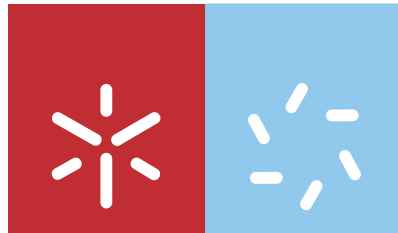


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Maria Helena Pereira Vilaça

Síntese de Derivados Cíclicos de RGD



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Maria Helena Pereira Vilaça

Síntese de Derivados Cíclicos de RGD

Dissertação de Mestrado em Química Medicinal

Trabalho efectuado sob a orientação da
**Professora Doutora Paula Margarida Vidigal
Soares Teixeira Ferreira**

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Este trabalho só foi possível graças à colaboração de diversos intervenientes que, directa ou indirectamente, ajudaram na sua realização. É com muito prazer que agradeço a todos eles.

Em primeiro lugar, gostaria de manifestar o meu reconhecimento à minha orientadora, a Doutora Paula Margarida Ferreira, pelo apoio e confiança depositados no meu trabalho, assim como por todos os ensinamentos transmitidos. Também agradeço pela simpatia com que me recebeu e pelo optimismo e disponibilidade sempre presentes.

Aos meus colegas de Mestrado e Laboratório pelo acolhimento e amizade mostrados; pelo companheirismo no laboratório mas também pelos momentos de convívio fora deste.

À Dra Elisa Pinto, pela solicitude manifestada na realização dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear e Análise Elementar.

À Universidade do Minho, em particular ao Departamento de Química, pelas condições de acolhimento proporcionadas para a realização deste trabalho.

A todos os meus amigos, porque sempre me apoiaram e acreditaram que era capaz. Obrigado pelos momentos de distração, que me ajudaram a superar as alturas menos optimistas. À minha segunda família no CAB e também à Vera, ao Miguel, ao André, à Daniela e à Ana; foram vocês quem mais me acompanhou durante este ano; obrigado por tudo.

Por fim, a toda a minha família, que sempre acreditou em mim, em particular aos meus pais e irmãos, pela sua compreensão, pela paciência, pelo incentivo, pela ajuda e acima de tudo, pelo amor e apoio ao longo de todo este tempo.

Muito obrigado a todos, espero não vos desiludir.

Resumo

Neste trabalho foram sintetizados, com diversos bis-aminoácidos através da reacção de ciclo-adição 1,3-dipolar de Huisgen entre azido- e alquinilaminoácidos e entre alquinilaminoácidos e bis-azidas. Os azido-aminoácidos foram obtidos pelo método de Wong, usando uma transferência diazo entre a azida de trifluorometanossulfonilo e a função amina do respectivo aminoácido. As bis-azidas foram sintetizadas a partir dos respectivos ácidos bis-borónicos com azida de sódio. Os alquinilaminoácidos foram obtidos através do acoplamento da propargilamina à função ácido carboxílico da cadeia principal ou lateral dos aminoácidos ou mediante uma reacção de substituição usando uma β -triazolildesidroalanina. A aplicação de diferentes condições reaccionais levou à síntese dos bis-aminoácidos com bons rendimentos.

Foram sintetizados diversos péptidos lineares contendo a sequência arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), usando a síntese peptídica em fase sólida e uma estratégia que envolve o uso do grupo 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc). Num dos péptidos foi acoplado um bis-aminoácido com o anel 1,2,3-triazole. Outro péptido foi ciclizado por formação de uma ligação amida, obtendo-se um péptido cíclico de RGD, c(Val-Arg[Pbf]-Gly-Asp[O^tBu]-Lys[Z]), com um resíduo de lisina protegido ortogonalmente na cadeia lateral, relativamente aos grupos protectores dos resíduos de arginina e ácido aspártico.

A reacção 1,3-dipolar de Huisgen também foi aplicada na ciclização de péptidos. Sintetizou-se um péptido linear com dois grupos alquino nos terminais amina e ácido carboxílico. Este péptido foi sintetizado em fase sólida e acoplado ao ácido 5-hexinóico no terminal amina. A propargilamina foi ligada em solução à função ácido carboxílico. A reacção deste péptido com a 1,4-benzenobis-azida permitiu obter um novo péptido cíclico contendo a sequência RGD. Após o tratamento com o ácido trifluoracético (TFA), obteve-se o péptido cíclico desprotegido contendo na sua estrutura dois anéis de 1,2,3-triazole.

Abstract

In this work we have synthesized, in good yields, several bis-amino acids using the Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition from azide- and alkynil-amino acids or from alkynilamino acids and bis-azides. The azide-amino acids were obtained from the corresponding amino acids and sodium azide by a diazo transfer using a sulfonyl azide as reported previously by Wong. The bis-azides were synthesized from the corresponding bis-boronic acids by treatment with sodium azide. The synthesis of the alkynil-amino acids was carried out by coupling propargylamine to the carboxylic acid function of amino acids or by a substitution reaction using as substrate a β -triazolyldehydroalanine.

Several peptides containing the arginine-glycine-aspartic acid (RGD) sequence were prepared using solid phase peptide synthesis (SPPS) and a 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) strategy. A bis-amino acid with a 1,2,3-triazole ring was coupled to one of the peptides. Another peptide containing a benzyloxycarbonyl protected lysine was cyclized by an amide bond using a head-to-tail strategy.

Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition was also applied in the cyclization of peptides with the RGD sequence. Thus, a linear peptide with two alkynil groups in the *N*- and *C*-terminals was prepared in a combined solid phase and solution strategy. This peptide was cyclized using 1,4-diazidobenzene. After cleavage of the protecting groups the cyclic RGD peptide was obtained and characterized.

Abreviaturas e Símbolos

%	Porcentagem
aa	Aminoácido
Abs	Absorvância
Ac	Acetilo
ACN	Acetonitrilo
AcOH	Ácido acético
Ala	<i>L</i> -Alanina
aq.	Aquoso
Ar	Aromático
Arg ou R	<i>L</i> -Arginina
Asn	<i>L</i> -Asparagina
Asp ou D	<i>L</i> -Ácido aspártico
Boc	<i>tert</i> -butiloxicarbonilo
Boc ₂ O	Dicarbonato de <i>tert</i> -butilo
Bu	Butilo
c	Ciclo
cat.	Catalisador
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
cm ⁻¹	1/Centímetros
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
Cy	Ciclohexilo
Cys	<i>L</i> -Cisteína
d	Dupleto
d.	Dias
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DCC	Diciclo-hexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
dd	Dupleto de dupleto
ddq	Dupleto de dupleto de quarteto
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DIC	Di-isopropilcarbodiimida

DIPEA	<i>N,N</i> -di-isopropiletilamina
DMAP	4-(<i>N,N'</i> -dimetilamino)piridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>D</i> -Phe ou <i>f</i>	<i>D</i> -Fenilalanina
DPPA	Fenilfosforilazida
dt	Dupleto de tripleto
DVB	Divinilbenzeno
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
eq.	Equivalentes
Et ₃ N	Trietilamina
<i>f</i>	Banda forte
<i>F</i>	<i>L</i> -Fenilalanina
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
Fmoc-Cl	Cloroformiato de 9-fluorenilmetilo
<i>g</i>	Gramas
Glu	Ácido <i>L</i> -glutâmico
Gly ou <i>G</i>	<i>L</i> -Glicina
<i>h</i>	Horas
HATU	Hexafluorofosfato de <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilurônio
HBTU	Hexafluorofosfato de <i>O</i> -(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilurônio
His	<i>L</i> -Histidina
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HOAt	1-Hidroxi-7-azabenzotriazole
HOBt	1-Hidroxibenzotriazole
HRMS	Espectrometria de massa de alta resolução (<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>)
Hz	Hertz
<i>i</i>	<i>ipso</i>
Ile	<i>L</i> -Isoleucina
IV	Infravermelho

J	Constante de acoplamento (expressa em Hz)
l	Banda larga
Leu	<i>L</i> -Leucina
lit.	Literatura
L _n	Ligando
Lys ou K	<i>L</i> -Lisina
<i>m</i>	<i>meta</i>
M	Molar (mmol/mL)
m	Multiplete
Me	Metilo
MeOH	Metanol
Met	<i>L</i> -Metionina
mg	Miligramas
MHz	Megahertz
min.	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar (mmol/L)
mmol	Milimoles
mol	Moles
mol%	Equivalentes em percentagem molar
Mtr	4-metoxi-2,3,6-trimetilfenilsulfonilo
nm	Nanómetros
<i>o</i>	<i>orto</i>
°C	Graus centígrados
<i>p</i>	<i>para</i>
p.f.	Ponto de fusão
Pbf	2,2,4,6,7-pentametildihidrofuran-5-sulfonilo
Pen	Penicilamina
PET	Tomografia de emissão de positrões (<i>Positron Emission Tomography</i>)
pm	Picómetros
ppm	Partes por milhão
Pro	<i>L</i> -Prolina
q	Quarteto

quint	Quinteto
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de próton
s	Singleto
sept	Septeto
Ser	<i>L</i> -Serina
SIMes	1,3-bis-(2,4,6-trimetilfenil)imidazole
sl	Singleto largo
SPPS	Síntese de péptidos em fase sólida (<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>)
t	Tripleto
t.a.	Temperatura ambiente
t.l.c.	Cromatografia em camada fina (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
TBTU	Tetrafluorborato de <i>O</i> -(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilurônio
^tBu	<i>Terc</i> -butilo
Tf	Trifluormetanossulfonilo
TFA	Ácido trifluoracético
TFE	2,2,2-Trifluoretanol
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico
Tos	Tosilo
Trp ou W	<i>L</i> -Tryptofano
Tyr	<i>L</i> -Tirosina
UV	Ultravioleta
v	<i>D</i> -Valina
Val ou V	<i>L</i> -Valina
Z	Benziloxicarbonilo
δ	Desvio químico (expresso em unidades de ppm)
ΔAla	Desidroalanina
δ_{C}	Desvio químico de carbono
δ_{H}	Desvio químico de próton
η	Rendimento
μmol	Micromoles
ν	Frequência (em unidades de cm^{-1})

Índice

1. Introdução	1
1.1. Péptidos cíclicos com a sequência RGD.....	3
1.1.1. Métodos de síntese	5
1.1.2. Síntese de péptidos cíclicos com a sequência RGD	8
2. Resultados e Discussão	17
2.1. Síntese de precursores.....	19
2.1.1. Síntese de Fmoc-aminoácidos	19
2.1.2. Síntese de alquilaminoácidos	19
2.1.3. Síntese de azido-aminoácidos.....	22
2.1.4. Síntese de bis-azidas.....	23
2.2. Síntese de bis-aminoácidos utilizando a reação de adição 1,3-dipolar de Huisgen.....	24
2.3. Síntese em fase sólida de péptidos contendo a sequência RGD	29
2.4. Síntese de péptidos cíclicos contendo a sequência RGD	40
3. Conclusões e Perspectivas Futuras	47
4. Parte Experimental	51
4.1. Procedimentos gerais	53
4.2. Síntese de precursores.....	54
4.2.1. Síntese de Fmoc-Trp-OH ⁵⁴ , 2a	54
4.2.2. Síntese de Fmoc-D-Phe-OH ⁵⁴ , 2b	54
4.2.3. Síntese de Fmoc-Lys-OH.TFA, 2d	55
4.2.4. Síntese de H-Ser-OMe.HCl ⁶⁵ , 10	56
4.2.5. Síntese de Tos-Ser-OMe ⁵⁶ , 11	56
4.2.6. Síntese de Tos-ΔAla(N-Boc)-OMe ⁶⁷ , 12	57

4.2.7.	Síntese de (<i>E</i>)-Boc- Δ Ala[β -(1,2,4-triazol-1-il)]-OMe ⁶⁸ , 13	57
4.2.8.	Síntese de Boc-Gly-OH ⁵⁵ , 3	58
4.2.9.	Síntese de azido-aminoácidos e bis-azidas	58
4.2.9.1.	Síntese de N ₃ -Gly-OH ⁶¹ , 15a	58
4.2.9.2.	Síntese de Z-Lys(N ₃)-OH, 15b	59
4.2.9.3.	Síntese da bis-azida 17a	60
4.2.9.4.	Síntese da bis-azida 17b	60
4.2.10.	Síntese de alquilaminoácidos	61
4.2.10.1.	Síntese de Boc-Gly-propargilamina, 4a	61
4.2.10.2.	Síntese de Fmoc-Gly-propargilamina, 4b	62
4.2.10.3.	Síntese de Fmoc-Asp(β -propargilamino)-O ^t Bu, 6a	63
4.2.10.4.	Síntese de Fmoc-Asp(β -propargilamino)-OH, 7	64
4.2.10.5.	Síntese de (<i>E</i>)-Boc- Δ Ala(β -propargilamino)-OMe ⁵⁹ , 6b	64
4.3.	Síntese de bis-aminoácidos utilizando a reação de adição 1,3-dipolar de Huisgen	65
4.3.1.	Síntese do composto 18a	65
4.3.1.1.	Com Cu(I)	65
4.3.1.2.	Com Cu(II)	66
4.3.2.	Síntese do composto 18b	66
4.3.3.	Síntese do composto 19a	67
4.3.4.	Síntese do composto 19b	67
4.3.5.	Síntese do composto 20	68
4.3.6.	Síntese do composto 18c	69
4.4.	Síntese em fase sólida de péptidos contendo a sequência RGD	70
4.4.1.	Procedimentos gerais da fase sólida	70
4.4.1.1.	<i>Loading</i> da resina	70
4.4.1.2.	Clivagem do Fmoc	70

4.4.1.3.	Acoplamento do aminoácido ao péptido na resina	71
4.4.1.4.	Clivagem do péptido da resina.....	71
4.4.2.	Síntese de H-Gly-Arg(Pbf)-Gly-Asp(O ^t Bu)-Trp-OH.AcOH, 21	71
4.4.3.	Síntese de H-Val-Arg(Pbf)-Gly-Asp(O ^t Bu)-Lys(Z)-OH.AcOH, 22	72
4.4.4.	Síntese do péptido 23	73
4.4.5.	Síntese do péptido 24	74
4.5.	Reacções dos péptidos contendo a sequência RGD; ciclização de péptidos ...	75
4.5.1.	Síntese de H-Gly-Arg(Pbf)-Gly-Asp-Trp-OH.TFA, 25	75
4.5.2.	Síntese do péptido 26	76
4.5.3.	Síntese de c[Val-Arg(Pbf)-Gly-Asp(O ^t Bu)-Lys(Z)], 27	78
4.5.4.	Síntese do péptido cíclico 28	79
4.5.5.	Síntese do péptido cíclico 29	80
Bibliografia.....		83

1. Introdução

1.1. Péptidos cíclicos com a sequência RGD

A sequência arginina-glicina-ácido aspártico [Arg-Gly-Asp (RGD)] (Figura 1) é encontrada em várias proteínas da matrix extracelular (vitronectina, fibrogénio e fibronectina, entre outras) e é responsável pelas interacções destas proteínas com uma série de receptores celulares conhecidos como integrinas^{1,2}.

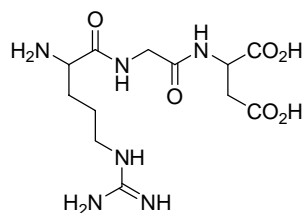


Figura 1. Tripéptido com a sequência RGD.

As integrinas participam na transdução de sinais celulares e estão envolvidas em processos importantes, tais como a regulação da proliferação celular e a apoptose³. Entre os membros desta família de receptores a integrina $\alpha_v\beta_3$ está directamente relacionada com a evolução e difusão de células tumorais e com a angiogénese². Este último processo é essencial no crescimento de tumores sólidos e no desenvolvimento de metástases⁴. A integrina $\alpha_v\beta_3$ encontra-se sobre-expressa nas células endoteliais activadas de tumores e em algumas células tumorais (glioblastomas, melanomas e carcinomas da mama, ovário e próstata)⁵. Como a integrina $\alpha_v\beta_3$ reconhece a sequência RGD, este tipo de péptidos pode ser usado como agentes anti-tumorais⁴ ou no desenvolvimento de agentes vectorizados para imagem médica não invasiva de tumores (Figura 2)^{6,7,8}.

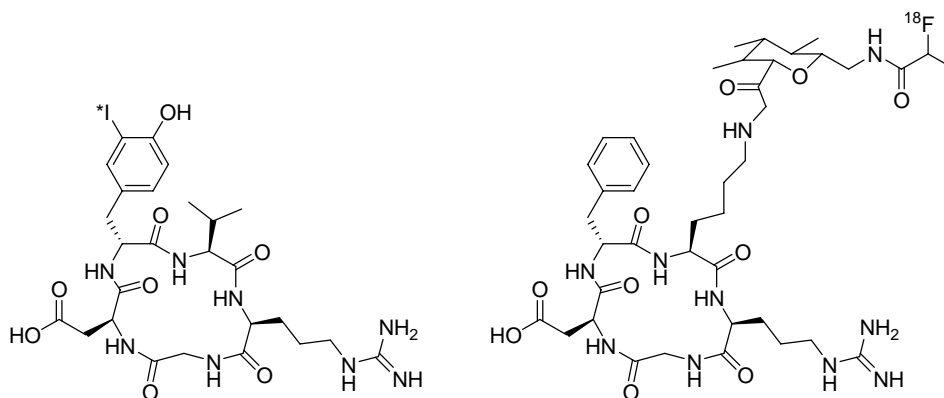


Figura 2. Agentes vectorizados para imagem médica não invasiva de tumores⁹.

Nos últimos anos foram efectuados vários estudos de relação estrutura-actividade entre péptidos com a sequência RGD e a integrina $\alpha_v\beta_3$, que conduziram ao desenvolvimento de vários compostos com elevada afinidade para este receptor^{4,10,11,12,13}.

Pierschbacher *et al*¹² estudaram diversos péptidos com a sequência RGD, tendo verificado que a substituição destes resíduos por aminoácidos quimicamente semelhantes ou pelos seus enantiómeros conduzia a uma diminuição da afinidade dos ligandos para a integrina $\alpha_v\beta_3$. Este estudo também mostrou que a afinidade para esta integrina de péptidos cíclicos com a sequência RGD era cerca de dez vezes superior à demonstrada pelos análogos lineares^{12,13}.

Kessler *et al*^{3,10,11} realizaram estudos estrutura/actividade de hexa- e pentapéptidos cíclicos com a sequência RGD e verificaram que a selectividade para a integrina $\alpha_v\beta_3$ era maior quando as distâncias entre os átomos de carbono α e β da arginina e do ácido aspártico era de 500 pm e 700 pm, respectivamente. Quanto à influência dos restantes aminoácidos, estabeleceram que a presença de um resíduo aromático hidrofóbico, como a fenilalanina ou o triptofano, a seguir ao ácido aspártico conduzia a um aumento da afinidade. A presença de um *D*-aminoácido na posição 4 também mostrou ser preferível relativamente aos análogos com o enantiómero *L*.

Estes estudos levaram aos ciclopentapéptidos c(RGDfV) e c(RGDFv) (Figura 3), com elevada afinidade e selectivos para o receptor $\alpha_v\beta_3$.

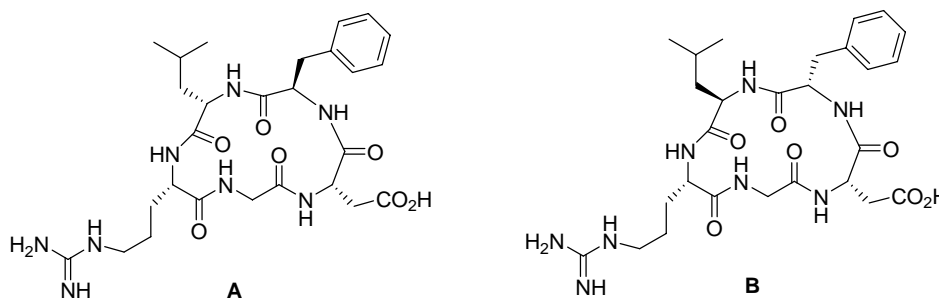


Figura 3. Estruturas dos péptidos c(RDGfV) (A) e c(RGDFv) (B).

A *N*-metilação do resíduo de valina do péptido c(RGDfV) levou à descoberta do pentapéptido cíclico c(RGDf[NMe]V), cuja afinidade para a integrina $\alpha_v\beta_3$ é cerca de quatro vezes maior, relativamente ao derivado não metilado¹⁴. Este péptido encontra-se actualmente na fase II dos ensaios clínicos como fármaco antitumoral (Cilengitide, EMD 121974)⁵.

A análise da estrutura de raios-X do complexo entre o fragmento extracelular da integrina $\alpha_v\beta_3$ e o pentapéptido c(RGDf[NMe]V) mostrou que o péptido se insere entre as duas subunidades α e β da integrina, ficando os resíduos de arginina e ácido aspártico virados para lados opostos^{1,15}. A Figura 4 mostra as principais interações entre a integrina $\alpha_v\beta_3$ e o péptido cíclico, sendo possível verificar que tanto os oxigénios da cadeia lateral do ácido aspártico como o hidrogénio da ligação amida entre a glicina e o ácido aspártico estabelecem interações importantes com a integrina. O mesmo acontece com o grupo guanidínio da arginina. O resíduo de glicina encontra-se entre as subunidades α e β e estabelece interações hidrofóbicas. O resíduo de fenilalanina estabelece interações hidrofóbicas com um resíduo de tirosina da integrina. A valina parece não estabelecer interações com a integrina, o que apoia a hipótese de este ser um bom resíduo para inserir alterações funcionais no pentapéptido.

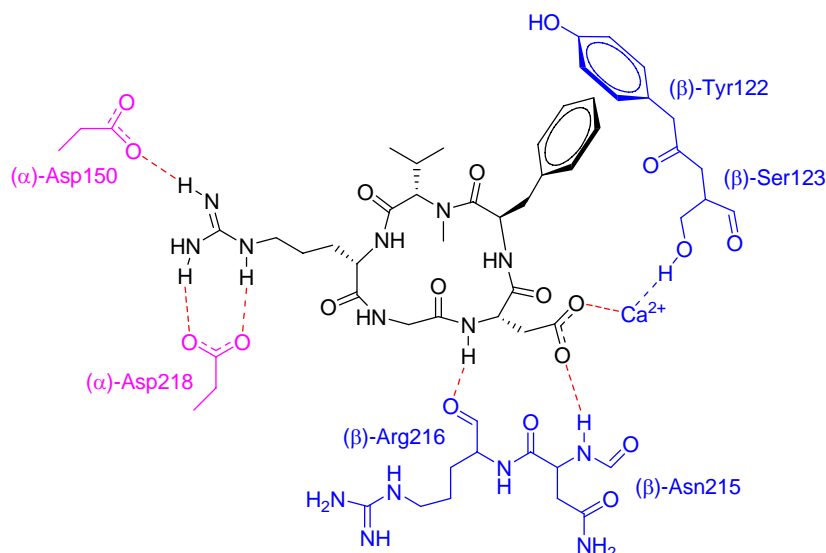


Figura 4. Representação esquemática das principais interações entre o péptido c(RGDf[NMe]V) e a integrina $\alpha_v\beta_3$ ¹ (o péptido está a preto; a subunidade α a rosa; a subunidade β a azul; as interações a vermelho).

1.1.1. Métodos de síntese

A descoberta dos péptidos c(RGDfV) e c(RGDf[NMe]V) levou à síntese de outros péptidos cíclicos com a sequência RGD, usando diferentes estratégias. Alguns péptidos foram sintetizados numa tentativa de reduzir a flexibilidade, o que facilitaria o estudo da

conformação activa^{16,17}; outros, para melhorar a actividade e farmacocinética, sem aumentar a toxicidade^{5,9,18}.

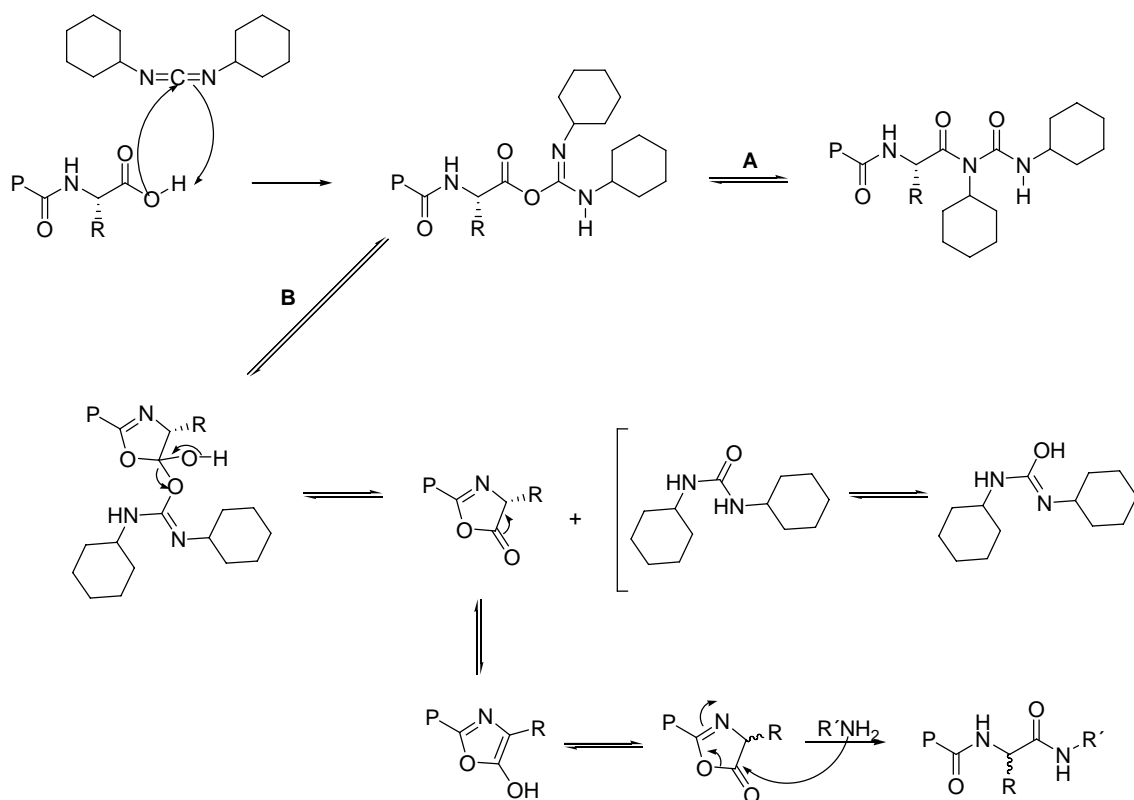
A síntese de péptidos pode ser efectuada em solução, em fase sólida ou utilizando uma combinação das duas estratégias anteriores.

A síntese de péptidos em fase sólida (SPPS)¹⁹ veio fornecer um meio bastante eficiente na síntese de péptidos. Enquanto a síntese em solução é eficaz na preparação de péptidos pequenos, quando se trata de péptidos com cadeias mais longas, surgem problemas de solubilidade e de purificação. Na síntese peptídica em fase sólida grande parte destes problemas é eliminada, uma vez que o péptido em construção encontra-se ligado a um suporte sólido polimérico insolúvel, sendo possível utilizar um excesso de reagentes e remover os produtos secundários por filtração¹⁹. A lavagem da resina com solventes adequados garante a eliminação completa dos produtos indesejados enquanto o uso de excesso dos reagentes de partida assegura bons rendimentos¹⁹. O desenvolvimento de novos suportes sólidos e de grupos protectores, bem como a possibilidade de automação tem levado a um uso cada vez maior da síntese em fase sólida para a construção de péptidos e pequenas proteínas²⁰.

Os grupos protectores em SPPS são normalmente o grupo *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) e o grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc)²¹. O grupo Boc é removido com ácidos, como o ácido trifluoracético (TFA), o ácido clorídico (HCl) ou o ácido sulfúrico (H₂SO₄)^{22,23}. A clivagem do grupo Fmoc ocorre em condições moderadamente básicas, normalmente 20% de piperidina ou morfolina num solvente orgânico²³, condições compatíveis com uma variedade de grupos protectores bastante superior à permitida com o uso do grupo Boc. A clivagem dos péptidos da resina sintetizados utilizando a estratégia Fmoc é feita normalmente em meio ácido²¹. No caso da estratégia Boc, a clivagem do péptido da resina é efectuada simultaneamente com a clivagem dos grupos da cadeia lateral, com ácido fluorídrico (HF) anidro^{21,24}.

A reacção de formação da ligação peptídica requer a activação da função ácido carboxílico, o que pode ser efectuada utilizando vários métodos²¹. Os agentes de acoplamento são uma das formas de promover a formação da ligação peptídica. Destes, os mais usados são as carbodiimidas²¹, sendo as mais comuns a dicitclohexilcarbodiimida (DCC) e a di-isopropilcarbodiimida (DIC). Estes reagentes ligam-se à função ácido carboxílico, formando *O*-acil ureias. As *O*-acil ureias são muito

reactivas, o que pode levar à racemização do aminoácido, por formação de uma oxazolona (Esquema 1).



Esquema 1. Activação do ácido carboxílico com DCC e possíveis reacções secundárias. **A:** rearranjo numa *N*-ácil ureia; **B:** racemização (P – grupo protector; R – cadeia lateral do aminoácido; R'NH₂ – aminoácido acoplado).

Para evitar este tipo de problemas, surgiu o uso de benzotriazoles²¹, como o 1-hidroxibenzotriazole (HOBt) ou o 1-hidroxi-7-azabenzotriazole (HOAt) (Figura 5). Estes compostos são capazes de reagir com as *O*-ácil ureias, formando ésteres activos, menos reactivos mas capazes de reagir com a amina.

Outros reagentes de acoplamento incluem os sais de urónio e de fósforo²¹. O hexafluorofosfato de *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurónio (HBTU) e o tetrafluorborato de *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurónio (TBTU) são exemplos deste tipo de reagentes (Figura 5).

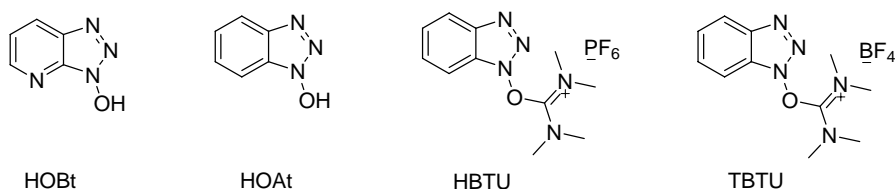


Figura 5. Estruturas dos agentes de acoplamento HOBt, HOAt, HBTU e TBTU.

Tendo em conta as características dos agentes de acoplamento existentes, tem-se verificado o uso de diferentes combinações destes agentes, quer na síntese em solução quer em fase sólida. As carbodiimidas DIC e DCC têm sido usadas nas duas estratégias de síntese peptídica^{5,24}, normalmente em conjunto com o HOBt. Em fase sólida é preferível o uso da DIC, devido ao seu menor volume e à maior solubilidade da ureia formada em solventes orgânicos, o que facilita a sua remoção por filtração²¹.

A reacção de ciclização de péptidos mais comum é a que envolve os grupos amina e ácido carboxílico dos extremos da cadeia peptídica, com formação de uma ligação amida. Este tipo de ciclização é normalmente denominado por ciclização *head-to-tail* e pode ser realizada utilizando os métodos usuais de formação da ligação amida²⁵. A ciclização *head-to-tail* apresenta alguns problemas, tais como a possibilidade de ocorrer dimerização e epimerização^{26,25}. A dimerização pode ser minimizada usando concentrações muito baixas do péptido (10^{-3} a 10^{-4} M) durante a ciclização. A epimerização é normalmente evitada com o uso de glicina na extremidade do ácido carboxílico do péptido^{26,25}. Quando não é possível utilizar este resíduo nessa posição, verificou-se que os reagentes de acoplamento como o HOAt minimizam a epimerização²⁵.

1.1.2. Síntese de péptidos cíclicos com a sequência RGD

Zhang *et al*²⁶ sintetizaram um péptido cíclico com a sequência RGD utilizando uma ciclização *head-to-tail* entre os resíduos de glicina e ácido aspártico, na presença de HBTU e *N,N*-di-isopropiletilamina (DIPEA) (Figura 6, A).

Kessler *et al*^{10,27} prepararam vários péptidos cíclicos com a sequência RGD através de uma ciclização *head-to-tail* usando como reagente de acoplamento na reacção de ciclização a fenilfosforilazida (DPPA) (Figura 3).

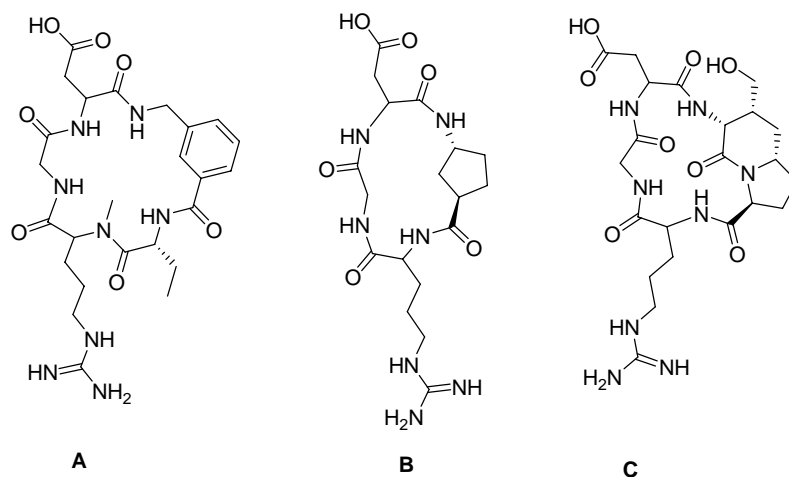


Figura 6. Estrutura de alguns péptidos cíclicos contendo a sequência RGD.

Em 2005, Casiraghi *et al*¹⁸ usaram o mesmo reagente DPPA em presença de bicarbonato de sódio para ciclizar miméticos peptídicos com a sequência RGD. Alguns dos compostos preparados evidenciaram afinidades iguais ou superiores às dos péptidos c(RGDfV) e c(RGDf[NMe]V) (Figura 6, **B**).

Manzoni *et al*⁵ prepararam péptidos cíclicos com lactamas bicíclicas incorporadas na cadeia principal do péptido. Estes autores optaram por efectuar a ciclização usando hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurónio (HATU), HOAt e DIPEA em DMF seco. O composto **C** da Figura 6, em particular, mostrou elevada afinidade para as integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$.

Para além da ciclização *head-to-tail* é possível promover a ciclização de cadeias peptídicas envolvendo as cadeias laterais dos aminoácidos. O tipo de ligação mais comum neste tipo de ciclização é a ponte dissulfeto^{12,24,28}. Os péptidos ciclizados através desta ligação são normalmente obtidos por inserção de dois resíduos de cisteína. A reacção ocorre em meio aquoso, na presença de agentes oxidantes, como o hexacianoferrato(III) de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$)^{12,24}. Este tipo de ciclização permitiu a síntese de péptidos com a sequência RGD e com elevada afinidade para o receptor $\alpha_v\beta_3$ (Figura 7, **A** e **B**).

Um outro tipo de ciclização através das cadeias laterais dos aminoácidos naturais é a formação de uma ligação amida entre resíduos de ácido glutâmico ou ácido aspártico e lisina^{29,30}.

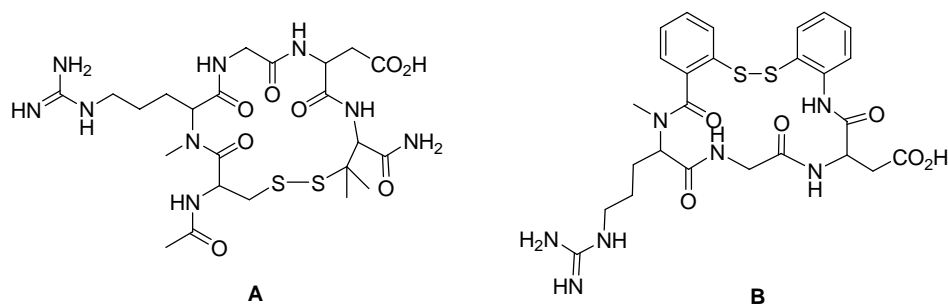


Figura 7. Estrutura dos péptidos Ac-ciclo-S-S-[Cys-(N^{α} -metil)Arg-Gly-Asp-Pen]-NH₂²⁴ (A) e 2-mercaptobenzoil-(N^{α} -metil)Arg-Gly-Asp-2-mercapto-anilida¹ (B).

A introdução de determinados grupos funcionais nas cadeias laterais dos aminoácidos ou na cadeia principal dos péptidos permite utilizar várias metodologias na ciclização de péptidos.

A metátase de alquenos é um exemplo de uma reacção que pode ser usada na ciclização de péptidos. Nesta reacção forma-se uma ligação carbono-carbono. Chaleix *et al*³¹ reportaram um péptido cíclico com a sequência RGD, usando esta reacção em fase sólida. Foram introduzidos nas posições 1 e 5 da cadeia peptídica resíduos de α -alilglicina, que ciclizaram na presença de um catalisador de ruténio (Figura 8).

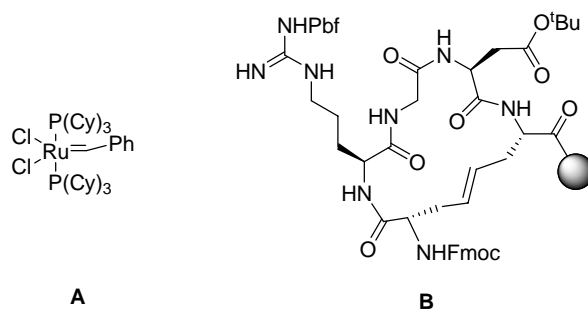
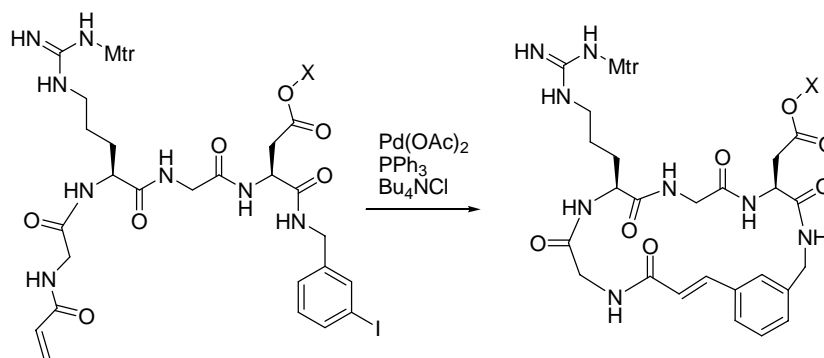


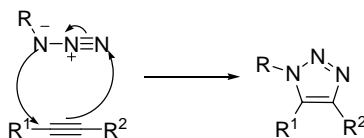
Figura 8. Estrutura do catalisador de Grubbs de ruténio³² (A) e do péptido c(alilGly-Arg-Gly-Asp-alilGly)-resina³¹ (B).

Em 2001, Akaji *et al*³³ usaram a reacção de Heck para obter péptidos cíclicos com a sequência RGD. Esta reacção ocorre entre um haleto de arilo e um alqueno em presença de um catalisador de paládio. Estes autores ligaram à função ácido carboxílico terminal a 3-iodobenzilamina e à função amina terminal o ácido propenóico. A ciclização ocorreu em presença de acetato de paládio, trifenilfosfina e cloreto de tetrabutylamónio (Esquema 2).



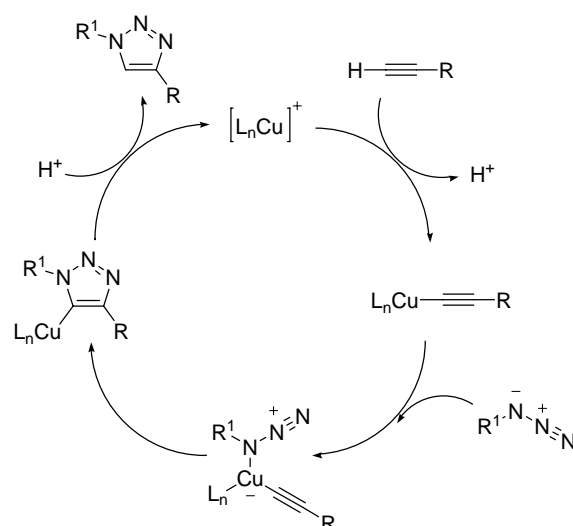
Esquema 2. Síntese de um péptido cíclico com a sequência RGD através da reacção de Heck, em fase sólida (X = resina) e em solução (X = H). **Condições:** 37°C; DMF/H₂O/Et₃N.

A reacção de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen também foi usada na ciclização de péptidos. Esta reacção consiste numa cicloadição concertada entre um dipolo-1,3 e um dipolarófilo (Esquema 3). Quando as duas espécies envolvidas são uma azida e um alquino, o produto da reacção é um anel de 1,2,3-triazole.



Esquema 3. Cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen de uma azida (dipolo-1,3) e um alquino (dipolarófilo).

A introdução da catálise com cobre(I) por Sharpless *et al*³⁴ levou a uma total regioselectividade da cicloadição para os 1,2,3-triazoles-1,4-dissubstituídos e permitiu reacções mais rápidas à temperatura ambiente. Sharpless³⁴ verificou que o cobre(I) pode ser gerado *in situ* a partir de sulfato de cobre penta-hidratado e ascorbato de sódio (como agente redutor), ou pode ser usado directamente um sal de cobre(I), tal como CuI, CuOTf.C₆H₆ ou [Cu(MeCN)₄][PF₆], em conjunto com um equivalente molar de uma base azotada. O mecanismo sugerido para a reacção catalisada por cobre(I) passa pela ligação do alquino ao cobre, seguida da ligação desta espécie à azida. A reacção evolui para a formação do triazole e regeneração da espécie de cobre(I) inicial (Esquema 4). Este mecanismo explica a regioselectividade obtida com a catálise.



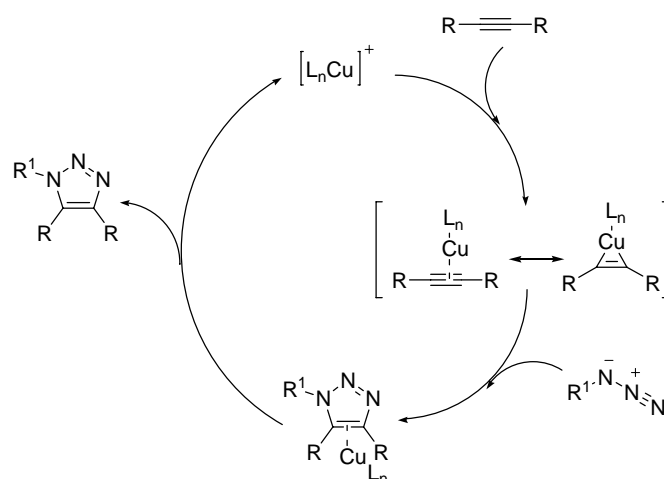
Esquema 4. Ciclo catalítico da cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen catalisada por cobre(I).

Desde o trabalho de Sharpless³⁴ surgiu uma vasta gama de catalisadores de cobre eficazes, tais como sais de Cu(I) (CuI ^{35,36} e $CuBr$ ^{37,38}), sais de Cu(II) em conjunto com um agente redutor^{39,40,41}, cobre(I) gerado por comproporção de Cu(0) e Cu(II)⁴² e *nanoclusters* de Cu(0)⁴³.

A reacção de Huisgen apresenta diversas vantagens, tais como a possibilidade de usar meio aquoso⁴⁴, não ser necessária a exclusão do oxigénio atmosférico³⁶, a total regioselectividade, as condições reaccionais suaves e os rendimentos elevados. Estas têm tornado a reacção de Huisgen muito utilizada em síntese orgânica. O facto de o anel de 1,2,3-triazole ser isótero da ligação amida³⁷ aumentou a aplicação desta reacção em síntese peptídica.

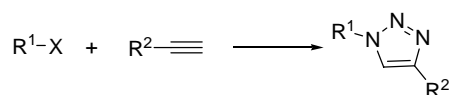
Os alquilaminoácidos normalmente usados em síntese peptídica são a *N*-propargilglicina⁴⁷ (Esquema 5, **A**), a α -propargilglicina^{37,41,45,46} (Esquema 5, **B**) e a propargilamina ligada ao terminal ácido carboxílico do péptido^{38,40} (Esquema 5, **C**). Papini *et al*⁴⁸ reportaram a síntese de um ω -alquil-*L*-aminoácido (Esquema 5, **D**), usando um complexo de níquel(II) como auxiliar quiral na introdução da cadeia lateral no átomo de carbono α da glicina.

haletos na presença de azida de sódio, sendo geradas *in situ* as respectivas azidas. O mecanismo sugerido para a reacção de Huisgen catalisada por este complexo de cobre (Esquema 7) sugere a complexação do cobre(I) com a ligação tripla, possibilitando assim o uso de alquinos dissustituídos.



Esquema 7. Ciclo catalítico sugerido por Nolan *et al.*⁵² para a síntese de 1,2,3-triazoles a partir de alquinos dissustituídos, catalisada pelo complexo de cobre(I) [Cu(SIMes)]Br (SIMes: 1,3-(2,4,6-trimetilfenil)imidazole).

Fokin *et al.*³⁹ desenvolveram um método para sintetizar 1,2,3-triazoles a partir de alquinos e azidas geradas *in situ* por substituição dos haletos com azida de sódio. No caso de haletos de arilo ou vinilo, foi usado azida de sódio, sulfato de cobre(II) penta-hidratado, ascorbato de sódio, *L*-prolina e carbonato de sódio, com aquecimento (Esquema 8, **A**); para os haletos de alquilo, usou-se azida de sódio, sulfato de cobre(II) penta-hidratado e ascorbato de sódio, à t.a. (Esquema 8, **B**).



A: R¹=aril, vinil; X=I; R²=alquil, aril

B: R¹=alquil; X=Cl, Br, I; R²=Ph, alquil

C: R¹=aril, vinil; X=B(OH)₂; R²=Ph, hexil

Esquema 8. Síntese de 1,2,3-triazoles a partir dos respectivos alquinos e haletos ou ácidos borónicos, por geração das azidas *in situ*. **Condições:** **A)** NaN₃ (1,2 eq.), CuSO₄·5H₂O (5-10 mol%), ascorbato de sódio (10-20 mol%), *L*-prolina (20 mol%), Na₂CO₃ (20 mol%), DMSO, H₂O (9:1), 60°C; **B)** NaN₃ (1,2 eq.), CuSO₄·5H₂O (5 mol%), ascorbato de sódio (10 mol%), DMF, H₂O (4:1), t.a.; **C)** NaN₃ (1,1 eq.), CuSO₄ (10 mol%), MeOH, H₂O (1:1), t.a..

Liu *et al*⁵³ também tentaram a síntese directa dos triazoles, partindo de ácidos borónicos. Neste caso não foi necessária a presença de um agente redutor (Esquema 8, C). Em ambos os trabalhos, os triazoles foram obtidos com total selectividade e bons rendimentos.

Mais recentemente foi tentada a síntese de 1,2,3-triazoles sem catalisador, apenas em refluxo de água durante 24h⁴⁴, partindo do haleto de alquilo ou arilo, de azida de sódio e do alquino. Os 1,2,3-triazoles foram obtidos com bons rendimentos, mas a regioselectividade nem sempre foi conseguida.

A cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen foi usada na ciclização de péptidos com a sequência RGD.

Finn *et al*⁴⁷ realizaram uma série de estudos para tentar explicar os resultados obtidos⁴⁶ na tentativa de ciclizar péptidos contendo a sequência RGD com a α -propargilglicina no terminal carboxílico e o ácido 5-azidopentanóico ligado ao terminal amina. Os produtos destas reacções foram os respectivos dímeros cíclicos. Nestes estudos foram exploradas diversas características dos péptidos e condições de ciclização, de modo a estabelecer os factores que favorecem a dimerização em relação à ciclização intramolecular. A ciclização em fase sólida mostrou favorecer a dimerização. O péptido cíclico A da Figura 9 foi o produto maioritário da tentativa de ciclização em solução (concentração de 0,8 mM) através da reacção 1,3-dipolar de Huisgen. O sistema catalítico escolhido por estes autores foi um complexo de cobre(I), $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4][\text{PF}_6]$, e 2,6-lutidina.

Liu *et al*³⁸ sintetizaram em fase sólida diversos péptidos com a sequência RGD contendo como aminoácido C-terminal o ácido aspártico acoplado à propargilamina e na posição N-terminal a α -azidoglicina. Após clivagem da resina, estes autores procederam à ciclização dos péptidos na presença de brometo de cobre(I) e DBU, usando soluções diluídas (10 mg/L). Os péptidos cíclicos com a sequência RGD foram obtidos com bons rendimentos, após clivagem dos grupos protectores (Figura 9, B).

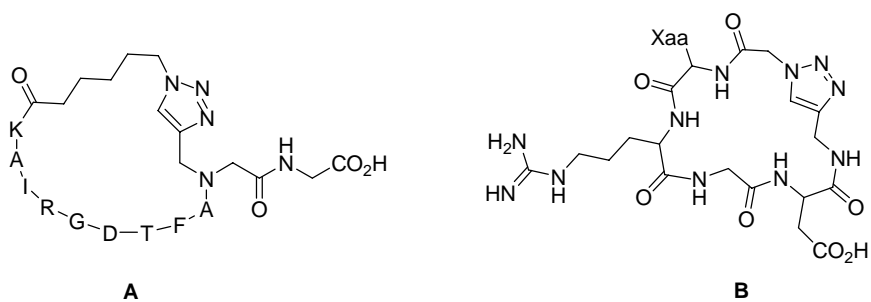


Figura 9. Péptidos com a sequência RGD ciclizados pela reação 1,3-dipolar de Huisgen catalisada por cobre(I) (B: Xaa = Gly, Ala, Leu, Ile, Cys, Met, Asp, Asn, Glu, Lys, Arg, His, Phe, Trp, Pro).

2. Resultados e Discussão

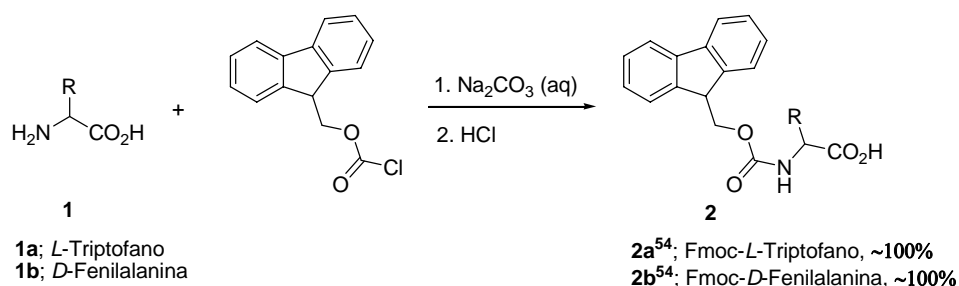
2.1. Síntese de precursores

Neste trabalho foram sintetizados vários tipos de precursores, nomeadamente Fmoc-aminoácidos, que foram utilizados na síntese em fase sólida dos péptidos lineares; alquinil- e azido-aminoácidos que foram usados em cicloadições 1,3-dipolares de Huisgen; e bis-azidas obtidas a partir dos respectivos ácidos bis-borónicos e usadas também em cicloadições 1,3-dipolares de Huisgen.

2.1.1. Síntese de Fmoc-aminoácidos

Carpino e Han⁵⁴ reportaram um método simples para proteger a função amina de aminoácidos com o grupo fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), com bons rendimentos. O reagente de protecção usado é o cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (Fmoc-Cl) e a reacção ocorre na presença de uma solução aquosa de carbonato de sódio. O tratamento da mistura reaccional com ácido leva à precipitação do aminoácido *N*-protegido.

Neste trabalho foi efectuada a protecção do *L*-triptofano (**1a**) e da *D*-fenilalanina (**1b**) com o grupo Fmoc, segundo o método referido. Obtiveram-se os respectivos aminoácidos com a função amina protegida, **2a** e **2b**, com rendimentos quantitativos (Esquema 9).

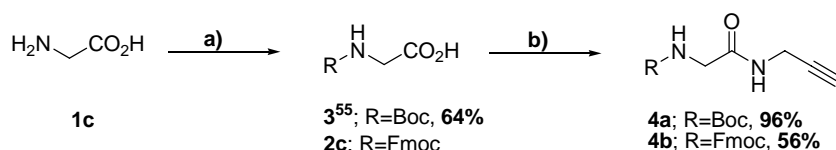


Esquema 9. Síntese de Fmoc-*L*-Triptofano e Fmoc-*D*-Fenilalanina.

2.1.2. Síntese de alquinilaminoácidos

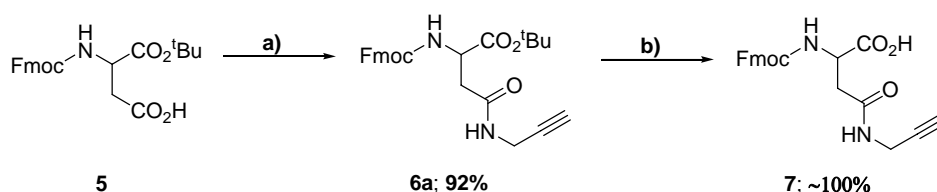
A síntese de alquinilaminoácidos foi efectuada através do acoplamento da propargilamina à função ácido carboxílico da glicina ou da cadeia lateral do ácido aspártico ou mediante uma reacção de substituição usando uma β -triazolildesidroalanina.

A reacção entre a Boc-*L*-glicina ou a Fmoc-*L*-glicina e a propargilamina, usando condições usuais de acoplamento entre aminoácidos (HOBt e DCC), permitiu a síntese de dois alquinilaminoácidos, com rendimentos de 96 e 56%, respectivamente (Esquema 10). No caso da síntese de **4b** não foi usada trietilamina na reacção de acoplamento para evitar a clivagem do grupo Fmoc, uma vez que este grupo é clivado em meio básico. A Boc-*L*-glicina (**3**) foi sintetizada a partir da *L*-glicina (**1c**), por reacção com dicarbonato de *tert*-butilo (Boc₂O) em meio básico⁵⁵.



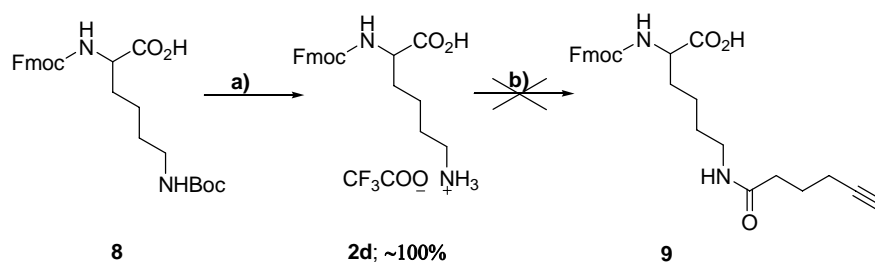
Esquema 10. Síntese de Boc- e Fmoc-glicina-propargilamina. **Condições:** **a)** Boc₂O (1,1 eq.), NaOH 1M, dioxano/H₂O, t.a., 30 min.; **b)** HOBt (1,0 eq.), DCC (1,0 eq.), propargilamina (1,0 eq.), Et₃N (1,0 eq.), ACN, t.a., 18h (no caso de **2c**, sem Et₃N).

O acoplamento da propargilamina com o grupo ácido carboxílico da cadeia lateral do ácido aspártico permitiu a obtenção do aminoácido **6a** (Esquema 11). Após clivagem do grupo *tert*-butilo com TFA obteve-se o aminoácido **7**, o qual pode ser introduzido numa cadeia peptídica.



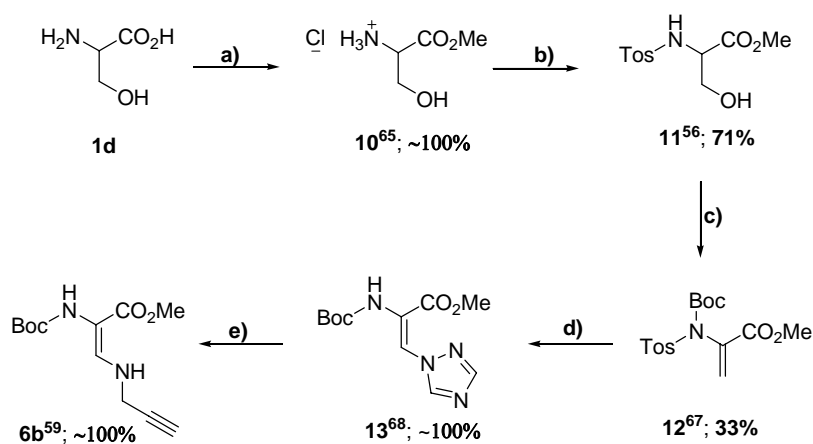
Esquema 11. Síntese de Fmoc-Asp(β-propargilamino)-OH, **7**. **Condições:** **a)** HOBt (1,0 eq.), DCC (1,0 eq.), propargilamina (1,0 eq.), Et₃N (1,0 eq.), ACN, t.a., 18h.; **b)** TFA (3 mL /mmol), 3h.

Numa tentativa de sintetizar outro aminoácido com um alquino na cadeia lateral e que pudesse ser introduzido numa cadeia peptídica tentou-se o acoplamento entre a Fmoc-lisina-OH **2d** e o ácido 5-hexinóico. Neste caso não foi possível isolar o produto pretendido **9** (Esquema 12).



Esquema 12. Acoplamento de Fmoc-lisina-OH com o ácido 5-hexinóico. **Condições:** a) TFA (3 mL /mmol), 5h ; b) HOBt (1,0 eq.), DCC (1,0 eq.), ácido 5-hexinóico (1,0 eq.), Et₃N (1,0 eq.), ACN, t.a., 18h.

A síntese de desidroalaninas *N,N*-diprotetidas a partir de derivados da serina foi descrita por Maia *et al*⁵⁶. Estes compostos di-acilados revelaram ser excelentes substratos em reacções de adição de Michael⁵⁷. Os mesmos autores verificaram que quando um dos grupos protectores era o 4-toluenossulfonilo e em presença de heterociclos de azoto ou de tióis ocorria a reacção de adição seguida da eliminação do grupo 4-toluenossulfonilo e regeneração da ligação dupla⁵⁸. Para obter as β -aminodesidroalaninas foi necessário promover a substituição do grupo 1,2,4-triazolilo da β -triazolildesidroalanina pela respectiva amina⁵⁹. Esta estratégia foi usada na síntese da β -propargilaminodesidroalanina **6b** (Esquema 13).



Esquema 13. Síntese de (*E*)-Boc- Δ Ala(β -propargilamino)-OMe (**6b**) a partir da *L*-serina. **Condições:** a) SOCl₂ (3,4 eq), MeOH, 40°C, 4h; b) TosCl (1,1 eq.), Et₃N (2,2 eq.), DCM, t.a., 4h; c) Boc₂O (2,5 eq.), DMAP (2,5 eq.), ACN seco, t.a., 3h; d) 1,2,4-triazole (1,0 eq.), K₂CO₃ (6,0 eq.), ACN, t.a., 18h; e) propargilamina (2,5 eq.), MeOH, t.a., 18h.

Os alquinos sintetizados foram caracterizados por espectroscopia de RMN de ¹H e de ¹³C. O sinal do próton do alquino surge como um tripleto a desvios químicos entre 2,22 e 3,09 ppm. Os prótons do grupo CH₂ propargílicos aparecem como um duplete de

dupletos a valores de desvio químico entre 3,85 e 4,06 ppm. O desdobramento deste sinal deve-se ao acoplamento com o protão do grupo NH e com o protão do alquino (Tabela 1).

Os sinais no espectro de RMN de ^{13}C dos átomos de carbono da ligação tripla surgem a desvios químicos entre os 71,63 e os 73,11 ppm e entre os 79,13 e os 81,07 ppm (Tabela 1).

Tabela 1. Desvios químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C dos compostos **4a** (CDCl_3), **4b** (DMSO), **6a** (CDCl_3), **6b** (CDCl_3) e **7** (DMSO).

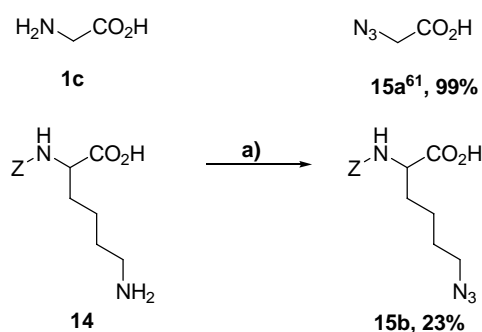
Composto	$\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$		$\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$		$\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
Boc-Gly-propargilamina, 4a	2,23	71,63	4,06	29,03	79,19
Fmoc-Gly-propargilamina, 4b	3,09	72,97	3,86	27,85	81,07
Fmoc-Asp(β -propargilamino)-O ^t Bu, 6a	2,22	71,80	4,05	29,16	79,13
Fmoc-Asp(β -propargilamino)-OH, 7	3,08	73,11	3,85	27,96	80,99
(<i>E</i>)-Boc- Δ Ala(β -propargilamino)-OMe ⁵⁹ , 6b	2,36	a)	3,95-3,97	a)	a)

a) Não efectuado

2.1.3. Síntese de azido-aminoácidos

O método de Wong⁴⁹ é uma das estratégias mais usadas na síntese de azido-aminoácidos. Este método permite a síntese de azido-aminoácidos⁶⁰ com bons rendimentos e baseia-se numa reacção de transferência diazo utilizando a azida de trifluorometanossulfonilo gerada *in situ* a partir do anidrido trifluorometanossulfónico.

Neste trabalho aplicou-se o método de Wong *et al*⁴⁹ na síntese da α -azidoglicina **15a** e da Z-lisina(ϵ -azido)-OH **15b** (Esquema 14). No caso da glicina obteve-se a respectiva azida com um rendimento excelente, enquanto a azida **15b** foi obtida com um rendimento consideravelmente mais baixo. Estes resultados estão, no entanto, de acordo com os obtidos por Zaloom e Roberts⁶⁰. Estes autores sugerem que a utilização de aminoácidos com grupos funcionais polares ou cadeias laterais volumosas como substratos nas reacções de transferência diazo conduz a rendimentos mais baixos. Esta reacção foi tentada com a Fmoc-lisina, no entanto não foi possível isolar o produto, tendo-se formado uma mistura complexa impossível de separar.



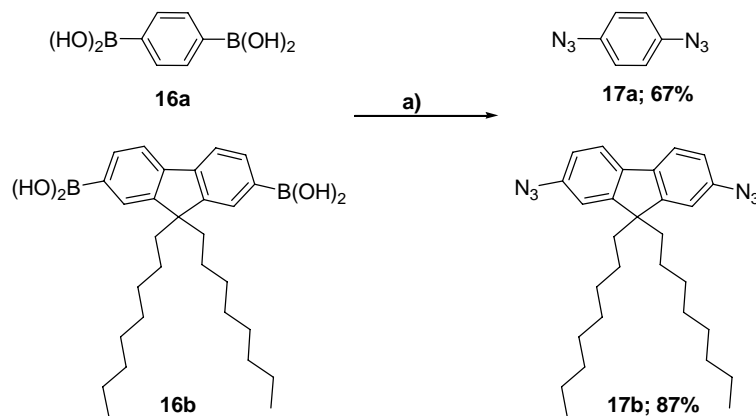
Esquema 14. Síntese dos azido-aminoácidos **15a** e **15b**. a) $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{N}_3$ (10 eq.), K_2CO_3 (1,5 eq.), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1 mol%), $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{DCM}$ (1/2/1,6), t.a., 18h.

A estrutura da α -azidoglicina **15a**, cuja síntese já tinha sido reportada anteriormente⁶¹, foi confirmada por espectroscopia de RMN de ^1H e por espectroscopia de IV. A Z-lisina(ϵ -azido)-OH **15b** foi caracterizada por espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C , espectroscopia de IV e massa de alta resolução. Em ambos os compostos, o grupo azido foi confirmado por espectroscopia de IV, pela presença de uma banda forte por volta dos 2100 cm^{-1} ⁶². Quanto ao espectro de RMN de ^1H do composto **15b**, verificou-se um aumento dos desvios químicos dos prótons da cadeia lateral quando comparados com os desvios químicos dos mesmos prótons na Z-Lys-OH. Este efeito é maior nos sinais dos prótons δ e ϵ da lisina e é devido ao efeito electro-retirador do grupo azido. No caso do espectro de RMN de ^{13}C , este efeito também foi observado no sinal correspondente ao átomo de carbono do grupo $\epsilon\text{-CH}_2$.

2.1.4. Síntese de bis-azidas

Liu *et al*⁵³ reportaram a síntese de diversas azidas aromáticas e vinílicas a partir dos respectivos ácidos borónicos, por tratamento com azida de sódio e usando um sal de cobre (II) como catalisador.

Neste trabalho, o método de Liu *et al*⁵³ foi aplicado a ácidos bis-borónicos, nomeadamente ao ácido 1,4-fenilbis-borónico (**16a**) e ao ácido (9,9-dioctil-9H-fluoreno-2,7-di-il)bis-borónico (**16b**) (Esquema 15). As respectivas bis-azidas (**17a** e **17b**) foram obtidas com rendimentos de 67 e 87%. Em relação ao descrito por Liu *et al*⁵³ verificou-se um aumento dos tempos reaccionais.



Esquema 15. Síntese de bis-azidas a partir de ácidos bis-borônicos. **Condições:** a) NaN₃ (2,5 eq.), CuSO₄·5H₂O (20 mol%), MeOH, t.a., 40-30h.

Em ambos os casos as bis-azidas foram isoladas por extração com éter de petróleo e posterior remoção do solvente. Os sólidos obtidos mostraram ser sensíveis à luz e ao ar. A caracterização por espectroscopia de RMN de ¹H e de ¹³C confirmou as estruturas dos compostos **17a** e **17b**. O espectro de RMN de ¹H do composto **17a** apresenta um único sinal a 7,02 ppm. Os prótons 1 e 8, 3 e 6 e 4 e 5 no composto **17b** são equivalentes, surgindo como dois dupletos a valores de desvio químico de 6,96 e 7,61 ppm e um duplete de dupletos a um desvio químico de 7,01 ppm. No caso do duplete correspondente aos prótons 1 e 8 a constante de acoplamento é de 1,8 Hz. Os átomos de carbono ligados ao grupo azida surgem nos espectros de RMN de ¹³C a 120,34 ppm no composto **17a** e a 138,71 ppm em **17b**.

Estas bis-azidas foram usadas na síntese de bis-aminoácidos e na ciclização de um péptido com a sequência RGD.

2.2. Síntese de bis-aminoácidos utilizando a reacção de adição 1,3-dipolar de Huisgen

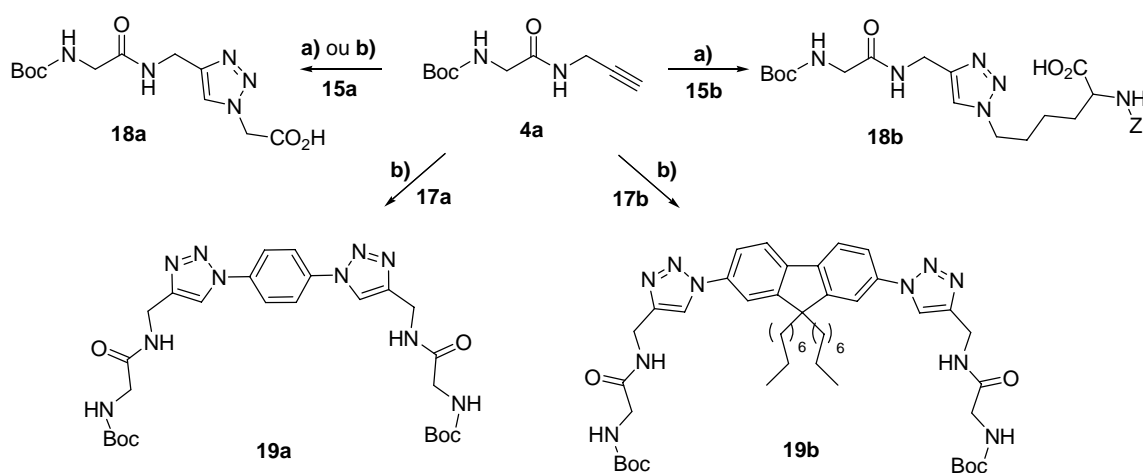
Os azido-aminoácidos (**15a** e **15b**), os alquinilaminoácidos (**4a**, **4b** e **6b**) e as bis-azidas (**17a** e **17b**) sintetizados foram usados na síntese de bis-aminoácidos.

A reacção entre azidas e alquinos é uma reacção de cicloadição 1,3-dipolar e leva à formação de um anel de 1,2,3-triazole. Esta reacção é normalmente catalisada por cobre, ocorre rapidamente, o produto precipita do meio reaccional e tem bons rendimentos.

Em 2004 Wu *et al*³⁵ testaram diversas condições reaccionais para a adição 1,3-dipolar de Huisgen entre uma fluoroalquilazida e um fenilalquino. Foram usados como

catalisadores sulfato de cobre(II) penta-hidratado e iodeto de cobre(I) e como agente redutor ascorbato de sódio, ácido ascórbico e trietilamina. Estes autores verificaram que os melhores resultados foram obtidos usando iodeto de cobre(I) como catalisador e trietilamina em misturas de acetonitrilo/água.

Apesar da diferença estrutural e química dos reagentes de partida usados, estas condições mostraram ser eficazes na reacção entre as azidas **15a** e **15b** e o alquino **4a**. Os bis-aminoácidos **18a** e **18b** foram obtidos com bons rendimentos (Entradas 1 e 2 da Tabela 2, Esquema 16).



Esquema 16. Síntese dos triazóis **18a**, **18b**, **19a** e **19b**. Condições: a) CuI (0,01 eq.), Et₃N (1,1 eq.), ACN/H₂O (1:2), t.a., 2,5 d; b) CuSO₄ (0,2 eq.), ascorbato de sódio (1,0 eq.), MeOH/H₂O (1:1), t.a., 19-23h.

No entanto a bis-azida **17b** não reagiu com o alquino **4a** nas mesmas condições reaccionais (Entrada 3 da Tabela 2).

Os mesmos autores que descreveram a síntese de azidas a partir de ácidos borónicos reportaram a síntese de aril-1,2,3-triazóis a partir dos ácidos borónicos⁵³ e dos respectivos alquinos, usando sulfato de cobre(II) anidro, ascorbato de sódio e azida de sódio, em metanol/água. Uma adaptação destas condições reaccionais levou à síntese dos compostos **19a** e **19b**, com rendimentos de 92 e 25% (Entradas 4 e 5 da Tabela 2, Esquema 16).

Tabela 2. Condições e resultados das adições 1,3-dipolares de Huisgen.

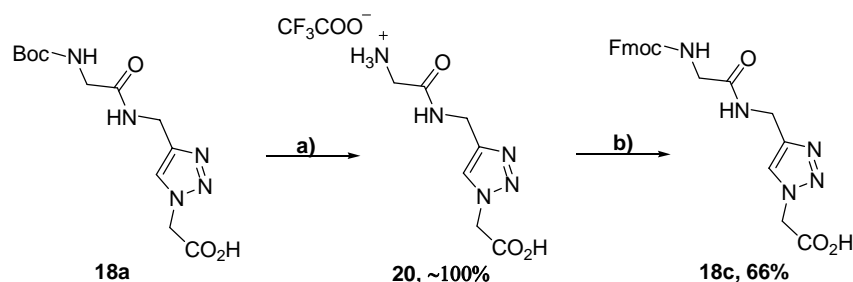
	Azida	Alquino (eq.)	Cat. (eq.)	Base (eq.)	Solvente	Tempo Reacção	Produto (η%)
1	15a	4a (1,1)	CuI (0,01)	Et ₃ N (1,1)	ACN:H ₂ O (1:2)	2,5d.	18a (74)
2	15b	4a (1,1)	CuI (0,01)	Et ₃ N (1,1)	ACN:H ₂ O (1:2)	2,5d.	18b (~100)
3	17b	4a (2,2)	CuI (0,02)	Et ₃ N (2,2)	ACN:H ₂ O (1:2)	2,5d.	4a (54)
4	17a	4a (2,2)	CuSO ₄ (0,2)	Ascorbato sódio (1,0)	MeOH:H ₂ O (1:1)	19h	19a (92)
5	17b	4a (2,2)	CuSO ₄ (0,2)	Ascorbato sódio (1,0)	MeOH:H ₂ O (1:1)	23h	19b (25)
6	15a	4a (1,1)	CuSO ₄ (0,1)	Ascorbato sódio (0,5)	MeOH:H ₂ O (1:1)	25h	18a (61)
7	17a	6b (2,2)	CuSO ₄ (0,2)	Ascorbato sódio (1,0)	MeOH:H ₂ O (1:1)	5d.	n.i.
8	15a	4b (1,1)	CuSO ₄ (0,1)	Ascorbato sódio (0,5)	MeOH:H ₂ O (1:1)	2d.	n.i.

n.i. não identificado

Para testar a versatilidade destas condições reaccionais, estas foram também aplicadas à reacção entre a azida **15a** e o alquino **4a**, tendo-se obtido o bis-aminoácido **18a** com um rendimento de 61% (Entrada 6 da Tabela 2, Esquema 16). Apesar deste rendimento ser inferior ao obtido com iodeto de cobre(I) e trietilamina, mostrou a possibilidade de se usar estas condições partindo de alquinos e azidas aromáticas ou alquílicas.

Nos entanto, a aplicação destas condições quer ao alquino **6b** quer ao **4b** não conduziu aos produtos pretendidos (Entradas 7 e 8 da Tabela 2).

Uma vez que a tentativa de sintetizar o composto **18c** por adição da azida **15a** e o alquino **4b** não foi bem sucedida, tentou-se obter este composto por clivagem do grupo Boc do composto **18a**, seguida de protecção da função amina com o grupo Fmoc. O composto **18c** foi obtido com um rendimento global de 49% (Esquema 17). Este composto tem interesse para aplicação em fase sólida, pois permite a introdução do anel de triazole, que é um isómero da ligação amida, numa cadeia peptídica em construção.

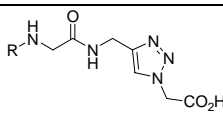
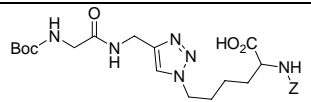


Esquema 17. Síntese do triazole **18c**. **Condições:** a) TFA (3mL /mmol), 3h30m; b) K_2CO_3 aq. a 10% (2,5 eq.), Fmoc-Cl (1,0 eq.), dioxano, 4h a 0°C, 18h à t.a.

A estrutura de todos os bis-aminoácidos sintetizados foi confirmada por espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C , assim como por análise elementar ou por espectroscopia de massa de alta resolução.

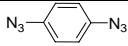
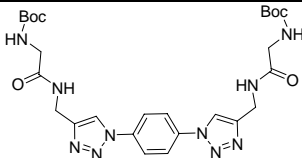
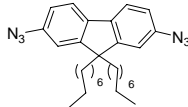
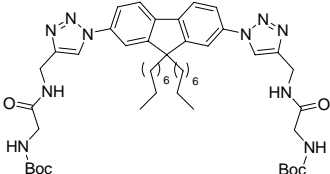
Comparando os sinais de RMN de ^1H das azidas de partida e dos triazoles obtidos (Tabela 3), verifica-se um aumento no desvio químico dos prótons do grupo CH_2 da azida **15a**, quando comparado com os mesmos prótons nos compostos **18a** e **18c**. Na azida **15b**, quando comparada com o composto **18b**, este aumento também se faz notar nos sinais dos prótons dos grupos $\varepsilon\text{-CH}_2$ e $\delta\text{-CH}_2$ da lisina. Nos espectros de RMN de ^{13}C não foi registrada nenhuma alteração significativa nos desvios químicos dos sinais mais comuns.

Tabela 3. Desvios químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C dos compostos **15a** (CDCl_3), **15b** (CDCl_3) e **18a-c** (DMSO).

Composto	$\alpha\text{-CH/CH}_2$		$\beta\text{- e } \gamma\text{-CH}_2$		$\delta\text{- e } \varepsilon\text{-CH}_2$	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
$\text{N}_3\text{-Gly-OH}$, 15a	3,97	-----	-----	-----	-----	-----
 18a ; R = Boc 18c ; R = Fmoc	5,23	50,40	-----	-----	-----	-----
$\text{Z-Lyz(N}_3\text{)-OH}$ 15b	4,40-4,45	53,47	1,69-1,78, 1,89-1,96 e 1,41-1,52	31,86 e 22,36	1,53-1,68 e 3,28	28,30 e 51,01
 18b	3,87-3,93	53,65	1,46-1,62 e 1,31-1,35	30,13 e 22,64	1,69-1,79 e 4,26-4,29	29,36 e 49,06

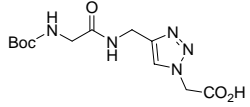
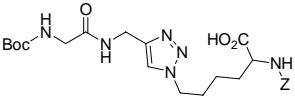
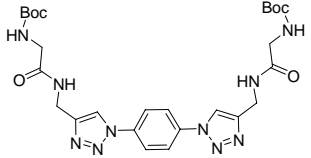
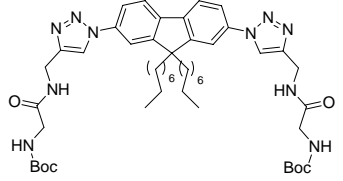
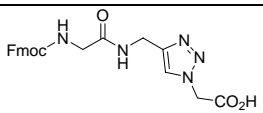
O espectro de RMN de ^1H da bis-azida **17a**, quando comparado com o do composto **19a**, verifica-se um aumento no valor do desvio químico dos prótons do anel aromático de 7,0 para 8,1 ppm. Esta desprotecção dos prótons aromáticos está relacionada com a conjugação com os dois anéis de triazole. O mesmo foi verificado com a bis-azida **17b** e o composto **19b**.

Tabela 4. Desvios químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C dos compostos **17a** (CDCl_3), **17b** (CDCl_3), **19a** (DMSO) e **19b** (DMSO).

Composto	H-Ar		C _i	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}	
	17a	7,02	120,34	136,67
	19a	8,10	121,20	136,18
	17b	7,01	117,85	137,58
		6,96	113,56	
		7,61	120,52	
	19b	7,89	119,00	139,66
		8,02	114,57	
		8,08	121,49	

Nos espectros de RMN dos alquinos as alterações foram maiores, tendo desaparecido os sinais do próton e dos átomos de carbono da ligação tripla e surgido os sinais correspondentes ao próton e aos átomos de carbono do anel de triazole (Tabela 5). A formação do anel de triazole nos compostos **18a**, **18b**, **19a** e **19b**, a partir de **4a** aumentou o valor do desvio químico dos prótons do grupo CH_2 propargílicos de 4,1 para 4,3 ou 4,4 ppm e do desvio químico do átomo de carbono de 29 para 34 ppm. Facto semelhante foi observado entre **4b** e **18c**. O desvio químico do átomo de carbono C-4 do anel de triazole surge a 144 ppm em **18a-c**, 146 ppm em **19a** e 156 ppm em **19b**. O próton CH da ligação tripla, que surgia a desvios químicos de 2,2 e 3,0 ppm em **4a** e **4b**, respectivamente, surge nos triazoles **18a-c**, **19a** e **19b** a 7,9 e 8,7 ppm. O átomo de carbono correspondente a este grupo CH também sofreu um aumento no seu desvio químico de 70 ppm para 124 ou 121 ppm.

Tabela 5. Desvios químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C dos compostos **4a** (CDCl_3), **4b** (DMSO), **18a-c** (DMSO), **19a** (DMSO) e **19b** (DMSO).

Composto	<u>CH₂CCH</u>		<u>CH₂CCH</u>		<u>CH₂CCH</u>
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
Boc-Gly-propargilamina 4a	4,06	29,03	2,23	71,63	79,19
 18a	4,31	34,12	7,87	124,21	144,77
 18b	4,26-4,29	34,20	7,87	122,62	144,73
 19a	4,41	34,17	8,68	121,24	146,49
 19b	4,41	34,16	8,68	121,22	155,84
Fmoc-Gly-propargilamina 4b	3,86	27,85	3,09	72,97	81,07
 18c	4,32	34,13	7,89	124,25	144,67

2.3. Síntese em fase sólida de péptidos contendo a sequência RGD

Neste trabalho foram sintetizados vários péptidos lineares com a sequência RGD utilizando a SPPS e uma estratégia Fmoc. Dois destes péptidos foram posteriormente ciclizados por duas metodologias diferentes.

Na SPPS dos péptidos lineares foi utilizada uma resina de cloreto de 2-clorotritilo e aminoácidos *N*-protegidos com o grupo Fmoc. Os grupos protectores 2,2,4,6,7-pentametildihidrofuran-5-sulfonilo (Pbf) e *tert*-butilo (^tBu) foram usados na protecção das cadeias laterais da arginina e ácido aspártico, respectivamente.

Os péptidos lineares **21-24** foram sintetizados utilizando esta metodologia (Figura 10).

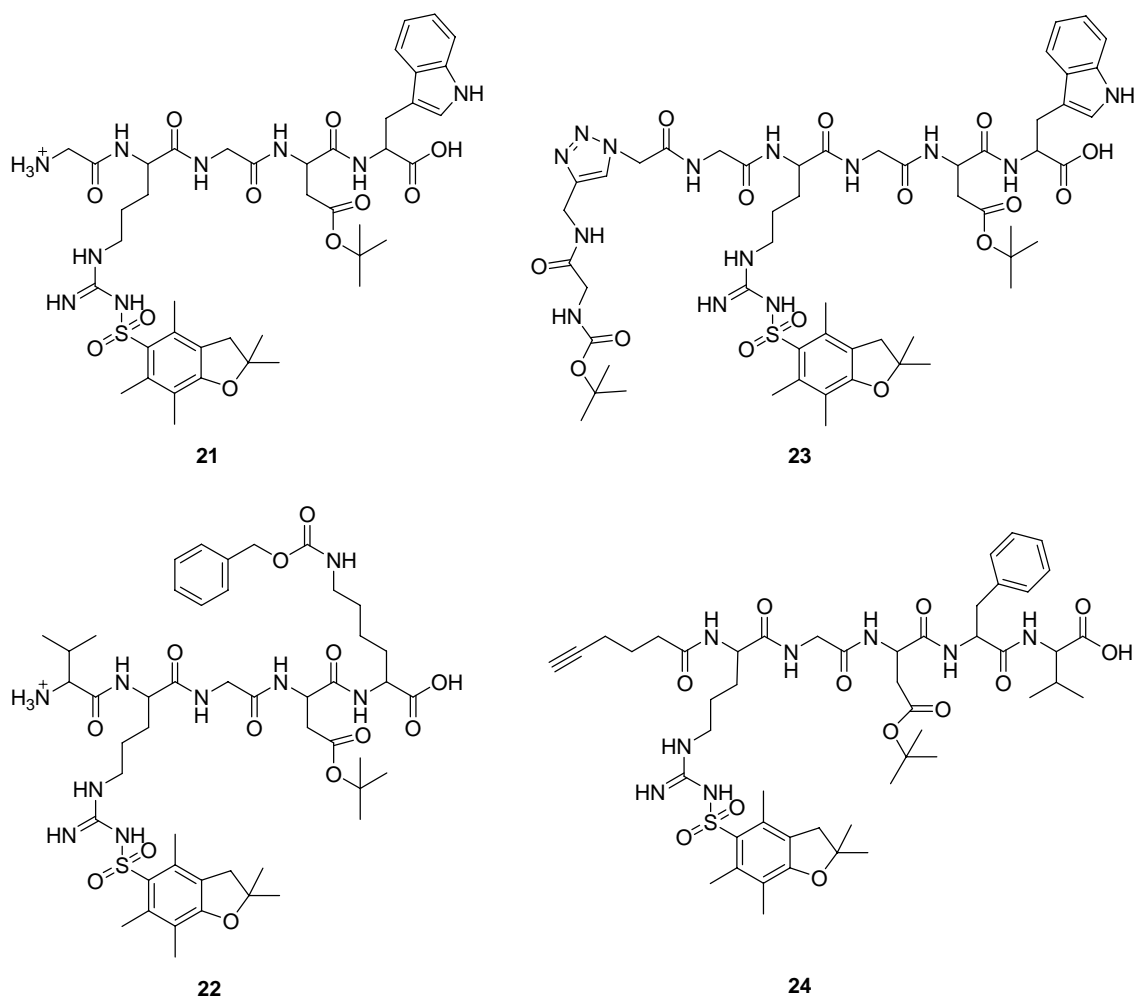
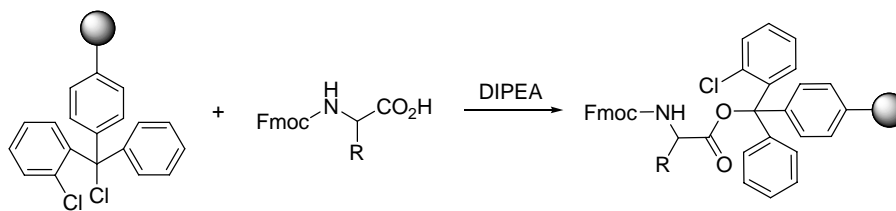
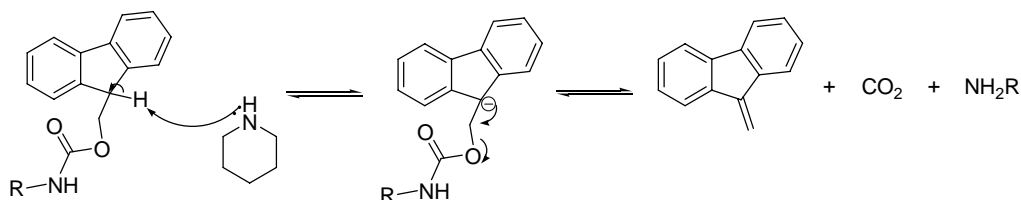


Figura 10. Estrutura dos péptidos lineares 21-24.

O primeiro aminoácido foi ligado à resina através de uma reacção de substituição nucleófila utilizando um excesso de Fmoc-aminoácido e uma base (Esquema 18). Após a reacção a resina foi lavada com uma mistura de DCM/MeOH/DIPEA para converter os grupos clorotritilo em metoxitritilo, impedindo assim uma posterior ligação de outros aminoácidos à resina que não reagiu. As lavagens com DCM e DMF foram efectuadas para eliminar o Fmoc-aminoácido em excesso. O *loading* da resina foi determinado por espectroscopia de UV através da quantificação do dibenzofluveno libertado da resina após clivagem do grupo Fmoc com piperidina (Esquema 19).



Esquema 18. Loading da resina de cloreto de 2-clorotritilo.



Esquema 19. Clivagem do grupo Fmoc com piperidina.

Na Tabela 6 apresenta-se os equivalentes de Fmoc-aminoácidos utilizados na síntese dos péptidos **21-24**, o *loading* da resina e o rendimento global do péptido protegido após clivagem da resina.

Tabela 6. Equivalentes de Fmoc-aminoácidos usados na síntese dos péptidos lineares **21-24**, *loading* da resina e rendimento.

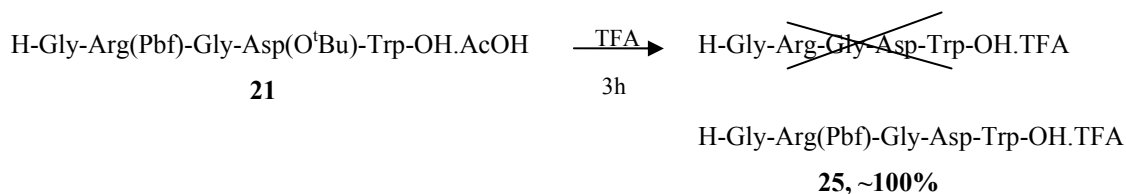
Péptido	Eq. de Fmoc-aminoácidos	Loading (mmol/g)	η (%)
21	4	0,66	40
22	4	0,48	33
23	4 (1,4 de 18a)	0,66	32
24	2	0,64	49

Após o acoplamento do primeiro aminoácido, foi feita a clivagem do grupo Fmoc por reacção com 20% de piperidina em DMF. A eficácia da desprotecção foi verificada através do teste de TNBS⁶³. Este teste consiste em adicionar a uma pequena fracção da resina umas gotas de uma solução a 10% de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) em DMF e umas gotas de uma solução de ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfónico (TNBS). Se existirem aminas primárias ligadas à resina, esta adquire uma coloração entre o laranja e o vermelho.

No acoplamento dos Fmoc-aminoácidos ao péptido foram usados os agentes de acoplamento HOBt e DIC. O teste de TNBS foi usado para verificar a eficácia de cada acoplamento.

A repetição sucessiva dos passos de desprotecção e acoplamento levou à síntese dos péptidos lineares que, após uma última desprotecção do grupo Fmoc, foram clivados da resina com uma mistura de AcOH/TFE/DCM. Os péptidos **21-24** foram todos obtidos na forma de sólidos, com rendimentos globais entre 32 e 49%.

Como já foi referido, a presença de um resíduo hidrofóbico ligado ao ácido aspártico da sequência RGD aumenta a afinidade e a selectividade dos péptidos para a integrina $\alpha_v\beta_3$ ¹⁰. Os péptidos **21**, **23** e **24** foram sintetizados com um resíduo de *D*-fenilalanina ou de *L*-triptofano ligados ao ácido aspártico. No caso do péptido **22** optou-se por ligar ao ácido aspártico um resíduo de lisina protegido na cadeia lateral com o grupo benziloxicarbonilo (Z). Este resíduo possibilitaria, por exemplo, a ligação do péptido a agentes imagiológicos. A desprotecção do péptido **21** contendo um resíduo fluorescente de triptofano foi efectuada na presença de TFA, durante 3 horas. No entanto, a análise por espectroscopia de RMN de ¹H e de ¹³C e por espectroscopia de massa de alta resolução do produto **25** revelou que ocorreu a clivagem do grupo *tert*-butilo, mas não a do grupo Pbf da arginina (Esquema 20).

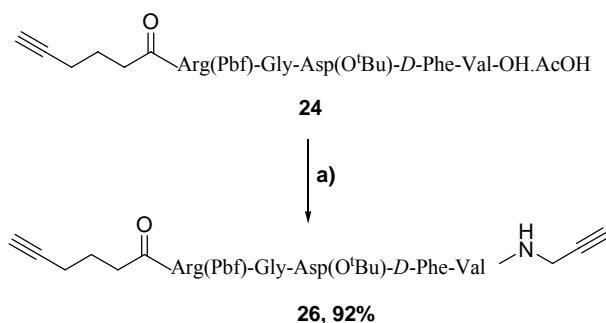


Esquema 20. Reacção do péptido **21** com TFA.

Parte do péptido **21**, ainda ligado à resina, foi ligada ao composto **18a** (1,4 eq.), utilizando as condições reaccionais usadas no acoplamento de aminoácidos. O péptido **23** foi isolado com um rendimento de 32%. A síntese deste péptido mostrou um método simples e eficaz de introduzir um anel de 1,2,3-triazole numa cadeia peptídica. Como já foi referido, este anel é um isómero da ligação amida e a sua introdução numa cadeia peptídica pode ser vantajosa, uma vez que por um lado aumenta a resistência do péptido à hidrólise enzimática e por outro possui actividade biológica intrínseca.

O péptido **24** foi sintetizado como precursor linear dos derivados cíclicos. Este péptido apresenta a sequência RGDfV, à qual se ligou, em fase sólida, na posição *N*-terminal o ácido 5-hexinóico. O produto **24** foi isolado com um rendimento global de 49%, tendo-se usado apenas 2 equivalentes de Fmoc-aminoácidos e de ácido 5-

hexinóico em cada passo reaccional, o que sugere que não é necessário um excesso de 4 equivalentes como descrito na maioria dos protocolos de síntese em fase sólida. Após clivagem da resina, o péptido **24** foi ligado à propargilamina, utilizando HBTU como reagente de acoplamento, para dar origem ao péptido **26**. Este foi obtido na forma de um sólido, com um rendimento excelente (Esquema 21). O péptido **26** apresenta dois alquinos terminais, o que possibilita a ciclização com bis-azidas.



Esquema 21. Síntese do péptido **26**. a) HOBt (1,0 eq), HBTU (1,0 eq), propargilamina (1,0 eq), DIPEA (2,0 eq), DMF, t.a., 18h.

Os péptidos lineares sintetizados foram caracterizados por espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C , utilizando as técnicas de DEPT-135, de COSY, de HMQC e de HMBC para a atribuição dos sinais.

Por exemplo, em relação ao péptido **24**, foi possível observar no espectro de HMQC as correlações entre os sinais dos prótons aromáticos (desvio químico entre 7,14 e 7,24 ppm) e os átomos de carbono dos grupos CH aromáticos a 126, 127 e 129 ppm (Figura 11, **A**), bem como as correlações entre os sinais dos prótons α -CH da arginina, do ácido aspártico, da *D*-fenilalanina e da valina (desvios químicos entre os 4,11 e os 4,63 ppm) e os sinais dos respectivos átomos de carbono (desvios químicos entre os 49 e os 57 ppm) (Figura 11, **B**). Na mesma zona do espectro é possível observar a correlação entre os prótons do grupo CH_2 da glicina e o átomo de carbono que surge a um desvio químico de 42 ppm. O tripleto no espectro de RMN de ^1H a um desvio químico de 2,75 ppm e com uma constante de acoplamento de 2,4 Hz foi atribuído ao próton do alquino terminal, tendo-se observado no espectro de HMQC (Figura 11, **C**) uma correlação entre o sinal deste próton e um átomo de carbono com um desvio químico de 71 ppm.

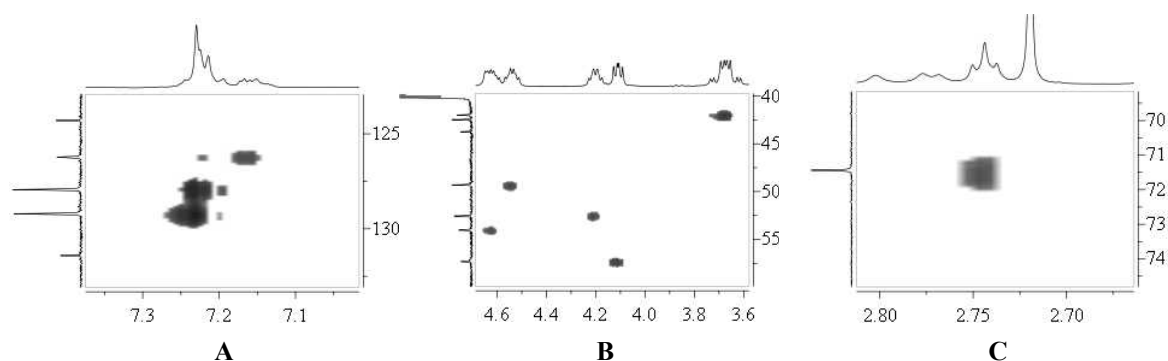


Figura 11. Espectro de HMQC em DMSO do péptido **24** nas zonas aromática (A), dos α -CH (B) e da correlação entre o sinal de próton com desvio químico de 2,75 ppm e o respectivo sinal de átomo de carbono (C).

Na zona do espectro de RMN de ^1H com desvios químicos entre os 0,8 e os 3,0 ppm surgem os sinais dos prótons dos grupos CH_3 e CH_2 . No espectro de HMQC desta zona (Figura 12) observou-se a correlação de um sinal de um átomo de carbono com dois sinais de próton, sendo este fenómeno observado em outros dois sinais de átomos de carbono. Estes carbonos, a desvios químicos de 28,98, 37,53 e 38,14 ppm, foram atribuídos aos grupos β - CH_2 da arginina, do ácido aspártico e da *D*-fenilalanina. O sinal do espectro de RMN de ^1H a um desvio químico de 2,0 ppm mostrou no espectro de HMQC correlação com um sinal a desvio químico de 30,13 ppm, tendo sido atribuído ao átomo de carbono β -CH da valina. No espectro de HMQC também foi possível observar uma correlação entre os sinais dos prótons dos grupos γ - CH_3 da valina e os sinais de dois átomos de carbono a desvios químicos de 17,91 e de 19,11 ppm. Os sinais dos prótons dos grupos CH_3 do Pbf surgem como singletos a desvios químicos de 1,40, 1,99, 2,40 e 2,46 ppm enquanto os prótons do grupo CH_2 surgem a 2,95 ppm e apresentam no espectro de HMQC uma correlação com um sinal de um átomo de carbono a 42,46 ppm. O singlete com desvio químico a 1,40 ppm integra para 6 prótons, pelo que foi atribuído aos dois grupos CH_3 do anel de 5 membros. Este sinal apresentou uma correlação com um sinal de um átomo de carbono a um desvio químico de 28,29 ppm. Os sinais dos restantes grupos CH_3 do Pbf surgem a desvios químicos de 12,26, 17,56 e 18,93 ppm (Figura 12).

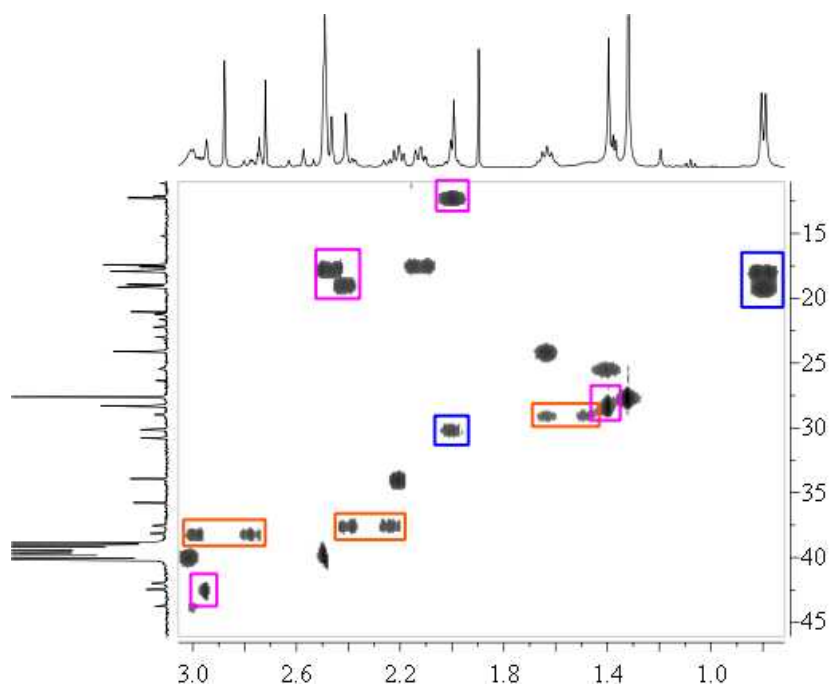


Figura 12. Espectro de HMQC em DMSO do péptido **24** da zona de desvios químicos entre 0,7 e 3,2 ppm no espectro de RMN de ^1H (a laranja estão as correlações entre os prótons e os átomos de carbono dos grupos $\beta\text{-CH}_2$; a azul, as correlações dos grupos $\gamma\text{-CH}_3$ e $\beta\text{-CH}$ da valina; a rosa, as correlações dos sinais dos grupos CH_3 e CH_2 do Pbf).

A análise do espectro de COSY do péptido **24** (Figura 13) permitiu estabelecer a correlação entre cada próton amida e o próton do grupo $\alpha\text{-CH}$ da arginina, do ácido aspártico, da *D*-fenilalanina e da valina e os prótons CH_2 da glicina.

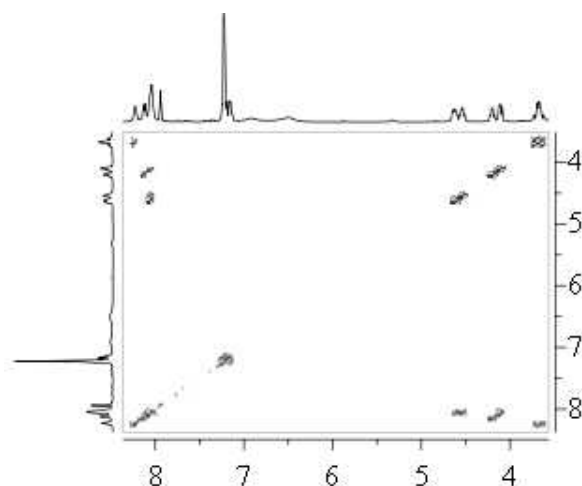


Figura 13. Espectro de COSY em DMSO do péptido **24** mostrando as correlações entre os prótons NH das amidas e os prótons dos grupos $\alpha\text{-CH}$ dos aminoácidos.

No espectro de COSY do péptido **24** também foi possível observar a correlação entre os prótons dos grupos α -CH e β -CH dos aminoácidos (Figura 14). No caso da arginina foi possível atribuir no espectro de RMN de ^1H o sinal com desvio químico de 3,0 ppm aos prótons do grupo δ -CH₂, uma vez que no espectro de COSY este sinal apresenta uma correlação com um sinal a desvio químico de 1,37-1,55 ppm que corresponde aos prótons do grupo γ -CH₂, sendo também observada a correlação entre os prótons dos grupos γ -CH₂ e β -CH₂. Neste espectro observa-se uma correlação entre o sinal dos prótons dos grupos CH₃ da valina e o sinal do β -CH ($\delta = 2,00$ ppm) que, por sua vez, apresenta uma correlação com o sinal com desvio químico a 4,11 ppm que corresponde ao α -CH.

Os sinais a desvios químicos de 1,63, 2,12 e 2,20 ppm no espectro de RMN de ^1H foram atribuídos aos três grupos CH₂ do ácido hexinóico ligado ao péptido. O próton que surge a um desvio químico de 2,12 ppm surge como um duplete de tripletos, com constantes de acoplamento de 2,4 e 7,2 Hz, respectivamente. A constante de 2,4 Hz indicou que este sinal correspondia ao grupo CH₂ mais próximo da ligação tripla. A correlação no espectro de COSY entre os sinais com desvios químicos de 2,12 e 2,21 ppm com o sinal a um desvio químico de 1,63 ppm indicou o último como sendo o sinal dos prótons do grupo CH₂ intermédio (Figura 14).

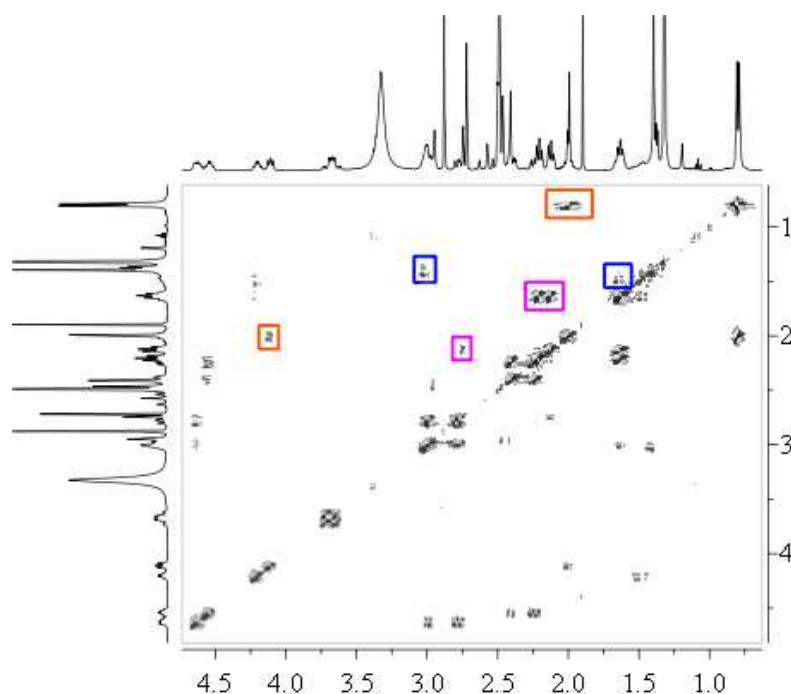


Figura 14. Espectro de COSY em DMSO do péptido **24** dos sinais com desvios químicos entre 0,8 e 4,7 ppm no espectro de RMN de ^1H (a azul estão realçadas as correlação entre os prótons β , γ e δ da arginina; a rosa, as correlações entre os prótons da ligação tripla e próximos desta; a laranja, as correlações entre os prótons da valina).

No fim da análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , dept, COSY e HMQC foi possível identificar quais os sinais de cada aminoácido, os prótons dos grupos protectores e os prótons provenientes do ácido hexinóico.

A análise do espectro de HMBC confirmou as atribuições de sinais feitas e permitiu identificar os sinais dos carbonos quaternários. Os prótons do grupo $\delta\text{-CH}_2$ da arginina apresentavam no espectro de HMBC uma correlação com um sinal com desvio químico de 156,10 ppm, que corresponde ao átomo de carbono do grupo guanidínio (Figura 15, A). A correlação observada entre os prótons aromáticos da fenilalanina e o sinal a desvio químico de 137,66 ppm indicou que este seria o C_i deste aminoácido (Figura 15, B).

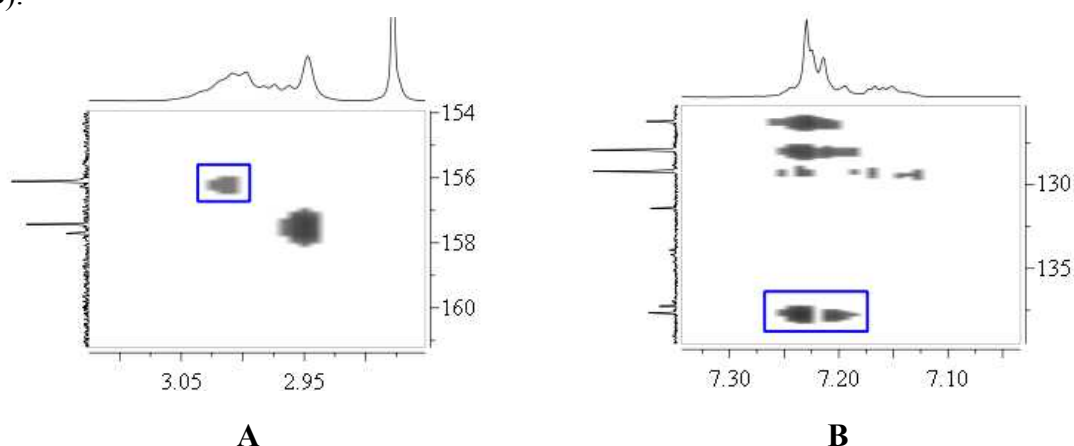


Figura 15. Espectro de HMBC em DMSO do péptido **24** com evidência da correlação entre os prótons do grupo $\delta\text{-CH}_2$ da arginina e o átomo de carbono do grupo guanidínio (A) e entre os prótons aromáticos da fenilalanina e o C_i desta (B).

O sinal dos grupos CH_3 do *terc*-butilo, que surge no espectro de RMN de ^1H como um singleto com integração para nove prótons e com um desvio químico de 1,32 ppm, apresentou uma correlação com o sinal do átomo de carbono quaternário com desvio químico de 80,06 ppm, indicando este como o sinal do átomo de carbono ligado aos três grupos CH_3 do *terc*-butilo. O sinal dos dois grupos CH_3 do Pbf, que surgem no espectro de RMN de ^1H a um desvio químico de 1,40 ppm, mostrou uma correlação, no espectro de HMBC, com o sinal de um átomo de carbono a um desvio químico de 86,27 ppm, o que levou à atribuição deste sinal ao átomo C-2 do grupo protector Pbf. O sinal correspondente aos prótons do grupo CH_2 do Pbf também mostrou uma correlação com o sinal do átomo de carbono a 86,27 ppm. A identificação e a atribuição dos restantes sinais dos átomos de carbono do grupo Pbf foram feitas através das correlações HMBC

entre os sinais dos prótons dos grupos CH_3 e CH_2 do Pbf e os sinais dos átomos de carbono (Figura 16).

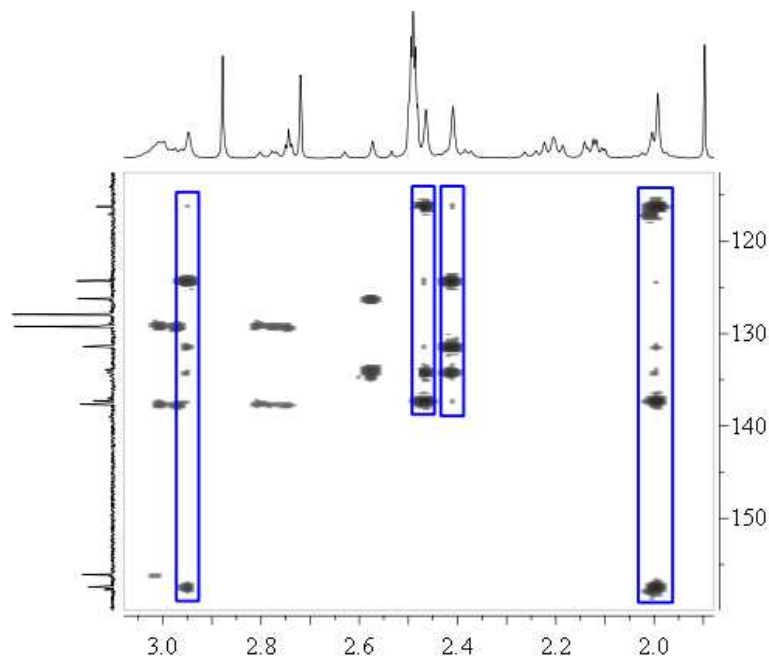


Figura 16. Espectro de HMBC em DMSO do péptido **24**, evidenciando a correlação entre os prótons e os carbonos do grupo Pbf.

A correlação observada no espectro de HMBC entre os átomos de carbono dos grupos carbonilo e os prótons α -CH dos aminoácidos e α -NH vizinhos confirmou a sequência de aminoácidos no péptido (Figura 17).

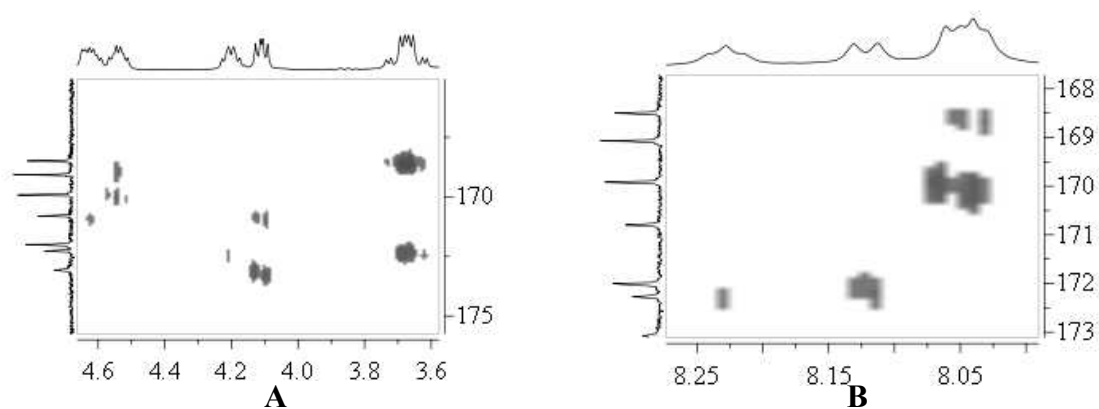


Figura 17. Espectro de HMBC em DMSO do péptido **24** com as correlações entre os sinais dos átomos de carbono na zona carbonílica e os prótons α -H, **A**, ou os prótons α -NH, **B**.

A atribuição dos sinais para cada um dos péptidos referidos na Tabela 6 foi efectuada de modo análogo ao descrito para o péptido **24** (Tabela 7). A análise de espectroscopia de massa de alta resolução de cada um dos péptidos confirmou as estruturas destes.

Tabela 7. Desvios químicos dos prótons da sequência RGD nos péptidos **21-26** em DMSO.

	21	22	23	24	25	26
α -NH Arg	8,47		8,19	8,12	8,59	8,06
α -CH Arg	4,29	4,25	4,24-4,28	4,20	4,33-4,39	4,20
β -CH ₂ Arg	1,48-1,51, 1,68-1,73	1,44-1,80	1,46-1,53, 1,62-1,69	1,37-1,55, 1,63	1,50-1,57, 1,68-1,77	1,47-1,62
γ -CH ₂ Arg	1,35-1,39	1,08-1,41	1,37-1,39	1,37-1,55	1,45-1,52	1,39-1,41
δ -CH ₂ Arg	3,00-3,02	2,89-3,08	2,98-3,02	2,98-3,02	3,08	2,98-3,02
α -NH Gly	7,95-8,02		8,19	8,23	8,30	8,17
α -CH ₂ Gly	3,68	3,60-3,82	3,69	3,61-3,64	3,69-3,80	3,68
α -NH Asp	8,39		8,11	8,04-8,06	8,01	8,02
α -CH Asp	4,43-4,49	4,48	4,64	4,54	4,48-4,57	4,53-4,57
β -CH ₂ Asp	2,32, 2,66	2,41-2,48, 2,62-2,78	2,35-2,43, 2,62	2,20-2,26, 2,37-2,44	2,34, 2,45	2,21-2,22, 2,37
4-CH ₃ Pbf	2,42	2,41	2,41	2,40	2,39	2,41
6-CH ₃ Pbf	2,47	2,48	2,46	2,46	2,27	2,46
7-CH ₃ Pbf	1,99	1,99	1,99	1,99	1,99	1,99
3-CH ₂ Pbf	2,95	2,95	2,94	2,95	2,99	2,95
2-CH ₃ Pbf	1,39	1,39	1,39	1,40	1,42	1,40
CH ₃ O ^t Bu	1,35	1,35	1,34	1,32	-----	1,32

Os péptidos **21**, **23** e **25** apresentam uma cadeia peptídica comum, Gly-Arg-Gly-Asp-Trp. Na Tabela 8 encontram-se os desvios químicos de próton dos resíduos ligados à sequência RGD. No caso dos prótons da glicina, verifica-se uma diminuição no valor do desvio químico dos prótons do grupo CH₂ do péptido **21** para o péptido **25**, ou seja, quando ocorre a desprotecção do grupo *terc*-butilo e se forma o sal de trifluoracetato. A ligação do composto **18a** no péptido **23** desprotege os prótons da glicina o que se traduz num aumento do desvio químico destes. No triptofano observa-se um aumento do desvio químico do próton alfa nos péptidos **25** e **23** quando comparado com o do péptido **21**. No caso do próton NH da cadeia lateral do anel de índole do triptofano verificou-se que este se tornou mais ácido no péptido **25**, apresentando um maior desvio químico.

Tabela 8. Desvios químicos dos prótons dos resíduos de triptofano e glicina dos peptídeos **21**, **23** e **25** em DMSO.

	Trp									Gly
	α -NH	α -CH	β -CH ₂	1-NH	2-CH	4-CH	5-CH	6-CH	7-CH	α -CH ₂
21	7,52	4,11	3,04-3,05, 3,16	10,67	7,03	7,48	6,89	7,00	7,27	2,97- 2,98
25	7,97	4,39-4,43	3,00-3,05, 3,11-3,16	11,85	7,14	7,50	6,97	7,08	7,33	2,59
23	7,99	4,40	3,02-3,07, 3,15	10,79	7,13	7,50	6,96	7,05	7,32	3,82

Os peptídeos **24** e **26** têm em comum a sequência CH≡C(CH₂)₃CO-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val. Os sinais dos prótons do resíduo de fenilalanina não sofreram alterações nos seus desvios químicos entre os peptídeos. Nos prótons da valina verifica-se um decréscimo mínimo nos valores dos desvios químicos dos prótons dos grupos α - e β -CH. Quanto ao grupo ligado ao resíduo de arginina, também não se observam alterações nos desvios químicos destes prótons (Tabela 9).

Tabela 9. Desvios químicos dos prótons dos peptídeos **24** e **26**, excepto dos prótons da sequência RGD em DMSO.

	Val			Phe				CH≡C(CH ₂) ₃ CO			
	α -NH	α -CH	β -CH	α -NH	α -CH	β -CH ₂	H-Ar	COCH ₂	CH ₂	CH ₂	CH
24	8,04- 8,06	4,11	1,97- 2,02	0,80	8,04- 8,06	4,63	7,14- 7,24	2,21	1,63	2,12	2,75
26	8,06	4,09	1,91	0,75	8,06	4,59- 4,63	7,13- 7,23	2,21	1,64	2,12	2,75

2.4. Síntese de peptídeos cíclicos contendo a sequência RGD

Os peptídeos cíclicos com a sequência RGD possuem uma actividade até 10 vezes superior à dos peptídeos lineares correspondentes¹². Existem diversos métodos usados na ciclização de peptídeos e derivados, mas na ciclização de peptídeos com a sequência RGD tem sido usada quase exclusivamente a ciclização por formação de uma ligação amida. No entanto, a introdução de outros grupos funcionais para promover a ciclização pode aumentar a actividade e favorecer a farmacocinética dos peptídeos, quer por alteração da conformação do peptídeo, quer por aumento da resistência deste à hidrólise enzimática.

Neste trabalho foram sintetizados dois péptidos cíclicos com a sequência RGD (Figura 18).

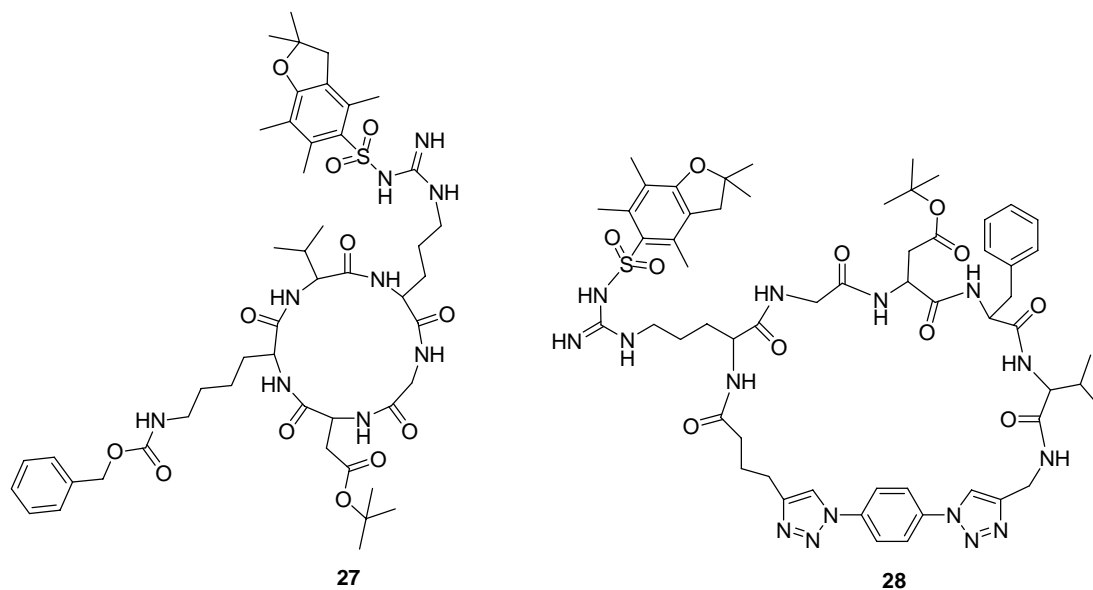
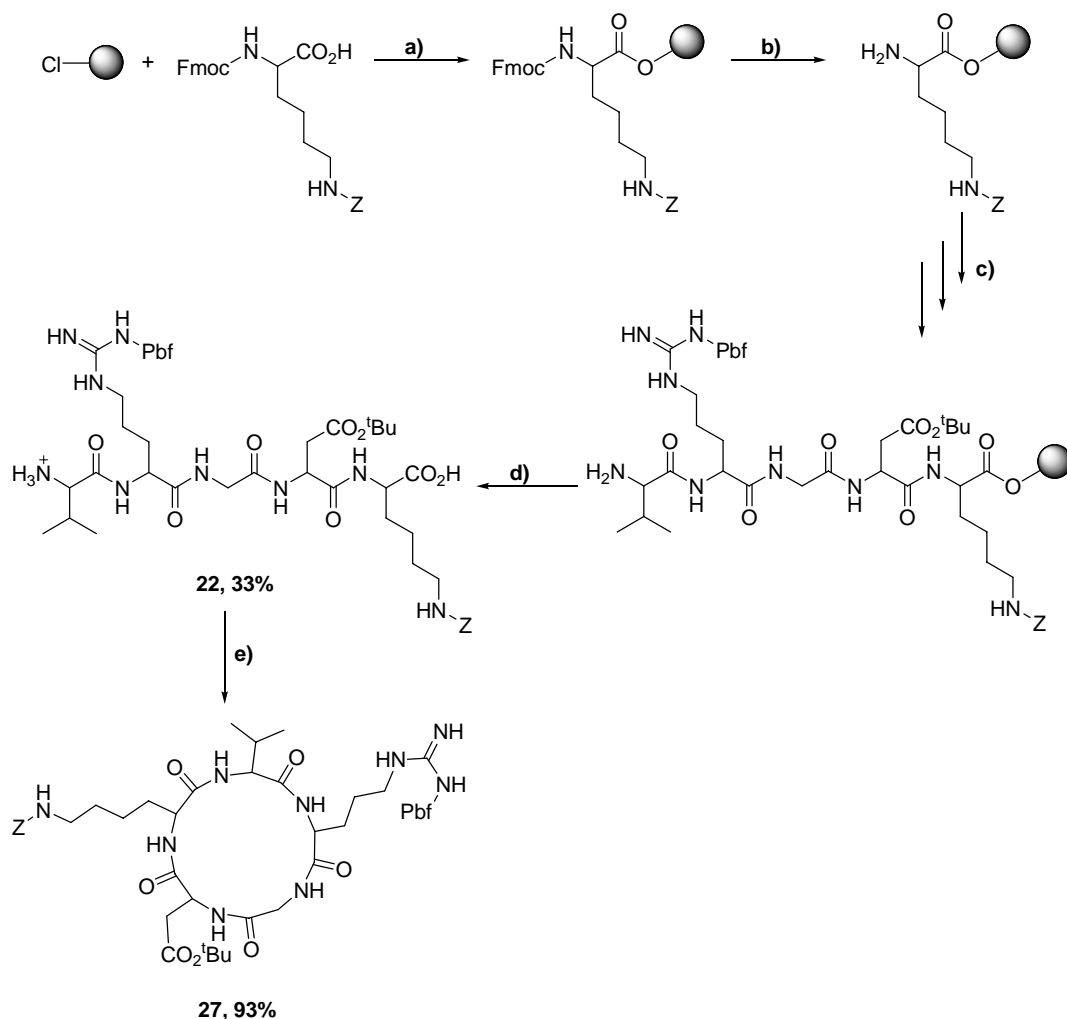


Figura 18. Estrutura dos péptidos cíclicos **27** e **28**.

O péptido **27** foi obtido por ciclização do péptido **22** através da formação de uma ligação amida entre os resíduos de valina e lisina. A reacção de ciclização foi efectuada utilizando uma solução diluída do péptido **22** ($5,5 \times 10^{-2}$ M) que foi tratada com HBTU e DIPEA²⁶. O péptido **27** precipitou da mistura reaccional tendo sido obtido com um rendimento de 93%. Como possui um resíduo de lisina com protecção ortogonal relativamente ao ácido aspártico e à arginina, o péptido **27** permite a ligação a outras moléculas. A síntese do péptido **27** encontra-se no Esquema 22 e corresponde a um rendimento global de 31%.



Esquema 22. Síntese do péptido **27**. **Condições:** **a)** DIPEA (4,0 eq.), DCM seco, t.a., 2h; **b)** 20% piperidina/DMF, t.a., 2h; **c)** **(i)** Fmoc-aa-OH (4,0 eq.), HOBt (4,0 eq.), DIC (4,0 eq.), DMF, t.a., 18h; **(ii)** 20% piperidina/DMF, t.a., 2h; repetição sucessiva de **(i)** e **(ii)**; **d)** AcOH/TFE/DCM (1:1:3), t.a., 1h; **e)** DIPEA (1,6 eq.), HBTU (1,0 eq.), DMF, t.a., 24h.

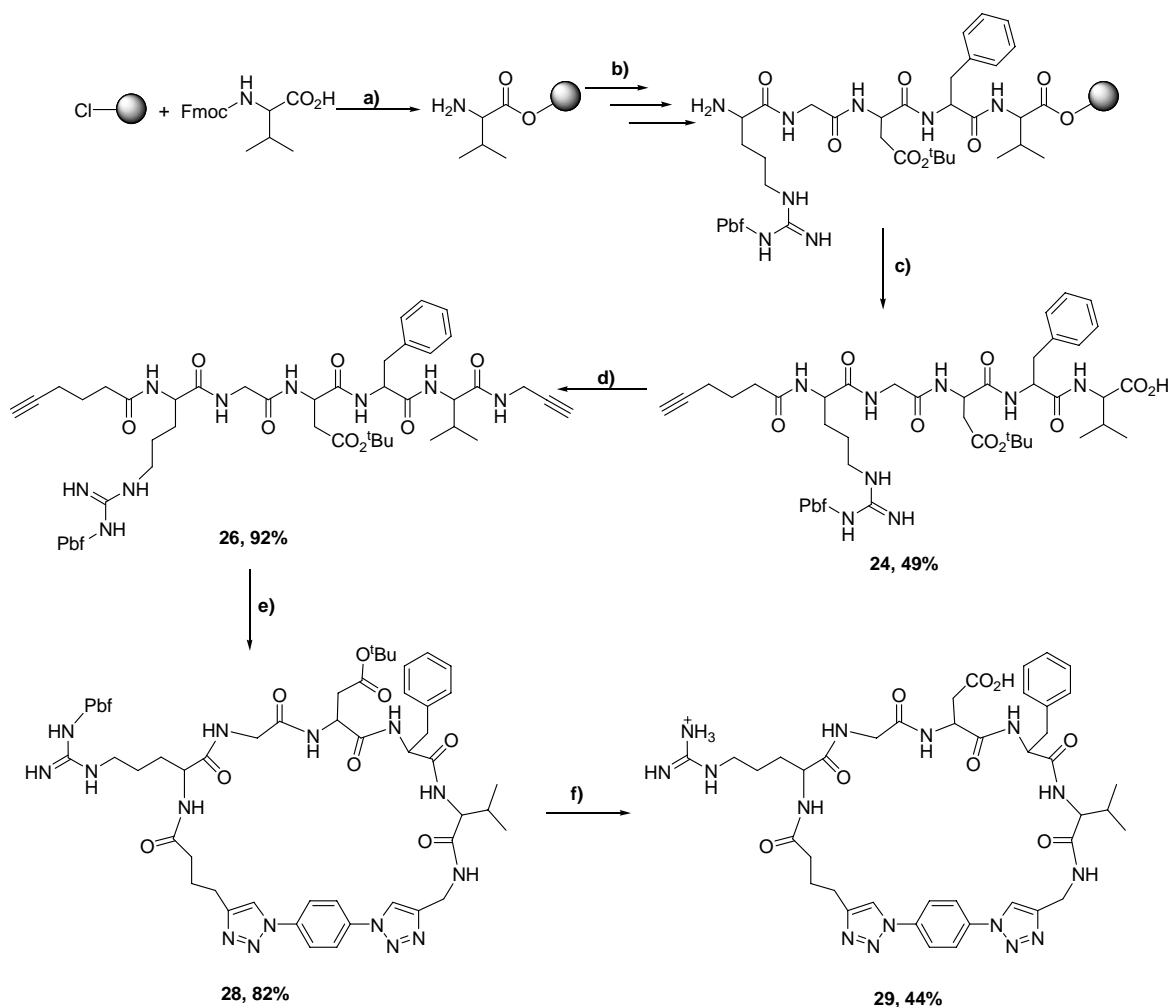
A Tabela 10 apresenta os valores de alguns desvios químicos de RMN de ^1H dos péptidos **22** e **27**. Uma vez que a ciclização ocorreu entre o grupo amina da valina e o grupo ácido carboxílico da lisina, o sinal dos prótons do grupo NH_2 da valina, a um desvio químico de 7,20 ppm, foi substituído por um singlete alargado com um desvio químico a 7,75 ppm, que integra para um próton e corresponde ao próton NH da ligação amida. Comparando os restantes sinais, observam-se algumas alterações nos desvios químicos dos prótons dos dois resíduos referidos; com a ciclização os desvios químicos dos $\alpha\text{-CH}$ destes resíduos sofreram um aumento, passando de multipletos próximos dos 3,7 ppm para multipletos a 4,2 ppm. O $\alpha\text{-CH}$ do ácido aspártico também registou um ligeiro aumento no seu desvio químico.

Tabela 10. Desvios químicos de alguns prótons dos péptidos **22** e **27** em DMSO.

	Asp		Lys				Val			
	α -CH	α -CH	β -CH ₂	γ -CH ₂	δ -CH ₂	ϵ -CH ₂	α -NH	α -CH	β -CH	CH ₃
22	4,48	3,60- -3,82	1,44-1,80	1,08- -1,41	1,08- -1,41	2,89- -3,08	7,20	3,60- -3,82	1,92- -2,02	0,88
27	4,62	4,12- -4,21	1,46-1,58, 1,59-1,71	1,08- -1,41	1,08- -1,41	2,94 ou 3,01	7,75	4,12- -4,21	1,94- -1,98	0,80

O péptido **26** reagiu com a bis-azida **17a**, na presença de iodeto de cobre(I) e trietilamina em DMF, tendo originado o péptido **28** com um rendimento de 82%. Este péptido possui dois anéis de 1,2,3-triazole, os quais podem melhorar a actividade do péptido relativamente ao c(RGDfV).

O péptido **28** foi submetido, sem mais purificações, à clivagem dos grupos protectores com TFA, aumentando-se desta vez o tempo reaccional para 5h. O produto foi isolado como um sólido que foi lavado com uma solução aquosa de EDTA para remover o cobre⁶⁴. O péptido **29** foi obtido com 44% de rendimento (Esquema 23).



Esquema 23. Síntese dos péptidos **28** e **29**. **Condições:** **a)** (i) DIPEA (4,0 eq.), DCM seco, t.a., 2h; (ii) 20% piperidina/DMF, t.a., 2h; **b)** (i) Fmoc-aa-OH (2,0 eq.), HOBt (2,0 eq.), DIC (2,0 eq.), DMF, t.a., 18h; (ii) 20% piperidina/DMF, t.a., 2h; repetição sucessiva de (i) e (ii); **c)** (i) ácido hexinóico (2,0 eq.), HOBt (2,0 eq.), DIC (2,0 eq.), DMF, t.a., 18h; (ii) AcOH/TFE/DCM (1:1:3), t.a., 1h; **d)** propargilamina (1,0 eq.), HOBt (1,0 eq.), HBTU (1,0 eq.), DIPEA (2,0 eq.), DMF, t.a., 22h; **e)** **17a** (1,0 eq.), CuI (0,02 eq.), Et₃N (2,2 eq.), DMF, t.a., 3,5d; **f)** TFA (3 mL/mmol), t.a., 5h.

As principais diferenças a nível dos desvios químicos de próton observadas entre os péptidos **26** e **28** encontram-se na Tabela 11. Os prótons do grupo CH₂ da propargilamina registaram um aumento nos desvios químicos de 3,8 para 4,4 ppm. Este tipo de desvio já tinha sido observado nos bis-aminoácidos **18a-c**, **19a** e **19b**. Este aumento é explicado pela formação do anel de 1,2,3-triazole. Os prótons do grupo CH₂ do ácido hexinóico, ao contrário do que se esperava, não mostraram alteração no seu desvio químico. Os sinais dos prótons das ligações triplas desapareceram, surgindo dois prótons de anéis aromáticos com desvios químicos entre 7,29 e 7,88 ppm.

Tabela 11. Desvios químicos de alguns prótons dos péptidos **26**, **28** e **29** em DMSO.

	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CO	Val				NHCH ₂	NHCH ₂	CH triazoles
		α -NH	α -CH	β -CH	CH ₃			
26	2,12/1,64/2,21	8,06	4,09	1,91	0,75	8,45	3,79	2,75 e 3,06
28	2,11-2,13/ 1,58-1,65/ 2,18-2,26	8,07- -8,12	4,13	1,90- -1,96	0,74	8,54- -8,55	4,38- -4,46	7,29 e 7,88
	2,00-2,15/ 1,60-1,64/ 2,15-2,27	8,56 ou 8,66	4,10	1,80- -2,00	0,74	8,56 ou 8,66	4,41- -4,50	7,30 e 7,88

A desprotecção do péptido **28** com TFA foi confirmada pelo desaparecimento dos sinais correspondentes aos prótons e carbonos dos grupos protectores *tert*-butilo e Pbf nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C.

3. Conclusões e Perspectivas Futuras

Neste trabalho foram sintetizados vários bis-aminoácidos novos, com bons rendimentos, utilizando a reacção de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen. Os bons resultados obtidos conduziram à aplicação de uma estratégia semelhante na síntese de um novo péptido cíclico com a sequência RGD.

A cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen entre azido- e alquinilaminoácidos foi bem sucedida e mostrou que as condições reaccionais normalmente usadas neste tipo de reacção podem ser utilizadas na síntese de bis-aminoácidos ligados por um anel de 1,2,3-triazole. A conversão dos ácidos bis-borónicos às respectivas bis-azidas, seguida da reacção com alquinilaminoácidos permitiu a obtenção de bis-aminoácidos com dois anéis de 1,2,3-triazole.

A síntese em fase sólida de diversos péptidos lineares contendo a sequência RGD levou à obtenção de precursores para a síntese de péptidos cíclicos.

O péptido linear H-Val-Arg(Pbf)-Gly-Asp(O^tBu)-Lys(Z)-OH foi ciclizado por formação de uma ligação amida, tendo sido obtido um péptido cíclico de RGD, contendo um resíduo de lisina protegido ortogonalmente, em relação aos resíduos de arginina e ácido aspártico. Futuramente, este péptido, após desprotecção do grupo benziloxycarbonilo, será ligado, em colaboração com o grupo de Química Biológica do CQ-UM, a agentes para imagem médica.

O anel de 1,2,3-triazole foi inserido numa cadeia peptídica por acoplamento de um bis-aminoácido contendo este anel. Este péptido linear poderá vir a ser ciclizado utilizando uma estratégia *head-to-tail* mediante a formação de uma ligação amida.

O acoplamento da propargilamina e do ácido 5-hexinóico aos terminais ácido carboxílico e amina de um péptido contendo a sequência RGD, e posterior reacção deste com uma bis-azida levaram à síntese de um péptido cíclico contendo dois anéis de 1,2,3-triazole. Prevê-se a síntese de péptidos análogos através da ligação de outras bis-azidas, nomeadamente a bis-azida **17b**.

A afinidade destes péptidos para a integrina $\alpha_v\beta_3$ será efectuada em colaboração com outros grupos de investigação.

4. Parte Experimental

4.1. Procedimentos gerais

Os espectros de RMN de ^1H foram efectuados em os aparelhos Varian Unity Plus 300 (300 MHz) ou Bruker Avance III 400 (400 MHz), usando o pico do solvente como referência interna. A constante de acoplamento (J) foi obtida em Hertz e o deslocamento químico (δ) em partes por milhão (ppm). Os espectros de RMN de ^{13}C foram realizados nos mesmos espectrómetros Varian Unity Plus (75,5 MHz) ou Bruker Avance III (100 MHz). A atribuição dos sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C foi feita com espectros de DEPT θ 135° e utilizando técnicas bidimensionais COSY, HMQC e HMBC. Os solventes deuterados usados foram dimetilsulfóxido (DMSO-d_6) e clorofórmio ($\text{CDCl}_3\text{-d}_1$).

Os espectros de Infravermelho (IV) foram registados num espectrofotómetro Bomen MB 104. As amostras foram preparadas com Nujol em células de cloreto de sódio.

As análises elementares foram realizadas num analisador elementar LECO-CHNS-932.

Os espectros de massa (HRMS) foram efectuados pelo Serviço de Espectrometria de Massa da Universidade de Vigo, Espanha.

Os pontos de fusão foram determinados num aparelho Gallenkamp e não foram corrigidos.

Os espectros de ultravioleta/visível foram obtidos num espectrofotómetro Shimadzu UV-2501PC.

Nas cromatografias em coluna utilizou-se sílica MN Kieselgel 60 M (230-400 mesh).

As cromatografias em camada fina (t.l.c.) foram efectuadas em placas Merck-Kieselgel 60 F₂₅₄. As placas de t.l.c. foram reveladas no ultravioleta ($\nu = 50$ Hz) numa câmara CN-6 de luz ultravioleta e, por vezes, usada a revelação com iodo.

Os solventes secos usados foram DCM e acetonitrilo. O DCM foi seco com cloreto de cálcio (CaCl_2) e hidreto de cálcio (CaH_2) e posteriormente destilado. O acetonitrilo foi tratado com sílica e hidreto de cálcio (CaH_2), destilado e armazenado em *molecular sieves*.

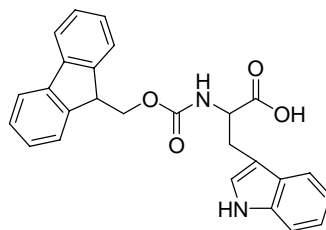
O éter de petróleo usado refere-se à fracção com ponto de ebulição $40\text{-}60^\circ\text{C}$.

As fases orgânicas foram secas usando sulfato de magnésio anidro (Riedel).

Na síntese peptídica em fase sólida foi usada a resina de cloreto de 2-clorotritilo (100-200 mesh) 1% DVB, com uma capacidade de 1 mmol/g.

4.2. Síntese de precursores

4.2.1. Síntese de Fmoc-Trp-OH⁵⁴, 2a

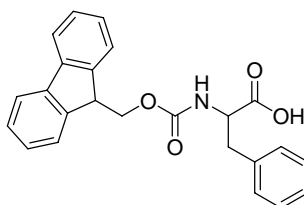


Dissolveu-se o H-*L*-Trp-OH (10 mmol, 2,04 g) numa solução aquosa a 10% de carbonato de sódio (2,5 eq., 25 mmol, 26,50 mL) e adicionou-se dioxano (15 mL). Colocou-se a mistura a agitar em banho de gelo e adicionou-se cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (1,0 eq., 10 mmol, 2,60 g) lentamente. A mistura ficou sob agitação, a 0°C, durante 4 h, e à t.a. durante 24 h. Adicionou-se água destilada (400 mL) à mistura reaccional e extraiu-se com éter etílico (2×100 mL). Arrefeceu-se a fase aquosa num banho de gelo e acidificou-se a pH 1-2, sob agitação vigorosa, com ácido clorídrico concentrado. Filtrou-se o sólido formado e lavou-se com éter etílico. Obteve-se o composto **2a** na forma de um sólido beje (4,26 g, ~100 %).

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO) 3,01 (1H, dd, J 10,2 e 14,7 Hz, β-CH₂), 3,19 (1H, dd, J 4,5 e 14,7 Hz, β-CH₂), 4,05-4,38 (4H, m, 9-CH, CH₂ Fmoc, α-CH), 6,97 (1H, t, J 7,4 Hz, CH Trp), 7,06 (1H, t, J 7,4 Hz, CH Trp), 7,16 (1H, d, J 2,1 Hz, 2-CH Trp), 7,26 (2H, t, J 7,1 Hz, 2-CH e 7-CH Fmoc), 7,32 (1H, t, J 7,2 Hz, CH Trp), 7,40 (2H, t, J 7,1 Hz, 3-CH e 6-CH Fmoc), 7,55 (1H, d, J 7,8 Hz, NH), 7,65 (1H, t, J 8,1 Hz, CH Trp), 7,69 (2H, d, J 8,7 Hz, 1-CH e 8-CH Fmoc), 7,87 (2H, d, J 7,8 Hz, 4-CH e 5-CH Fmoc), 10,85 (1H, s, NH), 12,70 (1H, sl, CO₂H) ppm.

p.f.: 150,5-152,0°C (**p.f.lit.:** 174-175°C⁵⁴).

4.2.2. Síntese de Fmoc-*D*-Phe-OH⁵⁴, 2b



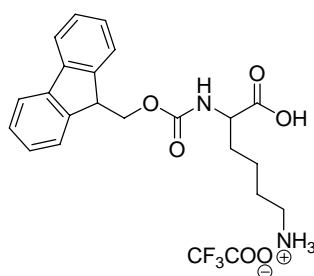
Dissolveu-se a H-*D*-Phe-OH (6,10 mmol, 1,01 g) numa solução aquosa a 10% de carbonato de sódio (2,5 eq., 15,25 mmol, 16,17 mL) e adicionou-se dioxano (13 mL). Colocou-se a mistura a agitar em banho de gelo e adicionou-se cloroformiato de 9-

fluorenilmetilo (1,0 eq., 6,10 mmol, 1,59 g) lentamente. A mistura ficou sob agitação, a 0°C, durante 4 h, e à t.a. durante a noite. Adicionou-se água destilada (300 mL) à mistura reaccional e extraiu-se com éter etílico (2×70 mL). Arrefeceu-se a fase aquosa num banho de gelo e acidificou-se a pH 1-2, sob agitação vigorosa, com ácido clorídrico concentrado. Filtrou-se o sólido formado e lavou-se com éter. Colocou-se na estufa de vácuo a secar. Obteve-se o composto **2b** na forma de um sólido branco (2,36 g; ~100%).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) 2,85 (1H, dd, J 10,8 e 13,8 Hz, β-CH₂), 3,06 (1H, dd J 4,5 e 13,8 Hz, β-CH₂), 4,10-4,25 (4H, m, α-CH, CH₂ Fmoc, 9-CH), 7,15-7,33 (6H, m, H-Ar, NH), 7,40 (2H, t, J 7,5 Hz, 2-CH e 7-CH), 7,63 (2H, t, J 6,9 Hz, 3-CH e 6-CH), 7,75 (2H, d, J 8,7 Hz, 1-CH e 8-CH), 7,87 (2H, d, J 7,8 Hz, 4-CH e 5-CH), 12,75 (1H, sl, CO₂H) ppm.

p.f.: 176-177°C (**p.f.lit.:** 183-185°C⁵⁴).

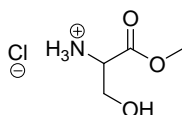
4.2.3. Síntese de Fmoc-Lys-OH.TFA, **2d**



Dissolveu-se a Fmoc-Lys(Boc)-OH (2,14 mmol; 1,00 g) em TFA (6,44 mL) e deixou-se em agitação à t.a. por 5 h. Evaporou-se o solvente no vácuo, tendo-se obtido um óleo que foi lavado com éter etílico. Obteve-se o composto **2d** na forma de um óleo castanho claro (1,04 g; ~100%).

¹H RMN (400 MHz, DMSO) 1,32-1,42 (2H, m, γ-CH₂), 1,49-1,57 (2H, m, δ-CH₂), 1,58-1,74 (2H, m, β-CH₂), 2,74-2,79 (2H, m, ε-CH₂), 3,89-3,95 (1H, m, α-CH), 4,20-4,25 (1H, m, 9-CH), 4,27-4,31 (2H, m, CH₂ Fmoc), 7,32 (2H, dt, J 1,2 e 7,6 Hz, 2-CH e 7-CH), 7,41 (2H, t, J 7,6 Hz, 3-CH e 6-CH), 7,61 (1H, d, J 8,0 Hz, NH), 7,70-7,77 (5H, m, 1-CH, 8-CH e NH₃⁺), 7,88 (2H, d, J 7,6 Hz, 4-CH e 5-CH) ppm.

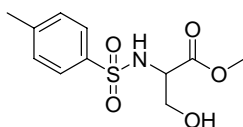
¹³C RMN (400 MHz, dmsO) 22,57 (γ-CH₂), 26,52 (δ-CH₂), 30,19 (β-CH₂), 38,62 (ε-CH₂), 53,62 (α-CH), 46,69 (9-CH), 65,60 (CH₂ Fmoc), 120,14 (4-CH e 5-CH), 125,27 (1-CH e 8-CH), 127,09 (2-CH e 7-CH), 127,66 (3-CH e 6-CH), 140,76 (C), 143,80 (C), 156,22 (C=O), 173,86 (CO₂H) ppm.

4.2.4. Síntese de H-Ser-OMe.HCl⁶⁵, **10**

Adicionou-se o cloreto de tionilo (3,4 eq., 343 mmol, 25 mL), gota a gota, a metanol (100 mL) em banho de gelo. Juntou-se lentamente a serina (100 mmol, 10,51 g) e deixou-se a agitar em banho termostatado a 40°C durante 4 h. Removeu-se o solvente no vácuo. O sólido obtido foi lavado com éter etílico. Obteve-se o cloridrato do éster metílico da serina na forma de uns cristais brancos (15,54 g; ~100 %).

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO) 3,74 (3H, s, OCH₃), 3,81 (2H, d, J 3,6 Hz, β-CH₂), 4,10 (1H, sl, α-CH), 5,58 (1H, sl, OH), 8,55 (3H, sl, NH₃⁺) ppm.

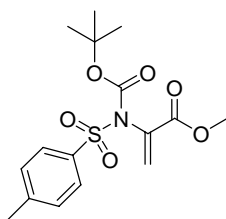
p.f.: 163-165°C (**p.f.lit.:** 165-166°C⁶⁵).

4.2.5. Síntese de Tos-Ser-OMe⁵⁶, **11**

A uma mistura de diclorometano (60 mL) e trietilamina (2,2 eq., 66 mmol, 9,20 mL) juntou-se o cloridrato do éster metílico da serina **10** (30 mmol, 4,66 g). Arrefeceu-se a mistura em banho de gelo e adicionou-se lentamente o cloreto de tosilo (1,1 eq., 33 mmol, 6,29 g). Deixou-se a agitar à t.a. durante 4 h, filtrou-se o sólido formado e evaporou-se o solvente no vácuo. Dissolveu-se o resíduo em acetato de etilo (180 mL) e lavou-se sucessivamente com uma solução de KHSO₄ 1M (2×60 mL), uma solução de NaHCO₃ 1M (2×60 mL) e uma solução saturada de cloreto de sódio (2×60 mL). Secou-se a fase orgânica com sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente no vácuo. Obteve-se o composto **11** na forma de um sólido branco, que foi recristalizado de acetato de etilo /éter etílico (5,84 g, 71 %).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) 2,44 (3H, s, CH₃), 3,63 (3H, s, OCH₃), 3,90 (2H, d, J 3,6 Hz, β-CH₂), 3,96-4,00 (1H, m, α-CH), 5,60 (1H, d, J 7,2 Hz, NH), 7,32 (2H, d, J 8,1 Hz, H-Ar), 7,75 (2H, d, J 8,1 Hz, H-Ar) ppm.

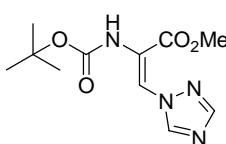
p.f.: 88-89°C (**p.f.lit.:** 92-93°C⁶⁶).

4.2.6. Síntese de Tos- Δ Ala(*N*-Boc)-OMe⁶⁷, **12**

A uma solução de Tos-Ser-OMe, **11** (10 mmol, 2,73 g) em acetonitrilo seco (10 mL), adicionou-se a DMAP (2,5 mmol, 0,30 g), e o Boc₂O (2,5 eq., 25 mmol, 5,46 g) e deixou-se sob agitação à t.a. Seguiu-se a reação por t.l.c. (éter etílico: éter de petróleo, 1:1). Ao fim de 3 h, evaporou-se o solvente em vácuo. Dissolveu-se o óleo obtido em éter etílico (200 mL) e lavou-se sucessivamente com uma solução de KHSO₄ 1M (1×100 mL, 3×50 mL), uma solução de NaHCO₃ 1M (3×50 mL) e uma solução saturada de cloreto de sódio (3×50 mL). Secou-se a fase orgânica com sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente em vácuo. Obteve-se um sólido amarelo claro, que foi recristalizado de éter etílico/ éter de petróleo. Obteve-se o composto **12** na forma de sólido branco (1,18 g, 33 %).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) 1,34 (9H, s, 3×CH₃), 2,44 (3H, s, CH₃), 3,79 (3H, s, OCH₃), 6,07 (1H, d, J 0,6 Hz, β-CH), 6,61 (1H, d, J 0,9 Hz, β-CH), 7,33 (2H, d, J 7,8 Hz, H-Ar), 7,96 (2H, d, J 8,4 Hz, H-Ar) ppm.

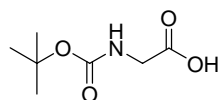
p.f.: 126,5-127,5°C (**p.f.lit.:** 129-130°C⁶⁷).

4.2.7. Síntese de (*E*)-Boc- Δ Ala[β-(1,2,4-triazol-1-il)]-OMe⁶⁸, **13**

Dissolveu-se a Tos- Δ Ala(*N*-Boc)-OMe, **12** (2,55 mmol; 0,91 g) em acetonitrilo (10 mL), e adicionou-se o 1,2,4-triazole (1,0 eq.; 2,55 mmol; 0,18 g) e o carbonato de potássio (6,0 eq.; 15,29 mmol; 2,11 g). Deixou-se a agitar à t.a. durante a noite. Filtrou-se o carbonato e evaporou-se o solvente à secura. Obteve-se o composto **13** na forma de um sólido laranja (0,68 g; ~100 %).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) 1,48 (9H, s, 3×CH₃), 3,89 (3H, s, OCH₃), 7,31 (1H, s, β-CH), 8,08 (1H, s, NH), 8,10 (1H, s, 3-CH ou 5-CH), 8,32 (1H, s, 3-CH ou 5-CH) ppm.

p.f.: 108,5-110,0°C (**p.f.lit.:** 109,5-110,5°C⁶⁸).

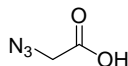
4.2.8. Síntese de Boc-Gly-OH⁵⁵, **3**

Colocou-se sob agitação, em banho de gelo, uma solução de glicina (20,42 mmol; 1,53 g) numa mistura de dioxano (40 mL), água destilada (20 mL) e hidróxido de sódio 1M (20 mL). Adicionou-se o Boc₂O (1,1 eq.; 22,46 mmol; 4,90 g) e agitou-se por 30 min. à t.a.. Concentrou-se a solução no vácuo até 25 mL e acidificou-se com uma solução de KHSO₄ 1M até pH 2-3. Extraíu-se a fase aquosa com acetato de etilo (2×50 mL). Juntaram-se as fases orgânicas, lavou-se com água destilada (2×50 mL), secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente no vácuo. Obteve-se o composto **3** na forma de uns cristais brancos, que foram recristalizados de acetato de etilo/ éter de petróleo (2,28 g; 64 %).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) 1,47 (9H, s, 3×CH₃), 3,98 (2H, d, J 4,8 Hz, α-CH₂), 5,03 (5/8H, s, NH), 6,53 (3/8H, s, NH) ppm.

p.f.: 83,5-85,0°C (**p.f.lit.:** 86-89°C⁶⁹).

4.2.9. Síntese de azido-aminoácidos e bis-azidas

4.2.9.1. Síntese de N₃-Gly-OH⁶¹, **15a**

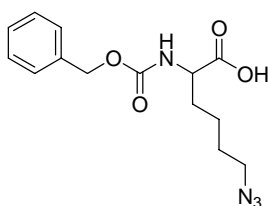
Dissolveu-se a azida de sódio (10 eq.; 92,40 mmol; 6,00 g) em água destilada (15 mL) e DCM (24 mL). Arrefeceu-se a mistura num banho de gelo durante 20 min. e adicionou-se o anidrido trifluormetanossulfônico (2,0 eq.; 18 mmol; 3,00 mL) lentamente durante 2 min.. Deixou-se a mistura sob agitação durante 2 h em banho de gelo. Extraíu-se a mistura com DCM (2×12 mL). Juntaram-se as fases orgânicas e lavou-se com uma solução saturada de carbonato de sódio (20 mL). Usou-se esta solução em DCM sem mais purificações. Dissolveu-se a glicina (9 mmol; 0,68 g), o carbonato de potássio (1,5 eq.; 13,50 mmol; 1,78 g) e o sulfato de cobre (II) pentahidratado (1,0 mol%; 90 μmol; 22,50 mg) em água destilada (30 mL) e metanol (60 mL). A esta solução adicionou-se a mistura preparada anteriormente (48 mL) e deixou-se sob agitação à t.a. durante 18 h. Evaporaram-se os solventes orgânicos no vácuo e diluiu-se o resíduo com água (150 mL). Acidificou-se a solução até pH 6 com ácido clorídrico concentrado. Diluiu-se com uma solução tampão de fosfato (250 mM, pH 6,2;

150 mL) e extraiu-se com acetato de etilo (4×60 mL) para remover a sulfonamida formada. Acidificou-se a fase aquosa até pH 2 com ácido clorídrico concentrado e extraiu-se novamente com acetato de etilo (4×60 mL). Combinaram-se as fases orgânicas, secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente à secura. Obteve-se o composto **15a** na forma de um óleo rosa pálido (0,90 g; 99 %).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) 3,97 (2H, s, $\alpha\text{-CH}_2$), 11,39 (1H, s, CO_2H) ppm.

IV (Nujol): 3150 l (O-H), 2954 (C-H), 2925 (C-H), 2854 (C-H), 2111 f (N_3), 1728 f (C=O) cm^{-1} .

4.2.9.2. Síntese de Z-Lys(N_3)-OH, **15b**



Dissolveu-se a azida de sódio (8,6 eq.; 46,20 mmol; 3,00 g) em água destilada (7,5 mL) e DCM (12 mL). Arrefeceu-se a mistura num banho de gelo durante 20 min. e adicionou-se o anidrido trifluormetanossulfônico (1,6 eq.; 9,00 mmol; 1,50 mL) lentamente durante 5 min.. Deixou-se a mistura sob agitação durante 2 h em banho de gelo. Extraiu-se a mistura com DCM (2×6 mL). Juntaram-se as fases orgânicas e lavaram-se com uma solução saturada de carbonato de sódio (10 mL). Usou-se esta solução em DCM sem mais purificações. Dissolveu-se a Z-Lys-OH (5,40 mmol; 1,26 g), o carbonato de potássio (1,3 eq.; 6,75 mmol; 0,93 g) e o sulfato de cobre (II) anidro (1,0 mol%; 45 μmol ; 7,20 mg) em água destilada (15 mL) e metanol (30 mL). A esta solução adicionou-se a mistura preparada anteriormente (24 mL) e deixou-se sob agitação à t.a. durante 18 h. Evaporaram-se os solventes orgânicos em vácuo e diluiu-se o resíduo com água destilada (75 mL). Acidificou-se a solução até pH 6 com ácido clorídrico concentrado. Diluiu-se com uma solução tampão de fosfato (250 mM, pH 6,2; 75 mL) e extraiu-se com acetato de etilo (4×30 mL) para remover a sulfonamida formada. Acidificou-se a fase aquosa até pH 2 com ácido clorídrico concentrado e extraiu-se novamente com acetato de etilo (3×30 mL). Combinaram-se as fases orgânicas, secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente à secura. Obteve-se o composto **15b** na forma de um óleo amarelo pálido (0,31 g; 23 %).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) 1,41-1,52 (2H, m, $\gamma\text{-CH}_2$), 1,53-1,68 (2H, m, $\delta\text{-CH}_2$), 1,69-1,78 (1H, m, $\beta\text{-CH}_2$), 1,89-1,96 (1H, m, $\beta\text{-CH}_2$), 3,28 (2H, t, J 6,6 Hz, $\epsilon\text{-CH}_2$).

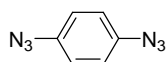
CH₂), 4,40-4,45 (1H, m, α -CH), 5,13 (2H, s, CH₂ Z), 5,29 (1H, d, J 8,0 Hz, NH), 7,33-7,37 (5H, m, H-Ar), 8,44 (1H, sl, CO₂H) ppm.

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) 22,36 (γ -CH₂), 28,30 (δ -CH₂), 31,86 (β -CH₂), 51,01 (ϵ -CH₂), 53,47 (α -CH), 67,22 (CH₂ Z), 128,09 (CH Z), 128,26 (CH Z), 128,53 (CH Z), 135,97 (C_i), 156,07 (C=O Z), 176.71 (CO₂H) ppm.

IV (Nujol): 3322 l (O-H), 2936 (C-H), 2869 (C-H), 2097 f (N₃), 1747 f (C=O), 1725 f (C=O) cm⁻¹.

HRMS: 329,12173, calc. para C₁₄H₁₈N₄NaO₄ 329,12203.

4.2.9.3. Síntese da bis-azida 17a



Num balão adicionou-se a azida de sódio (2,5 eq.; 5,00 mmol; 0,32 g), o sulfato de cobre (II) penta-hidratado (20 mol%; 0,40 mmol; 99,80 mg), metanol (5 mL) e o ácido 1,4-benzenobis-borónico (2,00 mmol; 0,33 g). Deixou-se a mistura sob agitação à t.a. e seguiu-se a reacção por t.l.c. (éter etílico). Ao fim de 40 h evaporou-se o solvente em vácuo. Extraiu-se a azida com éter de petróleo e removeu-se o solvente. Obteve-se o composto **17a** na forma de cristais de cor salmão (0,21 g; 67 %). Esta azida mostrou ser sensível ao ar e à luz.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) 7,02 (4H, s, CH) ppm.

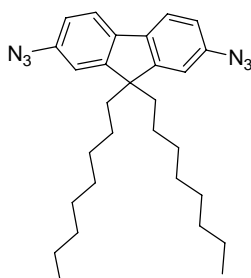
RMN de ¹³C (75,5 MHz, CDCl₃) 120,34 (CH), 136,67 (C) ppm.

IV (Nujol): 2954 f (C-H), 2924 f (C-H), 2854 f (C-H), 2107 f (N₃) cm⁻¹

Análise Elementar: C₆H₄N₆ (160,14): calculado C 45,00, H 2,52, N 52,48; obtido C 45,12, H 2,70, N 52,25.

p.f.: 79-82°C.

4.2.9.4. Síntese da bis-azida 17b



Num balão adicionou-se a azida de sódio (2,5 eq.; 2,50 mmol; 0,16 g), o sulfato de cobre (II) penta-hidratado (20 mol%; 0,20 mmol; 0,05 g), o metanol (3 mL) e o ácido

(9,9-dioctil-9*H*-fluoreno-2,7-di-il)bis-borónico (1,00 mmol; 0,48 g). Deixou-se em agitação à t.a. e seguiu-se a reação por t.l.c. (éter etílico). Ao fim de 30 h, evaporou-se o solvente em vácuo. Extraíu-se a azida com éter de petróleo e removeu-se o solvente no vácuo. Obteve-se o composto **17b** na forma de um sólido verde-escuro (0,41 g; 87 %). Esta azida mostrou ser sensível ao ar e à luz.

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) 0,57-0,61 (4H, m, CH₂), 0,82-0,89 (6H, m, 2×CH₃), 1,05-1,06 (8H, m, CH₂), 1,11-1,15 (8H, m, CH₂), 1,20-1,23 (4H, m, CH₂), 1,91-1,96 (4H, m, CH₂), 6,96 (2H, d, J 2,0 Hz, 1-CH e 8-CH), 7,01 (2H, dd, J 2,0 e 8,0 Hz, 3-CH e 6-CH), 7,61 (2H, d, J 8,0 Hz, 4-CH e 5-CH) ppm.

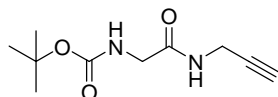
RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) 14,03 (CH₃), 22,56 (CH₂), 23,6 (CH₂), 29,16 (CH₂), 29,86 (CH₂), 31,74 (CH₂), 40,35 (CH₂), 55,43 (9-C), 113,56 (1-CH e 8-CH), 117,85 (3-CH e 6-CH), 120,52 (4-CH e 5-CH), 137,58 (4a-C e 5a-C), 138,71 (2-C e 7-C), 152,56 (1a-C e 8a-C) ppm.

IV (Nujol): 2954 f (C-H), 2925 f (C-H), 2854 f (C-H), 2103 f (N₃) cm⁻¹

p.f.: 64-66°C.

4.2.10. Síntese de alquilaminoácidos

4.2.10.1. Síntese de Boc-Gly-propargilamina, **4a**



Dissolveu-se a Boc-Gly-OH, **3** (10 mmol; 1,75 g) em acetonitrilo (10 mL) e colocou-se em agitação num banho de gelo. Adicionou-se o HOBt (1,0 eq.; 10 mmol; 1,35 g), a DCC (1,0 eq.; 10 mmol; 2,06 g) e a propargilamina (1,0 eq.; 10 mmol; 0,69 mL), esperando cerca de 5 min. entre cada adição. Adicionou-se a trietilamina (1,0 eq.; 10 mmol; 1,40 mL) e deixou-se em agitação durante a noite, à t.a. Filtrou-se a ureia formada e evaporou-se o solvente. Dissolveu-se em acetona e colocou-se no frio por 2 h. Filtrou-se novamente para remover toda a ureia e evaporou-se o solvente à secura. Dissolveu-se o resíduo em acetato de etilo (100 mL) e lavou-se sucessivamente com uma solução de KHSO₄ 1M (3×50 mL), uma solução de NaHCO₃ 1M (3×50 mL) e uma solução saturada de cloreto de sódio (3×50 mL). Secou-se a fase orgânica com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente no vácuo, obtendo-se um sólido bege, que revelou ser o composto **4a** (2,03 g, 96 %).

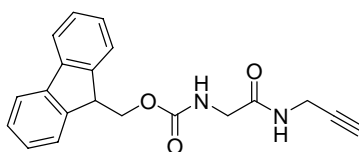
RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) 1,45 (9H, s, $3\times\text{CH}_3$), 2,23 (1H, t, J 2,4 Hz, CH), 3,82 (2H, d, J 5,6 Hz, $\alpha\text{-CH}_2$), 4,06 (2H, dd, J 2,4 e 5,6 Hz, CH_2), 5,29 (1H, sl, NH), 6,51 (1H, sl, NH) ppm.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) 28,26 (CH_3), 29,03 (CH_2), 44,26 ($\alpha\text{-CH}_2$), 71,63 (CH), 79,19 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 80,42 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 156,09 ($\text{C}=\text{O}$ Boc), 169,25 ($\text{C}=\text{O}$) ppm.

Análise elementar: $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ (212,25): calculado C 56,59, H 7,69, N 13,20; obtido C 57,36, H 7,76, N 12,57.

p.f.: 100,0-101,5°C.

4.2.10.2. Síntese de Fmoc-Gly-propargilamina, **4b**



Dissolveu-se a Fmoc-Gly-OH (1,00 mmol; 0,30 g) em acetonitrilo (5 mL) e colocou-se em agitação num banho de gelo. Adicionou-se o HOBt (1,0 eq.; 1,00 mmol; 0,14 g), a DCC (1,0 eq.; 1,00 mmol; 0,21 g) e a propargilamina (1,0 eq.; 1,00 mmol; 0,07 mL), esperando cerca de 5 min. entre cada adição. Deixou-se em agitação durante a noite, à t.a. Filtrou-se a ureia formada e evaporou-se o solvente. Dissolveu-se em acetona e colocou-se no frio por 5 h. Filtrou-se novamente para remover toda a ureia e evaporou-se o solvente à secura. Dissolveu-se o resíduo em acetato de etilo (50 mL) e lavou-se sucessivamente com uma solução de KHSO_4 1M (2×30 mL), uma solução de NaHCO_3 1M (2×30 mL) e uma solução saturada de cloreto de sódio (2×30 mL). Secou-se a fase orgânica com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente no vácuo, obtendo-se um sólido amarelado, que mostrou ser o composto **4b** (0,19 g, 56 %).

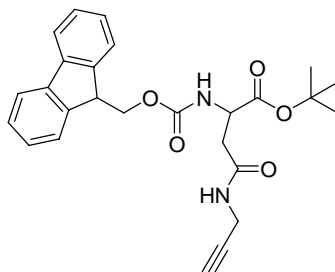
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) 3,09 (1H, t, J 2,4 Hz, CH), 3,60 (2H, d, J 6,0 Hz, $\alpha\text{-CH}_2$), 3,86 (2H, dd, J 2,4 e 5,6 Hz, CH_2), 4,22 (1H, t, J 6,4 Hz, 9-CH), 4,28 (2H, d, J 6,4 Hz, CH_2 Fmoc), 7,32 (2H, dt, J 0,8 e 7,2 Hz, 2-CH e 7-CH), 7,41 (2H, t, J 7,2 Hz, 3-CH e 6-CH), 7,53 (1H, t, J 6,0 Hz, NH), 7,71 (2H, d, J 7,2 Hz, 1-CH e 8-CH), 7,88 (2H, d, J 7,6 Hz, 4-CH e 5-CH), 8,29 (1H, t, J 5,2 Hz, NH) ppm.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO) 27,85 (CH_2), 43,27 ($\alpha\text{-CH}_2$), 46,61 (9-CH), 65,70 (CH_2 Fmoc), 72,97 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 81,07 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 120,08 (4-CH e 5-CH), 125,23 (1-CH e 8-CH), 127,06 (2-CH e 7-CH), 127,61 (3-CH e 6-CH), 140,70 (4a-C e 5a-C), 143,83 (1a-C e 8a-C), 156,45 ($\text{C}=\text{O}$ Fmoc), 168,88 ($\text{C}=\text{O}$) ppm.

Análise Elementar: C₂₀H₁₈N₂O₃ (334,37): calculado C 71,84, H 5,43, N 8,38; obtido C 70,99, H 5,61, N 8,51.

p.f.: 151-153°C.

4.2.10.3. Síntese de Fmoc-Asp(β -propargilamino)-O^tBu, 6a



Dissolveu-se o Fmoc-Asp-O^tBu (1,00 mmol; 0,41 g) em acetonitrilo (5 mL) e colocou-se em agitação num banho de gelo. Adicionou-se o HOBt (1,0 eq.; 1,00 mmol; 0,14 g), a DCC (1,0 eq.; 1,00 mmol; 0,21 g) e a propargilamina (1,0 eq.; 1,00 mmol; 0,07 mL), esperando cerca de 5 min. entre cada adição. Adicionou-se a trietilamina (1,0 eq.; 1,00 mmol; 0,14 mL) e deixou-se em agitação durante a noite, à t.a. Filtrou-se a ureia formada e evaporou-se o solvente. Dissolveu-se em acetona e colocou-se no frio por 2 h. Filtrou-se novamente para remover a ureia toda e evaporou-se o solvente à secura. Dissolveu-se em acetato de etilo (50 mL) e lavou-se sucessivamente com uma solução de KHSO₄ 1M (3×25 mL), uma solução de NaHCO₃ 1M (3×25 mL) e uma solução saturada de cloreto de sódio (3×25 mL). Secou-se a fase orgânica com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente no vácuo, obtendo-se o composto **6a** na forma de um sólido branco (0,41 g, 92 %).

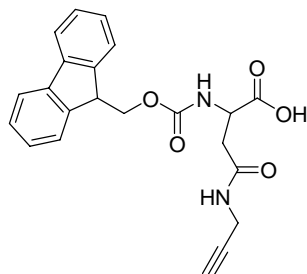
RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) 1,49 (9H, s, 3×CH₃), 2,22 (1H, s, CH₂C≡CH), 2,74 (1H, dd, J 4,5 e 15,6 Hz, β -CH₂), 2,90 (1H, dd, J 3,9 e 15,6 Hz, β -CH₂), 4,05 (2H, s, CH₂C≡CH), 4,24 (1H, t, J 7,1 Hz, 9-CH), 4,38 (2H, t, J 7,2 Hz, CH₂ Fmoc), 4,49-4,51 (1H, m, α -CH), 5,82 (1H, s, NH), 5,98 (1H, d, J 7,2 Hz, NH), 7,32 (2H, t, J 7,5 Hz, 2-CH e 7-CH), 7,41 (2H, t, J 7,5 Hz, 3-CH e 6-CH), 7,60 (2H, d, J 6,6 Hz, 1-CH e 8-CH), 7,77 (2H, d, J 7,5 Hz, 4-CH e 5-CH) ppm.

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) 27,87 (CH₃), 29,16 (CH₂), 37,92 (β -CH₂), 47,11 (9-CH), 51,31 (α -CH), 67,16 (CH₂ Fmoc), 71,80 (C≡CH), 79,13 (C≡CH), 82,62 (C(CH₃)₃), 119,95 (4-CH e 5-CH), 125,16 (1-CH e 8-CH), 127,06 (2-CH e 7-CH), 127,69 (3-CH e 6-CH), 141,26 (4a-C e 5a-C), 143,74 (1a-C e 8a-C), 156,20 (C=O Fmoc), 169,49 (C=ONH), 169,77 (CO₂^tBu) ppm.

Análise Elementar: C₂₆H₂₈N₂O₅ (448,51): calculado C 69,63, H 6,29, N 6,25; obtido C 69,17, H 6,18, N 6,00.

p.f.: 146-148°C.

4.2.10.4. Síntese de Fmoc-Asp(β -propargilamino)-OH, **7**



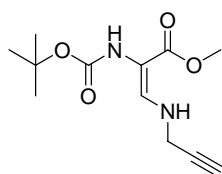
Dissolveu-se o Fmoc-Asp(β -propargilamino)-O^tBu, **6a** (0,56 mmol; 0,25 g) em TFA (1,7 mL) e colocou-se em agitação à t.a. durante 3 h. Evaporou-se o solvente e obteve-se um sólido amarelo, que mostrou ser o composto **7** (0,22 g; ~100 %).

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO) 2,49 (1H, dd, J 5,6 e 15,6 Hz, β -CH₂), 2,61 (1H, dd, J 5,4 e 15,6 Hz, β -CH₂), 3,08 (1H, t, J 2,4 Hz, C≡CH), 3,85 (2H, dd, J 2,4 e 5,2 Hz, CH₂), 4,20-4,23 (1H, m, 9-CH), 4,25-4,27 (2H, m, CH₂ Fmoc), 4,34-4,39 (1H, m, α -CH), 7,31 (2H, dt, J 1,2 e 7,6 Hz, 2-CH e 7-CH), 7,41 (2H, t, J 7,6 Hz, 3-CH e 6-CH), 7,55 (1H, d, J 8,4 Hz, NH), 7,69 (2H, d, J 7,2 Hz, 1-CH e 8-CH), 7,87 (2H, d, J 7,6 Hz, 4-CH e 5-CH), 8,33 (1H, t, J 5,2 Hz, NH) ppm.

RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO) 27,96 (CH₂), 36,68 (β -CH₂), 46,60 (9-CH), 50,43 (α -CH), 65,71 (CH₂ Fmoc), 73,11 (C≡CH), 80,99 (C≡CH), 120,11 (4-CH e 5-CH), 125,3 (1-CH e 8-CH), 127,11 (2-CH e 7-CH), 127,64 (3-CH e 6-CH), 140,7 (4a-C e 5a-C), 143,8 (1a-C e 8a-C), 155,81 (C=O Fmoc), 168,86 (C=O), 173,00 (CO₂H) ppm.

HRMS [M+H]: 393,14443, calc. para C₂₂H₂₁N₂O₅ 393,14450.

4.2.10.5. Síntese de (*E*)-Boc- Δ Ala(β -propargilamino)-OMe⁵⁹, **6b**



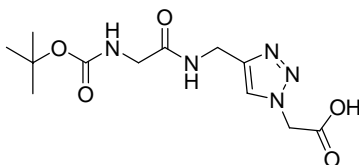
Dissolveu-se a (*E*)-Boc- Δ Ala[β -(1,2,4-triazol-1-il)]-OMe, **13** (1,50 mmol; 0,40 g) em metanol (5 mL) e adicionou-se a propargilamina (2,5 eq.; 3,75 mmol; 0,26 mL). Deixou-se em agitação à t.a. durante a noite. Seguiu-se a reacção por espectroscopia RMN de ¹H. Adicionou-se acetato de etilo (50 mL) e lavou-se com uma solução de

KHSO₄ 1M (3×20 mL) e uma solução saturada de cloreto de sódio (3×20 mL). Secou-se a fase orgânica com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente à secura. Obteve-se o composto **6b** na forma de um óleo amarelo (0,37 g; ~100 %).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) 1,47 (9H, s, 3×CH₃), 2,36 (1H, t, J 2,4 Hz, C≡CH), 3,72 (3H, s, OCH₃), 3,95-3,97 (2H, m, CH₂), 5,63 (1H, s, NH), 6,03 (1H, s, NH), 7,20 (1H, s, β-CH) ppm.

4.3. Síntese de bis-aminoácidos utilizando a reacção de adição 1,3-dipolar de Huisgen

4.3.1. Síntese do composto **18a**



4.3.1.1. Com Cu(I)

Dissolveu-se a N₃-Gly-OH, **15a** (0,50 mmol; 0,05 g) e a Boc-Gly-propargilamina, **4a** (1,1 eq.; 0,56 mmol; 0,12 g) em acetonitrilo (1 mL) e água destilada (2 mL). Adicionou-se a trietilamina (1,1 eq.; 0,56 mmol; 0,08 mL) e o iodeto de cobre (I) (0,01 eq.; 5,00 μmol; 0,96 mg). Deixou-se a mistura em agitação, à t.a., durante 2,5 dias. Adicionou-se água destilada (10 mL) e acidificou-se com uma solução de KHSO₄ 1M até pH 2. Extraíu-se com acetato de etilo (4×10 mL), juntaram-se as fases orgânicas, secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente. Obteve-se um óleo amarelo, que mostrou ser o composto **18a** (0,12 g; 74 %).

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO) 1,37 (9H, s, 3×CH₃), 3,53 (2H, d, J 6,0 Hz, α-CH₂), 4,31 (2H, d, J 5,7 Hz, CH₂), 5,22 (2H, s, CH₂CO₂H), 6,93 (1H, t, J 6,0 Hz, α-NH), 7,87 (1H, s, CH), 8,29 (1H, t, J 5,7 Hz, NH) ppm.

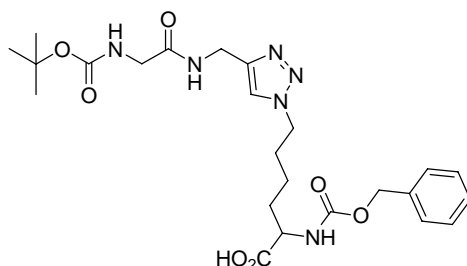
RMN de ¹³C (75,5 MHz, DMSO) 28,20 (CH₃), 34,12 (CH₂), 43,17 (α-CH₂), 50,40 (CH₂CO₂H), 78,02 (C(CH₃)₃), 124,21 (CH), 144,77 (C), 155,78 (C=O Boc), 168,61 (CO₂H), 169,32 (C=O) ppm.

Análise Elementar: C₁₂H₁₉N₅O₅ (313,31): calculado C 46,00, H 6,11, N 22,35; obtido C 45,17, H 6,13, N 21,39.

p.f.: deg. > 210°C.

4.3.1.2. Com Cu(II)

Dissolveu-se a N₃-Gly-OH, **15a** (0,85 mmol; 0,09 g), a Boc-Gly-propargilamina, **4a** (1,1 eq.; 0,94 mmol; 0,20 g), o sulfato de cobre (II) anidro (0,1 eq.; 0,09 mmol; 0,01 g) e o ascorbato de sódio (0,5 eq.; 0,43 mmol; 0,08 g) em metanol (1 mL) e água destilada (1 mL). Deixou-se em agitação à t.a. e seguiu-se a reacção por t.l.c. (éter etílico). Ao fim de 24 h, filtrou-se o sólido que precipitou do meio reaccional (0,03 g), que mostrou conter apenas um resíduo do composto **18a**. Acidificou-se o meio reaccional até pH 1 com uma solução de KHSO₄ 1M e extraiu-se com acetato de etilo (3×10 mL). Juntaram-se as fases orgânicas e secou-se com sulfato de magnésio anidro. Evaporou-se o solvente e obteve-se o composto **18a** na forma de um sólido de cor pérola (0,16 g; 61 %).

4.3.2. Síntese do composto **18b**

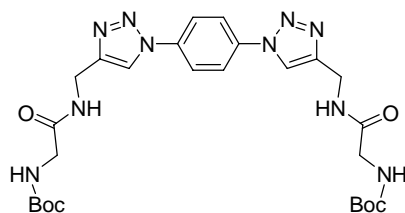
Dissolveu-se a Z-Lys(N₃)-OH, **15b** (0,17 mmol; 0,05 g) e a Boc-Gly-propargilamina, **4a** (1,1 eq.; 0,18 mmol; 0,04 g) em acetonitrilo (1 mL) e água destilada (2 mL). Adicionou-se a trietilamina (1,1 eq.; 0,18 mmol; 0,03 mL) e o iodeto de cobre (I) (0,01 eq.; 1,83 µmol; 0,35 mg). Deixou-se a mistura em agitação, à t.a., durante 2,5 dias. Adicionou-se água destilada (10 mL) e acidificou-se com uma solução de KHSO₄ 1M até pH 2. Extraíu-se com acetato de etilo (4×10 mL), juntaram-se as fases orgânicas, secaram-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente. Obteve-se um óleo amarelo, que mostrou ser o composto **18b** (0,09 g; ~100 %).

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO) 1,31-1,35 (2H, m, γ-CH₂), 1,37 (9H, s, 3×CH₃), 1,46-1,62 (2H, m, β-CH₂), 1,69-1,79 (2H, m, δ-CH₂), 3,52 (2H, d, J 5,6 Hz, α-CH₂), 3,87-3,93 (1H, m, α-CH), 4,26-4,29 (4H, m, CH₂ e ε-CH₂), 5,02 (2H, s, CH₂ Z), 6,92 (1H, t, J 6,0 Hz, NH Gly), 7,28-7,38 (5H, m, H-Ar), 7,55 (1H, d, J 8,0 Hz, α-NH Lys), 7,87 (1H, s, CH), 8,23 (1H, t, J 5,6 Hz, NH), 12,58 (1H, sl, CO₂H) ppm.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO) 22,64 ($\gamma\text{-CH}_2$), 28,17 (CH_3), 29,36 ($\delta\text{-CH}_2$), 30,16 ($\beta\text{-CH}_2$), 34,20 (CH_2), 43,19 ($\alpha\text{-CH}_2$), 49,06 ($\varepsilon\text{-CH}_2$), 53,65 ($\alpha\text{-CH}$), 65,38 ($\text{CH}_2\text{ Z}$), 78,01 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 122,62 (CH), 127,70 (CH), 127,78 (CH), 128,32 (CH), 136,97 (C), 144,73 (C), 155,78 (C=O Boc), 156,15 (C=O), 169,28 (C=O), 173,78 (CO_2H) ppm.

HRMS [M+H]: 519,25561, calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{N}_6\text{O}_7$ 519,25617.

4.3.3. Síntese do composto 19a



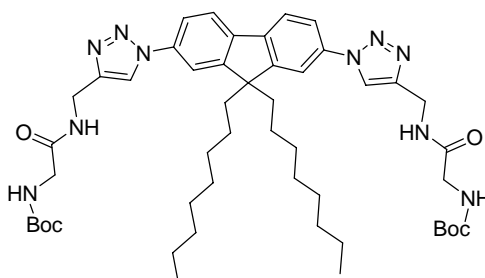
Dissolveu-se a bis-azida **17a** (0,25 mmol; 0,04 g), a Boc-Gly-propargilamina, **4a** (2,2 eq.; 0,55 mmol; 0,12 g), o sulfato de cobre (II) anidro (0,2 eq.; 0,05 mmol; 0,01 g) e o ascorbato de sódio (1,0 eq.; 0,25 mmol; 0,05 g) em metanol (1 mL) e água destilada (1 mL). Deixou-se em agitação à t.a. e seguiu-se a reacção por t.l.c. (éter etílico). Ao fim de 19 h, filtrou-se o sólido que precipitou do meio reaccional. Evaporou-se o solvente e adicionou-se acetato de etilo, filtrando-se o sólido precipitado. Os dois sólidos mostraram ser o composto **19a** (0,13 g; 92 %).

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) 1,37 (18H, s, $6\times\text{CH}_3$), 3,57 (4H, d, J 6,0 Hz, $\alpha\text{-CH}_2$), 4,41 (4H, d, J 5,4 Hz, CH_2), 6,97 (2H, t, J 5,4 Hz, NH), 8,10 (4H, s, H-Ar), 8,41 (2H, t, J 6,0 Hz, NH), 8,68 (2H, s, CH triazole) ppm.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO) 28,19 ($6\times\text{CH}_3$), 34,17 (CH_2), 43,29 ($\alpha\text{-CH}_2$), 78,09 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 121,20 (CH), 121,24 (CH), 136,18 (C), 146,49 (C), 155,87 (C=O Boc), 169,53 (C=O) ppm.

HRMS [M+H]: 585,28909, calc. para $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{N}_{10}\text{O}_6$ 585,28921.

4.3.4. Síntese do composto 19b



Dissolveu-se a bis-azida **17b** (0,25 mmol; 0,12 g), a Boc-Gly-propargilamina, **4a** (2,2 eq.; 0,55 mmol; 0,12 g), o sulfato de cobre (II) anidro (0,2 eq.; 0,05 mmol; 0,01 g) e o

ascorbato de sódio (1,0 eq.; 0,25 mmol; 0,05 g) em metanol (1 mL) e água destilada (1 mL). Deixou-se em agitação à t.a. e seguiu-se a reacção por t.l.c. (éter etílico). Ao fim de 24 h, filtrou-se o sólido que precipitou do meio reaccional (0,10 g), o qual mostrou ser o composto **19b** e a azida **17b**. Evaporou-se o solvente do líquido de filtração e adicionou-se acetato de etilo (50 mL). Lavou-se com água destilada (3×25 mL). Secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente. Obteve-se um óleo, que mostrou ser o alquino de partida. Lavou-se o sólido com éter de petróleo, obtendo-se o produto **19b** na forma de um sólido verde-claro (0,06 g, 25 %).

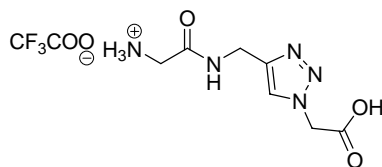
RMN de ^1H (300 MHz, DMSO) 0,44-0,58 (4H, m, CH_2), 0,71 (6H, t, J 6,9 Hz, $2\times\text{CH}_3$), 0,92-1,24 (20H, m, CH_2), 1,37 (18H, s, $6\times\text{CH}_3$), 2,08-2,18 (4H, m, CH_2), 3,56 (4H, d, J 6,0 Hz, $\alpha\text{-CH}_2$ Gly), 4,41 (4H, d, J 5,1 Hz, NHCH_2), 6,99 (2H, t, J 6,0 Hz, NH), 7,89 (2H, d, J 7,8 Hz, 3-CH e 6-CH), 8,02 (2H, s, 1-CH e 8-CH), 8,08 (2H, d, J 8,1 Hz, 4-CH e 5-CH), 8,40 (2H, t, J 5,1 Hz, NH), 8,68 (2H, s, CH triazole) ppm.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO) 13,77 ($2\times\text{CH}_3$), 21,91 (CH_2), 23,28 (CH_2), 24,43 (CH_2), 25,29 (CH_2), 28,15 ($6\times\text{CH}_3$), 28,42 (CH_2), 31,01 ($\alpha\text{-CH}_2$), 33,31 (CH_2), 34,16 (NHCH_2), 43,29 ($\alpha\text{-CH}_2$ Gly), 55,76 (9-C), 78,00 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 114,57 (1-CH e 8-CH), 119,00 (3-CH e 6-CH), 121,22 (CH), 121,49 (4-CH e 5-CH), 136,14 (4a-C e 5a-C), 139,66 (2-C e 7-C), 152,31 (1a-C e 8a-C), 155,84 (C triazole), 156,60 (C=O Boc), 169,45 (C=O Gly) ppm.

Análise Elementar: $\text{C}_{49}\text{H}_{72}\text{N}_{10}\text{O}_6$ (897,16): calculado C 65,60, H 8,09, N 15,61; obtido C 65,68, H 8,25, N 15,00.

p.f.: deg. > 180°C.

4.3.5. Síntese do composto **20**



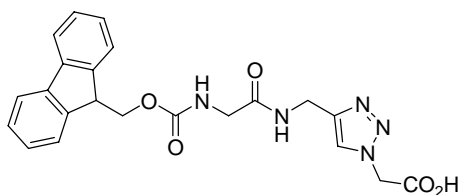
Dissolveu-se o composto **18a** (0,52 mmol; 0,16 g) em TFA (1,5 mL) e deixou-se em agitação à t.a. durante 3h30m. Evaporou-se o TFA, tendo-se obtido um óleo, que foi lavado com éter etílico. Obteve-se o composto **20** na forma de um sólido (0,17 g; ~100 %).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO) 3,54 (2H, s, $\alpha\text{-CH}_2$), 4,39 (2H, d, J 5,7 Hz, CH_2), 5,25 (2H, s, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 7,96 (1H, s, CH), 8,04 (3H, sl, NH_3^+), 8,85 (1H, t, J 5,7 Hz, NH) ppm.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO) 34,13 (CH_2), 40,12 ($\alpha\text{-CH}_2$), 50,47 ($\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 124,42 (CH), 143,90 (C triazole), 165,83 (C=O), 168,57 (CO_2H) ppm.

p.f.: 188,0-190,5°C.

4.3.6. Síntese do composto **18c**



Dissolveu-se o composto **20** (0,52 mmol; 0,17 g) numa solução aquosa de carbonato de sódio a 10% (2,5 eq.; 1,29 mmol; 1,30 mL) e adicionou-se dioxano (1 mL). Colocou-se em agitação num banho de gelo e adicionou-se cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (1,0 eq.; 0,52 mmol; 0,13 g) lentamente. Deixou-se em agitação a 0°C durante 4h e depois à t.a. durante a noite. Adicionou-se água destilada (30 mL) e extraiu-se com éter etílico (2×10 mL). Arrefeceu-se a fase aquosa num banho de gelo e acidificou-se até pH 1, com ácido clorídrico concentrado, sob agitação vigorosa. Colocou-se no frio durante 3h. Filtrou-se o sólido formado e colocou-se na estufa de vácuo. Obteve-se o composto **18c** na forma de um sólido (0,15 g; 66 %).

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) 3,62 (2H, d, J 5,6 Hz, $\alpha\text{-CH}_2$), 4,20 (1H, t, J, 6,4 Hz, 9-CH), 4,27 (2H, d, J 6,4 Hz, CH_2 Fmoc), 4,32 (2H, d, J 5,6 Hz, CH_2), 5,23 (2H, s, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 7,31 (2H, t, J 7,2 Hz, 2-CH e 7-CH), 7,41 (2H, t, J 7,2 Hz, 3-CH e 6-CH), 7,52 (1H, t, J, 5,6 Hz, NH), 7,70 (2H, d, J 7,2 Hz, 1-CH e 8-CH), 7,88 (2H, d, J 6,0 Hz, 4-CH e 5-CH), 7,89 (1H, s, CH), 8,38 (1H, t, J 5,6 Hz, NH) ppm.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO) 34,13 (CH_2), 43,40 ($\alpha\text{-CH}_2$), 46,63 (9-CH), 50,40 ($\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 65,71 (CH_2 Fmoc), 120,10 (4-CH e 5-CH), 124,25 (CH), 125,25 (1-CH e 8-CH), 127,08 (2-CH e 7-CH), 127,63 (3-CH e 6-CH), 140,71 (4a-C e 5a-C), 143,84 (1a-C e 8a-C), 144,67 (C triazole), 156,47 (C=O Fmoc), 168,58 (CO_2H), 169,04 (C=O) ppm.

HRMS [M+H]: 436,16209, calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_5$ 436,16155.

4.4. Síntese em fase sólida de péptidos contendo a sequência RGD

4.4.1. Procedimentos gerais da fase sólida

4.4.1.1. *Loading* da resina

Colocou-se a resina, o aminoácido e o balão a usar no excicador durante a noite. Dissolveu-se o aminoácido *N*-protegido com o grupo Fmoc (1,2 eq. relativamente à resina) em DCM seco (10 mL) e adicionou-se DIPEA (4.0 eq relativamente ao aminoácido). Caso necessário, adicionaram-se umas gotas de DMF para dissolver o aminoácido. Adicionou-se a resina e deixou-se em agitação à t.a., em condições anidras, durante pelo menos 2 h. Filtrou-se o solvente e lavou-se a resina com uma mistura de DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1, 3×10 mL), DCM (3×10 mL), DMF (3×10 mL) e DCM (3×10 mL), agitando cerca de 2 min.. Colocou-se a resina a secar no excicador até ao dia seguinte. Preparou-se uma solução de 20% de piperidina em DMF (50 mL). A uma pequena fracção da resina (3,33 mg) adicionou-se a solução de 20% de piperidina em DMF. Mediu-se a absorvância da solução com a resina a 290 nm, usando como branco a solução de 20% de piperidina em DMF. Aplicou-se a seguinte fórmula para calcular o *loading* da resina:

$$\text{Fmoc loading (mmol/g)} = \text{Abs lida} / (1,65 \times \text{mg resina})$$

4.4.1.2. Clivagem do Fmoc

Após lavar a resina com DMF (2×10 mL) por 2 min., adicionou-se uma solução de 20% de piperidina em DMF (10 mL) e deixou-se em agitação durante pelo menos 2 h. Filtrou-se a resina e lavou-se com DMF (2×10 mL), 2-propanol (2×10 mL), DMF (2×10 mL) e 2-propanol (2×10 mL). Utilizou-se o teste de TNBS para verificar a eficiência da clivagem do grupo Fmoc.

Teste de TNBS: Retirou-se uma amostra da resina para um tubo de amostras. Lavou-se uma vez com DMF. Adicionou-se umas gotas de DMF, 2 gotas de uma solução de DIPEA a 10% em DMF e 2 gotas de solução de TNBS a 1%. Esperou-se 5 min. para observar o resultado do teste (vermelho é indicativo da presença de grupos NH₂ livres).

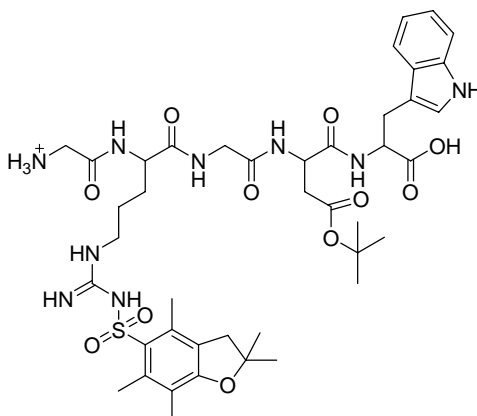
4.4.1.3. Acoplamento do aminoácido ao péptido na resina

Num balão dissolveu-se o aminoácido *N*-protegido com o grupo Fmoc (4,0 eq.), o HOBt (4,0 eq.) e a DIC (4,0 eq.) em DMF (10 mL). Transferiu-se a solução para a ampola com a resina e deixou-se a agitar durante a noite, à t.a. Filtrou-se o solvente e lavou-se a resina com DMF (3×10 mL) e DCM (3×10 mL), agitando cerca de 2 min. em cada lavagem. Verificou-se a eficácia do acoplamento com o teste de TNBS.

4.4.1.4. Clivagem do péptido da resina

Colocou-se a resina em agitação com uma solução de AcOH/TFE/DCM (1:1:3, 20 mL), à t.a., durante pelo menos 1 h. Filtrou-se a solução para um balão e evaporou-se o solvente. Adicionou-se éter etílico e colocou-se no frio por algumas horas. Filtrou-se o sólido formado.

4.4.2. Síntese de H-Gly-Arg(Pbf)-Gly-Asp(O^tBu)-Trp-OH.AcOH, 21



Seguiram-se os procedimentos gerais da fase sólida do ponto **4.4.1**. Usou-se 1,00 g de resina e obteve-se um *loading* de 0,66 mmol/g. O produto **21** foi obtido na forma de um sólido beje (0,13 g; 40 %).

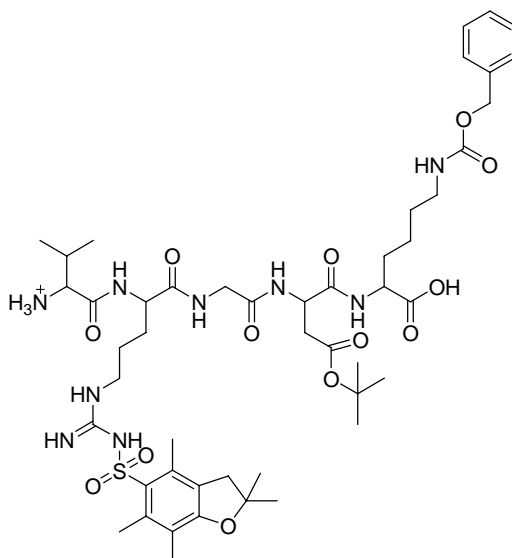
RMN de ¹H (400 MHz, DMSO) 1,35 (9H, s, 3×CH₃), 1,35-1,39 (2H, m, γ-CH₂ Arg), 1,39 (6H, s, 2-CH₃ Pbf), 1,48-1,51 (1H, m, β-CH₂ Arg), 1,68-1,73 (1H, m, β-CH₂ Arg), 1,99 (3H, s, 7-CH₃ Pbf), 2,32 (1H, dd, J 9,6 e 16,0 Hz, β-CH₂ Asp), 2,42 (3H, s, 4-CH₃ Pbf), 2,47 (3H, s, 6-CH₃, Pbf), 2,66 (1H, dd, J 5,2 e 16,0 Hz, β-CH₂ Asp), 2,95 (2H, s, 3-CH₂ Pbf), 2,97-2,98 (2H, m, α-CH₂ Gly), 3,00-3,02 (2H, m, δ-CH₂ Arg), 3,04-3,05 (1H, m, β-CH₂ Trp), 3,16 (1H, dd, J 5,6 e 14,8 Hz, β-CH₂ Trp), 3,68 (2H, d, J 5,2, α-CH₂ RGD), 4,11 (1H, d, J 5,2 Hz, α-CH Trp), 4,29 (1H, d, J 3,6 Hz, α-CH Arg), 4,43-

4,49 (1H, m, α -CH Asp), 6,89 (2H, t, J 7,6 Hz, 5-C Trp, NH), 7,00 (1H, t, J 7,6 Hz, 6-C Trp), 7,01 (1H, sl, NH), 7,03 (1H, d, J 1,6 Hz, 2-CH Trp), 7,27 (1H, d, J 8,0 Hz, 7-C Trp), 7,48 (1H, d, J 8,0 Hz, 4-C Trp), 7,52 (1H, d, J 7,6 Hz, NH Trp), 7,91 (1H, sl, NH), 7,98 (1H, sl, NH Gly), 8,39 (1H, d, J 8,0 Hz, α -NH Asp), 8,47 (1H, d, J 7,6 Hz, NH Arg), 10,67 (1H, s, 1-NH Trp) ppm.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO) 12,32 (7-CH₃ Pbf), 17,66 (6-CH₃ Pbf), 19,00 (4-CH₃ Pbf), 25,01 (γ -CH₂ Arg), 27,22 (β -CH₂ Trp), 27,69 (3 \times CH₃), 28,34 (2-CH₃ Pbf), 29,38 (β -CH₂ Arg), 37,22 (β -CH₂ Asp), 40,92 (δ -CH₂ Arg), 42,09 (α -CH₂ RGD), 42,51 (3-CH₂ Pbf), 43,75 (α -CH₂ Gly), 50,44 (α -CH Asp), 52,26 (α -CH Arg), 54,41 (α -CH Trp), 80,24 (C O^tBu), 86,31 (2-C Pbf), 110,63 (3-C Trp), 111,07 (7-C Trp), 116,27 (7-C Pbf), 118,04 (5-C Trp), 118,61 (4-C Trp), 120,61 (6-C Trp), 123,46 (2-C Trp), 124,33 (3a-C Pbf), 127,90 (3a-C Trp), 131,41 (4-C Pbf), 134,32 (5-C Pbf), 135,89 (1a-C Trp), 137,26 (6-C Pbf), 156,44 (C=N Arg), 157,42 (1a-C Pbf), 167,23 (C=O Gly), 168,65 (C=O RGD), 169,35 (β -C=O Asp), 169,39 (C=O Asp), 171,19 (C=O Arg), 174,19 (C=O Trp) ppm.

HRMS: 898,41295, calc. para C₄₂H₆₀N₉O₁₁S 898,41275.

4.4.3. Síntese de H-Val-Arg(Pbf)-Gly-Asp(O^tBu)-Lys(Z)-OH.AcOH, **22**



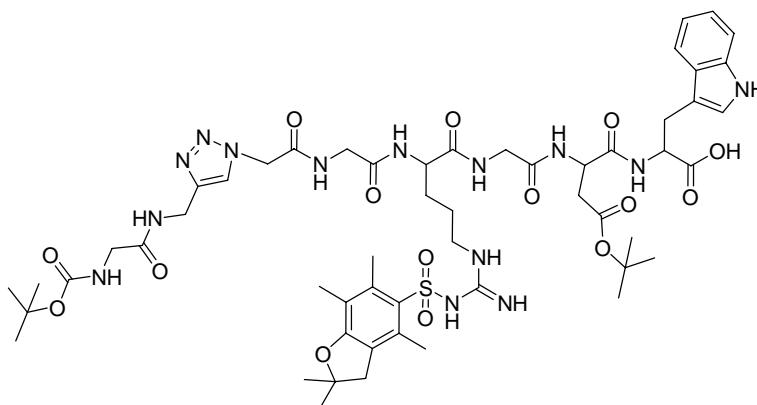
Seguiu-se o procedimento geral da fase sólida do ponto **4.4.1**. Usou-se 1 g de resina e obteve-se um *loading* de 0,48 mmol/g. O produto **22** foi obtido na forma de um sólido beje (0,17 g; 33 %).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO) 0,88 (6H, dd, J 6,6 e 21,9 Hz, CH₃ Val), 1,35 (9H, s, 3 \times CH₃), 1,39 (6H, s, 2-CH₃ Pbf), 1,08-1,41 (6H, m, γ -CH₂ Lys, γ -CH₂ Arg, δ -CH₂ Lys), 1,44-1,80 (4H, m, β -CH₂ Arg, β -CH₂ Lys), 1,92-2,02 (1H, m, β -CH Val), 1,99

(3H, s, 7-CH₃ Pbf), 2,41 (3H, s, 4-CH₃ Pbf), 2,41-2,48 (1H, m, β -CH₂ Asp), 2,48 (3H, s, 6-CH₃ Pbf), 2,62-2,78 (1H, m, β -CH₂ Asp), 2,89 3,08 (4H, m, ϵ -CH₂ Lyz, δ -CH₂ Arg), 2,95 (2H, s, 3-CH₂ Pbf), 3,60-3,82 (4H, m, α -CH₂ Gly, α -CH Val, α -CH Lyz), 4,25 (1H, sl, α -CH Arg), 4,48 (1H, sl, α -CH Asp), 4,98 (2H, s, CH₂ Z), 7,20 (2H, t, J 5,4 Hz, 2 \times NH), 7,33 (5H, s, H-Ar Z), 7,28-7,39 (1H, m, NH), 7,45 (1H, sl, NH), 7,98 (1H, sl, NH), 8,30 (1H, sl, NH), 8,39-8,48 (1H, m, NH), 8,65 (1H, sl, NH) ppm.

HRMS: 1016,51080, calc. para C₄₈H₇₄N₉O₁₃S 1016,51213.

4.4.4. Síntese do péptido 23



Seguiram-se os procedimentos gerais da fase sólida do ponto **4.4.1**. Usou-se 1,00 g de resina e obteve-se um *loading* de 0,66 mmol/g. No último acoplamento, usou-se 1,4 eq. do composto **18a**. O produto **23** foi obtido na forma de um sólido branco (0,13 g; 32 %).

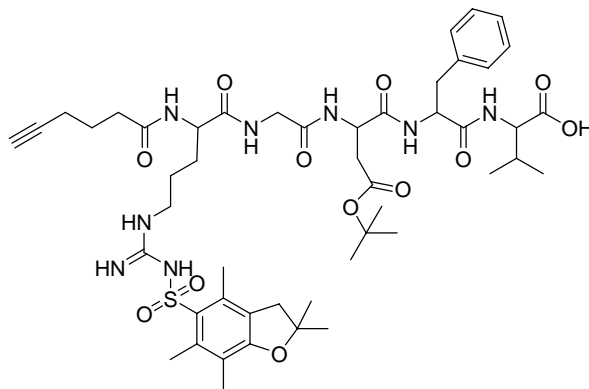
RMN de ¹H (400 MHz, DMSO) 1,34 (9H, s, O^tBu), 1,37 (9H, s, Boc), 1,37-1,39 (2H, m, γ -CH₂ Arg), 1,39 (6H, s, 2-CH₃ Pbf), 1,46-1,53 (1H, m, β -CH₂ Arg), 1,62-1,69 (1H, m, β -CH₂ Arg), 1,99 (3H, s, 7-CH₃ Pbf), 2,35-2,43 (1H, m, β -CH₂ Asp), 2,41 (3H, s, 4-CH₃ Pbf), 2,46 (3H, s, 6-CH₃, Pbf), 2,62 (1H, dd, J 5,6 e 16,0 Hz, β -CH₂ Asp), 2,94 (2H, s, 3-CH₂ Pbf), 2,98-3,02 (2H, m, δ -CH₂ Arg), 3,02-3,07 (1H, m, β -CH₂ Trp), 3,15 (1H, dd, J 5,2 e 14,8 Hz, β -CH₂ Trp), 3,53 (2H, d, J 6,0, NHCH₂CO), 3,69 (2H, d, J 6,0, α -CH₂ RGD), 3,82 (2H, d, J 5,2 Hz, α -CH₂ Gly), 4,24-4,28 (1H, m, α -CH Arg), 4,30 (2H, d, J 5,6 Hz, NHCH₂-triazole), 4,40 (1H, dd, J 7,2 e 13,2 Hz, α -CH Trp), 4,64 (1H, dd, J 8,4 e 14,0 Hz, α -CH Asp), 5,12 (1H, s, triazole-CH₂CO), 6,44 (2H, sl, 2 \times NH), 6,82 (1H, sl, NH), 6,92 (1H, t, J 6,4 Hz, NHCH₂CO), 6,96 (1H, dt, J 0,8 e 8,0 Hz, 5-C Trp), 7,05 (1H, dt, J 1,2 e 7,2 Hz, 6-C Trp), 7,13 (1H, d, J 2,0 Hz, 2-CH Trp), 7,32 (1H, d, J 8,0 Hz, 7-C Trp), 7,50 (1H, d, J 7,6 Hz, 4-C Trp), 7,84 (1H, s, CH triazole), 7,99 (1H, d, J 7,6 Hz, NH Trp), 8,11 (1H, d, J 8,4 Hz, NH Asp), 8,19 (2H, d, J 7,2 Hz, NH

Arg, NH RGD), 8,27 (1H, t, J 5,6 Hz, NHCH_2 -triazole), 8,50 (1H, t, J 5,6 Hz, NH Gly), 10,79 (1H, d, J 2,0 Hz, 1-NH Trp), 12,50 (1H, sl, CO_2H) ppm.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO) 12,26 (7- CH_3 Pbf), 17,59 (6- CH_3 Pbf), 18,94 (4- CH_3 Pbf), 25,34 (γ - CH_2 Arg), 26,87 (β - CH_2 Trp), 27,62 (CH_3 O^tBu), 28,18 (CH_3 Boc), 28,29 (2- CH_3 Pbf), 29,35 (β - CH_2 Arg), 34,13 (NHCH_2 -triazole), 37,52 (β - CH_2 Asp), 40,13 (δ - CH_2 Arg), 41,76 (α - CH_2 RGD), 41,91 (α - CH_2 Gly), 42,45 (3- CH_2 Pbf), 43,16 (NHCH_2CO), 49,17 (α -CH Asp), 51,44 (triazole- CH_2CO), 52,31 (α -CH Arg), 53,07 (α -CH Trp), 78,00 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ Boc), 80,20 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ O^tBu), 86,29 (2-C Pbf), 109,53 (3-C Trp), 111,36 (7-C Trp), 116,25 (7-C Pbf), 118,10 (4-C Trp), 118,36 (5-C Trp), 120,88 (6-C Trp), 123,75 (2-C Trp), 124,26 (CH triazole), 124,31 (3a-C Pbf), 127,17 (3a-C Trp), 131,42 (4-C Pbf), 134,16 (5-C Pbf), 136,03 (1a-C Trp), 137,26 (6-C Pbf), 144,57 (C triazole), 155,75 (C=O Boc), 156,06 (C=N Arg), 157,43 (1a-C Pbf), 165,67 (C=O triazole-Gly), 168,35 (C=O Gly), 168,44 (C=O RGD), 169,15 (β -C=O Asp), 169,28 (α -C=O triazole), 170,19 (C=O Asp), 171,63 (C=O Arg), 173,03 (C=O Trp) ppm.

HRMS [M+H]: 1193,53850, calc. para $\text{C}_{54}\text{H}_{77}\text{N}_{14}\text{O}_{15}\text{S}$ 1193,54080.

4.4.5. Síntese do péptido 24



Seguiram-se os procedimentos gerais da fase sólida do ponto 4.4.1. Usou-se 1,00 g de resina e obteve-se um *loading* de 0,6mmol/g. Nos acoplamentos usaram-se 2,0 eq. de aminoácido. O produto **24** foi obtido na forma de um sólido bege (0,33 g; 49 %).

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) 0,80 (6H, d, J 6,8 Hz, CH_3 Val), 1,32 (9H, s, $3\times\text{CH}_3$), 1,37-1,55 (3H, m, γ - CH_2 Arg, β - CH_2 Arg), 1,40 (6H, s, 2- CH_3 Pbf), 1,63 (3H, quint, J 7,0 Hz, β - CH_2 Arg, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,97-2,02 (1H, m, β -CH Val), 1,99 (3H, s, 7- CH_3 Pbf), 2,12 (2H, dt, J 2,4 e 7,2 Hz, $\text{CH}\equiv\text{CCH}_2$), 2,21 (2H, t, J 7,4 Hz, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2,20-2,26 (1H, m, β - CH_2 Asp), 2,37-2,44 (1H, m, β - CH_2 Asp), 2,40 (3H, s, 4- CH_3 Pbf), 2,46 (3H, s, 6- CH_3 Pbf), 2,75 (1H, t, J 2,4 Hz, $\text{CH}\equiv\text{CCH}_2$), 2,77 (1H, d, J 3,6 Hz, β - CH_2 Phe), 2,95 (2H, s, 3- CH_2 Pbf), 2,96-2,98 (1H, m, β - CH_2 Phe), 2,98-3,02 (2H, m, δ - CH_2

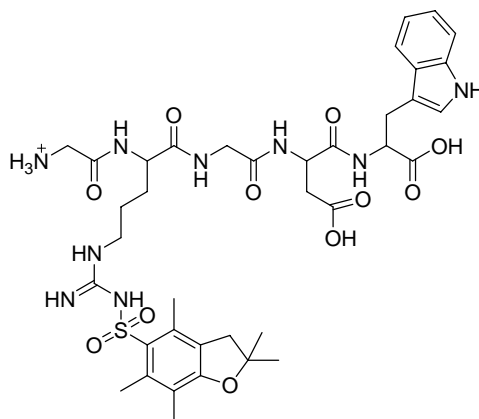
Arg), 3,61-3,64 (2H, m, α -CH₂ Gly), 4,11 (1H, dd, J 6,0 e 8,4 Hz, α -CH Val), 4,20 (1H, dd, J 7,6 e 13,2 Hz, α -CH Arg), 4,54 (1H, dd, J 8,4 e 13,2 Hz, α -CH Asp), 4,63 (1H, dd, J 4,4 e 9,2 Hz, α -CH Phe), 6,50 (2H, sl, 2×NH), 6,91 (1H, sl, NH), 7,14-7,17 (1H, m, H_p Phe), 7,19-7,24 (4H, m, H_o e H_m Phe), 8,04-8,06 (3H, m, NH Asp, NH Phe, NH Val), 8,12 (1H, d, J 7,2 Hz, NH Arg), 8,23 (1H, sl, NH Gly), 12,40 (1H, sl, CO₂H) ppm.

RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO) 12,26 (7-CH₃ Pbf), 17,41 (CH≡CCH₂), 17,58 (6-CH₃ Pbf), 17,91 (CH₃ Val), 18,93 (4-CH₃ Pbf), 19,11 (CH₃ Val), 24,08 (CH₂CH₂CH₂), 25,44 (γ -CH₂ Arg), 27,61 (3×CH₃), 28,29 (2-CH₃ Pbf), 28,98 (β -CH₂ Arg), 30,13 (β -CH Val), 33,94 (CH₂C=O), 37,53 (β -CH₂ Asp), 38,14 (β -CH₂ Phe), 41,99 (α -CH₂ Gly), 42,46 (3-CH₂ Pbf), 43,74 (δ -CH₂ Arg), 49,29 (α -CH Asp), 52,55 (α -CH Arg), 54,03 (α -CH Phe), 57,33 (α -CH Val), 71,44 (CH=CCH₂), 80,06 (C(CH₃)₃), 84,04 (CH≡CCH₂), 86,27 (2-C Pbf), 116,23 (7-C Pbf), 124,30 (3a-C Pbf), 126,22 (C_p Phe), 127,94 (C_m Phe), 129,21 (C_o Phe), 131,41 (4-C Pbf), 134,20 (5-C Pbf), 137,25 (6-C Pbf), 137,66 (C_i Phe), 156,10 (C=N Arg), 157,42 (1a-C Pbf), 168,50 (C=O Gly), 169,07 (β -C=O Asp), 169,92 (C=O Asp), 170,80 (C=O Phe), 172,00 (CH₂C=O), 172,27 (C=O Arg), 173,07 (CO₂H) ppm.

HRMS [M+H]: 995,48985, calc. para C₄₉H₇₁N₈O₁₂S 995,49067.

4.5. Reações dos péptidos contendo a sequência RGD; ciclização de péptidos

4.5.1. Síntese de H-Gly-Arg(Pbf)-Gly-Asp-Trp-OH.TFA, **25**



Adicionou-se TFA (1 mL) ao péptido **21** (0,12 g; 0,13 mmol) e deixou-se em agitação à t.a. durante 3 h. Evaporou-se o solvente, tendo-se obtido um óleo acastanhado. Adicionou-se éter etílico, colocou-se no congelador por 15 min. e filtrou-

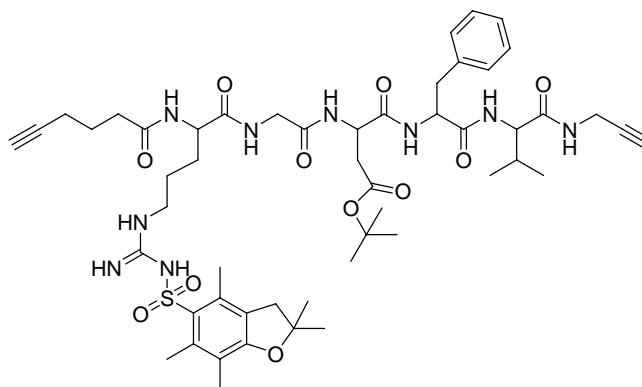
se o sólido formado. O produto **25** foi obtido na forma de um sólido rosa pálido (0,09 g; ~100 %).

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) 1,45-1,52 (2H, m, γ -CH₂ Arg), 1,50-1,57 (1H, m, β -CH₂ Arg), 1,68-1,77 (1H, m, β -CH₂ Arg), 1,99 (3H, s, 7-CH₃ Pbf), 2,27 (3H, s, 6-CH₃ Pbf), 2,34 (1H, dd, J 6,8 e 15,2 Hz, β -CH₂ Asp), 2,39 (3H, s, 4-CH₃ Pbf), 2,45 (1H, dd, J 4,2 e 12,6 Hz, β -CH₂ Asp), 3,00 (2H, s, 3-CH₂ Pbf), 3,00-3,05 (1H, m, β -CH₂ Trp), 3,08 (2H, t, J 5,8 Hz, δ -CH₂ Arg), 3,11-3,16 (1H, dd, J 5,6 e 14,8 Hz, β -CH₂ Trp), 3,34 (3H, sl, NH₃⁺), 2,59 (2H, s, α -CH₂ Gly), 3,69-3,80 (2H, m, α -CH₂ RGD), 4,33-4,39 (1H, m, α -CH Arg), 4,39-4,43 (1H, m, α -CH Trp), 4,48-4,57 (1H, m, α -CH Asp), 6,97 (1H, t, J 7,4 Hz, 5-C Trp), 7,08 (1H, t, J 7,6 Hz, 6-C Trp), 7,14 (1H, d, J 2,4 Hz, 2-CH Trp), 7,24 (3H, sl, 3×NH), 7,33 (1H, d, J 8,0 Hz, 7-C Trp), 7,50 (1H, d, J 7,6 Hz, 4-C Trp), 7,97 (1H, d, J 7,6 Hz, NH Trp), 8,01 (1H, d, J 8,0 Hz, NH Asp), 8,30 (1H, t, J 5,4 Hz, NH RGD), 8,59 (1H, d, J 7,6 Hz, α -NH Arg), 11,85 (1H, s, 1-NH Trp) ppm.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO) 12,13 (7-CH₃ Pbf), 16,63 (6-CH₃ Pbf), 18,46 (4-CH₃ Pbf), 24,83 (γ -CH₂ Arg), 26,95 (β -CH₂ Trp), 28,18 (2-CH₃ Pbf), 29,38 (β -CH₂ Arg), 36,47 (β -CH₂ Asp), 40,17 (α -CH₂ Gly), 40,34 (δ -CH₂ Arg), 41,74 (α -CH₂ RGD), 42,05 (3-CH₂ Pbf), 49,30 (α -CH Asp), 52,25 (α -CH Arg), 52,86 (α -CH Trp), 87,40 (2-C Pbf), 109,54 (3-C Trp), 111,38 (7-C Trp), 117,54 (7-C Pbf), 118,13 (4-C Trp), 118,37 (5-C Trp), 120,18 (6-C Trp), 123,77 (2-C Trp), 125,97 (3a-C), 127,29 (3a-C Trp), 128,73 (4-C Pbf), 134,27 (5-C Pbf), 136,04 (1a-C Trp), 139,77 (6-C Pbf), 156,80 (C=N Arg), 159,83 (1a-C Pbf), 165,95 (C=O Gly), 168,22 (C=O RGD), 179,17 (C=O Asp), 171,13 (C=O Arg), 171,81 (C=O Asp), 172,56 (C=O Trp) ppm.

HRMS: 842,34887, calc. para C₄₂H₆₀N₉O₁₁S 842,35015.

4.5.2. Síntese do péptido **26**



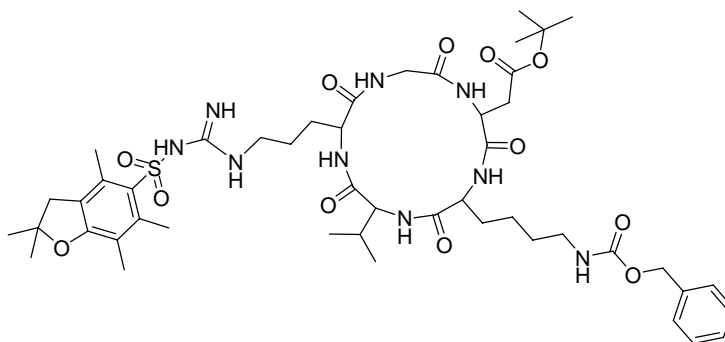
Dissolveu-se o péptido **24** (0,10 mmol; 0,11 g) em DMF (5 mL) e arrefeceu-se num banho de gelo. Adicionou-se o HOBt (1,0 eq.; 0,10 mmol; 0,01 g), o HBTU (1,0 eq.;

0,10 mmol; 0,04 g) e a propargilamina (1,0 eq.; 0,10 mmol; 0,01 mL), esperando cerca de 5 min. entre cada adição. Adicionou-se a DIPEA (2,0 eq.; 0,21 mmol; 0,04 mL) e deixou-se em agitação à t.a. durante a noite. Evaporou-se a DMF, obtendo-se um óleo, ao qual se adicionou água destilada. Filtrou-se o sólido formado, que mostrou ser o composto **26** e o péptido **24**. Colocou-se novamente este sólido com a propargilamina e os reagentes de acoplamento durante a noite. Evaporou-se a DMF e precipitou-se um sólido com água destilada. Obteve-se um sólido beje escuro (0,10 g; 92 %), que mostrou ser o composto **26**.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) 0,75 (6H, d, J 6,4 Hz, CH_3 Val), 1,32 (9H, s, $3\times\text{CH}_3$), 1,39-1,41 (2H, m, $\gamma\text{-CH}_2$ Arg), 1,40 (6H, s, 2- CH_3 Pbf), 1,47-1,62 (2H, m, $\beta\text{-CH}_2$ Arg), 1,64 (2H, quint, J 7,2 Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,91 (1H, sept, J 6,8 Hz, $\beta\text{-CH}$ Val), 1,99 (3H, s, 7- CH_3 Pbf), 2,12 (2H, dt, J 2,4 e 7,2 Hz, $\text{CH}\equiv\text{CCH}_2$), 2,21 (2H, t, J 7,6 Hz, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2,21-2,22 (1H, m, $\beta\text{-CH}_2$ Asp), 2,37 (1H, s, $\beta\text{-CH}_2$ Asp), 2,41 (3H, s, 4- CH_3 Pbf), 2,46 (3H, s, 6- CH_3 Pbf), 2,75 (1H, t, J 2,4 Hz, $\text{CH}\equiv\text{CCH}_2$), 2,78 (1H, d, J 9,6 Hz, $\beta\text{-CH}$ Phe), 2,95 (2H, s, 3- CH_2 Pbf), 2,97 (1H, d, J 8,8 Hz, $\beta\text{-CH}$ Phe), 2,98-3,02 (2H, m, $\delta\text{-CH}_2$ Arg), 3,06 (1H, t, J 2,4 Hz, $\text{CH}\equiv\text{CCH}_2\text{NH}$), 3,68 (2H, t, J 6,8 Hz, $\alpha\text{-CH}_2$ Gly), 3,79 (2H, ddq, J 2,4, 5,6 e 17,6 Hz, $\text{CH}\equiv\text{CCH}_2\text{NH}$), 4,09 (1H, dd, J 7,4 e 8,6 Hz, $\alpha\text{-CH}$ Val), 4,20 (1H, q, J 7,6 Hz, $\alpha\text{-CH}$ Arg), 4,53-4,57 (1H, m, $\alpha\text{-CH}$ Asp), 4,59-4,63 (1H, m, $\alpha\text{-CH}$ Phe), 6,39 (1H, sl, NH), 6,66 (2H, sl, $2\times\text{NH}$), 7,13-7,17 (1H, m, H_p Phe), 7,19-7,23 (4H, m, H_o e H_m Phe), 8,02 (1H, d, J 8,8 Hz, $\alpha\text{-NH}$ Asp), 8,06 (3H, d, J 9,2 Hz, $\alpha\text{-NH}$ Arg, $\alpha\text{-NH}$ Phe, $\alpha\text{-NH}$ Val), 8,17 (1H, t, J 5,2 Hz, $\alpha\text{-NH}$ Gly), 8,45 (1H, t, J 5,2 Hz, $\text{CH}\equiv\text{CCH}_2\text{NH}$) ppm.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO) 12,25 (7- CH_3 Pbf), 17,40 ($\text{CH}\equiv\text{CCH}_2$), 17,56 (6- CH_3 Pbf), 18,91 (4- CH_3 Pbf), 18,09 (CH_3 Val), 18,99 (CH_3 Val), 24,07 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 25,45 ($\gamma\text{-CH}_2$ Arg), 27,60 ($3\times\text{CH}_3$), 27,76 ($\text{CH}\equiv\text{CCH}_2\text{NH}$), 28,28 (2- CH_3 Pbf), 29,06 ($\beta\text{-CH}_2$ Arg), 30,58 ($\beta\text{-CH}$ Val), 33,90 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 37,62 ($\beta\text{-CH}_2$ Asp), 38,02 ($\beta\text{-CH}_2$ Phe), 40,29 ($\delta\text{-CH}_2$ Arg), 41,90 ($\alpha\text{-CH}_2$ Gly), 42,45 (3- CH_2 Pbf), 49,24 ($\alpha\text{-CH}$ Asp), 52,53 ($\alpha\text{-CH}$ Arg), 54,13 ($\alpha\text{-CH}$ Phe), 57,50 ($\alpha\text{-CH}$ Val), 71,42 ($\text{CH}\equiv\text{CCH}_2$), 72,85 ($\text{CH}\equiv\text{CCH}_2\text{NH}$), 80,06 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 80,88 ($\text{CH}\equiv\text{CCH}_2\text{NH}$), 84,03 ($\text{CH}\equiv\text{CCH}_2$), 86,27 (2-C Pbf), 116,23 (7-C Pbf), 124,29 (3a-C Pbf), 126,22 (C_p Phe), 127,92 (C_m Phe), 129,22 (C_o Phe), 131,40 (4-C Pbf), 134,16 (5-C Pbf), 137,24 (6-C Pbf), 137,52 (C_i Phe), 156,01 ($\text{C}=\text{N}$), 157,42 (1a-C Pbf), 168,46 ($\text{C}=\text{O}$ Gly), 169,01 ($\beta\text{-C}=\text{O}$ Asp), 170,01 ($\text{C}=\text{O}$ Asp), 170,69 ($\text{C}=\text{O}$ Val), 170,71 ($\text{C}=\text{O}$ Phe), 172,01 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 172,14 ($\text{C}=\text{O}$ Arg) ppm.

HRMS [$\text{M}+\text{H}$]: 1032,52280, calc. para $\text{C}_{52}\text{H}_{74}\text{N}_9\text{O}_{11}\text{S}$ 1032,52230.

4.5.3. Síntese de c[Val-Arg(Pbf)-Gly-Asp(O^tBu)-Lys(Z)], 27

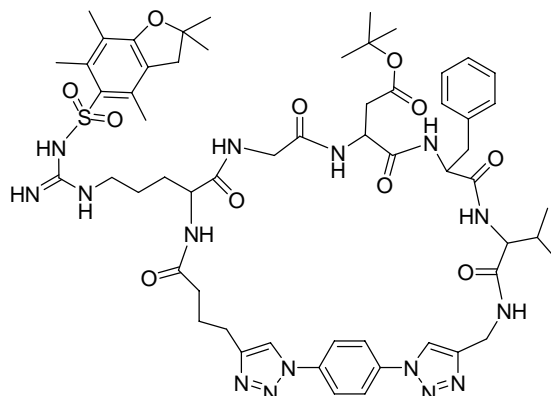
Dissolveu-se o péptido **22** (0,13 mmol; 0,14 g) em DMF (1,24 mL) e adicionou-se a DIPEA (1,6 eq.; 0,20 mmol; 0,04 mL). Adicionou-se esta solução a uma solução de HBTU (1,0 eq.; 0,13 mmol; 0,05 g) em DMF (1,07 mL), durante 1h. Deixou-se em agitação, à t.a., durante 24 h. Evaporou-se a DMF sob vácuo, obtendo-se um óleo. Adicionou-se acetonitrilo e colocou-se no frio por 4h. Filtrou-se o sólido formado, que revelou ser o produto ciclizado (0,12 g; 93 %).

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO) 0,80 (6H, d, J 6,0 Hz, CH₃ Val), 1,33 (9H, s, 3×CH₃), 1,38 (6H, s, 2-CH₃ Pbf), 1,08-1,41 (6H, m, γ-CH₂ Lys, γ-CH₂ Arg, δ-CH₂ Lys), 1,46-1,58 (2H, m, β-CH₂ Arg, β-CH₂ Lys), 1,59-1,71 (2H, m, β-CH₂ Arg, β-CH₂ Lys), 1,94-1,98 (1H, m, β-CH Val), 1,98 (3H, s, 7-CH₃ Pbf), 2,41 (3H, s, 4-CH₃ Pbf), 2,41-2,47 (1H, m, β-CH₂ Asp), 2,46 (3H, s, 6-CH₃ Pbf), 2,60-2,70 (1H, m, β-CH₂ Asp), 2,94 (4H, bs, 3-CH₂ Pbf, ε-CH₂ Lys ou δ-CH₂ Arg), 3,01 (2H, d, J 4,8 Hz, ε-CH₂ Lys ou δ-CH₂ Arg), 3,71 (2H, bs, α-CH₂ Gly), 4,12-4,21 (2H, m, α-CH Val, α-CH Lys), 4,22 (1H, sl, α-CH Arg), 4,62 (1H, sl, α-CH Asp), 4,98 (2H, s, CH₂ Z), 6,44 (1H, sl, NH), 6,82 (2H, sl, 2×NH), 7,32 (6H, sl, H_{Ar} Z, ε-NH Lys), 7,75 (1H, sl, NH Val), 7,87 (1H, d, J 8,0 Hz, NH Lys), 7,94-8,14 (3H, m, NH Asp, NH Gly, NH Arg) ppm.

RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO) 12,27 (7-CH₃ Pbf), 17,87 (6-CH₃ Pbf), 18,95 (CH₃ Val), 19,24 (4-CH₃ Pbf), 22,64 (γ-CH₂ Lys), 25,27 (γ-CH₂ Arg), 27,64 (3×CH₃), 28,29 (2-CH₃ Pbf), 29,15 (δ-CH₂ Lys e β-CH₂ Arg), 30,20 (β-CH Val), 31,43 (β-CH₂ Lys), 37,55 (β-CH₂ Asp), 40,14 (ε-CH₂ Lys ou δ-CH₂ Arg), 40,21 (ε-CH₂ Lys ou δ-CH₂ Arg), 41,90 (α-CH₂ Gly), 42,47 (3-CH₂ Pbf), 49,31 (α-CH Asp), 52,80 (α-CH Arg), 57,62 (α-CH Val), 57,97 (α-CH Lys), 65,13 (CH₂ Z), 80,18 (C(CH₃)₃), 86,27 (2-C Pbf), 116,26 (7-C Pbf), 124,30 (3a-C Pbf), 127,70 (CH Z), 128,32 (CH Z), 131,43 (4-C Pbf), 134,20 (5-C Pbf), 137,22 (6-C Pbf ou C_i Z), 137,27 (6-C Pbf ou C_i Z), 156,06 (C=O Z e C=N Arg), 157,41 (1a-C Pbf), 168,48 (C=O Gly), 169,11 (C=O Asp), 169,18 (C=O Asp), 170,88 (C=O Val ou Lys), 171,32 (C=O Val ou Lys), 171,45 (C=O Arg) ppm.

HRMS [M+H]: 998,50242, calc. para C₄₈H₇₂N₉O₁₂S 998,50157.

4.5.4. Síntese do péptido cíclico **28**



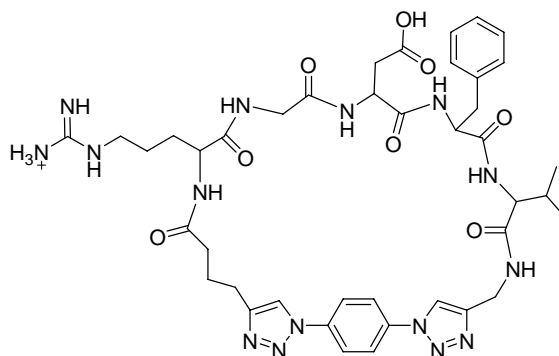
Dissolveu-se o péptido **26** (0,05 mmol; 0,05 g), o 1,4-diazidobenzeno (1,0 eq.; 0,05 mmol; 7,40 mg), o sulfato de cobre (II) anidro (0,2 eq.; 9,0 μ mol; 1,40 mg) e o ascorbato de sódio (1,0 eq.; 0,05 mmol; 9,20 mg) em DMF (2 mL) e colocou-se sob agitação à t.a., seguindo-se a reacção por t.l.c. (clorofórmio/metanol, 9:1). Ao fim de 20 h, adicionou-se mais sulfato de cobre (II) anidro (0,2 eq.) e ascorbato de sódio (1,0 eq.). Como não se verificou evolução da reacção, ao fim de mais 28 h adicionou-se o iodeto de cobre (I) (0,02 eq.; 0,90 μ mol; 0,20 mg) e a trietilamina (2,2 eq.; 0,10 mmol; 0,01 mL) e deixou-se em agitação à t.a. durante 3,5 dias. Quando o reagente de partida foi todo consumido (t.l.c: clorofórmio/metanol, 9:1), evaporou-se a DMF e precipitou-se um sólido com água destilada. O produto **28** foi obtido na forma de um sólido (0,04 g; 82 %).

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO) 0,74 (6H, sl, CH₃ Val), 1,31 (9H, s, 3×CH₃), 1,33-1,40 (2H, m, γ -CH₂ Arg), 1,40 (6H, s, 2-CH₃ Pbf), 1,40-1,52 (1H, m, β -CH₂ Arg), 1,58-1,65 (3H, m, β -CH₂ Arg, COCH₂CH₂), 1,90-1,96 (1H, m, β -CH Val), 1,98 (3H, s, 7-CH₃ Pbf), 2,11-2,13 (2H, m, CH₂CH₂-triazole), 2,18-2,26 (3H, m, β -CH₂ Asp, COCH₂CH₂), 2,39-2,45 (1H, m, β -CH₂ Asp), 2,40 (3H, s, 4-CH₃ Pbf), 2,45 (3H, s, 6-CH₃ Pbf), 2,75-2,79 (1H, m, β -CH₂ Phe), 2,93 (2H, s, 3-CH₂ Pbf), 2,93-3,00 (1H, m, β -CH₂ Phe), 2,98-3,02 (2H, m, δ -CH₂ Arg), 3,67-3,72 (2H, m, α -CH₂ Gly), 4,13 (1H, dd, J 6,0 e 14,4 Hz, α -CH Val), 4,19-4,21 (1H, m, α -CH Arg), 4,38-4,46 (2H, m, NHCH₂), 4,50-4,58 (1H, m, α -CH Asp), 4,58-4,65 (1H, m, α -CH Phe), 6,39 (1H, sl, NH), 6,67 (2H, sl, 2×NH), 7,13-7,17 (1H, m, H_p Phe), 7,21-7,22 (4H, m, H_o e H_m Phe), 7,29 (1H, s, CH triazole), 7,88 (1H, s, CH triazole), 8,07-8,12 (8H, m, 4×NH, H-Ar), 8,19 (1H, sl, α -NH Gly), 8,54-8,55 (1H, m, NHCH₂) ppm.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO) 12,24 (7- CH_3 Pbf), 17,41 (CH_2CH_2 -triazole), 17,57 (6- CH_3 Pbf), 18,92 (4- CH_3 Pbf), 18,02 (CH_3 Val), 19,11 (CH_3 Val), 24,07 (COCH_2CH_2), 25,48 (γ - CH_2 Arg), 27,57 ou 27,59 ($3\times\text{CH}_3$), 28,27 (2- CH_3 Pbf), 29,05 (β - CH_2 Arg), 30,33 (β - CH Val), 33,91 (COCH_2CH_2), 34,07 (NHCH_2), 37,58 (β - CH_2 Asp), 37,93 (β - CH_2 Phe), 40,18 (δ - CH_2 Arg), 41,93 (α - CH_2 Gly), 42,44 (3- CH_2 Pbf), 49,32 (α - CH Asp), 52,26 (α - CH Arg), 54,25 (α - CH Phe), 57,75 (α - CH Val), 80,09 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 86,27 (2-C Pbf), 116,22 (7-C Pbf), 120,39 (CH), 121,16 (CH), 121,16 (CH), 124,29 (3a-C Pbf), 126,22 (C_p Phe), 127,94 (C_m Phe), 129,21 (C_o Phe), 131,41 (4-C Pbf), 134,10 (5-C Pbf), 136,13 (C), 137,25 (6-C Pbf), 137,51 (C_i Phe), 145,93 (C), 147,66 (C), 156,02 (C=N), 157,42 (1a-C Pbf), 168,54 (C=O), 169,03 (C=O), 170,12 (C=O), 170,87 (C=O), 170,89 (C=O), 172,06 (C=O), 172,11 (C=O) ppm.

HRMS [M+H]: 1192,57320, calc. para $\text{C}_{58}\text{H}_{78}\text{N}_{15}\text{O}_{11}\text{S}$ 1192,57205.

4.5.5. Síntese do péptido cíclico 29



Adicionou-se TFA (0,7 mL) ao péptido cíclico **28** (0,02 mmol; 0,03 g) e deixou-se em agitação à t.a. durante 5h. Evaporou-se o solvente e guardou-se no excicador durante a noite. Obteve-se um sólido verde-escuro que foi lavado com uma solução de EDTA 0,1M para remover o cobre e, seguidamente com água destilada. Obteve-se o produto na forma de um sólido verde (9,40 mg; 44 %).

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) 0,74 (6H, sl, CH_3 Val), 1,60-1,64 (3H, m, β - CH_2 Arg, COCH_2CH_2), 1,80-2,00 (4H, m, β - CH_2 Arg, β - CH Val, γ - CH_2 Arg), 2,00-2,15 (2H, m, CH_2CH_2 -triazole), 2,15-2,27 (2H, m, COCH_2CH_2), 2,27-2,42 (2H, m, β - CH_2 Asp), 2,73-2,86 (1H, m, β - CH_2 Phe), 2,94-3,06 (1H, m, β - CH_2 Phe), 3,07 (2H, m, δ - CH_2 Arg), 3,68 (2H, sl, α - CH_2 Gly), 4,10 (1H, sl, α - CH Val), 4,26 (1H, sl, α - CH Arg), 4,41-4,50 (3H, m, NHCH_2 , α - CH Asp), 4,56 (1H, sl, α - CH Phe), 7,21-7,28 (7H, sl, H-Ar Phe, $2\times\text{NH}$), 7,30 (1H, s, CH triazole), 7,88 (1H, s, CH triazole), 8,07 (8H, m, $4\times\text{NH}$, H-Ar), 8,56 (1H, sl, NH), 8,66 (1H, sl, NH), 12,15 (1H, sl, CO_2H) ppm.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO) 17,34 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-triazole}$), 18,87 (CH_3 Val), 24,14 (COCH_2CH_2), 24,74 ($\gamma\text{-CH}_2$ Arg), 29,21 ($\beta\text{-CH}_2$ Arg), 30,24 ($\beta\text{-CH}$ Val), 33,91 (COCH_2CH_2), 34,07 (NHCH_2), 36,08 ($\beta\text{-CH}_2$ Asp), 37,75 ($\beta\text{-CH}_2$ Phe), 40,38 ($\delta\text{-CH}_2$ Arg), 41,93 ($\alpha\text{-CH}_2$ Gly), 49,55 ($\alpha\text{-CH}$ Asp), 52,52 ($\alpha\text{-CH}$ Arg), 54,52 ($\alpha\text{-CH}$ Phe), 58,02 ($\alpha\text{-CH}$ Val), 120,42 (CH), 121,51 (CH), 121,13 (CH), 126,17 (CH Phe), 127,91 (CH Phe), 129,13 (CH Phe), 136,92 (C), 137,64 (C Phe), 146,00 (C), 147,61 (C), 155,44 (C=N), 168,60 (C=O), 170,30 (C=O), 170,76 (C=O), 170,93 (C=O), 171,86 (C=O), 171,93 (C=O), 172,18 (C=O) ppm.

HRMS: 884,42699, calc. para $\text{C}_{41}\text{H}_{54}\text{N}_{15}\text{O}_8$ 884,42743.

Bibliografia

- (1) Marinelli, L.; Lavecchia, A.; Gottschalk, K.-E.; Novellino, E.; Kessler, H. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46*, 4393-4404.
- (2) Dayam, R.; Aiello, F.; Deng, J.; Wu, Y.; Garofalo, A.; Chen, X.; Neamati, N. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 4526-4534.
- (3) Gottschalk, K.-E.; Kessler, H. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 3767-3774.
- (4) D'Andrea, L. D.; Gatto, A.; Pedone, C.; Benedetti, E. *Chemical Biology & Drug Design* **2006**, *67*, 115-126.
- (5) Manzoni, L.; Belvisi, L.; Arosio, D.; Civera, M.; Pilkington-Miksa, M.; Potenza, D.; Caprini, A.; Araldi, E. M. V.; Monferini, E.; Mancino, M.; Podestà, F.; Scolastico, C. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 615-632.
- (6) Park, J.-A.; Lee, J.-J.; Jung, J.-C.; Yu, D.-Y.; Oh, C.; Ha, S.; Kim, T.-J.; Chang, Y. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2811-2813.
- (7) Wu, Y.; Zhang, X.; Xiong, Z.; Cheng, Z.; Fisher, D. R.; Liu, S.; Gambhir, S. S.; Chen, X. *J Nucl Med* **2005**, *46*, 1707-1718.
- (8) Liu, S. *Molecular Pharmaceutics* **2006**, *3*, 472-487.
- (9) Haubner, R.; Wester, H.-J. *Current Pharmaceutical Design* **2004**, *10*, 1439-1455.
- (10) Gurrath, M.; Muller, G.; Kessler, H.; Aumailley, M.; Timpl, R. *European Journal of Biochemistry* **1992**, *210*, 911-921.
- (11) Haubner, R.; Gratias, R.; Diefenbach, B.; Goodman, S. L.; Jonczyk, A.; Kessler, H. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 7461-7472.
- (12) Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E. *Journal of Biological Chemistry* **1987**, *262*, 17294-17298.
- (13) Pfaff, M.; Tangemann, K.; Muller, B.; Gurrath, M.; Muller, G.; Kessler, H.; Timpl, R.; Engel, J. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 20233-20238.
- (14) Dechantsreiter, M. A.; Planker, E.; Matha, B.; Lohof, E.; Holzemann, G.; Jonczyk, A.; Goodman, S. L.; Kessler, H. *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, *42*, 3033-3040.
- (15) Xiong, J.-P.; Stehle, T.; Zhang, R.; Joachimiak, A.; Frech, M.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A. *Science* **2002**, *296*, 151-155.
- (16) Haubner, R.; Schmitt, W.; Hölzemann, G.; Goodman, S. L.; Jonczyk, A.; Kessler, H. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 7881-7891.

- (17) Lohof, E.; Planker, E.; Mang, C.; Burkhart, F.; Dechantsreiter, M. A.; Haubner, R.; Wester, H.-J.; Schwaiger, M.; Hölzemann, G.; Goodman, S. L.; Kessler, H. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39*, 2761-2764.
- (18) Casiraghi, G.; Rassu, G.; Auzzas, L.; Burreddu, P.; Gaetani, E.; Battistini, L.; Zanardi, F.; Curti, C.; Nicastro, G.; Belvisi, L.; Motto, I.; Castorina, M.; Giannini, G.; Pisano, C. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 7675-7687.
- (19) Merrifield, R. B. *Journal of American Chemical Society* **1963**, *85*, 6.
- (20) Fields, G. B.; Noble, R. L. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1990**, *35*, 161-214.
- (21) Benoiton, N. L. *Chemistry of Peptide Synthesis*; CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, 2006.
- (22) Strazzolini, P.; Misuri, N.; Polese, P. *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 2075-2078.
- (23) Isidro-Llobet, A.; Álvarez, M.; Albericio, F. *Chemical Reviews* **2009**, *109*, 2455-2504.
- (24) Samanen, J.; Ali, F.; Romoff, T.; Calvo, R.; Sorenson, E.; Vasko, J.; Storer, B.; Berry, D.; Bennett, D. *Journal of Medicinal Chemistry* **1991**, *34*, 3114-3125.
- (25) Malesevic, M.; Strijowski, U.; Bächle, D.; Sewald, N. *Journal of Biotechnology* **2004**, *112*, 73-77.
- (26) Zhang, L.-h.; Pesti, J. A.; Costello, T. D.; Sheeran, P. J.; Uyeda, R.; Ma, P.; Kauffman, G. S.; Ward, R.; McMillan, J. L. *The Journal of Organic Chemistry* **1996**, *61*, 5180-5185.
- (27) Aumailley, M.; Gurrath, M.; Müller, G.; Calvete, J.; Timpl, R.; Kessler, H. *FEBS Letters* **1991**, *291*, 50-54.
- (28) Camarero, J. A.; Giralt, E.; Andreu, D. *Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 1137-1140.
- (29) Ruzza, P.; Donella-Deana, A.; Calderan, A.; Biondi, B.; Pinna, L.; Borin, G. *Letters in Peptide Science* **1999**, *6*, 117-121.
- (30) Davies, J. S. *Journal of Peptide Science* **2003**, *9*, 471-501.
- (31) Chaleix, V.; Sol, V.; Guilloton, M.; Granet, R.; Krausz, P. *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, 5295-5299.
- (32) Armstrong, S. K. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1998**, 371-388.

- (33) Akaji, K.; Teruya, K.; Akaji, M.; Aimoto, S. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2293-2303.
- (34) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 2596-2599.
- (35) Wu, Y.-M.; Deng, J.; Fang, X.; Chen, Q.-Y. *Journal of Fluorine Chemistry* **2004**, *125*, 1415-1423.
- (36) Marik, J.; Sutcliffe, J. L. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 6681-6684.
- (37) Turner, R. A.; Oliver, A. G.; Lokey, R. S. *Organic Letters* **2007**, *9*, 5011-5014.
- (38) Liu, Y.; Zhang, L.; Wan, J.; Li, Y.; Xu, Y.; Pan, Y. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 10728-10734.
- (39) Feldman, A. K.; Colasson, B.; Fokin, V. V. *Organic Letters* **2004**, *6*, 3897-3899.
- (40) Hartwig, S.; Hecht, S. *Macromolecules* **2010**, *43*, 242-248.
- (41) Cantel, S.; Le Chevalier Isaad, A.; Scrima, M.; Levy, J. J.; DiMarchi, R. D.; Rovero, P.; Halperin, J. A.; D'Ursi, A. M.; Papini, A. M.; Chorev, M. *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 5663-5674.
- (42) Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 3192-3193.
- (43) Pachón, L.; van Maarseveen, J.; Rothenberg, G. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2005**, *347*, 811-815.
- (44) Li, P.; Wang, L. *Letters in Organic Chemistry* **2007**, *4*, 23-26.
- (45) Goncalves, V.; Gautier, B.; Regazzetti, A.; Coric, P.; Bouaziz, S.; Garbay, C.; Vidal, M.; Inguibert, N. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*, 5590-5594.
- (46) Punna, S.; Kuzelka, J.; Wang, Q.; Finn, M. G. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 2215-2220.
- (47) Jagasia, R.; Holub, J. M.; Bollinger, M.; Kirshenbaum, K.; Finn, M. G. *The Journal of Organic Chemistry* **2009**, *74*, 2964-2974.
- (48) Isaad, A. L. C.; Barbetti, F.; Rovero, P.; D'Ursi, A. M.; Chelli, M.; Chorev, M.; Papini, A. M. *European Journal of Organic Chemistry* **2008**, *2008*, 5308-5314.
- (49) Alper, P. B.; Hung, S.-C.; Wong, C.-H. *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 6029-6032.

- (50) Scrima, M.; Chevalier-Isaad, A. L.; Rovero, P.; Papini, A. M.; Chorev, M.; D'Ursi, A. M. *European Journal of Organic Chemistry* **2010**, *2010*, 446-457.
- (51) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 3057-3064.
- (52) Díez-González, S.; Correa, A.; Cavallo, L.; Nolan, S. P. *Chemistry - A European Journal* **2006**, *12*, 7558-7564.
- (53) Tao, C.-Z.; Cui, X.; Li, J.; Liu, A.-X.; Liu, L.; Guo, Q.-X. *Tetrahedron Letters* **2007**, *48*, 3525-3529.
- (54) Carpino, L. A.; Han, G. Y. *The Journal of Organic Chemistry* **1972**, *37*, 3404-3409.
- (55) Bodanszky, M.; Bodanszky, A. *The Practice of Peptide Synthesis*; Springer-Verlag: Berlin, 1984; Vol. 21.
- (56) Ferreira, P. M. T.; Maia, H. L. S.; Monteiro, L. S.; Sacramento, J. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1999**, 3697-3703.
- (57) Ferreira, P. M. T.; Maia, H. L. S.; Monteiro, L. S.; Sacramento, J.; Sebastiao, J. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2000**, 3317-3324.
- (58) Ferreira, P. M. T.; Maia, H. L. S.; Monteiro, L. S.; Sacramento, J. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2001**, 3167-3173.
- (59) Ferreira, Paula M. T.; Maia, Hernâni L. S.; Monteiro, Luís S. *European Journal of Organic Chemistry* **2003**, 2635-2644.
- (60) Zaloom, J.; Roberts, D. C. *The Journal of Organic Chemistry* **1981**, *46*, 5173-5176.
- (61) Lundquist; Pelletier, J. C. *Organic Letters* **2001**, *3*, 781-783.
- (62) Lieber, E.; Rao, C. N. R.; Chao, T. S.; Hoffman, C. W. W. *Analytical Chemistry* **1957**, *29*, 916-918.
- (63) Hancock, W. S.; Battersby, J. E. *Analytical Biochemistry* **1976**, *71*, 260-264.
- (64) Malkoch, M.; Vestberg, R.; Gupta, N.; Mespouille, L.; Dubois, P.; Mason, A. F.; Hedrick, J. L.; Liao, Q.; Frank, C. W.; Kingsbury, K.; Hawker, C. J. *Chemical Communications* **2006**, 2774-2776.
- (65) Greenstein, J. P.; Winitz, M. *Chemistry of the Amino Acids*; Wiley: New York, 1961; Vol. 2.
- (66) Stoll, A.; Petrzilka, T. *Helvetica Chimica Acta* **1952**, *35*, 589-607.

(67) Ferreira, P. M. T.; Maia, H. L. S.; Monteiro, L. S. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 9575-9578.

(68) Ferreira, P. M. T.; Maia, H. L. S.; Monteiro, L. S.; Sacramento, J. *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 7437-7441.

(69) Pettit, G. R. *Synthetic Peptides*; Elsevier: Amsterdam, 1980; Vol. 5.