



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/UNB  
CURSO DE FARMÁCIA**

**VERONICA ALVES DOS SANTOS**

**ACIL-HIDRAZINO-PEPTÔMEROS: SÍNTESE VIA REAÇÕES DE UGI E  
UGI-HIDRAZINO CONSECUTIVAS, CARACTERIZAÇÃO  
ESTRUTURAL E TOXICIDADE CONTRA CÉLULAS NORMAIS E DE  
CÂNCER DE MAMA *IN VITRO***

**BRASÍLIA, DF**

**2017**

**VERONICA ALVES DOS SANTOS**

**ACIL-HIDRAZINO-PEPTÔMEROS: SÍNTESE VIA REAÇÕES DE UGI  
E UGI-HIDRAZINO CONSECUTIVAS, CARACTERIZAÇÃO  
ESTRUTURAL E TOXICIDADE CONTRA CÉLULAS NORMAIS E DE  
CÂNCER DE MAMA *IN VITRO***

Monografia de conclusão de curso apresentada como pré requisito parcial para a obtenção do grau de farmacêutica na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlmann

Co-orientador: Dra. Angélica de Fátima Silva Barreto

**BRASÍLIA, DF**

**2017**

VERONICA ALVES DOS SANTOS

**ACIL-HIDRAZINO-PEPTÔMEROS: SÍNTESE VIA REAÇÕES DE UGI E  
UGI-HIDRAZINO CONSECUTIVAS, CARACTERIZAÇÃO  
ESTRUTURAL E TOXICIDADE CONTRA CÉLULAS NORMAIS E DE  
CÂNCER DE MAMA *IN VITRO***

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlmann (Universidade de Brasília – Faculdade de  
Ceilândia) Orientador

---

Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa (Universidade de Brasília – Faculdade de  
Ceilândia)

---

Profa. Dra. Graziella Anselmo Joanitti (Universidade de Brasília – Faculdade de  
Ceilândia)

**BRASÍLIA, DF**

**2017**

Dedico esse trabalho a minha família que me ajudou com toda força, carinho, incentivo e apoio. A Deus pela graça de poder realizá-lo e a Nossa Senhora Aparecida pela intercessão.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela graça de poder realizar esse trabalho. A Nossa Senhora que intercede sempre por mim.

Agradeço aos meus pais Jair Alves Rodrigues e Maria Socorro Vieira dos Santos Rodrigues por toda a paciência, carinho, incentivo e força que me deram ao longo desses anos, por nunca desistirem de mim. Aos meus irmãos Jair Alves Rodrigues Filho e João Paulo Alves dos Santos por todo afeto e apoio.

Aos meus familiares e amigos e acompanharam a minha trajetória e estiveram sempre ao meu lado me ajudando a superar os obstáculos e compartilhando das minhas conquistas.

Ao grupo LaQMOS pela acolhida e todo ensinamento transmitido, me ajudando sempre nas minhas dificuldades no laboratório. Em especial ao Professor Dr. Carlos Klebez Zago de Andrade à pesquisadora e minha co-orientadora Angélica de Fátima Silva Barreto por todo ensinamento, paciência, confiança, aprendizado e por terem aberto as portas do laboratório para mim, por terem me acolhido como filha. Muito obrigada a todos vocês.

Aos alunos e amigos Victor Mello, Victor Hugo Sousa e Rayane Ganassin pela paciência de disposição para me ajudar a realizar os ensaios biológicos no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

As minhas amigas e companheiras Amanda, Jéssica e Julyanna que estiverem sempre comigo ao longo do curso, me apoiando e ajudando a encarar os desafios e superar cada obstáculo. O apoio de vocês foi essencial meninas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luís Alexandre Muehlmann por ter aceitado o desafio de orientação desse trabalho e por toda a paciência e tempo dedicados a mim, sempre disponíveis para tirar minhas dúvidas e me encorajando. Muito obrigada, você foi sensacional.

Aos meus irmãos de comunidade do Caminho Neocatecumenal que estiveram unidos a mim em oração e que acompanharam toda a minha trajetória.

*Como retribuirei ao Senhor todo o bem que  
me fez?  
Salmo 116*

## RESUMO

Os peptídeos são biomoléculas compostas por resíduos de aminoácidos ligados por meio de ligações peptídicas e sua diversidade estrutural faz com que esses compostos sejam versáteis e se destaquem como macromoléculas promissoras na busca de novos fármacos. Peptídeos bioativos possuem ampla aplicabilidade, podendo atuar como antifúngicos, antibacterianos, anti-inflamatórios, além de desempenharem funções hormonais e sinalizadores neurais. Alguns estudos apontam ainda seu potencial na atuação da terapia do câncer. Embora esses compostos exibam grandes vantagens como agentes terapêuticos, algumas limitações ainda restringem seu uso clínico. Por essa razão, nos últimos anos vem crescendo o interesse na síntese de miméticos, a fim de minimizar essas limitações por meio de modificações estruturais e viabilizar esses peptidomiméticos como potenciais candidatos a fármacos. O presente trabalho tem como objetivo realizar a síntese de acil-hidrazino-peptômeros, uma nova classe de peptidomiméticos, por meio de reações multicomponentes consecutivas. A ideia geral se baseia na obtenção dos compostos via reação de Ugi-hidrazino seguida por reação de hidrazinólise ou hidrólise e subsequente reação de Ugi-hidrazino ou reação clássica de Ugi. Essa metodologia permitiu a obtenção de peptidomiméticos com moderados a bons rendimentos (47-90%). Após realizada a síntese, os compostos foram submetidos a ensaios biológicos *in vitro* pelo método de MTT visando avaliar a citotoxicidade dos peptidomiméticos em células normais da linhagem NIH-3T3 (fibroblastos) e câncer de mama (4T1). Observou-se que a maioria dos compostos não são citotóxicos para células normais e não foram capazes de promover redução significativa da viabilidade das células cancerígenas.

**Palavras-chave:** Peptidomiméticos. Acil-hidrazino-peptômeros. Reações multicomponentes. Citotoxicidade. Câncer.

## ABSTRACT

Peptides are biomolecules composed of amino acid residues linked by peptide bonds and their structural diversity makes these compounds more versatile and stand out as promising macromolecules in the search for new drugs. Bioactive peptides have broad applicability, act as antifungal, antibacterial, anti-inflammatory, in addition to performing hormonal functions and neural flags. A few studies also point out its potential in the performance of cancer therapy. Although these compounds exhibit great advantages as therapeutic agents, some limitations still restrict their clinical use. For this reason, in recent years the interest in mimetic synthesis has increased, in order to minimize these limitations by means of structural modifications and to make these peptidomimetics feasible as potential drug candidates. The present work aims at the synthesis of acyl- hydrazino-peptomers, a new class of peptidomimetics, by means of consecutive multicomponent reactions. The general idea is based on obtaining the compounds by Ugi-hydrazino reaction followed by hydrazinolysis or hydrolysis reaction and subsequent reaction of Ugi-hydrazino or classical Ugi reaction. After synthesis, the compounds were submitted to *in vitro* biological assays by the MTT method to evaluate the cytotoxicity of the peptidomimetics in normal cells NIH-3T3 (fibroblasts) and verify their biological behavior in breast cancer cells (4T1). It was noted that the most of the compounds are not toxic to normal cells and haven't been able to promote significant reduction of the viability of cancer cells.

**Keywords:** Peptidomimetics. Acyl-hydrazino-peptomers. Multicomponent reactions. Cytotoxicity. Cancer.



# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 Peptidomiméticos .....	1
1.1.2 Peptóides .....	2
1.1.3 Azapeptídeos .....	3
1.1.4 Hidrazinopeptídeos .....	4
1.1.5 Peptômeros .....	4
1.1.6 Acil-hidrazino-peptômeros .....	4
1.2 Síntese .....	5
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>6</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>6</b>
3.1 Objetivo Geral .....	6
3.2 Objetivos específicos .....	7
<b>4. MÉTODOS</b> .....	<b>7</b>
4.1 Síntese do Isocianoacetato de Metila .....	7
4.2 Síntese da hidrazida <i>Cbz</i> -glicina 1a .....	8
4.3 Síntese da hidrazida <i>Boc</i> -glicina 1b .....	8
4.4 Síntese da <i>Boc</i> -hidrazida 1c .....	9
4.5 Síntese do acil-hidrazino-peptômero 2 .....	10
4.6 Síntese do acil-hidrazino-peptômero 3 .....	10
4.7 Síntese do acil-hidrazino-peptômero 4 .....	10
4.8 Síntese do acil-hidrazino-peptômero 5 .....	11
4.9 Síntese do acil-hidrazino-peptômero 6 .....	11
4.10 Síntese do acil-hidrazino-peptômero 7 .....	11
4.11 Síntese da hidrazida acil-hidrazino-peptômero 8 .....	12
4.12 Síntese da hidrazida acil-hidrazino peptômero 9 .....	12

4.13	Síntese do acil-hidrazino-peptômero 10 .....	12
4.14	Síntese do acil-hidrazino-peptômero 11 .....	13
4.15	Síntese do acil-hidrazino-peptômero 12 .....	13
4.16	Síntese do acil-hidrazino-peptômero 13 .....	14
4.17	Síntese do acil-hidrazino-peptômero 14 .....	14
4.18	Ensaio biológicos com células <i>in vitro</i> .....	15
4.18.1	Cultivo Celular .....	15
4.18.2	Tratamento .....	15
4.18.3	Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT .....	16
4.19	Análise dos dados.....	16
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	16
5.1	Hidrazida <i>Cbz</i> -glicina (1a).....	24
5.2	Hidrazida <i>Boc</i> -glicina (1b) .....	25
5.3	<i>Boc</i> -Hidrazida (1c).....	26
5.4	Acil-hidrazino-peptômero 2.....	27
5.5	Acil-hidrazino-peptômero 3.....	28
5.6	Acil-hidrazino-peptômero 4.....	29
5.7	Acil-hidrazino-peptômero 5.....	31
5.8	Acil-hidrazino-peptômero 6.....	32
5.9	Acil-hidrazino-peptômero 7.....	33
5.10	Hidrazida acil-hidrazino-peptômero 8 .....	34
5.11	Hidrazida acil-hidrazino-peptômero 9 .....	35
5.12	Acil-hidrazino-peptômero 10.....	37
5.13	Acil-hidrazino-peptômero 11.....	38
5.14	Acil-hidrazino-peptômero 12.....	39
5.15	Acil-hidrazino-peptômero 13.....	40
5.16	Acil-hidrazino-peptômero 14.....	41
6.	CONCLUSÃO.....	43

<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>51</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estruturas de Peptídeo (a), peptóide (b), azapeptídeo (c), peptômero (d) e hidrazinopeptídeo (E).....	2
<b>Figura 2.</b> Peptóides biologicamente tivos .....	3
<b>Figura 3.</b> Hidrazinopeptídeos naturais.....	4
<b>Figura 4.</b> Estrutura geral dos acil-hidrazino-peptômeros sintetizados no presente trabalho. ....	5
<b>Figura 5.</b> Estrutura de todos dos compostos sintetizados no presente trabalho.....	23
<b>Figura 6.</b> Viabilidade de células 4T1 E NIH-3T3 expostas à hidrazida <i>Cbz</i> -glicina 1a por 24 horas <i>in vitro</i> .....	25
<b>Figura 7.</b> Viabilidade de células 4T1 E NIH-3T3 expostas à hidrazida <i>Boc</i> -glicina 1b por 24 horas <i>in vitro</i> .....	26
<b>Figura 8</b> Viabilidade De Células 4T1 E NIH-3T3 expostas à hidrazida <i>Boc</i> -glicina 1c por 24 horas <i>in vitro</i> .....	27
<b>Figura 9.</b> Viabilidade de células 4T1 E NIH-3T3 expostas ao acil-hidrazino-peptômero 2 por 24 horas <i>in vitro</i> .....	28
<b>Figura 10.</b> Viabilidade de células 4T1 E NIH-3T3 expostas ao acil-hidrazino-peptômero 3 por 24 horas <i>in vitro</i> .....	29
<b>Figura 11.</b> Viabilidade de células 4T1 E NIH-3T3 expostas ao acil-hidrazino-peptômero 4 por 24 horas <i>in vitro</i> .....	30
<b>Figura 12.</b> Viabilidade de células 4T1 E NIH-3T3 expostas ao acil-hidrazino-peptômero 5 por 24 horas <i>in vitro</i> .....	32
<b>Figura 13.</b> Viabilidade de células 4T1 E NIH-3T3 expostas ao acil-hidrazino-peptômero 6 por 24 horas <i>in vitro</i> .....	33
<b>Figura 14.</b> Viabilidade de células 4T1 E NIH-3T3 expostas ao acil-hidrazino-peptômero 7 por 24 horas <i>in vitro</i> .....	34
<b>Figura 15.</b> Viabilidade de células 4T1 E NIH-3T3 expostas à hidrazida acil-hidrazino-peptômero 8 por 24 horas <i>in vitro</i> .....	35
<b>Figura 16.</b> Viabilidade de células 4T1 E NIH-3T3 expostas à hidrazida acil-hidrazino-peptômero 9 por 24 horas <i>in vitro</i> .....	36
<b>Figura 17.</b> Viabilidade de células 4T1 E NIH-3T3 expostas ao acil-hidrazino-peptômero 10 por 24 horas <i>in vitro</i> .....	37
<b>Figura 18.</b> Viabilidade de células 4T1 E NIH-3T3 expostas ao acil-hidrazino-peptômero 11 por 24 horas <i>in vitro</i> .....	38
<b>Figura 19.</b> Viabilidade de células 4T1 E NIH-3T3 expostas ao acil-hidrazino-peptômero 12 por 24 horas <i>in vitro</i> .....	40
<b>Figura 20.</b> Viabilidade de células 4T1 E NIH-3T3 expostas ao acil-hidrazino-peptômero 13 por 24 horas <i>in vitro</i> .....	41
<b>Figura 21.</b> Viabilidade de células 4T1 E NIH-3T3 expostas ao acil-hidrazino-peptômero 14 por 24 horas <i>in vitro</i> .....	42

## LISTA DE ESPECTROS

<b>Espectro 1.</b> Espectro de massas de alta resolução (EMAR) do acil-hidrazino-peptômero 2 .....	50
<b>Espectro 2.</b> Espectro de massas de alta resolução (EMAR) do acil-hidrazino-peptômero 3 .....	51
<b>Espectro 3.</b> Espectro de massas de alta resolução (EMAR) do acil-hidrazino-peptômero 4 .....	52
<b>Espectro 4.</b> Espectro de massas de alta resolução (EMAR) do acil-hidrazino-peptômero 5 .....	53
<b>Espectro 5.</b> Espectro de massas de alta resolução (EMAR) do acil-hidrazino-peptômero 6 .....	54
<b>Espectro 6.</b> Espectro de massas de alta resolução (EMAR) do acil-hidrazino-peptômero 7 .....	55
<b>Espectro 7.</b> Espectro de massas de alta resolução (EMAR) do acil-hidrazino-peptômero 10 .....	56
<b>Espectro 8.</b> Espectro de massas de alta resolução (EMAR) do acil-hidrazino-peptômero 11 .....	57
<b>Espectro 9.</b> Espectro de massas de alta resolução (EMAR) do acil-hidrazino-peptômero 12 .....	58
<b>Espectro 10.</b> Espectro de massas de alta resolução (EMAR) do acil-hidrazino-peptômero 13 .....	59
<b>Espectro 11.</b> Espectro de massas de alta resolução (EMAR) do acil-hidrazino-peptômero 14 .....	60

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Rota sintética 1 para obtenção do acil-hidrazino-peptômero.....	17
<b>Esquema 2.</b> Rota sintética 2 para obtenção do acil-hidrazino-peptômero.....	18
<b>Esquema 3.</b> Síntese das hidrazidas 1a-c .....	18
<b>Esquema 4.</b> Síntese dos acil-hidrazino-peptômeros 2-7 .....	20
<b>Esquema 5.</b> Síntese das hidrazidas intermediárias 8-9 e acil-hidrazino-peptômeros 10-11 .....	21
<b>Esquema 6.</b> Síntese dos ácidos intermediários e acil-hidrazino-peptômeros 12-14.	21

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Visão geral das características dos compostos sintetizados.....	42
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

4T1 - Adenocarcinoma mamário murino  
AMP - Peptídeos antimicrobianos  
Boc - *t*-Butoxicarbonila  
Cbz – Benziloxicarbonila  
CCD - Cromatografia em Camada Delgada  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – Diclorometano  
C<sup>α</sup> - Carbono-alfa  
DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbecco  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
EMAR - Espectrometria de Massas de Alta Resolução  
Et<sub>3</sub>N – Trietilamina  
EtOH – Etanol  
LiOH – Hidróxido de Lítio  
M.O - Micro-ondas  
m/z – Massa/carga  
MeOH – Metanol  
MTT - (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo)  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – Carbonato de Sódio  
NaHSO<sub>4</sub> – Bissulfato de Sódio  
NIH-3T3 - Fibroblasto murino  
POCl<sub>3</sub> - Cloreto de fosforila  
RPMI – Meio do Instituto Memorial Park Roswell  
SFB – Soro fetal bovino  
T.A – Temperatura ambiente  
TFE – Trifluoroetanol  
THF – Tetrahidrofurano  
CH<sub>3</sub>I - Iodometano  
NaHCO<sub>3</sub> – Bicarbonato de sódio  
DMF – Dimetilformamida  
N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O – Hidrazina monohidratada  
(Boc)<sub>2</sub>O – Dicarbonato de di-terc-butila  
NaOH – Hidróxido de sódio

## 1. INTRODUÇÃO

Os peptídeos são biomoléculas compostas por resíduos de aminoácidos ligados por meio de ligações peptídicas formadas pela desidratação de um grupo  $\alpha$ -carboxila de um aminoácido e um grupo  $\alpha$ -amina de outro. A diversidade estrutural destes compostos os torna versáteis, podendo ser amidados ou esterificados em suas carboxilas terminais, acetilados em seus grupos amino terminais, fosforilados ou sulfatados em um ou mais resíduos, lineares, semicíclicos ou cíclicos (MACHADO et al., 2004).

Sabe-se que essas moléculas apresentam vasta diversidade funcional e se destacam como macromoléculas promissoras na busca de novos fármacos. Nos últimos anos, a descoberta de peptídeos bioativos cresceu e, com isso, diversos fármacos antifúngicos, antibióticos e anti-inflamatórios de natureza peptídica têm sido descobertos. Existem ainda aqueles que desempenham funções hormonais e sinalizadores neurais. Outros estudos mostraram também estruturas peptídicas biologicamente ativas atuando como inibidores de proteases, imunossupressores e quimioterápicos (MACHADO et al., 2004; PICCHI et al., 2009).

Embora os peptídeos bioativos exibam grandes vantagens como agentes terapêuticos e apresentem um alto potencial para o tratamento de várias doenças, algumas limitações ainda dificultam o seu amplo uso clínico, tais como a rápida degradação proteolítica, potencial imunogenicidade e toxicidade sistêmica, além da baixa estabilidade metabólica e baixa permeabilidade intestinal. Por essa razão, a busca por miméticos vem aumentando no decorrer dos anos, a fim de minimizar essas limitações por meio de modificações estruturais e viabilizar esses peptidomiméticos como potenciais candidatos a fármacos (OVADIA et al., 2009; LEE et al, 2015).

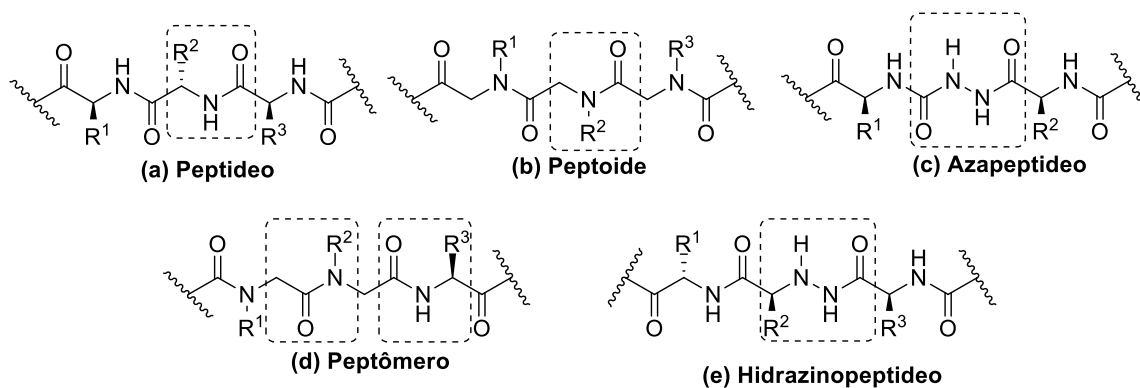
### 1.1 Peptidomiméticos

Buscando melhorar as propriedades farmacológicas dos peptídeos naturais, vários grupos de estudos vêm desenvolvendo grandes esforços em pesquisas que visam a alterar as estruturas dos aminoácidos. Tais modificações permitem a obtenção de moléculas que mimetizam as propriedades dos peptídeos, sendo então denominadas peptidomiméticos, objetivando manter a sua atividade biológica, a fim de minimizar algumas limitações presentes nos peptídeos naturais, tais como baixa



biodisponibilidade, baixa estabilidade metabólica e melhora da seletividade pelo receptor (BARRETO et al., 2016; ZEGA, 2005).

Dentre as classes mais importantes de peptidomiméticos já obtidas, destacam-se os peptídeos, azapeptídeos, hidrazinopeptídeos e peptídeo-peptídeos híbridos, denominados peptômeros. A figura 1 demonstra suas respectivas estruturas e ressalta as diferenças desses compostos.



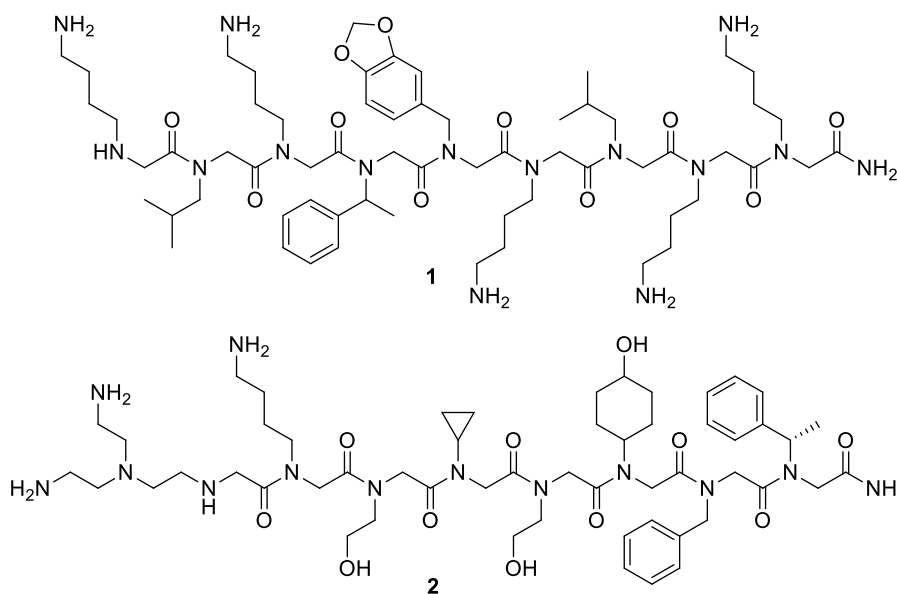
**Figura 1.** Estruturas de peptídeo (a), peptoide (b), azapeptídeo (c), peptômero (d) e hidrazinopeptídeo (e) (BARRETO et al., 2016).

### 1.1.2 Peptídeos

Desenvolvidos inicialmente no final da década de 1980 como parte de programa de pesquisa na descoberta de fármacos de uma pequena companhia denominada *Protos Corp* (ZUCKERMANN, 2010), os peptídeos são oligômeros de N-glicinas substituídas e se diferenciam dos peptídeos devido à mudança de posição de cadeias laterais, uma vez que, ao invés de se ligarem no C $\alpha$ , as ramificações se ligam no átomo de nitrogênio (figura 1). A presença de cadeias laterais ligada ao átomo de nitrogênio proporciona a ausência de ligações polares N-H, resultando no aumento da lipofilicidade e proporcionando no aumento da permeabilidade celular. (BARRETO et al., 2016).

Esses compostos são os miméticos mais comumente sintetizados e podem apresentar interessantes atividades biológicas. Dentre as vantagens dessas estruturas estão: estabilidade metabólica, boa variabilidade dos grupos funcionais por síntese química simples, alta flexibilidade e assim a possibilidade de explorar um amplo espaço conformacional, entre outras (KESSLER, 1993). Porém, algumas

características estruturais dos peptóides podem resultar em uma menor afinidade por alvos macromoleculares, o que limita a sua utilidade. Esse fato tem motivado a busca por estratégias que contribuam para o aumento na abundância de peptidomiméticos. A figura 2 representa alguns peptóides bioativos, sendo o **peptóide 1** um candidato para a terapia do câncer por ser um antagonista do receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular, e o **peptóide 2** um ligante do protooncogene Crk (UDUGAMASOORIYA et al., 2008; WRENN et al., 2007).



**Figura 2.** Peptóides biologicamente ativos (BARRETO et al., 2016).

### 1.1.3 Azapeptídeos

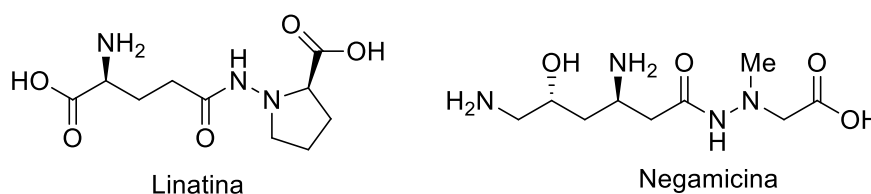
Os azapeptídeos pertencem a uma classe de peptidomiméticos explorados desde 1970 (GANTE, 1970) e considerados uma importante plataforma em química medicinal para a criação de fármacos (PROULX et al., 2011).

Esses compostos são caracterizados pela substituição do C<sup>α</sup> por um átomo de nitrogênio em um ou mais aminoácidos. A substituição resulta na inserção de um grupo semicarbazida na molécula, acarretando em um enorme efeito nas propriedades físicas e estruturais de um peptídeo. Sabe-se que a estrutura dessas moléculas tende a facilitar interações com receptores de proteínas e, como resultado, a estabilidade sobre as enzimas e a degradação química podem ser aumentadas em comparação aos peptídeos naturais. Essa classe tem demonstrado

interessantes atividades biológicas, incluindo ação antiviral e também inibição da cisteína proteases (BARRETO et al., 2016).

#### 1.1.4 Hidrazinopeptídeos

Os hidrazinopeptídeos são análogos de peptídeos com um grupo amida (CONH) substituído por um fragmento hidrazino CONHNH. Essa modificação foi primeiramente realizada em meados de 1960, representando uma classe de peptidomiméticos com potencial atividade biológica, como inibição de protease e atividade antimicrobiana. A figura 3 representa a estrutura de hidrazinopeptídeos naturais, onde a linatina atua como antagonista da vitamina B6 e a negamicina apresenta atividade antibiótica (KLOSTERMAN; LAMOUREUX; PARSONS, 1967; KONDO et al., 1971).



**Figura 3.** Hidrazinopeptídeos naturais (BARRETO et al., 2016).

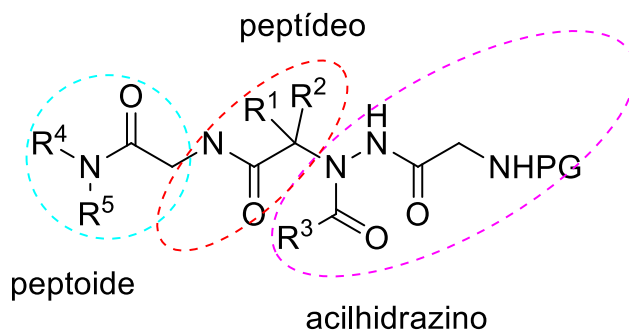
#### 1.1.5 Peptômeros

Os peptídeo-peptídeos híbridos, denominados peptômeros, são análogos de peptídeos que apresentam em sua estrutura tanto uma porção peptídeo quanto uma porção peptóide (figura 1). Esses compostos também apresentam potencial atividade biológica. Lee et al (2015) reportaram recentemente um estudo que aborda a síntese de uma biblioteca de peptômeros pro-fármacos com potencial atividade contra células de câncer de próstata (LEE et al., 2015).

#### 1.1.6 Acil-hidrazino-peptômeros

Outras alterações nas estruturas dos peptídeos já foram realizadas para a obtenção de novas classes de peptidomiméticos que, apesar de serem menos comuns, são também biologicamente ativos (BARRETO et al., 2016). Em face da vasta variedade de modificações estruturais que podem ser feitas para a obtenção de miméticos de peptídeos naturais, esse trabalho aborda o desenvolvimento de

uma nova classe de peptidomiméticos, denominada neste trabalho de acil-hidrazino-peptômeros. Esses compostos possuem em sua estrutura tanto uma porção peptídeo, como uma porção peptoíde, apresentando então a estrutura híbrida característica de um peptômero, como já mencionado anteriormente, além da inserção de uma porção acil-hidrazino. A figura abaixo representa a estrutura genérica dos compostos sintetizados nesse trabalho (figura 4).



**Figura 4.** Estrutura geral dos acil-hidrazino-peptômeros sintetizados no presente trabalho. (BARRETO et al., 2016).

## 1.2 Síntese

Para a síntese de peptidomiméticos, a abordagem mais comumente utilizada é a do método de submonômero, podendo ser realizada tanto em solução quanto em fase sólida. Essa técnica consiste no acoplamento de monômeros de N-glicinas substituídas, possibilitando o aumento da cadeia do composto. A desvantagem dessa abordagem é a necessidade de preparar quantidades adequadas de diversos monômeros de N-glicina substituídos protegidos (BARRETO et al., 2016; FARA, et al., 2005; ZUCKERMANN, 2011). Com isso, se faz necessário criar métodos alternativos para a síntese de peptidomiméticos que sejam rápidos e simples, visando aperfeiçoar o processo e reduzir o número de etapas. Tendo em vista essa necessidade, as reações multicomponentes mostram-se como uma abordagem versátil para a obtenção de peptidomiméticos (BARRETO et al., 2016).

Reações multicomponentes são aquelas nas quais dois ou mais materiais de partida reagem para formar um produto, incorporando essencialmente todos os átomos dos reagentes (DÖMLING, 2006). A reação de Ugi (descoberta em 1959 pelo pesquisador estoniano Ivar Ugi) envolve a utilização de quatro componentes

básicos: uma amina, um componente carbonílico (aldeído ou cetona), um ácido carboxílico e um isocianeto (WESSJOHANN; RIVERA; VERCILLO, 2009). Tal reação tem provado ser um método versátil para a síntese de peptômeros (BARRETO et al., 2016).

Para a realização desse trabalho, a síntese dos acil-hidrazino-peptômeros foi realizada a partir de reações de Ugi e Ugi-hidrazino consecutivas, uma vez que essas reações têm se mostrado útil para a síntese de peptidomiméticos. Vale ressaltar que esses compostos não podem ser obtidos pelo método do submonômero. É importante mencionar que esta é a primeira vez que reações de Ugi e Ugi-hidrazino consecutivas foram utilizadas de forma combinada para a síntese de peptidomiméticos. (BARRETO et al., 2016).

A síntese dos compostos presentes neste trabalho foi publicada no *Beilstein Journal of Organic Chemistry* em Dezembro de 2016 (anexo).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Acil-hidrazino-peptômeros pertencem a uma nova classe de peptidomiméticos, o que os torna interessantes para o desenvolvimento e descoberta de novos candidatos a fármacos. Desta maneira, a busca por um novo método de síntese que seja simples, rápido e eficiente é importante para a obtenção desses compostos.

Após realizar a síntese dos acil-hidrazino-peptômeros é importante analisar seu comportamento biológico em células da linhagem NIH-3T3 (fibroblasto murino) para averiguar a sua citotoxicidade e verificar se há atividade biológica desses compostos em células cancerosas 4T1 (adenocarcinoma mamário murino).

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

O presente trabalho tem como objetivo realizar a síntese de acil-hidrazino-peptômeros via reações de Ugi e Ugi-hidrazino consecutivas por meio de uma

abordagem versátil e de simples execução para a obtenção de peptidomiméticos e avaliar sua citotoxicidade contra células normais e de câncer de mama *in vitro*.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Realizar a síntese de uma variedade acil-hidrazino-peptômeros via reações de Ugi e Ugi-hidrazino consecutivas;
- Verificar a viabilidade de células normais da linhagem NIH-3T3 (fibroblastos) e de células 4T1 (adenocarcinoma mamário murino) *in vitro* expostas aos compostos sintetizados.

## **4. MÉTODOS**

A obtenção dos compostos propostos seguiu o método descrito por Barreto e colaboradores (BARRETO et al., 2016), que aborda a utilização de reações multicomponentes consecutivas para a síntese de peptidomiméticos.

Para a síntese foram propostos dois métodos. O primeiro abrange três etapas: primeiro a formação do acil-hidrazino-peptômero via reação de Ugi-hidrazino, seguido da formação da hidrazida via reação de hidrazinólise e, por último, uma nova reação de Ugi-hidrazino para a obtenção de um acil-hidrazino-peptômero. O segundo método também foi composto por três etapas, onde primeiro houve a formação do acil-hidrazino-peptômero via reação de Ugi-hidrazino, seguido da formação de um ácido via reação de hidrólise e, finalmente, a obtenção de um novo acil-hidrazino-peptômero via reação clássica de Ugi.

Os compostos foram devidamente caracterizados por Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR) para a confirmação de sua obtenção, os produtos sólidos tiveram seus pontos de fusão determinados e os fatores de retenção foram mensurados por cromatografia em camada delgada (CCD).

### **4.1 Síntese do Isocianoacetato de Metila**

Para a síntese do isocianeto, foi utilizada uma metodologia já descrita na literatura. Inicialmente, em uma solução contendo 5,022 g de cloridrato do éster metil-glicina (40 mmol), 5,8 mL de trietilamina (Et<sub>3</sub>N) (40 mmol) e 5,6 mg de ácido para-toluenosulfônico em 111,5 mL de formiato de etila foi submetida a um sistema

de refluxo por 48 horas. Após esse tempo, o meio reacional foi filtrado e concentrado a vácuo, obtendo-se o éster metílico da N-formiglicina, com rendimento quantitativo, sem a necessidade de purificação prévia. A formamida obtida na etapa anterior e 15,0 mL (108 mmol) de trietilamina foram dissolvidos em 60,0 mL de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). A solução foi coletada a 0 °C sob agitação constante e 3,34 mL de cloreto de fosforila ( $\text{POCl}_3$ ) foi adicionado lentamente. A reação foi agitada por 2 horas a 0 °C. Em seguida foi adicionada uma solução contendo 7,62 g de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) em 240 mL de água destilada. A mistura foi agitada por 1 hora a temperatura ambiente. Após esse tempo as fases foram separadas, a fase orgânica foi lavada por duas vezes com 100 mL de água destilada, seca com sulfato de sódio anidro e evaporada a vácuo. O produto bruto foi purificado por coluna cromatográfica ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), obtendo-se o isocianoacetato de metila com perfazendo massa igual a 1,59 g e rendimento de 44%.

#### 4.2 Síntese da hidrazida *Cbz*-glicina **1a**

Em uma solução de *Cbz*-glicina **a** (2,56 mmol, 0.54 g) em dimetilformamida (DMF) (3,0 mL) sob agitação, foi adicionado 0,28g de bicarbonato de sódio (3,38 mmol) e 0,60 mL de iodeto de metila (9,64 mmol). A mistura foi agitada sobre atmosfera de nitrogênio por 46 horas a temperatura ambiente. Após esse tempo adicionou-se 30 mL de acetato de etila, lavando-se a mistura com água destilada por três vezes. Em seguida, a fase orgânica foi separada, seca com sulfato de sódio anidro e concentrada a vácuo, obtendo-se o éster *Cbz*-glicina **b**, sem a necessidade de purificação, em 93% de rendimento (0,53 g; 2,38 mmol) (BARRETO et al., 2016).

Para a obtenção da hidrazida *Cbz*-glicina, o éster obtido na etapa anterior foi adicionado a uma solução de hidrazina monohidratada (17,2 mmol, 0,86 g) em etanol (1,4 mL). A reação foi submetida a um sistema de refluxo por 3 horas a 115°C. Após esse tempo, a mistura foi concentrada a vácuo e purificada por coluna cromatográfica ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow 10\% \text{ MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), obtendo-se o produto **1a** em 69% de rendimento (0,76 g; 3,42 mmol) (BARRETO et al., 2016).

#### 4.3 Síntese da hidrazida *Boc*-glicina **1b**

Inicialmente, adicionou-se 1,25 g do cloridrato do éster metílico da glicina **c** (10,0 mmol) a 30 mL de uma solução de dioxano/água (2:1, 20 e 10 mL). Após o sólido ser dissolvido, a reação foi alcalinizada com 10 mL de uma solução de

hidróxido de sódio (NaOH, 1 mol/L), coletada em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se 3,27 g de *dicarbonato de di-terc-butila* ((Boc)<sub>2</sub>O, 15,0 mmol) e 0,84 g de bicarbonato de sódio (10,0 mmol). A reação foi agitada *overnight* a temperatura ambiente. Após, metade do volume foi evaporado e o resíduo foi diluído em 40 mL de acetato de etila, coletado em banho de gelo e acidificado a pH 2,5 – 3,0 com solução de bissulfato de potássio (KHSO<sub>4</sub>, 1 mol/L). As fases foram separadas e a fração aquosa foi extraída duas vezes com 20 mL de acetato de etila. As fases orgânicas extraídas foram combinadas e, em seguida, lavadas com água destilada, seca com sulfato de sódio anidro e concentrada a vácuo para a obtenção do éster *Boc-glicina d*, sem a necessidade de purificação, com rendimento quantitativo (BARRETO et al., 2016).

Para a síntese da hidrazida *Boc-glicina 1b* (1,87 g; 9,90 mmol) do éster obtido na etapa anterior foi adicionado a uma solução de hidrazina monohidratada (39,6 mmol, 1,98 g) em etanol (3,0 mL). A reação foi submetida a um sistema de refluxo por 3 horas a 115°C. Após esse tempo, a mistura foi concentrada a vácuo e purificada por coluna cromatográfica (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → 10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), obtendo-se o produto **1b** em 78% de rendimento (1,45g; 7,67 mmol) (BARRETO et al., 2016).

#### 4.4 Síntese da *Boc*-hidrazida **1c**

Primeiramente, adicionou-se 1,46 g da amina **e** (10,0 mmol) a 30 mL de uma solução de dioxano/água (2:1, 20 e 10 mL). Após o sólido ser dissolvido, a reação foi alcalinizada com 10 mL de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH, 1 mol/L), coletada em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se 3,27 g de *dicarbonato de di-terc-butila* ((Boc)<sub>2</sub>O, 15,0 mmol) e 0,84 g de bicarbonato de sódio (10,0 mmol). A reação foi agitada *overnight* a temperatura ambiente. Após, metade do volume foi evaporado e o resíduo foi diluído em 40 mL de acetato de etila, coletado em banho de gelo e acidificado a pH 2,5 – 3,0 com solução de bissulfato de potássio (KHSO<sub>4</sub>, 1 mol/L). As fases foram separadas e a fração aquosa foi extraída duas vezes com 20 mL de acetato de etila. As fases orgânicas extraídas foram combinadas e em seguida lavadas com água destilada, seca com sulfato de sódio anidro e concentrada a vácuo para a obtenção do éster *Boc-glicina f*, sem a necessidade de purificação, em 73% de rendimento (1,07 g; 4,35 mmol) (BARRETO et al., 2016).



Em seguida, para a síntese da *Boc*-Hidrazida, 1,07 g (4,35 mmol) do éster **f** obtido na etapa anterior foi adicionado a uma solução de hidrazina monohidratada (17,4 mmol; 0,87 g) em 2,3 mL etanol. A reação foi submetida a um sistema de refluxo por 3 horas a 115°C. Após esse tempo, a mistura foi concentrada a vácuo e purificada por coluna cromatográfica (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → 15% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), obtendo-se o produto em 47% de rendimento (0,51 g; 2,05 mmol) (BARRETO et al., 2016).

#### 4.5 Síntese do acil-hidrazino-peptômero 2

Inicialmente, em uma solução da hidrazida *Cbz*-glicina **1a** (2,13 mmol, 0,476 g) em 4,0 mL de metanol sob agitação adicionou-se 0,19 mL (2,13 mmol) do isobutiraldeído. A reação ficou sob agitação por 30 minutos a temperatura ambiente para a formação da imina. Após esse tempo, o solvente foi removido a vácuo, a imina foi dissolvida em 4,5 mL de trifluoroetanol (TFE) e nessa solução foram adicionados 0,122 mL (2,13 mmol) de ácido acético e 0,19 mL (2,13 mmol) de isocianoacetato de metila. Após a adição de todos os reagentes, a solução foi agitada por 18 horas a temperatura ambiente. Em seguida, a reação foi concentrada a vácuo e purificada por coluna cromatográfica (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → 2% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) fornecendo o produto em 69% de rendimento (0,64 g; 1,47 mmol) (BARRETO et al., 2016).

#### 4.6 Síntese do acil-hidrazino-peptômero 3

Primeiramente, uma solução da hidrazida *Boc*-glicina **1b** (0,50 mmol; 0,094 g) em 1,0 mL de metanol sob agitação foi adicionado 0,045 mL (0,50 mmol) do isobutiraldeído. A reação foi agitada por 2 horas a temperatura ambiente para a formação da imina. Após a evaporação do solvente a vácuo, a imina foi dissolvida em 2,0 mL de trifluoroetanol (TFE) e em seguida adicionou-se 0,014 mL (0,25 mmol) de ácido acético e 0,023 mL (0,25 mmol) do isocianoacetato de metila. A reação foi agitada por 43 horas a temperatura ambiente e após esse tempo o solvente foi removido a vácuo para a concentração da mistura e o resíduo foi purificado por coluna cromatográfica (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → 2% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) obtendo-se o produto em 59% de rendimento (0,118 g; 0,293 mmol) (BARRETO et al., 2016).

#### 4.7 Síntese do acil-hidrazino-peptômero 4

Para dar início a síntese, foi adicionado a uma solução da hidrazida *Boc*-glicina 1b (1,59 mmol; 0,30 g) em 2,0 mL de trifluoroetanol (TFE) sob agitação 0,23 mL (3,18 mmol) de acetona. A reação se manteve em agitação por 2 horas a temperatura ambiente para a formação da imina. Em seguida adicionou-se 0,30 g de sulfato de sódio anidro, 0,059 mL (0,79 mmol) de ácido propanoico e 0,072 mL (0,79 mmol) do isocianoacetato de metila. Após agitação por 40 horas a temperatura ambiente, a reação foi filtrada, o solvente removido a vácuo e a mistura purificada por coluna cromatográfica ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow 4\% \text{ MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), obtendo-se o produto com massa igual a 0,287 g (0,714 mmol) e rendimento de 90% (BARRETO et al., 2016).

#### **4.8 Síntese do acil-hidrazino-peptômero 5**

Inicialmente, em uma solução da hidrazina *Boc*-glicina (0,50 mmol; 0,094 g) em 1,0 mL de trifluoroetanol (TFE) foi adicionado 0,073 mL (1,0 mmol) de acetona, mantendo-a em agitação por 1 hora a temperatura ambiente para a obtenção da imina. Após a formação da imina foram adicionados 0,50 g de sulfato de sódio anidro, 0,009 mL (0,25 mmol) de ácido fórmico e 0,023 mL (0,25 mmol) do isocianoacetato de metila. Após agitação de 24 horas, a solução foi filtrada, concentrada a vácuo e purificada por coluna cromatográfica ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow 4\% \text{ MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) resultando na obtenção do produto em 90% de rendimento (0,84 g; 0,25 mmol (BARRETO et al., 2016).

#### **4.9 Síntese do acil-hidrazino-peptômero 6**

Primeiramente, em uma solução da hidrazida 1c (2,13 mmol; 0,524 g) em 4,0 mL de metanol sob agitação adicionou-se 0,19 mL (2,13 mmol) do isobutiraldeído para a formação da imina, mantendo-se a agitação por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, o solvente foi evaporado a vácuo. A imina foi então dissolvida em 4,0 mL de trifluoroetanol (TFE) e foram adicionados a essa solução 0,12 mL (2,13 mmol) do ácido acético e 0,19 mL (2,13 mmol) do isocianoacetato de metila. A agitação permaneceu por 48 horas a temperatura ambiente. Após esse tempo a reação foi concentrada a vácuo e purificada por coluna cromatográfica ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow 2\% \text{ MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) fornecendo o produto em 73% de rendimento (0,710 g; 1,55 mmol) (BARRETO et al., 2016).

#### **4.10 Síntese do acil-hidrazino-peptômero 7**

Primeiramente, em uma solução da hidrazida 1c (1,62 mmol, 0,398 g) em 3,0 mL de metanol sob agitação adicionou-se 0,15 mL (1,62 mmol) do isobutiraldeído. A agitação se manteve por 1 hora a temperatura ambiente para a obtenção da imina. A imina foi então dissolvida em 3,0 mL de trifluoroetanol e foram adicionados 0,12 mL (1,62 mmol) do ácido propanoico e 0,15 mL (1,62 mmol) do isocianoacetato de metila. O meio reacional foi agitado por 51 horas a temperatura ambiente, concentrado a vácuo e o produto foi purificado por coluna cromatográfica ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow 4\% \text{ MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), fornecendo o produto em 71% de rendimento (0,543 g; 1,15 mmol) (BARRETO et al., 2016).

#### **4.11 Síntese da hidrazida acil-hidrazino-peptômero 8**

Para a síntese da hidrazida acil-hidrazino-peptômero 8 utilizou-se 0,286 g (0,71 mmol) do acil-hidrazino-peptômero 3 obtido anteriormente adicionando-o a uma solução de hidrazina monohidratada (2,84 mmol; 0,14 mL) em 3,3 mL de etanol. A reação foi submetida a um sistema de refluxo por 5 horas a 115°C. Após esse tempo, a mistura foi concentrada a vácuo e purificada por coluna cromatográfica ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow 15\% \text{ MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), obtendo-se o produto em 72% de rendimento (0,205 g; 0,51 mmol) (BARRETO et al., 2016).

#### **4.12 Síntese da hidrazida acil-hidrazino peptômero 9**

Para a obtenção da hidrazida acil-hidrazino-peptômero 9 utilizou-se 0,421 g (0,890 mmol) do acilhidrazido-peptômero 7 sintetizado anteriormente, adicionando-o a uma solução de hidrazida monohidratada (3,56 mmol; 0,17 mL) em 4,0 mL de etanol sob agitação. A reação foi submetida a um sistema de refluxo por 5 horas a 115°C. Em seguida, a reação foi concentrada a vácuo e purificada por coluna cromatográfica ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow 15\% \text{ MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), fornecendo o produto em 72% de rendimento (BARRETO et al., 2016).

#### **4.13 Síntese do acil-hidrazino-peptômero 10**

Inicialmente, em uma solução da hidrazida acil-hidrazino-peptômero 8 (0,472 mmol; 0,190 g) em 2,0 mL de trifluoroetanol (TFE) sob agitação adicionou-se 0,14 mL (1,89 mmol) da acetona. O meio reacional foi mantido sob agitação por 1 hora a temperatura ambiente para a formação da imina. Após esse tempo foram adicionados 0,035 mL (0,472 mmol) de ácido propanoico e 0,043 mL (0,472 mmol)

de isocianoacetato de metila, mantendo-se a agitação por 45 horas a temperatura ambiente. Em seguida, o solvente foi removido a vácuo e a mistura foi purificada por coluna cromatográfica ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow 8\% \text{ MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) fornecendo o produto em 60% de rendimento (0,173 g; 0,281 mmol) (BARRETO et al., 2016).

#### 4.14 Síntese do acil-hidrazino-peptômero 11

Primeiramente, em uma solução da hidrazida acil-hidrazino-peptômero 9 (0,361 mmol; 0,171 g) em 2,0 mL de trifluoroetanol (TFE) sob agitação adicionou-se 0,11 mL (1,44 mmol) de acetona. A reação foi agitada por 3 horas a temperatura ambiente para a formação da imina. Após a obtenção da imina foram adicionados 0,013 mL (0,180 mmol) de ácido propanoico e 0,016 mL (0,180 mmol) do isocianoacetato de metila mantendo-a sob agitação por 40 horas a temperatura ambiente. Em seguida a reação foi concentrada a vácuo e purificada por coluna cromatográfica ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow 8\% \text{ MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) obtendo-se o produto em 90% de rendimento (0,076 g; 0,161 mmol) (BARRETO et al., 2016).

#### 4.15 Síntese do acil-hidrazino-peptômero 12

Para a realização da hidrólise, adicionou-se a um tubo de vidro com capacidade para 10 mL, 0,205 g (0,47 mmol) do acil-hidrazino-peptômero 2 a 7,5 mL de uma solução contendo tetrahidrofurano (THF)/água (2:1, v:v) e 0,028g (1,18 mmol) de hidróxido de lítio (LiOH). Em seguida o tubo foi introduzido na cavidade de um reator micro-ondas (CEM Co., Discover) e irradiado por 5 minutos a 60°C sob agitação magnética. Após esse tempo a reação foi acidificada com solução de bissulfato de sódio ( $\text{NaHSO}_4$ , 2mol/L) a pH 2,0 e extraída com 30 mL de acetato de etila por duas vezes. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada a vácuo fornecendo o ácido **m**, sem a necessidade de purificação, em 94% de rendimento (0,185 g; 0,44 mmol) (BARRETO et al, 2016).

Em um tubo de vidro com capacidade para 10 mL, adicionou-se 0,185 g (0,44 mmol) do ácido **m** obtido na etapa anterior, 1,5 mL de metanol, 0,20 g de sulfato de sódio anidro, 0,0264 g (0,88 mmol) do paraformaldeído, 0,094 g (0,88 mmol) da benzilamina e 0,040 mL (0,44 mmol) de isocianoacetato de metila. A mistura foi inserida no interior de um reator micro-ondas (CEM Co., Discover) e irradiada por 3 minutos a 80°C sob agitação magnética. Em seguida, a mistura foi filtrada, concentrada a vácuo e purificada por coluna cromatográfica ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow 4\%$

MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) fornecendo o produto em 47% de rendimento (0,133 g; 0,207 mmol) (BARRETO et al., 2016).

#### 4.16 Síntese do acil-hidrazino-peptômero 13

A uma solução do acil-hidrazino-peptômero 3 (1,96 mmol, 0,788 g) em 69 mL tetrahidrofurano (THF)/água (2:1, v:v) adicionou-se 0,235 g (9,98 mmol) de hidróxido de lítio (LiOH) a 0°C. A reação foi agitada permanecendo-se a 0°C por 2,5 horas. Após esse tempo, a reação foi acidificada com solução de bissulfato de sódio (NaHSO<sub>4</sub>, 2mol/L) a pH 2,0 e extraída com de acetato de etila por três vezes. As fases orgânicas foram combinadas, secas com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada a vácuo fornecendo o ácido **n**, sem a necessidade de purificação, em rendimento quantitativo (0,761 g; 1,96 mmol) (BARRETO et al., 2016).

Em um tubo de vidro com capacidade para 10 mL, adicionou-se 0,633 g (1,63 mmol) do ácido **n** obtido anteriormente, 2,0 mL de metanol, 0,975 g de sulfato de sódio anidro, 0,0975 g (3,25 mmol) de paraformaldeído, 0,348 g (3,25 mmol) de benzilamina e 0,15 mL (1,63 mmol) de isocianoacetato de metila. A mistura foi inserida no interior de um reator micro-ondas (CEM Co., Discover) e irradiada por 3 minutos a 80°C sob agitação magnética. Em seguida, o reação foi filtrada, concentrada a vácuo e purificada por coluna cromatográfica (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → 4% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) fornecendo o produto em 76% de rendimento (0,748 g; 1,23 mmol) (BARRETO et al., 2016).

#### 4.17 Síntese do acil-hidrazino-peptômero 14

A uma solução do acil-hidrazino-peptômero 4 (0,803 mmol; 0,323 g) em 39 mL tetrahidrofurano (THF)/água (2:1, v:v) adicionou-se 0,096 g (0,401 mmol) de hidróxido de lítio (LiOH) a 0°C. A reação foi agitada por 2 horas mantendo-se a 0°C. Após esse tempo, a reação foi acidificada com solução de bissulfato de sódio (NaHSO<sub>4</sub>, 2 mol/L) a pH 2,0 e extraída com de acetato de etila por três vezes. As fases orgânicas foram combinadas, secas com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada a vácuo fornecendo o ácido, sem a necessidade de purificação, em 96% de rendimento (0,301 g; 0,775 mmol) (BARRETO et al., 2016).

A uma solução de benzilamina (1,55 mmol; 0,166 g) em 10 mL de metanol sob agitação foram adicionados 0,0465 g de paraformaldeído (1,55 mmol) e 0,20 g

de sulfato de sódio anidro. A reação permaneceu sob agitação por 1 hora a temperatura ambiente. Após esse tempo, adicionou-se 0,301 g (0,775 mmol) do ácido obtido na etapa anterior e após 10 minutos acrescentou-se 0,070 mL (0,775 mmol) do isocianoacetato de metila. A reação permaneceu sob agitação por 24 horas a temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi filtrada, concentrada a vácuo e purificada por coluna cromatográfica ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow 4\% \text{ MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) fornecendo o produto em 55% de rendimento (0,258 g; 0,425 mmol) (BARRETO et al., 2016).

#### **4.18 Ensaios biológicos com células *in vitro***

Para realização dos ensaios de viabilidade celular pelo método de MTT em células *in vitro* das linhagens NIH-3T3 (fibroblasto murino) e 4T1 (adenocarcinoma mamário murino) seguiu-se o protocolo padrão de cultivo de célula adotado pelo Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

##### **4.18.1 Cultivo Celular**

Inicialmente as células das linhagens NIH-3T3 e 4T1 a serem testadas *in vitro* foram cultivadas em meio DMEM (Meio Eagle Modificado por Dulbecco) e RPMI (Meio do Instituto Memorial Park Roswell), respectivamente, ambos suplementados com soro fetal (SFB) 10% (v.v) e 1% (v.v) de solução de antibiótico (100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina). As células foram então semeadas em placas de 96 poços contendo 1000 células por poço, mantendo-as incubadas por 24 horas em estufa a 37 °C e  $\text{CO}_2$  a 5%.

##### **4.18.2 Tratamento**

As células de ambas as linhagens foram expostas por 24 horas a doze concentrações diferentes de cada composto sintetizado, partindo-se da maior concentração de 450  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para a obtenção das demais concentrações foram realizadas diluições seriadas, resultando as seguintes concentrações: 225,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 112,50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 56,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 28,13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 14,06  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 7,03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 3,52  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1,75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0,87  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0,44  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 0,22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Após aplicação dos compostos as células foram novamente incubadas em estufa a 37°C e  $\text{CO}_2$  a 5%. Cada

concentração foi testada em triplicata e um grupo controle contendo apenas o meio de cultivo também foi realizado.

#### **4.18.3 Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT**

Passado o tempo de exposição, os compostos foram retirados das células e foram aplicados 150  $\mu$ L de uma solução de MTT em meio de cultivo (1:9, v:v) em cada poço e as células foram novamente incubadas em estufa a 37 °C e CO<sub>2</sub> a 5%. Após 2,5 horas de incubação a solução aplicada foi descartada e 200  $\mu$ L de DMSO (dimetilsulfóxido) foram aplicados para o rompimento das células e extração dos cristais de formazan obtidos pela atividade das desidrogenases, principalmente mitocondriais. A quantificação da viabilidade celular foi realizada a partir da leitura das placas em espectrofotômetro, onde a absorbância foi lida no comprimento de onda de 595 nm.

#### **4.19 Análise dos dados**

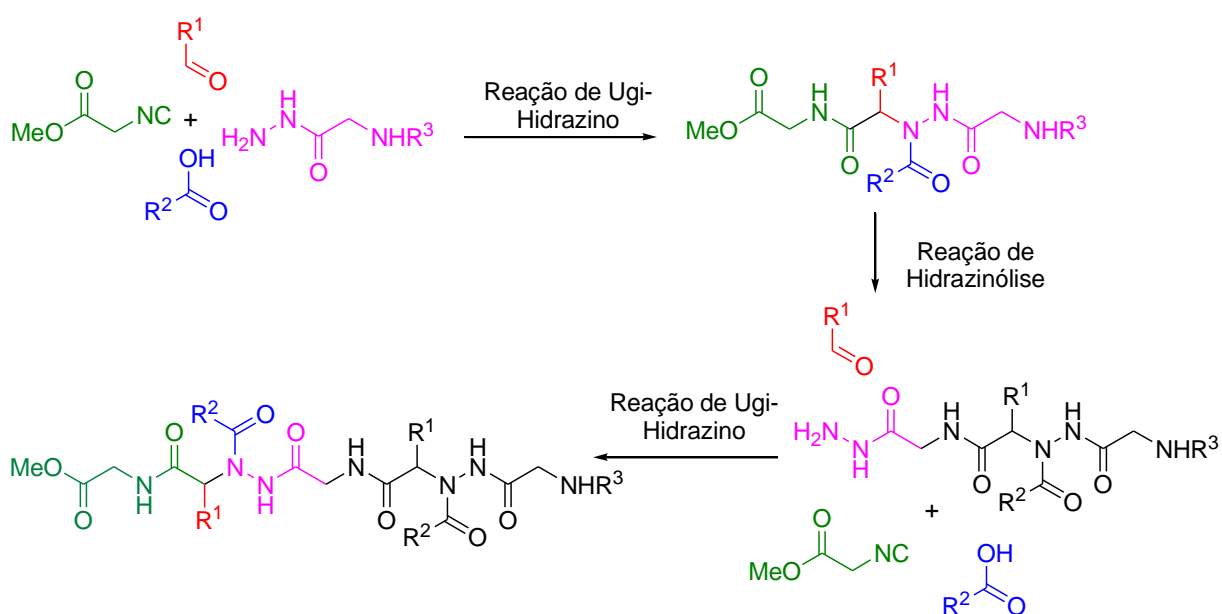
Os dados obtidos a partir dos ensaios biológicos foram analisados utilizando o programa Microsoft Excel (2013), onde a média das absorbâncias para cada concentração dos compostos testados foi normalizada pela média do grupo controle, fornecendo o valor da viabilidade celular expressos em porcentagem. Os resultados foram analisados no *software* GraphPad Prisma® 6.0 e foram submetidos a testes estatísticos específicos com significância estatística de 95% ( $p < 0,05$ ). Diferenças estatísticas foram avaliadas pelos testes Anova de duas via, aplicando pós-teste de múltiplas comparações de Tukey. Os resultados quantitativos foram descritos como média  $\pm$  erro padrão.

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

A abordagem desse trabalho para a síntese da nova classe de peptidomiméticos consistiu no uso de duas reações multicomponentes: a reação de Ugi-hidrazino e a reação clássica de Ugi (BARRETO et al., 2016). A reação clássica de Ugi é uma reação *one-pot* realizada a partir de quatro componentes básicos: uma amina, um grupo carbonílico (aldeído ou cetona), um ácido carboxílico e um

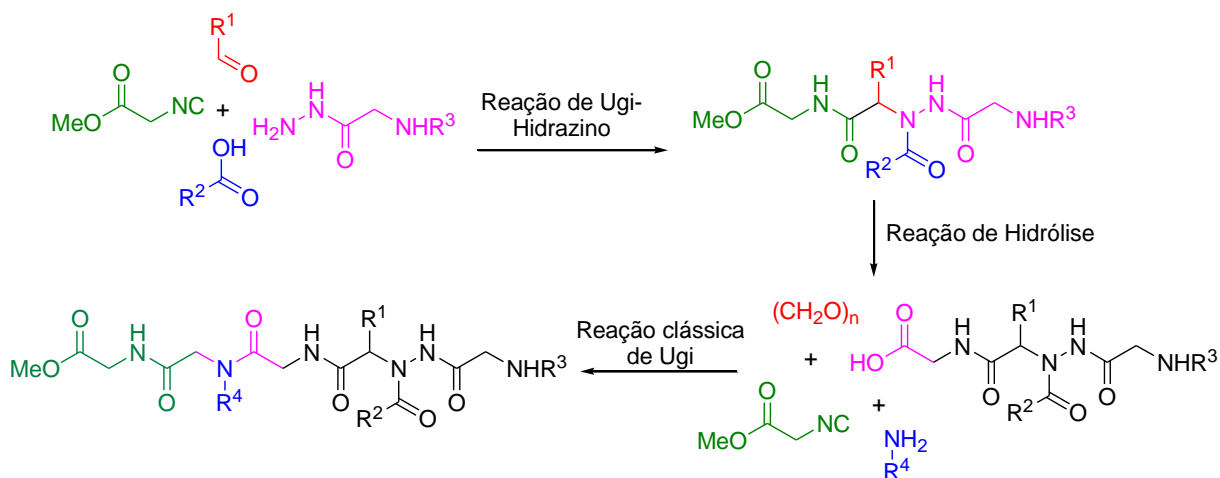
isocianeto. A reação de Ugi-hidrazino se difere da clássica devido a substituição do componente amina por uma hidrazida.

Os esquemas abaixo (esquemas 1 e 2) apresentam as rotas sintéticas adotadas para a obtenção dos peptidomiméticos propostos. Ao realizar uma primeira reação de Ugi-hidrazino obteve-se um acil-hidrazino-peptômero. A partir desse primeiro produto, duas vias sintéticas puderam ser seguidas: 1) uma posterior reação de hidrazinólise com hidrazina monohidratada para o fornecimento de uma hidrazida e uma subsequente segunda reação de Ugi-hidrazino; 2) uma reação de hidrólise com hidróxido de lítio (LiOH) resultando na formação de um ácido para uma subsequente reação clássica de Ugi. Ambas as vias resultaram na formação de acil-hidrazino-peptômeros via reação de Ugi consecutivas que consiste em uma abordagem inédita para a síntese da nova classe de peptidomimética explorada no presente trabalho.



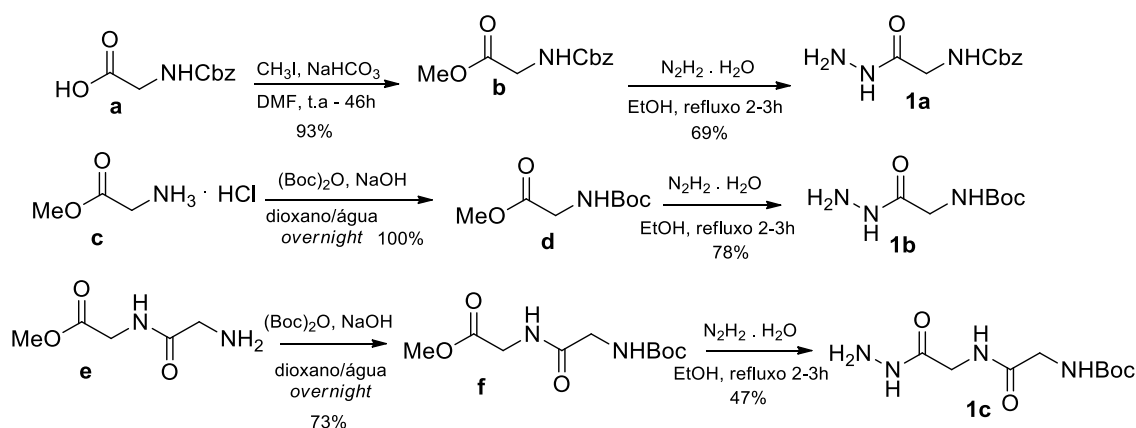
**Esquema 1.** Rota sintética 1 para obtenção de acil-hidrazino-peptômeros.





**Esquema 2.** Rota sintética 2 para obtenção de acil-hidrazino-peptômeros.

Para iniciar a síntese dos acil-hidrazino-peptômeros foi necessário primeiramente a obtenção dos materiais de partida utilizados na primeira reação multicomponente. Sendo assim, fez-se necessário a síntese das hidrazidas (esquema 3) utilizando ésteres derivados da glicina, que, ao serem submetidos a reação de hidrazinólise com hidrazida monohidratada, resultaram na formação das hidrazidas **1a-c**.

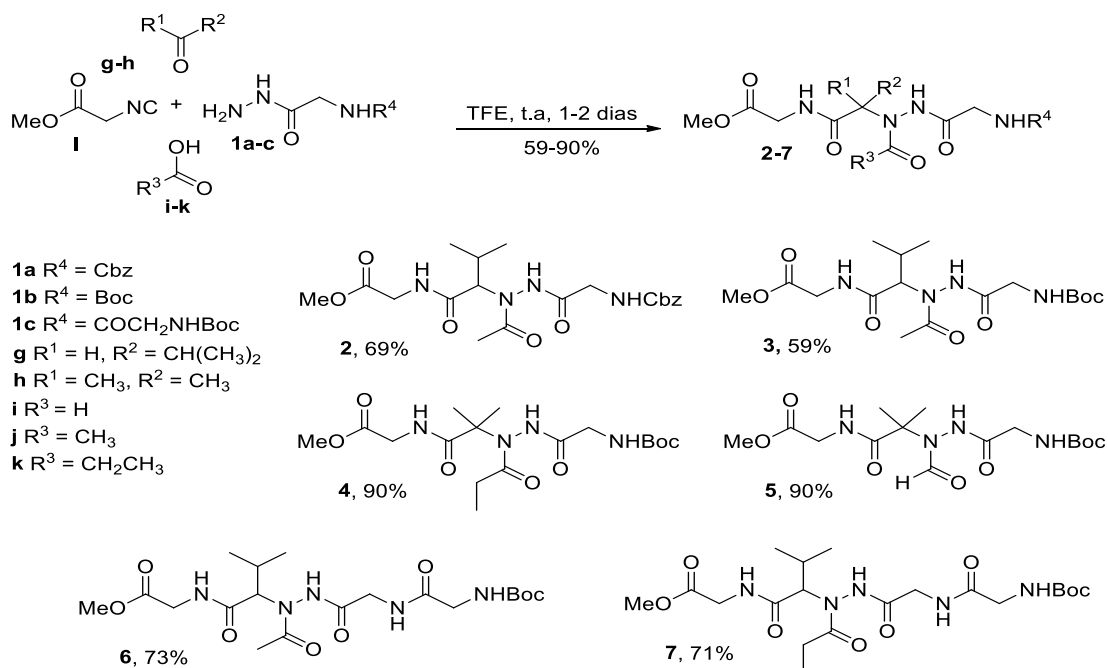


**Esquema 3.** Síntese das hidrazidas 1a-c (BARRETO et al., 2016).

Outro material de partida sintetizado foi o isocianoacetato de metila, que embora seja um reagente comercial, é mais viável economicamente realizar a sua síntese.

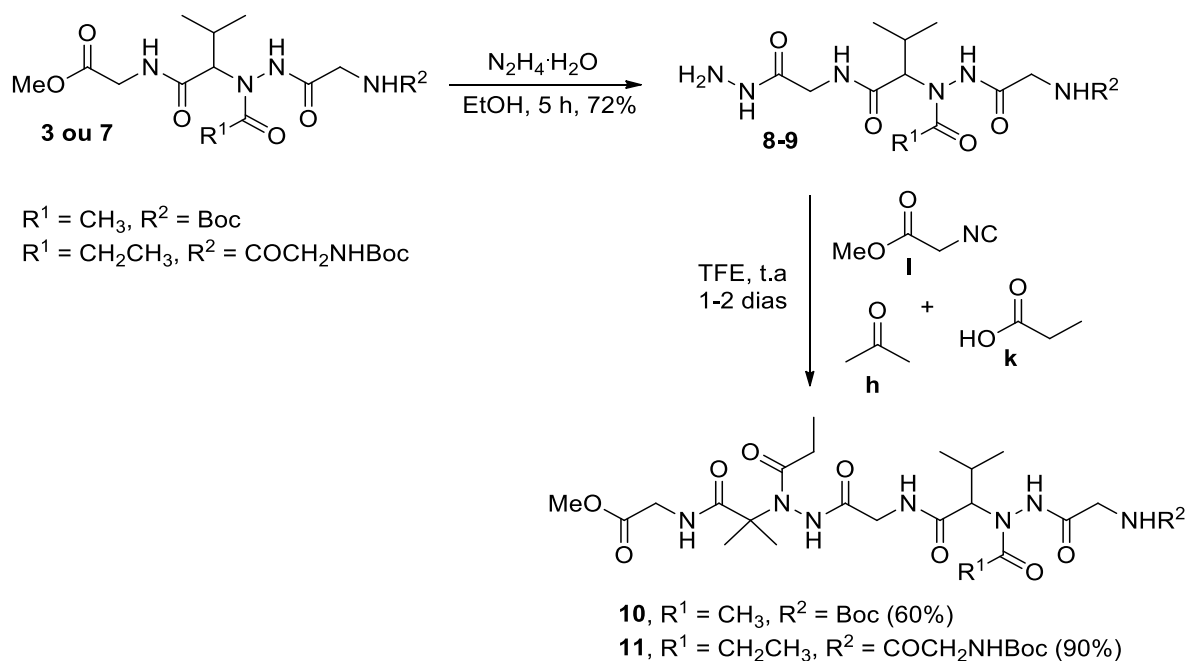
Com os materiais de partida em mãos, pôde-se dar início a síntese dos peptidomiméticos. O esquema 4 ilustra a rota sintética utilizada para a obtenção dos acil-hidrazino-peptômeros provenientes da primeira reação de Ugi-hidrazino e suas respectivas estruturas. Assim, a partir dessa reação foram obtidos seis compostos inéditos com rendimentos que variaram de moderados a excelentes (59-90%). As reações tiveram duração de 1-2 dias e foram realizadas a temperatura ambiente.

As três hidrazidas previamente sintetizadas (1a-c) foram utilizadas nessa primeira reação de Ugi-hidrazino e os componentes carbonílicos de escolha foram a acetona e o isobutiraldeído. Já os ácidos carboxílicos usados foram o ácido fórmico, acético e propanoico. Uma observação pertinente é que tentativas utilizando paraformaldeído, compostos aromáticos e ácidos graxos nessa primeira reação resultaram na formação de uma mistura complexa, impossibilitando a obtenção do produto desejado. Esse fato limita a possibilidade de formação de uma maior variedade de acil-hidrazino-peptômeros utilizando esse método. Vale ressaltar ainda que a escolha do solvente foi muito importante para o sucesso da reação, pois ao se tentar utilizar metanol como solvente – solvente comumente utilizado para reações de Ugi – houve a formação de uma mistura complexa ao invés do produto desejado. Assim, utilizando trifluoroetanol (TFE) como solvente da reação, o produto final pôde ser obtido (BARRETO et al., 2016).

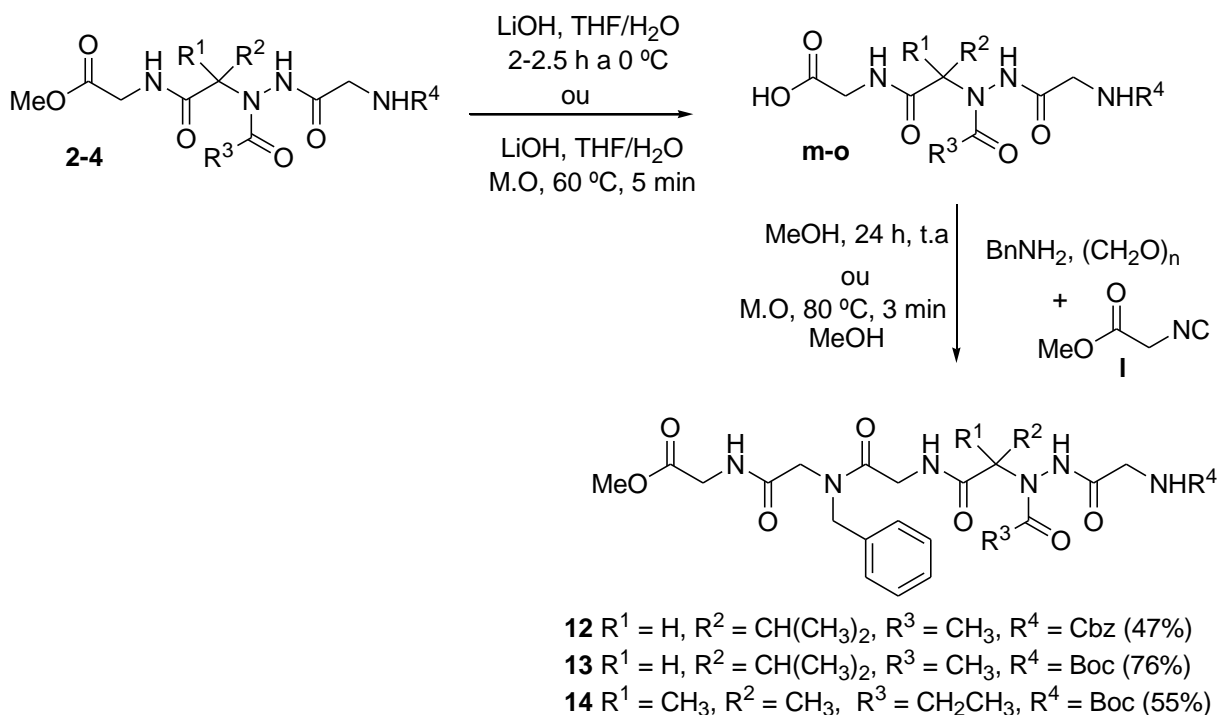


**Esquema 4.** Síntese dos acil-hidrazino-peptômeros 2-7 (BARRETO et al., 2016).

Visando a funcionalizar ainda mais as estruturas dos acil-hidrazino-peptômeros por meio do aumento do tamanho de sua cadeia principal e ramificações, os peptidomiméticos foram submetidos a uma nova reação multicomponente (reação de Ugi-hidrazino ou reação clássica de Ugi). Para isso, os acil-hidrazino-peptômeros 3 e 7 foram submetidos a reação de hidrazinólise com hidrazida monohidratada, resultando na obtenção das hidrazidas acil-hidrazino-peptômeros intermediárias (compostos 8 e 9), e subsequentemente a uma segunda reação de Ugi-hidrazino, fornecendo os acil-hidrazino-peptômeros 10 e 11, com rendimentos que variam de moderados a excelentes (60-90%). Já os acil-hidrazino-peptômeros 2-4 foram submetidos a reação de hidrólise realizada com hidróxido de lítio, resultando na obtenção dos ácidos **m-o** e posterior reação clássica de Ugi, possibilitando assim a obtenção dos acil-hidrazino-peptômeros 12-15 com moderados a bons rendimentos (47-76%). Os esquemas a seguir (esquemas 5 e 6) apresentam a rota sintética desenvolvida para a obtenção desses novos compostos (BARRETO et al, 2016).



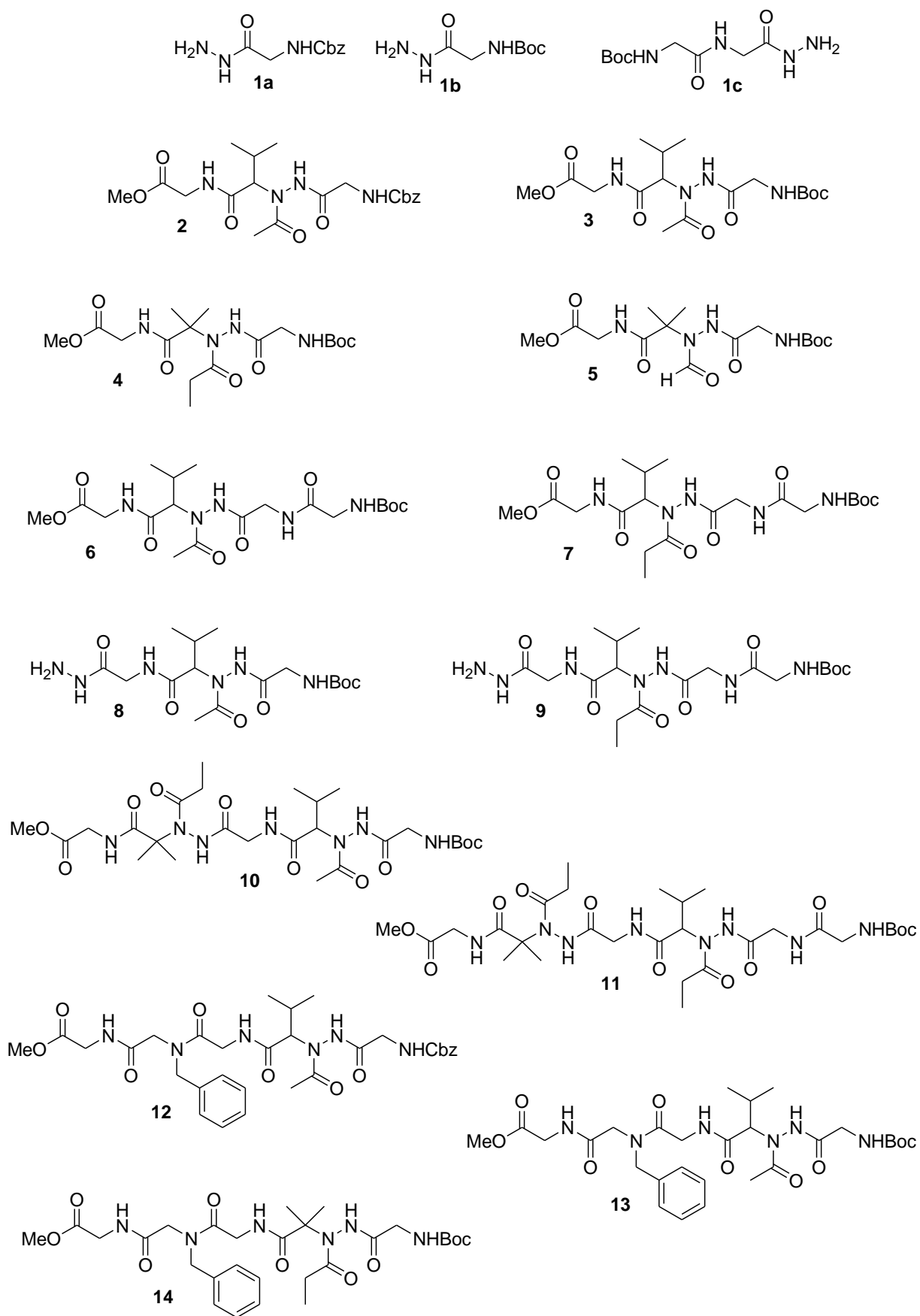
**Esquema 5.** Síntese das hidrazidas intermediárias 8-9 e acil-hidrazino-peptômeros 10-11 (BARRETO et al., 2016).



**Esquema 6.** Síntese dos ácidos intermediários e acil-hidrazino-peptômeros 12-14 (BARRETO et al., 2016).

A figura 5 ilustra a estrutura dos quatorze compostos inéditos obtidos a partir dessa abordagem, sendo que a hidrazida 1c é utilizada como intermediária para

algumas reações de primeira Ugi, os acil-hidrazino-peptômeros 2-7 são resultantes da primeira reação de Ugi-hidrazino, as hidrazidas 8 e 9 utilizadas como intermediárias, os acil-hidrazino-peptômeros 10 e 11 resultantes da segunda reação de Ugi-hidrazino e os acil-hidrazino-peptômeros 12-14 obtidos por meio da segunda reação clássica de Ugi realizada a partir de ácidos intermediários.



**Figura 5.** Estrutura de todos dos compostos sintetizados no presente trabalho.

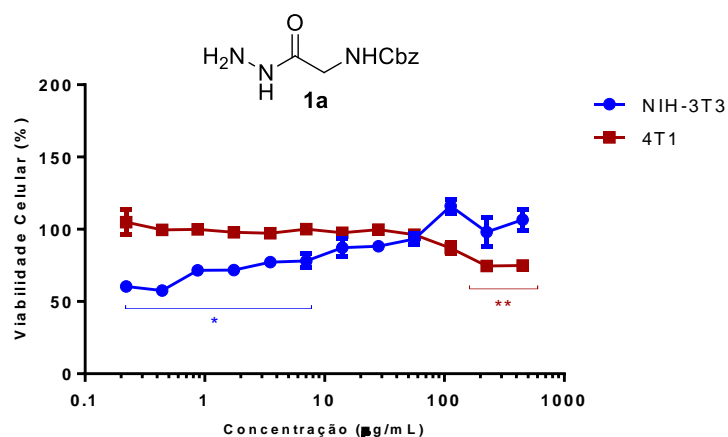
Os procedimentos para a caracterização de forma detalhada e a respectiva análise dos ensaios biológicos em células normais (NIH-3T3) e células de câncer de mama (linhagem 4T1) serão descritos a seguir.

### **5.1 Hidrazida *Cbz*-glicina (1a)**

A hidrazida *Cbz*-glicina 1a foi obtida por meio da reação de hidrazinólise com o éster *Cbz*-glicina previamente sintetizado. O produto final se apresentou no estado de um sólido branco, e seu ponto de fusão na faixa de 112-114°C e fator de retenção igual a 0,51, ao se utilizar uma solução de 15% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como fase móvel na CCD. Por não se tratar de um composto inédito e ser um intermediário da síntese, não houve a necessidade de realizar a caracterização por espectrometria de massas.

A figura 6 representa a toxicidade da *Cbz*-hidrazida 1a nas doze concentrações testadas contra linhagens NIH-3T3 e 4T1. Percebe-se que houve um comportamento curioso, pois nas concentrações mais baixas houve redução da viabilidade celular em cerca de 40% nas células NIH-3T3. Porém, ao aumentar gradativamente as concentrações, a viabilidade celular também foi aumentada.

Já na linhagem 4T1 o composto 1a não apresentou atividade significativa, pois nota-se que nas concentrações mais baixas as células continuaram com sua viabilidade celular praticamente inalterada, reduzindo cerca de 25% apenas nas duas últimas maiores concentrações. Com isso, percebe-se que esse composto não apresentou atividade anticâncer significativa nas concentrações testadas para essa linhagem.



**Figura 6.** Viabilidade de células 4T1 e NIH-3T3 expostas à hidrazida Cbz-glicina 1a por 24 horas *in vitro*. \*  $p < 0,05$  vs células NIH-3T3 controle (não tratadas). \*\*  $p < 0,05$  vs células 4T1 controle (não tratadas)

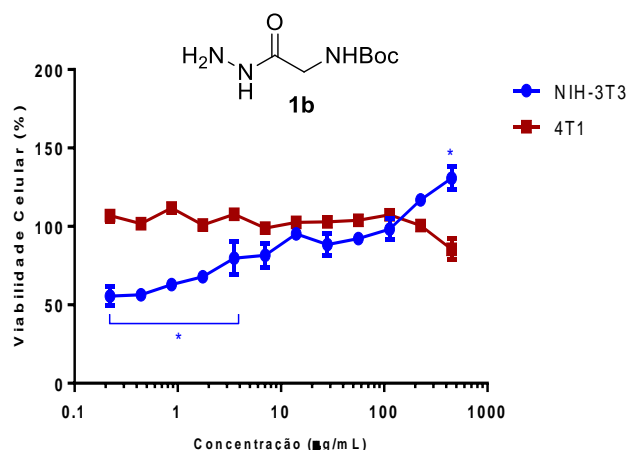
## 5.2 Hidrazida Boc-glicina (1b)

A hidrazida Boc-glicina 1b foi obtida por meio da reação de hidrazinólise com o éster Boc-glicina previamente sintetizado. O produto final se apresentou como um sólido branco, com ponto de fusão entre 105-107 °C e fator de retenção igual a 0,43 quando utilizada uma solução de 15% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como fase móvel na CCD. A caracterização por espectrometria de massas de alta resolução não foi realizada, já hidrazida Boc-glicina 1b não é um composto inédito, sendo utilizado como intermediário nas reações subsequentes e pode ser obtida comercialmente.

A figura 7 representa a viabilidade de células NIH-3T3 e 4T1 após serem expostas ao Boc-hidrazida 1b em doze concentrações testadas. Nota-se que este composto alterou a viabilidade das células NIH-3T3. Percebe-se que, ao se aplicar as menores concentrações nas células dessa linhagem, houve redução da viabilidade celular de aproximadamente 45% das células. Porém, em maiores concentrações do composto, as células tiveram sua viabilidade celular aumentada. Assim, nota-se que esse composto apresentou citotoxicidade para as células normais, porém, nas concentrações mais elevadas não houve redução da viabilidade celular.

Na linhagem 4T1 a hidrazida Boc-glicina 1b não apresentou atividade significativa, uma vez que, mesmo na concentração mais alta observou-se uma redução de apenas 15% na viabilidade celular. Sendo assim, o composto não apresentou atividade contra as células 4T1 nessas concentrações.





**Figura 7.** Viabilidade de células 4T1 e NIH-3T3 expostas à hidrazida Boc-glicina 1b por 24 horas *in vitro*. \*  $p < 0,05$  vs células NIH-3T3 controle (não tratadas).

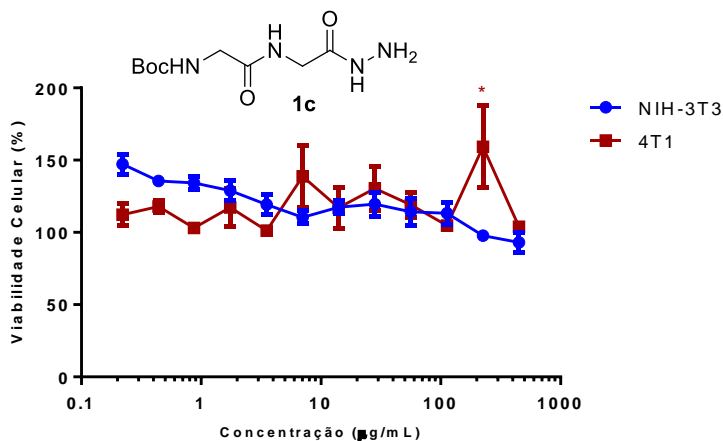
### 5.3 Boc-Hidrazida (1c)

A Boc-hidrazida 1c foi obtida por meio da reação de hidrazinólise com seu éster previamente sintetizado. O produto final, sólido branco, apresentou ponto de fusão entre 44-46°C e fator de retenção igual a 0,24, quando utilizado uma solução de 15% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como fase móvel na CCD. Embora esse composto seja inédito, não houve a necessidade de caracterização por espectrometria de massas por se tratar de um intermediário das etapas seguintes da síntese dos peptidomiméticos.

A figura 8 demonstra a viabilidade das células NIH-3T3 e 4T1 expostas ao Boc-hidrazida 1c nas doze concentrações testadas. Nota-se que as menores concentrações do composto exerceram efeito pró-proliferativa nas células NIH-3T3, aumentando a sua viabilidade celular em cerca de 50% na menor concentração de exposição (0,22 µg/mL). Ao se aumentar gradativamente a concentração do composto, percebe-se que houve a diminuição da atividade pró-proliferativa. Nas duas maiores concentrações (225,0 e 450,0 µg/mL) observou-se uma leve diminuição da viabilidade celular. Isso mostra que o composto 1c apresentou discreta citotoxicidade para células normais, porém, nas demais concentrações ele foi capaz de manter preservada a viabilidade.

Na linhagem 4T1 o composto 1c não apresentou atividade significativa, pois não houve redução da viabilidade celular mesmo na maior concentração de

exposição (450 µg/mL). O aumento da viabilidade destas células observado nas concentrações de 7,03 µg/mL e 225 µg/mL foi provocada pelo grande desvio padrão neste experimento.



**Figura 8.** Viabilidade de células 4T1 e NIH-3T3 expostas à hidrazida Boc-glicina 1c por 24 horas *in vitro*. \*  $p < 0,05$  vs células 4T1 controle (não tratadas).

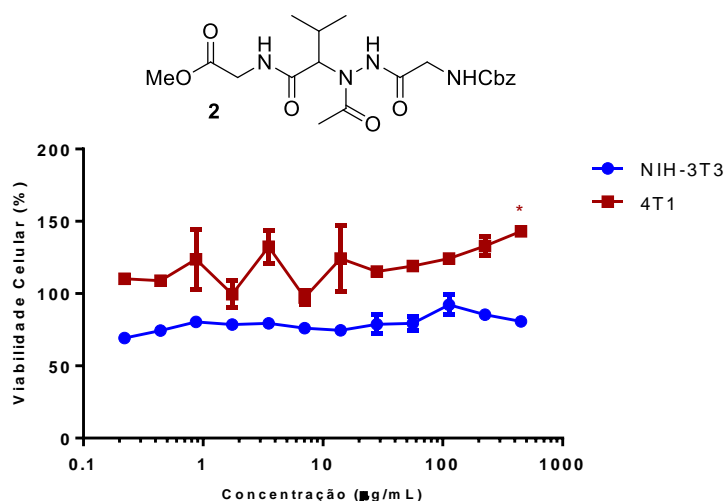
#### 5.4 Acil-hidrazino-peptômero 2

Para o preparo do acil-hidrazino-peptômero 2 utilizou-se a hidrazida Cbz-glicina **1a**, isobutiraldeído **g**, ácido acético **j** e isocianoacetato de metila **l** como reagentes de partida para a reação de Ugi-hidrazino. O produto final se apresentou na forma de um sólido bege, com ponto de fusão entre 103-105°C e fator de retenção de 0,54 quando utilizado uma solução de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/9, v:v) como fase móvel na CCD. O espectro de massas de alta resolução (espectro 1) do composto confirmou a obtenção do produto final, sendo possível observar o pico principal da razão massa/carga (m/z) do produto somada com ao íon Na<sup>+</sup> igual a 459,1848 g.mol<sup>-1</sup> e somada ao íon H<sup>+</sup> 437,2024 g.mol<sup>-1</sup> e as massas esperadas eram, respectivamente, 459,1856 g.mol<sup>-1</sup> e 437,2036 g.mol<sup>-1</sup> (BARRETO et al., 2016).

A figura 9 apresenta a viabilidade das linhagens NIH-3T3 e 4T1 ao serem expostas ao acil-hidrazino-peptômero 2 nas doze concentrações testadas. Na linhagem NIH-3T3 pôde-se perceber que, mesmo nas menores concentrações de exposição, o composto foi capaz de reduzir a viabilidade celular em aproximadamente 30%. Nas concentrações mais elevadas a viabilidade celular foi reduzida em cerca de 20%. Isso sugere que as menores concentrações foram mais

tóxicas para as células do quando comparadas com as maiores. Porém, todas as concentrações foram capaz de matar as células NIH-3T3, o que indica que o composto é citotóxico para células normais.

Na linhagem 4T1, esse composto apresentou atividade pró-proliferativa em todas as concentrações de exposição, aumentando a viabilidade celular em aproximadamente 10% na menor concentração (0,22 µg/mL) e 43% na maior concentração (450 µg/mL). Esses dados indicam que o composto não possui atividade anticâncer nessa linhagem nas concentrações testadas.



**Figura 9.** Viabilidade de células 4T1 e NIH-3T3 expostas ao acil-hidrazino-peptômero 2 por 24 horas *in vitro*. \*  $p < 0,05$  vs células 4T1 controle (não tratadas).

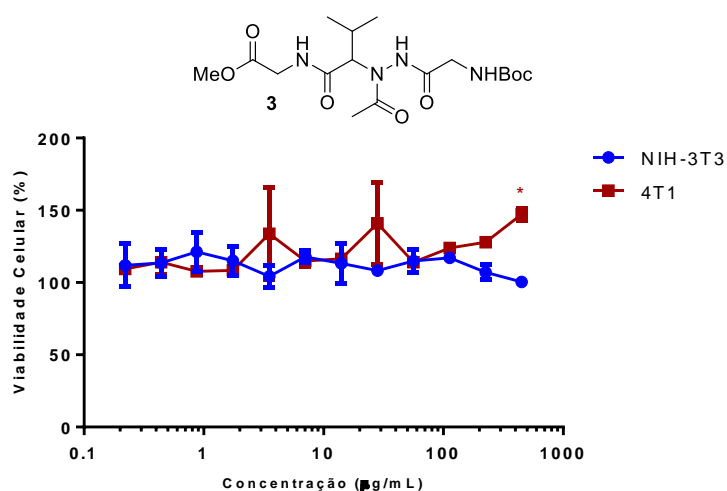
### 5.5 Acil-hidrazino-peptômero 3

Para a síntese do acil-hidrazino-peptômero 3 foi utilizado a hidrazida *Boc*-glicina **1b**, o isobutiraldeído **g**, o ácido acético **j** e o isocinoacetato de metila **l** como reagentes de partida para a reação de Ugi-hidrazino. O produto final, obtido na forma de um sólido branco, apresentou ponto de fusão entre 160-162°C e fator de retenção de 0,51 quando utilizado uma solução MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/9, v:v) como fase móvel na CCD. Através do espectro de massas de alta resolução (espectro 2) é possível perceber a confirmação da obtenção do produto esperado, onde observa-se o pico da razão massa/carga ( $m/z$ ) da soma da massa do produto com o íon Na<sup>+</sup>

sendo esse valor igual  $425,2015 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  e a massa esperada do produto somada a esse íon era de  $425,2012 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

A figura 10 representa o comportamento biológico das linhagens NIH-3T3 e 4T1 ao serem expostas ao acil-hidrazino-peptômero 3 nas doze concentrações testadas. O composto apresentou discreta atividade pró-proliferativa na linhagem NIH-3T3 em praticamente todas as concentrações de exposição. Na concentração mais elevada ( $450 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) não houve atividade pró-proliferativa, porém a viabilidade celular permaneceu em 100%. Isso pode nos indicar que o composto não apresentou citotoxicidade ao ser exposto a células normais.

Na linhagem 4T1 o peptidomimético também apresentou discreta atividade pró-proliferativa na maioria das concentrações expostas. Nota-se que especificamente nas concentrações de  $3,52 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $28,13 \mu\text{g}/\text{mL}$  e  $450,0 \mu\text{g}/\text{mL}$  houve um aumento da viabilidade celular de 33%, 40% e 47% respectivamente. Esses resultados evidenciam que esse composto não apresentou atividade contra células cancerosas nas concentrações testadas e, além disso, promoveu a proliferação celular, o que foge dos resultados esperados.



**Figura 10.** Viabilidade de células 4T1 e NIH-3T3 expostas ao acil-hidrazino-peptômero 3 por 24 horas *in vitro*. \*  $p < 0,05$  vs células 4T1 controle (não tratadas).

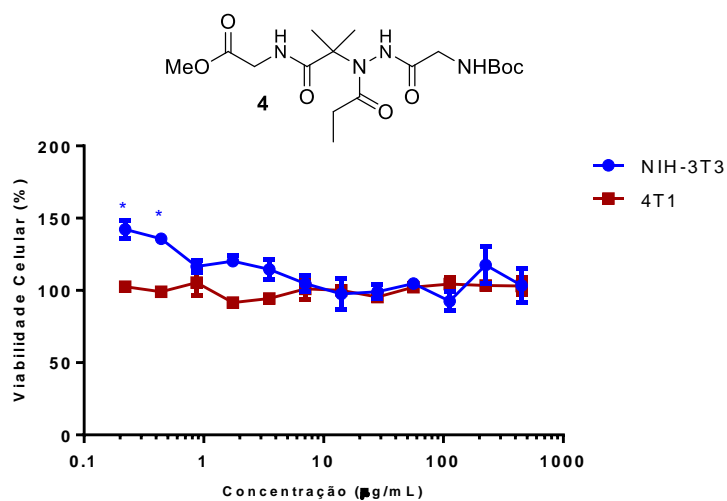
## 5.6 Acil-hidrazino-peptômero 4

Para a síntese do acil-hidrazino-peptômero 4 utilizou-se a hidrazida *Boc*-glicina **1b**, a acetona **h**, o ácido propanoico **k** e o isocianoacetato de metila **l** como

reagentes de partida para a reação de Ugi-hidrazino. O produto se apresentou na forma de um óleo viscoso amarelo claro e fator de retenção igual a 0,47 quando utilizado uma solução MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/9, v:v) como fase móvel na CCD. O espectro de massas de alta resolução (espectro 3) confirmou a formação do produto final esperado, apresentando o pico da razão massa/carga (m/z) do produto somada ao íon Na<sup>+</sup> igual 425,2013 g.mol<sup>-1</sup>. A massa esperada do produto somada a esse íon era de 425,2012 g.mol<sup>-1</sup>.

A figura 11 representa o efeito do acil-hidrazino-peptômero 4 sobre a viabilidade das linhagens NIH-3T3 e 4T1. O composto apresentou atividade pró-proliferativa sobre a linhagem NIH-3T3 em quase todas as concentrações, tornando-se mais discreta à medida que a concentração foi sendo aumentada. Nota-se que nas menores concentrações a atividade pró-proliferativa é mais intensa, onde há um aumento da viabilidade celular em aproximadamente 42% na menor concentração exposta (0,22 µg/mL). Apenas na concentração 112,5 µg/mL observou-se uma leve redução da viabilidade em aproximadamente 8%. Esses dados podem indicar que esse composto não é citotóxico para células normais nas concentrações testadas.

Na linhagem 4T1 o composto não foi capaz de reduzir a viabilidade celular de forma significativa em nenhuma das concentrações testadas. Percebe-se que a viabilidade permanece praticamente inalterada independente da concentração utilizada.



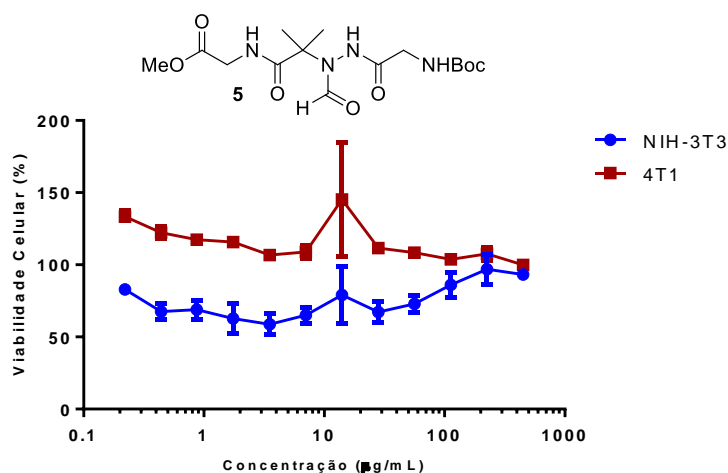
**Figura 11.** Viabilidade de células 4T1 e NIH-3T3 expostas ao acil-hidrazino-peptômero 4 por 24 horas *in vitro*. \* p<0,05 vs células NIH-3T3 controle (não tratadas).

## 5.7 Acil-hidrazino-peptômero 5

Para a obtenção do acil-hidrazino-peptômero 5 via primeira reação de Ugi-hidrazino utilizou-se a hidrazida *Boc*-glicina **1b**, a acetona **h**, o ácido fórmico **i** e o isocianoacetato de metila **l** como reagentes de partida. O produto final obtido apresentou-se na forma de um óleo viscoso amarelo claro e fator de retenção igual a 0,48 quando utilizada uma solução MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/9, v:v) como fase móvel na CCD. O espectro de massas de alta resolução (espectro 4) aponta a obtenção do produto final esperado, onde apresenta o pico da razão massa/carga (*m/z*) do produto somada ao íon Na<sup>+</sup> igual a 397,1703 g.mol<sup>-1</sup>. A massa esperada do produto somada a esse íon era de 397,1699 g.mol<sup>-1</sup>.

A figura 12 apresenta a viabilidade das linhagens NIH-3T3 e 4T1 expostas ao acil-hidrazino-peptômero 5 nas doze concentrações testadas. O composto reduziu a viabilidade celular da linhagem NIH-3T3 em todas as concentrações, sendo que as menores concentrações apresentaram maior atividade sobre a viabilidade celular, e especificamente na concentração de 3,52 µg/mL percebeu-se uma redução de aproximadamente 42%. Isso pode indicar que esse composto se apresentou citotóxico para células normais.

Na linhagem 4T1 o composto apresentou atividade pró-proliferativa, aumentando a viabilidade celular principalmente nas menores concentrações testadas. À medida que a concentração foi sendo aumentada, a atividade pró-proliferativa foi sendo reduzida gradativamente. Na menor concentração exposta (0,22 µg/mL) nota-se um aumento da viabilidade celular em cerca de 33%, enquanto que na maior concentração (450 µg/mL) a viabilidade se preservou próxima a 100%. Isso evidencia que esse composto não apresentou atividade contra essa linhagem nas concentrações testadas e que, ao contrário do resultado esperado, a molécula foi capaz de estimular a proliferação celular.



**Figura 12.** Viabilidade de células 4T1 e NIH-3T3 expostas ao acil-hidrazino-peptômero 5 por 24 horas *in vitro*.

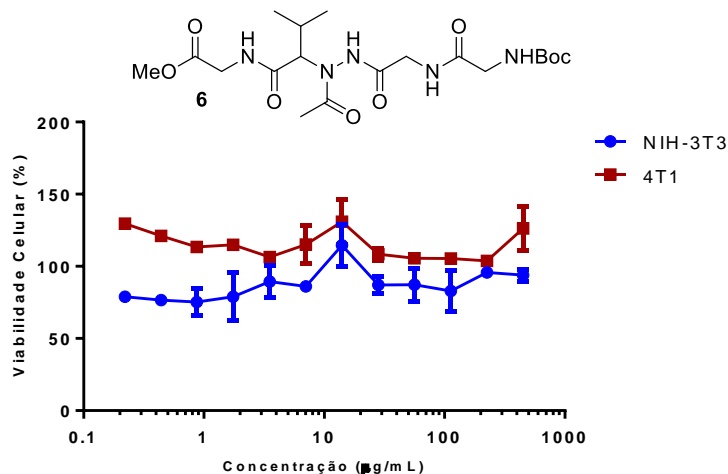
### 5.8 Acil-hidrazino-peptômero 6

A síntese do acil-hidrazino-peptômero 6 utilizou a hidrazida **1c**, o isobutiraldeído **g**, o ácido acético **j** e o isocianoacetato de metila **l** como reagentes de partida para a reação de Ugi-hidrazino. O produto final se apresentou na forma de um sólido amarelo, ponto de fusão entre 57-59°C e fator de retenção igual a 0,38 quando utilizada uma solução MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/9, v:v) como fase móvel na CCD. O espectro de massas de alta resolução (espectro 5) confirmou a obtenção do produto esperado, apresentando o pico da razão massa/carga (m/z) do produto somada ao íon Na<sup>+</sup> igual 482,2228 g.mol<sup>-1</sup>. A m/z esperada do produto somada a esse íon era de 482,2227 g.mol<sup>-1</sup>.

A figura 13 mostra a viabilidade das células da linhagens NIH-3T3 e 4T1 ao serem expostas ao acil-hidrazino-peptômero 6 nas doze concentrações testadas. Na linhagem NIH-3T3 houve redução da viabilidade celular em praticamente todas as concentrações deste composto, com exceção apenas da concentração 14,06 µg/mL que levou a um aumento de 14% da viabilidade. Este resultado evidencia que o composto foi tóxico para células normais.

Na linhagem 4T1 o composto apresentou atividade pró-proliferativa em todas as concentrações expostas havendo aumento da viabilidade celular, sendo que nas concentrações 0,22 µg/mL, 14,06 µg/mL e 450,0 µg/mL foi onde houve maior aumento de viabilidade (29%, 30% e 26% respectivamente). Isso sugere que o composto não possui atividade contra células desta linhagem nas concentrações

testadas e que, ao contrário do esperado, a molécula foi capaz de estimular a proliferação celular.



**Figura 13.** Viabilidade de células 4T1 e NIH-3T3 expostas ao acil-hidrazino-peptômero 6 por 24 horas *in vitro*.

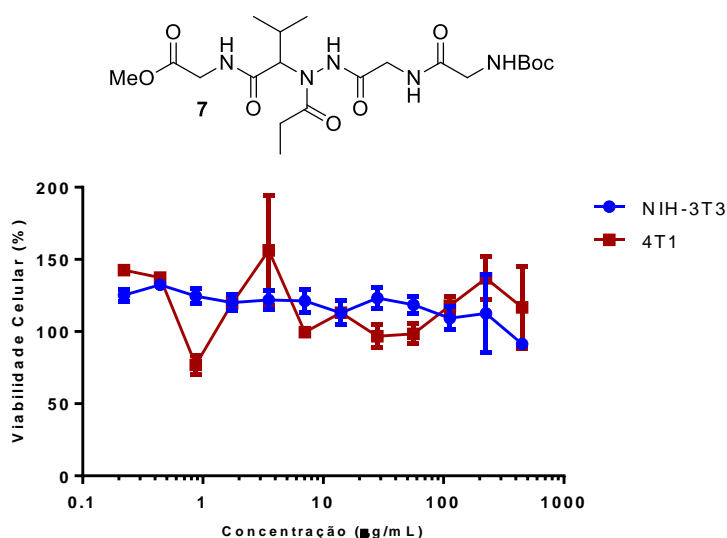
### 5.9 Acil-hidrazino-peptômero 7

Para a obtenção do acil-hidrazino-peptômero 7 foram utilizados a hidrazida **1c**, o isobutiraldeído **g**, o ácido propanoico **k** e o isocianoacetato de metila **l** como reagentes de partida para a primeira reação de Ugi-hidrazino. O produto final se apresentou na forma de um sólido amarelo claro com ponto de fusão de 53-55°C e fator de retenção igual a 0,46 quando utilizada uma solução MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/9, v:v) como fase móvel na CCD. O espectro de massas de alta resolução (espectro 6) aponta a formação do produto final esperado, onde apresenta o pico da razão massa/carga (m/z) do produto somada ao íon Na<sup>+</sup> igual 496,2383 g.mol<sup>-1</sup>. A massa esperada do produto ligado a este íon é 496,2379 g.mol<sup>-1</sup>.

A figura 14 representa o comportamento biológico das células das linhagens NIH-3T3 e 4H1 ao serem expostas ao acil-hidrazino-peptômero 7 nas doze concentrações testadas. O composto apresentou atividade pró-proliferativa na linhagem NIH-3T3 em praticamente todas as concentrações de exposição, havendo um aumento da viabilidade celular, com exceção da maior concentração (450 µg/mL), onde houve redução de aproximadamente 9%. Isso indica que o composto não é citotóxico para células normais nas concentrações testadas.



Na linhagem 4T1 o acil-hidrazino-peptômero 7 apresentou atividade pró-proliferativa em praticamente todas as concentrações testadas, pois nota-se o aumento da viabilidade celular, com algumas exceções, como na concentração 0,87 µg/mL onde pode-se perceber uma redução de cerca de 24%. Na concentração de 3,52 µg/mL a viabilidade chegou a ser aumentada em aproximadamente 56%. Esses dados podem nos inferir que o composto não apresentou atividade contra células cancerosas 4T1 nas concentrações testadas.



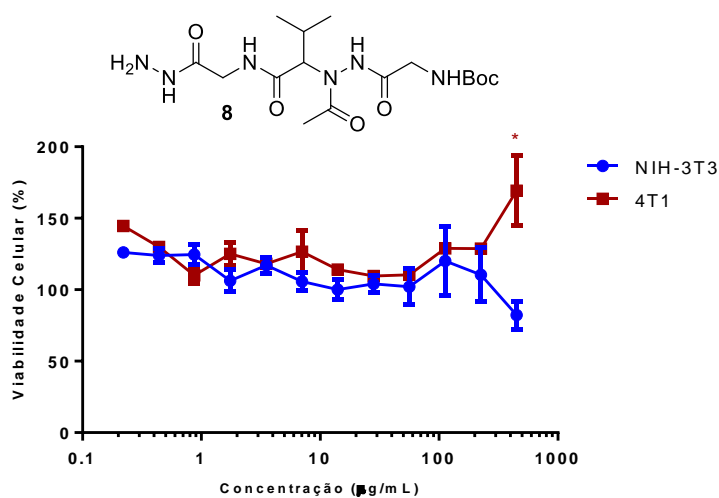
**Figura 14.** Viabilidade de células 4T1 e NIH-3T3 expostas ao acil-hidrazino-peptômero 7 por 24 horas *in vitro*.

### 5.10 Hidrazida acil-hidrazino-peptômero 8

A hidrazida acil-hidrazino-peptômero 8 foi obtida por meio de reação de hidrazinólise utilizando o acil-hidrazino-peptômero 3 previamente sintetizado. O produto final se apresentou como um sólido branco, com ponto de fusão entre 59-61°C e fator de retenção igual a 0,29 quando utilizada uma solução de 15% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como fase móvel na CCD. A caracterização por espectrometria de massas de alta resolução dessa hidrazida não foi realizada, uma vez que o composto foi utilizado como intermediário para etapas posteriores.

A figura 15 apresenta o comportamento biológico das células das linhagem NIH-3T3 e 4T1 ao serem expostos à hidrazida acil-hidrazino-peptômero 8 nas doze concentrações testadas. O composto apresentou atividade pró-proliferativa sobre a linhagem NIH-3T3 na maioria das concentrações expostas, percebendo-se um aumento da viabilidade celular, com exceção apenas da concentração mais elevada (450 µg/mL), onde houve redução de cerca de 18%.

Na linhagem 4T1 a hidrazida acil-hidrazino-peptômero 8 apresentou atividade pró-proliferativa, sendo possível perceber um aumento da viabilidade celular em todas as concentrações expostas. Nota-se que na maior concentração (450 µg/mL) houve um aumento de aproximadamente 69% da viabilidade celular, e na menor concentração (0,22 µg/mL) percebeu-se um aumento de cerca de 44%. Nas concentrações intermediárias houve uma variação. Vale ressaltar que não se observou redução significativa da viabilidade celular em nenhuma concentração, mostrando que esse composto não apresentou atividade anticâncer contra essa linhagem celular nas concentrações testadas.



**Figura 15.** Viabilidade de células 4T1 e NIH-3T3 expostas à hidrazida acil-hidrazino-peptômero 8 por 24 horas *in vitro*. \*  $p < 0,05$  vs células 4T1 controle (não tratadas).

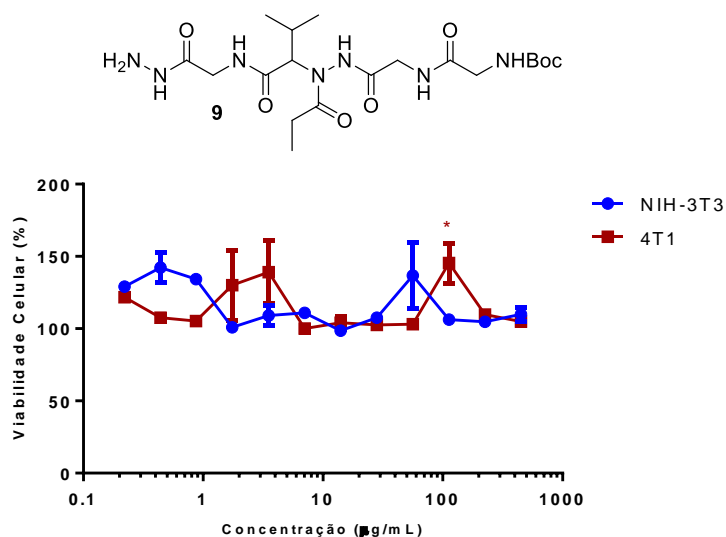
## 5.11 Hidrazida acil-hidrazino-peptômero 9

A hidrazida acil-hidrazino-peptômero 9 foi obtida por meio de reação de hidrazinólise utilizando o acil-hidrazino-peptômero 7 previamente sintetizado. O produto final se apresentou como um sólido branco, com ponto de fusão entre 101-

103°C e fator de retenção igual a 0,31 quando utilizada uma solução de 15% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como fase móvel na CCD. Para a caracterização desse composto não foi necessária a realização da espectrometria de massas de alta resolução por se tratar de um intermediário de reações posteriores.

A figura 16 ilustra o comportamento biológico das linhagens NIH-3T3 e 4T1 ao serem expostas à hidrazida acil-hidrazino-peptômero 9 nas doze concentrações testadas. O composto não foi tóxico às células da linhagem NIH-3T3 nas concentrações testadas, sendo possível perceber um aumento da viabilidade celular em algumas concentrações.

Na linhagem 4T1 a hidrazida acil-hidrazino-peptômero 9 apresentou atividade pró-proliferativa nas concentrações usadas. Foi possível perceber que nas concentrações 0,22, 1,75, 3,52 e 112,5 µg/mL houve aumento da viabilidade celular em aproximadamente 21, 30, 39 e 45%, respectivamente. Nas demais concentrações nota-se uma atividade discreta. Observou-se ainda que não houve redução da viabilidade celular em nenhuma concentração de exposição, mostrando que este composto não é citotóxico contra as células cancerosas 4T1.

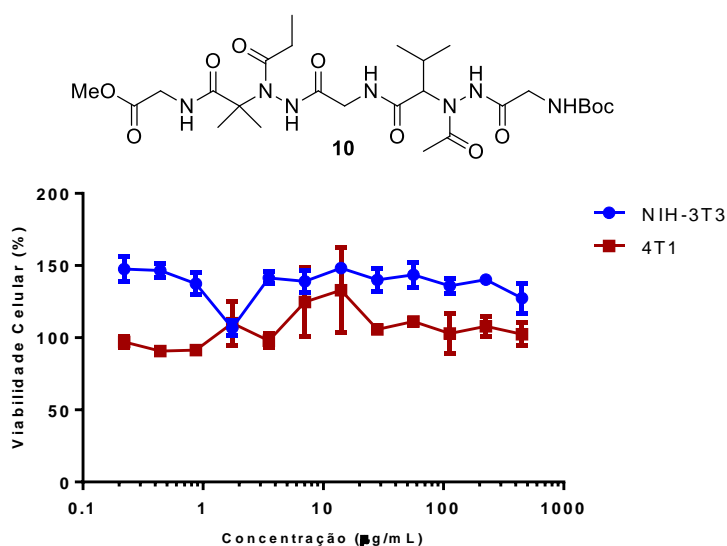


**Figura 16.** Viabilidade de células 4T1 e NIH-3T3 expostas à hidrazida acil-hidrazino-peptômero 9 por 24 horas *in vitro*. \*  $p < 0,05$  vs células 4T1 controle (não tratadas).

## 5.12 Acil-hidrazino-peptômero 10

Para a síntese do acil-hidrazino-peptômero 10 utilizou-se a hidrazida acil-hidrazino-peptômero **8** previamente sintetizada, a acetona **h**, o ácido propanoico **k** e o isocianoacetato de metila **l** como reagentes de partida para a segunda reação de Ugi-hidrazino. O produto final se apresentou como um sólido amarelo, com ponto de fusão entre 118-120°C e fator de retenção igual a 0,48 quando utilizada uma solução MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/9, v:v) como fase móvel na CCD. O espectro de massas de alta resolução (espectro 7) confirmou a formação do produto final esperado, apresentando o pico da razão massa/carga (m/z) do produto somada ao íon Na<sup>+</sup> igual a 638,3115 g.mol<sup>-1</sup>. A massa esperada do produto somada a esse íon era de 638,3126 g.mol<sup>-1</sup>.

A figura 17 mostra o comportamento biológico das linhagens NIH-3T3 e 4T1 ao seres expostas ao acil-hidrazino-peptômero 10 nas doze concentrações testadas. O composto apresentou atividade pró-proliferativa na linhagem NIH-3T3, sendo possível perceber um aumento da viabilidade celular em todas as concentrações testadas. Esses dados evidenciam que o composto não apresentou citotoxicidade para células normais nas concentrações testadas. Ainda, o acil-hidrazino-peptômero 10 não foi significativamente citotóxico contra células 4T1.

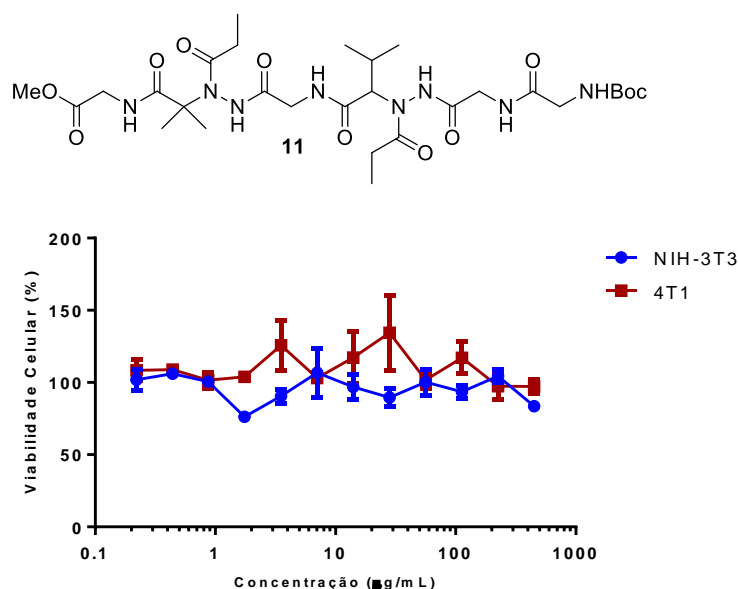


**Figura 17.** Viabilidade de células 4T1 e NIH-3T3 expostas ao acil-hidrazino-peptômero 10 por 24 horas *in vitro*.

### 5.13 Acil-hidrazino-peptômero 11

Para a obtenção do acil-hidrazino-peptômero 11 foram utilizados a hidrazida acil-hidrazino-peptômero **9** previamente sintetizada, a acetona **h**, o ácido propanoico **k** e o isocianoacetato de metila **l** como reagentes de partida para a segunda reação de Ugi-hidrazino. O produto final se apresentou como um sólido amarelo com ponto de fusão entre 107-109°C e fator de retenção igual a 0,39 quando utilizada uma solução MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/9, v:v) como fase móvel na CCD. O espectro de massas de alta resolução (espectro 8) indicou a confirmação do produto esperado, sendo possível observar o pico principal da razão massa/carga (m/z) do produto somada ao íon Na<sup>+</sup> igual 709,3495 g.mol<sup>-1</sup> e a massa esperada do produto somada a esse íon era de 709,3497 g.mol<sup>-1</sup>.

A figura 18 mostra que o acil-hidrazino-peptômero 11 não apresentou citotoxicidade para células normais. Ainda, na linhagem 4T1 o acil-hidrazino-peptômero 11 apresentou atividade pró-proliferativa variável, a depender da concentração utilizada. A partir disso pode-se inferir que o composto não apresenta atividade citotóxica contra as células 4T1.

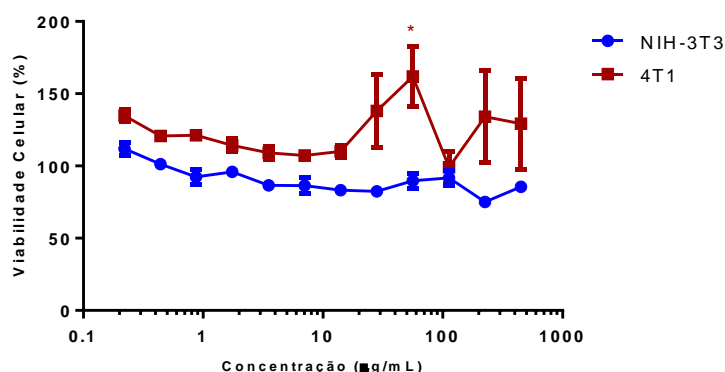
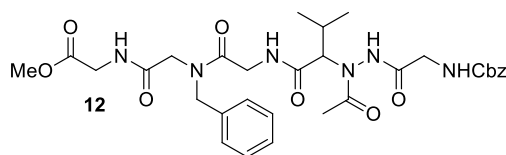


**Figura 18.** Viabilidade de células 4T1 e NIH-3T3 expostas ao acil-hidrazino-peptômero 11 por 24 horas *in vitro*.

#### 5.14 Acil-hidrazino-peptômero 12

Para a síntese do acil-hidrazino-peptômero 12 foi realizada a reação clássica de Ugi, utilizando o ácido **m** obtido por meio da hidrólise do acil-hidrazino-peptômero 2 previamente sintetizado, o paraformaldeído, a benzilamina e o isocianoacetato de metila **I** como reagentes de partida da reação. O produto final se apresentou na forma de um sólido amarelo, com ponto de fusão entre 87-89°C e fator de retenção igual a 0,53 quando utilizada uma solução MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/9, v:v) como fase móvel na CCD. O espectro de massas de alta resolução (espectro 9) confirmou a formação do produto final esperado, sendo possível observar o pico principal da razão massa/carga (m/z) do produto somada ao íon Na<sup>+</sup> igual a 663,2755 g.mol<sup>-1</sup>. A massa esperada do produto somada a esse íon era de 663,2754 g.mol<sup>-1</sup>.

A figura 19 demonstra o comportamento biológico das linhagens NIH-3T3 e 4T1 ao serem expostas ao acil-hidrazino-peptômero 12 nas doze concentrações testadas. O composto não apresentou citotoxicidade significativa contra células normais. Já na linhagem 4T1, o acil-hidrazino-peptômero 12 exerceu atividade pró-proliferativa em todas as concentrações testadas, sendo possível perceber o aumento da viabilidade celular. Nota-se que mesmo na menor concentração (0,22 µg/mL) houve um aumento de aproximadamente 33% e a medida que a concentração foi sendo aumentada, percebeu-se decréscimo da viabilidade. Porém, nas concentrações 28,13, 56,25, 225,0 e 450,0 observou-se novamente o aumento da viabilidade celular em aproximadamente 38, 61, 34 e 29%. Com isso pode-se inferir que o composto 12 não é citotóxico contra células cancerosas 4T1.

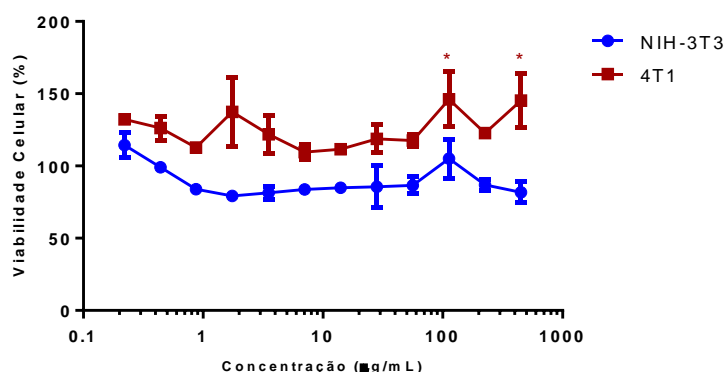
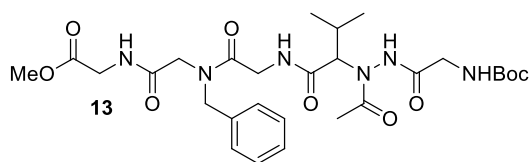


**Figura 19.** Viabilidade de células 4T1 e NIH-3T3 expostas ao acil-hidrazino-peptômero 12 por 24 horas *in vitro*. \*  $p < 0,05$  vs células 4T1 controle (não tratadas).

### 5.15 Acil-hidrazino-peptômero 13

Para a obtenção do acil-hidrazino-peptômero 13 foi realizada a reação clássica de Ugi utilizando, como reagentes de partida o ácido **n** obtido por meio da hidrólise do acil-hidrazino-peptômero 3, o paraformaldeído, a benzilamina e o isocianoacetato de metila **I**. O produto final se apresentou na forma de um sólido amarelo, ponto de fusão entre 79-81°C e fator de retenção igual a 0,53 quando utilizada uma solução de 15% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como fase móvel na CCD. O espectro de massas de alta resolução (espectro 10) comprovou a formação do produto final esperado, onde é possível observar o pico principal da razão massa/carga ( $m/z$ ) do produto somada ao íon Na<sup>+</sup> igual 629,2905 g.mol<sup>-1</sup>. A massa esperada do produto somada a esse íon era de 629,2911 g.mol<sup>-1</sup>.

A figura 20 apresenta o comportamento biológico das linhagens NIH-3T3 e 4T1 ao serem expostas ao acil-hidrazino-peptômero 13 nas doze concentrações testadas. Não houve citotoxicidade significativa contra as células NIH-3T3. Em células 4T1, foi observado um aumento da viabilidade celular em todas as concentrações testadas sem, no entanto, ser observada uma resposta celular proporcional às concentrações usadas.



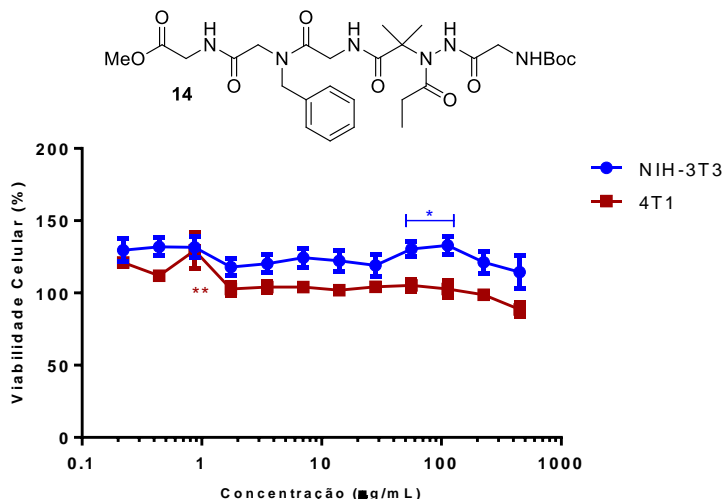
**Figura 20.** Viabilidade de células 4T1 e NIH-3T3 expostas ao acil-hidrazino-peptômero 13 por 24 horas *in vitro*. \*  $p < 0,05$  vs células 4T1 controle (não tratadas).

### 5.16 Acil-hidrazino-peptômero 14

Para a obtenção do acil-hidrazino-peptômero 14 foram utilizados o ácido o obtido por meio da hidrólise do acil-hidrazino-peptômero 4 previamente sintetizado, o paraformaldeído, a benzilamina e o isocianoacetato de metila I como reagentes de partida para a reação clássica de Ugi. O produto final apresentou-se na forma de um sólido amarelo, com ponto de fusão entre 84-86°C e fator de retenção igual a 0,44 quando utilizada uma solução MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/9, v:v) como fase móvel na CCD. O espectro de massas de alta resolução (espectro 11) constatou a formação do produto final esperado, onde é possível observar o pico principal da razão massa/carga ( $m/z$ ) do produto somada ao íon Na<sup>+</sup> igual 629,2903 g.mol<sup>-1</sup>. A massa esperada do produto somada a esse íon era de 629,2911 g.mol<sup>-1</sup>.

A figura 21 demonstra o comportamento biológico das linhagens NIH-3T3 e 4T1 ao serem expostas ao acil-hidrazino-peptômero 14. O composto aumentou a viabilidade tanto das células NIH-3T3 quanto das células 4T1, em todas as concentrações testadas, mas sem ser evidenciada qualquer tendência de variação da viabilidade proporcional às concentrações testadas.





**Figura 21.** Viabilidade de células 4T1 e NIH-3T3 expostas ao acil-hidrazino-peptômero 14 por 24 horas *in vitro*. \*  $p < 0,05$  vs células NIH-3T3 controle (não tratadas). \*\*  $p < 0,05$  vs células 4T1 controle (não tratadas).

Após a análise detalhada foi possível observar que a maioria dos compostos não apresentaram citotoxicidade para ambas as linhagens, porém, alguns desses apresentaram atividade pró-proliferativa. Esse fato poderia ser justificado devido a característica hidrofóbica que esses compostos apresentam por não serem solúveis em água, o que resultaria na agregação desses compostos às células e, conseqüentemente, o aumento da viabilidade celular. Uma outra hipótese que poderia ser levantada para esse comportamento seria a possibilidade desses compostos servirem como fonte de energia metabólica para as células e isso resultaria no aumento da proliferação celular. Sendo assim, para investigar a fundo essa atividade, mais ensaios biológicos são necessários e verificar esse comportamento.

Tendo visto os aspectos individuais de cada peptidomimético e seus intermediários, a tabela abaixo resume a caracterização de todos os compostos sintetizados nesse trabalho.

**Tabela 1.** Visão geral das características dos compostos sintetizados.

Composto	Estado físico	Ponto de fusão	Fator de Retenção
Hidrazida <i>Cbz</i> -glicina 1a	Sólido branco	112-114°C	0,51
Hidrazida <i>Boc</i> -glicina 1b	Sólido branco	105-107°C	0,43

<i>Boc</i> -hidrazida 1c	Sólido branco	44-46°C	0,24
Acil-hidrazino-peptômero 2	Sólido bege	103-105°C	0,54
Acil-hidrazino-peptômero 3	Sólido branco	160-162°C	0,51
Acil-hidrazino-peptômero 4	Óleo viscoso amarelo claro	-	0,47
Acil-hidrazino-peptômero 5	Óleo viscoso amarelo claro	-	0,48
Acil-hidrazino-peptômero 6	Sólido amarelo	57-59°C	0,38
Acil-hidrazino-peptômero 7	Sólido amarelo claro	53-55°C	0,46
Hidrazida acil-hidrazino-peptômero 8	Sólido branco	59-61°C	0,29
Hidrazida acil-hidrazino-peptômero 9	Sólido branco	101-103°C	0,31
Acil-hidrazino-peptômero 10	Sólido amarelo	118-120°C	0,48
Acil-hidrazino-peptômero 11	Sólido amarelo	107-109°C	0,39
Acil-hidrazino-peptômero 12	Sólido amarelo	87-89°C	0,53
Acil-hidrazino-peptômero 13	Sólido amarelo	79-81°C	0,53
Acil-hidrazino-peptômero 14	Sólido amarelo	84-86°C	0,44

## 6. CONCLUSÃO

Esse trabalho reporta uma nova abordagem para a síntese de acil-hidrazino-peptômeros via reações de Ugi consecutivas. A rota geral sintética pode ser considerada de simples execução, além de ser composta por um número reduzido de etapas, permitindo a obtenção de peptidomiméticos funcionalizados com altos rendimentos. Porém, existem algumas condições que limitam a obtenção de uma vasta variedade de acil-hidrazino-peptômeros, como o uso de ácidos graxos e substratos aromáticos, que resultam na formação de uma mistura complexa ao invés do produto desejado.

Os compostos sintetizados podem ser ainda mais funcionalizados por meio de novas reações de Ugi-hidrazino ou reação clássica de Ugi que visam a aumentar a sua cadeia principal. Esses peptidomiméticos podem ser submetidos a uma nova reação de hidrólise para a formação de um ácido, uma outra reação hidrazinólise para a formação de uma nova hidrazida ou também até mesmo a remoção do grupo

protetor para expor a porção amina da cadeia. Todos esses passos podem ser facilmente executados.

Os ensaios biológicos pelo método de MTT possibilitaram verificar que a maioria dos compostos não são citotóxicos contra células NIH-3T3 nem contra células 4T1. A atividade pró-proliferativa observada para alguns compostos deve ser melhor investigada para que se entenda tal comportamento ou pode ser um artefato de análise, já que não houve, em geral, uma resposta biológica dependente da concentração dos compostos, como esperado para moléculas bioativas.

Com isso, conclui-se que, embora os métodos de síntese empregados neste trabalho tenham sido desenvolvidas e aplicadas com sucesso, outros ensaios biológicos devem ser realizados para verificar se estes compostos podem ser empregados com outros fins.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRETO, Angélica de Fátima S et al. Consecutive isocyanide-based multicomponent reactions: synthesis of cyclic pentadepsipeptoids. **Beilstein Journal Of Organic Chemistry**, [s.l.], v. 10, p.1017-1022, 5 maio 2014.

BARRETO, Angélica de Fátima S. et al. Fast and efficient microwave-assisted synthesis of functionalized peptoids via Ugi reactions. **Organic & Biomolecular Chemistry**, [s.l.], v. 9, n. 14, p.5024-5017, 2011.

BARRETO, Angélica de Fátima S; SANTOS, Veronica Alves dos; ANDRADE, Carlos Kleber Z. Synthesis of acylhydrazino-peptomers, a new class of peptidomimetics, by consecutive Ugi and hydrazino-Ugi reactions. **Beilstein Journal Of Organic Chemistry**, [s.l.], v. 12, p.2865-2872, 27 dez. 2016.

BOUGET, Karine et al. Hydrazino-aza and N-azapeptoids with therapeutic potential as anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 11, n. 23, p.4881-4889, nov. 2003.

BUSHKOVA, Ekaterina; PARCHINSKY, Vladislav; KRASAVIN, Mikhail. Efficient entry into hydrazinopeptide-like structures via sequential Ugi reactions. **Molecular Diversity**, [s.l.], v. 14, n. 3, p.493-499, 10 nov. 2009.

CHEGUILLAUME, Arnaud et al. Submonomer Solution Synthesis of Hydrazinoazapeptoids, a New Class of Pseudopeptides. **The Journal Of Organic Chemistry**, [s.l.], v. 64, n. 8, p.2924-2927, abr. 1999.

CONSTABEL, Friederike; UGI, Ivar. Repetitive Ugi reactions. **Tetrahedron**, [s.l.], v. 57, n. 27, p.5785-5789, jul. 2001.

EKICI, Özlem Doğan et al. Design, Synthesis, and Evaluation of Aza-Peptide Michael Acceptors as Selective and Potent Inhibitors of Caspases-2, -3, -6, -7, -8, -9, and -10. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 49, n. 19, p.5728-5749, set. 2006.

FOWLER, Sarah A.; STACY, Danielle M.; BLACKWELL, Helen E.. Design and Synthesis of Macrocyclic Peptomers as Mimics of a Quorum Sensing Signal

from *Staphylococcus aureus*. **Organic Letters**, [s.l.], v. 10, n. 12, p.2329-2332, jun. 2008.

GANGLOFF, Niklas et al. Peptoids and Polypeptoids at the Frontier of Supra- and Macromolecular Engineering. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 116, n. 4, p.1753-1802, 24 fev. 2016.

GANTE, Joachim. Azapeptides, A Novel Class of Peptide Analogs. **Angewandte Chemie International Edition In English**, [s.l.], v. 9, n. 10, p.813-813, out. 1970.

HOSKIN, David W.; RAMAMOORTHY, Ayyalusamy. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Biomembranes**, [s.l.], v. 1778, n. 2, p.357-375, fev. 2008.

KESSLER, Horst. Peptoids—A New Approach to the Development of Pharmaceuticals. **Angewandte Chemie International Edition In English**, [s.l.], v. 32, n. 4, p.543-544, abr. 1993.

KLOSTERMAN, H. J.; LAMOUREUX, G. L.; PARSONS, J. L.. Isolation, Characterization, and Synthesis of Linatine. A Vitamin B6 Antagonist from Flaxseed (*Linum usitatissimum*)\*. **Biochemistry**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.170-177, jan. 1967.

KONDO, Shinichi et al. Negamycin, a novel hydrazide antibiotic. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 93, n. 23, p.6305-6306, nov. 1971.

KRASAVIN, Mikhail et al. Hydrazinopeptide Motifs Synthesized via the Ugi Reaction: An Insight into the Secondary Structure. **Synthesis**, [s.l.], v. 2010, n. 06, p.933-942, 25 jan. 2010.

LAKONTSEVA, Ekaterina; KRASAVIN, Mikhail. Diversity-oriented pyrazol-3-one synthesis based on hydrazinodipeptide-like units prepared via the Ugi reaction. **Tetrahedron Letters**, [s.l.], v. 51, n. 31, p.4095-4099, ago. 2010.

LAURENCIN, Mathieu et al. From a Marine Neuropeptide to Antimicrobial Pseudopeptides Containing Aza- $\beta$ -Amino Acids: Structure and Activity. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 55, n. 5, p.2025-2034, 8 mar. 2012.

LEE, Jiyoun et al. Prostate tumor specific peptide-peptoid hybrid prodrugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 25, n. 14, p.2849-2852, jul. 2015.

MACHADO, Alessandra et al. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, [s.l.], v. 27, n. 5, p.781-789, out. 2004.

MORA, Puig et al. Identification from a Positional Scanning Peptoid Library of in Vivo Active Compounds That Neutralize Bacterial Endotoxins. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 48, n. 4, p.1265-1268, fev. 2005.

ØSTERGAARD, Søren; HOLM, Arne. Peptomers: A versatile approach for the preparation of diverse combinatorial peptidomimetic bead libraries. **Molecular Diversity**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.17-27, 1997.

OVADIA, Oded et al. The effect of backbone cyclization on PK/PD properties of bioactive peptide-peptoid hybrids: The melanocortin agonist paradigm. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 18, n. 2, p.580-589, jan. 2010.

PANDA, Siva S. et al. Syntheses of Hydrazino Peptides and Conjugates. **European Journal Of Organic Chemistry**, [s.l.], v. 2013, n. 19, p.4156-4162, 16 maio 2013.

PAPO, N.; SHAI, Y.. Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. **Cmls Cellular And Molecular Life Sciences**, [s.l.], v. 62, n. 7-8, p.784-790, abr. 2005.

PAPO, Niv; SHAI, Yechiel. New Lytic Peptides Based on the d,l-Amphipathic Helix Motif Preferentially Kill Tumor Cells Compared to Normal Cells†. **Biochemistry**, [s.l.], v. 42, n. 31, p.9346-9354, ago. 2003.

PICCHI, Douglas Gatte et al. Peptídeos cíclicos de biomassa vegetal: características, diversidade, biossíntese e atividades biológicas. **Química Nova**, [s.l.], v. 32, n. 5, p.1262-1277, 2009.

PROULX, Caroline et al. Azapeptides and their therapeutic potential. **Future Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 3, n. 9, p.1139-1164, jul. 2011.

SABLE, Rushikesh; PARAJULI, Pravin; JOIS, Seetharama. Peptides, Peptidomimetics, and Polypeptides from Marine Sources: A Wealth of Natural Sources for Pharmaceutical Applications. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 15, n. 4, p.124-161, 22 abr. 2017.

SARMA, Bani Kanta; KODADEK, Thomas. Submonomer Synthesis of A Hybrid Peptoid–Azapeptoid Library. **Acs Combinatorial Science**, [s.l.], v. 14, n. 10, p.558-564, 8 out. 2012.

SARMA, Bani Kanta; LIU, Xiaodan; KODADEK, Thomas. Identification of selective covalent inhibitors of platelet activating factor acetylhydrolase 1B2 from the screening of an oxadiazolone-capped peptoid–azapeptoid hybrid library. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 24, n. 17, p.3953-3963, set. 2016.

SARMA, Bani Kanta; YOUSUFUDDIN, Muhammed; KODADEK, Thomas. Acyl hydrazides as peptoid sub-monomers. **Chemical Communications**, [s.l.], v. 47, n. 38, p.10590-10592, 2011. Royal Society of Chemistry (RSC).

STAWIKOWSKI, Maciej et al. Examples of Peptide-Peptoid Hybrid Serine Protease Inhibitors Based on the Trypsin Inhibitor SFTI-1 with Complete Protease Resistance at the P1□P1' Reactive Site. **ChemBiochem**, [s.l.], v. 6, n. 6, p.1057-1061, 10 maio 2005.

SUN, Jing; ZUCKERMANN, Ronald N.. Peptoid Polymers: A Highly Designable Bioinspired Material. **Acs Nano**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.4715-4732, 25 jun. 2013.

UDUGAMASOORIYA, D. Gomika et al. A Peptoid “Antibody Surrogate” That Antagonizes VEGF Receptor 2 Activity. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 130, n. 17, p.5744-5752, abr. 2008.

VERCILLO, Otilie E.; ANDRADE, Carlos Kleber Z.; WESSJOHANN, Ludger A.. Design and Synthesis of Cyclic RGD Pentapeptoids by Consecutive Ugi Reactions. **Organic Letters**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.205-208, jan. 2008.

WESSJOHANN, Ludger A.; RIVERA, Daniel G.; VERCILLO, Otilie E.. Multiple Multicomponent Macrocyclizations (MiBs): A Strategic Development Toward Macrocycle Diversity. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 109, n. 2, p.796-814, 11 fev. 2009.

WRENN, S. Jarrett et al. Synthetic Ligands Discovered by in Vitro Selection. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 129, n. 43, p.13137-13143, out. 2007.

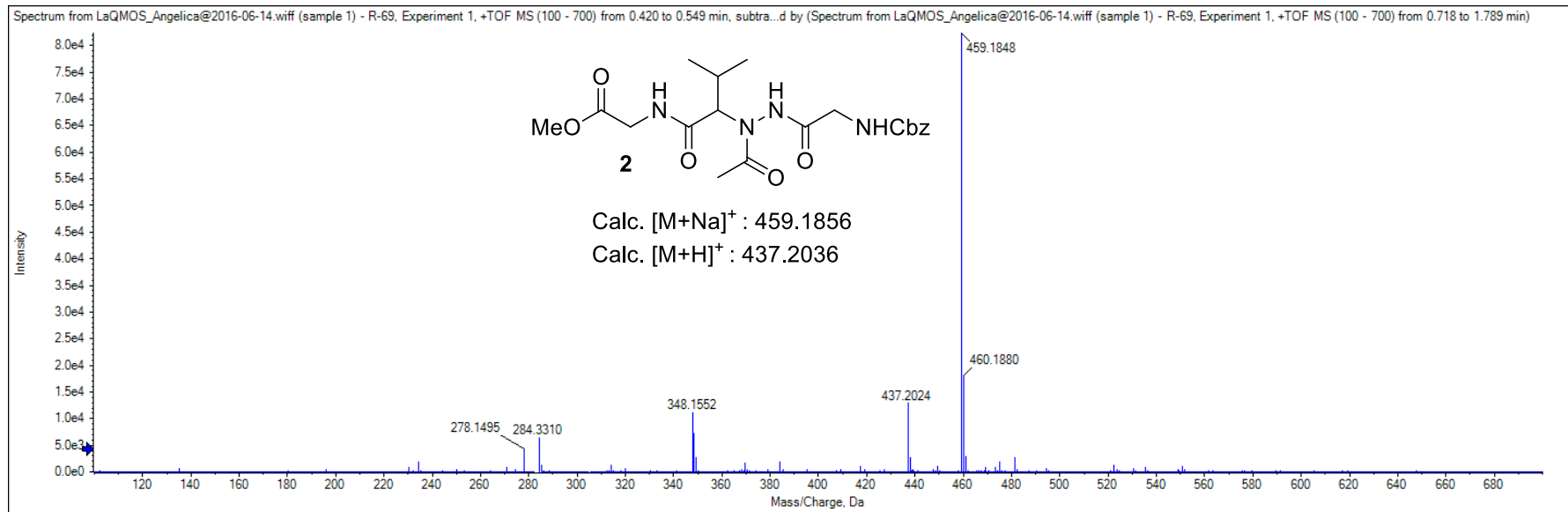
YOO, Barney; KIRSHENBAUM, Kent. Peptoid architectures: elaboration, actuation, and application. **Current Opinion In Chemical Biology**, [s.l.], v. 12, n. 6, p.714-721, dez. 2008.

ZEGA, Anamarija. Azapeptides as Pharmacological Agents. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 12, n. 5, p.589-597, 1 mar. 2005.

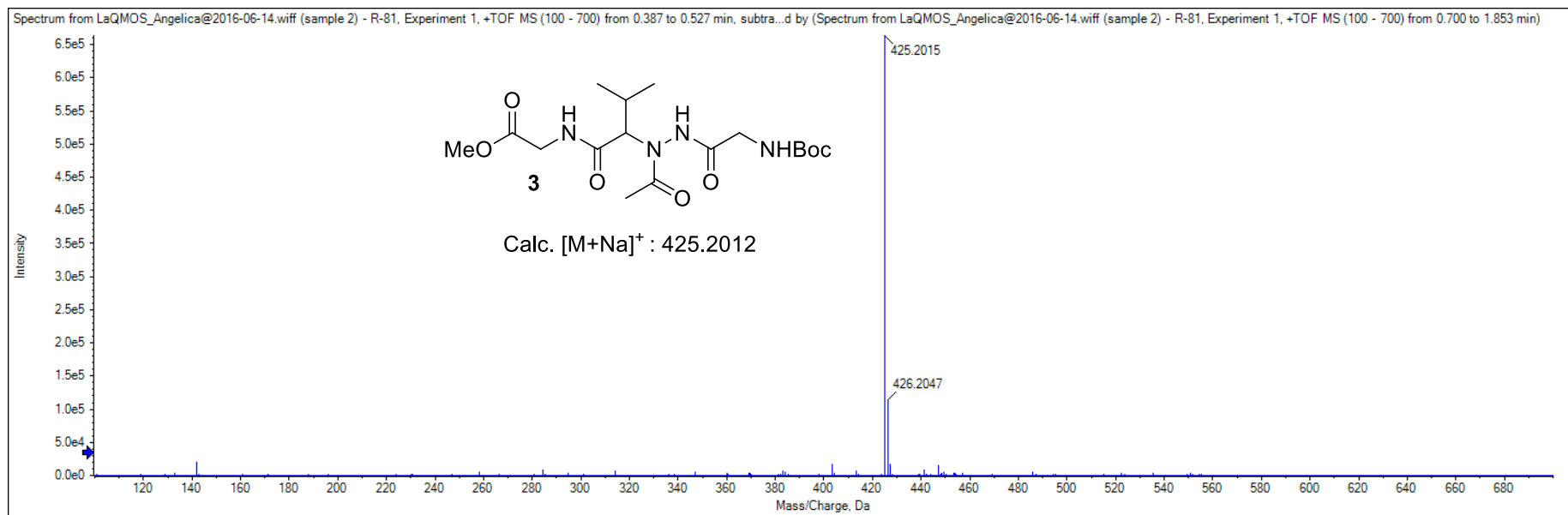
ZUCKERMANN, Ronald N.. Peptoid origins. **Biopolymers**, [s.l.], v. 96, n. 5, p.545-555, 23 dez. 2010.



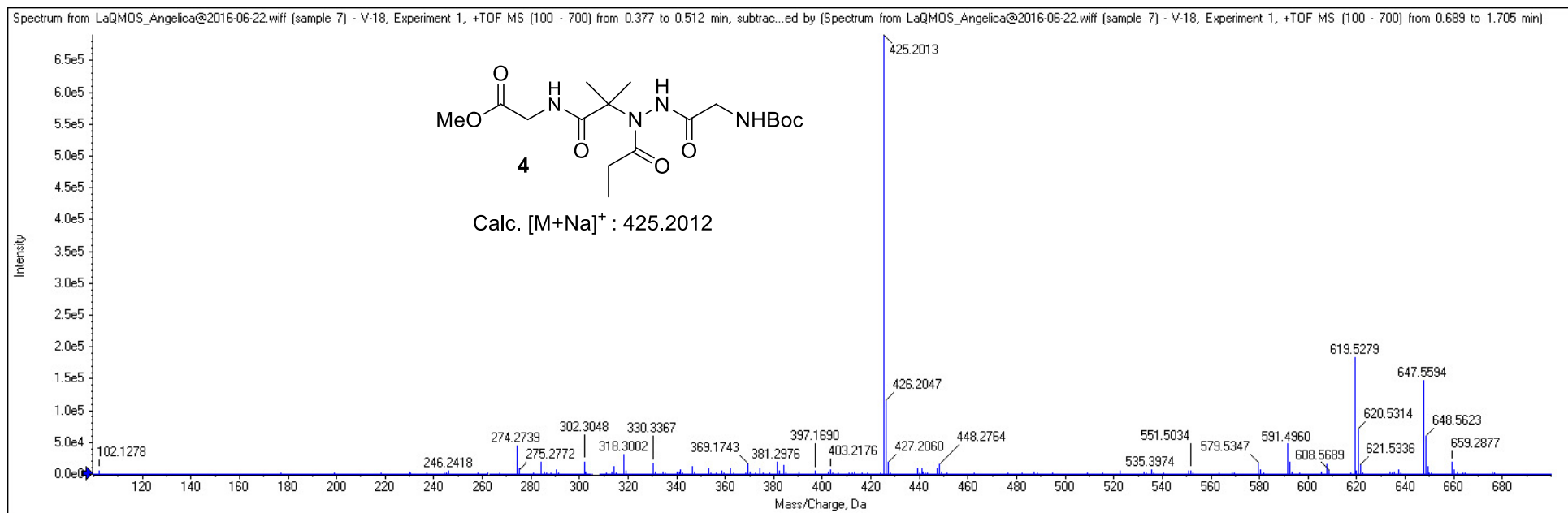
## ANEXOS



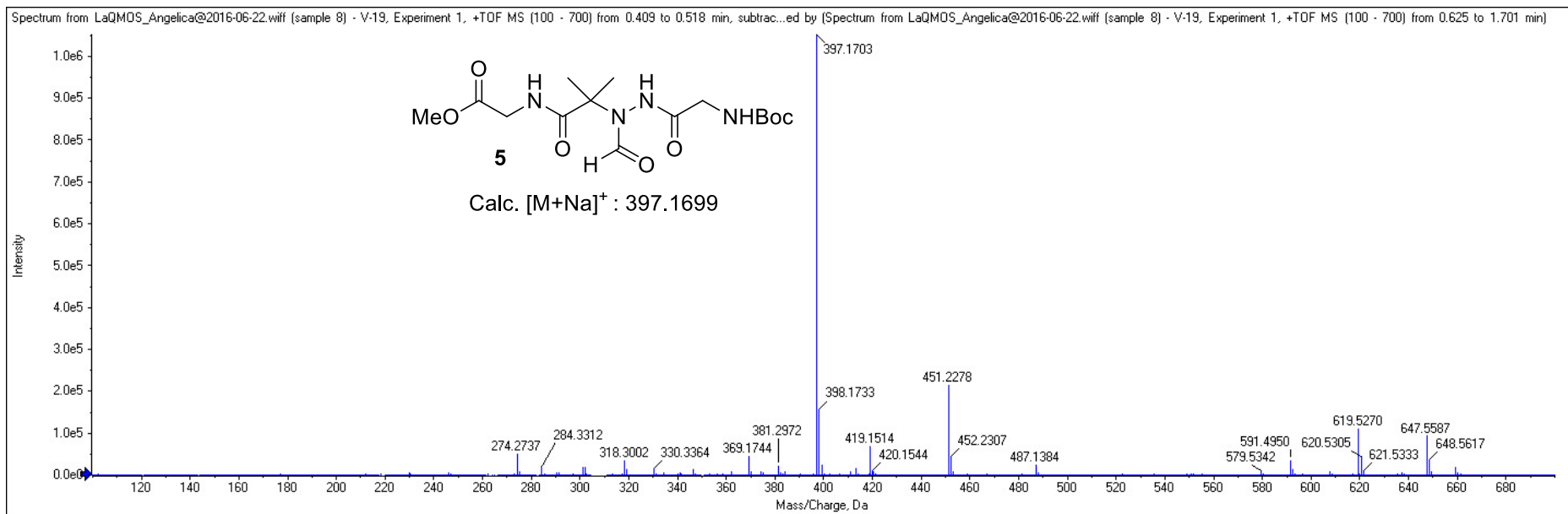
**Espectro 1.** Espectro de massas de alta resolução (EMAR) do acil-hidrazino-peptômero 2 (BARRETO et al., 2016).



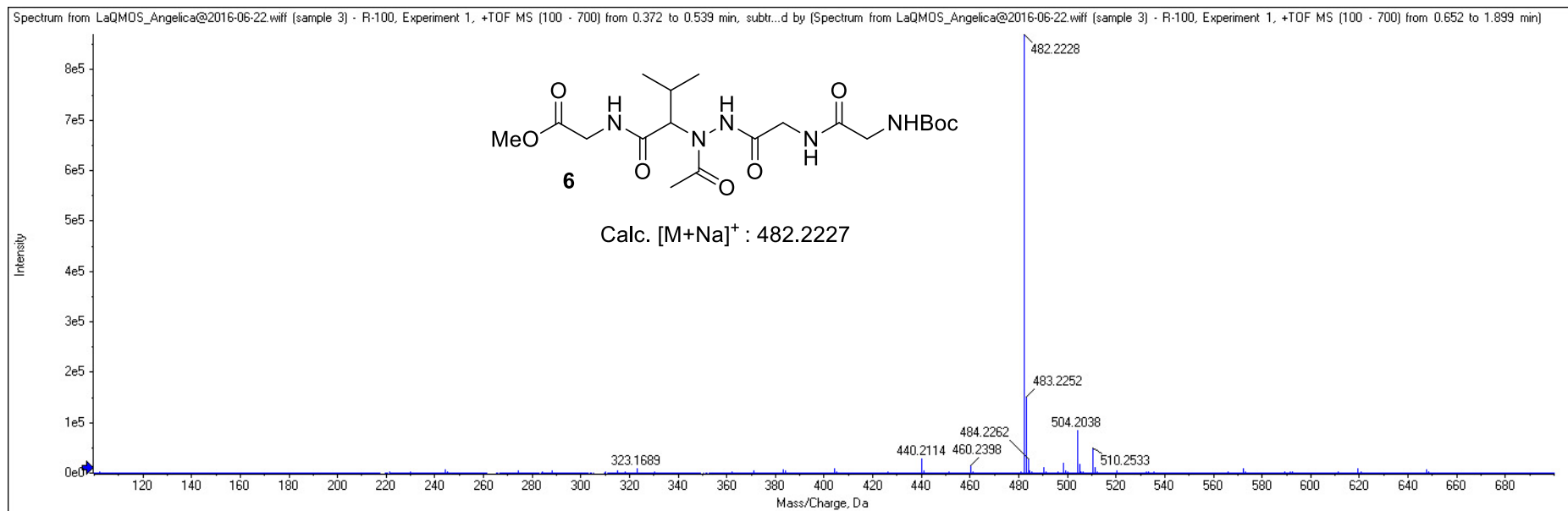
**Espectro 2.** Espectro de massas de alta resolução (EMAR) do acil-hidrazino-peptômero 3 (BARRETO et al., 2016).



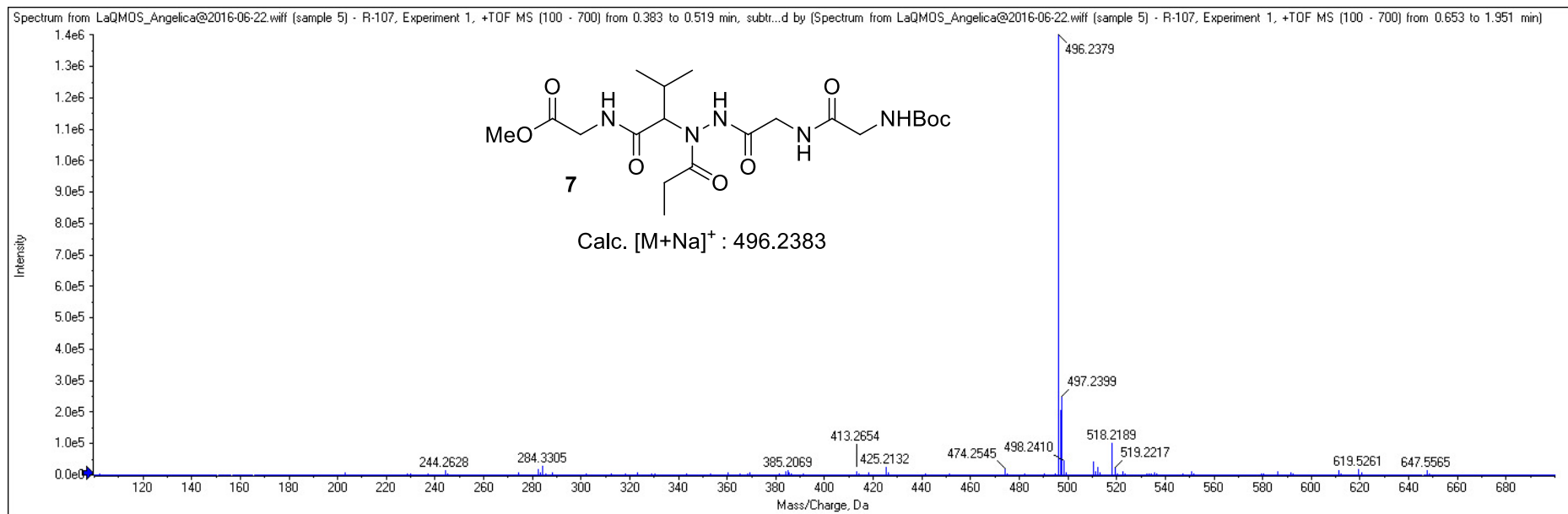
**Espectro 3.** Espectro de massas de alta resolução (EMAR) do acil-hidrazino-peptômero 4 (BARRETO et al., 2016).



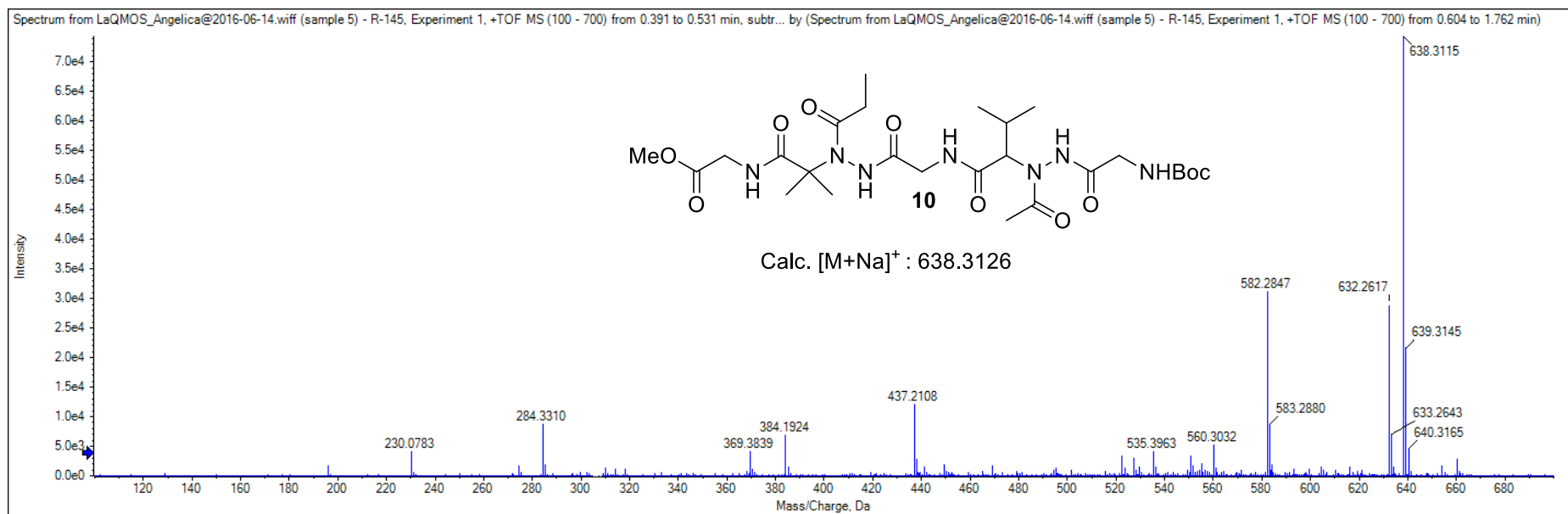
**Espectro 4.** Espectro de massas de alta resolução (EMAR) do acil-hidrazino-peptômero 5 (BARRETO et al., 2016).



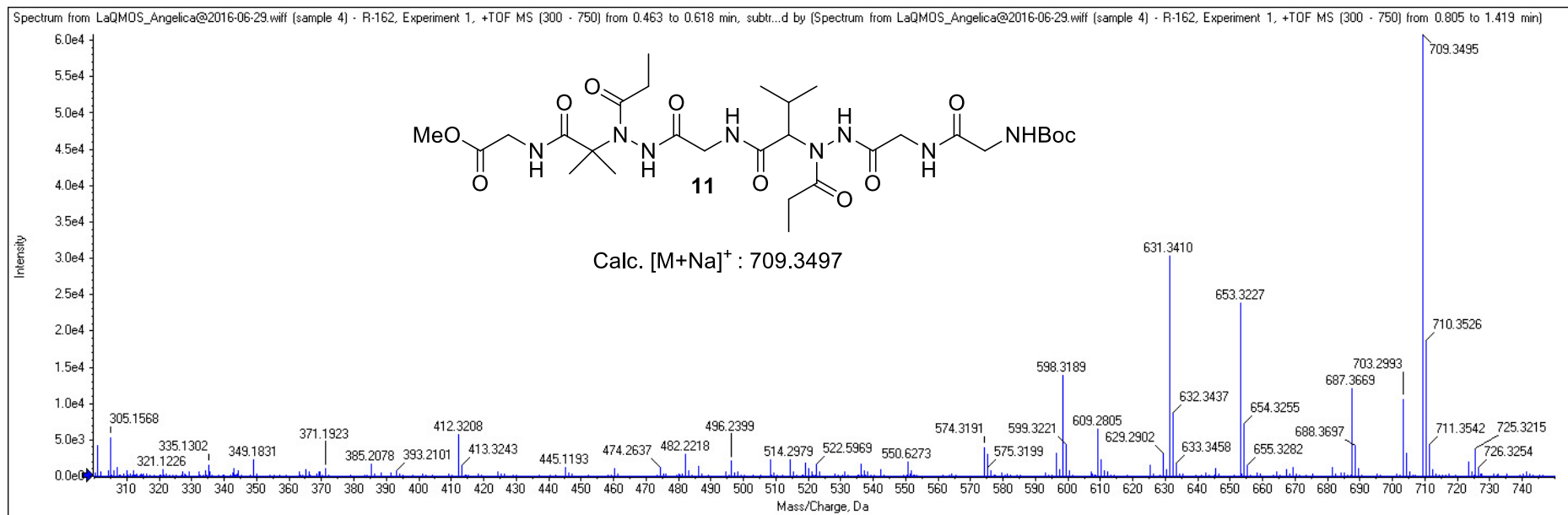
**Espectro 5.** Espectro de massas de alta resolução (EMAR) do acil-hidrazino-peptômero 6 (BARRETO et al., 2016).



**Espectro 6.** Espectro de massas de alta resolução (EMAR) do acil-hidrazino-peptômero 7 (BARRETO et al., 2016).

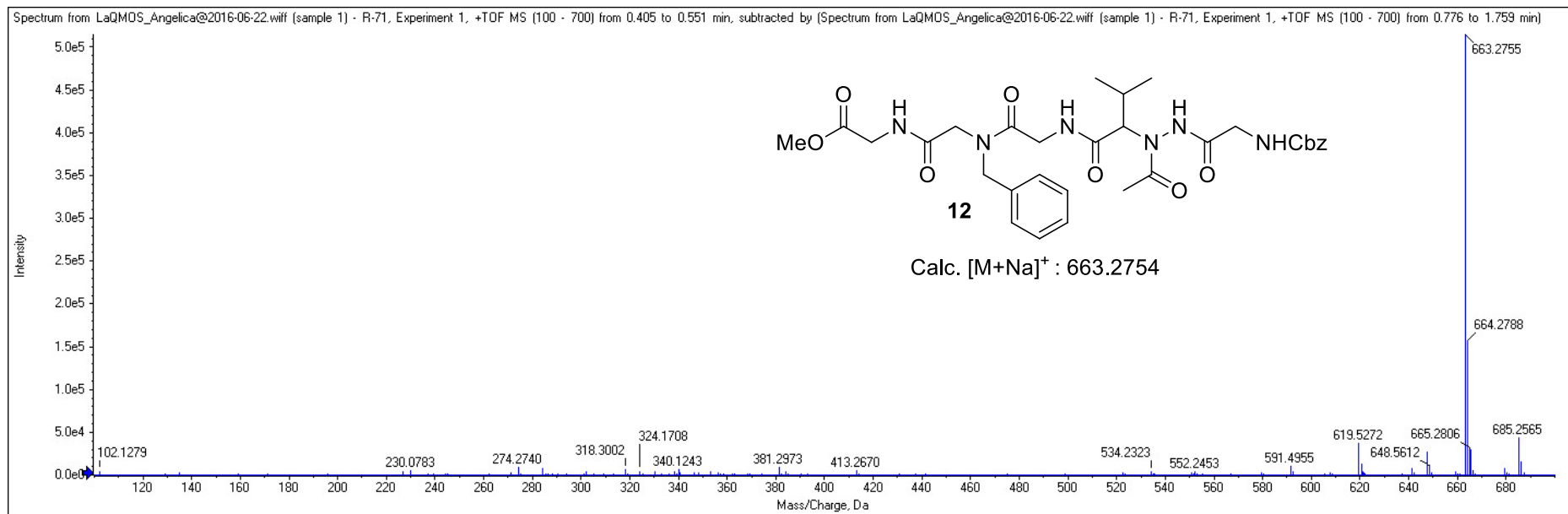


**Espectro 7.** Espectro de massas de alta resolução (EMAR) do acil-hidrazino-peptômero 10 (BARRETO et al., 2016).

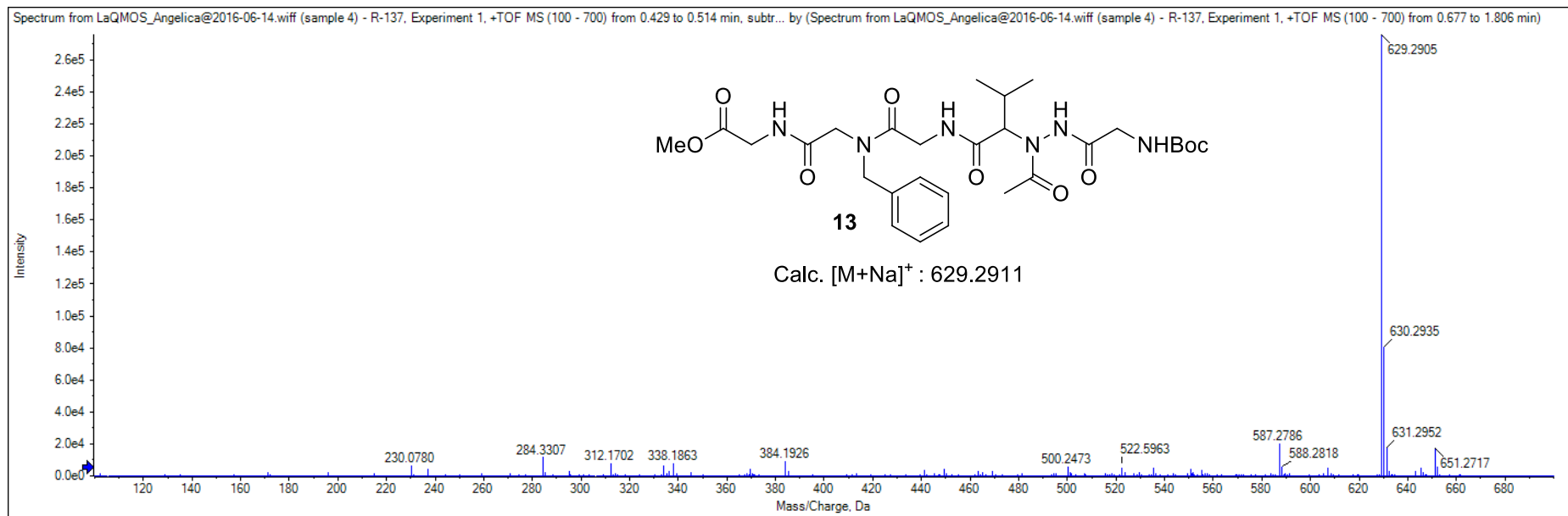


**Espectro 8.** Espectro de massas de alta resolução (EMAR) do acil-hidrazino-peptômero 11 (BARRETO et al., 2016).

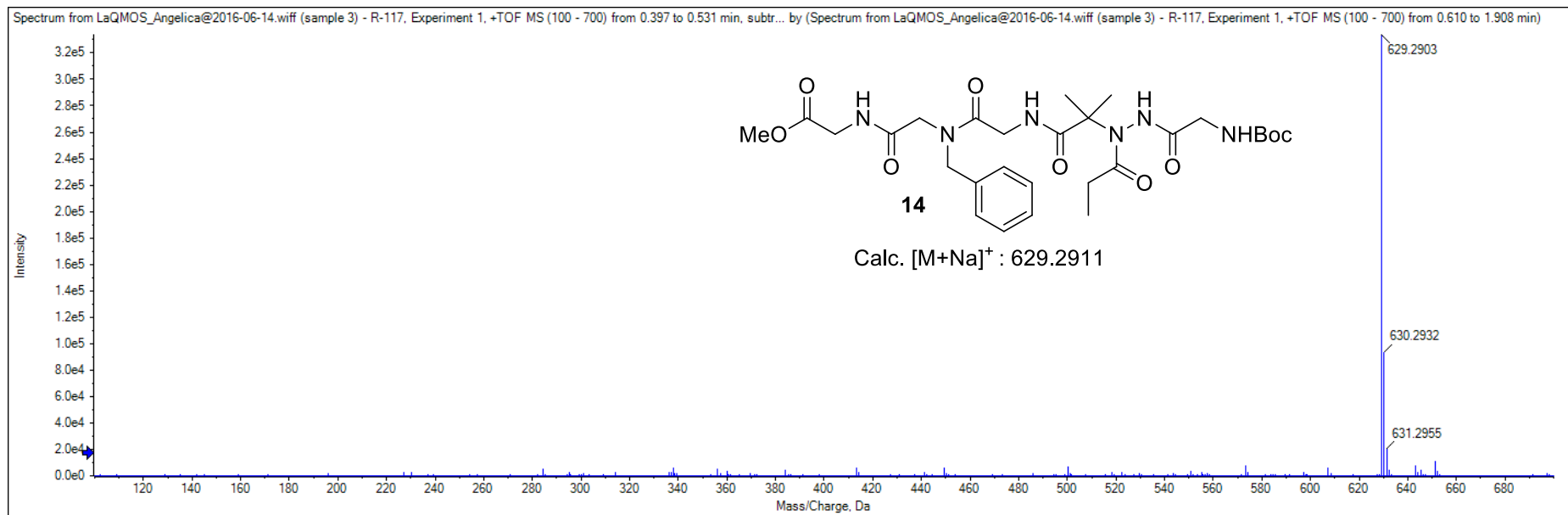




**Espectro 9.** Espectro de massas de alta resolução (EMAR) do acil-hidrazino-peptômero 12 (BARRETO et al., 2016).



**Espectro 10.** Espectro de massas de alta resolução (EMAR) do acil-hidrazino-peptômero 13 (BARRETO et al., 2016).



**Espectro 11.** Espectro de massas de alta resolução (EMAR) do acil-hidrazino-peptômero 14 (BARRETO et al., 2016).



# Synthesis of acylhydrazino-peptomers, a new class of peptidomimetics, by consecutive Ugi and hydrazino-Ugi reactions

Angélica de Fátima S. Barreto<sup>\*</sup>, Veronica Alves dos Santos and Carlos Kleber Z. Andrade<sup>\*</sup>

## Full Research Paper

Open Access

### Address:

Laboratório de Química Metodológica e Orgânica Sintética, Instituto de Química, Universidade de Brasília, CP 4478, 70910-970

### Email:

Angélica de Fátima S. Barreto<sup>\*</sup> - angelfsb@yahoo.com.br;

### Keywords:

acylhydrazino-peptomers; consecutive Ugi reactions; peptide-peptoid

*Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 2865–2872.

DOI: 10.7763/BJOC.2016.122865

Received: 28 September 2016

Accepted: 21 December 2016

Associate Editor: N. Sewald

© 2016 Barreto et al.; licensee Beilstein-Institut.

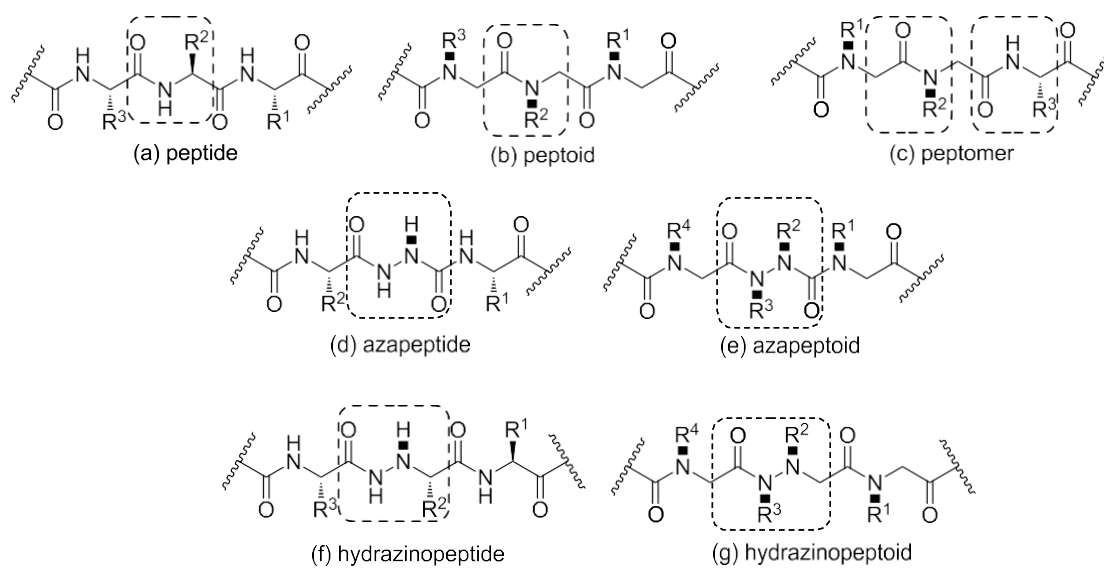
## Abstract

Herein we describe a versatile approach for the synthesis of acylhydrazino-peptomers, a new class of peptidomimetics. The key idea in this approach is based on a simple route using a one-pot hydrazino-Ugi four-component reaction followed by a hydrazino-lysis or hydrolysis reaction and subsequent hydrazino-Ugi reaction or classical Ugi reaction for the construction of acyclic acylhydrazino-peptomers. The consecutive multicomponent reactions produced a variety of acylhydrazino-peptomers in moderate to excellent yields (47–90%). These compounds are multifunctional intermediates that can be further functionalized to obtain new peptidomimetics with potential biological activity.

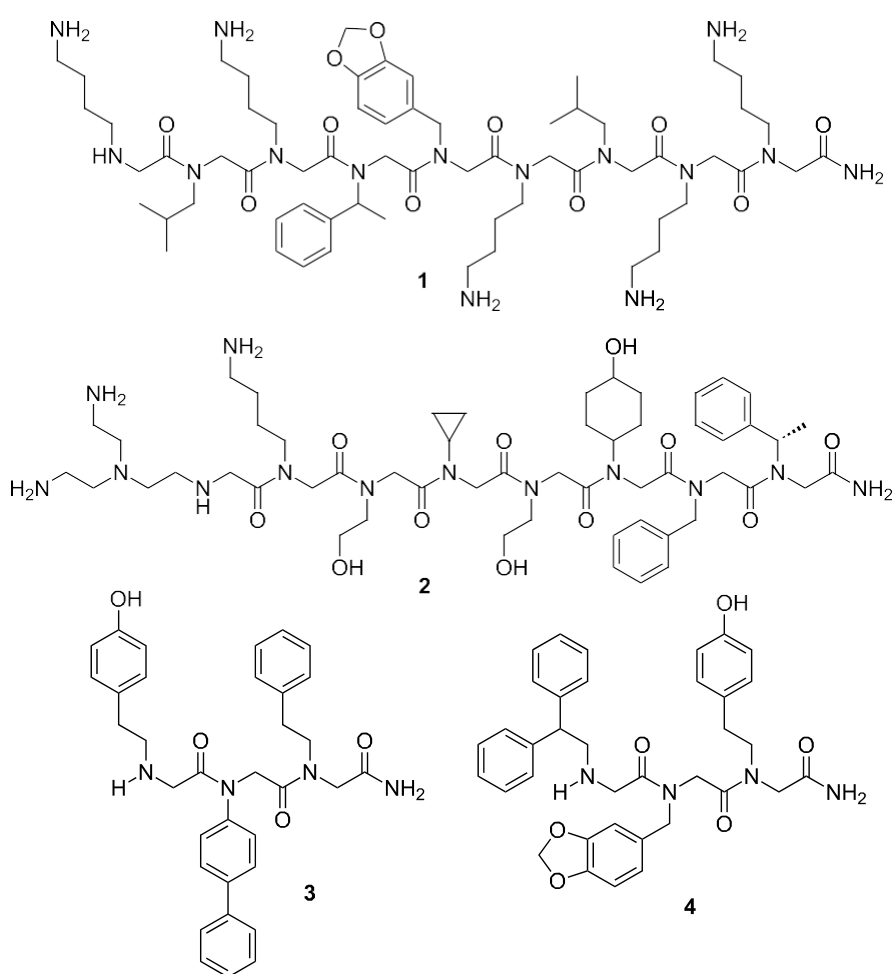
## Introduction

In the last decades, increasing efforts have been extensively carried out to improve the pharmacological properties of natural peptides by structural modification of the amino acids [1-8]. These modifications allowed the obtention of molecules that mimic the properties of peptides (peptidomimetics) but usually exhibit greater proteolytic stability, increased cellular permeabilities and avoid stereochemical constraints. Figure 1 represents some of the most important classes of peptidomimetics so far obtained and highlights the differences

among them. Of these, peptoids (oligomers of *N*-substituted glycine residues) [9-12] are the most common and may have interesting biological activities. For instance, peptoid **1** is a target for cancer therapeutics for being an antagonist of the vascular endothelial growth factor receptor 2 [13]; peptoid **2** is a ligand of the protooncogene Crk [14]; and peptoids **3** and **4** showed a high affinity for the  $\alpha$ 1-adrenergic and  $\mu$ -specific opiate receptors [15], respectively (Figure 2).



**Figure 1:** Structural features of (a) peptide, (b) peptoid, (c) peptomer, (d) azapeptide, (e) azapeptoid, (f) hydrazinopeptide and (g) hydrazinopeptoid.



**Figure 2:** Some biologically active peptoids.

Unlike peptides, in peptoids the side chain of the C $\alpha$  is bound to the nitrogen atom. Due to the consequent lack of the polar N–H bonds, their lipophilicity is increased, which may result in improved membrane permeability [16,17]. Furthermore, peptoids have also found utility in supra- and macromolecular engineering [18] and polymer chemistry [19]. Nevertheless, the lack of constraints in peptoids may result in a lower affinity for macromolecular targets, which limits their utility [20]. This finding has motivated the search for efficient strategies to introduce structural constraints into peptoid structures, which has contributed to increase the plethora of currently available peptidomimetics.

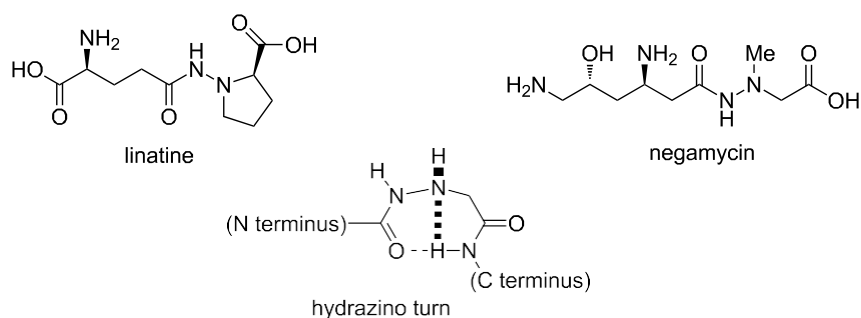
Azapeptides [21–23] are peptide analogs in which the C $\alpha$  atom is substituted by a nitrogen atom in one or more amino acids (Figure 1) and have been known since 1970 [24]. The introduction of a semicarbazide moiety has an enormous effect on the physical properties of a peptide as well as on its structural characteristics. The semicarbazide constraints tend to facilitate interactions with protein receptors due to turn geometry within the azapeptide. As a result, their stability over enzymes and chemical degradation may be enhanced compared to a natural peptide. Indeed, these compounds have shown to be a useful class of peptidomimetics with interesting biological activities [21–23], including antiviral [25,26] and cysteine protease inhibition [27–30].

Hydrazinopeptides [31–36] (peptide analogs in which one of the CONH links is replaced by a hydrazido fragment CONHNH, Figure 1) represent another class of peptidomimetics with promising conformational and biological activities, such as protease inhibition [37] and antimicrobial activity [38]. There are some natural peptides that contain such an  $\alpha$ -hydrazino acid moiety, e.g., the vitamin B6 antagonist linatine and the antibiotic negamycin (Figure 3). In the early 1970s, the first attempts to peptide modifications by hydrazino acids generated bioactive pseudopeptides [39]. Analogously to azapeptides, these compounds possess a conformational constraint (hydrazino

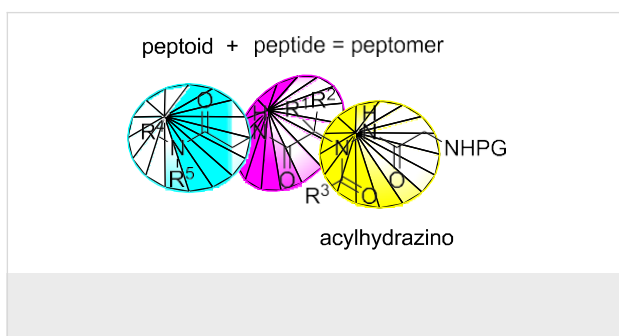
turn) due to the presence of intramolecular H-bonding interactions (Figure 3), which is similar in nature to a natural peptide  $\beta$ -turn. As already pointed out, this can improve the proteolytic stability of the natural peptide while preserving its biological activity.

Other changes in peptoid structures have also been carried out to obtain the less common but also biologically active azapeptoids [40], hydrazino-azapeptoids [41,42], retro hydrazino-azapeptoids [43] and peptoid-azapeptoid hybrids [39]. Recently, Seo et al. [44] reported the synthesis of a library of peptide-peptoid hybrid (termed peptomers by Ostergaard and Holm [45]) prodrugs that can be selectively activated by prostate cancer cells.

Peptidomimetics can be conveniently synthesized using the so called "submonomer approach" either in solution [41] or in solid-phase [46,47]. However, some disadvantages have been reported for long or difficult sequences [48]. It is therefore important to have alternative methods for the fast and easy construction of such important compounds. In this sense, the Ugi four-component reaction (U-4CR) has proven to be a robust and versatile method for the synthesis of peptoids and peptide-peptoid hybrids (peptomers) [49–53]. This reaction has also been combined with other protocols for the synthesis of bioactive peptides [54,55] and hydrazinopeptide motifs [33,34]. In continuing our research on the synthesis of peptoids [53,56,57], herein we describe the synthesis of a new class of peptidomimetics, which we have called acylhydrazino-peptomers (Figure 4), by analogy with the existing classes of peptidomimetics shown in Figure 1, using consecutive Ugi and hydrazino-Ugi reactions, respectively. These compounds comprise both a peptoid and a peptide moiety (hence a peptomer) along with an acylhydrazino portion. The use of a consecutive Ugi reaction to access peptidomimetics has proven very useful [56–62]. It is important to point out that these molecules cannot be obtained directly via the "submonomer approach".



**Figure 3:** Biologically active hydrazinopeptides and representation of the hydrazino turn.



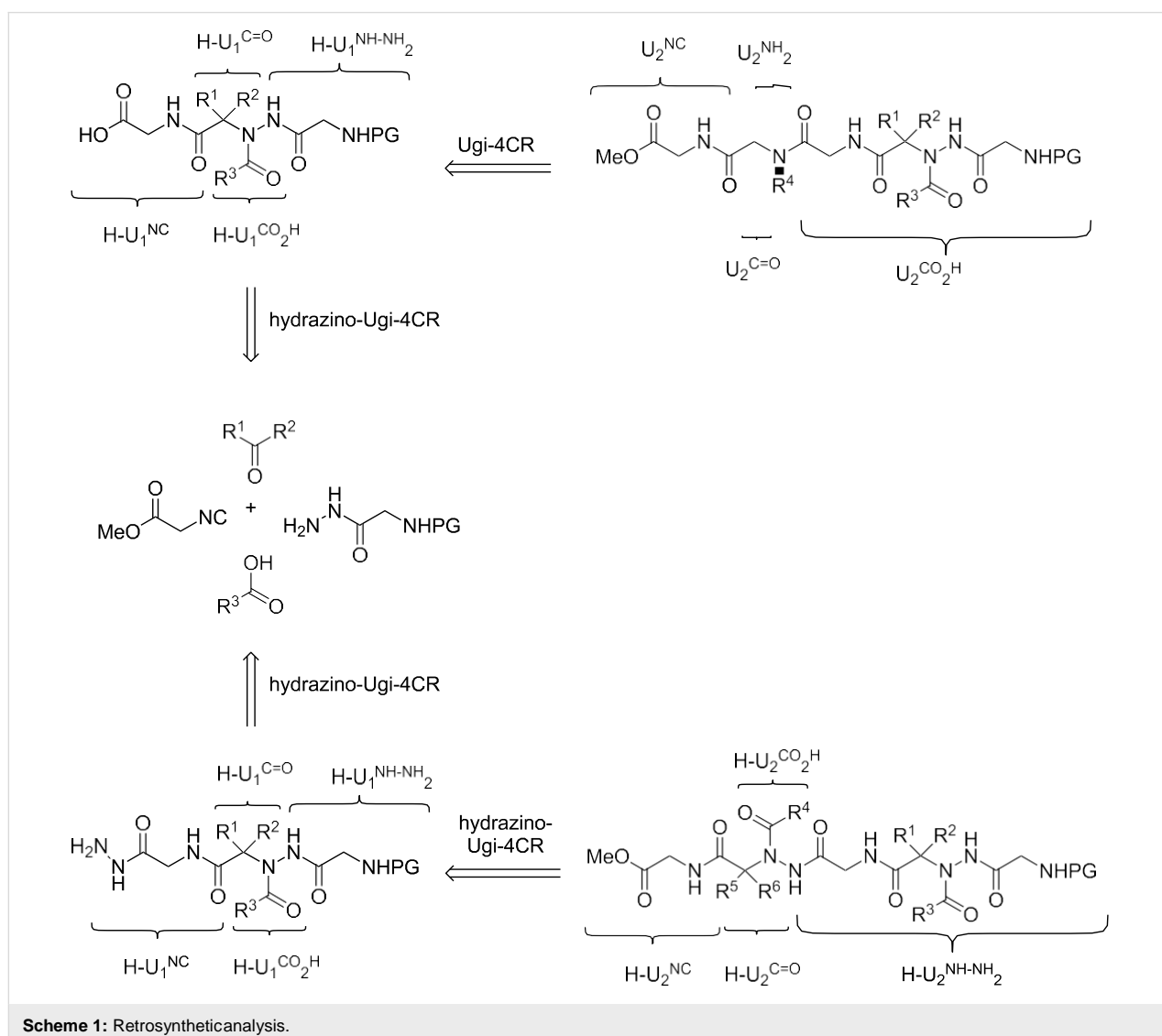
## Results and Discussion

Our approach involves the use of two multicomponent reactions (Scheme 1): the hydrazino-Ugi four-component reaction (HU-4CR) and the classical Ugi reaction (U-4CR). The strategy was based on the formation of an acylhydrazino-peptomer via an initial hydrazino-Ugi reaction followed by a hydrazinolysis

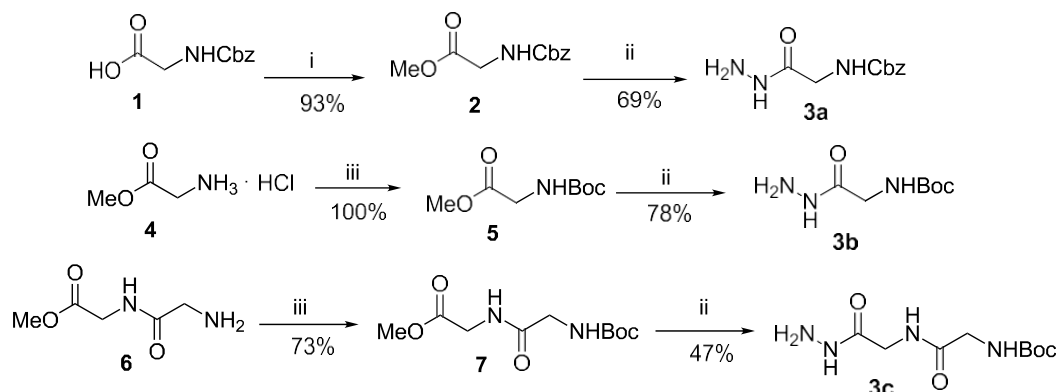
reaction (or ester hydrolysis) and a subsequent hydrazino-Ugi reaction (or a classical Ugi reaction).

The hydrazides **3a–c** used in the first MCR were prepared by the reaction of glycine-derived esters **2**, **5** and **7** with hydrazine monohydrate (hydrazinolysis), following a known procedure [63,64] (Scheme 2).

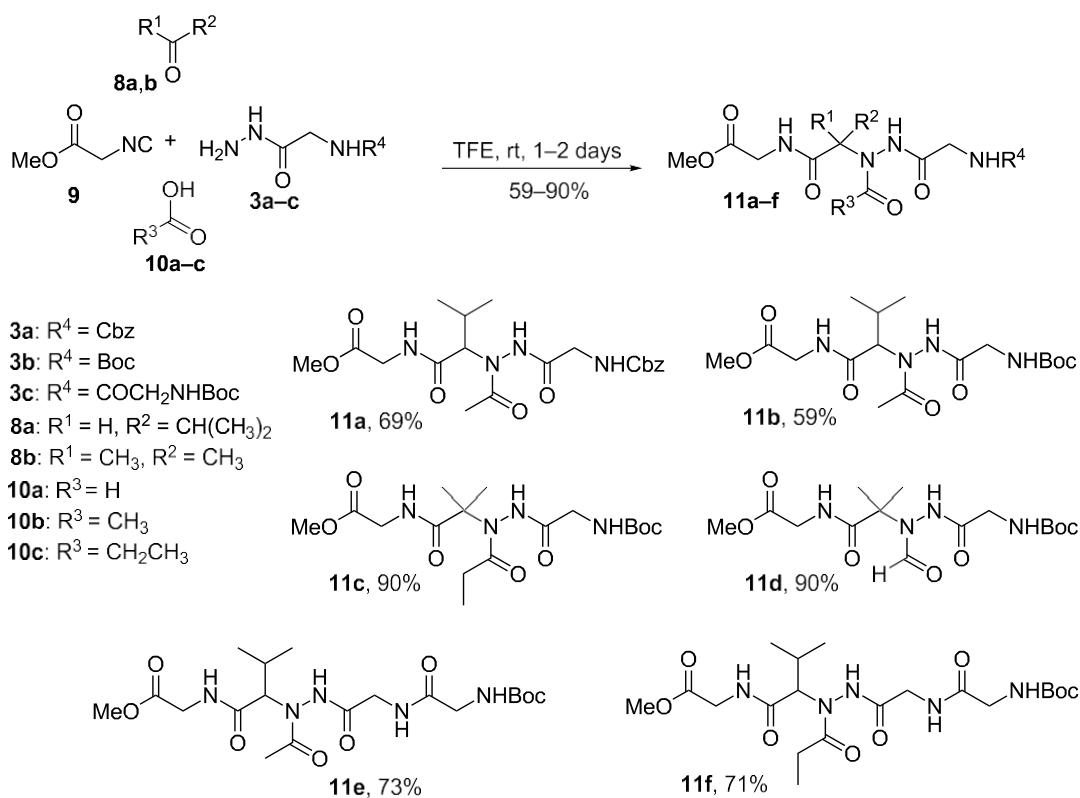
The obtained hydrazides were then reacted with isobutyraldehyde **8a**/acetone **8b**, carboxylic acids **10a–c** (formic, acetic or propionic acid) and ethyl isocyanoacetate **9** (Scheme 3). The reactions were conducted at room temperature in trifluoroethanol (TFE) for 1–2 days to yield the acylhydrazino-peptomers **11a–f** in moderate to good yields (59–90%). Aliphatic aldehydes, ketones and carboxylic acids succeeded in the hydrazino-Ugi reaction, except for paraformaldehyde, fatty acids and aromatic substrates, which led to formation of a com-







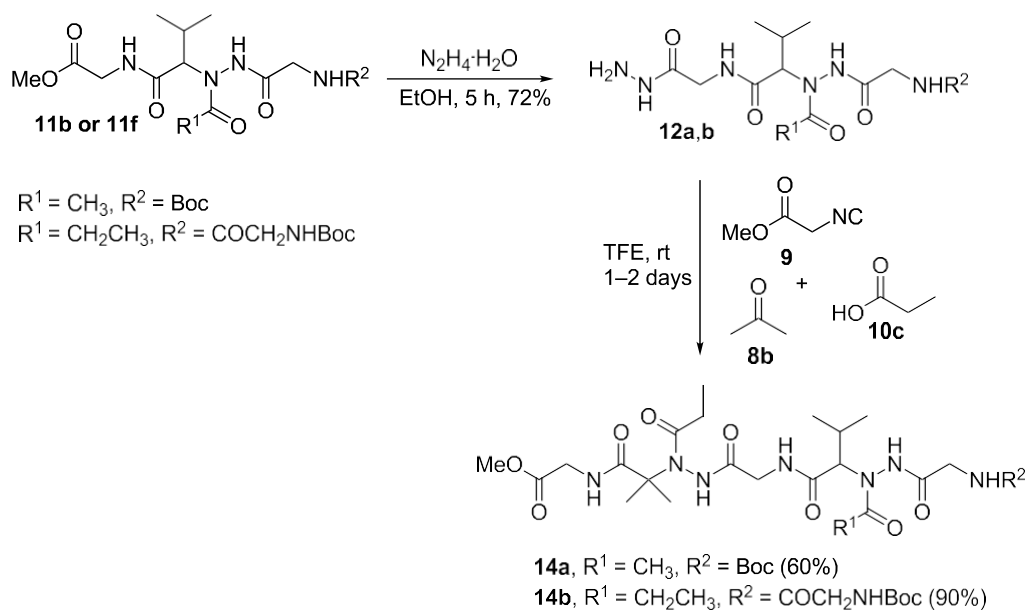
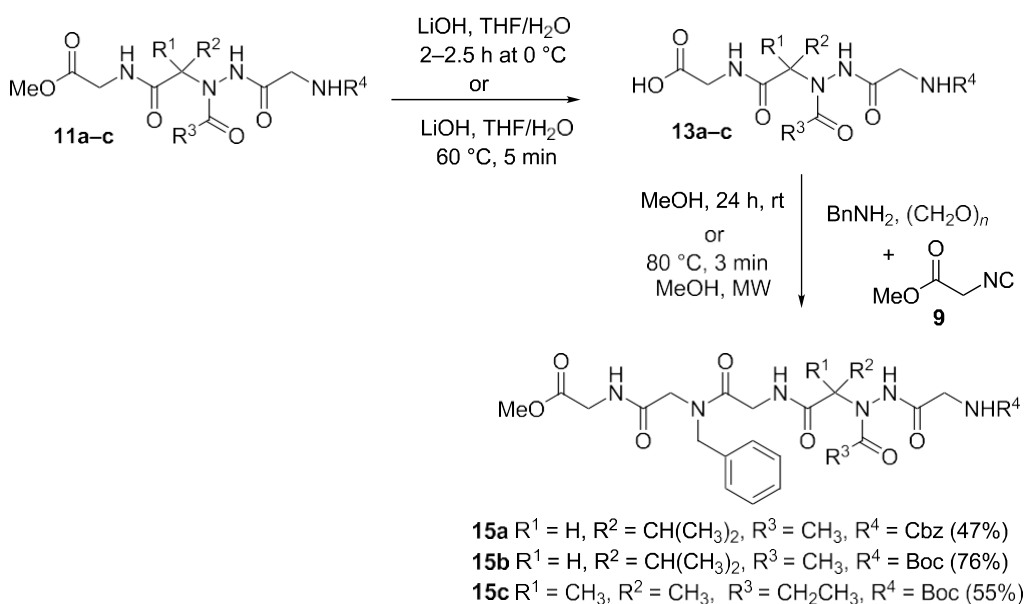
**Scheme 2:** Synthesis of hydrazides **3a–c**. Reagents and conditions: (i)  $\text{CH}_3\text{I}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , DMF, rt, 46 h; (ii)  $\text{N}_2\text{H}_4\text{H}_2\text{O}$ , EtOH, reflux, 2–3 h; (iii) (Boc) $_2$ O, NaOH, dioxane/ $\text{H}_2\text{O}$ , overnight.



**Scheme 3:** Synthesis of acylhydrazino-peptomers **11a–f**.

plex mixture. These results limited the obtention of a greater variety of acylhydrazino-peptomers by this method. The choice of TFE as the solvent for the hydrazino-Ugi reaction was important because the same reaction carried out in methanol, often the solvent of choice for Ugi reactions, provided the formation of a complex mixture. This fact has already been reported [34].

To further functionalize the acylhydrazino-peptomers structures, a second Ugi reaction was carried out. Hence, some acylhydrazino-peptomers were subjected to hydrazinolysis reaction or ester hydrolysis to give the corresponding hydrazides **12a,b** (Scheme 4) or acids **13a–c** (Scheme 5), respectively, which were used in the following step (hydrazino-Ugi reaction or clas-

Scheme 4: Synthesis of acylhydrazino-peptomers **14a,b**.Scheme 5: Synthesis of acylhydrazino-peptomers **15a-c**.

sical Ugi reaction) to yield the corresponding acylhydrazino-peptomers **14a,b** or **15a-c** in moderate to good yields (47–90%). All compounds were fully characterized by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR and HRMS giving data consistent with the proposed structures.

Functionalization on both termini of compounds **11**, **14** and **15** (ester hydrolysis and/or Boc deprotection) allows subsequent

Ugi or hydrazino-Ugi reactions to further elongate the peptomers main chain.

## Conclusion

In summary, we have developed a concise protocol for the synthesis of functionalized acylhydrazino-peptomers by consecutive Ugi reactions. The general route allows an easy access to highly functionalized peptomers in good yields and a reduced

number of steps. This method may also be employed to obtain new classes of peptidomimetics with potential biological activity.

## Supporting Information

### Supporting Information File 1

Detailed experimental procedures, NMR and mass spectra of all compounds.

[<http://www.beilstein-journals.org/bjoc/content/supplementary/1860-5397-12-285-S1.pdf>]

## Acknowledgements

The authors thank the Instituto de Química, Universidade de Brasília, CAPES and CNPq for financial

## References

- Zuckermann, R. N.; Kodadek, T. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2009**, *11*, 299–307.
- Simpson, L. S.; Burdine, L.; Dutta, A. K.; Feranchak, A. P.; Kodadek, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5760–5762. doi:10.1021/ja900852k
- Mora, P.; Masip, I.; Cortés, N.; Marquina, R.; Merino, R.; Merino, J.; Carbonell, T.; Mingarro, I.; Messegue, A.; Pérez-Payá, E. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1265–1268. doi:10.1021/jm040834i
- Fowler, S. A.; Stacy, D. M.; Blackwell, H. E. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2329–2332. doi:10.1021/ol800908h
- Wenger, R. M.; Payne, T. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1989**, *291*, 301–305.
- Hamy, F.; Felder, E. R.; Heizmann, G.; Lazdins, J.; Aboul-ela, F.; Varani, G.; Karn, J.; Klimkait, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 3548–3553. doi:10.1073/pnas.94.8.3548
- Stawikowski, M.; Stawikowska, R.; Jaśkiewicz, A.; Zablotna, E.; Rolka, K. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1057–1061. doi:10.1002/cbic.200400412
- Panda, S. S.; El-Nachef, C.; Bajaj, K.; Katritzky, A. R. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 4156–4162. doi:10.1002/ejoc.201201731
- Kessler, H. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 543–544. doi:10.1002/anie.199305431
- Yoo, B.; Kirshenbaum, K. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 714–721. doi:10.1016/j.cbpa.2008.08.015
- Zuckermann, R. N. *Pept. Sci.* **2011**, *96*, 545–555. doi:10.1002/bip.21573
- Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberg, S.; Marlowe, C. K.; Spellmeyer, D. C.; Tan, R.; Frankel, A. D.; Santi, D. V.; Cohen, F. E.; Bartlett, P. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 9367–9371. doi:10.1073/pnas.89.20.9367
- Udugamasooriya, D. G.; Dineen, S. P.; Brekken, R. A.; Kodadek, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5744–5752. doi:10.1021/ja711193x
- Wrenn, S. J.; Weisinger, R. M.; Halpin, D. R.; Harbury, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13137–13143. doi:10.1021/ja073993a
- Zuckermann, R. N.; Martin, E. J.; Spellmeyer, D. C.; Stauber, G. B.; Shoemaker, K. R.; Kerr, J. M.; Figliozzi, G. M.; Goff, D. A.; Siani, M. A.; Simon, R. J.; Banville, S. C.; Brown, E. G.; Wang, L.; Richter, L. S.; Moss, W. H. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2678–2685. doi:10.1021/jm00043a007

16. Rezai, T.; Bock, J. E.; Zhou, M. V.; Kalyanaraman, C.; Lokey, R. S.; Jacobson, M. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14073–14080. doi:10.1021/ja063076p
17. Ovadia, O.; Linde, Y.; Haskell-Luevano, C.; Dirain, M. L.; Sheynis, T.; Jelinek, R.; Gilon, C.; Hoffman, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 580–589. doi:10.1016/j.bmc.2009.12.010
18. Gangloff, N.; Ulbricht, J.; Lorson, T.; Schlaad, H.; Luxenhofer, R. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 1753–1802. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00201
19. Sun, J.; Zuckermann, R. N. *ACS Nano* **2013**, *7*, 4715–4732. doi:10.1021/nn4015714
20. Sarma, B. K.; Kodadek, T. *ACS Comb. Sci.* **2012**, *14*, 558–564. doi:10.1021/co3000852
21. Proulx, C.; Sabatino, D.; Hopewell, R.; Spiegel, J.; Ramos, Y. G.; Lubell, W. D. *Future Med. Chem.* **2011**, *3*, 1139–1164. doi:10.4155/fmc.11.74
22. Zega, A. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 589–597. doi:10.2174/0929867053362802
23. Gante, J. *Synthesis* **1989**, 405–413. doi:10.1055/s-1989-27269
24. Gante, J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1970**, *9*, 813. doi:10.1002/anie.197008131
25. Bailey, M. D.; Halmos, T.; Goudreau, N.; Lescop, E.; Llinàs-Brunet, M. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3788–3799. doi:10.1021/jm049864b
26. Randolph, J. T.; Zhang, X.; Huang, P. P.; Klein, L. L.; Kurtz, K. A.; Konstantinidis, A. K.; He, W.; Kati, W. M.; Kempf, D. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2745–2750. doi:10.1016/j.bmcl.2008.02.053
27. Magrath, J.; Abeles, R. H. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4279–4283. doi:10.1021/jm00101a004
28. Baggio, R.; Shi, Y.-Q.; Wu, Y.-q.; Abeles, R. H. *Biochemistry* **1996**, *35*, 3351–3353. doi:10.1021/bi952879e
29. Xing, R.; Hanzlik, R. P. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1344–1351. doi:10.1021/jm970802d
30. Ekici, Ö. D.; Li, Z. Z.; Campbell, A. J.; James, K. E.; Asgian, J. L.; Mikolajczyk, J.; Salvesen, G. S.; Ganesan, R.; Jelakovic, S.; Grütter, M. G.; Powers, J. C. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5728–5749. doi:10.1021/jm0601405
31. Guy, L.; Vidal, J.; Collet, A.; Amour, A.; Reboud-Ravaux, M. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4833–4843. doi:10.1021/jm980419o
32. Amour, A.; Collet, A.; Dubar, C.; Reboud-Ravaux, M. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *43*, 297–304. doi:10.1111/j.1399-3011.1994.tb00394.x
33. Bushkova, E.; Parchinsky, V.; Krasavin, M. *Mol. Diversity* **2010**, *14*, 493–499. doi:10.1007/s11030-009-9200-6
34. Krasavin, M.; Bushkova, E.; Parchinsky, V.; Shumsky, A. *Synthesis* **2010**, 933–942. doi:10.1055/s-0029-1219274
35. Lakontseva, E.; Krasavin, M. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 4095–4099. doi:10.1016/j.tetlet.2010.05.133
36. Bonnet, D.; Samson, F.; Rommens, C.; Gras-masse, H.; Melnyk, O. *J. Pept. Res.* **1999**, *54*, 270–278. doi:10.1034/j.1399-3011.1999.00105.x
37. Bordessa, A.; Keita, M.; Maréchal, X.; Formicola, L.; Lagarde, N.; Rodrigo, J.; Bernadat, G.; Bauvais, C.; Soulier, J.-L.; Dufau, L.; Milcent, T.; Crousse, B.; Reboud-Ravaux, M.; Onger, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 505–524. doi:10.1016/j.ejmech.2013.09.059
38. Laurencin, M.; Legrand, B. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 2865–2872. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00201
- Zatylny-Gaudin, C.; Bondon, A. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2025–2034. doi:10.1021/jm2011595
39. Niedrich, H.; Köller, G. *J. Prakt. Chem.* **1974**, *316*, 729–740. doi:10.1002/prac.19743160504

40. Sarma, B. K.; Liu, X.; Kodadek, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 3953–3963. doi:10.1016/j.bmc.2016.04.047
41. Cheguillaume, A.; Lehardy, F.; Bouget, K.; Baudy-Floc'h, M.; Le Grel, P. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2924–2927. doi:10.1021/jo9814871
42. Bouget, K.; Aubin, S.; Delcros, J.-G.; Arlot-Bonnemains, Y.; Baudy-Floc'h, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 4881–4889. doi:10.1016/j.bmc.2003.09.018
43. Aubin, S.; Martin, B.; Delcros, J.-G.; Arlot-Bonnemains, Y.; Baudy-Floc'h, M. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 330–334. doi:10.1021/jm049455f
44. Lee, J.; Huang, W.; Broering, J. M.; Barron, A. E.; Seo, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 2849–2852. doi:10.1016/j.bmcl.2015.04.092
45. Østergaard, S.; Holm, A. *Mol. Diversity* **1997**, *3*, 17–27. doi:10.1023/A:1009698507588
46. Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Kent, S. B. H.; Moos, W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10646–10647. doi:10.1021/ja00052a076
47. Sarma, B. K.; Yousufuddin, M.; Kodadek, T. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 10590–10592. doi:10.1039/c1cc12750k
48. Fara, M. A.; Diaz-Mochón, J. J.; Bradley, M. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 1011–1014. doi:10.1016/j.tetlet.2005.11.127
49. Dömling, A.; Ugi, I. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 3168–3210. doi:10.1002/1521-3773(20000915)39:18<3168::AID-ANIE3168>3.0.CO;2-U
50. Wessjohann, L. A.; Rivera, D. G.; Vercillo, O. E. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 796–814. doi:10.1021/cr8003407
51. Dömling, A. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 17–89. doi:10.1021/cr0505728
52. Dömling, A.; Beck, B.; Eichelberger, U.; Sakamuri, S.; Menon, S.; Chen, Q.-Z.; Lu, Y.; Wessjohann, L. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 7235–7239. doi:10.1002/anie.200601259
53. Barreto, A. F. S.; Vercillo, O. E.; Birkett, M. A.; Caulfield, J. C.; Wessjohann, L. A.; Andrade, C. K. Z. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5024–5027. doi:10.1039/c1ob05471f
54. Pando, O.; Stark, S.; Denkert, A.; Porzel, A.; Preusentanz, R.; Wessjohann, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7692–7695. doi:10.1021/ja2022027
55. Neves Filho, R. A. W.; Westermann, B.; Wessjohann, L. A. *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 1504–1507. doi:10.3762/bjoc.7.175
56. Vercillo, O. E.; Andrade, C. K. Z.; Wessjohann, L. A. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 205–208. doi:10.1021/ol702521g
57. Barreto, A. F. S.; Vercillo, O. E.; Wessjohann, L. A.; Andrade, C. K. Z. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1017–1022. doi:10.3762/bjoc.10.101
58. Constabel, F.; Ugi, I. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 5785–5789. doi:10.1016/S0040-4020(01)00516-6
59. Dömling, A. *Nucleosides Nucleotides* **1998**, *17*, 1667–1670. doi:10.1080/07328319808004699
60. Xu, P.; Zhang, T.; Wang, W.; Zou, X.; Zhang, X.; Fu, Y. *Synthesis* **2003**, 1171–1176. doi:10.1055/s-2003-39391
61. Zarganes-Tzitzikas, T.; Patil, P.; Khoury, K.; Herdtweck, E.; Dömling, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 51–55. doi:10.1002/ejoc.201403401
62. Brauch, S.; Gabriel, L.; Westermann, B. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3387–3389. doi:10.1039/b927388c

## License and Terms

This is an Open Access article under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The license is subject to the *Beilstein Journal of Organic Chemistry* terms and conditions:

(<http://www.beilstein-journals.org/bjoc>)

The definitive version of this article is the electronic one which can be found at:

[doi:10.3762/bjoc.12.285](https://doi.org/10.3762/bjoc.12.285)

63. Yale, H. L.; Losee, K.; Martins, J.; Holsing, M.; Perry, F. M.;  
Bernstein, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 1933–1942.  
doi:10.1021/ja01104a046
64. Bruice, T. C.; Benkovic, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 418–426.  
doi:10.1021/ja01057a026