

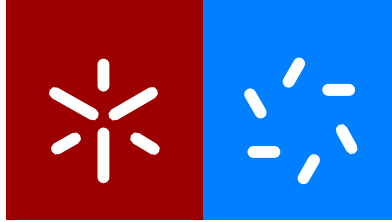
Universidade do Minho
Escola de Ciências

Síntese de novos péptidos antioxidantes de penetração
celular com alvo na mitocôndria

Diana Brandão

Diana Brandão

**Síntese de novos péptidos
antioxidantes de penetração celular
com alvo na mitocôndria**



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Diana Brandão

**Síntese de novos péptidos antioxidantes de
penetração celular com alvo na mitocôndria**

Tese de Mestrado
Mestrado em Química Medicinal

Trabalho efetuado sob a orientação de
Doutor Luís Miguel Oliveira Sieve Monteiro
e de
**Doutora Maria de Fátima Azevedo Brandão Amaral
Paiva Martins**

outubro de 2020

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações
CC BY-NC-ND

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A DISPONIBILIZAÇÃO OU A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Agradecimentos

A presente dissertação de mestrado foi possível graças ao apoio e incentivo de diversas pessoas, que me ajudaram neste turbilhão de emoções até ao trabalho final estar concluído. A todos vocês estou eternamente grata. No entanto, gostaria de distribuir uns agradecimentos especiais.

Em primeiro lugar, ao meu co-orientador, doutor Luís Miguel Oliveira Sieuve Monteiro, pela paciência, total apoio, disponibilidade e orientação ao longo deste ano. Muito obrigada pela partilha do seu conhecimento e me ter permitido a realizar este incrível projeto.

É importante, também, agradecer à minha co-orientadora, doutora Maria de Fátima Azevedo Brandão Amaral Paiva Martins, por me ter aberto as portas do seu laboratório e permitir que lá desenvolvesse esta dissertação. Muito obrigada pela simpatia e ajuda ao longo deste trabalho.

Agradeço igualmente aos meus colegas de laboratório pela simpatia e carinho com que me receberam. Muito obrigada pelos dias divertidos, me “darem” na cabeça sempre que era preciso e pela ajuda que sempre me prestaram.

Não poderia deixar de mencionar os meus amigos de mestrado, especialmente a Teresa Pereira e o André Lopes, por toda a amizade, carinho, disponibilidade, apoio e força que me deram ao longo do mestrado. Muito obrigada por me aturarem e me ajudarem sempre que preciso.

Às minhas amigas mais antigas, Ana Catarina, Soraia Lopes e Beatriz Fernandes agradeço a amizade, os disparates, o apoio e a vossa presença ao longo deste trabalho. Obrigada por me ouvirem e sempre me aconselharem da melhor forma possível.

Por fim gostaria de agradecer à minha família, especialmente à minha mãe, irmã, avó, tia e ao meu gato por sempre estarem lá quando preciso, por me acalmarem, dizerem que tudo vai correr bem e me ajudarem a ultrapassar os obstáculos que me vão aparecendo no caminho, sempre com o mesmo amor e carinho. Agradeço também, ao meu avô, que apesar de já não estar presente sempre me guiou e, antes mesmo de mim, já sabia qual seria o meu caminho. Obrigada a todos pelos dias felizes que me proporcionaram e todo o amor, espero um dia retribuir-vos da mesma forma.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Resumo

A mitocôndria desempenha um papel vital na regulação do metabolismo de energia celular. A sua capacidade de regular o equilíbrio redox é fundamental no controlo da vida e da morte celular. Desta forma, o mau funcionamento da mitocôndria causado por danos oxidativos tem sido associado a várias patologias humanas, tais como doenças neurodegenerativas e síndrome metabólica.^{1,2} Assim, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas envolvendo a diminuição do stress oxidativo mitocondrial é de grande importância.^{3,4}

Nas últimas duas décadas, muitos péptidos modificados estruturalmente foram sintetizados a fim de melhorar a sua capacidade de atravessar a membrana celular, mantendo baixa toxicidade e imunogenicidade.⁵ Os péptidos capazes de transportar e entregar uma ampla variedade de cargas bioativas intactas – desde proteínas a moléculas terapêuticas – através da membrana celular são conhecidos como péptidos de penetração celular (CPPs). Estes são péptidos curtos (5 a 30 aminoácidos de comprimento) com propriedades catiónicas e/ou anfipáticas, que apresentam uma toxicidade muito baixa. São derivados de proteínas naturais ou sintéticos. Desta forma, a conjugação de moléculas/agentes terapêuticos com CPPs permite uma penetração melhorada não só através da membrana celular como dentro de organelos específicos, tais como o núcleo e a mitocôndria.^{5,6}

Os péptidos de penetração mitocondrial (MPPs) representam uma direção relativamente nova no desenvolvimento de vetores com alvo na mitocôndria. São péptidos curtos e com alta capacidade de penetração na mitocôndria. A estrutura dos MPPs é geralmente catiónica e hidrofóbica, o que facilita a permeação através da membrana mitocondrial e a acumulação na matriz mitocondrial.⁷ Várias abordagens foram desenvolvidas e vários estudos mostram bons resultados na terapia do cancro, proteção cardíaca e outras doenças cardiovasculares bem como neuroproteção nas doenças de Parkinson e Alzheimer ou em distúrbios metabólicos.⁸

Os péptidos curtos de Szeto-Schiller (SS) desenvolvidos por Szeto e Schiller são os antioxidantes direcionados para a mitocôndria mais promissores.⁹ Estes péptidos são tetrapéptidos projetados com resíduos aromáticos alternados e aminoácidos básicos.^{9,10}

Neste trabalho é apresentada uma revisão teórica sobre o estudo dos péptidos de penetração celular e péptidos de penetração mitocondrial assim como a sua importância na terapêutica. Propomos, também, expandir a síntese de novos péptidos com um resíduo de 3,4-di hidroxifenilglicila¹¹ para isso, uma estratégia baseada na reação de Ugi foi utilizada.

Palavras chave: Antioxidantes, Péptidos de penetração celular, Péptidos de penetração mitocondrial, Reação de Ugi, Stress oxidativo

Abstract

The mitochondria play a vital role in regulating cellular energy metabolism. Their ability to regulate the redox/oxidative balance is critical in controlling cellular life and death. Thus, mitochondrial dysfunction caused by oxidative damage has been implicated in several human pathologies such as neurodegenerative diseases and metabolic syndromes.^{1,2} The development of new therapeutic strategies involving the minimization of mitochondrial dysfunction is of major importance.^{3,4}

In the last two decades, many structurally modified peptides have been synthesized in order to improve their ability to cross the cell membrane while maintaining low toxicity and immunogenicity.⁵ Peptides capable of transporting and delivering of a wide variety of intact bioactive cargoes – from proteins to therapeutic molecules – across the cellular membrane are known as cell-penetrating peptides, (CPPs). These are short peptides (5 to 30 amino acids long) with cationic and/or amphipathic properties present very low cytotoxicity. They are derived either from natural proteins or synthetically prepared. Thus, the conjugation of molecules/therapeutic agents with CPPs allows an improved uptake not only across the cellular membrane, but also into specific organelles such as the nucleus and the mitochondria.^{5,6}

Mitochondria penetrating peptides (MPPs) represent a relatively new direction in the development of mitochondria targeting vectors since these short peptides have high mitochondria uptake. The structure of MPPs is generally cationic and hydrophobic, which facilitates permeation through the hydrophobic mitochondrial membrane and accumulation in the mitochondria matrix.⁷ Several approaches have been undertaken and several basic research studies have shown successful results for cancer therapy, cardiac protection and other cardiovascular diseases as well as neuroprotection in Parkinson's and Alzheimer's diseases or for metabolic disorders.⁸

The short Szeto-Schiller (SS) peptides developed by Szeto and Schiller are one of the most promising mitochondria-targeted antioxidants.⁹ These peptides are tetrapeptides designed with alternating aromatic residues and basic amino acids.^{9,10}

In this work, a theoretical review on the study of cell penetrating peptides and mitochondrial penetrating peptides as well as their importance in therapy. We also propose to expand the synthesis of new peptides derived from 3,4-dihydroxyphenylglycine¹¹ for this, a strategy based on the Ugi reaction was used.

Key words: Antioxidants, Cell-penetrating peptides, Mitochondria penetrating peptides, Oxidative stress, Ugi reaction

Índice

Lista de abreviações	ix
Índice de figuras	xi
Índice de tabelas	xii
Índice de esquemas	xiii
1. Introdução	14
1.1. Stress oxidativo	15
1.2. Antioxidantes.....	15
1.2.1. Aminoácidos e os seus derivados como antioxidantes	16
1.2.2. Aminoácidos fenólicos	16
1.2.2.1. L-Tirosina e L-Dopa	16
1.2.2.2. <i>p</i> -Hidroxifenilglicina	17
1.2.2.3. 3,4-di-Hidroxifenilglicina	18
1.2.3. 2,6-Dimetiltirosina	20
1.2.4. α,β -Desidroaminoácidos.....	21
1.2.5. Ácidos fenólicos acoplados com aminoácidos proteinogénicos.....	23
1.2.6. Ácidos fenólicos acoplados com desidroaminoácidos.....	24
1.3. Péptidos de penetração celular.....	24
1.3.1. Definição de péptidos de penetração celular (CPPs)	24
1.3.2. Classificação dos CPPs.....	26
1.3.2.1. CPPs catiónicos	27
1.3.2.2. CPPs hidrofóbicos.....	28
1.3.2.3. CPPs anfipáticos	28
1.3.2.4. Péptidos ricos em prolinas	29
1.3.3. Métodos de conjugação de moléculas bioativas com CPPs.....	29
1.3.4. Conjugados de moléculas bioativas com CPPs	30
1.4. A mitocôndria.....	32

1.5.	Antioxidantes direcionados para a mitocôndria.....	32
1.6.	Péptidos de penetração mitocondrial (MPPs)	33
1.6.1.	Conjugados de moléculas bioativas com MPPs	34
1.6.2.	Péptidos de penetração mitocondrial como antioxidantes	36
1.7.	Metodologias Sintéticas	38
1.7.1.	Reações Multicomponente	38
1.7.2.	Reação de Ugi	39
2.	Resultados e Discussão	42
2.1.	Síntese pela reação de Ugi de derivados de péptidos com um aminoácido catecólico	43
2.1.1.	Síntese do dicarbonato de di- <i>tert</i> -butil (4-formil-1,2-fenileno).....	44
2.1.2.	Síntese dos aductos de Ugi.....	45
2.1.3.	Desproteção dos aductos de Ugi	46
2.2.	Síntese pela reação de Ugi de derivados de péptidos com um aminoácido catecólico e um resíduo de desidrofenilalanina	46
2.2.1.	Síntese da desidrofenilalanina.....	47
2.2.2.	Síntese de Tos- Δ Phe-DHPG-Cy pela reação de Ugi	47
3.	Conclusão e perspectivas futuras	49
4.	Secção Experimental.....	52
4.1.	Métodos gerais.....	53
4.2.	Síntese.....	53
4.2.1.	Síntese do dicarbonato de di- <i>tert</i> -butil (4-formil-1,2-fenileno).....	53
4.2.2.	Síntese dos aductos de Ugi.....	54
4.2.3.	Desproteção de aductos de Ugi.....	56
4.2.4.	Síntese da <i>N</i> (4-toluenosulfonilo) desidrofenilalanina.....	59
5.	Referências	61

Lista de abreviações

$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
ABTS	Ácido 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolinasulfônico)
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
BHA	Hidroxianisol butilado
BHT	Hidroxitolueno butilado
Boc ₂ O	Dicarbonato de di- <i>tert</i> -butilo
Brine	Solução saturada de cloreto de sódio
CDA	Antibióticos cálcio-dependentes
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CPPs	Péptidos de penetração celular (vem do inglês cell-penetrating peptides)
DEPT	Aprimoramento sem distorção por transferência de polarização
DFO	Deferoxamina
DHPG	3,4-di-Hidroxifenilglicina
DHR	Dihidrorodamina
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido deuterado
Dmt	2,6-Dimetil-L-tirosina
DOPA	L-β-(3,4-di-Hidroxifenil)alanina
Dox	Doxorrubicina
DPPH	1,1-Difenil-2-picrilhidrazil
ERN	Espécies reativas de nitrogénio
ERO	Espécies reativas de oxigénio

Fl-aTf	Apotransferrina marcada com fluoresceína
HMBC	Coerência de ligação múltipla heteronuclear
HMQC	Coerência quântica múltipla heteronuclear
HPG	<i>p</i> -Hidroxifenilglicina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
MPPs	Péptidos de penetração mitocondrial (vem do inglês mitochondria- -penetrating peptides)
NLSs	Sequências de localização nuclear
O ₂ ^{·-}	Radical superóxido
SS	Szeto-Schiller
SS-31	2,5-Dimetiltirosina-lisina-fenilalanina-NH ₂
TAMRA	Carboxi-tetrametilrodamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TLC	Cromatografia em camada fina
TMG	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametilguanidina
Tos	Grupo 4-toluenosulfonilo
TPP	Catião lipofílico trifenilfosfônio
3,4-DHPG	3,4-di-Hidroxifenilglicina
Z	Grupo benziloxicarbonilo
Z-Phe-H	<i>N</i> -benziloxicarbonilfenilalanina
Z-Gly-H	<i>N</i> -benziloxicarbonilglicina

Índice de figuras

Figura 1. Estrutura química da Vancomicina.....	18
Figura 2. Estrutura química da L- β -(3,4-di-hidroxifenil)alanina (L-DOPA) e da 3,4-di-hidroxifenilglicina (3,4-DHPG).....	19
Figura 3. Estrutura química, provável, do tetrâmero DHPG-Cu (II).....	19
Figura 4. Estrutura química da 2,6-dimetil-L-tirosina (Dmt).....	21
Figura 5. Estrutura química geral de um resíduo de α,β -desidroaminoácido.....	21
Figura 6. Estrutura química dos compostos com maior capacidade antioxidante	23
Figura 7. Ésteres metílicos de <i>N</i> -hidroxifenil e <i>N</i> -catecol desidroalanina	24
Figura 8. . Alguns métodos propostos para a translocação direta de CPPs com carga positiva	25
Figura 9. Modelo tipo carpete	26
Figura 10. Classificação dos CPPs	27
Figura 11. Estrutura química da prolina	29
Figura 12. Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na mitocôndria	32
Figura 13. Estrutura química do MitoQ.....	33
Figura 14. Estrutura química do complexo Doxorubicina (Dox)-MPP.....	34
Figura 15. Estruturas dos conjugados MPP-DFO. Fx: ciclohexilalanina, r: d-arginina.....	35
Figura 16. Capacidade de ligação ao ferro dos conjugados e DFO livre.	36
Figura 17. Estrutura química dos peptídeos SS. SS-02 (Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH ₂); SS-31 (D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH ₂); SS20 (Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH ₂).	37
Figura 18. Reação multicomponente descoberta por Strecker em 1850.....	38
Figura 19. Reação multicomponente de M. T. L. Passerini.....	39
Figura 20. Reação multicomponente de quatro componentes descrita por H. T. Bucherer e H. Bergs....	39
Figura 21. Reação de 4 componentes de Ugi	40

Índice de tabelas

Tabela 1. Efeito anti peroxidação lipídica de alguns compostos *N*-desidroaminoácidos e do α -tocoferol .. 22

Tabela 2. Desenvolvimento clínico de alguns conjugados CPP-agente terapêutico 31

Índice de esquemas

Esquema 1. Formação da L-dopa a partir da L-tirosina.....	17
Esquema 2. Proposta de biossíntese da <i>p</i> -hidroxifenilglicina	18
Esquema 3. Mecanismo proposto por Sugumaran et al. para a conversão da 3,4-DHPG em 3,4-dihidroxibenzaldeído.....	20
Esquema 4. Possíveis mecanismos para a reação de Ugi, onde A-OH = RCOOH, ArOH	40
Esquema 5. Reação de Ugi-Smiles/Ugi-Mumm	41
Esquema 6. Síntese de novos dipéptidos contendo um resíduo de hidroxifenilglicina	43
Esquema 7. Síntese de dipéptidos contendo um resíduo de hidroxifenilglicina	44
Esquema 8. Síntese do dicarbonato de di- <i>tert</i> -butil (4-formil-1,2-fenileno)	45
Esquema 9. Síntese dos aductos de Ugi	45
Esquema 10. Desproteção dos aductos de Ugi.....	46
Esquema 11. Síntese de <i>N</i> -(4-toluenosulfonil) desidrofenilalanina (Tos- Δ Phe-OH)	47
Esquema 12. Síntese de Tos- Δ Phe- <i>M</i> [Bzl(4-OMe)]DHPG(3,4- <i>O</i> -Boc)-Cy	48
Esquema 13. Síntese do Tos- Δ Phe-DHPG-Cy.....	48

1. Introdução

1.1. Stress oxidativo

Radicais livres são espécies químicas que possuem um elétron desemparelhado, sendo por isso altamente instáveis e muito reativos. Em organismos aeróbicos, radicais livres são produzidos constantemente durante o normal funcionamento da célula, sob a forma de espécies reativas de oxigénio (ERO) e de espécies reativas de nitrogénio (ERN).^{12,13}

Depois de produzidos, os radicais livres são removidos pelas defesas antioxidantes da célula, podendo a sua inativação ser por via enzimática ou não enzimática. Manter o equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é essencial para o normal funcionamento do organismo.¹² O stress oxidativo é um desequilíbrio entre a formação e a remoção de espécies reativas de oxigénio e de nitrogénio pelas defesas antioxidantes.¹³

A concentrações baixas e intermédias estas espécies reativas podem ser benéficas para a célula, pois estão envolvidas em vários processos fisiológicos de sinalização e regulação.¹⁴ No entanto, há situações onde este equilíbrio é destruído devido à produção excessiva de EROs ou porque há uma deficiência nas defesas antioxidantes da célula.¹⁵ Nestas situações, as espécies reativas de oxigénio em excesso podem danificar o ADN, as proteínas e os lípidos, levando a modificações e, muitas vezes, à inibição do seu normal funcionamento.^{12,16,17} As espécies reativas de oxigénio são sempre responsáveis pela apoptose da célula, pois quando se encontram em altas concentrações promovem a libertação do citocromo c para o citoplasma que ativa a caspase-9 que leva a célula à apoptose.¹⁸

O stress oxidativo pode ter causas naturais, como o exercício físico extremo ou processos de inflamação, mas pode também ter causas não naturais como a presença de xenobióticos no corpo ou de ambientes radioativos. De facto, a produção não controlada de radicais livres já foi apontada como uma possível causa de algumas doenças, tais como: alguns tipos de cancro, diabetes, cirrose, doenças cardiovasculares e desordens neurológicas, entre outras.^{12,19}

A exposição a radicais livres através de diversas formas levou a que o organismo desenvolvesse várias defesas para os eliminar. Qualquer excesso de ERO é continuamente inativado por antioxidantes endógenos (enzimáticos e não enzimáticos) e exógenos.^{12,20,21}

1.2. Antioxidantes

O conceito biológico de antioxidante refere-se a qualquer composto que é capaz de atrasar ou impedir a oxidação de substratos facilmente oxidáveis, tais como o ADN, as proteínas e os lípidos. Os antioxidantes reduzem o stress oxidativo, mutações no ADN bem como outros parâmetros associados ao dano celular. Estudos epidemiológicos provaram a capacidade de os antioxidantes conterem os efeitos da

atividade de ERO e diminuir a incidência de cancro, bem como outras doenças degenerativas. No entanto, um antioxidante que consegue neutralizar radicais livres normalmente torna-se uma espécie radicalar o que pode ser prejudicial.^{22,24}

A procura de antioxidantes naturais tem vindo a ganhar uma grande importância nos últimos anos uma vez que alguns antioxidantes sintéticos têm riscos para a saúde, principalmente danos hepáticos. No entanto, mesmo os antioxidantes naturais podem possuir alguma toxicidade. Assim, Bast e Haenen apresentaram algumas regras para serem seguidas na produção e pesquisa de antioxidantes naturais, tais como: (1) uma mudança na abordagem usada pela toxicologia clássica para avaliar aditivos e suplementos alimentares. Os fatores de segurança arbitrários que permitem a extrapolação dos resultados da pesquisa de ratos para humanos, não devem ser utilizados, (2) o conhecimento sobre a ação, toxicidade, biocinética e biotransformação dos ingredientes dos alimentos e medicamentos permitirão uma análise de risco/benefício mais precisa, (3) a modelagem biocinética/bioeficácia deve ser usada para ajudar na padronização de dosagens e (4) aumentar a precisão das análises de risco/benefício de todos os suplementos com alegações de saúde.^{24,25}

Os compostos fenólicos são a classe de antioxidantes naturais mais abundante. O potencial destes compostos como antioxidantes é reconhecido há muito tempo devido à sua grande capacidade de quebrar cadeias e eliminar os radicais, protegendo as células contra os efeitos prejudiciais das espécies reativas de oxigénio. A presença e disposição de múltiplos grupos hidroxilo na estrutura química dos polifenóis é importante para a sua capacidade antioxidante.²⁴

1.2.1. Aminoácidos e os seus derivados como antioxidantes

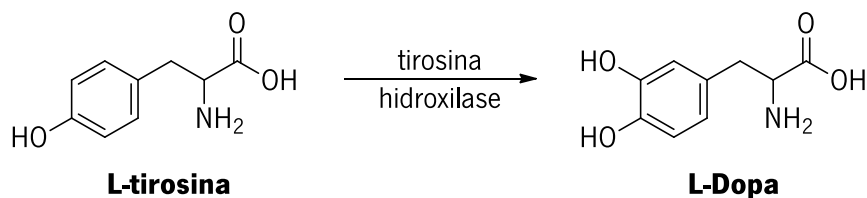
Aminoácidos fenólicos ou aminoácidos acoplados a grupos fenólicos ou catecólicos são substâncias bioativas envolvidas na supressão dos efeitos nefastos provocados pelo stress oxidativo, possuindo atividade biológica como anticancerígenos, antimicrobianos, anti-aterogénicos, entre outras. Estudos confirmam que a conjugação de aminoácidos com ácidos fenólicos é útil, não só para investigar a relação estrutura atividade, mas também pode constituir uma estratégia para melhorar a eficiência e bioatividade antioxidante.¹¹

1.2.2. Aminoácidos fenólicos

1.2.2.1. L-Tirosina e L-Dopa

Os fenóis naturais representam uma vasta classe de compostos que possuem uma interessante atividade biológica. Os compostos fenólicos são bastante estudados como antioxidantes, pois possuem uma estrutura estável após a eliminação dos radicais livres.²⁶

A L-tirosina é um dos aminoácidos fenólicos naturais que possui uma atividade antioxidante eficaz. É, também, o precursor inicial da biossíntese da L-Dopa, um precursor do neurotransmissor dopamina sendo por isso utilizado como medicamento para o alívio dos sintomas da doença de Parkinson. Um grupo hidroxilo adicional é introduzido no anel aromático da tirosina pela enzima tirosina hidroxilase (**esquema 1**).²³



Esquema 1. Formação da L-dopa a partir da L-tirosina

A L-tirosina e a L-Dopa provaram ser antioxidantes eficazes em diferentes ensaios *in vitro*, quando comparados com antioxidantes padrão, como o hidroxianisol butilado (BHA), o hidroxitolueno butilado (BHT) e o α -tocoferol. Destes ensaios pode destacar-se a peroxidação antilipídica, a determinação da capacidade redutora, a eliminação de radicais como o ABTS, o DPPH, o superperóxido e o peróxido de hidrogénio. Comparando a atividade antioxidante destes dois antioxidantes naturais, a L-Dopa é mais eficaz que a L-tirosina sendo possível perceber que a eliminação de radicais e a atividade antioxidante são controladas pelo número de grupos hidroxilo presentes.²³

1.2.2.2. *p*-Hidroxifenilglicina

A *p*-hidroxifenilglicina (HPG) é um aminoácido não proteínogénico encontrado em vários glicopeptídicos naturais, nomeadamente em alguns antibióticos, como no caso da vancomicina e seus derivados, em compostos antimicrobianos, como a ramoplanina, e em antibióticos cálcio-dependentes (CDA). Para a família dos antibióticos da vancomicina, o HPG tem um papel importante na estrutura e função da molécula final. No caso da vancomicina o HPG está presente no resíduo 4 e é oxidativamente reticulada com os anéis arilo das *L*-hidroxitirosinas nas posições 2 e 6, criando parte da estrutura rígida característica deste antibiótico (**figura 1**).²⁷

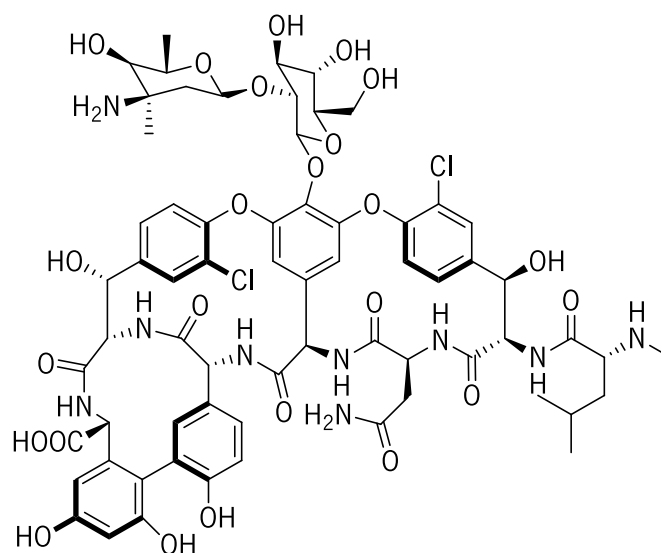
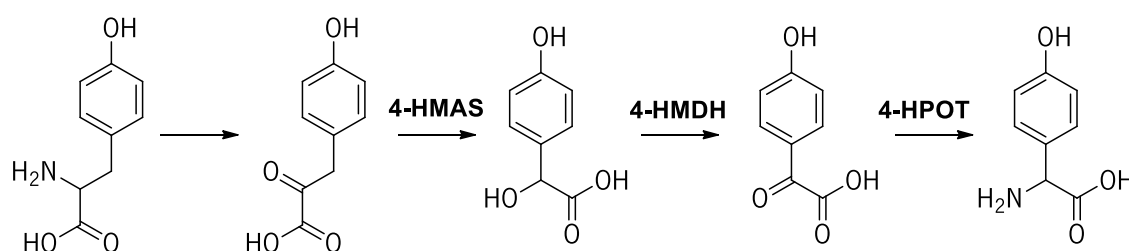


Figura 1. Estrutura química da Vancomicina

A natureza essencial deste aminoácido na estrutura central dos compostos da família da vancomicina sugere que o conhecimento da sua via biossintética é importante para a síntese de futuros compostos com potencial atividade antibiótica. A utilização de substratos marcados com ^{13}C , como $[^{13}\text{C}]$ tirosina ou $[^2\text{H},^{13}\text{C}]$ tirosina, provou que o HPG provém da tirosina (**esquema 2**).²⁷⁻²⁹



Esquema 2. Proposta de biossíntese da *p*-hidroxifenilglicina, onde 4-HMAS: 4-hidroxiandelato sintase; 4-HMDH: 4-hidroxiandelato desidrogenase e 4-HPOT: 4-hidroxiifenilglicoxalato transaminase (adaptado das referências 27 e 29)

1.2.2.3. 3,4-di-Hidroxifenilglicina

Catecóis são derivados de benzeno com dois grupos hidroxilo em posição orto sendo que muitos cumprem papéis bioquímicos essenciais e bem definidos. É o caso dos neurotransmissores de catecolamina, como a adrenalina e a noradrenalina. No entanto, os derivados de catecóis podem, também, ser encontrados como espécies ativas em diferentes ambientes, apresentando uma versatilidade química e físico-química que inspirou um crescente número de aplicações como materiais funcionais.³⁰

Os compostos catecólicos apresentam uma variedade de propriedades, tais como: a capacidade de estabelecer equilíbrios reversíveis em potenciais redox e pH moderados; reticulação irreversível através de mecanismos de oxidação complexos; excelentes propriedades quelantes; interação dos grupos hidroxilo vicinais com superfícies de natureza diferente. Apesar destas propriedades, tem-se dado pouca importância

a aminoácidos com a função *orto*-di-hidroxiarilo, como é o caso da 3,4-di-hidroxiifenilglicina (3,4-DHPG).¹¹ Este aminoácido não natural, tem sido estudado como ligando de cobre.³¹

A 3,4-DHPG tem sido estudada como ligando de cobre. A estereoquímica tem uma grande influência na identificação e força de complexos e complexos poliméricos formados por espécies que possuem uma quelação simultânea em ambos os locais do ligante. Estes efeitos são visíveis na comparação dos esquemas de polimerização da 3,4-DHPG e da L-β-(3,4-di-hidroxiifenil)alanina (DOPA). Estes dois ligandos são muito similares, mas o primeiro possui uma cadeia lateral mais curta, menos um grupo CH₂, sendo por isso uma molécula menos flexível que leva a reações de polimerização diferentes (**figura 2**).³¹

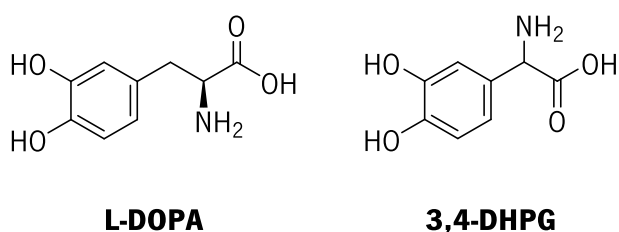


Figura 2. Estrutura química da L-β-(3,4-di-hidroxiifenil)alanina (L-DOPA) e da 3,4-di-hidroxiifenilglicina (3,4-DHPG)

Em comparação com a polimerização do sistema Dopa-cobre consegue-se perceber que para o 3,4-DHPG não ocorre dimerização fechada, esta diferença é atribuída à baixa flexibilidade da cadeia lateral desta catecolamina. Horton *et al.* propuseram a estrutura química mais provável, do polímero com maior ordem formado pelo tetrâmero DHPG-Cu (II) (**figura 3**).³¹

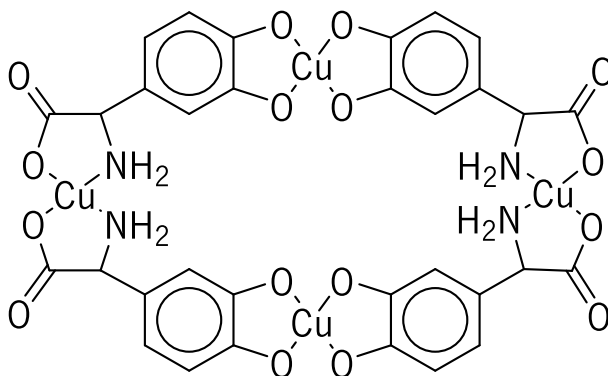
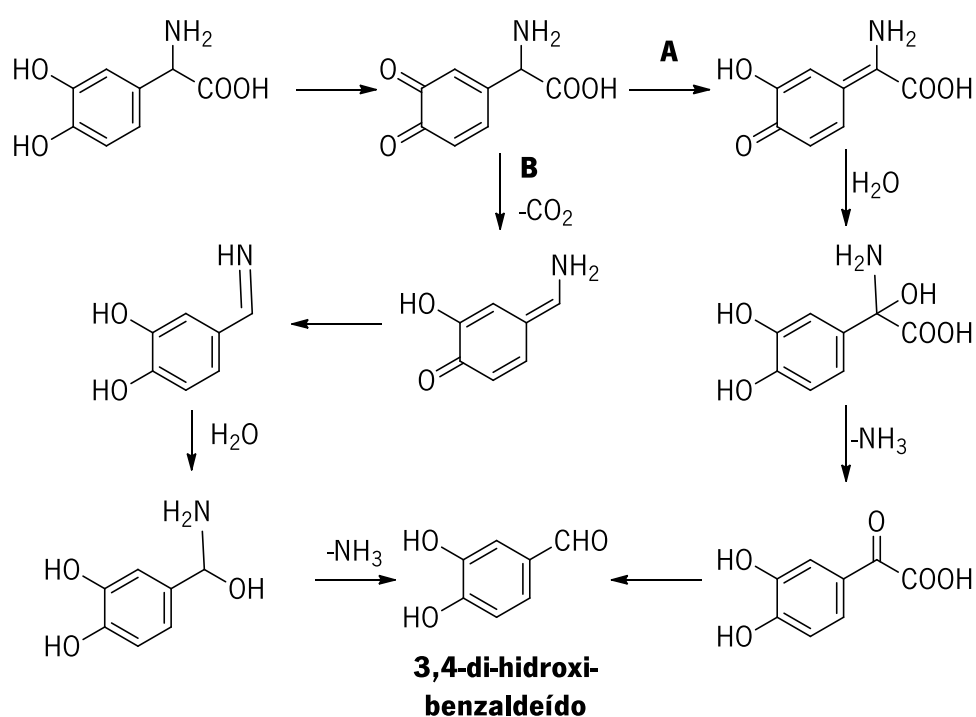


Figura 3. Estrutura química, provável, do tetrâmero DHPG-Cu (II) (retirado da referência 31)

Para além de ser estudado como um ligando de cobre, a 3,4-DHPG tem sido estudada como um substrato para a tirosinase.³² A tirosinase é uma enzima que contém cobre, esta catalisa a hidroxilquelação de monofenóis em *orto*-difenois e a oxidação destes em *orto*-quinonas usando oxigénio molecular.³³

O modelo enzimático mais utilizado é a tirosinase do cogumelo que oxida uma série de compostos

mono e difenólicos.³³ A oxidação enzimática da 3,4-DHPG foi seguida por espectrometria de UV/visível a diferentes valores de pH e por HPLC que mostraram a oxidação da DHPG na quinona correspondente, glicil-*orto*-benzo quinona. A partir destes testes foi, também, possível identificar o produto maioritário final formado a partir da oxidação enzimática da 3,4-DHPG, sendo este o 3,4-di-hidroxi-benzaldeído. A formação da quinona é o primeiro passo do processo oxidativo, no entanto, a sua instabilidade leva-a a sofrer duas transformações químicas não enzimáticas diferentes para dar origem ao benzaldeído final. A primeira (via **A**) consiste na tautomerização da quinona em metileno quinona, este por sua vez sofre uma adição 1,6 de Michael de água formando um hemiaminal instável que por perda de amoníaco gera o ácido 3,4-di-hidroxi-benzoilfórmico. Por fim, este último composto sofre uma descarboxilação enzimática que leva ao produto final 3,4-di-hidroxi-benzaldeído. A segunda (via **B**) consiste, inicialmente, numa descarboxilação não enzimática no qual o produto formado rapidamente reage com água para gerar o hemiaminal. Uma eliminação espontânea do amoníaco do hemiaminal, leva a formação do benzaldeído final (**esquema 3**).³²



Esquema 3. Mecanismo proposto por Sugumaran *et al.* para a conversão da 3,4-DHPG em 3,4-di-hidroxi-benzaldeído (adaptado da referência 32)

1.2.3. 2,6-Dimetiltirosina

O aminoácido 2,6-dimetil-L-tirosina (Dmt) (**figura 4**) possui propriedades antioxidantes uma vez que a metilação do anel fenólico potencia a eliminação de radicais livres com a formação de radicais de tirosila não reativos. Estes podem depois acoplar para formar ditirosina ou serem eliminados pela glutatona e/ou pelo ascorbato.⁵ O uso cada vez mais comum deste aminoácido não natural na síntese

peptídica tornou este composto importante em Química Medicinal.³⁴

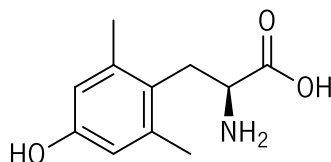


Figura 4. Estrutura química da 2,6-dimetil-L-tirosina (Dmt)

O Dmt é bastante utilizado na síntese de péptidos opióides e de outras pequenas moléculas. Normalmente, os ligantes opióides contendo Dmt em vez da tirosina no terminal amina exibem uma maior afinidade para os recetores μ -opióides. Muitos ligantes contendo Dmt relatados na literatura são analgésicos potentes e eficazes em modelos de dor pré-clínicos. Além disso, foi recentemente demonstrado que pequenos péptidos contendo um resíduo de Dmt podem ser absorvidos pelas células e ajudam a atenuar o stress oxidativo. Outros estudos com péptidos contendo este aminoácido também destacaram as propriedades antioxidantes da Dmt.³⁴

1.2.4. α,β -Desidroaminoácidos

α,β -Desidroaminoácidos são aminoácidos caracterizados pela ligação dupla carbono-carbono localizada entre o carbono α da cadeia principal e o carbono β da cadeia lateral (**figura 5**).³⁵

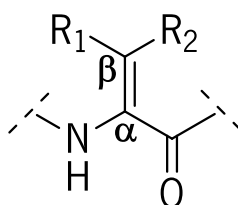


Figura 5. Estrutura química geral de um resíduo de α,β -desidroaminoácido (adaptado da referência 35)

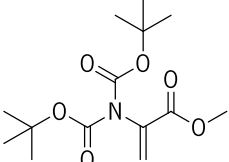
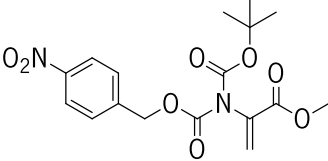
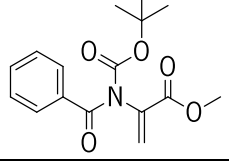
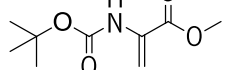
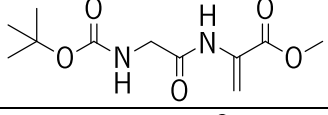
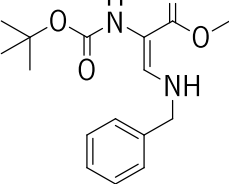
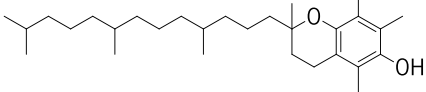
Os desidroaminoácidos não fazem parte dos 20 aminoácidos proteínogénicos encontrados na natureza, mas podem ser encontrados em toxinas e antibióticos. Estes possuem um papel importante na biossíntese de outros aminoácidos não proteínogénicos e de D-aminoácidos. Também apresentam um papel importante no local ativo de algumas enzimas que mostram atividade antioxidante.^{26,35-37}

De uma forma geral, a presença de um ou mais α,β -desidroaminoácidos numa cadeia peptídica tem um impacto grande, não só na conformação final adotada pelo péptido como no seu comportamento biológico, incluindo antibacteriano, antifúngico e antitumoral.^{26,36}

Ferreira *et al.* realizaram um estudo *in vitro* para comparar o efeito de 14 derivados da desidroalanina e do α -tocoferol na peroxidação lipídica no fígado de ratos (**tabela 1**). O α -tocoferol é o antioxidante lipossolúvel mais importante protegendo as membranas celulares da oxidação reagindo com

os radicais lipídicos produzidos na reação em cadeia da peroxidação lipídica. O α -tocoferol remove os intermediários de radicais livres e impede que a reação de oxidação continue.²⁰

Tabela 1. Efeito anti peroxidação lipídica de alguns compostos *N*-desidroaminoácidos e do α -tocoferol (adaptado da referência 20)

Compostos	Estrutura Química	Concentrações (mM)	% inibição
1		0,1	42±1,5
		1	78±0,3
2		0,1	47±1,5
		1	77±0,7
4		0,1	PE
		1	75±2,2
5		0,1	PE
		1	40±0,8
9		0,1	40±1,9
		1	75±1,4
12		0,1	PE
		1	78±1,7
α-tocoferol		0,1	33±1,4
		1	53±2,0

PE: efeito pro-oxidante

A uma concentração de 1mM os compostos estudados inibem a peroxidação lipídica entre os 70-79% com exceção do composto **5**, no entanto todos apresentam uma atividade superior à do α -tocoferol. A uma concentração de 0,1mM os compostos mais ativos foram **1**, **2** e **9**, pois apresentam uma atividade maior que o α -tocoferol. Os compostos **4**, **5** e **12** a uma concentração de 0,1mM tem um efeito de pro-oxidante, ou seja, induzem stress oxidativo criando espécies reativas de oxigênio ou inibindo sistemas antioxidantes.²⁰

Estes resultados demonstram que moléculas como os desidroaminoácidos, que são aceitadores de Michael reativos, podem ser ativos, in vitro, contra os oxidantes. Os derivados de desidroalanina e de *N*-acil

desidroalanina são capazes de eliminar radicais OH· mas não radicais 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) ou superóxido.²⁰

A combinação de porções fenólicas ou catecólicas com desidroaminoácidos pode ser uma abordagem valiosa para o desenvolvimento de novos compostos biologicamente ativos.³⁶

1.2.5. Ácidos fenólicos acoplados com aminoácidos proteínogénicos

Aminoácidos acoplados a grupos fenólicos ou catecólicos são substâncias bioativas envolvidas na supressão de efeitos nocivos do stress oxidativo³⁸⁻⁴¹ e possuem atividade biológica anticancerígena⁴², antimicrobiana⁴³⁻⁴⁶ e anti-aterogénicos⁴⁷. Estudos confirmaram que a conjugação entre diferentes tipos de compostos como aminoácidos e ácidos fenólicos é útil, não só para investigar relações de estrutura-atividade como pode constituir uma estratégia para melhorar a eficiência antioxidante e a bioatividade.^{48,49}

Silvia *et al.* propuseram a síntese de um novo conjunto de combinações moleculares entre ácidos fenólicos, aminoácidos e dopamina. O objetivo era investigar a influência de diferentes fragmentos fenólicos, em particular o ácido cafeico e o ácido 3,4-di-hidroxifenilacético, na atividade antioxidante das moléculas resultantes e, desta forma, melhorar a atividade antioxidante dos aminoácidos naturais. Foram sintetizados uma série de derivados da cisteína, da tirosina e da metionina, uma vez que estes aminoácidos possuem atividade antioxidante conhecida. Foi demonstrado que para os compostos terem uma atividade antioxidante significativa, a molécula tem de ter, no mínimo, dois grupos hidroxilo no anel aromático assim como um espaçador (-CH=CH-) entre o grupo carboxílico e o anel aromático (**figura 6**).⁴⁹

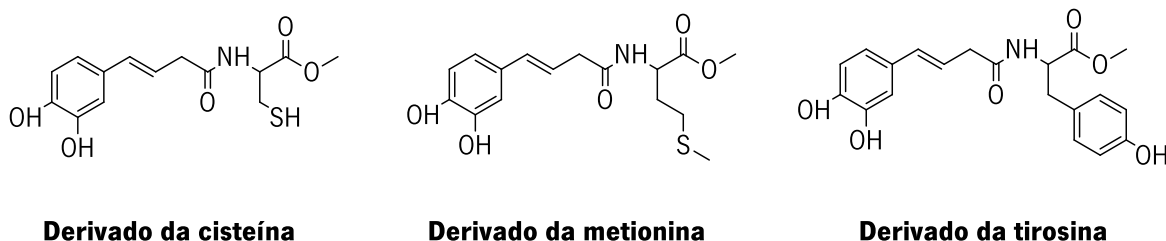


Figura 6. Estrutura química dos compostos com maior capacidade antioxidante (adaptado da referência 49)

A avaliação da capacidade de eliminação de radicais por parte dos derivados de ácido cafeico ou ácido 3,4-hidroxifenilacético com os três aminoácidos selecionados permitiu perceber que a presença do grupo sulfurado, em particular o grupo tiol da cisteína, resulta numa melhor escolha para a obtenção de moléculas com alta capacidade antioxidante. A conjugação da dopamina com alguns destes derivados fenólicos não mostrou nenhuma melhoria significativa na sua atividade antioxidante.⁴⁹ Estes resultados confirmam que o acoplamento de diferentes compostos melhora a eficiência antioxidante dos antioxidantes naturais.

1.2.6. Ácidos fenólicos acoplados com desidroaminoácidos

O acoplamento de desidroaminoácidos, que já possuem à partida propriedades antioxidantes, com porções fenólicas ou catecólicas pode ser uma abordagem valiosa para o desenvolvimento de novos compostos com atividade antioxidante incrementada ou com outras propriedades biológicas nomeadamente como anticancerígenos.³⁶

Monteiro *et al.*³⁶ estudaram o efeito da conjugação de desidroaminoácido com ácidos fenólicos ou catecólicos. Para tal desenvolveram uma estratégia inovadora para a síntese de uma série de derivados da desidroalanina e da desidrofenilalanina *N*-fenólicos ou *N*-catecólicos a partir de ésteres metílicos *N*-fenólicos ou *N*-catecólicos da serina ou da fenilserina, respetivamente (**figura 7**).

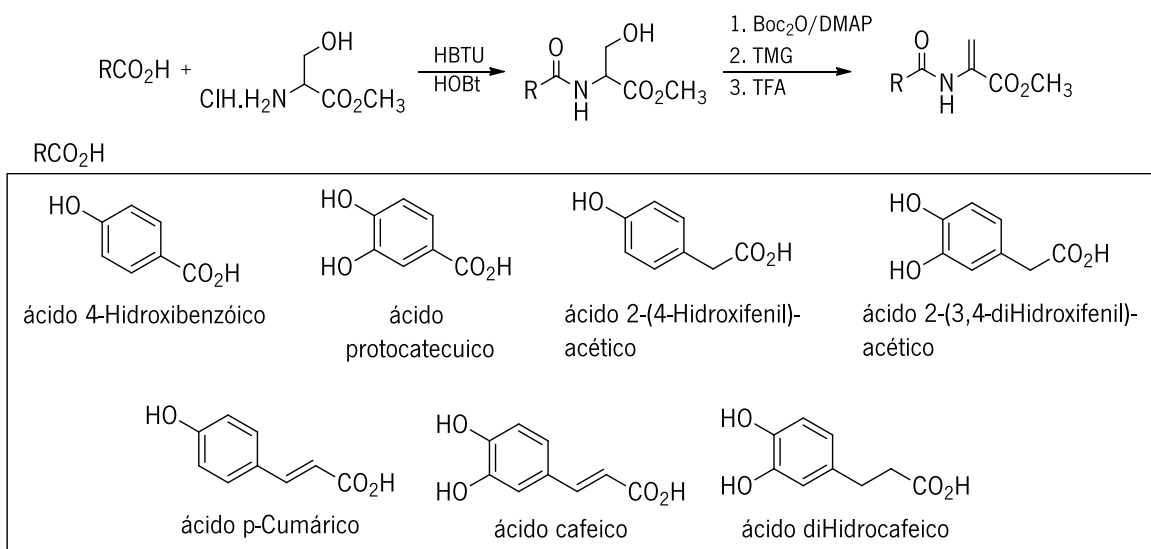


Figura 7. Ésteres metílicos de *N*-hidroxifenil e *N*-catecol desidroalanina (retirado da referência 36)

A toxicidade dos derivados de desidroalanina e desidrofenilalanina foi avaliada recorrendo a culturas celulares cancerígenas e não cancerígenas. Ensaios preliminares de toxicidade em culturas celulares de cancro gástrico (AGS) e cancro pulmonar (A549) mostraram que as moléculas mais potentes são as derivadas de desidrofenilalanina, o que pode ser atribuído à sua maior lipossolubilidade. Ensaios destes compostos em relação à viabilidade celular de uma cultura celular não cancerígena mostrou que as moléculas exibem baixa ou nenhuma toxicidade, dentro da gama de concentrações estudadas (até 25 mM). Desta forma, a toxicidade destes derivados foi maior em relação a células cancerígenas do que a células não cancerígenas.³⁶

1.3. Péptidos de penetração celular

1.3.1. Definição de péptidos de penetração celular (CPPs)

A membrana plasmática é uma barreira que protege a célula do influxo não regulado de moléculas bioativas e iões, regulando desta forma a estabilidade do seu ambiente interno. A maioria dos fármacos precisa atravessar uma ou mais membranas celulares para atingir os seus alvos e assim ter efeito terapêutico. Pequenas moléculas são capazes de penetrar a membrana, no entanto moléculas maiores, devido às suas propriedades físico-químicas, não o conseguem fazer.⁵ A capacidade de transportar macromoléculas para dentro das células é importante tanto na administração de medicamentos como em aplicações biotecnológicas (terapia genética).⁵⁰

Nas últimas décadas, novos agentes bioterapêuticos, como péptidos e proteínas, têm contribuído para o tratamento de várias doenças. Um destes casos têm sido os chamados péptidos de penetração celular (CPPs na sigla inglesa). Os péptidos de penetração celular são péptidos curtos (até 30 aminoácidos) e não tóxicos com propriedades catiónicas e/ou anfipáticas.^{6,51,52} Os CPPs abriram uma nova via para a entrega de uma grande variedade de cargas bioativas – de proteínas a moléculas terapêuticas – através da membrana celular, devido a sua alta eficiência de transdução (eficiência na internalização de CPPs na membrana celular) e baixa citotoxicidade.^{5,6,53,54}

Embora tenham sido realizados diversos estudos sobre CPPs, o mecanismo pelo qual eles penetram na célula ainda não está completamente esclarecido.⁵⁵ Sugere-se que a entrada de CPPs na célula pode ser influenciada por vários fatores, como as propriedades da molécula, nomeadamente, comprimento da molécula, deslocalização da carga, hidrofobicidade, a concentração do CPP e a natureza da carga bioativa a ser transportada (tamanho e carga).⁵⁶

Dois mecanismos foram propostos para a entrada dos CPPs na célula: translocação direta através da membrana celular e por via endocítica.⁵⁷ A translocação direta envolve a desestabilização da membrana plasmática independentemente da energia e temperatura.⁵⁸ Alguns modelos foram propostos para explicar a translocação direta de CPPs através da bicamada lipídica, incluindo a formação de micelas invertidas⁵⁹, formação de poros⁶⁰, translocação adaptativa⁶¹ e o modelo tipo carpete⁶² (**figura 8**).

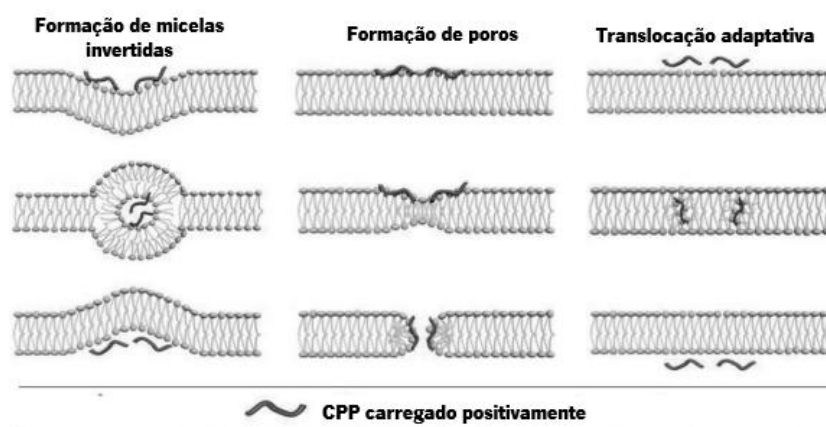


Figura 8. . Alguns métodos propostos para a translocação direta de CPPs com carga positiva. (adaptado da referência 58)

O primeiro passo em todos estes mecanismos consiste na interação dos CPPs carregados positivamente com componentes carregados negativamente da membrana, como alguns fosfolípidos da bicamada lipídica. Além da interação dos CPPs positivos com a camada lipídica negativa, no modelo da formação de micelas invertidas ocorre também a interação entre resíduos hidrofóbicos, como o triptofano e a parte hidrofóbica da membrana. O modelo de formação de poros consiste no modelo toroidal, onde os lípidos dobram-se de forma a que o CPP esteja sempre próximo da cabeça lipídica, assim tanto os CPPs como os fosfolípidos formam o poro. Neste modelo os poros apenas se formam quando a concentração de CPPs é superior a uma certa concentração limiar, sendo que esta concentração varia dependendo do CPP. No modelo de translocação adaptativa a interação entre os péptidos ricos em guanidinas e o grupo fosfato presente nas cabeças hidrofílicas dos lípidos mascara a carga peptídica, atenuando a sua polaridade e desta forma o CPP consegue difundir através da membrana celular.⁵⁸ No modelo tipo tapete, os CPPs ligam-se inicialmente à superfície da membrana celular cobrindo-a de forma semelhante a um tapete, após uma elevada concentração de CPPs ocorre a rutura da membrana (**figura 9**).⁶³

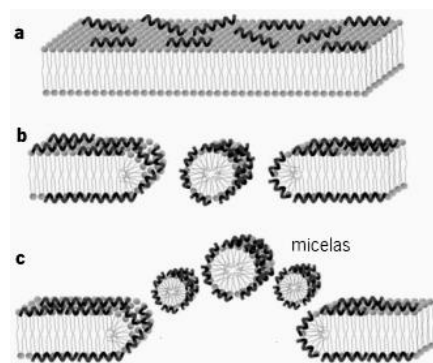


Figura 9. Modelo tipo tapete (retirado da referência 63)

A endocitose consiste na captação de material extracelular através do encapsulamento em vesículas designadas de endossomas. Assim, a libertação endossómica pode limitar a eficiência dos CPPs em atingirem alvos intracelulares, pois os CPPs podem não chegar a ser libertados para o citosol.^{55,64}

1.3.2. Classificação dos CPPs

Existem dois tipos de CPPs que têm sido usados para atravessar a membrana celular: (i) CPPs catiónicos, constituídos por cadeias curtas com vários resíduos de aminoácidos como a arginina, lisina e histidina. Os aminoácidos indicados fornecem carga positiva aos péptidos e permitem a sua interação com estruturas aniónicas, presentes na membrana plasmática, através de um mecanismo independente do recetor; (ii) péptidos anfipáticos, que contêm zonas lipofílicas e hidrofílicas responsáveis por um mecanismo de translocação direta de péptidos através da membrana celular.⁵²

Após 25 anos de investigação na área dos CPPs, centenas de sequências foram descritas. Dependendo da área de aplicação futura dos CPPs, os investigadores podem escolher entre várias características. Consequentemente, é útil ter um sistema de classificação como o mostrado na **figura 10**.⁶⁵

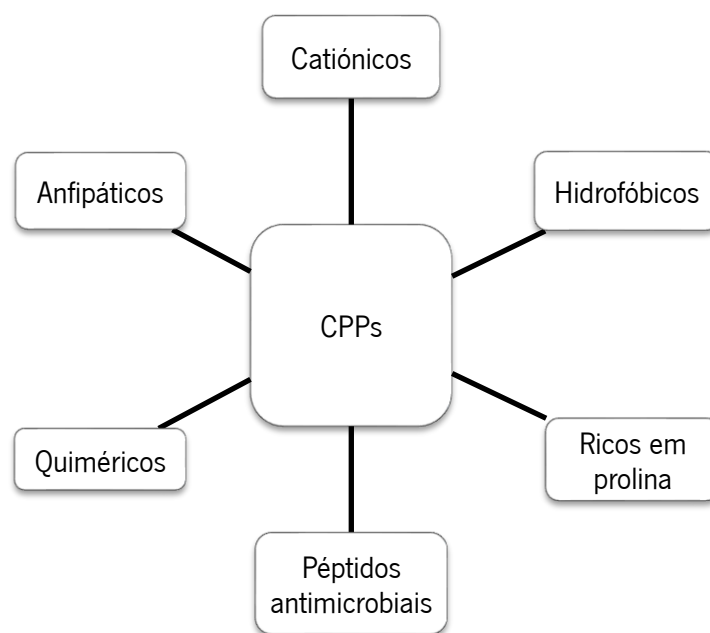


Figura 10. Classificação dos CPPs (adaptado da referência 65)

Até ao momento são conhecidos mais de 800 CPPs com origens e características diferentes.⁶⁶ A maioria dos CPPs tem uma carga positiva (83%), os CPPs aniônicos não formam uma classe própria e são atribuídos a outras classes: hidrofóbicos e anfipáticos. Os CPPs anfipáticos, que englobam os catiônicos e aniônicos, formam a maior classe (44%) ao passo que apenas 15% dos CPPs são classificados como hidrofóbicos.⁶⁷ Existem outros três subgrupos adicionais a ser considerados: CPPs com origem quimérica, CPPs anfipáticos ricos em prolina ou poliprolina e CPPs que mostram ter alguma atividade antimicrobiana.⁶⁵

1.3.2.1. CPPs catiônicos

Os péptidos catiônicos são uma classe de péptidos que contêm uma carga positiva elevada.^{66,68} Vários estudos sugeriram que são necessárias pelo menos oito cargas positivas para haver uma penetração eficiente destes compostos na membrana.⁶⁷

O primeiro CPP descoberto era do tipo catiônico, sendo um derivado da proteína Tat (RKKRRQRRR) do vírus HIV-1.⁶⁷⁻⁶⁹ A maioria dos péptidos catiônicos são sequências peptídicas que ocorrem naturalmente. Recentemente vários péptidos catiônicos artificiais foram desenvolvidos, incluindo homopolímeros de arginina e lisina.⁶⁸ Estudos sobre péptidos à base de arginina (de R3 a R12) mostraram que a sequência

mínima necessária para a captação celular é de seis argininas e que o aumento do número de argininas aumenta a eficiência de penetração na célula.⁷⁰ Em comparação, o aumento do número de resíduos de lisinas reduziu a captação de CPPs de polilisinas.⁷¹

Um caso especial de CPPs catiónicos são sequências de localização nuclear (NLSs na sigla inglesa). NLSs são péptidos curtos ricos em resíduos de lisina, arginina e prolina que podem ser transportados para o núcleo através do complexo de poros nucleares.⁶⁷ Como o número de cargas na maioria dos NLSs é inferior a oito, a maioria dos NLSs não são bons CPPs⁷², no entanto podem ser conjugados covalentemente a uma sequência peptídica hidrofóbica para obter um CPP anfipático com um bom perfil de absorção.⁶⁷

1.3.2.2. CPPs hidrofóbicos

A classe dos CPPs hidrofóbicos tem o menor número de representantes entre todos os CPPs. Estes CPPs contêm apenas aminoácidos apolares ou muito poucos aminoácidos carregados, tipicamente catiónicos.⁶⁹ Até ao momento, apenas alguns CPPs hidrofóbicos foram descobertos, incluindo os derivados da sequência de sinalização da proteína integrina beta 3 (VTVLALGALAGVGVG) e o fator de crescimento fibroblasto de Kaposi.⁷³

1.3.2.3. CPPs anfipáticos

Os CPPs anfipáticos e outros CPPs quiméricos de cadeias longas são compostos por aminoácidos hidrofóbicos e possuem adicionalmente resíduos catiónicos que aumentam a permeabilidade da membrana.⁷⁴

As moléculas anfipáticas possuem duas faces diferentes, que nos CPPs são uma área com carga positiva e/ou hidrofílica e uma região hidrofóbica. A classe anfipática dos CPPs é a mais numerosa, contendo 40% dos CPPs conhecidos até ao momento, contendo também péptidos com carga global negativa.^{67,69} Os CPPs anfipáticos podem ser ainda divididos em péptidos anfipáticos primários e secundários com base na sua sequência, comprimento e associação com lípidos.⁷⁵ No entanto, esta divisão não é muito rigorosa por isso diferentes autores podem atribuir alguns CPPs a diferentes grupos tendo em conta os efeitos biológicos e considerações estruturais.⁶⁹

Os CPPs anfipáticos primários são geralmente mais longos que os CPPs catiónicos, contendo vinte aminoácidos ou mais. Eles associam-se fortemente aos fosfolípidos neutros e aniónicos da membrana e são suficientemente longos para abranger o núcleo hidrofóbico das membranas, podendo inserir-se nestas e induzir rearranjos nos lípidos e distúrbios na organização da membrana. Embora os CPPs anfipáticos sejam maioritariamente quiméricos ou sintéticos, algumas sequências são derivadas de proteínas.⁶⁹

Os CPPs anfipáticos secundários não são estruturados quando estão em solução e só adquirem caráter anfipático quando alteram a sua estrutura secundária para α -hélice ou folha beta após a interação com fosfolípidos carregados negativamente presentes na membrana ou com glicoglicanos.⁷⁶

1.3.2.4. Péptidos ricos em prolina

A prolina (**figura 11**) possui um anel de pirrolidina na sua cadeia lateral que induz uma rigidez conformacional quando está presente num esqueleto peptídico. Apesar do seu caráter hidrofóbico, os péptidos ricos em prolina têm a grande vantagem de serem solúveis em água e em diferentes solventes orgânicos.⁷⁷

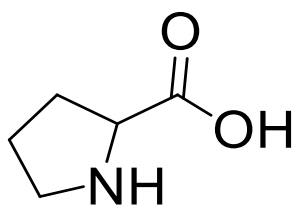


Figura 11. Estrutura química da prolina

Vários trabalhos mostraram que alguns péptidos ricos em prolina podem ser considerados CPPs, uma vez que penetram em células eucarióticas.⁷⁸ Entre as CPPs ricas em prolina mais estudadas até ao momento, é possível distinguir duas categorias dependendo se os aminoácidos presentes na sequência peptídica são ou não naturais.⁶⁶

1.3.3. Métodos de conjugação de moléculas bioativas com CPPs

Os CPPs têm sido utilizados para a entrega de inúmeras classes de moléculas, incluindo DNA, proteínas, fármacos e nanopartículas, muitas das quais são por vezes maiores que o próprio CPP.⁷⁹ No entanto, ainda não foi determinado se o acoplamento de um CPP a uma molécula, de tamanho considerável, interfere no mecanismo de translocação.⁸⁰

A conjugação de cargas bioativas a um CPP pode ocorrer de duas maneiras: i) conjugação covalente, onde as moléculas bioativas se ligam ao CPP através de uma ligação covalente, e ii) através de uma interação eletrostática, na qual se formam agregados ou nanopartículas.^{6,81} Estes diferentes processos de conjugação envolvem uma via sintética diferente e podem ter impacto na via de administração, no mecanismo de entrada na célula, na distribuição no interior da célula e noutros efeitos diferentes a nível celular. Além disso, com base na utilização terapêutica e na natureza do alvo, no qual o fármaco atua, a escolha da forma de conjugação desempenha um papel muito importante.⁸²

A maioria dos conjugados CPP-carga sintetizados até ao momento, em particular os que incluem

fármacos de pequena dimensão, são caracterizados por ligações covalentes estáveis e cliváveis. Este método de conjugação pode ou não empregar moléculas de ligação, desta forma as ligações dissulfeto, tioéter ou amida são frequentemente utilizadas para conectar fármacos de pequenas dimensões a CPPs⁸³ sendo, também, utilizadas para acoplar proteínas e péptidos, ácidos nucleicos e oligonucleotídeos de morfolino.⁸⁴

Os métodos de ligação covalente são, por vezes, limitados devido à possibilidade da ligação covalente entre o CPP e a carga bioativa poder alterar a atividade biológica da carga. Esta é a razão pela qual muitos sistemas são frequentemente planeados como complexos não-covalentes onde a carga e o CPP são independentes, mas ao mesmo tempo estão conectados.⁸² De facto, vários tipos de cargas bioativas foram transportados com sucesso pelos CPPs para as células através de complexos não covalentes aproveitando as interações eletrostáticas e por ligações por pontes de hidrogénio entre pares de nucleobases específicas (os ácidos nucleicos com carga negativa podem ser complexados por interação eletrostática com CPPs carregados positivamente, formando um complexo estável).⁸⁵

Outra possibilidade de conjugação é por interações biotina-avidina. A capacidade de entrega celular de vários CPPs foi comprovada com recurso a complexos de péptidos biotinilados com avidina ou streptavidina, sendo que a avidina poderá servir como andaime para a montagem de moléculas a serem entregues nas células usando CPPs biotinilados para facilitar o processo de absorção e interações mistas.⁸⁵ Atualmente, este método é frequentemente utilizado com CPPs aplicados na terapia genética.⁸⁶

1.3.4. Conjugados de moléculas bioativas com CPPs

Devido à sua capacidade única de transportar várias cargas com baixa toxicidade para dentro das células, os péptidos de penetração celular são hoje considerados uma ferramenta poderosa em biologia fundamental e para aplicações médicas.⁵¹ Conjugados de moléculas bioativas com CPPs podem, por exemplo: fornecer agentes de contraste para imagens de células; transportar péptidos e proteínas; mediar a entrega de fármacos que vão desde nanopartículas a proteínas terapêuticas.^{6,51} No geral, a eficiência de entrega dos CPPs pode depender de vários parâmetros, tais como o tamanho do complexo carga-CPP, natureza do CPP ou o tipo de sequência peptídica.⁶ O sucesso dos CPPs não vem apenas do excelente desempenho de entrega celular, mas também devido a sua versatilidade: são simples de sintetizar, modificar e melhorar.⁵¹

Péptidos, proteínas, oligonucleotídeos e outras moléculas ativas intracelularmente sem propriedades de translocação celular são frequentemente conjugados a CPPs de forma a melhorar a sua internalização.⁸⁷ Mais de 25 conjugados CPP-fármaco estão em desenvolvimento clínico com aplicações diversas, tais como inflamação^{88,89}, dor⁹⁰⁻⁹², cancro⁹³, doenças cardíacas⁹⁴⁻⁹⁶ e envelhecimento⁹⁷. O primeiro

conjugado de CPP em estudos clínicos, ciclosporina-octaarginine (PsorBan® da CellGate Inc.), foi utilizado para o tratamento da psoríase através da administração transdérmica de ciclosporina A.⁹⁸ Na fase II dos estudos clínicos, o PsorBan® penetrou na pele e manteve a sua atividade biológica, apresentando potencial benéfico em pacientes com psoríase leve e moderada. No entanto, a libertação do fármaco livre não era rápida o suficiente para competir com o clearance, então os estudos clínicos foram interrompidos em 2003.⁹⁹ Muitos outros conjugados foram desenvolvidos e podem ser visualizados na tabela 2.

Tabela 2. Desenvolvimento clínico de alguns conjugados CPP-agente terapêutico (adaptada das referências 98 e 51)

Composto	CPP	Agente terapêutico	Aplicação	Fase clínica	Corporação
AZX-100	PTD4 (YARAAARQARA)	Proteína de choque térmico 20 (HP20)	Prevenção e redução de cicatrizes	Fase II completa em 2012	Capstone Therapeutics
DTS-108	Vectocell®	SN38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina)	Cancro	Pré-clínica	Diatos SA and Drais Pharmaceuticals
XG-102	TAT	JNK quinase	Inflamação	Fase I completa em 2012	Xigen
AM11	TAT	Inibidor da JNK quinase	Perda auditiva	Fase II completa em 2013	Auris Medical and Xigen
R-002	MTS (KGEAAVLLPVLLAAPG)	Toxina botulínica	Distonia cervical	Fase II completa em 2018	Revanche Therapeutics

As propriedades únicas e as várias aplicações dos CPPs tornaram este grupo de compostos um dos mais amplamente estudados nos últimos 25 anos. As propriedades penetrantes dos CPPs aumentam a eficácia da entrega de fármacos hidrofílicos e material genético em vários tipos de células (incluindo células cerebrais) *in vivo*. Isto pode levar a avanços no tratamento de doenças para as quais não existe tratamento eficaz, devido às dificuldades no sistema de administração. No entanto, antes que os CPPs possam ser usados como transportadores de fármacos, os mecanismos pelo qual penetram nas células, a sua eficiência, seletividade, custo da síntese de complexos CPP-carga e a sua toxicidade, devem ser avaliados cuidadosamente, pois apesar do enorme progresso na conceção e síntese de novos fármacos, a maioria deles ainda não é satisfatoriamente eficaz *in vivo*.¹⁰⁰

1.4. A mitocôndria

A mitocôndria é um organelo citoplasmático que regula o metabolismo da célula. Este organelo está envolvido no metabolismo oxidativo energético através do catabolismo dos nutrientes, síntese do ATP pela fosforilação oxidativa e produção de calor.³

Estruturalmente a mitocôndria é constituída por dois componentes diferentes: a matriz mitocondrial interior e o espaço intermembranar, tendo uma membrana mitocondrial interna que os separa. O espaço intermembranar é limitado pela membrana mitocondrial externa, que desempenha o papel de transporte e transdução de sinal entre o organelo e o citosol.¹⁰¹

A mitocôndria é uma importante fonte geradora de espécies reativas de oxigénio e espécies reativas de nitrogénio (**figura 12**). A produção de EROs contribui para danos mitocondriais ligados a doenças degenerativas, tais como as doenças de Alzheimer, de Parkinson, a morte neural e o cancro.^{3,18,102,103} Em 1966 houve o primeiro relato de que a cadeia respiratória produz ERO, seguido do trabalho de Chance e colegas que provaram que mitocôndrias isoladas produzem peróxido de hidrogénio, H_2O_2 . Mais tarde confirmou-se que este H_2O_2 provem da dismutação do superperóxido ($O_2^{\cdot-}$) gerado nas mitocôndrias.¹⁰³

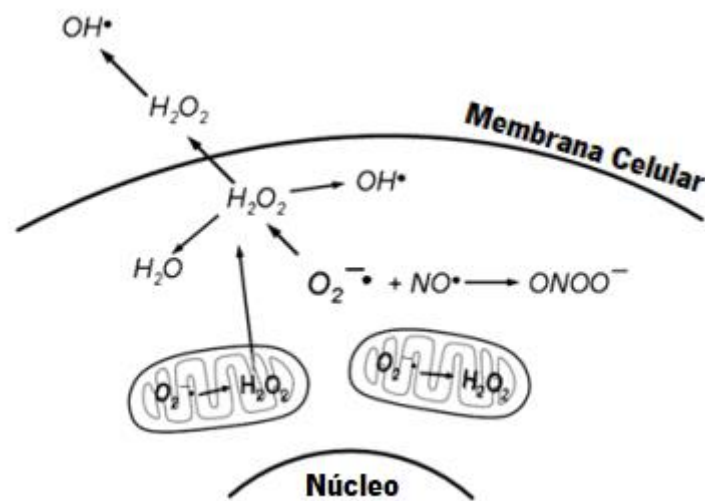


Figura 12. Produção de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio na mitocôndria (imagem retirada da referência 3)

A mitocôndria possui um método natural para eliminar as ERO de forma a manter a célula viva. Em condições normais o efeito das ERO é anulado pelos antioxidantes, quando este equilíbrio é quebrado e o efeito das ERO é mais potente que o poder antioxidante sobre elas ocorre dano na mitocôndria. A este dano dá-se o nome de stress oxidativo.³

1.5. Antioxidantes direcionados para a mitocôndria

Desde o início do século foram reportadas várias estratégias para direcionar antioxidantes para a

mitocôndria. Algumas destas estratégias incluem um direcionamento baseado (1) no potencial eletroquímico da mitocôndria, (2) na ligação a componentes presentes na membrana mitocondrial, (3) na presença de enzimas, exclusivas da mitocôndria, que catalisam a libertação de fármacos a partir de pró-fármacos e (4) no transporte dependente de fármacos e pró-fármacos.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶

Moléculas antioxidantes podem ser ligadas covalentemente a cátions lipídicos que se acumulam nas mitocôndrias como resultado do potencial da membrana mitocondrial. O MitoQ (**figura 13**) consiste na ligação do antioxidante ubiquinona, também conhecido como coenzima 10, ao cátion lipofílico trifenilfosfônio (TPP).¹⁰⁷

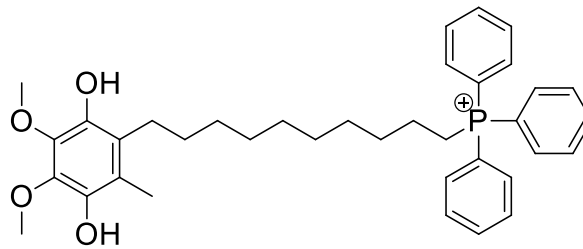


Figura 13. Estrutura química do MitoQ (adaptado da referência 107)

A carga negativa presente no interior da membrana mitocondrial resulta na acumulação de MitoQ no interior da mitocôndria de cerca de 500 vezes os níveis presentes no citoplasma.¹⁰⁷ A cadeia lateral do MitoQ permite-lhe penetrar profundamente no núcleo da membrana. Desta forma, assim que o MitoQ entra na mitocôndria é absorvido pela membrana interna da mitocôndria e é reciclado num ubiquinol ativo pela cadeia respiratória. Testes em mitocôndrias isoladas, permitiu verificar a eficácia do MitoQ contra a peroxidação lipídica.¹⁰⁸ Outros compostos foram, também, conjugados com o TPP, tais como tocoferol (vitamina E) gerando o MitoVitE e o composto Ebselen que forma o MitoPeroxidase.¹⁰⁷

Experiências em animais indicam que o MitoQ tem eficácia antioxidante em vários tecidos, uma vez que introduzido em ratos oralmente ou na corrente sanguínea, este composto espalha-se por vários órgãos, tais como cérebro, coração, músculos, fígado e rins. Este cenário permite que o estudo deste composto e outros relacionados sejam testados em doenças humanas.¹⁰⁸

1.6. Péptidos de penetração mitocondrial (MPPs)

A mitocôndria é um alvo importante no tratamento de várias doenças, devido ao seu papel na produção de energia e na morte celular. Um desafio significativo para a entrega de um fármaco na mitocôndria, é a estrutura impermeável da membrana interna hidrofóbica. Estudos teóricos e experimentais revelaram a importância da lipofilicidade e da carga positiva em moléculas que se acumulam na mitocôndria, mas a relação entre a estrutura química e a entrada na mitocôndria permanece mal definida.¹⁰⁹

Os péptidos de penetração mitocondrial (MPPs) representam uma nova direção para o desenvolvimento de vetores dirigidos à mitocôndria. São péptidos curtos de alta captação por parte das mitocôndrias. A estrutura dos MPPs é geralmente catiónica e hidrofóbica, o que facilita a permeação através da membrana hidrofóbica mitocondrial e a acumulação na sua matriz. Devido às suas estruturas peptídicas primárias e propriedades biocompatíveis, os MPPs com sequências curtas de aminoácidos (menos de 10 aminoácidos) exibem baixa citotoxicidade.⁷

1.6.1. Conjugados de moléculas bioativas com MPPs

Vários fármacos anticancerígenos são seletivamente tóxicos para as células cancerígenas, por interromperem a síntese de ácidos nucleicos no núcleo. Pouco se sabe sobre se a interferência da síntese de ácidos nucleicos na mitocôndria teria efeitos celulares significativos, por isso *Chamberlain et al.*¹¹⁰ conduziram um estudo para se perceber mais sobre esses efeitos. Para tal complexaram um péptido de penetração mitocondrial com o fármaco anticancerígeno doxorrubicina (**figura 14**), que inibe a enzima DNA topoisomerase II presente tanto no núcleo celular como na mitocôndria.

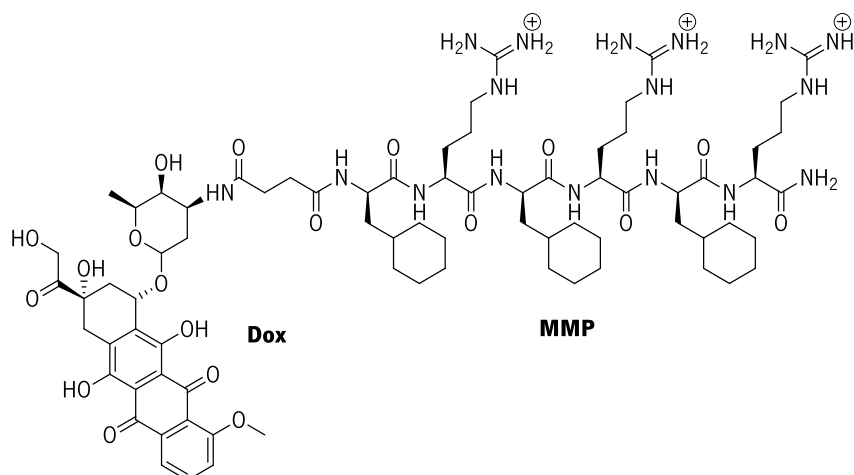


Figura 14. Estrutura química do complexo Doxorrubicina (Dox)-MPP (retirado da referência 110)

Este composto mantém a capacidade de inibir a topoisomerase II e danificar o ADN mitocondrial seletivamente, no entanto a potência do complexo Dox-MPP na mitocôndria diminuiu um pouco nas células sensíveis quando comparado com a doxorrubicina. Esta informação pode indicar que a topoisomerase do tipo II não é tão essencial na mitocôndria como é no núcleo celular ou que a quebra da hélice dupla do ADN não é monitorizada rigorosamente. No entanto, o complexo Dox-MPP demonstrou uma capacidade de superar os mecanismos de resistência a múltiplas drogas, como o efluxo da glicoproteína-P.¹¹⁰

A existência de ferro em excesso é uma preocupação numa série de condições clínicas, pois o excesso de ferro facilita reações de pro-oxidantes com substratos de oxigênio e nitrogênio dando origem ao

stress oxidativo.¹¹¹ O excesso de ferro deve ser removido através da utilização de quelantes de ferro naturais ou sintéticos, sendo a deferoxamina (DFO na sigla inglesa) o quelante mais utilizado clinicamente.¹¹² Algumas doenças hereditárias, tais como a hemocromatose, são caracterizadas por possuírem depósitos de ferro não localizados, no entanto, existem outras doenças conhecidas onde o excesso de ferro se encontra num tecido ou organelo específico como é o caso da ataxia de Friedreich onde o excesso de ferro se encontra na mitocôndria.¹¹³ Alta *et al.*¹¹³ sintetizaram quatro conjugados de MPP-DFO (**figura 15**) utilizando o ácido succínico como ligante, de forma a ter um quelante de ferro forte e permeável à mitocôndria.

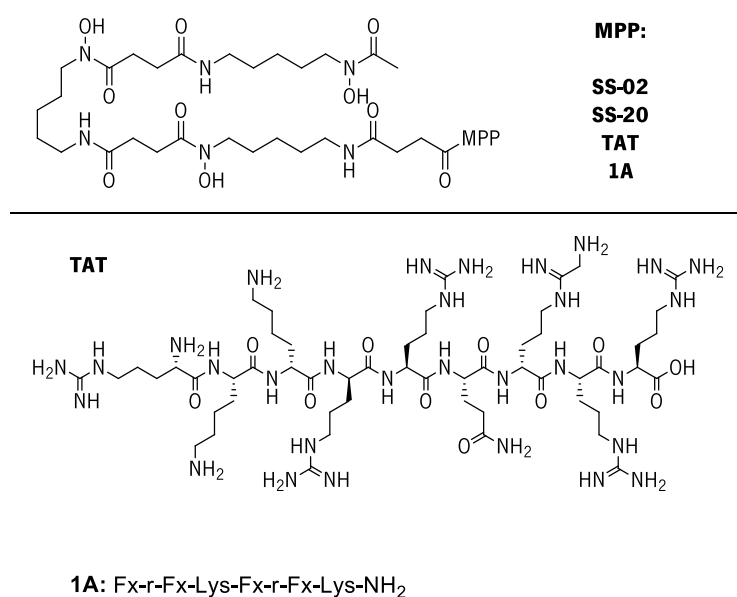


Figura 15. Estruturas dos conjugados MPP-DFO. Fx: ciclohexilalanina, r: d-arginina (adaptado da referência 113)

A presença de D-arginina torna os péptidos menos propensos a serem clivados pelas proteases presentes no citosol, enquanto que a ciclohexilamina é altamente lipofílica dotando o péptido da hidrofobicidade necessária para atravessar a membrana mitocondrial interna.¹¹³ Os quatro conjugados MPP-DFO foram estudados relativamente às suas propriedades quelantes e antioxidantes. As propriedades quelantes foram analisadas por fluorescência utilizando dois métodos: o primeiro é realizado com o complexo calceína-ferro que se torna fluorescente quando ocorre a eliminação do ferro por parte dos quelantes, neste caso a deferoxamina, libertando para a solução a molécula fluorescente de calceína; o segundo utiliza apotransferrina marcada com fluoresceína (Fl-aTf), este foi adicionado a várias quantidades de MPP-DFO e depois adicionaram ferro exógeno, pois apesar da DFO ter mais afinidade para o ferro do que a transferrina, a remoção de Fe₂Tf pela DFO é cineticamente prejudicada uma vez que o ferro fica protegido numa bolsa de ligação dentro da proteína transferrina, tendo pouca exposição ao solvente. Relativamente ao primeiro método, a ligação ao ferro e a afinidade dos quatro conjugados são idênticos à DFO livre (**figura 16A**), também no segundo método não houve um comportamento diferente da DFO livre

e dos conjugados (**figura 16B**).¹¹³

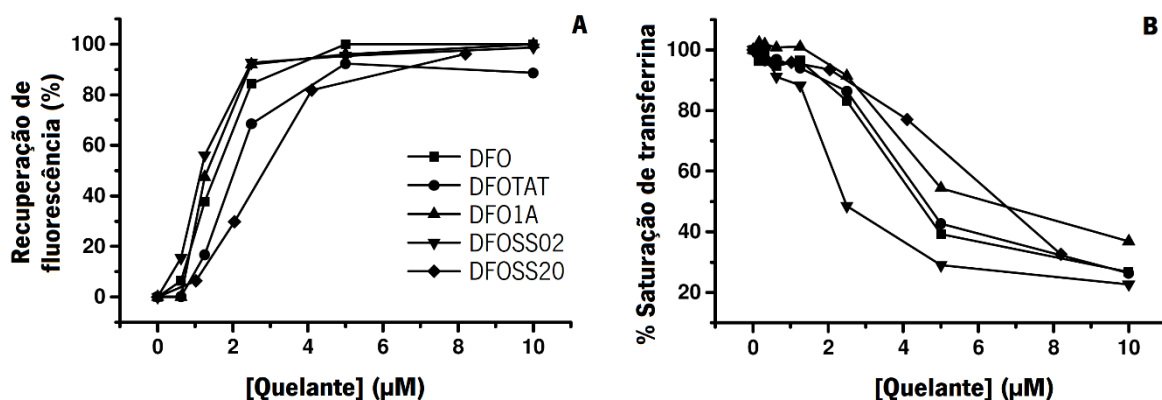


Figura 16. Capacidade de ligação ao ferro dos conjugados e DFO livre. (adaptado da referência 113)

A atividade antioxidante foi determinada através de uma sonda de dihidrorodamina (DHR). Esta sonda é oxidada pelos produtos da catalise do ferro, sendo que quelantes clinicamente relevantes devem interromper essa oxidação. Todos os quelantes estudados (DFO livre e MPP-DFO) suprimiram eficientemente a oxidação catalisada pelo ferro da sonda DHR, tanto em meio tamponado como em amostras de pacientes com excesso de ferro.¹¹³

Os conjugados MPP-DFO foram também marcados com carboxi-tetrametilrodamina (TAMRA) para demonstrar a localização mitocondrial em células A2780, todos os conjugados entraram na mitocôndria. Além disso, os MPP-DFO exibiram baixos níveis de toxicidade, interrupção do ciclo celular, danos no ADN mitocondrial e apoptose.¹¹³

Devido aos novos resultados de ensaios clínicos positivos e ao avanço da pesquisa na área do direcionamento mitocondrial, é necessário continuar a estudar a entrega direcionada de diferentes moléculas para a mitocôndria com a finalidade de desenvolver ferramentas úteis na área da investigação e da terapêutica.⁸

1.6.2. Péptidos de penetração mitocondrial como antioxidantes

Uma abordagem alternativa ao direcionamento de antioxidantes para a mitocôndria é o uso de pequenos péptidos com carga positiva com propriedades antioxidantes capazes de proteger a mitocôndria do stress oxidativo (**figura 17**). Péptidos deste tipo foram desenvolvidos por Szeto e Schiller tendo adquirido a designação de péptidos SS.^{18,104,114,115} Os péptidos SS são tetrapéptidos sintéticos com resíduos aromáticos alternados e aminoácidos básicos, que foram originalmente desenvolvidos como analgésicos opióides.^{5,104,105}

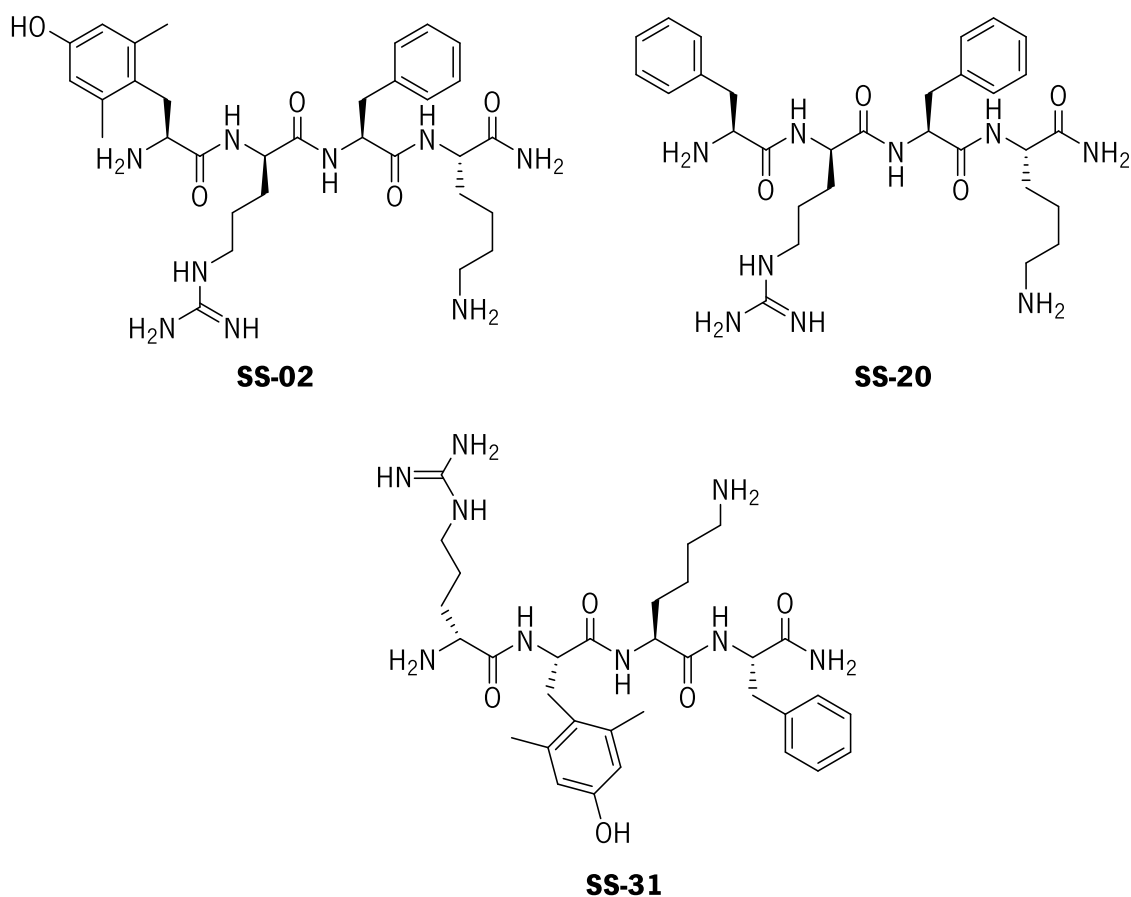


Figura 17. Estrutura química dos péptidos SS. SS-02 (Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂); SS-31 (D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂); SS20 (Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂). (retirado da referência 115)

Estes péptidos contêm uma sequência de aminoácidos que permite que penetrem livremente na célula, apesar de a pH fisiológico terem tripla carga positiva. Estudos com culturas celulares e mitocôndrias isoladas provaram que estes péptidos são capazes de eliminar espécies reativas de oxigênio, reduzir a produção mitocondrial de ERO e inibir a transição de permeabilidade mitocondrial, sendo por isso potentes na prevenção da apoptose induzida pelo stress oxidativo. Estes péptidos demonstraram excelente eficácia em modelos animais de neurodegenerescência e fibrose renal, não apresentando toxicidade.^{18,115}

Ambos os tetrapéptidos Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02) e D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) possuem um resíduo de 2,6-dimetil-L-tirosina (Dmt) mas numa posição diferente da cadeia peptídica. Por outro lado, o tetrapéptido Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) não possui um resíduo de Dmt. Tanto o SS-02 como o SS-31 eliminam o peróxido de hidrogénio e inibem a oxidação do ácido linoleico e das lipoproteínas de baixa densidade, ao passo que o SS-20 não mostra atividade antioxidante.¹⁰⁵ A atividade antioxidante dos tetrapéptidos SS-02 e SS-31 é atribuída à presença do grupo fenólico do resíduo de Dmt. Este resíduo pode eliminar radicais oxi formando radicais de tirosila não reativos, seguido por acoplamento radical-radical para criar ditirosina ou reagir com superóxido para formar hidroperóxido de tirosina. O Dmt é mais eficiente do que a tirosina na eliminação de ERO devido à semelhança estrutural com a vitamina E (tocoferol).^{5,104}

Estudos de absorção com SS-02 mostram uma absorção rápida (< 30 minutos) produzindo um

efeito benéfico, havendo uma maior concentração na mitocôndria do que no citosol. Estes resultados e a permeabilidade da membrana a estes péptidos sugerem que eles podem passar livremente a membrana em ambas as direções.^{5,104}

1.7. Metodologias Sintéticas

1.7.1. Reações Multicomponente

Nas reações químicas, normalmente, apenas um ou dois compostos participam.¹¹⁶ Se mais de dois aductos são convertidos em produtos, normalmente é necessário que a síntese ocorra numa sequência de diferentes reações. Tipicamente após cada passo o intermediário ou o produto final precisa ser isolado e purificado. À medida que mais passos forem necessários o rendimento do produto final vai diminuindo.¹¹⁶⁻¹¹⁸

Existem, no entanto, reações multicomponentes onde três ou mais reagentes são acoplados ao mesmo tempo para formar um produto que inclui a maioria dos átomos presentes nos reagentes iniciais.¹¹⁹ Os reagentes podem ser moléculas individuais diferentes ou podem ser diferentes grupos funcionais do mesmo reagente. Estas reações são já muito antigas, pois supõem-se que a adenina tenha a sua origem em 5 moléculas de cianeto de hidrogénio (HCN). É importante salientar que cada uma destas moléculas desempenha um papel diferente.¹¹⁶

As reações multicomponente permitem obter uma grande variedade de produtos com um rendimento mais elevado do que uma síntese convencional de várias etapas. Normalmente, os materiais de partida já se encontram disponíveis ou são facilmente sintetizados.¹¹⁸

Recentemente foi reconhecido a existência de três tipos de reações multicomponente diferentes.¹²⁰ As reações multicomponente do tipo I são a soma de todos os equilíbrios das sub-reações participantes, incluindo a etapa final que leva a formação do produto final. No tipo II os aductos e os produtos intermediários estão em equilíbrio, mas o produto final resulta de um passo reacional final praticamente irreversível. Por fim, as do tipo III correspondem a sequências de reações irreversíveis que ocorrem todas em direção ao produto.¹¹⁸

A primeira reação multicomponente foi descoberta por Strecker em 1850.¹²¹ Esta consiste numa condensação de três componentes (**figura 18**) que dão origem a α -ciano aminas que podem ser facilmente hidrolisadas em α -aminoácidos.¹¹⁶ Strecker permitiu que muitas outras reações multicomponentes fossem descobertas ao longo dos anos.

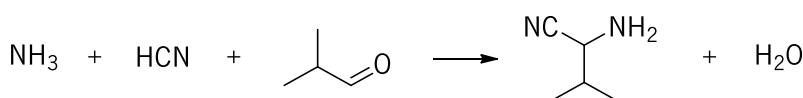


Figura 18. Reação multicomponente descoberta por Strecker em 1850 (adaptado da referência 116)

Em 1890, A. R. Hantsch descobriu que compostos α -cloro oxo, 1,3-dioxo e amoníaco condensam-

se formando um dos principais constituintes da hemoglobina e da clorofila, o pirrol.¹¹⁶ Três anos depois, o Italiano P. Bignelli introduziu a síntese de dihidropirimidinas com três componentes. Esta reação tem muitas aplicações, uma vez que as dihidropirimidinas têm um papel importante como agentes antagonistas de cálcio.¹²² A reação multicomponente mais conhecida é a condensação de três componentes de C. Mannich, descrita em 1912.¹²³ Nesta reação aminas e formaldeído combinam-se para formar uma base de Schiff (imina) que posteriormente reage com um reagente α -ácido. Esta reação é importante na síntese de alcaloides.^{116,124} Em 1921, M. T. L. Passerini descreveu uma das reações mais importantes dos isocianetos.¹²⁵ Os isocianetos podem reagir com um ácido carboxílico e uma cetona dando origem a amidas α -aciloxi-carboxílicas (**figura 19**).

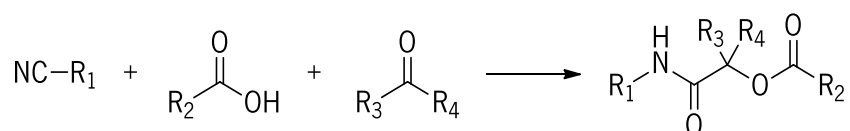


Figura 19. Reação multicomponente de M. T. L. Passerini (adaptado da referência 116)

A primeira reação multicomponente com quatro componentes foi descrita em 1934 por H. T. Bucherer e H. Bergs.¹²⁶ Esta reação é o melhor método geral para preparar os materiais de partida de muitos α -aminoácidos (**figura 20**). Do ponto de vista mecanístico é interessante observar que o HCN reage como o seu tautómero isocianeto de hidrogénio. No entanto, o mecanismo detalhado ainda não foi suficientemente investigado.¹¹⁶

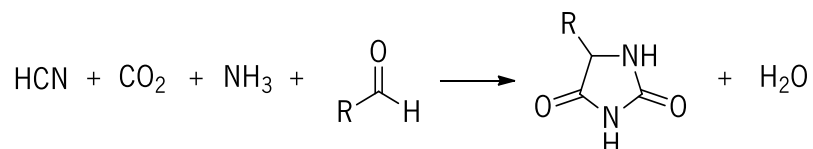


Figura 20. Reação multicomponente de quatro componentes descrita por H. T. Bucherer e H. Bergs (adaptado da referência 116)

Muitas reações multicomponente são utilizadas na indústria química. Um dos exemplos mais importantes é a reação de Roelen, também conhecida como hidroformilação. Esta reação foi descrita por W. Roelen em 1939 e consiste na formação de um aldeído através de monóxido de carbono, hidrogénio e um alceno.¹¹⁶ Muitas outras reações multicomponente foram descritas ao longo dos anos.

As reações de multicomponente surgiram nos últimos 20 anos como uma ferramenta poderosa na descoberta de fármacos devido as suas altas vantagens económicas e simplicidade operacional, permitindo a geração de bibliotecas resultantes da diversidade de inputs.¹²⁷

1.7.2. Reação de Ugi

A reação de Ugi é um dos marcos no campo das reações multicomponentes, tendo sido dedicados

grandes esforços na exploração do potencial desta reação. Esta consiste em adicionar uma amina primária, um composto carbonílico, um ácido carboxílico e um isocianeto para dar origem a α -aminoamidas (**figura 21**).¹²⁸

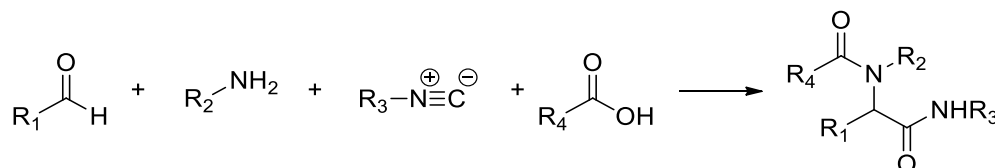
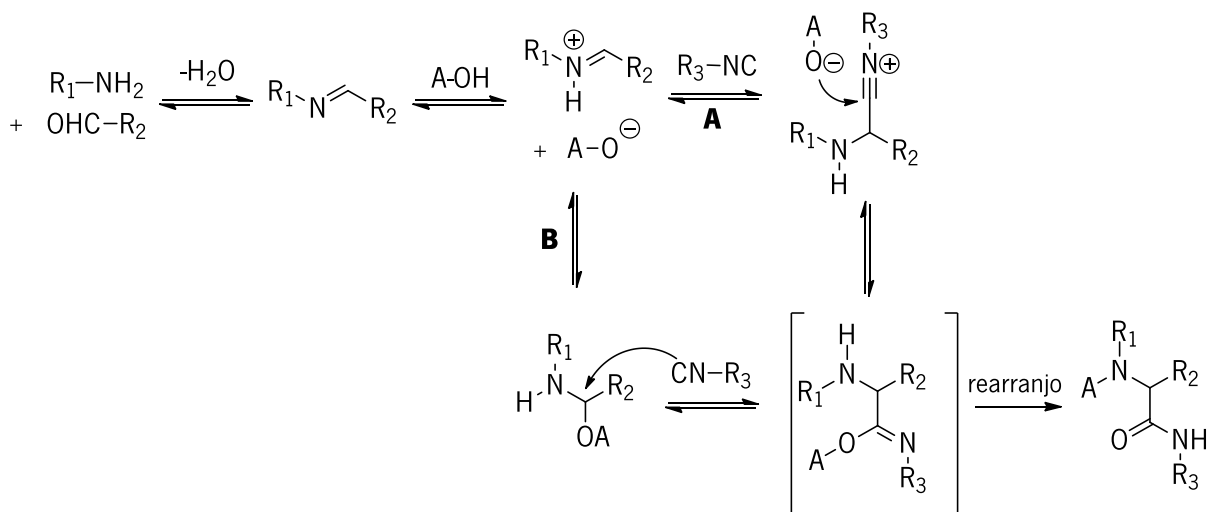


Figura 21. Reação de 4 componentes de Ugi (adaptado da referência 128)

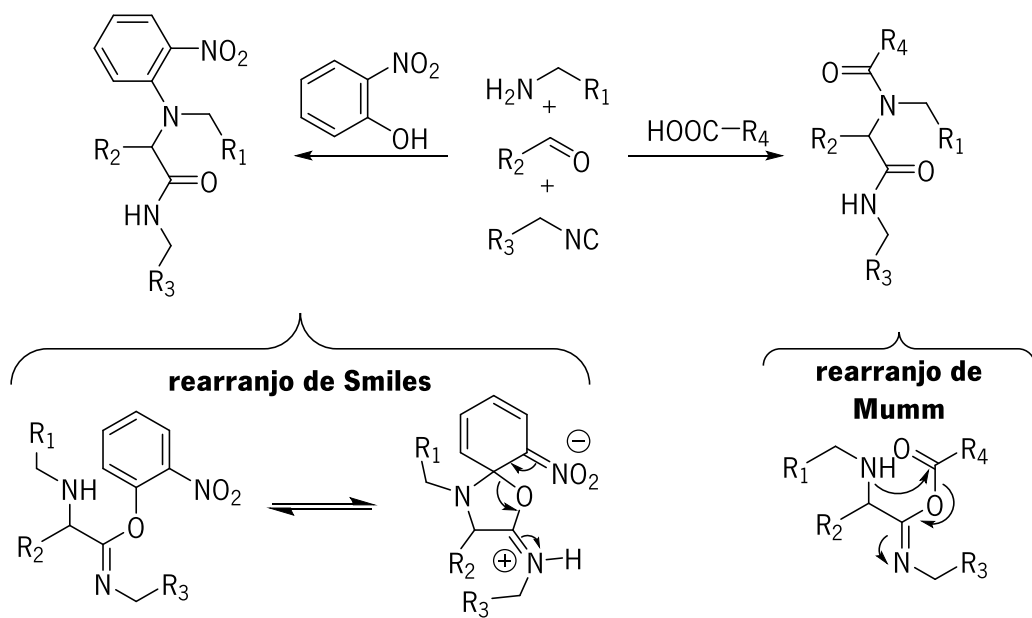
Nos últimos anos, várias modificações à reação clássica de Ugi foram descritas, incluindo variações de um dos componentes ou a introdução de uma ligação entre dois deles.¹²⁸

Foram postulados dois possíveis mecanismos para a reação de Ugi (**esquema 4**). Em ambos os mecanismos, o primeiro passo é a reação do aldeído com uma amina para formar uma imina que é protonada pela presença de um ácido carboxílico ou um fenol. O debate prende-se no facto de o próximo passo envolver uma série de equilíbrios envolvendo um nitrilo alquilado/hidrogenado que, pela presença do anião RO^- , dá origem ao imidato correspondente (**esquema 1**, caminho A)^{129,130} ou a formação do imidato envolver a inserção de um isocianeto num hemiaminal (**esquema 1**, caminho B).^{119,131}



Esquema 4. Possíveis mecanismos para a reação de Ugi, onde A-OH = RCOOH, ArOH (retirado da referência 119)

Em ambos os casos, o último passo consiste num rearranjo irreversível que desloca o equilíbrio para a formação da ligação dupla CO: rearranjo de Mumm quando A-OH é um ácido carboxílico, ocorre a transferência de uma unidade acilo do éster para a amina, e rearranjo de Smiles quando A-OH é um fenol, ocorre a migração intramolecular de um anel arilo atuando como eletrófilo (**esquema 5**).^{119,132,133}



Esquema 5. Reação de Ugi-Smiles/Ugi-Mumm (retirado da referencia 132)

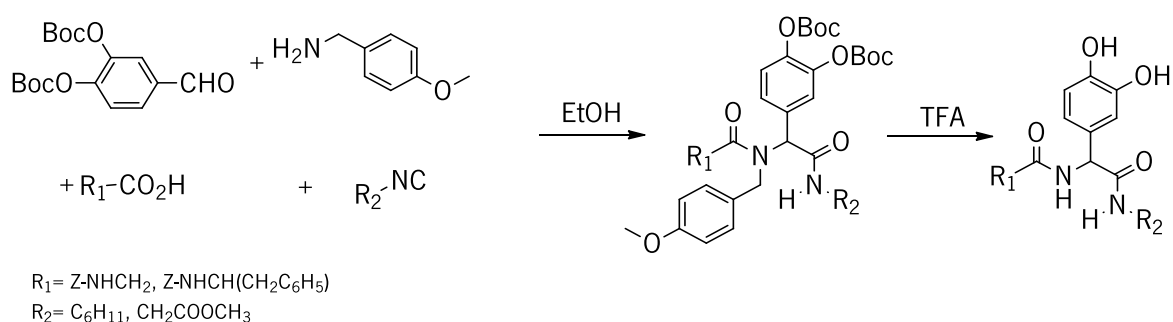
2. Resultados e Discussão

2.1. Síntese pela reação de Ugi de derivados de péptidos com um aminoácido catecólico

O desenvolvimento de estratégias sintéticas que permitam a síntese de novos aminoácidos com cadeias laterais fenólicas ou catecólicas pode dar origem a um novo repertório de blocos de construção sintéticos interessantes. Uma abordagem simples para a obtenção de novas hidroxifenilglicinas seria uma estratégia em que fenóis naturais simples seriam acoplados de forma econômica numa única etapa numa reação multicomponente.¹¹ Uma dessas reações multicomponente que pode ser com este objetivo é a reação de Ugi, descrita pela primeira vez por Ivar Ugi.^{116,120}

A reação de Ugi é a condensação de quatro classes de compostos diferentes: um aldeído, um ácido carboxílico, uma amina e um isocianeto.¹³⁴ O procedimento proposto no âmbito do trabalho desenvolvido utiliza como componente amina a 4-metoxibenzilamina, como componente ácido um aminoácido *N*-protegido, podendo ser a *N*-benziloxycarbonilglicina ou a *N*-benziloxycarbonilfenilalanina, como componente aldeído o dicarbonato de di-*tert*-butil (4-formil-1,2-fenileno) e como fragmento isocianeto o ciclohexilisocianeto ou o isocianoacetato de metilo (**esquema 6**). O aducto de Ugi formado é subsequentemente tratado com ácido trifluoroacético (TFA) para remover o grupo metoxibenzilamina e os grupos protetores *tert*-butiloxycarbonilo.

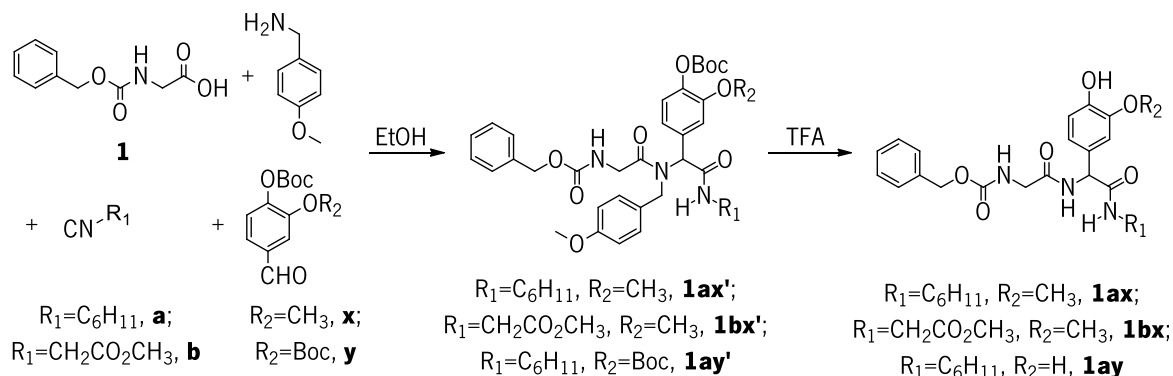
Este procedimento requer a proteção inicial dos grupos hidroxilo do componente aldeído, nomeadamente do 3,4-dihidroxibenzaldeído. Para tal o 3,4-dihidroxibenzaldeído foi tratado com dicarbonato de di-*tert*-butilo (Boc₂O) na presença de dimetilaminopiridina (DMAP) como catalisador para dar o dicarbonato de di-*tert*-butil (4-formil-1,2-fenileno).



Esquema 6. Síntese de novos dipéptidos contendo um resíduo de hidroxifenilglicina

O trabalho desenvolvido veio na continuidade de ensaios preliminares realizados anteriormente no âmbito do grupo de investigação (**esquema 7**). O composto **1ay**, foi o primeiro dipéptido contendo um resíduo de hidroxifenilglicina obtido, tendo sido utilizado como componente ácido na reação de Ugi a *N*-benziloxycarbonilglicina. A síntese deste dipéptido foi descrito pelo grupo de investigação numa publicação

de 2019.¹¹ O uso de um aminoácido *N*-protegido como componente ácido permite a obtenção num só passo de um dipéptido. Por esta razão o grupo de investigação continuou a explorar esta vertente e sintetizou os compostos **1ax** e **1bx**, no entanto os seus dados não foram ainda publicados.



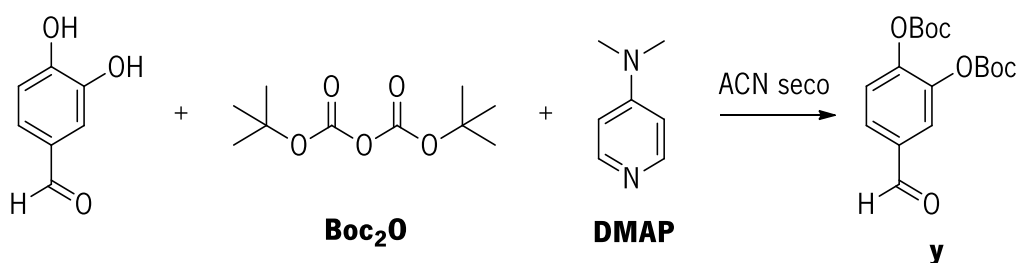
Esquema 7. Síntese de dipéptidos contendo um resíduo de hidroxifenilglicina

Dos dados obtidos previamente pelo grupo de investigação¹¹, os péptidos que apresentam uma melhor capacidade antioxidante são os que possuem uma fração catecólica, pelo que neste trabalho se utilizou um componente aldeído que nos permitia obter no composto final um anel de catecol.

2.1.1. Síntese do dicarbonato de di-*tert*-butil (4-formil-1,2-fenileno)

Como referido anteriormente, o uso de um componente catecólico na reação de Ugi requer proteção prévia das funções hidroxilo. Esta necessidade surge das limitações referentes ao uso de porções catecol na síntese devido à sua alta instabilidade em ambiente básico, o que no caso da reação de Ugi advém da natureza básica da componente amina.

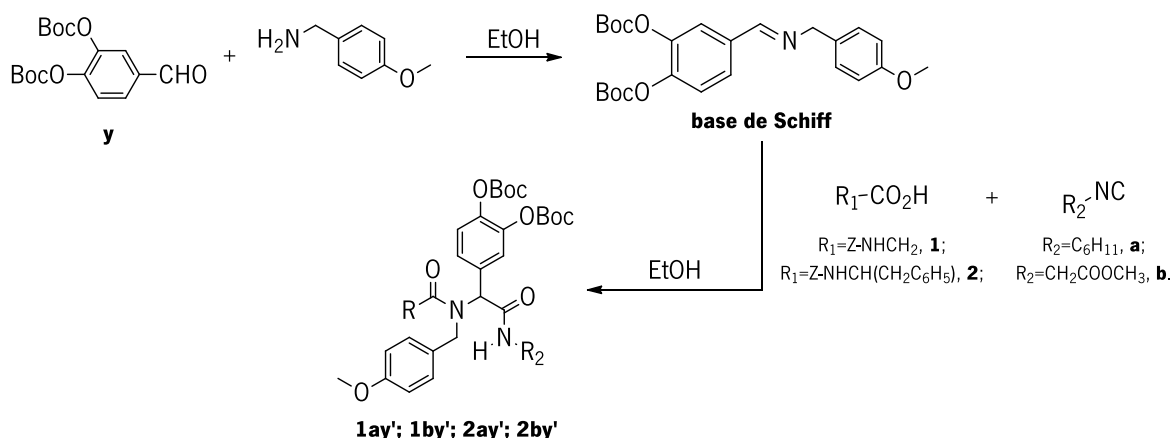
O 3,4-dihidroxibenzaldeído foi, portanto, utilizado na forma protegida como o seu derivado *tert*-butilcarbonato. A vantagem deste derivado é que pode ser facilmente obtido pela reação de hidroxibenzaldeídos com o dicarbonato de di-*tert*-butilo na presença de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalisador.³⁶ Além disso, esta proteção temporária pode ser facilmente removida com TFA, simultaneamente com a remoção do grupo 4-metoxibenzilo. A proteção foi realizada através do tratamento do 3,4-dihidroxibenzaldeído com 2 equivalentes de dicarbonato de di-*tert*-butilo (Boc_2O) em acetonitrilo (ACN) seco usando 0,10 equivalentes de DMAP a fim de dar o dicarbonato de di-*tert*-butil (4-formil-1,2-fenileno) (composto **y**, **esquema 8**) com um rendimento de 74%.



Esquema 8. Síntese do dicarbonato de di-*tert*-butil (4-formil-1,2-fenileno)

2.1.2. Síntese dos aductos de Ugi

Neste trabalho, propomos expandir a gama de péptidos com resíduos de hidroxifenilglicina pela reação de Ugi. A reação de Ugi é geralmente realizada em duas etapas. Na primeira etapa ocorre a condensação da amina com o aldeído protegido (composto **y**) para formar a base de Schiff correspondente (**esquema 9**). Esta reação foi seguida por TLC e quando se verificou a ausência de reagentes adicionou-se o ciclohexilisocianeto (composto **a**, **esquema 9**) ou o isocianoacetato de metilo (composto **b**, **esquema 9**) seguido da adição de *N*-benziloxicarbonilglicina (Z-Gly-OH) (composto **1**, **esquema 9**) ou *N*-benziloxicarbonilfenilalanina (Z-Phe-OH) (composto **2**, **esquema 9**), formando assim o aducto de Ugi.



Esquema 9. Síntese dos aductos de Ugi

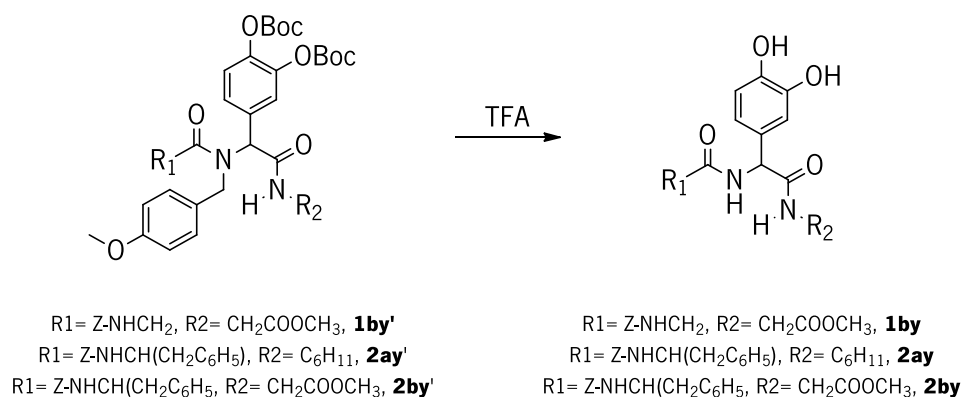
Os produtos **1ay'** e **1by'** foram obtidos pela reação do dicarbonato de di-*tert*-butil (4-formil-1,2-fenileno) com a 4-metoxibenzilamina, Z-Gly-OH e ciclohexilisocianeto ou isocianoacetato de metilo, respetivamente. A reação ocorreu à temperatura ambiente em ambiente de árgon. Ao fim de dois dias de reação a mistura reacional foi lavada com KHSO_4 (1M), NaHCO_3 (1M) e brine e seca com sulfato de sódio anidro. Das soluções concentradas conseguiu-se precipitar os produtos **1ay'** e **1by'** que foram isolados por filtração com rendimentos de 60% e 37%, respetivamente.

Os produtos **2ay'** e **2by'** foram obtidos pela reação do dicarbonato de di-*tert*-butil (4-formil-1,2-fenileno) com a 4-metoxibenzilamina, Z-Phe-OH e ciclohexilisocianeto ou isocianoacetato de metilo,

respetivamente. Nestas reações foi realizado o mesmo procedimento geral, no entanto após as lavagens não se conseguiu precipitar o produto, tendo-se procedido a uma purificação por cromatografia em coluna de uma parte do composto **2ay'** (184 mg) da qual se conseguiu obter 79,41 mg de composto puro. Uma vez que o composto de interesse é o aducto de Ugi desprotegido, o composto **2by'** e grande parte do composto **2ay'** foram desprotegidos impuros.

2.1.3. Desproteção dos aductos de Ugi

O passo final na síntese de novos derivados de péptidos catecólicos requer a remoção dos grupos protetores das funções hidroxilo e da amina terciária dos aductos de Ugi. Este procedimento foi efetuado através do tratamento dos compostos **1by'**, **2ay'** e **2by'** com ácido trifluoroacético (TFA) a 80°C (esquema 10).



Esquema 10. Desproteção dos aductos de Ugi

Os derivados de péptidos catecólicos finais **1by**, **2ay** e **2by** foram purificados através de uma coluna cromatográfica com rendimentos de 6,52%, 12,58% e 17,56%, respetivamente. As estruturas finais foram confirmadas por ^1H , ^{13}C e técnicas bidimensionais. Apenas o composto **2by** não pôde ser caracterizado por ^{13}C e as respetivas técnicas bidimensionais.

2.2. Síntese pela reação de Ugi de derivados de péptidos com um aminoácido catecólico e um resíduo de desidrofenilalanina

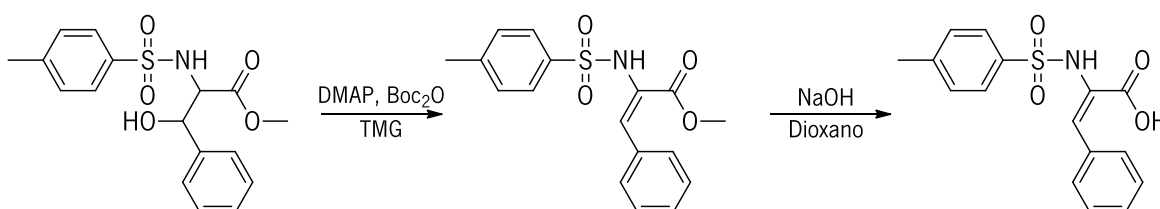
Os desidroaminoácidos constituem uma importante classe de aminoácidos não proteínogénicos com várias atividades biológicas, incluindo atividade antioxidantes. A presença de um ou mais desidroaminoácidos numa cadeia polipeptídica tem um forte impacto não só na estrutura secundária da cadeia como, também, na sua atividade biológica. Assim, desidroaminoácidos inseridos em cadeias peptídicas, para além de tornar esses péptidos resistentes à proteólise, podem conferir-lhes atividades

antibacterianas, antifúngicas e anti tumorais.³⁶

A combinação de porções fenólicas ou catecólicas com desidroaminoácidos pode ser uma abordagem importante para o desenvolvimento de novos compostos biologicamente ativos.³⁶

2.2.1. Síntese da desidrofenilalanina

O desidroaminoácido desidrofenilalanina *N*-protegido com um grupo 4-toluenosulfonilo (Tos) foi preparado a partir do éster metílico da *N*-(4-toluenosulfonil) fenilserina usando uma reação de desidratação com dicarbonato de di-*tert*-butilo (Boc_2O) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP) seguido por tratamento com *N,N,N',N'*-tetrametilguanidina (TMG) (**esquema 11**). Posteriormente o éster metílico é removido com hidróxido de sódio (NaOH) 1M dando origem à *N*-(4-toluenosulfonil) desidrofenilalanina (Tos- Δ Phe-OH).



Esquema 11. Síntese de *N*-(4-toluenosulfonil) desidrofenilalanina (Tos- Δ Phe-OH)

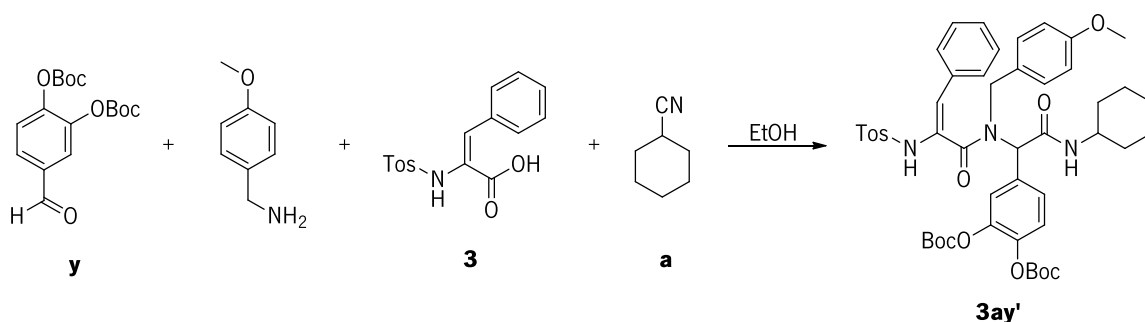
O composto intermediário Tos- Δ Phe-OMe foi obtido pela reação de 1 equivalente de Boc_2O na presença de 0,1 equivalente de DMAP como catalisador à qual, ao fim de 24 horas, se adicionou TMG. A reação ocorreu à temperatura ambiente. Ao fim de 3 dias a mistura reacional foi lavada com KHSO_4 (1M), NaHCO_3 (1M) e solução saturada de NaCl e seca com sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado dando origem ao Tos- Δ Phe-OMe na forma de um óleo com um rendimento de 42%.

O intermediário foi dissolvido em dioxano tendo sido adicionado NaOH (1M) à solução. Ao fim de 1 dia de reação à temperatura ambiente, acidificou-se a mistura até a um valor de pH entre os 2 e os 3 com KHSO_4 (1M). Precipitou o sal inorgânico KNaSO_4 , que foi descartado por filtração da solução. A fase aquosa foi lavada algumas vezes com acetado de etilo. As várias porções de fase orgânica foram recolhidas e secas com sulfato de sódio anidro. A evaporação da fase orgânica deu origem a um sólido branco que por $^1\text{HMRN}$ permitiu confirmar a obtenção do composto pretendido, Tos- Δ Phe-OH. Este composto foi obtido com um rendimento de 87%.

2.2.2. Síntese de Tos- Δ Phe-DHPG-Cy pela reação de Ugi

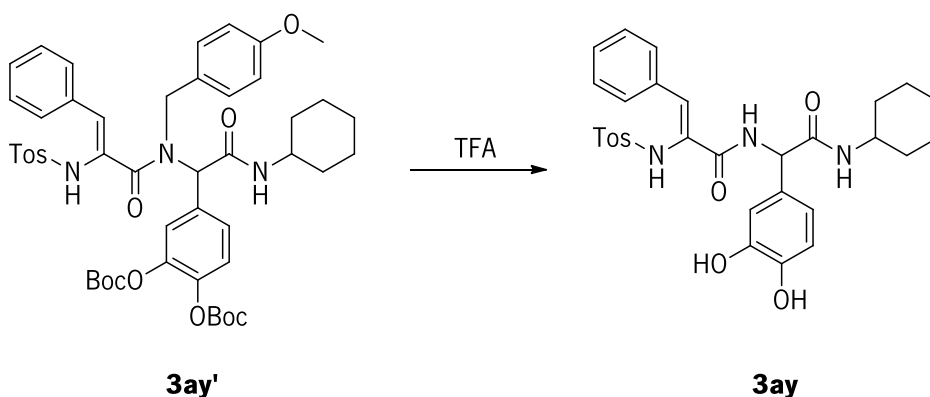
O primeiro passo para a síntese do composto Tos- Δ Phe-DHPG-Cy pela reação de Ugi é a síntese do seu aducto. Para tal utilizou-se o mesmo procedimento anteriormente descrito, no qual se o usou como

componente ácido o Tos- Δ Phe-OH (composto **3**, **esquema 12**), preparado previamente, o ciclohexilisocianeto (composto **a**, **esquema 12**) e o dicarbonato de di-*tert*-butil (4-formil-1,2-fenileno) (composto **y**, **esquema 12**). Esta reação permitiu obter o aducto Tos- Δ Phe-*M*[Bzl(4-OMe)]DHPG(3,4-*O*-Boc)-Cy (composto **3ay'**, **esquema 12**).



Esquema 12. Síntese de Tos- Δ Phe- *M*[Bzl(4-OMe)]DHPG(3,4-*O*-Boc)-Cy

A reação ocorreu à temperatura ambiente em atmosfera de argon. Ao fim de dois dias de reação a mistura reacional foi lavada com KHSO_4 (1M), NaHCO_3 (1M) e solução saturada de NaCl e seca com sulfato de sódio anidro. Após a evaporação do solvente obteve-se o composto final com algumas impurezas (318 mg), do qual cerca de 100 mg foram purificadas por coluna cromatográfica obtendo-se 7,8 mg de composto puro. O resto do composto foi desprotegido com TFA a 80°C para dar origem ao composto Tos- Δ Phe-DHPG-Cy (composto **3ay**, **esquema 13**).



Esquema 13. Síntese do Tos- Δ Phe-DHPG-Cy

O produto final **3ay** foi obtido impuro, infelizmente não foi possível purificá-lo por coluna cromatográfica, devido ao encerramento dos laboratórios na época do estado de emergência.

3. Conclusão e perspetivas futuras

Ao longo deste trabalho, um método económico de uma etapa foi usado para sintetizar quatro péptidos de penetração celular dos quais se espera terem atividade antioxidante. Os produtos finais (compostos **1by**, **2ay**, **2by** e **3ay**) foram obtidos através de uma reação de Ugi seguida do tratamento dos aductos obtidos com ácido trifluoroacético.

Inicialmente foram obtidos os aductos de Ugi **1ay'**, **1by'**, **2ay'**, **2by'** e **3ay'**. No entanto, os rendimentos não foram os esperados, pois esta reação costuma ter rendimentos acima dos 80%, para além do baixo grau de pureza apresentado por alguns aductos formados. Os aductos foram, por sua vez, desprotegidos com TFA dando origem aos produtos finais impuros e com baixos rendimentos após purificação por coluna. O aducto de Ugi **1ay'** não foi desprotegido, pois pretendia-se retirar o grupo *N*-protetor benziloxycarbonil (Z) para posteriormente acoplar com outro aminoácido. Infelizmente isto não foi possível, devido à interrupção do trabalho laboratorial consequência da pandemia de Covid-19.

Todos os compostos podem ser usados em outras reações de acoplamento com aminoácidos ou outros péptidos para formar outros derivados que podem ser testados como antioxidantes com alvo na mitocôndria ou genericamente como péptidos de penetração celular, algo que deverá ser feito num futuro próximo.

As reações aqui apresentadas serão repetidas de forma a melhorar os seus rendimentos, pois devido ao curto tempo de trabalho experimental não o foi possível fazer. Igualmente deve ser determinada a sua atividade antioxidante por ensaios de atividade de eliminação de radicais e por voltametria cíclica. A capacidade destes péptidos para penetrar a mitocôndria, também deverá ser estudada.

A atividade de eliminação de radicais dos novos compostos preparados poderá ser determinada usando 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•) como radical estável. Este método é um dos mais comumente empregados para determinar a atividade de eliminação de radicais livres.¹¹

A correlação entre o perfil antioxidante e as propriedades redox de antioxidantes de baixo peso molecular está bem estabelecida.¹¹ A voltametria cíclica tem sido utilizada como uma importante ferramenta para avaliação da capacidade antioxidante de antioxidantes. Os compostos com potencial de oxidação mais baixo são mais facilmente oxidados e geralmente apresentam melhores atividades antioxidantes. Assim, os potenciais de pico de oxidação para novos compostos preparados deverão ser determinados por voltametria cíclica.

A capacidade de penetrar a mitocôndria, poderá ser analisada pela determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), pela produção de espécies reativas de oxigénio (ERO) e pela produção de ATP.⁵

Seria igualmente interessante acoplar estes CPPs com alguns fármacos que possuem um bom potencial para o tratamento de algumas doenças que envolvem o stress oxidativo, de forma a melhorar a

sua penetração na célula. De facto, os CPPs permitem ampliar a janela de fármacos que se pode estudar para uma determinada doença, uma vez que alguns deles são excluídos por não conseguirem atingir o alvo quando este se encontra dentro das células. Assim, muitos fármacos podem ter um potencial terapêutico muito elevado, mas esta capacidade não é manifestada se não conseguirem atravessar a membrana celular.

Devido à importância de pequenos péptidos como agentes moduladores de recetores de dopamina, ensaios farmacológicos dos peptídeos preparados poderão ser efetuados para avaliar a potencial atividade antiparkinsoniana como moduladores alostéricos positivos de recetores D2. Além disso, todos os peptídeos sintetizados deverão ser avaliados biologicamente para determinar seus perfis de neuro e citotoxicidade.¹³⁵

4. Secção Experimental

4.1. Métodos gerais

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) ^1H e ^{13}C foram registados num espectrómetro Bruker Avance III de 400 e 100,6 MHz, respetivamente. Foram usadas técnicas de HMQC, HMBC e DEPT 135 para a identificação de alguns sinais. Na descrição de cada espectro de RMN, os dados são indicados pela seguinte ordem: desvio químico (δ) em partes por milhão (ppm), multiplicidade de sinal [s (singleto), sl (singleto largo), d (duplete), dl (duplete largo), t (tripleto), m (multiplete)], constante de acoplamento (J) em Hertz (Hz), número de prótons (nH), identificação do próton. Os desvios químicos indicados foram registados relativamente ao padrão interno que é constituído pelo solvente usado para aquisição do espectro.

As reações foram monitorizadas por cromatografia em camada fina (TLC). Para TLC utilizou-se placas de alumínio com gel de sílica 60 F254 da Merck. A revelação das placas foi efetuada por exposição a radiação UV e por iodo. Nas purificações por coluna cromatográfica utilizou-se gel de sílica da Merk (0,040-0,063 mm).

4.2. Síntese

Procedimento A: Síntese dos aductos de Ugi

A uma solução de dicarbonato de di-*terc*-butil (4-formil-1,2-fenileno) (2,04 mmol) em etanol (5 mL) sob agitação em ambiente de argon adicionou-se 1,10 equivalentes de 4-metoxibenzilamina. Após 5 horas, adicionou-se 1,10 equivalentes de ácido carboxílico e 1,10 equivalentes do isocianeto e deixou-se reagir durante 2 dias. A mistura reacional foi evaporada a pressão reduzida e o resíduo obtido dissolvido em acetato de etilo (50 mL) e lavado com KHSO_4 (1M), NaHCO_3 (1M) e brine (3x25 mL cada). A camada orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida dando origem ao aducto de Ugi correspondente. O produto obtido foi depois recristalizado ou sujeito a coluna cromatográfica.

Procedimento B: Desproteção dos aductos de Ugi

Ácido trifluoracético foi adicionado ao aducto de Ugi (0,25 M) e a solução refluxada a 80°C durante 10 minutos. O TFA foi evaporado a pressão reduzida. O produto obtido foi depois recristalizado ou sujeito a coluna cromatográfica.

4.2.1. Síntese do dicarbonato de di-*terc*-butil (4-formil-1,2-fenileno)¹

A uma solução de 3,4-di-hidroxibenzaldeído (5,5 mmol) em acetato de etilo seco (5 mL) sob

¹ Síntese realizada por mim, descrição dos espectros realizada em trabalhos anteriores pelo grupo de investigação

agitação à temperatura ambiente adicionou-se 2 equivalentes de dicarbonato de di-*terc*-butilo e 0,2 equivalentes de 4-dimetilaminopiridina. A reação foi seguida por TLC e quando se verificou a ausência de reagente inicial evaporou-se o solvente a pressão reduzida. O resíduo obtido foi dissolvido em acetato de etilo (60 mL) e lavado com ácido cítrico 5% (3x25 mL) e brine (2x25 mL). A camada orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida dando origem ao dicarbonato de di-*terc*-butil (4-formil-1,2-fenileno) (1,374 g; 73,8%) sob a forma de um óleo castanho claro.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,55 [s, 18H, 2C(CH₃)₃]; 7,45 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, ArH); 7,77 (dd, *J* = 8,0 Hz, *J* = 1,6 Hz, 1H, ArH); 7,80 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H, ArH); 9,95 (s, 1H, CHO) ppm.

4.2.2. Síntese dos aductos de Ugi

Síntese de Z-Gly-*M*[Bzl(4-OMe)]DHPG(3,4-*O*Boc)-Cy, **1ay**'²

O procedimento A foi seguido usando Z-Gly-OH (**1**) como ácido carboxílico, dicarbonato de di-*terc*-butil (4-formil-1,2-fenileno) (**y**) e isocianeto de ciclohexil (**a**) para dar origem ao aducto de Ugi **1ay**' (0,950 g; 59,8%) como um sólido de cor areada (de acetado de etilo/éter de petróleo).

R_f = 0,60 (éter de petróleo/éter dietílico 1:5).

P.f. 113 – 114°C

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,10 – 1,12 (m, 3H, CH₂ ciclohexil); 1,31 – 1,34 (m, 3H, CH₂ ciclohexil); 1,56 [s, 18H, 2C(CH₃)₃]; 1,65 – 1,70 (m, 2H, CH₂ ciclohexil); 1,84 – 1,88 (m, 2H, CH₂ ciclohexil); 3,74 – 3,80 (m, 4H, OCH₃ + CH ciclohexil); 3,93 (dl, *J* = 16,8 Hz, 1H, αCH₂); 4,10 (dl, *J* = 16,8 Hz, 1H, αCH₂); 4,43 (dl, *J* = 17,2 Hz, 1H, C₆H₄CH₂); 4,60 (dl, *J* = 17,2 Hz, 1H, C₆H₄CH₂); 5,10 (s, 2H, CH₂ Z); 5,66 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, αCH); 5,71-5,73 (m, 2H, 2NH); 6,75 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, ArH); 6,94 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, ArH); 7,15 (s, 2H, ArH); 7,30-7,35 (m, 6H, ArH) ppm.

¹³C NMR (100,6 MHz, CDCl₃): δ = 24,73 (CH₂); 24,81 (CH₂); 25,40 (CH₂); 27,58 [2C(CH₃)₃]; 29,63 (CH₂); 31,90 (CH₂); 32,65 (CH₂); 43,46 (αCH₂); 48,91 (CH ciclohexil); 49,27 (C₆H₄CH₂); 55,17 (OCH₃); 62,75 (αCH); 66,85 (CH₂ Z); 84,03 [2C(CH₃)₃]; 114,17 (CH); 123,37 (CH); 125,00 (CH); 127,69 (CH); 127,95 (2CH); 128,03 (2CH); 128,46 (3CH); 133,04 (C); 136,39 (C); 142,59 (C); 142,75 (C); 150,39 (C); 150,43 (C); 156,14 (C=O); 158,91 (2C=O); 167,37 (C=O); 170,12 (C=O) ppm.

HRMS (ESI): *m/z* [M + H]⁺ calcd de C₄₂H₅₄N₃O₁₁: 776,3758; obtido:776,3768.

Síntese de Z-Gly-*M*[Bzl(4-OMe)]HMPG(3-OMe, 4-*O*Boc)-Cy, **1ax**'³

O procedimento A foi seguido usando Z-Gly-OH (**1**) como ácido carboxílico, carbonato de *terc*-butil

² Síntese realizada por mim, descrição dos espectros realizada em trabalhos anteriores pelo grupo de investigação

³ Síntese e caracterização realizada em trabalhos anteriores pelo grupo de investigação

(4-formil-2-metoxifenileno) (**x**) e isocianeto de ciclohexil (**a**) para dar origem ao aducto de Ugi **1ax'** (0,74 g; 81%) como um sólido branco (de éter dietílico).

P.f. 160 – 163°C

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 1,03 – 1,17 (m, 3H, CH_2 ciclohexil); 1,25 – 1,39 (m, 3H, CH_2 ciclohexil); 1,55 [s, 19H, $2\text{C}(\text{CH}_3)_3$]; 1,60 – 1,66 (m, 2H, CH_2 ciclohexil); 1,84 – 1,89 (m, 2H, CH_2 ciclohexil); 3,71 (s, 3H, OCH_3); 3,75 (s, 3H, OCH_3); 3,78 – 3,83 (m, 1H, CH ciclohexil); 3,95 (dd, J = 4,4 Hz, J = 17,2 Hz, 1H, αCH_2); 4,09 (dd, J = 4,4 Hz, J = 17,2 Hz, 1H, αCH_2); 4,44 (d, J = 17,2 Hz, 1H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2$); 4,58 (dl, J = 17,2 Hz, 1H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2$); 5,10 (s, 2H, CH_2 Z); 5,57 (d, J = 7,2 Hz, 1H, αCH); 5,70 (sl, 2H, 2NH); 6,75 (d, J = 8,4 Hz, 2H, ArH); 6,90 – 6,95 (m, 4H, ArH); 7,04 (d, J = 8,4 Hz, 1H, ArH); 7,29 – 7,36 (m, 5H, ArH) ppm.

^{13}C NMR (100,6 MHz, CDCl_3): δ = 24,72 (CH_2); 24,79 (CH_2); 25,38 (CH_2); 27,57 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$]; 32,72 (CH_2); 32,75 (CH_2); 43,46 (αCH_2); 48,77 (CH ciclohexil); 49,14 ($\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2$); 55,18 (OCH_3); 55,93 (OCH_3); 63,47 (αCH); 66,81 (CH_2 Z); 83,63 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$]; 114,08 (CH); 122,07 (CH); 122,74 (CH); 127,58 (CH); 127,93 (2CH); 128,03 (3CH); 128,45 (4CH); 133,23 (C); 136,39 (C); 140,48 (C); 144,75 (C); 151,13 (C); 151,38 (C); 156,15 (C=O); 158,86 (C=O); 167,77 (C=O); 170,10 (C=O) ppm.

HRMS (ESI): m/z [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ calcd para $\text{C}_{38}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_9$: 689,33123.

Síntese de Z-Gly-*M*[Bzl(4-OMe)]HMPG(3-OMe, 4-*O*Boc)-Gly-OMe, **1bx'**²

O procedimento A foi seguido usando Z-Gly-OH (**1**) como ácido carboxílico, carbonato de *tert*-butil (4-formil-2-metoxifenileno) (**x**) e isocianoacetato de metilo (**b**) para dar origem ao aducto de Ugi **1bx'** (0,745 g; 62%) como um sólido branco (de éter dietílico/etanol).

M.p. 77 – 80°C

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 1,55 [s, 19H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$]; 3,72 (m, 9H, $2(\text{OCH}_3) + \text{CO}_2\text{CH}_3$); 3,95 (m, 4H, $\alpha\text{CH}_2 + \alpha\text{CH}_2$); 4,43 (d, J = 17,2 Hz, 1H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2$); 4,58 (d, J = 17,2 Hz, 1H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2$); 5,09 (s, 2H, CH_2 Z); 5,73 (sl, 1H, αCH); 5,77 (sl, 2H, 2NH); 6,35 (sl, 1H, ArH); 6,75 (d, J = 8,4 Hz, 2H, ArH); 6,93 – 7,06 (m, 4H, ArH); 7,04 (d, J = 8,4 Hz, 1H, ArH); 7,31 – 7,35 (m, 5H, ArH) ppm.

^{13}C NMR (100,6 MHz, CDCl_3): δ = 24,72 (CH_2); 24,79 (CH_2); 25,38 (CH_2); 27,57 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$]; 32,72 (CH_2); 32,75 (CH_2); 43,46 (αCH_2); 49,14 ($\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2$); 55,18 (OCH_3); 55,93 (OCH_3); 63,47 (αCH); 66,81 (CH_2 Z); 83,63 [$\text{C}(\text{CH}_3)_3$]; 114,08 (CH); 122,07 (CH); 122,74 (CH); 127,58 (CH); 127,93 (2CH); 128,03 (3CH); 128,45 (4CH); 133,23 (C); 136,39 (C); 140,48 (C); 144,75 (C); 151,13 (C); 151,38 (C); 156,15 (C=O); 158,86 (C=O); 167,77 (C=O); 170,10 (C=O) ppm.

HRMS (ESI): m/z [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ calcd para $\text{C}_{38}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_9$: 689,33123.

Síntese de Z-Gly-M[Bzl(4-OMe)]DHPG(3,4-*O*-Boc)-Gly-OMe, 1by'

O procedimento A foi seguido usando Z-Gly-OH (**1**) como ácido carboxílico, dicarbonato de di-*tert*-butil (4-formil-1,2-fenileno) (**y**) e isocianoacetato de metilo (**b**) para dar origem ao aducto de Ugi **1by'** (0,575 g; 36,8%) como um sólido de cor areada (de diclorometano/*n*-hexano).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,47 [s, 18H, 2C(CH₃)₃]; 3,61 (s, 3H, OCH₃); 3,66 (s, 3H, OCH₃); 4,37 (d, *J* = 16 Hz, 2H, αCH₂); 4,51 (d, *J* = 16 Hz, 2H, CH₂ isocianeto); 5,00 (s, 2H, CH₂ Z); 5,69 (s, 1H, CH DHPG); 6,66 – 7,09 (m, 12H, ArH); 7,52 (sl, 1H, αNH); 7,80 (sl, 1H, NH isocianeto) ppm.

Síntese de Z-Phe-M[Bzl(4-OMe)]DHPG(3,4-*O*-Boc)-Cy, 2ay'

O procedimento A foi seguido usando Z-Phe-OH (**2**) como ácido carboxílico, dicarbonato de di-*tert*-butil (4-formil-1,2-fenileno) (**y**) e isocianeto de ciclohexil (**a**) para dar origem ao aducto de Ugi **2ay'** (1,484 g; 83,8%) como um óleo amarelado, impuro. Composto foi sujeito a coluna cromatográfica usando como eluente acetato de etilo/éter de petróleo 1:3.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,04 – 1,67 (m, 28 H, 2C(CH₃)₃ + CH₂ ciclohexil); 2,84 – 3,05 (m, 2H, CH₂ Phe); 3,78 (s, 3H, OCH₃); 4,80 – 4,87 (m, 1H, αCH); 5,05 (s, 2H, CH₂ Z); 6,65 – 7,34 (m, 19H, ArH e 2NH) ppm.

Síntese de Z-Phe-M[Bzl(4-OMe)]DHPG(3,4-*O*-Boc)-Gly-OMe, 2by'

O procedimento A foi seguido usando Z-Phe-OH (**2**) como ácido carboxílico, dicarbonato de di-*tert*-butil (4-formil-1,2-fenileno) (**y**) e isocianoacetato de metilo (**b**) para dar origem ao aducto de Ugi **2by'** (1,338 g) impuro.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,52 (s, 18H, 2C(CH₃)₃); 3,70 (s, 3H, OMe isocianeto); 3,73 (s, 3H, OMe); 5,08 (s, 2H, CH₂ Z); 5,81 (s, 1H, DHPG); 6,79 – 7,32 (m, 14H, ArH e 2NH) ppm.

Síntese de Tos-ΔPhe- M[Bzl(4-OMe)]DHPG(3,4-*O*-Boc)-Cy, 3ay'

O procedimento A foi seguido usando Tos-ΔPhe-OH (**3**) como ácido carboxílico, dicarbonato de di-*tert*-butil (4-formil-1,2-fenileno) (**y**) e isocianeto de ciclohexil (**a**) para dar origem ao aducto de Ugi **3ay'**.

¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 1,04 – 1,59 (m, 28H, 2C(CH₃)₃ + CH₂ ciclohexil); 3,78 (s, 3H, OMe); 6,79 – 7,46 (m, 18H, ArH e 2NH) ppm.

4.2.3. Desproteção de aductos de Ugi

Síntese de Z-Gly-DHPG-Cy, **1ay**⁴

O procedimento B foi seguido usando como reagente o composto **1ay'** para dar origem ao produto final **1ay** (0,252 g; 74%) como um sólido branco (de acetato de etilo/éter dietílico).

Rf = 0.82 (éter de petróleo/acetato de etilo 1:4).

P.f. 162-163 °C.

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ = 1,11 – 1,71 (m, 10H, CH₂ ciclohexil); 3,63 – 3,67 (m, 1H, CH ciclohexil); 3,87 (d, J = 6,0 Hz, 2H, αCH₂); 5,10 (s, 2H, CH₂ Z); 5,32 (d, J = 7,6 Hz, 1H, αCH); 6,70 (dl, J = 7,6 Hz, 1H, NH); 6,73 (s, 2H, ArH); 6,91 (s, 1H, ArH); 7,26 – 7,39 (m, 6H, ArH + NH); 7,66 (d, J = 7,2 Hz, 1H, NH) ppm.

¹³C NMR (100,6 MHz, DMSO): δ = 25,62 (CH₂); 26,27 (CH₂); 29,26 (CH₂); 33,26 (CH₂); 33,38 (CH₂); 45,01 (αCH₂); 49,20 (CH ciclohexil); 57,16 (αCH); 66,93 (CH₂ Z); 115,45 (CH); 115,90 (CH); 119,80 (CH); 128,63 (2CH); 129,24 (3CH); 131,60 (C); 138,16 (C); 145,66 (C); 145,78 (C); 157,63 (C=O); 169,13 (C=O); 170,00 (C=O) ppm.

HRMS (ESI): m/z [M + H]⁺ calcd for C₂₄H₃₀N₃O₆: 456,2135; obtido: 456,2141.

Síntese de Phe-HMPG(3-OMe, 4-OH)-Cy, **1ax**³

O procedimento B foi seguido usando como reagente o composto **1ax'** para dar origem ao produto final **1ax** (0,254 g; 98%) como um sólido branco (de éter dietílico/etanol).

P.f. 169 – 175°C

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ = 1,05 – 1,74 (m, 10H, CH₂ ciclohexil); 3,67 – 3,73 (m, 6H, αCH₂ + OCH₃ + CH ciclohexil); 5,02 (s, 2H, CH₂ Z); 5,39 (d, J = 8,0 Hz, 1H, αCH); 6,67 – 6,80 (m, 3H, ArH); 6,93 – 6,97 (m, 2H, ArH); 7,30 – 6,50 (m, 3H, ArH); 6,99 (d, J = 1,6 Hz, 1H, ArH); 7,30 – 7,34 (m, 5H, ArH); 8,06 (d, J = 8,0 Hz, 1H, NH); 8,15 (d, J = 7,6 Hz, 1H, NH); 8,24 (d, J = 8,4 Hz, 1H, NH) ppm.

¹³C NMR (100,6 MHz, DMSO): δ = 24,34 (CH₂); 24,46 (CH₂); 25,16 (CH₂); 32,14 (CH₂); 32,27 (CH₂); 43,46 (αCH₂); 47,60 (CH ciclohexil); 55,09 (αCH); 55,55 (OCH₃); 65,45 (CH₂ Z); 111,10 (CH); 111,16 (CH); 113,73 (CH); 115,07 (CH); 115,16 (CH); 117,52 (C); 119,28 (CH); 119,47 (CH); 127,63 (CH); 127,80 (CH); 128,38 (CH); 129,43 (C); 129,91 (C); 137,07 (C); 145,90 (C); 146,14 (C); 147,36 (C); 157,69 (C=O); 165,31 (C=O); 168,60 (C=O) ppm.

HRMS (ESI): m/z [M + H]⁺ calcd para C₂₅H₃₁N₃O₆: 469,22129.

Síntese de Phe-HMPG(3-OMe, 4-OH)-Gly-OMe, **1bx**³

O procedimento B foi seguido usando como reagente o composto **1bx'** para dar origem ao produto

⁴ Síntese e caracterização realizada em trabalhos anteriores pelo grupo de investigação

final **1bx** (0,20 g; 87%) como um sólido laranja (de éter dietílico).

P.f. 194 – 195°C

^1H NMR (400 MHz, DMSO): δ = 3,60 (s, 3H, CO_2CH_3); 3,70 (d, J = 6,0 Hz, 2H, αCH_2); 3,75 (s, 3H, OCH_3); 3,85 (dl, 2H, αCH_2); 5,02 (s, 2H, CH_2 Z); 5,39 (d, J = 8,0 Hz, 1H, αCH); 6,70 (d, J = 8,4 Hz, 1H, ArH); 6,79 (d, J = 8,4 Hz, 1H, ArH); 6,99 (d, J = 1,6 Hz, 1H, ArH); 7,30 – 7,34 (m, 5H, ArH); 7,45 (t, J = 6,0 Hz, 1H, NH); 8,33 (d, J = 8,4 Hz, 1H, NH); 8,65 (t, J = 6,0 Hz, 1H, NH) ppm.

^{13}C NMR (100,6 MHz, DMSO): δ = 40,57 (CH_2); 43,34 (αCH_2); 51,68 (OCH_3); 55,64 (OCH_3); 56,02 (CH_2); 64,90 (CH_2); 65,40 (CH_2); 111,53 (CH); 115,03 (CH); 119,81 (CH); 127,62 (CH); 127,76 (CH); 128,34 (CH); 129,18 (C); 137,05 (C); 146,07 (C); 147,30 (C); 156,48 (C); 168,49 (C=O); 170,11 (C=O); 170,60 (C=O); 206,50 (C=O) ppm.

HRMS (ESI): m/z [M + H]⁺ calcd para $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_8$: 459,16416.

Síntese de Z-Gly-DHPG-Gly-OMe, **1by**

O procedimento B foi seguido usando como reagente o composto **1by'** para dar origem ao produto final **1by** (0,0340 g; 6,52%) como um óleo amarelado. Composto foi sujeito a coluna cromatográfica usando como eluente acetato de etilo/metanol 10:0,1.

^1H NMR [400 MHz, DMSO]: δ = 3,60 (s, 3H, OCH_3), 3,69 (d, J = 8 Hz, 2H, αCH_2), 3,83 (t, J = 8 Hz, 2H, CH_2), 5,02 (s, 2H, CH_2 Z), 5,31 (d, J = 8 Hz, 1H, βCH), 6,65 (s, 2H, ArH), 6,78 (s, 1H, ArH), 7,34 (s, 5H, ArH), 7,43 (t, J = 8 Hz, 1H, NH), 8,25 (d, J = 8 Hz, 1H, NH), 8,59 (t, J = 8 MHz, 1H, NH), 8,90 (sl, 2H, 2OH) ppm.

^{13}C NMR [100 MHz, DMSO]: δ = 41,96; 44,50; 53,29; 57,39; 67,29; 116,08; 116,81; 120,19; 128,81; 129,32; 129,60; 129,76; 137,62; 145,91; 145,99; 158,37; 170,86; 171,58; 172,51 ppm.

Síntese de Z-Phe-DHPG-Cy, **2ay**

O procedimento B foi seguido usando como reagente o composto **2ay'** para dar origem ao produto final **2ay** (0,03961 g; 12,58%) como um óleo laranja. Composto foi sujeito a coluna cromatográfica usando como eluente acetato de etilo/éter de petróleo 1:1.

^1H NMR [400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$]: δ = 1,12 – 1,83 (m, 10H, CH_2 ciclohexil); 3,61 – 3,75 (m, 3H, CH_2 Phe + CH ciclohexil); 4,45 – 4,54 (m, 2H, αCH); 5,04 (s, 2H, CH_2 Z); 6,65 (d, J = 8 Hz, 1H, CH DHPG); 6,91 (s, 1H, CH DHPG); 7,00 (d, J = 8 Hz, 1H, CH DHPG); 7,17 – 7,36 (m, 11H, ArH + NH); 7,88 (s, 1H, NH); 7,90 (s, 1H, NH) ppm.

^{13}C NMR [100 MHz, DMSO]: δ = 35,03 (CH_2); 35,69 (CH_2); 42,70 (CH_2); 42,81 (CH_2); 43,01 (CH_2); 48,18

(CH₂ Phe); 58,66 (CH); 64,96 (α CH Phe); 66,80 (CH) 76,18 (CH₂ Z); 124,85 (CH); 125,05 (CH); 125,36 (CH); 129,26 (CH); 129,47 (CH); 136,68 (CH); 137,87 (CH); 137,95 (CH); 138,00 (CH); 138,48 (CH); 138,63 (CH); 139,69 (CH); 139,72 (CH); 141,05 (C); 147,77 (C); 148,24 (C); 155,37 (C-OH); 155,47 (C-OH); 166,67 (C=O); 170,33 (C=O); 179,72 (C=O) ppm.

Síntese de Z-Phe-DHPG-Gly-OMe, 2by

O procedimento B foi seguido usando como reagente o composto **2by'** para dar origem ao produto final **2by** (0,1373 g; 17,56%) como um óleo avermelhado. Composto foi sujeito a coluna cromatográfica usando como eluente acetato de etilo/metanol 9:1.

¹H NMR [400 MHz, (CD₃)₂CO]: δ = 3,19 – 3,27 (m, 1H, β CH₂); 3,63 – 3,64 (m, 1H, β CH₂); 3,66 (s, 3H, OMe); 3,98 (s, 2H, α CH₂ Gly); 4,16 – 4,21 (m, 1H, α CH Phe); 4,82 (s, 2H, CH₂ Z); 5,37 e 5,49 (2s, 1H, CH DHPG); 6,71 – 7,31 (m, 16 H, ArH e 3NH) ppm.

Síntese de Tos- Δ Phe-DHPG-Cy, 3ay

O procedimento B foi seguido usando como reagente o composto **3ay'** para dar origem ao produto final **3ay** (0,171 g) impuro.

¹H NMR [400 MHz, (CD₃)₂CO]: δ = 1,13 – 1,83 (m, CH₂ ciclohexil); 2,60 (s, CH₃ tosil); 3,30 – 3,54 (m, CH ciclohexil); 5,24 (s, CH DHPG); 5,38 (s, β CH Δ Phe); 6,77 – 7,86 (m, ArH + NH) ppm.

4.2.4. Síntese da *N*-(4-toluenosulfonilo) desidrofenilalanina

Síntese de Tos- Δ Phe-OMe

A uma solução de Tos-Phe(β -OH)-OMe em 5 mL de acetonitrilo seco foram adicionados 1 equivalente de Boc₂O e 0,10 equivalentes de DMAP. A reação ocorreu sob agitação à temperatura ambiente e foi acompanhada por TLC. Quando se verificou a ausência do reagente inicial, adicionou-se TMG (2%). Ao fim de 24h de reação, sob agitação, a mistura reacional foi evaporada a pressão reduzida e o resíduo obtido dissolvido em acetato de etilo (60 mL) e lavado com KHSO₄ (1M), NaHCO₃ (1M) e brine (3x30 mL, cada). A fase orgânica foi seca em sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida dando origem ao composto Tos- Δ Phe-OMe (0,247 g; 41,8%) sob a forma de cristais amarelados.

¹H NMR [400 MHz, CDCl₃): δ = 2,37 (s, 3H, CH₃ tosil); 3,50 (s, 3H, OMe); 4,25 (dd, J = 4 Hz, J = 12 Hz, 2H, CH₂); 5,94 (d, J = 4 Hz, 1H, H β); 7,14 – 7,49 (m, 9H, ArH) ppm.

Síntese de Tos- Δ Phe-OH

A uma solução de Tos- Δ Phe-OMe (0,247 g) em dioxano (5 mL) foi adicionado 3 mL de NaOH (1M). A reação ocorreu sob agitação à temperatura ambiente. Ao fim de 16 horas adicionou-se à reação KHSO₄ (1M) de forma a acidificar a mistura reacional até um valor de pH entre os 2 e 3. Da adição resultou um precipitado que foi descartado, a mistura foi então evaporada a pressão reduzida. O resíduo obtido foi dissolvido em água desionizada (10 mL) e a fase aquosa lavada sucessivamente com acetato de etilo (5x10 mL), sendo recolhida a fase orgânica que foi seca com sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado a pressão reduzida dando origem ao composto Tos- Δ Phe-OH (0,206 g; 87,03%) sob a forma de cristais brancos.

¹H NMR [400 MHz, DMSO): δ = 2,35 (s, 3H, CH₃ tosil); 4,01 – 4,05 (m, 2H, CH₂); 7,28 – 7,77 (m, 9H, ArH) ppm.

5. Referências

- (1) Reddy, P. H.; Manczak, M.; Kandimalla, R. Mitochondria-targeted small molecule SS31: a potential candidate for the treatment of Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* **2017**, *26*, 1483-1496.
- (2) Teixeira, J.; Deus, C. M.; Borges, F.; Oliveira, P. J. Mitochondria: Targeting mitochondrial reactive oxygen species with mitochondriotropic polyphenolic-based antioxidants. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2018**, *97*, 98-103.
- (3) Sorriento, D.; Pascale, A. V.; Finelli, R.; Carillo, A. L.; Annunziata, R.; Trimarco, B.; Iaccarino, G. Targeting mitochondria as therapeutic strategy for metabolic disorders. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 604685.
- (4) Apostolova, N.; Victor, V. M. Molecular strategies for targeting antioxidants to mitochondria: therapeutic implications. *Antioxid. Redox Signal.* **2015**, *22*, 686-729.
- (5) Cerrato, C. P.; Pirsinu, M.; Vlachos, E. N.; Langel, U. Novel cell-penetrating peptide targeting mitochondria. *FASEB J.* **2015**, *29*, 4589-4599.
- (6) Derakhshankhah, H.; Jafari, S. Cell penetrating peptides: A concise review with emphasis on biomedical applications. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *108*, 1090-1096.
- (7) Zhao, T.; Liu, X.; Singh, S.; Liu, X.; Zhang, Y.; Sawada, J.; Komatsu, M.; Belfield, K. D. Mitochondria Penetrating Peptide-Conjugated TAMRA for Live-Cell Long-Term Tracking. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30*, 2312-2316.
- (8) Cerrato, C. P.; Langel, Ü. Cell-Penetrating Peptides Targeting Mitochondria. In *Mitochondrial Biology and Experimental Therapeutics*, 1^a edição, **2018**; pp 593-611.
- (9) Szeto, H. H. Mitochondria-targeted peptide antioxidants: novel neuroprotective agents. *AAPS J.* **2006**, *8*, E521-E531.
- (10) Copolovici, D. M.; Lupitu, A. I. Peptide-based systems for drug delivery. In *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*, 1^a edição, **2018**; pp 409-429.
- (11) Monteiro, L. S.; Paiva-Martins, F.; Oliveira, S.; Machado, I.; Costa, M. An efficient one-pot synthesis of polyphenolic amino acids and evaluation of their radical-scavenging activity. *Bioorg. Chem.* **2019**, *89*, 102983.
- (12) Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 44-84.
- (13) Pham-Huy, L. A.; He, H.; Pham-Huy, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.* **2008**, *4*, 89.
- (14) Fridovich, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *893*, 13-18.
- (15) Machlin, L. J.; Bendich, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients 1. *FASEB J.* **1987**, *1*, 441-445.
- (16) Fu, S.; Davies, M. J.; Stocker, R.; Dean, R. Evidence for roles of radicals in protein oxidation

in advanced human atherosclerotic plaque. *Biochem. J.* **1998**, *333*, 519-525.

(17) Ridnour, L. A.; Isenberg, J. S.; Espey, M. G.; Thomas, D. D.; Roberts, D. D.; Wink, D. A. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 13147-13152.

(18) Szeto, H. H. Cell-permeable, mitochondrial-targeted, peptide antioxidants. *AAPS J.* **2006**, *8*, E277-E283.

(19) Halliwell, B. Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* **1996**, *16*, 33-50.

(20) Ferreira, P. M.; Monteiro, L. S.; Coban, T.; Suzen, S. Comparative effect of N-substituted dehydroamino acids and α -tocopherol on rat liver lipid peroxidation activities. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2009**, *24*, 967-971.

(21) Bouayed, J.; Bohn, T. Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2010**, *3*, 228-237.

(22) Pisoschi, A. M.; Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97*, 55-74.

(23) Gülçin, I. Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids* **2007**, *32*, 431.

(24) Ndhala, A. R.; Moyo, M.; Van Staden, J. Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules? *Molecules* **2010**, *15*, 6905-6930.

(25) Bast, A.; Haenen, G. R. The toxicity of antioxidants and their metabolites. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2002**, *11*, 251-258.

(26) Suzen, S.; Gurkok, G.; Coban, T. Novel N-acyl dehydroalanine derivatives as antioxidants: studies on rat liver lipid peroxidation levels and DPPH free radical scavenging activity. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2006**, *21*, 179-185.

(27) Hubbard, B. K.; Thomas, M. G.; Walsh, C. Biosynthesis of Lp-hydroxyphenylglycine, a non-proteinogenic amino acid constituent of peptide antibiotics. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 931-942.

(28) Sussmuth, R. D.; Wohlleben, W. The biosynthesis of glycopeptide antibiotics—a model for complex, non-ribosomally synthesized, peptidic secondary metabolites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *63*, 344-350.

(29) Choroba, O. W.; Williams, D. H.; Spencer, J. Biosynthesis of the vancomycin group of antibiotics: involvement of an unusual dioxygenase in the pathway to (S)-4-hydroxyphenylglycine. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5389-5390.

(30) Sedo, J.; Saiz-Poseu, J.; Busque, F.; Ruiz-Molina, D. Catechol-based biomimetic functional materials. *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 653-701.

(31) Gorton, J.; Jameson, R. Complexes of doubly chelating ligands. Part III. Proton and copper (II) complexes of 3, 4-dihydroxyphenylglycine (DOPG). *J.C.S. Dalton* **1972**, 307-310.

- (32) Sugumaran, M.; Tan, S.; Sun, H.-L. Tyrosinase-catalyzed oxidation of 3, 4-dihydroxyphenylglycine. *Arch. BioChem. Biophys.* **1996**, *329*, 175-180.
- (33) Gasowska, B.; Wojtasek, H.; Hurek, J.; Drag, M.; Nowak, K.; Kafarski, P. Redox reaction between amino-(3,4-dihydroxyphenyl)methyl phosphonic acid and dopaquinone is responsible for the apparent inhibitory effect on tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 4098-4104.
- (34) Bender, A. M.; Griggs, N. W.; Gao, C.; Trask, T. J.; Traynor, J. R.; Mosberg, H. I. Rapid Synthesis of Boc-2',6'-dimethyl-L-tyrosine and Derivatives and Incorporation into Opioid Peptidomimetics. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 1199-1203.
- (35) Siodlak, D. alpha,beta-Dehydroamino acids in naturally occurring peptides. *Amino Acids* **2015**, *47*, 1-17.
- (36) Monteiro, L. S.; Oliveira, S.; Paiva-Martins, F.; Ferreira, P. M. T.; Pereira, D. M.; Andrade, P. B.; Valentão, P. Synthesis and preliminary biological evaluation of new phenolic and catecholic dehydroamino acid derivatives. *Tetrahedron* **2017**, *73*, 6199-6209.
- (37) König, B.; Bonauer, C.; Walenzyk, T. α,β -Dehydroamino Acids. *Synthesis* **2006**, *2006*, 1-20.
- (38) Wei, Q.-Y.; Jiang, H.; Zhang, J.-X.; Guo, P.-F.; Wang, H. Synthesis of *N*-hydroxycinnamoyl amino acid ester analogues and their free radical scavenging and antioxidative activities. *Med. Chem. Res.* **2011**, *21*, 1905-1911.
- (39) Son, S.; Lewis, B. A. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure– activity relationship. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 468-472.
- (40) Spasova, M.; Kortenska-Kancheva, V.; Totseva, I.; Ivanova, G.; Georgiev, L.; Milkova, T. Synthesis of cinnamoyl and hydroxycinnamoyl amino acid conjugates and evaluation of their antioxidant activity. *J. Pept. Sci.* **2006**, *12*, 369-375.
- (41) Kwak, S.-Y.; Lee, S.; Yang, J.-K.; Lee, Y.-S. Antioxidative activities of caffeoyl-proline dipeptides. *Food Chem.* **2012**, *130*, 847-852.
- (42) De, P.; Baltas, M.; Bedos-Belval, F. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents-a review. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 1672-1703.
- (43) Fu, J.; Cheng, K.; Zhang, Z. M.; Fang, R. Q.; Zhu, H. L. Synthesis, structure and structure-activity relationship analysis of caffeic acid amides as potential antimicrobials. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 2638-2643.
- (44) G. Chochkova, M.; Y. Chorbadzhiyska, E.; I. Ivanova, G.; Najdenski, H.; Ninova, M.; S. Milkova, T. Antimicrobial and Radical Scavenging Activities of *N*-Hydroxycinnamoyl - L-Cysteine and - L-Proline Ethyl Esters. *Nat. Prod. J.* **2012**, *2*, 50-54.
- (45) Wei, Q.-Y.; Jiang, H.; Zhang, J.-X.; Zhang, C.; Guo, P.-F. Antimicrobial Activities of the Cinnamoyl Amide of Amino Acid Derivatives. *Asian J. Chem.* **2012**, *24*.
- (46) Georgiev, L.; Chochkova, M.; Totseva, I.; Seizova, K.; Marinova, E.; Ivanova, G.; Ninova, M.; Najdenski, H.; Milkova, T. Anti-tyrosinase, antioxidant and antimicrobial activities of

hydroxycinnamoylamides. *Med. Chem. Res.* **2012**, *22*, 4173-4182.

(47) Lee, S.; Han, J. M.; Kim, H.; Kim, E.; Jeong, T. S.; Lee, W. S.; Cho, K. H. Synthesis of cinnamic acid derivatives and their inhibitory effects on LDL-oxidation, acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1 and -2 activity, and decrease of HDL-particle size. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4677-4681.

(48) Flueraru, M.; Chichirau, A.; Chepelev, L. L.; Willmore, W. G.; Durst, T.; Charron, M.; Barclay, L. R.; Wright, J. S. Cytotoxicity and cytoprotective activity in naphthalenediols depends on their tendency to form naphthoquinones. *Free Radic. Biol. Med.* **2005**, *39*, 1368-1377.

(49) Silvia, V.; Baldisserotto, A.; Scalambra, E.; Malisardi, G.; Durini, E.; Manfredini, S. Novel molecular combination deriving from natural aminoacids and polyphenols: Design, synthesis and free-radical scavenging activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *50*, 383-392.

(50) Rodriguez Plaza, J. G.; Morales-Nava, R.; Diener, C.; Schreiber, G.; Gonzalez, Z. D.; Lara Ortiz, M. T.; Ortega Blake, I.; Pantoja, O.; Volkmer, R.; Klipp, E.; Herrmann, A.; Del Rio, G. Cell penetrating peptides and cationic antibacterial peptides: two sides of the same coin. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 14448-14457.

(51) Habault, J.; Poyet, J. L. Recent Advances in Cell Penetrating Peptide-Based Anticancer Therapies. *Molecules* **2019**, *24*.

(52) Aroui, S.; Kenani, A.: Cell-Penetrating Peptides: A Challenge for Drug Delivery. In *Cheminformatics and its Applications*, IntechOpen, **2020**.

(53) Khafagy el, S.; Morishita, M. Oral biodrug delivery using cell-penetrating peptide. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 531-539.

(54) Jones, S. W.; Christison, R.; Bundell, K.; Voyce, C. J.; Brockbank, S. M.; Newham, P.; Lindsay, M. A. Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *145*, 1093-1102.

(55) Nasrollahi, S. A.; Taghibiglou, C.; Azizi, E.; Farboud, E. S. Cell-penetrating peptides as a novel transdermal drug delivery system. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2012**, *80*, 639-646.

(56) Fonseca, S. B.; Pereira, M. P.; Kelley, S. O. Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 953-964.

(57) Ram, N.; Aroui, S.; Jaumain, E.; Bichraoui, H.; Mabrouk, K.; Ronjat, M.; Lortat-Jacob, H.; De Waard, M. Direct Peptide Interaction with Surface Glycosaminoglycans Contributes to the Cell Penetration of Maurocalcine. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 24274-24284.

(58) Li, Z.; Zhang, Y.; Zhu, D.; Li, S.; Yu, X.; Zhao, Y.; Ouyang, X.; Xie, Z.; Li, L. Transporting carriers for intracellular targeting delivery via non-endocytic uptake pathways. *Drug Deliv.* **2017**, *24*, 45-55.

(59) Derossi, D.; Calvet, S.; Trembleau, A.; Brunissen, A.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 18188-18193.

(60) Matsuzaki, K.; Yoneyama, S.; Murase, O.; Miyajima, K. Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan X translocation. *Biochem.* **1996**, *35*, 8450-8456.

- (61) Rothbard, J. B.; Jessop, T. C.; Lewis, R. S.; Murray, B. A.; Wender, P. A. Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9506-9507.
- (62) Pouny, Y.; Rapaport, D.; Mor, A.; Nicolas, P.; Shai, Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogs with phospholipid membranes. *Biochem.* **1992**, *31*, 12416-12423.
- (63) Mudhakar, D.; Harashima, H. Learning from the viral journey: how to enter cells and how to overcome intracellular barriers to reach the nucleus. *AAPS J.* **2009**, *11*, 65-77.
- (64) Kalafatovic, D.; Giralt, E. Cell-Penetrating Peptides: Design Strategies beyond Primary Structure and Amphipathicity. *Molecules* **2017**, *22*.
- (65) Mickan, A.; Sarko, D.; Haberkorn, U.; Mier, W. Rational design of CPP-based drug delivery systems: considerations from pharmacokinetics. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2014**, *15*, 200-209.
- (66) Carolina Pulido, X.; Royo, M.; Albericio, F.; Rodríguez, H. Péptidos que atraviesan la membrana celular como potenciales transportadores de fármacos. *Bionatura* **2016**, *1*.
- (67) Milletti, F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov. Today* **2012**, *17*, 850-860.
- (68) Guo, Z.; Peng, H.; Kang, J.; Sun, D. Cell-penetrating peptides: Possible transduction mechanisms and therapeutic applications. *Biomed. Rep.* **2016**, *4*, 528-534.
- (69) Pooga, M.; Langel, U. Classes of Cell-Penetrating Peptides. *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1324*, 3-28.
- (70) Tunnemann, G.; Ter-Avetisyan, G.; Martin, R. M.; Stockl, M.; Herrmann, A.; Cardoso, M. C. Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 469-476.
- (71) Zahid, M.; Robbins, P. D. Cell-type specific penetrating peptides: therapeutic promises and challenges. *Molecules* **2015**, *20*, 13055-13070.
- (72) Mueller, J.; Kretzschmar, I.; Volkmer, R.; Boisguerin, P. Comparison of cellular uptake using 22 CPPs in 4 different cell lines. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 2363-2374.
- (73) Oehlke, J.; Scheller, A.; Wiesner, B.; Krause, E.; Beyermann, M.; Klauschenz, E.; Melzig, M.; Bienert, M. Cellular uptake of an α -helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.* **1998**, *1414*, 127-139.
- (74) Pujals, S.; Giralt, E. Proline-rich, amphipathic cell-penetrating peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 473-484.
- (75) Ziegler, A. Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 580-597.
- (76) Madani, F.; Lindberg, S.; Langel, U.; Futaki, S.; Graslund, A. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J. Biophys.* **2011**, *2011*, 414729.

- (77) Li, L.; Geisler, I.; Chmielewski, J.; Cheng, J. X. Cationic amphiphilic polyproline helix P11LRR targets intracellular mitochondria. *J. Control Release* **2010**, *142*, 259-266.
- (78) Fernandez-Carneado, J.; Kogan, M. J.; Castel, S.; Giralt, E. Potential peptide carriers: amphipathic proline-rich peptides derived from the N-terminal domain of gamma-zein. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 1811-1814.
- (79) Wagstaff, K. M.; Jans, D. A. Protein transduction: cell penetrating peptides and their therapeutic applications. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 1371-1387.
- (80) Magzoub, M.; Gräslund, A. Cell-penetrating peptides: small from inception to application. *Q. Rev. Biophys.* **2004**, *37*, 147-195.
- (81) Foged, C.; Nielsen, H. M. Cell-penetrating peptides for drug delivery across membrane barriers. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, *5*, 105-117.
- (82) Feni, L.; Neundorff, I. The Current Role of Cell-Penetrating Peptides in Cancer Therapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2017**, *1030*, 279-295.
- (83) Regberg, J.; Srimanee, A.; Langel, U. Applications of cell-penetrating peptides for tumor targeting and future cancer therapies. *Pharmaceuticals (Basel)* **2012**, *5*, 991-1007.
- (84) Reissmann, S. Cell penetration: scope and limitations by the application of cell-penetrating peptides. *J. Pept. Sci.* **2014**, *20*, 760-784.
- (85) Pooga, M.: Synthesis of cell-penetrating peptides for cargo delivery. In *Peptide Synthesis and Applications*; Springer, 2005; pp 77-89.
- (86) Margus, H.; Padari, K.; Pooga, M. Cell-penetrating peptides as versatile vehicles for oligonucleotide delivery. *Mol. Ther.* **2012**, *20*, 525-533.
- (87) Langel, Ü.: Classes and Applications of Cell-Penetrating Peptides. In *CPP, Cell-Penetrating Peptides*, 1ª edição, **2019**; pp 29-82.
- (88) Fu, L. S.; Wu, Y. R.; Fang, S. L.; Tsai, J. J.; Lin, H. K.; Chen, Y. J.; Chen, T. Y.; Chang, M. D. Cell Penetrating Peptide Derived from Human Eosinophil Cationic Protein Decreases Airway Allergic Inflammation. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 12352.
- (89) Gurney, L. R. I.; Taggart, J.; Tong, W. C.; Jones, A. T.; Robson, S. C.; Taggart, M. J. Inhibition of Inflammatory Changes in Human Myometrial Cells by Cell Penetrating Peptide and Small Molecule Inhibitors of NFkappaB. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2966.
- (90) Peng, J.; Rao, Y.; Yang, X.; Jia, J.; Wu, Y.; Lu, J.; Tao, Y.; Tu, W. Targeting neuronal nitric oxide synthase by a cell penetrating peptide Tat-LK15/siRNA bioconjugate. *Neurosci. Lett.* **2017**, *650*, 153-160.
- (91) Garcia-Caballero, A.; Gadotti, V. M.; Chen, L.; Zamponi, G. W. A cell-permeant peptide corresponding to the cUBP domain of USP5 reverses inflammatory and neuropathic pain. *Mol. Pain* **2016**, *12*.
- (92) Ma, W. Y.; Murata, E.; Ueda, K.; Kuroda, Y.; Cao, M. H.; Abe, M.; Shigemitsu, K.; Hirose, M. A

synthetic cell-penetrating peptide antagonizing TrkA function suppresses neuropathic pain in mice. *J. Pharmacol. Sci.* **2010**, *114*, 79-84.

(93) Jia, L.; Gorman, G. S.; Coward, L. U.; Noker, P. E.; McCormick, D.; Horn, T. L.; Harder, J. B.; Muzzio, M.; Prabhakar, B.; Ganesh, B.; Das Gupta, T. K.; Beattie, C. W. Preclinical pharmacokinetics, metabolism, and toxicity of azurin-p28 (NSC745104) a peptide inhibitor of p53 ubiquitination. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2011**, *68*, 513-524.

(94) A Betts, C.; JA Wood, M. Cell penetrating peptide delivery of splice directing oligonucleotides as a treatment for Duchenne muscular dystrophy. *Curr. Pharm. Des* **2013**, *19*, 2948-2962.

(95) Koutsokeras, A.; Purkayastha, N.; Rigby, A.; Subang, M. C.; Sclanders, M.; Vessillier, S.; Mullen, L.; Chernajovsky, Y.; Gould, D. Generation of an efficiently secreted, cell penetrating NF-kappaB inhibitor. *FASEB J.* **2014**, *28*, 373-381.

(96) Gurbel, P. A.; Bliden, K. P.; Turner, S. E.; Tantry, U. S.; Gesheff, M. G.; Barr, T. P.; Covic, L.; Kuliopulos, A. Cell-Penetrating Pepducin Therapy Targeting PAR1 in Subjects With Coronary Artery Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2016**, *36*, 189-197.

(97) Nasrollahi, S. A.; Fouladdel, S.; Taghibiglou, C.; Azizi, E.; Farboud, E. S. A peptide carrier for the delivery of elastin into fibroblast cells. *Int. J. Dermatol.* **2012**, *51*, 923-929.

(98) Shi, N. Q.; Qi, X. R.; Xiang, B.; Zhang, Y. A survey on "Trojan Horse" peptides: opportunities, issues and controlled entry to "Troy". *J. Control Release* **2014**, *194*, 53-70.

(99) Langel, Ü.: Clinical Trials and Commercialization Using CPPs. In *CPP, Cell-Penetrating Peptides*, Springer, 1^a edição, **2019**; pp 395-408.

(100) Ruczynski, J.; Wierzbicki, P. M.; Kogut-Wierzbicka, M.; Mucha, P.; Siedlecka-Kroplewska, K.; Rekowski, P. Cell-penetrating peptides as a promising tool for delivery of various molecules into the cells. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2014**, *52*, 257-269.

(101) Rosania, G. R. Supertargeted chemistry: identifying relationships between molecular structures and their sub-cellular distribution. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 659-685.

(102) Hoye, A. T.; Davoren, J. E.; Wipf, P.; Fink, M. P.; Kagan, V. E. Targeting mitochondria. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 87-97.

(103) Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **2009**, *417*, 1-13.

(104) Rocha, M.; Hernandez-Mijares, A.; Garcia-Malpartida, K.; Banuls, C.; Bellod, L.; M Victor, V. Mitochondria-targeted antioxidant peptides. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 3124-3131.

(105) Anders, M.; Robotham, J. L.; Sheu, S.-S. Mitochondria: new drug targets for oxidative stress-induced diseases. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2006**, *2*, 71-79.

(106) Victor, V.; Rocha, M. Targeting antioxidants to mitochondria: a potential new therapeutic strategy for cardiovascular diseases. *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 845-863.

- (107) Galley, H. F. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br. J. Anaesth.* **2011**, *107*, 57-64.
- (108) Murphy, M. P. Targeting lipophilic cations to mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerget.* **2008**, *1777*, 1028-1031.
- (109) Horton, K. L.; Stewart, K. M.; Fonseca, S. B.; Guo, Q.; Kelley, S. O. Mitochondria-Penetrating Peptides. *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 375-382.
- (110) Chamberlain, G. R.; Tulumello, D. V.; Kelley, S. O. Targeted delivery of doxorubicin to mitochondria. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1389-1395.
- (111) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M.: *Free radicals in biology and medicine*; Oxford University Press, USA, 2015.
- (112) Kwiatkowski, J. L. Real-world use of iron chelators. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2011**, *2011*, 451-458.
- (113) Alta, R. Y.; Vitorino, H. A.; Goswami, D.; Liria, C. W.; Wisnovsky, S. P.; Kelley, S. O.; Machini, M. T.; Esposito, B. P. Mitochondria-penetrating peptides conjugated to desferrioxamine as chelators for mitochondrial labile iron. *PLoS One* **2017**, *12*, e0171729.
- (114) Smith, R. A.; Murphy, M. P. Mitochondria-targeted antioxidants as therapies. *Discov. Med.* **2011**, *11*, 106-114.
- (115) Szeto, H. H. Mitochondria-targeted cytoprotective peptides for ischemia-reperfusion injury. *Antioxid. Redox Signal.* **2008**, *10*, 601-619.
- (116) Ugi, I.; Dömling, A.; Hörl, W. Multicomponent reactions in organic chemistry. *Endeavour* **1994**, *18*, 115-122.
- (117) Ugi, I.; Demharter, A.; Hörl, W.; Schmid, T. Ugi reactions with trifunctional α -amino acids, aldehydes, isocyanides and alcohols. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 11657-11664.
- (118) Ugi, I.; Werner, B.; Dömling, A. The chemistry of isocyanides, their multicomponent reactions and their libraries. *Molecules* **2003**, *8*, 53-66.
- (119) Cheron, N.; Ramozzi, R.; El Kaim, L.; Grimaud, L.; Fleurat-Lessard, P. Challenging 50 years of established views on Ugi reaction: a theoretical approach. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 1361-1366.
- (120) Ugi, I. Multikomponentenreaktionen (MCR). I. Perspektiven von Multikomponentenreaktionen und deren Bibliotheken. *J. prakt. Chem.* **1997**, *339*, 499-516.
- (121) Strecker, A. Ueber die künstliche Bildung der Milchsäure und einen neuen, dem Glycocoll homologen Körper. *Liebigs Ann.* **1850**, *75*, 27-45.
- (122) Kappe, C. O. 100 years of the Biginelli dihydropyrimidine synthesis. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 6937-6963.
- (123) Mannich, C.; Krösche, W. Ueber ein kondensationsprodukt aus formaldehyd, ammoniak und antipyrin. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1912**, *250*, 647-667.

- (124) Franz, A.; Eschler, P.-Y.; Tharin, M.; Neier, R. The preparation and the cascade reactions of N-butadienyl-N-alkylketeneN, O-tert-butyldimethylsilyl acetals. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 11643-11656.
- (125) Passerini, M.; Simone, L. Isonitriles. I. Compound of p-isonitrileazobenzene with acetone and acetic acid. *Gazz. Chim. Ital* **1921**, *51*, 126-129.
- (126) Bucherer, H. T.; Steiner, W. Syntheses of hydantoins. I. Reactions of α -hydroxy and α -amino nitriles. *J. Prakt. Chem.* **1934**, *140*, 291-316.
- (127) Lambruschini, C.; Galante, D.; Moni, L.; Ferraro, F.; Gancia, G.; Riva, R.; Traverso, A.; Banfi, L.; D'Arrigo, C. Multicomponent, fragment-based synthesis of polyphenol-containing peptidomimetics and their inhibiting activity on beta-amyloid oligomerization. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 9331-9351.
- (128) Pan, S. C.; List, B. Catalytic three-component Ugi reaction. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 3622-3625.
- (129) Barthelon, A.; El Kaïm, L.; Gizolme, M.; Grimaud, L. Thiols in Ugi- and Passerini-Smiles-Type Couplings. *Eur. J. of Org. Chem.* **2008**, *2008*, 5974-5987.
- (130) Faggi, C.; Garcia-Valverde, M.; Marcaccini, S.; Menchi, G. Isolation of Ugi four-component condensation primary adducts: A straightforward route to isocoumarins. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 788-791.
- (131) Bock, H.; Ugi, I. Multicomponent reactions. II. Stereoselective synthesis of 1 (S)-camphor-2-cis-methylidene-isocyanide and its application in Passerini-and Ugi-reaction. *J. prakt. Chem.* **1997**, *339*, 385-389.
- (132) Brauch, S.; Gabriel, L.; Westermann, B. Seven-component reactions by sequential chemoselective Ugi-Mumm/Ugi-Smiles reactions. *Chem. Comm. (Camb)* **2010**, *46*, 3387-3389.
- (133) Holden, C. M.; Greaney, M. F. Modern Aspects of the Smiles Rearrangement. *Chemistry* **2017**, *23*, 8992-9008.
- (134) Hulme, C.; Gore, V. " Multi-component Reactions: Emerging Chemistry in Drug Discovery"From Xylocain to Crixivan'. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 51-80.
- (135) Sampaio-Dias, I. E.; Silva-Reis, S. C.; Garcia-Mera, X.; Brea, J.; Loza, M. I.; Alves, C. S.; Algarra, M.; Rodriguez-Borges, J. E. Synthesis, Pharmacological, and Biological Evaluation of MIF-1 Picolinoyl Peptidomimetics as Positive Allosteric Modulators of D2R. *ACS Chem. Neurosci.* **2019**, *10*, 3690-3702.