

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Universidade de São Paulo

19.071

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**“PREPARAÇÃO DE ÉSTERES DE PEPTÍDEOS
ATRAVÉS DE SOLVÓLISE E AMINÓLISE DE
PEPTIDIL-RESINAS DE KAISER ASSISTIDAS
POR Ca^{2+} ”**

Cléria Mendonça de Moraes

**Tese submetida ao Departamento de Bioquímica
do Instituto de Química da Universidade de São Paulo,
como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Terêsa Machini de Miranda

São Paulo, 2000

**“Preparação de Ésteres de Peptídeos Através de
Solvólise e Aminólise de Peptidil-Resinas de Kaiser
Assistidas por Ca²⁺”**

CLÉRIA MENDONÇA DE MORAES

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovada por:

Profa. Dra. MARIA TERÊSA MACHINI DE MIRANDA
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. IOLANDA MIDEA CUCCOVIA
IQ - USP

Profa. Dra. LILIANA MARZORATI
IQ - USP

→ melhor professora do mundo.

Profa. Dra. ELIZABETH IGNE FERREIRA
FCF - USP

Prof. Dr. REINALDO MARCHETTO
IQ - UNESP - Araraquara

**SÃO PAULO
11 DE MAIO DE 2000.**

*Aos meus pais,
pelo amor, apoio e incentivo.*

*À minha irmã e ao meu irmão,
meus melhores amigos.*

Agradeço

à Profa. Dra. Maria Terêsa Machini de Miranda, pela oportunidade, ensinamentos, orientação e paciência.

ao Prof. Dr. Marcelo Porto Bemquerer, pela colaboração ativa no início deste trabalho, pelas sugestões e instrutivas discussões.

à Daniela Manz, aluna de Iniciação Científica que participou na etapa inicial do desenvolvimento deste projeto.

ao aluno de Iniciação Científica Klaus Nobre da Silva, pela participação ativa neste trabalho e pelo auxílio na realização dos estudos de solubilidade dos sais de metais através de eletroforese capilar, incorporação da arginina à resina oxima, aminólise e solvólise de peptidil-KOR.

à Profa. Dra Ana Paula Valente e ao Prof. Dr. Fábio C. de Almeida do Depto de Bioquímica Médica da UFRJ, pela colaboração na realização dos estudos de RMN de alta resolução sob o ângulo mágico.

ao Prof. Dr. Hermi Brito do IQ-USP pelo EuCl_3 fornecido, pela colaboração e contribuições durante os experimentos de luminescência do Eu^{3+} .

à Prof. Dra. Marina F.M. Tavares do IQ-USP pela colaboração, auxílio na elaboração dos experimentos de eletroforese capilar.

à Lídia pela atenção, pelo auxílio na utilização do espectrômetro de massa do B12I e também pela amizade.

ao Prof. Dr. Massuo J. Kato pela disponibilidade do espectrômetro de massa e ao Leandro pelo auxílio prestado na aquisição dos dados.

ao Prof. Dr Eduardo Maffud Cilli do Depto de Biofísica da UNIFESP, pelo auxílio prestado na determinação do volume dos grãos das peptidil-KOR e KOR, pelas discussões e amizade.

ao Dr. Eberhard Humpfer da Bruker pelas figuras do rotor e do probe de RMN de alta resolução sob o ângulo mágico, pelas sugestões e pelas discussões.

à Izaura N. Toma pela análise de aminoácidos de parte de minhas amostras e amizade.

ao Cleber W. Liria pelas análises de aminoácidos de minhas amostras a partir de 1998 e pelo apoio técnico no laboratório.

ao CNPq pela bolsa concedida e à FAPESP pelo auxílio financeiro ao projeto coordenado pela Profa. Dra. M. Terêsa M. Miranda.

à Pró-Reitoria de Pós-Graduação pelo auxílio financeiro para a participação no 25th. European Peptide Symposium.

ao Brian pela amizade, pela ajuda em todas as correções de textos escritos em inglês e pelos happy hours com a nossa turma.

aos meus queridos colegas de laboratório: Marcos Paulo, Mirta, Giselli, Sérgio, Guto e Neusa pela troca de informações e amizade.

ao Nicolau pela curta, mas agradável convivência.

ao Prof. Dr. Antônio de Miranda pelo auxílio na revisão de alguns textos, pelas discussões e pela amizade.

à Prof. Mineko Tominaga pela atenção e simpatia.

aos meus grandes amigos do Bloco 11: Luiz Sidney, Joaquim, Ricardo e Mirian, pela amizade.

aos meus queridos amigos do Bloco 8: Célia Pesquero, Sonia Nan, Larisse, Andréa, Cristiane, Gilberto, PC, Chico, Denise, Flávia, Pilar e Orlando.

aos meus amigos do Bloco 9, 10 e 12: Pedro, Felipe, Ribamar, Augusto, Janice, Ana Paula, Valdemir, Jorge e Leonardo.

ao meus grandes amigos do Bloco 4: Paulo Firmino, Celize, Cheng e Flávio, que estão sempre dispostos a ajudarem em tudo.

à minha querida companheira de inglês Antonieta e a nossa Profa. Karin também.

à Cristina Keiko e à Cláudia pela inestimável amizade.

à amiga Eveline que, apesar da distância, está sempre me acompanhando, apoiando e incentivando a descobrir novos caminhos.

à Marcia Branciforti (amiga campineira), à Simone Fontes Arantes e Laura, pela amizade e por todos as referências enviadas.

aos meus amigos Sandra Mara, Ute, Juergen, Martin, Lucinês, Elaine, Márcia da Siemens, Erika Saito e Irina pela amizade.

a todo o corpo docente, técnico e administrativo do IQ-USP e especialmente à Miriam da Central Análítica e à Sílvia Baader.

a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, colaboraram para a concretização deste trabalho.

Lista de abreviações

As abreviações utilizadas estão de acordo com as recomendações da "IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature" (*J. Biol. Chem.*, **264**, 668-673, 1989).

Ac: acetil

ACN: acetonitrila

BOC: t-butiloxicarbonil

BOP: hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)fosfônio

Bzl: benzil

BzIOH: álcool benzílico

BzISH: álcool tiobenzílico

(2-Cl-Z): 2-cloro-benziloxicarbonil

CCK: colecistocinina

cHex: ciclohexil

CP: "cross polarization"

CPMG: "Carr-Purcell-Meibom-Gill"

DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno

DCC: dicitclohexilcarbodiimida

DCM: diclorometano

DIC: diisopropilcarbodiimida

DIPEA: diisopropiletilamina

DMF: N,N'-dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

DMSO-d₆: dimetilsulfóxido deuterado

DNA: ácido desoxiribonucleico

EI-MS: "eletronspray-mass spectrometry"

Et: etil

EtOH: etanol

FAB-MS: "fast atom bombardment"

FID: "free induction decay"

Fmoc: 9-fluorenilmetoxicarbonil

GA: grau de aminoacilação
GS: grau de substituição
HAc: ácido acético
HIBA: ácido hidroxiiisobutírico
HMQC: "heteronuclear multiple quantum coherence"
HPLC: "high resolution liquid chromatographic"
HOBt: 1-hidroxi-benzotriazol
HR-MAS: "high resolution magic angle spinning"
¹H-RMN: ressonância magnética nuclear protônica
HR-RMN: ressonância magnética nuclear de alta resolução
KOR: resina oxima de Kaiser
LDMS: "laser desorption mass spectrometry"
MAS: "magic angle spinning"
Me: metil
MEE: metoxi-etoxi-etil
MeOH: metanol
MTP: 4-metil-tio-fenol
Mtr: 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzenosulfonil
NMP: N-metilpirrolidona
NOESY: "nuclear overhauser effect spectroscopy"
OAc: acetato
Pac: fenacil
Pbf: 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonil
PS: suporte polimérico
PyBOP: hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfônio
RMN: ressonância magnética nuclear
RNA: ácido ribonucléico
RP-HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência em fase inversa.
SASRIN: resina álcool 2-metoxi-4-benziloxibenzilíco
SCC: síntese enzimática cineticamente controlada
SPFS: síntese de peptídeos em fase sólida
STC: síntese enzimática termodinamicamente controlada

TBTU: 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluorborato

TEA: trietilamina

TFA: ácido trifluoroacético

TFMSA: ácido trifluorometanosulfônico

TOCSY: “total correlation spectroscopy”

Abreviações dos aminoácidos

Alanina: Ala (A)	Isoleucina: Ile (I)
Ácido aspártico: Asp (D)	Leucina: Leu (L)
Ácido glutâmico: Glu (E)	Lisina: Lys (K)
Arginina: Arg (R)	Metionina: Met (M)
Asparagina: Asn (N)	Prolina: Pro (P)
Cisteína: Cys (C)	Serina: Ser (S)
Fenilalanina: Phe (F)	Treonina: Thr (T)
Glicina: Gly (G)	Triptofano: Trp (W)
Glutamina: Gln (Q)	Tyrosina: Tyr (Y)
Histidina: His (H)	Valina: Val (V)

ÍNDICE GERAL

I. RESUMO	XXI
II. SUMMARY	XXIV
III. INTRODUÇÃO	01
1. Síntese de Peptídeos	01
1.1. Síntese Química.....	02
1.2. Síntese Enzimática.....	07
1.3. Síntese via DNA-recombinante.....	13
2. Síntese de Peptídeos α-esterificados	18
2.1. Via método químico.....	19
2.2. Via método enzimático.....	21
2.3. Mediante assistência por íons metálicos.....	23
3. Resina Oxima de Kaiser em síntese de peptídeos	25
4. Utilização dos íons lantanídeos como substitutos luminescentes do íon Ca^{2+}	28
5. Análise estrutural de peptidil-resinas por ressonância magnética nuclear	30
6. Colecistocinina	35
IV. OBJETIVOS	40
V. MATERIAL E MÉTODOS	42
1. Material	42
2. Métodos Analíticos e Cromatográficos	42
2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Inversa (RP-HPLC).....	42
2.2. Análise de aminoácidos.....	43
2.3. Medidas Espectrofotométricas.....	43
2.4. Espectrometria de massas.....	43

2.5. Eletroforese Capilar.....	44
2.6. Análise Elementar.....	44
3. Métodos Preparativos.....	45
3.1. Procedimento geral para a síntese da resina oxima de Kaiser (KOR) e determinação do seu grau de funcionalização.....	45
3.2. Introdução do primeiro aminoácido à KOR (aminoacilação da KOR).....	45
3.3. Procedimento geral para a síntese dos peptidil-KOR.....	46
3.4. Método geral de solvólise de peptidil-KOR.....	47
3.5. Método geral de aminólise de peptidil-KOR.....	46
3.6. Acompanhamento das reações de solvólise e aminólise por RP-HPLC.....	47
3.7. Procedimento geral empregado para a separação da KOR ou peptidil-KOR residual.....	48
3.8. Método geral para a determinação dos rendimentos de reação.....	48
a) Quantificação dos produtos esterificados formados nos meios reacionais por RP-HPLC.....	48
b) Quantificação da porcentagem de desligamento do peptídeo da KOR.....	49
3.9. Investigação da viabilidade de metanólise de Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde, X= Gly (PR Ia), Ala (PR Ib) ou Phe (PR Ic)] na presença de HAc, Ca(OAc) ₂ ou mistura de ambos.....	50
a) Em escala analítica.....	50
b) Em escala preparativa.....	50
3.10. Metanólise de Ac-Ala-Gly-X-oxima [onde, X= Gly (PR IIa), Ala (PR IIb), Phe (PR IIc) ou Lys(2-Cl-Z) (PR II d)] em presença de Ca(OAc) ₂	51
3.11. Metanólise comparativa de Ac-Ala-Gly-X-oxima [(onde X= Gly (PR IIa), Ala (PR IIb), Phe (PR IIc) ou Lys(2-Cl-Z) (PR II d)] em presença de Ca(OAc) ₂	51
3.12. Etanolise de Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde, X=Lys(2-Cl-Z) (PR II d) ou Ala (PR II e)] em presença de Ca(OAc) ₂	51
a) Investigação preliminar.	51

b) Etanólise comparativa de Ac-Ala-Gly-X-KOR [(onde, X= Lys(2-Cl-Z) (PRIf) e Ala (PR IIb)] na presença de Ca(OAc) ₂	52
c) Etanólise de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR (PRId) mediada por Ca ²⁺ em diferentes solventes.....	52
3.13 Investigação da viabilidade de tiólise de Ac-Ala-Gly-X-KOR [(onde X= Lys(2-Cl-Z) (PRId) e Ala (PR IIb)].....	52
3.14. Investigação da viabilidade de benzólise de Ac-Ala-Gly-X-oxima [(onde X= Lys(2-Cl-Z) (PRId) e Ala (PR IIb)].....	52
3.15. Metanólise de Ac-Ile-Ser(OBzl)-Asp(OX)-KOR [(onde,X= cHex (PR IIIa) ou Bzl (PR IIIb)] na presença e ausência de Ca(OAc) ₂	53
a) Investigação preliminar.....	53
b) Cinéticas de metanólise de Ac-Ile-Ser(OBzl)-Asp(cHex)-KOR (PR IIIa) na presença de Ca(OAc) ₂	53
c) Metanólise comparativa de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PR IIIc) na ausência e presença de Ca(OAc) ₂ em diversos solventes.....	53
d) Efeito da concentração de Ca(OAc) ₂ na metanólise de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)- (PR IIIe) e Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PR IIIc).....	54
- Quantidade de Ca(OAc) ₂ equimolar à de peptídeo.....	54
- Quantidade de Ca(OAc) ₂ inferior à de peptídeo.....	54
3.16. Solvólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(Bzl)-Arg(Mtr)-KOR (KORIVa) mediada por Ca ²⁺	54
a) Metanólise.....	54
b) Etanólise.....	54
c) Benzólise.....	55
3.17. Metanólise de peptidil-KOR na presença de EuCl ₃	55
a) Investigação da viabilidade de metanólise de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR (PR IIIe).....	55
b) Cinética da metanólise de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR (PR IIIe).....	55
c) Investigação da viabilidade de metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-	

Asp-(OBzl)-oxima (PRIIIb).....	56
d) Metanólise comparativa de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp-(OcHex)-KOR (PRIIIc) na presença e ausência de EuCl_3	56
3.18. Metanólise de Ac-Ala-Gly-Ala-KOR (PRIIe) na presença de EuCl_3	56
3.19. Metanólise e etanólise de Ac-Ile-Ser(OBzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRIVb) em presença de Ca^{2+} , Eu^{3+} ou Tb^{3+} em DCM ou DMSO.....	57
a) Metanólise.....	57
b) Etanólise.....	57
3.20. Aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$	58
a) Investigação preliminar.....	58
b) Aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRIIIId) em escala preparativa	58
c) Aminólise comparativa de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRIIIId) por Arg(HCl)OEt na presença de HAc ou $\text{Ca}(\text{OAc})_2$	58
d) Aminólise de Ac-Ile-Ser(OBzl)-Asp(cHex)-KOR (PRIIIId) por Arg(HCl)-OMe na presença de EuCl_3 ou TbCl_3 em diferentes solventes.....	59
3.21. Purificação dos ésteres de peptídeos obtidos nas reações de solvólise e aminólise de peptidil-KOR.....	60
3.22. Desproteção total das cadeias laterais dos aminoácidos contidos nos peptídeos α -esterificados obtidos.....	60
a) Desproteção de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-OMe.....	60
b) Desproteção de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-Arg(HCl)-OR (onde, R= Me ou Et).....	61
3.23. Determinação do grau de inchamento/solvatação da KOR e de peptidil-KOR em diferentes solventes ou mistura deles.....	61
a) Através da variação do volume.....	61
b) Através de medidas do diâmetro dos grãos.....	61
3.24. Esterificação de Boc-L-Arg(Mtr)-OH.....	62
a) Boc-L-Arg(Mtr)-OPac	62

b) Boc-L-Arg(Mtr)-OMtp	62
c) Boc-L-Arg(Mtr)-OC ₂ H ₄ OC ₂ H ₅	63
d) Remoção do grupo t-Boc do Boc-Arg(Mtr)-OPac	63
4. Análise estrutural	64
4.1. Espectroscopia de luminescência no estudo da metanólise de Ac-Ala-Gly-Ala-KOR (PR) na ausência e presença de Eu ³⁺	64
4.2. Análise de peptidil-KOR através de HRMAS.....	64
VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
1. Síntese de KOR, Boc-aminoacil-KOR e Ac-peptidil-KOR.....	65
2. Metanólise de Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde, X= Gly (PR1a), Ala (PR1b) ou Phe (PR1c)] assistida por Ca ²⁺	69
a) Constatação da possibilidade de ocorrência.....	69
b) Tentativa de quantificação das metanólises por medida das quantidades dos peptídeos esterificados formados.....	76
3. Etanólise, benzólise e tiólise de Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde X= Lys(2-Cl-Z) (PR11f) ou Ala (PR11e)] assistidas pelo Ca ²⁺	84
4. Novas etanólises de Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde X= Ala ou Lys(2-Cl-Z)] em presença de Ca(OAc) ₂	87
5. Metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OZ)-KOR [onde, Z= cHex ou Bzl] assistida por Ca ²⁺	88
6. Influência da quantidade de Ca ²⁺ sobre a eficiência de metanólise de peptidil-KOR.....	99
7. Metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-KOR (PR1Va) assistida pelo Ca ²⁺	99
8. Metanólise de peptidil-KOR assistida por Eu ³⁺	106
9. Metanólise e etanólise comparativa de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em presença de Ca(OAc) ₂ , EuCl ₃ e TbCl ₃	111
10. Tentativa de determinação da solubilidade dos sais empregados nos solventes utilizados.....	119
11. Aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PR111a) por arginina esterificada assistida por Ca ²⁺	119

12. Aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRIIIId) por Arg(HCl)-OMe na presença de EuCl_3 ou TbCl_3 em diferentes solventes.....	124
13. Inchamento de KOR e peptidil-KOR em diferentes solventes orgânicos e misturas destes com metanol.....	128
14. Estudos estruturais de peptidil-KOR e das soluções reacionais.....	131
a) por espectroscopia de luminescência.....	131
b) por HR-MAS.....	134
15. Preparação de novos ésteres de arginina.....	148
16. Remoção dos grupos protetores das cadeias laterais dos Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-OMe, Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-Arg-OMe e Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-ArgOEt.....	149
17. Caracterização dos ésteres de peptídeos preparados.....	150
VII. CONCLUSÕES.....	153
1. Solvólise de Peptidil-KOR assistidas pelo Ca^{2+} , Eu^{3+} ou Tb^{3+}	153
2. Aminólise.....	155
3. Estudo espectroscópicos.....	155
4. Geral.....	156
IX. REFERÊNCIAS.....	158
IX. CURRICULUM VITAE.....	183

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1:	As Diferentes Modalidades da Síntese Química de Peptídeos.....	02
Esquema 2:	Síntese clássica de peptídeos passo a passo em direção C→N	03
Esquema 3:	Etapas da síntese em fase sólida	05
Esquema 4:	Representação esquemática das possibilidades de manipulação da síntese enzimática	09
Esquema 5:	Possibilidade de troca do resíduo C-terminal do aminoácido em peptídeos.....	23
Esquema 6:	Reação de transesterificação de Moz-Asn- Leu-Gly-OEt em metanol (A) e modelo de ligação do íon cálcio ao peptídeo Moz-Asn-Leu-Gly-OEt (B).....	24
Esquema 7:	Preparação da resina oxima de Kaiser.....	26
Esquema 8:	Desligamento do peptídeo da KOR por diversos nucleófilos.....	26
Esquema 9:	Estrutura primária da CCK-58 humana	36
Esquema 10:	Representação esquemática das reações estudadas.....	40
Esquema 11:	Metodologia utilizada no estudo da solvólise e aminólise de peptidil-KOR assistida por Ca^{2+} , Eu^{3+} ou Tb^{3+}	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Estratégias empregadas na síntese de peptídeos em fase sólida	06
Figura 2:	Comparação entre os processos termodinamicamente (a) e cineticamente (b) controlados	10
Figura 3:	Caminhos reacionais da transferência de acila catalisada por protease	11
Figura 4:	Engenharia genética, o processo de clonagem do DNA.....	14
Figura 5:	Síntese de peptídeos via ribossômica.....	15
Figura 6:	Seqüência de reações e organização modular da biosíntese da gramicidina S.....	17
Figura 7:	Agente de condensação, fosfato de (2,3-dihidro-2-tioxo-3-benzoxazolil) difenílico.....	20
Figura 8:	Preparação de ésteres α -picolilícos de peptídeos.....	21
Figura 9:	Espectros de RMN- ¹ H da peptidil-resina GPGRAF-Tentagel [TG] em DMSO-d ₆	32
Figura 10:	Partes que compõem um rotor para ressonância magnética nuclear de alta resolução segundo o ângulo mágico.....	33
Figura 11:	Probe de alta resolução segundo o ângulo mágico.....	34
Figura 12:	Espectros de infravermelho obtidos em pastilha de KBr após acilação (A) e conversão em oxima (B) do polímero de poliestireno contendo 1% de divinilbenzeno.....	66
Figura 13:	Análise cromatográfica da metanólise de Ac-Ala-Gly-Ala-KOR em presença de Ca(OAc) ₂ (A), HAc (B) e mistura de ambos (C).....	70
Figura 14:	Perfis cromatográficos de RP-HPLC de Ac-Ala-Gly-Ala-OMe purificado (A) e de HPLC de troca iônica do seu	

	hidrolisado (B).....	72
Figura 15:	Perfis cromatográficos de RP-HPLC de Ac-Ala-Gly-Gly-OMe purificado (A) e de HPLC de troca iônica do seu hidrolisado (B).....	73
Figura 16:	Perfis cromatográficos de RP-HPLC de Ac-Ala-Gly-Phe-OMe purificado (A) e de HPLC de troca iônica do seu hidrolisado (B).....	74
Figura 17:	Espectro de infravermelho do éster Ac-Ala-Gly-Gly-OMe purificado, em pastilha de KBr.....	75
Figura 18:	Perfil de RP-HPLC do padrão de Ac-Ala-Gly-Ala-OMe antes (A) e após a estocagem (B).....	77
Figura 19:	Curva padrão de áreas do pico cromatográfico <i>versus</i> quantidades do éster de peptídeo.....	78
Figura 20:	Curva padrão de áreas do pico cromatográfico <i>versus</i> quantidades do éster de peptídeo.....	79
Figura 21:	Análise cromatográfica da metanólise de Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde, X=Gly, Ala, Phe ou Lys(2-Cl-Z)] em presença de Ca(OAc) ₂	81
Figura 22:	Gráfico de quantidade de peptídeo esterificado formado <i>versus</i> tempo de metanólise de Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde, X= Gly, Ala Phe ou Lys (2-Cl-Z)] assistida por Ca ²⁺	83
Figura 23:	Perfis de RP-HPLC da etanólise de Ac-Ala-Gly-Ala-KOR (A) e Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR (B) em DCM na presença de Ca(OAc) ₂	85
Figura 24:	Perfis de RP-HPLC da etanólise de Ac-Ala-Gly-Lys (2-Cl-Z)-KOR em DCM na presença de Ca(OAc) ₂	89
Figura 25:	Perfis de RP-HPLC da etanólise de Ac-Ala-Gly-Lys (2-Cl-Z)-KOR em DMSO na presença de Ca(OAc) ₂	90
Figura 26:	Perfis de RP-HPLC da etanólise de Ac-Ala-Gly-Lys (2-Cl-Z)-KOR em 25% DMSO/tolueno na presença de	

	Ca(OAc) ₂	91
Figura 27:	Perfis de RP-HPLC da coeluição de Ac-Ala-Gly-Lys (2-Cl-Z)-OEt padrão e as misturas reacionais da etanólise de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR em DCM (A), DMSO (B) e 25% DMSO/tolueno (C) na presença de Ca(OAc) ₂	92
Figura 28:	Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ile-S.er(Bzl)-Asp(OBzl)-KOR e Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DCM na ausência (A e C) e presença de Ca(OAc) ₂ (B e D).....	94
Figura 29:	Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DCM na presença de Ca(OAc) ₂	96
Figura 30:	Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DCM (A), CHCl ₃ (B) e DMSO (C).....	97
Figura 31:	Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DCM(A), CHCl ₃ (B) e DMSO (C) na presença de Ca(OAc) ₂	98
Figura 32:	Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR em DCM na ausência de aditivo (A), na presença de 35 μmol de Ca(OAc) ₂ (B) ou de 63 μmol de Ca(OAc) ₂ (C).....	100
Figura 33:	Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DCM na presença de Ca(OAc) ₂ (1,0 peptídeo:0,1 Ca ²⁺).....	101
Figura 34:	Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-KOR em DCM na presença de Ca(OAc) ₂	103
Figura 35:	Perfil de RP-HPLC do produto purificado da reação de metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-KOR em DCM na presença de Ca(OAc) ₂	104
Figura 36:	Perfis de RP-HPLC da etanólise (A) e benzólise (B) de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-KOR em DCM na	

	presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$	104
Figura 37:	Perfis de RP-HPLC dos produtos purificados das reações de etanólise (A) e benzólise (B) de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-KOR em DCM na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$	105
Figura 38:	Espectros de massas (ES-MS) dos produtos obtidos na solvólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-KOR em DCM na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$. (A) etanólise e (B) benzólise.....	105
Figura 39:	Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR em DCM na presença de 35 μmol (A) e 63 μmol (B) de EuCl_3	108
Figura 40:	Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (A e C) Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-KOR (B), na ausência de aditivo (A) e na presença de EuCl_3 (B e C).....	110
Figura 41:	Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DCM na ausência de aditivos.....	112
Figura 42:	Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DCM na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (A), EuCl_3 (B) e TbCl_3 (C).....	113
Figura 43:	Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DMSO na ausência de aditivos.....	114
Figura 44:	Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DMSO na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (A), EuCl_3 (B) e TbCl_3 (C).....	115
Figura 45:	Perfis de RP-HPLC da etanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DCM na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (A), EuCl_3 (B) e TbCl_3 (C).....	116
Figura 46:	Perfis de RP-HPLC da etanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DMSO na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$	

	(A), EuCl_3 (B) e TbCl_3 (C).....	117
Figura 47:	Perfis de RP-HPLC da etanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DCM (A) e DMSO (B) na ausência de aditivos.....	118
Figura 48:	Perfis de RP-HPLC da aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR por Arg(HCl)-OMe e Arg(HCl)-OEt em DMF na ausência (A e C, respectivamente) e na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (B e D, respectivamente).....	120
Figura 49:	Perfis cromatográficos da aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR por Arg(HCl)-OMe em DMF assistida por $\text{Ca}(\text{Oac})_2$ realizada em escala preparativa.....	122
Figura 50:	Perfis cromatográficos da aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR por Arg(HCl)-OEt em DMF assistida por $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ realizada em escala preparativa.....	123
Figura 51:	Perfis cromatográficos das aminólises comparativas de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR por Arg(HCl)-OEt em DMF.....	125
Figura 52:	Perfis de RP-HPLC da aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em NMP na ausência (A) e presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (B), EuCl_3 (C) ou TbCl_3 (D).....	127
Figura 53:	Perfis de RP-HPLC da aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DMF (A), DMSO (B) e DMSO/tolueno (1:1;v/v) (C) na presença de EuCl_3	127
Figura 54:	Grãos de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR vistos ao microscópio.....	130
Figura 55:	Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ala-Gly-Ala-KOR em DCM na e presença de EuCl_3	132
Figura 56:	Espectro de emissão de EuCl_3 obtido à temperatura ambiente sob excitação a 394 nm e nas condições reacionais da metanólise de Ac-Ala-Gly-Ala-KOR.....	133
Figura 57:	Espectro de emissão de EuCl_3 obtido à temperatura	

	ambiente sob excitação a 394 nm em DCM/MeOH na presença de Ac-Ala-Gly-Lys-(2-Cl-Z)-OMe.....	134
Figura 58:	Espectros de HR-MAS ^1H de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR em $\text{DMSO-}d_6$	135
Figura 59:	Espectros de ^1H -HRMAS de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR em $\text{DMSO-}d_6$ adquirido após um período de 20 ms de CPMG.....	136
Figura 60:	Espectros bidimensionais de RMN- ^1H (HR-MAS), TOCSY de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR em $\text{DMSO-}d_6$ adquirido após um período de 20 ms de CPMG.....	138
Figura 61:	Espectros bidimensionais de RMN- ^1H (HR-MAS), NOESY de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR em $\text{DMSO-}d_6$ adquirido após um período de 20 ms de CPMG.....	139
Figura 62:	Espectro de RMN- ^1H (HR-MAS), HMQC- $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ da peptidil-resina Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-oxima em $\text{DMSO-}d_6$ adquirido após um período de 20 ms de CPMG.....	140
Figura 63:	Espectro de RMN- ^1H (HR-MAS) de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR em $\text{DMSO-}d_6$	142
Figura 64:	Espectro de RMN- ^1H (HR-MAS) de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR lavada em $\text{DMSO-}d_6$	143
Figura 65:	Espectro de RMN- ^1H (HR-MAS) de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em $\text{DMSO-}d_6$	145
Figura 66:	Espectros de RMN- ^1H (HR-MAS) de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em $\text{DMSO-}d_6$	149
Figura 67:	Espectros de RMN- ^1H (HR-MAS), TOCSY de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em $\text{DMSO-}d_6$	146
Figura 68:	Espectros de RMN- ^1H (HR-MAS) de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em $\text{DMSO-}d_6$ adquirido após um período de 20 ms de CPMG.....	147
Figura 69:	Perfis cromatográficos de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-OMe	

bruto (A) e do Ac- Ala-Gly-Lys-OMe bruto obtido após a
exposição de A a HF (B)..... 150

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Condições de análise para confecção das curvas padrão.....	49
Tabela 2: Condições experimentais empregadas nas metanólises de Ac-Ala-Gly-X-KOR (onde X= Gly, Ala ou Phe).....	50
Tabela 3: Condições experimentais empregadas para as reações de metanólise de peptidil-resina Ac-Ala-Gly-Ala-KOR (PRIIb)....	57
Tabela 4: Condições experimentais empregadas para as reações de aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRIIIa)	58
Tabela 5: Condições experimentais empregadas na aminólise comparativa de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRIIId)...	59
Tabela 6: Purificações dos produtos obtidos das solvólise e aminólises das peptidil-KORs estudadas	60
Tabela 7: Caracterização dos aminoacil-KOR (Boc-X-KOR) e peptidil-KOR (Ac-peptidil-KOR) sintetizados.....	67
Tabela 8: Acoplamento de Boc-Arg(Mtr)-OH à KORIV.....	68
Tabela 9: Inchamento da KOR em diferentes solventes e temperaturas	69
Tabela 10: Metanólise de Ac-Ala-Gly-X-KOR em presença de Ca(OAc) ₂	72
Tabela 11: Áreas do pico cromatográfico obtidas em função da quantidade do peptídeo Ac-Ala-Gly-X-OMe (nmol) analisado	80
Tabela 12: Resultados das metanólises de Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde, X= Gly (PRIIa), Ala (PRIIb), Phe (PRIIc) ou Lys(2-CI-Z) (PRIIId)] assistidas por Ca ²⁺	82
Tabela 13: Rendimentos de reações de metanólise obtidos a partir de análise do meio reacional por RP-HPLC	83
Tabela 14: Estudo comparativo da metanólise de Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde, X= Gly (PRIIa), Ala (PRIIb), Phe (PRIIc) ou Lys(2-CI-Z) (PRIIId)]	84

Tabela 15: Etanólise, benzólise e tiólise de peptidil-KOR assistida por Ca^{2+}	86
Tabela 16: Etanólise da Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde, X= Ala (KORlle) ou Lys(2-Cl-Z) (PRllf)]	87
Tabela 17: Tentativa de maximização da etanólise de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR (PRllf; $\text{GS}_i = 0,43$ mmol/g) em presença de íons Ca^{2+}	88
Tabela 18: Metanólise de Ac-Ile-Ser-(Bzl)-Asp-(OZ)-KOR [onde, Z= cHex (PRllla) ou Bzl (PRlllb)] assistida por Ca^{2+}	95
Tabela 19: Metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRlllc, $\text{GS}_i = 0,32$ mmol/g).....	95
Tabela 20: Metanólise da resina Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRllld, $\text{GS}_i = 0,30$ mmol/g) em diferentes solventes na ausência e presença de Ca^{2+}	96
Tabela 21: Metanólise de Ac-peptidil-KOR assistida pelos íons Ca^{2+}	99
Tabela 22: Solvólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-KOR (PRIVa, $\text{GS}_i = 0,35$ mmol/g) assistida por Ca^{2+}	106
Tabela 23: Metanólise de Ac-peptidil-KOR assistida pelos íons Ca^{2+} e Eu^{3+}	109
Tabela 24: Estudo comparativo da solvólise de peptidil-KOR em presença de Eu^{3+}	111
Tabela 25: Solvólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRIVb; $\text{GS}_i = 0,29$ mmol/g) na presença e ausência dos aditivos $\text{Ca}(\text{OAc})_2$, EuCl_3 e TbCl_3	118
Tabela 26: Aminólise de Ac-Ile-Ser-(OBzl)-Asp-(OcHex)-KOR (PRllla; $\text{GS}_i = 0,29$ mmol/g).....	121
Tabela 27: Aminólise comparativa de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRllld, $\text{GS}_i = 0,30$ mmol/g).....	125
Tabela 28: Aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRllld, $\text{GS}_i = 0,30$ mmol/g) em diferentes solventes na ausência e presença de Ca^{2+} , Eu^{3+} ou Tb^{3+}	129
Tabela 29: Variação do volume KOR e de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-	

KOR a 37 °C em diferentes solventes e misturas.....	129
Tabela 30: Valores de inchamento dos grãos em diferentes solventes orgânicos à temperatura ambiente.....	129
Tabela 31: Atribuição das ressonâncias dos prótons da Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR feita a partir do Espectro bidimensional TOCSY.....	137

I. RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi propor e estabelecer um novo método de preparação de peptídeos protegidos α -esterificados.

Para tal, investigamos inicialmente o efeito da presença de HAc, $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ e mistura de ambos na eficiência de metanólise de Ac-Ala-Gly-X-KOR (onde, X= Gly, Ala ou Phe) em DCM. Surpreendentemente, as reações assistidas por Ca^{2+} forneceram os produtos esterificados desejados com os mais altos rendimentos.

Com base nestes dados comparamos as eficiências das reações de metanólise de Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde, X= Lys(2-Cl-Z), Phe, Ala ou Gly] assistidas pelo íon cálcio. Estas se mostraram dependentes da natureza do resíduo C-terminal ligado à resina, pois os rendimentos de desligamento peptídico da KOR obtidos para as reações de 6 horas apresentaram a seguinte ordem: Lys(2-Cl-Z) < Phe < Ala < Gly. Após 48 h, os rendimentos foram superiores a 68%.

A possibilidade de preparar Ac-Ala-Gly-X-OEt [onde, X= Lys(2-Cl-Z) ou Ala] usando o mesmo procedimento foi também investigada. Ac-Ala-Gly-Ala-OEt e Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-OEt foram produzidos com 69 e 24% de rendimento em 72h a 37^oC, respectivamente. Quando DCM foi substituído por DMSO ou 25%DMSO/tolueno a 55^oC, houve um aumento significativo nos rendimentos de etanólise da Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR.

Benzólise e tiólise de Ac-Ala-Gly-X-OEt [onde, X= Lys(2-Cl-Z) ou Ala] foram testadas. As análises de aminoácidos das peptidil-KOR residuais mostraram que o desligamento do peptídeo da KOR ocorreu em certa extensão, mas infelizmente nas condições de análise por RP-HPLC empregadas não fomos capazes de detectar os produtos formados.

Metanólises adicionais foram realizadas em presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ empregando peptidil-KOR relacionados ao hormônio colecistocinina: Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-KOR (1), Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (2) e Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-KOR (3). Os rendimentos de desligamento dos peptídeos 1, 2 e 3 foram 54, 68 e 84%, respectivamente. Não foram detectadas nos meios reacionais quantidades significativas de produtos

secundários resultantes de rearranjos ou de transesterificação simultânea do éster presente na cadeia lateral do resíduo de ácido aspártico. Estes resultados evidenciaram que a assistência do Ca^{2+} é seletiva e o método aplicável a peptídeos contendo arginina e ácido aspártico protegidos ligados à resina de Kaiser.

O efeito do solvente foi investigado realizando-se metanólises de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DCM, DMSO e CHCl_3 em presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$. Em 72 horas as metanólises realizadas em DMSO foram quantitativas, enquanto que em DCM ou CHCl_3 estas apresentaram rendimentos de ~63%.

Em seguida, examinamos a capacidade do Eu^{3+} em assistir a reação de metanólise de peptidil-KOR em DCM. Os rendimentos de desligamento do peptídeo foram semelhantes ou ligeiramente superiores aos obtidos em presença de Ca^{2+} .

Estudos adicionais demonstraram que não é necessário excesso molar de Ca^{2+} ou Eu^{3+} para o aumento da eficiência das metanólises.

Metanólise e etanolise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DCM e DMSO em presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$, EuCl_3 e TbCl_3 também foram realizadas. As metanólises em DCM em presença de Ca^{2+} , Eu^{3+} ou Tb^{3+} forneceram o produto desejado com 62, 95 ou 95% de rendimento, respectivamente. Em DMSO, a reação assistida por Ca^{2+} foi quantitativa, mas nenhum produto foi obtido em presença de Eu^{3+} ou Tb^{3+} . As etanólises em DCM assistidas por estes íons lantanídicos foram também mais eficientes do que as mediadas por Ca^{2+} (28, 17 e 5%, respectivamente). Em DMSO, observou-se a formação do éster etílico apenas para a reação assistida por Ca^{2+} . O rendimento de desligamento do peptídeo da KOR foi de 80%, mas observou-se a presença de um produto secundário no peptídeo α -esterificado bruto. Novamente, nenhum produto foi obtido nas reações assistidas por Eu^{3+} ou Tb^{3+} em DMSO.

Estudos adicionais demonstraram que $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ pode também assistir a aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR por Arg(HCl)OMe ou Arg(HCl)OEt em DMF. Os rendimentos de desligamento do peptídeo da

KOR foram superiores a 70%, sendo os ésteres desejados os produtos majoritários formados nos meios reacionais (47 e 68% do total, respectivamente). Na ausência do íon metálico, os rendimentos foram de apenas 10-13%. Reações comparativas evidenciaram que a aminólise assistida por Ca^{2+} é equivalente (ou ligeiramente inferior em termos de seletividade) àquelas descritas na literatura catalisadas pelo ácido acético.

Tentativas de aminólise em DMSO, NMP e DMSO/tolueno (1:1, v:v) na presença de Ca^{2+} , Eu^{3+} e Tb^{3+} também foram feitas. Os resultados demonstraram que apenas o Ca^{2+} foi capaz de assistir a maioria delas. Isto ocorreu provavelmente devido a interações entre o DMSO e os lantanídeos.

Uma análise preliminar de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR e de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR através de HR-MAS na presença e ausência de Ca^{2+} foi feita com o intuito de investigar as interações estabelecidas entre o íon metálico e os peptídeos sob o ponto de vista estrutural. Os resultados obtidos sugeriram que a presença do Ca^{2+} diminui a mobilidade da cadeia peptídica, o que sugere complexação. Uma complexação tornaria a ligação peptídeo-KOR mais susceptível ao ataque nucleofílico do álcool ou aminoácido esterificado.

Medidas de inchamento de peptidil-KOR em diferentes solventes puros e nas misturas utilizadas nos estudos descritos acima demonstraram que a solvatação da peptidil-KOR não é o fator determinante na eficiência destas reações. Por outro lado, estudos qualitativos sugeriram, que a solubilidade dos sais de cálcio, európio e térbio seja crucial.

Concluindo, os dados obtidos até o momento indicam que a metanólise, etanólise e aminólise de peptidil-KOR assistidas pelos íons Ca^{2+} consistem em uma alternativa nova e atraente para preparar ésteres α -metílicos e α -etílicos de N_{α} -acil-peptídeos totalmente protegidos ou desprotegidos. As reações foram realizadas em pH aparente neutro e se mostraram muito seletivas à ligação oxima.

II. SUMMARY

The ultimate goal of the present work was to propose and establish a new method to prepare α -esterified protected peptides.

At first, we examined the effect of HAc, Ca(OAc)₂ and mixtures of both on the efficiency of methanolysis of Ac-Ala-Gly-X-KOR (where, X= Gly, Ala or Phe) in DCM. Surprisingly, the reactions carried-out in the presence of Ca(OAc)₂ gave the corresponding esterified peptides with the highest yields.

Based on these data, we compared the efficiencies of methanolysis of Ac-Ala-Gly-X-KOR [where, X= Lys(2-Cl-Z), Phe, Ala or Gly] assisted by the calcium ion. They showed to be dependent on the nature of the C-terminal residue linked to the solid support since the yields found for 6-hour reactions were: Lys(2-Cl-Z) < Phe < Ala < Gly. After 48 h of reaction, yields were all higher than 68%.

The possibility of obtaining Ac-Ala-Gly-X-OEt [where, X= Lys(2-Cl-Z) or Ala] using the same procedure was then investigated. In 72 hours at 37°C Ac-Ala-Gly-Ala-OEt and Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-OEt were produced with yields of 69% and 24%, respectively. When DCM was replaced by DMSO or 25%DMSO/toluene at 55°C, the percentages of peptide release from Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR were 44% in 72h and 66% in 36h, respectively.

Benzolysis and thiolysis of Ac-Ala-Gly-X-OEt [where, X= Lys(2-Cl-Z) or Ala] were tested as well. Despite the fact that amino acid analysis of the remaining peptidyl-KOR showed that the peptide detachment from the resin had occurred to some extent, we were not able to detect by analytical RP-HPLC the products formed in the reaction media.

We also studied the methanolyses of some peptidyl-resins related to the peptide hormone cholecystokinin: Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-KOR (1), Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (2) and Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-KOR (3). The yields of peptide detachment from 1, 2 or 3 were 54, 68 and 84%, respectively. No significant amounts of byproducts resulting from possible rearrangements or simultaneous transesterification of the ester present at the lateral side chain of aspartic acid were detected in the reaction media. Such results allowed us to conclude that the procedure proposed was

quite selective and applicable to peptides containing protected arginine or aspartic acid attached to Kaiser oxime resin.

The effect of the solvent on the methanolysis efficiency was then investigated. For that, reactions containing Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR and $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ suspended in DCM, DMSO and CHCl_3 were carried-out. That in DMSO was quantitative while those in DCM or CHCl_3 yielded the esterified peptide with 63% in 72 h.

The ability of Eu^{3+} to assist methanolysis of peptidyl-KOR in DCM was demonstrated since peptide detachment yields for some reactions were similar or slightly superior to those assisted by Ca^{2+} . Additional studies showed that molar excess of Ca^{2+} or Eu^{3+} is not required for the enhancement of methanolysis efficiency.

Comparative methanolyses and ethanolyses of Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR assisted by Ca^{2+} , Eu^{3+} and Tb^{3+} in different solvents were also studied. Methanolysis in DCM in the presence of Ca^{2+} , Eu^{3+} or Tb^{3+} supplied the desired product with yields of 62, 95 or 95%, respectively. In DMSO, the reaction assisted by Ca^{2+} was quantitative, but no product was formed in presence of Eu^{3+} or Tb^{3+} . Ethanolysis in DCM assisted by Eu^{3+} or Tb^{3+} was also more efficient than that performed in presence of Ca^{2+} (28, 17 and 5%, respectively). However, in DMSO the desired α -ethyl ester was formed only in the presence of Ca^{2+} .

We were able to show that $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ can also assist the aminolysis of Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR in DMF by Arg(HCl)OMe or Arg(HCl)-OEt. The peptide detachment yields were higher than 70%, being the desired esters the major products formed in the reaction medium. In the absence of the metal ion, yields were only 10-13%. Further studies evidenced that aminolysis assisted by Ca^{2+} is equivalent (or slightly inferior in terms of selectivity) to those described in the literature that uses HAc as catalyst.

Attempts of aminolysis in DMSO, NMP, DMSO/toluene (1:1, v/v) containing Ca^{2+} , Eu^{3+} and Tb^{3+} showed that only Ca^{2+} was able to assist the formation of the esterified peptide in all these solvents. This is probably due to DMSO interaction with the lanthanide ions.

Preliminary analyses of two peptidyl-KOR by HR-MAS in the presence and absence of Ca^{2+} were performed in order to obtain structural information that could help us to determine the interactions established between the metal ion and peptides. The results found indicated that the presence of Ca^{2+} makes peptide chain less mobile, which suggests complexation. A complexation could make the peptide-resin oxime bond more susceptible to nucleophilic attacks, favoring solvolysis and aminolysis.

Swelling measurements of Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR and Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR in pure solvents and in the mixtures employed showed that the solvation of peptidyl-KOR is not the factor that determines the efficiency of these reactions. On the other hand, qualitative studies suggested that the solubility of the calcium, europium and terbium salts could be crucial.

Hence, the data presented here indicate that methanolysis, ethanolysis and aminolysis of peptidyl-KOR assisted by Ca^{2+} provide a new alternative and attractive way to prepare fully protected or unprotected N_{α} -acyl-peptides α -methyl and α -ethyl esters. The reactions were performed at neutral pH and showed to be very selective to oxime bond.

III. INTRODUÇÃO

1. Síntese de Peptídeos

A síntese de peptídeos é uma ferramenta indispensável para a elucidação estrutural e estudo de produtos isolados em quantidades muito pequenas a partir de fontes naturais, tais como os hormônios peptídicos (Janssens *et al.*, 1994), os neuropeptídeos (Holman *et al.*, 1999), muitos venenos (Cartier *et al.*, 1996; Jacobsen *et al.*, 1997) e vários antibióticos (Takahashi *et al.*, 1997). O estudo de tais compostos é essencial para: 1) a compreensão de seus mecanismos fisiológicos (Mor *et al.*, 1994) e de sua capacidade de regular funções metabólicas; 2) a investigação da relação entre as suas estruturas e funções (Russel *et al.*, 1994; Sexton *et al.*, 1999); 3) a busca de agonistas/antagonistas potentes de suas ações biológicas (Gobbo *et al.*, 1995; Rizo *et al.*, 1996); 4) utilizá-los em terapêutica (Kelley, 1996; Cooper *et al.*, 1999).

A síntese de peptídeos também tem se tornado essencial à pesquisa em imunologia, mais especificamente para a caracterização de epítopos e geração de anticorpos (Jung & Becksickinger, 1992; Mahale *et al.*, 1993; Krambovitis *et al.*, 1998).

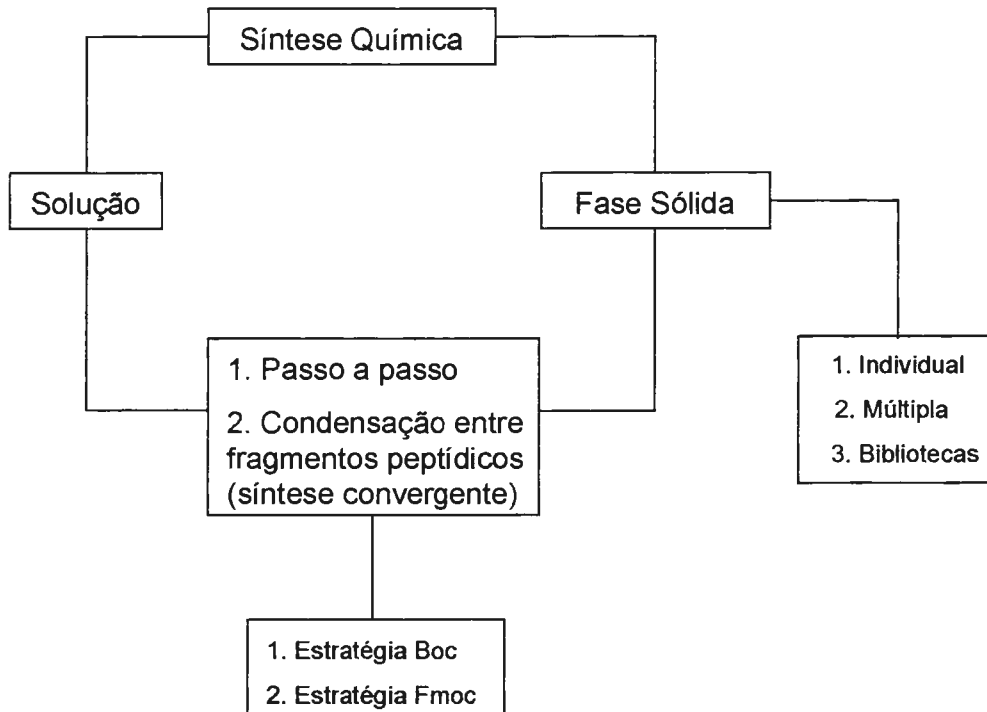
Três são as metodologias para a obtenção de peptídeos sintéticos:

1. *Síntese Química*: que utiliza reagentes químicos para a formação das ligações peptídicas.
2. *Síntese Enzimática*: que utiliza enzimas para a formação das ligações peptídicas.
3. *Tecnologia do DNA recombinante*: que utiliza as técnicas de clonagem de genes e a maquinaria ribossômica ou complexos enzimáticos (conhecidos como peptídeo-sintetases) para a formação das ligações peptídicas.

A escolha de uma delas depende do tamanho da cadeia peptídica a ser sintetizada, da complexidade relativa à natureza dos aminoácidos que a constituem e da quantidade de produto desejada. Na maioria dos casos, entretanto, opta-se pela síntese química que já está bem estabelecida.

1.1. Síntese Química

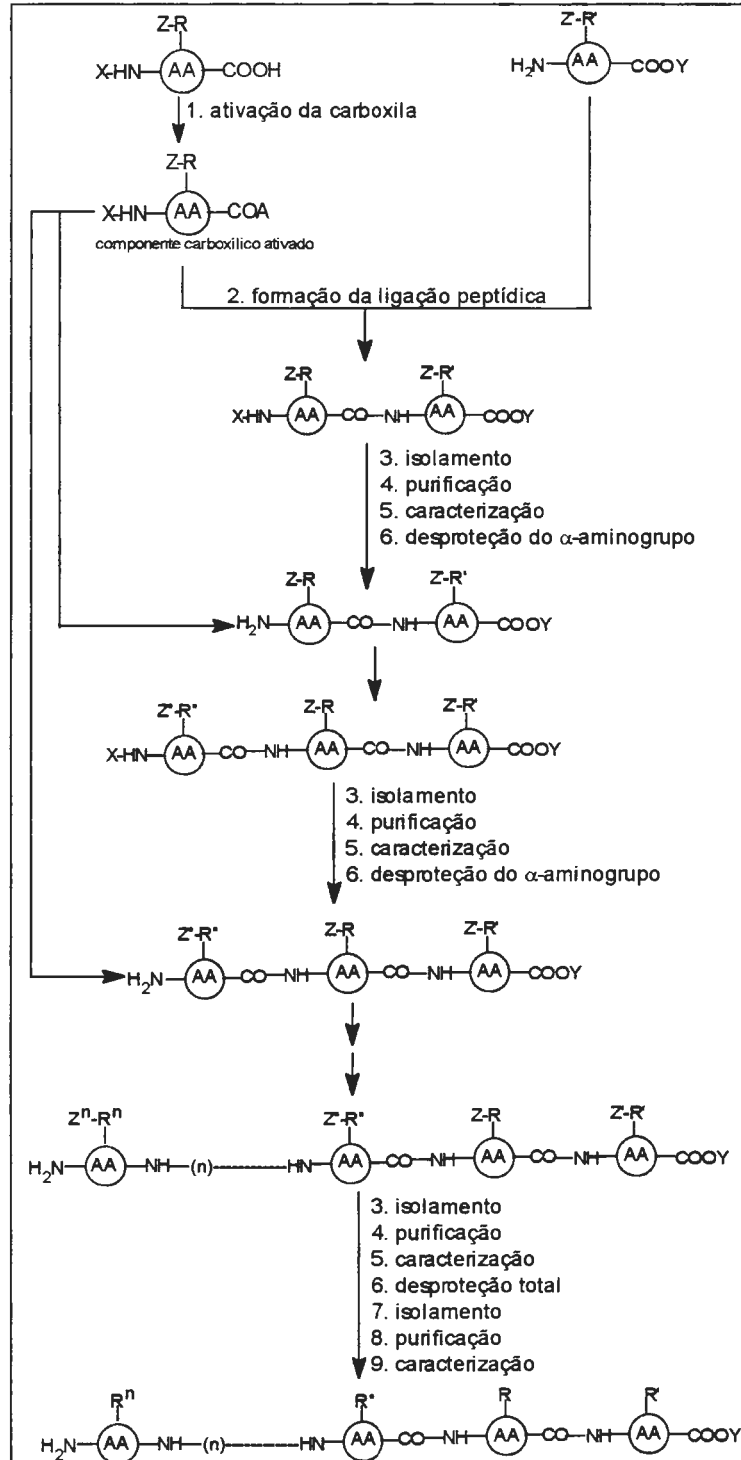
A síntese química de peptídeos pode ser subdividida em síntese clássica ou em solução e síntese em fase sólida (**Esquema 1**).



Esquema 1: As Diferentes Modalidades da Síntese Química de Peptídeos.

A síntese química em solução é realizada empregando-se a abordagem experimental de síntese orgânica clássica: etapas de proteção, de acoplamento e de desproteção acompanhada por isolamento e caracterização de cada um dos intermediários ou produtos formados, o que implica operações de extração, lavagem, precipitação, cristalização, filtração, centrifugação, cromatografias, secagem, etc... (**Esquema 2**). As sínteses de cadeias peptídicas longas demandam, portanto, muito tempo, dinheiro e esforço.

A síntese em fase sólida de peptídeos foi introduzida por R. B. Merrifield (Merrifield, 1963). Graças à ela foram produzidos nas últimas décadas milhares de peptídeos sintéticos de tamanho e seqüência variados.



Esquema 2: Síntese clássica de peptídeos passo a passo em direção C→N. AA, aminoácido; R, R', cadeias laterais funcionalizadas; X, grupo protetor do α-amino; Y, grupo protetor da α-carboxila; Z, Z', grupos protetores das cadeias laterais; A, substituinte ativador.

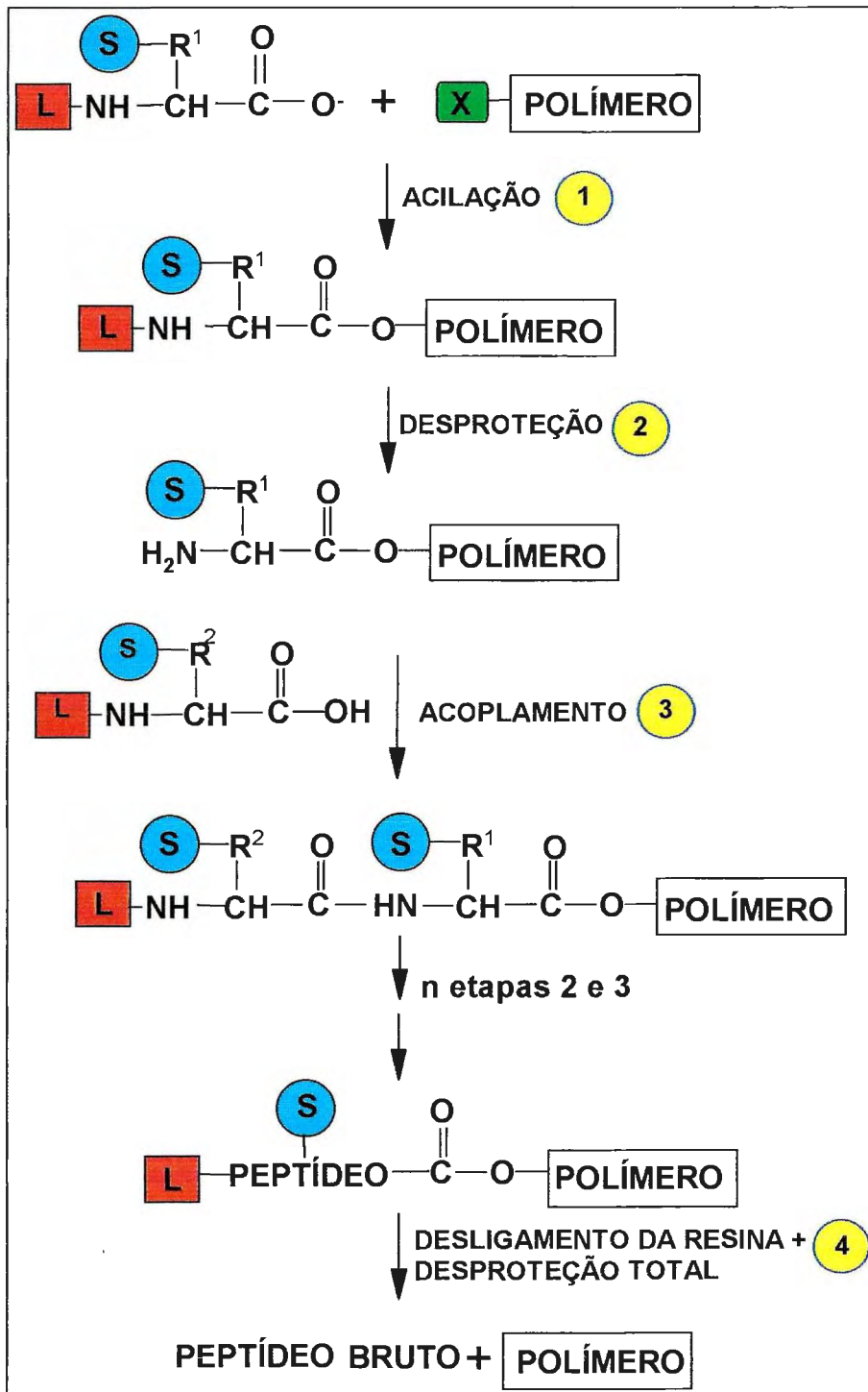
A síntese em fase sólida de peptídeos foi introduzida por R. B. Merrifield (Merrifield, 1963). Graças à ela foram produzidos nas últimas décadas milhares de peptídeos sintéticos de tamanho e seqüência variados.

Neste método, os aminoácidos (passo a passo) ou fragmentos peptídicos (síntese convergente) são acoplados um a um a um suporte sólido sem qualquer interrupção para o isolamento e a caracterização dos intermediários formados (**Esquema 3**). Completada a síntese, o peptídeo, que está ligado via um "linker*" ao suporte polimérico, pode ser desligado na forma de um ácido carboxílico ou amida. Nesta etapa, os grupos protetores das cadeias laterais também são removidos. Os suportes insolúveis geralmente empregados são derivados principalmente do poliestireno e da poliamida/suporte Kieselguhn (Barany *et al.*, 1987; Fields & Noble, 1990).

As sínteses em fase sólida podem ser individuais, múltiplas ou via química combinatória (Zhang & Davidson, 1999) e são realizadas manual ou automaticamente. Duas são as estratégias empregadas: a t-Boc e a Fmoc. Como é possível observar na **Figura 1**, as principais diferenças entre elas são: natureza da proteção do grupo α -amino dos aminoácidos, natureza dos protetores das cadeias laterais reativas e tipo de clivagem do peptídeo do suporte polimérico com desproteção total simultânea.

Apesar de todo o desenvolvimento alcançado nesta metodologia, alguns de seus problemas ainda não foram completamente solucionados. Além daqueles relativos à ocorrência de reações secundárias (acarretando a formação de subprodutos no meio reacional) podemos ainda citar: 1) a ocorrência de agregação das cadeias peptídicas em crescimento; 2) a epimerização; 3) a síntese de peptídeos longos (superior a 30 resíduos de aminoácidos) e/ou de seqüências particularmente problemáticas (Penke & Nierges, 1991; Miranda *et al.*, 1993). Dependendo do comprimento da cadeia peptídica e de sua complexidade relativa à natureza dos aminoácidos que a constituem, torna-se em alguns casos totalmente inviável obter determinados peptídeos pela metodologia da SPFS.

* linker é um grupo funcionalizado que conecta o peptídeo ao suporte polimérico.



Esquema 3: Etapas da síntese em fase sólida. X= OH ou NH₂; R¹ e R²= cadeias laterais; S= grupo protetor da cadeia lateral do aminoácido; L= grupo protetor do grupo α-amino (Boc ou Fmoc); n= no. de acoplamentos necessários para completar a seqüência peptídica desejada.

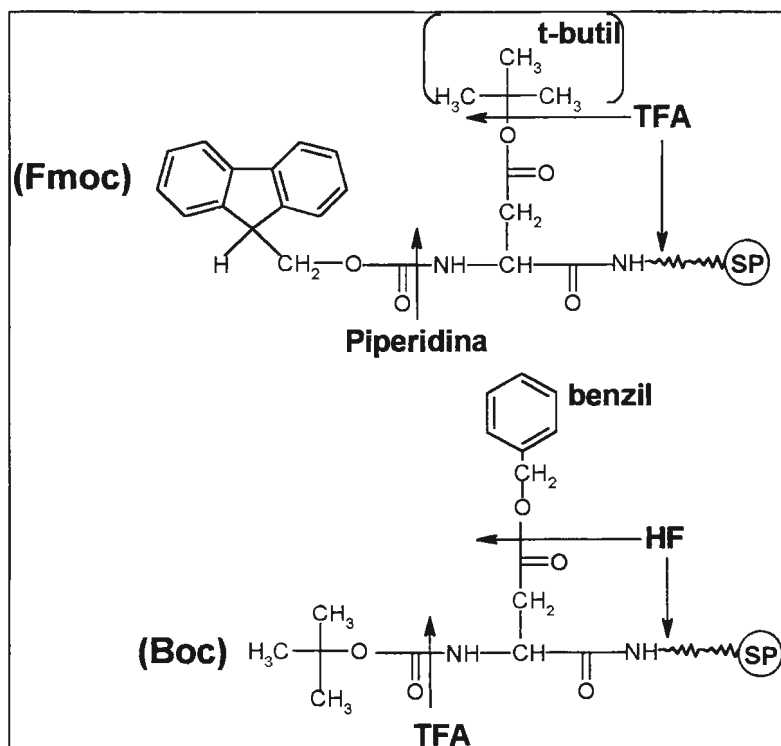


Figura 1: Estratégias empregadas na síntese de peptídeos em fase sólida. SP= suporte polimérico; Fmoc, Boc e TFA: lista de abreviações.

De fato, uma vez que as reações do processo de síntese não são quantitativas, pode ocorrer que o produto desejado obtido esteja em sua forma bruta em concentrações tão baixas que não justifiquem a tentativa de sua purificação.

Diante deste fato e da necessidade de sintetizar inúmeros peptídeos longos e complexos, tenta-se atualmente:

- 1- aumentar os rendimentos de todas as etapas do processo de modo que eles se aproximem ao máximo de 100% (geralmente desenvolvendo novos protocolos de síntese e usando diferentes grupos protetores, reagentes acopladores, resinas, temperatura de reações e/ou sequestradores de carbocátions (Varanda & Miranda, 1997);
- 2- sintetizar fragmentos peptídicos menores por SPFS e condensá-los posteriormente para obter o peptídeo desejado. Esta abordagem tem recebido grande atenção por parte dos interessados em síntese de determinados peptídeos considerados longos e difíceis de se preparar pela

SPFS passo a passo. Este tipo de síntese é chamada de convergente (Benz, 1993; Krambovitis *et al.*, 1998).

1.2. Síntese Enzimática

A literatura atual mostra um crescente interesse nas reações catalisadas por enzimas (Gill *et al.*, 1996). Na química de peptídeos, tem-se tentado realizar reações de formação de ligação peptídica mediante catálise por proteases (Schellenberg & Jakubke, 1991; Sears & Clark, 1993).

Em princípio, o uso de enzimas proteolíticas na síntese de peptídeos oferece várias vantagens sobre os procedimentos químicos. As mesmas advêm principalmente da estereo- e regio-especificidade destes catalisadores (Schellenberger & Jakubke, 1991). Por esta razão, as reações enzimáticas requerem o mínimo de proteção das cadeias laterais dos aminoácidos.

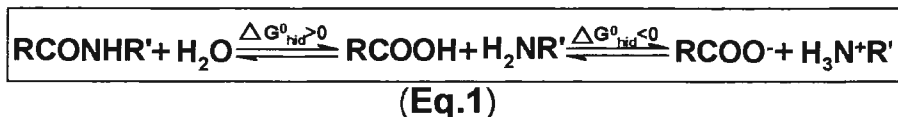
As enzimas proteolíticas mais usadas na síntese de peptídeos têm sido a termolisina (Miranda *et al.*, 1986; Miranda *et al.*, 1991; Persichetti *et al.*, 1995), a pepsina (Bemquerer *et al.*, 1994), a subtilisina (Moree *et al.*, 1997), tripsina (Blanco *et al.*, 1991; Davey *et al.*, 1995; Ivanov *et al.*, 1997; Bemquerer *et al.*, 1998), α -quimotripsina (Myazawa *et al.*, 1996), papaína (Mitin *et al.*, 1997; Fité *et al.*, 1998) e carboxipeptidase-Y (Kunugi *et al.*, 1997).

Existe atualmente um grande interesse em tornar as proteases mais estáveis nos meios reacionais e mais específicas para a síntese de ligações peptídicas. Através de modificação química ou manipulação por mutagênese-sítio dirigida é possível aumentar a atividade de ligase de uma protease (Jackson *et al.*, 1994; Muir *et al.*, 1998).

Como mostra a **Equação 1**, as proteases são biocatalisadores que seguem o princípio da reversibilidade microscópica e, portanto, podem acelerar a formação da ligação peptídica bem como o faz com a sua hidrólise, seu papel biológico natural.

O principal obstáculo prático a ser superado para a inversão da hidrólise é encontrar condições experimentais adequadas que possibilitem

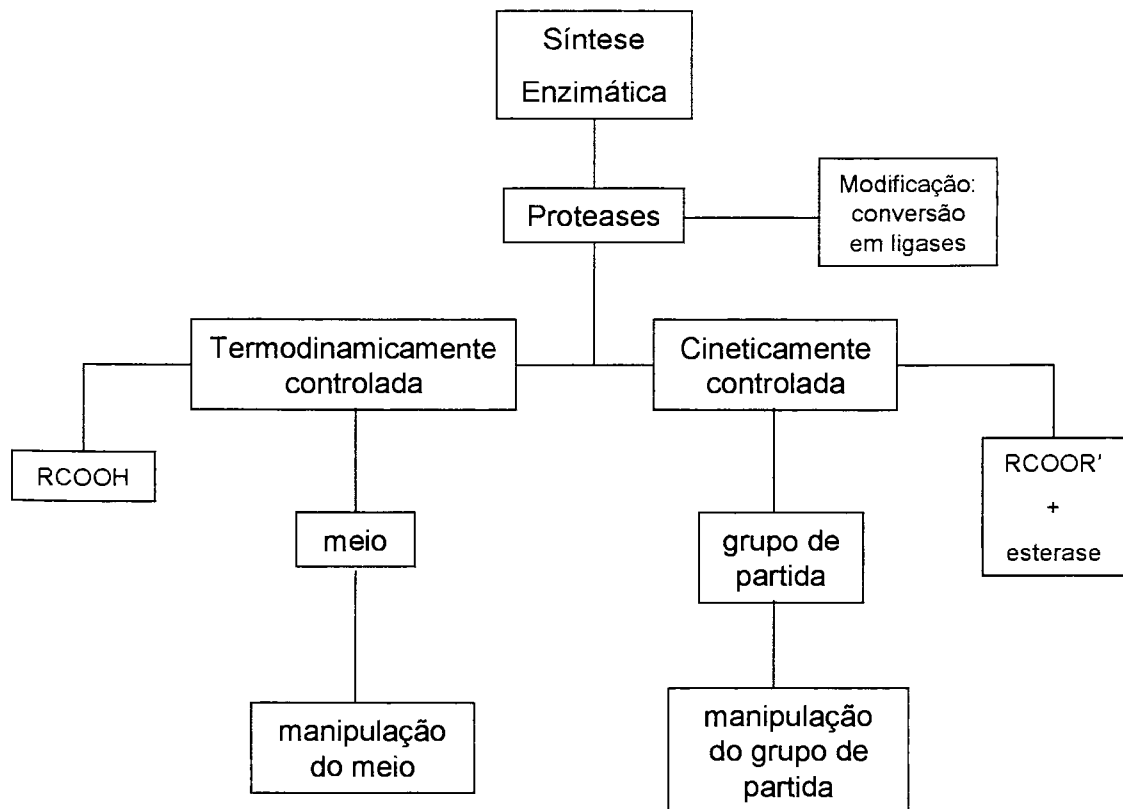
ultrapassar a barreira energética de desionização dos reagentes (RCOOH e H₂N-R') mantendo íntegro o catalisador biológico, os substratos e o próprio produto formado.



Segundo o **Esquema 4**, é possível manipular os meios reacionais com o objetivo de promover a síntese enzimática de ligação peptídica. Esta pode ser conseguida em sistemas monofásicos orgânico ou orgânico-aquoso e em sistemas bifásicos. O rendimento pode ser aumentado através da diminuição da atividade química da água no meio reacional usando sistemas congelados (Gerisch *et al.*, 1994) ou pelo emprego de meios densos (Bemquerer, 1991).

A realização da síntese enzimática em meios com baixa atividade de água propicia a diminuição das reações secundárias de hidrólise das ligações peptídicas já existentes nos substratos e no produto formado, o aumento da solubilidade de derivados de aminoácidos, a simplificação do isolamento dos produtos e, em alguns casos, o aumento da termoestabilidade da enzima (Adlercreutz & Matiasson, 1984; Zaks & Klibanov, 1984). Por outro lado, em meio orgânico pode ocorrer uma diminuição da atividade enzimática. É sabido que solventes orgânicos (geralmente empregados como co-solventes nas reações) são bons para os substratos, mas danosos para a estrutura da enzima. Por estas razões, vem se estudando diversas combinações destes solventes de maneira a obter misturas que maximizem o rendimento e não sejam “danosas” ao catalisador biológico (Gill *et al.*, 1996).

Com base na **Equação 1** também é possível fazer com que a formação da ligação peptídica ocorra em meio orgânico-aquoso pela adição de agentes que levem à diminuição da solubilidade do peptídeo formado no meio reacional ou ainda “seqüestrem” o mesmo dele (Kullman, 1987).

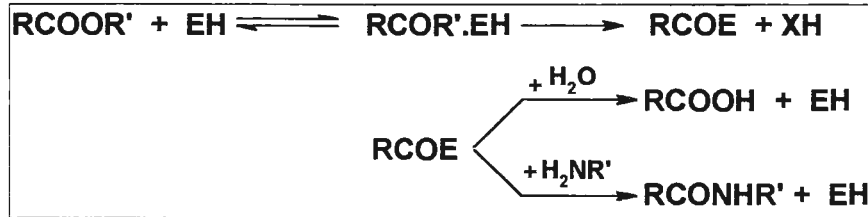


Esquema 4: Representação esquemática das possibilidades de manipulação da síntese enzimática (Jakubke, 1994).

A estratégia de síntese enzimática na qual se emprega o componente carboxílico com a sua carboxila- α livre e se manipula o meio reacional para inverter a hidrólise conforme descrito acima é chamada de síntese termodinamicamente controlada (**STC**). Esta apresenta algumas desvantagens, tais como a lentidão das reações e o uso de grandes quantidades de enzima. Além disso, altas concentrações de solventes orgânicos são necessárias para suprimir a ionização dos derivados de aminoácidos e/ou fragmentos peptídicos que estão sendo condensados (Schellenberger & Jakubke, 1991).

A síntese cineticamente controlada (**SCC**) emprega um componente carboxílico α -esterificado (RCOOR') para rapidamente acilar a enzima (EH). A acilenzima (RCOE) formada sofre então uma desacilação competitiva na etapa determinante do processo: por água para produzir o ácido (RCOOH) e

pelo nucleófilo ($\text{H}_2\text{NR}'$) para produzir o produto peptídico desejado (RCONHR' ; **Equação 2**; Bonger & Heimer, 1994).



(Eq.2)

Somente aquelas proteases com atividade esterásica são capazes de formar intermediários covalentes acil-enzima, tais como as serino e cisteína-proteases, e podem ser usadas nesta estratégia (Gololobov *et al.*, 1992).

As SCC podem ser mais eficientemente influenciadas do que as STC. A alteração da natureza do éster usado (ou grupo de partida) pode favorecer drasticamente a formação do intermediário acil-enzima, tornando mais rápida a velocidade da síntese da ligação peptídica. A **Figura 2** permite comparar a STC com a SCC.

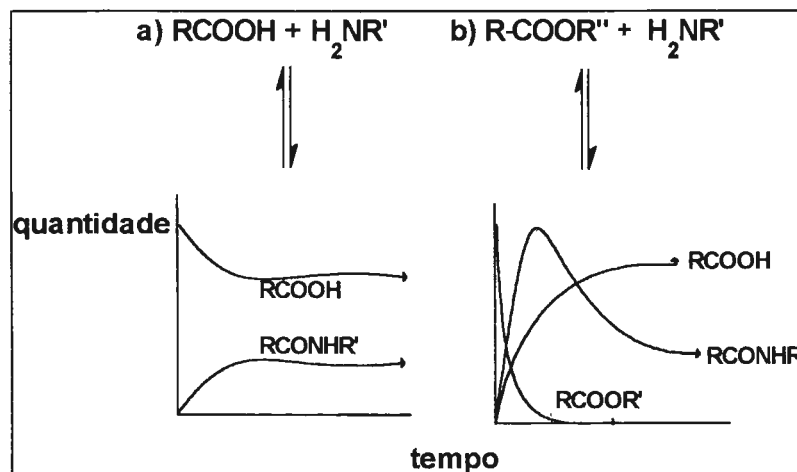


Figura 2: Comparação entre os processos termodinamicamente (a) e cineticamente (b) controlados (Schellenberger & Jakubke, 1991).

Na SCC, a formação e hidrólise de uma ligação peptídica podem ser consideradas como acilações eletrofílicas, ou seja, transferências de acila a um grupo amino ou a uma molécula de água (**Figura 3**). O complexo ativado acil-protease é um intermediário altamente energético, estando prontamente disposto a sofrer desacilação por ataque de um nucleófilo. Se o nucleófilo for uma molécula de água, o complexo ativado é hidrolisado formando RCOOH. Se o nucleófilo é um grupo α -amino de um resíduo de aminoácido, a ligação peptídica é formada produzindo RCONHR'. A partição do complexo acil-protease entre clivagem hidrolítica e aminólise não depende somente da concentração dos nucleófilos presentes no meio, mas também do poder nucleofílico destes competidores. Portanto, embora a formação da ligação peptídica possa parecer um processo desfavorável, muitas vezes ela pode suplantar a reação de hidrólise dependendo das condições empregadas. Além disso, a proporção entre a aminólise e a hidrólise é essencialmente determinada pela especificidade do subsítio S' da enzima. A eficiência do ataque nucleofílico do grupo amino depende da interação S'-P' no sítio ativo da enzima. Todos estes fatores tornam possível controlar o processo em termos de aumento de rendimento de síntese (Gololobov *et al.*, 1992).

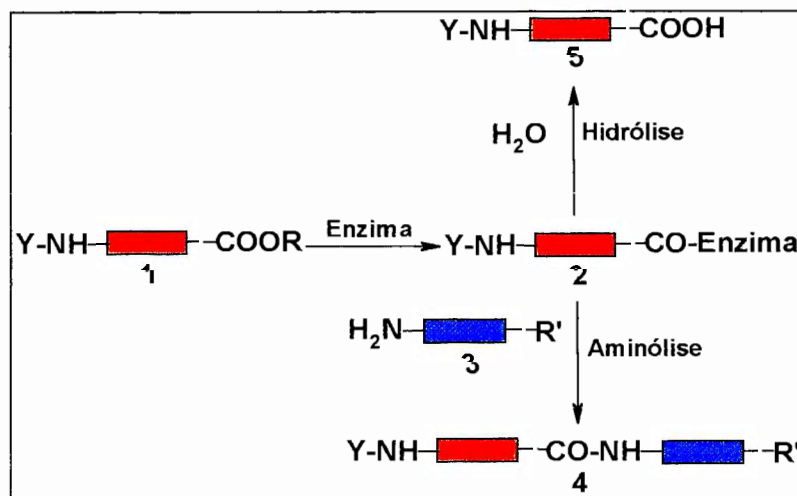


Figura 3: Caminhos reacionais da transferência de acila catalisada por protease. éster de peptídeo (1), complexo acil-enzima (2), nucleófilo (3), síntese do peptídeo (4) e hidrólise (5) (Jakubke, 1994).

Na SCC é possível utilizar ésteres de aminoácidos ou de peptídeos de reatividade diferentes (Jakubke, 1994). Os dados da literatura têm demonstrado que a escolha adequada de um grupo de partida mais específico favorece a supressão de reações de hidrólises secundárias. Como exemplo, podemos citar o uso de “substratos inversos” na síntese catalisada por tripsina. Nesta metodologia, a carga positiva requerida para a catálise da tripsina não está localizada na posição P₁, mas sim no grupo de partida do substrato (Myazawa *et al.*, 1999; Ivanov *et al.*, 1997). Também podemos citar o uso de éster *p*-amidínofenílico (Itoh *et al.*, 1996) e éster picolílico (Mitin *et al.*, 1993).

Fica claro, portanto que as SCC são mais rápidas e, muitas vezes, mais específicas do que as STC.

Neste ponto se faz importante esclarecer que ainda pouco se sabe sobre a especificidade primária e secundária de proteases em presença de solventes microaquosos. As mesmas estão bem determinadas para reações de hidrólise de substratos peptídicos em meio aquoso (Schellenberger *et al.*, 1991; Schellenberger & Jakubke, 1986; MacRae *et al.*, 1981).

De forma geral, o uso da metodologia de síntese enzimática de formação de ligações peptídicas tem sido bem sucedido quando empregado: 1) na síntese de di, tri e tetrapeptídeos e outros peptídeos pequenos, em reações de transpeptidação específica (Miranda *et al.*, 1986; Berner *et al.*, 1992; Kappes & Waldmann, 1997); 2) acoplamentos entre pequenos fragmentos peptídicos sintetizados via métodos químicos (Cerovsky *et al.*, 1997; Bordusa *et al.*, 1999); 3) modificações de produtos isolados ou preparados em laboratório (Bhugaloo-Via *et al.*, 1999).

A condensação de fragmentos peptídicos, principalmente, não está bem estabelecida, necessitando ainda de muito estudo para ser amplamente utilizada. Por outro lado, em teoria a mesma consiste em uma alternativa promissora à síntese química convergente usualmente empregada para a obtenção de peptídeos longos. De uma forma geral, as reações enzimáticas de acoplamento entre os fragmentos vinham sendo realizadas principalmente usando a estratégia de STC (Xaus *et al.*, 1992; Nishino *et al.*,

1992a, b e c; Mihara *et al.*, 1993). Mais recentemente, entretanto, a estratégia de SCC tem ganho mais atenção (Bongers & Heimer, 1994; Gunther & Bordusa, 2000) devido ao fato de a mesma ter-se mostrado de maior aplicabilidade: a possibilidade de ativação dos componentes carboxílicos na forma de ésteres de diferentes reatividades ajuda a minimizar a ocorrência de hidrólises secundárias dos fragmentos reagentes (considerado o maior problema do método enzimático).

1.3 Síntese via DNA-recombinante

A produção de polipeptídeos via a tecnologia do DNA recombinante, também denominada mais informalmente como engenharia genética, consiste basicamente em gerar os compostos a partir de seqüências de DNA correspondentes a eles. O DNA é incorporado em um vetor que é capaz de replicar, dentro de um tipo apropriado de célula, a qual produzirá a seqüência peptídica codificada pelo DNA incorporado. Este vetor é geralmente um plasmídeo, pedaço circular de DNA bacteriano relativamente pequeno (4.000 a 8.000 pares de base), ou um vírus, tal como bacteriófago lambda (Lippard & Berg, 1994). O processo de clonagem envolve: 1) a separação de um gene ou segmento de DNA a partir de um cromossomo ou a síntese do oligonucleotídeo de seqüência definida; 2) a sua ligação à uma molécula menor carregadora de DNA para gerar o DNA recombinante (uma molécula resultante da união de fragmentos diferentes de DNA que não são encontrados juntos na natureza). A expressão do DNA clonado é precedida pela sua inserção nas células hospedeiras. Através de métodos especiais de seleção e identificação, aquelas que produziram a cadeia polipeptídica desejada são coletadas. Finalmente, o material expresso é delas isolado. A **Figura 4** a seguir ilustra o processo de clonagem, inserção e replicação:

O desenvolvimento desta técnica está associado: 1) à descoberta de endonucleases bacterianas (enzimas de restrição) capazes de cortar o DNA em posições específicas; 2) ao conhecimento dos processos de replicação e reparo do DNA; 3) à disponibilidade de métodos para selecionar ou identificar aquelas células hospedeiras que contêm a molécula de DNA

recombinante; 4) à possibilidade de síntese química de seqüências nucleotídicas específicas.

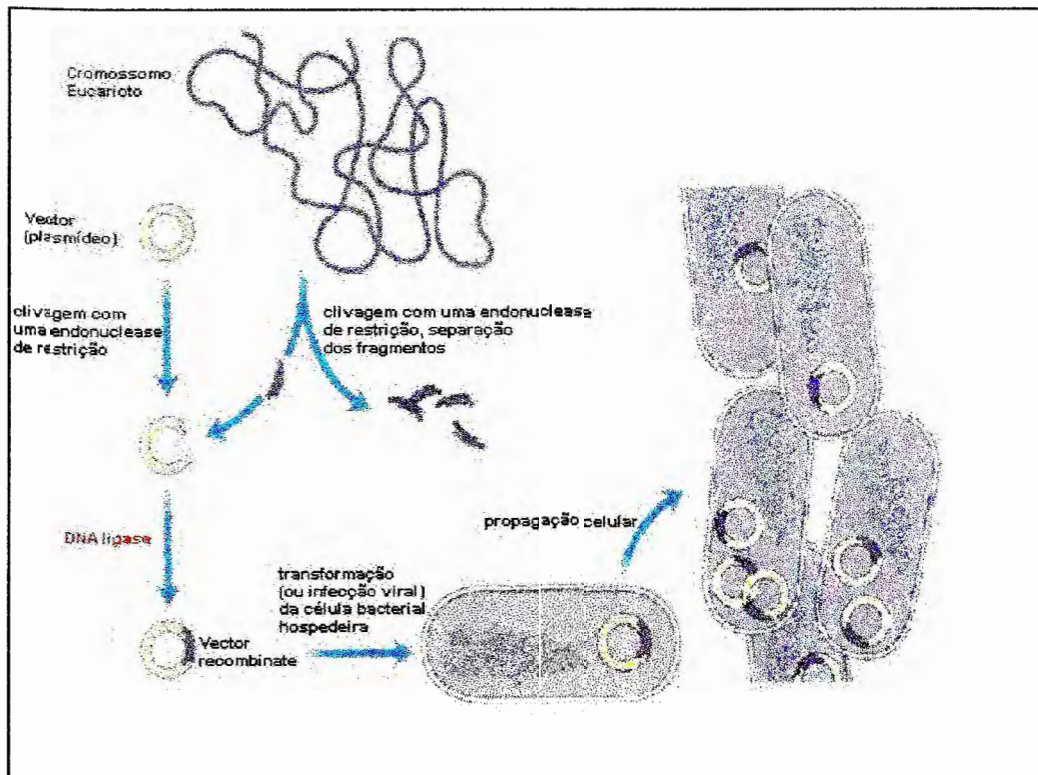


Figura 4: Engenharia genética, um exemplo do processo de clonagem do DNA (Lehninger *et al.*, 1993).

As bactérias expressam os genes clonados através de dois mecanismos de biossíntese conhecidos: o ribossômico e o não ribossômico.

Na síntese ribossômica o peptídeo é sintetizado através da transcrição do DNA em m-RNA e posterior tradução. Este processo envolve toda a maquinaria ribossômica da bactéria. A cadeia polipeptídica pode então ser processada por proteinases específicas para produzir o peptídeo desejado que apresenta em sua constituição os aminoácidos usuais (L-aminoácidos). A **Figura 5** a seguir ilustra a obtenção de peptídeos pela via ribossômica.

O método biológico baseado na tecnologia do DNA recombinante usando a via ribossômica para a tradução é ideal para síntese de muitos

polipeptídeos e proteínas (Anthony *et al.*, 1989). Entretanto, este é ainda um método que apresenta várias limitações, dentre as quais a obtenção de peptídeos pequenos e a incorporação de aminoácidos modificados. Além disso, nem todos os genes de eucariotos podem ser expressos em bactérias (procariotos). De fato, muitos peptídeos requerem intensas modificações pós-tradução para serem biologicamente ativos e as bactérias freqüentemente não são capazes de realizar tais modificações.

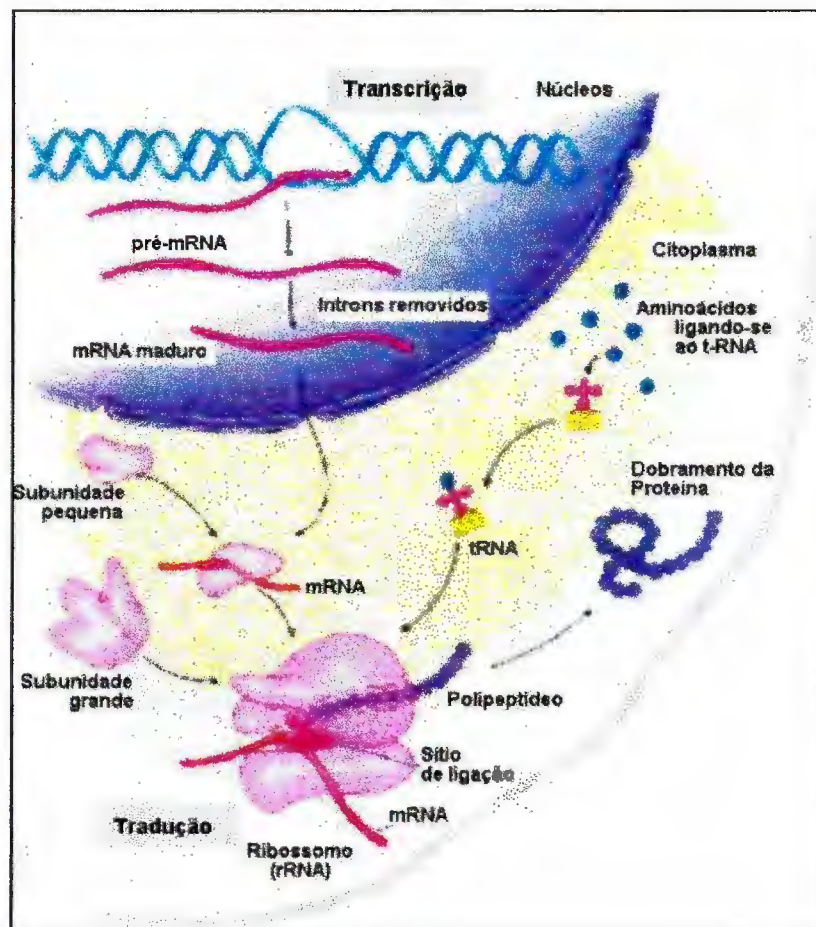


Figura 5: Síntese de peptídeos via ribossômica (Tobin & Dusheck, 1998).

Na síntese não ribossômica, o peptídeo é sintetizado através de sintetases peptídicas que são complexos enzimáticos responsáveis pelo reconhecimento, ativação, modificação e união dos aminoácidos para

resultar em produtos peptídicos (Stein *et al.*, 1996). Neste processo, é possível incorporar L ou D aminoácidos.

A identificação e seqüência dos resíduos de aminoácidos envolvidos na síntese via não ribossômica são ditadas pela organização das enzimas multifuncionais (sintetases peptídicas) em domínios (**Figura 6** ilustra a síntese não ribossômica do peptídeo cíclico gramicidina S). Cada domínio do complexo representa uma unidade funcional responsável pelo: 1) reconhecimento e ativação de aminoácidos (domínio de adenilação); 2) formação de uma ligação tioéster com o substrato através do cofator 4'-fosfopanteteína (domínio de tiolação ou da proteína carregadora de peptidil); 3) condensação de peptidil ou fragmentos aminoacil (domínio de condensação); 4) liberação do produto por ciclização ou hidrólise. Domínios exibindo várias modificações funcionais têm sido identificados e são responsáveis pela epimerização do carbono- α da ligação tioéster-substrato, metilação do grupo amino, redução do grupo carbonil ativado e formação de anéis heterocíclicos envolvendo as cadeias laterais de cisteína, serina ou treonina. Um conjunto de domínios usados para completar um ciclo de alongamento é denominado módulo. O módulo mais simples é constituído pelos domínios de adenilação, tiolação e de condensação para o reconhecimento, ativação, ligação e condensação dos substratos. Um módulo constituído destes três domínios é a base repetitiva das sintetases peptídicas e o verdadeiro bloco construtivo (módulo de alongação) dos peptídeos (Kleinkauf & Döhren, 1996; Marahiel *et al.*, 1997; Döhren *et al.*, 1997).

As sintetases peptídicas estão se tornando um alvo de grande interesse na produção de novos peptídeos bioativos. Por isso, o número de laboratórios envolvidos no isolamento e caracterização de novas sintetases peptídicas e manipulação genética vem aumentando a cada dia. A possibilidade de manipular as sintetases peptídicas tem estimulado pesquisas adicionais nesta área (Duitman *et al.*, 1999). O trabalho clássico realizado por Stachelhaus e colaboradores (1995) demonstraram a viabilidade de se gerar enzimas híbridas de sintetases peptídicas através da

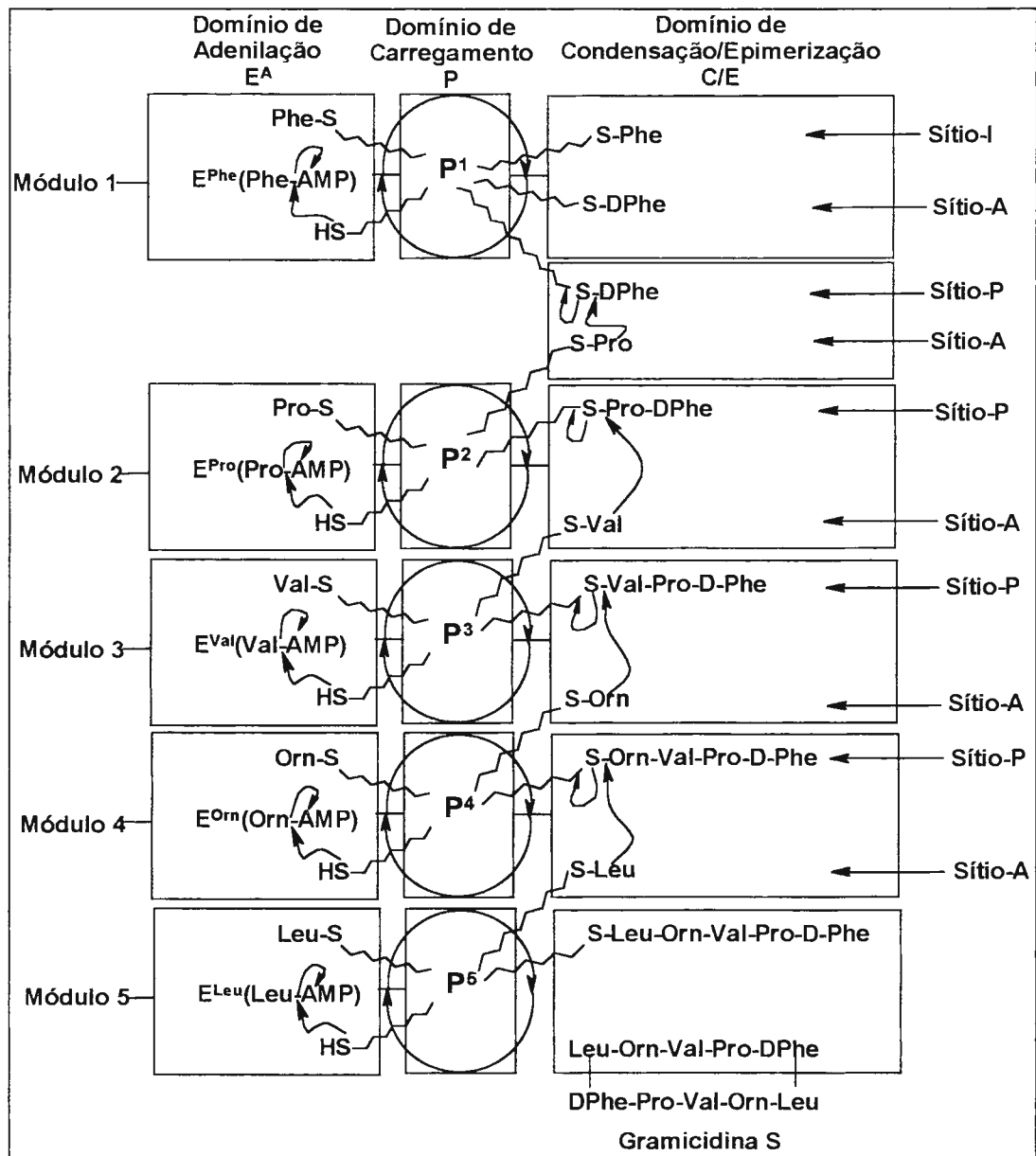


Figura 6: Seqüência de reações e organização modular da biossíntese da gramicidina S. O módulo 1 é formado pelo domínio de adenilação E^{Phe} , domínio carregador P e um domínio de epimerização; todos os três combinados constituem a gramicidina S sintetase 1 e o primeiro domínio de condensação deste complexo multienzimático. Cada condensação contém um doador e um receptor (ou em analogia ao sistema ribossômico, sítios peptidil e aminoacil, denominados de sítios de I (iniciação) ou P (para peptidil) e A (aminoacilação). O decapeptídeo cíclico foi obtido pela condensação de dois peptídeos idênticos sintetizados pelos módulos da proteína descritos acima. (Döhren *et al.*, 1997).

engenharia genética. As trocas específicas de domínios entre diferentes organismos (fungos e bactérias) conduziram à síntese de peptídeos modificados.

DeFerra e colaboradores modificaram a enzima surfactina sintetase através do deslocamento da região C-terminal com atividade intrínseca de tioesterase para outro domínio de ligação de aminoácidos, produzindo assim um complexo capaz de produzir eficientemente tetrapeptídeos e pentapeptídeos lineares de seqüência definida (DeFerra *et al.*, 1997). Estes autores discutem o papel do domínio da tioesterase na produção eficiente de novos peptídeos.

Apesar dos avanços e dos sucessos obtidos na manipulação das sintetases peptídicas, muitos aspectos envolvidos na síntese de peptídeos via mecanismo "tiotemplate" ainda não estão bem estabelecidos e precisam ser melhor estudados.

2. Síntese de Peptídeos α -esterificados

Os ésteres são de extrema utilidade na síntese de peptídeos. Podem ser utilizados como protetores semi-permanentes de carboxila α , β , e δ ou ainda como ativadores da carboxila α em reações de acoplamento químico ou enzimático entre dois aminoácidos ou dois fragmentos peptídicos.

Ésteres metílicos, etílicos e benzílicos de N_α -acil-peptídeos são usualmente empregados como componentes carboxílicos em SCC (Jakubke, 1987; Kullmann, 1987). Tioésteres de fragmentos peptídicos protegidos podem ser suficientemente ativos para dispensar o uso de reagentes acopladores em síntese química convergente de peptídeos longos (Hojo & Aimoto, 1991; 1992).

Os peptídeos ou derivados de aminoácidos α -esterificados podem ser obtidos por via química ou enzimática. Vários são os métodos de esterificação de N_α -acil-aminoácidos descritos na literatura (Kim & Patel, 1995; Coste & Campagne, 1995). A preparação de ésteres de N_α -acil-peptídeos, contudo, não é trivial (direta, simples ou rápida). Os métodos químicos ou de transesterificação clássicos são, em geral, baseados em

catálise por ácidos ou bases, o que pode ser danoso para a integridade do peptídeo ou, ainda, levar a diversas reações secundárias. Já os métodos enzimáticos são realizados em condições brandas de reações, mas são demorados e trabalhosos, nem sempre fornecendo bons rendimentos.

2.1. Via método químico

Neste caso, o peptídeo α -esterificado pode ser obtido através de:

1) Transesterificação do α -éster em presença de um álcool

Em 1982, Seebach e colaboradores descreveram a transesterificação de diversos ésteres quando estes eram tratados com titânio IV $[(Ti(OR)_4)]$ em presença de álcoois. Este método de transesterificação foi descrito como extremamente brando por utilizar condições de reação essencialmente neutras. Além disso, o uso de solventes secos não era necessário.

Em seguida, Rehwinkel & Steglich (1982) aplicaram este procedimento à síntese de diversos ésteres α -isopropílicos e α -benzílicos de Boc-dipeptídeos através da transesterificação de ésteres α -metílicos de Boc-dipeptídeos com auxílio de $Ti(i-OCH_3H_7)_4$. Estes autores propuseram o uso de alcóxido de Ti (IV) como uma alternativa ao reagente acoplador DCC/DMAP (Neises & Steglich, 1982).

Ilankumaran & Verkade (1999) produziram ésteres alílicos de Boc-peptídeos via transesterificação de seus respectivos ésteres metílicos na presença de uma super base do tipo $P(RCH_2CH_2)_3N$. Rendimentos e epimerização elevados foram obtidos (~95 e 50%, respectivamente).

Em 1992, Ueda e Mori demonstraram que o reagente fosfato de 2,3-diidro-2-tioxo-3-benzoxazolil-difenílico (**Figura 7**) atua como um eficiente agente de condensação e pode ser utilizado na preparação ésteres de dipeptídeos com rendimentos elevados através do acoplamento entre aminoácidos protegidos no N-terminal e ésteres de aminoácidos (Ueda & Mori, 1992).

Kim & Patel (1995) e Coste & Campagne (1995) utilizaram o reagente BOP na preparação de diversos α -ésteres de aminoácidos que foram obtidos com rendimentos elevados em condições reacionais suaves de

síntese (Kim & Patel, 1995; Coste & Campagne, 1995). Tal procedimento, portanto, é passível de ser aplicado à esterificação de α -carboxila de peptídeos (Campagne *et al.*, 1995).

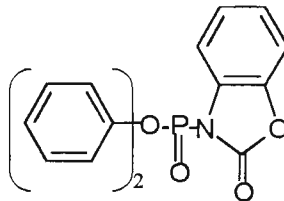


Figura 7: Agente de condensação, fosfato de (2,3-dihidro-2-tioxo-3-benzoxazolil) difenílico.

2) Incorporação de aminoácidos α -esterificados a fragmentos peptídicos

Este método é utilizado freqüentemente em síntese de peptídeos em solução. O grupo C-terminal de um aminoácido pode ser protegido pelo éster α -picolílico, por exemplo, o qual é estável a ácidos e adequado à síntese de peptídeos via estratégia Boc (Bodanszky, 1993). A **Figura 8** ilustra a obtenção de ésteres α -picolílicos de peptídeos.

3) Solvólise ou aminólise de peptidil-resinas

Barton e colaboradores demonstraram que o composto 2-dimetilaminometano transesterifica eficientemente peptídeos ligados à resina de Merrifield com baixo índice de racemização (Barton *et al.*, 1973). Por outro lado, α -ésteres metílicos, etílico e benzílicos de peptídeos têm sido obtidos através de solvólise de peptidil-resinas de Merrifield na presença de trietilamina. A reação em metanol é realizada à temperatura ambiente durante 20 horas, enquanto que aquelas em etanol ou álcool benzílico requerem temperaturas mais elevadas e são mais demoradas: 45 °C em 90 h e 80 °C em 40 h, respectivamente (Stewart & Young, 1982).

Nicolas e colaboradores (1997) prepararam diversos ésteres de peptídeos, dentre eles ésteres α -alquílicos. Estes compostos foram obtidos através da transesterificação de peptídeos ligados à resinas de Merrifield e SASRIN. Ac-Tyr(tBu)-Gly-Gly-OMe, Ac-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Ala-Ala-OMe e Ac-Tyr(tBu)-Gly-Phe-OMe foram obtidos na presença de DIEA ou KCN em

metanol após 6 horas de reação, sendo que as porcentagens de desligamentos foram 89, 84 e 49%, respectivamente.

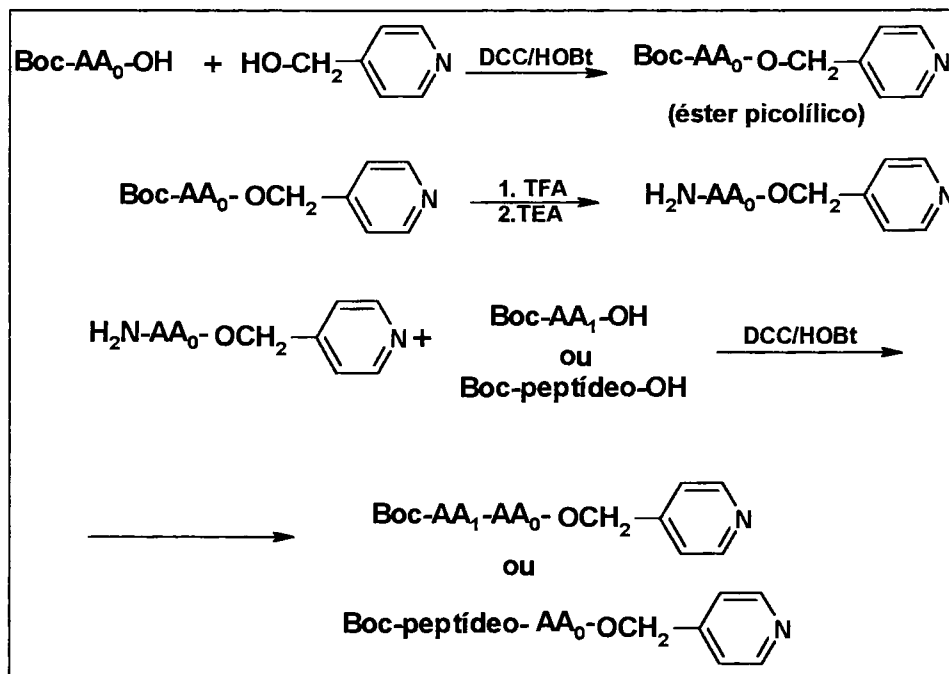


Figura 8: Preparação de ésteres α -picolínicos de peptídeos.

Recentemente, Aiswaryakumari & Sreekumar (1998) sintetizaram ésteres α -metílicos e α -etílicos de Boc-dipeptídeos através da aminólise de peptidil-resinas por ésteres de aminoácidos em condições neutras. Estes autores utilizaram como suporte poliméricos o poliestireno e poliácroléina funcionalizados com os reagentes acilantes oximinoésteres ou oximino anidrido ditiocarbônico. Os rendimentos de desligamento dos peptídeos esterificados e os tempos de reação variaram de 58 a 84% e de 10 a 18 horas, respectivamente.

2.2. Via método enzimático

As proteases, esterases e lipases são as enzimas frequentemente utilizadas em transformações envolvendo grupos amida e éster. Como o papel biológico destas enzimas é clivar as ligações peptídicas (proteases),

ésteres (esterases) e ésteres de ácidos graxos (lipases), tais enzimas podem ser empregadas na síntese de peptídeos α -esterificados (Bemquerer *et al.*, 1991).

Estes compostos podem ser obtidos por:

- 1) Esterificação direta da carboxila- α C-terminal de peptídicos
- 2) Conversão de α -amidas de peptídeos a α -ésteres
- 3) Transpeptidação de peptídeos
- 4) Incorporação de um aminoácido ou peptídeo α -esterificado a fragmentos peptídicos

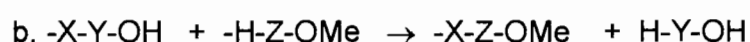
A enzima papaína catalisa a síntese de ésteres α -glicerílicos de Boc(Z)-aminoácidos protegidos e peptídeos com rendimentos de 50-70% (Mitin *et al.*, 1997). Estes ésteres podem ser posteriormente usados como substratos nas sínteses de peptídeos catalisadas por tripsina.

Meos e colaboradores (1995) demonstraram a aplicabilidade da síntese cineticamente controlada à obtenção de ésteres de peptídeos em um único passo a partir de peptídeos com o grupo C-terminal amidado. Bz-Arg-NH₂ foi usado como um substrato modelo para o estudo da reação de transferência de acila catalisada por papaína em metanol. O rendimento obtido após 8 horas de reação, contendo apenas 1% de água, foi acima de 85% a 25 °C. Os dipeptídeos Z-Gly-Leu-NH₂ e Bz-Ala-Val-NH₂ foram convertidos aos respectivos ésteres metílicos com 24% e 87% de rendimento. Este resultado demonstra que a eficiência de esterificação depende da natureza do aminoácido na posição P₁. Aminoácidos mais hidrofóbicos levam a baixos rendimentos. Dependendo do aminoácido na posição P₁ a esterificação pode ser facilmente realizada em etanol aquoso e catalisada por papaína. Foi observado também que a imobilização da enzima aumenta o rendimento da síntese de ésteres etílicos termodinamicamente controlada, mas o mesmo não ocorre com a síntese cineticamente controlada. Os autores propõem este método como uma alternativa na obtenção de ésteres de peptídeos longos.

A carboxipeptidase-Y também é uma outra enzima empregada na síntese de ésteres de peptídeos. Esta enzima é bastante

interessante, pois apresenta atividade ampla dependendo do meio reacional empregado (Breddam *et al.*, 1981). A carboxipeptidase-Y também pode exibir atividade peptidásica, sendo capaz de catalisar a troca de um resíduo C-terminal por uma série de outros grupos. Além disso, substratos dipeptídeos N-bloqueados podem ser convertidos a ésteres e amidas dependendo do nucleófilo da reação: álcoois (MeOH), NH₃, Gly-OH e GlyOMe (Breddam *et al.*, 1981). Algumas das reações catalisadas pela carboxipeptidase-Y encontram-se ilustradas abaixo:

Conversão de peptídeos a ésteres peptídicos:



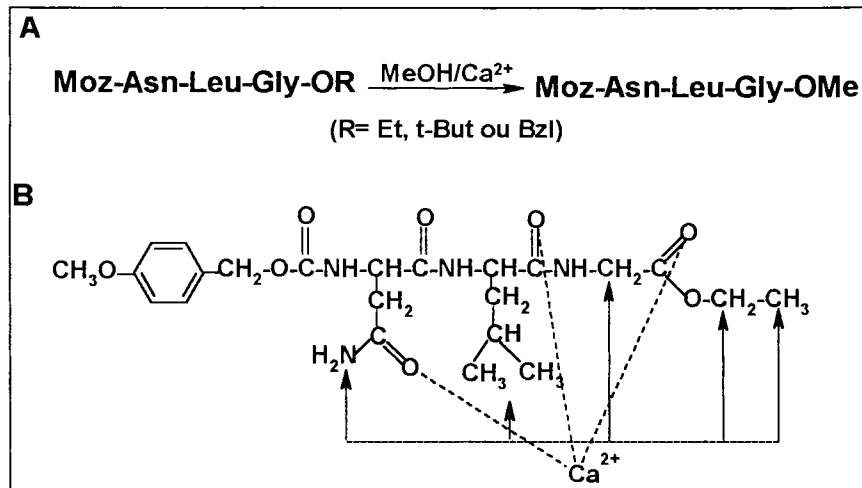
Esquema 5: Possibilidade de troca do resíduo C-terminal em peptídeos. X, Y e Z representam resíduos de aminoácidos.

Berner e colaboradores (1992) estudaram sistematicamente a especificidade de carboxipeptidase-Y em relação ao grupo C-terminal de oligo- e polipeptídeos. Peptídeos esterificados quimicamente foram utilizados como substratos em reação de transpeptidação em meio básico que empregava o éster isobutílico de glicina como nucleófilo.

2.3. Mediante assistência de íons metálicos

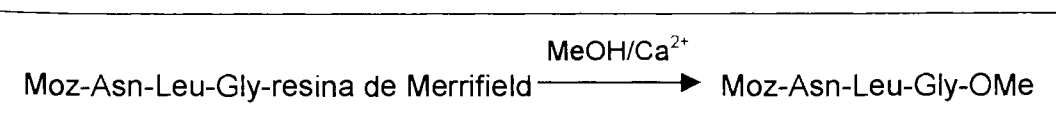
Miranda e colaboradores foram os primeiros a demonstrar que o íon Ca²⁺ é capaz de assistir reações de transesterificação de ésteres etílicos, t-butílicos e benzílicos de peptídeos aos seus ésteres metílicos correspondentes em misturas de diclorometano e metanol (Miranda *et al.*, 1991a). Com base em resultados obtidos em um estudo estrutural utilizando ressonância magnética protônica de alta resolução, estes autores sugeriram um modelo de interação do íon Ca²⁺ com um dos ésteres etílicos de peptídeo estudados (Miranda *et al.*, 1991a; **Esquema 6**).

Como a ligação entre um peptídeo e a resina de Merrifield se dá através de um éster benzílico, o mesmo grupo investigou a possibilidade de



Esquema 6: Reação de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt em metanol (A) e modelo de ligação do íon cálcio ao peptídeo Moz-Asn-Leu-Gly-OEt (B) segundo Miranda *et al.*, 1991b.

desligamento de um tripeptídeo desta resina através da metodologia por eles já descrita. Como era esperado, e está mostrado na reação abaixo, o éster metílico de peptídeo pôde assim ser obtido (Miranda *et al.*, 1991b):



Ésteres benzílicos de peptídeos já haviam sido produzidos por Moore & Kwork (1980) através de transesterificação de aminoacil- e peptidil-resinas de Merrifield em álcool benzílico contendo KCN. Neste trabalho foi estudado: 1) como a natureza dos derivados de aminoácidos e de peptídeos ligado à resina influenciam a reação de solvólise; 2) o efeito da concentração de KCN na eficiência da reação; 3) como diferentes éteres-coroa influenciam a velocidade da transesterificação. Estes autores observaram que a natureza do penúltimo aminoácido, bem como o aminoácido ligado ao suporte polimérico podem influenciar a velocidade desta reação e que peptídeos

transesterificam mais facilmente do que Boc-aminoácidos. Contudo, as transesterificações de peptídeos ligados à resina por aminoácidos hidrofóbicos tais como, Ile, Val, Pro e Thr(OBzl) necessitam de temperaturas mais elevadas (50 °C); nestas condições o desligamento dos peptídeos é quantitativa.

Seebach e colaboradores (1991) demonstraram que mistura de DBU e LiBr saponifica (THF/H₂O) e transesterifica eficientemente peptidil-resinas Wang e peptidil-resinas PAM. Em ambos os casos não foi observada epimerização no resíduo C-terminal esterificado.

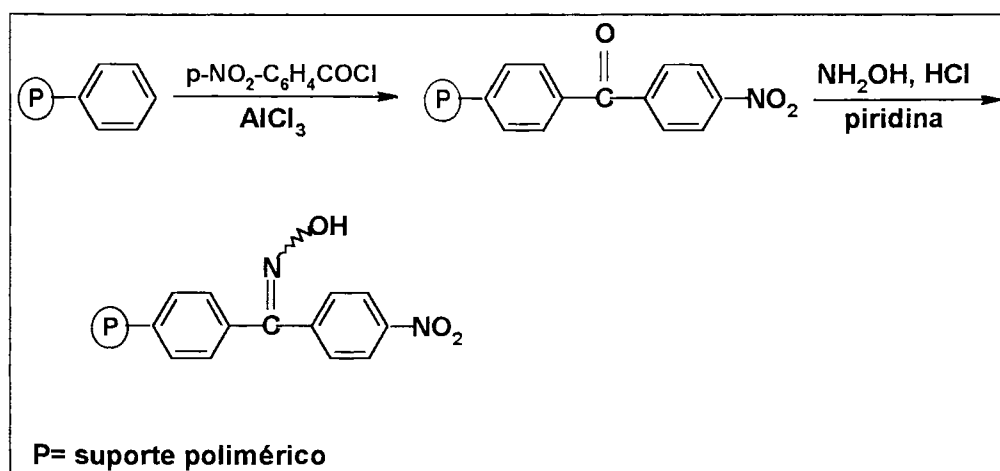
3. Resina Oxima de Kaiser em síntese de peptídeos

Em 1980, DeGrado & Kaiser introduziram a resina *p*-nitrobenzofenona oxima (resina de Kaiser, KOR) na síntese de peptídeos.

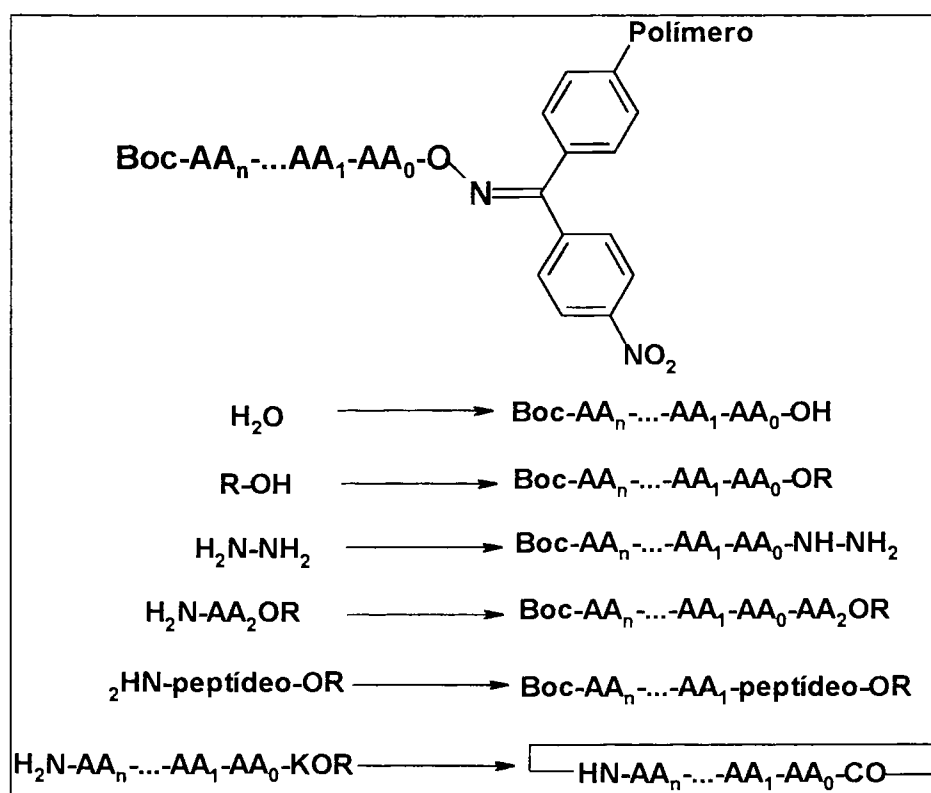
O **Esquema 7** ilustra as etapas de funcionalização a partir do suporte polimérico de poliestireno contendo 1% de divinilbenzeno via acilação de Friedel-Crafts pelo cloreto de *p*-nitrobenzoíla. O polímero de benzofenona obtido é então convertido a correspondente resina oxima pela reação de cloridrato de hidroxilamina e piridina em etanol.

O éster de oxima formado entre um peptídeo e este suporte polimérico é suficientemente ativo para sofrer o ataque nucleofílico de uma grande variedade de compostos, tais como aminoácidos, peptídeos esterificados, hidrazinas, álcoois e água. O grupo α -amino do próprio peptidil-KOR é um nucleófilo potente, podendo também atacar o éster de oxima para gerar o peptídeo cíclico correspondente (**Esquema 8**). Em geral, estas são catalisadas pelo ácido acético ou por bases (Siemens *et al.*, 1990; Mihara *et al.*, 1995; Pichette *et al.*, 1997).

Siemens e colaboradores demonstraram que sob condições apropriadas, é possível gerar ésteres 4-(metiltio)fenílicos de peptídeos através da síntese em fase sólida, utilizando-se a resina oxima como suporte. Estes ésteres peptídicos podem posteriormente ser oxidados às sulfonas correspondentes, gerando derivados mais eletrofílicos (Siemens *et al.*, 1990).



Esquema 7: Preparação da resina oxima de Kaiser (DeGrado e Kaiser, 1980).



Esquema 8: Desligamento do peptídeo da KOR por diversos nucleófilos (DeGrado & Kaiser, 1980). AA₁, AA₂, AA_n representam resíduos de aminoácidos; OR or SR= éster ou tioéster.

Pichette e colaboradores (1997) prepararam ésteres α -metílicos, α -benzílicos de peptídeos através de solvólise de peptidil-KOR na presença de DBU. Este método é descrito como rápido, com altos rendimentos de desligamento e sem racemização. Entretanto, leva a uma reação indesejada: a transesterificação do éster de Asp(OBzl).

Recentemente, Hamuro e colaboradores (1999) descreveram que um peptidil-KOR pode ser acoplado diretamente a outro peptidil-resina através de aminólise, o que ampliou mais ainda a aplicabilidade deste suporte polimérico à síntese de peptídeos.

A resina oxima de Kaiser também tem sido empregada na preparação de fragmentos protegidos não esterificados. Peptídeos correspondentes às porções amino-terminal (1-34), média (35-71), carboxi-terminal (72-104) da guanidilribonuclease RNase T₁ foram obtidos a partir de fragmentos protegidos sintetizados via fase sólida utilizando-se como suporte sólido a KOR (Sasaki *et al.*, 1991). Neste trabalho, Sasaki e colaboradores mostraram que a condensação entre segmentos peptídicos protegidos, estando um deles ligado a um suporte sólido, pode ser bastante lenta devido à baixa solubilidade dos reagentes ou a formação de pontes de hidrôgeno na peptidil-KOR em crescimento.

Em 1992, Hendrix e colaboradores utilizaram a resina oxima de Kaiser na SPFS convergente da proteína β -amilóide da doença de Alzheimer, tendo descrito que o uso da referida resina trouxe grande flexibilidade ao processo. As condições reacionais, no entanto, foram ajustadas de modo a minimizar reações secundárias, tais como a formação de aspartimida em condições básicas. A aspartimida formada pode ser hidrolisada durante a etapa posterior de desproteção acidolítica e de extração do peptídeo, formando-se dois isômeros α - e β -aspartil que são indistinguíveis por técnicas comumente aplicadas de massa e análise de aminoácidos (Hendrix *et al.*, 1992).

4. Utilização dos íons lantanídeos como sondas luminescentes do íon Ca^{2+}

O cálcio (do latim Calx, cal), na sua forma iônica, é o mais importante e mais versátil elemento bioinorgânico. Este metal alcalino-terroso é amplamente distribuído na crosta terrestre, o quinto elemento mais abundante nas águas do mar (3,39% em peso) e também no corpo humano (~2% do peso).

O cálcio atua em muitos processos fisiologicamente fundamentais ao homem: 1) divisão celular; 2) secreção hormonal (por exemplo, secreção de insulina); 3) coagulação sanguínea ("cascata da coagulação"); 4) reações de anticorpos; 5) fotossíntese; 6) transmissão dos impulsos nervosos; 7) geração de energia (desfosforilação do ATP, degradação do glicogênio) para contração muscular; 8) ativação do metabolismo oxidativo, etc... O corpo humano mantém a concentração correta dos íons cálcio no meio extracelular (~1,2 mM) e no citossol (~0,1 μM) por uso de bombas específicas. Este sistema é capaz de responder apropriadamente a sinais que ocorrem na forma de mudanças repentinas na concentração destes íons.

De modo geral, os íons Ca^{2+} podem ser vistos como mediadores de informações. Estes se ligam especifica e seletivamente a proteínas e peptídeos. Por exemplo, a ligação do cálcio à proteína calmodulina causa uma mudança conformacional que ativa a enzima fosforilase-quinase, catalisadora da quebra do glicogênio, levando à produção de energia necessária para a contração muscular. Alguns peptídeos só apresentam atividade quando na presença de Ca^{2+} , como é caso do peptídeo isolado por Lakey e colaboradores (1983), o qual inibe o crescimento de bactérias gram-positivas, e da ocitocina, um nonapeptídeo cíclico que está envolvido primariamente na contração uterina e na estimulação da liberação do leite nos tecidos mamários. O mecanismo de ação deste último ainda não é completamente compreendido, mas sabe-se que o Ca^{2+} extracelular é requerido para sua ação hormonal (Ananthanarayanan & Brimble, 1996).

Devido à grande importância de Ca^{2+} nos sistemas biológicos, vários estudos têm sido realizados a fim de se conhecer a geometria dos sítios de

ligação e determinar as conformações ativas de complexos proteína/ou peptídeo-cálcio (Katz *et al.*, 1996; Ananthanarayanan *et al.*, 1996). Os lantanídeos têm auxiliado muito nestes estudos, pois estes funcionam como substitutos luminescentes do cálcio (Klakamp, 1992; Cierniewski *et al.*, 1994).

O Eu^{3+} e o Tb^{3+} apresentam propriedades ópticas peculiares: são luminescentes em solução aquosa e a luminescência é mantida quando estes íons participam de um sistema complexo-ligante. Os mesmos exibem emissões múltiplas devido às várias transições eletrônicas que, por sua vez, são sensíveis ao meio (Richardson, 1982). Graças às suas propriedades de coordenação, os íons lantanídicos são bastante similares aos metais alcalinos terrosos, especialmente ao íon Ca^{2+} . A maior similaridade entre o Ca^{2+} e os Ln^{3+} é o raio iônico (Ca^{2+} : 1,06 Å e os Ln^{3+} variam de 1,06 a 0,85 Å). Os Ln^{3+} são mais solvatados do que o Ca^{2+} e para se ligarem aos sítios biológicos, têm que perder suas esferas de solvatação. Há um grande aumento de entropia no sistema quando o Ln^{3+} se liga, o que contribui para o aumento de suas constantes de ligação.

Os íons Eu^{3+} e Tb^{3+} são, portanto, extremamente úteis em estudos espectroscópicos de sistemas biológicos. Os elétrons 4f no seu antepenúltimo nível eletrônico são eficientemente protegidos pelos elétrons 5s e 5p dos efeitos externos. Conseqüentemente, os elétrons 4f não estão envolvidos no comportamento químico normal destes elementos, nem participam da formação de ligações. Os orbitais *f* preenchidos ou vazios exercem pouca influência no comportamento químico destes elementos, mas têm grande efeito sobre seus espectros e propriedades magnéticas (Lee, 1980).

Em diferentes combinações químicas os lantanídios Eu^{3+} e Tb^{3+} exibem as mesmas propriedades espectroscópicas relacionadas às transições 4f. Essas transições são responsáveis pela absorção característica e espectro de luminescência com muitas bandas estreitas e estados excitados com tempos de vida longos (ordem de milissegundos).

Os espectros de emissão dos complexos de Eu^{3+} em solução apresentam bandas relacionadas às transições ${}^5\text{D}_0\text{-}{}^7\text{F}_J$ ($J= 0-4$, algumas vezes 0-6). As transições mais fortes observadas são ${}^5\text{D}_0\text{-}{}^7\text{F}_{1,2,4}$ com ${}^5\text{D}_0\text{-}{}^7\text{F}_2$ exibindo hipersensibilidade a mudanças no meio ambiente. Em solução, a emissão do estado excitado ${}^5\text{D}_1$ é geralmente mais fraca enquanto que a luminescência de níveis superiores ${}^5\text{D}_2$ e ${}^5\text{D}_3$ é geralmente suprimida eficientemente. No estado sólido linhas mais fortes são algumas vezes observadas e são originadas dos níveis ${}^5\text{D}_{1,2,3}$ (Bünzli, 1989). Informações sobre a composição e estrutura de sua esfera de coordenação podem ser obtidas tanto nos espectros de emissão quanto nos de excitação (Elbanowski & Makowska, 1996).

O espectro de excitação permite a identificação dos grupos doadores no ligante e dos sítios de ligação do íon lantanídico. A análise da variação da intensidade das bandas de emissão ou mesmo da supressão fornecem informações sobre as distâncias entre grupos ligantes e eles, tão bem quanto a estequiometria do complexo (Horrocks *et al.*, 1981). A análise das mudanças na intensidade das emissões das bandas destes íons ou da luminescência dos ligantes por outro íon metálico permite a determinação da distância entre dois metais. Medidas do tempo de emissão do Eu^{3+} em água fornecem informações sobre o número de moléculas de águas presentes na esfera de coordenação do metal (número de hidratação; Richardson, 1982). Através da intensidade (parâmetro η) e a estrutura das bandas de emissão, informações valiosas a respeito das ligações e propriedades conformacionais do ligante e os sítios de ligação do metal também podem ser obtidas (Poluéktov *et al.*, 1975a, b).

5. Análise estrutural de peptidil-resinas por ressonância magnética nuclear

Um dos grandes problemas da síntese de peptídeos em fase sólida é a ausência de métodos analíticos disponíveis para se caracterizar estruturalmente o peptídeo quando este se encontra ainda ligado ao suporte polimérico. O método mais freqüentemente empregado é desligá-lo e

analisá-lo em solução através das técnicas analíticas convencionais, o que implica consumo de tempo adicional.

Para se contornar tal problema, passou-se a utilizar alguns tipos de espectroscopia, dentre elas a de RMN em fase sólida. Esta, entretanto, se mostrou bastante limitada pois, os espectros obtidos eram mal resolvidos em decorrência do alargamento dos picos resultantes de interações anisotrópicas que os vários núcleos dos sólidos experimentam com os seus vizinhos.

Giralt e colaboradores (1994) foram os primeiros a demonstrar que RMN- ^{13}C poderia ser utilizada para: 1) analisar qualitativamente suportes poliméricos empregados na SPFS em um determinado solvente; 2) fornecer informações estruturais e semi-quantitativas do seu grau de funcionalização; 3) monitorar o processo de alongamento do peptídeo. Para tanto, o tripeptídeo H-Asn-(N-CH₃)Ala-Thr-NH₂ foi sintetizado através da estratégia Boc e as peptidil-resinas foram suspensas no solvente (CDCl₃ ou DMSO) ou mistura de solventes [CDCl₃:DMSO (1:1) ou C₄H₈O:DMSO (4:1)] para análise em um tubo de alta resolução convencional para líquidos (com 10 mm de diâmetro). Assim, os espectros de ^{13}C em fase gel foram obtidos para todos os intermediários da síntese e os deslocamentos químicos referentes aos carbonos da cadeia peptídica determinados. As atribuições foram feitas por comparação com deslocamentos químicos já tabelados obtidos com aminoácidos protegidos em solução. Após a primeira reação de acoplamento foi possível verificar a presença de sinais adicionais da peptidil-resina não reagida. Sinais em 117 e 21,4 ppm revelaram a formação de uma grande quantidade de nitrila na cadeia lateral de asparagina. Além disso, a mobilidade de diferentes partes da molécula peptídica pôde ser determinada em cada etapa da síntese em fase sólida, fornecendo assim uma base quantitativa para o melhoramento das condições.

Em 1994, Look e colaboradores também utilizaram RMN- ^{13}C no monitoramento de reações em fase sólida. Neste trabalho, foram utilizadas amostras enriquecidas com C¹³ a fim de se realizar análise mais rápida e com menor quantidade de amostra (20 mg). Fica claro, portanto, que apesar

deste tipo de espectroscopia ser adequada e confiável, o seu uso torna-se limitado justamente devido à baixa abundância isotópica do ^{13}C (ao redor de 1,108%) que acarreta baixa sensibilidade de detecção.

Para que espectros de RMN- ^1H de alta resolução fossem obtidos para sólidos ou géis, novas técnicas e instrumentos (hardwares, probes e rotores) foram desenvolvidos. Um dos maiores avanços foi a análise da amostra no ângulo mágico (MAS) sob rotação intensa. Esta técnica havia sido proposta inicialmente por Andrew e colaboradores (1958) para anular ou reduzir as interações anisotrópicas (interações de spins, de proteção magnética e dipolar). Estas interações provocam alargamento dos picos nos espectros de RMN em sólidos e têm dependências geométricas do tipo $(3\cos^2\theta-1)$ (no caso das interações dipolares, por exemplo, θ é o ângulo entre o vetor internuclear e o campo magnético B_0). O movimento rápido e isotrópico que ocorre em soluções não-viscosas anula em média este fator geométrico, originando sinais de RMN estreitos. Uma vez que a função $(3\cos^2\theta-1)$ se anula para $\theta= 54,7^\circ$, este passou a ser chamado de ângulo mágico, no qual é possível alinhar todos os vetores internucleares e as interações dipolares.

A **Figura 9** a seguir mostra os espectros de RMN- ^1H de uma peptidil-resina inchada em DMSO- d_6 . Como é possível observar, em **A** a amostra está estática e o espectro obtido é de baixa resolução; em **B** a amostra se encontra sob rotação intensa no ângulo mágico e o espectro é de alta resolução.

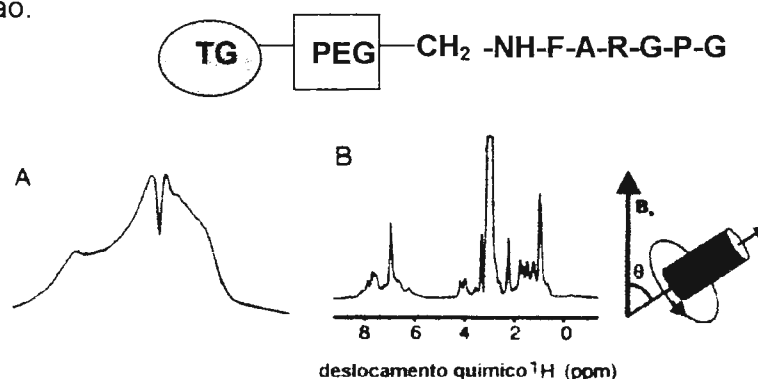


Figura 9: Espectros de RMN- ^1H da peptidil-resina GPGRAF-Tentagel [TG] em DMSO- d_6 : (A) amostra estática; (B) amostra em rotação orientada segundo o ângulo mágico a 5 KHz em um probe da Bruker VT-MAS. Figura adaptada do trabalho de Jelinek *et al.* (1997).

Os experimentos de ressonância magnética nuclear de alta resolução em ângulo mágico requerem melhoramentos instrumentais do espectrômetro de RMN a ser usado que incluem principalmente:

- 1) um hardware capaz de girar as amostras orientadas no ângulo mágico em velocidades variadas.
- 2) um rotor extremamente resistente e capaz de suportar as forças geradas pelas altas velocidades de rotação da amostra (**Figura 10**).
- 3) uma unidade pneumática responsável pela inserção e ejeção do rotor.
- 4) filtros digitais que têm como função eliminar as bandas laterais resultantes da alta velocidade de rotação da amostra num probe que apresente alta sensibilidade, mecanicamente mais resistente e mais apto a suportar as condições impostas pela rotação da amostra em altas velocidades (**Figura 11**).

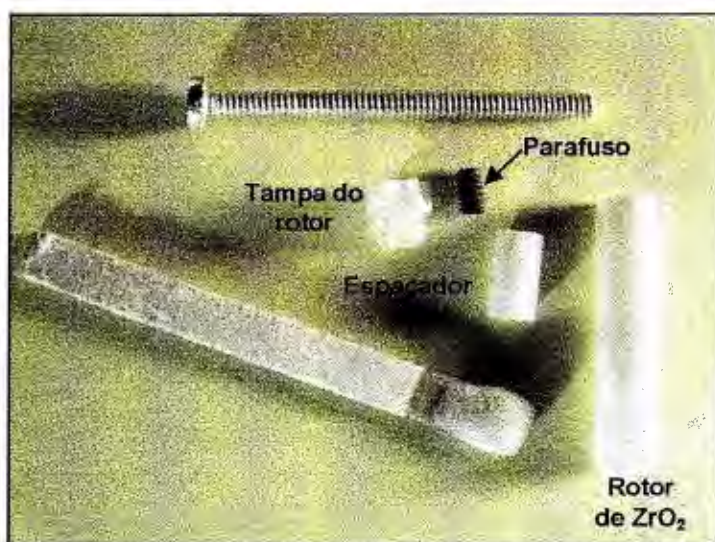


Figura 10: Partes que compõem um rotor para ressonância magnética nuclear de alta resolução segundo o ângulo mágico.

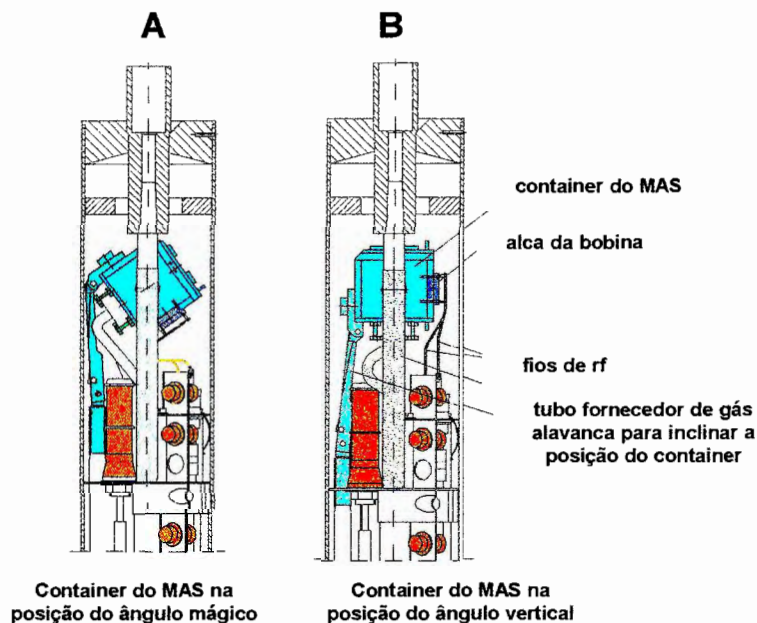


Figura 11: Probe de alta resolução segundo o ângulo mágico: (A) "container" na posição do ângulo mágico; **(B)** "container" na posição vertical. Rf= radiofrequência.

Com base neste conhecimento, em 1997, Dhalluin e colaboradores estudaram SPFS por espectroscopia de ^1H -RMN através da combinação de condições eficientes de inchamento de peptidil-resinas à técnica de ângulo mágico acima descrita. Assim, as moléculas ligadas ao suporte polimérico apresentaram alta mobilidade, facilitando a detecção dos prótons da ligação peptídica por eliminação dos termos anisotrópicos de interações dipolares. Uma vez que a abundância isotópica de ^1H é cerca de 100% (99,98%), pouca quantidade de amostra foi necessária (10 mg). Estes autores conseguiram monitorar e analisar o efeito do solvente na SPFS da seqüência peptídica agregante $\text{NH}_2\text{-Thr-Glu-Gly-Glu-Ala-Arg-Gly-Ser-Val-Ile-OH}$ pela estratégia Fmoc empregando como suporte polimérico a resina Wang.

Em seguida, Warrass e colaboradores demonstraram um método simples de suprimir eficientemente todos os sinais de ressonância dos solventes empregados nas SPFS, ampliando a aplicabilidade da técnica HR-MAS ao estudo de peptidil-resinas (Warrass *et al.*, 1999).

Cilli e colaboradores utilizaram a ressonância paramagnética (RPE) no monitoramento da síntese de peptídeos em fase sólida. Peptidil-resinas com diferentes graus de substituição e seqüências agregantes foram investigadas (Cilli *et al.*, 1997; Cilli *et al.*, 1999), permitindo a detecção de diferentes graus de agregação da cadeia peptídica como uma função do solvente e do grau de substituição das resinas.

O método de RPE consiste no emprego de uma molécula "sonda" paramagnética (marcador de spin). O composto paramagnético Toc (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-*N*-óxido-4 amino-4-carboxílico) pode ser protegido em seu grupamento amino terminal com os protetores Boc ou Fmoc (Nakaie *et al.*, 1981; Nakaie *et al.*, 1982; Marchetto *et al.*, 1993) e assim introduzido na cadeia peptídica através da síntese em fase sólida. A teoria básica da espectroscopia de RPE é a mesma que a de RMN, porém dois importantes fatores adicionais estão presentes: as interações nucleares hiper-finas e o fator *g*. As interações nucleares hiper-finas de um par de elétron desemparelhado com um número quântico de spin *I* dá um aumento de $2I+1$ linhas no espectro. Isto significa, por exemplo, que um par de elétron associado ao núcleo de nitrogênio ($I = 1$) apresenta 3 linhas no espectro de RPE. O fator *g* determina a posição destas linhas no espectro (Cantor & Schimmel, 1980). As interações nucleares hiperfinas e o fator *g* são sensíveis a orientação do radical em relação ao campo magnético, movimento molecular e a polaridade do ambiente local. Estes fatores por sua vez afetam as características do sinal de RPE que pode ser analisada para obter informações estruturais, de movimento e polaridade.

A maior desvantagem da RPE em relação a RMN é justamente a necessidade de se incorporar um aminoácido paramagnético à seqüência peptídica.

6. Colecistocinina

A colecistocinina (**CCK**) foi inicialmente descrita como um hormônio peptídico gastrointestinal responsável pela contração da vesícula biliar,

Dois subtipos de receptores para as CCKs foram descritos na literatura: 1) o receptor do subtipo A (CCK-A) predomina nos órgãos periféricos tais como pâncreas, vesícula biliar e íleo, mas também é encontrado em regiões distintas do sistema nervoso central. Há evidências que os receptores CCK-A mediam o efluxo dopaminérgico e a satisfação; 2) o receptor do subtipo B (CCK-B), presente em várias regiões do cérebro, que mostra um perfil estrutural e farmacológico similar àqueles dos receptores gastrintestinais. Acredita-se que o receptor CCK-B esteja envolvido com o desenvolvimento da ansiedade (Van Megen *et al.*, 1996).

Dentre todas as formas moleculares conhecidas, a CCK-8 foi a mais estudada devido ao fato de ser um peptídeo pequeno e exibir o espectro total de atividades biológicas atribuídas a este hormônio peptídico (Villanueva, 1982; Hruby, 1990; McCort-Tranchepain, 1992; Ron, 1992). Tais estudos forneceram dados relevantes para o entendimento do mecanismo de ação e do papel biológico da CCK. Estudos similares referentes às formas moleculares maiores deste hormônio (CCK-33, CCK-39 e CCK-58), entretanto, não foram realizados devido à dificuldade de síntese destes peptídeos. Até 1992, apenas a CCK-33 havia sido sintetizada por métodos químicos em solução e em fase sólida, porém com grande dificuldade e baixos rendimentos (Kurano *et al.*, 1987; Penke *et al.*, 1986; Fujii *et al.*, 1988).

Devido à grande importância destas formas moleculares para a elucidação da fisiologia da CCK em mamíferos e à crescente necessidade em dispor de quantidade suficiente que possibilite tais estudos, Miranda e colaboradores sintetizaram análogos de CCK-8, CCK-33, CCK-39 e CCK-58 pelo método da fase sólida. A decisão de sintetizar análogos e não os peptídeos naturais foi feita com base no tamanho e seqüência da CCK-58, alvo principal, e nas dificuldades previamente encontradas na síntese da CCK-33. Apesar de terem sido os primeiros análogos de CCK-39 e CCK-58 a serem obtidos em laboratório, estes compostos se mostraram menos potentes que os naturais na estimulação da secreção de amilase em pâncreas de rato (Miranda *et al.*, 1993a; 1993b; 1994).

Em 1997, Kitagawa e colaboradores descreveram a SPFS da CCK-39. O dipeptídeo Fmoc-Asp-Phe-NH₂ foi ligado a resina 2-clorotritil através da cadeia lateral do ácido aspártico e os Fmoc-aminoácidos subseqüentes foram sendo introduzidos passo a passo. A síntese foi conduzida com proteção mínima nas cadeias laterais do aminoácidos e os resíduos Asn e Gln foram introduzidos pelo Fmoc-Asn/Gln-OPFP na presença de HOBt. Os quatro resíduos de arginina foram protegidos com Pbf, um grupo protetor bastante sensível à condições de desproteção empregadas (90% TFA/H₂O a 4 °C). Os grupos protetores t-Bu/Boc foram utilizados para os aminoácidos que requeriam proteção na cadeia lateral incluindo His, a qual foi introduzida na forma de His(Boc). Após o alongamento da cadeia peptídica, o peptídeo ligado à resina foi clivado utilizando-se mistura de HAc-TFA-DCM (1:1:3 v/v, 25 °C, 30 min) e em seguida da desproteção realizada com solução de 90% TFA aq. (4 °C, 15 h). Por espectrometria de massas pode-se verificar que o grupo sulfato permaneceu intacto após as etapas de clivagem e desproteção. Apesar do sucesso da síntese, o rendimento obtido foi baixo (8%) devido à oxidação dos resíduos de metionina (Kitagawa *et al.*, 1997, 1999).

A CCK-58 continua como um dos alvos nunca atingido pelos químicos de peptídeos.

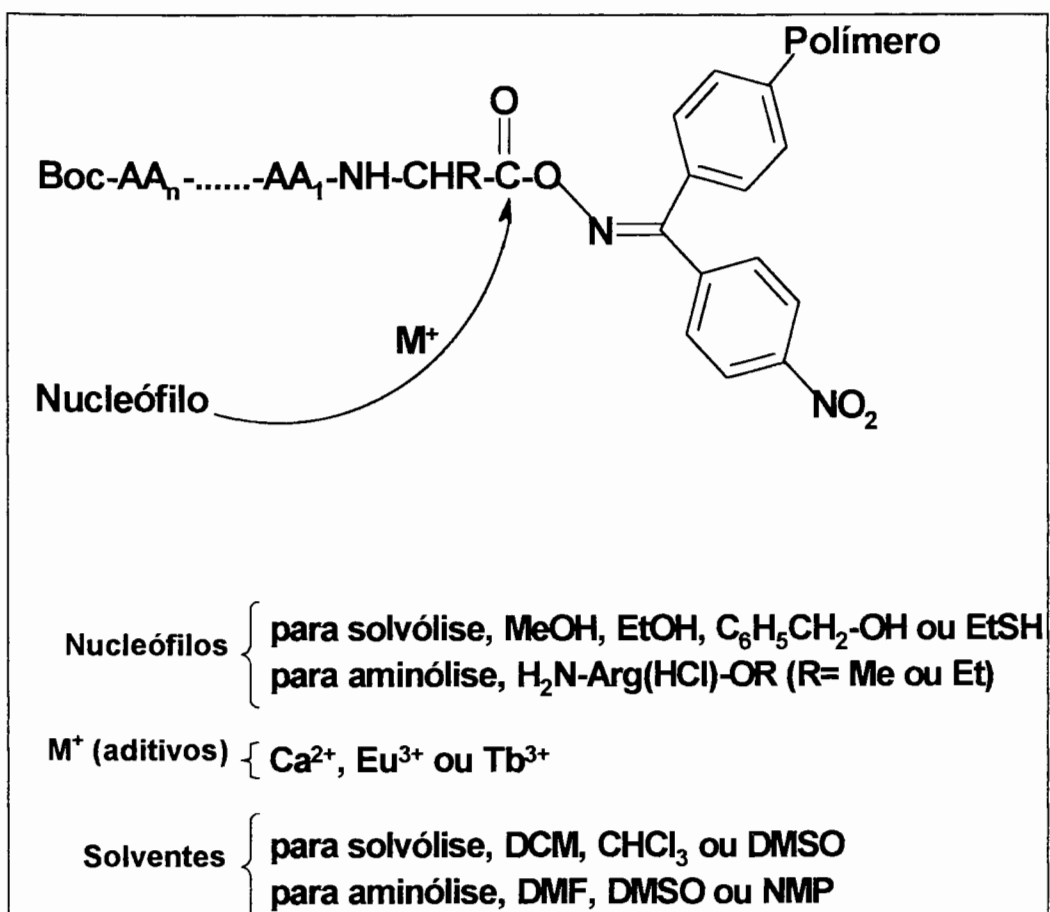
A tecnologia do DNA-recombinante também está sendo empregada na tentativa de se obter peptídeos da CCK. Plasmídeos recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* expressaram a prepro-CCK humana que resultou na secreção de vários intermediários da pro-CCK (Rourke *et al.*, 1997). A análise detalhada desta proteína mostrou que a mesma não apresentava duas modificações essenciais à atividade biológica da CCK: 1) C-terminal amidado; 2) sulfatação da tirosina. Além disso, foi demonstrado que a clivagem proteolítica da pro-CCK ocorre no C-terminal de três sítios com resíduos básicos, Arg¹⁰⁵-Arg¹⁰⁶, Arg⁹⁵ e Lys⁸¹. Estas posições de clivagem são responsáveis pela produção da CCKs bioativas nos vertebrados, produtos relacionados à CCK-8 (forma predominante no cérebro de mamíferos) e produtos relacionados à CCK-22 (forma predominante no

plasma humano e também de outros mamíferos), respectivamente. Estes autores sugerem que a protease Kex2, uma nova endopeptidase específica para lisina e presente no sistema de secreção desta levedura, é responsável pela clivagem da ligação Asp-Arg.

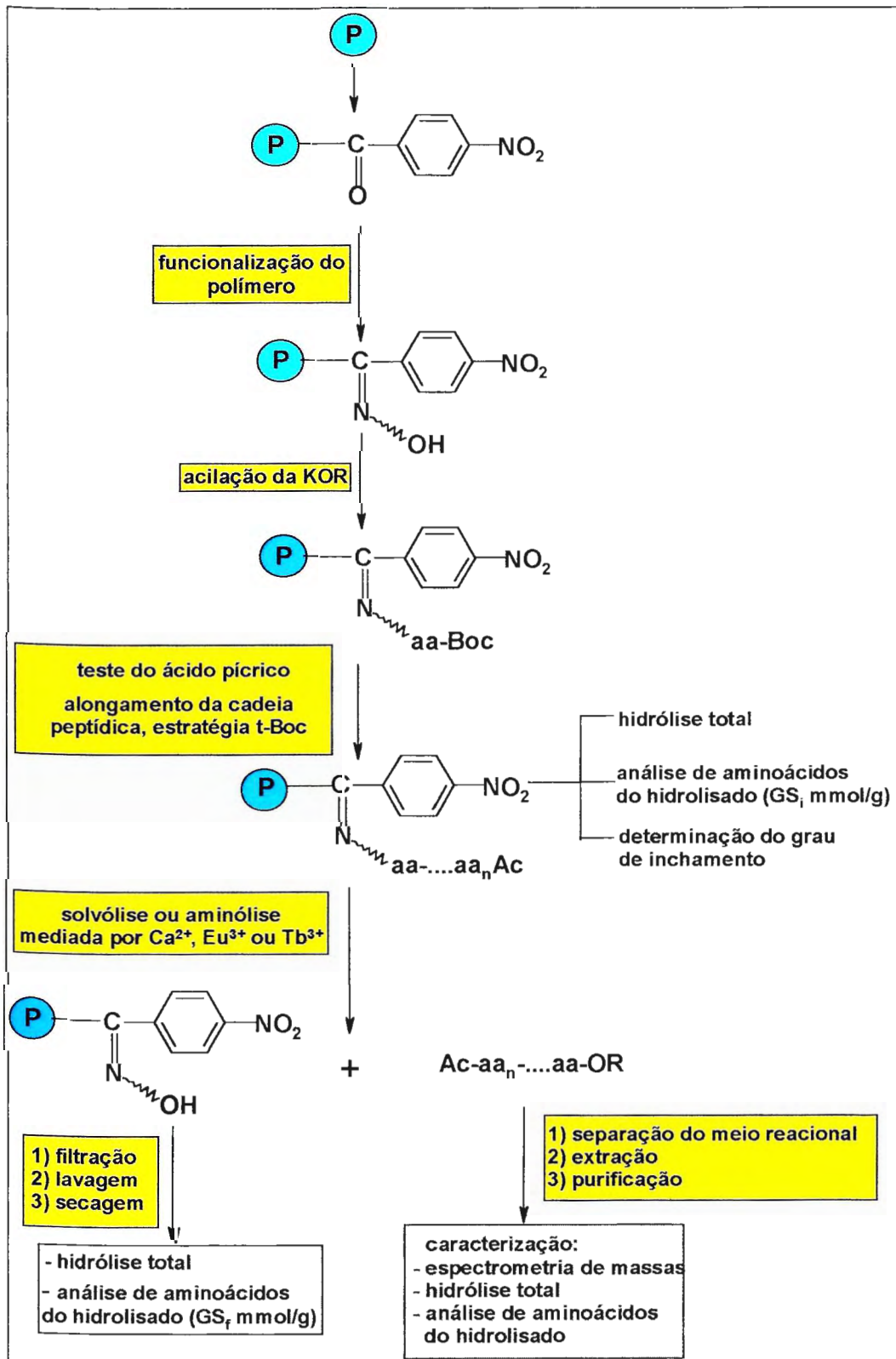
IV. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi explorar sistematicamente a possibilidade de combinar a suscetibilidade do éster de oxima de peptidil-KOR a ataques nucleofílicos com a capacidade do íon cálcio de assistir reações de transesterificação de ésteres de peptídeos em misturas de DCM e álcool. Tal combinação poderia se tornar um método alternativo, mais seletivo e bastante brando de se preparar peptídeos α -esterificados diretamente por solvólise ou aminólise de peptidil-KOR.

O **Esquema 10** resume as reações estudadas no desenvolvimento do projeto proposto. Já o **Esquema 11** resume a abordagem experimental empregada para estudá-las.



Esquema 10: Representação esquemática das reações estudadas.



Esquema 11: Metodologia utilizada no estudo da solvólise e aminólise de peptidil-KOR assistida por Ca²⁺, Eu³⁺ ou Tb³⁺. GS= grau de substituição (i= inicial e f= final); OR=éster.

V. Materiais e Métodos

1. Materiais

Os Boc-aminoácidos utilizados foram adquiridos da Bachem Califórnia. O suporte polimérico para a síntese da resina oxima de Kaiser era de procedência da Bio-Rad (Bio-Beads S-X1, 200-400 mesh). Os reagentes acopladores BOP, PyBOP, TBTU e HOBt eram de diversas procedências (Sigma, Bachem, Advanced Chemtech e Sigma, respectivamente).

A solução HCl:ácido propiônico 1:1(v/v) era da Sigma ou preparada a partir de HCl (12N) e ácido propiônico (99%) (ambos de grau analítico e adquiridos da Merck e Aldrich, respectivamente).

Os seguintes solventes e reagentes foram empregados sem purificação prévia: DCM, DMF, CHCl_3 , DMSO, MeOH, EtOH, BzIOH, BzISH, ACN, etanotiol, álcool isopropílico, anidrido acético, TEA, DIEA, $\text{Ca}(\text{OAc})_2$, ácido pícrico, HAc, TFA, 2-cloroacetamida, 4-metiltiofenol, 2-bromoacetofenona, éter di-(etilenoglicol)metílico e cloreto de 4-nitrobenzoíla. Estes foram adquiridos da Merck, Applied Biosystem, Sigma Chemical Company, Aldrich e Fluka. Todos os solventes eram de grau analítico e a acetonitrila de grau cromatográfico.

A resina oxima de *p*-nitrofenona foi sintetizada em nosso laboratório segundo o método descrito por DeGrado e Kaiser (1980). As condições experimentais empregadas estão descritas a seguir.

2. Métodos Analíticos e Cromatográficos

2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC)

Foram utilizados dois tipos de cromatógrafos. Um deles era composto por um controlador de bombas e gradientes Waters, um integrador Beckman 427, um detector Waters 486, duas bombas Waters 510 e um injetor Rheodyne 7125. O outro era da LDC Analytical composto por um detector

SpectroMonitor 3100, por duas bombas ConstaMetric 3200 e 3500, um injetor Rheodyne 7125 e um integrador DataJet.

As colunas utilizadas eram Vydac C₁₈ analítica (0,45 cm x 25,0 cm, 5 µm e 300 Å) e semi-preparativa (1,1 cm x 25,0 cm, 5 µm e 300 Å).

As condições experimentais empregadas estão descritas nos itens e figuras que se seguem.

2.2. Análise de aminoácidos

As hidrólises das peptidil-resinas foram efetuadas em HCl 12 N:ácido propiônico (1:1, v:v) a 130 °C por 24, 48 ou 72 horas e as dos peptídeos esterificados em presença de HCl 6 N e fenol a 110 °C por 24 horas. Em ambos os casos, as hidrólises foram realizadas em um "Pico-Tag Work Station" Waters, de acordo com o procedimento padrão descrito no manual do equipamento.

A composição de aminoácidos dos hidrolisados obtidos foi determinada em um analisador automático da Beckman, modelo 7300, acoplado a um computador. Foi empregado o método de derivatização pós-coluna com ninidrina (Mant & Hodges, 1991). Os cálculos foram feitos tomando-se como referência a concentração molar dos resíduos de aminoácidos contidos em uma mistura padrão (5 nmol de cada).

2.3. Medidas Espectrofotométricas

As medidas de absorvância foram realizadas nos seguintes espectrofotômetros: Varian, série 634; Beckman, modelo DU-70 e Hitachi, modelo U-2001.

Os espectros de infravermelho foram obtidos na faixa de 400-4000 cm⁻¹ em um espectrofotômetro FTIR MIDAC, modelo Prospect-IR, acoplado a um computador da HP 386/25.

2.4. Espectrometria de massas

O produto isolado e purificado da reação de solvólise da resina Ac-A-G-K-(2-Cl-Z)-KOR foi analisado no "The Salk Institute for Biological Studies,

Clayton Foundation Laboratories for Peptide Biology, Ca, EUA", por MALDI-TOF-MS, usando como matriz o ácido α -ciano 4-hidroxicinâmico. O espectrômetro de massa era um Bruker Reflex.

Os produtos isolados e purificados das reações de metanólise e etanolise das resina Ac-Ile-Ser (Bzl)-Asp(OX)-KOR (onde, X= cHex ou Bzl) e Ac-A-G-X-KOR (onde, X= Gly, Ala, Phe e Lys(2-Cl-Z)) e aminólise de Ac-Ile-00Ser-(Bzl)-Asp(OX)-KOR por Arg(HCl)OR (onde, R= Me ou Et) foram analisados no Niigata College of Pharmacy, pelo Dr. Kouki Kitagawa. A técnica empregada foi a EI-MS, sendo o espectrômetro um Hitachi M-2500.

Os produtos isolados e purificados das reações de metanólise e etanolise da resina Ac-Ile-Ser-(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR e Ac-Ile-Ser (Bzl)-Asp(OBzl)-Arg-(Mtr)-KOR foram analisados em nosso Instituto em um espectrômetro de massas de duplo quadrupolo Micromass, modelo Quattro II, utilizando a técnica de ES-MS.

2.5. Eletroforese Capilar

As tentativas de determinação da solubilidade dos sais de metais empregados por eletroforese capilar (CE) foram feitas em um equipamento 270 A-HT da Applied Biosystems. As dimensões do capilar de sílica fundida eram de 72 cm x 50 μ m (de diâmetro interno), sendo a distância do recipiente contendo a amostra até o detector de 50 cm. As amostras foram aplicadas pelo método hidrodinâmico, sendo que na extremidade posterior à amostra do capilar fez-se vácuo por período de 0,5 segundos. Os tampões utilizados foram: imidazol 5 mM e HIBA 5 mM. As detecções foram feitas no comprimento de onda de 210 nm.

2.6. Análise Elementar

As porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram determinadas em um microanalisador do tipo CHN, modelo 240 da Perkin-Elmer. Estas análises foram feitas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3. Métodos Preparativos

3.1. Procedimento geral para a síntese da resina oxima de Kaiser (KOR) e determinação do seu grau de funcionalização

Em um procedimento típico, 5,5 g de Biobeads SX-1 da Bio-Rad foram adicionados à mistura de 90 mL de DCM, 1,0 g (5,2 mmol) de cloreto de *p*-nitrobenzoila e 1,1 g (7,2 mmol) de AlCl₃ contida em um balão de fundo redondo de 100 mL. A mistura reacional foi agitada mecanicamente por 40 horas. A resina foi então lavada com dioxano/HCl 4 N (3:1, v:v, 100mL), dioxano/H₂O (3:1, v:v, 100 mL), DMF (100 mL), MeOH (50 mL), DCM (50 mL) e MeOH (50 mL).

A resina cetônica obtida foi suspensa em solução piridina/etanol (1:5 (v/v), 50 mL) e a esta suspensão foram adicionados 5,2 g (74,5 mmoles) de HCl.NH₂OH. A mistura reacional foi aquecida e mantida sob refluxo. Após 22 horas, a mistura foi filtrada ainda quente e a resina foi lavada com MeOH/H₂O (3:1, (v/v), 100 mL), DMF (50 mL), DCM (50 mL), MeOH (50 mL), DCM (50mL) e MeOH (50 mL). Foram feitas 4 sínteses, tendo sido as resinas de lotes diferentes denominadas de **RI** (5,0 g), **RII** (10,0 g), **RIII** (10,0 g) e **RIV** (70,0 g). As mesmas foram submetidas à análise elementar.

3.2. Introdução do primeiro aminoácido à KOR (aminoacilação da KOR)

Massa de 1,0 g de KOR foi suspensa em 10 mL de DCM. Foram acrescentados 1,5 mmol de Boc-aminoácido, 1,5 mL de solução 1 M de DIC em DCM e a mistura reacional foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 22 horas. A resina foi então lavada com DCM (4x) e seca sob vácuo. O grau de substituição da Boc-aminoacil-KOR foi determinado pelo teste do ácido pícrico como descrito a seguir.

Uma amostra de aproximadamente 5 mg de Boc-aminoacil-KOR foi transferida para um frasco de placa porosa. O grupamento Boc foi removido por tratamento com solução de 25% TFA em DCM (1 x 1min, 1 x 25 min). Procedeu-se, então, a lavagens da aminoacil-KOR com DCM (4x), solução de 10% TEA/DCM (3x 2 min) e DCM (6x). Em seguida, uma solução de

ácido pícrico 0,15 M em DCM foi adicionada à aminoacil-KOR e a suspensão resultante foi deixada em repouso por 5 minutos. Esta operação foi repetida por 5 vezes. Finalmente, a resina foi lavada com etanol e DCM alternadamente até que a solução de lavagem se tornasse totalmente incolor. O picrato foi então extraído com solução de 10% TEA/DCM e a aminoacil-resina lavada com DCM (a porcentagem final de DCM foi de 10-20%). Esta solução foi coletada e diluída para 100 mL com etanol. A concentração de picrato de trietilamônio foi determinada por leitura espectrofotométrica ($\epsilon_{358} = 14500$). Os resultados obtidos encontram-se descritos na **Tabela 7**.

Foram assim preparados os Boc-Gly-KOR (**R1a**; **R1a**), Boc-Ala-KOR (**R1b**; **R11b**; **R11e**), Boc-Phe-KOR (**R1c**; **R11c**), Boc-Lys(2-Cl-Z)-KOR (**R11d**; **R11f**; **R111e**), Boc-Asp(OcHex)-KOR (**R111a**; **R111c**; **R111d**; **R1Vb**) e Boc-Arg(Mtr)-KOR (**R1Va**).

3.3. Procedimento geral para a síntese das peptidil-KOR

Após a introdução do primeiro aminoácido na resina e determinação de seu grau de substituição pelo ácido pícrico, o grupo Boc foi removido com solução de TFA em DCM (60% em volume, 25 min). Procedeu-se então lavagens com DCM (2x), isopropanol (2x), DCM (2x), isopropanol (2x) e novamente DCM (3x). Os acoplamentos foram efetuados com 3 equivalentes de Boc-aminoácido, 3 equivalentes de TBTU e 5 equivalentes de DIEA em DMF por 90 min. Após os acoplamentos, foram efetuadas lavagens com DMF (2x), DCM (2x), isopropanol (2x), DCM (2x), isopropanol (2x) e DCM (3x). Completado o último acoplamento, o grupo Boc foi removido com solução de TFA em DCM (60% em volume, 25 min). Procedeu-se, então, a lavagens com DCM (2x), isopropanol (2x), DCM (2x), isopropanol (2x) e novamente DCM (3x). A seguir, a peptidil-resina foi tratada com anidrido acético (50% em DCM) e algumas gotas de piridina por 15 minutos para acetilação do grupamento α -amino do peptídeo. Todas as reações foram monitoradas pelo teste da nindrina (Kaiser *et al.*, 1970). A resina foi lavada com DCM e álcool isopropílico e seca à vácuo.

Desta forma, foram preparados as seguintes peptidil-resinas: Ac-Ala-Gly-Gly-KOR (**PR1a**; **PR1a**), Ac-Ala-Gly-Ala-KOR (**PR1b**; **PR1b**; **PR1e**), Ac-Ala-Gly-Phe-KOR (**PR1c**; **PR1c**); Ac-Ala-Gly-Lys(2-CIZ)-KOR (**PR1d**; **PR1f**; **PR1e**), Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (**PR11a**; **PR11c**; **PR11d**; **PR11b**), Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-KOR (**PR11b**); Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-KOR (**PR11a**).

Todas foram caracterizadas pela determinação de seu conteúdo de aminoácidos e grau de substituição inicial (GS_i), conforme descrito no item **3.8b**. Os resultados estão apresentados no item **4.1** que se segue.

3.4. Método geral de solvólise de peptidil-KOR

A peptidil-KOR foi suspensa na mistura solvente álcool ou tiol na ausência ou presença do sal de metal de interesse. A suspensão obtida foi mantida a 37 °C por tempos determinados sob agitação orbital de 300 rpm. O sobrenadante foi analisado por RP-HPLC periodicamente e a reação finalizada segundo os procedimentos descritos nos itens **3.6** e **3.7** desta seção.

3.5. Método geral de aminólise de peptidil-KOR

O éster de arginina foi previamente dissolvido em DMF e parcialmente neutralizado com DIEA. A peptidil-resina foi então adicionada a esta solução em ausência ou presença do sal do metal de interesse. A mistura foi mantida a 37 °C por tempos determinados sob agitação orbital de 300 rpm. O sobrenadante foi analisado periodicamente e a reação finalizada segundo os procedimentos descritos nos itens **3.6** e **3.7** desta seção.

3.6. Acompanhamento das reações de solvólise e aminólise por RP-HPLC

Alíquotas de 10 µL eram removidas do meio reacional, diluídas a 100 µL com 60% ACN/0,09%TFA/H₂O, 90% ACN/0,09%TFA/H₂O, 0,1% TFA/H₂O ou apenas ACN e analisadas em condições experimentais determinadas previamente.

3.7. Procedimento geral empregado para a separação da KOR ou peptidil-KOR residual

As reações foram interrompidas nos tempos de 6, 48 ou 72 horas e as peptidil-resinas foram lavadas alternadamente com os solventes utilizados na reação (quando o DMSO estava presente no meio reacional, o mesmo era substituído por MeOH para as lavagens das peptidil-resinas resultantes). Estas foram secas sob vácuo, hidrolisadas e analisadas em seus conteúdos de aminoácidos. Os filtrados foram evaporados em rota-evaporador e os resíduos resultantes dissolvidos em 30 mL de acetato de etila. As fases acetálicas foram lavadas com água (3 x 10 mL), secas com sulfato de sódio, filtradas e evaporadas. Os materiais brutos foram então dissolvidos nos solventes empregados para HPLC e liofilizados.

3.8. Método geral para a determinação dos rendimentos de reação

a) Quantificação dos produtos esterificados formados nos meios reacionais por RP-HPLC

Para cada um dos ésteres Ac-Ala-Gly-X-OMe [onde X= Gly, Ala, Phe ou Lys(2-Cl-Z)] purificados (graus de pureza descritos na **Tabela 1** abaixo) foi feita uma curva-padrão de sua quantidade (no. de mol) versus área do pico correspondente a ela detectado por RP-HPLC. Para tanto, os Ac-Ala-Gly-X-OMe [onde X= Gly, Ala ou Phe) foram dissolvidos em 0,1%TFA/H₂O e o Ac-Ala-Gly-Lys-(2-Cl-Z)-OMe em 60% ACN/0,09% TFA, de modo que a concentração final das soluções fosse de 1 mg/mL. Alíquotas de volumes variados foram injetadas em triplicata nas condições isocráticas descritas na **Tabela 11**.

De posse das curvas-padrão pudemos, portanto, quantificar os produtos presentes nos meios reacionais analisados.

Tabela 1: Condições de análise para confecção das curvas padrão:

<i>Padrões</i>	<i>% de pureza</i>	<i>Proporção</i>
Ac-A-G-G-OMe	89	95% de A: 5% de C
Ac-A-G-A-OMe	68	62% de A: 38% de C
Ac-A-G-F-OMe	85	75% de A: 25% de C
Ac-A-G-K(CIZ)-OMe	93	40% de A :60% de B

1) solvente A: 0,1% TFA/H₂O; 2) solvente B: 60% de ACN em 0,09%TFA/ H₂O; 3) solvente C: 25% ACN em 0,09% TFA/H₂O.

b) Quantificação da porcentagem de desligamento do peptídeo da KOR

As resinas ou peptidil-resinas residuais lavadas e secas foram submetidas à hidrólise total seguida de determinação do seu conteúdo de aminoácidos. Os valores obtidos possibilitaram o cálculo dos seus graus de substituições finais (mmol/g) por comparação dos valores de áreas dos aminoácidos de mistura padrão com as áreas obtidas dos hidrolisados:

$$A_{MP} \text{ _____ } 5 \text{ nmol}$$

$$A_{AA} \text{ _____ } X \text{ nmol}$$

$$X \text{ nmol} \text{ _____ } 50 \text{ mL}$$

$$Y \text{ nmol} \text{ _____ } 1000 \text{ mL}$$

$$GS_{AA} = \frac{Y \cdot 10^{-6} \text{ mmol}}{M \text{ g}}$$

M g

Onde:

A_{MP} = área média do padrão correspondente ao aminoácido.

A_{AA} = área correspondente ao aminoácido.

GS_{AA} = grau de substituição referente ao aminoácido.

M = massa de aminoácido utilizada para análise.

GS_{final} = média dos GS_{AA} presentes na peptidil-KOR

Os resultados obtidos foram subtraídos dos graus de substituições iniciais das peptidil-resinas (GS_i) para a obtenção das porcentagens de desligamento dos peptídeos do suporte polimérico. Nos casos em que os produtos formados nos meios reacionais eram únicos e os desejados, tais porcentagens de desligamento do peptídeo foram consideradas como

idênticas aos rendimentos de solvólise ou aminólise. Por outro lado, quando mais de um produto era formado nos meios reacionais, esta igualdade não existia. Nestes casos, a interpretação das porcentagens de desligamento do peptídeo era feita com muita cautela.

3.9. Investigação da viabilidade de metanólise de Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde, X= Gly (PR1a), Ala (PR1b) ou Phe (PR1c)] na presença de HAc, Ca(OAc)₂ ou mistura de ambos.

a) Em escala analítica

Massas de 100 mg de Ac-Ala-Gly-X-KOR (onde, X= Gly, Ala ou Phe) foram suspensas em 2,0 mL de DCM e 0,5 mL de MeOH. Às suspensões resultantes foram adicionados 100 µL (170 µmol) de ácido acético glacial, 10 mg (63 µmol) de Ca(OAc)₂ ou ainda mistura de ambos. As reações se processaram por 75 ou 96 h a 37 °C. As reações foram monitoradas e finalizadas segundo os procedimentos descritos nos itens 3.6 e 3.7 desta seção.

b) Em escala preparativa

Ac-Ala-Gly-X-KOR (onde, X= Gly, Ala ou Phe) foi suspenso em DCM e MeOH e à suspensão foi adicionado Ca(OAc)₂. As condições experimentais encontram-se descritas na Tabela 2. As reações se processaram por 96h, foram monitoradas e finalizadas segundo os procedimentos descritos no item 3.6 e 3.7 desta seção.

Tabela 2: Condições experimentais empregadas nas metanólises de Ac-Ala-Gly-X-KOR (onde X= Gly, Ala ou Phe).

X (lote; GS _i)	Peptidil-KOR mg (µmol)	MeOH (mL)	DCM (mL)	Ca(OAc) ₂ mg (µmol)
Gly (PR1a; 0,46)	348,7 (160)	1,7	7	35,1 (222)
Ala (PR1b; 0,52)	186,5 (97)	0,9	3,7	18,9 (119)
Phe (PR1c; 0,38)	307,1 (117)	1,5	7,0	31,1 (197)

Condições de Monitoramento: coluna: Vydac C₁₈, 5 µm, 8 x 100 mm; fluxo: 1,0 mL/min; solvente A: 0,1%TFA/H₂O; solvente B: 60% ACN% em TFA/0,09%; gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min.; λ: 210 nm.

3.10. Metanólise de Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde, X= Gly (PRIIa), Ala (PRIIb), Phe (PRIIc) ou Lys(2-Cl-Z) (PRIID)] em presença de Ca(OAc)₂

Estas reações foram refeitas seguindo o procedimento geral descrito no item 3.4. As peptidil-resinas Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde, X= Gly, Ala, Phe ou Lys(2-Cl-Z)] foram suspensas em 2,0 mL DCM e 0,5mL MeOH e então 10 mg (63 μ mol) de Ca(OAc)₂ foram adicionados. As reações se processaram por 72 horas a 37 °C, tendo sido monitoradas e finalizadas segundo descrito nos itens 3.6. e 3.7. desta seção.

3.11. Metanólise comparativa de Ac-Ala-Gly-X-KOR [(onde X= Gly (PRIIa), Ala (PRIIb), Phe (PRIIc) ou Lys(2-Cl-Z) (PRIID)] em presença de Ca(OAc)₂

Massas destas peptidil-resinas correspondentes a 35 μ mol de peptídeo foram suspensas em 2,0 mL de DCM, 0,5 mL de MeOH e 10 mg de Ca(OAc)₂ (63 μ mol). As suspensões foram mantidas a 37 °C sob agitação orbital a 300 rpm. O monitoramento da reação e sua finalização foram feitos de acordo com os procedimentos descritos nos item 3.6. e 3.7. desta seção.

3.12. Etanólise de Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde, X=Lys(2-Cl-Z) (PRIIIf) ou Ala (PRIIe)] em presença de Ca(OAc)₂**a) Investigação preliminar**

100 mg de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR (43 μ mol) ou de Ac-Ala-Gly-Ala-KOR (54 μ mol) foram suspensas em 2,0 mL de DCM, 0,5 mL de EtOH e 10 mg (63 μ mol) de Ca(OAc)₂. As suspensões foram mantidas a 37 °C sob agitação orbital a 300 rpm. Alíquotas de 10 μ L eram removidas do meio reacional, diluídas a 100 μ L ACN e analisadas por RP-HPLC. Após 72 horas de reação, as peptidil-resinas foram filtradas, lavadas com DCM e etanol exaustiva e alternadamente. As peptidil-resinas residuais e os sobrenadantes foram tratados de acordo com o procedimento descrito no item 3.6 desta seção.

b) Etanólise comparativa de Ac-Ala-Gly-X-KOR [(onde, X= Lys(2-Cl-Z) (PRIIId) e Ala (PR IIb)] na presença de Ca(OAc)₂.

Massas de peptidil-resinas correspondentes a 35 µmol de peptídeos foram suspensas em 2,0 mL de DCM, 0,5 mL de EtOH e 10 mg (63 µmol) de Ca(OAc)₂. As suspensões foram mantidas a 37 °C sob agitação orbital a 300 rpm. O monitoramento das reações e suas finalizações nos tempos de 6, 48 e 72 horas foram feitas de acordo com os procedimentos descritos nos itens 3.6 e 3.7. desta seção.

c) Etanólise de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR (PRIIIf) mediada por Ca²⁺ em diferentes solventes.

A peptidil-resina (25 mg; 9,5 µmol de peptídeo) foi suspensa em mistura de DCM, DMSO ou 25% DMSO/tolueno (500 µL) e EtOH (125 µL). Ca(OAc)₂ (2,5 mg, 15,8 µmol) foi então adicionado. A suspensão foi mantida a 37±1 °C sob agitação orbital a 300 rpm. O monitoramento da reação e sua finalização nos tempos de 36 ou 72 horas foram feitos de acordo com os procedimentos descritos nos itens 3.6 e 3.7. desta seção.

3.13 Investigação da viabilidade de tiólise de Ac-Ala-Gly-X-KOR [(onde X= Lys(2-Cl-Z) (PRIIId) e Ala (PRIIb)].

100 mg de cada uma das peptidil-resinas (38 ou 53 µmol de peptídeo) foram suspensas em DCM (2,0 mL), EtSH (0,5 mL) e Ca(OAc)₂ (10 mg, 63 µmol). As suspensões foram mantidas a 37 °C sob agitação orbital a 300 rpm. As reações foram monitoradas e finalizadas conforme descrito nos itens 3.6 e 3.7. desta seção.

3.14. Investigação da viabilidade de benzólise de Ac-Ala-Gly-X-oxima [(onde X= Lys(2-Cl-Z) (PRIIId) e Ala (PR IIb)]

100 mg de cada um das peptidil-resinas (38 ou 53 µmol de peptídeo) foram suspensas em 2,0 mL de DCM, 0,5 mL de álcool benzílico contendo 10 mg de Ca(OAc)₂ (63 µmol). As suspensões foram mantidas a 37 °C sob

agitação orbital a 300 rpm. As reações foram monitoradas e finalizadas segundo descrito nos itens 3.6. e 3.7. desta seção.

3.15. Metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OX)-KOR [(onde, X=cHex (PRIIIa) ou Bzl (PRIIIb)] na presença e ausência de Ca(OAc)₂

a) Investigação Preliminar

100 mg da peptidil-resina (29 ou 27 μmol de peptídeo) foram suspensas em 2,0 mL de DCM, 0,5 mL de MeOH e 10 mg (63 μmol) de Ca(OAc)₂. As suspensões foram mantidas a 37 °C sob agitação orbital a 300 rpm. As reações foram monitoradas e finalizadas após 72 horas segundo descrito nos itens 3.6. e 3.7. desta seção.

b) Cinéticas de metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(cHex)-KOR (PRIIIa) na presença de Ca(OAc)₂

À 109,4 mg de peptidil-KOR (35 μmol de peptídeo) foram adicionados 2,0 mL de DCM, 0,5 mL de MeOH e 10,0 mg (63 μmol) de Ca(OAc)₂. As misturas reacionais foram mantidas a 37 °C, sob agitação orbital a 300 rpm. O monitoramento da reação e finalização nos tempos de 6, 48 e 72 horas foram realizados segundo os procedimentos descritos nos itens 3.6. e 3.7. desta seção.

c) Metanólise comparativa de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRIIIc) na ausência e presença de Ca(OAc)₂ em diversos solventes

A peptidil-resina (58,3 mg, 17,5 μmol de peptídeo) foi suspensa em 1 mL de solvente (DCM, CHCl₃ ou DMSO), 0,25 mL de MeOH na presença ou ausência de Ca(OAc)₂ (5 mg, 31,6 μmol). As misturas reacionais foram mantidas a 37 °C sob agitação orbital a 300 rpm. O monitoramento e finalização das reações nos tempos de 6, 48 e 72 horas foram realizados segundo descrito nos itens 3.6. e 3.7. desta seção.

d) Efeito da concentração de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ na metanólise de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)- (PRIIIe) e Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRIIId).

- Quantidade de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ equimolar à de peptídeo:

Massas de peptidil-resinas correspondentes a 35 μmol de peptídeos foram adicionados 2,0 mL de DCM, 0,5 mL de MeOH e 35 μmol de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (5,5 mg, μmol). A mistura foi mantida a 37 °C sob agitação orbital a 300 rpm. O monitoramento e finalização das reações após 72 horas foram realizados de acordo com os procedimentos descritos nos itens 3.6. e 3.7. desta seção.

- Quantidade de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ inferior à de peptídeo:

116,7 mg de peptidil-resina (35 μmol de peptídeo) foi suspensa DCM/MeOH (2,0 mL: 0,5 mL, v/v) na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (1,2 mg, 8 mmol). A suspensão foi mantida a 37 °C sob agitação orbital a 300 rpm. O monitoramento e finalização da reação após 72 horas foram realizados de acordo com os procedimentos descritos nos itens 3.6. e 3.7. desta seção.

3.16. Solvólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(Bzl)-Arg(Mtr)-KOR (PRIVa) mediada por Ca^{2+}

a) Metanólise

Massa de 50 mg desta peptidil-KOR (17,5 μmol de peptídeo) foi suspensa em 1 mL de DCM. À suspensão foram acrescentados 2 equivalentes de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (5,5 mg; 35 μmol) e 0,25 mL de metanol. As suspensões foram agitadas orbitalmente a 300 rpm e 37 °C. O monitoramento da reação nos tempos 0, 5, 20, 30 48 e 96 horas e a sua finalização após 96 horas foram realizados segundo descrito nos itens 3.6. e 3.7. desta seção.

b) Etanólise

Massa de 50 mg da peptidil-KOR (17,5 μmol de peptídeo) foi suspensa em 1mL de DCM. À suspensão foram acrescentados 2

equivalentes de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (5,5 mg; 35 μmol) e 0,25 mL de etanol. A mistura reacional foi mantida sob agitação orbital a 300 rpm e 37 °C. O monitoramento da reação nos tempos de 0, 8, 20, 24, 42 e 54 horas e a sua finalização após 54 horas foram realizados conforme os procedimentos descritos nos itens **3.6.** e **3.7.** desta seção.

c) Benzólise

Massa de 50 mg da peptidil-KOR (35 μmol de peptídeo) foi suspensa em 1 mL de DCM. À suspensão foram acrescentados 2 equivalentes de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (5,5 mg; 35 μmol) e 0,25 mL de álcool benzílico. A mistura reacional foi mantida sob agitação orbital a 300 rpm e 37 °C. O monitoramento da reação nos tempos de 0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas e sua finalização após 72 horas de reação foram realizados segundo descrito nos itens **3.6.** e **3.7.** desta seção.

3.17. Metanólise de peptidil-KOR na presença de EuCl_3 .

a) Investigação da viabilidade de metanólise de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR (PRIIIe)

81,4 mg de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR (35 μmol de peptídeo) foram suspensos em 2,0 mL de DCM e 0,5 mL de MeOH contendo 17,1 mg (63 μmol) de EuCl_3 . A suspensão foi mantida a 37 °C sob agitação orbital a 300 rpm. O monitoramento da reação nos tempos de 6, 48 e 72 horas e sua finalização após 72 horas foi realizada segundo o procedimento descrito nos itens **3.6.** e **3.7.** desta seção.

b) Cinética da metanólise de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR (PRIIIe)

81,4 mg de peptidil-resina (35 μmol de peptídeo) foram suspensas em 2,0 mL de DCM e 0,5 mL de MeOH contendo 9,0 mg (35 μmol) de EuCl_3 . A mistura foi mantida a 37 °C sob agitação orbital a 300 rpm. O monitoramento da reação nos tempos de 0, 6, 24, 48 e 72 horas e a finalização após 6, 48 e

72 horas foram realizados de acordo com os procedimentos descritos nos itens **3.6.** e **3.7.** desta seção.

c) Investigação da viabilidade de metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp-(OBzl)-oxima (PRIIIb)

129,6 mg de peptidil-resina (35 μmol de peptídeo) foram suspensas em 2,0 mL de DCM e 0,5 mL de MeOH contendo 17,1 mg (66 μmol) de EuCl_3 . A suspensão foi mantida a 37 °C sob agitação orbital a 300 rpm. O monitoramento da reação nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas e a sua finalização após 72 horas foram realizados de acordo com os procedimentos descritos nos itens **3.6.** e **3.7.** desta seção.

d) Metanólise comparativa de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp-(OcHex)-KOR (PRIIIc) na presença e ausência de EuCl_3

109,4 mg de peptidil-KOR (35 μmol de peptídeo) foram suspensas em 2,0 mL de DCM e 0,5 mL de MeOH contendo 35 ou 63 μmol de EuCl_3 . As misturas reacionais foram mantidas a 37 °C sob agitação orbital a 300 rpm. O monitoramento e finalização das reações foram realizados de acordo com os procedimentos descritos nos itens **3.6.** e **3.7.** desta seção.

3.18. Metanólise de Ac-Ala-Gly-Ala-KOR (PRIIe) na presença de EuCl_3

À peptidil-resina (26 ou 34 μmol) foram adicionados DCM, MeOH e EuCl_3 nas proporções descritas na **Tabela 3** a seguir. A mistura foi então mantida a 37 °C sob agitação orbital a 300 rpm. O monitoramento nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas de reação e a sua finalização após 72 horas foram realizados de acordo com os procedimentos descritos nos itens **3.6.** e **3.7.** desta seção.

As reações 1 e 2 foram também acompanhadas por espectroscopia de luminescência. Para tanto, alíquotas foram retiradas do meio reacional com uma pipeta Pasteur e transferidas diretamente para um tubo de quartzo (do tipo daqueles utilizados para análise por RMN) afim de registrar os espectros de emissão e excitação à temperatura ambiente do íon Eu^{3+} em

um espectrofluorímetro SPEX-Fluorolog 212, totalmente controlado por um sistema de interface do tipo DM 300F. Para o registro, esperou-se a peptidil-resina decantar e a solução reacional se tornar visivelmente livre de partículas. Como controles analisamos a luminescência do EuCl_3 em MeOH/DCM [4:1 (v/v)] na ausência da peptidil-resina; 2) imediatamente após a sua adição.

Tabela 3: Condições experimentais empregadas para as reações de metanólise de peptidil-resina Ac-Ala-Gly-Ala-KOR (PRIIb)

Reação	mg (n° mol)	EuCl_3 (μmol)	MEOH (mL)	DCM (mL)
1	49,6 (26 μmol)	19,7	0,25	1
2	49,0 (26 μmol)	17,5	0,25	1
3	65,7 (34 μmol)	17,5	0,5	2

Condições de Monitoramento: *coluna:* Vydac C_{18} , 5 μm , 300 Å (0,46 cm x 25,0 cm); *fluxo:* 1,0 mL/min; *solvente A:* 0,1% TFA/H₂O; *solvente B:* 60% ACN% em 0,09% TFA/ H₂O; *gradiente linear:* 5 a 95% de B em 30 min; λ : 210 nm.

3.19. Metanólise e etanólise de Ac-Ile-Ser(OBzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRIVb) em presença de Ca^{2+} , Eu^{3+} ou Tb^{3+} em DCM ou DMSO

a) Metanólise

Massa de 30 mg de Ac-Ile-Ser(OBzl)-Asp(OcHex)-KOR (8,7 μmol de peptídeo) foi suspensa em 0,6 mL de DCM ou DMSO. Foram acrescentados 1,8 equivalentes de $\text{Ca}(\text{Ac})_2$, EuCl_3 ou TbCl_3 e 0,15 mL de metanol. As suspensões resultantes foram mantidas sob agitação orbital a 300 rpm e 37 °C. O monitoramento e finalização das reações foram realizados de acordo com os procedimentos descritos nos itens 3.6. e 3.7. desta seção.

b) Etanólise

A etanólise foi realizada conforme descrito acima na presença de 0,15 mL de etanol. As suspensões resultantes foram mantidas sob agitação orbital a 300 rpm e 37 °C. O monitoramento e finalização das reações foram realizados de acordo com os procedimentos descritos nos itens 3.6. e 3.7. desta seção.

3.20. Aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR por ésteres de arginina em presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$

a) Investigação preliminar

Arg-OMe.2HCl ou Arg-OEt.2HCl foi previamente dissolvido em DMF e parcialmente neutralizado com DIEA. Em seguida, foram adicionados à solução as peptidil-KOR (PRIIIa) nas proporções descritas na **Tabela 4** abaixo. As misturas foram incubadas e as reações monitoradas e finalizadas segundo os procedimentos descritos nos **itens 3.6.** e **3.7.** desta seção.

Tabela 4. Condições experimentais empregadas para as reações de aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRIIIa).

Peptidil-KOR (mg/ μmol)	Nucleófilo (μmol)	$\text{Ca}(\text{OAc})_2$ mg (μmol)
50,3 / 14,5	ArgOMe.HCl (16)	-
50,4 / 14,6	(16)	5 (32)
100,1 / 29,0	ArgOEt.HCl (34)	-
100,6 / 29,2	(34)	10 (63)

Condições de Monitoramento: *solvente:* 2 mL de DCM; *coluna:* Novapack C₁₈, 5 μm , 8 x 100 mm; *fluxo:* 1,0 mL/min; *solvente A:* 0,1% TFA/H₂O; *solvente B:* 90% ACN% em 0,09% TFA/ H₂O; *gradiente linear:* 5 a 95% de B em 30 min.; λ : 210 nm.

b) Aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRIII d) em escala preparativa

Arg-OR.2HCl (onde, R= Me ou Et; 360 μmol) foi dissolvido em DMF (6 mL) e parcialmente neutralizado com DIEA (62,7 mL; 360 μmol). À solução foram acrescentados $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (25,7 mg; 162,5 μmol) e a peptidil-KOR (300 mg, 90 μmol). A suspensão foi incubada e a reação monitorada e finalizada após 72 horas de acordo com os procedimentos descritos nos **itens 3.6.** e **3.7.** desta seção.

c) Aminólise comparativa de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRIII d) por Arg(HCl)OEt na presença de HAc ou $\text{Ca}(\text{OAc})_2$

O nucleófilo Arg-OEt.2HCl foi previamente dissolvido em DMF e parcialmente neutralizado com DIEA. Posteriormente, $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ ou ácido

acético e a peptidil-KOR foram acrescentados (**Tabela 5**). A mistura foi mantida a 37 °C sob agitação orbital a 300 rpm. Aliquotas de 10 µL foram removidas do meio reacional, diluídas com 90 µL de uma solução de 90% ACN/0,09% TFA de H₂O e analisadas por RP-HPLC nos tempos de 0, 1, 3 e 5 horas. Após 5 horas de reação, as peptidil-resinas foram lavadas alternadamente com DCM, MeOH ou EtOH e H₂O, secos sob vácuo e guardados para posterior análise de seus conteúdos de aminoácidos. Os filtrados foram concentrados em rota-evaporador e liofilizados.

Tabela 5: Condições experimentais empregadas na aminólise comparativa de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (**PRIIId**).

Reação	Peptídeo (µmol)	Arg(2.HCl)OEt (µmol)	Aditivo	(µmol)	DIEA (µmol)	DMF (µL)
1	8,7	35	Ca(OAc) ₂	15,6	35,0	583
2	17,5	64,8	HAc	34,6	64,8	432
3	17,5	21,9	HAc	24,9	22,4	460

Condição de Monitoramento: *coluna:* Vydac C₁₈, 5 µm, 300 Å (0,46 cm x 25,0 cm); *solvente A:* 0,1% TFA/H₂O; *solvente B:* 90% ACN em 0,09%TFA/H₂O; *fluxo:* 1 mL/min; *gradiente linear:* 5 a 95%B em 30 min; *λ:* 210 nm.

d) Aminólise de Ac-Ile-Ser(OBzl)-Asp(cHex)-KOR (PRIIId) por Arg(HCl)-OMe na presença de EuCl₃ ou TbCl₃ em diferentes solventes

Massa de 30 mg de peptidil-KOR (8,7µmol de peptídeo) foi suspensa em 0,6 mL de solvente (NMP, DMF, DMSO ou 50% DMSO/Tolueno) contendo 4 equivalentes Arg-OMe.2HCl (parcialmente neutralizado com 0,6 µL de DIEA) e 1,8 equivalentes de Ca(OAc)₂, EuCl₃ ou TbCl₃. A incubação, o monitoramento nos tempos 0, 6, 16 e 40 horas e a finalização das reações após 40 horas ou 16 horas, quanto NMP era o solvente empregado, foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos nos itens **3.5.**, **3.6.** e **3.7.** desta seção.

3.21. Purificação dos ésteres de peptídeos obtidos nas reações de solvólise e aminólise de peptidil-KOR

Os ésteres de peptídeos obtidos nas reações acima descritas foram purificados por RP-HPLC em coluna analítica ou semi-preparativa usando as condições descritas abaixo:

Tabela 6: Purificações dos produtos obtidos das solvólises e aminólises das peptidil-KORs estudadas.

<i>Éster de Peptídeo</i>	<i>Gradiente linear</i>
Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-OMe	5 a 95%B em 30 min
Ac-Ala-Gly-Gly-OMe	5 a 95%B em 30 min
Ac-Ala-Gly-Ala-OMe	5 a 95%B em 30 min
Ac-Ala-Gly-Phe-OMe	28 a 58%B em 30 min
Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-OEt	62 a 92%B em 30 min
Ac-Ala-Gly-Ala-OEt	5 a 95%B em 30 min
Ac-Ile-Ser-(Bzl)-Asp(OcHex)-OMe	44 a 84%C em 40 min
Ac-Ile-Ser-(Bzl)-Asp(OcHex)-OEt	41 a 81%C em 40 min
Ac-Ile-Ser-(Bzl)-Asp(OBzl)-OMe	44 a 84%C em 40 min
Ac-Ile-Ser-(Bzl)-Asp(OcHex)-Arg(HCl)-OMe	20 a 80%C em 60 min
Ac-Ile-Ser-(Bzl)-Asp(OcHex)-Arg(HCl)-OEt	40 a 70%C em 30 min
Ac-Ile-Ser-(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-OMe	65 a 95%C em 15 min
Ac-Ile-Ser-(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-OEt	65 a 95%C em 15 min
Ac-Ile-Ser-(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-OBzl	65 a 95%C em 15 min

As purificações foram realizadas em escala analítica ou semi-preparativa (1-5 mg).

Condição de Monitoramento: *coluna:* Vydac C₁₈, 5 µm, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; *solvente A:* 0,1% TFA/H₂O; *solvente B:* 60% ACN em 0,09%TFA/H₂O; *solvente C:* 90%ACN em 0,09%TFA/H₂O; *fluxo:* 1 mL/min; *λ:* 210 nm.

3.22. Desproteção total das cadeias laterais dos aminoácidos contidos nos peptídeos α-esterificados obtidos

a) Desproteção de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-OMe

21,14 mg de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-OMe foram expostos a 8 mL de HF e 0,5 mL de anisol por um tempo de 1h:30 min a 0°C. O HF foi eliminado, o Ac-Ala-Gly-Lys-OMe precipitado e lavado com éter diisopropílico (3x). Em seguida, este foi solubilizado em uma mistura de 0,1% de TFA/H₂O e 60% de ACN em 0,09% TFA/H₂O. A solução resultante foi liofilizada e o peptídeo bruto analisado por RP-HPLC.

b) Desproteção de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-Arg(HCl)-OR (onde R= Me ou Et).

O éster de peptídeo protegido [24,7 mg (34 μ mol) quando R= Me e 40 mg (55 μ mol) quando R= Et] foi exposto a 2-3 mL de HF e 0,1 mL de anisol. A mistura reacional permaneceu sob agitação em um banho de gelo por 1,5 horas. O HF foi eliminado, o éster do peptídeo bruto precipitado, lavado com éter diisopropílico e finalmente solubilizado em 0,1% TFA/H₂O e 90% ACN em 0,09% TFA/H₂O. O material foi liofilizado e analisado por RP-HPLC.

3.23. Determinação do grau de inchamento/solvatação da KOR e de peptidil-KOR em diferentes solventes ou mistura.

a) Através da variação do volume

As medidas foram realizadas em triplicata em um frasco graduado e jaquetado mantido a 37 °C. Para tal, 300 mg de KOR (**PRIII**) ou de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (**PRIIId**) foram pré-lavadas com isopropanol e em seguida suspensas em DCM, CHCl₃, DMSO ou mistura destes últimos com MeOH. A variação dos volumes era registrada após 3 minutos de contato do material em estudo com cada um dos solventes ou mistura de interesse (Ludwick *et al.*, 1986; Varanda & Miranda, 1997). Os resultados obtidos encontram-se descritos na **Tabela 29**.

b) Através de medidas do diâmetro dos grãos

Os diâmetros dos grãos de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (**PRIIId**) e Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR (**PRIIle**) secos e embebidos nos diferentes solventes ou misturas de interesse foram medidos em um microscópio Olympus SZ-CL50 equipado com uma câmera Olympus OEU 142 e empregando o programa Image-Plus (The Proven Solution Version 3.0.01.00). O parâmetro de inchamento utilizado foi o volume de solvente por grão convertido em porcentagem (%) que representa a parcela do volume do grão solvatado total ocupado pelo solvente. Calcula-se este parâmetro pela

razão entre o volume do solvente absorvido (obtido subtraindo-se o volume do grão seco do volume do grão solvatado) pelo volume total solvatado do grão, multiplicado por cem (Cilli, 1997). Os resultados obtidos encontram-se descritos na **Tabela 30**.

3.24. Esterificação de Boc-L-Arg(Mtr)-OH

a) Boc-L-Arg(Mtr)-OPac (Papadimitriov *et al.*, 1967):

Uma solução de Boc-L-Arg(Mtr)-OH (0,5 mmol; 243 mg) e trietilamina (0,07 mL) em etanol (0,75 mL) foi esfriada a 0 °C. À ela foi adicionado brometo de fenacila (0,5 mmol: 99,5 mg). A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada de sílica-gel (mistura eluente: CHCl₃:MeOH:HAc; 85:10:5, v/v/v). Após 27 h, a mistura reacional foi concentrada sob pressão reduzida e solubilizada em 30 mL DCM. A fase orgânica foi lavada com 3 x 10 mL de uma solução de ácido cítrico 10%/H₂O, 3 x 10 mL de H₂O, 3 x 10 mL de uma solução NaHCO₃ 10%/H₂O e seca com Na₂SO₄. Após eliminação do solvente sob pressão reduzida, o material bruto obtido foi liofilizado. A massa encontrada foi de 110,8 mg (37%). O éster foi purificado através de coluna cromatográfica de sílica-gel 60F usando-se como mistura eluente CHCl₃/MeOH com gradiente de polaridade. Foram obtidas 76 mg (25%) do éster desejado. Fórmula molecular: C₂₉H₄₀N₄O₈S, [EI-MS; M+Na⁺]⁺ obtido (calculado): 627 (627,7). Análise elementar para C, H e N obtida (esperada): 57,23% (57,55) de C; 6,25% (6,61) de H; 9,15% (9,26) de N.

b) Boc-L-Arg(Mtr)-OMTP (Coste & Campagne, 1995):

Uma solução de Boc-L-Arg(Mtr)-OH (0,5 mmol; 243mg), 4-metil-tiofenol (0,55 mmol, 77 mg) e PyBOP (0,5 mmol, 260 mg) em 2 mL de DCM/DMF (7:3) foi colocada em banho de gelo seco em etanol e a ela foi adicionada DIPEA (1 mmol, 0,13 mL) e após 30 min a mistura reacional foi aquecida à temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (mistura eluente: CHCl₃:MeOH:HAc; 85:1,7:3, v/v/v). Após 3h, a mistura reacional foi evaporada sob pressão

reduzida e o resíduo obtido solubilizado em 30 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com uma solução de ácido cítrico 10%/H₂O (3 x 10 mL), H₂O (3 x 10 mL) e uma solução de 10% NaHCO₃ em H₂O (3 x 10 mL) e seca com Na₂SO₄. Após eliminação do solvente sob pressão reduzida, o material bruto foi liofilizado. A massa obtida foi de 24,5 mg (80%). O material foi reservado para posterior purificação. Fórmula molecular: C₂₈H₄₀N₄O₇S₂, [EI-MS; M+Na]⁺, obtido (calculado): 631 (631,8).

c) Boc-L-Arg(Mtr)-MEE (Coste & Campagne, 1995):

Uma solução de Boc-L-Arg(Mtr)OH (0,5 mmol; 243 mg), HOC₂H₄OC₂H₄OH (0,55 mmol, mL) e PyBOP (0,5 mmol, 260 mg) em 2 mL de DMF foi colocada em um banho de gelo seco em etanol e à ela foi adicionada DIPEA (1 mmol, 0,13 mL) e após 30 min a mistura reacional foi aquecida à temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (mistura eluente: CHCl₃:MeOH:HAc; 85:1,7:3, v/v/v). Após 7 h, a mistura reacional teve o seu solvente evaporado e o resíduo obtido foi solubilizado em 30 mL acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com solução de ácido cítrico 10% em H₂O (3 x 10 mL), H₂O (3 x 10 mL), solução de NaHCO₃ 10% em H₂O (3 x 10 mL) e seca com Na₂SO₄. Após filtração, o solvente foi eliminado sob pressão reduzida. O material bruto obtido foi lavado três vezes com éter etílico e novamente evaporado para precipitação do produto. O material obtido foi reservado para posterior purificação.

Fórmula molecular: C₂₆H₄₄N₄O₉S, [EI-MS; M+Na]⁺ obtido (calculado): 611,7 (611,0).

d) Remoção do grupo t-Boc do Boc-Arg(Mtr)-OPac (Fujino *et al.*, 1981)

30 mg (49,6 μmol) de Boc-Arg(Mtr)-OPac foram adicionadas à mistura TFA/tioanisol (4,3 mL; 9:1, v/v). Após 2 horas de reação, a mistura reacional teve o seu solvente evaporado sob pressão reduzida e foi lavada com éter etílico (3x) e novamente evaporada (houve precipitação de um sólido branco). O material bruto foi transferido para funil de placa porosa e então

lavado com éter diisopropílico gelado (4x), sendo a seguir solubilizado com 0,1% TFA/H₂O e 90% ACN em 0,09%TFA/H₂O. A massa obtida do produto foi de 12 mg (82 % de rendimento). Fórmula molecular: C₂₉H₄₀N₄O₈S, [EI-MS; M+Na]⁺ obtido (calculado): 293 (293,3).

4. Análise estrutural

4.1. Espectroscopia de luminescência no estudo da metanólise de Ac-Ala-Gly-Ala-KOR (PRIIb) na ausência e presença de Eu³⁺

Os espectros de emissão e excitação da peptidil Ac-Ala-Gly-Ala-KOR (PRIIb) foram registrados à temperatura ambiente em um espectrofluorímetro SPEX-Fluorolog 212, totalmente controlado por um sistema de interface do tipo DM 300F. As transições eletrônicas ⁵D₀-⁷F_J para o íon Eu³⁺ (com J= 0-4) foram o nosso alvo principal de observação.

4.2 Análise de peptidil-KOR através de HR-MAS

Amostras da peptidil-resina Ac-Ala-Gly-Lys(2-CI-Z)-KOR(PRIIIc; 1-3mg) ou Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRIIId; 6 mg) foram introduzidas em um rotor de 4 mm designado para experimento de HR-RMN. Após solvatação em volume mínimo de DMSO deuterado (DMSO-*d*₆), foram realizados os experimentos de RMN à temperatura ambiente em um espectrômetro DRX 400 equipado com um probe para estado sólido CP MAS. Uma velocidade de spinning de 5 kHz foi usada para obter os espectros HR-MAS de ¹H. Espectros de ¹H filtrado de T₂ foram obtidos após um período de 20 ms de CPMG. Os espectros de TOCSY foram obtidos com um mixing time de 80 ms (mlev; Levitt *et al.*, 1982); espectros de NOESY foram obtidos com um mixing time de 50 ms. O espectro ¹H-¹⁵N HMQC foi obtido com uma largura de 28 ppm. Todos os espectros foram adquiridos usando States-TPPI para detecção por quadratura (Marion *et al.*, 1989).

VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Síntese de KOR, Boc-aminoacil-KOR e Ac-peptidil-KOR

Como já descrito no item II, o objetivo de nosso trabalho era estabelecer um método alternativo para a obtenção de fragmentos peptídicos α -esterificados. Por esta razão, nos dedicamos ao estudo da possibilidade de se preparar estes compostos através de solvólise e aminólise de peptidil-KOR assistida por Ca^{2+} .

Inicialmente, o polímero de poliestireno inter cruzado com 1% de divinilbenzeno foi acilado via Friedel-Crafts através do cloreto de *p*-nitrobenzoila conforme descrito por DeGrado e Kaiser (1980). A formação do polímero de benzofenona foi evidenciada através de análise de infravermelho: bandas fortes foram observadas em 1660 (estiramento C=O), 1522 e 1310 (deformação axial C-O) cm^{-1} . O polímero da benzofenona foi então convertido na correspondente oxima pela reação com cloridrato de hidroxilamina em piridina e etanol. O infravermelho da KOR resultante mostrou forte banda em torno de 3507 cm^{-1} referente à estiramento OH e não apresentou absorção correspondente à carbonila. A **Figura 12** mostra os espectros de infravermelho do intermediário cetônico (**A**) e da KOR (**B**) obtidos. Os dados encontrados na análise elementar dos diferentes lotes de KOR mostraram um conteúdo de nitrogênio de 2,2 a 2,7%, o que corresponde a um grau de funcionalização de 0,78 a 0,96 mmol/g.

De posse dos lotes de KOR, demos início à preparação dos peptidil-KOR de interesse. Os aminoácidos C-terminal foram acoplados à KOR em presença de DIC/DCM e os graus de funcionalização determinados através do teste do picrato (Gisin, 1972). Os resultados obtidos estão mostrados na **Tabela 7**. A seguir, através de um protocolo padrão alongamos as cadeias peptídicas para obter as peptidil-KORs, que foram caracterizadas em seus conteúdos de aminoácidos e graus de substituições. Os resultados obtidos também se encontram listados na **Tabela 7**.

A dificuldade em ligar arginina à resina oxima era bem conhecida por nós. Tal dificuldade parece estar associada ao fato de que derivados de ami-

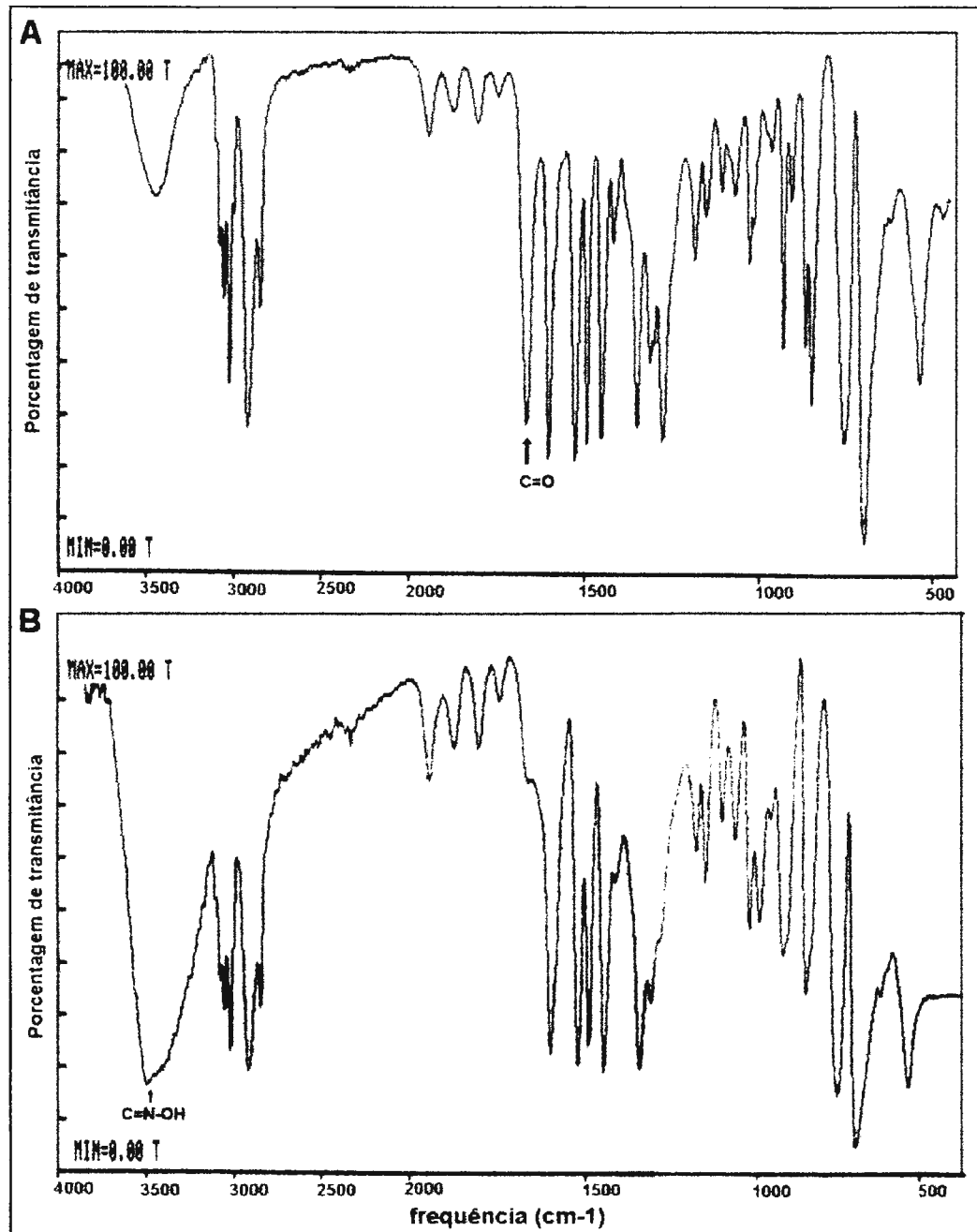


Figura 12: Espectros de infravermelho obtidos em pastilha de KBr após acilação (A) e conversão em oxima (B) do polímero de poliestireno contendo 1% de divinilbenzeno.

Tabela 7: Caracterização dos aminoacil-KOR (Boc-X-KOR) e peptidil-KOR (Ac-peptidil-KOR) sintetizados

Lote de KOR	BOC-X-KOR	GA ^a (mmol/g)	Ac-Peptidil-KOR correspondente	Sigla	Conteúdo de aminoácidos das obtido (esperado) ^b	GS; (mmol/g)
I	Gly	0,62	Ala-Gly-Gly-	PR1a	Gly: 1,9 (2,0); Ala: 1,0 (1,0)	0,46
	Ala	0,55	Ala-Gly-Ala-	PR1b	Gly: 0,86 (1,0); Ala: 2,0 (2,0)	0,52
	Phe	0,53	Ala-Gly-Phe-	PR1c	Gly: 1,0 (1,0); Ala: 1,0 (1,0); Phe: 0,6 (1,0)	0,38
	Gly	0,37	Ala-Gly-Gly-	PR1a	Gly: 2,00(2,00); Ala: 1,15 (1,0)	0,36
	Ala	0,51	Ala-Gly-Ala-	PR1b	Gly: 1,1 (1,0); Ala: 2,0 (2,0)	0,53
II	Phe	0,47	Ala-Gly-Phe-	PR1c	Gly: 1,0 (1,0); Ala: 1,0 (1,0); Phe: 0,6 (1,0)	0,34
	Lys(2-Cl-Z)	0,50	Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-	PR1d	Gly: 1,0 (1,0); Ala: 1,0 (1,0); Lys(2-Cl-Z): 0,83 (1,0)	0,43
	Ala	0,58	Ala-Gly-Ala-	PR1e	Gly: 0,9 (1,0); Ala: 2,0 (2,0)	0,54
	Lys(2-Cl-Z)	0,51	Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-	PR1f	Gly: 0,9 (1,0); Ala: 1,0 (1,0); Lys(2-Cl-Z): 0,7 (1,0)	0,38
	Asp(OcHex)	0,41	Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-	PR1iia	Asp: 1,2 (1,0); Ser: - (1,0); Ile: 1,0 (1,0)	0,29
III	Asp(OBzl)	0,27	Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-	PR1iib	Asp: 1,1 (1,0); Ser: - (1,0); Ile: 1,0 (1,0)	0,27
	Asp(OcHex)	0,45	Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-	PR1iic	Asp: 1,3 (1,0); Ser: 0,55 (1,0); Ile: 1,0 (1,0)	0,32
	Asp(OcHex)	0,41	Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-	PR1iid	Asp: 1,1 (1,0); Ser: 0,1 (1,0); Ile: 1,0 (1,0)	0,30
	Lys(2-Cl-Z)	0,50	Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-	PR1iie	Gly: 1,0 (1,0); Ala: 1,0 (1,0); Lys(2-Cl-Z): 0,83 (1,0)	0,43
	Arg(Mtr)	0,52	Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)	PR1iva	Asp: 0,9 (1,0); Ser: - (1,0); Ile: 1,0 (1,0); Arg: 1,0 (1,0)	0,35
IV	Asp(OcHex)	0,45	Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-	PR1ivb	Asp: 1,08 (1,0); Ser: 0,60 (1,0); Ile: 1,0 (1,0)	0,29

a: Grau de Aminoacilação determinado pelo teste do picrato segundo Gisin (1972); b: Obtido após hidrólise de 5, 24, 48 ou 72 horas em HCl:ácido propiónico (1:1;v/v); GS:= grau de substituição inicial dos peptidil-KOR.

noácidos tais como Boc-Arg(Tos)-OH são pouco solúveis em DCM, o solvente geralmente utilizado para a aminoacilação desta resina (Sasaki *et al.*, 1991).

Com o objetivo de posteriormente obtermos Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-KOR, buscamos estudar e propor condições experimentais adequadas para o acoplamento eficiente de Boc-Arg(Mtr)-OH à KOR. Os resultados obtidos nas várias tentativas feitas se encontram descritos na **Tabela 8**. Diferentes condições reacionais foram testadas, solvente e reagentes acopladores foram alterados, a fim de se incorporar o derivado Boc-Arg(Mtr)-OH à KOR com graus de substituição a resina KOR adequados a síntese em fase sólida. Nas condições experimentais analisadas, o reagente acoplador mais eficiente foi o DIC. Novas reações em DCM feitas em condições experimentais idênticas também forneceram a aminoacil-KOR de grau de substituição na faixa de 0,4 a 0,5 mmol/g.

Tabela 8: Acoplamento de Boc-Arg(Mtr)-OH à KOR (IV)

<i>Solvente empregado</i>	<i>Reagente acoplador empregado</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>*GA_f (mmols/g)</i>
DMF	TBTU	ambiente	0,030
DMF/DCM (1:1 v/v)	DIC	ambiente	0,10
DMF/DCM (1:1 v/v)	DIC	37	0,13
DCM/DMF (2:1 v/v)	DIC/HOBT	ambiente	0,12
DCM	DIC	ambiente	0,52
DCM	DIC	ambiente	0,31
DCM	DIC	ambiente	0,44

*GA= grau de acilação da KOR

Condições do acoplamento: massa inicial da KOR: 0,4 g (0,38 mmol); massa de Boc-Arg(Mtr)-OH: 292 mg (0,6 mmol); volume de solvente: 1mL/g de resina; DIC: (0,6 mmol); HOBT: 81mg (0,6 mmol); TBTU: 193 mg (0,6 mmol); tempo de acoplamento: 72 h.

Visando investigar se o parâmetro determinante da eficiência de acilação pelo derivado de arginina era o inchamento da suporte, o examinamos nos dois solventes citados acima: DMF e DCM (**Tabela 9**). De fato, em DCM a temperatura ambiente a KOR se solvata e incha muito mais do que em DMF na mesma temperatura.

Tentamos, também, examinar o inchamento deste polímero em temperatura elevada (60 °C), de modo que pudéssemos diminuir o tempo da

aminoacilação (72h) e/ou aumentar o grau de acilação da KOR. Para isto, empregamos DMF, DMSO e 25%DMSO/tolueno como solventes. O melhor inchamento foi encontrado em 25%DMSO/tolueno (**Tabela 9**), o que sugere a possibilidade de otimizarmos tal aminoacilação (tempo, eficiência e grau de substituição) empregando esta mistura de solventes, a qual é totalmente compatível com o uso de alta temperatura.

Todos estes estudos e seus resultados mostraram que é possível incorporar a arginina à resina oxima nas condições experimentais testadas. Entretanto, a eficiência do acoplamento depende de um compromisso entre a solubilidade do derivado de aminoácido e do grau de inchamento da resina no solvente empregado.

Tabela 9: Inchamento da KOR em diferentes solventes e temperaturas

Solvente empregado	Inchamento (ΔV , mL)	
	25 °C	60 °C
MeOH	6,0 (0)	6,3 (0)
DCM	20,3±0,00 (3,4)	-
DMF	14,3±0,15 (2,4)	12,7±0,0 (2,1)
DMSO	2,3±0,06 (0,4)	3±0,1 (0,5)
25%DMSO/Tolueno	17±0,00 (2,8)	17,4±0,1 (2,9)

Todas as medidas foram realizadas de acordo com o método descrito Ludwick *et al.* (1986) e Varanda & Miranda (1997). Quantidade correspondente a resina: 300 mg; volume de solvente adicionado: 5 mL; tempo de espera para leitura do volume: 3 min. Os valores mostrados em parênteses referem-se a V/V_i onde, V = volume final e V_i volume inicial.

De posse da Boc-Arg(Mtr)-KOR de grau de substituição 0,52 mmol/g, realizamos a síntese do Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-KOR desejado. O alongamento da cadeia peptídica não apresentou problemas (**Tabela 7**).

2. Metanólise de Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde, X= Gly (PR1a), Ala (PR1b) ou Phe (PR1c)] assistida por Ca^{2+}

a) Constatação da possibilidade de ocorrência

Para verificar a possibilidade de ocorrência de metanólise da peptidil-KOR assistida por $Ca(OAc)_2$, incubamos o Ac-Ala-Gly-Ala-KOR em

DCM/MeOH na presença deste sal. Como pode ser observado na **Figura 13A**, um único produto solúvel foi formado no meio reacional. Quando isolado e caracterizado (**Figura 14**), os dados obtidos (análise de aminoácidos e espectrometria de massas, descritos no item 17 desta seção) evidenciaram ser ele o Ac-Ala-Gly-Ala-OMe desejado.

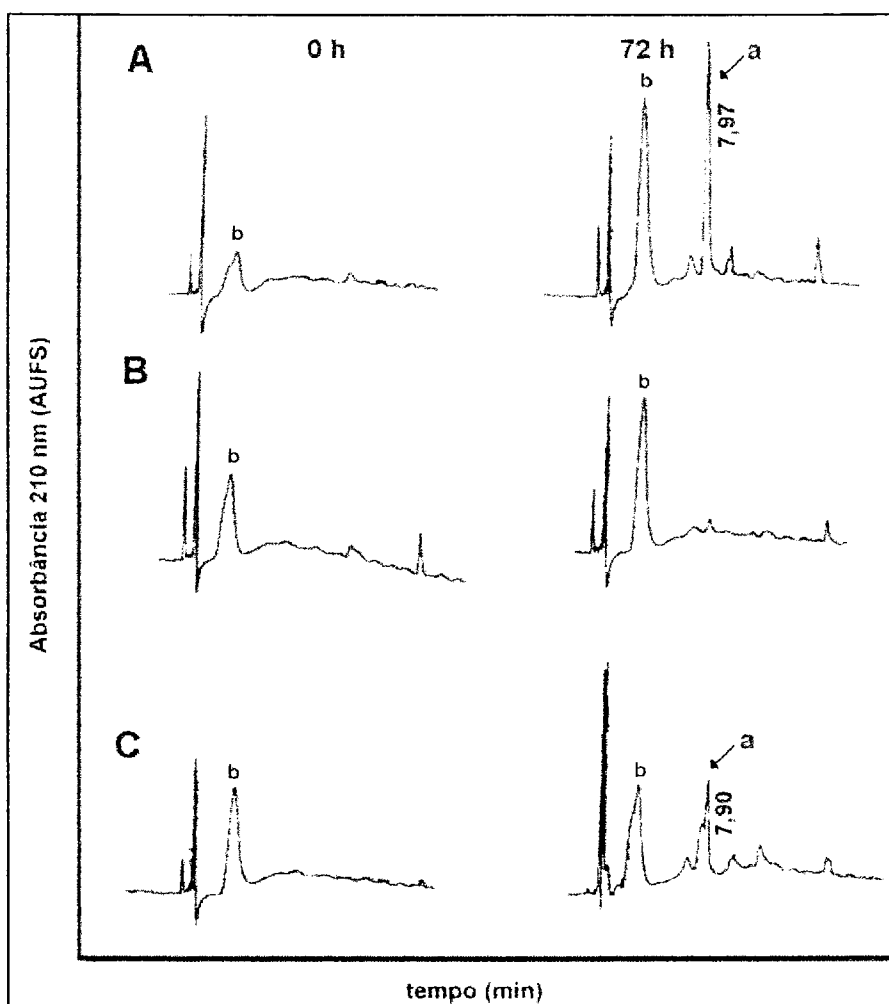


Figura 13: Análise cromatográfica da metanólise de Ac-Ala-Gly-Ala-KOR em presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (A), HAc (B) e mistura de ambos (C). a= Ac-A-G-A-OMe; b= contaminante do meio reacional.

Condição de monitoramento: *coluna:* Vydac C_{18} , 5 μm , 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; *solvente A:* 0,1% TFA/ H_2O ; *solvente B:* 60% ACN em 0,09% TFA/ H_2O ; *gradiente linear:* 5 a 95% de B em 30 min, *fluxo:* 1 mL/min; λ : 210 nm.

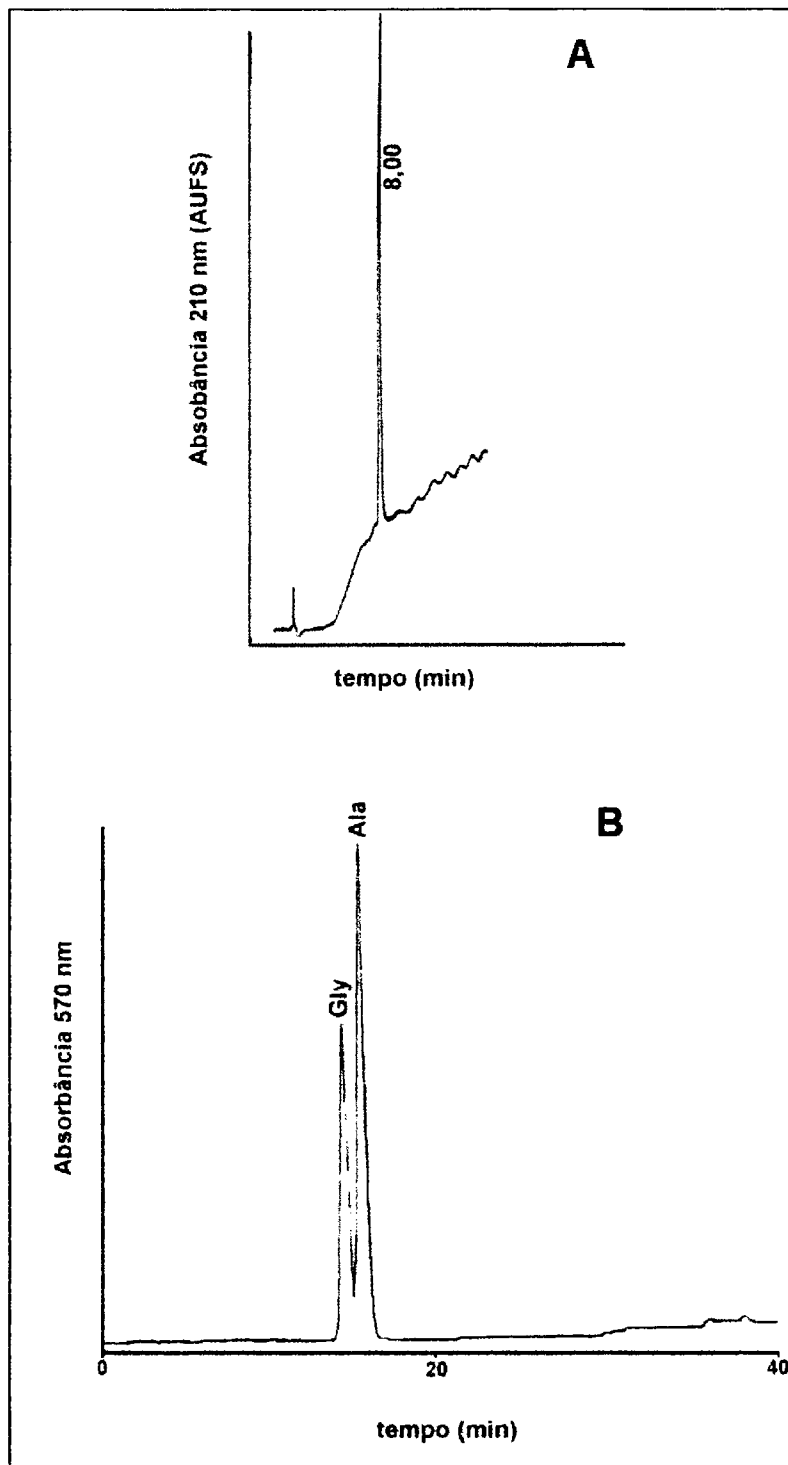


Figura 14: Perfis cromatográficos de RP-HPLC de Ac-Ala-Gly-Ala-OMe purificado (A) e de HPLC de troca iônica do seu hidrolisado (B).

Condição de monitoramento: *coluna:* Vydac C₁₈ 5 μm, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; *solvente A:* 0,1% TFA/H₂O; *solvente B:* 60% ACN em conteúdo 0,09% TFA/H₂O; *gradiente linear:* 5 a 95% B em 30 min; *fluxo:* 1mL/min; $\lambda = 210$ nm.

Em seguida, comparamos a eficiência deste aditivo com a do HAc, o catalisador geralmente empregado nas reações de aminólise de peptidil-KOR e com a mistura HAc/Ca(OAc)₂ (**Figuras 13B e 13C**, respectivamente) e também variamos o resíduo de aminoácido C-terminal da Ac-Ala-Gly-X-KOR (onde, X= Gly, Ala ou Phe; **Tabela 10**).

Tabela 10: Metanólise de Ac-Ala-Gly-X-KOR em presença de Ca(OAc)₂

Catalisador ou aditivo	X (lote)			X		
	GS _i x 10 ⁻² (mmol/g)			Gly	Ala (%)	Phe
	Gly (PR1a) 46	Ala (PR1b) 52	Phe (PR1c) 38			
	GS _i x 10 ⁻² (mmol/g)			Desligamento peptideo-KOR		
HAc	41	47	25	11	8	34
Ca(OAc) ₂	7	4	4	85	91	88
HAc/Ca(OAc) ₂	3	5	5	93	93	88

Condição Experimental: peptidil-resina: 100 mg; solvente: 2,0 mL DCM e 0,5 mL MeOH; aditivo: Ca(OAc)₂ (63 μmol), HAc (1,7 mmol) ou mistura de ambos; temperatura: 37 °C; agitação orbital: 300 rpm. As reações foram monitoradas por RP-HPLC analítico. **Condição monitoramento:** coluna: Vydac C₁₈ 5μm, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1%TFA/H₂O; solvente B: 60%ACN em 0,09%TFA/H₂O; gradiente linear: 5 a 95%B em 30 min; λ: 210 nm.

No geral, as reações assistidas por Ca²⁺ foram mais eficientes no desligamento do peptídeo esterificado da KOR (rendimentos de clivagem superiores a 80%) do que as reações assistidas por ácido acético (rendimentos de clivagem inferiores a 40%). As **Figuras 15 e 16** mostram os perfis cromatográficos de RP-HPLC dos produtos solúveis isolados dos meios reacionais das metanólises individuais de Ac-Ala-Gly-X-KOR (onde, X= Gly ou Phe) e os perfis cromatográficos de HPLC de troca-iônica de seus hidrolisados: Ac-Ala-Gly-Gly-OMe e Ac-Ala-Gly-Phe-OMe, respectivamente. Como esperado, o conteúdo de aminoácidos obtidos corresponde ao valor teórico, assim como as massas moleculares (ver **item 17**) foram idênticas àquelas calculadas para Ac-Ala-Gly-Gly-OMe, Ac-Ala-Gly-Ala-OMe e Ac-Ala-Gly-Phe-OMe. A **Figura 17** mostra o espectro de infravermelho de Ac-Ala-Gly-Gly-OMe purificado. Nele, a presença do éster metílico também fica evidente pela banda de absorção na região de 1.745 cm⁻¹ (estiramento C=O)

e 1216 cm^{-1} (deformação axial de C-C=O). Os ésteres de peptídeos obtidos até então foram estocados como padrões.

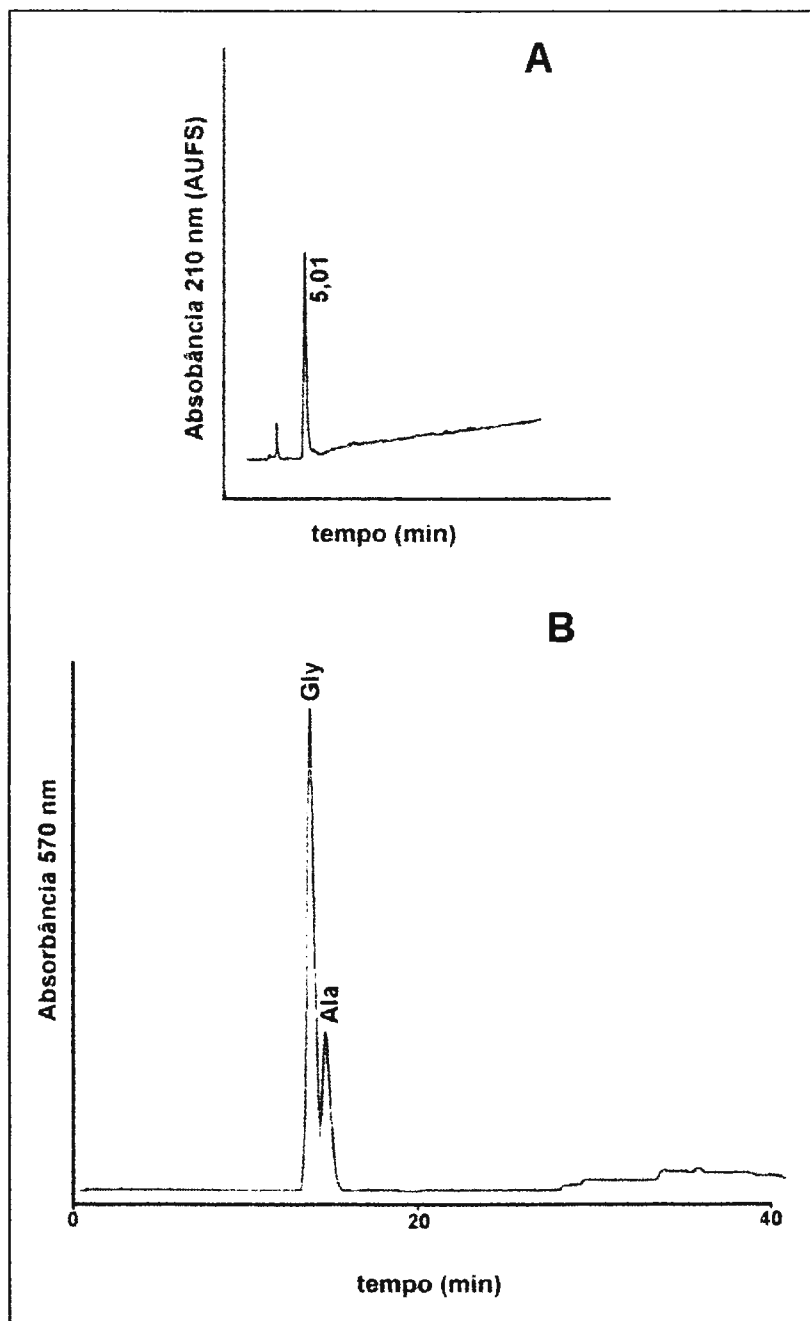


Figura 15: Perfis cromatográficos de RP-HPLC de Ac-Ala-Gly-Gly-OMe purificado (A) e de HPLC de troca iônica do seu hidrolisado (B).

Condição de monitoramento: coluna: Vydac C₁₈, 5 μm , 300 \AA , 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1% TFA/H₂O; solvente B: 60% ACN em conteúdo 0,09% TFA/H₂O; gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min; λ : 210 nm.

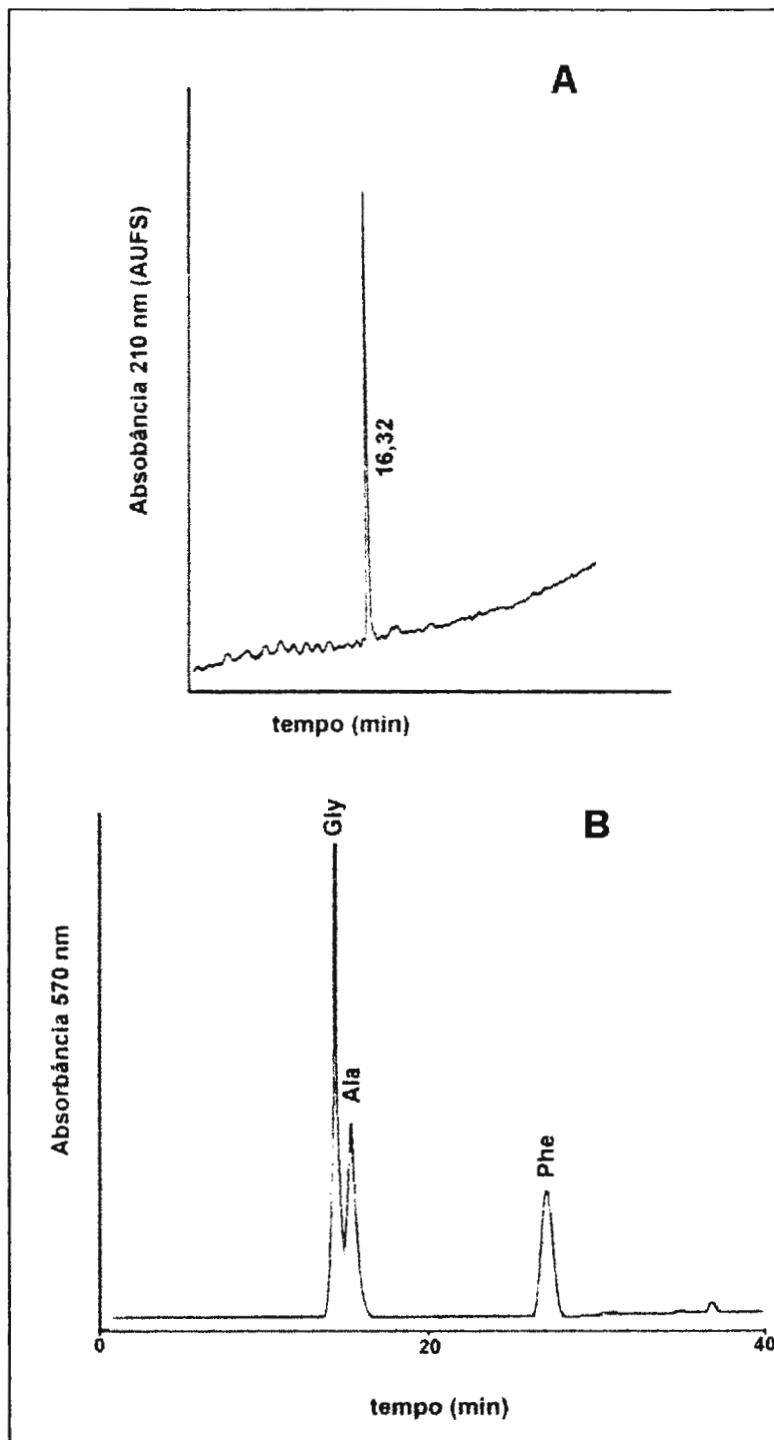


Figura 16: Perfis cromatográficos de RP-HPLC de Ac-Ala-Gly-Phe-OMe purificado (A) e de HPLC de troca iônica do seu hidrolisado (B).

Condição de monitoramento: *coluna:* Vydac C₁₈, 5 μm, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; *solvente A:* 0,1%TFA/H₂O; *solvente B:* 60% ACN em 0,09% TFA/H₂O; *gradiente linear:* 5 a 95% de B em 30 min, *fluxo:* 1mL/min; *λ:* 210 nm.

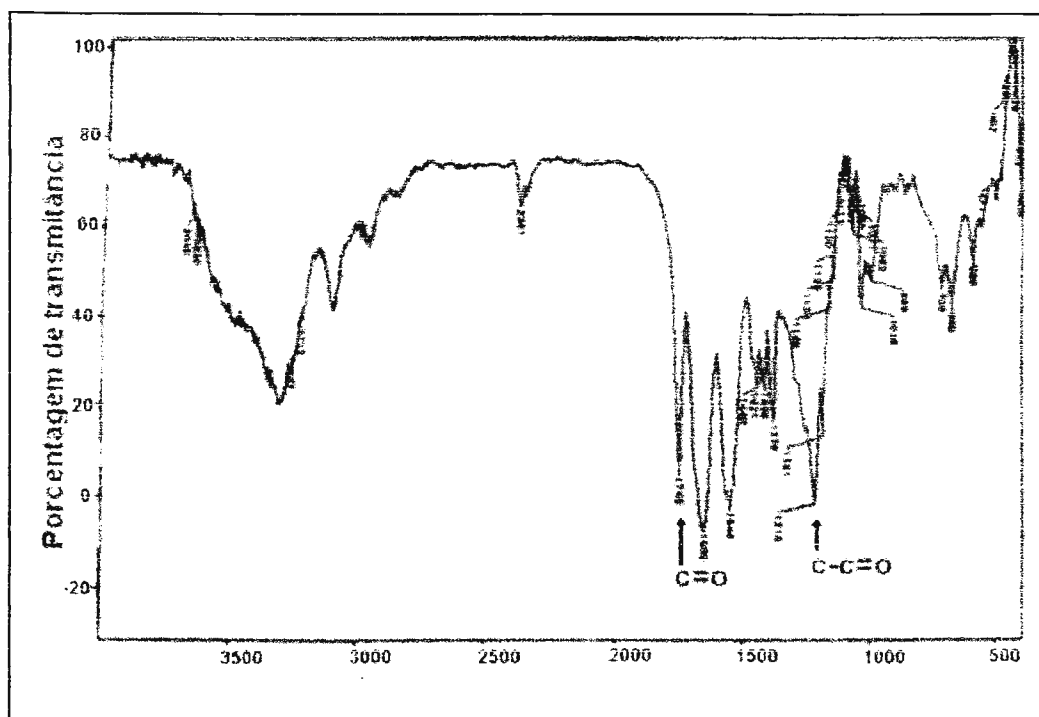


Figura 17: Espectro de infravermelho do éster Ac-Ala-Gly-Gly-OMe purificado, em pastilha de KBr (1 mg de produto/100 mg de KBr).

Para controle, realizamos em paralelo a este estudo duas reações adicionais: metanólise de Fmoc-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR na ausência de Ca^{2+} ou ácido acético (**A**) e na presença de Ca^{2+} (**B**). Nenhum produto se formou em A mesmo após 100 h de reação, confirmando que, de fato, o Ca^{2+} assistia as metanólises estudadas.

Como os resultados acima descritos sugeriram que o método proposto por nós poderia ser aplicável a qualquer seqüência peptídica, realizamos novas solvólises de peptidil-resinas Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde, X= Gly (**PRIIa**), Ala (**PRIIb**), Phe (**PRIIc**) e Lys(2-Cl-Z) (**PRIIId**)] em metanol na presença de acetato de cálcio ($63 \mu\text{mol}$) a fim de: 1) verificar a influência do aminoácido C-terminal no rendimento de clivagem da peptidil-resina; 2) tentar quantificar as reações por RP-HPLC: neste caso, alíquotas dos meios reacionais seriam retiradas e analisadas em tempos determinados e as áreas dos picos cromatográficos correspondentes aos produtos seriam

comparadas com as áreas de curvas-padrão feitas para os Ac-Ala-Gly-X-OMe de concentrações conhecidas.

b) Tentativa de quantificação das metanólises por medida das quantidades dos peptídeos esterificados formados

Antes de iniciar o estudo foi tomado o cuidado de se reanalisar os padrões utilizados na elaboração das curvas-padrão para verificar a viabilidade de seus usos. A análise de uma amostra de concentração conhecida evidenciou grande desvio no valor do número de mol obtido em relação ao número de mol esperado. Tal fato decorreu provavelmente da degradação dos padrões armazenados em solução. Em todos os cromatogramas analisados verificou-se o aumento da quantidade de um subproduto mais polar: no caso da metanólise da peptidil-resina Ac-Ala-Gly-Gly-KOR, o produto formado Ac-Ala-Gly-Gly-OMe não ficava retido na coluna C₁₈. A **Figura 18** ilustra os perfis cromatográficos correspondentes ao padrão Ac-Ala-Gly-Ala-OMe, utilizado na elaboração da curva padrão antes (**A**) e após a estocagem (**B**).

Por esta razão, foram preparados novos padrões a partir da metanólise assistida por Ca²⁺ das peptidil-KOR correspondentes. Em seguida, os 2 µL das misturas reacionais de Ac-Ala-Gly-X-KOR (X= Phe, Ala e Gly) foram diluídos em 10 µL de 0,1% de TFA/H₂O (60% de ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA, quando X= Phe) e alíquotas foram analisadas por RP-HPLC. As condições foram então adequadas à coluna semi-preparativa para realização das purificações. As frações obtidas contendo os peptídeos purificados foram juntadas e liofilizadas, fornecendo sólidos brancos. Entretanto, quando estes foram analisados por RP-HPLC, os mesmos apresentaram tempos de retenção inferiores aos esperados. Por isto, foram realizadas diversas outras purificações, mas em todas observou-se a degradação dos peptídeos esterificados. A análise por espectrometria de massas (EI-MS) confirmou que os produtos de degradação correspondiam aos peptídeos íntegros não esterificados em suas α-carboxilas.

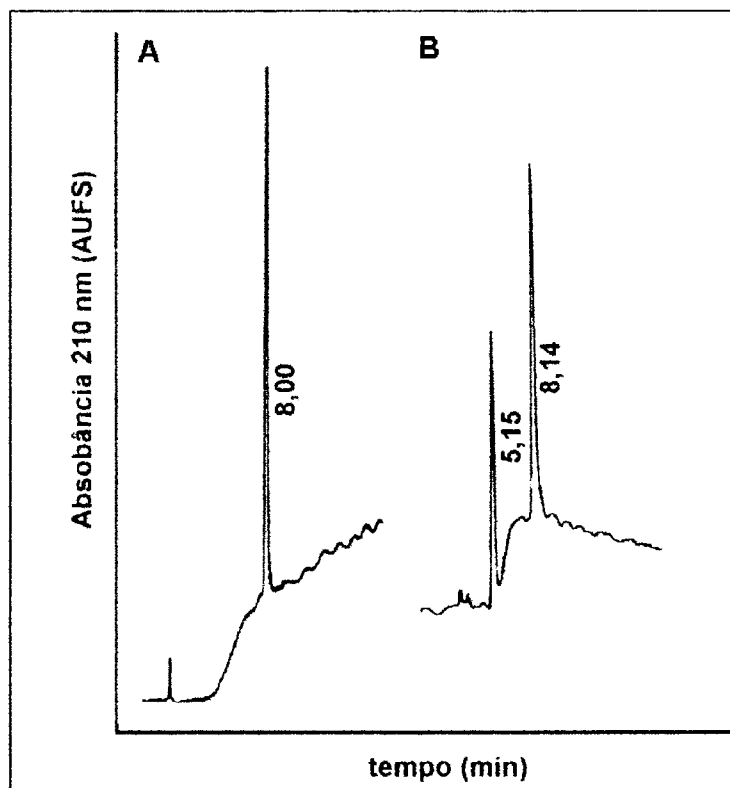


Figura 18: Perfil de RP-HPLC do padrão de Ac-Ala-Gly-Ala-OMe antes (A) e após a estocagem (B).

Condições de análise: coluna: Vydac C₁₈, 5 μm, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; *solvente A:* 0,1% de TFA/H₂O, *solvente B:* 60% de ACN em 0,09%TFA/H₂O; *gradiente:* 5 a 95% de B em 30 min; *fluxo:* 1mL/min; λ : 210.

Uma vez que não foi possível preparar novos padrões dos ésteres Ac-Ala-Gly-X-OMe (onde, X= Gly, Ala ou Phe), tentamos utilizar as curvas padrão obtidas anteriormente (**Figuras 19-20**). A **Tabela 11** mostra os resultados obtidos para as curvas de áreas dos picos cromatográficos correspondentes aos peptídeos α -esterificados versus a quantidade de peptídeo analisada.

As reações de metanólise de Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde, X= Gly, Ala, Phe e Lys(2-Cl-Z)] em DCM/MeOH na presença de Ca²⁺ foram então realizadas. A **Figura 21** ilustra os perfis de RP-HPLC obtidos destas reações. As quantidades de produtos formados nos diferentes tempos foram calculadas em função das curvas padrões. Os resultados obtidos encontram-se descritos na **Tabela 12** e mostrados na **Figura 22**.

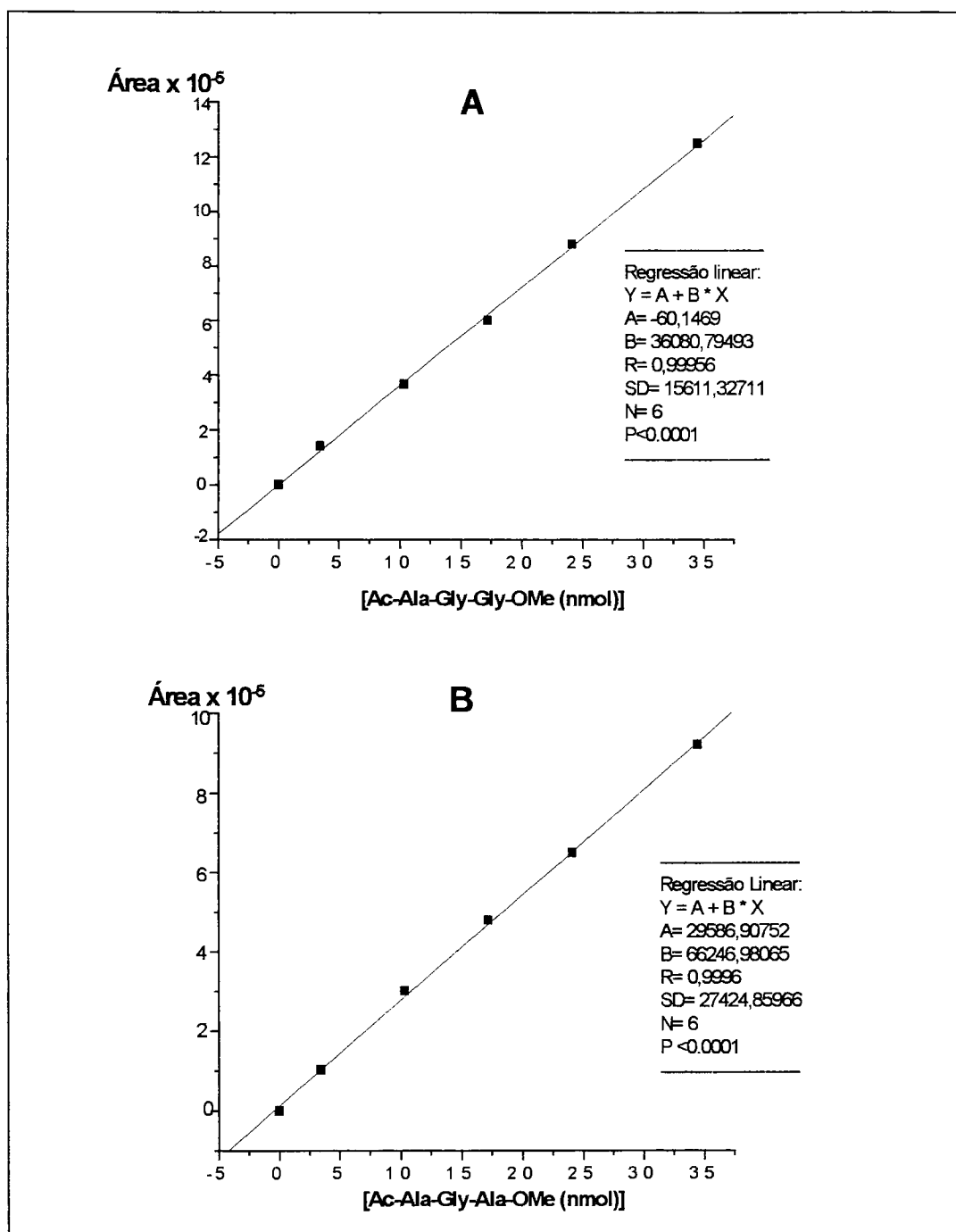


Figura 19: Curvas-padrão de áreas do pico cromatográfico versus quantidades do éster de peptídeo. Ac-Ala-Gly-Gly-OMe (A) e Ac-Ala-Gly-Ala-OMe.

Condição de RP-HPLC analítico: *coluna:* Vydac C₁₈, 5 μm, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; *solvente A:* 0,1% TFA/H₂O; *solvente B:* 25% ACN em 0,09% TFA/H₂O; *condição isocrática:* 5% (A) e 38% de B (B); *fluxo:* 1 mL/min; $\lambda = 210$ nm.

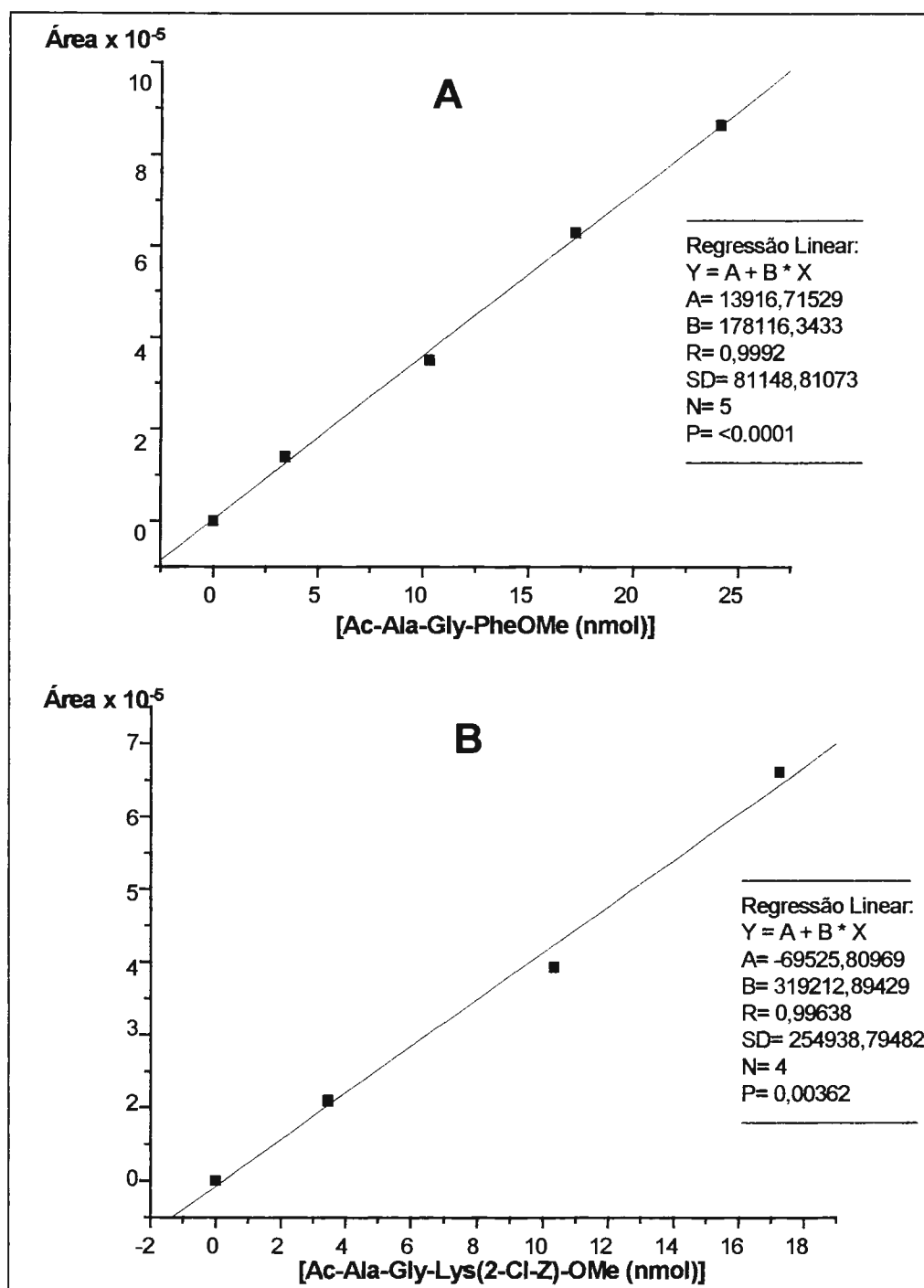


Figura 20: Curvas-padrão de áreas do pico cromatográfico versus quantidades do éster de peptídeo. Ac-Ala-Gly-Phe-OMe (A) e Ac-Ala-Gly-Lys(2-CI-Z)-OMe (B).

Condição de RP-HPLC analítico: coluna: Vydac C₁₈, 5 μm, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1% TFA/H₂O; solvente B: 60% ACN em 0,09% TFA/H₂O; condição isocrática: 35% (A) e 60% de B (B); fluxo: 1 mL/min; λ = 210nm.

Tabela 11: Áreas do pico cromatográfico obtidas em função da quantidade do peptídeo Ac-Ala-Gly-X-OMe (nmol) analisado

X	Volume injetado (μL)	Peptídeo (nmol)	Área
Gly	1	3,45	140305,0
	3	10,35	365719,0
	5	17,24	598604,0
	7	24,14	879893,0
	10	34,49	1250483,0
Ala	1	2,4	253496,7
	3	7,5	748774,2
	5	12,4	1197076,1
	7	17,4	1620780,4
	10	24,9	2297760,8
Phe	1	2,5	699795,6
	3	7,3	1748821,8
	5	12,2	3136342,5
	7	17,0	4313083,5
Lys-(2-Cl-Z)	1	1,85	1096601,0
	3	5,55	2930583,0
	6	11,10	5603081,0

Condições de Monitoramento: coluna: Vydac C₁₈, 5 μm, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; *fluxo*: 1,0 mL/min; *solvente A*: 0,1% TFA/H₂O; *solvente B*: 25% ACN em 0,09% TFA/H₂O; *solvente C*: 60% ACN em 0,09% de TFA/H₂O; *condição isocrática*: 5 % de B (Gly); 35% de B (Ala); 38% de C (Phe); 60% de C (Lys-(2-Cl-Z)) λ: 210 nm.

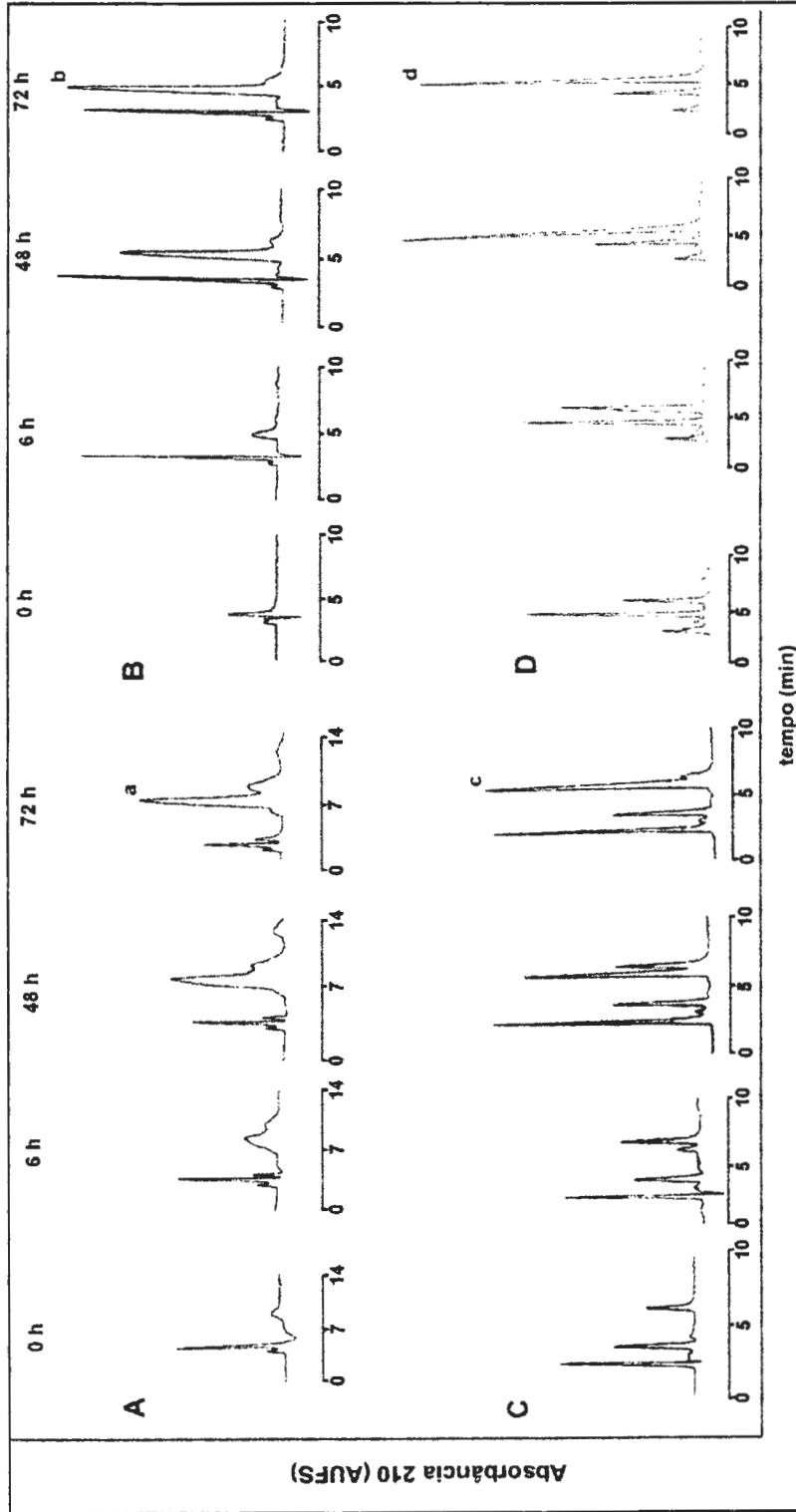


Figura 21: Análise cromatográfica da metanólise de Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde X= Gly, Ala, Phe ou Lys(2-Cl-Z)] em presença de Ca(OAc)₂. [Ac-Ala-Gly-Gly-OMe (A); Ac-Ala-Gly-Ala-OMe (B); Ac-Ala-Gly-Phe-OMe (C); Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-OMe (D). a, b, c e d: ésteres α -metílicos produzidos].

Condição de monitoramento: coluna: Vydac C₁₈, 5 μ m, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1%TFA/H₂O; solvente B: 25% ACN em 0,09%TFA/H₂O; solvente C: 60% ACN em 0,09% TFA/H₂O; condição isocrática: 5% de B (A); 38% de B (B); 35% de C (C); 60% de C (D); fluxo: 1mL/min; λ : 210 nm.

Tabela 12: Resultados das metanólises de Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde, X= Gly (PRIIa), Ala (PRIIb), Phe (PRIIc) ou Lys(2-Cl-Z) (PRIIId)] assistidas por Ca²⁺

Tempo (horas)	Gly		Ala	
	Área	Peptídeo (nmol)	Área	Peptídeo (nmol)
1	0	0	108558	1,2
2	261979	7,3	203692	2,6
3	339206	9,4	356678	4,9
4	483028	13,4	384848	5,4
6	1700526	47,1	665755	9,6
8	1586975	44,0	714467	10,3
10	1995882	55,3	934899	13,7
24	2525654	70,0	1549780	22,9
48	2987603	82,8	2391155	35,6
72	2708583	75,1	2607816	38,9

Tempo (horas)	Phe		Lys(2-Cl-Z)	
	Área	Peptídeo (nmol)	Área	Peptídeo (nmol)
1	87295	0,41	1475921	4,8
2	160436	0,82	1636891	5,3
3	206072	1,1	1647338	5,4
4	355458	1,9	1455399	4,8
6	440740	2,4	2000588	6,5
8	594522	3,3	2487946	8,0
10	627457	3,4	2647121	8,5
24	1368836	7,6	3908517	12,5
48	2664979	14,9	7941345	25,1
72	3779713	21,1	7800551	24,7

Calculando o rendimento a partir das curvas das **Figuras 19-20**, obtivemos os resultados descritos na **Tabela 13**. Tornou-se evidente que os rendimentos foram super-estimados. Além disto, o uso deste método evidenciou a ocorrência de interferências na medida de áreas dos picos presentes nos cromatogramas que levava a erros significativos. Por esta razão, passamos a determinar os rendimentos destas reações em tempos definidos segundo o método descrito no item **3.8.6**. da seção anterior. Os rendimentos assim determinados para 6, 48 e 72 horas estão apresentados na **Tabela 14**. Estes se mostraram altos (> 68% em 48h) e obedeceram a seguinte ordem: Ac-Ala-Gly-Gly-KOR > Ac-Ala-Gly-Ala-KOR > Ac-Ala-Gly-

Phe-KOR> Ac-Ala-Gly-Lys(2-CI-Z)-KOR, o que nos possibilitou concluir que o efeito estérico e hidrofóbico tem influência na velocidade da metanólise.

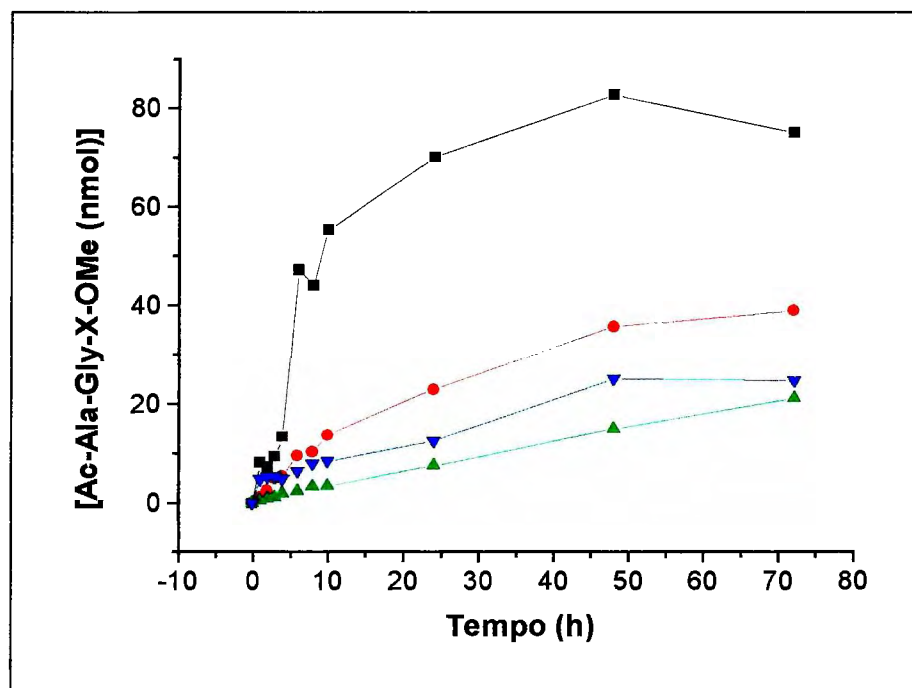


Figura 22: Gráfico de quantidade de peptídeo esterificado formado versus tempo de metanólise de Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde X= Gly, Ala, Phe ou Lys(2-CI-Z)] assistida por Ca^{2+} .

Tabela 13: Rendimentos de reações de metanólise obtidos a partir de análise por RP-HPLC do meio reacional

Produto Formado	Quantidade (μmol)	Rendimento (%)
Ac-Ala-Gly-Gly-OMe	18,6	53
Ac-Ala-Gly-Ala-OMe	9,7	28
Ac-Ala-Gly-Phe-OMe	5,3	15
Ac-Ala-Gly-Lys(2-CI-Z)OMe	6,1	18

Condição experimental: peptidil-resina: 35 μmol ; solvente: 2,0 mL de DCM e 0,5 mL de MeOH; $\text{Ca}(\text{OAc})_2$: 63 μmol ; temperatura: 37 $^{\circ}\text{C}$; agitação orbital: 300 rpm; tempo de reação: 72 horas. **Condição de monitoramento:** coluna: Vydac C_{18} 5 μm , 300 \AA , 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1%TFA/ H_2O ; solvente B: 25%ACN em 0,09%TFA/ H_2O ; solvente C: 60% ACN em 0,09%TFA/ H_2O ; condição isocrática: 5% B (X= Gly); 28% B (X= Ala); 35% C (X= Phe); 60% C [X= Lys(2-CI-Z)]; fluxo: 1 mL/min; λ : 210 nm.

Tabela 14: Estudo comparativo da metanólise de Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde, X= Gly (PRIIa), Ala (PRIIb), Phe (PRIIc) ou Lys(2-Cl-Z) (PRIID)]

X GS _i (mmol/g)	GS _f (mmol/g)			Desligamento peptídeo-KOR (%)		
	tempo (h)			tempo (h)		
	6	48	72	6	48	72
Gly 0,36	0,19	0,04	0	46	89	100
Ala 0,53	0,04	0,078	0,04	30	85	92
Phe 0,34	0,31	0,073	0,07	10	78	81
Lys-(2-Cl-Z)- 0,38	0,31	0,12	0,11	9	68	72

GS_i e GS_f: grau de substituição inicial e grau de substituição final da peptidil-KOR

Condição experimental: peptídeo: 35 μmol; solvente: 2,0 mL DCM e 0,5mL MeOH; Ca(OAc)₂: 63 μmol; temperatura: 37 °C; agitação orbital: 300 rpm. As reações foram monitoradas por RP-HPLC analítico.

Condição de monitoramento: coluna: Vydac C₁₈ 5μm, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1%TFA/H₂O; solvente B: 25%ACN em 0,09%TFA/H₂O; solvente C: 60% ACN em 0,09%TFA/H₂O; condição isocrática: 5% B (X= Gly); 28% B (X= Ala); 35% C (X= Phe); 60% C [X= Lys(2-Cl-Z)]; fluxo: 1 mL/min; λ: 210 nm.

3. Etanólise, benzólise e tiólise de Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde X= Lys(2-Cl-Z) (PRIIIf) ou Ala (PRIIe)] assistidas pelo Ca²⁺

Tendo confirmado a habilidade do íon cálcio em assistir tais reações e o efeito da natureza do aminoácido C-terminal na clivagem da peptidil-resina de Kaiser, decidimos investigar posteriormente se este procedimento alternativo poderia ser aplicado também à preparação de ésteres α-etílicos, benzílicos e tioetílicos das seqüências peptídicas empregadas até então. Assim, examinamos a viabilidade da etanólise, benzólise e tiólise de Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde X= Ala ou Lys(2-Cl-Z)] na presença de EtOH, EtSH e C₆H₅CH₂OH em DCM e Ca²⁺.

Os perfis cromatográficos de alíquotas coletadas das reações de etanólise evidenciaram o aparecimento de produtos únicos nos meios reacionais em DCM (**Figura 23**). Quando isolados e caracterizados estes demonstraram ser os peptídeos esterificados desejados: Ac-Ala-Gly-Ala-OEt e Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)OEt (**item 17**). As análises cromatográficas das reações de benzólise e tiólise, por outro lado, não evidenciaram a formação por Bemquerer (1996). Estaria a solvólise ocorrendo e os produtos formados

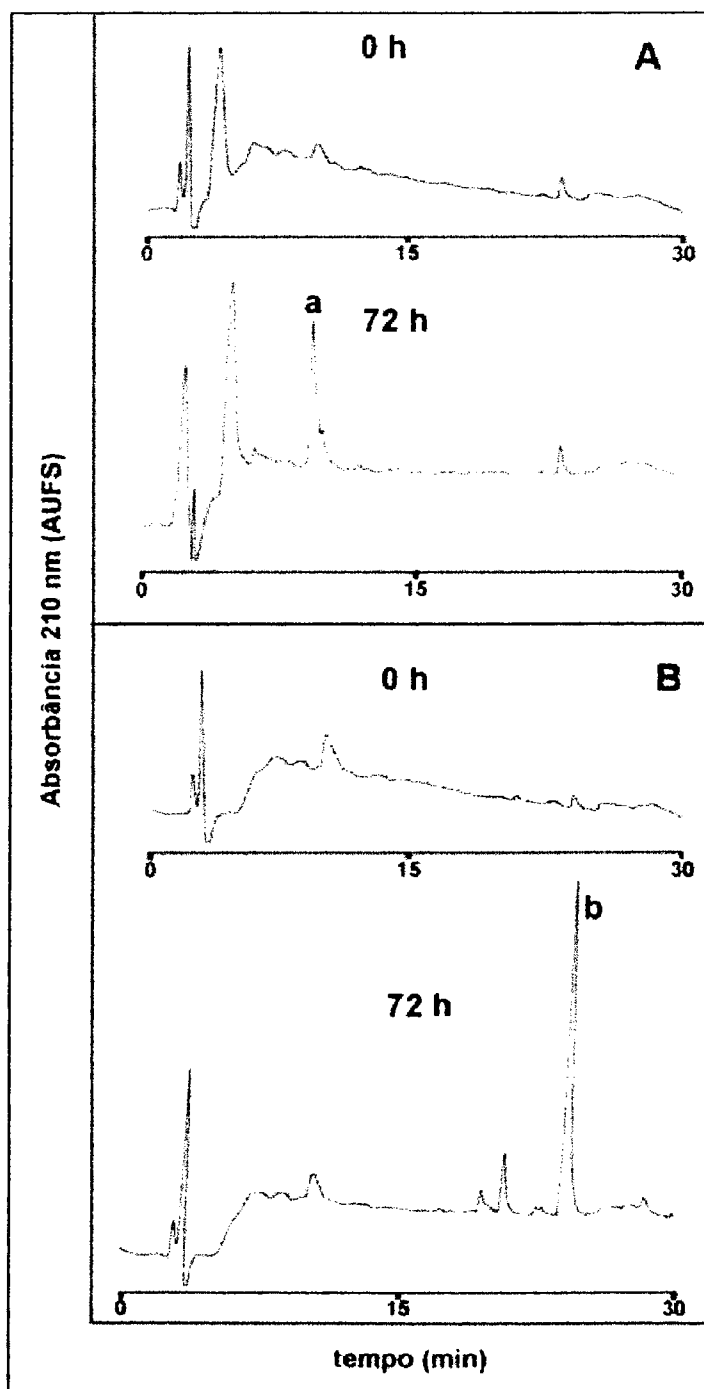


Figura 23: Perfis de RP-HPLC da etanólise de Ac-Ala-Gly-Ala-KOR (A) e Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR (B) em DCM na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$. Ac-Ala-Gly-Ala-OEt (a) e Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-OEt (b).

Condição de monitoramento: coluna: Vydac C_{18} , 5 μm , 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1% TFA/ H_2O ; solvente B: 60% ACN em 0,09% TFA/ H_2O ; gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min; λ : 210 nm.

de produtos mesmo após 72 horas de reação, o que já havia sido observado sendo hidrolisados no meio reacional ou os ésteres peptídicos seriam de natureza suficientemente hidrofóbica para não serem eluídos da coluna, mesmo em altas concentrações de acetonitrila? As reações haviam sido acompanhadas por RP-HPLC em condição gradiente e utilizou-se sistema eluente composto por duas soluções adequadas a ampla gama de compostos: solução A: 0,1% de TFA/H₂O e solução B: 60% ACN em 0,09% de TFA/H₂O ou 99% ACN em 0,09% de TFA/H₂O (Bemquerer, 1996).

Surpreendentemente, a quantificação do desligamento do peptídeo da KOR através da hidrólise total e análise do conteúdo de aminoácidos da peptidil-KOR antes e após as reações de solvólise indicou que todas as reações realizadas (etanólise, benzólise e tiólise) ocorreram em maior ou menor extensão (**Tabela 15**).

Todos estes resultados nos levaram a concluir que: 1) a etanólise, benzólise e tiólise de peptidil-KOR também pode ser assistida pelo íon Ca²⁺; 2) as reações de benzólise e tiólise devem ser melhor estudadas sob o ponto de vista de monitoramento. Como neste trabalho o nosso interesse

Tabela 15: Etanólise, benzólise e tiólise de peptidil-KOR assistida por Ca²⁺

Peptidil-KOR [lote; GS _i (mmol/g)]	Nucleófilo	GS _f (mmol/g)	Desligamento peptídeo-KOR (%)
Ac-Ala-Gly-Ala- (PRIIe ;0,54)	EtOH	0,17	69
	EtSH	0,27	50
	C ₆ H ₅ CH ₂ OH	0,23	57
Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)- (PRIIf ;0,38)	EtOH	0,29	24
	EtSH	0,35	8
	C ₆ H ₅ CH ₂ OH	0,11	29

GS_i e GS_f: graus de substituição inicial e final do peptidil-KOR. Condição Experimental: peptidil-KOR: 100 mg; solvente: 2,0 mL DCM e 0,5 mL EtOH, EtSH ou C₆H₅CH₂OH; Ca(OAc)₂: 63 μmol; temperatura: 37°C; agitação orbital: 300 rpm. As reações foram monitoradas por RP-HPLC analítica.

Condição de monitoramento: coluna: Vydac C₁₈ 5 μm, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1%TFA/H₂O; solvente B: 60 % ACN em 0,09%TFA/H₂O; gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min; fluxo: 1mL/min; λ: 210 nm.

estava muito mais voltado para a produção de ésteres α-metílicos e etílicos de peptídeos, optamos por melhor investigar a metanólise, etanólise e aminólise de peptidil-KOR em presença de Ca(OAc)₂.

4. Novas etanólises de Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde X= Ala ou Lys(2-Cl-Z)] em presença de Ca(OAc)₂.

Desta vez, as reações foram realizadas a partir de 35 μmol de peptídeo para ambas peptidil-KOR, mas as proporções de solventes utilizados anteriormente foram mantidas (2,0 mL de DCM e 0,5 de EtOH). As reações foram interrompidas nos tempos de 6, 48 e 72 horas. Os rendimentos de desligamento do peptídeo da KOR foram determinados por análise de aminoácidos das peptidil-KOR antes e após as reações conforme descrito no item 3.8b e mostrado na Tabela 16.

Tabela 16: Etanólise da Ac-Ala-Gly-X-KOR [onde, X= Ala (KORIIe) ou Lys(2-Cl-Z) (PRIIId)]

Peptidil-KOR [lote; GS _i , (mmol/g)]	GS _f (mmol/g)			Desligamento peptídeo-KOR (%)		
	tempo					
	6 h	48 h	72 h			
Ac-Ala-Gly-Ala- (PRIIb; 0,53)	0,48	0,44	0,42	9	17	60
Ac-Ala-Gly-Lys-(2-Cl-Z)- (PRIIId; 0,43)	0,42	0,28	0,27	2	35	37

GS_i e GS_f: graus de substituição inicial e final do peptidil-KOR;

Condição experimental: peptídeo: 35 μmol; solvente: 2,0 mL DCM e 0,5 mL EtOH; Ca(OAc)₂: (63 μmol); temperatura: 37 °C; agitação orbital: 300 rpm. As reações foram monitoradas por RP-HPLC analítico. Condição de monitoramento: coluna: Vydac C₁₈ 5μm, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1% TFA/H₂O; solvente B: 60% ACN em 0,09% TFA/H₂O; gradiente linear: 5 a 95 % de B em 30 minutos λ: 210 nm.

Em função dos resultados apresentados anteriormente, tentamos otimizar a etanólise da Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR. Além da troca de solventes, novas condições experimentais foram testadas conforme descrito no item 3.12c. Quando DMSO foi utilizado como solvente, houve aumento significativo na porcentagem de desligamento do peptídeo da KOR (44%) em relação àquelas observadas para as etanólises ocorridas em DCM (19%). Variando-se a temperatura do meio reacional e o solvente, um desligamento mais efetivo (66%) foi conseguido em um tempo menor de reação (36 h). Estes resultados encontram-se expressos na Tabela 17.

Tabela 17: Tentativa de maximização da etanolise de Ac-Ala-Gly-Lys(2-CI-Z)-KOR (PRIf; GS_i= 0,38 mmol/g) em presença de íons Ca²⁺

Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (horas)	GS _f (mmol/g)	Desligamento peptídeo-KOR (%)
DCM	37	72	0,31	19
DMSO	37	72	0,21	44
25% DMSO/tolueno	55	36	0,13	66

GS_i e GS_f: graus de substituição inicial e final do peptídil-KOR; Condição experimental: peptídeo: 9,5 μmol; solvente: 0,5 mL; etanol: 0,125 mL; Ca(OAc)₂: 17,1 μmol; proporção molar: peptídeo-aditivo: 1:1,8; agitação orbital: 300 rpm. As reações foram monitoradas por RP-HPLC analítica por período de 36 e 72h. Condição de monitoramento: coluna: Vydac C₁₈, 5 μm, 300 Å 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1% TFA/H₂O; solvente B: 60% ACN em 0,09%TFA/H₂O; fluxo: 1 mL/min; gradiente linear: 5 a 95%B em 30 min; λ: 210 nm.

Os perfis cromatográficos dos meios reacionais, entretanto, mostraram a formação do produto desejado e de produtos secundários (Figuras 24-26). A Figura 27 mostra o experimento de coeluição entre o produto e os meios reacionais. Como não dispúnhamos de quantidade suficiente de material para realizar a purificação e separação dos contaminantes formados, fizemos então análise por espectrometria de massa das amostras analisadas por RP-HPLC. Os dados obtidos em diferentes análises dos meios reacionais indicaram que poderia estar havendo a liberação de dipeptídeos e derivados de Lys(2-CI-Z) produzidos durante a síntese da cadeia peptídica de Ac-Ala-Gly-Lys(2-CI-Z)-KOR, tais como Ac-Gly-Lys(2-CI-Z)-OEt [(M+H⁺: 442,8 (calculado) e 443,6 (obtido)]; Ac-Lys(2-CI-Z)-OEt [(M+H⁺: 384,7 (calculado) e 385,3 (obtido)].

5. Metanolise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OZ)-KOR [onde, Z= cHex ou Bzl] assistida por Ca²⁺.

Os estudos de solvólise na presença de Ca(OAc)₂ foram ampliados à esta seqüência para se verificar:

1) A possibilidade de ocorrência de transesterificação da cadeia lateral do derivado de aminoácido protegido Asp(OZ) em presença de Ca²⁺ e metanol. A literatura descreve algumas reações secundárias que ocorrem durante o desligamento de peptídeos contendo Asp(OBzl) da KOR. Como por exemplo, podemos citar a transesterificação da cadeia lateral e a formação de aspartimida (Pichette *et al.*, 1997; Hendrix *et al.*, 1992).

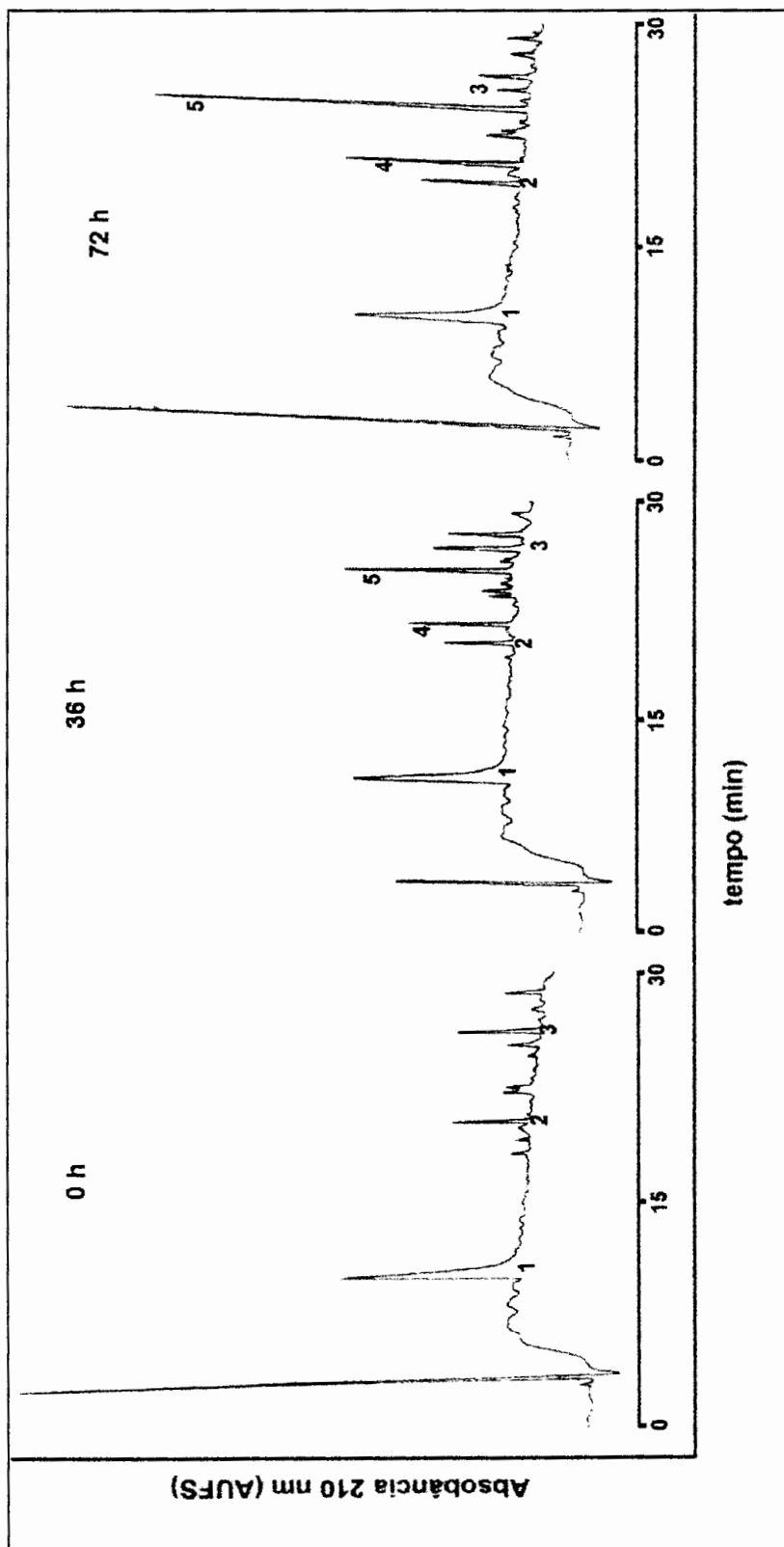


Figura 24: Perfis de RP-HPLC da etanólise de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR em DCM na presença de Ca(OAc)₂. 1, 2 e 3 = provenientes do meio reacional; e 4= produto secundário; 5= Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-OEt. Condição de monitoramento: coluna: Vydac C₁₈, 5 µm, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1% TFA/H₂O; solvente B: 60% ACN em 0,09% TFA/H₂O; gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min; λ: 210 nm; volume de injeção: 10 µL.

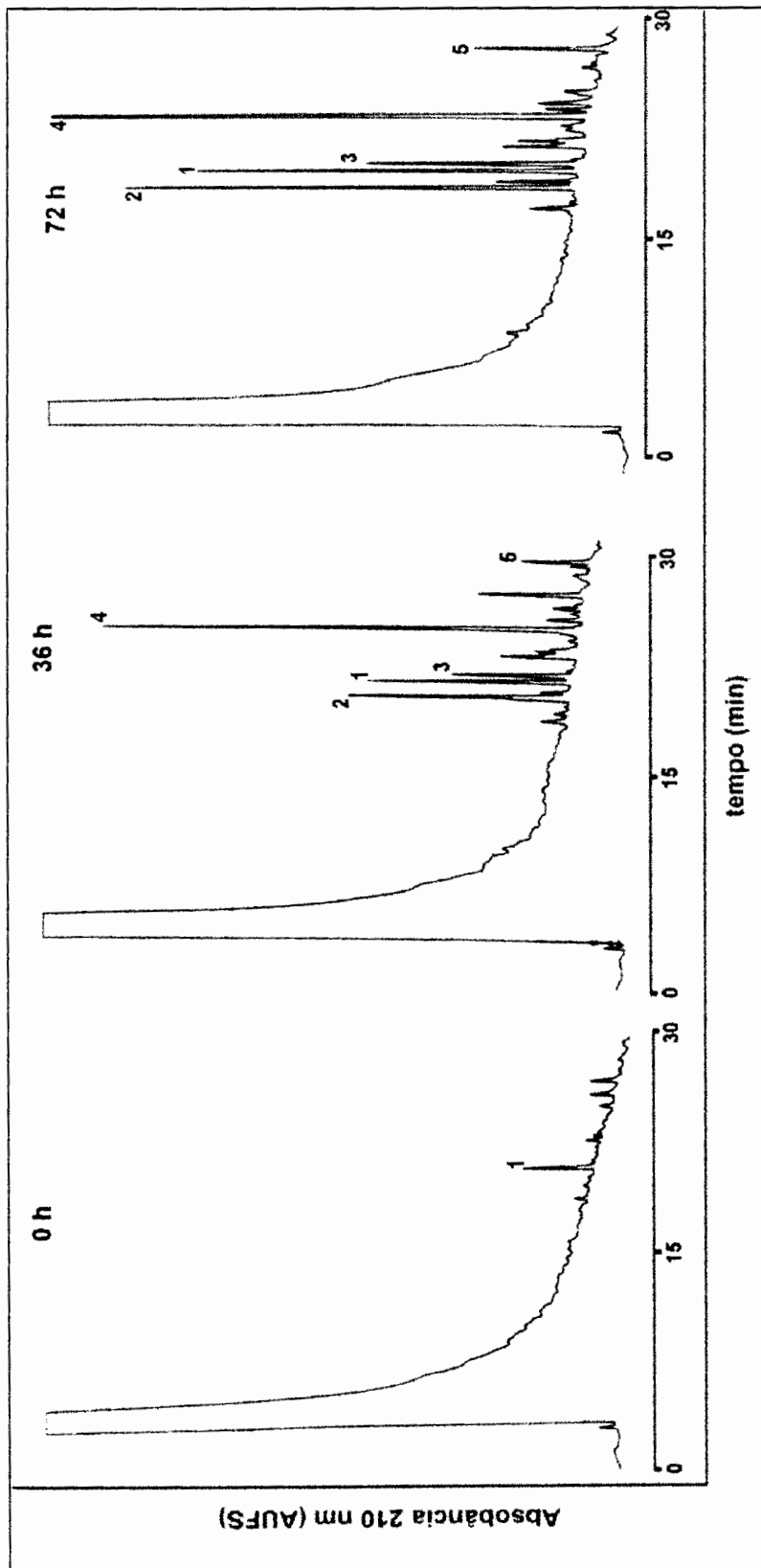


Figura 25: Perfis de RP-HPLC da etanólise de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR em DMSO na presença de Ca(OAc)₂. 1 = proveniente do meio reacional; 2, 3 e 5 = produtos secundários; 4 = Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-OEt. Condição de monitoramento: coluna: Vydac C₁₈, 5 µm, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1%TFA/H₂O; solvente B: 60% ACN em 0,09% TFA/H₂O; gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min, fluxo: 1mL/min; λ: 210 nm; volume de injeção: 10 µL.

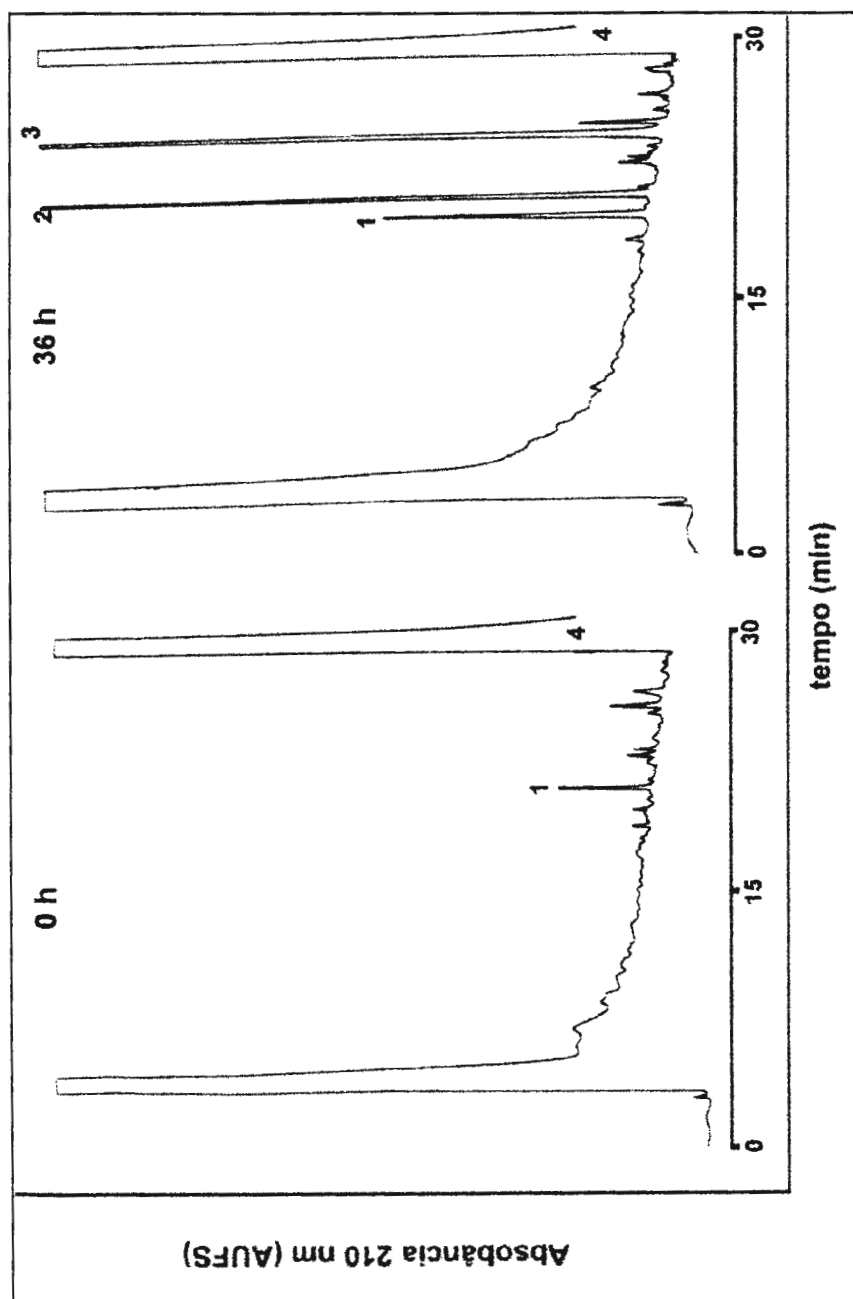


Figura 26: Perfis de RP-HPLC da etanólise de Ac-Ala-Gly-Lys(2-CI-Z)-KOR em 25% DMSO/tolueno na presença de Ca(OAc)₂. 1 e 2 = provenientes do meio reacional; 3 = Ac-Ala-Gly-Lys(2-CI-Z)-OEt; 4 = tolueno.

Condição de monitoramento: coluna: Vydac C₁₈, 5 μm, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1%TFA/H₂O; solvente B: 60% ACN em 0,09% TFA/H₂O; gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min, fluxo: 1mL/min; λ: 210 nm; volume de injeção: 10 μL.

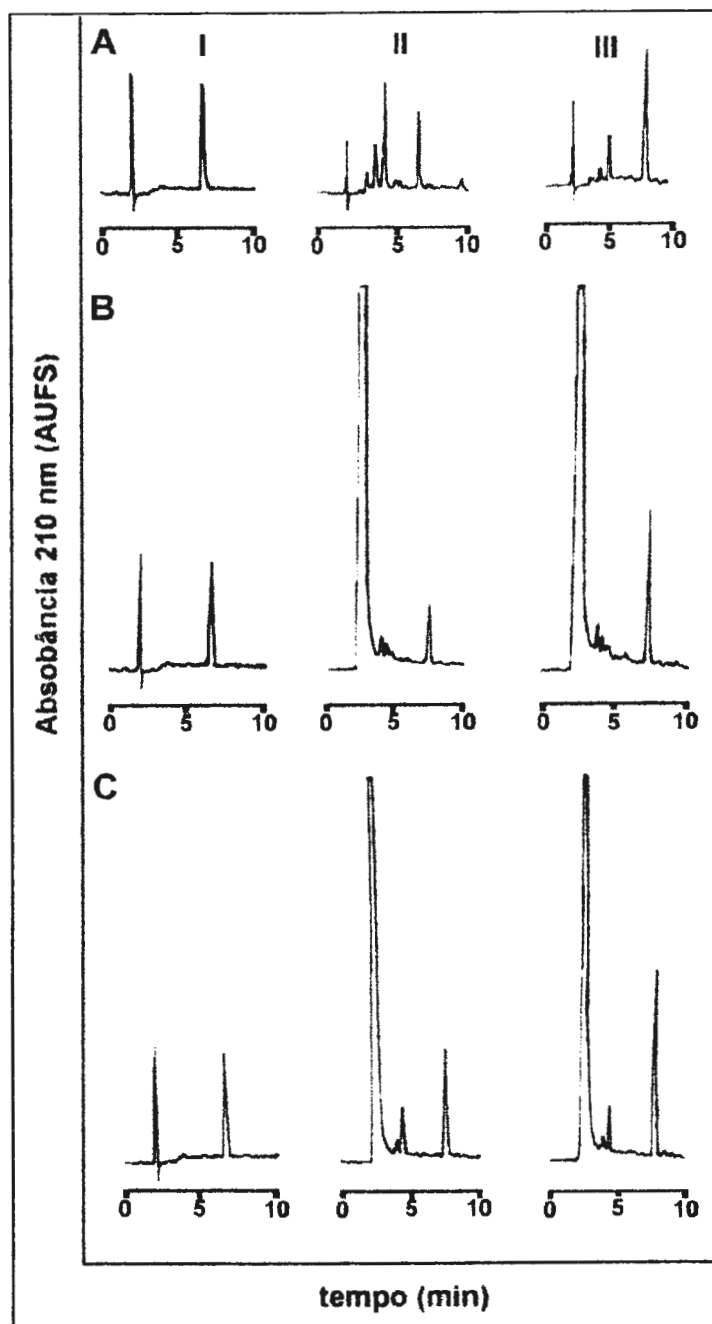


Figura 27: Perfis de RP-HPLC da coeluição de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)OEt padrão e as misturas reacionais da etanolise de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR em DCM (A), DMSO (B) e 25% DMSO/tolueno (C) na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$. I= Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)OEt padrão; II= mistura reacional; III= coeluição.

Condição de monitoramento: coluna: Vydac C_{18} , 5 μm , 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1% TFA/ H_2O ; solvente B: 60% ACN em 0,09% TFA/ H_2O ; condição isocrática: 60% de B, fluxo: 1 mL/min; λ : 210 nm.

2) Ampliar a aplicabilidade do nosso método de produção seletiva de peptídeos α -esterificados.

Além disso, tínhamos (e ainda temos) grande interesse em dispor de ésteres α -metílicos e etílicos desta seqüência, que é um fragmento da colecistocinina (CCK) humana.

A **Figura 28 (B e D)** mostra os perfis cromatográficos das reações de metanólise na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$. Estes demonstram a formação de produtos únicos e portanto, a não ocorrência de reações secundárias na metanólise estudada. Este resultado é valioso, pois a ocorrência de qualquer reação secundária caracterizaria desvantagem do procedimento por nós proposto. Como é possível observar, nas reações realizadas como controles, em ausência de aditivo não houve formação de produto (**Figura 28 A e C**), o que confirmou que o Ca^{2+} assiste a reação de metanólise em questão. Os produtos obtidos foram isolados e caracterizados por análise de aminoácidos e espectrometria de massas (ver **item 17**), demonstrando que eles eram os peptídeos esterificados desejados. A **Tabela 18** fornece os dados de quantificação destas reações interrompidas após 72 horas de incubação.

A **Tabela 19**, por outro lado, mostra os dados de quantificação obtidos a partir de reações realizadas com $\text{Ac-Ile-Ser}(\text{Bzl})\text{-Asp}(\text{OcHex})\text{-KOR}$ na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ e interrompidas após 6, 48 e 72 h. Como se observa, em 72 h o desligamento do peptídeo foi de 63%. Como se formou apenas um produto no meio reacional pode-se dizer que o rendimento da metanólise também foi de 63% (**Figura 29**).

Investigamos também a metanólise de $\text{Ac-Ile-Ser}(\text{Bzl})\text{-Asp}(\text{OcHex})\text{-KOR}$ (**PRIIId**) na ausência e presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ em CHCl_3 e DMSO e os comparamos com os obtidos em DCM. Os resultados obtidos estão mostrados nas **Figuras 30 e 31** e na **Tabela 20**. Estes mostraram que os rendimentos de metanólise em DCM e CHCl_3 foram bastante semelhantes (\approx 53% em 48 h e 63% em 72 h), porém inferiores àqueles obtidos em DMSO (85% em 48 h e 100% em 72 h). Independentemente do solvente utilizado, não ocorreu a formação de qualquer produto secundário nestas metanólises.

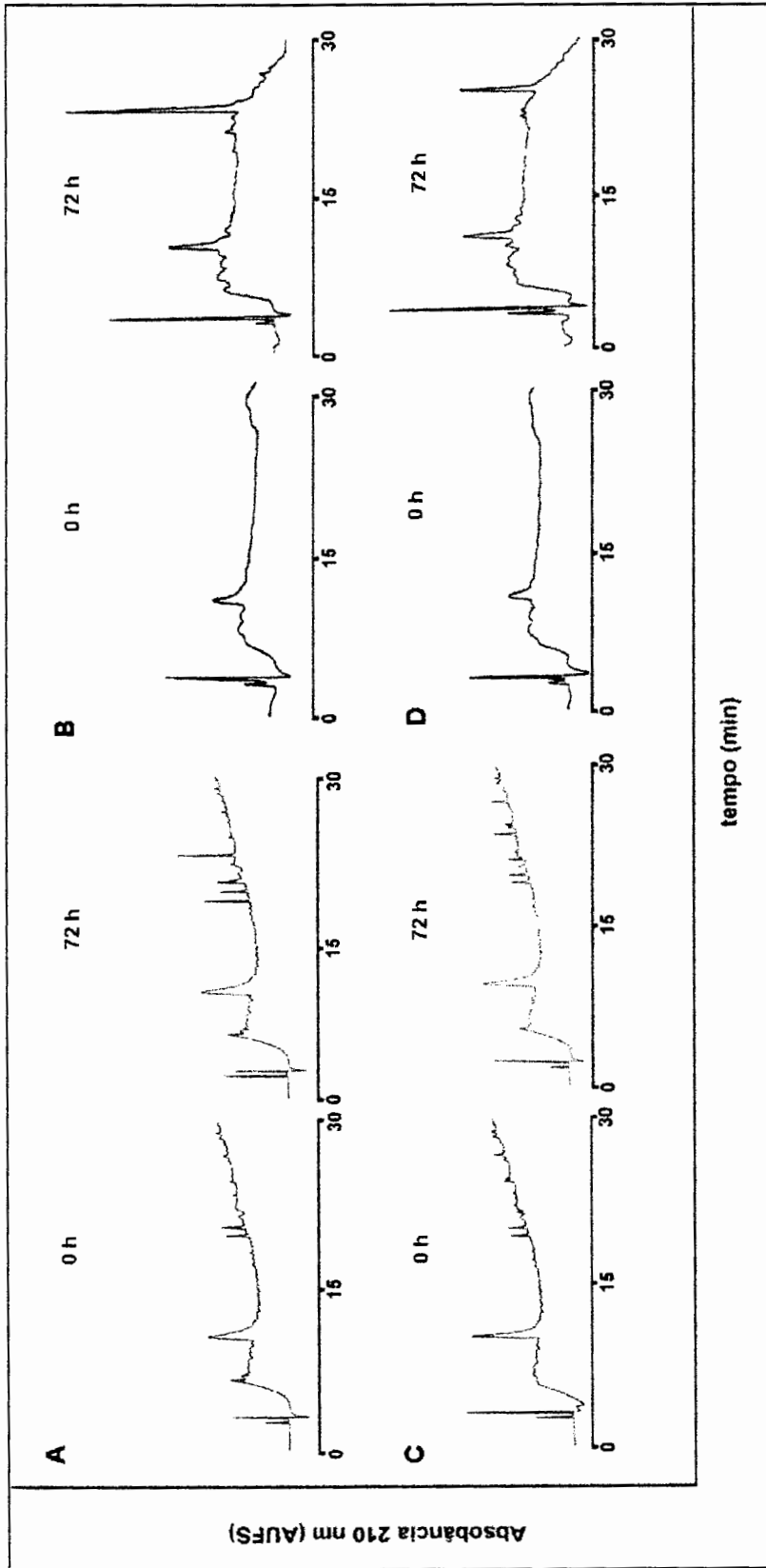


Figura 28: Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-KOR e Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DCM na ausência (A e C) e presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (B e D), respectivamente. a: Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-OMe; b: Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-OMe.

Condição de monitoramento: coluna: Vydac C_{18} , 5 μm , 300 \AA , 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1%TFA/ H_2O ; solvente B: 60% ACN em 0,09% TFA/ H_2O ; gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min; λ : 210 nm.

Estes resultados confirmam a especificidade desta reação à ligação oxima e demonstram a eficiência do DMSO como solvente.

Tabela 18: Metanólise de Ac-Ile-Ser-(Bzl)-Asp-(OZ)-KOR [onde, Z= cHex (PRIIIa) ou Bzl (PRIIIb)] assistida por Ca²⁺

Z (GS _i ; mmol/g)	Aditivo	GS _f mmol/g	Desligamento peptídeo-KOR (%)
cHex	Ca(OAc) ₂	0,16	44
(0,29)	-	0,29	0
Bzl	Ca(OAc) ₂	0,12	54
(0,27)	-	0,27	0

GS_i e GS_f: grau de substituição inicial e final do peptidil-KOR

Condição experimental: peptidil-resina: 100 mg; solvente: 2,0 mL DCM e 0,5 mL MeOH; Ca(OAc)₂: 63 μmol; temperatura: 37 °C; agitação orbital: 300 rpm. As reações foram monitoradas por RP-HPLC analítica durante um período de 72h. **Condição de monitoramento:** coluna: Vydac C₁₈, 5 μm, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1% TFA/H₂O; solvente B: 90% ACN em 0,09%TFA/H₂O; fluxo: 1 mL/min; gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min; λ: 210 nm.

Tabela 19: Metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRIIIc, GS_i= 0,32 mmol/g)

GS _f (mmol/g) tempo			Desligamento peptídeo-KOR (%) tempo		
6 h	48 h	72 h	6 h	48 h	72 h
0,24	0,17	0,12	25	47	63

GS_i e GS_f: grau de substituição inicial e final do peptidil-KOR

Condição experimental: peptídeo: 35 μmol; solvente: 2,0 mL DCM e 0,5mL MeOH; Ca(OAc)₂: 63 μmol; temperatura: 37 °C; agitação orbital: 300 rpm. As reações foram monitoradas por RP-HPLC analítica. **Condição de monitoramento:** coluna: Vydac C₁₈ 5μm, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1%TFA/H₂O; solvente B: 60 %ACN em 0,09%TFA/H₂O; gradiente linear: 5 a 95 % de B em 30 minutos; λ: 210 nm.

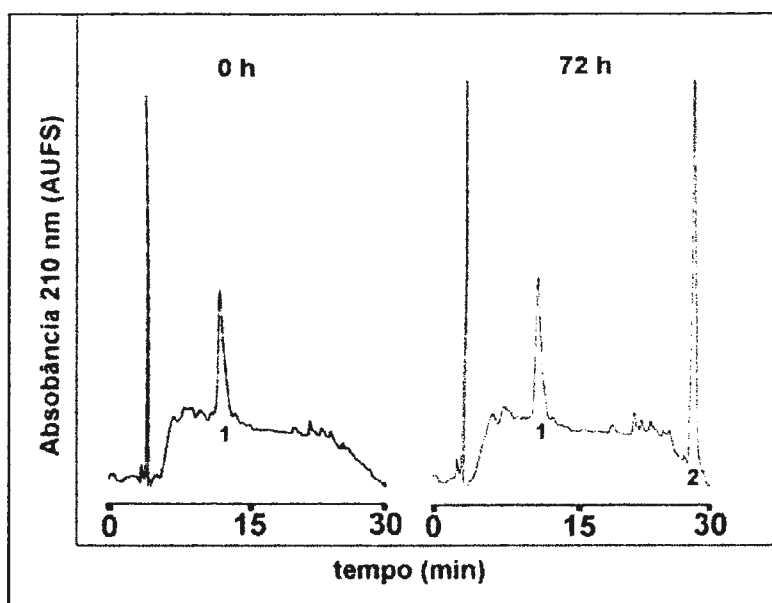


Figura 29: Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DCM na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$. 1= proveniente de DCM; 2= produto.

Condição de monitoramento: coluna: Vydac C_{18} , 5 μm , 300 \AA 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1% TFA/ H_2O ; solvente B: 60% ACN em 0,09% TFA/ H_2O ; gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min; λ : 210 nm.

Tabela 20: Metanólise da resina Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PR11ld, $\text{GS}_i = 0,30$ mmol/g) em diferentes solventes na ausência e presença de Ca^{2+}

Solvente	Aditivo	Tempo (horas)	GS_f (mmol/g)	Desligamento peptídeo-KOR (%)
DCM	$\text{Ca}(\text{OAc})_2$	-	0,24	20
		6	0,20	33
		48	0,14	53
		72	0,11	63
CHCl_3	$\text{Ca}(\text{OAc})_2$	-	0,20	33
		6	0,16	47
		48	0,13	57
		72	0,11	63
DMSO	$\text{Ca}(\text{OAc})_2$	-	0,24	20
		6	0,18	40
		48	0,04	85
		72	0	100

GS_i e GS_f : graus de substituição inicial e final do peptídeo-KOR

Condição experimental: peptídeo: 17,5 μmol ; solvente: 1,0 mL; metanol: 0,25 mL; $\text{Ca}(\text{OAc})_2$: 31,6 μmol ; temperatura: 37 $^\circ\text{C}$; agitação orbital: 300 rpm. As reações foram monitoradas por RP-HPLC analítica. **Condição de monitoramento:** coluna: Vydac C_{18} , 5 μm , 300 \AA , 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1% TFA/ H_2O ; solvente B: 90% ACN em 0,09% TFA/ H_2O ; fluxo: 1 mL/min; gradiente linear: 5 a 95%B em 30 min; λ : 210 nm.

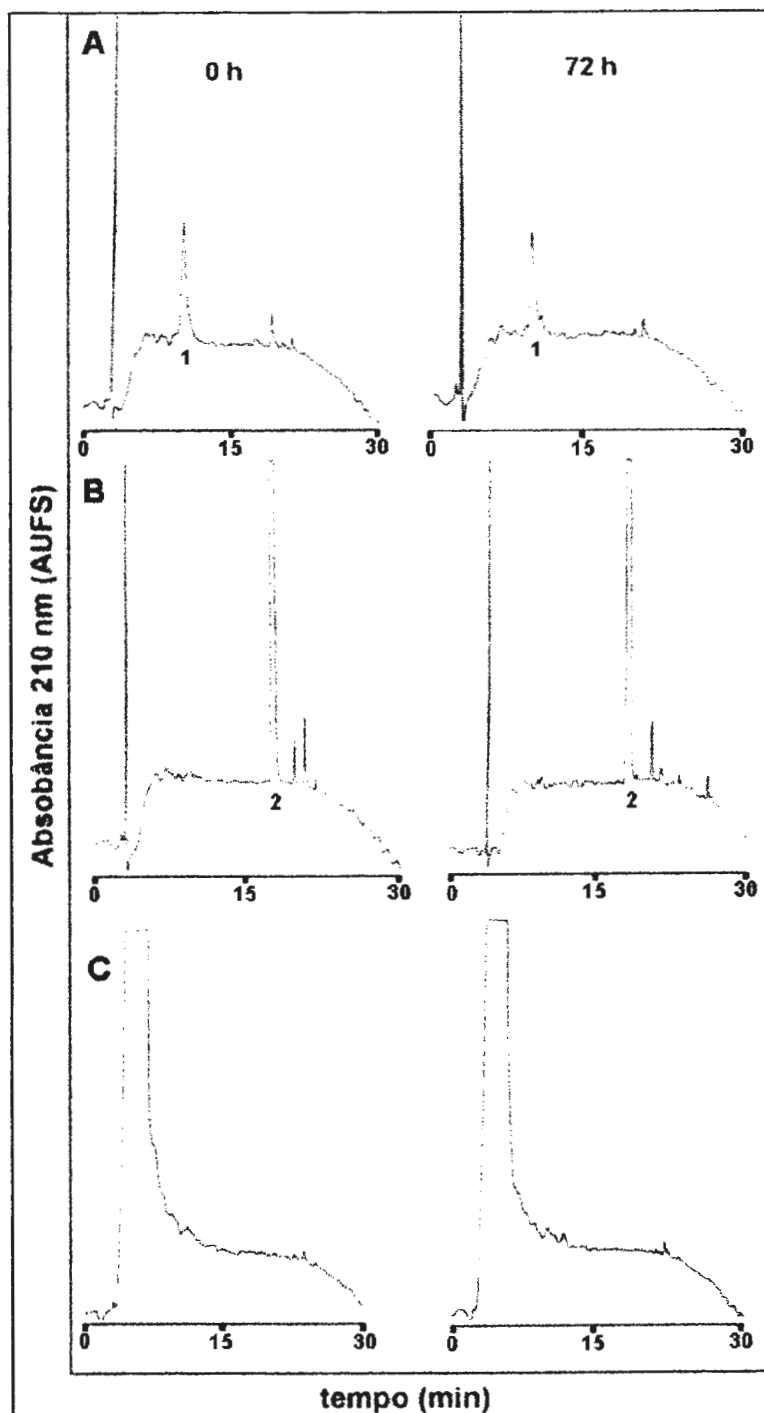


Figura 30: Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DCM (A), CHCl₃ (B) e DMSO (C). 1= proveniente do DCM; 2= proveniente do CHCl₃.

Condição de monitoramento: coluna: Vydac C₁₈, 5 μm, 300 Å 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1%TFA/H₂O; solvente B: 60% ACN/H₂O contendo 0,09% TFA; gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min, fluxo: 1mL/min; λ: 210 nm.

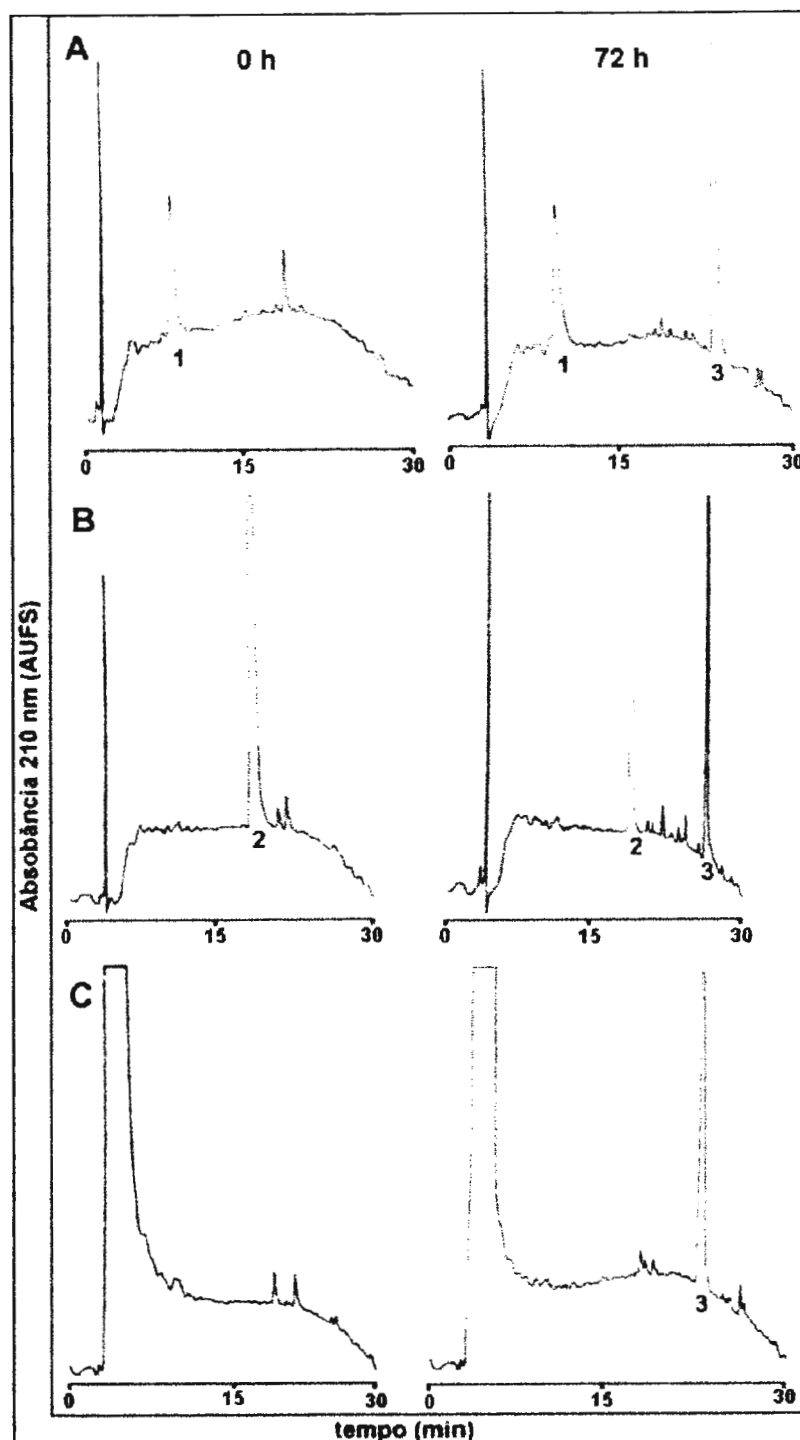


Figura 31: Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DCM (A), CHCl_3 (B) e DMSO (C) na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$. 1= proveniente do DCM; 2= proveniente do CHCl_3 ; 3= produto.

Condição de monitoramento: coluna: Vydac C_{18} , 5 μm , 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1% TFA/ H_2O ; solvente B: 60% ACN em 0,09% TFA/ H_2O ; gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min; λ : 210 nm.

6. Influência da quantidade de Ca^{2+} sobre a eficiência de metanólise de peptidil-KOR.

Finalmente, investigamos se o excesso molar dos íons cálcio seria ou não necessário para a ocorrência das solvólises assistidas por eles. Metanólises de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR (PRIIIe) que foram realizadas em mistura DCM/MeOH na proporção molar de 2:1 e 1:1 de íon cálcio: peptídeo. Estas misturas produziram unicamente os produtos esterificados desejados, na presença de Ca^{2+} . Os rendimentos de desligamento da KOR, como pode ser observado na **Tabela 21**, foram superiores a 90% (na ausência de Ca^{2+} o rendimento foi de apenas 7%), revelando que o excesso molar não é necessário. Rendimentos menores foram obtidos quando a metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR foi realizada na relação molar peptídeo: Ca^{2+} foi de 1:0,1 (61% de desligamento). As **Figuras 32 e 33** mostram os perfis de RP-HPLC obtidos para estas reações.

Tabela 21: Metanólise de Ac-peptidil-KOR assistida pelos íons Ca^{2+}

Peptidil-KOR [Lote; GS_i (mmol/g)]	Aditivo (ion: peptídeo)	GS_f (mmol/g)	Desligamento peptídeo-KOR (%)
Ac-Ala-Gly-Lys-(2-Cl-Z)- (PRIIIe, 0,43)	-	0,40	7
	$\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (1:1)	0,02	95
	$\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (2:1)	0,01	97
Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)- (PRIIIId, 0,30)	$\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (0,1:1)	0,12	61

GS_i e GS_f : graus de substituição inicial e final do peptidil-KOR

Condição experimental: peptídeo: 35 μmol ; solvente: 2,0 mL DCM e 0,5 mL metanol; $\text{Ca}(\text{OAc})_2$: 35 μmol , 63 ou 35 μmol ; temperatura: 37°C; agitação orbital: 300 rpm. As reações foram monitoradas por RP-HPLC analítica durante um período de 72h. Condição de monitoramento: coluna: Vydac C_{18} , 5 μm , 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1% TFA/ H_2O ; solvente B: 60% ACN em 0,09% TFA/ H_2O ; solvente C: 90% ACN em 0,09% TFA/ H_2O ; fluxo: 1 mL/min; gradiente linear: 5 a 95%B em 30 min e 5 a 95%C em 30 min; λ : 210 nm.

7. Metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-KOR (PRIVa) assistida pelo Ca^{2+}

Uma vez que o método de preparação de ésteres de peptídeos protegidos a partir de solvólise e de peptidil-KOR assistidas por Ca^{2+} havia se mostrado viável e aplicável a peptídeos contendo Gly, Ala, Phe, Lys(2-Cl-

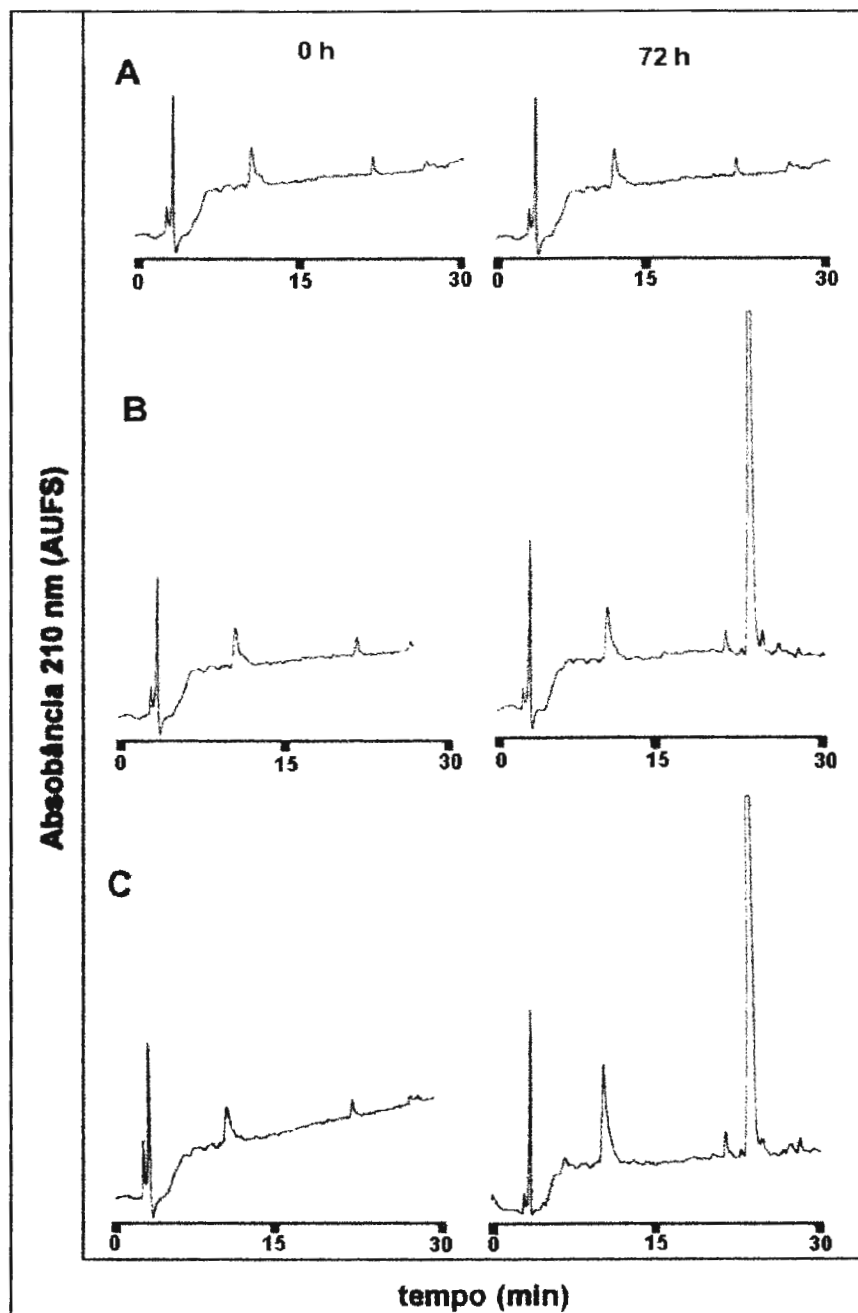


Figura 32: Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR em DCM na ausência de aditivo (A), na presença de 35 μmol de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (B) ou de 63 μmol de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$.

Condição de monitoramento: *coluna:* Vydac C_{18} , 5 μm , 300 \AA , 0,46 cm x 25,0 cm; *solvente A:* 0,1% TFA/ H_2O ; *solvente B:* 60% ACN em 0,09% TFA/ H_2O ; *gradiente linear:* 5 a 95% de B em 30 min, *fluxo:* 1 mL/min; λ : 210 nm.

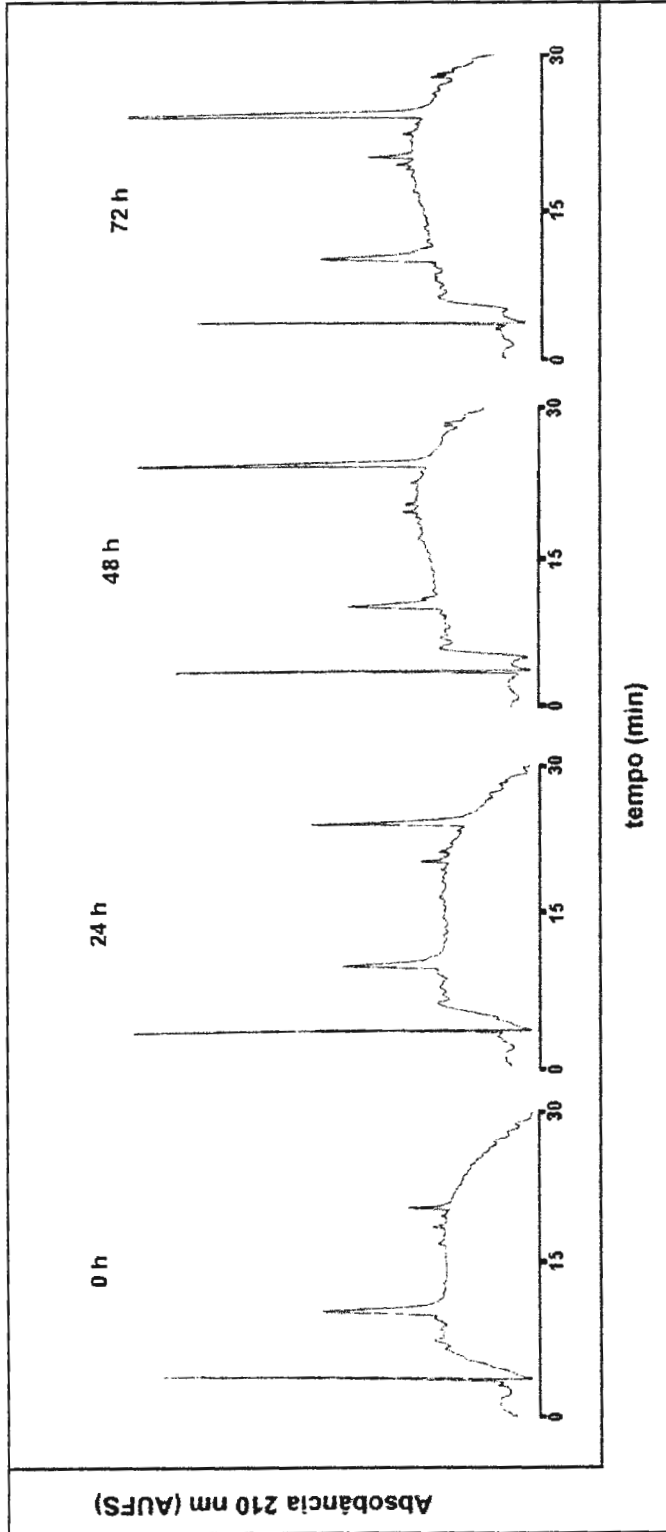


Figura 33: Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DCM na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (1,0 peptídeo:0,1 Ca^{2+}).

Condição de monitoramento: *coluna*: Vydac C_{18} , 5 μm , 300 \AA , 0,46 cm x 25,0 cm; *solvente A*: 0,1% TFA/ H_2O ; *solvente B*: 60% ACN contendo 0,09% TFA/ H_2O ; *gradiente linear*: 5 a 95% de B em 30 min, *fluxo*: 1 mL/min; λ : 210 nm.

Z), Asp(OBzl) ou Asp(OcHex) (Moraes, *et al.*, 1999; 2000), nos propusemos a ampliar o mesmo a outro fragmento da CCK: um tetrapeptídeo que contém arginina como resíduo C-terminal.

Inicialmente, realizamos a metanólise em DCM na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$. O monitoramento por RP-HPLC da incubação forneceu os resultados mostrados na **Figura 34**. Como se pode observar, um produto solúvel foi sendo formado no meio reacional. A confirmação de que este era o Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-OMe desejado foi conseguida através da análise do material isolado e purificado (**Figura 35**). Estes resultados mostram, portanto, que o íon Ca^{2+} também é capaz de assistir a metanólise de peptidil-KOR contendo arginina na posição C-terminal. Em outras palavras, nosso procedimento de metanólise também é aplicável a este tipo de seqüência peptídica.

A seguir investigamos a possibilidade de etanólise e benzólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-KOR em DCM em presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$.

A **Figura 36** mostra os perfis cromatográficos obtidos por RP-HPLC. Como se pode observar, em cada meio reacional houve a formação de apenas um produto. A **Figura 37** apresenta os perfis dos produtos obtidos após purificação por RP-HPLC. Ambos foram analisados por espectrometria de massas. Os dados obtidos (**Figura 38**) mostraram apenas os picos íons moleculares correspondentes ao carbocátion Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)C=O⁺, ou seja, houve perda dos OEt e OBzl ($M^+ = 906$). Os outros picos correspondem a $M+H^+$ (907) e $M+Na^+$ (929 ou 930). Em outras palavras, não detectamos o pico íon molecular correspondente à molécula íntegra. Os dados de análise de aminoácidos mostraram a presença de todos os aminoácidos esperados, estando os valores obtidos em acordo com os valores calculados (ver **item 17**). Tais resultados nos fizeram levantar a hipótese de que fragmentação inesperada possa ter ocorrido na análise dos compostos esterificados por ES-MS.

A análise das peptidil-resinas residuais após as solvólises de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-KOR discutidas anteriormente forneceram os dados da **Tabela 22**.

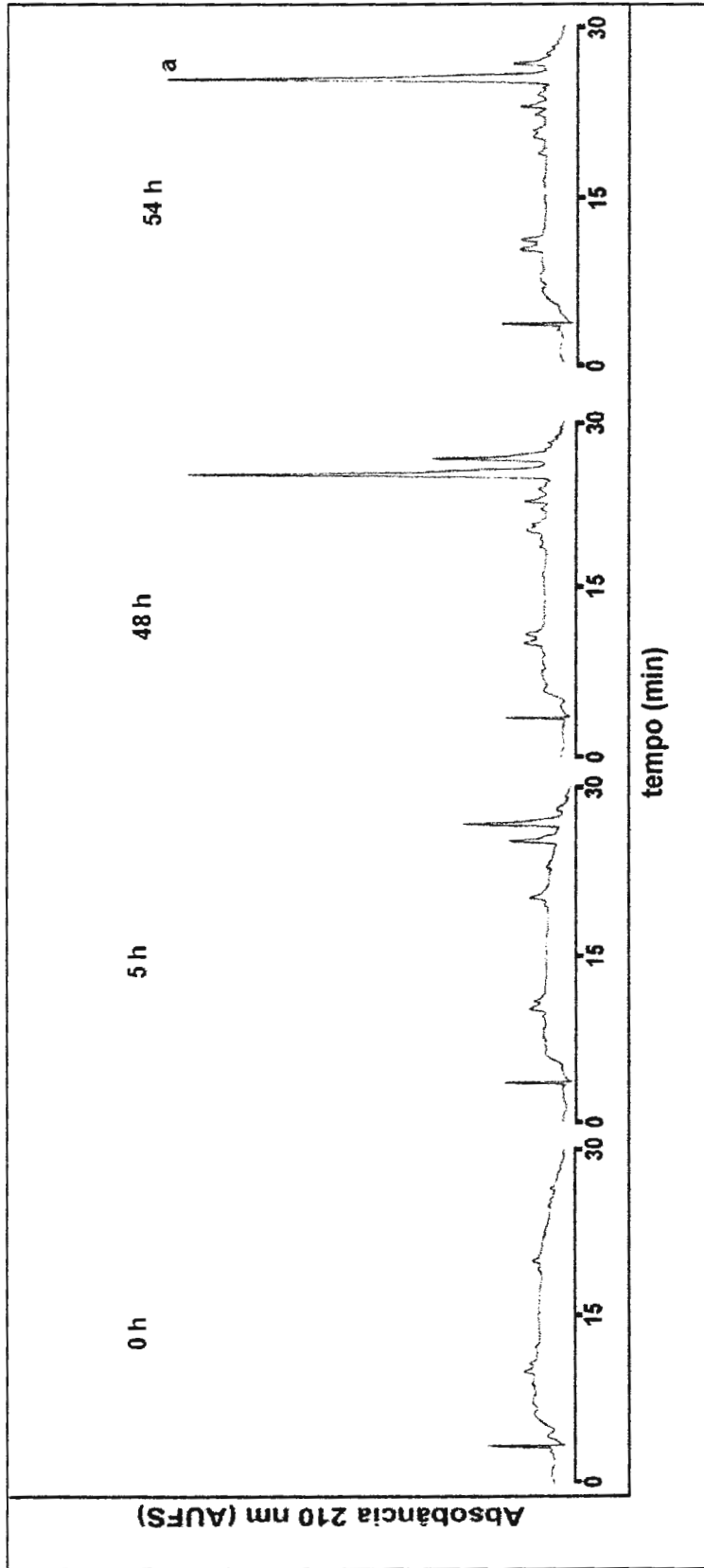


Figura 34: Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Arg(Mtr)-KOR em DCM na presença de Ca(OAc)₂. a = Ac-Ile-Ser(Bzl)-Arg(Mtr)-OMe.

Condição de monitoramento: coluna: Vydac C₁₈, 5 µm, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1%TFA/H₂O; solvente B: 60% ACN em 0,09% TFA/H₂O; gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min, fluxo: 1mL/min; λ: 210 nm.

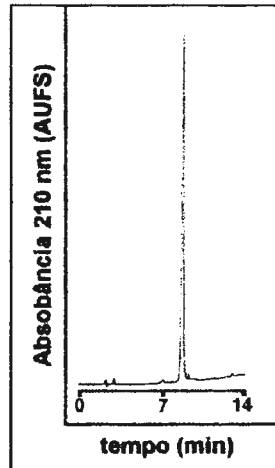


Figura 35: Perfil de RP-HPLC do produto purificado da reação de metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-KOR em DCM na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$.

Condição de monitoramento: *coluna:* Vydac C_{18} , 5 μm , 300 \AA , 0,46 cm x 25,0 cm; *solvente A:* 0,1% TFA/ H_2O ; *solvente B:* 60% ACN em 0,09% TFA/ H_2O ; *gradiente linear:* 5 a 95% de B em 30 min, *fluxo:* 1 mL/min; λ : 210 nm.

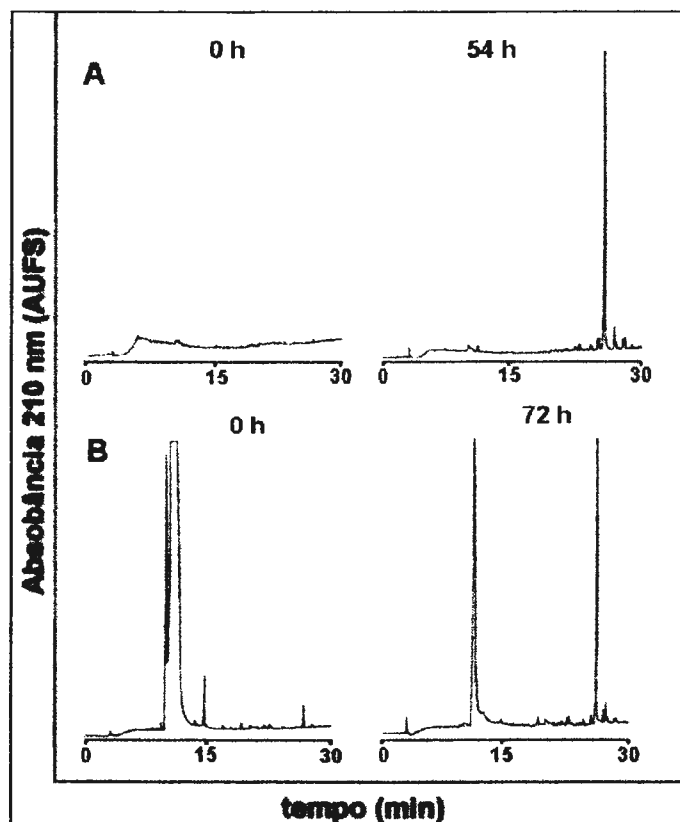


Figura 36: Perfis de RP-HPLC da etanolise (A) e benzólise (B) de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-KOR em DCM na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$.

Condição de monitoramento: *coluna:* Vydac C_{18} , 5 μm , 300 \AA , 0,46 cm x 25,0 cm; *solvente A:* 0,1% TFA/ H_2O ; *solvente B:* 60% ACN em 0,09% TFA/ H_2O ; *gradiente linear:* 5 a 95% de B em 30 min, *fluxo:* 1 mL/min; λ : 210 nm.

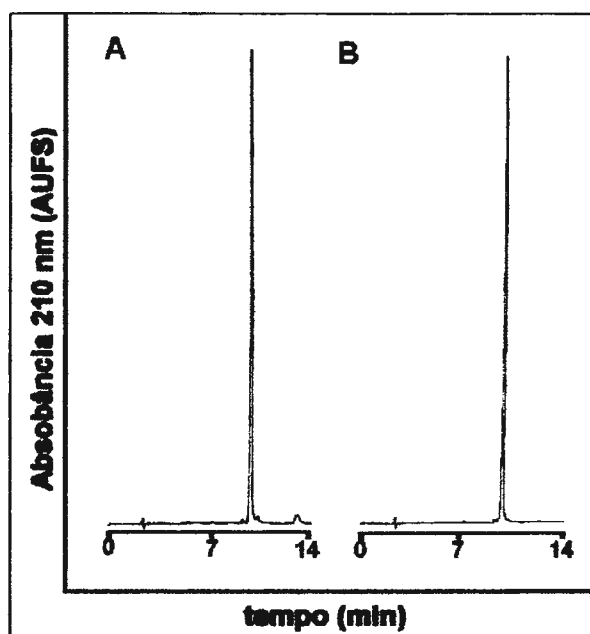


Figura 37: Perfis de RP-HPLC dos produtos purificados das reações de etanolólise (A) e benzólise (B) de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-KOR em DCM na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$.

Condição de monitoramento: coluna: Vydac C_{18} , 5 μm , 300 \AA , 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1% TFA/ H_2O ; solvente B: 60% ACN em 0,09% TFA/ H_2O ; gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min; λ : 210 nm.

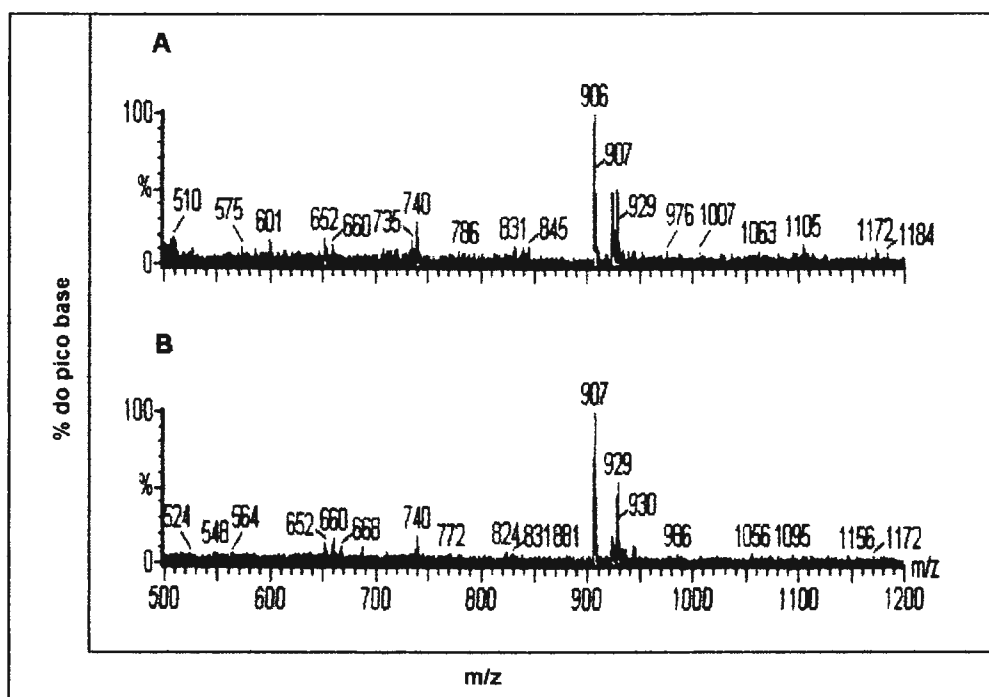


Figura 38: Espectros de massas (ES-MS) dos produtos obtidos na solvólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-KOR em DCM na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$. (A) etanolólise e (B) benzólise.

Tabela 22: Solvólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)-KOR (PRIVa, GS_i= 0,35 mmol/g) assistida por Ca²⁺

Nucleófilo	Tempo (h)	GS _f (mmol/g)	Rendimento de clivagem (%)
MeOH	96	0,04	84
EtOH	54	0,11	68
C ₆ H ₅ CH ₂ OH	72	0,14	60

GS_i e GS_f: graus de substituição inicial e final do peptidil-KOR

Condição experimental: *peptídeo*: 26,0 μmol; *solvente*: 1,0 mL DCM e 0,25 mL nucleófilo; *Ca(OAc)₂*: 63 μmol; *temperatura*: 37°C; *agitação orbital*: 300 rpm. A reação foi monitorada por RP-HPLC analítica.

Condição de monitoramento: *coluna*: Vydac C₁₈, 5 μm, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; *solvente A*: 0,1% TFA/H₂O; *solvente B*: 90% ACN em 0,09%TFA/H₂O; *fluxo*: 1mL/min; *gradiente linear*: 5 a 95%B em 30 min; *λ*: 210 nm.

8. Metanólise de peptidil-KOR assistida por Eu³⁺.

Devido às similaridades entre os íons lantanídicos e os metais alcalinos terrosos em termos das propriedades de coordenação e raio iônico (Ca²⁺: 1,06 Å; Ln³⁺: 1,06-0,85 Å), decidimos examinar a possibilidade do Eu³⁺ assistir reações de metanólise de peptidil-KOR. É conhecido que os íons lantanídicos são capazes de promover a hidrólise de ésteres alquílicos de aminoácidos (Takarada *et al.*, 1998) e transesterificação de *N*-aciloxazolidinonas (Fukuzawa & Hongo, 1998).

Inicialmente, realizamos a metanólise de Ac-Ala-Gly-Lys-(2-Cl-Z)-KOR usando a proporção molar Eu³⁺:peptídeo de 2:1. Esta, seletivamente forneceu o éster desejado. O rendimento de desligamento da resina foi comparável aos obtidos em presença de Ca²⁺ (> 80%, **Tabela 23**). Este foi um achado importante por duas razões: 1) sugeriu que a complexação do Eu³⁺ com os oxigênios doadores presentes na peptidil-KOR, tais como as carbonilas dos aminoácidos e oxigênios da ligação oxima, deve ocorrer e facilitar as solvólises observadas; 2) Eu³⁺ é um substituto luminescente do Ca²⁺ (Elbanowski & Makowska, 1996), o que pode ser muito útil nas investigações espectroscópicas de reações assistidas por este íon.

Em seguida, investigamos também se o excesso molar do íon európio seria ou não necessário para a ocorrência eficiente das metanólises de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR. Na proporção molar de 1 Eu³⁺: 1 peptídeo, a reação produziu unicamente o peptídeo esterificado desejado com

rendimento superior a 90%, revelando que o excesso molar não era necessário.

A **Figura 39** mostra os perfis cromatográficos comparativos para as reações realizadas na presença de EuCl_3 . Quando analisados por RP-HPLC, os produtos obtidos nas metanólises de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR assistidas por EuCl_3 coeluíram com a amostra padrão de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-OMe.

A fim de confirmar a possibilidade de substituição total do Ca^{2+} por Eu^{3+} como aditivo das metanólises das peptidil-KOR, novas reações foram realizadas na presença de EuCl_3 . A possibilidade de ocorrência de transesterificação do éster benzílico da cadeia lateral do ácido aspártico observada em outros métodos (Pichette *et al.*, 1997) e inexistente no nosso foi investigada (Moraes *et al.*, 1999; 2000).

Os perfis de RP-HPLC da **Figura 40** mostram que assim como observado para o $\text{Ca}(\text{OAc})_2$, não houve a formação de produtos secundários durante a metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-KOR e Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR. Além disso, o rendimento da reação em presença de Eu^{3+} foi superior (74%) ao obtido em presença de Ca^{2+} (54%). Todos estes dados reafirmaram que o método por nós proposto é seletivo ao éster de oxima. A **Tabela 23** apresenta os rendimentos de clivagem obtidos nas metanólises de peptidil-KOR assistidas pelo Eu^{3+} .

Os dados obtidos após 6 e 48 h de reação indicam que a metanólise da Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR foi mais rápida do que para Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR. Em ambos os casos, entretanto, após 72 horas de reação, os peptídeos já haviam se desligado por completo da KOR (**Tabela 24**).

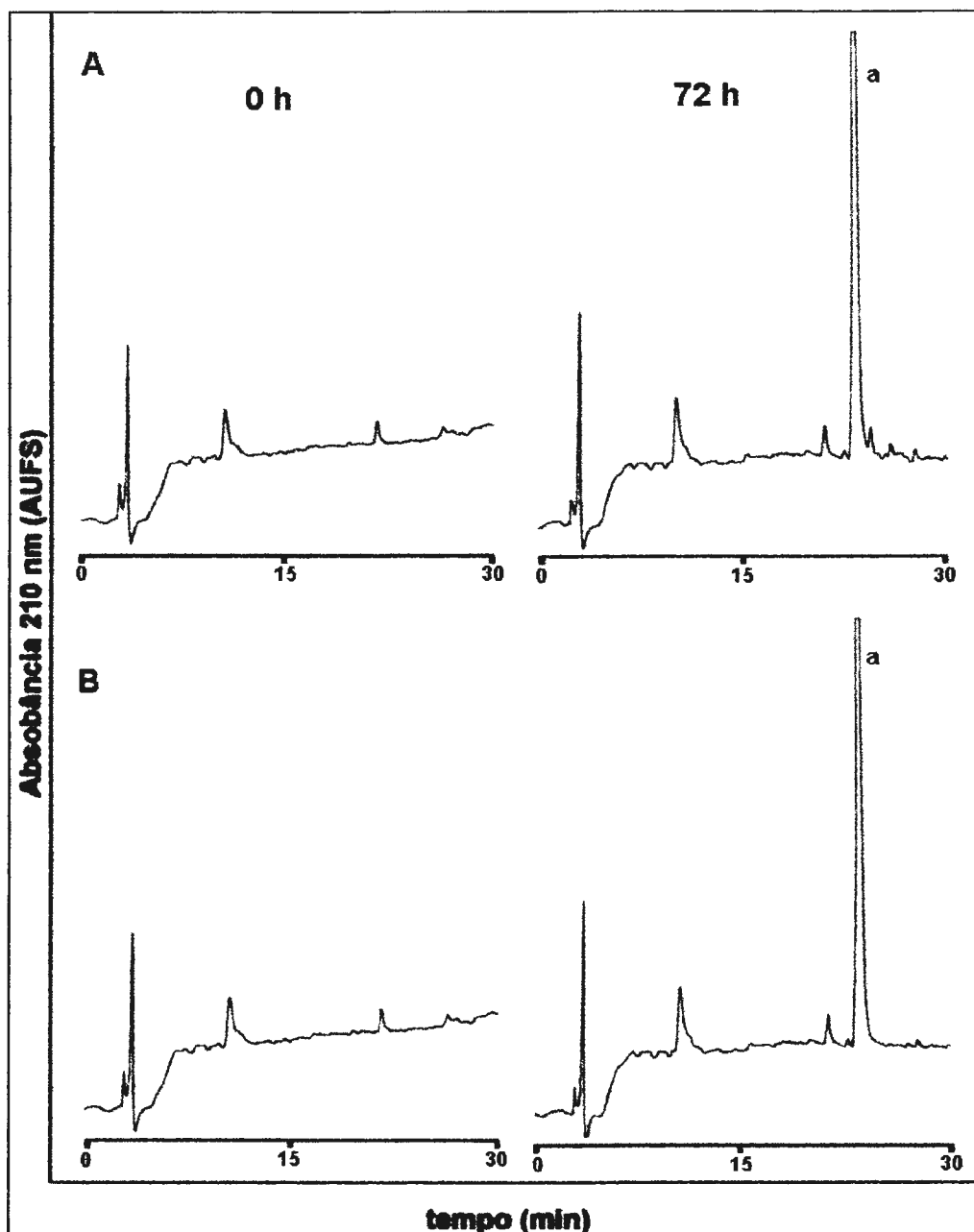


Figura 39: Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR em DCM na presença de 35 μmol (A) e 63 μmol (B) de EuCl_3 . a= Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-OMe.

Condição de monitoramento: coluna: Vydac C₁₈, 5 μm , 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1% TFA/H₂O; solvente B: 60% ACN em 0,09% TFA/H₂O; gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min; λ : 210 nm.

Tabela 23: Metanólise de Ac-peptidil-KOR assistida pelos íons Ca^{2+} e Eu^{3+}

Peptidil-KOR [lote; GS_i (mmol/g)]	Aditivo (ion: peptideo)	GS_f (mmol/g)]	Desligamento peptideo-KOR (%)
Ac-Ala-Gly-Lys-(2-Cl-Z)- (0,43)	-	0,40	7
	EuCl_3 (1:1)	0	100
	EuCl_3 (2:1)	0	100
Ac-Ile-Ser(Bzl)- Asp(OBzl)- (0,27)	EuCl_3 (2:1)	0,07	74
Ac-Ile-Ser(Bzl)- Asp(OcHex)- (0,32)	-	0,32	0
	EuCl_3 (2:1)	0	100

GS_i e GS_f : graus de substituição inicial e final do peptidil-KOR

Condição experimental: peptideo: 35 μmol ; solvente: 2,0 mL DCM e 0,5 mL metanol; EuCl_3 : 35 ou 63 μmol ; temperatura: 37°C; agitação orbital: 300 rpm. As reações foram monitoradas por RP-HPLC analítica durante um período de 72h.

Condição de monitoramento: coluna: Vydac C_{18} , 5 μm , 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1% TFA/ H_2O ; solvente B: 60% ACN em 0,09%TFA/ H_2O ; solvente C: 90% TFA/ H_2O contendo 0,09% TFA; fluxo: 1 mL/min; gradiente linear: 5 a 95%B em 30 min e 5 a 95%C em 30 min; λ : 210 nm; volume injetado: 10 μL .

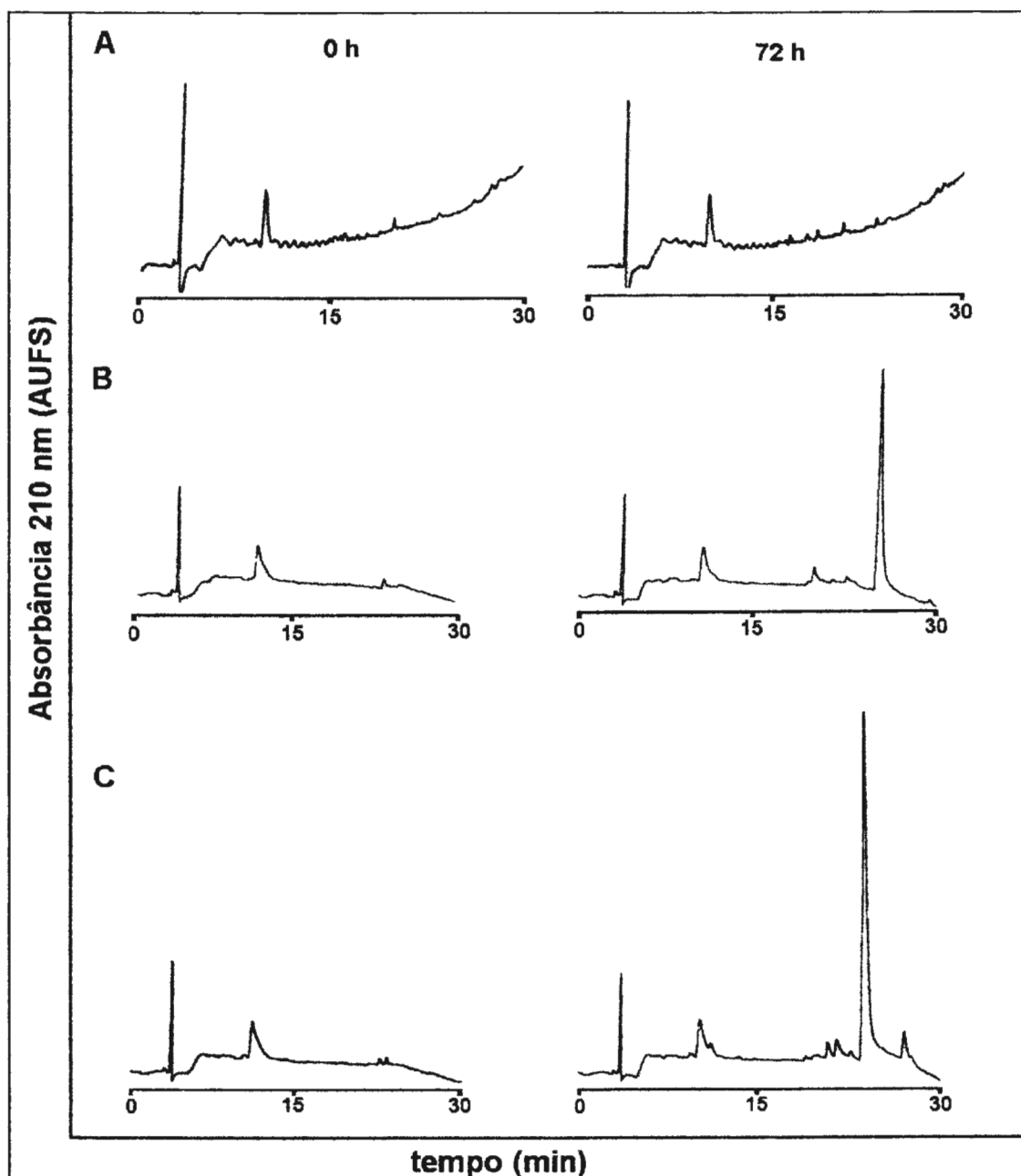


Figura 40: Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (A e C) e Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-KOR (B). Na ausência de aditivo (A) e na presença de EuCl_3 . (B e C).

Condição de monitoramento: *coluna:* Vydac C_{18} , 5 μm , 300 \AA , 0,46 cm x 25,0 cm; *solvente A:* 0,1% TFA/ H_2O ; *solvente B:* 90% ACN em 0,09% TFA/ H_2O ; *gradiente linear:* 5 a 95% de B em 30 min, *fluxo:* 1 mL/min; λ : 210 nm.

Tabela 24: Estudo comparativo da solvólise de peptidil-KOR em presença de Eu^{3+}

Peptidil-KOR (lote; GS _i , mmol)	Desligamento peptídeo-KOR (%)		
	6 h	48 h	72 h
Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)- (PRIIIe, 0,43)	72	96	100
Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)- (PRIIIc, 0,32)	22	95	100

GS_i e GS_f: graus de substituição inicial e final do peptidil-KOR

Condição Experimental: peptídeo: 35 μmol ; *solvente*: 2,0 mL de DCM e 0,5 mL de metanol; *EuCl*₃: 63 μmol ; *temperatura*: 37^oC; *agitação orbital*: 300 rpm. A reação foi monitorada por RP-HPLC durante um período de 72 h. Para a metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-oxima no tempo 48 horas, utilizou-se metade dos reagentes empregados nas outras metanólises, porém a proporção entre os mesmos foi mantida constante.

Condição de monitoramento: *coluna*: Vydac C₁₈, 5 μm , 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; *solvente A*: 0,1% TFA/H₂O; *solvente B*: 60% ACN em 0,09%TFA/H₂O; *solvente C*: 90% ACN em 0,09%TFA/H₂O; *gradiente linear*: 5 a 95 % B em 30 min; *fluxo*: 1 mL/min; λ : 210 nm.

9. Metanólise e etanólise comparativa de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex) em presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$, EuCl_3 e TbCl_3 .

Em paralelo, realizamos também uma análise comparativa das reações de metanólise e etanólise da peptidil-resina Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR assistidas por Ca^{2+} , Eu^{3+} ou Tb^{3+} em DCM (um bom solvente para o inchamento da resina) e DMSO (um solvente aprótico capaz de dissolver bem os sais empregados). O objetivo era otimizar ainda mais estas reações.

Para tanto, a Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR foi resintetizada em grande escala de modo que este estudo comparativo pudesse ser realizado com um único lote de peptidil-KOR.

Os monitoramentos das incubações da Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em mistura de DCM/MeOH na ausência de aditivo, sendo que o produto foi detectado na presença dos íons Ca^{2+} , Eu^{3+} ou Tb^{3+} forneceram os resultados mostrados nas **Figuras 41 e 42**, respectivamente. Como se pode observar, um único produto foi formado em cada um dos meios reacionais testados. A confirmação de que este era o Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-OMe desejado foi conseguida através da análise do material purificado por espectrometria de massas e análises de aminoácidos do seu hidrolisado total. Esta última forneceu os graus de substituições mostrados

na **Tabela 25**, indicando que os rendimentos das metanólises em DCM foram superiores a 60%.

Estes resultados, portanto, evidenciaram que também o Tb^{3+} , uma outra sonda luminescente do Ca^{2+} , é capaz de assistir a metanólise da peptidil-KOR contendo o derivado Asp(OcHex) na posição C-terminal em DCM.

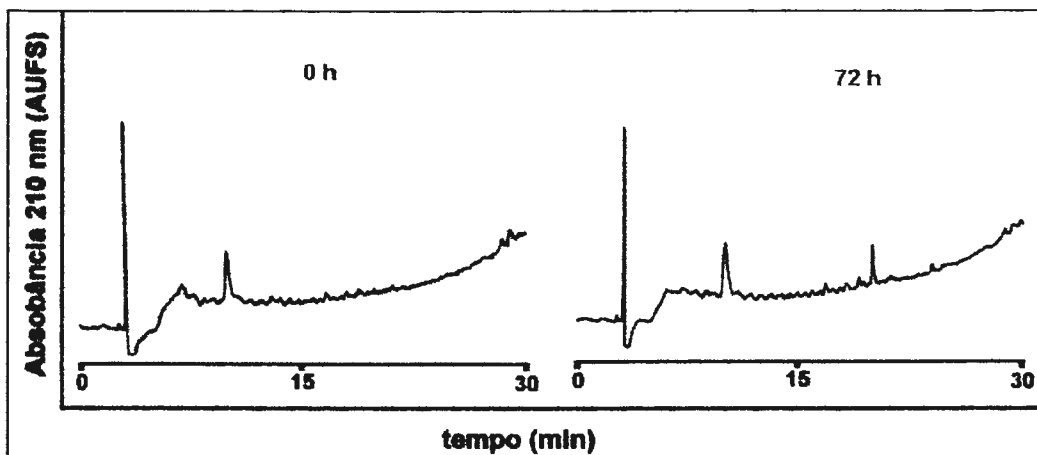


Figura 41: Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DCM na ausência de aditivos.

Condição de monitoramento: coluna: Vydac C₁₈, 5 μ m, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1% TFA/H₂O; solvente B: 90% ACN em 0,09% TFA/H₂O; gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min; λ : 210 nm.

Nas **Figuras 43 e 44** podemos observar que em DMSO, não houve formação do produto esperado na ausência de aditivo, sendo que o produto desejado foi detectado somente na reação assistida por Ca^{2+} . Tal resultado era esperado por nós já que estudos da literatura demonstram que os lantanídeos formam complexos estáveis com DMSO (Khan *et al.*, 1997).

A **Figura 45** mostra os perfis de RP-HPLC obtidos nos monitoramentos das etanólises da peptidil-KOR em DCM na presença dos íons Ca^{2+} , Eu^{3+} ou Tb^{3+} . Como se pode observar, novamente dois produtos solúveis foram formados na reação contendo Eu^{3+} . Um deles é o peptídeo α -esterificado (2); o outro um subproduto (1)^f. Quando o DCM foi substituído

^f Este subproduto não foi isolado e caracterizado.

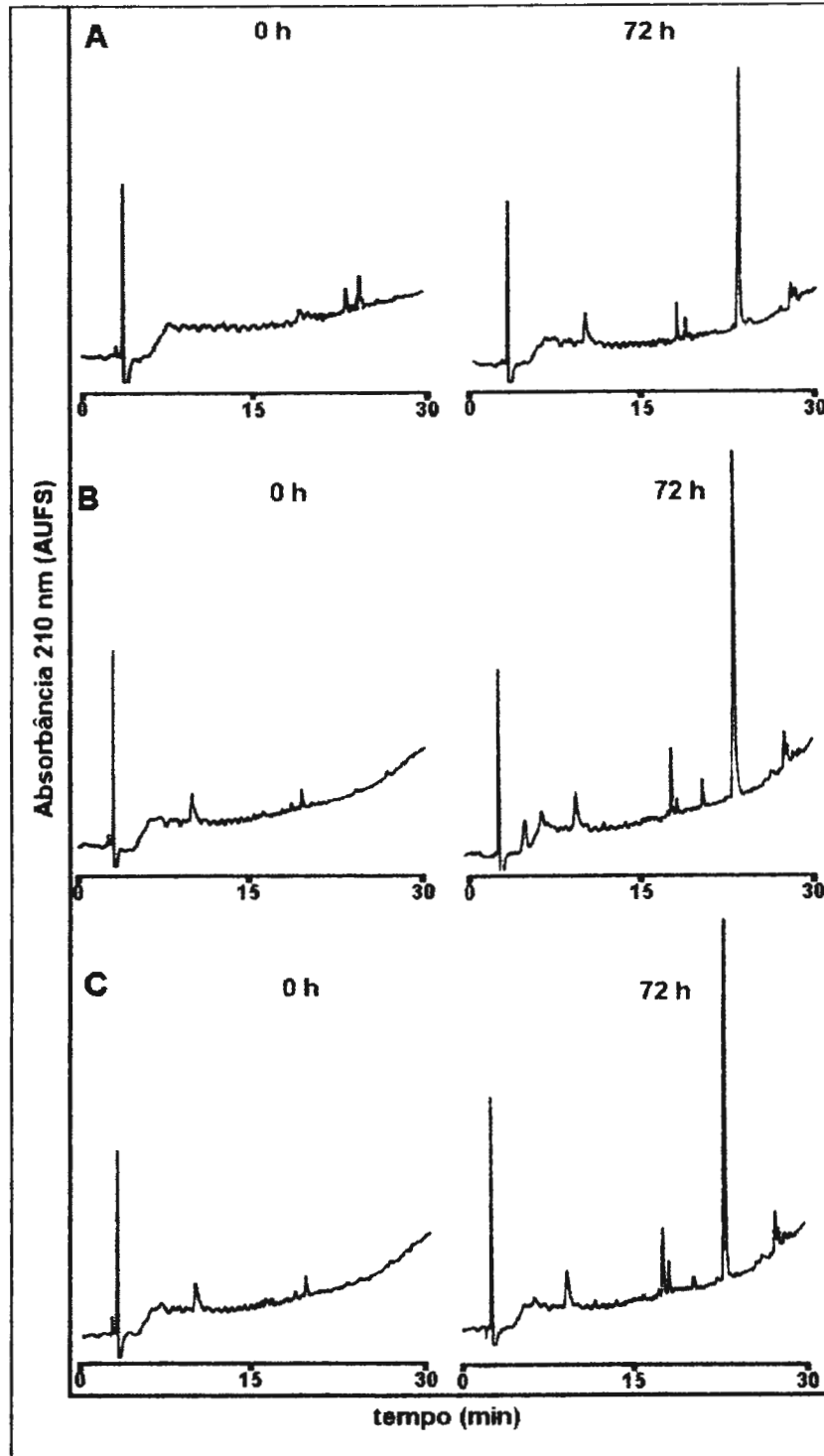


Figura 42: Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DCM na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (A), EuCl_3 (B) e TbCl_3 (C).

Condição de monitoramento: *coluna:* Vydac C_{18} , 5 μm , 300 \AA , 0,46 cm x 25,0 cm; *solvente A:* 0,1% TFA/ H_2O ; *solvente B:* 90% ACN em 0,09% TFA/ H_2O ; *gradiente linear:* 5 a 95% de B em 30 min, *fluxo:* 1 mL/min; λ : 210 nm.

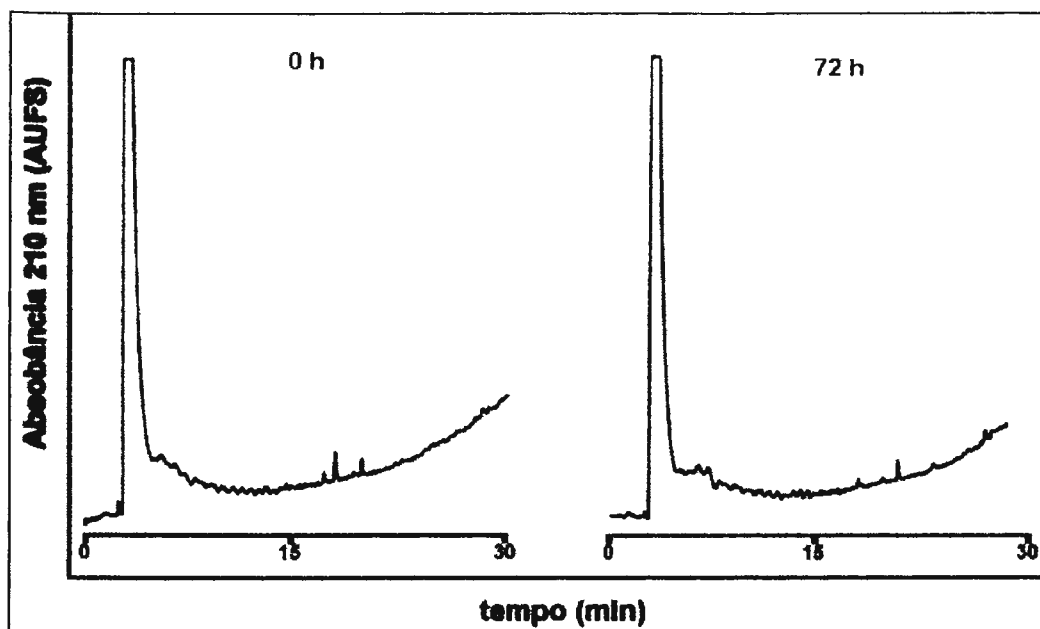


Figura 43: Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DMSO na ausência de aditivos.

Condição de monitoramento: coluna: Vydac C₁₈, 5 μm, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1% TFA/H₂O; solvente B: 90% ACN em 0,09% TFA/H₂O; gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min; λ: 210 nm.

pelo DMSO na presença dos íons Ca²⁺, Eu³⁺ ou Tb³⁺ houve, como esperado, formação de produto somente na reação assistida por Ca²⁺ (**Figura 46**). A caracterização do material isolado confirmou ser ele o Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-OEt. A **Figura 47** mostra os perfis de RP-HPLC obtidos nos monitoramentos das etanólises da peptidil-KOR em DCM e DMSO na ausência de aditivos.

Todos os dados quantitativos obtidos por análise de aminoácidos das peptidil-KOR residuais provenientes destas reações de solvólise discutidas acima estão expressos na **Tabela 25**. A superioridade da metanólise em relação a etanólise pode ser facilmente notada. Tal diferença pode estar relacionada a diversos fatores, tais como a nucleofilicidade dos álcoois empregados, solvatação da peptidil-KOR em questão, solubilidade dos sais utilizados como aditivos nos meios reacionais e até a eficiência de complexação dos íons ao peptidil-KOR nas condições experimentais empregadas.

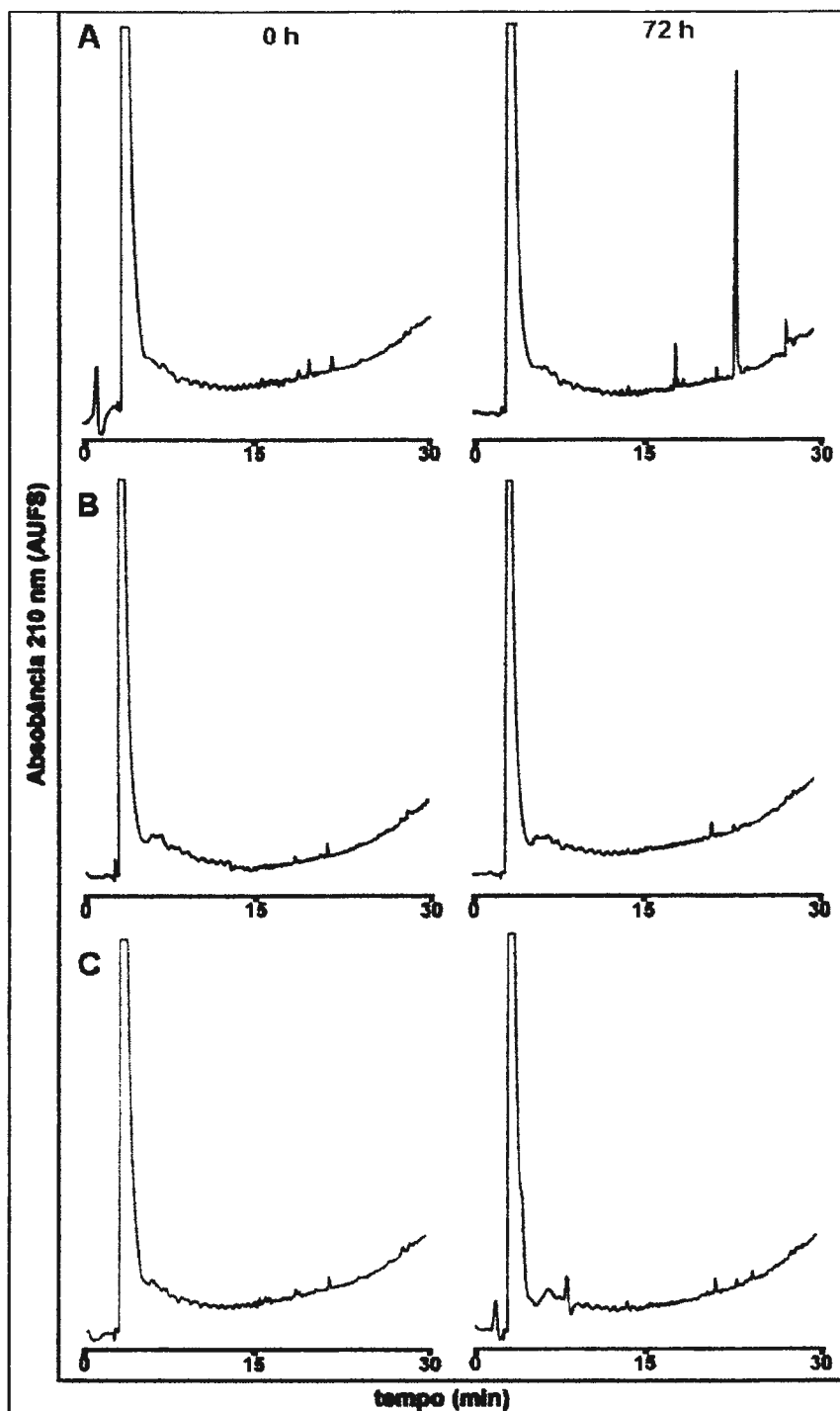


Figura 44: Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DMSO na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (A), EuCl_3 (B) e TbCl_3 (C).

Condição de monitoramento: *coluna:* Vydac C_{18} , 5 μm , 300 \AA , 0,46 cm x 25,0 cm.; *solvente A:* 0,1% TFA/ H_2O ; *solvente B:* 90% ACN em 0,09% TFA/ H_2O ; *gradiente linear:* 5 a 95% de B em 30 min, *fluxo:* 1 mL/min; λ : 210 nm; volume injetado: 10 μL .

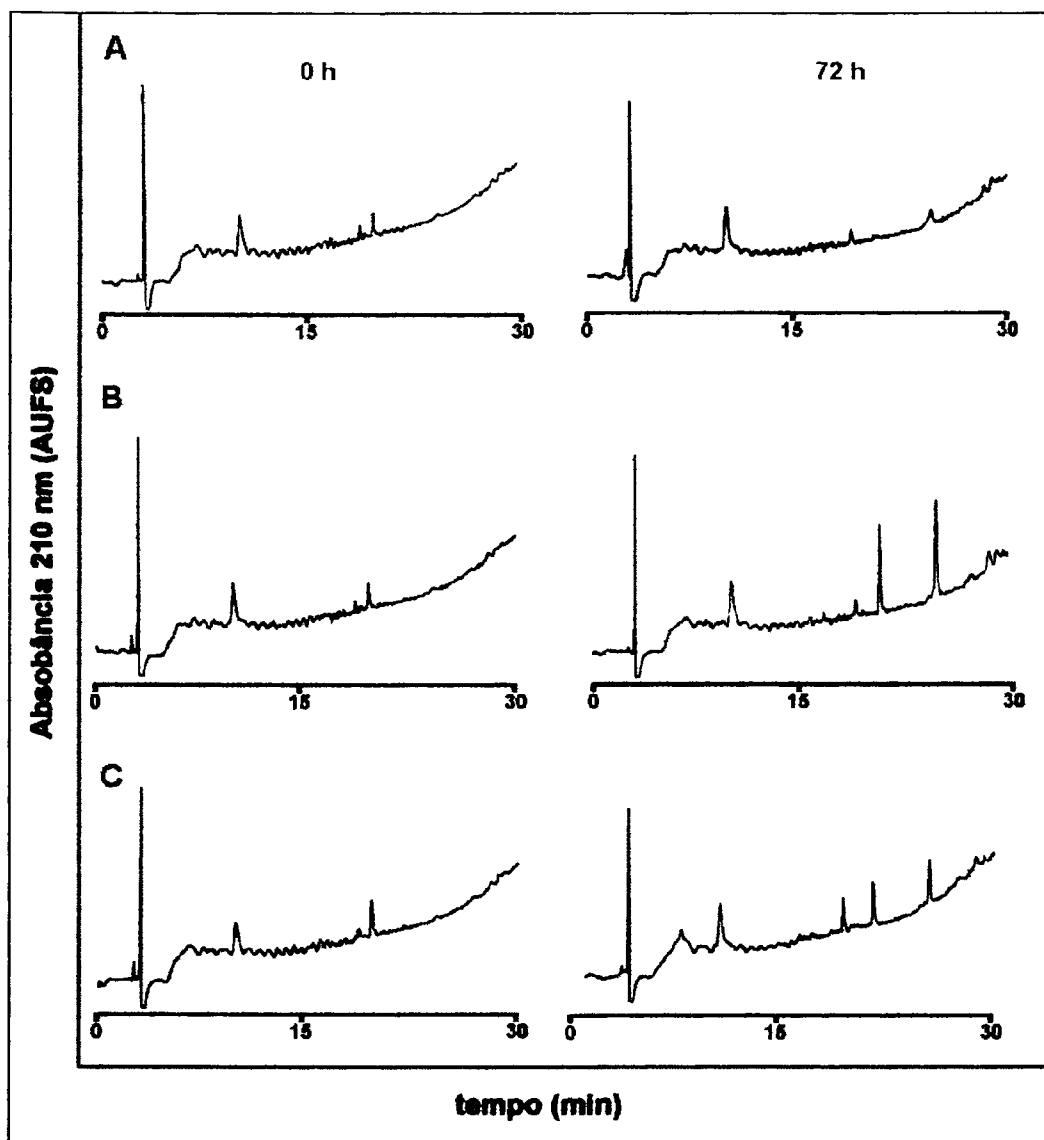


Figura 45: Perfis de RP-HPLC da etanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DCM na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (A), EuCl_3 (B) e TbCl_3 (C).

Condição de monitoramento: *coluna:* Vydac C_{18} , 5 μm , 300 \AA , 0,46 cm x 25,0 cm; *solvente A:* 0,1% TFA/ H_2O ; *solvente B:* 90% ACN em 0,09% TFA/ H_2O ; *gradiente linear:* 5 a 95% de B em 30 min, *fluxo:* 1 mL/min; λ : 210 nm; volume injetado: 10 μL .

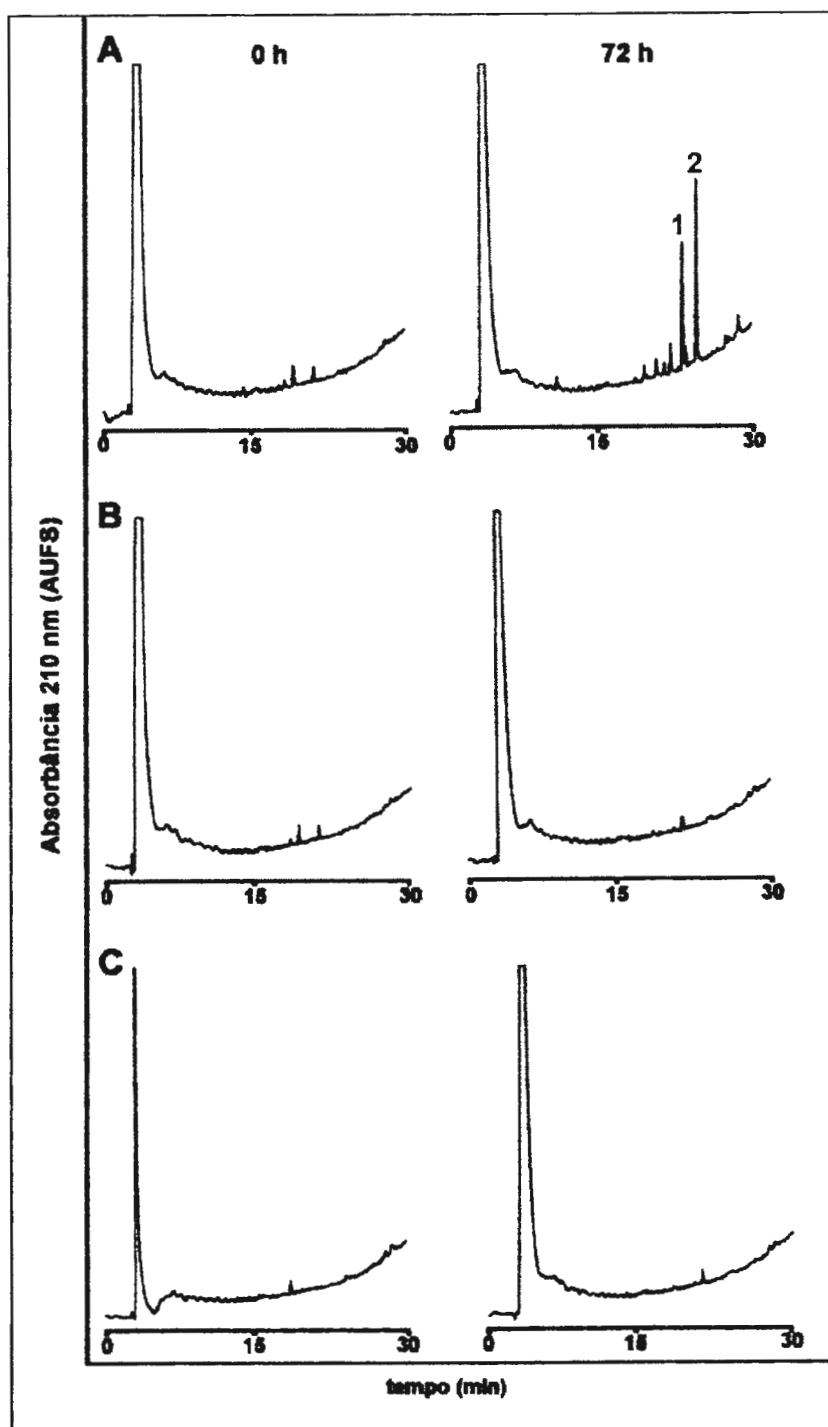


Figura 46: Perfis de RP-HPLC da etanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DMSO na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (A), EuCl_3 (B) e TbCl_3 (C). 1= subproduto; 2= Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-OEt.

Condição de monitoramento: *coluna:* Vydac C_{18} , 5 μm , 300 \AA , 0,46 cm x 25,0 cm; *solvente A:* 0,1%TFA/ H_2O ; *solvente B:* 90% ACN em 0,09% TFA/ H_2O ; *gradiente linear:* 5 a 95% de B em 30 min, *fluxo:* 1mL/min; λ : 210 nm; volume injetado: 10 μL .

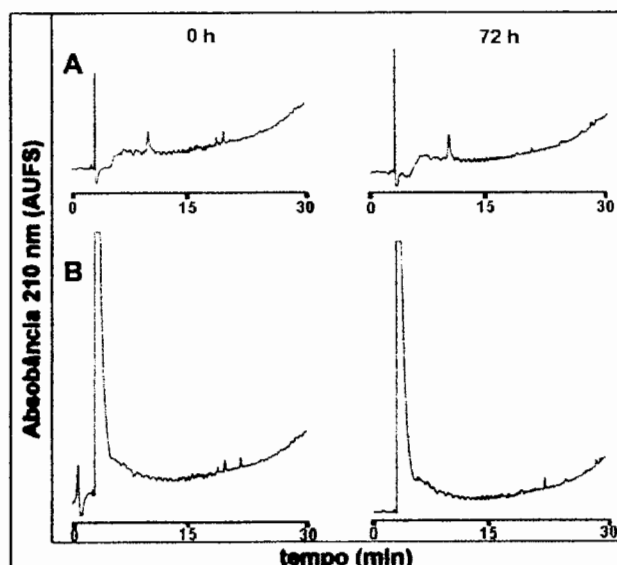


Figura 47: Perfis de RP-HPLC da etanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DCM (A) e DMSO (B) na ausência de aditivos.

Condição de monitoramento: coluna: Vydac C₁₈, 5 μm, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1%TFA/H₂O; solvente B: 90% ACN em 0,09% TFA/H₂O; gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min, fluxo: 1mL/min; λ: 210 nm; volume injetado: 10 μL.

Tabela 25: Solvólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRIVb; GS_i= 0,29 mmol/g) na presença e ausência dos aditivos Ca(OAc)₂, EuCl₃ e TbCl₃

Solvente	Nucleófilo	Aditivo	GS _f (mmol/g)	Desligamento peptídeo-KOR(%)
DCM	MeOH	Ca(OAc) ₂	0,11	62
		EuCl ₃	0,02	93
		TbCl ₃	0	100
	EtOH	----	0,3	0
		Ca(OAc) ₂	0,28	5
		EuCl ₃	0,22	28
		TbCl ₃	0,25	17
		----	0,29	0
DMSO	MeOH	Ca(OAc) ₂	0	100
		EuCl ₃	0,27	0
		TbCl ₃	0,28	3
	EtOH	----	0,28	3
		Ca(OAc) ₂	0,05	82
		EuCl ₃	0,29	0
		TbCl ₃	0,29	0
		----	0,29	0

GS_i e GS_f: graus de substituição inicial e final do peptídeo-KOR Condição experimental: peptídeo: 8,8 μmol; solvente: 0,6 mL DCM ou DMSO e 0,150mL metanol ou etanol; Ca(OAc)₂, EuCl₃ ou TbCl₃: 15,8 μmol; temperatura: 37 °C; agitação orbital: 300 rpm. As reações foram monitoradas por RP-HPLC durante um período de 72h. Condição de monitoramento: coluna: Vydac C₁₈, 5 μm, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1% TFA/H₂O; solvente B: 90% ACN em 0,09%TFA/H₂O; fluxo: 1 mL/min; gradiente linear: 5 a 95%B em 30 min; λ: 210 nm; volume injetado: 10 μL.

10. Tentativa de determinação da solubilidade dos sais empregados nos solventes utilizados

Os resultados anteriormente apresentados sugeriram que a solubilidade dos sais utilizados nos solventes empregados seja um fator determinante da eficiência das reações estudadas. Por isso, tentamos determinar a solubilidade dos mesmos nas misturas de solventes por nós empregadas. Para tanto, empregamos a técnica de eletroforese capilar. Os resultados obtidos mostraram que a diferença de viscosidade dos solventes e das misturas de solventes (DCM/MeOH ou EtOH, CHCl₃/MeOH ou EtOH e DMSO/MeOH ou EtOH) interferiu significativamente nas medidas. Por esta razão, as análises deverão ser repetidas em condições experimentais mais apropriadas.

Um estudo qualitativo, entretanto, demonstrou que o DMSO solubiliza melhor os sais empregados. Além disso, foi observado que, de forma geral, os sais de EuCl₃ e TbCl₃, ao contrário do Ca(OAc)₂, são mais facilmente solubilizados em DCM, NMP, DMF, DMSO e 50%DMSO/tolueno.

11. Aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRIIIa) por arginina esterificada assistida por Ca²⁺

A eficiência das reações de solvólise pareceu ser dependente do álcool empregado, o que limita o seu uso para a preparação de ésteres variados de peptídeos. Para contornar esta limitação, tentamos preparar Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-Arg(HCl)-OR (onde R= Me ou Et) via aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR por Arg(HCl)-OMe ou Arg(HCl)-OEt. Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-Arg-OMe e Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-Arg-OEt foram formados nos respectivos meios reacionais. As porcentagens de desligamento dos peptídeos da KOR na presença de Ca²⁺ foram superiores a 70%, enquanto que na ausência deste íon, estas foram de apenas 10-13%.

A **Figura 48** apresenta os perfis cromatográficos obtidos no monitoramento das reações por RP-HPLC. Como se observa, dois produtos foram formados. Por esta razão, não pudemos tratar as porcentagens acima

citadas como representativas diretas dos rendimentos de aminólise como havíamos feito até então com as reações de solvólise. A **Tabela 26** apresenta os rendimentos de desligamento peptídeo-KOR obtidos nestas aminólises.

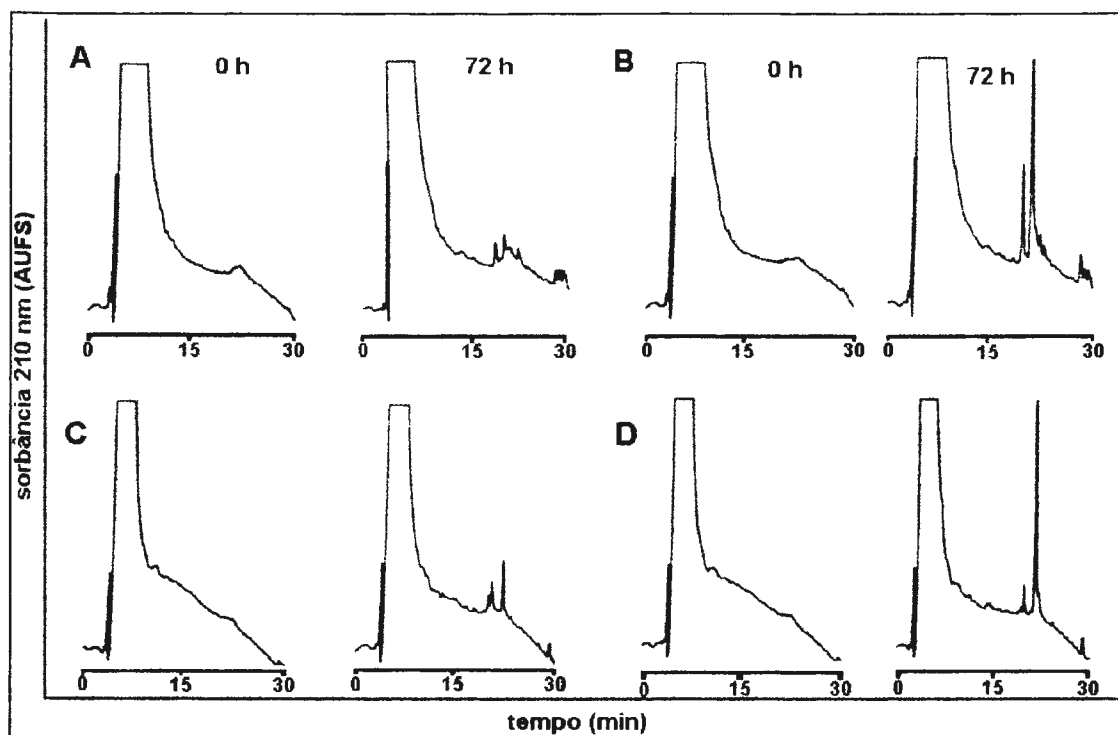


Figura 48: Perfis de RP-HPLC da aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR por Arg(HCl)-OMe e Arg(HCl)-OEt em DMF na ausência (A e C, respectivamente) e na presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (B e D, respectivamente).

Condição de monitoramento: coluna: Vydac C_{18} , 5 μm , 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1% TFA/ H_2O ; solvente B: 90% ACN em 0,09% TFA/ H_2O ; gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min, fluxo: 1 mL/min; λ : 210 nm; volume injetado: 10 μL .

A fim de se obter o produto Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-Arg(HCl)-OR (onde R= Me ou Et) em maior quantidade e determinar os rendimentos reais de aminólise (através do isolamento e determinação da quantidade de peptídeo α -esterificado formado), realizamos as reações em escala preparativa (**Figura 49 e 50**). As análises de aminoácidos dos peptidil-KOR residuais hidrolisados indicaram que tanto para a aminólise de Ac-Ile-

Tabela 26: Aminólise de Ac-Ile-Ser-(OBzl)-Asp-(OchHex)-KOR (PRIIIa; GS_i=0,29 mmol/g)

<i>Nucleófilo</i>	<i>Aditivo</i>	<i>GS_f (mmol/g)</i>	<i>Desligameto peptídeo-KOR (%)</i>
Arg(HCl)OMe	-	0,26	10
	Ca(OAc) ₂	0,07	76
Arg(HCl)OEt	-	0,25	13
	Ca(OAc) ₂	0,03	89

GS_i e GS_f: graus de substituição inicial e final do peptidil-KOR

Condição experimental: *peptídeo:* 14,5 μmol para Arg(HCl)OMe e 29,0 μmol para Arg(HCl)OEt; *solvente:* 2,0 mL DMF; *nucleófilos:* Arg-(HCl)OMe, 71 μmol e Arg-(HCl)OEt, 141 μmol; *aditivo:* Ca(OAc)₂ (32 e 63 μmol, respectivamente); *temperatura:* 37 °C; *agitação orbital:* 300 rpm. As reações foram monitoradas por RP-HPLC analítica durante um período de 72h.

Condição de monitoramento: *coluna:* Vydac C₁₈, 5 μm, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; *solvente A:* 0,1% TFA/H₂O; *solvente B:* 90% ACN em 0,09% TFA/H₂O; *fluxo:* 1 mL/min; *gradiente linear:* 5 a 95%B em 30 min; *λ:* 210 nm; *volume injetado:* 10 μL.

Ser(Bzl)-Asp(OchHex)-KOR por Arg(HCl)OMe, como por Arg(HCl)OEt as porcentagens de desligamento peptídeo-KOR foram de ~76%. Como foram obtidas 24,7 mg de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OchHex)-Arg(HCl)-OMe e 43,7 mg de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OchHex)-Arg(HCl)-OEt concluímos que os rendimentos de aminólise foram de 38 e 66% respectivamente. De fato, como é possível observar na **Figura 48**, a quantidade de contaminante presente no bruto da aminólise por Arg(HCl)OMe é bem superior àquela presente no bruto proveniente da aminólise por Arg(HCl)OEt, o que leva à diminuição do rendimento de aminólise. O isolamento e análise por espectrometria de massas deste subproduto indicou que este era o tetrapeptídeo com a carboxila livre (provavelmente resultante da hidrólise secundária do éster metílico do tetrapeptídeo).

Em 1980, De Grado & Kaiser descreveram a clivagem de peptídeos protegidos a partir da KOR através de aminólise catalisada por ácido acético (DeGrado & Kaiser, 1980). Dois anos mais tarde, os mesmos autores usaram o mesmo procedimento para preparar peptídeos protegidos usando ésteres de peptídeos como nucleófilos (DeGrado & Kaiser, 1982). Em 1990, Siemens e colaboradores prepararam Boc-Gly-Phe-OMMP a partir de Boc-Gly-KOR em presença de 25% de excesso de Phe-OMMP.HBr, 40% de

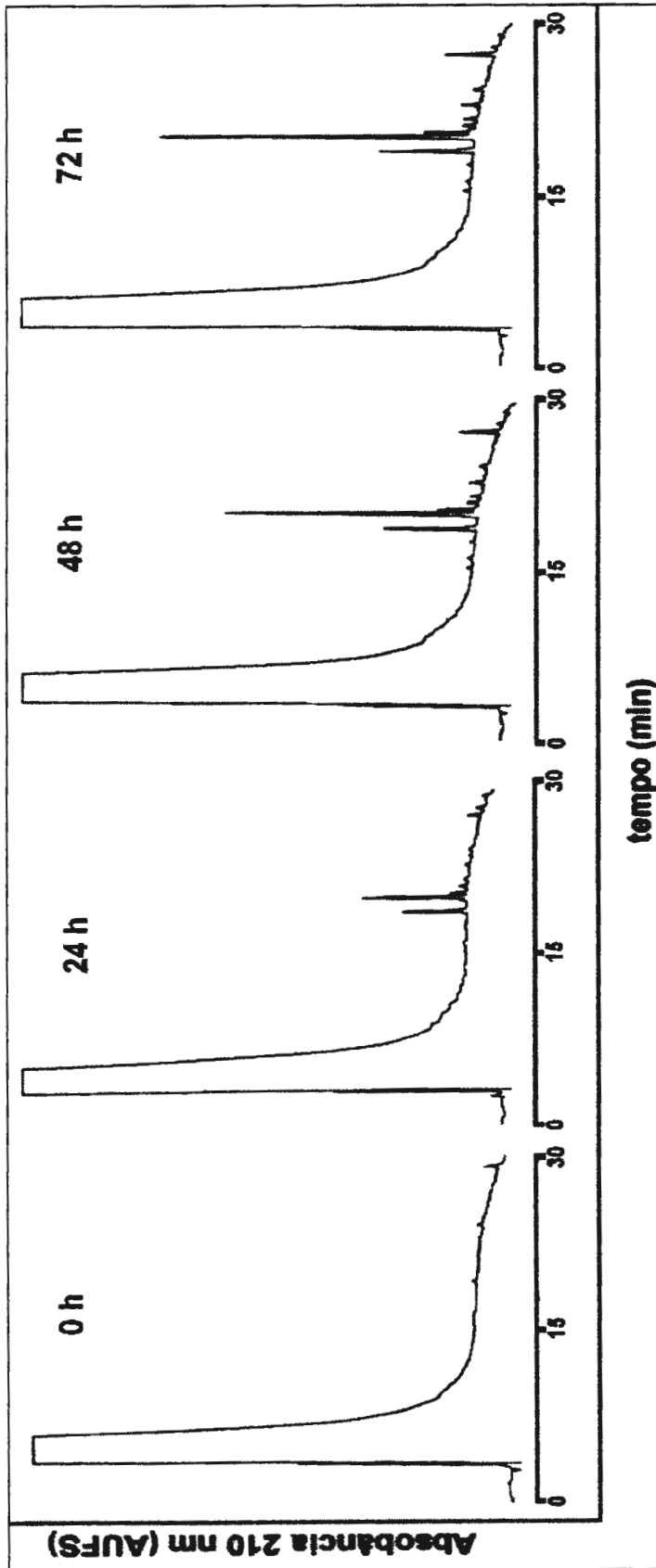


Figura 49: Perfis cromatográficos da aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR por Arg(HCl)OMe em DMF assistida por Ca(OAc)₂ realizada em escala preparativa.

Condição de monitoramento: *coluna*: Vydac C₁₈ 5 μ m, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; *solvente A*: 0,1% TFA/H₂O; *solvente B*: 90% ACN em 0,09% TFA/H₂O; *gradiente linear*: 5 a 95% B em 30 min; *fluxo*: 1 mL/min; λ : 210 nm; *volume injetado*: 10 μ L.

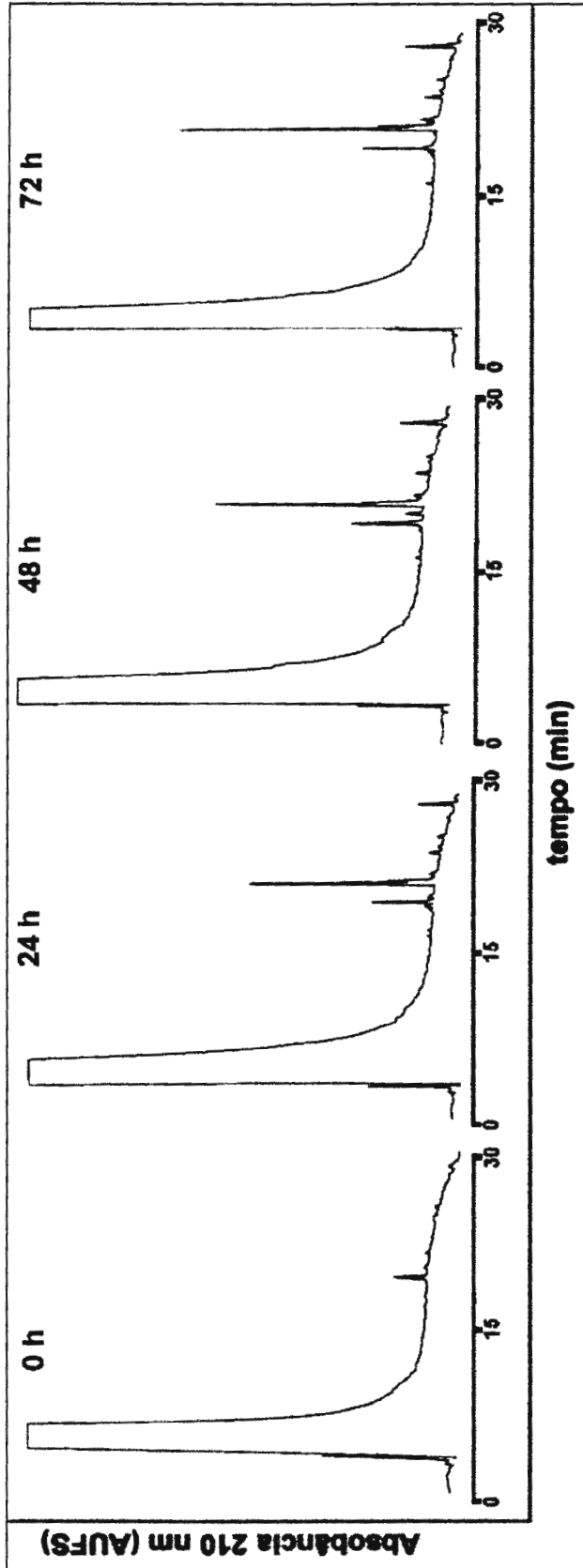


Figura 50: Perfis cromatográficos da aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR por Arg(HCl)-OEt em DMF assistida por Ca(OAc)₂, realizada em escala preparativa.

Condição de monitoramento: *coluna*: Vydac C₁₈ 5 μ m, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; *solvente A*: 0,1% TFA/H₂O; *solvente B*: 90% ACN em 0,09% TFA/H₂O; *gradiente linear*: 5 a 95% B em 30 min; *fluxo*: 1 mL/min; λ : 210 nm.

excesso de AcOH e DIEA suficiente para neutralizar o derivado de aminoácido. O produto isolado foi obtido com 64% de rendimento.

Com base nestes dados, decidimos comparar o nosso procedimento de aminólise com os citados acima. Para tanto, realizamos três reações de 5 h usando Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR e Arg(HCl)OEt como materiais de partida: a primeira foi conduzida de acordo com o nosso procedimento experimental (Moraes *et al.*, 1999; Moraes *et al.*, 2000; **reação 1**), a segunda nas condições experimentais descritas por DeGrado & Kaiser (DeGrado & Kaiser, 1982; **reação 2**) e a terceira de acordo com o procedimento de Siemens e colaboradores (Siemens *et al.*, 1990; **reação 3**). Como mostram a **Figura 51** e a **Tabela 27**, a **reação 1** apresentou desligamento peptídeo-KOR de 30%, sendo que 41% dos produtos formados correspondia ao produto de aminólise desejado. O rendimento de desligamento para a **reação 2** foi de 37%, sendo a porcentagem do produto de aminólise desejado no material bruto de 71%. A **reação 3** forneceu uma porcentagem de desligamento peptídeo-KOR de 27%, sendo que a porcentagem do produto desejado correspondia a 55%. Se levamos em consideração os rendimentos e qualidades dos materiais brutos obtidos, estes dados indicam que o nosso procedimento parece ser comparável àquele empregado por Siemens e colaboradores e ligeiramente menos seletivo do que aquele usado por DeGrado & Kaiser.

É importante esclarecer que esta comparação é válida apenas para 5 h de reação. Observamos que com o passar do tempo, a quantidade de produto esterificado formado na **reação 1** (nosso procedimento) aumenta muito em relação ao contaminante, o que eleva bastante o rendimento de aminólise assistida pelos íons Ca^{2+} (**Figura 50**).

12. Aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRIIIId) por Arg(HCl)-OMe na presença de EuCl_3 ou TbCl_3 em diferentes solventes

A fim de aumentar a eficiência ou a seletividade da aminólise desta peptidil-KOR, investigamos novas condições experimentais. Inicialmente, substituímos o DMF, solvente utilizado até então para estas reações, por

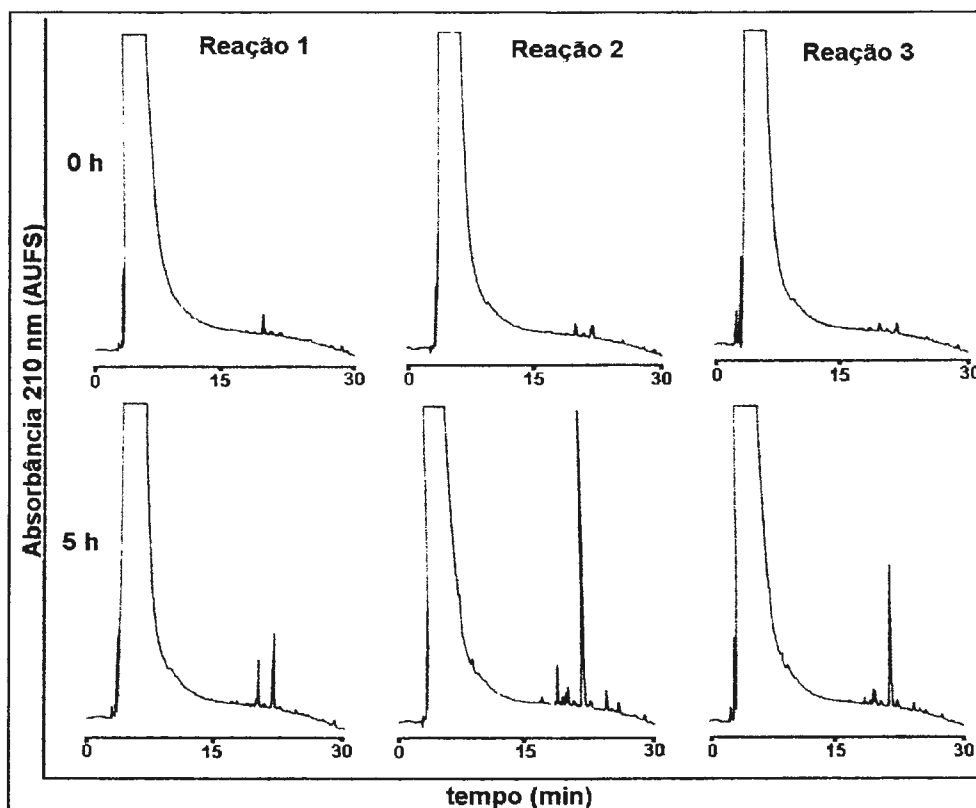


Figura 51: Perfis cromatográficos das aminólises comparativas de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR por Arg(HCl)-OEt em DMF.

Reação 1= nosso procedimento; reação 2= DeGrado & Kaiser, 1982; reação 3= Siemens *et al.*, 1990.

Condição de monitoramento: coluna: Vydac C₁₈ 5 μ m, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1% TFA/H₂O; solvente B: 90% ACN em 0,09% TFA/H₂O; gradiente linear: 5 a 95% B em 30 min; fluxo: 1mL/min; λ : 210nm.

Tabela 27: Aminólise comparativa de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRIIIId, GS_i= 0,30 mmol/g)

Reação	Aditivo: peptídeo proporção molar	GS _f (mmol/g)	Desligamento peptídeo-KOR (%)
1	1:1,8	0,21	30
2	1:2,0	0,19	37
3	1:1,4	0,22	27

GS_i e GS_f: graus de substituição inicial e final do peptidil-KOR

Condição Experimental: peptídeo: 8,75 μ mol (reação 1) e 17,5 μ mol (reação 2 e reação 3); DMF: 583 mL (reação 1), 460 mL (reação 2) e 432 mL (reação 3); nucleófilo: H-Arg-(HCl)OEt: 35,0 μ mol (reação 1), 21,9 μ mol (reação 2) e 64,8 μ mol (reação 3); aditivo: Ca(OAc)₂ (15,6 μ mol, reação 1), HAc (24,9 μ mol, reação 2) e HAc (34,6 μ mol, reação 3); DIEA: 35,0 μ mol (reação 1), 22,4 μ mol (reação 2), 64,8 μ mol (reação 3); temperatura: 37°C; agitação orbital: 300 rpm. As reações foram monitoradas por RP-HPLC analítica durante um período de 5h. Condição de Monitoramento: coluna: Vydac C₁₈, 5 μ m, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; solvente A: 0,1% TFA/H₂O; solvente B: 90% ACN em 0,09%TFA/H₂O; fluxo: 1 mL/min; gradiente linear: 5 a 95%B em 30 min; λ : 210 nm.

NMP. O perfil cromatográfico de RP-HPLC em NMP foi bastante semelhante ao obtido anteriormente em DMF. Novamente, observamos a formação do mesmo subproduto (**Figura 52B**). O material bruto desta aminólise foi submetido à espectrometria de massas e o pico íon molecular correspondente ao Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-Arg-OMe ($M^+=718$) foi detectado. É possível observar na **Figura 52** que na ausência de aditivos a aminólise em NMP ocorre, porém em menor extensão em relação aquela assistida pelo Ca^{2+} .

Assim como nas metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR, as aminólises mediadas pelos íons metálicos Tb^{3+} e Eu^{3+} não produziram os produtos desejados nos seguintes solventes testados: DMF, DMSO e DMSO/Tolueno (1:1 v/v) (**Figura 53**).

A **Tabela 28** apresenta os rendimentos de desligamento obtidos em todas estas aminólises. Estes resultados parecem estar associados: 1) a complexação do íons Tb^{3+} e Eu^{3+} com os solventes polares utilizados como discutido anteriormente (**item 9**) desta seção; 2) à diferença de solubilidade dos sais empregados nos solventes estudados.

Tabela 28: Aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRIIIId, $GS_i=0,30$ mmol/g) em diferentes solventes na ausência e presença de Ca^{2+} , Eu^{3+} ou Tb^{3+}

<i>Aditivo</i>	<i>Solvente</i>	<i>Tempo (horas)</i>	<i>GS_f (mmol/g)</i>	<i>Desligamento peptídeo-KOR (%)</i>
$Ca(OAc)_2$	NMP	40	0,20	33
$EuCl_3$			0,30	0
$TbCl_3$			0,30	0
----			0,30	0
$EuCl_3$	DMF	16	0,25	16
	DMSO		0,28	7
	DMSO/Tolueno (1:1)		0,27	10

GS_i e GS_f : grau de substituição inicial e final do peptidil-KOR

Condição experimental: peptídeo: 8,75 μ mol; nucleófilo: 35 μ mol (ArgOMe.2HCl); DIEA: 12,5 μ mol; aditivo: 15,75 μ mol ($Ca(OAc)_2$, $EuCl_3$ ou $TbCl_3$); solvente: 583 μ L [DMF, DMSO ou DMSO/tolueno (1:1)]. **Condições de monitoramento:** coluna: Vydac C_{18} , 5 μ m, 300 \AA , 0,46 cm x 25,0 cm; fluxo: 1mL/min; solvente A: 0,1% TFA/H₂O; solvente B: 90% ACN em 0,09% TFA/H₂O; gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min; λ : 210 nm; volume injetado: 10 μ L.

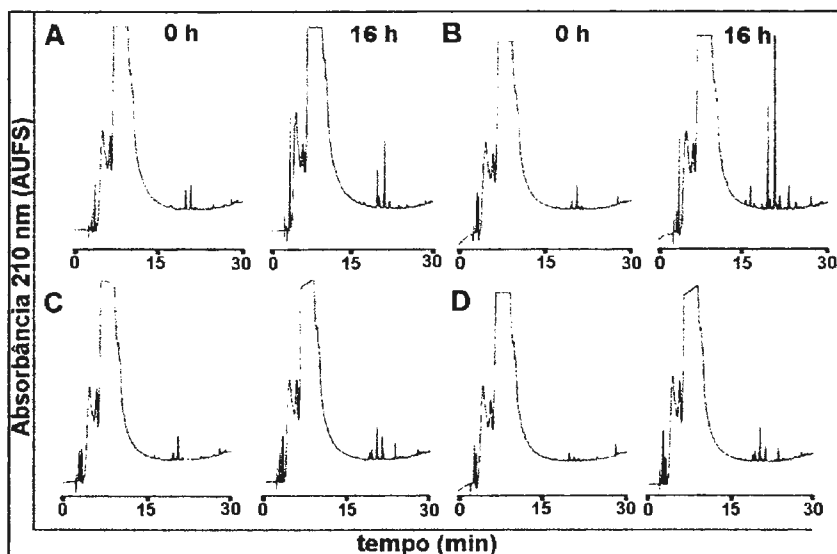


Figura 52: Perfis de RP-HPLC da aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OchHex)-KOR em NMP na ausência (A) e presença de $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (B), EuCl_3 (C) ou TbCl_3 (D). Condições de monitoramento: coluna: Vydac C_{18} , $5\mu\text{m}$, 300\AA , $0,46\text{ cm} \times 25,0\text{ cm}$; fluxo: 1 mL/min ; solvente A: $0,1\% \text{ TFA/H}_2\text{O}$; solvente B: $90\% \text{ ACN}$ em $0,09\% \text{ TFA/H}_2\text{O}$; gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min; λ : 210 nm ; volume injetado: $10\ \mu\text{L}$.

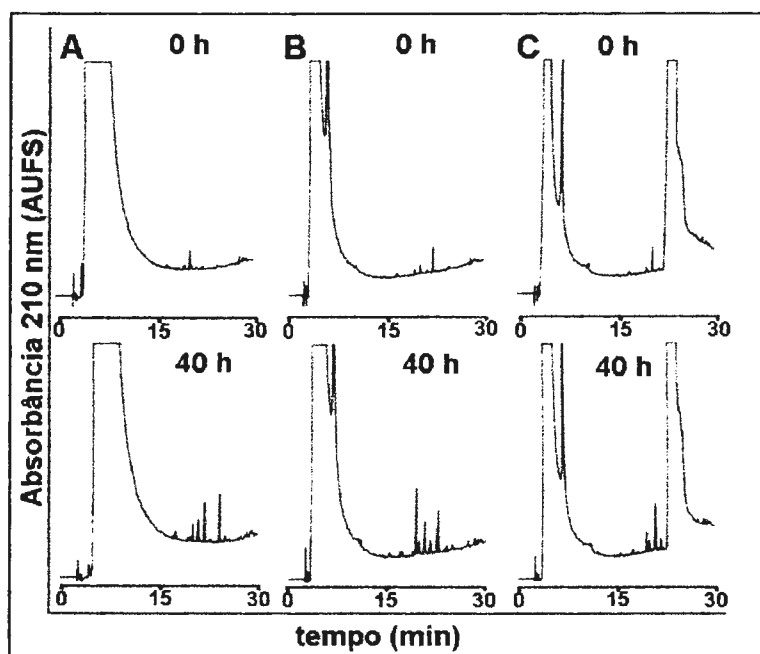


Figura 53: Perfis de RP-HPLC da aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OchHex)-KOR em DMF (A), DMSO (B) e DMSO/tolueno (1:1;v/v) (C) na presença de EuCl_3 . Condições de monitoramento: coluna: Vydac C_{18} , $5\mu\text{m}$, 300\AA , $0,46\text{ cm} \times 25,0\text{ cm}$; fluxo: 1 mL/min ; solvente A: $0,1\% \text{ TFA/H}_2\text{O}$; solvente B: $90\% \text{ ACN}$ em $0,09\% \text{ TFA/H}_2\text{O}$; gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min; λ : 210 nm ; volume injetado: $10\ \mu\text{L}$.

13. Inchamento de KOR e peptidil-KOR em diferentes solventes orgânicos e misturas com metanol

Além da solubilidade do aditivo no meio reacional, o inchamento de peptidil-KOR também poderia ser um parâmetro determinante da eficiência das reações estudadas. Por isso, decidimos examinar tal propriedade para Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR e Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR nas misturas de solventes utilizadas em nossas reações de solvólise e/ou aminólise.

Inicialmente, determinamos o inchamento da KOR e da Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR através da variação do volume de uma massa fixa das mesmas (300 mg). A **Tabela 29** mostra os resultados obtidos. A ordem encontrada foi: DCM \approx CHCl₃ > DCM/MeOH \approx CHCl₃/MeOH > DMF > DMSO, ou seja, os solventes que causam a melhor solvatação da peptidil-KOR são menos polares: DCM e CHCl₃. O mesmo ocorre com as misturas contendo MeOH ou EtOH: 25% DMSO em tolueno/DCM/EtOH > DCM/MeOH > em (todas elas na proporção 4:1, v/v).

Os resultados obtidos através da determinação do diâmetro dos grãos de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR e Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR estão expressos na **Tabela 30**. Como é possível se observar, as medidas realizadas apresentaram valores de desvios padrão elevados. Isto é justificável, pois as peptidil-resinas foram sintetizadas a partir do suporte polimérico de procedência da Bio-Rad (Bio-Beads SX1) com tamanhos de grãos de 200-400 mesh, portanto, uma amostra de partida bastante heterogênea (**Figura 54**). Novamente, DCM/MeOH ou CHCl₃/MeOH demonstraram ser as melhores misturas.

A peptidil-resina Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR também inchou melhor em DCM e em DCM/MeOH.

Estes resultados combinados aos rendimentos de solvólise descritos em itens anteriores nos possibilitaram concluir que o grau de inchamento da peptidil-KOR não é o fator determinante da eficiência das reações estudadas neste trabalho.

Tabela 29: Variação do volume KOR e de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR a 37 °C em diferentes solventes e misturas.

Solventes	ΔV (mL)	
	KOR	Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR
DCM	19,0±2,2 (4,0±0,5)	15,0±0,8 (4,3±0,5)
CHCl ₃	17,0±0,5 (3,6±0,2)	14,3±0,5 (3,5±0,3)
DMSO	3,0 ±0,5 (1,0±0,05)	1,7±0,5 (1,3±0,05)
DMF	10,8±1,3(2,3±0,2)	8,7±0,9 (2,2±0,3)
DCM/MeOH	11,2±0,8 (2,8±0,4)	11,3±0,5 (3,0±0,2)
DCM/EtOH	7,3±1,2 (2,8±0,4)	19,7±0,5 (3,8±0,2)
CHCl ₃ /MeOH	9,3±0,5 (2,8±0,5)	10,3±0,5 (2,5±0,2)
DMSO/MeOH	2,7±0,6 (1,0±0,05)	2,7±0,5 (1,1±0,05)
DMSO/EtOH	4,0±0,7 (1,5±0,1)	3,7±0,5 (1,5±0,1)
25%DMSO em tolueno/EtOH	16,7±1,9 (2,5±0,4)	11,0±0,8 (2,4±0,2)

Todas as medidas foram realizadas de acordo com o método descrito por Ludwick *et al.*, (1986) e Varanda & Miranda, 1997. Quantidade correspondente a resina: 300 mg. Todas as misturas são 4:1 (v/v). Os valores mostrados em parênteses a V/V_i onde V_f = volume final e V_i = volume inicial.

Tabela 30: Valores de inchamento dos grãos em diferentes solventes orgânicos à temperatura ambiente

Peptidil-KOR (mmol/g) (lote; GS _i ; mmol/g)	Solvente	Diâmetro (μm)	Volume do Grão solvatado (μm^3)	Volume de solvente ^a (%)
Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)- (0,43)	-	53,8±8,6	81535	-
	DCM	93,3±20,1	425249	81
	DCM/MeOH	75,8±13,1	228037	64
Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)- (0,38)	DMSO	70,0±13,0	179594	54
	-	52,7±6,1	76635	-
	DCM	101,4±15,9	545899	86
	DCM/MeOH	109,0±17,9	678075	89
	DMSO	70,3±13,8	181913	58
	DMSO/MeOH	88,6±14,9	364166	79
Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)- (0,32)	DMSO/EtOH	87,6±14,3	351974	78
	-	56,4±7,6	93936	-
	DCM	100,3±15,2	528325	82
	CHCl ₃	115,6±24,6	808857	88
	DMSO	64,5±11,6	140500	33
	DMF	83,7±15,7	307025	69
	DCM/MeOH	89,5±15,8	375377	75
	CHCl ₃ /MeOH	95,3±16,9	453186	79
DMSO/MeOH	64,1±11,2	137902	32	

^avolume de solvente no grão solvatado menos volume de solvente no grão seco/volume de solvente no grão solvatado x 100.

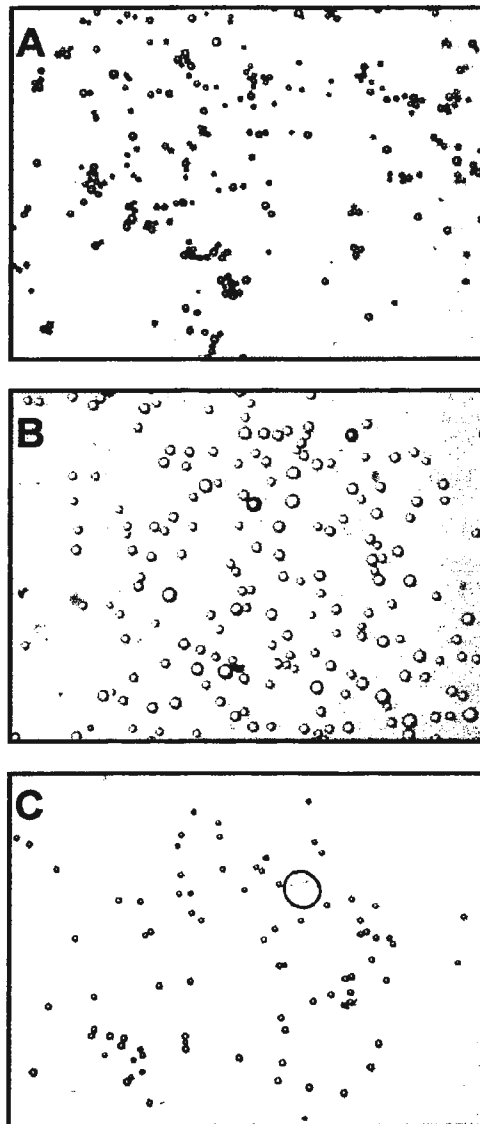


Figura 54: Grãos de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR vistos ao microscópio. Grãos secos (A), grãos em DCM (B) e grãos em DMSO (C).

14. Estudos estruturais das peptidil-resinas e das soluções reacionais

Se os íons Ca^{2+} são capazes de assistir as solvólises e aminólises das peptidil-KOR estudadas é provavelmente porque a exemplo do que já havia sido descrito por Miranda e colaboradores para o Moz-Asn-Leu-Gly-OEt (1991), estes se complexam com os oxigênios presentes nas mesmas, diminuindo a densidade eletrônica do carbono carbonílico do éster da oxima. Tal diminuição tornaria esta ligação mais suscetível ao ataque nucleofílico de álcoois ou derivados de aminoácidos. Portanto, um estudo estrutural das peptidil-KOR por RMN em presença e ausência de Ca^{2+} forneceria dados que nos auxiliariam a propor um mecanismo para esta assistência. Daí o nosso interesse em realizá-lo.

a) por espectroscopia de luminescência

Como já descrito, a metanólise da Ac-Ala-Gly-Ala-KOR (PRIIb) também foi testada em presença de Eu^{3+} (**Figura 55**) tendo se mostrado quantitativa (100%) em 72 horas. Algumas tentativas preliminares de acompanharmos a reação através da luminescência do íon Eu^{3+} foram feitas. Tanto a solução do meio reacional, quanto a peptidil-resina foram submetidas à esta análise. Para tanto, alíquotas do meio reacional foram transferidas para o tubo de leitura (fino e semelhante aos empregados para análise por RMN) com uma pipeta Pasteur em tempos determinados. Apesar de nosso esforço em coletar quantidades idênticas não fomos bem sucedidos: até mesmo perda de material ocorreu durante as transferências. Como ora mais, ora menos o peptidil-resina e reagentes eram retirados do meio reacional, foi extremamente difícil manter o controle total do experimento. Também não foi possível utilizar uma cubeta de quartzo para a aquisição dos espectros, pois a peptidil-KOR depositada no fundo da cubeta não era suficiente para ser atingida pela luz incidente. Apesar dos problemas, foi possível qualitativamente observar variações nas intensidades dos espectros de emissão nos diferentes tempos de análise da mistura reacional (dados não mostrados). De acordo com Brito e colaboradores (1998) através da observação e quantificação destas

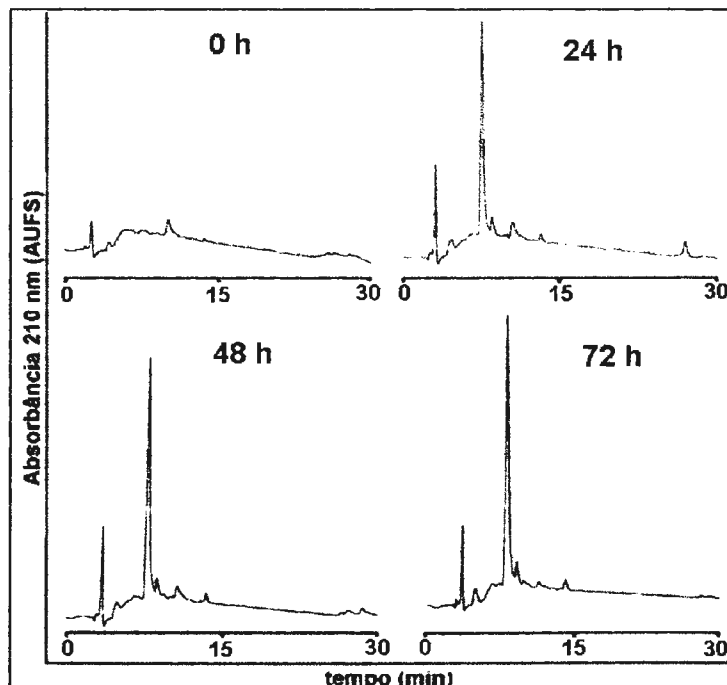


Figura 55: Perfis de RP-HPLC da metanólise de Ac-Ala-Gly-Ala-KOR em DCM na presença de EuCl_3 .

Condições de monitoramento: coluna: Vydac C_{18} , (0,45 cm x 25,00 cm, $5\mu\text{m}$, 300Å); fluxo: 1mL/min; solvente A: 0,1% TFA/ H_2O ; solvente B: 60% ACN/ H_2O contendo 0,09% TFA; gradiente linear: 5 a 95% de B em 30 min; λ : 210 nm.

variações é possível obter informações do ambiente químico ao redor do íon lantanídico em estudo.

O espectro de emissão da mistura reacional da metanólise de Ac-Ala-Gly-Ala-KOR em DCM foi adquirido a partir 460 a 720 nm, sob excitação a 394 nm. Neste experimento, as transições $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_J$ ($J=0-4$) foram observadas tanto para o suporte polimérico (peptidil-KOR) quanto para a solução reacional ($\text{EuCl}_3/\text{MeOH}/\text{DCM}$). O suporte polimérico utilizado se mostrou fotosensível e houve diminuição da banda de absorção em presença da mistura reacional. A análise da mistura reacional evidenciou principalmente aumento nas intensidades das bandas correspondentes às transições $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ e $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_3$ (**Figura 56**). Infelizmente, estes experimentos não nos permitiram visualizar claramente a interação entre a peptidil-resina e o íon Eu^{3+} .

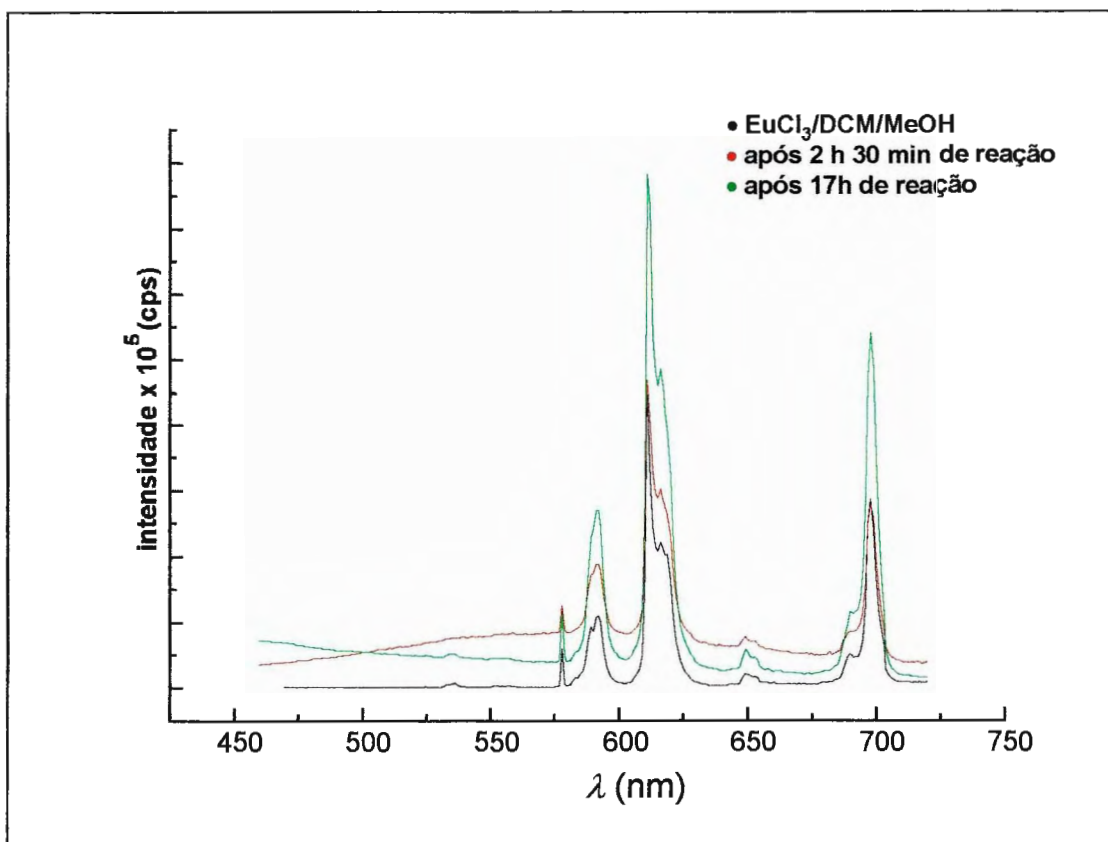


Figura 56: Espectro de emissão de EuCl_3 obtido à temperatura ambiente sob excitação a 394 nm e nas condições reacionais da metanólise de Ac-Ala-Gly-Ala-KOR.

Além disso, decidimos realizar uma análise qualitativa das mudanças no espectro de luminescência do íon Eu^{3+} na solução reacional em presença e ausência do peptídeo Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-OMe, pois dispúnhamos deste peptídeo em grande quantidade. Para tanto, os espectros de emissão de $\text{EuCl}_3/\text{MeOH}/\text{DCM}$ e $\text{EuCl}_3/\text{MeOH}/\text{DCM}-\text{Ac-Ala-Gly-Lys}(2\text{-Cl-Z})\text{-OMe}$ foram adquiridos nas mesmas condições utilizadas anteriormente. Novamente, estas transições foram representadas no espectro por linhas finas (**Figura 57**) e houve um aumento nas intensidades relativas das bandas quanto o mesmo foi adquirido na presença do peptídeo; além disso, as mesmas se apresentaram menos desdobradas para a solução contendo o peptídeo, porém nenhum deslocamento na posição dos picos foi observado. Este resultado sugere que houve um aumento do número de ligantes ao redor do íon Eu^{3+} , como era esperado.

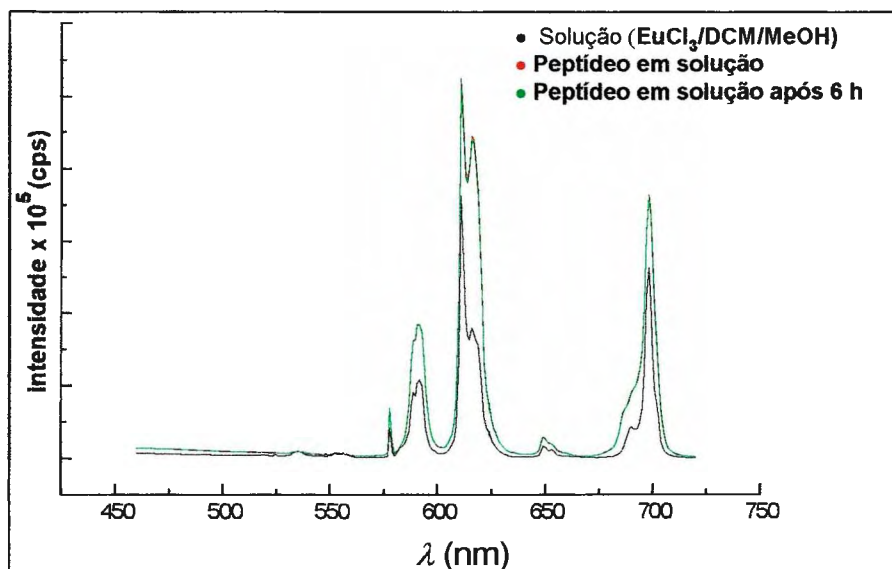


Figura 57: Espectro de emissão de EuCl_3 obtido à temperatura ambiente sob excitação a 394 nm em DCM/MeOH na presença de Ac-Ala-Gly-Lys-(2-Cl-Z)-OMe. Proporção peptídeo: EuCl_3 = 2: 1.

b) por HR-MAS

A **Figura 58** mostra os espectros iniciais unidimensionais de H^1 da Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR (**PRIIIe**) em ausência do íon cálcio (**A**) e em sua presença (3,3 mg/mL; **B**) obtidos sob condições idênticas. A boa qualidade destes espectros confirmou que o inchamento da peptidil-KOR em DMSO-d_6 é suficiente para possibilitar a detecção das ressonâncias de H^1 correspondentes aos prótons amídicos nele presentes. Nenhuma alteração nos deslocamentos químicos foi observada na presença de acetato de cálcio. Medidas da relação sinal/ruído, entretanto, nos possibilitaram observar que houve um alargamento dos sinais na presença deste íon. Tal alargamento poderia sugerir que a peptidil-resina passou a apresentar menor mobilidade.

Para estudar a variação da mobilidade, espectros de H^1 foram adquiridos depois de um período de 20 ms de CPMG (**Figura 59**). CPMG consiste em um melhoramento do método “spin eco” proposto por Meiboom & Gill (1958). Este método foi inicialmente introduzido por Hahn e modificado por Carr and Purcell e é utilizado na determinação de T_2 . O alargamento dos

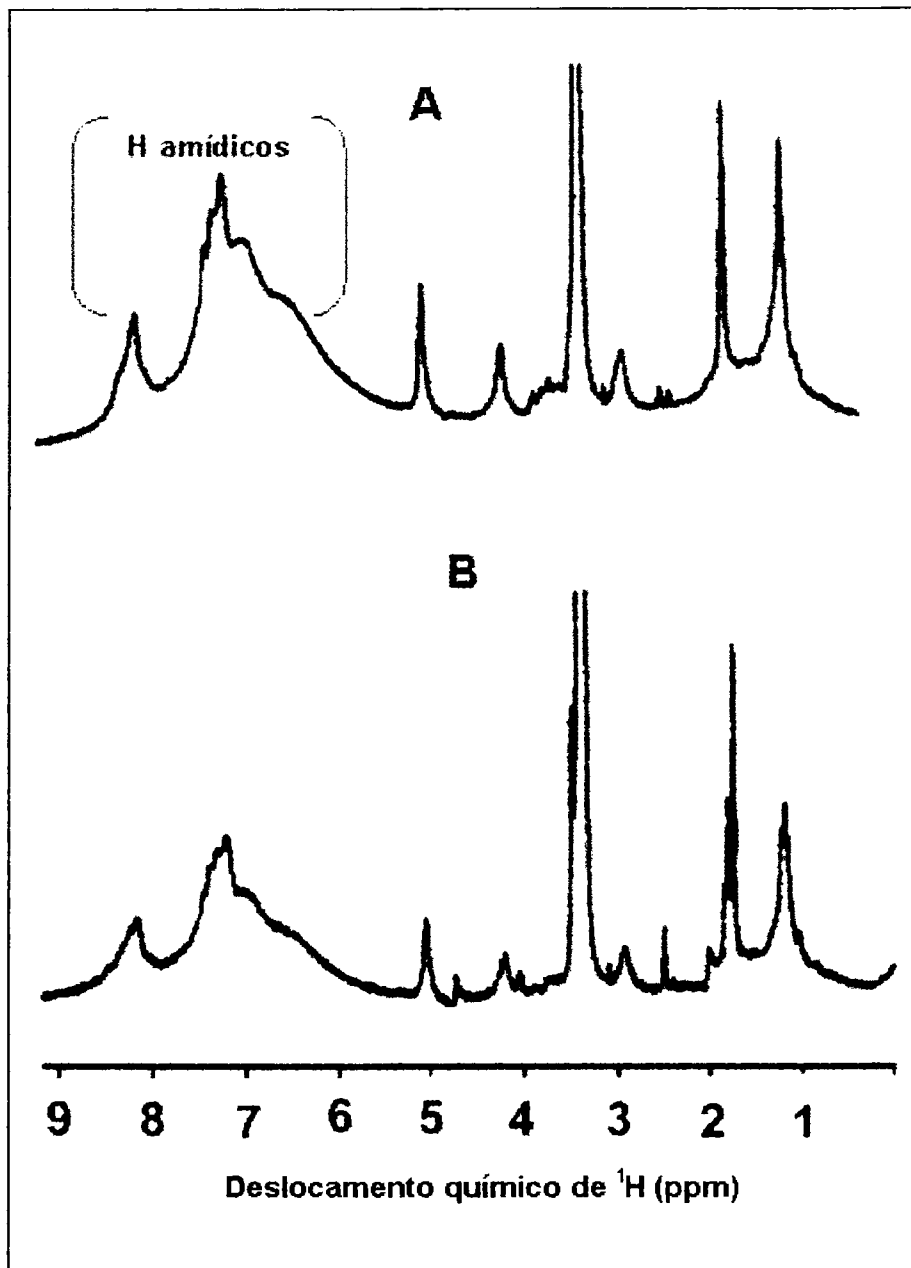


Figura 58: Espectros de HR-MAS ^1H de Ac-Ala-Gly-Lys(2-CI-Z)-KOR em $\text{DMSO-}d_6$. Os espectros foram obtidos na ausência (A) e presença de Ca^{+2} (B)^{*}. A velocidade foi de 5 kHz.

^{*} Não foi feita a correção da linha de base.

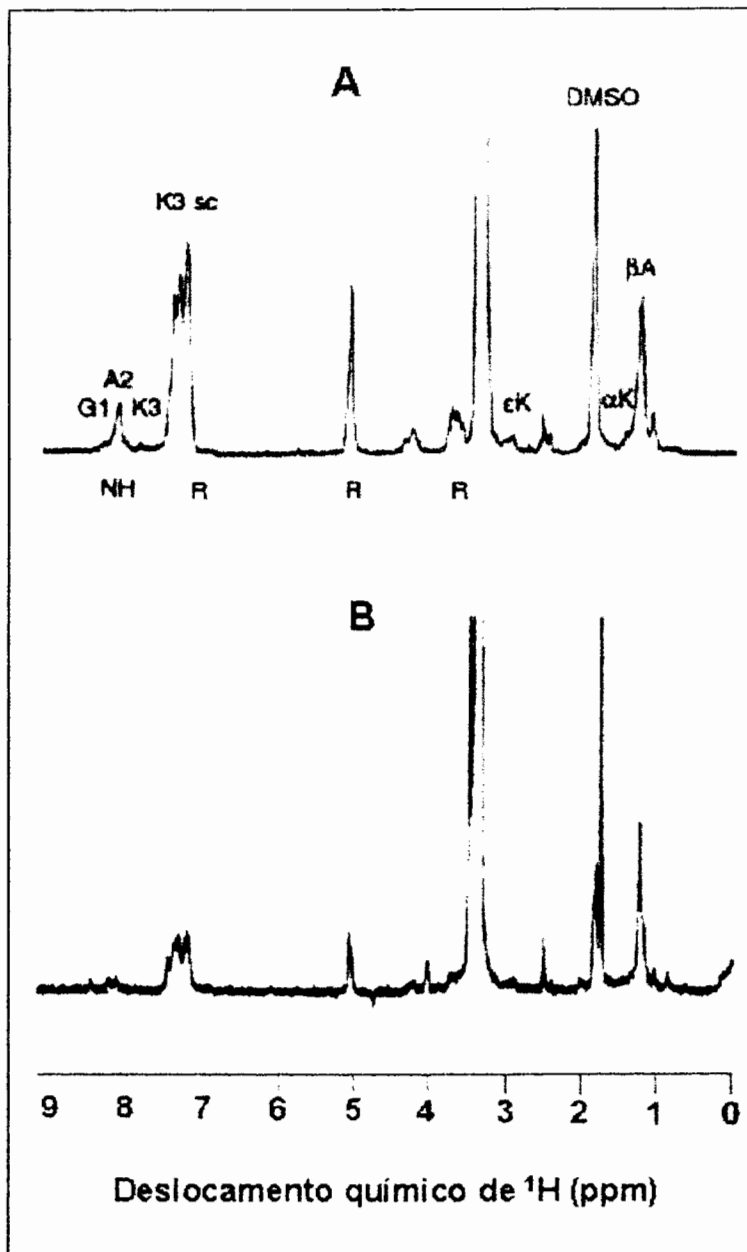


Figura 59: Espectros de ^1H -HRMAS de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR em $\text{DMSO-}d_6$ adquirido após um período de 20 ms de CPMG. Os espectros foram obtidos na ausência (A) e presença (B) de Ca^{+2} . A velocidade de rotação foi de 5 kHz. R= resina oxima de Kaiser; G= glicina; A=alanina; K= lisina; sc= cadeia lateral; α , β e ϵ = cadeias laterais dos aminoácidos.

sinais previamente detectados em presença de acetato de cálcio foram evidenciados no **Espectro 59B**, indicando que a adição de Ca^{2+} tornou a cadeia peptídica do peptidil-KOR mais rígida. Como todos os seus sinais desapareceram após 20 ms de relaxação via T_2 , pode-se concluir que também a KOR se tornou mais rígida.

A atribuição de cada aminoácido presente na peptidil-resina foi realizada através do experimento TOCSY. Todos os aminoácidos presentes na seqüência foram detectados (**Tabela 31**). Os experimentos de TOCSY e NOESY realizados em presença do íon cálcio mostram uma razão sinal-ruído muito menor, provavelmente devido ao processo de relaxação via $T_{1\rho}$ (**Figuras 60B e 61B**). Medidas da relaxação sinal/ruído possibilitaram determinar que houve um alargamento dos sinais na presença deste íon, sugerindo que o peptidil-KOR apresenta menor mobilidade nestas condições.

Tabela 31: Atribuição das ressonâncias dos prótons da Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR feita a partir do Espectro bidimensional TOCSY (Figura 58).

Aminoácido	Deslocamento Químico de H (ppm)
Gly	N-H: 8,20; C-Ha: 3,80
Ala	N-H: 8,15; C-Ha: 4,20; C-Hb: 1,20
Lys	N-H: 7,85; N-H (cl): 7,40; C-Ha: 4,20; C-Hb: nd; C-Hg: 1,39; C-Hd: 1,40; C-He: 3,0

cl= cadeia lateral; nd= não determinado

O experimento HMQC de ^1H - ^{15}N (**Figura 62**) mostra somente um pico para cada resíduo de aminoácido da peptidil-KOR, sugerindo que no meio este possa existir em uma conformação preferencial. Os espectros de NOESY adquiridos na ausência e presença de Ca^{2+} mostram uma diferença significativa na posição e número de picos. Este resultado indicou que o peptídeo não adota uma conformação específica na presença de cálcio.

Os espectros de RMN podem sofrer grandes modificações em decorrência da variação da temperatura ou solvente, em alguns casos simplificando os espectros e facilitando as interpretações (Giralt *et al.*, 1984;

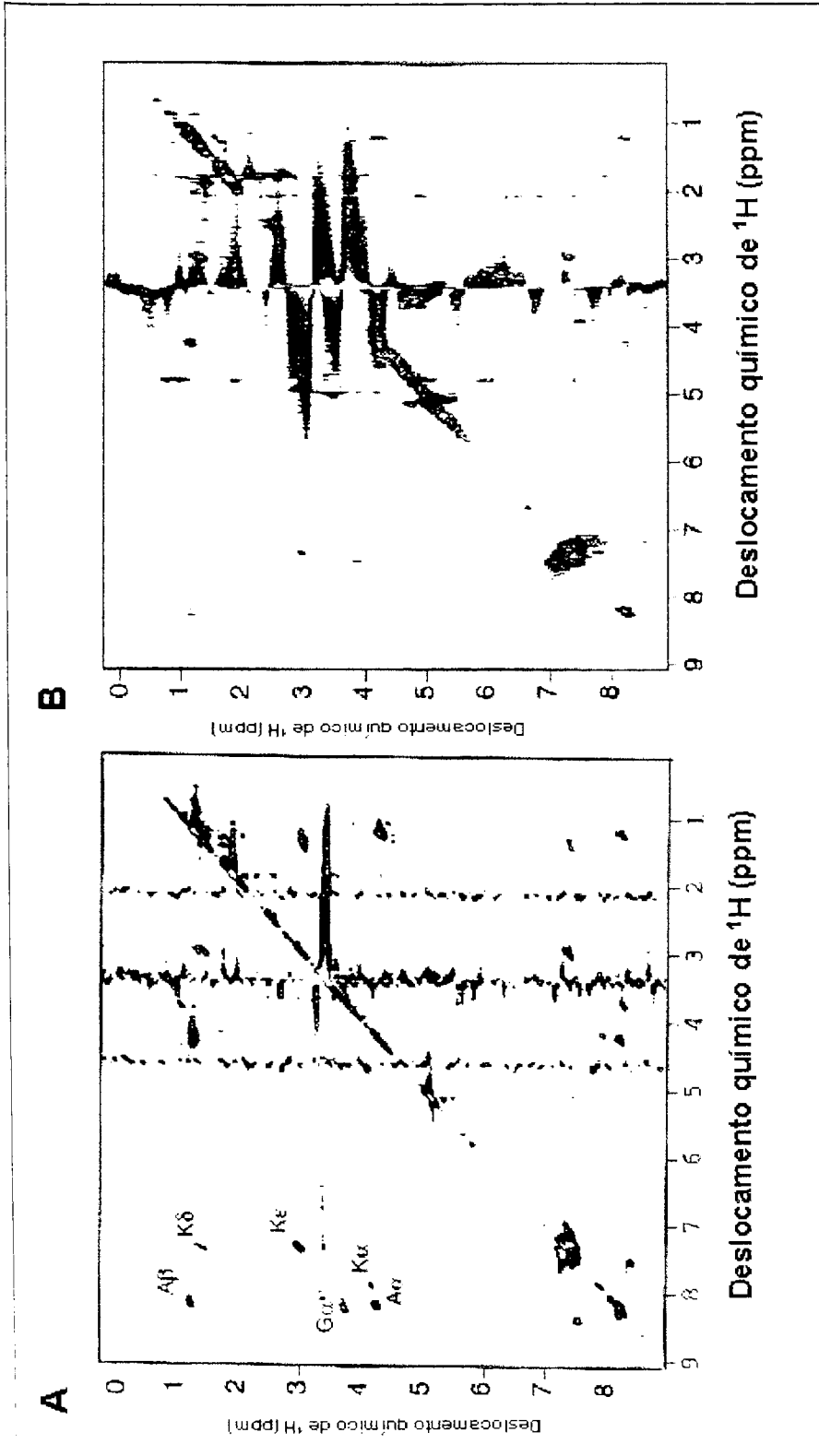


Figura 60: Espectros bidimensionais de RMN- ^1H (HR-MAS), TOCSY de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR em DMSO- d_6 adquirido após um período de 20 ms de CPMG. Os espectros foram obtidos na ausência (A) e presença de Ca^{+2} (B). A velocidade de rotação foi de 5 kHz e o "mixing time" foi de 80 ms (mlev).

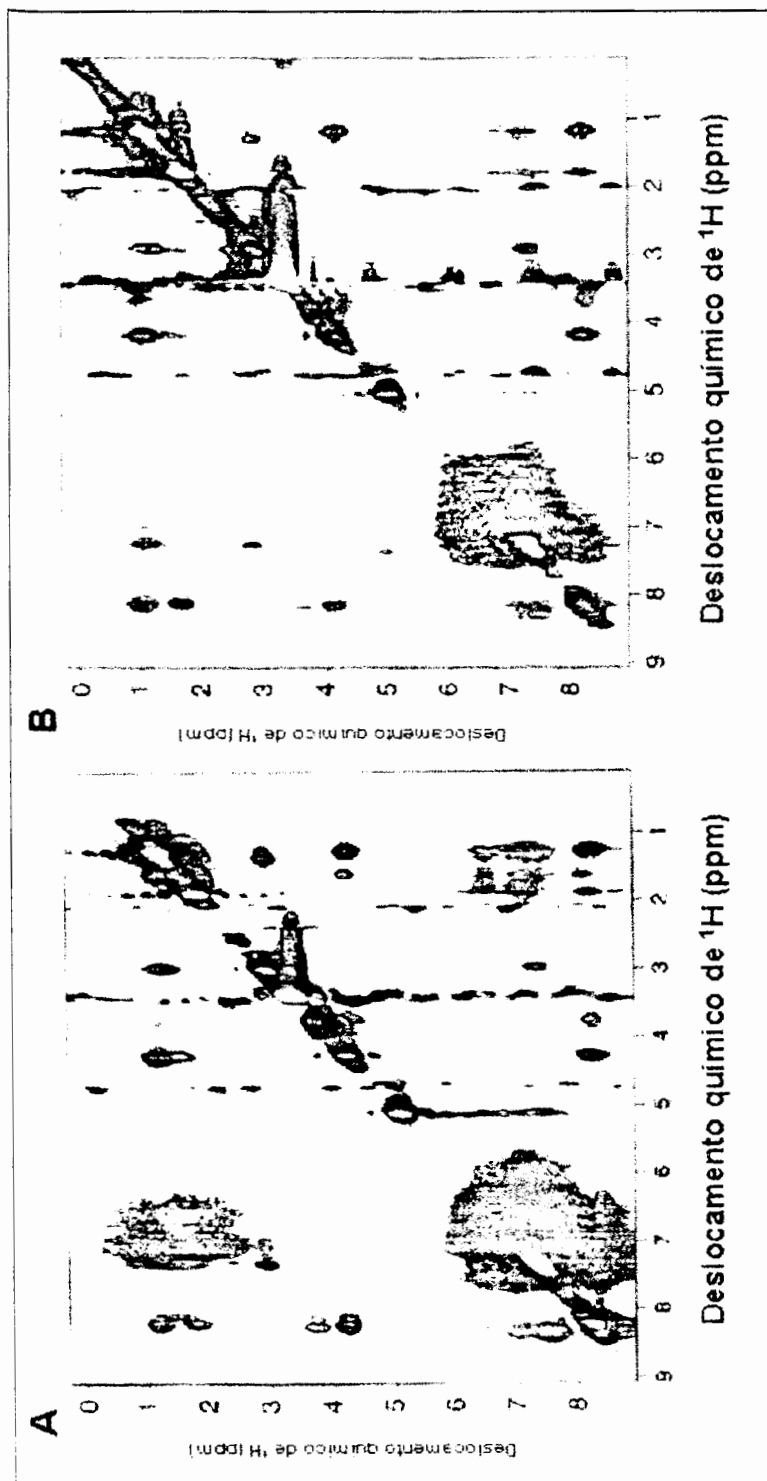


Figura 61: Espectros bidimensionais de RMN- ^1H (HR-MAS), NOESY de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR em DMSO- d_6 adquirido após um período de 20 ms de CPMG. Os espectros foram obtidos na ausência (A) e na presença de Ca^{+2} (B). A velocidade de rotação foi de 5 kHz e o "mixing time" foi de 80 ms (mlev³³)

³³ Experimento que descreve o desacoplamento de banda larga usando uma sequência de pulso pulsos de 180° e pulsos compostos. Isto aumenta a largura da banda e requer menor potência de desacoplamento, evitando assim o aquecimento da amostra (Gil & Geraldes, 1987).

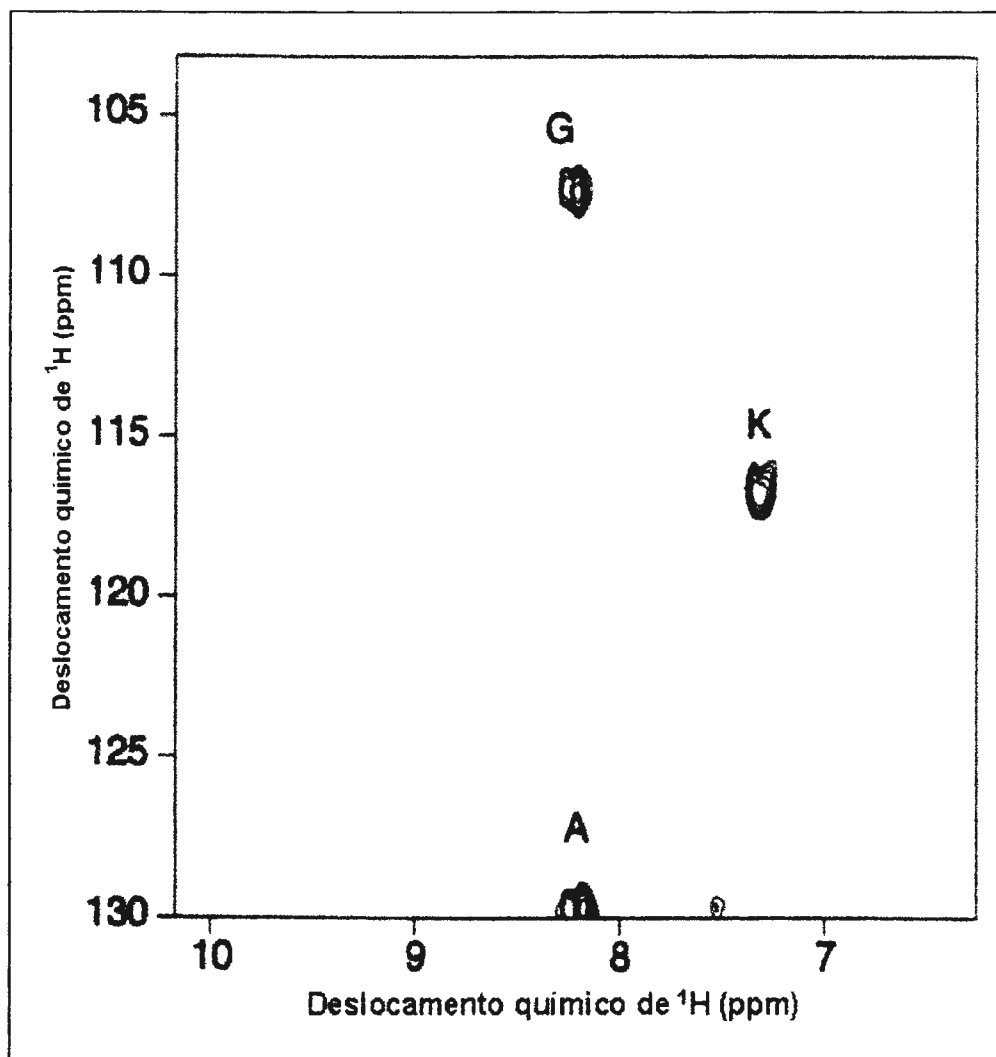


Figura 62: Espectro de RMN- ^1H (HR-MAS), HMQC- ^1H - ^{15}N da peptidil-resina Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-oxima em DMSO- d_6 adquirido após um período de 20 ms de CPMG. O espectro foi obtido na ausência de Ca^{+2} . Não houve sinal suficiente para adquirir este espectro em presença deste íon.

Dhalluim *et al.*, 1997). Estimativas da distribuição de mobilidade dos peptídeos ancorados à resina podem ser obtidos através de medidas do tempo de relaxação que está relacionado diretamente ao inchamento da resina (Giralt *et al.*, 1984). Medidas do tempo de relaxação podem fornecer uma base quantitativa para o melhoramento das condições experimentais.

Por esta razão, realizamos novos experimentos da peptidil-resina Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR (PRIIIe) com o objetivo de determinar quantitativamente os tempos de relaxação T_1 e T_2 dos prótons amídicos da ligação peptídica. Geralmente, estes tempos são determinados experimentalmente através do método de inversão de spin e spin echo, respectivamente (Gil & Geraldes, 1987). A comparação entre T_1 e T_2 na presença e ausência de cálcio nos possibilitaria quantificar qualquer variação de mobilidade da cadeia peptídica da peptidil-KOR.

A **Figura 63** apresenta o espectro unidimensional de H^1 obtido para o Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR em ausência de íons cálcio. Este espectro mostra linhas bem definidas para os prótons amídicos (deslocamento químico: 8,0-8,6 ppm) que são características de amostras em solução. A diferença entre os espectros das **Figuras 63** e **58** poderia ser explicada por uma possível decomposição da peptidil-resina.

Obtido o novo espectro da peptidil-resina Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR, o solvente DMSO- d_6 foi retirado e a resina foi lavada algumas vezes com DMSO- d_6 . Um novo espectro unidimensional de 1H foi feito. A **Figura 64** apresentou uma diminuição do sinal dos prótons amídicos(*), o que pode ser resultante da perda de resina durante a lavagem ou ainda perda do peptídeo para a solução.

A peptidil-resina Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR (PRIIIId) também foi analisada por HR-MAS em DMSO- d_6 (**Figura 65**). Espectros uni- e bidimensionais foram obtidos na presença e ausência de Ca^{2+} (**Figura 66A;B** e **67A;B**, respectivamente). A **Figura 67** é ampliação da região dos prótons amídicos. Nestas condições experimentais foi possível analisar a ressonância de 1H correspondente a eles. Nenhuma modificação no deslocamento químico foi observada na presença de $Ca(OAc)_2$: medidas da relação sinal/ruído evidenciaram alargamento dos sinais na presença deste íon, sugerindo que a peptidil-resina apresenta menor mobilidade. Para estudar a variação da mobilidade, espectros de 1H foram adquiridos depois de um período de 20 ms de CPMG (**Figura 68**). O alargamento dos sinais

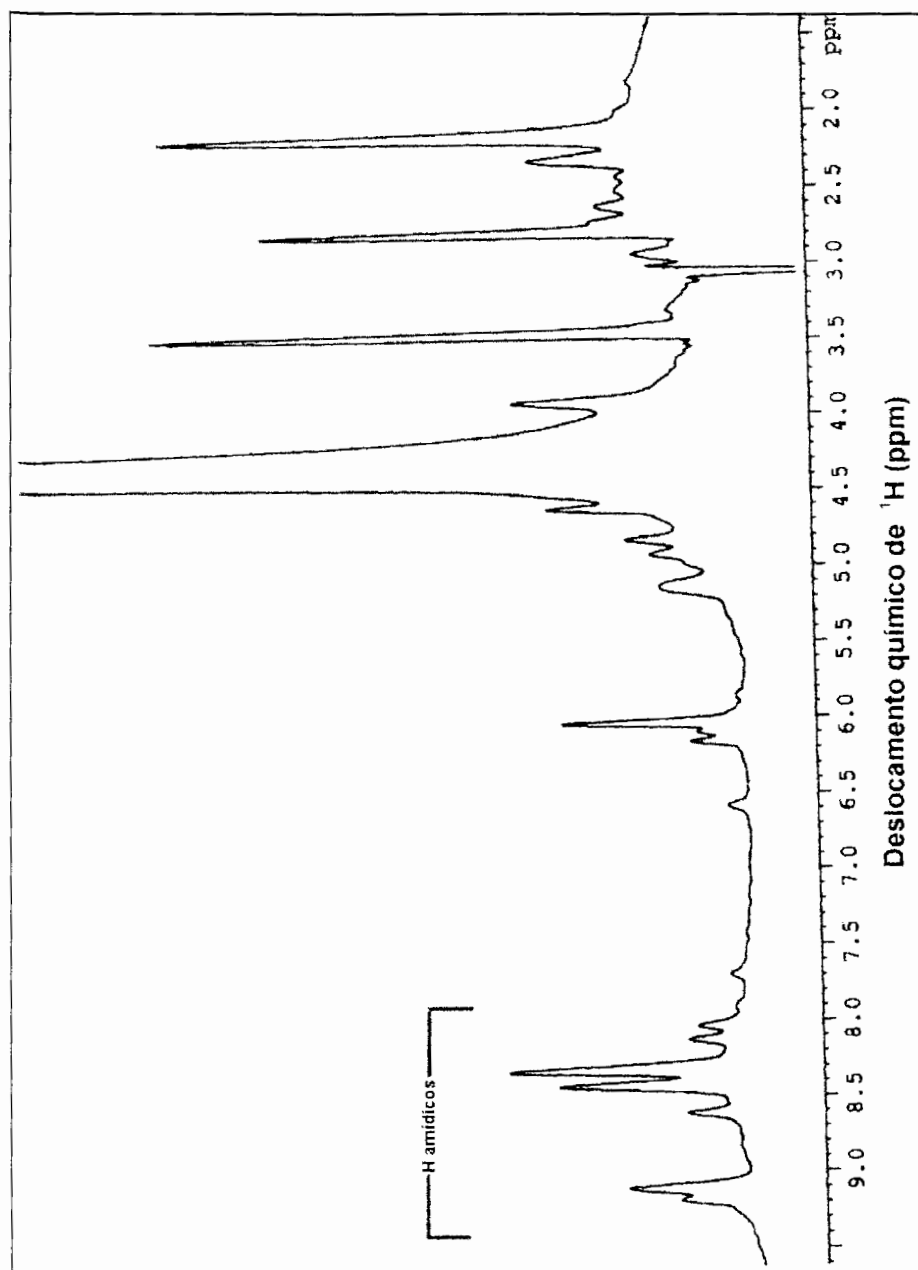


Figura 63: Espectro de RMN- ^1H (HR-MAS) de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR em DMSO- d_6 . O espectro foi obtido após 1000 scans. A rotação orbital foi de 5 kHz.

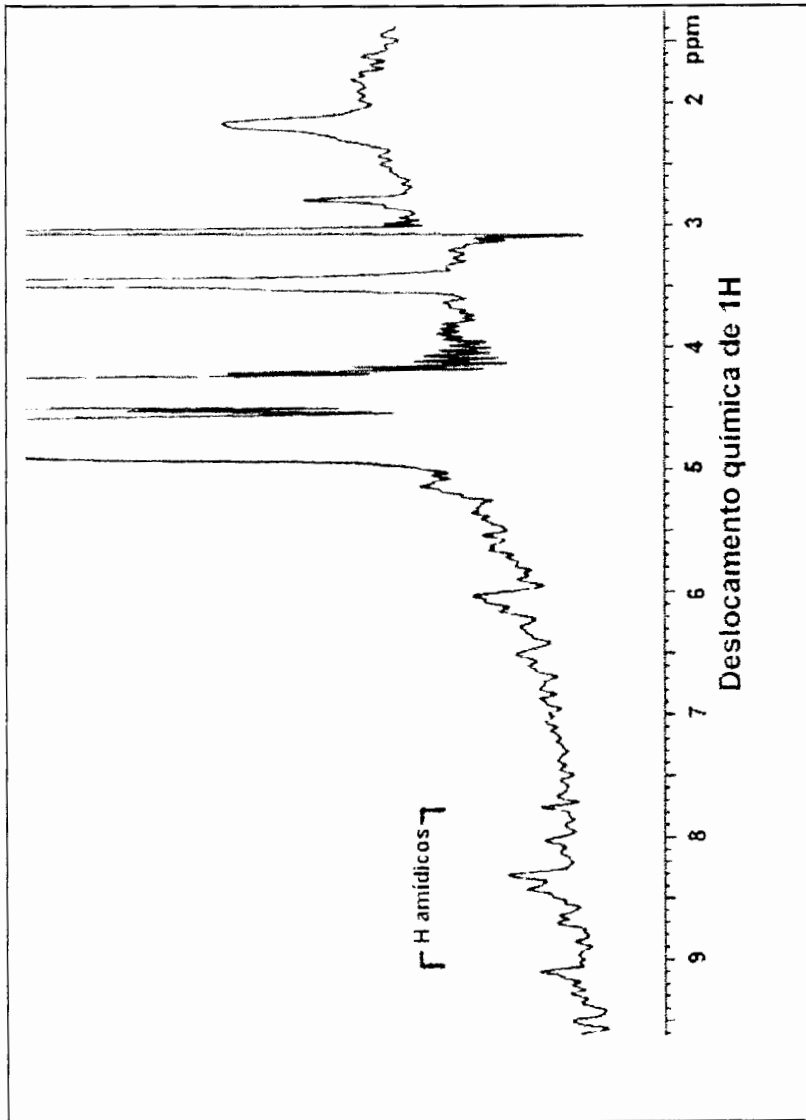


Figura 64: Espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ (HR-MAS) de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR lavada em $\text{DMSO-}d_6$ adquirido após um período de 64 scans. A rotação orbitalar foi de 5 kHz.

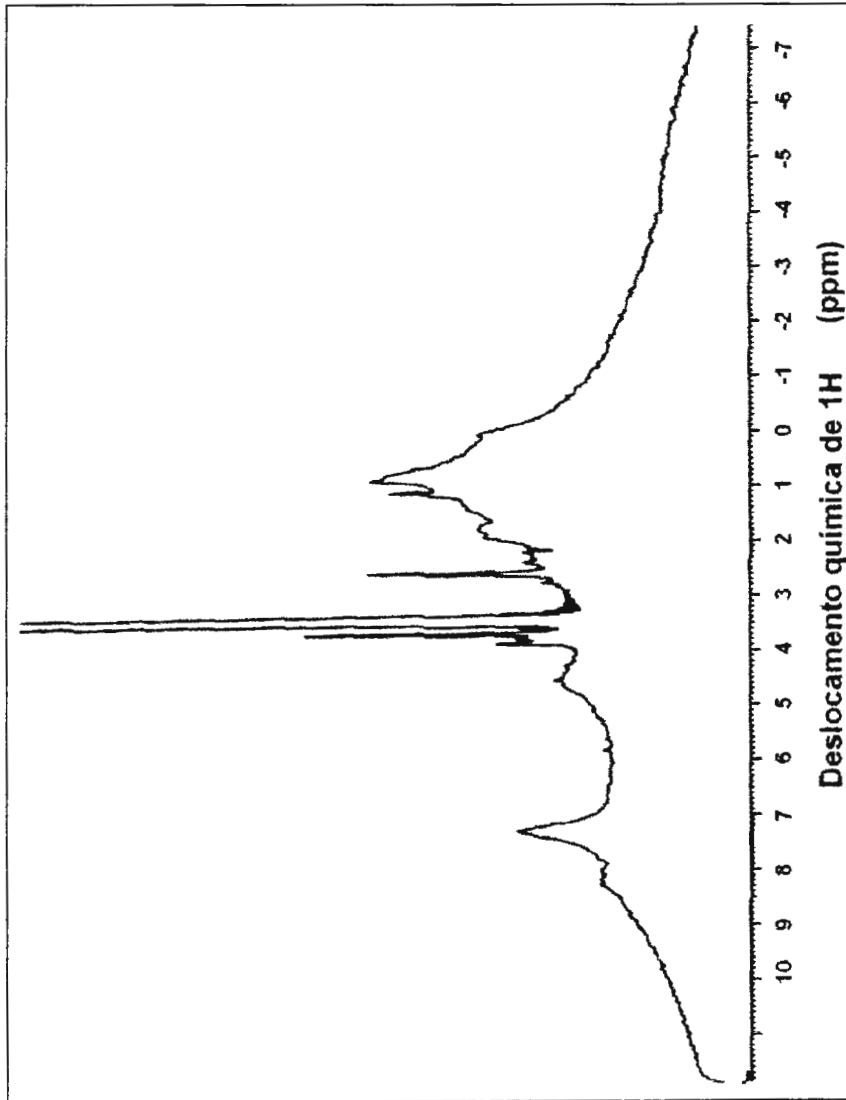


Figura 65: Espectro de RMN-¹H (HR-MAS) de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DMSO-*d*₆. O espectro foi obtido após 1000 scans. A rotação orbitalar foi de 5 kHz.

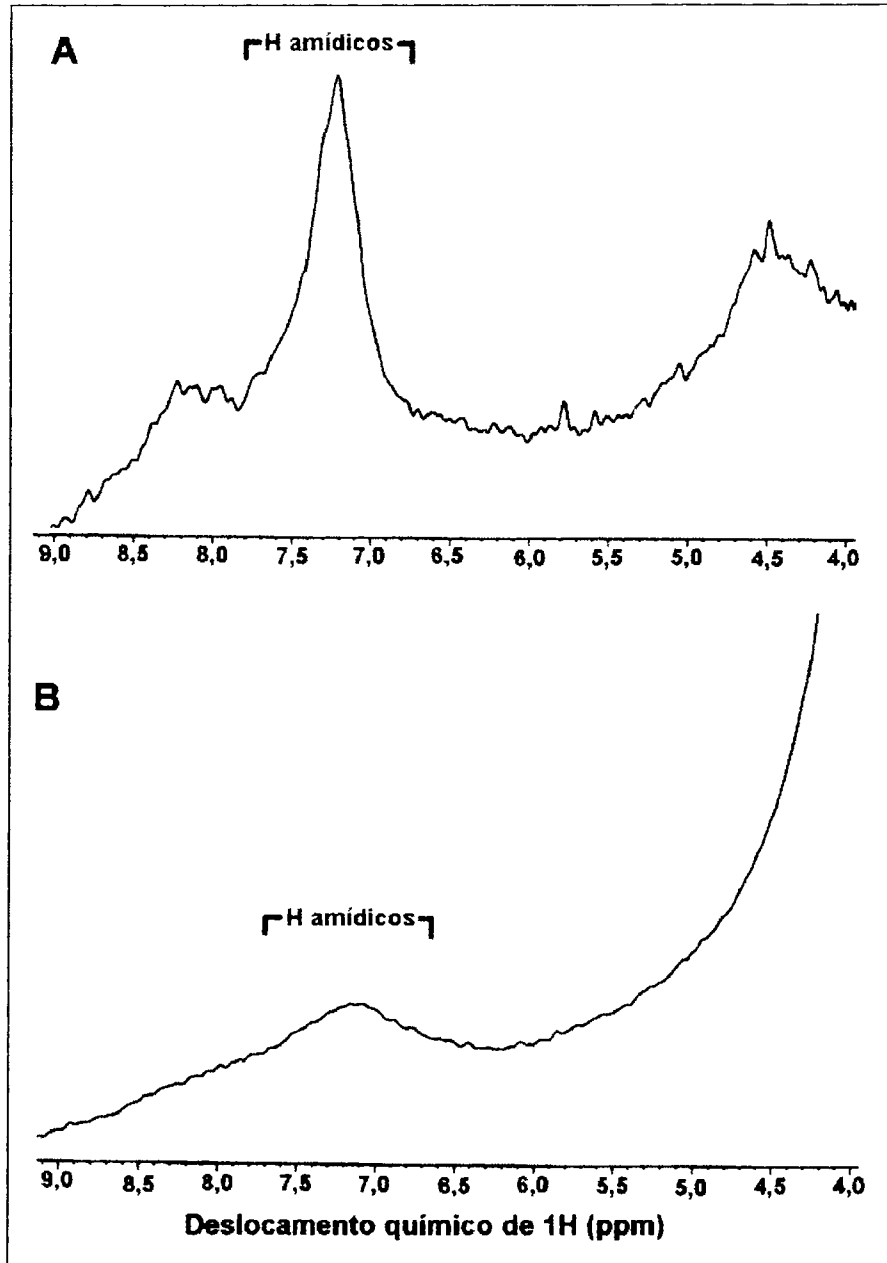


Figura 66: Espectros de RMN-¹H (HR-MAS) de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DMSO-*d*₆. Os espectros foram obtidos na ausência (A) e presença de Ca⁺² (B) e obtido após 1000 scans. A rotação orbitalar foi de 5 kHz.

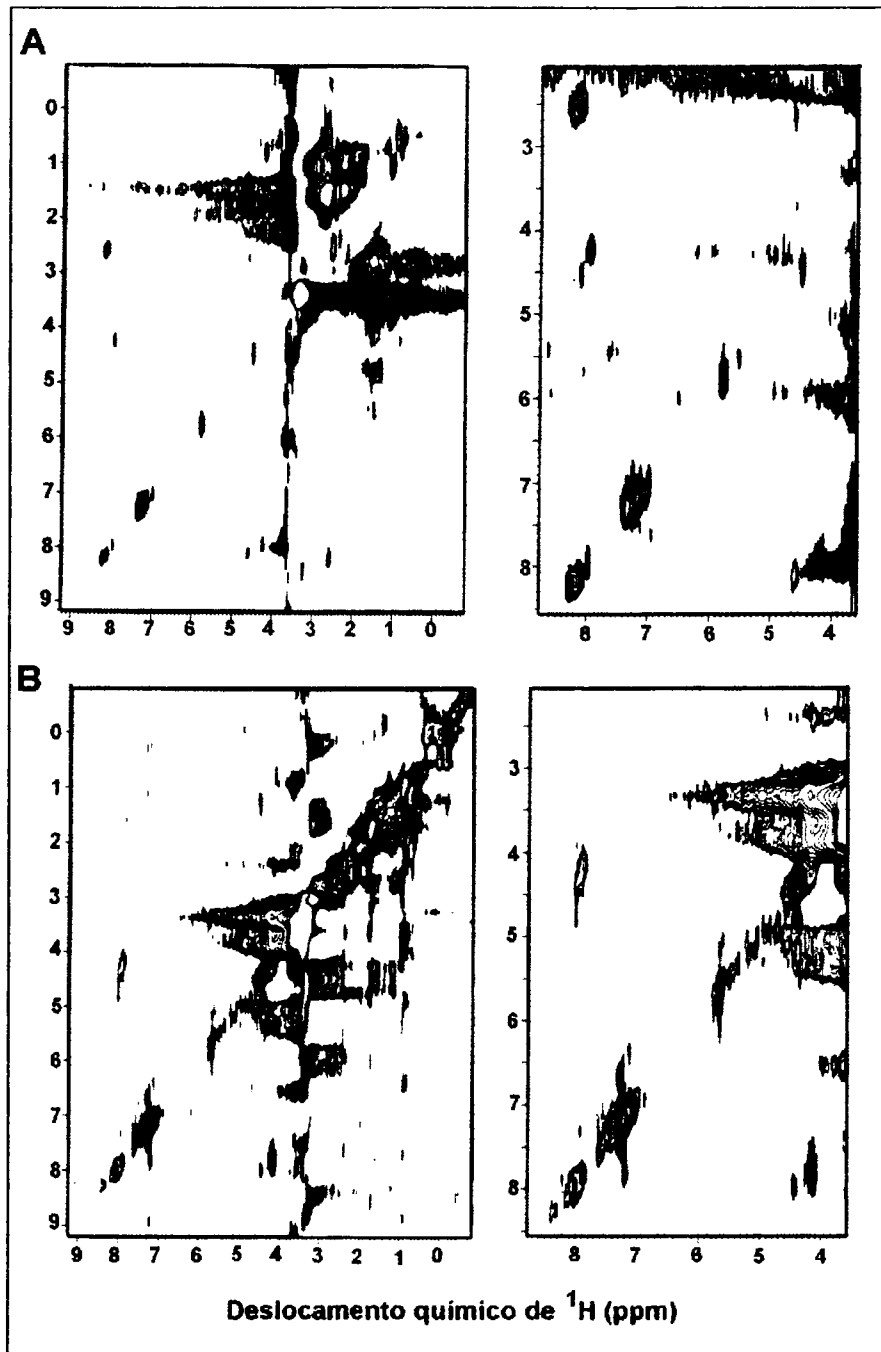


Figura 67: Espectros de RMN- ^1H (HR-MAS), TOCSY de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DMSO- d_6 adquirido após um período de 20 ms de CPMG. Os espectros foram obtidos na ausência (A) e presença de Ca^{+2} (B). A rotação foi de 5 kHz.

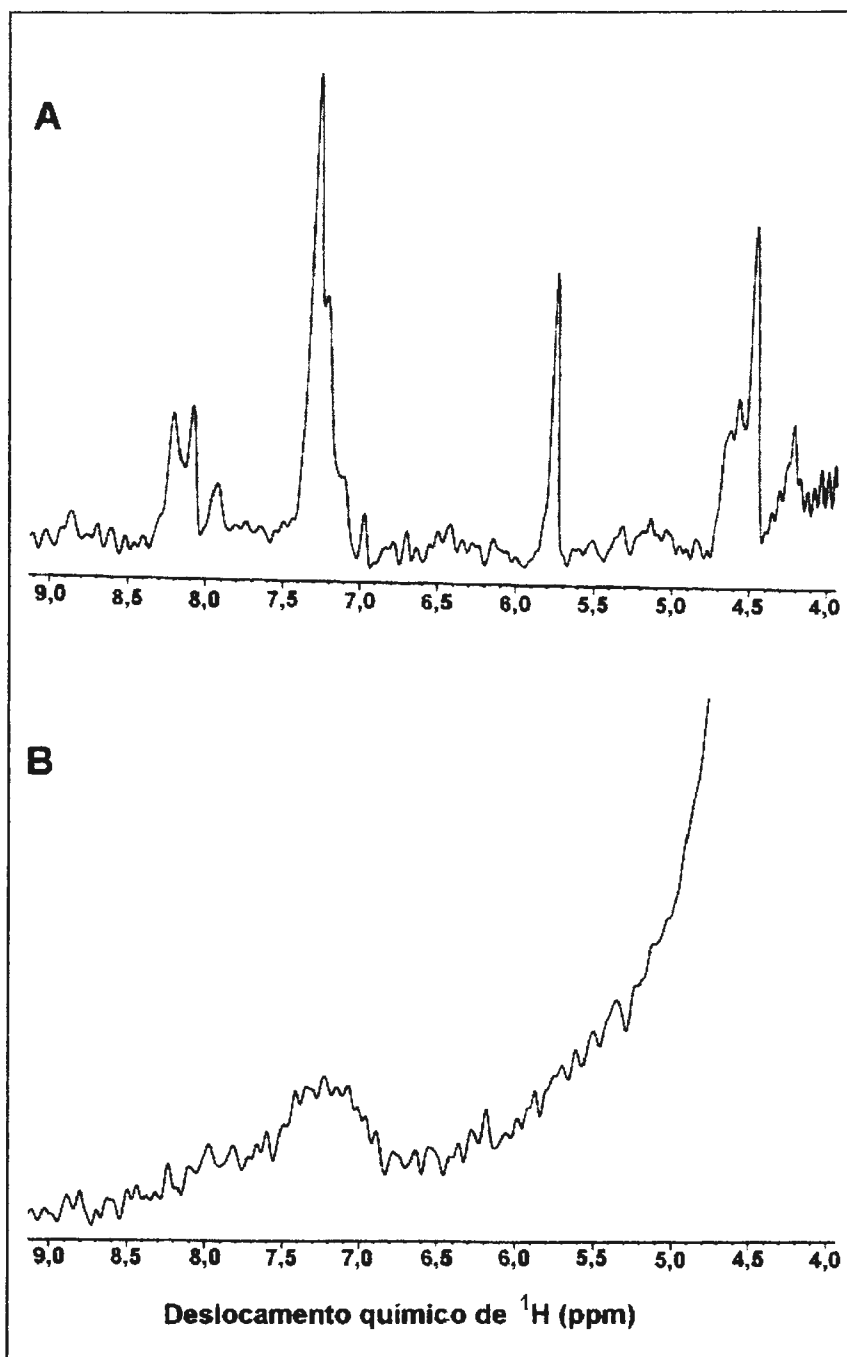


Figura 68: Espectros de RMN-¹H (HR-MAS) de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR em DMSO-*d*₆ adquirido após um período de 20 ms de CPMG. Os espectros foram obtidos na ausência (A) e presença de Ca⁺² (B). A rotação foi de 5 kHz e o "mixing time" foi de 80 ms (mlev).

previamente detectado foi confirmado no **Espectro B**, indicando que sob tais condições não somente a cadeia peptídica da peptidil-KOR, mas também a própria resina tornou-se mais rígida. A determinação dos tempos de relaxação não foi realizada, pois não foi possível acumular o número de scans necessários para a quantificação mais precisa dos mesmos[§]. Portanto, os dados apresentados são apenas qualitativos.

A atribuição de cada aminoácido presente em Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR não foi possível de ser feita através do experimento **TOCSY**. Os experimentos de **TOCSY**. Os espectros obtidos em presença de cálcio mostram razão sinal-ruído muito menor, provavelmente devido ao processo de relaxação via $T_{1\rho}$ (**Figura 67**). Medidas da relação sinal/ruído possibilitaram determinar que houve alargamento dos sinais na presença deste íon, indicando novamente que a peptidil-resina apresenta menor mobilidade nestas condições.

15. Preparação de novos ésteres de arginina

Com o objetivo de se obter diferentes ésteres do fragmento tetrapeptídico da h-CCK Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-ArgOR via aminólise da peptidil-KOR correspondente assistida pelo Ca^{2+} , sintetizamos ésteres inéditos de Boc-Arg(Mtr)-OH. Estes ésteres de peptídeos a serem obtidos deverão ser utilizados em trabalhos futuros como substratos em SCC.

Ésteres de aminoácidos são geralmente preparados por ativação das suas carboxilas com DCC em DCM na presença de um álcool (Kurzer, & Douraghi-Zadeh, 1967; Neises & Steglich, 1978). Não utilizamos este método em nossas esterificações, pois o derivado Boc-Arg(Mtr)-OH não é muito solúvel em DCM.

Utilizamos sim o reagente PyBOP. Este reagente, assim como o BOP, é muito empregado em reações de acoplamento em síntese em fase sólida. Além disso, ele vem sendo aplicado na preparação de diversos ésteres de peptídeos (Kim & Patel, 1995; Coste & Campagne, 1995). A vantagem do uso deste reagente é que a reação de esterificação pode ser realizada em

[§]Os experimentos foram interrompidos algumas vezes devido à falta de energia elétrica.

DMF, ou seja, no melhor solvente para dissolução do Boc-Arg(Mtr)-OH. Cabe lembrar que os grupos protetores ácido e base lábeis geralmente utilizados são estáveis ao processo de esterificação.

Assim, por esta metodologia conseguimos preparar dois ésteres de derivados de arginina: Boc-Arg(Mtr)-MTP e Boc-Arg(Mtr)-MEE, cujos dados de caracterização estão apresentados no **item 3.21**. Já o éster Boc-Arg(Mtr)-Pac foi preparado em presença de brometo de fenacila e DIEA (Papadimitriov *et al.*, 1967). As reações de esterificação realizadas não foram otimizadas.

Em trabalho posterior a este, os novos ésteres terão o grupo Boc removido para, em seguida, serem utilizados como componente nucleofílicos na aminólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR assistidas por Ca^{2+} .

16. Remoção dos grupos protetores das cadeias laterais dos Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-OMe, Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-Arg-OMe e Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-Arg-OEt.

A reação de desproteção da cadeia lateral do resíduo de lisina de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-OMe em presença de HF forneceu o Ac-Ala-Gly-Lys-OMe, confirmando a estabilidade do éster α -metílico nesta etapa. A **Figura 69** apresenta os perfis de RP-HPLC do Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-OMe de partida e do Ac-Ala-Gly-Lys-OMe formado.

Estes resultados são importantes, pois mostram a viabilidade da nossa proposta de obtenção não só de ésteres α -metílicos e etílicos de peptídeos com cadeias laterais protegidas, mas também daqueles sem a proteção das mesmas. Como já descrito anteriormente, os ésteres α -metílicos e etílicos de peptídeos totalmente protegidos são importantes como componentes amínicos em condensações químicas entre fragmentos peptídicos e os de peptídeos desprotegidos são vastamente empregados como substratos em condensações enzimáticas cineticamente controladas. Estas condensações podem possibilitar a obtenção de peptídeos, muitas vezes inviáveis de se obter pelo método da fase sólida passo a passo convencional.

Os produtos obtidos das aminólises de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR por Arg(HCl)OMe e Arg(HCl)OEt também foram submetidos à desproteção total em presença de HF. A análise por espectrometria de massas confirmou que os produtos formados eram os Ac-Ile-Ser-Asp-Arg-OMe e Ac-Ile-Ser-Asp-Arg-OEt desejados (ver **item 17**).

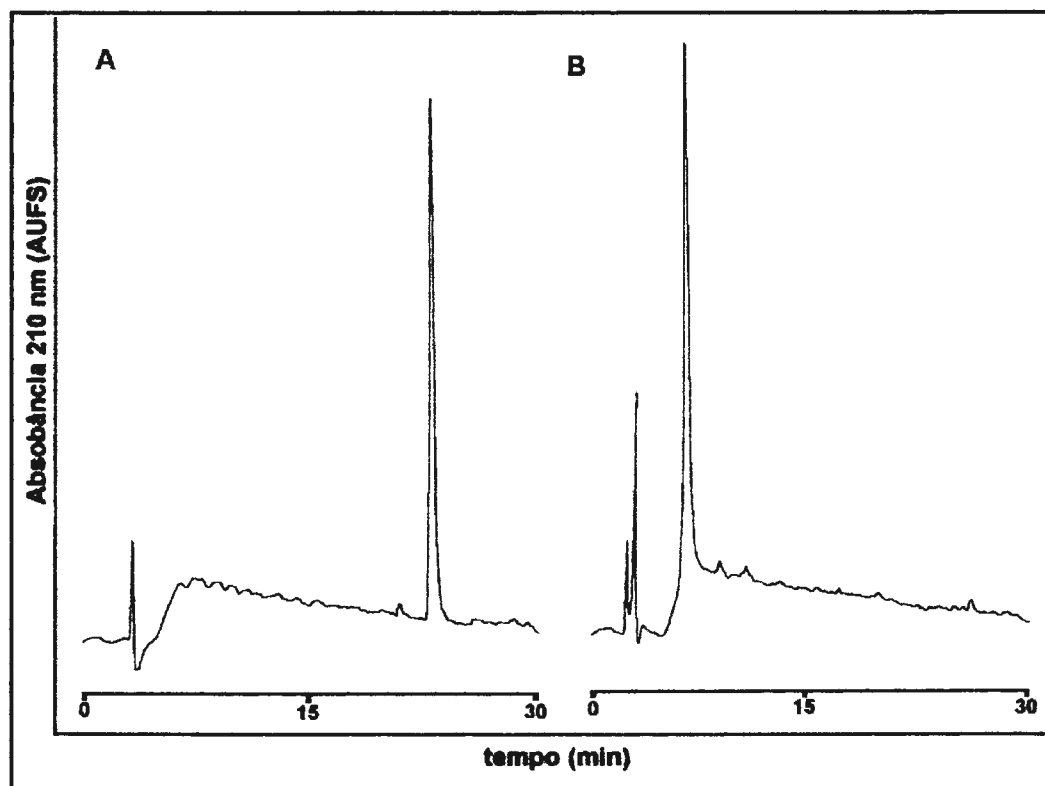


Figura 69: Perfis cromatográficos de Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-OMe bruto (A) e do Ac-Ala-Gly-Lys-OMe bruto obtido após a exposição de A a HF (B).

Condição de monitoramento: *coluna:* Vydac C₁₈, 5 μm, 300 Å, 0,46 cm x 25,0 cm; *solvente A:* 0,1% TFA/H₂O; *solvente B:* 60% ACN em 0,09% TFA/H₂O; *gradiente linear:* 5 a 95% de B em 30 min, *fluxo:* 1 mL/min; *λ:* 210 nm.

17. Caracterização dos ésteres de peptídeos

Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)OMe: análise de aminoácidos: Gly: obtido, 1,00 (esperado, 1,00), Ala: 1,02 (1,00), Lys: 1,08 (1,00). Análise por espectrometria de massa: Calcd. (M+H⁺): 498,9, obtido: 499,0.

Ac-Ala-Gly-LysOMe: análise de aminoácidos: Gly: obtido, 0,83 (esperado, 1,00), Ala: 1,00 (1,00), Lys: 1,10 (1,00). Análise por espectrometria de massas: Calcd. (M+H⁺): 330,4 obtido: 331,0.

Ac-Ala-Gly-GlyOMe: análise de aminoácidos: Gly: 2,17 (esperado, 2,00), Ala: 1,00 (1,00). Análise por espectrometria de massas: Calcd. (M⁺): 259,3, obtido: 259,0.

Ac-Ala-Gly-AlaOMe: análise de aminoácidos: Gly: 1,01 (esperado, 1,00), Ala: 2,00 (2,00). Análise por espectrometria de massas: Calcd. (M⁺): 273,3, obtido: 273,0.

Ac-Ala-Gly-PheOMe: análise de aminoácidos: Gly: 1,10 (esperado, 1,00), Ala: 1,00 (1,00), Phe 0,87 (1,00). Análise por espectrometria de massas: Calcd. (M⁺): 349,4, obtido: 349,0.

Ac-Ala-Gly-GlyOH: análise de aminoácidos: Gly: 1,75 (esperado, 2,00), Ala: 1,00 (1,00). Análise por espectrometria de massas: Calcd. (M⁺): 245,3, obtido: 245.

Ac-Ala-Gly-AlaOH: análise de aminoácidos: Gly: 1,02 (esperado, 1,00), Ala: 2,00 (2,00). Análise por espectrometria de massas: Calcd. (M⁺): 259,3, obtido: 260.

Ac-Ala-Gly-PheOH: análise de aminoácidos: Gly: 0,95 (esperado, 1,00), Ala: 1,00 (1,00), Phe 0,67 (1,00). Análise por espectrometria de massas: Calcd. (M⁺): 337, obtido: 335,2.

Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)OEt: análise de aminoácidos: Gly: 1,10 (esperado, 1,00), Ala: 1,00 (1,00), Lys: 0,95 (1,00). Análise por espectrometria de massas: Calcd. (M+H⁺): 513,1, obtido: 513,0.

Ac-Ala-Gly-AlaOEt: análise de aminoácidos: Gly: 0,99 (esperado, 1,00), Ala: 2,00 (2,00). Análise por espectrometria de massas: Calcd. (M+H⁺): 288,3, obtido: 288,0.

Ac-Ile-Ser-(Bzl)-Asp(OcHex)OMe: análise de aminoácidos: Ile: 1,00 (esperado, 1,00), Ser: 0,96 (1,00), Asp: 1,04 (1,00). Análise por espectrometria de massas: Calcd. (M+H⁺): 562,8, obtido: 562,0.

Ac-Ile-Ser-(Bzl)-Asp(OcHex)OEt: análise de aminoácidos: Ile: 1,00 (esperado, 1,00), Ser: 0,97 (1,00), Asp: 1,05 (1,00). Análise por espectrometria de massa: Calcd. (M+H⁺): 576,8 obtido: 576,9.

Ac-Ile-Ser-(Bzl)-Asp(OBzl)OMe: análise de aminoácidos: Asp: 1,03 (esperado, 1,00), Ser: 0,86 (1,00), Ile: 1,00 (1,00). Análise por espectrometria de massa: Calcd. (M+H⁺): 570,7, obtido: 570,0.

Ac-Ile-Ser-(Bzl)-Asp(OcHex)-Arg(HCl)OMe: análise de aminoácidos: Asp: 1,01 (esperado, 1,00), Ser: 1,05 (1,00), Ile: 1,00 (1,00), Arg: 1,00 (1,00). Análise por espectrometria de massa: Calcd. (M+H⁺): 718,9, obtido: 718,0.

Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-Arg(HCl)OEt: análise de aminoácidos: Asp: 1,17 (esperado, 1,00), Ser: 1,06 (1,00), Ile: 1,00 (1,00), Arg: 1,02 (1,00). Análise por espectrometria de massa: Calcd. (M+H⁺): 732,9, obtido: 733,0.

Ac-Ile-Ser-Asp-Arg(HCl)OMe: análise de aminoácidos: Asp: 1,22 (esperado, 1,00), Ser: 1,01(1,00), Ile: 1,00 (1,00), Arg: 0,88 (1,00). Análise por espectrometria de massa: Calcd. (M+H⁺): 504,6; obtido: 504

Ac-Ile-Ser-Asp-Arg(HCl)OEt: análise de aminoácidos: Asp: 1,11 (esperado, 1,00), Ser: 0,96 (1,00), Ile: 1,00 (1,00), Arg: 0,79 (1,00). Análise por espectrometria de massa: Calcd. (M+H⁺): 518,7; obtido: 518.

Ac-Ile-Ser-(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)OMe: análise de aminoácidos: Asp: 1,09 (esperado, 1,00), Ser: 0,98 (1,00), Ile: 1,00 (1,00), Arg: 0,99 (1,00). Análise por espectrometria de massa: Calcd. (M⁺): 938,1, obtido: 938.

Ac-Ile-Ser-(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)OEt: análise de aminoácidos: Asp: 1,11 (esperado, 1,00), Ser: 0,99 (1,00), Ile: 1,00 (1,00), Arg: 0,95 (1,00). Análise por espectrometria de massa: Calcd. (M⁺): 952,1 obtido: 906.

Ac-Ile-Ser-(Bzl)-Asp(OBzl)-Arg(Mtr)OBzl: análise de aminoácidos: Asp: 1,21 (esperado, 1,00), Ser: 1,05 (1,00), Ile: 1,00 (1,00), Arg: 0,89 (1,00). Análise por espectrometria de massa: Calcd. (M+H⁺): 1014,1 obtido: 906.

VII. CONCLUSÕES

O estudo da viabilidade de obtenção de ésteres de peptídeos através da solvólise e aminólise de peptidil-resinas de Kaiser assistidas pelos íons Ca^{2+} , Eu^{3+} e Tb^{3+} foi o tema central deste trabalho. Como já citado na Introdução, a obtenção de peptídeos longos é ainda um problema para os químicos de peptídeos que pode ser resolvido através do desenvolvimento das metodologias atuais de condensação entre fragmentos. O uso da **SCC** é uma alternativa atraente para tal. Entretanto, para que esta metodologia seja uma ferramenta útil é fundamental o desenvolvimento de métodos ágeis de obtenção de diferentes α -ésteres de peptídeos.

Os resultados obtidos nos experimentos aqui descritos nos permitiram concluir que:

1) Solvólise de Peptidil-KOR assistidas pelo Ca^{2+} , Eu^{3+} ou Tb^{3+} .

- i. A eficiência das reações de solvólise estudadas depende de diversos fatores: natureza do aminoácido ligado à resina, natureza do álcool que funcionará como nucleófilo, natureza do solvente orgânico empregado, temperatura e solubilidade do sal empregado no meio reacional.
- ii. O inchamento da peptidil-KOR parece não ser o fator determinante da eficiência destas reações.
- iii. Através dos rendimentos de desligamento do peptídeo da KOR nas metanólises de Ac-Ala-Gly-X-KOR [(onde, X= Gly, Ala ou Phe)], verificamos que o Ca^{2+} assistiu mais eficientemente estas reações do que o fez o ácido acético ou ainda a mistura de ambos nas condições experimentais empregadas.
- iv. O álcool mais eficiente para a solvólise de peptidil-KOR foi o metanol. Os rendimentos de desligamento do peptídeo da resina, independentemente da seqüência de aminoácidos e dos solventes

testados, foram sempre superiores aos obtidos na etanólise, benzólise ou tiólise. Em geral, estes ultrapassaram 80%.

- v. A solvólise de peptidil-KOR é lenta mesmo em presença de Ca^{2+} . Porém, verificamos que no tempo de 48 horas a reação já está próxima do seu rendimento máximo.
- vi. Nas reações de metanólise as condições suaves empregadas no desligamento do peptídeo da resina não afetam o éster protetor de cadeia lateral do ácido aspártico e nem levam a rearranjos indesejáveis. Tais reações são, portanto, seletivas à ligação oxima.
- vii. Os íons lantanídicos Eu^{3+} e Tb^{3+} , sondas luminescentes do Ca^{2+} , também são capazes de assistir metanólise e etanólise de peptidil-KOR. Os íons Ca^{2+} , Eu^{3+} e Tb^{3+} assistiram a produção de Ac-Ala-Gly-Ala-OMe, Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-OMe, Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-OMe e Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-OMe em DCM. Em DMSO, ocorreu metanólise da peptidil-resina Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR apenas em presença de Ca^{2+} . A explicação para este resultado está associada ao fato de que DMSO interage com os íons Eu^{3+} e Tb^{3+} .
- viii. Nas metanólises e etanólises em DCM, o Eu^{3+} é um aditivo tão eficiente quanto o Ca^{2+} . Os rendimentos de desligamento do peptídeo da resina são semelhantes e algumas vezes superiores àqueles obtidos na presença de Ca^{2+} .
- ix. Não é necessário um excesso molar de aditivo, seja este Ca^{2+} ou Eu^{3+} , nas metanólises de peptidil-KOR.

2) Aminólise:

- i. O íon cálcio também é capaz de assistir reações de aminólise de modo equivalente ou ligeiramente inferior, em termos de seletividade, ao ácido acético.
- ii. Neste caso, DMF, DMSO e NMP podem ser empregados como solventes.
- iii. Os resultados obtidos nas aminólises realizadas na presença de Eu^{3+} e Tb^{3+} evidenciaram que, ao contrário do Ca^{2+} , estes não são capazes de assistir eficientemente as aminólises de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-KOR por Arg(HCl)-OMe em determinados solventes ou misturas.

3) Estudo espectroscópicos:

- i. Apesar de baixo, o inchamento da Ac-Ala-Gly-Lys(2-Cl-Z)-KOR em DMSO-d_6 foi suficiente para fornecer espectros de boa qualidade através da técnica HR-MAS.
- ii. Os espectros obtidos não somente permitiram identificar cada resíduo de aminoácido presente nesta peptidil-KOR, mas também indicaram que esta seqüência em particular não adota uma conformação preferencial em DMSO-d_6 (na presença ou ausência de Ca^{2+}). A atribuição dos picos mostrou deslocamentos químicos para os prótons do peptídeo compatíveis com um “random coil”, como suportado pela ausência de inter-resíduos nos espectros de NOE.
- iii. Em presença de cálcio, contudo, há um decréscimo significativo da mobilidade das seqüências peptídicas (evidenciada pela diminuição da intensidade da razão sinal-ruído), sugerindo uma complexação do Ca^{2+} aos grupos carbonílicos do peptídeo. Tal complexação facilitaria

a metanólise e aminólise através de um mecanismo similar ao proposto por nós anteriormente para a transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt em metanol (Miranda *et al.*, 1991).

4) Geral:

- i. Ca^{2+} apresenta um papel fundamental tanto em reações de solvólise quanto de aminólises de peptidil-KOR.
- ii. A determinação do rendimento final das solvólises de peptidil-KOR via análise por RP-HPLC dos meios reacionais é sujeita a influência dos seguintes fatores: disponibilidade dos padrões em termos de qualidade e integridade química; condições das análises, variabilidade nas injeções, presença de contaminantes de comportamento cromatográfico próximo ao peptídeo α -esterificado. A determinação via análise de aminoácidos dos hidrolisados dos peptidil-KOR antes e após as reações é mais direto e confiável.
- iii. É possível incorporar Boc-Arg(Mtr)-OH à resina oxima de Kaiser. Entretanto, a reação é extremamente delicada e suscetível a variações de rendimento em função da escala, solvente, temperatura e reagente acoplador.
- iv. A obtenção de ésteres α -metílicos de peptídeos de cadeia lateral desprotegida por metanólise da peptidil-KOR e desproteção em HF é totalmente viável.
- v. Os dados obtidos até o momento indicam que o método por nós desenvolvido é uma alternativa nova e atraente para preparar ésteres α -metílicos e α -etílicos de peptídeos totalmente protegidos ou desprotegidos com bons rendimentos finais.

Partes do conteúdo aqui apresentado foram publicados em: uma comunicação - Moraes, C.M., Toma, I. & Miranda, M.T.M. (1999) In: *Peptides 1998, Proceedings of the 25th European Peptide Symposium* (Bajusz, S. & Hudecz, F., eds.), Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary, pp. 230-231; um trabalho completo - Moraes, C.M., Bemquerer, M.P. & Miranda, M.T.M. (2000) Solvolysis and aminolysis on peptidyl-Kaiser oxime resin assisted by Ca^{2+} and Eu^{3+} : a mild procedure to prepare alpha-methyl and ethyl esters of protected peptides. *J. Peptide Res.* **55**, 279-288.

IX. REFERÊNCIAS

Adlercreutz, P. & Matiasson, B. (1984). Aspects of biocatalyst stability in organic solvents. *Biocatalysis* **1**, 108-118.

Aiswaryakumari, K. & Sreekumar, K. (1998) Macromolecular Structure and reactivity: peptide synthesis using polymeric acyl transfer reagents. *Polymer International* **45**, 255-261.

Ananthanarayanan, V.S. & Brimble, K.S. (1996) Interaction of oxytocin with Ca^{2+} : I. CD and Fluorescence Spectral Characterization and Comparison with Vasopressin. *Biopolymers* **40**, 433-443.

Ananthanarayanan, V.S., Belciug, M-P. & Zhorov, B.S. (1996) Interaction of oxytocin with Ca^{2+} : II. Proton Magnetic Resonance and Molecular Modeling Studies of Conformations of the Hormone and its Ca^{2+} complex. *Biopolymers* **40**, 445-464.

Andrew, E.R.; Bradbury, A. & Eades, R.G. (1958) Removal of dipolar broadening of Nuclear magnetic resonance spectra of solids by specimen rotation. *Nature*, **183**, 1802-1803.

Anthony-Cahill, S.J., Griffith, M.C., Noren, C.J., Suich, D.J. & Schultz, P.G. (1989) Site-specific mutagenesis with unnatural aminoacids. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 400-403.

Barany, G., Kneib-Cordonier, N. & Mullen, D.G. (1987) Solid-phase peptide synthesis: a silver anniversary report. *Int. J. Peptide Protein Res.* **30**, 705-739.

Barton, M. A., Lemieux, R.U. & Savoie, J.Y. (1973) Solid-phase synthesis of selectively protected peptide for use as building units in the solid-phase synthesis of large molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 4501-4506.

Bemquerer, M.P., Theobaldo, F.C. & Tominaga, M. (1991) Pepsin-catalyzed peptide-synthesis in biphasic systems. *Biom. Biochim Acta* **50**, S94-S97.

Bemquerer, M.P., Adlercreutz, P. & Tominaga, M. (1994) Pepsin-catalyzed peptide synthesis in organic media: studies with free and immobilized enzyme. *Int. J. Peptide Res.* **44**, 448-456.

Bemquerer, M.P. (1996) Síntese de Peptídeos catalisada por pepsina na presença de solventes orgânicos. São Paulo. 186p. Tese (Doutorado)-Instituto de Química de São Paulo, Universidade de São Paulo.

Bemquerer, M.P., Liria, C.W., Kitagawa, K., Miranda, M.T.M. & Tominaga, M. (1998) Mixtures of trifluoroethanol or hexafluoroisopropanol and dimethylformamide are not of general applicability for peptide condensations catalyzed by trypsin. *J. Peptide Res.* **51**, 29-37.

Benz, H. (1993) The role of solid-phase fragment condensation (SPFC) in peptide synthesis. *Synthesis* 337-58.

Berner, P.-F., Blanquet, S. & Schmitter, J-M. (1992) Carboxipeptidase-Y catalyzed transpeptidation of esterified oligo- and polipeptides and its use for the specific carboxyl-terminal labeling of proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 2603-2610.

Bhugaloo-Via, I.P., Douliez, J.P., Moll, D., Dousset, X., Boyaval, P. & Marion, D. (1999) Delineation of key amino acid side chains and peptide domains for antimicrobial properties of divercin V41, a pediocin-like bacteriocin secreted by *Carnobacterium divergens* V41. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2895-900.

Blanco, R.M., Alvaro, G. & Guisán, J.M. (1991) Enzyme reaction engineering: design of peptide synthesis by stabilized trypsin. *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 573-583.

Bodanszky, M. (1993) Peptide Chemistry- A practical Textbook, 2nd, Revised ed., Springer-Verlag, Heidelberg.

Bonger, J, Lambros, T., Liu, W., Ahmad, M., Campbell, R.M., Felix, A.M. & Heimer, E.P. (1992) Enzymatic semisynthesis of a superpotent analog of human growth hormone-releasing factor. *J. Med. Chem.* **35**, 3934-3941.

Bonger, J. & Heimer, E.P. (1994) Recent applications of enzymatic peptide synthesis. *Peptides* **15**, 183-193.

Bordusa, F., Dahl, C., Jakubke, H-D., Burger, K. & Kocsch, B. (1999) Synthesis of alpha-fluoroalkyl substituted peptides via enzymatic fragment condensation. *Tetrahedron: Assymetry* **10**, 307-313.

Bradwejn, J. (1995) Cholecystokinin and panic disorder. In: Bradwejn, J.; Vasar, E.; eds. Cholecystokinin and anxiety: from neuron to behavior. Austin: Springer-Verlang, R.G. Lanes Company, 73-86.

Breddam, K. *et al* (1981) *Carlsberg Res. Commun.*, **46**, 121-128.

Brito, H.F., Malta, O.L., Alves de Carvalho, C.A., Menezes, J.F.S, Souza, L.R. & Ferraz, R. (1998) Luminescence behaviour of Eu³⁺ with thenoyltrifluoroacetate, sulfoxides and macrocyclics. *J. Alloys Compounds* **257-277**, 254-257.

Bünzli, J.C.G (1989) Lanthanides Probe Life, Chemical of Rare Earth Science, Theory and Practise (Bünzli, J.C.G. & G.R. Choppin, eds) Elsevier, Amesterdan, Oxford, New York, Tokyo.

Cabaret, D., Maillot, S. & Wakselman, M. (1990) Accelerated esterification of aminoacids with lipoglycosylated α -chymotrypsin in polar solvents. *Tetrahedron Lett.* **31**, 2131-2134.

Campagne, J.M., Coste J, Jouin, P. (1995) (1H-benzotriazol-1-loxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate-mediated and (1h-benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate-mediated activation of monophosphonate esters- synthesis of mixed phosphonate diesters, the reactivity of the benzotriazolyl phosphonic esters vs the reactivity of the benzotriazolyl carboxylic esters. *J. Org. Chem.* **60**, 5214-5223.

Cantor, C.R. & Schimmel, P.R. (1980) Biophysical Chemistry-Part I: Techniques for the study of biological structure and function. W.H. Freeman and Company, New York.

Cartier, G.E., Yoshikami, D.J., Gray, W.R., Luo, S.Q., Olivera, B.M. & McIntosh, J.M. (1996) A new alpha-conotoxin which targets alpha 3 beta 2 nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.* **271**, 7522-28.

Cerovsky, V., Wunsch, E. & Brass, J. (1997) Enzymatic semisynthesis of dicarba analogs of calcitonin. *European J. Biochem.* **247**, 231-237.

Ciemiewski, C.S., Haas, T.A., Smith, J.W. & Plow, E.F. (1994) Characterization of cation-binding sequences in the platelet integrin GPIIb-IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) by terbium luminescence. *Biochemistry* **33**, 12238-12246.

Cilli, E.M., Marchetto, R., Schreier, S., Nakaie, C.R. (1997) Use of spin label EPR spectra to monitor peptide chain aggregation inside resin beads. *Tetrahedron Lett.* **38**, 517-520.

Cilli, E.M. (1997) Resinas com alto grau de substituição: avaliação do emprego na síntese peptídica e estudos físico-químicos. São Paulo. 172p. Tese (Doutorado)- Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

Cilli, E.M., Marchetto, R., Schreier, S., Nakaie, C.R. (1999) Correlation between the mobility of spin-labeled peptide chains and resin solvation: An approach to optimize the synthesis of aggregating sequences. *J. Org. Chem.* **64**, 9118-9123.

Cooper, R.G., Harbottle, R.P., Schneider, H., Coutelle, C. & Miller, A.D. (1999) Peptide Mini-Vectors for Gene Delivery. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 1949-52.

Coste, J. & Campagne, J-M. (1995) Esterification of carboxylic-acids using BOP or PYBOP *Tetrahedron Lett.* **36**, 4253-56.

Crawley, J.N. & Corwin, R.L. (1994) Biological actions of cholecystokinin. *Peptides* **15**, 731-755.

Crawley, J.N. (1995) Interactions between cholecystokinin and other neurotransmitter systems. In: Cholecystokinin and anxiety: from neuron to behaviour (Bradwejn, J. & Vasar, E., eds). Austin: Springer-Verlang, R.G. Lanes Company, 101-126.

Davey, M.W., Rommelaere, H., De Boeck, S., Goethals, M., Damme, J.V. & Vandekerckhove, J. (1995) Trypsin-mediated semisynthesis of salmon calcitonin. *Int. J. Peptide Protein Res.* **45**, 380-385.

DeFerra, F., Rodriguez, F., Tortora, O., Tosi, C. & Grandi, G. (1997) Engineering of peptide synthetases: key role of the thioesterase-like domain for efficient production of recombinant peptidases. *J. Biol. Chem.* **272**, 25304-25309.

DeGrado, W.F. & Kaiser, E.T. (1980) Polymer-bound oxime esters as supports for solid-phase peptide-synthesis- Preparation of protected peptide-fragments. *J. Org. Chem.* **45**, 1295-1300.

DeGrado, W.F. & Kaiser, E.T. (1982) Solid-phase synthesis of protected peptides on a polymer-bound oxime- Preparation of segments comprising the sequence of acyto-toxic 26-peptide analog. *J. Org. Chem.* **47**, 3258-3261.

Dhalluim, C., Boutillon, C., Tartar, A. & Lippens, G. (1997) Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance in Solid-Phase Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 10494-10500.

Döhren, H.V., Keller, U., Vater, J. & Zocher, R. (1997) Multifunctional peptide synthesis. *Chem. Rev.* **97**, 2675-2705.

Duitman, E.H., Hamoen, L.W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., Bernhard, F., Reinhardt, R., Schimdt, M., Ullrich, C., Stein, T., Leenders, F. & Vater, J. (1999) The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: A multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc. Nat Acad. Sci USA* **96**, 13294-13299.

Elbanowski, M. & Makowska, B. (1996) The lanthanides as luminescent probes in investigations of biochemical systems. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **99**, 85-92.

Eysselein, V.E., Eberlein, G.A., Schaeffer, M., Grandt, D., Goebell, H., Niebel, W., Rosenquist, G.L., Meyer, H.E., Reeve, J.R. (1990) Characterization of the major form of cholecystokinin in human intestine-CCK-58. *American J. Physiology* **258**, G253-G260, Part 1.

Fields, G.B. & Noble, R.L. (1990) Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Peptide Protein Res.* **35**, 161-214.

Fité, M., Alvaro, G, Clapés, López-Santin, J., Benaiges, M.D. & Caminal, G. (1998) Reactivity of easily removable protecting groups for glycine in peptide synthesis using papain as catalyst. *Enzyme Microb. Technol.* **23**, 199-203.

Fujii, N. Futaki, S., Morimoto, H., Ionue, K. Doi, R. Tobe, T. & Yajima, H. (1988) Total Synthesis of human cholecystokinin-33. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 324-325.

Fujino, M., Wakimasu, M. & Kitada, C. (1981) Further studies on the use of multi-substituted benzenesulfonyl groups for protection for protection of the guanidino function of arginine. *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 2825-2831.

Fukuzawa, S-I. & Hongo, Y. (1998) Transesterification of N-acyloxazolidinones with alcohol by lanthanum(III) iodide. *Tetrahedron Lett.* **39**, 3521-3524.

Gangwar, S., Pauletti, G.M., Siahaan, T.J., Stella, V.J. & Borchardt, R.T. (1997) Synthesis of a novel esterase-sensitive cyclic prodrug of a hexapeptide using an (acyloxy)alkoxy promoiety. *J. Org. Chem.* **62**, 1356-1362.

- Gerish, S., Ullmann, G., Stunbenrauch, K. & Jakubke, H-D. (1994) Enzymatic peptide synthesis in frozen aqueous systems: influence of modified reaction conditions on the peptide yield. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **375**, 825-828.
- Gil, V.M. & Geraldes, C.F.G.C., (1987) Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Gill, I., López-Fandinó, R., Jorba, X. & Vulfon E.N. (1996) Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enz. Microbial Technology* **18**, 162-183.
- Giralt, E., Rizo, J. & Pedroso, E. (1984) Application of gel-phase ^{13}C -NMR to monitor solid phase peptide synthesis. *Tetrahedron* **40**, 4141-4152.
- Gisin, B.F. (1972) The monitoring of reactions in solid-phase peptide synthesis with picric acid. *Anal. Chim. Acta.* **58**, 248-249.
- Gobbo, M., Biondi, L., Filira, F., Piek, T. & Rocchi, R. (1995) Cyclic analogues of Thr⁶-bradykinin, N⁶-Lys-bradykinin and endo-Lys^{8a}-vespulinin 1. *Int. J. Protein Res.* **45**, 459-465.
- Gololobov, M.Y., Kozlova, E.V., Borisov, I., Schellenberger, U., Schellenberger, V. & Jakubke, H-D (1992) How predict product yield in kinetically controlled enzymatic peptide synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 432-436.
- Gololobov, M.Y., Stepanov, V.M., Voyushina, T.L., Morozova, I.P. & Adlercreutz, P. (1994) Side reactions in enzymatic peptide synthesis in organic media: effects of enzyme, solvent, and substrate concentrations. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 522-528.

Gunther, R. & Bordusa, F. (2000) Protease catalysis mediated by a substrate mimetic: a novel enzymatic approach to the synthesis of carboxylic acid amides. *Chem.* **6**, 463-467.

Hamuro, Y., Scialdone, M.A. & DeGrado, W. (1999) Resin-to-resin and Aminoacyl-transfer reactions using oxime supports. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 1636-1644.

Harro, J., Vasar, E. & Bradwejn, J. (1993) CCK in animal and human research on anxiety. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**, 244-249.

Hendrix, J.C., Jarret, J.T., Anisfeld, S.T. & Lansbury Jr, P.T. (1992) Studies related to a convergent fragment-coupling approach to peptide synthesis using the Kaiser oxime resin. *J. Org. Chem.* **57**, 3414-3420.

Högberg, H.E., Edlund, H., Berglund, P. & Hedenstrom, E. (1993) Water activity influences enantioselectivity in a lipase catalyzed resolution by esterification in an organic solvent. *Tetrahedron: Asymmetry* **4**, 2123-2126.

Hojo, H. & Aimoto, S. (1991) Polypeptide synthesis using the S-alkyl thioester of a partially protected peptide segment. Synthesis of the DNA-binding domain of c-Myb protein (142-193). *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **64**, 111-117.

Hojo, H. & Aimoto, S. (1992) Protein synthesis using S-alkyl thioester of partially protected peptide segments. Synthesis of DNA-binding protein of *Bacillus stearothermophilis*. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **65**, 3055-3063.

Holman, G.M., Nachman, R.J. & Coast, G.M. (1999) Isolation, characterization and biological activity of a diuretic myokinin neuropeptide from the housefly, *Musca domestica*. *Peptides* **20**, 1-10.

Horrocks Jr, W.D. & Sudnick, D. R. (1981) Lanthanide ion luminescence probes of the structure of biological macromolecules. *Acc. Chem. Res.* **14**, 384-392.

Hruby, V.J., Fang, S., Knapp, R., Kazmierski, W., Lui, G.K. & Yamamura, H.I. (1990) Cholecystokinin analogues with high affinity and selectivity from brain membrane receptors *Int. J. Peptide Protein. Res.* **35**, 566-573.

Itoh, K., Sekizaki, H., Toyota, E., Fujiwara, N. & Tanizawa, K. (1996) Application of inverse substrates to trypsin-catalyzed peptide synthesis. *Bioorg. Chem.* **24**, 59-68.

Itoh, S. & Lal, H. (1990) Influence of cholecystokinin and analogues on memory process. *Drug Develop. Res.* **21**, 257-276.

Ivanov, I.P., Yomtova, V.M. & Petkov, D.D. (1997) Semispecific ester substrates of trypsin as acyl donors in kinetically controlled peptide synthesis. *Biocatal. Biotransform.* **14**, 195-204.

Jackson, D.Y., Burnier, J., Quan, C., Stanley, M., Tom, J. & Wells, J. A. (1994) A designed peptide ligase for total synthesis of ribonuclease A with unnatural catalytic residues. *Science* **26**, 243-247.

Jacobsen, R., Yoshikami, D., Ellison, M., Martinez, J., Gray, W.R., Cartier, G.E., Shon, K.J., Groebe, D.R., Abramson, S.N., Olivera, R.M. & McIntosh, J.M. (1997) Differential targeting of nicotinic acetylcholine receptors by novel alpha A-conotoxins. *J. Biol. Chem.* **272**, 22531-22537.

Jakubke, H-D (1987) Enzymatic peptide synthesis. In *The Peptide: Analysis, Synthesis, Biology* (Underfried, S. & Meienhofer, J. eds), Academic Press, London **9**, 103.

Jakubke, H-D (1994) Protease-catalyzed peptide synthesis: basic principles, new synthesis strategies and medium engineering. *J. Chin. Chem. Soc.* **41**, 355-370.

Janssens, M.P.E., Kellner, R. & Gade, G. (1994) A novel adipokinetic octapeptide found in the Damselflies *Pseudagrion-Inconspicuum* e *Isiinura-Senegalensis*. *Biochem. J.* **302**, 539-543.

Jarret, J.T. & Lansbury Jr, P.T. (1990) Improved coupling of protected peptides on the Kaiser oxime resin using BOP activation. *Tetrahedron Lett.* **31**, 4561-4564.

Jelinek, R., Valente, A.P., Valentine, K.G. & Opella, S.J. (1997) Two-dimensional NMR spectroscopy of peptides on beads. *J. Mag. Reson.*, **125**, 185-187.

Johnson, L.R., Stening, G.F. & Grossman, M.I. (1970) Effect of sulfation on the gastrointestinal actions of caerulein. *Gastroenterology* **58**, 208-216.

Jung, G. & Becksickinger, A.G. (1992) Multiple peptide-synthesis methods and their applications. *Angew. Chem. Int. Edit.* **31**, 367-383.

Kaiser, E., Colescott, R.L., Bossinger, C.D. & Cook, P.I. (1970) Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **34**, 595-598.

Kappes, T. & Waldmann, H. (1997) Enzymatic synthesis of peptide conjugates: tools for the study of biological signal transduction. *Liebigs Ann.-Recueil* **5** 803-813.

Katz, A.K., Glusker, J.P. Beebe, S.A. & Bock, C.W. (1996) Calcium ion coordination: a comparison with that of beryllium, magnesium, and zinc. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 5752-5763.

Kelley, W.S. (1996) Therapeutic peptides: the devil is in the details. *Biotechnology* **14**, 28-31.

Kempton, C., Kaiser, D., Haag, S., Nicholson, G., Gnau, V., Tilmann, W., Gierling, K.H., Decker, H. Zähler, H., Jung, G. & Metzger, J.W., (1997) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **36**, 498-501.

Khan, A.A. & Iftikhar, K. (1997) Mixed-ligand lanthanide complexes.11. Absorption spectra and hypersensitivity in the complexes of Pr-III, Nd-III, Ho-III and Er-III in non-aqueous solutions. *Polyhedron* **16**, 4153-4161.

Kim, M.H. & Patel, D.V. (1995) "BOP" as a reagent for mild and efficient preparation of esters. *Tetrahedron Lett.* **35**, 5603-5606.

Kitagawa, K., Aida C., Fujiwara, H., Yagami, T. & Futaki, S. (1997) Efficient solid-phase synthesis of sulfated tyrosine-containing peptides using 2-chlorotrityl resin: Facile synthesis of gastrin/cholecystokinin peptides. *Tetrahedron Lett.* **38**, 599-602.

Kitagawa, K., Aida, C., Fujiwara, H., Yagami, T. & Futaki, S. (1999) Total solid-phase synthesis of humans cholecystokinin (CCK-39). Peptides: Chemistry, Structure and Biology.

Klakamp, S.L. & Horrocks, W.D. (1992) Lanthanide ion luminescence as a probe of DNA-structure.1. guanine-containing oligomers and nucleotides. *J. Inorg. Biochem.* **46**, 175-192.

Kleinkauf, H. & Döhren, H.V. (1996) A nonribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **236**, 335-351.

Krambovitis, Z.E., Hatzidakis, G. & Barlos, K. (1998) Preparation of MUC-1 oligomers using an improved convergent solid-phase peptide synthesis. *J. Biol. Chem.* **273**, 10874-10879.

Kullmann, W. (1987) *Enzymatic Peptide Synthesis*. CRC Press.

Kunugi, S., Suzuki, N., Nishimoto, S., Morisawa, T. & Yoshida, M. (1997) Kinetic Study of carboxypeptidase-Y catalyzed peptide condensation reactions in aqueous-organic solvent. *Biocatal. Biotransform.* **14**, 205-217.

Kurano, Y., Kimura, T. & Sasakibara, S. (1987) Total synthesis of porcine cholecystokinin-33 (CCK-33). *J. Chem. Soc. Commun.*, 323-325.

Kurzer, F. & Douraghi-Zadeh, K. (1967) Advances in the chemistry of carbodiimides. *Chem. Rev.* **67**, 107-152.

Lakey, J.H., Lea, E.J.A, Rudd, H.M. & Hopwood, D.A. (1983) A new channel-forming antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2) which requires calcium for its activity. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 3565-3573.

Lee, J.D. (1980) *Química Inorgânica um novo texto conciso*, Ed. Edgard Blücher Ltda, São Paulo.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L. & Cox, M.M. (1993) *Principle of Biochemistry* Worth Publishers, New York.

Levitt, M.H., Freeman, R. & Frenkiel, T. (1982a) Broad band heteronuclear decoupling. *J. Mag. Reson.* **47**, 328-330.

Levitt, M.H., Freeman, R., Frenkiel, T. (1982b) Supercycles for broad-band heteronuclear decoupling. *J. Mag. Reson.* **50**, 157-160.

Lippard, S.J. & Berg, J.M., (1994) Principles of Bioinorganic Chemistry, 4nd ed, University. Science Books, Mill Valley, California.

Lloyd, R.C., Dickman, M. & Jones, B. (1998) Probing the specificity of the S₁' leaving group, site of subtilisin Bacillus lentus using an enzyme-catalyzed transesterification reaction. *Tetrahedron: Asymmetry.* **9**, 551-561.

Lobl, T.J. & Maggiora, L.L. (1988) Convenient Synthesis of C-terminal peptide analogs by aminolysis of oxime resin linked protected peptides. *J. Org. Chem.* **53**, 1979-1982.

Look, G.C., Holmes, C.P. Chinn, J.P. & Gallop, M.A. (1994) Methods for combinatorial organic synthesis: the use of fast ¹³C NMR analysis for gel phase reaction monitoring. *J. Org. Chem.* **59**, 7588-7590.

Ludwick, A.G., Jelinski, L.W., Live, D., Kintanar, A., Dumais, J.J. (1986) Association of peptide chains during Merrifield solid-phase peptide synthesis—a deuterium NMR-study. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 6493-6496.

MacRae, B.J., Kurachi, K., Heimark, R.L., Fujikawa, K., Davie, E.W. & Powers, J.C. (1981) Mapping the active sites of bovine thrombin, factor IX_a, factor XI_a, factor XII_a, plasma kallikrein, and trypsin with amino acid and peptide thioesters: Development of new sensitive substrates. *Biochemistry* **20**, 7196-7206.

Mahale, S.D., Kadam, L.R. & Pereira, J. (1993) Studies on the delineation of the antigenic of determinants of chicken riboflavin carrier protein (CRCP)-identification of a determinant in the region 10-24 of the protein. *Int. J. Peptide. Prot. Res.* **41**, 28-33.

Mant, C.T. & Hodges, R.S. (1991) In: "High Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins" CRC Press, Section XIV: Smillie, L.B. e Natriss, M., "Aminoacid Analyses of Proteins and Peptides: An Overview, 847.

Marahiel, M.A., Stachelhaus, T. & Mootz, Henning, D. (1997) Modular peptide synthetases involved nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.* **97**, 2651-2673.

Marchetto, R., Schreier, S. & Nakaie, C.R. (1993) A novel spin-labeled amino-acid derivative for use in peptide synthesis - (9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-2,2,6,6-tetramethylpiperidina-N-oxyl-4-amino-4-carboxylic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **23**, 11042-11043.

Marion, D., Ikura, M., Tschudin, R. & Bax, A. (1989) Rapid recording of 2D NMR-spectra without phase cycling- application to the study of hydrogen exchange in proteins. *J. Mag. Reson.* **85**, 393-399.

Marshall, J.L., Erickson, K.C. & Folson, T.K. (1970) The esterification of carboxylic acids using a boron trifluoride-etherate-alcohol reagent. *Tetrahedron Lett.* **46**, 4011-4012.

McCort-Tranchepain, I., Ficheux, D., Duriex, C., Roques, B.P. (1992) Replacement of Tyr-SO₃H by a p-carboxymethyl-phenylalanine in a CCK-8-derivative preserves its high affinity for CCK-B receptor. *Int. J. Peptide Protein Res.* **39**, 48-57.

Meos, H., Haga, M. & Tōugu, V. (1995) Single-step enzymatic conversation of peptide amides to esters. *Tetrahedron Lett.* **13**, 2343-2346.

Merrifield, B. (1963) Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149-2154.

Mihara, H., Xu, M., Nishino, N. & Fujimoto, T. (1993) Application of tryptic condensation strategy for the synthesis of alpha-melanocyte stimulating hormone *Int. J. Peptide Protein Res.* **41**, 405-410.

Mihara, H., Yamabe, S., Niidome, T. & Aoyagi, H. (1995) Efficient preparation of cyclic peptide mixtures by solid-phase synthesis and cyclization cleavage with oxime resin. *Tetrahedron Lett.* **36**, 4837-4840.

Miranda, M.T.M., Cheng, E., Muradian, J., Seidel, W.F. & Tominaga, M. (1986) Thermolysin as a catalyst in enzymatic synthesis of asparagine-containing peptides. *Bioorg. Chem.* **14**, 182-193.

Miranda, M.T.M. & Tominaga, M. (1991) Thermolysin as a catalyst in enzymatic synthesis of asparagine-containing peptides II. *Bioorg. Chem.* **14**, 128-133.

Miranda, M.T.M., Morita, H. & Tominaga, M. (1991a) Transesterification of Moz-Asn-Leu-Gly-OEt in metanol- confirmation of Ca^{2+} mediated catalysis. *Int. J. Peptide Protein Res.* **37**, 299-305.

Miranda, M.T.M., Theobaldo, F.C. & Tominaga, M. (1991b) Transesterification of peptide esters and peptidyl resins in methanol-contain calcium acetate. *Int. J. Peptide Protein Res.* **37**, 451-456.

Miranda, M.T.M., Craig, A.G., Miller, C., Liddle, R.A., Rivier, J.E. (1993a) Total synthesis, purification, and characterization of human [Phe(P- $\text{CH}_2\text{SO}_3\text{NA}$)(52), NLe(32,53,56), NaI(55)]-CCK20-58, [Tyr(52),

NLe(32,53,56), Nal(55)]-CCK-58, and [Phe(P-CH₂SO₃NA)(52), NLe(32,53,56), Nal(55)]-CCK-58. *J. Protein Chem.* **12**, 533-544.

Miranda, M.T.M., Liddle, R.A. & Rivier, J.E. (1993b) Synthesis of human CCK26-33 and CCK-33 related analogs on 2,4-DMBHA and TMBHA. *J. Med. Chem.* **36**, 1681-1688.

Miranda, M.T.M., Miller, C., Craig, A.G., Dykert, J., Liddle, R.A. & Rivier, J.E. (1994) Synthesis of human CCK-58-related analogs. In *Peptides, Chemistry, Structure and Biology*: R. S. Hodges & J. A. Smith (Eds.) , ESCOM, Leiden, 59-61.

Mitin, Y.V., Braun, K. & Kuhl, P. (1997) Papain catalyzed synthesis of glyceryl esters of N-protected amino acids and peptides for the use in trypsin catalyzed peptide synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* **54**, 287-290.

Mitin, Y.V., Zapevalova, N.P. & Gorbunova, E.Y. (1993) New approaches to peptide synthesis with help of trypsin. *Chem. Pept. Protein.* **516**, 187-194.

Moore, G.J. & Kwork, Y. (1980) Cleavage of protected amino acids and peptides from benzyl ester resins by transesterification with KCN in benzyl alcohol. *Canadian J. Biochem.* **58**, 641-643.

Mootz, H.D. & Marahiel, M.A. (1999) Design of multimodular peptide syntheses. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 341-348.

Mor, A., Chartrel, N., Vaudry, H. & Nicolas, P. (1994) Skin peptide tyrosine-tyrosine, a member of the pancreatic-polypeptide family- isolation, structure, synthesis and endocrine activity. *Proc. Nat Acad. Sci USA* **91**, 10295-10299.

Moraes, C.M., Toma, I. & Miranda, M.T.M. (1999) In *Peptides 1998, Proceedings of the 25th European Peptide Symposium* (Bajusz, S. & Hudecz, F., eds.), Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary, pp. 230-231.

Moraes, C.M., Bemquerer, M.P. & Miranda, M.T.M. (2000) Solvolysis and aminolysis on peptidyl-Kaiser oxime resin assisted by Ca^{2+} and Eu^{3+} : a mild procedure to prepare alpha-methyl and ethyl esters of protected peptides. *J. Peptide. Res.* **55**, 279.

Moree, W.J., Sears, P., Kawashiro, K., Witte, K. & Wong, C-H. (1997) Exploitation of subtilisin BPN' as catalyst for the synthesis of peptides containing noncoded amino acids, peptide mimetics and peptide conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 3942-3947.

Morley, J.E. (1982) The ascent of cholecystokinin (CCK) from gut and brain. *Life Sci* **30**, 479-493.

Muir, T.W., Sondhi, D. & Cole, P.A. (1998) Expressed protein ligation: A general method for protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* **95**, 6705-6710.

Myazawa, T., Ensatsu, E., Tanaka, K. Yanagihara, R. & Yamada, T. (1999) Superiority of the carbamoylmethyl ester as donor ester in the protease-catalyzed kinetically controlled peptide synthesis in organic media. In *Peptides 1998, Proceedings of the 25th European Peptide Symposium* (Bajusz, S. & Hudecz, F., eds.), Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary, pp. 140-141.

Myazawa, T., Nakajo, S., Nishikawa, M., Imagawa, K., Yanagihara, R. & Yamada, T. (1996) α -Chymotrypsin-catalysed peptide synthesis using activated esters as acyl donors. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**, 2867-2868.

Nakai, C. R., Goissis, G., Schreier, S. & Paiva, A.C.M. (1981) PH-dependence of electron-paramagnetic-res spectra of nitroxides containing ionizable groups. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **14**, 173-180.

Nakai, C.R., Schreier, S. & Paiva, A.C.M. (1983) Synthesis and properties of spin-labeled angiotensin derivatives. *Biochem. Biophys. Acta* **742**, 63-71.

Neises, B. & Steglich, W. (1978) Simple Method for the esterification of carboxylic acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **17**, 522-524.

Neises, B & Steglich, W. (1982) Racemization-free esterification of 2-nitrophenylsulphenyl-protected amino acids by dicyclohexylcarbodiimide-4-dimethylaminopyridine. *J. Chem. Soc Chem. Comm.* **19**, 1132-1133.

Nicolas, E., Clemente, J., Ferrer, T., Albericio, F. & Giralt, E. (1997) The use of the Nbb-resin for the solid-phase synthesis of peptide alkylesters and alkylamides. Synthesis of Leuprolide. *Tetrahedron* **53**, 3179-3194.

Nishino, N., Xu, M., Mihara, H. & Fujimoto, T. (1992) Hexafluoroisopropyl alcohol is a useful cosolvent with dimethylformamide for tryptic synthesis of peptides. *Chem. Lett.* **2**, 327-330.

Nishino, N., Xu M, Mihara, H. & Fujimoto, T. (1992) Tryptic condensation combined with peptide segment synthesis condensation strategy for the efficient synthesis of human growth-hormone releasing-factor (1-29) amide. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 648-650.

Nishino, N., Xu M., Mihara, H. & Fujimoto, T. (1992) Use of hexafluoroisopropyl alcohol in tryptic condensation for partially protected precursor of alpha-melanocyte stimulating hormone. *Tetrahedron Lett.* **33**, 3137-3140.

Nishino, N., Xu, M., Mihara, H., Fujimoto, T., Ueno, Y. & Kumagai, H. (1992) Sequence dependence in solid-phase-cyclization-cleavage for cyclo(-arginyl-glycyl-aspartyl-phenylglycyl-). *Tetrahedron Lett.* **33**, 1479-1482.

Noritomi, H., Watanabe, A. & Kise, H. (1989) Enzymatic reactions in aqueous organic media .7. Peptide and ester synthesis in organic solvents by alpha-chymotrypsin immobilized through non covalent binding to polyvinyl-alcohol). *Polym. J.* **21**, 147-153.

Papadimitriov, J.T., Yovanidis, C., Paganou, A. Zervas, L. New methods in peptide synthesis. Part V. On α - and γ -diphenylmethyl and phenacyl esters of L-glutamic acid. *J. Chem. Soc (C)*, 1830-1836.

Penke, B. & Nierges, L. (1991) Solid-phase synthesis of porcine cholecystokinin-33 in a new resin via Fmoc-strategy. *Peptide Res.* **4**, 289-295.

Penke, B., Zarándi, M., Zsigó, J., Tóth, G.K., Kovács, K., & Telegdy, G. (1986) Synthesis of cholecystokinin peptides. In: *Peptides 1986* (Theodoropoulos, D. ed.), Walter de Gruyter, Berlin, 19th European Peptide Symposium, 447-450.

Persichetti, R.A., St. Clair, N.L., Griffith, J.P., Navia, M.A. & Margolin, A.L. (1995) Cross-Linked Enzyme Crystals (CLECs) of Thermolysin in the synthesis of peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 2732-2737.

Pichette, A., Voyer, N., Larouche, R. & Meillon, J.C. (1997) A useful method for the preparation of fully protected peptide acids and esters. *Tetrahedron Lett.* **38**, 1279-1282.

Pinget, M., Straus, E. & Yalow, R.S. (1979) Release of cholecystokinin peptides from a synaptosome-enriched fraction of rat cerebral cortex. *Life Sci.* **25**, 339-342.

PoluéktoV, N.S., Kononenko, L.I., Vel'tyukova, S.V., Gava, S.A. & Drobyazko, V.N. (1975) "Hypersensitive" transitions in the luminescence spectra of samarium and europium ions in solutions of various complexes. *Dokl. Akad. Nauk. SSR.* **220**, 146-149.

PoluéktoV, N.S., Drobyazko, V.N., Meshkova, S.B., Vel'tyukova, S.V. & Kononenko, L.I., (1975) Variation in the band intensity ratio of the luminescence spectra from Eu^{3+} , Sm^{3+} , Tb^{3+} , and Dy^{3+} ion complexes as a function of the number of coordinated ligands. *Dokl. Akad. Nauk. SSR.* **224**, 913-915.

Reeve, J.R., Eysselein, V., Walsh, J.H., Ben-Avram, C.M., Shively, J.E. (1986) New molecular forms of cholecystokinin. Microsequence analysis of forms previously characterized by chromatographic methods. *J. Biol. Chem.* **261**, 16392-16397.

Rehwinkel, H. & Steglich, W. (1982) Racemisierung Umesterung N-geschützter Dipeptide-ester mit Hilfe von Titan(IV)-alkoxiden. *Synthesis*, 826-827.

Richardson, F.S. (1982) Terbium(III) and europium(III) ions as luminescent probes and stains for biomolecular systems. *Chem. Rev.* **82**, 541-552.

Rizo, J., Sutton, R.B., Breslau, J., Koeber, S.C., Porter, J., Hagler, A.T., Rivier, J.E. & Gierasch, L.M. (1996) A novel conformation in a high potent, constrained gonadotropin-releasing hormone antagonist. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 970-76.

Ron, D., Gilon, C., Hanani, M., Vromen, A., Selinger, Z. & Chorev, M. (1992) *N*-methylated analogs of Ac[Nle^{28,31}]CCK(26-33): Synthesis, activity, and receptor selectivity. *J. Med. Chem.* **35**, 2806-2811.

Rourke, I.J., Johnsen, A.H., Nanni, D., Petersen, J.G.L. & Rehfeld, J.F. (1997) Heterologous expression of human cholecystokinin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **272**, 9720-9727.

Russel, J., Gee, P., Liu, S.M. & Angeletti, R.H. (1994) Inhibition of parathyroid-hormone secretion by amino-terminal chromogranin peptides. *Endocrinology* **135**, 337-342.

Sasaki, T., Findeis, M.A. & Kaiser, E.T. (1991) Evaluation of the oxime resin based segment synthesis-condensation approach using RNase T₁ as a model synthetic target. *J. Org. Chem.* **56**, 3159-3168.

Schellenberg, V. & Jakubke, H-D. (1991) Protease-catalyzed kinetically controlled peptide synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**, 1437-1449.

Schellenberger, V. & Jakubke, H-D. (1986) A spectrophotometric assay for the characterization of the S' subsite specificity of alpha-chymotrypsin. *Biochim. Biophys. Acta* **869**, 54-60.

Schellenberger, V., Braune, K., Hofmann H.J. & Jakubke, H-D. (1991) The specificity of chymotrypsin: a statistical analysis of hydrolysis data. *Eur. J. Biochem.* **199**, 623-636.

Sears, P.S. & Clark, D.S. (1993) Comparison of soluble and immobilized trypsin kinetics: implications for peptide synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 118-124.

Seebach, D., Hungerbuhler, E., Naef, R., Schnurrenberger, P., Weidmann, B. & Zuger, M. (1982) Titanate-mediated transesterification with functionalized substrates. *Synthesis*, 138-141.

Seebach, D., Thaler, A., Blaser, D. & Ko, S.Y. (1991) Transesterifications with 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]undec-7-ene/lithium bromide (DBU/LiBr) - Also applicable to cleavage of peptides from resins in Merrifield syntheses *Helv. Chim. Acta* **74**, 1102-1118.

Sexton, P.M., Findlay, D.M. & Martin, T.J. (1999) Calcitonin. *Curr. Med. Chem.* **6**, 1067-1093.

Shlik, J., Koszycki, D. & Bradwejn, J. (1998) Decrease in short-term memory function induced by CCK-4 in healthy volunteers. *Peptide* **19**, 969-975.

Shlik, J., Vasar, V., Aluoja, A., Kingisepp, P-H., Jagomägi, K., Vasar, E., Rägo, L. & Bradwejn, J. (1997) Cholecystokinin and psychiatric disorders: role in aethioly and potential of receptor antagonists in therapy. *CNS Drugs* **8**, 134-152.

Siemens, L.M.; Rottneck, F.W. & Trzuppek, L.S. (1990) Selective catalysis of ester aminolysis- an approach to peptide active esters. *J. Org. Chem.* **55**, 3507-3511.

Siling, M.I. & Laricheva, T.N. (1996) Titanium compounds as catalysts for esterification and transesterification. *Russian Chem. Rev.* **65**, 279-286.

Stachelhaus, T., Schneider, A. & Marahiel, M.A. (1995) Rational design of peptide antibiotics by targeted replacement of bacterial and fungal domains. *Science* **269**, 69-72.

Stein, T., Vater, J., Kruff, V., Otto, A., Wittmann-Liebolds, B., Franke, P., Panico, M., McDowell, R. & Morris, H.R. (1996). The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. *J. Biol. Chem.* **271**, 15428-15435.

Stewart, J.M. & Young, J. (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed., Pierce Chemical Co., Rockford, IL.

Takahashi, T., Muneoka, Y., Lohmann, J., deHaro, M.S.L., Solleder, G., Bosch, T.C.G., David, C.N., Bode, H.R., Koizumi, O., Shimizu, H., Hatta, M., Fujisawa, T. & Sugiyama, T. (1997) Systematic isolation of peptide signal molecules regulating development in hydra: LWamide and PW families. *Proc. Nat Acad. Sci USA* **94**, 1241-46.

Takarada, T., Takahashi, R., Yashiro, M. & Komiyama, M. (1998) Lanthanide ion-induced hydrolyses of alkyl esters and amides of alpha-amino acids. *J. Phys. Org. Chem.* **11**, 41-46.

Tatemoto, K., Jörnvall, H., Siimesmaa, S., Halldén, G. & Mutt, V. (1984) Isolation and characterization of cholecystokinin-58 (CCK-58) from porcine brain. *Febs Letters* **174**, 289-293.

Tobin, A.J. & Dusheck, J. (1998) *Asking about life*. Saunders College Publishing .

Ueda, M. & Mori, H. (1992) Diphenyl-(2,3-dihydro-2-thioxo-3-benzoxazolyl)-phosphonate: a new, reactive condensing agent for the synthesis of amides, esters, peptides, and β -lactams via condensation. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **65**, 1636-1641.

- Van Megen, H.J.G.M., Westenberg, H.G.M. & den Boer, J.A. (1996) Effect of the cholecystokinin-B receptors antagonist L-365.260 on lactate-induced panic attacks in panic disorder patients. *Biol. Psychiatry* **40**, 804-6.
- Varanda, L. & Miranda, M.T.M. (1997) Solid-phase peptide synthesis at elevated temperatures: a search for an optimized synthesis condition of unsulfated cholecystokinin-12. *J. Peptide Res.* **50**, 102-108.
- Villanueva, M.L., Collins, S.M., Jensesn, R.T. & Gardner, J.D. Structural requirements for action of cholecystokinin on enzyme secretion from pancreatic acini (1982) *Am. J. Physiol.* **242**, G416-G422.
- Voits, M. Beckett, S.R.G., Marsden, C.A. & Fink, H. (1999) Role of cholecystokinin type B receptors in ultrasound induced behavior in Rats. *Peptides* **20**, 383-386.
- Warrass, R., Wieruszeski, J-M. & Lippens, G. (1999) Efficient Suppression of solvent resonance in HR-MAS of resin-supported molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 3787-3788.
- Williams, J.A. (1982) Cholecystokinin: a hormone and a neurotransmitter. *Biomed. Res.* **3**, 107-121.
- Xaus, N., Albericio, F., Jorba, X., Calvet, S., Clapes, P., Torres, J.L. & Valencia, G. (1992) Racemization free coupling of peptide segments – synthesis of an insect neuropeptide. *Int. J. Peptide Protein* **39** 528-532.
- Zaks, A. & Klibanov, A.M. (1984) Enzymes catalysts in organic media at 100°C. *Science* **224**, 1249-1251.
- Zhang, M.L. & Davidson, A. (1999) A rheumatoid factor specific mimotope identified by a peptide display library. *Autoimmunity* **30**, 131-142.