada a 37 °C durante 20-24 h. A presença ou ausência de halos de hemólise em torno dos pontos de aplicação da foram observadas e fotografadas. Devido aos resultados alcançados, os compostos (40) ou (42) foram então testados em concentrações mais baixas (5, 10, 50, 100 e 300 μ M). Dois experimentos independentes foram realizados, cada um em duplicado.

Ensaio 3. Ensaio de hemólise utilizando glóbulos vermelhos humanos (hRBCs). Utilizaram-se colônias frescas de *S. aureus* ATCC 25923 para preparar um inóculo com uma DO_{600} igual a 0,1. Os compostos (40) e (42) foram testados em diferentes concentrações (10, 50, 100 e 200 μ M). Resumidamente, 2 μ L de solução de concentração 100x (1 mM, 5 mM, 10 mM e 20 mM em DMSO do composto (40) ou (42)) foram adicionados a 198 μ L do inóculo preparado. Foram utilizados dois controlos positivos, 2

μL de DMSO em 198 de inoculo e 200 μL de apenas inoculo. A incubação a 37 °C por 7 horas aconteceu, e depois disso, 100 μL de cada suspensão bacteriana foram diretamente adicionados a 100 μL de uma suspensão ao 2% de *hRBC*. Previamente, sangue humano foi coletada em EDTA (1,8 mg/mL), lavado três vezes e novamente suspensa em PBS (pH 7,4), para depois ser diluído até 2% em PBS. As misturas de suspensão de bactérias e os *hRBCs* foram incubadas por 30 min a 37 °C e depois por outros 30 min a 4 °C [52]. Então, eles foram centrifugados a 1000xg por 5 min e a absorbância (Abs) do sobrenadante foi lida a 420 nm. Dois experimentos independentes foram realizados, cada um em duplicado.

Ensaio 4. Ensaio de viabilidade celular em fibroblastos humanos. Os fibroblastos humanos (linhagem Detroit 551) foram comprados do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brasil). As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Vitrocell, Brasil) suplementado com 1% de solução antibiótica (5.000 U/mL de penicilina e 5mg/mL de estreptomicina, LGC Biotecnologia, Brasil) e 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor (LGC Biotecnologia, Brasil) a 37 °C e 5% de CO₂ em atmosfera úmida. As células foram semeadas em placa de cultura de 96 poços a uma densidade de 5×10^3 e mantidas durante 24 h a 37 °C e 5% de CO₂. O tratamento foi realizado com 100 μl de diferentes concentrações dos compostos **(40)** (200 a 6,25 μM) e **(42)** (300 a 9,38 μM) preparados por diluições em série em DMEM contendo 0,5% de DMSO. As placas foram incubadas por 24 e 48 h.

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução de corante MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, Sigma-Aldrich, EUA), de acordo com Dos Santos *et al.* 2018 [60]. Após o tempo de exposição, o meio foi removido e foi adicionada uma mistura 15 μL de solução de MTT em PBS (5 mg/mL) e 85 μL de DMEM em cada poço. A placa foi incubada durante 2 h a 37 °C e 5% de CO₂ em atmosfera úmida, então subsequentemente o meio com MTT foi removido e foram adicionados 100 μL de DMSO para dissolver os sais de formazan produzidos pelas células vivas. A absorbância foi medida a 595 nm utilizando um leitor de microplacas SpectraMax® Plus 384 (Molecular Devices, USA).

Os valores de absorbância foram convertidos em porcentagem usando a ferramenta de transformação do GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Softwares, USA). A viabilidade celular foi avaliada por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de

comparação múltipla de Bonferroni para verificar diferenças estatísticas entre os grupos tratados e o grupo controle DMEM. A ANOVA *two-way* seguida pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni foi empregada para comparar as médias entre o tempo de exposição 24 e 48 h. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) da quintuplicada e as diferenças entre as médias foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5. Bibliografia

- [1] HILTUNEN, T.; VIRTALA, M.; LAINE, A-L. Antibiotic resistance in the wild: an ecoevolutionary perspective. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **2017**, 372(1712), 20160039.
- [2] STANTON, T. B. A call for antibiotic alternatives research. *Trends. Microbiol.* **2013**, 21(3), 111.
- [3] GREENBERG, E. Bacterial communication and group behavior. *J. Clin. Invest.* **2003**, 112(9), 1288.
- [4] ZHUN, H.; SUN, S. J. Inhibition of bacterial quorum sensing-regulated behaviors by *Tremella fuciformis* extract. *Curr. Microbiol.* **2008**, 57(5), 418.
- [5] BOYER, M.; WISNIEWSKI-DYÉ, F. Cell-cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum. *FEMS. Microbiol. Ecol.* **2009**, 70(1), 1.
- [6] NG, W-L.; BASSLER, B. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu. Rev. Genet.* **2009**, 43, 197.
- [7] TAL-GAN, Y.; STANCY, D. M.; FOEGEN, M. K.; KOENIG, D. W.; BLACKWELL, H. E. Highly potent inhibitors of quorum sensing in *Staphylococcus aureus* revealed through a systematic synthetic study of the group-III autoinducing peptide. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135(21), 7869.
- [8] RASMUSSEN T.; GIVSKOV M. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int. J. Med. Microbiol.* **2006**, 296(2-3), 149.
- [9] NI, N.; LI, M. WANG, J.; WANG. B. Inhibitors and antagonists of bacterial quorum sensing. *Med. Res. Rev.* **2009**, 29(1), 65.
- [10] DESOUKY, S. E.; NISHIGUCHI, K.; ZENDO, T.; IGARASHI, Y.; WILLIAMS, P.; SONOMOTO, J.; NAKAYAMA, J. High-throughput screening of inhibitors targeting Agr/Fsr quorum sensing in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2013**, 77(5), 923.
- [11] VANDEPUTTE, O. M.; KIENDREBEOGO, M.; RAJAONSON, S.; DIALLO, B.; MOL, A.; EL JAZIRI, M.; BAUCHER, M. Identification of catechin as one of the flavonoids from *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of quorum-sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microb.* **2010**, 76(1), 243.

- [12] JAKOBSEN, T. H.; WARMING, A. N.; VEJBORG, R. M.; MOSCOSO, J. A.; STEGGER, M.; LORENZEN, F.; RYBTKE, M.; ANDERSEN, J. B.; PETERSEN, R.; ANDERSEN, P. S.; NIELSEN, T. E.; TOLKER-NIELSEN, T.; FILLOUX, A.; INGMER, H.; GIVSKOV, M. A broad range quorum sensing inhibitor working through sRNA inhibition. *Sci. Rep.* **2017**, 7(9857), 1.
- [13] BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. *agr*-Mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog.* **2008**, 4(4),1.
- [14] FERLUGA, S.; STEINDLER, L.; VENTURI, V. *Secondary Metabolites in Soil Ecology*. P. Karlovsky. Heidelberg, Germany, Springer. **2008**, 14, 69.
- [15] WAGNER, V.; IGLEWSKI, B. *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. *Clin. Rev. Allergy. Immunol.* **2008**, 35(3), 124.
- [16] NOVICK, R. P.; GEISINGER, E. Quorum sensing in staphylococci. *Annu. Rev. Genet.* **2008**, 42, 541.
- [17] SHOJIMA, A.; NAKAYAMA, J. Quorum sensing in Gram-positive bacteria: assay protocols for staphylococcal *agr* and enterococcal *fsr* systems. *Methods Mol. Biol.* **2014**, 1147, 33.
- [18] THOENDEL, M. J. Synthesis of the accessory gene regulator autoinducing peptide in *Staphylococcus aureus*. PhD (Doctor of Philosophy) thesis, University of Iowa, 2012. <http://ir.uiowa.edu/etd/2999>
- [19] BRODERICK, A. H.; STACY, D. M.; TAL-GAN, Y.; KRATOCHVIL, M. J.; BLACKWELL, H. E.; LYNN, D. M. Surface coatings that promote rapid release of peptide-based AgrC inhibitors for attenuation of quorum sensing in *Staphylococcus aureus*. *Adv. Healthcare Mater.* **2014**, 3, 97
- [20] KITIR, B.; BALDRY, M.; INGMER, H.; OLSEN, C. A. Total synthesis and structural validation of cyclodepsipeptides solonamide A and B. *Tetrahedron.* **2014**, 70(40), 7721
- [21] MANSSON, M.; NIELSEN, A.; KJÆRULFF, L.; GOTFREDSEN, C. H.; WIETZ, M.; INGMER, H.; GRAM, L.; LARSEN, T. O. Inhibition of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus* by novel depsipeptides from a marine *Photobacterium*. *Mar Drugs.* **2011**, 9(12), 2537.
- [22] CHAN, W. C.; COYLE, B. J.; WILLIAMS, P. Virulence regulation and quorum sensing in staphylococcal infections: Competitive agrc antagonists as quorum sensing inhibitors. *J. Med. Chem.* **2004**, 47(19), 4633.

- [23] VIJAYAKUMAR, K.; RAMANATHAN, T. Antiquorum sensing and biofilm potential of 5- Hydroxymethylfurfural against Gram positive pathogens. *Microb. Pathog.* **2018**, 25, 48.
- [24] SHARIFI, A.; MOHAMMADZADEH, A.; ZAHRAEI SALEHI, T.; MAHMOODI, P. Anti-bacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing effects of *Thymus daenensis* and *Satureja hortensis* essential oils against *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, 124(2), 379.
- [25] LINA, G.; JARRAUD, S., JI, G.; GREENLAND, T.; PEDRAZA, A.; ETIENNE, J.; NOVICK, R. P.; VANDENESCH, F. Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the *agr* signal receptor in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **1998**, 28(3), 655.
- [26] SCOTT, R. J.; LIAN, L-Y.; MUHARRAM, S. H.; COCKAYNE, A.; WOOD, S. J.; BYCROFT, B. W.; WILLIAMS, P.; CHAN, W. C. Side-chain-to-tail thiolactone peptide inhibitors of the staphylococcal quorum-sensing system. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13(15), 2449.
- [27] GORSKE, B. C.; BLACKWELL, H. E. Interception of quorum sensing in *Staphylococcus aureus*: A new niche for peptidomimetics. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4(8), 1441.
- [28] OTTO, M.; SÜßMUTH, R.; JUNG, G.; GÖTZ, F. Structure of the pheromone peptide of the *Staphylococcus epidermidis agr* system. *FEBS Letters.* **1998**, 424, 89.
- [29] OTTO, M.; SÜßMUTH, R.; VUONG, C.; JUNG, G.; GÖTZ, F. Inhibition of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus* by the *Staphylococcus epidermidis agr* pheromone and derivatives. *FEBS Letters.* **1999**, 450, 257.
- [30] JOHNSON, J. G.; WANG, B.; DEBELOUCHINA, G. D.; NOVICK, R. P.; MUIR, T. W. Increasing AIP macrocycle size reveals key features of *agr* activation in *Staphylococcus aureus*. *Chem. Bio. Chem.* **2015**, 16(7), 1093.
- [31] SIVANATHAN, S.; SCHERKENBECK, J. Cyclodepsipeptides: A rich source of biologically active compounds for drug research. *Molecules.* **2014**, 19(8), 12368.
- [32] KARATHANASI, G.; BOJER, M. S.; BALDRY, M.; JOHANNESSEN, B. A.; WOLFF, S.; GRECO, I.; KILSTRUP, M.; HANSEN, P. R.; INGMER, H. Linear peptidomimetics as potente antagonists of *Staphylococcus aureus agr* quorum sensing. *Sci. Rep.* **2018**, 8(1), 3562.

- [33] HANSEN, A.M.; PENG, P.; BALDRY, M.; PEREZ-GASSOL, I.; CHRISTENSEN, S. B.; MØLLESØE OBEL VINTHER, J.; INGMER, H.; FRANZYK, H. Lactam hybrid analogues of solonamide B and autoinducing peptides as potent *S. aureus* AgrC antagonists. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 152, 370.
- [34] AMBLARD, M.; FEHRENTZ, J. A.; MARTINEZ, J.; SUBRA, G. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Mol. Biotechnol.* **2006**, 33(3), 239.
- [35] MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron.* **2005**, 61, 10827.
- [36] ISIDRO-LLOBET, A.; ALVAREZ, M.; ALBERICIO, F. Amino acid-protecting groups. *Chem. Rev.* **2009**, 109(6), 2455.
- [37] AAPPTEC. Practical Guide to Solid Phase Peptide Synthesis. *Synthesis Notes*.
- [38] ALICIA B. POMILIO, A. B.; BATTISTA, M. E.; VITALE, A. A. Naturally-Occurring cyclopeptides: structures and bioactivity. *Curr. Org. Chem.* **2006**, 10(16), 2075.
- [39] MORIOKA, T.; LOIK, N. D.; HIPOLITO, C. J.; GOTO, Y.; SUGA, H. Selection-based discovery of macrocyclic peptides for the next generation therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, 26, 34.
- [40] GAO, F.; YAN, X.; SHAKYA, T.; BAETTIG, O. M. AIT-MOHAND-BRUNET, S.; BERGHUIS, A. M.; WRIGHT, G. D.; AUCLAIR, K. Synthesis and structure-activity relationships of truncated bisubstrate inhibitors of aminoglycoside 6'-N-acetyltransferases. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 5273.
- [41] VITALI, T. I.; KOROSTYLEV, A.; KÖNIG, G.; BÖRNER, A. Facile preparation and purification of mono *tert*-butyl malonate. *Synth. Commun.* **2006**, 36(2), 187.
- [42] DAVIDSON, D.; BERNHARD, S. A. The structure of Meldrum's supposed β -lactonic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, 70(10), 3426.
- [43] COELHO, F.; ALMEIDA, W. P. The Baylis-Hillman reaction: a strategy for the preparation of multifunctionalised intermediates for organic synthesis. *Química Nova.* **2000**, 23(1), 98.
- [44] JUNG, G. Lantibiotics-Ribosomally synthesized biologically active polypeptides containing sulfide bridges and α,β -didehydroamino acids. *Angew. Chemie Int. Ed. English.* **1991**, 30(9), 1051.
- [45] FOTOUHI, N.; JOSHI, P.; TILLEY, J. W.; ROWAN, K.; SCHWINGE, V.; WOLITZKY, B. Cyclic thioether peptide mimetics as VCAM-VLA-4 antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10(11), 1167.

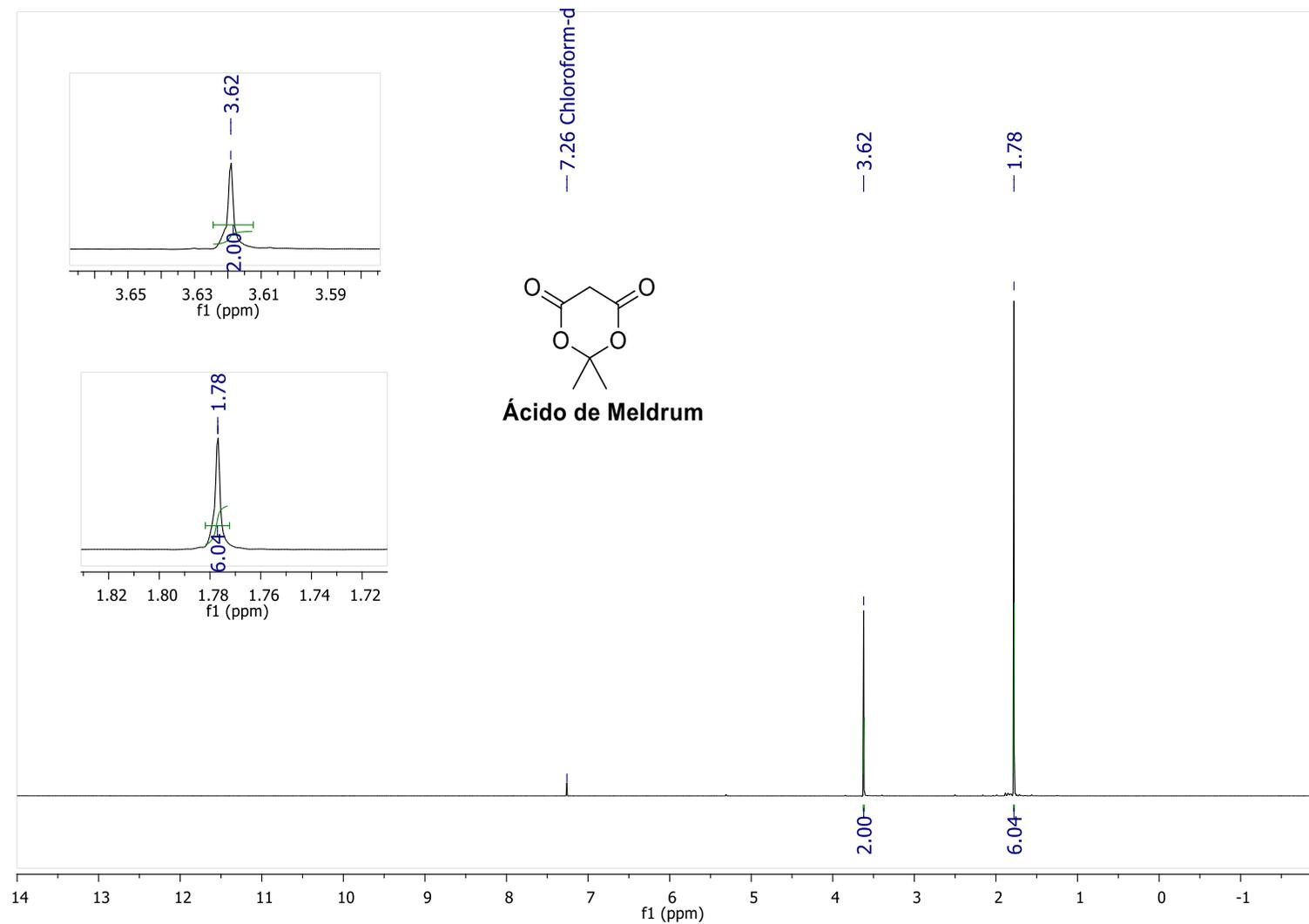
- [46] JONES, D. S.; GAMINO, C. A.; RANDOW, M. E.; VICTORIA, E. J.; YU, L.; COUTTS, S. M. Synthesis of a cyclic-thioether peptide which binds anti-cardiolipin antibodies. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39(24), 6107.
- [47] ROBERTS, K. D.; LAMBERT, J. N.; EDE, N. J.; BRAY, A. M. Efficient synthesis of thioether-based cyclic peptide libraries. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39(45), 8357.
- [48] SILVA, V. S.; TOLENTINO, T. A.; RODRIGUES, T. C. A. F.; SANTOS, F. F. M.; MACHADO, D. F. S.; SILVA, W. A.; DE OLIVEIRA, H. C. B.; MACHADO, A. H. L. Unprecedented *E*-stereoselectivity on the sigmatropic Hurd-Claisen rearrangement of Morita-Baylis-Hillman adducts: a joint experimental-theoretical study. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, 17(18), 4498
- [49] LIU, W.-T.; NG, J.; MELUZZI, D.; BANDEIRA, N.; GUTIERREZ, M.; SIMMONS, T. L.; SCHULTZ, A. W.; LININGTON, R. G.; MOORE, B. S.; GERWICK, W. H.; PEVZNER, P. A.; DORRESTEIN, P. C. Interpretation of tandem mass spectra obtained from cyclic nonribosomal peptides. *Anal. Chem.* **2009**, 81(11), 4200.
- [50] *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus* Rosenbach (ATCC[®] 29213[™]) https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/29213.aspx?geo_country=pt#characteristics (acceso agosto 10, 2019).
- [51] NAKAYAMA, J.; UEMURA, Y.; NISHIGUCHI, K.; YOSHIMURA, N.; IGARASHI, Y.; SONOMOTO, K. Ambuic acid inhibits the biosynthesis of cyclic peptide quormones in Gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2009**, 53(2), 580.
- [52] SAKOULAS, G.; ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING, R. C. JR.; WENNERSTEN, C.; VENKATARAMAN, L.; NOVICK, R. P.; GOLD, H. S. Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2002**, 46(5), 1492.
- [53] NIELSEN, A.; MÅNSSON, M.; BOJER, M. S.; GRAM, L.; LARSEN, T. O.; NOVICK, R. P.; FREES, D.; FRØKIÆR, H.; INGMER, H. Solonamide B inhibits quorum sensing and reduces *Staphylococcus aureus* mediated killing of human neutrophils. *PLoS One.* **2014**, 9(1), e84992.
- [54] WEBSTER, A. M.; COBB, S. L. Recent advances in the synthesis of peptoid macrocycles. *Chem. Eur. J.* **2018**, 24(30), 7560.

- [55] AMARGO W.L.F *Purification of Laboratory Chemicals* 2000, Butterworth Heinemann
- [56] KIM, Y-W; GROSSMANN, T. N.; VERDINE, G. L. Synthesis of all-hydrocarbon stapled α -helical peptides by ring-closing olefin metathesis. *Nat. Protoc.* **2011**, 6(6), 761.
- [57] LI, B.; BERLINER, M.; BUZON, R.; CHIU, C.; COLGAN, S. T.; KANEKO, T.; KEENE, N.; KISSEL, W.; LE, T.; LEEMAN, K.; MARQUEZ, B.; MORRIS, R.; NEWELL, L.; WUNDERWALD, S.; WITT, M.; WEAVER, J.; ZHANG, Z.; ZHANG, Z. Aqueous phosphoric acid as a mild reagent for deprotection of *tert*-butyl carbamates, esters, and ethers. *J. Org. Chem.* **2006**, 71(24), 9045.
- [58] MATEUS, C. R.; FELTRIN, M. P.; COSTA, A. M.; COELHO, F.; ALMEIDA, W. P. Diastereoselectivity in heterogeneous catalytic hydrogenation of Baylis–Hillman adducts. Total synthesis of (\pm)-sitophilate. *Tetrahedron*, **2001**, 57(32), 6901.
- [59] Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically – ninth edition: approved Standard M7-A9. Wayne, PA, USA. **2012**.
- [60] DOS SANTOS, R. C.; OMBREDANE, A. S.; SOUZA, J. M. T.; VASCONCELOS, A. G.; PLÁCIDO, A.; AMORIM, A. D. G. N; BARBOSA, E. A.; LIMA, F. C. D. A.; ROPKE, C. D.; ALVES M. M. M.; ARCANJO, D. D. R.; CARVALHO, F. A. A.; DELERUE-MATOS, C.; JOANITTI, G. A.; LEITE, J. R. S. A. Lycopene-rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) displays cytotoxic effect against human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 via an apoptotic-like pathway. *Food Res. Int.* **2018**, 105, 184.

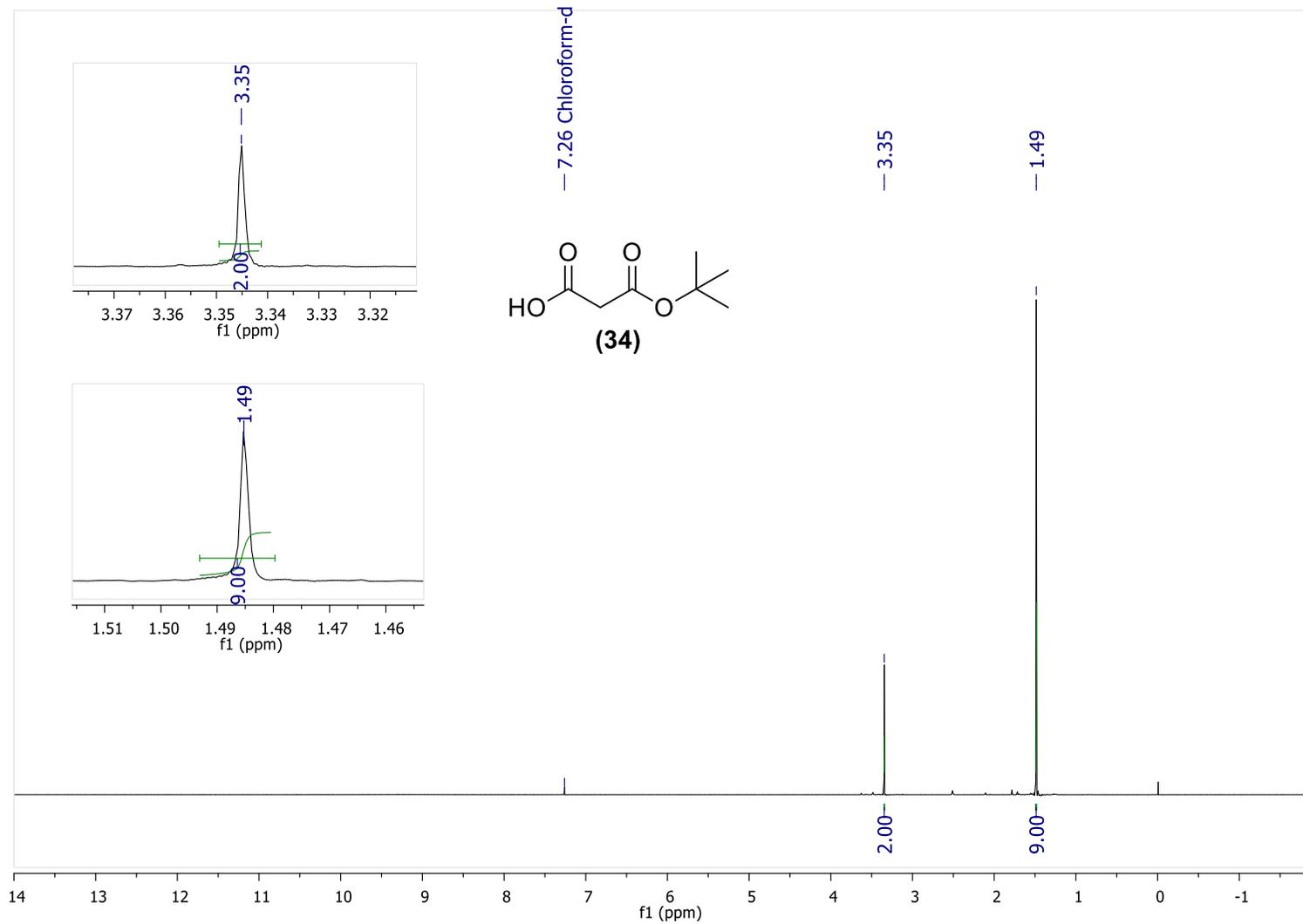
Anexos

ANEXO I: Dados de caracterização para o ácido de Meldrum e ácido mono *tert*-butil malônico (34)

Espectro de RMN-¹H do ácido de Meldrum em CDCl₃

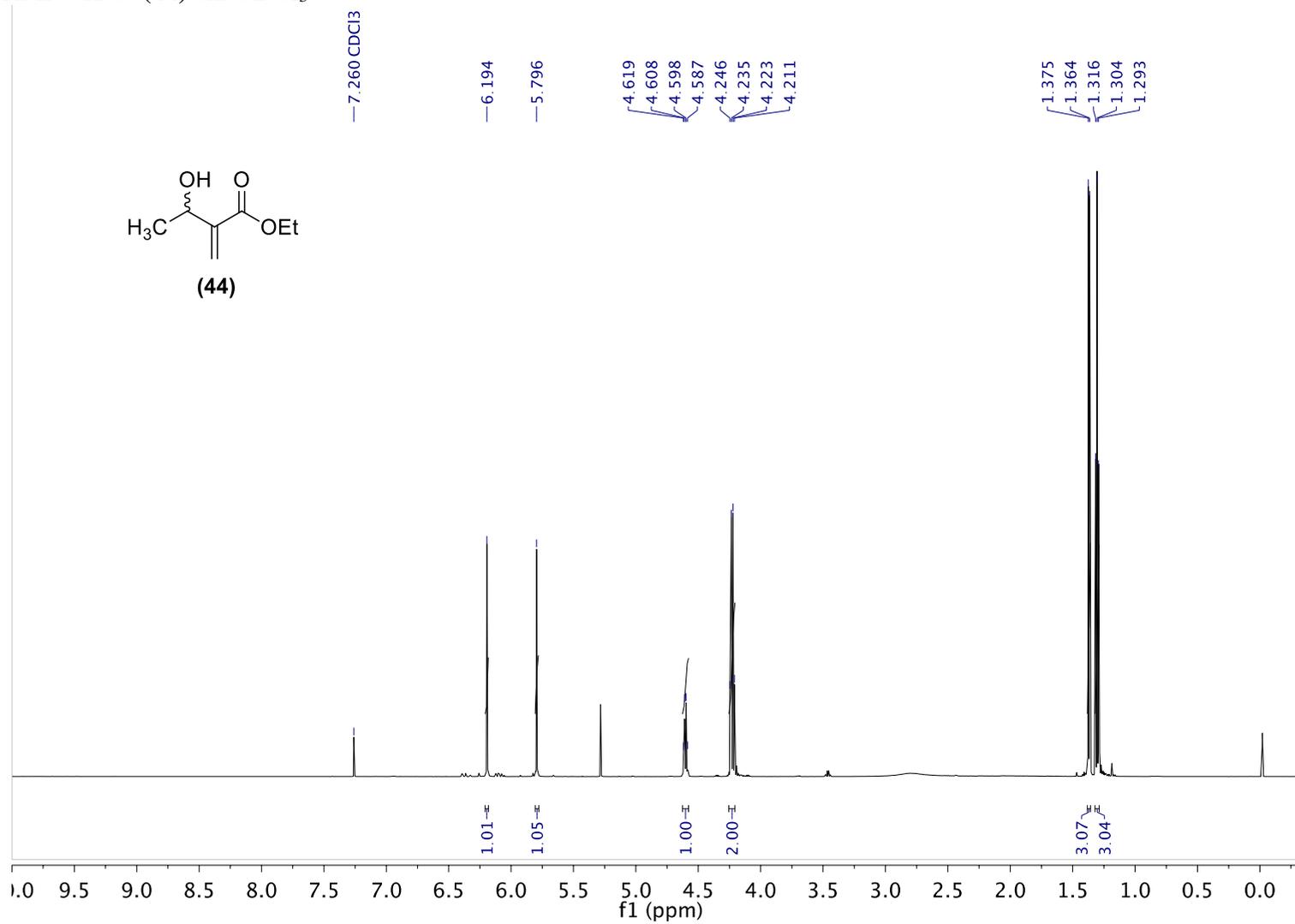


Espectro de RMN-¹H de (34) em CDCl₃

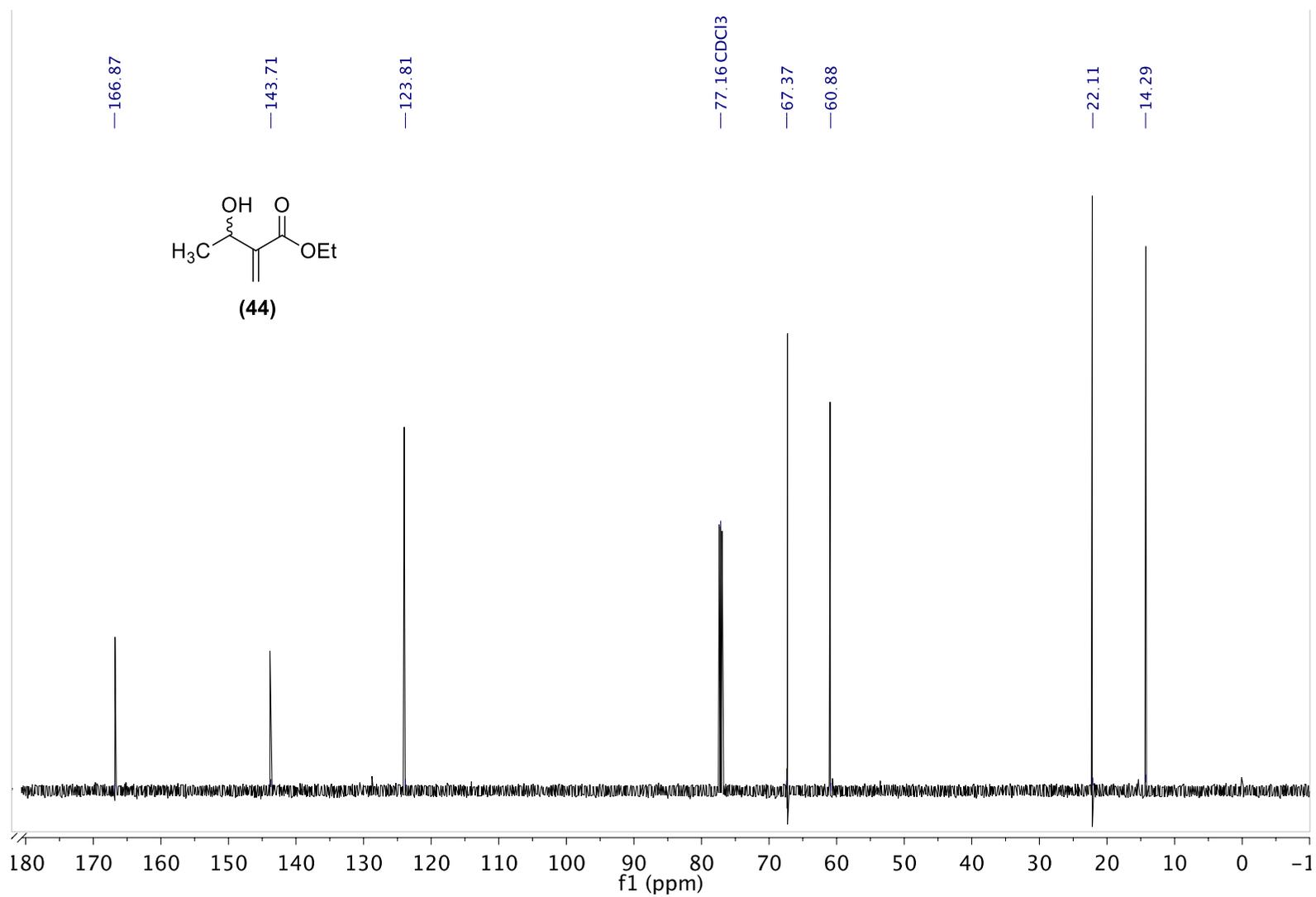


ANEXO II: Dados de caracterização para os AMBH e ácidos do AMBH

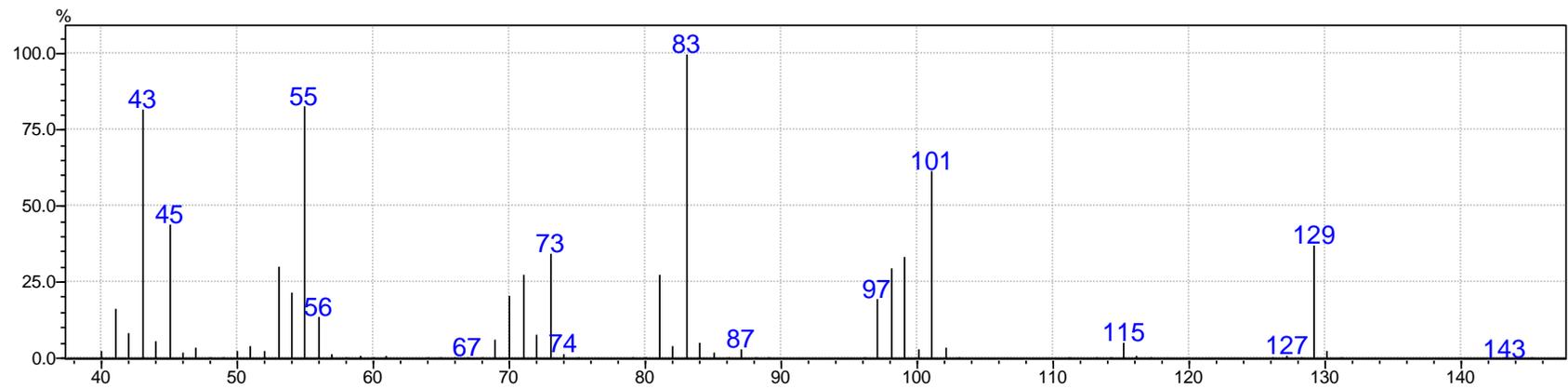
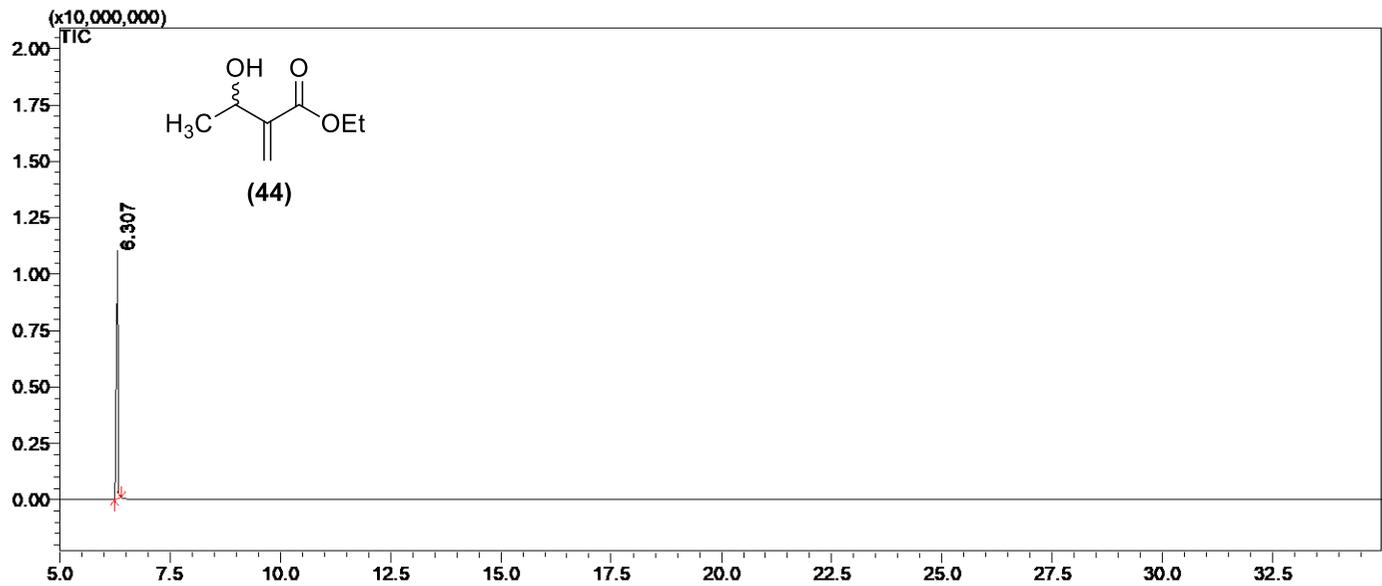
Espectro de RMN-¹H de (44) em CDCl₃



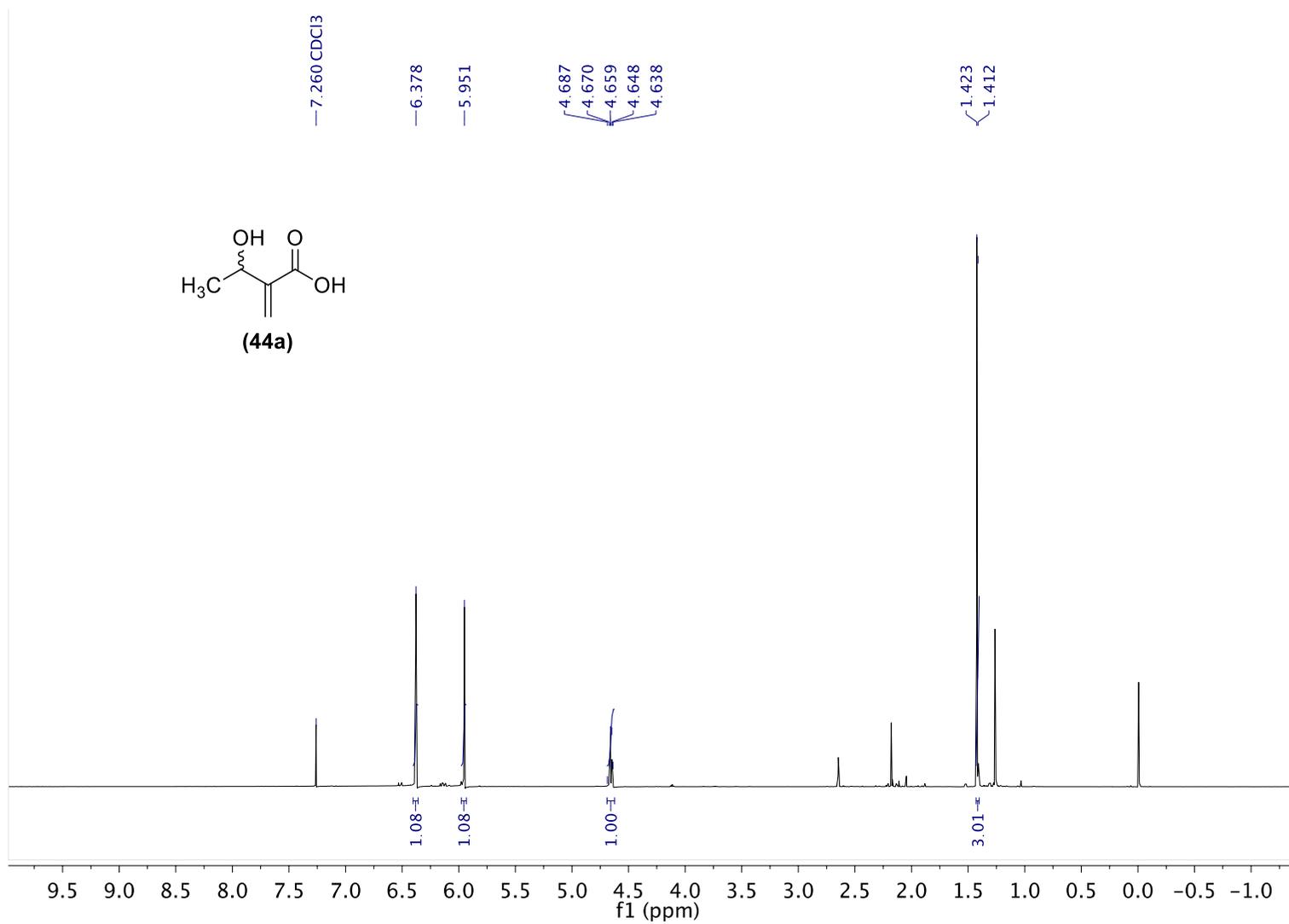
Espectro de RMN-¹³C de **(44)** em CDCl₃



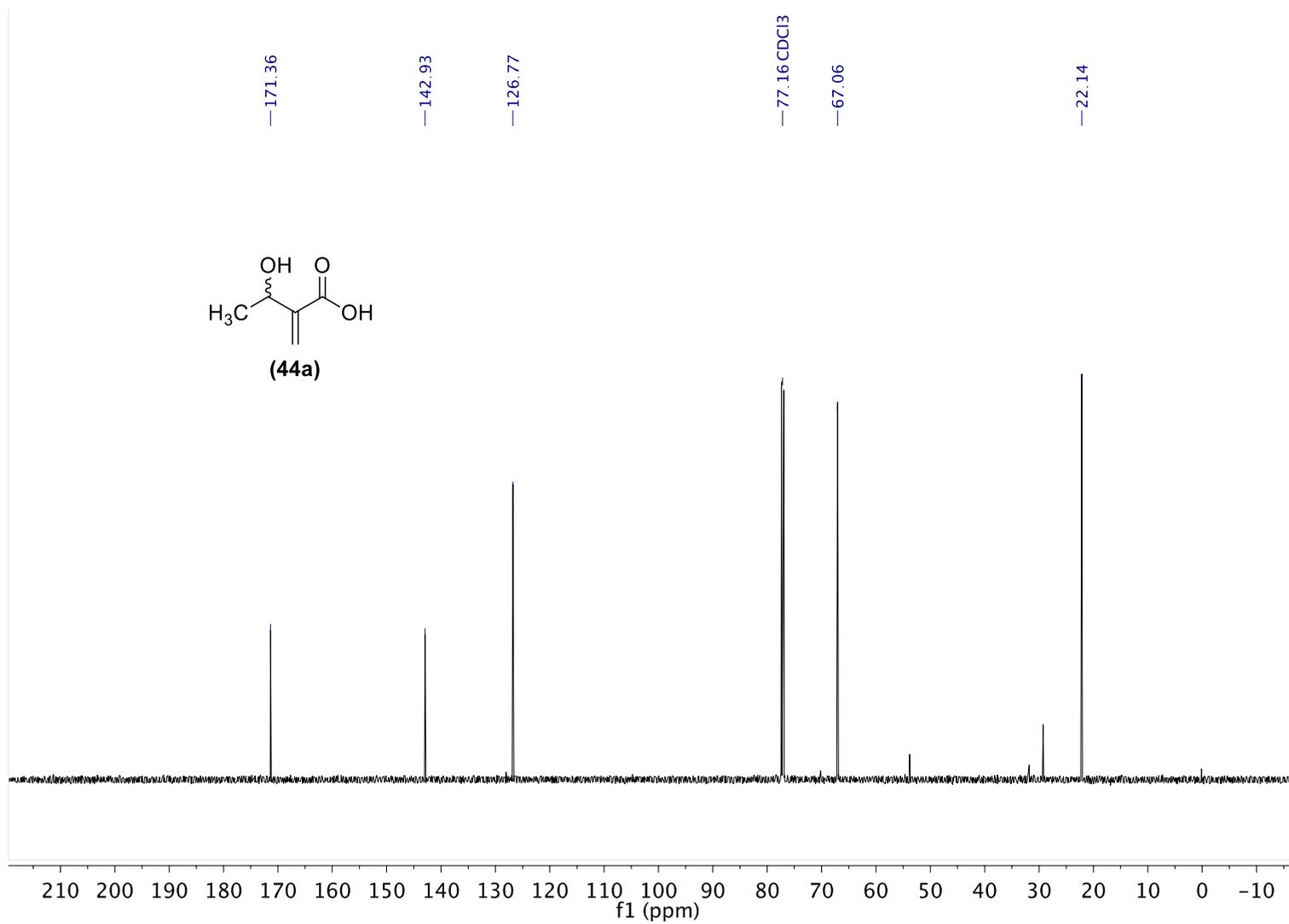
Perfil de CG e EM-IE de (44)



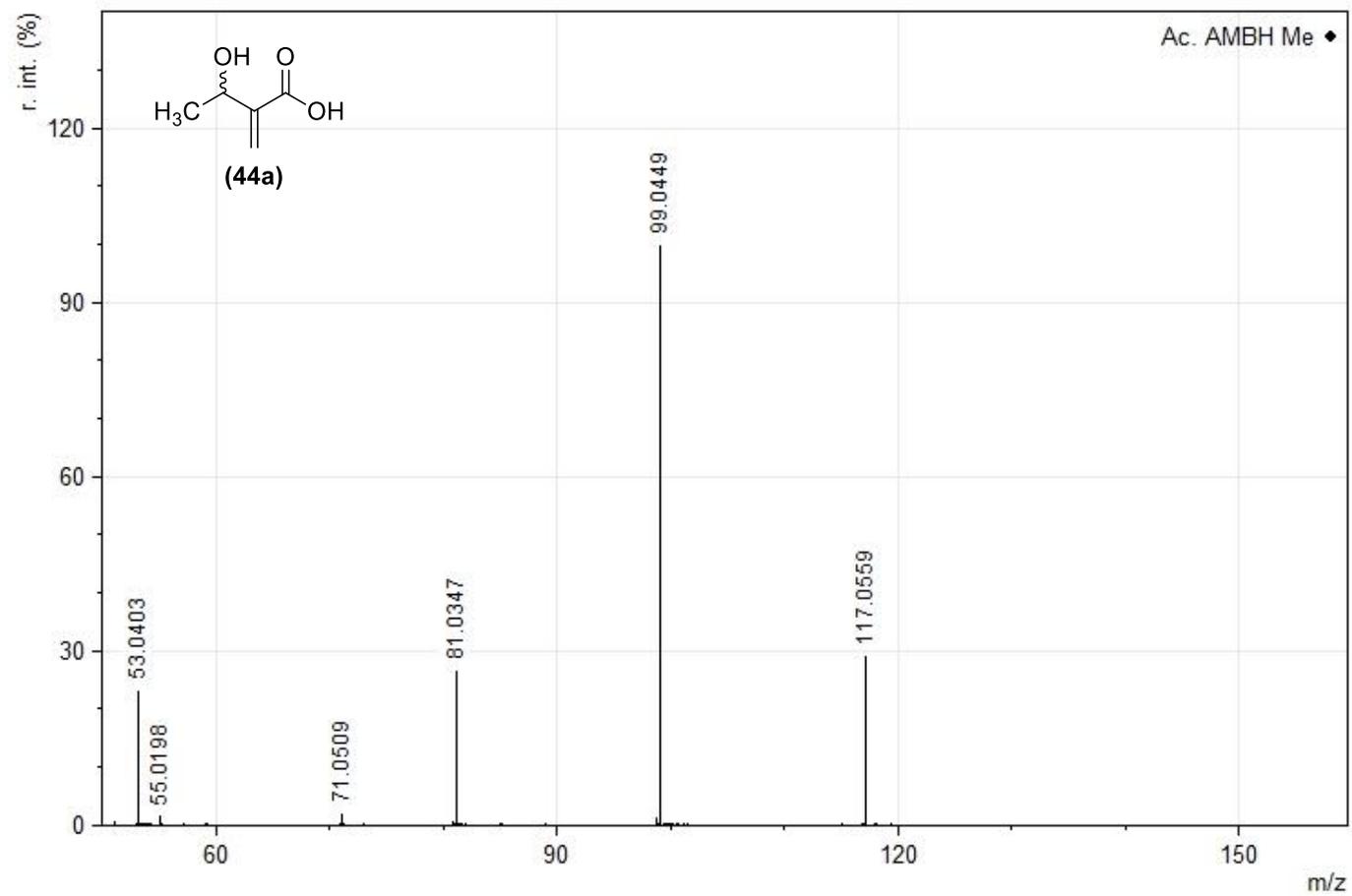
Espectro de RMN-¹H de (44a) em CDCl₃



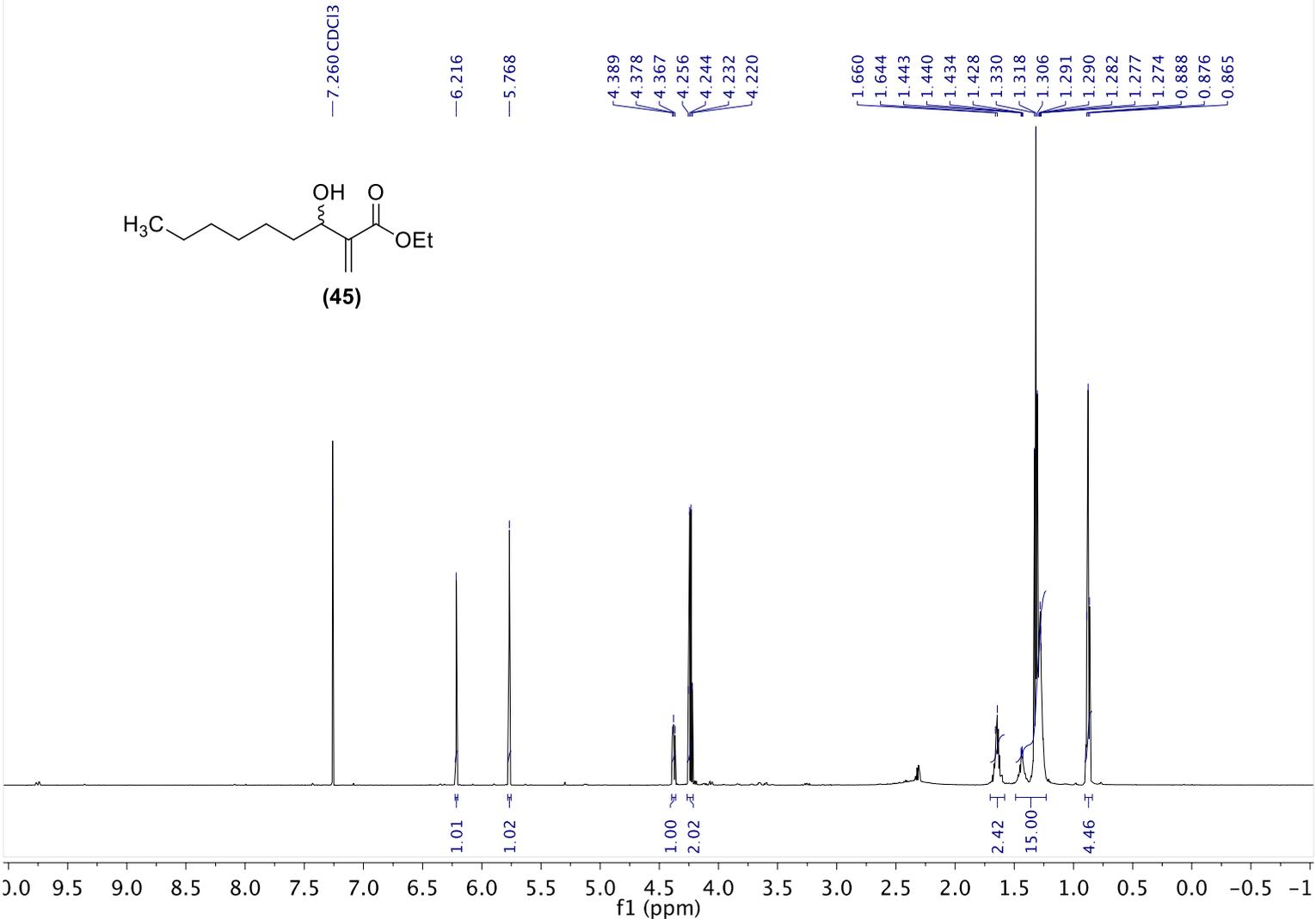
Espectro de RMN-¹³C de **(44a)** em CDCl₃



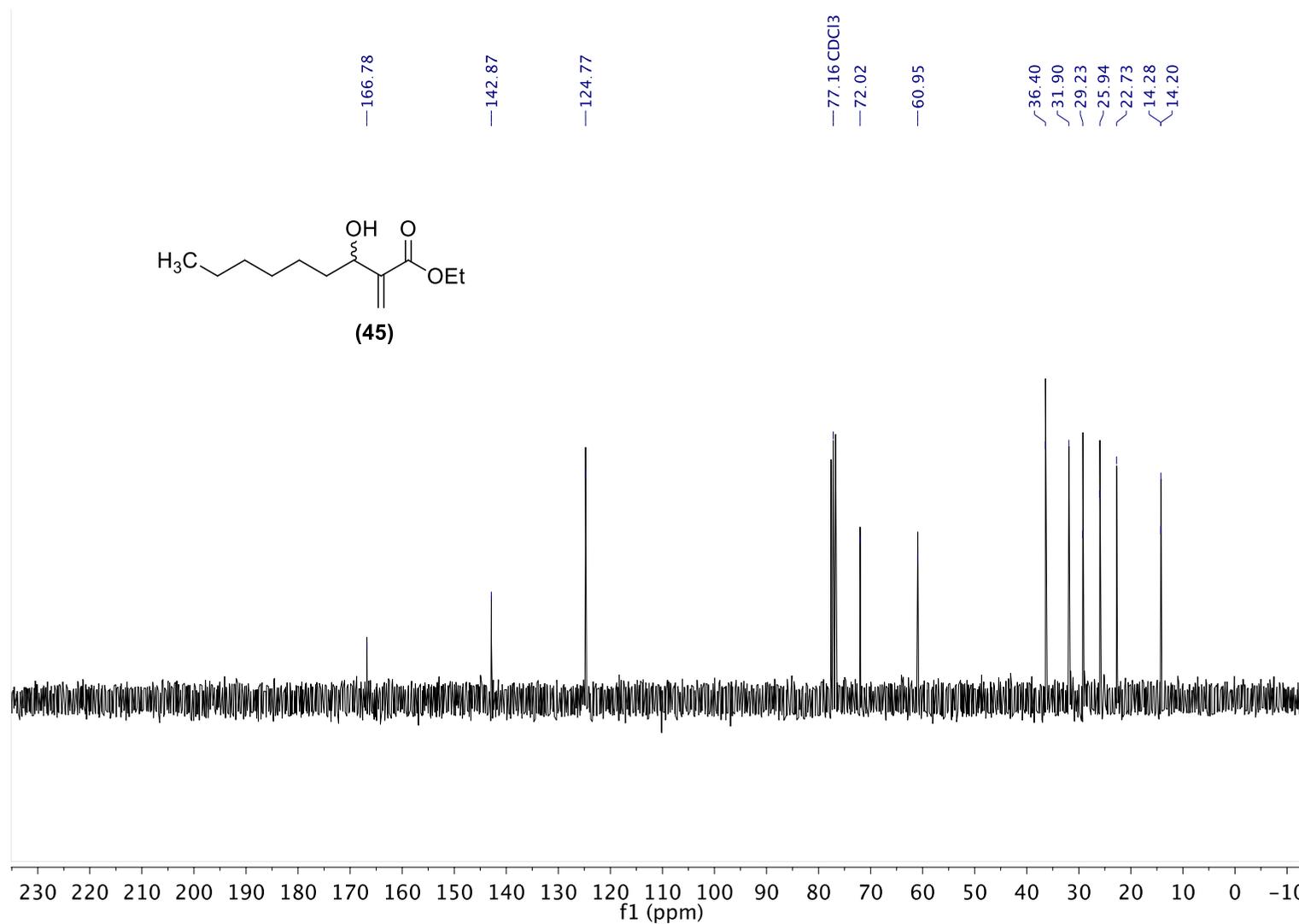
Espectro AR-MS/MS de (44a)



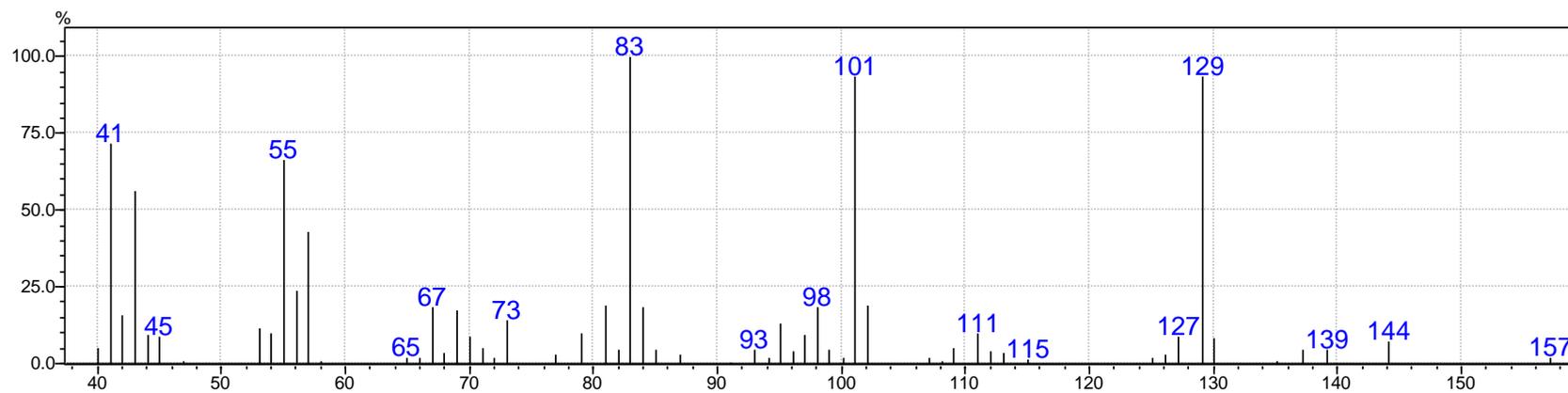
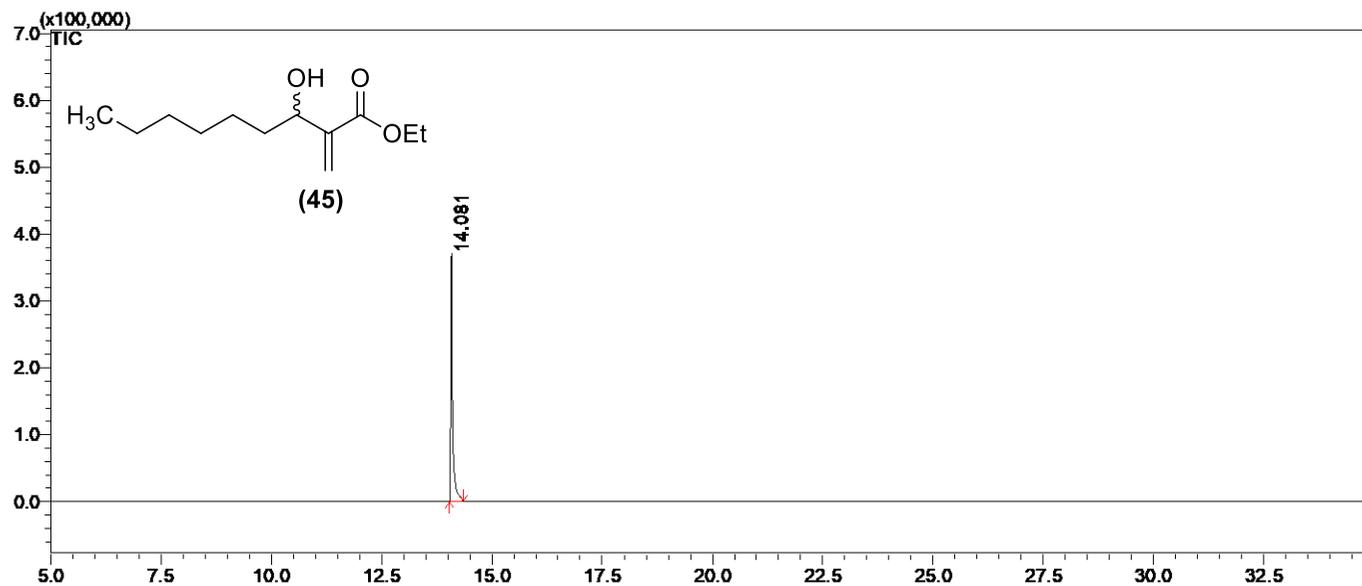
Espectro de RMN-¹H de (45) em CDCl₃



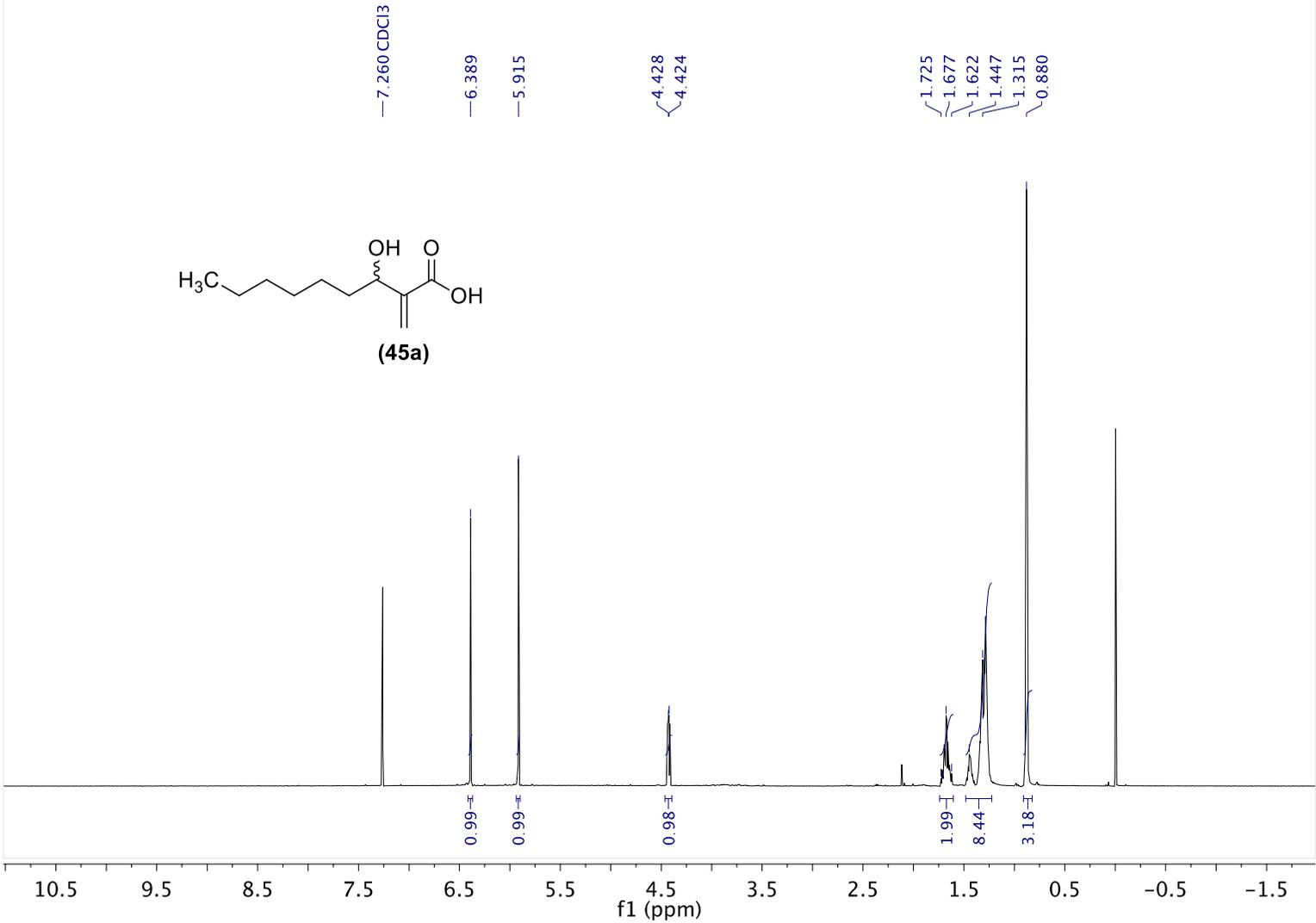
Espectro de RMN-¹³C de (45) em CDCl₃



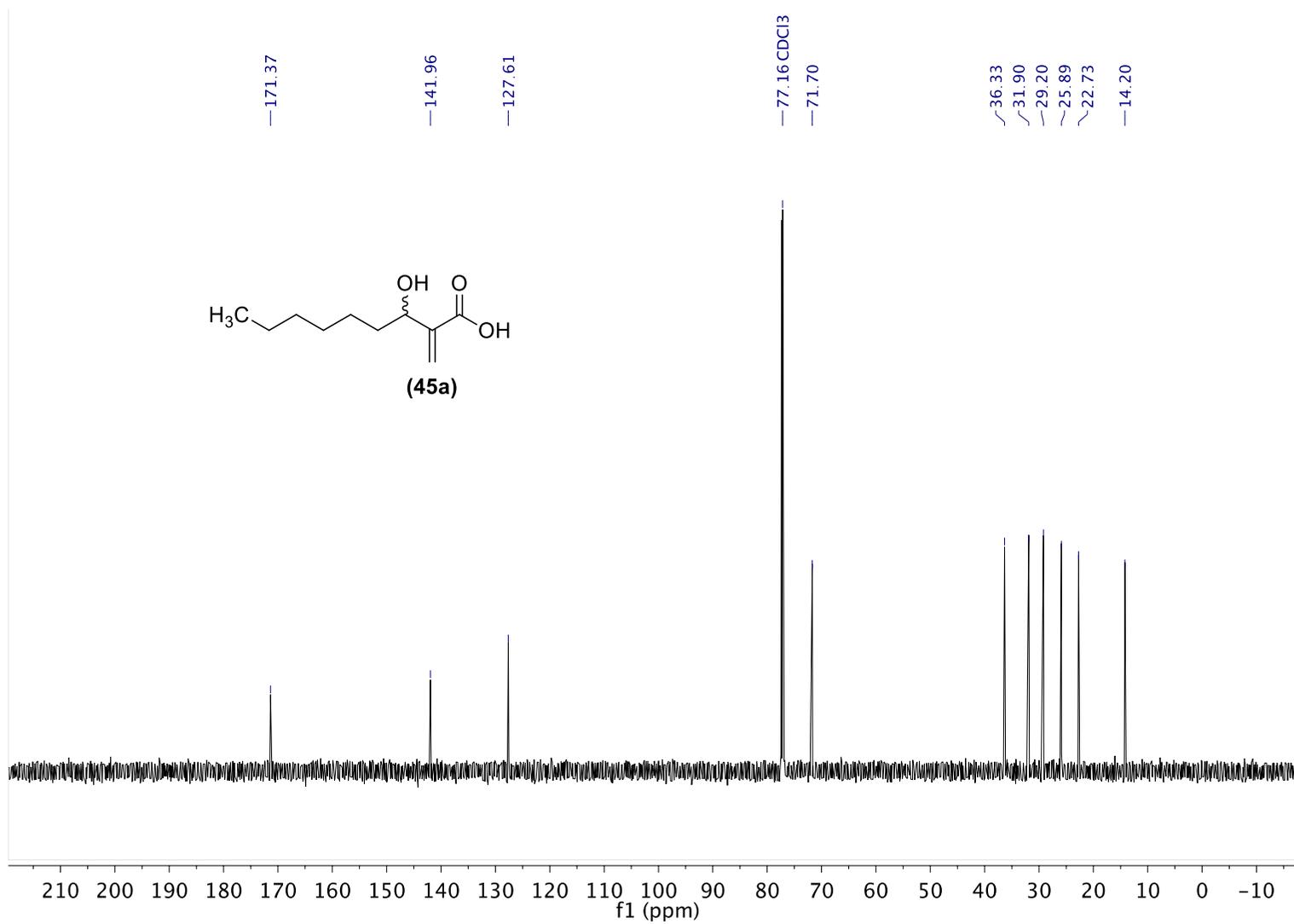
Perfil de CG e EM-IE de (45)



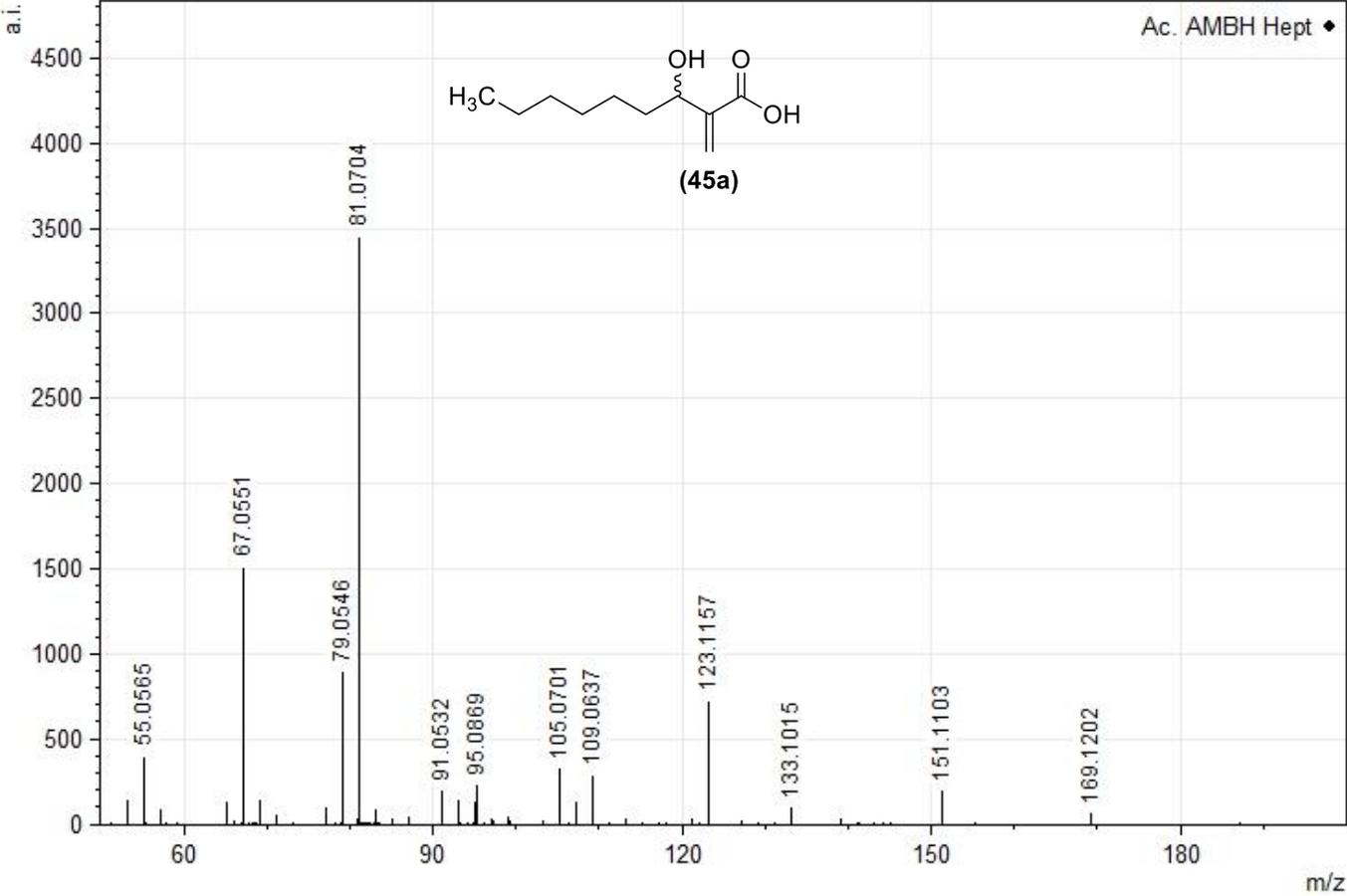
Espectro de RMN-¹H de (45a) em CDCl₃



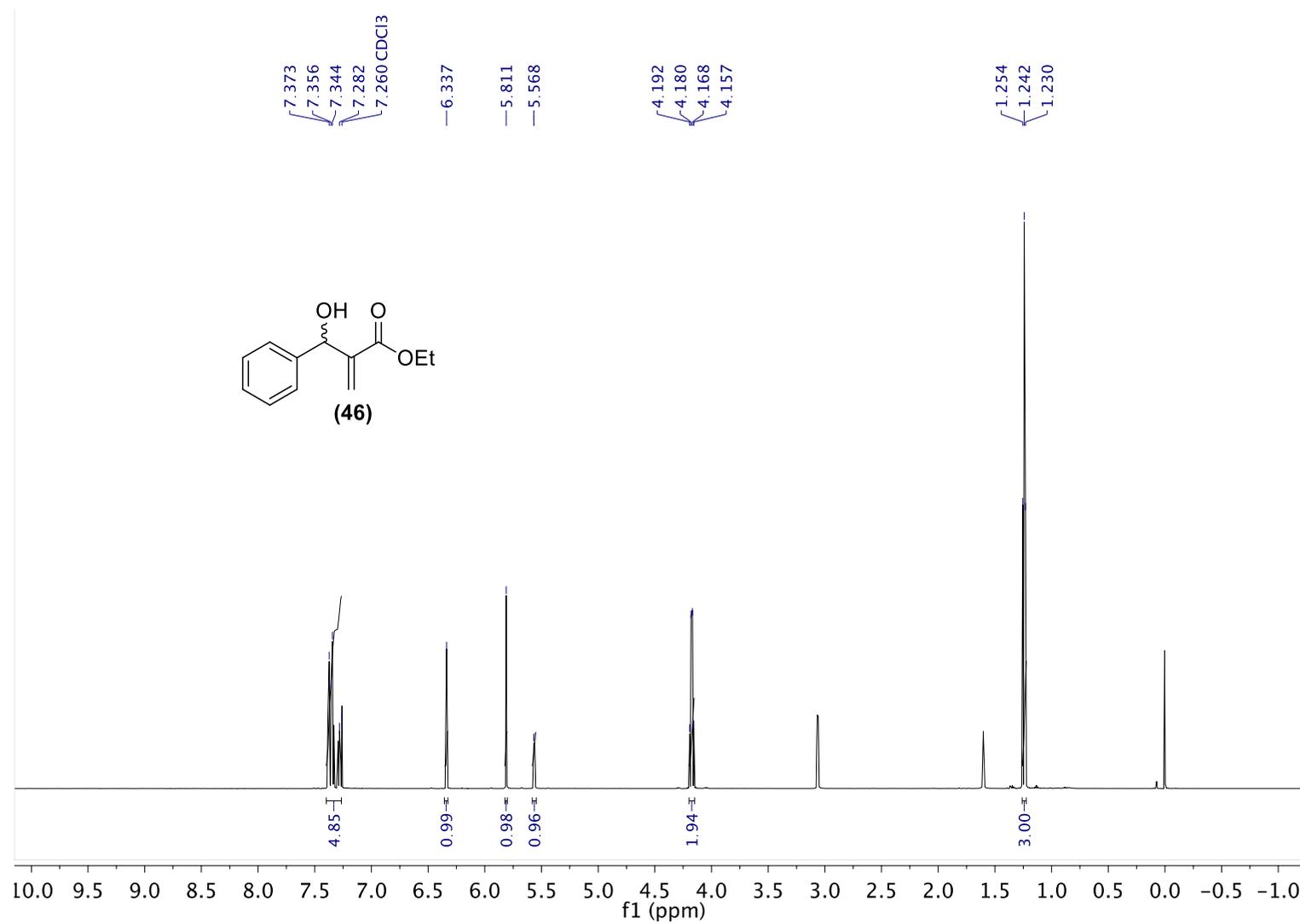
Espectro de RMN-¹³C de (45a) em CDCl₃



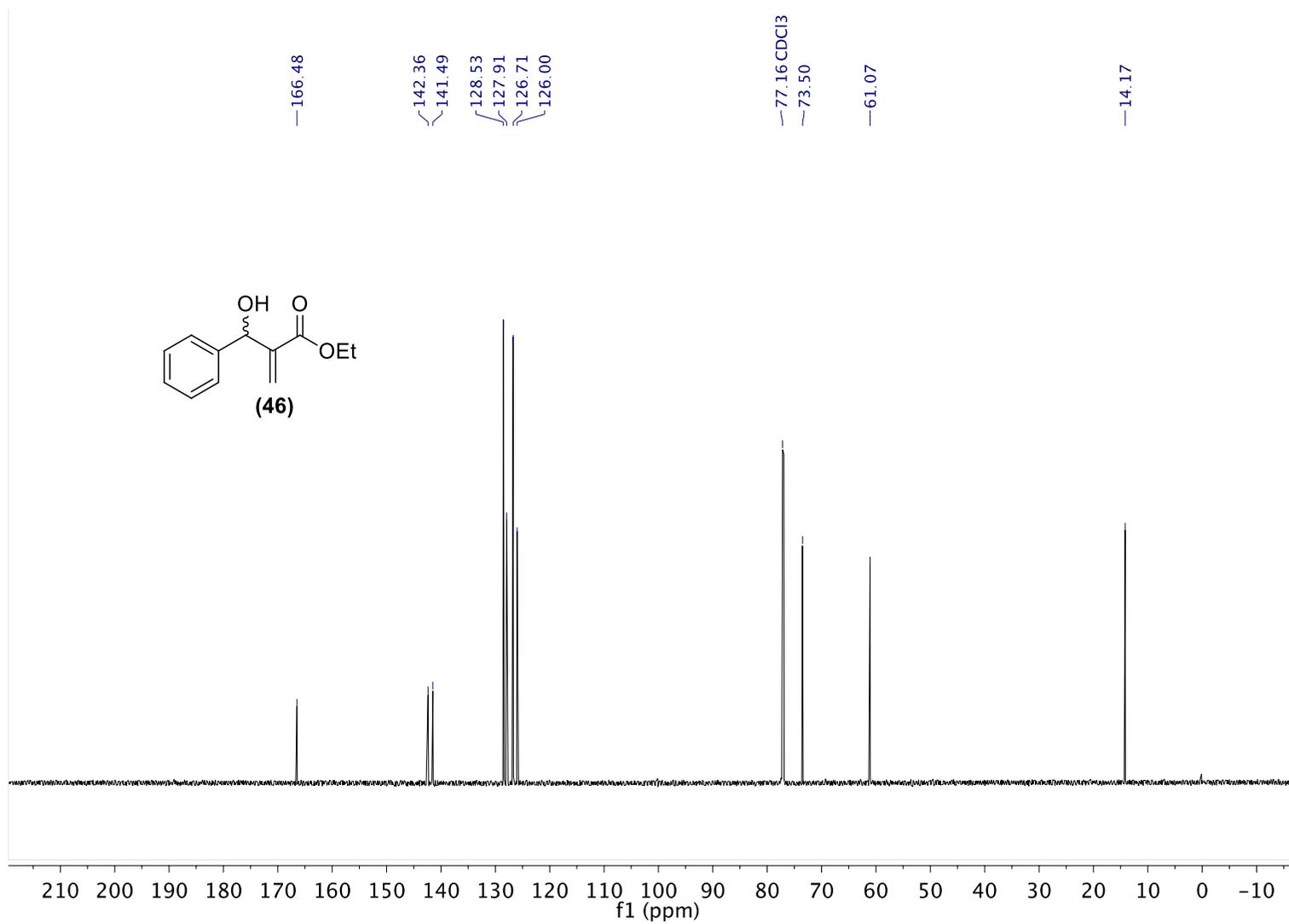
Espectro AR-MS/MS de (45a)



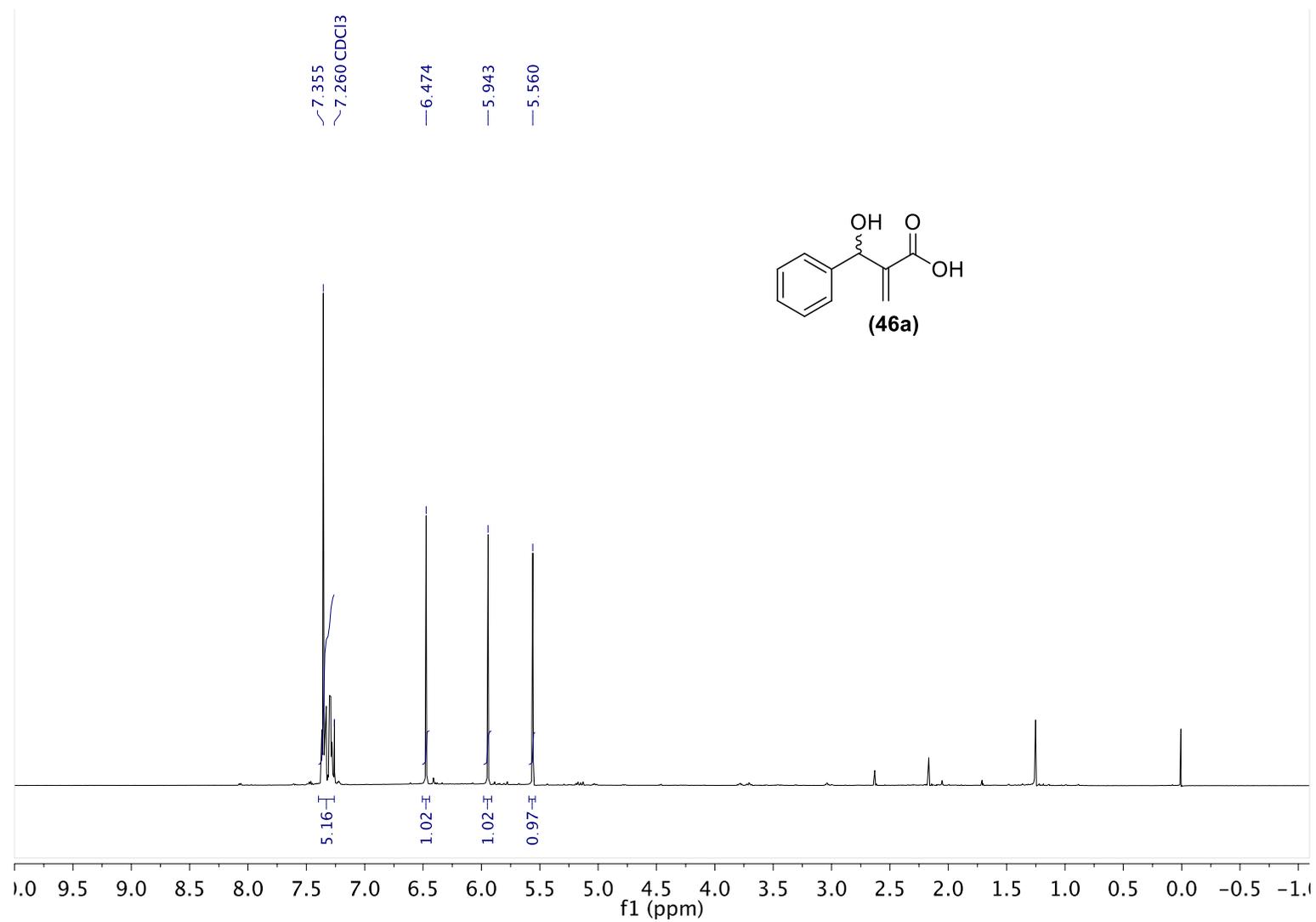
Espectro de RMN-¹H de (46) em CDCl₃



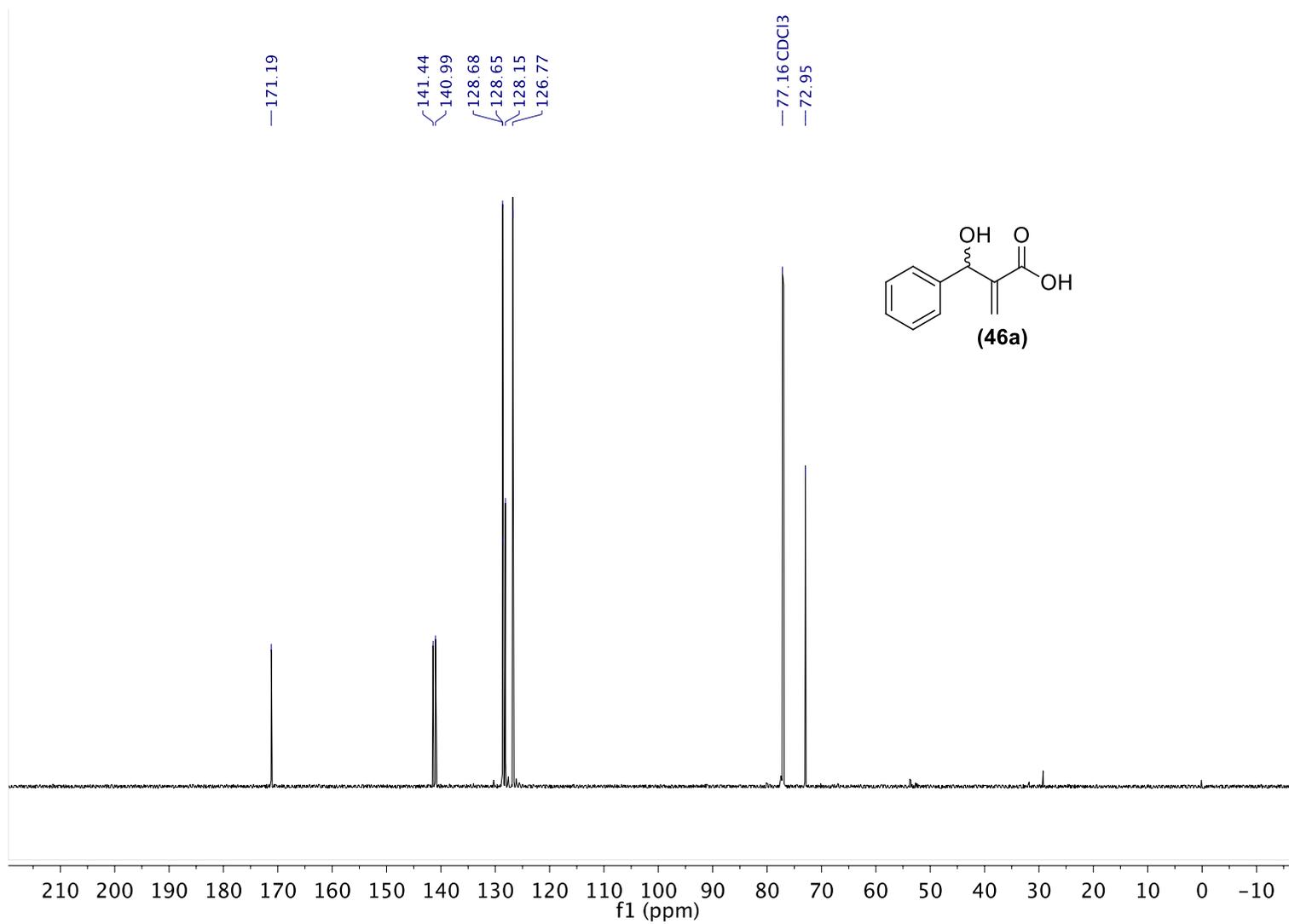
Espectro de RMN-¹³C de **(46)** em CDCl₃



Espectro de RMN-¹H de **(46a)** em CDCl₃



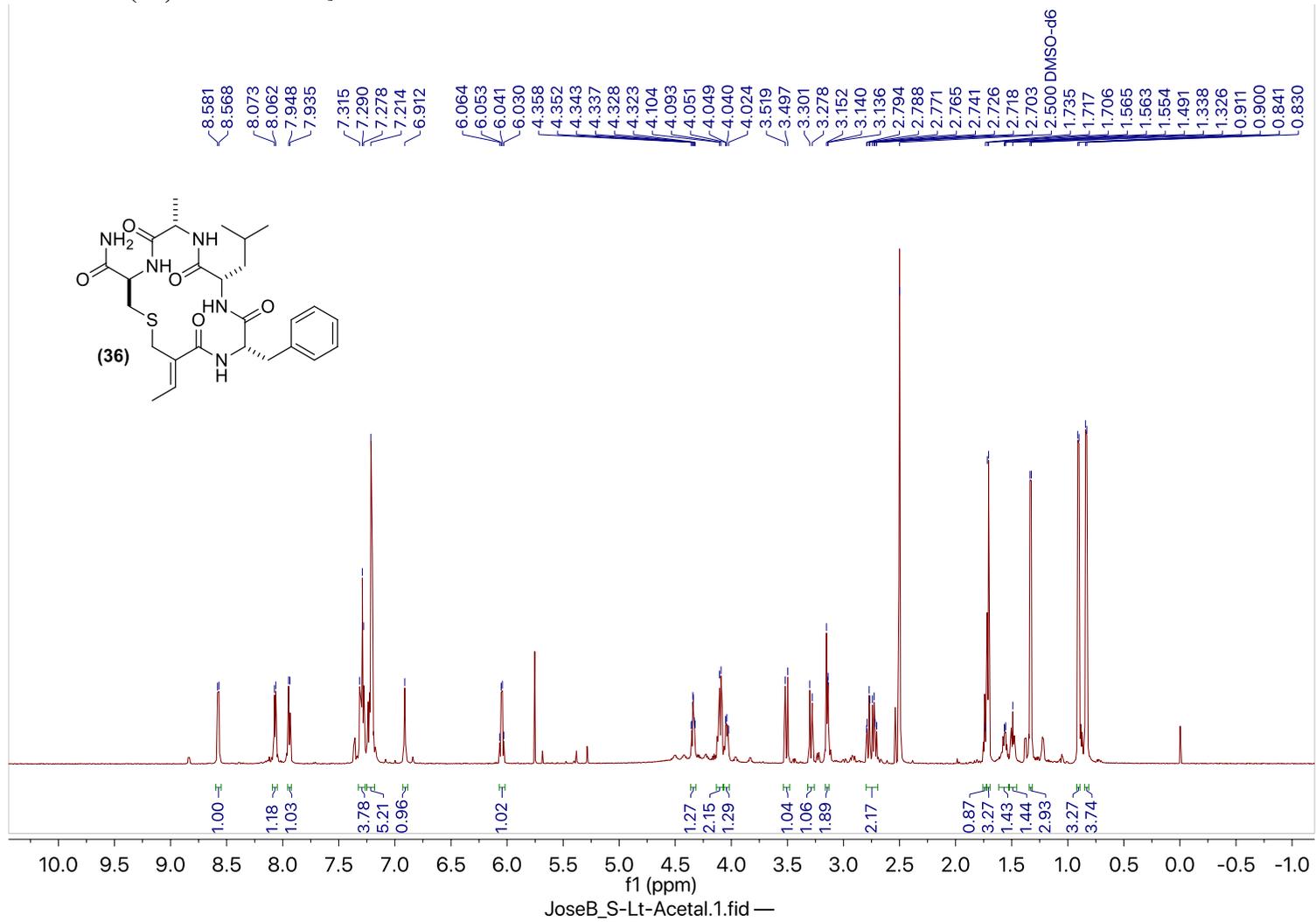
Espectro de RMN-¹³C de **(46a)** em CDCl₃



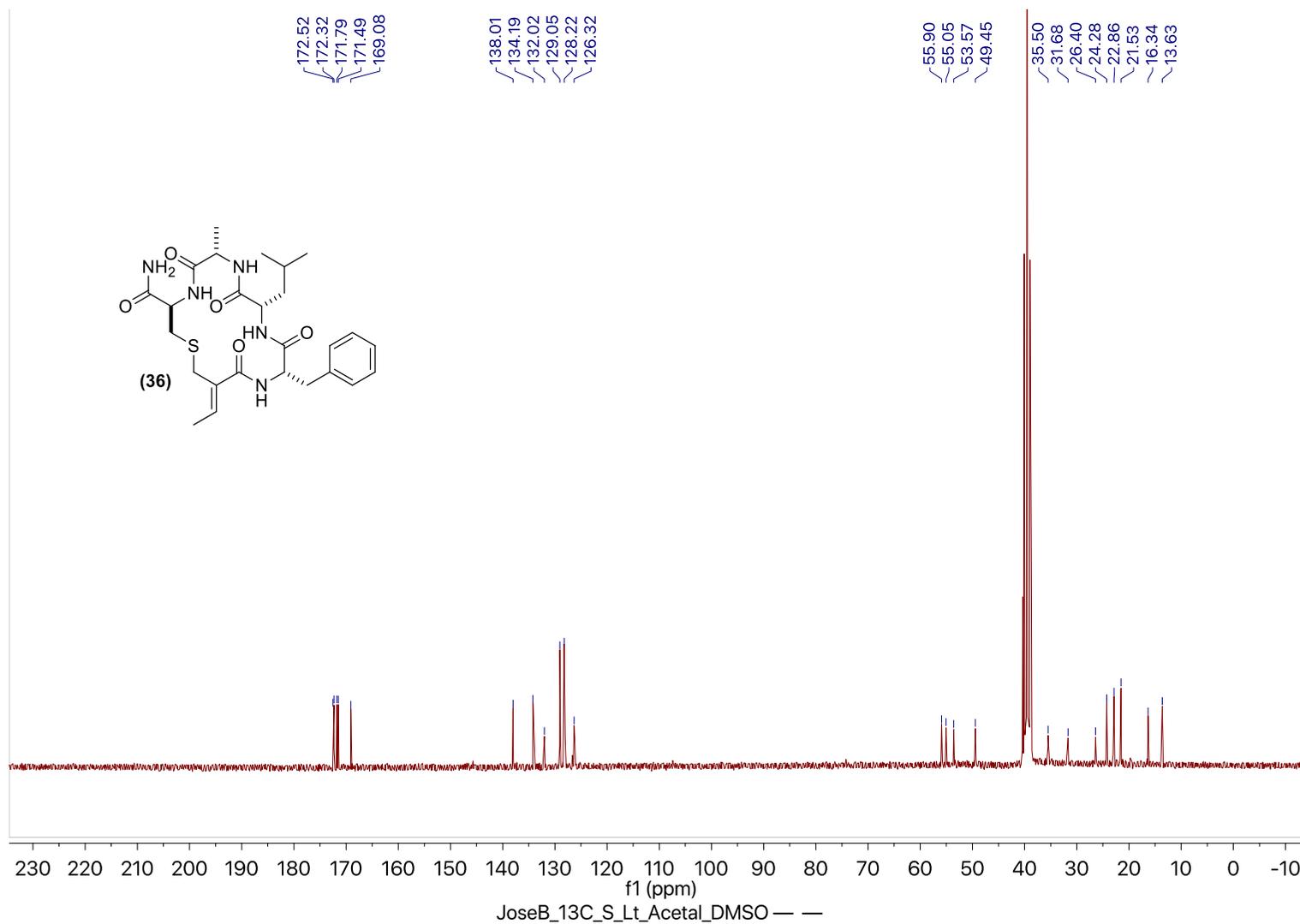
ANEXO III: Dados de caracterização para os compostos peptidomiméticos

Dados de caracterização para o composto (36).

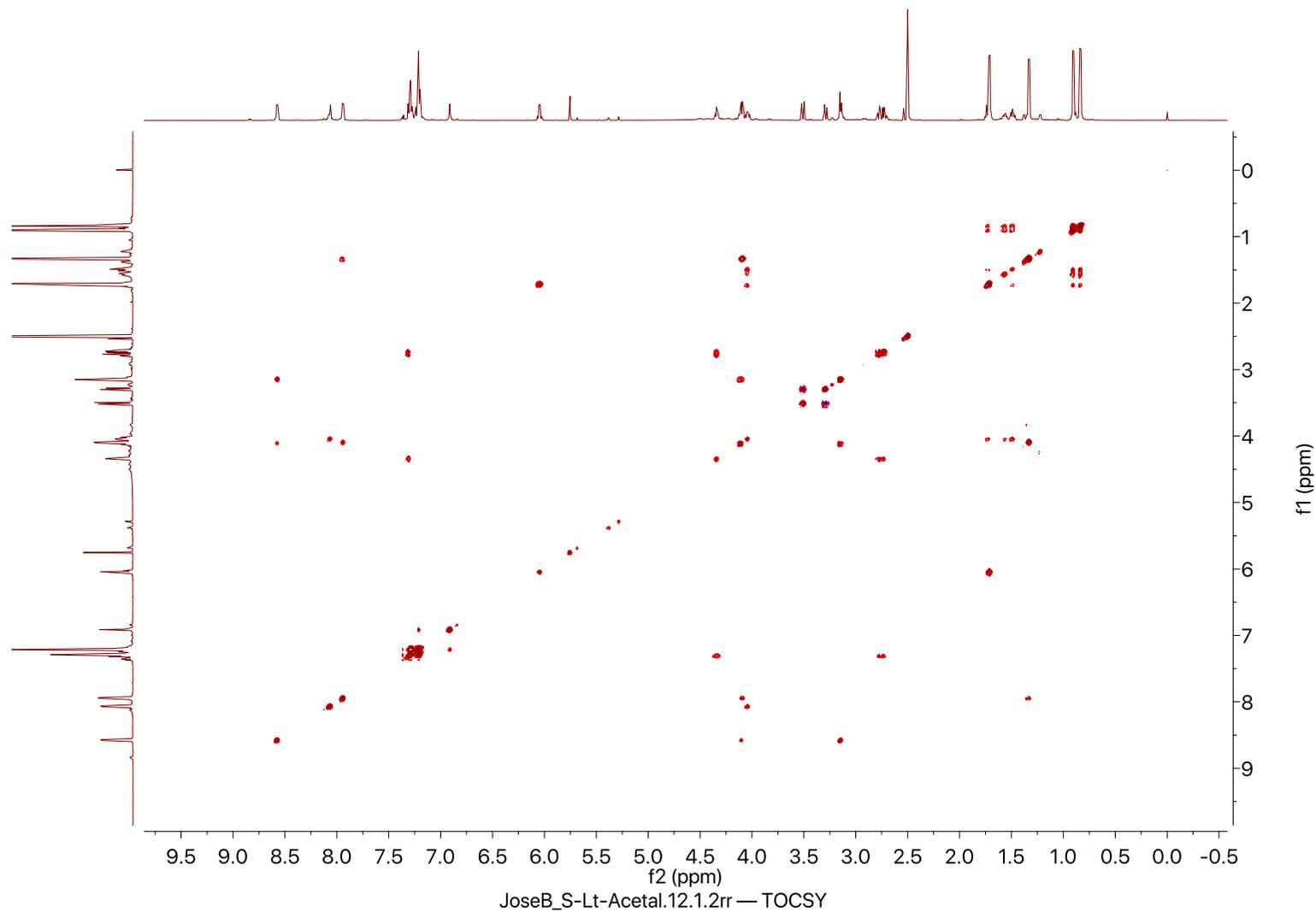
Espectro de RMN-¹H de (36) em DMSO-*d*₆



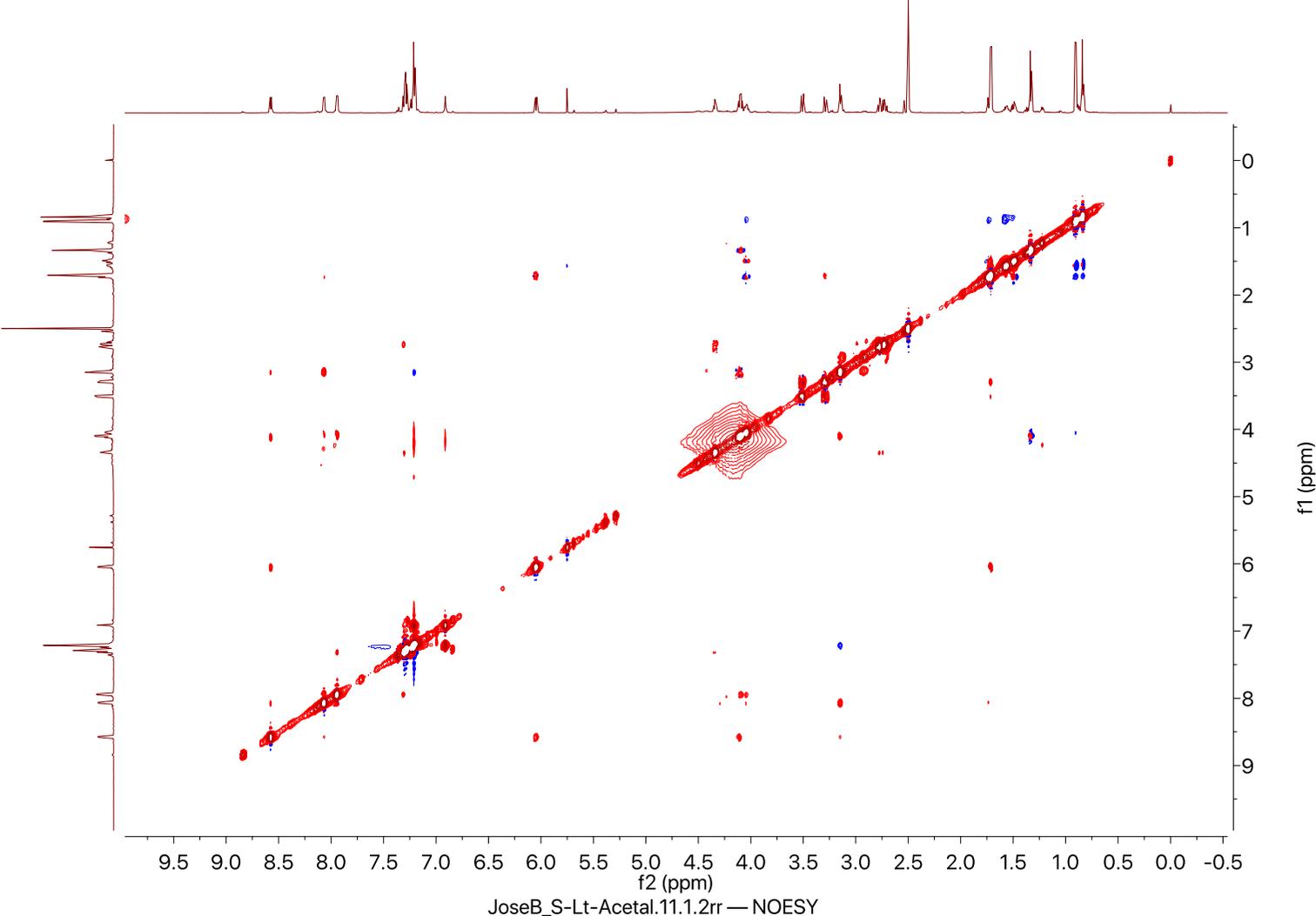
Espectro de RMN-¹³C de **(36)** em DMSO-*d*₆



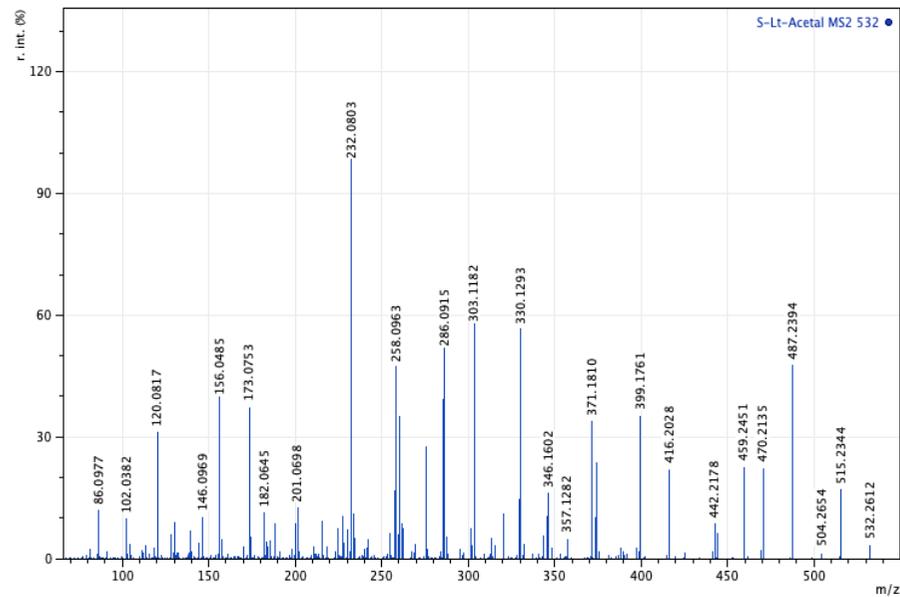
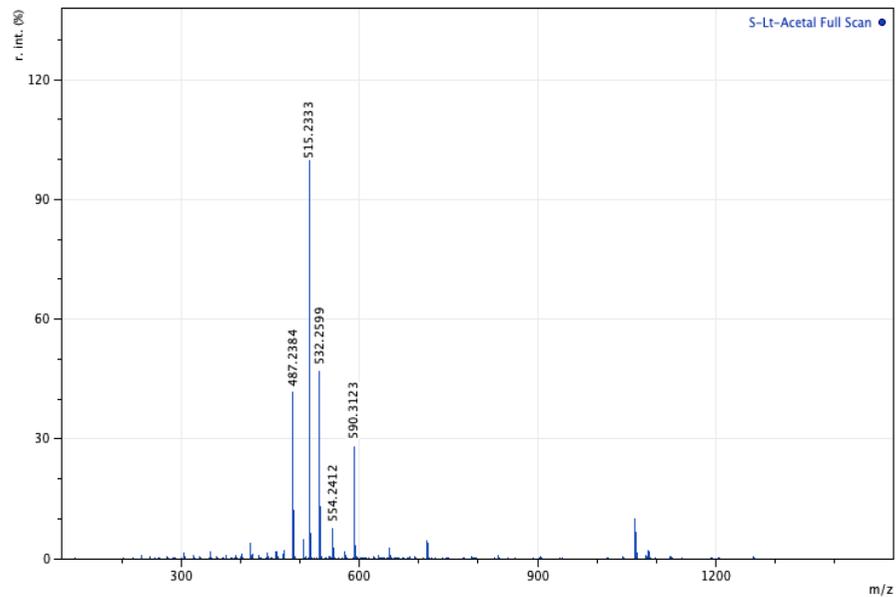
Espectro *TOCSY* de **(36)** em $\text{DMSO-}d_6$



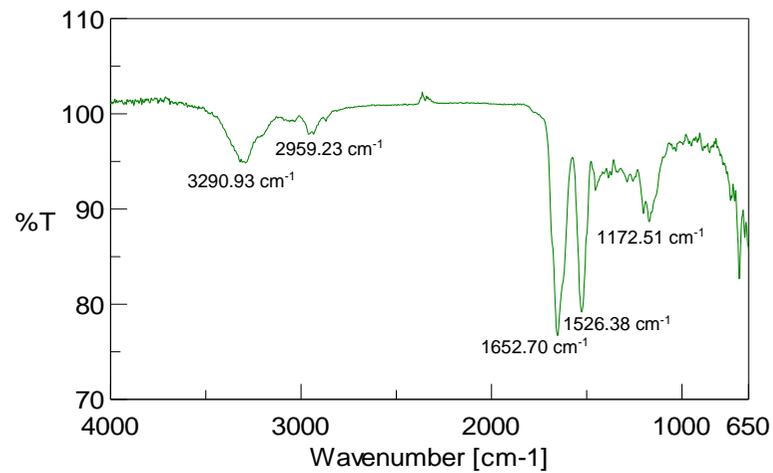
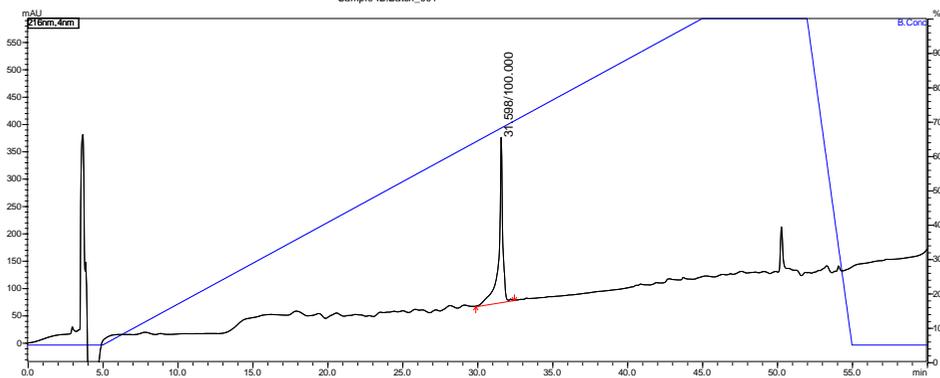
Espectro *NOESY* de **(36)** em $\text{DMSO-}d_6$



Espectros EMAR-IES-TOF, AR-MS/MS, IV-ATR e perfil de CLAE para o composto (36)

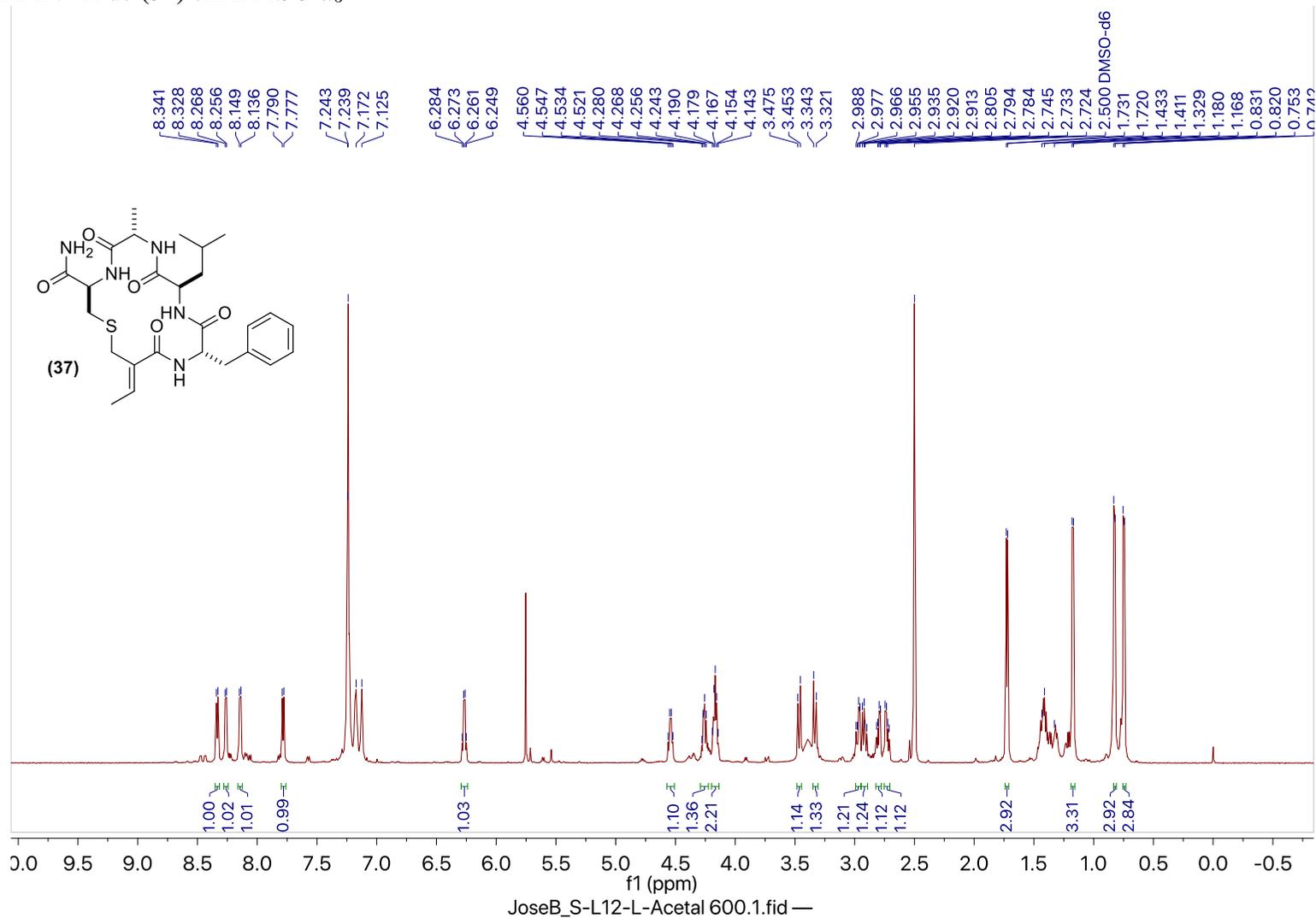


Datafile Name: 2018.03.15-Pur-S-Lt-Acetal_15032019_001.lcd
 Sample Name: Pur-S-Lt-Acetal
 Sample ID: Batch_001

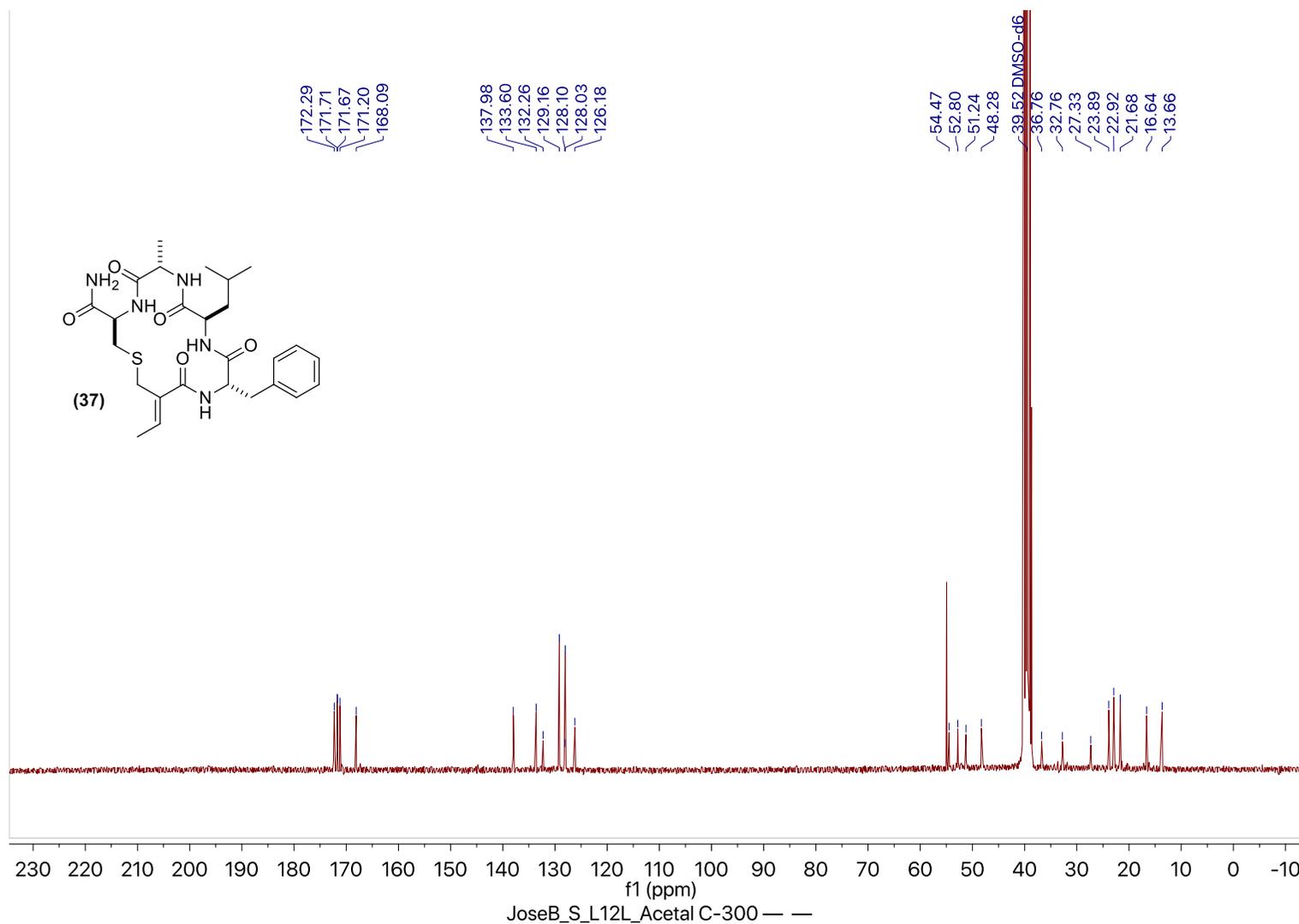


Dados de caracterização para o composto (37)

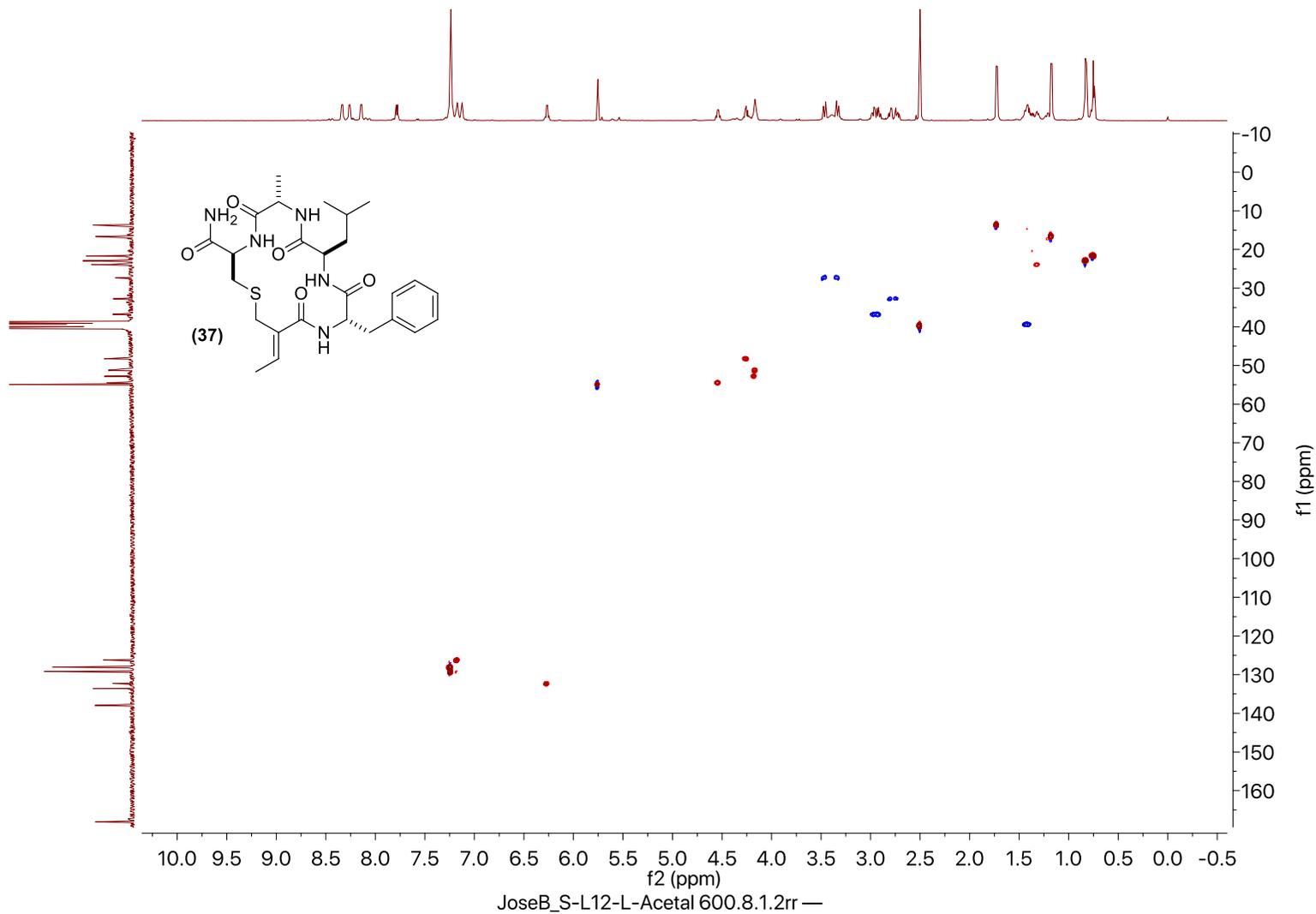
Espectro de RMN-¹H de (37) em DMSO-*d*₆



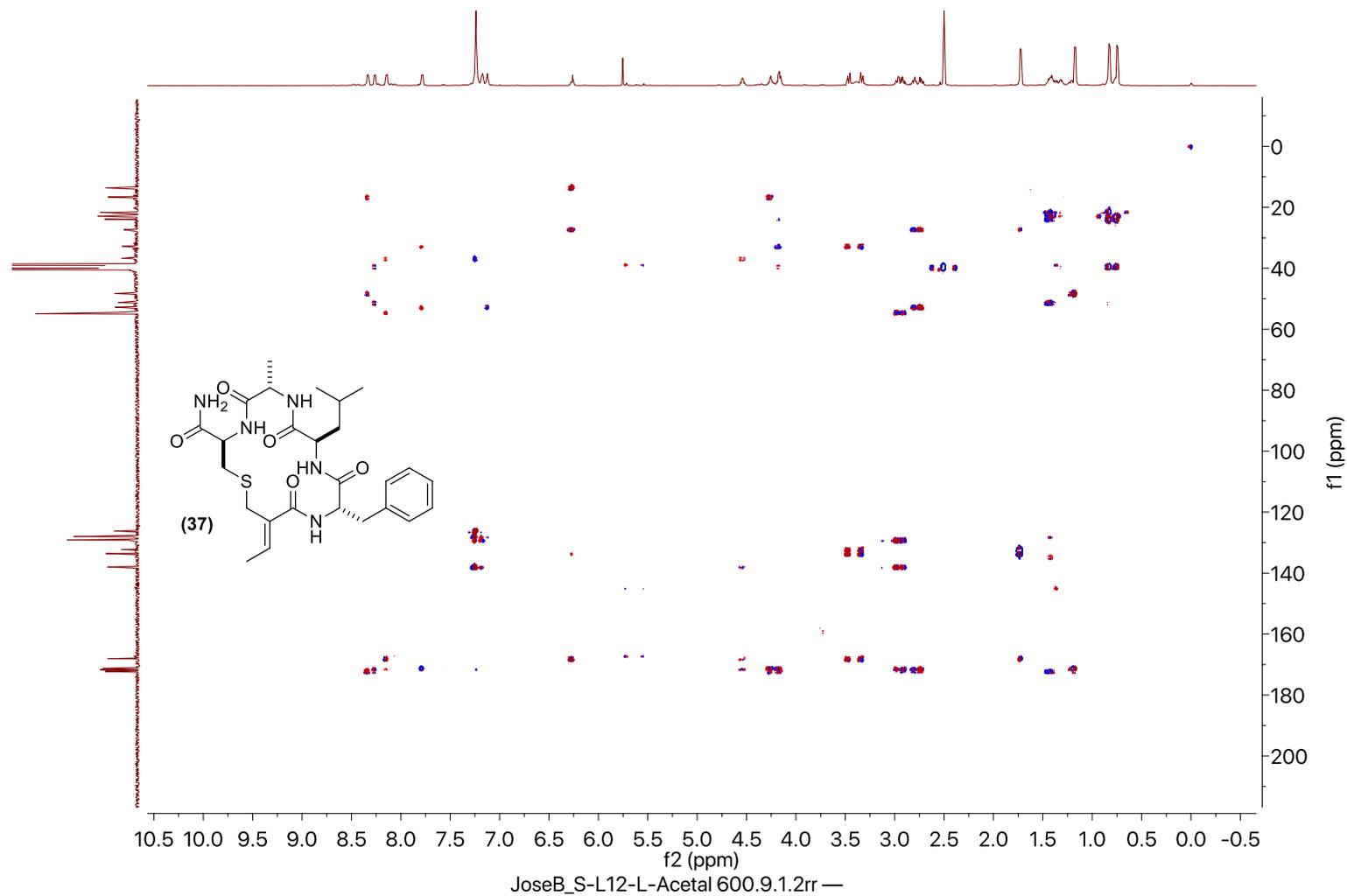
Espectro de RMN-¹³C de (37) em DMSO-*d*₆



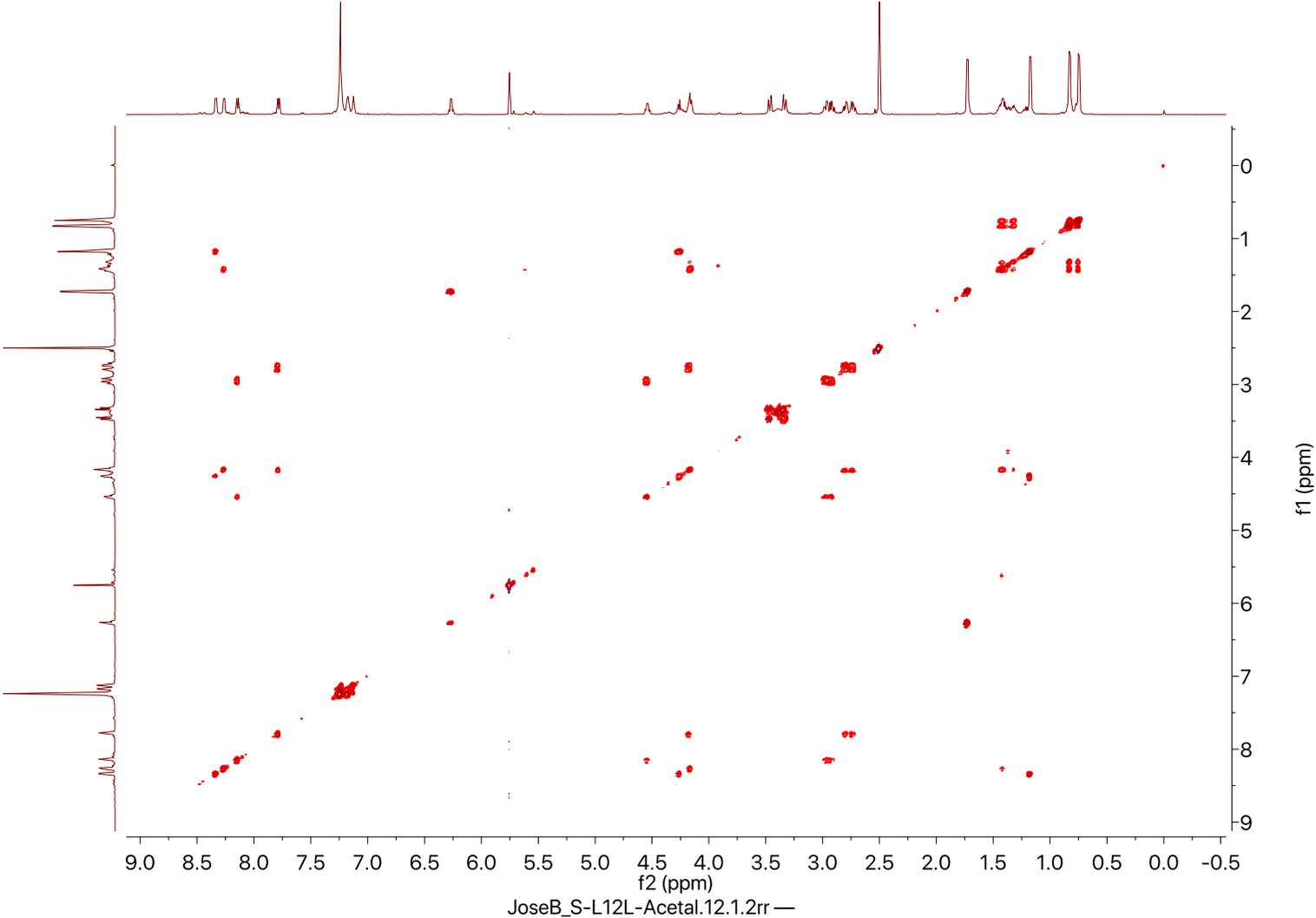
Espectro *HSQC* de (37) em DMSO-*d*₆



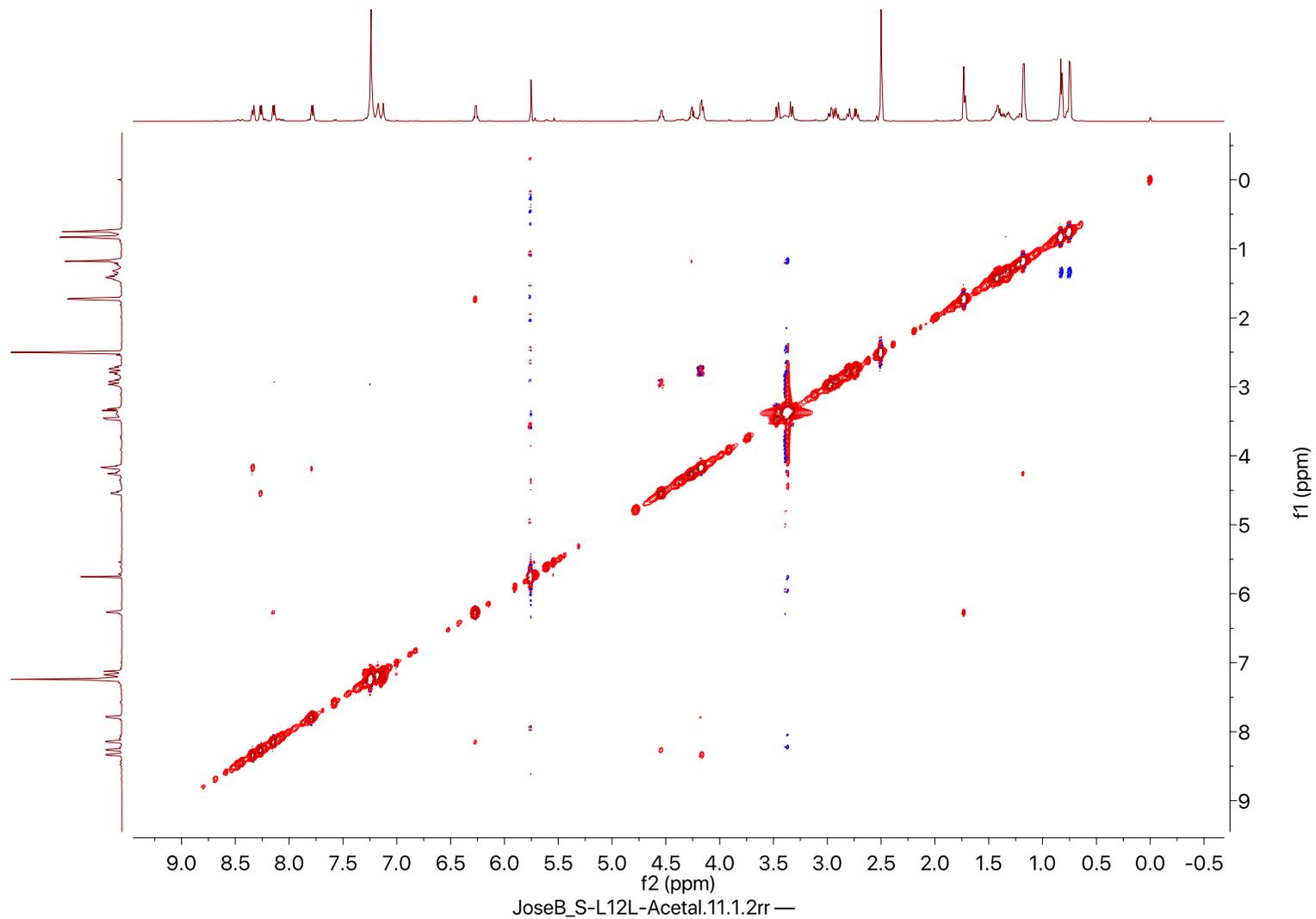
Espectro *HMBC* de (37) em DMSO-*d*₆



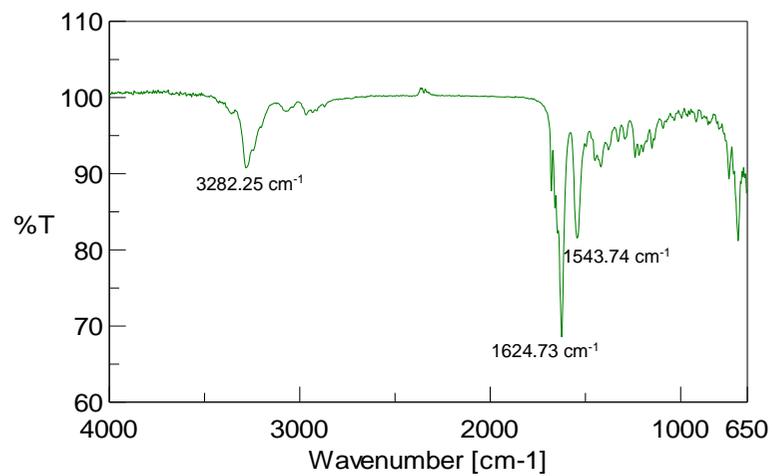
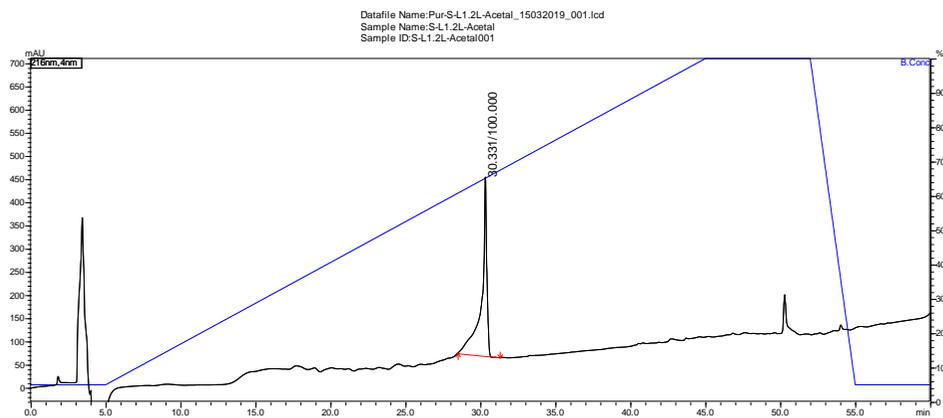
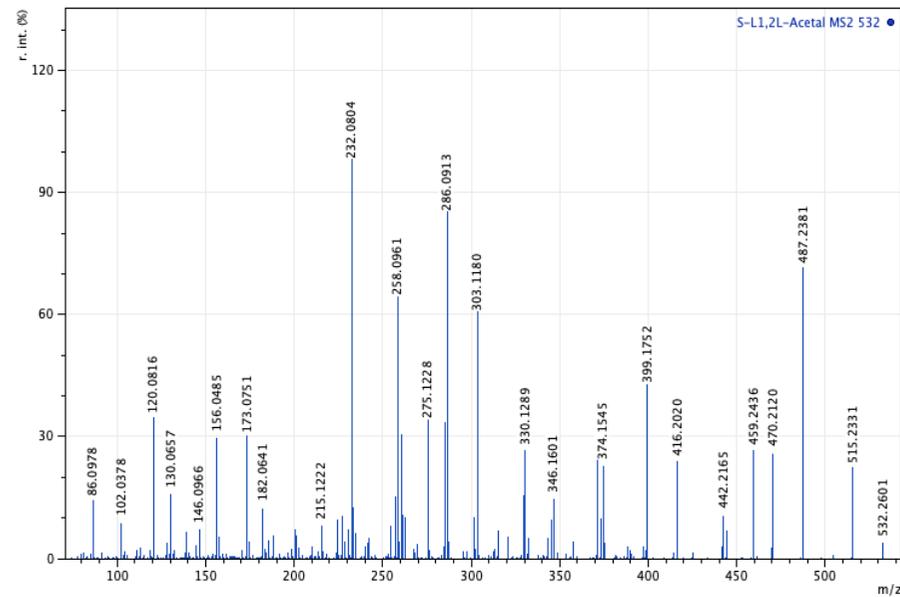
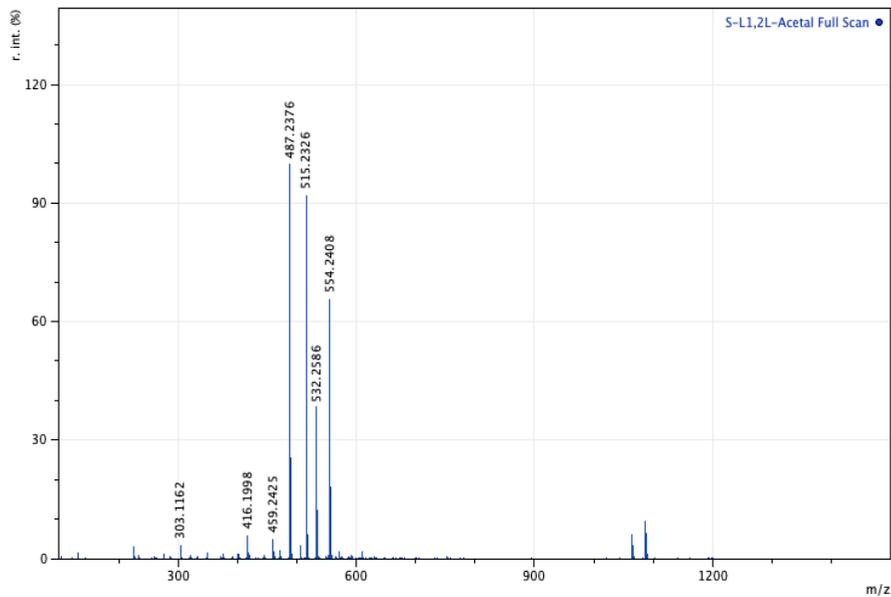
Espectro *TOCSY* de (37) em DMSO-*d*₆



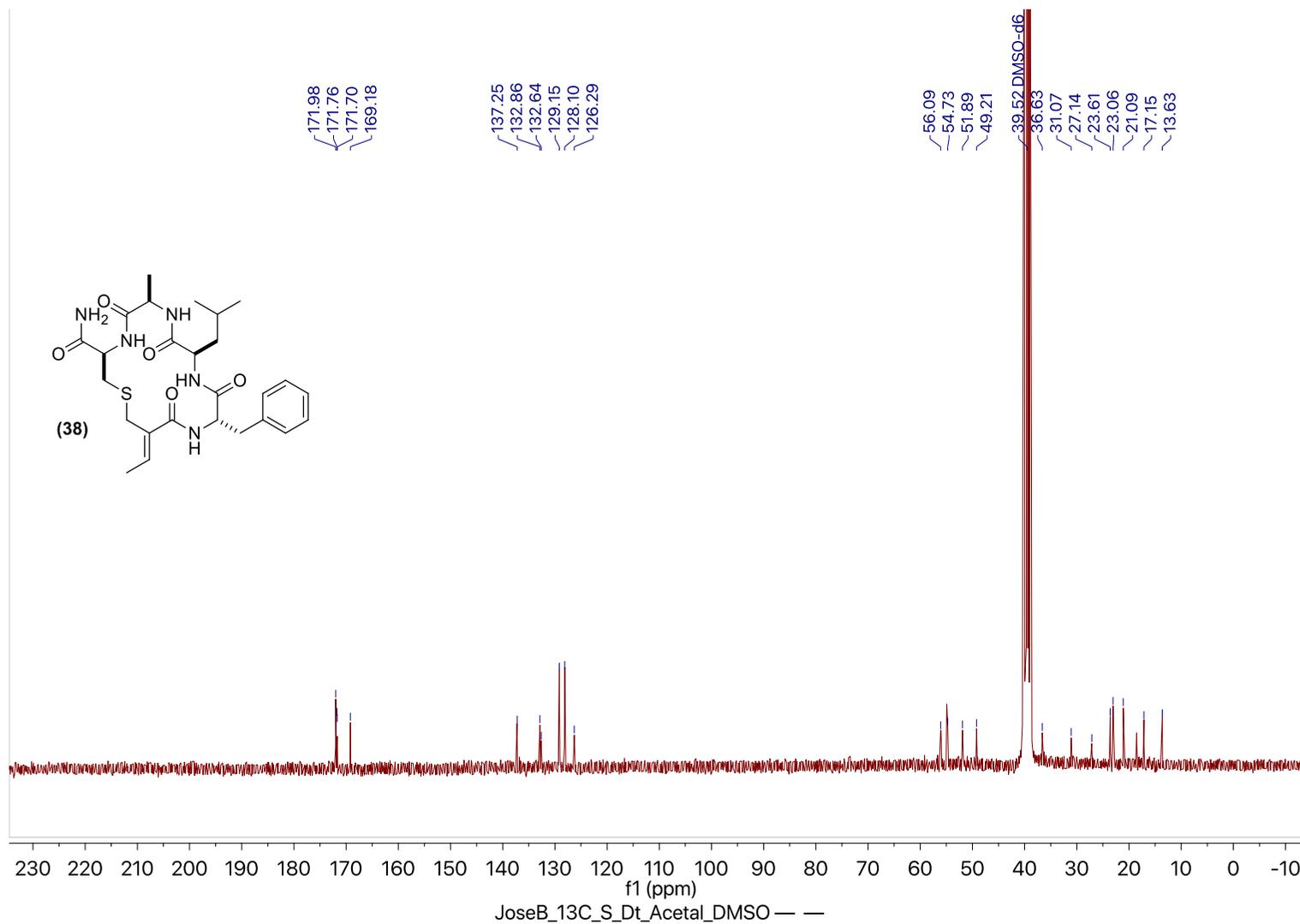
Espectro *NOESY* de (37) em DMSO-*d*₆



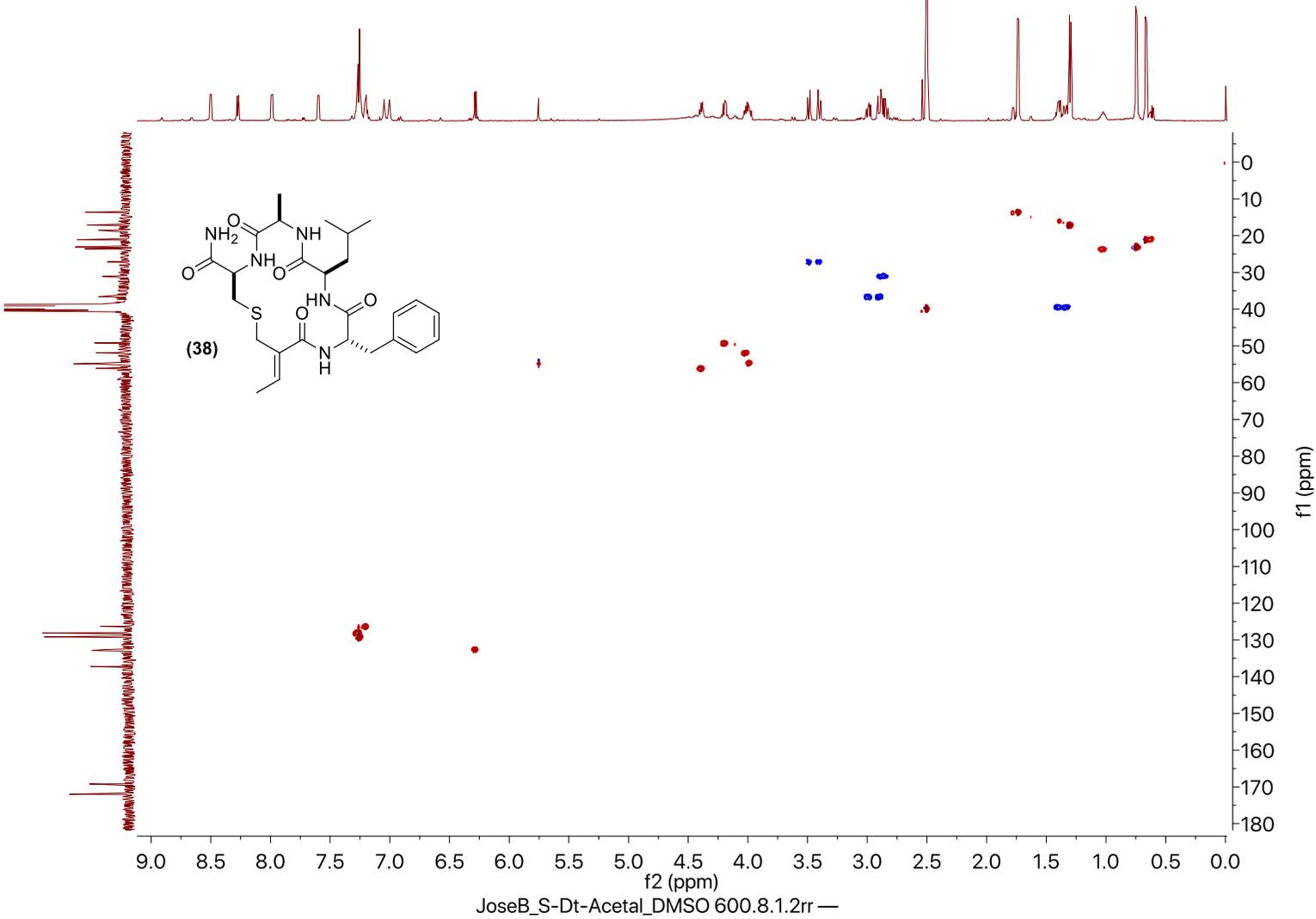
Espectros EMAR-IES-TOF, AR-MS/MS, IV-ATR e perfil de CLAE para o composto (37)



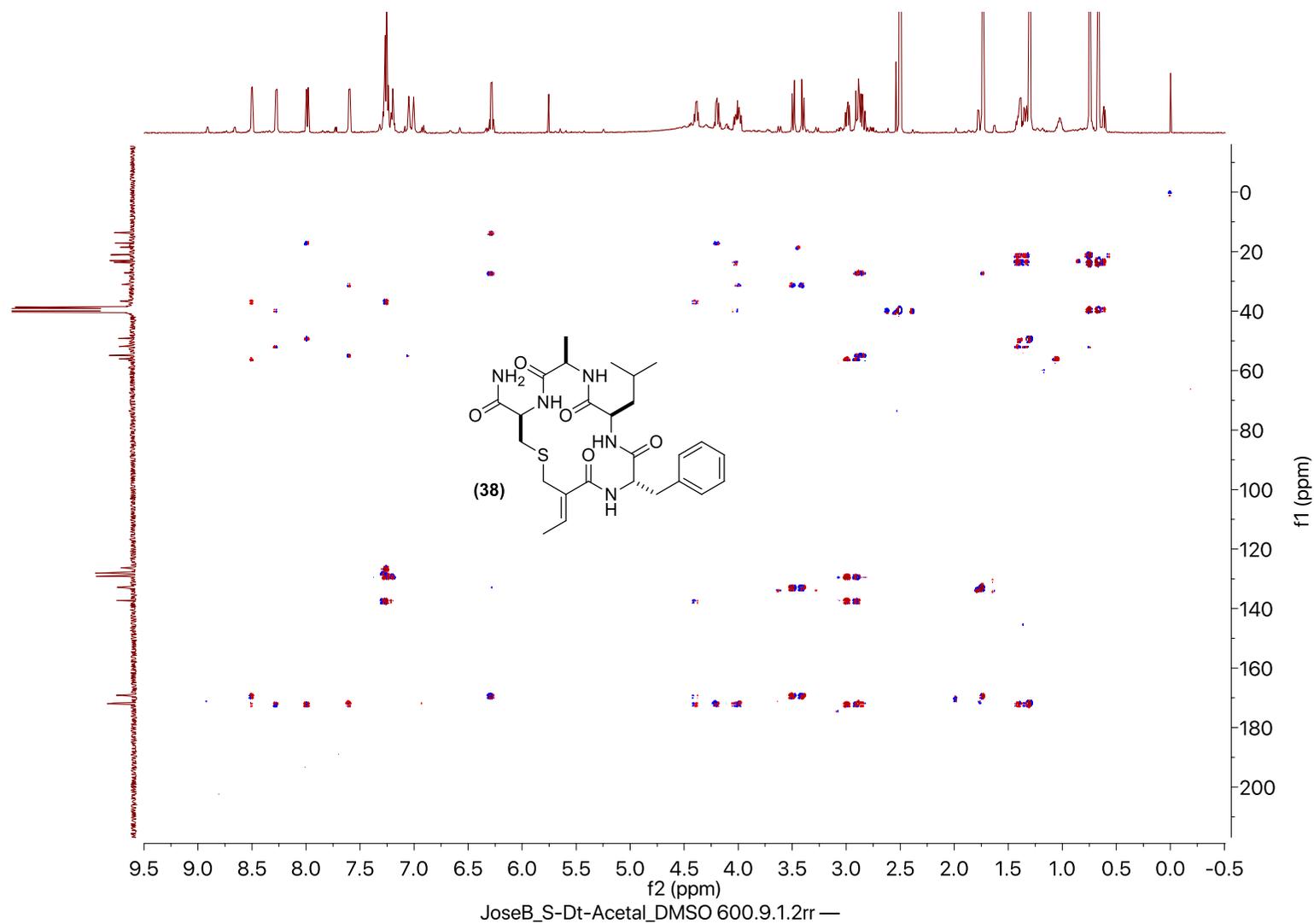
Espectro de RMN- ^{13}C de **(38)** em DMSO- d_6



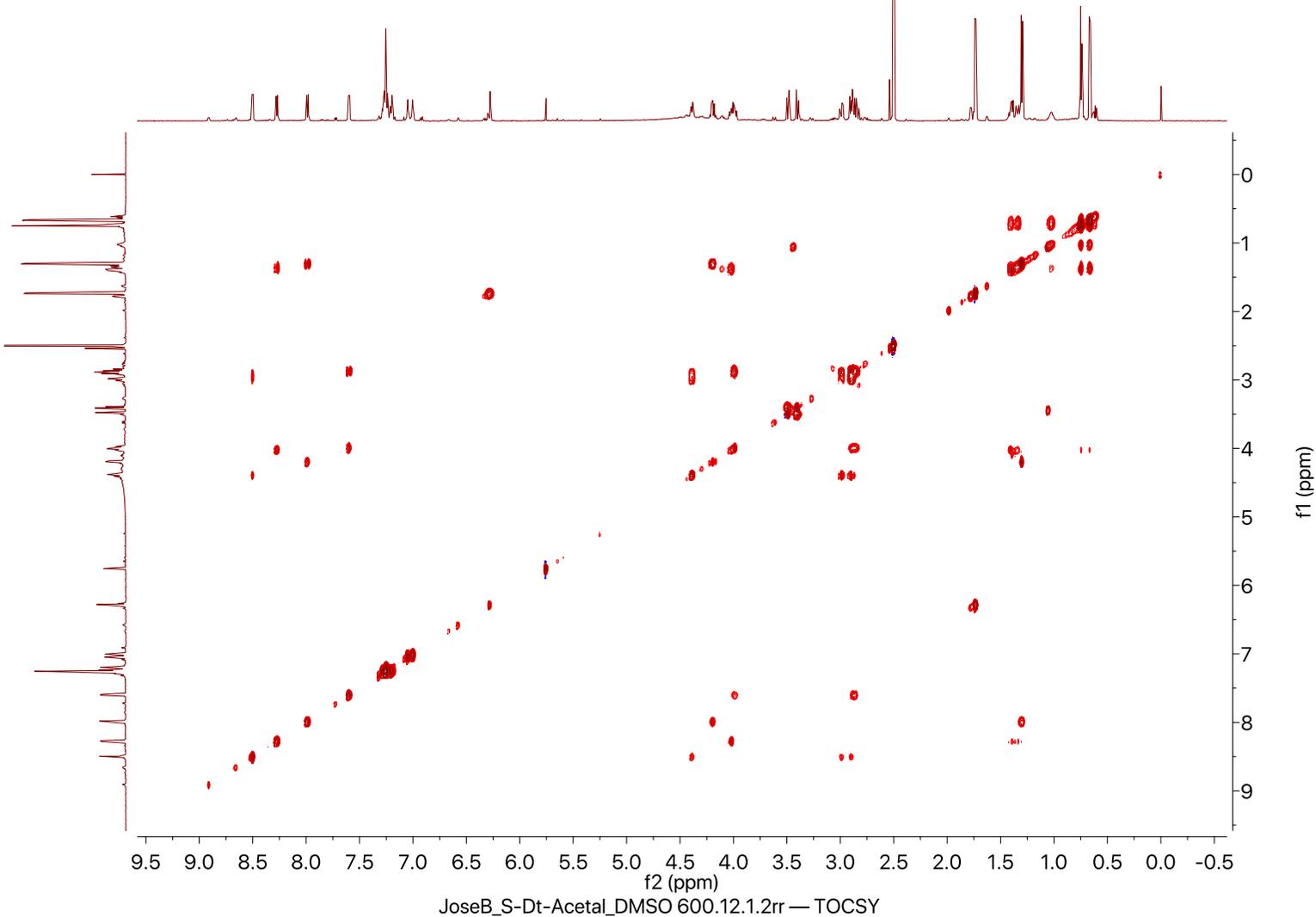
Espectro *HSQC* de (38) em DMSO-*d*₆



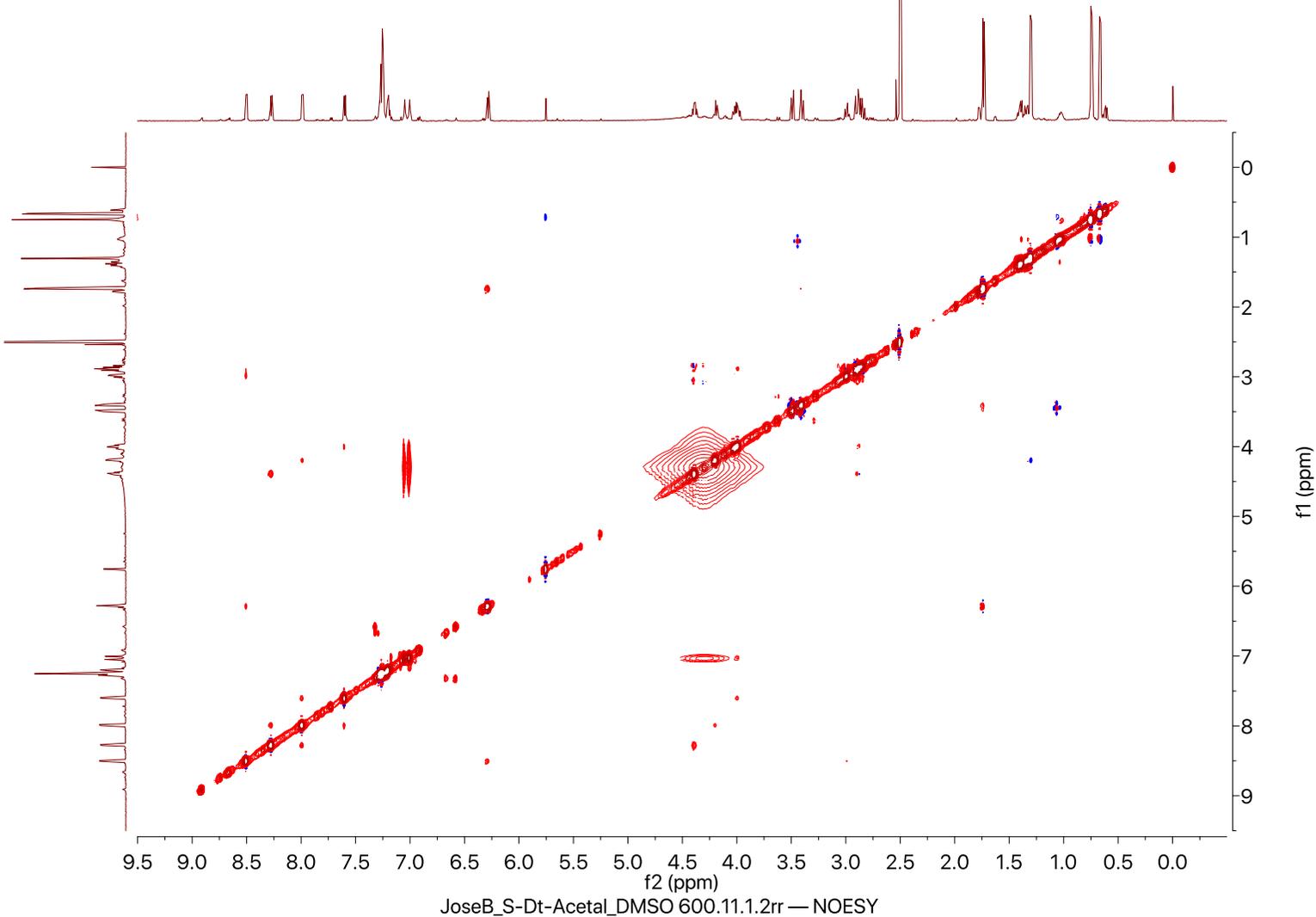
Espectro *HMBC* de **(38)** em DMSO-*d*₆



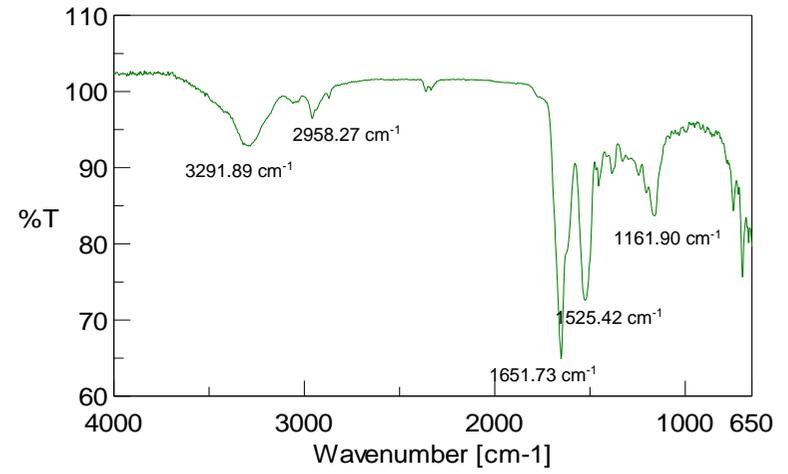
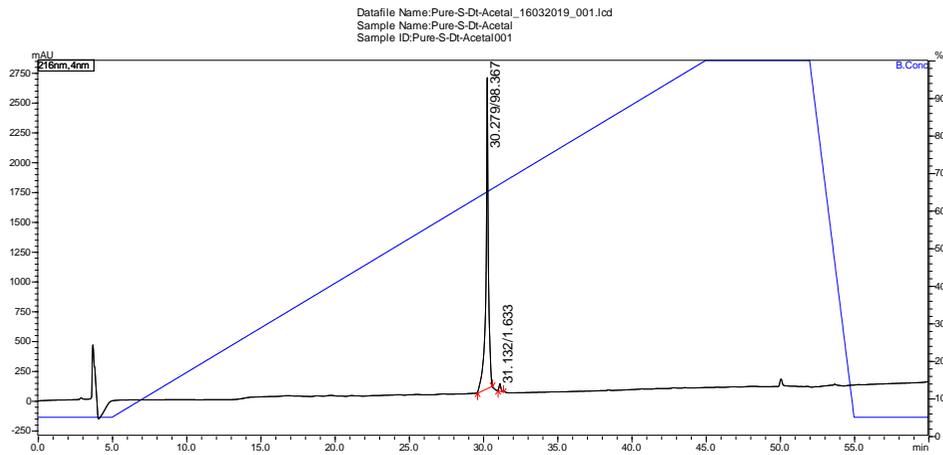
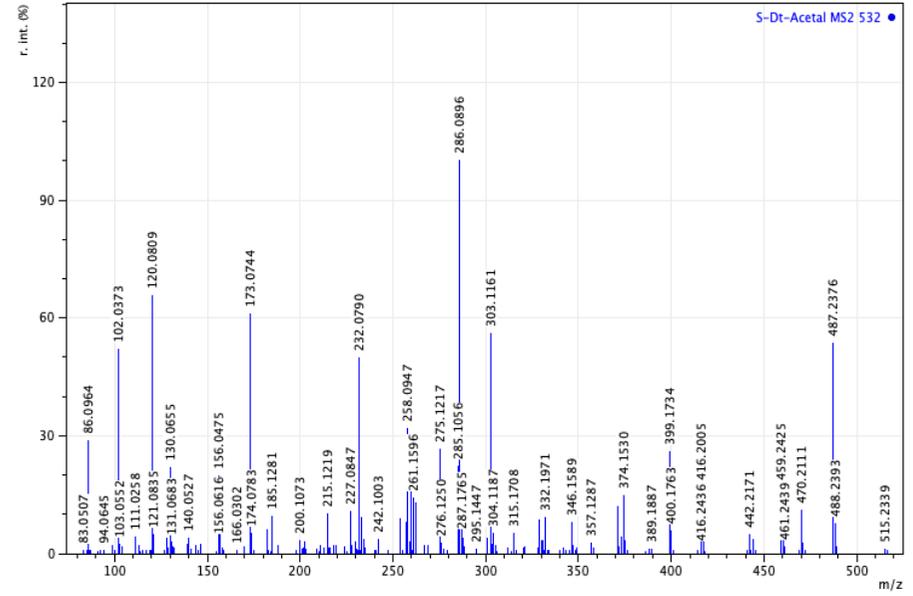
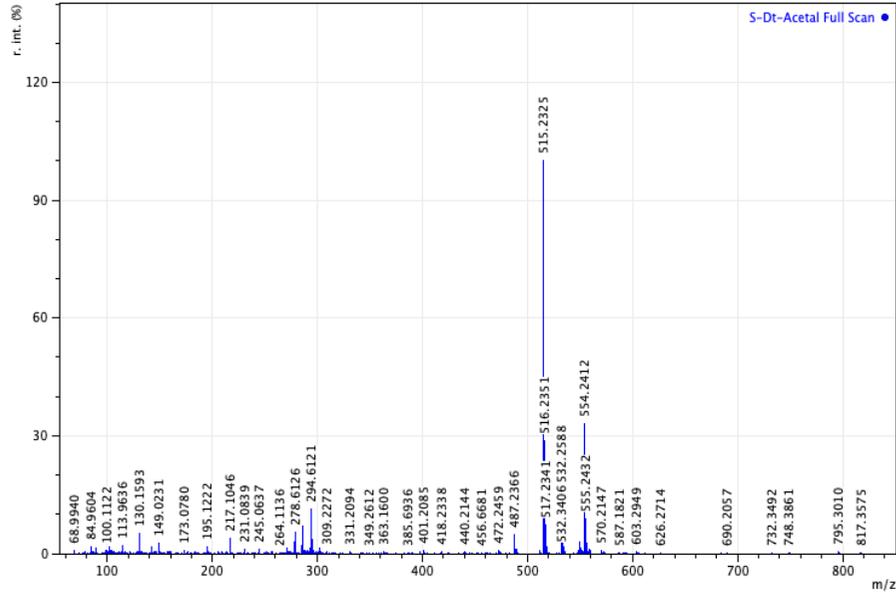
Espectro *TOCSY* de (38) em DMSO-*d*₆



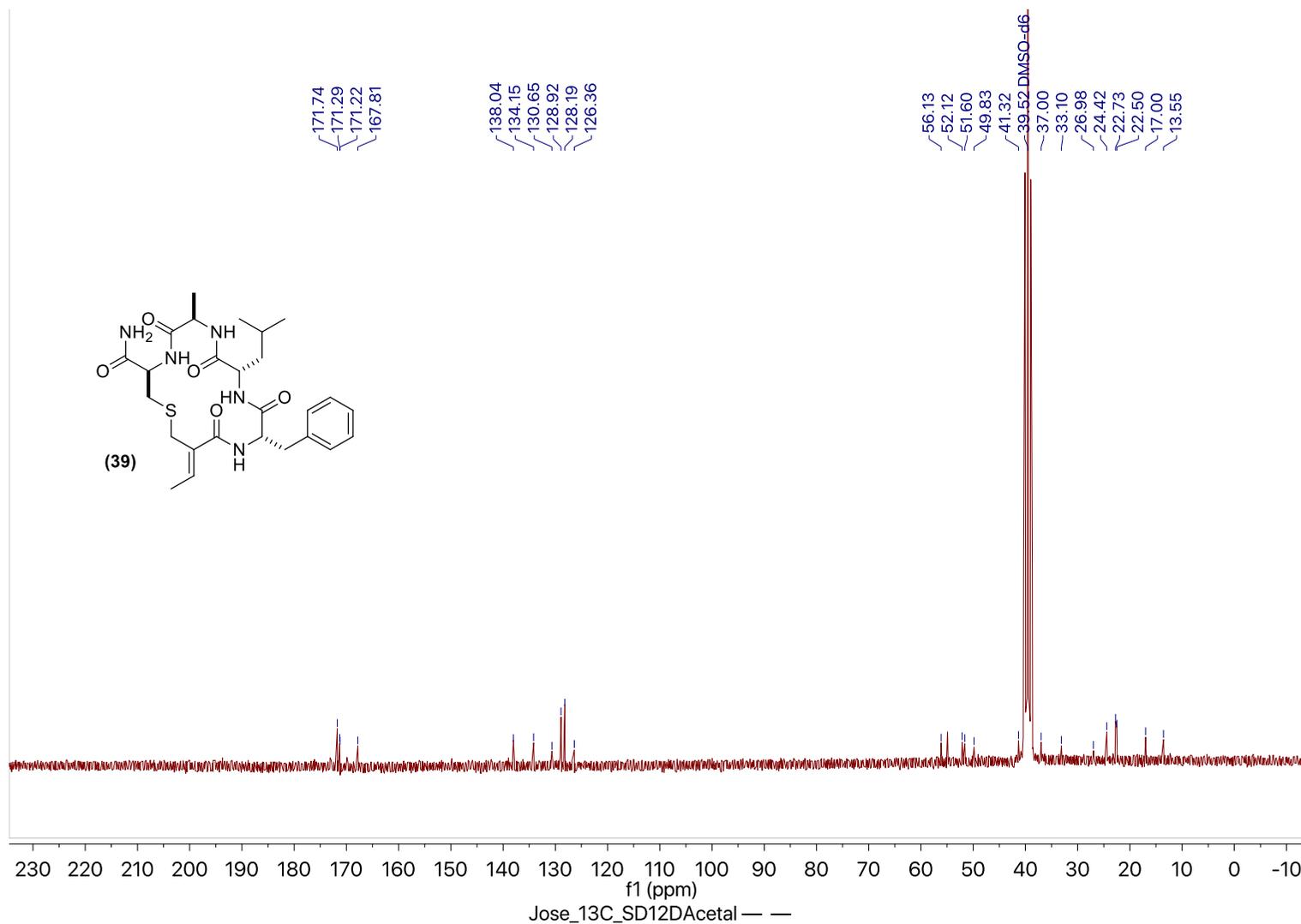
Espectro *NOESY* de **(38)** em *DMSO-d₆*



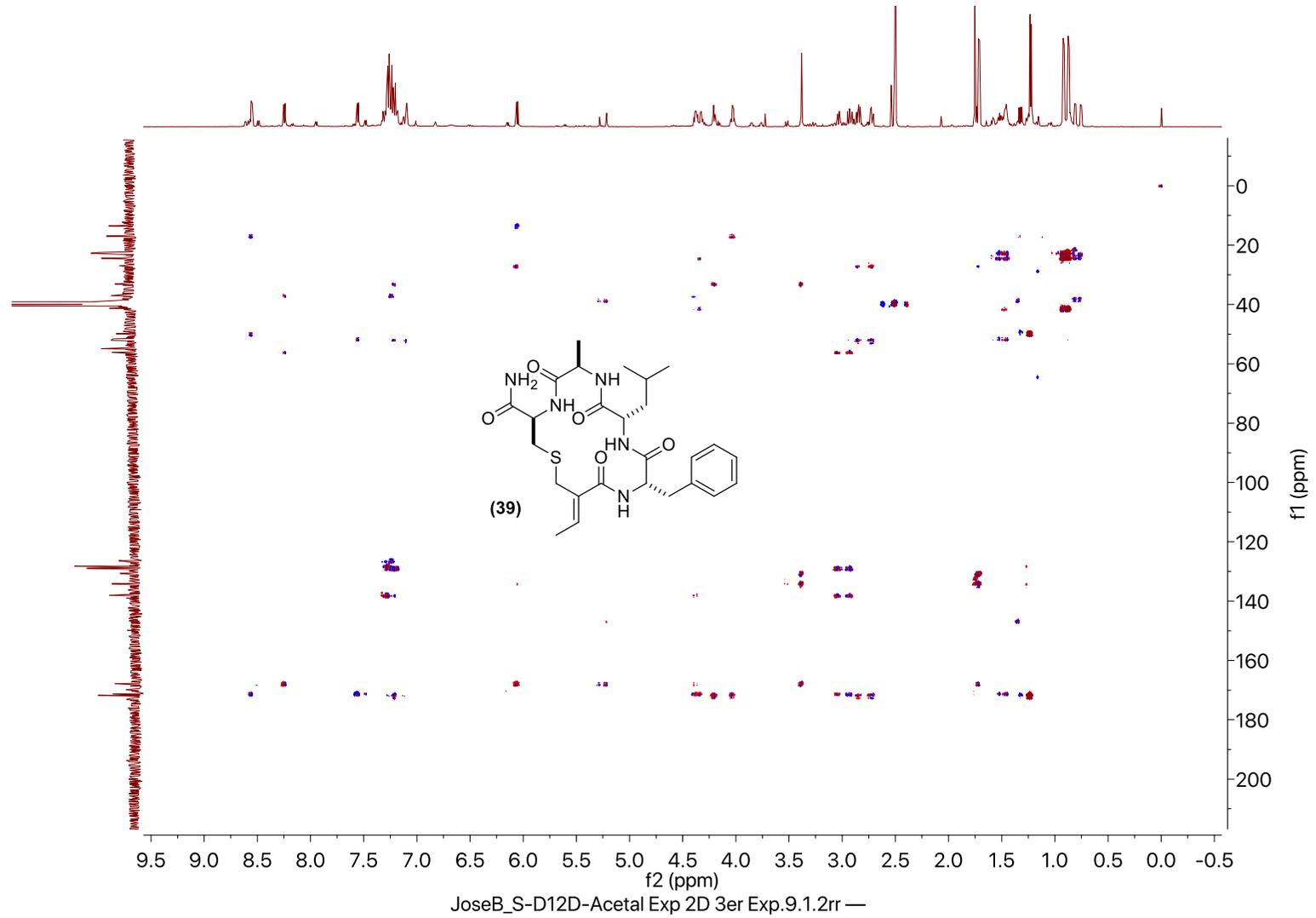
Espectros EMAR-IES-TOF, AR-MS/MS, IV-ATR e perfil de CLAE para o composto (38)



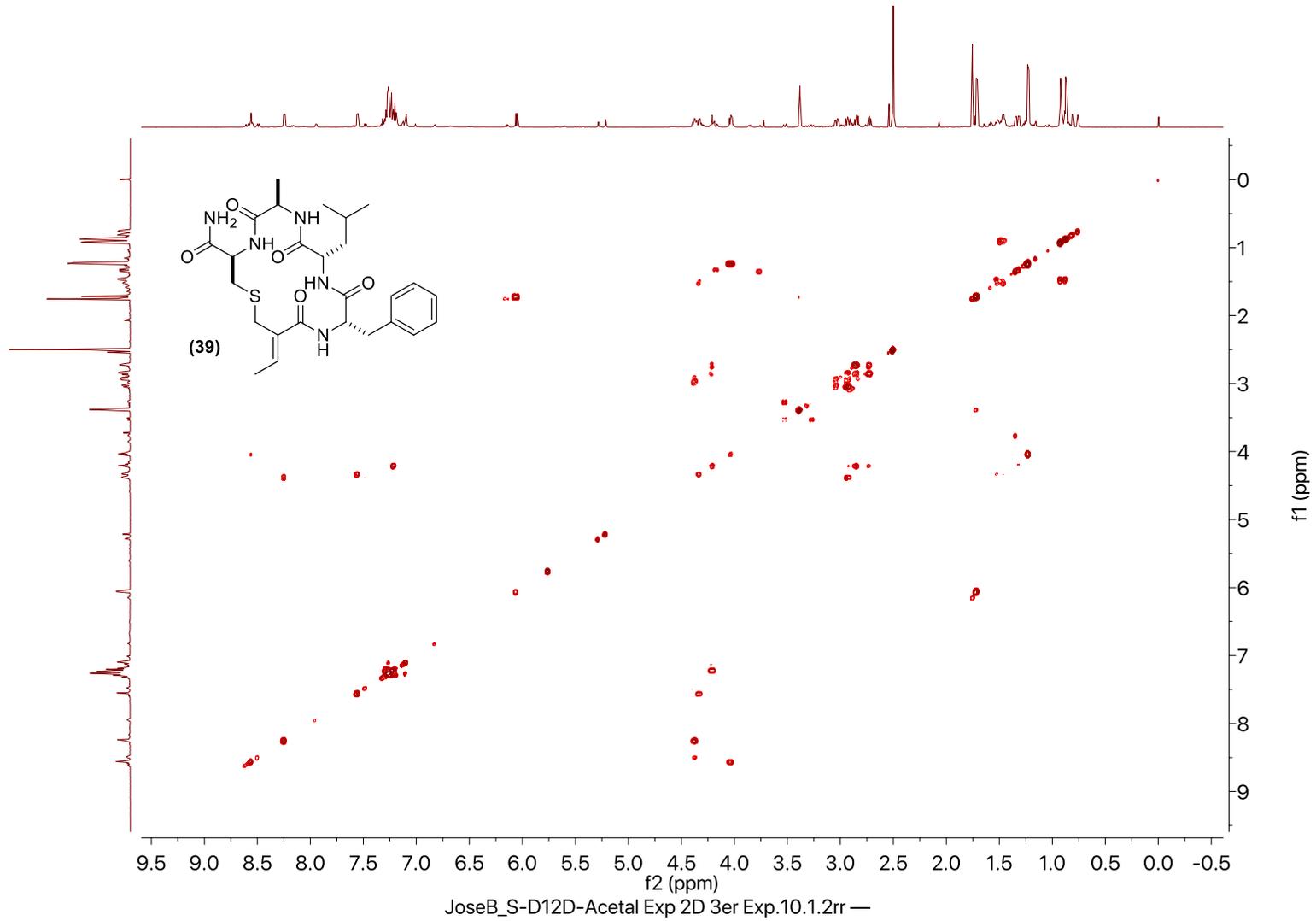
Espectro de RMN-¹³C de (39) em DMSO-d₆



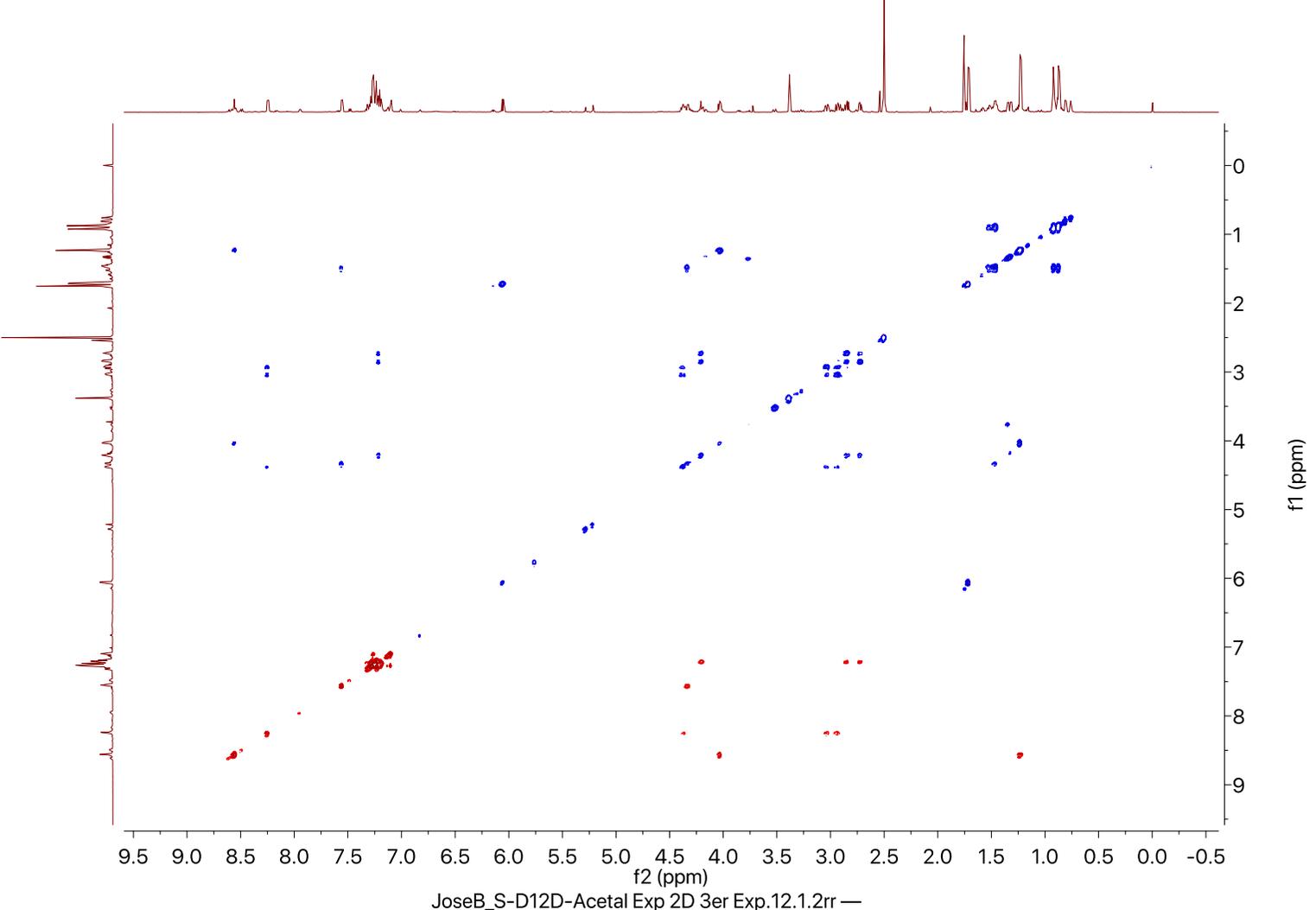
Espectro *HMBC* de (39) em DMSO-*d*₆



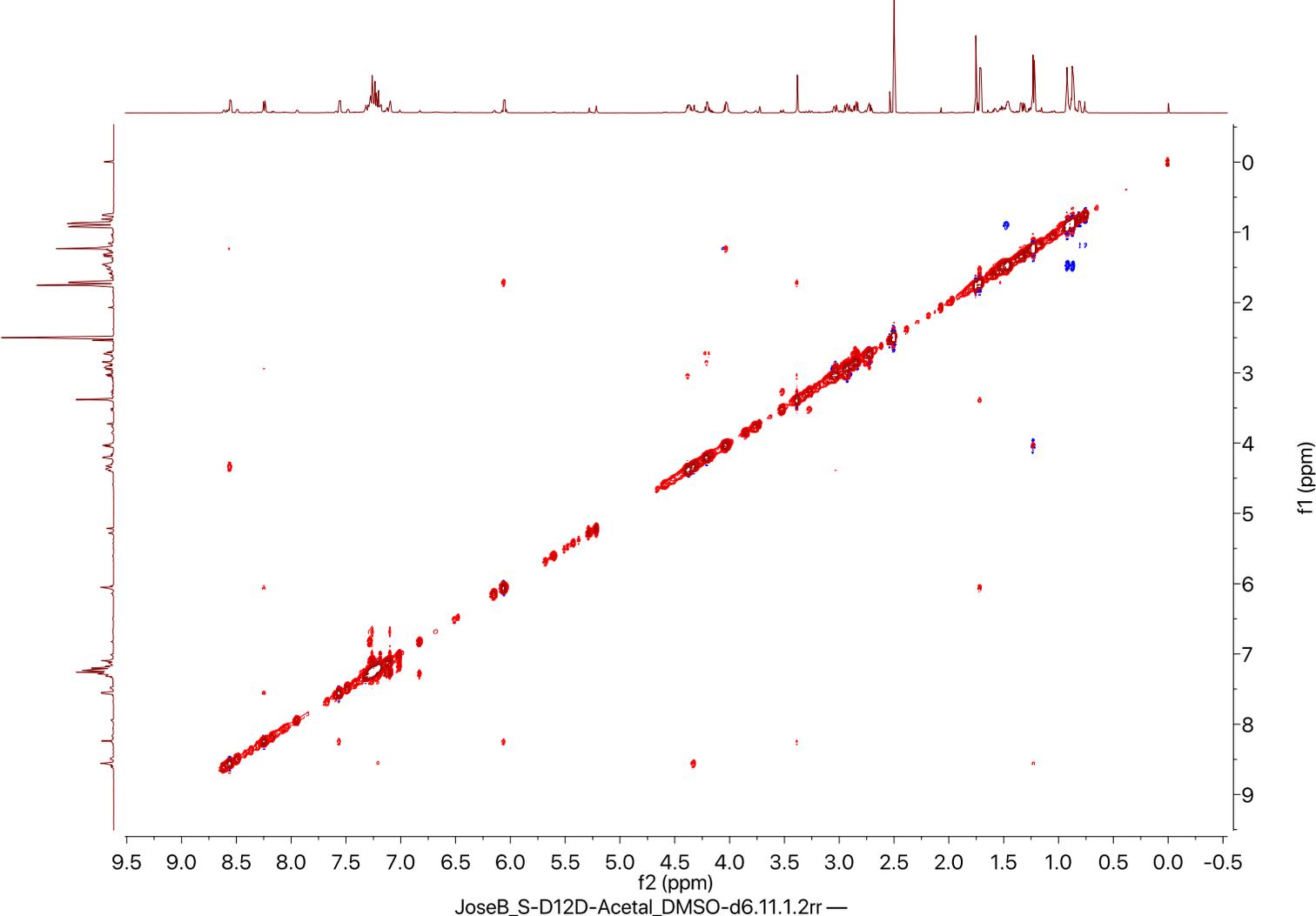
Espectro *COSY* de **(39)** em DMSO-*d*₆



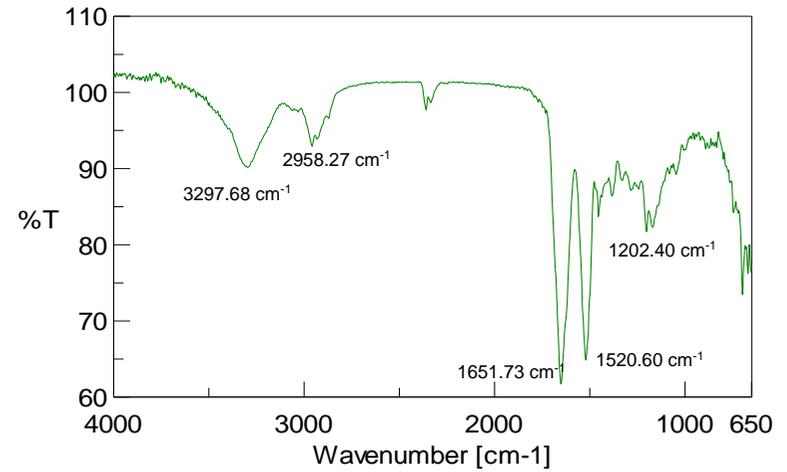
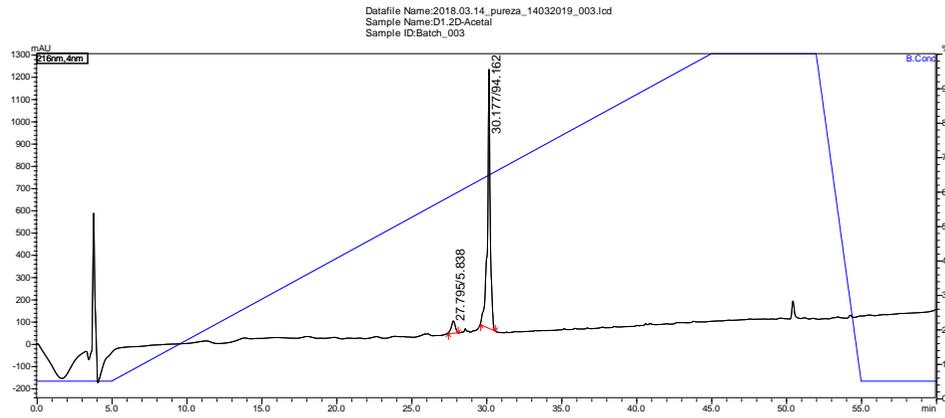
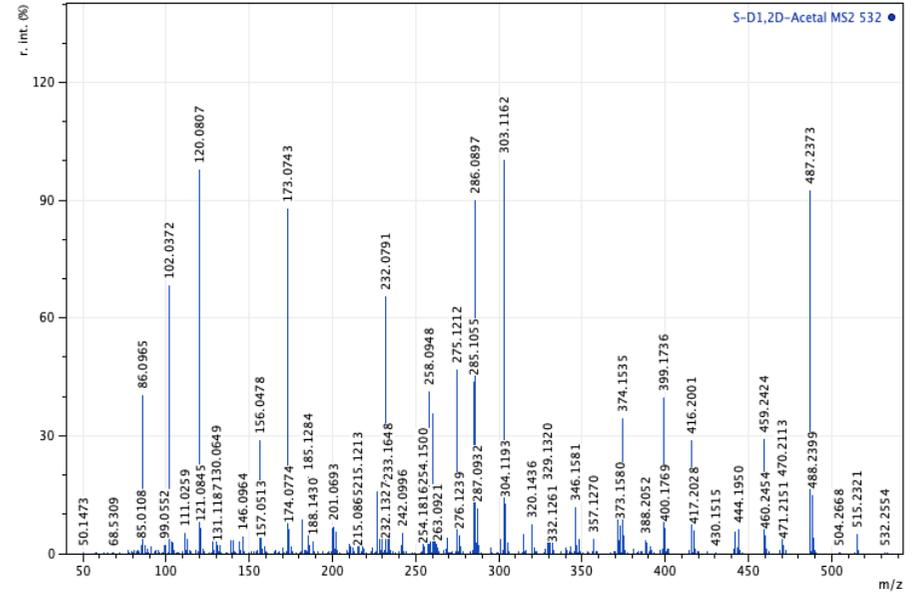
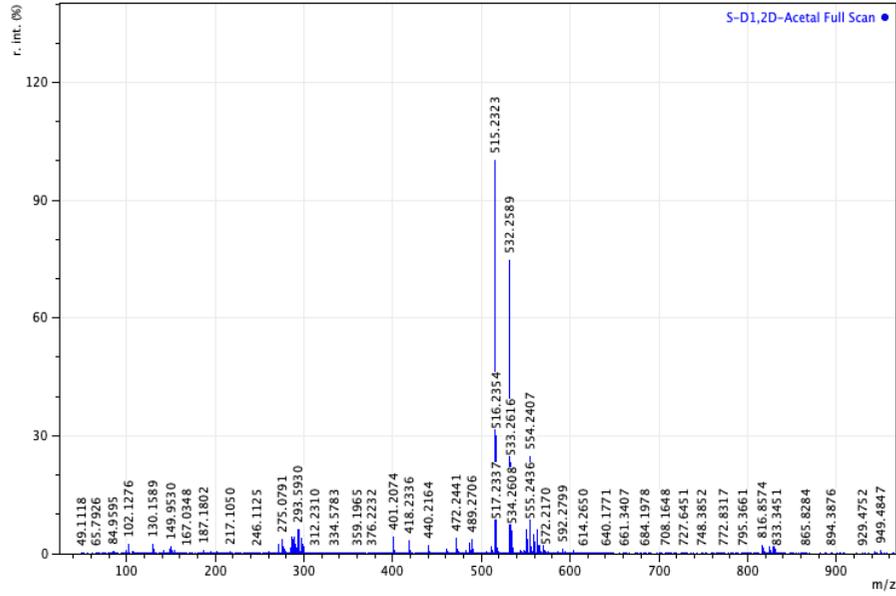
Espectro *TOCSY* de (39) em DMSO-*d*₆



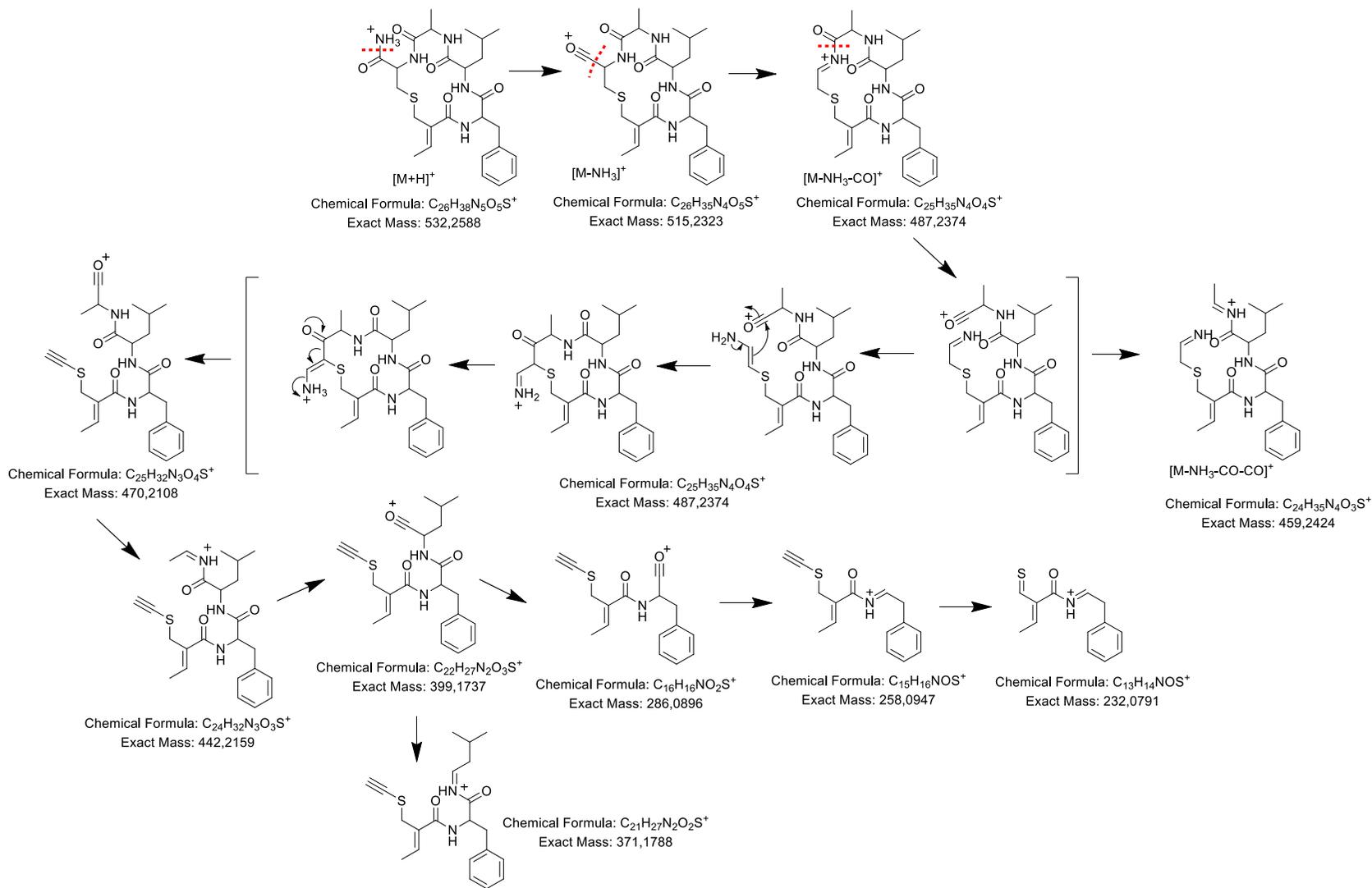
Espectro *NOESY* de **(39)** em DMSO-*d*₆



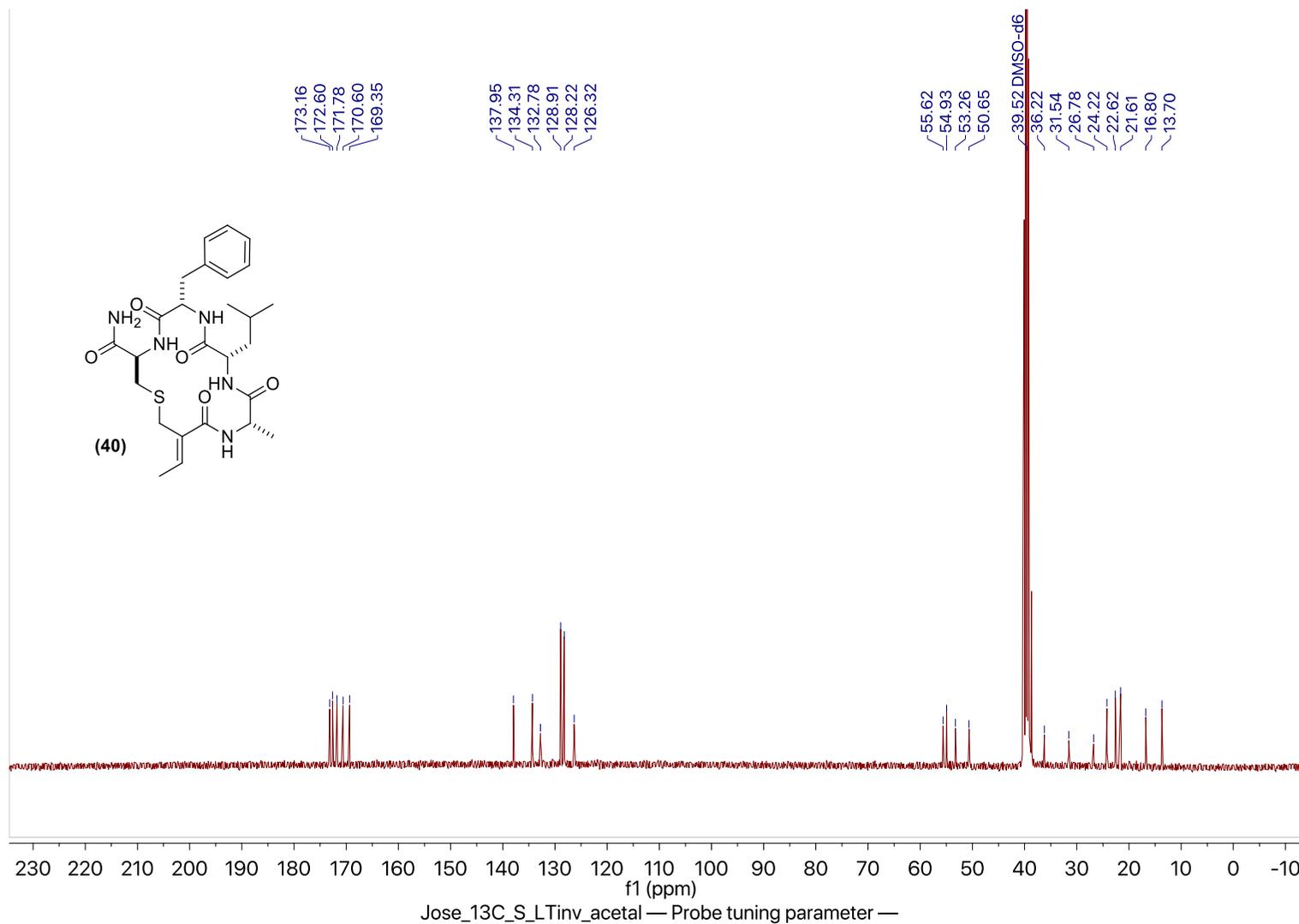
Espectros EMAR-IES-TOF, AR-MS/MS, IV-ATR e perfil de CLAE para o composto (39)



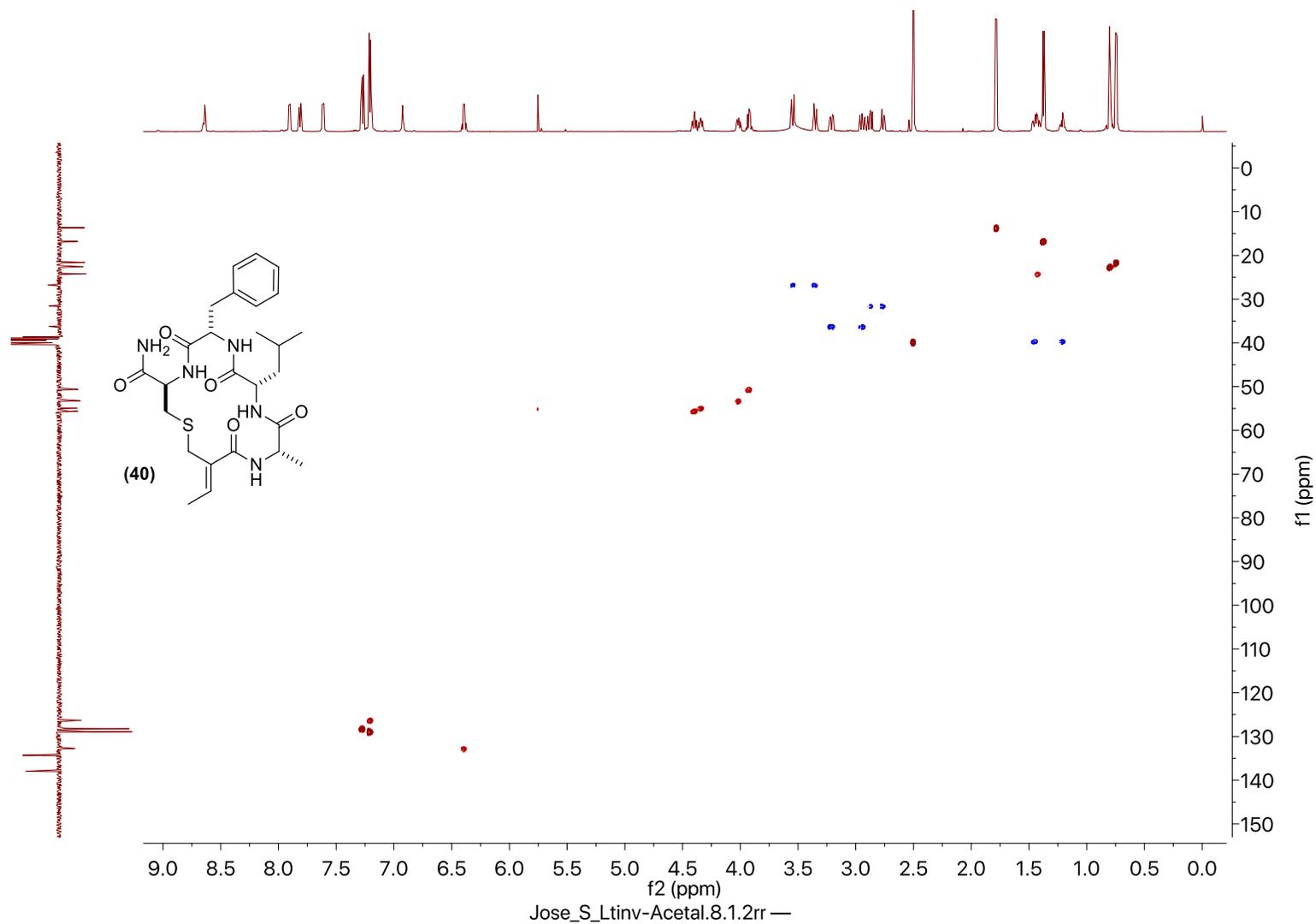
Fragmentações características observadas no IES-MS/MS para os compostos (36), (37), (38) e (39)



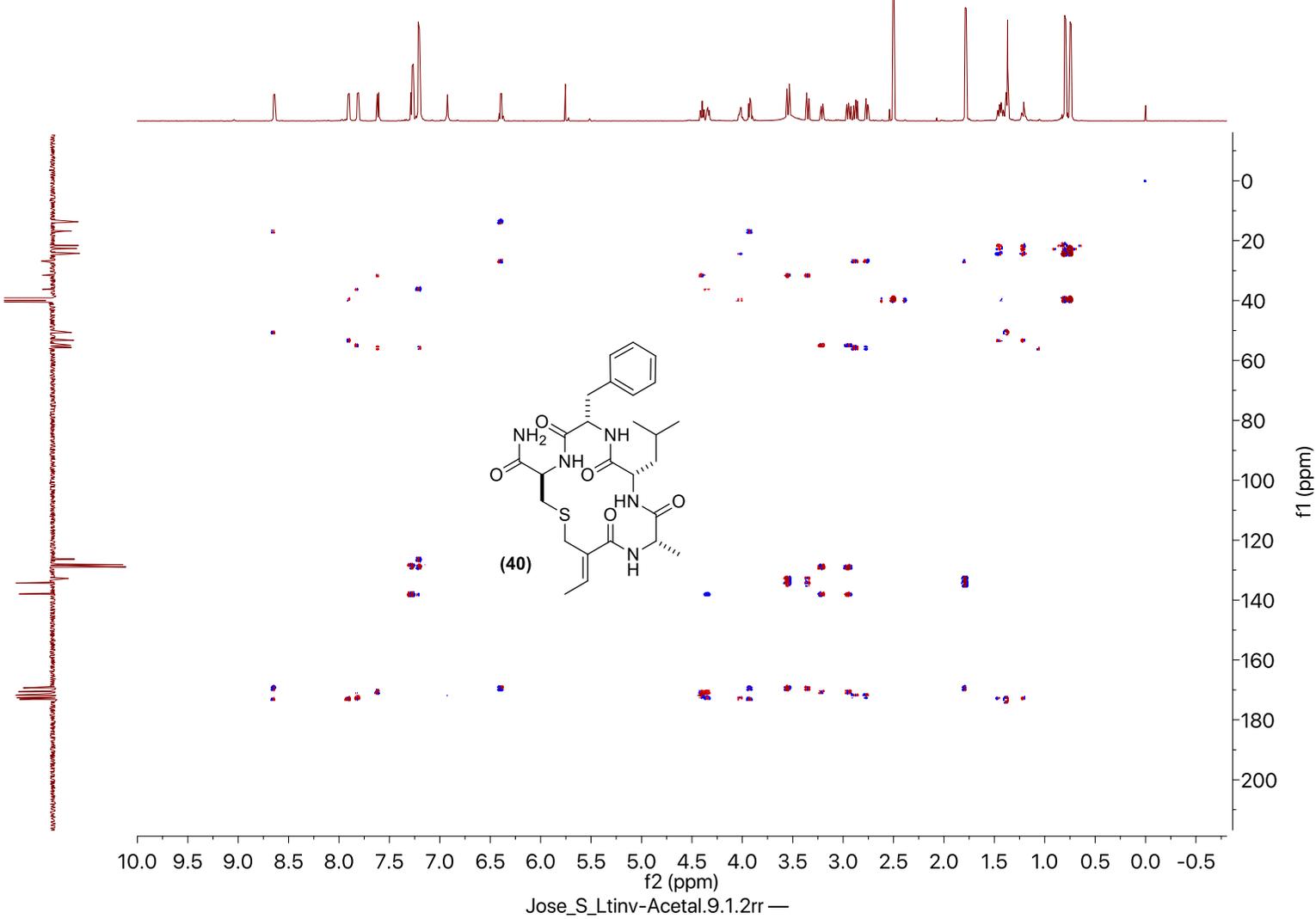
Espectro de RMN-¹³C de (40) em DMSO-*d*₆



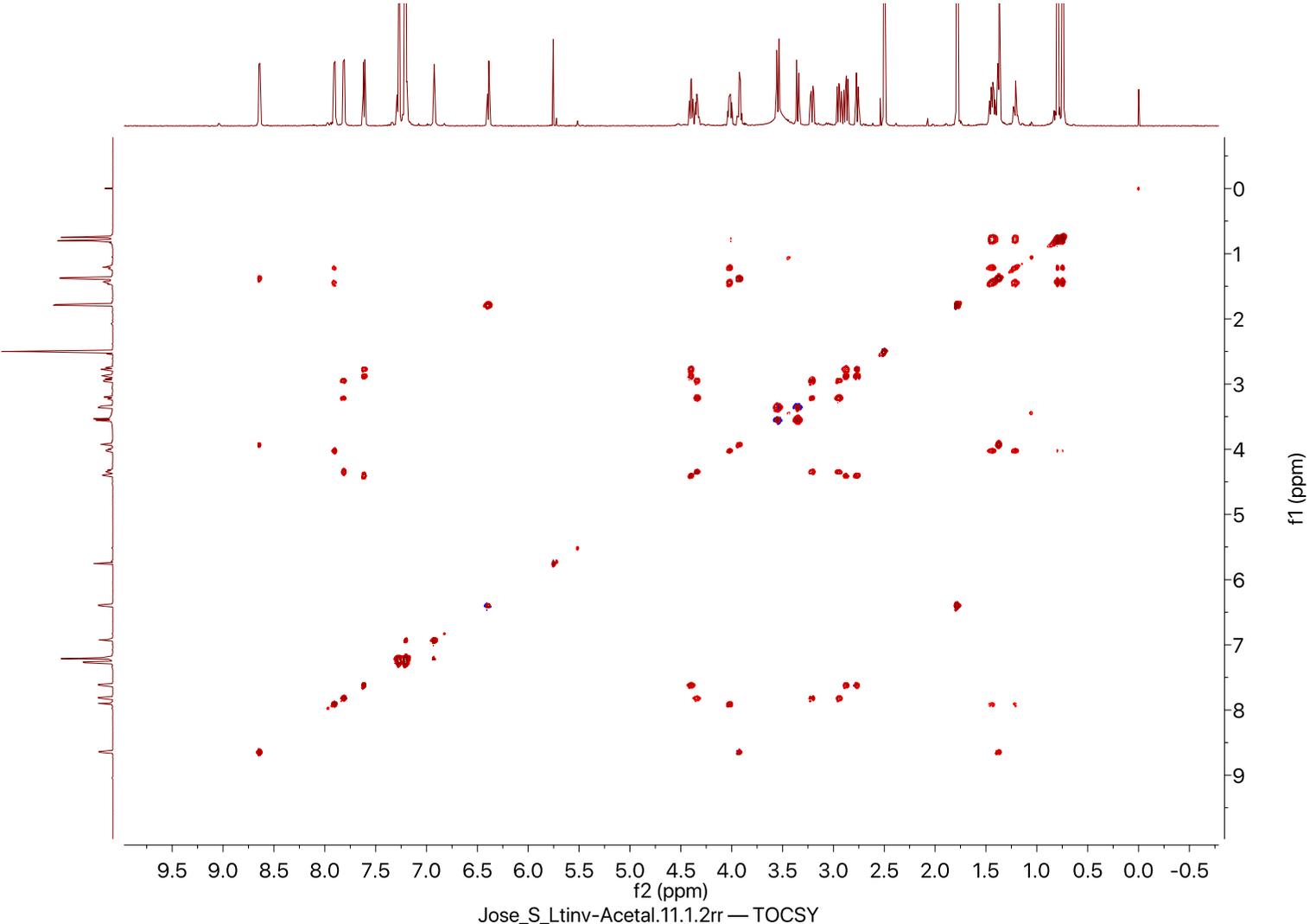
Espectro *HSQC* de **(40)** em DMSO-*d*₆



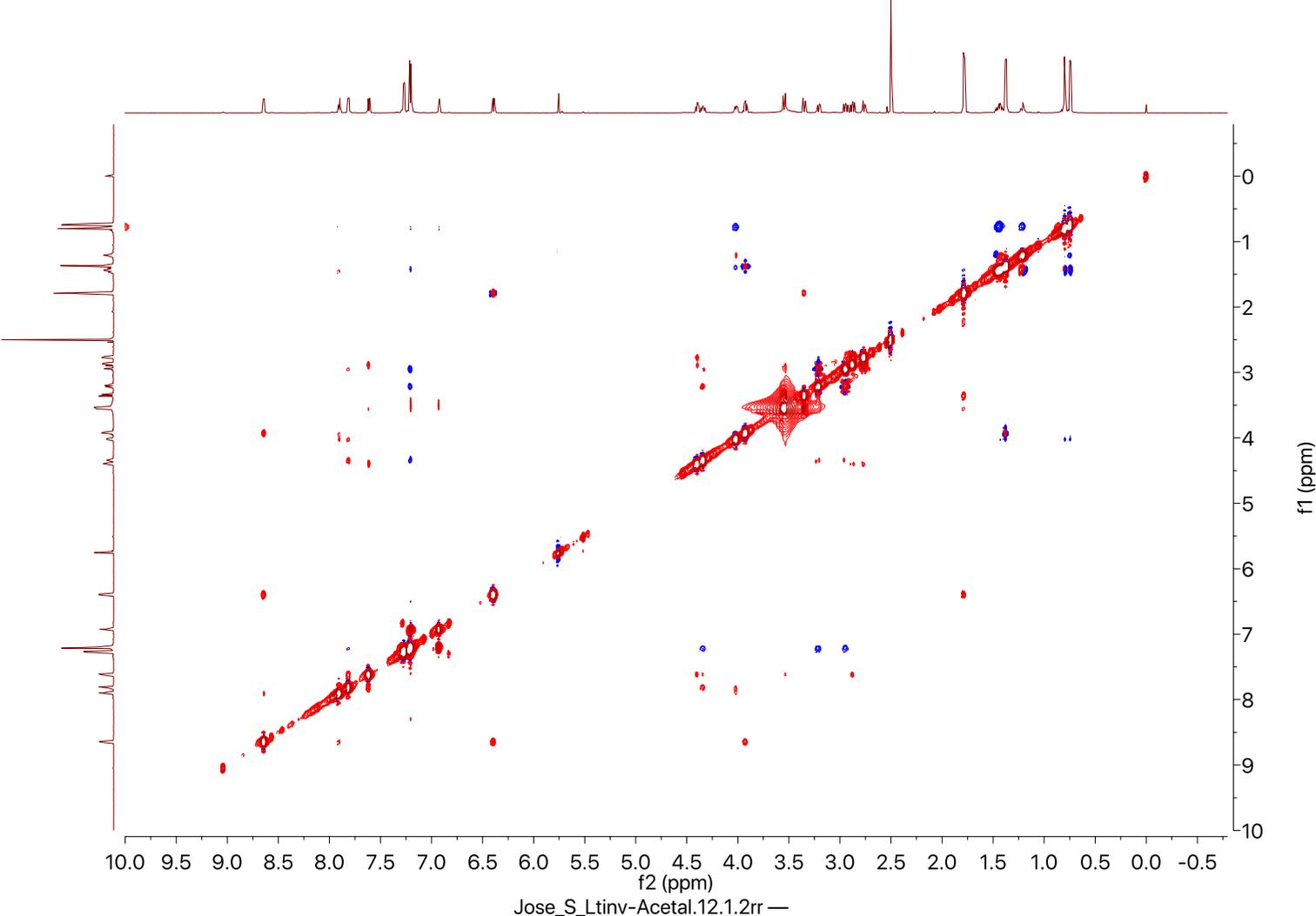
Espectro *HMBC* de (40) em DMSO-*d*₆



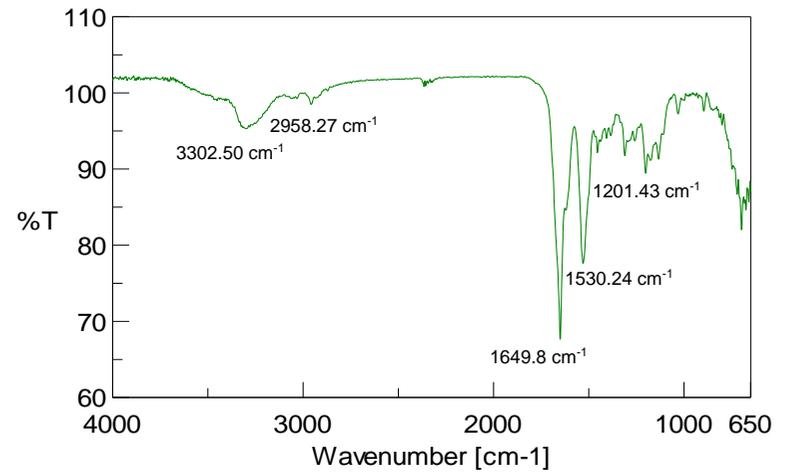
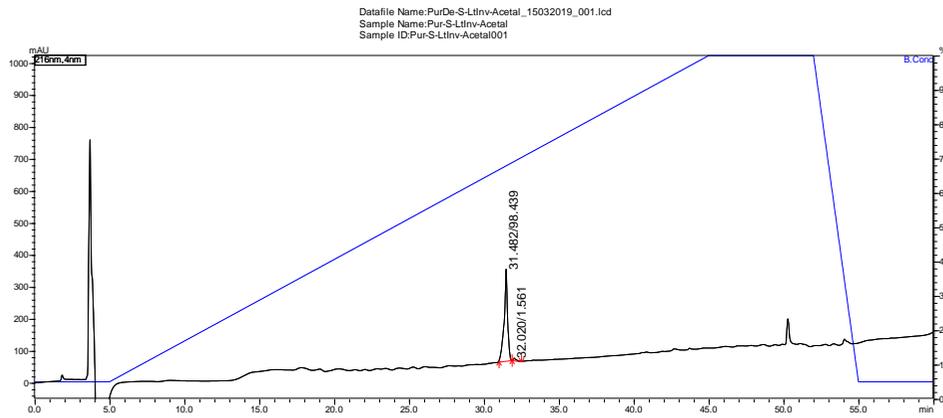
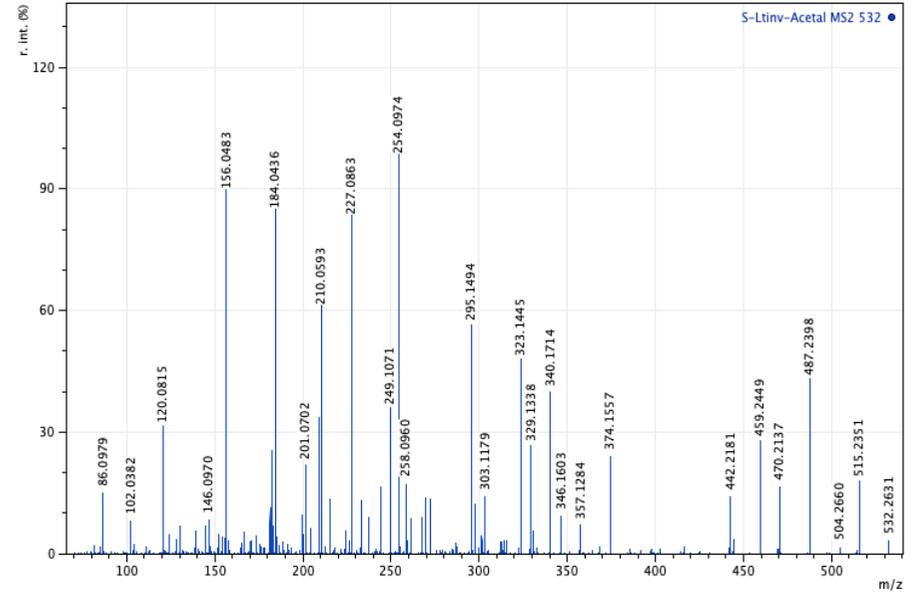
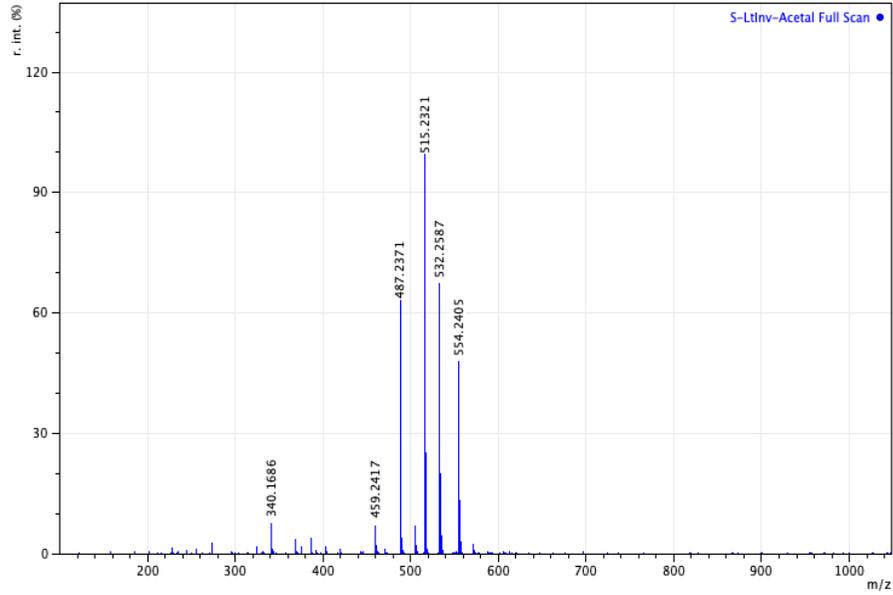
Espectro *TOCSY* de (40) em DMSO-*d*₆



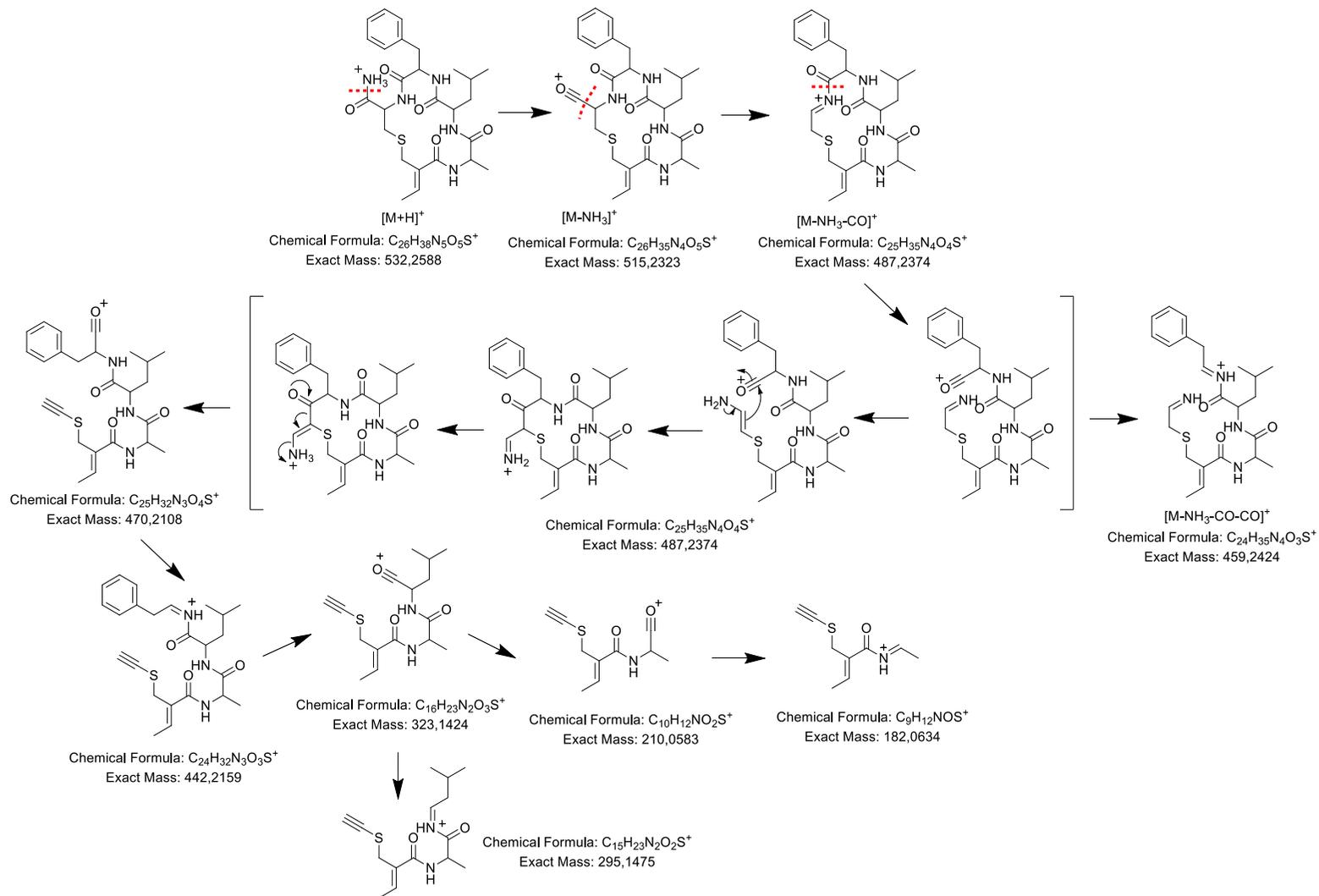
Espectro *NOESY* de (40) em DMSO-*d*₆



Espectros EMAR-IES-TOF, AR-MS/MS, IV-ATR e perfil de CLAE para o composto (40)

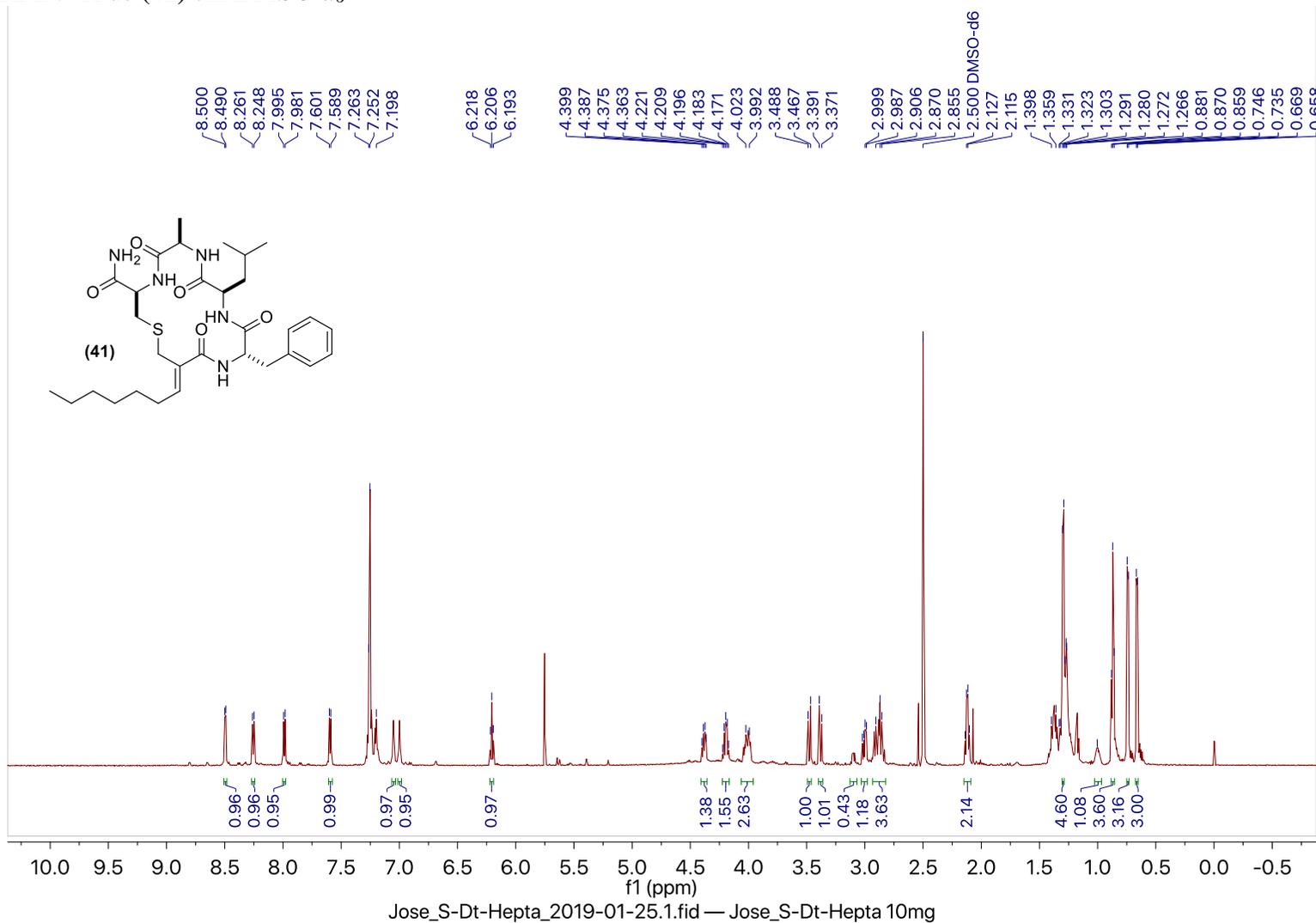


Fragmentações características observadas no IES-MS/MS para o composto (40)

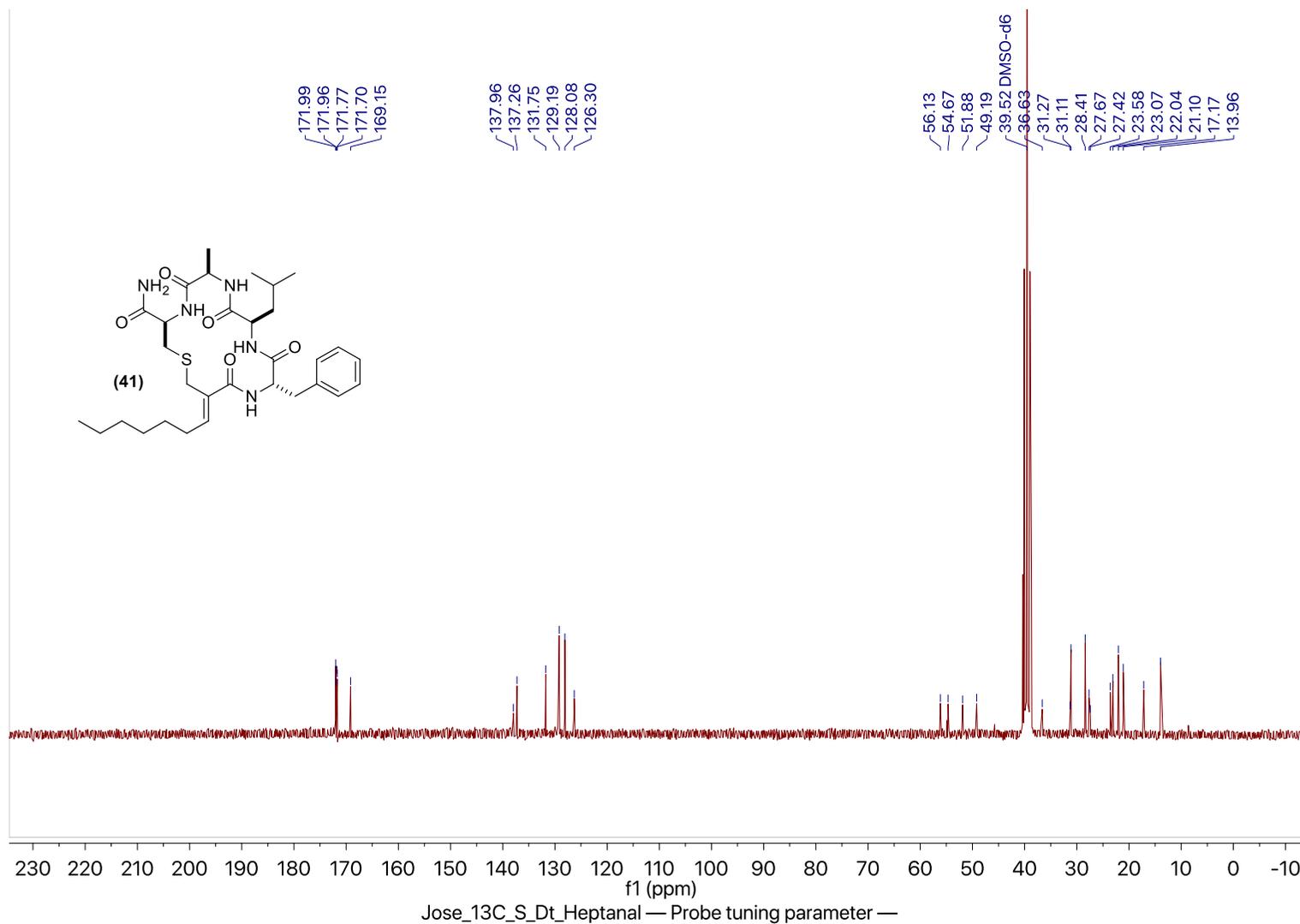


Dados de caracterização para o composto (41)

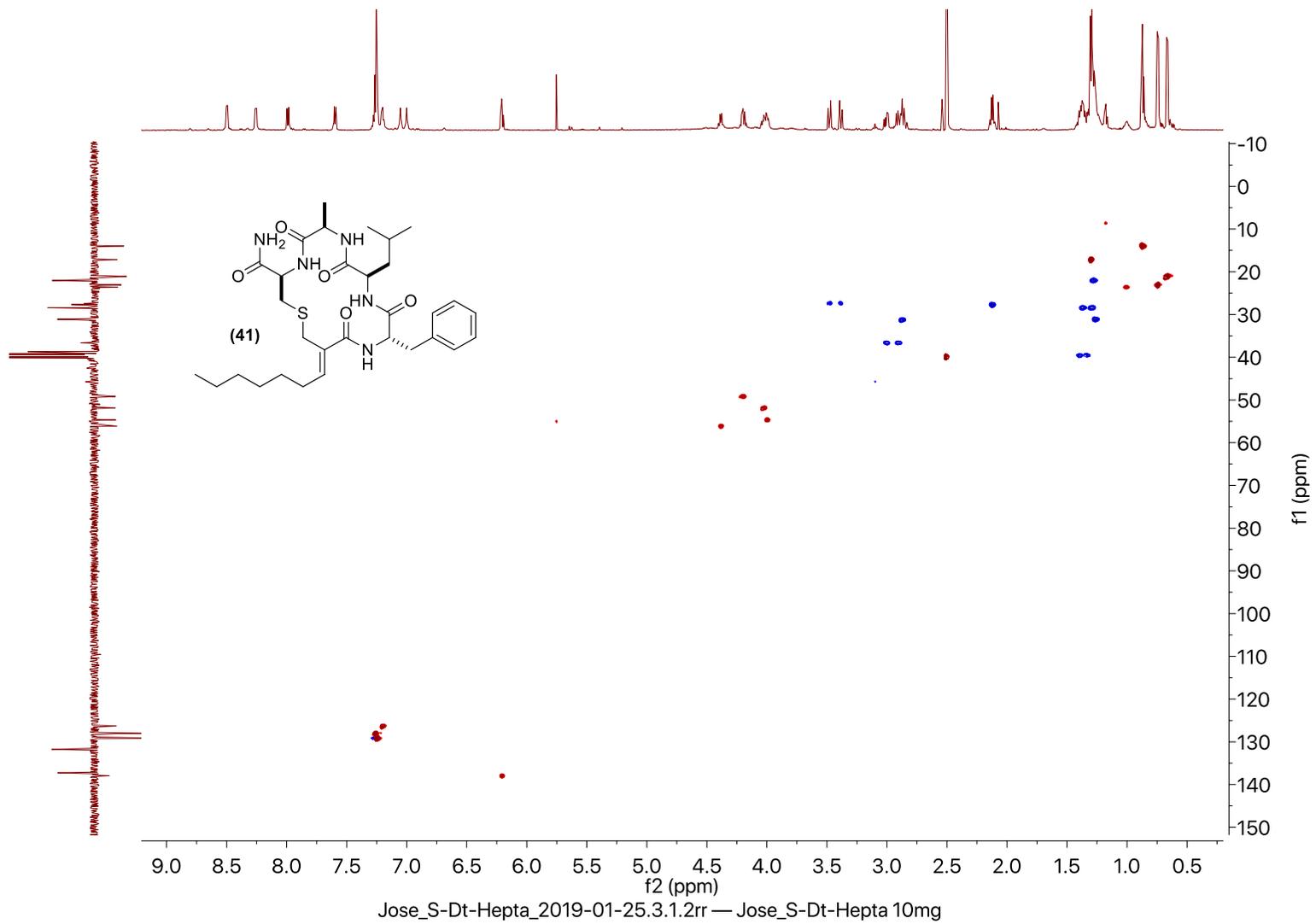
Espectro de RMN-¹H de (41) em DMSO-*d*₆



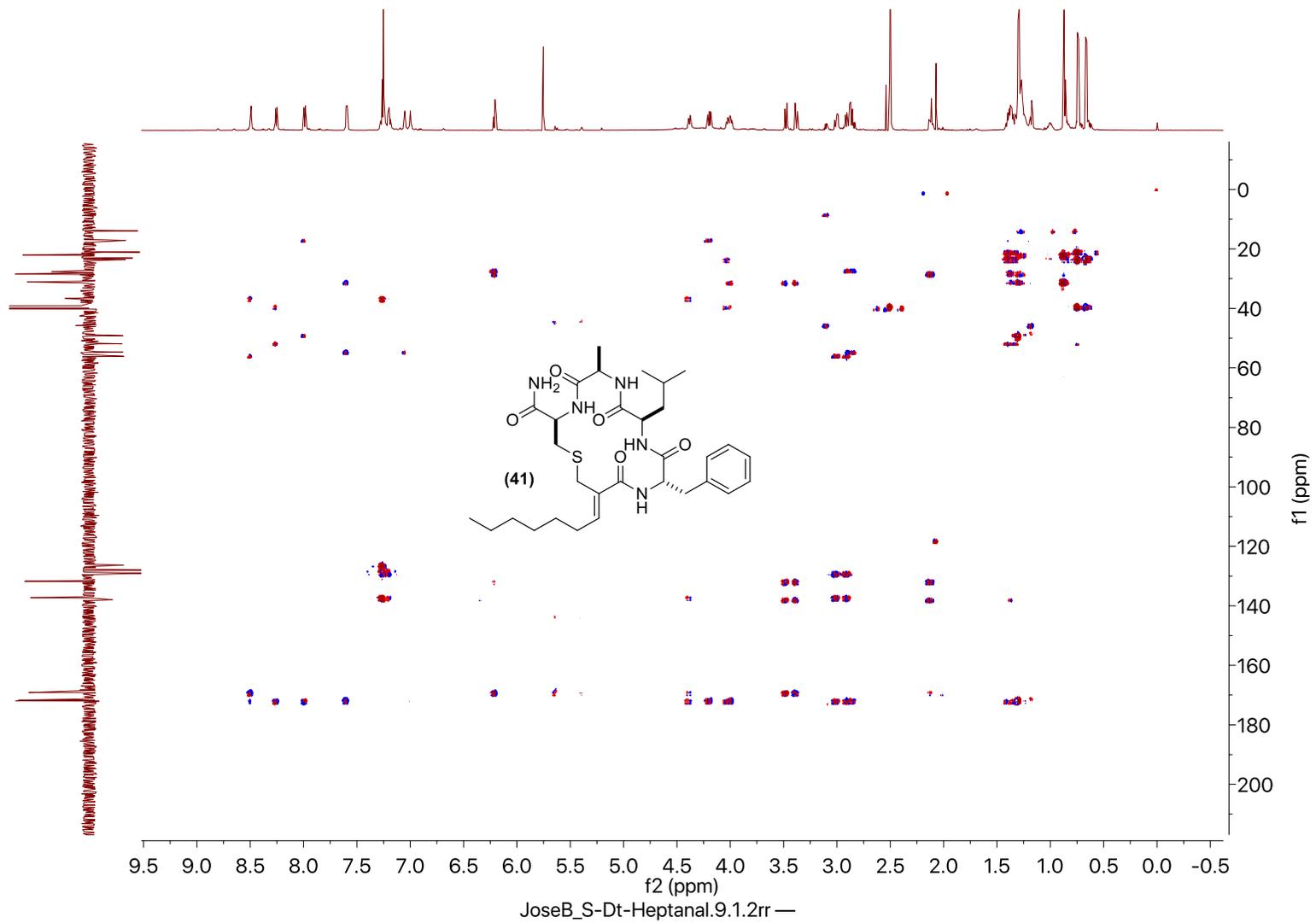
Espectro de RMN-¹³C de (41) em DMSO-*d*₆



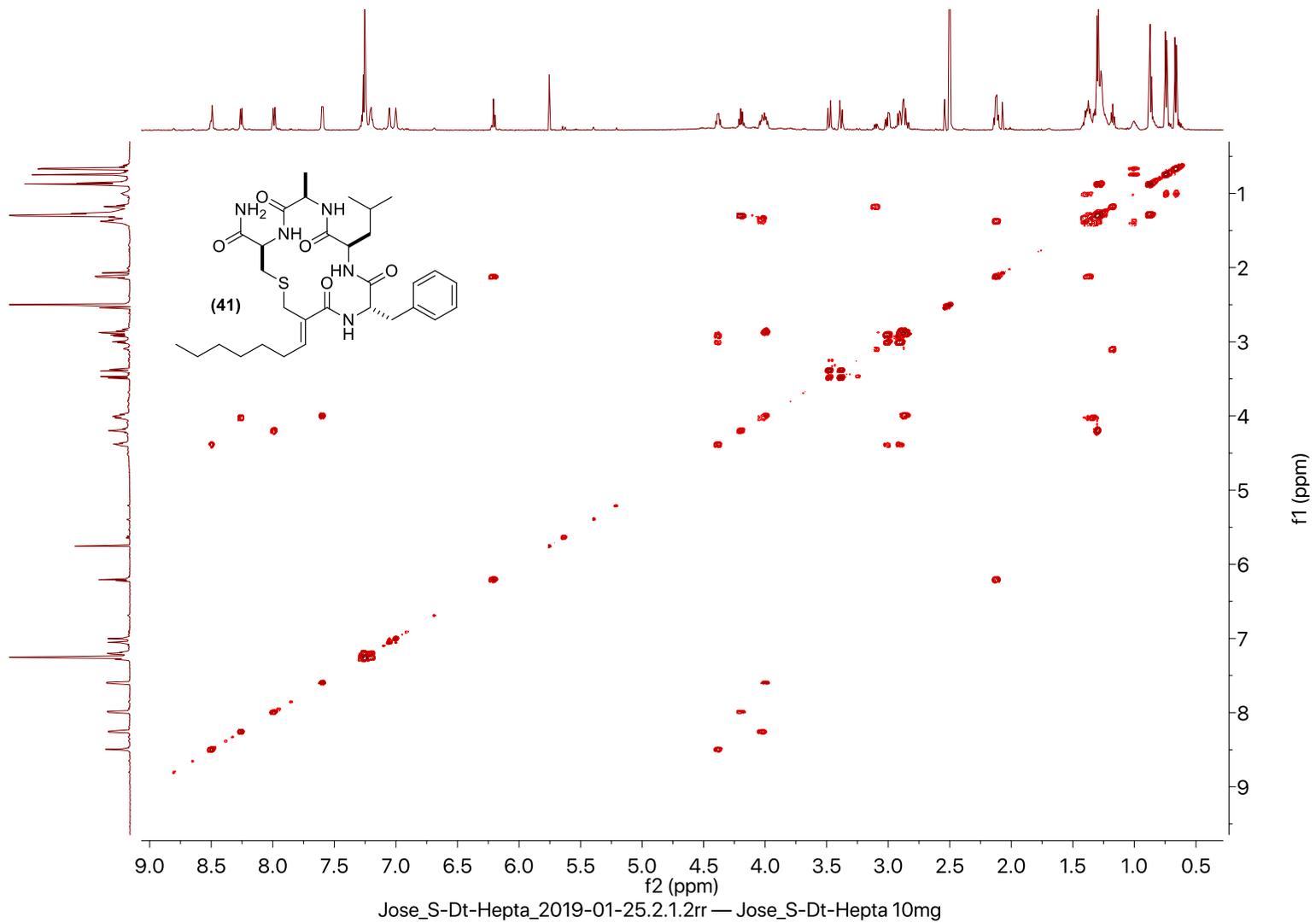
Espectro *HSQC* de (41) em DMSO-*d*₆



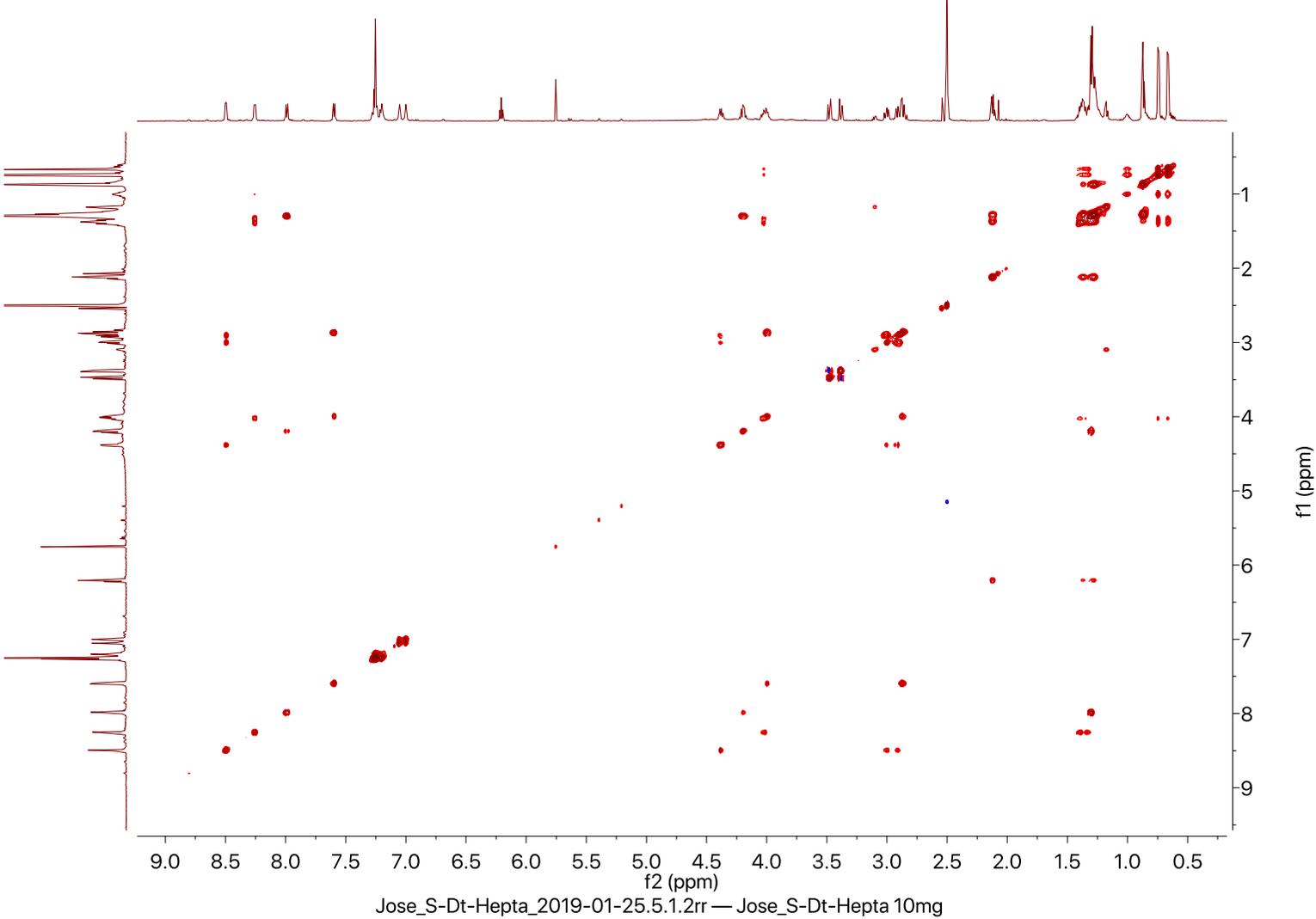
Espectro *HMBC* de (41) em DMSO-*d*₆



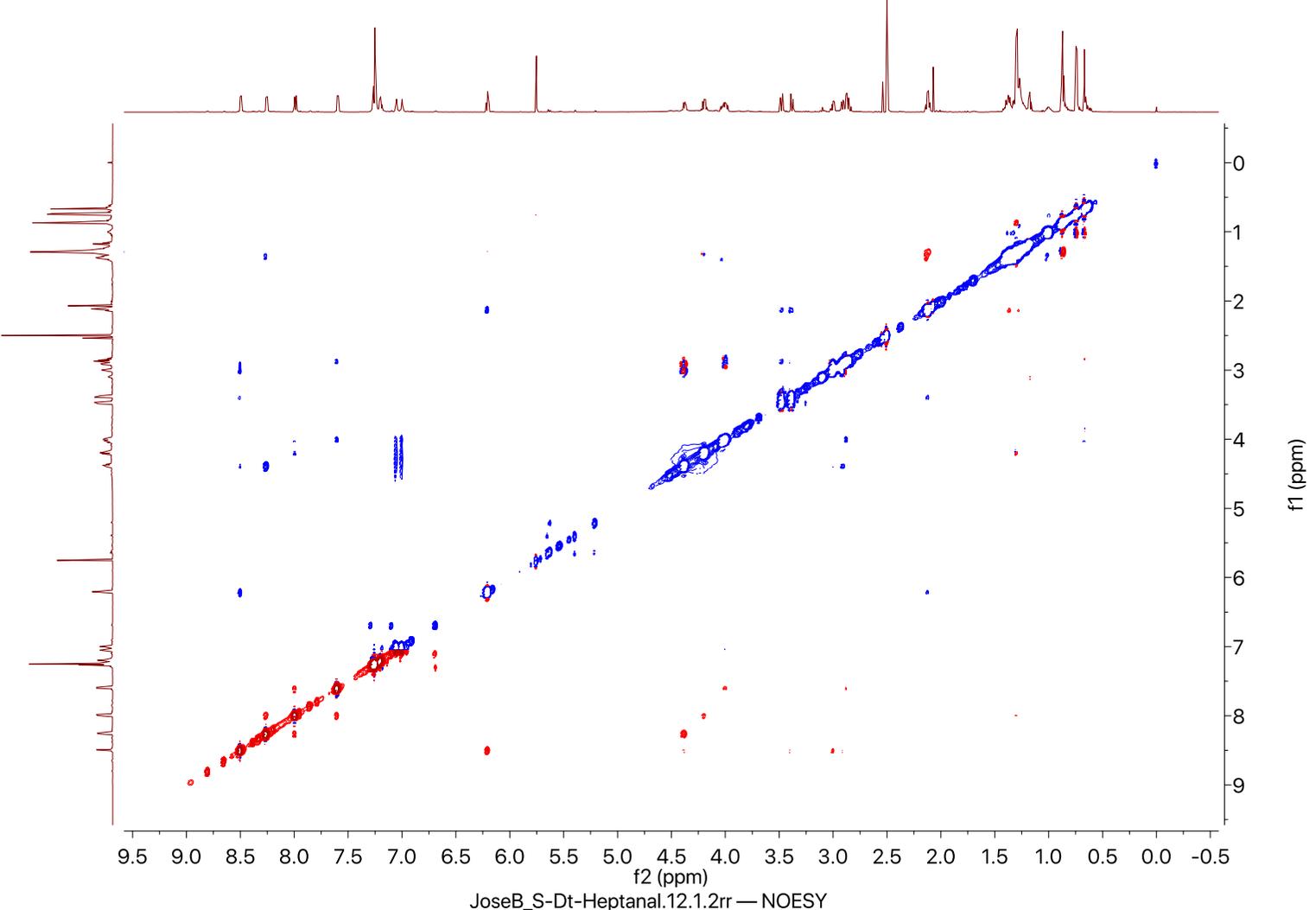
Espectro *COSY* de (41) em DMSO-*d*₆



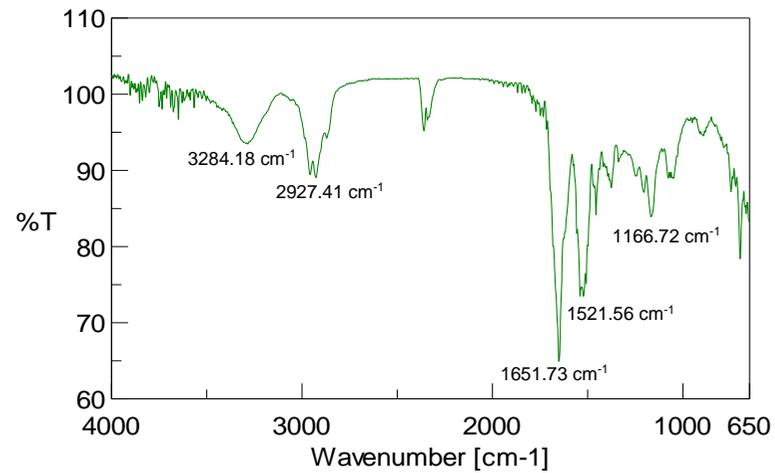
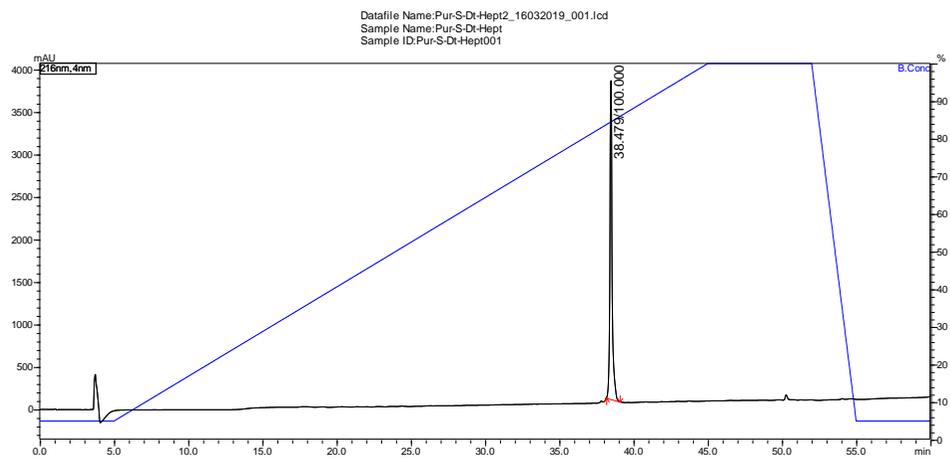
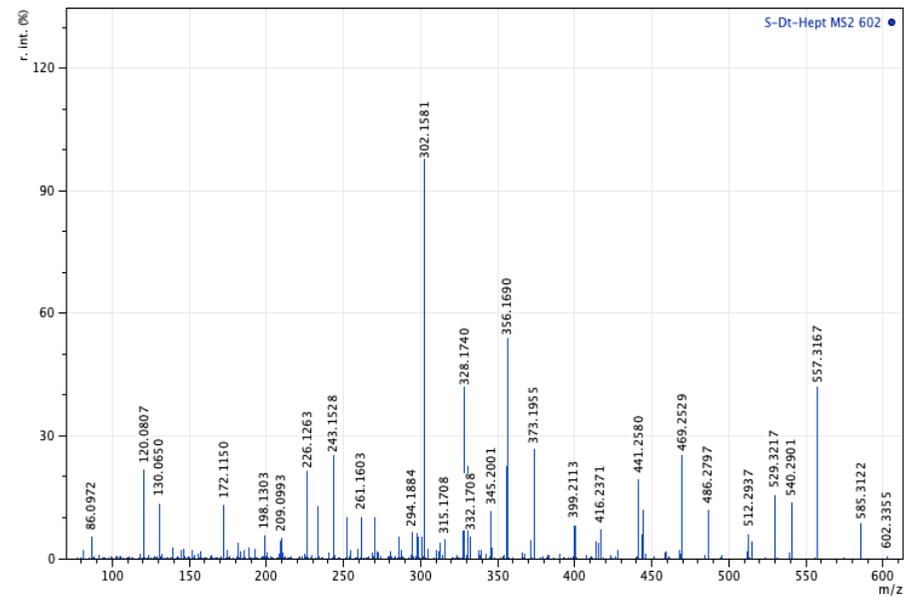
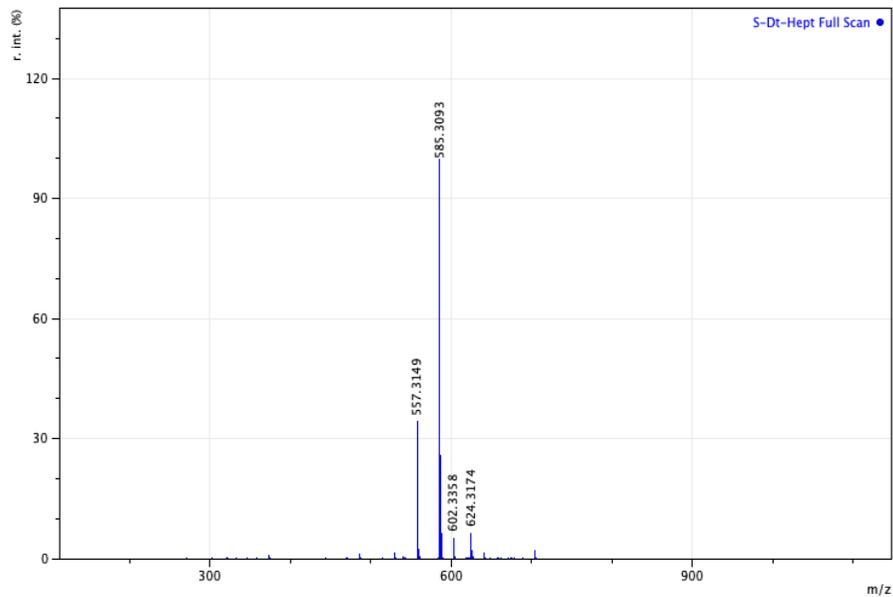
Espectro *TOCSY* de (41) em DMSO-*d*₆



Espectro *NOESY* de (41) em DMSO-*d*₆

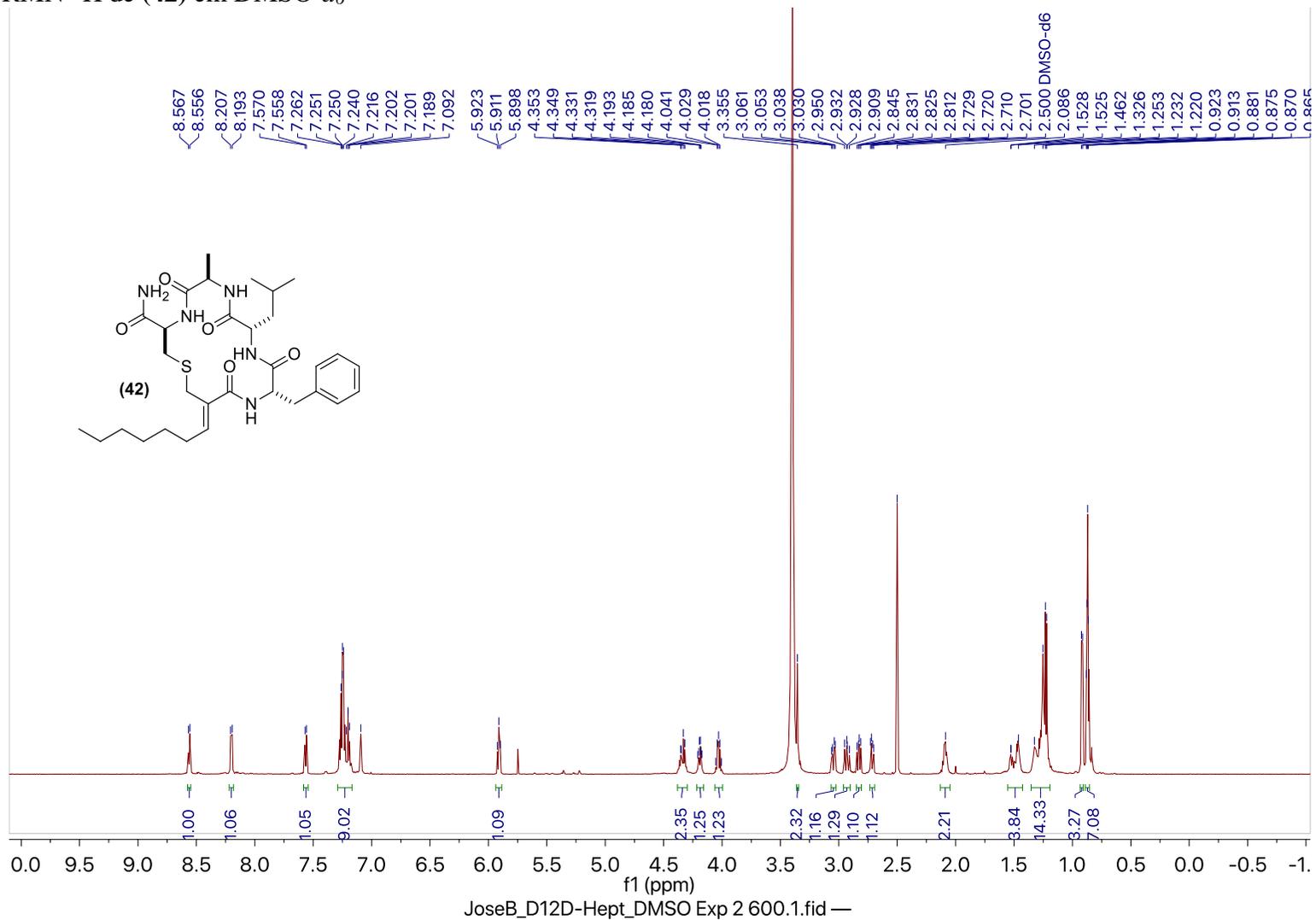


Espectros EMAR-IES-TOF, AR-MS/MS, IV-ATR e perfil de CLAE para o composto (41)

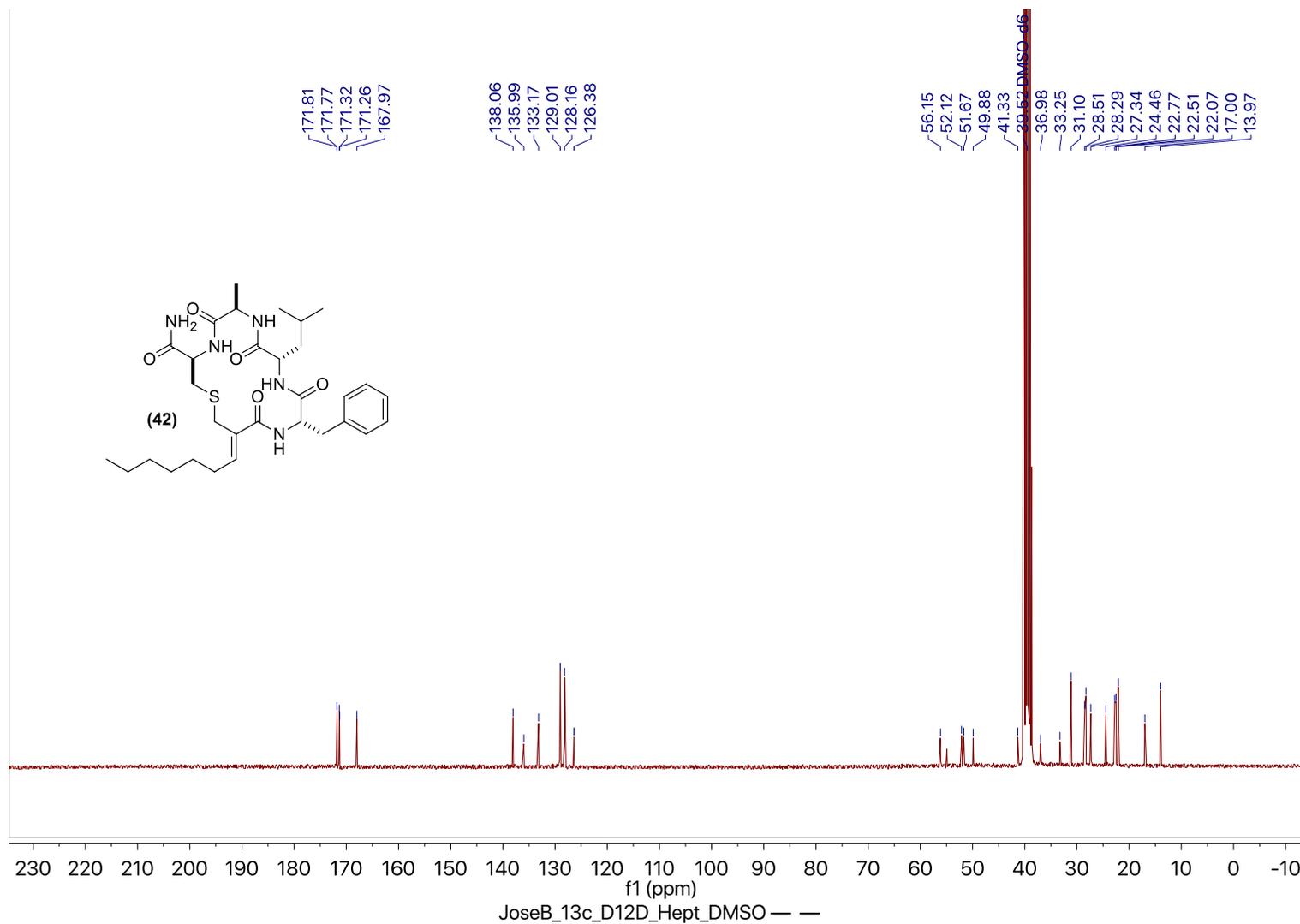


Dados de caracterização para o composto (42)

Espectro de RMN-¹H de (42) em DMSO-*d*₆



Espectro de RMN-¹³C de (42) em DMSO-*d*₆

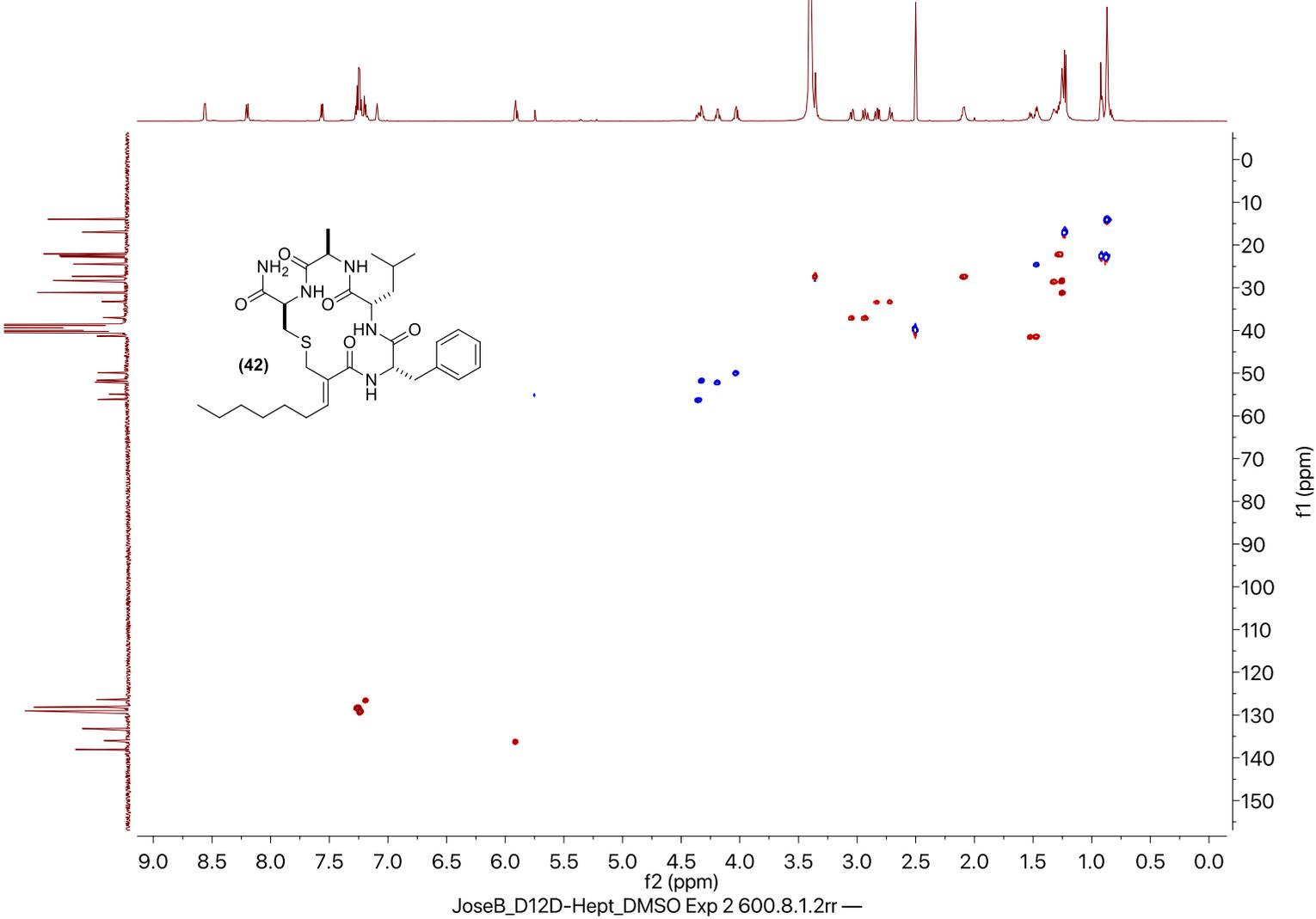


171.81
171.77
171.32
171.26
167.97

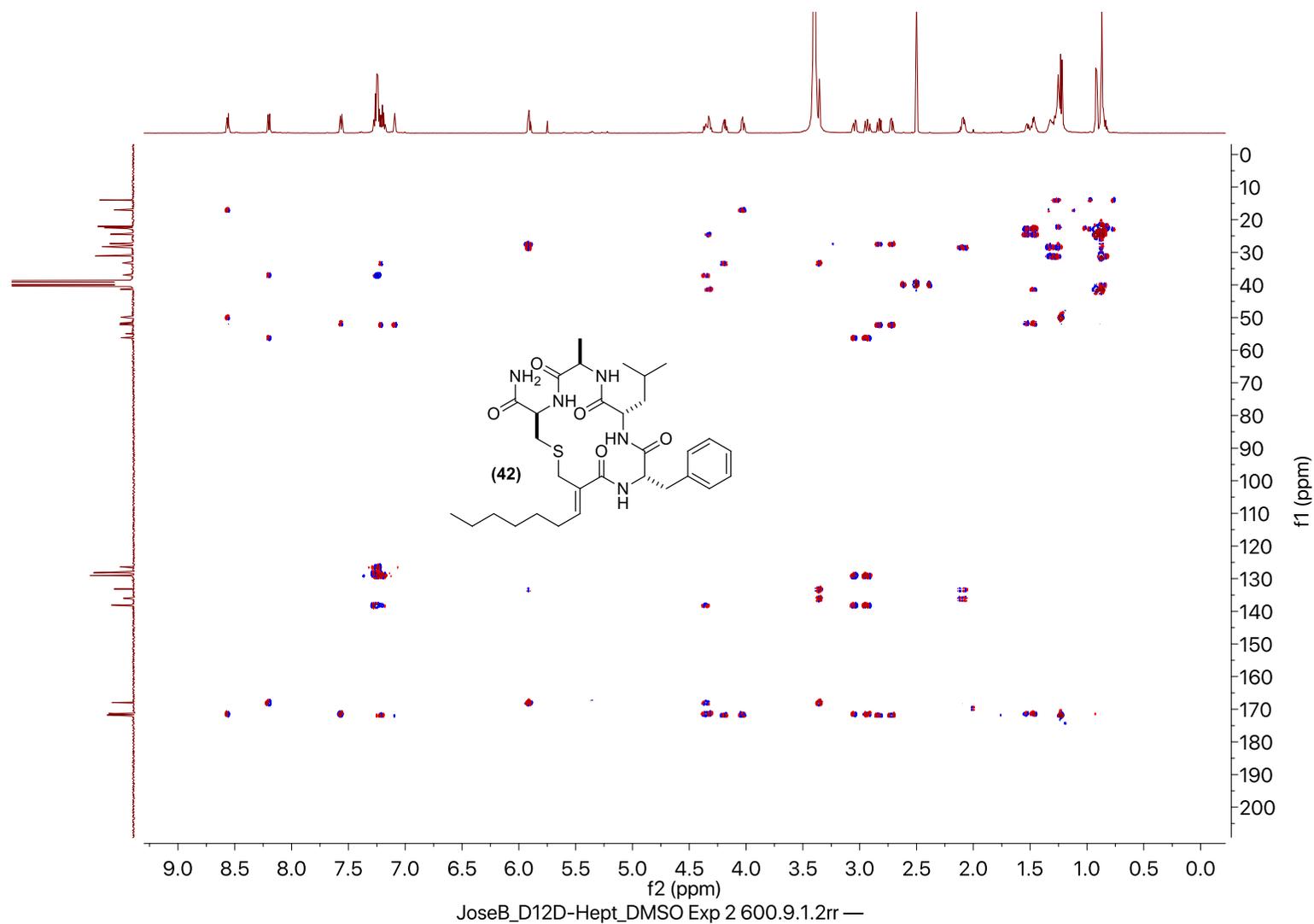
138.06
135.99
133.17
129.01
128.16
126.38

56.15
52.12
51.67
49.88
41.33
39.59 DMSO-*d*₆
36.98
33.25
31.10
28.51
28.29
27.34
24.46
22.77
22.51
22.07
17.00
13.97

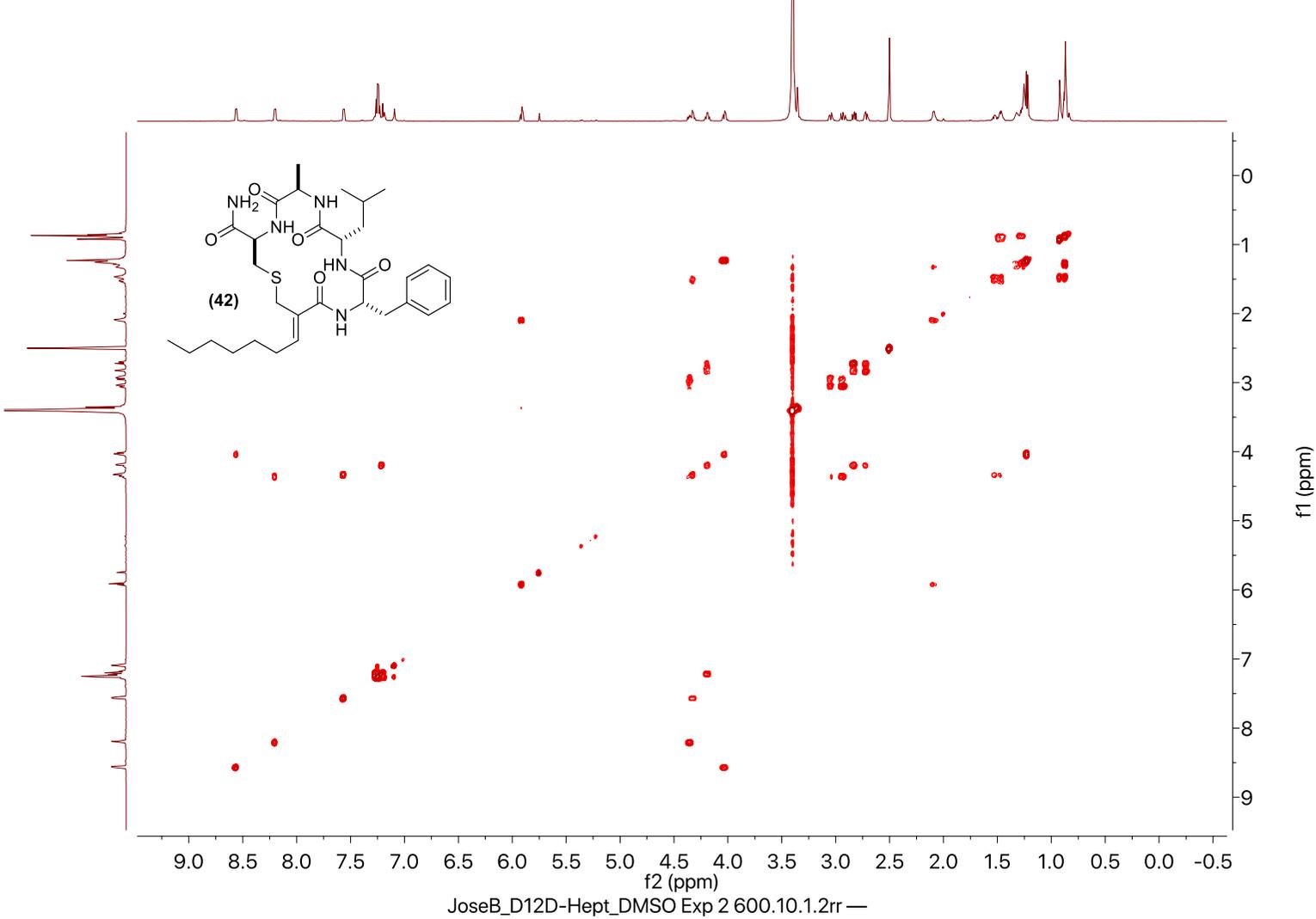
Espectro *HSQC* de (42) em DMSO-*d*₆



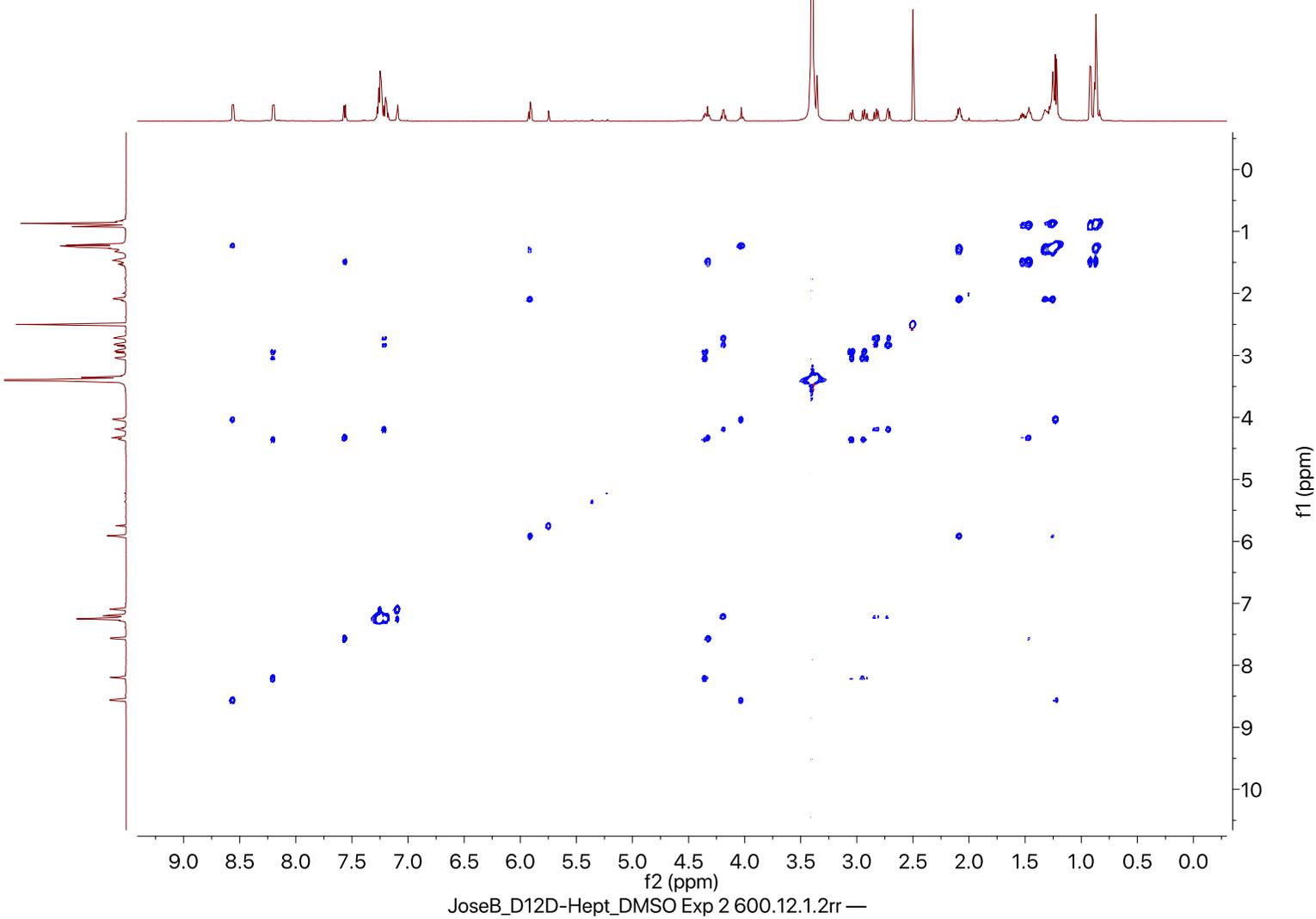
Espectro *HMBC* de (42) em DMSO-*d*₆



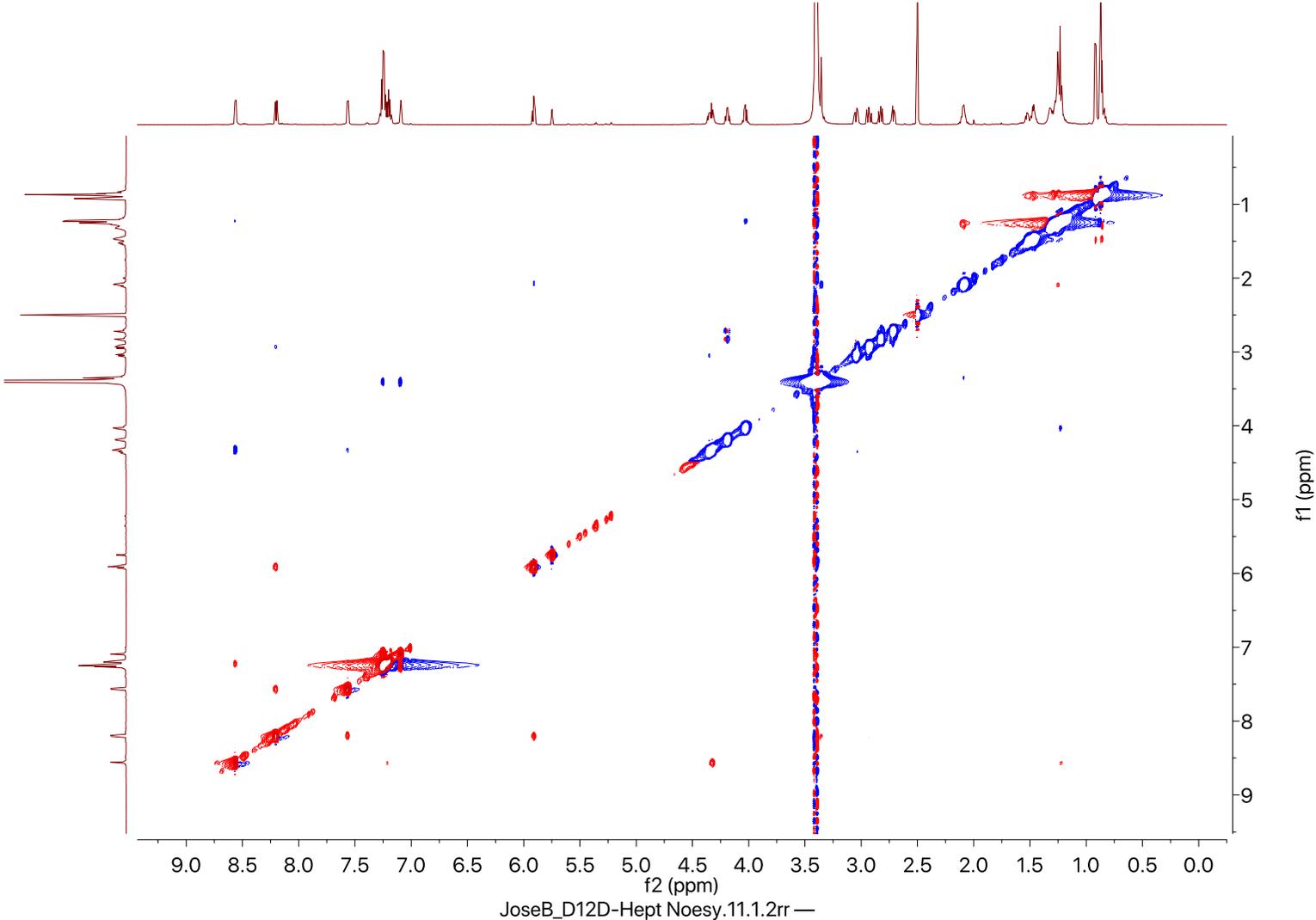
Espectro *COSY* de (42) em DMSO-*d*₆



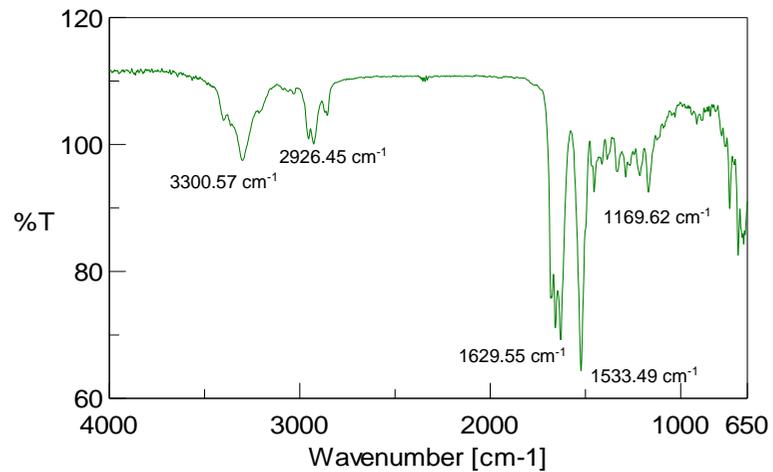
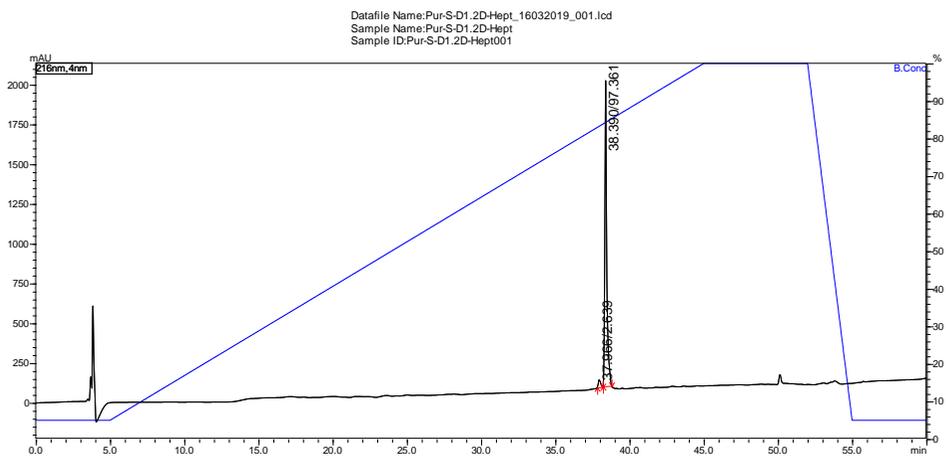
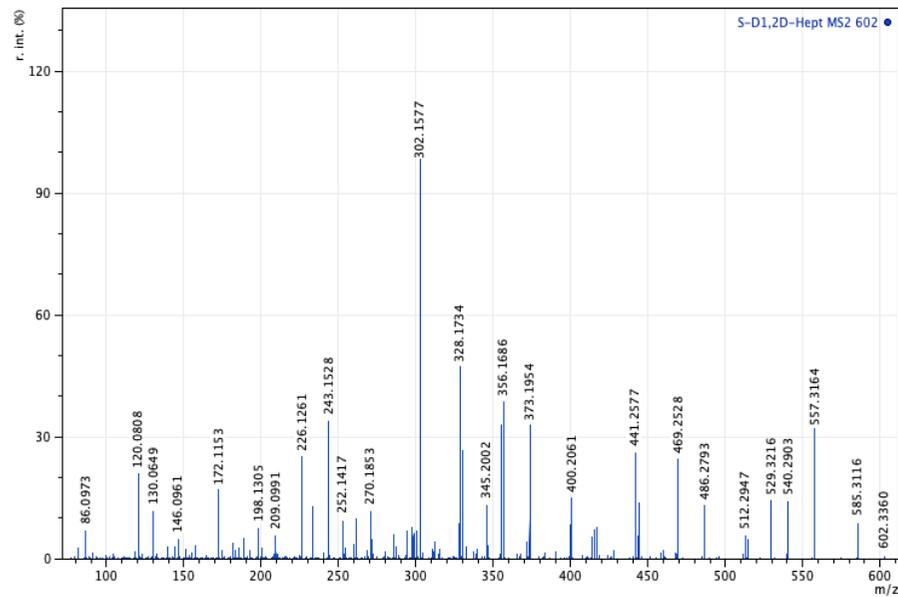
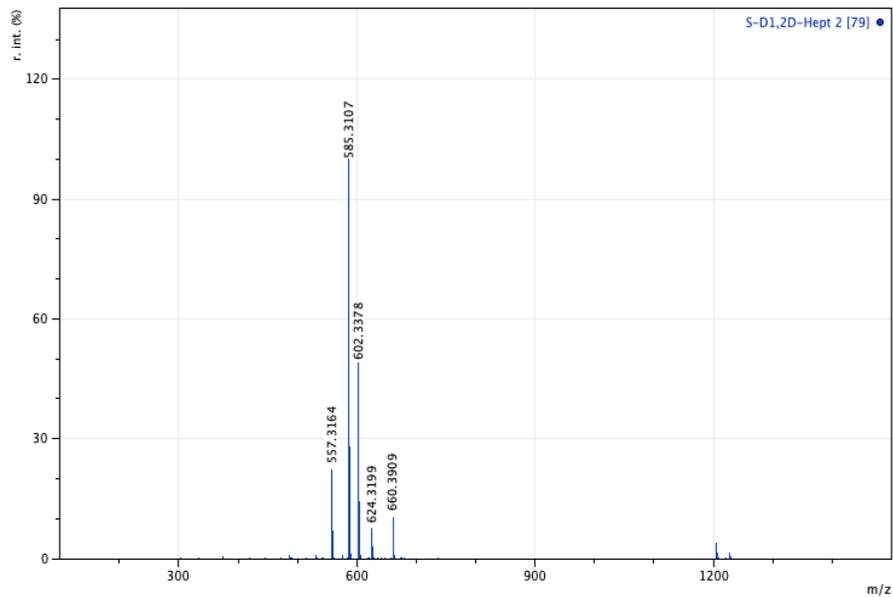
Espectro *TOCSY* de (42) em DMSO-*d*₆



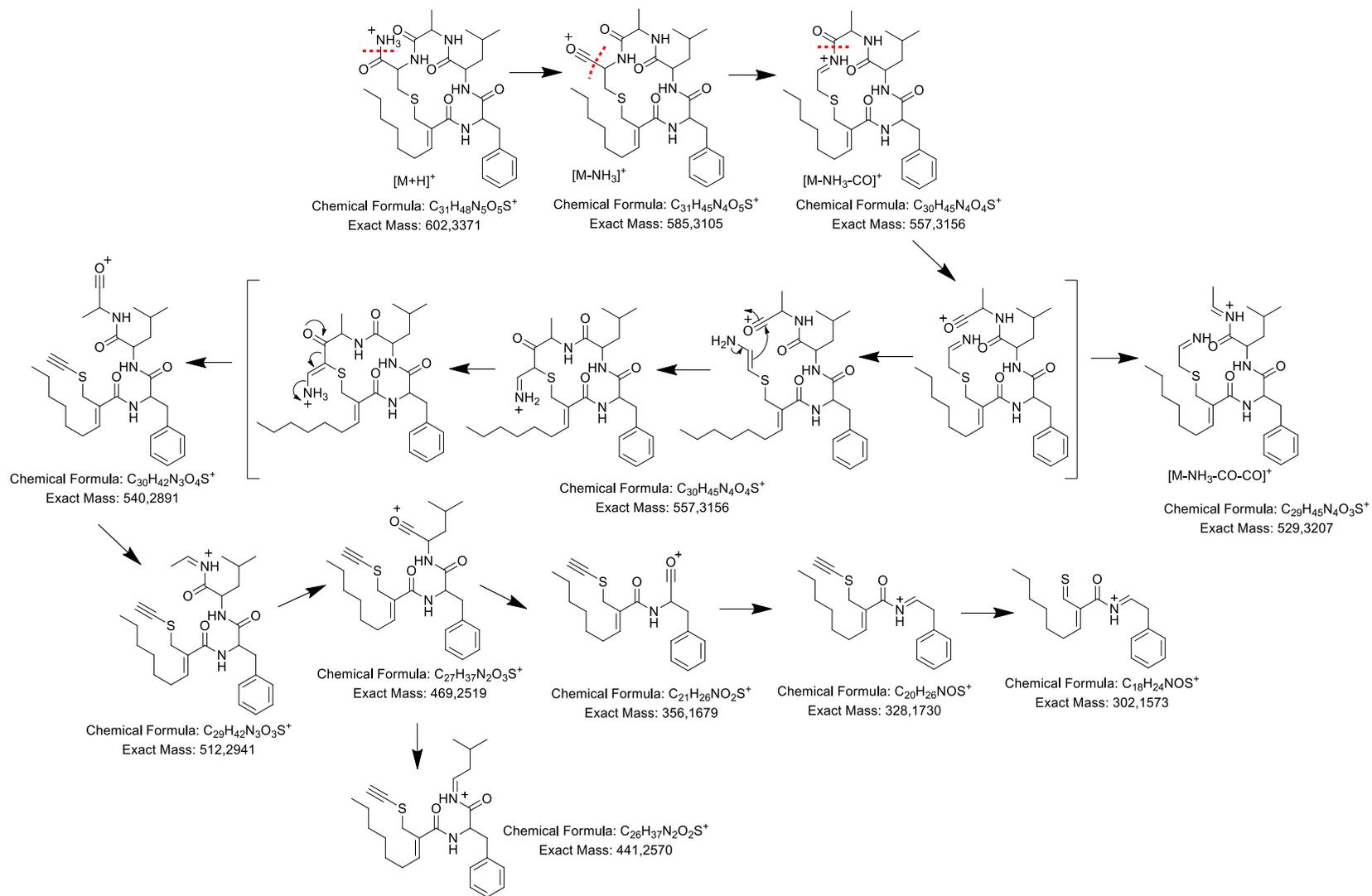
Espectro *NOESY* de (42) em DMSO-*d*₆



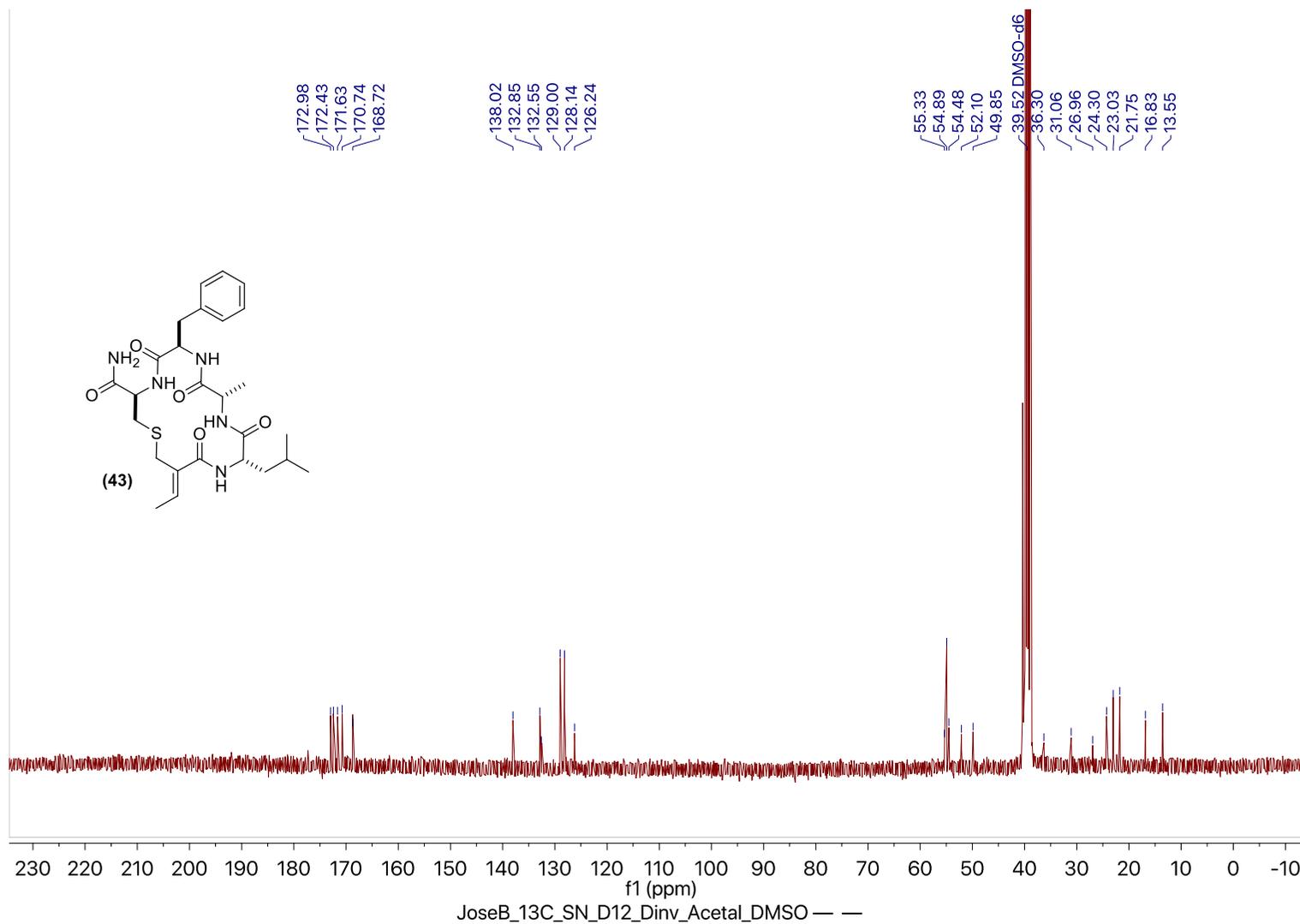
Espectros EMAR-IES-TOF, AR-MS/MS, IV-ATR e perfil de CLAE para o composto (42)



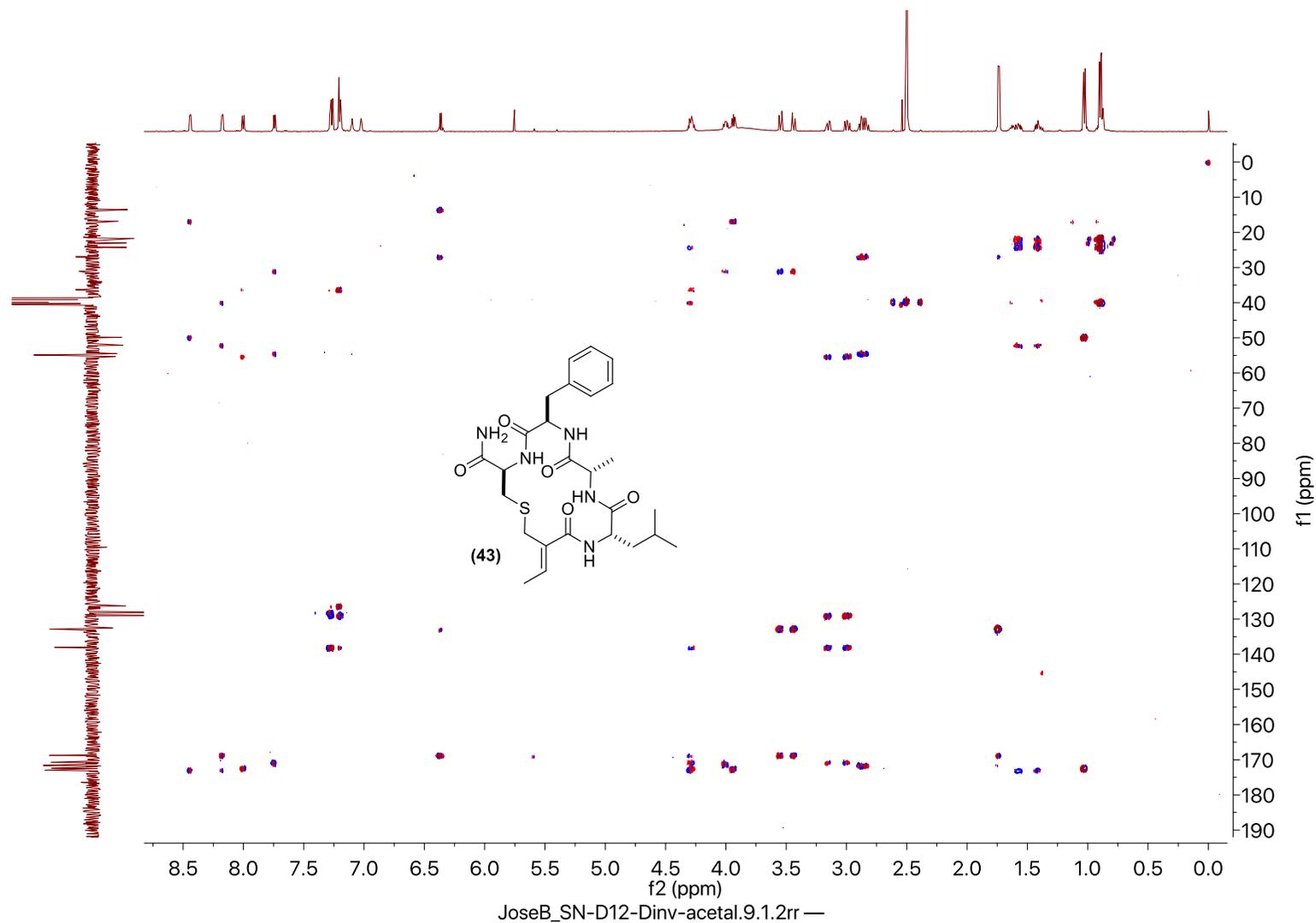
Fragmentações características observadas no IES-MS/MS para os compostos (41) e (42)



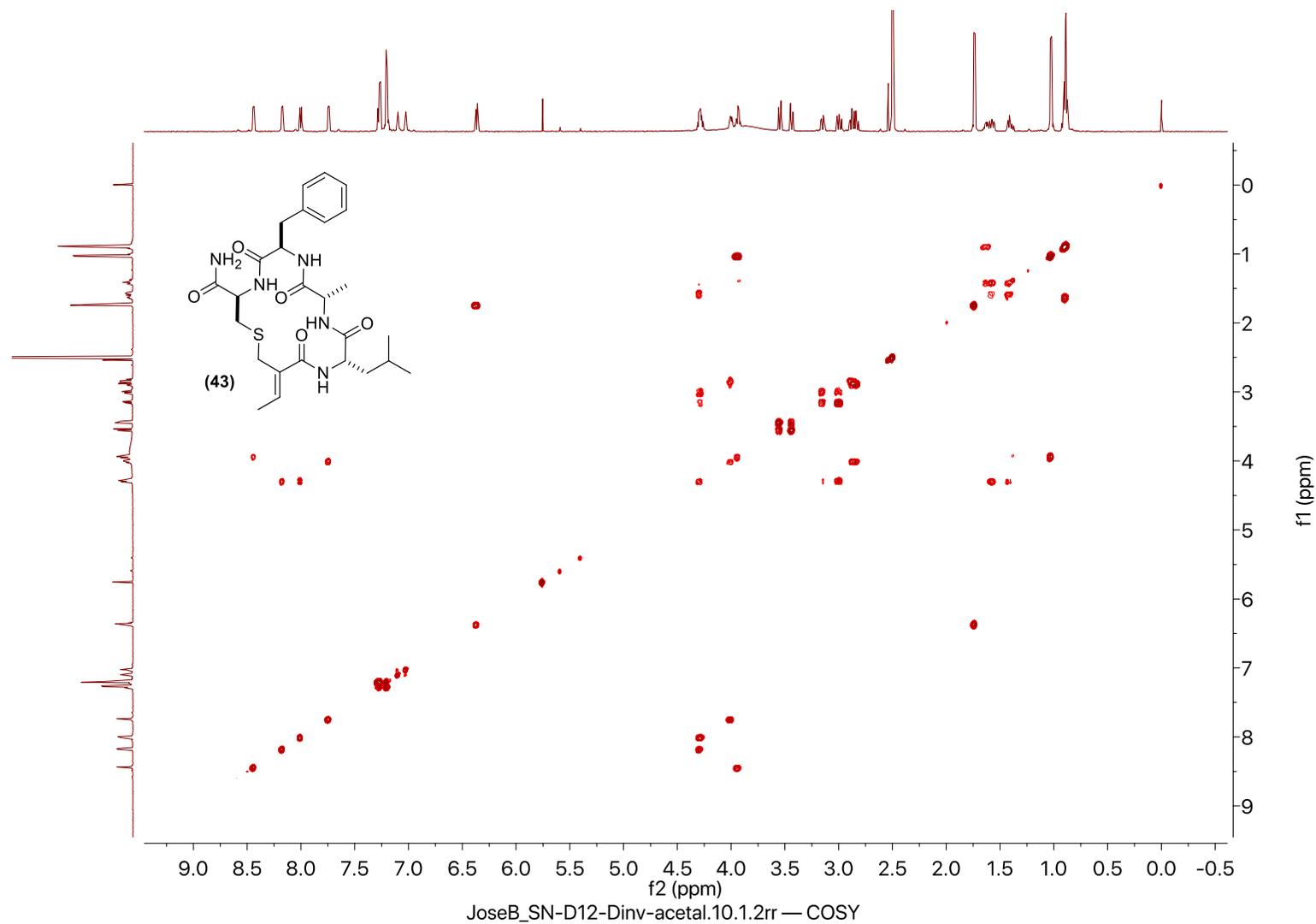
Espectro de RMN-¹³C de (43) em DMSO-*d*₆



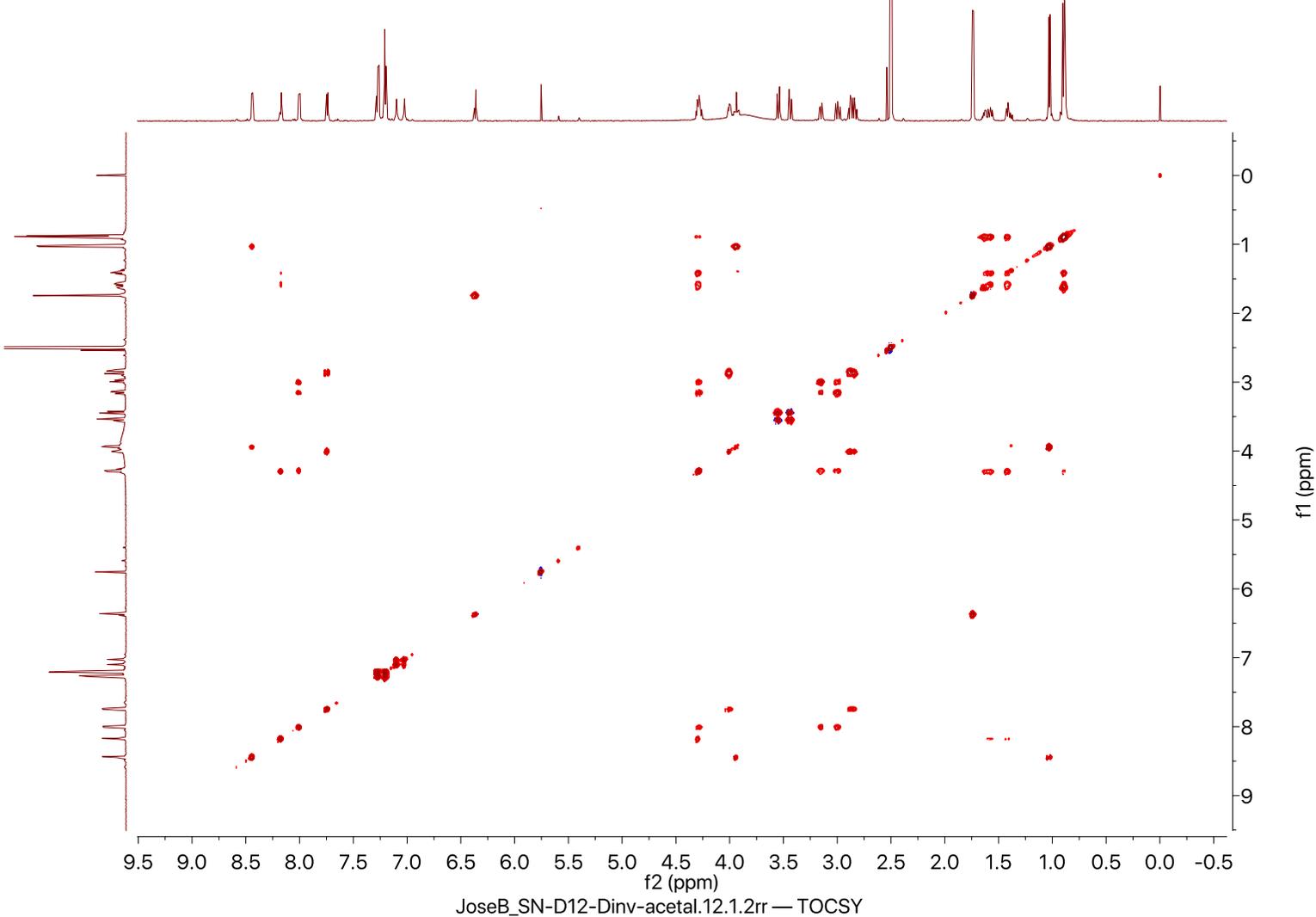
Espectro *HMBC* de (43) em DMSO-*d*₆



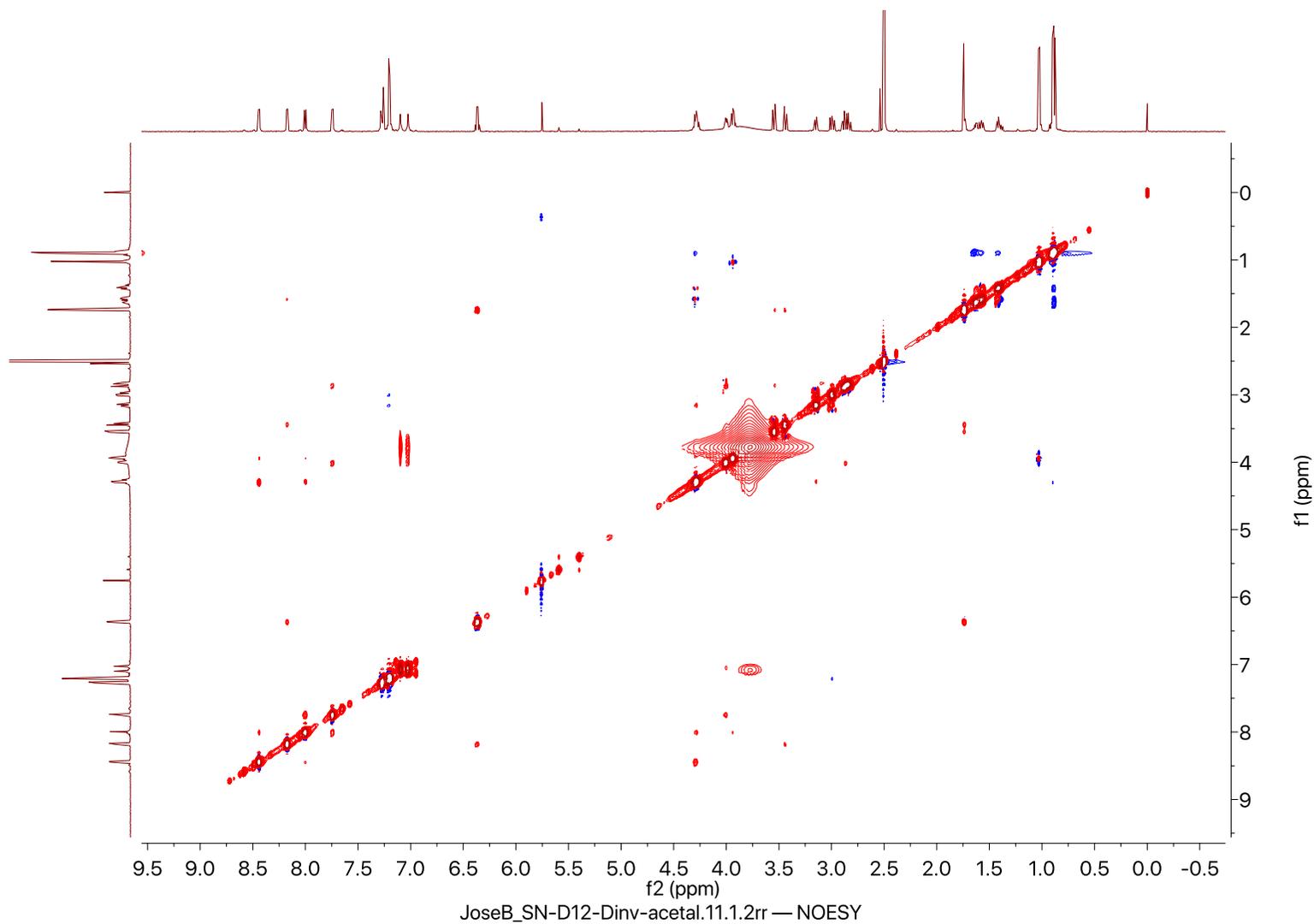
Espectro *COSY* de (43) em DMSO-*d*₆



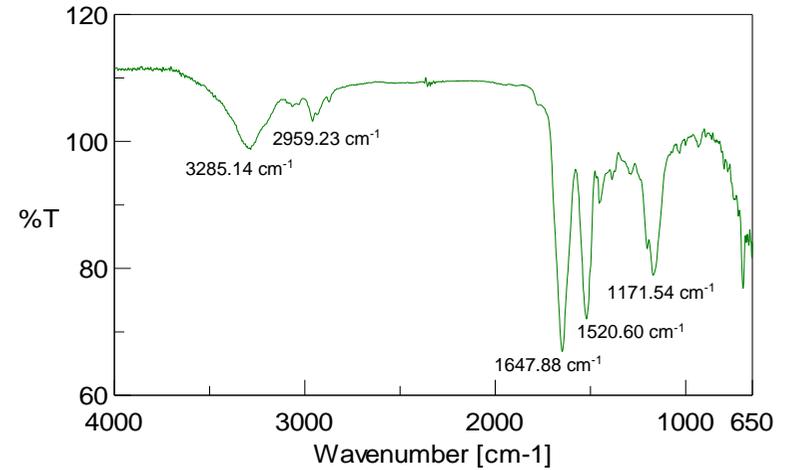
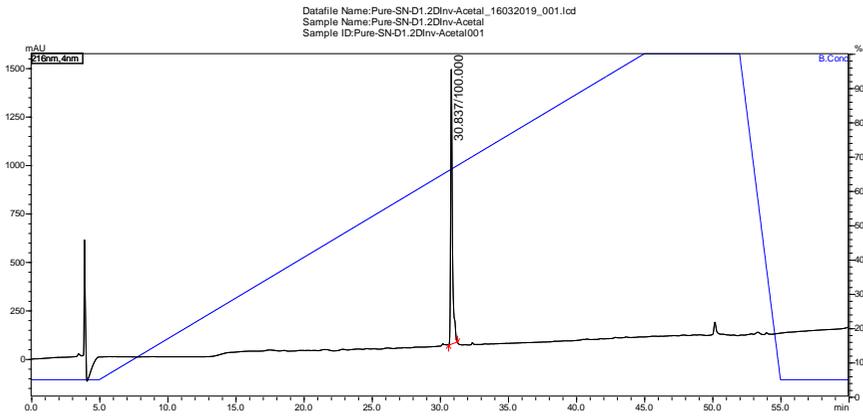
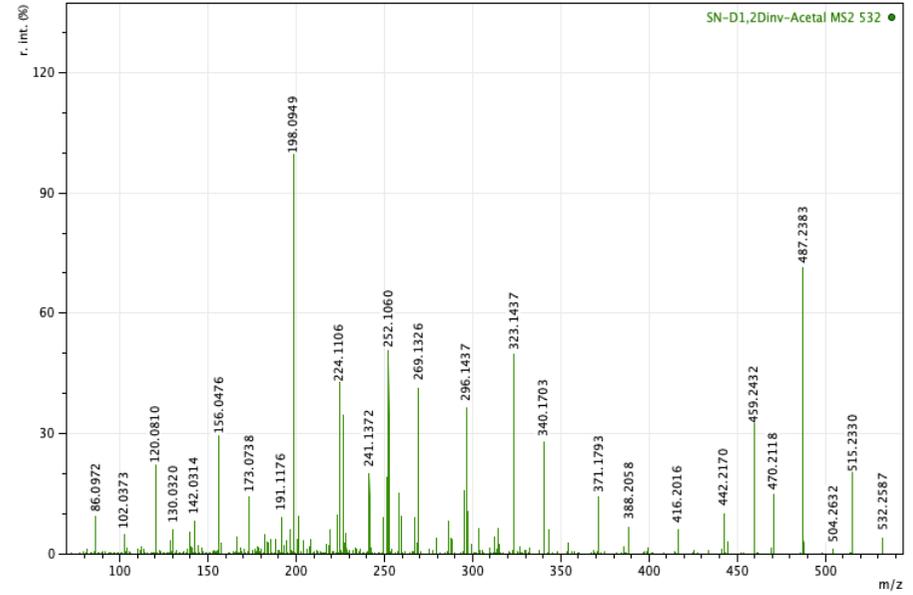
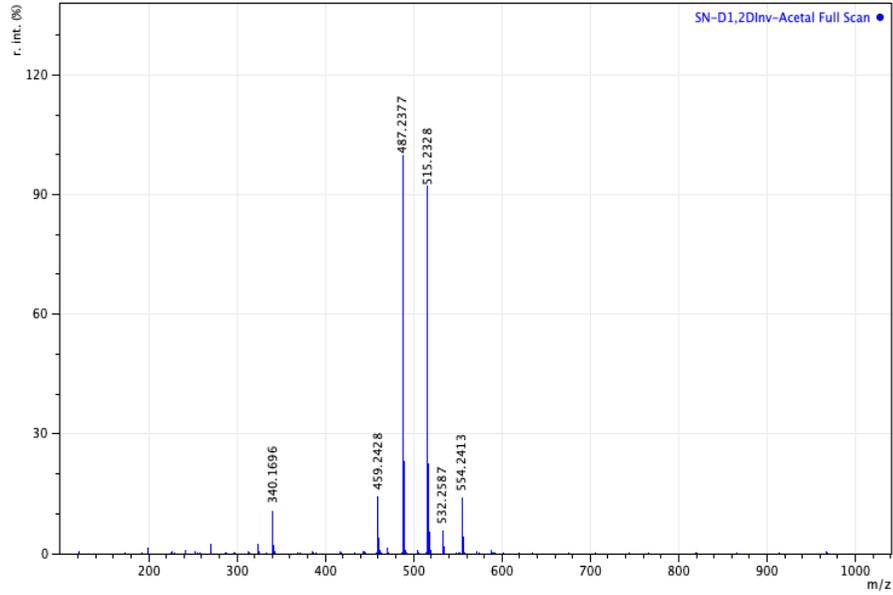
Espectro *TOCSY* de (43) em DMSO-*d*₆



Espectro *NOESY* de **(43)** em $\text{DMSO-}d_6$



Espectros EMAR-IES-TOF, AR-MS/MS, IV-ATR e perfil de CLAE para o composto (43)



Fragmentações características observadas no IES-MS/MS para o composto (43)

