

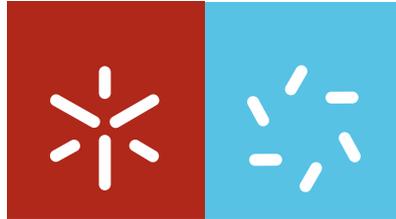


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Marco Aurélio Correia Preto

Modelação Molecular de Péptidos Bioactivos

Março de 2009



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Marco Aurélio Correia Preto

Modelação Molecular de Péptidos Bioactivos

Tese de Doutoramento em Ciências
Área de Conhecimento Química

Trabalho efectuado sob orientação do
Professor Doutor Hernâni L. S. Maia

Março de 2009

Autor:

Marco Aurélio Correia Preto

E-mail: mcpreto@gmail.com

Tese de Doutoramento em Ciências, Área de Conhecimento Química

Título: Modelação Molecular de Péptidos Bioactivos.

Ano da Publicação: 2009

Orientador:

Professor Doutor Hernâni L. S. Maia

E-mail: hmaia@quimica.uminho.pt

Co-orientador:

Professora Doutora Lígia L. M. M. Rodrigues

E-mail: ligiar@quimica.uminho.pt

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



Universidade do Minho, 13 de Março de 2009

Para os meus Pais

“The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not “Eureka!” (I found it!) but “That’s funny” ...”

Isaac Asimov

Agradecimentos

À Universidade do Minho, pela formação concedida.

À Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, e em especial ao grupo de Química Teórica, pela utilização de recursos informáticos, e pela preciosa ajuda em todas as fases das simulações moleculares realizadas.

À FCT, pelo financiamento dos projectos POCTI/QUI/35380/99 e POCI/QUI/55673/04, que permitiram a realização dos trabalhos aqui presentes.

Ao Professor Doutor Hernâni L. S. Maia pela orientação científica e apoio manifestado.

À Professora Doutora Lígia L. M. M. Rodrigues pela co-orientação, apoio e incentivo que sempre demonstrou.

À Professora Doutora Maria João Ramos, por todo o apoio, ajuda e disponibilidade na realização e interpretação das simulações moleculares realizadas.

Ao Professor Doutor André Melo, por todo o apoio, ajuda, incentivo que sempre demonstrou.

À Doutora Elisa pela constante disponibilidade no traçado dos espectros de RMN e realização de análises elementares.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Química da Universidade do Minho e do Grupo de Química Teórica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto por todo o apoio concedido.

A todos os colegas e amigos que tive a felicidade de fazer ao longo destes anos, tanto na Universidade do Minho, como na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Aos meus amigos, por toda a motivação e apoio.

Aos meus pais, irmão e restante família, por toda a educação, constante apoio e motivação.

Resumo

A Angiotensina II é um pequeno péptido, que participa em diversos mecanismos fisiológicos. Com especial interesse para nós, devemos salientar a participação desta hormona no mecanismo de regulação da pressão arterial, estando directamente ligada com o surgimento de algumas patologias como a hipertensão.

Uma abordagem ao tratamento da hipertensão é a administração de antagonistas da Angiotensina II, específicas ao seu receptor At1, cuja activação desencadeia uma cascata de respostas fisiológicas que levam ao aumento do valor da pressão arterial. O bloqueio desta activação pelo uso de antagonistas permite controlar os valores da pressão arterial, sem os efeitos secundários que frequentemente surgem com outras abordagens terapêuticas.

A inclusão de dialquilglicinas em péptidos, para além de conferir um certo grau de resistência às enzimas digestivas, inclui restrições estruturais que, usadas convenientemente, podem permitir a conservação preferencial de uma estrutura adaptada ao alvo em vista.

Neste trabalho, foram realizados estudos estruturais sobre a Angiotensina II e alguns dos seus antagonistas peptídicos, usando simulações moleculares, que permitiram a observação de um conjunto de características estruturais típicas de cada um. Foi igualmente simulado um conjunto de análogos desenhados, procurando encontrar as características estruturais típicas de antagonistas peptídicos da Angiotensina II. Dos compostos simulados, dois foram propostos como bons candidatos a possuírem actividade antagonista.

Foi desenvolvida a síntese de análogos de Angiotensina II, usando técnicas clássicas de síntese peptídica em solução. Embora não tenha sido concluída a síntese de nenhum dos candidatos desenhados, as sínteses realizadas permitiram encontrar algumas soluções para problemas de síntese deste tipo de compostos.

Abstract

Angiotensin II is a small peptide, which participates in several physiologic mechanisms. With a special interest to us, we should point out its role on the regulation of blood pressure, being directly involved in the genesis of some pathologies, like hypertension.

An approach to the treatment of hypertension is the administration of Angiotensin II antagonists, specific to its At1 receptor, whose activation triggers a cascade of physiologic responses that lead to the increase of blood pressure. The blockage of this activation, using Angiotensin II antagonists, allows the control of blood pressure values, avoiding some side effects common with other therapeutic approaches.

The insertion of dialkylglycines on peptides, besides conferring some degree of resistance to the action of digestive enzymes, includes structural restrictions that, properly used, should allow the conservation of a given conformer, specially adapted to the pretended target.

In this work, structural studies were performed on Angiotensin II and some of its peptide antagonists, using molecular simulation, which allowed the observation of several structural features that distinguish Angiotensin II and its peptide antagonist. A number of designed analogs were also simulated, searching the structural features identified for Angiotensin II peptide antagonists. From the simulated analogs, two were selected as promising candidates for antagonistic activity.

The synthesis of Angiotensin II analogs was developed, using classic techniques of peptide synthesis on solution. Although not completed, the performed synthesis allowed the identification and solution of some problems common to the synthesis of this type of compounds.

Índice:

- Agradecimentos	vii
- Resumo	ix
- Abstract	x
- Índice	xi
- Abreviaturas	xiii
- 1. Introdução	
1.1 A Angiotensina II	2
1.2 Simulações computacionais	6
1.3 Síntese peptídica	24
1.4 Dialquilglicinas	30
1.5 Objectivos	31
Referências	32
- 2. Simulação Molecular	
2.1 Contextualização do trabalho	38
2.2 Parametrização de aminoácidos não codificados	40
2.3 Simulações moleculares da angiotensina II em diferentes meios	50
2.4 Simulações moleculares de antagonistas peptídicos da AngII e dos análogos modelados	58
Referências	69
- 3. Síntese	
3.1 Contextualização do trabalho	74
3.2 Síntese de [Aib3,Aib5,Aib8]AngII	75
3.3 Síntese de [Sar1,Aib3,Aib5,Aib8]AngII	86
Referências	92
- 4. Conclusões	93

- 5. Secção Experimental	
5.1 Reagentes, solventes e instrumentação	98
5.2 Procedimentos	99
- 6. Anexos	129

Abreviaturas:

δ	desvio químico (expresso em unidades de ppm)
Ac	grupo acetilo
AcOEt	acetato de etilo
ACE	Enzima conversora da Angiotensina (“ <i>Angiotensin Converting Enzyme</i> ”)
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
Aib	ácido aminoisobutirico ou dimetilglicina
AngII	Angiotensina II
Ar	arilo
Boc	grupo terc-butoxicarbonilo
Bzl	grupo benzilo
d	duplete
dd	duplete de dupletos
dt	duplete de tripleto
DCCI	<i>N,N'</i> -diciclo-hexilcarbodiimida
DCHU	diciclo-hexilureia
DCM	diclorometano
Deg	dietilglicina
DMSO	sulfóxido de dimetilo
DMSO-d6	sulfóxido de dimetilo hexadeuterado
DIEA	<i>N,N'</i> -diisopropiletilamina
Dpg	dipropilglicina
D _i bg	di-isobutilglicina
Døg	difenilglicina
D _{b_n} g	dibenzilglicina
Et	grupo etilo
Et ₂ O	éter dietílico
Et ₃ N	trietilamina
Gly	glicina
GPCR	Receptor Acoplado a Proteína G
h	hora
HBTU	hexafluorofosfato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónio
His	histidina

HOBt	1-hidroxibenzotriazole
HRMS	espectroscopia de massa de alta resolução
Hz	Hertz
J	constante de acoplamento (expressa em Hz)
m	multipeto
Me	grupo metilo
min	minuto
Orn	ornitina
p.f.	ponto de fusão
Phl	grupo fenilalaninoilo (“ <i>phenylalaninol</i> ”)
ppm	partes por milhão
Pro	prolina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
q	quarteto
q ap	quarteto aparente
rdf	função de distribuição radial (“ <i>radial distribution function</i> ”)
RESP	“ <i>Restricted electrostatic potential</i> ”
RMSD	Desvio quadrático médio (“ <i>root mean square deviation</i> ”)
s	singleto
s l	singleto largo
Sar	sarcosina
t	tripleto
t ap	tripleto aparente
t.l.c.	cromatografia em camada fina (thin layer chromatography)
TFA	ácido trifluoracético
TMU	tetrametilureia
Tyr	tirosina
TyrCH ₃	O-metiltirosina
VDW	Van derWalls
Z	grupo benziloxicarbonilo

1 Introdução

1.1 Angiotensina II

A Angiotensina II (AngII) é uma hormona constituída por 8 aminoácidos, dispostos linearmente com a sequência Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe (figura 1).

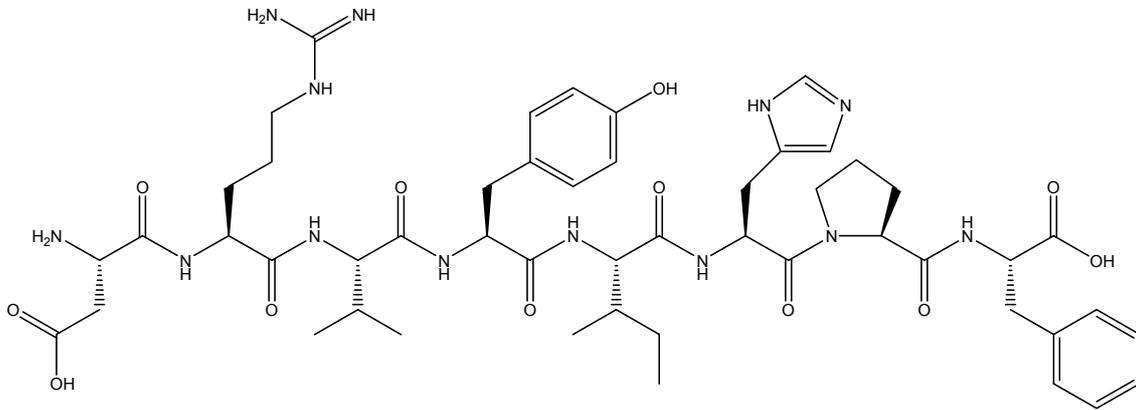


Figura 1. Fórmula de estrutura da Angiotensina II

Esta hormona participa em vários mecanismos do nosso metabolismo, incluindo o controlo da pressão arterial e homeostase de electrólitos, por exemplo ^{1,2}. Os rins, as glândulas supra-renais, o coração, os vasos sanguíneos, o cérebro, o tracto gastrointestinal e os órgãos reprodutivos são alguns dos locais onde esta hormona cumpre a sua função fisiológica ³. Ela é parte integrante do sistema Renina-Angiotensina (RAS) (figura 2).

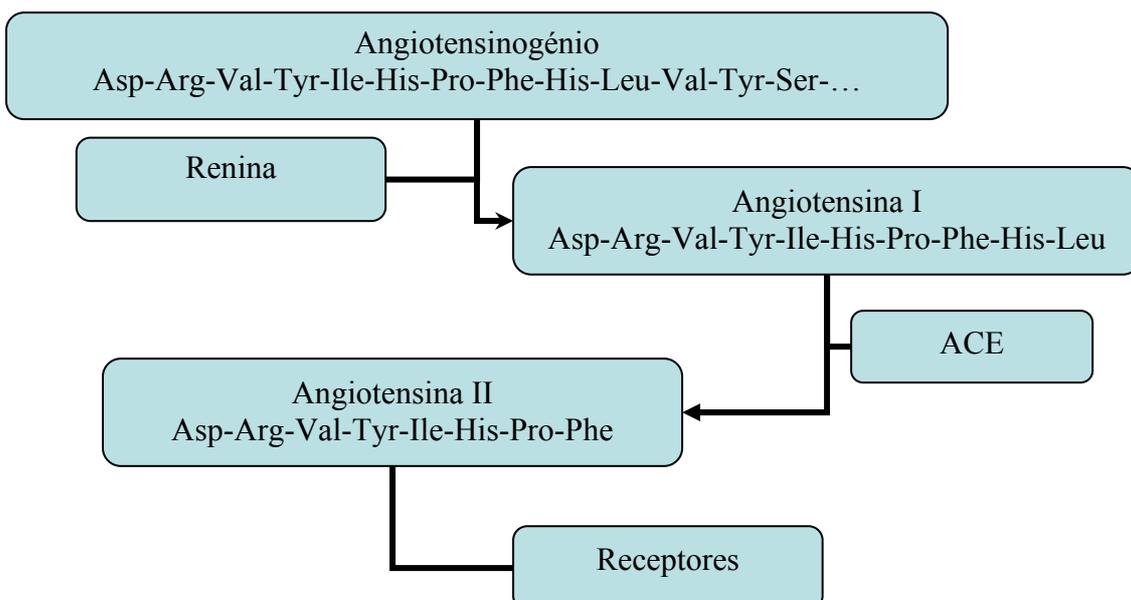


Figura 2. Sistema Renina-Angiotensina.

A Angiotensina II é fundamentalmente produzida a partir da acção da “Angiotensin Converting Enzyme” (ACE) sobre a Angiotensina I, que por sua vez é produzida a partir da acção da Renina sobre o Angiotensinogénio. A interacção da Angiotensin II com os seus receptores específicos desencadeia as suas funções fisiológicas que são diferenciadas, conforme o receptor com que interacciona. Foram bem caracterizados dois receptores da Angiotensina II, o receptor At1 e o receptor At2. Foi ainda identificado um receptor adicional, cuja existência está quase unanimemente aceite ⁴.

Os receptores da AngII pertencem à superfamília das GPCR (“*G-Protein Coupled Receptors*”) ⁵, sendo proteínas transmembranares, que intervêm na transmissão de sinais do exterior para interior das células ⁶. Estas proteínas são o alvo de uma grande parte dos fármacos existentes no mercado, uma vez que estão relacionados com praticamente todas as funções fisiológicas no nosso organismo ⁷. Embora esta família seja muito extensa, foram apenas caracterizadas duas estruturas cristalográficas ^{8,9}. Usando a estrutura da Rodopsina bovina ⁸ e técnicas de modelação por homologia, foram construídos vários modelos dos receptores da AngII. No entanto, após a determinação da estrutura cristalográfica do receptor humano β_2A , verificou-se que existem diferenças significativas entre o modelo previsto e a estrutura determinada. Verificou-se que o modelo criado era mais próximo da Rodopsina Bovina que do receptor humano β_2A , revelando as limitações destas técnicas de modelação, quando se usa apenas uma estrutura ⁹.

O nosso interesse centra-se fundamentalmente na interacção da Angiotensina II com o seu receptor At1, uma vez que é esta interacção que desencadeia as respostas fisiológicas que pretendemos evitar numa terapia anti-hipertensiva. Este receptor é composto por 359 resíduos ¹⁰, dispostos num arranjo tridimensional típico das GPCR (contendo 7 hélices transmembranares). Estudos de mutagénese direccionada (*Site Directed Mutagenesis*) sugerem que a zona de interacção com a AngII está situada nos “*loops*” extracelulares e na região transmembranar das hélices que constituem o receptor ⁴. Há praticamente acordo relativamente à importância dos resíduos Lys199 (localizada na porção extracelular da hélice 5) e Asp278 ou Asp281 (encontrados parte extracelular da hélice 7) como sendo dois pontos fundamentais para a interacção da AngII com o seu receptor At1 ¹¹. Este receptor é encontrado fundamentalmente no endotélio vascular. A sua activação pela AngII induz vasoconstrição, libertação de

Aldosterona e reabsorção renal de Sódio. Estes efeitos são responsáveis pelo aumento da pressão sanguínea ¹².

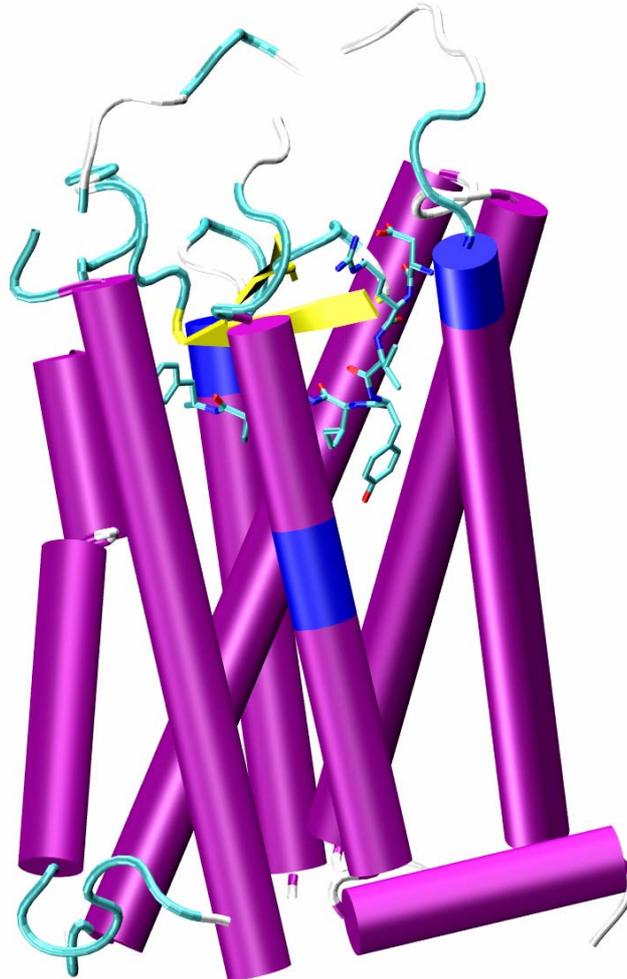


Figura 3. Modelo aproximado do receptor At1 e AngII, mostrando grosseiramente a zona de interação entre estas duas espécies. Este modelo foi construído pelo Prof. Laerte Oliveira e pode ser encontrado em www.gpcr.org/7tm

O receptor humano da AngII At2 é composto por uma sequência de 363 aminoácidos ¹³. Este receptor encontra-se fundamentalmente no tecido fetal, no útero e na medula das glândulas supra-renais ¹². Pensa-se que a sua função está relacionada com o desenvolvimento fetal e diferenciação celular.

O bloqueamento do sistema Renina-Angiotensina tem sido uma abordagem terapêutica de grande sucesso no controlo da hipertensão. A terapia mais usual tem sido a administração de inibidores da ACE, no entanto, em alguns pacientes, esta terapia é acompanhada de alguns efeitos secundários indesejados ¹². De modo a evitar este problema, actualmente tem-se usado uma terapia baseada na administração de antagonistas da AngII. Existe uma variedade de antagonistas peptídicos mas estes compostos têm de ser administrados por via intravenosa. Embora existam antagonistas peptídicos muito potentes, devido à sua reduzida biodisponibilidade, não se revelaram uma terapia eficiente. Apenas depois do aparecimento do Losartan (DuP 753) ¹⁴ e posteriormente de outros antagonistas não peptídicos, esta abordagem terapêutica foi implementada de modo realmente eficaz e conveniente ¹². Estes fármacos têm mostrado uma eficácia idêntica à dos inibidores da ACE, mas apresentam efeitos secundários muito menos significativos ^{15,16}.

1.2 Simulações computacionais

1.2.1 Contextualização

O desenvolvimento de novos compostos (como novos fármacos e catalisadores) é uma das principais áreas de interesse da Química. Uma grande quantidade de recursos é direccionada para este fim, onde por vezes os avanços são realizados numa base de tentativa/erro. Neste contexto, os cálculos computacionais permitem uma análise detalhada de certos aspectos deste problema, tornando possível uma melhor racionalização das possíveis soluções.

Uma questão prévia é a existência de uma estrutura tridimensional representativa do sistema em estudo. Esta estrutura pode ser obtida através de diversas técnicas experimentais, como a difracção de raios-X e espectroscopia de ressonância nuclear (NMR). Quando esta estrutura não está disponível temos de recorrer a metodologias de modelação molecular por homologia.

O tipo de métodos teóricos que podemos utilizar é fortemente dependente da dimensão e complexidade do sistema em estudo:

Sistemas pequenos e simples podem ser tratados usando métodos quânticos, que apresentam uma exactidão elevada. Os diversos tipos de métodos quânticos que podem ser utilizados são apresentados na secção 1.2.2.

Sistemas de grande dimensão e complexidade não podem ser tratados por métodos puramente quânticos. Nestes casos, podemos usar várias metodologias alternativas. Todas elas utilizam formalismos teóricos mais simplificados, que permitem uma redução significativa dos recursos computacionais necessários para a sua implementação. Para este efeito, as metodologias utilizadas são bastante diversas:

No formalismo atomístico clássico, todos os átomos do sistema são tratados explicitamente. No entanto, a correspondente estrutura electrónica só é considerada de uma forma implícita. As interacções entre os átomos são descritas por uma energia potencial clássica, cuja forma será discutida na secção 1.2.3.

No formalismo híbrido, o sistema é dividido em duas regiões. Uma região activa, por exemplo o soluto em soluções diluídas ou o centro activo numa enzima, que é determinante no estudo que pretendemos efectuar. Uma região não activa, por exemplo o solvente em soluções diluídas ou os resíduos que não pertencem ao centro

activo numa enzima, que não é tão relevante para este estudo. A região activa é tratada a um nível atomístico, utilizando métodos teóricos do nível mais alto possível. A região não activa é tratada usando nível(eis) teórico(s) mais simplificado(s), que não é/são forçosamente atomístico(s). Neste trabalho, não utilizamos métodos deste tipo.

Na figura 4, é apresentado um fluxograma que permite racionalizar a utilização das diversas metodologias utilizadas.

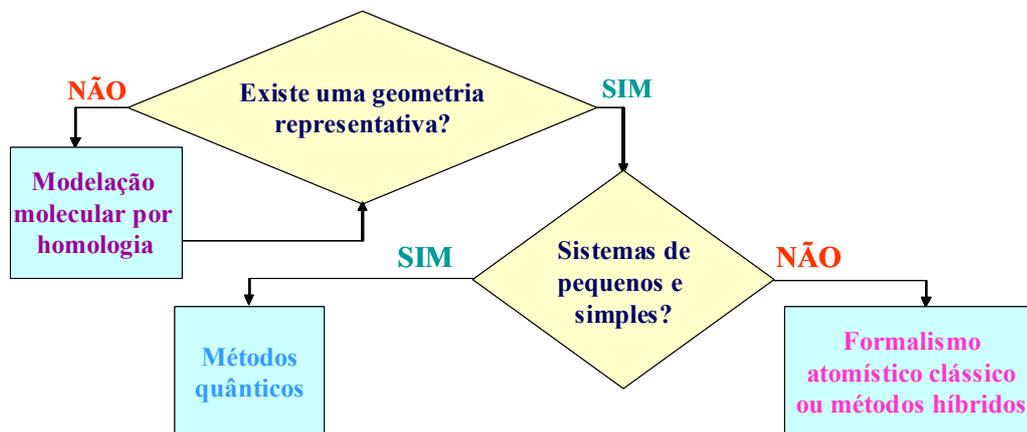


Figura 4. Fluxograma das diferentes metodologias teóricas usadas no estudo de sistemas químicos.

Outro ponto de vista importante, na classificação dos métodos teóricos, é a perspectiva com que são estudados os sistemas químicos:

- numa perspectiva estática, procuramos efectuar uma análise selectiva das respectivas superfícies de energia potencial. Esta perspectiva pode ser adequada para estudar sistemas com graus de liberdade conformacionais limitados;

- numa perspectiva dinâmica, pretendemos amostrar, de uma forma adequada, o espaço conformacional do sistema em estudo. Esta abordagem é essencial para modelar sistemas muito flexíveis, cujas propriedades são fortemente dependentes das diversas conformações que o sistema pode assumir. Para este efeito, recorreremos a métodos de simulação molecular que serão apresentados na secção 1.2.4. Neste contexto, os métodos de Monte Carlo (MC) e da Dinâmica Molecular (MD) são os mais utilizados.

1.3.2 Métodos Quânticos

Métodos quânticos ou de estrutura electrónica são métodos baseados na resolução aproximada da equação de Schrödinger,

$$H\Psi(r_n, r_e) = E\Psi(r_n, r_e), \quad (1.1)$$

onde H é o operador Hamiltoniano, $\Psi(r_n, r_e)$ é a função de onda dependente da posição dos núcleos (r_n) e dos electrões (r_e) e E é a energia do sistema.

Assumindo a aproximação de Born-Oppenheimer, que em linhas gerais se baseia no facto de existir uma grande diferença entre as massas dos núcleos e dos electrões, o que permite desacoplar os movimentos destas partículas, a função de onda ($\Psi(r_n, r_e)$) pode ser decomposta nas suas componentes nuclear ($\Psi_n(r_n)$) e electrónica ($\Psi_e(r_e; r_n)$):

$$\Psi(r_n, r_e) = \Psi_n(r_n)\Psi_e(r_e; r_n) \quad (1.2)$$

Considerando um sistema com N núcleos e M electrões, podemos definir equação de Schrödinger electrónica para uma geometria nuclear fixa (r_n^f),

$$H_e\Psi_e(r_e; r_n^f) = E_e\Psi_e(r_e; r_n^f), \quad (1.3)$$

onde H_e é o operador Hamiltoniano electrónico em unidades atómicas, que difere do operador H da equação 1.1 no facto de não incluir os termos relativos à energia cinética e potencial dos núcleos:

$$H_e = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^M \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^N \sum_{i=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^{i-1} \frac{1}{r_{ij}} \quad (1.4)$$

$$\nabla_i^2 = \frac{\partial^2}{\partial^2 x_i} + \frac{\partial^2}{\partial^2 y_i} + \frac{\partial^2}{\partial^2 z_i} \quad (1.5)$$

Na equação 1.4, o primeiro termo corresponde à energia cinética electrónica, o segundo à energia de atracção electrão-núcleo e o terceiro à energia de repulsão inter-electrónica. Na mesma equação, Z_A é a carga do núcleo A , r_{iA} a distância entre o electrão i e o núcleo A e r_{ij} a distância entre os electrões i e j . Na equação 1.5, ∇_i^2 é o operador Laplaciano associado aos movimentos do electrão i definido em coordenadas cartesianas.

Atendendo a que estamos a considerar um sistema com núcleos fixos, a energia total do sistema (E_{total}) é calculada como a soma das suas componentes electrónica (E_e) e de repulsão nuclear (E_{RN}):

$$E_{total} = E_e + E_{RN} \quad (1.6)$$

Na equação 1.6, a energia de repulsão nuclear é calculada como,

$$E_{RN} = \sum_{A=1}^N \sum_{B=1}^{A-1} \frac{Z_A Z_B}{r_{AB}}, \quad (1.7)$$

onde r_{AB} é a distância entre os núcleos A e B .

As funções de onda electrónicas ($\Psi_e(r_e; r_n^f)$) são habitualmente descritas como uma expansão de X determinantes de Slater (Δ_k):

$$\Psi_e(r_e; r_n^f) = \sum_{k=1}^X A_k \Delta_k \quad (1.8)$$

Cada determinante de Slater pode ser escrito como um produto antissimetrizado de M funções orbitais-spin monoelectrónicas (ψ_i):

$$\Delta_k = (M!)^{1/2} \begin{vmatrix} \psi_1(1) & \psi_1(2) & \dots & \psi_1(M) \\ \psi_2(1) & \psi_2(2) & \dots & \psi_2(M) \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \psi_M(1) & \psi_M(2) & \dots & \psi_M(M) \end{vmatrix} \quad (1.9)$$

As funções monoeléctricas (ψ_i) são descritas como um produto das suas componentes orbital (φ_i) e de spin (θ_i):

$$\psi_i = \varphi_i \times \theta_i, \text{ com } \theta_i = \alpha \text{ ou } \theta_i = \beta \quad (1.10)$$

As funções orbitais (φ_i) são habitualmente expandidas como uma combinação linear de m funções de base (χ_p) linearmente independentes:

$$\varphi_i = \sum_p c_{pi} \chi_p \quad (1.11)$$

Desta forma, para determinarmos a energia de uma determinada estrutura depois de definir o conjunto de funções de base, apenas necessitamos de calcular os coeficientes c_{pi} e A_k . Uma vez que para sistemas polielectronicos não há uma solução analítica para a equação de Schrödinger electrónica, recorreremos habitualmente ao formalismo variacional. Este formalismo baseia-se na minimização do valor esperado da energia, para uma função tentativa do tipo descrito das equações 1.8 a 1.11, relativamente aos parâmetros ajustáveis c_{pi} e A_k .

Para sistemas de camada fechada, podemos considerar que as funções monoeléctricas (ψ_i) ocorrem em pares com a mesma componente orbital (φ_i) e com componentes de spin (θ_i) diferentes. Na sua formulação mais simples, a expansão 1.8 inclui apenas um determinante de Slater (Δ_1) correspondente ao estado electrónico fundamental. A aplicação do formalismo variacional a este modelo leva-nos às equações de Hartree-Fock para um sistema de camada fechada (também denominado de RHF, “*Restricted Hartree-Fock*”). A resolução destas equações é efectuada de uma forma

iterativa, na qual é construída uma função de onda electrónica aproximada. Esta função é obtida através da minimização do correspondente valor esperado da energia, relativamente às funções orbitais monoeléctricas (φ_i) e conseqüentemente aos correspondentes ajustáveis (c_{pi}). Estas funções são melhoradas ao longo do processo iterativo, até que determinados critérios de convergência (na energia e nos coeficientes c_{pi}) sejam atingidos. A este processo iterativo é dado o nome de método do campo auto-consistente (“*Self-consistent Field*” ou SCF). Neste processo iterativo, as interacções instantâneas entre electrões não são contabilizadas. O cálculo da componente bielectrónica é aproximado, calculando-se a repulsão que cada electrão sente pela densidade electrónica média definida por todos os outros. Desta forma, mesmo usando um conjunto completo de funções de base ($m=\infty$), o valor esperado da energia calculado (energia do limite de Hartree-Fock) será sempre superior ao valor de energia exacta. A esta diferença chama-se correlação electrónica. É importante notar que a escolha do conjunto de funções de base é primordial. Este deve ser o tão pequeno quanto possível (dado que o cálculo escala com m^4 , em que m é o número de funções de base), sem comprometer a exactidão dos resultados.

A figura 5 mostra, de forma simplificada, como funciona método iterativo SCF.

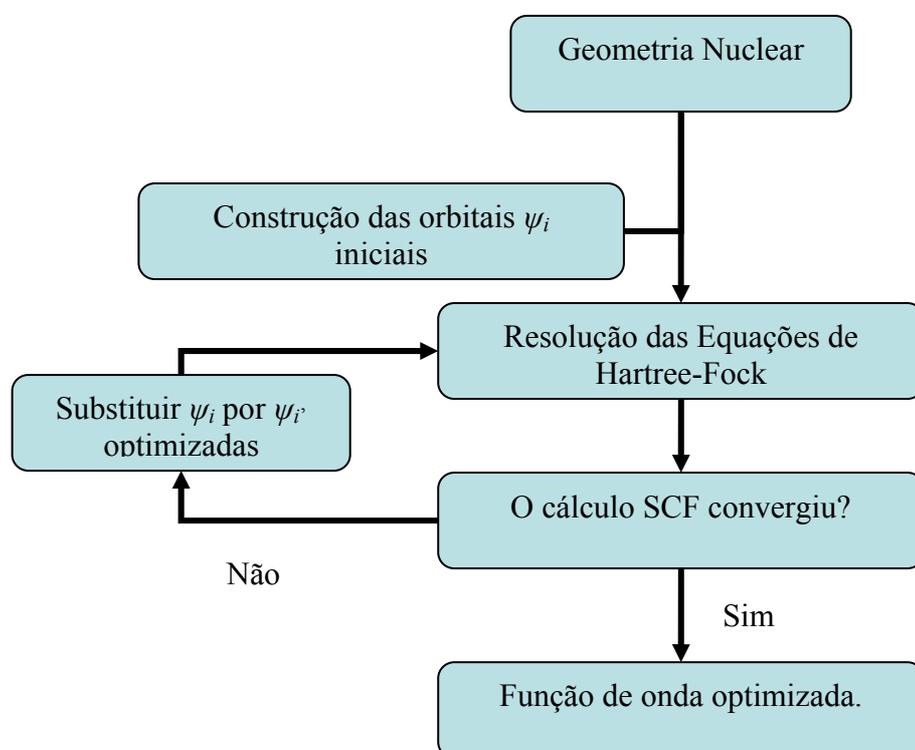


Figura 5. Esquema exemplificativo do funcionamento do método iterativo do campo auto-consistente (SCF).

Uma vez que conseguimos calcular a energia total do sistema para configurações de núcleos fixos, podemos construir uma superfície de energia potencial dependente unicamente das coordenadas nucleares. Esta superfície tem uma dimensionalidade demasiado elevada, $3N-6$ em moléculas não lineares ou $3N-5$ em moléculas lineares, para poder ser explorada exhaustivamente. Optamos habitualmente por fazer uma caracterização selectiva desta superfície, localizando os correspondentes pontos estacionários relevantes (mínimos). Usando algoritmos matemáticos de minimização (como o dos “gradientes conjugados” e o *steepest descent*), podemos determinar as correspondentes geometrias que correspondem aos estados de equilíbrio que contribuem para as propriedades do sistema. Muitos destes algoritmos usam o cálculo da primeira derivada (o vector da primeira derivada é denominado de gradiente). No entanto, outros calculam também a segunda derivada (o que nos dá informação sobre a concavidade da superfície e conseqüentemente a proximidade de um ponto estacionário). Na figura 6, apresentamos um fluxograma de um processo de optimização de geometria usando um método quântico.

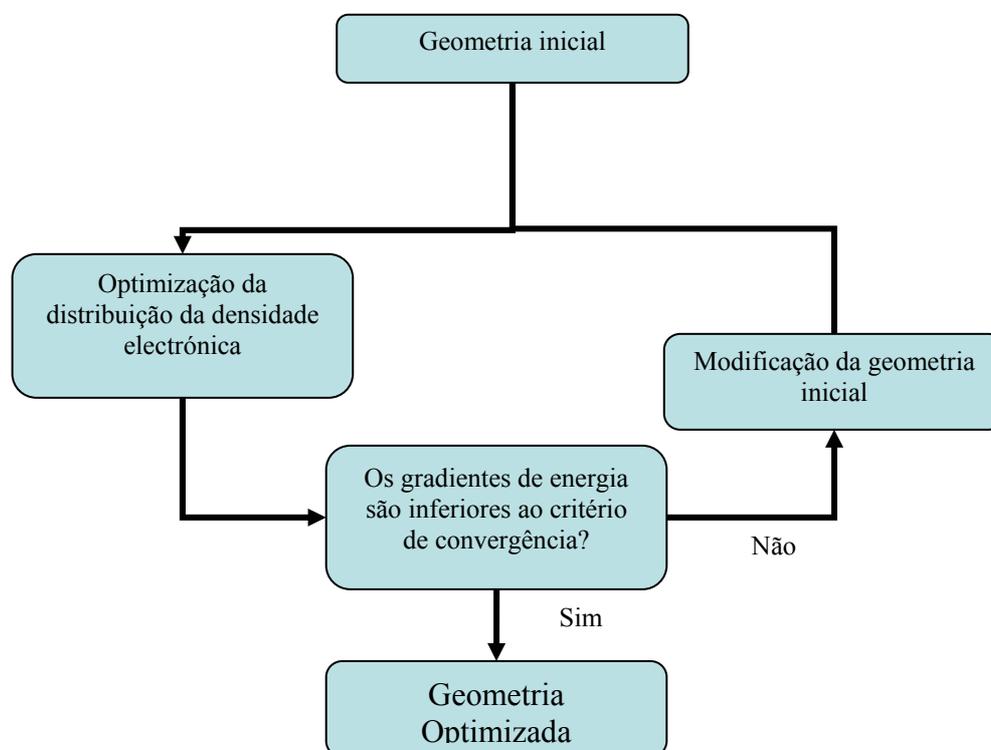


Figura 6. Esquema simplificado do processo de optimização de uma estrutura usando um método quântico.

Embora não tenham sido usados no decorrer deste trabalho, devemos realçar a existência de outros métodos quânticos para a determinação da estrutura electrónica. Para tratar sistemas de camada aberta, foi proposto o método não restrito de Hartre-Fock¹⁷. Entretanto, métodos como de Interação de Configurações¹⁸, de Moller-Plesset¹⁸ e *Coupled Cluster* (CC)¹⁸, foram elaborados para incluírem o cálculo da Correlação Electrónica.

1.2.3 Métodos Clássicos

Os métodos atomísticos clássicos baseiam-se no tratamento simplificado da estrutura molecular. Considerando válida a aproximação de Born-Oppenheimer, é possível desacoplar os movimentos dos núcleos e dos electrões. Desta forma, a energia potencial pode ser parametrizada como uma função que depende unicamente da geometria nuclear. Nesta perspectiva, os métodos de atomísticos clássicos não calculam qualquer componente electrónica, que é implicitamente incluída na parametrização da energia potencial. A energia potencial (V) de uma estrutura molecular pode então ser calculada como a soma de vários termos:

$$V = V_{Ligações} + V_{\hat{Angulos}} + V_{Torções} + V_{Electrostático} + V_{VdW} \quad (1.12)$$

A expressão 1.12 é representativa de grande parte das implementações deste tipo de métodos. A correspondente função energia potencial inclui termos ligantes (associados a ligações, ângulos e torções) e termos não ligantes (electrostáticos ou de Van der Walls (VdW)). No entanto, foram propostas funções de energia potencial mais complexas que adicionalmente incluem também os chamados termos cruzados (que reflectem a correlação entre termos ligantes) e termos de polarização. No decurso deste trabalho, utilizámos a energia potencial do tipo Amber na sua implementação parm99, que é definida como:

$$V = \sum_{\text{ligações}} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{\text{ângulos}} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{\text{torções}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] \quad (1.13)$$

Os primeiros dois termos têm uma forma harmónica e estão associados a ligações e ângulos de ligação, respectivamente. Uma energia potencial deste tipo é uma boa aproximação para a descrição dos ângulos. Devido à sua simplicidade, é também usado para descrever as ligações com comprimentos próximos dos valores de equilíbrio. No entanto, especialmente para comprimentos de ligação afastados dos valores de equilíbrio, uma função energia potencial de Morse é mais adequada para descrever este tipo de parâmetros (figura 7). O primeiro termo define a energia potencial referente às ligações, sendo r a distância entre dois átomos ligados, r_{eq} a respectiva distância de equilíbrio e K_r a constante de força harmónica associada. O segundo termo está associado aos ângulos de ligação, sendo θ um ângulo da ligação, θ_{eq} o correspondente ângulo de equilíbrio e K_θ a constante de força harmónica associada.

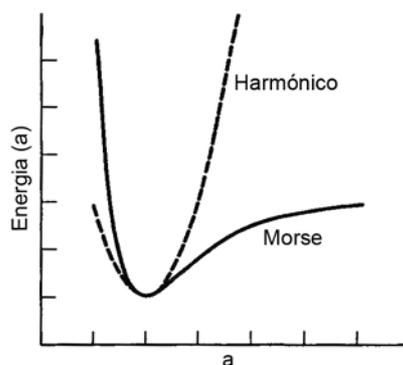


Figura 7. Comparação entre as energias potenciais harmónica (linha tracejada) e de Morse (linha contínua).

O terceiro termo é referente às torções (ângulos de diedro) e é definido por um potencial com uma forma contínua, reflectindo o carácter periódico típico das torções. A figura 8 mostra o comportamento típico deste potencial.

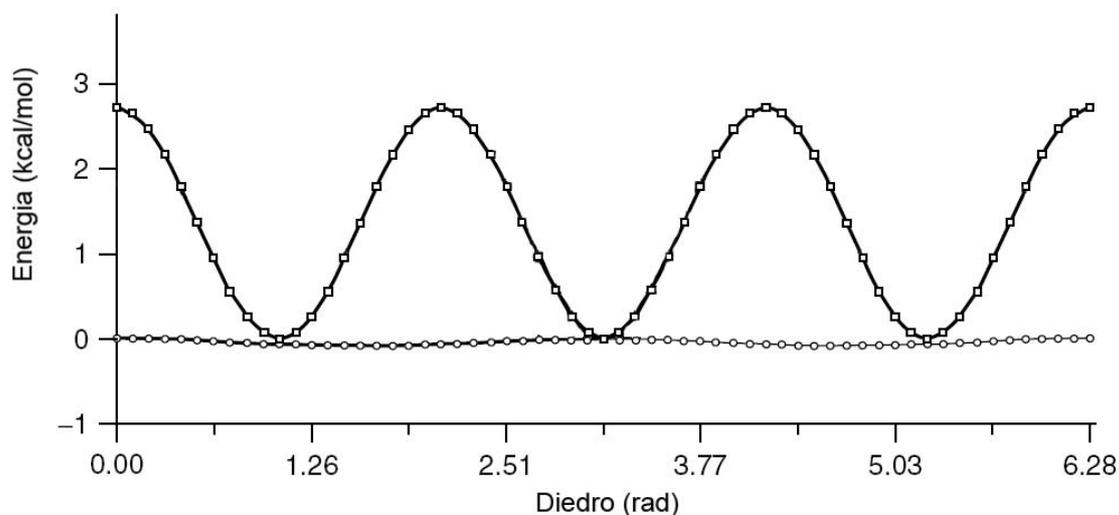


Figura 8. Forma típica de potenciais associados a ângulos de diedro. A linha com quadrados mostra o comportamento de um diedro com periodicidade de 3. A linha com círculos mostra um diedro com uma barreira energética baixa (sendo portanto bastante livre), com uma periodicidade de 2, com mínimos energéticos em $\frac{\pi}{2}$ e em $\frac{3\pi}{2}$.

O quarto termo aglomera em si as componentes não ligantes do potencial. Estas são efectivamente a componente electrostática (definida por $\frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}}$, onde q_i e q_j são as cargas pontuais atribuídas a cada átomo, ϵ é a constante dielétrica do meio (permitividade) e R_{ij} é a distância entre os dois átomos) e as interacções de Van der Waals (definida por um potencial de Lennard-Jones 12-6, em que A_{ij} e B_{ij} são parâmetros estipulados para cada par de átomos i e j e R_{ij} é a distância entre os dois átomos em causa).

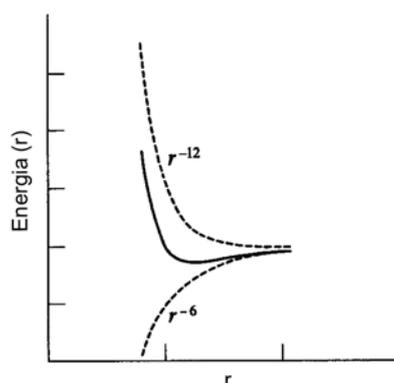


Figura 9. Potencial Lennard-Jones. As linhas tracejadas mostram o comportamento das parcelas dependentes dos termos repulsivo (r^{-12}) e atractivo ($-r^{-6}$). A linha contínua mostra o comportamento do potencial de Lennard-Jones.

Este modelo é bastante simples na sua forma, que como vimos descreve tanto ligações como ângulos com uma simples expressão harmónica, os diedros estão dependentes, na maior parte das situações, de alguns parâmetros e são identificados em muitos casos apenas pelos seus átomos centrais, as interacções de VDW são representadas por um potencial 6-12 e as interacções electrostáticas são modeladas como interacções Coulômbicas entre cargas pontuais. Para além disto, as interacções de VDW e electrostáticas são calculadas apenas para átomos em moléculas diferentes ou separados por 3 ou mais ligações (e onde as interacções não ligantes entre átomos separados por 3 ligações, denominadas de interacções 1-4, são reduzidas por aplicação de um factor de escalonamento).

A função energia potencial Amber/parm99¹⁹, utilizada neste trabalho, é especialmente apropriada para descrever biomoléculas. Não é fácil encontrar uma função energia potencial que seja aplicada de uma forma universal. Neste contexto, foram propostas vários modelos de energia potencial aplicados a diferentes tipos de sistemas químicos (ver tabela 1).

Tabela 1. Alguns campos de forças e seus campos de aplicação¹⁸

Nome	Aplicação	Referência
Amber	Biomoléculas	19,20
BMS	Ácidos Nucleicos	21
CHARMM	Biomoléculas	22-24
Chem-X	Compostos Orgânicos	25
CFF/CVFF	Orgânicos e inorgânicos	26-28
DREIDING	Orgânicos e inorgânicos (elementos representativos)	29
ECEPP	Proteínas	30
ESFF	Geral	31
GROMOS	Biomoléculas	32,33
MM2	Compostos Orgânicos	34
MM3	Orgânicos e biomoléculas	35,36
MM4	Hidrocarbonetos, alcoóis, éteres e hidratos de carbono	37,38
MMFF	Orgânicos e biomoléculas	39-43
MOMECC	Compostos com metais de transição	44
OPLS	Biomoléculas e alguns compostos orgânicos	45,46
PEF95SAC	Hidratos de carbono	47
PFF	Proteínas	48
SHAPES	Compostos com metais de transição	49
SYBYL/Tripes	Compostos orgânicos e Proteínas	50
TraPPE	Compostos orgânicos	51
UFF	Geral	52-54
VALBOND	Compostos com metais de transição	55

1.2.4. Simulações moleculares

O estudo teórico de sistemas flexíveis em solução coloca problemas particulares. O sistema a simular tem obrigatoriamente limites, e estes podem ser tratados de diferentes formas. A abordagem mais simples é considerar o sistema como isolado, sendo os seus limites uma interface com o vazio. Esta não é normalmente uma boa solução, pois a não ser que tenhamos um sistema muito grande, os efeitos de superfície ganham uma importância muito exagerada. Outra abordagem possível é a utilização de um sistema periódico, no qual o sistema modelado é tratado como a célula original de uma rede infinita de sistemas idênticos⁵⁶. Desta forma, as partículas que se encontrem na fronteira do sistema estão expostas a um potencial idêntico às que se encontram no centro. Mas esta abordagem gera um número infinito de interações. De modo a evitarmos este problema, o cálculo de interações não ligantes é truncado a partir de uma determinada distância⁵⁶. Estas interações podem alternativamente ser estimadas utilizando um tratamento matemático mais elaborado, como as somas de *Ewald*⁵⁷ e métodos nelas baseadas como o “*Particle Mesh Ewald*”⁵⁸, recorrendo ao uso de expansões em série e transformadas de *Fourier*.

O cálculo das propriedades termodinâmicas deste tipo de sistemas, não pode ser efectuado numa perspectiva estática, centrada na conformação de energia mínima. Precisamos de abordar o problema numa perspectiva dinâmica, baseada numa amostragem apropriada do correspondente espaço conformacional. Para este efeito, os métodos de simulação molecular são especialmente apropriados. As metodologias estocásticas, como o método de Monte Carlo⁵⁶, geram estruturas aleatoriamente, que são aceites caso obedeam a um critério energético. Metodologias determinísticas usam as leis da mecânica clássica Newtonianas para determinar a evolução temporal do sistema. A estes métodos dá-se o nome genérico de Dinâmica Molecular. De acordo com 2ª lei de Newton,

$$F(i, t_j) = m(i) \times a(i, t_j) \quad (1.14)$$

onde $F(i, t_j)$ é a força que actua na partícula i no momento t_j , $a(i, t_j)$ é a correspondente aceleração e $m(i)$ é a respectiva massa. Esta equação pode ser expressa numa forma

alternativa, conduzindo às chamadas equações de movimento de Newton para as N partículas do sistema:

$$\frac{\partial^2 r(i, t_j)}{\partial t_j^2} = \frac{F(i, t_j)}{m(i)}, i=1, \dots, N \quad (1.15)$$

Na equação 1.15, $r(i, t_j)$ é a posição da partícula i no momento t_j . A força ($F(i, t_j)$) é obtida como simétrico do gradiente da energia potencial (dada por exemplo pela equação geral 1.12) relativamente ao deslocamento da partícula i no tempo t_j :

$$F(i, t_j) = -\nabla_{r(i, t_j)} V(t_j) \quad (1.16)$$

$$\text{onde } -\nabla_{r(i, t_j)} V(t_j) = \frac{\partial V(t_j)}{\partial r(i, t_j)} \quad (1.17)$$

A correspondente velocidade ($v(i, t_j)$) é calculada pela equação (1.18):

$$v(i, t_j) = \frac{\partial r(i, t_j)}{\partial t_j} \quad (1.18)$$

A integração analítica das equações 1.15 a 1.18 não é possível. Neste contexto, temos de recorrer a algoritmos de integração numérica. Um parâmetro importante nestes algoritmos é o intervalo de tempo de integração (δt). Este parâmetro deve ser suficientemente pequeno de forma a conseguir amostrar o movimento mais rápido dentro de um sistema (geralmente os modos de vibração *stretching*). Se não existirem constrangimentos aplicados a ligações, devemos usar um valor de $\delta t=0,5 \text{ fs}$. Constrangendo as ligações que envolvem pelo menos um átomo de hidrogénio, podemos aumentar o valor de δt para $1,0 \text{ fs}$. Constrangendo todas as ligações, podemos usar um valor de δt de $2,0 \text{ fs}$.

Neste trabalho utilizámos o algoritmo de “*leap-frog*”⁵⁶, que é baseado no algoritmo de “*Verlet*”⁵⁶. Este algoritmo, partindo de um conjunto de coordenadas nucleares ($r(i, t_j)$, $i=1, \dots, N$), calcula o conjunto das posições de todas as partículas

$(r(i, t_j + \delta t), i=1, \dots, N)$ e as suas velocidades associadas $(v(i, t_j + \delta t/2), i=1, \dots, N)$. O nome “*leap-frog*” surge precisamente de que o cálculo das posições nucleares e das correspondentes velocidades não ocorrer no mesmo instante. Este cálculo ocorre em tempos diferentes ($t_j + \delta t$ para as posições e $t_j + \delta t/2$ para as velocidades). O algoritmo de integração funciona através de saltos alternados, que se destinam ao cálculo das posições e das velocidades.

A dinâmica molecular permite obter um conjunto de configurações distribuídas de acordo com uma determinada função de distribuição estatística ou *ensemble* estatístico. Deste modo, a medição de uma quantidade física é obtida através da média destas mesmas configurações (ou microestados) encontradas para um sistema durante um cálculo de dinâmica molecular. Desde que os tempos de amostragem sejam suficientemente longos, será de esperar que a média destas configurações correspondam aos verdadeiros estados de equilíbrio termodinâmico. O valor esperado de uma propriedade mecânica é calculado então como a média dos valores obtidos para um conjunto adequado de L configurações de equilíbrio, geradas através da simulação MD. Por exemplo, o valor esperado da energia potencial $\langle V \rangle$ pode ser calculado como:

$$\langle V \rangle = \frac{1}{L} \sum_{j=1}^L V(t_j) \quad (1.19)$$

Os *ensembles* de maior interesse (NVT e NPT) implicam que a temperatura seja mantida constante. Neste contexto, é importante calcular a energia cinética instantânea:

$$K(t_j) = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m(i) v(i, t_j)^2 \quad (1.20)$$

A temperatura (T) é então obtida através da energia cinética segundo o teorema da equipartição da energia:

$$K(t_j) = \frac{3}{2} N k_B T \quad (1.21)$$

As técnicas utilizadas para simular os referidos *ensembles* implicam normalmente o acoplamento com um banho térmico, que troca energia com o sistema molecular para que este se mantenha a temperatura constante.

Por outro lado no *ensemble NPT*, é necessário manter a pressão (P) constante. A pressão é uma propriedade mecânica, cujo valor esperado $\langle P \rangle$ pode ser calculada como:

$$\langle P \rangle = \frac{N k_B T}{V} + \left\langle \sum_{i=1}^N r(i, t_j) \times F(i, t_j) \right\rangle \quad (1.22)$$

No *ensemble NPT*, a pressão é fixada usando um pistão que faz variar o volume do sistema ou por escalamento das posições das partículas.

Para iniciar uma simulação, é necessário estabelecer uma geometria inicial para o sistema molecular. O sistema é habitualmente inserido numa caixa, cujo volume depende da sua densidade. A geometria inicial pode ser obtida através de técnicas espectroscópicas (NMR, difracção de raios-X, difracção de neutrões, etc) ou de modelação molecular por homologia. Habitualmente, procede-se a uma optimização prévia do sistema molecular, de forma a iniciar a simulação a partir de uma conformação mais favorável.

As velocidades iniciais podem ser obtidas através de uma distribuição de velocidades de Maxwell-Boltzmann representativa de uma temperatura T , próxima de 0 K. Como normalmente se pretendem efectuar simulações a temperaturas muito superiores (próximas de 298,15 K), é necessário fornecer energia cinética ao sistema através do reajustamento das velocidades dos átomos do sistema. Esta fase da simulação é designada por aquecimento.

Em seguida, procede-se à equilibração do sistema, tendo em conta a propriedade (O) que se pretende calcular por amostragem. Uma propriedade física O , geralmente converge para o seu valor de equilíbrio, exponencialmente com o tempo:

$$O(t_j) = O_0 + C \exp(-t_j/\tau) \quad (1.23)$$

em que $O(t)$ corresponde a uma média de uma quantidade física num curto intervalo de tempo, de forma a eliminar flutuações instantâneas. A variável determinante desta equação é o tempo de relaxamento τ , que pode ser da ordem de centenas de passos temporais, permitindo-nos observar a convergência para o valor de equilíbrio. No lado oposto, τ pode ser muito maior que a escala de tempo de simulação, por exemplo, um segundo. Neste caso, não é possível observar qualquer relaxamento, e não é possível calcular a propriedade termodinâmica. Em situações intermédias, o tempo de relaxamento pode ser maior que a escala de tempo de simulação, mas ser possível observar a tendência para a convergência. Deste modo, pode ser extrapolado um valor para O_0 , mesmo sem se atingir o estado de equilíbrio. As propriedades mecânicas como a energia e a entalpia têm tempos de relaxação curtos. Propriedades associadas a flutuações, por exemplo as capacidades caloríficas, têm tempos de relaxação longos.

Após o sistema ter atingido o equilíbrio relativamente à propriedade em estudo, procede-se à fase de produção onde são geradas as configurações que permitem calcular as médias de *ensemble*. Finalmente, estas médias são calculadas a partir da análise das trajectórias obtidas na fase da produção.

Uma simulação utilizando dinâmica molecular pode ser representada pelo fluxograma da figura 10.

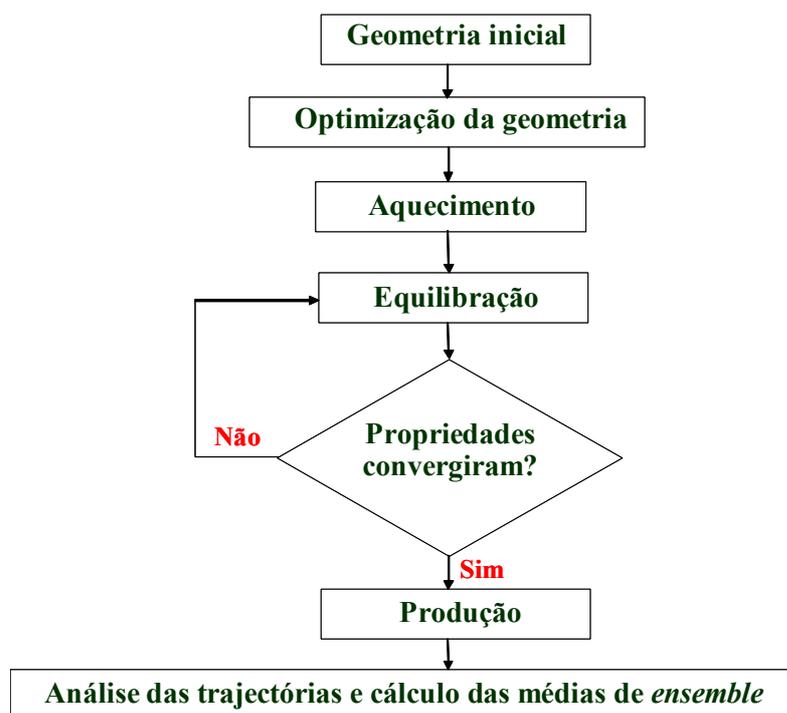


Figura 10. Fluxograma do procedimento habitualmente utilizado nas simulações de dinâmica molecular.

1.3 Síntese peptídica

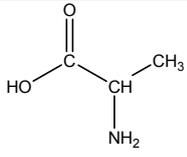
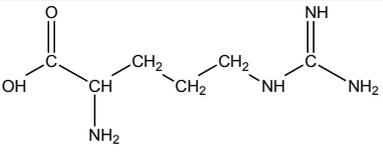
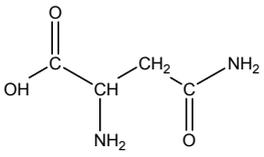
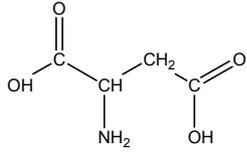
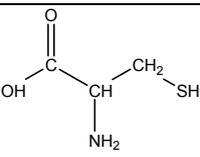
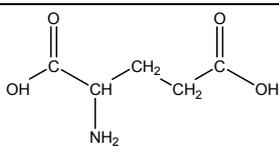
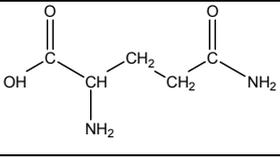
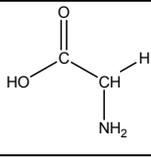
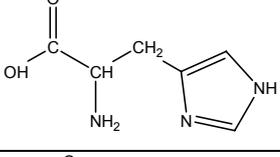
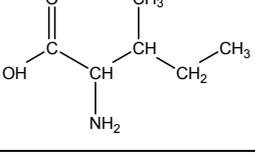
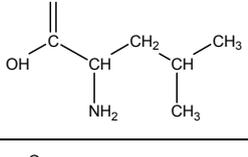
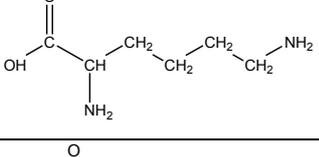
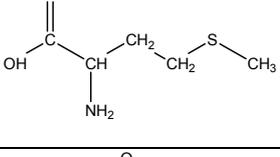
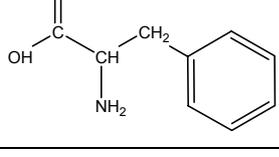
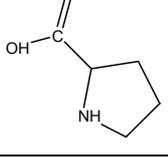
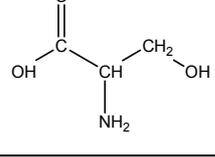
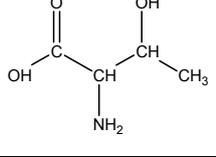
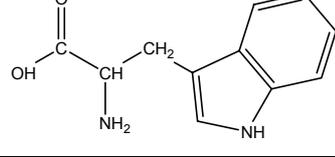
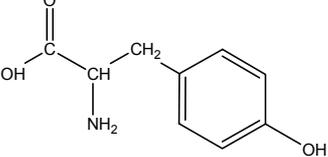
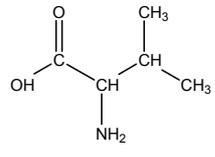
1.3.1 Péptidos e Aminoácidos

Os péptidos são uma classe de compostos extremamente vasta e interessante. Embora sejam constituídos de unidades simples (aminoácidos), os péptidos possuem características biológicas diversas, abrangendo antibióticos, venenos, hormonas, analgésicos, etc⁵⁹. A sua síntese é fonte de enorme interesse (especialmente na química medicinal), pois permite-nos confirmar a estrutura de péptidos naturais, preparar grandes quantidades de péptidos raros (que ocorram na natureza em pequenas quantidades, permitindo a sua avaliação biológica) e preparar análogos (permitindo encontrar espécies com propriedades biológicas aumentadas, que poderão permitir novas abordagens terapêuticas). No péptido, é chamada de estrutura primária a sequência de aminoácidos que o compõe e estrutura secundária ao tipo estrutura que adquire (existindo diversos padrões estruturais bem conhecidos, como folhas β -pregueadas, hélices α e diversos tipos de dobras, por exemplo). É chamado de estrutura terciária ao tipo de empacotamento que os diversos elementos estruturais realizam. Esta mesma classificação é usada também para proteínas (embora para estas possa existir também a caracterização da estrutura quaternária, resultante das aglomeração de vários monómeros proteicos ou de subunidades diferentes).

Os aminoácidos são as unidades básicas que constituem os péptidos, e como o próprio nome indica, incluem (pelo menos) um grupo amina e um grupo ácido na sua constituição. Embora exista um grande número de aminoácidos, apenas 20 são codificadas por ADN (tabela 2). Estes aminoácidos são constituídos basicamente por um grupo amina e um grupo ácido carboxílico, ligados por um carbono, que possui um grupo R (que diferencia cada aminoácido codificado) e um hidrogénio. Com a exceção da glicina, todos são opticamente activos (uma vez que possuem um carbono quiral entre o grupo amina e o grupo ácido) e todo e qualquer péptido e proteína sintetizada biologicamente (com uma sequência baseada na transcrição de ADN) é exclusivamente composta por L-aminoácidos.

De notar que, tendo um grupo ácido e um grupo amina simultaneamente, têm propriedades mistas de ácidos e bases existindo um intervalo de pH no qual tanto o grupo ácido como o grupo amina estão carregados (figura 11). A esta espécie chamamos zwitterião.

Tabela 2. Os 20 aminoácidos codificados por ADN.

Nome	Sigla de 3 letras	Estrutura	Nome	Sigla de 3 letras	Estrutura
Alanina	Ala		Arginina	Arg	
Asparagina	Asn		Ácido Aspártico	Asp	
Cisteína	Cys		Ácido Glutâmico	Glu	
Glutamina	Gln		Glicina	Gly	
Histidina	His		Isoleucina	Ile	
Leucina	Leu		Lisina	Lys	
Metionina	Met		Fenilalanina	Phe	
Prolina	Pro		Serina	Ser	
Trionina	Thr		Triptofano	Trp	
Tirosina	Tyr		Valina	Val	

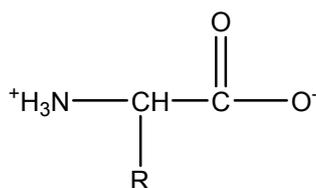


Figura 11. Zwitterião

Uma vez que todos os aminoácidos (codificados) partilham o mesmo tipo de estrutura base, são as diferentes cadeias laterais que lhes conferem diferentes características, resultando assim em aminoácidos carregados positivamente (ou básicos, Arg, Lys), carregados negativamente (ou ácidos, Asp, Glu), polares (Ser, Cys, Thr, Asn, Gln, Tyr, His) e apolares (Gly, Ala, Ile, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp).

1.3.2 Ligação peptídica

Como foi dito anteriormente, um péptido, sendo uma sequência de aminoácidos, resulta da condensação de (pelo menos dois) aminoácidos, no qual é formada uma ligação química entre o carbono do grupo ácido de um dos aminoácidos e o azoto do grupo amina do outro aminoácido. Laboratorialmente, esta ligação pode ser obtida de diferentes formas⁶⁰. Os métodos de formação de ligação peptídica usados neste trabalho baseiam-se na activação do carbono do grupo ácido, originando uma espécie que funcionará como agente acilante do grupo amina do resíduo seguinte, na linha do que está representado na figura 12.

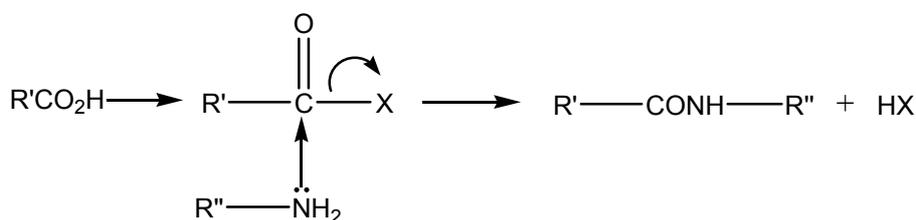


Figura 12. Esquema representativo da formação de uma ligação peptídica.

O reagente de activação e acoplamento historicamente mais usado é a dicitclo-hexilcarbodiimida (DCCI ou DCC)^{60,61} que, quando adicionado ao componente ácido forma o agente acilante reactivo. Este reagente é vulgarmente usado em conjunto com 1-hidroxibenzotriazole (HOBt), de forma a reduzir problemas de racemização e outras

reacções laterais, através da formação de um agente acilante menos potente, selectivo ⁶⁰. No decurso deste trabalho, foi usado um outro reagente de acoplamento, o hexafluorofosfato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónio, (HBTU), que funciona de forma análoga à reacção usando DCCI/HOBt ⁶², resultando normalmente em rendimentos mais elevados que a utilização de DCC. Existem muitos outros métodos de formação da ligação peptídica, incluindo a utilização de ésteres activos, anidridos mistos e azidas ⁶¹.

Acontece que se adicionarmos o reagente de activação a uma mistura dos dois aminoácidos que pretendemos acoplar, obtemos o péptido desejado e muitos outros produtos, uma vez que ambos os grupos ácido são activados, podendo reagir com ambos os grupos amina (e mesmo com grupos amina de péptidos formados entretanto). O que pretendemos é um péptido com uma determinada sequência de aminoácidos, e desta forma, são necessários vários cuidados para evitar todas estas possíveis reacções. Uma vez que como cada aminoácido possui um grupo ácido e um grupo amina, não nos é possível controlar o local específico onde ocorrerá a acilação. Por esta razão, são usados grupos protectores em todos os locais passíveis de reagir, bloqueando assim possíveis cursos reaccionais indesejados e permitindo seleccionar o local específico da acilação pretendida.

1.3.3 Grupos Protectores

Como foi referido no ponto anterior, a utilização de grupos protectores na síntese de péptidos permite-nos realizar um acoplamento peptídico selectivo entre um grupo ácido e um grupo amina em particular, uma vez que todos os outros grupos passíveis de reagir estão impedidos pela presença do grupo protector.

Foram desenvolvidos diversos grupos protectores, tanto para a protecção do grupo ácido, como para a protecção do grupo amina. São também usados nas cadeias laterais de aminoácidos, onde tal for necessário, recorrendo-se a diferentes grupos, conforme a protecção a realizar.

Entre os grupos protectores normalmente usados para a protecção do grupo amina, podemos referir a utilização de alquóxiámidas como o benziloxycarbonilo (Z) (geralmente introduzido usando o cloroformiato de benzilo nas condições de Schotten-Baumann) e *t*-butoxicarbonilo (Boc) (introduzido com a utilização de anidrido de *t*-

butilo). O grupo Z pode ser removido por tratamento com HBr/AcOH ou por hidrogenação catalítica, enquanto que o grupo Boc é usualmente removido usando TFA.

Para além destes dois, existem muitos outros grupos protectores, como o 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc, clivavel em condições básicas) ou o 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo (Troc, removível usando um processo redutor, geralmente Zn/AcOH), por exemplo (figura 13) ^{59,60}.

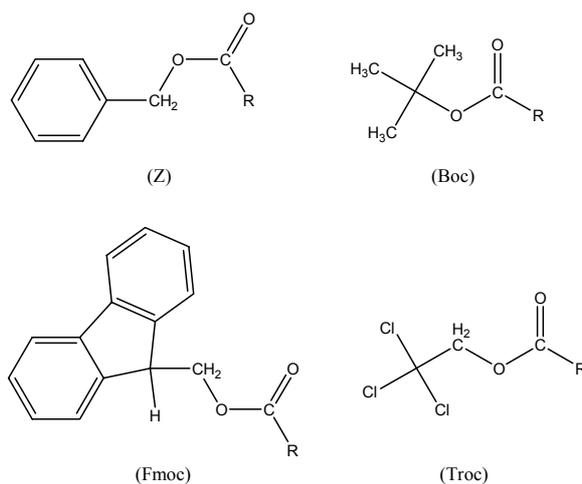


Figura 13. Estruturas de grupos usados para a protecção do grupo amina.

Os grupos ácidos são facilmente protegidos através da sua esterificação. A utilização de ésteres metílicos (OMe) e etílicos (OEt) é comum, uma vez que são resistentes às condições de formação da ligação peptídica e a muitos dos processos de desprotecção do grupo amina. A sua preparação é realizada usando cloreto de tionilo e metanol (para a obtenção do éster metílico) ou etanol (para a obtenção do éster etílico). Para além destes exemplos existem muitos outros ésteres que podem ser usados, como ésteres benzílicos (OBzl) ou de *t*-butilo (OBu^t) (figura 14), por exemplo ⁶⁰.

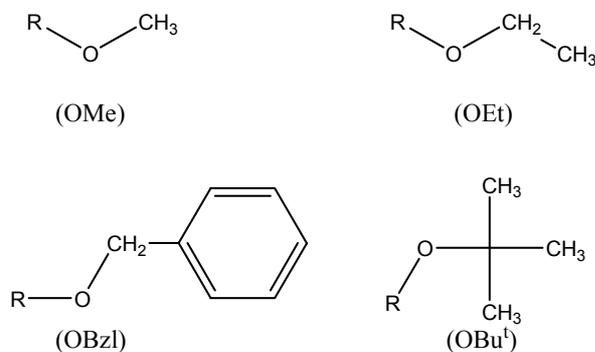


Figura 14. Estruturas de grupos usados para a protecção dos grupos ácido.

A remoção de ésteres etílicos e metílicos é geralmente conseguida por hidrólise alcalina. É de notar que a remoção destes grupos tem de ocorrer sem degradação da cadeia peptídica entretanto formada e deverá ocorrer selectivamente, de modo a garantir a existência de apenas um centro reactivo para o acoplamento seguinte, na situação de se pretender um acoplamento posterior. O facto de um grupo protector ser resistente ao processo de desprotecção dos restantes grupos protectores é muito importante, uma vez que é esta característica (ortogonalidade) que nos permite seleccionar o local de um próximo acoplamento durante a construção sequencial de um péptido. Um exemplo típico desta propriedade é a utilização de éster benzílico (OBzl) e Boc, no qual, Boc permanece estável protegendo o grupo amina, durante a desprotecção do grupo ácido (a remoção do grupo OBzl é realizada com $H_2/Pd-C$), acontecendo o oposto na condição de desprotecção do grupo amina (o grupo Boc é removido com TFA). Desta forma, utilizando grupos protectores ortogonais, poderemos planear e executar a construção de qualquer sequência peptídica.

1.4 Dialquilglicinas

As dialquilglicinas são uma família de aminoácidos com um conjunto particular de características estruturais interessantes. Uma vez que têm duas cadeias laterais ligadas ao seu carbono α , os seus ângulos de diedro (φ e ψ) típicos são diferentes dos aminoácidos codificados por DNA (figura 15). O ácido aminoisobutírico (Aib) é o exemplo mais simples desta família, podendo ser encontrado em alguns antibióticos peptídicos⁶³ (como a alameticina (“*alamethicin*”), que possui a sequência Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Phl, produzida pelo fungo *Trichoderma viride*).

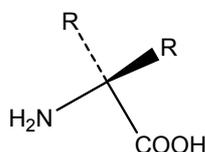


Figura 15. Estrutura geral de uma $C_{\alpha,\alpha}$ -dialquilglicina.

Para além do Aib, os restantes elementos desta família não são comumente usados para o desenho de novos péptidos, devido à dificuldade de preparação. Estudos realizados, revelam que as $C_{\alpha,\alpha}$ -dialquilglicinas com cadeias laterais maiores (com dois ou mais carbonos em cada cadeia), têm uma preferência por uma conformação de tipo C_5 ($\varphi = 180^\circ$ e $\psi = 180^\circ$)⁶⁴. Esta particularidade faz com que estes aminoácidos ocupem espaços conformacionais que estão restritos (ou mesmo impedidos) aos aminoácidos codificados por ADN. Desta forma, podem ser usados na preparação de péptidos ou peptidomiméticos com conformações atípicas, podendo permitir a preparação de compostos com características estruturais específicas.

Como foi referido anteriormente, devido à sua natureza, a síntese destes resíduos não é trivial. Os métodos mais comuns são o método de Strecker e o método de Bucherer-Berg⁶³. Contudo, quando pretendemos a obtenção das espécies mais estereamente constrangidas, estes métodos não são eficazes. Como solução para este problema, outros métodos têm vindo a ser desenvolvidos, como a alquilação de nitroacetato⁶³ e a reacção de Ugi-Passerini.

1.5 Objectivos

O desenvolvimento de metodologias de inclusão de $C_{\alpha,\alpha}$ -dialquilglicinas em sequências peptídicas vem abrir um grande leque de possibilidades na criação de peptidomiméticos e péptidos conformacionalmente constrangidos.

Face às suas características, a introdução destes resíduos em compostos com actividade biológica pode criar compostos análogos, que poderão igualmente possuir actividade biológica. Este tipo de aplicação pode ser usado para criar fármacos ou compostos líder para o desenvolvimento de novas terapias.

Sendo a Angiotensina II (AngII) um candidato a tal aplicação, este trabalho tem como objectivos, a proposta e síntese de antagonistas da AngII contendo $C_{\alpha,\alpha}$ -dialquilglicinas. Estas espécies serão fundamentalmente compostos peptídicos, mas dada a maior resistência das $C_{\alpha,\alpha}$ -dialquilglicinas à acção das enzimas digestivas, deverão ter uma maior biodisponibilidade que os antagonistas peptídicos existentes. Outro factor importante será o facto de estes resíduos incorporarem em si constrangimentos conformacionais, o que trará pistas importantes sobre a conformação (ou conformações) activa(s).

Os análogos da AngII desenhados serão modelados através da substituição de resíduos não funcionais (que não desempenham nenhum papel fundamental na activação do receptor) e métodos teóricos serão usados para a selecção de candidatos promissores.

A modelação de $C_{\alpha,\alpha}$ -dialquilglicinas e outros aminoácidos não codificados revelar-nos-á as suas características estruturais particulares e permitirá a parametrização destes resíduos, possibilitando a simulação de sequências contendo estes aminoácidos.

Uma metodologia para a síntese destes compostos será também elaborada, usando preferencialmente, técnicas de síntese em solução.

Referências:

- (1) Mavromoustakos, T.; Kolocouris, A.; Zervou, M.; Roumelioti, P.; Matsoukas, J.; Weisemann, R. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1714-1722.
- (2) Spyroulias, G. A.; Nikolakopoulou, P.; Tzakos, A.; Gerothanassis, I. P.; Magafa, V.; Manessi-Zoupa, E.; Cordopatis, P. *Eur J Biochem* **2003**, *270*, 2163-2173.
- (3) Timmermans, P. B. M. W. M.; Wong, P. C.; Chiu, A. T.; Herblin, W. F.; Benfield, P.; Carini, D. J.; Lee, R. J.; Wexler, R. R.; Saye, J. A. M.; Smith, R. D. *Pharmacol Rev* **1993**, *45*, 205-251.
- (4) de Gasparo, M.; Catt, K. J.; Inagami, T.; Wright, J. W.; Unger, T. *Pharmacol Rev* **2000**, *52*, 415-472.
- (5) *Nature Rev. Drug Disc.* **2004**, *3*, 577.
- (6) Underwood, D. J.; Prendergast, K. *Chemistry & Biology* **1997**, *4*, 239-248.
- (7) Thompson, M. D.; Burnham, W. M.; Cole, D. E. C. *Crit. Rev. Clin. Lab. Scien.* **2005**, *42*, 311 - 389.
- (8) Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Trong, I. L.; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; Yamamoto, M.; Miyano, M. *Science* **2000**, *289*, 739-745.
- (9) Cherezov, V.; Rosenbaum, D. M.; Hanson, M. A.; Rasmussen, S. G. F.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Choi, H.-J.; Kuhn, P.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K.; Stevens, R. C. *Science* **2007**, *318*, 1258-1265.
- (10) Furuta, H.; Guo, D.-F.; Inagami, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *183*, 8-13.
- (11) Santos, E. L.; Pesquero, J. B.; Oliveira, L.; Paiva, A. C. M.; Costa-Neto, C. M. *Reg. Pept.* **2004**, *119*, 183.
- (12) Dina, R.; Jafari, M. *Am J Health-Syst Pharm* **2000**, *57*, 1231-1238.
- (13) Koike, G.; Horiuchi, M.; Yamada, T.; Szpirer, C.; Jacob, H. J.; Dzau, V. *J. Biochem. l Biophys. Res. Commun.* **1994**, *203*, 1842-1850.
- (14) Duncia, J. V.; Carini, D. J.; Chiu, A. T.; Johnson, A. L.; Price, W. A.; Wong, P. C.; Wexler, R. R.; Timmermans, P. B. M. W. M. *Med. Res. Rev.* **1992**, *12*, 149-191.
- (15) Berl, T. *J Am Soc Nephrol* **2004**, *15*, S71-76.

- (16) Zorba Paster, R.; Snively, D. B.; Sweet, A. R.; Draper, R. A.; Goldberg, A. I.; Soffer, B. A.; Sweet, C. S. *Clin. Therap.* **1998**, *20*, 978.
- (17) Aburi, M.; Smith, P. E. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 1997-2008.
- (18) Cramer, C. J. *Essentials of Computational Chemistry, Theories and Models*; Second Edition ed.; John Wiley & Sons Ltd: Chichester, 2004.
- (19) Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5179-5197.
- (20) Kollman, S. J. W. P. A.; Nguyen, D. T.; Case, D. A. *J. Comp. Chem.* **1986**, *7*, 230-252.
- (21) Langley, D. R. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1998**, *16*, 487-508.
- (22) Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. *J. Comp. Chem.* **1983**, *4*, 187-217.
- (23) Nilsson, L.; Karplus, M. *J. Comp. Chem.* **1986**, *7*, 591-616.
- (24) Patel, S.; III, C. L. B. *J. Comp. Chem.* **2004**, *25*, 1-16.
- (25) Murrall, N. W.; Davies, E. K. *J. Chem. Inf. Comp. Scien.* **1990**, *30*, 312-316.
- (26) Lifson, S.; Hagler, A. T.; Dauber, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 5111-5121.
- (27) Hwang, M. J.; Stockfish, T. P.; Hagler, A. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2515-2525.
- (28) Ewig, C. S.; Berry, R.; Dinur, U.; Hill, J.-R.; Hwang, M.-J.; Li, H.; Liang, C.; Maple, J.; Peng, Z.; Stockfish, T. P.; Thacher, T. S.; Yan, L.; Ni, X.; Hagler, A. T. *J. Comp. Chem.* **2001**, *22*, 1782-1800.
- (29) Mayo, S. L.; Olafson, B. D.; Goddard, W. A. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 8897-8909.
- (30) Kang, Y. K.; No, K. T.; Scheraga, H. A. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 15588-15598.
- (31) Shi, S.; Yan, L.; Yang, Y.; Fisher-Shaulsky, J.; Thacher, T. *J. Comp. Chem.* **2003**, *24*, 1059-1076.
- (32) Daura, X.; Mark, A. E.; Gunsteren, W. F. V. *J. Comp. Chem.* **1998**, *19*, 535-547.
- (33) Lukas D. Schuler; Daura, X.; Gunsteren, W. F. v. *J. Comp. Chem.* **2001**, *22*, 1205-1218.

- (34) Burkert, U. a. A., N.L. *Molecular Mechanics, ACS Monograph 177*; American Chemical Society: Washington, 1982.
- (35) Allinger, N. L.; Yuh, Y. H.; Lii, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8551-8566.
- (36) Stewart, E. L.; Nevins, N.; Allinger, N. L.; Bowen, J. P. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5350-5360.
- (37) Allinger, N. L.; Chen, K.; Lii, J.-H. *J. Comp. Chem.* **1996**, *17*, 642-668.
- (38) Lii, J.-H.; Chen, K.-H.; Allinger, N. L. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 3006-3015.
- (39) Halgren, T. A. *J. Comp. Chem.* **1996**, *17*, 490-519.
- (40) Halgren, T. A. *J. Comp. Chem.* **1996**, *17*, 520-552.
- (41) Halgren, T. A. *J. Comp. Chem.* **1996**, *17*, 553-586.
- (42) Halgren, T. A.; Nachbar, R. B. *J. Comp. Chem.* **1996**, *17*, 587-615.
- (43) Halgren, T. A. *J. Comp. Chem.* **1996**, *17*, 616-641.
- (44) Bernhardt, P. V.; Comba, P. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 2638-2644.
- (45) Jorgensen, W. L.; Tirado-Rives, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1657-1666.
- (46) Kaminski, G. A.; Friesner, R. A.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 6474-6487.
- (47) Fabricius, J.; Engelsen, S. B.; Rasmussen, K. *J. Carbohydrate Chem.* **1997**, *16*, 751 - 772.
- (48) Kaminski, G. A.; Stern, H. A.; Berne, B. J.; Friesner, R. A.; Cao, Y. X.; Murphy, R. B.; Zhou, R.; Halgren, T. A. *J. Comp. Chem.* **2002**, *23*, 1515-1531.
- (49) Allured, V. S.; Kelly, C. M.; Landis, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1-12.
- (50) Clark, M.; III, R. D. C.; Opdenbosch, N. V. *J. Comp. Chem.* **1989**, *10*, 982-1012.
- (51) Chen, B.; Potoff, J. J.; Siepmann, J. I. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 3093-3104.
- (52) Rappe, A. K.; Casewit, C. J.; Colwell, K. S.; Goddard, W. A.; Skiff, W. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10024-10035.
- (53) Casewit, C. J.; Colwell, K. S.; Rappe, A. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10035-10046.

- (54) Casewit, C. J.; Colwell, K. S.; Rappe, A. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10046-10053.
- (55) Root, D. M.; Landis, C. R.; Cleveland, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4201-4209.
- (56) Frenkel, D.; Smit, B. *Understanding Molecular Simulation, From Algorithms to Applications*; 2nd edition ed.; Academic Press: London, 2002; Vol. 1.
- (57) Allen, M. P.; Tildesley, D. J. *Computer Simulation of Liquids*; Oxford University Press: New York, 1987.
- (58) Ulrich, E.; Lalith, P.; Max, L. B.; Tom, D.; Hsing, L.; Lee, G. P. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 8577-8593.
- (59) Bailey, P. D. *An Introduction to Peptide Chemistry*; John Wiley & Sons: Sussex, 2001.
- (60) Jones, J. *The Chemical Synthesis of Peptides*; Oxford University Press: New York, 1994.
- (61) *The Peptides - Analysis, Synthesis, Biology*; Academic Press: New York, 1979; Vol. Vol.1 - Major Methods of Peptide Bond Formation.
- (62) Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillessen, D. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927-1930.
- (63) Fu, Y.; Hammarstrom, L. G. J.; Miller, T. J.; Fronczek, F. R.; McLaughlin, M. L.; Hammer, R. P. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7118-7124.
- (64) Valle, G.; Crisma, M.; Bonora, G. M.; Toniolo, C.; Lelj, F.; Barone, V.; Fraternali, F.; Hardy, P. M.; Langran-Goldsmith, A.; Maia, H. L. S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1990**, 1481-1487.

2 Simulações moleculares

2.1. Contextualização

Como foi referido anteriormente, a AngII é uma hormona que desempenha um papel crucial no mecanismo de regulação da tensão arterial. A sua interacção com o seu receptor At1 desencadeia uma série de respostas fisiológicas que levam ao aumento do valor da tensão arterial. O bloqueio desta activação, através da administração de antagonistas da AngII, é uma abordagem possível para o combate à hipertensão.

Existem vários antagonistas peptídicos da AngII, mas estes são rapidamente decompostos por enzimas gastrointestinais e apresentam um tempo de vida no plasma sanguíneo muito limitado ^{1,2}. De modo a contornar este problema, propusemo-nos a desenhar candidatos a antagonistas da AngII, através da substituição de alguns dos seus resíduos por dialquilglicinas e outros aminoácidos não codificados.

Existem fortes evidências da importância dos resíduos Arg2, Tyr4, His6 e carboxilato terminal para a interacção com o receptor ³⁻⁶. Estudos de relação estrutura-actividade têm vindo a mostrar que:

- a) O carácter agonista/antagonista do análogo está fortemente ligada ao resíduo 8. Antagonistas de tipo I, caracterizados por velocidades lentas de ressensibilização do receptor, podem ser obtidos por substituição da Phe8 por um resíduo alifático ⁷. Antagonistas de tipo II, caracterizados por velocidades rápidas de ressensibilização do receptor, podem ser obtidos, metilando o grupo hidróxido da cadeia lateral do resíduo Tyr4 ⁷.
- b) A mutação do resíduo Asp1 por um resíduo apolar (como a Sar) aumenta a potência de tanto agonistas como antagonistas análogos da AngII ^{7,8}.
- c) As posições 3, 5, e 7 são ocupadas por aminoácidos que não estão directamente envolvidos na activação e interacção com o receptor, embora desempenhem um papel essencial na manutenção da estrutura conveniente para esta interacção ¹. Desta forma, a substituição destes resíduos revela-se possível para a obtenção de antagonistas potentes da AngII ^{1,9}.

Face à informação recolhida, desenvolvemos uma estratégia de desenho de candidatos a antagonistas da AngII, baseada nos seguintes pontos:

- a) Substituição do resíduo Asp1 pelo resíduo Sar1;
- b) Substituição de resíduos estruturais, não essenciais à activação e/ou interacção (Val3, Ile5 e Pro7), por aminoácidos não codificados que preservem uma estrutura conveniente;
- c) Substituição do resíduo Phe8 por um aminoácido com cadeia(s) lateral(ais) alifática(s) (por exemplo a isoleucina ou uma dialquilglicina).

A presença de aminoácidos sintéticos, não codificados pelo ADN, torna os péptidos que os contêm mais resistentes à acção das enzimas digestivas. Desta forma, esperamos aumentar os tempos de vida dos péptidos modelados após serem administradas a um organismo vivo ¹⁰.

A estrutura tridimensional (3D) do receptor At1 não foi ainda determinada experimentalmente. Além disso, como o número de estruturas homólogas desta proteína com estruturas 3D determinadas experimentalmente é muito restrito, a obtenção de um modelo computacional para estrutura deste receptor torna-se pouco viável. Por isso, adoptámos uma estratégia de selecção dos candidatos a antagonistas baseada na estrutura dos ligandos. Neste trabalho, efectuámos estudos estruturais através da modelação e simulação moleculares da AngII e de alguns dos seus antagonistas peptídicos.

Foi necessário parametrizar previamente os resíduos sintéticos. Os cálculos quânticos envolvidos nesta parametrização foram efectuados, usando o programa Gaussian98 ¹¹, num computador Alpha Digital Personal Work Station 600au. Os cálculos de mecânica e dinâmica molecular foram efectuados num computador bi-processador Pentium IV, com o programa AMBER 6 ¹², usando a energia potencial AMBER/parm99 modificada com a inclusão dos parâmetros desenvolvidos neste trabalho.

2.2. Parametrização de aminoácidos não codificados

As funções de energia potencial mais usados na simulação de biomoléculas, (por exemplo AMBER^{12,13}, CHARMM¹⁴ e GROMOS¹⁵) não incluem a parametrização dos aminoácidos não codificados pelo ADN. Nestas circunstâncias, foi necessário calcular parâmetros correspondentes a estes resíduos. O programa e a energia potencial AMBER¹² foram escolhidos para este efeito, uma vez que utilizam uma estratégia de parametrização bem definida (fundamentalmente no que respeita à parametrização das cargas pontuais atribuídas a cada átomo)¹³. Isto permitiu que a nossa parametrização fosse efectuada de uma forma consistente com a função de energia potencial original.

Os aminoácidos parametrizados são indicados na figura 16. A sua parametrização foi realizada tendo em conta a posição onde seriam inseridos na cadeia peptídica (posições N-terminal, C-terminal e inseridas no meio da cadeia).

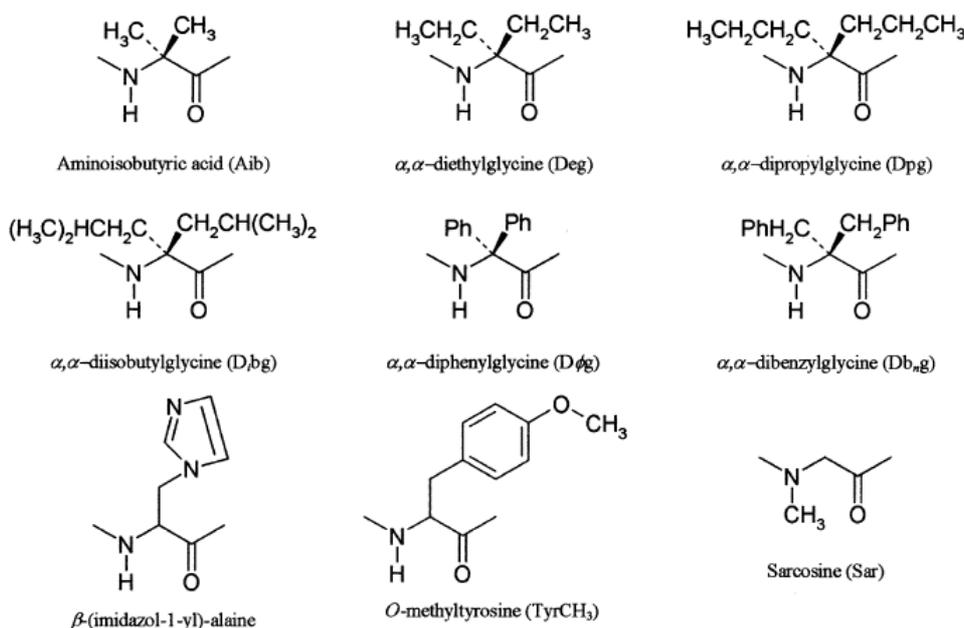


Figura 16. Aminoácidos não codificados por ADN parametrizados.

Foram utilizados modelos truncados duma cadeia peptídica, na qual se simularam as diferentes posições relativas possíveis na cadeia, usando grupos metilamina e/ou acetilo. A forma genérica destes fragmentos pode ser observada na figura 17.

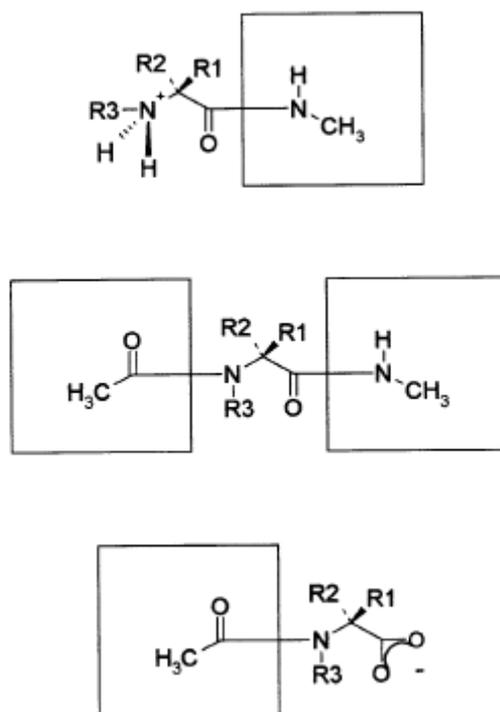


Figura 17. Forma geral dos modelos usados para parametrizar os aminoácidos, simulando as diferentes posições possíveis de ocupação numa cadeia peptídica.

Uma vez que os parâmetros a desenvolver são destinados à função energia potencial AMBER¹², a atribuição do tipo de átomo seguiu a mesma convenção. Foi apenas necessário introduzir um novo tipo de átomo (o azoto N_γ da β -(imidazol)-1-yl)alanina).

De modo a que as cargas pontuais das dialquilglicinas tenham uma menor dependência estrutural, foi seguida uma abordagem multiconfiguracional para a sua determinação. Nesta aproximação, foi efectuada uma análise conformacional usando os dois ângulos diedros χ_1 e χ_2 (figura 18).

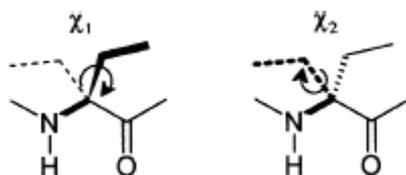


Figura 18. Representação dos ângulos de diedro das cadeias laterais, usados na pesquisa conformacional realizada.

Esta análise conformacional foi efectuada usando o método semi-empírico AM1¹⁶. Ambos os ângulos diedros variaram entre 0 ° e 360 ° com incrementos de 10 °. Os resultados obtidos, para cada resíduo parametrizado, foram representados na forma de um mapa conformacional. Cada um destes mapas apresenta 1369 pontos e permitiu-nos identificar as conformações mais relevantes. Como critério para identificação destas conformações, foram considerados todos os mínimos locais cuja energia fosse maior ou igual a 3 kcal mol⁻¹ relativamente ao mínimo absoluto (figura 19).

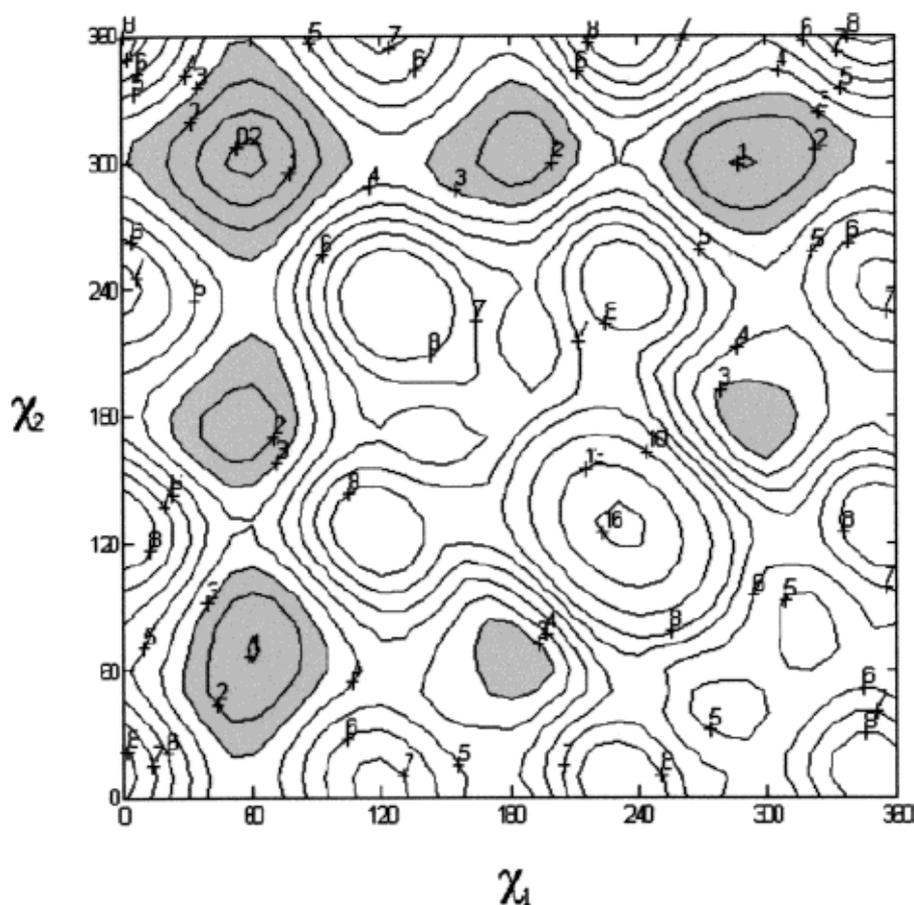


Figura 19. Mapa conformacional obtido para a Dietilglicina (Deg) em posição C-terminal. As zonas cinzentas indicam os mínimos locais identificados.

Cada um dos mínimos locais, identificados para um dado resíduo, foi posteriormente otimizado usando um nível de tratamento quântico Hartree-Fock/6-31G(d)¹⁷. As cargas pontuais dos seus átomos foram então calculadas, usando uma metodologia que combina o método de Merz-Kollman^{13,18} com uma abordagem multiconfiguracional¹⁹⁻²¹, em consistência com a parametrização da função energia

potencial AMBER. De acordo esta metodologia, as populações de Boltzman normalizadas são usadas com factores de peso de cada mínimo local. As figuras 20 e 21 mostram as topologias e as cargas pontuais atribuídas a cada resíduo parametrizado.

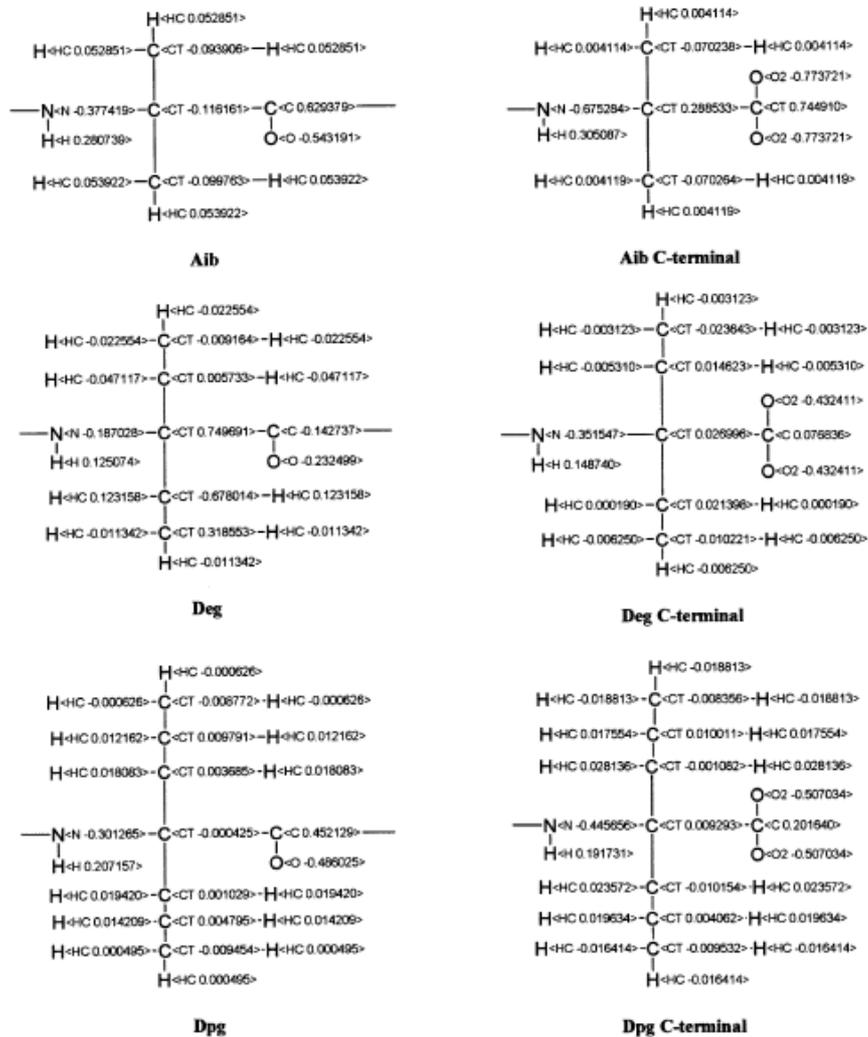


Figura 20. Cargas pontuais e tipos de átomos atribuídos aos resíduos Aib, Deg e Dpg. Foram consideradas as posições C-terminal e no seio da cadeia peptídica.

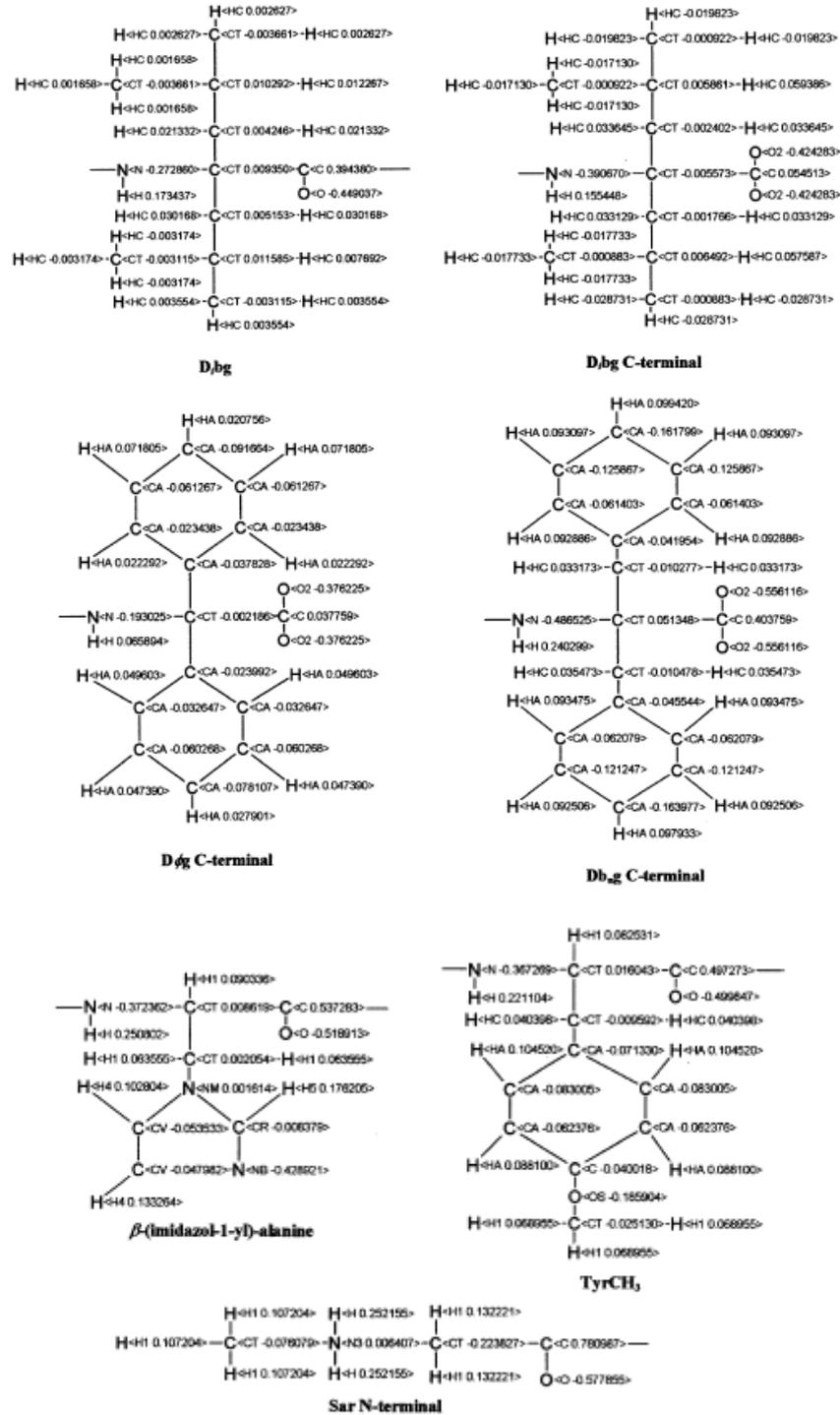


Figura 21. Cargas pontuais e tipos de átomos atribuídos aos resíduos B, bg, (em posições C-terminal e no seio da cadeia peptídica), D, ðg e D, b, g (ambos em posição C-terminal), ð-(imidazol-1-yl)-alanina e TyrCH₃ (ambos parametrizados como estando no seio da cadeia peptídica) e Sar (em posição N-terminal).

A maioria dos parâmetros ligantes em falta foi determinada a partir parâmetros similares do AMBER e de outras funções energia potencial similares. Para este efeito, foram efectuadas comparações entre topologias e valores de parâmetros geométricos obtidos através das optimizações efectuadas. Apenas dois ângulos diedros tiveram que ser parametrizados de raiz, uma vez que não existiam nenhuns parâmetros geométricos semelhantes nas funções energia potencial disponíveis. Estes parâmetros são os ângulos diedros X-C-OS-X (que define a torção existente entre o carbono “para” da cadeia lateral de Tyr(CH₃) e o oxigénio a ele ligado) e X-CT-NM-X (usado para modelar a ligação entre o C_β e o azoto a ele ligado, na cadeia lateral de β-(imidazol-1-yl)-alanina). A respectiva parametrização envolveu análises conformacionais em compostos modelo apropriados, efectuadas ao nível de tratamento quântico Hartree-Fock/6-31G(d) ¹⁷. Os ângulos diedro em estudo foram variados entre -180 ° e 180 ° com incrementos de 10 °. Cada ponto do espaço conformacional foi obtido, fixando o ângulo diedro correspondente e minimizando todos os outros parâmetros geométricos. Desta forma foram obtidas estruturas mínimas percorrendo a totalidade da torção em causa em intervalos regulares. Estas mesmas estruturas foram depois usadas para cálculos pontuais a nível clássico para aferir os valores energéticos clássicos. Os perfis energéticos obtidos serviram para ajustar heurísticamente os valores dos parâmetros clássicos, de modo a melhor representarmos estes diedros (figuras 22 e 23). Os parâmetros calculados são apresentados na tabela 3.

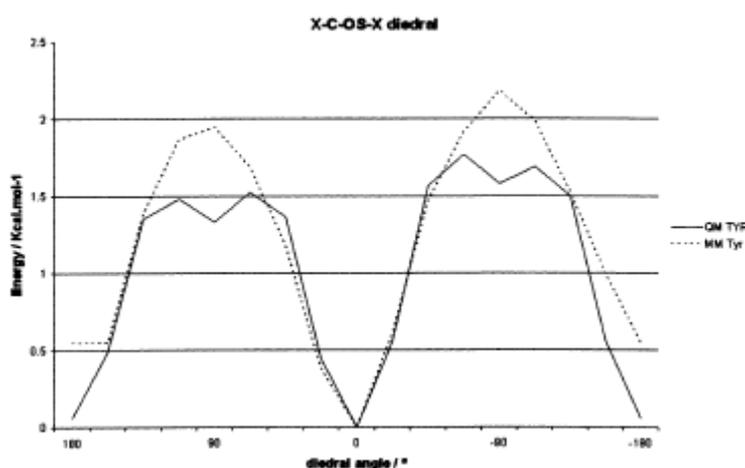


Figura 22. Comparação entre o perfil energético quântico e clássico (obtido com os parâmetros determinados para o diedro X-C-OS-X).

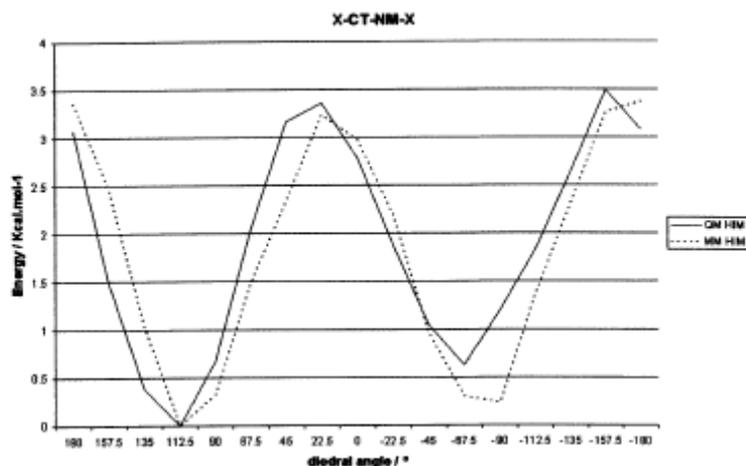


Figura 23. Comparação entre o perfil energético quântico e clássico (obtido com os parâmetros determinados para o diedro X-CT-NM-X).

De modo a avaliarmos a estabilidade dos parâmetros obtidos, efectuámos simulações por dinâmica molecular (MD) de diversos di e tripéptidos adequados. Todas as possibilidades de inserção (XXX-Gly, Gly-XXX-Gly ou Gly-XXX, onde XXX representa cada aminoácido não codificado) foram consideradas. Estas simulações foram efectuadas em ambiente aquoso, usando entre 1213 e 1787 moléculas de água do tipo TIP3P²² dentro de uma caixa cúbica com aproximadamente 30 Å de aresta. Estes sistemas foram modelados colocando cada péptido no centro de uma caixa de água pré-equilibrada, onde as moléculas de água cujos átomos se encontrassem a menos da soma dos raios de VDW com os átomos do soluto foram removidas. Cada sistema foi minimizado até que o gradiente energético fosse menor que 0,001 kcal mol⁻¹, usando 1000 passos de minimização com o algoritmo “*steepest descent*” e os restantes usando o algoritmo de gradientes conjugados. Efectuámos depois uma equilibração de 50 ps, à temperatura de 300 K, num *ensemble* NVT. O termóstato de Berendsen²³, com uma constante de acoplamento de 1 ps, foi usado para manter a temperatura constante.

Finalmente, efectuámos as simulações de produção durante 250 ps num *ensemble* NPT. O termóstato e baróstato de Berendsen²³, com constantes de acoplamento respectivamente de 1,0 e 0,2 ps, foram utilizados para manter constantes a temperatura (300 K) e a pressão (1 atm).

Tabela 3. Lista dos parâmetros ligantes adicionados ao campo de forças AMBER

Ligação	Fonte	Kr (kcal mol ⁻¹ Å ⁻²) ^a	r _{eq} ^b		
C-OS	CHARMM	365.0	1.38		
NM-CR	G98/AMBER	410.0	1.40		
CV-NM	G98/AMBER	410.0	1.40		
CV-CV	G98/AMBER	512.0	1.41		
CT-NM	G98/AMBER	337.0	1.427		
Ângulo		K _θ (kcal mol ⁻¹ rad ⁻²) ^c	θ _{eq} (°) ^d		
C-OS-CT	CHARMM	61.0	108.0		
CA-C-OS	CHARMM	55.0	120.0		
H4-CV-CV	G98/CHARMM	23.0	129.44		
NM-CV-CV	G98/CHARMM	65.0	106.1		
NM-CV-H4	G98/CHARMM	25.0	122.4		
NM-CR-H5	G98/CHARMM	25.0	122.6		
NM-CR-NB	G98/CHARMM	100.0	111.4		
CV-NM-CR	G98/CHARMM	70.0	106.5		
CV-CV-NB	G98/CHARMM	65.0	110.0		
H1-CT-NM	G98/AMBER	50.0	109.2		
H1-NM-CV	AMBER	50.0	109.5		
CT-NM-CV	G98/CHARMM	70.0	127.0		
CT-NM-CR	G98/CHARMM	70.0	126.4		
CT-CT-NM	G98/CHARMM	46.5	114.5		
CA-CT-C	CHARMM	70.0	109.47		
CA-CT-CA	CHARMM	70.0	109.47		
N-CT-CA	CHARMM	70.0	111.6		
Ângulo diedro		n path ^e	V _n /2 (kcal mol ⁻¹) ^f	γ (°) ^g	n ^h
X-C-OS-X	G98	2	0.850	180.0	2
X-NM-CV-X	AMBER	4	6.000	180.0	2
X-CT-NM-X	G98	6	1.725	0.0	2
X-NM-CR-X	AMBER	4	9.300	180.0	2
X-CV-CV-X	AMBER	4	14.500	10.0	2

^a Constante de força associada ao comprimento da ligação química. ^b distância de equilíbrio associada à ligação química. ^c Constante de força associada ao ângulo de ligação. ^d valor de equilíbrio para o ângulo de ligação. ^e parâmetro que divide o valor de V_n/2. ^f 1/2 do valor da barreira energética associada à torção. ^g Fase. ^h Periodicidade. Quando a fonte surge como G98/"função energia potencial", significa que o parâmetro foi escolhido da função energia potencial nomeada. Esta estimativa envolve uma comparação com os dados obtidos das minimizações efectuadas com o programa Gaussian 98.

Todas as simulações MD foram efectuadas com condições de fronteira periódicas (PBC), usando o algoritmo *leap-frog*²⁴ para a integração das equações de movimento com incrementos temporais de 1 fs. O algoritmo SHAKE²⁵ foi utilizado para constreger todas as ligações envolvendo átomos de hidrogénio e átomos pesados. As interacções electrostáticas de longa distância foram estimadas, usando uma metodologia PME^{26,27}. Um modelo contínuo foi usado para avaliar as interacções de VDW. Foi usada uma distância de *cutoff* de 12 Å e uma *skin* de 2 Å, para gerar a lista de

interacções não ligantes. Esta foi actualizada sempre que um átomo se deslocava mais do que 1 Å desde a última actualização. As interacções electrostáticas foram truncadas a uma distância igual à soma da distância de “*cutoff*” e da “*skin*”, enquanto que as interacções de VDW e electrostáticas 1-4 foram truncadas à distância de “*cutoff*”. Para além disto, de modo a não sobrevalorizar as interacções não ligantes entre átomos da mesma molécula, as interacções de VDW 1-4 foram escaladas por um factor de 2 e as interacções electrostáticas 1-4 foram escaladas por um factor de 1,2.

Todas as simulações efectuadas atingiram o equilíbrio rapidamente em aproximadamente 10 ps. Características estruturais, como a planaridade da ligação peptídica e os ângulos diedros da cadeia peptídica φ e ψ , foram monitorizadas ao longo do tempo. As dialquilglicinas com cadeia laterais mais longas, quando inseridos nos pequenos péptidos simulados, mostram uma preferência por conformações em que tanto φ como ψ apresentam valores próximos de 180 °. Quando os aminoácidos parametrizados se encontravam numa posição terminal, encontrámos uma maior variabilidade conformacional. Estes resultados são concordantes com trabalhos anteriormente apresentados por outros autores ²⁸. Na figura 24, é apresentado um exemplo característico observado no péptido Gly-Deg-Gly.

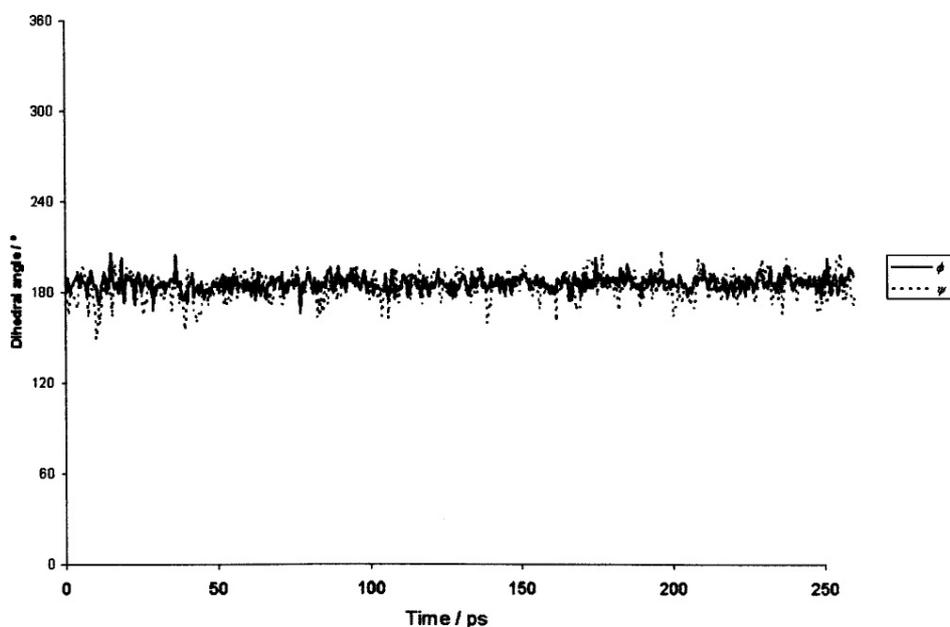


Figura 24. Comportamento dos ângulos da cadeia peptídica φ e ψ , do aminoácido Deg no decurso da simulação realizada sobre o péptido Gly-Deg-Gly.

Todos os parâmetros definidos mostraram uma boa estabilidade nas simulações efectuadas. Desta forma, demonstrámos que estes parâmetros podiam ser utilizados na simulação dos análogos da AngII anteriormente referidos.

2.3 Simulações moleculares da angiotensina II em diferentes meios

De modo a podermos avaliar o comportamento conformacional da AngII, efectuámos simulações MD no vácuo, em meio aquoso e em solução de DMSO. Este último solvente apresenta uma polaridade intermédia, pelo que pode ser considerado como uma representação aproximada do meio em que se encontra a AngII no local de interacção com o seu receptor At1.

A simulação MD da AngII no vácuo foi efectuada durante 2 ns. Os dois sistemas modelo em solução foram construídos colocando uma molécula de AngII, com a geometria obtida por técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) em DMSO²⁹, no centro de duas caixas de solvente de dimensão apropriada. Estas caixas foram pré-equilibradas, usando simulações MD efectuadas nos *ensembles* NVT e NPT. O sistema modelo aquoso continha 3260 moléculas de água TIP3P²² numa caixa cúbica com 50,985 Å de aresta. O sistema modelo em DMSO continha 772 moléculas deste solvente do tipo OPLS³⁰, numa caixa cúbica com 48,73 Å de aresta. A geometria inicial deste sistema foi criada com o programa PACKMOL³¹. As médias de *ensemble* associadas a propriedades termodinâmicas e estruturais foram então calculadas, usando dados apropriados que foram registados a cada 50 passos (50 fs).

Os dois sistemas modelo foram depois optimizados, mantendo o soluto fixo, até que os gradientes energéticos fossem menores $0,0001 \text{ kcal mol}^{-1}$. Foram necessários 2000 passos efectuados com o algoritmo de *steepest descent* e cerca de 18000 passos com o algoritmo de gradientes conjugados para obter este resultado. Cada sistema foi então sujeito a um gradiente de temperatura entre 0 K e 300 K, durante 50 ps. Efectuámos depois as respectivas equilibrações a 300 K num *ensemble* NVT, usando o termóstato de Berendsen²³ com uma constante de acoplamento de 1 ps, durante aproximadamente 50 ps. Em seguida, efectuámos as equilibrações dos sistemas modelo num *ensemble* NPT à temperatura 300 K e pressão de 1 atm. Este passo foi extremamente rápido na solução aquosa (50 ps), mas relativamente lento (2 ns) na solução de DMSO. A fase de produção, efectuada no mesmo *ensemble*, foi de 2 ns em cada caso. O termóstato e baróstato de Berendsen²³, com constantes de acoplamento respectivamente de 1,0 e 0,2 ps, foram utilizados para manter constantes a temperatura (300 K) e a pressão (1 atm) em todas as simulações efectuadas num *ensemble* NPT.

Todas as simulações MD foram efectuadas com condições de fronteira periódicas (PBC), usando o algoritmo de *leap-frog*²⁴ para a integração das equações de

movimento com incrementos temporais de 1 fs. O algoritmo SHAKE²⁵ foi utilizado para restringir todas as ligações envolvendo átomos de hidrogénio e átomos pesados. As interações electrostáticas de longa distância foram estimadas, usando uma metodologia PME^{26,27}. Um modelo contínuo foi usado para avaliar as interações de VDW. Foi usada uma distância de “*cutoff*” de 12 Å e uma “*skin*” de 2 Å, para gerar a lista de interações não ligantes. Esta foi actualizada sempre que um átomo se deslocava mais do que 1 Å desde a última actualização. As interações electrostáticas foram truncadas a uma distância igual à soma da distância de *cutoff* e da *skin*, enquanto que as interações de VDW e electrostáticas 1-4 foram truncadas à distância de *cutoff*. Para além disto, de modo a não sobrevalorizar as interações não ligantes entre átomos da mesma molécula, as interações de VDW 1-4 foram escaladas por um factor de 2 e as interações electrostáticas 1-4 foram escaladas por um factor de 1,2.

A caracterização das propriedades estruturais da AngII nos diversos meios simulados foi então efectuada, registando a evolução de alguns parâmetros geométricos ao longo de cada simulação. Foram considerados os seguintes parâmetros geométricos:

- Ângulos de diedro φ e ψ da cadeia peptídica.
- Distâncias entre o átomo C_α do resíduo i e o átomo C_α do resíduo $i+3$.
- Distâncias entre o átomo C_α do resíduo i e o átomo C_α do resíduo $i+4$.
- Ângulo O(Tyr)–H(Tyr)–N(His) (figura 25).
- Ângulo N_δ (His)-H(His)–O'(Phe) ou ângulo N_δ (His)-H(His)–O''(Phe) (figura 25).
- Ângulo entre os planos que contém os anéis aromáticos das cadeias laterais dos resíduos Tyr4 e His6.
- Ângulo entre os planos do anel aromático do resíduo His(6) e os átomos do grupo carboxilato (Phe8) terminal.
- Distância entre os átomos H(Tyr) e N_ϵ (His) (figura 25).
- Distância entre os átomos H(His) e O'(Phe) ou O''(Phe) (figura 25).

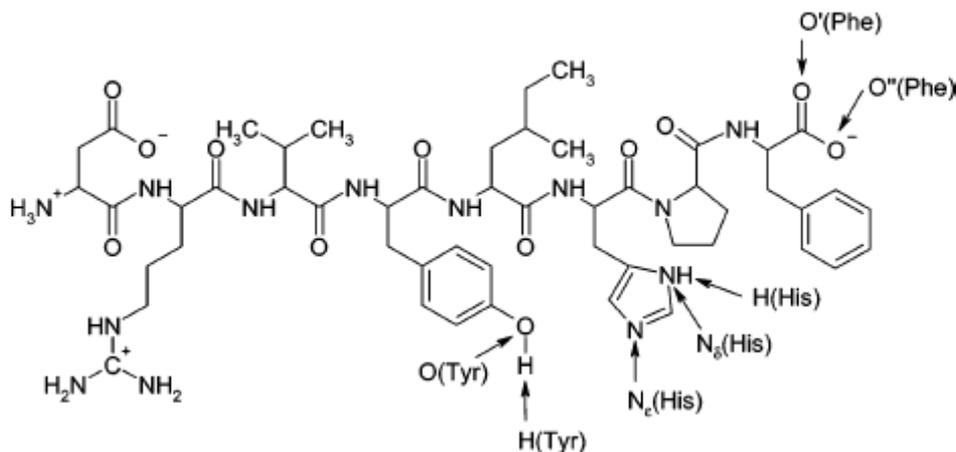


Figura 25. Indicação dos átomos da ANGII relevantes para a discussão da análise estrutural realizada.

A análise realizada aos ângulos de diedro da cadeia peptídica envolveu o estudo da sua evolução temporal e a construção de diagramas probabilísticos ϕ vs. ψ (figura 26).

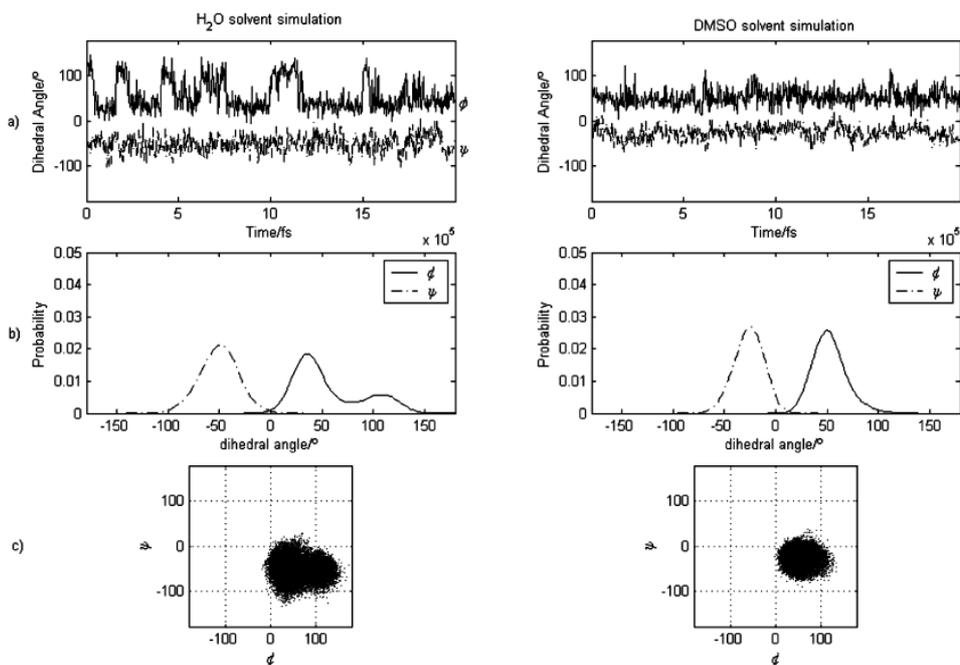


Figura 26. Representações típicas obtidas da análise dos ângulos de diedro da cadeia peptídica. O exemplo apresentado refere-se ao resíduo Arg2, mostrando: a) a evolução dos valores dos ângulos de diedro em função do tempo de simulação, b) a distribuição das populações de cada diedro e c) o espaço conformacional acessível ao resíduo durante a simulação.

Foram identificados apenas quatro conformações predominantes para a AngII na solução de DMSO. Esta hormona apresentou uma variabilidade conformacional significativamente maior em solução aquosa. De facto, dezasseis conformações

principais para a AngII nesta solução. A região C-terminal da AngII possui uma conformação muito bem definida em ambos os solventes. A correspondente região N-terminal é muito mais flexível, sendo responsável pela maior parte da variabilidade conformacional observada. No caso extremo da simulação realizada em vácuo, a AngII adota uma estrutura enrolada bastante conservada, com distâncias custas entre os grupos carregados. A figura 27 mostra claramente a influência que o meio tem no comportamento desta hormona.

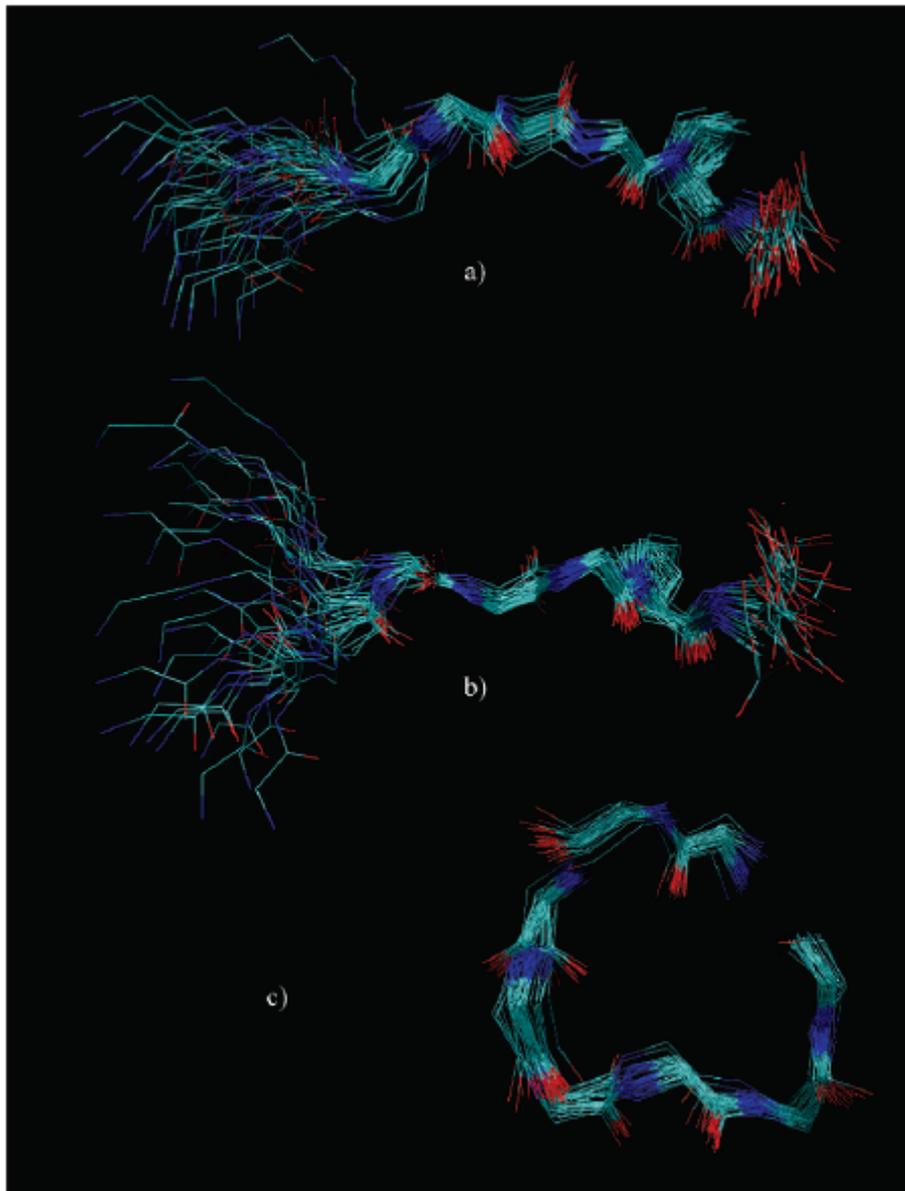


Figura 27. Sobreposição de estruturas da cadeia peptídica obtidas durante a simulação realizada em a) DMSO, b) água e c) vácuo. As estruturas foram recolhidas em intervalos de 50 ps e mostram um claro aumento de variabilidade conformacional com o aumento da polaridade do meio.

Podemos observar uma diminuição da variabilidade conformacional da cadeia peptídica, correspondendo ao aumento da importância das interações electrostáticas intermoleculares, com a diminuição da polaridade do meio.

A possibilidade de formação ligações de hidrogénio entre as cadeias laterais de Tyr4, His6 e o carboxilato terminal de Phe8 foi investigada. Valores típicos para uma ligação de hidrogénio oscilam entre 1,6 e 2,4 Å, com um ângulo de aproximadamente 180 °. Nas simulações efectuadas, não foram encontrados indícios de uma ligação de hidrogénio entre a cadeia lateral de Tyr4 e His6. Apesar disso, os anéis aromáticos destas duas cadeias laterais estão habitualmente orientados um para o outro. Por outro lado, a ligação de hidrogénio entre a cadeia lateral de His6 e o carboxilato terminal é conservada durante a maior parte da simulação em DMSO. Esta ligação só ocorre ocasionalmente na simulação em ambiente aquoso (figura 28). A figura 29 mostra o arranjo espacial destes três resíduos, bem como a proximidade entre os átomos envolvidos na ligação de hidrogénio.

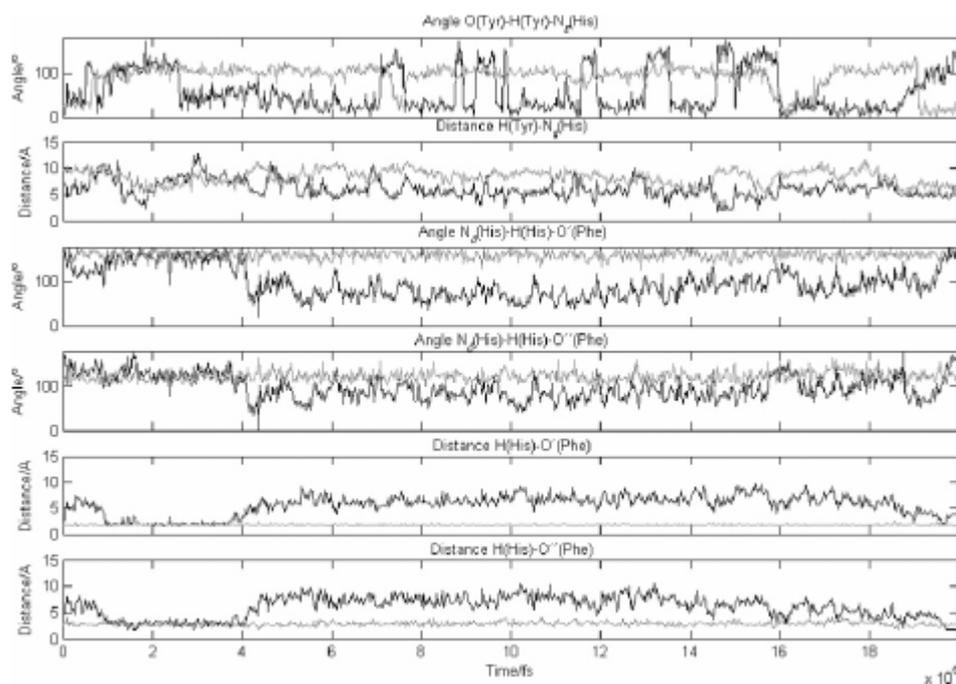


Figura 28. Evolução temporal de alguns dos parâmetros geométricos estudados. As linhas cinzentas indicam a simulação em DMSO e a linha preta mostra os dados relativos à simulação executada em ambiente aquoso.

Outra característica estrutural, identificada na simulação em DMSO, foi a presença de uma interacção electrostática forte entre as cadeias laterais de Asp1 e Arg2 (figura 30). De facto, estas cadeias laterais mantêm-se muito próximas uma da outra durante praticamente toda a simulação. Na simulação efectuada em água, esta interacção não foi identificada. Observámos que o momento polar da água é suficiente para estabilizar as duas cadeias laterais carregadas sem que elas interactuem.

Comparando as estruturas mínimas encontradas durante a simulação em DMSO e água (figura 31), encontrámos uma diferença substancial. A AngII assumiu uma conformação estendida na solução de DMSO e uma conformação dobrada em torno dos resíduos Val3 e Tyr4 na solução aquosa.

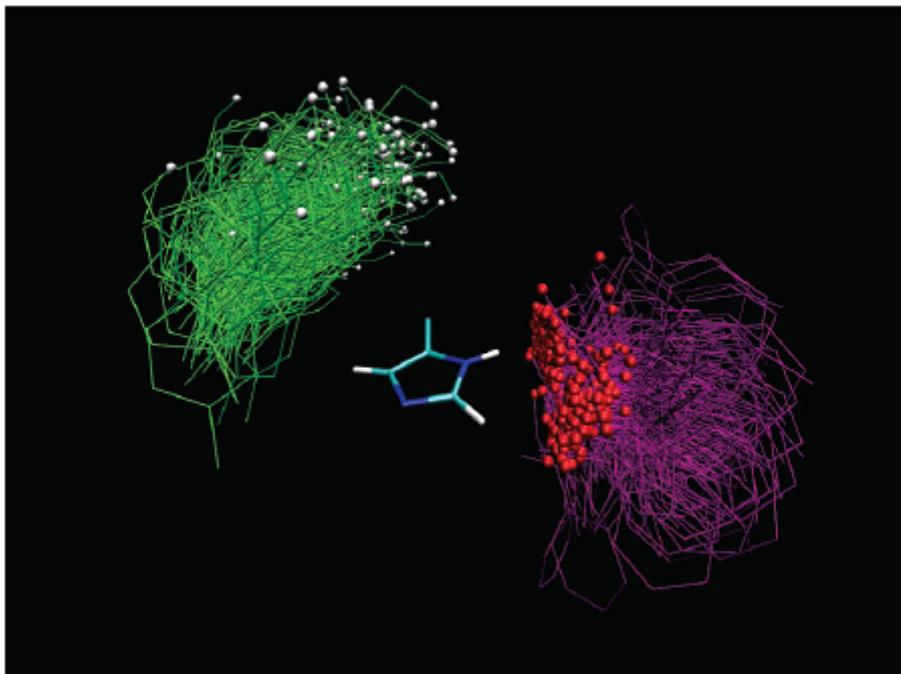


Figura 29. Sobreposição da cadeia lateral de His6, mostrando as disposições relativas da cadeia lateral de Tyr4 (verde) e Phe8 (púrpura), para a simulação realizada em DMSO. Os átomos de oxigénio do carboxilato terminal de Phe8 estão representados a vermelho.

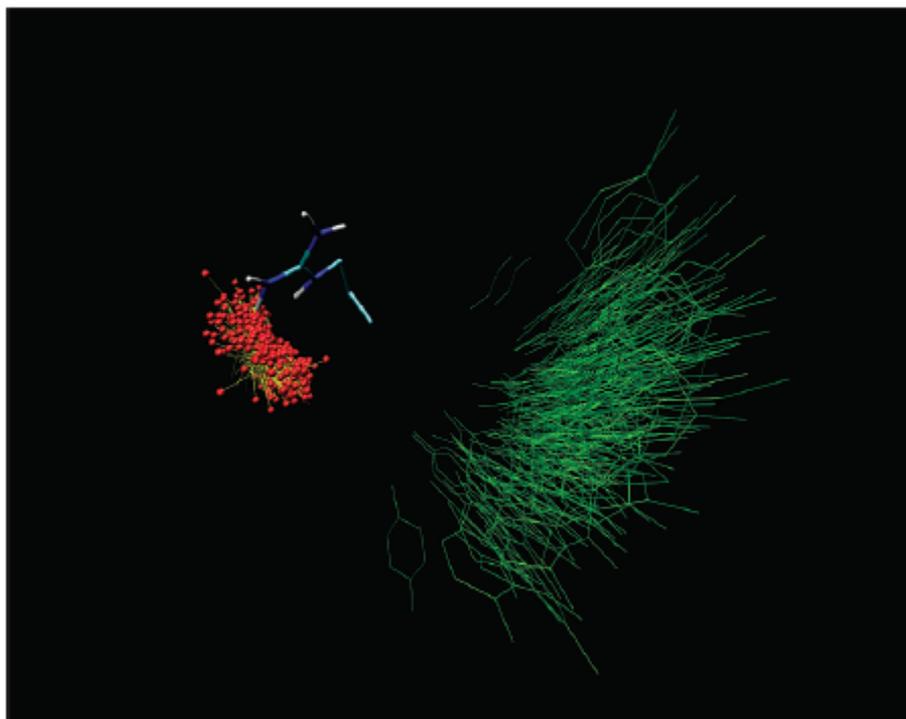


Figura 30. Sobreposição da cadeia lateral de Arg2, mostrando as disposições relativas da cadeia lateral de Asp1 (amarelo) e Tyr4 (verde), para a simulação realizada em DMSO. Os átomos de oxigênio do carboxilato da cadeia lateral de Asp1 estão representados a vermelho.

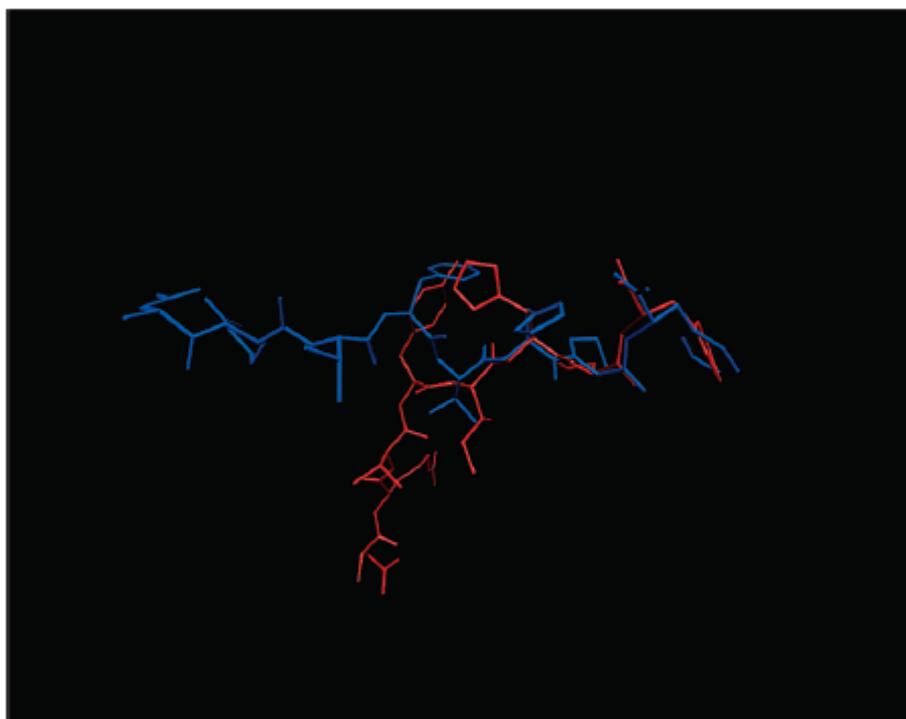


Figura 31. Estruturas de energia mínima da AngII, encontradas durante a simulação em DMSO (azul) e água (vermelho). A região C-terminal da AngII foi usada para a sobreposição, mostrando que é estruturalmente pouco afectada pela mudança de meio.

Uma vez que o DMSO é tido como uma melhor aproximação ao ambiente sentido pela AngII no local de interacção do seu receptor At1, pensamos que a conformação activa desta hormona será portanto próxima da apresentada neste solvente. Por outro lado, a estrutura da região C-terminal é bastante próxima em ambos os meios. Esta rigidez conformacional intrínseca sugere que os resíduos associados desempenham um papel importante na activação do receptor At1.

2.4 Simulações moleculares de antagonistas peptídicos da AngII e dos análogos modelados

Nesta secção, apresentamos os resultados obtidos nas simulações MD de análogos da AngII em DMSO. Selecionámos cinco antagonistas peptídicos da AngII do tipo I e treze análogos modelados seguindo a estratégia apresentada na secção 2.1 (ver tabela 4).

A geometria da AngII, obtida por RMN²⁹ em solução de DMSO, foi utilizada com ponto de partida na modelação dos sistemas em estudo. Foram efectuadas mutações apropriadas nesta sequência de modo a obter cada péptido em estudo.

Seguindo uma estratégia idêntica à apresentada na secção 2.3, cada análogo da AngII foi colocada no centro de uma caixa pré-equilibrada de DMSO. As características dos sistemas simulados são apresentadas na tabela 4. Foram usados contra-íões cloreto para neutralizar os sistemas carregados. Estes contra-íões foram colocados a menos de 4 Å do grupo amónio terminais.

As simulações efectuadas seguiram um protocolo semelhante ao apresentado na secção 2.3. Os sistemas modelo foram otimizados, mantendo o soluto fixo, até que os gradientes energéticos fossem menores $0,0001 \text{ kcal mol}^{-1}$. Foram necessários 2000 passos efectuados com o algoritmo de *steepest descent* e até um máximo de 18000 passos com o algoritmo de gradientes conjugados para obter este resultado. Cada sistema foi então sujeito a um gradiente de temperatura entre 0 K e 300 K, durante 50 ps. Efectuámos depois as respectivas equilibrações a 300 K num *ensemble* NVT, usando o termóstato de Berendsen²³ com uma constante de acoplamento de 1 ps, durante aproximadamente 250 ps. Em seguida, efectuámos as equilibrações dos sistemas modelo num *ensemble* NPT à temperatura 300 K e pressão de 1 atm. Este passo demorou aproximadamente 0,2 ns. A fase de produção, efectuada no mesmo *ensemble*, foi de 2 ns em cada caso. O termóstato e baróstato de Berendsen²³, com constantes de acoplamento respectivamente de 1,0 e 0,2 ps, foram utilizados para manter constantes a temperatura (300 K) e a pressão (1 atm) em todas as simulações efectuadas num *ensemble* NPT. Na secção de Anexos deste trabalho, está reunida um conjunto de dados relevantes destas simulações

Tabela 4. Lista dos análogos peptídicos da AngII, com as condições iniciais de cada sistema simulado. Os péptidos sombreados a cinzento são antagonistas da AngII de tipo I.

	Aresta inicial (Å)	Nº de moléculas de DMSO	Sequência							
			Res. 1	Res. 2	Res. 3	Res. 4	Res. 5	Res. 6	Res. 7	Res. 8
[Sar ¹ ,Aib ³ ,Ile ⁸]AngII	59.25	1393	Sar	Arg	Aib	Tyr	Ile	His	Pro	Ile
[Sar ¹ ,Aib ⁵ ,Ile ⁸]AngII	57.39	1221	Sar	Arg	Val	Tyr	Aib	His	Pro	Ile
[Sar ¹ ,Aib ⁷ ,Ile ⁸]AngII	58.97	1362	Sar	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Aib	Ile
[Sar ¹ ,Aib ⁸]AngII	57.21	1216	Sar	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Aib
[Sar ¹ ,Ile ⁸]AngII	57.45	1231	Sar	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Ile
Comp 1 [Sar ¹ ,Aib ³ ,Aib ⁵ ,Aib ⁸]AngII	51.61	941	Sar	Arg	Aib	Tyr	Aib	His	Pro	Aib
Comp 2 [Sar ¹ ,Dpg ⁸]AngII	53.61	978	Sar	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Dpg
Comp 3 [Sar ¹ ,Deg ⁸]AngII	53.43	967	Sar	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Deg
Comp 4 [Sar ¹ ,D,bg ⁸]AngII	53.18	961	Sar	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	D,bg
Comp 5 [Aib ³ ,Aib ⁵ ,Aib ⁸]AngII	51.23	921	Asp	Arg	Aib	Tyr	Aib	His	Pro	Aib
Comp 6 [Sar ¹ ,Db,g ⁸]AngII	51.04	908	Sar	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Db,g
Comp 7 [Sar ¹ ,Deg ³ ,Deg ⁵ ,Deg ⁸]AngII	53.53	948	Sar	Arg	Deg	Tyr	Deg	His	Pro	Deg
Comp 8 [Sar ¹ ,Dpg ³ ,Dpg ⁵ ,Dpg ⁸]AngII	53.86	994	Sar	Arg	Dpg	Tyr	Dpg	His	Pro	Deg
Comp 9 [Sar ¹ ,Deg ² ,Aib ⁵ ,Deg ⁸]AngII	53.54	985	Sar	Arg	Deg	Tyr	Aib	His	Pro	Deg
Comp 10 [Sar ¹ ,Deg ² ,Aib ⁵ ,Aib ⁸]AngII	57.56	1231	Sar	Arg	Deg	Tyr	Aib	His	Pro	Aib
Comp 11 [Sar ¹ ,Dpg ³ ,Aib ⁵ ,Dpg ⁸]AngII	58.31	1280	Sar	Arg	Dpg	Tyr	Aib	His	Pro	Dpg
Comp 12 [Sar ¹ ,Deg ⁵ ,Aib ⁷ ,Ile ⁸]AngII	57.07	1214	Sar	Arg	Val	Tyr	Deg	His	Aib	Ile
Comp 13 [Sar ¹ ,Deg ² ,Aib ⁵ ,Dpg ⁸]AngII	58.13	1266	Sar	Arg	Deg	Tyr	Aib	His	Pro	Dpg

Todas as simulações MD foram efectuadas com condições de fronteira periódicas (PBC), usando o algoritmo de *leap-frog*²⁴ para a integração das equações de movimento com incrementos temporais de 1 fs. O algoritmo SHAKE²⁵ foi utilizado para constrianger todas as ligações envolvendo átomos de hidrogénio e átomos pesados. As interações electrostáticas de longa distância foram estimadas, usando uma metodologia PME^{26,27}. Um modelo contínuo foi usado para avaliar as interações de VDW. Foi usada uma distância de *cutoff* de 12 Å e uma *skin* de 2 Å, para gerar a lista de interações não ligantes. Esta foi actualizada sempre que um átomo se deslocava mais

do que 1 Å desde a última actualização. As interacções electrostáticas foram truncadas a uma distância igual à soma da distância de *cutoff* e da *skin*, enquanto que as interacções de VDW e electrostáticas 1-4 foram truncadas à distância de *cutoff*. Para além disto, de modo a não sobrevalorizar as interacções não ligantes entre átomos da mesma molécula, as interacções de VDW 1-4 foram escaladas por um factor de 2 e as interacções electrostáticas 1-4 foram escaladas por um factor de 1,2.

Em analogia com as simulações da AngII, foram analisados determinadas características estruturais que parecem ser relevantes para a actividade biológica. A caracterização das propriedades estruturais dos análogos da AngII foi então efectuada, registando a evolução de alguns parâmetros geométricos ao longo de cada simulação. As médias de *ensemble* associadas foram então calculadas, usando dados apropriados que foram registados a cada 50 passos (50 fs). Esta metodologia permitiu-nos estabelecer relações estrutura-actividade relevantes.

Em analogia com o observado nas simulações da AngII, os valores de RMSD calculados indicam que a região C-terminal é consideravelmente mais rígida que a região N-terminal (tabela 5, figuras 32 e 33). Estes resultados são consistentes com estudos, previamente apresentados por outros autores^{6,32}, que indicam que a primeira região é fortemente responsável pela actividade biológica desta hormona.

O mecanismo de *charge-relay*, proposto por Matsoukas e col.²⁹, sugere que a activação do receptor At1 pela AngII estaria associada a um processo de transferência de protão conjugada. Neste processo, estariam envolvidas as cadeias laterais dos resíduos Tyr4 e His6 e o grupo carboxilato terminal. Para este mecanismo ser viável, seria necessário que os grupos envolvidos estabelecessem entre si um sistema conjugado de ligações de hidrogénio. No entanto, apesar das cadeias laterais da Tyr4 e His6 estarem orientados muitas vezes uma para a outra, quase nunca se verificou a formação de uma ligação de hidrogénio estável entre elas. Pelo contrário, a ligação de hidrogénio entre a cadeia lateral da His6 e o grupo carboxilato terminal foi observada em quase todos os péptidos simulados. Estes resultados são concordantes com os apresentados na secção 2.3 para as simulações da AngII.

Tabela 5. RMSD médio e desvio padrão relativos aos átomos da cadeia peptídica, para cada simulação (calculada para a totalidade da cadeia, para a região N-terminal (do resíduo 1 até ao resíduo 4) e para a região C-terminal (do resíduo 5 até ao resíduo 8)).

	Cadeia Total		Região N-terminal		Região C-terminal	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
AngII	1.156	0.495	0.733	0.289	0.264	0.094
[Sar ¹ ,Aib ³ ,Ile ⁸]AngII	2.285	0.228	0.962	0.188	0.447	0.186
[Sar ¹ ,Aib ⁵ ,Ile ⁸]AngII	2.485	0.252	0.868	0.213	0.369	0.263
[Sar ¹ ,Aib ⁷ ,Ile ⁸]AngII	1.877	0.518	1.006	0.229	0.325	0.092
[Sar ¹ ,Aib ⁸]AngII	3.017	0.131	0.920	0.249	0.514	0.072
[Sar ¹ ,Ile ⁸]AngII	2.394	0.271	0.924	0.184	0.724	0.162
Comp 1 [Sar ¹ ,Aib ³ ,Aib ⁵ ,Aib ⁸]AngII	2.434	0.647	1.367	0.296	0.837	0.224
Comp 2 [Sar ¹ ,Dpg ⁸]AngII	1.414	0.363	0.903	0.183	0.383	0.173
Comp 3 [Sar ¹ ,Deg ⁸]AngII	1.711	0.410	0.999	0.298	0.903	0.087
Comp 4 [Sar ¹ ,Dibg ⁸]AngII	2.174	0.186	0.556	0.171	1.355	0.155
Comp 5 [Aib ³ ,Aib ⁵ ,Aib ⁸]AngII	1.913	0.389	0.885	0.232	0.670	0.076
Comp 6 [Sar ¹ ,Db _n ⁸]AngII	2.183	0.374	0.933	0.223	0.466	0.187
Comp 7 [Sar ¹ ,Deg ³ ,Deg ⁵ ,Deg ⁸]AngII	1.493	0.243	1.329	0.128	0.317	0.118
Comp 8 Sar ¹ ,Dpg ³ ,Dpg ⁵ ,Dpg ⁸]AngII	2.651	0.302	0.878	0.199	1.040	0.103
Comp 9 [Sar ¹ ,Deg ³ ,Aib ⁵ ,Deg ⁸]AngII	2.382	0.481	1.387	0.206	0.355	0.100
Comp 10 [Sar ¹ ,Deg ³ ,Aib ⁵ ,Aib ⁸]AngII	2.150	0.593	0.836	0.210	0.327	0.095
Comp 11 [Sar ¹ ,Dpg ³ ,Aib ⁵ ,Dpg ⁸]AngII	2.396	0.237	0.904	0.196	0.462	0.095
Comp 12 [Sar ¹ ,Deg ⁵ ,Aib ⁷ ,Ile ⁸]AngII	2.665	0.196	1.064	0.201	1.341	0.117
Comp 13 [Sar ¹ ,Deg ³ ,Aib ⁵ ,Dpg ⁸]AngII	2.355	0.286	0.928	0.212	0.268	0.061

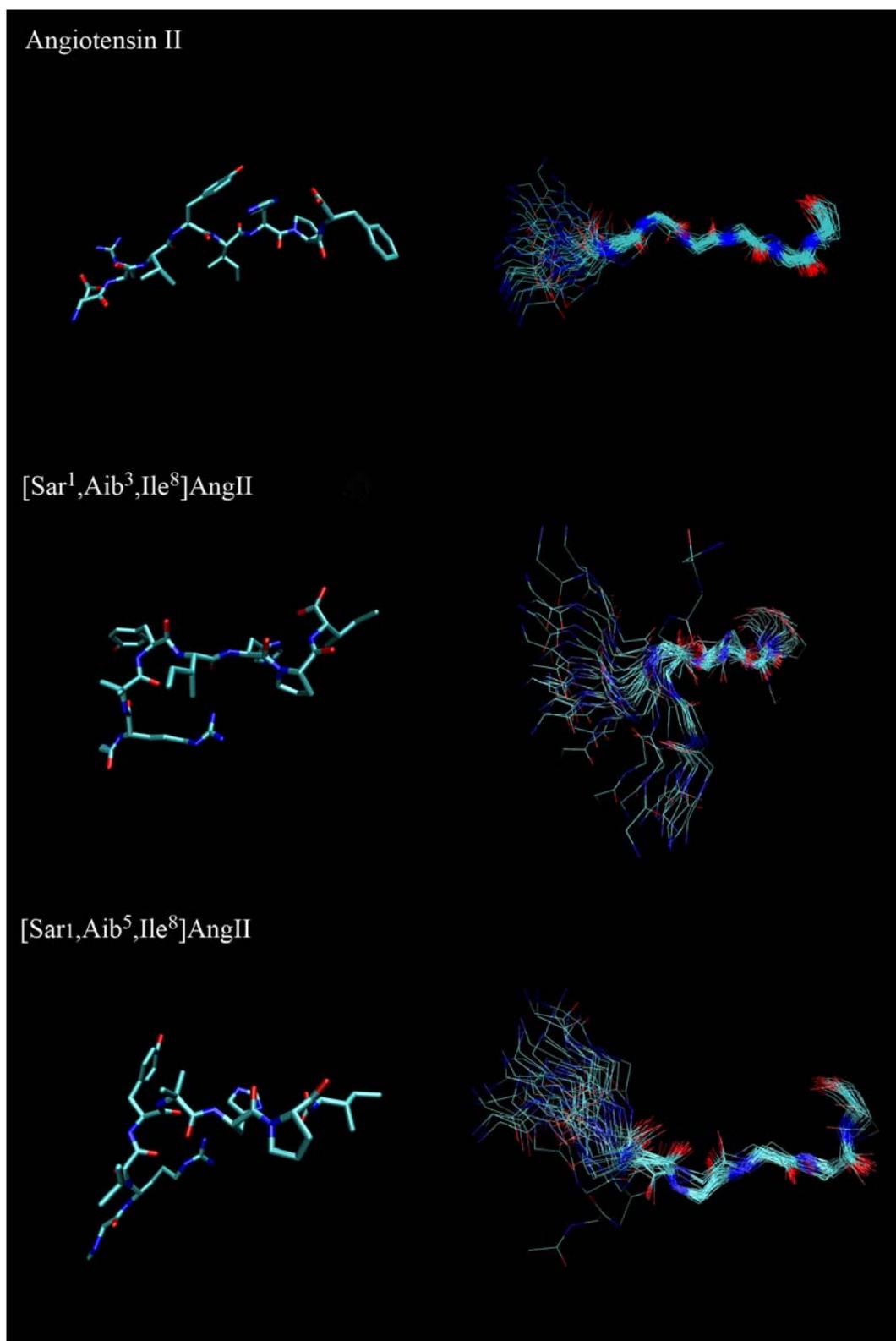


Figura 32. Estruturas de energia mínima e conformações da cadeia peptídica para cada antagonista simulado. A região do resíduo 4 ao resíduo 6 foi usada para a sobreposição das diferentes conformações da cadeia peptídica.

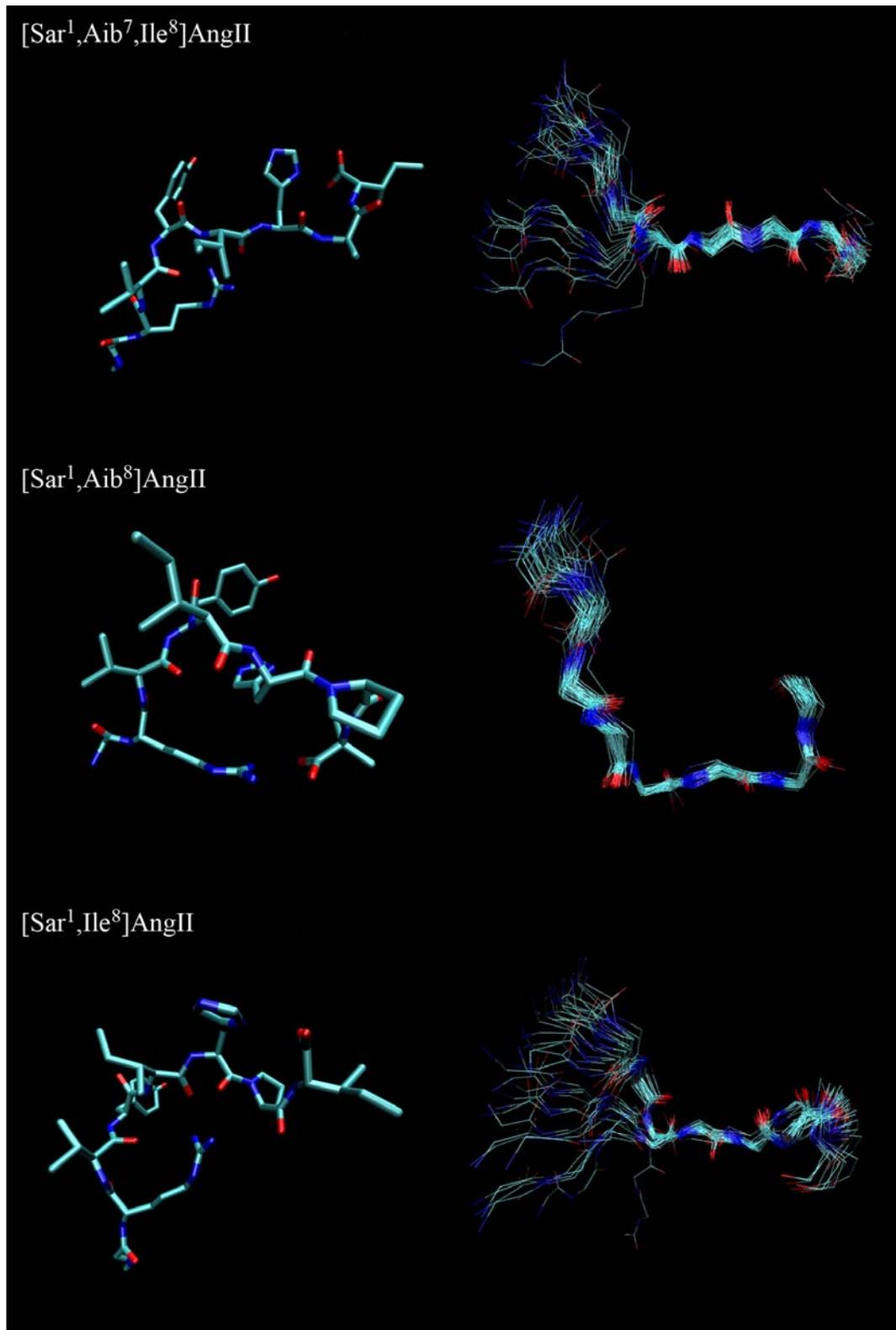


Figura 33. Estruturas de energia mínima e conformações da cadeia peptídica para cada antagonista simulado. A região do resíduo 4 ao resíduo 6 foi usada para a sobreposição das diferentes conformações da cadeia peptídica.

A dobra centrada no resíduo Tyr4, previamente identificada nas simulações efectuadas para a AngII, foi também observada nas simulações dos seus antagonistas do

tipo I. Sobrepondo as regiões N-terminais destes péptidos (figura 34), podemos constatar que esta dobra é muito menos pronunciada na AngII do que para os seus antagonistas. Estes resultados estão de acordo com o modelo, previamente proposto por outros autores ⁶, de que a AngII e seus antagonistas, partilham o mesmo modo de interacção da região N-terminal com o receptor At1. Isto implica que as respectivas regiões C-terminais estejam orientadas para zonas diferentes deste receptor (figura 34).

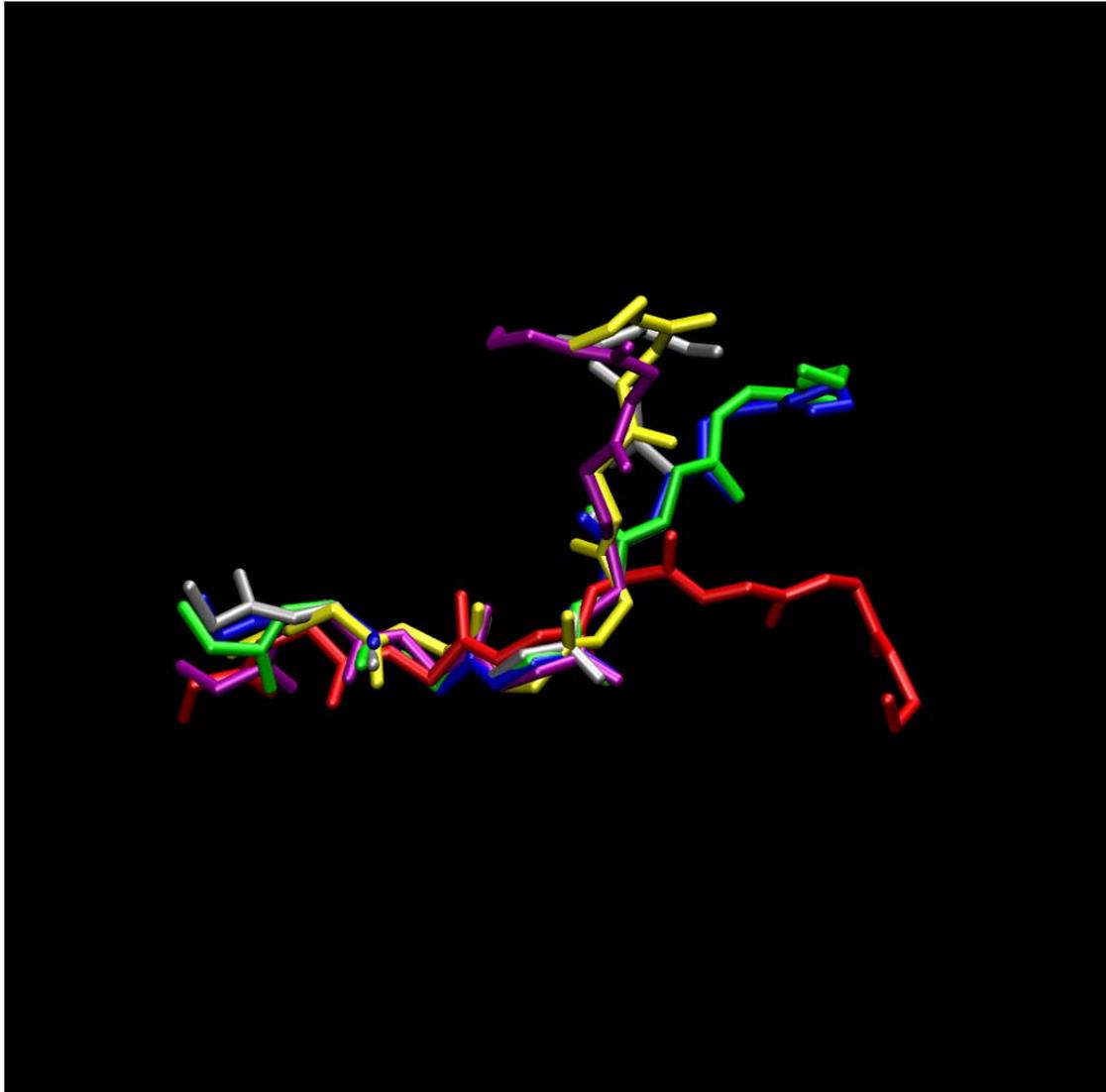


Figura 34. Sobreposição das regiões N-terminais das cadeias peptídicas da AngII e antagonistas tipo I simulado. A AngII está representada a vermelho, a $[\text{Sar}^1, \text{Aib}^3, \text{Ile}^8]$ AngII a azul, a $[\text{Sar}^1, \text{Aib}^5, \text{Ile}^8]$ AngII a amarelo, a $[\text{Sar}^1, \text{Aib}^7, \text{Ile}^8]$ AngII a verde, a $[\text{Sar}^1, \text{Aib}^8]$ AngII a púrpura e a $[\text{Sar}^1, \text{Ile}^8]$ AngII a cinzento. Podemos observar um padrão estrutural comum a todos os antagonistas, quando comparados com a AngII.

Foi observado que a mutação do resíduo Asp1 por Sar aumenta significativamente a actividade de agonistas e antagonistas da AngII^{7,8}. Esta mutação irá eliminar a interacção entre as cadeias laterais dos resíduos Arg2 e Asp1, que foi identificada nas simulações da AngII em solução de DMSO. Desta forma, aumentamos a capacidade do grupo guanidínio da cadeia lateral da Arg2 para interagir com o receptor At1. Esta característica pode ser responsável pelo aumento de actividade observada.

Tendo em conta toda a informação reunida, propusemos os seguintes critérios para a selecção dos candidatos mais promissores a antagonistas do tipo I da AngII:

- (i) Rigidez da região C-terminal.
- (ii) Orientação favorável das cadeias laterais dos resíduos Tyr4 e His6.
- (iii) Formação da ligação de hidrogénio entre a cadeia lateral do resíduo His6 e carboxilato terminal.
- (iv) Inexistência da interacção entre as cadeias laterais dos resíduos 1 (Asp na AngII) e Arg2.
- (v) Orientação da região C-terminal, quando as regiões N-terminais da AngII e do seu análogo peptídico são sobrepostas.
- (vi) Número de resíduos não codificados inseridos na sequência peptídica, que está directamente correlacionado com a resistência à decomposição catalizada pelas enzimas gastrointestinais.

Na Tabela 6, são apresentadas as características dos antagonistas do tipo I da AngII e dos correspondentes análogos. De acordo com os resultados obtidos na análise desta tabela, os candidatos mais promissores a antagonistas da AngII são o Composto 11 ([Sar1,Dpg3,Aib5,Dpg8]AngII) e o Composto 13 ([Sar1,Deg3,Aib5,Dpg8]AngII). Estes péptidos obedecem a todos os critérios previamente definidos e apresentam orientações espaciais semelhantes às dos antagonistas do tipo I da AngII simulados (figuras 35 e 36).

Tabela 6. Características estruturais da AngII, dos seus antagonistas de tipo I e dos análogos desenhados (as linhas sombreadas a cinzento mostram os candidatos mais promissores) *.

Péptido	Rigidez C-terminal	Orientação dos anéis aromáticos das cadeias laterais de Tyr4 e His 6**	Formação de uma ponte de hidrogénio entre His6 e o carboxilato terminal	Inexistência da ponte salina identificada na AngII, entre o Res. 1 e Arg2	Orientação da região C-terminal, quando a região N-terminal é sobreposta***
AngII	+	><	+	-	AngII
[Sar1,Aib3,Ile8]AngII	+	<>	+	+	type 1 ant
[Sar1,Aib5,Ile8]AngII	+	<>	+	+	type 1 ant
[Sar1,Aib7,Ile8]AngII	+	<>	+	+	type 1 ant
[Sar1,Aib8]AngII	+	<>	-	+	type 1 ant
[Sar1,Ile8]AngII	+	<>	+	+	type 1 ant
Comp 1	+	<>	+	+	X
Comp 2	+	><	+	+	AngII
Comp 3	-	<>	-	+	X
Comp 4	-	><	-	+	type 1 ant
Comp 5	+	><	+	+	AngII
Comp 6	+	<>	+	+	type 1 ant
Comp 7	+	><	+	+	X
Comp 8	-	<>	-	+	type 1 ant
Comp 9	+	<>	+	+	X
Comp 10	+	<>	+	+	X
Comp 11	+	<>	+	+	type 1 ant
Comp 12	-	><	-	+	type 1 ant
Comp 13	+	<>	+	+	type 1 ant

* O símbolo (+) indica que o péptido apresenta a característica, enquanto que o símbolo (-) tem o significado oposto.

** A notação (><) indica que os anéis aromáticos das cadeias laterais de Tyr4 e His6 estão orientados um para o outro, enquanto que (<>) indica que estão orientados em direcções opostas.

*** A notação (AngII) indica que, quando sobrepomos a região N-terminal, a região C-terminal possui uma orientação similar à AngII, a notação (Type 1 ant) indica que esta característica é semelhante à de um antagonista de tipo I, e a notação (X) indica que a estrutura adoptada não se assemelha nem à AngII, nem à estrutura adoptada pelos seus antagonistas de tipo I.

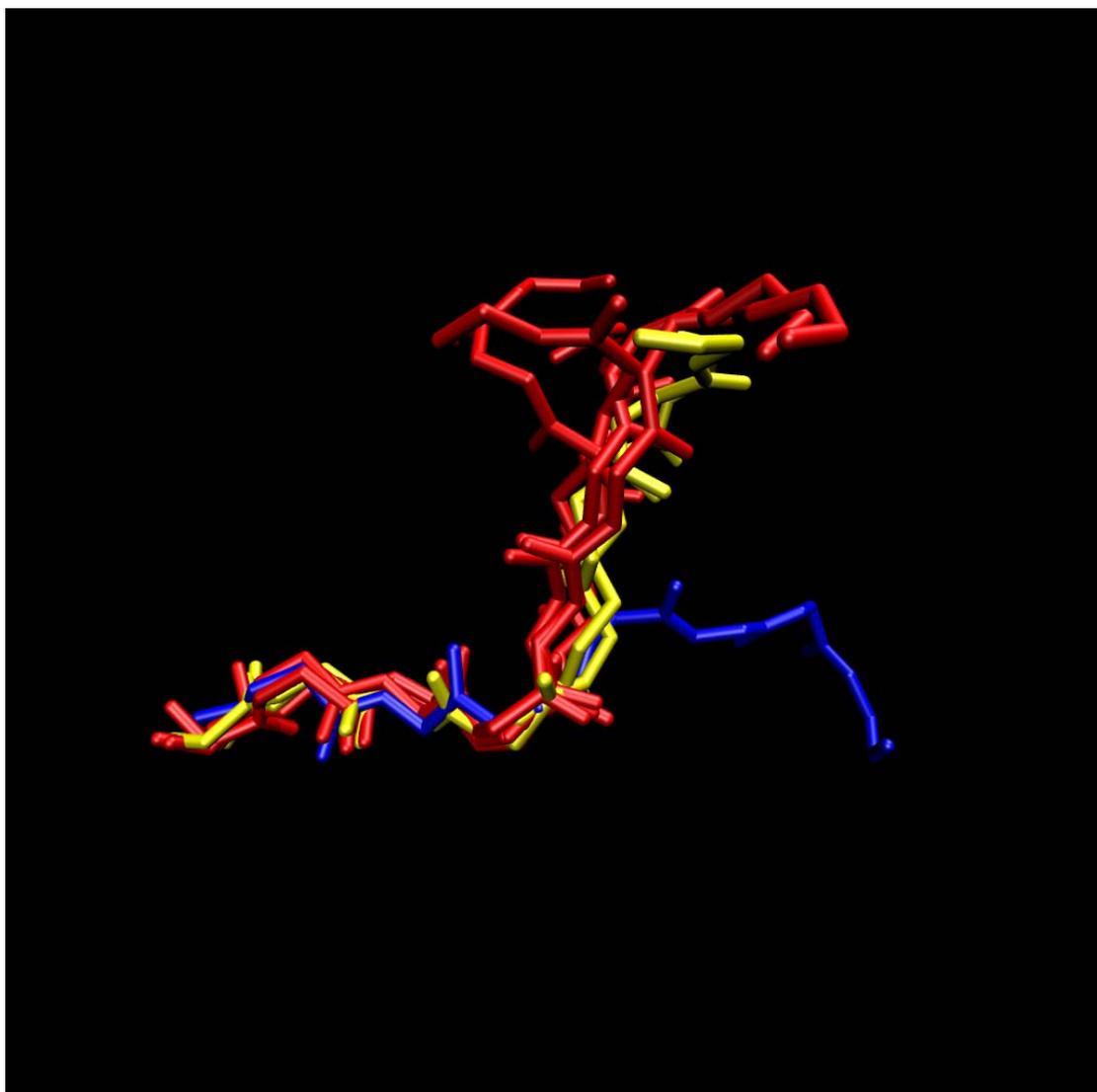


Figura 35. Sobreposição da região N-terminal das estruturas mínimas da AngII (azul), antagonistas de tipo I (vermelho) e Composto 11 e 13 (amarelo). Apenas estão representadas as cadeias principais.

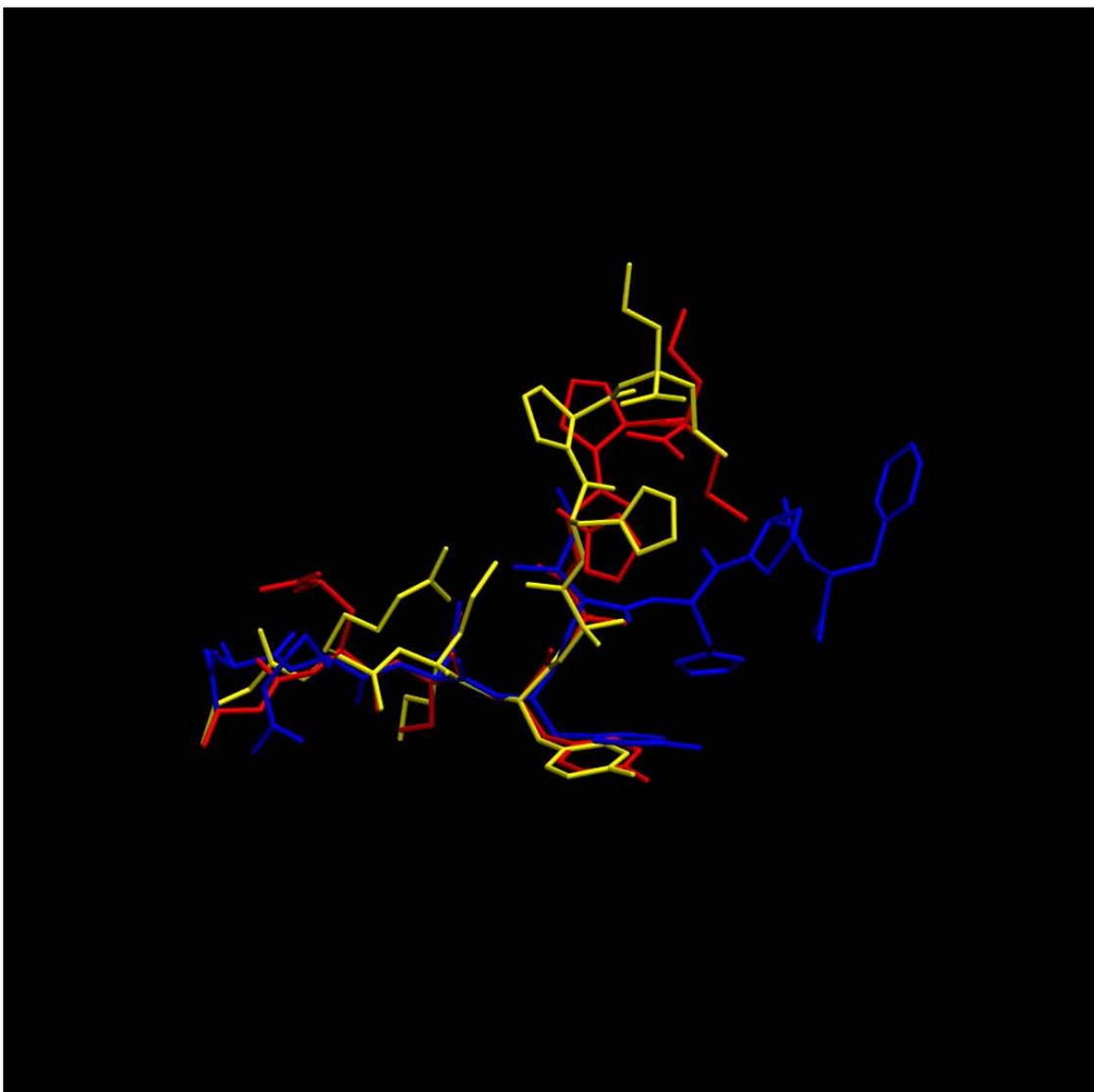


Figura 36. Sobreposição da região N-terminal das estruturas de energia mínima encontradas para a AngII (azul), Composto 11 (amarelo) e Composto 13 (vermelho). Apenas os átomos da cadeia peptídica foram usados como referência para a sobreposição. Os átomos de hidrogénio foram omitidos para maior simplicidade da representação.

Referências:

- (1) Tzakos, A. G.; Gerothanassis, I. P.; Troganis, A. N. *Cur. Topics Med. Chem.* **2004**, *4*, 431.
- (2) Moutevelis-Minakakis, P.; Gianni, M.; Stougiannou, H.; Zoumpoulakis, P.; Zoga, A.; Vlahakos, A. D.; Iliodromitis, E.; Mavromoustakos, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1737.
- (3) Mavromoustakos, T.; Kolocouris, A.; Zervou, M.; Roumelioti, P.; Matsoukas, J.; Weisemann, R. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1714-1722.
- (4) Hsieh, K.-H.; Kiraly-Olah, I. C.; Jorgensen, E. C.; Lee, T. C. *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 1044-1047.
- (5) Bovy, P. R.; O'Neal, J. M.; Olins, G. M.; Patton, D. R.; McMahon, E. G.; Palomo, M.; Koepke, J. P.; Salles, K. S.; Trapani, A. J.; Smits, G. J.; McGraw, D. E.; Hutton, W. C. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1477-1482.
- (6) Wilkes, B. C.; Masaro, L.; Schiller, P. W.; Carpenter, K. A. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4410-4418.
- (7) Roumelioti, P.; Tselios, T.; Alexopoulos, K.; Mavromoustakos, T.; Kolocouris, A.; Moore, G. J.; Matsoukas, J. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 755.
- (8) Matsoukas, J.; Cordopatis, P.; Belte, U.; Goghari, M. H.; Ganter, R. C.; Franklin, K. J.; Moore, G. J. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1418-1421.
- (9) Samanen, J.; Cash, T.; Narindray, D.; Brandeis, E.; Adams, W.; Weideman, H.; Yellin, T.; Regoli, D. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 3036-3043.
- (10) Turk, J.; Needleman, P.; Marshall, G. R. *Mol Pharmacol* **1976**, *12*, 217-224.
- (11) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A., Jr.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Rega, N.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe,

M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A.; Gaussian, Inc: Pittsburgh, 2001.

(12) Case, D. A.; Pearlman, D. A.; Caldwell, J. W.; Cheatham, T. E. I.; Ross, W. S.; Simmerling, C. L.; Darden, T. A.; Merz, K. M.; Stanton, R. V.; Cheng, A. L.; Vicent, J. J.; Crowley, M.; Tsui, V.; Radmer, R. J.; Duan, Y.; Pitera, J.; Massova, I.; Seibel, G. L.; Singh, U. C.; Weiner, P. K.; Kollman, P. A.; University of California: San Francisco, 1999.

(13) Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5179-5197.

(14) Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. *J. Comp. Chem.* **1983**, *4*, 187-217.

(15) Jan Hermans; Berendsen, H. J. C.; Gunsteren, W. F. V.; Postma, J. P. M. *Biopolymers* **1984**, *23*, 1513-1518.

(16) Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902-3909.

(17) Hariharan, P. C.; Pople, J. A. *Theor. Chem. Acc.* **1973**, *28*, 213-222.

(18) Jr, B. H. B. K. M. M.; Kollman, P. A. *J. Comp. Chem.* **1990**, *11*, 431-439.

(19) Reynolds, C. A.; Essex, J. W.; Richards, W. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9075-9079.

(20) Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W.; Kollman, P. A. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10269-10280.

(21) Cieplak, P.; Cornell, W. D.; Bayly, C.; Kollman, P. A. *J. Comp. Chem.* **1995**, *16*, 1357-1377.

(22) Jorgensen, W., L.; Jayaraman, C.; Jeffrey, D. M.; Roger, W. I.; Michael, L. K. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926-935.

(23) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; Gunsteren, W. F. v.; DiNola, A.; Haak, J. R. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684-3690.

(24) van Gunsteren, W. F.; Berendsen, H. J. C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1990**, *29*, 992-1023.

(25) Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. *J. Comp. Phys.* **1977**, *23*, 327.

- (26) Ulrich, E.; Lalith, P.; Max, L. B.; Tom, D.; Hsing, L.; Lee, G. P. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 8577-8593.
- (27) Darrin, M. Y.; Tom, A. D.; Lee, G. P. *J. Chem. Phys.* **1993**, *99*, 8345-8348.
- (28) Valle, G.; Crisma, M.; Bonora, G. M.; Toniolo, C.; Lelj, F.; Barone, V.; Fraternali, F.; Hardy, P. M.; Langran-Goldsmith, A.; Maia, H. L. S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1990**, 1481-1487.
- (29) Matsoukas, J. M.; Hondrelis, J.; Keramida, M.; Mavromoustakos, T.; Makriyannis, A.; Yamdagni, R.; Wu, Q.; Moore, G. J. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 5303-5312.
- (30) Skaf, M. S. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 7996-8003.
- (31) Martínez, J. M.; Martínez, L. *J. Comp. Chem.* **2003**, *24*, 819-825.
- (32) Mohan, R.; Chou, Y. L.; Bihovsky, R.; Lumma, W. C.; Erhardt, P. W.; Shaw, K. J. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2402-2410.

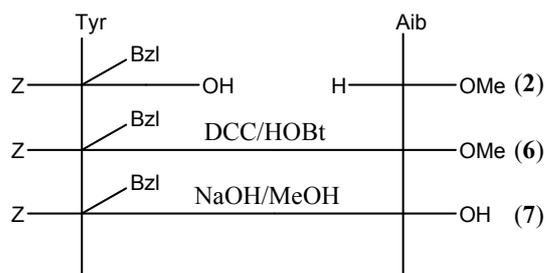
3

Síntese

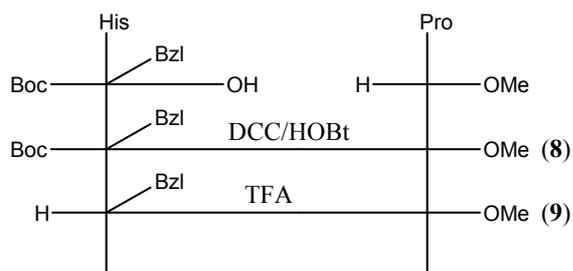
3.1 Contextualização e Estratégia Inicial

Durante o período em que as simulações moleculares dos antagonistas conhecidos e dos candidatos desenhados decorriam, propusemo-nos a iniciar a síntese de alguns candidatos, após a colecção de diversas sequências de análogos com actividade biológica determinada. Tal como referido no capítulo anterior, foram idealizadas substituições nas posições 3 e 5, pois mostram possuir um papel estrutural (não intervindo directamente com o mecanismo de activação do receptor) e na posição 8, pois a substituição da Phe que ocupa esta posição na AngII por um resíduo alifático elimina a actividade agonista.

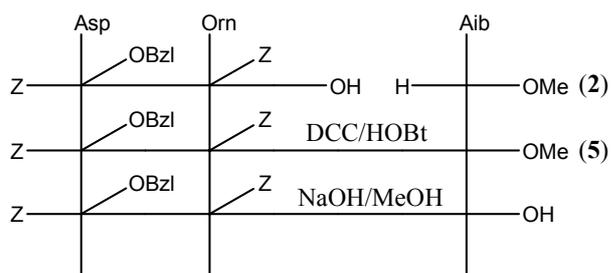
Os candidatos seleccionados foram [Aib3,Aib5,Aib8]AngII e [Sar1,Aib3,Aib5,Aib8]AngII. A utilização do Aib foi escolhida, uma vez que este aminoácido possui constrangimentos menores que as restantes $C_{\alpha,\alpha}$ -dialquilglicinas, o que nos pareceu ser um bom compromisso entre a restrição conformacional necessária à eficácia do composto e uma relativa adaptabilidade ao centro activo do receptor (cuja estrutura continua por ser determinada). A não utilização de $C_{\alpha,\alpha}$ -dialquilglicinas com cadeias laterais muito volumosas sugeria um processo de síntese aparentemente simples, e embora seja um aminoácido com constrangimentos que os aminoácidos codificados não têm, existe a vantagem do acoplamento poder ocorrer via um intermediário oxazolona^{1,2}.



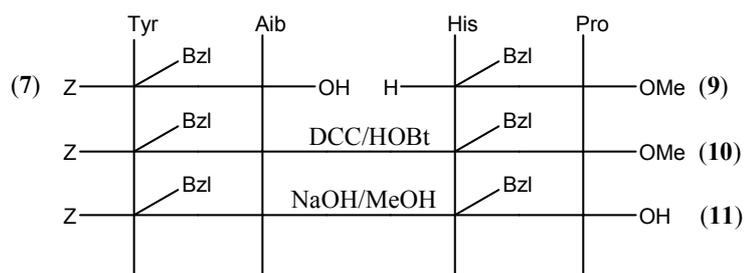
Esquema 3. Síntese idealizada para o fragmento B.



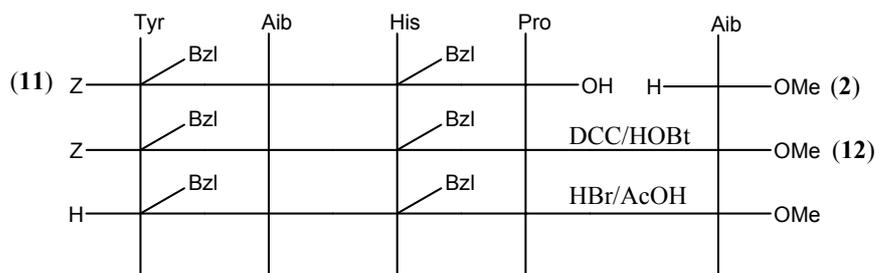
Esquema 4. Síntese idealizada para o fragmento C



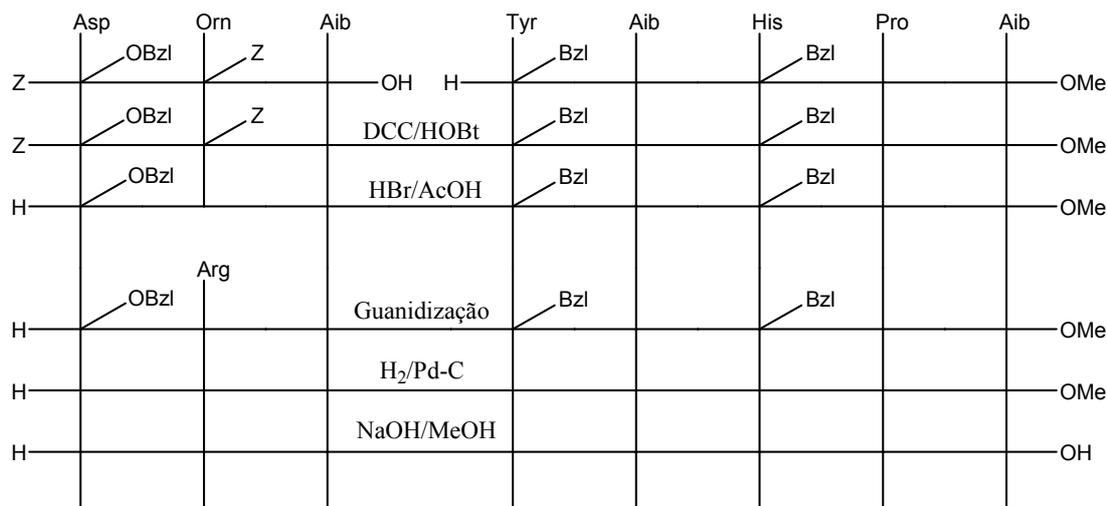
Esquema 5. Síntese idealizada para o fragmento A+Aib.



Esquema 6. Síntese idealizada para o fragmento B+C.



Esquema 7. Síntese idealizada para o fragmento (B+C)+Aib.



Esquema 8. Síntese idealizada para o fragmento (A+Aib)+((B+C)+Aib).

Os ésteres metílicos dos aminoácidos Orn(Z) e Aib foram obtidos a partir das suas formas livres, usando uma metodologia comum, com recurso a cloreto de tionilo⁴. Durante a protecção do grupo ácido da ornitina (preparação H-Orn(Z)-OMe.HCl (1)), notou-se que a realização da reacção a temperatura elevada, favoreceu a acidólise do grupo protector da cadeia lateral (no espectro de RMN do produto obtido, foi notada a inexistência do singlete com $\delta \approx 5$ relativo aos protões de CH₂-Ar e dos protões aromáticos do grupo Z). A repetição desta reacção à temperatura ambiente (conforme descrito em (1)), permitiu a obtenção de H-Orn(Z)-OMe.HCl com um rendimento apreciável (92%), com tempos de reacção não muito extensos. Esta mesma protecção foi realizada no aminoácido Aib (preparação de H-Aib-OMe.HCl (2)), a alta temperatura, com rendimento semelhante.

A síntese do fragmento A foi iniciada com o acoplamento entre Asp e Orn, recorrendo à metodologia de acoplamento típica com DCC/HOBt⁵ (preparação de Z-

Asp(OBzl)-Orn(Z)-OMe (**3**)). Tanto a análise elementar como o espectro de ressonância magnética nuclear corroboram a presença deste composto, obtido com um rendimento de 77 % (mas cuja reprodutibilidade nem sempre foi observada, com rendimentos médios a rondarem os 50%, levando-nos a experimentar o acoplamento usando o método de anidrido misto, mas com insucesso). Esta falta de reprodutibilidade pode dever-se à dificuldade em solubilizar os reagentes (tanto em EtOAc ou DCM), o que leva a uma cinética muito lenta e a tempos de reacção extremamente longos (chegando a vários dias).

A desprotecção do composto (**3**) usando metodologia comum de remoção de ésteres alquílicos ⁵, deu origem a Z-Asp(OBzl)-Orn(Z)-OH (**4**), com um rendimento moderado (67 %). Este rendimento deve-se provavelmente a esterificação que ocorre durante a acidificação do meio (contendo ainda algum MeOH) ou reacções laterais que ocorrem com a cadeia lateral do Asp (quando exposta a pH extremos). A presença do composto (**4**) foi confirmada com o desaparecimento do singlete típico, atribuído aos 3 prótons do grupo –O-CH₃, não sendo contudo observado o sinal do grupo OH.

O acoplamento de Z-Asp(OBzl)-Orn(Z)-OH (**4**) com H-Aib-OMe.HCl (**2**) origina Z-Asp(OBzl)-Orn(Z)-Aib-OMe (**5**), usando a metodologia clássica DCCI/HOBt com um rendimento moderado (esquema 5). O espectro de RMN deste composto mostra um desvio químico para o pico atribuído ao NH do Aib bastante diferente, anteriormente encontrado a 8,94 ppm e agora presente entre 6 e 7,1 ppm, demonstrando que é quimicamente diferente do grupo amina do aminoácido livre. A reacção de acoplamento para a obtenção deste composto foi difícil e os rendimentos médios das diferentes preparações realizadas são inferiores a 30 %, existindo dificuldades no tratamento da mistura reaccional, uma vez que o sólido obtido continha o tripéptido pretendido contaminado com vários outros produtos. Estes problemas levaram-nos a abandonar esta abordagem de preparação do fragmento A+Aib e procurar um modo mais eficaz de preparar este fragmento.

Paralelamente à preparação do fragmento A, decorria a preparação dos fragmentos B e C. A preparação do fragmento B foi realizada sem problemas, iniciando-se com o acoplamento de Z-Tyr(Bzl)-OH e H-Aib-OMe.HCl, conforme o esquema da estratégia inicialmente elaborada (esquema 3), onde o composto Z-Tyr(Bzl)-Aib-OMe (**6**) foi facilmente cristalizável. A sua presença é inequivocamente provada tanto pela análise elementar como pela análise do seu espectro de RMN. Para

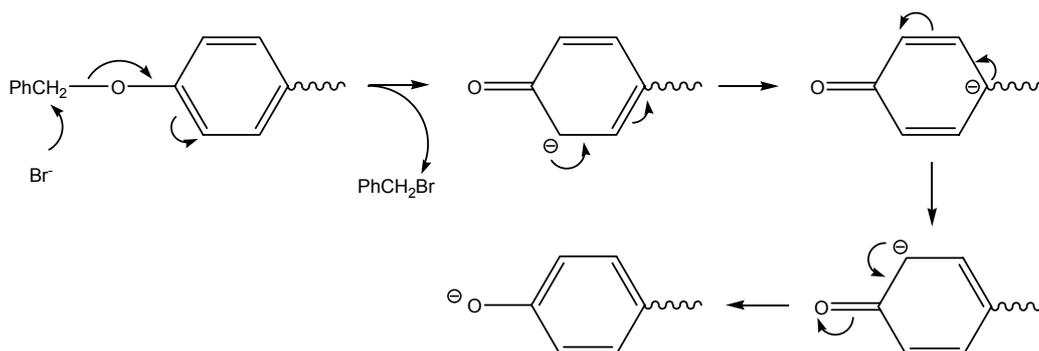
além dos singletos característicos dos CH₃ de Aib como dos prótons *orto* e *meta* da cadeia lateral de Tyr, o espectro de RMN do composto isolado apresenta o pico correspondente ao NH de Aib a um desvio químico bem diferente, mostrando que é diferente do NH de Aib livre. A preparação de fragmento B (Z-Tyr(Bzl)-Aib-OH (**7**)) é terminada depois da remoção do éster metílico do grupo ácido de (**6**), cuja obtenção ocorre com um rendimento muito bom, resultando da facilidade com que se consegue extrair o composto da solução aquosa (uma vez que é facilmente solubilizado em CHCl₃).

A preparação do fragmento C (esquema 4) iniciou-se com a tentativa de acoplamento de Boc-His(Bzl)-OH e H-Pro-OMe.HCl, usando DCC/HOBt, que não funcionou como o previsto, pensamos que devido aos problemas geralmente associados com acoplamentos com Pro². Assim, recorremos a uma outra metodologia, usando-se HBTU como reagente de activação^{6,7}, obtendo-se Boc-His(Bzl)-Pro-OMe (**8**), identificado e caracterizado por espectroscopia de RMN e análise elementar. Para a remoção do grupo protector Boc usou-se TFA⁵, obtendo-se H-His(Bzl)-Pro-OMe.CF₃COOH (**9**) com um rendimento de 99 %. A identificação deste composto é realizada através da observação do seu espectro de RMN, uma vez que o pico associado aos prótons do grupo Boc não está presente no seu espectro, surgindo um pico a 8,4 ppm, cuja integração corresponde a 3 prótons, que atribuímos ao grupo amina terminal. A cromatografia em camada fina (tlc) mostra a presença de um grupo amina livre, por revelação com solução de ninidrina.

O acoplamento entre os fragmentos B e C não foi realizado conforme a estratégia inicialmente idealizada, uma vez que após o sucesso do acoplamento usando HBTU, decidimos utilizar este reagente para realizar os acoplamentos entre fragmentos de maiores dimensões. O composto Z-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-OMe (**10**) foi preparado com um bom rendimento (79 %) e a remoção do éster metílico do seu grupo ácido terminal (Z-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-OH (**11**)) ocorreu igualmente com bom rendimento (85 %). Em ambas as reacções os compostos isolados foram identificados e caracterizados por espectroscopia de RMN e análise elementar (no caso do composto (**11**)).

Para o acoplamento do fragmento B+C (**11**) com H-Aib-OMe.HCl (esquema 7), voltou a usar-se HBTU, como reagente de acoplamento, obtendo Z-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe (**12**) com um rendimento de 74 %. A espectroscopia de RMN de

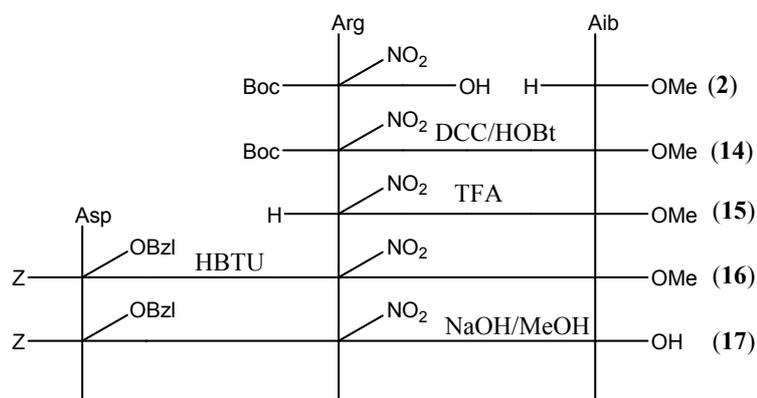
^1H e ^{13}C , bem como a análise elementar estavam de acordo com a estrutura do composto. Para terminar a preparação do fragmento (B+C)+Aib, executou-se a remoção do grupo Z, com HBr/AcOH ⁵, mas, em vez do composto esperado H-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe.HBr, obtivemos H-Tyr-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe.HBr (**13**), cuja presença foi comprovada pela interpretação do espectro de RMN (surgindo apenas um singlete na região de desvio químico de 5,37 ppm, o que indica a presença de apenas um grupo $-\text{CH}_2\text{-Ar}$, e registando-se a presença de um pico na região de 14 ppm, característica de grupos OH) e por espectrometria de massa (a massa encontrada para $[\text{M}+1]$ foi 690,58 esperando-se um valor de 764,41 para o composto H-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe.HBr). A clivagem do grupo Bzl da cadeia lateral da Tyr, nas condições usadas para a remoção do grupo Z, foi inesperada. Pensamos que o uso de HBr/AcOH , remove o grupo Bzl via um ataque nucleófilo, gerando um anião, estabilizado por deslocalização de carga ao longo do sistema aromático da cadeia lateral, conforme o esquema seguinte.



Esquema 9. Possível clivagem de Bzl da cadeia lateral de Tyr .

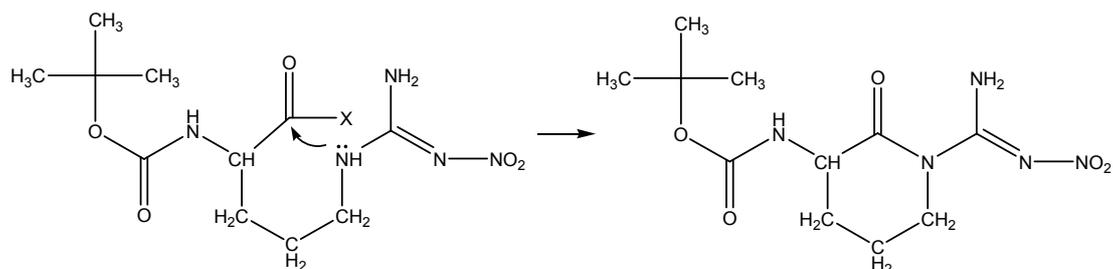
A reacção de guanidização foi testada numa pequena amostra de Z-Asp(OBzl)-Orn(Z)-Aib-OMe (**5**) após tratamento com HBr/AcOH (H-Asp(OBzl)-Orn-Aib-OMe). Verificou-se que o tratamento com HBr/AcOH remove não só o grupo protector Z, mas também o grupo benzilo, localizado na cadeia lateral de Asp (os espectros obtidos do produto desta reacção não apresentam qualquer pico na zona de desvio químico próximo de 5ppm, associado com aos prótons do grupo $\text{CH}_2\text{-Ar}$). No entanto experimentamos a reacção de guanidização neste composto, não conseguindo isolar o produto (em parte devido à dificuldade em purificar o péptido e à possibilidade de guanidização do grupo amina inicial) e assim procuramos uma outra abordagem para a síntese deste fragmento, usando não Orn mas Arg.

A utilização de Arg com a cadeia lateral desprotegida era uma hipótese, uma vez que o pKa do grupo guanidilo ($pK_a \approx 12,5$) é bem mais elevado que o do grupo amina ($pK_a \approx 8$), garantindo que o grupo guanidilo esteja protonado, sendo possível a realização de acoplamentos usando este resíduo ⁸. Após uma pesquisa bibliográfica foi encontrada uma metodologia de hidrogenação recente, que permitia a fácil remoção do grupo nitro da cadeia lateral da arginina ⁹, e da maior parte dos grupos protectores usados, recorrendo ao monoformiato de hidrazina e catalisador de Pd-C. Desta forma a estratégia e preparação do fragmento inicial foi alterada conforme o seguinte esquema:



Esquema 10. Síntese de Z-Asp(OBzl)-Arg(NO₂)-Aib-OH.

A preparação do dipéptido Arg-Aib foi levada a cabo na tentativa de evitar os baixos rendimentos geralmente associados com os acoplamentos envolvendo o Asp, mas o rendimento obtido para a preparação do composto **(14)** foi igualmente baixo. A existência de reacções laterais significativas contribuem para este facto. Numa das preparações realizadas (usando DCM e cuja reacção decorreu durante alguns dias), foi inclusivamente isolado a espécie resultante da ciclização da cadeia lateral com o grupo ácido, reportada como ocorrendo na presença do grupo carboxilo activado ¹⁰, conforme o esquema 11. Este composto cíclico foi isolado e caracterizado por análise elementar e espectroscopia de RMN, conforme descrito na parte experimental.

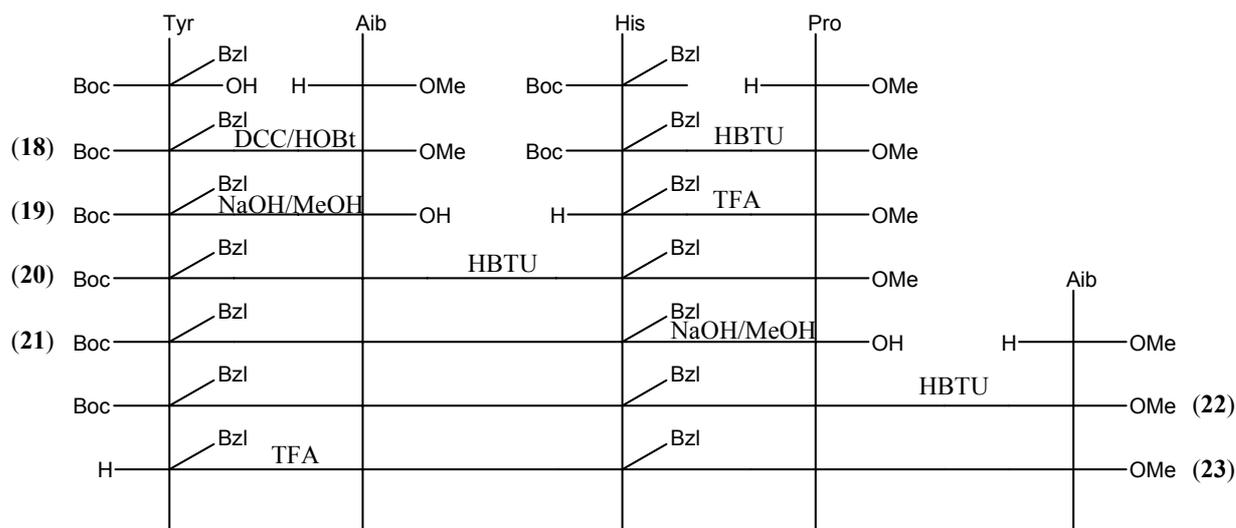


Esquema 11. Formação de anel na arginina.

A desprotecção, realizada com TFA, do composto **(14)** permitiu a obtenção de H-Arg(NO₂)-Aib-OMe.CF₃COOH (**15**), com um rendimento quase quantitativo. No espectro de RMN de ¹H foi observado o desaparecimento do sinal 5,47 ppm da αNH da Arg do péptido protegido e o aparecimento dum singlete largo a 7.91 ppm, integrando para 3 protões (NH₃⁺).

A preparação do tripéptido Z-Asp(OBzl)-Arg(NO₂)-Aib-OMe (**16**) foi conseguida conforme o esquema 10, com um rendimento muito bom, mas a reacção de hidrólise para a remoção do éster metílico (preparação do composto Z-Asp(OBzl)-Arg(NO₂)-Aib-OH (**17**)), ocorre com um rendimento baixo (≈ 25 %). O baixo rendimento da reacção de hidrólise é devido provavelmente à labilidade da ligação peptídica entre os aminoácidos Arg e Aib, exigindo um acompanhamento muito cuidado da reacção, de modo a terminá-la assim que surjam produtos de reacções laterais identificáveis por tlc.

Uma vez que durante a realização do esquema delineado para síntese do fragmento (B+C)+Aib (esquema 7), encontrámos alguns problemas, devido à falta de ortogonalidade encontrada entre a protecção do grupo amina (Z) e a protecção da cadeia lateral (Bzl) de Tyr, a preparação do fragmento B foi alterada de modo a introduzir um grupo protector no grupo amina de Tyr ortogonal com os grupos protectores usados nas cadeias laterais e grupo ácido. O grupo protector escolhido foi Boc, devido à boa experiência tida nas preparações anteriores (sendo uma metodologia simples, habitualmente com rendimentos muito elevados). A estratégia de síntese para este fragmento está descrita no esquema seguinte (esquema 12).



Esquema 12. Síntese de H-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe.CF₃COOH.

A síntese do novo fragmento (B+C)+Aib iniciou-se com a preparação de Boc-Tyr(Bzl)-Aib-OMe (**18**), decorrendo com utilização da metodologia clássica com DCC/HOBt, obtendo-se um bom rendimento. A desprotecção realizada neste composto originou Boc-Tyr(Bzl)-Aib-OH (**19**), igualmente com um bom rendimento, mas sendo necessário acompanhar a reacção com bastante cuidado, devido à labilidade da ligação peptídica entre Tyr e Aib, quando comparada com uma ligação peptídica entre dois aminoácidos codificados (durante uma reacção muito longa, a exposição do composto (**18**) ao meio básico em que a desprotecção é realizada, permitiu isolar o aminoácido Boc-Tyr(Bzl)-OH). As estruturas dos compostos (**18**) e (**19**) foram confirmadas por espectroscopia de RMN.

O acoplamento de (**19**) com (**9**) foi realizado recorrendo novamente à metodologia usando HBTU^{6,7}, obtendo-se Boc-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-OMe (**20**), com um rendimento muito bom (90 %). A análise elementar, bem como os dados de RMN ¹H confirmaram a estrutura. A preparação da espécie desprotegida Boc-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-OH (**21**), é conseguida com um rendimento mediano, sendo necessário acompanhar a reacção com intervalos de tempo reduzidos de modo a minimizar a extensão de reacções laterais. Durante esta preparação, a adição da base deve ser realizada a baixa temperatura, pois de outra forma aumentamos significativamente a extensão da clivagem da ligação entre Tyr e Aib. No espectro de RMN de ¹H é observável o grupo OH ácido e o espectro de massa mostra também o ião molecular esperado.

Boc-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe (**22**) foi obtido com elevado rendimento, recorrendo novamente à utilização de HBTU como reagente de acoplamento. Uma vez mais a estrutura do composto foi confirmada por espectrometria de massa de alta resolução e por RMN. A utilização de TFA para a remoção do grupo Boc ocorre com um rendimento inferior ao habitual (68%), mas permitiu isolar o composto H-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe.CF₃COOH (**23**), sendo necessário realizar a reacção a baixa temperatura, de modo a evitar reacções laterais. O desaparecimento dos sinais do grupo Boc (1,37 ppm), do NH Tyr (5,58 ppm) e o aparecimento de um singlete alargado, integrando para 3, a 8,03 ppm confirmam a estrutura do péptido desprotegido.

Com a pequena quantidade disponível de Z-Asp(OBzl)-Arg(NO₂)-Aib-OH (**17**), obtida após várias preparações, tentamos acoplar com (**23**), usando HBTU, Et₃N como base em EtOAc, durante 24 h, mas desta reacção não conseguimos isolar o octapéptido esperado. No espectro de massa do material obtido, não foi encontrado o pico do ião molecular previsto para este péptido. Dadas estas dificuldades e após esgotar o material preparado, abandonamos esta síntese.

Embora a obtenção de Asp-Arg-Aib-Tyr-Aib-His-Pro-Aib não tenha sido concluída, permitiu encontrar e solucionar alguns problemas com a estratégia inicialmente definida. A utilização da metodologia de acoplamento com recurso ao HBTU ^{6,7}, mostrou-se vantajosa, permitindo a obtenção de dipéptidos problemáticos e dos fragmentos de maiores dimensões, com o pequeno inconveniente de os produtos isolados estarem ligeiramente contaminados com TMU.

Devemos realçar também, o cuidado necessário durante a remoção de ésteres alquílicos (desprotecção os grupos ácido) ⁵, pois a acidificação do meio (para protonação e conseqüente precipitação do péptido como grupo ácido desprotegido) deverá ocorrer depois de garantirmos que praticamente todo o MeOH terá sido removido da preparação. A simples evaporação a pressão reduzida não foi uma abordagem satisfatória, e o MeOH ainda presente esterificou novamente o péptido, levando a rendimentos baixíssimos. Este problema foi solucionado com a utilização de algumas lavagens com Et₂O e novamente evaporação a pressão reduzida, na presença de algum Et₂O, tirando partido da mistura azeotrópica formada entre MeOH e Et₂O, para remover a maior parte de MeOH. Desta forma conseguimos obter rendimentos apreciáveis de modo consistente.

Os problemas com a preparação do fragmento N-inicial levaram-nos a iniciar a síntese do composto [Sar1,Aib3,Aib5,Aib8]AngII, que segundo o estabelecido anteriormente, seria um bom candidato a possuir actividade biológica (uma vez que possui o aminoácido Sar na posição N-inicial, característica esta, encontrada em agonistas e antagonistas de elevada potência).

O octapéptido final totalmente protegido seria tratado com $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{HCOOH}/\text{Pd-C}$ ⁹ esperando-se remover todos os grupos protectores das cadeias laterais, uma vez que esta metodologia está descrita como sendo eficaz para a remoção de grupos protectores cliváveis por hidrogenólise.

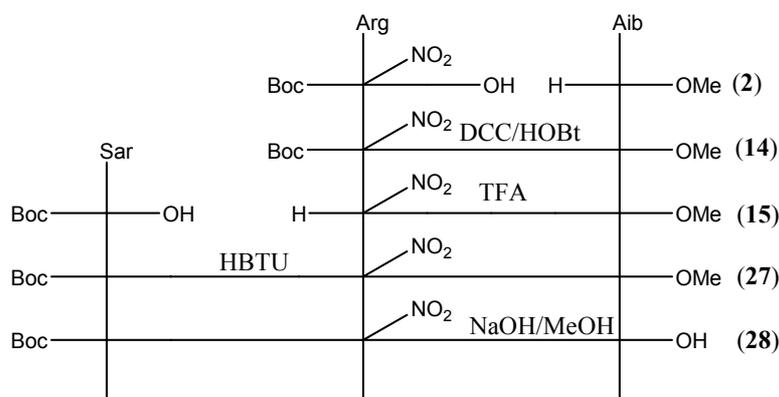
Aproveitando muito do trabalho já realizado, a síntese de [Sar1,Aib3,Aib5,Aib8]AngII iniciou-se com a preparação de Boc-Arg(NO₂)-Aib-OH (**24**). Este composto foi obtido com bom rendimento por desprotecção do composto (**14**) por hidrólise alcalina⁵. No espectro de RMN do composto (**24**) é visível o sinal correspondente ao OH, a 12,23 ppm.

O acoplamento entre (**24**) e (**23**) foi realizado usando HBTU, resultando na obtenção de Boc-Arg(NO₂)-Aib-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe (**25**) com rendimento razoável. A análise de massa do produto isolado identificou o pico esperado ($(M+1)^+$ 1666,67) e a interpretação dos seus espectros de RMN é coerente com o esperado para este composto. Contudo, devido à sobreposição de diversos picos, a atribuição de alguns protões de grupos NH, não foi conseguida de forma inequívoca. A desprotecção do composto (**25**), com TFA, origina o composto H-Arg(NO₂)-Aib-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe.CF₃COOH (**26**), com um bom rendimento. Embora não tenham sido realizadas análises elementares ou de espectrometria de massa do produto isolado, o seu espectro de RMN mostra o desaparecimento dos protões pertencentes ao grupo Boc e o aumento da área de integração na região correspondente aos protões de grupos NH (a atribuição inequívoca destes protões não foi possível uma vez que há um grande número de sobreposições).

Foi feita uma tentativa de acoplamento de Boc-Sar-OH com (**26**), usando HBTU. Esta reacção foi realizada numa escala extremamente pequena, usando a totalidade do composto (**26**), obtendo-se uma quantidade residual do produto esperado, identificado por espectroscopia de RMN. A abordagem definida no esquema 14 mostrou-se pouco vantajosa, dada a dificuldade em obter quantidades significativas dos precursores necessários para o acoplamento final, uma vez que as preparações realizadas com quantidades maiores apresentaram grande decréscimo nos rendimentos.

Dada a dificuldade encontrada em conseguir quantidades significativas do composto (**26**) e do produto do seu acoplamento com Sar, decidiu-se acoplar o

tripéptido N-inicial (Sar-Arg-Aib) com o pentapéptido C-terminal (Tyr-Aib-His-Pro-Aib, **(23)**), de acordo com esquema 15.



Esquema 15. Síntese do fragmento Boc-Sar-Arg(NO₂)-Aib-OH.

A preparação de Boc-Sar-Arg(NO₂)-Aib-OMe (**27**) realizou-se usando HBTU como reagente de acoplamento^{6,7}, obtendo-se o produto com um rendimento razoável (pouco superior a 70%). O espectro de RMN obtido mostra claramente a presença do grupo -N-CH₃ (da sarcosina) a 2,97 ppm, não apresentando o pico atribuído a NH₃⁺ do composto precursor (**15**).

O passo final para a obtenção de Boc-Sar-Arg(NO₂)-Aib-OH (**28**) exigiu algum cuidado. A reacção foi realizada usando o protocolo usual para a remoção de ésteres alquílicos (usando NaOH), mas o produto obtido (**28**) é bastante solúvel na solução aquosa resultante, sendo necessário realizar diversas extracções com EtOAc de modo a recuperar o produto formado, resultando num óptimo rendimento.

Seguidamente realizou-se o acoplamento entre (**28**) e (**23**), usando HBTU, obtendo-se Boc-Sar-Arg(NO₂)-Aib-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe (**29**), com um rendimento de cerca de 60%. Embora o espectro de RMN do composto isolado seja bastante complexo, o desaparecimento do pico correspondente ao grupo OH, singletto largo a 12,5 ppm, e a posição do pico correspondente a NH de Tyr, dá-nos indicação da ocorrência do acoplamento esperado (contudo, nem todos os prótons foram inequivocamente atribuídos, e existem também no espectro ¹³C algumas sobreposições de picos de carbonos de anéis aromáticos e de CH₃ de Aib). A análise de espectrometria de massa mostra o pico esperado a 1237,6 (M+1)⁺, sendo outra evidência da presença do composto pretendido.

Seguidamente realizou-se o protocolo proposto por Gowda e Mahesh ⁹, no qual o uso de monoformiato de hidrazina permite a remoção do grupo nitro da cadeia lateral de Arg. Esperou-se também conseguir a remoção dos grupos Bzl que protegem as cadeias laterais de Tyr e His. Após uma primeira reacção, foi isolado um produto, sendo identificado como Boc-Sar-Arg-Aib-Tyr-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe (**30**), com um rendimento um pouco inferior a 70%. O espectro de RMN apresenta um singlete característico dos prótons do grupo $-\text{CH}_2\text{-Ar}$ (indicando a presença de pelo menos um grupo Bzl) e apresenta também um pico característico, atribuído ao grupo OH na cadeia lateral de Tyr (9,65 ppm) e para além disso, observa-se no espectro de massa um ião molecular com a massa esperada (1102,6). Estes dados espectroscópicos provam a presença deste composto. Na espectrometria de massa realizada foi também observado um pico a 1147,58, que correspondia um composto onde apenas foi removido o grupo protector da cadeia lateral da Tyr (Boc-Sar-Arg(NO₂)-Aib-Tyr-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe). Numa preparação posterior, numa tentativa de obter uma remoção completa dos grupos protectores, usou-se um tempo de reacção bastante mais longo (72 h), contudo verificou-se a degradação extensa não se conseguindo isolar o produto.

Devemos realçar que relativamente aos compostos com 7 ou 8 aminoácidos, as quantidades de reagentes manipuladas eram bastante reduzidas (sendo por vezes próximas de 0,05 mmol), contribuindo para a dificuldade em isolar algum componente.

Para a conclusão da desprotecção deste péptido (**30**) seria ainda necessário a remoção do Boc do seu grupo amina N-terminal, remoção do éster metílico do seu grupo ácido C-terminal e da remoção de Bzl da cadeia lateral de His. As desprotecções finais não foram realizadas por não se dispor de quantidade suficiente do octapéptido (**30**) e por não se dispor de mais tempo para se repetir a preparação de todos os precursores.

A figura 36 resume os passos, com os respectivos rendimentos, da preparação de (**30**).

O uso de um outro grupo protector para o grupo amina da Sar, por exemplo Z, reduziria o processo de síntese em um passo, pois a remoção deste grupo seria simultânea com a remoção do grupo nitro.

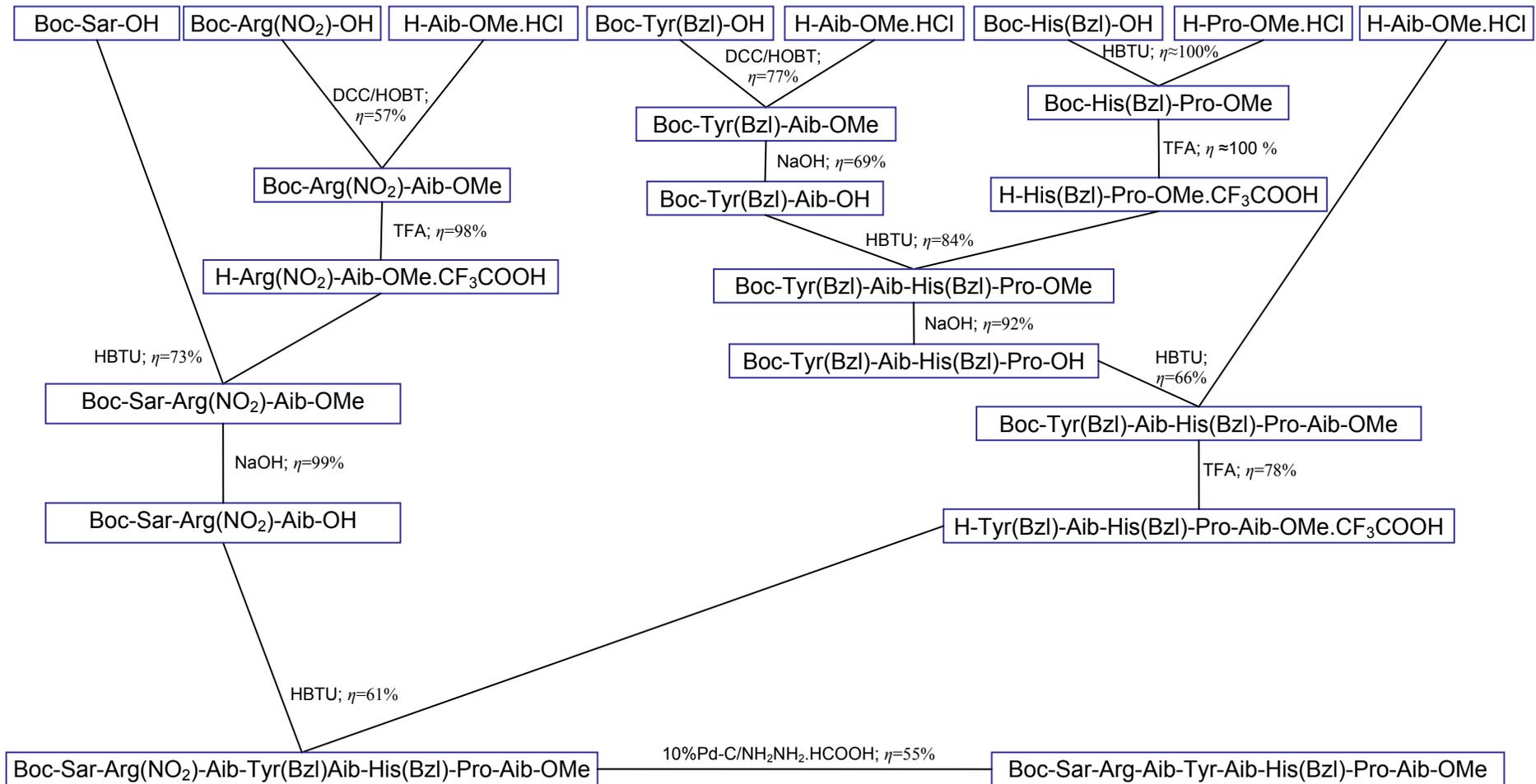


Figura 36. Síntese de Boc-Sar-Arg-Aib-Tyr-His(Bzl)-Pro-Aib-OME

Devemos acrescentar que a atribuição dos espectros dos compostos com 7 e 8 aminoácidos é complexa devido à sobreposição de muitos dos picos, mas aplicação de técnicas ROSY, COSY, HMQC e HMBC, juntamente com a análise de espectrometria de massa, temos garantia da sequência (para além das evidências de RMN de todos os precursores usados). De referir também que alguns dos produtos obtidos foram usados ligeiramente contaminados, e para se proceder à sua caracterização, quando se encontrou dificuldade com a sua cristalização, uma pequena toma foi purificada por cromatografia em coluna.

Referências:

- (1) *The Peptides - Analysis, Synthesis, Biology*; Academic Press: New York, 1979; Vol. Vol.1 - Major Methods of Peptide Bond Formation.
- (2) Jones, J. *The Chemical Synthesis of Peptides*; Oxford University Press: New York, 1994.
- (3) Habeeb, A. F. S. A.; Hirs, C. H. W.; Timasheff, S. N. In *Methods in Enzymology*; Academic Press: 1972; Vol. Volume 25, p 558-566.
- (4) Bodansky, M.; Klausner, Y. S.; Ondetti, M. A. *Peptide Synthesis*; John Wiley & Sons: New York, 1976.
- (5) Bodanszky, M.; Bodanszky, A. *The Practice of Peptide Synthesis*; Springer - Verlag: Berlin, 1984.
- (6) Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillessen, D. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927-1930.
- (7) N. Leo Benoiton; Young C. Lee; Rene Steinaur; Chen, F. M. F. *Inter. J. Pept. Protein Res.* **1992**, 40, 559-566.
- (8) Gish, D. T.; Carpenter, F. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 5872-5877.
- (9) Gowda, D. C.; Mahesh, B. *Prot. Pept. Lett.* **2002**, 9, 225-230.
- (10) Paul, R.; Anderson, G. W.; Callahan, F. M. *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 3347-3350.

4 Conclusões

Neste trabalho, efectuamos o desenho e simulação de péptidos sintéticos, análogos da AngII. Desenvolvemos uma estratégia sistemática para a modelação de compostos deste tipo que possam constituir bons candidatos a antagonistas de tipo I da AngII.

As simulações efectuadas para a AngII e seus análogos demonstram que a estrutura é fortemente condicionada pelo meio envolvente. De facto, a rigidez das estruturas simuladas aumenta significativamente com a redução da polaridade do meio.

Estas mesmas simulações permitiram-nos também sugerir um conjunto de características estruturais que um bom antagonista de tipo I da AngII deve possuir, nomeadamente:

- a) Rigidez da região C-terminal;
- b) Orientação favorável das cadeias laterais dos resíduos Tyr4 e His6;
- c) Formação de uma ligação de hidrogénio entre a cadeia lateral da His6 e o grupo carboxilato terminal;
- d) Inexistência de interações fortes entre Arg2 e o resíduo N-terminal (resíduo que ocupa a posição 1);
- e) Orientação da região C-terminal diferenciada entre AngII e respectivos antagonistas, quando a região N-terminal é sobreposta;
- f) Número razoável de resíduos não codificados (de modo a aumentar a resistência às enzimas digestivas).

Dos compostos desenhados, após a análise das simulações realizadas, 2 sobressaem como os potenciais antagonistas mais promissores (comp11 - [Sar1,Dpg3,Aib5,Dpg8]AngII) e comp13 - [Sar1, Deg3, Aib5, Dpg8]AngII), reunindo todos os critérios estabelecidos para um antagonista peptídico de tipo I.

Embora a preparação do composto, cuja síntese foi iniciada, não tenha sido concluída, foram encontrados várias soluções para os problemas encontrados na nossa estratégia inicial. O acoplamento dos resíduos que compõem o péptido [Sar1,Aib3,Aib5,Aib8]AngII foi conseguido (com a caracterização dos precursores preparados), faltando a desprotecção da cadeia lateral de His6, do grupo amina terminal e do grupo ácido terminal para a finalização da síntese. Alguns dos precursores preparados podem ser usados na síntese dos compostos Comp11 e Comp13, propostos

como promissores antagonistas da AngII, embora usando uma estratégia um pouco diferente, uma vez que o grupo Boc, usado para proteger a Tyr, não é compatível com as condições da reacção de Ugi, usada para a incorporação das dialquilglicinas na cadeia peptídica. A utilização de outra protecção para a Sar (Z, por exemplo) poderá também trazer vantagens, evitando-se a realização de uma desprotecção (uma vez que Z pode ser removido aquando da hidrogenação com formiato de hidrazina) e permitindo a realização de reacções de Ugi para o acoplamento de dialquilglicinas com cadeias laterais maiores.

Futuramente a simulação de antagonistas da AngII de tipo II poderá trazer mais informação sobre o tipo de interacções que este tipo de compostos tem com o receptor At1 da AngII, e consequentemente trazer mais pistas sobre o processo de activação do receptor. Claro que a obtenção de uma estrutura por cristalografia de raios X do receptor, embora sendo uma tarefa difícil, será um desenvolvimento sem precedentes, permitindo uma interpretação a nível atómico das interacções entre o receptor e os seus ligandos (especialmente se a estrutura e cristalografia for obtida com um ligando no centro de interacção).

Com o crescente interesse nestes receptores (constituindo uma grande percentagem dos alvos farmacológicos das actuais terapias), podemos esperar um crescente número de estruturas homólogas (de outras GPCR), o que facilitará a obtenção de um modelo obtido por homologia mais fiável (especialmente se existirem bastantes estruturas do mesmo tipo do receptor). Isto permitirá uma abordagem diferente ao modo como desenhamos os antagonistas, permitindo a criação de um modelo farmacofórico mais detalhado, uma vez que conterà informação estrutural dependente de um “*binding site*” proteico, que é estruturalmente mais conservado que um péptido livre (como no caso dos nossos ligandos). Com este tipo de informação, será possível quantificar da intensidade de interacção entre os diferentes ligandos e o receptor (dentro das limitações do método usado), embora a prova final de que qualquer composto sugerido terá a actividade desejada, será sempre o teste de actividade biológica.

5

Secção Experimental

5.1 Reagentes, solventes e instrumentação

Os compostos de partida foram adquiridos no mercado e foram usados sem purificação prévia.

Os solventes utilizados tinham grau de pureza elevado e como tal não foram sujeitos a qualquer processo de purificação adicional. O éter de petróleo utilizado correspondia à fracção de ponto de ebulição 40 ° – 60 °C.

Na cromatografia em coluna foi usada sílica gel 60, com tamanho de grão 0,063-0,2 mm (70-230 Mesh) ou 0,04-0,063 mm (Mesh 230-400) da Macherey-Nagel ou Merck.

Na cromatografia em camada fina foram utilizadas placas de vidro com sílica gel 60 (espessuras 0,25) e com indicador fluorescente UV₂₅₄, da Macherey-Nagel ou Merck.

Os pontos de fusão foram determinados num aparelho Gallenkamp e não foram sujeitos a correcção.

Os espectros de ¹H NMR foram obtidos a 300 MHz num espectrómetro Varian Unity Plus 300 ou a 400 MHz num Bruker Avance II⁺ 400, usando os sinais dos solventes residuais como referências internas. Os espectros de ¹³C NMR foram obtidos a 75,4 MHz (espectrómetro Varian) ou a 100,62 MHz (espectrómetro Bruker). Usaram-se técnicas de dupla ressonância, e bidimensionais (HMQC e HMBC), sempre que necessário, para a atribuição completa dos sinais de protão e de carbono.

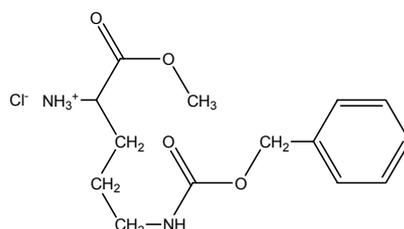
Os espectros de massa foram obtidos num espectrómetro AutoSpec E, realizados pela técnica FAB no modo de alta resolução no C.A.C.T.I. – Unidad de Espectrometria de Massas (Vigo) ou num Thermo Finnigan LXQ MS, na Universidade do Minho.

As análises elementares foram obtidas num analisador Leco CHNS-932.

A rotação óptica foi medida num micro-polarímetro AA 1000, a 25 °C.

5.2 Procedimentos

– Preparação de H-Orn(Z)-OMe.HCl (1)



Arrefeceu-se metanol (20 mL) a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e adicionou-se gota a gota cloreto de tionilo (5 mL) seguido da adição de H-Orn(Z)-OH (20 mmoles, 2,64 g). Deixou-se a mistura em agitação e à temperatura ambiente durante 6 h. Após evaporação do solvente, a pressão reduzida, obteve-se um óleo que solidificou por adição de éter etílico. O sólido branco obtido foi filtrado e recristalizado de metanol e éter etílico (92%, 4,72g, 18,4 mmoles).

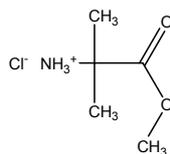
P.f.: 139,9-140,8 $^{\circ}\text{C}$.

$[\alpha]_{\text{D}}$ = + 14,0 $^{\circ}$ (C 1,0 %; MeOH).

Análise elementar: Calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_4\cdot\text{HCl}$: C 53,08, H 6,68, N 8,84; encontrado: C 52,56, H 6,54, N 9,77.

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,40-1,60 (2H, m, γCH_2), 1,76 (2H, m, βCH_2), 2,99 (2H, q ap, $J = 6,3\text{ Hz}$, δCH_2), 3,73 (3H, s, OCH_3), 4,02 (1H, t ap, $J = 6,0\text{ Hz}$, αCH), 5,00 (2H, s, $\text{O-CH}_2\text{-Ar}$), 7,31-7,36 (5H, m, Ar), 8,44 (3H, s l, NH_3^+).

– Preparação de H-Aib-OMe.HCl (2)



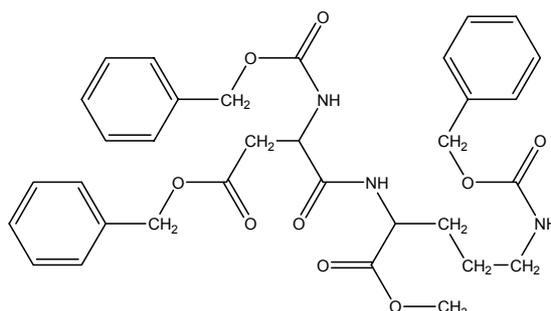
Foi usado o método descrito para (1), deixando a mistura reaccional [H-Aib-OH (25 mmoles, 2,58 g), em 25 mL de metanol e 6,5 mL de cloreto de tionilo] a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 h. Obteve-se um sólido branco (93%).

P.f.: 177,0-177,8 °C.

Análise elementar: Calculado para $C_5H_{11}NO_2.HCl$: C 39,10, H 7,87, N 9,12; encontrado: C 38,97, H 7,68, N 9,25.

1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 1,74 (6H, s, 2x CH_3 (Aib)), 3,83 (3H, s, OCH_3), 8,94 (3H, s l, NH_3^+).

- Preparação de Z-Asp(OBzl)-Orn(Z)-OMe (3)



Arrefeceu-se a 0 °C uma solução de H-Orn(Z)-OMe.HCl (6 mmoles, 1,90 g), Z-Asp(OBzl)-OH (6 mmoles, 2,14 g) e HOBt (6 mmoles, 0,920 g) em diclorometano (20 mL). Em seguida adicionou-se trietilamina (6 mmoles, 0,90 mL) e DCCI (6,3 mmoles, 1,30 g) e deixou-se a reagir à temperatura ambiente durante 7 h e 30 min, seguindo a reacção por tlc. Após filtração o solvente foi removido a pressão reduzida e o resíduo obtido foi dissolvido na quantidade mínima de acetona e deixado durante 1 hora a -4 °C. A DCHU que precipitou foi removida por filtração e a solução concentrada a pressão reduzida. Dissolveu-se o resíduo obtido em EtOAc (30 mL) e a solução foi extraída sucessivamente com uma solução saturada de $NaHCO_3$ (2 x 15 mL), solução de ácido cítrico 10% (2 x 15 mL), solução saturada de $NaHCO_3$ (2 x 15 mL) e água (2 x 15 mL). A fase orgânica foi seca com $MgSO_4$ e após evaporação do solvente o resíduo obtido foi cristalizado com uma mistura de EtOAc e éter de petróleo. Obteve-se um sólido branco (77%).

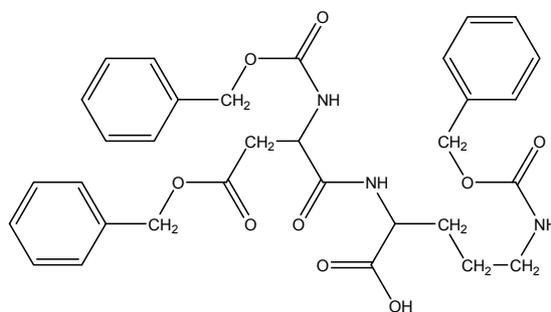
P.f.: 91,8-93,3 °C.

$[\alpha]_D = -8,0^\circ$ (C 1,0 %; MeOH).

Análise elementar: Calculado para $C_{33}H_{37}N_3O_9$: C 63,96, H 6,02, N 6,78; encontrado: C 63,89, H 5,99, N 6,84.

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,48-1,56 (2H, m, γCH_2 (Orn)), 1,61-1,94 (2H, m, βCH_2 (Orn)), 2,75 (1H, dd, $J = 17,4$ e $6,0$ Hz, βCH_2 (Asp)), 3,12-3,21 (3H, m, δCH_2 (Orn) + βCH_2 (Asp)), 3,73 (3H, s, O- CH_3), 4,54-4,65 (2H, m, αCH (Asp) + αCH (Orn)), 4,98 (1H, t, $J = 4,7$ Hz, δNH (Orn)), 5,07 (2H, s, CH_2 -Ar), 5,12 (2H, s, CH_2 -Ar), 5,14 (2H, s, $-\text{CH}_2$ -Ar), 5,96 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, NH (Asp)), 7,07 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, NH (Orn)), 7,32-7,36 (15H, m, Ar).

- Preparação de Z-Asp(OBzl)-Orn(Z)-OH (4)



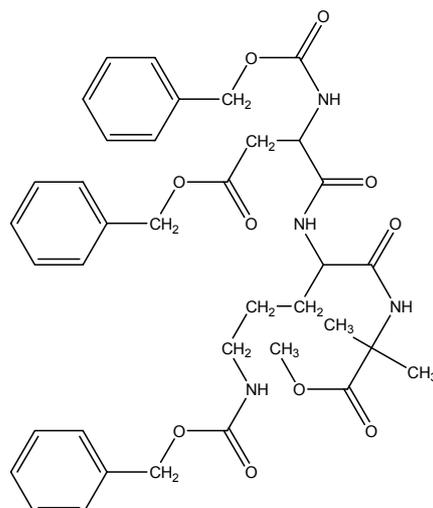
Dissolveu-se Z-Asp(OBzl)-Orn(Bzl)-OMe (1 mmol, 0,670 g) em metanol (10 mL), arrefeceu-se a solução a $0\text{ }^\circ\text{C}$ e adicionou-se uma solução 1M de NaOH (1,00 mmol, 1 mL). Após 20 minutos a mistura reaccional foi deixada à temperatura ambiente durante 3 h (reacção seguida por tlc). Adicionou-se água (10 mL) e o metanol foi removido a pressão reduzida. O pH da solução resultante foi ajustado a 1, por adição de HCl 1 M, e foi deixada a baixa temperatura ($-4\text{ }^\circ\text{C}$). O sólido entretanto formado foi separado por decantação e triturado com éter etílico e posteriormente lavado com éter de petróleo e seco. Obteve-se um sólido branco (67%).

P.f.: 93,8-95,5 $^\circ\text{C}$.

$[\alpha]_{\text{D}}$ = + 8,0 $^\circ$ (C 1,0 %; MeOH).

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,40-1,56 (2H, m, γCH_2 (Orn)), 1,58-1,72 (1H, m, βCH (Orn)), 1,72-1,92 (1H, m, βCH (Orn)), 2,68-2,90 (2H, m, βCH_2 (Asp)), 2,98-3,19 (2H, m, δCH_2 (Orn)), 4,40-4,55 (1H, m, αCH (Orn)), 4,55-4,70 (1H, m, αCH (Asp)), 5,02-5,07 (6H, s l ap, CH_2 -Ar), 5,31-5,58 (1H, m, NH), 6,20-6,50 (1H, m, NH (Asp)), 7,18-7,40 (15H, m, Ar), 7,40-7,60 (1H, m, NH (Orn)), não foi observado o sinal do protão hidroxilo.

- Preparação de Z-Asp(OBzl)-Orn(Z)-Aib-OMe (5)

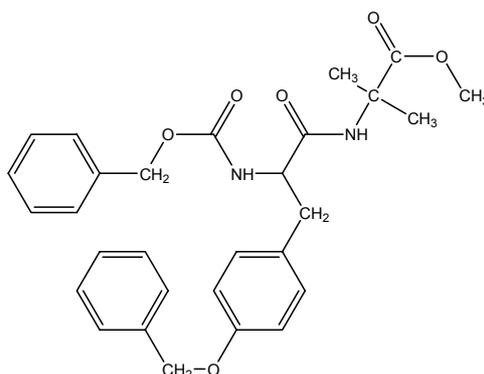


Na preparação deste composto usou-se o método descrito para **(3)** fazendo a reacção entre Z-Asp(OBzl)-Orn(Z)-OH (0,8 mmoles, 0,484 g) e H-Aib-OMe.HCl (0,8 mmoles, 0,123 g) em EtOAc (40 mL). O sólido resultante foi cristalizado numa mistura de EtOAc e n-hexano, obtendo-se um sólido branco com um rendimento de 66,6%.

P.f.: 139,7-141,6 °C.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,47 (3H, s, CH₃ (Aib)), 1,49 (3H, s, CH₃(Aib)), 1,52-1,68 (2H, m, γCH₂(Orn)), 1,80-1,96 (2H, m, βCH₂(Orn)), 2,13-2,25 (1H, m, βCH₂ (Asp)), 2,55-2,63 (1H, m, βCH₂ (Asp)), 3,07-3,23 (2H, m, δCH₂(Orn)), 3,68 (3H, s, O-CH₃), 4,42-4,63 (2H, m, αCH(Orn)+αCH(Asp)), 5,02-5,18 (6H, m, 3x-CH₂-Ar), 6,00-7,10 (4H, m, 4x NH), 7,34 (15H, s l, 3 x Ar).

- Preparação de Z-Tyr(Bzl)-Aib-OMe (6)



Foi usado o método descrito para **(3)** (DCCI/HOBt, em DCM, um eq de Et₃N), fazendo a reacção entre Z-Tyr(OBzl)-OH (5 mmoles, 2,03 g) e H-Aib-OMe.HCl (5 mmoles, 0,586 g). O composto foi isolado, após cristalização com uma mistura de EtOAc e Et₂O, como um sólido branco com um rendimento de 76,5%.

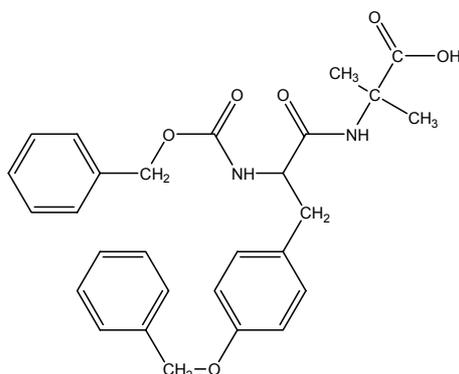
P.f.: 114,2-115,0 °C.

[α]_D = - 3,6° (C 1,0 %; MeOH).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,42 (3H, s, CH₃ (Aib)), 1,43 (3H, s, CH₃ (Aib)), 2,94 (1H, dd, J = 13,6 e 7,5 Hz, βCH₂(Tyr)), 3,08 (1H, dd, J = 10,5 e 5,7 Hz, βCH₂ (Tyr)), 3,70 (3H, s, O-CH₃), 4,35 (1H, d ap, J = 6,3 Hz, αCH (Tyr)), 5,04 (2H, s, CH₂-Ar(Z)), 5,10 (2H, s, -CH₂-Ar(Bzl)), 5,45 (1H, d, J = 6,9 Hz, NH (Tyr)), 6,27 (1H, s, NH(Aib)), 6,91 (2H, d, J = 8,7 Hz, *m*CH(Tyr)), 7,15 (2H, d, J = 8,1 Hz, *o*CH(Tyr)), 7,42-7,33 (10H, m, Ar).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 24,43 e 24,55 (2 x CH₃ (Aib)), 37,70 (βCH₂(Tyr)), 52,58 (O-CH₃), 56,18 (αCH(Tyr)), 56,39 (αC(Aib)), 66,91 (CH₂-Ar(Bzl)), 66,98 (CH₂-Ar(Z)), 114,93(*m*CH(Tyr)), 127,38, 127,92, 127,94, 128,13, 128,47, 128,53, 128,62, (CH-Ar), 130,49 (*o*CH(Tyr)), 136,14 (Cqaternário-CH₂ (Tyr)), 136,85 (Cqaternário (Z)), 155,85 (C-O(Tyr)), 157,74 (C=O (Z)), 169,85 (C=O (Tyr)), 174,45 (C=O, (Aib)).

- Preparação de Z-Tyr(Bzl)-Aib-OH (7)



Este composto foi obtido como um sólido branco (98%) usando o método descrito para **(4)** (partindo de 1 mmol, 0,505 g, de Z-Tyr(Bzl)-Aib-OMe), com tempo de reacção de 7 h à temperatura ambiente.

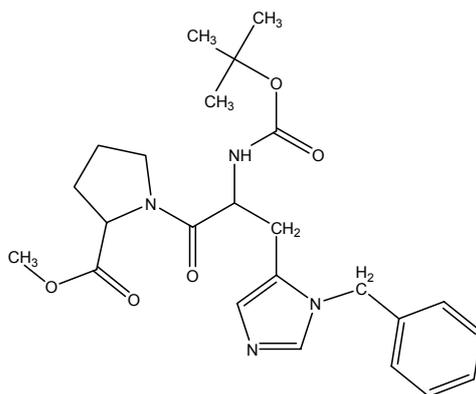
P.f.: 110,0-112,2 °C.

Análise elementar: Calculado para $C_{28}H_{30}N_2O_6 \cdot \frac{1}{2} H_2O$: C 67,27, H 6,27, N 5,61; encontrado: C 67,75, H 6,15, N 5,77.

1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 1,43 (3H, s, CH_3 (Aib)), 1,46 (3H, s, CH_3 (Aib)), 2,99 (2H, d, $J = 6,6$ Hz, βCH_2 (Tyr)), 4,49 (1H, q ap, $J = 6,6$ Hz, αCH (Tyr)), 5,00 (2H, s, CH_2 -Ar(Z)), 5,06 (2H, s, CH_2 -Ar(Bzl)), 5,94 (1H, d, $J = 7,2$ Hz, NH(Tyr)), 6,77 (1H, s l, NH(Aib)), 6,88 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, mCH (Tyr)), 7,13 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, oCH (Tyr)), 7,27-7,42 (10H, m, 2 x Ar), 8,9 (1H, s l, OH).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 24,22 e 24,46 (2 x CH_3 (Aib)), 37,70 (βCH_2 (Tyr)), 56,19 (αCH (Tyr)), 56,55 (αC (Aib)), 67,02 (CH_2 -Ar(Bzl)), 69,86 (CH_2 -Ar(Z)), 114,92 (mCH (Tyr)), 127,38, 127,86, 127,89, 128,10, 128,45, 128,51, 128,62, (CH-Ar), 130,49 (oCH (Tyr)), 136,06 (Cquaternário- CH_2 (Tyr)), 136,90 (Cquaternário (Z)), 156,32 (C-O(Tyr)), 157,72 (C=O (Z)), 171,16 (C=O (Tyr)), 177,25 (C=O, (Aib)).

- Preparação de Boc-His(Bzl)-Pro-OMe (**8**)



Arrefeceu-se a 0 °C uma solução de Boc-His(Bzl)-OH (0,5 mmoles, 0,173 g), H-Pro-OMe.HCl (0,5 mmoles, 0,083 g) em diclorometano (20 mL). Em seguida adicionou-se diisopropiletilamina (DIEA) (0,5 mmoles, 0,086 mL) e HBTU (0,5 mmoles, 0,190 g) e deixou-se a reagir à temperatura ambiente durante 3 h, seguindo a reacção por tlc. O solvente foi removido a pressão reduzida e o resíduo obtido foi

dissolvido em EtOAc (25 mL) e a solução extraída sucessivamente com uma solução de ácido cítrico 10% (2 x 12,5 mL), solução saturada de NaHCO₃ (2 x 12,5 mL) e solução saturada de NaCl (2 x 12,5 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄ e após evaporação do solvente obteve-se um sólido branco (99%) ligeiramente contaminado com tetrametilureia (TMU), identificada por espectroscopia de rnm.

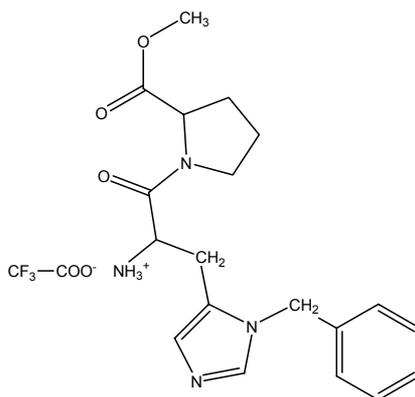
P.f.: 89,5-94,4 °C.

[α]_D = - 35,8° (C 1,0 %; MeOH).

Análise elementar: Calculado para C₂₄H₃₂N₄O₅.¹/₂DCM+1¹/₂ H₂O: C 55,95, H 6,85, N 11,4; encontrado: C 55,63, H 6,63, N 11,23.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,38 (9H, s, Boc), 1,88-1,97 (3H, m, γCH₂(Pro)+ βCH(Pro)), 2,13-2,21 (1H, m, βCH(Pro)), 2,89 (1H, dd, J = 14,4 e 6,6 Hz, βCH(His)), 3,04 (1H, dd, J = 14,4 Hz, 6,3 Hz, βCH(His)), 3,39-3,49 (1H, m, δCH(Pro)), 3,67(3H, s, O-CH₃), 3,68-3,78 (1H, m, δCH(Pro)), 4,45 (1H, dd, J = 8,1 e 7,2 Hz, αCH(Pro)), 4,70 (1H, dd, J = 14,7 e 6,6 Hz, αCH(His)), 5,09 (2H, s, CH₂-Ar), 5,48 (1H, d, J = 8,4 Hz, NH(His)), 6,87 (1H, s, δCH(His)), 7,19-7,36 (5H, m, Ar), 7,64 (1H, s, εCH(His)).

- Preparação de H-His(Bzl)-Pro-OMe.CF₃COOH (9)



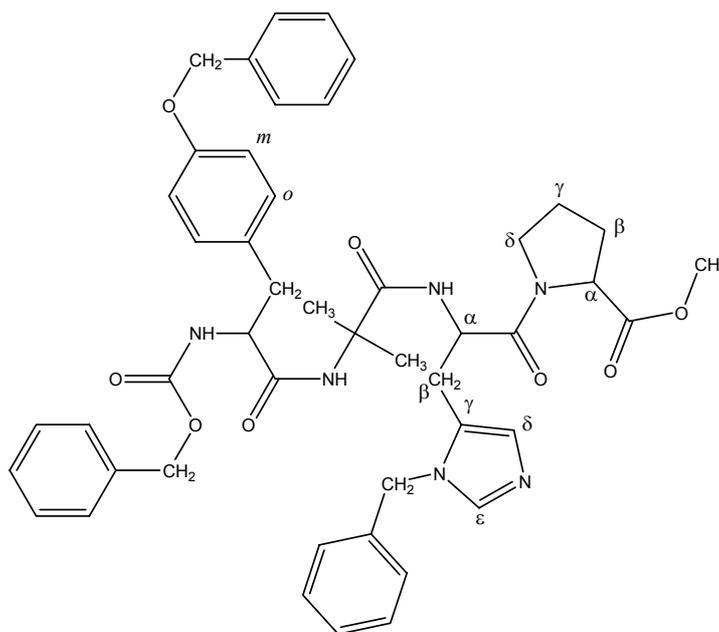
Dissolveu-se Boc-His(Bzl)-Pro-OMe (1 mmol, 0,457 g) em TFA (2 mL), arrefeceu-se a solução a 0 °C. Após 15 minutos à temperatura ambiente, foi adicionado éter etílico (50 mL à temperatura de -4 °C) à mistura reaccional, que foi deixada à temperatura de -4 °C durante 1 hora. O sólido entretanto formado foi separado por

decantação e lavado com éter etílico. Após secagem a pressão reduzida, obteve-se uma espuma sólida (99%).

P.f. não determinado.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,85-2,12 (3H, m, γCH₂(Pro)+βCH(Pro)), 2,17-2,31 (1H, m, βCH(Pro)), 3,28 (1H, dd, J = 19,2 e 5,7 Hz, βCH(His)), 3,27-3,38 (2H, m, βCH(His)+ δCH(Pro)), 3,67 (3H, s, O-CH₃), 3,70-3,80 (1H, m, δCH(Pro)), 4,55-4,95 (1H, m, αCH(Pro)), 4,64 (1H, t ap, J = 5,1 Hz, αC_αH(His)), 5,24 (2H, s, CH₂-Ar), 7,34-7,46 (7H, m, Ar, δCH(His), εCH(His)), 8,40 (3H, s, NH₃⁺).

- Preparação de Z-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-OMe (10)



Na preparação deste composto usou-se o método descrito para **(8)** fazendo a reacção entre Z-Tyr(Bzl)-Aib-OH (0,7 mmoles, 0,343 g) e H-His(Bzl)-Pro-OMe. CF₃COOH (0,7 mmoles, 0,329 g), em DCM (20 mL) durante 16 h. Após tratamento da mistura reaccional obteve-se uma espuma sólida branca (79%).

P.f.: 77,0-79,2 °C.

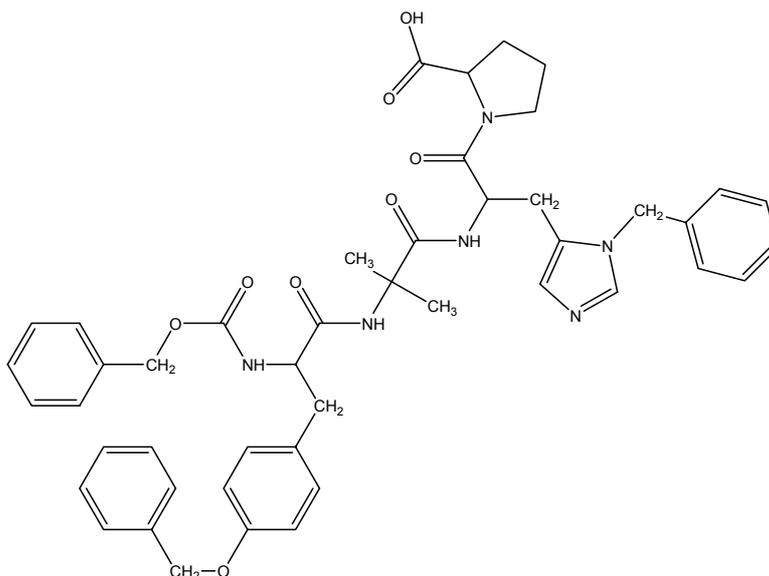
[α]_D = - 16,2° (C 1,0 %; MeOH).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 1,35 (3H, s, CH₃(Aib)), 1,48 (3H, s, CH₃(Aib)), 1,83-2,27 (4H, m, γCH₂(Pro)+βCH₂(Pro)), 2,83-3,10 (4H, m, βCH₂(Tyr)+

$\beta\text{CH}_2(\text{His})$), 3,61 (3H,s, O-CH₃), 3,56-3,83 (2H, m, $\delta\text{CH}_2(\text{Pro})$); 4,36 (1H, q ap, J = 7,5 Hz, $\alpha\text{CH}(\text{Tyr})$), 4,50 (1H, dd, J = 8,4 e 4,2 Hz, $\alpha\text{CH}(\text{Pro})$), 4,82 (1H, q ap, J = 6,0 Hz, $\alpha\text{CH}(\text{His})$), 4,95 (2H, s, CH₂-Ar (Bzl/His)), 5,02 (4H, s, 2x CH₂-Ar), 6,00 (1H, d, J = 8,1 Hz, NH(Tyr)), 6,59 (1H, s l, NH(Aib)), 6,82 (1H, s, $\delta\text{CH}(\text{His})$), 6,87 (2H, d, J = 8,4 Hz, *m*CH(Tyr)), 7,11 (2H, d, J = 8,4 Hz, *o*CH(Tyr)), 7,35 (1H, s, $\epsilon\text{CH}(\text{His})$), 7,24-7,45 (15H, m, 3 x Ar), 7,41 (1H, s, NH(His)).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 23,52 (CH₃ (Aib)), 24,91 ($\gamma\text{CH}_2(\text{Pro})$), 25,91 (CH₃ (Aib)), 28,91 ($\beta\text{CH}_2(\text{Pro})$), 29,63 ($\beta\text{CH}_2(\text{His})$), 37,37 ($\beta\text{CH}_2(\text{Tyr})$), 46,82 ($\delta\text{CH}_2(\text{Pro})$), 50,75 (CH₂-Ar(His(Bzl))), 51,31 ($\alpha\text{C}(\text{His})$), 52,00 (O-CH₃), 56,54 ($\alpha\text{CH}(\text{Tyr})$), 57,09 ($\alpha\text{C}(\text{Aib})$), 58,62 ($\alpha\text{CH}(\text{Pro})$), 66,92 (CH₂-Ar(Tyr(Bzl))), 69,91 (CH₂-Ar(Z)), 114,88 (*m*CH(Tyr)), 118,15 ($\delta\text{CH}_2(\text{His})$), 127,25, 127,34, 127,41, 127,89, 128,01, 128,11, 128,47, 128,52, 128,87 e 128,98 (15 CH-Ar), 130,56 (*o*CH(Tyr)), 136,17 ($\gamma\text{C}(\text{His})$), 136,84 (C quaternário (His(Bzl))), 136,99 ($\epsilon\text{C}(\text{His})$), 137,18 (C quaternário- βCH_2 Ar(Tyr) e C quaternário (Z)), 156,06 (C=O (Z)), 157,69(C-O(Tyr)), 169,85 (C=O, (His)), 170,13 (C=O, (Tyr)), 172,63 (C=O, (Pro)), 173,86 (C=O, (Aib)).

- Preparação de Z-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-OH (11)



Este composto foi obtido como um sólido branco (85%) usando o método descrito para **(4)** (Z-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-OMe (0,2 mmoles, 0,166 g), 3 equivalentes de base), com tempo de reacção de 20 h à temperatura ambiente.

P.f. 102,4-103,1 °C.

$[\alpha]_D = -6,0^\circ$ (C 1,0 %; MeOH).

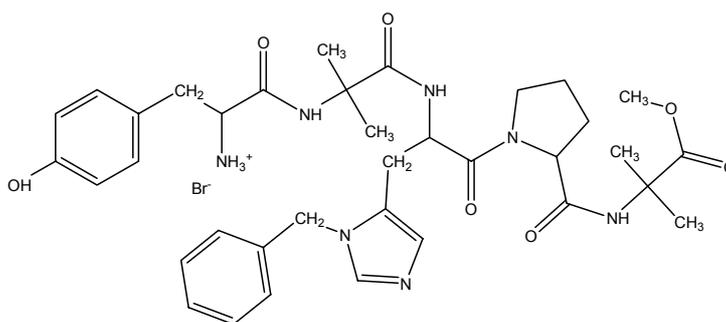
Análise elementar: Calculado para $C_{46}H_{50}N_6O_8 \cdot H_2O$: C 66,33, H 6,29, N 10,09; encontrado: C 66,15, H 6,30, N 9,74.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 1,34 (3H, s, CH_3 (Aib)), 1,43 (3H, s, CH_3 (Aib)), 1,81-1,96 (2H, m, γCH_2 (Pro)), 2,03-2,21 (2H, m, βCH_2 (Pro)), 2,85-3,12 (3H, m, βCH_2 (His) + βCH (Tyr)), 3,19-3,32 (2H, m, βCH (Tyr) + δCH (Pro)), 3,63-3,72 (1H, m, δCH (Pro)), 4,37 (1H, q ap, $J = 7,2$ Hz, αCH (Tyr)), 4,48 (1H, t ap, $J = 6,6$ Hz, αCH (Pro)), 4,79 (1H, dd, $J = 12,4$ e $6,9$ Hz, αCH (His)), 5,23 (1H, d, $J = 14,7$ Hz, NH(Tyr)), 6,02 (1H, s l, NH (Aib)), 6,83 (1H, s, δCH (His)), 6,83 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, $m CH$ (Tyr)), 7,12 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, $o CH$ (Tyr)), 7,17-7,47 (16H, m, Ar + ϵCH (His)), 8,24 (1H, s, NH(His)), não foi observado o grupo OH.

^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 24,13 (CH_3 (Aib)), 24,98 (γCH_2 (Pro)), 25,91 (CH_3 (Aib)), 27,64 (βCH_2 (Pro)), 29,34 (βCH_2 (His)), 37,16 (βCH_2 (Tyr)), 47,41 (δCH_2 (Pro)), 50,77 (αC (His)), 52,16 (CH_2 -Ar(His(Bzl))), 56,53 (αCH (Tyr)), 56,82 (αC (Aib)), 61,10 (αCH (Pro)), 66,79 (CH_2 -Ar(Tyr(Bzl))), 69,87 (CH_2 -Ar(Z)), 114,76 ($m CH$ (Tyr)), 119,42 (δCH_2 (His)), 127,42, 127,93, 128,22, 128,40, 128,55, 128,82 e 129,10, (15 CH -Ar), 130,43 ($o CH$ (Tyr)), 134,27 (γC (His)), 135,80 (C quaternário (His(Bzl))), 136,33 (ϵC (His)), 136,95 (C quaternário- βCH_2 Ar(Tyr) e C quaternário (Z)), 156,29 (C=O (Z)), 157,58 (C-O(Tyr)), 169,36 (C=O, (His)), 170,73 (C=O, (Tyr)), 174,25 (C=O, (Aib)), 175,67 (C=O, (Pro)).

(($\beta\text{CH}_2(\text{His})$), 37,37 ($\beta\text{CH}_2(\text{Tyr})$), 47,29 (($\delta\text{CH}_2(\text{Pro})$), 50,90 ($\text{CH}_2\text{-Ar}(\text{His}(\text{Bzl}))$), 51,93 ($\alpha\text{C}(\text{His})$), 52,24 (O-CH_3), 56,12 ($\alpha\text{C}(\text{Aib})$), 56,54 ($\alpha\text{CH}(\text{Tyr})$), 56,90 ($\alpha\text{C}(\text{Aib})$), 60,67 ($\alpha\text{CH}(\text{Pro})$), 66,93 ($\text{CH}_2\text{-Ar}(\text{Z})$), 69,89 ($\text{CH}_2\text{-Ar}(\text{Tyr}(\text{Bzl}))$), 114,97 ($m\text{CH}(\text{Tyr})$), 117,99 ($\delta\text{CH}_2(\text{His})$), 127,28, 127,35, 127,37, 127,48, 127,90, 127,92, 127,96, 128,09, 128,20, 128,37, 128,45, 128,48, 128,70, 128,84 e 129,00 (15 CH-Ar), 128,51 ($o\text{CH}(\text{Tyr})$), 130,45 (C quaternário- βCH_2 $\text{Ar}(\text{Tyr})$, 135,85 ($\gamma\text{C}(\text{His})$), 136,53 ($\epsilon\text{C}(\text{His})$), 136,78 (C quaternário ($\text{His}(\text{Bzl})$), 136,89 (C quaternário- βCH_2 $\text{Ar}(\text{Tyr})$, 137,38 (C quaternário (Z)), 156,05 ($\text{C=O}(\text{Z})$), 157,74($\text{C-O}(\text{Tyr})$), 170,24 (C=O , (Tyr)), 170,93 (C=O , (His)), 172,10 (C=O , (Pro)), 173,49 (C=O , (Aib)), 175,09 (C=O , (Aib)).

- Preparação de H-Tyr-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe.HBr (13)



A uma solução de HBr/ CH_3COOH (33%) (13 mL) adicionou-se, com agitação, Z-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe (0,1 mmoles, 0,092 g), deixando a mistura protegida da humidade (vaso reaccional tapado com tubo contendo CaCl_2). Após 1h (reacção seguida por tlc) adicionou-se éter dietílico seco (cerca de 100 mL), e deixou-se a baixa temperatura ($-4\text{ }^\circ\text{C}$) durante 3 h. O sólido entretanto formado foi filtrado e seco, obtendo-se um sólido branco (83%).

P.f.: 193,5-199,8 $^\circ\text{C}$ (com decomposição).

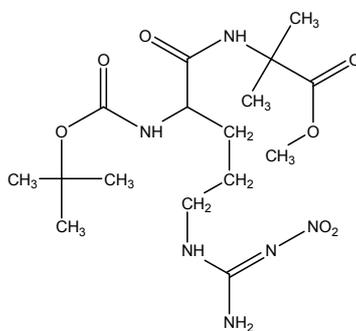
HRMS: previsto para $[\text{M}+1]^+$: 690,36; encontrado: 690,58.

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,12 (3H, s, $\text{CH}_3(\text{Aib})$), 1,16 (3H, s, $\text{CH}_3(\text{Aib})$), 1,30 (3H, s, $\text{CH}_3(\text{Aib})$), 1,34 (3H, s, $\text{CH}_3(\text{Aib})$), 1,70-1,92 (3H, m, $\gamma\text{CH}_2(\text{Pro})+\beta\text{CH}(\text{Pro})$), 2,02-2,20 (1H, m, $\beta\text{CH}(\text{Pro})$), 2,71-2,92 (2H, m, $\beta\text{CH}(\text{Tyr})+\beta\text{CH}(\text{His})$), 2,93-3,12 (2H, m, $\beta\text{CH}(\text{Tyr})+\beta\text{CH}(\text{His})$), 3,40-3,60 (2H, m, $\delta\text{CH}_2(\text{Pro})$), 3,53 (3H, s, O-CH_3), 3,92-4,06 (1H, m, $\alpha\text{CH}(\text{Tyr})$), 4,29 (1H, dd, $J = 8,4\text{ Hz}$, $3,9\text{ Hz}$,

α CH(Pro)), 4,78-4,89 (1H, m, α CH(His)), 5,37 (2H, s, CH₂-Ar (Bzl/His)), 6,71 (2H, d, J = 8,4 Hz, *m*CH(Tyr)), 7,06 (2H, d, J = 8,4 Hz, *o*CH(Tyr)), 7,35-7,44 (5H, m, Ar), 7,49 (1H, m, δ CH(His)), 7,71 (1H, d, J = 8,4 Hz, NH(His)), 8,04 (3H, s ap l, NH₃⁺), 8,34 (1H, s, NH(Aib)), 8,49 (1H, s, NH(Aib)), 9,18 (1H, s, ϵ CH(His)), 14,12 (1H, s l, OH(Tyr)).

¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 23,91 (CH₃ (Aib)), 24,25 (γ CH₂(Pro)), 24,53 (CH₃ (Aib)), 25,34 (CH₃ (Aib)), 25,65 (CH₃ (Aib)), 26,47 ((β CH₂(His)), 29,20 (β CH₂(Pro)), 35,94 (β CH₂(Tyr)), 46,83 ((δ CH₂(Pro)), 49,66 (α C(His)), 51,69 (CH₂-Ar(His(Bzl))), 51,83 (O-CH₃), 53,88 (α CH(Tyr)), 55,10 (α C(Aib)), 56,24 (α C(Aib)), 59,21 (α CH(Pro)), 115,28 (*m*CH(Tyr)), 120,39 (δ CH₂(His)), 124,95 (*o*CH(Tyr)), 128,28, 128,63 e 128,97 (5 CH-Ar), 129,86 (γ C(His)), 130,56 (C quaternário- β CH₂ Ar(Tyr)), 134,54 (ϵ C(His)), 134,95 (C quaternário (His(Bzl))), 156,52 (C-O(Tyr)), 167,69 (C=O, (Tyr)), 167,99 (C=O, (His)), 171,09 (C=O, (Pro)), 172,93 (C=O, (Aib)), 174,30 (C=O, (Aib)).

- Preparação de Boc-Arg(NO₂)-Aib-OMe (14)



Na preparação deste composto usou-se o método descrito para **(3)**, fazendo a reacção entre Boc-Arg(NO₂)-OH (5 mmoles, 1,60 g) e H-Aib-OMe.CF₃COOH (5 mmoles, 0,773 g), em EtOAc (20 mL). O produto obtido após o tratamento da mistura reaccional, foi purificado por cromatografia em coluna (100 g de sílica gel; DCM/MeOH 19:1 como eluente) obtendo-se uma espuma sólida (57 %) após evaporação do solvente.

P.f.: 96,7-98,8 °C.

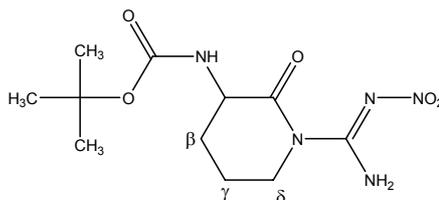
[α]_D = - 7,0° (C 1,0 %; MeOH).

Análise elementar: Calculado para $C_{16}H_{30}N_6O_7 \cdot \frac{3}{2}H_2O$: C 43,13, H 7,48, N 18,87; encontrado: C 42,76, H 6,87, N 18,89.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 1,44 (9H, s, Boc), 1,53 (3H, s, CH_3 (Aib)), 1,54 (3H, s, CH_3 (Aib)), 1,63-1,92 (4H, m, βCH_2 (Arg)+ γCH_2 (Arg)), 3,33-3,50 (2H, m, δCH_2 (Arg)), 3,74 (3H, s, O- CH_3), 4,26 (1H, s l ap, αCH (Arg)), 5,47 (1H, d, J = 7,5 Hz, NH(Arg)), 7,06 (1H, s, NH(Aib)), 7,59 (2H, s l, NH_2), 8,63 (1H, s l, ϵNH (Arg)).

^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 24,50 (γCH_2 (Arg)), 24,72 e 24,85 (CH_3 (Aib)), 28,26 (CH_3 (Boc)), 30,39 (βCH_2 (Arg)), 40,55 (δCH_2 (Arg)), 52,56 (O- CH_3), 53,03 (αC (Arg)), 56,26 (αC (Aib)), 80,22 (C quaternário (Boc)), 156,16 (C=O (Boc)), 159,36 (C quaternário (Arg)), 171,47(C=O(Arg)), 174,80 (C=O(Aib)).

Nota: Conforme indicado na discussão, foi isolado um composto resultante da ciclização da Arg, após uma tentativa de preparação de (14), cuja caracterização é a seguinte:

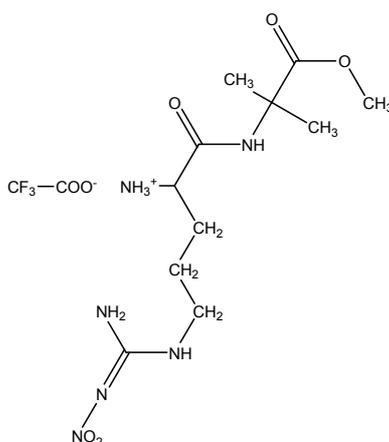


P.f.: 131,5-132,8 °C.

Análise elementar: Calculado para $C_{11}H_{19}N_5O_5$: C 43,85, H 6,36, N 23,24; encontrado: C 44,00, H 6,29, N 23,22.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 1,47 (9H, s, Boc), 1,56-1,73 (1H, m, βCH), 1,88-2,05 (2H, m, γCH_2), 2,42-2,56 (1H, m, βCH), 3,50-3,63 (2H, m, δCH), 4,47 (1H, q ap, J = 11,4 Hz, αCH), 4,67 (1H, dt, J = 13,1 e 4,8 Hz, δCH), 5,16 (1H, d, J = 6,0 Hz, NH), 9,54 (1H, s l, NH_2), 10,41 (1H, s l, NH_2).

- Preparação de H-Arg(NO₂)-Aib-OMe.CF₃COOH (15)



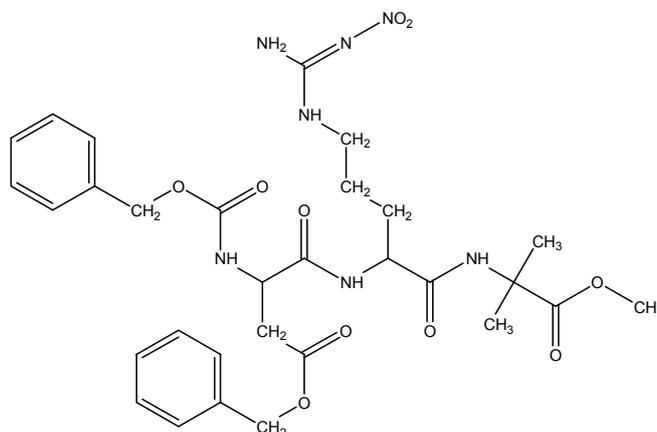
Na preparação deste composto usou-se o método descrito para **(9)**, reagindo Boc-Arg(NO₂)-Aib-OMe (1 mmoles, 0,418 g) em TFA (2 mL), durante 20 min. Após tratamento da mistura reaccional, obteve-se um sólido branco (98%).

P.f.: 114,0-116,0 °C.

[α]_D = + 31,6° (C 1,0 %; MeOH).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1,36 (3H, s, CH₃(Aib)), 1,40 (3H, s, CH₃(Aib)), 1,46-1,59 (2H, m, γCH₂(Arg)), 1,62-1,74 (2H, m, βCH₂(Arg)), 3,18 (2H, s l ap, δCH₂(Arg)), 3,57 (3H, s, O-CH₃), 3,69 (1H, t ap, J = 6,0 Hz, αCH(Arg)), 7,91 (3H, s l, NH₃⁺), 8,08 (1H, s l, NH), 8,61 (1H, s l, NH), 8,76 (2H, s, NH₂).

- Preparação de Z-Asp(OBzl)-Arg(NO₂)-Aib-OMe (16)

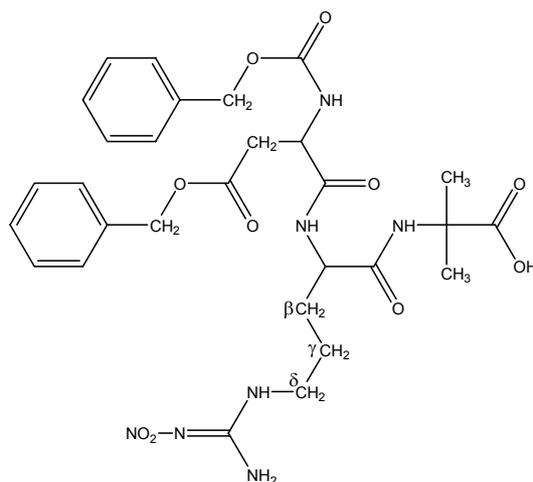


Na preparação deste composto usou-se o método descrito para **(8)**, fazendo a reacção entre Z-Asp(Bzl)-OH (1,0 mmoles, 0,357 g) e H-Arg(NO₂)-Aib-OMe.CF₃COOH (1,0 mmoles, 0,432 g), em diclorometano (50 mL), durante 22 h. Após tratamento da mistura reaccional, obteve-se um sólido branco (94%).

P.f.: 82,6-85,0 °C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,50 (3H, s, CH₃(Aib)), 1,51 (3H, s, CH₃(Aib)), 1,63-1,77 (2H, m, γCH₂(Arg)), 1,79-1,97 (2H, m, βCH₂(Arg)), 2,85 (1H, dd, J = 16,8 Hz, 6,0 Hz, βCH(Asp)), 3,05 (1H, dd, J = 16,8 e 5,1 Hz, βCH(Asp)), 3,12-3,36 (2H, m, δCH₂(Arg)), 3,70 (3H, s, O-CH₃), 4,48-4,65 (2H, m, αCH(Arg)+ αCH(Asp)), 5,08 (2H, s, CH₂-Ar), 5,11 (2H, s, CH₂-Ar), 6,01 (1H, d, J = 8,7 Hz, NH(Arg)), 7,02 (1H, s, NH(Aib)), 7,28-7,40 (12H, m, Ar+NH(Asp)+εNH(Arg)), 8,30 (2H, s l, NH₂).

- Preparação de Z-Asp(OBzl)-Arg(NO₂)-Aib-OH (17)



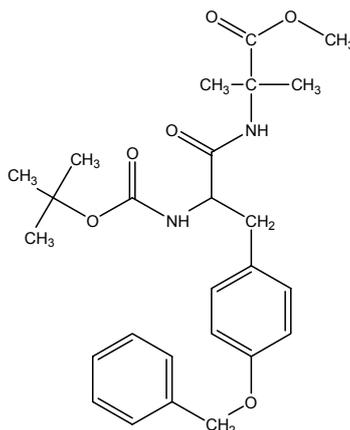
Usando o método descrito para **(4)**, este composto foi obtido como um sólido branco (25%), (partindo de 0,3 mmol, 0,197 g, de Z-Asp(Bzl)-Arg(NO₂)-Aib-OMe) com tempo de reacção de 40 min à temperatura ambiente.

P.f.: 126,0-128,0 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm): 1,31 (3H, s, CH₃(Aib)), 1,34 (3H, s, CH₃(Aib)), 1,40-1,75 (4H, m, γCH₂(Arg) + βCH₂(Arg)), 2,55-2,78 (2H, m, βCH₂(Asp)), 3,05-3,20 (2H, m, δCH₂(Arg)), 4,20-4,40 (2H, m, αCH(Arg)+αCH(Asp)), 5,00 (2H, s,

CH₂-Ar), 5,01 (2H, s, CH₂-Ar), 7,28-7,44 (10H, m, Ar), 7,62 (1H, d, J = 6,0 Hz, NH(Asp)), 7,84 (1H, d, J = 6,0 Hz, NH(Arg)), 8,00 (2H, m., NH₂), 8,22 (1H, s, NH(Aib)), 8,50 (1H, s ap l, εNH(Arg)), 12,50 (1H, s l, OH).

- Preparação de Boc-Tyr(Bzl)-Aib-OMe (18)



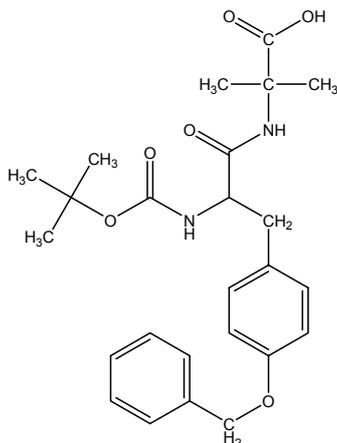
Foi usado o método descrito para **(3)**, (DCCI/HOBt, em DCM, um eq de Et₃N), fazendo a reacção entre o Boc-Tyr(OBzl)-OH (10 mmoles, 3,71 g) e H-Aib-OMe.HCl (10 mmoles, 1,54 g). O composto foi isolado, após cristalização com uma mistura de Et₂O e éter de petróleo, como um sólido branco com um rendimento de 85%.

P.f.: 80,7-82,0 °C.

[α]_D = - 3,6° (C 1,0 %; MeOH).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 1,43 (12H, s, CH₃ (Aib) + CH₃(Boc)), 1,45 (3H, s, CH₃ (Aib)), 2,92 (1H, dd, J = 13,8 Hz, 7,8 Hz, βCH (Tyr)), 3,04 (1H, dd, J = 11,1 e 6,0 Hz, βCH (Tyr)), 3,72 (3H, s, O-CH₃), 4,23 (1H, d ap, J = 6,0 Hz, αCH (Tyr)), 5,06 (2H, s, -CH₂-Ar(Bzl) + NH (Tyr)), 6,24 (1H, s, NH(Aib)), 6,92 (2H, d, J = 9,0 Hz, *m*CH(Tyr)), 7,15 (2H, d, J = 9,0 Hz, *o*CH(Tyr)), 7,32-7,45 (5H, m, Ar).

- Preparação de Boc-Tyr(Bzl)-Aib-OH (19)



Este composto foi obtido como um sólido branco (84%) usando o método descrito para **(4)** (5,0 mmol, 2,35 g, de Z-Tyr(Bzl)-Aib-OMe , usando 1 equivalente de base), com tempo de reacção de 7 h, à temperatura ambiente.

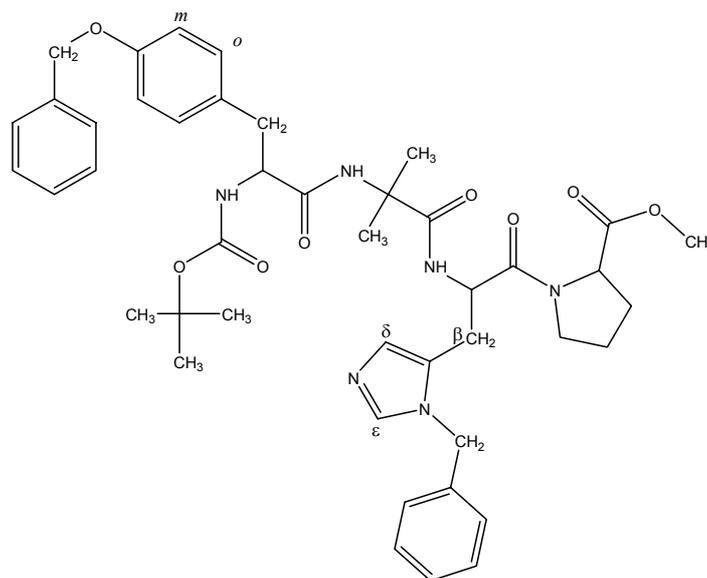
P.f.: 78,8-80,4 °C.

[α]_D = + 2,4° (C 1,0 %; MeOH).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 1,41 (9H, s, CH₃(Boc)), 1,46 (3H, s, CH₃(Aib)), 1,49 (3H, s, CH₃(Aib)), 2,98 (2H, d ap, J = Hz, β CH₂(Tyr)), 4,40 (1H, s ap l, α CH(Tyr)), 5,03 (2H, s, -CH₂-Ar(Bzl)), 5,43 (1H, s l, NH(Tyr)), 6,77 (1H, s l, NH (Aib)), 6,91 (2H, d, J = 8,4 Hz, *m*CH(Tyr)), 7,15 (2H, d, J = 8,1 Hz, *o*CH(Tyr)), 7,31-7,44 (5H, m, Ar), 8,83 (1H, s l, OH).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 24,23 (CH₃ (Aib)), 24,53 (CH₃ (Aib)), 28,66 (CH₃ (Boc)), 37,66 (β CH₂(Tyr)), 55,79 (α CH(Tyr)), 56,34 (α C(Aib)), 69,91 (CH₂-Ar(Tyr(Bzl))), 114,94 (*m*CH(Tyr)), 127,38, 127,90, 128,83 (5 CH-Ar), 130,48 (*o*CH(Tyr)), 136,94 (C qaternário- β CH₂ Ar(Tyr)), 155,91 (C qaternário (Bzl)), 157,71 (C-O(Tyr)), 171,47 (C=O, (Tyr)), 177,21 (C=O, (Aib)).

- Preparação de Boc-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-OMe (20)



Na preparação deste composto usou-se o método descrito para **(8)**, fazendo a reacção entre Boc-Tyr(Bzl)-Aib-OH (1,4 mmoles, 0,639 g) e H-His(Bzl)-Pro-OMe. CF₃COOH (1,4 mmoles, 0,659 g), em EtOAc (25 mL) durante 14 h. Após tratamento da mistura reaccional obteve-se um sólido branco (90%), ligeiramente contaminado com TMU.

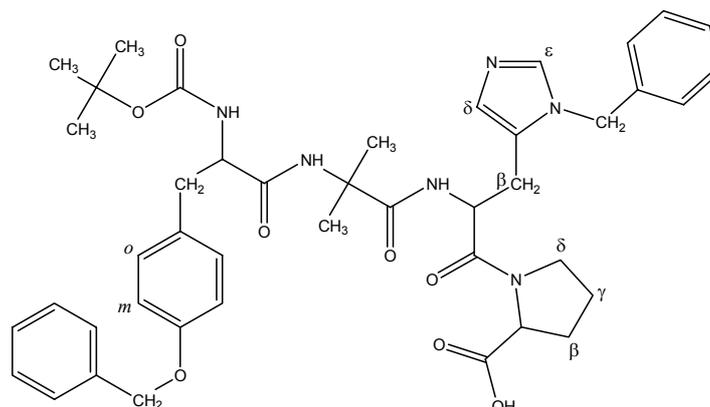
P.f.: 85,8-87,1 °C.

[α]_D = - 10,4° (C 1,0 %; MeOH).

Análise elementar: Calculado para C₄₄H₅₄N₆O₈.2H₂O: C 63,60, H 6,99, N 10,12; encontrado: C 63,28, H 6,77, N 10,17.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 1,38 (9H, s, CH₃(Boc)), 1,40 (3H, s, CH₃(Aib)), 1,47 (3H, s, CH₃(Aib)), 1,86-2,24 (4H, m, γCH₂(Pro)+βCH₂(Pro)), 2,83-3,10 (4H, m, βCH₂(Tyr) + βCH₂(His)), 3,63 (3H,s, O-CH₃), 3,52-3,81 (2H, m, δCH₂(Pro)); 4,28 (1H, q ap, J = 7,2 Hz, αCH(Tyr)), 4,50 (1H, dd, J = 8,4 Hz, 4,5 Hz, αCH(Pro)), 4,83 (1H, q ap, J = 7,5 Hz, αCH(His)), 5,03 (2H, s, CH₂-Ar (Bzl/His)), 5,07 (2H, s, CH₂-Ar (Bzl/Tyr)), 5,55 (1H, d, J = 8,1 Hz, NH(Tyr)), 6,62 (1H, s l, NH(Aib)), 6,87-6,90 (3H, m, δCH(His) + mCH(Tyr)), 7,10-7,19 (2H, m, oCH(Tyr)), 7,24-7,45 (11H, m, εCH(His) + Ar), 7,62 (1H, s, NH(His)).

- Preparação de Boc-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-OH (21)



Este composto foi obtido como um sólido branco (61%) usando o método descrito para **(4)** (2,0 mmol, 1,19 g, de Boc-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-OMe, usando 1 equivalentes de base (adicionada a 0 °C)), com tempo de reacção de 7 h à temperatura ambiente.

P.f.: 145,8-147,2 °C.

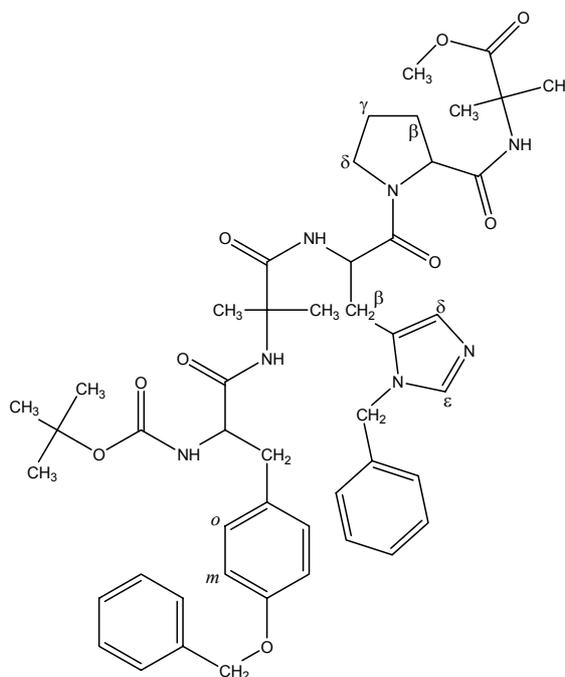
HRMS: previsto para $[M+1]^+$: 781,39; encontrado: 781,58.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1,28 (9H, s, CH₃(Boc)), 1,32 (3H, s, CH₃(Aib)), 1,34 (3H, s, CH₃(Aib)), 1,75-1,92 (3H, m, γ CH₂(Pro) + β CH(Pro)), 2,04-2,22 (1H, m, β CH(Pro)), 2,58-2,71 (2H, m, β CH(His) + β CH(Tyr)), 2,78-2,97 (2H, m, β CH(His) + β CH(Tyr)), 3,48-3,64 (2H, m, δ CH₂(Pro)), 4,02-4,13 (1H, m, α CH(Tyr)), 4,20 (1H, t ap, J = 5,4 Hz, α CH(Pro)), 4,65-4,81 (1H, m, α CH(His)), 5,05 (2H, s, -CH₂-Ar (Bzl/His)), 5,25 (2H, s, -CH₂-Ar (Bzl/Tyr)), 6,86-6,92 (3H, m, δ CH(His) + *m*CH(Tyr)), 7,10-7,18 (2H, m, *o*CH(Tyr)), 7,26-7,43 (11H, m, Ar + ϵ CH(His)), 7,94 (1H, s l, NH (Aib)), 8,01 (1H, s l, NH(Tyr)), 8,58 (1H, s l, NH(His)), 12,20 (1H, s l, OH).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 24,20 (CH₃ (Aib)), 24,40 (γ CH₂(Pro)), 24,77 (CH₃ (Aib)), 27,83 (β CH₂(His)), 28,12 (CH₃ (Boc)), 28,75 (β CH₂(Pro)), 36,80 (β CH₂(Tyr)), 46,44 (δ CH₂(Pro)), 50,04 (α C(His)), 50,93 (CH₂-Ar(His/Bzl)), 55,55 (α CH(Tyr)), 56,44 (α C(Aib)), 58,86 (α CH(Pro)), 69,10 (CH₂-Ar(Tyr/Bzl)), 77,97 (C(CH₃)₃ (Boc)), 114,28 (*m*CH(Tyr)), 119,13 (δ CH₂(His)), 127,57, 127,59, 127,74, 127,91, 128,40 e 128,84 (10 CH-Ar), 130,19 (*o*CH(Tyr)), 130,29 (C quaternário- β CH₂ Ar(Tyr)), 135,41 (γ C(His)), 137,23 (ϵ C(His)), 137,25 (C quaternário (His(Bzl))), 156,09

(C=O (Boc)), 156,87 (C-O(Tyr)), 171,32 (C=O, (Tyr)), 173,17 (C=O, (His)), 174,62 (C=O, (Aib)), 175,47 (C=O, (Pro)).

- Preparação de Boc-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe (22)



Na preparação deste composto usou-se o método descrito para **(8)**, fazendo a reacção entre Boc-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-OH (1,0 mmoles, 0,781 g) e H-Aib-OMe.HCl (1,0 mmoles, 0,154 g), adicionando a base (Et₃N, 0,13 mL) a baixa temperatura, em EtOAc (50 mL) durante 21 h. Após tratamento da mistura reaccional obteve-se um sólido branco (92%) cristalizando de uma mistura de EtOAc/Et₂O.

P.f.: 104,5-105,6 °C.

[α]_D = - 21,2° (C 1,0 %; MeOH).

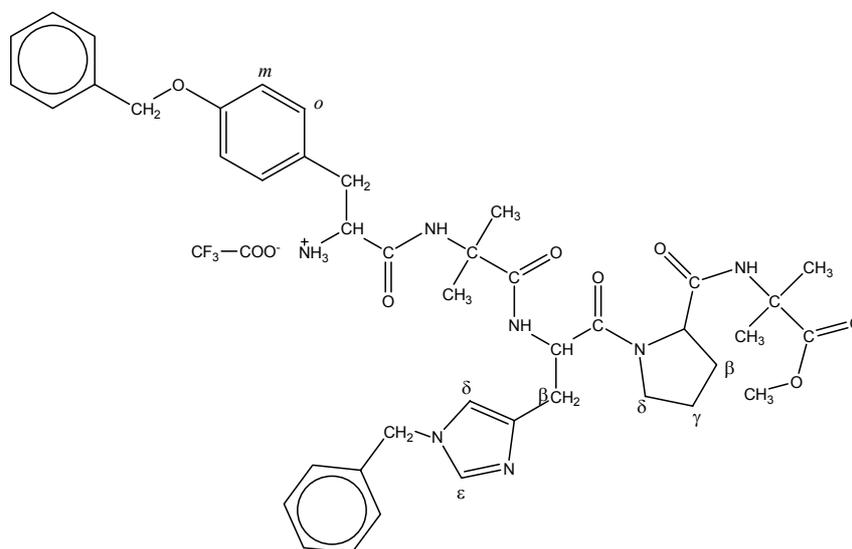
HRMS: previsto para [M+1]⁺: 880,46; encontrado: 880,67

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,37 (9H, s, CH₃(Boc)), 1,40 (3H, s, CH₃(Aib)), 1,45 (3H, s, CH₃(Aib)), 1,46 (3H, s, CH₃(Aib)), 1,47 (3H, s, CH₃(Aib)), 1,80-2,06 (3H, m, γCH₂(Pro)+βCH(Pro)), 2,12-2,24(1H, m, βCH(Pro)), 2,84-3,08 (4H, m, βCH₂(Tyr)+ βCH₂(His)), 3,44-3,82 (2H, m, δCH₂(Pro)), 3,62 (3H,s, O-CH₃), 4,20-4,36 (1H, m, αCH(Tyr)), 4,49 (1H, dd, J = 8,4 e 4,2 Hz, C_αH(Pro)), 4,78-4,86 (1H, m, αCH(His)), 5,02 (2H, s, CH₂-Ar (Bzl/Tyr)), 5,04 (2H, s, CH₂-Ar (Bzl/His)), 5,58 (1H,

d, $J = 8,1$ Hz, NH(Tyr)), 6,65 (1H, s l, NH(Aib)), 6,85-6,92 (3H, m, δ CH(His) + m CH(Tyr)), 7,10-7,17 (3H, m, o CH(Tyr) + NH(His)), 7,22-7,43 (11H, m, Ar + ϵ CH(His)), 8,42 (1H, s l, NH(Aib)).

^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 23,73 (γ CH₂(Pro)), 24,73 (CH₃ (Aib)), 24,90 (CH₃ (Aib)), 25,58 (CH₃ (Aib)), 25,73 (CH₃ (Aib)), 28,23 (CH₃ (Boc)), 28,91 (β CH₂(Pro)), 30,88 (β CH₂(His)), 37,37 (β CH₂(Tyr)), 46,84 (δ CH₂(Pro)), 50,86 (CH₂-Ar(His(Bzl))), 51,26 (α C(His)), 51,99 (O-CH₃), 56,12 (α CH(Tyr)), 56,86 (α C(Aib)), 57,00 (α C(Aib)), 58,65 (α CH(Pro)), 69,93 (CH₂-Ar(Tyr(Bzl))), 114,88 (m CH(Tyr)), 118,25 (δ CH(His)), 127,31, 127,38, 127,86, 128,17, 128,40, 128,37, 128,51 (10 CH-Ar), 128,90 (o CH(Tyr)), 130,51 (C quaternário- β CH₂ Ar(Tyr)), 136,10 (γ C(His)), 136,54 (ϵ C(His)), 136,70 (C quaternário (His(Bzl))), 137,02 (C quaternário (Tyr/Bzl)), 155,49 (C=O (Boc)), 157,65 (C-O(Tyr)), 170,56 (C=O, (Tyr)), 172,61 (C=O, (Pro)), 173,52 (C=O, (Aib)), 173,91 (C=O, (His)), 175,03 (C=O, (Aib)).

- Preparação de H-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe.CF₃COOH (23)



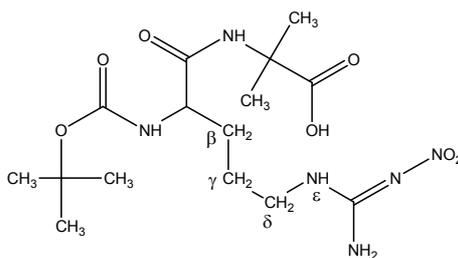
Na preparação deste composto usou-se o método descrito para (9), deixando Boc-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe (0,4 mmoles, 0,352 g) numa mistura de TFA (1 mL) e EtOAc (2mL), durante 35 min, a 0 °C. Após tratamento da mistura reaccional, obteve-se um sólido branco (68%).

P.f.: decomp. a 230 °C.

HRMS: previsto para $[M+1]^+$: 780,41; encontrado: 780,41.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,13 (3H, s, $\text{CH}_3(\text{Aib})$), 1,16 (3H, s, $\text{CH}_3(\text{Aib})$), 1,22 (3H, s, $\text{CH}_3(\text{Aib})$), 1,25 (3H, s, $\text{CH}_3(\text{Aib})$), 1,75-1,95 (3H, m, $\gamma\text{CH}_2(\text{Pro})+\beta\text{CH}(\text{Pro})$), 2,10-2,22(1H, m, $\beta\text{CH}(\text{Pro})$), 2,70-3,10 (4H, m, $\beta\text{CH}_2(\text{Tyr})+\beta\text{CH}_2(\text{His})$), 3,40-3,70 (2H, m, $\delta\text{CH}_2(\text{Pro})$), 3,57 (3H,s, O- CH_3), 4,00-4,15 (1H, m, $\alpha\text{CH}(\text{Tyr})$), 4,18-4,24 (1H, m, $\alpha\text{CH}(\text{Pro})$), 4,72-4,87 (1H, m, $\alpha\text{CH}(\text{His})$), 5,05 (2H, s, $\text{CH}_2\text{-Ar}$ (Bzl/His)), 5,31 (2H, s, $\text{CH}_2\text{-Ar}$ (Bzl/Tyr)), 6,86-6,97 (3H, m, $\delta\text{CH}(\text{His}) + m\text{CH}(\text{Tyr})$), 7,10-7,22 (3H, m, $o\text{CH}(\text{Tyr}) + \text{NH}(\text{Aib})$), 7,28-7,43 (11H, m, Ar + $\epsilon\text{CH}(\text{His})$), 7,61 (1H, d, $J = 4,0$ Hz, $\text{NH}(\text{His})$), 8,03 (3H, s l, $\text{NH}_3^+(\text{Tyr})$), 8,97 (1H, s l, $\text{NH}(\text{Aib})$).

- Preparação de Boc-Arg(NO_2)-Aib-OH (24)



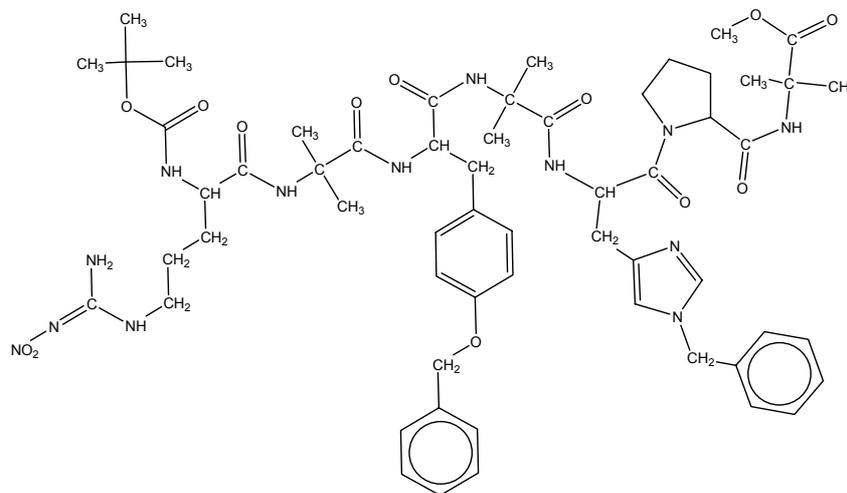
Este composto foi obtido usando o método descrito para **(4)**, (0,4 mmol, 0,167 g, de Boc-Arg(NO_2)-Aib-OMe, usando 3 equivalentes de base), com tempo de reacção de 22 h, à temperatura ambiente (adicionando 2 eq de HCl 1M no fim da reacção). Após tratamento da mistura reaccional, obteve-se uma solução aquosa, que foi extraída com EtOAc. A fase orgânica foi seca com MgSO_4 e após evaporação do solvente, resultou um sólido branco (81%).

P.f.: 120,2-122,0 °C.

$[\alpha]_D$ = - 5,9 ° (C 1,0 %; MeOH).

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,32 (9H, s, Boc), 1,34 (3H, s, $\text{CH}_3(\text{Aib})$), 1,37 (3H, s, $\text{CH}_3(\text{Aib})$), 1,40-1,63 (4H, m, $\beta\text{CH}_2(\text{Arg})+\gamma\text{CH}_2(\text{Arg})$), 3,05-3,18 (2H, m, $\delta\text{CH}_2(\text{Arg})$), 3,84-3,98(1H, m, $\alpha\text{CH}(\text{Arg})$), 6,71 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, $\text{NH}(\text{Arg})$), 7,65-8,15 (1H, m, $\epsilon\text{NH}(\text{Arg})$) 7,96 (2H, s, $\text{NH}_2(\text{Arg})$), 8,47 (1H, s, $\text{NH}(\text{Aib})$), 12,23 (1H, s, OH).

- Preparação de Boc-Arg(NO₂)-Aib-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe
(25)



Na preparação deste composto usou-se o método descrito para **(8)** fazendo a reacção entre o Boc-Arg(NO₂)-Aib-OH (0,24 mmoles, 0,097 g) e H-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe.CF₃COOH (0,24 mmoles, 0,210 g), adicionando a base (Et₃N, 0,033 mL) a baixa temperatura, em EtOAc (25 mL) durante 24 h. Após tratamento da mistura reaccional obteve-se um sólido branco (76%) cristalizando de uma mistura de MeOH/Et₂O.

P.f.: 142,0-143,5 °C.

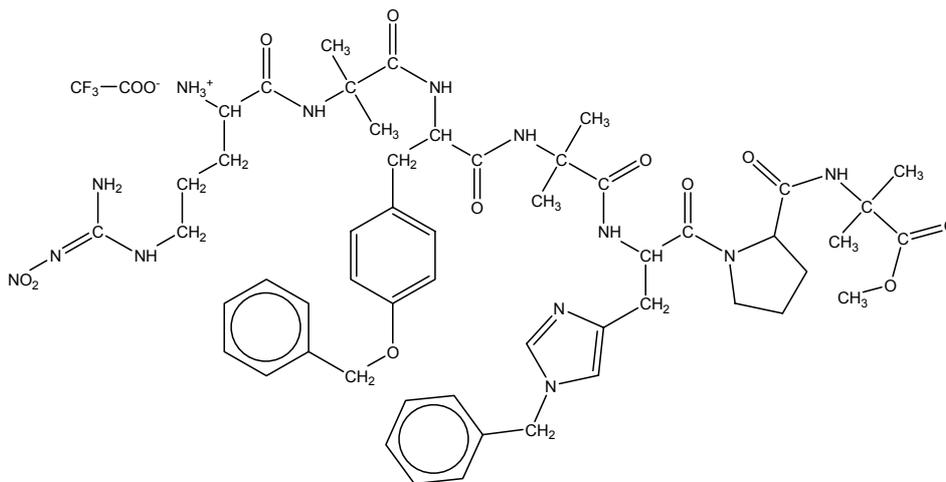
HRMS: previsto para [M+1]⁺: 1166,60, encontrado: 1166,67.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1,18-1,39 (27H, m, CH₃(Aib) + CH₃(Boc)), 1,40-1,63 (4H, m, βCH₂(Arg) + γCH₂(Arg)), 1,68-2,03 (4H, m, γCH₂(Pro)+βCH₂(Pro)), 2,58-2,94 (4H, m, βCH₂(Tyr) + βCH₂(His)), 3,02-3,18 (2H, m, δCH₂(Arg)), 3,37-3,60 (2H, m, δCH₂(Pro), sob o pico da água), 3,53 (3H,s, O-CH₃), 3,75-3,88 (1H, m, αCH(Tyr)), 3,97-4,08 (1H, m, αCH(Arg)), 4,16 (1H, dd, J = 3,6 Hz, 8,8 Hz, αCH(Pro)), 4,36-4,68 (1H, m, αCH(His)), 5,04 (2H, s, CH₂-Ar (Bzl/His)), 5,10 (2H, s, CH₂-Ar (Bzl/Tyr)), 6,84-6,93 (2H, m, *m*CH(Tyr)), 6,97-7,18 (4H, m, *o*CH(Tyr) + δCH(His) + NH(Aib)), 7,22-7,42 (11H, m, Ar + εCH(His)), 7,45-8,08 (5H, m, NH(His) + NH(Tyr) + NH₂(Arg) + εNH(Arg)), 7,88 (2H, s l, NH₂), 8,25 (1H, s l, NH(Arg)) 8,42 (1H, s l, NH(Aib)), 8,70 (1H, s, NH(Aib)).

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 23,60 (γCH₂(Pro)), 24,25 (γCH₂(Arg)), 24,48, 24,73, 25,03, 25,56, 26,29 (6 CH₃ (Aib)), 28,14 (3 CH₃ (Boc)),

28,58 ($\beta\text{CH}_2(\text{Arg})$), 28,99 ($\beta\text{CH}_2(\text{Pro})$), 30,61 ($(\beta\text{CH}_2(\text{His}))$), 34,68 ($\delta\text{CH}_2(\text{Arg})$), 36,27 ($\beta\text{CH}_2(\text{Tyr})$), 46,60 ($(\delta\text{CH}_2(\text{Pro}))$), 49,66 ($\text{CH}_2\text{-Ar}(\text{His}(\text{Bzl}))$), 51,18 ($\alpha\text{C}(\text{His})$), 51,71 (O-CH_3), 54,33 ($\alpha\text{CH}(\text{Tyr})$), 55,04 ($\alpha\text{C}(\text{Aib})$), 55,93 ($\alpha\text{C}(\text{Aib})$), 55,96 ($\alpha\text{CH}(\text{Arg})$), 56,18 ($\alpha\text{C}(\text{Aib})$), 59,84 ($\alpha\text{CH}(\text{Pro})$), 69,10 ($\text{CH}_2\text{-Ar}(\text{Tyr}(\text{Bzl}))$), 78,54 (C quaternário (Boc)), 114,37 ($m\text{CH}(\text{Tyr})$), 117,52 ($\delta\text{CH}(\text{His})$), 127,45, 127,48, 127,59, 127,71, 127,76, 128,41, 128,60, 128,64 (10 CH-Ar), 130,13 ($o\text{CH}(\text{Tyr})$), 130,29 (C quaternário- βCH_2 Ar(Tyr), 136,95 ($\epsilon\text{C}(\text{His})$), 137,22 (C quaternário (His/Bzl), 137,37 (C quaternário (Tyr/Bzl), 137,57 ($\gamma\text{C}(\text{His})$), 155,89 (C=O (Boc)), 156,88 (C-O (Tyr)), 159,41 (C quaternário (Arg)), 170,17 (C=O, (Tyr)), 171,43 (C=O, (Arg)), 172,27 (C=O, (Pro)), 172,53 (C=O, (Aib)), 173,55 (C=O, (His)), 174,34 (C=O, (Aib)), 174,48 (C=O, (Aib)).

- Preparação de H-Arg(NO₂)-Aib-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe.CF₃COOH (26)



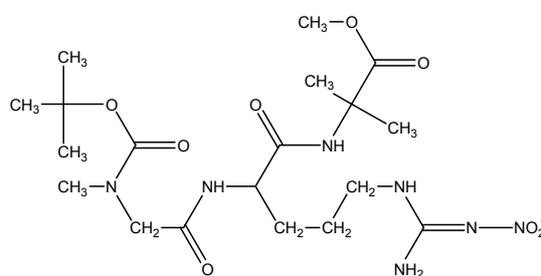
Na preparação deste composto usou-se o método descrito para (9), reagindo Boc-Arg(NO₂)-Aib-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe (0,01 mmoles, 0,117 g) em TFA (1 mL), durante 20 min, à temperatura ambiente. Após tratamento da mistura reaccional, obteve-se um sólido branco (84%).

P.f.: 129,1-131,5 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1,19-1,35 (18H, m, CH₃(Aib)), 1,41-1,59 (4H, m, $\beta\text{CH}_2(\text{Arg})$ + $\gamma\text{CH}_2(\text{Arg})$), 1,62-1,97 (4H, m, $\gamma\text{CH}_2(\text{Pro})$ + βCH_2 (Pro)), 2,70-3,19 (6H, m, $\beta\text{CH}_2(\text{Tyr})$ + $\beta\text{CH}_2(\text{His})$ + $\delta\text{CH}_2(\text{Arg})$), 3,23-3,410 (2H, m, δCH_2

(Pro), sob o pico da água), 3,53 (3H,s, O-CH₃), 3,69-3,82 (1H, m, αCH(Tyr)), 3,95-4,10 (1H, m, αCH(Arg)), 4,19-4,30 (1H, m, αCH(Pro)), 4,62-4,82 (1H, m, αCH(His)), 5,03 (2H, s, CH₂-Ar (Bzl/His)), 5,23 (2H, s, CH₂-Ar (Bzl/Tyr)), 6,89 (1H, s l, NH(Aib)), 6,90 (2H, d, J = 8,1 Hz, *m*CH(Tyr)), 7,08 (2H, d, J = 8,4 Hz, *o*CH(Tyr)), 7,12 (1H, s l, δCH(His)), 7,25-7,44 (11H, m, Ar + εCH(His)), 7,45-8,20 (8H, m, NH(His) + NH(Tyr) + NH₂(Arg) + εNH(Arg) + NH₃⁺(Arg)), 7,88 (2H, s l, NH₂), 8,50-8,60 (2H, s l, NH(Aib)).

- Preparação de Boc-Sar-Arg(NO₂)-Aib-OMe (27)

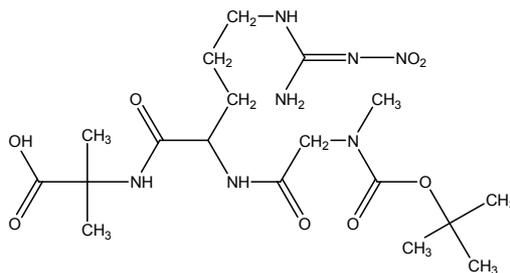


Na preparação deste composto usou-se o método descrito para **(8)** (Boc-Sar-OH (0,1 mmoles, 0,019 g), H-Arg(NO₂)-Aib-OMeCF₃COOH (0,1 mmoles, 0,043 g), em EtOAc (20 mL), DIEA (0,1 mmoles, 0,033 mL) adicionada a baixa temperatura), com tempo de reacção de 6 h. Após tratamento da mistura reaccional obteve-se um sólido branco (73%), que foi cristalizado de uma mistura de EtOAc/Et₂O.

P.f.: 89,0-90,0 °C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,46 (9H, s, Boc), 1,51 (3H, s, CH₃(Aib)), 1,52 (3H, s, CH₃(Aib)), 1,66-1,74 (2H, m, γCH₂(Arg)), 1,82-1,92 (2H, m, βCH₂(Arg)), 2,97 (3H, s, CH₃(Sar)), 3,28-3,47 (2H, m, δCH₂(Arg)), 3,72 (3H, s, O-CH₃), 3,89 (2H, s, αCH₂(Sar)), 4,61 (1H, s l ap, αCH(Arg)), 7,03 (1H, s l, NH(Arg)), 7,18 (1H, s l, NH(Aib)), 7,57 (2H, s l, NH₂), 8,35 (1H, s l, εNH(Arg)).

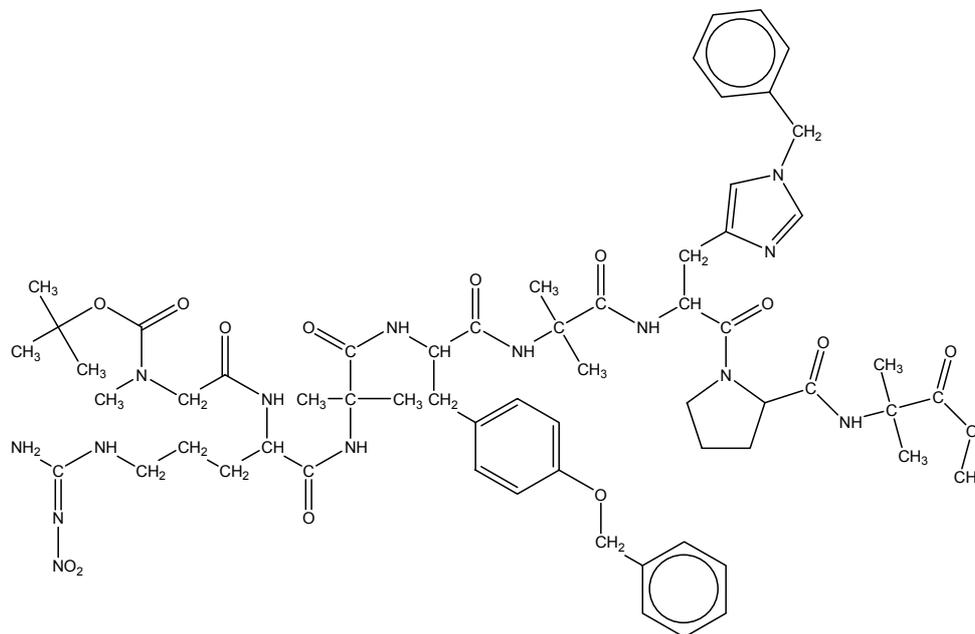
- Preparação de Boc-Sar-Arg(NO₂)-Aib-OH (28)



Este composto foi obtido usando o método descrito para **(4)** (partindo de 0,6 mmol, 0,294 g, de Boc-Sar-Arg(NO₂)-Aib-OMe, 3 equivalentes de base), com tempo de reacção de 24 h, à temperatura ambiente (adicionando 2 eq de HCl 1M no fim da reacção). Após tratamento da mistura reaccional, a solução aquosa foi extraída com EtOAc. A fase orgânica foi seca com MgSO₄ e após evaporação do solvente, obteve-se um sólido branco (99%).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1,31 (9H, s, Boc), 1,32 (3H, s, CH₃(Aib)), 1,34 (3H, s, CH₃(Aib)), 1,38-1,75 (4H, m, γCH₂(Arg) + βCH₂(Arg)), 2,76 (3H, s, CH₃(Sar)), 3,13 (2H, s l, δCH₂(Arg)), 3,77 (2H, s, αCH₂(Sar)), 4,30 (1H, s l ap, αCH(Arg)), 7,90-7,97 (2H, m, NH₂), 8,08 (1H, s l, NH(Arg)), 8,23 (1H, s l, NH(Aib)), 8,52 (1H, s l, εNH(Arg)), 12,20 (1H, s l, OH).

- Preparação de Boc-Sar-Arg(NO₂)-Aib-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe (29)



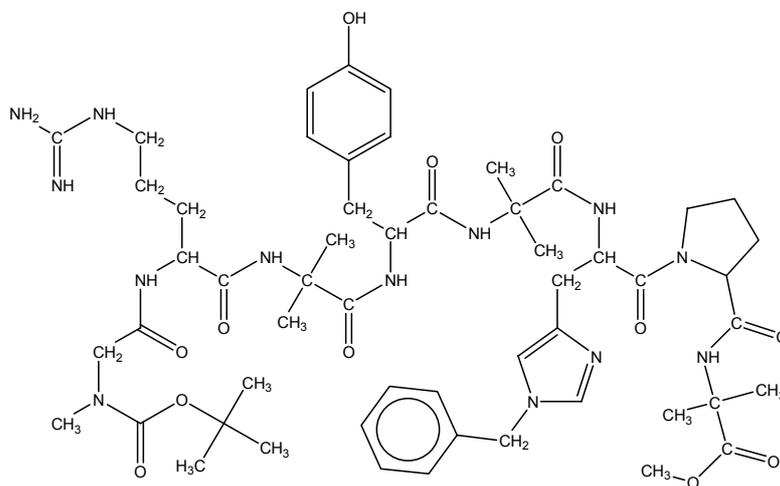
Usou-se o método descrito para (8), fazendo a reacção entre Boc-Sar-Arg(NO₂)-Aib-OH (0,25 mmoles, 0,119 g) e H-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe.CF₃COOH (0,25 mmoles, 0,223 g), adicionando a base (DIEA, aprox. 1 eq., 0,050 mL) a temperatura baixa (0 °C), em EtOAc (30 mL), com um tempo de reacção à temperatura ambiente de 48 h. Após tratamento da mistura reaccional obteve-se um sólido branco (61%).

HRMS: previsto para [M+1]⁺: 1237.63; encontrado: 1237.636.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1,13-1,40 (27H, m, CH₃(Aib) + CH₃(Boc)), 1,43-2,04 (8H, m, βCH₂(Arg) + γCH₂(Arg) + γCH₂(Pro) + βCH₂(Pro)), 2,70-3,09 (6H, m, βCH₂(Tyr) + βCH₂(His) + δCH₂(Arg)), 3,15 (3H, s, CH₃(Sar)), 3,30-3,43 (2H, m, δCH₂(Pro), sob o pico da água), 3,53 (3H, s, O-CH₃), 3,72-3,91 (1H, m, αCH(Tyr)), 3,91-4,26 (4H, m, αCH₂(Sar) + αCH(Arg) + αCH(Pro)), 4,36-4,50 (1H, m, αCH(His)), 5,04 (2H, s, CH₂-Ar (Bzl/His)), 5,11 (2H, s, CH₂-Ar (Bzl/Tyr)), 6,80-6,94 (2H, m, *m*CH(Tyr)), 7,02-7,19 (3H, m, *o*CH(Tyr) + δCH(His)), 7,22-7,44 (12H, m, Ar + 2 NH(Aib)), 7,72 (1H, s, εCH(His)), 7,50-8,82 (4H, m, NH(His) + NH₂(Arg) + εNH(Arg)), 8,05 (1H, s, NH(Tyr)), 8,72 (1H, s, NH(Aib)), 8,74 (1H, s, NH(Arg)).

^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 23,63 ($\gamma\text{CH}_2(\text{Pro})$), 24,19 ($\gamma\text{CH}_2(\text{Arg})$), 24,45, 24,67, 24,71, 25,01, 25,07, 25,43, 25,67, 25,98, 26,11, 26,37 (6 CH_3 (Aib)), 27,92 (3 CH_3 (Boc)), 28,54 ($\beta\text{CH}_2(\text{Arg})$), 28,97 ($\beta\text{CH}_2(\text{Pro})$), 30,54 ($\beta\text{CH}_2(\text{His})$), 34,77 ($\delta\text{CH}_2(\text{Arg})$), 35,14 ($\beta\text{CH}_2(\text{Tyr})$), 35,25 ($\text{CH}_3(\text{Sar})$), 46,57 ($\delta\text{CH}_2(\text{Pro})$), 49,63 ($\text{CH}_2\text{-Ar}(\text{His}(\text{Bzl}))$), 51,20 ($\alpha\text{C}(\text{Tyr})$), 51,76 (O-CH_3), 51,88 ($\alpha\text{CH}(\text{His})$), 53,40($\alpha\text{C}(\text{Sar})$), 55,00 ($\alpha\text{C}(\text{Aib})$), 55,11 ($\alpha\text{C}(\text{Aib})$), 55,97 ($\alpha\text{CH}(\text{Arg})$), 56,10 ($\alpha\text{C}(\text{Aib})$), 59,85 ($\alpha\text{CH}(\text{Pro})$), 69,05 ($\text{CH}_2\text{-Ar}(\text{Tyr}(\text{Bzl}))$), 78,87 (C quaternário (Boc)), 114,36 ($m\text{CH}(\text{Tyr})$), 117,61 ($\delta\text{CH}(\text{His})$), 127,36, 127,44, 127,52, 127,57, 127,70, 128,36, 128,53, 128,59 (10 CH-Ar), 130,16 ($o\text{CH}(\text{Tyr})$), 131,35 (C quaternário- βCH_2 Ar(Tyr), 136,77 ($\epsilon\text{C}(\text{His})$), 137,17 (C quaternário (His/Bzl), 137,34 ($\gamma\text{C}(\text{His})$), 137,63 (C quaternário (Tyr/Bzl), 155,29 (C=O (Boc)), 156,80 (C-O (Tyr)), 159,281 (C quaternário (Arg)), 170,14 (C=O , (Tyr)), 171,03(C=O , (Sar)), 171,13 (C=O , (Arg)), 172,21 (C=O , (Pro)), 173,50 (C=O , (His)), 173,56 (C=O , (Aib)), 174,27 (C=O , (Aib)), 174,42 (C=O , (Aib)).

- Preparação de Boc-Sar-Arg-Aib-Tyr-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe (30)



Para a preparação deste composto, realizou-se a preparação prévia de monoformiato de hidrazina, segundo o método apresentado por Gowda e Mahesh [9]. Dissolveu-se Boc-Sar-Arg(NO_2)-Aib-Tyr(Bzl)-Aib-His(Bzl)-Pro-Aib-OMe (0,06 mmol, 0,070 g) em metanol (5 mL). Adicionou-se Pd-C 10% (0,140 g) e com agitação, adicionou-se monoformiato de hidrazina (0,9 mmoles). A mistura reaccional foi deixada

à temperatura ambiente, com agitação (reacção seguida por tlc) e após 8 h, foi filtrada através de kieselgur. O filtrado foi evaporado e o resíduo solubilizado em EtOAc e lavado com uma solução saturada de NaCl. Após secagem com MgSO₄, a fase orgânica foi evaporada e o resíduo triturado com Et₂O. Após decantação e secagem, foi obtido um sólido (55%).

HRMS: previsto para [M+1]⁺: 1102.60; encontrado: 1102.60.

¹H NMR (300 MHz, (CD₃)₂CO) δ (ppm): 1,25-1,55 (27H, m, CH₃(Aib) + CH₃(Boc)), 1,55-2,45 (8H, m, β CH₂(Arg) + γ CH₂(Arg) + γ CH₂(Pro) + β CH₂(Pro)), 2,80-3,38 (9H, m, β CH₂(Tyr) + β CH₂(His) + δ CH₂(Arg) + CH₃(Sar), sob os picos de metanol), 3,58-3,68 (2H, m, δ CH₂(Pro)), 3,70 (3H,s, O-CH₃), 3,89-4,70 (6H, m, α CH(Tyr) + α CH₂(Sar) + α CH(Arg) + α CH(Pro) + α CH(His)), 5,30 (2H, s, CH₂-Ar (Bzl/His)), 6,00 (1H, s l, NH), 6,78 (2H, s l, NH₂(Arg)), 7,00-7,22 (2H, m, *m*CH(Tyr)), 7,30-7,43 (2H, m, *o*CH(Tyr)), 8,31-8,35 (5H, m, Ar), 7,43-8,60 (9H, m, δ CH(His) + ϵ CH(His) + NH), 9,65 (1H, s l, OH(Tyr)).

6 Anexos

Tabela S1. Distâncias entre $C_{\alpha(i)}$ $C_{\alpha(i+2)}$ (valores em Angstroms). Células sombreadas indicam a presença de uma α,α -dialkylglycine na posição $i+1$.

Compound	Dist. Res. 1 - Res. 3			Dist. Res. 2 - Res. 4			Dist. R3 - R5			Dist. Res. 4 - Res. 6			Dist. Res. 5 – Res. 7			Dist. Res. 6 – Res. 8		
	Max	Min	Ave	Max	Min	Ave	Max	Min	Ave	Max	Min	Ave	Max	Min	Ave	Max	Min	Ave
AngII	7.7034	5.8310	7.1246	7.6291	5.3645	6.8352	7.5212	5.2344	6.320	7.6541	4.8701	6.6331	7.7006	5.4379	7.0819	6.5348	4.7610	5.7856
[Sar ¹ ,Aib ³ ,Ile ⁸]AngII	7.6462	5.6976	6.7628	7.4448	4.7107	6.4979	7.2349	5.2475	5.9191	7.7518	5.6251	7.0174	7.7044	5.6545	6.9864	6.8820	4.6757	5.6865
[Sar ¹ ,Aib ⁵ ,Ile ⁸]AngII	7.6505	5.4565	6.6463	7.3779	5.1475	6.3954	7.3221	5.1005	6.0589	7.6968	5.3301	6.6772	7.6930	5.7260	7.0096	6.7462	4.4126	5.7244
[Sar ¹ ,Aib ⁷ ,Ile ⁸]AngII	7.7304	5.8599	6.9774	7.3455	5.2410	6.4409	6.9907	5.1137	5.9804	7.6445	5.4447	7.0486	7.7871	5.4829	7.1957	6.5335	4.5615	5.6592
[Sar ¹ ,Aib ⁸]AngII	7.7092	5.3833	6.6959	7.3797	4.8670	6.3545	6.7163	5.2742	5.9250	6.8372	4.9226	6.0332	7.7255	6.1054	7.2980	6.2978	4.7380	5.4366
[Sar ¹ ,Ile ⁸]AngII	7.6915	5.6328	6.8307	7.2696	5.2427	6.4744	7.0788	5.3370	5.9992	7.7064	5.5184	7.1159	7.5859	5.8911	6.6835	6.4504	4.4421	5.6619
Comp 1																		
[Sar ¹ ,Aib ³ ,Aib ⁵ ,Aib ⁸]AngII	7.6253	5.0698	6.5276	7.2932	4.7564	6.0733	7.7734	5.6714	7.0036	7.5842	5.5138	6.8454	7.6750	5.6159	6.8422	7.3294	4.3686	5.7221
Comp 2																		
[Sar ¹ ,Dpg ⁸]AngII	7.6039	5.1628	6.4302	7.6799	4.9172	6.7341	7.5865	5.3300	6.5376	7.7082	5.5163	7.0757	7.6413	5.5040	7.0618	6.5892	4.6058	5.6875
Comp 3																		
[Sar ¹ ,Deg ⁸]AngII	7.6731	5.5293	6.8130	7.4841	4.8515	6.4655	7.7328	5.3267	6.4411	7.6937	5.4790	7.0192	7.7507	5.9968	7.2688	7.3681	4.9492	6.6898
Comp 4																		
[Sar ¹ ,D,ibg ⁸]AngII	7.6213	5.4831	6.6450	7.5993	5.2917	6.8713	7.1279	5.0228	5.8876	6.8064	4.9871	5.8983	7.5044	4.8848	6.5783	7.6196	5.1217	6.6712
Comp 5																		
[Aib ³ ,Aib ⁵ ,Aib ⁸]AngII	7.6906	5.5900	7.0427	7.4260	4.8564	6.5566	7.6859	5.1943	6.7137	7.5762	5.2742	6.5090	7.7226	5.9313	7.2128	7.1841	4.8137	6.0991
Comp 6																		
[Sar ¹ ,Db,g ⁸]AngII	7.6994	5.5819	6.9796	7.5918	4.9153	6.4015	6.9609	5.1777	5.9801	7.7058	5.5304	7.1703	7.6724	5.4432	6.9307	6.4624	5.0390	5.7414
Comp 7																		
[Sar ¹ ,Deg ³ ,Deg ⁵ ,Deg ⁸]AngII	7.4262	5.1522	6.3378	6.6899	4.8510	5.7545	7.7480	5.9142	7.0665	7.5943	5.5899	6.6443	7.7134	6.0436	7.1408	6.5963	4.8927	5.6843
Comp 8																		
[Sar ¹ ,Dpg ³ ,Dpg ⁵ ,Dpg ⁸]AngII	7.5762	5.6793	6.6570	7.3928	4.7494	6.5413	7.3838	5.5611	6.3433	7.5956	5.5542	7.1613	7.6903	5.9695	7.2304	7.4499	4.8283	6.6939
Comp 9																		
[Sar ¹ ,Deg ³ ,Aib ⁵ ,Deg ⁸]AngII	7.5066	5.3172	6.3670	7.0046	4.8302	5.8425	7.8013	5.8144	7.0955	7.6399	4.8430	6.3651	7.7097	5.7077	6.8965	6.7104	5.0478	5.6306
Comp 10																		
[Sar ¹ ,Deg ³ ,Aib ⁵ ,Aib ⁸]AngII	7.6868	5.5039	6.8319	7.5687	5.2719	6.9623	7.7983	5.8794	7.2735	7.4859	4.7882	6.2814	7.6172	5.7158	6.9432	6.4003	4.5858	5.7325
Comp 11																		
[Sar ¹ ,Dpg ³ ,Aib ⁵ ,Dpg ⁸]AngII	7.6793	5.1447	6.7699	7.3513	5.0568	6.7087	7.6240	5.3694	6.8615	7.6568	5.5766	6.9693	7.6501	6.0172	7.1239	6.4757	4.8628	5.6956
Comp 12																		
[Sar ¹ ,Deg ⁵ ,Aib ⁷ ,Ile ⁸]AngII	7.6895	5.3555	6.8507	7.4666	5.1431	6.4441	7.3185	5.6892	6.6304	7.6476	5.6780	7.1469	7.7483	4.9172	6.5352	6.8020	4.4254	5.8137
Comp 13																		
[Sar ¹ ,Deg ⁵ ,Aib ⁷ ,Dpg ⁸]AngII	7.6342	5.5360	6.9319	7.3938	5.1462	6.7395	7.0660	5.1050	6.0187	7.3956	4.6451	6.5566	7.6425	6.0273	7.0506	6.4269	5.1028	5.6989

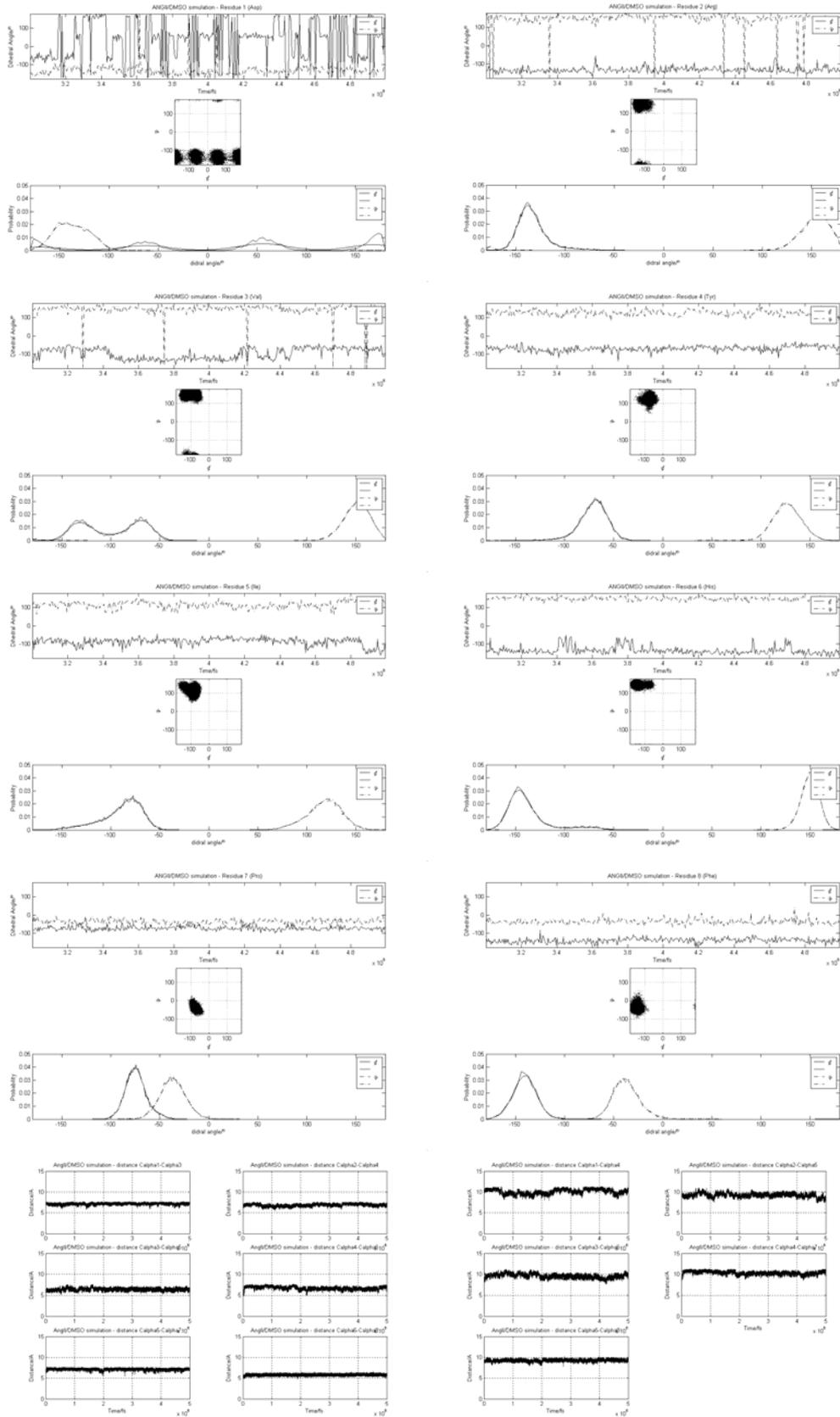
Tabela S2. Distâncias entre $C_{\alpha(i)}$ $C_{\alpha(i+3)}$ (valores em Angstroms). Células sombreadas indicam a presença de uma α,α -dialkylglycine entre a posição i e $i+4$.

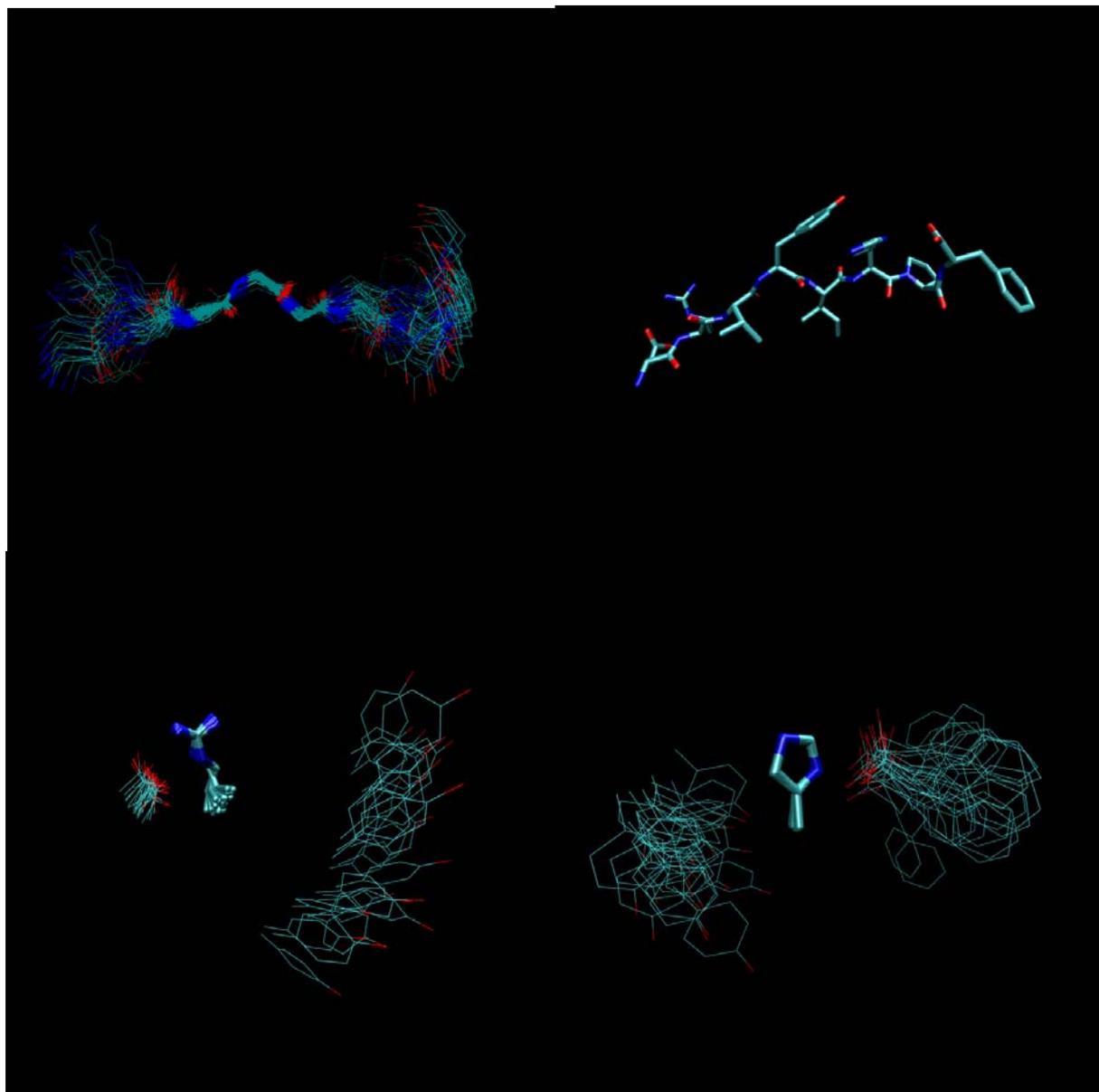
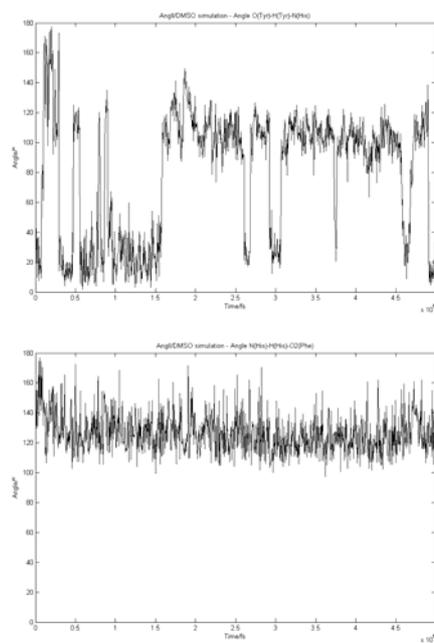
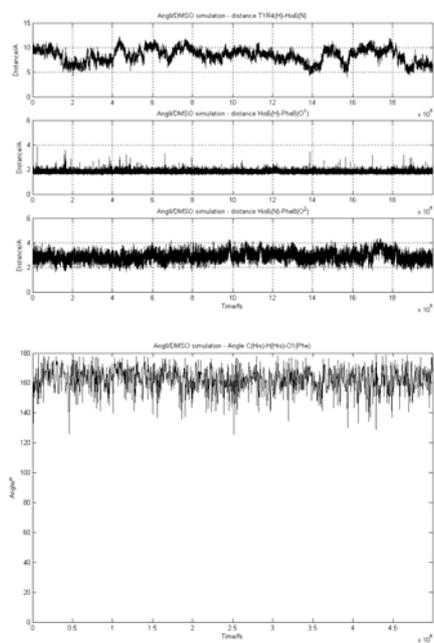
Compound	Dist. Res. 1 – Res. 4			Dist. Res. 2 – Res. 5			Dist. Res. 3 – Res. 6			Dist. Res. 4 – Res. 7			Dist. Res. 5 – Res. 8		
	Max	Min	Ave	Max	Min	Ave									
AngII	11.3169	8.2686	10.2318	10.4600	7.3395	9.1175	10.8958	7.5932	9.3006	11.2377	8.3984	10.1537	10.0543	8.1402	9.2719
[Sar ¹ ,Aib ³ ,Ile ⁸]AngII	10.8847	7.4193	9.4547	9.8576	7.3499	8.3036	10.7067	8.0237	9.2217	11.2788	8.1026	10.2560	10.5739	7.3593	9.0149
[Sar ¹ ,Aib ⁵ ,Ile ⁸]AngII	10.9269	7.2448	9.5414	10.2638	7.8151	9.0185	10.9943	5.9303	8.3049	11.1872	8.8897	10.2667	10.3847	7.9617	9.1825
[Sar ¹ ,Aib ⁷ ,Ile ⁸]AngII	10.9369	7.5091	9.4208	10.2889	7.2564	8.6085	10.6774	7.9994	9.4591	11.4548	8.7297	10.7205	10.2654	7.4033	9.0155
[Sar ¹ ,Aib ⁸]AngII	10.9736	7.6856	9.4795	9.5103	7.5225	8.6417	9.1284	6.5966	8.0585	10.4080	7.1263	9.1316	9.9362	7.7092	8.8259
[Sar ¹ ,Ile ⁸]AngII	10.9053	7.9681	9.6588	9.4050	7.6022	8.4510	10.7200	7.9777	9.3499	11.2719	7.6407	9.5211	10.0406	7.5662	8.8619
Comp 1 [Sar ¹ ,Aib ³ ,Aib ⁵ ,Aib ⁸]AngII	10.4635	6.9574	8.8441	10.9976	7.3822	9.5215	11.3213	6.9298	9.2740	11.0453	6.6569	9.4827	10.6043	7.4906	8.9435
Comp 2 [Sar ¹ ,Dpg ³]AngII	11.2895	8.0838	9.8482	11.1788	8.0318	9.9898	11.2820	8.0279	10.1144	11.3338	8.0850	10.5359	10.2853	8.0666	9.0901
Comp 3 [Sar ¹ ,Deg ⁸]AngII	11.1878	7.0237	9.5144	10.7598	7.6523	9.2657	11.2557	8.0016	10.0045	11.3859	9.0599	10.7540	10.9825	8.2602	9.7438
Comp 4 [Sar ¹ ,Dbg ⁸]AngII	11.1861	8.4519	10.0831	10.1342	7.3275	8.9782	10.3374	8.1914	9.0885	9.5482	6.3686	7.7625	10.9672	8.4954	9.9711
Comp 5 [Aib ³ ,Aib ⁵ ,Aib ⁸]AngII	10.9170	7.4950	9.6147	10.9920	6.9561	9.2192	10.2962	5.1346	8.1175	11.3593	6.0779	9.0448	10.7656	7.6558	9.1490
Comp 6 [Sar ¹ ,Dbg ⁸]AngII	10.9662	8.0989	9.5681	10.2151	6.8592	8.2400	10.6680	7.8374	9.3033	11.3678	8.2819	10.3449	9.9947	7.6707	9.0267
Comp 7 [Sar ¹ ,Deg ³ ,Deg ⁵ ,Deg ⁸]AngII	10.2846	7.4929	8.9682	10.4516	8.0553	9.2276	11.3480	7.9543	9.8780	11.3332	8.5446	10.1167	10.2345	7.7922	9.2021
Comp 8 [Sar ¹ ,Dpg ³ ,Dpg ⁵ ,Dpg ⁸]AngII	10.7784	8.1965	9.6548	9.4403	6.4532	8.0764	10.5981	7.0786	8.7865	11.2603	8.5715	10.4435	10.9341	8.1810	9.7503
Comp 9 [Sar ¹ ,Deg ³ ,Aib ⁵ ,Deg ⁸]AngII	10.0600	7.2663	8.8363	10.7264	7.5951	9.2900	11.4875	7.8216	9.6791	11.2947	8.1546	9.9576	9.9391	7.9232	9.0152
Comp 10 [Sar ¹ ,Deg ³ ,Aib ⁵ ,Aib ⁸]AngII	11.3279	8.1868	10.1180	11.2777	7.6752	10.0913	10.7411	6.3104	8.8441	11.1271	8.1998	9.9126	10.0364	7.8372	9.1015
Comp 11 [Sar ¹ ,Dpg ³ ,Aib ⁵ ,Dpg ⁸]AngII	10.8059	7.9964	9.7875	10.6456	6.9848	8.9083	10.8453	7.3353	8.8459	11.3151	7.6982	9.8550	10.2786	7.8000	9.0854
Comp 12 [Sar ¹ ,Deg ⁵ ,Aib ⁷ ,Ile ⁸]AngII	11.0392	7.5893	9.3724	10.2324	7.6096	8.9372	10.8647	8.7758	10.0822	11.0534	8.3321	9.9960	9.9789	5.9417	7.4066
Comp 13 [Sar ¹ ,Deg ³ ,Aib ⁵ ,Dpg ⁸]AngII	10.8109	7.7781	9.8400	10.5713	7.1084	9.1548	9.9683	6.2571	8.2756	11.1749	7.8200	10.2855	9.9344	7.7534	9.1307

As páginas seguintes contêm dados relevantes recolhidos de cada simulação realizada em DMSO. Os dados estão apresentados na seguinte ordem:

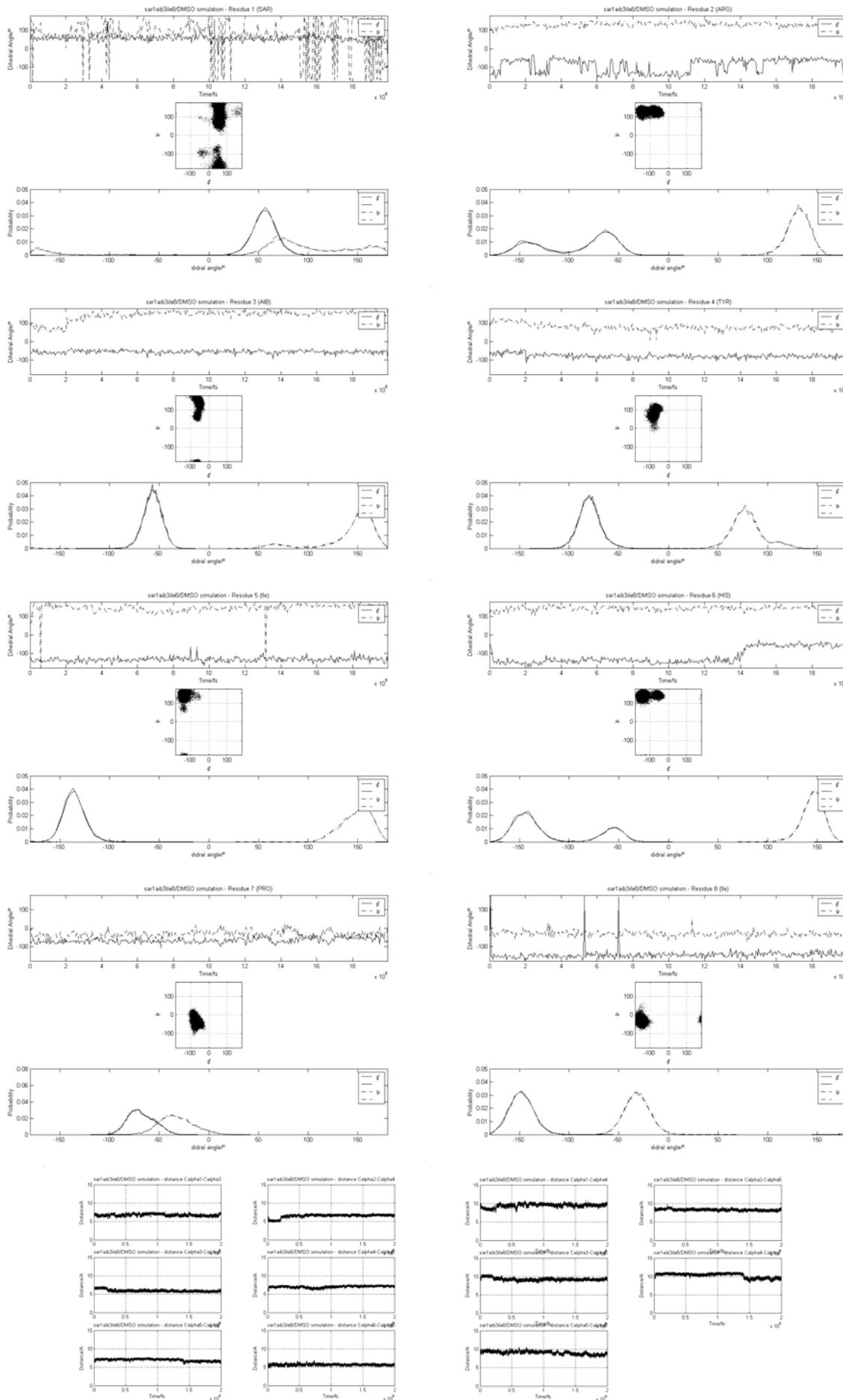
- Nome;
- Representações relativas aos valores dos ângulos de diedro de cada resíduo:
 - ângulo vs. tempo de simulação;
 - φ vs. ψ ;
 - distribuição de populações;
- Distâncias entre $C\alpha$ do resíduo i e $C\alpha$ do resíduo $i+2$;
- Distâncias entre $C\alpha$ do resíduo i e $C\alpha$ do resíduo $i+3$;
- Distância entre H(Res 4)-N(Res 6), H(Res 6)-O1(Res 8) e H(Res 6)-O2(Res 8) vs. tempo de simulação;
- ângulo O(Res 4)-H(Res 4)-H(Res 6) vs. tempo de simulação;
- ângulo N(Res 6)-H(Res 6)-O₁(Res 8) vs. tempo de simulação;
- ângulo N(Res 6)-H(Res 6)-O₂(Res 8) vs. tempo de simulação;
- Figuras:
 - sobreposição do esqueleto peptídico dos resíduos 4,5 e 6. As cadeias laterais e os átomos de hidrogénio não estão representados (superior esquerdo);
 - estrutura com a conformação de menor energia encontrada. Os átomos de hidrogénio não estão representados (superior direito);
 - sobreposição da cadeia lateral do resíduo 2, mostrando as posições relativas das cadeias laterais dos resíduos 1 e 4. Os átomos de hidrogénio não estão representados (inferior esquerdo);
 - sobreposição da cadeia lateral do resíduo 6, mostrando as posições relativas da cadeia lateral do resíduo 4 e o resíduo 8. Os átomos de hidrogénio não estão representados (inferior direito).

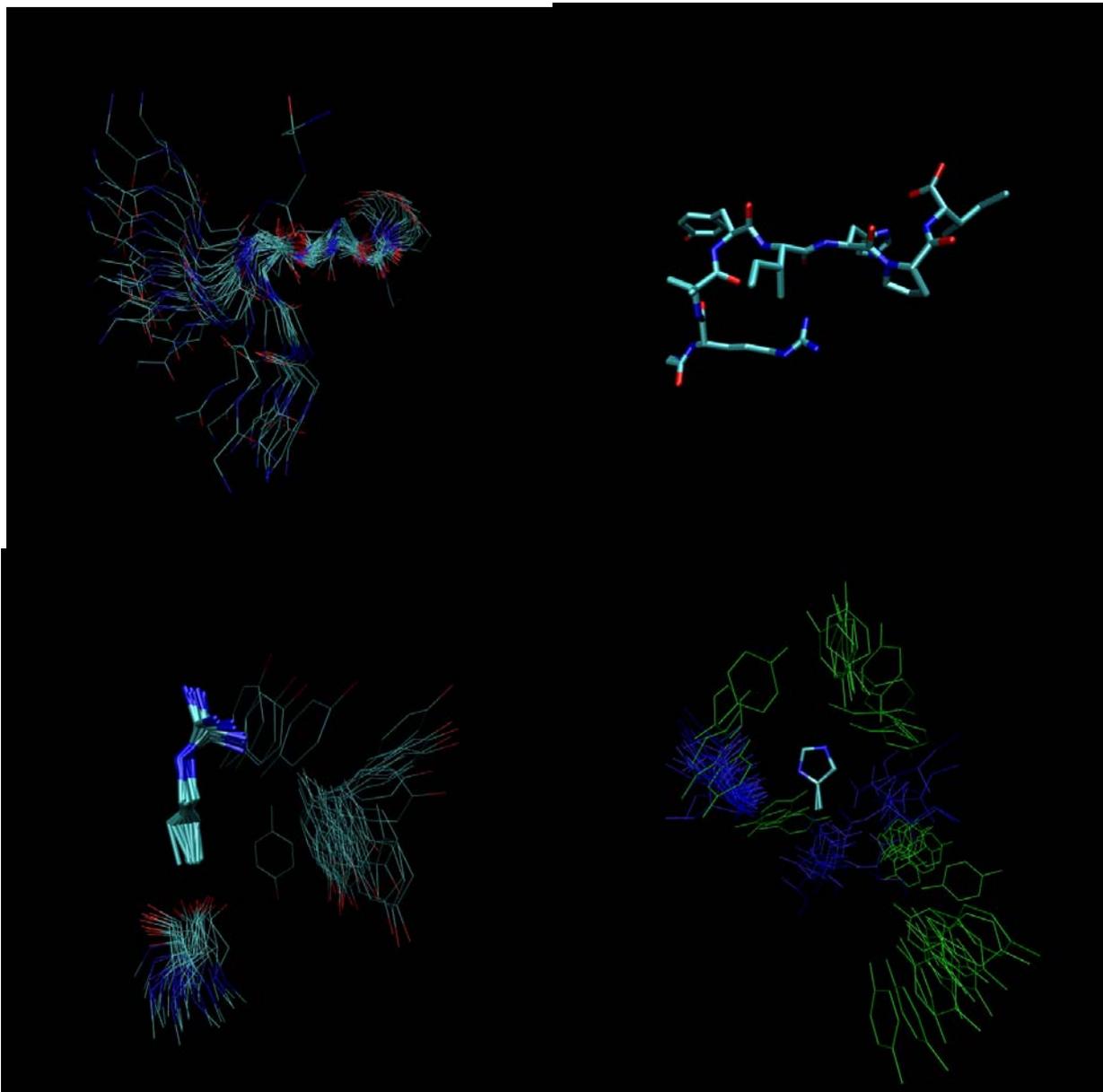
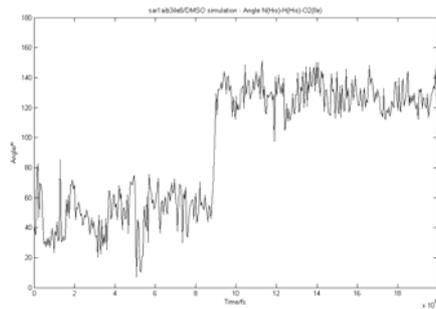
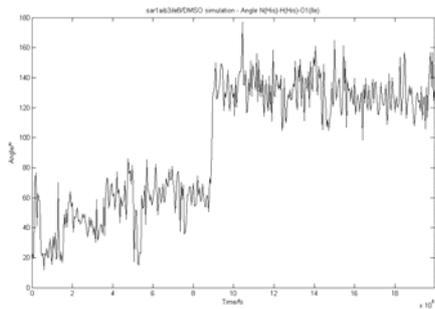
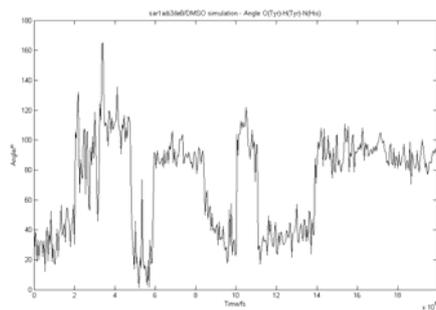
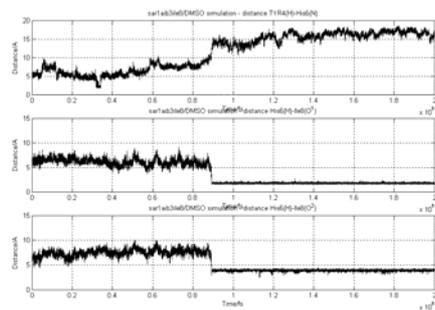
AngII



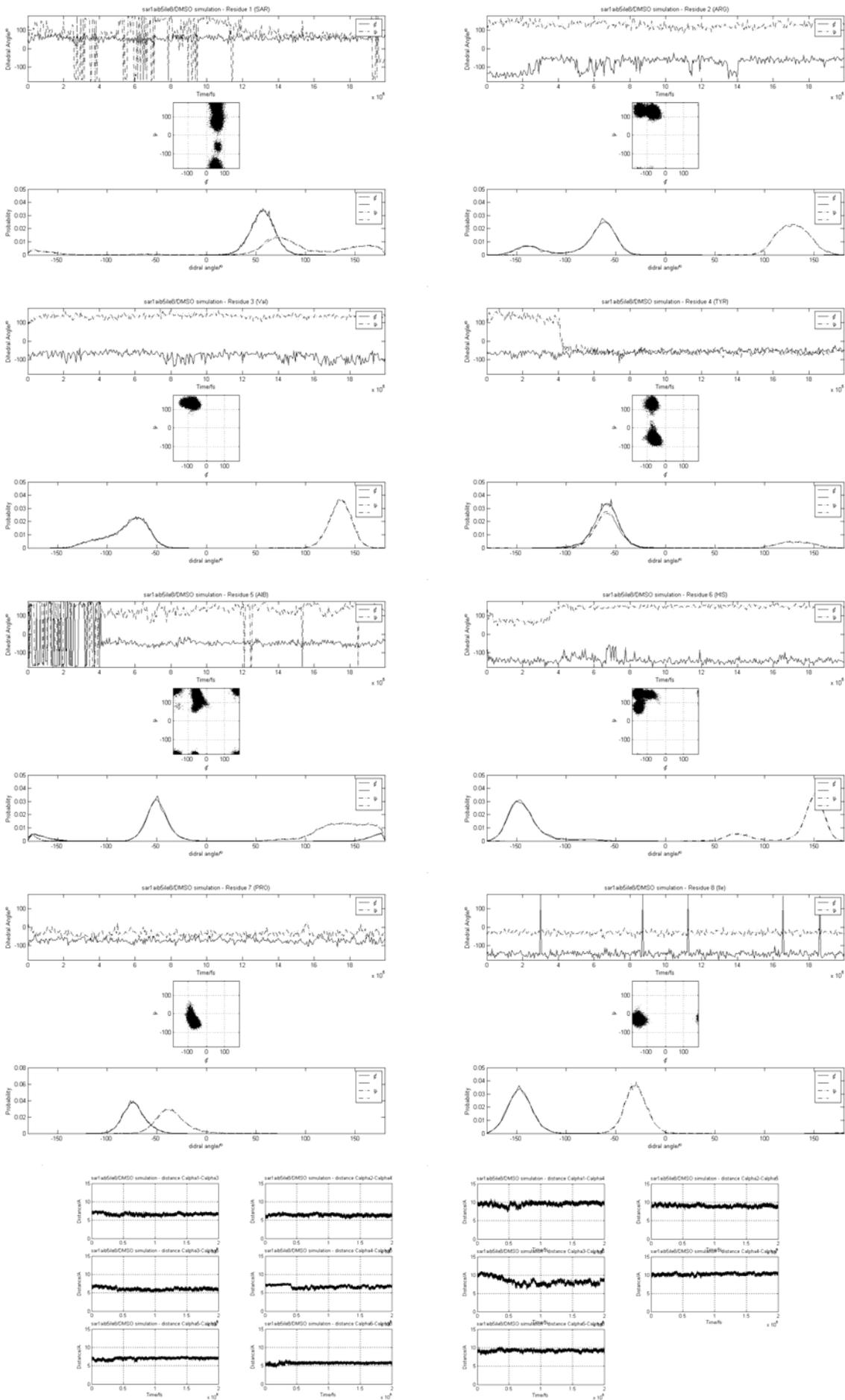


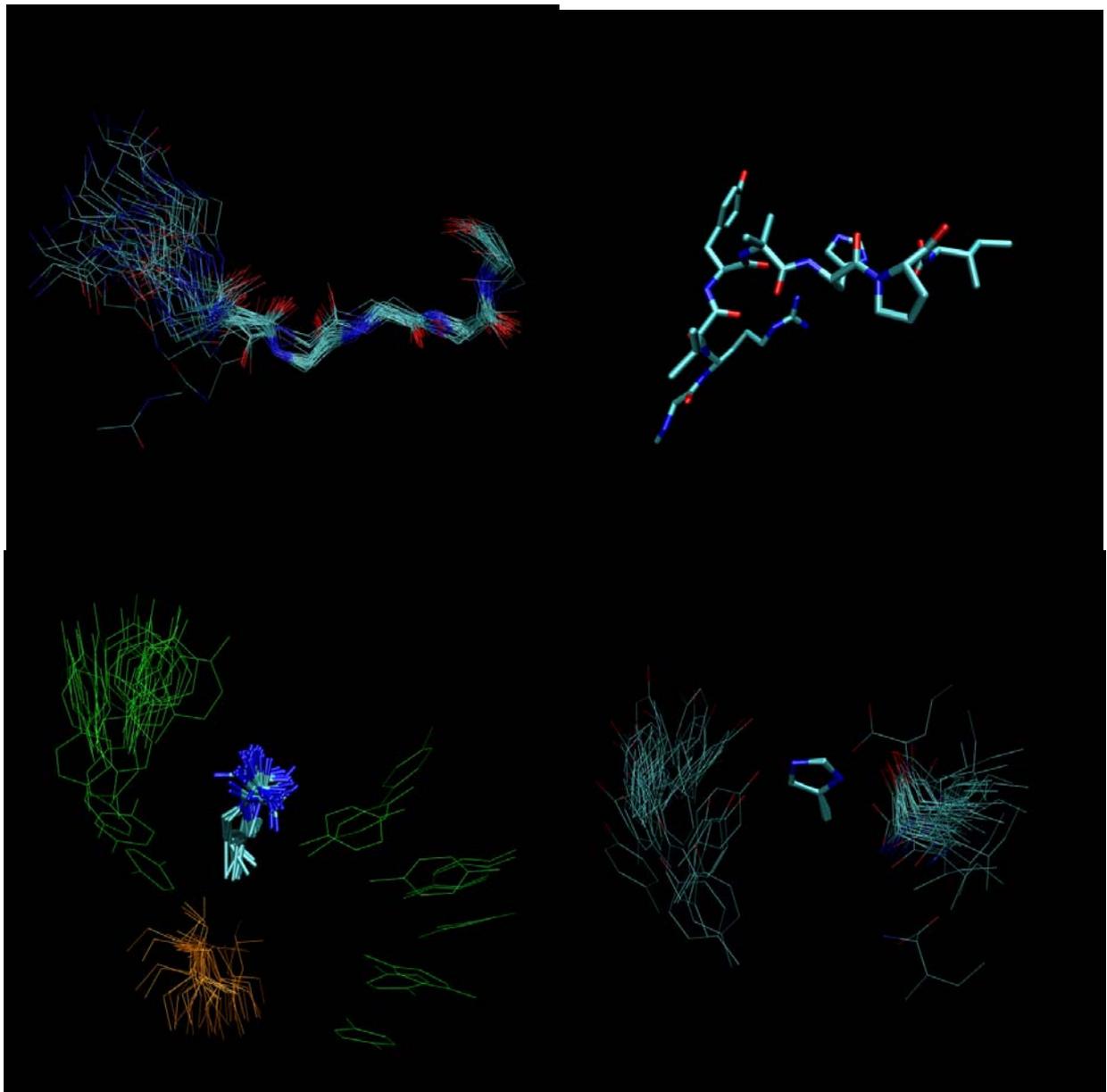
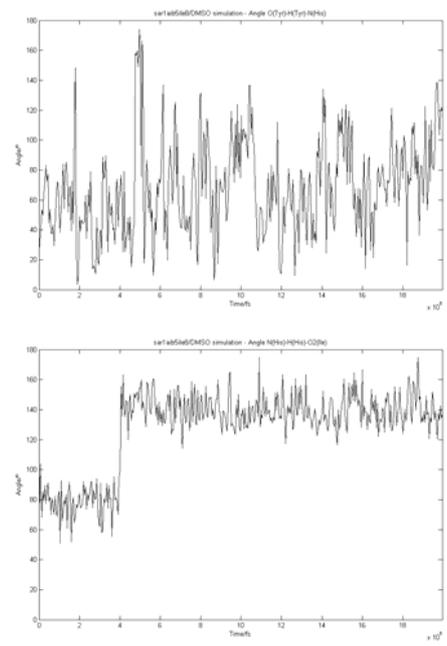
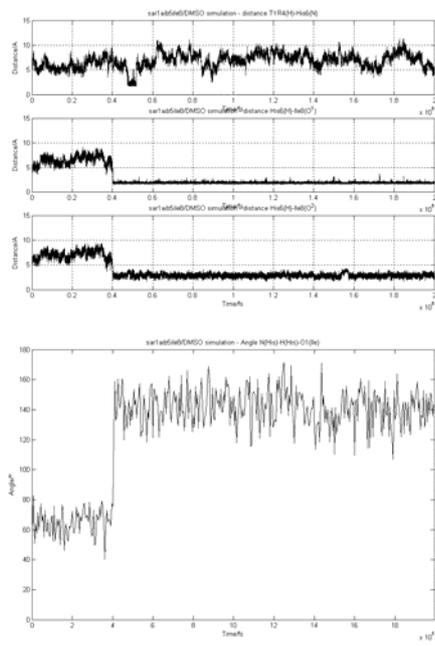
[Sar1,Aib3,Ile8]AngII



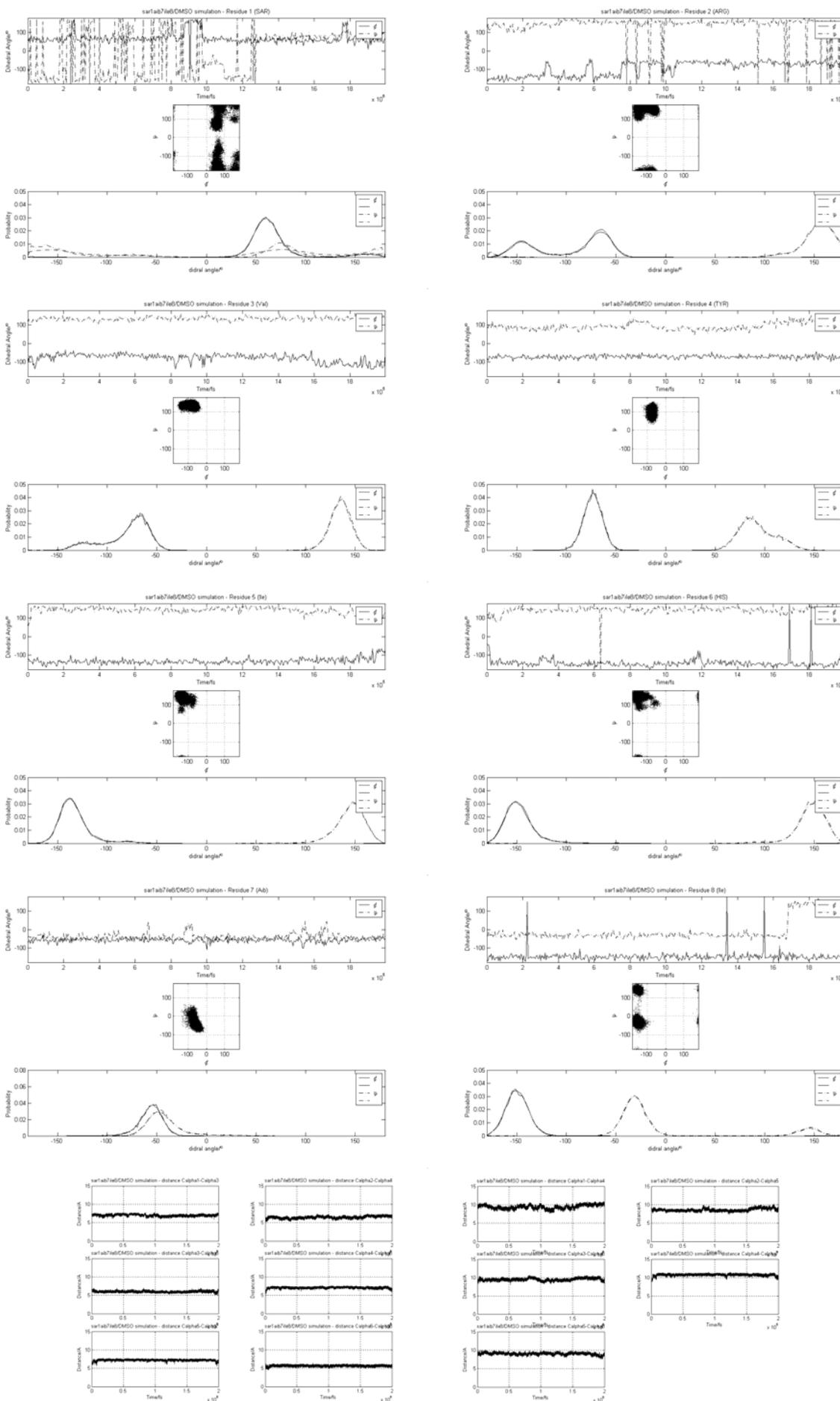


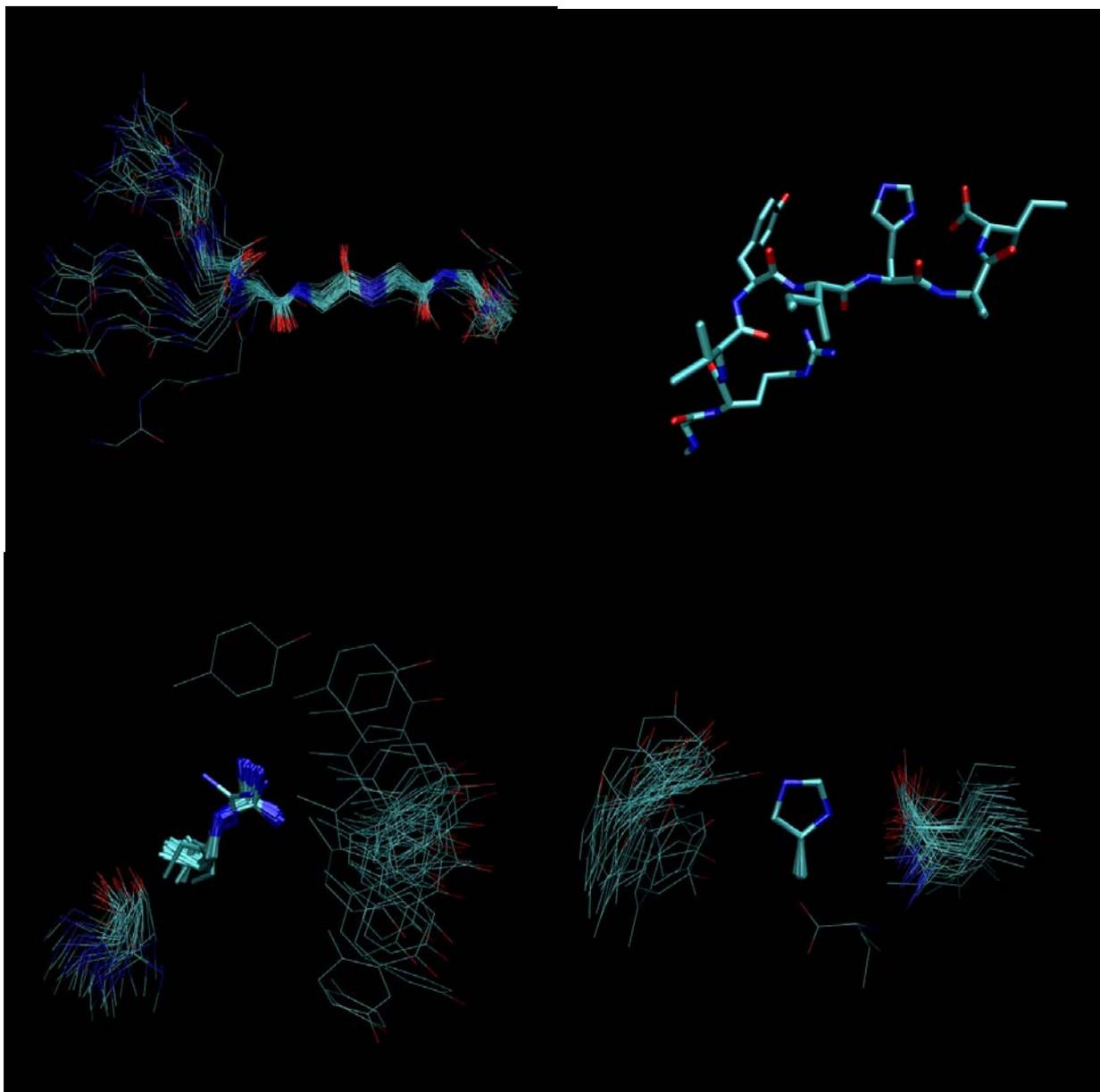
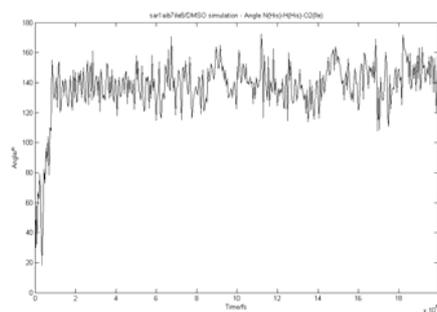
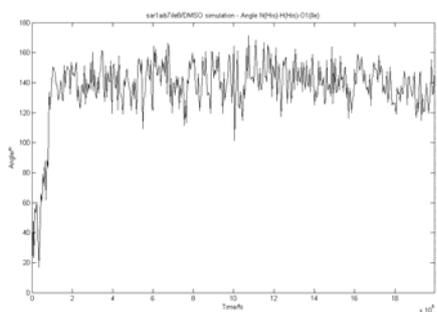
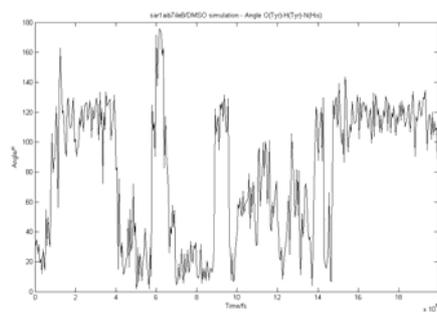
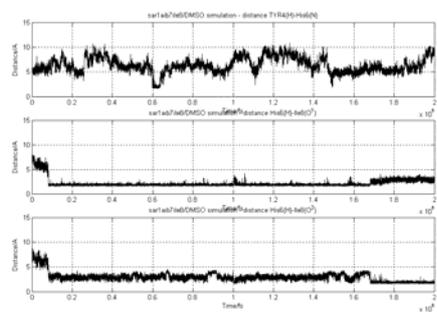
[Sar1,Aib5,Ile8]AngII



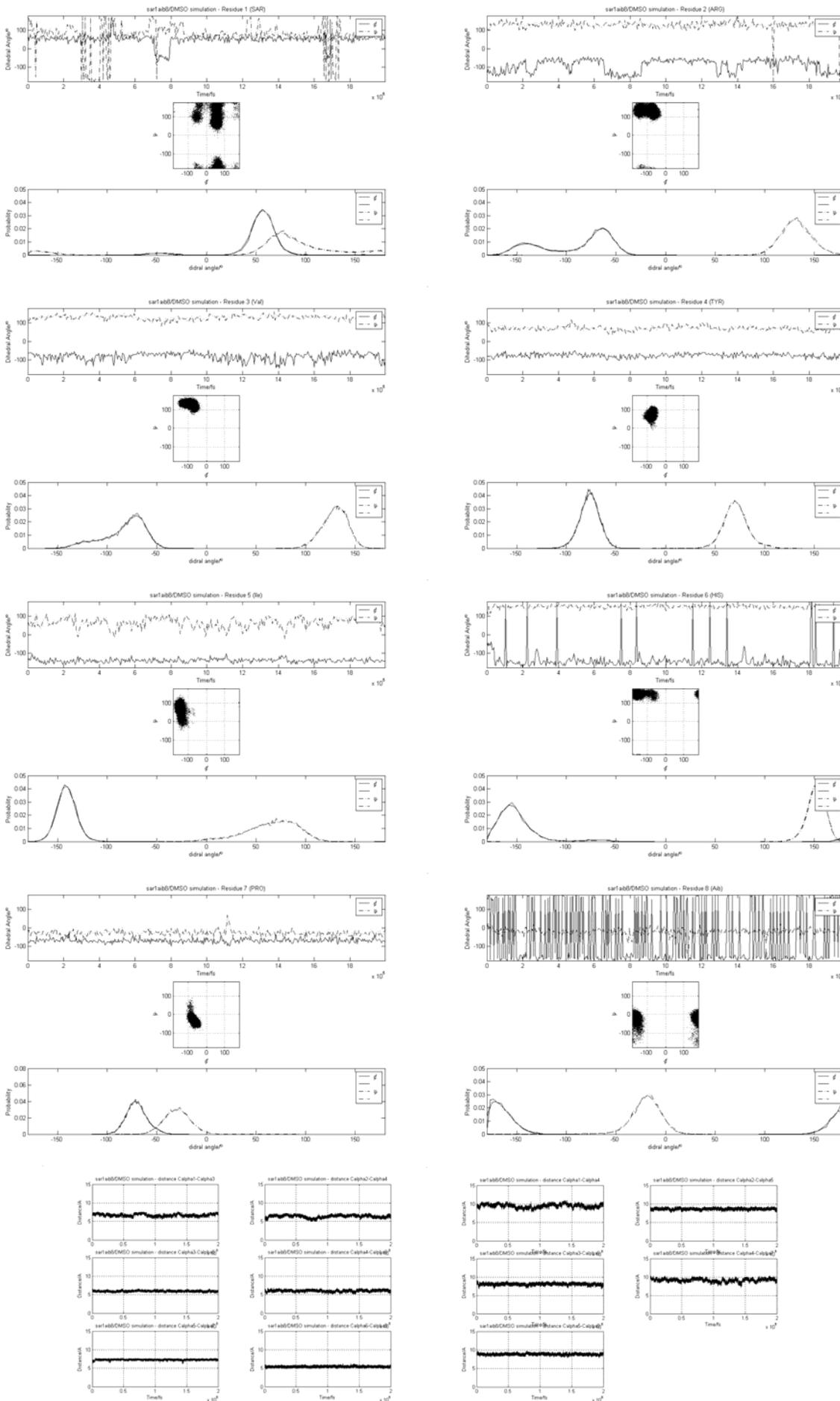


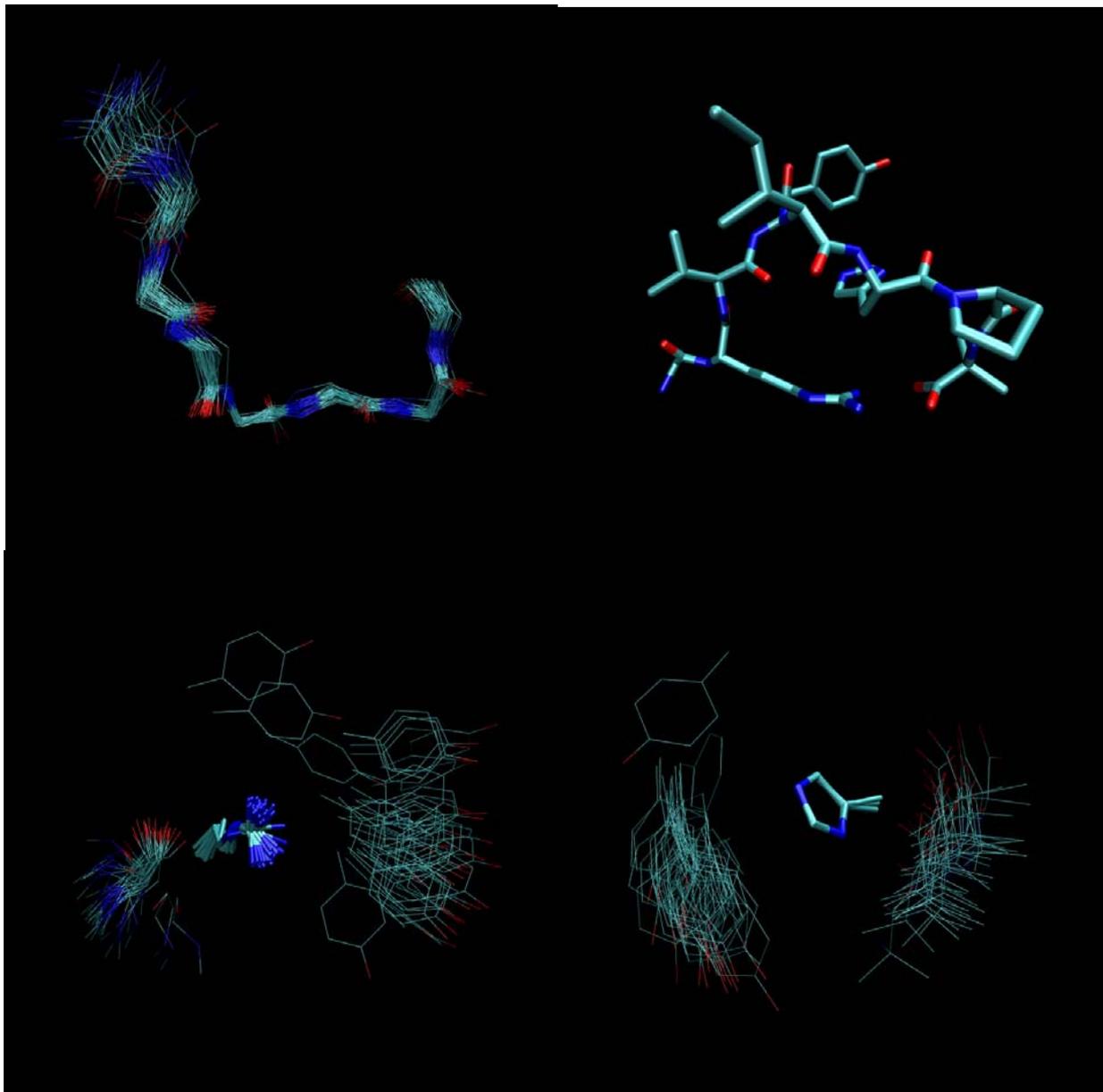
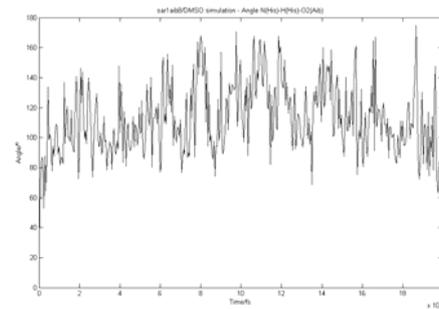
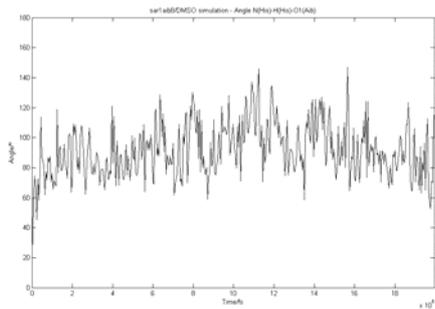
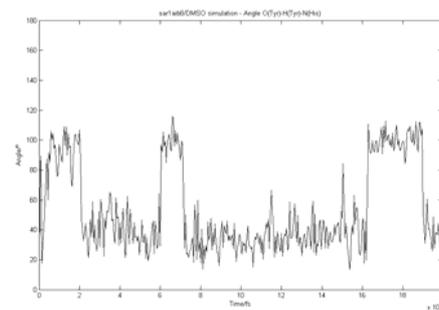
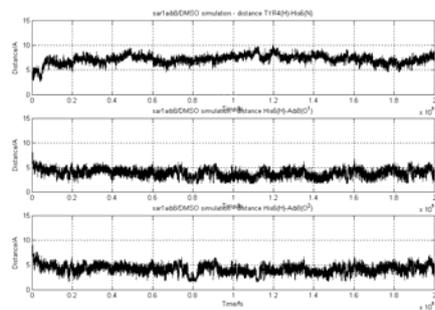
[Sar1,Aib7,Ile8]AngII



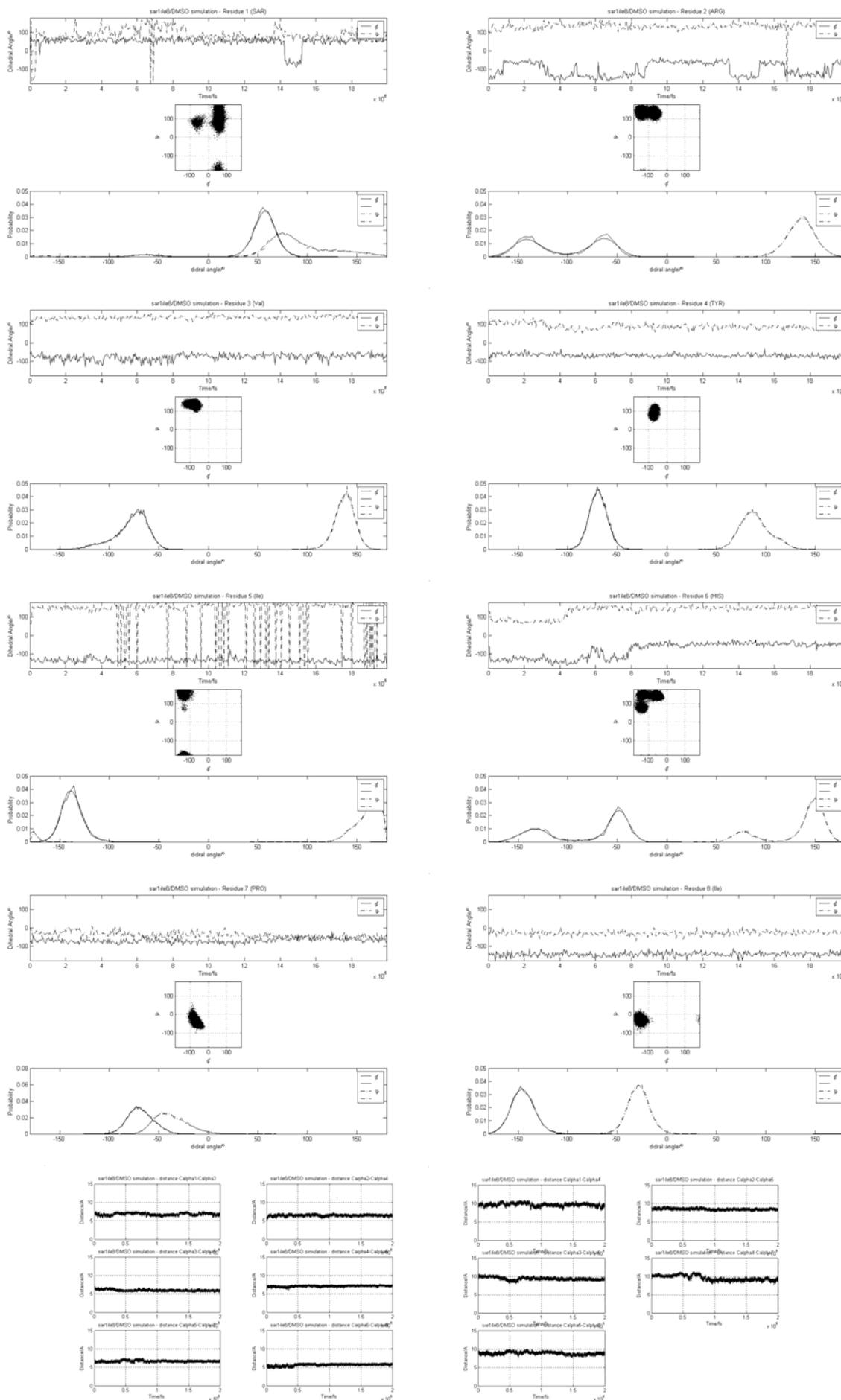


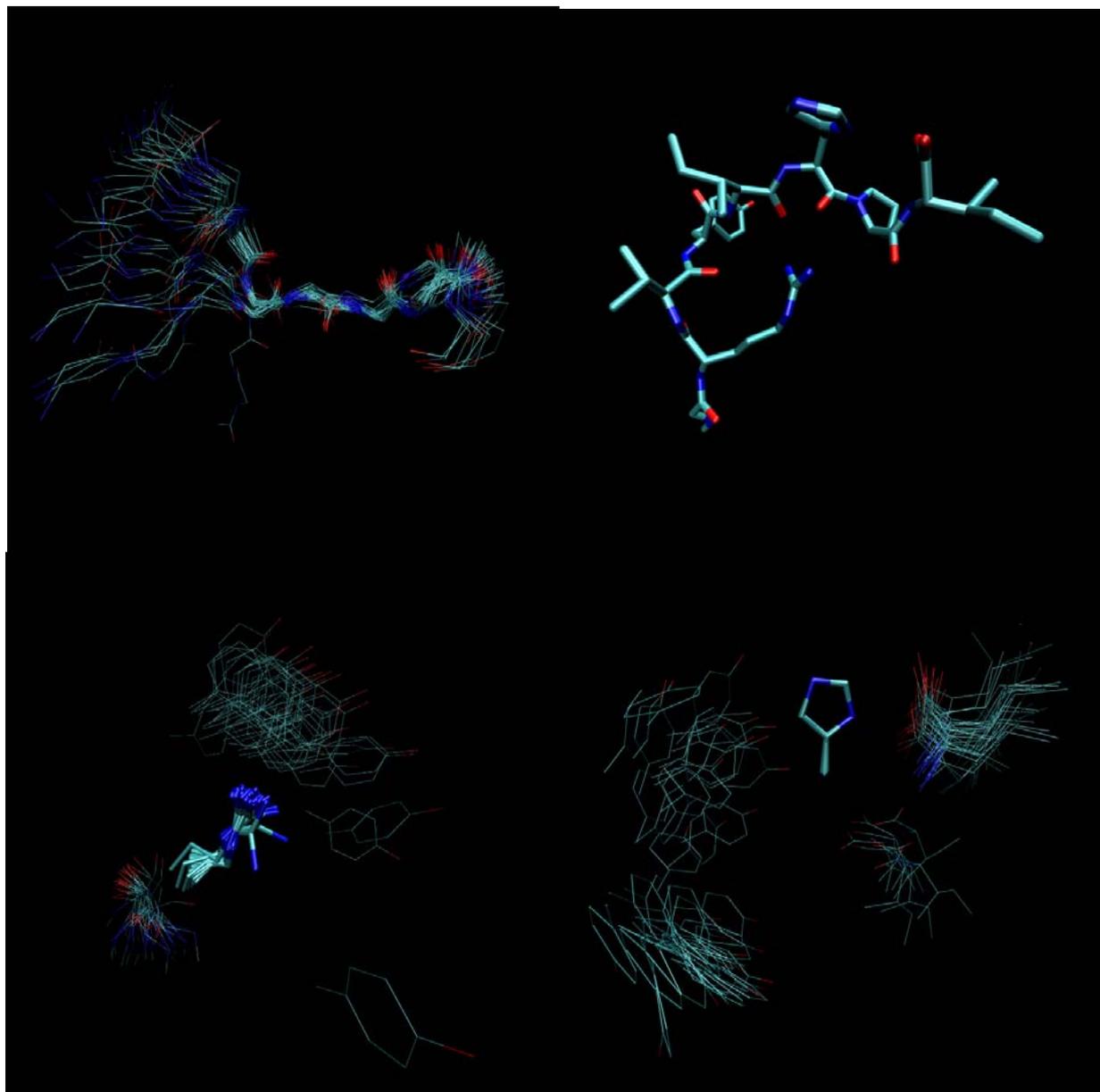
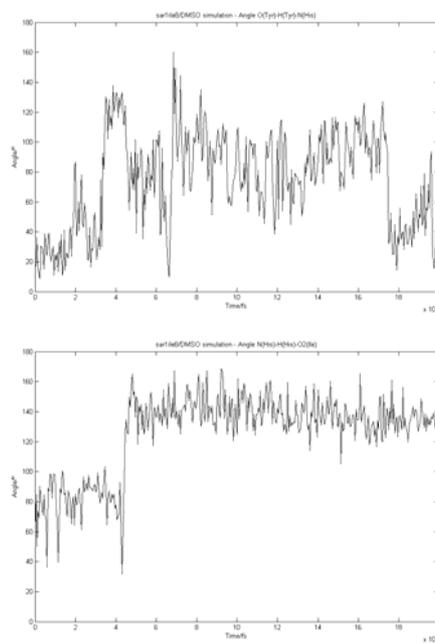
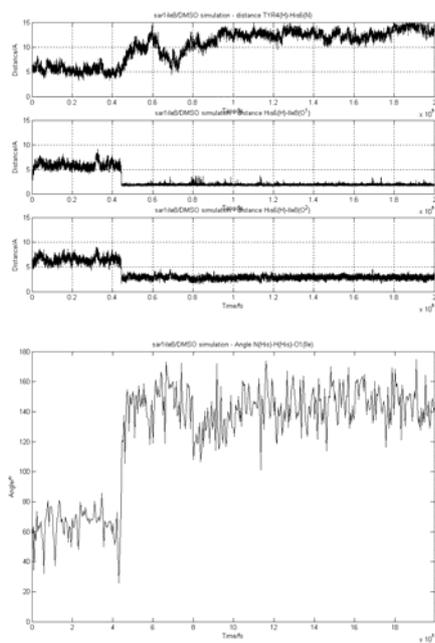
[Sar1,Aib8]AngII



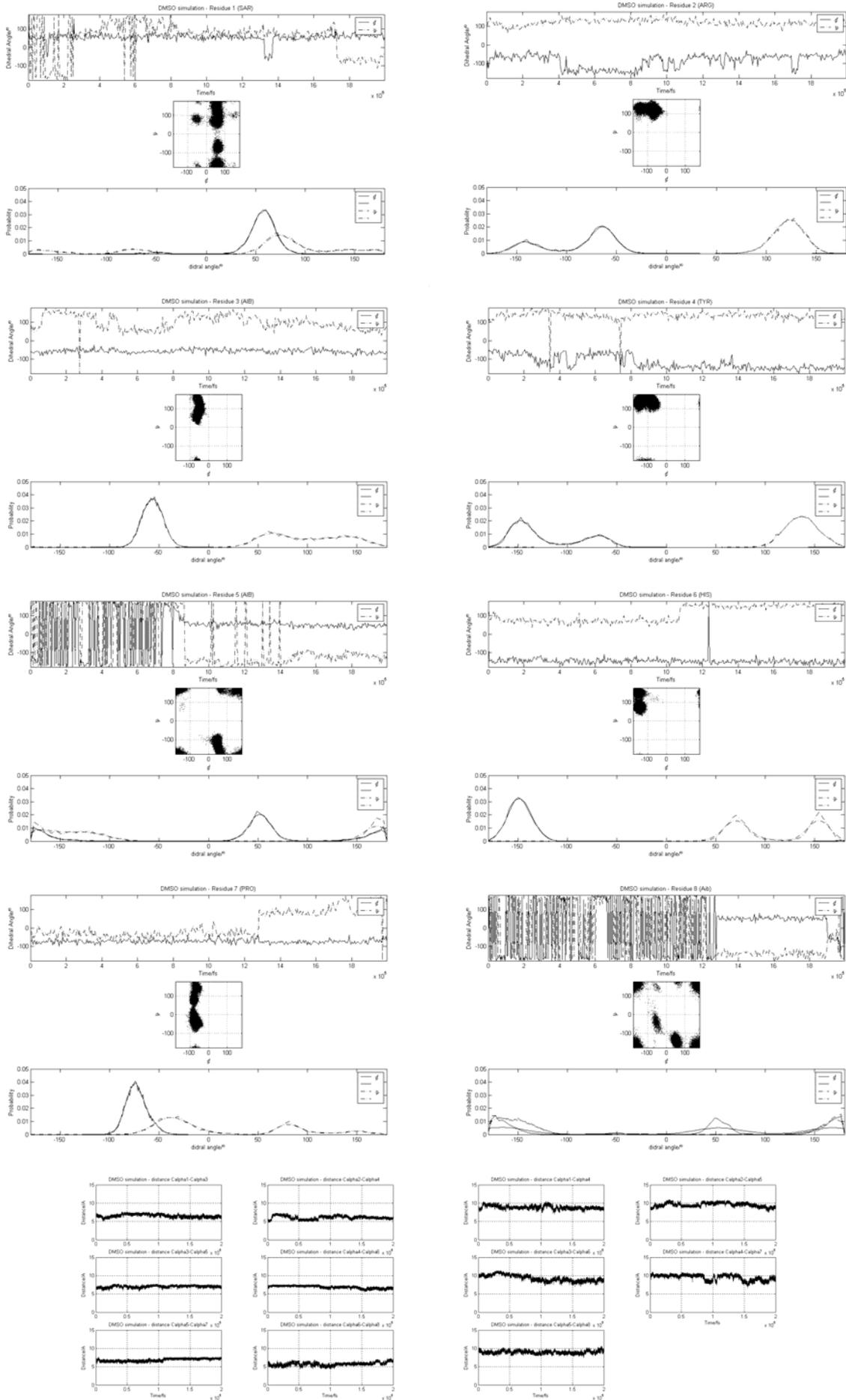


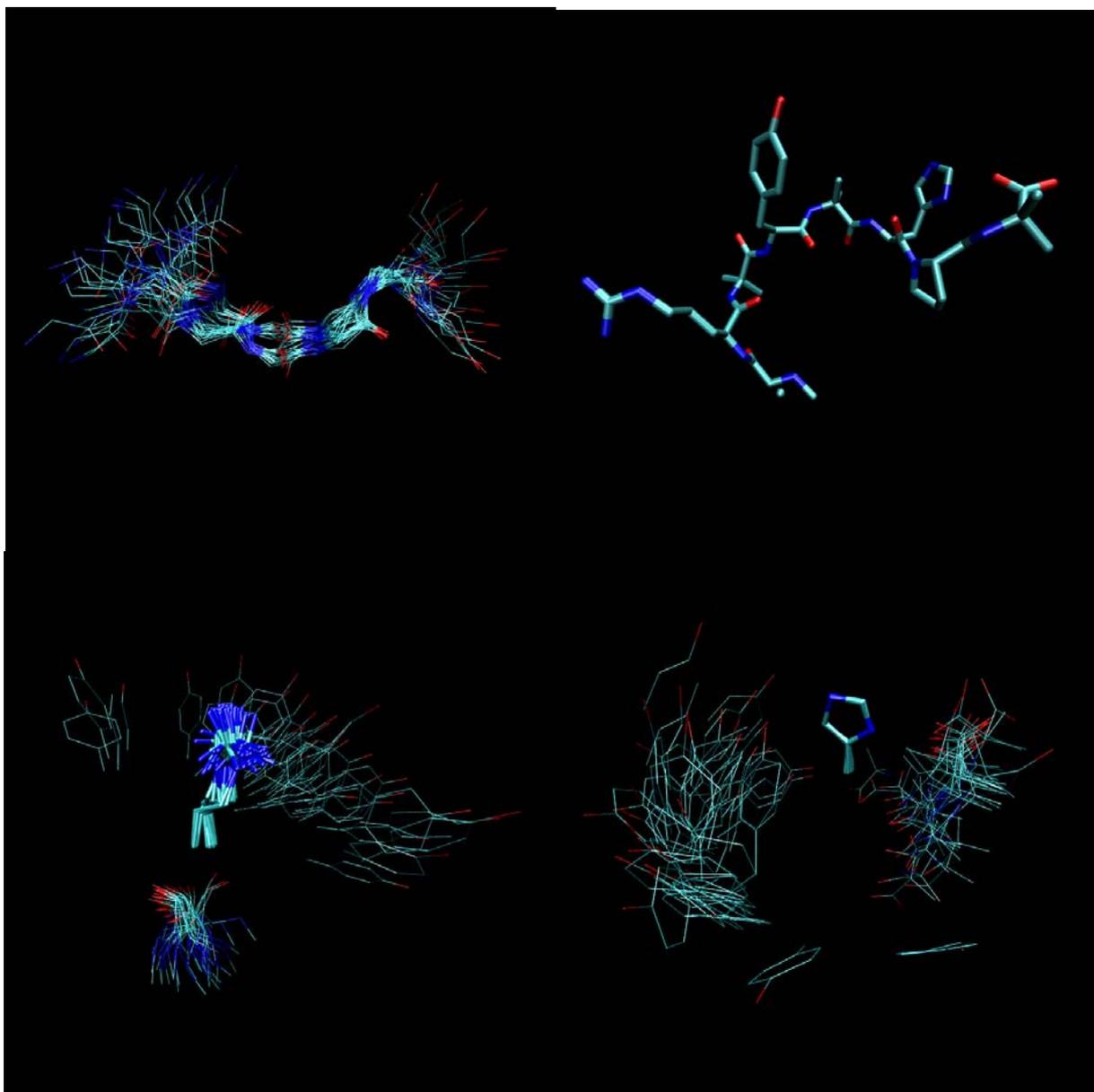
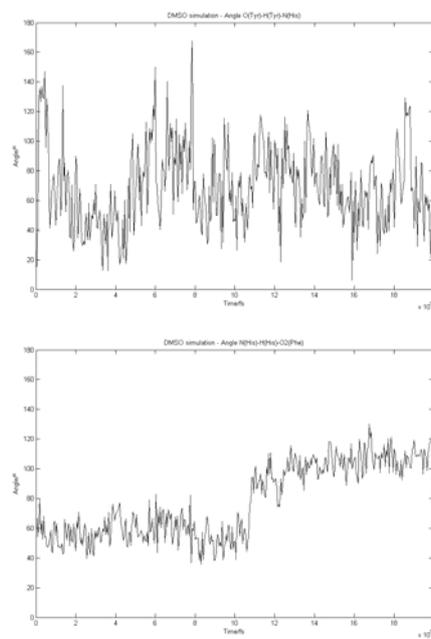
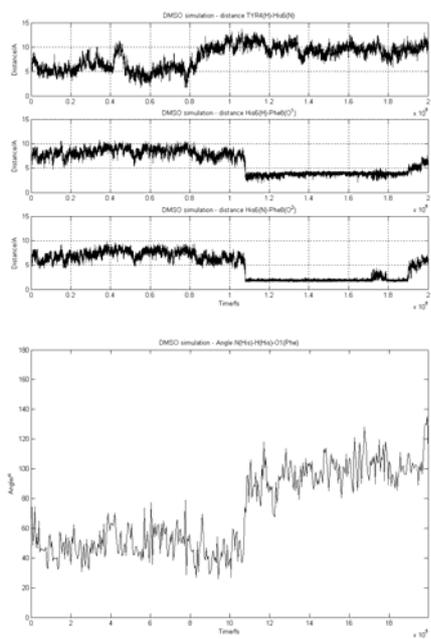
[Sar1,Ile8]AngII



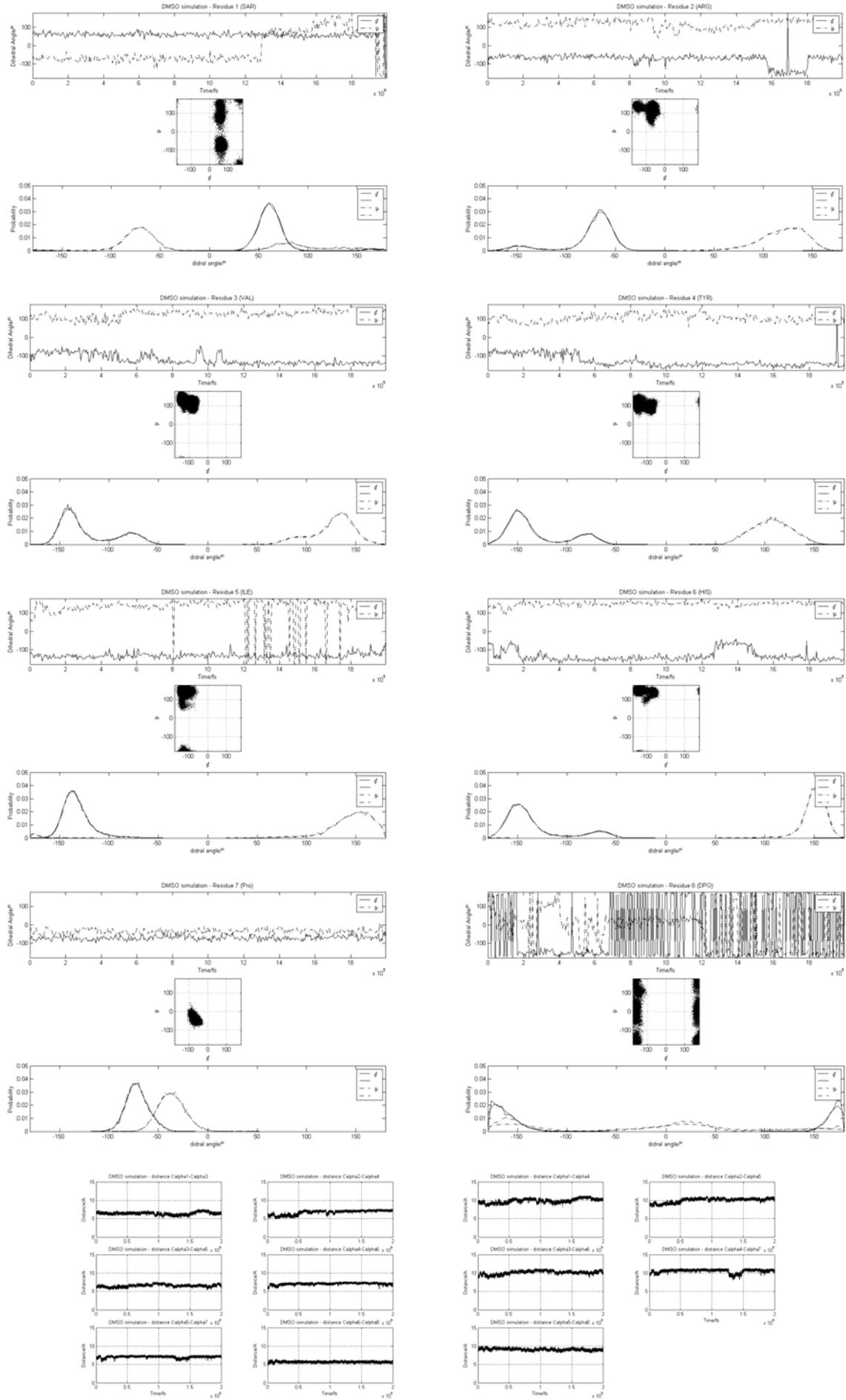


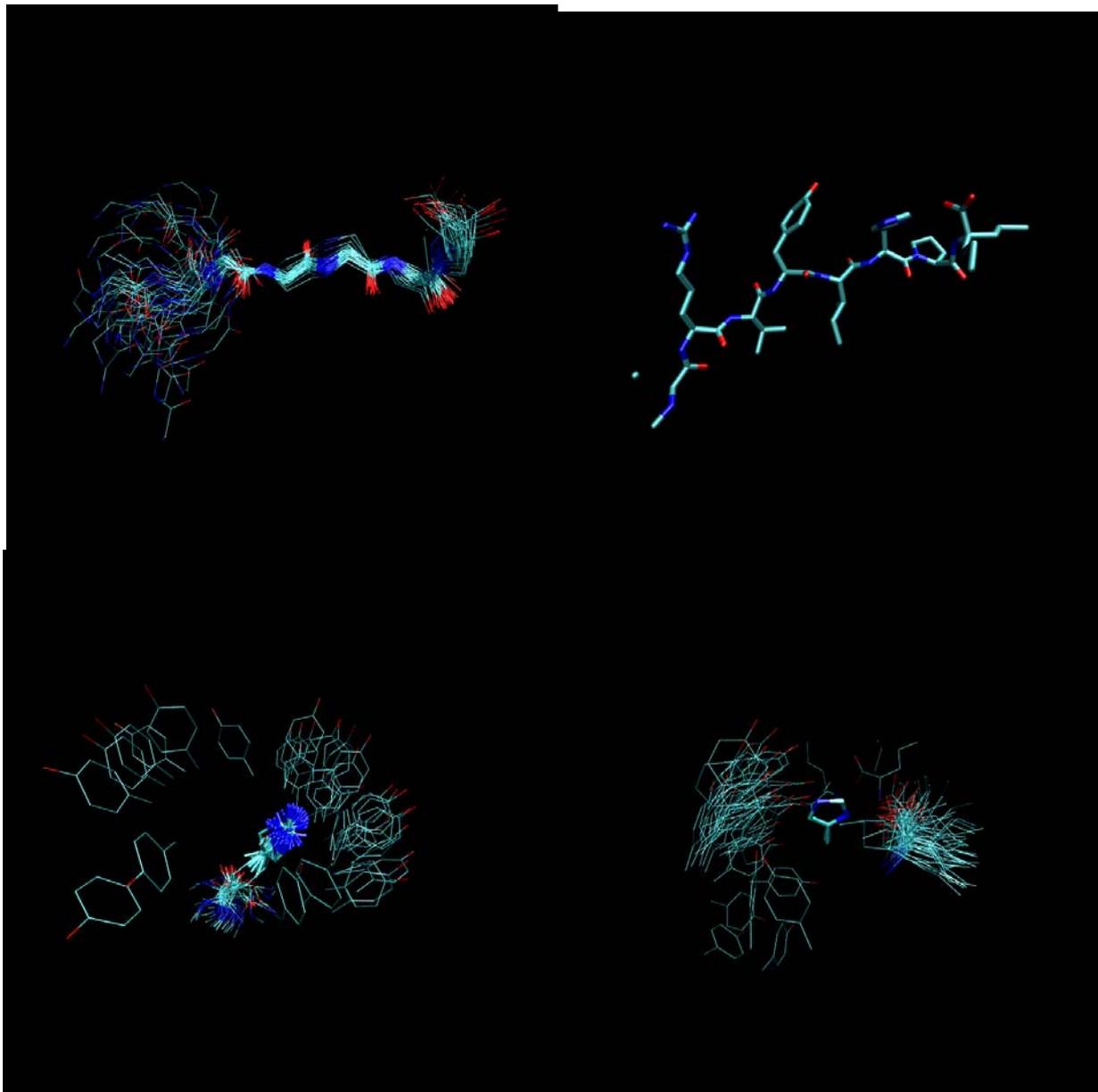
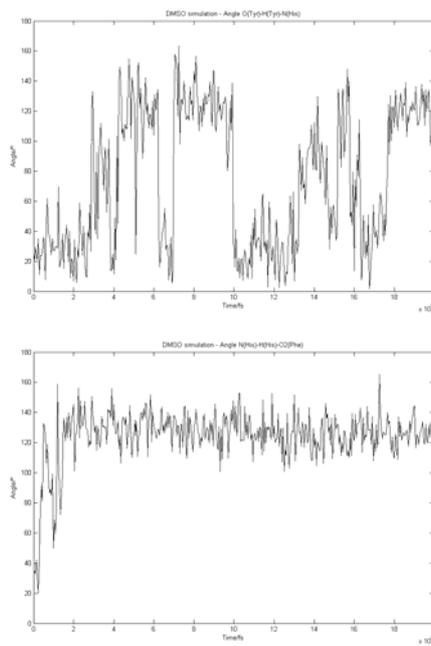
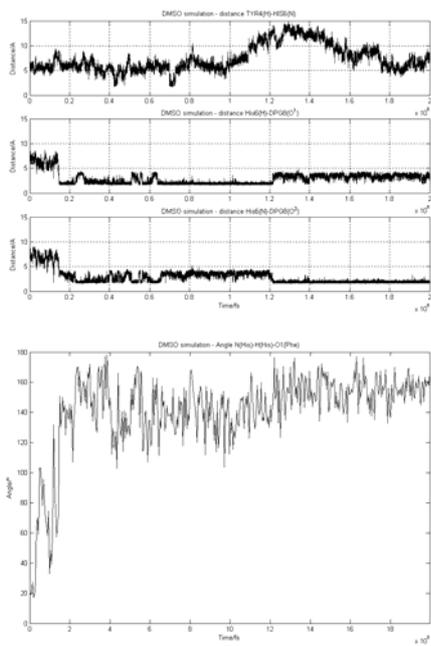
Composto 1 – [Sar1,Aib3,Aib5,Aib8]AngII



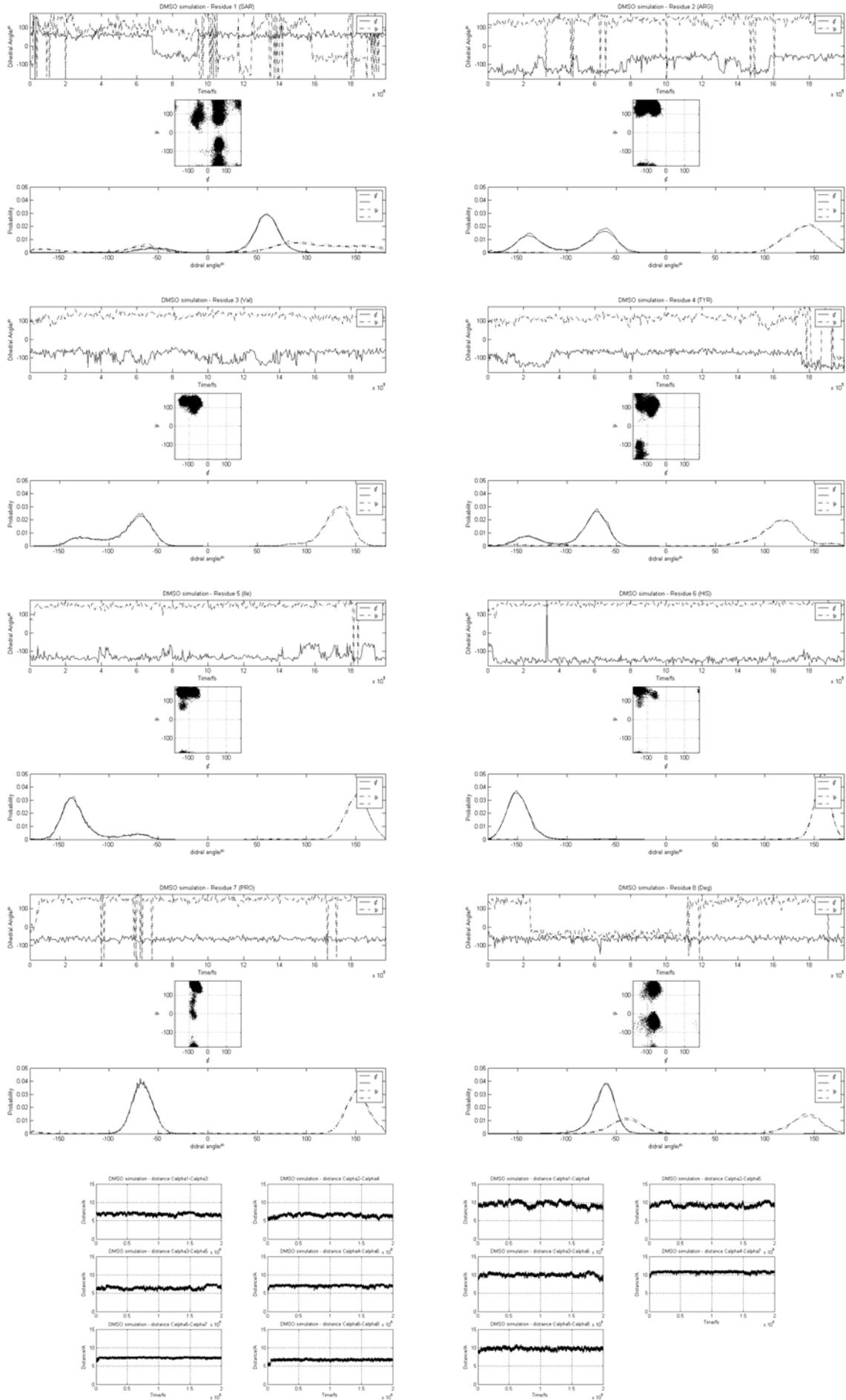


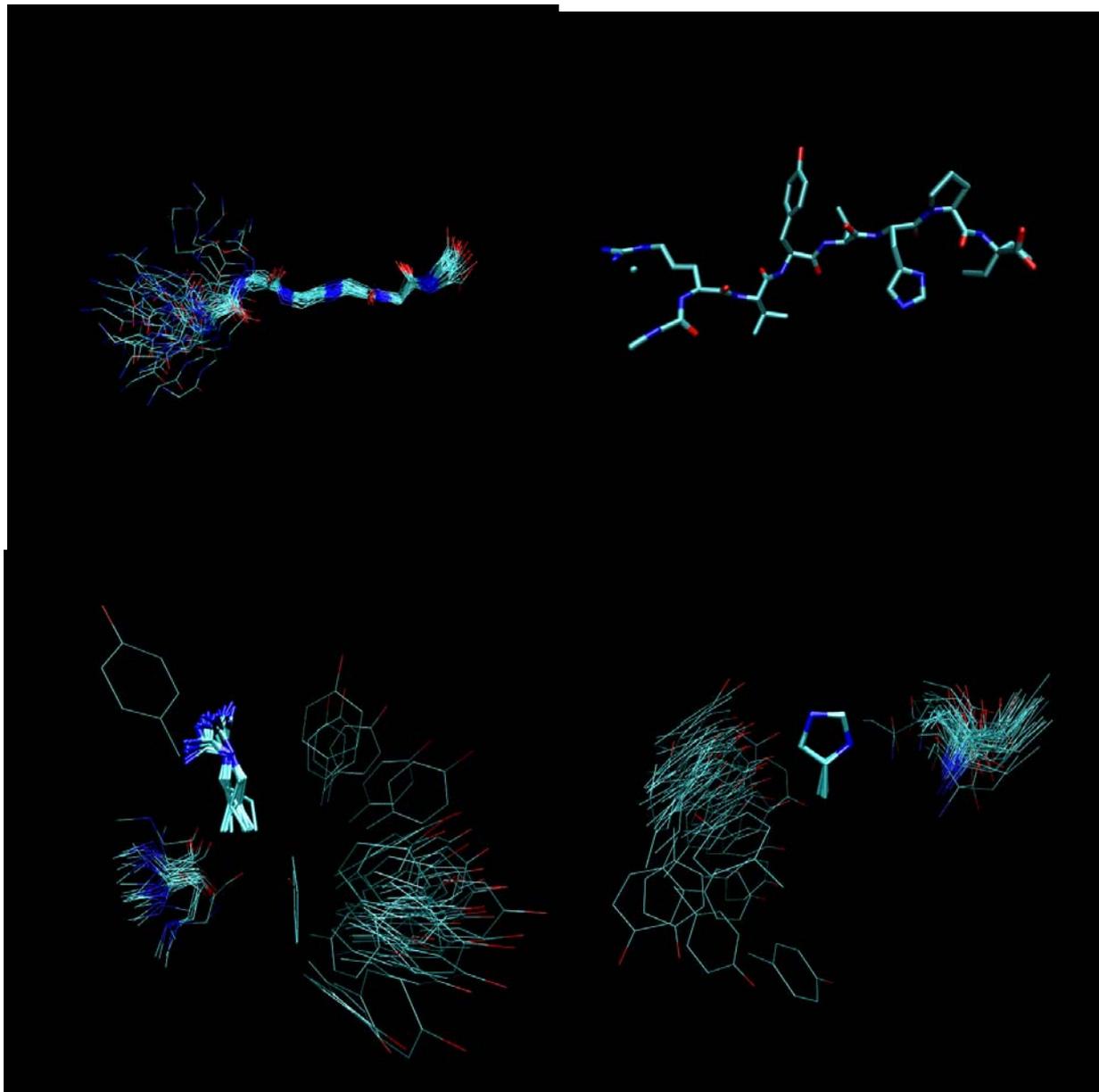
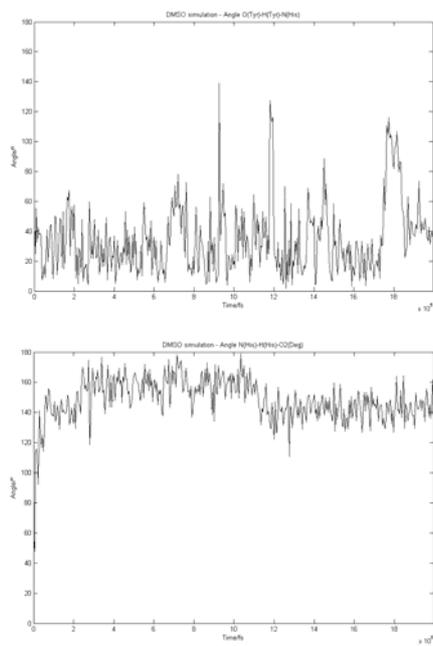
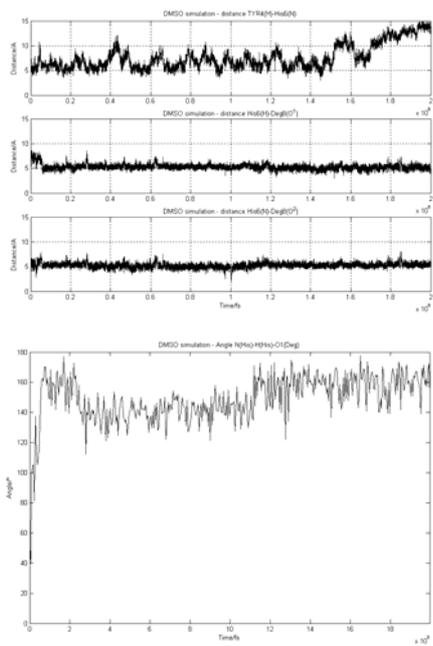
Composto 2 – [Sar1,Dpg8]AngII



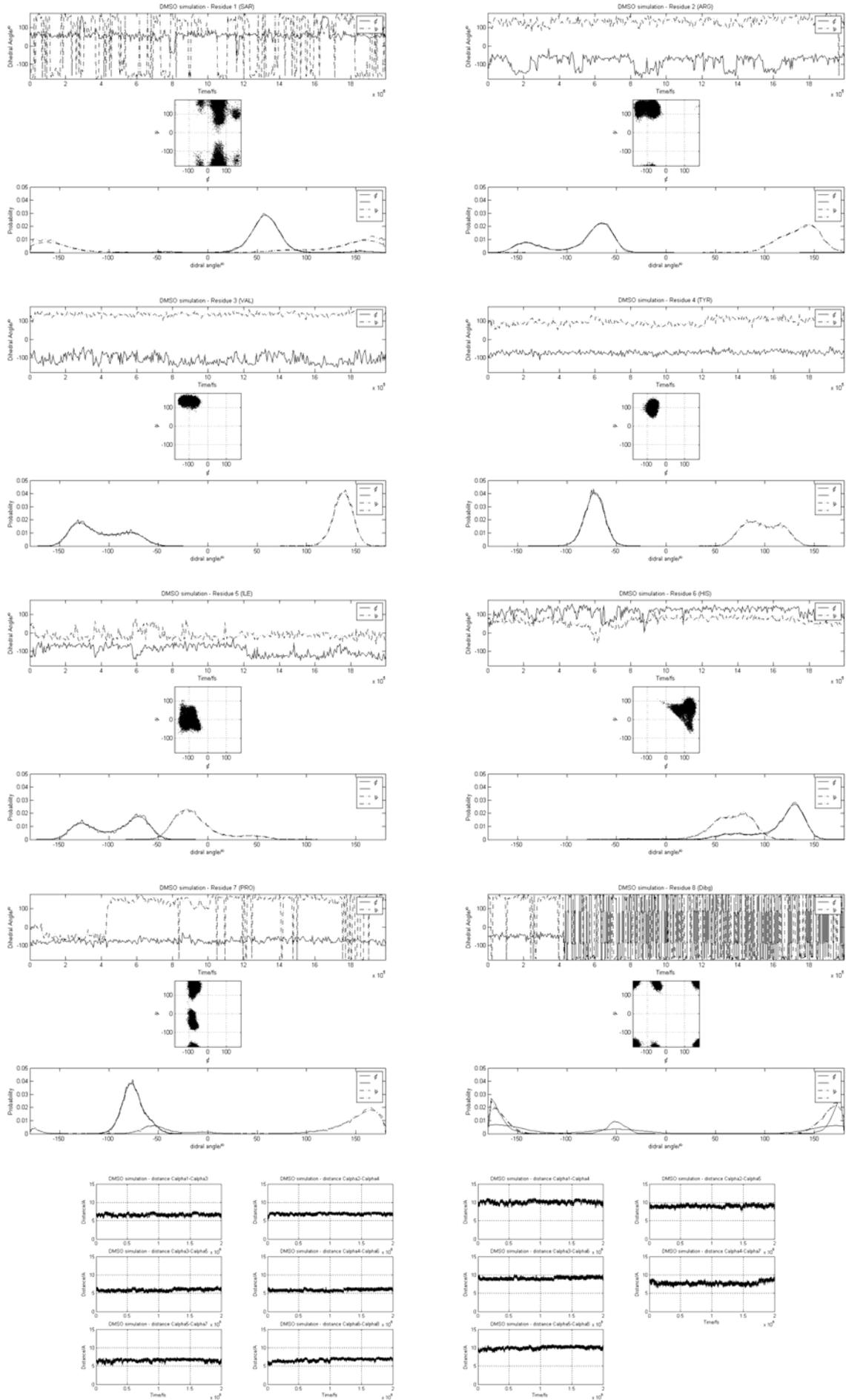


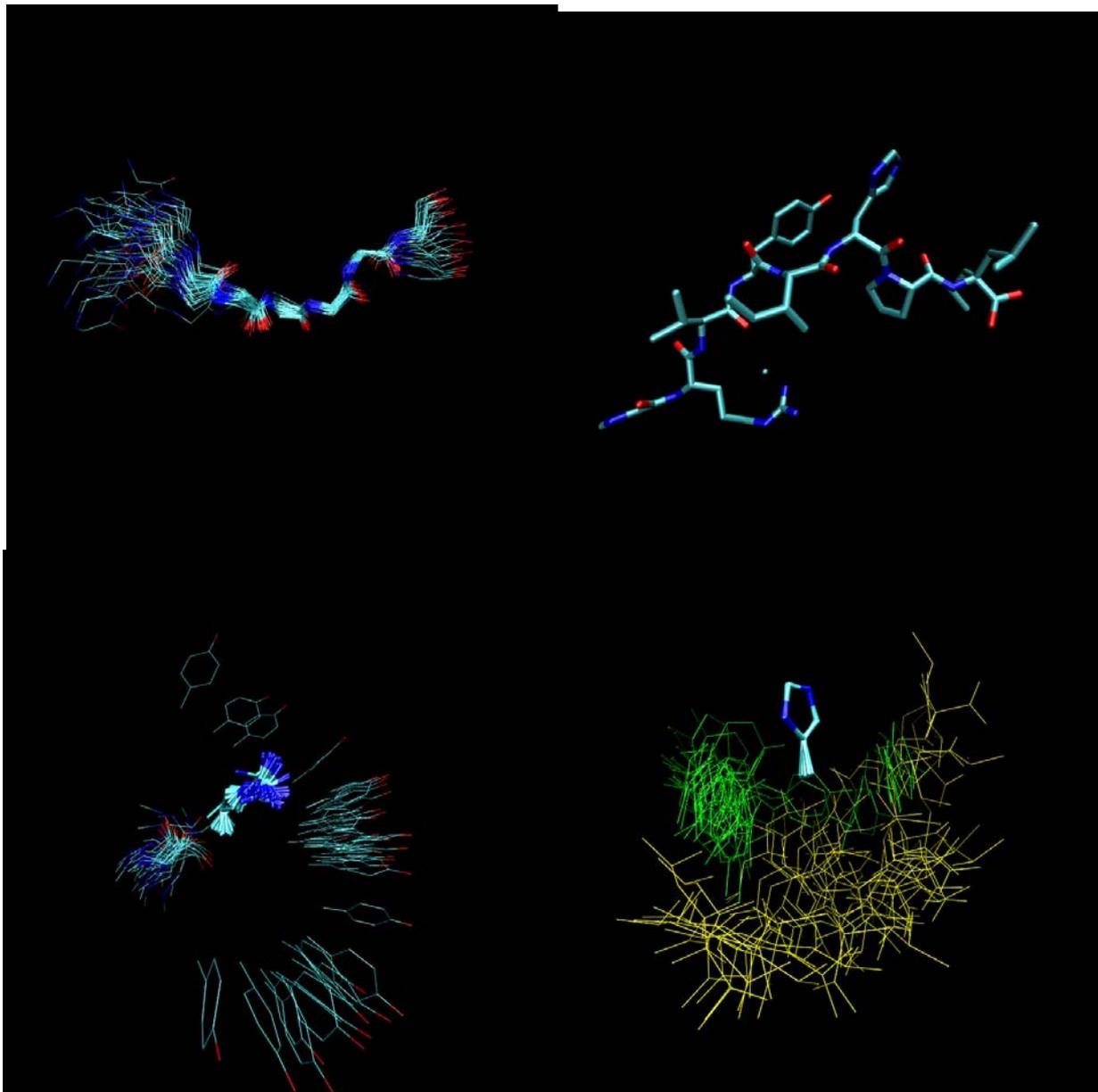
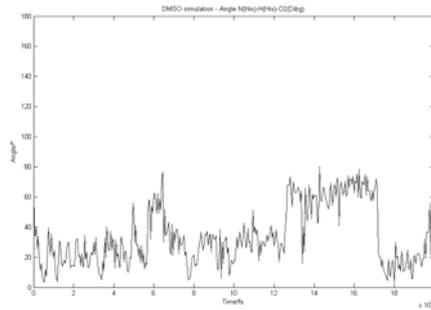
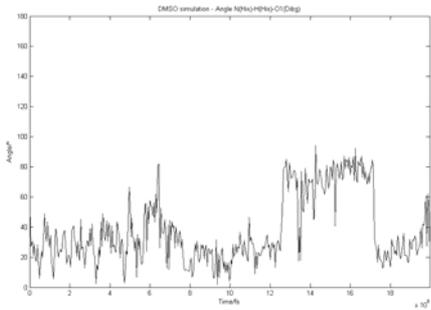
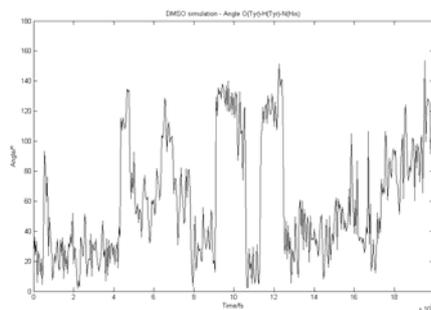
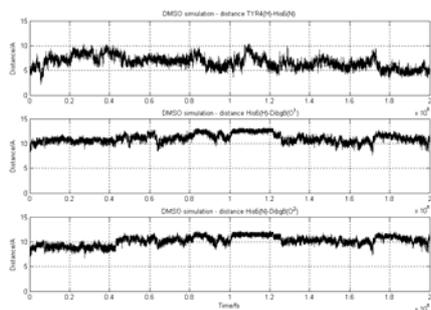
Composto 3 – [Sar1, Deg8]AngII



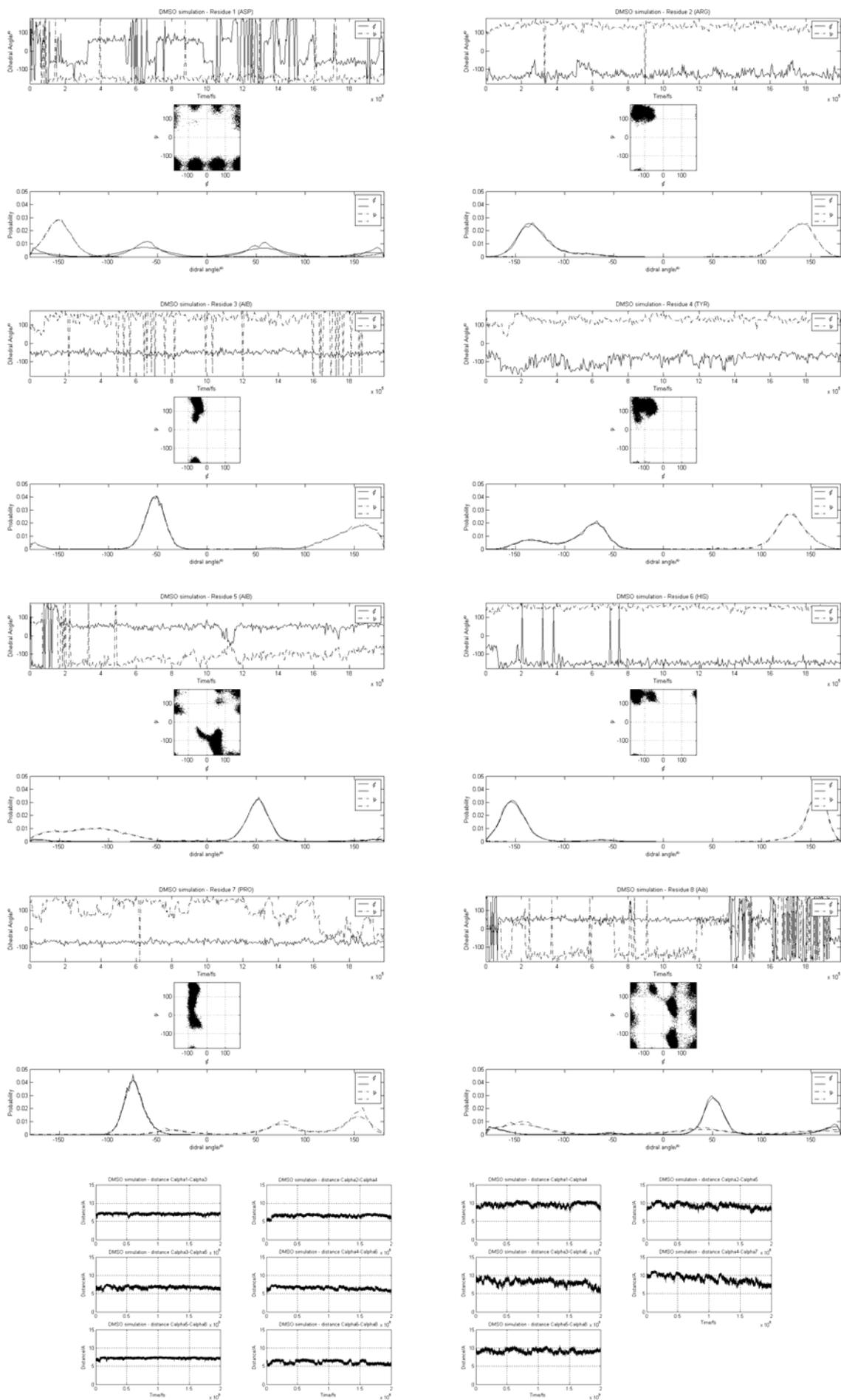


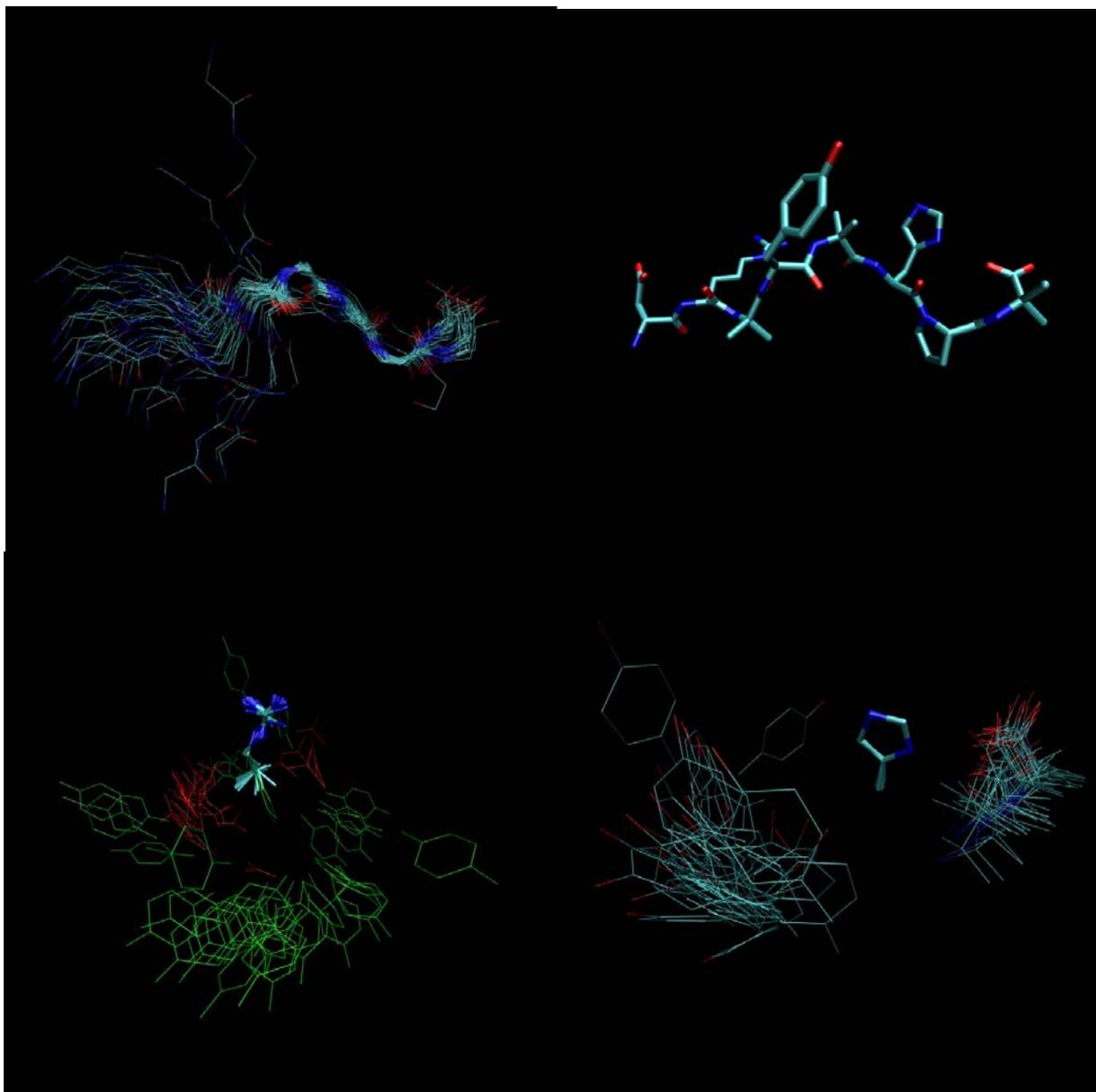
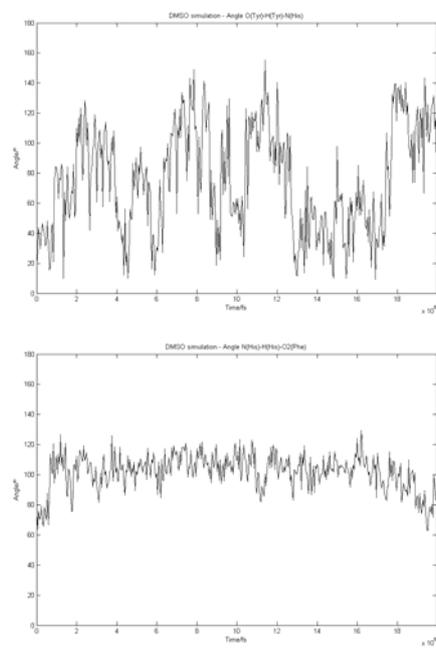
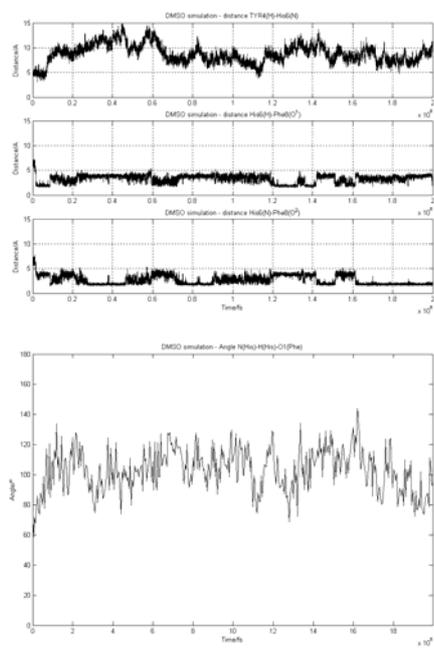
Composto 4 – [Sar1,Dibg8]AngII



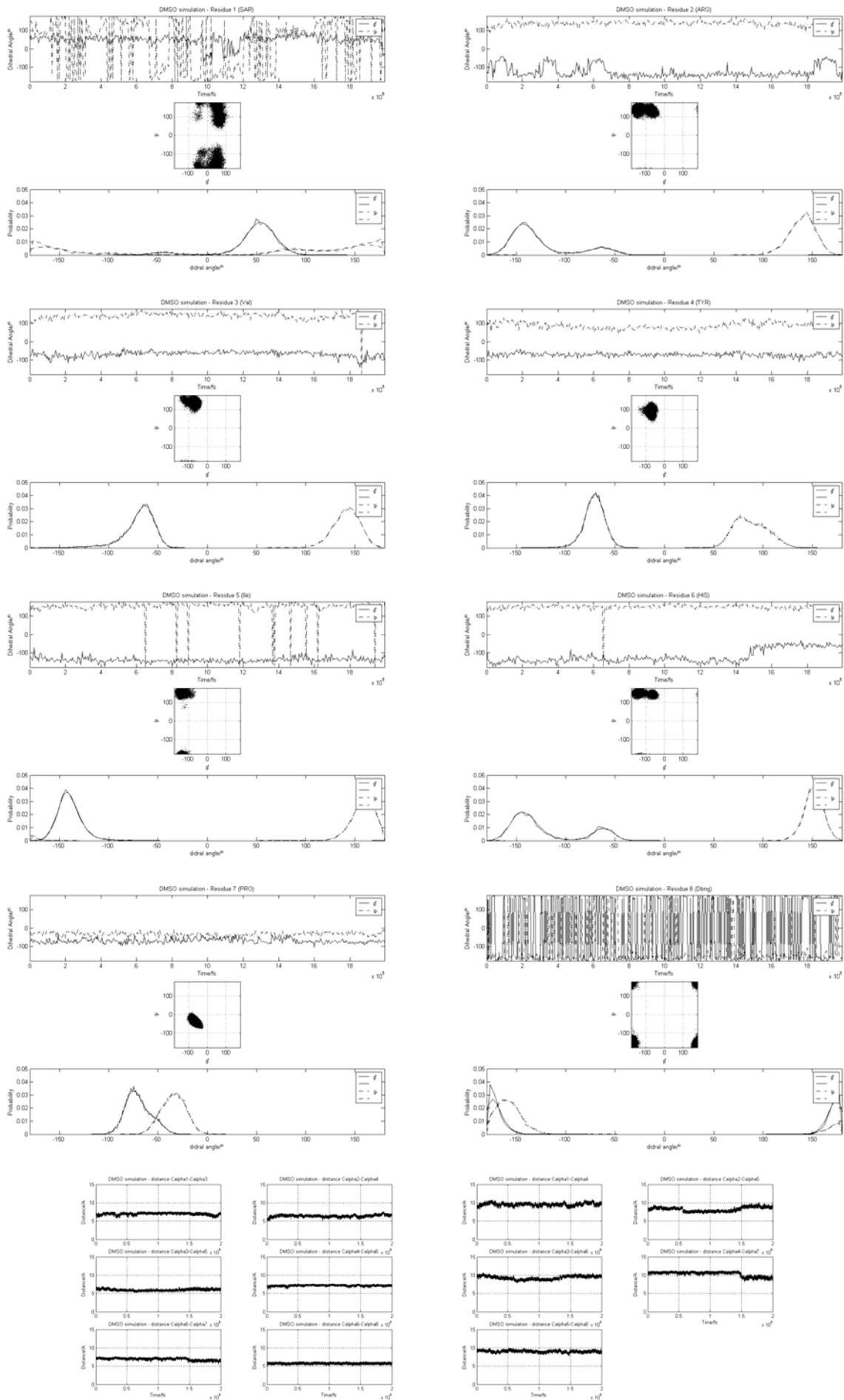


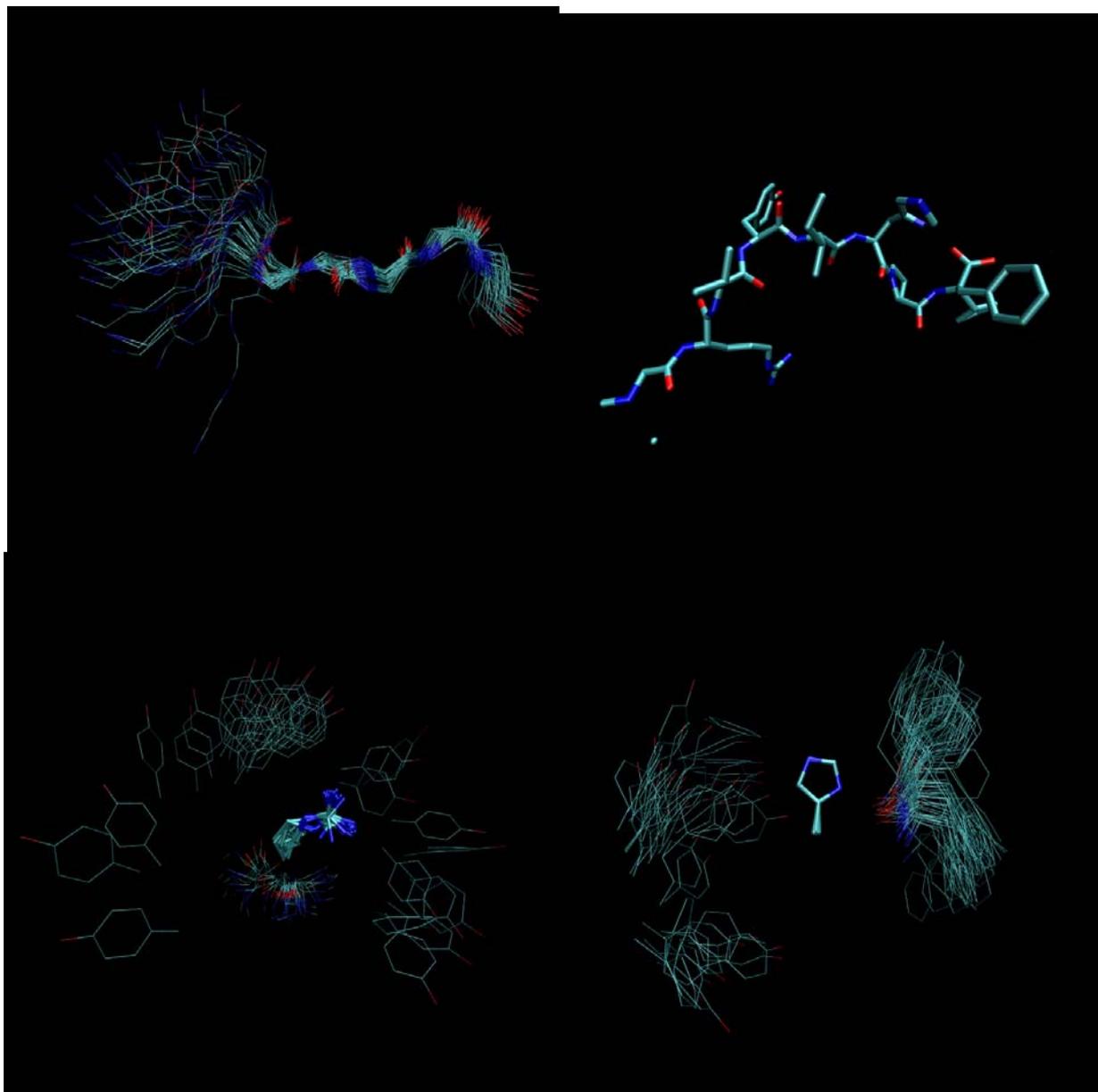
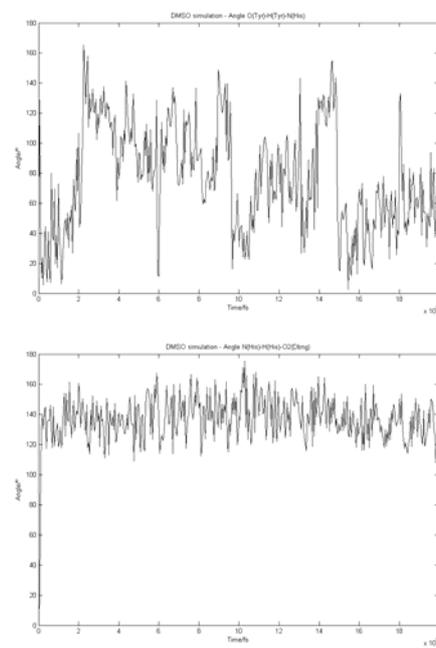
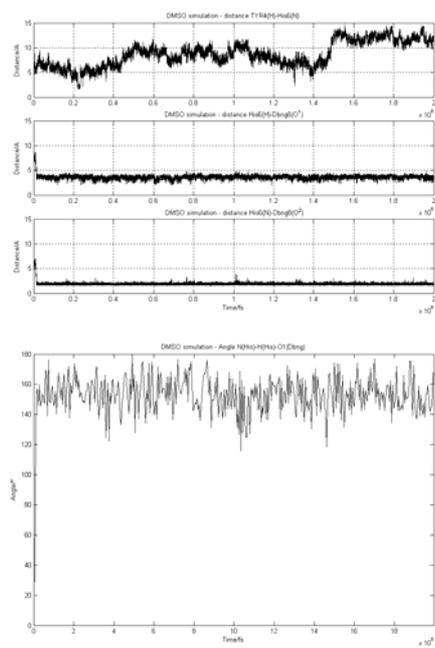
Composto 5 – [Aib3,Aib5,Aib8]AngII



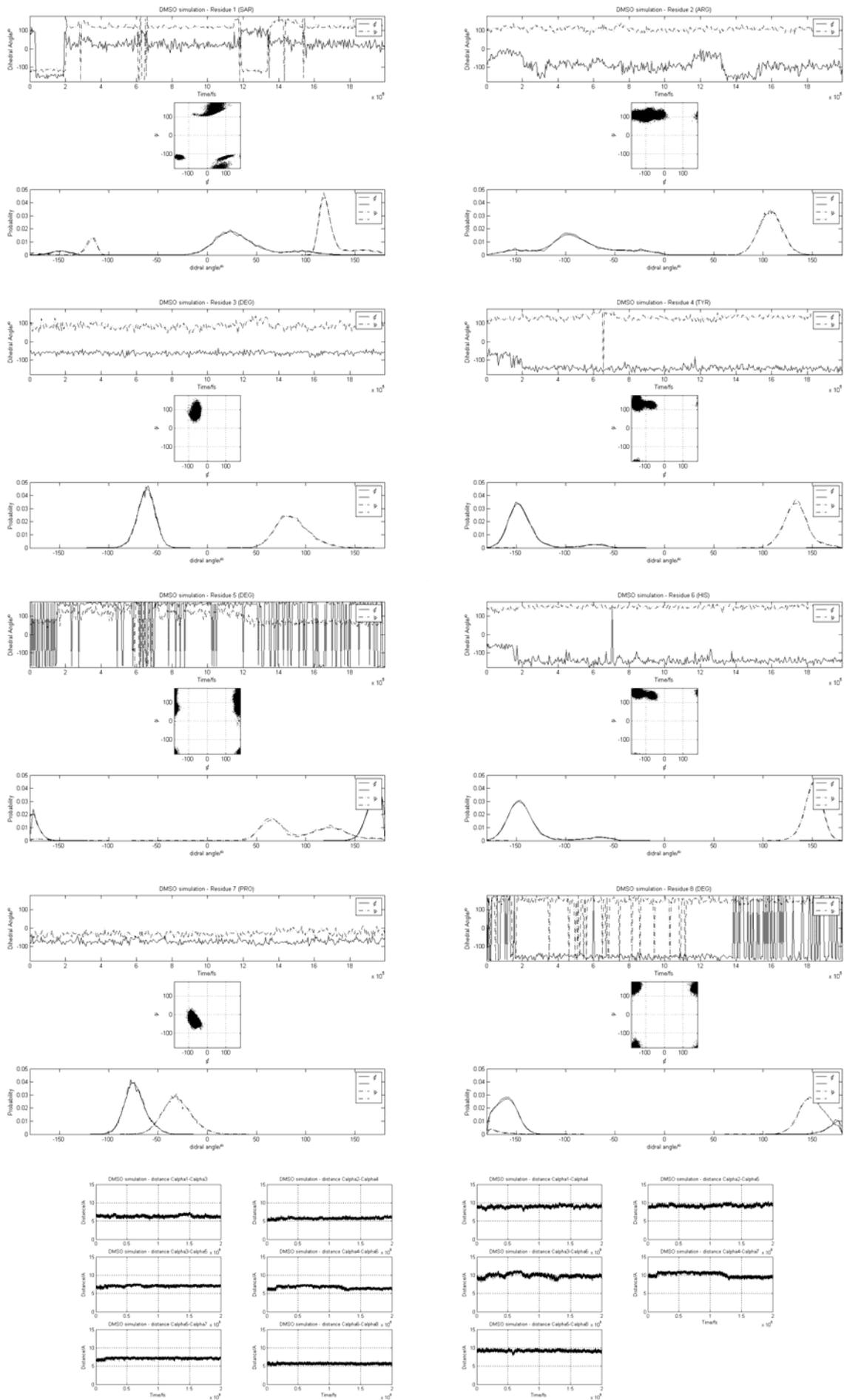


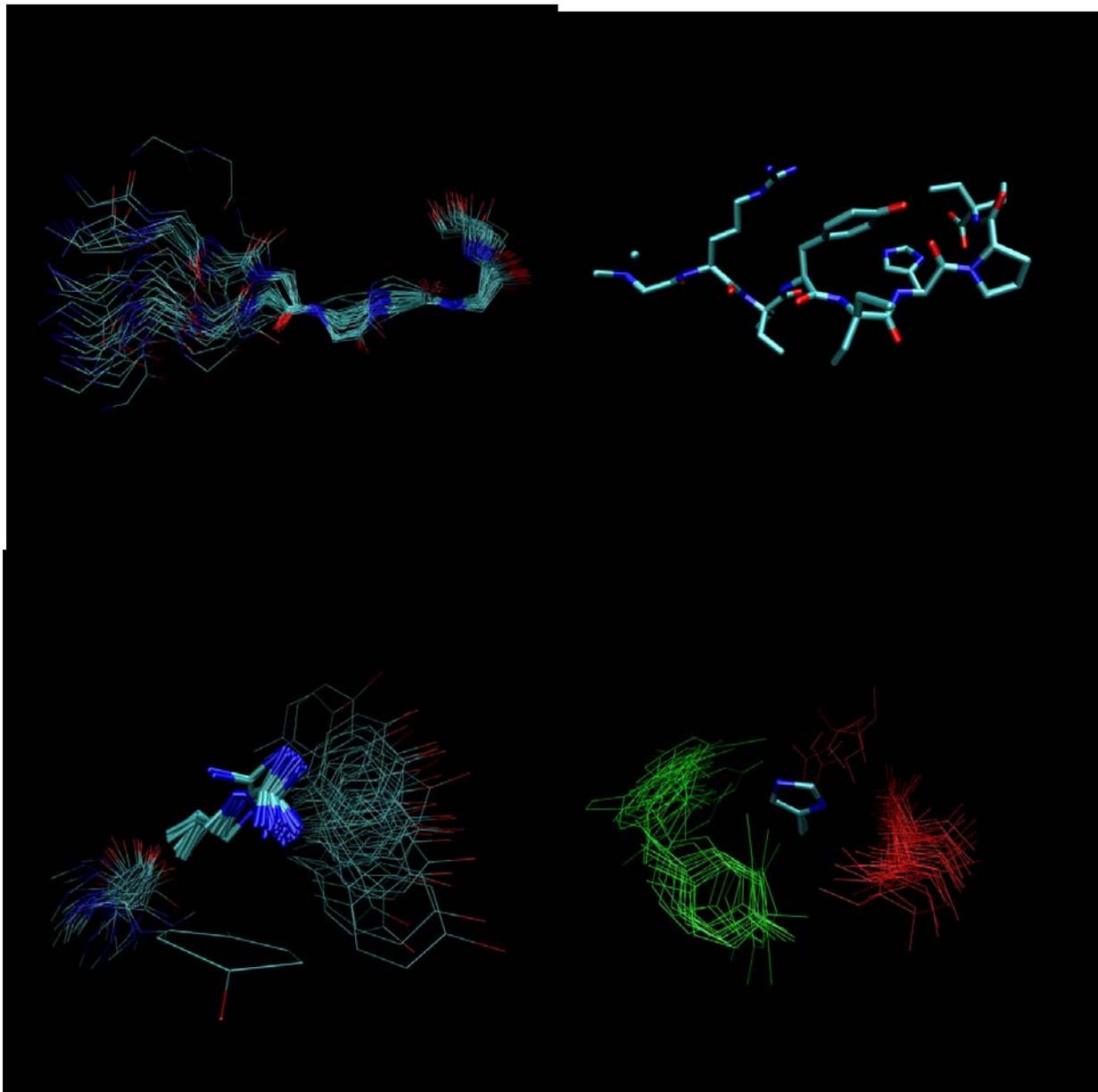
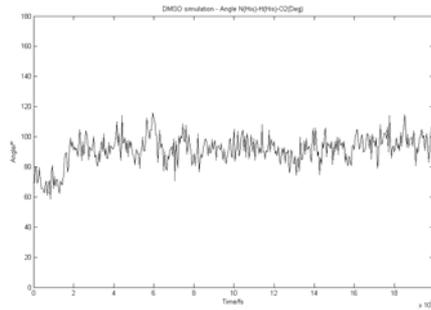
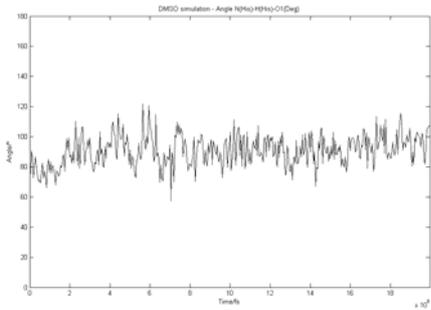
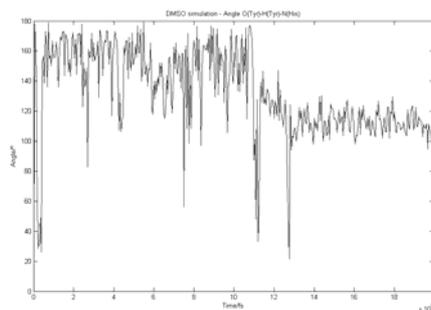
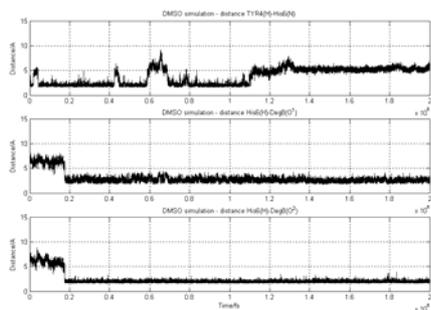
Composto 6 – [Sar1,Db_ng8]AngII



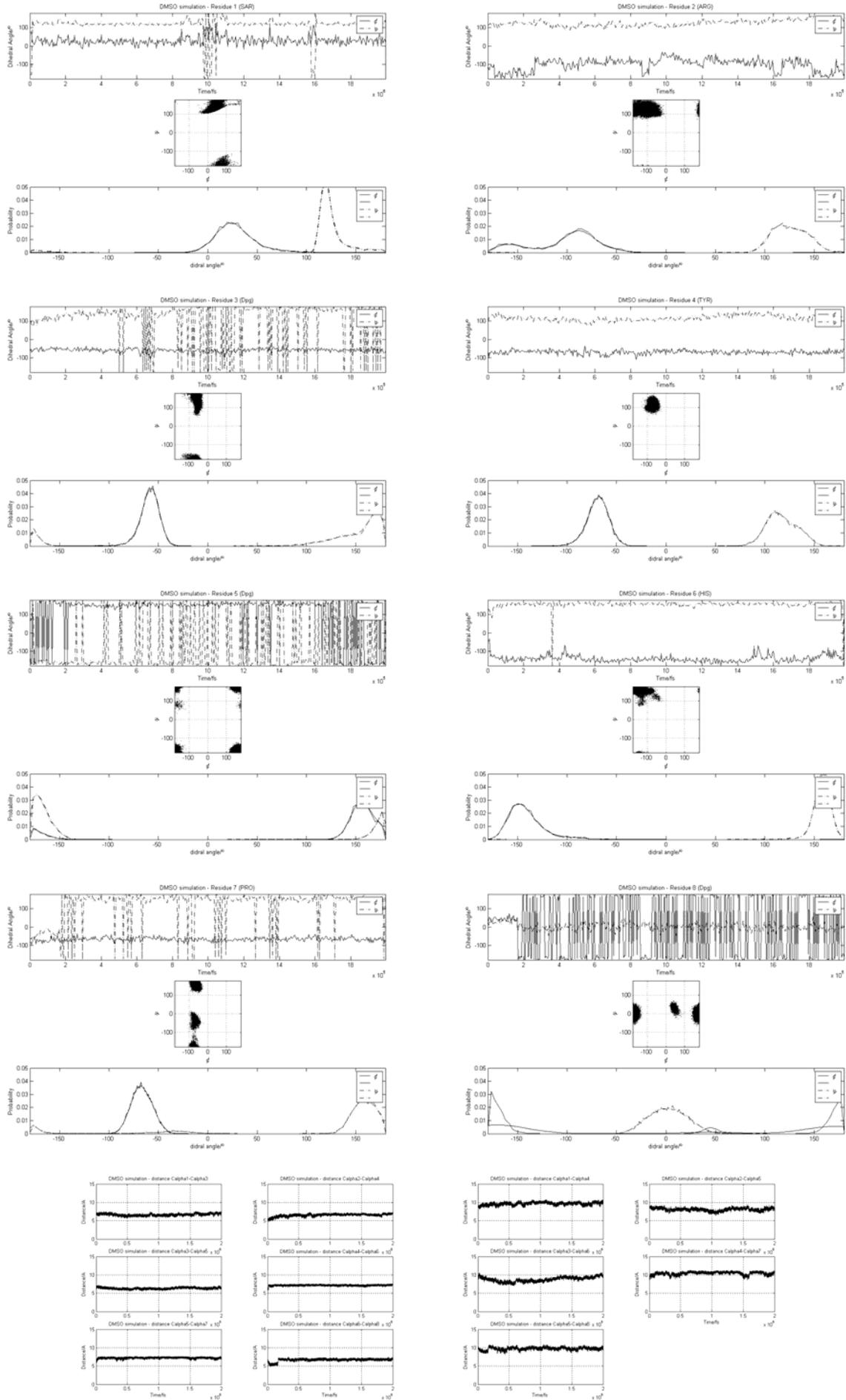


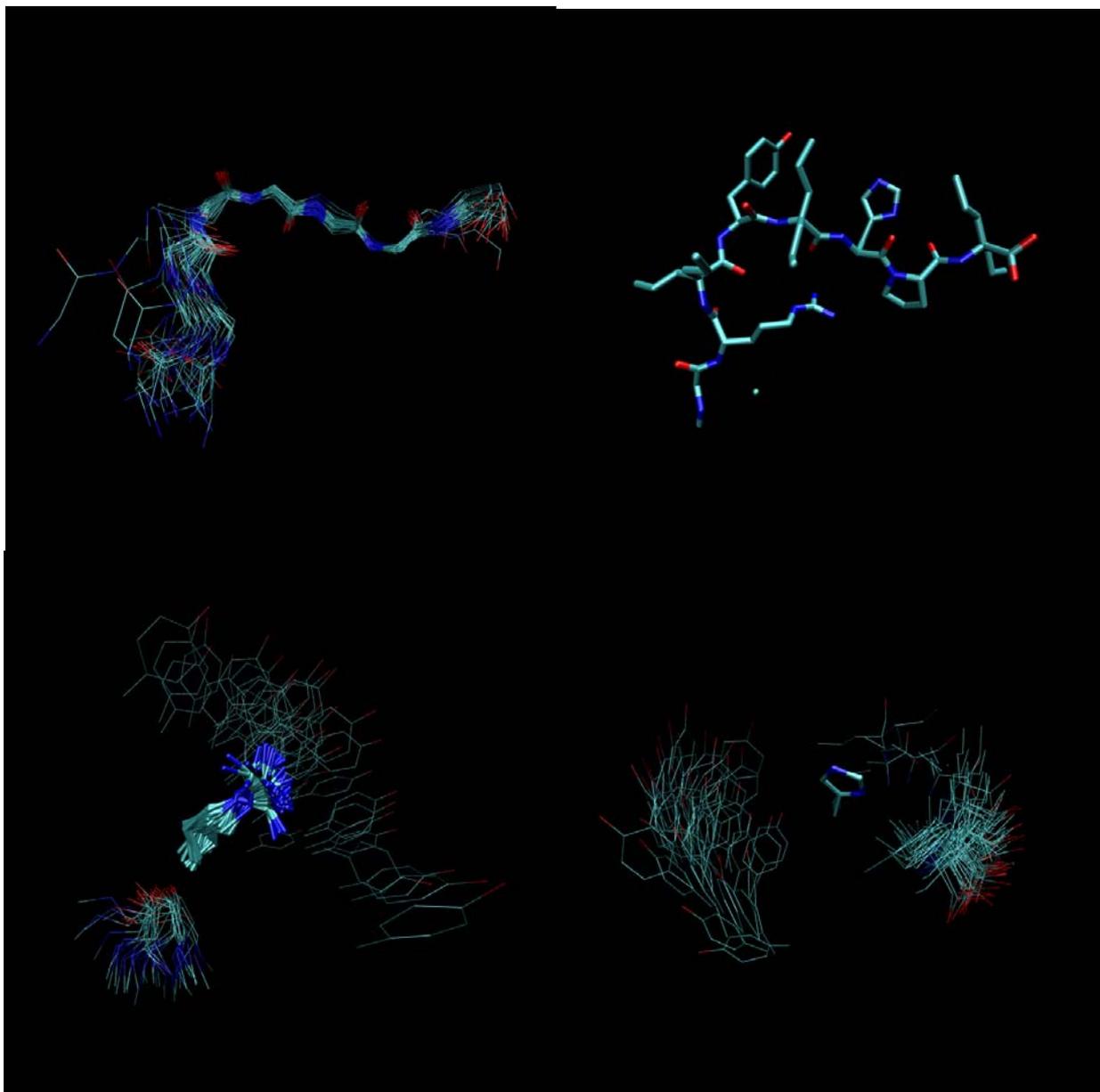
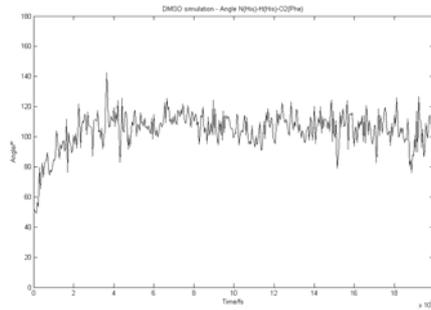
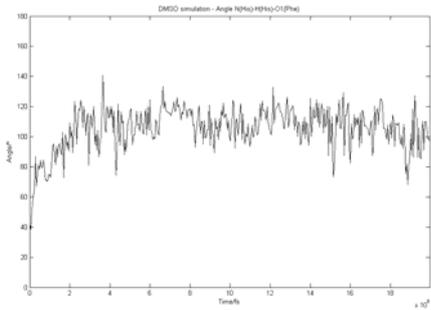
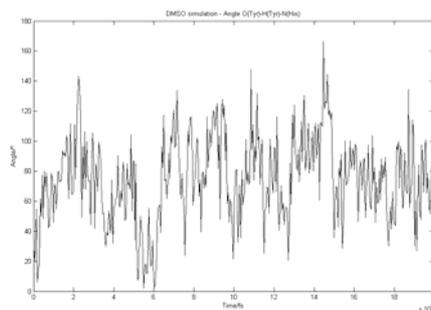
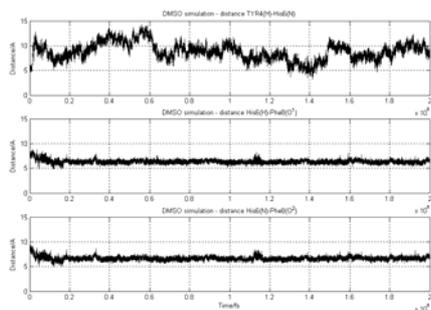
Composto 7 – [Sar1, Deg3, Deg5, Deg8]AngII



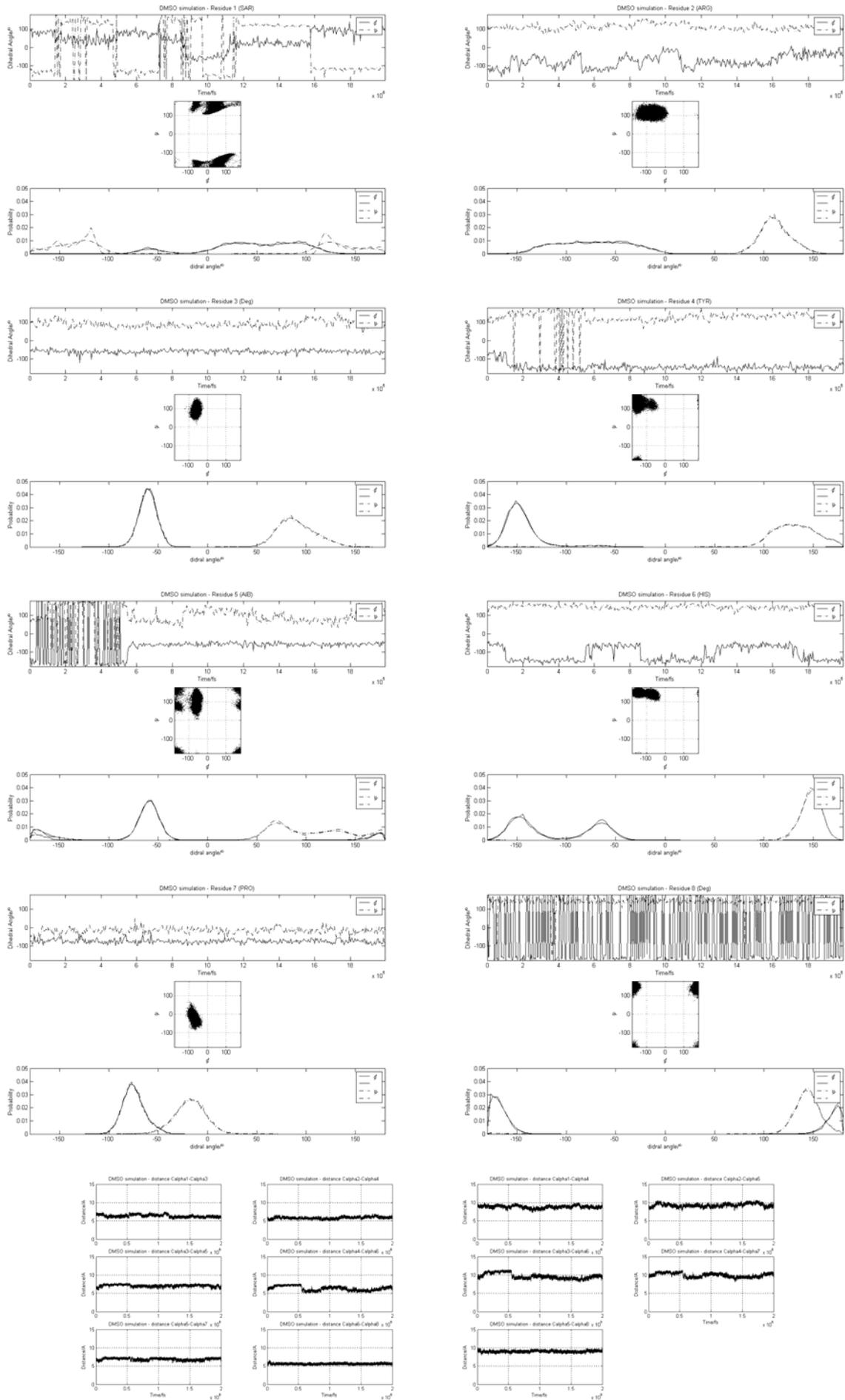


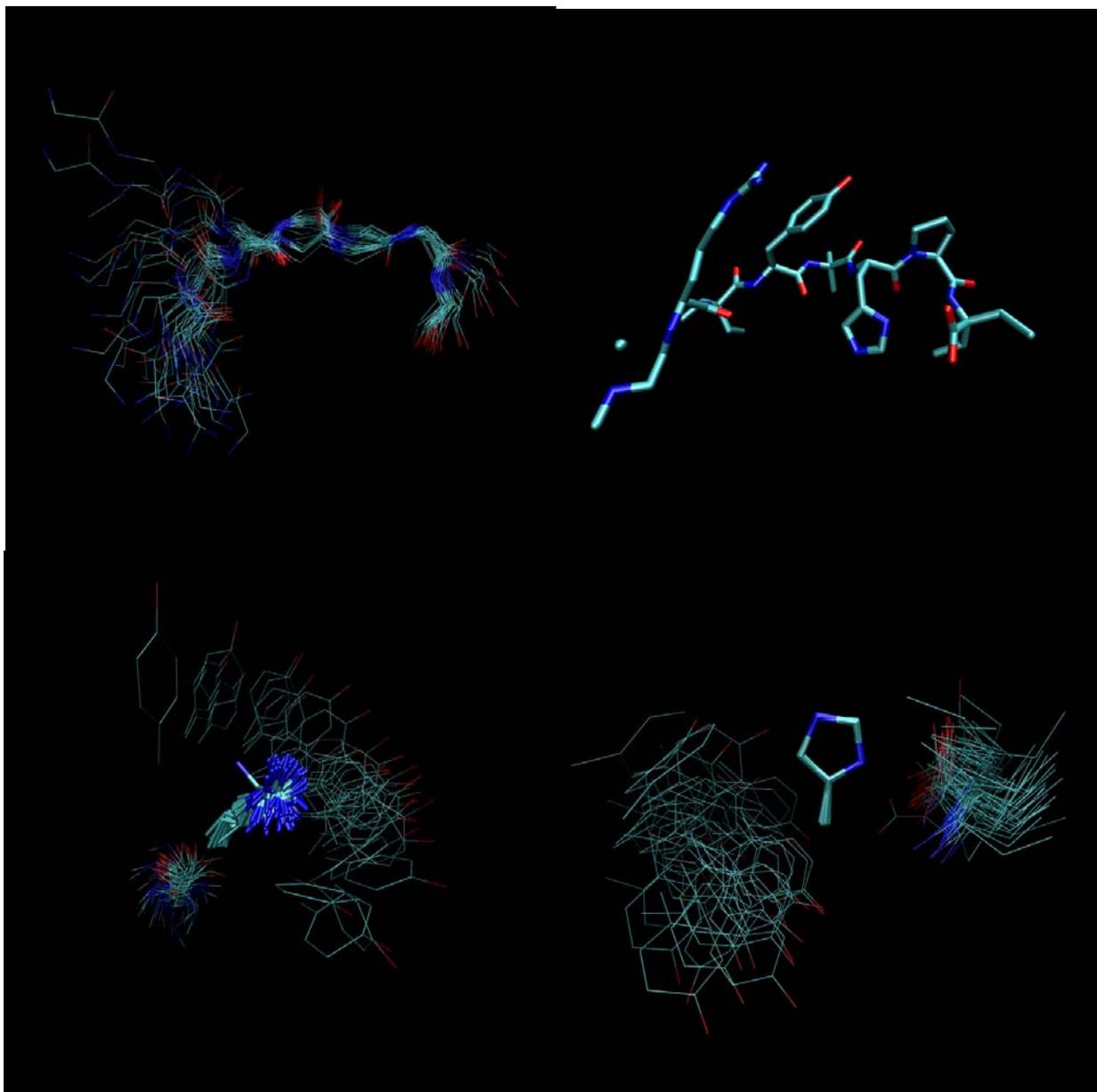
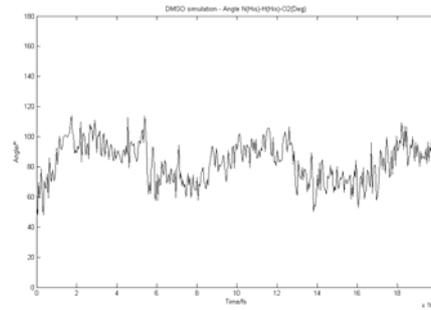
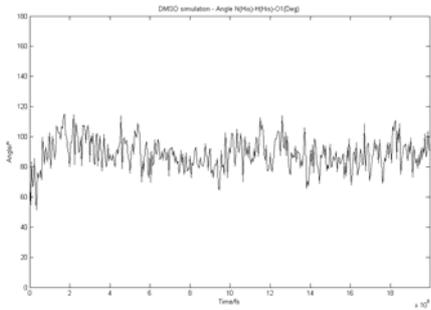
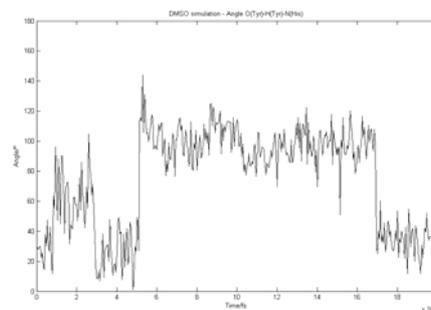
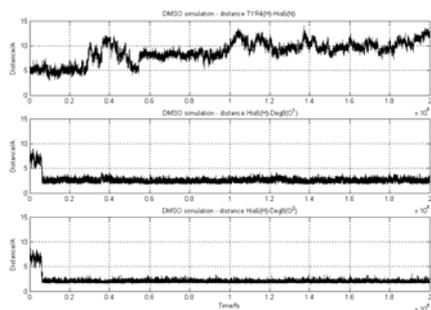
Composto 8 – [Sar1,Dpg3,Dpg5,Dpg8]AngII



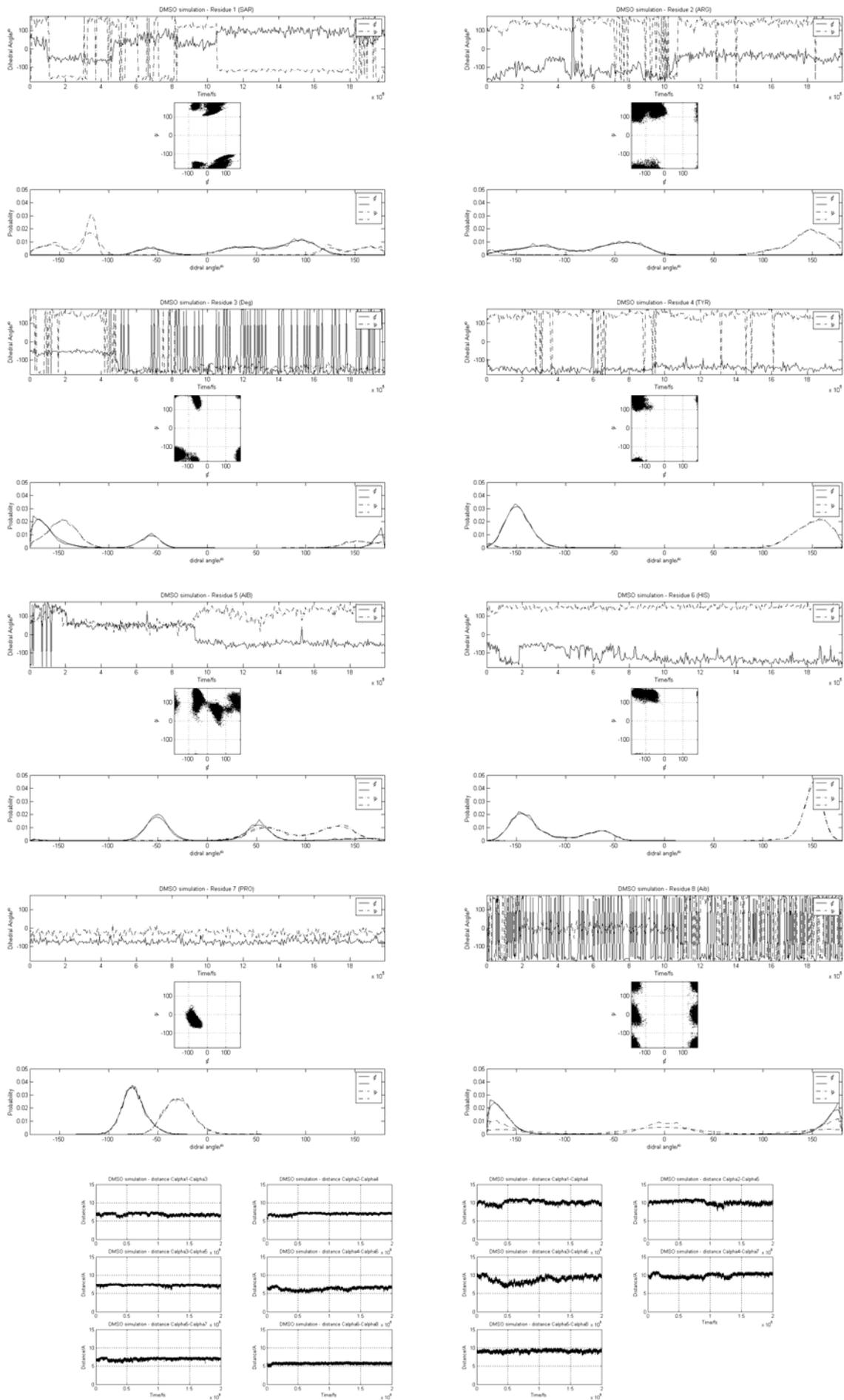


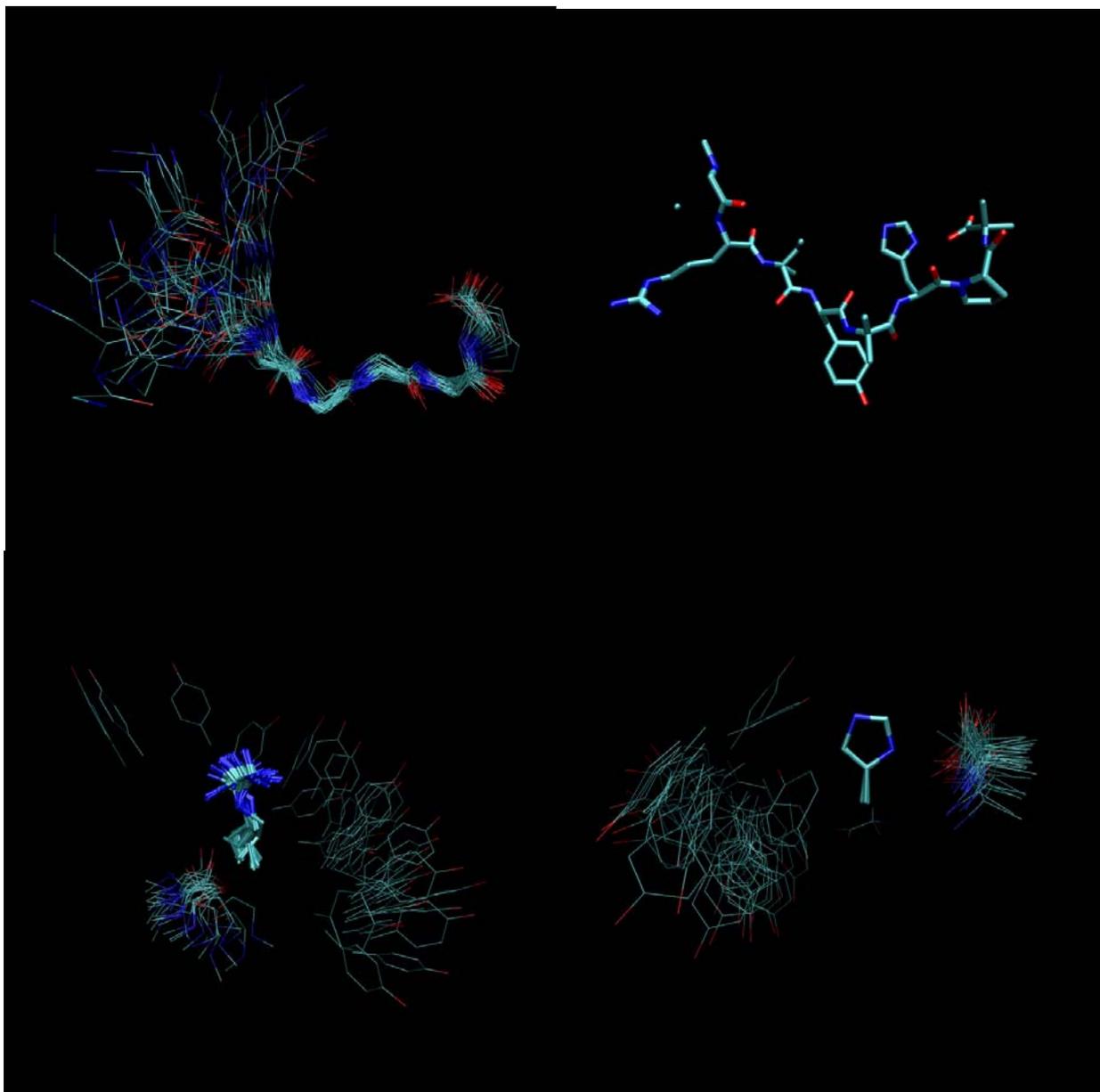
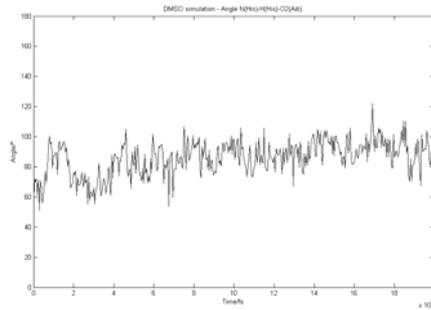
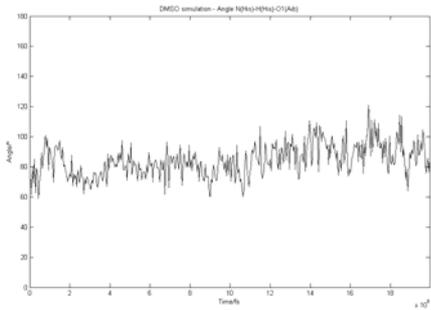
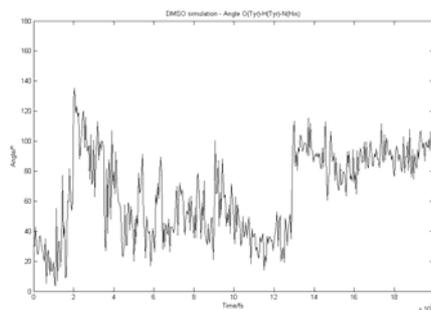
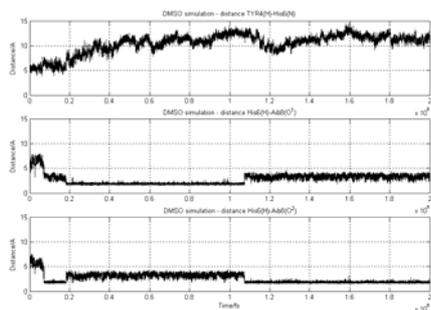
Composto 9 – [Sar1, Deg3, Aib5, Deg8]AngII



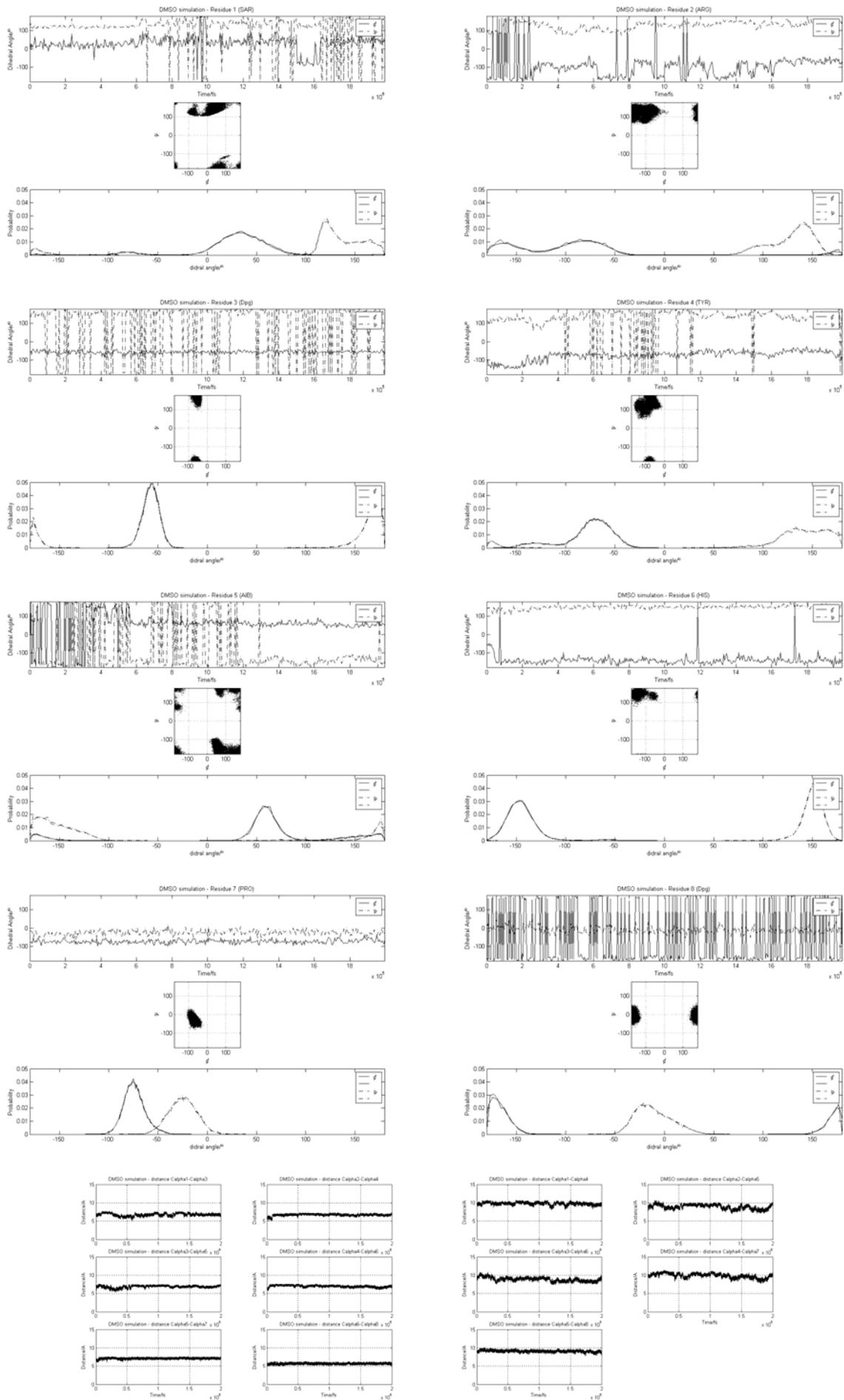


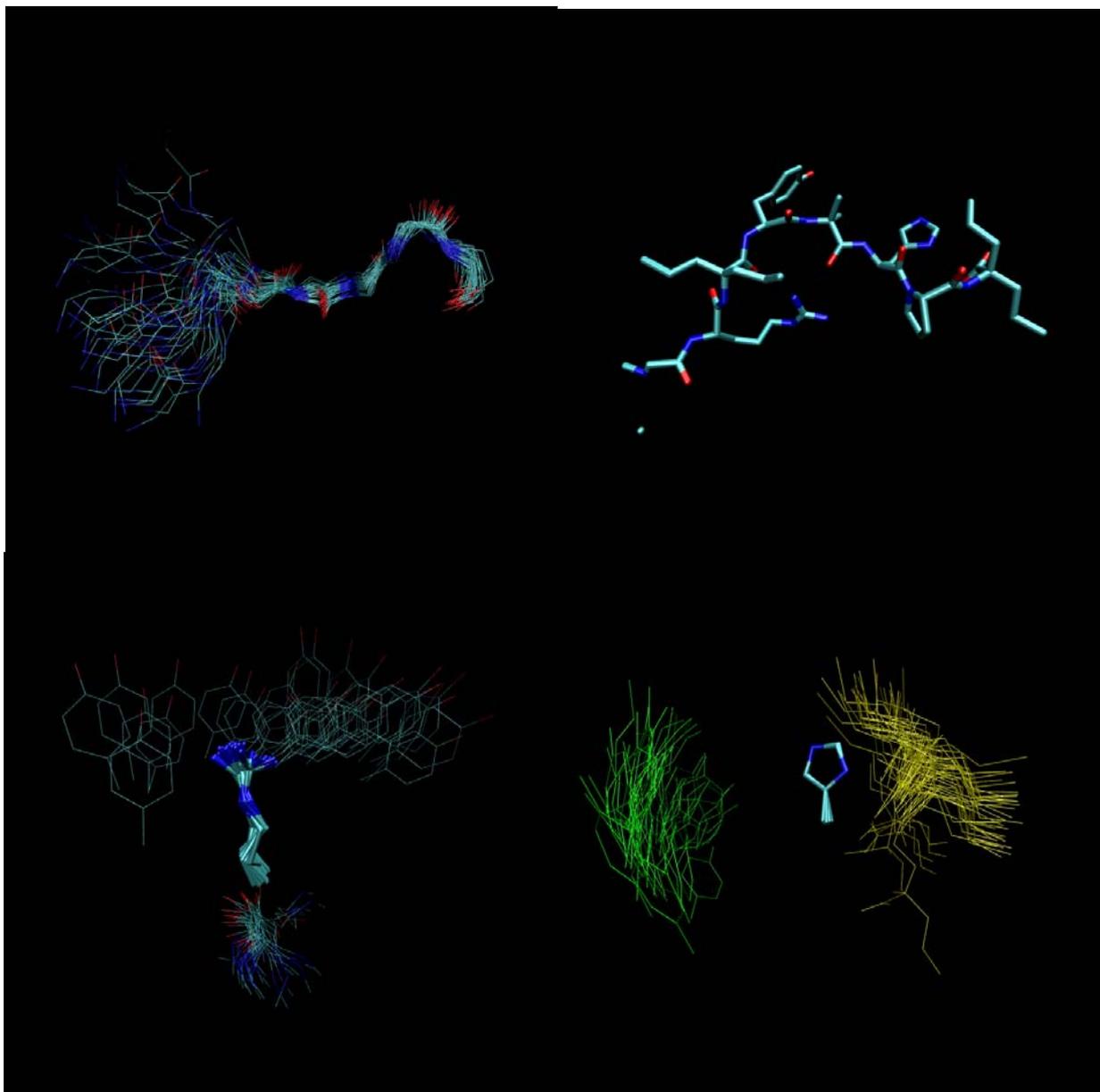
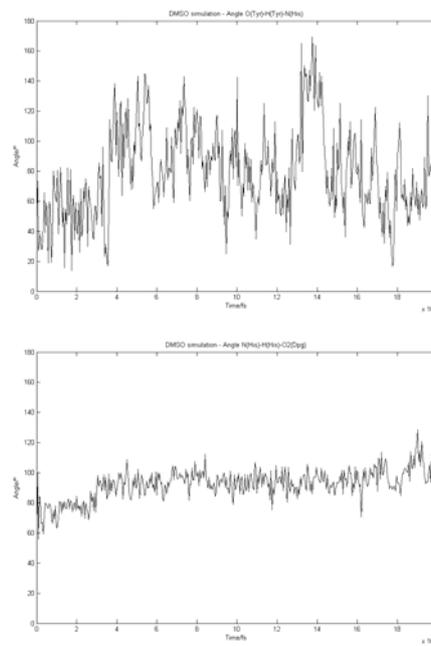
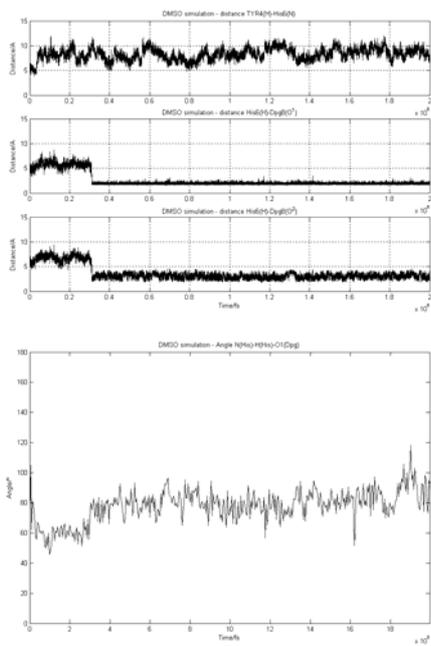
Composto 10 – [Sar1, Deg3, Aib5, Aib8]AngII



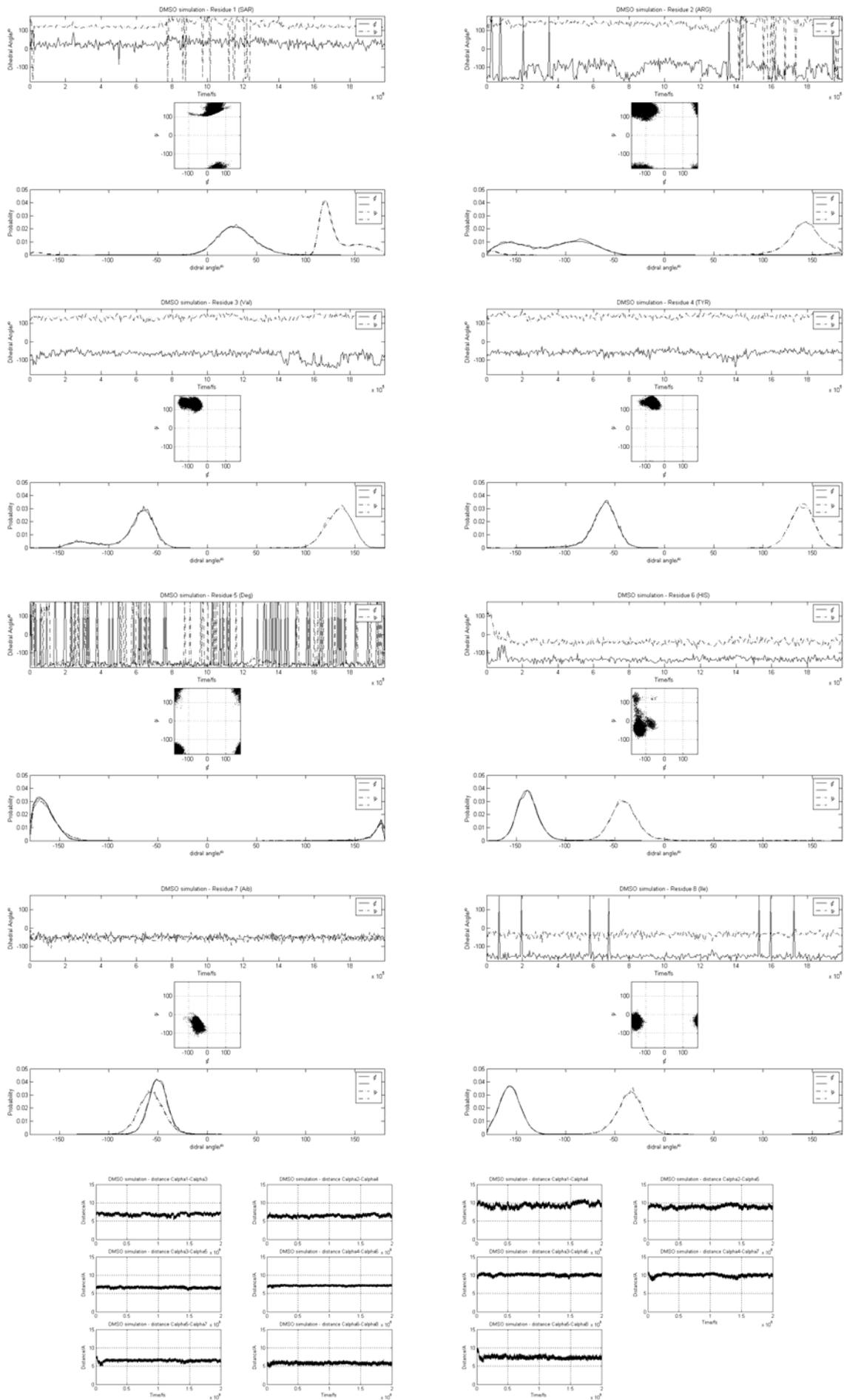


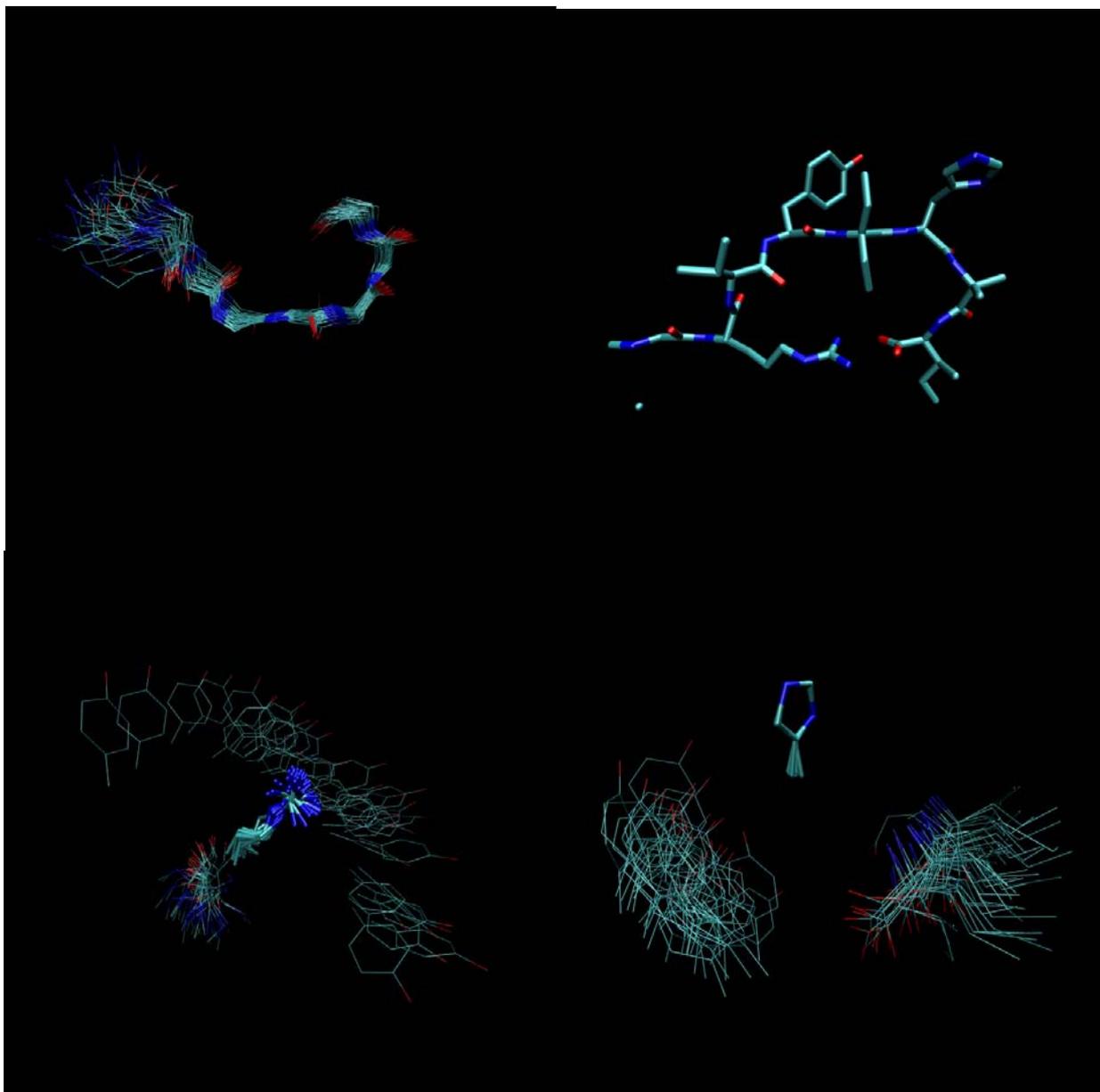
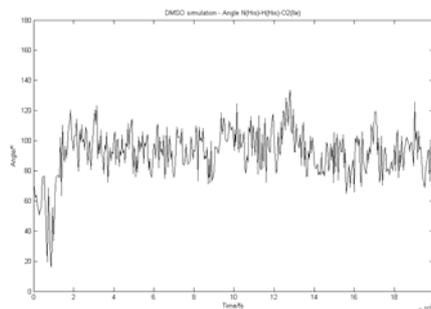
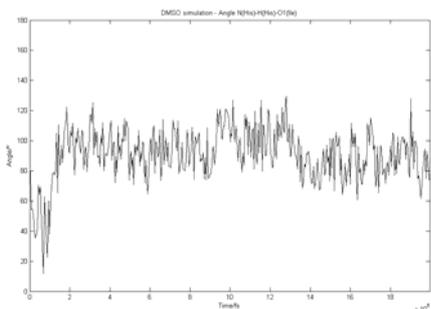
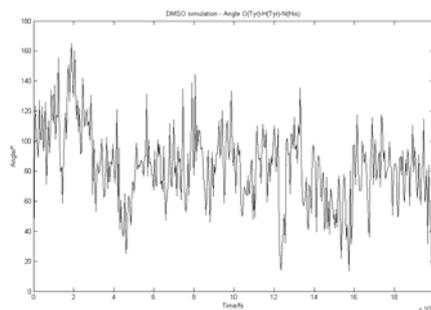
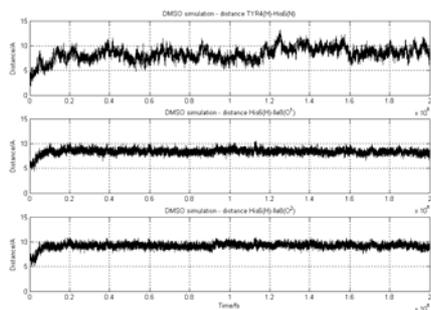
Composto 11 – [Sar1,Dpg3,Aib5,Dpg8]AngII





Composto 12 – [Sar1, Deg5, Aib7, Ile8]AngII





Composto 13 – [Sar1, Deg3, Aib5, Dpg8]AngII

