

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

SÍNTESE DE SISTEMAS RELACIONADOS
A BLEOMICINA

MESTRANDO: SANDRO LUCIO MIRESKI

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANTONIO CARLOS JOUSSEF

Florianópolis, Fevereiro de 2006.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

SÍNTESE DE SISTEMAS RELACIONADOS
A BLEOMICINA

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERIDADE FEDERAL DE SANTA
CATARINA PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM QUÍMICA

MESTRANDO: SANDRO LUCIO MIRESKI

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANTONIO CARLOS JOUSSEF

Florianópolis, Fevereiro de 2006.

Sandro Lucio Mireski

SÍNTESE DE SISTEMAS RELACIONADOS A BLEOMICINA

Esta dissertação foi julgada e aprovada em sua forma final pelo orientador e demais membros da banca examinadora para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química, especialidade em Química Orgânica:

Orientador: _____

Prof. Dr. Antonio Carlos Joussef
Departamento de Química – UFSC

Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera
Coordenador do Curso de Pós-Graduação
Departamento de Química – UFSC

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Augusto Susin Ceccato
Departamento de Química – UFSC

Prof. Dr. Marcus César Mandolesi Sá
Departamento de Química – UFSC

Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro
Departamento de Química – UFSC

Florianópolis, 16 de fevereiro de 2006.

**DEDICO ESTE TRABALHO AOS MEUS PAIS
JOÃO E ALCIONE, AOS MEUS IRMÃOS SANDERSON, SIMONE
E SIOMARA PELO AMOR E O CARINHO,
E A TODOS OS MEUS AMIGOS.**

Os químicos são uma estranha classe de mortais, impelidos por um impulso quase insano a procurar seus prazeres em meio a fumaça e vapor, fuligem e chamas, venenos e pobreza, e no entanto, entre todos esses males, tenho a impressão de viver tão agradavelmente que preferiria morrer a trocar de lugar com o rei da Pérsia.

Johann Joachim Becher, *Physica Subterrânea* (1667)

AGRADECIMENTOS

- Ao professor Antônio Carlos Joussef, pela oportunidade dada, pela inspiração, incentivo, busca e persistência nos objetivos, pela amizade e pelo desenvolvimento de um censo crítico mais apurado nas discussões científicas/filosóficas.
- Ao professor Luiz Augusto dos Santos Madureira pela amizade e bolsa na Central de Análises durante a graduação, ajudando de maneira fundamental na minha formação e na concretização do curso de graduação em Química.
- Ao professor Augusto Susin Ceccato, pela amizade, pelas brincadeiras e pelos primeiros passos dados neste trabalho, pelo grande coração e ajuda nos momentos difíceis.
- Aos meus amigos de laboratório, Luciana (Luka), Luciano (Gaúcho), Tula, Luciano, Márcia, Gustavo, Marcus, Lidiane (Lidi), Daliana (Dali), cachaceiros de plantão, consumidores compulsivos de café e Rock`roll, pelas discussões filosóficas, pelo carinho, amizade e excelente ambiente de trabalho.
- Ao pessoal da minha casa (Jagatah), Rodrigo (Dega), Endrigo, Leônidas (Calouro), Eduardo e Leomar, pela amizade e carinho, pelas muitas e muitas risadas e bebedeiras.
- Aos amigos do LABINC pela amizade, confiança e disponibilidade dos equipamentos.
- Aos amigos do CALQ.
- Aos funcionários da Central de Análises.
- Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.
- À Universidade Federal de Santa Catarina e ao curso de Pós-Graduação em Química pela oportunidade e formação.
- A minha família.
- A Deus e a todos que de uma maneira ou outra contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Bleomicina.....	1
1.2- Metalo-antibiótico.....	2
1.3- Mecanismo de ação da BLM.....	2
1.4- Estrutura da BLM-A ₂	4
1.5- Análogos Sintéticos.....	5
1.6- Novos sistemas elaborados da BLM.....	10
2- JUSTIFICATIVAS.....	11
3- OBJETIVOS.....	12
3.1- Objetivos Gerais.....	12
3.2- Objetivos Específicos.....	12
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
5- PARTE EXPERIMENTAL.....	37
5.1- Instrumentação e Reagentes.....	37
5.2- Procedimentos empregados na preparação dos sistemas.....	37
5.2.1- Preparação do sistema HPH-Pep.....	37
5.2.1.1- Preparação do composto HPH-Pep (1).....	37
5.2.1.2- Preparação do composto HPH-Pep-COOH (2).....	38
5.2.2- Preparação do sistema HFH-Pep (histidina-fenol-histidina). 39	
5.2.2.1- Preparação do composto bis(2,6-hidroximetil)-4- metilfenol (18).....	39
5.2.2.2- Preparação do composto 1-benzil-2,6- bis(hidroximetil)-4-metilfenol (19).....	40
5.2.2.3- Preparação do composto ácido 2-benzilóxi-5- metilisoftálico (16).....	40
5.2.2.4- Preparação do composto HFH-Pep-COOME-OBn (4).....	41
5.2.2.5- Preparação do composto HFH-Pep-COOME-OMe (3)....	42
5.2.2.6- Preparação do composto HFH-Pep-COOME-OH (5).....	43
5.2.2.7- Preparação do composto HFH-Pep-COOH-OBn (6).....	44

5.2.2.8- Preparação do HFH-Pep-COOH-OH (7).....	44
6- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	46
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mistura de análogos da BLM que diferem na parte amino terminal.....	1
Figura 2: Complexo dioxigênio ativado BLM-Fe ²⁺ -O ₂	3
Figura 3: Mecanismo proposto mediado pela BLM-Fe ²⁺ , A O ₂ e B sem O ₂	3
Figura 4: Estrutura da BLM-A ₂ com o grupo 3-dimetilsulfôniopropilamino terminal.....	4
Figura 5: Modelo sintético PYML-1.....	5
Figura 6: Modelos sintéticos PYML-3 e PYML-4.....	5
Figura 7: Modelos sintéticos PYML-6 e PYML-7.....	6
Figura 8: a) Estrutura proposta para o complexo BLM-Fe ²⁺ -O ₂ e b) PYML.....	7
Figura 9: a) Modelos HPH, MeO-HPH e Me ₂ N-HPH e b) modo de coordenação proposto.....	7
Figura 10: Modelos Me ₂ N-HPH e seus similares.....	8
Figura 11: Modelo HPH-Pep (1) recolocando na porção amino secundária uma ligação peptídica.....	9
Figura 12: Sistema HPH-Pep modelo para o novo sistema HFH-Pep.....	10
Figura 13: Função amida de 1 semelhante a uma ligação peptídica.....	13
Figura 14: Metodologias utilizadas na formação de ligações peptídicas.	14
Figura 15: Espectro de IV de 1 em pastilha de KBr.....	16
Figura 16: Espectro de RMN de ¹ H de 1 em DMSO-d ₆	17
Figura 17: Espectro de RMN de ¹ H de 1 em DMSO-d ₆ /D ₂ O.....	17
Figura 18: Espectro de RMN de ¹³ C de 1 em DMSO-d ₆	18
Figura 19: Espectro de IV de 2 em pastilha de KBr.....	19
Figura 20: Espectro de RMN de ¹ H de 2 em DMSO-d ₆	20
Figura 21: Espectro de RMN de ¹ H de 2 em DMSO-d ₆ /D ₂ O.....	21
Figura 22: Espectro de RMN de ¹ H de 2 em DMSO-d ₆ a 72°C.....	21
Figura 23: Espectro de RMN de ¹ H de 2 em DMSO-d ₆ a 25°C.....	22

Figura 24: Espectro de RMN de ^{13}C de 2 em DMSO- d_6 a 72°C	22
Figura 25: Substituição do ácido 8 pelo 12.....	23
Figura 26: Espectro de IV de 3 em pastilha de KBr.....	24
Figura 27: Espectro de RMN de ^1H de 3 em DMSO- d_6	25
Figura 28: Espectro de RMN de ^1H de 3 em DMSO- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$	25
Figura 29: Espectro de IV de 4 em pastilha de KBr.....	27
Figura 30: Espectro de RMN de ^1H de 4 em DMSO- d_6	28
Figura 31: Espectro de IV de 5 em pastilha de KBr.....	29
Figura 32: Espectro de RMN de ^1H de 5 em DMSO- d_6	30
Figura 33: Espectro de RMN de ^1H de 5 em DMSO- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$	30
Figura 34: Espectro de RMN de ^{13}C de 5 em DMSO- d_6	31
Figura 35: Espectro de IV de 6 em pastilha de KBr.....	33
Figura 36: Espectro de RMN de ^1H de 6 em DMSO- d_6	34
Figura 37: Espectro de RMN de ^1H de 6 em DMSO- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$	34
Figura 38: Espectro de IV de 7 em pastilha de KBr.....	35
Figura 39: Espectro de RMN de ^1H de 7 em DMSO- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$	36

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Reação de formação de 1 preparado por Otsuka.....	13
Esquema 2: Preparação de 10.....	14
Esquema 3: Mecanismo proposto para geração do cloreto de ácido via reagente de Vilsmeier.....	15
Esquema 4: Preparação de 1 pelo método do cloreto de ácido.....	15
Esquema 5: Reação de hidrólise básica para preparação de 2.....	18
Esquema 6: Preparação de 1 utilizando o procedimento de Schotten-Baumann.....	19
Esquema 7: Preparação do ácido metilado 13 a partir de 14.....	23
Esquema 8: Preparação do dicloreto de ácido 15.....	23
Esquema 9: Preparação de 3.....	24
Esquema 10: Preparação de 7 em uma única etapa utilizando LiCl.....	26
Esquema 11: Substituição do ácido com o grupo metóxi 13 pelo 16 com benzilóxi.....	26
Esquema 12: Preparação de 4.....	27
Esquema 13: Reação de hidrogenólise de 4 resultando no produto 5.....	29
Esquema 14: Reação de hidrólise de 5 para obtenção do produto final 7.....	31
Esquema 15: Seqüência de etapas reacionais para a obtenção de 7.	32
Esquema 16: Hidrólise do diéster assimétrico para o seu respectivo ácido.....	32
Esquema 17: Reação de hidrólise básica para a obtenção de 6.....	33
Esquema 18: Reação de hidrogenólise para obtenção do produto final 7.....	35

SIGLAS E ABREVIATURAS

AcOH – Ácido acético
COOH – Ácido carboxílico
AcOEt – Acetato de etila
HCl – Ácido clorídrico
DNA – Ácido desoxirribonucléico
AsPC-1 – Adenocarcinoma pancreático humano
DNA – Ácido desoxirribonucléico
H₂O – Água
D₂O – Água deuterada
Ar – Aromático
Al₂O₃ – Alumina
BLM – Bleomicina
BLMs – Bleomicinas
OBn – Benzilóxi
C – Carbono
K₂CO₃ – Carbonato de sódio
cm – Centímetro
NH₄Cl – Cloreto de amônio
LiCl – Cloreto de lítio
(COCl)₂ – Cloreto de oxalila
SOCl₂ – Cloreto de tionila
CHCl₃ – Clorofórmio
pH – Constante de acidez
J – Constante de acoplamento
CCD – Cromatografia de camada delgada
d – Dupleto
dt – Dupleto de tripleto
dd – Dupleto de dupleto
CH₂Cl₂ – Diclorometano

DPPA – Difenil fosforazidato
Me₂N – Dimetilamino
DMF – Dimetilformamida
DMSO-d₆ – Dimetilsulfóxido deuterado
IV – Espectroscopia de Infravermelho
COOMe – Éster
Ph – Fenol
PAP's – Fosfatases ácidas púrpuras
g – Gramas
°C – Graus Celsius
Hz – Hertz
OH – Hidroxila
H – Hidrogênio
H₂ – Hidrogênio molecular
HPH – Histidina-piridina-histidina
NaOH – Hidróxido de sódio
HFH - Histidina-fenol-histidina
h – Hora
Im – Imidazol
Lit – Literatura
L – Litro
MHz – Mega-Hertz
MeOH – Metanol
MeO – Metoxila
mL – Mililitro
mmol – Milimol
min – minuto
N₂ – Nitrogênio molecular
POCl₃ – Oxicloreto de fósforo
O₂ – Oxigênio molecular
Pd – Paládio metálico

ppm – Parte por milhão

PCl_5 – Pentacloroeto de fósforo.

Pep – Peptídica

Py – Piridina

p.f. – Ponto de fusão

RMN de ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN de ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

AIDS – Síndrome de Imundeficiência Adquirida

s – Singleto

Na_2SO_4 – Sulfato de sódio

TMS – Tetrametilsilano

PCl_3 – Tricloreto de fósforo

TEA – Trietilamina

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

RESUMO

As Bleomicinas (BLMs) constituem uma família de antibióticos glicopeptídicos antitumorais, descoberta por Umezawa em culturas do *Streptomyces verticillus*, e foi o primeiro agente anti-tumoral a mostrar especificidade na distribuição e metabolismo tecido/órgão, tendo um efeito terapêutico principal único, em particular, câncer. Associadas com outros quimioterápicos são clinicamente utilizadas no tratamento de linfomas de Hodgkin's, carcinomas de pele, cabeça e pescoço, tumores de testículos e ovários. As BLMs apresentam também propriedades antivirais, inibindo a replicação do HIV-1, e em combinação com outros agentes antivirais são utilizadas no tratamento da AIDS.

A importância das BLMs na medicina despertou, nas últimas três décadas, grande interesse na síntese de análogos simplificados, tais como os sistemas **PYML**, **HPH** e **HPH-Pep**. De maneira geral, esses sistemas contêm ligações amídicas, as quais se assemelham as ligações peptídicas presentes nas BLMs. Assim, este trabalho se fundamentou no desenvolvimento de uma metodologia simples e eficiente na elaboração de modelos relacionados à BLM e outras metaloenzimas utilizando o método do cloreto de ácido na formação da ligação amídica. Para efeito de comparação, esta metodologia foi aplicada na síntese do composto HPH-Pep (**1**), previamente preparado por Otsuka (74% de rendimento), reagindo o dicloreto de picolila (**8**) com histidinato de metila (**9**). Este procedimento se mostrou um método alternativo, menos laborioso e com rendimento satisfatório (70%). Esta metodologia foi aplicada, com sucesso, nas construções dos compostos, ainda inéditos, HFH-Pep-COOMe-OMe (**3**) e HFH-Pep-COOMe-OBn (**4**).

O tratamento dos compostos **1** e **4** com NaOH em MeOH forneceu os derivados ácidos HPH-Pep-COOH (**2**) e HFH-Pep-COOH-OBn (**6**) em bons rendimentos.

A reação de hidrogenólise do composto **6** levou ao produto desejado HFH-Pep-COOH-OH (**7**) quantitativamente.

ABSTRACT

Bleomycins (BLMs) are a family of glycopeptides antitumor antibiotics discovered by Umezawa from cultures of *Streptomyces verticillus*, and are now clinically used in the treatment of Hodgkin's lymphoma, carcinomas of the skin, head and neck, and tumors of testicles and ovary. They have also antiviral properties and inhibit HIV-1 replication and they are used in the treatment of AIDS in combination with other antiviral agents. In addition to their medicinal importance they have attracted a great deal of structural and synthetic studies because of their unique mechanism of action.

In the last three decades, many studies have been performed on the synthesis of simplified analogs of BLMs such as **PYML**, **HPH** and **HPH-Pep**. These analogs present amide functionality which resemble peptide bonding found in BLMs. Therefore, this work is based on the development of a simple and an efficient methodology to the construction of BLM related models and other metalloenzymes by the use of acid chlorides in amide bond formation. In order to compare this methodology to that one applied by Otsuka (74% yield), it was carried out the reaction of dipicolylchloride (**8**) with histidine methyl ester (**9**) to prepare HPH-Pep (**1**). This procedure is very reliable, provides a reasonable yield (70%) and gives easy isolation of the product (**1**) with high purity. This method was also applied successfully to the construction of new compounds HFH-COOMe-OMe (**3**) and HFH-COOMe-OBn (**4**).

Basic hydrolysis of compounds **1** and **3** with NaOH in MeOH led to compounds HPH-Pep-COOH (**2**) and HFH-COOH-OBn (**6**) respectively in good yields.

Hydrogenolysis of compound **6** provided the desired compound HFH-Pep-COOH-OH (**7**) quantitatively.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Bleomicina

A Bleomicina (BLM) constitui uma família de antibióticos glicopeptídicos antitumorais, descoberta em culturas do fungo *Streptomyces verticillus* em 1962, e publicada em 1966 por Umezawa *et al.*¹. Similar a muitas outras substâncias encontradas na natureza, a BLM é isolada como uma mistura de diversos análogos (11 moléculas), que diferem na parte amino terminal, sendo as BLM A₂ e B₂ as mais abundantes.^{2, 3} (Figura 1)

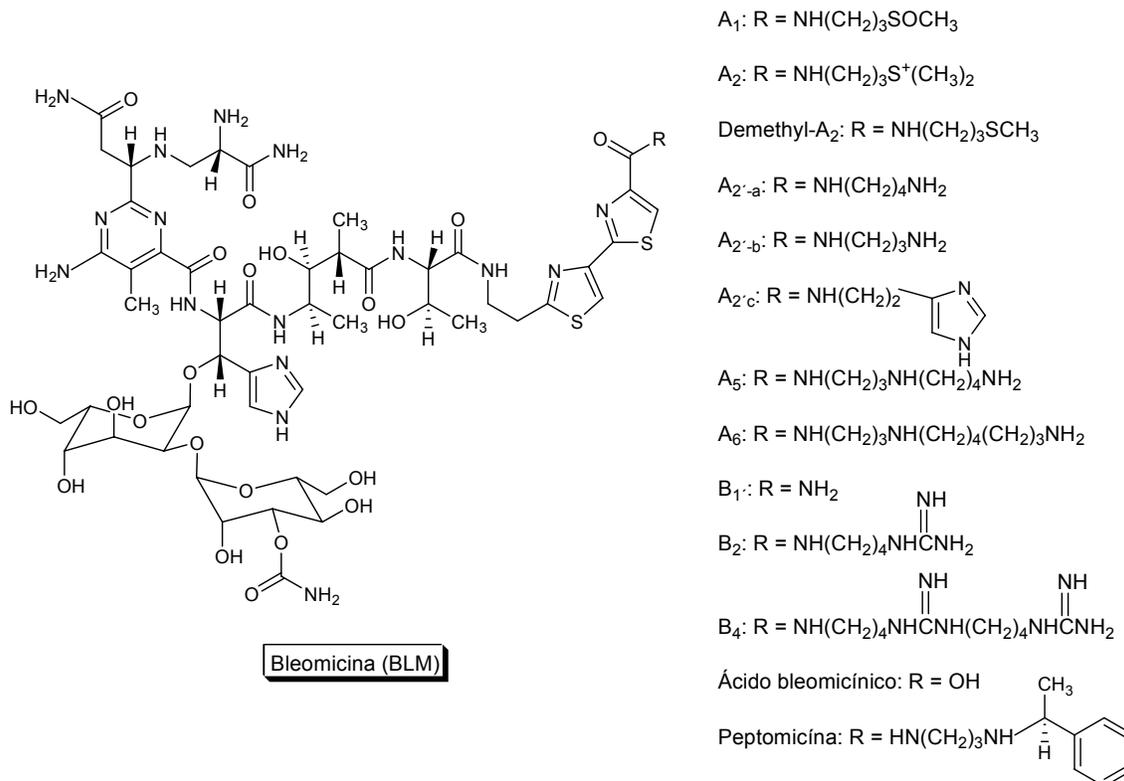


Figura 1: Mistura de análogos da BLM que diferem na parte amino terminal.

A BLM foi o primeiro agente anti-tumoral a mostrar especificidade na distribuição e metabolismo tecido/órgão, tendo um efeito terapêutico principal único, o câncer.⁴ Associadas com outros quimioterápicos as BLMs são clinicamente utilizadas no tratamento de linfomas de Hodgkin's, carcinomas de

pele, cabeça e pescoço, tumores de testículos e ovários.^{1, 2, 5, 6, 7} Além de propriedades antitumorais, as BLMs apresentam também propriedades antivirais, inibindo a replicação do HIV-1, e em combinação com outros agentes antivirais são utilizadas no tratamento da AIDS.^{8, 9} Como a maioria das drogas antitumorais e antivirais, as BLMs possuem alguns efeitos colaterais, sendo o mais grave deles a fibrose pulmonar, causada principalmente em pacientes que tenham um histórico de doenças pulmonares e associados a fatores como doses acumulativas, idade, função renal e exposição a oxigênio durante o tratamento.¹⁰

1.2- Metalo-antibiótico

Originalmente, a primeira BLM foi isolada como um complexo de Cu^{2+} , sendo suas propriedades extensivamente estudadas.¹ Estes estudos revelaram se tratar de um excelente ligante, podendo se coordenar com diferentes íons metálicos, tais como Mn^{2+} , $\text{Fe}^{2+/3+}$, $\text{Co}^{2+/3+}$, $\text{Ni}^{2+/3+}$, Cu^{+2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ga^{3+} , Ru^{2+} e o isótopo radiativo ^{105}Rh usado em radioterapia.² Além desses, são também relatados complexos com os íons metálicos Pt^{2+} e Pd^{2+} .¹¹

1.3- Mecanismo de ação da BLM

Ainda que a BLM tenha um número de propriedades bioquímicas interessantes, sua ação citotóxica resulta da habilidade em causar fragmentação no DNA. Estudos *in vitro* indicam que a BLM causa acúmulo de células na fase G_2 do ciclo celular, e muitas destas células exibem aberrações nos cromossomos, incluindo quebras cromatídicas, brechas e fragmentos, bem como no transporte. Mesmo que a ação citotóxica deste antibiótico esteja relacionada à formação de ligações com o DNA, este fármaco é classificado como agente ciclo-celular específico (CCS).^{12, 13} A BLM causa quebra do DNA pela interação com O_2 e o íon metálico Fe^{2+} . (Figura 2)

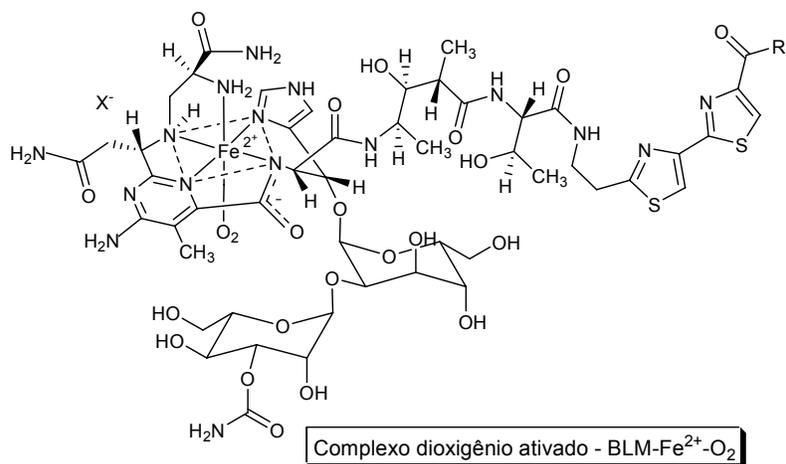


Figura 2: Complexo dioxigênio ativado BLM-Fe²⁺-O₂.

Na presença de O₂ e um agente redutor, tal como ditioneitol, o complexo BLM-metal torna-se ativado e mecanisticamente funciona como uma ferro oxidase, transferindo elétrons do átomo de Fe²⁺ para o O₂ produzindo espécies ativadas de oxigênio. Também foi mostrado, que complexos de metalo-BLM podem ser ativados pela reação com a enzima Flavina, NADPH citocromo P-450 redutase. A BLM liga-se ao DNA através do amino terminal do peptídeo, e o complexo ativado gera radicais livres que são os responsáveis pela quebra da cadeia de DNA.^{12, 14, 15} O complexo ativado, proposto como (BLM-Fe⁵⁺=O), quebra a fita do DNA especificamente nas seqüências G-C e G-T (5'→3').¹⁶ (Figura 3)

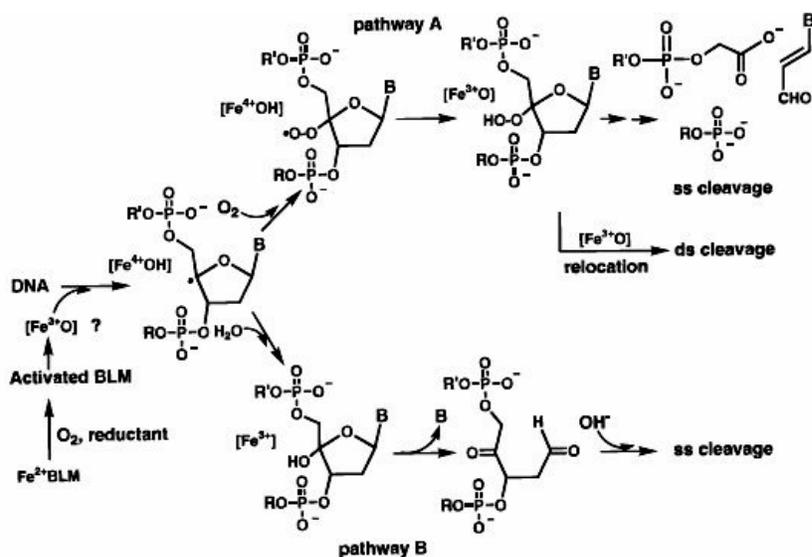


Figura 3: Mecanismo proposto mediado pela BLM-Fe²⁺, **A** O₂ e **B** sem O₂.¹⁶

Mais recentemente foi mostrado que a BLM-A₂ quebra o RNA bem como de maneira satisfatória, híbridos de DNA-RNA, fornecendo ácidos nucleicos alvos, relatados como potenciais agentes biológicos.¹⁴

1.4- Estrutura da BLM-A₂

A BLM-A₂ difere das outras Bleomicinas que ocorrem naturalmente, tendo o grupo 3-dimetilsulfôniopropilamino ligado ao carbono carbonílico terminal (Figura 4) e é o principal componente (70%) da droga anticâncer Bleoxano. A estrutura da BLM-A₂ foi revisada em 1978¹⁷ e confirmada por síntese total por Hecht *et al.*¹⁸ e Umezawa *et al.*¹⁹ em 1982.

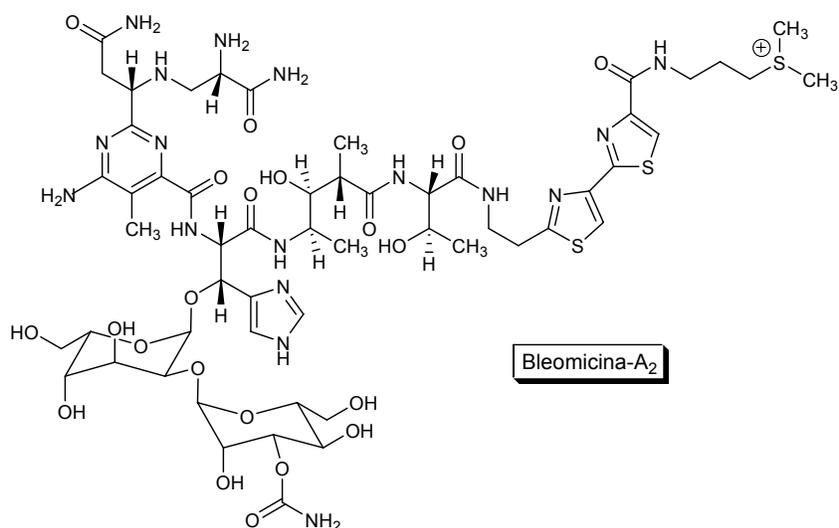


Figura 4: Estrutura da BLM-A₂ com o grupo 3-dimetilsulfôniopropilamino terminal.

Cada fragmento estrutural da BLM-A₂ contribui importante para sua atividade biológica. Estudos estruturais, biofísicos, químicos e biológicos da BLM-A₂ e seus derivados definiram a porção aminopirimidina, incluindo a cadeia propilamida e a ela ligada a β-aminoalanina juntamente com o anel imidazólico da porção β-hidroxihistidina. Esses três fragmentos constituem o sitio de ligação com o metal (formação do complexo ternário BLM-Fe²⁺-O₂) responsável pela clivagem do DNA.^{20,21} Ao fragmento bitiazol e o grupo sulfônio contido em sua cadeia lateral

é sugerido que o bitiazol intercala na dupla hélice, sendo o grupo sulfônio atraído eletrostaticamente pelo grupo fosfato. Já a porção do dissacarídeo (L-gulose e 3-O-carbamoil-D-manose) pode ser responsável pelo acúmulo seletivo da BLM em algumas células cancerosas. Embora não haja indícios de seu envolvimento na quebra do DNA, há um aumento aparente na eficiência de clivagem, sendo então sugerido que o dissacarídeo facilite a permeabilidade na membrana celular.^{13, 22, 23}

1.5- Análogos Sintéticos

Baseado nas informações estruturais, Otsuka *et al.*²⁴ e Umezawa *et al.*²⁵ sintetizaram o modelo sintético PYML-1 (Figura 5), o primeiro com característica estrutural semelhante a da BLM, na qual demonstrou ter a capacidade de ativar o dioxigênio (18% por ESR) pela formação do complexo dioxigênio ativado (PYML-1-Fe²⁺-O₂), indicando ser um modelo estrutural simplificado.

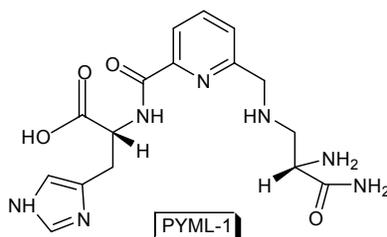


Figura 5: Modelo sintético PYML-1.

Como a BLM quelada apresenta os grupos CH₂CONH₂ e o dissacarídeo vicinais ao centro metálico, foi assumido que esses substituintes têm grande influência na propriedade de ligação do metal com o dioxigênio. Isso levou a se propor modificações na PYML-1 levando aos modelos sintetizados por Kittaka *et al.*^{23, 26} PYML-3 e PYML-4. (Figura 6)

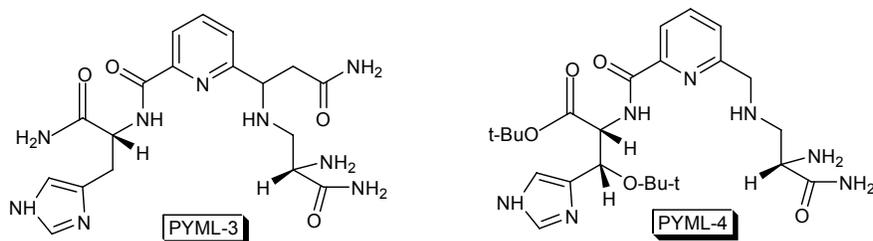


Figura 6: Modelos sintéticos PYML-3 e PYML-4.

Após as modificações, os modelos PYML-3 PYML-4, foram estudados e indicaram que o grupo CH_2CONH_2 contribui na estabilização do complexo metálico e a porção dissacarídica parece ser particularmente importante como um fator estérico, uma vez que este foi substituído pelo grupo tert-butil, na qual é assumido formar uma cavidade hidrofóbica para acomodar o dioxigênio. Diante dessas modificações, observou-se um aumento na capacidade de ativação do dioxigênio (71%) no complexo PYML-4- $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$. A propriedade eletrônica da BLM sobre o centro metálico de ferro, indica exercer um forte efeito na ativação do dioxigênio.^{23,}
²⁶ Com o intuito de observar este efeito, Kittaka *et al.*,^{23, 27} sintetizou os modelos PYML-6 e PYML-7.(Figura 7) contendo grupos doadores e retiradores de elétrons ligados na posição 4 do anel piridínico.

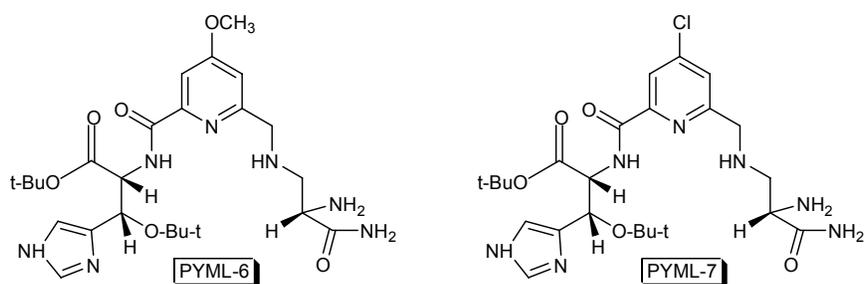


Figura 7: Modelos sintéticos PYML-6 e PYML-7.

O modelo PYML-6 com o substituinte metóxi, mostrou um aumento na capacidade de ativação do dioxigênio (97%). Por outro lado o substituinte cloro, PYML-7, levou a uma diminuição da ativação (55%), sugerindo uma significativa influência da densidade eletrônica π do átomo de nitrogênio do anel piridínico na ativação do dioxigênio.^{23, 27}

Similar ao sitio ativo da BLM, o anel piridínico e imidazólico do modelo PYML são coplanares (em função da ligação peptídica) com a posição axial sendo ocupada pelo grupo amino primário da aminoalanina. (Figura 8-a) As introduções dos grupos MeO e Me_2N no anel piridínico aumentaram de 1,4 e 1,8 vezes respectivamente a eficiência de ativação do dioxigênio em relação ao PYML não substituído. (Figura 8-b).

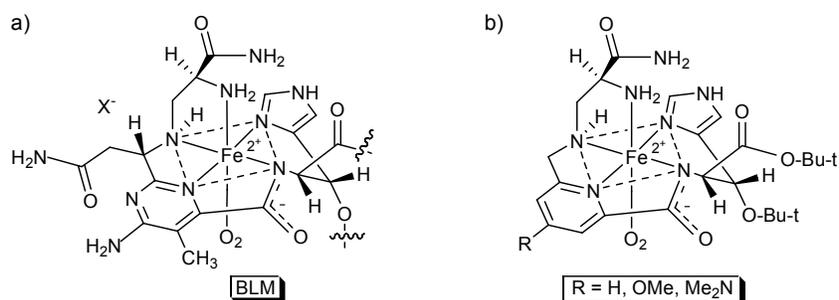


Figura 8: a) Estrutura proposta para o complexo BLM-Fe²⁺-O₂ e b) PYML.

Com estes elementos no ambiente de coordenação, Otsuka *et al.*²⁸ construiu o modelo simétrico HPH (Histidina-Piridina-Histidina) (Figura 9-a) com o objetivo de aumentar a flexibilidade da estrutura para que o anel piridínico ocupasse a posição axial (Figura 9-b) na esfera de coordenação do complexo metálico. Além do mais, os modelos MeO-HPH e Me₂N-HPH contendo os grupos doadores de elétrons foram preparados com o intuito de examinar os efeitos eletrônicos do substituinte da piridina axial no HPH versus aquele da piridina equatorial no PYML. O efeito eletrônico do substituinte na piridina pode ser transmitido efetivamente para o dioxigênio pela outra extremidade do orbital d_{z²} do ferro aumentando assim a capacidade de ativação.

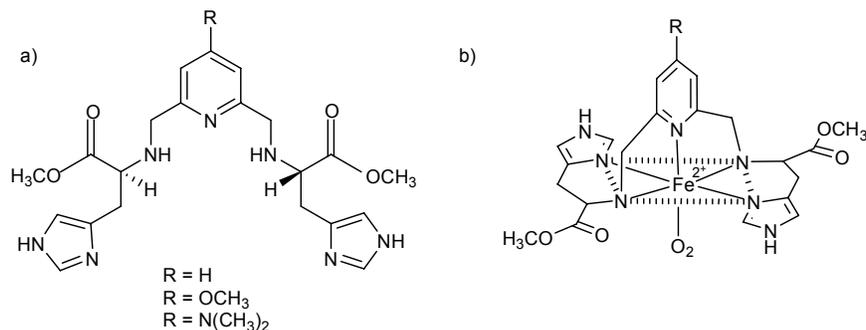


Figura 9: a) Modelos HPH, MeO-HPH e Me₂N-HPH e b) modo de coordenação proposto.

Neste contexto, os derivados de HPH contendo os grupos MeO e Me₂N na posição 4 do anel piridínico aumentaram consideravelmente a capacidade de ativação do dioxigênio (HPH-Fe²⁺-O₂). O incremento da força ativante do dioxigênio foi bem maior quando comparado com os mesmos derivados de PYML.

Os modelos MeO-HPH e Me₂N-HPH são 5 e 8 vezes maiores respectivamente, quando comparadas ao HPH não substituído.²⁸

Como observado na BLM, o modelo Me₂N-HPH tem uma maior afinidade pelos íons Cu²⁺ e Zn²⁺ em relação ao íon Fe²⁺. Diante dessas observações e através do conhecimento que proteínas fisiologicamente significativas freqüentemente contem zinco, como um cofator de enzimas, e também um elemento chave na construção da estrutura secundária de proteínas como fator de transcrição, a inibição da função destas proteínas de transcrição levaria a interferência na replicação do vírus da AIDS. Assim, a proposta da utilização de Me₂N-HPH capaz de coordenar zinco eficientemente poderia modular a função destas proteínas contendo zinco e inibiria a infecção do HIV nos linfócitos humanos. Neste contexto, foram preparados os modelos Me₂N-HPH e seus similares (Figura 10) os quais exibiram expressiva capacidade seqüestrante de zinco e mostraram relevante efeito inibitório na atividade de interação do DNA da enzima HIV-EP1.^{29, 30, 31, 32, 33}

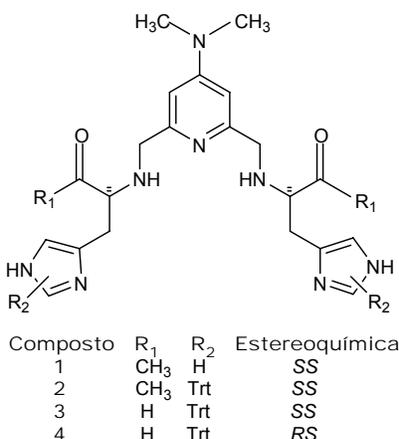


Figura 10: Modelos Me₂N-HPH e seus similares.

Além do mais, espécies contendo oxigênio reativo são freqüentemente envolvidas no mecanismo de apoptose (células programadas a morrer são removidas sem induzir inflamações em seus micro-ambientes) e como dentre os derivados de HPH, o complexo Me₂N-HPH-Fe²⁺-O₂ é o mais efetivo ativante do dioxigênio, este modelo se mostrou um indutor de apoptose no tratamento de células AsPC-1 (Adenocarcinoma pancreático humano, linhagem de célula

resistente a apoptose). A indução de apoptose por Me₂N-HPH foi inibida pelos íons metálicos Cu²⁺ e Zn²⁺, indicando que a quelação do íon Fe²⁺ é responsável pela indução como observado na BLM para clivar o DNA e a atividade de induzir apoptose parece ser uma característica única desse sistema entre os compostos relacionados com a BLM, podendo ser referência estrutural na confecção de novos e seletivos agentes de indução de apoptose em células neoplásicas.^{34, 35}

Uma versão modificada do HPH é o modelo HPH-Pep, sintetizado por Otsuka *et al.*³⁶, no qual o grupo aminometil foi substituído por aminocarbonil (substituição nas posições 2,6 do anel piridínico) assemelhando-se a uma ligação peptídica encontrada na BLM. Esta rigidez estrutural poderia restringir o processo de ativação do dioxigênio via complexação com o íon Fe²⁺. (Figura 11)

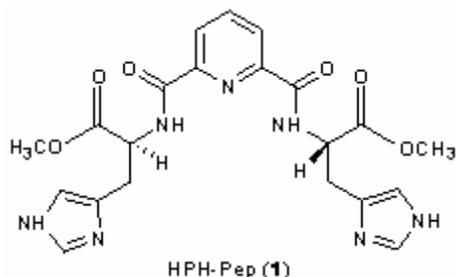


Figura 11: Modelo HPH-Pep (1) recolocando na porção amino secundária uma ligação peptídica.

Embora Otsuka não mencione a preparação de complexos com Fe²⁺, ele foi capaz de preparar o complexo HPH-Pep-Cu²⁺ que surpreendentemente tem a sua capacidade ativante de dioxigênio alterada para supressora de espécies radicalares, especificamente superóxido sem gerar peróxido de hidrogênio. Foi constatado também que o complexo não suprime outras espécies radicalares como peróxido de hidrogênio e radical hidroxil.³⁶

Uma outra aplicação, bem sucedida, do ligante HPH-Pep foi relatada por Hori *et al.* no tratamento hipertérmico (elevação da temperatura corporal ou do tecido, utilizado na terapia do câncer) de leucemia (células de rato (L-1210) e humanas (Molt-4 e HL60)). O HPH-Pep não mostrou efeito citotóxico a 37°C, porém a 44°C apresentou excelente efeito, demonstrando ser um promissor sensibilizador para o tratamento hipertérmico na terapia do câncer.³⁷

1.6- Novos sistemas elaborados da BLM

Com base nestes dados, trabalhamos no desenvolvimento de metodologias simples e baratas, utilizando reagentes disponíveis, objetivando a elaboração de sistemas relacionados a BLM e outras metaloenzimas, contendo as funções relativas aos resíduos de aminoácidos histidina, tirosina e aspártico. Como apresentado, à maioria destes sistemas foram preparados por Otsuka e colaboradores, entre eles o HPH-Pep (Histidina-Piridina-Histina) que serviu de base para ampliação do novo sistema por nós chamado de HFH-Pep (Histidina-Fenol-Histidina) (Figura 12)

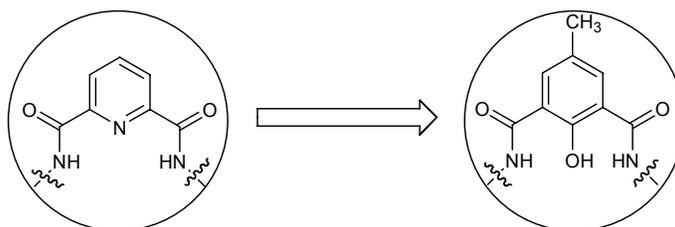


Figura 12: Sistema HPH-Pep modelo para o novo sistema HFH-Pep.

2- JUSTIFICATIVAS

Na síntese de sistemas que contenham resíduos de aminoácidos se objetiva ter modelos que possam mimetizar as propriedades estruturais e/ou funcionais de enzimas ou metaloenzimas. Estas desempenham papéis específicos, sendo na maioria das vezes, vitais para o bom funcionamento de todo o sistema biológico. Embora não se possa subestimar a contribuição de todos os componentes, modelos que apresentam resíduos semelhantes aos encontrados nestes sistemas podem fornecer informações relevantes e mais fiéis do funcionamento. A síntese destes análogos tem várias aplicações e elevado potencial em áreas biológicas afins como medicina e farmacologia, no desenvolvimento de novos medicamentos (na terapia do câncer, em doenças causadas por agentes patogênicos, etc) ³⁸ e a possibilidade de ser aplicada a qualquer modelo, dependendo somente da atividade que se deseja alcançar, ou seja, a ativação ou inibição seletiva a ser mimetizada. Este fator torna necessária a ampliação dos projetos de pesquisa relacionados a estes compostos, uma vez que os mesmos possuem extremo potencial biológico, podendo contribuir diretamente para a melhoria e bem estar do ser humano.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivos Gerais

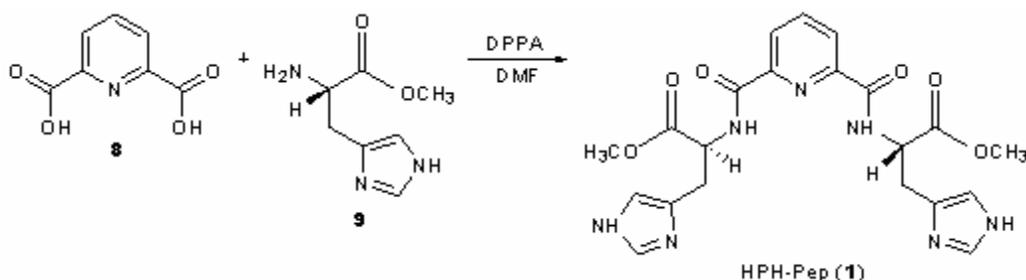
- Desenvolver metodologias para a síntese de sistemas relacionados a Bleomicina (BLM).
- Sintetizar os sistemas Histidina-Piridina-Histidina (HPH-Pep) e Histidina-Fenol-Histidina (HFH-Pep) com as unidades estruturais condensadas através de ligações semelhantes às ligações peptídicas.
- Empregar os compostos na preparação de modelos funcionais e/ou estruturais de metaloenzimas.

3.2- Objetivos Específicos

- Preparar o composto HPH-Pep (**1**) pelo método do cloreto de ácido.
- Utilizar o método do cloreto de ácido na preparação do composto HFH-Pep-COOH-OH (**7**).
- Sintetizar os diácidos 2-metóxi-5-metilsoftálico (**13**) e 2-benzilóxi-5-metilsoftálico (**16**) como base na construção do composto HFH-Pep-COOH-OH (**7**).
- Estabelecer métodos de purificação adequados para os sistemas HPH-Pep e HFH-Pep.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A idéia neste trabalho foi desenvolver metodologias simples e eficientes utilizando reagentes disponíveis na elaboração de sistemas relacionados a BLM e outras metaloenzimas contendo as funções relativas aos resíduos de aminoácidos histidina, tirosina e aspártico. Como já apresentado anteriormente, a maioria destes compostos relacionados a BLM, como o HPH-Pep (1), foram preparados por Otsuka e colaboradores³⁶, que utilizam o DPPA (Difenil fosforazidato) como agente ativante na reação de acoplamento (formação da ligação amídica) entre o ácido dipicolínico (8) e o histidinato de metila (9) (Esquema 1).



Esquema 1: Reação de formação de 1 preparado por Otsuka.

Em comum com a química de preparação de dipeptídeos, a reação de formação dessa ligação amídica assemelha-se muito a uma ligação peptídica.³⁹⁻⁴² (Figura 13).

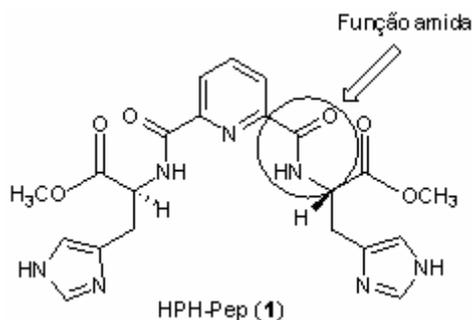


Figura 13: Função amida de 1 semelhante a uma ligação peptídica.

Muitas metodologias de formação de ligações peptídicas têm sido descritas^{39,40} (Figura 14), e, passadas duas décadas, o design, a síntese e a inovação dos reagentes de acoplamento, ainda é uma área de intensa investigação. Geralmente, a escolha se faz de acordo com a necessidade de se evitar racemização no processo, uma vez que, na sua grande maioria, aminoácidos opticamente ativos são utilizados. No entanto, métodos mais robustos e clássicos como cloretos de ácido são rotineiramente usados em síntese.

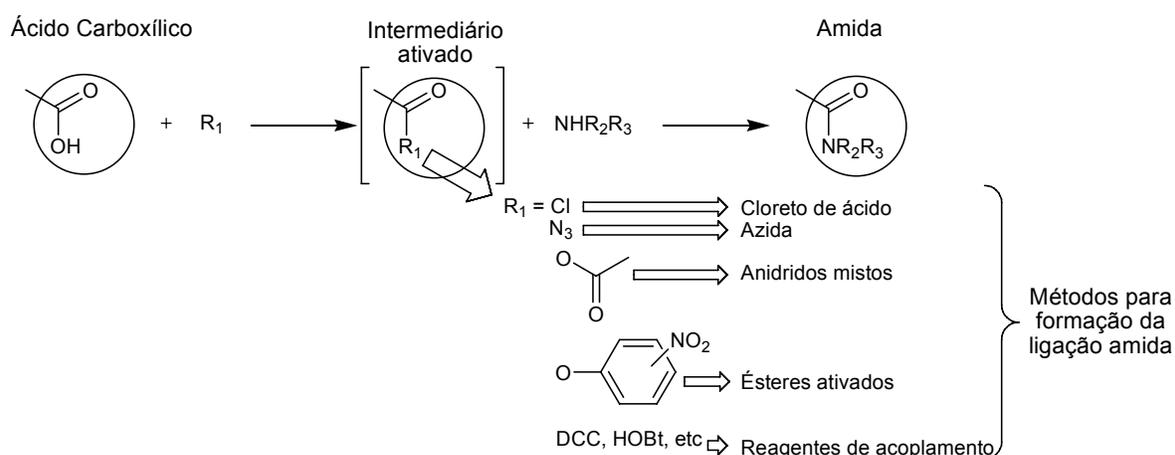
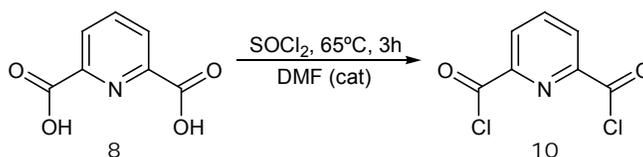


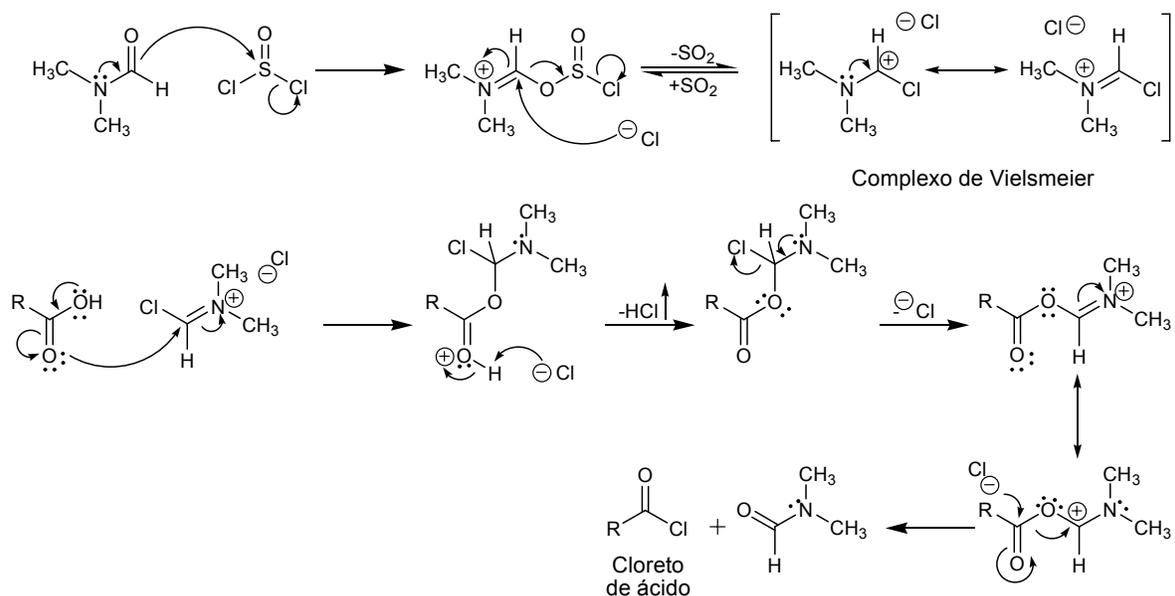
Figura 14: Metodologias utilizadas na formação de ligações peptídicas.

Dentre as metodologias mostradas (Figura 14), optamos pela geração do cloreto de ácido devido à disponibilidade de reagentes capazes de efetuar tal transformação, tais como; cloreto de tionila (SOCl₂), cloreto de oxalila (COCl)₂, tricloreto de fósforo (PCl₃), oxicloreto de fósforo (POCl₃) e pentacloreto de fósforo (PCl₅). Assim, dentre esses reagentes, utilizamos o SOCl₂ na presença de uma quantidade catalítica de dimetilformamida (DMF) para gerar quantitativamente o dicloreto de dipicolila (**10**) (Esquema 2).



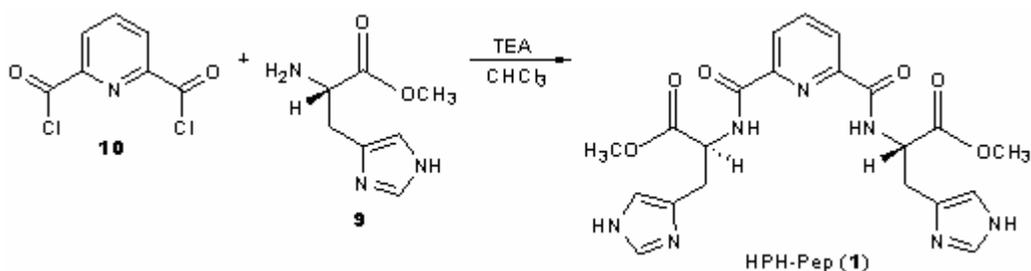
Esquema 2: Preparação de **10**.

As reações catalisadas por DMF na preparação de cloretos de ácido ocorrem via reagente de Vilsmeier (sal de Halometiliminium) (Esquema 3), formado entre o SOCl_2 e o DMF, o qual possui caráter mais eletrofílico que o SOCl_2 e é rapidamente atacado nucleoficamente pelo ácido carboxílico, levando a formação irreversível do cloreto de ácido desejado, eliminando SO_2 e HCl , conforme o mecanismo descrito por Zaoral.^{41, 43-45}



Esquema 3: Mecanismo proposto para geração do cloreto de ácido via reagente de Vilsmeier.

A reação de **10** com **9** em clorofórmio (CHCl_3) na presença de trietilamina (TEA) (Esquema 4) foi completa em 96h (acompanhada por $\text{CCD Al}_2\text{O}_3$, AcOEt/MeOH (8:2)) e o HPH-Pep (**1**) foi obtido em 70% de rendimento.



Esquema 4: Preparação de **1** pelo método do cloreto de ácido.

Vale ressaltar que nesse procedimento o produto é isolado como um sólido branco que precipita na interfase clorofórmio-água no “work up”, necessitando apenas ser “filtrado” e “lavado” com água e acetona respectivamente fornecendo **1** com alto grau de pureza e sem racemização durante o processo (ver dados na parte experimental). Embora o rendimento esteja um pouco abaixo daquele obtido por Otsuka (74%), nosso procedimento é bem mais simples, menos laborioso e não envolve purificação por cromatografia de coluna.³⁶ Alguns dados espectrais, mais relevantes, que caracterizam **1** são mencionados a seguir:

O espectro de IV de **1** (Figura 15) mostra bandas de absorção em 3384 cm^{-1} relativas ao estiramento N-H_{amina}, e, em 1747 e 1663 cm^{-1} referentes aos estiramentos das carbonilas (C=O) dos grupos éster e amida respectivamente.

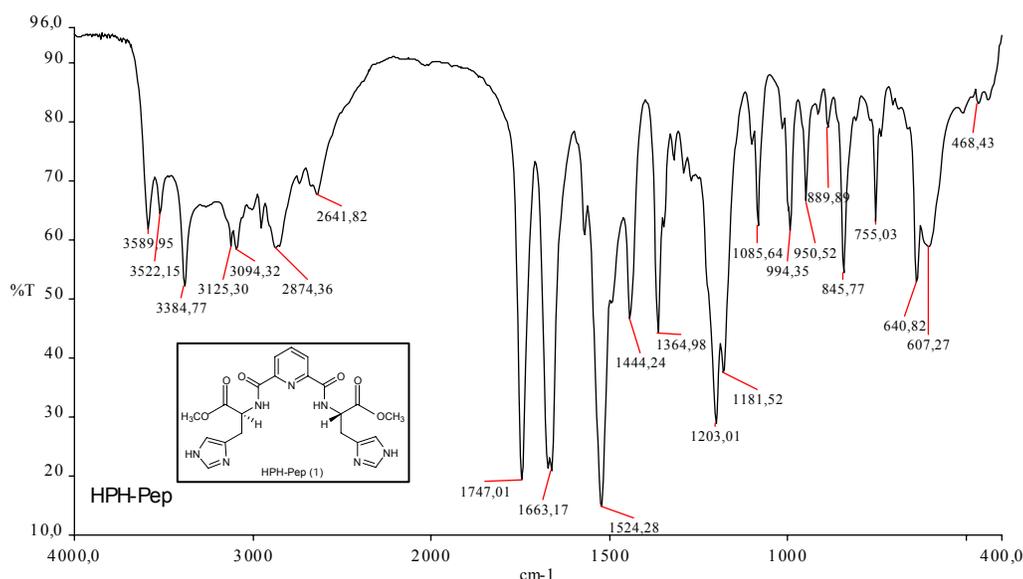


Figura 15: Espectro de IV de **1** em pastilha de KBr.

No espectro de RMN de ^1H de **1** (Figura 16) aparece um singlete em 3,66 ppm referente aos hidrogênios metílicos do grupo éster (6H), um dubleto de tripleto em 4,71 ppm relativo ao hidrogênio metínico (2H, $J = 6,8$ e 7,2 Hz) e o hidrogênio amídico em 9,49 ppm (2H, $J = 7,2$ Hz) que na presença de D_2O (Figura 17) desaparece. e o sinal em 4,71 ppm aparece agora como um tripleto ($J = 6,8$ Hz).

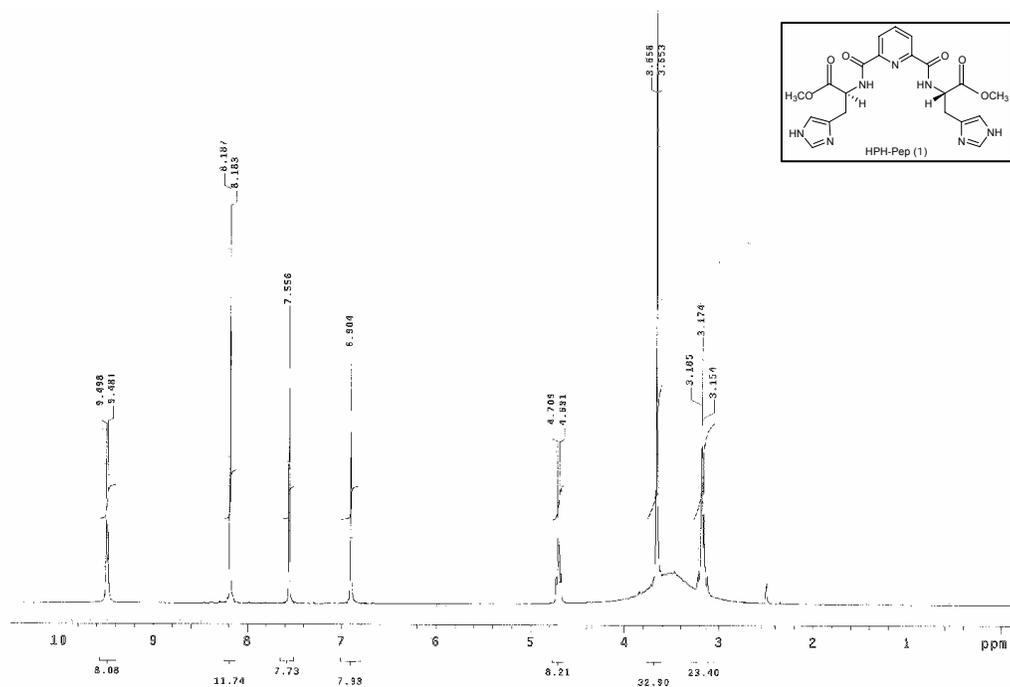


Figura 16: Espectro de RMN de ^1H de 1 em DMSO-d_6 .

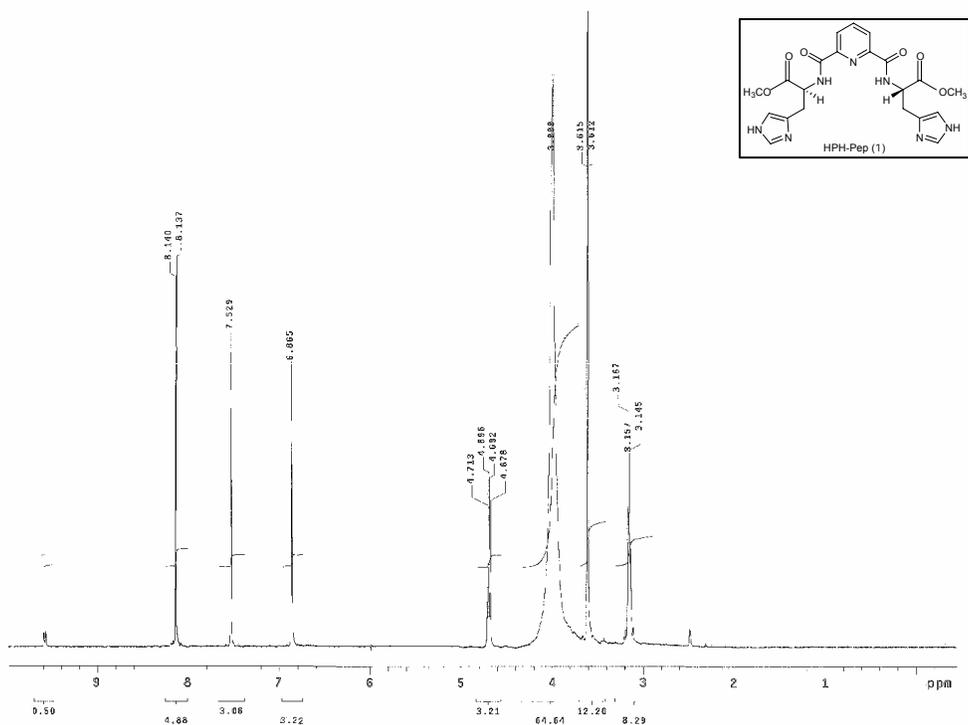


Figura 17: Espectro de RMN de ^1H de 1 em $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$.

Já o espectro de RMN de ^{13}C de **1** (Figura 18) mostra sinais em 172,41 e 164,14 ppm, correspondentes aos carbonos das funções éster e amida respectivamente.

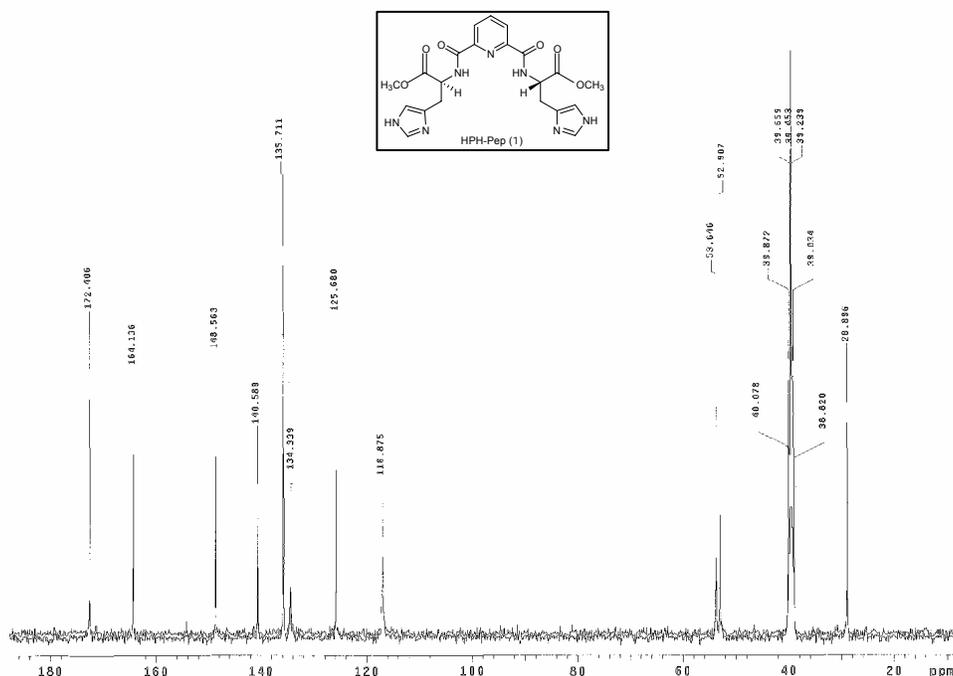
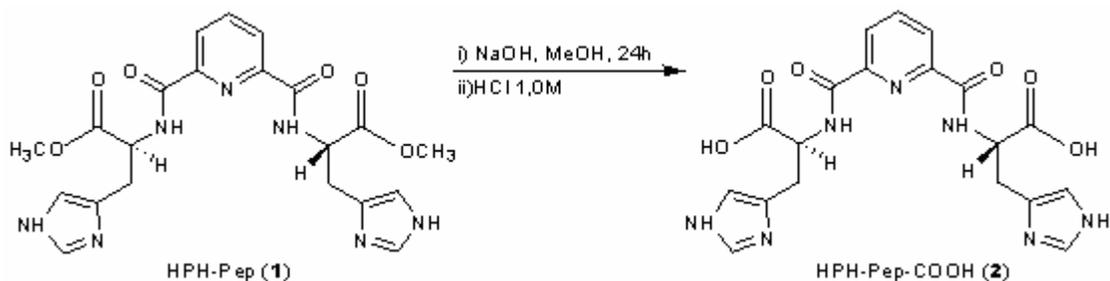


Figura 18: Espectro de RMN de ^{13}C de **1** em DMSO- d_6 .

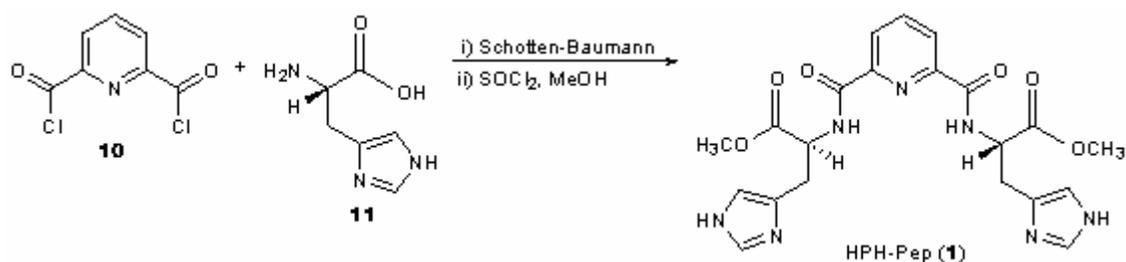
Com o objetivo de modificar a propriedade quelante de **1** e de acoplar resíduos de aminoácido para formação de dipeptídeos ampliando assim a polifuncionalidade da molécula, procuramos obter o HPH-Pep-COOH (**2**) a partir da hidrólise básica de **1**. (Esquema 5)



Esquema 5: Reação de hidrólise básica para preparação de **2**.

A reação foi completa em 24h (acompanhada por CCD Al_2O_3 , AcOEt/MeOH (9:1)) e a dissolução do resíduo reacional em água e acidificação do

meio até pH \cong 6,5 seguido de adição de acetona, forneceu o produto **2** como um sólido branco em 95% de rendimento. Embora a literatura não mencione a preparação e caracterização do composto **2**, este foi descrito por You *et al.*⁴⁶ (preparação e p.f= 241-242°C) na síntese de **1**, que representa uma metodologia oposta a nossa. Essa metodologia utiliza o procedimento de Schotten-Baumann reagindo diretamente o **10** com histidina (**11**) e subsequente esterificação (Esquema 6).



Esquema 6: Preparação de **1** utilizando o procedimento de Schotten-Baumann.

O espectro de IV de **2** (Figura 19) mostra bandas de absorção em 3266-3138 cm⁻¹ relativas aos estiramentos N-H_{amina} e O-H_{ácido}. Em 1663 cm⁻¹ e 1591-1530 cm⁻¹ aparecem os estiramentos das carbonilas (C=O) da amida e do grupo carboxílico (assimétrico e simétrico). A presença da banda de absorção da carbonila (C=O) da função éster em 1741 cm⁻¹, não é observada.

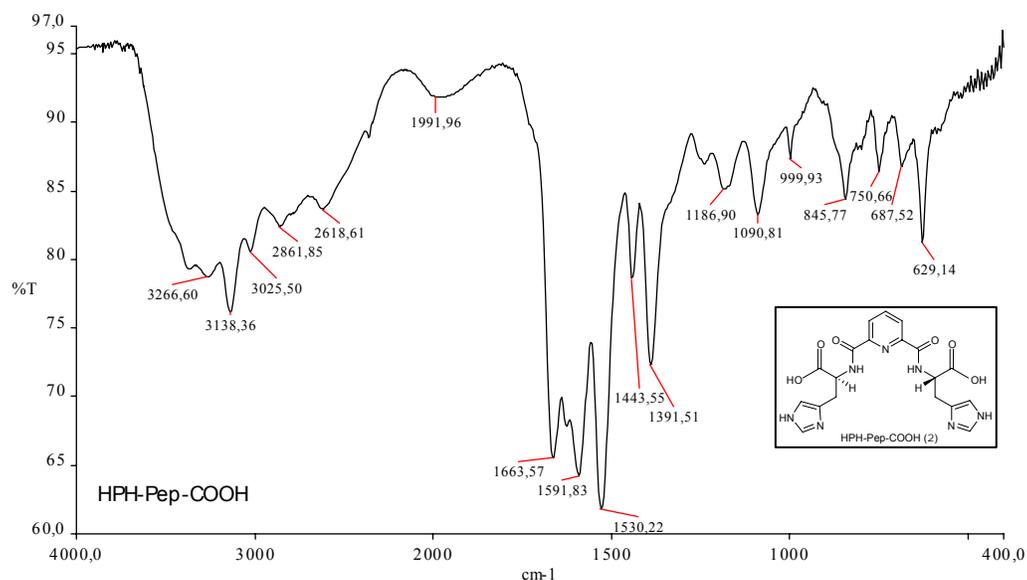


Figura 19: Espectro de IV de **2** em pastilha de KBr.

O espectro de RMN de ^1H de **2** (Figura 20) mostrou um conjunto de dois dubletos relativos dos hidrogênios amídicos em 9,48 e 9,38 ppm (troca na presença de D_2O) (Figura 21), um conjunto de dois dubletos de tripletos em 4,69 e 4,60 ppm relativos aos hidrogênios metínicos (4,70-4,68 e 4,61-4,60 ppm). O sinal referente aos hidrogênios metílicos da função éster em 3,66 ppm não é observado. Essas observações sugerem duas propostas: a primeira poderia ser um processo de racemização parcial durante a hidrólise básica devido o éster **1** não apresentar esses sinais dobrados e a segunda, poderia estar envolvido um equilíbrio de conformêros. Assim, a presença do equilíbrio conformacional em **2** pode ser confirmada pelo registro de espectros de RMN de ^1H em função da temperatura, Podemos observar que na temperatura de 72°C (Figura 22) a maioria dos desdobramentos coalescem, e mais importante ainda, é o fato que a integridade do composto é mantida pelo registro do espectro no processo de resfriamento até 25°C (Figura 23). De maneira análoga, foi observado na temperatura de 72°C a coalescência dos sinais de carbono no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 24).

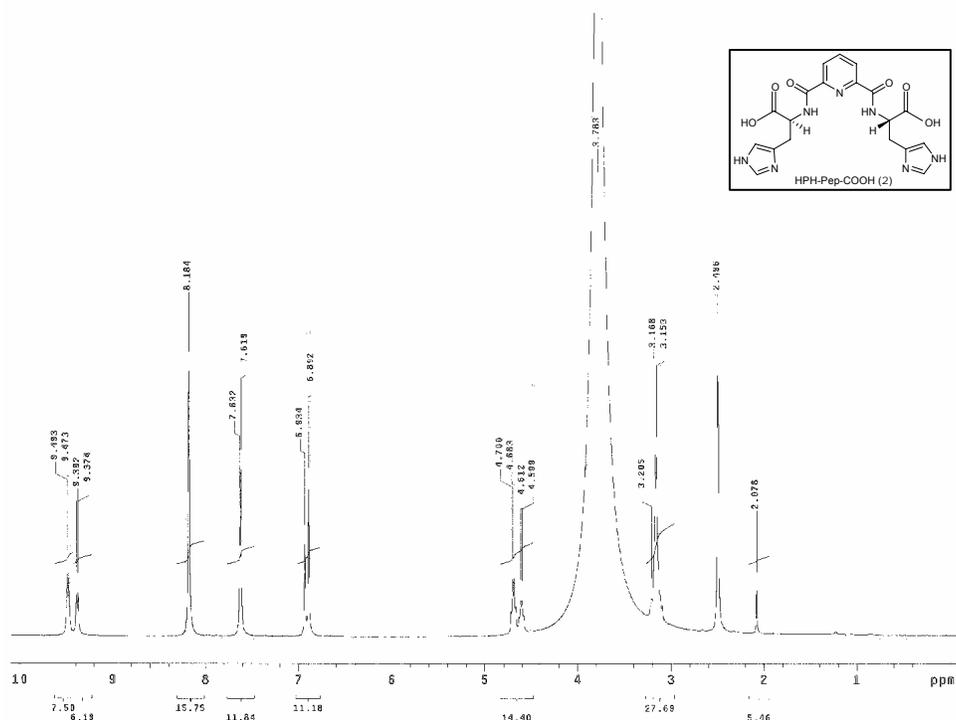


Figura 20: Espectro de RMN de ^1H de **2** em DMSO-d_6 .

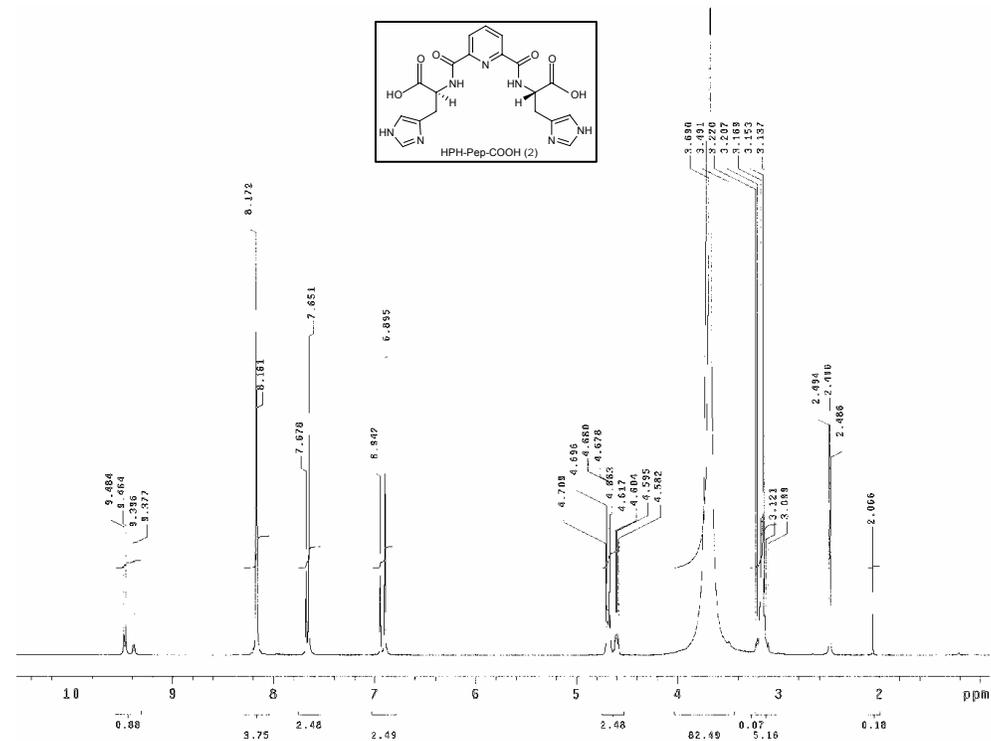


Figura 21: Espectro de RMN de ^1H de 2 em $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$.

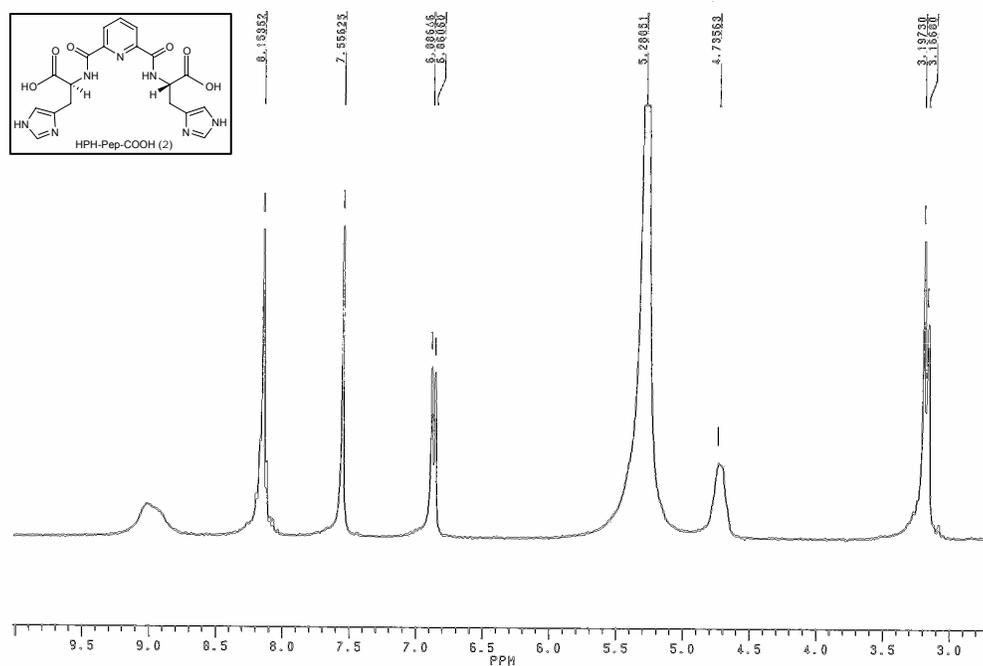


Figura 22: Espectro de RMN de ^1H de 2 em DMSO-d_6 a 72°C .

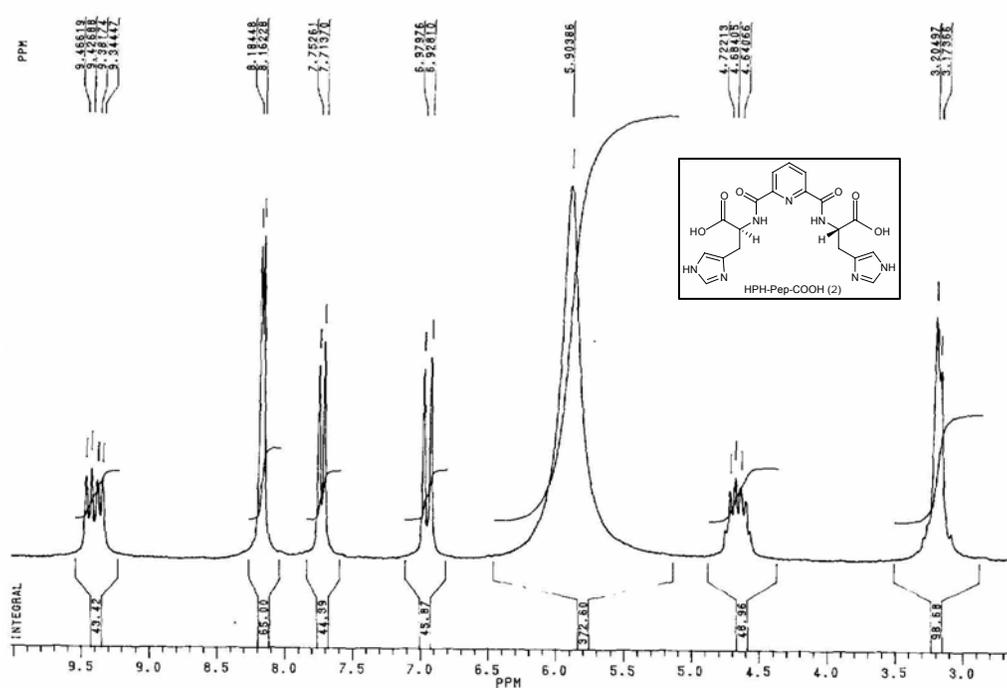


Figura 23: Espectro de RMN de ^1H de **2** em DMSO-d_6 a 25°C .

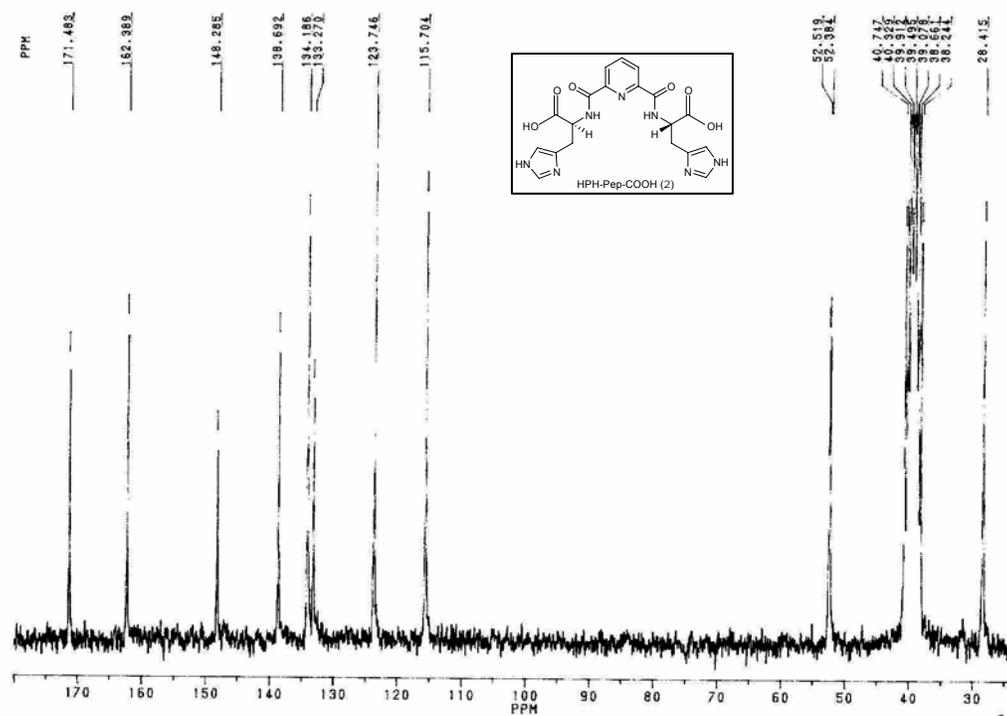


Figura 24: Espectro de RMN de ^{13}C de **2** em DMSO-d_6 a 72°C .

Na tentativa de ampliarmos ainda mais a construção de sistemas relacionados a BLM e também a outras metaloenzimas contendo histidina, optamos utilizar o ácido 2-hidróxi-5-metilsoftálico (**12**) como substituto do ácido dipicolínico (**8**) (Figura 25).

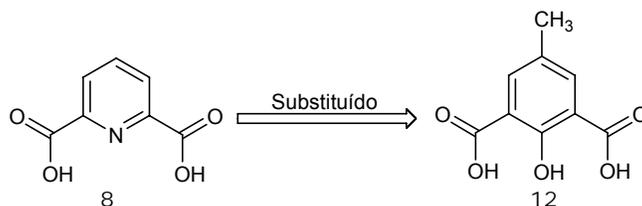
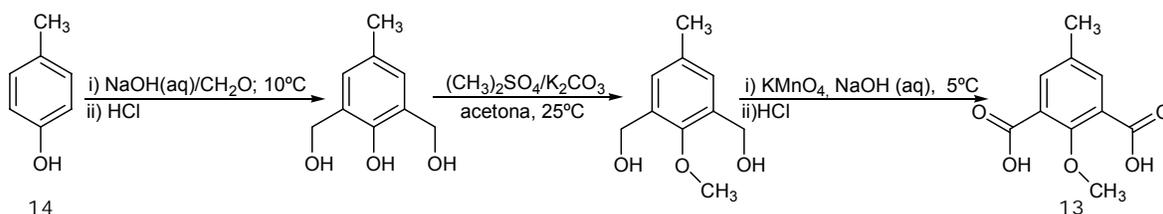


Figura 25: Substituição do ácido **8** pelo **12**.

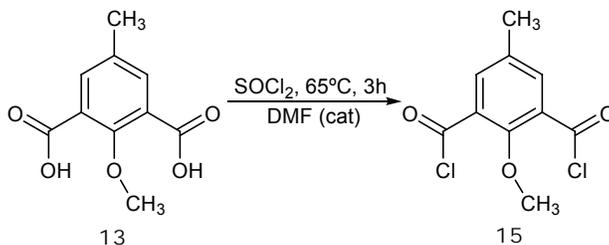
A escolha se deve ao fato de que o ácido **12** contém a função fenol que está presente na tirosina, sendo um dos responsáveis pela ação catalítica de várias metaloenzimas, dentre elas as fosfatases ácidas púrpuras (PAP's).

Assim, dada a não disponibilidade comercial do ácido **12**, preparamos o derivado ácido (2-metóxi-5-metilsoftálico (**13**)) a partir do p-cresol (**14**).⁴⁷ (Esquema 7).



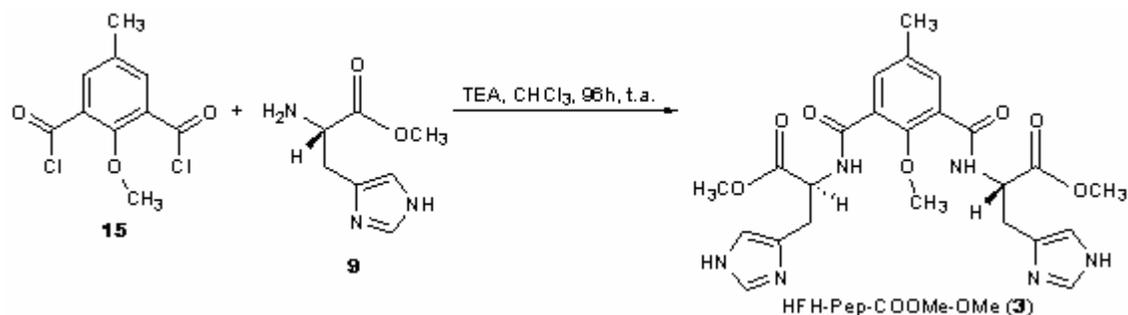
Esquema 7: Preparação do ácido metilado **13** a partir de **14**.

Utilizando a mesma metodologia de preparação de HPH-Pep (**1**), convertemos o ácido **13** em seu respectivo dicloreto (**15**). (Esquema 8)



Esquema 8: Preparação do dicloreto de ácido **15**.

O dicloreto **15** por sua vez reagiu com **9** em CHCl_3 na presença de TEA (Esquema 9). A reação foi completa em 96h (acompanhada por CCD Al_2O_3 , AcOEt/MeOH (1:1)) e o HFH-Pep-COOMe-OMe (**3**) foi obtido, após purificação em coluna ($\text{Al}_2\text{O}_3/\text{MeOH}$), como um “foam” amarelo-palha com 37% de rendimento.



Esquema 9: Preparação de **3**.

O espectro de IV de **3** (Figura 26) mostra bandas de absorção em 3362 cm^{-1} , relativas ao estiramento $\text{N-H}_{\text{amina}}$, e em 1743 cm^{-1} e 1660 cm^{-1} referentes aos estiramentos simétricos das carbonilas (C=O) dos grupos éster e amida respectivamente.

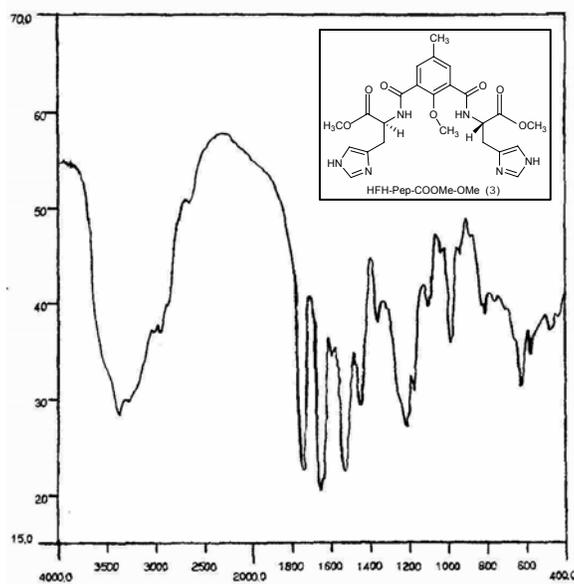


Figura 26: Espectro de IV de **3** em pastilha de KBr.

No espectro de RMN de ^1H de **3** (Figura 27) é observado dois singletos em 3,74 e 3,57 ppm relativos aos hidrogênios metílicos das metoxilas do éster e

do fenol respectivamente. A presença de um dubleto de tripleto em 4,84 ppm ($J=7,2$ e $7,0$ Hz) referente aos hidrogênios metínicos e um dubleto em 8,8 ppm ($J=7,2$ Hz) relativo aos hidrogênios amídicos (trocam com D_2O) (Figura 28). Esses dados condizem com a estrutura proposta para **3**.

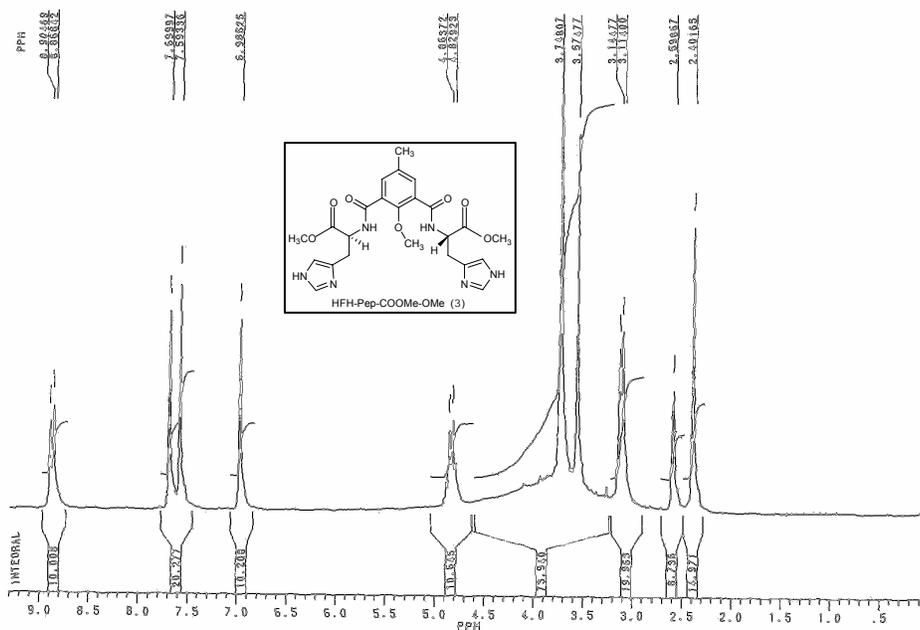


Figura 27: Espectro de RMN de 1H de **3** em $DMSO-d_6$.

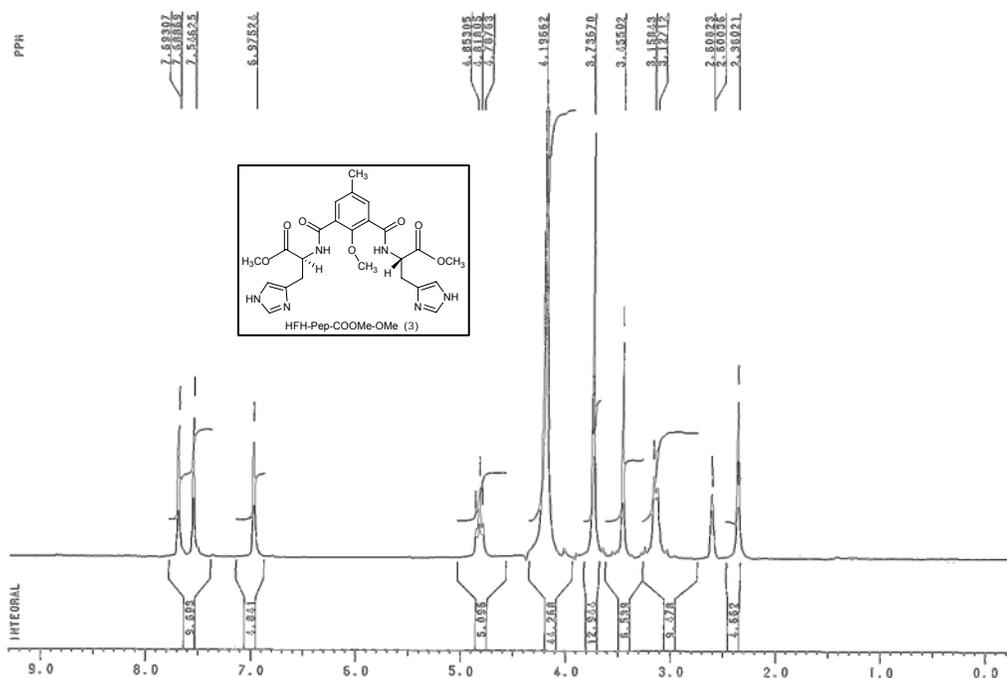
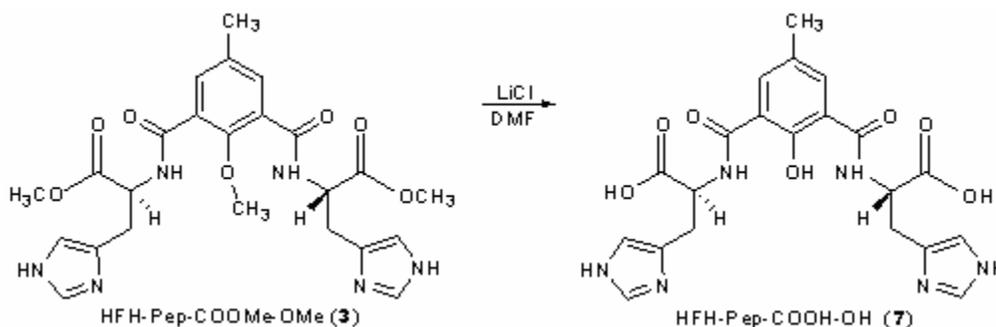


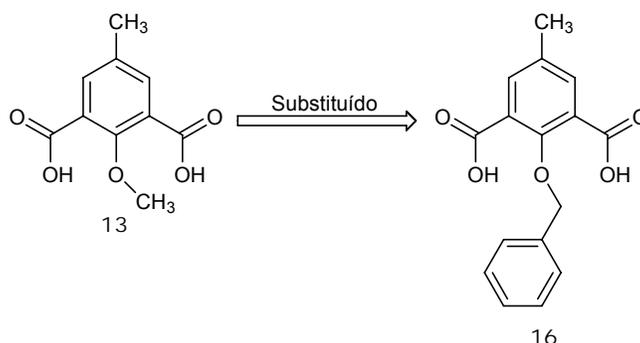
Figura 28: Espectro de RMN de 1H de **3** em $DMSO-d_6/D_2O$.

A intenção de utilizarmos o ácido **15** com o fenol protegido como metil éter se deve ao fato que poderíamos obter a molécula alvo **7** em condições bem mais brandas, em uma única etapa, pela reação com cloreto de lítio (LiCl) em DMF⁴⁸, evitando assim a reação de saponificação (Esquema 10).



Esquema 10: Preparação de **7** em uma única etapa utilizando LiCl.

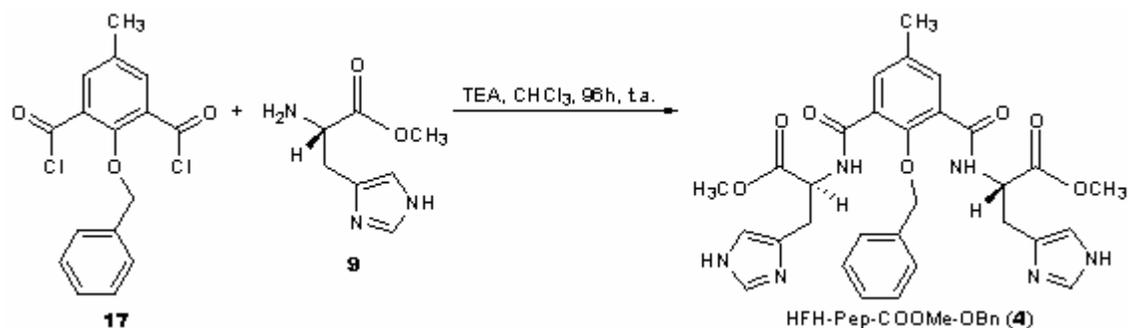
Dessa forma, o composto **3** foi levado às condições de desmetilação acima citada e após 24h (acompanhada por CCD Al₂O₃/MeOH (1:1)) todo material de partida foi consumido. Inúmeras tentativas de isolamento do composto foram realizadas, no entanto, sem sucesso. Dado a este insucesso, decidimos preparar o ácido **16** (Esquema 11) contendo o grupo benzilóxi, em substituição ao metóxi, baseado na facilidade de remoção deste grupo por hidrogenólise.



Esquema 11: Substituição do ácido com o grupo metóxi **13** pelo **16** com benzilóxi.

Assim, o ácido **16** foi convertido em seu dicloreto ácido (**17**) que, por sua vez, reagiu com **9** (Esquema 12), sob mesmas condições já descritas anteriormente, e após 96h (CCD, Al₂O₃-MeOH/AcOEt (3:7)) o HFH-Pep-COOMe-

OBn (**4**) foi isolado e purificado por cromatografia de coluna (Al_2O_3 - $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{TEA}$ (92:6:2) como um foam amarelo-claro em 30% de rendimento.



Esquema 12: Preparação de 4.

O espectro de IV de **4** (Figura 29) mostra bandas de absorção em 3362 cm^{-1} , relativas ao estiramento $\text{N-H}_{\text{amina}}$, e em 1744 cm^{-1} e 1652 cm^{-1} referentes aos estiramentos das carbonilas (C=O) dos grupos éster e amida respectivamente.

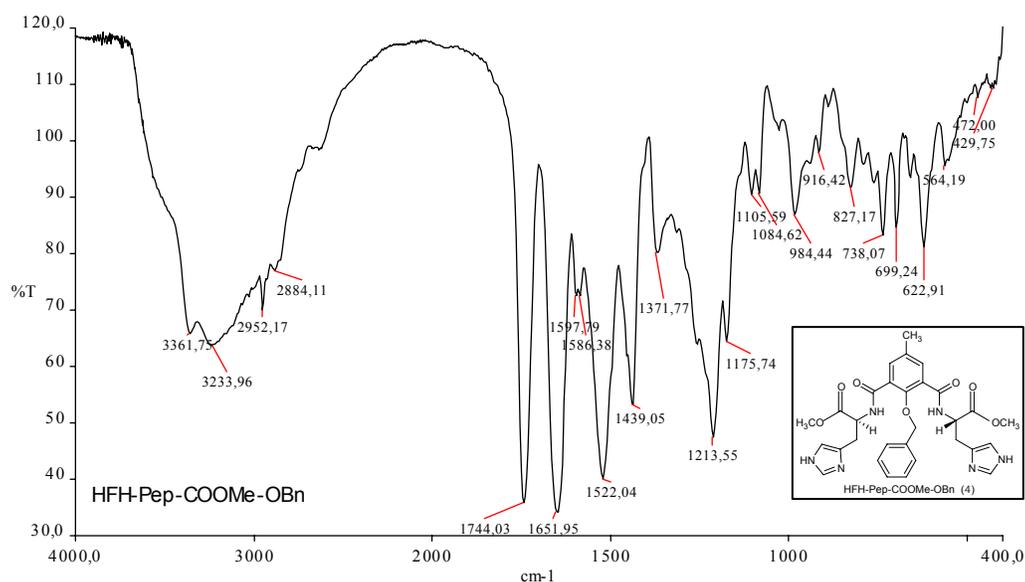


Figura 29: Espectro de IV de 4 em pastilha de KBr.

No espectro de RMN de ^1H do produto **4** (Figura 30) é observado um singlete em 3,65 ppm relativo aos hidrogênios metílicos da função éster. A presença de um multipletto entre 5,10 e 4,85 ppm referente aos hidrogênios metilênicos e metínicos, e em 8,13 ppm um singlete referente aos hidrogênios amídicos.

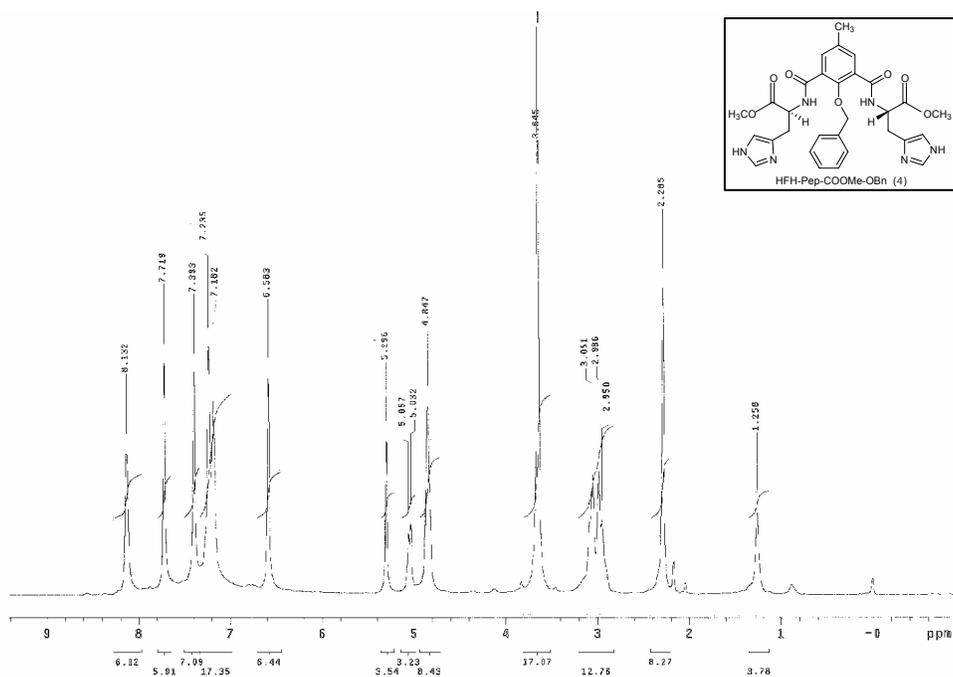


Figura 30: Espectro de RMN de ^1H de **4** em DMSO- d_6 .

O rendimento desta reação foi considerado baixo dada instabilidade de **4** em cromatografia de coluna e a alumina se mostrou à fase estacionária mais apropriada, embora grande parte do produto se decompõe durante o processo de purificação.

O produto **4** foi submetido a hidrogenólise em MeOH utilizando Pd/C 10% como catalisador por um período 24h. O HFH-Pep-COOMe-OH (**5**) (Esquema 13) foi obtido como um sólido amarelo-palha com rendimento quantitativo. O produto em metanol mostrou forte fluorescência, o que não era observado para **4**. A clivagem do grupo benzilóxi se mostrou eficiente, trabalhando em condições neutras e não necessitando nenhum processo elaborado de purificação além de “filtragem” e “evaporação” do solvente.

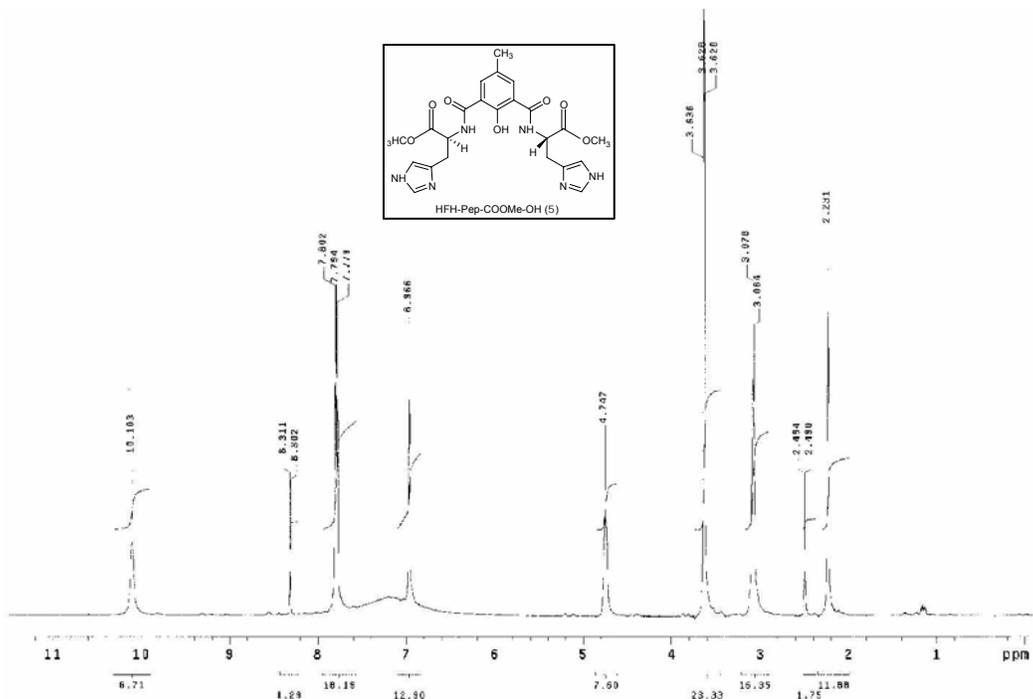


Figura 32: Espectro de RMN de ^1H de 5 em DMSO- d_6 .

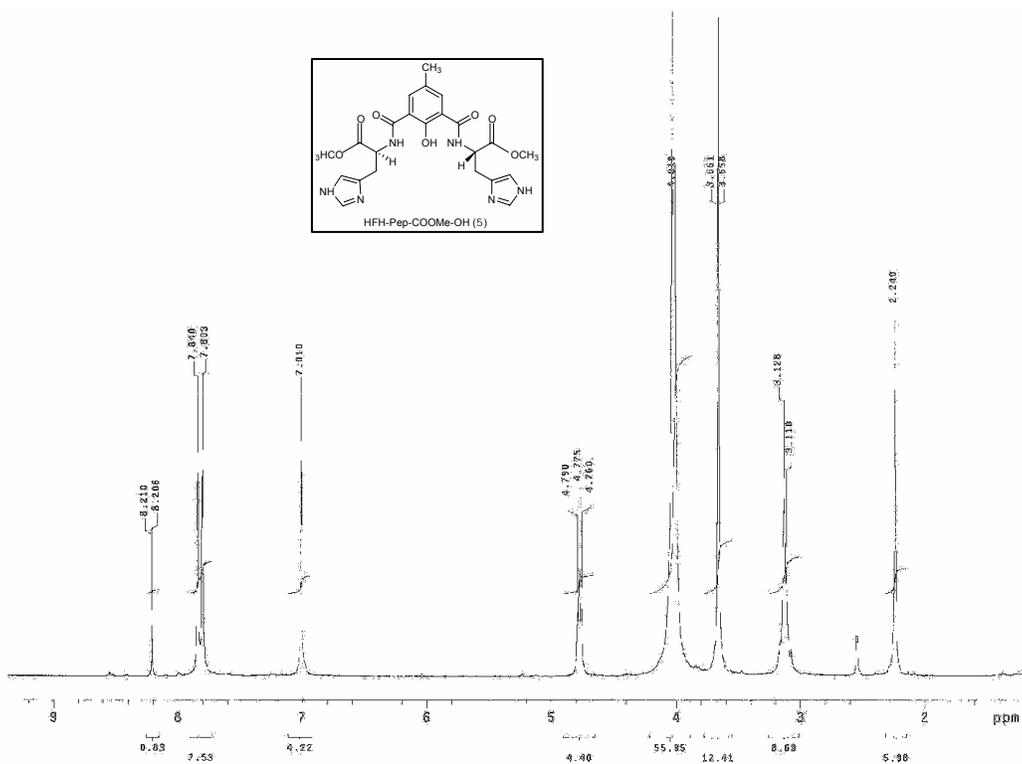
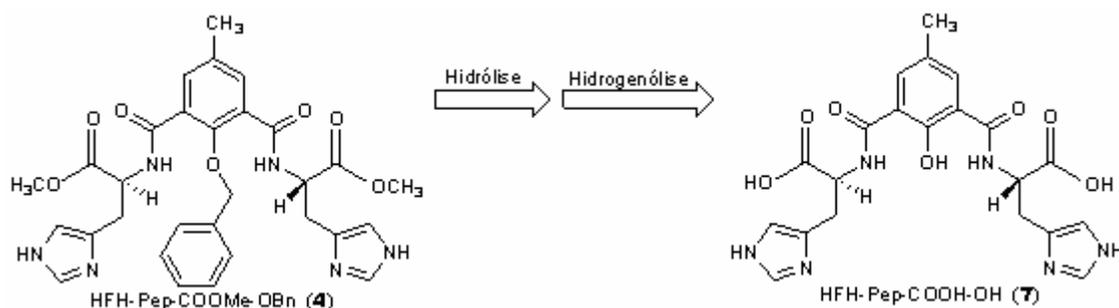


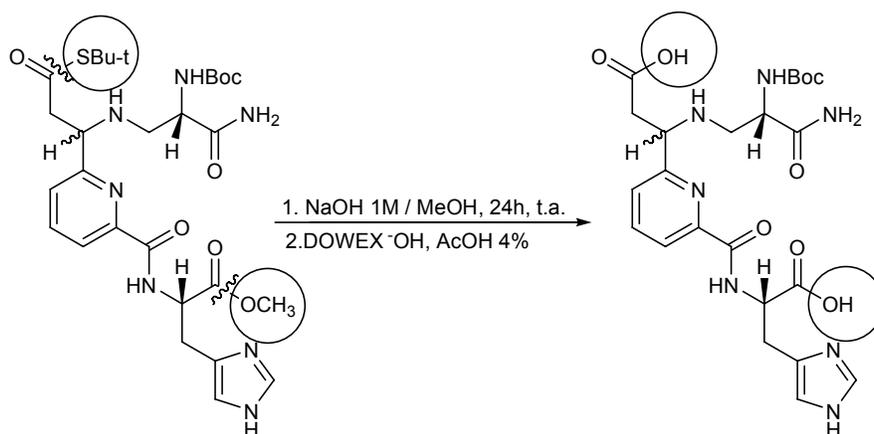
Figura 33: Espectro de RMN de ^1H de 5 em DMSO- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$.

Várias tentativas de isolamento do produto foram feitas e se mostraram ineficientes, dada a sua alta solubilidade em água. Devido a esta dificuldade em isolar o produto desejado (**7**), decidimos modificar a seqüência das reações para hidrólise e hidrogenólise de **4** (Esquema 15).



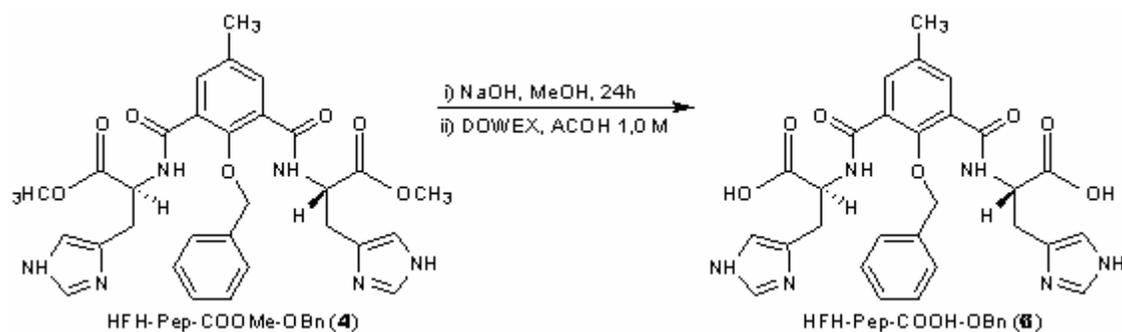
Esquema 15: Seqüência de etapas reacionais para a obtenção de **7**.

O objetivo foi diminuir a solubilidade do produto em água com a presença de grupo benzilóxi e como já sabíamos que a etapa de hidrogenólise era quantitativa, e além do mais, o produto da reação de hidrólise de **4** poderia, em tese, ser purificado por coluna de troca iônica baseado em um dos procedimentos utilizados por Kittaka *et al.*²⁶ (Esquema 16)



Esquema 16: Hidrólise do diéster assimétrico para o seu respectivo ácido.

Dessa maneira o composto **4** foi hidrolisado em meio básico e purificado em coluna de troca iônica (DOWEX 1x2 OH⁻) forneceu, após liofilização, o composto HFH-Pep-COOH-OBn (**6**) (Esquema 17) como um sólido branco em 66% de rendimento.



Esquema 17: Reação de hidrólise básica para a obtenção de **6**.

O espectro de IV de **6** (Figura 35) mostra bandas de absorção em 3366-2500 cm^{-1} relativas aos estiramentos N-H_{amina}, N-H_{imidazol} e OH do ácido e em 1648 cm^{-1} e 1628 cm^{-1} referentes aos estiramentos da carbonila C=O dos grupos amida e ácido respectivamente. As bandas de absorção correspondentes aos estiramentos assimétrico e simétrico (C-O) do ácido carboxílico aparecem em 1589 e 1519 cm^{-1} respectivamente.

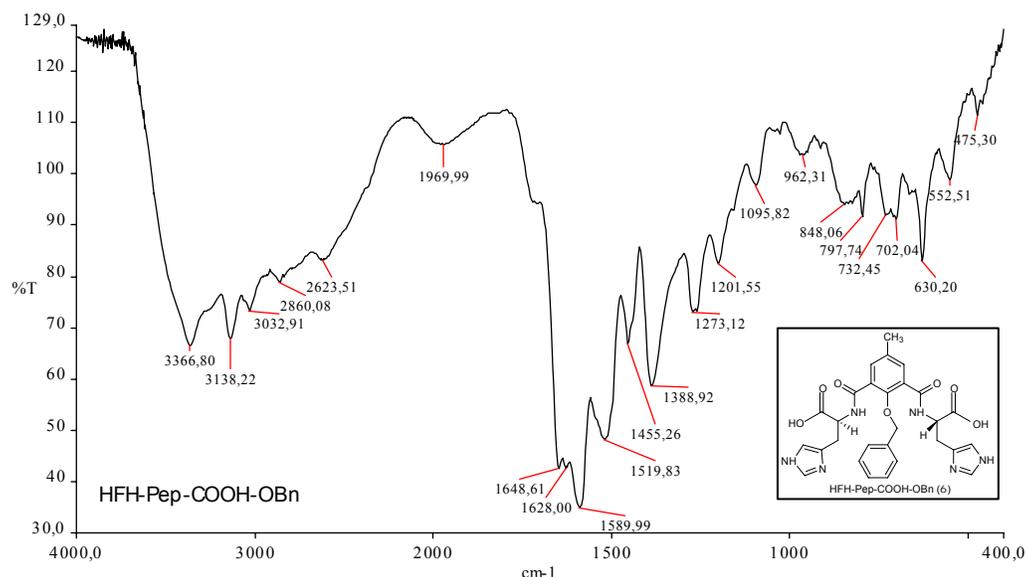


Figura 35: Espectro de IV de **6** em pastilha de KBr.

No espectro de RMN de ^1H de **6** (Figura 36) podemos observar alguns sinais característicos do composto: a ausência do sinal em 3,65 ppm relativo a metoxila do éster, um sinal em 8,65 ppm relativo aos hidrogênios amídicos

(desaparecem com a presença de D₂O) (Figura 37) e os sinais em 4,91 e 4,60 ppm são relativos aos hidrogênios benzílicos e metínicos respectivamente.

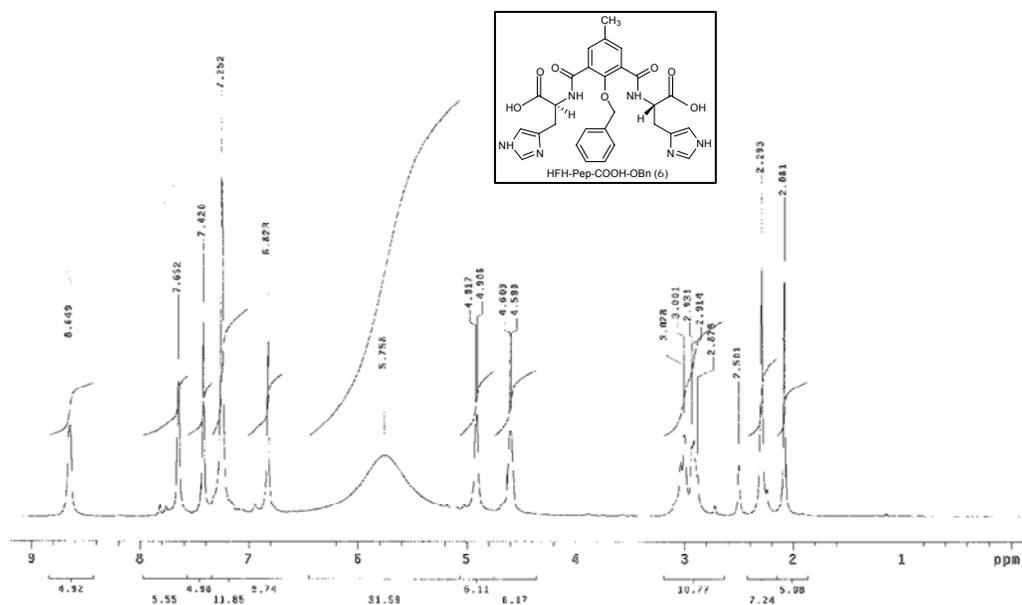


Figura 36: Espectro de RMN de ¹H de 6 em DMSO-d₆.

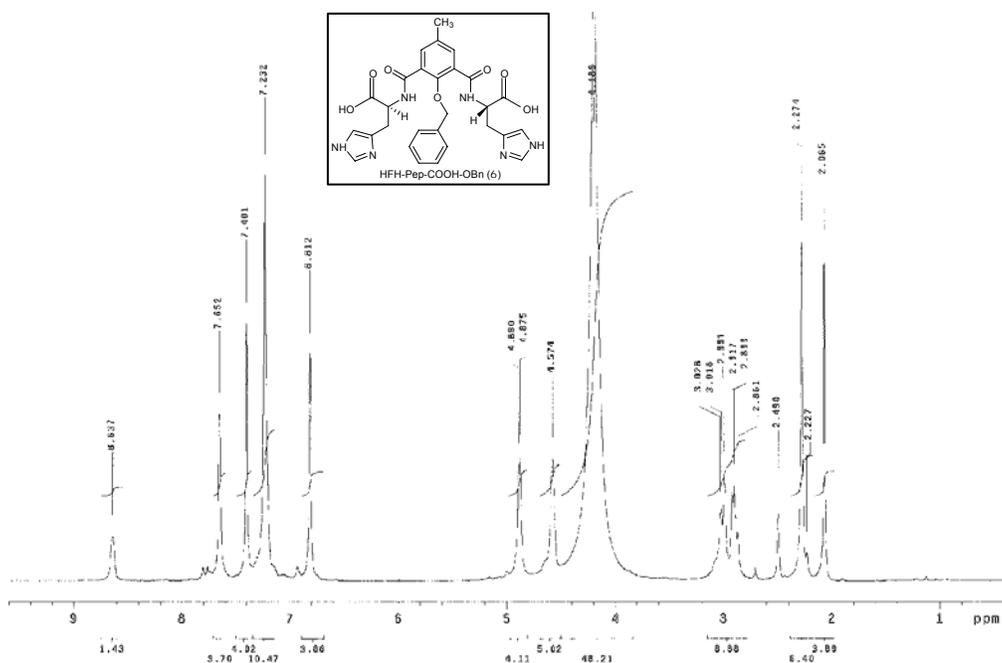


Figura 37: Espectro de RMN de ¹H de 6 em DMSO-d₆/D₂O.

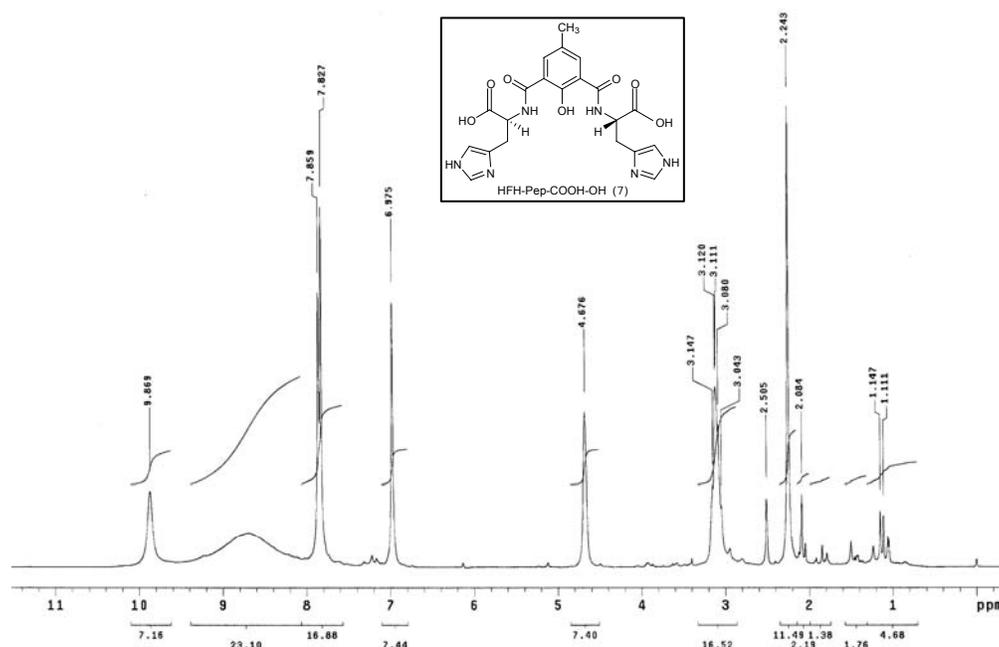


Figura 39: Espectro de RMN de ^1H de **7** em $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$.

Desta forma, Observamos que a melhor estratégia de preparação de **7** a partir de **4** é a reação de hidrólise básica seguida de hidrogenólise.

Com isto em mente e sabendo da instabilidade de **4** no processo de purificação, decidimos prepará-lo como descrito anteriormente, porém sem purificá-lo em coluna, pois sabíamos que este era formado quase que quantitativamente (verificado por CCD, $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-AcOEt/MeOH}$ (1:1)). Assim, saponificamos o material isolado, o qual foi purificado na resina de troca iônica e liofilizado, fornecendo um sólido branco, que submetido a hidrogenólise, resultou em um sólido bege **7**, com 54% de rendimento. Análises posteriores confirmarão os dados experimentais.

5- PARTE EXPERIMENTAL

5.1- Instrumentação e Reagentes

Os pontos de fusão (p.f) foram determinados em aparelho Microquímica, modelo MQAPF-31 não tendo sido corrigidos. Os espectros de IV foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer System 200 FT-IR. Os espectrofotômetros Brucker AW-200 (200 MHz e 50 MHz) e Varian 400 (400 MHz e 100 MHz) foram utilizados para determinação dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C respectivamente, tendo tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Em todos os procedimentos, foram utilizados reagentes e solventes procedentes da Aldrich, Carlo Erba, Baker, Nuclear e suas purificações foram realizadas, quando necessário, usando metodologias descritas na literatura.^{49, 50} As reações foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando sílica 60 F₂₅₄ e alumina 60 F₂₅₄ (marca Riedel-de Ræen) como adsorventes.

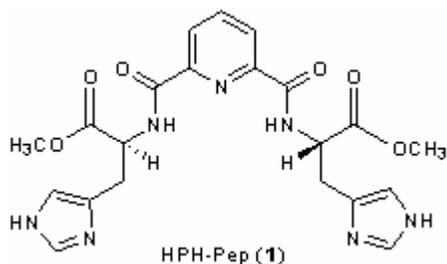
5.2- Procedimentos empregados na preparação dos sistemas

5.2.1- Preparação do sistema HPH-Pep

5.2.1.1- Preparação do composto HPH-Pep (1)

A uma suspensão do ácido dipicolínico **8** (1,34g; 8,0 mmol) em SOCl_2 (2,0 mL, 28,0 mmol) em agitação sob atmosfera de N_2 foi adicionado DMF (0,1 mL). A mistura reacional foi aquecida a 65°C por 3h. Após o aquecimento, a solução resultante foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 30 min, o excesso de SOCl_2 foi eliminado no rota evaporador fornecendo o dicloreto ácido **10** (sólido branco cristalino p.f: 63°C , Lit⁵¹ $62-62,5^\circ\text{C}$) A uma suspensão de histidinato de metila **9** (3,84g, 16,0 mmol) em CHCl_3 (50,0 mL) sob N_2 , e, em banho de gelo/água, foi adicionado TEA (6,8 mL; 48 mmol). Após 15 min sob agitação, uma solução do dicloreto **10** em CHCl_3 (40,0 mL) foi adicionado gota-a-

gota durante 30 min. A mistura reacional permaneceu sob agitação a temperatura ambiente por 96h, e então foi lavada com uma solução saturada de NH_4Cl sob forte agitação, precipitando um sólido na interface, o qual foi separado por filtração, lavado com água destilada (2 x 50,0 mL) e acetona (2 x 20,0 mL), seco no “dry oven” rendendo **1** como um sólido branco.



Rendimento: 70%

p.f.: 199,0-200,0 °C (Lit³⁶ 198,0-199,0 °C)

IV (KBr, cm^{-1}): 3384 (ν NH-amina), 1747 (ν C=O-éster), 1663 (ν C=O-amida).

RMN de ^1H (DMSO- d_6 , ppm) δ : 3,17 (d, 4H, CH_2)
3,66 (s, 6H, OCH_3), 4,71 (dt, 2H, $J = 6,8$ e $7,2$

Hz, CH), 6,90 (s, 2H, CH-Im), 7,56 (s, 2H, CH-Im), 8,18 (m, 3H, CH-Py), 9,49 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz, NH-amida).

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , ppm) δ : 28,89 (CH_2), 52,91 (OCH_3), 53,65 (CH), 116,87-148,56 (6C, CH-Py, C-Py, CH-Im, C-Im), 164,14 (C=O, amida), 172,41 (C=O, éster).

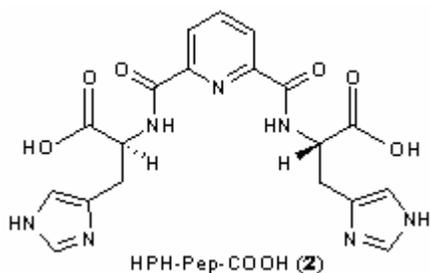
Anal. CHN Calcd. para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{O}_6 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ C= 50,75%; H= 5,24%; N= 19,74%

Encontrado: C= 50,78%; H= 5,15%; N= 19,67%

Atividade ótica: $[\alpha]_D^{20,0} = -61,85^\circ$ (lit. $[\alpha]_D^{18,9} = -61,45^\circ$)³⁶

5.2.1.2- Preparação do composto HPH-Pep-COOH (2)

A uma solução de **1** (1,80g; 3,8 mmol) em MeOH (40,0 mL) foi adicionado NaOH (0,92g; 23 mmol) em MeOH (20 mL). Após a adição, a mistura foi deixada sob agitação por 24h a temperatura ambiente. A mistura reacional foi então evaporada, redissolvida em água destilada, resfriada em banho gelo-água e neutralizada com HCl 1,0mol.L⁻¹ (pH \cong 6,5). Acetona foi adicionada à solução até a formação de precipitado. O precipitado foi coletado por filtração e lavado com água destilada (2 x 100,0 mL) e acetona (2 x 50,0 mL), seco no “dry oven” obtendo-se **2** como um sólido branco.



Rendimento: 95%

p.f.: 241,0-242,0°C (Lit⁴⁶ 241,0-242,0 °C)

IV (KBr, cm⁻¹): 3266-3138 (ν NH-amina, ν OH-ácido), 1663 (ν C=O-amida), 1591-1530 (ν C=O-ácido).

RMN ¹H (DMSO-d⁶, ppm) δ: 3,18 (m, 4H, CH₂), 4,74 (m, 2H, CH), 6,93 (s, 1H, CH-Im), 6,98 (s,

1H, CH-Im), 7,71 (s, 1H, CH-Im), 7,75 (s, 1H, CH-Im), 8,15 (m, 3H, CH-Py)

RMN ¹³C (DMSO-d⁶, ppm) δ: 28,60 (CH₂), 53,20 (CH), 53,51 (CH), 116,70-148,53 (10C, CH-Py, C-Py, CH-Im, C-Im), 162,88 (C=O, amida), 173,16 (C=O, ácido)

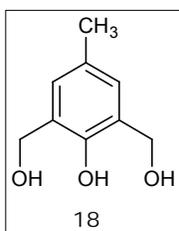
Anal. CHN Calcd. para C₁₉H₁₉N₇O₆·4,5H₂O; C= 43,68%; H= 5,40%; N= 18,76%

Encontrado: C= 43,79%; H= 5,00%; N= 18,69%

5.2.2- Preparação do sistema HFH-Pep (histidina-fenol-histidina).

5.2.2.1- Preparação do composto bis(2,6-hidroximetil)-4-metilfenol (18)

A uma solução de NaOH (20,0g; 500,0 mmol) em água destilada (80,0 mL) sob agitação, em banho de gelo/água a 0°C, foi adicionado p-cresol **14** (43,2g; 400,0 mmol) e em seguida formaldeído 37% (80,0 mL). A mistura foi mantida sob agitação a 0 °C por 2h e a 10 °C por 48h. O precipitado formado foi coletado por filtração, dissolvido em água e a solução resultante foi neutralizada com HCl 0,1 mol.L⁻¹. O sólido obtido foi filtrado, seco a vácuo e recristalizado em MeOH, obtendo-se **18** como um sólido cristalino levemente amarelado.



Rendimento: 70%

p.f.: 128,0-129,0°C (Lit⁵² 128,0-129,0°C)

IV (KBr, cm⁻¹): 3396 (ν O-H-fenol), 3314 (ν O-H-alcool), 1604 (ν C=C), 1370 (CH₃)

RMN ¹H (DMSO-d⁶, ppm) δ: 2,19 (s, 3H, CH₃) 4,52 (s, 4H, CH₂),

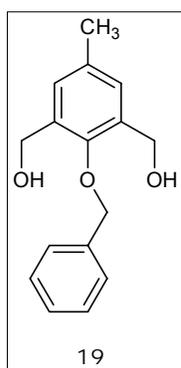
6,94 (s, 2H, CH-Ar)

Anal. CHN Calcd. para $C_9H_{12}O_3$: C = 64,27%; H = 7,19%

Encontrado: C= 63,91%; H= 7,39%

5.2.2.2- Preparação do composto 1-benzil-2,6-bis(hidroximetil)-4-metilfenol (19)

Uma mistura de **18** (16,9g; 100 mmol), K_2CO_3 (15,4g; 111,0 mmol) e brometo de benzila (11,8 mL; 100,0 mmol) em acetona (350,0 mL) sob agitação e atmosfera de N_2 foi refluxada por 10h. Após resfriamento a temperatura ambiente, a mistura reacional foi filtrada e evaporada. O sólido branco resultante dissolvido em CH_2Cl_2 (200,0 mL) e a solução orgânica foi lavada com água destilada (2 x 100,0 mL), seca em Na_2SO_4 e filtrada. Adição de hexano a fase orgânica levou a formação de um precipitado, o qual foi filtrado, lavado com hexano (2 x 50,0 mL) e seco no “dry oven” por 24h a $60^\circ C$, obtendo-se **19** como um sólido branco.



Rendimento: 90%

p.f.: 111,3-111,6 $^\circ C$ (Lit⁵² 111,3-111,6 $^\circ C$)

IV (KBr, cm^{-1}): 3326 (v O-H), 2916-2880 (v C-H), 1370 (CH_3)

RMN 1H (DMSO- d_6 , ppm) δ : 2,28 (s, 3H, CH_3), 4,52 (s, 4H), 4,81 (s, 2H) 5,07 (s, 2H), 7,15 (s, 2H, CH-Ar), 7,30 – 7,50 (m, 5H, CH-OBn)

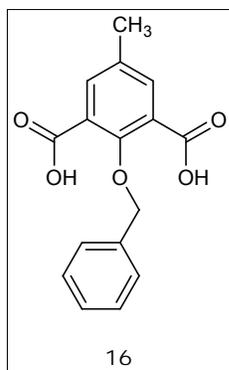
Anal. CHN Calcd. para $C_{16}H_{18}O_3$: C = 74,40%; H = 7,02%

Encontrado: C= 74,09%; H= 7,31%

5.2.2.3- Preparação do composto ácido 2-benzilóxi-5-metilsoftálico (16)

A uma suspensão resfriada (banho gelo/água) de **19** (4,78g; 18,5 mmol) em água destilada (50,0 mL) foi adicionado uma solução de NaOH $7,5 mol.L^{-1}$ (14,7 mL) e então $KMnO_4$ (8,70g; 55 mmol) suspenso em água destilada (10,0 mL) foi adicionado em pequenas porções por um período de 1,5h e a mistura reacional foi mantida sob as mesmas condições por 30 min e pelo mesmo período a

temperatura ambiente. A suspensão resultante foi aquecida em banho maria (60°C) por 10 min, filtrada sobre celite e lavada com água destilada quente (2 x 50,0 mL). O filtrado foi resfriado (banho de gelo/água) e adicionado HCl conc. até pH 3. O sólido branco formado foi filtrado, lavado com água destilada (2 x 50,0 mL) e seco no “dry oven” por 24h a 75°C, obtendo-se **16** como um sólido branco.



Rendimento: 63%

p.f.: 143,0-144,0°C (Lit⁵² 146,0-147,0 °C)

IV (KBr, cm⁻¹): 2954 (ν O-H), 1714 (ν C=O), 1382 (CH₃)

RMN ¹H (DMSO-d⁶, ppm) δ: 2,32 (s, 3H, CH₃), 4,98 (s, 2H, CH₂), 7,35 (m, 5H, CH-OBn), 7,66 (s, 2H, CH-Ar)

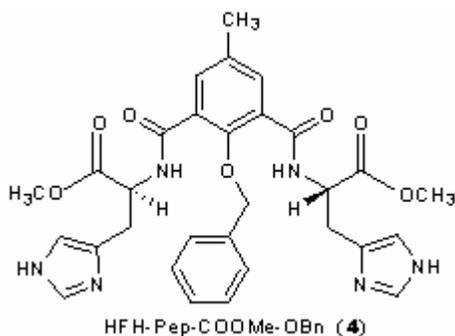
Anal. CHN Calcd. para C₁₆H₁₄O₅.2/3H₂O: C= 64,38%; H= 5,14%

Encontrado: C= 64,48%; H= 4,76%

5.2.2.4- Preparação do composto HFH-Pep-COOMe-OBn (**4**)

A uma suspensão resfriada (banho de gelo/água) de **16** (2,29g; 8 mmol) em CHCl₃ (30,0 mL) em agitação e sob atmosfera de N₂, foram adicionados SOCl₂ (2,0 mL, 28 mmol) e DMF (0,1 mL). A mistura reacional foi mantida sob agitação e aquecimento (65°C) por 3h. Após o aquecimento, a solução foi resfriada a temperatura ambiente por 30 min e o excesso de SOCl₂, eliminado no rota evaporador, obtendo-se o dicloreto **17** como um óleo viscoso amarelo-palha. A uma suspensão de histidinato de metila **9** (3,84 g; 16,0 mmol) em CHCl₃ (50,0 mL) sob N₂, e, em banho de gelo/água, foi adicionado TEA (6,8 mL; 48 mmol). Após 15 min sob agitação, uma solução do dicloreto **17** (2,59g; 8mmol) em CHCl₃ (30,0 mL) foi adicionado gota a gota durante 10 min. A mistura reacional permaneceu sob agitação a temperatura ambiente por 96h e então foi lavada com uma solução saturada de NH₄Cl (3 x 100,0 mL) e água destilada (1 x 100,0 mL). A fase orgânica foi seca em Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada sob vácuo. O sólido resultante foi cromatografado em sílica-60 usando como eluente uma mistura

CH₂Cl₂/MeOH/TEA (92:6:2). As frações foram combinadas e lavadas com uma solução saturada de NH₄Cl e a fase orgânica evaporada sob vácuo fornecendo um foam, o qual foi seco no “dry oven” por 24h a 45°C, obtendo-se **4** como um foam amarelo-palha.



Rendimento: 30%

p.f.: foam

IV (KBr, cm⁻¹): 3362 (ν N-H-amina), 1744 (ν C=O-éster), 1652 (ν C=O-amida)

RMN ¹H (DMSO-d⁶, ppm) δ: 2,28 (s, 3H, CH₃), 2,99 (m, 4H, CH₂), 3,65 (s, 6H, OCH₃), 4,84 (s largo, 3H, CH e CH₂ (parte do sistema AB)) 1H,

CH₂), 5,04 (sistema AB, 1H, CH₂), 6,58 (s, 2H, CH-Im), 7,21 (m, 5H, CH-OBn), 7,39 (s, 2H, CH-Im), 7,72 (s, 2H, CH-Ar), 8,14 (s, 2H, NH-amida).

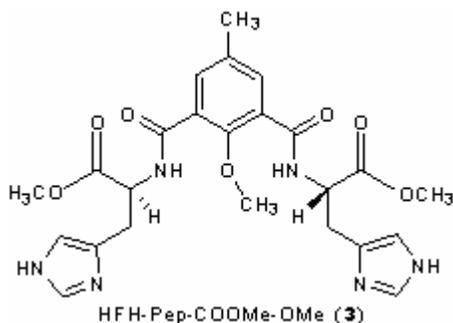
RMN de ¹³C (CDCl₃, ppm) δ: 20,58 (CH₃) 28,68 (CH₂), 52,47 (OCH₃), 52,81 (CH), 117,88-135,43 (10 C, CH-Ar, C-Ar, CH-Im, C-Im), 152,49 (C-fenol), 165,47 (C=O, amida), 171,97 (C=O, éster)

Anal. CHN Calcd. para C₃₀H₃₂N₆O₇.3/2CH₃OH.1/2CH₂Cl₂; C= 57,43%; H= 5,83%; N= 12,56%

Encontrado: C= 57,25%; H= 5,62%; N= 12,52%

5.2.2.5- Preparação do composto HFH-Pep-COOMe-OMe (**3**)

Preparado de acordo com o procedimento utilizado para **4**, usando a mesma escala. O resíduo resinoso obtido foi dissolvido em MeOH e filtrado em uma cama de alumina. O solvente foi evaporado sob vácuo e o óleo resultante foi dissolvido em CHCl₃ e a solução foi evaporada sob vácuo (esta operação foi repetida 3 vezes) fornecendo um foam amarelo-claro.



Rendimento: 25%

p.f.: foam

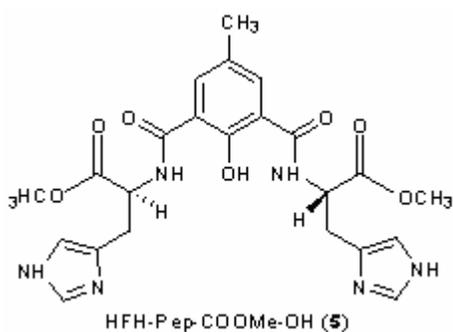
IV (KBr, cm^{-1}): 3362 cm^{-1} (ν N-H-amina), 1743 (ν C=O, éster) 1660, (ν C=O, amina)

RMN ^1H (DMSO- d^6 , ppm) δ : 2,41 (s, 3H, CH_3), 3,14 (d, 4H, $J = 6,1$ Hz CH_2), 3,45 (s, 3H, Ph- OCH_3), 3,74 (s, 6H, OCH_3), 4,84 (dt, 2H, $J = 7,2$

e 6,1 Hz, CH), 6,98 (s, 2H, CH-Im), 7,59 (s, 2H, CH-Im), 7,69 (s, 2H, CH-Ar), 8,88 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz, NH-amida)

5.2.2.6- Preparação do composto HFH-Pep-COOMe-OH (**5**)

Uma suspensão de **4** (0,3g; 0,51mmol) e Pd/C 10% (0,06g) em MeOH (60,0 mL) foi submetida à hidrogenólise num sistema Paar sob pressão de H_2 de 40 psi por 24h. A mistura reacional foi filtrada em celite, evaporada e suspenso em clorofórmio e evaporado (esta operação foi repetida 3 vezes) e o produto seco no dry oven por 24h a 90°C , obtendo-se **5** como um sólido amarelo-palha.



Rendimento: quantitativo

p.f.: 200°C (dec)

IV (KBr, cm^{-1}): 3354-3140 (ν N-H, amina, ν O-H, fenol), 1742 (ν C=O, éster), 1652 (ν C=O, amida)

RMN ^1H (DMSO- d^6 , ppm) δ : 2,23 (s, 3H, CH_3), 3,07 (m, 4H, CH_2), 3,66 (s, 6H, OCH_3), 4,75 (s, 2H, CH), 6,97 (s, 2H, CH-Im), 7,78 (s, 2H, CH-

Im), 7,80 (s, 2H, CH-Ar), 10,10 (s, 2H, NH-amida)

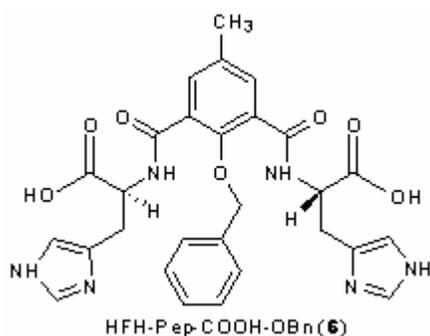
RMN ^{13}C (DMSO- d^6 , ppm) δ : 20,50 (CH_3) 28,90 (CH_2), 52,81 (OCH_3), 53,70 (CH), 117,47-135,51 (9C, CH-Ar, C-Ar, CH-Im, C-Im), 163,08 (C-fenol), 168,18 (C=O, amida), 172,57 (C=O, éster). Os sinais entre 20,5 e 53,70 ppm aparecem dobrados.

Anal. CHN Calcd. para $C_{23}H_{26}N_6O_7 \cdot 2 CH_3OH \cdot \frac{1}{2} CHCl_3$; C= 49,18%; H= 5,54%; N= 13,50%

Encontrado: C= 48,81%; H= 5,03%; N= 13,65%

5.2.2.7- Preparação do composto HFH-Pep-COOH-OBn (6)

A uma solução de **4** (0,48g; 0,8 mmol) em MeOH (10,0 mL) foi adicionado uma solução de NaOH (0,19g; 4,8 mmol) em MeOH (20,0 mL) e a mistura reacional foi deixada sob agitação por 24h à temperatura ambiente. O solvente foi evaporado e o sólido resultante foi redissolvido em água desionizada e purificado em coluna de resina DOWEX 1x2-200 (100-200 mesh) (básica ^-OH) usando como eluente uma solução de AcOH 4%. A fração contendo o eluído foi liofilizada e o sólido obtido foi suspenso em acetona (50,0 mL) e deixado sob agitação por 24h à temperatura ambiente. Após a agitação, o sólido foi coletado por filtração, lavado com acetona (3x; 20,0 mL) e seco no dry oven por 48h a 90°C, obtendo-se **6** como um sólido branco.



Rendimento: 66%

p.f.: >200,0 °C (dec.)

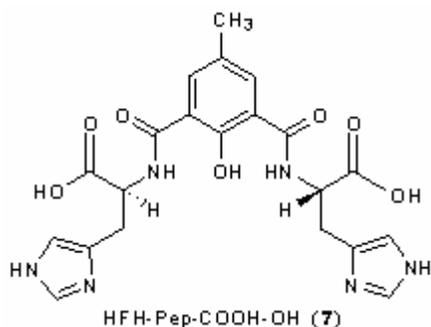
IV (KBr, cm^{-1}): 3366-2500 (ν N-H-amina, ν N-H-imidazol, ν O-H-ácido) 1648 (ν C=O-amida), 1628 (ν C=O-ácido).

RMN 1H (DMSO- d_6 , ppm) δ : 2,29 (s, 3H, CH_3), 2,93 (m, 4H, CH_2), 4,60 (m, 2H, CH), 4,91 (m, 2H, CH_2 -OBn) 6,82 (s, 2H, CH-Im), 7,26 (m, 5H, CH-OBn) 7,42 (s, 2H, CH-Im), 7,65 (s, 2H, CH-Ar), 8,65 (s, 2H, NH-amida)

5.2.2.8- Preparação do composto HFH-Pep-COOH-OH (7)

A uma solução de **6** (0,20g; 0,4 mmol) em MeOH / H_2O (4:1) (60,0 mL) foi adicionado Pd/C 10% (0,05g) e submetida à hidrogenólise num sistema Paar

sob pressão de H₂ de 40 psi por 24h. A mistura reacional foi filtrada em celite, evaporada e o produto seco no “dry oven” por 24h a 90°C, obtendo-se **7** como um sólido bege.



Rendimento: quantitativo

p.f.: >200°C (dec)

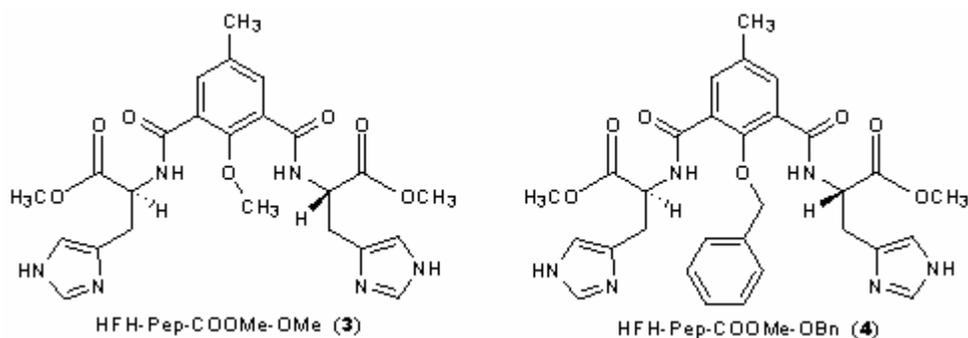
IV (KBr, cm⁻¹): 3366-2500 (ν N-H-amina, ν N-H-imidazol, ν O-H-ácido) 1648 (ν C=O, amida), 1628 (ν C=O, ácido).

RMN ¹H (DMSO-d⁶, ppm) δ: 2,24 (s, 3H, CH₃), 3,04-3,15 (m, 4H, CH₂), 4,68 (s, 2H, CH) 6,98 (s, 2H, CH-Im), 7,86-7,83 (m, 2H, CH-Im e 2H, CH-Ar), 9,87 (s, 2H, NH-amida)

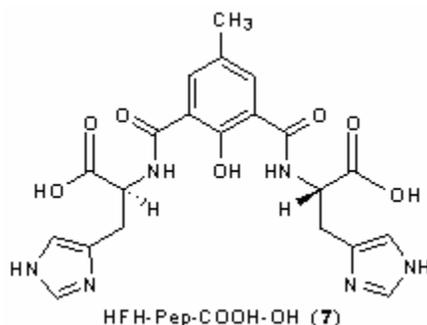
6- CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

-Este trabalho se fundamentou em desenvolver uma metodologia simples e eficiente na formação de ligação amídica pela reação de vários cloretos de ácido com o histidinato de metila na elaboração de sistemas relacionados a BLM e outras metaloenzimas.

-Para efeito de comparação, esta metodologia foi aplicada na construção do sistema HPH-Pep (**1**), previamente preparado por Otsuka (74% de rendimento), e se mostrou um método alternativo, menos laborioso e com rendimento satisfatório (70%). Esta metodologia foi bem sucedida nas construções dos sistemas, ainda inéditos, HFH-Pep (**3** e **4**).

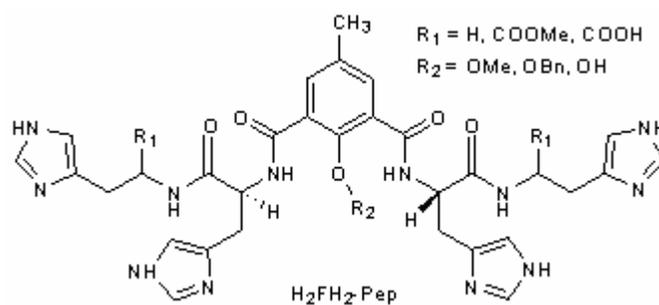


Vários protocolos de desproteção foram utilizados na conversão de HFH-Pep (**3** e **4**) em HFH-Pep-COOH-OH (**7**) sendo as reações de hidrólise básica e de hidrogenólise serem a seqüência mais adequada.



Perspectivas

Em continuação a este trabalho, pretendemos otimizar a rota sintética de obtenção do sistema HPH-Pep (**7**), bem como estudar suas propriedades quelantes em colaboração com outros grupos de pesquisa. Além do mais, seria de grande valia utilizarmos o HPH-Pep (**7**) como base na construção de sistemas mais complexos e polifuncionalizados, tal como H_2FH_2 -Pep, que melhor mimetizem a nível molecular o sítio catalítico de metaloenzimas do tipo BLM.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Umezawa H.; Maeda K.; Takeuchi T.; Okami Y; New antibiotics. Bleomycin A and B. *J Antibiot.*, **1966**, 19A, 200-209.
2. Ming, L.; Structure and Function of Metalloantibiotics, *Medicinal Research Reviews*, **2003**, 23, 6, 697-762.
3. Mir, L.M.; Tounekti, O.; Orłowski, S.; Bleomycin: Revival of an Old Drug. *Gen. Pharmac.* **1996**, 27, 5, 745-748.
4. Lim, V.K.E.; Naber, K.G.; Sidwell, R.W.; The history of antibiotics: The Japanese story. *Newsletter of The international Society of ChemoTherapy. Antibiotics Chemotherapy*, ISC, **2002**, 6, 3, 4-5.
5. Kurosaki H.; Ishikawa, Y., Hayashi, K.; Sumi, M.; Tanaka, Y.; Goto, M.; Inada, K.; Taniguchi, I.; Shionoya, M.; Matsuo, H.; Sugiyama, M.; Kimura, E.; Synthesis, spectroscopic, redox properties, and DNA cleavage activity of low-spin iron(III) complexes of bleomycin analogues. *Inorganica Chimica Acta*, **1999**, 294, 56–61
6. Xua, Z.; Wang, M.; Xiao, S.; Zhanga, Y.; Yang, M.; Novel Bleomycin Analogues: Synthesis, Antitumor Activity, and Interaction with DNA. *Helvetica Chimica Acta*, **2004**, 87, 2834-2841.
7. Chen, J.; Stubbe, J.; Bleomycins: new methods will allow reinvestigation of old issues. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2004**, 8, 175-181.
8. Georgiou, N.; Van der Bruggen, T.; Healy, D.M.C.; Van Tienen, C.; Bie, P.; Oudshoorn, M.; Marxa, J.J.M.; Van Asbeck, B.S.; Bleomycin has antiviral properties against drug-resistant HIV strains and sensitises virus to currently used antiviral agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **2005**, 27, 1, 63-68.
9. Georgiou, N.; Van der Bruggen, T.; Oudshoorn, M.; Bie, P.; Jansen, C.; Nottet, H.S.L.M.; Marxa, J.J.M.; Van Asbeck, B.S.; Mechanism of Inhibition of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 by the Oxygen Radical Generating Agent Bleomycin. *Antiviral Research*, **2004**, 63, 97-106.
10. Azambuja, E.; Flecka, J.F.; Batista, R.G.; Menna Barreto, S.S. Bleomycin lung toxicity: Who are the patients with increased risk? *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, **2005**, 18, 363-366.

11. Papakyriakou, A.; Bratsos, I.; Katsaros, N.; Structural studies on metallobleomycins: The interaction of Pt(II) and Pd(II) with Bleomycin. *J.Serb.Chem.Soc.*, **2003**, 68, 4-5, 337-348.
12. Hardmen, J.G.; Gilman, A.G.; Limbird, L.E.; *Goodman & Gilman's. The Pharmacological basis of therapeutics. Ninth Edition. International Edition*, McGraw-Hill, USA, **1996**, 1266-1267.
13. Almeida, V.L.; Leitão, A.; Reina, L.C.B.; Montanari, C.A.; Donnici, C.L.; Lopes, M.T.P.; Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular não Específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. *Quim.Nova*, **2005**, 28, 1, 118-129.
14. Boger, D.L.; Cai, H.; Bleomycin: Synthetic and Mechanistic Studies *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 448-476.
15. Hecht, S.M.; Bleomycin: New Perspectives on the Mechanism of Action. *J. Nat. Prod.*, **2000**, 63, 158-168.
16. Stubbe, J.; Kozarich, J.W.; Wu, W.; Vanderwall, D.E.; Bleomycins: A Structural Model for Specificity, Binding, and Double Strand Cleavage. *Acc. Chem. Res.*, **1996**, 29, 322-330.
17. Takita, T.; Muraoka, Y.; Nakatani, T.; Fujii, A.; Umezawa, Y.; Naganawa, H.; Umezawa, H.; *J. Antibiot.*, **1978**, 31, 801-804.
18. Takita, T.; Umezawa, Y.; Saito, S.I.; Morishima, H.; Naganawa, H.; Umezawa, H.; Tsuchiya, T.; Miyake, T.; Kageyama, S.; Umezawa, S.; Muraoka, Y.; Suzuki, M.; Otsuka, M.; Narita, M.; Kobayashi, S.; Ohno, M.; *Tetrahedron Lett.*, **1982**, 23, 521-524.
19. Aoyagi, Y.; Katano, K.; Suguna, H.; Primeau, J.; Chang, L.H.; Hecht, S.M.; Total synthesis of Bleomycin. *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 5537-5538.
20. Silverman, R.B.; *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*. Academic Press Inc., USA. **1992**, 258-265.
21. Cowan, J.A.; *Inorganic Chemistry an Introduction. Second Edition*, Wiley-VCH, USA, **1997**, 406-418.

22. Galm, U.; Hager, M.H.; Van Lanen, S.G.; Ju, J.; Thorson, J.S.; Shen, B.; Antitumor Antibiotics: Bleomycin, Enecladins, and Mitomycin. *Chem.Rev.*, **2005**, 105, 739-758.
23. Ohno, M.; From natural bleomycins to man-designed bleomycins, *Pure&Appl.Chem.*, **1989**, 61, 3, 581-584.
24. Otsuka, M.; Yoshida, M.; Kobayashi, S.; Ohno, M.; Sugiura, Y.; Takita, T.; Umezawa, H., Transition-metal binding site of bleomycin. A synthetic analog capable of binding iron(II) to yield an oxygen-sensitive complex. *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 6986.
25. Umezawa, H.; Takita, T.; Sugiura, Y.; Otsuka, M.; Kobayashi, S.; Ohno, M.; DNA-Bleomycin interaction: Nucleotide sequence specific binding and cleavage of DNA by Bleomycin. *Tetrahedron*, **1984**, 40, 501-509.
26. Kittaka, A.; Sugano, Y.; Otsuka, M.; Ohno, M.; Synthetic Models for the Transition Metal binding Site of Bleomycin. Remarkable improvement of Dioxygen Activating Capability. *Tetrahedron*, **1988**, 44, 10, 2811-2820.
27. Kittaka, A.; Sugano, Y.; Otsuka, M.; Ohno, M.; Man-designed bleomycins. Synthesis of dioxygen activating molecules and a DNA cleaving molecule based on Bleomycin-Fe(II)-O₂ complex. *Tetrahedron*, **1988**, 44, 10, 2821-2833.
28. Otsuka, M.; Satake, H.; Sugiura, Y.; Restricting of the Bleomycin metal core. Novel oxigen-activating ligands with symmetrized structure. *Tetrahedron Letters*, **1993**, 34, 52, 8497-8500.
29. Otsuka, M.; Fujita, M.; Sugiura, Y.; Novel Zinc Chelators which inhibit the binding of HIV-EP1 (HIV Enhancer binding protein) to NF-κB Recognition Sequence. *J. Med. Chem.*, **1994**, 37, 4267-4269.
30. Otsuka, M.; Fujita, M.; Aoki, T.; Ishii, S.; Sugiura, Y.; Yamamoto, T.; Inoue, J.; Novel Zinc Chelators whith dual activity in the inhibition of the κB Site-binding proteins HIV-EP1 and NF-κB. *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 3264-3270.
31. Fujita, M.; Otsuka, M.; Sugiura, Y.; Metal-chelating inhibitors of a Zinc Fingers Protein HIV-EP1. Remarkable Potentiation of inhibitory activity by introduction of SH groups. *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 503-507.

32. Fujita, M.; Otsuka, M.; Sugiura, Y.; Metal-chelating inhibitors of a Zinc Fingers Protein HIV-EP1. Remarkable Potentiation of inhibitory activity by introduction of SH groups. *ICR Annual Report*, **1996**, 3, 40-41.
33. Otsuka, M.; Fujita, M.; Sugiura, Y.; Yamamoto, T.; Inoue, J.; Maekawa, T.; Ishii, S.; Synthetic Inhibitors of regulatory proteins involved in the signaling pathway of the replication of Human Immunodeficiency Virus 1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **1997**, 5, 1, 205-215.
34. Suginaka, R.; Izui, R.; Inoue, J.; Muraoka, Y.; Yamaguchi, K.; Otsuka, M.; Umezawa, K.; Induction of apoptosis in human pancreatic Carcinoma Cells by a Synthetic Bleomycin-like ligand, *Jpn. J. Cancer Res.*, **1998**, 89, 947-953.
35. Umezawa, K.; Nakazawa, K.; Uchihata, Y.; Otsuka, M.; Screening for inducers of apoptosis in apoptosis-resistant human Carcinoma Cells. *Advan. Enzyme Regul.*, **1999**, 39, 145-156.
36. Otsuka, M.; Satake, H.; Murakami, S.; Mitsunobu, D.; Ishida, T.; Shibasaki, M.; Sugiura, Y.; An Artificial Cu^{II} Complex with Intriguing Oxygen Radical-Quenching Profile. X-Ray Structure, Cytochrome c Assay, and ESR Study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **1996**, 4, 10, 1703-1708.
37. Hori, Y.; Nagai, R.; Urabe, N.; Yoshikawa, T.; Otsuka, M.; Sensitization of Hyperthermic Treatment of Leukemic Cell Lines by a Synthetic Peptide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2002**, 10, 111-115.
38. Duarte, C., Síntese Estereosseletiva de alcalóides e N-Heterocíclicos. *Série de textos da Escola de Verão em Química II*, Editora da UFSCar, São Carlos, **2001**.
39. Montalbetti, C.A.G.N.; Falque, V.; Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, **2005**, 61, 10827-10852.
40. Kimmerlin, T.; Seebach, D.; '100 years of peptide synthesis': ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to β -peptide assemblies. *J. Peptide Res.*, **2005**, 65, 229-260.
41. Bodanszky, M.; Peptide Chemistry: A Practical textbook. Second, Revised Edition, Spriger-Verlag, USA, **1993**, 55-73.
- 42 Jones, J.; *The Chemical Synthesis of Peptide (International series of monographs on chemistry)*. Oxford University Press, USA, **1991**, v. 23, 42-75.

43. Beckwith, A. L. J.; *The chemistry of amides*. Interscience Publishers, UK. **1970**.
44. Marson, C. M.; Giles, P. R.; *Synthesis using Vilsmeier Reagents*. CRC Press, USA, **1994**, 11-12, 109-111.
45. Zaoral, M.; Arnold, Z.; Chemical Abstract, **1961**, 56, 8836.
46. You, J.; Yu, X.; Liu, C.; Xie, R.; Synthesis of New Chiral macrocyclic tetraoxo Polyamines containing Pyridine ring an functional arms. *Synthetic Communications*, **1999**, 29, 14, 2447-2455.
47. Ulmann, F., Brittner, K., *Berichie*, **1909**, 42, 2539-2548
48. Bernard, A. M., Ghiani, M. R.; Piras, P. P.; *Synthesis*, **1989**, 4, 287-289.
49. Perrin, D.D.; Armarego, W.L.F.; *Purification of Laboratory Chemicals. Thyrd Edition*, Pergamon Press, UK, **1988**.
50. Vogel, A.I.; *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry. Fifth Edition*. Editors: Furnis, B.S.; Hanaford, A.J.; Smith, P.W.G.; Tatchell, A.R.; Longman Scientific & Technical, UK, **1989**.
51. Lyakhov, S.A., *Pharmaceutical Chemistry Journal*, **2003**, 37, 9, 535-537.
52. Cunha Junior, A., *Síntese de um novo ligante precursor de complexos modelos para o sítio ativo da Urease*, Trabalho de conclusão de Curso de Química, UFSC, **2001**.