

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Soraya Maria Zandim Maciel Dias Ferreira

**ESTRATÉGIAS PARA MARCAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS:
SÍNTESE DE COMPOSTOS FLUORESCENTES E RADIOMARCADOS
COM FLÚOR-18**

Belo Horizonte
2015

UFMG/ICEx/DQ. 1112^a

T. 501^a

Soraya Maria Zandim Maciel Dias Ferreira

**ESTRATÉGIAS PARA MARCAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS:
SÍNTESE DE COMPOSTOS FLUORESCENTES E RADIOMARCADOS
COM FLÚOR-18**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências – Química.

Belo Horizonte

2015

F383e Ferreira, Soraya Maria Zandim Maciel Dias
2015 Estratégias para marcação de moléculas
T bioativas [manuscrito] : síntese de compostos
fluorescentes e radiomarcados com flúor-18 /
Soraya Maria Zandim Maciel Dias Ferreira. 2015.
[xiv], 120 f. : il.

Orientadora: Rossimiriam Pereira de Freitas.
Coorientadora: Rosemeire Brondi Alves.

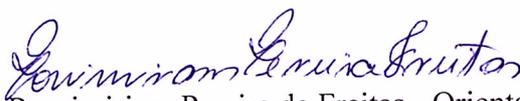
Tese (doutorado) - Universidade Federal de
Minas Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química Orgânica - Teses 2. Flúor - Teses
3. Cumarinas - Teses 4. Aminoácidos - Teses 5.
Mecanismos de reações orgânicas - Teses 6.
Triazóis - Teses I. Freitas, Rossimiriam Pereira
de, Orientadora II. Alves, Rosemeire Brondi,
Coorientadora III. Título.

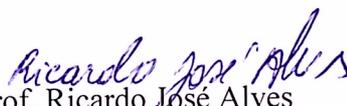
**"Estratégias para Marcação de Moléculas Bioativas: Síntese de Compostos
Fluorescentes e Radiomarcados com Flúor-18"**

Soraya Maria Zandim Maciel Dias Ferreira

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:



Prof. Rossimiriam Pereira de Freitas - Orientadora
UFMG



Prof. Ricardo José Alves
UFMG/FAFAR



Prof. Dorila Piló Veloso
UFMG



Prof. Giovanni Wilson Amarante
UFJF



Prof. Fabio Luiz Navarro Marques
USP

Belo Horizonte, 29 de setembro de 2015.

Este trabalho foi realizado sob a orientação da Professora Doutora Rossimiriam Pereira de Freitas (UFMG) e coorientação da Professora Doutora Rosemeire Brondi Alves (UFMG).

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro.”

Fernando Sabino

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

À Profa. Rossimiriam, com quem tanto aprendi, a orientação, a disponibilidade, a presteza e a amizade.

À Profa. Rosemeire toda a assistência na caracterização dos compostos sintetizados, a prontidão e o entusiasmo.

Aos alunos de iniciação científica Hugo, Ana Carolina e Augusto o empenho, a dedicação e o imenso auxílio nos experimentos.

Aos colegas do LABSINTO, Vanessa, Bruno, Natália, Flaviane, Laureana, Mariana, Fernando, Fabíola, Thiago, Keller, Luíza, Carlos e Angélica o trabalho em equipe e a convivência agradável.

À equipe da UPPR, em ordem alfabética: Adilson, Bruno, Cassiano, Eduardo, Flávia, Hoo, Hugo, José Carlos, Juliana, Leonardo, Malamut, Marilene, Marina, Moreira, Nelson, Paulo, Sérgio e Zacarias, a cooperação nos experimentos com Flúor-18, o ambiente de trabalho harmonioso e a compreensão.

Aos colegas do CDTN, Denise, Gracinha, Márcio, Roberto e Wagner, as palavras de estímulo e apoio.

Aos Profs. Daniel, Jarbas e Eufrânio, bem como aos respectivos grupos de trabalho, a colaboração profícua e as contribuições ao trabalho.

À Aretha e ao Daniel Santos o auxílio na obtenção dos espectros de massas.

Ao grupo do Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG as análises no infravermelho.

Aos meus queridos pais o exemplo, o incentivo, as orações e o carinho.

Ao meu irmão as frequentes visitas descontraídas.

Ao Eduardo, companheiro de todas as horas, a enorme ajuda na formatação do texto e nas análises estatísticas, os valiosos conselhos, a paciência, o apoio e o amor.

Aos meus familiares e amigos a torcida e os muitos momentos de alegria.

RESUMO

A Tomografia por Emissão de Pósitrons e a Imagem de Fluorescência são modalidades de imagem molecular, que permitem a visualização e a medida de processos biológicos nos níveis celular e molecular. Estas técnicas possuem vasta aplicação nas áreas de bioquímica, biologia, desenvolvimento de novos fármacos, diagnóstico e terapia. O objetivo pretendido com este trabalho consistiu na marcação de biomoléculas com flúor-18 ou com pró-fluoróforo cumarínico, visando a uma potencial aplicação para obtenção de imagens. Considerando a atividade antitumoral descrita para alguns alquiltriazóis fluorados, foi realizada a radiosíntese desses compostos com ^{18}F em substituição ao ^{19}F em duas etapas, sendo a primeira relativa à reação $\text{S}_{\text{N}}2$ com o ^{18}F fluoreto e a segunda, referente à reação “click” dos intermediários radiomarcados com o 4-pentin-1-ol, na presença de Cu(I). Para a radiosíntese, um método completamente automatizado foi desenvolvido, utilizando o módulo TracerLab MX FDG. Neste trabalho, foi realizada também a síntese em fase sólida do peptídeo UBI 31-38, seguida de conjugação a um pró-fluoróforo cumarínico via reação “click”. O peptídeo UBI 31-38 possui tamanho reduzido e acentuada atividade antimicrobiana, o que o torna um candidato promissor a agente diagnóstico ou terapêutico de infecções. A azidocumarina foi escolhida como marcador devido às suas propriedades fotofísicas desejáveis, pequeno tamanho, biocompatibilidade e facilidade de manipulação para sínteses. A reação “click” foi empregada como estratégia de marcação em ambos os casos, em função de sua rapidez, seletividade, alto rendimento e versatilidade. Vários compostos obtidos foram avaliados quanto a sua atividade biológica. Destaca-se a atividade antifúngica apresentada pelo conjugado triazólico peptídeo-cumarina contra várias linhagens de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, incluindo uma linhagem resistente ao fluconazol.

Palavras-chave: flúor-18, cumarina, peptídeo, reação “click”, ubiquidina, triazóis.

ABSTRACT

Strategies for labeling bioactive molecules: synthesis of fluorescent and fluorine-18 radiolabeled compounds

Positron Emission Tomography and Fluorescence imaging are molecular imaging techniques that enable the characterization and measurement of biologic processes at the cellular and molecular levels. Molecular imaging is showing enormous usefulness in the areas of biochemical, biology, drug discovery, diagnosis and therapy. Our goal in this work was to label bioactive molecules with fluorine-18 or with a coumarin profluorophore, aiming to develop probes with potential application in imaging processes. Since antitumoral activity was reported for some fluorinated alkyltriazoles, the radiosynthesis of these compounds was performed by replacing ^{19}F for ^{18}F on their structures in two steps: first, the bimolecular nucleophilic substitution reaction with ^{18}F fluoride; and subsequently, the click reaction of the resultant intermediates with 4-pentyn-1-ol in the presence of Cu(I). For the radiosynthesis, a new fully automated method was developed using the TracerLab MX FDG synthesizer module. In addition, the peptide UBI 31-38 was synthesized by means of solid phase peptide synthesis, and then, conjugated with a coumarin profluorophore via the click reaction. The reduced size of UBI 31-38, combined with its strong antimicrobial activity, make this compound a promising candidate for the diagnosis of infections or antimicrobial therapy. The azidocoumarin was chosen as profluorophore owing to its favorable photophysical properties, small size, biocompatibility and its ability to be easily manipulated synthetically. The click reaction was used as labelling strategy in both cases due to its speed, selectivity, the high yields and versatility. Some of the synthesized compounds were screened for their biological activity. Notably, the peptide-coumarin conjugate exhibited strong antifungal activity against a set of strains of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, including a fluconazole-resistant strain.

Keywords: fluorine-18, coumarin, peptide, click reaction, ubiquicidin, triazoles.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - A reação “click” ou CuAAC	5
Esquema 2 – Emprego da reação “click” para marcação de peptídeos com ^{18}F	6
Esquema 3 - Exemplos da aplicação da reação "click" utilizando 2- ^{18}F -fluoroetilazida e alcinos comerciais.....	7
Esquema 4 - Síntese de sondas BODIPY-triazólicas	9
Esquema 5 - Rota de síntese para obtenção do bloco construtor marcado com ^{18}F 5'	15
Esquema 6 - Reação para obtenção do derivado triazólico marcado com ^{18}F 6'	15
Esquema 7 - Rota de síntese proposta para obtenção dos conjugados peptídicos.....	16
Esquema 8 - Síntese do bloco construtor radiomarcado 5'	17
Esquema 9 - Solubilização do KF em DMSO e reação com 4 catalisada por 18-coroa-6	20
Esquema 10 - Formação do subproduto azidoformato 12	21
Esquema 11 – Preparação de 15 e síntese do bloco construtor radiomarcado 16'	26
Esquema 12 - Síntese de derivados triazólicos fluorados “frios” e radiomarcados	27
Esquema 13 - Proposta mecanística para a reação “click”	33
Esquema 14- Princípio da síntese de peptídeos em fase sólida.....	37
Esquema 15 - Mecanismo da reação de desproteção dos grupos Fmoc	38
Esquema 16 - Reação da ninidrina para detecção de aminas primárias	40
Esquema 17 - Proposta de mecanismo para reação de acoplamento mediada por DIC	41
Esquema 18 - Racemização causada pela formação de oxazolonas.....	42
Esquema 19- Proposta de mecanismo de acoplamento de aminoácidos com DIC e HOBt.....	43
Esquema 20 - Mecanismo de remoção do grupo protetor Boc.....	44
Esquema 21 - Síntese da 3-azido-7-dietilaminocumarina 10	45
Esquema 22 - Proposta mecanística para síntese da 7-dietilamino-3-nitrocumarina 29	46
Esquema 23- Proposta de mecanismo para síntese da 3-azido-7-dietilaminocumarina 10	47
Esquema 24 – Conjugação do alcinopeptídeo 8 via reação CuAAC	48
Esquema 25 - Síntese do derivado triazólico cumarínico 31	50
Esquema 26 - Princípio do ensaio do MTT	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Princípio da Tomografia por Emissão de Pósitrons.....	2
Figura 2 - Estrutura de ^{18}F FDG	3
Figura 3 - Representação esquemática do princípio da imagem de fluorescência	3
Figura 4 – Estrutura de blocos de síntese marcados com ^{18}F aplicados em reações CuAAC....	6
Figura 5 - Núcleos de fluoróforos sintéticos usuais	8
Figura 6 - Marcação fluorogênica de glicoconjugados em células vivas via reação CuAAC....	9
Figura 7 - Mecanismo de ação básico dos AMPs.....	11
Figura 8 - Estrutura de UBI 31-38.....	13
Figura 9 - Estrutura dos principais antifúngicos empregados no tratamento da criptococose .	14
Figura 10 – Montagem inicialmente utilizada para reação $\text{S}_{\text{N}}2$ com ^{18}F	22
Figura 11 – Ilustração do módulo TracerLab MX FDG com cassete adaptado para síntese de 5'	22
Figura 12 - Estrutura do <i>cryptand 2.2.2</i>	23
Figura 13 – Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos compostos (a) 4 e (b) 5 analisados em coluna analítica Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm), fase móvel: acetonitrila:água 7:3, 1,0 mL.min ⁻¹ e detector de índice de refração	24
Figura 14 – Cromatograma, obtido por CLAE, do bruto da reação de síntese de 5' em detector (a) de índice de refração e (b) de radioatividade, nas mesmas condições cromatográficas de 5	25
Figura 15 - Cromatograma, obtido por CLAE, do composto 16 analisado em coluna analítica Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm), fase móvel: acetonitrila:água 8:2, 1,0 mL.min ⁻¹ e detector de índice de refração	26
Figura 16 - Cromatograma, obtido por CLAE, do bruto da reação de síntese de 16' em detector (a) de índice de refração e (b) de radioatividade, nas condições cromatográficas de 16	27
Figura 17 - Cromatograma, obtido por CLAE, do composto 6 analisado em coluna analítica Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm), fase móvel: acetonitrila:água 7:3, 1,0 mL.min ⁻¹ e detector de índice de refração	29
Figura 18 - Cromatograma, obtido por CLAE, do bruto da reação de síntese de 6' em detector (a) de índice de refração e (b) de radioatividade, nas mesmas condições cromatográficas de 6	30

Figura 19 - Cromatograma, obtido por CLAE, do composto 17 analisado em coluna analítica Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm), fase móvel: acetonitrila:água 8:2, 1,0 mL.min ⁻¹ e detector de índice de refração	30
Figura 20 - Cromatograma, obtido por CLAE, do bruto da reação de síntese de 17' em detector (a) de índice de refração e (b) de radioatividade, nas mesmas condições cromatográficas de 17	31
Figura 21 - Representação do ciclo de síntese de peptídeos em fase sólida.....	34
Figura 22 - Grupo protetor Fmoc	35
Figura 23 - Resina Rink-Amide Fmoc aminometil-poliestireno	35
Figura 24 - Espectro de massas (MALDI-TOF) do derivado peptídico 9	49
Figura 25 - Resultados do ensaio fluorimétrico para avaliação da produção de ROS	53
Figura 26 - Curva de sobrevida de CCD-Lu.....	54
Figura 27 - Espectros de absorção e de emissão de 11 em água	55
Figura 28 - Espectros de absorção do composto 11 em diferentes concentrações	56
Figura 29- Curva de calibração do máximo de absorção em função da concentração de 11 ...	57
Figura 30- Espectros de absorção no UV de sulfato de quinina em diferentes concentrações	58
Figura 31 - Espectros de emissão de sulfato de quinina em diferentes concentrações	58
Figura 32 - Espectros de emissão do composto 11 em diferentes concentrações	59
Figura 33 - Relação entre o máximo de absorção de 11 em 423 nm com a área sobre o respectivo espectro de emissão em concentrações variadas	59
Figura 34 - Relação entre o máximo de absorção do sulfato de quinina em 345 nm com a área sobre o respectivo espectro de emissão em concentrações variadas	60
Figura 35 - Configuração adaptada dos reagentes e acessórios para síntese de 5' e 16' no módulo TracerLab MX FDG	69
Figura 36 - Configuração adaptada dos reagentes e acessórios para síntese dos triazóis 6' e 17' no módulo TracerLab MX FDG	73
Figura 37 - Seringa e filtro utilizados para síntese de peptídeos em fase sólida	76
Figura 38- Espectro de absorção na região do IV de 2 (ATR).....	101
Figura 39 - Espectro de RMN de ¹ H do composto 2 (200 MHz, CDCl ₃)	102
Figura 40 - Espectro de RMN de ¹³ C do composto 2 (50 MHz, CDCl ₃)	102
Figura 41 - Espectro de absorção na região do IV de 3 (ATR).....	103
Figura 42 - Espectro de RMN de ¹ H do composto 3 (200 MHz, CDCl ₃)	103
Figura 43 - Espectro de RMN de ¹³ C do composto 3 (50 MHz, CDCl ₃)	104
Figura 44 - Espectro de absorção na região do IV de 4 (ATR).....	104

Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H do composto 4 (200 MHz, CDCl_3)	105
Figura 46 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 4 (50 MHz, CDCl_3)	105
Figura 47 - Espectro de RMN de ^1H do composto 12 (400 MHz, CDCl_3)	106
Figura 48 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 12 (100 MHz, CDCl_3)	106
Figura 49 - Espectro de absorção na região do IV de 5 (ATR)	107
Figura 50 - Espectro de RMN de ^1H do composto 5 (200 MHz, CDCl_3)	107
Figura 51 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 5 (50 MHz, CDCl_3)	108
Figura 52 - Espectro de absorção na região do IV de 16 (ATR)	108
Figura 53 - Espectro de RMN de ^1H do composto 16 (200 MHz, CDCl_3)	109
Figura 54 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 16 (50 MHz, CDCl_3)	109
Figura 55 - Espectro de absorção na região do IV de 6 (ATR)	110
Figura 56 - Espectro de RMN de ^1H do composto 6 (200 MHz, CDCl_3)	110
Figura 57 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 6 (50 MHz, CDCl_3)	111
Figura 58 - Espectro de massas (MALDI-TOF) do peptídeo UBI 31-38	111
Figura 59 - Espectro de massas (MALDI-TOF) do alcinopeptídeo 8	112
Figura 60 - Espectro de absorção na região do IV de 29 (ATR)	112
Figura 61 - Espectro de RMN de ^1H do composto 29 (200 MHz, CDCl_3)	113
Figura 62 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 29 (50 MHz, CDCl_3)	113
Figura 63 - Espectro de absorção na região do IV de 30 (ATR)	114
Figura 64 - Espectro de RMN de ^1H do composto 30 (200 MHz, CDCl_3)	114
Figura 65 - Espectro de absorção na região do IV de 10 (ATR)	115
Figura 66 - Espectro de RMN de ^1H do composto 10 (400 MHz, CDCl_3)	115
Figura 67 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 10 (100 MHz, CDCl_3)	116
Figura 68 - Espectro de RMN de DEPT do composto 10 (100 MHz, CDCl_3)	116
Figura 69 - Espectro de RMN de HSQC do composto 10 (400 MHz, CDCl_3)	117
Figura 70 - Espectro de RMN de HMBC do composto 10 (400 MHz, CDCl_3)	117
Figura 71 - Espectro de massas (MALDI-TOF) do derivado peptídico 11	118
Figura 72 - Espectro de absorção na região do IV de 31 (ATR)	118
Figura 73 - Espectro de RMN de ^1H do composto 31 (200 MHz, CDCl_3)	119
Figura 74 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 31 (50 MHz, CDCl_3)	119
Figura 75 - Espectro de massas do composto 31 (ESI-MS)	120

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Lista de derivados de aminoácidos empregados na síntese de UBI 31-38 e respectivas estruturas	35
Quadro 2 - Sequência de eventos adaptada para síntese de 5' e 16'	70
Quadro 3 - Sequência de eventos adaptada para síntese dos derivados triazólicos radiomarcados 6' e 17'	74
Quadro 4 - Linhagens de <i>Cryptococcus</i> utilizadas e respectiva origem.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade de peptídeos UBI contra SARM (Brouwer <i>et al.</i> , 2006).	12
Tabela 2 – Resultados de rendimento radioquímico para marcação de 4 com ¹⁸ F em diferentes temperaturas.....	23
Tabela 3 - Pureza e rendimento radioquímicos dos derivados triazólicos radiomarcados após purificação	31
Tabela 4 - Valores de MIC para os compostos sintetizados contra linhagens de <i>C. gattii</i> e <i>C. neoformans</i>	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida, acrônimo em inglês para <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
AMP	Peptídeo antimicrobiano, acrônimo em inglês para <i>Antimicrobial Peptide</i>
ATR	Reflectância total atenuada, acrônimo em inglês para <i>Attenuated Total Reflectance</i>
Boc	<i>tert</i> -Butiloxicarbonila
BODIPY	Boro-dipirrometano
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDTN	Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CuAAC	Cicloadição 1,3-dipolar entre alcino e azida catalisada por cobre (I)
DCM	Diclorometano
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDT	1,2-Etanoditiol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
¹⁸ FDG	Fludesoxiglicose (18 F)
Fmoc	9-Fluorenilmetiloxicarbonil
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
IC	Concentração inibitória, acrônimo em inglês para <i>Inhibitory Concentration</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ICEEx	Instituto de Ciências Exatas

IV	Infravermelho
MALDI-TOF	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo, acrônimo em inglês para <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight</i>
MIC	Concentração inibitória mínima, acrônimo em inglês para <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
Pbf	2,2,4,6,7-pentametil-di-hidrobenzofurano-5-sulfonila
PET	Tomografia por emissão de pósitrons, acrônimo em inglês para <i>Positron Emission Tomography</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RR	Rendimento radioquímico
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilicina
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único, acrônimo em inglês para <i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>
SPFS	Síntese de peptídeos em fase sólida
tBu	<i>terc</i> -butila
TFA	Ácido trifluoroacético, acrônimo em inglês para <i>trifluoroacetic acid</i>
TIS	Triisopropilsilano
Trt	Tritila
UBI	Ubiquidina
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UPPR	Unidade de Pesquisa e Produção de Radiofármacos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Imagem molecular	1
1.2	Marcação de moléculas bioativas usando a reação “click”	4
1.2.1	Marcação de moléculas bioativas com ^{18}F	5
1.2.2	Marcação de moléculas bioativas com fluoróforos	7
1.3	Os peptídeos antimicrobianos: o caso da ubiquidina	10
1.4	Criptococose: a importância da descoberta de novos agentes anticriptococais	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	Objetivo geral.....	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1	Síntese dos blocos construtores contendo ^{18}F 5' e 16'	17
3.2	Radiossíntese de alquiltriazóis de cadeia longa contendo ^{18}F	27
3.3	Síntese e conjugação do peptídeo UBI 31-38.....	33
3.3.1	Síntese do peptídeo UBI 31-38 e do alcinopeptídeo 8	33
3.3.2	Síntese do pró-fluoróforo cumarínico 10	45
3.3.3	Síntese de derivados triazólicos via reação CuAAC	48
3.4	Avaliação da atividade biológica.....	50
3.4.1	Avaliação da atividade antifúngica.....	50
3.4.2	Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio.....	52
3.4.3	Teste de citotoxicidade	53
3.5	Estudos fotofísicos.....	55
4	PARTE EXPERIMENTAL.....	61
4.1	Métodos Gerais	61
4.1.1	Cromatografia em camada delgada	61

4.1.2	Cromatografia em coluna	61
4.1.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	61
4.1.4	Faixa de fusão	62
4.1.5	Espectroscopia na região do infravermelho.....	62
4.1.6	Espectrometria de Massas	62
4.1.7	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	62
4.1.8	Espectrometria UV-vis	63
4.1.9	Espectrometria de fluorescência.....	63
4.1.10	Tratamento de solventes e reagentes	63
4.2	Sínteses	63
4.2.1	Síntese de 9-bromononan-1-ol 2 (Hilario <i>et al.</i> , 2011).....	63
4.2.2	Síntese de 9-azidononan-1-ol 3 (Hilario <i>et al.</i> , 2011)	64
4.2.3	Síntese de metanossulfonato de 9-azidononanila 4 (Hilario <i>et al.</i> , 2011).....	65
4.2.4	Síntese de 1-azido-9-fluorononano 5 e 1-azido-12-fluorododecano 16 (Li <i>et al.</i> , 2008, com adaptações)	66
4.2.5	Radiossíntese do 1-azido-9-[¹⁸ F]fluorononano 5' e 1-azido-12-[¹⁸ F]fluorododecano 16' (Hamacher, Coenen e Stocklin, 1986, com adaptações)	68
4.2.6	Síntese dos derivados triazólicos fluorados 6 e 17	71
4.2.7	Radiossíntese dos derivados triazólicos fluorados 6' e 17' (Glaser <i>et al.</i> , 2007, com adaptações)	72
4.2.8	Síntese do peptídeo UBI 31-38 e do alcinopeptídeo	75
4.2.9	Síntese da 7-dietilamino-3-nitrocumarina 29 (Sivakumar <i>et al.</i> , 2004)	80
4.2.10	Síntese de 3-amino-7-dietilaminocumarina 30 (Sivakumar <i>et al.</i> , 2004).....	81
4.2.11	Síntese da 3-azido-7-dietilaminocumarina 10 (Sivakumar <i>et al.</i> , 2004).....	82
4.2.12	Síntese dos derivados peptídicos 1,2,3-triazólicos via reação “click” (Howarth e Ricci, 2011)	83
4.2.13	Síntese da 7-(dietilamino)-3-(4-(3-hidroxiopropil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)-2 <i>H</i> -cromen-2-ona 31	84

4.3	Ensaio biológicos	85
4.3.1	Avaliação da atividade antifúngica.....	85
4.3.2	Ensaio fluorimétricos para detecção de ROS.....	87
4.3.3	Teste de Citotoxicidade	87
4.4	Estudos fotofísicos	88
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	89
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
	ANEXO: ESPECTROS	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 Imagem molecular

A imagem molecular é considerada o futuro da imagem médica e pode ser definida como a caracterização e a medida de processos biológicos nos níveis celular e molecular. Ao contrário de outras modalidades de imagem convencional, a imagem molecular está voltada à visualização de anormalidades moleculares, que constituem a base das doenças, e não à visualização dos efeitos finais causados por essas alterações, permitindo o diagnóstico precoce de doenças. Além disso, os dados provenientes dos estudos de imagem molecular podem contribuir para uma melhor compreensão de fenômenos biológicos, identificação de regiões acometidas por uma determinada patologia e elucidação dos mecanismos envolvidos nas doenças. A imagem molecular constitui uma grande promessa nas áreas de diagnóstico, monitoramento terapêutico e desenvolvimento de novos fármacos (Weissleder e Mahmood, 2001; James e Gambhir, 2012).

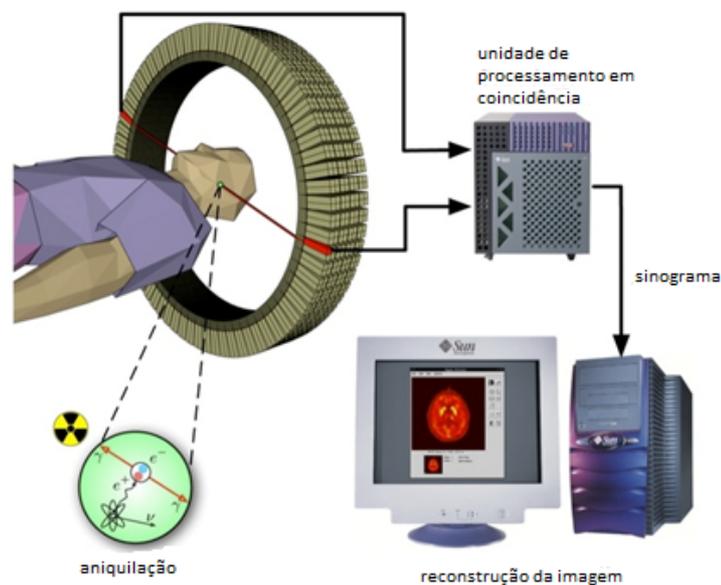
Embora a ressonância magnética, a ultrassonografia e a tomografia computadorizada sejam incluídas no rol das modalidades de imagem molecular, as imagens de medicina nuclear e as imagens ópticas são consideradas as modalidades de imagem molecular mais práticas devido à sua alta sensibilidade e especificidade (Kobayashi *et al.*, 2010).

Em medicina nuclear, duas técnicas tomográficas são empregadas para obtenção de imagens: a tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT, de *Single Photon Emission Computed Tomography*), na qual são utilizados radionuclídeos emissores de raios gama, tais como ^{99m}Tc , ^{123}I e ^{67}Ga , e a tomografia por emissão de pósitrons (PET, de *Positron Emission Tomography*), na qual são utilizados radionuclídeos emissores de pósitrons, a exemplo de ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N e ^{68}Ga (Saha, 2010). Essas técnicas apresentam elevada sensibilidade, são quantitativas, não invasivas e podem ser utilizadas para obtenção de imagens de corpo inteiro. Entretanto, a baixa resolução espacial, além da necessidade de utilização de compostos radioativos, que possuem meia vida e causam exposição do paciente e da equipe de medicina nuclear à radiação ionizante, podem ser citadas como desvantagens (Kobayashi *et al.*, 2010). Embora ambas as técnicas de medicina nuclear sejam amplamente utilizadas para diagnóstico, estadiamento e monitoramento terapêutico, a PET, em especial,

tem sido reconhecida e aplicada como uma ferramenta de pesquisa valiosa no processo de desenvolvimento e avaliação de fármacos (Mamat, Ramenda e Wuest, 2009).

A PET baseia-se na detecção em coincidência de dois raios gama de 511 keV diametralmente opostos, emitidos após a aniquilação de um pósitron, emitido por um radionuclídeo que foi administrado ao paciente junto a uma substância bioativa (carreador), com um elétron do meio. Os dados são coletados ao redor do eixo do corpo do paciente e processados para reconstrução de imagens, como mostrado na Figura 1 (Saha, 2010; Alauddin, 2012).

Figura 1 - Princípio da Tomografia por Emissão de Pósitrons

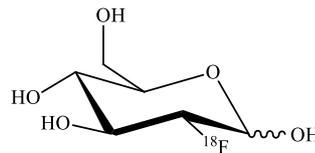


Adaptado de http://sitemaker.umich.edu/pet.chemistry/positron_emission_tomography.

Os radiotraçadores para PET são formados pela combinação de um radionuclídeo emissor de pósitrons com uma substância biologicamente ativa. O ^{18}F é um emissor de pósitrons amplamente utilizado, em virtude de suas propriedades físicas favoráveis: possui meia vida de 109,7 minutos, o que permite a execução de radiossínteses envolvendo mais de uma etapa, e emite pósitrons de baixa energia e curto alcance, o que resulta em imagens de elevada resolução e baixa dose de radiação aos pacientes (Schirmacher, Wangler e Schirmacher, 2007; Li e Conti, 2010). A fludesoxiglicose (18 F) - ^{18}F FDG (Figura 2, página 3) – é o radiofármaco mais comumente utilizado em PET, com aplicações em cardiologia, neurologia e, principalmente, em oncologia (Wood, Hoskin e Saunders, 2007). O acúmulo de

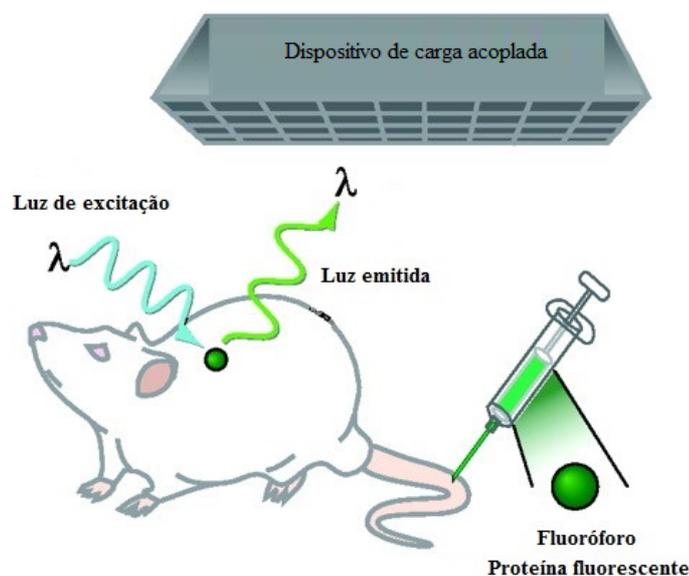
^{18}F FDG nos tecidos é proporcional à utilização de glicose. As células malignas, em sua maioria, apresentam metabolismo glicolítico aumentado em relação às normais. Essa diferença se traduz em maior consumo de glicose pelas células tumorais e, conseqüentemente, em maior captação de ^{18}F FDG, permitindo a detecção precoce de tumores (Fletcher *et al.*, 2008; Soares Junior *et al.*, 2010).

Figura 2 - Estrutura de ^{18}F FDG



Diferentemente da SPECT e PET, que são amplamente utilizadas na clínica para o diagnóstico por imagem, a imagem de fluorescência é uma técnica de imagem óptica emergente, com importância crescente em pesquisas pré-clínicas e translacionais (Sevick-Muraca, 2012). Na fluorescência, uma luz externa com comprimento de onda apropriado é utilizada para excitar uma substância fluorescente, que emite, quase imediatamente, uma luz com comprimento de onda maior e de menor energia, que é detectada em uma câmera com dispositivo de carga acoplada (em inglês, *charge-coupled device*) e convertida em imagem, como representado na Figura 3 (Luker e Luker, 2008; James e Gambhir, 2012).

Figura 3 - Representação esquemática do princípio da imagem de fluorescência



Adaptado de James e Gambhir, 2012.

A imagem de fluorescência pode ser aplicada a uma diversidade de pesquisas biológicas. Como exemplo, podem ser citados o estudo *in vivo* da atividade das metaloproteinases da matriz, enzimas proteolíticas responsáveis pela degradação da matriz extracelular, também envolvidas na metástase e angiogênese de tumores, utilizando substratos fluorogênicos (Bremer, Tung e Weissleder, 2001); a detecção de metástases pulmonares que expressam o receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano em modelos murinos a partir de anticorpos conjugados a fluoróforos (Koyama *et al.*, 2007) e o mapeamento de linfonodos sentinelas com indocianina verde em um estudo clínico piloto realizado com pacientes com câncer de mama (Trojan *et al.*, 2009).

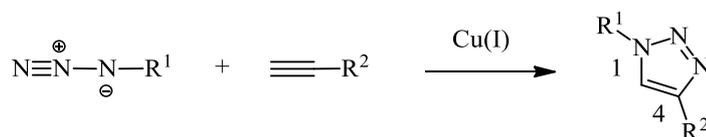
A maior desvantagem desta técnica está relacionada à atenuação e ao espalhamento da luz, causados pelos tecidos. No caso do espectro do visível, a absorção da luz por biomoléculas como a hemoglobina, lipídeos e água pode reduzir o sinal óptico em aproximadamente 10 vezes por centímetro de tecido. A alternativa para visualização de tecidos mais profundos por fluorescência baseia-se na obtenção de imagens na região do infravermelho próximo ($\lambda = 650-900$ nm), na qual a absorção de luz pelas biomoléculas é mais baixa e a autofluorescência tecidual encontra-se reduzida. Destaca-se, porém, que para determinadas aplicações, como a detecção de tumores na superfície epitelial, emissores de luz com comprimentos de onda mais baixos (na região do azul, verde ou amarelo) e alta eficiência quântica podem produzir resultados tão bons quanto, ou ainda melhores do que as sondas na região do infravermelho próximo (Luker e Luker, 2008; Kobayashi *et al.*, 2010).

1.2 Marcação de moléculas bioativas usando a reação “click”

O termo “química click” foi introduzido em 2001 por Sharpless para designar um conjunto de reações químicas termodinamicamente favoráveis, de simples execução em laboratório e elevado rendimento. Para ser considerada “click”, uma reação deve atender os seguintes requisitos: ser rápida e estereoespecífica, fornecer produtos com alto rendimento, gerar somente produtos secundários que possam ser removidos por métodos não cromatográficos, ser realizada sob condições diversas (idealmente o processo não deve ser sensível a oxigênio e água), com materiais de partida e reagentes acessíveis, sem o uso de solventes, com solventes atóxicos ou de fácil remoção, de modo que o produto possa ser facilmente isolado (Kolb, Finn e Sharpless, 2001).

A reação de cicloadição 1,3-dipolar entre um alcino e uma azida catalisada por cobre (I) – CuAAC – representada no Esquema 1 é o principal exemplo de química “click”. Esta reação ocorre sob condições brandas e requer procedimentos simples de purificação, gerando produtos com elevado rendimento. Apresenta a conveniência de utilizar como materiais de partida alcinos e azidas funcionalizados, com formação regioespecífica do isômero 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituído (Rostovtsev *et al.*, 2002; Freitas *et al.*, 2011). Além disso, os triazóis são estáveis em condições fisiológicas e podem se associar a alvos biológicos através de ligações de hidrogênio e interações dipolo (Mamat, Ramenda e Wuest, 2009). Em química medicinal, a reação CuAAC tem sido largamente empregada como ferramenta para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, seja como estratégia de hibridação molecular, seja como método de síntese rápida de novos análogos de compostos potencialmente ativos. A reação tornou-se também muito popular em áreas de interface com a química orgânica, como aquela representada pela bioconjugação, possibilitando a derivatização de biomoléculas tais como peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, ou carboidratos. Enfim, o número de trabalhos descrevendo o uso desta reação para a obtenção dos mais diversos produtos inéditos é crescente e vasto, demonstrando seu enorme potencial na ciência contemporânea (Freitas *et al.*, 2011).

Esquema 1 - A reação “click” ou CuAAC

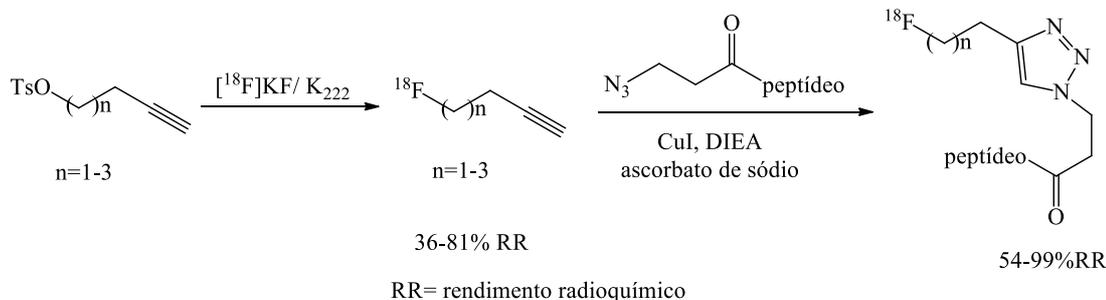


1.2.1 Marcação de moléculas bioativas com ^{18}F

Apesar do reconhecido valor das imagens PET, as aplicações potenciais da técnica dependem significativamente da disponibilidade de radiotraçadores apropriados. O desenvolvimento de novos radiotraçadores, contudo, mostra-se desafiador e a radioquímica envolvida nesse processo é apontada como a principal limitante no âmbito de PET (Li e Conti, 2010). O principal desafio está relacionado ao desenvolvimento de radiosínteses que sejam rápidas, de alto rendimento, quimiosseletivas e que não necessitem de etapas de desproteção. Diante dessas demandas, a reação CuAAC apresenta-se como uma abordagem atraente para o planejamento e a síntese de radiotraçadores (Glaser e Robins, 2009).

A reação CuAAC foi aplicada pela primeira vez como estratégia para marcação com ^{18}F por Marik e Sutcliffe (2006), que reagiram alcinos marcados com ^{18}F e peptídeos funcionalizados com o grupo azido para síntese de peptídeos radiomarcados (Esquema 2).

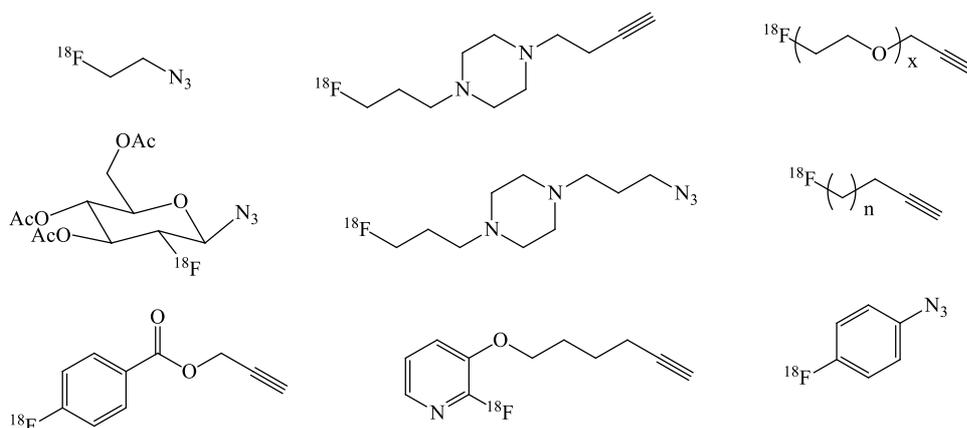
Esquema 2 – Emprego da reação “click” para marcação de peptídeos com ^{18}F



Fonte: Marik e Sutcliffe, 2006.

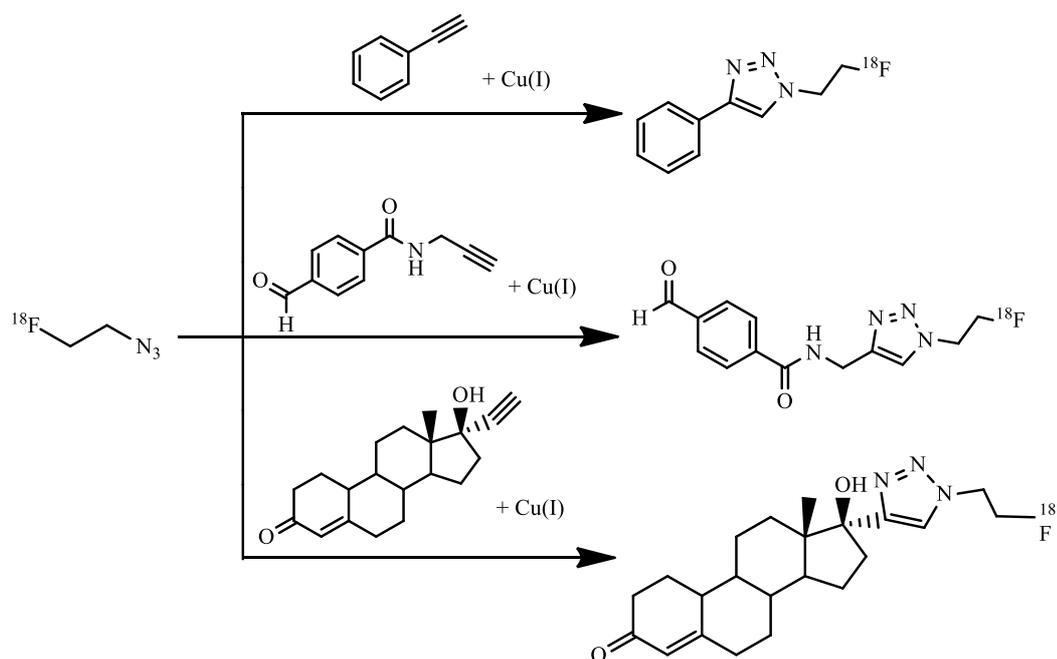
Desde então, vários estudos têm demonstrado a viabilidade de utilizar esta técnica para marcação de substâncias com ^{18}F com elevada eficiência (Glaser e Arstad, 2007; Kim *et al.*, 2008; Ross *et al.*, 2008; Gill e Marik, 2011; Pretze, Pietzsch e Mamat, 2013). Uma abordagem usual baseia-se no uso de pequenos blocos de síntese que atuam como agentes de marcação bifuncionais. Em geral, a aplicação desses blocos envolve a incorporação do radionuclídeo a uma pequena molécula orgânica, a qual pode, posteriormente, ser ligada a peptídeos, proteínas, oligonucleotídeos e antibióticos, sob condições brandas de reação (Glaser e Robins, 2009; Mamat, Ramenda e Wuest, 2009). Exemplos de blocos construtores funcionalizados com alcino ou azida e marcados com ^{18}F são mostrados na Figura 4 (Kettenbach, Schieferstein e Ross, 2014).

Figura 4 – Estrutura de blocos de síntese marcados com ^{18}F aplicados em reações CuAAC



Em uma publicação recente, derivados 1,2,3-triazólicos marcados com ^{18}F foram obtidos com elevado rendimento radioquímico, após procedimento simplificado de purificação, utilizando 2- ^{18}F -fluoroetilazida e diferentes alcinos comerciais via reação “click”, como exemplificado no Esquema 3 (Zhou *et al.*, 2015).

Esquema 3 - Exemplos da aplicação da reação "click" utilizando 2- ^{18}F -fluoroetilazida e alcinos comerciais

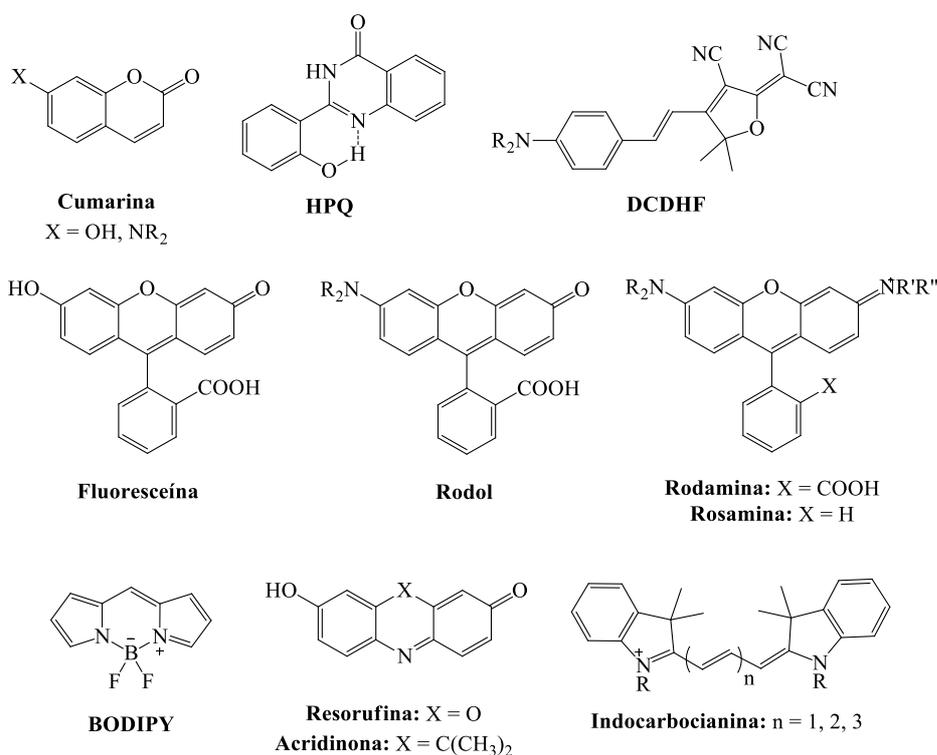


1.2.2 Marcação de moléculas bioativas com fluoróforos

No caso da imagem de fluorescência, a reação CuAAC também tem sido empregada para ligação dos fluoróforos a uma diversidade de biomoléculas, produzindo os respectivos conjugados. Como a reação CuAAC é bio-ortogonal, ela pode ser utilizada para a marcação seletiva de biomoléculas, inclusive em sistemas biológicos, permitindo que proteínas, glicoconjugados e outras biomoléculas de interesse sejam visualizadas em um ambiente fisiologicamente relevante. Em alguns estudos, substratos não fluorescentes são utilizados e, após a reação “click”, convertidos em produtos 1,2,3-triazólicos fluorescentes. Enquanto estes últimos geram um sinal detectável forte, os reagentes remanescentes não contribuem para o ruído da imagem (Sivakumar *et al.*, 2004; Sawa *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2007; Zhou, Yao, *et al.*, 2013).

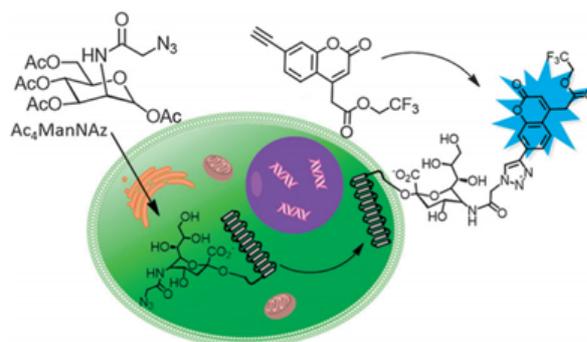
Os fluoróforos podem ser divididos em três classes principais: fluoróforos sintéticos de pequena massa molecular, proteínas codificadas geneticamente e nanocristais fluorescentes (Kobayashi *et al.*, 2010). Os fluoróforos sintéticos oferecem vantagens em relação aos demais, pois o uso de estratégias químicas permite moldar as propriedades e a posição do fluoróforo em um experimento. Na Figura 5 estão representadas as estruturas dos fluoróforos sintéticos mais comumente empregados em pesquisas biológicas (Wysocki e Lavis, 2011).

Figura 5 - Núcleos de fluoróforos sintéticos usuais



O núcleo cumarínico tem sido utilizado como pró-fluoróforo em muitos trabalhos devido às suas propriedades fotofísicas desejáveis, pequeno tamanho, biocompatibilidade e facilidade de manipulação para sínteses (Sivakumar *et al.*, 2004; Ray e Bharadwaj, 2008). Rong e colaboradores (2014), por exemplo, sintetizaram uma sonda fluorogênica cumarínica, funcionalizada com grupo alcino, que foi utilizada para marcação de glicoproteínas contendo o azidoaçúcar Ac₄ManNAz, em células vivas, via reação CuAAC, como representado na Figura 6, página 9 (Rong *et al.*, 2014).

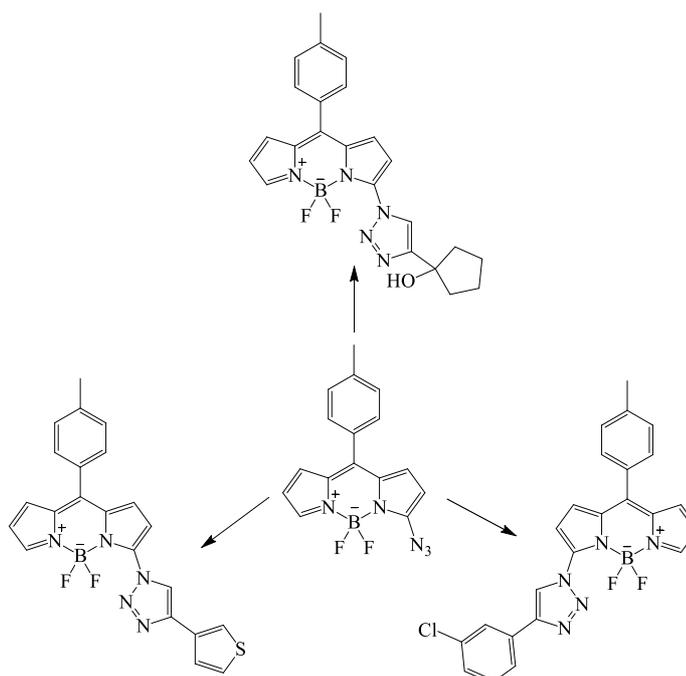
Figura 6 - Marcação fluorogênica de glicoconjugados em células vivas via reação CuAAC



Fonte: Rong *et al.*, 2014

Seguindo esta mesma linha, em uma publicação recente (Chauhan *et al.*, 2014), uma sonda fluorogênica contendo grupo azido ligado ao anel de boro-dipirrometano (BODIPY) foi ativada por ligação CuAAC com alcinos alifáticos e aromáticos, fornecendo triazóis fluorescentes, que foram utilizados para obtenção de imagens em células (Esquema 4). Dentre as vantagens de se utilizar fluoróforos derivados de BODIPY, destacam-se a intensa absorção da luz visível, os coeficientes de extinção molar relativamente altos, a biocompatibilidade, a estabilidade química e fotoquímica, além da possibilidade de funcionalização do núcleo de BODIPY, como estratégia para obtenção de fluoróforos que absorvem e emitem luz em comprimentos de onda maiores (Loudet e Burgess, 2007).

Esquema 4 - Síntese de sondas BODIPY-triazólicas

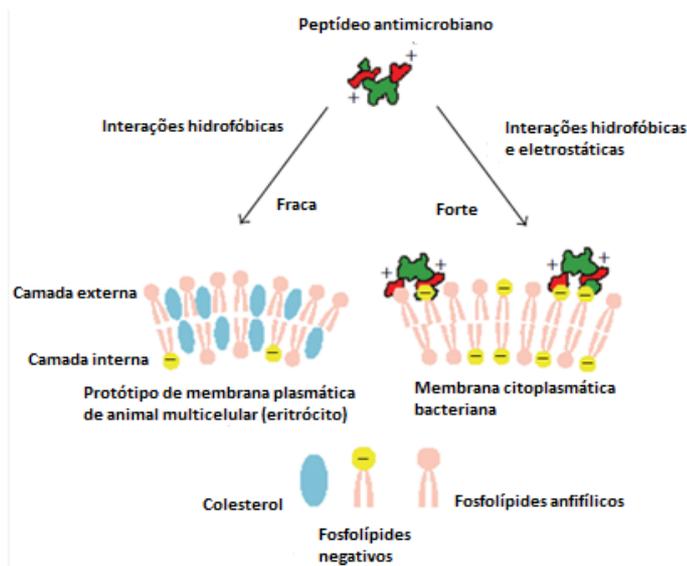


1.3 Os peptídeos antimicrobianos: o caso da ubiquicidina

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs, de *antimicrobial peptides*) são substâncias contendo menos que cem resíduos de aminoácidos, que apresentam amplo espectro de ação contra bactérias, vírus e fungos (Ganz, 2003; Izadpanah e Gallo, 2005). Constituem um componente essencial do sistema de defesa inato e são produzidos por microrganismos, bem como por organismos multicelulares de ambos os reinos vegetal e animal (Bulet, Stocklin e Menin, 2004; Li *et al.*, 2012). Os AMPs são considerados bons candidatos para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e de diagnóstico em função de sua diversidade estrutural, seletividade, baixa propensão ao aparecimento de resistência e mecanismos de ação distintos dos agentes antimicrobianos convencionais (Bradshaw, 2003; Brouwer, Wulferink e Welling, 2008; Ahmad *et al.*, 2012).

Os mecanismos pelos quais os peptídeos antimicrobianos agem contra os patógenos são diversos e complexos (Nguyen, Haney e Vogel, 2011). Como a maioria dos AMPs é catiônica e anfifílica, acredita-se que a base do mecanismo de ação dessas substâncias envolva uma interação eletrostática inicial dos domínios catiônicos com a membrana celular negativamente carregada dos microrganismos, seguida de inserção na bicamada lipídica por meio de interações hidrofóbicas (Figura 7, página 11). Como consequência, podem ocorrer o aumento transitório da permeabilidade da membrana e o extravasamento de constituintes celulares, levando à lise celular (Izadpanah e Gallo, 2005). Outros mecanismos antimicrobianos que afetam processos celulares chave, como a síntese de proteínas e de DNA, o enovelamento de proteínas, a atividade enzimática e a síntese de parede celular também foram descritos (Nguyen, Haney e Vogel, 2011).

Figura 7 - Mecanismo de ação básico dos AMPs



Adaptado de Lupetti *et al.*, 2003.

A ligação preferencial dos AMPs aos patógenos, em detrimento às células de mamíferos, pode ser explicada pela presença de fosfolípidos negativamente carregados que ficam expostos na superfície das membranas dos microrganismos; porém, segregados na camada interna da membrana (voltada ao citoplasma) nas células de plantas e animais (Zaslouff, 2002; Lupetti *et al.*, 2003). Além disso, a presença de colesterol nas membranas eucarióticas reduz a ligação aos AMPs, impedindo a ruptura da bicamada lipídica (Matsuzaki *et al.*, 1995; Glukhov *et al.*, 2005).

Existe grande interesse na marcação fluorescente ou radioativa de peptídeos antimicrobianos que podem ser empregados para estudos de mecanismo de ação e diagnóstico de infecções por imagem, dentre outras aplicações (Friedrich *et al.*, 2000; Bucki *et al.*, 2004; Akhtar *et al.*, 2005; Salber *et al.*, 2008; White *et al.*, 2010; Gee *et al.*, 2013; Liu e Gu, 2013; Chen *et al.*, 2014; Ebenhan *et al.*, 2014; Mokaleng *et al.*, 2015). O fragmento do peptídeo antimicrobiano ubiquidina 29-41 marcado com ^{99m}Tc , por exemplo, tem sido extensamente investigado como agente de diagnóstico diferencial entre infecções e inflamações assépticas em animais e humanos (Welling *et al.*, 2000; Welling *et al.*, 2001; Melendez-Alafort *et al.*, 2004; Nibbering *et al.*, 2004; Akhtar *et al.*, 2005). Constituída por 59 resíduos de aminoácidos, a ubiquidina (UBI) foi inicialmente isolada de macrófagos murinos e posteriormente encontrada em humanos, em baixas concentrações, como primeira linha de defesa nas células epiteliais das vias aéreas, em macrófagos ativados e na mucosa do cólon

(Hiemstra *et al.*, 1999; Wiesner e Vilcinskas, 2010; Akhtar *et al.*, 2012). Outros fragmentos desse peptídeo (UBI 18-35 e UBI 31-38) marcados com ^{99m}Tc também se mostraram efetivos para o diagnóstico de infecções, devido à ligação preferencial aos microrganismos (Welling *et al.*, 2001; Akhtar *et al.*, 2005; Brouwer *et al.*, 2006).

O peptídeo UBI e seus fragmentos foram também investigados quanto à potencial atividade contra uma diversidade de patógenos, tais como *Aspergillus fumigatus* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (SARM), um alvo prioritário para o desenvolvimento de novos antibióticos em função do risco que representa à saúde (Brouwer *et al.*, 2006; Lupetti *et al.*, 2008). Destaca-se a pesquisa conduzida por Brouwer e colaboradores (2006), em que a eficácia antimicrobiana do peptídeo UBI 1-59 e de seus fragmentos foi estudada tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Como pode ser observado na Tabela 1, os resultados demonstraram que o peptídeo UBI 1-59 apresentou maior atividade contra SARM, seguido de UBI 31-38.

Tabela 1 - Atividade de peptídeos UBI contra SARM (Brouwer *et al.*, 2006).

Peptídeo	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
	IC 50 ^a (μM)	IC 50 ^b (μmol/camundongo)
UBI 1-59	0,60	0,42
UBI 1-18	24,5	8,2
UBI 18-35	23,5	2,9
UBI 36-41	>200	6,6
UBI 42-59	>200	8,0
UBI 18-29	82,5	68,0
UBI 29-41	20,0	3,1
UBI 31-38	16,0	0,10
UBI 22-35	38,0	5,8

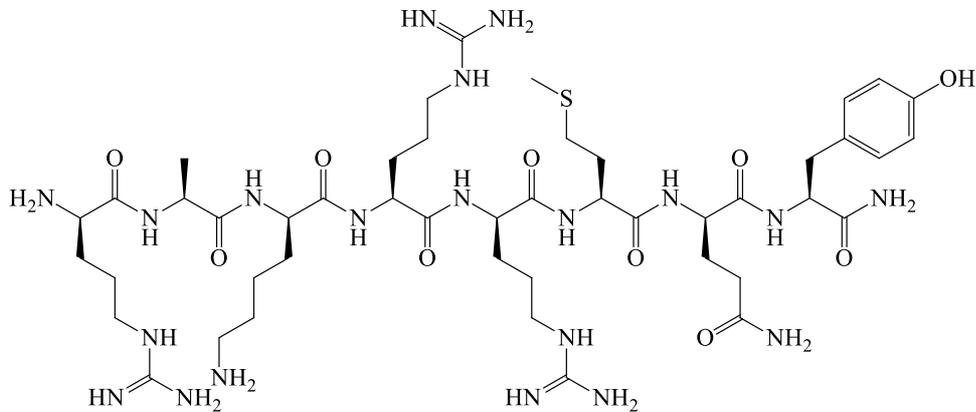
^a IC 50 foi determinada após 2 h de incubação.

^b IC 50 foi determinada pela medida de microrganismos viáveis/g de tecido em camundongos tratados em comparação com camundongos não tratados. O número de bactérias foi determinado 24 h após administração do peptídeo, isto é, 18 h após o início da infecção (1×10^7 UFC/camundongo).

A disponibilidade, possibilidade de síntese química, tamanho reduzido e acentuada atividade de UBI 31-38 (Figura 8, página 13) fazem desse peptídeo um candidato promissor a agente diagnóstico ou terapêutico de infecções (Brouwer *et al.*, 2006).

Figura 8 - Estrutura de UBI 31-38

Sequência de aminoácidos: RAKRRMQY



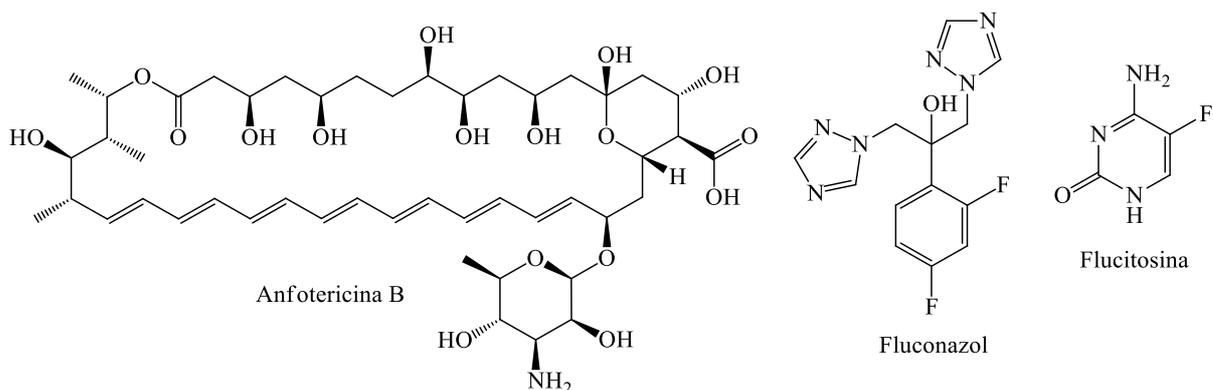
Ao contrário da maioria dos peptídeos antimicrobianos que são armazenados em grânulos e transferidos a fagolisossomos ou secretados no ambiente extracelular, a UBI está presente na porção citosólica e é liberada somente após dano celular grave, durante a infecção aguda. Peptídeos antimicrobianos citoplasmáticos podem desempenhar um papel na inibição do crescimento bacteriano no citosol da célula do hospedeiro e é possível que contribuam com as defesas do hospedeiro se forem liberados após a desintegração de macrófagos mortos. Destaca-se, porém, que a relevância fisiológica, o mecanismo de ação e o espectro antimicrobiano da UBI ainda estão pouco esclarecidos (Wiesner e Vilcinskas, 2010).

1.4 Criptococose: a importância da descoberta de novos agentes anticriptococais

A criptococose é uma micose importante, responsável por mais de 600.000 mortes em todo o mundo a cada ano (Kwon-Chung *et al.*, 2014). A infecção é usualmente transmitida por inalação de basidiósporos ou leveduras dessecadas, sendo as espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* os principais agentes etiológicos da doença (Chayakulkeeree e Perfect, 2006). Do ponto de vista clínico e epidemiológico, tem-se a criptococose oportunista, cosmopolita, associada a condições de imunodepressão celular, causada predominantemente por *C. neoformans*, e a criptococose primária de hospedeiro aparentemente imunocompetente, endêmica em áreas tropicais e subtropicais, causada predominantemente por *C. gattii* (Consenso em criptococose, 2008). A criptococose acomete sítios pulmonares e cutâneos, embora a manifestação mais grave da doença ocorra no sistema

nervoso central, causando meningoencefalite, que é 100% fatal nos casos não tratados (Buchanan e Murphy, 1998). O tratamento é essencial para reduzir a mortalidade por criptococose; entretanto, o arsenal terapêutico disponível é limitado. Os antifúngicos mais frequentemente empregados para o combate da infecção por *Cryptococcus* estão mostrados na Figura 9 (Ferreira *et al.*, 2015). A combinação de anfotericina B com flucitosina é a terapia de indução recomendada para meningoencefalite criptocócica e criptococose pulmonar grave (Perfect *et al.*, 2010). Apesar de sua eficácia, os efeitos adversos e a nefrotoxicidade causados pela anfotericina B limitam seu uso (Laniado-Laborin e Noemi Cabrales-Vargas, 2009). A flucitosina, por sua vez, não está disponível na maior parte da África e da Ásia, onde a incidência da doença é mais alta (Loyse *et al.*, 2013). Em regiões com recursos limitados, o fluconazol constitui o principal tratamento da doença em pacientes com AIDS. Contudo, o aparecimento de cepas resistentes a fluconazol já foi descrito (Yamazumi *et al.*, 2003; Varma e Kwon-Chung, 2010; Cheong e McCormack, 2013). Existe, portanto, uma grande demanda pelo desenvolvimento de novos agentes antifúngicos para o tratamento desta micose. Embora a UBI e alguns de seus fragmentos sejam ativos contra uma diversidade de microrganismos patogênicos, não foram encontradas evidências na literatura de que tenham sido investigados contra linhagens do fungo *C. neoformans* ou *C. gattii*.

Figura 9 - Estrutura dos principais antifúngicos empregados no tratamento da criptococose



2 OBJETIVOS

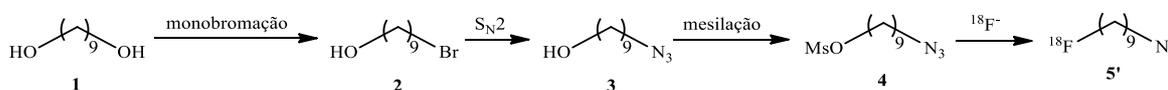
2.1 Objetivo geral

Considerando a importância das técnicas de imagem molecular e a versatilidade da reação “click”, o objetivo pretendido com este trabalho consistiu na síntese de novas substâncias marcadas com ^{18}F e de um conjugado do peptídeo UBI 31-38 com pró-fluoróforo cumarínico, como potencial candidato a marcador molecular e agente terapêutico de infecções.

2.2 Objetivos específicos

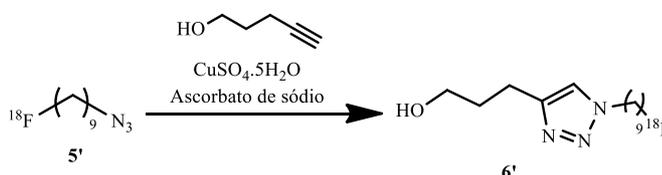
- Sintetizar o bloco construtor **5'** contendo ^{18}F e função azida, em quatro etapas, a partir do diol comercial **1**, como representado no Esquema 5.

Esquema 5 - Rota de síntese para obtenção do bloco construtor marcado com ^{18}F **5'**



- A partir do bloco construtor **5'**, sintetizar o derivado triazólico radiomarcado **6'** via reação “click” (Esquema 6), considerando a atividade antitumoral descrita para o composto “frio” **6** na literatura (Gontijo *et al.*, 2015).

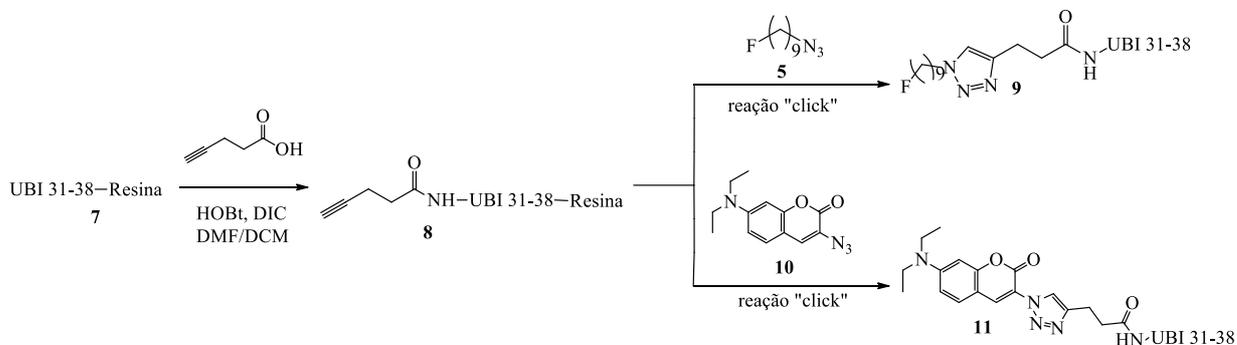
Esquema 6 - Reação para obtenção do derivado triazólico marcado com ^{18}F **6'**



- Sintetizar o composto **8** (Esquema 7), um derivado do peptídeo antimicrobiano UBI 31-38 contendo função alcino, utilizando o método de síntese de peptídeos em fase sólida, para posterior conjugação do mesmo ao bloco construtor **5**.

- Conjugar o derivado peptídico UBI 31-38 **8** ao pró-fluoróforo cumarínico **10** via reação “click” (Esquema 7) e realizar estudos fotofísicos do bioconjugado **11**.

Esquema 7 - Rota de síntese proposta para obtenção dos conjugados peptídicos



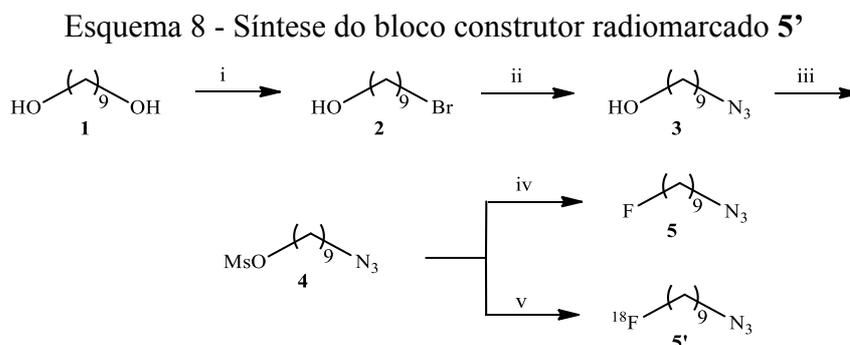
- Caracterizar os compostos obtidos por meio de técnicas como espectroscopia no infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) e por espectrometria de massas.
- Avaliar a atividade antimicrobiana e citotóxica *in vitro* dos derivados obtidos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção está dividida em cinco partes. Na primeira, a síntese de blocos construtores marcados com ^{18}F será abordada. Na segunda, a obtenção de derivados triazólicos a partir dos blocos construtores contendo ^{18}F via reação CuAAC serão apresentados. Na terceira, a síntese em fase sólida e a conjugação do peptídeo UBI 31-38 com pró-fluoróforo cumarínico e com 1-azido-9-fluorononano serão discutidas. Na quarta, a atividade biológica de alguns compostos inéditos obtidos será relatada. Por fim, os resultados dos estudos fotofísicos do bioconjugado **11** serão discutidos.

3.1 Síntese dos blocos construtores contendo ^{18}F **5'** e **16'**

O 1-azido-9-fluorononano **5** e 1-azido-9- ^{18}F fluorononano **5'** foram sintetizados a partir do 1,9-nonanodiol comercial **1** em quatro etapas: monobromação seletiva, seguida de substituição nucleofílica bimolecular com azida de sódio, mesilação e, por fim, substituição nucleofílica bimolecular com fluoreto de potássio ou com ^{18}F fluoreto, como representado no Esquema 8.



Reagentes e condições: i) HBr (48%), tolueno, refluxo, 24 h, rendimento: 80%; ii) NaN_3 (0,5 mol.L⁻¹ em DMSO), temperatura ambiente, 23 h, rendimento: 95%; iii) Cloreto de mesila, trietilamina, diclorometano, temperatura ambiente, 24 h, rendimento: 87%; iv) KF, 18-coroa-6, DMSO, refluxo, 24 h, rendimento: 57%; v) $^{18}\text{F}^-$, K_2CO_3 , *Cryptand* 2.2.2, acetonitrila, 110°C, 15 min, rendimento radioquímico: $27,5 \pm 0,3\%$ (n = 3).

Na primeira etapa, o 1,9-nonanodiol **1** foi mantido sob refluxo com solução aquosa de ácido bromídrico 48%, utilizando-se tolueno como solvente. O balão de reação foi acoplado a um sistema extrator de água (aparelho de Dean-Stark), pois a remoção da água formada no meio favorece o deslocamento do equilíbrio da reação no sentido da formação dos produtos. O rendimento obtido (80%) foi semelhante ao relatado por Grube e colaboradores (86%) e por Hilário e colaboradores (70-80%) (Grube, Timm e Kock, 2006; Hilario *et al.*, 2011). Utilizou-se 1,1 equivalente de HBr para cada equivalente do 1,9-nonanodiol, o que favoreceu a obtenção do produto monobromado em relação ao dibromado. Ainda que minoritário, o produto dibromado foi obtido e isolado durante a etapa de purificação.

Na etapa seguinte, o 9-azidononan-1-ol **3** foi sintetizado via reação de substituição nucleofílica bimolecular, com base no método descrito por Alvarez e colaboradores (1997) para preparação de azidas alquílicas, utilizando brometos de alquila e azida de sódio em DMSO, à temperatura ambiente (Alvarez e Alvarez, 1997). O método de síntese empregado levou à obtenção do produto de interesse com elevado rendimento (95%), em concordância com o relatado (97%) por Hilário e colaboradores (2011). Além disso, a reação foi realizada sem aquecimento, um aspecto importante a ser considerado, uma vez que muitas azidas são substâncias explosivas, que se decompõem, com consequente liberação de N₂, a partir de um estímulo externo menor, como pressão, impacto ou calor (Brase *et al.*, 2005).

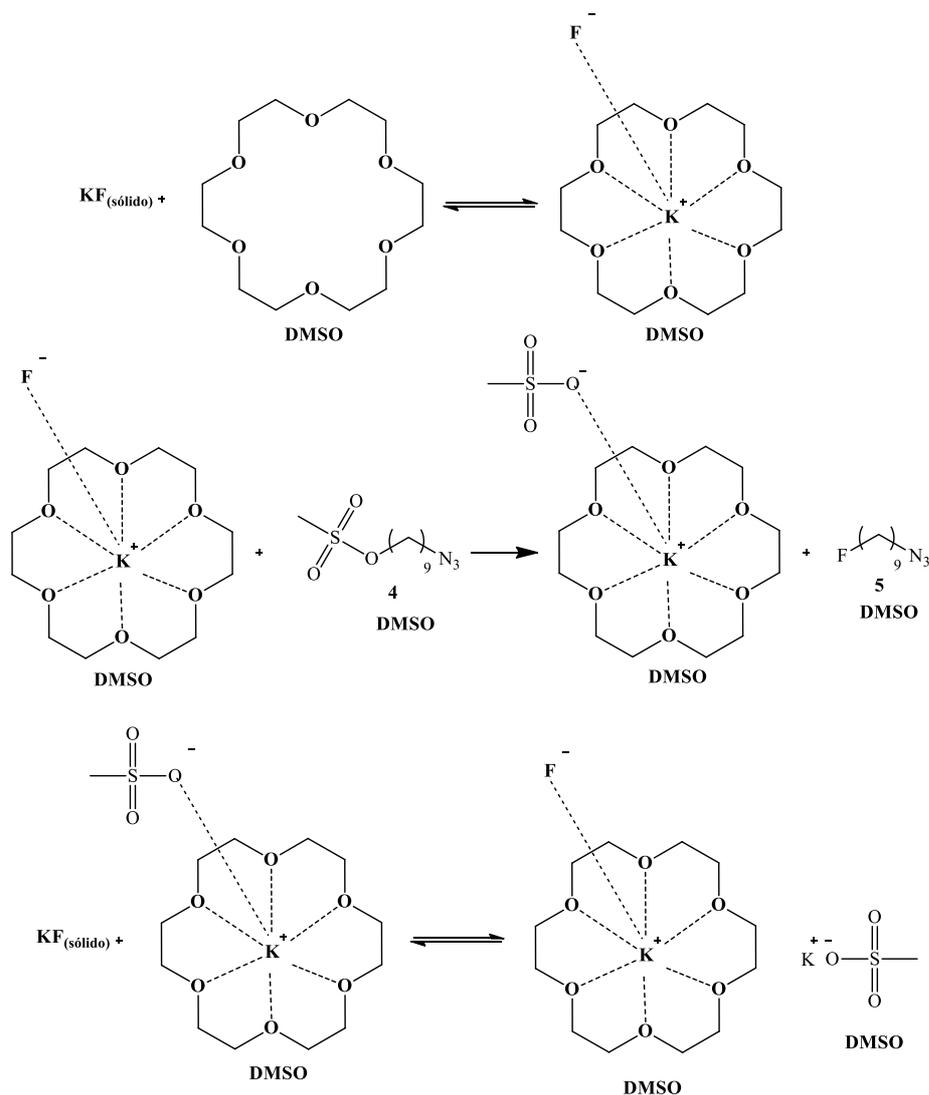
A conversão do 9-azidononan-1-ol **3** no metanossulfonato de 9-azidononanila **4** foi realizada conforme procedimento descrito por Hilário e colaboradores (2011). O sistema foi deixado sob agitação magnética durante 24 horas à temperatura ambiente, fornecendo o produto **4** como um óleo amarelo com 87% de rendimento. O objetivo nesta etapa era introduzir um bom grupo abandonador na molécula, que pudesse ser facilmente substituído pelo fluoreto na etapa seguinte. Os grupos abandonadores geralmente empregados para substituição nucleofílica com [¹⁸F]fluoreto são os sulfonatos (triflato, mesilato, tosilato ou nosilato) ou outros haletos (Cl, Br ou I) (Cai, Lu e Pike, 2008). Considerando a disponibilidade do cloreto de mesila em nosso laboratório e o elevado rendimento descrito para a obtenção deste composto (92%) por Hilário e colaboradores (2011), este intermediário foi a primeira tentativa escolhida para obtenção de um composto bifuncionalizado, capaz de reagir com fluoreto por substituição nucleofílica bimolecular e com alcinos por reação “click”.

A síntese de 1-azido-9-fluorononano **5** foi realizada por reação de substituição nucleofílica bimolecular, empregando-se fluoreto de potássio e 1,4,7,10,13,16-hexa-oxaciclo-octadecano (18-coroa-6).

O fluoreto apresenta elevada densidade eletrônica, o que lhe confere forte caráter básico quando não solvatado. Este íon é um nucleófilo fraco em razão de sua baixa polarizabilidade e, na presença de solventes próticos como a água, sua nucleofilia é ainda menor, devido à formação de ligações de hidrogênio fortes e de cavidades de solvatação estáveis.

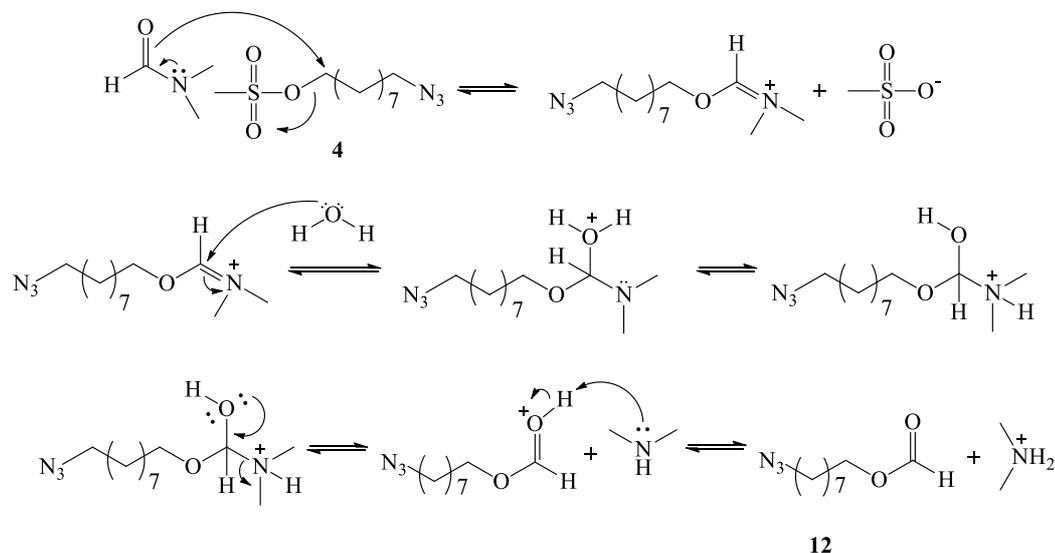
Os fluoretos de metais alcalinos como LiF, NaF, KF e CsF podem ser usados como fontes de íon fluoreto para obtenção de derivados fluorados. Destaca-se, porém, que o aumento da força iônica reduz a nucleofilia e a solubilidade do sal em solventes orgânicos, o que explica a menor reatividade do LiF quando comparada a dos demais (Furuya, Kuttruff e Ritter, 2008).

Os éteres de coroa complexam sais metálicos, dissolvendo-os em solventes apróticos polares e apolares. Liotta e Harris (1974) relataram a solubilização de fluoreto de potássio em acetonitrila e benzeno empregando o éter 18-coroa-6, o que aumentou a reatividade do fluoreto diante de uma variedade de substratos orgânicos (Liotta e Harris, 1974). O aumento de solubilidade e reatividade de sais metálicos na presença do éter de coroa pode ser explicado pela dissociação do composto iônico em um cátion fortemente complexado e em um ânion não solvatado. O cátion complexado torna-se mais solúvel no meio de baixa polaridade e, a fim de manter a eletroneutralidade, o ânion também é transportado para o solvente orgânico. O cátion fica impedido de interagir fortemente com o ânion devido ao impedimento estérico causado pelo éter de coroa. Consequentemente, o ânion fica livre (não solvatado) e em um estado de energia relativamente alto, o que lhe confere maior reatividade (Carey e Sundberg, 2007). O processo de interação dos éteres de coroa com os sais inorgânicos sólidos, com consequente solubilização em solventes orgânicos apolares é denominado catálise por transferência de fase sólido-líquida e, por esta razão, os éteres de coroa constituem uma classe de catalisadores por transferência de fase (Pliego e Riveros, 2012). A interação do éter 18-coroa-6 com o fluoreto de potássio para promover sua solubilização em DMSO e posterior reação S_N2 está representada no Esquema 9 (página 20).

Esquema 9 - Solubilização do KF em DMSO e reação com **4** catalisada por 18-coroa-6

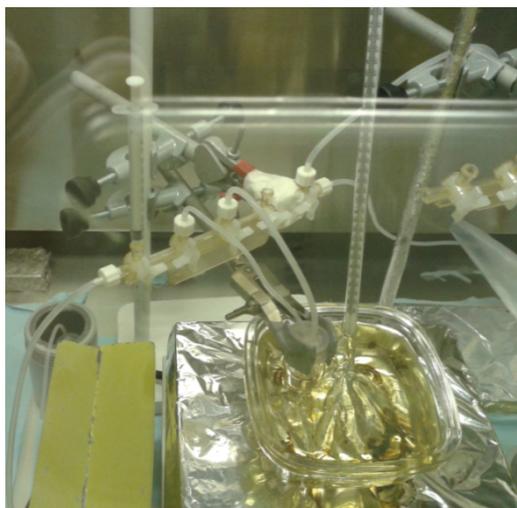
Adaptado de Pliego e Riveros, 2012.

Para conversão de **4** em **5** (Esquema 8, página 17), a dimetilformamida foi inicialmente empregada como solvente da reação, com base no método descrito por Li e colaboradores (2008). Entretanto, nestas condições, o produto majoritário, obtido com 41% de rendimento, foi o composto **12** (azidoformato), resultante da reação de **4** com o solvente e água, provavelmente na etapa de elaboração da reação, conforme proposta mecanística mostrada no Esquema 10 (página 21).

Esquema 10 - Formação do subproduto azidoformato **12**

A formação deste produto pode ser atribuída à baixa nucleofilia do íon fluoreto, sendo a reação com o solvente predominante. O produto **12** foi caracterizado por RMN de ^1H (Figura 47, página 106) e de ^{13}C (Figura 48, página 106). A substituição do DMF por DMSO levou à obtenção do produto de interesse **5**.

Por fim, o procedimento e os reagentes utilizados na síntese de **5** foram modificados para a radiosíntese de **5'**, considerando, principalmente, as restrições impostas pelo tempo de meia vida e à forma de obtenção do ^{18}F , como discutido na introdução deste trabalho. O composto 1-azido-9- ^{18}F fluorononano **5'** foi sintetizado por reação de substituição nucleofílica bimolecular, empregando-se ^{18}F fluoreto em solução aquosa e o complexo formado a partir do cátion potássio e do aminopoliéter 4,7,13,16,21,24-Hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosano (*Cryptand* 2.2.2), como catalisador por transferência de fase, com base no método amplamente utilizado para síntese de ^{18}F FDG (Hamacher, Coenen e Stocklin, 1986). A princípio, esta reação foi realizada de modo manual, em uma capela de exaustão de gases, utilizando anteparo de chumbo para reduzir a exposição à radiação. Um cassete foi adaptado à montagem para facilitar as etapas de transferência de líquidos e de manutenção do sistema sob pressão reduzida, como mostrado na Figura 10 (página 22).

Figura 10 – Montagem inicialmente utilizada para reação S_N2 com ^{18}F 

Posteriormente, a síntese de **5'** foi realizada em módulo de síntese TracerLab MX FDG, instalado em célula quente, utilizando o cassete e a sequência de ^{18}F FDG com adaptações (Figura 11). O método de síntese automatizado mostrou-se mais vantajoso do que o manual, pois permitiu maior controle sobre os parâmetros da reação (tempo, temperatura e pressão), é mais facilmente reproduzido e reduziu a exposição dos operadores à radiação.

Figura 11 – Ilustração do módulo TracerLab MX FDG com cassete adaptado para síntese de **5'**

Como citado anteriormente, o ^{18}F possui meia vida de 109,7 minutos e decai por emissão de pósitrons (96,86%) e por captura de elétrons (3,14%) até o estado fundamental do nuclídeo estável ^{18}O (Bé *et al.*, 2004). O ^{18}F forma ligações covalentes fortes com carbono e pode ser incorporado a uma variedade de moléculas orgânicas (Welch e Redvanly, 2003). Neste trabalho, o ^{18}F foi produzido pela reação nuclear $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ e obtido na forma de ^{18}F fluoreto em solução aquosa, a partir da irradiação de um alvo contendo água enriquecida com ^{18}O com feixe de prótons acelerados em ciclotron. O ^{18}F fluoreto foi separado da água irradiada utilizando cartucho QMA (de *quaternary methyl ammonium*) de troca aniônica, que permite a passagem da água, mas retém os ânions ^{18}F fluoreto (IAEA, 2008). Uma solução de carbonato de potássio, *Cryptand 2.2.2*, água e acetonitrila foi utilizada para eluição do ^{18}F fluoreto para o frasco reator. O *Cryptand 2.2.2* (Figura 12) é um éter de coroa cíclico, empregado para aumentar a reatividade do fluoreto pelo mesmo mecanismo descrito para o éter 18-coroa-6. A água residual foi evaporada azeotropicamente por meio da adição de pequeno volume de acetonitrila ao frasco reator, mantido sob aquecimento e pressão reduzida. Em seguida, o composto **4**, dissolvido em acetonitrila, foi adicionado ao frasco reator e foram realizados experimentos em temperaturas diferentes, para avaliar o efeito deste parâmetro sobre o rendimento radioquímico da reação. Os resultados estão representados na Tabela 2.

Figura 12 - Estrutura do *cryptand 2.2.2*

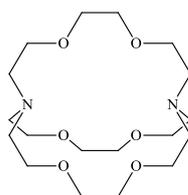


Tabela 2 – Resultados de rendimento radioquímico para marcação de **4** com ^{18}F em diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	Rendimento radioquímico não corrigido (média ± desvio padrão)
80	13,5 ± 1,4% (n = 3)
110	27,5 ± 0,3% (n = 3)

A partir destes resultados, a temperatura da reação foi fixada em 110°C, uma vez que, nesta condição, o rendimento radioquímico foi cerca de duas vezes maior do que o obtido para reação realizada a 80°C. Em outros trabalhos (Jeong *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2007),

também foi relatado que a reação de substituição nucleofílica do grupo mesila pelo [^{18}F]fluoreto é favorecida em temperatura mais altas (100°C) em detrimento das mais baixas (50 , 80 e 90°C , por exemplo).

A caracterização dos compostos **2**, **3**, **4** e **5** foi realizada por espectroscopia na região do IV, RMN de ^1H e de ^{13}C , conforme pode ser observado nas Figuras 38 a 46 (páginas 101 a 105) e 49 a 51 (páginas 107 a 108). Após caracterização, os compostos **4** e **5** foram analisados por sistema de cromatografia líquida de alta eficiência equipado com detector de índice de refração e de radioatividade (Figura 13) para posterior acompanhamento da radiosíntese de **5'**. O tempo de retenção do composto “frio” **5** foi utilizado como referência para identificação do análogo marcado com ^{18}F (**5'**) (Figura 14, página 25).

Figura 13 – Cromatogramas, obtidos por CLAE, dos compostos (a) **4** e (b) **5** analisados em coluna analítica Zorbax Eclipse XDB-C18 ($150 \times 4,6 \text{ mm}$), fase móvel: acetonitrila:água 7:3, $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e detector de índice de refração

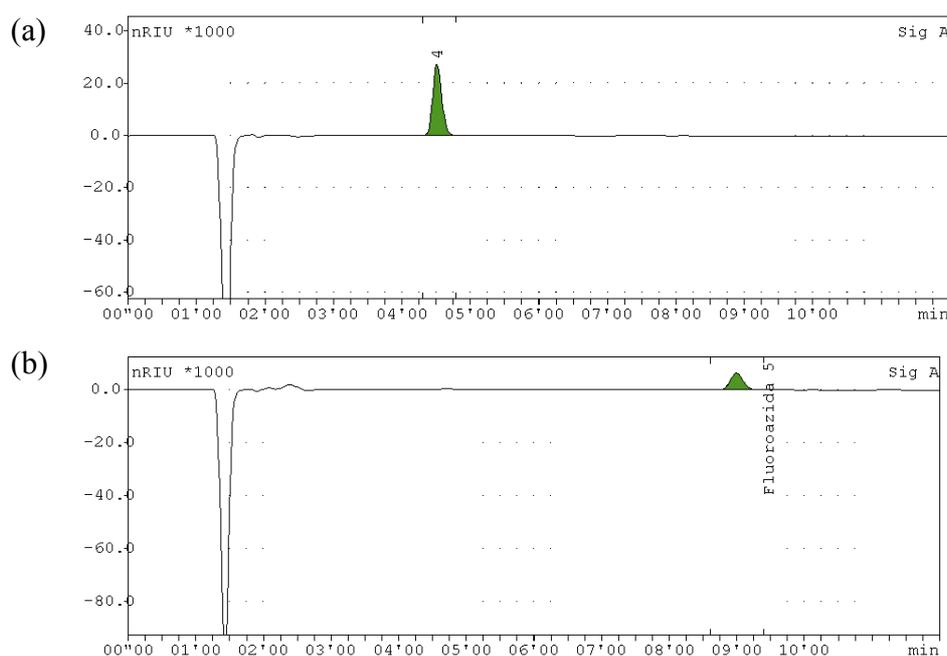
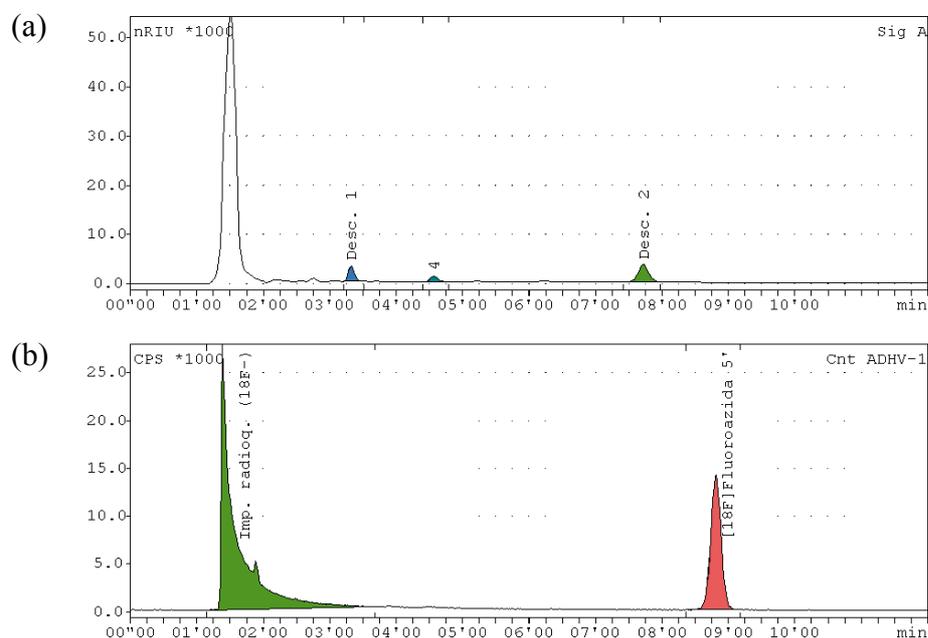
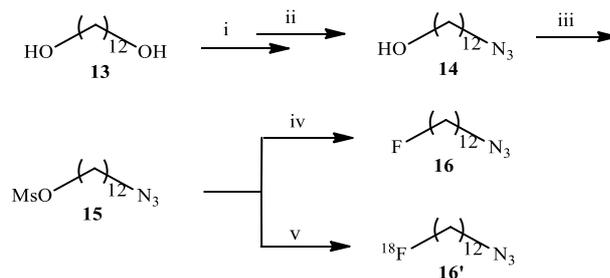


Figura 14 – Cromatograma, obtido por CLAE, do bruto da reação de síntese de **5'** em detector (a) de índice de refração e (b) de radioatividade, nas mesmas condições cromatográficas de **5**



Embora impurezas químicas (não caracterizadas) e radioquímicas (a exemplo do $[^{18}\text{F}]$ fluoreto) tenham sido evidenciadas no cromatograma do bruto da reação (Figura 14), optou-se por realizar a purificação somente ao término da etapa seguinte, uma vez que a reação CuAAC dificilmente seria afetada por tais impurezas.

Considerando os bons resultados obtidos para a síntese de **5** e **5'**, decidiu-se pela obtenção dos análogos **16** e **16'**, contendo doze átomos de carbono em sua cadeia, a partir do metanossulfonato de 12-azidododecila **15**, gentilmente cedido por Gontijo (Gontijo *et al.*, 2015). Assim como o composto **4**, esse intermediário foi sintetizado por Gontijo em três etapas de reação a partir do diol comercial 1,12-dodecanodiol **13** (Esquema 11, página 26).

Esquema 11 – Preparação de **15** e síntese do bloco construtor radiomarcado **16'**

Reagentes e condições: i) HBr (48%), tolueno, refluxo, 24 h, rendimento: 65%; ii) NaN₃ (0,5 mol.L⁻¹ em DMSO), temperatura ambiente, 24 h, rendimento: 80%; iii) Cloreto de mesila, trietilamina, diclorometano, temperatura ambiente, 24 h, rendimento: 84%; iv) KF, 18-coroa-6, DMSO, refluxo, 24 h, rendimento: 55%; v) ¹⁸F⁻, K₂CO₃, *Cryptand* 2.2.2, acetonitrila, 110°C, 15 min, rendimento radioquímico: 27,2 ± 6,8% (n=3).

O composto “frio” **16** foi caracterizado por espectroscopia na região do IV (Figura 52, página 108), RMN de ¹H (Figura 53, página 109) e de ¹³C (Figura 54, página 109) e analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (Figura 15). A formação do análogo radiomarcado **16'** foi evidenciada pela presença de um pico no cromatograma da Figura 16 (página 27) com mesmo tempo de retenção que o padrão “frio”. O composto **16'** foi obtido com 27,2 ± 6,8% (n = 3) de rendimento radioquímico, valor semelhante ao obtido para radiosíntese de **5'**.

Figura 15 - Cromatograma, obtido por CLAE, do composto **16** analisado em coluna analítica Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm), fase móvel: acetonitrila:água 8:2, 1,0 mL.min⁻¹ e detector de índice de refração

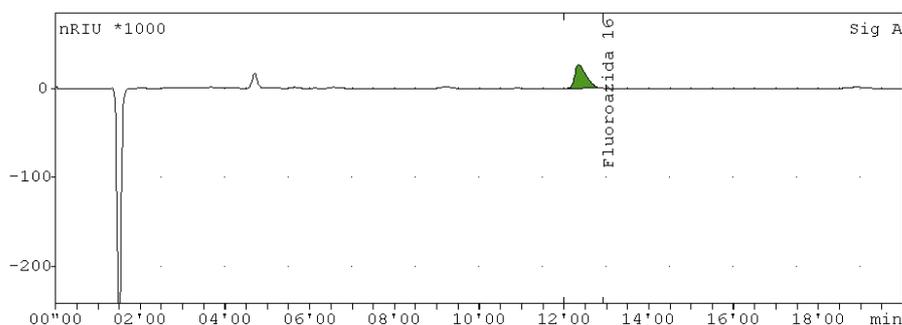
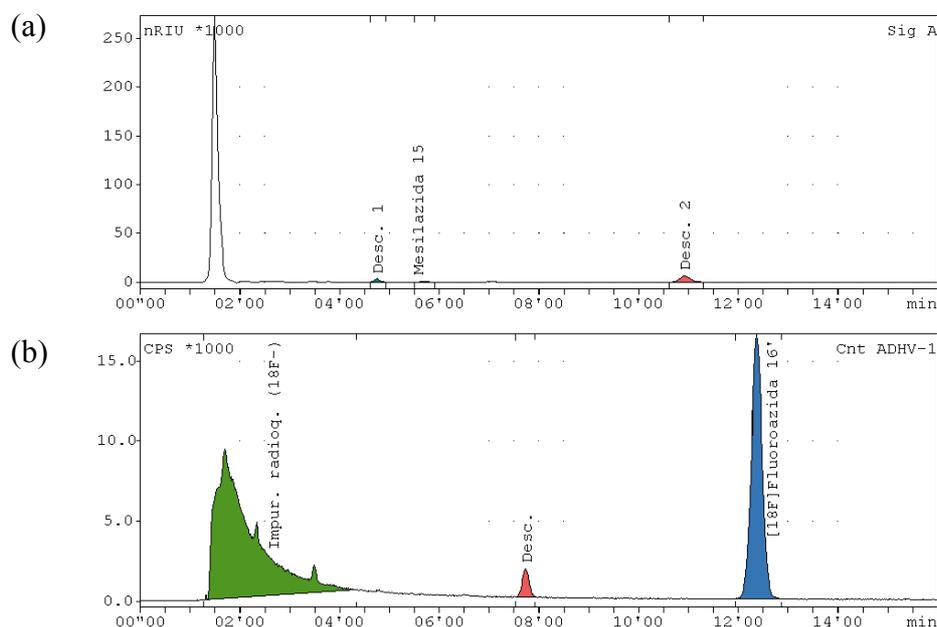


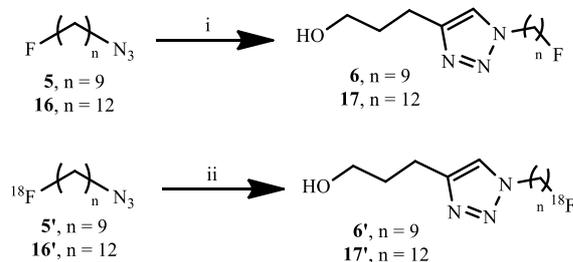
Figura 16 - Cromatograma, obtido por CLAE, do bruto da reação de síntese de **16'** em detector (a) de índice de refração e (b) de radioatividade, nas condições cromatográficas de **16**



3.2 Radiossíntese de alquiltriazióis de cadeia longa contendo ^{18}F

Os derivados triazólicos fluorados “frios” **6** e **17** e os análogos radiomarcados **6'** e **17'** foram obtidos via reação CuAAC clássica (Rostovtsev *et al.*, 2002), utilizando cobre (I) como catalisador, preparado *in situ* pela redução do sulfato de cobre (II) penta-hidratado na presença de ascorbato de sódio, como representado no Esquema 12.

Esquema 12 - Síntese de derivados triazólicos fluorados “frios” e radiomarcados



Reagentes e condições i) 4-pentin-1-ol, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ascorbato de sódio, H_2O , diclorometano, temperatura ambiente, 24 h, rendimento: 49% para **6** e 46% para **17**; ii) 4-pentin-1-ol, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ascorbato de sódio, H_2O , acetonitrila, 110°C , 15 min, rendimento radioquímico: 100% para **6'** e **17'** ($n=2$).

O composto **6** foi sintetizado a partir do 1-azido-9-fluorononano **5** conforme procedimento descrito por Gontijo e colaboradores (2015) e caracterizado por espectroscopia na região do IV (Figura 55, página 110), RMN de ^1H (Figura 56, página 110) e de ^{13}C (Figura 57, página 111). O composto **17** foi gentilmente cedido por Gontijo. Esses derivados triazólicos “frios” foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (Figura 17 e Figura 19, páginas 29 e 30).

Os derivados triazólicos marcados com ^{18}F **6'** e **17'** foram sintetizados, respectivamente, a partir dos blocos construtores radiomarcados **5'** e **16'**, em módulo de síntese TracerLab MX FDG, instalado em célula quente, utilizando o cassete e a sequência de ^{18}F FDG com adaptações. Os procedimentos descritos por Glaser e colaboradores (2007) para reação CuAAC entre 2- ^{18}F -fluoroetilazida e alcinos comerciais foram adotados, com modificações na quantidade de catalisador empregado, no solvente e na temperatura da reação. No referido trabalho, foi utilizado excesso de cobre em relação ao alcino; entretanto, como os resultados obtidos por Sirion e colaboradores (2007) demonstraram que um efeito catalítico satisfatório em curto intervalo de tempo é obtido com 20 mol% de sulfato de cobre; neste trabalho, foi utilizado 30 mol% deste reagente e 60 mol% de ascorbato de sódio para assegurar que a quantidade de catalisador no frasco reator fosse suficiente. A outra diferença se refere à substituição de DMF por acetonitrila como solvente da reação, para evitar a necessidade de remoção de mais uma impureza nas etapas de purificação. A acetonitrila já estava presente no frasco reator, pois havia sido utilizada na etapa anterior ($\text{S}_{\text{N}}2$) e é mais facilmente eliminada (menor ponto de ebulição) do que o DMF. Além disso, Glaser e colaboradores (2007) realizaram a reação CuAAC a 80°C e relataram rendimentos radioquímicos mais elevados do que à temperatura ambiente. Neste trabalho, a reação CuAAC foi realizada em 80 e 110°C e, em ambas condições, o rendimento radioquímico, determinado utilizando-se cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de radioatividade foi de 100% ($n=2$). Optou-se por manter a reação na mesma temperatura (110°C) da etapa anterior, pois o módulo de síntese utilizado não dispõe de sistema de resfriamento e cerca de 10 minutos são necessários para que a temperatura no frasco reator reduza a 80°C . Por fim, destaca-se que, neste trabalho, a reação CuAAC foi realizada no mesmo frasco reator onde 1-azido-9- ^{18}F fluorononano **5'** ou 1-azido-12- ^{18}F fluorododecano **16'** foi sintetizado (reação *one-pot*). A formação dos produtos de interesse **6'** e **17'** foi analisada em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, equipado com detector de índice de refração e de radioatividade, utilizando os tempos de retenção dos compostos “frios”

6 e **17** como referência. A purificação do bruto da reação foi realizada por extração em fase sólida, utilizando cartucho tC18, para remoção, principalmente, do [^{18}F]fluoreto. Esta impureza radioquímica foi detectada ao fim da reação de marcação de **4** e **15** e é considerada crítica, pois pode comprometer a avaliação da biodistribuição do produto de interesse. Como os derivados triazólicos possuem diferenças no caráter hidrofílico/hidrofóbico (cLog P de **6** e **17** correspondem, respectivamente, a 2,70 e 3,77 de acordo com Gontijo e colaboradores (2015)), foi utilizada a mistura etanol:água 1:1 para eluição de **6** e etanol 100% para eluição de **17**. O método de purificação empregado mostrou-se adequado para obtenção dos produtos de interesse com elevada pureza radioquímica (Tabela 3, página 31), porém a presença do alcino comercial remanescente (impureza química) ainda pode ser observada nos cromatogramas de **6'** (Figura 18, página 30) e **17'** (Figura 20, página 31). Procedimentos de purificação adicionais podem ser necessários, dependendo dos tipos de estudo em que esses compostos forem aplicados.

Figura 17 - Cromatograma, obtido por CLAE, do composto **6** analisado em coluna analítica Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm), fase móvel: acetonitrila:água 7:3, 1,0 mL.min $^{-1}$ e detector de índice de refração

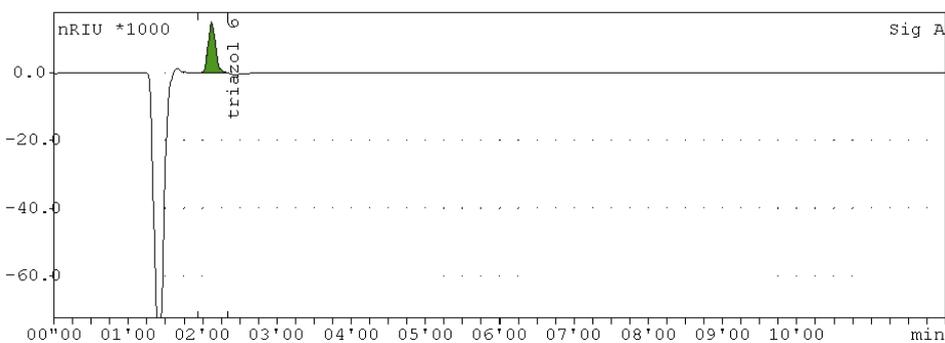


Figura 18 - Cromatograma, obtido por CLAE, do bruto da reação de síntese de **6'** em detector (a) de índice de refração e (b) de radioatividade, nas mesmas condições cromatográficas de **6**

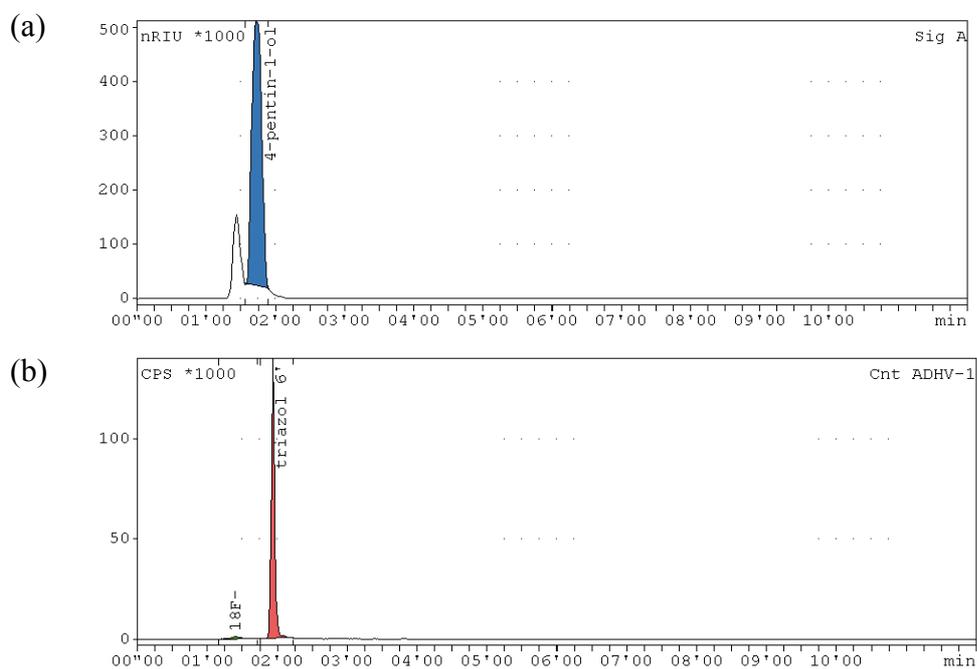


Figura 19 - Cromatograma, obtido por CLAE, do composto **17** analisado em coluna analítica Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm), fase móvel: acetonitrila:água 8:2, 1,0 mL.min⁻¹ e detector de índice de refração

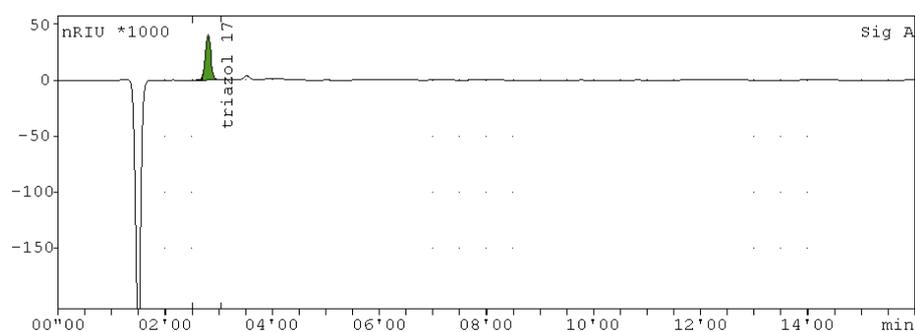
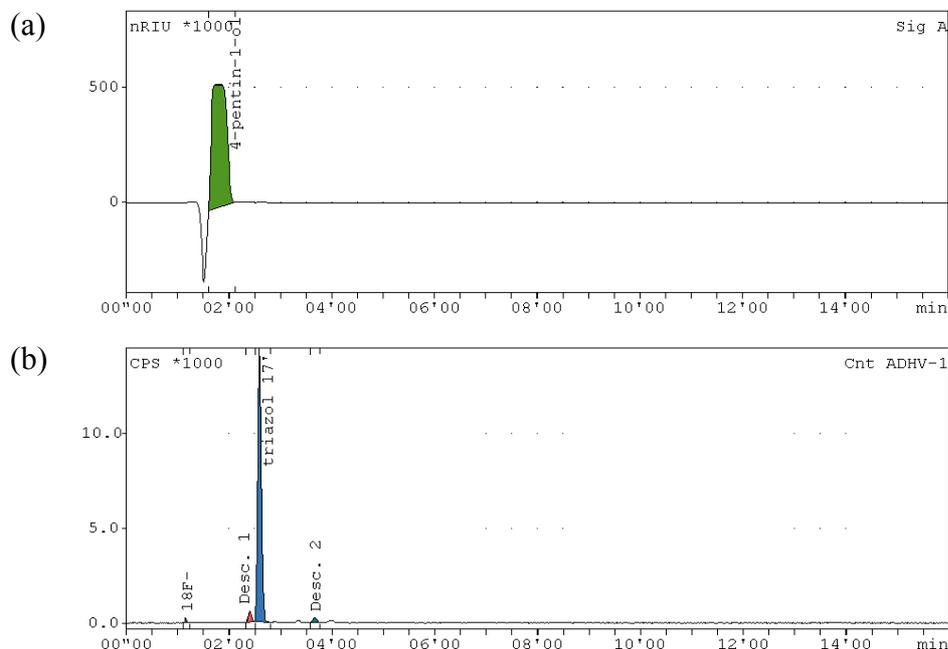


Figura 20 - Cromatograma, obtido por CLAE, do bruto da reação de síntese de **17'** em detector (a) de índice de refração e (b) de radioatividade, nas mesmas condições cromatográficas de **17**



O tempo total para preparação dos derivados triazólicos **6'** e **17'** a partir de [^{18}F]fluoreto no módulo de síntese TracerLab MX FDG foi de 53 minutos e os rendimentos radioquímicos globais não corrigidos são mostrados na Tabela 3. Pode-se notar que os valores de rendimento global registrados são inferiores à combinação dos valores de rendimento individuais obtidos para cada etapa da síntese (cerca de 27% para reação $\text{S}_{\text{N}}2$ e 100% para reação CuAAC), o que pode ser atribuído a perdas no frasco reator, no cassete e no cartucho tC18, além do próprio decaimento do ^{18}F .

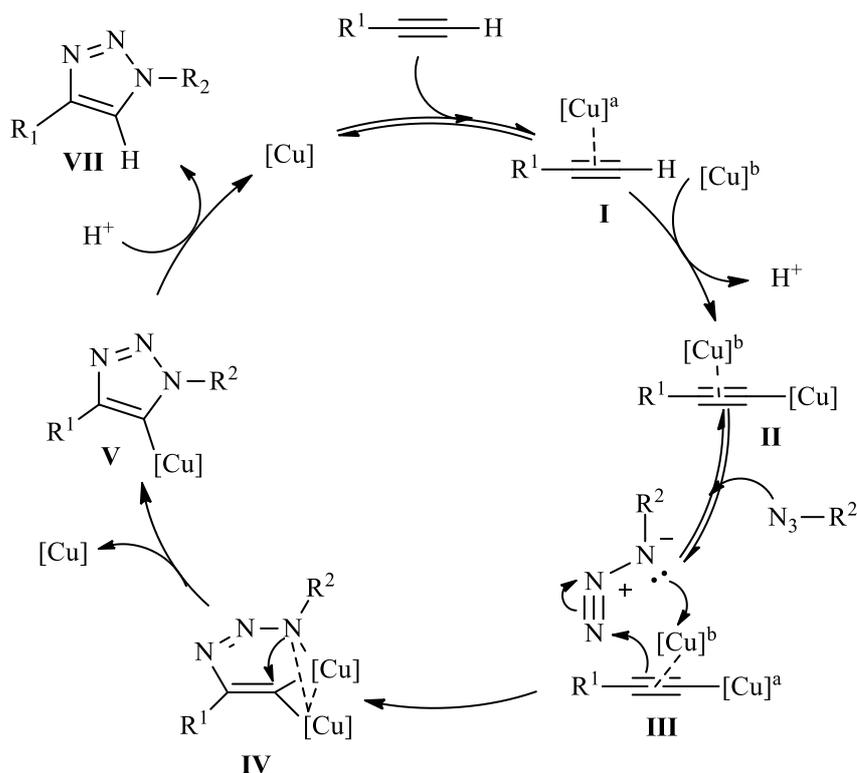
Tabela 3 - Pureza e rendimento radioquímicos dos derivados triazólicos radiomarcados após purificação

Produto	Pureza radioquímica (média \pm desvio padrão)	Rendimento global não corrigido (média \pm desvio padrão)
6'	97,9 \pm 0,3%	11,1 \pm 2,6% (n = 3)
17'	91,5 \pm 0,4%	10,7 \pm 2,7 % (n = 3)

A reação de cicloadição entre um alcino terminal e uma azida orgânica, catalisada por cobre, é uma das reações mais exploradas em química e áreas de interface desde sua

descoberta, no início do século XXI (Rostovtsev *et al.*, 2002; Tornøe, Christensen e Meldal, 2002). Embora intensamente discutida por diferentes grupos nos últimos anos, muitos estudos corroboram a proposta mecanística representada no Esquema 13 (página 33). Nesta proposta inicialmente ocorre a complexação π entre o Cu(I) e o alcino terminal, o que reduz o pKa do hidrogênio para 9,8 unidades, permitindo sua desprotonação em um sistema aquoso, sem a necessidade de adição de base (Himo *et al.*, 2005). Ocorre, então, a formação do acetileto de cobre por ligação σ e a complexação de um segundo átomo de Cu(I) com a ligação π , formando o complexo catalítico ativo, contendo dois núcleos de cobre (II) (Worrell, Malik e Fokin, 2013). Na etapa seguinte, ocorre a coordenação reversível da azida orgânica à ligação π do complexo de cobre, gerando o complexo azida acetileto (III). Neste complexo, o cobre exerce dois efeitos importantes, pois torna o nitrogênio terminal da azida mais eletrofílico e o carbono β -vinilidênico do alcino mais nucleofílico, favorecendo o ataque para formação do metalociclo (IV). Assim, o ataque nucleofílico do carbono β do acetileto ao N-3 da azida resulta na formação da primeira ligação C-N, produzindo o intermediário IV (Hein e Fokin, 2010). Esta etapa é endotérmica e define a regioseletividade da reação, pois possui menor energia de ativação (15 kJ.mol^{-1}) do que a reação não catalisada (26 kJ.mol^{-1}), realizada em elevadas temperaturas (Huisgen, Szeimies, Mobius, 1967). Atribui-se, também, à diferença entre as energias de ativação, a maior velocidade da reação catalisada em relação à não-catalisada (Himo *et al.*, 2005; Meldal e Tornøe, 2008). Em seguida, ocorre a contração do anel por uma associação transanular do par de elétrons não ligantes de N-1 com o orbital π antiligante de C-5/Cu, fornecendo a segunda ligação C-N no triazóila de cobre V. Por fim, esse intermediário é protonado, com a formação do produto triazólico 1,4-dissubstituído VII e a regeneração do catalisador (Bock, Hiemstra e Van Maarseveen, 2005).

Esquema 13 - Proposta mecanística para a reação “click”



Adaptado de Worrell, Malik e Fokin, 2013.

3.3 Síntese e conjugação do peptídeo UBI 31-38

Nesta parte, a síntese em fase sólida do peptídeo UBI 31-38 e do alcinopeptídeo **8**, bem como as reações para obtenção do pró-fluoróforo cumarínico serão discutidas. Os resultados das reações CuAAC realizadas com estes compostos (Esquema 7, página 16) serão apresentados na sequência.

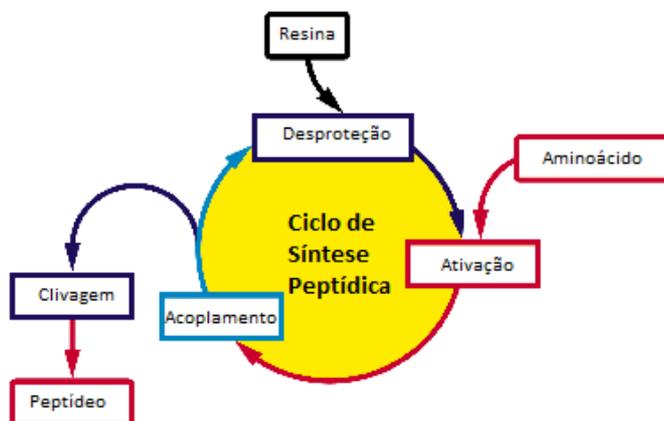
3.3.1 Síntese do peptídeo UBI 31-38 e do alcinopeptídeo **8**

A síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) foi apresentada à sociedade científica em 1963 e resultou em uma grande mudança nas perspectivas de síntese de peptídeos (Merrifield, 1963). O método é atualmente um dos mais utilizados para reproduzir e criar peptídeos e proteínas em laboratórios de uma maneira sintética. A SPFS permite a obtenção de peptídeos naturais pouco abundantes e que são difíceis de expressar em bactérias. Além

disso, propicia a incorporação de aminoácidos não naturais e D-aminoácidos, modificações da cadeia principal e de suas extremidades amino e carboxi-terminais (Amblard *et al.*, 2006).

A SPFS é realizada utilizando um suporte polimérico sólido, insolúvel em água e em solventes orgânicos, no qual a cadeia peptídica é construída. A síntese do peptídeo é realizada em etapas, acoplando-se um aminoácido de cada vez. Na síntese, são utilizados derivados de aminoácidos, nos quais os grupos reativos (amino ou carboxi e alguns grupos de cadeias laterais) são protegidos para evitar reações secundárias. Os grupos protetores do grupo responsável pelo acoplamento (amino ou carboxi) devem ser lábeis em um meio que não cause a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais. Cada resíduo de aminoácido é adicionado à cadeia pelo grupo não protegido e, ao final do acoplamento, tem-se a outra extremidade ainda protegida. Em seguida, é realizada a desproteção dessa extremidade, seguida de novo acoplamento do resíduo subsequente. Ao término da síntese, o peptídeo é clivado do suporte e, simultaneamente, os grupos protetores das cadeias laterais são removidos, usualmente por acidólise (Chan e White, 2000). O princípio geral de SPFS está ilustrado na Figura 21 e consiste em ciclos repetidos de acoplamento e desproteção.

Figura 21 - Representação do ciclo de síntese de peptídeos em fase sólida

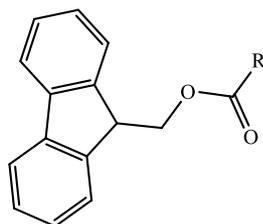


Adaptado de <http://moulder.temple.edu/research-capabilities/solid-phase-peptide-synthesis>

As etapas de desproteção/acoplamento são acompanhadas pelo teste da ninidrina. Trata-se de um teste colorimétrico, qualitativo, de fácil execução, que indica a presença de aminas primárias (Kaiser *et al.*, 1970).

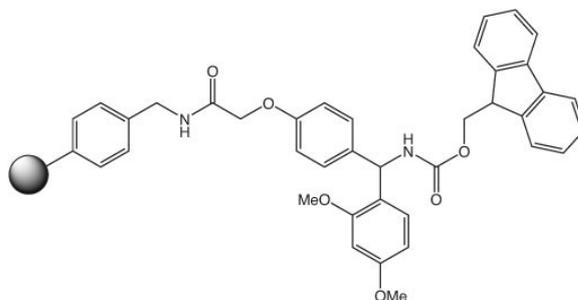
A síntese do peptídeo UBI 31-38 e do alcinopeptídeo **8** foram realizadas em fase sólida, via estratégia Fmoc (grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonil, Figura 22, página 35).

Figura 22 - Grupo protetor Fmoc



A resina Rink-Amide Fmoc aminometil-poliestireno (Figura 23) com grau de substituição $0,63 \text{ mmol.g}^{-1}$, que fornece o peptídeo com grupo amida terminal livre como produto final, foi empregada como suporte sólido.

Figura 23 - Resina Rink-Amide Fmoc aminometil-poliestireno

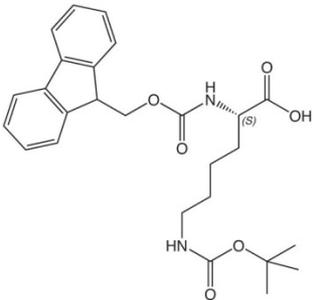
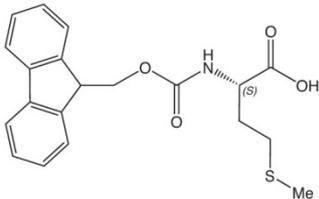
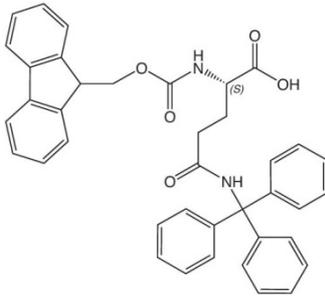
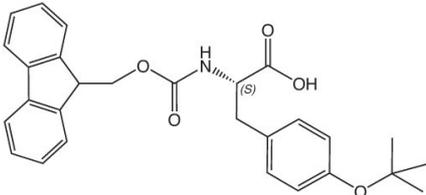


Os derivados de aminoácidos utilizados e as respectivas estruturas estão representados no Quadro 1.

Quadro 1 - Lista de derivados de aminoácidos empregados na síntese de UBI 31-38 e respectivas estruturas (continua)

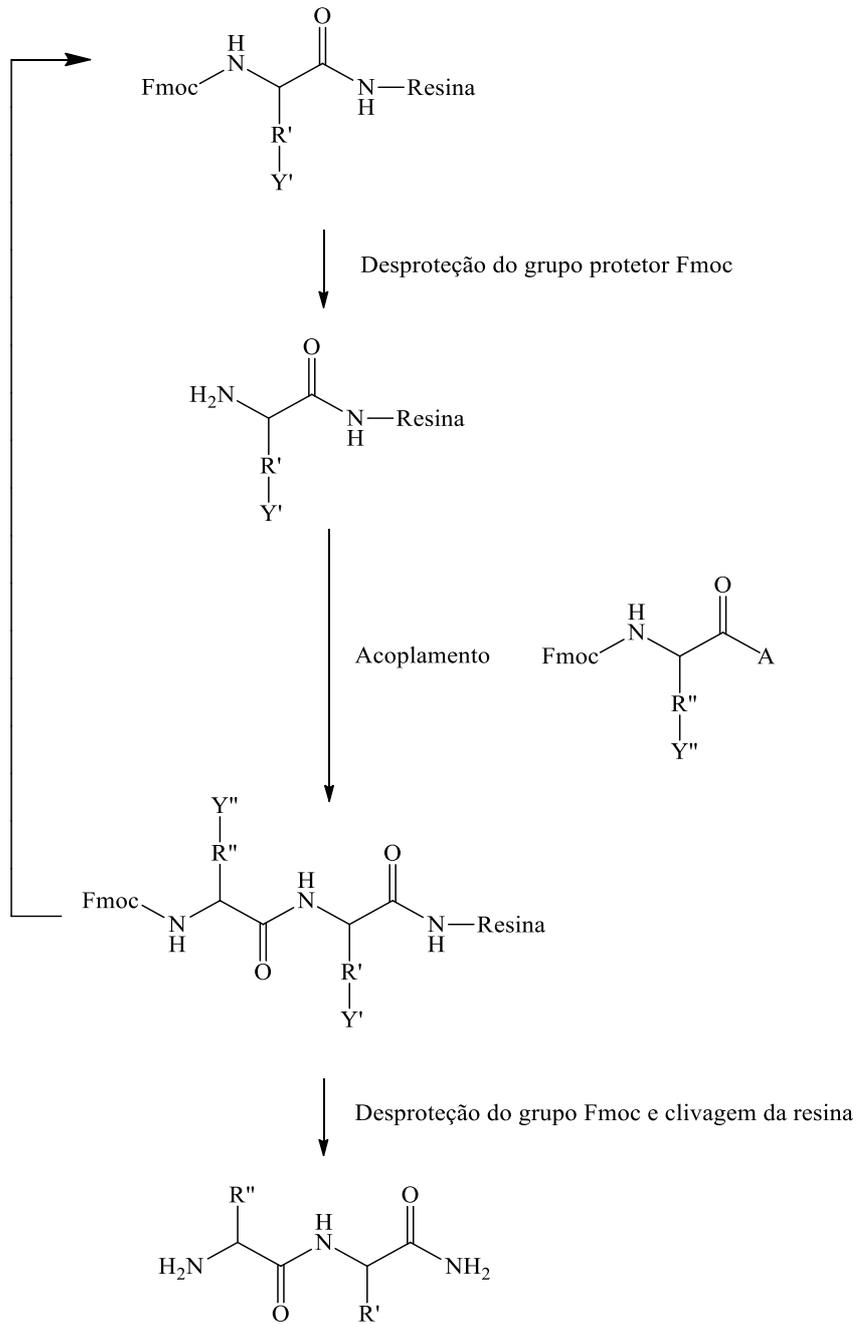
Derivado de aminoácido	Estrutura
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	
Fmoc-L-Ala-OH	

Quadro 1 - Lista de derivados de aminoácidos empregados na síntese de UBI 31-38 e respectivas estruturas (conclusão)

Derivado de aminoácido	Estrutura
Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	
Fmoc-L-Met-OH	
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	
Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH	

O protocolo de síntese utilizado está ilustrado no Esquema 14 (página 37). O processo de desproteção/acoplamento se repete até a obtenção da sequência de aminoácidos de interesse. No fim, o peptídeo é clivado da resina e os grupos protetores das cadeias laterais são removidos sob as mesmas condições.

Esquema 14- Princípio da síntese de peptídeos em fase sólida



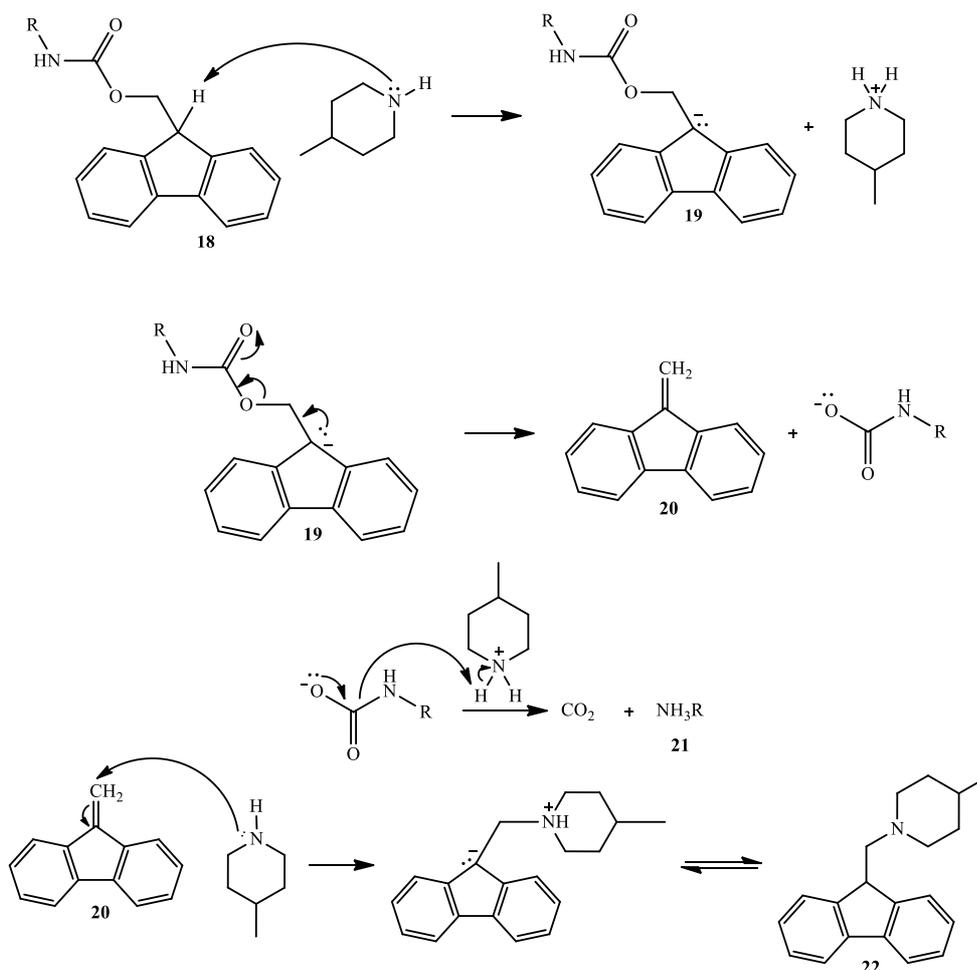
Y = Grupo permanente da cadeia lateral
 A = Grupo ativador da carboxila

Adaptado de Chan e White, 2000.

3.3.1.1 Reação de remoção dos grupos Fmoc

Os grupos Fmoc são amplamente utilizados como protetores na síntese de peptídeos em fase sólida porque podem ser facilmente removidos em meio básico, com solução de 4-metilpiperidina em DMF 20% (v/v), sem que outros grupos protetores das cadeias laterais ou o ligante entre a resina e o peptídeo, ambos ácido-lábeis, sejam afetados. O mecanismo da desproteção está representado no Esquema 15. Inicialmente, ocorre a desprotonação do anel fluoreno de **18** para gerar o intermediário aromático ciclopentadieno **19**. Esse intermediário, por reação de eliminação, fornece o dibenzofulveno **20** e o aminocarboxilato que sofre descarboxilação para produzir a amina terminal livre **21**. O dibenzofulveno **20** reage com a 4-metilpiperidina, formando o aduto **22**, que absorve fortemente na região do UV, propriedade que pode ser utilizada para acompanhamento da reação (Chan e White, 2000).

Esquema 15 - Mecanismo da reação de desproteção dos grupos Fmoc

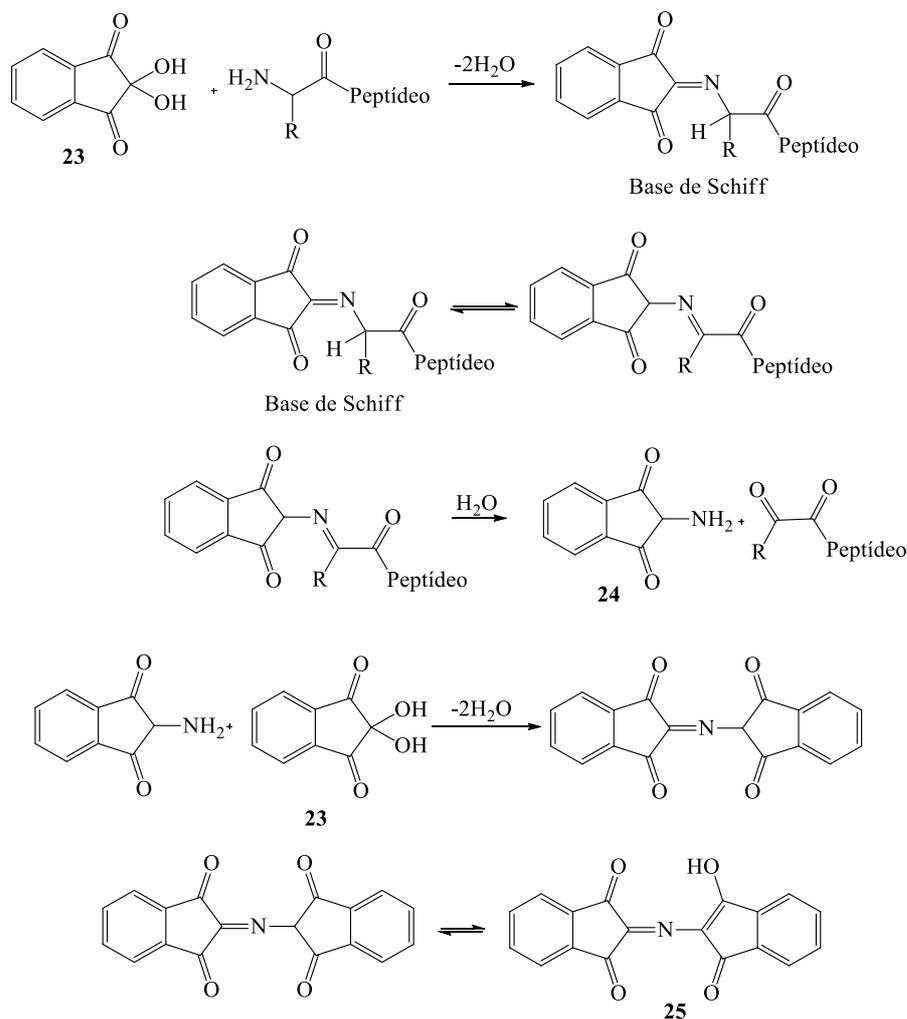


Na síntese do peptídeo UBI 31-38 e do alcinopeptídeo derivado, a reação de desproteção, bem como a de acoplamento, foi monitorada pelo teste de Kaiser.

3.3.1.2 Teste da Ninidrina

O teste da ninidrina, ou teste de Kaiser, foi empregado para verificar a eficiência das etapas de desproteção e acoplamento no processo de síntese do peptídeo UBI 31-38 e do alcinopeptídeo derivado, de modo a se evitar a formação de cadeias peptídicas incompletas. Trata-se de um teste colorimétrico, baseado na reação da ninidrina com uma pequena amostra (quatro grãos) de peptídeo na resina (Kaiser *et al.*, 1970). A sequência de reações envolvidas está representada no Esquema 16 (página 40). A ninidrina **23** reage com o grupo amino livre de um resíduo de aminoácido para gerar uma base de Schiff. Em seguida, ocorre tautomerismo, seguido de hidrólise para formar a amina **24** que reage com outra molécula de ninidrina, formando o composto colorido **25**, com conjugação estendida. Destaca-se que apenas aminas primárias ou amônia sofrem condensação com a ninidrina para formar uma base de Schiff, conforme mostrado na sequência (Benoiton, 2006).

Esquema 16 - Reação da ninidrina para detecção de aminas primárias



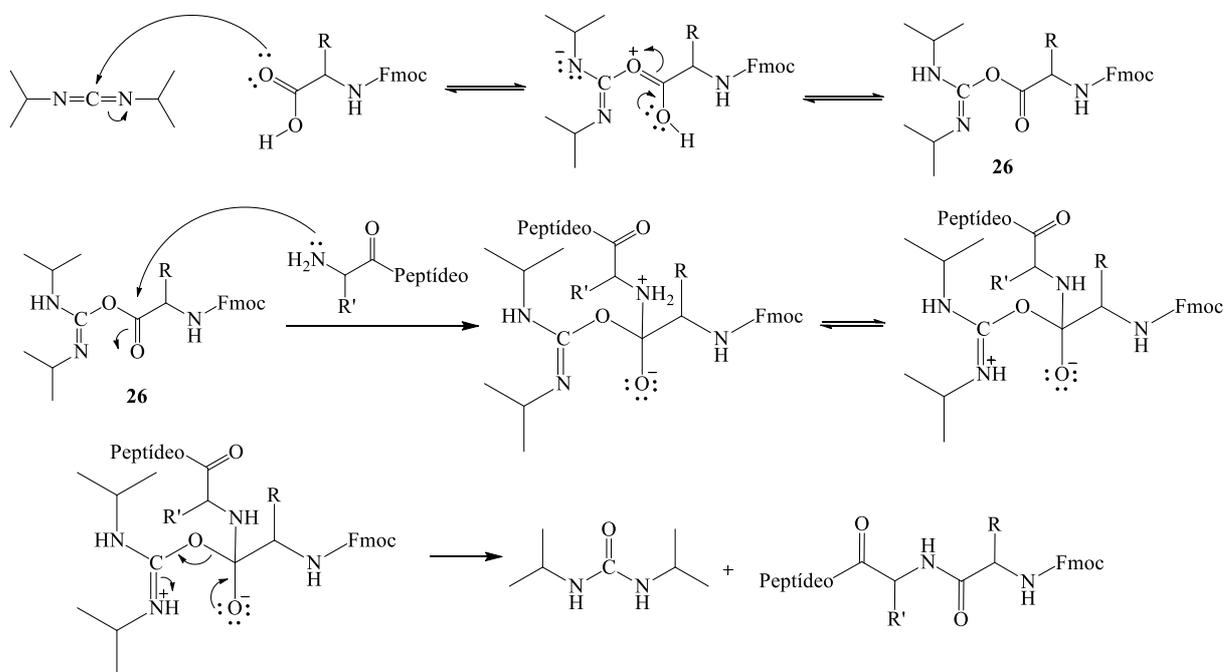
Adaptado de Benoiton, 2006.

3.3.1.3 Reação de acoplamento

Os reagentes de acoplamento empregados na síntese de UBI 31-38 e do alcinopeptídeo **8** foram *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) e 1-hidroxibenzotriazol (HOBt). O DIC foi utilizado para aumentar a eletrofilia do grupo carboxilato, transformando a hidroxila em um melhor grupo abandonador. O oxigênio da carbonila age como nucleófilo e ataca o carbono central da carbodiimida, formando uma *O*-aciluréia, o que favorece o ataque nucleofílico do grupo amino do peptídeo ligado à resina à extremidade *C*-terminal do resíduo que está sendo acoplado. No Esquema 17 (página 41) é mostrada uma proposta de mecanismo para o acoplamento de aminoácidos na presença de DIC. Destaca-se, porém, que outras possibilidades já foram descritas para a reação nucleofílica entre o aminoácido e a *O*-aciluréia

26, o que levaria à formação de outros intermediários para essa reação, que não foram representados no esquema (Lloyd-Williams, Albericio e Giralt, 1997).

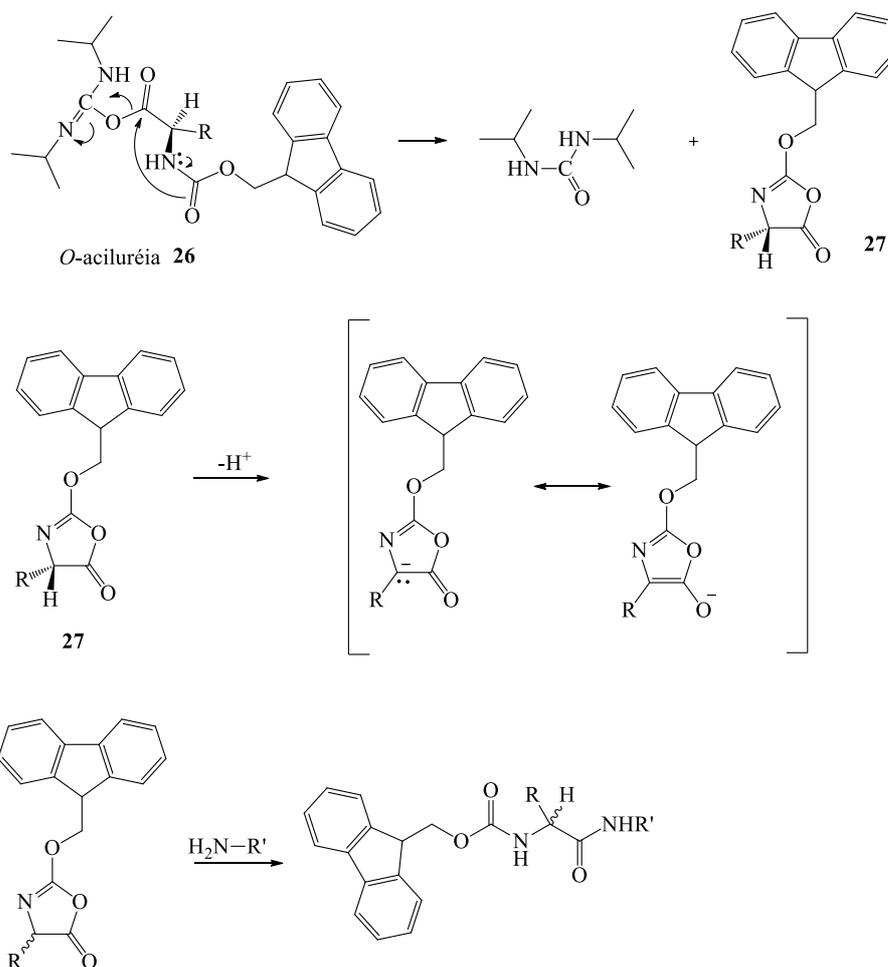
Esquema 17 - Proposta de mecanismo para reação de acoplamento mediada por DIC



Adaptado de Solomons e Fryhle, 2012.

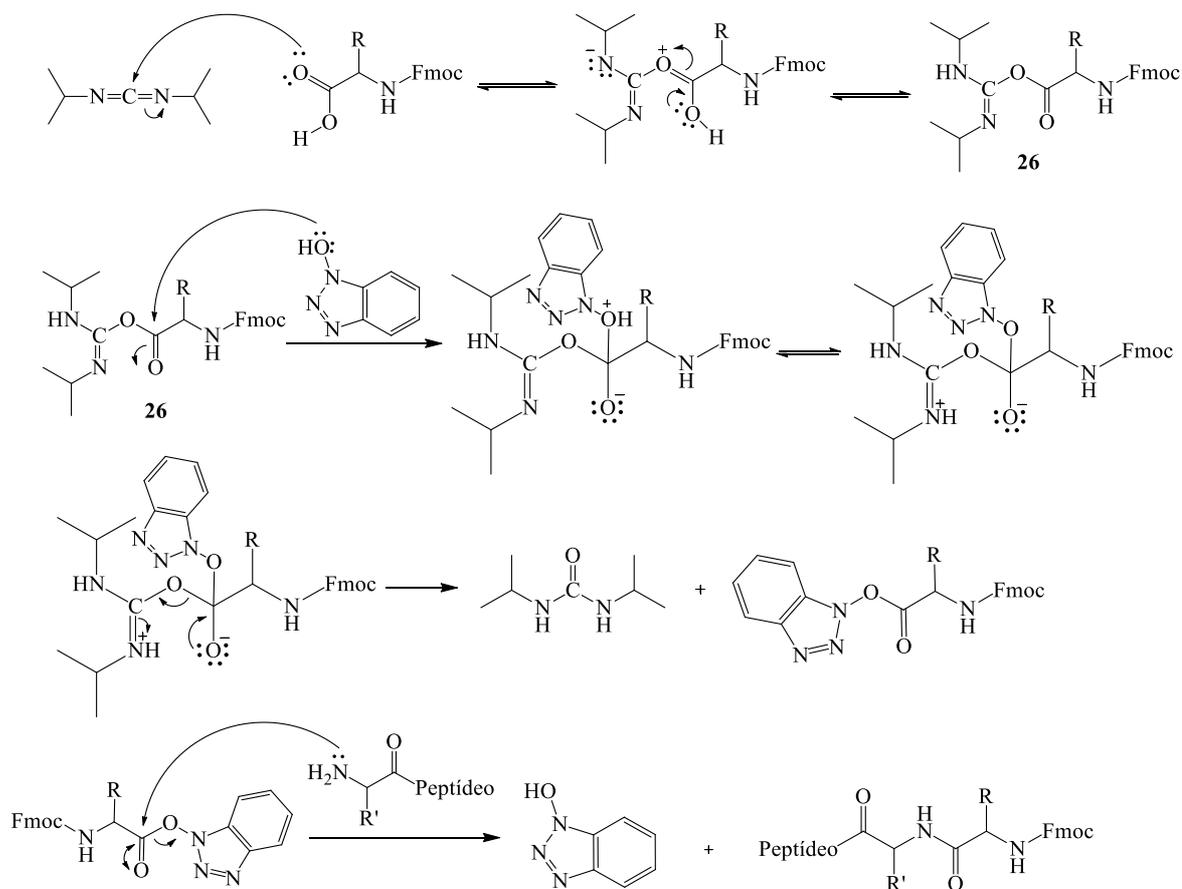
Uma reação secundária que pode ocorrer na presença de DIC é a formação de 5(4H)-oxazolonas do tipo **27**, produzidas por ciclização intramolecular do intermediário *O*-aciluréia **26** (Esquema 18, página 42). A formação de oxazolonas é indesejável porque elas podem perder um próton, fornecendo um ânion estabilizado por ressonância. Esse ânion pode ser novamente protonado pelos dois lados do plano do anel, levando à racemização do aminoácido (Lloyd-Williams, Albericio e Giralt, 1997).

Esquema 18 - Racemização causada pela formação de oxazolonas



Para evitar a racemização do aminoácido, o HOBt foi utilizado na etapa de acoplamento. O HOBt reage com o intermediário *O*-aciluréia **26**, cuja formação está mostrada no Esquema 17 (página 41), produzindo um éster ativo que é menos reativo e menos susceptível à racemização (Lloyd-Williams, Albericio e Giralt, 1997). O mecanismo de acoplamento mediado por DIC na presença de HOBt está mostrado no Esquema 19 (página 43).

Esquema 19- Proposta de mecanismo de acoplamento de aminoácidos com DIC e HOBt



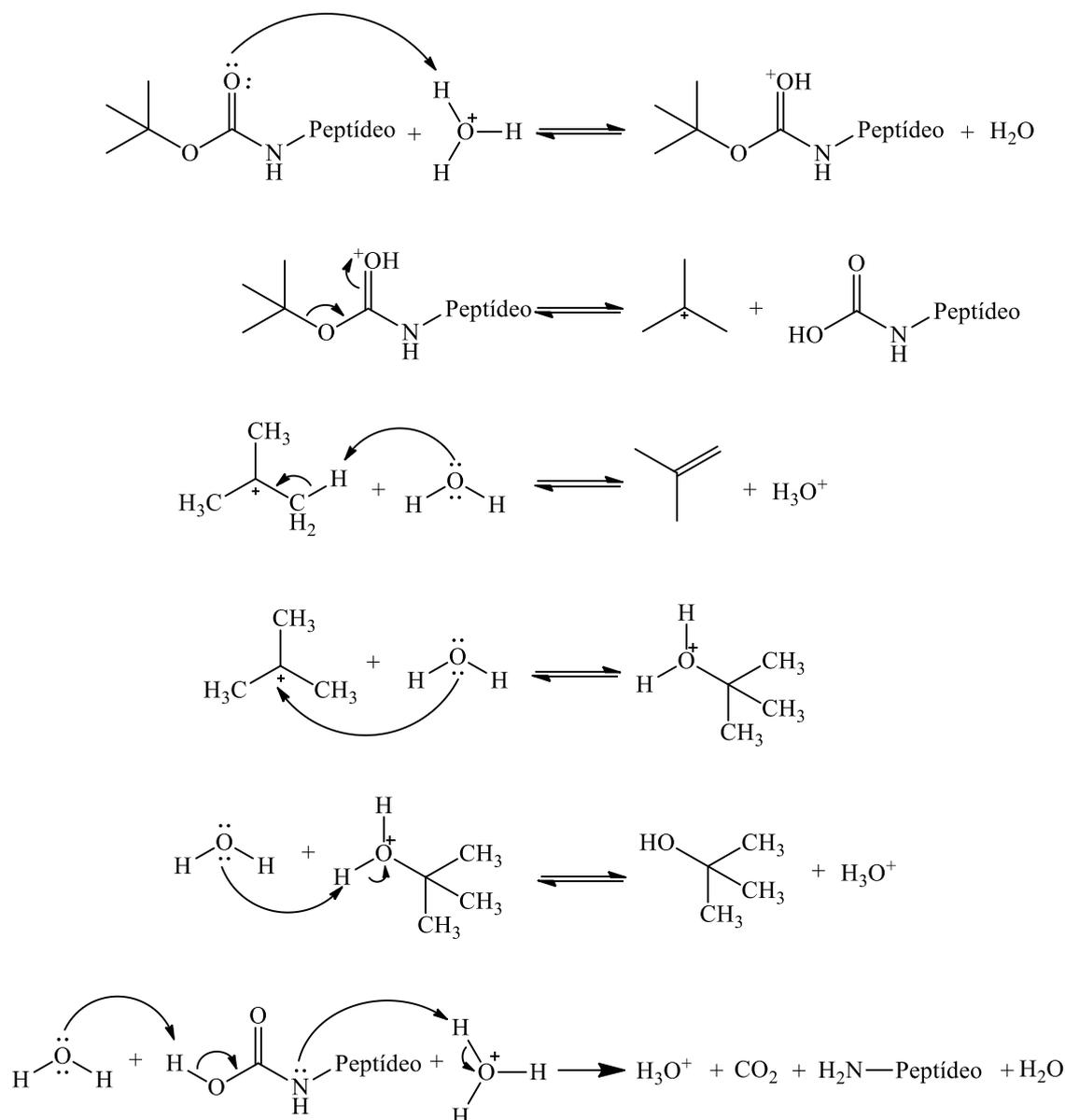
O ácido 4-pentinóico também foi acoplado ao peptídeo UBI 31-38 para formação do alcinopeptídeo **8** utilizando DIC.

3.3.1.4 Clivagem

A clivagem do peptídeo ancorado à resina Rink-amide pelo ligante trialcóxibenzilamino (Figura 23, página 35) e a remoção dos grupos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos foram realizadas simultaneamente, utilizando uma solução de ácido trifluoroacético (TFA, de *trifluoroacetic acid*), água, 1,2-etanoditiol (EDT) e triisopropilsilano (TIS). No caso do peptídeo UBI 31-38 e de seus derivados, foram removidos os seguintes grupos protetores de cadeia lateral de aminoácidos: 2,2,4,6,7-pentametil-di-hidrobenzofurano-5-sulfonila (Pbf) da arginina, *terc*-butiloxicarbonila (Boc) da lisina, tritila (Trt) da glutamina e *terc*-butila (tBu) da tirosina (Quadro 1, página 35). Os mecanismos para as reações de remoção dos grupos protetores de cadeia lateral e o de clivagem da resina seguem os mesmos princípios. No Esquema 20 (página 44) é mostrado o

mecanismo de remoção do grupo Boc como exemplo. Inicialmente ocorre protonação da carbonila, seguida de liberação espontânea de um carbocátion terciário, que pode originar um produto de reação E1 ou reagir, por exemplo, com nucleófilos presentes no meio.

Esquema 20 - Mecanismo de remoção do grupo protetor Boc



Adaptado de Lloyd-Williams, Albericio e Giralt, 1997.

Para evitar que as espécies catiônicas reativas liberadas após clivagem dos grupos protetores e do ligante da resina sejam atacados por centros nucleofílicos das cadeias laterais dos peptídeos, bons nucleófilos, denominados “sequestradores de carbocátions” são adicionados à solução de clivagem. A água é moderadamente efetiva na captação do cátion

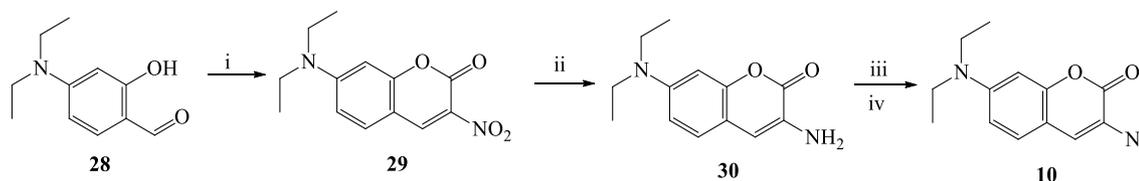
tert-butílico e dos produtos da clivagem de Pbf. O EDT é considerado o melhor “sequestrador” do cátion *tert*-butílico, e captura também produtos da clivagem de Pbf e cátions tritila em alguma extensão. O TIS é efetivo na captação de produtos da clivagem de Pbf, Boc, Trt e do ligante da resina Rink-amide (Chan e White, 2000).

O peptídeo UBI 31-38 e o alcinopeptídeo **8** foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência e caracterizados por espectrometria de massas, como pode ser observado, respectivamente, na Figura 58 (página 111) e na Figura 59 (página 112).

3.3.2 Síntese do pró-fluoróforo cumarínico **10**

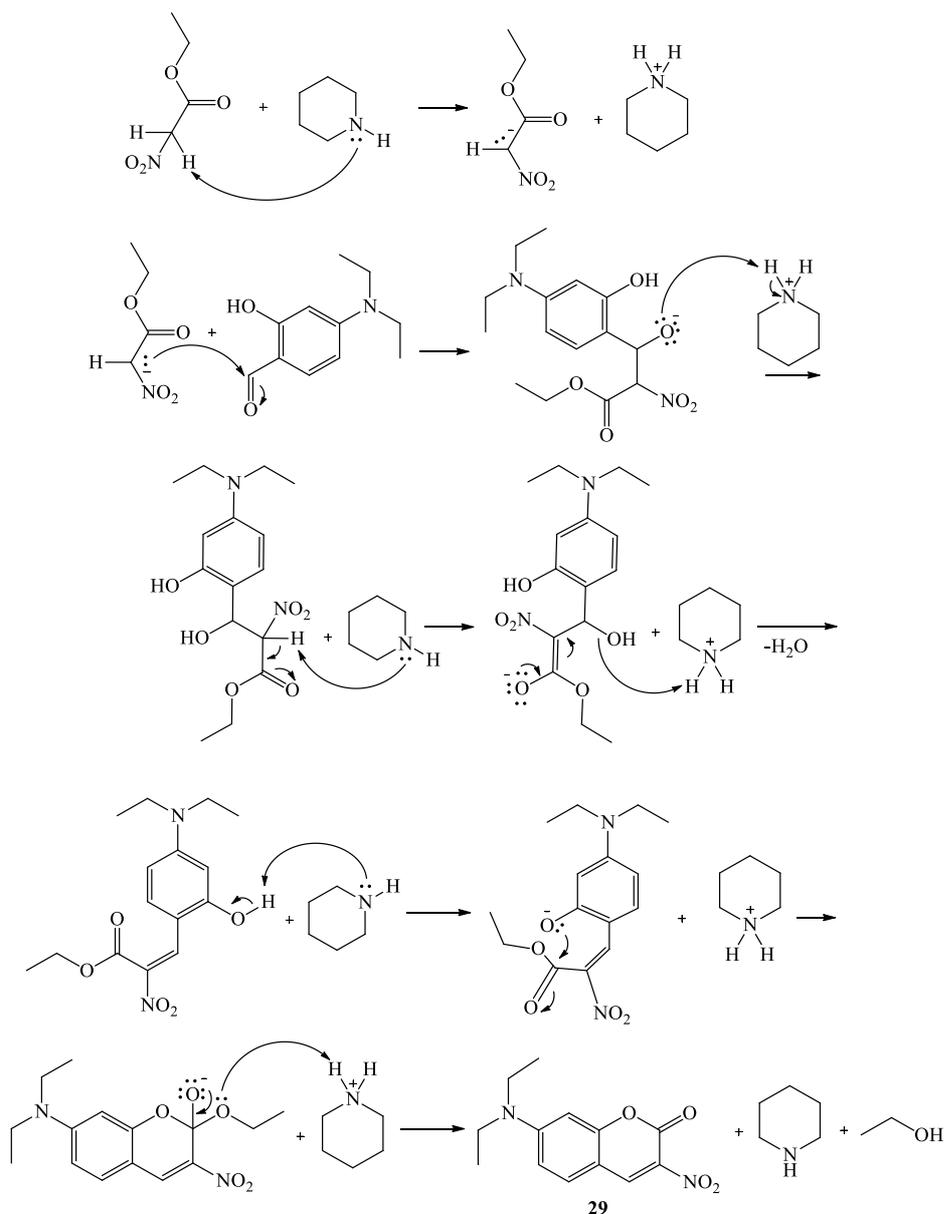
A 3-azido-7-dietilaminocumarina **10** foi obtida em três etapas, conforme método descrito por Sivakumar e colaboradores (2004). Inicialmente, a 7-dietilamino-3-nitrocumarina **29** foi sintetizada a partir da reação entre o 4-dietilaminossalicilaldeído e nitroacetato de etila por reação de condensação do tipo Knoevenagel. Posteriormente, o composto **29** foi reduzido a 3-amino-7-dietilaminocumarina **30** que, por sua vez, foi utilizada para obtenção da 3-azido-7-dietilaminocumarina **10** via sal de diazônio, seguido de tratamento com azida de sódio (Esquema 21).

Esquema 21 - Síntese da 3-azido-7-dietilaminocumarina **10**



Reagentes e condições: i) Nitroacetato de etila, piperidina, ácido acético, 1-butanol, refluxo, 24 h, rendimento: 79%; ii) Cloreto estano (II), HCl 36,5%, temperatura ambiente, 4 h, rendimento: 62%; iii) HCl 17,2%, nitrito de sódio, 0-5°C, 1 h; iv) Acetato de potássio, azida de sódio, 0-5°C, 5 h, rendimento: 78%.

O rendimento da reação de síntese de **29** foi de 79%, valor próximo ao descrito na literatura utilizando condições de síntese semelhantes (Sivakumar *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 2005; Ray e Bharadwaj, 2008; Zhou, Chu, *et al.*, 2013). Sivakumar e colaboradores (2004) obtiveram 73%; Anderson e colaboradores (2005), 80%; Ray e colaboradores (2008), 90% e Zhou e colaboradores (2013), 86%. A proposta de mecanismo para esta reação está representada no Esquema 22 (página 46).

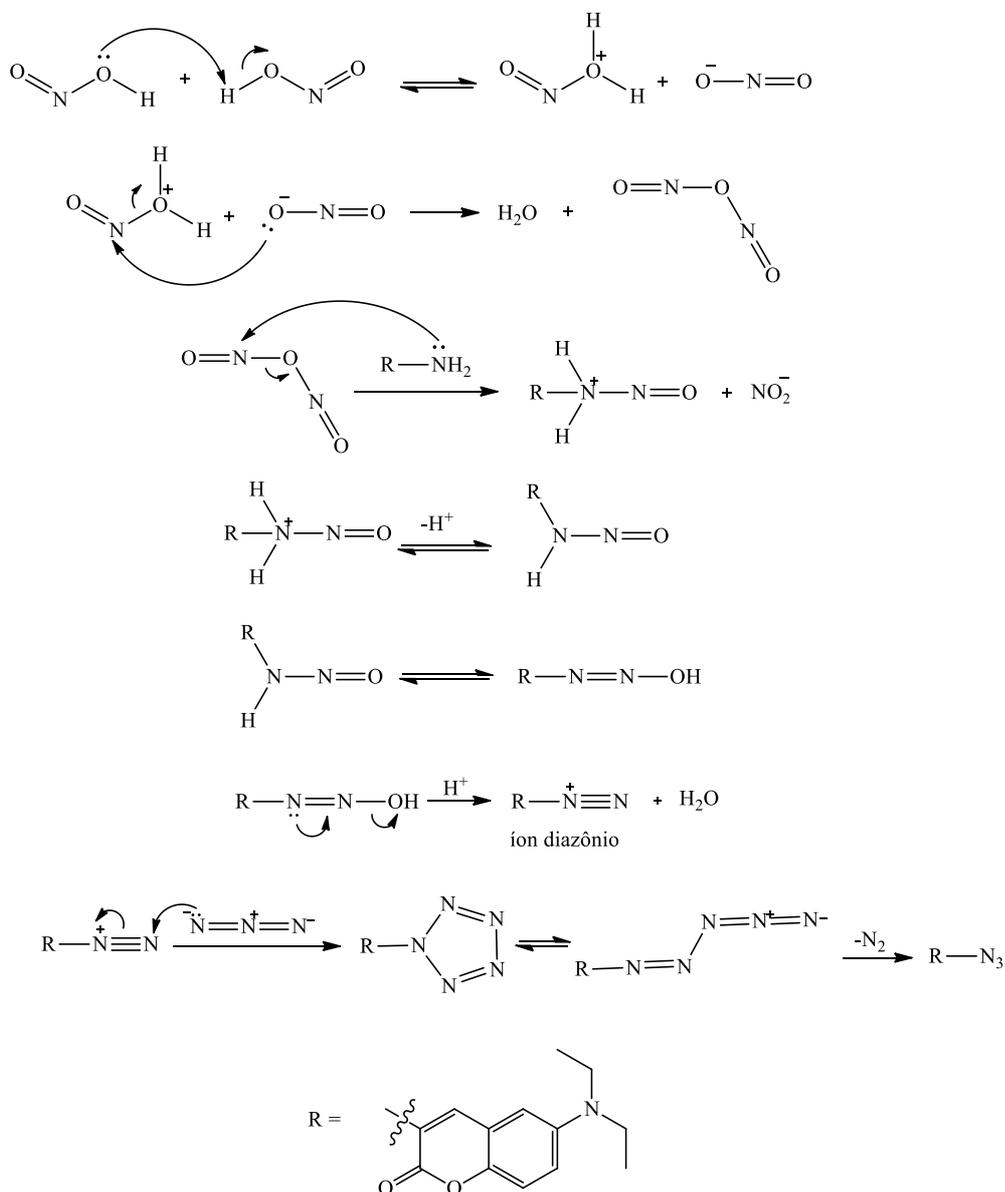
Esquema 22 - Proposta mecanística para síntese da 7-dietilamino-3-nitrocumarina **29**

O composto 3-amino-7-dietilaminocumarina **30** foi obtido a partir da redução de 7-dietilamino-3-nitrocumarina **29** promovida por $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e HCl aquoso. O rendimento bruto obtido foi de 62%, um pouco mais baixo que o descrito (68%) por Sivakumar e colaboradores (2004). As perdas possivelmente ocorreram na etapa de extração líquido-líquido do produto, na qual se observou que as fases não ficaram bem separadas. O produto é relativamente instável e não foi purificado.

A 3-amino-7-dietilaminocumarina **30** foi transformada na azida correspondente **10** por reação de diazotização, seguida do tratamento do sal de diazônio com azida de sódio. Ao contrário da reação de Sandmeyer, essa reação parece não envolver quebra da ligação C-

heteroátomo (mecanismo de substituição nucleofílica aromática clássico via sal de diazônio), mas sim o ataque da azida ao nitrogênio eletrofílico do íon diazônio. Assim, o tratamento da amina aromática com ácido nitroso a 0°C fornece o sal de diazônio. Os sais de diazônio são em geral instáveis, mas os aromáticos são mais estáveis devido à ressonância entre os nitrogênios e o anel. No caso da reação com íons azida, os sais de diazônios agem como eletrófilos e são atacados pelo par de elétrons não ligantes do nitrogênio da azida de sódio, com formação de intermediários pentazenos e pentazóis, seguida da perda de nitrogênio gasoso, que leva à obtenção da azida **10**, conforme mecanismo representado no Esquema 23 (Brase *et al.*, 2005; Smith, 2013).

Esquema 23- Proposta de mecanismo para síntese da 3-azido-7-dietilaminocumarina **10**



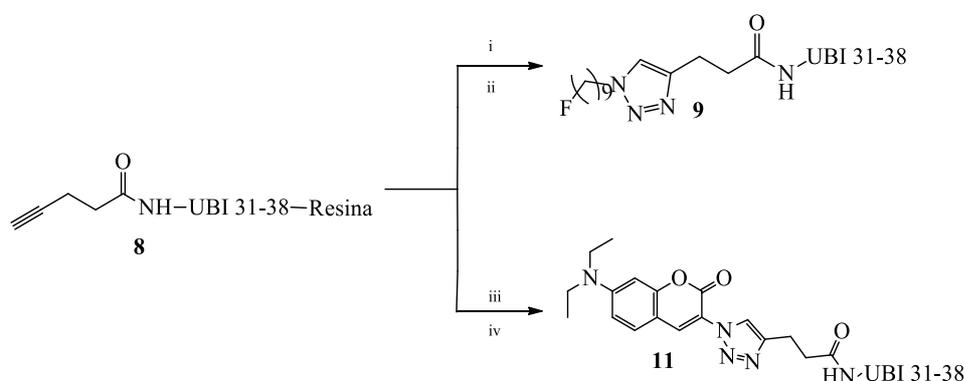
Os intermediários **29** e **30** e a azidocumarina **10** foram caracterizados por espectroscopia na região do IV, RMN de ^1H e de ^{13}C (Figuras 60 a 70, páginas 112 a 117). Os sinais foram atribuídos por comparação com os dados espectrais descritos na literatura (Sivakumar *et al.*, 2004).

A azidocumarina **10** é considerada um pró-fluoróforo porque, embora não apresente fluorescência devido ao efeito “quenching” do nitrogênio α rico em elétrons do grupo azido, leva à formação de uma unidade triazólica fortemente fluorescente, após a reação CuAAC com um alcino terminal (Sivakumar *et al.*, 2004).

3.3.3 Síntese de derivados triazólicos via reação CuAAC

Os derivados 1,2,3-triazólicos do peptídeo UBI 31-38 foram obtidos pela reação CuAAC entre o alcinopeptídeo **8** e as azidas **5** e **10**, na presença do catalisador Cu(I), conforme mostrado no Esquema 24.

Esquema 24 – Conjugação do alcinopeptídeo **8** via reação CuAAC



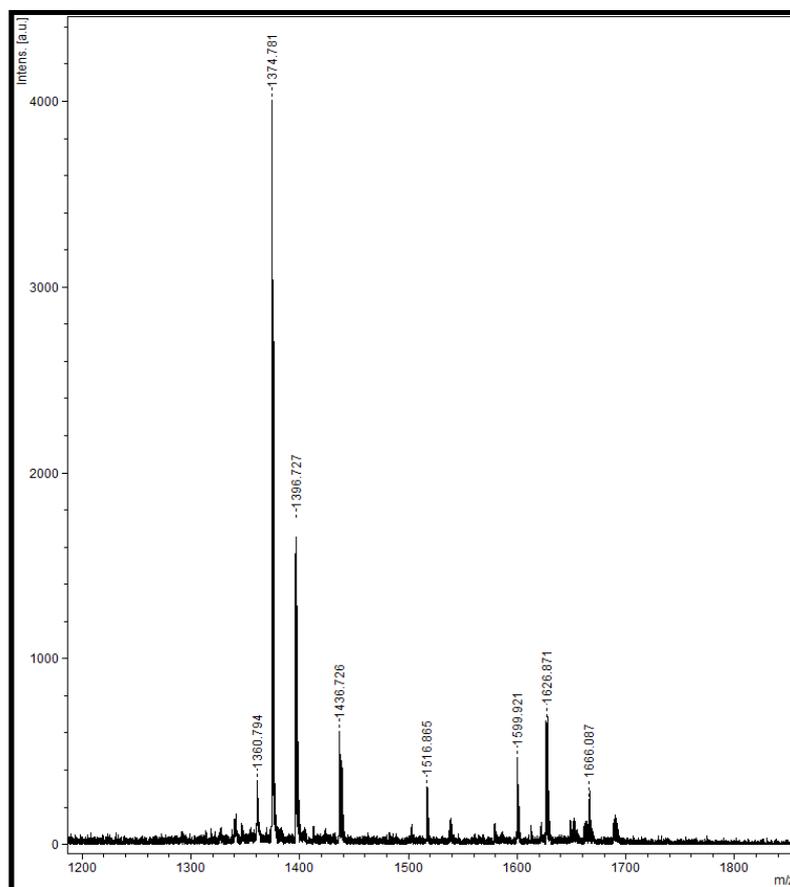
Reagentes e condições: i) 1-azido-9-fluorononila **5**, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ascorbato de sódio, DCM, H_2O , temperatura ambiente, 15 h; ii) Solução de TFA/ H_2O /EDT/TIS 94,0/2,5/2,5/1,0, 3 h; iii) 3-azido-7-dietilaminocumarina **10**, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ascorbato de sódio, DCM, H_2O , temperatura ambiente, 60 h; iv) Solução de TFA/ H_2O /EDT/TIS 94,0/2,5/2,5/1,0; 3 h.

Neste trabalho, o procedimento descrito por Howarth e colaboradores (2011) foi adaptado para a obtenção dos derivados peptídicos 1,2,3-triazólicos **9** e **11**. Optou-se por realizar a reação “click” com o alcinopeptídeo **8** ainda preso à resina e com as cadeias laterais protegidas, a fim de se evitarem reações secundárias. Devido ao fato de o alcinopeptídeo **8**

utilizado como reagente não estar isolado, sua massa não pôde ser determinada com exatidão e, por esse motivo, os cálculos estequiométricos são aproximados.

Durante a elaboração da reação CuAAC, foi realizada lavagem da resina com solução de EDTA (50% p/v) tamponada com NH_4OH (pH 9,5) para remoção de possível cobre residual, antes da etapa de clivagem. O objetivo do tampão é assegurar a desprotonação dos grupos acetato presentes no EDTA, o que aumenta sua capacidade complexante devido ao efeito quelato, além de deslocar qualquer Cu(I) , eventualmente complexado com o produto, pela formação de complexos com a amônia. No espectro obtido (Figura 24), observou-se um pico principal referente à massa de 1374,78, que corresponde a $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para **9** (1374,80 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), demonstrando que os procedimentos utilizados foram adequados para a obtenção do produto de interesse. Embora a síntese do derivado fluorado **9** tenha sido realizada de forma eficiente, as dificuldades encontradas na preparação de ^{18}F -UBI 31-38, nas tentativas iniciais de radiossíntese estudadas neste trabalho, conduziram a uma mudança de estratégia para marcação deste peptídeo.

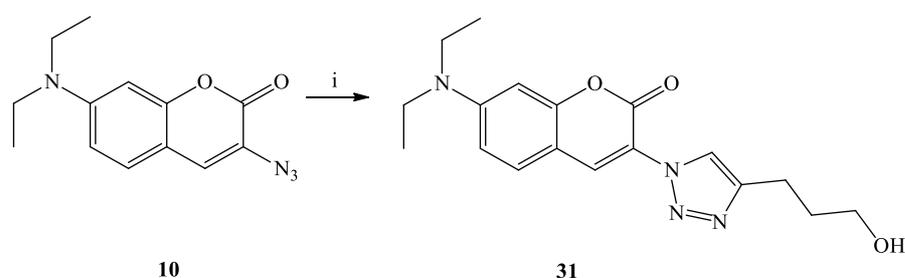
Figura 24 - Espectro de massas (MALDI-TOF) do derivado peptídico **9**



O derivado peptídico 1,2,3-triazólico **11** foi obtido empregando-se os mesmos procedimentos de síntese descritos para **9** e a formação do produto de interesse foi evidenciada por espectrometria de massas (Figura 71, página 118). Os compostos **9** e **11** foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência e posteriormente utilizados em ensaios biológicos de atividade antifúngica contra *Cryptococcus* spp, realizados pelo grupo do Prof. Dr. Daniel Assis dos Santos, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Para investigar se a presença do anel triazólico na estrutura dos conjugados **9** e **11** seria suficiente para um efeito antifúngico significativo, inclusive na ausência do peptídeo UBI 31-38, o triazol **31** foi sintetizado. Este composto inédito foi obtido via reação CuAAC (Esquema 25), conforme procedimento descrito por Sivakumar e colaboradores (2004).

Esquema 25 - Síntese do derivado triazólico cumarínico **31**



Reagentes e condições: i) 4-pentín-1-ol, ascorbato de sódio, sulfato de cobre (II) pentahidratado, água, diclorometano, temperatura ambiente, 20 h; rendimento: 55%.

O produto **31** foi caracterizado por espectroscopia na região do IV (Figura 72, página 118), RMN de ^1H (Figura 73, página 119) e de ^{13}C (Figura 74, página 119) e por espectrometria de massas (Figura 75, página 120).

3.4 Avaliação da atividade biológica

3.4.1 Avaliação da atividade antifúngica

Considerando a atual demanda pelo desenvolvimento de novos agentes antifúngicos para o tratamento da criptococose e as propriedades antimicrobianas descritas para UBI 31-38 e para diversos derivados cumarínicos, a atividade do UBI 31-38, do alcinopeptídeo **8**, da azidocumarina **10**, dos conjugados peptídicos **9** e **11** e do derivado triazólico **31** contra

linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans* foi avaliada. Os resultados da determinação da concentração inibitória mínima (MIC, de *minimum inhibitory concentration*) estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de MIC para os compostos sintetizados contra linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*

		MIC para os compostos ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)						
	Fungo	UBI 31-38	8	10	9	11	31	FCZ
Linhagem de <i>C. gattii</i>	ICB 181	>0,23	>0,22	>0,99	0,09	0,09	>0,75	0,05
	L135/03	>0,23	>0,22	>0,99	0,19	0,04	>0,75	0,05
	196L/03	>0,23	>0,22	>0,99	0,09	0,04	>0,75	0,10
	547/OTT	>0,23	>0,22	>0,99	0,09	0,04	>0,75	0,10
	ATCC 32608	>0,23	>0,22	>0,99	0,09	0,09	>0,75	0,05
	ATCC 24065	>0,23	>0,22	>0,99	0,19	0,18	>0,75	0,01
	1913ER	>0,23	>0,22	>0,99	0,19	0,18	>0,75	0,05
	L27/01	>0,23	>0,22	>0,99	0,09	0,04	>0,75	0,10
	L28/02	>0,23	>0,22	>0,99	0,19	0,09	>0,75	0,10
	LMM 818	>0,23	>0,22	>0,99	0,19	0,18	>0,75	0,10
	L24/01	>0,23	>0,22	>0,99	0,09	0,09	>0,75	0,05
	23/10993	>0,23	>0,22	>0,99	0,19	0,18	>0,75	0,05
	29/10893	>0,23	>0,22	>0,99	0,09	0,09	>0,75	0,03
	L27/01 _F *	>0,23	>0,22	>0,99	ND	0,09	>0,75	0,42
Linhagem de <i>C. neoformans</i>	ATCC 96806	>0,23	>0,22	>0,99	ND	0,09	>0,75	0,15
	ATCC 62066	>0,23	>0,22	>0,99	ND	0,09	>0,75	0,03
	ATCC 24067	>0,23	>0,22	>0,99	0,19	0,09	>0,75	0,02
	ATCC 28957	>0,23	>0,22	>0,99	ND	0,09	>0,75	0,003

*L27/01_F é uma linhagem de *C. gattii* resistente ao fluconazol (Santos *et al.*, 2014).

ND se refere a valores de MIC não determinados.

O conjugado peptídeo–cumarina **11** foi o mais ativo dentre os compostos avaliados. Além de apresentar atividade antifúngica de moderada a excelente contra várias linhagens ensaiadas, fornecendo valores de MIC comparáveis ($0,04\text{--}0,18 \mu\text{mol.mL}^{-1}$) aos do fluconazol ($\text{MIC} = 0,003\text{--}0,15 \mu\text{mol.mL}^{-1}$), o conjugado **11** inibiu, de forma eficiente, o crescimento de

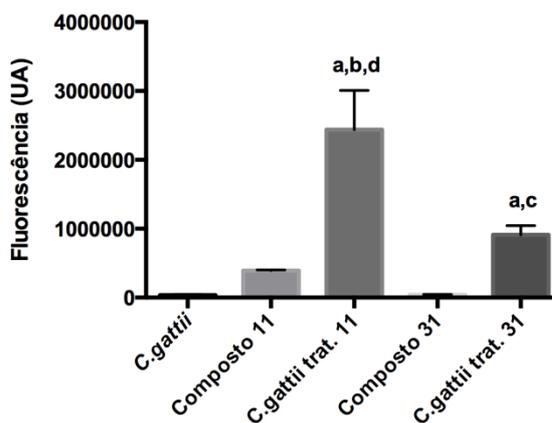
uma linhagem de *C. gattii* resistente ao fluconazol (L27/01_F) na concentração de 0,09 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$. O conjugado peptídeo-fluoroazida **9** exibiu atividade antifúngica semelhante a do fluconazol contra algumas linhagens de *C. gattii*; porém, o peptídeo UBI 31–38 e os compostos **8**, **10** e **31** apresentaram baixa atividade contra as linhagens de *C. gattii* e *C. neoformans*, com valores de MIC equivalentes a $>0,23$; $>0,22$; $>0,99$ e $>0,75$ $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Destaca-se que o conjugado **11** exibiu melhor atividade antifúngica que seus precursores **8** e **10**, bem como do que o peptídeo UBI 31–38, indicando que a associação entre o peptídeo e o derivado cumarínico utilizando o triazol como ligante é benéfica para a eficácia antimicrobiana deste composto. Em alguns trabalhos, foi relatado que a combinação do esqueleto cumarínico a vários heterociclos contendo nitrogênio, como azetidina, tiazolidina e tiazol, resultou em aumento significativo da eficácia e ampliação do espectro de atividade antimicrobiana (Shi e Zhou, 2011). Embora vários triazóis sejam extensivamente utilizados na clínica como fármacos antifúngicos (Lass-Floerl, 2011), a combinação do anel triazólico com outros farmacóforos está sendo investigada, para que novos agentes antifúngicos sejam desenvolvidos, com mecanismos de ação distintos e potencialmente eficazes contra fungos multirresistentes (Zhou e Wang, 2012). Neste trabalho, a importância do peptídeo para preservação da atividade antifúngica do conjugado **11** foi demonstrada. A ausência de UBI 31–38 no derivado triazólico **31** resultou em redução acentuada da atividade deste composto contra as linhagens testadas (MIC $>0,75$ $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) quando comparado a **11**, sugerindo que o peptídeo UBI 31–38, o derivado cumarínico e o triazol possuem um efeito sinérgico (Ferreira *et al.*, 2015).

3.4.2 Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio

Dados da literatura têm demonstrado que a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS, de *reactive oxygen species*) desempenha um papel importante na atividade antifúngica de alguns peptídeos (Lupetti *et al.*, 2002; Park e Lee, 2010; Cho e Lee, 2011) e fármacos, como evidenciado para itraconazol e anfotericina B contra *C. gattii* (Ferreira *et al.*, 2013). Neste trabalho, a produção endógena de ROS pelo fungo *C. gattii* induzida pelo conjugado peptídeo-cumarina **11** e pelo derivado triazólico **31** foi investigada por meio de ensaios fluorimétricos. Os níveis de ROS foram medidos na linhagem ATCC 32608 de *C. gattii* (grupo controle), nas soluções do conjugado peptídeo-cumarina **11** e do derivado triazólico **31**, para que a linha de base fosse obtida para tais compostos. Em seguida, a

produção intracelular de ROS após tratamento de *C. gattii* com os compostos **11** e **31**, na mesma concentração do MIC, foi medida. Os resultados estão representados na Figura 25 e expressos em unidades arbitrárias (UA) de fluorescência, sendo a intensidade da fluorescência medida diretamente proporcional ao acúmulo de ROS.

Figura 25 - Resultados do ensaio fluorimétrico para avaliação da produção de ROS



“a” indica diferença estatisticamente significativa entre o grupo em questão e *C. gattii*.

“b” indica diferença estatisticamente significativa entre as células tratadas com o composto **11** e o composto **11** sozinho.

“c” indica diferença estatisticamente significativa entre as células tratadas com o composto **31** e o composto **31** sozinho.

“d” indica diferença estatisticamente significativa entre os dois tratamentos (compostos **11** e **31**).

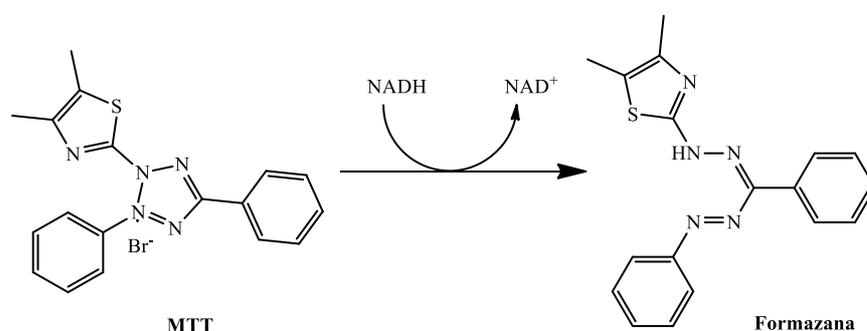
É possível observar que os níveis de ROS após tratamento de *C. gattii* com **11** e **31** foram mais elevados do que os do grupo controle ou dos compostos sozinhos. O maior valor de ROS foi medido para o tratamento com **11**, que foi justamente o composto mais ativo contra linhagens de *C. neoformans* e *C. gattii*. Esses resultados sugerem que, para os compostos **11** e **31**, possivelmente existe uma correlação entre a indução da produção de ROS e a atividade antifúngica.

3.4.3 Teste de citotoxicidade

A citotoxicidade do derivado peptídico 1,2,3-triazólico **11** foi avaliada em uma linhagem de célula humana não cancerosa (fibroblasto pulmonar CCD-Lu ATCC CCL-210) utilizando o ensaio colorimétrico do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT). O princípio deste ensaio consiste na conversão do MTT (substrato

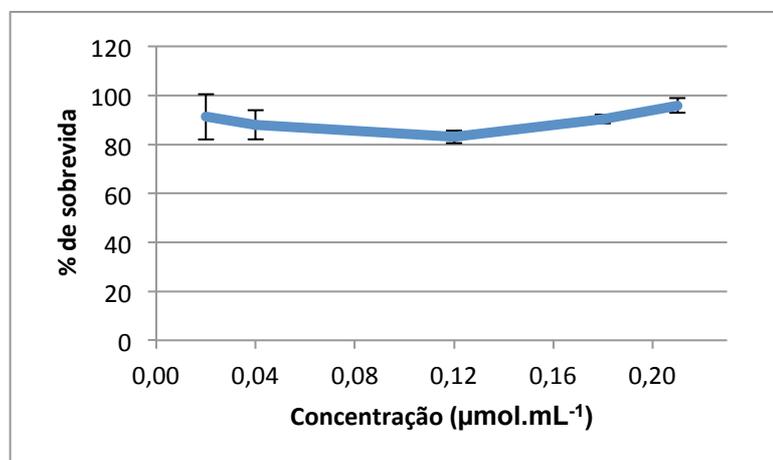
amarelo claro) a um produto chamado formazana (azul escuro) por células viáveis com metabolismo ativo, como representado no Esquema 26. O mecanismo exato da redução do MTT em formazana não foi completamente esclarecido, porém, possivelmente, envolve a reação com NADH ou outras substâncias redutoras, que transferem elétrons ao MTT. A formazana é parcialmente solúvel no meio e, por este motivo, um solvente apropriado (como isopropanol ou DMSO) é utilizado para dissolvê-la, fornecendo uma solução homogênea para leitura da absorvância. A viabilidade celular está proporcionalmente relacionada ao grau de redução do MTT (Mosmann, 1983; Riss *et al.*, 2015).

Esquema 26 - Princípio do ensaio do MTT



Neste trabalho, a taxa de sobrevivência celular foi avaliada após exposição ao conjugado **11**, em concentrações variando de 0,02 a 0,21 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$. A partir dos resultados de absorvância obtidos para cada concentração, um gráfico de porcentagem de sobrevivida vs concentração foi construído (Figura 26), sendo que a absorvância do controle negativo (ausência de **11**) foi considerada como 100% de sobrevivida.

Figura 26 - Curva de sobrevivida de CCD-Lu

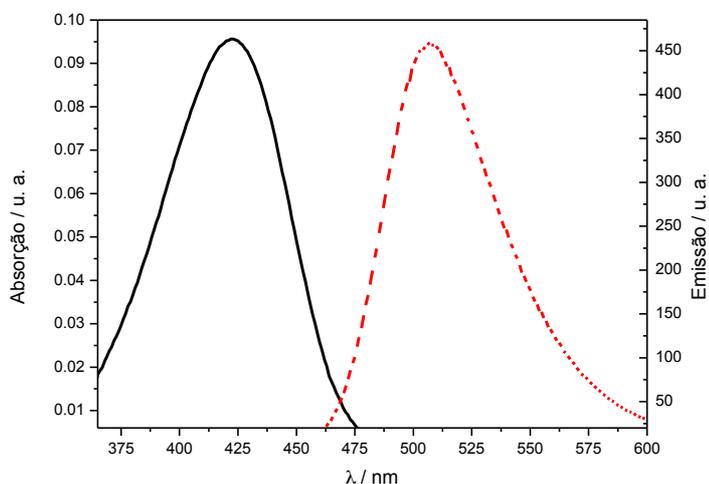


Os resultados demonstraram que o conjugado **11** não é citotóxico, uma vez que a viabilidade celular ficou compreendida na faixa de 80 a 100%, inclusive na concentração de $0,21 \mu\text{mol.mL}^{-1}$. Como esta concentração é superior ao maior valor de MIC ($0,18 \mu\text{mol.mL}^{-1}$) obtido para este composto, pode-se dizer que **11** possui um índice de seletividade de atividade anticriptocócia, em relação à citotoxicidade, de moderado a alto.

3.5 Estudos fotofísicos

As propriedades fotofísicas do conjugado peptídeo-cumarina **11** foram estudadas para avaliar a potencial aplicação deste composto na obtenção de imagens de fluorescência, o que poderia auxiliar na investigação dos mecanismos de ação contra *Cryptococcus* spp., por exemplo. Os espectros de absorção (linha cheia) e de emissão (linha tracejada) do conjugado **11** em água (concentração: $5,0 \mu\text{mol.mL}^{-1}$) estão mostrados na Figura 27. Foi possível observar que este composto absorve luz na região de 360 – 470 nm, com máximo em 423 nm; e emite em 460 – 580 nm, com máximo em 501 nm.

Figura 27 - Espectros de absorção e de emissão de **11** em água



O deslocamento de Stokes, calculado pela diferença entre os comprimentos de onda referentes ao máximo de emissão e de absorção, correspondeu a 78 nm para o composto **11**. Valores de deslocamentos de Stokes mais altos (>50 nm) são desejáveis, porque permitem que a emissão seja detectada com baixa interferência, já que os comprimentos de onda de absorção e emissão são significativamente diferentes. Além disso, o efeito de auto-*quenching* ocorre principalmente em fluoróforos com pequenos deslocamentos de Stokes (Kress-Rogers, 1997; Horvath *et al.*, 2015). O composto 7-hidroxi-4-metil-cumarina, por exemplo, possui o

máximo de absorção em 310 nm e o de emissão em 356 nm; apresentando, portanto, baixo valor de deslocamento de Stokes (46 nm), que é prejudicial às suas aplicações como sonda fluorescente (Xie *et al.*, 2012). O valor de deslocamento de Stokes obtido para o composto **11** foi semelhante ao descrito na literatura para outros derivados triazólicos (71-73 nm) sintetizados a partir da azidocumarina **10** (Sivakumar *et al.*, 2004).

O coeficiente de extinção molar (ϵ) de **11** foi determinado, experimentalmente, por meio da aquisição de espectros de absorção em diferentes concentrações (Figura 28). A partir dos resultados obtidos, um gráfico do máximo de absorção *vs* concentração foi construído (Figura 29 (página 57)).

Figura 28 - Espectros de absorção do composto **11** em diferentes concentrações

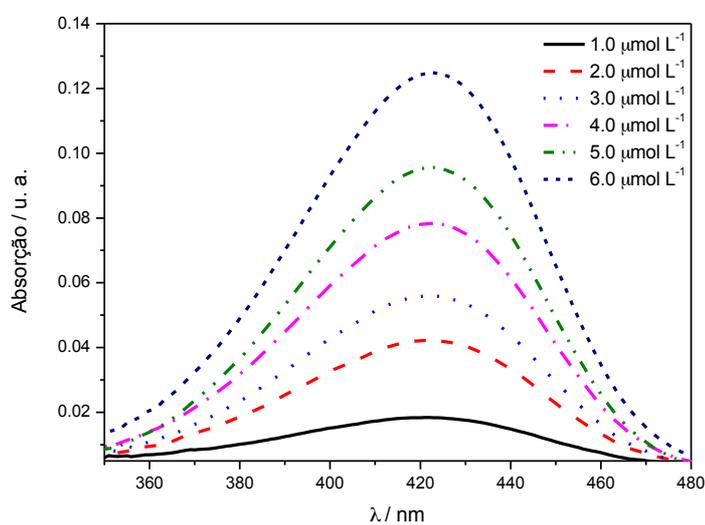
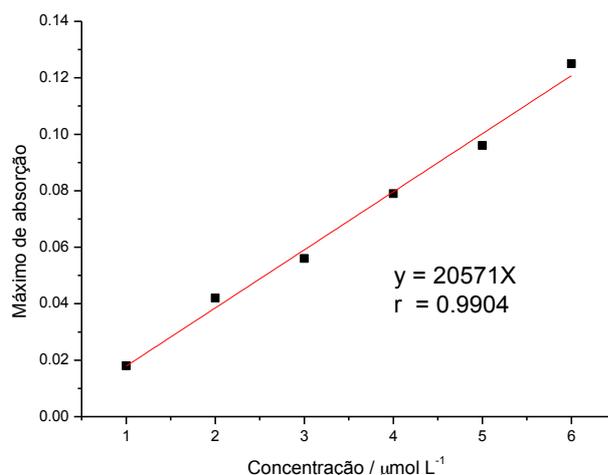


Figura 29- Curva de calibração do máximo de absorção em função da concentração de **11**

Com base na equação de Lambert-Beer, tem-se que a inclinação da reta obtida corresponde ao produto do coeficiente de extinção molar pelo caminho óptico. Como a cubeta utilizada possui caminho óptico de 1,0 cm, a inclinação da reta, neste caso, fornece o valor do coeficiente de extinção molar.

$$A = \varepsilon.B.C,$$

onde A se refere à absorvância; ε , ao coeficiente de extinção molar; B, ao caminho óptico e C, à concentração.

O coeficiente de extinção molar determinado para o composto **11** em água foi de $2,06 \times 10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, que é superior ao relatado para o núcleo cumarínico em tolueno ($1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (Xie *et al.*, 2012). Em outras publicações, derivados cumarínicos com coeficientes de extinção molar na faixa de $0,3$ a $4,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ foram descritos (Signore *et al.*, 2010; Schill *et al.*, 2013).

O rendimento quântico de fluorescência (Φ) é um parâmetro chave para avaliação de fluoróforos, pois se trata de uma medida direta da eficiência com que um fluoróforo é capaz de converter a luz absorvida em luz emitida (Wuerth *et al.*, 2013). Neste trabalho, Φ de **11** foi determinado com base no método desenvolvido por Williams e colaboradores (1983), utilizando sulfato de quinina como padrão. Espectros de absorção e de emissão do sulfato de quinina em diferentes concentrações foram obtidos, como representado, respectivamente, na Figura 30 (página 58) e na Figura 31 (página 58), de modo análogo ao realizado para o composto **11** (Figura 28, página 56 e Figura 32, página 59). A partir dos resultados obtidos, gráficos da área sobre o espectro de emissão vs máximo de absorção foram construídos para a

amostra e o padrão, conforme pode ser observado na Figura 33 (página 59) e na Figura 34 (página 60), respectivamente.

Figura 30- Espectros de absorção no UV de sulfato de quinina em diferentes concentrações

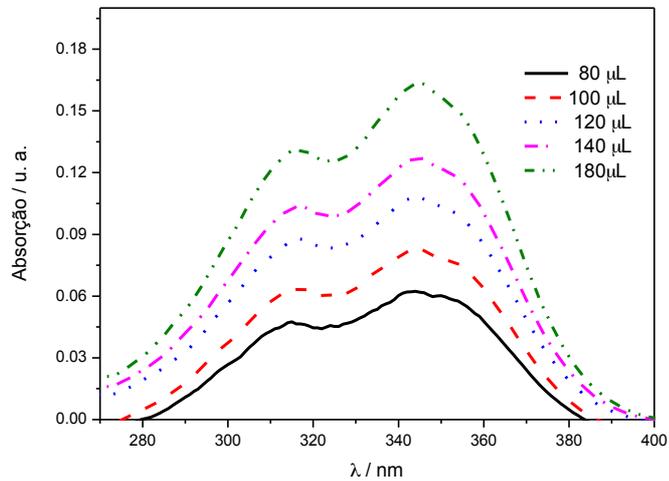


Figura 31 - Espectros de emissão de sulfato de quinina em diferentes concentrações

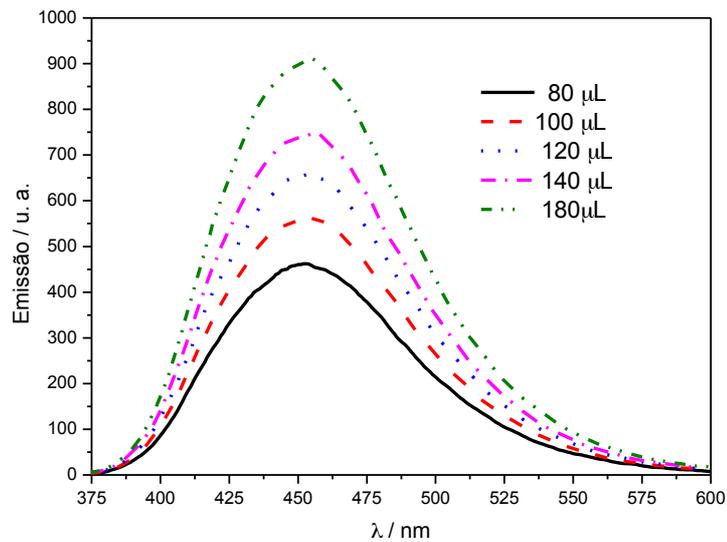


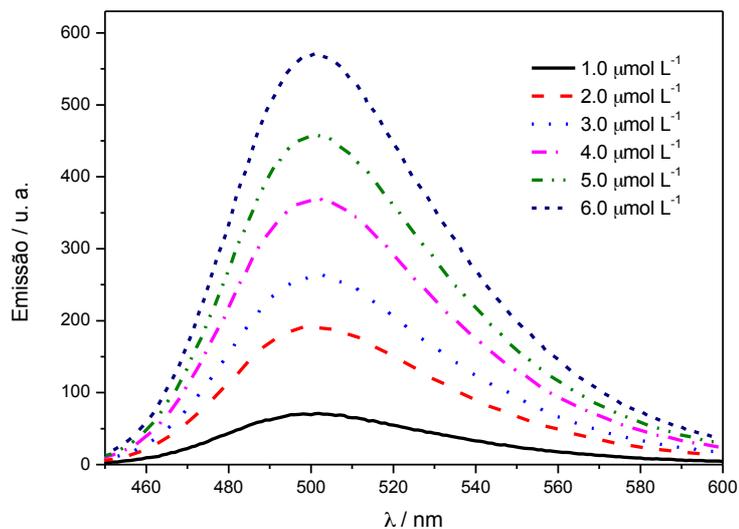
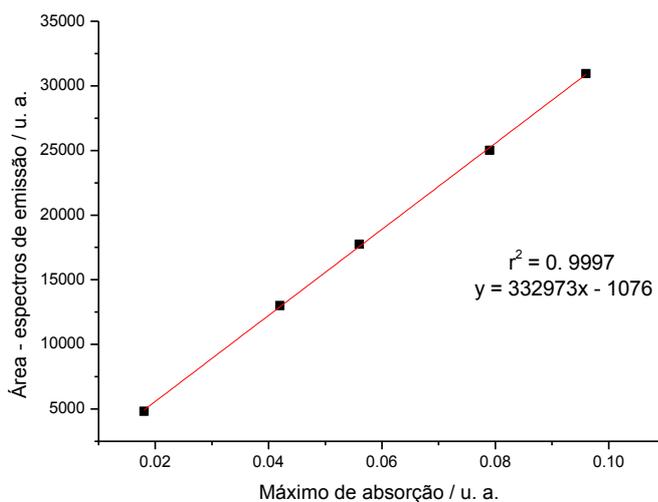
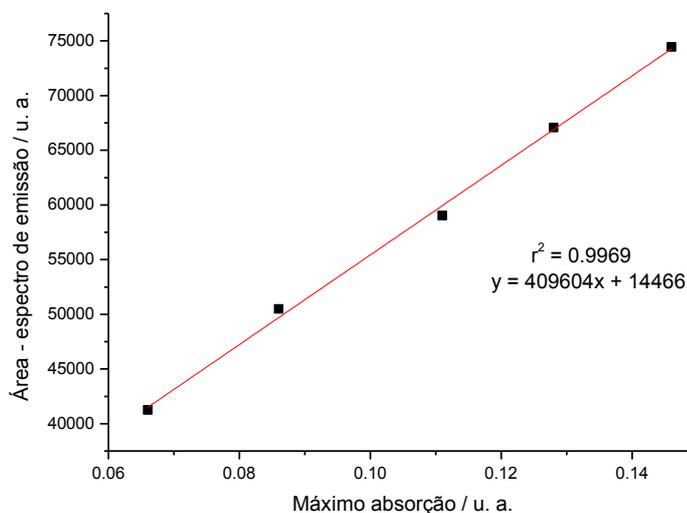
Figura 32 - Espectros de emissão do composto **11** em diferentes concentraçõesFigura 33 - Relação entre o máximo de absorção de **11** em 423 nm com a área sobre o respectivo espectro de emissão em concentrações variadas

Figura 34 - Relação entre o máximo de absorção do sulfato de quinina em 345 nm com a área sobre o respectivo espectro de emissão em concentrações variadas



O rendimento quântico da amostra foi determinado utilizando a equação abaixo:

$$\Phi_{Am} = \Phi_{Pa} \left(\frac{\text{Grad}_{Am}}{\text{Grad}_{Pa}} \right) \left(\frac{\eta_{Am}}{\eta_{Pa}} \right)$$

onde Φ_{Am} e Φ_{Pa} se referem ao rendimento quântico da amostra e do padrão, respectivamente; Grad_{Am} e Grad_{Pa} , à inclinação da reta do máximo de absorção vs área do espectro de emissão em concentrações diferentes para a amostra e o padrão, respectivamente e η_{Am} e η_{Pa} , ao índice de refração da solução da amostra e do padrão, respectivamente.

O rendimento quântico calculado para **11** foi de 0,44, utilizando os valores de inclinação da reta obtidos para as curvas da Figura 33 (página 59) e da Figura 34 (página 60), dados de índice de refração da água (1,3321) e o do ácido sulfúrico (1,332) e o valor de rendimento quântico descrito para o sulfato de quinina (0,546) (Williams, Winfield e Miller, 1983).

O rendimento quântico, bem como o tempo de vida de fluorescência, talvez sejam as características mais importantes de um fluoróforo. O rendimento quântico é a razão do número de fótons emitidos pelo o número de fótons absorvidos. Substâncias com grande rendimento quântico, aproximando-se da unidade, apresentam emissão mais brilhante (Lakowicz, 1999). O resultado de rendimento quântico obtido para **11** é próximo ao intervalo (0,6-0,7) relatado por Sivakumar e colaboradores (2004) para triazóis cumarínicos.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Métodos Gerais

Os métodos gerais empregados para identificação, purificação e caracterização dos compostos de interesse, bem como para o tratamento dos solventes empregados na síntese, são descritos a seguir.

4.1.1 Cromatografia em camada delgada

Utilizou-se sílica gel 60 G da Merck, de 0,25 mm de espessura sobre lâminas de vidro para cromatografia em camada delgada de fase normal. As placas foram ativadas por 30 minutos a 100 °C.

4.1.2 Cromatografia em coluna

Utilizou-se sílica gel da Merck (tamanho de partícula 0,063-0,200 mm) para cromatografia em coluna. A fase móvel empregada para as colunas seguiu a ordem eluotrópica usual, na ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol.

4.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A CLAE foi empregada para purificação do peptídeo UBI 31-38 e de seus derivados. As corridas cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo Varian Pro Star 210 com injetor manual e detector na região do UV ($\lambda = 214$ nm) (Departamento de Química, ICEX, UFMG). Utilizou-se coluna analítica de fase reversa Vydac C18 (250 x 4,6 mm) e *loop* de 20 μ L para escala analítica e coluna semipreparativa Vydac C18 (250 x 10,5 mm) e *loop* de 2 mL para escala semipreparativa. Os eluentes utilizados foram: água destilada acidulada com ácido trifluoroacético (TFA 0,1% - fase A) e acetonitrila grau HPLC em TFA (ACN/TFA 0,08% - fase B).

A CLAE também foi utilizada para análise dos produtos obtidos por radiosíntese. As corridas cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo Agilent modelo 1200, com

injetor manual, equipado com detector de índice de refração e de radioatividade (Unidade de Pesquisa e Produção de Radiofármacos, CDTN). Utilizou-se coluna analítica de fase reversa modelo Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm) e *loop* de 20 μ L. Os eluentes utilizados foram acetonitrila grau HPLC e água destilada.

4.1.4 Faixa de fusão

As faixas de fusão foram determinadas em aparelho Fisher-Jonhs e não foram corrigidas (Departamento de Química, ICEX, UFMG).

4.1.5 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros na região do IV foram obtidos em espectrômetro FT-IR, *Spectrum One SP-IR Spectrometer* da Perkin-Elmer com inserção direta da amostra (Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, UFMG).

4.1.6 Espectrometria de Massas

Os espectros de massas na faixa de 700 a 4500 Da foram obtidos em espectrômetro de massas do tipo MALDI-ToF/ToF (AutoFlex III, Bruker Daltonics) operando em modo positivo refletido (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG). As amostras foram diluídas em uma solução saturada de matriz do ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em placa de MALDI do tipo Anchor-Chip na proporção 1:1, onde foram secadas à temperatura ambiente. O aparelho foi calibrado para a faixa de massa citada utilizando o *Peptide Calibration Standard II*.

Os espectros de massas adquiridos num intervalo de m/z 50-500 foram adquiridos no espectrômetro de massas do tipo LCMS-IT-TOF (Bruker Daltonics Micro TOF) com fonte de ionização por electrospray e analisador do tipo tempo de voo (Departamento de Química, ICEX, UFMG). As amostras foram solubilizadas em MeOH.

4.1.7 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos nos equipamentos Bruker *ADVANCE DRX 400* e *DPX 200* com transformada de Fourier (Departamento de Química,

ICEx, UFMG). O solvente CDCl_3 foi empregado para solubilização das amostras. Utilizou-se o pico do tetrametilsilano (TMS) presente no clorofórmio deuterado como referência interna. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J), em Hertz (Hz). As multiplicidades estão abreviadas da seguinte maneira: s (simpleto), d (duplete), dd (duplete duplo), t (triplete), td (triplete duplo), q (quarteto), quint (quinteto) e m (multiplete).

4.1.8 Espectrometria UV-vis

As medidas de absorvância na região do UV-visível foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis Varian Cary 100, utilizando cubeta de quartzo de 1 cm (Departamento de Química, ICEx, UFMG).

4.1.9 Espectrometria de fluorescência

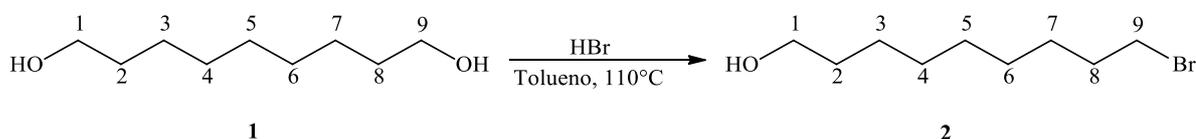
As análises de emissão foram realizadas em um espectrofotômetro de fluorescência Varian Cary Eclipse (Departamento de Química, ICEx, UFMG).

4.1.10 Tratamento de solventes e reagentes

O solvente DMF foi tratado por destilação simples e o DMSO, com peneira molecular do tipo A4 ativada. O KF foi solubilizado em metanol e, posteriormente, recristalizado por redução do volume, seguido de secagem a 100 °C sob vácuo por, no mínimo, três horas. Esse procedimento foi realizado imediatamente antes do uso. A água destilada foi obtida em equipamento Milli-Q, da marca Millipore (Departamento de Química, ICEx, UFMG). Os demais reagentes foram utilizados sem a necessidade de tratamento prévio.

4.2 Sínteses

4.2.1 Síntese de 9-bromononan-1-ol 2 (Hilario *et al.*, 2011)



Procedimentos

Em um balão de fundo redondo de 250 mL contendo uma mistura de 1,9-nonanodiol **1** (3,7 g, 23,1 mmol) em 100 mL de tolueno, conectado a um sistema extrator de água (aparelho de Dean-Stark) e a um condensador, foi adicionado o ácido bromídrico 48% (4,3 mL, 25,4 mmol). A mistura reagente foi mantida sob agitação magnética a 110°C durante 24 horas. O término da reação foi confirmado por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 80/20, revelador: vapor de iodo sublimado). O solvente da reação foi removido sob pressão reduzida em evaporador rotatório. O resíduo obtido foi cromatografado em coluna de sílica (eluente: hexano/acetato de etila 100/0 a 70/30), levando à obtenção de **2** (4,1 g, 80%).

Rendimento: 80%

Aspecto físico: óleo de cor amarela

FM: C₉H₁₉BrO

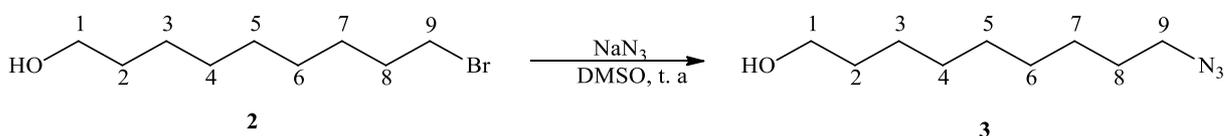
MM: 223,15 g.mol⁻¹

IV ($\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹) (Figura 38, página 101): 3366 (ν O-H álcool), 2926, 2853 (ν C-H alifático), 1054 (ν C-O álcool primário).

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Figura 39, página 102): 1,31-1,45 (m, 10 H, H-3 a H-7); 1,47-1,60 (m, 2 H, H-2); 1,76-1,91 (m, 3 H, H-8 e OH); 3,41 (t, $J_{9,8} = 6,8$ Hz, 2 H, H-9); 3,64 (t, $J_{1,2} = 6,6$ Hz, 2 H, H-1).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Figura 40, página 102): 25,6; 28,0; 28,6; 29,2; e 29,3 (C-3 a C-7); 32,6 e 32,7 (C-2 e C-8); 33,9 (C-9); 62,9 (C-1).

4.2.2 Síntese de 9-azidononan-1-ol **3** (Hilario *et al.*, 2011)



Procedimentos

Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de azida de sódio em DMSO 0,5 mol.L⁻¹, agitando durante 24 horas a azida de sódio (3,25 g) em 100 mL de DMSO à temperatura ambiente.

Em um balão de fundo redondo de 250 mL contendo o 9-bromononan-1-ol **2** (4,8 g, 21,5 mmol), foram adicionados 47,4 mL da solução de azida de sódio em DMSO 0,5 mol.L⁻¹ (23,7 mmol). A mistura foi mantida sob agitação magnética, à temperatura ambiente, durante 24 horas. A evolução da reação foi acompanhada por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 80/20, revelador: vapor de iodo sublimado). À mistura reagente, adicionaram-se 50 mL de água destilada gelada e extraiu-se com diclorometano. A fase orgânica foi lavada com uma solução aquosa saturada de cloreto de sódio e, posteriormente, foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi cromatografado em uma coluna de sílica (eluente: hexano/acetato de etila 100/0 a 70/30), fornecendo o produto **3**, como um óleo amarelo (3,8 g, 95%).

Rendimento: 95%

Aspecto físico: óleo de cor amarela

FM: C₉H₁₉N₃O

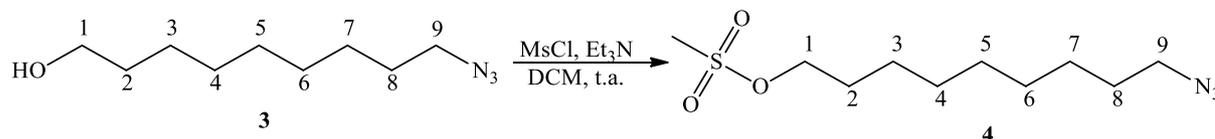
MM: 185, 27 g.mol⁻¹

IV ($\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹) (Figura 41, página 103): 3332 (ν OH álcool), 2927, 2855 (ν C-H alifático), 2090 (ν -N₃), 1256 (ν C-N), 1055 (ν_{as} C-O álcool primário).

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Figura 42, página 103): 1,21-1,40 (m, 10 H, H-3 a H-7); 1,48-1,60 (m, 4 H, H-2 e H-8); 2,31 (sl, 1 H, OH); 3,22 (t, $J_{9,8} = 6,8$ Hz, 2 H, H-9); 3,58 (t, $J_{1,2} = 6,4$ Hz, 2 H, H-1).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Figura 43, página 104): 25,6; 26,6; 28,7; 28,9; 29,2 e 29,3 (C-3 a C-8); 32,6 (C-2); 51,3 (C-9); 62,7 (C-1).

4.2.3 Síntese de metanossulfonato de 9-azidononanila **4** (Hilario *et al.*, 2011)



Procedimentos

A uma solução de 9-azidononan-1-ol **3** (3,9 g, 21,0 mmol) em 50 mL de diclorometano, mantida em banho de gelo, acrescentaram-se cloreto de mesila (4,8 g, 41,9 mmol) e trietilamina (8,5 g, 84,0 mmol) lentamente. A mistura foi mantida sob agitação

magnética à temperatura ambiente durante 20 horas. Posteriormente, a mistura foi vertida em gelo picado e extraída com diclorometano. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi cromatografado em coluna de sílica (eluente: hexano/acetato de etila 100/0 a 60/40, revelador: vapor de iodo sublimado), levando à obtenção do composto **4**, como um óleo amarelo (4,8 g, 87%).

Rendimento: 87%

Aspecto físico: óleo de cor amarela

FM: C₁₀H₂₁N₃O₃S

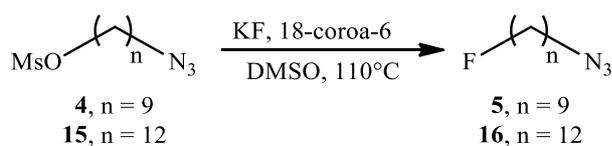
MM: 263,36 g.mol⁻¹

IV ($\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹) (Figura 44, página 104): 2930, 2857 (ν C-H alifático), 2092 (ν -N₃), 1350 (ν_{as} -S(=O)₂), 1258(ν C-N), 1171 (ν_{s} -S(=O)₂).

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Figura 45, página 105): 1,25-1,51 (m, 10 H, H-3 a H-7); 1,52-1,64 (m, 2 H, H-8); 1,75 (quint, $J_{2,1} = J_{2,3} = 6,5$ Hz, 2H, H-2); 3,00 (s, 3 H, CH₃); 3,26 (t, $J_{9,8} = 6,8$ Hz, 2 H, H-9); 4,22 (t, $J_{1,2} = 6,5$ Hz, 2 H, H-1).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Figura 46, página 105): 25,2; 26,5; 28,7; 28,8; 28,9; 29,0; 29,1 (C-2 a C-8); 37,2 (CH₃); 51,3 (C-9); 70,1 (C-1).

4.2.4 Síntese de 1-azido-9-fluorononano **5** e 1-azido-12-fluorododecano **16** (Li *et al.*, 2008, com adaptações)

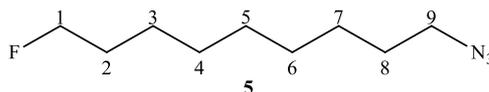


Procedimentos

Em um balão de 10 mL acoplado a um condensador de refluxo, adicionaram-se fluoreto de potássio anidro (66 mg, 1,14 mmol) e éter 18-coroa-6 (300 mg, 1,14 mmol) em 2 mL de DMSO anidro. Posteriormente, acrescentou-se a mesilazida **4** (150 mg, 0,57 mmol) ou **15** (174 mg, 0,57 mmol). O sistema foi mantido sob agitação magnética a 110 °C durante 20 horas. A evolução da reação foi acompanhada por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 80/20, revelador: vapor de iodo sublimado). A reação foi elaborada adicionando-se 20 mL de diclorometano à mistura, que foi lavada com água destilada, com auxílio de funil de

separação. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi cromatografado em coluna de sílica (eluente: hexano/acetato de etila 100/0 a 80/20). Após a eliminação do solvente, obteve-se o produto **5** (61 mg, 57%) ou **16** (82 mg, 55%), na forma de um óleo incolor e ligeiramente amarelado, respectivamente.

1-azido-9-fluorononano **5**



Rendimento: 57%

Aspecto físico: óleo incolor

FM: C₉H₁₈FN₃

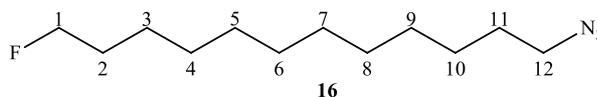
MM: 187,15 g.mol⁻¹

IV ($\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹) (Figura 49, página 107): 2929 (ν_{as} C-H alifático), 2857 (ν_{s} C-H alifático), 2091 (ν -N₃), 1258 (ν C-N), 1004 (ν C-F).

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Figura 50, página 107): 1,20-1,49 (m, 10 H, H-3 a H-7); 1,52-1,81 (m, 4 H, H-2 e H-8); 3,25 (t, $J_{9,8} = 6,8$ Hz, 2 H, H-9); 4,42 (td, $J_{1,2} = 6,2$ Hz e $J_{1,F} = 47,2$ Hz, 2 H, H-1).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Figura 51, página 108): 25,1; 26,6; 28,7; 29,0 e 29,2 (C-3 a C-8); 30,3 ($J_{2,F} = 19,3$, C-2), 51,3 (C-9); 84,0 ($J_{1,F} = 163,2$, C-1).

1-azido-12-fluorododecano **16**



Rendimento: 55%

Aspecto físico: óleo ligeiramente amarelado

FM: C₁₂H₂₄FN₃

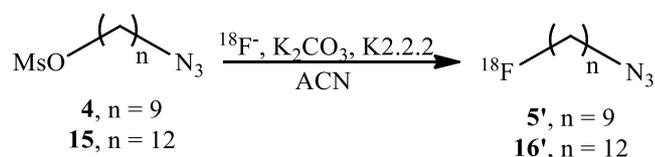
MM: 229,34 g.mol⁻¹

IV ($\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹) (Figura 52, página 108): 2929 (ν_{as} C-H alifático), 2857 (ν_{s} C-H alifático), 2091 (ν -N₃), 1258 (ν C-N), 1004 (ν C-F).

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Figura 53, página 109): 1,20-1,50 (m, 16 H, H-3 a H-10); 1,52-1,80 (m, 4 H, H-2 e H-11); 3,26 (t, $J_{12,11} = 6,8$ Hz, 2 H, H-12); 4,44 (td, $J_{1,2} = 5,2$ Hz e $J_{1,F} = 47,2$ Hz, 2 H, H-1).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), δ (ppm) (Figura 54, página 109): 25,0; 25,1; 26,6; 28,8; 29,1; 29,2 e 29,4 (C-3 a C-11); 30,4 ($J_{2,\text{F}} = 19,3$, C-2); 51,4 (C-12); 84,0 ($J_{1,\text{F}} = 163,3$, C-1).

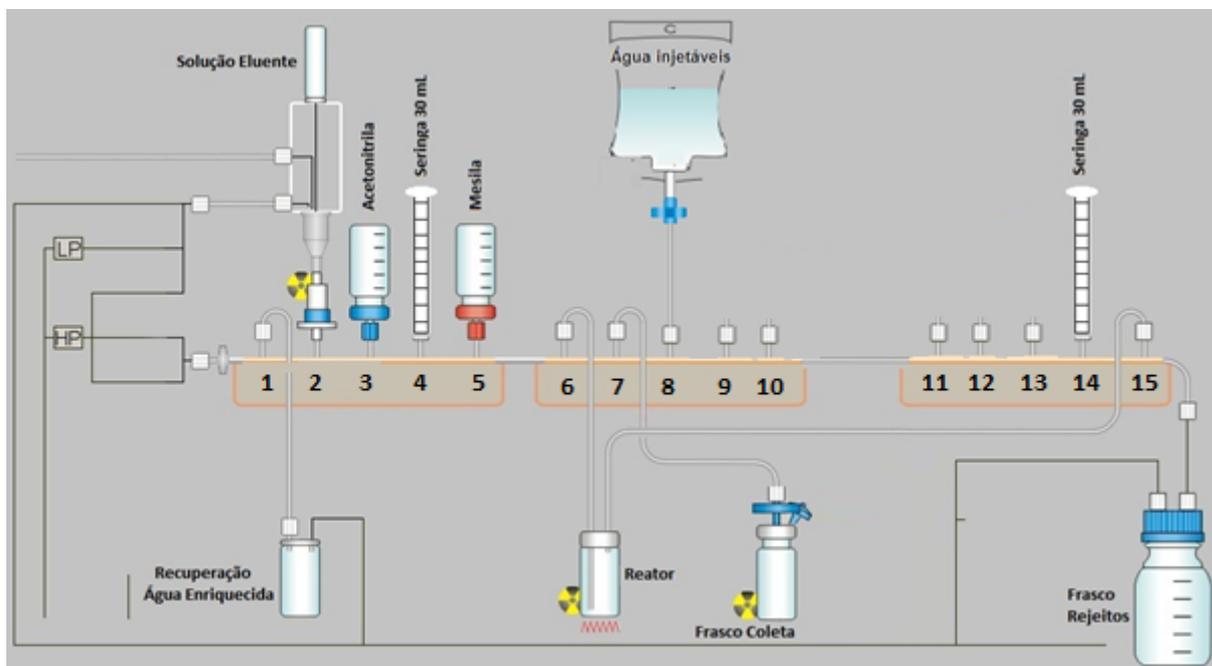
4.2.5 Radiossíntese do 1-azido-9- ^{18}F fluorononano **5'** e 1-azido-12- ^{18}F fluorododecano **16'** (Hamacher, Coenen e Stocklin, 1986, com adaptações)



Procedimentos

A radiossíntese das ^{18}F fluoroazidas **5'** e **16'** foi realizada na Unidade de Pesquisa e Produção de Radiofármacos do CDTN, utilizando módulo de síntese TracerLab MX FDG, que é controlado remotamente por um sistema computadorizado. A sequência de operações a serem executadas pelo módulo foi editada em uma planilha específica antes do início da reação. O cassete removível (ABX, Alemanha) utilizado para síntese de ^{18}F FDG foi adaptado para a síntese automatizada de **5'** e **16'**, como pode ser observado na Figura 35 (página 69). Este cassete é constituído por três blocos, sendo que cada um possui cinco válvulas, totalizando 15 posições para encaixe de reagentes ou acessórios para a síntese. Na posição 1, foram inseridos um filtro hidrofóbico, para evitar passagem de umidade ao cassete, e uma saída para coleta da água enriquecida irradiada. Na posição 2, foram colocados um reservatório plástico, o cartucho QMA pré-condicionado e a mistura eluente para recebimento, retenção e eluição do ^{18}F fluoreto. Na posição 3, foi encaixado um frasco contendo 7 mL de acetonitrila anidra, utilizada na etapa de evaporação azeotrópica da água residual no reator, bem como para diluição do precursor **4** (2,5 mg) ou **15** (3 mg). Nas posições 4 e 14, foram acopladas duas seringas de 30 mL vazias para auxiliar nas etapas de transferência de líquidos no cassete. Na posição 5, foi inserida a mesilazida **4** ou **15**. A linha de entrada do frasco reator foi colocada na posição 6 e a de saída, na posição 15. Na posição 7, foi inserida uma linha de transferência do bruto da reação $\text{S}_{\text{N}}2$ para frasco de coleta do produto acabado. Na posição 8 foi colocada uma bolsa de 250 mL de água para injetáveis. As posições 9 a 13 foram mantidas vazias. Por fim, na posição 15, além da saída do frasco reator, foi instalada uma linha para transferência dos rejeitos gerados durante a síntese.

Figura 35 - Configuração adaptada dos reagentes e acessórios para síntese de **5'** e **16'** no módulo TracerLab MX FDG



A sequência de operações realizada para síntese de **5'** e **16'** no módulo de síntese foi essencialmente a mesma padronizada pela empresa ABX para marcação do triflato de manose com ^{18}F na síntese de ^{18}F FDG. A principal diferença se refere à temperatura da reação $\text{S}_{\text{N}}2$, que é de 85°C no caso do ^{18}F FDG e, neste trabalho, foi mantida em 110°C . As etapas da síntese estão sumarizadas no Quadro 2 (página 70).

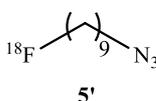
Antes do recebimento do ^{18}F , o precursor **4** ou **15** foi solubilizado em 1,5 mL de acetonitrila anidra, os frascos de reagentes foram pressurizados, o cassete foi lavado com acetonitrila e a os êmbolos das seringas, acoplados. O ^{18}F , produzido em ciclotron, foi transferido ao módulo de síntese por uma linha de tefzel subterrânea. O ^{18}F fluoreto permaneceu retido no cartucho QMA, contendo resina de troca aniônica, enquanto a água enriquecida irradiada foi coletada em um frasco próprio. Em seguida, o ^{18}F fluoreto foi eluído por uma mistura contendo K_2CO_3 (7 mg), *cryptand* 2.2.2 (22 mg) acetonitrila (0,3 mL) e água (0,3 mL) e enviado ao frasco reator. No frasco reator, a mistura foi evaporada até a secura a 95°C com auxílio de adições consecutivas de acetonitrila (três alíquotas de 80 μL) para formação de mistura azeotrópica. O precursor **4** ou **15** previamente solubilizado em acetonitrila foi adicionado ao frasco reator, que foi mantido a 110°C por 15 minutos para fornecer o intermediário ^{18}F fluoroazida **5'** ou **16'**, respectivamente. Não foi realizado

procedimento de purificação ao término da reação de marcação. O bruto da reação foi analisado em cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com detector de índice de refração e de radioatividade.

Quadro 2 - Sequência de eventos adaptada para síntese de **5'** e **16'**

Item	Etapas da síntese de 5' e 16'
1	Retenção do [¹⁸ F]fluoreto no cartucho QMA e coleta da água enriquecida
2	Eluição do [¹⁸ F]fluoreto e envio ao frasco reator
3	Adições sucessivas de acetonitrila (3 x 80 µL para evaporação azeotrópica)
4	Transferência do precursor (4 ou 15) em acetonitrila (1,5 mL) para o frasco reator
5	Reação S _N 2 a 110°C por 15 minutos
6	Envio do produto final ao frasco de coleta

1-azido-9-[¹⁸F]fluorononano **5'**



Tempo de síntese após o bombardeamento: 33 minutos

Rendimento radioquímico: 27,5 ± 0,3% (n = 3)

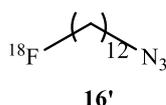
Aspecto físico: obtido na forma de solução em acetonitrila

FM: C₉H₁₈¹⁸FN₃

MM: 186,15 g.mol⁻¹

Caracterização por CLAE, utilizando o tempo de retenção do composto “frio” como padrão: Figura 14, página 25.

1-azido-12-[¹⁸F]fluorododecano **16'**

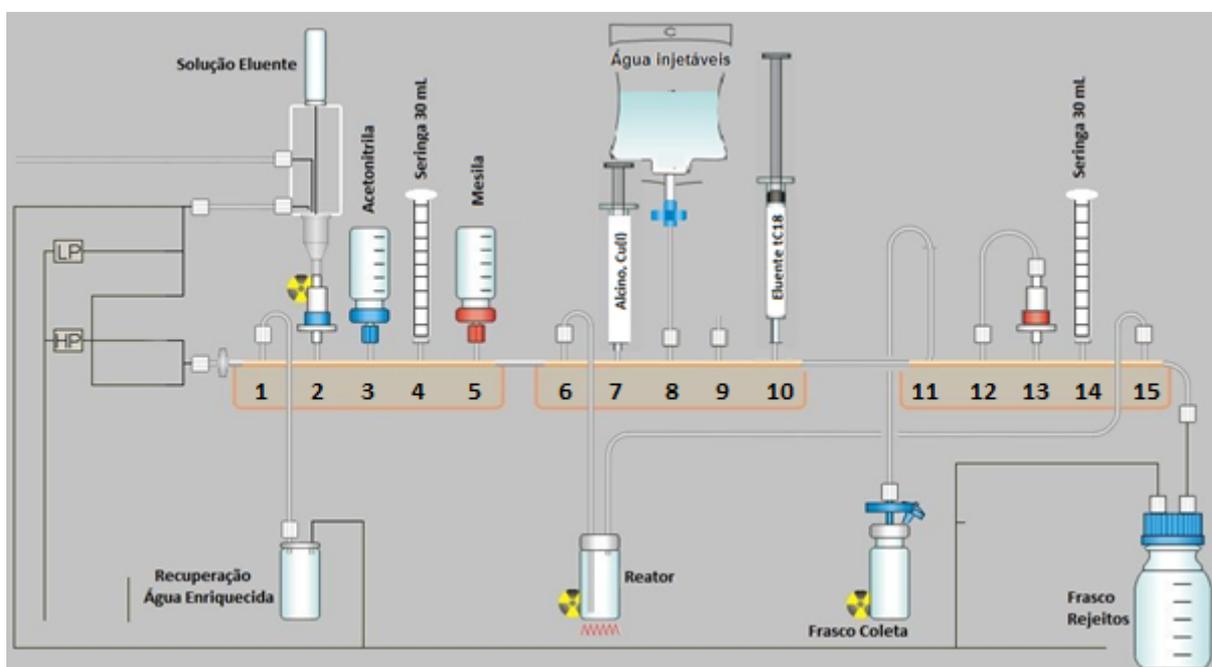


Tempo de síntese após o bombardeamento: 33 minutos

Rendimento radioquímico: 27,2 ± 6,8% (n = 3)

ascorbato de sódio (2,8 mg), acetonitrila (0,2 mL) e água (0,8 mL). Na posição 8 foi colocada uma bolsa de 250 mL de água para injetáveis. A posição 9 foi mantida vazia. Na posição 10, uma seringa de 3 mL contendo o eluente do cartucho tC18 foi acoplada. Na posição 11 foi inserida uma linha de transferência do produto acabado. Na posição 12 foi instalada uma linha para passagem do bruto de reação ao cartucho tC18 (instalado na posição 13). Por fim, na posição 15, além da saída do frasco reator, uma linha para transferência de rejeitos gerados durante a síntese foi instalada.

Figura 36 - Configuração adaptada dos reagentes e acessórios para síntese dos triazóis **6'** e **17'** no módulo TracerLab MX FDG



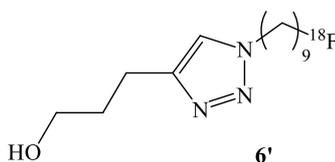
Na primeira etapa da síntese de **6'** e **17'**, foi utilizada a mesma sequência de operações empregada para a síntese de **5'** e **16'** no módulo de síntese TracerLab MX FDG, descritas anteriormente. Após o término da reação S_N2 , a mistura de 4-pentin-1-ol, sulfato de cobre penta-hidratado, ascorbato de sódio, acetonitrila e água foi adicionada ao frasco reator para reação “click” com o intermediário radiomarcado (**5'** ou **16'**). A mistura foi mantida em 110°C por mais 15 minutos. O bruto de reação foi purificado em cartucho tC18 que, inicialmente, foi lavado com 18 mL de água, para remoção de [^{18}F]fluoreto e outras impurezas polares e, em seguida, com 3 mL de etanol:água 1:1 ou de etanol 100%, para eluição dos produtos de interesse **6'** e **17'**, respectivamente. O produto acabado foi coletado e

analisado em cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com detector de índice de refração e de radioatividade. As etapas da síntese de **6'** e **17'** estão sumarizadas no Quadro 3.

Quadro 3 - Sequência de eventos adaptada para síntese dos derivados triazólicos radiomarcados **6'** e **17'**

Item	Etapas da síntese de 6' e 17'
1	Retenção do [¹⁸ F]fluoreto no cartucho QMA e coleta da água enriquecida
2	Eluição do [¹⁸ F]fluoreto e transferência ao frasco reator
3	Adições sucessivas de acetonitrila (3 x 80 µL para evaporação azeotrópica)
4	Transferência do precursor (4 ou 15) em acetonitrila (1,5 mL) para o frasco reator
5	Reação S _N 2 a 110°C por 15 minutos
6	Adição dos reagentes (4-pentin-1-ol, CuSO ₄ .5H ₂ O, ascorbato de sódio, acetonitrila e água) para reação CuAAC
7	Reação CuAAC a 110°C por 15 minutos
8	Purificação em cartucho tC18 previamente condicionado com etanol (10 mL) e água (10 mL)
9	Lavagem do cartucho tC18 com água (18 ml) para remoção de [¹⁸ F]fluoreto e outras impurezas polares
10	Eluição do produto de interesse 6' ou 17' , respectivamente, com etanol:água 1:1 (3 mL) ou etanol 100% (3 mL)
11	Envio do produto final ao frasco de coleta

Derivado 1,2,3-triazólico **6'**



Tempo de síntese após o bombardeamento: 53 minutos

Rendimento radioquímico: 11,1 ± 2,6% (n = 3)

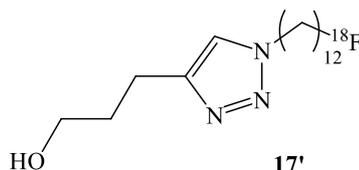
Aspecto físico: obtido na forma de solução em etanol:água 1:1

FM: $C_{14}H_{26}^{18}FN_3O$

MM: $270,21 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Caracterização por CLAE, utilizando o tempo de retenção do composto “frio” como padrão: Figura 18, página 30.

Derivado 1,2,3-triazólico **17'**



Tempo de síntese após o bombardeamento: 53 minutos

Rendimento radioquímico: $10,7 \pm 2,7\%$ ($n = 3$)

Aspecto físico: obtido na forma de solução em etanol

FM: $C_{17}H_{32}^{18}FN_3O$

MM: $312,45 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Caracterização por CLAE, utilizando o tempo de retenção do composto “frio” como padrão: Figura 20, página 31.

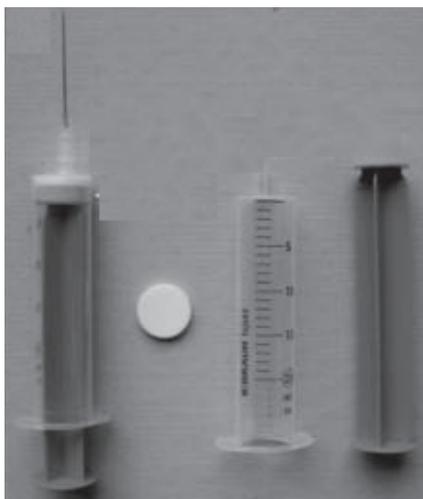
4.2.8 Síntese do peptídeo UBI 31-38 e do alcinopeptídeo

A síntese do peptídeo UBI 31-38 e do derivado de UBI 31-38 com função alcino, ambas em fase sólida, são descritas a seguir.

4.2.8.1 Síntese do peptídeo UBI 31-38 (Chan e White, 2000)

O peptídeo UBI 31-38 foi sintetizado manualmente, de acordo com a metodologia padrão de síntese de peptídeo em fase sólida, via estratégia Fmoc (Figura 22, página 35), utilizando a resina Rink-Amide Fmoc aminometil-poliestireno (Figura 23, página 35) com grau de substituição $0,63 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$. A síntese foi iniciada do resíduo de aminoácido C-terminal em direção à extremidade N-terminal. Os derivados de aminoácidos utilizados foram Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Met-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH e Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH (Quadro 1, página 35). As sínteses foram realizadas em seringas de plástico contendo filtro sinterizado, conforme mostrado na Figura 37 (página 76).

Figura 37 - Seringa e filtro utilizados para síntese de peptídeos em fase sólida



Fonte: Chatterjee, Laufer e Kessler, 2012.

4.2.8.1.1 Preparação da resina para SPFS

Considerando o grau de substituição da resina empregada ($0,63 \text{ mmol.g}^{-1}$), a massa de resina calculada para síntese de 250 mg ($0,23 \text{ mmol}$, 1 eq) de UBI 31-38 foi de 365 mg. A resina foi transferida para uma seringa de plástico contendo filtro e tampa, à qual adicionaram-se cerca de 5 mL de DCM. A suspensão foi agitada manualmente. Em seguida, a resina foi deixada em contato com DCM durante 10 minutos e, após esse intervalo, removeu-se o solvente por filtração. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes, utilizando-se 5 mL de DCM em cada. O preparo da resina é uma etapa importante, pois o DCM aumenta o volume de contato da resina, facilitando o acoplamento dos aminoácidos.

4.2.8.1.2 Remoção dos grupos Fmoc

A resina Rink-amide e os derivados de aminoácidos comerciais utilizados são protegidos com o grupo Fmoc, que foram removidos nas etapas de desproteção mostradas no Esquema 15 (página 38). Para a desproteção, acrescentaram-se à seringa contendo a resina cerca de 3 mL da solução de 4-metilpiperidina em DMF 20% (v/v). Em seguida, a seringa foi mantida sob agitação (240 rpm) em uma mesa agitadora durante 12 minutos. Após esse intervalo, a solução foi removida por filtração. Esse procedimento foi repetido mais uma vez e, ao seu término, procedeu-se à lavagem descrita a seguir.

4.2.8.1.3 Lavagem

O conteúdo da seringa foi lavado com cerca de 5 mL de DMF e cerca de 5 mL de isopropanol por aspirações seguidas, nesta ordem, alternadamente, por três vezes e, posteriormente, com cerca de 5 mL de DCM por duas vezes consecutivas. Após cada lavagem, o solvente foi descartado por filtração.

4.2.8.1.4 Teste da ninidrina (Kaiser *et al.*, 1970)

Para acompanhamento da eficiência de cada etapa de acoplamento, utilizou-se o teste da ninidrina (teste químico qualitativo para confirmação de grupo amino livre). Para o teste, cerca de quatro grãos de resina foram transferidos para tubo de ensaio, em seguida, adicionaram-se: uma gota de solução de piridina a 2% (v/v) em solução aquosa de KCN 1 mmol.L⁻¹, duas gotas de solução de fenol em etanol 80% (m/v) e uma gota de solução de ninidrina em piridina 5% (m/v), nesta ordem.

Após a etapa de desproteção, o resultado do teste da ninidrina deve ser positivo, ou seja, os grãos da resina devem ficar coloridos, em geral, azuis. Após a etapa de acoplamento, o resultado do teste da ninidrina deve ser negativo, ou seja, os grãos da resina devem ficar claros, em suas cores originais. Se o resultado do teste não for o esperado, deve-se repetir a etapa de desproteção ou acoplamento, conforme o caso.

4.2.8.1.5 Acoplamento

A etapa de acoplamento consiste na formação de uma ligação amídica e consequente introdução de um novo resíduo de aminoácido à sequência. Para o acoplamento, transferiu-se para a seringa contendo a resina desprotegida uma solução contendo o derivado de aminoácido (4 eq.), HOBt (138 mg, 0,90 mmol, 4 eq.) e DIC (141 µL, 0,90 mmol, 4 eq.) em uma mistura de DMF e DCM na proporção 2:1 (v/v). A seringa foi submetida à agitação moderada (240 rpm) em mesa agitadora durante duas horas. Após esse período, a solução contendo os ativadores foi removida por filtração. Realizou-se o procedimento de lavagem, seguido do teste da ninidrina.

4.2.8.1.6 Continuação da síntese

Procedeu-se ao ciclo de etapas que inclui: desproteção, lavagem, teste da ninidrina, acoplamento, lavagem, teste da ninidrina até a obtenção da sequência completa de aminoácidos do peptídeo UBI 31-38.

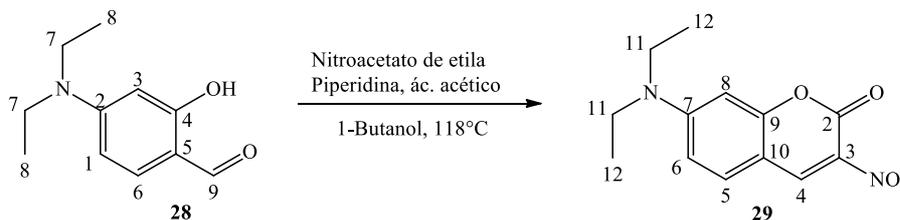
4.2.8.1.7 Clivagem do peptídeo

A remoção dos grupos protetores das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos e a clivagem do peptídeo da resina foram realizadas simultaneamente, empregando uma solução de TFA/H₂O/EDT/TIS 94,0/2,5/2,5/1,0. Utilizou-se a proporção de 10 mL de solução por grama de peptídeo ligado à resina. O volume apropriado foi transferido à seringa, que foi mantida sob agitação (240 rpm) em uma mesa agitadora durante três horas. Após este procedimento, obteve-se o peptídeo solúvel na solução de clivagem, juntamente com os produtos de reação entre os grupos protetores das cadeias laterais e os nucleófilos sequestradores de carbocátions (EDT e TIS). A solução resultante foi transferida para um tubo Falcon e o TFA foi removido por evaporação, por ação de N₂ gasoso. Em seguida, adicionaram-se 10 mL de éter diisopropílico e resfriou-se a mistura em banho de N₂ líquido. Procedeu-se à centrifugação (3500 rpm, cinco minutos) e o sobrenadante foi removido com auxílio de pipeta. Adicionou-se novamente éter diisopropílico ao precipitado, seguido de resfriamento, centrifugação e remoção do sobrenadante por mais quatro vezes. O sólido foi então dissolvido em água e a solução foi liofilizada em aparelho Thermo Fisher, modelo ModulyoD-115 (Departamento de Química, ICEX, UFMG).

4.2.8.1.8 Purificação e secagem das amostras

O peptídeo UBI 31-38 e seus derivados foram purificados por CLAE, conforme descrito no item 4.1.3 (página 61). As frações coletadas durante a purificação foram reunidas e a acetonitrila foi removida sob pressão reduzida em evaporador rotatório. A solução obtida foi liofilizada para obtenção de UBI 31-38, na forma de um sólido branco (165,5 mg, 66%).

4.2.9 Síntese da 7-dietilamino-3-nitrocumarina **29** (Sivakumar *et al.*, 2004)



Procedimentos

Uma mistura contendo 1-butanol (20 mL), 4-dietilaminossalicilaldeído **28** (1,4 g, 7,2 mmol), nitroacetato de etila (0,8 mL, 7,2 mmol) e ácido acético (0,2 mL) foi mantida sob refluxo por 24 horas em um balão de fundo redondo de 100 mL acoplado a um condensador. A mistura foi então resfriada à temperatura ambiente e, após a adição de 100 mL de água destilada, observou-se a formação de um sólido laranja, que foi isolado por filtração sob vácuo, fornecendo a 7-dietilamino-3-nitro-cumarina **29** (1,5 g, 79%).

Rendimento: 79%

Aspecto físico: sólido laranja

FM: C₁₃H₁₄N₂O₄

MM: 262,26 g.mol⁻¹

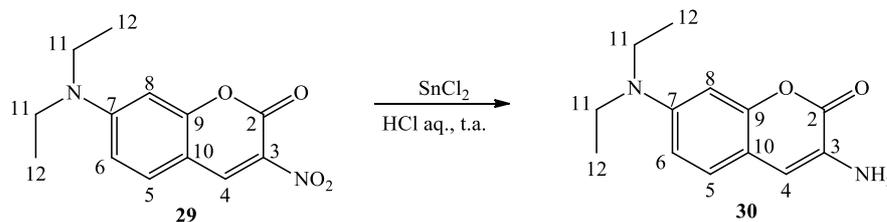
Faixa de Fusão: 196-200°C (193-195°C Sivakumar *et al.*, 2004)

IV (ν_{máx}, cm⁻¹) (Figura 60, página 112): 1744 (ν C=O), 1505 (ν_{as} -NO₂), 1325 (ν_s -NO₂), 1253 (ν_{as} C-O), 823 (ν C-N).

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Figura 61, página 113): 1,26 (t, J_{11,12} = 5,8 Hz, 6 H, H-12); 3,26-3,82 (m, 4 H, H-11); 6,44 (s, 1 H, H-8); 6,70 (d, J_{6,5} = 8,3 Hz, 1H, H-6); 7,43 (d, J_{5,6} = 8,3 Hz 1 H, H-5); 8,68 (s, 1 H, H-4).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Figura 62, página 113): 12,5 (C-12), 45,7 (C-11), 96,8 (C-8); 106,3 (C-10); 111,4 (C-6); 126,7 (C-3); 132,8 (C-5 e C-4); 143,4 (C-7), 154,8 (C-2); 158,9 (C-9).

4.2.10 Síntese de 3-amino-7-dietilaminocumarina 30 (Sivakumar *et al.*, 2004)



Procedimentos

Em um balão de fundo redondo de 100 mL, adicionaram-se, nesta ordem, HCl 37,4% (20 mL) e cloreto estanoso di-hidratado (6,4 g, 28,4 mmol) sob agitação magnética. A essa suspensão, acrescentou-se a 7-dietilamino-3-nitrocumarina **29** (0,25 g, 0,95 mmol) à temperatura ambiente, em pequenas porções, num intervalo de 30 minutos. A mistura foi mantida sob agitação durante quatro horas e, em seguida, foi vertida em gelo picado (20 g). O pH do meio foi ajustado para a faixa alcalina, utilizando-se uma solução de hidróxido de sódio (5 M). Procedeu-se à extração da suspensão obtida com éter dietílico. A fase etérea foi coletada, lavada com água destilada e, posteriormente, foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. Um sólido amarelo fluorescente ($\lambda = 254 \text{ nm}$) foi obtido como produto (0,137 g, 62%).

Rendimento: 62%

Aspecto físico: sólido amarelo fluorescente ($\lambda = 254 \text{ nm}$)

FM: $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$

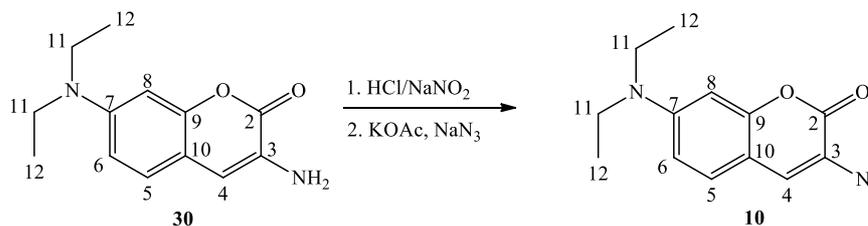
MM: $232,28 \text{ g.mol}^{-1}$

Faixa de Fusão: $84\text{-}86^\circ\text{C}$ ($85\text{-}87^\circ\text{C}$ Sivakumar *et al.*, 2004)

IV ($\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}) (Figura 63, página 114): 3401 ($\nu_{\text{as}} \text{-NH}_2$), 3338 ($\nu_{\text{s}} \text{-NH}_2$), 1693 e 1683 ($\nu \text{C=O}$), 1621 ($\nu \text{C=C}$), 1587 ($\delta \text{-NH}_2$), 1273 ($\nu \text{C-N}$); 1263 ($\nu_{\text{as}} \text{C-O}$).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ (ppm) (Figura 64, página 114): 1,18 (t, $J_{11,12} = 7,0 \text{ Hz}$, 6 H, H-12); 3,37 (q, $J_{12,11} = 7,0 \text{ Hz}$, 4 H, H-11); 3,89 (s, 2H, NH_2); 6,43-6,66 (m, 2 H, H-8 e H-6); 6,71 (s, 1H, H-4); 7,11 (d, $J_{5,6} = 8,6 \text{ Hz}$, 1 H, H-5).

4.2.11 Síntese da 3-azido-7-dietilaminocumarina **10** (Sivakumar *et al.*, 2004)



Procedimentos

Em um balão de fundo redondo de 100 mL, a 3-amino-7-dietilaminocumarina **30** (100 mg, 0,43 mmol) foi dissolvida lentamente em uma solução de HCl 17,2% (4 mL) à temperatura ambiente. Em seguida, o sistema foi resfriado com banho de gelo e adicionou-se NaNO₂ (30 mg, 0,43 mmol). A mistura reagente foi mantida entre 0 e 5°C sob agitação magnética por uma hora. Após esse intervalo, adicionaram-se pequenas porções de solução de acetato de potássio em água (2 g.mL⁻¹) até que o pH do meio atingisse 4. Adicionou-se, aos poucos, azida de sódio (57 mg, 0,88 mmol) em banho de gelo. A mistura foi mantida entre 0 e 5°C sob agitação magnética por mais cinco horas, fornecendo um sólido verde, que foi isolado por filtração e lavado com água fria (86,6 mg, 78%).

Rendimento: 78%

Aspecto físico: sólido verde

FM: C₁₃H₁₄N₄O₂

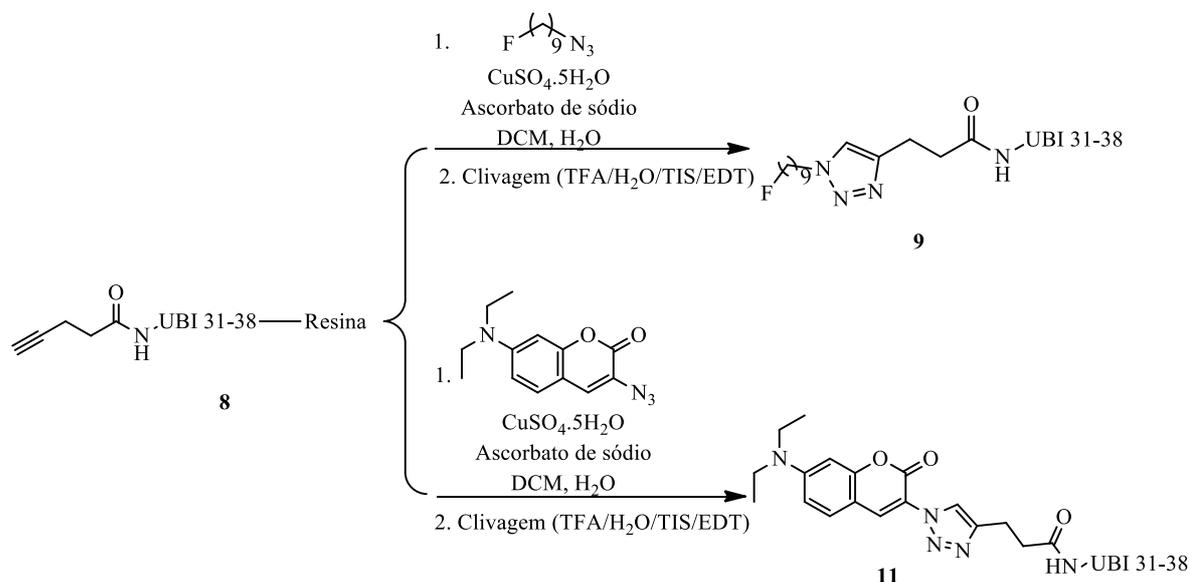
MM: 258,28 g.mol⁻¹

IV ($\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹) (Figura 65, página 115): 2117 ($\nu_{\text{as}} -\text{N}_3$), 1704 (ν C=O), 1620 (ν C=C), 1333 (ν C-O), 1268 (ν C-N).

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Figura 66, página 115): 1,19 (t, $J_{11,12} = 6,8$ Hz, 6 H, H-12); 3,39 (q, $J_{11,12} = 6,8$ Hz, 4 H, H-11); 6,47 (d, $J_{6,8} = 1,6$ Hz, 1 H, H-8); 6,57 (dd, $J_{6,5} = 8,8$ Hz, $J_{6,8} = 1,6$ Hz, 1H, H-6); 7,07 (s, 1 H, H-4); 7,17 (d, $J_{5,6} = 8,8$ Hz, 1 H, H-5).

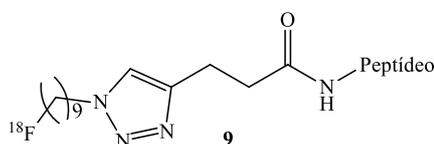
RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Figura 67, página 116): 12,5 (C-12), 44,9 (C-11), 97,3 (C-8); 108,0 (C-10); 109,6 (C-6); 119,4 (C-3); 127,8 (C-4); 128,3 (C-5); 149,9 (C-7), 154,2 (C-9); 158,5 (C-2).

4.2.12 Síntese dos derivados peptídicos 1,2,3-triazólicos via reação “click” (Howarth e Ricci, 2011)



Procedimentos

Em um balão de fundo redondo de 10 mL, adicionaram-se a azida (**5** ou **10**) (0,06 mmol), o alcinopeptídeo **8** ligado à resina com grupos protetores (estimativa de 0,028 mmol de alcinopeptídeo puro) e 2 mL de DCM. Posteriormente, adicionaram-se sulfato de cobre (II) penta-hidratado (1,5 mg, 0,006 mmol) e ascórbato de sódio (2,4 mg, 0,012 mmol) em 2 mL de água. A mistura foi mantida à temperatura ambiente sob agitação magnética por intervalo variável (15 a 60 horas) e, posteriormente, transferida para uma seringa de 5 mL com filtro. O conteúdo da seringa foi lavado com uma solução de EDTA 50% (m/v): NH_4OH 25% 1:1 (5 x 4 mL); água destilada (5 x 4 mL), álcool isopropílico (5 x 4 mL) e DCM (5 x 4 mL). Procedeu-se à clivagem e purificação por CLAE para obtenção dos derivados **9** e **11**.



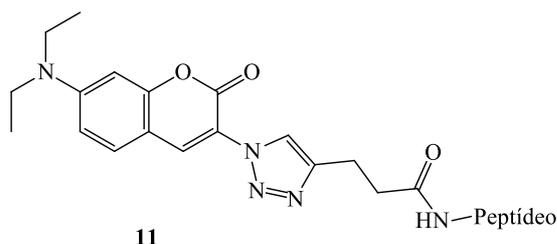
Massa obtida: 30 mg

Aspecto físico: sólido branco

FM: $\text{C}_{60}\text{H}_{104}\text{FN}_{23}\text{O}_{11}\text{S}$

MM: $1373,80 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

MALDI-TOF/MS m/z : calculado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1374,80; encontrado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1374,78 (Figura 24, página 49).



Massa obtida: 38 mg

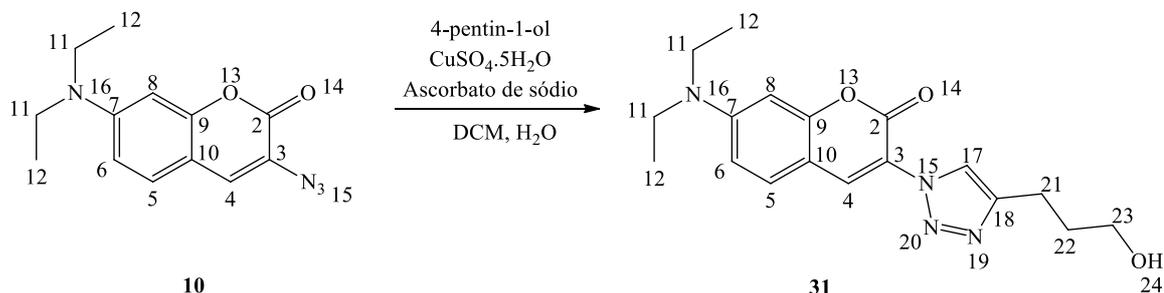
Aspecto físico: sólido amarelo claro, fluorescente ($\lambda = 254$ nm)

FM: C₆₄H₁₀₀N₂₄O₁₃S

MM: 1444,76 g.mol⁻¹

MALDI-TOF/MS *m/z*: calculado [M+H]⁺: 1445,77; encontrado [M+H]⁺: 1445,70 (Figura 71, página 118).

4.2.13 Síntese da 7-(dietilamino)-3-(4-(3-hidroxiopropil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-2H-cromen-2-ona **31**



Procedimentos

Em um balão de fundo redondo de 10 mL, adicionaram-se 4-pentyn-1-ol (33 mg, 0,39 mmol), 3-azido-7-dietilaminocumarina **10** (100 mg, 0,39 mmol), ascorbato de sódio (46,4 mg, 0,23 mmol) e sulfato de cobre penta-hidratado (29,2 mg, 0,12 mmol) em uma mistura água/DCM 1/1 (v/v, 3 mL). A mistura foi mantida à temperatura ambiente, protegida da luz, sob agitação magnética, por 20 horas. Passado esse período, o diclorometano foi removido sob pressão reduzida e acrescentou-se água gelada (5 mL) ao resíduo. O precipitado foi isolado por filtração, lavado com uma mistura de EDTA 50% (m/v):NH₄OH 25% 1:1 (v/v, 5 mL) e água gelada (10 mL) e secado sob vácuo, fornecendo o produto como um sólido verde (73,4 mg, 55%).

Rendimento: 55%

Aspecto físico: sólido verde

FM: C₁₈H₂₂N₄O₃

MM: 342,39 g.mol⁻¹

IV ($\nu_{\text{máx}}$, cm⁻¹) (Figura 72, página 118): 3251(ν O-H álcool), 2866 (ν_{as} C-H alifático), 1717 (ν C=O), 1620 (ν C=C).

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Figura 73, página 119): 1,24 (t, $J_{11,12} = 6,9$ Hz, 6 H, H-12); 2,01 (sl, 2 H, H-22); 2,92 (sl, 2 H, H-21); 3,45 (q, $J_{11,12} = 6,9$ Hz, 4 H, H-11); 3,77 (sl, 2 H, H-23); 6,54 (s, 1 H, H-8); 6,67 (d, $J_{5,6} = 8,8$ Hz, 1 H), 7,40 (d, $J_{5,6} = 8,8$ Hz, 1H), 8,35 (sl, 2 H, H-4 e H-20).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ (ppm) (Figura 74, página 119): 12,6 (C-12), 22,3 (C-21); 32,2 (C-22); 45,1 (C-11), 62,0 (C-23); 97,3 (C-8); 107,4 (C-10); 110,3 (C-6); 117,4 (C-3); 130,1 (C-4); 134,8 (C-5); 151,8 (C-7); 156,0 (C-9); 157,2 (C-2).

MALDI-TOF/MS m/z : calculado [M+H]⁺: 343,39; encontrado [M+H]⁺: 343,16 (Figura 75, página 120).

4.3 Ensaios biológicos

4.3.1 Avaliação da atividade antifúngica

Os ensaios biológicos para avaliação da atividade do peptídeo UBI 31-38, do alcinopeptídeo **8**, da 3-azido-7-dietilaminocumarina **10**, dos conjugados peptídicos **9** e **11**, e do derivado cumarínico-triazólico **31** contra *Cryptococcus* spp. foram realizados pelo grupo do Prof. Dr. Daniel Assis dos Santos (Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG).

Nos experimentos, foram utilizadas catorze linhagens de *C. gattii* e quatro de *C. neoformans*, listadas no Quadro 4 (página 86). As linhagens de origem clínica e ambiental pertencem à Coleção de Culturas do Laboratório de Micologia da UFMG e as linhagens de referência são provenientes da coleção da Universidade da Geórgia (Atlanta, EUA). As amostras foram mantidas em estoque a -80°C e, antes dos ensaios, repicadas em meio ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 35°C por 48 h. O inóculo foi preparado em solução de NaCl 0,9% (p/v) estéril e a transmitância das suspensões, ajustada para 75-77% em espectrofotômetro (λ : 530 nm), o que corresponde à concentração de 1×10^6 a 5×10^6

células.mL⁻¹. Em seguida, diluições sucessivas de 1:50 e 1:20 do inóculo inicial foram realizadas em RPMI-1640 para obter uma suspensão com 1x 10³ a 5 x 10³ células.mL⁻¹.

Quadro 4 - Linhagens de *Cryptococcus* utilizadas e respectiva origem

Fungo	Linhagem	Origem
<i>C. gattii</i>	ICB 181	Ambiental
	135L/03	Clínica
	196L/03	Clínica
	547 OTTI	Ambiental
	ATCC 32608	Amostra referência
	ATCC 24065	Amostra referência
	1913/ER	Clínica
	L27/01	Clínica
	L28/02	Clínica
	LMM 818	Clínica
	L24/01	Clínica
	23/10993	Clínica
29/10893	Clínica	
	L27/01 _F	Clínica, com resistência induzida em laboratório
<i>C. neoformans</i>	ATCC 96806	Amostra referência
	ATCC 62066	Amostra referência
	ATCC 24067	Amostra referência
	ATCC 28957	Amostra referência

As concentrações inibitórias mínimas dos compostos sintetizados e do fármaco de referência fluconazol (Sigma-Aldrich) foram determinadas pelo teste de microdiluição, conforme método descrito no documento M27-A3 (CLSI, 2008). Foram preparadas soluções estoque (1 mg.mL⁻¹) do peptídeo UBI 31-38, do alcinopeptídeo **8**, dos conjugados peptídicos **9** e **11** e do fluconazol, em água destilada estéril; da 3-azido-7-dietilaminocumarina **10** e do derivado cumarínico-trizólico **31**, em DMSO. Em seguida, diluições consecutivas das soluções estoque foram realizadas em meio RPMI-1640, de modo a se obterem soluções de trabalho com o dobro das concentrações a serem testadas. Todos os compostos foram avaliados na faixa de concentração de 0,5 a 256 µg.mL⁻¹.

Em cada poço da placa de microdiluição foram adicionados 100 μL da suspensão do inóculo e 100 μL da solução de cada composto ou de RPMI-1640 (controle positivo), sendo todo o teste realizado em duplicata. As placas foram incubadas a 35°C durante 72 h. A leitura foi realizada visualmente e o valor de MIC foi definido como a menor concentração do composto que inibiu o crescimento fúngico após incubação.

4.3.2 Ensaios fluorimétricos para detecção de ROS

Assim como a avaliação da atividade antifúngica, os ensaios fluorimétricos para detecção de ROS também foram realizados pelo grupo do Prof. Dr. Daniel Assis dos Santos. Os níveis de ROS endógenos foram medidos por ensaios fluorimétricos na linhagem ATCC 32608 de *C. gattii* (grupo controle) e nos compostos **11** e **31** individualmente (para obtenção das linhas de base). Em seguida, as células de *C. gattii* ($1,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹) foram tratadas com o MIC do composto **11** ou **31** em meio RPMI-1640 sem vermelho de fenol e incubadas com 10 μM de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína durante 30 minutos para quantificação do ROS. A fluorescência foi medida em um fluorímetro (Synergy 2 SL Luminescence Microplate Reader; ICB, UFMG) utilizando comprimentos de onda de excitação e de emissão equivalentes a 485 e 530 nm, respectivamente. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos na forma de média \pm erro padrão, em unidades arbitrárias de fluorescência. As comparações estatísticas foram realizadas utilizando análise de variância *One-Way* para um nível de significância de 95%. A correção de Bonferroni foi adotada para ajuste de significância nas comparações múltiplas. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o sistema GraphPad Prism versão 6.

4.3.3 Teste de Citotoxicidade

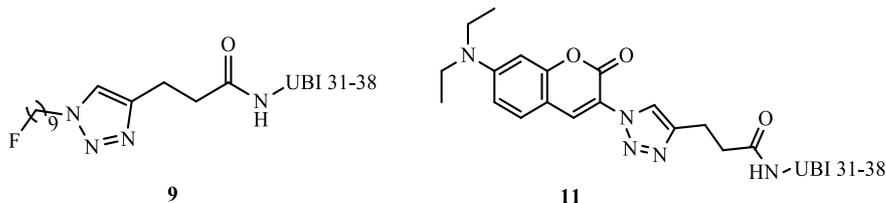
O teste de citotoxicidade foi realizado pelo grupo da Dra. Luciana Maria Silva, da Fundação Ezequiel Dias. A citotoxicidade do derivado peptídico triazólico **11** foi avaliada em uma linhagem de célula humana não cancerosa (fibroblasto pulmonar CCD-Lu ATCC CCL-210) utilizando o método colorimétrico do MTT, com base nos procedimentos descritos por Mosmann (1983). Inicialmente, a suspensão celular (1×10^6 células.mL⁻¹) foi distribuída em uma placa de 96 poços (1×10^5 células/poço) e incubada por 24 h a 37 °C em atmosfera umedecida com 5% de CO₂ para adesão. Em seguida, os poços foram lavados com PBS e

incubados por 24 h com o derivado peptídico triazólico **11** em diferentes concentrações (0,02; 0,04; 0,12; 0,18 e 0,21 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$). Após o período de incubação, as placas foram tratadas com 10 μL de solução de MTT (5 mg.mL^{-1}) e novamente incubadas por mais quatro horas. Posteriormente, foram adicionados 100 μL de DMSO aos poços para solubilização dos cristais de formazana. As leituras de absorvância foram realizadas em 550 nm (Spectramax M5e, Molecular Devices, Sunnyvale, EUA). A citotoxicidade foi determinada como a porcentagem de redução da absorvância em relação à das células controle, não tratadas (100% de viabilidade celular). O ensaio foi realizado em triplicata.

4.4 Estudos fotofísicos

Os estudos para avaliação das propriedades fotofísicas do conjugado peptídeo-cumarina **11** foram realizados em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Eufrânio Nunes da Silva Júnior (Departamento de Química, ICEX, UFMG). Inicialmente, uma solução estoque do conjugado **11** (250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em água foi preparada. A partir desta solução, foram preparadas soluções de trabalho com concentração de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Os espectros de absorção e de emissão foram obtidos para cada solução de trabalho e utilizados para determinação do deslocamento de Stokes e do coeficiente de extinção molar de **11**.

O sulfato de quinina foi utilizado como referência para determinação do rendimento quântico de **11**. Uma solução estoque de sulfato de quinina (500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de ácido sulfúrico 0,1 mol.L^{-1} foi preparada. Para a aquisição dos espectros de absorção e emissão deste composto, volumes crescentes da solução de sulfato de quinina foram adicionados diretamente a uma cubeta contendo 3,0 mL de solução de ácido sulfúrico 0,1 mol.L^{-1} , de modo que os volumes adicionados totalizassem 80,0; 100,0; 120,0; 140,0 e 180,0 μL . A partir dos dados espectrais da amostra e da substância de referência, gráficos da área sobre o espectro de emissão vs máximo de absorção em concentrações variadas foram construídos e utilizados no cálculo do rendimento quântico de **11**.



- os estudos fotofísicos realizados com o conjugado **11**, incluindo a obtenção de espectros de absorção e de emissão, a determinação do deslocamento de Stokes, do coeficiente de extinção molar e do rendimento quântico, dão suporte à potencial aplicação deste composto para obtenção de imagens de fluorescência em sistemas biológicos;
- a síntese do conjugado peptídeo-fluoroazida **9** foi considerada importante, pois representa o primeiro passo na síntese de ^{18}F -UBI 31-38, um potencial agente de diagnóstico diferencial entre infecções e inflamações assépticas;
- por fim, as caracterizações espectroscópicas permitiram a confirmação estrutural dos compostos sintetizados neste trabalho.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, A. et al. Identification and Design of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications. **Current Protein & Peptide Science**, v. 13, n. 3, p. 211-223, 2012.

AKHTAR, M. et al. Antimicrobial peptides as infection imaging agents: better than radiolabeled antibiotics. **International Journal of Peptides**, v. 2012, p. 1-19, 2012.

AKHTAR, M. et al. Antimicrobial peptide Tc-99m-ubiquicidin 29-41 as human infection-imaging agent: Clinical trial. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 46, n. 4, p. 567-573, 2005.

ALAUDDIN, M. Positron emission tomography (PET) imaging with ¹⁸F-based radiotracers. **American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 2, n. 1, p. 55-76, 2012.

ALVAREZ, S.; ALVAREZ, M. A practical procedure for the synthesis of alkyl azides at ambient temperature in dimethyl sulfoxide in high purity and yield. **Synthesis**, v. 1997, n. 4, p. 413-414, 1997.

AMBLARD, M. et al. Methods and Protocols of modern solid phase peptide synthesis. **Molecular Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 239-254, 2006.

ANDERSON, C. et al. Dimethylplatinum (II) complexes with isocyanocoumarin ligands: the crystal structure of cis-dimethylbis-(7-diethylamino-3-isocyanocoumarin)platinum(II). **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 690, n. 1, p. 168-176, 2005.

BENOITON, N. **Chemistry of peptide synthesis**. USA: CRC Press, 2006. 290p.

BÉ, M. et al. **Table of Radionuclides (vol. 1 – A = 1 to 150)**. Monographie BIPM-5. Sèvres: Bureau International des Poids et Mesures, 2004. 285p.

BOCK, V.; HIEMSTRA, H.; VAN MAARSEVEEN, J. Cu-I-catalyzed alkyne-azide "click" cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2006, n. 1, p. 51-68, 2005.

BRADSHAW, J. Cationic antimicrobial peptides - Issues for potential clinical use. **Biodrugs**, v. 17, n. 4, p. 233-240, 2003.

BRASE, S. et al. Organic azides: An exploding diversity of a unique class of compounds. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 44, n. 33, p. 5188-5240, 2005.

BREMER, C.; TUNG, C.; WEISSLEDER, R. In vivo molecular target assessment of matrix metalloproteinase inhibition. **Nature Medicine**, v. 7, n. 6, p. 743-748, 2001.

BROUWER, C. et al. Synthetic peptides derived from human antimicrobial peptide ubiquicidin accumulate at sites of infections and eradicate (multi-drug resistant) *Staphylococcus aureus* in mice. **Peptides**, v. 27, n. 11, p. 2585-2591, 2006.

BROUWER, C.; WULFERINK, M.; WELLING, M. The pharmacology of radiolabeled cationic antimicrobial peptides. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 5, p. 1633-1651, 2008.

BUCHANAN, K.; MURPHY, J. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. 71-83, 1998.

BUCKI, R. et al. Antibacterial activities of rhodamine B-conjugated gelsolin-derived peptides compared to those of the antimicrobial peptides cathelicidin LL37, magainin II, and melittin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 1526-1533, 2004.

BULET, P.; STOCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 169-184, 2004.

CAI, L.; LU, S.; PIKE, V. Chemistry with F-18 fluoride ion. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2008, n. 17, p. 2853-2873, 2008.

CAREY, F.; SUNDBERG, R. **Advanced Organic Chemistry**. 5th ed. New York: Springer, 2007. 1199p.

CHAN, W. (Ed.); WHITE, P. (Ed.). **Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 2000. 346p.

CHATTERJEE, J.; LAUFER, B.; KESSLER, H. Synthesis of N-methylated cyclic peptides. **Nature Protocols**, v. 7, n. 3, p. 432-444, 2012.

CHAUHAN, D. et al. BODIPY based 'click on' fluorogenic dyes: application in live cell imaging. **Tetrahedron Letters**, v. 55, n. 1, p. 244-247, 2014.

CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 507-544, 2006.

CHEN, L. et al. Synthesis and Antibacterial Activities of Antibacterial Peptides with a Spiropyran Fluorescence Probe. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1-7, 2014.

CHEONG, J.; MCCORMACK, J. Fluconazole resistance in cryptococcal disease: emerging or intrinsic? **Medical Mycology**, v. 51, n. 3, p. 261-269, 2013.

CHO, J.; LEE, D. The antimicrobial peptide arenicin-1 promotes generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -General Subjects**, v. 1810, n. 12, p. 1246-1251, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition**. CLSI document M27-A3, v. 28, n. 14, Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. 25p.

CONSENSO em criptococose: 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 524-544, 2008.

- EBENHAN, T. et al. Preclinical Evaluation of Ga-68-Labeled 1,4,7-Triazacyclononane-1,4,7-Triacetic Acid-Ubiquicidin as a Radioligand for PET Infection Imaging. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 55, n. 2, p. 308-314, 2014.
- FERREIRA, G. et al. The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 8, p. 1801-1811, 2013.
- FERREIRA, S. et al. Novel Synthetic Compounds as Potential Anticryptococcal Agents. **Current Organic Synthesis**, v. 12, p. 730-745, 2015.
- FERREIRA, S. et al. Synthesis of a New Peptide–Coumarin Conjugate: A Potential Agent against Cryptococcosis. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, n. 3, p. 271-275, 2015.
- FLETCHER, J. et al. Recommendations on the use of F-18-FDG PET in oncology. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 49, n. 3, p. 480-508, 2008.
- FREITAS, L. et al. The "click" reaction in the synthesis of 1,2,3-triazoles: chemical aspects and applications. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1791-1804, 2011.
- FRIEDRICH, C. et al. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 8, p. 2086-2092, 2000.
- FURUYA, T.; KUTTRUFF, C.; RITTER, T. Carbon-fluorine bond formation. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, v. 11, n. 6, p. 803-819, 2008.
- GANZ, T. The role of antimicrobial peptides in innate immunity. **Integrative and Comparative Biology**, v. 43, n. 2, p. 300-304, 2003.
- GEE, M. et al. Imaging the action of antimicrobial peptides on living bacterial cells. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1-6, 2013.
- GILL, H.; MARIK, J. Preparation of F-18-labeled peptides using the copper(I)-catalyzed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition. **Nature Protocols**, v. 6, n. 11, p. 1718-1725, 2011.
- GLASER, M.; ARSTAD, E. "Click labeling" with 2- F-18 fluoroethylazide for positron emission tomography. **Bioconjugate Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 989-993, 2007.
- GLASER, M.; ROBINS, E. "Click labelling" in PET radiochemistry. **Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals**, v. 52, n. 9-10, p. 407-414, 2009.
- GLUKHOV, E. et al. Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 40, p. 33960-33967, 2005.
- GONTIJO, V. et al. Long-chain alkyltriazoles as antitumor agents: synthesis, physicochemical properties, and biological and computational evaluation. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 1, p. 430-441, 2015.

- GRUBE, A.; TIMM, C.; KOCK, M. Synthesis and mass spectrometric analysis of cyclostellamines H, I, K and L. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2006, n. 5, p. 1285-1295, 2006.
- HAMACHER, K.; COENEN, H.; STOCKLIN, G. Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-¹⁸F-fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic-substitution. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 27, n. 2, p. 235-238, 1986.
- HEIN, J.; FOKIN, V. Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 4, p. 1302-1315, 2010.
- HIEMSTRA, P. et al. Ubiquicidin, a novel murine microbicidal protein present in the cytosolic fraction of macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 66, n. 3, p. 423-428, 1999.
- HILARIO, F. et al. Synthesis and Evaluation of Antimalarial Activity of Oxygenated 3-alkylpyridine Marine Alkaloid Analogues. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 78, n. 3, p. 477-482, 2011.
- HIMO, F. et al. Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 1, p. 210-216, 2005.
- HORVATH, P. et al. Small-Molecule Fluorophores with Large Stokes Shifts: 9-Iminopyronin Analogues as Clickable Tags. **Journal of Organic Chemistry**, v. 80, n. 3, p. 1299-1311, 2015.
- HOWARTH, N.; RICCI, J. Synthesis of N-propynyl analogues of peptide nucleic acid (PNA) monomers and their use in the click reaction to prepare N-functionalized PNAs. **Tetrahedron**, v. 67, n. 49, p. 9588-9594, 2011.
- HSU, T. et al. Alkynyl sugar analogs for the labeling and visualization of glycoconjugates in cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 8, p. 2614-2619, 2007.
- HUISGEN, R.; SZEIMIES, G.; MOBIUS, L. 1,3-Dipolare Cycloadditionen, XXXII. Kinetik der Additionen organischer Azide and CC-Mehrfachbindungen. **Chemische Berichte**, v. 100, n. 2, p. 2494-2507, 1967.
- INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). **Cyclotron Produced Radionuclides: Principles and Practice**. Vienna: IAEA, 2008. 215p. (Technical Report Series, n. 465).
- IZADPANA, A.; GALLO, R. Antimicrobial peptides. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, n. 3, p. 381-392, 2005.
- JAMES, M.; GAMBHIR, S. A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 2, p. 897-965, 2012.

JEONG, J. et al. Synthesis of no-carrier-added F-18 fluoroacetate. **Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals**, v. 39, n. 5, p. 395-399, 1997.

KAISER, E. et al. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595-8, 1970.

KETTENBACH, K.; SCHIEFERSTEIN, H.; ROSS, T. 18F-Labeling Using Click Cycloadditions. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-16, 2014.

KIM, D. et al. A (18)F-labeled glucose analog: Synthesis using a click labeling method and in vitro evaluation. **Archives of Pharmaceutical Research**, v. 31, n. 5, p. 587-593, 2008.

KOBAYASHI, H. et al. New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 5, p. 2620-2640, 2010.

KOLB, H.; FINN, M.; SHARPLESS, K. Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 40, n. 11, p. 2004-2021, 2001.

KOYAMA, Y. et al. Spectral fluorescence molecular imaging of lung metastases targeting HER2/neu. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 10, p. 2936-2945, 2007.

KRESS-ROGERS, E. (Ed). **Handbook of Biosensors and Electronic Noses: Medicine, Food, and the Environment**. [s.l.]: CRC Press, 1997. 687p.

KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 7, 2014.

LAKOWICZ, J. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Nova York: Springer, 1999. 683p.

LANIADO-LABORIN, R.; NOEMI CABRALES-VARGAS, M. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 4, p. 223-227, 2009.

LASS-FLOERL, C. Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: a comparative review. **Drugs**, v. 71, n. 18, p. 2405-2419, 2011.

LEE, S. et al. One-step high-radiochemical-yield synthesis of F-18 FP-CIT using a protic solvent system. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 34, n. 4, p. 345-351, 2007.

LI, X. et al. 5-tert-butyl-2-(4'-F-18 fluoropropynylphenyl)-1,3-dithiane oxides: potential new GABA(A) receptor radioligands. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 35, n. 5, p. 549-559, 2008.

LI, Y. et al. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides**, v. 37, n. 2, p. 207-215, 2012.

- LI, Z.; CONTI, P. Radiopharmaceutical chemistry for positron emission tomography. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 11, p. 1031-1051, 2010.
- LIOTTA, C.; HARRIS, H. Chemistry of naked anions. I. Reactions of 18-crown-6 complex of potassium fluoride with organic substrates in aprotic organic-solvents. **Journal of the American Chemical Society**, v. 96, n. 7, p. 2250-2252, 1974.
- LIU, C.; GU, Y. Noninvasive optical imaging of staphylococcus aureus infection in vivo using an antimicrobial peptide fragment based near-infrared fluorescent probes. **Journal of Innovative Optical Health Sciences**, v. 6, n. 3, p. 1-9, 2013.
- LLOYD-WILLIAMS, P.; ALBERICIO, F.; GIRALT, E. **Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins**. [s.l.]: CRC Press, 1997. 278p.
- LOUDET, A.; BURGESS, K. BODIPY dyes and their derivatives: Syntheses and spectroscopic properties. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 11, p. 4891-4932, 2007.
- LOYSE, A. et al. Flucytosine and cryptococcosis: time to urgently address the worldwide accessibility of a 50-year-old antifungal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 11, p. 2435-2444, 2013.
- LUKER, G.; LUKER, K. Optical imaging: Current applications and future directions. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 49, n. 1, p. 1-4, 2008.
- LUPETTI, A. et al. Human antimicrobial peptides' antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, n. 11, p. 1125-1129, 2008.
- LUPETTI, A. et al. Radiopharmaceuticals: new antimicrobial agents. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 70-73, 2003.
- LUPETTI, A. et al. Internal Thiols and reactive oxygen species in candidacidal activity exerted by an N-terminal peptide of human lactoferrin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1634-1639, 2002.
- MAMAT, C.; RAMENDA, T.; WUEST, F. Recent Applications of Click Chemistry for the Synthesis of Radiotracers for Molecular Imaging. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 21-34, 2009.
- MARIK, J.; SUTCLIFFE, J. Click for PET: rapid preparation of F-18 fluoro-peptides using Cu-I catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition. **Tetrahedron Letters**, v. 47, n. 37, p. 6681-6684, 2006.
- MATSUZAKI, K. et al. Molecular Basis for Membrane Selectivity of an Antimicrobial Peptide, Magainin-2. **Biochemistry**, v. 34, n. 10, p. 3423-3429, 1995.
- MELDAL, M.; TORNOE, C. Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 8, p. 2952-3015, 2008.

MELENDEZ-ALAFORT, L. et al. Biokinetics of Tc-99m-UBI 29-41 in humans. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 31, n. 3, p. 373-379, 2004.

MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963.

MOKALENG, B. et al. Synthesis, Ga-68-Radiolabeling, and Preliminary In Vivo Assessment of a Depsipeptide-Derived Compound as a Potential PET/CT Infection Imaging Agent. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 1-12, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NGUYEN, L.; HANEY, E.; VOGEL, H. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464-472, 2011.

NIBBERING, P. et al. Tc-99m-labeled UBI 29-41 peptide for monitoring the efficacy of antibacterial agents in mice infected with *Staphylococcus aureus*. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 45, n. 2, p. 321-326, 2004.

PARK, C.; LEE, D. Melittin induces apoptotic features in *Candida albicans*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 394, n. 1, p. 170-172, 2010.

PERFECT, J. et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 3, p. 291-322, 2010.

PLIEGO JR., J.; RIVEROS, J. New insights on reaction pathway selectivity promoted by crown ether phase-transfer catalysis: Model ab initio calculations of nucleophilic fluorination. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 363, p. 489-494, 2012.

PRETZE, M.; PIETZSCH, D.; MAMAT, C. Recent Trends in Bioorthogonal Click-Radiolabeling Reactions Using Fluorine-18. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 8618-8665, 2013.

RAY, D.; BHARADWAJ, P. A coumarin-derived fluorescence probe selective for magnesium. **Inorganic Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 2252-2254, 2008.

RISS, T. et al. Cell Viability Assays. In: SITTAMPALAM, G. (Ed.), et al. **Assay Guidance Manual**. [s.l.:s.n.], 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065>>. Acesso em: 04 ago. 2015.

RONG, L. et al. A coumarin derivative as a fluorogenic glycoproteomic probe for biological imaging. **Chemical Communications**, v. 50, n. 6, p. 667-669, 2014.

ROSS, T. et al. Fluorine-18 Click Radiosynthesis and Preclinical Evaluation of a New (18)F-Labeled Folic Acid Derivative. **Bioconjugate Chemistry**, v. 19, n. 12, p. 2462-2470, 2008.

- ROSTOVTSEV, V. et al. A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 41, n. 14, p. 2596-2599, 2002.
- SAHA, G. **Fundamentals of nuclear pharmacy**. 6th ed. New York: Springer, 2010. 409p.
- SALBER, D. et al. Comparison of Tc-99m- and F-18-ubiquitin autoradiography to anti-*Staphylococcus aureus* immunofluorescence in rat muscle abscesses. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 49, n. 6, p. 995-999, 2008.
- SANTOS, J. et al. Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *Cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine cryptococcosis. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. 1-14, 2014.
- SAWA, M. et al. Glycoproteomic probes for fluorescent imaging of fucosylated glycans in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 33, p. 12371-12376, 2006.
- SCHILL, H. et al. 4-Trifluoromethyl-Substituted Coumarins with Large Stokes Shifts: Synthesis, Bioconjugates, and Their Use in Super-Resolution Fluorescence Microscopy. **Chemistry – A European Journal**, v. 19, n. 49, p. 16556-16565, 2013.
- SCHIRRMACHER, R.; WANGLER, C.; SCHIRRMACHER, E. Recent developments and trends in F-18-radiochemistry: Syntheses and applications. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 4, n. 4, p. 317-329, 2007.
- SEVICK-MURACA, E. Translation of Near-Infrared Fluorescence Imaging Technologies: Emerging Clinical Applications. **Annual Review of Medicine**, v. 63, p. 217-231, 2012.
- SHI, Y.; ZHOU, C. Synthesis and evaluation of a class of new coumarin triazole derivatives as potential antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 3, p. 956-960, 2011.
- SIGNORE, G. et al. Polarity-Sensitive Coumarins Tailored to Live Cell Imaging. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 4, p. 1276-1288, 2010.
- SIRION, U. et al. An efficient F-18 labeling method for PET study: Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition of bioactive substances and F-18-labeled compounds. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 23, p. 3953-3957, 2007.
- SIVAKUMAR, K. et al. A fluorogenic 1,3-dipolar cycloaddition reaction of 3-azidocoumarins and acetylenes. **Organic Letters**, v. 6, n. 24, p. 4603-4606, 2004.
- SMITH, M. **March's advanced organic chemistry : reactions, mechanisms, and structure**. 7th ed. New York: Wiley, 2013. 2047p.
- SOARES JUNIOR, J. et al. Lista de recomendações do Exame PET/CT com ¹⁸F-FDG em Oncologia. Consenso entre a Sociedade Brasileira de Cancerologia e a Sociedade Brasileira de Biologia, Medicina Nuclear e Imagem Molecular. **Radiologia Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 255-259, 2010.

SOLOMONS, T.; FRYHLE, C. **Química Orgânica**. 10. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. 644p. (v.2).

TORNOE, C.; CHRISTENSEN, C.; MELDAL, M. Peptidotriazoles on solid phase: 1,2,3-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, n. 9, p. 3057-3064, 2002.

TROYAN, S. L. et al. The FLARE intraoperative near-infrared fluorescence imaging system: a first-in-human clinical trial in breast cancer sentinel lymph node mapping. **Annals of Surgical Oncology**, v. 16, n. 10, p. 2943-2952, 2009.

VARMA, A.; KWON-CHUNG, K. J. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to Fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2303-2311, Jun 2010.

WEISSLEDER, R.; MAHMOOD, U. Molecular imaging. **Radiology**, v. 219, n. 2, p. 316-333, 2001.

WELCH, M. (Ed.); REDVANLY, C. (Ed.). **Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications**. Chichester: Wiley, 2003. 862p.

WELLING, M. et al. Tc-99m-Labeled antimicrobial peptides for detection of bacterial and *Candida albicans* infections. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 42, n. 5, p. 788-794, 2001.

WELLING, M. et al. Technetium-99m labelled antimicrobial peptides discriminate between bacterial infections and sterile inflammations. **European Journal of Nuclear Medicine**, v. 27, n. 3, p. 292-301, 2000.

WHITE, A. et al. Optical Imaging of Bacterial Infection in Living Mice Using Deep-Red Fluorescent Squaraine Rotaxane Probes. **Bioconjugate Chemistry**, v. 21, n. 7, p. 1297-1304, 2010.

WIESNER, J.; VILCINSKAS, A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. **Virulence**, v. 1, n. 5, p. 440-464, 2010.

WILLIAMS, A.; WINFIELD, S.; MILLER, J. Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer. **Analyst**, v. 108, n. 1290, p. 1067-1071, 1983.

WOOD, K.; HOSKIN, P.; SAUNDERS, M. Positron emission tomography in oncology: a review. **Clinical Oncology**, v. 19, n. 4, p. 237-255, 2007.

WORRELL, B.; MALIK, J.; FOKIN, V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. **Science**, v. 340, n. 6131, p. 457-460, 2013.

WUERTH, C. et al. Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples. **Nature Protocols**, v. 8, n. 8, p. 1535-1550, 2013.

WYSOCKI, L.; LAVIS, L. Advances in the chemistry of small molecule fluorescent probes. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 6, p. 752-759, 2011.

XIE, L. et al. Fluorescent coumarin derivatives with large stokes shift, dual emission and solid state luminescent properties: An experimental and theoretical study. **Dyes and Pigments**, v. 92, n. 3, p. 1361-1369, 2012.

YAMAZUMI, T. et al. Characterization of heteroresistance to fluconazole among clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 267-272, 2003.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389-395, 2002.

ZHOU, C.; WANG, Y. Recent Researches in Triazole Compounds as Medicinal Drugs. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 239-280, 2012.

ZHOU, D. et al. Facile purification and click labeling with 2- F-18 fluoroethyl azide using solid phase extraction cartridges. **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 7, p. 952-954, 2015.

ZHOU, Y. et al. Visualizing Hg²⁺ ions in living cells using a FRET-based fluorescent sensor. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 106, p. 197-202, 2013.

ZHOU, Y. et al. A click-activated fluorescent probe for selective detection of hydrazoic acid and its application in biological imaging. **Chemical Communications**, v. 49, n. 53, p. 5924-5926, 2013.

7 ANEXO: ESPECTROS

Figura 38- Espectro de absorção na região do IV de 2 (ATR)

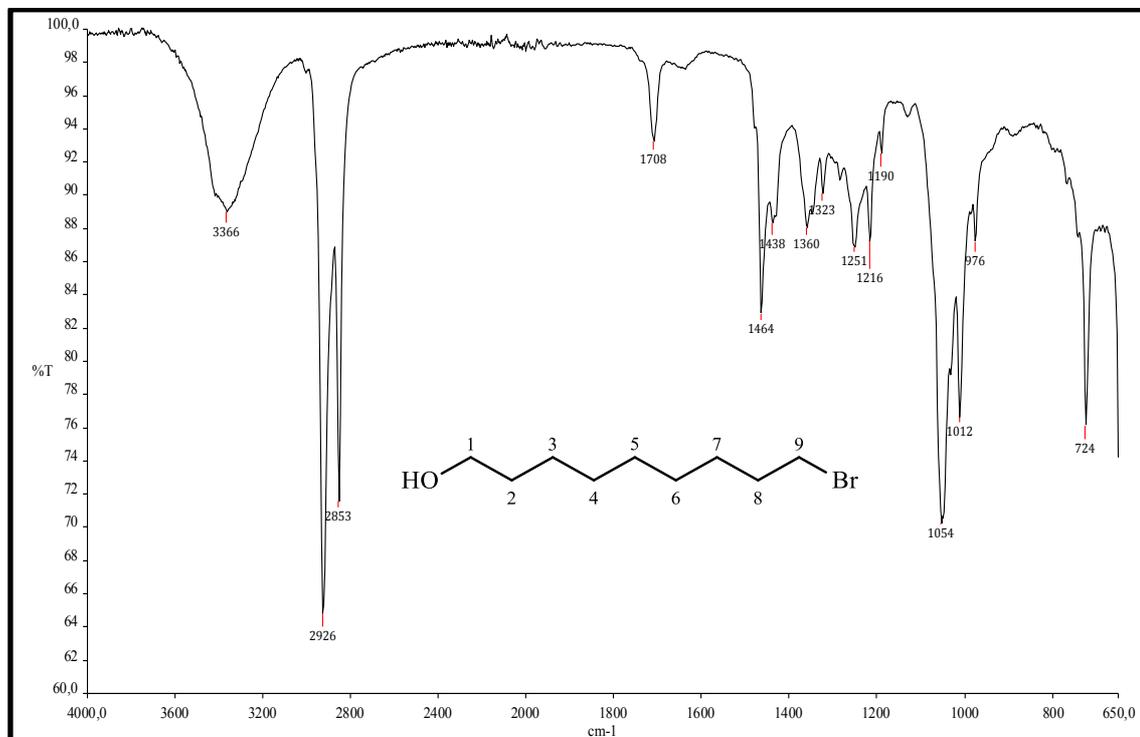


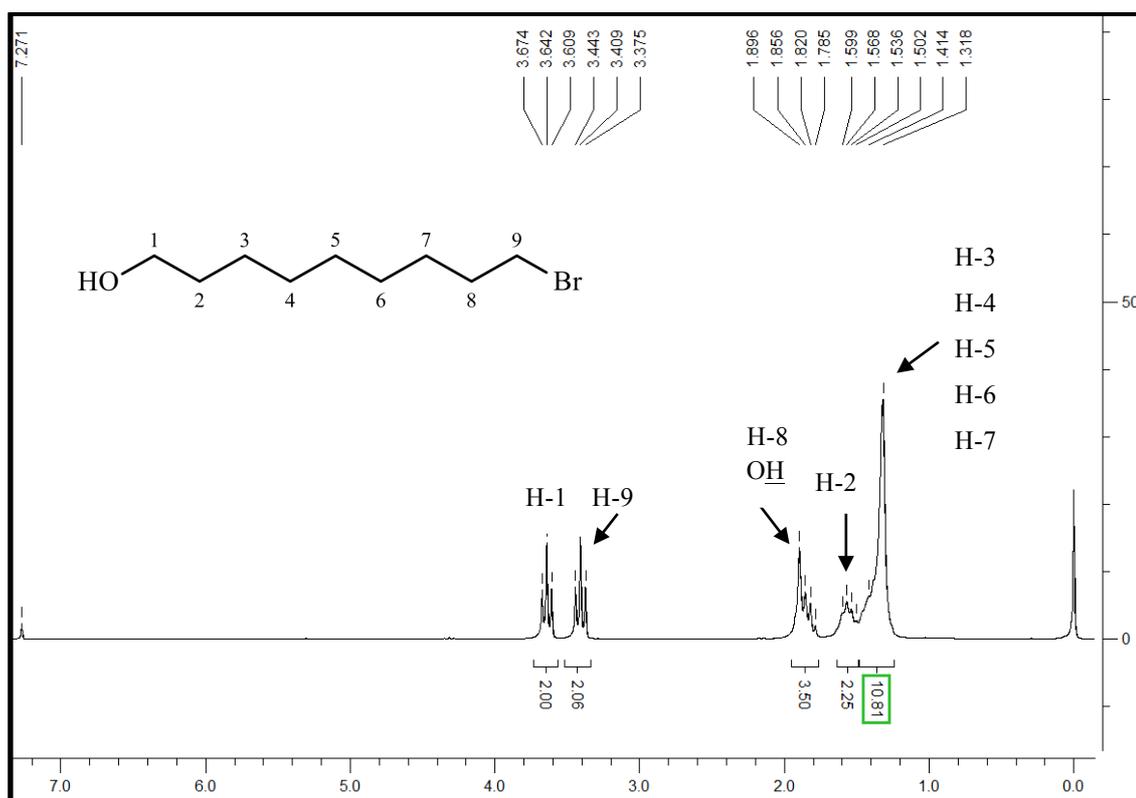
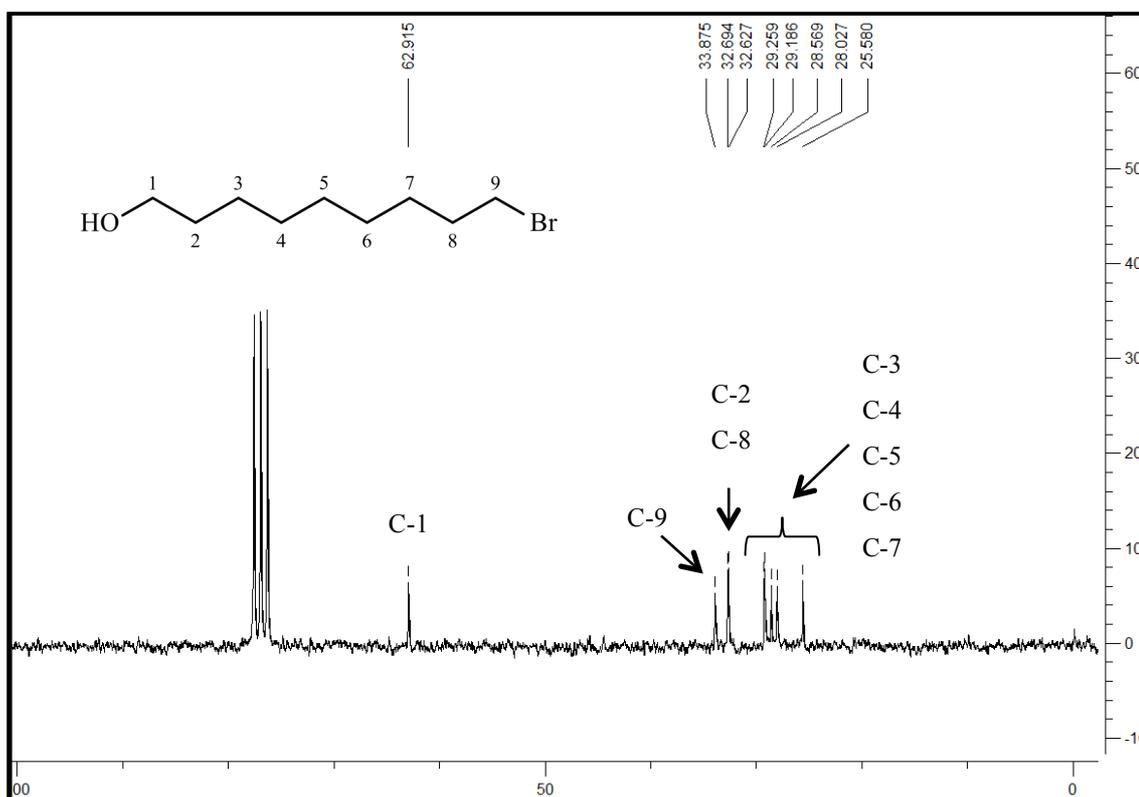
Figura 39 - Espectro de RMN de ^1H do composto **2** (200 MHz, CDCl_3)Figura 40 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **2** (50 MHz, CDCl_3)

Figura 41 - Espectro de absorção na região do IV de 3 (ATR)

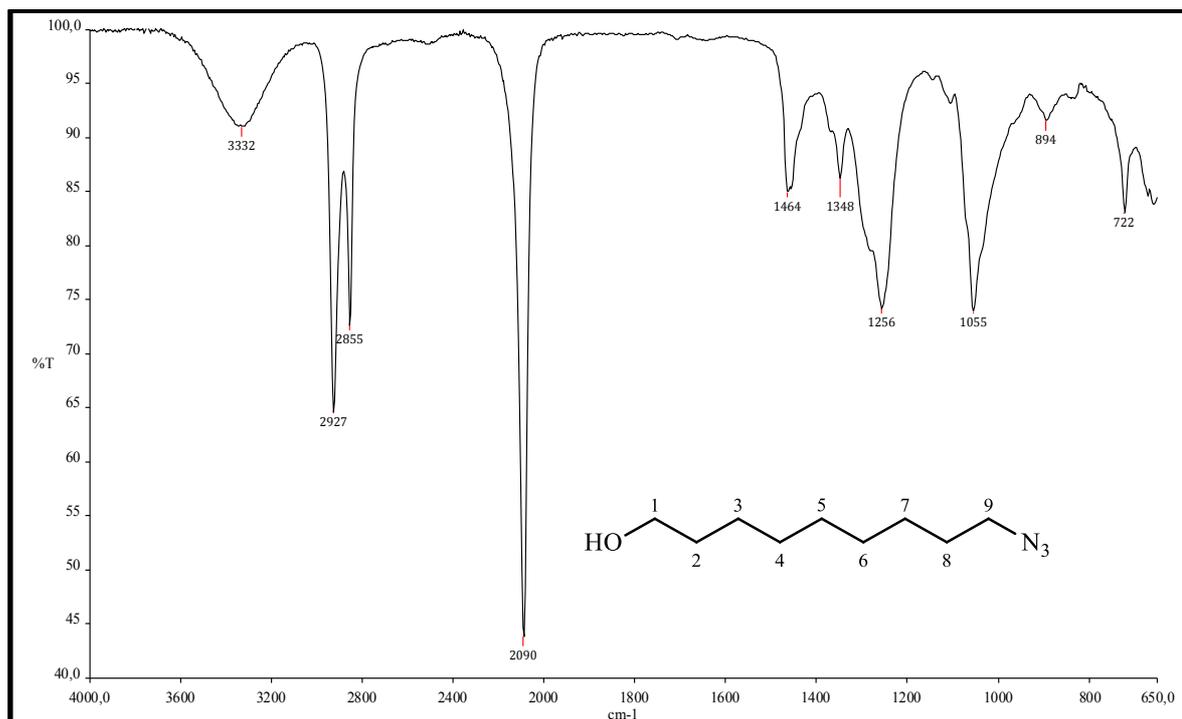
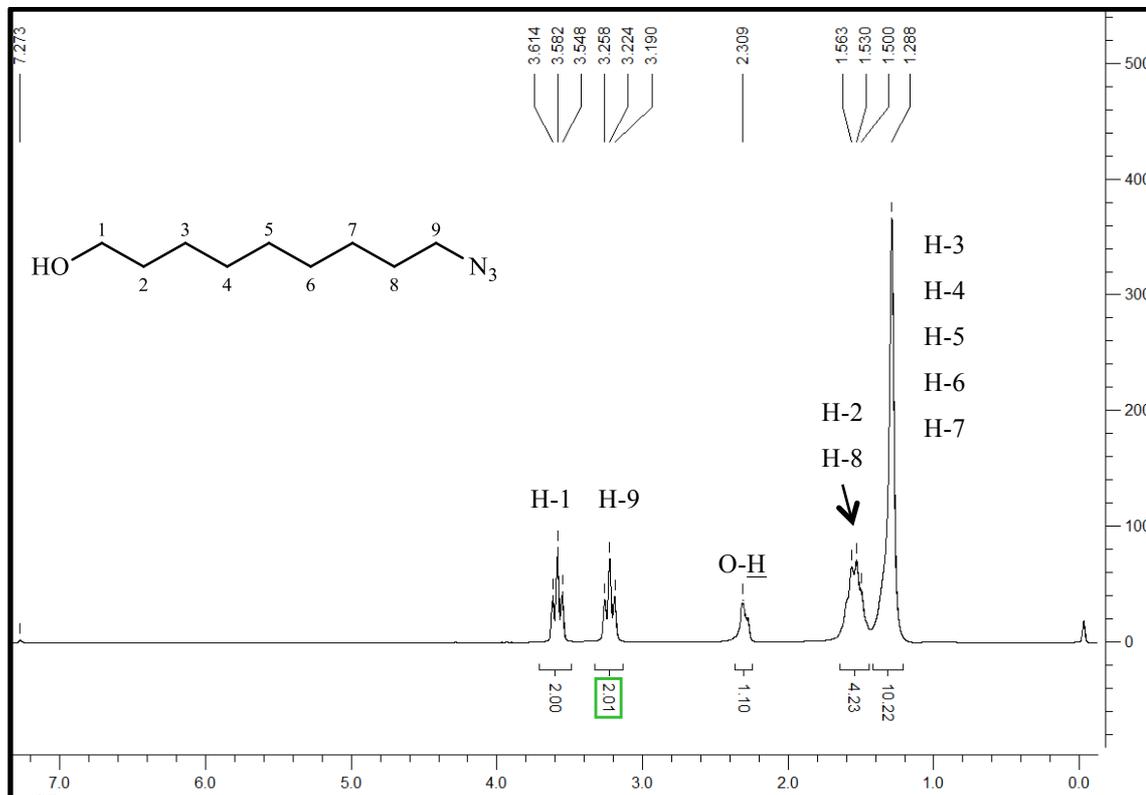
Figura 42 - Espectro de RMN de ¹H do composto 3 (200 MHz, CDCl₃)

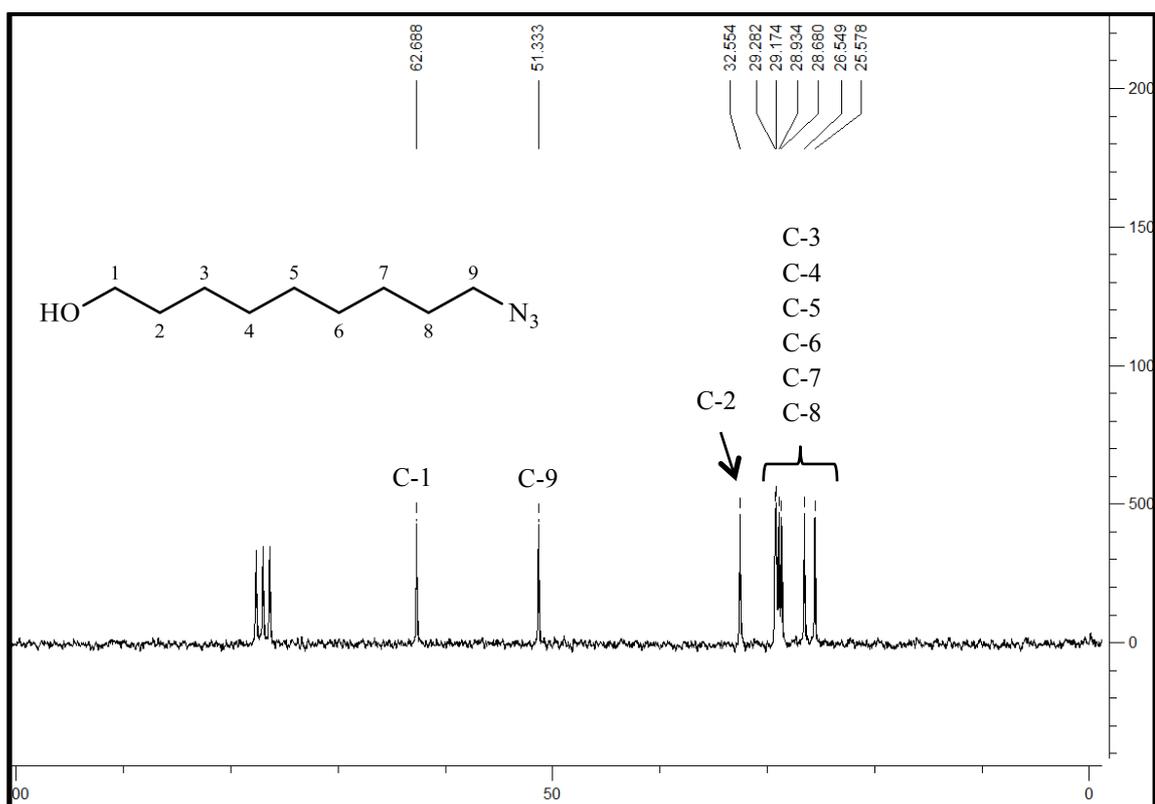
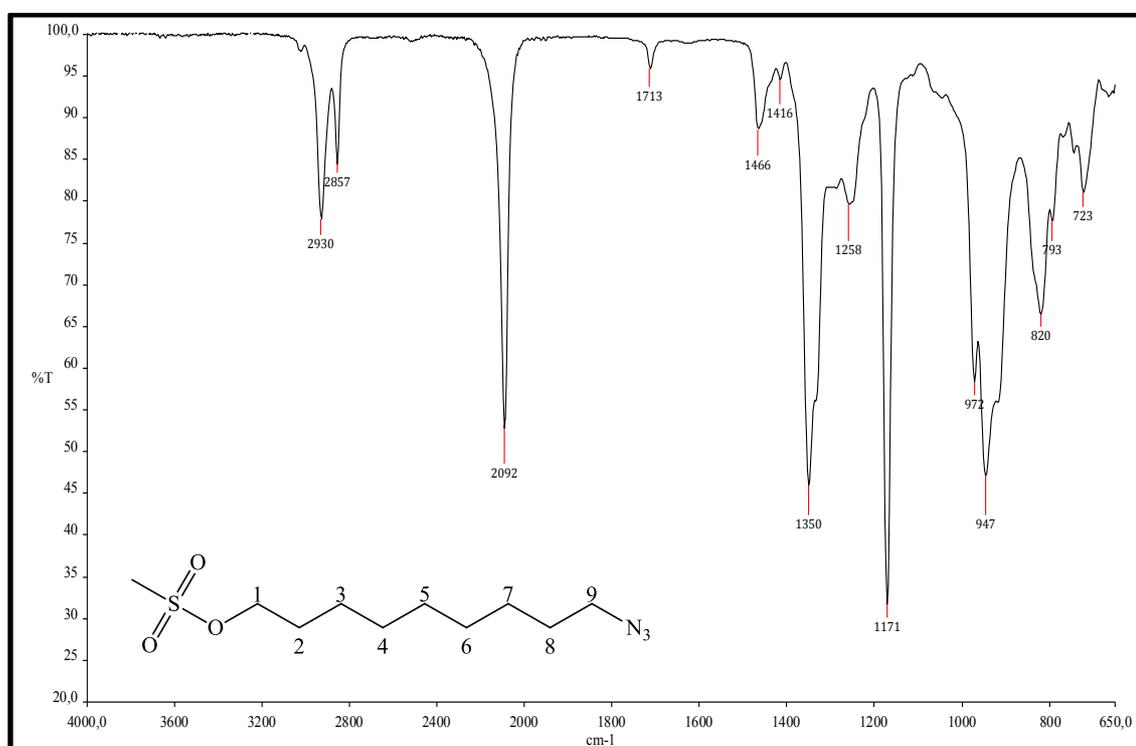
Figura 43 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **3** (50 MHz, CDCl_3)Figura 44 - Espectro de absorção na região do IV de **4** (ATR)

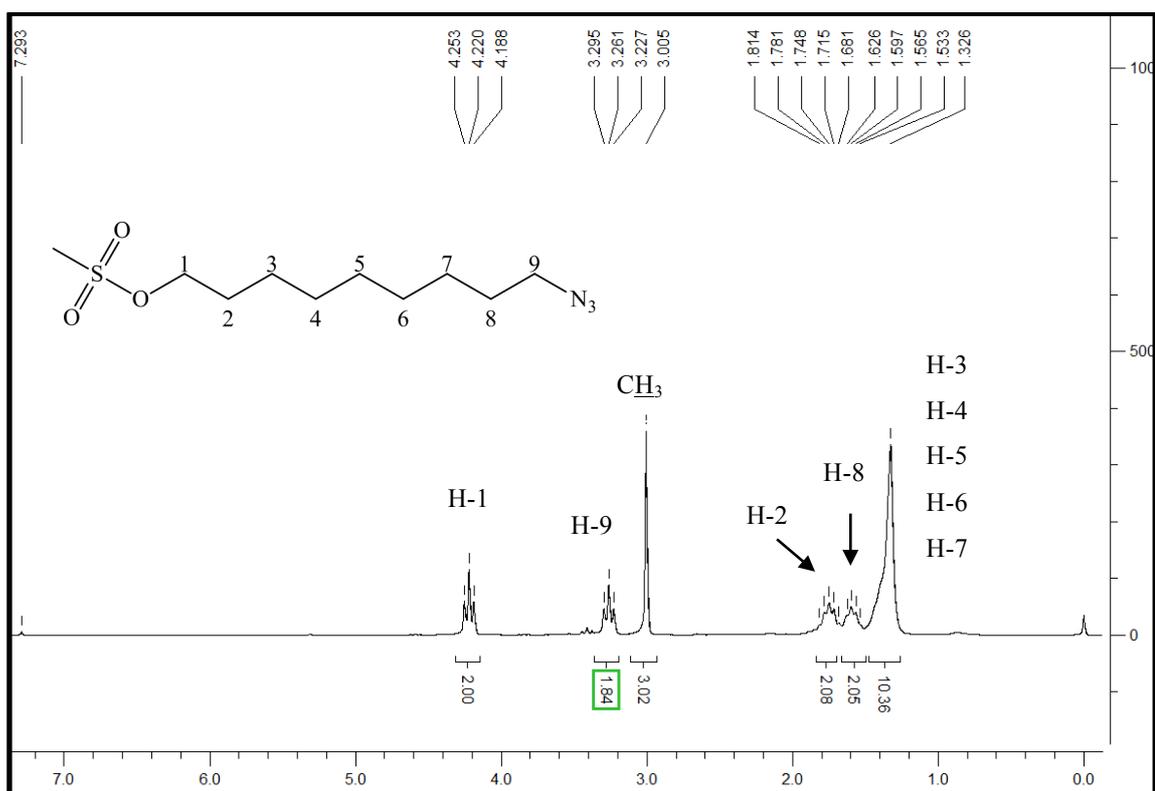
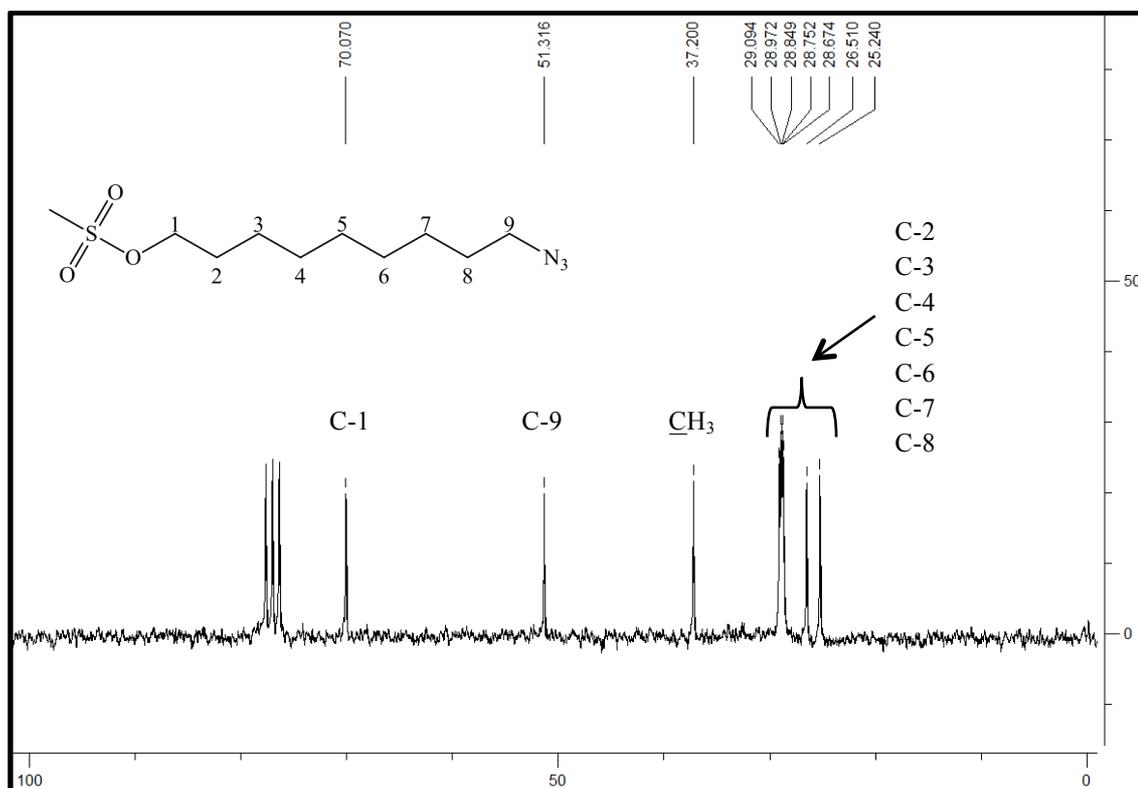
Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H do composto **4** (200 MHz, CDCl_3)Figura 46 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **4** (50 MHz, CDCl_3)

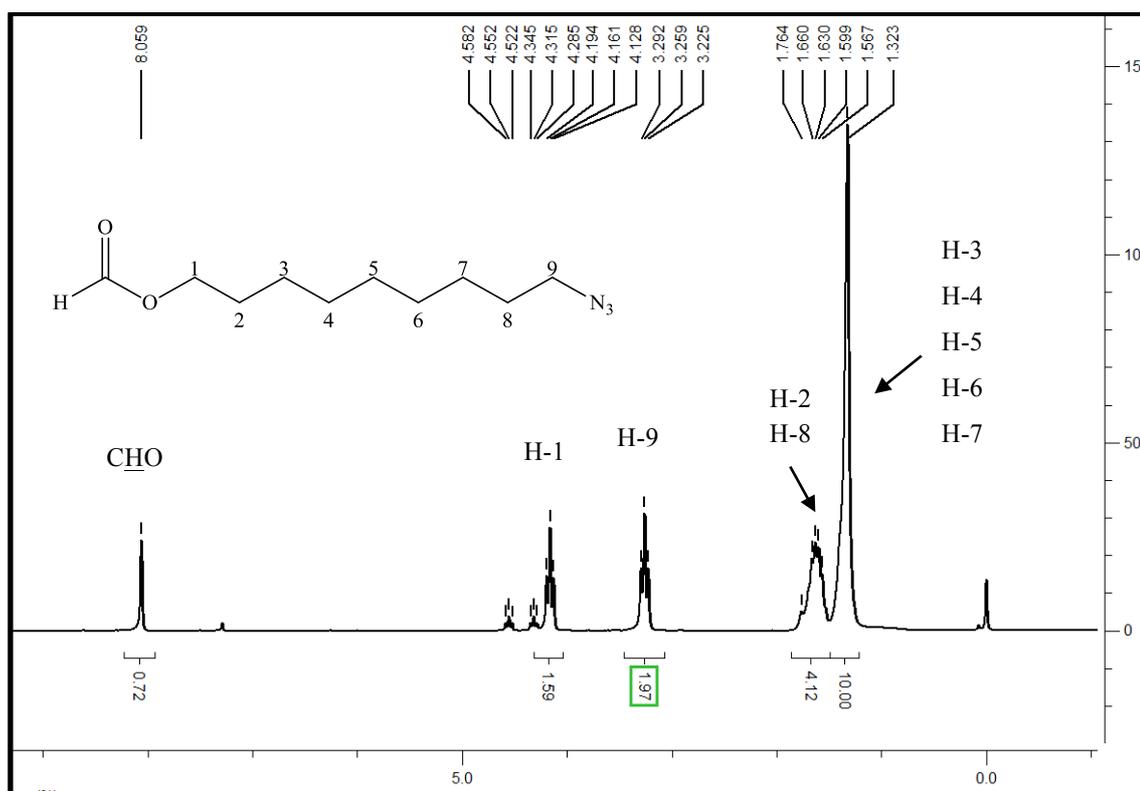
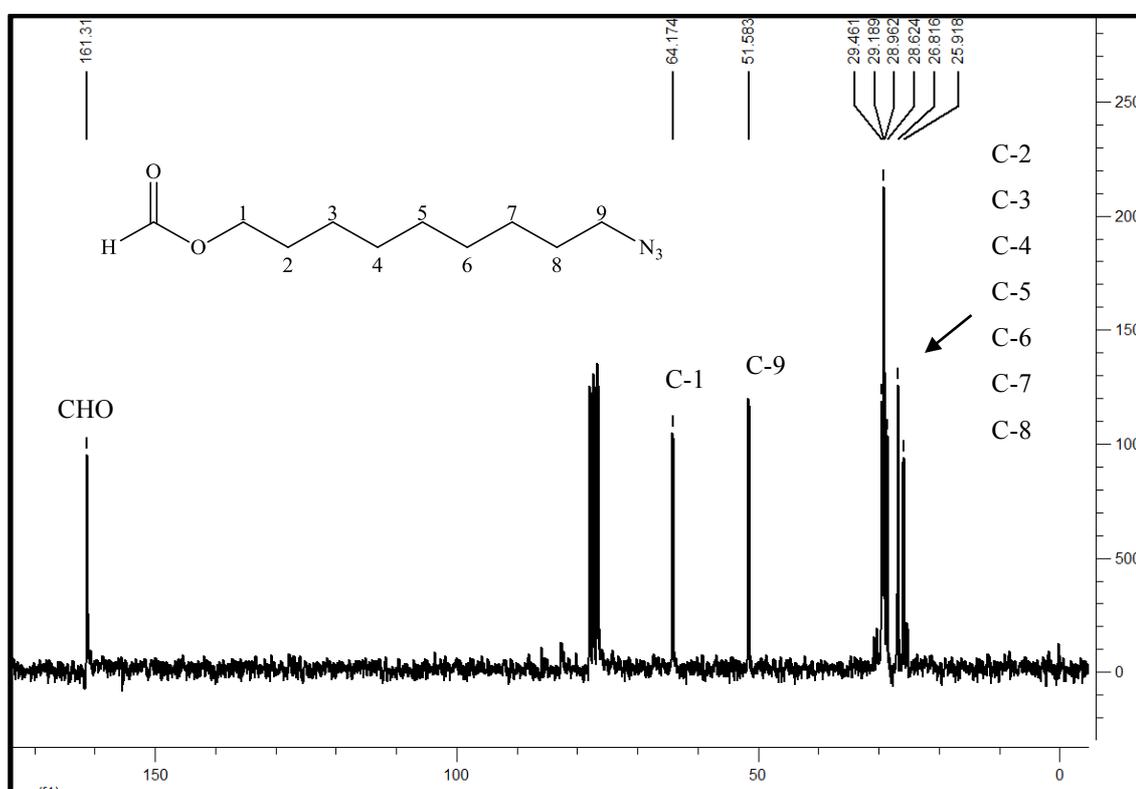
Figura 47 - Espectro de RMN de ^1H do composto **12** (400 MHz, CDCl_3)Figura 48 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **12** (100 MHz, CDCl_3)

Figura 49 - Espectro de absorção na região do IV de 5 (ATR)

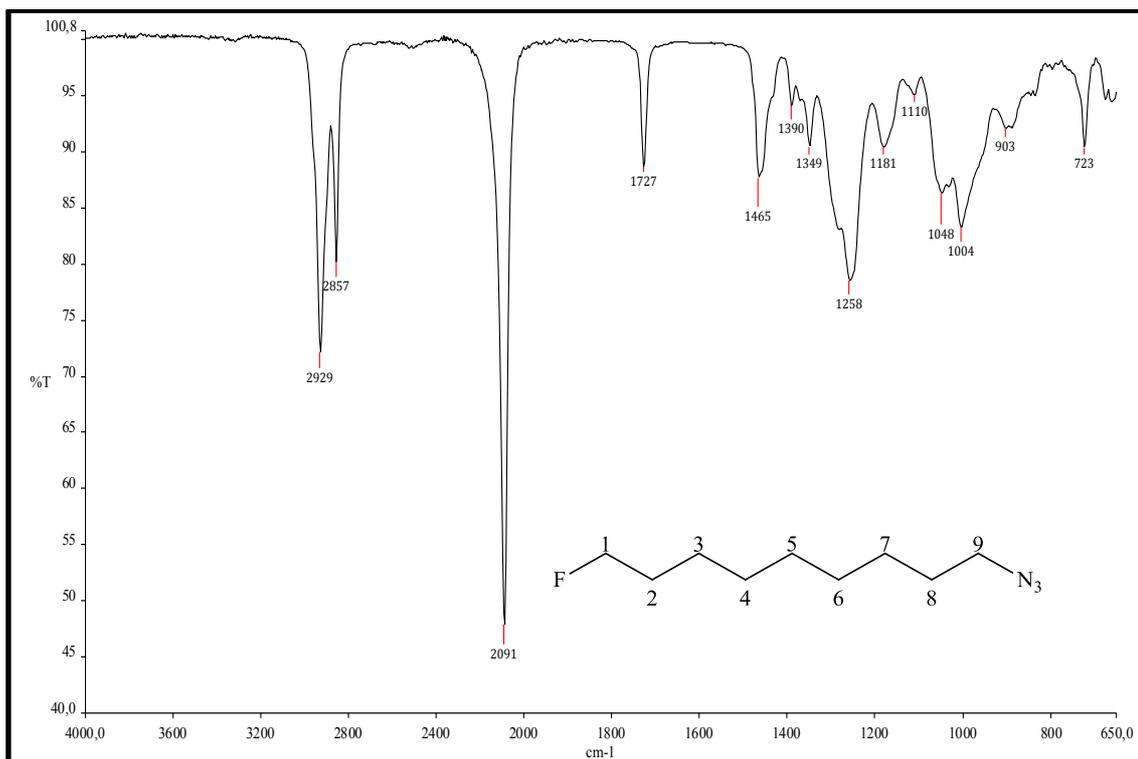
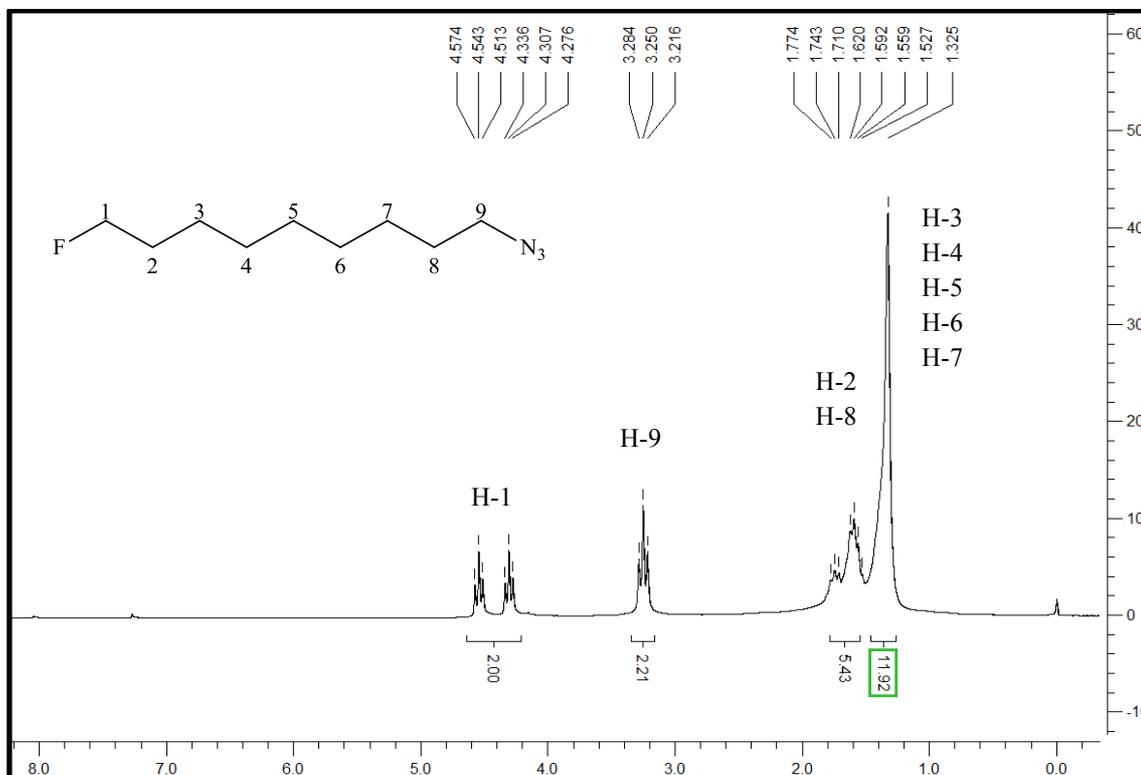
Figura 50 - Espectro de RMN de ^1H do composto 5 (200 MHz, CDCl_3)

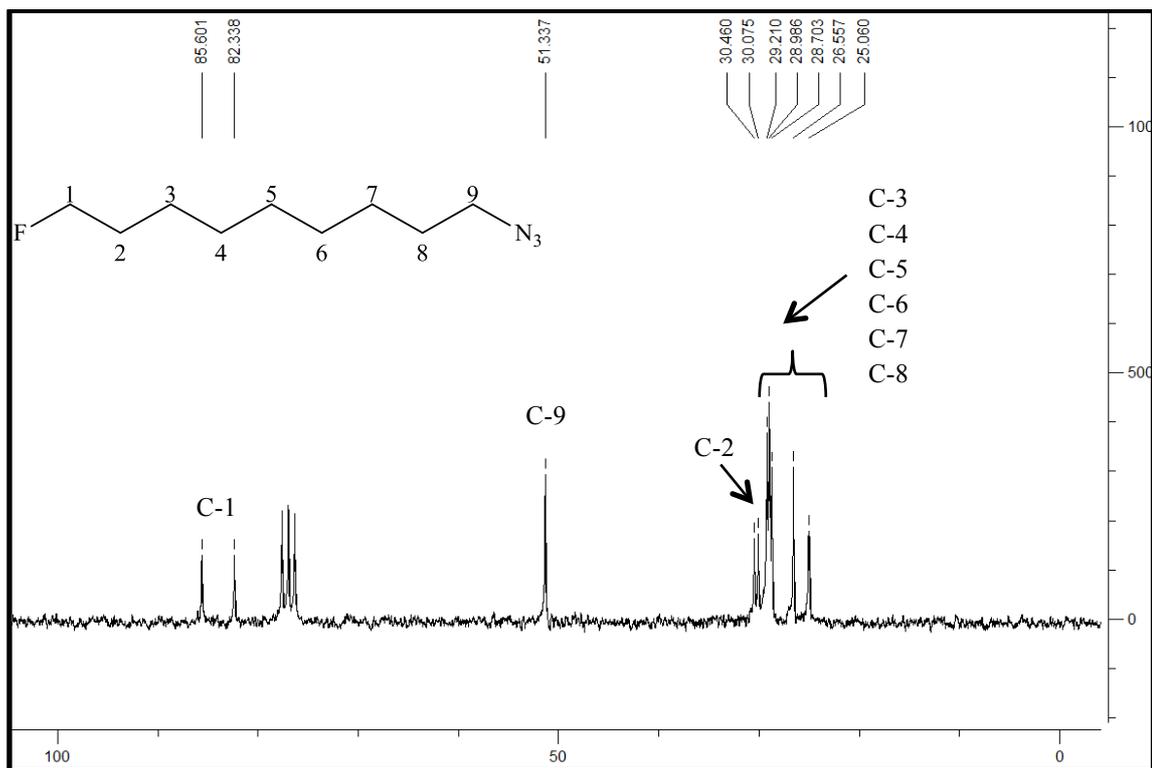
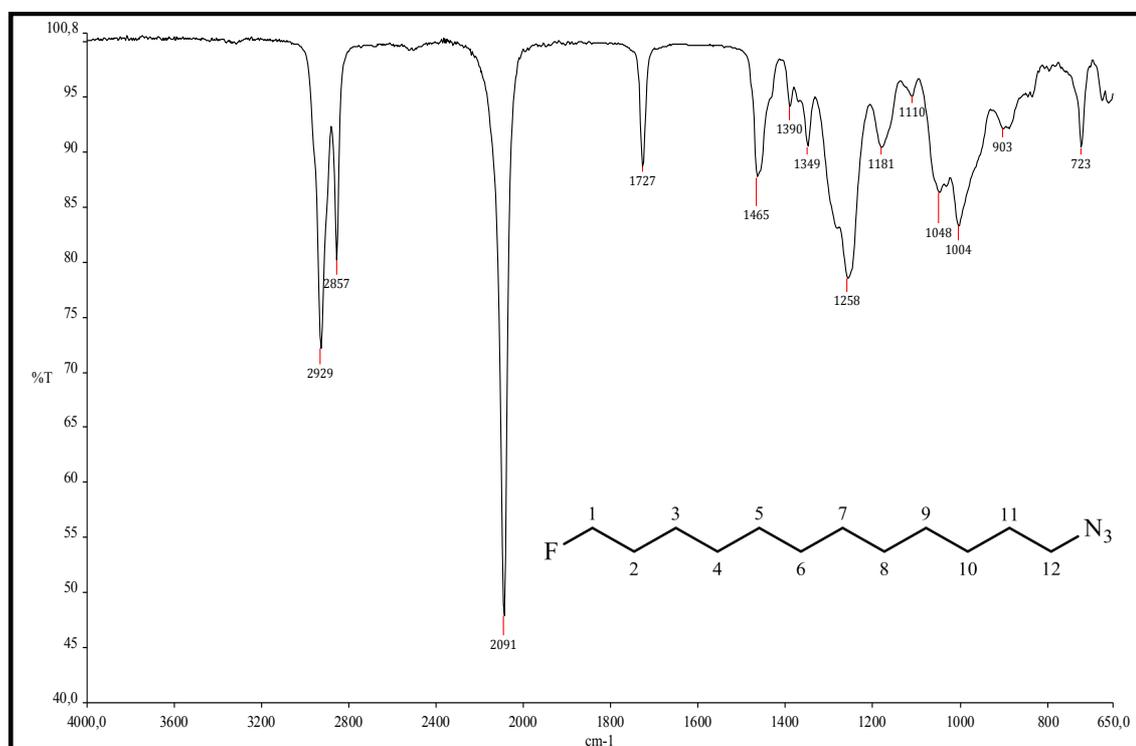
Figura 51 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **5** (50 MHz, CDCl_3)Figura 52 - Espectro de absorção na região do IV de **16** (ATR)

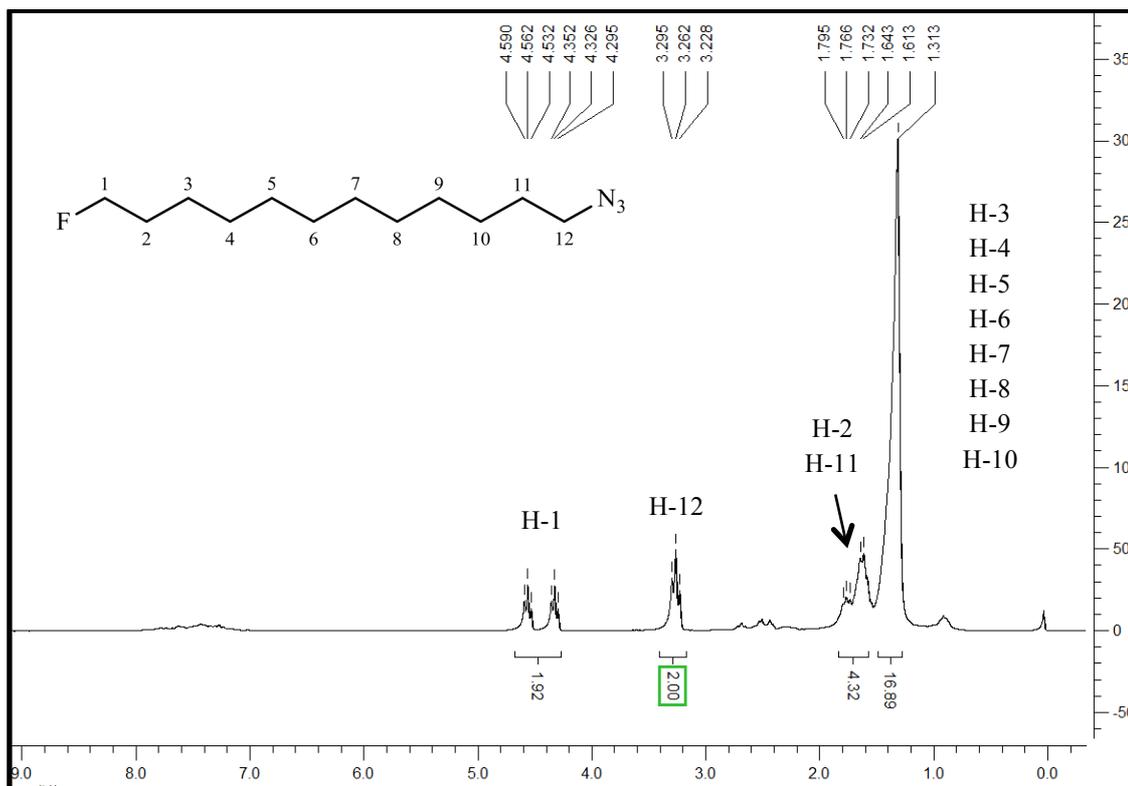
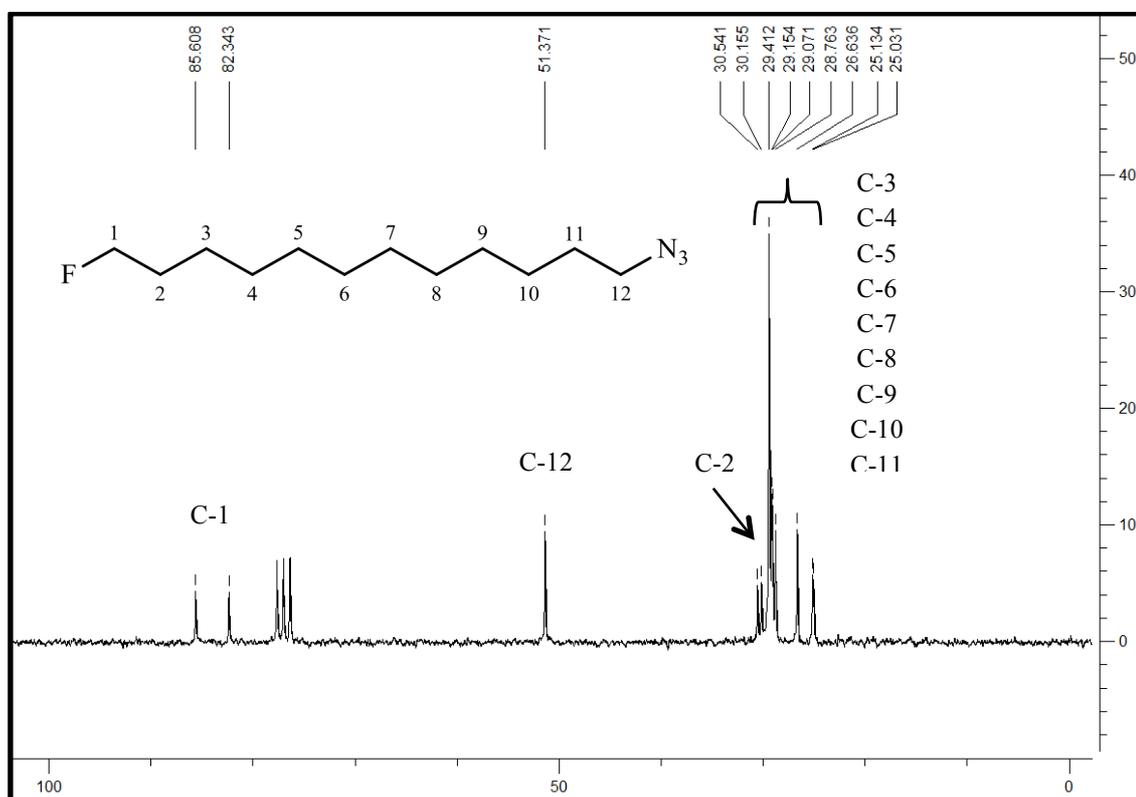
Figura 53 - Espectro de RMN de ^1H do composto **16** (200 MHz, CDCl_3)Figura 54 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **16** (50 MHz, CDCl_3)

Figura 55 - Espectro de absorção na região do IV de 6 (ATR)

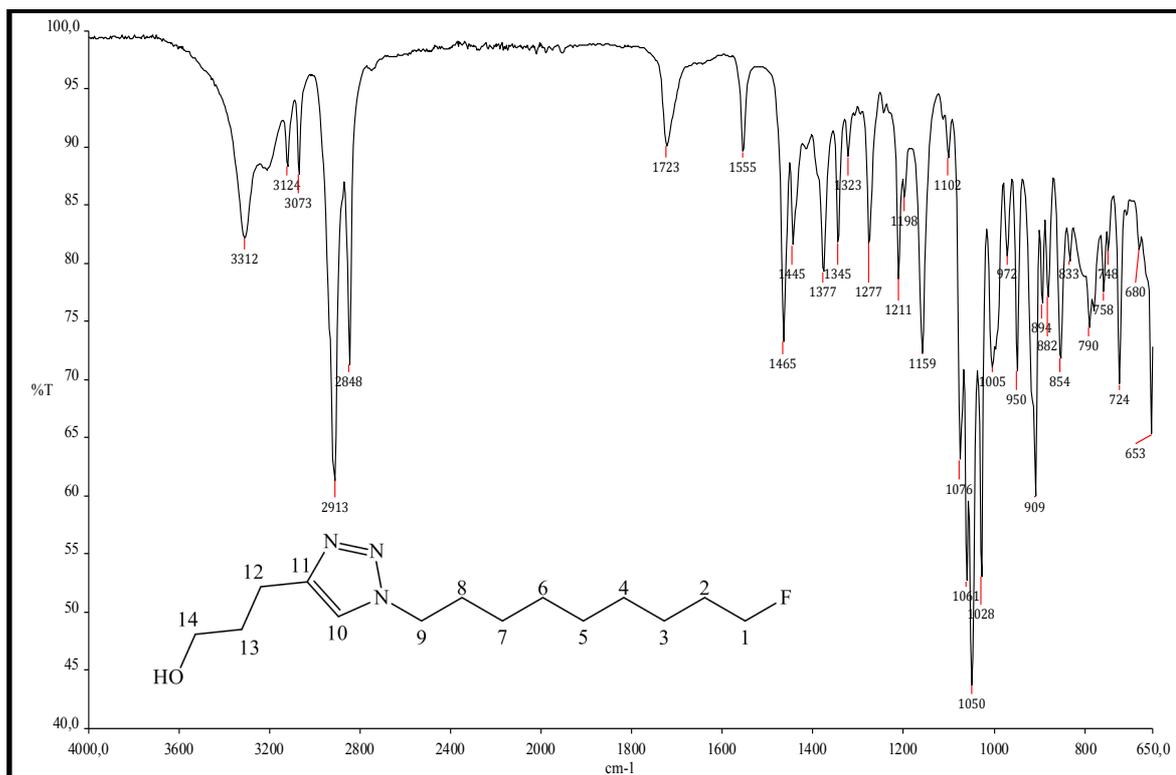
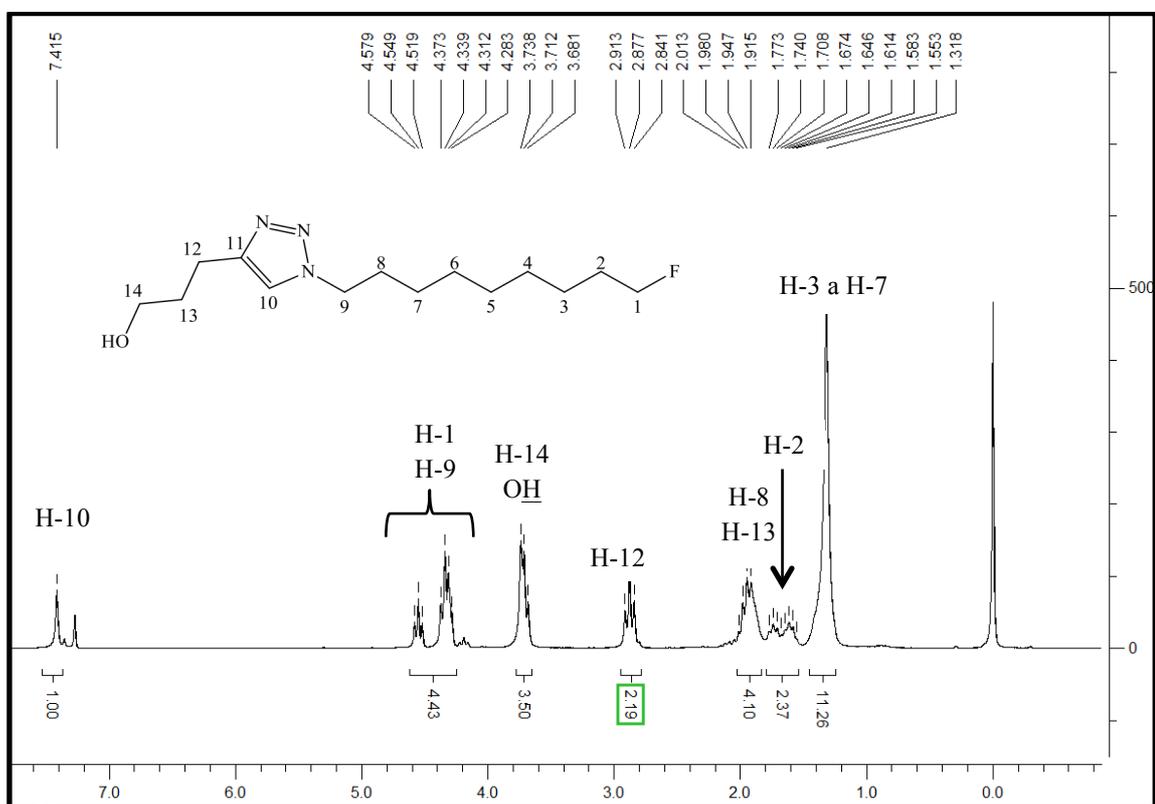
Figura 56 - Espectro de RMN de ¹H do composto 6 (200 MHz, CDCl₃)

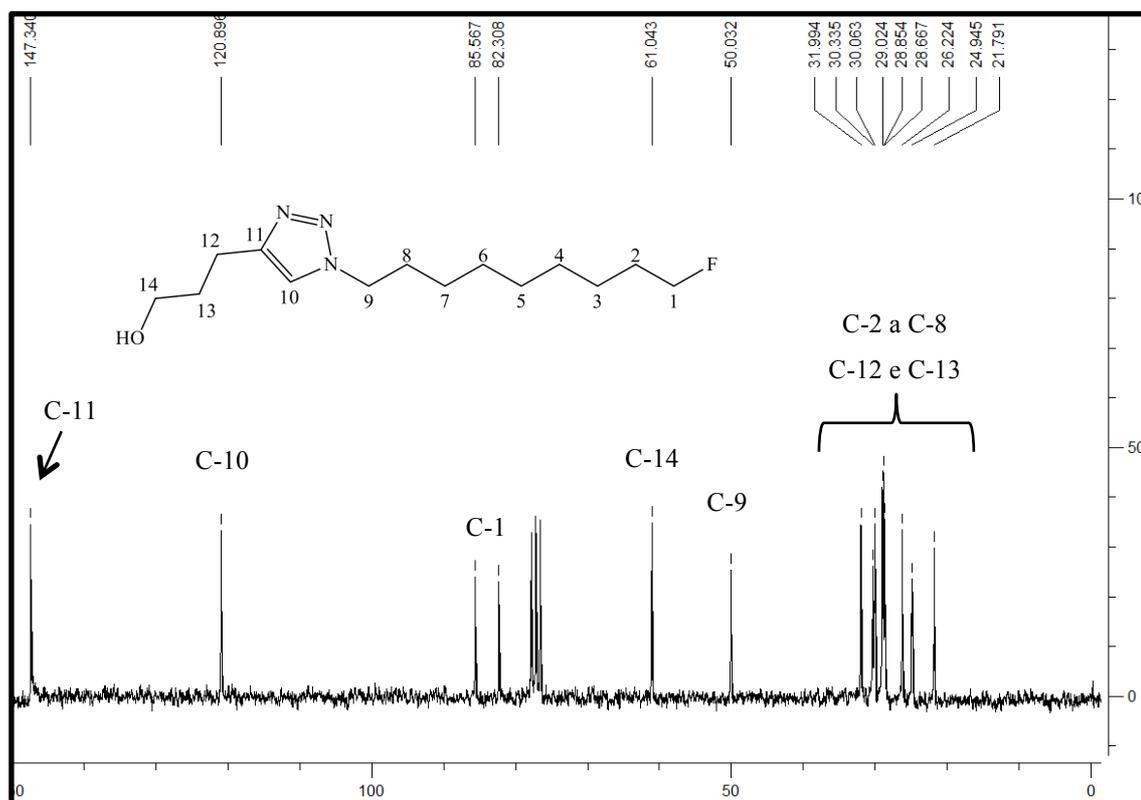
Figura 57 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 6 (50 MHz, CDCl_3)

Figura 58 - Espectro de massas (MALDI-TOF) do peptídeo UBI 31-38

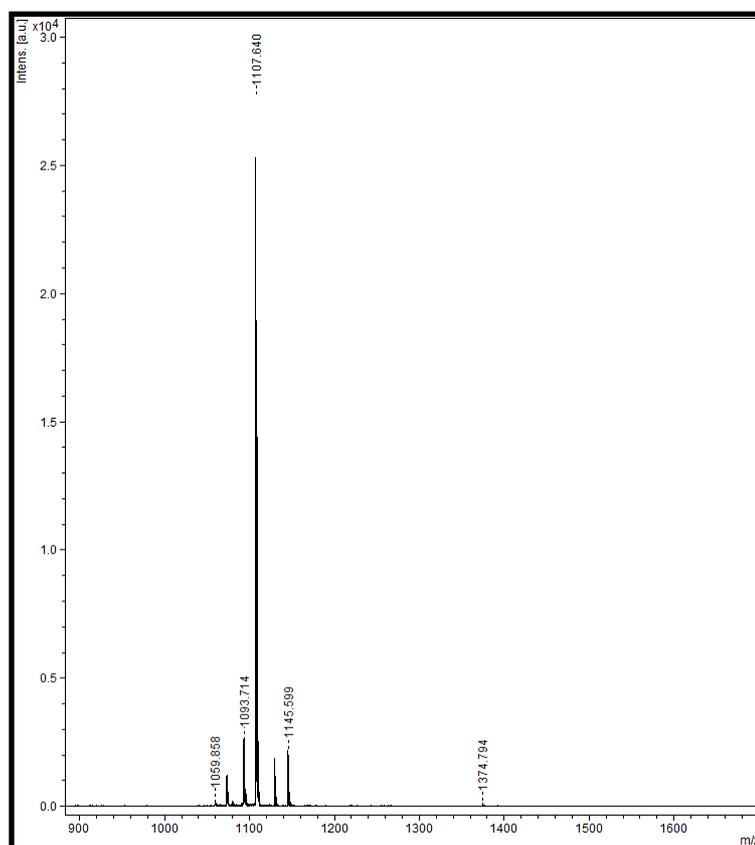


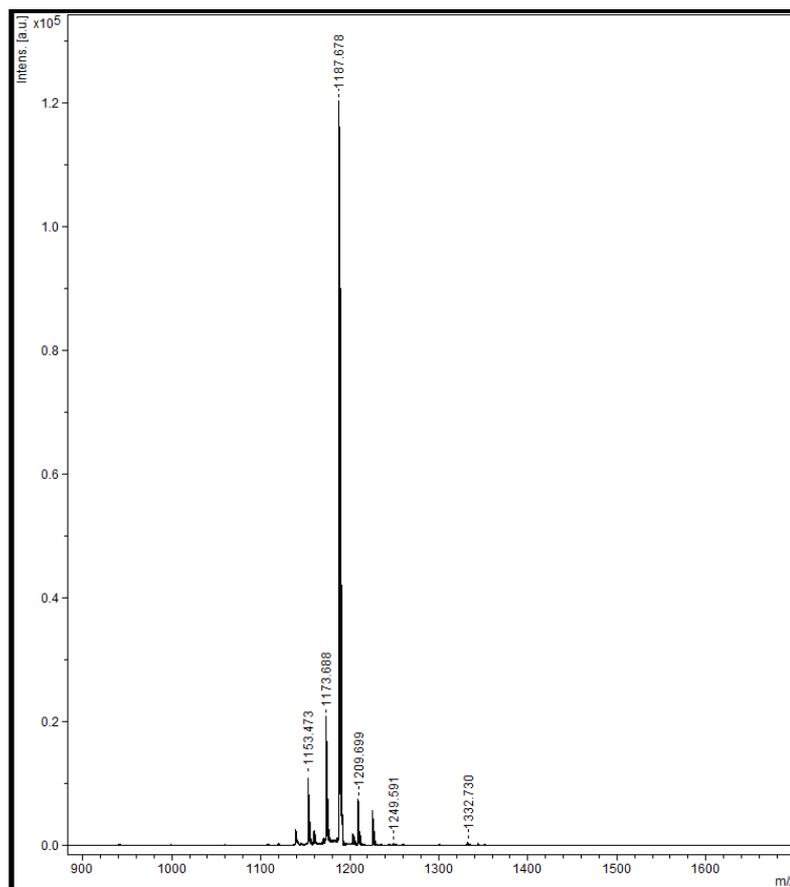
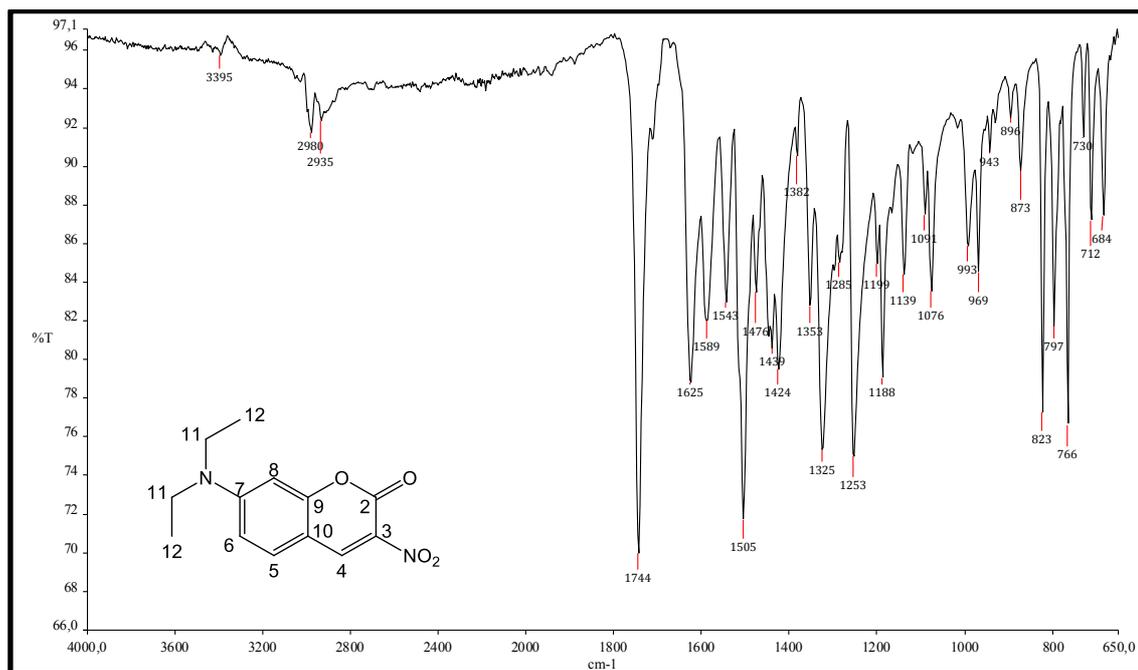
Figura 59 - Espectro de massas (MALDI-TOF) do alcinopeptídeo **8**Figura 60 - Espectro de absorção na região do IV de **29** (ATR)

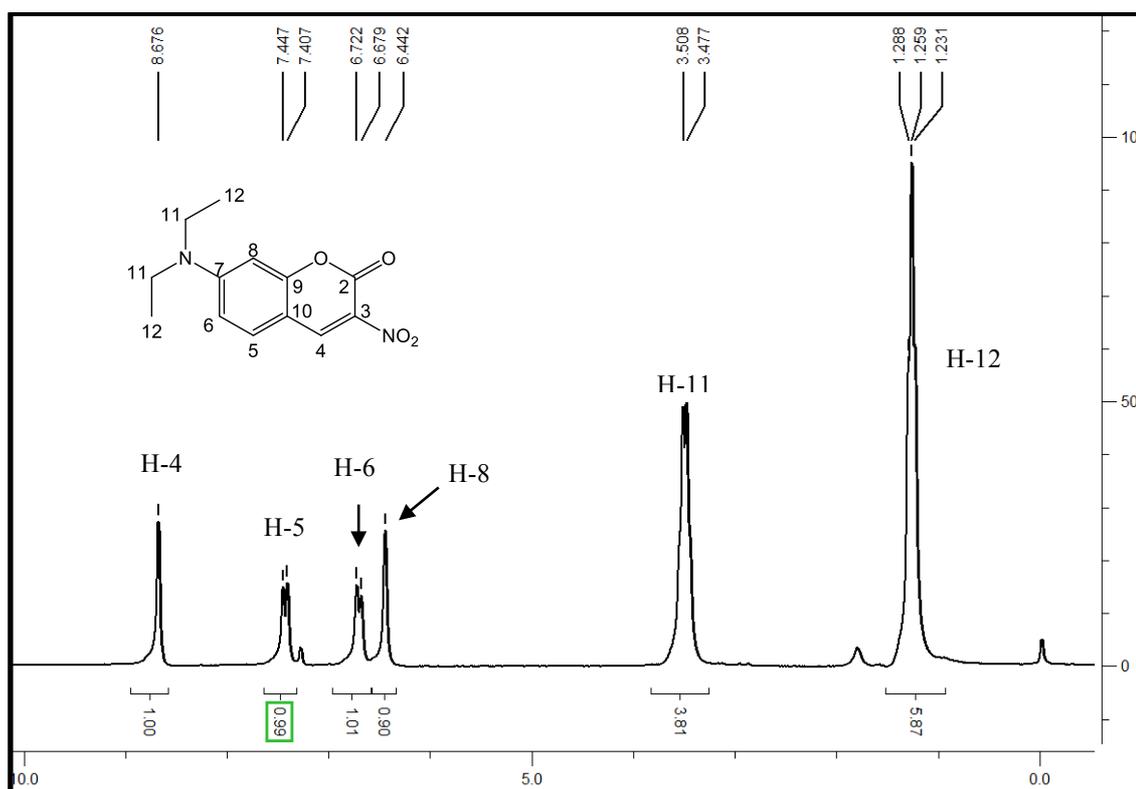
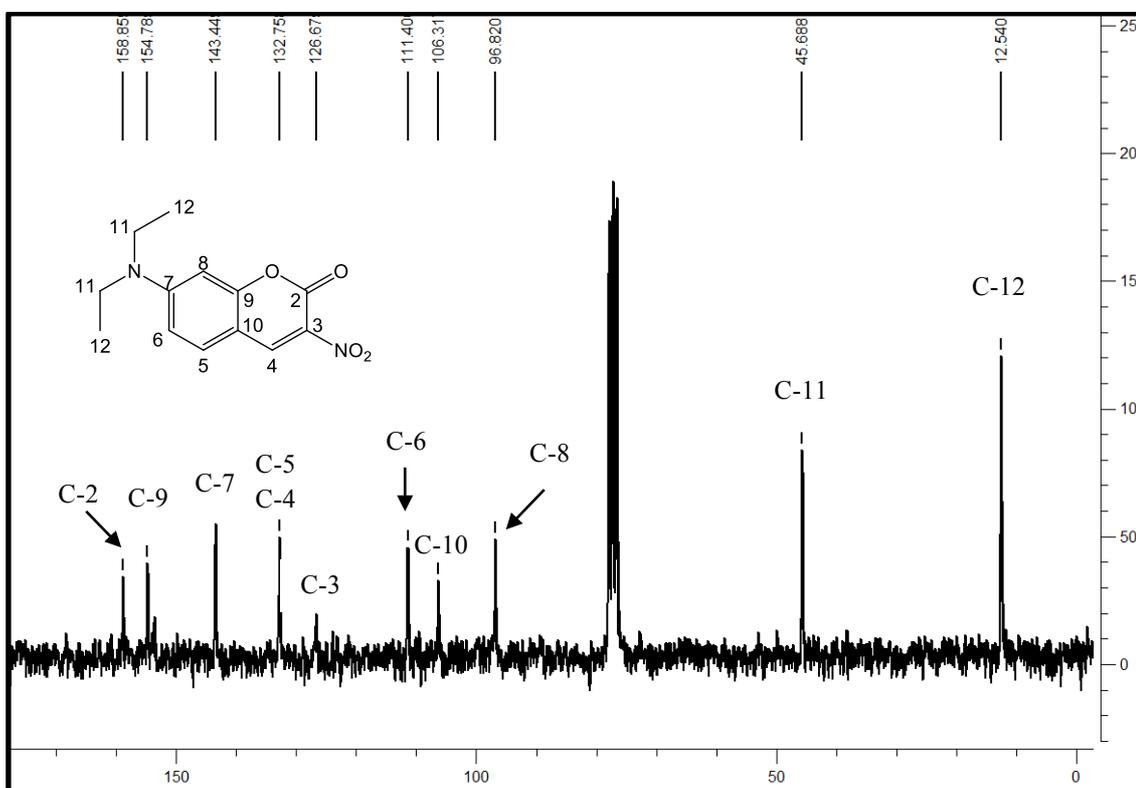
Figura 61 - Espectro de RMN de ^1H do composto **29** (200 MHz, CDCl_3)Figura 62 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **29** (50 MHz, CDCl_3)

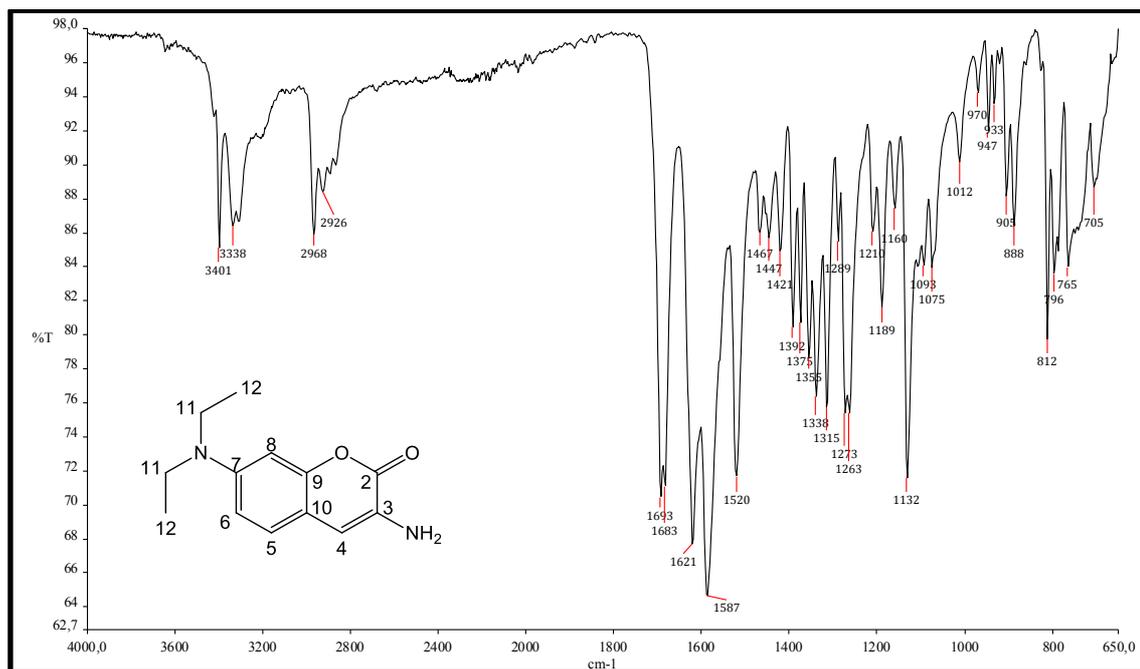
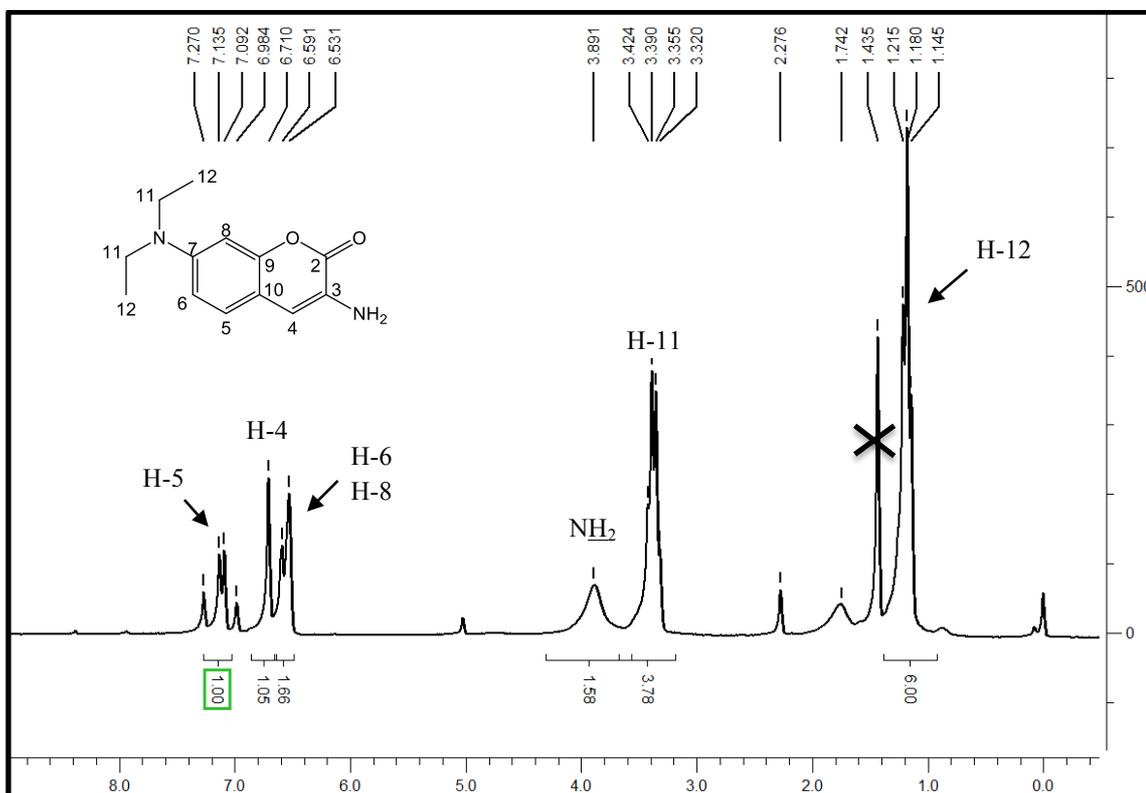
Figura 63 - Espectro de absorção na região do IV de **30** (ATR)Figura 64 - Espectro de RMN de ¹H do composto **30** (200 MHz, CDCl₃)

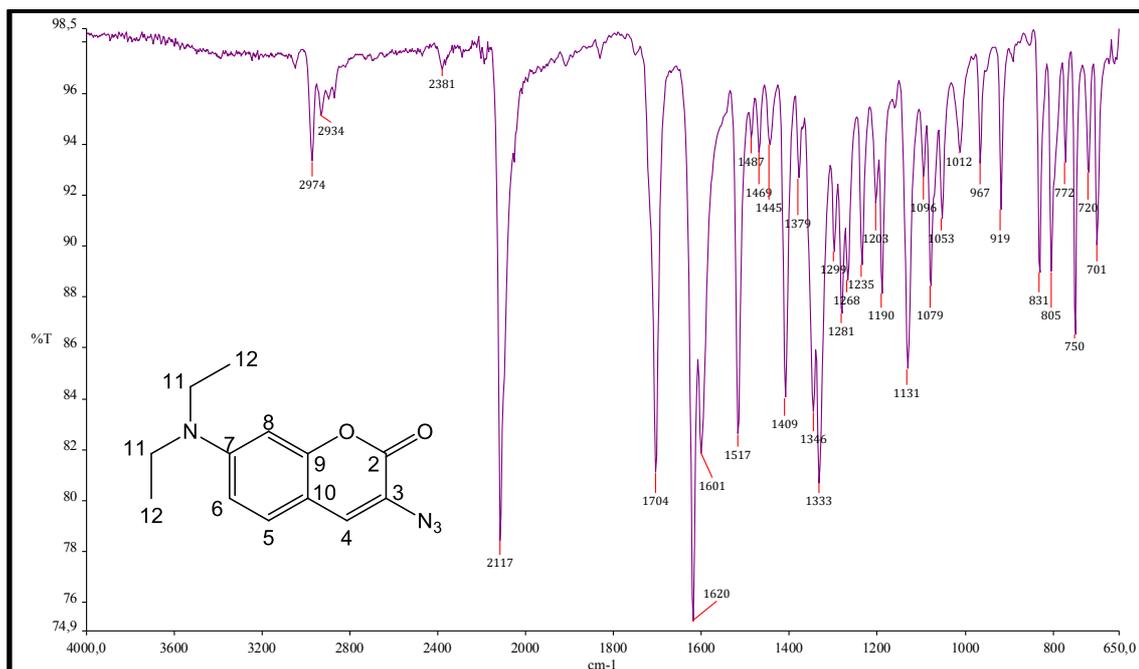
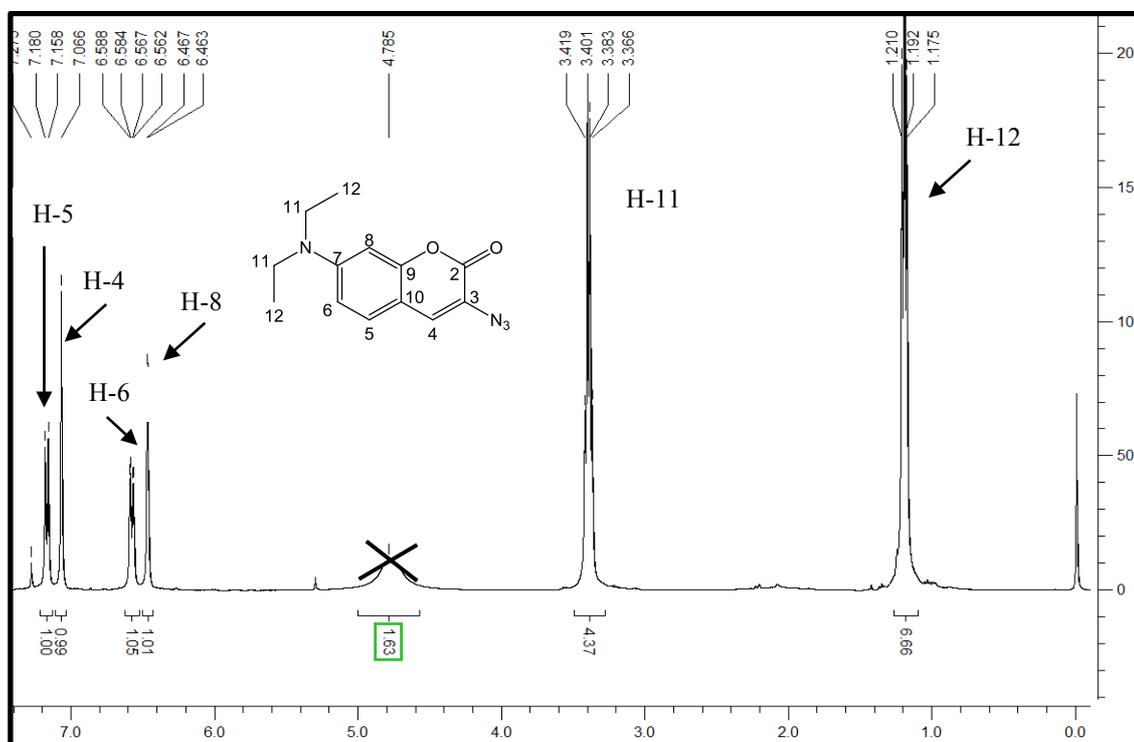
Figura 65 - Espectro de absorção na região do IV de **10** (ATR)Figura 66 - Espectro de RMN de ¹H do composto **10** (400 MHz, CDCl₃)

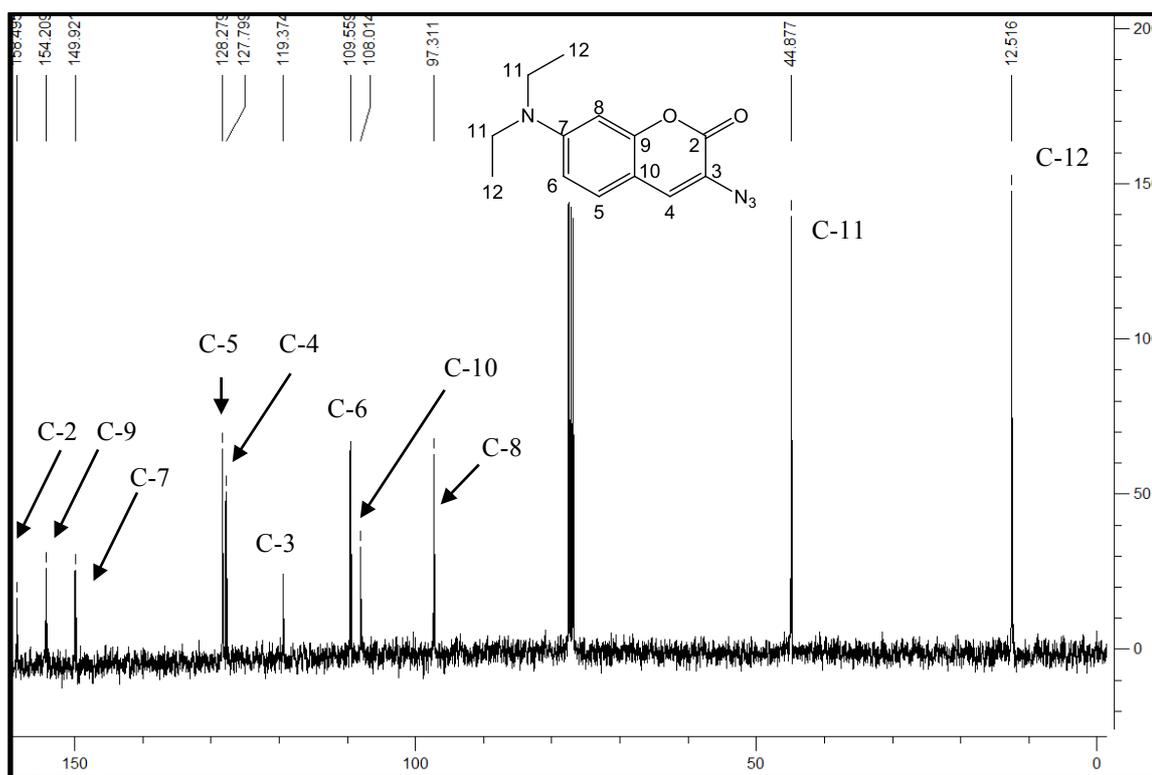
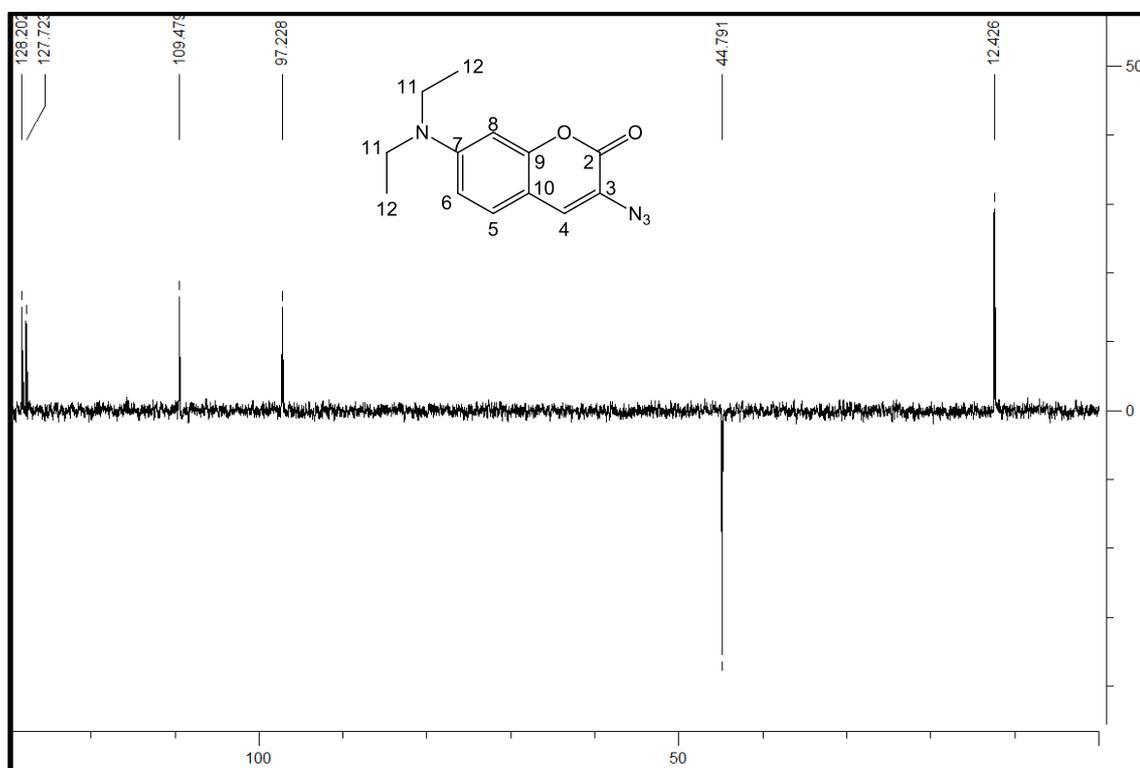
Figura 67 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **10** (100 MHz, CDCl_3)Figura 68 - Espectro de RMN de DEPT do composto **10** (100 MHz, CDCl_3)

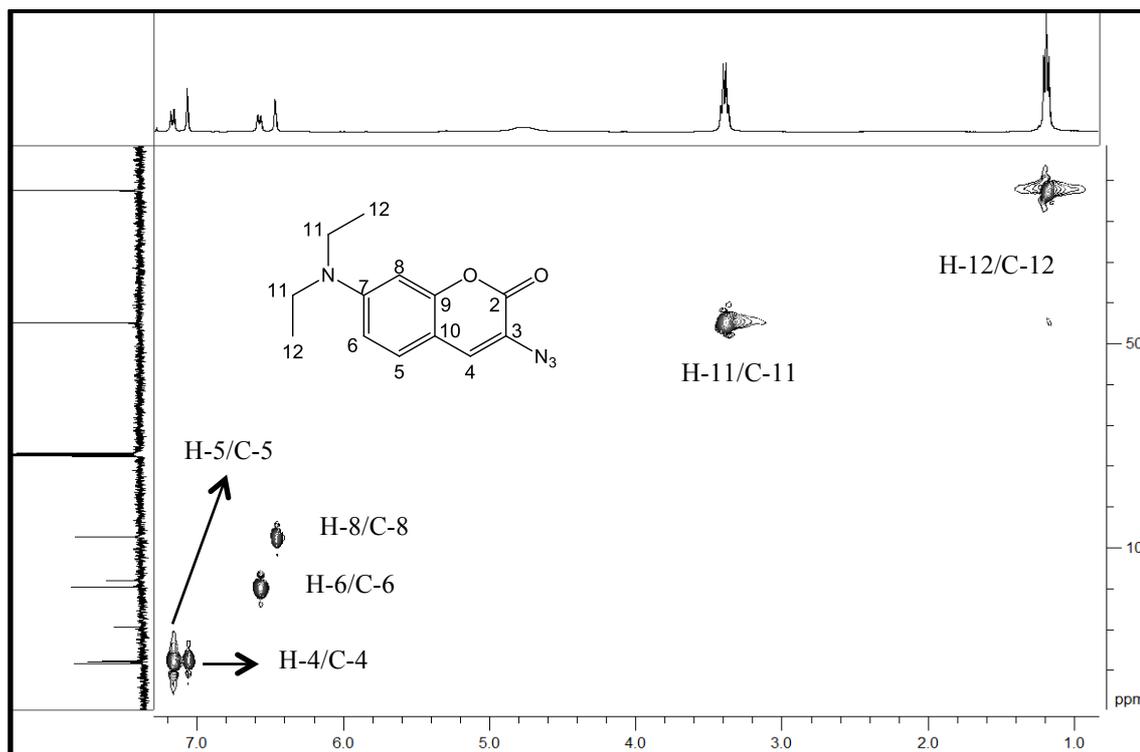
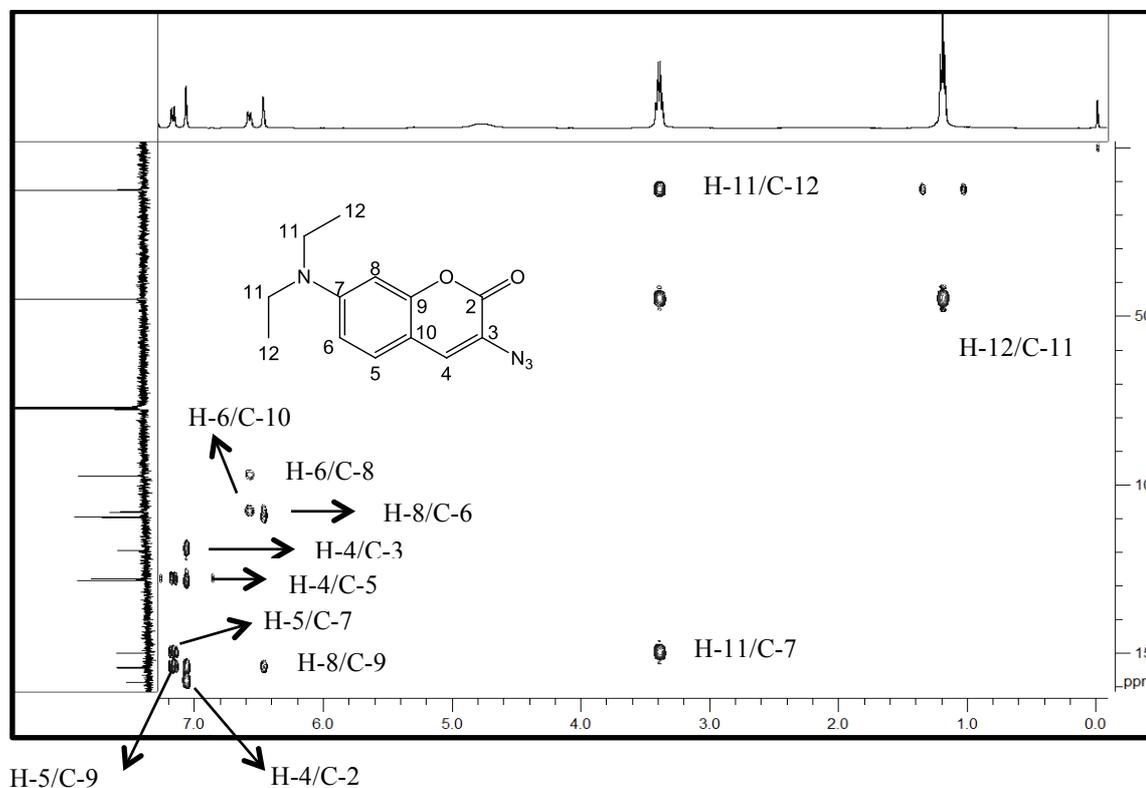
Figura 69 - Espectro de RMN de HSQC do composto **10** (400 MHz, CDCl₃)Figura 70 - Espectro de RMN de HMBC do composto **10** (400 MHz, CDCl₃)

Figura 71 - Espectro de massas (MALDI-TOF) do derivado peptídico 11

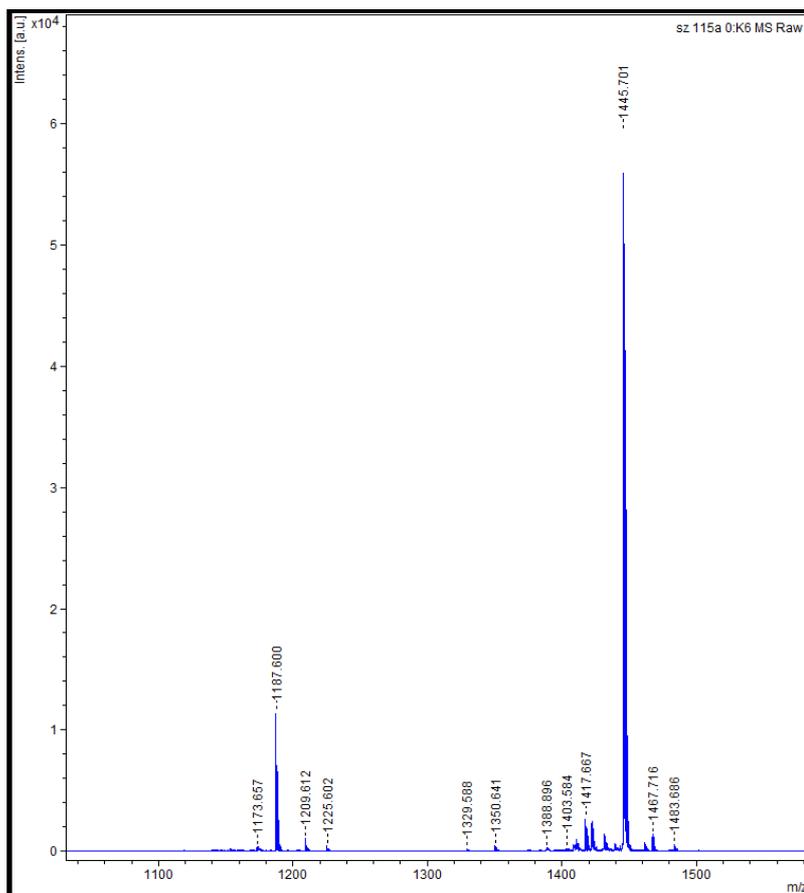


Figura 72 - Espectro de absorção na região do IV de 31 (ATR)

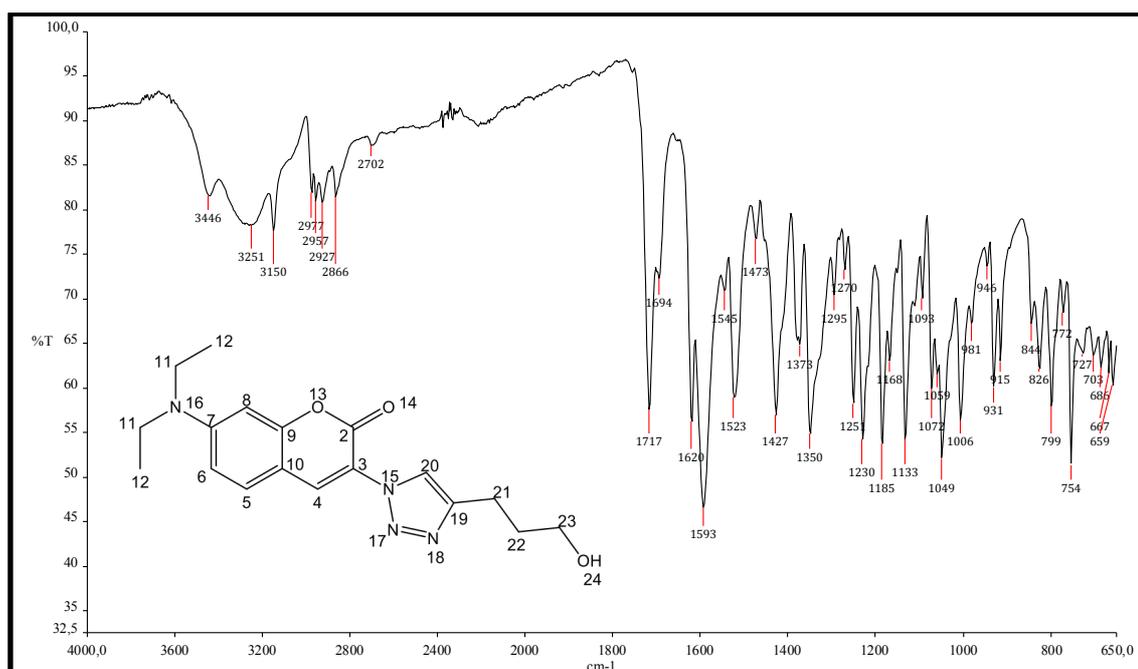


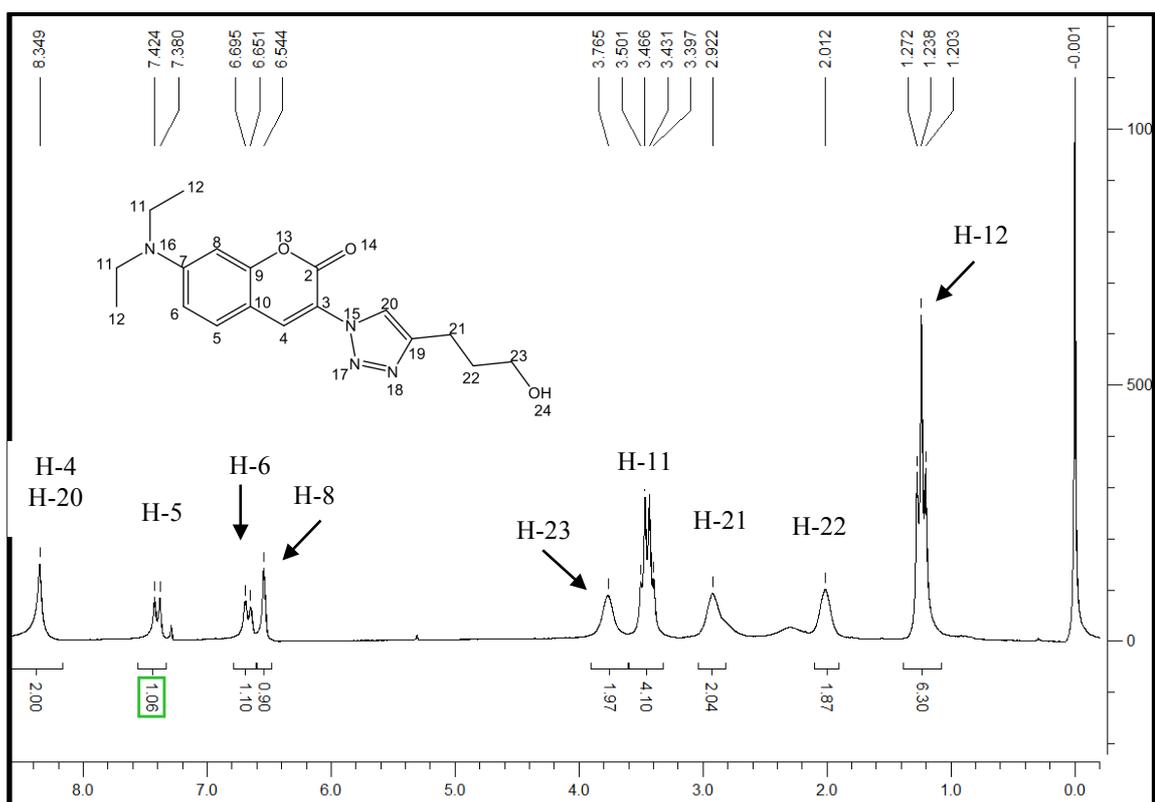
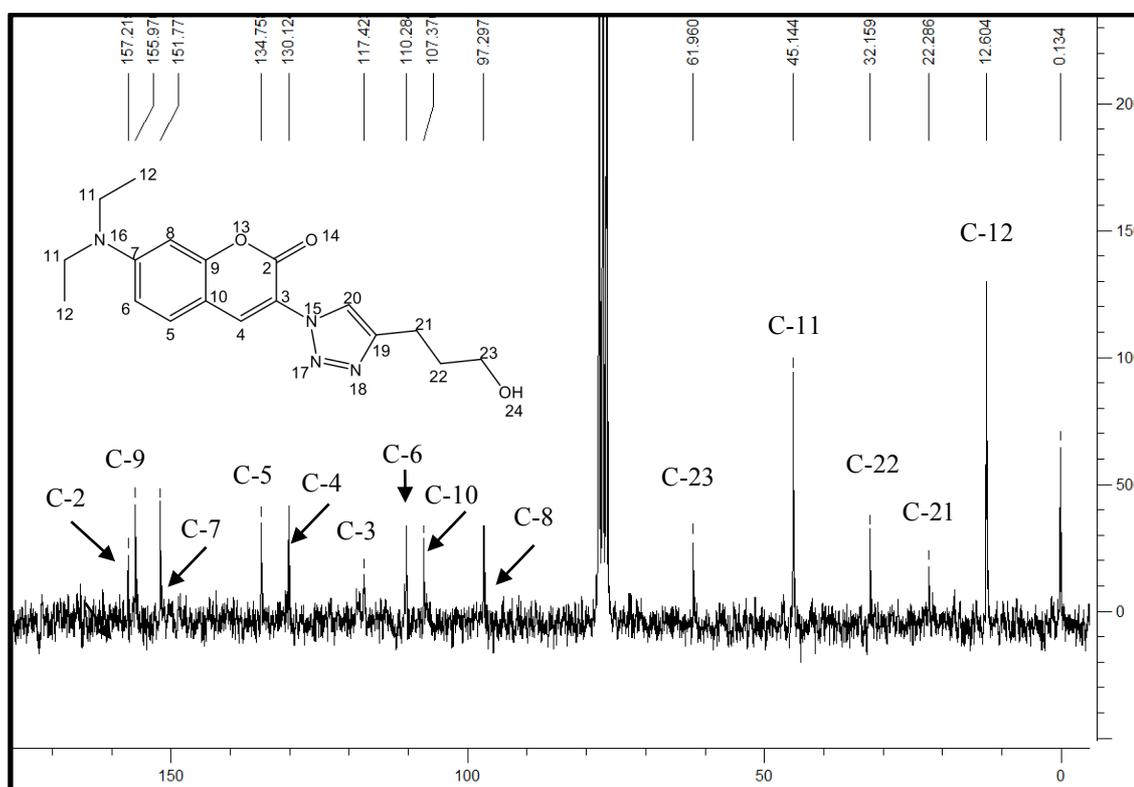
Figura 73 - Espectro de RMN de ^1H do composto **31** (200 MHz, CDCl_3)Figura 74 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **31** (50 MHz, CDCl_3)

Figura 75 - Espectro de massas do composto **31** (ESI-MS)