

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Depsipeptídeos Incorporados em Compostos Policíclicos Tensos: Síntese, Análise  
Conformacional e estudo de estrutura-atividade**

**Mariane Axt**

**29/04/2002**

**INSTITUTO DE QUÍMICA/UFRGS  
BIBLIOTECA**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal  
do Rio Grande do Sul para a obtenção do título de Doutor em Química**

O trabalho descrito na presente dissertação foi realizado entre 05/1998 e 04/2002, parte no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação do professor Valentim Emilio Uberti Costa e co-orientação da Professora Adriana Raffin Pohlmann e parte no Instituto IRCOF-França sob orientação do Professor Jean-Charles Quirion, inteiramente pelo autor, salvo eventuais agradecimentos que apareçam no texto.

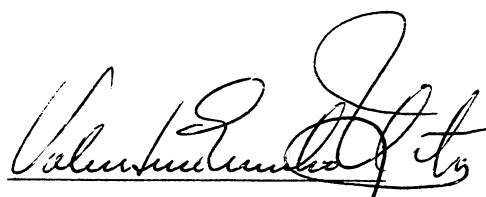


---

Mariane Axt

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de DOUTOR EM QUÍMICA, e aprovada em sua forma final, pelo orientador e co-orientador e pela Comissão Examinadora, no curso de Pós-Graduação em Química.

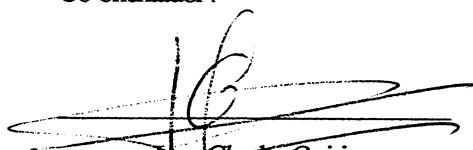
Orientadores:



---

Valentim Emilio Uberti Costa

Co-orientador:



---

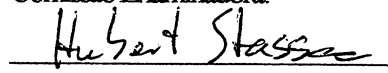
Jean-Charles Quirion  
IRCOF-França



---

Adriana Raffin Pohlmann  
UFRGS-RS

Comissão Examinadora:



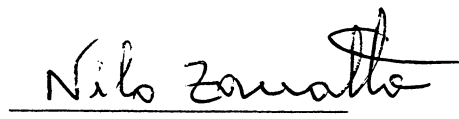
---

Hubert Karl Stassen  
UFRG-RS



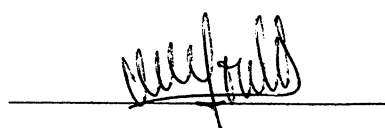
---

Luiz Alberto Colnago  
EMBRAPA-Instrumentação-SP



---

Nilo Zanatta  
UFSM-RS



---

Hassan Oulyadi  
IRCOF-França

INSTITUTO DE QUÍMICA/UFRGS  
BIBLIOTECA

À minha mãe,  
Margarete Axt

**INSTITUTO DE QUÍMICA/UFRGS  
BIBLIOTECA**

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer a CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, bem como a Pró-Reitoria de Pesquisa da UFRGS, por ter me concedido a bolsa de doutorado e a bolsa de doutorado sanduiche.

Gostaria de agradecer a meu orientador, Prof. Dr. Valentim Emílio Uberti Costa, que me acompanhou durante este período, incentivando-me tanto a um crescimento científico quanto pessoal e me permitindo, através de inúmeras discussões, estruturar este trabalho.

Agradeço também à minha co-orientadora, Profa. Dra. Adriana Rafin Pohlman, pela colaboração neste trabalho.

Gostaria de agradecer a meu orientador durante o estágio sanduiche, Prof. Dr. Jean-Charles Quirion, bem como a meu co-orientador Dr. Xavier Pannecoucke, ambos da Universidade INSA de Rouen, por ter me acolhido em seu laboratório, me proporcionado condições ímpares de trabalho e depositado-me extrema confiança para tal.

Gostaria de agradecer ao Dr. Hassan Oulyadi, da Universidade INSA de Rouen, por ter seguido este trabalho, durante meu período de estágio sanduiche, com grande interesse, esmero, competência e disponibilidade.

Gostaria de agradecer a Região da Alta Normandia na França pelo financiamento da pesquisa realizada neste trabalho durante o período de estágio sanduíche.

Gostaria de agradecer ao CRIHAN, centro de computação da Universidade de Rouen, a qual disponibilizou os softwares para execução de parte deste trabalho.

Gostaria de agradecer a meus colegas de laboratório pelo apoio, auxílio, pelas discussões e pela amizade.

Gostaria de agradecer aos professores e funcionários do Instituto de Química que participaram diretamente ou indiretamente detes trabalho ou da minha formação.

**INSTITUTO DE QUÍMICA/UFRGS  
BIBLIOTECA**



Agradeço também aos meus colegas que dividiram comigo algumas alegrias e angústias durante estes anos.

Finalmente, agradeço a minha família que foi minha sustentação em todas as situações, fáceis e difíceis e que, em muitos momentos foi privada da minha presença devido a execução deste trabalho.

## Lista de trabalhos gerados a partir dos resultados descritos nesta Tese

### Publicações

Mariane Axt, João Alifantes, Valentim Emílio Uberti Costa, *J. Chem. Soc. Perkin II*, **1999**, 2, 2783.

Mariane Axt, João Alifantes, Maria Elisabeth S. Mollmann, Peter Seidl, Valentim Emílio Uberti Costa, *J. Braz. Chem. Soc.*, **1999**, 10, 341.

Mariane Axt, Xavier Pannecoucke, Hassan Oulyadi, Jean-Charles Quirion, Adriana R. Pohlmann e Valentim E. U. Costa, Peptide Analogs Containing the Pentacyclo[5,4,0,0<sup>2,6</sup>,0<sup>3,6</sup>,0<sup>5,9</sup>]Undecane Scaffold: Conformational Analysis in Solution. *Submetido (2002)*.

Mariane Axt, Xavier Pannecoucke, Hassan Oulyadi, Jean-Charles Quirion, Adriana R. Pohlmann e Valentim E. U. Costa, Intramolecular Hydrogen Bonding in Depsipeptides containing *endo*-3,6-Tricyclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-4,9-diene-3,6-*endo*-diol. *Submetido (2002)*.

### Trabalhos Apresentados em Congressos

Mariane Axt, Morisso, F. D. P., Adriana R. Pohlmann, Valentim E. U. Costa Análise Conformacional de Pseudopeptídeos incorporados dos Resíduos *exo*-2,3-biciclo[2.2.1]heptano e *endo*-3,6-triciclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-4,9-dieno, apresentado no *VII Encontro de Usuários de Ressonância Magnética Nuclear*, em maio de **1999**, Angra dos Reis, RJ.

Mariane Axt, Adriana R. Pohlmann, Valentim E. U. Costa, Síntese e Análise Conformacional de Pseudopeptídeos incorporados do Resíduo *endo*-3,6-triciclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-4,9-dieno, apresentado na *23ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química*, em maio de **2000**, Poços de Caldas, MG.

Mariane Axt, Xavier Pannecoucke, Hassan Oulyadi, Jean-Charles Quirion, Adriana R. Pohlmann e Valentim E. U. Costa, Peptide Analogs Containing the Pentacyclo[5.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>3,6</sup>.0<sup>5,9</sup>]Undecane Scaffold: Conformational Analysis in Solution, apresentado no *4<sup>th</sup> International Symposium of Peptide and Proteinmimetics*. setembro de **2001**, Spa, Bélgica.

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisão Bibliográfica - Pseudopeptídeos: relação estrutura-atividade.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Peptídeos Lineares</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Peptídeos Restritos</b>	<b>6</b>
<b>2.3. Depsipeptídeos</b>	<b>18</b>
<b>2.4. Simetria</b>	<b>21</b>
<b>2.5. Inibição da Protease do vírus HIV-1</b>	<b>21</b>
<b>2.5.1. Inibidores irreversíveis</b>	<b>23</b>
<b>2.5.2. Inibidores competitivos</b>	<b>24</b>
<b>2.5.3. Inibidores da dimerização</b>	<b>28</b>
<b>2.6. Considerações Gerais sobre a análise conformacional</b>	<b>31</b>
<b>2.6.1. Estudo de Agregação</b>	<b>31</b>
<b>2.6.2. Deslocamento Químico do NH</b>	<b>32</b>
<b>2.6.3. Titulação de Solvente</b>	<b>32</b>
<b>2.6.4. Variação da Temperatura e Coeficiente de Temperatura</b>	<b>33</b>
<b>2.6.5. Velocidade de troca de H/D</b>	<b>34</b>
<b>2.6.6. Constante de Acoplamento <math>^3J_{\text{HN-CH}\alpha}</math></b>	<b>34</b>
<b>2.6.7. Efeito Overhauser Nuclear</b>	<b>35</b>
<b>2.6.8. Análise Teórica</b>	<b>36</b>
<b>3. Experimental</b>	<b>40</b>
<b>3.1. Generalidades</b>	<b>41</b>
<b>3.2. Análises Espectroscópicas</b>	<b>41</b>
<b>3.2.1. RMN – Geral</b>	<b>41</b>
<b>3.2.2. Demais experimentos de RMN</b>	<b>42</b>
<b>3.2.3. Cálculos Teóricos</b>	<b>42</b>
<b>3.3. Síntese</b>	<b>44</b>
<b>4. Resultados e Discussão</b>	<b>55</b>
<b>4.1. Escolha das sequências peptídicas e meio de análise</b>	<b>56</b>
<b>4.2. Síntese</b>	<b>56</b>
<b>4.3. Análise Conformacional</b>	<b>60</b>

4.3.1. Determinação do tempo de mistura $\tau_m$ ,	60
4.3.2. Estudo do Sistema Pentacíclico em Solução de $\text{CDCl}_3$	
4.3.2.1. Sistema <i>endo-endo</i> : composto 8	64
4.3.2.2. Sistema <i>endo-endo</i> : composto 9	78
4.3.2.3. Sistema <i>exo-exo</i> : compostos 10 e 11	88
4.3.2.4. Sistema <i>endo-exo</i> : compostos 6, 7, 12, 13 e 14	99
4.3.3. Estudo do Sistema Pentacíclico em Solução de $\text{DMSO-}d_6$	110
4.3.4. Comparação entre os Sistemas Pentacíclicos	116
4.3.5. Estudo do Sistema Tricíclico em Solução de $\text{CDCl}_3$	118
4.3.6. Estudo do Sistema Tricíclico em Solução de $\text{DMSO-}d_6$	137
4.3.7. Discussão Geral de Resultados	140
4.3.7.1. Coeficiente de Temperatura	140
4.3.7.2. Interpretação do processo de troca de H/D	141
4.3.7.3. Cálculos Teóricos	142
4.3.8. Estudo sobre Inibidores da Protease do HIV-1	144
5. Conclusão	150
6. Perspectivas	152
7. Referências	156
8. Anexos	161

## Abreviaturas

1.  $\Delta\delta$ -Variação de deslocamento químico
2. COSY-Homonuclear Correlation Spectroscopy
3. HETCOR-Heteronuclear shift correlation
4. EON-Efeito Overhauser Nuclear
5. RMN- Ressonância Magnética Nuclear
6. TMS-Tetrametilsilano
7. HMQC-Heteronuclear multiple-quantum coherence
8. NOESY- Nuclear overhauser effect spectroscopy
9. IV-Infra-vermelho
10. RMSD-root-mean-square deviation
11. AM1-Austin Model number 1
12. PM3-Parametric Model number 3
13. DCC- dicitclohexilcarbodiimida
14. DMAP- 4-(N,N-Dimetilamino)piridina
15. DMSO-dimetilsulfóxido
16. FMOC-9-fluorenilmetoxicarbonila
17. Boc - *t*-butoxicarbonila
18. NMM - *N*-metilmorfolina
19. pf-ponto de fusão
20. t.a.-temperatura ambiente
21. Bz-Benziloxicarbonila

## Resumo

Uma série de pseudo-peptídeos incorporados de estruturas pentacíclicas e tricíclicas foram sintetizadas e suas preferências conformacionais em solução foram avaliadas através de espectroscopia de RMN (velocidade de troca de deutério, EON, titulação de solvente entre outros) e através de cálculos teóricos utilizando-se dinâmica molecular, métodos semi-empíricos e *ab initio*. Em solução de  $\text{CDCl}_3$ , os compostos pentacíclicos mostraram preferencialmente as conformações em dobra-C8 e dobra- $\gamma$ . Em solução de  $\text{DMSO-}d_6$ , o dipeptídeo ( $\pm$ )-12 adota uma conformação em dobra- $\gamma$  para uma das cadeias peptídicas e uma conformação em dobra- $\gamma$  e uma estrutura não-clássica, dobra-C5, para a outra cadeia. Os compostos tricíclicos evidenciaram a formação de dobras- $\beta$  e folhetos- $\beta$  em solução de  $\text{CDCl}_3$ . Realizou-se a análise de van't Hoff para estes derivados, obtendo-se dados termodinâmicos os quais estão de acordo com os dados teóricos. As espécies ligadas por ligações de hidrogênio destes derivados mostraram-se entalpicamente favoráveis mas entropicamente desfavoráveis. Os estudos teóricos, sustentados através de dados experimentais, tornou possível identificar estas conformações e foram de grande importância na discussão dos resultados observados. Finalmente, sintetizou-se uma série de derivados destes sistemas para serem testados na inibição da protease do vírus HIV-1, realizando-se uma análise comparativa de modelos de complexação com a enzima.

## Abstract

An assembly of nineteen depsipeptides attached to the conformationally restrict *endo*-tricyclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-4,9-dieno-3,6-*endo-endo*-diol (**2**) and three stereochemically different pentacyclo[5.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>3,10</sup>.0<sup>5,9</sup>]undecano-8,11-diol derivatives (**3**, **4** and **5**) were synthesized. In order to investigate the conformational preferences in solution these depsipeptides were studied by NMR spectroscopy and by dynamic simulations, semi-empirical and *ab initio* calculations. In the NMR experiments, the most probable secondary structures were evaluated from different parameters as the rates of proton-deuterium exchange, nuclear Overhauser effects, titration experiment, temperature coefficients, coupling constants and chemical shifts of NH protons analysis. In CDCl<sub>3</sub> solution, the pentacyclic scaffolds displayed different types of turn conformations characterized by a 8-membered hydrogen-bonded ring and by a  $\gamma$ -like strand hydrogen-bonded ring for each peptide chain. In a strong solvating medium such as DMSO-*d*<sub>6</sub> the depsipeptide ( $\pm$ )-**12** derived from pentacyclo[5.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>3,10</sup>.0<sup>5,9</sup>]undecano-*endo-exo*-8,11 system adopts a  $\gamma$ -like strand hydrogen-bonded ring for one peptide chain and, for the other one, a bifurcated H-bond formed by a  $\gamma$ -like strand and a non classical C5-structure. The tricycle constrained peptides have been shown to adopt  $\beta$ -turn- and  $\beta$ -sheet-like conformations. The van't Hoff analysis for all derivatives in CDCl<sub>3</sub> solution indicated that the formation of hydrogen-bonded species is enthalpically preferred but entropically disfavoured, in agreement with the theoretical studies. The theoretical calculations made it possible to identify the conformations and were of great importance in the discussion of the observed results. In addition, the conformationally constrained molecular frameworks of (**2**), (**3**), (**4**) and (**5**) were used to build a series of eight novel symmetric and pseudo-symmetric peptidomimetics to test as HIV-1 protease inhibitors, which are in the stage of biologic test. Finally, a complexation model of these compounds in the protease active site was proposed and compared with the current models in the literature.

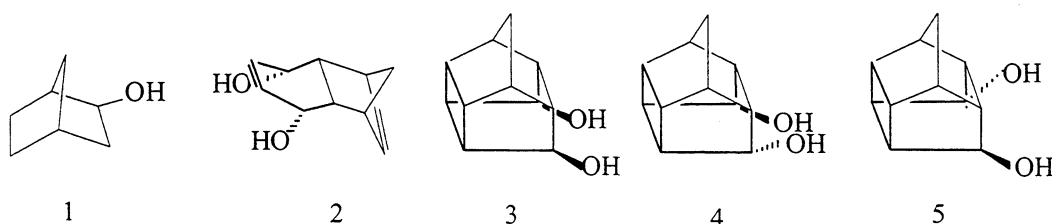
## **1. INTRODUÇÃO**



# 1. INTRODUÇÃO

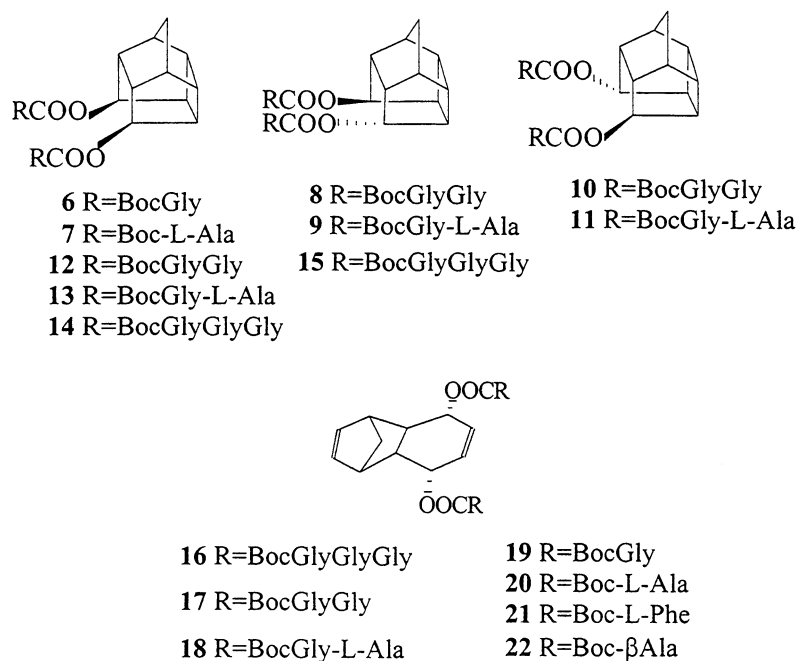
Os elementos de quiralidade e a conformação são fundamentais para o reconhecimento molecular nos sistemas vivos. Deste modo, diferentes conformações secundárias em peptídeos podem gerar diferentes respostas farmacológicas importantes. A síntese de análogos peptídicos mais ativos e mais específicos pode ser realizada a partir da determinação da conformação ativa de peptídeos. Além da análise cristalográfica por raios-X, esta determinação pode ser realizada, utilizando-se a combinação de métodos computacionais e métodos sofisticados de espectroscopia. Com este objetivo, várias unidades de restrição conformacional têm sido preparadas para estabilizar estruturas secundárias de peptídeos.

No presente estudo introduzimos os sistemas *exo*-norbornano- (1), *endo*-tricyclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-4,9-dien-3,6-*endo*-diol-(2) e pentaciclo[5,4,0,0<sup>2,6</sup>,0<sup>3,10</sup>,0<sup>5,9</sup>]undecanos-(3), (4) e (5) como unidades restritoras em análogos de peptídeos (Figura 1).



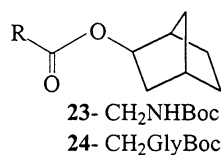
**Figura 1.** Policíclicos como unidades restritoras em pseudopeptídeos

Dessa forma, os pseudopeptídeos 6-22 (Figura 2) foram preparados com o objetivo de se analisar, através de técnicas de RMN e cálculos teóricos, que tipos de estruturas secundárias estes policiclos poderiam induzir em cadeias peptídicas paralelas.



**Figura 2.** Pseudopeptídeos incorporados de compostos policíclicos

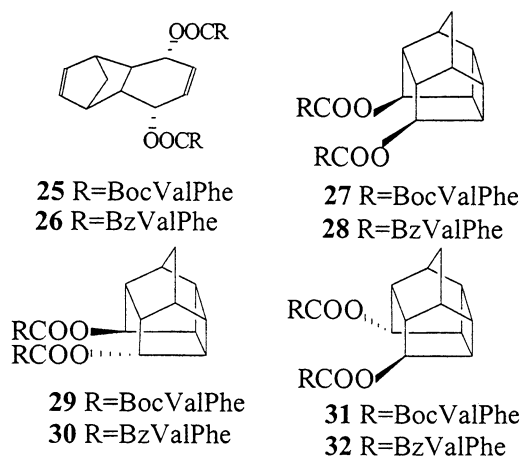
Os compostos **23** e **24** (Figura 3) foram utilizados como referências de estruturas não ligadas por ligações de hidrogênio nos estudos de análise conformacional.



**Figura 3.** Compostos referência não-ligados

Este trabalho subdivide-se, então, em várias etapas. No próximo capítulo apresentar-se-á a importância de se restringir a conformação de peptídeos e algumas aplicações de peptidomiméticos, bem como a relevância de elementos simétricos ou pseudo-simétricos em sistemas biológicos. Antes de iniciar a discussão dos resultados far-se-á um breve resumo das diversas técnicas que serão utilizadas no transcorrer do trabalho. O terceiro capítulo descreve os procedimentos experimentais de síntese, análise e cálculos. A discussão da síntese dos dióis e dos respectivos pseudopeptídeos é descrita na primeira parte do capítulo de discussão dos resultados, quarto capítulo. Em seguida, é abordada a análise conformacional dos pseudopeptídeos incorporados das estruturas pentacíclicas, apresentando-se, inicialmente, os resultados experimentais e após os teóricos, tanto em solvente de baixa polaridade como em

solvente polar. Estes compostos são subdivididos em três famílias conforme sua estereoquímica seja *endo-endo*, *exo-exo* ou *endo-exo*. Após, o mesmo tipo de estudo é realizado para os derivados incorporados de compostos tricíclicos. Considerando-se os resultados de todos os compostos, faz-se uma discussão geral dos resultados. Esse capítulo encerra-se com um estudo que consiste em avaliar a aplicação de derivados específicos dos sistemas tricíclico e pentacíclico na inibição da protease do vírus HIV-1. Dessa forma, foram obtidos os compostos **25-32** (Figura 4) e propostos modelos de complexação com o sítio ativo da protease e comparados com modelos existentes na literatura.



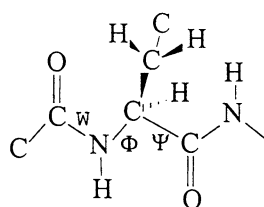
**Figura 4.** Pseudopéptídeos para testes biológicos

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **PSEUDOPEPTÍDEOS: RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE**

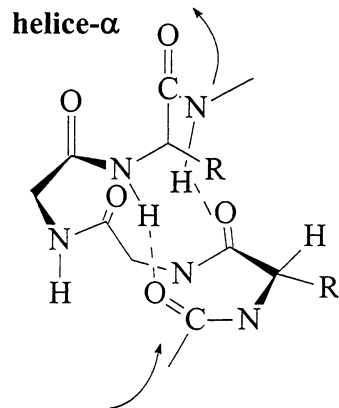
## 2.1 PEPTÍDEOS LINEARES

Peptídeos biologicamente ativos estão envolvidos em um grande número de processos fisiológicos, descritos através de suas interações com receptores e enzimas, originando uma série de trabalhos relativos a busca de aplicação destes como potenciais agentes terapêuticos.<sup>1</sup> Existem indícios de que as ligações de hidrogênio intramoleculares formadas entre os resíduos de aminoácidos, as quais resultam em estruturas secundárias, são elementos chaves importantes no reconhecimento molecular e na atividade biológica dos peptídeos e proteínas.<sup>2</sup> Essas estruturas secundárias são geradas através da possibilidade que a cadeia peptídica possui de se dobrar segundo os ângulos  $\omega$ ,  $\psi$  e  $\phi$ . Entretanto, nos peptídeos naturais é observada a torção livre ao redor destes ângulos (Figura 5), conferindo-lhes a possibilidade de assumir diversas conformações.



**Figure 5.** Ângulos de ligações amida em peptídeos e proteínas.

As estruturas secundárias encontradas em peptídeos naturais são principalmente as dobras- $\beta$  (I-VII),<sup>3</sup> folhetos- $\beta$  paralelos e anti-paralelos,<sup>4</sup> dobras- $\gamma$  e hélice- $\alpha$ <sup>5</sup> (Figura 6). Estudos demonstram que dobras- $\beta$  são características comuns de peptídeos biologicamente ativos e proteínas globulares, atuando como sítio de reconhecimento molecular em muitos processo biológicos.<sup>3</sup> A deposição de um polipeptídeo insolúvel com estrutura de folheto- $\beta$  constitui uma peça importante no progresso do mal de Alzheimer.<sup>4</sup> Estes também são encontrados em proteínas fibrosas como a seda e do cabelo. Por outro lado, a hemoglobina, proteína responsável pelo transporte de oxigênio, possui aproximadamente 75% de sua estrutura em hélice- $\alpha$ . Mudanças conformacionais envolvendo a conversão de hélice- $\alpha$  em folhetos- $\beta$  são responsáveis por doenças relacionadas aos *prions*.<sup>4</sup> E assim, inúmeros exemplos poderiam ser sucessivamente citados.

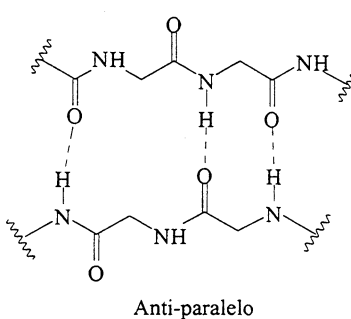
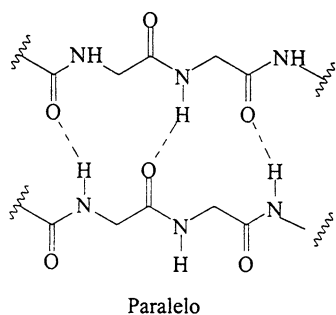


**dobras- $\beta$**

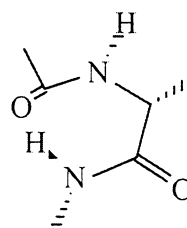
tipo dobra	$\phi_2$	$\psi_2$	$\phi_3$	$\psi_3$
I	-60	-30	-90	0
I'	60	30	90	0
II	-60	120	80	0
II'	60	-120	-80	0
III	-60	-30	-60	-30
III'	60	-30	-60	-30
IV	descrito abaixo			
V	-80	80	80	-80
V'	80	-80	-80	80
VI	descrito abaixo			
VII	descrito abaixo			

IV-possui 2 ou mais ângulos com diferença de  $40^\circ$  dos ângulos definidos acima; VI-possui uma cis-Pro na posição 3; VII-forma uma dobra na cadeia da proteína criada através de  $\psi_2=180^\circ$ ,  $|\phi_3| < 60^\circ$ ,  $|\psi_2| < 60^\circ$  e  $\phi_3=180^\circ$ .

**Folhetos- $\beta$**



**dobra- $\gamma$**

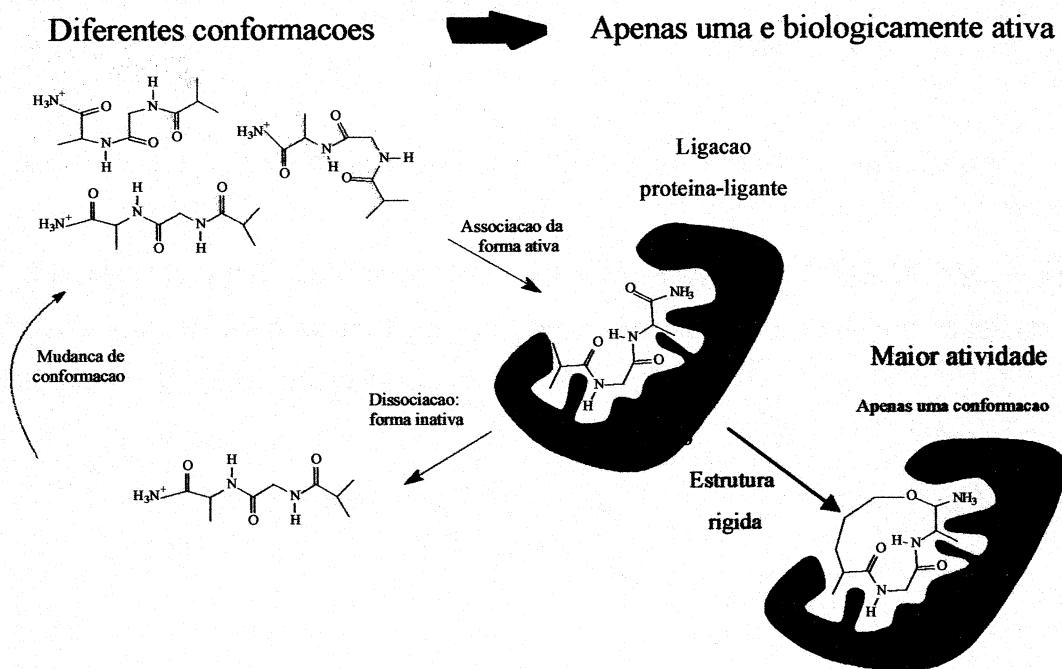


**Figura 6.** Tipos de estruturas secundárias encontradas em peptídeos e proteínas.

## 2.2. PEPTÍDEOS RESTRITOS

Normalmente, dentre um conjunto de diversos conformêrmeros dos peptídeos lineares, apenas um deles possui a atividade biológica desejada (Figura 7), ocasionando a minimização de uma série de propriedades importantes no que diz respeito interações substrato-sítio ativo. Dessa forma, observa-se um decréscimo da estabilidade metabólica com respeito a proteases endógenas, da biodisponibilidade oral e da seletividade com respeito a receptores específicos e um aumento da velocidade de excreção. Além disso, ocorrem interações do peptídeo conformacionalmente flexível com diversos sítios receptores, gerando inúmeros efeitos colaterais. Por este motivo, peptídeos naturais tornam-os fracos candidatos ao uso terapêutico.<sup>6</sup> Essas dificuldades podem ser, no entanto, superadas recorrendo-se à síntese de análogos peptídicos que imitem a ação dos peptídeos naturais a nível de receptor, chamados de peptidomiméticos.<sup>7</sup> Inúmeros pesquisadores têm focalizado sua atenção no planejamento e síntese de peptidomiméticos que apresentam nucleação dos mais diversos tipos de estruturas secundárias.<sup>4,8</sup>

Uma das estratégias mais comuns para o desenvolvimento de peptidomiméticos é baseada na construção de análogos com conformação restrita, de forma que a cadeia de aminoácidos fique disposta em um arranjo rígido, induzindo apenas a estrutura secundária desejada (Figura 7).



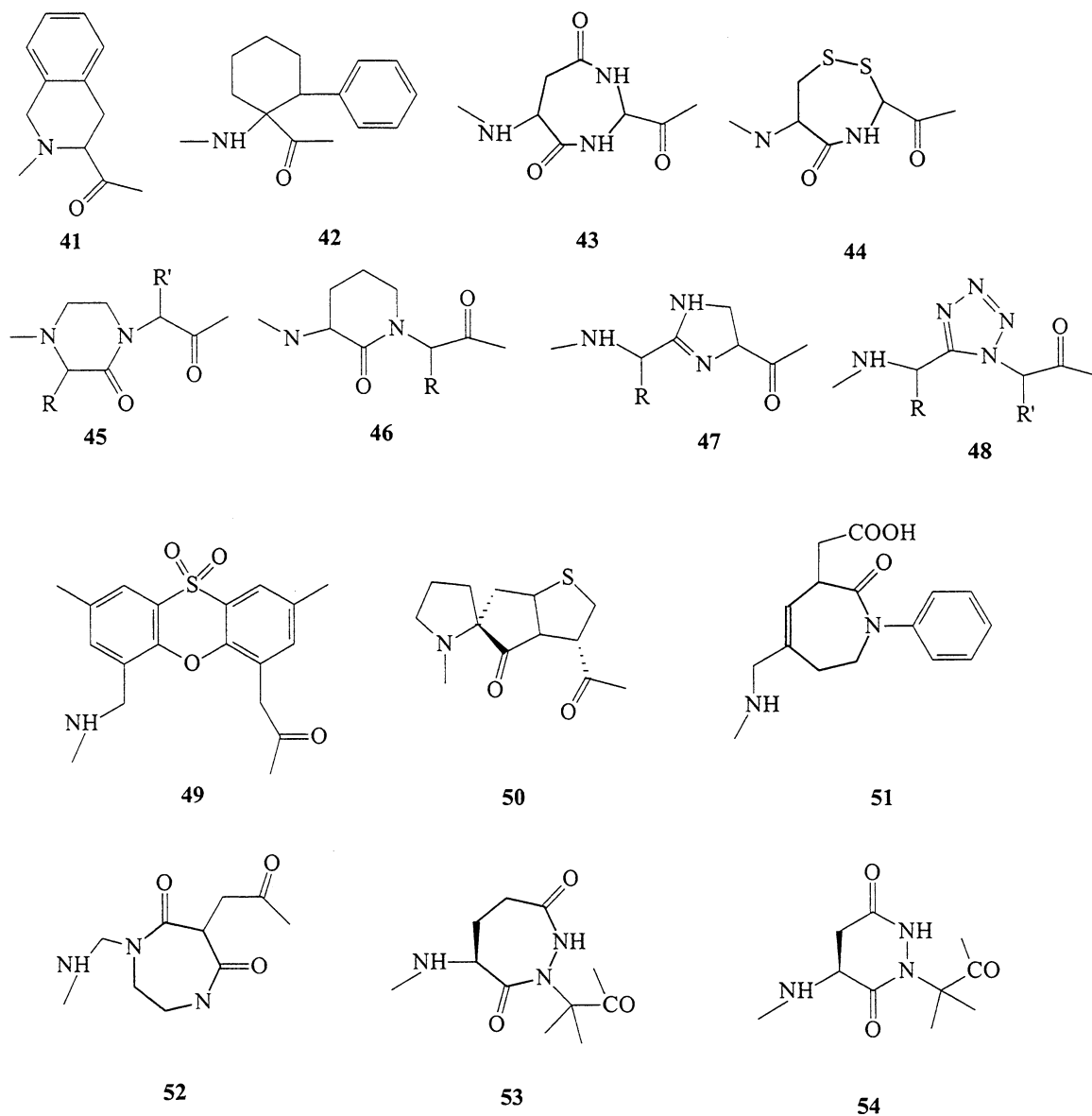
**Figura 7.** Esquema comparando peptídeos naturais e peptídomiméticos no encaixe do sítio ativo de uma proteína.

Estas moléculas normalmente mostram um aumento da afinidade com o receptor, da seletividade, da biodisponibilidade oral, da resistência à proteases celulares e da estabilidade metabólica e uma diminuição de efeitos colaterais.<sup>9</sup> Além disso, peptídomiméticos podem tanto ter efeito biológico como também bloquear a ação de receptores ou enzimas, podendo ajudar na elucidação e na compreensão de conformações adotadas pelas proteínas.<sup>1b</sup>

Uma das modificações estruturais largamente utilizada para restringir o espaço conformacional de um peptídeo tem sido a introdução de uma subestrutura cíclica, das quais a mais evidente é o aminoácido cíclico natural prolina. É conhecido que a prolina não apresenta apenas um papel no controle da estrutura do peptídeo, mas também atua no reconhecimento de sítios de interação de proteínas.<sup>9</sup> No mesmo sentido, inúmeros restritores não naturais, têm sido testados com o mesmo propósito. Hayashi e colaboradores<sup>10a</sup> obtiveram uma série de peptídeos contendo análogos da prolina com ciclos de 4 membros (composto **33**) e 6 membros (composto **35**) e observaram a formação de dobras- $\beta$ , mesmo comportamento observado para o composto com o resíduo natural, composto **34** (Figura 8).







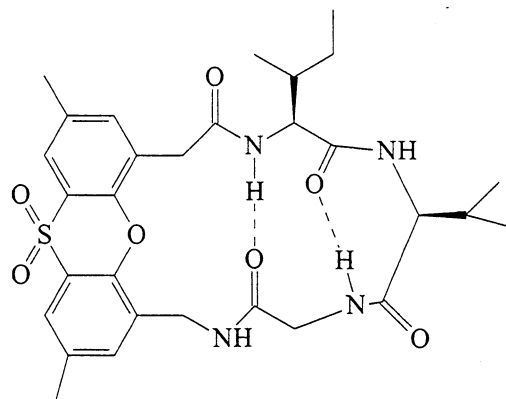
**Figura 10.** Exemplos variados de peptidomiméticos

As estruturas tricíclicas **49** e **50** foram empregadas na construção de mímicos de folhetos- $\beta$ , enquanto que as estruturas **51-52** e **53-54** mimetizam respectivamente dobras- $\gamma$  e hélices- $\alpha$ .

Porém, trocas de unidades peptídicas por não-peptídicas podem influenciar de forma significativa as propriedades estruturais de compostos biologicamente ativos. Como consequência disto, outros tipos de dobras têm sido identificadas em peptidomiméticos. Vanderesse e colaboradores identificaram dobras-C5 (ligação de H formando anel de 5 membros) em compostos onde a ligação amida foi substituída por amidoxi (CO-NH-O-), oxima (CH=N-O-) e hidroxilamina (CH<sub>2</sub>-NH-O-).<sup>12</sup> Wu e Wang realizaram um estudo teórico com  $\beta$ -peptídeos e além de dobras hélices, dobras-C5 e C6 (ciclo com 6 membros) foram

estabilizadas.<sup>13</sup> Gung e Zhu estudaram dobras-*Asx* (ciclos de 8-10 membros), estruturas formadas em cadeias laterais de resíduos aspargina (Asn), comparando com a estabilidade de dobras- $\gamma$ .<sup>14</sup> Recentemente, tem-se encontrado alguns destes elementos em estruturas secundárias de polipeptídeos e proteínas<sup>14, 15</sup> Entretanto, o efeito de muitas delas na estabilização de estruturas de proteínas e em processos biológicos é ainda desconhecido.

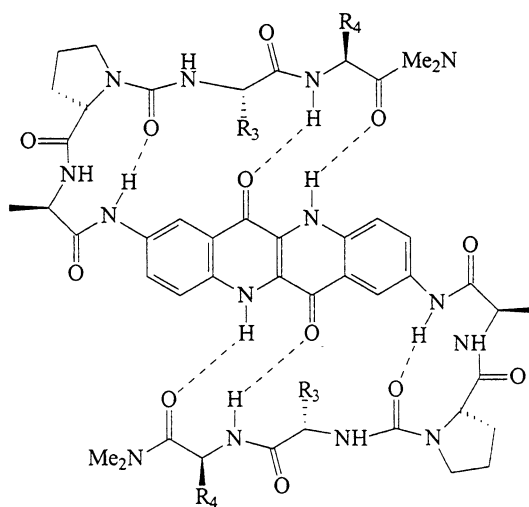
Muitos dos parâmetros que envolvem estruturas secundárias clássicas também são desconhecidos. Apesar da importância de folhetos- $\beta$  como elementos básicos em estruturas de proteínas, os estudos sobre os princípios que norteiam sua formação e estabilidade estão menos desenvolvidos que os respectivos estudos com hélices- $\alpha$ . Um dos principais motivos disso deve-se ao fato da dificuldade de se encontrar peptídeos com formação de folhetos- $\beta$  solúveis, enquanto que existe uma vasta gama de pequenos peptídeos que formam hélices- $\alpha$  em solução.<sup>16</sup> Acredita-se que a baixa solubilidade de peptídeos em conformação de folhetos- $\beta$  ou sua alta tendência em agregar-se seja devido a seu caráter anfipático e da característica destes peptídeos de serem normalmente constituídos por um grande número de resíduos hidrofóbicos.<sup>16</sup> Além disso, é mais difícil gerar pequenos incrementos de folhetos do que de hélices, uma vez que estas últimas formam-se ao longo de um segmento contínuo, enquanto que os folhetos formam-se de segmentos de cadeias que podem estar largamente separadas ao longo de um esqueleto polimérico.<sup>17</sup> Com o intuito de estabelecer os princípios de funcionamento destas estruturas, inúmeros pesquisadores, entre eles Feigel, Kemp, Kelly e Nowick, têm sintetizado e estudado a formação de folhetos- $\beta$  artificiais. O uso de restritores aromáticos rígidos na indução de folhetos- $\beta$  foi usada pela primeira vez por Feigel, em 1986, onde ciclopeptídeos são usados para a estabilização da estrutura secundária (Figura 11).<sup>18</sup>



55

**Figura 11.** Ciclopeptídeo aromático proposto por Feigel na indução de folhetos- $\beta$ .

Kemp e Bowen<sup>19</sup> descreveram a obtenção de folhetos- $\beta$  anti-paralelos utilizando a epindolidinona como restritor (Figura 12). Eles observaram que havia um aumento na formação de folhetos- $\beta$  variando-se o resíduo 4 de glicina (Gly) para alanina (Ala), fenilalanina (Phe) e valina (Val).

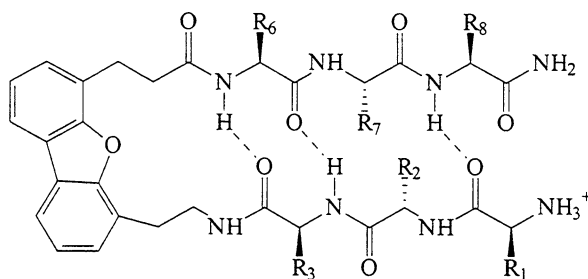


56

**Figura 12.** Restritor aromático proposto por Kemp e Bowen na indução de folhetos- $\beta$  anti-paralelos

Com o mesmo intuito que Feigel, Schneider e Kelly usou restritores aromáticos para forçar a proximidade entre as duas cadeias peptídicas.<sup>20</sup> Entretanto, os folhetos- $\beta$  de Schneider e Kelly não são ciclizados e, dessa forma, são estabilizados por grupos hidrofóbicos (Figura 13). Seus resultados indicaram a formação de um “cluster” hidrofóbico entre os

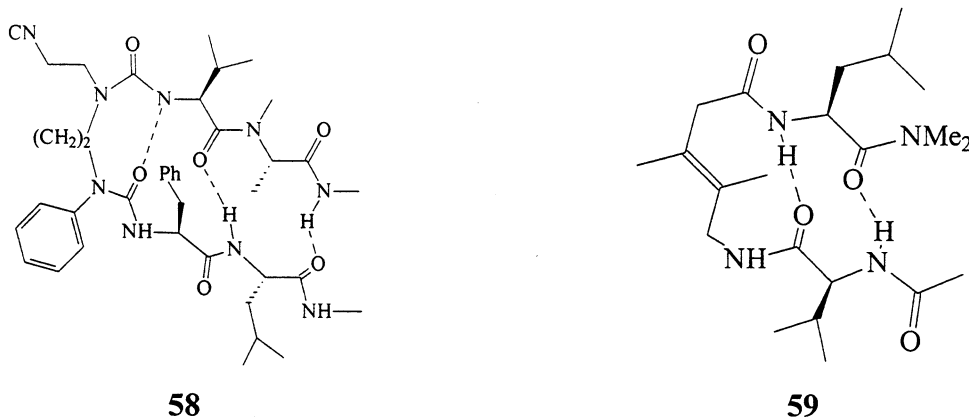
grupos metilas da valina ( $R_3$  e  $R_6$ ) e dos anéis do dibenzofurano. Variando-se a seqüência peptídica através da inclusão de resíduos mais hidrofílicos nestas posições ou trocando-se o restritor por outro que não poderia formar o “cluster”, observou-se perda da estrutura secundária e formação preferencialmente da estrutura livre.



57

**Figura 13.** Restritor aromático proposto por Schneider e Kelly na indução de folhetos- $\beta$ .

Desde então, tem-se buscado sintetizar uma série de restritores não aromáticos que restrinjam os graus de liberdade das cadeias peptídicas, induzindo folhetos- $\beta$ . É o caso do trabalho de Nowick e colaboradores e Gellman e colaboradores os quais utilizaram respectivamente pontes dimetilênicas (**58**) e *trans*-alcenos (**59**) como restritores<sup>21</sup> (Figura 14).



58

59

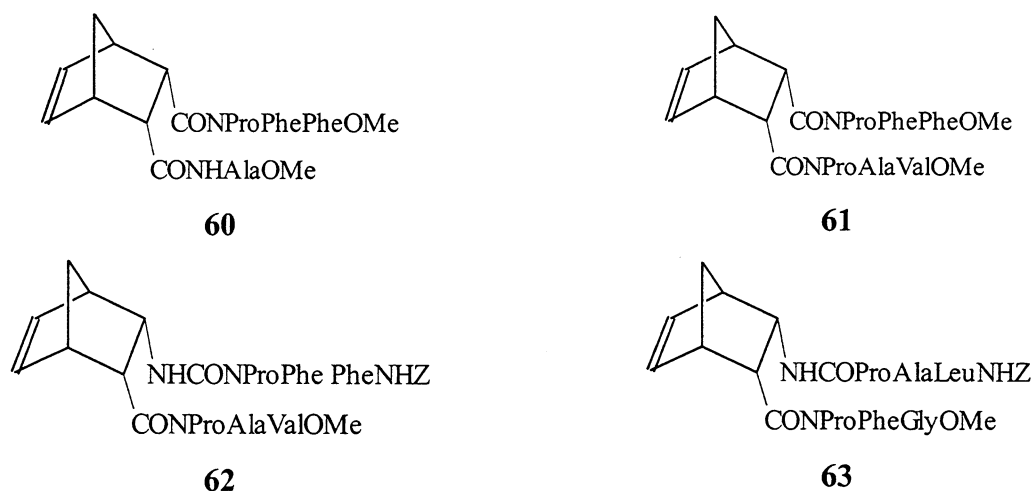
**Figura 14.** Restritores não aromáticos utilizados na indução de folhetos- $\beta$ .

Além do estudo de estruturas secundárias, atualmente o planejamento de novos fármacos tem sido direcionado também no sentido de compreender outros fenômenos que possuem grande importância nos processos biológicos. Um destes fenômenos é conhecido como colapso hidrofóbico.<sup>1a</sup> Este efeito é utilizado para explicar a observação de que quando um peptídeo é dissolvido em água (ou interage com o sítio ativo de uma enzima), as interações entre os grupos hidrofóbicos é diminuída ao mínimo. Normalmente, este efeito leva

ao colapso da conformação bioativa com concomitante perda da atividade. Não obstante, em alguns casos o colapso hidrofóbico é desejado pois apenas a conformação colapsada é bioativa. Portanto, no planejamento de um peptidomimético deve ser considerado se o colapso hidrofóbico poderá ser prevenido ou induzido.

Recentemente, alguns trabalhos têm relatado a síntese e análise conformacional de peptídeos incorporados em moléculas policíclicas tensas. A arquitetura não-linear e conformacionalmente rígida do esqueleto policíclico pode prevenir o colapso hidrofóbico das unidades peptídicas da conformação bioativa e, dessa forma, servir como um precursor ideal no planejamento de novos fármacos.<sup>22</sup>

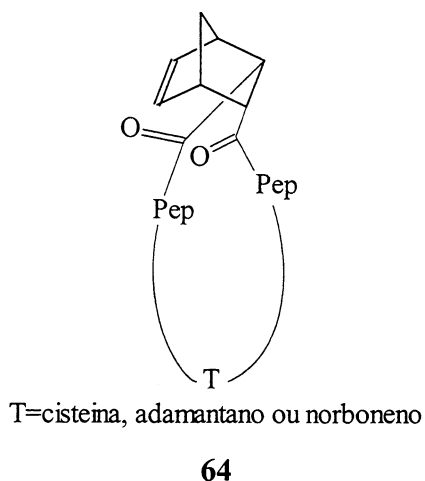
North e colaboradores<sup>23</sup> sintetizaram aminoácidos bidentados incorporados ao norborneno através da dessimetrização de *meso*-anidridos bicíclicos (Figura 15), observando a nucleação de folhetos- $\beta$  paralelos e antiparalelos.



**Figura 15.** Estruturas estudadas por North e colaboradores como indutores de folhetos- $\beta$ .

Estes autores não observaram nenhum tipo de ligação de H para o derivado **60**, onde há a presença de um tripeptídeo em uma das cadeias e um resíduo de aminoácido na outra. Mesmo após a inclusão de mais dois resíduos nesta última cadeia (composto **61**) não houve indução de folheto- $\beta$ , como desejado, mas a formação de uma mistura de duas conformações distintas, uma em dobras- $\beta$  intracadeia e outra em dobras- $\beta$  intercadeia. A substituição de um grupo amida por uréia em uma das cadeias (composto **62**), aumentando a flexibilidade do sistema, resultou na formação do folheto- $\beta$  desejado. Estes autores também estudaram a formação de folhetos- $\beta$  anti-paralelos através do composto **63**.

Ranganathan e colaboradores utilizaram a mesma unidade norborneno para gerar peptídeos cíclicos (Figura 16), os quais mostraram propriedades de transporte iônico através de camadas fosfolipídicas.<sup>22</sup>



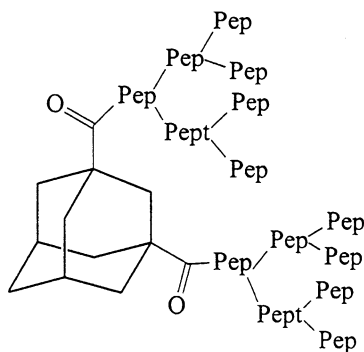
**Figura 16.** Exemplificação de peptídeo cíclico proposto por Ranganathan e colaboradores.

Kuroda e co-autores<sup>24</sup> relataram a obtenção do adamantil aminoácido **65** como indutor de dobra- $\gamma$ , enquanto Menger e Migulin<sup>25</sup> utilizaram o mesmo policíclico para a obtenção de um tetra-aminoácido (**66**), o qual evidenciou propriedades surfactantes (Figura 17).



**Figura 17.** Derivados do adamantano utilizados respectivamente como indutor dobra- $\gamma$  e como surfactante.

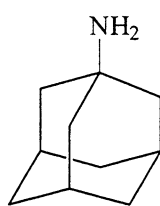
Ranganathan e Kurur divulgaram a utilização do adamantano na síntese de peptídeos dendríticos, visando mimetizar proteínas globulares (Figura 18).<sup>26</sup>



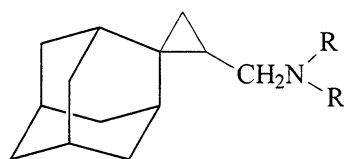
67

**Figura 18.** Pseudopeptídeo dendrítico proposto por Ranganathan e Kurur.

A utilização de estruturas policíclicas no planejamento de compostos biologicamente ativos tem sido estimulada através de evidências que mostram que agentes terapêuticos incorporados destes compostos possuem a capacidade de transpôr membranas de células lipofílicas.<sup>1a, 2, 27</sup> Neste sentido, derivados de compostos policíclicos têm mostrado eficácia como anti-depressivos, anti-virais (**68**), agentes hipoglicêmicos, agentes anti-tumorais, na inibição de proteases e no tratamento de diferentes doenças, como por exemplo no mal de Parkinson (**69**).<sup>1a, 2, 27</sup>



68

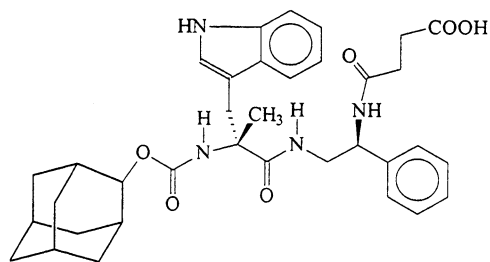


69

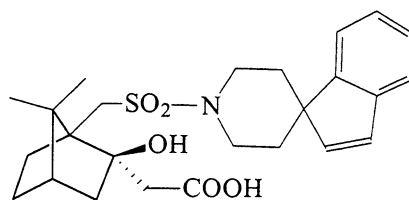
**Figura 19.** Compostos policíclicos com atividade contra o mal de Parkinson e anti-viral.

Pesquisas nesta área mostram a aplicação de compostos policíclicos incorporados de pseudopeptídeos como miméticos de neuromoduladores/neurotransmissores e de ligantes endógenos.<sup>2</sup> Os compostos **70** e **71** (Figura 20) atuam, respectivamente, como excelentes antagonistas de peptídeos no sistema nervoso central e da oxitocina.





70



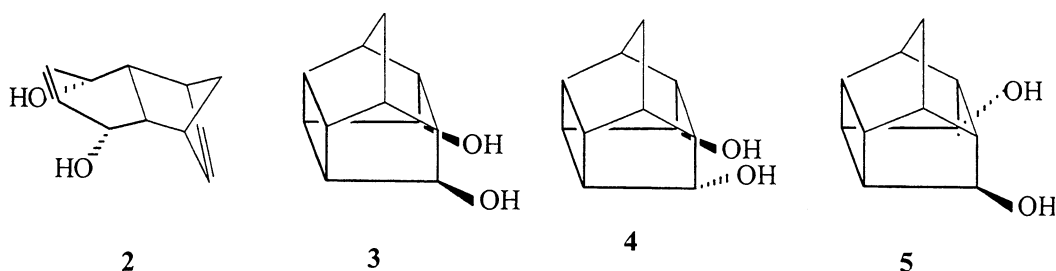
71

**Figura 20.** Peptidomiméticos biologicamente ativos incorporados em compostos policíclicos tensos.

Por outro lado, compostos policíclicos têm contribuído para a elucidação de inúmeros conceitos em ressonância magnética nuclear<sup>28</sup> e em química, incluindo estudos de rearranjos e carbocátions,<sup>29</sup> efeitos eletrônicos através de ligações e através do espaço, hiperconjugação e estudos teóricos.<sup>30</sup>

Um dos objetivos do nosso grupo de pesquisa tem sido buscar novas metodologias sintéticas e novas aplicações de compostos policíclicos tensos.<sup>31</sup> Dessa forma, temos explorado aplicações destas estruturas em RMN<sup>32</sup> e na síntese de ligantes pró-quirais na área de organometálicos.

Considerando a rigidez conformacional aliada a potenciais propriedades biológicas que estas estruturas podem conferir a agentes terapêuticos, nosso grupo propõe o estudo de compostos policíclicos, outros que as unidades norborneno e adamantano, na síntese de novos análogos peptídicos. Para tanto, utilizou-se os compostos policíclicos tensos **2**, **3**, **4** e **5** (Figura 21) como possíveis indutores de conformações secundárias específicas em pseudopeptídeos.



2

3

4

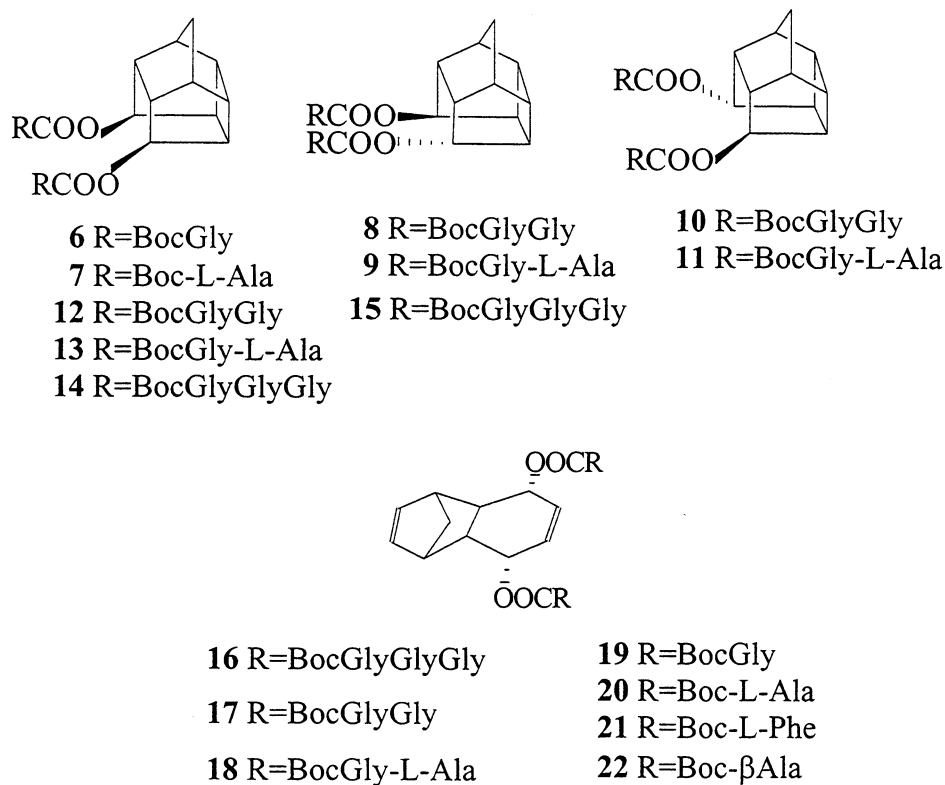
5

**Figura 21 .** Compostos policíclicos tensos utilizados na síntese de novos análogos peptídicos

A possibilidade de obter três diferentes orientações estereoquímicas (*endo-exo*, *endo-endo* e *exo-exo*) torna o sistema pentacíclico muito interessante para este tipo de investigação,

permitindo a construção de diferentes espaçadores rígidos a partir da mesma unidade policíclica. Por outro lado, peptídeos multi-derivativos podem ser obtidos a partir da estrutura tricíclica devido a presença de ligações duplas, tornando-a um precursor estratégico.<sup>33</sup>

Visando, então, examinar o potencial destes policíclicos em induzir ligações de hidrogênio intramoleculares, sintetizou-se uma série de pseudopeptídeos (Figura 22) procedendo-se a análise conformacional utilizando-se técnicas de RMN e cálculos teóricos.

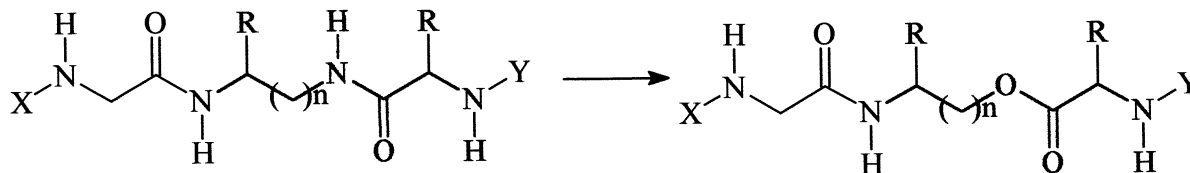


**Figura 22.** Pseudopeptídeos incorporados de compostos policíclicos tenso

Considerando a estrutura básica destes pseudopeptídeos destacam-se duas particularidades as quais podem conferir-lhes propriedades específicas: (1) a presença de uma modificação no resíduo C-terminal, ou seja, um grupamento amida é trocado por um grupamento éster e (2) a existência de um plano de simetria (derivados de **2**, **4** e **5**).

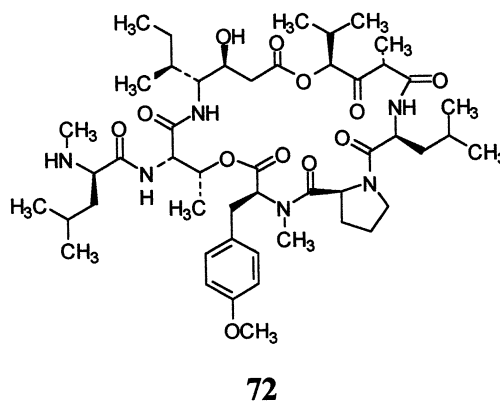
### 2.3. DEPSIPEPTÍDEOS

Pseudopeptídeos os quais possuem um grupo amida trocado por um éster são chamados de depsipeptídeos (Figura 23).



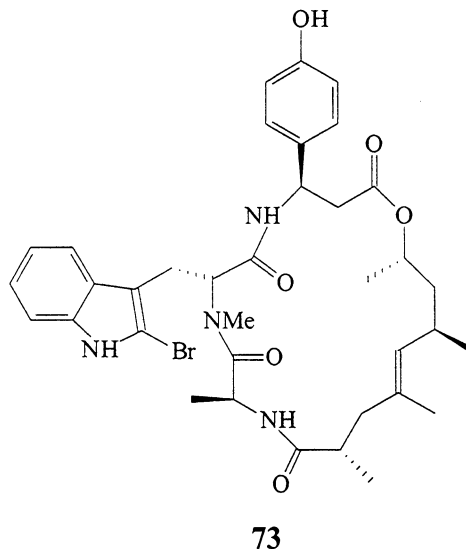
**Figura 23.** Depsipeptídeo.

Diversos depsipeptídeos apresentam atividade biológica e possuem papel importante em sistemas biológicos conhecidos. As dideminas A, B e C possuem atividades antivirais, antitumorais e imunossupressivas (Figura 24).<sup>34</sup>



**Figura 24.** Didemina A.

O ciclodepsipeptídeo Jaspamido, metabólito de uma esponja marinha, é um potente citotóxico, com propriedades inseticidas (Figura 25).<sup>34</sup>

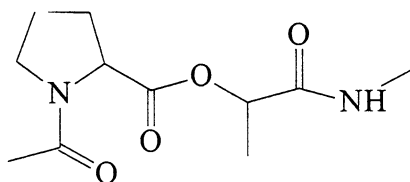


**Figura 25.** Jaspamido

Além disso, depsipeptídeos são encontrados em antibióticos tais como valinomicina, beauvericina e eniantina A, B e C.<sup>34</sup>

Adicionalmente a importância intrínseca de suas propriedades, a análise das conformações secundárias adotadas por depsipeptídeos pode prover diferentes informações daquelas obtidas por poliamidas. Depsipeptídeos tem sido comparados com peptídeos em vários aspectos uma vez que os grupamentos éster e amida secundária apresentam algumas similaridades. Ambos são planares e preferem a conformação *trans*. Dessa forma, suas propriedades conformacionais têm sido estudadas e correlacionadas. Ingwall e Goodman<sup>35</sup> realizaram a análise conformacional de polidepsipeptídeos e concluíram que estes polímeros apresentam-se em formação de hélice como as poliamidas.

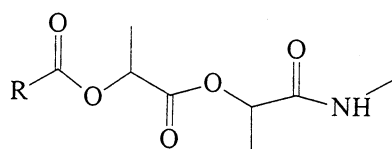
O composto Ac-ProLacNHMe (**74**) foi estudado no estado sólido e evidenciou-se uma conformação de dobra- $\beta$ , também observada para o derivado ProAlaNHMe (Figura 26).<sup>36</sup>



**74**

**Figura 26.** Ac-ProLacNHMe

No entanto, amidas secundárias e ésteres diferem significativamente com relação a suas propriedades de ligação de hidrogênio. Amidas secundárias contêm um sítio doador na ligação de H (o hidrogênio amida), enquanto que o éster não. Além disso, a carbonila da amida é mais fortemente receptora na ligação de H que a carbonila do éster. Por outro lado, o caráter  $sp^3$  é maior em ésteres que em amidas, atribuindo a este maior flexibilidade conformacional. Neste sentido, depsipeptídeos tornam-se compostos interessantes, uma vez que combinam similaridades com os peptídeos poliamidas, diminuição na capacidade de se ligar através de ligações de H e um aumento de flexibilidade conformacional. Movidos por este espírito, Gellman e colaboradores<sup>37</sup> estudaram di e tridepsipeptídeo (Figura 27) na adoção de conformações de dobra- $\beta$  e dobra de hélice- $\alpha$  (anel de 13 membros). Estes autores uniram várias técnicas espectroscópicas a cálculos de mecânica molecular, realizando uma análise termodinâmica e identificando os prováveis equilíbrios existentes.



75

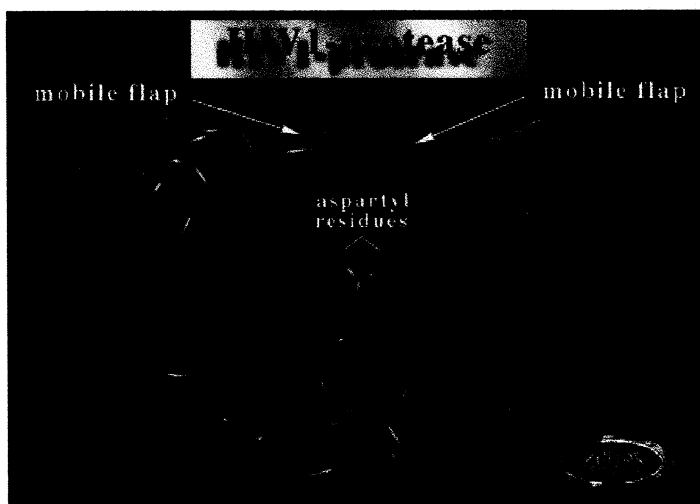
**Figura 27.** Estrutura de tridepsipeptídeo estudado por Gellman e colaboradores

## 2.4. SIMETRIA

Recentemente, tem sido mostrado que a simetria pode ser uma ferramenta importante na análise estrutural de proteínas.<sup>38</sup> Dessa forma, tem-se postulado que peptídeos simétricos podem atuar em processos de reconhecimento biológico<sup>39</sup> Uma das aplicações de pseudopeptídeos simétricos mais estudadas hoje em dia é na inibição da protease do vírus HIV, responsável pela síndrome de deficiência imunológica (AIDS).<sup>39</sup>

## 2.5. INIBIÇÃO DA PROTEASE DO VÍRUS HIV-1

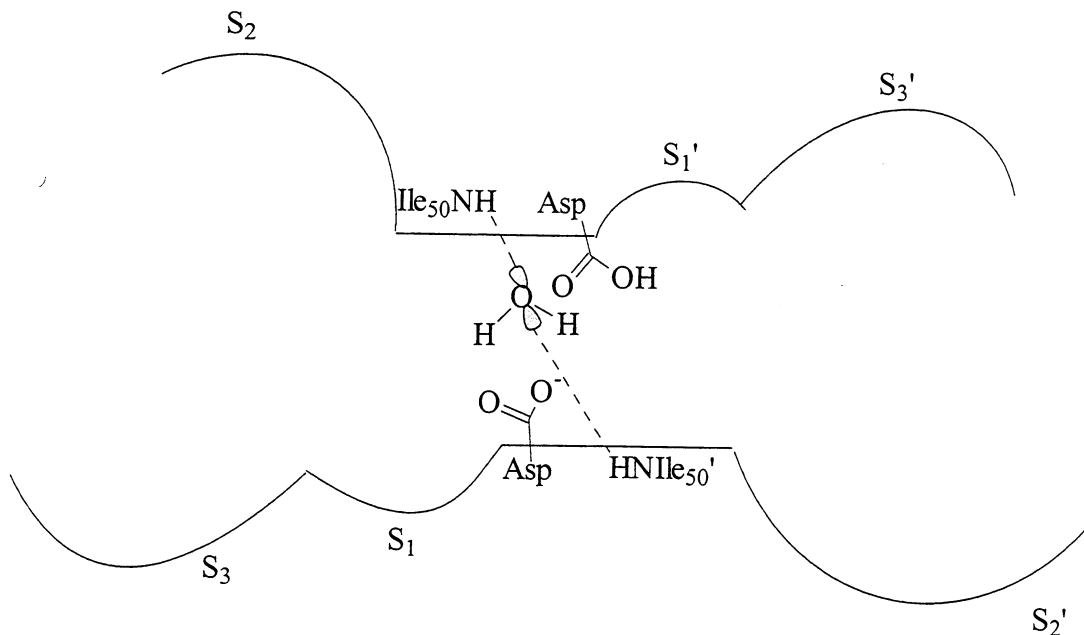
A protease do vírus HIV-1 apresenta-se em forma dimérica, cuja interface é formada pela interseção dos resíduos N- e C-terminais de cada monômero, gerando quatro cadeias em folhetos- $\beta$  antiparalelos.<sup>40</sup> Os dímeros também interagem na região de dobras (“*flap*”) composta de um folheto- $\beta$  antiparalelo formado por 45-50 resíduos (Figura 28). Estas dobras interagem entre si e com o substrato que está ligado ao sítio catalítico. Na ausência de substrato (com exceção de H<sub>2</sub>O), a enzima possui um plano de simetria perfeitamente C2.



**Figura 28.** Dímero da protease do vírus HIV-1.

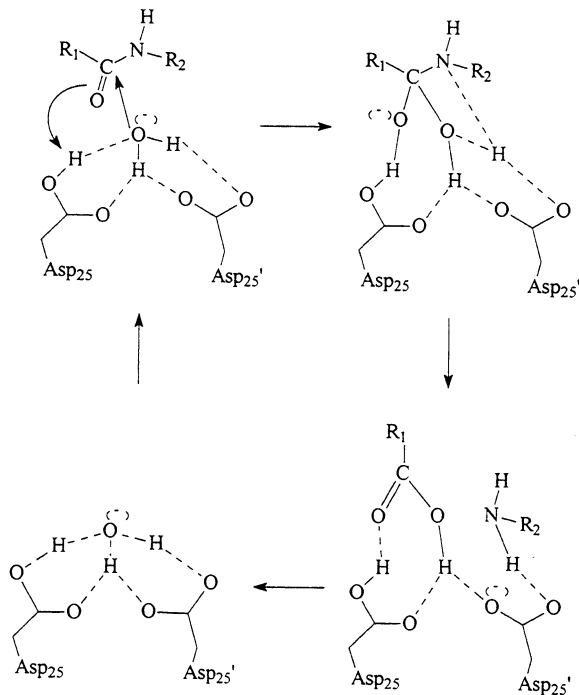
No entanto, o dímero torna-se mais compacto na presença de um substrato, perdendo sua simetria e estabilizando-se. O sítio ativo é formado basicamente por 6 sítios hidrofóbicos (3 de cada monômero), quais sejam, S1, S1', S2, S2', S3 e S3', e pelos resíduos Asp25, Asp25' e Ile50, Ile50' (Figura 29). O substrato encaixa nos sítios hidrofóbicos através de grupamentos

apolares que são chamados, conforme o sítio enzimático, de P1, P1', P2, P2', P3 e P3'. A seqüência Phe-Gly é uma das seqüências importantes que forma o sítio S1, onde ocorre a maior quebra de poliproteínas. Os resíduos Ile50 e Ile50' coordenam com uma molécula de água, a qual participa do mecanismo de quebra de ligações peptídicas, formando uma estrutura tetraédrica.



**Figura 29.** Representação esquemática do sítio catalítico da enzima.

Uma região importante do sítio ativo é formada pelos resíduos de aspartatos catalíticos. A molécula de H<sub>2</sub>O, coordenada as Ile50, atua como nucleófilo catalítico na quebra de ligações peptídicas entre os resíduos Asp-25 e Asp-25', sendo uma das chaves do mecanismo catalítico da protease (Pr) do HIV (Figura 30).



**Figura 30.** Descrição do mecanismo de clivagem de ligação peptídica através dos resíduos Asp25 do sítio catalítico da protease do HIV.

Diversos inibidores da Pr do HIV têm sido desenvolvidos nos últimos anos. Todos os compostos em uso clínico (Saquinavir, Indinavir e Ritonavir) são **inibidores competitivos**, os quais mimetizam a presença de um substrato no sítio ativo do dímero da Pr. Propostas alternativas incluem moléculas que se ligam covalentemente (**inibidores irreversíveis**) modificando os aspartatos do sítio ativo, impedindo o acesso da molécula de H<sub>2</sub>O, bem como moléculas que bloqueiam a região de interface entre os monômeros da Pr, impedindo a formação do sítio ativo (**inibidores da dimerização**).

### 2.5.1. Inibidores irreversíveis

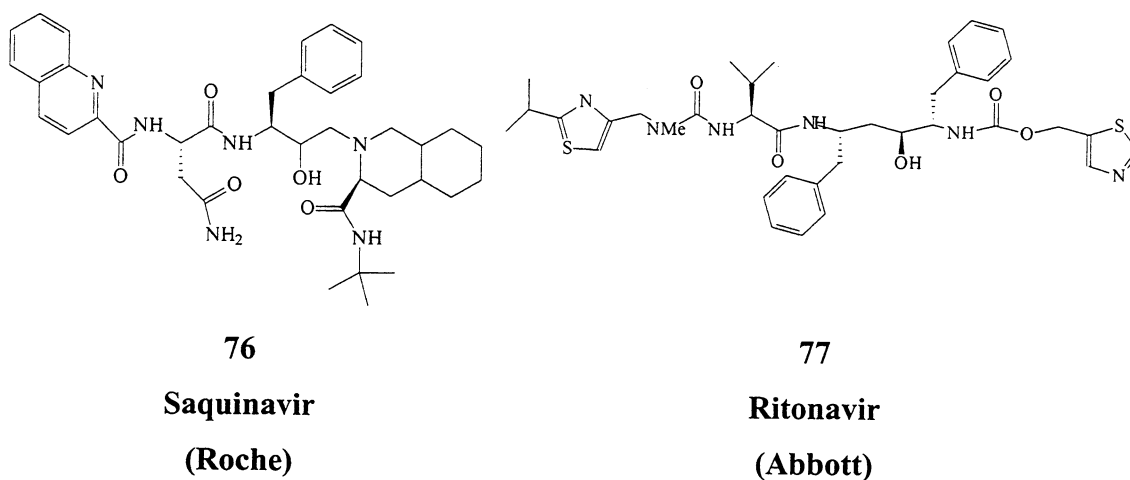
A maior parte dos inibidores irreversíveis são compostos não peptídicos e apresentam sérios problemas como baixa afinidade com a protease, alta toxicidade em cultura celular e funções que se mostram muito reativas ou muito facilmente metabolizadas *in vivo*.<sup>40</sup>



## 2.5.2. Inibidores competitivos

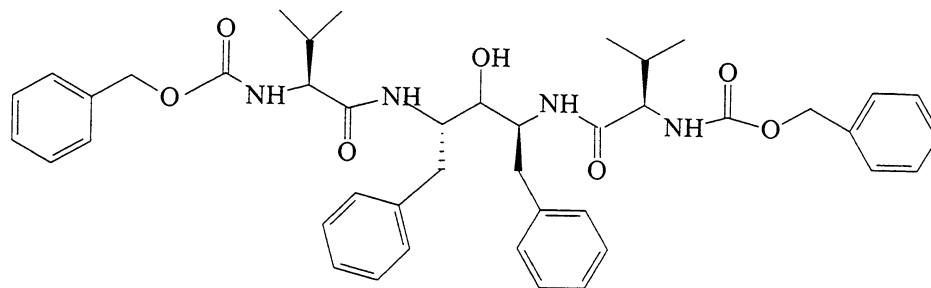
A habilidade da protease do HIV em quebrar substratos que contenham prolina na posição P1' foi utilizada como base para o planejamento de inibidores seletivos. Dessa forma, preparou-se inibidores competitivos onde um grupamento hidroxilamina mimetiza a prolina nesta posição.<sup>41</sup>

A substituição da prolina por decahidro-isoquinolina-3-carbonila resultou no primeiro composto utilizado comercialmente na inibição da protease: o saquinavir (figura 31). No entanto, este inibidor mostrou baixa biodisponibilidade oral e dificuldade em transpor a barreira hemato-encefálica.<sup>40</sup>



**Figura 31.** Peptídomiméticos utilizados comercialmente no tratamento da AIDS

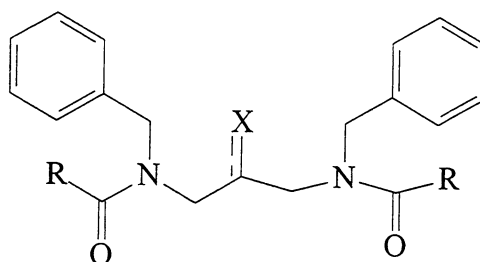
Ritonavir (Figura 31) foi o segundo inibidor utilizado para uso terapêutico, utilizando a Phe na posição P1. Pesquisadores da Abbott foram os primeiros a explorar a simetria única do dímero da protease do HIV-1 para o planejamento de inibidores baseados na simetria C2. Associou-se, então, a presença dos grupos hidrofóbicos do Ritonavir e desenvolveu-se inibidores com o objetivo de sobrepor eixos de simetria com aquele da protease, maximizando, assim, interações com os sub-sítios da enzima. Esta linha de raciocínio levou ao planejamento do composto A-74704 (Figura 32).<sup>41</sup>



78

**Figura 32.** Inibidor A74704

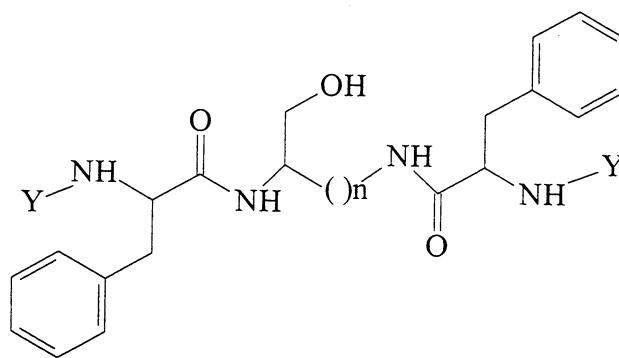
Desde então, diversos inibidores simétricos têm sido propostos, evidenciando-se atividade anti-HIV.<sup>42</sup> Kraus e colaboradores utilizaram inibidores simétricos evidenciando que ambos derivados hidroxilados e carbonilados inibem a enzima (Figura 33).<sup>43</sup>



79

**Figura 33.** Inibidores simétricos proposto por Kraus e colaboradores.

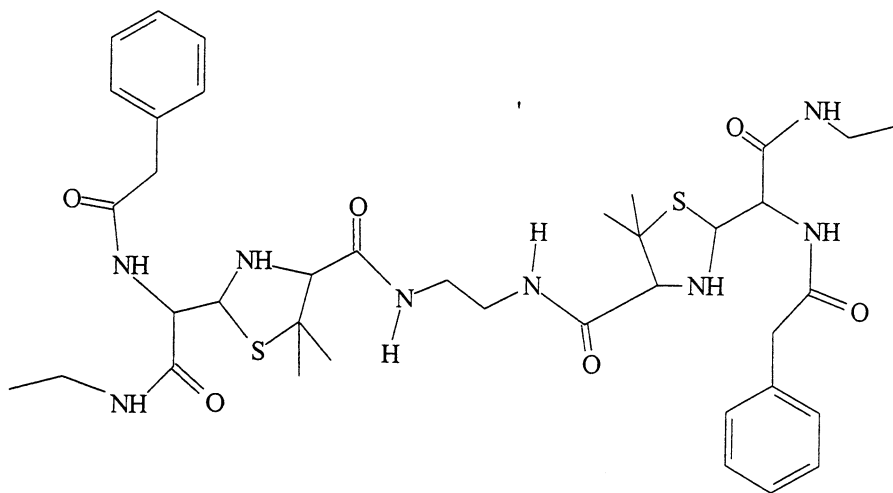
Tomatis e colaboradores analisaram amino álcoois pseudo-simétricos e observaram que a introdução de uma cadeia carbonada entre os resíduos peptídicos aumentava a atividade anti-HIV (Figura 34). Estes autores observaram também maior atividade para o derivado dimetilênico em relação ao derivado monometilênico. Além disso, determinaram que diferentes grupos substituintes do N-terminal podem interferir no potencial de atividade anti-HIV de estruturas simétricas, mostrando a importância do substituinte em P3.<sup>42a</sup>



80

**Figura 34.** Inibidor anti-HIV com ponte metilênica ligando resíduos peptídicos.

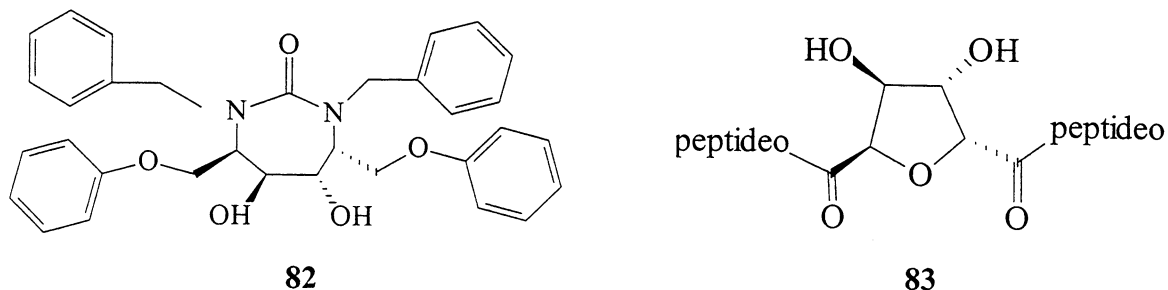
Em trabalho semelhante, Holmes e colaboradores<sup>44</sup> propõem um dímero de derivado da penicilina separado por uma ponte dimetilênica como inibidor em potencial (Figura 35). Observou-se que o aumento da cadeia carbonada de dois para três carbonos traduz-se em diminuição da atividade biológica.



81

**Figura 35.** Inibidor proposto por Holmes e colaboradores

Hultén e colaboradores sugeriram a utilização de uréias cíclicas<sup>45</sup> (**82**) enquanto Chakraborty e colaboradores<sup>46</sup> propõem a utilização de carboidratos cíclicos (**83**) como unidade rígida para o planejamento de novos inibidores (Figura 36).



**Figura 36.** Inibidores propostos por Hultén e colaboradores e Chakraborty e colaboradores

Martinez e colaboradores introduziram uma sub-estrutura cíclica (ponte dimetilênica) ligando derivados dicarbonilados.<sup>47</sup>

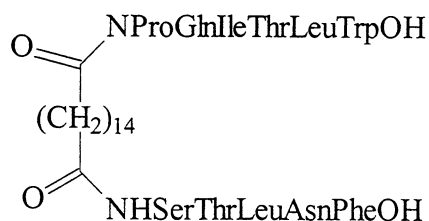
Apesar dos esforços de pesquisadores em buscar inibidores cada vez mais potentes, o vírus é capaz de mutar, ocasionando a manutenção da atividade da enzima ao mesmo tempo tornando-se imune a inibidores. Isso é possível devido ao seu repertório reduzido de aminoácidos (99 cada monômero). Certos elementos do sítio ativo precisam ser conservados para haver atividade enzimática, no entanto, outros aminoácidos, menos cruciais, podem sofrer mutação com conservação da atividade, mas alterando o perfil da inibição. É o caso do resíduo Gly27 o qual pode mover-se dependendo dos substituintes do substrato. O surgimento de resistência a medicamentos é o maior problema das terapias contra este vírus altamente mutável. Neste sentido, o desenvolvimento de novos inibidores é um estudo de extrema importância no combate a esta doença.

Estudos cristalográficos demonstram que inibidores simétricos podem ligar-se aos sítios hidrofóbicos da protease, tanto de uma forma simétrica, como assimétrica, dependendo do posicionamento dos eixos da protease e do inibidor, conferindo a estes maior versatilidade. Este fato mostra que além das interações por ligação de hidrogênio, as interações de van der Waals são de extrema importância para o encaixe do substrato no sítio ativo.<sup>41</sup> Em última análise, estas interações podem permanecer inalteradas com mutações isoladas de resíduos da protease, não alterando, assim, a atividade do inibidor. Além disso, compostos de baixo peso molecular e alta lipofilicidade, fato que aumenta a permeabilidade em membranas biológicas, conferem aumento da atividade anti-HIV.<sup>39a</sup> Estes dois fatos corroboram o uso de compostos policíclicos como possíveis candidatos a inibidores desta enzima.

### 2.5.3. Inibidores da dimerização

Os folhetos- $\beta$  formados pelos resíduos C- e N- terminais são responsáveis pela estabilização de 50% da força dimérica. Então, uma alternativa para desativar o sítio ativo é impedir sua formação através da formação de um heterodímero inativo. Este tipo de inibição pode ser importante no combate a este vírus, uma vez que as diferentes mutações conhecidas apresentaram variações a nível do sítio ativo, mas não das partes C- e N-terminais da protease, as quais permanecem inalteradas.

O Peptídeo sintético, representando ambas cadeias C- e N-terminal do monômero ( $\text{NH}_3\text{-ProGlnIleThrLeu-(Gly)}_3\text{-CysThrLeuAsnPheCOOH}$ ), separadas por três resíduos de Gly foi um dos primeiros inibidores a serem testados. Porém este inibidor apresentou inibição apenas quando a enzima estava na forma monomérica.<sup>48</sup> Zutshi e colaboradores<sup>49</sup> prepararam um inibidor que mimetiza a seqüência C-terminal (ThrLeuAsnPhe-OMe) e a seqüência N-terminal (ProGlnIleThrLeu-OMe) da enzima, separados por uma cadeia alquílica de 14 carbonos. Observou-se inibição, porém não satisfatória (Figura 37): A alta flexibilidade conformacional induziu um termo de entropia desfavorável na energia de interação do complexo inibidor-monômero.

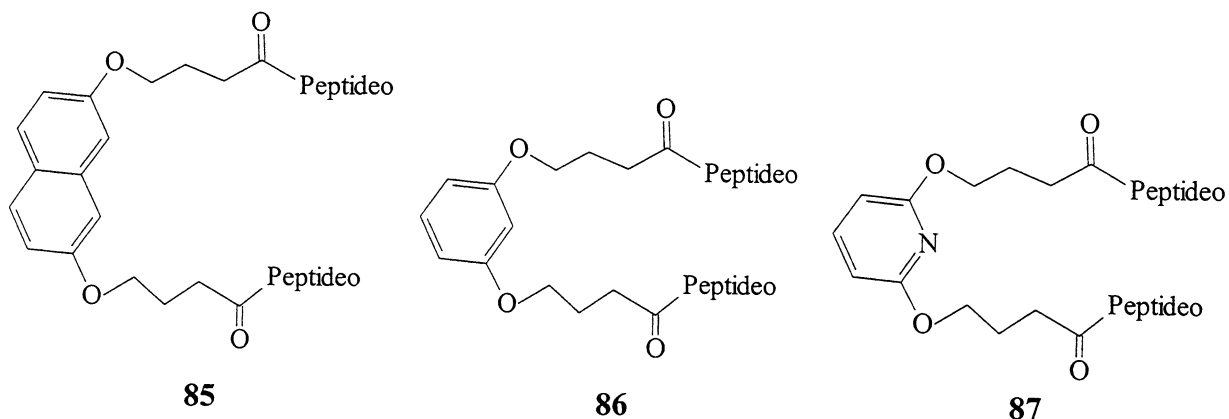


84

**Figure 37.** Inibidor da dimerização da protease do HIV.

Ligações duplas e triplas foram introduzidas para diminuir a flexibilidade conformacional desta cadeia alquílica, mas observou-se uma diminuição da atividade.<sup>49</sup>

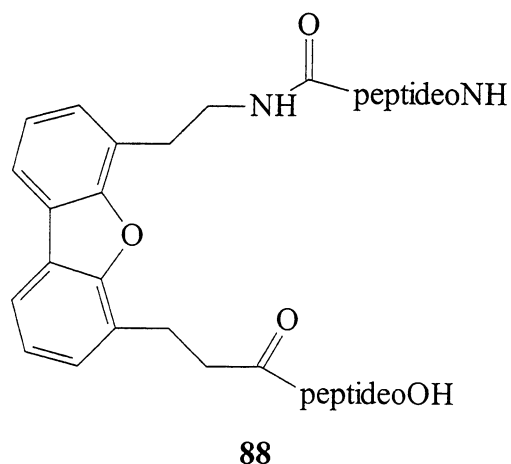
Bouras e colaboradores propuseram o uso de restritores aromáticos como o naftalenodiól (**85**), resorcinol (**86**) e piridinodiól (**87**).<sup>39b</sup> Estes autores testaram diferentes tipos de seqüências, propondo também uma diminuição da cadeia peptídica e utilização de inibidores simétricos (Figura 38). Seus melhores resultados apresentaram a mesma atividade que o inibidor de cadeia alquílica proposto anteriormente.



**Figura 38.** Inibidores da dimerização da Pr-HIV propostos por Bouras e colaboradores.

Foi observado, também, que seqüências pequenas, como valina-leucina-valina-OMe (VLV-OMe), apresentaram os melhores resultados na indução da potência inibidora, embora não reproduzam as seqüências envolvendo o folheto- $\beta$  anti-paralelo da protease do HIV.

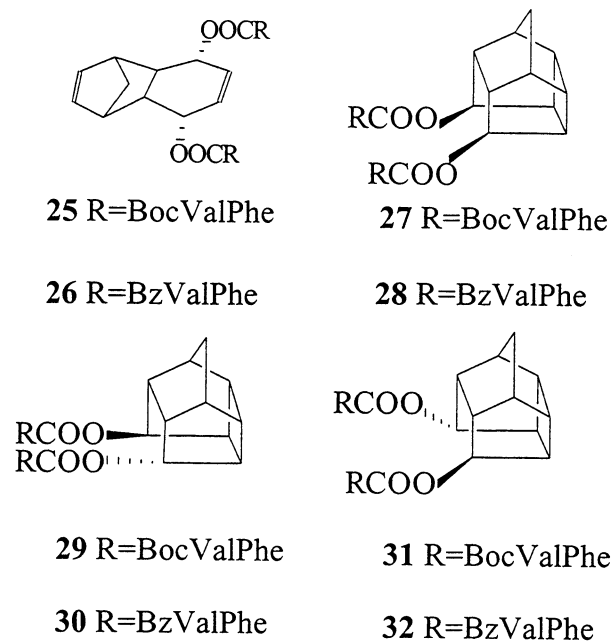
Recentemente, Kiso e colaboradores<sup>50</sup> propuseram um inibidor com cadeias peptídicas N- e C-terminal incorporadas ao dibenzofurano mostrando, da mesma forma, moderada atividade inibidora da protease (Figura 39). Este inibidor representa um dos poucos inibidores com seqüência N-terminal existentes na literatura e segundo os autores, modificações na seqüência peptídica pode levar a aumentos da sua atividade.



**Figura 39.** Inibidor de dimerização proposto por Kiso e colaboradores.

Acredita-se que uma inibição efetiva desta protease, passará futuramente pela utilização em conjunto de inibidores tanto do sítio ativo quanto de dimerização ou ainda, pela utilização de compostos que possuam dupla funcionalidade, ou seja, atuem nos dois processos ao mesmo tempo.

Considerando os fatos acima, propõem-se como uma segunda etapa deste trabalho, a síntese de uma série de 8 pseudopeptídeos incorporados de compostos policíclicos para serem testados como modelos de inibidores da protease do vírus HIV (Figura 40).



**Figura 40.** Pseudopeptídeos incorporados de compostos policíclicos como inibidores da protease do HIV.

## **2.6. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A ANÁLISE CONFORMACIONAL**

A conformação de um peptídeo em solução depende basicamente de sua seqüência de aminoácidos e da polaridade do meio onde ele se encontra. A natureza de um dado solvente pode interferir na formação de ligação de hidrogênio intramolecular em função de sua força ácido-básica. Então, segundo o solvente utilizado, a estrutura tridimensional do peptídeo pode modificar-se.

Os peptídeos em solução apresentam-se normalmente em equilíbrio conformacional. Como consequência deste equilíbrio, os parâmetros de RMN aparecem como médias. Dessa forma, a utilização de um grande número de parâmetros (constantes de acoplamento, EON, velocidade de troca de deutério, coeficiente de temperatura, efeito de co-solvente, etc...) permite descrever de forma mais quantitativa os diferentes confôrmeros envolvidos no equilíbrio.

### **2.6.1. Estudo de Agregação**

Os peptídeos podem formar ligações de H intra e intermoleculares. Esta última é caracterizada através da formação de dímeros, trímeros ou agregados. Um alto grau de associação destes agregados pode levar à formação de micelas, dependendo da natureza do composto e do meio em que ele está dissolvido. Aumentando-se a concentração, a proporção de agregados torna-se mais significativa, aumentando o número de ligações de H intermoleculares, aumentando, assim, a média do deslocamento químico observado. Assim, o estudo de análise conformacional de peptídeos inicia-se pelas medidas de variação de deslocamento químico dos hidrogênios NH em função da concentração (gráfico de  $\delta$  versus  $\log[C]$ ). O experimento indica a faixa de concentração na qual a presença de agregados (ligações de H intermoleculares) é mínima, ou seja, o deslocamento químico é linear e constante com a variação do logaritmo da concentração. Os demais experimentos devem então serem realizados nessa faixa de concentração.



### 2.6.2. Deslocamento Químico do NH

O deslocamento químico de um hidrogênio NH é fortemente influenciado pelo efeito de solvatação. A solvatação provoca uma desblindagem dos hidrogênios e a desblindagem varia conforme o solvente utilizado, sendo forte no caso de solventes polares como o CD<sub>3</sub>OD e DMSO-*d*<sub>6</sub> e fraca no caso de solventes não associativos como o CDCl<sub>3</sub>. No entanto, há adicionalmente inúmeros efeitos que influenciam o deslocamento químico do NH, como a acessibilidade do solvente à ligação de H, a natureza dos grupamentos envolvidos na ligação de H, o tipo de dobra formada, a posição do hidrogênio do NH com relação ao cone de desblindagem da carbonila, forças de repulsão de grupamentos espacialmente próximos e assim por diante. Assim, é conhecido que os hidrogênios NH de hélices- $\alpha$  são mais blindados (~0,1 ppm) que os correspondentes NH de uma estrutura livre, enquanto que em um folheto- $\beta$  eles aparecem em torno de 0,5 ppm mais desblindados.<sup>5</sup> O estudo das espécies ligadas por ligação de H e solvatadas (livres) pode ser realizado perturbando-se o sistema, como por exemplo através da variação da temperatura ou adicionando-se um co-solvente que possui propriedades ácido-básicas diferentes (técnica da titulação de solvente).

### 2.6.3. Titulação de Solvente

A adição seqüencial de um solvente polar (associativo) em uma solução do peptídeo em um solvente de baixa polaridade (não-associativo) é denominada técnica de titulação de solvente. Quando um peptídeo forma ligações de H intramoleculares em um solvente de baixa polaridade, a perturbação desta ligação pelo solvente polar pode ser medida através da variação do deslocamento químico dos hidrogênios NH. É importante lembrar que, em peptídeos de até três resíduos, freqüentemente pode haver a estabilização das ligações de H apenas em solventes apolares ou de baixa polaridade, ocorrendo o rompimento destas na presença, mesmo que em pequenas quantidades, de solventes polares.

#### 2.6.4. Variação da Temperatura e Coeficiente de Temperatura

Tanto a solvatação quanto as ligações de H são reforçadas a baixas temperaturas, devido a um fenômeno entrópico, o que se traduz pela desblindagem dos hidrogênios NH. Então, o acompanhamento da variação do deslocamento químico como função da temperatura é freqüentemente utilizada para determinar a formação de ligações de hidrogênio, bem como para determinar a existência de equilíbrios conformacionais. Para tanto, um gráfico de deslocamento químico do NH em função da temperatura é construído e o coeficiente de temperatura é dado pelo coeficiente angular da reta. A linearidade desta curva representa o caso onde provavelmente não há mudanças conformacionais das espécies existentes em solução. A interpretação dos valores de coeficientes de temperatura, variam conforme a polaridade do solvente utilizado.

No caso do hidrogênio NH ligado intramolecularmente normalmente observar-se-á pouca variação do deslocamento químico (variação entrópica) com a variação da temperatura, independente do solvente utilizado. Portanto, tanto em solventes polares como apolares, pequenos coeficientes de temperatura são observados para espécies ligadas (menores que 3 ppb/K).<sup>51</sup> No entanto, o comportamento de espécies livres é diferenciado segundo o meio de análise. Em solventes polares, ocorrem a formação de ligações de H intermoleculares entre o solvente e o peptídeo. A variação da temperatura traduz-se em rompimento ou formação destas ligações e grande variação do deslocamento químico. Dessa forma, grandes coeficientes de temperatura (maiores que 4ppb/K) em solventes polares são devido à presença majoritária de espécies livres.<sup>51b</sup> Ao contrário, em solventes apolares ou de baixa polaridade, onde o processo de solvatação se processa basicamente através de forças de dipolo-dipolo e de van der Waals, observa-se pequena variação do deslocamento do NH de espécies livres com a variação da temperatura (menores que 3 ppb/K).<sup>4</sup> Grandes coeficientes em solventes apolares são atribuídos, por Nowick e colaboradores,<sup>4</sup> a hidrogênios NH que participam de um equilíbrio entre as espécies ligada e não ligada e, por Toniolo e colaboradores,<sup>52</sup> a um hidrogênio NH que está inicialmente blindado e é transferido a um ambiente desblindado, fato que pode ser explicado tanto através da dissociação de agregados quanto de espécies ligadas intramolecularmente.

Incertezas ligadas a interpretações de coeficientes de temperatura tem sido discutido na literatura. Andersen e colaboradores<sup>53</sup> realizaram uma análise correlacionando os coeficientes de temperatura e deslocamentos químicos em solventes polares, aplicando a polipeptídeos e proteínas. Estes autores descrevem que os coeficientes de temperatura não geram erros de interpretação apenas em dois casos, (1) onde em um equilíbrio há a presença majoritária de espécies livres ou (2) no caso de uma estrutura rígida, ou seja, onde a ligação de H não é afetada pela mudança de temperatura. No caso de peptídeos dinâmicos, onde há o estabelecimento de um equilíbrio conformacional entre as espécies ligada e livre com variações de suas percentagens a cada temperatura, o coeficiente de temperatura falha em prever o estado de determinados hidrogênios. Neste caso, estes autores sustentam a idéia de que a utilização de coeficientes de temperatura, unido aos dados de variação de deslocamentos químicos (com relação ao estado livre) e técnicas como a velocidade de troca de H/D, garantem melhor precisão desta avaliação.

#### 2.6.5. Velocidade de troca de H/D

A determinação da velocidade de troca de deutério foi realizada adicionando-se metanol- $d_4$  à uma solução diluída do peptídeo em  $\text{CDCl}_3$  e medindo-se a velocidade de extinção do sinal de NH em espectros de RMN de  $^1\text{H}$ . Em solução de DMSO- $d_6$  foi realizada de forma clássica, adicionando-se  $\text{D}_2\text{O}$ . A troca de deutério pode ser um bom parâmetro para se medir a acessibilidade ao solvente de um hidrogênio NH.

#### 2.6.6. Constante de Acoplamento $^3J_{\text{HN-CH}\alpha}$ <sup>4, 51b</sup>

Os valores de constantes de acoplamento também são dados importantes na análise de estruturas de peptídeos. As constantes de acoplamento são dependentes do ângulo entre os hidrogênios. Então, os valores de  $^3J_{\text{HN-CH}\alpha}$  podem indicar se um dado NH encontra-se em ligação de H intramolecular. Normalmente, peptídeos naturais e proteínas podem ser classificados em duas faixas distintas:  $^3J_{\text{HN-CH}\alpha} < 6$  Hz (por exemplo para hélices- $\alpha$ ) e  $^3J_{\text{HN-CH}\alpha} > 8$  Hz (como para folhetos- $\beta$ ). Distorções destas estruturas levam a modificações dos valores de  $^3J_{\text{HN-CH}\alpha}$  como é observado quando a prolina está presente. Conformações livres

normalmente fornecem valores de  ${}^3J_{\text{HN-CH}\alpha} = 6\text{-}8$  Hz. Através das constantes de acoplamento vicinais pode-se obter os valores de ângulos de diedros, utilizando-se a equação de Karplus. No caso de biomoléculas utiliza-se mais frequentemente derivações desta equação.<sup>54</sup>

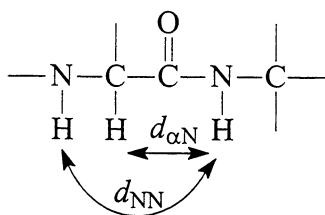
### 2.6.7. Efeito Overhauser Nuclear<sup>5</sup>

EON é um fenômeno proveniente da relaxação dipolar entre dois núcleos, e manifesta-se em espectros de 1D através da mudança da intensidade de um sinal saturando-se outro que encontra-se espacialmente próximo. A intensidade do EON é proporcional a  $r^{-6}$ , onde  $r$  é a distância entre dois núcleos. Em experimentos de 2D (NOESY), um tempo  $\tau_m$ , chamado de tempo de mistura, é aplicado entre dois pulsos de  $90^\circ$ , segundo a seqüência:  $(\pi/2) - t_1 - (\pi/2) - \tau_m - (\pi/2) - \text{aquisição}$ .

A informação de acoplamento dipolar é transmitida durante este intervalo  $\tau_m$ . Então, quanto maior este tempo, maior é esta transferência. Entretanto, o aumento de  $\tau_m$  leva, também, a um processo de propagação da perturbação da população (a relaxação dipolar é propagada através da molécula de um núcleo para outro), chamado de difusão de *spin*, o qual traduz-se por uma diminuição da intensidade do sinal de EON. Neste ponto, não é mais possível explorar os dados de EONs para quantificar as distâncias. Por isso, em um estudo estrutural, onde informações precisas são necessárias, determina-se, inicialmente, o tempo de mistura com o qual a relação intensidade de EON e distâncias internucleares são proporcionais. Este processo pode ser realizado obtendo-se vários espectros de NOESY com tempos de mistura diferentes e traçando-se um gráfico dos valores de intensidade de EON em função de  $\tau_m$ .

Com relação à informação estrutural que o EON pode fornecer no estudo de peptídeos e proteínas, ressalta-se a grande importância desta técnica na identificação dos tipos de estruturas secundárias observadas. Experimentalmente, pode-se observar EONs entre hidrogênios separados por distâncias de 2 a 4 Å. Considerando que a intensidade dos EONs decresce em função da sexta potência da distância, hidrogênios separados por distância de 2 Å devem fornecer grandes efeitos de EON, enquanto aqueles separados de 4 Å podem produzir EON fracos ou não ser observados. EONs envolvendo hidrogênios NH e

hidrogênios em posição  $\alpha$ , bem como EONs entre hidrogênios NH (respectivamente denominados  $d_{\alpha N}$  e  $d_{NN}$ ) são freqüentemente encontrados em estruturas secundárias (Figura 41).<sup>4</sup>



**Figura 41.** EONs freqüentemente encontrados em estruturas secundárias.

#### 1.2.8. Análise Teórica:<sup>55</sup> Dinâmica Molecular, cálculos Semi-Empíricos e *ab initio*

Na análise estrutural de biomoléculas utiliza-se, freqüentemente, métodos de minimização de energia para determinar um mínimo local na superfície de energia potencial, o qual pode ser realizado utilizando-se diversas metodologias abrangendo métodos de mecânica e dinâmica molecular e métodos quânticos do tipo *ab initio* e semi-empíricos.

Nos métodos de mecânica molecular uma molécula é considerada como um número de elétrons que circundam um conjunto de núcleos carregados positivamente. A atração Coulômbica entre estes dois tipos de partículas forma a base para átomos e moléculas. O potencial entre duas partículas com carga  $q_i$  e  $q_j$  separadas por uma distância  $r_{ij}$  é dado por

$$V_{ij} = \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$$

Nos métodos de mecânica molecular (MM) ou de campo de força a energia eletrônica é descrita como uma função paramétrica de coordenadas nucleares. Tais parâmetros são provenientes de dados experimentais ou de cálculos computacionais de alto nível. As moléculas são modeladas como átomos mantidos próximos através de ligações. Os campos de força designados para calcular macromoléculas apresentam várias simplificações se comparados a campos de força universais, além de não considerarem os átomos de hidrogênio explicitamente e sim como átomos unidos ao átomo pesado. Exemplos destes campos de força são AMBER, CHARMM, GROMOS, OPLS e DREIDING. Entretanto, os métodos de mecânica molecular podem, muitas vezes, levar a energias de mínimo local as quais não traduzem com exatidão as estruturas reais.

Para contornar este problema, normalmente são utilizados métodos que descrevem a dinâmica do sistema, ou seja, como o sistema evolui no tempo. A dinâmica molecular resolve a equação de movimento de Newton:

$$F_i = m_i a_i$$

onde  $F_i$  é a força,  $m_i$  é a massa e  $a_i$  é a aceleração do átomo  $i$ . A força do átomo  $i$  pode ser computada diretamente das derivadas da energia potencial  $V$  com respeito as coordenadas  $r_i$ , podendo ser resolvida em função do tempo:

$$\frac{dV}{dr_i} = m \frac{d^2 r_i}{dt^2}$$

A integração da equação de Newton é feita em pequenos intervalos de tempo (*time steps*) que variam de 1-10 fs. A temperatura pode ser calculada das velocidade atômicas:

$$\frac{3N}{2} k_B T = \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} m_i v_i^2$$

onde  $k_B$  é a constante de Boltzmann,  $m_i$  e  $v_i$  são a massa e a velocidade atômica do átomo  $i$  e  $N$  é o número de átomos ( $3N$  é o número de graus de liberdade). Para uma simulação a energia constante, a temperatura flutua devido à interconversão de energia cinética e potencial. Se a temperatura é mantida constante, então as velocidade atômicas podem ser ajustadas. A energia potencial total  $V_{total}$  é usualmente definida como o somatório de diversos termos:

$$V_{total} = V_{ligação} + V_{ângulo} + V_{dihedro} + V_{vdW} + V_{coulomb} + V_{RMN}$$

Os primeiros cinco termos são termos resultantes de energias empíricas, as quais descrevem interações físicas entre os átomos, enquanto que o último termo é incluído através de informações de RMN, mas não corresponde à força física real. Este potencial contém informações de restrições de RMN e tem o efeito de manter os hidrogênios que apresentam interações de EON próximos.

O método de *simulated annealing* é um procedimento de varredura do espaço conformacional utilizado nas simulações de dinâmica molecular que envolve aumento da temperatura do sistema, seguido de um lento resfriamento até 0K para vencer os mínimos locais e localizar a região de mínimo global.

A precisão com relação às estruturas calculadas é determinada basicamente de duas formas: se as restrições de RMN são satisfeitas e se um significativo número de estruturas convergem entre si, mostrando um RMSD (desvio médio quadrático)  $< 2\text{Å}$ . O RMSD é gerado sobrepondo as estruturas e calculando uma rotação que minimiza o valor global:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i - r'_i)^2}$$

onde N é o número de átomos que estão sendo comparados,  $r_i$  e  $r'_i$  são as coordenadas atômicas respectivamente para a estrutura referência e a estrutura calculada. Para a comparação de uma família de estruturas, cada estrutura é rodada de forma a obter o melhor encaixe com a estrutura referência. No caso onde há violações dos dados de EON ou os valores de RMSD são muito grande, toda a sistemática de análise deve ser reiniciada.

Normalmente, os procedimentos experimentais de determinação de estruturas de biomoléculas envolvem uma pré-otimização, utilizando-se métodos de mecânica molecular, para posterior cálculo utilizando-se métodos de dinâmica molecular.

Apesar dos métodos de dinâmica molecular se mostrarem eficazes na determinação estrutural de biomoléculas e muitas vezes serem a única forma de descrever tais sistemas (como é o caso de polipeptídeos e proteínas), a descrição detalhada da distribuição eletrônica só pode ser feita através do auxílio da mecânica quântica. Para tanto, os métodos de *ab initio* resolvem aproximadamente a equação de Schroedinger por meio de uma representação da repulsão inter eletrônica exata por uma aproximação de campo médio, sem fazer uso de parâmetros experimentais. Outra aproximação utilizada é a introdução de um conjunto de base para expandir o orbital molecular (OM). Idealmente um grande conjunto de base, que descreve os orbitais atômicos, deve ser utilizado para representar de maneira exata o orbital molecular, contudo restrições computacionais exigem que limitações mais ou menos drásticas devam ser realizadas nesta representação. Quanto menores as bases mais pobre é a representação.

Os métodos semi-empíricos reduzem o tempo computacional dos métodos *ab initio* diminuindo o número de integrais necessárias para a construção da matriz Fock. Então,

apenas os elétrons de valência e um número mínimo de bases são considerados. Para compensar estas aproximações, as integrais restantes são traduzidas em parâmetros e seus valores fixados com base em dados calculados ou experimentais. Os diversos métodos semi-empíricos existentes são definidos exatamente através do número de integrais não negligenciadas e de como é feita a parametrização. Os métodos AM1 (*Austin Model 1*) e PM3 (*Parametric Method Number 3*) são parametrizações do modelo NDDO, onde a parametrização é feita em termos de variáveis atômicas, ou seja, referem-se somente a natureza de um único átomo. Eles diferem entre si no modo como a repulsão *core-core* é tratada e como os parâmetros são estabelecidos.



### **3. EXPERIMENTAL**

### 3.1. GENERALIDADES

Utilizou-se clorofórmio- $d_1$  99,8% em átomo de D, metanol- $d_4$  e DMSO- $d_6$  da Aldrich Chemical Co. como materiais puros. Todos os aminoácidos usados possuem configuração L. Os pontos de fusão não foram corrigidos e foram medidos em um aparelho VMF4X. As medidas de infra-vermelho foram realizadas em um espectrômetro Perkin Elmer, em KBr e a uma temperatura de 25°C. As reações foram monitoradas, quando possível, por cromatografia em camada delgada usando-se sílica gel G (Merck). Os produtos foram purificados empregando-se cromatografia em coluna Flash de sílica gel 60 (partículas de tamanho 0,040-0,060 mm, Merck), eluída com gradientes de ciclohexano e acetato de etila. Os rendimentos referem-se a produtos cromatografados e espectroscopicamente puros.

### 3.2. ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS

#### 3.2.1. RMN -Geral

Os valores de deslocamentos químicos são expressos em  $\delta$  (partes por milhão) relativos ao TMS (padrão interno). Os espectros de RMN dos compostos **1-5** e **17-23** foram obtidos com espectrômetro Varian YH-300, em campo magnético operando em 7,0 Tesla (T), usando um probe multinuclear Varian de 5 mm e a uma temperatura de 22°C quando não especificada. O software Varian foi utilizado para adquirir e processar os espectros de 1D e 2D. Para a seqüência de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  aplicou-se, respectivamente, um pulso de 20,1  $\mu\text{s}$  (ângulo de pulso=90,0 graus) e 14,0  $\mu\text{s}$  (ângulo do pulso=90,0 graus). Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos com 32 transientes e 30K pontos e processados com 16K pontos. Os experimentos de NOESY foram obtidos usando-se um tempo de mistura de 0,3 s. Os espectros de RMN dos compostos **25-32** foram obtidos com espectrômetro Bruker DMX, em campo magnético operando em 7,0 T. Os espectros de RMN dos compostos **6-15** foram obtidos com espectrômetro Bruker DMX, em campo magnético operando em 11,7 T. Já os espectros de RMN dos compostos **16** e **24** foram obtidos com espectrômetro Bruker AVANCE DMX, em campo magnético operando em 14,0 T. Utilizou-se um probe QXI inverso de 5 mm e a temperatura foi ajustada em 25°C, quando não especificada, controlada por uma unidade Eurotherm de temperatura variável com precisão de 0,1 °C. O Software Bruker XWINNMR foi utilizado para adquirir e processar os espectros de 1D e 2D. De forma geral, o número de aquisições foi de 32 para os espectros de NOESY e COSY.

Além disso, os espectros foram gravados com 1K pontos de dados complexos em F2 para cada incremento de 480-512 t1 com uma janela de 10,24 ppm. Os experimentos de NOESY para o composto **10** foram feitos com tempo de mistura entre 0,1 e 0,7 s.

### 3.2.2. Demais experimentos de RMN

Os experimentos de determinação de dependência do deslocamento químico do hidrogênio NH com a concentração foram efetuados entre 5 e 7 diferentes concentrações (entre 1 e 50 mM). Os coeficientes de temperatura dos hidrogênios NH foram estudados através da aquisição de espectros de 1D a dez diferentes temperaturas entre -25 e +55°C para as soluções em CDCl<sub>3</sub> e oito diferentes temperaturas entre 25 e 80°C para as soluções em DMSO-*d*<sub>6</sub> e apresentados em ppb/K. As velocidades de troca de H/D foram determinadas através da aquisição de espectros de RMN de <sup>1</sup>H após a adição de CD<sub>3</sub>OD em uma solução de CDCl<sub>3</sub> (1:1). Terminou-se os experimentos quando os hidrogênios foram completamente substituídos por deutério. Integrou-se os sinais de hidrogênio NH de cada espectro e traçou-se gráficos de logaritmo da integração em função do tempo. A inclinação destas retas resultou nas constantes de troca de H/D.

### 3.2.3. Cálculos Teóricos

Os cálculos teóricos foram obtidos em uma *workstation Silicon Graphics O2R10000* utilizando-se o pacote de modelagem molecular *Cerius2* e processados em uma *workstation Silicon Graphics SGI Origine2000*. O campo de força DREIDING foi utilizado para a primeira energia de otimização, a qual foi computada até convergência (definida como um gradiente de energia de 0,001 Kcal.mol<sup>-1</sup>), seguindo o algoritmo de Newton Raphson (ABNR). Dados de EON e restrições de ligação de H (considerando os dados de troca de H/D) foram usados para minimizar uma estrutura sem ligação de H. Restrições de distância internuclear para hidrogênios que apresentaram correlações NOESY foram estimadas entre 2,0 e 4,0 Å, de acordo com as distâncias estimadas pelo Programa Aurelia (Software Bruker).<sup>56</sup> Os cálculos de dinâmica molecular foram realizadas usando-se uma constante dielétrica para uma aproximação do efeito do solvente.<sup>57</sup> A dinâmica foi calculada aquecendo-se o sistema a 1000K e resfriando-se exponencialmente até 0K em um tempo de *time step* de 0,001 ps. A simulação *annealing* foi repetida 10 vezes e as estruturas resultantes foram minimizadas usando-se um método de gradiente, gerando um conjunto de aproximadamente 2000 estruturas. Para as estruturas **9**, **12** e **13** foram testadas conformações iniciais onde a

ligação de H era estabilizada por ambos NH(1) e NH(2). As estruturas resultantes foram comparadas com os dados de RMN. Da mesma forma, ligações de H intra e intercadeia foram testadas para todos os compostos, sendo observada a tendência de formação de conformação intracadeia para as estruturas pentacíclicas e intercadeia para as tricíclicas, com exceção da estrutura **22**. As estruturas de mais baixa energia dos cálculos de MD foram agrupadas em famílias. Elegeram-se 10 membros de cada família para calcular o valor de RMSD e comparar com dados experimentais de RMN. A família com menor desvio destes dados e com pequeno valor de RMSD foi escolhida. A estrutura de mais baixa energia desta família foi minimizada pelos métodos semi-empíricos PM3 e AM1 e, então, por cálculos *ab initio*.<sup>58</sup> Os métodos semi-empíricos foram calculados utilizando-se MOPAC6 com o processo de convergência Camp-King (definido como um gradiente de 0,001 Kcal.mol<sup>-1</sup>). Os cálculos *ab initio* foram realizados usando-se o programa Gaussian94. Realizou-se cálculos Hartree-Fock com a base padrão 6-31G\*\*. Optou-se pela base 6-31G ao invés de 3-21G, uma vez que a primeira é uma base maior, podendo fornecer maior precisão nos cálculos. Além disso, foram utilizadas funções de polarização (p e d) e a base 3-21G é muito pequena para suportar estas funções (elas se tornam desbalanceadas). Todas as possibilidades de conformação intra e intermolecular foram minimizadas através de cálculos AM1 (mesmo para estruturas com desvio dos dados de NOE), comparando-se os momentos de dipolo e as energias relativas com as estruturas mais prováveis. Para estudar o efeito de solvente, utilizou-se o método “*self-consistent isodensity surface polarized continuum model*” (SCIPCM), estimando-se a energia de solvatação no nível HF/6-31G\*\*.<sup>13</sup> Aplicou-se um valor de isosuperfície de 0,001 e os cálculos foram efetuados somente em CHCl<sub>3</sub> ( $\epsilon = 5.0$ ), uma vez que o modelo não é muito apropriado para solventes que possuam grandes interações específicas com o soluto. Das estruturas resultantes de cálculos de dinâmica molecular, semi-empírico e *ab initio*, obteve-se os valores de  $J^3_{\text{HCNH}}$ , os quais foram comparados com os valores experimentais.

### 3.3. SÍNTESE

#### Preparação do *endo*-tríciclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-4,9-dieno-3,6-*endo-endo*-diol (2)<sup>59</sup>

Aquece-se em torno de 50-60°C uma solução de 49,2 g (0,45 mol) de hidroquinona em 450 mL de uma solução 2% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Adiciona-se 28,7 g (0,25 mol) de KClO<sub>3</sub> e 440 mg (0,24 mmol) de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. A suspensão passa de verde escuro para preta e finalmente amarela. Neste ponto, filtra-se e recristaliza-se em água para obter 40 g de quinona (83% de rendimento).

A reação de Diels-Alder foi realizada da seguinte forma: uma solução de 15 mL de ciclopentadieno em 27 mL de metanol foram adicionados lentamente em uma solução de 18,75 g (173 mmol) de quinona em 40 mL de metanol a 0°C. Após a adição, deixa-se agitando 30 min e filtra-se. Adiciona-se, então, água destilada, aquecendo até que o restante de quinona oleifique no fundo do recipiente. Neste ponto, separa-se este óleo do filtrado e deixa-se resfriar para o aduto *endo*-tríciclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-4,9-dieno-3,6-diona precipitar (52% de rendimento).

A uma solução de 2,8 g aduto (27 mmol) em 250 mL de tolueno são adicionados 40 mL de uma solução 1M de DIBAL-H (em n-hexano) sob atmosfera inerte. Após, deixa-se a solução agitando por 1h e coloca-se a em banho de gelo, onde adiciona-se, lentamente, 50 mL de uma solução de KOH 30%. Deixa-se agitando por mais 1h e extrai-se com éter etílico. O rendimento global desde a reação de Diels-Alder foi de 50%. pf 132 °C (lit.<sup>59</sup> 131-133°C). RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD, 25°C, TMS) δ (ppm) = 1,70 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,00 (s, 2H, CH), 3,50 (s, 2H, CH), 4,95 (m, 2H, CH), 5,90 (s, 2H, CH), 6,30 (s, 2H, CH) RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ (ppm) = 44,0; 46,0; 50,0; 68,0; 130,0; 137,0. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C estão de acordo com os valores da literatura.<sup>59</sup>

**Preparação do Pentáciclo[5.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>3,10</sup>.0<sup>5,9</sup>]undecano-8,11-*exo-exo*-diol (5)<sup>60</sup>** A fotociclização de **2** (1,5g-8,4 mmol) foi realizada em solução de acetato de etila (25mL) via irradiação ultravioleta, utilizando-se uma lâmpada de 100W de Hg por 24 h. Rendimento: 80%. pf 230-231 °C (lit.<sup>60</sup> 232-233°C). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ (ppm) = 33,4; 40,9; 41,3; 44,8; 48,2; 71,2. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C estão de acordo com os valores da literatura.<sup>59, 60</sup>

**Preparação do ( $\pm$ )-Pentaciclo[5.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>3,10</sup>.0<sup>5,9</sup>]undecano-8,11-*endo-exo*-diol (3) e Pentaciclo[5.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>3,10</sup>.0<sup>5,9</sup>]undecano-8,11-*endo-endo*-diol (4)<sup>60</sup>**

A fotociclicização de uma solução de 19g do aduto *endo*-triciclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-4,9-dieno-3,6-diona em 300 mL de acetato de etila por 15h forneceu o composto pentaciclo[5.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>3,10</sup>.0<sup>5,9</sup>]undecano-8,11-diona-(**89**) com 88% de rendimento. RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 38,4; 40,0; 43,5; 44,3; 54,4; 189,7.

A uma solução de 6g de dicetona **89** (34 mmol) em 170 mL de metanol em aparelho de ultra-som a 15<sup>o</sup>C foram adicionados 2,6g de NaBH<sub>4</sub> (68 mmol). Deixou-se reagindo por 1,5h, adicionou-se um pouco de água e concentrou-se a solução. Extraiu-se com acetato de etila à quente, saturando-se a fase aquosa com NaCl, para obter uma mistura de 2:1 de ( $\pm$ )-**3** e **4**, os quais foram separados em coluna cromatográfica eluindo-se com um gradiente de ciclohexano e acetato de etila. Rendimento: 80%. ( $\pm$ )-**3** pf 276-276,5<sup>o</sup>C (lit.<sup>60</sup> 275-276<sup>o</sup>C); RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  (ppm) = 35,7; 39,8; 40,6; 42,0; 43,5; 44,8; 46,0; 47,8; 50,2; 73,5; 74,0. **4** pf 275<sup>o</sup>C (lit.<sup>60</sup> 274<sup>o</sup>C). <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  (ppm) = 34,4; 38,2; 39,7; 42,9; 45,4; 71,5. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C estão de acordo com os valores da literatura.<sup>60</sup>

**Preparação dos peptídeos lineares.** A uma solução de 1,5 mmol do ácido (aminoácido N-protetido), 0,15 mmol de DMAP e 1 mmol da amina (aminoácido C-protetido) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foi adicionado 3 mmol de NMM. Resfria-se a solução e adiciona-se 1,5 mmol de DCC. Após 1h, retira-se o banho de gelo e deixa-se agitando por mais 12h. O bruto reacional é filtrado e purificado em coluna cromatográfica, eluindo-se com ciclohexano e acetato de etila para fornecer os peptídeos lineares. Estes foram hidrolisados em uma solução 1:1 de 1,4-dioxano e NaOH 0,4 N, em uma proporção de 0,7 g de éster para 20 mL de dioxana e 20 mL de NaOH 0,4 N. Deixa-se agitando por 12 h, acidifica-se até atingir um pH=1, satura-se com NaCl e extrai-se com acetato de etila a quente.

**Preparação dos compostos 6-32.** A uma solução a 0<sup>o</sup> C dos dióis **2**, ( $\pm$ )-**3**, **4**, **5** ou *exo*-norborneol (1mmol) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,125mL/mmol) foram adicionados, seqüencialmente, o ácido livre (do amino-ácido ou peptídeo) (3,0 mmol), NN-dimetilaminopiridina (DMAP) (0,3 mmol) e diciclohexilcarbodiimida (DCC) (3,0 mmol). Após 1 h a 0<sup>o</sup> C, a mistura foi agitada por 12h a temperatura ambiente. O precipitado de DCU foi filtrado e lavado com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelado. O filtrado foi evaporado a pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna

cromatográfica de sílica gel, eluída com um gradiente de ciclohexano/acetato de etila para fornecer os produtos 6-32.

**bis-N-(*t*-butoxicarbonil)glicinato de (±)-pentaciclo[5.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>3,10</sup>.0<sup>5,9</sup>]undecan-8,11-endo-exo-diila (6):** Rendimento 72%; sólido amorfo; RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, 3 mM CDCl<sub>3</sub>, 25°C, TMS) δ (ppm) = 1,34 (m, 1H, CH), 1,47 (s, 18H, CH<sub>3</sub>), 1,76 (m, 1H, CH), 2,39-2,87 (m, 8H, CH), 3,84-3,96 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 4,79 (m, 1H, CH), 4,99 (arred, 2H, NH), 5,59 (m, 1H, CH); RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, 50 mM CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 28,5; 35,2; 36,6; 39,1; 39,6; 41,1; 43,1; 44,5; 45,3; 46,5; 75,2; 78,6; 80,0; 156,1; 169,0; 170,3; IV (KBr): ν (cm<sup>-1</sup>) = 3435 (NH), 2977 (CH), 1712 (C=O), 1685 (C=O); CHN calcd. (%) para C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (492): C 60,97; H 7,32; N 5,69 encontrado: C 60,90; H 7,66; N 5,43.

**bis-N-*t*-(butoxicarbonil)-L-alaninato de pentaciclo[5.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>3,10</sup>.0<sup>5,9</sup>]undecan-8,11-endo-exo-diila (7):** Rendimento 63%; sólido amorfo; RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, 3 mM CDCl<sub>3</sub>, 25°C, TMS) δ (ppm) = 1,20 (m, 1H, CH), 1,25-1,36 (m, 6H, CH<sub>3</sub>), 1,47 (s, 18H, CH<sub>3</sub>), 1,76 (m, 1H, CH), 2,41-2,88 (m, 8H, CH), 4,24-4,32 (m, 2H, CH), 4,78 (t, <sup>3</sup>J(H,H)=4 Hz, 1H, CH), 5,04 (arred, 2H, NH), 5,65 (d, <sup>3</sup>J(H,H)=6 Hz, 1H, CH); RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, 50 mM CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 18,7; 19,1; 28,7; 35,4; 36,6; 36,7; 39,2; 39,4; 39,7; 41,1; 41,3; 43,2; 43,4; 44,6; 44,7; 45,4; 45,5; 46,5; 46,7; 49,8; 73,4; 75,4; 78,5; 80,0; 155,4; 173,4; IV (KBr): ν (cm<sup>-1</sup>) = 3434 (NH), 2979 (CH), 1713 (C=O), 1687 (C=O); CHN calcd. (%) para C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (520): C 62,31; H 7,69; N 5,38. encontrado: C 62,09; H 7,91; N 5,35.

**bis-N-*t*-[(butoxicarbonil)glicil]-glicinato de pentaciclo[5.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>3,10</sup>.0<sup>5,9</sup>]undecan-8,11-endo-endo-diila (8):** Rendimento 40%; sólido amorfo; RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, 3 mM CDCl<sub>3</sub>, 25°C, TMS) δ (ppm) = 1,13-1,23 (m, 1H, CH), 1,49 (s, 18H, CH<sub>3</sub>), 1,65-1,73 (m, 1H, CH), 2,45 (m, 2H, CH), 2,59 (m, 2H, CH), 2,68 (m, 2H, CH), 2,90 (m, 2H, CH), 3,87 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 4,06 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 4,66 (m, 2H, CH), 5,29 (arred, 2H, NH), 6,83 (br, 2H, NH); RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, 50 mM CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 28,5; 34,3; 35,4; 39,4; 41,8; 42,4; 43,1; 44,3; 73,6; 80,5; 156,4; 170,0; 170,6. IV (KBr): ν (cm<sup>-1</sup>) = 3436 (NH), 2933 (CH), 1722-1686 (C=O); CHN calcd. (%) para C<sub>29</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub> (606): C 57,43; H 6,93; N 9,24. encontrado: C 56,61; H 6,58; N 8,88.

**bis-*N-t*-[(butoxicarbonil)glicil]-L-alaninato de pentaciclo[5.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>3,10</sup>.0<sup>5,9</sup>]undecan-8,11-endo-endo-diila (9)**: Rendimiento 55%; sólido amorfo; RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, 3 mM CDCl<sub>3</sub>, 25°C, TMS)  $\delta$  (ppm) = 1,12-1,15 (m, 1H, CH), 1,39-1,47 (m, 6H, CH<sub>3</sub>), 1,50 (s, 18H, CH<sub>3</sub>), 1,69-1,71 (m, 1H, CH), 2,39 (m, 2H, CH), 2,45 (m, 1H, CH), 2,50 (m, 1H, CH), 2,70 (m, 3H, CH), 2,80 (m, 1H, CH), 3,78-3,95 (m, 5H, CH<sub>2</sub> e CH), 4,56-4,61 (m, 2H, CH), 4,95-4,99 (m, 1H, CH), 5,43 (arred, 2H, NH), 6,62 (arred, 2H, NH); RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, 50 mM CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 17,9; 28,7; 34,7; 35,8; 39,6; 40,1; 42,8; 45,7; 49,0; 72,3; 80,5; 156,0; 170,0; 171,4. IV (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3423 (NH), 2975 (CH), 1747 (C=O), 1715 (C=O), 1686 (C=O); CHN calcd. (%) para C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub> (634): C 58,67; H 7,26; N 8,83. encontrado: C 60,45; H 7,52; N 8,57.

**bis-*N-t*-[(butoxicarbonil)glicil]glicinato de pentaciclo[5.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>3,10</sup>.0<sup>5,9</sup>]undecan-8,11-exo-exo-diila (10)**: Rendimiento 41%; sólido amorfo; RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, 3 mM CDCl<sub>3</sub>, 25°C, TMS)  $\delta$  (ppm) = 1,49 (s, 18H, CH<sub>3</sub>), 1,52 (m, 1H, CH), 1,73 (m, 1H, CH), 2,52 (m, 2H, CH), 2,67 (m, 4H, CH), 2,76 (m, 2H, CH), 3,87 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 4,00 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 5,10 (arred, 2H, NH), 5,12 (m, 2H, CH), 6,56 (arred, 2H, NH); RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, 50 mM CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 28,0; 32,1; 38,0; 40,2; 42,5; 43,0; 45,0; 76,5; 80,4; 156,4; 169,2; 170,3; IV (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3439 (NH), 2960 (CH), 1720-1688 (C=O); CHN calcd. (%) para C<sub>29</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub> (606): C 57,43; H 6,93; N 9,24. encontrado: C 57,66; H 7,35; N 8,78.

**bis-*N-t*-[(butoxicarbonil)glicil]-L-alaninato de pentaciclo[5.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>3,10</sup>.0<sup>5,9</sup>]undecan-8,11-exo-exo-diila (11)**: Rendimiento 64%; sólido amorfo; RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, 3 mM CDCl<sub>3</sub>, 25°C, TMS)  $\delta$  (ppm) = 1,35-1,40 (m, 6H, CH<sub>3</sub>), 1,49 (s, 18H, CH<sub>3</sub>), 1,54 (m, 1H, CH), 1,74 (m, 1H, CH), 2,35-2,37 (m, 2H, CH), 2,42-2,69 (m, 4H, CH), 2,76 (m, 2H, CH), 3,70-3,87 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 4,51-4,52 (m, 2H, CH), 5,00 (arred, 2H, NH), 5,15-5,20 (m, 2H, CH), 6,55 (arred, 2H, NH); RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, 50 mM CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 18,4; 18,6; 28,5; 34,3; 34,4; 39,6; 39,7; 41,5; 41,6; 42,3; 42,4; 45,7; 45,8; 46,6; 46,7; 48,3; 48,4; 49,2; 77,4; 77,5; 80,5; 156,4; 169,2; 170,3; IV (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3424 (NH), 2978 (CH), 1721-1686 (C=O); CHN calcd. (%) para C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub> (634): C 58,67; H 7,26; N 8,83. encontrado: C 58,87; H 7,63; N 8,55.

**bis-*N-t*-[(butoxicarbonil)glicil]-glicinato de ( $\pm$ )-pentaciclo[5.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>3,10</sup>.0<sup>5,9</sup>]undecan-8,11-endo-exo-diila (12)**: Rendimiento 85%; sólido amorfo; RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, 3 mM



CDCl<sub>3</sub>, 25°C, TMS)  $\delta$  (ppm) = 1,28-1,37 (m, 1H, CH), 1,48 (s, 18H, CH<sub>3</sub>), 1,55-1,60 (m, 1H, CH), 2,09-2,87 (m, 8H, CH), 3,89 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 4,00-4,32 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 4,79-4,86 (m, 1H, CH), 5,37 (m, 2H, NH), 5,43 (m, 1H, NH), 6,05 (m, 1H, CH), 6,58 (m, 1H, NH), 6,73 (m, 1H, NH); RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, 50 mM CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 28,1; 34,8; 36,0; 38,7; 39,2; 40,7; 41,2; 42,7; 43,8; 44,2; 44,9; 46,1; 74,9; 78,6; 80,0; 156,1; 169,0; 170,3; IV (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3436 (NH), 2977 (CH), 1713-1686 (C=O); CHN calcd. (%) para C<sub>29</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub> (606): C 57,43; H 6,93; N 9,24. encontrado: C 56,46; H 6,96; N 8,78.

**bis-N-t-[(butoxicarbonil)glicil]-L-alaninato de pentaciclo[5.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>3,10</sup>.0<sup>5,9</sup>]undecan-8,11-endo-exo-diila (13):** Rendimiento 89%; sólido amorfo; RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, 3 mM CDCl<sub>3</sub>, 25°C, TMS)  $\delta$  (ppm) = 0,88-0,89 (m, 1H, CH), 1,28-1,39 (m, 6H, CH<sub>3</sub>), 1,40 (s, 18H, CH<sub>3</sub>), 1,73-1,78 (m, 1H, CH), 2,39-2,86 (m, 8H, CH), 3,79-3,92 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 4,51-4,76 (arred, 2H, NH), 4,77-5,16 (m, 1H, CH), 5,40 (arred, 2H, NH), 6,58 (m, 1H, NH), 6,72 (m, 1H, NH). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, 50 mM CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 18,2; 28,5; 35,3; 36,3; 39,0; 39,5; 40,9; 42,1; 43,2; 44,3; 44,7; 46,3; 48,7; 75,8; 78,8; 80,4; 156,6; 169,5; 172,3. IV (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3424 (NH), 2978 (CH), 1714-1682 (C=O); CHN calcd. (%) para C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub> (634): C 58,67; H 7,26; N 8,83. encontrado: C 58,56; H 7,23; N 8,35.

**bis-N-t-[(butoxicarbonil)glicilglicil]-glicinato de(±)-pentaciclo[5.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>3,10</sup>.0<sup>5,9</sup>]undecan-8,11-endo-exo-diila (14):** Rendimiento 71 %; sólido amorfo; RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, 3 mM CDCl<sub>3</sub>, 25°C, TMS)  $\delta$  (ppm) = 1,30 (m, 1), 1,40 (s, 18), 1,70 (m, 1), 2,40-2,90 (m, 8), 3,9-3,8 (m, 4), 3,90-4,10 (m, 8), 4,90 (m, 1), 5,50-6,00 (arred, 2), 5,70 (m, 1), 6,90-7,50 (arred, 4). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, 50 mM CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 28,7; 35,5; 36,9; 39,5; 39,7; 41,2; 41,7; 42,2; 42,9; 43,1; 43,5; 44,6; 45,0; 45,5; 47,0; 75,7; 79,8; 80,3; 157,3; 169,1; 170,8; 171,3. CHN calcd. (%) para C<sub>33</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>. 1/2H<sub>2</sub>O (729): encontrado: C 54,33; H 6,70; N 11,53.

**bis-N-t-[(butoxicarbonil)glicilglicil]-glicinato de(±)-pentaciclo[5.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>3,10</sup>.0<sup>5,9</sup>]undecan-8,11-endo-endo-diila (15):** Rendimiento 57%; sólido amorfo; RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, 3 mM CDCl<sub>3</sub>, 25°C, TMS)  $\delta$  (ppm) = 1,10 (m, 1), 1,40 (s, 18), 1,70 (m, 1), 2,30-2,90 (m, 8), 3,9 (m, 4), 3,90-4,10 (m, 8), 4,60 (m, 1), 5,00 (m, 1), 5,40-5,80 (arred, 2), 6,90-7,50 (arred, 4). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, 50 mM CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 28,5; 34,2; 35,7; 39,9; 42,0; 42,9; 43,0; 43,5; 44,5; 73,9; 74,0; 80,3; 157,4; 169,2; 170,9; 171,5. CHN calcd. (%) para C<sub>33</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub> (720): encontrado: C 54,97; H 6,69; N 11,60.

**bis-N-t-[(butoxicarbonil)glicilglicil]-glicinato de endo-triciclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-4,9-dien-3,6-endo-endo-diila (16):** Rendimento 50%; sólido amorfo; RMN de <sup>1</sup>H (600 MHz, 3 mM CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 0,80-1,00 (m, 2), 1,40 (s, 18), 2,88 (m, 2), 2,97 (m, 2), 3,70-4,00 (m, 4), 4,06-4,20 (m, 8), 5,21-5,32 (arred, 2), 5,40 (m, 2), 5,50 (m, 2), 5,76 (m, 2), 6,75-7,05 (arred, 2). RMN de <sup>13</sup>C (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 28,5; 34,4; 38,5; 41,9; 43,3; 45,0; 46,1; 71,0; 80,3; 128,0; 136,0; 157,4; 169,2; 170,9; 171,5. CHN Calcd. para C<sub>33</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>: C, 55,00; H, 6,67; N, 11,67. encontrado: C, 54,77; H, 6,98; N, 11,44.

**bis-N-t-[(butoxicarbonil)glicil]-glicinato de endo-triciclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-4,9-dien-3,6-endo-endo-diila (17):** Rendimento 97%; pf 86-87 °C; RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, 3 mM CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1,19-1,29 (m, 2), 1,40 (s, 18), 2,88 (arred, 2), 2,97 (br, 2), 3,80-3,82 (m, 4), 4,06-4,12 (m, 4), 5,05 (arred, 2), 5,30 (m, 2), 5,39-5,42 (m, 2), 5,74 (m, 2), 6,57 (br, 2). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 28,2; 37,9; 41,2; 45,7; 48,5; 70,8; 80,3; 127,7; 135,4; 156,0; 169,4. IV (KBr) ν (cm<sup>-1</sup>) = 3335, 2982, 2928, 1742, 1705, 1681; CHN calcd. para C<sub>29</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>: C, 57,43; H, 6,93; N, 9,24. encontrado: C, 57,18; H, 7,17; N, 8,96.

**bis-N-t-[(butoxicarbonil)glicil]-L-alaninato de endo-triciclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-4,9-dien-3,6-endo-endo-diila (18):** Rendimento 94%; pf 74-75 °C; RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, 3 mM CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1,19-1,21 (m, 2), 1,40 (s, 18), 1,43-1,46 (m, 9), 2,76-2,83 (m, 2), 2,98 (m, 2), 3,76 (m, 4), 4,55-4,63 (m, 2), 5,06 (arred, 2), 5,29 (m, 2), 5,36 (m, 2), 5,75 (arred, 2), 6,6 (m, 2); RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 18,0; 18,2; 28,2; 37,8; 43,9; 45,6; 48,0; 48,4; 70,6; 80,0; 127,5; 127,8; 135,1; 135,7; 156,0; 171,2; 169,4; 172,3; 172,4. IV (KBr) ν (cm<sup>-1</sup>) = 3325, 2979, 2934, 1722, 1708, 1694; CHN calcd. para C<sub>30</sub>H<sub>45</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>: C, 58,67; H, 7,26; N, 8,83. encontrado: C, 58,64; H, 7,23; N, 9,15.

**bis-N-t-(butoxicarbonil)-glicinato de endo-triciclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-4,9-dien-3,6-endo-endo-diila (19):** Rendimiento 89%; pf 68-70 °C; RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, 3 mM CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1,25-1,33 (m, 2), 1,47 (s, 18), 2,80 (br, 2), 3,07 (br, 2), 4,00 (m, 4), 5,07 (arred, 2), 5,48 (s, 2), 5,42 (arred, 2), 5,80 (s, 2). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 28,2; 38,0; 42,0; 46,0; 48,0; 70,1; 80,0; 127,9; 135,8; 156,0; 170,0. IV (KBr) ν (cm<sup>-1</sup>) = 3384, 2976, 2928, 1742, 1711; CHN calcd. para C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>.3/2H<sub>2</sub>O: C, 57,80; H, 7,51; N, 5,36. encontrado: C, 57,20; H, 7,27; N, 5,67.

**bis-*N-t*-(butoxicarbonil)-L-alaninato de *endo*-triciclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-4,9-dien-3,6-*endo*-*endo*-diila (20)**: Rendimiento 55%; pf 73-74°C; RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, 3 mM CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1,19-1,24 (m, 2), 1,39 (s, 18), 1,51 (s, 9), 2,75-2,83 (m, 2), 2,99 (arred, 2), 4,30 (m, 2), 4,97 (arred, 2), 5,28-5,29 (m, 2), 5,34-5,37 (m, 2), 5,76 (s, 2). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 18,8; 19,0; 28,6; 38,1; 38,2; 45,9; 46,0; 48,7; 49,6; 70,6; 70,7; 80,0; 128,1; 135,5; 135,7; 135,9; 156,0; 171,5. IV (KBr) ν (cm<sup>-1</sup>) = 3370, 2980, 2936, 1744, 1715; CHN calcd. para C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>·3/2H<sub>2</sub>O: C, 59,20; H, 7,31; N, 5,12. encontrado: C, 58,59; H, 7,96; N, 5,31.

**bis-*N-t*-(butoxicarbonil)-L-phenil alaninato de *endo*-triciclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-4,9-dien-3,6-*endo*-*endo*-diila (21)**: Rendimiento 95%; pf 72-73 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, 3 mM CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1,18-1,25 (m, 2), 1,40 (s, 18), 2,58-2,63 (m, 2), 2,80-2,97 (m, 2), 3,03-3,15 (m, 4), 4,54 (arred, 2), 4,83-4,99 (m, 2), 5,01-5,2 (m, 2), 5,22-5,38 (arred, 2), 5,60 (s, 2), 7,02-7,30 (m, 5). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 28,2; 37,8; 37,9; 38,4; 38,6; 45,7; 48,4; 54,5; 54,6; 70,4; 80,0; 127,1; 128,6; 128,6; 129,2; 129,3; 135,5; 136,0; 155,8; 171,5. IV (KBr) ν (cm<sup>-1</sup>) = 3445, 3378, 2970, 2934, 1736, 1711; CHN calcd. para C<sub>39</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>: C, 69,64; H, 7,14; N, 4,17. encontrado: C, 69,91; H, 7,17; N, 4,41.

**bis-*N-t*-(butoxicarbonil)-βalaninato de *endo*-triciclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-4,9-dien-3,6-*endo*-*endo*-diila (22)**: Rendimiento 94%; pf 55-56<sup>0</sup>C; RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, 3 mM CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1,22-1,40 (m, 2), 1,40 (s, 18), 2,60 (m, 4), 2,80 (m, 2), 3,02 (m, 2), 3,41 (m, 4), 5,00 (arred, 2), 5,38 (m, 2), 5,42 (m, 2), 5,80 (m, 2). RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, 50 mM CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 28,1; 34,4; 36,0; 37,7; 45,6; 48,2; 69,4; 79,1; 127,6; 135,1; 155,5; 171,6. IV (KBr) ν (cm<sup>-1</sup>) = 3372, 2982, 2934, 1746, 1717; CHN calcd. para C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>·H<sub>2</sub>O: C, 60,22; H, 7,43; N, 5,20. encontrado: C, 60,31; H, 7,78; N, 5,46.

***N-t*-(butoxicarbonil)-glicinato de biciclo[2.2.1]heptila-2-*exo* (23)**: Rendimiento 90%, sólido amorfo; RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, 3 mM CDCl<sub>3</sub>, 25°C, TMS) δ (ppm) = 1,00-1,20 (m, 2H, CH), 1,20-1,70 (m, 6H, CH), 1,40 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 2,43 (m, 2H, CH), 3,76 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,60 (m, 1H, CH), 4,85 (arred, 1H, NH). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, 50 mM CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 23,7; 27,7; 27,9; 34,8; 34,9; 39,0; 40,9; 42,2; 78,0; 79,1; 155,9; 169,6. IV (KBr) ν (cm<sup>-1</sup>) = 3378, 2965, 1718, 1690; CHN calcd. (%) para C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub> (269): C 62,45, H 8,55, N 5,20. encontrado: C 62,33, H 8,67, N 5,12.

***N-t*- [(butoxicarbonil)glicil]-glicinato de biciclo[2.2.1]heptila-2-*exo* (24)**: Rendimiento 91%, sólido amorfo; RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz, 3 mM  $\text{CDCl}_3$ , 25°C, TMS)  $\delta$  (ppm) = 1,12-1,22 (m, 5H, CH), 1,49 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 1,52-1,54 (m, 1H, CH), 1,74-1,78 (m, 2H, CH), 2,34 (m, 2H, CH), 3,88 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4,03 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4,71 (d,  $^3\text{J}(\text{H,H})=7$  Hz, 1H, CH), 5,00 (arred, 1H, NH), 6,45 (arred, 1H, NH); CHN calcd. (%) para  $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5$  (326): C 58,90; H 7,98; N 8,59. encontrado: C 58,88, H 8,00, N 8,57.

***bis-N-t*- [(butoxicarbonil)-L-valil]-L-fenilalaninato de *endo*-triciclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-4,9-dien-3,6-*endo-endo*-diila (25)**: Rendimiento 72 %; sólido amorfo; RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, 3 mM  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 0,50-0,90 (m, 6), 1,10 (m, 1), 1,40 (s, 18), 1,60 (m, 1), 2,00 (m, 2), 2,40-2,90 (m, 4), 3,10 (m, 4), 3,90 (m, 2), 4,90 (m, 2), 5,00-5,40 (m, 6), 5,60 (m, 2), 6,70 (m, 2), 7,00-7,30 (m, 10); RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, 50 mM  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 18,0; 18,5; 20,0; 29,0; 31,5; 38,5; 38,6; 46,0; 49,0; 54,5; 60,0; 70,1; 80,3; 127,5; 128,0; 129,0; 129,5; 135,8; 156,0; 169,4. CHN calcd. (%) para  $\text{C}_{49}\text{H}_{66}\text{N}_4\text{O}_{10}$  (870): C 67,59; H 7,59; N 6,44. encontrado: C 67,60; H 7,63; N 6,42.

***bis-N-t*- [(benziloxycarbonil)-L-valil]-L-fenilalaninato de *endo*-triciclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-4,9-dien-3,6-*endo-endo*-diila (26)**: Rendimiento 48 %; sólido amorfo; RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, 3 mM  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 0,60-0,90 (m, 6), 1,10 (m, 1), 1,30 (m, 4), 1,60 (m, 1), 2,00 (m, 2), 2,50-2,90 (m, 4), 3,00 (m, 4), 4,10 (m, 2), 4,90-5,40 (m, 6), 5,60 (m, 2), 5,80 (arred, 2), 7,00-7,40 (m, 22); RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, 50 mM  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 18,0; 18,5; 20,0; 32,0; 38,5; 38,6; 46,0; 49,0; 54,5; 60,0; 67,0; 70,1; 127,5; 128,2; 128,5; 128,7-129,1; 129,6; 135,8; 156,0; 169,0. CHN calcd. (%) para  $\text{C}_{55}\text{H}_{62}\text{N}_4\text{O}_{10}$  (938): C 70,36; H 6,61; N 5,97. encontrado: C 70,32; H 6,65; N 6,59.

***bis-N-t*-[(butoxicarbonil)-L-valil]-L-fenilalaninato de pentaciclo[5.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>3,10</sup>.0<sup>5,9</sup>]undecan-8,11-*endo-exo*-diila (27)**: Rendimiento 55 %; sólido amorfo; RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, 3 mM  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 0,70-0,90 (m, 6), 1,10 (m, 1), 1,40 (s, 18), 1,60 (m, 1), 2,20 (m, 2), 2,30-2,90 (m, 4), 3,10 (m, 4), 3,7 (m, 1), 4,10 (m, 2), 4,90 (m, 3), 5,40 (arred, 2), 7,00 (m, 2), 7,10-7,40 (m, 10); RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, 50 mM  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 17,5; 18,2; 20,0; 29,0; 31,5; 35,5; 36,5; 38,5; 39,5; 39,7; 41,5; 43,5; 45,0; 45,5; 47,0; 54,9; 60,0; 75,0; 79,4; 80,3; 127,3; 128,4; 129,1; 156,0; 169,0. CHN calcd. (%) para  $\text{C}_{49}\text{H}_{66}\text{N}_4\text{O}_{10} \cdot 3/2\text{H}_2\text{O}$  (897): C 65,55; H 7,69; N 6,24. encontrado: C 65,54; H 7,70; N 6,20.

**bis-*N-t*-[(benziloxicarbonil)-L-valil]-L-fenilalaninato de pentaciclo[5.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>3,10</sup>.0<sup>5,9</sup>] undecan-8,11-endo-exo-diila (28):** Rendimiento 53 %; sólido amorfo; RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, 3 mM CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 0,70-0,90 (m, 6), 1,10 (m, 1), 1,30 (m, 4), 1,60 (m, 1), 2,20 (m, 2), 2,30-2,90 (m, 4), 3,10 (m, 4), 3,7 (m, 1), 4,10 (m, 2), 4,90 (m, 3), 5,40 (arred, 2), 7,00 (m, 2), 7,10-7,40 (m, 20); RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, 50 mM CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 17,5; 18,2; 20,0; 31,5; 35,5; 36,5; 38,5; 39,5; 39,7; 41,5; 43,5; 45,0; 45,5; 47,0; 54,9; 60,0; 68,0; 75,0; 79,4; 80,3; 127,0-129,5; 156,0; 169,0. CHN calcd. (%) para C<sub>55</sub>H<sub>62</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>.H<sub>2</sub>O (956): C 69,04; H 6,69; N 5,86. encontrado: C 69,00; H 6,70; N 5,84.

**bis-*N-t*-[(butoxicarbonil)-L-valil]-L-fenilalaninato de (±)-pentaciclo[5.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>3,10</sup>.0<sup>5,9</sup>] undecan-8,11-endo-endo-diila (29):** Rendimiento 31%; sólido amorfo; RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, 3 mM CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 0,70-0,90 (m, 6), 1,10 (m, 1), 1,40 (s, 18), 1,60 (m, 1), 2,20 (m, 2), 2,30-2,70 (m, 4), 3,10 (m, 4), 3,7 (m, 1), 4,00 (m, 2), 4,80 (m, 2), 4,90 (m, 1), 5,20-5,30 (arred, 2), 6,80-6,90 (arred, 2), 7,10-7,40 (m, 10); RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, 50 mM CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 20,0; 29,0; 31,5; 34,5; 36,0; 38,0; 38,5; 39,5; 40,0; 43,0; 43,5; 46,0; 54,0; 60,0; 72,0; 74,0; 80,3; 127,5; 129,1; 129,7; 156,0; 169,0. CHN calcd. (%) para C<sub>49</sub>H<sub>66</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>.H<sub>2</sub>O (888): C 66,22; H 7,66; N 6,31. encontrado: C 66,21; H 7,69; N 6,28.

**bis-*N-t*-[(benziloxicarbonil)-L-valil]-L-fenilalaninato de (±)-pentaciclo[5.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>3,10</sup>.0<sup>5,9</sup>] undecan-8,11-endo-endo-diila (30):** Rendimiento 46 %; sólido amorfo; RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, 3 mM CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 0,70-0,90 (m, 6), 1,10 (m, 1), 1,30 (m, 4), 1,60 (m, 1), 2,10 (m, 2), 2,30-2,70 (m, 4), 3,10 (m, 4), 3,7 (m, 1), 4,00 (m, 2), 4,80 (m, 2), 5,10 (m, 1), 5,50-5,80 (arred, 2), 7,00-7,10 (arred, 2), 7,15-7,40 (m, 20); RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, 50 mM CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 18,0; 20,0; 32,0; 34,5; 36,0; 38,0; 38,5; 39,5; 40,0; 43,0; 43,5; 46,0; 54,0; 60,0; 67,0; 72,0; 74,0; 127,5; 128,3-128,6; 128,9-129,1; 129,6-129,8, 156,0; 169,0. CHN calcd. (%) para C<sub>55</sub>H<sub>62</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>.1/2H<sub>2</sub>O (947): C 69,69; H 6,65; N 5,91. encontrado: C 69,68; H 6,65; N 5,90.

**bis-*N-t*-[(butoxicarbonil)-L-valil]-L-fenilalaninato de (±)-pentaciclo[5.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>3,10</sup>.0<sup>5,9</sup>] undecan-8,11-exo-exo-diila (31):** Rendimiento 32 %; sólido amorfo; RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, 3 mM CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 0,70-0,90 (m, 6), 1,10 (m, 1), 1,40 (s, 18), 1,60 (m, 1), 2,10 (m, 2), 2,30-2,70 (m, 4), 3,00 (m, 4), 4,00 (m, 2), 4,70 (m, 2), 5,10 (m, 2), 5,20 (arred, 2), 6,60 (arred, 2), 7,10-7,40 (m, 10); RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, 50 mM CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 19,0; 20,0; 29,0;

37,0; 41,0; 45,0; 46,0; 48,0; 52,0; 54,0; 60,0; 84,0; 134,0; 135,0; 136,0; 156,0; 169,0. CHN calcd. (%) para  $C_{49}H_{66}N_4O_{10}$  (870): C 67,59; H 7,59; N 6,44. encontrado: C 67,57; H 7,60; N 6,44.

***bis-N-t-[(benziloxicarbonil)-L-valil]-L-fenilalaninato de (±)-pentaciclo[5.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>3,10</sup>.0<sup>5,9</sup>] undecan-8,11-exo-exo-diila (32)***: Rendimiento 30 %; sólido amorfo; RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, 3 mM CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 0,70-0,90 (m, 6), 1,10 (m, 1), 1,30 (m, 4), 1,60 (m, 1), 2,10 (m, 2), 2,30-2,70 (m, 4), 3,10 (m, 4), 4,00 (m, 2), 4,70 (m, 2), 5,20 (m, 2), 5,50 (arred, 2), 7,00-7,10 (arred, 2), 7,15-7,40 (m, 20); RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, 50 mM CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 19,0; 20,0; 37,0; 41,0; 45,0; 46,0; 48,0; 52,0; 54,0; 60,0; 67,0; 84,0; 134,0-136,0; 156,0; 169,0. CHN calcd. (%) para  $C_{55}H_{62}N_4O_{10} \cdot H_2O$  (956): C 69,04; H 6,69; N 5,86. encontrado: C 69,01; H 6,69; N 5,85.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 4.1. Escolha das seqüências peptídicas e meio de análise

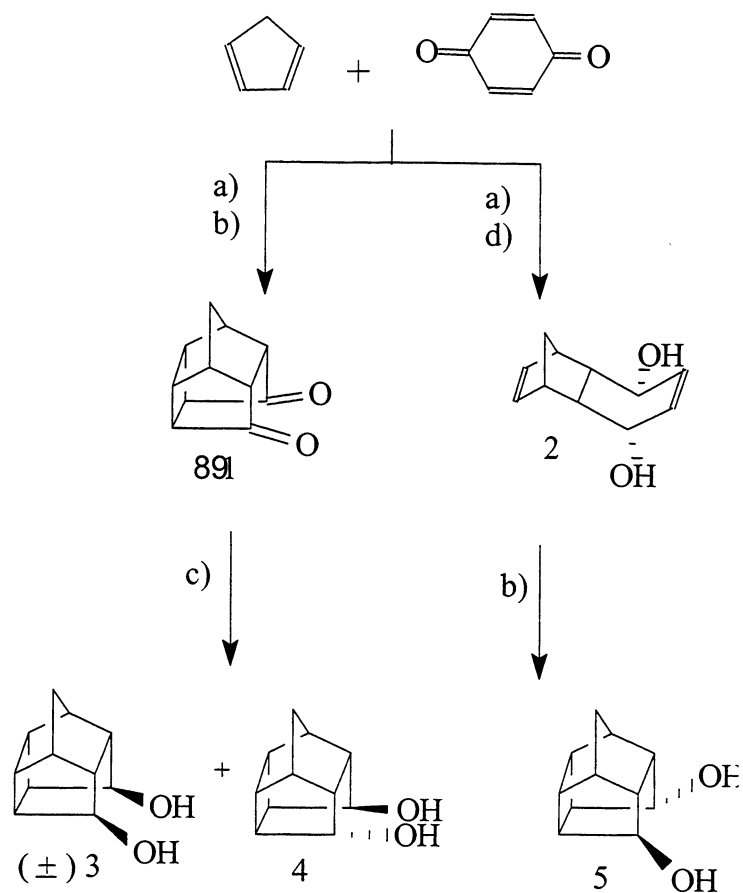
Considerando que a polaridade do solvente pode fornecer uma noção do comportamento do peptídeo nos sítios hidrofóbicos e hidrofílicos da interface de uma membrana e ajudar na compreensão do comportamento de peptídeos em sistemas biológicos,<sup>37b, 61</sup> realizou-se o estudo de análise conformacional dos pseudo-peptídeos sintetizados em diferentes meios, como  $\text{CDCl}_3$ , e  $\text{DMSO-}d_6$ .

A escolha dos resíduos de aminoácidos utilizados baseou-se em estudo realizado anteriormente por Marshall,<sup>6</sup> onde os aminoácidos são classificados segundo sua rigidez conformacional. Dessa forma, três grupos básicos se destacam: (1) glicina, a qual é a mais flexível e com maior área torsional; (2) prolina, que possui rigidez cíclica por natureza; (3) todos os outros resíduos mostram comportamento parecido ao da alanina, a qual possui somente 50% do espaço torsional apresentado pela glicina. Outro estudo, realizado por Hayashi Asai e Ogoshi, mostra que seqüências formadas por aminoácidos apolares interferem menos na conformação induzida pelo ciclo no qual estas seqüências estão ligadas.<sup>62</sup> Dessa forma, inicialmente utilizou-se resíduos formados por Gly, aumentando-se gradativamente a rigidez conformacional através da introdução de aminoácidos apolares e  $\alpha$ -substituídos.

#### 4.2. SÍNTESE

Os compostos pentacíclicos **2-5** foram sintetizados com rendimentos globais de 50% conforme procedimento descrito na parte experimental (Esquema 1). Reagiu-se ciclopentadieno e *p*-benzoquinona em reação de Diels-Alder, gerando o aduto *endo*-tríciclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undecan-4,9-dieno-3,6-diona. Este aduto foi reduzido com DIBAL-H, fornecendo **2** em 50 % de rendimento. Nesta última reação passou-se de um rendimento de 22% para 90% ao trocar o solvente de extração de éter etílico, segundo a literatura,<sup>59</sup> para acetato de etila a quente. O aduto *endo*-tríciclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undecan-4,9-dieno-3,6-diona, resultante da reação de Diels-Alder, foi também submetido sucessivamente às reações de ciclização fotoquímica e de redução, fornecendo os dióis ( $\pm$ )-**3** e **4** numa razão de 1:2. O pentaciclodiol **5** foi obtido através da reação de fotociclização do triciclodiol **2**.



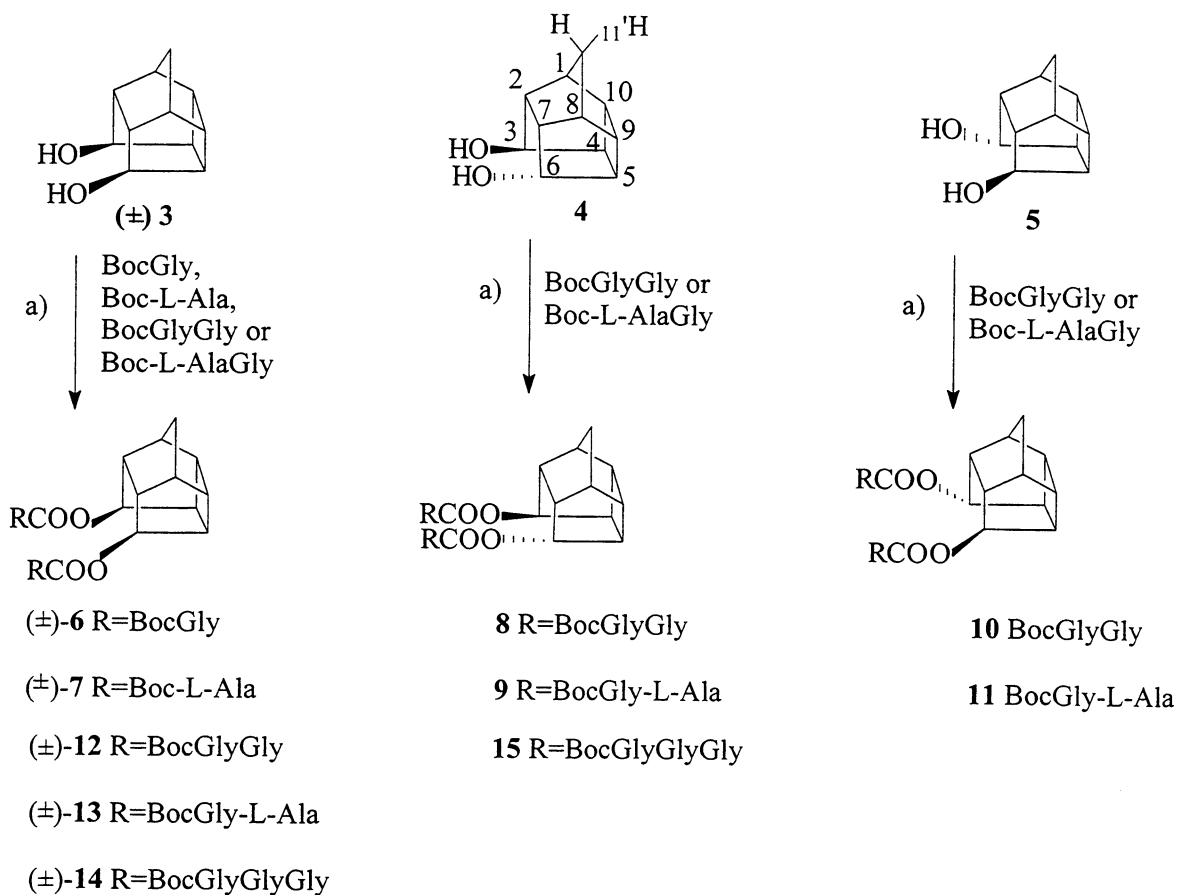


- a)  $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 1h; b)  $h\nu$ ,  $15^\circ\text{C}$ , 15-24h;  
 c)  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , ultra-som, t.a., 1h;  
 d) DIBAL-H,  $\text{C}_7\text{H}_8$ , t.a., 2h.

### Esquema 1

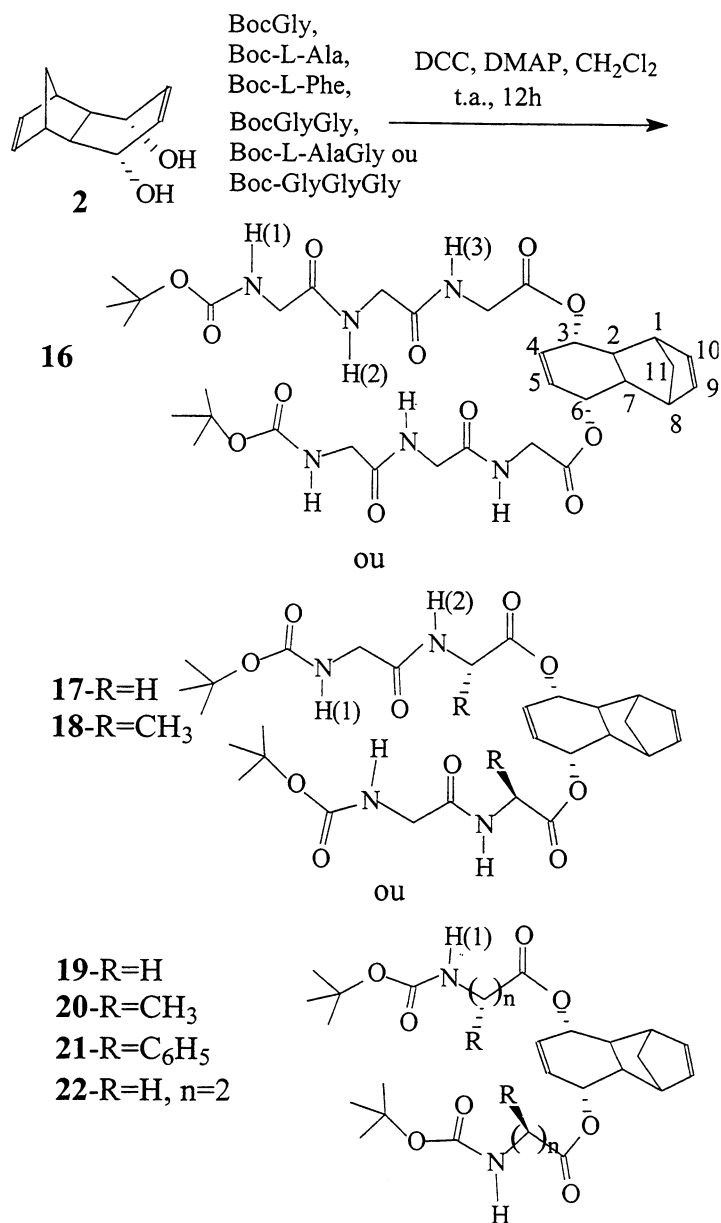
Os dipeptídeos foram obtidos através de condensação em condições clássicas, usando-se diciclohexilcarbodiimida (DCC) como agente ativador do ácido. Os *bis*-amino ácidos e depsipeptídeos foram preparados em uma única etapa através da condensação dos dióis **2**, ( $\pm$ )-**3**, **4**, **5** ou *exo*-norbonano com os amino-ácidos, di ou tripeptídeos *N*-protegidos resultando nos compostos **6-32** (Esquemas 2-4 e Figura 42). Modificando-se o método clássico de extração, passou-se de rendimentos de 60-70% a rendimentos praticamente quantitativos: deixou-se de lavar a fase orgânica com solução de HCl 10% e posteriormente com solução saturada de bicarbonato de sódio para realizar-se diretamente uma cromatografia em coluna do produto bruto de reação. Sintetizou-se separadamente os

peptídeos lineares, seguido de hidrólise dos ésteres com uma mistura de 1,4-dioxano e solução aquosa de NaOH 1 M (1:1 v/v) para posteriormente realizar-se a condensação com os dióis. Nas reações de hidrólise, aumentou-se também os rendimentos ao extrair os respectivos ácidos com acetato de etila a quente.



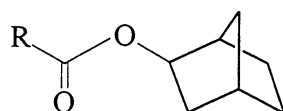
a) DCC, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a., 12h

### Esquema 2



**Esquema 3**

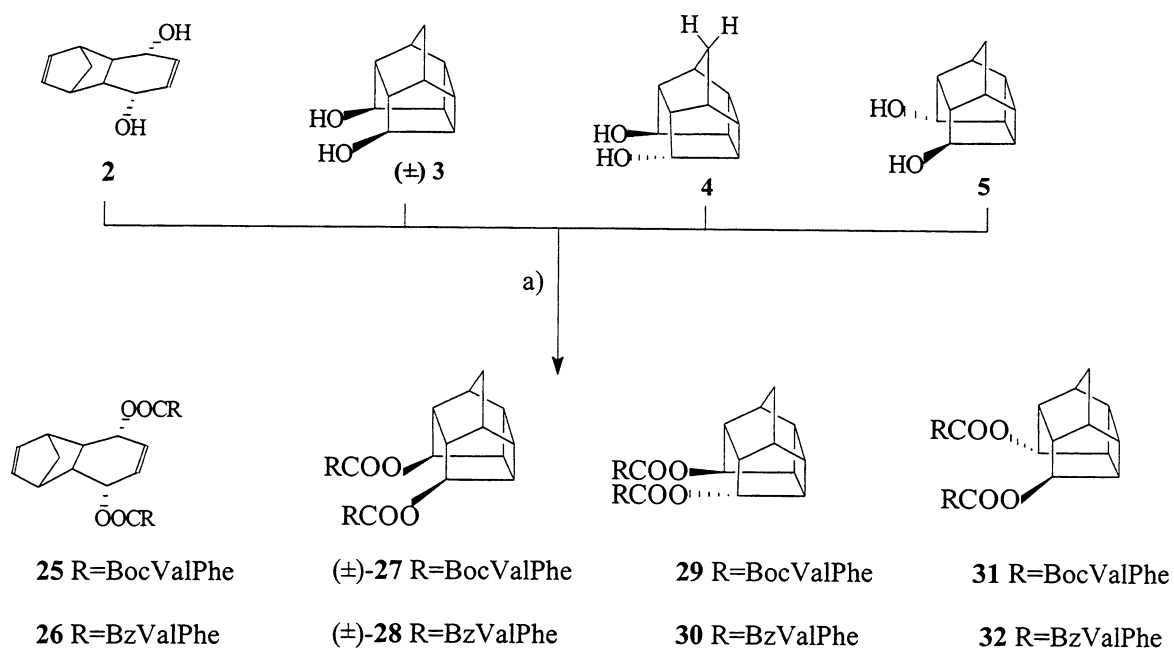
Os compostos **23** e **24** (Figura 42) foram sintetizados para fins de comparação com os derivados tricíclicos e pentacíclicos. Por outro lado, os compostos **25-32** (esquema 4) foram preparados após realização dos estudos de análise conformacional dos demais derivados e de modelagem molecular como moléculas alvo de ensaios biológicos.



23- CH<sub>2</sub>NHBoc

24- CH<sub>2</sub>GlyBoc

**Figura 39.** Pseudopeptídeos derivados do sistema bicíclico



a) BocValPhe ou BzValPhe, DCC, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a., 12h

#### Esquema 4

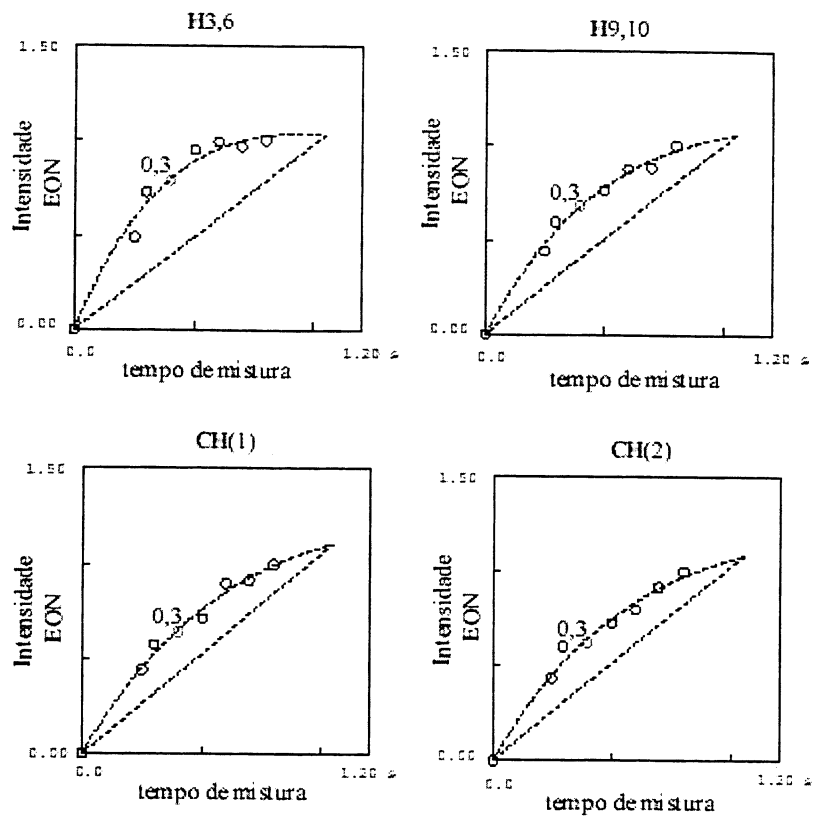
### 4.3. ANÁLISE CONFORMACIONAL

#### 4.3.1. Determinação do tempo de mistura $\tau_m$ , para ser aplicado a todos experimentos de NOESY

Inicialmente, realizou-se um estudo de intensidade de EON a fim de determinar o tempo de mistura apropriado para obter-se o máximo de informações dipolares, guardando uma relação de proporcionalidade direta com a distância inter-atômica. Para tanto utilizou-

se sete valores de tempo de mistura (de 150 a 800 ms) e aplicou-se ao composto **10**. Este estudo é realizado a partir do volume das taxas de correlação de cada espectro de NOESY. Esta estimativa é feita com a ajuda do programa AURELIA 2.0 (Bruker S. A.), que realiza cálculos de segmentação interativa. A segmentação inicia no topo de cada sinal, descendo ao mesmo tempo em que é feita a coleta de dados. Esse processo é repetido diversas vezes. A coleta de dados é realizada até que seja alcançada a segmentação de outro sinal ou seja alcançado o nível mínimo de segmentação (especificado inicialmente). Considerando que os sinais são curvas lorentzianas e que as larguras dos sinais que são comparados são similares, qualquer valor pode ser escolhido para o nível de segmentação. Baixos valores resultam em grandes volumes, os quais são menos influenciados pelo ruído. Entretanto, eles podem apresentar interpenetração de sinais e imperfeições da linha base. Para melhorar os resultados de segmentação, em alguns casos introduz-se dois parâmetros: as áreas de integração máxima ao longo de  $\omega_1$  e  $\omega_2$ .

Traçou-se então um gráfico de volume das taxas de correlação dipolares em função dos tempos de mistura para todos os hidrogênios. Alguns destes gráficos estão exemplificados na Figura 43. Estas curvas apresentam uma primeira parte linear e após um aspecto curvilíneo que traduz o fenômeno de difusão de *spin*. Optou-se então por trabalhar com um valor de tempo de mistura de 300 ms para todas as estruturas analisadas neste trabalho, uma vez que este valor encontra-se numa faixa de correlação linear.



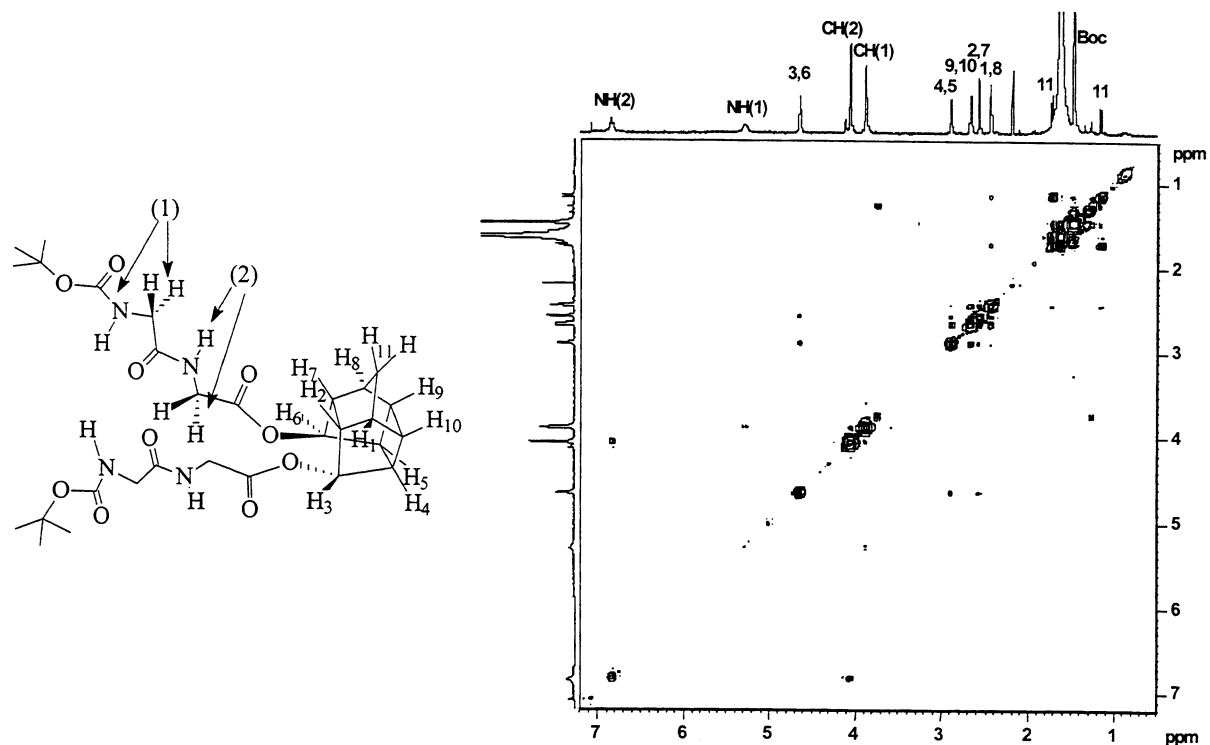
**Figura 43.** Gráficos de Intensidade de EON em função do tempo de mistura para o composto 10.

## 4.3.2. Estudo do Sistema Pentacíclico em solução de $\text{CDCl}_3$

### 4.3.2.1. Sistema *endo-endo*: *bis*-BocGlyGly-pentaciclo – 8

#### Atribuição dos sinais de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$

Os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram atribuídos com base nos espectros COSY e HMQC, ilustrados nas Figuras 44 e 45. Os deslocamentos químicos estão expressos na parte experimental.



**Figura 44.** Espectro COSY do composto 8 em  $\text{CDCl}_3$  adquirido a 500 MHz.

Observa-se as correlações dos hidrogênios NH (NH(1) e NH(2)) e seus respectivos hidrogênios da posição  $\alpha$  (CH(1) e CH(2)). Além disso, podem ser observadas as correlações entre os hidrogênios carbinólicos (3 e 6) e os hidrogênios das posições 4, 5 e 2,7, bem como entre os hidrogênios 1, 8 e os hidrogênios da posição 11. Os hidrogênios 1,8 acoplam com 9,10, os quais estão acoplados a 4,5.

Estes hidrogênios foram correlacionados com seus respectivos carbonos através do espectro HMQC.

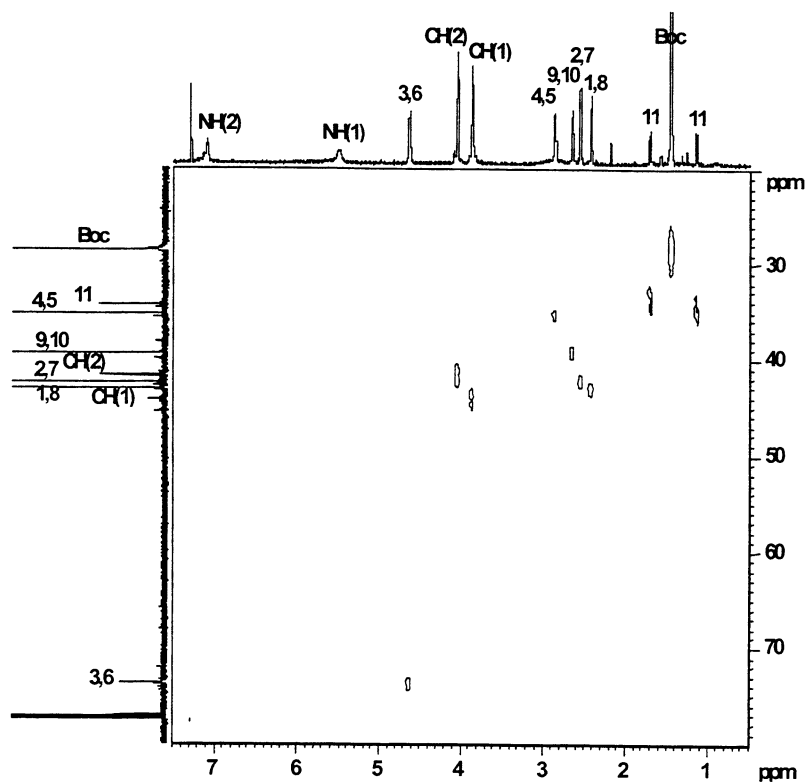


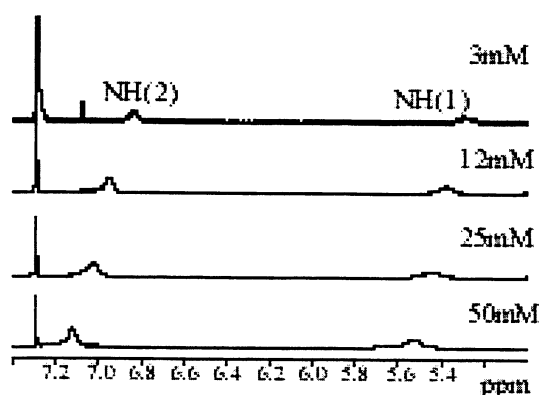
Figura 45. Espectro HMQC do composto 8 em  $\text{CDCl}_3$  adquirido a 500 MHz.



## Determinação de estruturas secundárias

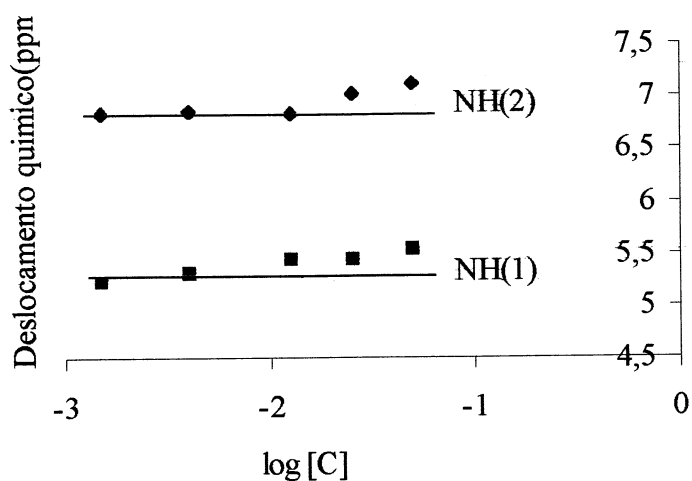
### Estudo de RMN

Os dados da variação do deslocamento químico em função da concentração indicam baixa concentração de agregados entre 1 e 3 mM. A figura 46 representa os espectros correspondentes as concentrações de 3 a 50 mM.



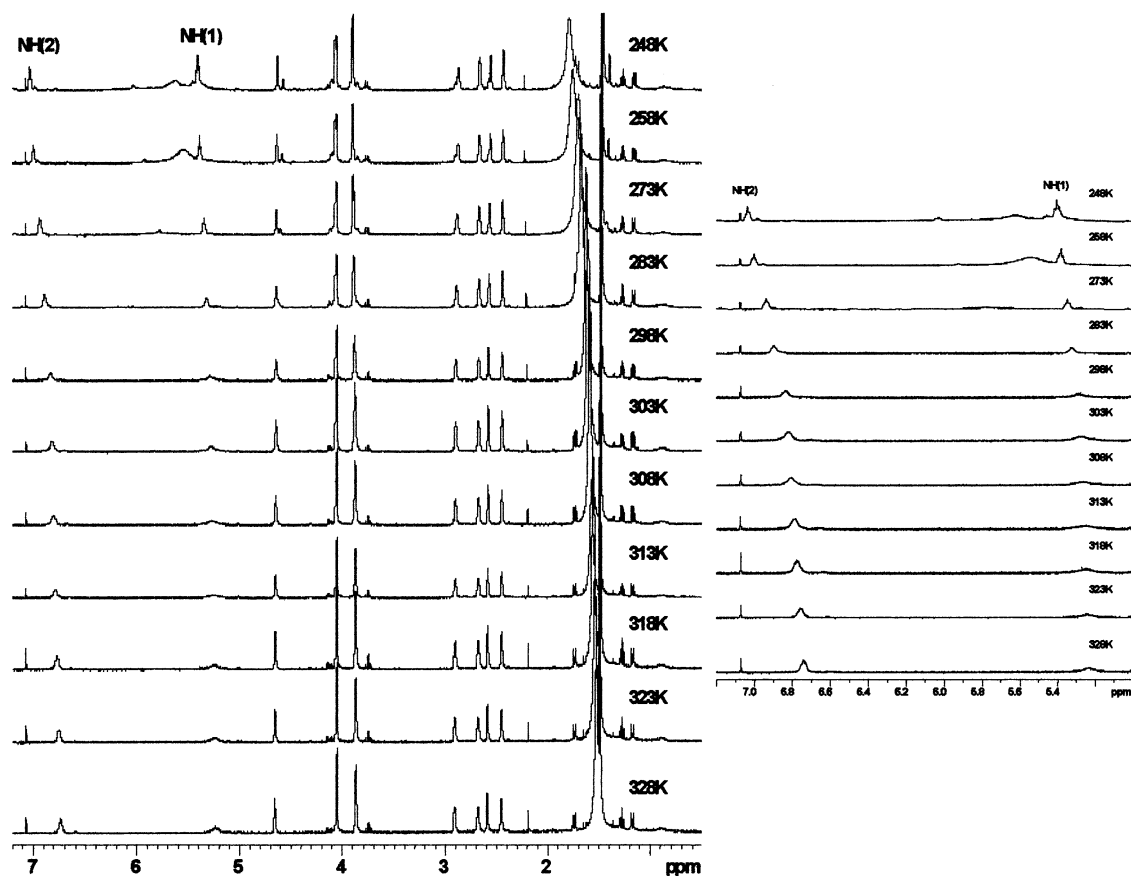
**Figura 46.** Espectros de RMN- $^1\text{H}$  em função da concentração para o composto 8.

O gráfico de deslocamento químico em função do logaritmo da concentração é ilustrado na figura 47, onde pode-se observar que os valores de deslocamento químico dos hidrogênios NH mantêm-se constantes na faixa de concentração de 1 a 3 mM (dois primeiros valores), indicando que a concentração de agregados é mínima. Portanto, todas as demais análises serão realizadas nesta faixa de concentração, como forma de se garantir que são analisadas principalmente ligações de hidrogênio intramoleculares. Os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  dos NH-carbamato [NH(1)] e NH-amida [NH(2)] em solução de concentração 3 mM em  $\text{CDCl}_3$  estão expressos no anexo I.

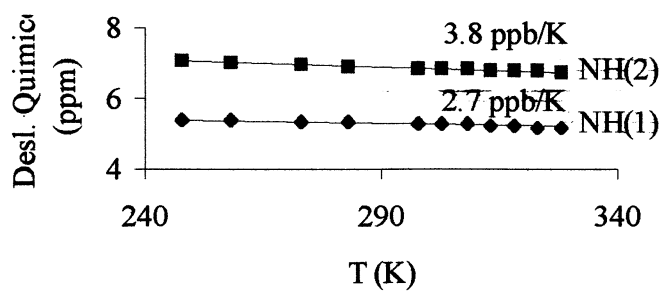


**Figura 47.** Gráfico da variação do deslocamento químico em função do logaritmo da concentração para o composto **8**.

Seguindo os estudos de RMN, realizou-se a análise de RMN à temperatura variável. Os coeficientes de temperatura dos hidrogênios NH foram determinados em estudo de RMN, variando-se a temperatura de 248 a 328K (Figuras 48 e 49). Observou-se uma dependência linear do deslocamento químico, evidenciando ausência de mudanças conformacionais das espécies existentes em solução. Os coeficientes de temperatura de NH(1) e NH(2) foram respectivamente  $-2,7$  e  $-3,8$  ppb/K, o que pode indicar tanto a presença de ligação de hidrogênio quanto de uma espécie livre.



**Figura 48.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **8** em função da temperatura e expansão dos sinais de NH.



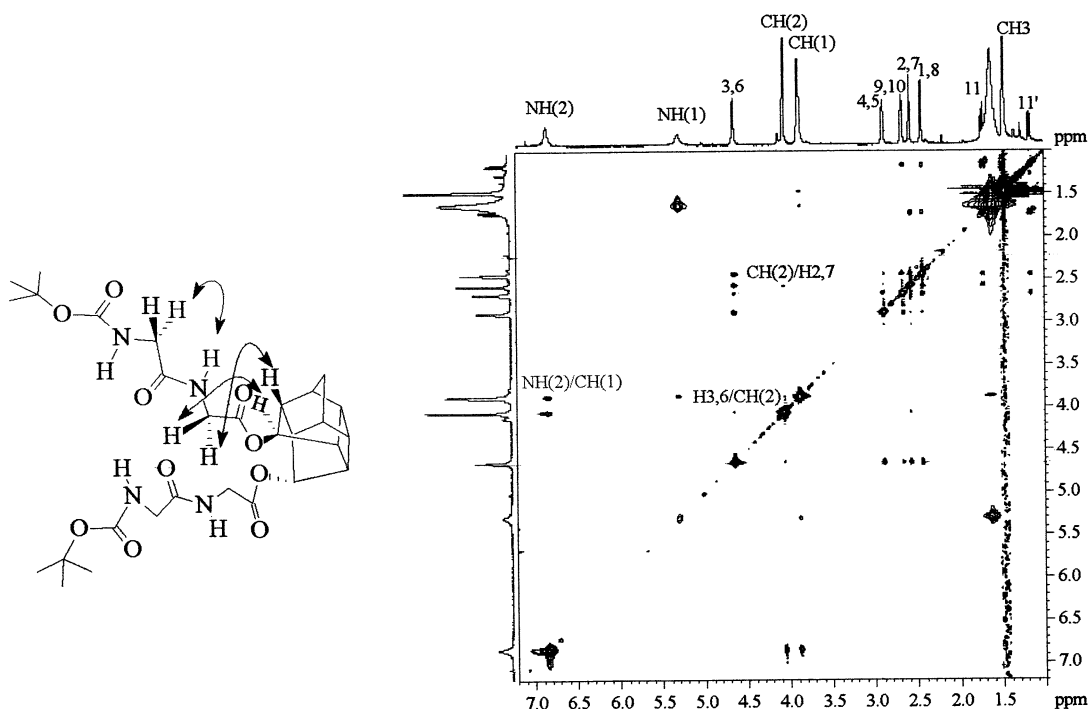
**Figura 49.** Gráfico da variação do deslocamento químico em função da temperatura para **8**.

Valores de constante de acoplamento  $^3J_{\text{HN-CH}\alpha}$  experimentais são importantes dados na análise de estruturas de peptídeos. Devido a sobreposição das duas cadeias de peptídeos,

estas medidas tornaram-se difíceis à temperatura ambiente. Dessa forma, experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos a baixas temperaturas (248K). Constantes de acoplamento de 5,7 e 5,3 Hz foram observadas respectivamente para  $^3J_{\text{HN (1)-CH}\alpha(1)}$  e  $^3J_{\text{HN (2)-CH}\alpha(2)}$ , indicando, possivelmente, a presença de uma conformação restringida por uma ligação de H.

Com o intuito de obter informações mais precisas acerca da formação de ligação de H intramolecular, realizou-se a determinação da velocidade de troca de deutério em solução 1:1 de  $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$  (vide anexo I). As velocidades de troca de deutério para NH(1) e NH(2) foram respectivamente  $1,3 \times 10^{-4}$  e  $10^{-3}$ . A interpretação destas medidas foram feitas comparando-se a magnitude das constantes de velocidade de troca obtidas para os compostos padrões não ligados **23** ( $1,9 \times 10^{-3}$ ) e **24** ( $>10^{-3}$  para ambos hidrogênios NH- vide anexo II). A constante de velocidade de troca de NH(1) é significativamente menor que aquela observada para NH(2) e para os compostos padrões, indicando a presença de ligação de H, a qual retarda a troca destes hidrogênios por deutério. Constantes na ordem de  $10^{-3}$  indicam uma troca instantânea e a presença preponderante de espécies livres nesta temperatura.

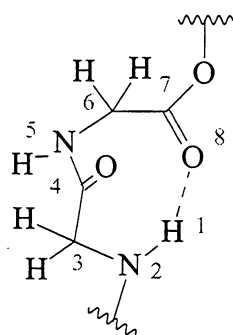
Dados de efeito Overhauser nuclear (Figura 50) fornecem evidências suplementares sobre o tipo de conformação secundária adotada. As correlações mais importantes estão indicadas em azul, vermelho e verde.



**Figura 50.** Espectro NOESY do composto **8** a 298K obtido a 500 MHz.

As correlações entre os hidrogênios CH(2) e os hidrogênios CH das posições 3,6 e 2,7 sugerem ligação de hidrogênio intracadeia. Além disso, correlações típicas de conformação em dobra foram observadas entre os hidrogênios NH(2) e CH(1) (representação em verde). Os hidrogênios das posições 3 e 6 também apresentaram NOE com os hidrogênios das posições 1\8, 2\7, 4\5 e 9\10.

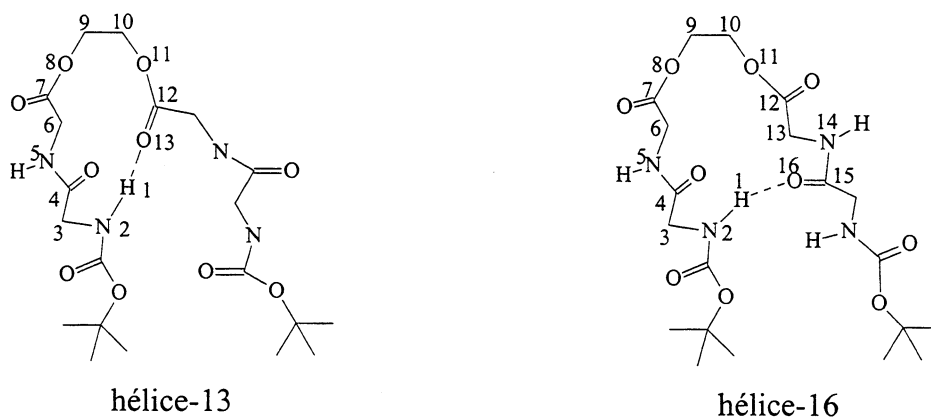
Os dados experimentais acima revelam que este composto mostra uma propensão marcante na estabilização de uma dobra de 8-membros (dobra-C8) através do NH(1) e CO éster. A figura 51 ilustra uma representação esquemática deste tipo de dobra.



**Figura 51.** Representação esquemática de uma dobra-C8, onde um ciclo de 8 membros está envolvido.

### Estudo Teórico

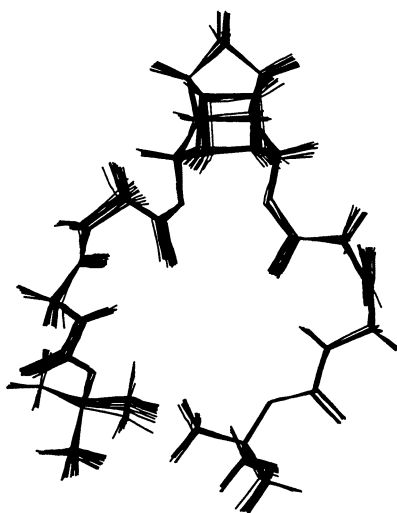
A estabilidade relativa desta estrutura foi analisada através de cálculos teóricos. Inicialmente, técnicas de dinâmica molecular (DM) foram empregadas com o objetivo de determinar as possíveis conformações existentes. Os dados experimentais revelaram que este dipeptídeo apresenta tendência de formação de ligação de hidrogênio intracadeia. Entretanto, dobras intra e intercadeia foram testadas como conformações iniciais, ou seja, estudou-se todas possibilidades de NH(1) formar ligações de H. Dessa forma, três possibilidades foram testadas: anel de 8 membros (dobra-C8) em conformação intracadeia e hélice-13 e 16 em conformações intercadeia (Figura 52).



**Figura 52.** Representação esquemática de dobras de hélice-13 e hélice-16.

Os cálculos de dinâmica molecular indicaram que todas as estruturas minimizadas para a conformação hélice-13 não estão de acordo com os dados de experimentos de NOE e ambas as conformações hélice-13 e hélice-16 não forneceriam espectros relativos a estruturas simétricas, como foi observado em experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

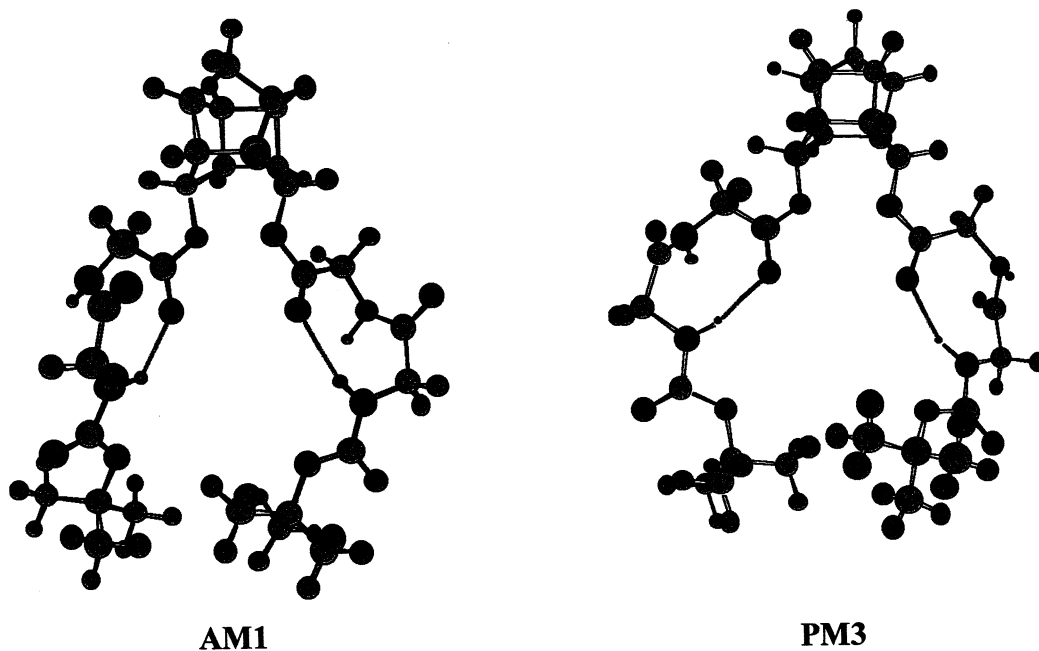
Realizou-se, então, cálculos de dinâmica molecular para a conformação em dobras-C8. Como restrições utilizou-se as distâncias das ligações de H (fixadas em 2Å), das distâncias entre os hidrogênios CH(2) e os hidrogênios CH das posições 3,6 e 2,7 (fixadas em 3Å) e da distância entre os hidrogênios NH(2) e CH(1), também fixada em 3Å. A família de confôrmeros com menor desvio dos dados obtidos experimentalmente foi selecionada. Para realizar o cálculo de RMSD, escolheu-se 10 estruturas de mais baixa energia desta família, as quais estão representadas na Figura 53.



**Figura 53.** Dez estruturas de menor energia para o composto **8** extraídas dos cálculos de dinâmica molecular

A superposição dos átomos das dez estruturas resultou em um RMSD de 0,05 Å, mostrando boa convergência entre estas.

As estruturas de mais baixa energia desta família foi minimizada através de métodos semi-empíricos (AM1 e PM3) e cálculos *ab initio* sem restrições conformacionais (Figuras 54 e 55).



**Figura 54.** Estrutura do composto **8** calculada através de cálculos semi-empíricos AM1 e PM3.



**Figura 55.** Estrutura do composto **8** calculada através de cálculos *ab initio*.

Estas estruturas mostraram distâncias compatíveis com os dados de EONs. Estes valores estão expressos na Tabela 1 para o modelo calculado pelo método *ab initio*.



**Tabela 1.** Distâncias inter-atômicas do modelo de *ab initio* do composto **8**.

Correlações	d (Å)
NH(2)-CH(1)	2,64-2,75
CH(2)-H <sub>3,6</sub>	2,18
CH(2)-H <sub>2,7</sub>	2,28

Comparações dos ângulos diedros  $\Phi$  e  $\Psi$  indicam que as geometrias de MD e *ab initio* possuem uma margem de tolerância de  $20^\circ$ ,<sup>63</sup> indicando que a família obtida por MD é estável quando submetida a cálculos mais precisos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Comparação entre os ângulos diedros  $\Phi$  e  $\Psi$  das geometrias de MD e *ab initio* do composto **8**.

MD		6-31G**	
$\Phi_{\text{HN}(1)\text{CH}\mathbf{8}}$	$\Phi_{\text{HN}(2)\text{CH}\mathbf{8}}$	$\phi_{\text{HN}(1)\text{CH}\mathbf{8}}$	$\phi_{\text{HN}(2)\text{CH}\mathbf{8}}$
-159,8	-174,5	-134,2	-169,0
80,7	-55,1	105,5	-50,9
156,9	-178,8	145,9	-178,5
-83,7	62,4	-94,1	63,6
$\Psi_{\text{HN}(1)\text{CO}\mathbf{8}}$	$\Psi_{\text{HN}(2)\text{CO}\mathbf{8}}$	$\psi_{\text{HN}(1)\text{CO}\mathbf{8}}$	$\psi_{\text{HN}(2)\text{CO}\mathbf{8}}$
5,1	121,2	-4,2	102,2
-122,3	-119,9	-122,3	-138,9
110,4	114,5	108,6	118,8
-6,7	-126,9	-8,8	-122,5

Além disso, estes ângulos de torção permitem calcular valores de  ${}^3J_{\text{HN-CH}\alpha}$  teórico utilizando-se a equação de Karplus adaptada a biomoléculas, chamada de equação de Pardi:<sup>64</sup>

$${}^3J_{HH} = 6,4 \cos^2 \theta - 1,4 \cos \theta + 1,9$$

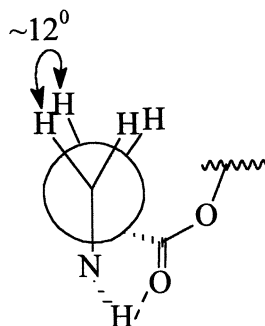
Considerando que existem quatro valores distintos de ângulos diedros para cada C $\alpha$ H (dois para cada cadeia), obteve-se quatro valores de  $^3J_{\text{HN-CH}\alpha}$ . Na tabela 3 são listadas as faixas com os menores e maiores valores.

Como realizado anteriormente por outros autores,<sup>65</sup> esses valores foram comparados com os valores obtidos experimentalmente, encontrando-se uma boa correlação entre estes dados, corroborando a formação da estrutura em dobra-C8 (Tabela 3).

**Tabela 3.** Comparação entre os valores de  $^3J_{\text{HN-CH}\alpha}$  (Hz) teóricos e experimentais para **8**.

<b>Método</b>	$^3J_{\text{HN (1)-CH}\alpha(1)}$	$^3J_{\text{HN (2)-CH}\alpha(2)}$
<b>experimental</b>	5,7	5,3
<b>AM1</b>	4,6-6,6	4,0-6,2
<b>PM3</b>	5,5-6,2	4,4-5,6
<b>6-31G**</b>	5,0-6,8	3,9-6,0

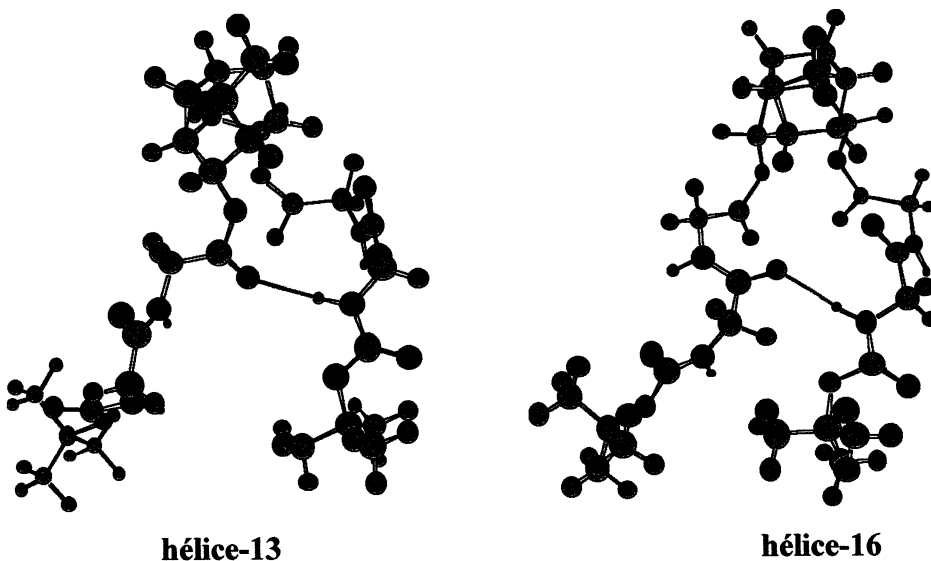
Apesar de uma série de efeitos, como efeitos do meio, não serem considerados, as estruturas calculadas através dos três métodos de cálculos estão de acordo com os resultados experimentais, corroborando com a proposta de modelo para este composto. Ressalta-se que embora anéis de 8 membros não sejam estruturas secundárias clássicas, sua formação pode ser provavelmente explicada tanto pelo baixo impedimento estérico quanto pela flexibilidade torcional apresentados pelos resíduos de Gly, como já foi observado em cadeias similares.<sup>66</sup> Na verdade o ciclo em dobra-C8 está praticamente no mesmo plano e os dois grupamentos metilênicos encontram-se em conformação eclipsada, como mostrado na figura 56. Portanto, adicionais impedimentos estéricos conferidos através da introdução de grupamentos volumosos nestas posições pode acarretar ruptura da ligação de H.



**Figura 56.** Representação geométrica de uma dobra-C8.

Gellman e colaboradores<sup>66</sup> deduziram que esta estrutura era preferida em detrimento de estruturas com ciclos menores (dobra- $\gamma$  e dobra-C6) devido ao ângulo N-H...O ser mais linear.

A boa correlação entre os dados semi-empíricos e *ab initio* permitiu a realização de estudos suplementares utilizando-se o método AM1, o qual apresenta menor custo computacional. Embora tenha sido determinado que conformações intercadeia não são prováveis para este sistema, minimizou-se estas estruturas através do método AM1 e comparou-se as energias de formação com aquela encontrada para a conformação intracadeia (Figura 57 e Tabela 4).



**Figura 57.** Cálculo AM1 das estruturas hélice-13 e hélice-16 do composto 8.

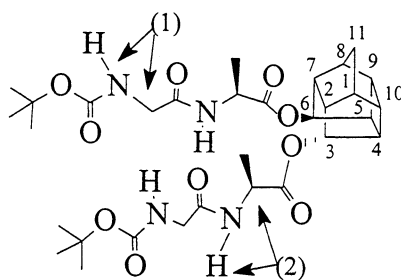
**Tabela 4 .** Energias relativas das conformações intra e intercadeia

<b>Conformações</b>	<b><math>\Delta E</math> (Kcal/mol)</b>
<b>dobra-C8</b>	0,0
<b>hélice-13</b>	34,9
<b>hélice-16</b>	89,1

Observa-se que a conformação em dobra-C8 é 34,9 e 89,1 Kcal/mol mais estável respectivamente que as conformações hélice-13 e hélice-16, tornando improvável a presença de conformações intercadeia para este composto e justificando a formação da estrutura em dobra-C8.

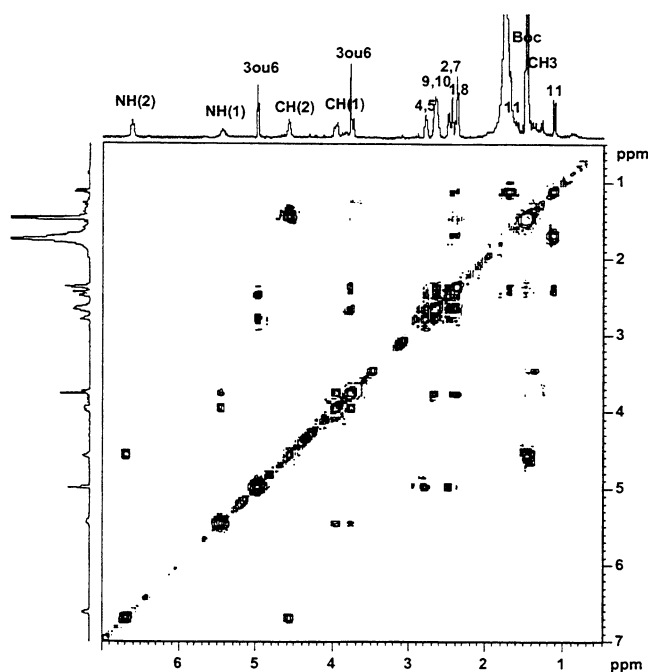
Maiores detalhes sobre os cálculos teóricos são descritos na parte de introdução geral e experimental.

#### 4.3.2.2.Sistema *endo-endo*: Bis-BocGlyAla-Pentaciclo – 9



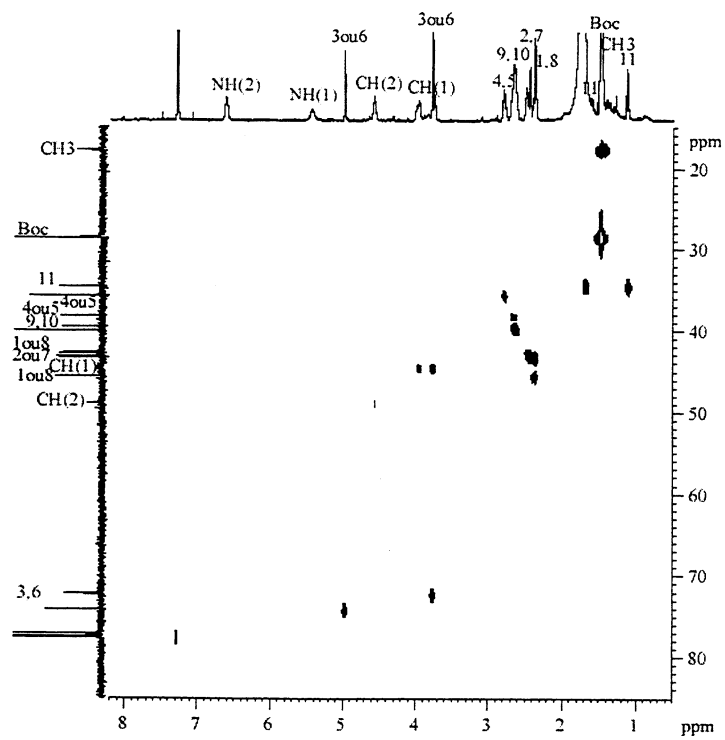
#### Atribuição dos sinais de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$

Os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram atribuídos com base nos espectros COSY e HMQC, ilustrados nas Figuras 58 e 59. Os deslocamentos químicos estão expressos na parte experimental.



**Figura 58.** Espectro COSY do composto **9** em  $\text{CDCl}_3$  adquirido a 500 MHz.

Observou-se as correlações entre NH(2) e CH(2), entre NH(1) e CH(1) e CH(2) e  $\text{CH}_3$  das cadeias peptídicas. As demais correlações são devido principalmente aos hidrogênios do policiclo. Ressalta-se que dois sinais são observados para os hidrogênios carbinólicos do policiclo (separados de mais de 1 ppm), evidenciando uma dessimetria da estrutura. Os hidrogênios foram correlacionados com seus respectivos carbonos através do espectro HMQC.

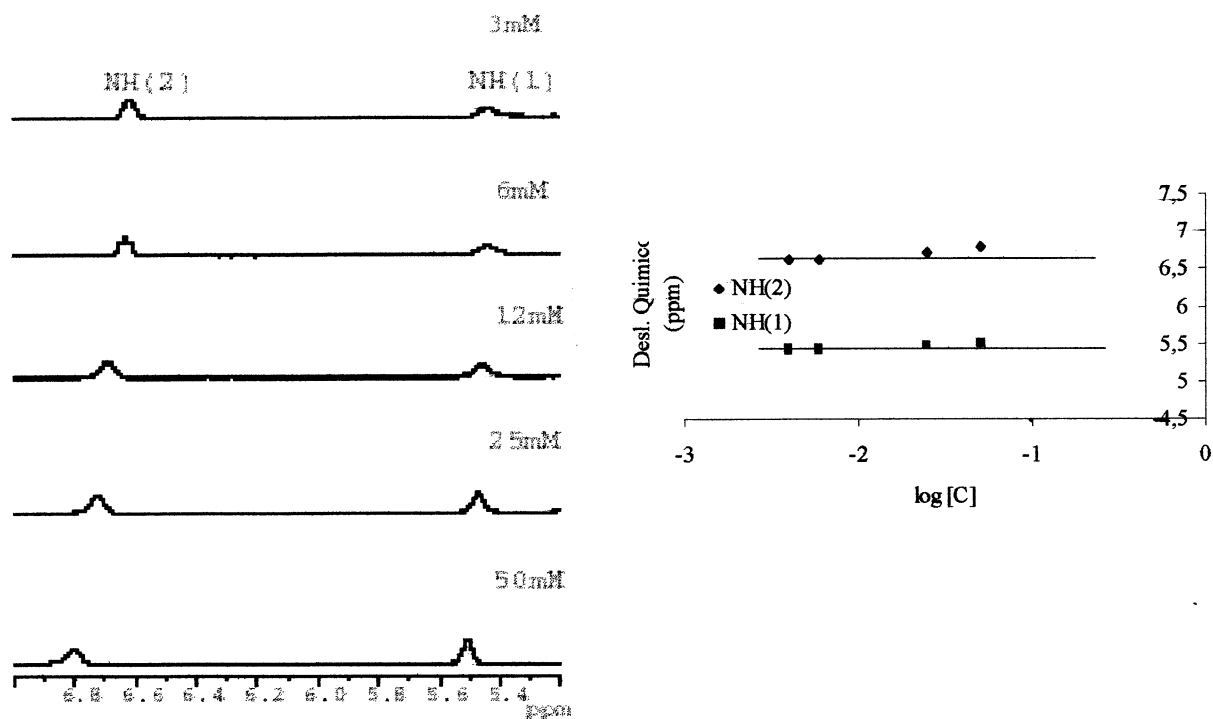


**Figura 59.** Espectro HMQC do composto **9** em  $\text{CDCl}_3$  adquirido a 500 MHz.

## Determinação de estruturas secundárias

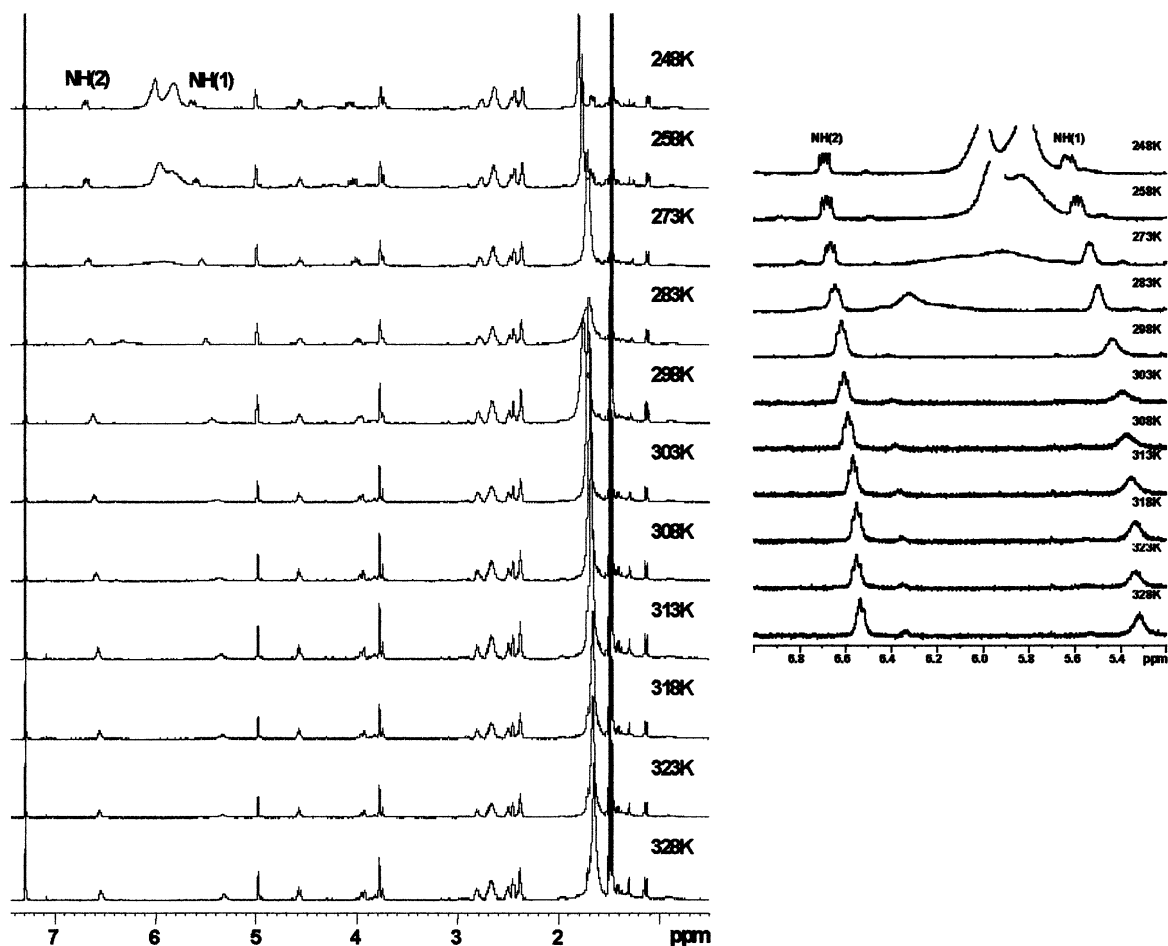
### Estudo de RMN

Os dados da variação do deslocamento químico dependente da concentração indicam baixa concentração de agregados entre 1 e 6 mM (Figura 60).

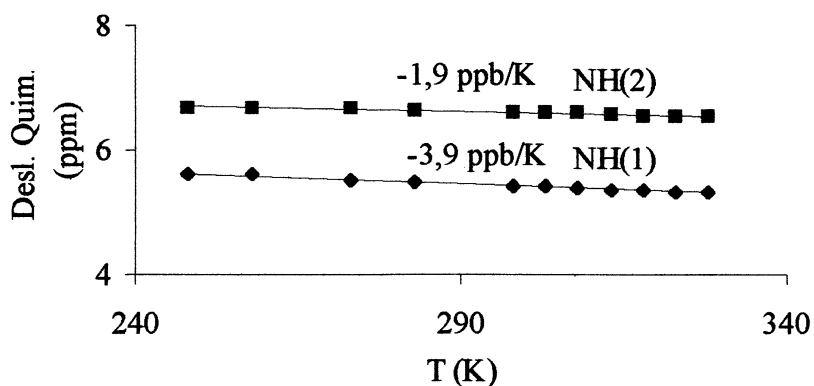


**Figura 60.** Espectros de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz) em função da concentração e gráfico da variação do deslocamento químico em função do logaritmo da concentração do composto 9

Os deslocamentos químicos de <sup>1</sup>H e os coeficientes de temperatura dos hidrogênios NH(1) e NH(2) em solução 3 mM de CDCl<sub>3</sub> estão expressos no anexo I. Observou-se uma dependência linear dos deslocamentos químicos em função da temperatura, evidenciando que não houve mudanças conformacionais das espécies existentes em solução (Figuras 61 e 62). Os coeficientes de temperatura de NH(1) e NH(2) foram respectivamente -3,9 e -1,9 ppb/K.



**Figura 61.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) do composto **9** em função da temperatura e expansão dos sinais de NHs.

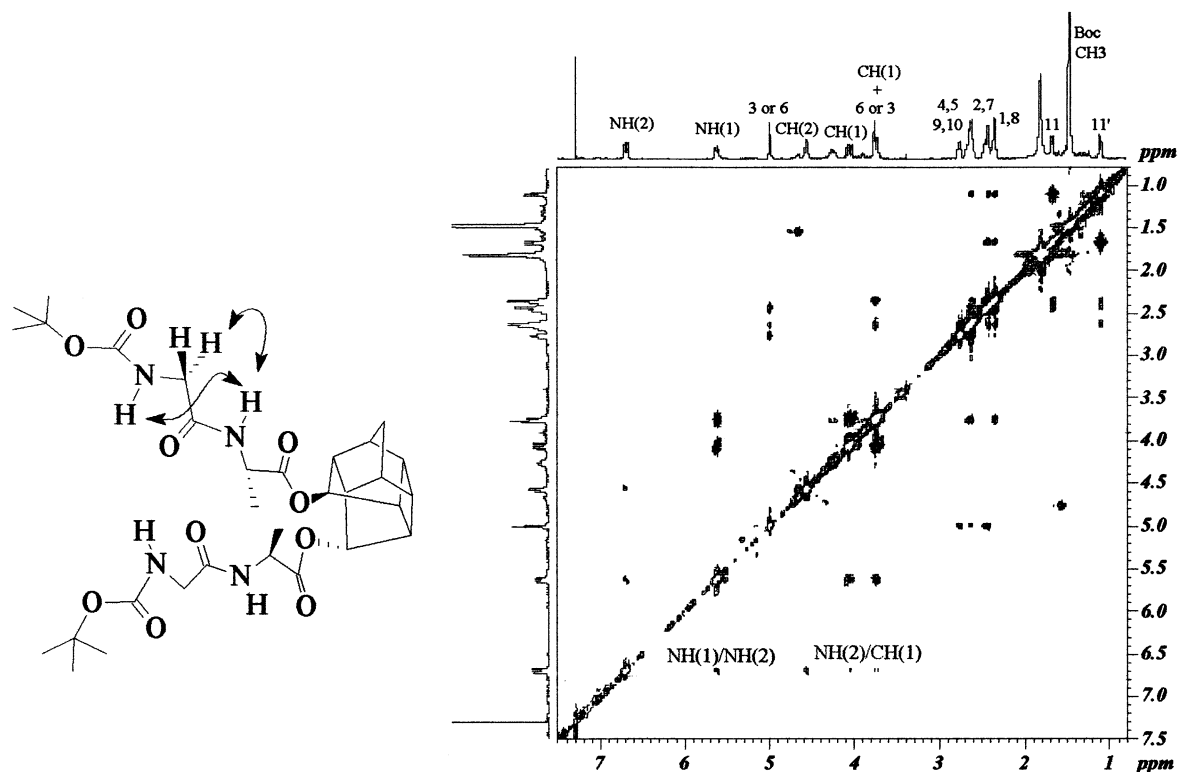


**Figura 62.** Gráfico da variação do deslocamento químico em função da temperatura para o composto **9**

As velocidades de troca de deutério para ambos NH(1) e NH(2) foi de  $10^{-3}$  (anexo I), indicando a presença preponderante, nesta temperatura, de espécies livres.



Valores de constante de acoplamento  $^3J_{\text{HN-CH}\alpha}$  foram medidas a baixas temperaturas (248K), obtendo-se 5,9 e 7,5 Hz para  $^3J_{\text{NH(1)-CH}\alpha(1)}$  e 6,7 e 7,2 Hz para  $^3J_{\text{HN(2)-CH}\alpha(2)}$ . A similaridade dos primeiros valores para cada NH com aqueles encontrados para o composto **8** podem indicar a presença de uma conformação tencionada a baixas temperaturas. Este fato poderia ser explicado considerando um equilíbrio entre as conformações livre e ligada. Experimentos de efeito Overhauser nuclear a 248K (Figura 63) forneceram evidências suplementares sobre o tipo de conformação secundária adotada.

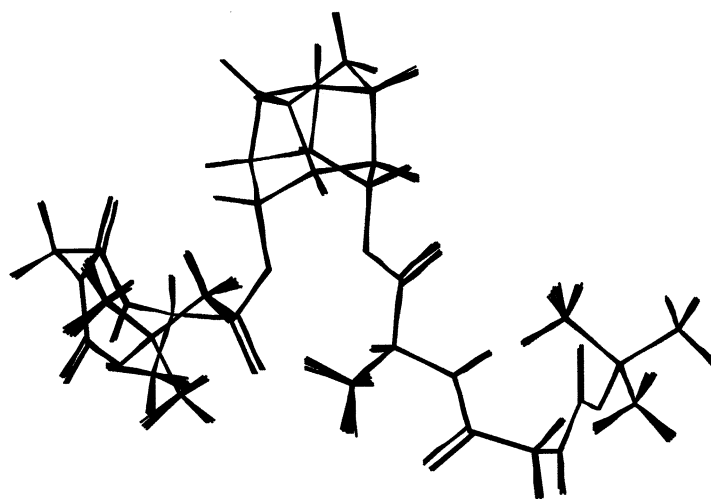


**Figura 63.** Espectro NOESY do composto **9** a 248K obtido a 500 MHz.

Correlações típicas de conformação dobra foram observadas entre os hidrogênios NH(2) e CH<sub>2</sub>(1) e NH(1) e NH(2).

### Estudo Teórico

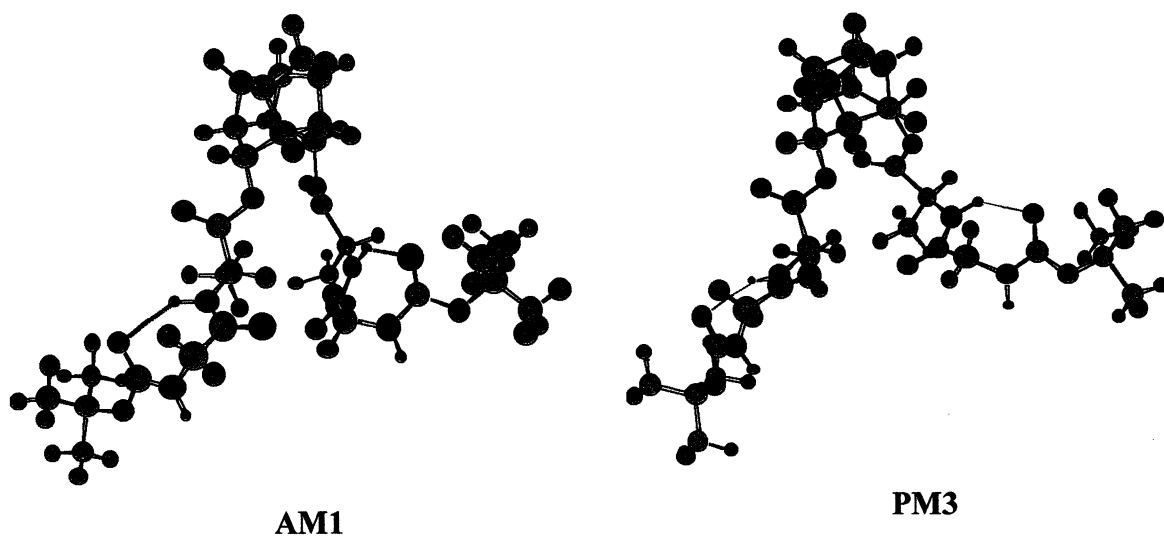
Estudou-se todas possibilidades de NH(1) e NH(2) formar ligações de H. Os cálculos de dinâmica molecular indicaram baixa probabilidade de formação de ligação de H intercadeia e de ligação envolvendo NH(1). Foi estabilizada a conformação do tipo dobra- $\gamma$  envolvendo NH(2). A família mais representativa dos cálculos de MD, com as dez estruturas de menor energia estão representadas na Figura 64.



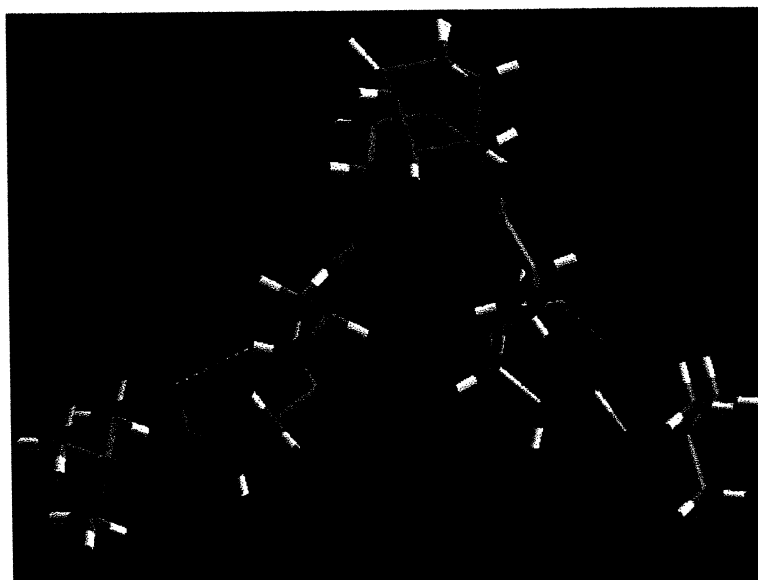
**Figura 64.** Família de menor energia para o composto **9** extraída dos cálculos de dinâmica molecular

A sobreposição dos átomos destas dez estruturas resultou em um RMS de 0,01 Å, mostrando boa convergência entre estas.

A estrutura de mais baixa energia desta família foi minimizada através de métodos semi-empíricos (AM1 e PM3) e cálculos *ab initio* (Figuras 65 e 66).



**Figura 65.** Estrutura do composto **9** calculada através de cálculos semi-empíricos AM1 e PM3.



**Figura 66.** Estrutura do composto **9** calculada através de cálculos *ab initio*.

Comparações dos ângulos diedros  $\Phi$  e  $\Psi$  indicaram que as geometrias de MD e *ab initio* possuem uma margem de tolerância de  $20^\circ$ , com exceção de  $\psi_{\text{HN}(2)\text{CO}}$ , indicando que a conformação obtida por MD é estável quando submetida a cálculos mais precisos (Tabela 5).

**Tabela 5.** Comparações geométricas entre as estruturas calculadas por MD e *ab initio* do composto **9**.

MD		6-31G**	
$\phi_{\text{HN}(1)\text{CH}^9}$	$\phi_{\text{HN}(2)\text{CH}^9}$	$\phi_{\text{HN}(1)\text{CH}^9}$	$\phi_{\text{HN}(2)\text{CH}^9}$
32,6	26,9	18,3	20,5
147,6	-161,5	136,1	-168,0
-155,3		-149,8	
-39,6		-31,8	
$\psi_{\text{HN}(1)\text{CO}^9}$	$\psi_{\text{HN}(2)\text{CO}^9}$	$\psi_{\text{HN}(1)\text{CO}^9}$	$\psi_{\text{HN}(2)\text{CO}^9}$
-115,0	67,2	-124,8	102,3
1,9	-120,0	-7,9	-165,8
116,5		112,0	
-0,8		-5,0	

Os valores de  $^3J_{\text{HN-CH}\alpha}$  teóricos e experimentais encontram uma boa correlação entre si, corroborando a formação da estrutura do tipo dobra- $\gamma$  (Tabela 6).

**Tabela 6.** Comparação entre os valores de  ${}^3J_{\text{HN-CH}\alpha}$  (Hz) teóricos e experimentais para o composto **9**

Método	${}^3J_{\text{HN (1)-CH}\alpha(1)}$ <b>9</b>	${}^3J_{\text{HN (2)-CH}\alpha(2)}$ <b>9</b>
experimental	5,9	6,7
AM1	3,9-5,5	4,6-6,8
PM3	4,0-6,3	5,4-7,4
6-31G**	3,8-5,3	4,1-6,3

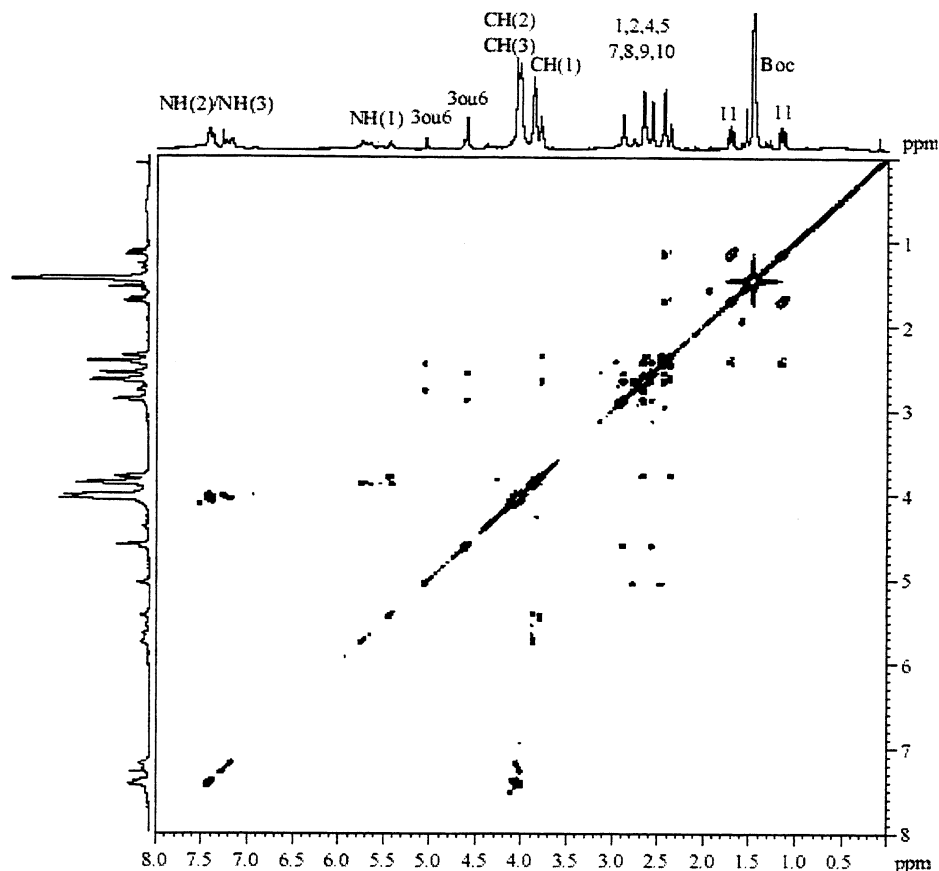
Considerando os resultado acima descritos, concluimos que as estruturas calculadas através dos três métodos de cálculos estão de acordo com os resultados experimentais, corroborando com a proposição do modelo em dobra do tipo  $\gamma$ . Além disso, algumas observações podem ser feitas: a estrutura *ab initio* de **9** indica que um dos hidrogênios carbinólicos estaria no cone de blindagem da carbonila de um dos ésteres. Esta observação é sustentada através dos dados de RMN, onde os hidrogênios carbinólicos são assinalados como dois conjuntos de sinais, separados de 1 ppm.

A comparação das energias de formação de conformações intercadeia com aquela encontrada para a conformação intracadeia para **9**, também mostrou improvável a presença dessas conformações.

### 4.3.2.3. bis-BocGlyGlyGly-Pentaciclo – 15

#### Atribuição dos sinais de RMN de $^1\text{H}$

Os sinais de  $^1\text{H}$  RMN foram atribuídos com base nos espectros COSY e NOESY, ilustrados nas Figuras 67 e 68. O deslocamentos químicos estão expressos na parte experimental.



**Figura 67.** Espectro COSY do composto **15** a 3 mM adquirido a 500 MHz.

Observou-se as correlações entre os hidrogênios NH e seus respectivos  $\text{CH}\alpha$ . Os hidrogênios carbinólicos das posições 3 e 6 aparecem com deslocamentos químicos diferentes e apresentam correlações com os hidrogênios do policiclo. Aparentemente três deslocamentos químicos diferentes podem ser observados para estes hidrogênios, sendo um deles sobreposto aos sinais dos  $\text{CH}\alpha$  das cadeias peptídicas. Os outros dois, absorvendo em aproximadamente 4,5 e 5,0 ppm, apresentam uma integração de 2:1. Em primeira análise, isso poderia indicar a presença de duas conformações a temperatura ambiente. O espectro NOESY mostra fortes correlações  $d_{\text{N}\alpha}$  e fraca correlação  $d_{\text{NN}}$ .

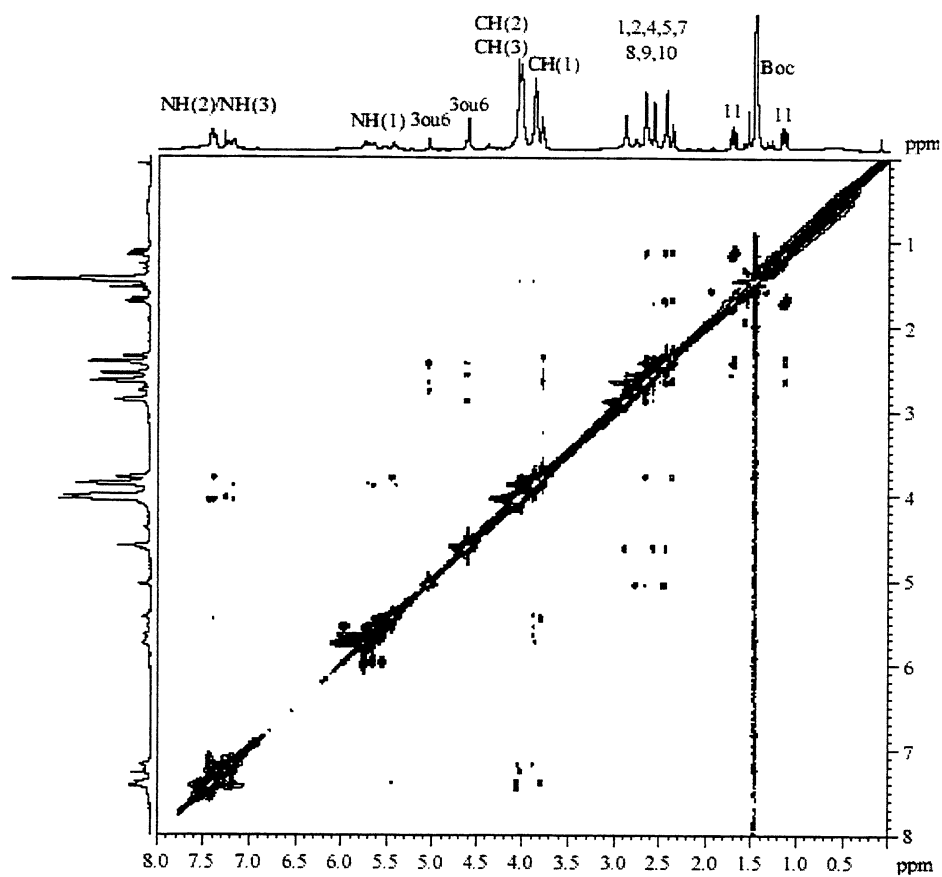


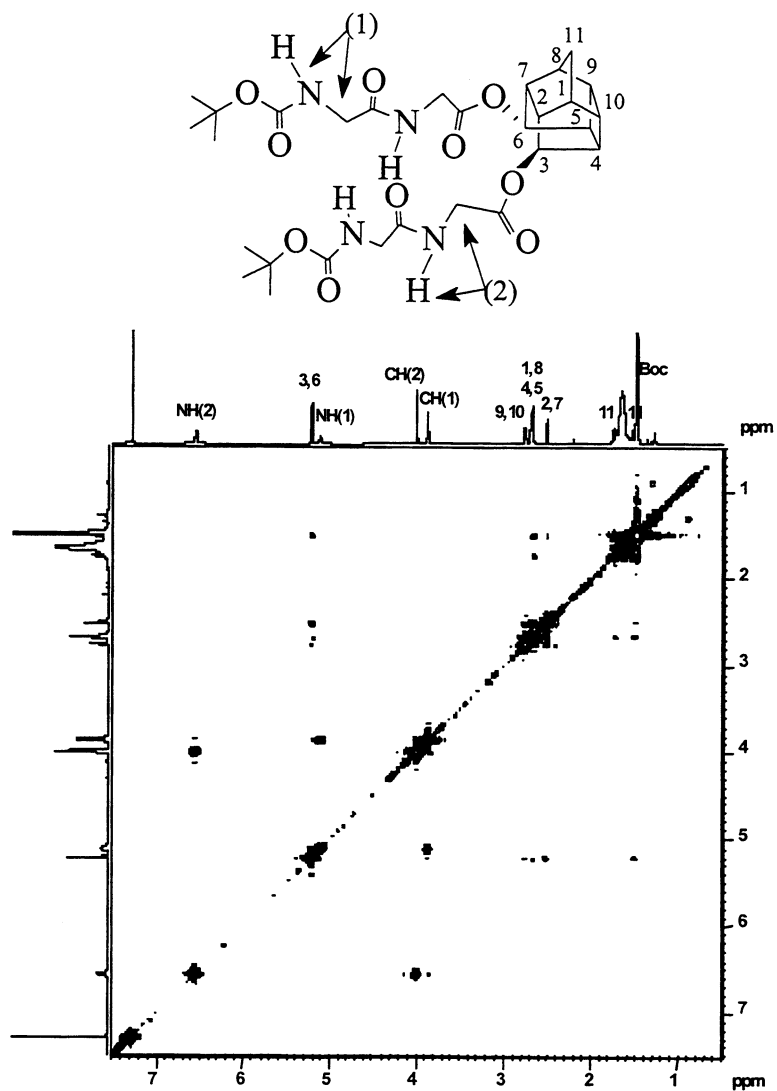
Figura 68. Espectro NOESY do composto 15 adquirido a 500 MHz.

### 4.3.2.3. Sistema *exo-exo*: *bis*-BocGlyGly-Pentaciclo-10 e *bis*-BocGlyAla-Pentaciclo-11

#### Atribuição dos sinais de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$

Os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos compostos 10 e 11 foram atribuídos com base nos espectros COSY e HMQC, ilustrados nas Figuras 69 a 72.

#### Composto 10



**Figura 69.** Espectro COSY do composto 10 em  $\text{CDCl}_3$  adquirido a 500 MHz.

Observa-se a correlação entre os sinais NH(1)/CH(1) e NH(2)/CH(2), além daquelas entre os hidrogênios do policíclico. Os hidrogênios foram correlacionados com seus respectivos carbonos através do espectro de HMQC (Figura 70).

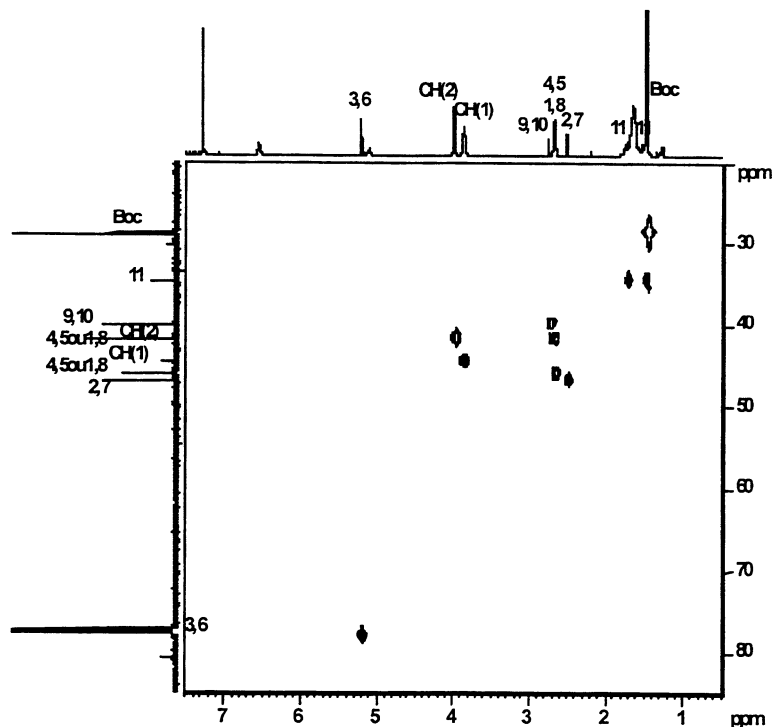
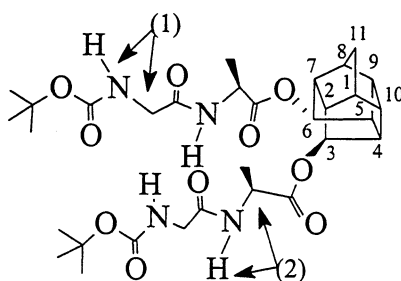


Figura 70. Espectro HMQC do composto 10 em  $\text{CDCl}_3$  adquirido a 500 MHz.

### Composto 11



Igualmente, na figura 71 são observadas as correlações entre  $\text{NH}(1)/\text{CH}(1)$ ,  $\text{NH}(2)/\text{CH}(2)$  e  $\text{CH}(2)/\text{CH}_3$ , além das correlações apresentadas pelo policiclo. O espectro HMQC (Figura 72) mostra a correlação dos hidrogênios atribuídos acima com seus respectivos carbonos.



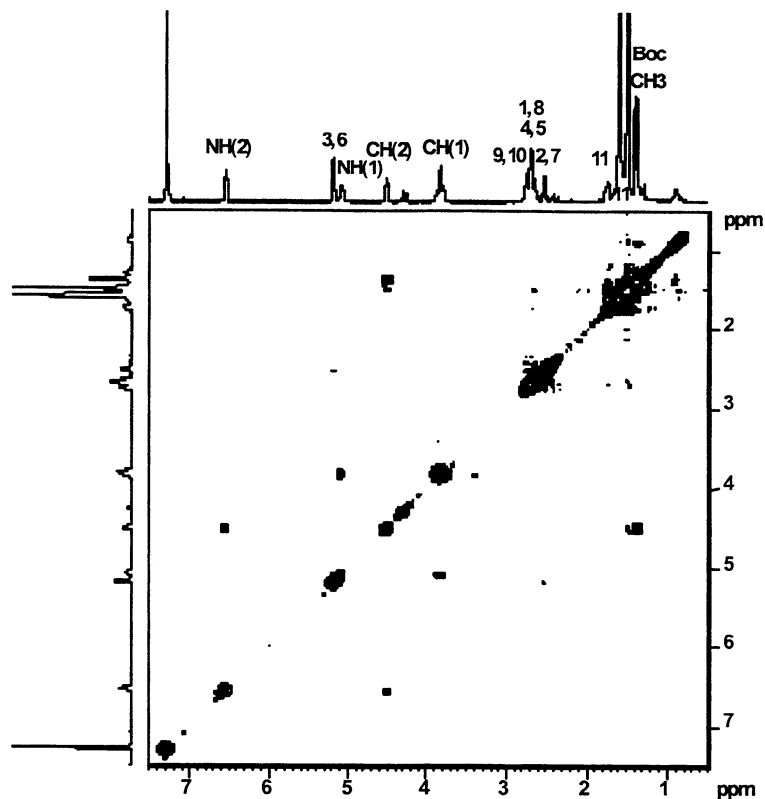


Figura 71. Espectro COSY do composto 11 em  $\text{CDCl}_3$  adquirido a 500 MHz.

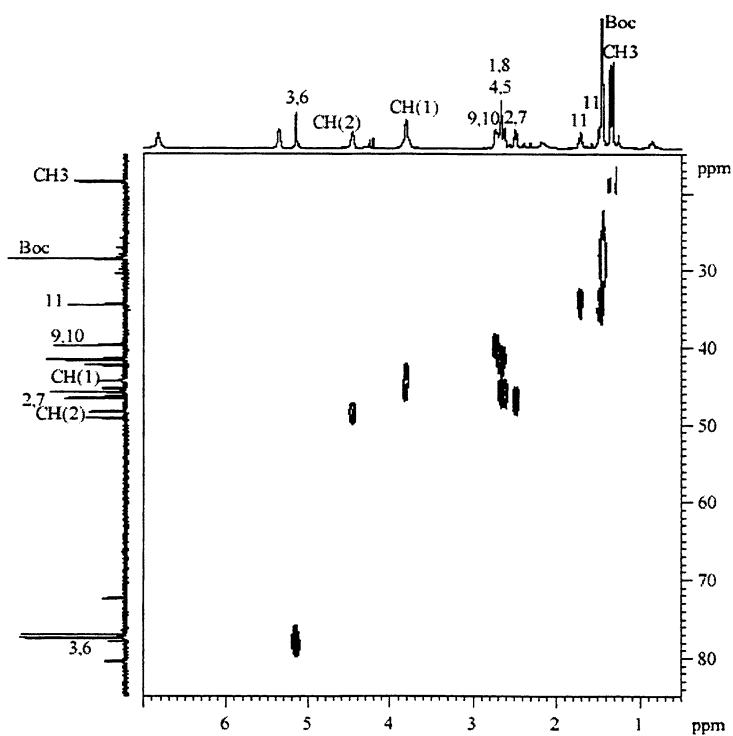


Figura 72. Espectro HMQC do composto 11 em  $\text{CDCl}_3$  adquirido a 500 MHz.

## Determinação de Estruturas Secundárias

### Estudo de RMN

Os dados da variação do deslocamento químico dependente da concentração indicam baixa concentração de agregados para os compostos 10 e 11, respectivamente, entre 1 e 9 mM e 1 e 3 mM (Figuras 73 e 74).

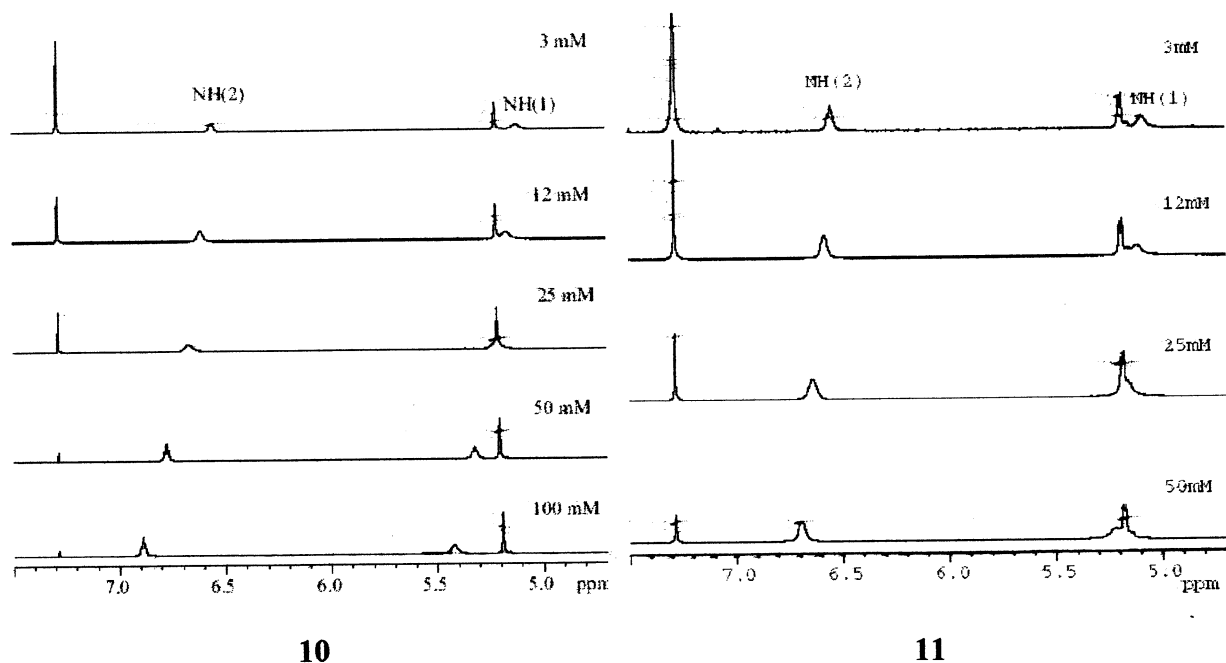


Figura 73. Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  em função da concentração para os compostos 10 e 11.

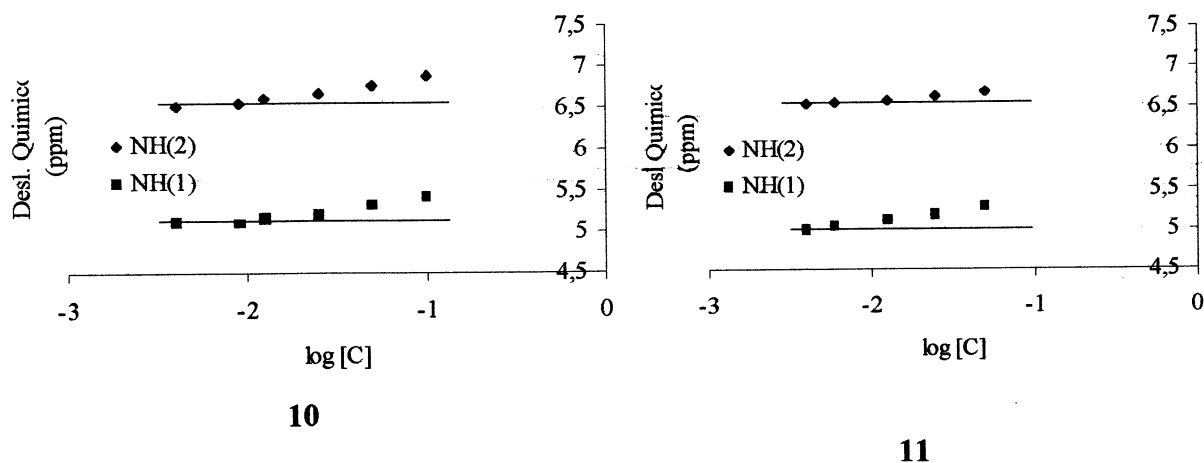
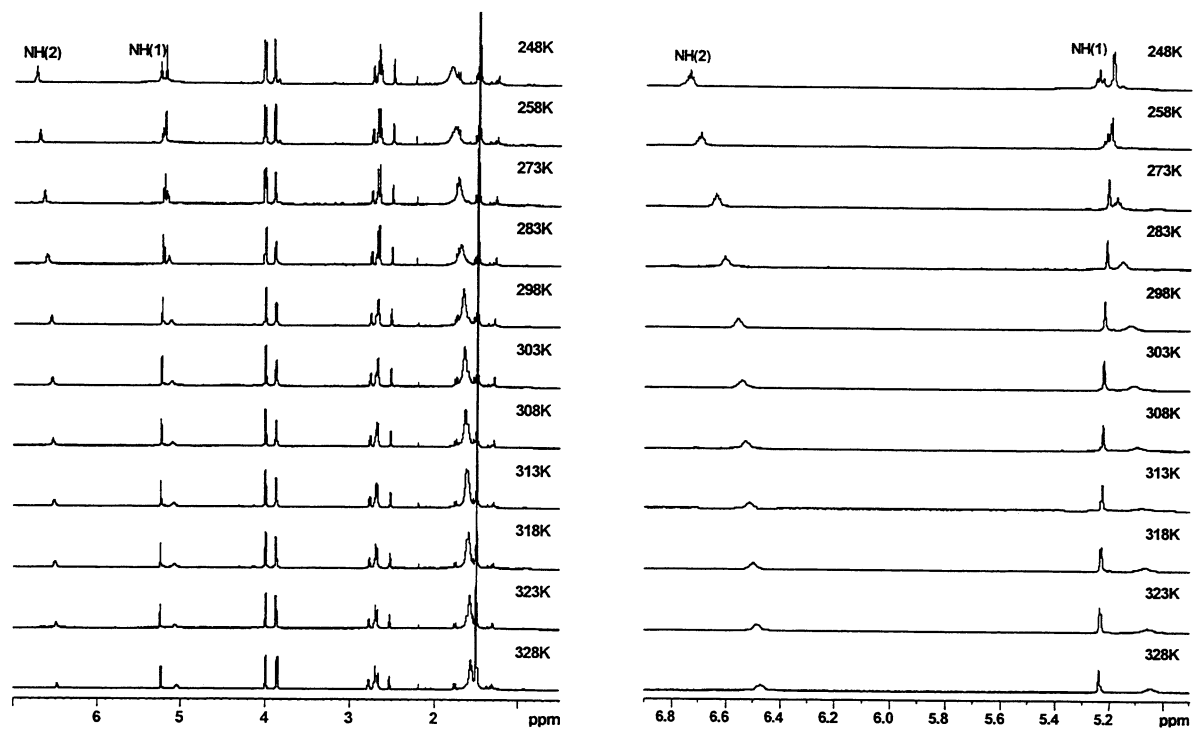


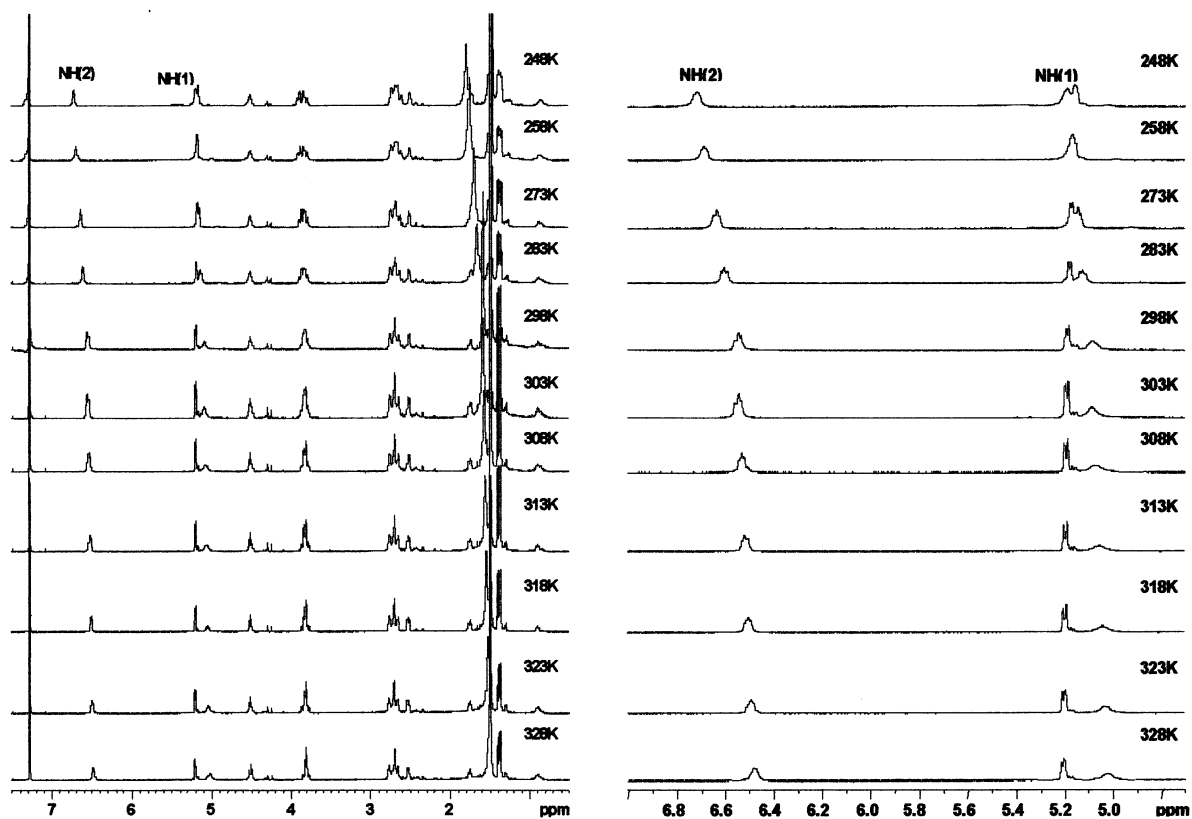
Figura 74. Gráfico da variação do deslocamento químico em função do logaritmo da concentração para os compostos 10 e 11.

Os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e os coeficientes de temperatura dos hidrogênios NHs estão expressos no anexo I. Observou-se uma dependência linear do deslocamento

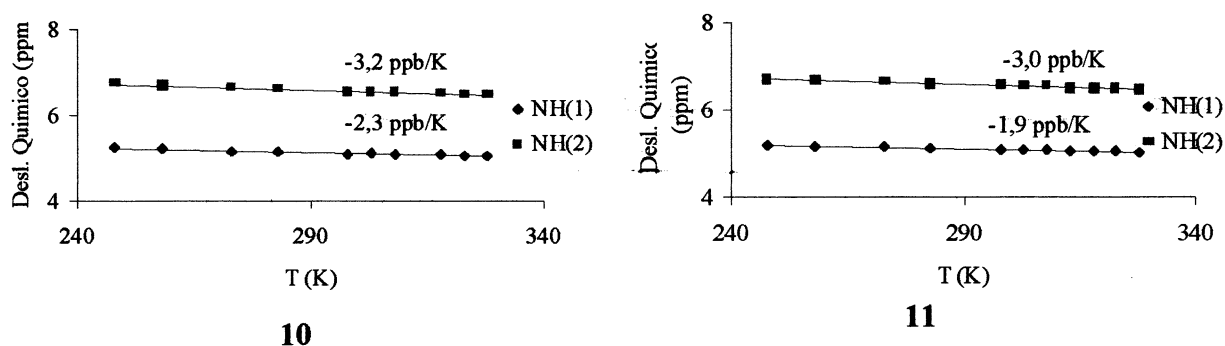
químico em função da temperatura para ambos compostos (Figuras 75 a 77). Os coeficientes de temperatura de NH(1) e NH(2) podem ser observados nos gráficos da Figura 77.



**Figura 75.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do composto 10 em função da temperatura e expansão dos sinais de NHs.



**Figura 76.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **11** em função da temperatura e expansão dos sinais de NHs.



**Figura 77.** Gráfico da variação do deslocamento químico em função da temperatura para os compostos **10** e **11**.

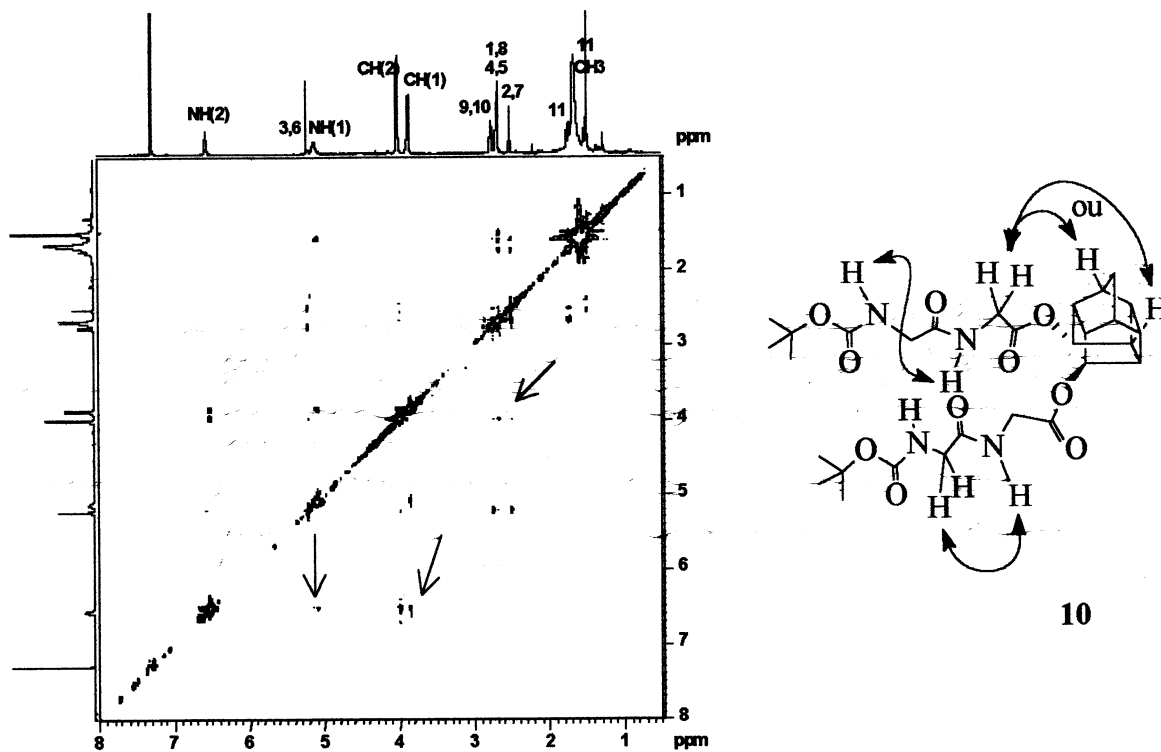
As velocidades de troca de deutério para NH(1) e NH(2) (anexo I) evidenciam que NH(1) do composto **10** e NH(2) do composto **11** apresentam ligação de hidrogênio intramolecular.

Dados de efeito Overhauser nuclear e constantes de acoplamento  $^3J_{\text{HN-CH}\alpha}$  (Tabela 7 e Figuras 78 e 79) fornecem evidências suplementares sobre o tipo de conformação secundária adotada.

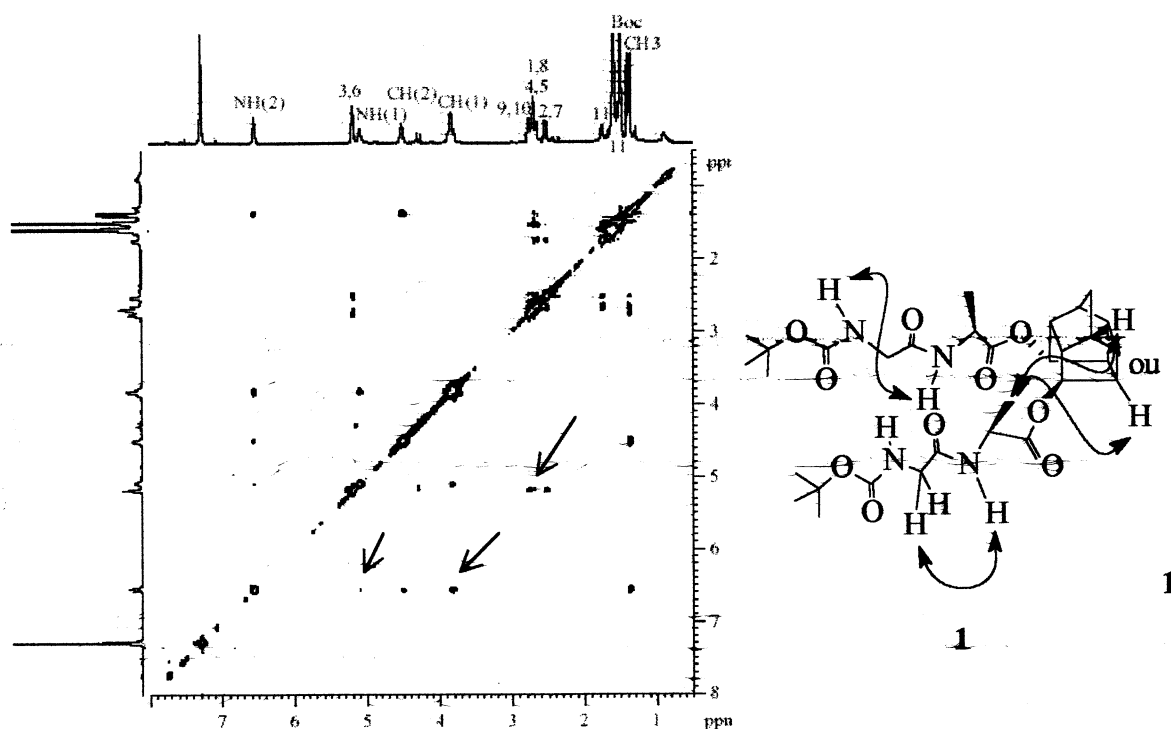
**Tabela 7.** Correlações de NOE (298K) e  $^3J_{\text{HN-CH}\alpha}$  dos compostos **10** e **11**.

estrutura	correlações NOE	$^3J_{\text{HN (1)-CH}\alpha(1)}$	$^3J_{\text{HN (2)-CH}\alpha(2)}$
<b>10</b>	NH(2)-NH(1); NH(2)-CH(1); CH(2)-CH <sub>1,8</sub> ou CH <sub>4,5</sub>	5,9 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>
<b>11</b>	NH(2)-NH(1); NH(2)-CH(1); CH <sub>3</sub> (2)- CH <sub>1,8</sub> ou CH <sub>4,5</sub>	4,5 <sup>b</sup>	6,0 <sup>b</sup>

a- valor obtido a 248K. b- valor obtido a 283K.



**Figura 78.** Espectro NOESY do composto **10** a 298K obtido em 500 MHz.

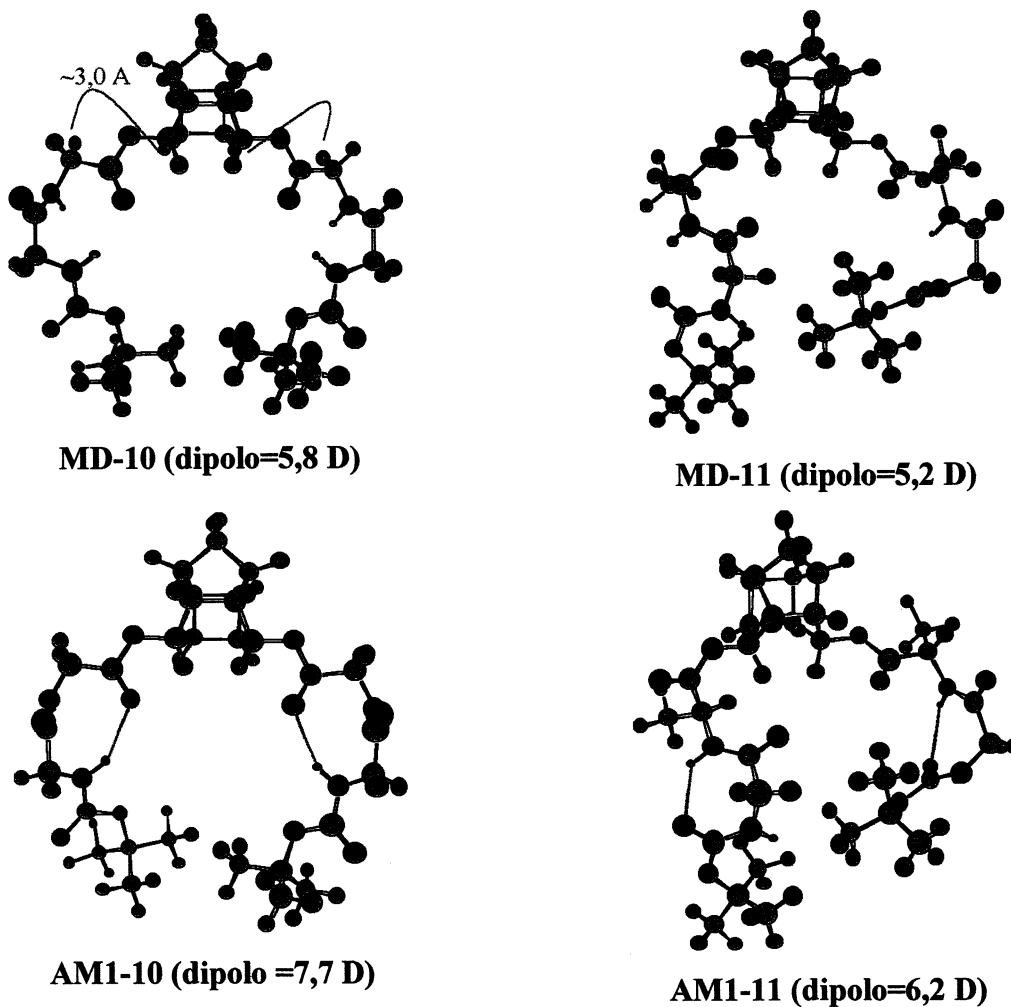


**Figura 79.** Espectro NOESY do composto **11** a 298K obtido a 500 MHz.

A análise dos dados descritos na Tabela 7 e Tabela 1 do anexo I mostram que os coeficientes de temperatura não estão de acordo com os dados de NOE, constantes de acoplamento e dados de troca de H/D. No entanto, dados na literatura comprovam que a interpretação de coeficientes de temperatura pode ser muitas vezes problemática.<sup>53, 67</sup> Andersen e colaboradores sugerem que para peptídeos com uma conformação em dobra parcialmente populada, dados de velocidade de troca H/D tornam-se um critério mais apropriados para distinguir hidrogênios NH expostos ao solvente daqueles ligados por ligações de H.<sup>53</sup> Os coeficientes encontrados para os compostos **10** e **11** poderiam indicar uma situação onde há um dos hidrogênios NH ligado (ou ambos) ou uma situação onde eles encontram-se livres. Cruzando estas informações com os dados de velocidade de troca de H/D e EON, conclui-se que os coeficientes de temperatura são referentes a dois hidrogênios NH em uma conformação tencionada, onde um deles está ligado por ligação de H e o outro apresenta-se bloqueado em uma conformação rígida dentro da dobra formada.

## Estudo Teórico

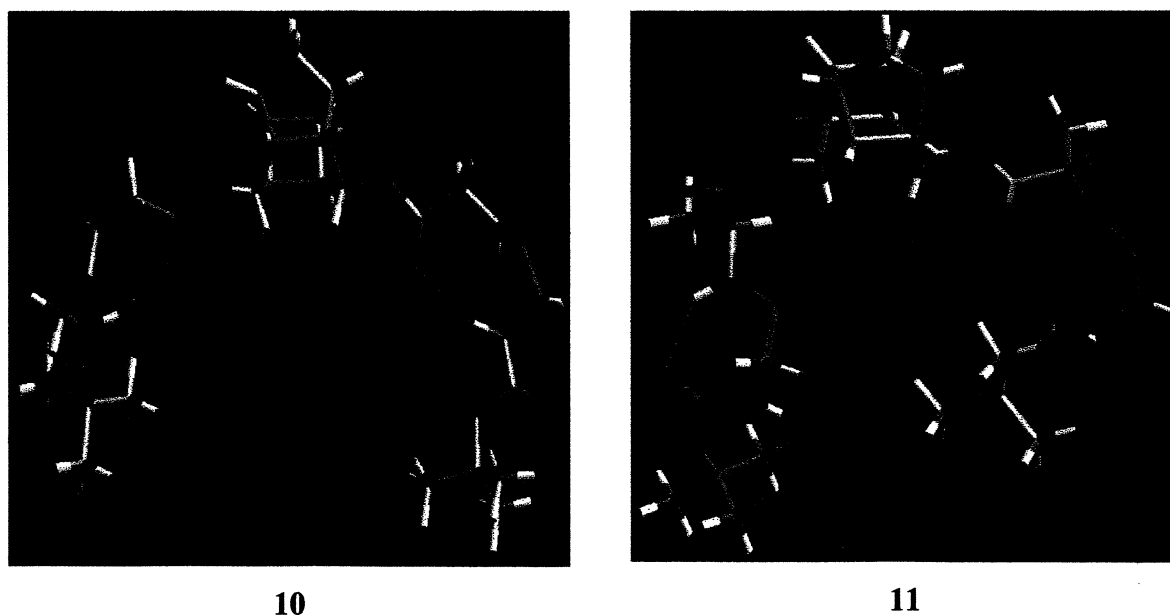
As Figuras 80 e 81 ilustram as simulações teóricas para os compostos **10** e **11**. Observou-se que o sistema *exo-exo* não possui uma geometria adequada para a formação de estruturas com ligação intercadeia. O composto **10** mostrou a formação de uma conformação do tipo dobra-C8 (NH(2)-CO(1)), enquanto que **11** apresentou a formação do tipo dobra- $\gamma$  (NH(1)-COéster).



**Figura 80.** Cálculos de MD e AM1 para os compostos **10** e **11**.

O modelo resultante dos cálculos de MD para o composto **10** evidenciam uma distância de aproximadamente 3 Å entre os hidrogênios do CH(2) e H<sub>4,5</sub>, indicando que provavelmente este é o EON observado para os hidrogênios  $\alpha$ -amida. A diferença de dipolo existente entre as estruturas de MD (solvatado) e AM1 (não solvatado) poderia explicar porque ocorre uma pequena modificação de conformação. No entanto, as estruturas encontradas em MD e AM1 poderiam facilmente se interconverter devido ao movimento

molecular existente em solução. Da mesma forma, distâncias menores entre os hidrogênios CH<sub>3</sub>(2) e H<sub>4,5</sub> foram observadas para o composto **11** se comparadas com as distâncias entre CH<sub>3</sub>(2) e H<sub>1,8</sub>, indicando que provavelmente este é o EON observado. Da mesma forma que para **10**, uma pequena modificação estrutural foi observada ao passarmos dos cálculos de MD para AM1. O grupamento éster de uma das cadeias, inicialmente em trans (energeticamente mais estável) passa para uma conformação em cis, provavelmente devido a proximidade das carbonilas do éster e amida. Como consequência disto, uma pequena distância é observada entre CH(2) e H<sub>3ou6</sub>, cujo EON não é observado. Considerando que fenômenos associados a equilíbrios entre formas cis e trans em ésteres não são energeticamente elevados<sup>55c</sup> e que há uma diferença considerável de dipolo entre as duas estruturas (estabilizando preferencialmente o conformero de menor dipolo em CDCl<sub>3</sub>), é possível que ocorra uma interconversão entre as duas conformações. Além disso, observa-se muitas vezes que a forma onde a carbonila está eclipsada com a metila pode ser energeticamente favorecida.<sup>55c</sup> A Tabela 8 ilustra as constantes de acoplamento calculadas e experimentais.



**Figura 81.** Cálculos de *ab initio* para os compostos **10** e **11**.

**Tabela 8.**  $^3J_{\text{HN-CH}\alpha}$  (Hz) experimentais e teóricas para os compostos **10** e **11**.

$^3J_{\text{HN-CH}\alpha}$	experimental	6-31G**
$^3J_{\text{HN}(1)\text{CH}\alpha(1)}$ <b>10</b>	5,9	4,9-7,2
$^3J_{\text{HN}(2)\text{CH}\alpha(2)}$ <b>10</b>	5,0	3,9-5,7
$^3J_{\text{HN}(1)\text{CH}\alpha(1)}$ <b>11</b>	4,5	3,6-5,6
$^3J_{\text{HN}(2)\text{CH}\alpha(2)}$ <b>11</b>	6,0	4,6-6,6



Os modelos calculados, bem como os valores de  ${}^3J_{\text{HN-CH}\alpha}$  estão de acordo com os valores medidos espectroscopicamente.

De posse do modelo teórico do composto **10** realizou-se a comparação dos valores de distância internucleares teórico e experimental. Estes últimos foram calculados através dos volumes das taxas de correlações de um conjunto de espectros de NOESY a diferentes tempos de mistura, já exposto no início da seção de discussão. Esta grandeza é correlacionada a distância entre os hidrogênios concernentes. Então, conhecendo-se a distância  $r_{ki}$  em uma molécula e sua correspondente intensidade do sinal de EON  $I_{ki}$ , uma distância desconhecida  $r_{mn}$  pode ser calculada medindo-se a correspondente intensidade de EON  $I_{mn}$ , segundo a equação abaixo:

$$\sqrt[6]{\frac{I_{ki}}{I_{mn}}} = \frac{r_{mn}}{r_{ki}}$$

Na prática, escolhe-se uma taxa de referência que constitua distâncias de referência ideais. Normalmente utiliza-se taxas referentes a dois hidrogênios geminados ou hidrogênios em posição orto a um grupo fenila. É bom ressaltar que as intensidades medidas podem estimar apenas valores aproximados de distâncias inter-nucleares. Os resultados estão expressos na Tabela 9. Utilizou-se como referência a distância entre os hidrogênios da posição 11 ( $d=1,82$  Å)

**Tabela 9.** Comparação entre as distâncias internucleares experimentais e teóricas para o composto **10**.

<b>Hidrogênios relacionados</b>	$d_{\text{teórica}}$ (Å)	$d_{\text{exp}}$ (Å)
CH <sub>3,6</sub> -CH <sub>9,10</sub>	2,65-2,70	2,70
NH(2)-CH(2)	2,43-2,95	2,83
NH(2)-CH(1)	2,48-3,57	2,97
NH(1)-CH(1)	2,84-2,87	3,05

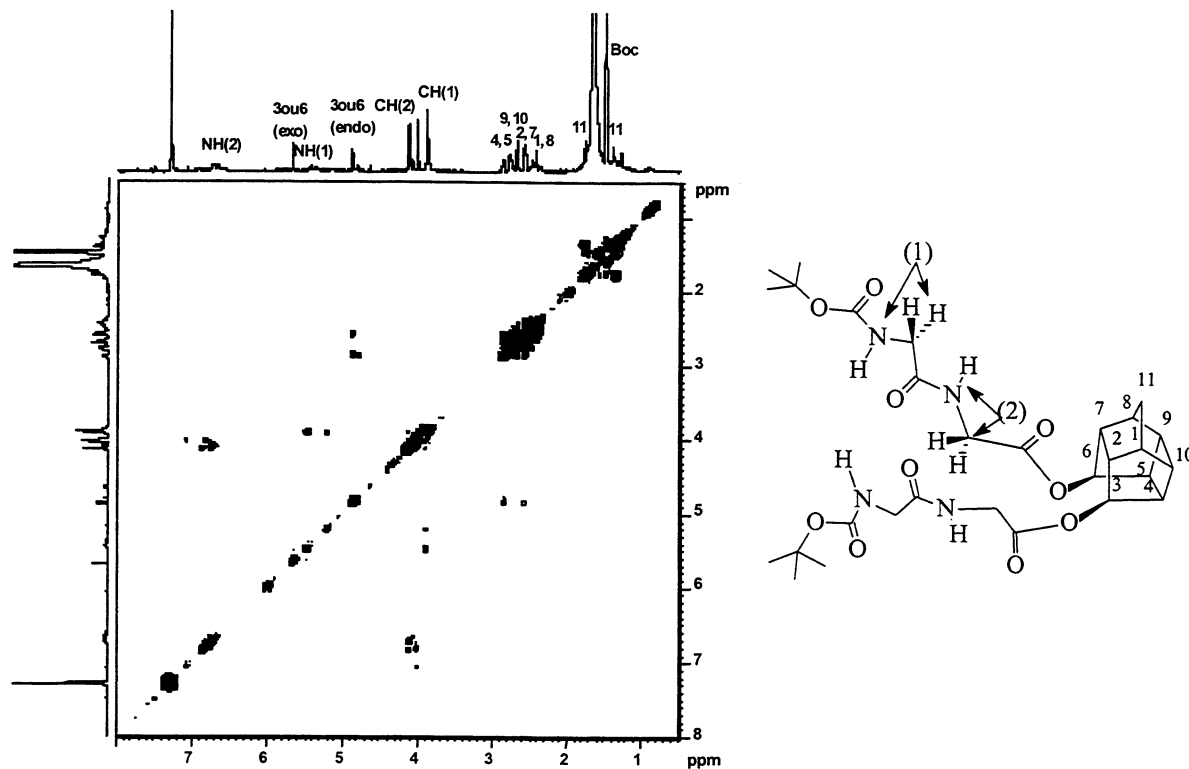
Observa-se a boa correlação entre as distâncias calculadas e experimentais, corroborando com as proposições dos modelos propostos.

#### 4.3.2.4. Sistema *endo-exo*: compostos 6, 7, 12, 13 e 14

##### Atribuição dos sinais de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$

Os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos compostos foram atribuídos com base nos espectros COSY e HMQC. Nas figuras 82-85 estão ilustrados os espectros de COSY e HMQC para os compostos 12 e 13. As figuras 86 e 87 ilustram os espectros de COSY e NOESY de 14.

##### Composto 12



**Figura 82.** Espectro COSY do composto 12 em  $\text{CDCl}_3$  adquirido a 500 MHz.

As correlações mais marcantes observadas foram entre o NH(2) e CH(2), NH(1) e CH(1), e entre o CH carbinólico do policiclo em posição *endo* e o hidrogênio da posição 2 ou 7 e o hidrogênio da posição 4 ou 5. Os hidrogênios carbinólicos foram diferenciados comparando-se seus deslocamentos químicos com aqueles obtidos pelos sistemas *endo-endo* e *exo-exo*. Em seguida, estes hidrogênios foram correlacionados com seus respectivos carbonos através do espectro de HMQC.

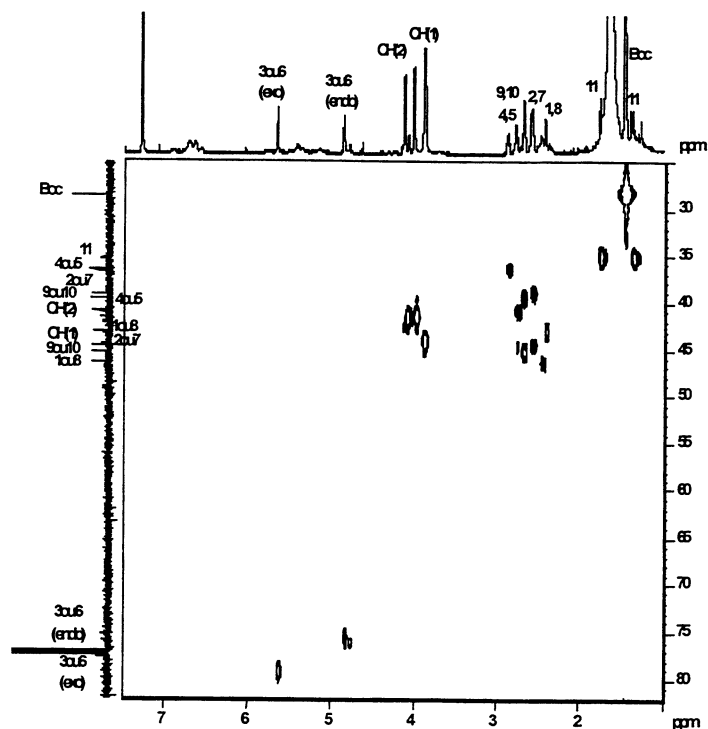


Figura 83. Espectro HMQC do composto 12 em  $\text{CDCl}_3$  adquirido a 500 MHz.

### Composto 13

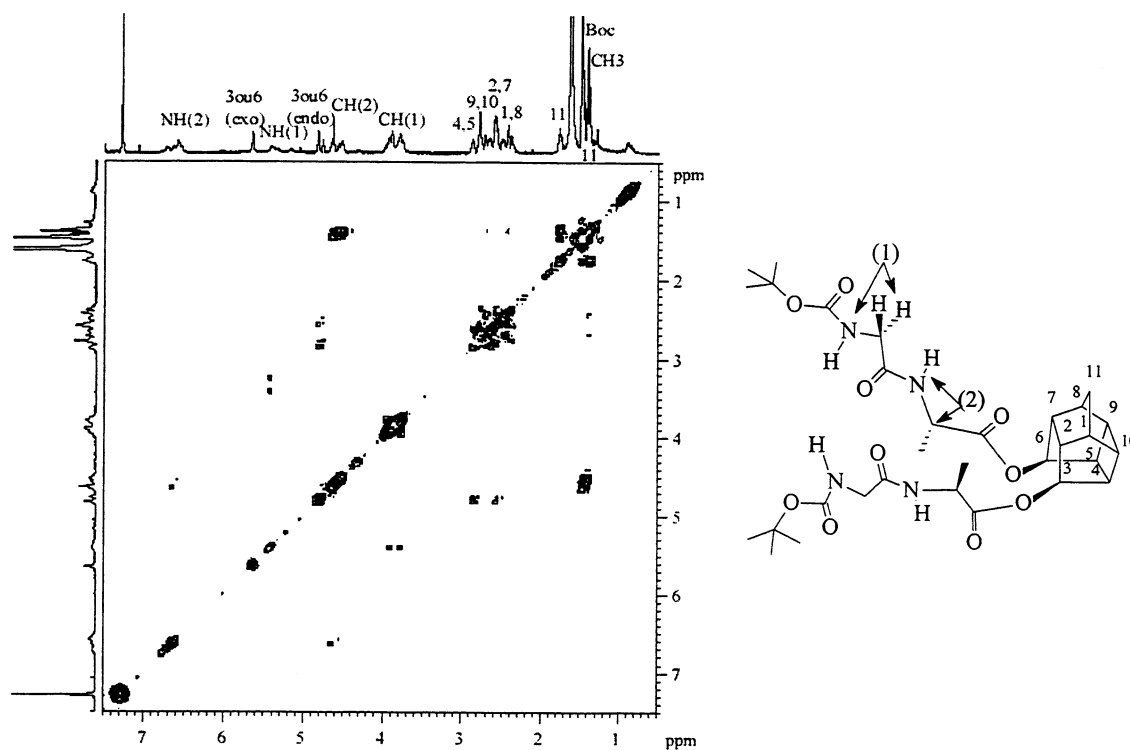


Figura 84. Espectro COSY do composto 13 em  $\text{CDCl}_3$  adquirido a 500 MHz.

As mesmas correlações da cadeia peptídica foram observadas para este composto, além da correlação entre CH(2) e CH<sub>3</sub>. Igualmente, foram observadas os mesmos acoplamentos para o CH carbinólico *endo*. A atribuição dos respectivos carbonos é feita através do espectro HMQC.

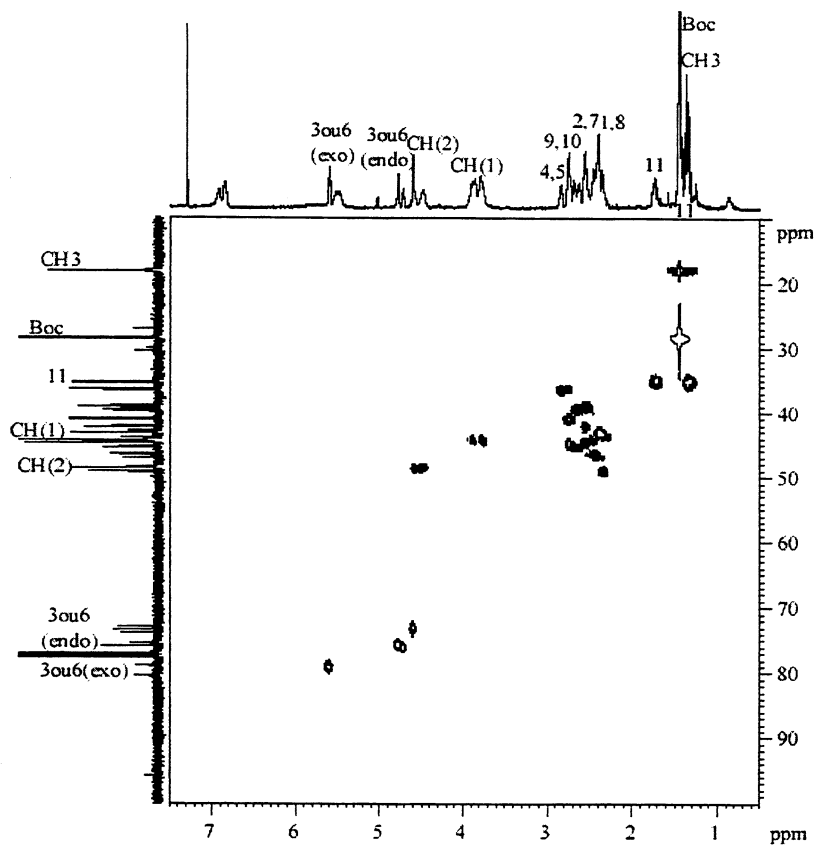
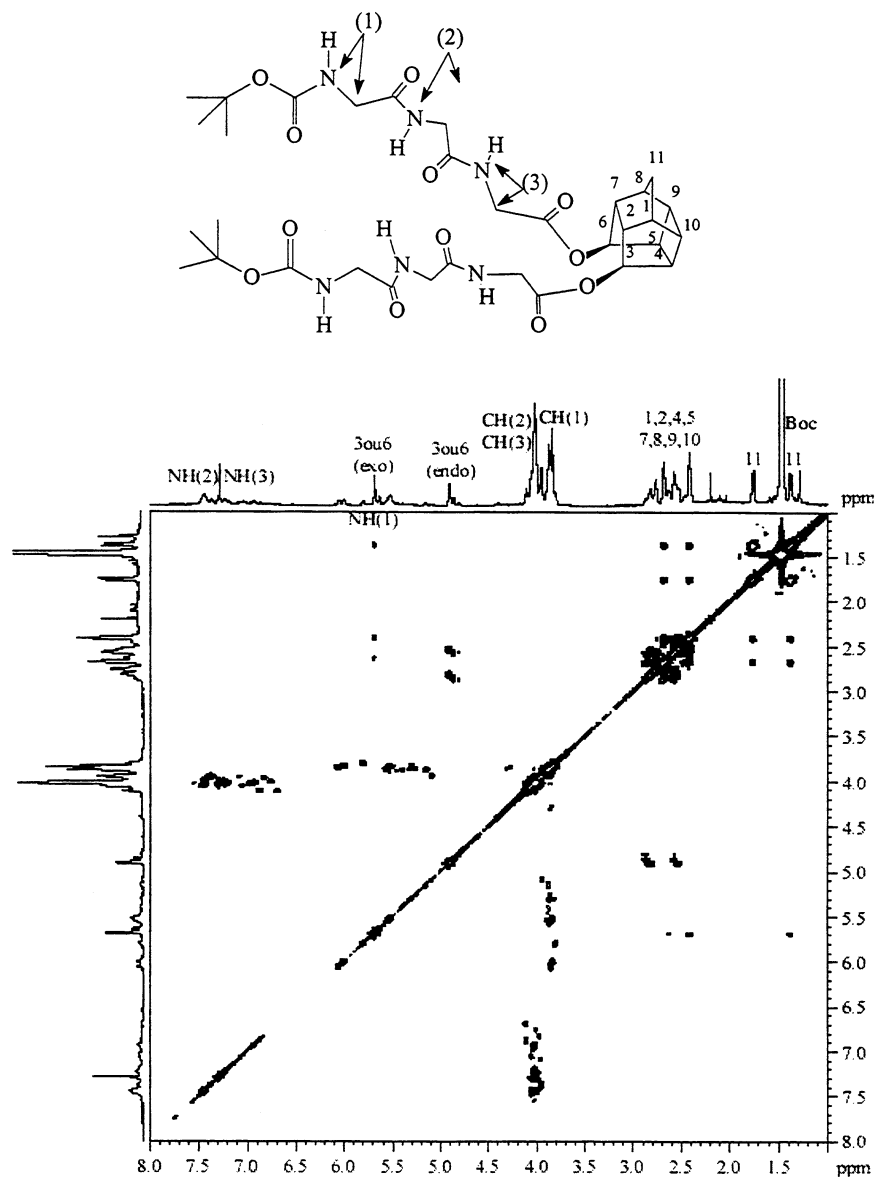


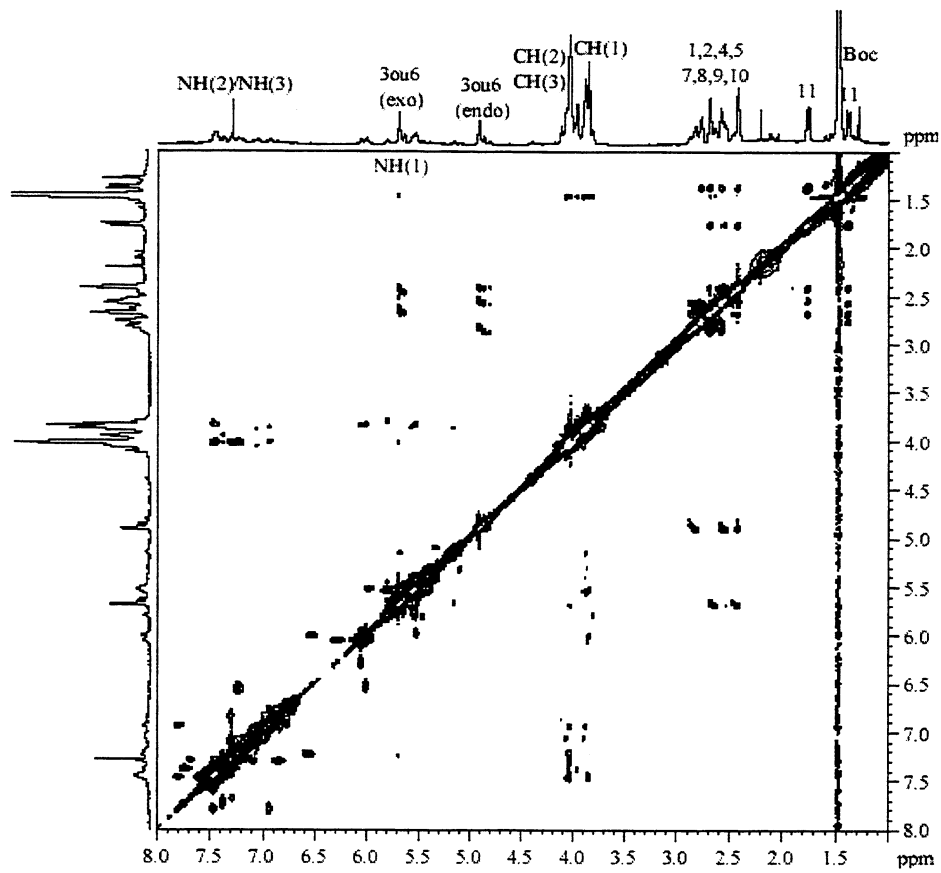
Figura 85. Espectro HMQC do composto 13 em CDCl<sub>3</sub> adquirido a 500 MHz.

## Composto 14



**Figura 86.** Espectro COSY do composto 14 em  $\text{CDCl}_3$  adquirido a 500 MHz.

Observou-se as correlações entre NH(1)/CH(1), NH(2)/CH(2) e NH(3)/CH(3), além de diversas correlações dos hidrogênios do policiclo. Considerando a complexidade das correlações e que o estudo de análise conformacional não chegou a ser realizado com esta estrutura, optou-se por não atribuir de forma mais precisa seus espectros.



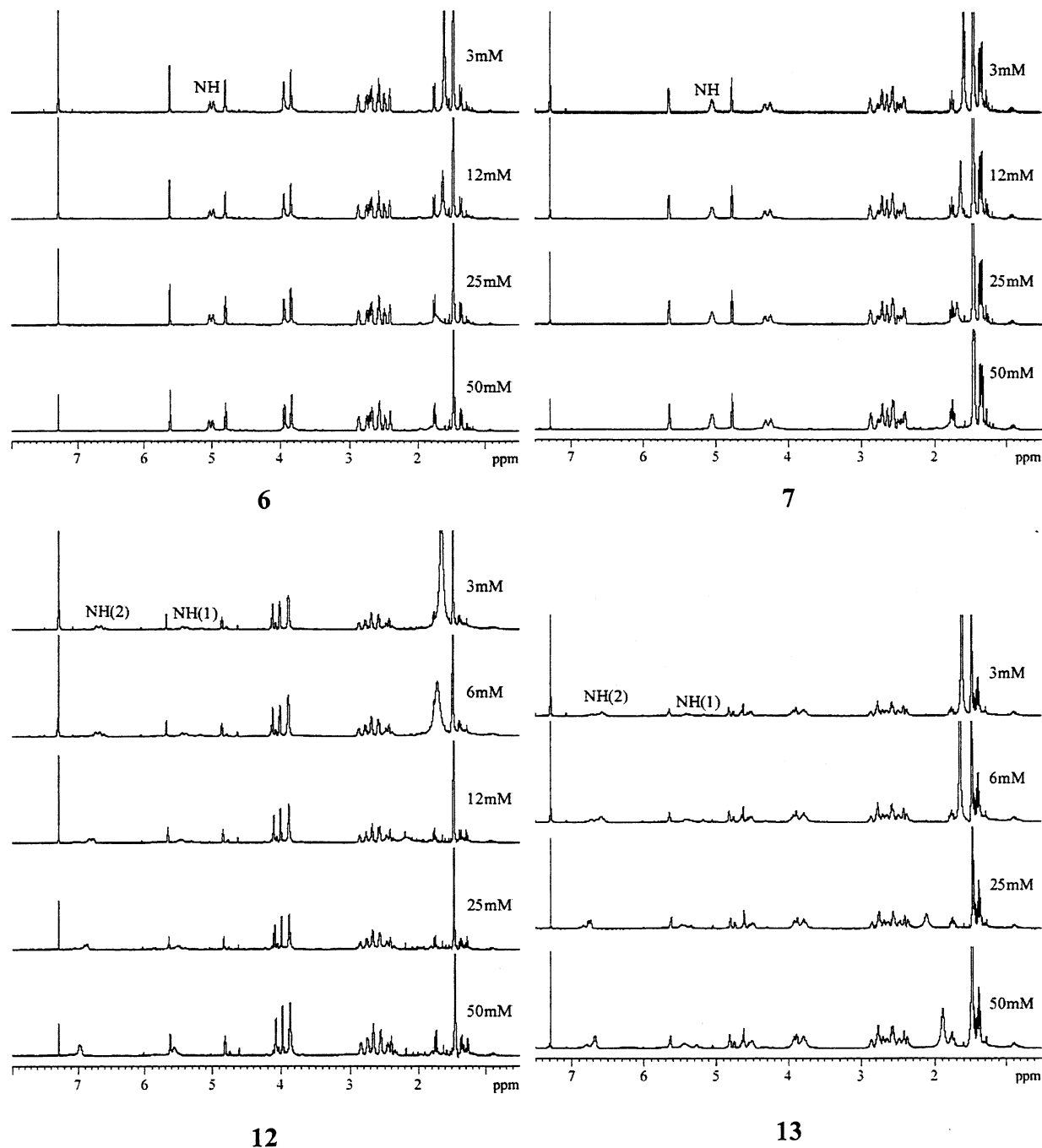
**Figura 87.** Espectro NOESY do composto 14 em  $\text{CDCl}_3$  adquirido a 500 MHz.

## Determinação de estruturas secundárias

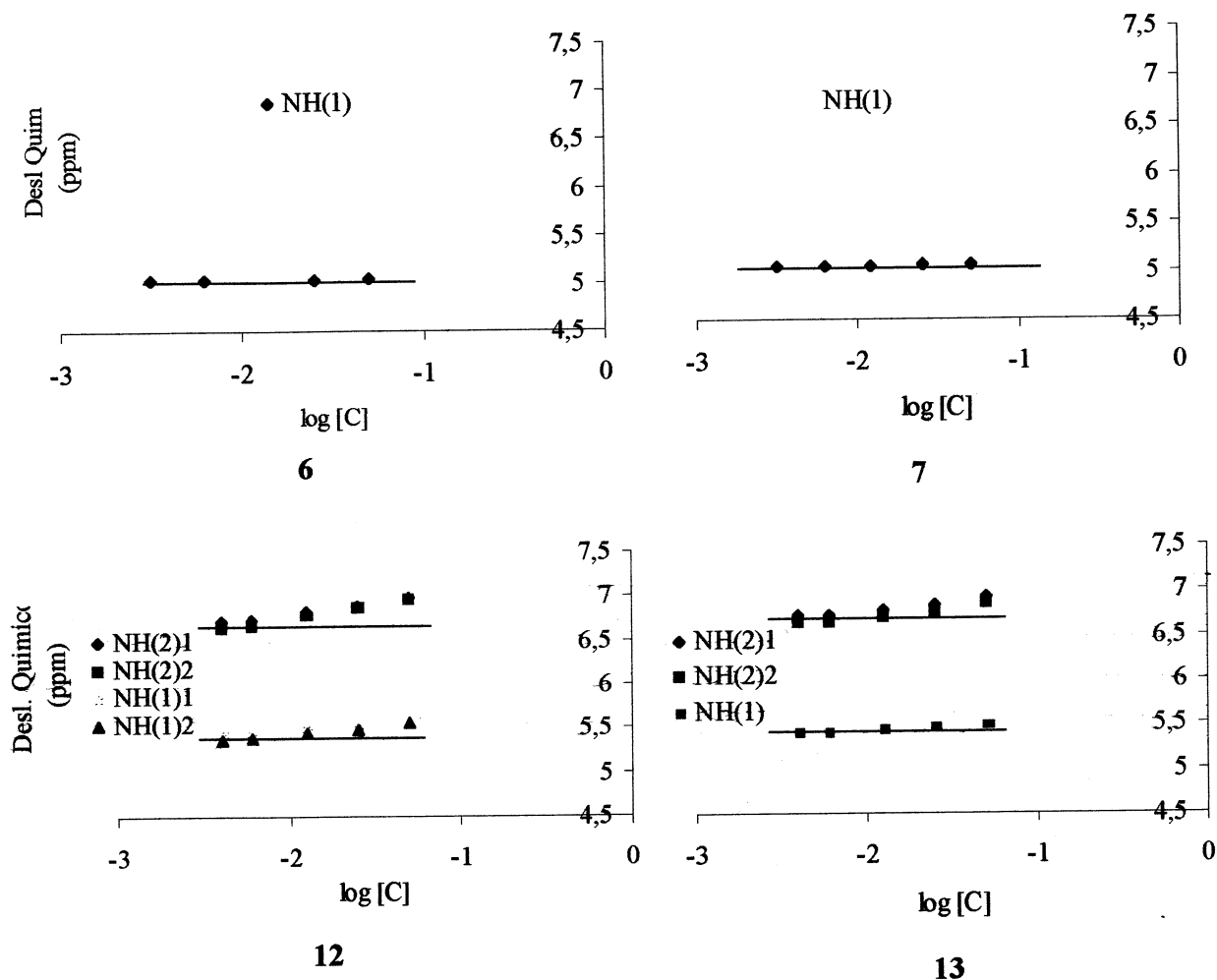
### Estudo de RMN

Este estudo foi realizado para os compostos 6-7 e 12-13.

Os dados da variação do deslocamento químico dependente da concentração indicam baixa concentração de agregados para os compostos 6-7 e 12-13 respectivamente entre 1 e 50 mM e 1 e 6 mM (Figuras 88 e 89).



**Figura 88.** Espectros de RMN- $^1\text{H}$  em função da concentração para os compostos 6-7 e 12-13.



**Figura 89.** Gráficos da variação do deslocamento químico em função do logaritmo da concentração para os compostos 6-7 e 12-13.

Os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e os coeficientes de temperatura dos hidrogênios NH estão expressos no anexo I. Observou-se uma dependência linear do deslocamento químico em função da temperatura para todos os compostos, evidenciando que não há variação conformacional das espécies presentes em solução. A variação de deslocamento químico dependente da temperatura é exemplificada para os compostos 12 e 13 (Figuras 90 e 91). Os coeficientes de temperatura de NH(1) e NH(2) de todos os compostos podem ser observados nos gráficos da Figura 92.



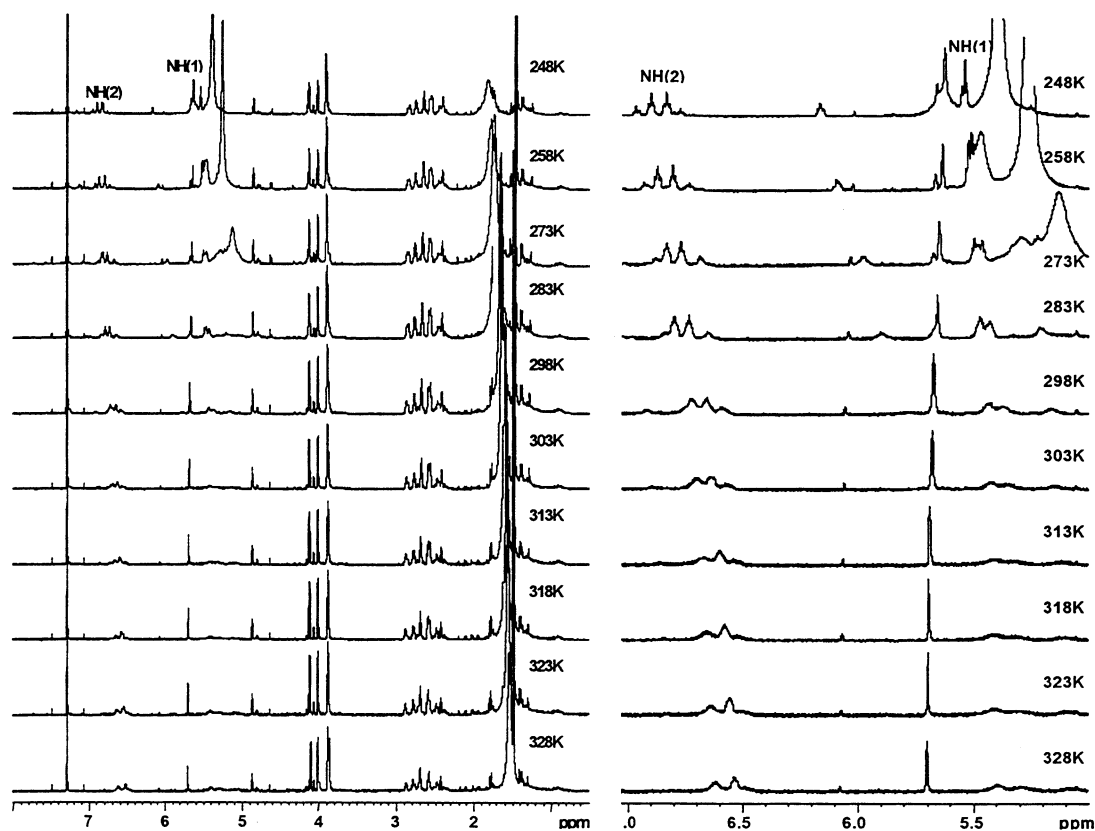


Figura 90. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H do composto 12 em função da temperatura e expansão dos sinais dos NHs.

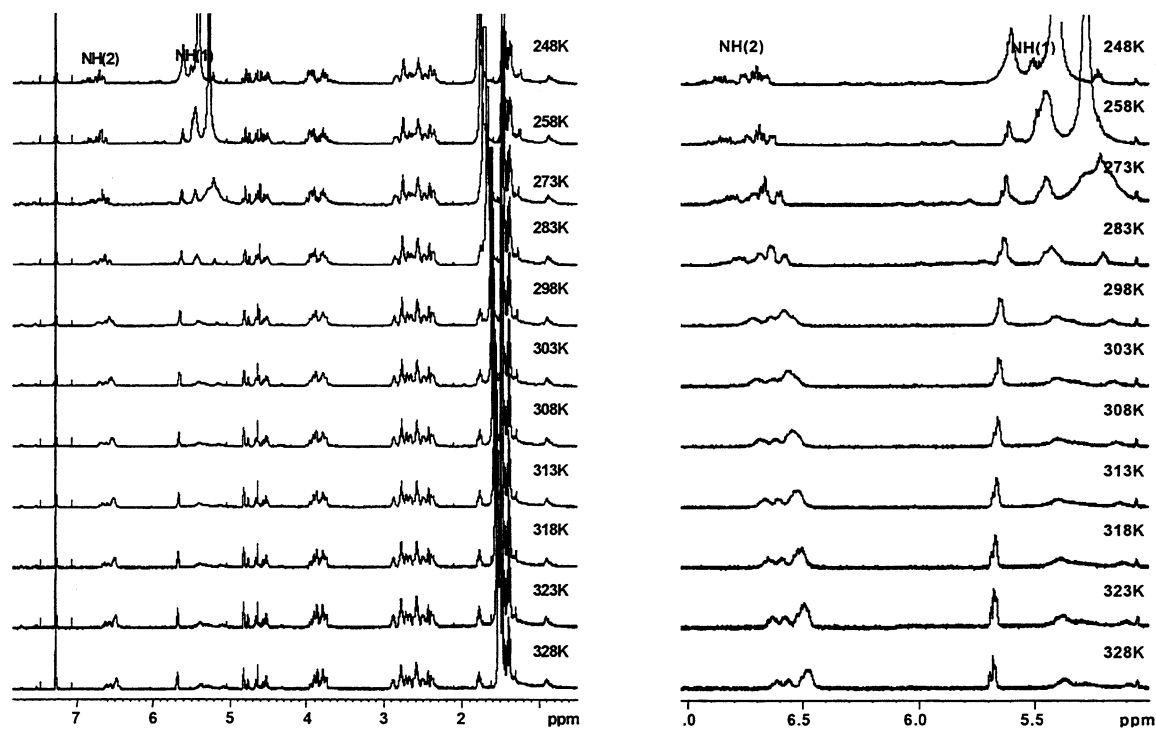
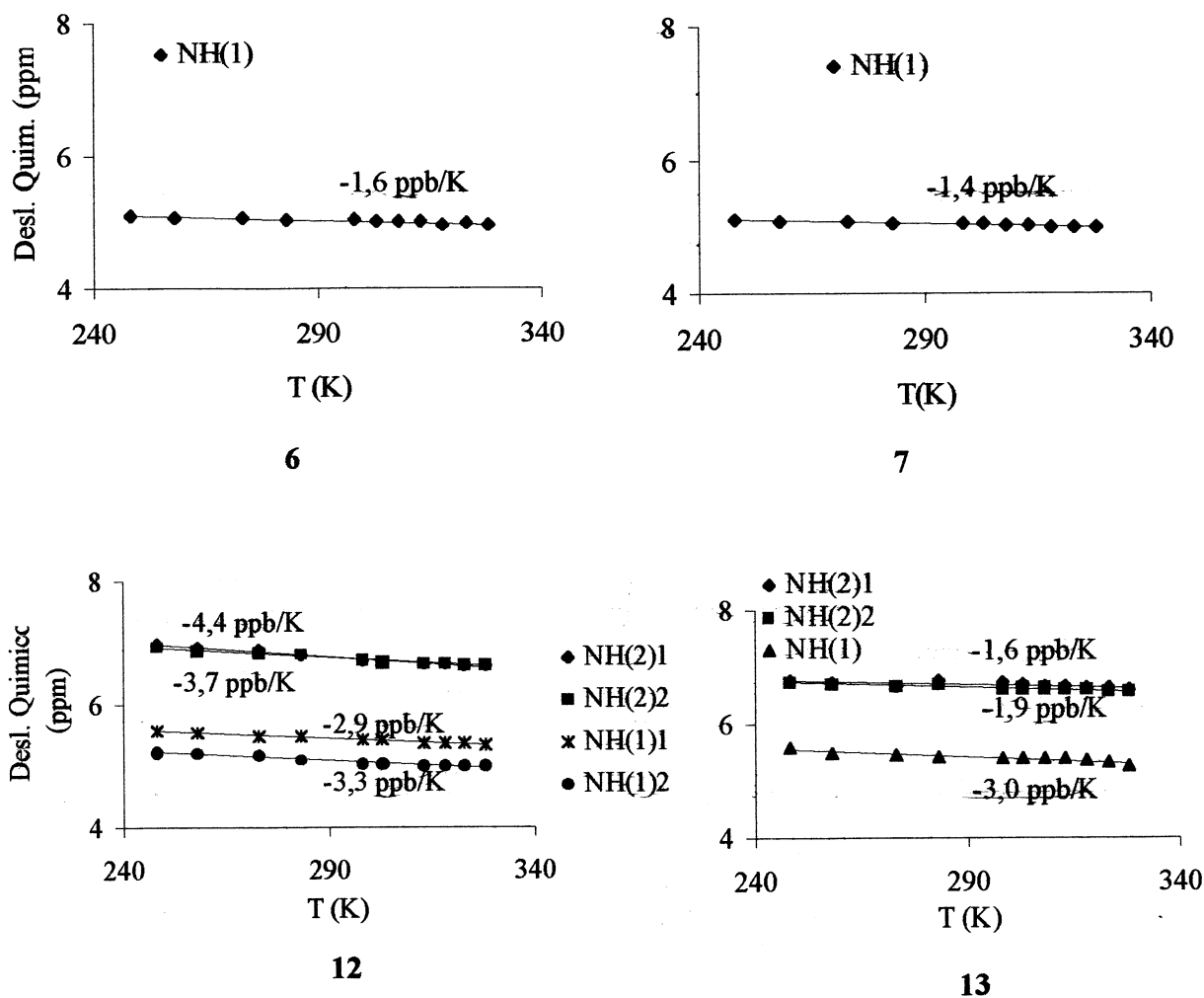


Figura 91. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H do composto 13 em função da temperatura e expansão dos sinais dos NHs.



**Figura 92.** Gráficos da variação do deslocamento químico em função da temperatura para os compostos 6-7 e 12-13.

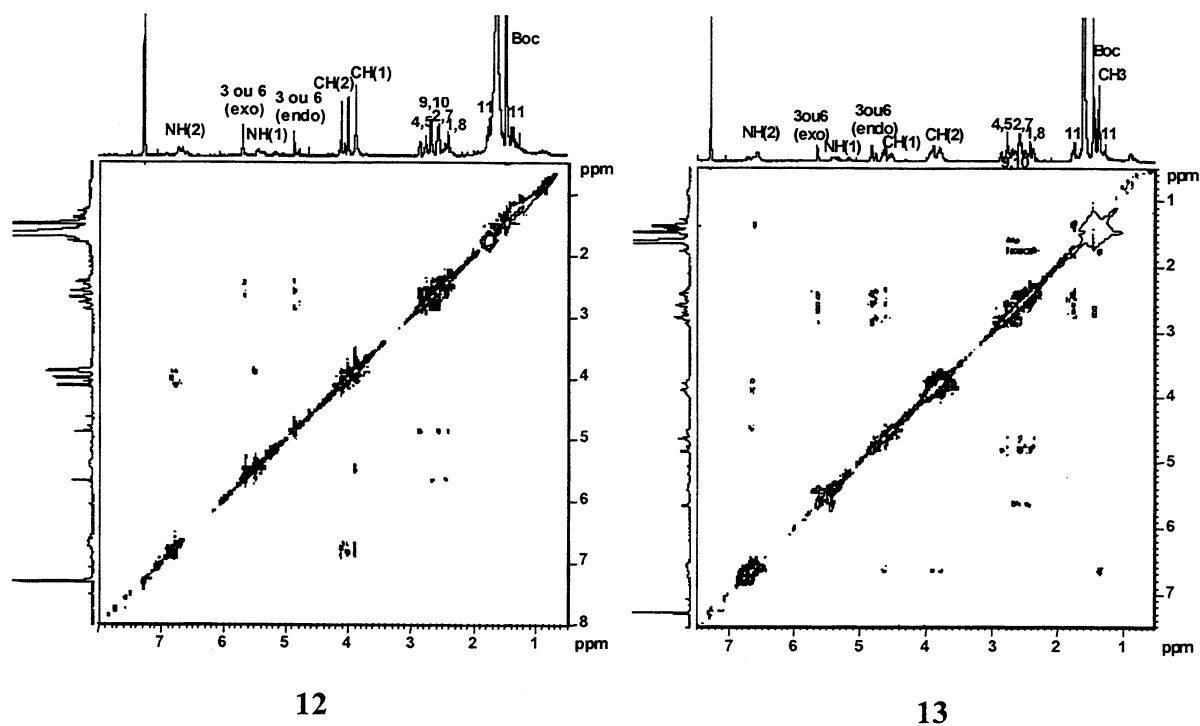
As grandes constantes de velocidade de troca de deutério (Tabela 1 do anexo I) para NH(1) e NH(2) evidenciam que os compostos 6-7 e 12-13 estão prioritariamente na forma livre a temperatura ambiente. Além disso, os compostos 6 e 7 não apresentaram EON típicos de estruturas em dobra e a baixas temperaturas não evidenciaram a presença de espécies ligadas. Portanto, esses dados podem indicar que o sistema *endo-exo* não possui propensão a formar ligações de H intercadeia.

Dados de efeito Overhauser nuclear e constantes de acoplamento  $^3J_{\text{HN-CH}\alpha}$  (Tabela 10 e Figura 93) fornecem evidências suplementares sobre o tipo de conformação secundária adotada pelos compostos 12 e 13 a baixas temperaturas. Observou-se correlações do tipo  $d_{\text{N}\alpha}$ , típicas de estruturas em dobra.

**Tabela 10.** Correlações de NOE e  $^3J_{\text{HN-CH}\alpha}$  a 248K dos compostos 12 e 13.

estrutura	Correlações NOEs	$^3J_{\text{HN (1)-CH}\alpha(1)}$	$^3J_{\text{HN (2)-CH}\alpha(2)}$
12	NH(2)-CH(1)	5,9	5,8 e 6,1
13	NH(2)-CH(1)	6,3	[a]

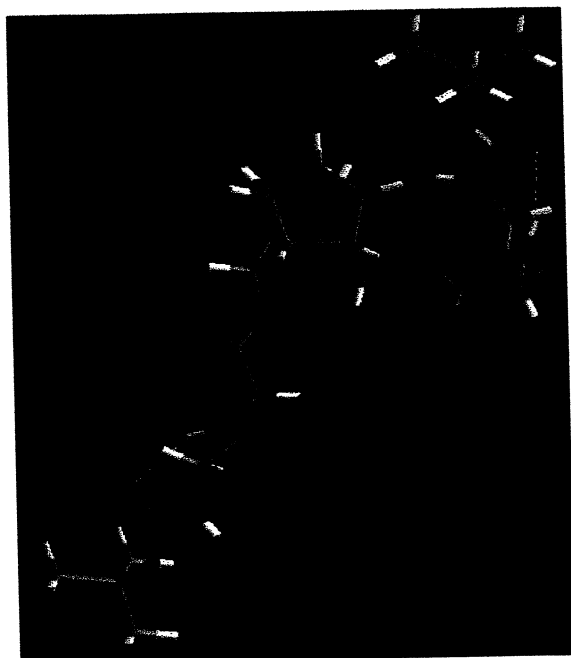
[a]- complexidade dos sinais impediu medida.



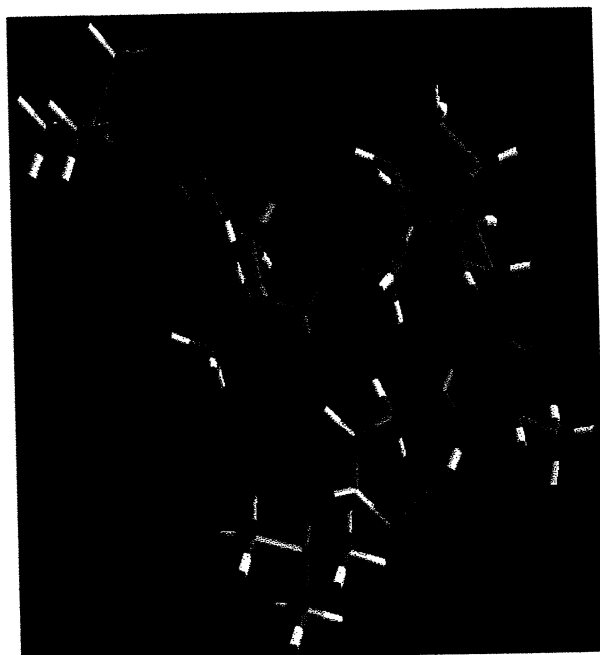
**Figura 93.** Espectro NOESY dos compostos 12 (273K) e 13 (248K) obtidos a 500 MHz.

### Estudo Teórico

A Figura 94 ilustra as simulações teóricas para os compostos 12 e 13. Observou-se a formação de conformações do tipo dobra- $\gamma$  (NH(2)-CO(1)) para ambos compostos.



12



13

**Figura 94.** Cálculos de *ab initio* para os compostos 12 e 13.

Na Tabela 11 pode-se observar a comparação das constantes de acoplamento calculadas e experimentais (medidas a 248K)

**Tabela 11.** Constantes de acoplamento  $^3J_{\text{HN-CH}\alpha}$  (Hz) experimentais e teóricas para os compostos 12 e 13.

Constantes de acoplamento	experimental	6-31G**
$^3J_{\text{HN}(1)\text{CH}\alpha(1)}$ <b>12</b>	5,9	3,3-5,1
$^3J_{\text{HN}(2)\text{CH}\alpha(2)}$ <b>12</b>	5,8 a 6,1	4,0-6,0
$^3J_{\text{HN}(1)\text{CH}\alpha(1)}$ <b>13</b>	6,3	3,6-5,4
$^3J_{\text{HN}(2)\text{CH}\alpha(2)}$ <b>13</b> <sup>[a]</sup>	-	1,5-3,0

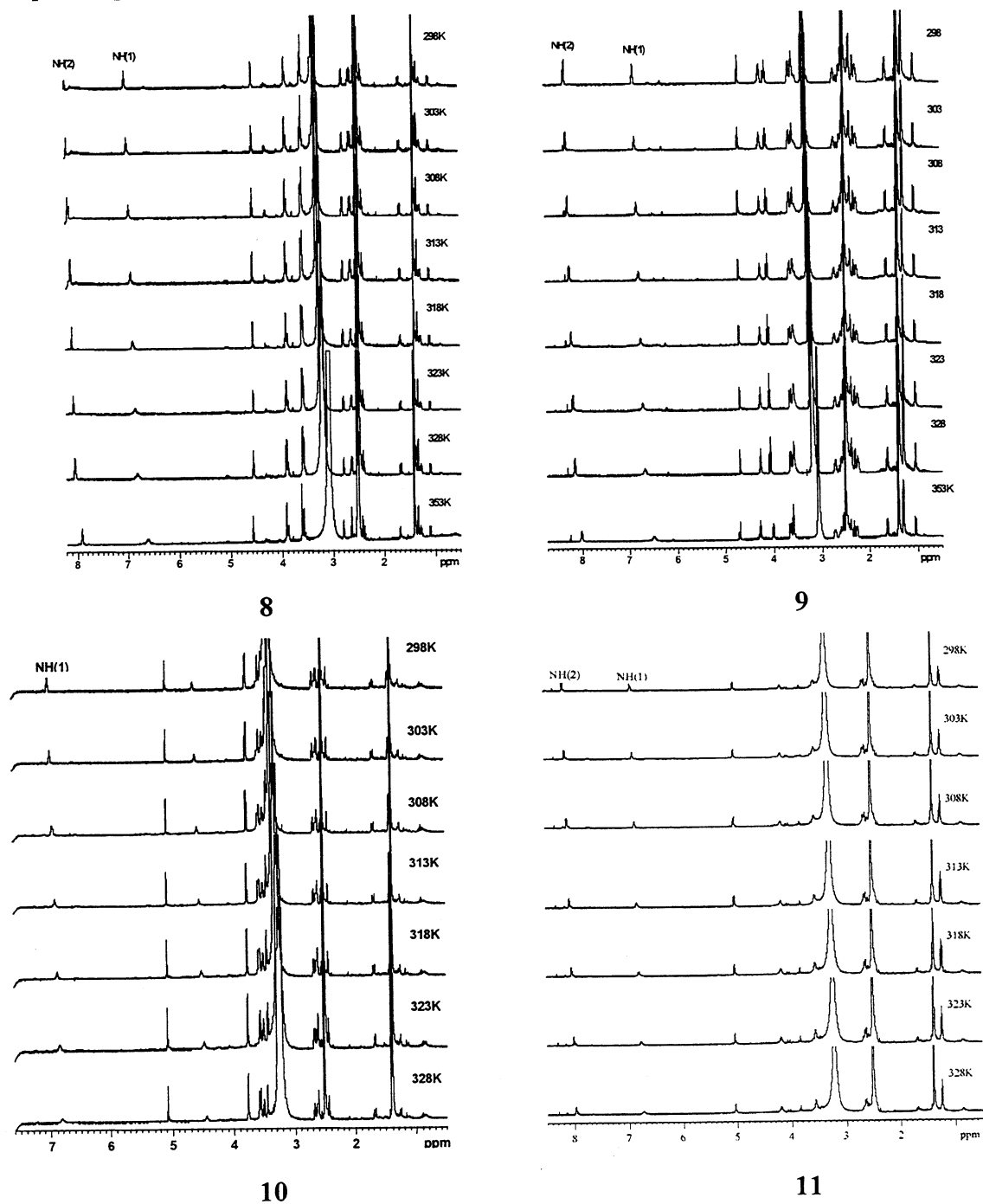
[a]- complexidade dos sinais de NH impediu a medida.

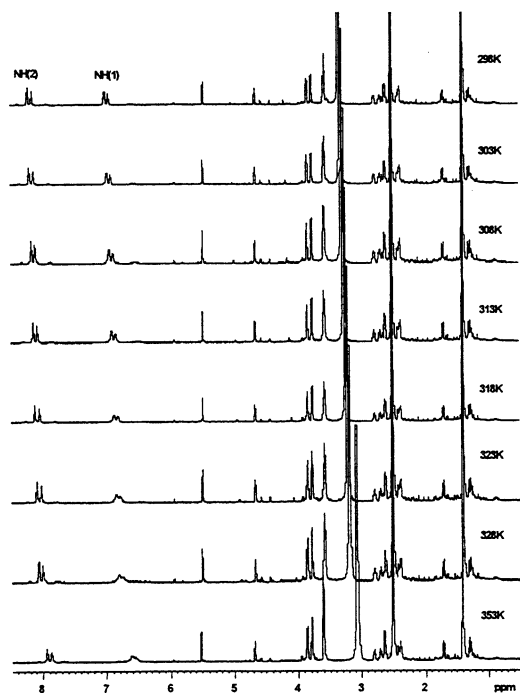
Os modelos calculados, bem como os valores de  $^3J_{\text{HN-CH}\alpha}$  estão em boa correlação com os valores medidos espectroscopicamente.

### 4.3.3. Estudo do Sistema Pentacíclico em Solução de DMSO-*d*<sub>6</sub>

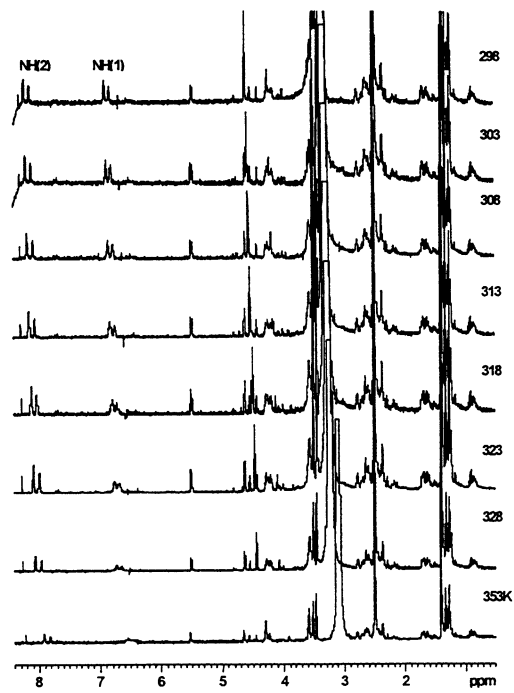
#### Determinação de Estruturas Secundárias Estudo de RMN

Observou-se dependência linear dos deslocamentos químicos de NH com a temperatura quando experimentos foram realizados em DMSO-*d*<sub>6</sub>. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H em função da temperatura para os compostos 8-13 são exemplificados na Figura 95, enquanto que os respectivos gráficos podem ser observados na Figura 96.



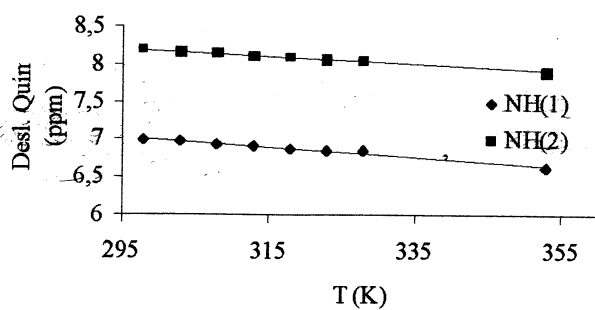


12

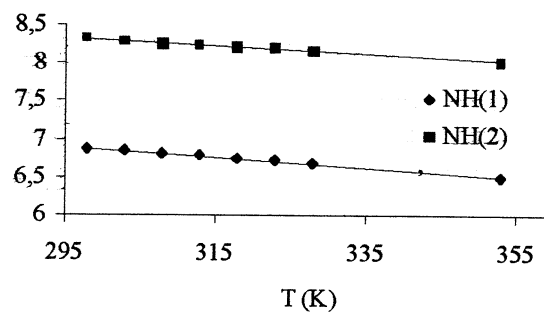


13

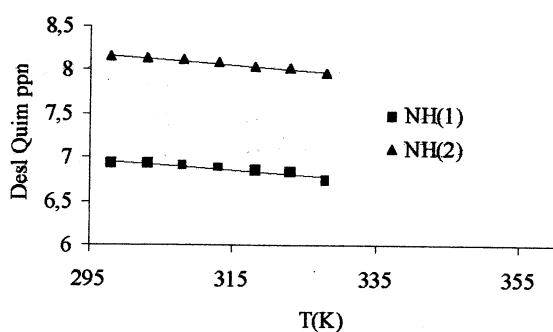
**Figura 95.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos compostos 8-13 em solução de DMSO-*d*<sub>6</sub> 3 mM em função da temperatura.



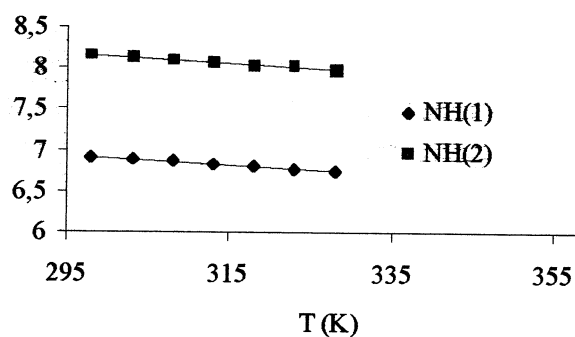
8



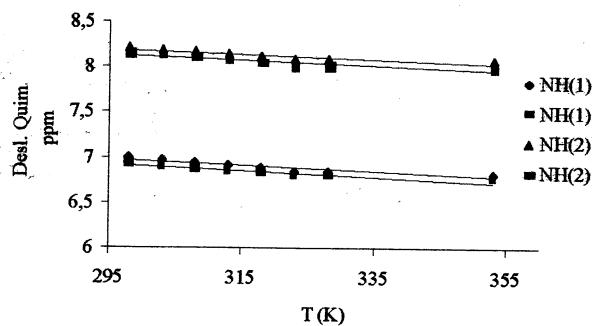
9



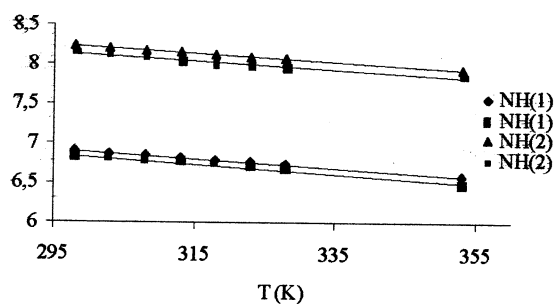
10



11



12



13

**Figura 96.** Gráficos da variação do deslocamento químico em função da temperatura em solução de DMSO-*d*<sub>6</sub> a 3 mM para os compostos 8-13.

Os deslocamentos químicos e coeficientes de temperatura dos compostos 6-13 estão ilustrados na Tabela 12.

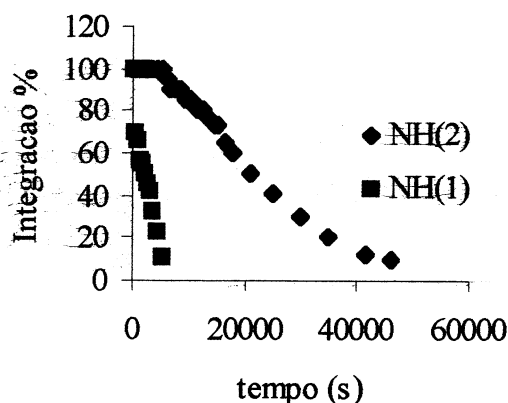
**Tabela 12.** Deslocamentos químicos (298 K) e coeficientes de temperatura (298 K a 353 K) dos hidrogênios NH em solução de DMSO-*d*<sub>6</sub> 3 mM para os compostos 6-13.

composto	<sup>1</sup> Hδ (ppm)	-Δδ/ΔT (ppb/K)
6	7,19 e 7,17	5,3 e 5,0
7	7,28 e 7,22	8,1 e 7,1
8 <sub>NH(1)</sub>	6,99	6,1
8 <sub>NH(2)</sub>	8,18	4,3
9 <sub>NH(1)</sub>	6,87	6,7
9 <sub>NH(2)</sub>	8,31	5,3
10 <sub>NH(1)</sub>	6,92	5,6
10 <sub>NH(2)</sub>	8,15	6,1
11 <sub>NH(1)</sub>	6,91	5,8
11 <sub>NH(2)</sub>	8,15	5,3
12 <sub>NH(1)</sub>	6,94 e 7,00	3,5 e 3,4
12 <sub>NH(2)</sub>	8,15 e 8,21	2,9 e 2,8
13 <sub>NH(1)</sub>	6,83 e 6,90	6,2 e 5,8
13 <sub>NH(2)</sub>	8,15 e 8,24	5,5 e 5,4

Os coeficientes de temperatura foram relativamente altos para todos os compostos com exceção de **12**. Este resultado não era esperado, uma vez que peptídeos com até 3 resíduos possuem tendência considerável em romper suas ligações de H em meios fortemente solvantes como o DMSO-*d*<sub>6</sub>.<sup>68</sup>

Evidência adicional da estrutura secundária é dada pelos experimentos de troca de H/D em solução 3mM de DMSO-*d*<sub>6</sub> (500μL) na presença de D<sub>2</sub>O (50μL) a 298 K (Figura 97). A constante de velocidade de troca do NH amida é muito menor que aquela correspondente ao NH carbamato ( $k_{\text{NH}(2)}=2,0 \times 10^{-5}$ ,  $k_{\text{NH}(1)}=1,0 \times 10^{-4}$ ). A pequena constante de velocidade para o NH amida indica que a ligação de H envolvendo este hidrogênio é estável durante várias horas a estas condições.



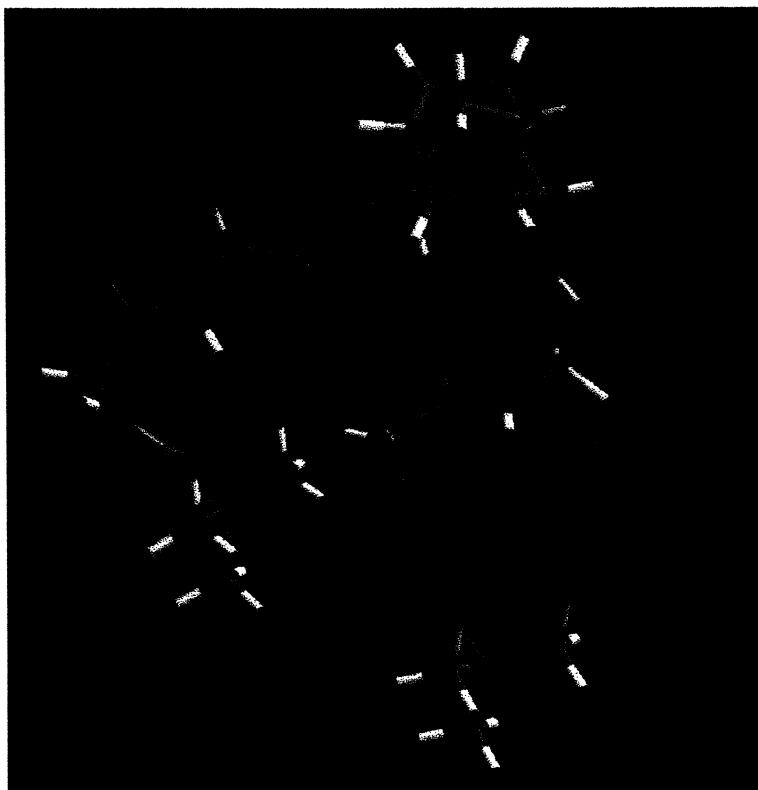


**Figura 97.** Medidas de velocidade troca de H/D para o composto 12 em DMSO-*d*<sub>6</sub>.

Além disso, mesmo com o aumento da temperatura a 80°C (Figura 95), os hidrogênios NH(2) mantêm sua resolução, enquanto que o sinal do NH(1) arredonda. A perda de resolução com aumento da temperatura é normalmente observado para hidrogênios NH expostos ao solvente.<sup>69</sup> Considera-se, ainda, que a pequena constante de acoplamento  $^3J_{\text{HN}(2)\text{-CH}(2)}$  de 4,3 Hz indica a presença de uma conformação restringida. Correlações de NOE típicas de conformação em dobra foram observadas entre NH(2) e ambos NH(1) e CH(1). Estes dados corroboram com a proposição do envolvimento do NH(2) em ligação de hidrogênio intramolecular.

### Estudo teórico

A estrutura calculada, obtida através dos mesmos procedimentos descritos acima, revela a formação de ligação intracadeia disposta na forma de um dobra- $\gamma$  para uma das cadeias peptídicas e na forma de um dobra- $\gamma$  (NH...OC 2,21-2,28 Å e N-H...O 139,9-143,3°) e uma estrutura C5 (NH...OC 2,29 Å e N-H...O 102,7°) para a outra cadeia peptídica (Figura 98). Esta última representa uma classe distinta de ligação intramolecular e já foi previamente detectada tanto em peptídeos quanto em proteínas.<sup>15, 70</sup> Embora a estrutura em dobra-C5 represente uma ligação de H fraca (devido ao pequeno ângulo NH...O), esta conformação pode ser estabilizada por interações eletrostáticas (dipolo), uma vez que existe a coplanaridade da carbonila e do NH amida.<sup>13</sup>



**Figura 98.** Estrutura do composto 12 minimizada por cálculos *ab initio* (a partir de dados experimentais em solução de DMSO-*d*<sub>6</sub>).

Ressalta-se que a presença de dois receptores CO para um doador NH também poderia explicar a grande estabilidade desta conformação. O modelo calculado fornece as distâncias NH(1)···NH(2) de 3,61-3,67 e NH(2)···CH(1) de 2,50-2,64 Å e constante de acoplamento  $^3J_{\text{HN(2)-CH(2)}}$  de 4,1 a 6,0 Hz, os quais estão de acordo com os resultados experimentais.

#### 4.3.4. Comparação entre os Sistemas Pentacíclicos

Os resultados acima evidenciaram a tendência dos sistemas pentacíclicos em formar estruturas do tipo dobra- $\gamma$  e dobras-C8. É bom lembrar que o deslocamento químico de um hidrogênio NH depende da força da ligação de H e de sua orientação relativa ao cone de anisotropia da carbonila ligada a este hidrogênio. Normalmente, as dobras- $\gamma$  são estruturas onde o hidrogênio NH encontra-se fora do cone de anisotropia.<sup>71a</sup> Conseqüentemente, os hidrogênios envolvidos nestas ligações devem sofrer uma blindagem relativa a outras formas de ligações intramoleculares.

O sistema *endo-exo* possui maior tendência a formar dobra- $\gamma$  que estruturas de C8 membros. Além disso, observou-se maior probabilidade deste sistema em formar ligação de H em solvente polar. A observação de dobras- $\gamma$  em DMSO é um resultado interessante, uma vez que este tipo de estruturas secundária é comumente observada em soluções de solventes pouco polares.<sup>71</sup>

Uma aparente similaridade entre os sistemas *endo-endo* e *exo-exo* foi observada. Com o objetivo de determinar as diferenças relativas entre estes sistemas, comparou-se parâmetros geométricos relevantes (Tabela 13) e calculou-se o efeito do solvente nas conformações encontradas.<sup>13</sup>

**Tabela 13.** Distâncias (Å) e ângulos N-H...O (°) de estruturas de cálculos *ab initio* no vácuo para os compostos 8-13.

composto	d <sub>NH...OC</sub>	ângulo <sub>N-H...O</sub>
8	2,38	148,1-149,7
9	2,13-2,23	141,0-145,4
10	2,32-2,34	156,1-156,3
11	2,11-2,12	137,1-142,7
12	2,19-2,21	140,9-144,0
13	2,06-2,14	143,9-147,9

Para o estudo de efeito de solvente empregou-se o modelo “*self-consistent isodensity surface polarized continuum model*” (SCIPCM,  $\epsilon = 5.0$  para  $\text{CHCl}_3$ ). Estimou-se, deste modo, a energia de solvatação no nível HF/6-31G\*\* (Tabela 14).

**Tabela 14.** Energia de Solvatação Relativa dos Compostos **8-13** (SCIPCM,  $\epsilon = 5.0$  para  $\text{CHCl}_3$ ).

Composto	dipolo (D) <sub>gás</sub>	$\Delta E_{\epsilon=5}$ (kcal/mol)
<b>8</b>	9,3	-0,036
<b>9</b>	3,1	-0,028
<b>10</b>	7,7	-0,037
<b>11</b>	6,2	-0,043
<b>12</b> <sup>[a]</sup>	4,6	-0,038
<b>12</b> <sup>[b]</sup>	4,3	-0,031
<b>13</b>	8,9	-0,025

[a]- Estrutura extraída de dados experimentais em solução de  $\text{CHCl}_3$ ; [b]- Estrutura extraída de dados experimentais em solução de  $\text{DMSO-}d_6$ .

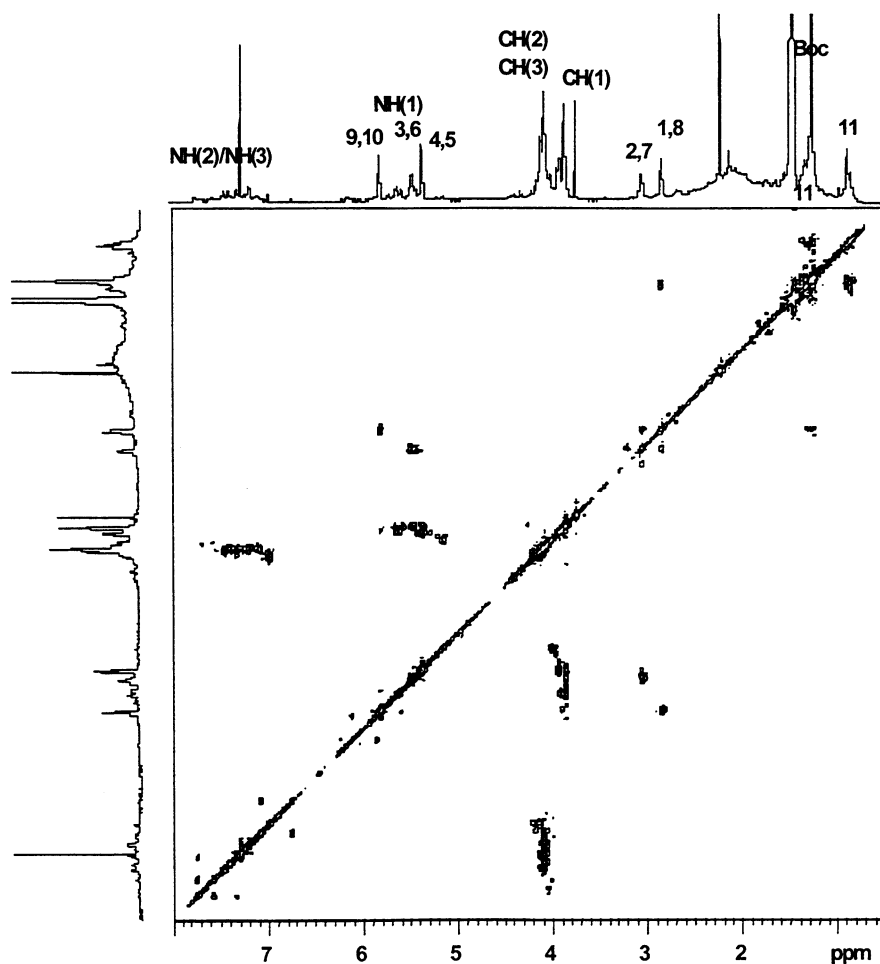
Neste sentido, foi observado: (1) Os pseudopeptídeos **10** e **11** possuem menores comprimento de ligação de H que, respectivamente, **8** e **9** (Tabela 13); (2) as diferenças entre as energias solvatadas e não solvatadas são muito pequenas; (3) A comparação das conformações obtidas para o composto **12** em  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{DMSO-}d_6$ , mostrou que a primeira é mais estável quando solvatada em  $\text{CDCl}_3$ , o que já era esperado. (4) Para os sistemas *endo-endo* e *exo-exo* há um acréscimo na polaridade da molécula ao passar da conformação dobra- $\gamma$  para dobra-C8.

As diferenças de energia encontradas evidenciam que provavelmente a conformação adotada por estes compostos é pouco influenciada pela solvatação e que os conformeros não mudariam significativamente se fossem realizados cálculos de minimização de energia solvatados. Considerando-se os dados geométricos, pode-se concluir que há uma maior estabilização das estruturas em dobra-C8 e dobra- $\gamma$  para o sistema *exo-exo* que para o *endo-endo*, confirmando os dados experimentais observados para estes compostos a temperatura ambiente. Isto pode ser explicado através do decréscimo de interações estéricas entre as cadeias peptídicas observadas para estes dois compostos. Menores momentos de dipolos para dobras- $\gamma$  indicam sua maior tendência em se formar em solventes apolares.

#### 4.3.5. Estudo do Sistema tricíclico em Solução de $\text{CDCl}_3$

##### Atribuição dos sinais de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$

Inicialmente, os sinais de RMN de hidrogênio e carbono-13 foram atribuídos utilizando-se as técnicas COSY e HETCOR ou HMQC e correlações espaciais usando-se o experimento NOESY. Um espectro COSY é exemplificado para o composto **16** na Figura 99.



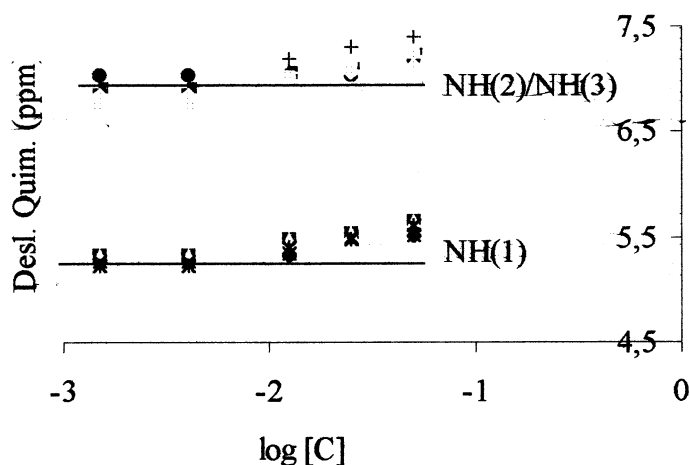
**Figura 99.** Espectro COSY do composto **16** a 273K obtido a 600MHz.

Observou-se correlações entre os hidrogênios NH e seus respectivos hidrogênios  $\text{CH}\alpha$ , além das correlações entre os hidrogênios das posições 3,6 com os hidrogênios das posições 2,7 e os hidrogênios das posições 9,10 com os hidrogênios das posições 1,8. Estes últimos correlacionam-se com um dos hidrogênios geminados da posição 11.

## Determinação de Estruturas Secundárias

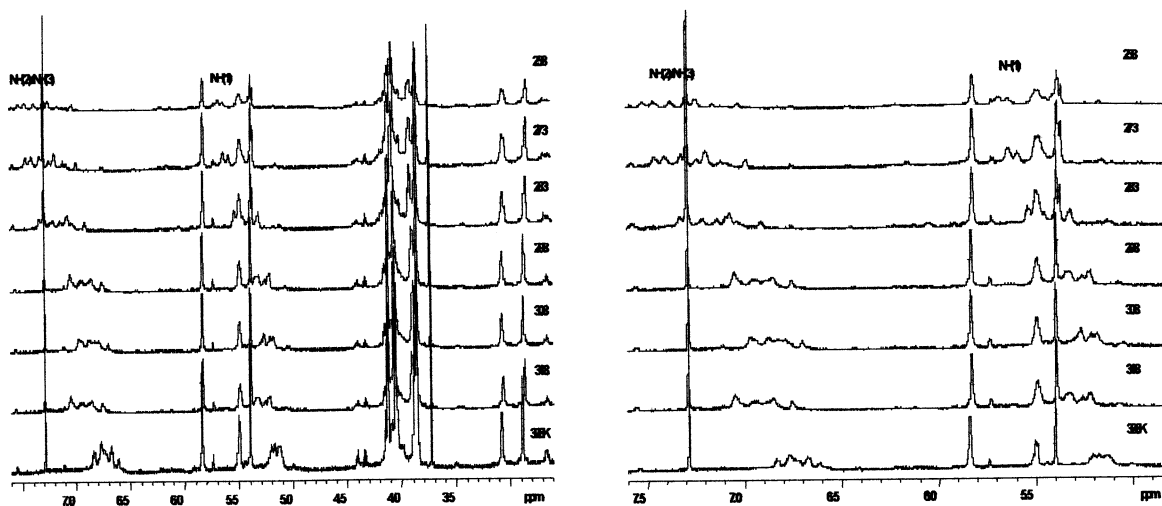
### Estudo de RMN

As curvas de dependência de concentração dos deslocamentos químicos de NH em solução de  $\text{CDCl}_3$  sugerem ausência de efeito de agregação na faixa de 1 mM a 3 mM para os compostos 16-18 e 1 mM a 50 mM para os compostos 19-22. Um gráfico de deslocamento químico em função do logaritmo da concentração é exemplificado na Figura 100. Os demais gráficos podem ser encontrados no anexo III.

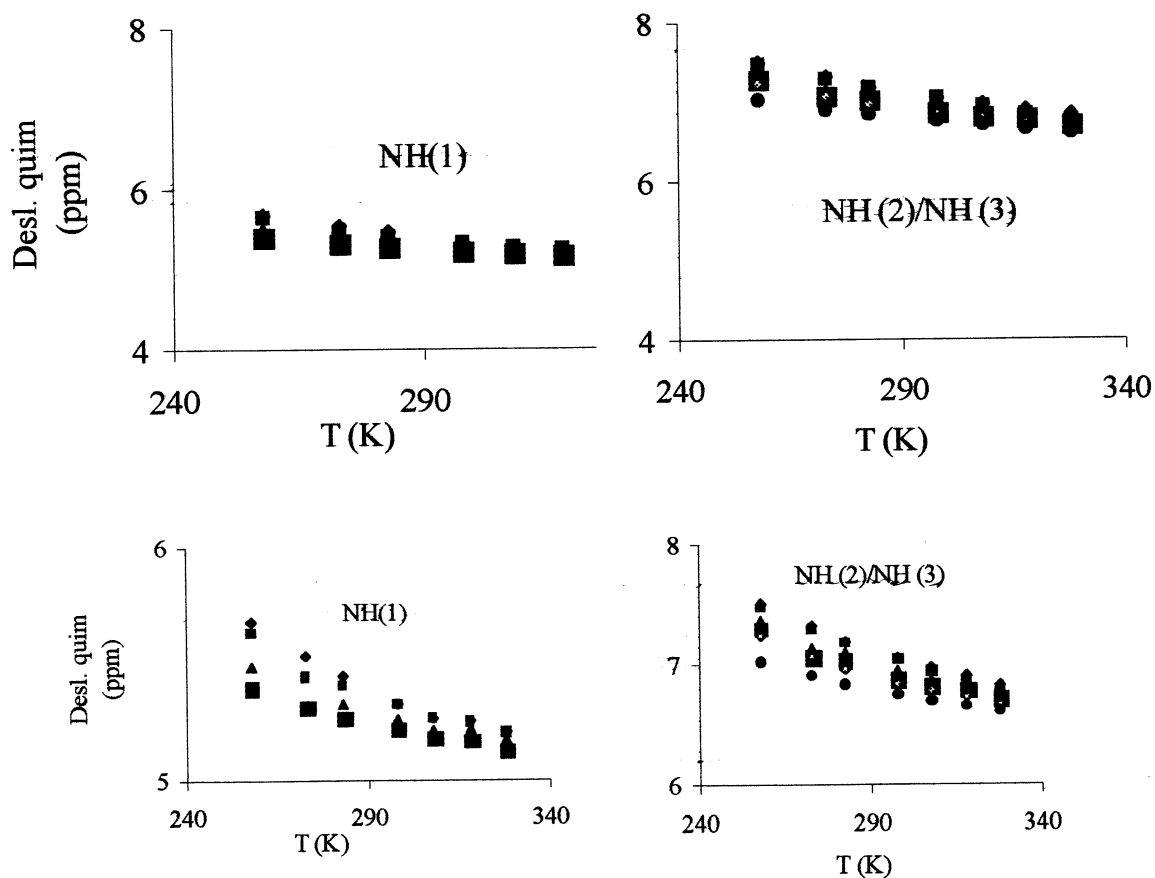


**Figura 100.** Gráfico de deslocamento químico em função do log [C] para o composto 16

Observou-se uma variação linear da temperatura para todos os compostos na faixa de 248-328 K, exceto para o composto 1 (mudança no coeficiente angular da reta a 298K), indicando que apenas duas espécies estão presentes em solução (uma ligada e outra não-ligada) ou o equilíbrio entre diversas espécies representando um único espectro em toda a faixa de temperatura analisada. Exemplificação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  a várias temperaturas e dos gráficos de deslocamento químico dos hidrogênios NH em função da temperatura são ilustrados nas Figuras 101 e 102 para o composto 16. Os deslocamentos químicos e os coeficientes de temperatura dos hidrogênios NH-carbamato e NH-amida estão expressos na Tabela 15 e demais gráficos podem ser encontrados no anexo III.



**Figura 101.** Espectros de RMN-<sup>1</sup>H do composto 16 em função da temperatura



**Figura 102.** Gráficos de deslocamento químico dos hidrogênios NH em função da temperatura e suas respectivas expansões para o composto 16

**Tabela 15.** Deslocamentos químicos (298 K) e coeficiente de temperatura dos compostos 16-22 em solução 3 mM de CDCl<sub>3</sub> (248 K a 328 K).

Composto	$\delta$ (ppm)		$\Delta\delta/\Delta T$ (ppb/K)	
	NH <sub>carbamato</sub>	NH <sub>amida</sub>	NH <sub>carbamato</sub>	NH <sub>amida</sub>
16	5,21 e 5,32	6,75; 6,86; 6,95; 7,05	-4,6 e -8,8 <sup>a</sup>	-6,8; -10,0; -10,2; -11,6 <sup>a</sup>
17	5,11	6,64	-2,8	-3,2
18	5,10	6,64	-2,3	-3,0
19	5,07	-	-2,8	-
20	4,97	-	-2,4	-
21	5,01	-	-1,6	-
22	5,00	-	-2,5	-

a-Valores calculados entre 258 e 298 K.

Observou-se pequenos coeficientes de temperatura para todos os compostos com exceção para o composto 1. Segundo a literatura,<sup>4</sup> a presença de ligações de H intramoleculares é possível em toda a faixa de coeficiente de temperatura observada para os compostos 16-22.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H de 16 apresentou-se complexo à temperatura ambiente, mostrando pelo menos 4 sinais relativos ao NH-amida e dois relativos ao NH-carbamato distribuídos em dois conjuntos de sinais (Figura 101). Em geral, os compostos 17 a 22 mostraram apenas um conjunto de sinais de ressonância, indicando a presença de uma conformação preferencial e/ou a média entre diferentes conformações a esta temperatura. Apesar de não esperar-se que os sinais das duas cadeias peptídicas de 18, 20 e 21 fossem semelhantes, devido a presença de um centro quiral, nenhuma diferença significativa foi observada. Entretanto, uma pequena diferença foi observada para os sinais dos hidrogênios das posições 4 e 5 do anel tricíclico dos compostos 18 e 20 e para os sinais dos hidrogênios das posições 3, 4, 5 e 6 do composto 21. À baixa temperatura, observou-se a resolução dos sinais correspondentes aos NH-carbamato e aos NH-amida de 16, o que pode ser explicado através de um processo de troca dinâmica em solução. Neste sentido, pode-se observar sinais



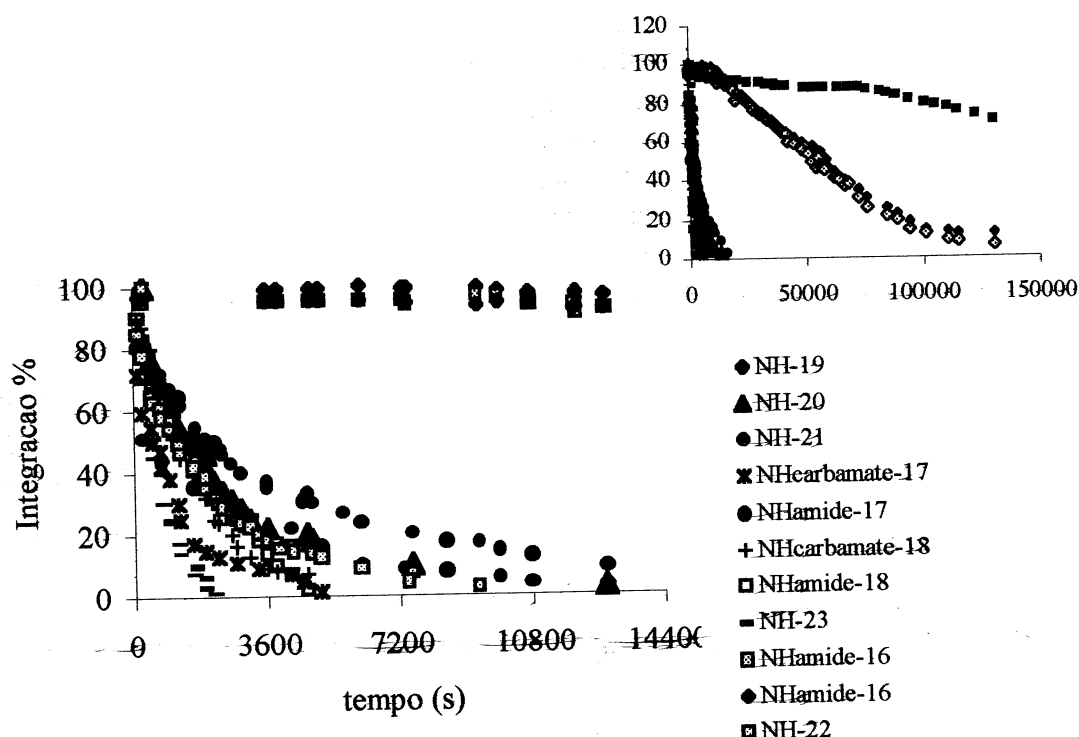
de ressonância correspondentes a espécies em equilíbrio em solução, devido a redução da velocidade deste equilíbrio quando se reduz a temperatura.

Para a análise de deslocamento químico dos hidrogênios NH, é preciso considerar que os hidrogênios NH ligados em peptídeos com conformações em dobra parcialmente populadas geralmente aparecem blindados relativo a NH completamente ligados.<sup>53</sup> Além disso, adicionalmente a ligações de hidrogênio amida-amida (NH<sub>amida</sub>-CO<sub>amida</sub>) outras combinações são possíveis para estes compostos: carbamato-éster, amida-éster ou carbamato-carbamato. Dessa forma, uma ligação de H envolvendo um CO-éster como receptor não produz uma desblindagem substancial do deslocamento químico do NH ( $\delta_{\text{NH}}$ ) em contraste com o efeito de uma ligação de H intramolecular envolvendo um receptor CO-amida.<sup>37b,72</sup> Estudos comparando ligações de H amida-amida e amida-éster denotam que a primeira é cerca de 1,6 a 3,0 Kcal/mol entalpicamente mais estável que a outra.<sup>37b</sup> Com relação ao carbamato, dois pontos podem ser levantados: (1) ele deve ser um CO receptor mais forte que o CO amida devido a maior efeito indutivo, mas; (2) ele deve ser um NH receptor mais fraco que o NH amida. Como resultado destas diferenças, a variação do deslocamento químico entre as espécies ligadas e não-ligadas é menor para um NH em ligação de H do tipo carbamato-éster, carbamato-amida ou amida-éster que para um NH amida-amida.<sup>37b</sup> Considerando estas observações prévias, desenvolveu-se o estudo de deslocamento químico empregando-se os compostos **23** e **24** a 3 mM (a esta concentração a agregação destes compostos é negligenciável - vide anexo II) como referências não ligadas para comparar respectivamente com os compostos **19-22** e **17-18**. Pode-se observar que os deslocamentos químicos dos hidrogênios NH-carbamato aparecem em região diferente que os hidrogênios NH-amida (Tabela 15). Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H a 298 K em solução 3 mM de CDCl<sub>3</sub> mostrou deslocamentos químicos de 4,85 ppm e 5,00 ppm para os NH-carbamato dos compostos **23** e **24** e um deslocamento químico de 6,45 ppm para o NH-amida do composto **24** a temperatura ambiente. Os deslocamentos químicos do NH-carbamato dos compostos **19-22** são em torno de 0,12 ppm a 0,22 ppm mais desblindados quando comparados com o  $\delta_{\text{NH}}$  do composto **23**. Já os deslocamentos químicos dos NH-carbamato e NH-amida dos compostos **17-18** são respectivamente 0,10 ppm a 0,11 ppm e 0,19 ppm a 0,20 ppm mais desblindados quando comparados com os  $\delta_{\text{NH}}$  do composto **24**. Estes dados estão de acordo com os dados obtidos por Gellman e Gallo<sup>37b</sup> que observaram variações de  $\delta_{\text{NH}}$  para hidrogênios NH-carbamato de 0,1 ppm a 0,5 ppm, as quais foram atribuídas à presença dos estados ligados e não ligados. Estes autores determinaram que os compostos que apresentaram

uma variação de deslocamento químico de 0,1 ppm estão aproximadamente 60% em ligação de H intramolecular a 273 K. Neste sentido, nossas observações sugerem que os compostos **17-22** apresentam uma percentagem de suas populações em ligação de H a 298 K.

Com o objetivo de estudar a estabilidade relativa dos hidrogênios ligados em solução de  $\text{CDCl}_3$ , analisou-se a dependência do deslocamento químico de NH quando adicionado  $\text{DMSO-}d_6$  em solução de  $\text{CDCl}_3$ . Quando comparados com os sinais em solução de  $\text{CDCl}_3$ , o decapeptídeo **17** apresenta, em solução de 15 % (v/v)  $\text{DMSO-}d_6$  em  $\text{CDCl}_3$ , dois sinais de hidrogênios NH-amida desblindados respectivamente 0,7 e 1,0 ppm. Estes sinais integram 1:1 e desaparecem instantaneamente ao adicionar-se  $\text{D}_2\text{O}$ . Os compostos **18**, **20** e **21** apresentam significativas variações dos deslocamentos químicos de NH. Entretanto, o composto **19** mostra mais três sinais de hidrogênio NH em solução de  $\text{DMSO-}d_6/\text{CDCl}_3$ , absorvendo a 5,9 ppm, 5,8 ppm e 5,6 ppm, além daquele observado em solução pura de  $\text{CDCl}_3$ . Os três novos sinais desaparecem instantaneamente após adição de 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ . Este resultado indica que o sinal que é observado em ambas soluções é provavelmente relativo a um hidrogênio NH ligado. Para o composto **22**, observou-se o mesmo sinal de RMN de  $^1\text{H}$  em ambas soluções. Estes dados evidenciam que as ligações de H dos compostos **19** e **22** são provavelmente mais estabilizadas que para os compostos **17-18** e **20-21**.

Outra evidência que comprova a ligação de hidrogênio intramolecular foi observada através da determinação da velocidade de troca hidrogênio-deutério para os hidrogênios NH em uma solução 3 mM de uma mistura 1:1 (v/v) de  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 295 K.<sup>53</sup> A figura 103 ilustra as curvas de integração dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  em função do tempo para os compostos **16-23**. A curva para **24** não está representada na Figura 103 uma vez que este apresentou uma troca H/D muito rápida, impossibilitando as medidas.



**Figura 103.** Curvas de integração dos hidrogênios NH em função do tempo no experimento de troca de H/D

Kuroda e colaboradores determinaram constantes de velocidade de troca de H/D para ligações de hidrogênios amida-amida em conformações do tipo dobra- $\gamma$  de peptídeos miméticos incorporando anéis adamantano.<sup>24</sup> Estas constantes de velocidade apresentaram valores entre  $2,8 \times 10^{-5}$  a  $2,3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  para hidrogênios NH ligados intramolecularmente e entre  $4,2 \times 10^{-4}$  a  $4,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  para hidrogênios NH livres. O valor da constante de velocidade de troca H/D para o composto **16** foi de  $5,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  a  $3,0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  para NH(2) e NH(3) e maior que  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  para NH(1) (Tabela 16). A integração após a adição de  $\text{CD}_3\text{OD}$  indica que um hidrogênio NH-amida apresenta troca mais rápida que os outros três. As constantes de velocidade de troca para NH(1) dos compostos **17-22** foram determinadas na faixa de  $7,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  a  $5,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ . Para o NH(2) dos compostos **17** e **18** estas constantes foram, respectivamente,  $2,3 \times 10^{-4}$  e  $6,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Da mesma forma que para os compostos pentacíclicos, utilizou-se os compostos **23** e **24** como referências não ligadas. A comparação destes resultados evidencia a formação de ligação de H intramolecular para todos os

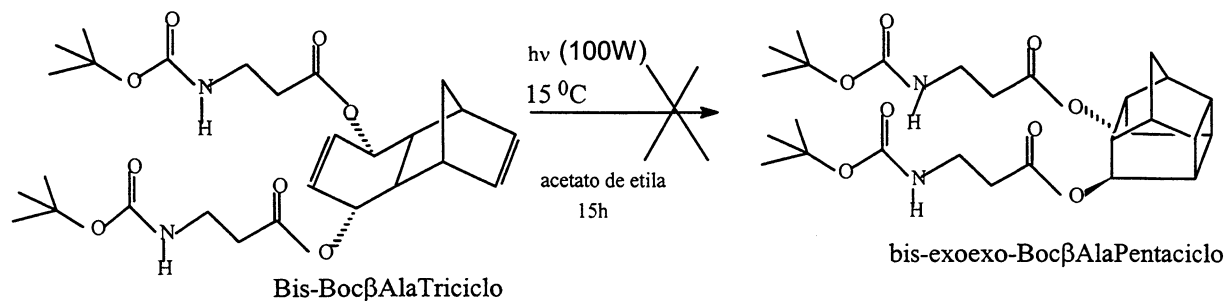
compostos. O composto **16** possui provavelmente três NH-amida envolvidos em ligação de H intramolecular (dois deles possuem uma constante de velocidade de troca de  $5,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  e o outro possui uma constante de  $3,0 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ), enquanto que os hidrogênios NH-carbamato e um dos NH-amida encontra-se livre. Os compostos **17** e **18** apresentam ambos hidrogênios NH(1) e NH(2) envolvidos em ligação de H intramolecular.

**Tabela 16.** Velocidade de troca de hidrogênio-deutério para os hidrogênios NH dos compostos **16-24**.

Composto	k (s <sup>-1</sup> )	
	NH-carbamato	NH-amida
<b>16</b> <sup>a</sup>	>10 <sup>-3</sup>	5,0 x 10 <sup>-5</sup> a 3,0 x 10 <sup>-6</sup>
<b>17</b>	5,9 x 10 <sup>-4</sup>	2,3 x 10 <sup>-4</sup>
<b>18</b>	7,0 x 10 <sup>-4</sup>	6,0 x 10 <sup>-4</sup>
<b>19</b>	5,0 x 10 <sup>-5</sup>	-
<b>20</b>	4,0 x 10 <sup>-4</sup>	-
<b>21</b>	2,0 x 10 <sup>-4</sup>	-
<b>22</b>	4,0 x 10 <sup>-4</sup>	-
<b>23</b>	1,9 x 10 <sup>-3</sup>	-
<b>24</b>	>10 <sup>-3</sup>	>10 <sup>-3</sup>

a-Dados dos NH-amida correspondem a três hidrogênios com troca lenta.

Os estudos de efeito Overhauser nuclear (NOE) em solução 3 mM de CDCl<sub>3</sub> mostraram correlações entre átomos de hidrogênio do anel tricíclico das posições 2 e 7 e os átomos de hidrogênios das posições 4, 5 e 11 para todos os derivados. Estes resultados evidenciam que o anel tricíclico está bloqueado na conformação aberta.<sup>73</sup> Para confirmar esta interpretação, o composto **22** foi submetido à reação de cicloadição fotoquímica (hv, 100W; 15 °C; 15 h) e não foram observados traços de formação do aduto.



**Figura 104.** Reação de fotociclização para **22**.

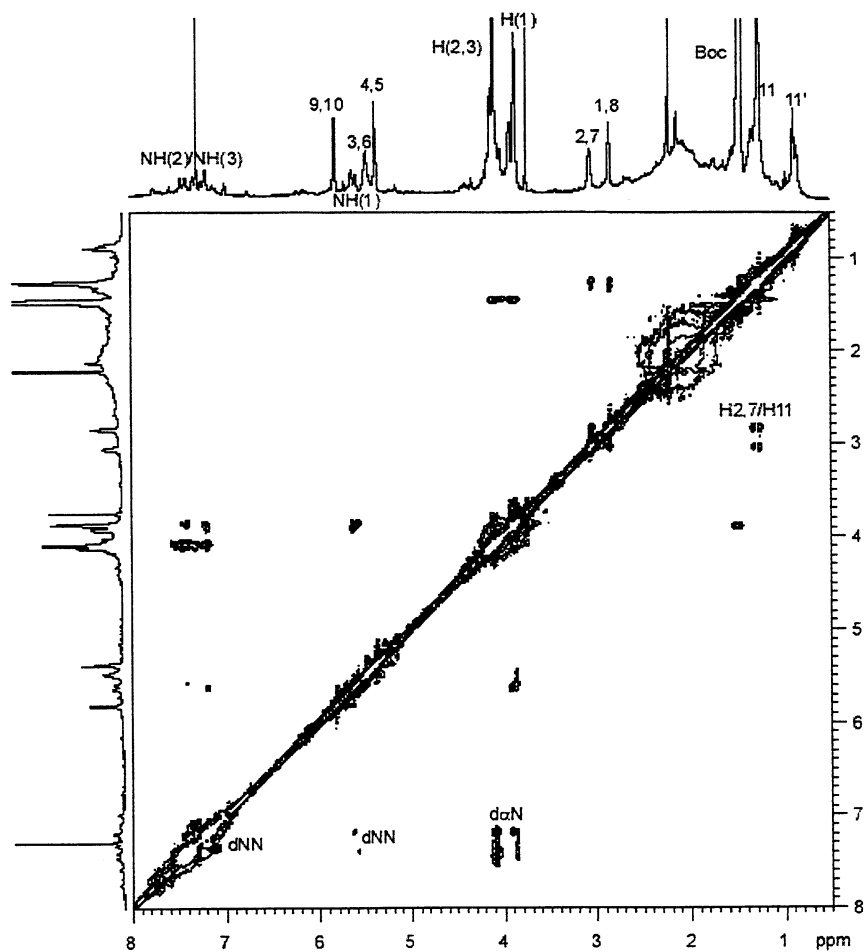
Outros dados importantes de correlações NOE são mostrados na Tabela 17 e Figura 105, onde exemplifica-se o espectro NOESY para o composto **16**.

**Tabela 17.** Correlações NOE relevantes dos compostos **16-18**.

estrutura	Correlações NOE
<b>16<sup>a</sup></b>	$d_{\alpha N}$ ; $d_{NN(i, i+1)}$ ; $d_{NN(i+1, i+2)}$
<b>17<sup>b</sup></b>	$d_{\alpha N(i, i+1)}$
<b>18<sup>b</sup></b>	$d_{\alpha N(i, i+1)}$
<b>22<sup>b</sup></b>	$\underline{NH}/\underline{CH_2}^{\circ}CO$

a- a 263 K. b- a 298K.

A presença de fortes correlações NOE do tipo  $d_{\alpha N}$  sugerem evidências de formação de folheto- $\beta$ . Além disso, observa-se também correlações do tipo  $d_{NN}$ . A correlação entre os hidrogênios da posição 2,7 com um dos hidrogênios geminados, evidencia a conformação aberta.



**Figura 105.** Espectro NOESY de 16 a 263K obtido a 600MHz.

## Análise termodinâmica

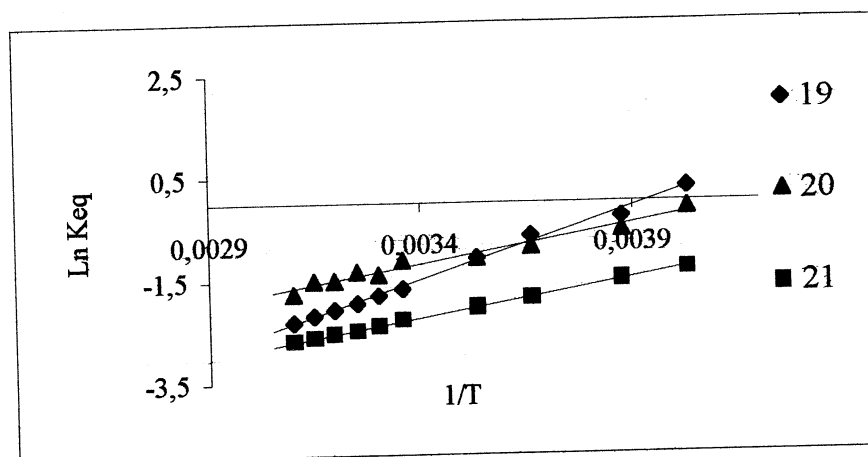
A comparação entre  $\Delta\delta_{\text{NH}}/\Delta T$  de um NH completamente livre com um NH completamente ligado por ligação de H pode produzir informações sobre a população de um NH parcialmente ligado.<sup>67a</sup> Então, o equilíbrio entre as populações ligadas e não ligadas podem ser descritas através das equações (1) e (2):

$$K_{eq} = \frac{(\delta_{obs} - \delta_n)}{(\delta_b - \delta_{obs})} \quad (1)$$

$$\ln K = \frac{-\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (2)$$

onde, o deslocamento químico de um hidrogênio NH em uma ligação de H é descrito através de  $\delta_{obs}$ ;  $\delta_n$  é o deslocamento químico padrão do hidrogênio NH no estado não ligado e  $\delta_b$  é o deslocamento químico padrão do NH no estado completamente ligado. Escolher os padrões  $\delta_b$  e  $\delta_n$  é a tarefa mais difícil neste tipo de estudo, uma vez que é importante que estes sejam provenientes de um sistema similar aquele que se deseja analisar. Uma vez que na literatura não foram encontrados padrões para compostos policíclicos, utilizou-se os compostos **23** e **24** como padrões de compostos não ligados, respectivamente para os compostos *bis*-amino-ácidos e *bis*-pseudopeptídeos. Como padrão ligado escolheu-se os compostos **16** e **17** respectivamente para o NH-amida dos compostos **17** e **18** e para o NH-carbamato dos compostos **19-21**. Utilizou-se, também, o composto **19** como padrão para os compostos **20-21** e comparou-se os resultados com aqueles obtidos utilizando-se **17** como referência. Não encontrou-se uma referência ligada adequada para o NH(1) dos compostos **17-18**. É conhecido na literatura que erros sistemáticos (podendo atingir até 30%) podem surgir na escolha dos valores de deslocamento químico limites.<sup>37a</sup> Entretanto, tais erros terão impactos similares na análise de uma série de compostos e as diferenças entálpicas entre os diferentes produtos continuam significativas.

A Figura 106 ilustra curvas de termodinâmica para os compostos **19-21**. Os resultados da análise termodinâmica está ilustrada na Tabela 18.



**Figura 106.** Curvas de termodinâmica para os compostos 19-21 quando 17 foi utilizado como referência ligada.

**Tabela 18.** Resultados dos parâmetros termodinâmicos para os derivados 17-21

NH-amida	Coef corr.	$\Delta H^{\circ}$ (Kcal/mol)	$\Delta S^{\circ}$ (ue) <sup>d</sup>
17 <sup>a</sup>	0,99	-3,6	-7,4
18	0,98	-3,0	-6,4
NH-carbamato	Coef corr.	$\Delta H^{\circ}$ (Kcal/mol)	$\Delta S^{\circ}$ (eu)
19 <sup>b</sup>	>0,99	-5,5	-10,9
20 <sup>b</sup>	0,96	-3,0	-6,4
20 <sup>c</sup>	0,95	-4,7	-8,5
21 <sup>b</sup>	>0,99	-3,0	-7,3
21 <sup>c</sup>	0,95	-4,1	-8,7

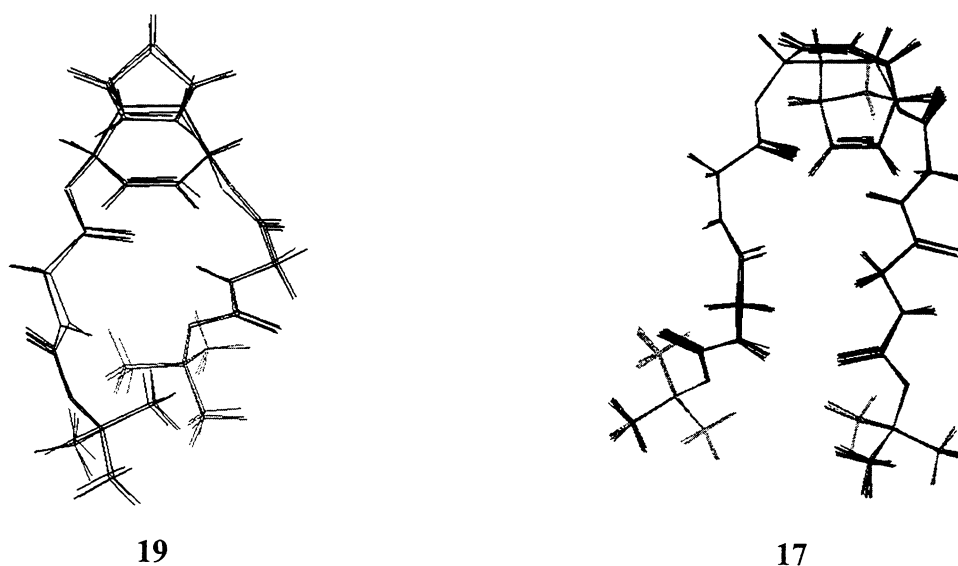
a- 16 foi usado como referência ligada; b- 17 foi usado como referência ligada; c- 19 foi usado como referência ligada; d- utilizou-se R em unidade de cal.

Os dados acima são consistente com a formação de um equilíbrio entre as espécies não ligada (NH livre), favorecida entropicamente, e ligada, favorecida entalpicamente. As curvas de van't Hoff (248-328K) indicam que, em solução de  $CDCl_3$ , o estado ligado é favorecido entalpicamente cerca de  $-3,0$  Kcal/mol a  $-5,5$  Kcal/mol em relação ao estado livre. A população de hidrogênios NH ligados diminui quando a temperatura aumenta e encontra-se predominantemente ligada quando a temperatura diminui. Uma tendência decrescente para a formação de ligação de H foi observada para as estruturas de 19 a 21. Da mesma forma, a ligação de H do NH-amida do composto 17 mostra-se mais estável que a do composto 18.



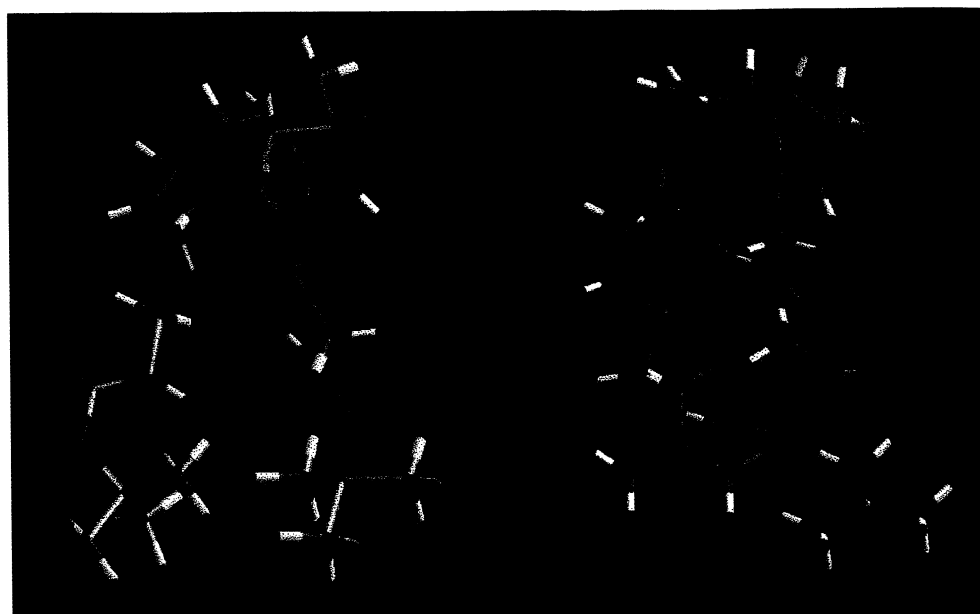
## Análise Teórica

A análise estrutural foi, então, seguida através de cálculos teóricos. Da mesma forma que para os compostos pentacíclicos, iniciou-se pelos cálculos de dinâmica molecular, onde todas as possibilidades de conformações foram analisadas (incluindo dobras intra e intercadeia). Para os compostos **16-18**, somente ligações de H intercadeia estão de acordo com as observações experimentais. Considerando que dobras do tipo C5 seriam a única possibilidade para os compostos **19-21** formarem ligações de H intracadeia, testou-se apenas ligações intercadeias (dobra- $\beta$  ou conformação em hélice). Já para o composto **22**, calculou-se dobras inter e intramoleculares como conformação inicial, ou seja, hélice-11 e -16 em ligação de H intercadeia e anel de seis membros (C6) em ligação de H intracadeia. Com o objetivo de estabelecer a melhor metodologia, inicialmente calculou-se a conformação intercadeia para os compostos **17** (dobra- $\beta$ ) e **19** (folheto- $\beta$ ). A família mais representativa dos cálculos de MD para estes compostos, com as dez estruturas mais estáveis, foram selecionadas e estão representadas na Figura 107.



**Figura 107.** Sobreposição das 10 estruturas de menor energia de **17** e **19** calculadas por MD

A sobreposição de todos os átomos das dez estruturas resultou em um RMSD de 0,05 e 0,06 Å, respectivamente para os compostos **17** e **19**, mostrando boa convergência entre as estruturas. Em seguida, a estrutura de menor energia de cada família foi minimizada através de cálculos semi-empíricos AM1 e cálculos *ab initio* (Figura 108).



19

17

**Figura 108.** Representação da estrutura de menor energia de **17** e **19** extraída de cálculos *ab initio*.

Pode-se observar que o composto **19** adota a conformação de dobra- $\beta$ , enquanto que o composto **17** adota uma conformação de folheto- $\beta$ .

A comparação dos ângulos diedros  $\Phi$  e  $\Psi$  indicam que as geometrias provenientes da dinâmica molecular e dos cálculos *ab initio* possuem no máximo uma diferença de  $20^\circ$  (Tabela 19), validando os resultados de MD.<sup>63</sup>

**Tabela 19.** Propriedades geométricas da estrutura mais estável extraída da dinâmica molecular (MD) e do método 6-31G\*\* para **17** e **19**.

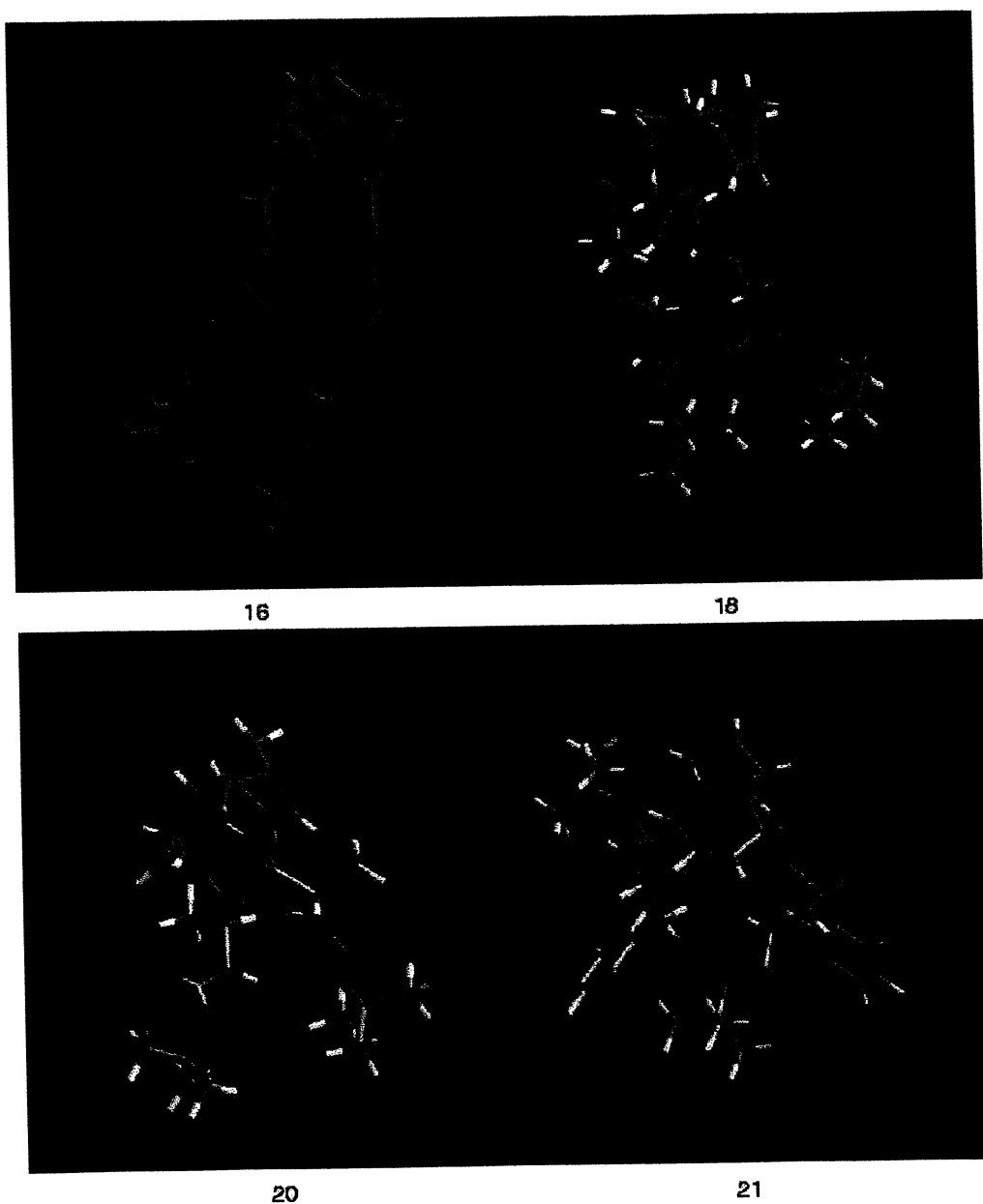
MD			6-31G**		
$\Phi_{19}$	$\Phi_{\text{NH}(1)\text{CH}17}$	$\Phi_{\text{NH}(2)\text{CH}17}$	$\Phi_{19}$	$\Phi_{\text{NH}(1)\text{CH}17}$	$\Phi_{\text{NH}(2)\text{CH}17}$
-162,7	-15,5	-138,7	-178,5	-33,2	-126,9
113,3	-142,7	-27,2	125,9	-150,6	-9,1
-126,8	99,8	73,4	-119,7	118,7	75,8
45,9	-129,8	-170,6	66,3	-122,1	-166,4
$\Psi_{19}$	$\Psi_{\text{CH}(1)\text{CO}17}$	$\Psi_{\text{CH}(2)\text{CO}17}$	$\Psi_{19}$	$\Psi_{\text{CH}(1)\text{CO}17}$	$\Psi_{\text{CH}(2)\text{CO}17}$
151,8	95,5	-138,2	159,0	92,3	-135,5
-102,6	115,5	111,0	-95,6	111,8	109,3
17,2	-128,6	47,4	17,9	-131,3	42,3
-91,4	-152,1	-66,1	-83,7	-150,3	-72,2

Como pode ser observado na Tabela 20 as estruturas calculadas por AM1 estão de acordo com aquelas calculas pelo método 6-31G\*\*, permitindo-nos desta forma seguir a investigação teórica aplicando os cálculos semi-empíricos.

**Tabela 20.** Comparação dos parâmetros geométricos de AM1 e 6-31G\*\* para os compostos **17** e **21**.

	Composto 19		Composto 17	
	AM1	6-31G**	AM1	6-31G**
$d_{\text{NH}(1)\dots\text{OC}}$	1,99	1,99	2,03	2,03
$d_{\text{NH}(2)\dots\text{OC}}$			2,32	2,32
$\alpha_{\text{N-H}(1)\dots\text{O}}$	172,9	172,9	160,9	156,5
$\alpha_{\text{N-H}(2)\dots\text{O}}$			159,7	161,8
$\alpha_{\text{H}(1)\text{-N-C}\alpha\text{-H}}$	-119,7; 125,9	-119,7; 125,9	-153,7; -34,7	-150,6; -33,2
ângulo $\text{H}(2)\text{-N-C}\alpha\text{-H}$			70,8; -168,8	75,8; -166,4

A Figura 109 mostra a conformação intercadeia para os compostos **16**, **18**, **20** e **21** calculados pelo método AM1



**Figura 109.** Estrutura de mais baixa energia calculada pelo método AM1 para os compostos **16, 18, 20 e 21.**

O modelo dos compostos **16 e 18** mostram a formação de uma conformação do tipo folheto- $\beta$ . Além disso, observa-se para o composto **16** a formação de um anel de C5 membros entre o NH(3) e CO éster, justificando nos dados experimentais a presença de três hidrogênios NH com troca H/D lenta. Embora a estrutura C5 represente uma ligação de H fraca, devido ao seu pequeno ângulo NH $\cdots$ O (Tabela 21), esta estrutura secundária pode estar sendo estabilizada através de uma interação eletrostática do tipo não ligada (dipolo), devido a coplanaridade da carbonila e do NH amida.<sup>13</sup>

A Tabela 21 ilustra alguns parâmetros geométricos relevantes das ligações de hidrogênio intramoleculares para todos os compostos.

**Tabela 21.** Distâncias (Å) e ângulos N-H...O (°) relevantes para as estruturas calculadas por AM1 para os compostos **16-21**.

Compostos	$d_{\text{NH}(1)\text{O}}$	$d_{\text{NH}(2)\text{O}}$	$\alpha_{\text{N-H}(1)\text{O}}$	$\alpha_{\text{N-H}(2)\text{O}}$	$d_{\text{NH}(2)\text{O}(2)}$	$d_{\text{NH}(2)\text{O}(3)}$	$d_{\text{NH}(3)\text{Oester}}$
					$\alpha_{\text{NH}(2)\text{O}(2)}$	$\alpha_{\text{NH}(2)\text{O}(3)}$	$\alpha_{\text{NH}(3)\text{Oester}}$
					2,00	2,30	2,05
<b>16</b>	-	-	-	-	137,2	106,0	160,5
<b>17</b>	2,03	2,32	160,9	159,7	-	-	-
<b>18</b>	2,09	2,09	131,2	144,3	-	-	-
<b>19</b>	1,99	-	172,9	-	-	-	-
<b>20</b>	2,05	-	141,3	-	-	-	-
<b>21</b>	2,11	-	134,5	-	-	-	-

Os valores de energia e comprimento da ligação de H revelam que a presença de um grupo metila (**20**) ou benzila (**21**) em um resíduo secundário pode causar desestabilização da conformação em dobra.

As conformações em hélice, calculadas para os compostos **19-21**, tiveram seus momentos dipolos e energias relativas comparados com as estruturas em dobra- $\beta$  (Tabela 22).

**Tabela 22.** Energias relativas e momentos dipolos das conformações em dobra- $\beta$  e hélice dos compostos **19-21**.

Compostos	Conformação	$\Delta E$ (kcal/mol)	$d$ (D)
<b>19</b>	dobra- $\beta$	0,00	2,6
<b>19</b>	hélice	42,73	7,9
<b>20</b>	dobra- $\beta$	0,00	3,8
<b>20</b>	hélice	2,34	7,4
<b>21</b>	dobra- $\beta$	0,00	8,1
<b>21</b>	hélice	1,81	7,9

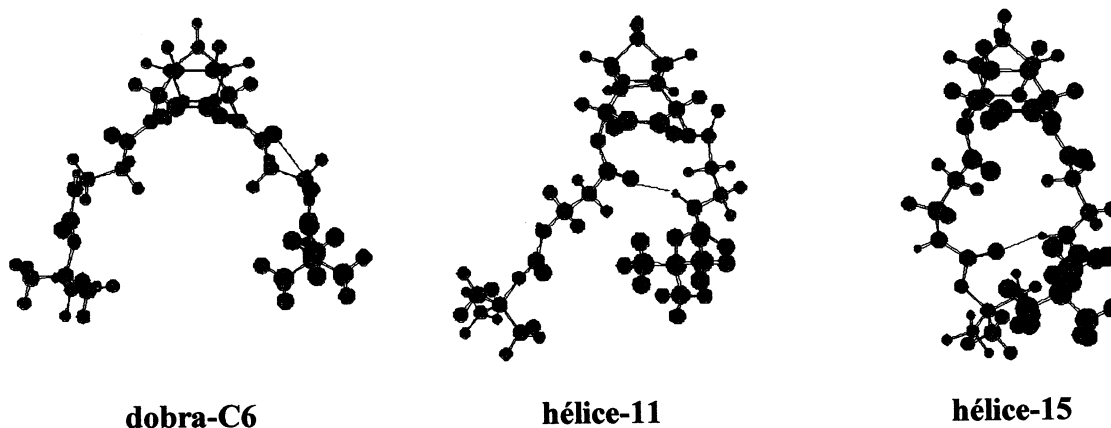
Observou-se que as estruturas em dobra- $\beta$  são 1,81 a 42,73 kcal/mol mais estáveis que as conformações em hélice. Além disso, de forma geral as conformações em dobra- $\beta$  possuem

menores momentos de dipolos, evidenciando maior propensão de serem estabilizadas em meio de baixa polaridade como em solução de  $\text{CDCl}_3$ .

Os dados experimentais mostraram que os compostos **16** e **19** apresentam as ligações de H mais estáveis que os demais. A possível origem desta estabilidade é a flexibilidade do resíduo Gly e menor impedimento estérico de Gly com relação aos demais amino-ácidos.

A análise dos dados teóricos confirma que as ligações de hidrogênio mais prováveis são do tipo carbamato-éster, amida-éster e carbamato-carbamato. Quando este último tipo de ligação de H está presente, os grupamentos Boc encontram-se mais próximos que nos outros modelos, desestabilizando a conformação secundária. Este fato poderia justificar porque o composto **17**, apesar de ser formado por resíduos de Gly, não segue o mesmo comportamento de **16** e **19**. Além disso, observa-se nos modelos teóricos que somente um dos hidrogênios de cada par NH-carbamato ou NH-amida encontra-se ligado, enquanto que o outro está livre. Este fato também pode indicar que os sinais observados são relativos a médias entre hidrogênios livres e ligados e está de acordo com as observações experimentais. Isto é verdade para os compostos com um centro quiral, onde haverá preferência de nucleação de folhetos- $\beta$  apenas para um lado (assim como casos conhecidos de  $\alpha$ -hélices). No entanto, quando seqüências aquirais são utilizadas (aquelas com resíduo glicina) a energia de nucleação de folhetos- $\beta$  para um lado e para outro será equivalente e as duas espécies coexistirão em equilíbrio. Dessa forma, a espécie ligada destes compostos apresentará sempre os dois hidrogênios NH ligados. Este fato também pode explicar a maior estabilidade dos compostos **16** e **19** frente aos demais.

As simulações teóricas para **22** mostraram que existe uma possibilidade de formação de ligação de H intracadeia (conformação em dobra-C6) e duas intercadeia (hélice-11 e -15), o que pode ser observado na Figura 110. A Tabela 23 mostra as energias relativas destas estruturas secundárias calculadas pelo método AM1.



**Figura 110.** Estruturas de mais baixa energia calculadas pelo método AM1 para o composto **22** em diversas conformações.

**Tabela 23.** Energias relativas das conformações em dobra-C6, hélice-11 e 15 do composto **22**

Conformações	$\Delta E$ (Kcal/mol)
dobra-C6	0,00
hélice-11	73,12
hélice-15	23,60

Estes dados mostram que a conformação do tipo C6 é 73,12 e 23,60 Kcal/mol mais estável respectivamente que as conformações hélice-11 e 15, significando que a presença de ligação de H intercadeia torna-se improvável para esta estrutura. Além disso, a conformação do tipo hélice-11 não é estável quando submetida a cálculo *ab initio*, convergindo sempre para a conformação da ligação de H intracadeia. Este resultado não é surpreendente uma vez que  $\beta$ -peptídeos são conhecidos por formar anéis de 6 e 8 membros.<sup>13</sup> O modelo do anel de 6 membros fornece os seguintes dados geométricos de ligação de H: distância NH(1)···COéster = 2,21-2,22 e ângulo NH(1)···O de 119,8-120,4 Å.

#### 4.3.6. Estudo do Sistema Tricíclico em Solução de DMSO-*d*<sub>6</sub>

##### Determinação de Estruturas Secundárias

##### Estudo de RMN

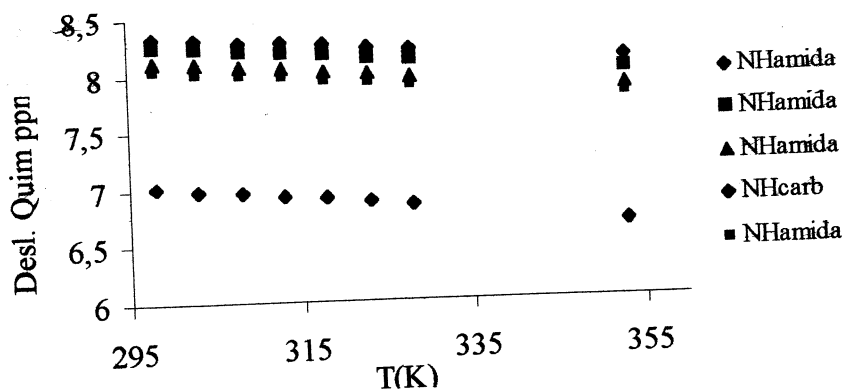
Os deslocamentos químicos e coeficientes de temperatura estão expressos na Tabela 24 para os compostos **16-19** e **21**.

**Tabela 24.** Dados de deslocamentos químicos e coeficientes de temperatura do sistema tricíclico.

Composto	$\delta_{(\text{ppm})}$	$-\Delta\delta/\Delta T$
<b>16</b> <sub>NHcarb</sub>	7,01	6,3
<b>16</b> <sub>NHamida</sub>	8,33; 8,25; 8,11 e 8,04	4,1; 4,7; 4,9 e 4,8
<b>17</b> <sub>NHcarb</sub>	7,02	5,6
<b>17</b> <sub>NHamida</sub>	8,24	3,9
<b>18</b> <sub>NHcarb</sub>	6,92	5,3
<b>18</b> <sub>NHamida</sub>	8,22	4,9
<b>19</b>	7,26	4,8
<b>21</b>	7,4	-

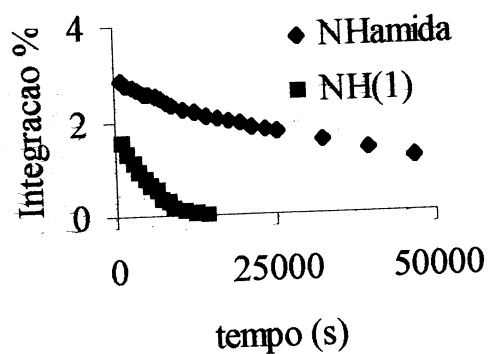
Os coeficientes de temperatura indicam que os compostos acima provavelmente não estão em ligação de H intramolecular. Observou-se uma dependência linear dos deslocamentos químicos para os compostos estudados na faixa de temperatura de 298 a 353 K. A Figura 111 exemplifica um gráfico de dependência de temperatura para o composto **16**. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **16** a 298K mostrou 4 sinais relativos a NH-amida (8,33; 8,25; 8,11; 8,04 ppm) e um relativo ao NH-carbamato (7,01 ppm).





**Figura 111.** Gráfico de deslocamento químico em função da temperatura para o composto 16 em solução de DMSO- $d_6$ .

Fato interessante foi observado ao adicionar-se 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$  em uma solução 3mM de 16 em 500 $\mu\text{L}$  de DMSO- $d_6$  (Figura 112): os NH amida apresentaram troca de H/D lenta ( $k=8.0 \times 10^{-6}$ ) em relação aos NH carbamato ( $k=1.0 \times 10^{-4}$ ).



**Figura 112.** Gráfico da análise de troca de H/D do composto 16 em solução de DMSO- $d_6$ .

A situação na qual é observada coeficiente de temperatura  $>3$  ppb/K e pequena velocidade de troca de H/D em solventes polares, pode ser explicada basicamente através de duas situações distintas: (1) o composto encontra-se em uma conformação secundária e o aumento de temperatura força o rompimento da ligação de H, gerando um coeficiente alto; (2) há a existência de um equilíbrio entre diversos conformêros (diversos compostos ligados em equilíbrio com suas espécies não ligadas) nos quais os NH amida possuem deslocamentos químicos muito diferentes.<sup>71a</sup> Neste último caso, o aumento de temperatura gera um coeficiente alto, porém no experimento de troca de H/D, há a troca rápida daqueles hidrogênios livres e troca lenta para os hidrogênios ligados.

Caso a primeira hipótese esteja correta, é provável que a estrutura observada em  $\text{CDCl}_3$  seja estável em  $\text{DMSO-}d_6$ , uma vez que a integração dos sinais de NH referem-se a presença de três hidrogênios com troca de H/D lenta, como observado na solução de baixa polaridade. Assim, folhetos- $\beta$  poderiam ser nucleados em solução de solvente polar, o que normalmente não é observado.

### 4.3.7. Discussão Geral de Resultados

#### 4.3.7.1. Coeficiente de Temperatura

Segundo a literatura, o deslocamento químico observado é uma a média dos deslocamentos químicos entre a espécie ligada por ligação de H e a espécie livre a cada temperatura. Assim, aumentando-se a temperatura, a espécie livre torna-se mais populada enquanto que diminuindo-se a temperatura a espécie ligada torna-se mais populada.<sup>53</sup> Então, espera-se uma correlação entre o deslocamento químico (ou o desvio de deslocamento químico da espécie livre causado pela ligação de H) e o coeficiente de temperatura. Esta correlação deve refletir a influência da temperatura no equilíbrio entre a espécie ligada e livre.

Baseado nestes fatos, propomos algumas relações entre coeficientes de temperatura e ligações de H. Considerando-se, então, um equilíbrio entre essas duas espécies, na qual a presença da espécie ligada é preponderante, o hidrogênio NH ligado intramolecularmente pode passar por dois processos distintos: (1) a variação da temperatura não acarreta rompimento da ligação de H e (2) a variação da temperatura causa rompimento da ligação de H. No primeiro caso, observa-se pequena variação do deslocamento químico (variação entrópica) com a variação da temperatura, independente do solvente utilizado (baixo coeficiente de temperatura). Caso ocorra o rompimento dessa ligação, novamente dois casos são possíveis: (1) as espécies ligada e livre possuem pequena diferença de deslocamento químico e (2) as espécies ligada e livre possuem grande diferença de deslocamento químico. Se a análise é conduzida em solvente polar, presume-se que ambos os casos resultem em altos coeficientes de temperatura. Se, ao contrário, a análise é conduzida em solvente apolar, no primeiro caso deve-se observar um baixo coeficiente de temperatura e no segundo caso um alto coeficiente de temperatura. Considerando-se, agora, um equilíbrio onde a espécie livre é preponderante, serão observados em solventes polar e apolar respectivamente altos e baixos coeficientes de temperatura, conforme observado na literatura. A tabela 25 resume as conclusões acima.

**Tabela 25 .** Relação coeficiente de temperatura-ligação de H

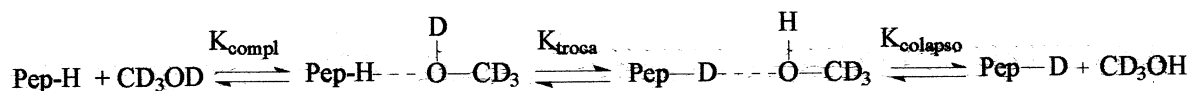
Solvente	Espécie livre		Espécie ligada predomina	
	Ligação H não rompe		Ligação H rompe	
			$\delta_{obs}-\delta_n=grande$	$\delta_{obs}-\delta_n=pequeno$
<b>polar</b>	>4 ppb/K	<3 ppb/K	>4 ppb/K	>4 ppb/K
<b>apolar</b>	<3 ppb/K	<3 ppb/K	>4 ppb/K	<3 ppb/K

$\delta_n$  é o deslocamento químico não ligado.

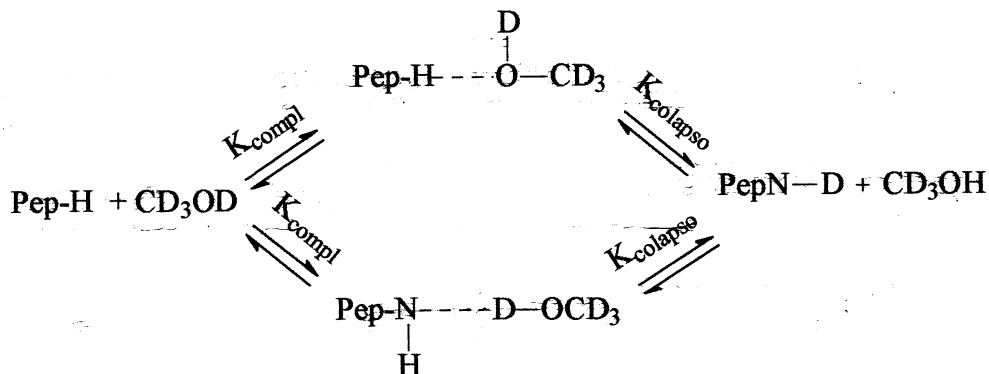
Em outras palavras, a distinção entre espécies ligada e livre em um equilíbrio dinâmico é problemática. Para polipeptídeos e proteínas, o trabalho de Andersen e colaboradores, onde coeficientes de temperatura e deslocamentos químicos são correlacionados, parece esclarecedor no sentido de precisar sítios de ligação e sítios livres em equilíbrios conformacionais.<sup>53</sup>

#### 4.3.7.2. Interpretação do processo de troca de H/D

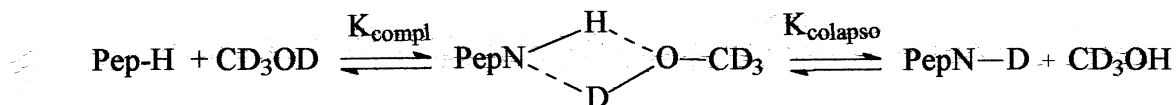
O processo da troca isotópica pode ser descrito por:



onde ocorre uma primeira etapa de formação do complexo peptídeo- $\text{CD}_3\text{OD}$ , dada por  $K_{\text{compl}}$ , uma segunda etapa de transferência do deutério para o peptídeo, dada por  $K_{\text{troca}}$  e uma última etapa de colapso das espécies, dada por  $K_{\text{colapso}}$ . A etapa determinante deste processo é a formação do complexo. Os equilíbrios mostrados acima podem ser escritos da seguinte forma:



ou, ainda, pode-se propor o seguinte intermediário tetraédrico onde a formação do complexo e troca H/D ocorrem concomitantemente.



onde a velocidade da reação é dada por  $K_{\text{compl}}[\text{Pep-H}][\text{CD}_3\text{OD}]$ . O acesso das moléculas de  $\text{CD}_3\text{OD}$  entre as cadeias peptídicas envolvidas em ligações intramoleculares é fundamental para a formação do complexo. Para peptídeos que não apresentam dificuldades experimentais de acesso do solvente ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) ao NH, como por exemplo impedimentos estéricos, haverá uma alta concentração de  $\text{CD}_3\text{OD}$  entre as cadeias peptídicas e o processo torna-se de pseudo-primeira ordem. Logo, a velocidade da reação passa a ser  $K'_{\text{compl}}[\text{Pep-H}]$  e a constante  $K'_{\text{compl}}$  varia de acordo com as forças de ligação dos respectivos peptídeos. No entanto, quando o acesso do solvente é dificultado no interior do peptídeo, a concentração de  $\text{CD}_3\text{OD}$  próxima a ligação de H é baixa e a velocidade de formação do complexo passa a depender da concentração de  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Nestes casos, as curvas de extinção do sinal de hidrogênio em função do tempo apresentam um 'plateau' inicial que representa o acesso (ou difusão) das moléculas de  $\text{CD}_3\text{OD}$  entre as cadeias peptídicas para formação do complexo. Uma vez ocorrido isso, o comportamento cinético passa a ser de pseudo-primeira ordem. Este último comportamento é observado para os compostos **8**, **16** e **19**. Entre os compostos do sistema tricíclico, **16** e **19** apresentaram ligações de H mais estáveis.

#### 4.3.7.3. Cálculos Teóricos

Segundo a literatura, as parametrizações do método AM1 normalmente descrevem as ligações de hidrogênio com uma distância aproximadamente correta, mas com uma geometria errada. Já as parametrizações do método PM3 descrevem todos os nitrogênios como piramidais, e as ligações de hidrogênio com distâncias menores ( $\sim 0,1\text{\AA}$ ), contrariando observações experimentais.<sup>55a</sup>

A partir de comparações feitas entre os resultados obtidos pelos métodos semi-empíricos e o método 6-31G\*\* (Tabela 26), as seguintes conclusões podem ser feitas: (1) o método AM1 forneceu valores de distância de ligação de H mais próximas aos valores encontrados pelo método *ab initio*, enquanto que o método PM3 apresentou maiores

distorções destes valores; (2) variações equivalentes de ângulos da ligação de H foram observadas com ambos os métodos, descrevendo satisfatoriamente bem o sistema.

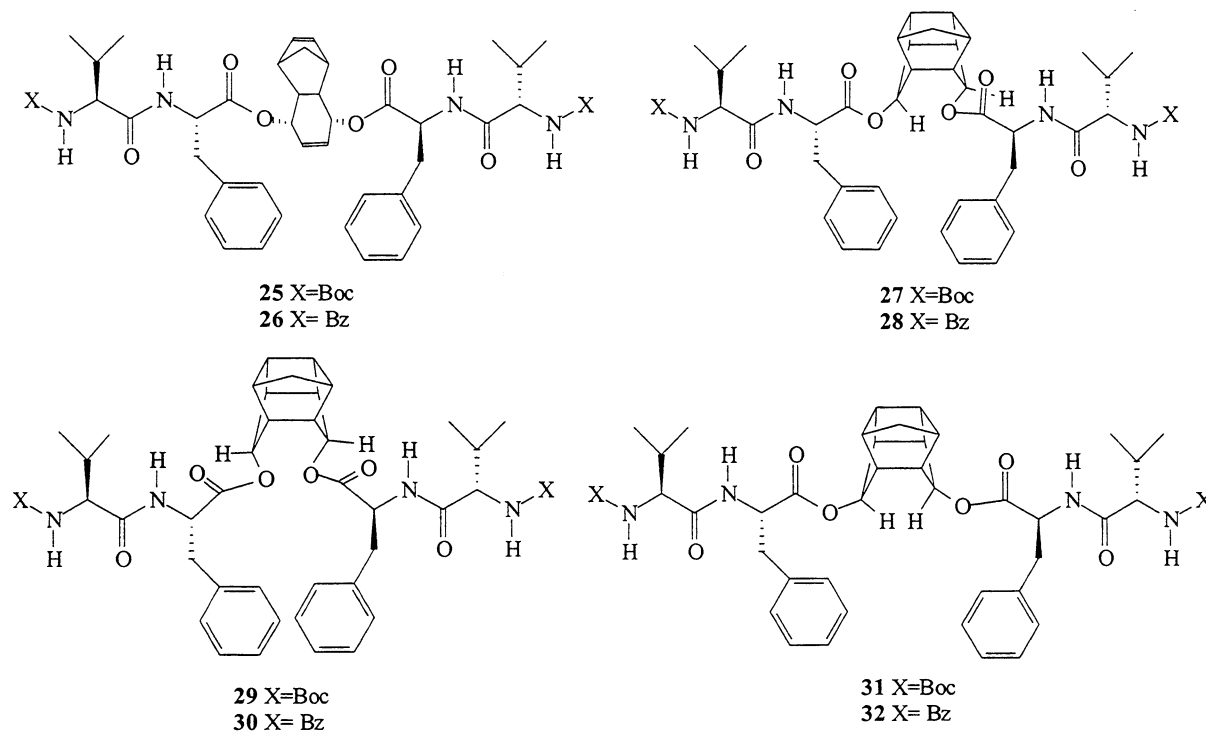
Assim, conclui-se que o método AM1 representa melhor as ligações de H que o método PM3.

**Tabela 26 .** Comparação entre dados geométricos de cálculos semi-empíricos e *ab initio*.

Comp	<i>ab initio</i>		AM1		PM3	
	$d_{\text{NH}\dots\text{OC}}$	$\alpha_{\text{N-H}\dots\text{O}}$	$d_{\text{NH}\dots\text{OC}}$	$\alpha_{\text{N-H}\dots\text{O}}$	$d_{\text{NH}\dots\text{OC}}$	$\alpha_{\text{N-H}\dots\text{O}}$
<b>8</b>	2,38	148,1-149,7	2,17-2,24	138,0	1,91-2,01	159,2
<b>9</b>	2,13-2,23	141,0-145,4	2,17-2,18	140,0	2,00	148,0
<b>11</b>	2,11-2,12	137,1-142,7	2,16-2,21	134,0	2,03-2,04	136,0
<b>12</b>	2,19-2,21	140,9-144,0	1,92-2,00	139,0	2,00	139,7
<b>13</b>	2,06-2,14	143,9-147,9	2,05	147,4	2,00	148,0
<b>17<sub>NH(1)</sub></b>	2,03	156,5	2,03	160,9	1,95	
<b>17<sub>NH(2)</sub></b>	2,32	161,8	2,32	159,7	2,01	164,1
<b>19</b>	1,99	172,9	1,99	172,9	1,92	173,7

#### 4.3.8. Avaliação de pseudopeptídeos incorporados de compostos tricíclicos e pentacíclicos como inibidores da protease do HIV-1.

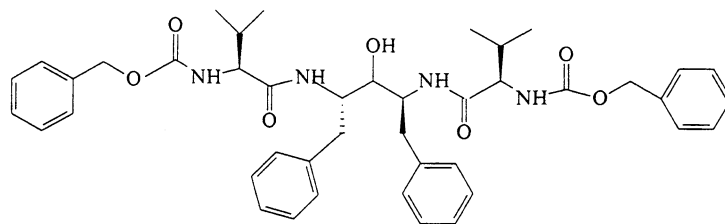
A série de compostos abaixo (25-32) foi elaborada com a finalidade de serem testadas como possíveis candidatas a inibidores da protease do vírus HIV-1 (Figura 112).



**Figura 112.** Compostos utilizados como possíveis candidatas a inibidores da protease do vírus HIV-1.

A escolha destes compostos dividiu-se basicamente em duas etapas: (1) determinação de uma seqüência ativa e (2) estudo de modelagem dos derivados policíclicos para comparação com outros modelos de complexação substrato-sítio ativo existentes na literatura.

A escolha dos resíduos levou em consideração produtos já testados anteriormente como inibidor da protease do HIV, principalmente o composto A-74704 (figura 113), testado pelo laboratório Abbott, como possível substituto do Ritonavir.



78

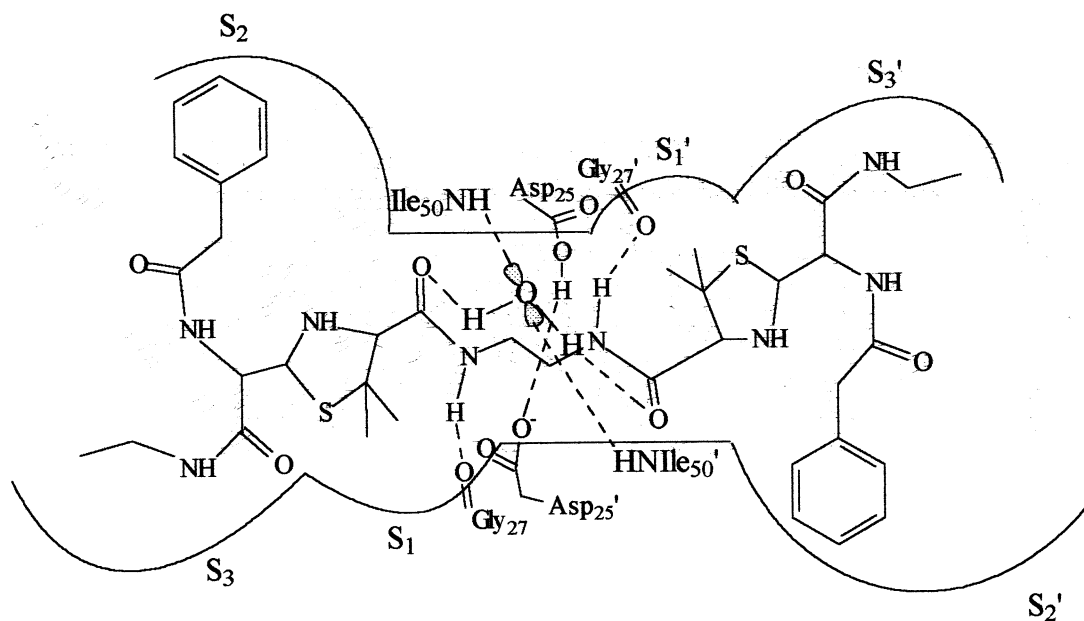
**Figura 113.** Inibidor A74704

A partir de então inúmeros trabalhos têm utilizado seqüências similares para desenvolver novos inibidores, onde os grupos fenila e metila substituem a posição do substrato respectivamente em P1 e P2, contribuindo para fortes ligações hidrofóbicas.<sup>39a, 42b</sup> Por outro lado, estudos demonstram que o grupamento em P3 também exerce papel importante na inibição da enzima.<sup>74</sup> Tem sido mostrado que grupamentos como os grupos protetores Bz e Fmoc apresentam boa eficácia nesta posição.<sup>42a</sup> Considerando, então, estes estudos propôs-se a utilização da seqüência XValPheOH, onde a Phe, Val e X (Boc ou Bz) ocupariam respectivamente as posições P1, P2 e P3. Para testar a influência do grupo N-terminal interagindo em S3 foram utilizados como grupos protetores tanto Boc quanto Bz.

A importância da restrição dos graus de liberdade de inibidores da protease do HIV é ressaltada por alguns autores, como visto na introdução deste trabalho, corroborando o uso de estruturas policíclicas para este fim.<sup>45, 46</sup> A proposição da utilização destes compostos como inibidores é baseado em alguns modelos de complexação inibidor-enzima propostos na literatura.<sup>42, 44</sup>

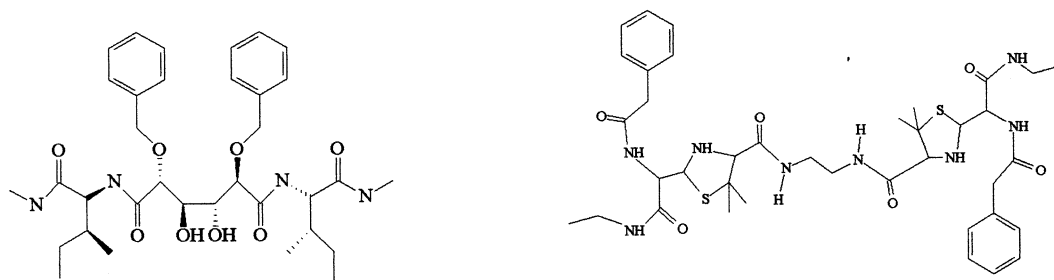
A figura 114 ilustra o modelo proposto por Holmes e colaboradores,<sup>44</sup> onde estão indicadas as interações enzima-enzima (em azul) e enzima-substrato (em vermelho). Este estudo indica que as interações responsáveis pela inibição são, principalmente aquelas onde a molécula de H<sub>2</sub>O apresenta-se num arranjo tetraédrico coordenada tanto pelos resíduos Ile50 da enzima, quanto pelas carbonilas do inibidor, impedindo assim seu acesso aos resíduos Asp25 (vide mecanismo exposto na revisão bibliográfica). Além disso, fortes interações hidrofóbicas podem ser observadas no sítios S1, S2 e S3.





**Figura 114.** Modelo de complexação enzima-substrato proposto por Holmes e colaboradores.

Com o intuito de comparar as posições geométricas dos grupos farmacofóricos dos compostos estudados com aqueles existentes na literatura, realizamos cálculos de mecânica molecular das estruturas dos inibidores propostos nos trabalhos de Holmes e colaboradores<sup>44</sup> e Alterman e colaboradores<sup>42b</sup> (Figura 115) bem como dos compostos **25-32** (Figura 112).

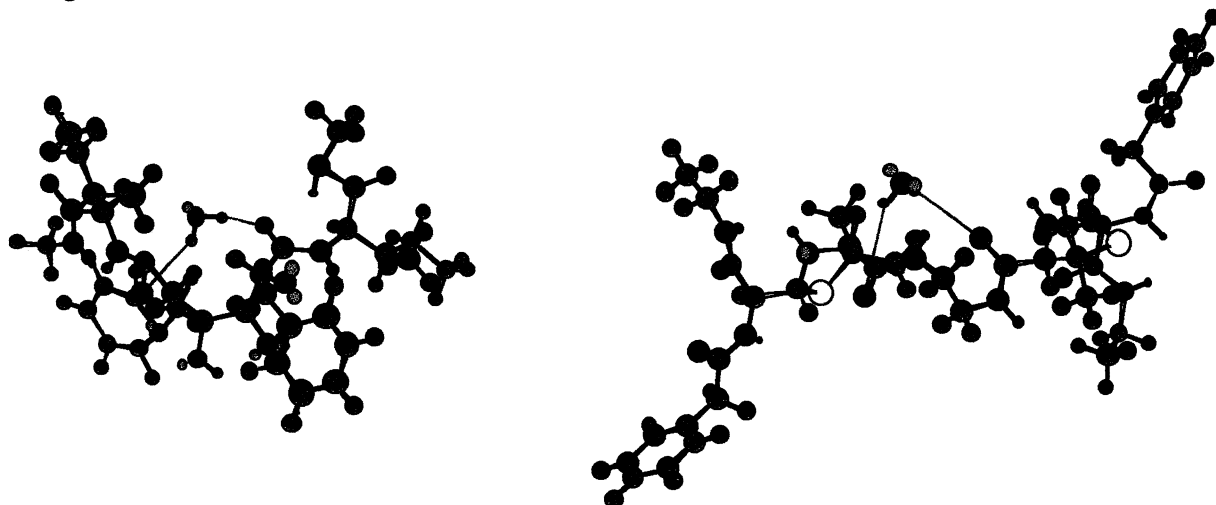


**90** - proposto por Alterman e colaboradores      **81** – proposto por Holmes e colaboradores

**Figura 115.** Inibidores utilizados como modelos.

Os cálculos de minimização foram realizados orientando-se os grupos P1, P1', P2, P2', P3 e P3' nas posições indicadas nos modelos encontrados na literatura. Inseriu-se, além disso, uma molécula de H<sub>2</sub>O coordenada ao inibidor, objetivando-se melhor visualizar as ligações de hidrogênio formadas entre estes e os resíduos Ile50 da enzima. Para os compostos policíclicos, buscou-se minimizações onde os grupos fenila, metilas e protetor do *N*-terminal encontravam-se nas mesmas posições P1, P2 e P3 dos grupamentos equivalentes dos inibidores calculados. Além disso, tentou-se estabelecer um paralelo entre as conformações

encontradas no capítulo de análise conformacional e o encaixe destas estruturas no sítio catalítico. Os resultados da modelagem molecular dos compostos modelos estão representados na figura 116.



*Cálculo do modelo proposto por Alterman  
e colaboradores*

*Cálculo do modelo proposto por Holmes  
e colaboradores*

**Figura 116.** Cálculos de mecânica molecular dos inibidores modelos

Algumas medidas geométricas importantes destes dois modelos são listadas na Tabela 27.

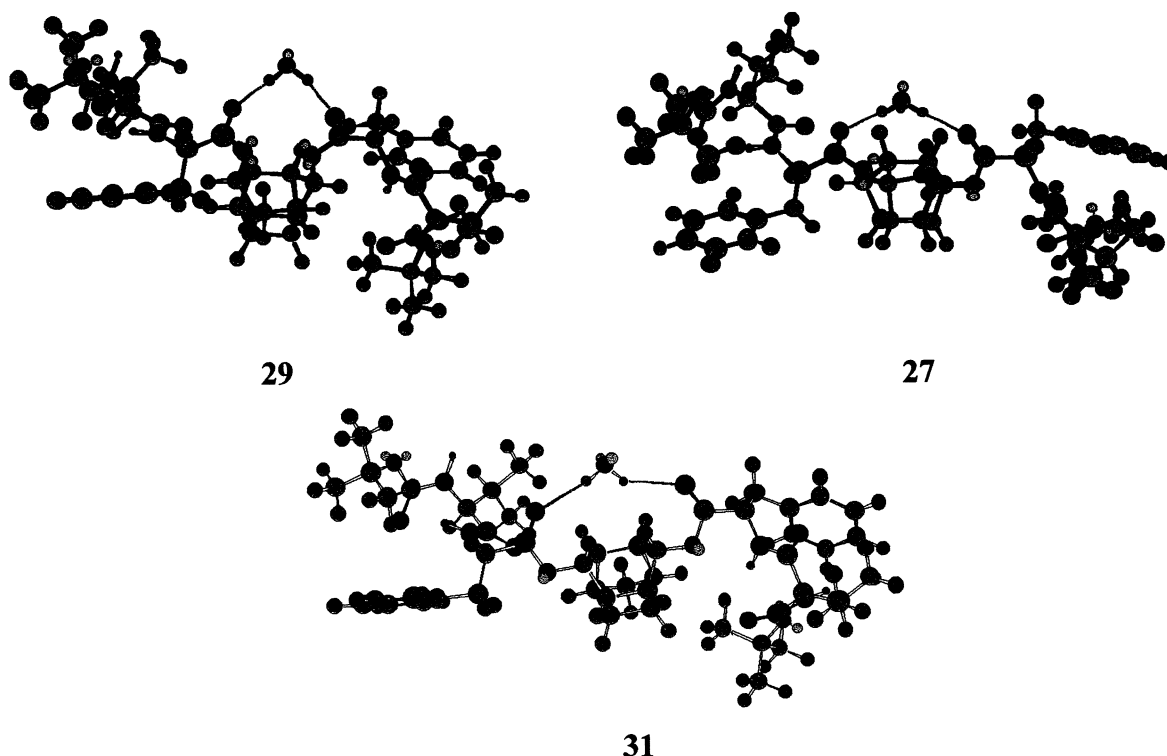
As distâncias entre P1-P1' foram medidas entre os carbonos bezílicos para o modelo de Alterman e entre os carbonos das respectivas metilas no modelo de Holmes. O inverso foi realizado para as medidas de distância entre P2-P2'.

**Tabela 27.** Alguns dados geométricos dos inibidores modelos

Modelo	$d_{CO-OC}$ (Å)	$d_{CO-H_2O}$ (Å)	$d_{P1-P1'}$ (Å)	$d_{P2-P2'}$ (Å)
Alterman	5,1	1,9 e 2,5	6,7	10,3-15,1
Holmes	4,8	~3,0	7,2-9,2	17

Observou-se nestes modelos que a distância entre os dois oxigênios carbonílicos que estão em ligação de H com a molécula de H<sub>2</sub>O permanece em torno de 5,0 Å. Por outro lado as distâncias entre os oxigênios carbonílicos e os hidrogênios de H<sub>2</sub>O em ligação de H variam de 1,9 a 3,0 Å. A distância apresentada nas ligações de H com a água, com exceção de uma das ligações do primeiro modelo, deve-se provavelmente ao ângulo existente entre as duas

carbonilas, fato que pode desfavorecer o arranjo tetraédrico. A figura 117 exemplifica os resultados de modelagem molecular obtidos para os compostos 27, 29 e 31.



**Figura 117.** Cálculos de mecânica molecular dos compostos 27, 29 e 31.

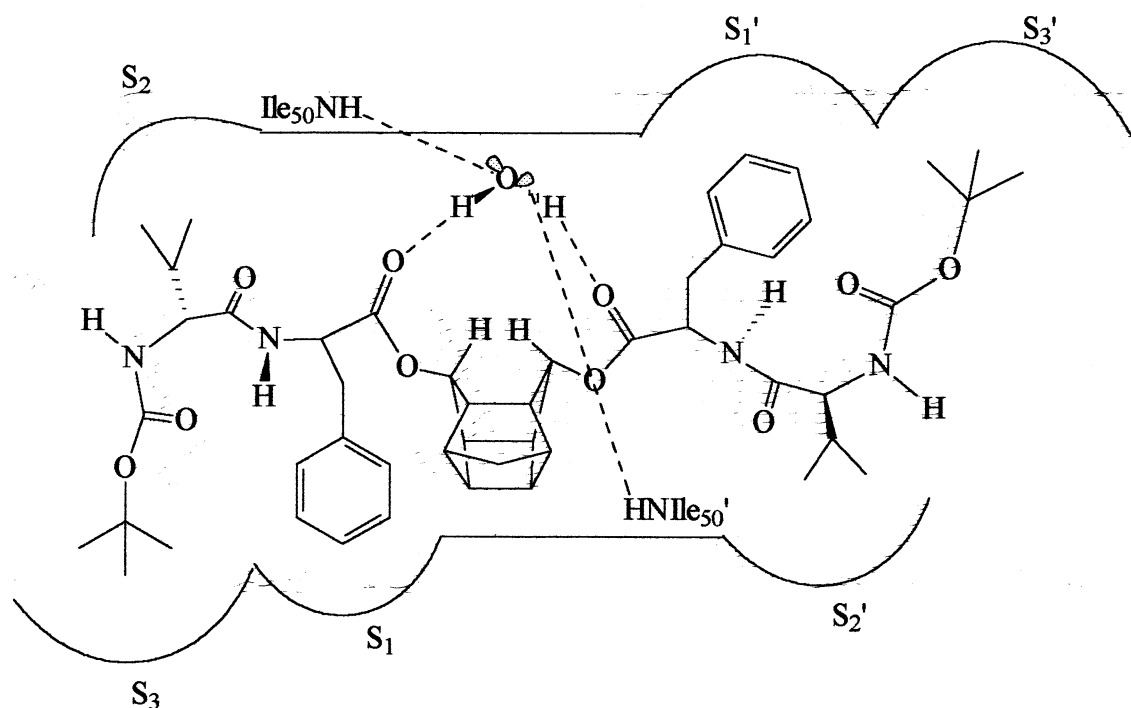
As respectivas medidas geométricas dos modelos ilustrados na figura 117 são ilustradas na tabela 28.

**Tabela 28.** Dados geométricos dos compostos 27, 29 e 31.

Estrutura	$d_{CO-OC}$ (Å)	$d_{CO-H_2O}$ (Å)	$d_{P1-P1'}$ (Å)	$d_{P2-P2'}$ (Å)
27	4,8	1,9	9,2	15,2-16,0
29	3,9	1,9	8,5	14,4-14,8
31	5,7	2,3	10,3	14,4-15,0

Em relação aos modelos propostos na literatura observa-se uma diminuição das distâncias de ligação entre o substrato e a molécula de água, fato que é proporcionado pela geometria tencionada destes compostos. Ao mesmo tempo, a orientação dos grupos hidrofóbicos para o encaixe nas respectivas cavidades é favorável. Com relação a distância entre os grupos nas posições P1 e P1', observa-se que apenas o sistema *exo-exo* possui uma distância um pouco além daquela apresentada pelos modelos da literatura. Já as distâncias P2-

P2' estão dentro da faixa apresentada por estes modelos. Com base nestes fatos, propôs-se um modelo de complexação para os compostos estudados. Um exemplo deste modelo é ilustrado na figura 118 para o sistema pentaciclo *exo-exo*, onde as interações do composto com a enzima são mostradas em vermelho. Ressalta-se que posicionamento dos grupamentos nas posições S1, S2 e S3 ocorre concomitantemente com a formação de dobras- $\gamma$ , o que pode ser um fator determinante na estabilidade do complexo substrato-enzima.



**Figura 118.** Modelo de complexação proposto para o composto 31.

Atualmente, os compostos 25-32 encontram-se em fase de testes da inibição da protease do HIV-1 que serão realizados por um laboratório de análises francês em colaboração com um grupo de pesquisa da Universidade de Strasburgo, o grupo de pesquisa da Universidade INSA de Rouen, onde parte deste trabalho foi realizado, e o nosso grupo.

## **5. CONCLUSÃO**

## 5. CONCLUSÃO

Os dados descritos neste trabalho sugerem que os sistemas pentacíclicos *endo-endo* e *exo-exo* induzem basicamente conformações do tipo C8 turn e dobra- $\gamma$ , enquanto que o sistema pentacíclico *endo-exo* possui maior preferência em formar  $\gamma$ -like turns. Já os dados para o sistema tricíclico sugerem a indução de conformação do tipo dobra- $\beta$  e folheto- $\beta$ . Estas conclusões foram sustentadas principalmente através de experimentos de variação de temperatura, análise dos deslocamentos químicos dos hidrogênios NH, experimentos de titração com DMSO-*d*<sub>6</sub>, trocas de H/D, dados de NOE, constantes de acoplamento, e cálculos teóricos. Estes dados indicam a formação de equilíbrios entre as formas livre e ligada, as quais são evidenciadas para os compostos tricíclicos através da análise de van't Hoff. Os métodos de dinâmica molecular e *ab initio* obtiveram boa convergência e mostraram-se indispensáveis na obtenção das conformações finais propostas. Além disso, a boa correlação dos métodos semi-empíricos e 6-31G\*\* permite a utilização dos primeiros em cálculos de minimização, requerendo, assim, menor tempo de CPU. Entre os dois métodos semi-empíricos utilizados (AM1 e PM3), o AM1 mostrou-se mais coerente com os dados de *ab initio* no que se refere a reproduzir as ligações de H.

Estes análogos de peptídeos incorporados em policiclos podem contribuir para o estudo de estruturas secundárias clássicas e não-clássicas e para a compreensão das interações destas com receptores biológicos, seja em meio de baixa polaridade ou polar. Presume-se que estruturas rígidas deste tipo possam permitir a criação de compostos com aplicação tanto química quanto terapêutica. Neste sentido, os modelos propostos para serem testados na inibição do vírus do HIV apresentaram uma geometria favorável para o encaixe no sítio catalítico quando comparados com outros modelos existentes na literatura, evidenciando que estes possuem potencial para contribuir na compreensão e no estudo de sistemas biológicos.

## **6. PERSPECTIVAS**

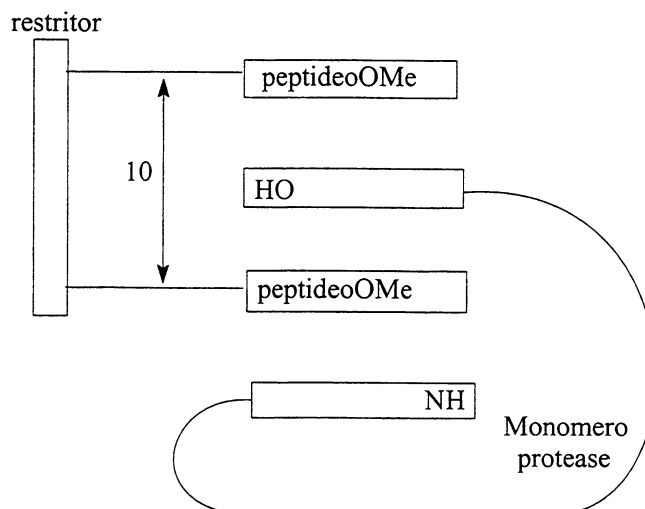
## Análise Conformacional

A análise conformacional dos tripeptídeos derivados dos sistemas *endo-endo* e *endo-exo* que foram sintetizados poderá fornecer informações adicionais sobre estes compostos. Além disso, peptídeos de cadeia longa (mais que três resíduos) poderiam ajudar na compreensão do comportamento destes sistemas em solventes polares.

### Estudo da inibição da protease do vírus HIV-1

O estudo da interação substratos-protease do HIV-1 poderá ser expandido através de cálculos de “docking” destes compostos no sítio catalítico, objetivando obter informações mais precisas e detalhadas sobre as possíveis interações existentes. De posse dos dados de atividade biológica dos compostos **25-32** e utilizando-se ferramentas como cálculos dos substratos no sítio ativo da protease, poder-se-á planejar a síntese de novos inibidores em potencial a partir de compostos policíclicos tensos.

Além de apresentarem-se como possíveis candidatos a inibidores do sítio ativo, estes compostos podem ser utilizados como precursores de inibidores da dimerização através da formação de um heterodímero (Figura 119).

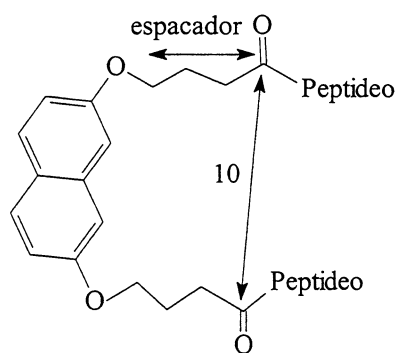


**Figura 119.** Estratégia de obtenção de inibidores baseada em modelos rígidos.

Dos tipos de restritores existentes na literatura, aquele estudado por Bouras e colaboradores<sup>39b</sup> assemelha-se mais aos compostos presentes neste estudo. Porém, estes autores sugerem fortemente que a presença de um espaçador (Figura 120) é condição



indispensável para o estabelecimento do folheto- $\beta$  anti-paralelo com o monômero do HIV. Além disso, eles propõem que a distância entre as cadeias peptídicas do inibidor (distância OC-CO) deve girar em torno de 10 Å.



**Figura 120.** Inibidor da dimerização dos monômeros da Pr-HIV.

Se analisarmos os modelos calculados para os compostos pentaciclos *endo-endo*, *exo-exo*, *endo-exo* e triciclo (8-13, 16-22) podemos observar que as distâncias entre as carbonílas dos grupamentos ésteres variam entre 3,8 e 7,0 Å (Tabela 29).

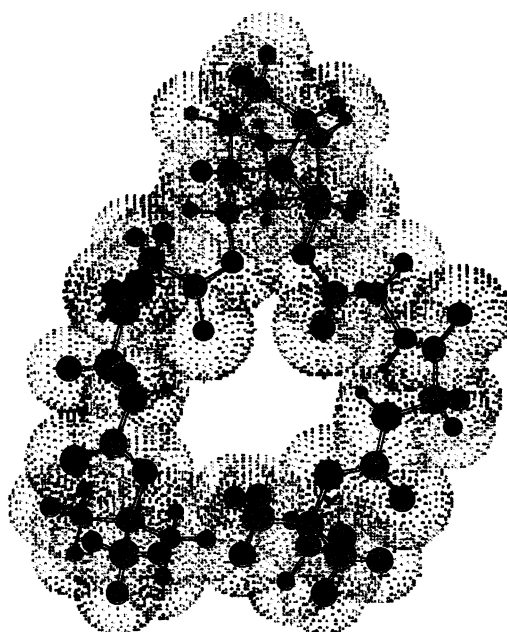
**Tabela 29.** Dados de distâncias inter-atômicas dos sistemas estudados

Composto	$d_{\text{HO-OH}}$ (Å)
pentaciclo- <i>endo-endo</i> -diól	3,8-4,2
pentaciclo- <i>endo-exo</i> -diól	5,6-5,7
pentaciclo- <i>exo-exo</i> -diól	6,8-7,0
triciclo-diól	4,4-4,7

Apesar do sistema pentaciclo *exo-exo* representar uma distância intercadeia próxima ao valor estabelecido pelos autores acima citados, acredita-se que o fato de não haver a presença do espaçador pode gerar interações estéricas consideráveis entre o policiclo e o resíduo terminal do monômero. Assim, seria aconselhável a introdução de um espaçador entre o policiclo e a seqüência peptídica, como sugerido por Bouras e colaboradores. Neste caso, torna-se interessante analisar qual o efeito da distância entre os oxigênios dos grupos éter pode ocasionar na formação do dímero heterogêneo. Finalmente, dos quatro policiclos analisados neste trabalho acredita-se que a estrutura tricíclica seja a mais indicada para o estudo de inibição através da formação de um folheto- $\beta$  com um dos monômeros, uma vez que ela demonstrou, nos estudos de análise conformacional, tendência de nucleação de folhetos- $\beta$ .

## Outras Aplicações

Outras características interessantes podem ser observadas nestes compostos, como por exemplo no modelo dos compostos do sistema *endo-endo*, onde forma-se uma cavidade hidrofílica entre as duas cadeias peptídicas (Figura 121). Para o composto **8**, seis átomos de oxigênio estão direcionados para parte interna desta cavidade. Dessa forma, estes compostos podem ser utilizados em estudos de complexação com metais.



**Figura 121.** Superfície do modelo do composto **8**.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. (a) Gante, J., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1699; (b) Seebach, D., Abele, S., Schreiber, J. V., Martinoni, B., *Chimia* **1998**, *52*, 734.
2. Giannis, A., Kolter, T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1244-1267.
3. Ball, J. B., Hughes, R., Alewood, P. F., Andrews, P. R., *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3467-3478.
4. Nowick, J. S., Smith, E. M., Pairish, M., *Chem. Soc. Rev.* **1996**, 401-415.
5. Evans, J. N. S., *Biomolecular NMR Spectroscopy*, Oxford University Press, Oxford, **1996**.
6. Marshall, G. R., *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3547.
7. (a) Freidinger, R. M.; Schwenk, P. D.; Veber, D. F., *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 104-109; (b) Freidinger, R. M.; Schwenk, P. D.; Veber, D. F., Brooks, J. R.; Saperstein, R., *Science* **1980**, *210*, 656.
8. (a) Das, C.; Raghobhama, S.; Balaram, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5812-5813. (b) Stanger, H. E.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4236-4237. (c) Soth, M. J.; Nowick, J. S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 276-281. (d) Shankaramma, S. C.; Kumar Singh, S.; Sathyamurthy, A.; Balaram, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5360-5363.
9. Kini, R., Evans, H. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *212*, 1115-1124.
10. (a) Hayashi, T., Asai, T., Ogoshi, H., *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 3039; (b) Pohlmann, A. R., Quirion, J.-C., Guillaume, D., Husson, H.-P., *Química Nova* **1999**, *22*, 828-837.
11. (a) Hirschmann, R. *Ang. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1278-1301. (b) Peczu, M. W., Hamilton, A. D. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2479-2494.
12. Thévenet, L., Vanderesse, R., Marraud, M., Didierjean, C., Aubry, A., *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2361-2364.
13. Wu, Y.-D., Wang, De-P., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13485-13493.
14. Gung, B. W., Zhu, Z., *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6482-6483.
15. Ashish, R., Kishore, R., *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2767-2770.
16. Wang, H., Sung, S.-S., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1999-2009.
17. Chung, Y. J., Huck, R., Christianson, L. A., Stanger, H. E., Krauthause, S., Powell, D. R., Gellman, S. H., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3995-4004.
18. Feigel, M., *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 181.
19. Kemp, D. S., Bowen, B. R., *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 5077-5080.
20. Schneider, J. P., Kelly, J. W., *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2169.
21. (a) Nowick, J. S., Mahrus, S., Smith, E. M., Ziller, J. W., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1066. (b) Gardner, R. R., Liang, G. B., Gellman, S. H., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3280.

22. Ranganathan, D.; Haridas, V.; Kurur, S.; Thomas, A.; Madhusudanan, K. P.; Nagaraj, R.; Kunwar, A. C.; Sarma, A. V. S.; Karle, I. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8448-8460.
23. (a) Jones, I. G., North, M., Teijeira, M., Uiarate, E., *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 889. (b) Jones, I. G., Jones, W., North, M., *Synlett* **1997**, 63.
24. Kuroda, Y., Ueda, H., Nozawa, H., Ogoshi, H., *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7901.
25. Menger, F., Migulin, V. A., *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8916-8921
26. Ranganathan, D., Kurur, S., *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1265-1268
27. Jasys, V. J.; Lombardo, F.; Appleton, T. A.; Bordner, J.; Ziliox, M.; Volkmann, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 466-473.
28. Günther, H. *NMR Spectroscopy*, John Wiley & Sons, NY, **1985**.
29. Surya Prakash, G. K.; Olah, G.; Fessner, W.D. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 746-748.
30. Brown, F. K.; Houk, K. N.; Burnell, D. J.; Valenta, Z. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 3050-3059.
31. a) Morisso, F. D. P.; Wagner, K.; Hörner, M.; Burrow, R. A.; Bortoluzzi, A. J.; Costa, V. E. U. *Synthesis* **2000**, *9*, 1247-1252. (b) Costa, V. E. U.; Alifantes, J.; Martins, J. E. D.; Lapis, A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II* **2001**, *2*, 7-12 (c) Lapis, A.; Kreutz, O. C.; Pohlmann, A. R.; Costa, V. E. U. *Tetrahedron: asymmetry* **2001**, *12*, 557-561.
32. a) Axt, M.; Alifantes, J.; Costa, V. E. U. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II* **1999**, *12*, 2783-2788. (b) Costa, V. E. U.; Alifantes, J.; Mascarenhas, Y. P.; Silva, C. H. T. P.; Seidl, P. R. *J. Mol. Struct.* **2000**, *519*, 37-40; (c) Seidl, P. R.; Tostes, J. G. R.; Carneiro, J. W. M.; Costa, V. E. U.; Silva, C. H. T. P.; Pinto, P. S. S.; Lie, S. K.; Taft, C. A. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **1999**, *488*, 151-156.
33. Chakraborty, T. K.; Ghosh, A.; Nagaraj, R.; Sankar, A. R.; Kunwar, A. C. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9169-9175.
34. Wipf, P., *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2115-2134.
35. Ingwall, R. T., Goodman, M. *Macromolecules* **1974**, *7*, 598.
36. Lewis, P. N., Momany, F. A., Scheraga, H. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *303*, 211.
37. (a) Liang, G., Rito, C. J., Gellman, S. H., *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4440-4442. (b) Gallo, E. A., Gellman, S. H., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9774-9788.
38. Keinan, S.; Avnir, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4378-4384.
39. (a) Wachtmeister, J.; Mühlman, A.; Classon, B.; Kvarnström, A. H.; Samuelsson, B. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3219-3225. (b) Bouras, A.; Boggetto, N.; Benatalah, Z.; Rosny, E.; Sicsic, S.; Reboud-Ravaux, M. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 957-962.

40. Todd, S., Anderson, C.-G., Jolly, D. J., Craik, C. S., *Biochimica et Biophysica Acta*, **2000**, *1477*, 168-188.
41. Tomasselli, A. G., Heinrikson, R. L., *Biochimica et Biophysica Acta*, **2000**, *1477*, 189-214.
42. (a) Marastoni, M., Bazzaro, M., Bortolotti, F., Salvadori, S., Tomatis, R., *Eur. J. Med. Chem.* **1999**, *34*, 651-657. (b) Alterman, M., Bjorsne, M., Muhlman, A., Classon, B., Kvarnstrom, I., Danielson, H., Markgren, P.-O., Nilroth, U., Unge, T., Hallberg, A., Samuelson, B., *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3782-3792.
43. Michelis, C., Rocheblave, L., Priem, G., Chermann, J. C., Kraus, J. L., *Bioorg Med. Chem.* **2000**, *8*, 1253-1262.
44. Holmes, D. S., Clemens, I. R., Cogley, K. N., Humber, D. C., Kitchin, J., Orr, D. C., Patel, B., Paternoster, I. L., Storer, R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 503-508.
45. Hultén, J., Anderson, H. O., Schaal, W., Danielson, H., Classon, B., Kvarnstrom, I., Karlén, A., Unge, T., Samuelson, B., Hallberg, A., *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4054-4061.
46. Chakraborty, T. K., Gosh, S., Rao, M. H. V., Kunwar, A. C., Cho, H., Ghosh, A. K., *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 10121-10125.
47. Garrouste, P., Pawlowski, M., Tonnaire, T., Sicsic, S., Dumy, P., Rosny, E., Reboud-Ravaux, M., Fulcrand, P., Martinez, J., *Eur. J. Med. Chem.*, **1998**, *33*, 423-436.
48. Babé, L. M., Rosé, J., Craik, C. S., *Protein Sci.* **1992**, *1*, 1244-1253.
49. Zutshi, R., Franciskovich, K., Schultz, M., Schweitzer, B., Bishop, P., Wilson, M., Chmielewski, J., *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4841-4845.
50. Song, M., Rajesh, S., Hayashi, Y., Kiso, Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2465-2468.
51. (a) Jones, I. G., Jones, W., North, M., *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1505. (b) Kessler, H., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512-523.
52. Stevens, E. S., Sugawara, N., Bonora, G. M., Toniolo, C., *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7148-7150.
53. Andersen, N. H.; Neidigh, J. W.; Harris, S. M.; Lee, G. M.; Liu, Z.; Tong, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8547-8561.
54. Bystrov, V. F., Arseniev, A. S., Gavrillov, Y. D., *J. Magn. Res.* **1978**, *30*, 151.
55. (a) Jensen, F., *Introduction to Computational Chemistry*, Wiley, Odense, **1999**. (b) van Gunsteren, W. F., Berendsen, H. J. C., *Ang. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 992-1023. (c) Burkert, U., Allinger, N. L., *Molecular Mechanics*, ACS Monograph, **1982**.
56. Dinh, T. Q.; Du, X.; Armstrong, R. W. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6606-6616.

57. Publicações recentes em MD de peptídeos no vácuo: (a) Wang, X.; Espinosa, J. F.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4821-4822. (b) Barchi, J. J.; Huang, X.; Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Durell, S. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2711-2718.
58. Lindman, S.; Lindeberg, G.; Nyberg, G.; Karlén, A. Hallberg, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2375-2383.
59. Craze, G. A.; Watt, I. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II* **1981**, 175-184.
60. Marchand, A. P.; LaRoe, W. D.; Sharma, G. V. M.; Suri, S. C.; Reddy, D. S. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1622-1625.
61. (a) Zacharlasse, K. A.; Phuc, N. V.; Kozankiewicz, V. *J. Phys. Chem.* **1981**, *85*, 2676-2683.
62. Hayashi, T.; Asai, T.; Ogoshi, H. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3039-3042.
63. Jiménez, A. I.; Cativiela, C.; Catalán, J. G.; Pérez, J. J.; Aubry, A.; París, M.; Marraud, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5811-5821.
64. Pardi, A., Billeter, M., Wuthrich, R., *J. Mol. Biol.* **1984**, *180*, 741-751.
65. Chakraborty, T. K.; Ghost, S.; Jayaprakash, S.; Sharma, J. A. R. P.; Ravikanth, V.; Diwan, P. V.; Nagaraj, R.; Kunwar, C. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* 6441-6457.
66. Gellman, S. H., Adams, B. R., Dado, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 460-461.
67. (a) Gellman, S. H.; Dado, G. P.; Liang, G.; Adams, B. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1164-1173. (b) Gellman, S. H.; Adams, B. R. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3381-3384.
68. Gregory, P. D., Samuel, H. G., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4228.
69. Kemp, W. *NMR in Chemistry-A Multinuclear Introduction*, Macmillan Education LTD, London, **1986**.
70. Huck, B. R.; Fish, J. D.; Gellman, S. H. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2607-2610.
71. (a) Convert, O., Duplaa, H., Louillet, D., Chassaing, G., *Analisis* **1990**, *18*, i45 (b) Pohlmann, A.; Guillaume, D.; Quirion, J.-C.; Husson, H.-P. *J. Pept. Res.* **1998**, *51*, 116-120.
72. Kim, K., Germanas, J P., *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2853-2860.
73. Al-Hamday, R.; Bruce, J. M.; Heatley, F.; Khalafy, J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans II* **1985**, 1395-1400.
74. Cheng, Y., Rano, T. A., Huening, T. T., Zhang, F., Lu, Z., Schleif, W. A., Gabryelski, L., Olsen, D. B., Stahlhut, M., Kuo, L. C., Lin, J. H., Xu, X., Jin, L., Olah, T. V., McLoughlin, D. A., King, R. C., Chapman, K. T., Tata, J. R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 529-532.

## **ANEXOS**



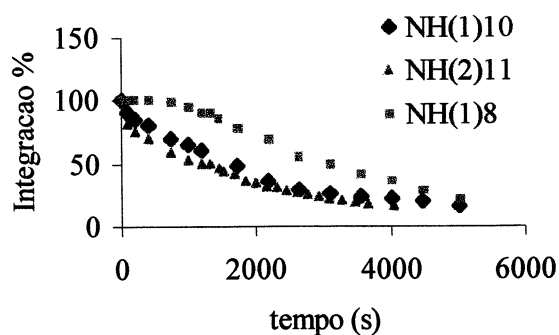
## ANEXO 1

## Sistema Pentaciclo

**Tabela 1.** Dados de RMN para os compostos ( $\pm$ )-6-7, 10-11, ( $\pm$ )-12-13 em solução 3mM de  $\text{CDCl}_3$ .

composto	$^1\text{H}\delta$ (ppm) <sup>[a]</sup>	$-d\delta/dT$ (ppb/K)	$K_{\text{H/D}}$ <sup>[a]</sup>
6 <sub>NH(1)</sub>	4,99	1,6	$>10^{-3}$
7 <sub>NH(1)</sub>	5,04	1,4	$>10^{-3}$
8 <sub>NH(1)</sub>	5,30	2,7	$1,3 \times 10^{-4}$
8 <sub>NH(2)</sub>	6,81	3,8	$>10^{-3}$
9 <sub>NH(1)</sub>	5,43	3,9	$>10^{-3}$
9 <sub>NH(2)</sub>	6,62	1,9	$>10^{-3}$
10 <sub>NH(1)</sub>	5,12	2,3	$1,5 \times 10^{-4}$
10 <sub>NH(2)</sub>	6,56	3,2	$1,6 \times 10^{-3}$
11 <sub>NH(1)</sub>	5,00	1,9	$8,7 \times 10^{-4}$
11 <sub>NH(2)</sub>	6,55	3,0	$2,2 \times 10^{-4}$
12 <sub>NH(1)</sub>	5,37 e 5,43	3,3 e 2,9	$>10^{-3}$
12 <sub>NH(2)</sub>	6,58, e 6,73	4,1 e 3,7	$>10^{-3}$
13 <sub>NH(1)</sub>	5,40	3,0	$>10^{-3}$
13 <sub>NH(2)</sub>	6,58 e 6,72	2,4 e 1,6	$>10^{-3}$

[a]- temperatura ambiente



**Figura 1.** Experimento de Trocas de H/D para os compostos 8, 10 e 11 a temperatura ambiente.

**Tabela 2.** Deslocamentos químicos (298 K) e coeficientes de temperatura (298 K a 353 K) dos hidrogênios NH em solução 3 mM de DMSO- $d_6$  dos compostos **6-13**.

<b>composto</b>	<b><math>^1\text{H}\delta</math> (ppm)</b>	<b><math>-d\delta/dT</math> (ppb/K)</b>
<b>6</b>	7,19 e 7,17	5,3 e 5,0
<b>7</b>	7,28 e 7,22	8,1 e 7,1
<b>8<sub>NH(1)</sub></b>	6,99	6,1
<b>8<sub>NH(2)</sub></b>	8,18	4,3
<b>9<sub>NH(1)</sub></b>	6,87	6,7
<b>9<sub>NH(2)</sub></b>	8,31	5,3
<b>10<sub>NH(1)</sub></b>	6,92	5,6
<b>10<sub>NH(2)</sub></b>	8,15	6,1
<b>11<sub>NH(1)</sub></b>	6,91	5,8
<b>11<sub>NH(2)</sub></b>	8,15	5,3
<b>12<sub>NH(1)</sub></b>	6,94 e 7,00	3,5 e 3,4
<b>12<sub>NH(2)</sub></b>	8,15 e 8,21	2,9 e 2,8
<b>13<sub>NH(1)</sub></b>	6,83 e 6,90	6,2 e 5,8
<b>13<sub>NH(2)</sub></b>	8,15 e 8,24	5,5 e 5,4

## ANEXO 2

### Sistema bicíclico

Os dados da variação do deslocamento químico dependente da concentração, sugerem baixa concentração de agregados na faixa entre 1 a 12 mM e na faixa de 1 a 15 mM respectivamente para os compostos **23** e **24** (Figura 1).

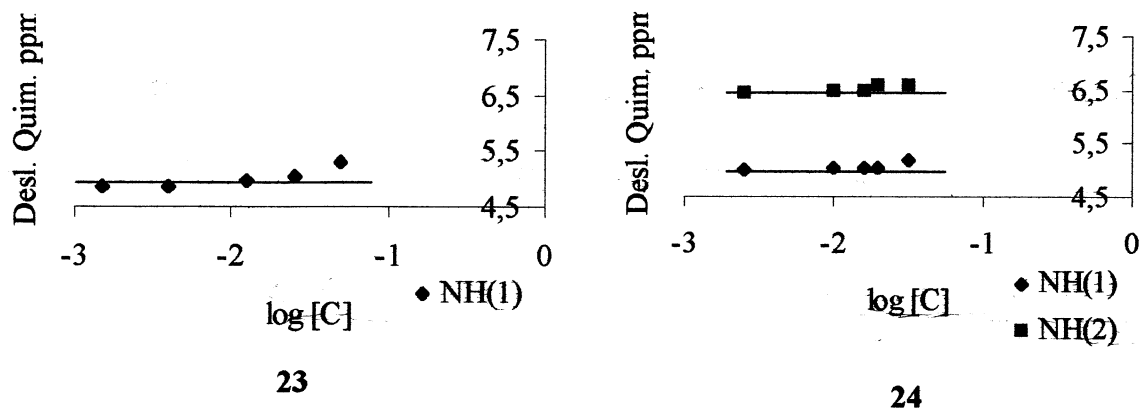


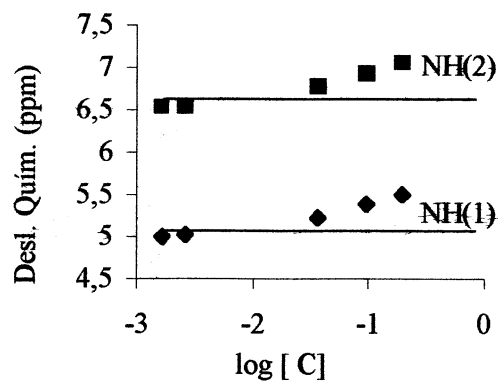
Figura 1. Gráfico da variação do deslocamento químico em função do log da concentração

Observou-se uma dependência linear dos hidrogênios NH de ambos compostos em função da temperatura. A determinação da velocidade de troca de deutério para **23** e **24** foi realizada seguindo mesmo tipo de procedimento realizado para os outros compostos e as seguintes constantes de velocidade de troca foram observadas:  $1,9 \times 10^{-3}$  para o composto **23** e  $>10^{-3}$  para ambos hidrogênios NH de **24**. Além disso, não foram observadas correlações NOE típicas de estruturas secundárias para o composto **24**.

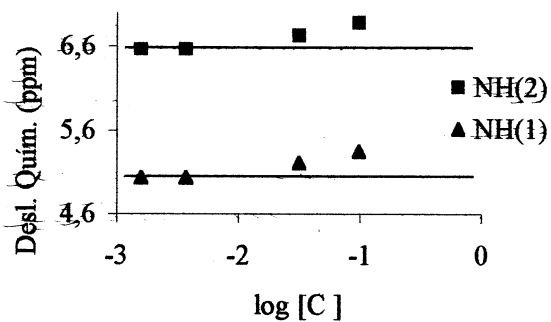
Os resultados demonstram que **23** e **24** não apresentam ponte de hidrogênio intramolecular em solução de  $\text{CDCl}_3$ , podendo, desta forma, ser utilizados como referências não ligada na comparação com os dados espectroscópicos dos demais compostos.

**ANEXO 3**

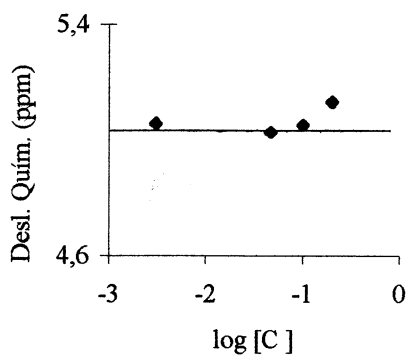
**Sistema Tricíclico**



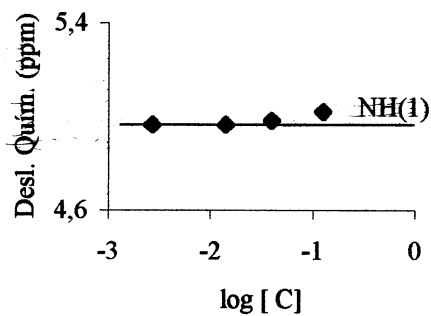
**17**



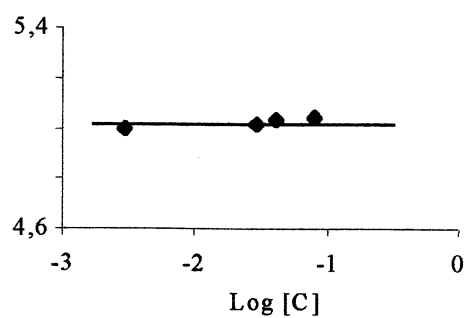
**18**



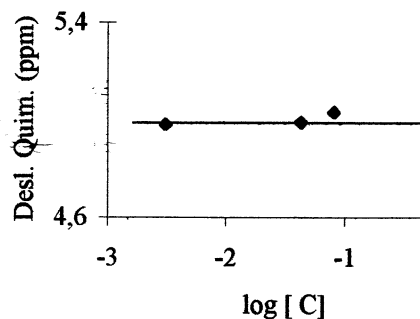
**19**



**20**

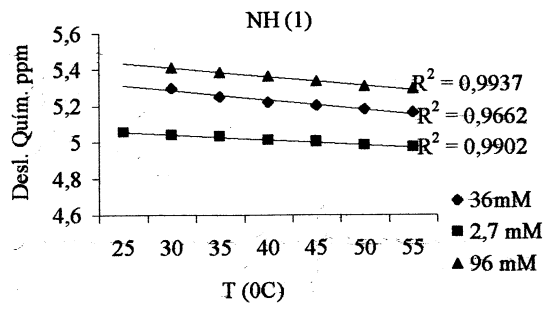


**21**

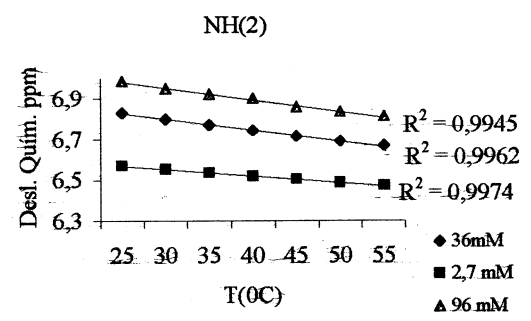


**22**

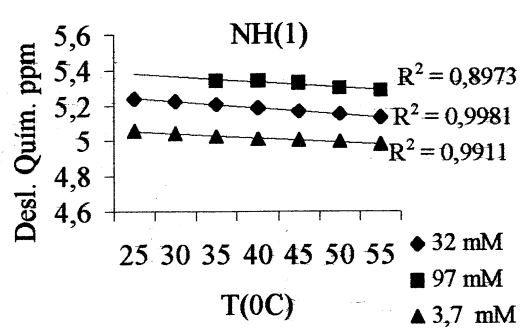
**Figura 1.** Gráficos da variação do deslocamento químico em função do logaritmo da concentração para os compostos 17-22



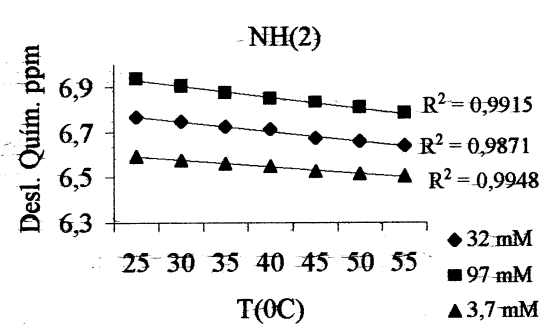
17



17

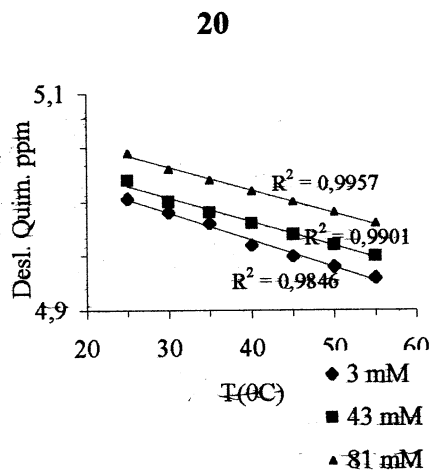
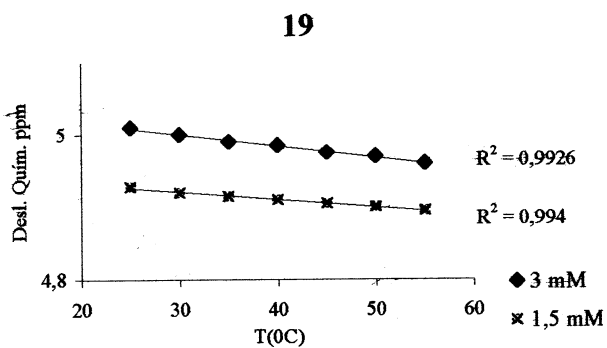
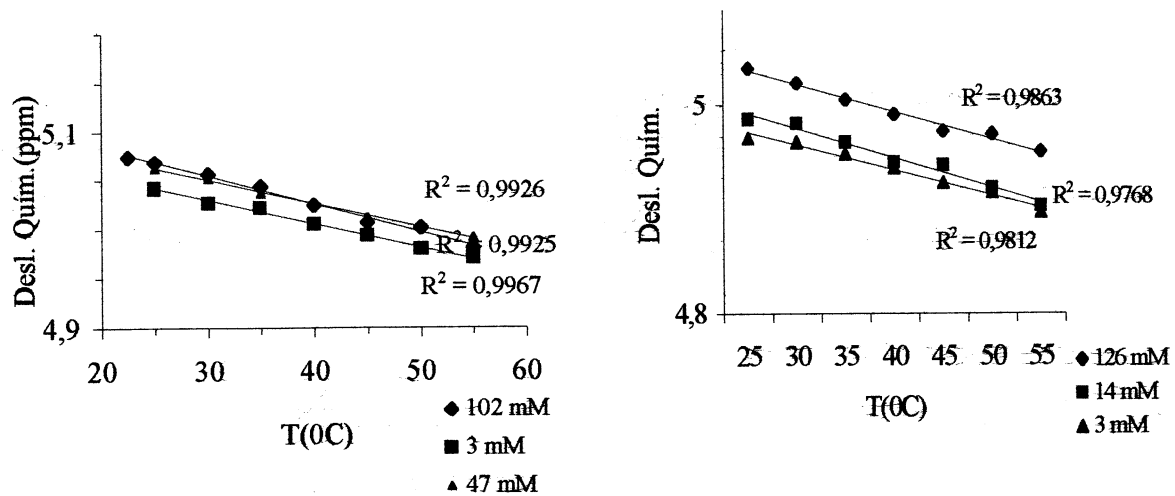


18

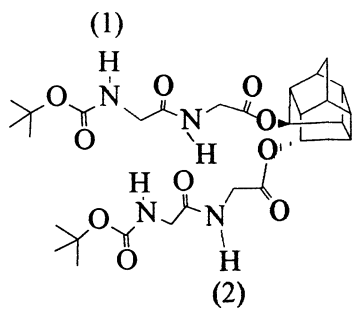


18

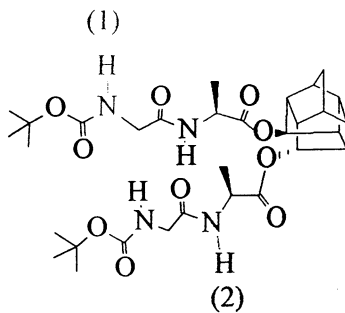
**Figura 2.** Gráficos da variação do deslocamento químico em função da temperatura para os compostos 17-18.



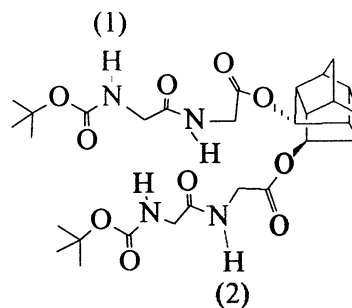
**Figura 3.** Gráficos da variação do deslocamento químico em função da temperatura para os compostos 19-22.



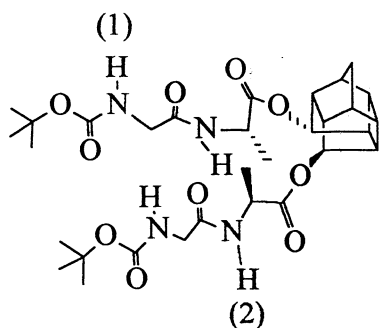
**8-endo-endo**



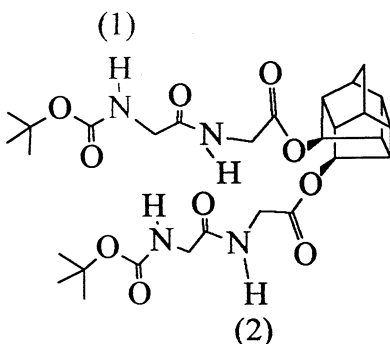
**9-endo-endo**



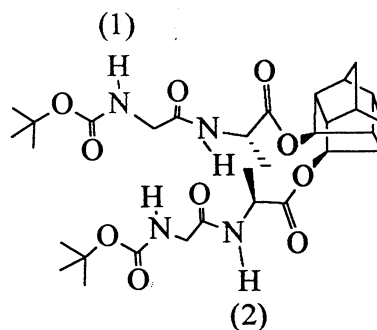
**10-exo-exo**



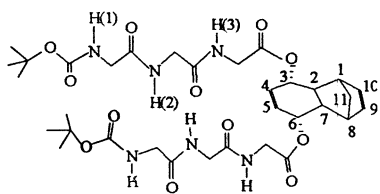
**11-exo-exo**



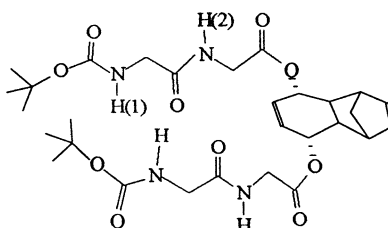
**12-endo-exo**



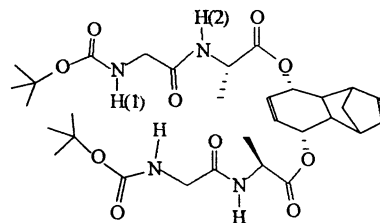
**13-endo-exo**



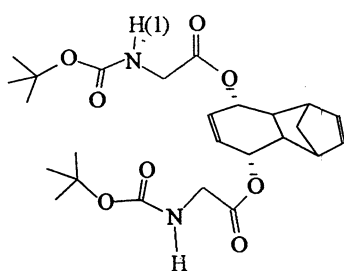
**16**



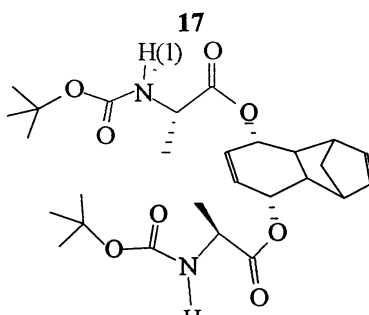
**17**



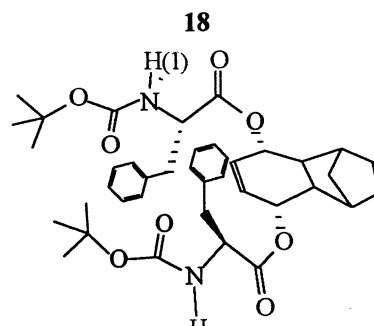
**18**



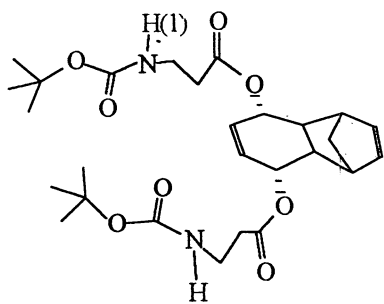
**19**



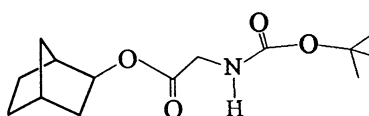
**20**



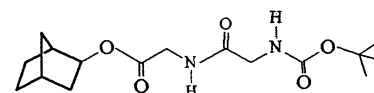
**21**



**22**



**23**



**24**

Numerações

