DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**SÍNTESE EM FASE SÓLIDA EM ALTA
TEMPERATURA: SEQUÊNCIAS DIFÍCEIS,
COLECISTOCININAS-22 E 33 NÃO SULFATADAS
E RACEMIZAÇÃO**

Marcos Paulo de Souza

Orientadora: Profa. Dra. Maria Terêsa Machini de Miranda

São Paulo, 2000

T
S. 1.1
S. 1.2

DEDALUS - Acervo - CQ

30100002562

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Souza, Marcos Paulo de
S729s Síntese em fase sólida em alta temperatura : seqüências
difíceis, colecistocininas-22 e 33 não sulfatadas e
racemização / Marcos Paulo de Souza. -- São Paulo,
2000.
120p.

Dissertação (mestrado)–Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador: Miranda, Maria Terêsa Machini de

1. Peptídios : Bioquímica 2. Peptídios : Síntese :
Química orgânica I. T. II. Miranda, Maria Terêsa Machini
de, orientador.

574.192456 CDD

SÍNTESE EM FASE SÓLIDA EM ALTA TEMPERATURA: SEQÜÊNCIAS DIFÍCEIS, COLECISTOCININAS-22 E 33 NÃO SULFATADAS E RACEMIZAÇÃO

Marcos Paulo de Souza

Dissertação submetida ao Departamento de Bioquímica do
Instituto de Química da Universidade de São Paulo como
requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Maria Terêsa Machini de Miranda

**São Paulo
2000**

**“Síntese em Fase Sólida em Alta
Temperatura: Seqüências Difíceis,
Colecistocininas-22 e 33 não Sulfatadas e
Racemização”**

MARCOS PAULO DE SOUZA

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

Aprovado por:

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

Prof. Dr. MAURÍCIO DA SILVA BAPTISTA
IQ - USP

Prof. Dr. MARCELO PORTO BEMQUERER
UFMG

SÃO PAULO
13 DE MARÇO DE 2000.

Dedico esta tese

**Aos meus pais, Alaíde e Cláudio,
Aos meus irmãos Marcelo e Sheila,
À minha Orientadora,
Aos meus amigos.**

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Terêsa Machini de Miranda, pela orientação, incentivo e amizade.

Ao auxílio financeiro recebido da FAPESP e CNPq (Bolsas e financiamento ao projeto coordenado pela Dra. Miranda).

Aos amigos de laboratório: Sumika, Daniela, Cleber, Cléria, Neusa, Sérgio, Mirta, Klaus, Luís e Giselli pelo apoio, troca de informações e amizade.

À Profa. Dra. Marina F. M. Tavares do Departamento de Química Fundamental do IQ-USP pela disponibilidade e auxílio no aparelho de CE, assim como pela amizade. Também agradeço às suas alunas sempre prestativas.

Ao Prof. Dr. Massuo J. Kato pela disponibilidade do aparelho de espectrometria de massa e ao Leandro pelo auxílio técnico.

Ao Prof. Dr. Antônio de Miranda pelo empréstimo dos Boc-D-aminoácidos.

Ao Valdemir e à Lídia pelo auxílio na utilização do novo aparelho de espectrometria de massa do B12 inferior.

Ao Humberto pelas fotos.

A todos os amigos de Pós-graduação.

Aos amigos do IPEN pelos incentivos.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho se realizasse.

CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIACÕES

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO	1
1. Síntese de peptídeos em fase sólida	1
2. Racemização em síntese de peptídeos	6
3. Agregação em síntese de peptídeos em fase sólida (“sequências difíceis”).....	11
4. Síntese de peptídeos longos.....	17
5. Síntese de peptídeos em fase sólida em altas temperaturas.....	19
6. Técnicas para análise e separação de peptídeos.....	21
 OBJETIVOS.....	 34
 MATERIAIS.....	 36
 MÉTODOS.....	 36

1. Síntese dos peptídeos.....	36
2. Clivagem do peptídeo do suporte polimérico e desproteção total...	40
3. Análise e purificação dos peptídeos e seus contaminantes por RP-HPLC.....	41
4. Análise de aminoácidos.....	41
5. Eletroforese capilar.....	42
6. Espectrometria de massa.....	42

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....43

1. Estudo sobre a racemização.....	43
1.1. Utilização do dipeptídeo Ac-Ile-Gly como modelo.....	43
1.2. Utilização do tripeptídeo (D-Tyr)-Lys-Trp como modelo.....	52
1.3. Utilização do tetrapeptídeo Ile-Phe-Gly-Thr-NH ₂ como modelo.....	61
2. Estudo sobre “seqüências difíceis”.....	76
2.1. Utilização do fragmento (89-99) da Protease do HIV-1 como modelo.....	75
2.2. Utilização do fragmento (14-36) do ph-GnRH como modelo.....	80
2.3. Utilização de um octadecapeptídeo relacionado a uma glicoproteína do envelope do HIV-1 como modelo.....	84
3. Estudos sobre peptídeos longos.....	91
3.1. Utilização da colecistocinina-22 humana não sulfatada como modelo.....	91

3.2. Utilização da colecistocinina-33 humana não sulfatada como modelo.....	92
---	----

CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SINTETIZADOS.....98

a) Análise de aminoácidos.....	98
b) Espectrometria de massa.....	102

CONCLUSÕES.....104

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....106

CURRICULUM VITAE.....117

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema dos passos da síntese de peptídeos em fase sólida (onde, R^1 e R^2 = cadeias laterais dos aminoácidos; $X = -NH_2$ ou $-OH$; Y = agente ativador).

Figura 2. Equipamento utilizado durante a síntese manual de peptídeos em fase sólida.

Figura 3. Sistema de HF utilizado para clivagem do peptídeo do suporte polimérico (Estratégia t-Boc de síntese).

Figura 4. Modelo esquemático da agregação intermolecular entre cadeias peptídicas

Figura 5. Aparato para SPFS em alta temperatura.

Figura 6. Representação esquemática de um cromatógrafo para HPLC em modo isocrático.

Figura 7. Frasco empregado para hidrólise gasosa total de peptídeos.

Figura 8. Fórmula estrutural da ninidrina (I), produto de reação entre a ninidrina e um aminoácido (II) e o produto de reação entre a ninidrina e a prolina (III).

Figura 9. Esquema de um analisador automático de aminoácidos.

Figura 10. Instrumentação para eletroforese capilar.

Figura 11. Estrutura do 18-C-6H₄ (a), complexo formado entre o 18-C-6H₄ e uma amina primária (b).

Figura 12. Dados de recuperação (miligramas de peptídeo bruto/miligramas de peptidil-resina submetidos à clivagem) e de pureza ($\% \times 10^{-2}$) dos Ac-Ile-Gly sintetizados nas condições descritas da TABELA 3.

Figura 13. Dados de recuperação (miligramas de peptídeo bruto/miligramas de peptidil-resina submetidos à clivagem) e de pureza ($\% \times 10^{-2}$) dos Ac-Ile-Gly sintetizados nas condições descritas da TABELA 3.

Figura 14. Perfis de RP-HPLC dos Ac-Ile-Gly brutos obtidos nas condições descritas na TABELA 3.

Figura 15. Perfis de RP-HPLC dos Ac-Ile-Gly brutos obtidos nas condições descritas na TABELA 3.

Figura 16. Perfis de RP-HPLC dos Ac-Ile-Gly brutos obtidos nas condições descritas na TABELA 3.

Figura 17. Aminograma-padrão obtido para a mistura que contém 5 nmol de treonina, glicina, D-alô-isoleucina, isoleucina e fenilalanina.

Figura 18. Aminogramas obtidos na análise dos hidrolisados dos Ac-Ile-Gly sintetizados nas condições da TABELA 3.

Figura 19. Aminogramas obtidos na análise dos hidrolisados dos Ac-Ile-Gly sintetizados nas condições da TABELA 3.

Figura 20. Eletroferograma extraído do trabalho de Riester e col., 1996.

Figura 21. Dados de recuperação (miligramas de peptídeo bruto/miligramas de peptidil-resina submetidos à clivagem) e de pureza ($\% \times 10^{-2}$) dos (D-Tyr)-Lys-Trp brutos obtidos pela síntese convencional (1) e por SPFS em alta temperatura (2).

Figura 22. Perfis de RP-HPLC dos (D-Tyr)-Lys-Trp brutos. A.1 e B.1 = brancos, A.2 e B.2 = peptídeo sintetizado pelo método convencional, A.3 e B.3 = peptídeo sintetizado a 60°C.

Figura 23. Eletroferogramas dos (D-Tyr)-Lys-Trp brutos sintetizados pela síntese convencional (1) e pela síntese em alta temperatura (2).

Figura 24. Perfis de RP-HPLC de Tyr-(D-Lys)-Trp (A.2) e Tyr-Lys-Trp (B.2) brutos. A.1 e B.1 correspondem aos seus respectivos brancos.

Figura 25. Eletroferogramas obtidos no experimento de coeluição gradual entre (D-Tyr)-Lys-Trp sintetizado pela SPFS em alta temperatura, Tyr-(D-Lys)-Trp e Tyr-Lys-Trp.

Figura 26. Dados de recuperação (miligramas de peptídeo bruto/miligramas de peptidil-resina submetidos à clivagem) e de pureza ($\% \times 10^{-2}$) dos Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂ brutos obtidos pela síntese convencional (A) e por SPFS em alta temperatura (B).

Figura 27. Perfis de RP-HPLC dos Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂ brutos. A.1 e B.1 = brancos, A.2 e B.2 = peptídeo sintetizado pelo método convencional; A.3 e B.3 = peptídeo sintetizado a 60°C.

Figura 28. Análise por RP-HPLC dos peptídeos brutos: A = Ile-(D-Phe)-Gly-Thr-NH₂; B = (D-alo-Ile)-Phe-Gly-Thr-NH₂; C = (D-alo-Ile)-(D-Phe)-Gly-Thr-NH₂.

Figura 29. Experimento de coeluição entre os estereoisômeros e o Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂ obtido por SPFS em alta temperatura (1); 2 = (D-alo-Ile)-(D-Phe)-Gly-Thr-NH₂; 3 = (D-alo-Ile)-Phe-Gly-Thr-NH₂; 4 = Ile-(D-Phe)-Gly-Thr-NH₂.

Figura 30. Aminogramas obtidos na análise da mistura dos aminoácidos Thr, Gly, D-allo-Ile, Ile e Phe (A) e dos hidrolisados dos Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂ brutos obtidos por SPFS convencional (B) e em alta temperatura (C).

Figura 31. Eletroferogramas Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂ obtidos por SPFS convencional (1) e em alta temperatura (2).

Figura 32. Eletroferogramas mostrando as coeluições entre o peptídeo bruto Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂ obtido por SPFS em alta temperatura e alguns de seus estereoisômeros.

Figura 33. Dados de recuperação (miligramas de peptídeo bruto/miligramas de peptidil-resina submetidos à clivagem) e de pureza (%10⁻²) do fragmento 89-99 da protease do HIV-1 obtido pela síntese convencional (1) e por SPFS em alta temperatura (2).

Figura 34. Perfis de RP-HPLC dos fragmentos 89-99 da Protease do HIV-1 brutos. A.1 e B.1 = brancos, A.2 e B.2 = peptídeo sintetizado pelo método convencional, A.3 e B.3 = peptídeo sintetizado por SPFS a 60°C.

Figura 35. Dados de recuperação (miligramas de peptídeo bruto/miligramas de peptidil-resina submetidos à clivagem) e de pureza (%10⁻²) do fragmento (14-36) do ph-GnRH bruto obtido pela síntese convencional (1) e por SPFS em alta temperatura (2).

Figura 36. Perfis de RP-HPLC dos ph-GnRH (14-36) brutos. A.1 e B.1 = brancos, A.2 e B.2 = peptídeo sintetizado pelo método convencional, A.3 e B.3 = peptídeo sintetizado a 60°C.

Figura 37. Dados de recuperação (miligramas de peptídeo bruto/miligramas de peptidil-resina submetidos à clivagem) e pureza ($\%10^{-2}$) do octadecapeptídeo derivado de uma glicoproteína do envelope do HIV-1, onde 1 = SPFS convencional, 2 = SPFS em alta temperatura.

Figura 38. Perfis de RP-HPLC dos octadecapeptídeos derivados de uma glicoproteína do envelope do HIV-1 brutos em sistema de solventes contendo TFA (A) e em TEAP (B). A 1, B 1 = branco; A 2, B 2 = peptídeo obtido por SPFS convencional; A 3, B 3 = peptídeo obtido por SPFS em alta temperatura.

Figura 39. Pontos problemáticos das sínteses convencional e em alta temperatura dos peptídeos estudados.

Figura 40. Dados de recuperação (miligramas de peptídeo bruto/miligramas de peptidil-resina submetidos à clivagem) e pureza ($\%10^{-2}$) da hCCK-22 não sulfatada, onde: 1 = SPFS convencional, 2 = SPFS em alta temperatura.

Figura 41. Perfis de RP-HPLC das hCCK-22 não sulfatadas brutas. A.1 e B.1 = brancos, A.2 e B.2 = peptídeo sintetizado pelo método convencional, A.3 e B.3 = peptídeo sintetizado a 60°C.

Figura 42. Dados de recuperação (miligramas de peptídeo bruto/miligramas de peptidil-resina submetidos à clivagem) e pureza da hCCK-33 não sulfatada, onde: 1 = SPFS convencional, 2 = SPFS em alta temperatura.

Figura 43. Perfis de RP-HPLC das hCCK-33 não sulfatadas brutas: A.1 e B.1 = brancos, A.2 e B.2 = peptídeo sintetizado pelo método convencional, A.3 e B.3 = peptídeo sintetizado a 60°C.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CARACTERÍSTICAS DE UMA SEQUÊNCIA DIFÍCIL.

TABELA 2. RESINAS UTILIZADAS NAS SÍNTESES DOS PEPTÍDEOS.

TABELA 3. SÍNTESE DO PEPTÍDEO Ac-Ile-Gly.

TABELA 4. DADOS DE SÍNTESE, CLIVAGEM DA RESINA E DESPROTEÇÃO TOTAL DE Ac-Ile-Gly.

TABELA 5. DADOS DE SÍNTESE, CLIVAGEM DA RESINA E DESPROTEÇÃO TOTAL DE (D-Tyr)-Lys-Trp.

TABELA 6. DADOS DE SÍNTESE, CLIVAGEM DA RESINA E DESPROTEÇÃO TOTAL DO Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂.

TABELA 7. DADOS DE SÍNTESE, CLIVAGEM DA RESINA E DESPROTEÇÃO TOTAL DO FRAGMENTO 89-99 DA PROTEASE DO HIV-1.

TABELA 8. DADOS DE SÍNTESE, CLIVAGEM DA RESINA E DESPROTEÇÃO TOTAL DO FRAGMENTO (14-36) DO ph-GnRH.

TABELA 9. DADOS DE SÍNTESE, CLIVAGEM DA RESINA E DESPROTEÇÃO TOTAL DA SEQUÊNCIA DERIVADA DE UMA GLICOPROTEÍNA DO ENVELOPE DO HIV-1.

TABELA 10. MASSAS MOLECULARES OBTIDAS NA ANÁLISE DOS PRODUTOS OBTIDOS NAS SÍNTESES DO OCTADECAPÉPTIDO DERIVADO DA GLICOPROTEÍNA DO ENVELOPE DO HIV-1.

TABELA 11. DADOS DE SÍNTESE, CLIVAGEM DA RESINA E DESPROTEÇÃO TOTAL DA CCK-22 HUMANA NÃO SULFATADA.

TABELA 12. DADOS DE SÍNTESE, CLIVAGEM E DESPROTEÇÃO DA CCK-33 HUMANA NÃO SULFATADA.

TABELA 13. DADOS DE ANÁLISE DOS PEPTÍDEOS POR FAB-LSIMS.

TABELA 14. DADOS DE ANÁLISE DOS PEPTÍDEOS POR ES-MS.

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).

18-C-6H₄ = 6-ácido tetracarboxílico-18-coroa

2-Cl-Z = 2-cloro-benziloxicarbonil

Abs = Absorbância

Ac- = Acetil

Acm = acetamidometil

ACP₆₅₋₇₄ = Fragmento 65-74 da proteína transportadora de acila.

Boc = tert-butiloxicarbonil

BOP = Benzotriazol-1-il-tris (dimetilamino) fosfoniúmexafluorofosfato

Bu^t = tert-butil

Bzl = éter benzílico

CCK = Colecistocinina

CE = eletroforese capilar

Dcb = 2,6-diclorobenzil

DCC = Dicicloexilcarbodiimida

DCM = Diclorometano

DIC = Diisopropilcarbodiimida

DIEA = N,N-diisopropiletilamina

DMF = N,N-dimetilformamida

DMSO = Dimetilsulfóxido

DVB = Divinilbenzeno

ES-MS = Electrospray ionization mass spectrometry

FAB-LSIMS = Fast atom bombardment-liquid secondary ion mass spectrometry

Fmoc = 9-Fluorenilmetiloxicarbonil

HCl = Ácido clorídrico

HF = Fluoreto de hidrogênio

HFIP = 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol

HIV = Vírus da imunodeficiência adquirida

Hmb = 2-hidroxi-4-metoxibenzil

HOAt = 1-Hidroxi-7-azabenzotriazol

HOBt = 1-hidroxibenzotriazol

HPLC = Cromatografia líquida de alta eficiência

MBHA = 4-metilbenzidril-amino-resina

MeOH = Metanol

NMP = N-metilpirrolidona

OBzl = Éster benzílico

OcHex = ciclohexil

OEt = Éster etílico

OMe = Éster metílico

Pam = fenilacetamidometil

PEG = polietilenoglicol

ph-GnRH = Precursor do hormônio liberador da gonadotrofina humana

Pmc = 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonil

RINK = 4-(2', 4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil) fenoxi-resina

RMN = Ressonância magnética nuclear

RP-HPLC = Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa

SAMBHA = (4-succinilamido-2', 2', 4'-trimetoxi) benzidrilamino-resina

SPFS = Síntese de peptídeos em fase sólida

TBTU = O-benzotriazolil-N,N,N',N'-tetrametiluronium tetrafluoroborato

TEA = Trietilamina

TFA = Ácido trifluoroacético

TMBHA = 4-(benziloxi)-2', 4'- dimetoxibenzidrilamino-resina

TN = Teste de ninidrina

TRIS = Tris (hidroximetil)-aminometano

Trt = tritil

UV-VIS = Ultravioleta-visível

Z = Benziloxicarbonil

RESUMO

A síntese em fase sólida é o método mais utilizado na obtenção de peptídeos em laboratório. Em geral, as diferentes etapas do processo são realizadas em temperatura ambiente. De fato, até o início desta década, temperaturas elevadas ($>40^{\circ}\text{C}$) eram empregadas apenas esporadicamente nas etapas de acoplamento. Em 1993, entretanto, Rabinovich e Rivier propuseram a realização de todas as etapas do processo a 75°C . Em 1996, Saneei e colaboradores tentaram automatizar o processo a $40\text{--}50^{\circ}\text{C}$, apesar de não ter sido feita nenhuma avaliação sistemática prévia. Em 1997, Varanda & Miranda descreveram o primeiro estudo sistemático feito com o objetivo de investigar aspectos, vantagens, desvantagens e limitações da SPFS em altas temperaturas.

O presente trabalho teve como objetivo ampliar os conhecimentos sobre o método através da avaliação de três importantes aspectos considerados problemáticos na SPFS convencional: racemização, agregação e síntese de peptídeos longos. Para tanto, vários peptídeos foram escolhidos como modelos de estudo. Todos eles foram sintetizados por SPFS convencional (usando protocolos de rotina de nosso laboratório) e por SPFS em alta temperatura (empregando as condições experimentais descritas por Varanda & Miranda em 1997). Os materiais brutos foram comparados em: 1- suas recuperações a partir de suas peptidil-resinas correspondentes; 2- suas qualidades. RP-HPLC, determinação do conteúdo de aminoácidos e CE foram os métodos de análise empregados. Os produtos e subprodutos majoritários foram isolados para caracterização química por análise de aminoácidos de seus hidrolisados totais e por espectrometria de massas.

Os resultados obtidos demonstraram que no aspecto racemização a SPFS em alta temperatura, nas condições experimentais empregadas, mostrou-se equivalente à SPFS convencional: a incidência de estereoisômeros contaminantes nos peptídeos brutos foi inferior a 1%. O estudo do aspecto agregação evidenciou que se por um lado as condições experimentais empregadas para a SPFS em alta temperatura levaram a uma suposta minimização, por outro os peptídeos brutos

obtidos foram de qualidade muito inferior a daqueles provenientes da síntese convencional: interrupções do crescimento das cadeias em resíduos de glutamina levaram à formação significativa de peptídeos contaminantes deletados. Se a agregação está ou não relacionada ao favorecimento destas reações secundárias é questão ainda não respondida.

A síntese da CCK-22 humana não sulfatada sugeriu que o método de SPFS em alta temperatura é adequado à sua obtenção com bom rendimento e em tempo reduzido. Entretanto, a síntese da CCK-33 correspondente, um protótipo de peptídeo longo de sequência complexa, evidenciou que, para a obtenção deste tipo de composto, a mistura 25%DMSO/tolueno pode não ser o solvente ideal comum para as etapas de desproteção, neutralização e acoplamento. Nestas condições, a mistura DIC/HOBt pode também não ser a melhor opção.

ABSTRACT

Stepwise solid-phase synthesis (SPPS) is the method of choice to prepare peptides. Although deprotection, neutralization and acetylation have been generally carried out at room temperature, the couplings have not. Indeed, elevated temperatures have been used to enhance coupling efficiency in conventional SPPS.

The idea of performing all the synthetic steps at high temperatures, shortening the peptide chain build-up process, has not been explored until the 90s. In 1993, Rabinovich & Rivier proposed some modifications to the conventional SPPS protocols and achieved some peptide syntheses by performing deprotection, neutralization, coupling and acetylation at 75 °C. In 1996, Saneei and co-workers tried to automate the entire synthetic process at 40-50 °C. In 1997, Varanda & Miranda reported the first systematic study on SPPS at elevated temperatures. These authors determined optimized synthesis conditions of unsulfated cholecystokinin-12 by investigating aspects of the methodology such as temperature, solvent systems, resins compatibility, type of resins, peptide-resins swelling properties and, also, coupling agents efficiencies.

The main goal of the present work was to evaluate SPPS at elevated temperature in three different aspects: racemization, aggregation and applicability to the synthesis of long and complex peptides. For that, we chose some model peptides and synthesized them manually using conventional SPPS (our laboratory's routine protocols) and SPPS at elevated temperature (Varanda & Miranda's protocols). The crude peptides were compared in their recoveries from the corresponding peptidyl-resins after final cleavage and full deprotection and in their qualities. RP-HPLC, CE and amino acid analyses were the techniques employed in the comparisons. The major products and by-products were isolated and characterized using amino acid analysis and mass spectrometry.

The results can be summarized as follows:

1- no significant contamination resulting from racemization has been detected in the crude peptides. The amounts of stereoisomers present on the crude peptides

were always lower than 1% independently of the SPPS method employed or the analytical technique used for comparison;

2- no final conclusion could be taken regarding to the aggregation phenomenon. Under the experimental conditions employed for SPPS at elevated temperature, some couplings were definitely favoured. Despite that, the crude materials obtained showed low purities. Isolation and characterization of the major contaminants led us to conclude that the occurrence of undesired chain termination have also been favoured. Whether aggregation is related to that or not is to be investigated.

3- the SPPS at elevated temperature protocol employed showed to be suitable for the synthesis of unsulfated human CCK-22. The same can not be said for the unsulfated human CCK-33, a large and complex peptide. Thus, we concluded that for the preparation of this type of compound 25%DMSO/toluene and/or its combination with DIC/HOBt may not be a good choice.

INTRODUÇÃO

1. Síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS)

A síntese de peptídeos em fase sólida foi introduzida por R. B. Merrifield em 1963 em um esforço para contornar muitos dos problemas existentes na síntese clássica (ou em solução) destes compostos. Por sua proposição revolucionária, Merrifield recebeu o prêmio Nobel de Química de 1984 (Merrifield, 1963).

A metodologia consiste no crescimento da cadeia peptídica ligada a um suporte sólido polimérico ou resina, que é insolúvel e estável química e fisicamente em presença dos reagentes e solventes utilizados durante o processo sintético. Os aminoácidos da sequência são incorporados um a um à resina até que se obtenha o peptídeo desejado. Em seguida, a peptidil-resina resultante é submetida à clivagem da ligação covalente entre a cadeia peptídica e a resina para liberação do peptídeo bruto para a solução. A maior vantagem da síntese em fase sólida é o fato de que a mesma elimina todas as etapas de isolamento e de purificação de intermediários, o que a torna ágil e rápida. Por outro lado, isto demanda que, para se obter um produto homogêneo, todas as reações do processo ocorram com a maior eficiência possível (Stewart & Young, 1984; Merrifield, 1997).

A **Figura 1** mostra um esquema básico da SPFS. O suporte ou resina é um polímero sintético que possui grupos funcionais reativos (X). O aminoácido que irá tornar-se o resíduo C-terminal do peptídeo é um derivado que possui o seu $N\alpha$ -aminogruppo bloqueado por um grupo protetor temporário (L) e, quando necessário, um protetor semi-permanente de cadeia lateral reativa (S). Em certas condições, este derivado de aminoácido liga-se ao grupo funcional da resina (**etapa de acilação; 1**). Posteriormente, o grupo L da aminoacil-resina resultante é removido por exposição a um reagente que não é capaz de clivar o derivado de aminoácido da resina ou de remover o grupo protetor S (**etapa de desproteção; 2**). O próximo aminoácido protegido é acoplado ao aminoacil polímero $N\alpha$ -desprotegido através da ativação de sua carboxila α que

Figura 1. Esquema dos passos da síntese de peptídeos em fase sólida (onde, R^1 e R^2 = cadeias laterais dos aminoácidos; $\text{X} = -\text{NH}_2$ ou $-\text{OH}$; Y = agente ativador).

proporciona o aumento da velocidade da formação da ligação peptídica em relação ao grupo carboxílico e amino sem ativação (**etapa de acoplamento; 3**), sendo que existe uma grande variedade de agentes acopladores, tais como: DIC; BOP (Steinauer e col., 1989); TBTU (Knorr e col., 1989), HOAt (Carpino, 1993), etc. Novamente, o protetor do aminogruppo deste novo aminoácido é removido e o aminoácido seguinte é acoplado, produzindo assim um ciclo de desproteções parciais, neutralizações e acoplamentos até a obtenção da sequência desejada. Um novo reagente é então utilizado para clivar o peptídeo do suporte polimérico. Nesta etapa, todos os grupos protetores são removidos (**etapa de clivagem final e desproteção total; 4**) obtendo-se assim o peptídeo bruto livre em solução (Stewart & Young, 1984; Merrifield, 1997).

A síntese do peptídeo ocorre em apenas um frasco, o que elimina perdas de massa por transferência. Este contém um filtro poroso, onde o excesso de reagentes e subprodutos são eliminados por lavagens e filtrações (**Figura 2**). A resina e/ou a peptidil-resina permanecem retidas por serem insolúveis em todos os solventes utilizados (Stewart & Young, 1984; Merrifield, 1997).

Atualmente, a SPFS pode ser feita manual ou automaticamente utilizando-se duas estratégias químicas de síntese: a t-Boc e a Fmoc. A diferença entre estas duas estratégias está na labilidade do grupo protetor L e dos grupos protetores S. Na estratégia t-Boc, se faz uso do grupo t-Boc como L, o qual é lábil a TFA. Também se empregam grupos S derivados do grupo benzil que são resistentes ao TFA, podendo ser eliminados apenas na etapa de clivagem do peptídeo da resina por meio da exposição da peptidil-resina a HF a 0°C em um sistema adequado (**Figura 3**). Na estratégia Fmoc se emprega o Fmoc removível por bases orgânicas. Neste caso, os S são derivados do t-butil resistentes a bases e lábeis a ácidos: devido à labilidade da ligação resina-peptídeo, é possível o emprego de ácidos orgânicos como o TFA (Fields & Noble, 1990).

A SPFS convencional pode ser individual ou múltipla. Esta última modalidade inclui a construção de bibliotecas de peptídeos (Lebl & Krchnák, 1997).

Figura 2. Equipamento utilizado durante a síntese manual de peptídeos em fase sólida.

Figura 3. Sistema de HF utilizado para clivagem do peptídeo do suporte polimérico (para estratégia t-Boc de síntese).

2. Racemização em síntese de peptídeos

Várias reações secundárias ocorrem durante as diferentes etapas da SPFS. Parte delas resulta em modificações químicas das cadeias laterais dos aminoácidos presentes na sequência em construção, levando a um acúmulo de subprodutos contaminantes e, em consequência, à redução dos rendimentos de síntese e purificação (Stewart & Young, 1984; Atherton e col., 1980; Hsieh e col., 1996).

A racemização, por outro lado, decorre da necessidade de ativação da carboxila α em meio básico dos aminoácidos para a formação da ligação peptídica (Bodanszky, 1984; 1993). Nestas condições, o efeito indutivo provocado pelo grupo ativador (X) ligado à carboxila torna o próton do carbono α mais ácido e, portanto, bastante sensível à abstração do hidrogênio do carbono quiral pela base:

Uma vez que esta abstração é uma reação reversível, no retorno ao carbono α o próton pode sofrer inversão de sua configuração espacial.

O mesmo não ocorre com aminoácidos e seus N-acil-derivados não ativados porque em meio básico as carboxilas livres são ânions que previnem a formação de um segundo centro aniônico nos carbonos α :

(onde, **B** = base orgânica)

A consequência da racemização é a diminuição parcial da pureza quiral do aminoácido incorporado. Como na síntese química de peptídeos a ativação do α -COOH é essencial, esta reação secundária é tida como inerente a ela e difícil de ser totalmente evitada.

Os principais mecanismos da racemização em N-acil-aminoácidos ou N-acil-peptídeos ativados mediante catálise por bases são os seguintes:

- Abstração direta do próton do carbono α ;
- Racemização via β -eliminação reversível;
- Racemização a azlactona [5(4H)-oxazolona].

A abstração direta do próton de carbonos α por bases é um mecanismo específico que ocorre principalmente com a fenilglicina, um constituinte de peptídeos microbianos (Bodanszky, 1984; 1993).

(onde, Y é o grupo protetor e X um grupo ativador)

A β -eliminação ocorre preferencialmente com os derivados ativados da S-alquil-cisteína que sofrem racemização catalisada por bases orgânicas mesmo quando seu grupamento amino é protegido por um grupo do tipo uretana (Bodanszky, 1984; 1993):

(onde, Y é o grupo protetor e X um grupo ativador)

A racemização via formação de azlactona é o mecanismo mais comum e estudado. Os caminhos propostos são os seguintes:

Como se observa, o próton ácido sendo abstraído do centro quiral pela base leva à geração de um ânion que é estabilizado por ressonância. A racemização ocorrida via este mecanismo é influenciada por diversos fatores, tais como a natureza dos aminoácidos que estão sendo ativados, dos solventes nos quais ocorre a reação e das bases terciárias empregadas. A natureza do grupo acilante do grupamento amino também tem um papel decisivo na manutenção ou diminuição da pureza quiral do peptídeo sintetizado (Bodanszky, 1984; 1993).

Além destes mecanismos, existem outros envolvidos com a abstração intramolecular do próton do carbono quiral dos aminoácidos. É o caso que ocorre devido à presença de centros básicos no intermediário O-acil-isouréia ao se usar a DCC como agente ativador:

Para minimizar a racemização por estes mecanismos, utilizam-se aditivos com caráter ácido como o HOBt (Konig & Geiger, 1970). A presença de um segundo nucleófilo na mistura reacional também reduz a concentração de O–acil-isouréia e, deste modo, a extensão da racemização (Bodanszky, 1993).

Somente os resíduos de prolina e glicina são inertes a esta importante reação secundária. Durante a síntese, o grupo benzil da cadeia lateral da fenilalanina contribui para estabilização do carbânion e, por conseguinte, facilita a abstração do próton do carbono α . As cadeias laterais alifáticas da alanina e leucina não podem influenciar a racemização do hidrogênio do carbono α , mas as ramificações do carbono β contidas nas cadeias laterais da valina e isoleucina levam a um aumento da mesma (Bodanszky, 1984, 1993).

Vários sistemas modelos tem sido propostos para o estudo da racemização em síntese de peptídeos. Da mesma forma, várias são as técnicas empregadas. Estas auxiliam na avaliação do efeito de solventes, bases, temperatura e procedimentos de acoplamentos sobre a incidência desta reação secundária (Bodanszky, 1984, 1993).

O primeiro modelo a ser usado para estudar a racemização na síntese química clássica de peptídeos foi o acoplamento entre Bzl-Leu-OH e Gly-OEt. A rotação específica do produto foi usada para estabelecer sua pureza enantiomérica (Williams & Young, 1963). Este modelo entretanto, apresentou a desvantagem de empregar o benzoil como protetor do grupo α -amino da leucina que sabidamente leva à uma maior formação de azlactona e, conseqüentemente, à geração do ânion por abstração do próton.

TFA-Val-Val-OMe ou Z-Leu-Phe-Val-OBu e seus diastereoisômeros são voláteis e separáveis por cromatografia a gás e, portanto, estes peptídeos também têm sido empregados como modelos (Bodansky, 1993).

Ac-L-Phe-Ala-OMe e Ac-D-Phe-Ala-OMe também foram utilizados para determinar por RMN a extensão da racemização do resíduo de fenilalanina

durante o acoplamento entre Ac-L-Phe-OH e Ala-OMe: os deslocamentos químicos dos prótons metílicos da alanina dos dois compostos foram característicos e diferentes (Bodansky, 1993).

O acoplamento de Ac-Ile-OH à Gly-OEt tem sido considerado um excelente modelo, pois o Ac-(D-alo-Ile)-Gly-OEt produzido por inversão do hidrogênio do carbono α da isoleucina pode ser facilmente detectado e quantificado: após hidrólise total do dipeptídeo bruto obtido, o hidrolisado pode ser analisado em uma coluna de troca iônica (Spackman e col. ,1958). A razão molar entre a isoleucina e a D-alo-Isoleucina (estrutura abaixo), que são eluídas separadamente, possibilita a quantificação da extensão da racemização ocorrida durante o acoplamento em diferentes condições experimentais (Bodanszky & Conklin, 1967).

Numa extensão deste modelo também se utiliza o exemplo a seguir: Z-Gly-Ala é acoplada a Leu-OBzl e após a hidrogenólise para desproteção total, a mistura contendo Gly-(L-Ala)-Leu e Gly-(D-Ala)-Leu íntegros é injetada em um analisador de aminoácidos para separação e quantificação dos dois diastereoisômeros. A vantagem de se usar este modelo em relação ao anterior é a possibilidade da troca da Ala do tripeptídeo por qualquer outro aminoácido de interesse (Bodansky, 1993).

Atualmente estas técnicas se tornaram praticamente obsoletas devido à preferência pelo uso de RP-HPLC. A utilização do acoplamento modelo entre Z-Gly-Xxx-OH e Val-OEt (onde Xxx = Phe, Leu, Val) para estudar a incidência da racemização em presença do reagente acoplador BOP e de

diferentes bases em solventes variados (Steinauer e col., 1989) é um ótimo exemplo. Da mesma forma, é o acoplamento da Z-Gly-Xaa a Xbb-OMe (onde, Xaa e Xbb = aminoácidos; Miyazawa e col., 1992) ou o acoplamento de histidina para a síntese do peptídeo Arg-Glu-Arg-His-Ala-Tyr-OH. A separação entre este e o seu diastereoisômero Arg-Glu-Arg-(D-His)-Ala-Tyr-OH por RP-HPLC permitiu a quantificação da incidência de racemização ocorrida na histidina (Angeletti e col., 1997).

Mais recentemente, o peptídeo (D-Tyr)-Lys-Trp foi empregado para estudos de racemização em SPFS convencional. Para este composto e seus sete possíveis estereoisômeros foram sintetizados e separados por CE na presença de um seletor quiral. Assim, a análise do peptídeo bruto e a quantificação dos níveis de contaminação pelos estereoisômeros em questão foi bem sucedida (Riester e col., 1996).

3. Agregação em síntese de peptídeos em fase sólida (“seqüências difíceis”)

Um dos mais sérios problemas na síntese de peptídeos em fase sólida é a ocorrência de acoplamentos incompletos. Estes levam ao aumento da quantidade de subprodutos com uma ou mais deleções de aminoácidos na seqüência, os quais podem apresentar comportamento cromatográfico similar ao do peptídeo desejado. Nestes casos, a purificação do produto principal torna-se muito árdua e o rendimento final é bastante baixo (Kent, 1988). Por esta razão, inúmeros esforços têm sido feitos para minimizar este problema (Milton & Milton, 1990; Schonolzer e col. 1992; Hyde e col., 1994).

Este tipo de dificuldade foi inicialmente observada durante a síntese da angiotensinil-bradicinina, na qual não se conseguiam realizar os acoplamentos dos resíduos 12-17. O problema foi contornado trocando-se o reagente de desproteção (HCl 1N em ácido acético) por HCl 4N em dioxano e a resina de poliestireno com 2% de ligações cruzadas por outra com 1% (Merrifield, 1967).

Alguns fatores podem contribuir para a dificuldade destes acoplamentos, que parecem ser seqüência-dependente. Dentre eles, temos a baixa solubilidade dos reagentes (N-acil-aminoácidos e reagentes acopladores) e a formação de estruturas secundárias insolúveis que surgiram devido a uma solvatação deficiente das cadeias peptídicas em crescimento. Esta deficiência leva à formação de estruturas compactas que reduzem a difusão dos reagentes (Bedford e col., 1992). Tais estruturas são semelhantes a agregados intermoleculares estabilizados por ligações de hidrogênio em folhas- β (Schnolzer e col., 1992; **Figura 4**). As seqüências peptídicas com tendência a formá-las são chamadas de "seqüências difíceis" .

Estudos sobre a ocorrência de agregação e desproteção incompleta do grupo Fmoc da seqüência difícil (Ala)_n-Lys-OH mostraram que quando $n \geq 6$ 20 – 25 % do grupo protetor Fmoc continuava presente no peptídeo após tentativa de remoção total do mesmo em piperidina/DMF. De fato, quando o alongamento foi continuado até $n = 10$ e o peptídeo foi clivado da resina, foram encontrados no material bruto fragmentos com $n = 6-9$ (Larsen & Holn, 1998).

Tem-se notado também que para certas seqüência peptídicas, a eficiência de acoplamento varia em função do distanciamento do aminoácido em relação ao suporte polimérico. Isto foi concluído a partir da síntese em fase sólida da Ribonuclease A, na qual foram encontradas sérias dificuldades após a incorporação do oitavo resíduo de aminoácido na resina (Pugh e col., 1992).

Em SPFS, o uso de resinas com alto grau de substituição e excesso de ligações cruzadas acarreta o agravamento da agregação. Em um excesso superior a 1% de divinilbenzeno, por exemplo, as ligações cruzadas inibem o inchamento dos grãos da resina e, portanto, a solvatação das cadeias peptídicas em crescimento. Assim, ocorre o aumento das interações intercadeias (Pugh e col., 1992).

A partir de estudos de acoplamentos envolvendo Boc- e Fmoc-aminoácidos pôde-se concluir que as seqüências passíveis de agregação, em geral, apresentam as características mostradas na **TABELA 1** (Milton & Milton, 1990). Seqüências difíceis são, portanto, observadas em ambas estratégias de síntese (Boc ou Fmoc), sendo que algumas dificuldades encontradas em uma estratégia são muitas vezes também observadas na outra. Estes dados sugerem que a formação de agregados intermoleculares ocorre em um estágio comum a ambas as estratégias. Por exemplo, a desproteção do grupamento α -amino é sempre quantitativa na estratégia Boc, enquanto na estratégia Fmoc muitos dos acoplamentos difíceis são precedidos por dificuldades na etapa de desproteção (vagarosa ou incompleta). Estas relações (desproteção lenta/acoplamento vagaroso na química Fmoc vs. desproteção rápida/acoplamento vagaroso na química Boc) sugerem que na química Boc o TFA seria responsável por desfazer as estruturas secundárias pré-formadas. Desta forma, a agregação ocorreria

Figura 4. Modelo esquemático da agregação intermolecular entre cadeias peptídicas.

quando o grupo α -amino protonado da peptidil-resina é neutralizado (Schnolzer e col.,1992). Esta suspeita foi experimentalmente confirmada por espectroscopia de IR-FT que evidenciou que uma determinada peptidil-resina mostrou maior tendência de formar ligações de hidrogênio do tipo NH quando se encontrava em forma desprotonada (Milton e col., 1990).

Estudos de RMN do fragmento decapeptídico da proteína transportadora de acila, de fragmentos do hormônio liberador da gonadotrofina humana e o do fator liberador do hormônio de crescimento revelaram uma diminuição do inchamento em DCM e DMF nos pontos de acoplamento incompletos. Tal redução, entretanto, pode ser revertida quando o grupo α -amino é protonado (Merrifield, 1995).

Mutter e colaboradores estudaram a relação entre a seqüência primária de alguns peptídeos, suas conformações preferenciais em solução e suas propriedades físico-químicas (tendência à agregação, solubilidade e

TABELA 1. CARACTERÍSTICAS DE UMA SEQUÊNCIA DIFÍCIL

1. Reações incompletas de acoplamento.
2. Reacoplamentos produzem pouca ou nenhuma melhora.
3. Ocorre independentemente do tipo de resina ou estratégia.
4. Inchamento reduzido da peptidil-resina em DCM.
5. Aumento da dificuldade de síntese em resinas com alto grau de substituição.
6. Agravamento das dificuldades de acoplamento de aminoácidos que levam a impedimentos estéricos.
7. Sequência de aminoácidos específica.
8. Mecanismo: agregação intermolecular das cadeias peptídicas protegidas.

reatividade). Isto foi possível através da síntese de uma série de oligo- e cooligopeptídeos contendo 9 a 20 resíduos que foram preparados sobre o polietilenoglicol (PEG; El Rahman e col., 1980). A solvatação eficiente destas peptidil-resinas em diferentes solventes permitiu que estudos conformacionais dos mesmos fossem realizados. Oligômeros com tendência para formar α -hélice ou estruturas randômicas não mostraram grandes alterações na solvatação e na velocidade de acoplamento. Entretanto, houve uma drástica diminuição da solvatação e reatividade do grupo amino terminal quando a estrutura β se formou. A inserção de uma prolina na seqüência reverteu o quadro. Assim, ficou mostrado que não era o suporte polimérico e sim a seqüência peptídica que determinava a estrutura secundária da peptidil-resina (El Raman e col., 1980; Toniolo e col., 1979).

Para minimizar os efeitos da agregação na SPFS empregam-se vários recursos práticos como, por exemplo:

- a utilização de solventes dipolares apróticos em alternativa ao DCM, tais como: a DMF (Meiser & Kent, 1983), a NMP (Tam, 1986), o HFIP diluído em DCM (Milton & Milton, 1990), misturas NMP/DMSO (Bagley e col., 1990) e ainda a mistura HCl-dioxano (que provoca bom inchamento da resina ao ser utilizado na desproteção durante a estratégia Boc; Stewart & Young, 1984);
- a utilização de resinas polares ou resinas com baixo grau de substituição (Bedford e col., 1992). O desenvolvimento de novos grupos protetores, tais como o Hmb que protege o grupo amino terminal e pode ser utilizado na estratégia de síntese Fmoc/Bu^t (Simmonds, 1996).

A técnica da neutralização *in situ* tem trazido uma melhora significativa na eficiência de síntese de seqüências difíceis. Esta consiste em realizar acoplamentos rápidos com grande excesso molar de aminoácidos pré-ativados (ésteres de Boc-aminoácidos-OBt, por exemplo) na presença de bases como a DIEA. Neste caso, a etapa de desproteção emprega 100% de TFA para uma rápida remoção do grupo Boc (Schnolzer e col., 1992).

Stewart & Klis foram bem sucedidos na síntese da Ribonuclease (1-13)-poliestireno-1% de divinilbenzeno, a qual se caracterizava pela

dificuldade em incorporar os resíduos de alanina 5, 4 e 3. Estes autores adicionaram NaClO₄ , LiBr ou KSCN (0,4M para cada) ao meio reacional contendo DMF, conseguindo assim aumentar a velocidade de acoplamento em presença de DCC, ésteres de HOBt ou anidridos simétricos (Merrifield, 1995).

Substituições ou modificações na ligação amida influenciam a conformação das cadeias peptídicas e, por isto, a inserção de um resíduo de Pro no meio da seqüência provoca uma ruptura dos agregados anteriormente formados. Substituições no C^α, como o ácido α-aminoisobutírico, resulta em um efeito similar (Narita e col., 1985). Muitas substituições por D-aminoácidos podem levar à quebra de agregados, onde todos os outros aminoácidos do peptídeos são da série L (Merrifield e col., 1988).

Alguns estudos indicam uma redução do efeito da agregação durante a síntese, via estratégia Fmoc, quando certas seqüências de aminoácidos são incorporadas à porção C-terminal do peptídeo agregante. Durante a síntese de (Thr-Val)₅ e do fragmento 65-74 da proteína transportadora de acila observou-se um grande aumento no rendimento final quando estes peptídeos foram precedidos em suas porções C-terminais de 6 resíduos de Lys (Boc). Estas lisinas podem ser, posteriormente, removidas enzimaticamente. Investigações por espectroscopia Raman IR-FT da seqüência agregante (Ala)₆ alongada com este tipo de extensão C-terminal mostraram que a seqüência (Lys(Boc)₆) induz o peptídeo a assumir uma estrutura aleatória durante o crescimento da cadeia peptídica. Na ausência desta porção, o peptídeo adquire preferencialmente a conformação de estrutura β (Larsen & Holn, 1998).

O fenômeno da agregação também é relacionado à algumas patologias como a doença de Alzheimer. Esta se caracteriza pelo acúmulo de agregados fibrilares insolúveis constituídos principalmente de dois peptídeos β-amilóides: Aβ 1-40 e Aβ 1-42. Em condições patológicas, a produção de Aβ 1-42 é aumentada, sugerindo que este peptídeo tenha um

papel importante na doença de Alzheimer (Selkoe, 1996). Como já foram identificados resíduos de isoaspartil em cérebros de pacientes com doença de Alzheimer, recentemente realizou-se a síntese de dois isômeros da A β 1-42 contendo resíduos de isoaspartil ao invés de resíduos de ácido aspártico: A β 1-42 (isoAsp 7) e A β 1-42 (isoAsp 23). Experimentos posteriores demonstraram que este último forma agregados mais estáveis do que o peptídeo nativo. Por esta razão, este peptídeo poderia estar sendo formado no cérebro de doentes de Alzheimer e influenciando a agregação (Fukuda e col., 1999).

As placas de agregados também contêm outros peptídeos de natureza hidrofóbica. Estudos indicam que a produção de um peptídeo que contém 35 resíduos de aminoácidos (NAC) em alta quantidade na sinapse poderia estar associada à formação de amilóides (Han e col., 1995; Weinreb e col., 1996). Tem sido mostrado que o NAC pode formar agregados *in vitro* que analisados por IR-FT mostraram conter estrutura em folha β (Han e col., 1995). Para se determinar qual porção do peptídeo era responsável pela agregação, foram sintetizados dois fragmentos: peptídeo NAC (1-18) e peptídeo NAC (19-35), onde as estruturas destes dois fragmentos assim como do peptídeo íntegro foram determinadas por dicroísmo circular. Os resultados indicam que o peptídeo NAC (19-35) adota uma estrutura em α -hélice e o peptídeo NAC (1-18) assim como o NAC, formam folhas β . Portanto, a região N-terminal do NAC é o principal determinante do fenômeno de agregação (El-Agnaf e col., 1998).

4. Síntese de peptídeos longos

Embora atualmente os peptídeos longos (> 30 resíduos), possam ser também obtidos pelo método do DNA recombinante, a síntese química ainda continua sendo a metodologia de escolha para preparação destes compostos (Sakakibara, 1995).

Entretanto, como foi citado nos itens anteriores desta Introdução, o método químico ainda apresenta alguns problemas não solucionados. É o

caso da agregação e da ocorrência de inúmeras reações secundárias envolvendo os resíduos de aminoácidos presentes na cadeia peptídica em crescimento ou mesmo a ligação peptídeo-resina. Além do mais, sendo baseados em reações químicas específicas, as diferentes etapas do processo sintético (acoplamento, desproteção e neutralização) não são quantitativas, o que certamente leva a outros tipos de reações secundárias e acúmulos de subprodutos.

Quanto maior for o peptídeo, mais estes problemas agravam-se e por isto costuma-se generalizar que “os peptídeos longos são mais difíceis de ser obtidos pela SPFS do que os curtos”.

Em 1989, Wlodawer conseguiu sintetizar por SPFS a Protease do HIV-1 que contém 99 resíduos, o que na época foi um trabalho memorável. Após uma otimização das técnicas de separação, o produto pôde ser isolado e cristalizado (Wlodawer e col., 1989). Uma outra realização notável foi a síntese química total da insulina humana pelo método da condensação de fragmentos em solução. Neste caso, a formação das pontes de dissulfeto corretas entre os resíduos de cisteína contidos nas cadeias A e B deste peptídeo também foi conseguida (Kent, 1988). Em 1993, Miranda e col. sintetizaram análogos das colecistocininas (CCK) humanas contendo 33, 39 e 58 resíduos (Miranda e col., 1993a ; 1993b). Em 1999, Aimoto descreveu a síntese do fragmento (14-193) da proteína c-Myb (Aimoto, 1999). A CCK-58 humana, entretanto, nunca foi obtida e continua a ser um desafio sintético para os químicos de peptídeos. Assim como ela, muitos outros peptídeos longos.

Neste panorama, a síntese em fase sólida por condensação entre fragmentos (também conhecida por síntese convergente), vem sendo considerada como a mais apropriada estratégia para obtenção de peptídeos longos ou pequenas proteínas pelo método químico. De acordo com esta metodologia, fragmentos peptídicos protegidos são sintetizados previamente por SPFS passo a passo e condensados seqüencialmente a uma determinada peptidil-resina para a obtenção do peptídeo desejado (Lloyd-

Williams e col., 1993). Neste caso, a estratégia Fmoc é a mais freqüentemente utilizada para a obtenção dos fragmentos. Atualmente estuda-se a síntese de peptídeos longos compatíveis com o uso da química t-Boc/Bzl. Nesta os fragmentos peptídicos protegidos são sintetizados sobre suportes poliméricos com funcionalização baseada no ácido α -hidroximetil acrílico e clivados deles, ainda na forma protegida, em meio básico: 5-10% de piperidina (Eggenweiler e col., 1996).

A síntese convergente apresenta a vantagem de a purificação do peptídeo desejado ser mais facilitada em relação à SPFS passo a passo. Por outro lado, os fragmentos peptídicos reagentes necessitam ser preparados, purificados e previamente caracterizados, o que é bastante trabalhoso. Uma outra desvantagem desta metodologia é a baixa solubilidade dos fragmentos peptídicos protegidos nos solventes geralmente utilizados. Pesquisadores mostraram que a solubilidade de peptídeos protegidos não é dependente do comprimento da cadeia, mas sim de sua seqüência. Em um estudo com aproximadamente 1600 segmentos peptídicos protegidos de 120 peptídeos biologicamente ativos sintetizados, mais de 90% se mostraram solúveis em DMF, 5% foram solúveis em uma mistura NMP/DMF, 3% em uma mistura NMP/DMSO e menos de 1% foi insolúvel em DMSO (Kimura e col., 1990). Por esta razão, a DMF tem sido o solvente mais utilizado na SPFS convergente de peptídeos longos.

5. Síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) em altas temperaturas

Como já citado acima, na década de 60 R. B. Merrifield propôs o método da SPFS (Merrifield, 1963). Segundo a sua concepção, as diferentes etapas do processo são realizadas em temperatura ambiente (Stewart & Young, 1984).

Ao longo dos anos, entretanto, várias tentativas foram feitas no sentido de se empregar temperaturas mais elevadas para aumentar a eficiência das etapas de acoplamento. Dentre as tentativas bem sucedidas, podemos citar: 1- a de Merrifield e colaboradores (1974) que conseguiram um aumento

significativo do rendimento de acoplamento entre Bpoc-Gly e Val-resina (de 42 para 64 ou 71%) quando a temperatura da reação era aumentada (de -15°C para 0°C ou para 25°C, respectivamente); 2- a realização de alguns acoplamentos a temperaturas superiores a 50°C durante a síntese do fator transformador de crescimento alfa (TGF α ; Tam, 1986); 3- a síntese de dois outros peptídeos por Lloyd e colaboradores empregando alta temperatura (60°C) em reações de acoplamento (Lloyd e col., 1990).

Nos últimos anos, o interesse no emprego de alta temperatura em SPFS vem aumentando significativamente, não ficando mais restrito apenas à melhoria de determinadas reações de acoplamento e/ou de ruptura dos agregados formados durante o processo de síntese (Brandtner e col., 1994; Tam & Lu, 1995). Existe atualmente um grande interesse em reduzir o tempo total de síntese de um peptídeo pelo método da fase sólida através da realização de todas as etapas do processo em altas temperaturas. Tal possibilidade foi inicialmente demonstrada por Rabinovich & Rivier (1994) que sintetizaram o neuropeptídeo Y e o fator liberador da corticotrofina a 75°C empregando como solvente 25% DMSO/tolueno. Dois anos depois, Saneii e colaboradores tentaram empregar tais condições em protótipos de sistemas automatizados (Saneii e col., 1996).

Varanda & Miranda (1997), entretanto, foram os pioneiros no estudo sistemático desta metodologia alternativa a SPFS em alta temperatura. Tal estudo levou-os ao estabelecimento das melhores condições para a síntese a 60 °C do fragmento 65-74 da proteína transportadora de acila (ACP₆₅₋₇₄; reconhecidamente uma típica seqüência agregante), da CCK-8 humana não sulfatada e de sua CCK-12 correspondente. Neste trabalho, foram descritas pela primeira vez: 1) as propriedades de inchamento de diferentes resinas comerciais, tais como MBHA, TMBHA, RINK e SAMBHA em diferentes solventes a 60°C; 2) a possibilidade de se utilizar-se com sucesso estes suportes poliméricos em sínteses em altas temperaturas; 3) a eficiência comparativa de diferentes reagentes acopladores nas condições experimentais empregadas (Varanda & Miranda, 1997).

O empenho no desenvolvimento desta metodologia é perfeitamente compreensível quando se considera: 1) o crescente número de laboratórios dedicados a sintetizar peptídeos pelo método da fase sólida de maneira individual, múltipla ou pela química combinatória; 2) a vasta demanda destes compostos para uso interdisciplinar; 3) que a obtenção de determinados peptídeos pela SPFS convencional demanda síntese manual e longos tempos. A **Figura 5** abaixo mostra o aparato que vem sendo utilizado em nosso laboratório para SPFS em alta temperatura.

Figura 5. Aparato para SPFS em alta temperatura.

6. Técnicas para análise e separação de peptídeos

6.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia é um termo geral aplicado para designar uma vasta gama de técnicas baseadas na partição de uma amostra entre uma fase móvel, que pode ser um gás ou um líquido, e uma fase estacionária, que também pode ser um líquido ou um sólido. A descoberta deste tipo de técnica é geralmente creditada a Tswett, já que em 1903 este descreveu a separação de pigmentos de folhas verdes usando uma coluna de giz. O

termo “cromatografia” foi escolhido para descrever as zonas coloridas vistas em movimento na coluna empregada.

Em 1938, Izmailov & Schraiber descreveram os fundamentos da cromatografia em camada delgada (TLC ou CCD; Izmailov & Schraiber, 1938). Nos anos 50 e 60, a cromatografia a gás se tornou uma técnica sofisticada de análise. No final da década de 60, a cromatografia líquida passou a ser desenvolvida como uma técnica complementar a ela (Johnson & Stevenson, 1978). Atualmente, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem-se mostrado extremamente versátil para o isolamento e purificação de praticamente todos os tipos de compostos, incluindo as biomoléculas.

A HPLC é particularmente apropriada para a separação de um determinado peptídeo a partir de uma mistura complexa de um extrato natural ou ainda daquela obtida na SPFS (Miller & Rivier, 1996). Para tanto, vários tipos de cromatografia podem ser empregados:

Cromatografia de exclusão (SEC)

Nesta técnica a separação é baseada nas diferenças de volumes dos compostos. O suporte polimérico é um gel quimicamente inerte de superfície porosa. As moléculas pequenas podem entrar nestes poros, onde são retidas. Já as moléculas maiores não podem entrar nos poros e assim não são retidas, sendo eluídas primeiramente.

A SEC também é chamada de cromatografia de permeação em gel, cromatografia em gel ou de filtração em gel. O Sephadex é o suporte mais empregado, sendo que para este gel a pressão à qual a coluna é submetida não pode ultrapassar 1-2 atm (Johnson & Stevenson, 1978; Mant & Hodges, 1991).

Cromatografia de troca iônica (IEC)

Neste tipo, a separação depende da troca de íons entre a fase móvel, o material a ser separado e os sítios iônicos (catiônicos ou aniônicos) do suporte polimérico. Muitas destas fases fixas são derivados do poliestireno funcionalizado. Para manter a neutralidade de cargas destas fases fixas,

utilizam-se como fases móveis tampões que contêm um grande número de íons de carga oposta à dos grupos funcionais carregados. Quando a amostra ionizada passa pela fase fixa, interage com esta última deslocando os contra-íons previamente introduzidos. Assim, a retenção da amostra é baseada na diferença entre a sua afinidade e a dos contra-íons do tampão pela fase fixa. O tipo de contra-íon e o pH do tampão influenciam a retenção, a mudança de alguns destes parâmetros provoca a eluição do íon da coluna (Johnson & Stevenson, 1978; Mant & Hodges, 1991).

Cromatografia de partição

Esta técnica depende da partição do soluto (amostra) entre dois solventes imiscíveis. Um dos solventes está retido em um suporte sólido (fase estacionária), enquanto que o outro líquido flui livremente pela coluna (fase móvel).

Nos primórdios da cromatografia líquida, a fase estacionária (polar ou apolar) se encontrava na superfície de um suporte inerte que era empacotado dentro de uma coluna e a fase móvel passava livremente por esta. Esta forma de cromatografia era conhecida como cromatografia líquido-líquido (Johnson & Stevenson, 1978).

Para maior durabilidade da coluna foram desenvolvidos suportes ligados covalentemente à fase estacionária. Estabeleceu-se então que quando a fase estacionária fosse mais polar que a fase móvel, a cromatografia seria denominada como “de fase normal”. Se ocorresse o contrário, a cromatografia seria chamada “de fase reversa”. Atualmente, ambas vem sendo amplamente utilizadas e os suportes mais conhecidos são a sílica gel e seus derivados, tais como: sílica-C₄, sílica-C₈, sílica-C₁₈, (Mant & Hodges, 1991).

A técnica de HPLC de fase reversa (RP-HPLC) vem sendo extensivamente empregada na separação das misturas complexas obtidas nas sínteses de peptídeos. O tempo de retenção deste tipo de compostos na coluna depende essencialmente das naturezas hidrofóbicas da amostra e da sílica derivatizada, sendo que os peptídeos mais hidrofílicos são

eluídos primeiramente e os mais hidrofóbicos posteriormente (Mant & Hodges, 1991). As fases móveis mais usadas para RP-HPLC de peptídeos são a água, a mistura água/MeOH e a mistura água/ACN contendo 0,09-0,1% de TFA (fonte de contra-íons e do baixo pH). Muitas vezes, porém, estas fases contêm fosfato de trietilamônio (TEAP), ao invés de TFA. De fato, estes dois tipos de sistemas de solventes apresentam capacidades de resolução diferentes, sendo, por isso, empregados como complementares (Kirby e col., 1993 ; Miller & Rivier, 1996).

A **Figura 6** mostra as partes fundamentais de um cromatógrafo para HPLC. A fase móvel é movida por uma (modo isocrático) ou por duas bombas (modo gradiente). A amostra é introduzida através de um injetor e levada pela fase móvel sob fluxo controlado até a cabeça da coluna. Lá, a amostra fica retida até a sua desorção e eluição da coluna. Todo o processo é monitorado por um detector em um comprimento de onda específico e os sinais elétricos são transmitidos a um registrador ou integrador, os quais fornecem o perfil cromatográfico.

6.2. Análise de aminoácidos

O conhecimento da composição de aminoácidos em peptídeos ou proteínas é importante para a sua identificação ou para o entendimento de suas propriedades. Um sistema automatizado para determinar o conteúdo de aminoácidos de hidrolisados peptídicos foi inicialmente descrito por Spackman, Stein e Moore em 1958. O método baseia-se na separação dos aminoácidos em uma coluna de troca iônica, sendo que a eluição dos mesmos dá-se por aumento gradual do pH do sistema eluente. Por seu trabalho, Spackman, Stein e Moore receberam o Prêmio Nobel de Química em 1978 (Spackman e col., 1958).

Figura 6. Representação esquemática de um cromatógrafo para HPLC em modo isocrático.

A etapa de hidrólise total das amostras é realizada em atmosfera de N_2 contendo vapor de HCl durante 24h a uma temperatura de $110^\circ C$. Os frascos utilizados são semelhantes ao mostrado na **Figura 7** (Smillie & Nattriss, 1991). O hidrolisado é seco a vácuo e dissolvido em um tampão de $pH \sim 3$, sendo, posteriormente, injetado no analisador automático de aminoácidos. Inicialmente, portanto, todos os aminoácidos ficam retidos na coluna de troca iônica que consiste em um tubo cheio de grânulos de poliestireno funcionalizada com grupos sulfônicos ($-SO_3^-$), tendo como contra-íon o Na^+ . Em $pH 3$ os aminoácidos são cátions, diferindo apenas em seu grau de ionização. Os íons Na^+ são assim deslocados por eles que passam a interagir com os grupos $-SO_3^-$. Os aminoácidos com maior carga líquida positiva (Lys, Arg, Arg) interagem mais fortemente, enquanto os com menor densidade de carga positiva a $pH 3$ (Glu e Asp) o fazem mais fracamente. Para a eluição dos 20 aminoácidos a coluna experimenta um aumento gradativo de pH , através do uso alternado de tampões de $pH = 3,5$

; 4,5 e 7,0. Assim, Glu e Asp são eluídos primeiramente, enquanto os aminoácidos básicos permanecem retidos até que a coluna atinja pH 7. A separação também se dá por intermédio das diferentes interações hidrofóbicas entre os aminoácidos e a matriz de poliestireno (Lehninger e col., 1993).

Após a eluição cada um dos aminoácidos sofre uma derivatização com ninidrina (**Figura 8**) em um reator a temperatura $\geq 100^{\circ}\text{C}$, gerando um composto púrpura de $\lambda \text{ máx} = 570 \text{ nm}$ para as aminas primárias. Neste comprimento de onda, as absorbâncias são medidas sendo proporcional à concentração dos aminoácidos. Por resultar em um composto amarelo após reação com ninidrina, a prolina é detectada em um comprimento de onda específico (440 nm; Smillie, & Nattriss, 1991). Um esquema do analisador de aminoácidos é dado na **Figura 9**.

Figura 7. Frasco empregado para hidrólise gasosa total de peptídeos.

Figura 8. Fórmula estrutural da ninidrina (I), produto de reação entre a ninidrina e um aminoácido (II) e o produto de reação entre a ninidrina e a prolina (III), (Smille & Nattriss, 1991).

Figura 9. Esquema de um analisador automático de aminoácidos.

6.3. Eletroforese Capilar (CE)

A eletroforese foi introduzida por Tiselius no início da década de 30 através do método da fronteira móvel, no qual ele demonstra a separação parcial de algumas proteínas constituintes do soro sanguíneo. Por este trabalho, o mesmo recebeu o Prêmio Nobel em 1948 (Grossman e col., 1992; Tavares, 1996).

Nos anos que se seguiram, a eletroforese em papel foi bastante utilizada devido ao aumento da rapidez, eficiência e escala de separação. Sua maior limitação, entretanto, era a dissipação do calor provocado pelo efeito Joule. O calor gerado uniformemente através do meio condutor era dissipado somente pelas extremidades do papel, produzindo gradientes de temperatura e, conseqüentemente, gradientes de densidade que podiam gerar correntes de convecção misturando bandas já separadas. Uma solução simples encontrada para o problema foi a utilização de tubos de vidro com dimensões capilares (15-100 μm). A remoção eficiente do calor através das paredes do capilar, praticamente elimina a convecção, sendo possível o estabelecimento de campos elétricos substancialmente maiores (Grossman e col., 1992; Tavares, 1996).

Ao se aplicar um campo elétrico na solução do capilar, esta provoca o movimento de solutos iônicos, onde sua mobilidade iônica corresponde a sua velocidade limite V_i , em um campo elétrico de valor unitário E :

$$\mu_i = \frac{V_i}{E}$$

μ_i = mobilidade iônica

V_i = velocidade limite

E = valor do campo elétrico

Durante a migração, a separação ocorre devido aos diferentes valores de mobilidade iônica dos solutos.

Em soluções de eletrólitos compostos de ácidos ou base fracos, existem pelo menos duas espécies em equilíbrio: a molécula não ionizada (com mobilidade zero) e a base ou ácido conjugado, cada qual com um

valor particular de mobilidade. Em presença de um campo elétrico ambas as formas migrarão como um soluto único. Este fenômeno é denominado mobilidade efetiva (Grossman e col., 1992; Tavares, 1996).

A CE tem emergido como um poderoso método alternativo para separação de uma variedade de solutos, sendo complementar à HPLC. Este método tornou-se muito popular para a separação de biomoléculas. Suas principais vantagens são a possibilidade de utilizar volumes bastante reduzidos de amostras (1 – 10 nL), a completa automatização da análise e a sua compatibilidade com uma variedade de técnicas de detecção, tais como a absorção no UV-VIS, fluorescência, medidas de técnicas de condutividade, espectrometria de massa, etc (Grossman e col., 1992; Tavares, 1996).

A **Figura 10** mostra um esquema de um aparelho de eletroforese capilar. Nela vemos uma fonte de alta tensão, capilares (constituídos de sílica fundida), eletrodos (geralmente de platina) e um detector. Uma fonte de alta tensão é usada para estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar, sendo que o operador é protegido por uma caixa de acrílico, que envolve todo o sistema. A fonte de alta tensão é conectada através de eletrodos de platina, a dois reservatórios contendo uma solução de um eletrólito. O tubo capilar é preenchido com a solução e serve de canal de migração, suas extremidades são imersas nos reservatórios de solução completando o contato elétrico. A termostatização do sistema é realizada por circulação de um líquido ou ar através de um cartucho contendo o capilar (Grossman e col., 1992; Tavares, 1996).

Em eletroforese capilar, amostras podem ser introduzidas no capilar por métodos eletrocinéticos ou hidrodinâmicos. Na injeção eletrocinética um gradiente de potencial é estabelecido ao longo do comprimento do capilar por um período de tempo estabelecido, onde a amostra é introduzida como resultado da combinação entre as velocidades eletroforética e eletroosmótica. Na injeção hidrodinâmica utiliza-se de um gradiente de pressão para a introdução da amostra no capilar, a qual esta pode ser feita

por pressurização ou vácuo em um dos reservatórios de solução (Grossman e col., 1992; Tavares, 1996).

A sílica fundida é caracterizada pela presença de diferentes tipos de grupos silanol, os quais apresentam um caráter ácido. Dependendo do pH alguns destes grupos são ionizados, tornando a superfície do capilar carregada negativamente. Quando um campo elétrico é imposto tangencialmente à superfície, forças elétricas atuam nas cargas da superfície do capilar causando um movimento de íons em direção ao eletrodo de carga oposta. Durante a migração, os íons transportam moléculas de água induzindo um fluxo de solução como um todo, conhecido como fluxo eletroosmótico. Quando este fluxo é de alta intensidade, ele permite a condução de solutos em direção ao detector sem distinção de carga. Sendo assim, é possível a análise simultânea de amostras contendo tanto solutos catiônicos, aniônicos e neutros, embora para este último não haja diferença temporal entre diferentes solutos neutros (Grossman e col., 1992; Tavares, 1996)

Figura 10. Instrumentação para eletroforese capilar.

A CE vem sendo empregada na separação de enantiômeros de peptídeos (Kirby e col., 1993). Apesar dos enantiômeros possuírem mobilidades eletroforéticas idênticas, podem-se adicionar reagentes quirais

às soluções tampões que formarão complexos com os enantiômeros em análise produzindo complexos diastereoisoméricos em equilíbrio dinâmico (Terabe e col., 1994). Complexos metálicos quirais, ciclodextrinas (CDs), éteres-coroa e oligossacarídeos tem sido empregados com sucesso (Terabe e col., 1994). Gassmann e colaboradores foram os primeiros a separar enantiômeros de biomoléculas por CE. Eles utilizaram o complexo Cu (II)-histidina como aditivo no tampão eletroforético e conseguiram separar aminoácidos dansilados (Dns-AAs). Os complexos de cobre formados tinham uma carga positiva nas condições experimentais empregadas (pH 7-8) e migravam para o cátodo. Estes foram formados por Cu (II)-L-histidina e Dns-L-AAs ou Dns-D-AAs, que são diastereoisômeros e possuem supostamente pequena diferença de mobilidade eletroforética. Neste caso, a separação baseia-se na constante de formação ou estabilidade dos complexos. Assim, o enantiômero do Dns-aminoácido que tivesse maior constante de ligação com o Cu (II) teria uma maior velocidade de migração para o catodo (Gassmann e col., 1985; Terabe, 1994).

Complexação com Ciclodextrinas (CD-CE)

A separação de enantiômeros por CE usando ciclodextrinas como seletores quirais foi introduzida por Fanali. É uma das mais bem sucedidas técnicas para separação de enantiômeros em CE (Fanali, 1989).

As CDs são oligossacarídeos cíclicos, com nomes particulares como α , β - e γ -CD, constituídas por seis, sete e oito glicopiranosos unidas, respectivamente. Sua superfície externa é hidrofílica, enquanto a interna é hidrofóbica, sendo que alguns compostos podem ser inseridos nesta última por interações hidrofóbicas (Fanali, 1989). Estas moléculas são desprovidas de carga, mas quando um soluto é incluído dentro de sua cavidade, o complexo de inclusão formado tem uma carga idêntica à do soluto livre (mas com um aumento na massa molecular, diminuindo assim sua velocidade eletroforética). A separação entre os enantiômeros se dá pela diferença de constantes de formação dos complexos de inclusão entre os pares dos

mesmos e a CD, sendo que o enantiômero que se ligar mais fortemente à CD terá uma menor velocidade efetiva (Terabe e col., 1994).

Estrutura da α -Ciclodextrina

Complexação com éteres-coroa

Os éteres-coroa são compostos que apresentam anéis constituídos por poliéteres que formam cavidades capazes de formar complexos de inclusão estáveis com cátions de metais alcalinos (particularmente com o potássio), alcalinos terrosos, o íon amônio e alquilaminas protonadas. Estes dois últimos formam complexos ligando-se a três átomos de oxigênios da cavidade do composto quiral por ligações de hidrogênio, $\text{NH}^+ \cdots \text{O}$ (**Figura 11**; Kuhn e col., 1994).

O 6-ácido tetracarboxílico-18-coroa (**18-C-6H₄**) foi primeiramente sintetizado por Lehn e colaboradores (**Figura 11**), sendo utilizado atualmente na separação em CE de aminas primárias como aminoácidos e peptídeos (Kuhn & Erni, 1992 ; e Kuhn e col., 1994; Riester e col., 1996).

A complexação das alquilaminas protonadas na cavidade não é o único fator responsável pela separação de enantiômeros, interações adicionais entre os substituintes do anel do éter coroa e o ligante são necessárias para conseguir-se a separação (Kuhn & Erni, 1992).

Figura 11. Estrutura do 18-C-6H₄ (a); b) complexo formado entre o 18-C-6H₄ e uma amina primária (b).

OBJETIVOS

Os estudos realizados por nosso grupo anteriormente sobre SPFS em alta temperatura demonstraram que esta metodologia era capaz de fornecer peptídeos pequenos e médios de boa qualidade com maior rapidez que a SPFS convencional. Além disso, em condições experimentais que pareciam minimizar o fenômeno da agregação (Varanda & Miranda, 1997).

Por esta razão, propusemo-nos neste trabalho a melhor avaliar a metodologia e tais condições de síntese em três aspectos diferentes: racemização, agregação e síntese de peptídeos longos. Para tanto, utilizamos diferentes peptídeos-modelo. O esquema que se segue resume o trabalho realizado e a abordagem experimental empregada.

MATERIAIS

Os reagentes e solventes utilizados eram de grau analítico ou cromatográfico e foram adquiridos da Merck, Applied Biosystems, Fluka, EM Science e Sigma.

A β -Ciclodextrina e a 18-C-6H₄ empregados eram de procedência da Aldrich Chemical Company, Inc.

Os derivados de L e D-aminoácidos e as aminoacil-resinas utilizadas foram adquiridas da Bachem Califórnia (Torrance, CA), Applied Biosystems e da Protein Research Foundation.

A resina RINK foi comprada da NovaBiochem, Inc.

A água que foi utilizada durante o trabalho era Milli-Q.

MÉTODOS

1. Síntese dos peptídeos

Todos os peptídeos foram sintetizados manualmente pelo método da fase sólida, utilizando as estratégias t-Boc ou Fmoc (Stewart & Young, 1984). As sínteses convencionais a temperatura ambiente foram realizadas conforme o **Esquema 1**. Para as sínteses em alta temperatura foram utilizadas as condições experimentais empregadas por Varanda & Miranda (1997) descritas no **Esquema 2**.

As sínteses dos peptídeos modelos foram realizadas a partir dos suportes poliméricos descritos na **TABELA 2**. A eles foram sendo acoplados passo a passo os aminoácidos da seqüência. Os grupos empregados para proteção das cadeias laterais na estratégia Boc foram:

- Ácido Glutâmico, Ácido Aspártico – OcHex
- L-e D-Lisina – 2-Cl-Z
- Serina – Bzl; Treonina – Bzl
- L-e D-Tirosina – Bzl e Dcb, respectivamente;

Para a estratégia Fmoc foram usados os seguintes grupos protetores:

- Ácido Aspártico ; Tirosina; Treonina; Serina – Bu^t

TABELA 2. RESINAS UTILIZADAS NAS SÍNTESES DOS PEPTÍDEOS

PEPTÍDEO	RESINA UTILIZADA (grau de substituição; mmol/g)
Ac-Ile-Gly	Boc-Gly-Pam (0,83) Fmoc-Gly-resina álcool p-alcoxibenzílico (0,65)
(D-Tyr)-Lys-Trp	Boc-Trp-Pam (0,70)
Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂	MBHA (0,69 – 0,77)
ph-GnRH (14-36)	t-Boc-Gln-Pam (0,41)
Fragmento (89-99) da protease do HIV-1	t-Boc-Asn-Pam (0,34)
Octadecapeptídeo derivado de uma glicoproteína do envelope do HIV-1	Fmoc-Phe-resina álcool p-alcoxibenzílico (0,30)
CCK-22 e -33 humanas não sulfatadas	Rink (0,45)

Esquema 1: Procedimento experimental para a SPFS convencional (27°C; Miranda e col., 1993; Varanda & Miranda, 1997).

1. Lavagem inicial

- . 2x DCM ou DMF^a
- . 2x MeOH
- . 2x TEA (10%) / DCM^b
- . 2x MeOH
- . 2x DCM ou DMF^a
- . Teste de Ninidrina

2. Acoplamento/Reacoplamento (60 min)

- . Boc-aa ou Fmoc-aa (2,5x em excesso).
- . DIC (1M) / DCM + HOBt, ou
- . TBTU (estequiométrica ao Boc-aa) em DMF + DIEA, (pH 9-10)

3. Lavagem pós-acoplamento

- . 2x DCM ou DMF^a
- . 2x MeOH
- . 2x TEA (10%) / DCM^b
- . 2x MeOH
- . 2x DCM ou DMF^a
- . Teste de Ninidrina

4. Desproteção

- . Anisol (2 ou 3 gotas)
- . TFA/DCM^b (20 min) ou 20% Piperidina / DMF^a (10 min.)

5. Lavagem pós-desproteção

- . Anisol (1%) / Isopropanol
- . 2x DCM ou DMF^a
- . 2x MeOH
- . 2x TEA (10%) / DCM^b
- . 2x MeOH^b
- . 2x DCM ou DMF^a
- . Teste de Ninidrina

^a para estratégia Fmoc; ^b para estratégia t-Boc

Esquema 2: Procedimento experimental para a SPFS em alta temperatura (60°C; Varanda & Miranda, 1997).

1. Lavagem inicial

- . 2x 25%DMSO/Tolueno
- . 2x MeOH
- . 2x TEA (10%)/Tolueno ^b
- . 2x MeOH
- . 2x Tolueno
- . Teste de Ninidrina

2. Acoplamento/reacoplamento (20 min)

- . Boc-aa ou Fmoc-aa (2,5x em excesso).
- . DIC (1M) / DCM + HOBt ou
- TBTU (estequiométrica ao Boc-aa)* em
- 25% DMSO/Tolueno + DIEA (pH 9-10)

3. Lavagem pós-acoplamento

- . 2x MeOH
- . 2x 25% DMSO/Tolueno
- . 2x TEA (10%)/Tolueno ^b
- . 2x MeOH
- . 2x Tolueno
- . Teste de Ninidrina

4. Desproteção

- . Anisol (2 ou 3 gotas)
- . TFA/Tolueno ^b (10 min) ou 20%
- Piperidina / DMF ^a (5 min.)

5. Lavagem pós-desproteção

- . Anisol (1%) / Isopropanol
- . 2x 25% DMSO/Tolueno
- . 2x TEA (10%)/Tolueno ^b
- . 2x MeOH
- . 2x Tolueno
- . Teste de Ninidrina

^a para estratégia Fmoc; ^b para estratégia t-Boc

- Arginina – Pmc
- Cisteína – Acm ou Trt
- Triptofano; Lisina – t-Boc
- Histidina – Trt

Nas sínteses convencionais as reações de acoplamento foram realizadas empregando 2,5 vezes de excesso molar de t-Boc ou Fmoc-aminoácidos em **DCM**, **DMF** ou **NMP**. Nas sínteses a 60 °C foram utilizadas a mistura **25% DMSO/Tolueno**, **DMF** ou **NMP**. Os reagentes empregados como agentes acopladores foram: **DIC (1M/DCM)** combinado com **HOBt** (Bodanszky, M. 1993) e **TBTU** (Knorr e col., 1989). Em princípio, os tempos de acoplamento e reacoplamento foram em torno de 1h nas SPFS convencionais e 20 min. nas SPFS em alta temperatura. Estes foram monitorados pelo teste de ninidrina (Kaiser e col.; 1970).

As etapas de remoção dos grupos t-Boc ou Fmoc (desproteção), também foram monitorados pelo teste de ninidrina (Kaiser e col., 1970).

2. Clivagem do peptídeo do suporte polimérico e desproteção total (Stewart & Young, 1984; Miranda e col., 1993)

As desproteções totais e clivagens finais das peptidil-resinas obtidos pela estratégia Boc foram feitas pelo seu tratamento por 90 min a 0°C com ~ 5 mL de **HF** contendo 1% de anisol. Após eliminação do HF sob vácuo, os peptídeos brutos foram precipitados com éter diisopropílico anidro gelado e posteriormente extraídos com os solventes A (0,1% TFA/ H₂O) e B (60%, 80% ou 90% de ACN/H₂O contendo 0,09% TFA).

As peptidil-resinas obtidas pela estratégia Fmoc foram clivados e totalmente desprotegidos pelo seu tratamento com 2 ml de 99%TFA/ 1% fenol durante 90 ou 120 min, 95%TFA/ 5% etanoditiol durante 90 ou 120 min. ou a utilização do Reagente R (90%TFA/ 5%tioanisol/ 3% etanoditiol/ 2% anisol) durante 4h. Posteriormente, foi adicionado éter diisopropílico anidro gelado ao meio reacional para provocar a precipitação do peptídeo (nos casos em que esta não ocorreu, a resina e o peptídeo foram separados

da solução por centrifugação). Por fim, o peptídeo e a resina foram suspensos diversas vezes nos solventes A e B para extração dos peptídeos, sendo que a solução contendo o peptídeo foi separado da resina por filtração. Todas as soluções resultantes da extração foram juntadas e liofilizadas, fornecendo os peptídeos brutos sólidos.

3. Análise e purificação dos peptídeos e seus contaminantes por RP-HPLC

Os peptídeos brutos foram analisados por **RP-HPLC** usando um sistema da LDC Analytical constituído por bombas ConstaMetric 3500 e 3200, um detector UV-VIS-modelo Spectromonitor 3100, injetor Rheodyne modelo 7125 e um integrador Waters 745 B. Foram utilizadas uma coluna Vydac C₁₈ analítica, 5 µm, 300 Å, 4,6 mm x 25,0 cm. As condições experimentais empregadas estão descritas nas legendas das figuras.

As purificações dos peptídeos modelos foram realizadas nas mesmas condições experimentais descritas, porém com o fluxo de 3 mL / min em uma coluna Vydac C₁₈ semi-preparativa, 5 µm, 300 Å, 1,1 x 25 cm.

4. Análise de Aminoácidos (Manning & Moore, 1968; Smillie & Nattriss, 1991)

Os peptídeos foram submetidos à hidrólise ácida gasosa com HCl 6N sob atmosfera de N₂ a 110 °C por 24h em uma "Workstation Pico Tag". A composição de aminoácidos dos hidrolisados foi determinada em um analisador automático da Beckman Instruments, Inc., modelo 7300. Este sistema emprega o método de derivatização pós-coluna, no qual os aminoácidos obtidos pela hidrólise são separados por cromatografia de troca iônica e detectados como produto de uma reação com ninidrina a 440 ou 570 nm. A proporção molar de cada resíduo de aminoácido foi determinada em relação à concentração molar total dos resíduos de aminoácidos detectados por este método.

5. Eletroforese capilar (Grossman e col., 1992)

As análises por eletroforese capilar (CE) foram feitas usando o equipamento 270 A-HT da Perkin Elmer Applied Biosystems. As dimensões do capilar de sílica fundida eram de 72 cm x 50 µm (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 (5" Hg) por um período de tempo estabelecido e a solução foi aspirada. Os tampões utilizados foram: solução 100 mM de ácido fosfórico (titulada com hidróxido de sódio 0,1M até pH = 2,5) contendo 10 mM de β-ciclodextrina; 30 mM TRIS (ajustado para pH =2,0 pela titulação de uma solução de ácido cítrico) contendo 10 mM de **18-C-6H₄**. O intervalo de voltagem empregado nos diferentes experimentos foi de 15 a 30 kV, sendo que a corrente variou de 30 a 103 µA. O tempo de injeção em todos os casos foi de 4s. As detecções dos peptídeos foram feitas no comprimento de onda de 210 nm e a temperatura usada foi de 30°C.

6. Espectrometria de massa (Siuzdak,1996)

Os peptídeos purificados foram submetidos à análise por espectrometria de massas para a confirmação de suas massas moleculares. Estas análises foram realizadas no laboratório do Dr. Kouki Kitagawa, Niigata College of Pharmacy, Niigata, Japão, ou no espectrômetro de massas de duplo quadrupolo da marca Micromass, modelo Quattro II do IQ-USP, através da técnica de ionização por electrospray (ES-MS).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. ESTUDOS SOBRE A RACEMIZAÇÃO

1.1. Utilização do dipeptídeo Ac-Ile-Gly como modelo

Para investigar se o uso da alta temperatura em SPFS tem grande influência na incidência de racemização possível de ocorrer durante as etapas de acoplamento, realizamos inicialmente a síntese do dipeptídeo **Ac-Ile-Gly**. Este modelo simples e eficiente foi idealizado por Bodansky & Conklin que estudaram a influência de aminas terciárias na indução de racemização durante o acoplamento da Ac-Ile à Gly-OEt: para a quantificação da racemização ocorrida o peptídeo bruto era hidrolisado e submetido à análise de aminoácidos em uma coluna de troca iônica que separa a isoleucina de um de seus estereoisômeros a D-allo-isoleucina (Bodansky e Conklin, 1967; Spackman e col., 1958).

Em trabalho anterior no nosso laboratório, Varanda & Miranda (1997) verificaram que, além da mistura **25% DMSO/Tolueno**, o **DMF** e o **NMP** a 60°C poderiam ser utilizados como solventes durante a SPFS de um peptídeo. Portanto, decidimos também empregá-los na SPFS em alta temperatura. Variamos também o agente ativador da α -carboxila (**TBTU** e **DIC**) e a estratégia de síntese utilizada (**Boc** e **Fmoc**).

A **TABELA 3** mostra que para cada caso de SPFS convencional foi feita uma SPFS em alta temperatura usando a mesma estratégia, experimentos utilizando a mistura 25%DMSO/tolueno a temperatura ambiente não foram realizados, pois os reagentes não se dissolviam muito bem nestas condições. Como desejávamos comparar a recuperação (mg de peptídeo bruto obtida / mg de peptidil-resina clivada) e pureza dos peptídeos brutos, ~100 mg de cada dipeptidil-resina foram submetidos à clivagem e desproteção total em ~5 mL HF por 90 min. a 0°C, para os peptídeos sintetizados por estratégia t-Boc ou em 2 mL de uma solução de 95% TFA/ 5% fenol durante 90 min para peptídeos sintetizados por estratégia Fmoc.

TABELA 3. SÍNTESE DO PEPTÍDEO Ac-Ile-Gly.

Condição	Condição de síntese	Solvente utilizado durante o acoplamento	Agente acoplador	Solução de desproteção	Tempo de acoplamento	Estratégia
1	convencional	DMF	TBTU	50%TFA/ DCM	90 min	t-Boc
2	alta temperatura	25%DMSO/ Tolueno	TBTU	50%TFA/ Tolueno	30 min	t-Boc
3	convencional	DCM	DIC	50%TFA/ DCM	90 min	t-Boc
4	alta temperatura	25%DMSO/ Tolueno	DIC	50%TFA/ Tolueno	30 min	t-Boc
5	alta temperatura	NMP	DIC	50%TFA/ Tolueno	30 min	t-Boc
6	alta temperatura	DMF	DIC	50%TFA/ Tolueno	30 min	t-Boc
7	convencional	DMF	DIC	20%Piperidina /DMF	90 min	Fmoc
8	alta temperatura	25%DMSO/ Tolueno	DIC	20%Piperidina /Tolueno	30 min	Fmoc
9	alta temperatura	NMP	DIC	20%Piperidina /NMP	30 min	Fmoc
10	alta temperatura	DMF	DIC	20%Piperinina /DMF	30 min	Fmoc

TABELA 4. DADOS DE SÍNTESE, CLIVAGEM DA RESINA E DESPROTEÇÃO TOTAL DE Ac-Ile-Gly.

Ac-Ile-Gly (relativo às condições da TABELA 3)	Massa Inicial de resina (mg)	Massa de peptidil- resina obtida (mg)	Ganho de Massa da resina (mg)	Massa de peptidil-resina clivada (mg)	Massa de peptídeo bruto obtida (mg)
1	182,8	186,0	3,2	100,3	7,5
2	182,2	190,0	7,8	101,9	12,0
3	180,9	190,0	9,1	99,9	14,4
4	180,5	203,9	23,4	102,0	8,6
5	181,6	200,0	18,0	101,0	9,1
6	180,3	178,1	(2,2)	101,4	11,6
7	229,1	201,9	(27,2)	101,0	17,4
8	227,0	187,8	(39,2)	101,0	16,0
9	229,4	187,9	(42,4)	100,3	14,9
10	226,9	198,4	(28,5)	100,0	15,6

Obs. : Os valores em parênteses representam perdas de massa.

Todas as lavagens e extrações foram realizadas de forma idêntica utilizando os mesmos volumes de solventes. A **TABELA 4** mostra quantidades de resina ou de aminoacil-resina iniciais, os ganhos de massa durante o acoplamento da Ac-Ile, as massas das dipeptidil-resinas clivadas e desprotegidas totalmente e, finalmente, as massas de dipeptídeos brutos obtidas.

Estes materiais foram analisados por **RP-HPLC** em duas condições experimentais que utilizam sistemas de solventes diferentes (contendo TFA ou TEAP) de forma a termos uma melhor avaliação de suas purezas. As **Figuras 12, 13, 14, 15 e 16** mostram os dados de recuperação e pureza obtidos. As purezas de ambos, nas condições analíticas utilizando-se **TFA** ou **TEAP**, se mostraram altas e similares. Entretanto, ao compararmos os cromatogramas (**Figura 14** na condição 1A e 2A), vemos que a área do pico correspondente ao dipeptídeo sintetizado em alta temperatura é menor do que à daquele correspondente ao material obtido por SPFS convencional. Certamente, isto deve-se à um maior conteúdo peptídico do último.

Como mostra a **Figura 12** (onde todos os peptídeos foram sintetizados pela estratégia t-Boc), as recuperações dos peptídeos sintetizados em alta temperatura (condições 4, 5, 6 utilizando-se como solventes **25%DMSO/Tolueno**, **NMP** e **DMF**, respectivamente) foram similares aos dos produtos da SPFS convencional (condição 3), e as purezas e os perfis cromatográficos nos três casos de sínteses em alta temperatura foram comparáveis (ver **Figura 15**, condições 3,4,5 e 6).

Os resultados obtidos a partir das sínteses em alta temperatura utilizando-se a estratégia Fmoc mostraram que a recuperações em todos os casos foram similares àquelas das sínteses convencionais (**Figura 13**). As purezas dos peptídeos sintetizados em alta temperatura utilizando-se como solvente o **NMP** (**Figura 16**, condição 9) e o **DMF** (**Figura 16**, condição 10) também foram comparáveis aos dos peptídeos brutos obtidos pela síntese convencional (**Figura 16**, condição 7).

No cromatograma da **Figura 16**, condição 8, pode-se visualizar que existe uma maior quantidade de um subproduto no peptídeo bruto

Figura 12. Dados de recuperação (miligramas de peptídeo bruto/miligramas de peptidil-resina submetidos à clivagem) e de pureza ($\% \times 10^{-2}$) dos Ac-Ile-Gly sintetizados nas condições descritas da TABELA 3.

Figura 13. Dados de recuperação (miligramas de peptídeo bruto/miligramas de peptidil-resina submetidos à clivagem) e de pureza ($\% \times 10^{-2}$) dos Ac-Ile-Gly sintetizados nas condições descritas da TABELA 3.

Figura 14. Perfis de RP-HPLC dos Ac-Ile-Gly brutos obtidos nas condições descritas na TABELA 3.

Condições Analíticas: Para os perfis A: solvente A: 0,1 % TFA/ H₂O; B= 30% ACN/H₂O contendo 0,09%TFA, gradiente: 5 a 95 % de B em 30 min, quantidade de amostra injetada: 5,1 µg (condição 1) e 5,1µg (condição 2). Para os perfis B: solvente A: TEAP ; solvente B= 30% ACN/ TEAP, gradiente: 23 a 95% de B em 35 min, quantidade de amostra injetada: 2,0 µg (condição 1) e 1,8µg (condição 2). Para ambas condições: Coluna: Vydac C₁₈, Fluxo=1,0 mL/min, λ= 210 nm, atenuação: 64.

CONDIÇÃO 3

CONDIÇÃO 4

CONDIÇÃO 5

CONDIÇÃO 6

Figura 15. Perfis de RP-HPLC dos Ac-Ile-Gly brutos obtidos nas condições descritas na TABELA 3.

Condições Analíticas: Para os perfis A: solvente A: 0,1%TFA/ H₂O; B= 30% ACN/H₂O contendo 0,09%TFA, gradiente: 5 a 95% de B em 30 min, quantidade de amostra injetada: 4,6µg; 4,5µg; 4,5µg; 4,7µg, para as condições 3, 4, 5 e 6, respectivamente. Para os perfis B: solvente A: TEAP ; solvente B= 30% ACN/ TEAP , gradiente: 23 a 95% de B em 35 min, quantidade de amostra injetada: 1,9 µg; 1,8 µg; 1,8 µg e 1,9 µg para as condições 3, 4, 5 e 6, respectivamente. Para ambas condições: Coluna: Vydac C₁₈, Fluxo=1,0 mL/min, λ = 210 nm, atenuação: 64.

Figura 16. Perfis de RP-HPLC dos Ac-Ile-Gly brutos obtidos nas condições descritas na TABELA 3.

Condições Analíticas: Para os perfis A: solvente A: 0,1 % TFA/ H₂O; B= 30% ACN/H₂O contendo 0,09%TFA, gradiente: 5 a 95% de B em 30 min, quantidade de amostra injetada: 4,4µg; 4,5µg; 4,5µg e 4,9µg para as condições 7, 8, 9 e 10, respectivamente. Para os perfis B: solvente A: TEAP ; solvente B= 30% ACN/ TEAP , gradiente: 23 a 95% de B em 35 min, quantidade de amostra injetada: 1,8 µg para as condições 7, 8, 9 e 1,9 µg para condição 10. Para ambas condições: Coluna: Vydac C₁₈, Fluxo=1,0 mL/min, λ = 210 nm, atenuação: 64.

sintetizado em alta temperatura em **25% DMSO/Tolueno** como solvente do que nos outros peptídeos brutos. Este subproduto provavelmente se formou devido à uma remoção incompleta do grupo protetor Fmoc ao se utilizar a mistura 20% de Piperidina/ Tolueno na etapa de desproteção do grupo N α -amino (**TABELA 3, condição 8**).

Na literatura é descrita a separação da L-isoleucina e a D-allo-isoleucina em uma coluna de troca iônica de um analisador de aminoácidos (Bodansky & Conklin, 1967; Bodansky, 1993;). Desta forma, a racemização ocorrida na incorporação da isoleucina durante o processo de síntese de um peptídeo que contenha este resíduo pode ser determinada via a análise de aminoácidos do seu hidrolisado total.

Sendo assim, preparamos uma mistura contendo os aminoácidos Thr, Gly, Ile, Phe, e com a D-allo-Ile (a Thr e Phe também foram adicionadas a esta solução devido à sua utilização futura em análises de outro peptídeo modelo). Alíquotas contendo 3, 5 e 8 nmols destes aminoácidos foram injetadas no analisador de aminoácidos construindo uma curva padrão de concentração versus área para cada aminoácido. O aminograma padrão obtido é mostrado na **Figura 17**. Posteriormente, os peptídeos brutos obtidos nas sínteses convencional e em alta temperatura foram submetidos à hidrólise ácida por 24 h a 110°C para análise e comparação dos hidrolisados.

A **Figura 18 e 19** mostra os cromatogramas dos hidrolisados. Como podemos observar, nenhum dos aminogramas evidenciou a presença de D-allo-Ile. Este estereoisômero poderia ser detectado mesmo se existisse na ordem de 0,1 nmol.

1.2. Utilização do tripeptídeo (D-Tyr)-Lys-Trp como modelo

De posse dos resultados e conclusões obtidas com o peptídeo Ac-Ile-Gly, ampliamos nosso estudo à uma outra sequência peptídica. A (D-Tyr)-Lys-Trp já havia sido empregada como modelo em um estudo sobre racemização de aminoácidos ocorrida na SPFS convencional (Riester e col., 1996). Como estes autores determinaram condições analíticas em CE para a

Figura 17. Aminograma-padrão obtido para a mistura que contenha 5 nmol dos aminoácidos treonina, glicina, D-alo-isoleucina, isoleucina e fenilalanina.

Figura 18. Aminogramas obtidos na análise dos hidrolisados dos Ac-Ile-Gly sintetizados nas condições da TABELA 3 (os números correspondem àqueles das condições de síntese empregadas).

Abs 570 nm

Tempo (min.)

Figura 19. Aminogramas obtidos na análise dos hidrolisados dos Ac-Ile-Gly sintetizados nas condições da TABELA 3 (os números correspondem àqueles das condições de síntese empregadas).

separação e quantificação de sete estereoisômeros formados durante o processo sintético deste tripeptídeo (2 deles coeluem; **Figura 20**), realizaríamos as análises de nossos materiais brutos por CE utilizando as mesmas condições experimentais por eles determinada.

A escolha desta sequência peptídica por Riester e colaboradores provavelmente se deu devido ao fato de esta possuir carga total +2 (devido ao grupo amino da cadeia lateral da lisina e o N-terminal da D-Tyr) em pH 2 empregado para as análises por CE: a carga positiva auxiliaria a migração em direção ao cátodo. A presença do triptofano auxiliaria na detecção por apresentar elevado valor de ϵ em 210 nm, permitindo que os estereoisômeros contaminantes pudessem ser detectados em baixas concentrações.

Figura 20. Eletroferograma extraído do trabalho de Riester e col., 1996.

Como feito para o peptídeo modelo Ac-Ile-Gly, sintetizamos (D-Tyr)-Lys-Trp pela SPFS convencional (Stewart & Young, 1984) e por SPFS em alta temperatura (Varanda & Miranda, 1997).

Riester e colaboradores sintetizaram o peptídeo por estratégia Fmoc usando como solvente o DMF (que poderia induzir à uma maior formação de produtos racêmicos em relação ao DCM) e DIC como agente ativador (Riester e col., 1996). Nossas sínteses foram realizadas pela estratégia t-

Boc, sendo que no acoplamento da t-Boc-Lys-OH à Trp-resina foi utilizado como agente ativador o DIC em DCM (síntese convencional) ou em 25% DMSO/Tolueno (síntese em alta temperatura). No acoplamento da t-Boc-D-Tyr à Lys-Trp-resina foi utilizado o TBTU em DMF (síntese convencional) ou 25% DMSO/Tolueno (síntese em alta temperatura) em pH=9-10 para ambas.

A **TABELA 5** descreve os dados de síntese, clivagem e desproteção total da (D-Tyr)-Lys-Trp e de dois estereoisômeros sintetizados apenas pela SPFS convencional. Similarmente ao modelo-1, todos os passos de clivagem e desproteção total, lavagem e extração foram realizados de forma idêntica e partindo-se das mesmas quantidades. As **Figuras 21 e 22** mostram os índices de recuperação e os perfis cromatográficos dos peptídeos brutos obtidos. Conforme podemos observar, os índices são próximos (0,33 e 0,28), mas a pureza do peptídeo sintetizado em alta temperatura é inferior à do peptídeo sintetizado pela síntese convencional.

As condições empregadas na análise comparativa por CE dos peptídeos sintetizados pelos métodos de síntese SPFS convencional e em alta temperatura foram as mesmas utilizadas por Riester e colaboradores (1996), (comprimento do capilar até o detector = 50 cm, tampão = 30 mM de Tris e 10 mM de 18-C-6H₄, ajustado a pH= 2,0 pela titulação de uma solução de ácido cítrico, voltagem = 30 kV, λ = 210 nm, concentrações das soluções contendo os peptídeos = 0,5 mg/mL, vácuo por 4s em 5 in. Hg para a injeção das amostras), exceto pela temperatura que ao invés de 30 foi de 21°C (Riester e col., 1996).

Ao analisarmos os resultados mostrados na **Figura 23**, vemos que o peptídeo sintetizado pela síntese convencional contém um subproduto majoritário, do lado esquerdo do pico principal (**Figura 23-1**) e o peptídeo sintetizado em alta temperatura contém dois (**Figura 23-2**). Tais contaminantes poderiam ser estereoisômeros resultantes de racemização.

Como partimos de Boc-L-Trp-resina comercial para realizarmos as sínteses, acreditamos que este continha quase que exclusivamente L-Trp. Além disso, este Boc-aminoacil-resina foi empregado em ambas sínteses e um dos contaminantes só aparece em um dos peptídeos brutos. Por estas

TABELA 5. DADOS DE SÍNTESE, CLIVAGEM DA RESINA E DESPROTEÇÃO TOTAL DE (D-Tyr)-Lys-Trp.

Peptídeo	Massa Inicial de resina (mg)	Massa de peptidil-resina obtida (mg)	Ganho de Massa da resina (mg)	Massa de peptidil-resina clivada (mg)	Massa de peptídeo bruto obtida (mg)
(D-Tyr)-Lys-Trp (síntese convencional)	214,3	254,1	39,8	101,0	33,0
(D-Tyr)-Lys-Trp (alta temperatura)	214,3	274,2	59,9	100,7	28,7
Tyr-D-Lys-Trp (síntese convencional)	142,9	172,3	30,0	100,0	31,2
Tyr-Lys-Trp (síntese convencional)	142,9	205,2	62,3	101,9	17,8

Figura 21. Dados de recuperação (miligramas de peptídeo bruto/miligramas de peptidil-resina submetidos à clivagem) e de pureza ($\% \times 10^{-2}$) dos (D-Tyr)-Lys-Trp brutos obtidos pela síntese convencional (1) e por SPFS em alta temperatura (2).

Figura 22. Perfis de RP-HPLC dos (D-Tyr)-Lys-Trp brutos. A.1 e B.1 = brancos, A.2 e B.2 = peptídeo sintetizado pelo método convencional, A.3 e B.3 = peptídeo sintetizado a 60°C.

Condições Analíticas: Para os perfis A.1, A.2, A.3: solvente A: 0,1% TFA/ H₂O; B= 30% ACN/H₂O contendo 0,09%TFA, gradiente: 5 a 95 % de B em 30 min. Para os perfis B.1, B.2 e B.3: solvente A: TEAP ; solvente B= 30% ACN/ TEAP, gradiente: 23 a 95% de B em 35 min. Para ambas as condições: Coluna: Vydac C₁₈, Fluxo=1,0 mL/min, λ = 210 nm, atenuação: 64; quantidade de amostra injetada: 0,32 μ g (A.2 e B.2), 0,35 μ g (A.3 e B.3).

Abs 210 nm

Figura 23. Eletroferogramas dos (D-Tyr)-Lys-Trp brutos sintetizados pela síntese convencional (1) e pela síntese em alta temperatura (2).

Condições Experimentais: Comprimento do capilar até o detector: 50 cm; tampão utilizado: 30 mM de Tris contendo 10 mM 18-C-6H₄ ajustado para pH 2,0 pela titulação de uma solução de ácido cítrico; voltagem: 30 kV, $\lambda = 210$ nm; tempo de injeção: 4s; 5" Hg; temperatura: 21°C; concentração dos peptídeos: 0,5 mg/mL.

razões, excluímos a possibilidade de os contaminantes citados serem estereoisômeros contendo D-Trp. Assim, os contaminantes poderiam corresponder aos seguintes estereoisômeros: LLL, LDL e DDL. Como a LDL coeluiu com DDL no eletroferograma descrito por Riester e colaboradores (**Figura 20**), realizamos a síntese dos estereoisômeros LLL (Tyr-Lys-Trp) e o LDL (Tyr-(D-Lys)-Trp). Os perfis cromatográficos de RP-HPLC de ambos peptídeos brutos são mostrados na **Figura 24**.

De posse destes dois padrões, realizamos experimentos de coeluição por CE entre esses compostos e o peptídeo bruto obtido por SPFS em alta temperatura. Conforme podemos observar na **Figura 25**, ao misturarmos os estereoisômeros sintetizados (formas LLL e LDL) com o peptídeo bruto e analisarmos a mistura, não observamos a coeluição destes com os contaminantes presentes no peptídeo. Estes resultados indicaram que os contaminantes majoritários observados não eram resultantes de racemização ocorrida nas etapas de acoplamento do processo sintético realizado a 60°C. Caso estes correspondam aos estereoisômeros DLD e LDD da **Figura 20**, estes decorreram da presença de D-Trp na Boc-L-Trp-Pam adquirida, sendo resultado de racemização durante o acoplamento do derivado de triptofano à resina, o que nada tem a ver com a metodologia de SPFS em alta temperatura em avaliação.

É importante esclarecer que para a realização deste estudo contamos com a colaboração da Profa. Marina F. M. Tavares do Departamento de Química Fundamental de nosso Instituto.

1.3. Utilização do tetrapeptídeo Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂ como modelo

Já havíamos empregado como modelo um dipeptídeo (Ac-Ile-Gly) que teria apenas um resíduo que poderia sofrer racemização (Ile) e um tripeptídeo [(D-Tyr)-Lys-Trp)] contendo dois resíduos potencialmente susceptíveis à racemização (Tyr, Lys). Por isto, escolhemos estudar o tetrapeptídeo Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂ que teria três resíduos que poderiam sofrer racemização (Ile, Phe e Thr).

Figura 24. Perfis de RP-HPLC de Tyr-(D-Lys)-Trp (A.2) e Tyr-Lys-Trp (B.2) brutos; A.1 e B.1 correspondem aos seus respectivos brancos.

Condições Analíticas: Coluna: Vydac C₁₈ ; solvente A: 0,1 % TFA/ H₂O ; B= 30% ACN/ H₂O contendo 0,09%TFA, λ = 210 nm, fluxo =1,0 mL/min; gradiente: 5 a 95 % de B em 30 min; atenuação: 64.

Figura 25. Eletroferogramas obtidos no experimento de coeluição gradual entre (D-Tyr)-Lys-Trp sintetizado pela SPFS em alta temperatura, Tyr-(D-Lys)-Trp e Tyr-Lys-Trp.

Condições Experimentais: Comprimento do capilar até o detector: 50 cm; tampão utilizado: 30 mM de Tris e 10 mM 18-C-6H₄ ajustado para pH 2,0 pela titulação de uma solução de ácido cítrico; voltagem: 30 kV; $\lambda = 210$ nm, tempo de injeção: 4s; 5" Hg, temperatura: 21 °C.

Este peptídeo foi desenhado a partir do conhecimento de que determinados aminoácidos têm grande tendência de sofrer mudança de configuração ao redor do carbono α (Phe, Ile e Thr). Por exemplo, o grupo benzil da cadeia lateral da fenilalanina contribui para a estabilização de um carbânion (que facilita a abstração do próton de seu carbono alfa); a ramificação no carbono β da isoleucina pode facilitar a ocorrência de racemização devido ao impedimento estérico que leva à redução das velocidades de acoplamento facilitando a abstração do próton do carbono alfa (Bodanszky, 1993). Como o peptídeo deveria possuir uma carga líquida positiva para auxiliar na sua migração no capilar durante as análises por CE, optamos por amidar a sua carboxila terminal.

Assim, este peptídeo foi sintetizado: 1) pelo método convencional em temperatura ambiente usando **DCM** como solvente (Stewart & Young, 1984); 2) por SPFS a 60°C usando **25% DMSO/Tolueno** como solvente (Varanda & Miranda, 1997). Em ambas sínteses foi empregado o HOBt como aditivo nas etapas de acoplamento.

Como desejávamos comparar a recuperação e pureza dos peptídeos brutos obtidos, submetemos à clivagem e desproteção total ~100 mg de cada uma das peptidil-resinas (~ 10 mL HF por 90 min. a 0°C). Todas as lavagens e extrações dos peptídeos brutos foram realizadas de forma idêntica utilizando os mesmos volumes de solventes, como feito nos estudos anteriores. A **TABELA 6** mostra os valores de massas iniciais, os ganhos de massa da resina durante os alongamentos, as massas de peptidil-resinas clivadas e desprotegidas totalmente e as massas de peptídeo bruto obtidas nas duas sínteses.

a) Análise comparativa dos materiais brutos por RP-HPLC

A **Figura 26** mostra os índices de recuperação dos peptídeos brutos obtidos e as purezas dos mesmos obtidos por RP-HPLC. Como pode observar-se, as recuperações dos peptídeos brutos foram bastantes similares (0,37 e 0,36), assim como seus perfis cromatográficos (**Figura 27**). Com o intuito de detectarmos e quantificarmos qualquer porcentagem de racemização ocorrida durante a síntese do peptídeo **Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂**

TABELA 6. DADOS DE SÍNTESE, CLIVAGEM DA RESINA E DESPROTEÇÃO TOTAL DO Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂.

Peptídeo	Massa Inicial de resina (mg)	Massa de peptidil-resina obtida (mg)	Ganho de Massa da resina (mg)	Massa de peptidil-resina clivada (mg)	Massa de peptídeo bruto obtida (mg)
H-Ile-Phe-Gly-Thr-NH ₂ (síntese convencional)	130,6	165,4	34,8	100,3	36,9
H-Ile-Phe-Gly-Thr-NH ₂ (alta temperatura)	130,0	165,0	35,0	100,1	35,7
H-Ile-(D-Phe)-Gly-Thr-NH ₂ (síntese convencional)	435,4	525,0	89,6	525,0	165,0
H-(D-alo-Ile)-Phe-Gly-Thr-NH ₂ (síntese convencional)	129,1	170,2	41,1	101,3	32,8
H-(D-alo-Ile)-(D-Phe)-Gly-Thr-NH ₂ (síntese convencional)	129,7	160,2	30,5	100,6	32,8

Figura 26. Dados de recuperação (miligramas de peptídeo bruto/miligramas de peptidil-resina submetidos à clivagem) e de pureza ($\% \times 10^{-2}$) dos Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂ brutos obtidos pela síntese convencional (A) e por SPFS em alta temperatura (B).

Figura 27. Perfis de RP-HPLC dos Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂ brutos: A.1 e B.1 = brancos, A.2 e B.2 = peptídeo sintetizado pelo método convencional, A.3 e B.3 = peptídeo sintetizado a 60°C.

Condições Analíticas: Para os perfis A.1, A.2, A.3: solvente A: 0,1% TFA/ H₂O; B= 30% ACN/H₂O contendo 0,09%TFA, gradiente: 5 a 95 % de B em 30 min. Para os perfis B.1, B.2 e B.3: solvente A: TEAP ; B= 30% ACN/ TEAP, gradiente: 25 a 70% de B em 30 min. Para ambas as condições: Coluna: Vydac C₁₈, Fluxo=1,0 mL/min, λ = 210 nm, atenuação: 64; quantidade de amostra injetada: 0,75 μ g (A.2 e A.3), 0,80 μ g (B.2 e B.3).

pelo método convencional e por SPFS em alta temperatura, pretendíamos sintetizar os sete isômeros possíveis que poderiam ser formados durante as sínteses. Entretanto, isto não foi possível porque não se encontra comercialmente a Boc-(D-alo-Thr) e o D-alo-Thr necessário para prepará-lo na quantidade necessária é extremamente caro. Portanto, optamos por sintetizar apenas três isômeros: **Ile-(D-Phe)-Gly-Thr-NH₂**, **(D-alo-Ile)-Phe-Gly-Thr-NH₂**, **(D-alo-Ile)-(D-Phe)-Gly-Thr-NH₂** para assim avaliarmos a racemização ocorrida apenas durante os acoplamentos dos aminoácidos Phe e Ile, o que já seria bastante condizente com os objetivos deste trabalho.

Os dados de síntese, desproteção total e clivagem dos estereoisômeros utilizados como padrões também estão descritos na **TABELA 6** (pagina 65). A **Figura 28** mostra os perfis cromatográficos obtidos para cada um dos estereoisômeros sintetizados.

Assim, realizamos experimentos de coeluição gradativa em HPLC empregando cada um dos três estereoisômeros sintetizados [**(D-alo-Ile)-Phe-Gly-Thr-NH₂** , **(D-alo-Ile)-(D-Phe)-Gly-Thr-NH₂**, **Ile-(D-Phe)-Gly-Thr-NH₂**] que foram sendo adicionados ao peptídeo sintetizado em alta temperatura (**Figura 29**). Como se observa nos perfis cromatográficos obtidos em condições otimizadas, os estereoisômeros sintetizados não coeluíram entre si ou com o peptídeo sintetizado em alta temperatura. A comparação entre o perfil cromatográfico do mesmo e da mistura contendo os quatro peptídeos nos permitiram concluir que não existia nele quantidade significativa e detectável por **RP-HPLC** de qualquer um dos estereoisômeros padrões empregados. O mesmo ocorreu com o material bruto obtido por SPFS convencional.

b) Análise comparativa dos hidrolisados dos peptídeos brutos via determinação de seus conteúdos de aminoácidos

Como citado anteriormente, a racemização ocorrida na isoleucina durante o processo de síntese de um peptídeo que contenha este resíduo pode ser determinada via análise de aminoácidos do hidrolisado do peptídeo bruto em estudo. Este método é muito mais simples e sensível (limite inferior

Figura 28. Análise por RP-HPLC dos peptídeos brutos: A = Ile-(D-Phe)-Gly-Thr-NH₂; B = (D-allo-Ile)-Phe-Gly-Thr-NH₂; C = (D-allo-Ile)-(D-Phe)-Gly-Thr-NH₂.

Condições Analíticas: Coluna: Vydac C₁₈; solvente A: 0,1% TFA/ H₂O; B= 30% ACN/ H₂O contendo 0,09%TFA, λ = 210 nm, fluxo =1,0 mL/min; gradiente: 5 a 95% de B em 30 min; atenuação: 64; quantidade de amostra injetada: 1,5 μ g (A); 0,93 μ g (B); 0,90 μ g (C).

Figura 29. Experimento de coeluição entre os estereoisômeros e o Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂ obtido por SPFS em alta temperatura (1); 2 = (D-alo-Ile)-(D-Phe)-Gly-Thr-NH₂ ; 3 = (D-alo-Ile)-Phe-Gly-Thr-NH₂ ; 4 = Ile-(D-Phe)-Gly-Thr-NH₂.

Condições Analíticas: Coluna: Vydac C₁₈ ; solvente A: TEAP; B= 30% ACN/TEAP, λ = 210 nm, fluxo =1,0 mL/min; gradiente: 25 a 70% de B em 30 min; atenuação: 64.

= 0,1 nmol) que a RP-HPLC e, portanto; nos permitiria determinar a porcentagem de racemização sofrida pela isoleucina (que seria a soma de todos os estereoisômeros que conteriam D-alo-isoleucina), caso ela fosse muito baixa. Desta forma, os peptídeos brutos obtidos da síntese convencional e da SPFS em alta temperatura foram submetidos à hidrólise ácida por 24 h a 110°C. Os aminogramas dos hidrolisados obtidos são mostrados na **Figura 30**. Ao compararmos a **Figura 30 A**, que mostra a separação entre a Ile e a D-alo-Ile, com **30 B** e **30 C** nota-se que não foi possível detectar a presença de produto racêmico mesmo na ordem de 0,1 nmols em ambos os peptídeos brutos hidrolisados.

c) Análise comparativa dos materiais brutos por CE

Como a análise de aminoácidos não seria capaz de detectar a presença de estereoisômeros em quantidade inferior a 0,1 nmol, também empregamos **CE** na análise dos peptídeos brutos obtidos nas SPFS convencional e em alta temperatura. Os limites de detecção desta técnica quando se empregam detectores de UV são 10^{-13} a 10^{-15} moles (Ewing e col. 1989).

Novamente contamos com a colaboração da Profa. Dra. Marina F. M. Tavares para a realização das análises desejadas. Inicialmente, estudamos a melhor condição de separação entre o peptídeo com configuração LLL e os três estereoisômeros sintetizados. Esta foi: comprimento do capilar ao detector: 50 cm; tampão utilizado: 100 mM de Ácido Fosfórico titulado com NaOH 0,1 M ; pH 2,5 ; 10 mM de β -ciclodextrina; Voltagem: 15kV ; comprimento de onda: 210 nm. Como a concentração de contaminantes presentes nos peptídeos brutos obtidos por SPFS convencional e em alta temperatura poderia ser extremamente baixa, realizamos um estudo onde aumentamos gradativamente a concentração das soluções contendo o peptídeo sintetizado em SPFS convencional (LLL) mantendo constante a concentração dos outros estereoisômeros (~0,08 mg/ml de cada), de tal forma a não comprometer a separação entre os componentes. Assim,

Figura 30. Aminogramas obtidos na análise da mistura dos aminoácidos Thr, Gly, D-alo-Ile, Ile e Phe (A) e dos hidrolisados dos Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂ brutos obtidos por SPFS convencional (B) e em alta temperatura (C).

chegamos a um máximo de concentração para o peptídeo LLL de 5 mg/ mL.

Nestas condições, realizamos as análises dos **Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂** brutos sintetizado pela síntese convencional e em alta temperatura. A **Figura 31** mostra os eletroferogramas obtidos. Como podemos observar, o tetrapeptídeo sintetizado em alta temperatura apresentou uma quantidade superior de subprodutos. Para comprovarmos se alguns destes subprodutos correspondia a um produto de racemização, fizemos novamente a coeluição gradativa da solução contendo o peptídeo sintetizado em alta temperatura com os três estereoisômeros **(D-alo-Ile)-Phe-Gly-Thr-NH₂** , **(D-alo-Ile)-(D-Phe)-Gly-Thr-NH₂** e a **Ile-(D-Phe)-Gly-Thr-NH₂**. Como pode ser visto na **Figura 32**, o peptídeo sintetizado em alta temperatura apresenta pequena contaminação dos estereoisômeros **(D-alo-Ile)-(D-Phe)-Gly-Thr-NH₂** e **Ile-(D-Phe)-Gly-Thr-NH₂**, sendo 0,45% e 0,58%, respectivamente, as porcentagens relativas de contaminação. (Cálculo: área do estereoisômero $\times 100\%$ / área do pico principal + área do estereoisômero).

Apesar de ter sido formada uma maior quantidade de produtos racêmicos na síntese em alta temperatura do que na síntese convencional, a racemização ocorrida ainda se mostrou desprezível (< 1%).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram, portanto, que as condições empregadas para a SPFS em alta temperatura não levam à enantiomerização significativa ou ainda superior à aquela que ocorre nas condições empregadas na SPFS convencional. Infelizmente, porém, não podemos estabelecer qualquer comparação entre nossos dados e os da literatura justamente porque, até o momento, nenhuma avaliação comparativa ou estudo sistemático relacionado à racemização em SPFS em alta temperatura foi descrito. O trabalho de Barlos e colaboradores, por exemplo, descreve apenas a resistência de trítol-aminoácidos à racemização mesmo a 30-80°C em presença de trietilamina (Barlos e col., 1986).

Abs 210 nm

Figura 31. Eletroferogramas dos Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂ brutos obtidos por SPFS convencional (1) e em alta temperatura (2).

Condições Experimentais: Comprimento do capilar ao detector: 50 cm; tampão utilizado: 100mM de Ácido Fosfórico titulado com NaOH 0,1M a pH 2,5 contendo 10 mM de β -Ciclodextrina, voltagem: 15 kV, $\lambda = 210$ nm, tempo de injeção: 4s, 5" Hg, temperatura: 21°C.

Abs 210 nm

Figura 32. Eletroferogramas mostrando as coeluições entre o peptídeo bruto Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂ obtido por SPFS em alta temperatura e alguns de seus estereoisômeros.

Condições Experimentais: Comprimento do capilar ao detector: 50 cm; tampão utilizado: 100mM de Ácido Fosfórico titulado com NaOH 0,1M a pH 2,5 contendo 10 mM de β -Ciclodextrina, voltagem: 15 kV, λ = 210 nm, tempo de injeção: 4s, 5" Hg, temperatura: 21°C.

2. Estudos sobre “seqüências difíceis”

2.1. Utilização do fragmento (89-99) da Protease do HIV-1 como modelo

Em 1992 Schnolzer e colaboradores descreveram que a seqüência (98-99) da Protease do HIV-1 tinha grande tendência em formar agregados resultantes da formação de ligações de hidrogênio intercadeias peptídicas em crescimento e, em conseqüência, a incorporação dos resíduos Ile 93 e Thr 91 era bastante dificultada. Por esta razão, este peptídeo foi escolhido como uma das seqüências a serem estudadas no presente trabalho.

Como ao realizarem estudos em diferentes condições de síntese do ACP₆₅₋₇₄ por SPFS em alta temperatura, sabidamente uma “seqüência agregante” ou “difícil”, Varanda & Miranda não verificaram qualquer problema relacionado ao fenômeno da agregação (Varanda & Miranda, 1997), sintetizamos o fragmento 89-99 da protease do HIV-1 **Leu-Leu-Thr-Gln-Ile-Gly-Aba-Thr-Leu-Asn** (onde, o ácido L- α -amino-n-butírico (Aba) foi usado em substituição a dois resíduos de Cys de acordo com Wlodawer e col., 1989) por SPFS convencional e por SPFS em alta temperatura. A estratégia utilizada foi a t-Boc, sendo que os peptídeos foram elongados a partir da t-Boc-Asn-Resina Pam (0,34 mmol/g).

Na síntese convencional foi utilizado como agente ativador o DIC combinado ao HOBt e o DCM como solvente para a realização dos acoplamentos. Para os reacoplamentos foi utilizado como agente acoplador o TBTU em DMF, pH= 9-10. Em ambos os casos, o período de acoplamento foi de 60 min. Todos os resíduos necessitaram de reacoplamentos, sendo que a Thr 8 a partir do C-terminal necessitou de 2 reacoplamentos. Os testes de ninidrina realizados após os acoplamentos de Thr 3, Ile 6, Gln 7, Thr 8, Leu 9 e Leu 10 a partir do C-terminal persistiam em permanecer intensamente positivos, tendo-se tornado negativos somente após 1-3 reacoplamentos.

Na síntese em alta temperatura foi utilizada a mistura 25%DMSO/Tolueno como solvente e mantido o agente acoplador. Os acoplamentos foram realizados por um período de 20 - 30 min. Os testes de

ninidrina realizados após os acoplamentos da Leu 2, Ile 6, Thr 8 e Leu 10 a partir do C-terminal foram positivos. Assim como na síntese convencional, foram necessários reacoplamentos para todos os resíduos citados, sendo que para a Leu 9 foram necessários 2 reacoplamentos.

Os dados de ganho de massa das resinas, as quantidades de peptidil-resinas clivadas e as massas de peptídeos brutos obtidos estão mostrados na **TABELA 7**. Os dados de recuperação e pureza por RP-HPLC, assim como os cromatogramas dos peptídeos brutos são mostrados nas **Figuras 33 e 34**, respectivamente.

Como podemos observar na **TABELA 7**, o ganho da massa da resina na síntese convencional é bem superior ao da de SPFS em alta temperatura (88,0 e 30,3 mg, respectivamente). A recuperação dos peptídeos brutos a partir das peptidil-resinas foram similares (0,25 para síntese convencional e 0,19 para a síntese em alta temperatura). Os perfis cromatográficos dos peptídeos brutos mostram que obtivemos o decapeptídeo com pureza de 66% pela SPFS convencional e com pureza de 47% pela SPFS em alta temperatura (avaliação por cromatografia usando sistema de solvente contendo TFA).

O perfil cromatográfico, em sistema de solvente TEAP, do peptídeo bruto sintetizado em alta temperatura (**Figura 34, B.3**) mostra a presença de dois subprodutos principais que são eluídos antes do produto majoritário (peptídeo desejado). Sendo assim, realizamos a purificação do subproduto que estava em maior quantidade (subproduto 1, tempo de retenção: 11,1 min.) e o caracterizamos. A massa molecular obtida por espectrometria de massa foi de 713 Da. A análise de aminoácidos de seu hidrolisado total nos revelou a seguinte proporção molar relativa: Asx: encontrado: 1,09 (teórica: 1); Thr: 1,10 (1); Glx: 0,84 (1); Gly: 0,99 (1); Ile: 0,72 (1); Leu: 1,26 (1) (valores médios de três determinações). A partir destes dados deduzimos que o subproduto 1 correspondia ao seguinte fragmento: pGlu-Ile-Gly-Ab-Thr-Leu-Asn.

TABELA 7. DADOS DE SÍNTESE, CLIVAGEM DA RESINA E DESPROTEÇÃO TOTAL DO FRAGMENTO 89-99 DA PROTEASE DO HIV-1.

Síntese	Massa inicial de resina (mg)	Massa de peptidil-resina obtida (mg)	Ganho de Massa da resina (mg)	Massa de peptidil-resina clivada (mg)	Massa de peptídeo bruto obtida (mg)
convencional	303,2	391,2	88,0	100,3	25,4
alta temperatura	294,5	324,8	30,3	102,0	19,3

Figura 33. Dados de recuperação (miligramas de peptídeo bruto/miligramas de peptidil-resina submetidos à clivagem) e de pureza ($\% \times 10^{-2}$) do fragmento 89-99 da protease do HIV-1 obtido pela síntese convencional (1) e por SPFS em alta temperatura (2).

Figura 34. Perfis de RP-HPLC dos fragmentos 89-99 da Protease do HIV-1 brutos: A.1 e B.1 = brancos, A.2 e B.2 = peptídeo sintetizado pelo método convencional, A.3 e B.3 = peptídeo sintetizado por SPFS a 60°C.

Condições Analíticas: Para os perfis A.1, A.2, A.3: solvente A: 0,1 % TFA/ H₂O; B= 90% ACN/H₂O contendo 0,09%TFA. Para os perfis B.1, B.2 e B.3: solvente A: TEAP ; B= 90% ACN/ TEAP. Para ambas condições: gradiente: 5 a 95 % de B em 30 min. Coluna: Vydac C₁₈, Fluxo: 1,0 mL/min, λ : 210 nm, atenuação: 128; quantidade de amostra injetada: 8 μ g (A.2 e A.3) e 3 μ g (B.2 e B.3).

Este resultado evidenciou que simultaneamente à formação do peptídeo desejado houve a interrupção prematura do crescimento da cadeia do peptídeo causada pela transformação da glutamina em ácido piroglutâmico. Esta interrupção é descrita na literatura como uma reação secundária que ocorre durante a etapa de desproteção pela exposição da glutamina a ácidos fracos como o TFA (Bodanszky & Martinez, 1983).

Segundo Rabinovich & Rivier esta reação secundária pode, de fato, ser favorecida nas condições de SPFS em alta temperatura por nós empregada (Rabinovich & Rivier, 1994).

A caracterização do produto majoritário obtido é mostrada no item Caracterização dos Peptídeos a seguir, tendo esta confirmado que ele era o peptídeo desejado.

2.2. Utilização do fragmento (14-36) do ph-GnRH como modelo

A síntese deste peptídeo e seus análogos tem demonstrado que esta sequência tem todas as características de uma sequência agregante típica (Milton & Milton, 1990).

Sintetizamos, portanto, o peptídeo *Asp-Ala-Glu-Asn-Leu-Ile-Asp-Ser-Phe-Gln-Glu-Ile-Val-Lys-Glu-Val-Gly-Gln-Leu-Asp-Glu-Thr-Gln* por SPFS convencional e por SPFS em alta temperatura. A estratégia utilizada foi a t-Boc, sendo que os peptídeos foram alongados a partir da t-Boc-Gln-Pam (0,41 mmol/g). Os derivados de aminoácidos utilizados foram quase os

mesmos utilizados por Milton & Milton na síntese do peptídeo D-Ala¹⁷-(14-36) pHGnRH descrita (Milton & Milton, 1990).

Na síntese convencional, realizamos os acoplamentos utilizando DIC/HOBt em DCM e os reacoplamentos empregando TBTU em DMF, pH= 9-10; ambos pelo período de 60 min. Foram necessários reacoplamentos para todos os resíduos, exceto para a Gly 7. Dois reacoplamentos foram feitos para a Gln 14 e Glu 21 a partir do C-terminal do peptídeo. O acoplamento do resíduo Asn 20, ocorreu com grande dificuldade, sendo necessários cinco reacoplamentos e a troca do solvente DMF pela mistura 50%DMSO/DMF.

A síntese em alta temperatura foi realizada empregando-se 25%DMSO/Tolueno como solvente e o DIC combinado ao HOBt como agente acoplador. O período de acoplamento ou de reacoplamento foi de 20 min. Nestas condições de síntese, só foram necessários reacoplamentos após a Val 11 a partir do resíduo C-terminal, sendo os tempos de acoplamento de 30 min. Nestas condições, os resíduos de Asp 23, Leu 19, Phe 15 e Glu 13 não necessitaram de reacoplamentos para serem incorporados.

A **TABELA 8** mostra os dados de ganho de massa, as massas de peptidil-resinas clivadas e as massas dos peptídeos brutos obtidas nas sínteses. Os dados de recuperação e pureza por RP-HPLC, assim como os cromatogramas dos peptídeos brutos são mostrados nas **Figuras 35 e 36**, respectivamente.

Observa-se na **Figura 35** que a síntese em alta temperatura forneceu valores de recuperação e de pureza inferiores aos da SPFS convencional. Comparando os perfis cromatográficos (**Figuras 36, A.2 e A.3**), vemos que o peptídeo bruto obtido por SPFS a 60°C apresenta contaminação por dois subprodutos (subprodutos 1 e 2, com tempos de retenção de 8,6 e 13,5 min. respectivamente). Ao realizarmos suas purificações e caracterizações por análise de aminoácidos e espectrometria de massa, obtivemos os seguintes resultados:

TABELA 8. DADOS DE SÍNTESE, CLIVAGEM DA RESINA E DESPROTEÇÃO TOTAL DO FRAGMENTO (14-36) DO ph-GnRH.

Síntese	Massa inicial de resina (mg)	Massa de peptidil-resina obtida (mg)	Ganho de Massa da resina (mg)	Massa de peptidil-resina clivada (mg)	Massa de peptídeo bruto obtida (mg)
Convencional	243,4	491,6	248,2	101,8	43,1
Alta temperatura	243,0	394,4	151,4	103,9	30,0

Figura 35. Dados de recuperação (miligramas de peptídeo bruto/miligramas de peptidil-resina submetidos à clivagem) e de pureza ($\% \times 10^{-2}$) dos fragmentos (14-36) do ph-GnRH brutos obtidos pela síntese convencional (1) e por SPFS em alta temperatura (2).

Figura 36. Perfis de RP-HPLC dos ph-GnRH (14-36) brutos: A.1 e B.1 = brancos, A.2 e B.2 = peptídeo sintetizado pelo método convencional, A.3 e B.3 = peptídeo sintetizado a 60°C.

Condições Analíticas: Para os perfis A.1, A.2, A.3: solvente A= 0,1 % TFA/ H₂O; B= 80% ACN/H₂O contendo 0,09%TFA. Para os perfis B.1, B.2 e B.3: solvente A= TEAP ; B= 80% ACN/ TEAP. Para ambas condições: gradiente: 5 a 95 % de B em 30 min. Coluna: Vydac C₁₈, Fluxo: 1,0 mL/min, λ: 210 nm, atenuação: 128, quantidade de amostra injetada: 11 µg (A.2 e A.3), 16 µg (B.2: e B.3).

SUBPRODUTO 1:

Análise de aminoácidos: Asx: esperado: 1,05 (teórico: 1); Thr: 0,96 (1); Glx: 2,91 (3); Leu: 1,08 (1) (valores médios de três determinações); massa molecular: 715 Da.

SUBPRODUTO 2:

Análise de aminoácidos: Asx: 1,43 (1); Thr: 1,12 (1); Glx: 6,2 (6); Gly: 1,10 (1); Val: 1,33 (1); Ile: 0,67 (1); Leu: 1,3 (1); Lys: 0,91 (1) (valores médios de três determinações); massa molecular: 1598 Da.

A partir destes valores deduzimos que estes subprodutos correspondem aos seguintes fragmentos: Gln-Leu-Asp-Glu-Thr-GlnOH (P.M.: 715) e Gln-Glu-Ile-Val-Lys-Glu-Val-Gly-Gln-Leu-Asp-Glu-Thr-GlnOH (P.M.: 1598).

Estes dados indicaram que novamente houve interrupção do crescimento da cadeia do peptídeo. Desta vez, a interrupção ocorreu nos dois resíduos de glutamina. Acreditamos que durante as desproteções deste resíduo, assim como na síntese do fragmento 89-99 da protease do HIV-1, possa ter ocorrido a transformação dos resíduos de glutamina em ácido piroglutâmico, mas neste caso, as reações foram totalmente revertidas durante as fases de clivagem da peptidil-resina, desproteção total ou extração dos peptídeos brutos. Por outro lado, as interrupções poderiam ter sido uma coincidência, mas decorrentes de agregação inter-cadeias peptídicas que tornou impossibilitado o crescimento do ph-GnRH (14-36).

A caracterização do produto desejado é mostrado no item Caracterização dos Peptídeos a seguir, tendo esta confirmado que ele era o peptídeo desejado.

2.3. Utilização de um octadecapeptídeo relacionado a uma glicoproteína do envelope do HIV-1 como modelo

Este peptídeo foi anteriormente usado como modelo por Hyde (Hyde e col., 1994). Estes autores realizaram trocas de solventes e dos protetores de cadeias laterais dos aminoácidos durante as reações de acoplamento

com vistas a minimizar a agregação observada em sua síntese. Segundo eles, deveríamos encontrar dificuldades na desproteção/acoplamento a partir da Val 11 a partir do C-terminal.

O peptídeo de sequência Leu-Ile-Asn-Cys-Asn-Thr-Ser-Val-Ile-Thr-Gln-Ala-Cys-Pro-Lys-Val-Ser-Phe foi, portanto, sintetizado por nós por SPFS convencional e por SPFS em alta temperatura. A estratégia utilizada foi a Fmoc, partindo-se de Fmoc-Phe-resina álcool p-alcoxibenzílico (0,30 mmol/g).

Tanto os acoplamentos como os reacoplamentos na síntese convencional, foram realizados utilizando o DIC combinado ao HOBt como agentes ativadores e o DMF como solvente. Nos casos em que foram necessários um reacoplamentos, foi utilizado o TBTU em DMF em pH = 9-10. No geral, o tempo de acoplamento foi de 60 min. Os resíduos Ser 12, Asn 14, Cys 15, Ile 17 e Leu 18 a partir do C-terminal necessitaram de 1 ou 2 reacoplamentos. Para a total incorporação de Ser 12 e Leu 18 foram necessários dois reacoplamentos. Também foram encontradas dificuldades nas desproteções dos resíduos: Ser 2; Pro 5; Cys 6; Ser 12; Asn 14; Cys 15 e Asn 16 a partir do C-terminal.

A síntese em alta temperatura foi realizada empregando-se a mistura 25%DMSO/Tolueno como solvente (exceto nos acoplamentos dos resíduos de Gln e Asn, onde foi utilizado o NMP) e o DIC como agente acoplador combinado ao HOBt. Os acoplamentos foram realizados por um período de 20 min. Nestas condições foram encontradas dificuldades na incorporação dos seguintes resíduos: Ala 7, Ser 12, Thr 13, Asn 14, Asn 16 e Ile 17; todos eles necessitaram de um reacoplamento. As desproteções incompletas observadas durante a síntese convencional também foram observadas durante a síntese em alta temperatura.

Os dados de ganho de massa da resina, as quantidades de peptidil-resinas clivadas e massas de peptídeos brutos estão mostradas na **TABELA 9**. As recuperações, pureza e os perfis cromatográficos dos peptídeos brutos são mostrados nas **Figuras 37 e 38**, respectivamente.

TABELA 9. DADOS DE SÍNTESE, CLIVAGEM DA RESINA E DESPROTEÇÃO TOTAL DA SEQUÊNCIA DERIVADA DE UMA GLICOPROTEÍNA DO ENVELOPE DO HIV-1.

Síntese	Massa inicial de resina (mg)	Massa de peptidil-resina obtida (mg)	Ganho de Massa da resina (mg)	Massa de peptidil-resina clivada (mg)	Massa de peptídeo bruto obtida (mg)
convencional	329,8	408,7	78,9	100,9	8,3
alta temperatura	333,4	432,7	99,3	100,9	12,0

Figura 37. Dados de recuperação (miligramas de peptídeo bruto/miligramas de peptidil-resina submetidos à clivagem) e pureza ($\% \times 10^{-2}$) do octadecapeptídeo derivado de uma glicoproteína do envelope do HIV-1, onde 1 = SPFS convencional, 2 = SPFS em alta temperatura.

Figura 38. Perfis de RP-HPLC dos octadecapeptídeos derivados de uma glicoproteína do envelope do HIV-1 brutos em sistema de solventes contendo TFA (A) e em TEAP (B). A 1, B 1 = branco; A 2, B 2 = peptídeo obtido por SPFS convencional; A 3, B 3 = peptídeo obtido por SPFS em alta temperatura.

Condições analíticas: Para os perfis A 1, A 2, A 3: solvente A = 0,1 % TFA/ H₂O ; B= 90% ACN/ H₂O contendo 0,09%TFA. Para os perfis B 1, B 2, B 3: solvente A = TEAP ; B= 90% ACN/ TEAP , gradiente: 15-55 % B em 30 min, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min; Coluna: C18; atenuação: 128; quantidade injetada: 20 μ g.

O peptídeo obtido pela SPFS convencional foi clivado da resina e totalmente desprotegido usando a mistura 95% de TFA e 5% de etanoditiol por 90 min., enquanto o obtido pela SPFS em alta temperatura necessitou de 120 min. Esta diferença de tempos de clivagem foi necessária, pois por algum motivo a clivagem de 90 min. não foi eficiente o bastante para remover totalmente os protetores de cadeia lateral presentes na peptidil-resina obtida a 60°C.

Os resultados da **Figura 37** nos mostram-nos que a recuperação do peptídeo sintetizado em alta temperatura foi superior à aquela do obtido pela síntese convencional (0,15 e 0,08 ; respectivamente). Entretanto, ao compararmos os perfis cromatográficos do peptídeo sintetizado em alta temperatura com aqueles da SPFS convencional, vemos que o primeiro possui uma pureza inferior (**Figura 38**).

Os componentes majoritários (com tempo de retenção de 16,8 min. para SPFS convencional e 16,9 min. para SPFS em alta temperatura), ambos perfis no sistema contendo TFA), dos peptídeos brutos de ambas as sínteses foram isolados por RP-HPLC, hidrolisados e submetidos à análise de seu conteúdo de aminoácidos. Os resultados são mostrados no item Caracterização dos Peptídeos a seguir. Como pode ser visto, os valores obtidos pela análise de aminoácidos são concordantes com os esperados. Por outro lado, os dados obtidos por espectrometria de massa indicam uma massa molecular superior (2010 Da) à esperada (1920 Da); (**TABELA 14**), o que possivelmente se deve à presença de grupos protetores no peptídeo desejado e/ou a reações secundárias ocorridas durante o processo de alongamento de ambas sínteses ou de clivagem da resina e desproteção total. A análise por espectrometria de massa dos produtos minoritários contidos nos peptídeos brutos (**TABELA 10**) evidenciou a presença do peptídeo desejado acrescido de um grupo Acm (1992 Da), acrescido do grupo Bu^t (1975 Da) e produtos de deleção (1464 e 1682 Da).

Um resumo das etapas problemáticas das sínteses dos três peptídeos estudados neste item é mostrado na **Figura 39**.

Os dados apresentados acima não nos permite afirmar se a agregação pode estar sendo minimizada nas condições experimentais por nós empregadas para SPFS em alta temperatura. Para tanto, precisaríamos acompanhar o alongamento do peptídeo com medidas do grau de solvatação da peptidil-resina, medidas de microcalorimetria ou ainda por ressonância magnética nuclear de ângulo mágico (MAS-NMR; Dhalluin, 1997), análise por espectroscopia de Infravermelho (IR-FT), (Yang e col., 1994) ou espectroscopia RAMAN. Por outro lado, fica claro que as condições experimentais descritas por Varanda & Miranda e utilizadas por nós facilitam a ocorrência de reações secundárias que comprometem a qualidade do peptídeo bruto de seqüência agregante ou difícil. Este aspecto negativo deve ser investigado.

TABELA 10. MASSAS MOLECULARES OBTIDAS NA ANÁLISE DOS PRODUTOS OBTIDOS NAS SÍNTESES DO OCTADECAPEPTÍDEO DERIVADO DA GLICOPROTEÍNA DO ENVELOPE DO HIV-1 (VER FIGURA 38, A.2 e A.3)

	Tempo de retenção dos subprodutos (min.)	Peso molecular obtido (Da)
SPFS CONVENCIONAL	14,1-14,5	1682
	15,7	1464
	16,8	2010
SPFS EM ALTA TEMPERATURA	16,9	2010
	17,9	1992
	18,7	1975

Fragmento (89-99) da protease do HIV-1

Leu-Leu-Thr-Gln-Ile-Gly-Ab^a-Thr-Leu-Asn (síntese convencional)

Leu-Leu-Thr-Gln-Ile-Gly-Ab^a-Thr-Leu-Asn (síntese em alta temperatura)

Fragmento (14-36) do ph-GnRH

Asp-Ala-Glu-Asn-Leu-Ile-Asp-Ser-Phe-Gln-Glu-Ile-Val-Lys-Glu-Val-Gly-Gln-Leu-Asp-Glu-Thr-Gln (síntese convencional)

Asp-Ala-Glu-Asn-Leu-Ile-Asp-Ser-Phe-Gln-Glu-Ile-Val-Lys-Glu-Val-Gly-Gln-Leu-Asp-Glu-Thr-Gln (síntese em alta temperatura)

Octadecapeptídeo derivado de uma glicoproteína do envelope do HIV-1

↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓

Leu-Ile-Asn-Cys-Asn-Thr-Ser-Val-Ile-Thr-Gln-Ala-Cys-Pro-Lys-Val-Ser-Phe (síntese convencional)

Leu-Ile-Asn-Cys-Asn-Thr-Ser-Val-Ile-Thr-Gln-Ala-Cys-Pro-Lys-Val-Ser-Phe (síntese em alta temperatura)

↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑

Figura 39. Pontos problemáticos das sínteses convencional e em alta temperatura dos peptídeos estudados. Os resíduos de aminoácidos em negrito se referem àqueles que necessitaram de reacoplamentos. As setas indicam as desproteções problemáticas.

3. Estudo sobre peptídeos longos

3.1. Utilização da colecistocinina-22 humana não sulfatada como modelo

A colecistocinina (CCK) é um hormônio peptídico gastrointestinal responsável pela contração da vesícula biliar, secreção de enzimas no pâncreas e pela motilidade intestinal (Williams, 1982; Miyasaka e col., 1997). É também um neuropeptídeo envolvido em várias funções biológicas em estudo: controle de apetite, liberação de peptídeos opióides e outras (Morley, 1982; Crawley & Corwin, 1994; Bras e col., 1999). A CCK pode ser encontrada em formas moleculares de tamanhos diversos. Estes peptídeos sulfatados consistem em modelos extremamente interessantes sob o ponto de vista sintético, pois apresentam seqüências complexas. Por estas razões, neste trabalho escolhemos as formas moleculares da CCK-22 e -33 humanas não sulfatadas como os modelos de peptídeos longos e de seqüência complexa. A presença do grupo sulfato em uma das tirosinas em muito complicaria o nosso trabalho, sem que acrescentasse muito a ele.

A hCCK-22 não sulfatada de seqüência [Asn-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp-Pro-Ser-His-Arg-Ile-Ser-Asp-Arg-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂](#) foi sintetizada por SPFS convencional e por SPFS em alta temperatura. A estratégia utilizada foi a Fmoc, sendo que os peptídeos foram alongados a partir da resina RINK (média do grau de substituição: 0,45 mmol/g).

Na síntese convencional foi utilizada a DIC combinada ao HOBt como agentes ativadores e a DMF como solvente. O uso de TBTU em DMF, pH = 9-10, foi necessário apenas nos reacoplamentos dos últimos resíduos desta seqüência: Leu 21 e Asn 22. O tempo de acoplamento na maioria dos casos foi de 60 min. Foram encontradas dificuldades nos acoplamentos dos resíduos posteriores à Ser 11 a partir do C-terminal, sendo que para cada um deles foi necessário um reacoplamento. A Asn 22 foi incorporada à cadeia peptídica em crescimento somente após 3 reacoplamentos de 60 min. utilizando-se o TBTU como agente ativador seguido de outro de 12 h

utilizando-se como agente acoplador o DIC combinado ao HOBt. Os resíduos que mostraram dificuldades durante sua desproteção foram: Ser 11, Ser 15, Pro 16, Asp 17 e Asn 22 a partir do C-terminal.

Para síntese em alta temperatura foi utilizado DIC combinado ao HOBt como agentes acopladores e a mistura 25%DMSO/tolueno como solvente pelo período de 20 min. Foram encontradas dificuldades nos acoplamentos dos resíduos Asp 8, Arg 9, Ile 12, His 14, Ser 15, Asp 17, Leu 18, Asn 19 e Leu 21 a partir do C-terminal. As dificuldades encontradas nas desproteções foram as mesmas encontradas durante a síntese convencional.

Os peptídeos obtidos pela SPFS convencional e em alta temperatura foram clivados da resina e totalmente desprotegidos pelo seu tratamento com o reagente R pelo período de 90 min. Os dados de ganho de massa das resinas, as quantidades de peptidil-resinas clivadas e as massas de peptídeos brutos obtidas são dados na **TABELA 11**. As recuperações e os perfis cromatográficos dos peptídeos brutos são mostrados nas **Figuras 40 e 41**, respectivamente.

Como mostra a **Figura 40**, as recuperações dos peptídeos sintetizados em ambas condições mostraram-se similares (0,60 e 0,55 ; respectivamente). A **Figura 41** mostra que a qualidade do peptídeo bruto obtida pela SPFS em alta temperatura é próxima à daquele obtido pela SPFS convencional.

A caracterização dos produtos majoritários é mostrada no item Caracterização dos peptídeos a seguir, tendo esta confirmado que o pico principal representava o produto principal.

3.2. Utilização da colecistocinina-33 humana não sulfatada como modelo

Como havíamos iniciado a síntese da CCK-22 não sulfatada em uma escala de 0,2 mmol, após atingirmos o resíduo 22 a partir do C – terminal dividimos a massa de peptidil-resina obtida pela metade e prosseguimos a síntese da CCK-33 não sulfatada tanto pela síntese convencional quanto

TABELA 11. DADOS DE SÍNTESE, CLIVAGEM DA RESINA E DESPROTEÇÃO TOTAL DA CCK-22 HUMANA NÃO SULFATADA

Síntese	Massa inicial de resina (mg)	Massa de peptidil-resina obtida (mg)	Ganho de Massa da resina (mg)	Massa de peptidil-resina clivada (mg)	Massa de peptídeo bruto obtida (mg)
convencional	444,8	1170	725,2	100,9	55,5
alta temperatura	445,5	1119	673,5	101,7	60,6

Figura 40. Dados de recuperação (miligramas de peptídeo bruto/miligramas de peptidil-resina submetidos à clivagem) e pureza ($\% \times 10^{-2}$) da hCCK-22 não sulfatada, onde: 1 = SPFS convencional, 2 = SPFS em alta temperatura.

Figura 41. Perfis de RP-HPLC das hCCK-22 não sulfatadas brutas: A.1 e B.1 = brancos, A.2 e B.2 = peptídeo sintetizado pelo método convencional, A.3 e B.3 = peptídeo sintetizado a 60°C.

Condições Analíticas: Para os perfis A.1, A.2, A.3: solvente A= 0,1 % TFA/ H₂O; B= 90% ACN/H₂O contendo 0,09%TFA. Para os perfis B.1, B.2 e B.3: solvente A= TEAP ; B= 90% ACN/ TEAP. Para ambas condições: gradiente: 5 a 95 % de B em 30 min. Coluna: Vydac C₁₈, Fluxo: 1,0 mL/min, λ : 210 nm, atenuação: 128; quantidade de amostra injetada: 5 μ g (A.2 e A.3) e 3 μ g (B.2 e B.3).

pela síntese em alta temperatura. Assim, *Lys-Ala-Pro-Ser-Gly-Arg-Met-Ser-Ile-Val-Lys-Asn-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp-Pro-Ser-His-Arg-Ile-Ser-Asp-Arg-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂* foi obtido pelos dois métodos.

No alongamento por SPFS convencional utilizamos como agente ativador nas etapas de acoplamento o DIC combinado ao HOBt em DMF. Nos reacoplamentos de 60 min. foi utilizado o TBTU em DMF, pH=9-10. Estes, porém, não foram bem sucedidos. Após o acoplamento da Val 24 a partir do C-terminal, em alguns casos foram necessários vários reacoplamentos, sendo que o teste de ninhidrina negativo só foi observado após acoplamentos de 9 a 24h utilizando como agente acoplador o DIC. Quanto às desproteções, tivemos dificuldades na Ser 30 e Pro 31 a partir do C-terminal.

Durante a síntese em alta temperatura obtivemos grandes dificuldades no acoplamento da Lys 23 a partir do C-terminal: o tempo de duração foi aumentado de 20 para 40 min. Dificuldades nos acoplamentos dos resíduos Ile 25, Ser 26 e Met 27 também foram encontradas, sendo que em média foram realizados 2 reacoplamentos para cada um destes resíduos pelo período de 60 min. Após a incorporação da Met 27, realizamos a síntese restante fazendo acoplamentos pelo período de 60 min., onde na maioria dos casos foi necessário apenas um reacoplamento em presença de DIC/HOBt. Quanto às desproteções, tivemos problemas nos mesmos resíduos de aminoácidos já descritos para a síntese convencional.

Os dados de ganho de massa das resinas, as quantidades de peptidil-resinas clivadas e as massas de peptídeos brutos obtidas são dados na **TABELA 12**. As recuperações e os perfis cromatográficos dos peptídeos brutos são mostrados nas **Figuras 42 e 43**. As clivagens das resinas e desproteções totais simultâneas para a obtenção dos peptídeos brutos a serem comparados foram realizadas similarmente às das hCCK -22.

A **Figura 42** mostra-nos que a recuperação obtida na síntese em alta temperatura foi equivalente a da síntese convencional (0,62 e 0,60; respectivamente), embora a qualidade do produto desejado no caso da

TABELA 12. DADOS DE SÍNTESE, CLIVAGEM E DESPROTEÇÃO DA CCK-33 HUMANA NÃO SULFATADA

Síntese	Massa Inicial de peptidil-resina (mg)	Massa de peptidil-resina obtida (mg)	Ganho de Massa da peptidil-resina (mg)	Massa de peptidil-resina clivada (mg)	Massa de peptídeo bruto obtida (mg)
convencional	587,1	678,8	91,7	101,4	60,7
alta temperatura	554,8	650,9	96,1	99,1	61,7

Figura 42. Dados de recuperação (miligramas de peptídeo bruto/miligramas de peptidil-resina submetidos à clivagem) e pureza ($\% \times 10^{-2}$) da hCCK-33 não sulfatada, onde: 1- SPFS convencional, 2- SPFS em alta temperatura.

Figura 43. Perfis de RP-HPLC das hCCK-33 não sulfatadas brutas: A.1 e B.1 = brancos, A.2 e B.2 = peptídeo sintetizado pelo método convencional, A.3 e B.3 = peptídeo sintetizado a 60°C.

Condições Analíticas: Para os perfis A.1, A.2, A.3: solvente A= 0,1 % TFA/ H₂O; B= 90% ACN/H₂O contendo 0,09%TFA. Para os perfis B.1, B.2 e B.3: solvente A= TEAP ; B= 90% ACN/ TEAP . Para ambas condições: gradiente: 15 a 65 % de B em 30 min. Coluna: Vydac C₁₈, Fluxo: 1,0 mL/min, λ: 210 nm, atenuação: 128; quantidade de amostra injetada: 7 µg (A.2 e A.3) e 6 µg (B.2: e B.3).

síntese em alta temperatura tenha sido bem inferior em relação àquela síntese convencional (**Figura 43**).

A caracterização do produto majoritário de B.2 (**Figura 43**), é mostrada no item Caracterização dos Peptídeos a seguir, tendo esta confirmado que ele era a hCCK-33 não sulfatada.

Os resultados acima apresentados demonstram que é possível sintetizar as hCCK-22 e -33 não sulfatada nas condições empregadas por nós para SPFS em alta temperatura. A síntese da hCCK -33 não sulfatada, entretanto, não produziu uma quantidade apreciável do peptídeo desejado sugerindo que as condições devam ser otimizadas através da troca do solvente, controle do grau de inchamento da peptidil-resina em diferentes etapas do alongamento e de troca do reagente acoplador. Quiçá deva também ser tentado o acoplamento entre fragmentos.

CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SINTETIZADOS

a) Análise de aminoácidos

As análises de aminoácidos dos hidrolisados dos peptídeos purificados (picos majoritários) obtidos foram realizadas nas condições descritas no item 5 de Métodos. Os resultados encontrados foram os seguintes:

Para o peptídeo **Ac-Ile-Gly**:

Sintetizado na condição 1: Ile: esperado: 0,91 (teórico: 1,00); Gly: 1,09 (1,00).

Sintetizado na condição 2: Ile: 0,92 (1,00); Gly: 1,08 (1,00).

Sintetizado na condição 3: Ile: 0,94 (1,00); Gly: 1,06 (1,00).

Sintetizado na condição 4: Ile: 0,91 (1,00); Gly: 1,09 (1,00).

Sintetizado na condição 5: Ile: 0,92 (1,00); Gly: 1,09 (1,00).

Sintetizado na condição 6: Ile: 0,93 (1,00); Gly: 1,07 (1,00).

Sintetizado na condição 7: Ile: 0,92 (1,00); Gly: 1,08 (1,00).

Sintetizado na condição 8: Ile: 0,98 (1,00); Gly: 1,02 (1,00).

Sintetizado na condição 9: Ile: 0,94 (1,00); Gly: 1,06 (1,00).

Sintetizado na condição 10: Ile: 0,91 (1,00); Gly: 1,06 (1,00).

(D-Tyr)-Lys-Trp (SPFS convencional): Tyr: 0,96 (1,00), Lys: 1,03 (1,00).

(D-Tyr)-Lys-Trp (SPFS em alta temperatura): Tyr: 0,80 (1,00), Lys: 1,08 (1,00).

Tyr-(D-Lys)-Trp: Tyr: 0,96 (1,00), Lys: 1,03 (1,00).

Tyr-Lys-Trp: Tyr: 0,92 (1,00), Lys: 1,07 (1,00).

Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂ (SPFS convencional): Ile: 0,86 (1,00); Phe: 0,83 (1,00); Gly: 1,15 (1,00); Thr: 1,16 (1,00).

Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂ (SPFS em alta temperatura): Ile: 0,82 (1,00); Phe: 0,76 (1,00); Gly: 1,29 (1,00); Thr: 1,14 (1,00).

Ile-(D-Phe)-Gly-Thr-NH₂: Ile: 0,86 (1,00); Phe: 0,83 (1,00); Gly: 1,18 (1,00); Thr: 1,12 (1,00).

(D-alo-Ile)-Phe-Gly-Thr-NH₂: D-alo-Ile: 1,12 (1,00); Phe: 0,96 (1,00); Gly: 1,00 (1,00); Thr: 0,93 (1,00).

(D-alo-Ile)-(D-Phe)-Gly-Thr-NH₂: D-alo-Ile: 1,12 (1,00); Phe: 0,96 (1,00); Gly: 1,00 (1,00); Thr: 0,93 (1,00).

Fragmento (89-99) da Protease do HIV-1 (SPFS convencional): Asx: 1,01 (1,00); Thr: 1,97 (2,00); Glx: 1,02 (1,00); Gly: 0,97 (1,00); Aba: ND; Ile: 0,93 (1,00); Leu: 3,09 (3,00).

Fragmento (89-99) da Protease do HIV-1 (SPFS em alta temperatura): Asx: 1,07 (1,00); Thr: 1,88 (2,00); Glx: 1,00 (1,00); Gly: 0,96 (1,00); Aba: ND; Ile: 1,01 (1,00); Leu: 3,15 (3,00).

ph-GnRH (14-36) (SPFS convencional): Asx: 4,07 (4,00); Thr: 0,92 (1,00); Ser: 0,85 (1,00); Glx: 7,76 (7,00); Gly: 1,00 (1,00); Ala: 0,99 (1,00); Val: 1,72 (2,00); Ile: 1,65 (2,00); Leu: 2,01 (2,00); Phe: 0,99 (1,00); Lys: 1,06 (1,00).

ph-GnRH (14-36) (SPFS em alta temperatura): Asx: 4,13 (4,00); Thr: 0,95 (1,00); Ser: 0,98 (1,00); Glx: 7,99 (7,00); Gly: 1,1 (1,00); Ala: 0,96 (1,00); Val: 1,76 (2,00); Ile: 1,62 (2,00); Leu: 2,15 (2,00); Phe: 0,91 (1,00); Lys: 1,09 (1,00).

Octadecapeptídeo derivado de uma glicoproteína do envelope do HIV-1 (SPFS convencional): Asx: 1,90 (2,00); Thr: 1,80 (2,00); Ser: 1,98 (2,00); Glx: 1,15 (1,00); Pro: 1,47 (1,00); Ala: 1,14 (1,00); Cys: 1,39 (2,00); Val: 1,86 (2,00); Ile: 1,96 (2,00); Leu: 1,17 (1,00); Phe: 1,02 (1,00); Lys: 1,1 (1,00).

Octadecapeptídeo derivado de uma glicoproteína do envelope do HIV-1

(SPFS em alta temperatura): Asx: 2,05 (2,00); Thr: 1,82 (2,00); Ser: 1,97 (2,00); Glx: 1,02 (1,00); Pro: 1,13 (1,00); Ala: 1,19 (1,00); Cys: 1,65 (2,00); Val: 1,63 (2,00); Ile: 1,68 (2,00); Leu: 1,04 (1,00); Phe: 1,09 (1,00); Lys: 0,98 (1,00).

hCCK-22 não sulfatada; (SPFS convencional): Asx: 6,60 (6); Ser: 1,82 (2,00); Glx: 1,10 (1,00); Pro: 1,15 (1,00); Gly: 1,16 (1,00); Met: 2,16 (2,00); Ile: 0,90 (1,00); Leu: 2,07 (2,00); Tyr: 0,98 (1,00); Phe: 1,14 (1,00); His: 1,03 (1,00); Arg: 1,92 (2,00).

hCCK-22 não sulfatada; (SPFS em alta temperatura): Asx: 6,18 (6,00); Ser: 1,85 (2,00); Glx: 0,94 (1,00); Pro: 1,05 (1,00); Gly: 1,06 (1,00); Met: 1,73 (2,00); Ile: 1,03 (1,00); Leu: 2,09 (2,00); Tyr: 1,08 (1,00); Phe: 1,12 (1,00); His: 0,91 (1,00); Arg: 1,66 (2,00).

hCCK-33 não sulfatada; (SPFS em convencional): Asx: 6,37 (6,00); Ser: 3,61 (4,00); Glx: 1,14 (1,00); Pro: 2,03 (2,00); Gly: 2,14 (2,00); Ala: 0,98 (1,00); Val: 0,77 (1,00); Met: 3,13 (3,00); Ile: 1,70 (2,00); Leu: 2,14 (2,00); Tyr: 1,00 (1,00); Phe: 1,16 (1,00); His: 0,98 (1,00); Lys: 2,03 (2,00); Arg: 2,71 (3,00).

hCCK-33 não sulfatada; (SPFS em alta temperatura): Asx: 6,17 (6,00); Ser: 3,40 (4,00); Glx: 0,99 (1,00); Pro: 2,53 (2,00); Gly: 2,00 (2,00); Ala: 0,81 (1,00); Val: 0,77 (1,00); Met: 2,88 (3,00); Ile: 1,55 (2,00); Leu: 1,95 (2,00); Tyr: 0,97 (1,00); Phe: 1,21 (1,00); His: 1,07 (1,00); Lys: 2,06 (2,00); Arg: 2,66 (3,00).

Todos os valores são médias de três determinações. O triptofano não é detectado na análise de aminoácidos por ser totalmente degradado no processo de hidrólise em HCl 6N. Tyr, Ser, Cys, Met e Thr podem ser

parcialmente degradados, o que pode explicar algumas diferenças entre os dados teóricos e experimentais descritos.

b) Espectrometria de massa.

Os resultados da caracterização dos peptídeos purificados por espectrometria de massa pelo método **FAB-LSIMS** são mostrados na **TABELA 13**. Na **TABELA 14** são mostrados os valores de massa molecular esperados e obtidos para os peptídeos purificados utilizados no estudo da agregação e de seqüências longas e complexas. Estes últimos foram analisados através da técnica de **ES-MS**. Os valores obtidos são válidos tanto para os peptídeos sintetizados por SPFS convencional quanto para síntese em alta temperatura.

TABELA 13. DADOS DE ANÁLISE DOS PEPTÍDEOS POR FAB-LSIMS.

Peptídeo	Massa molecular esperada (Da)	Massa molecular obtida (Da), (M + H)⁺	Tempo de retenção em (min) no sistema contendo TFA (página de referência)*
Ac-Ile-Gly	230	231	14,3 (condição 1), (pag. 49)
(D-Try)-Lys-Trp	495	496	22,2 (pag. 59)
Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂	435	436	21,5 (pag. 67)

TABELA 14. DADOS DE ANÁLISE DOS PEPTÍDEOS POR ES-MS.

Peptídeo	Massa molecular esperada (Da)	Massa molecular obtida (Da)	Tempo de retenção em (min) no sistema contendo TFA (página de referência)*
Fragmento 89-99 da protease do HIV-1	1057	1057,2	12,3 (pag. 79)
ph-GnRH (14-36)	2602	2623 (M+Na⁺)	21,0 (pag. 83)
Octadecapeptídeo relacionado ao HIV-1	1920	2010	16,8 (pag. 87)
hCCK-22 (não sulfatada)	2709	2709,4	15,9 (pag. 94)
hCCK-33 (não sulfatada)	3864	3866	18,0 (pag.97)

* Obs : Nas tabelas estão indicados apenas os valores de tempo de retenção dos peptídeos purificados sintetizados pela síntese convencional.

CONCLUSÕES

Os resultados inéditos obtidos no presente trabalho nos permitem fazer vários comentários e chegar a algumas conclusões:

1) Como já havia sido descrito anteriormente por Rabinovich & Rivier (1994) e Varanda & Miranda (1997), de maneira geral a SPFS em altas temperaturas é perfeitamente aplicável à síntese de peptídeos de diferentes seqüências. A mesma, entretanto, apresenta vantagens e desvantagens ainda não suficientemente conhecidas em relação ao método convencional de síntese em fase sólida. Por esta razão, o método não vem sendo usado rotineiramente.

2) Até o momento, a principal vantagem da SPFS em alta temperatura é a possibilidade de diminuição do tempo de alongamento da cadeia peptídica sobre o suporte polimérico. Esta grande vantagem, entretanto, pode perder o seu valor frente a um número expressivo de desvantagens. Daí a necessidade de melhor investigar a metodologia.

3) RP-HPLC, análise de aminoácidos e CE demonstraram ser técnicas analíticas eficientes e complementares para a separação, identificação e quantificação de estereoisômeros contaminantes presentes em peptídeos brutos.

4) Como não foi observada a presença de produtos de racemização (estereoisômeros) detectáveis por análise de aminoácidos e CE nos brutos Ac-Ile-Gly e (D-Tyr)-Lys-Trp, concluímos que os contaminantes deste último são provenientes de outras reações secundárias ocorridas durante o processo sintético de alongamento que não a racemização. Por outro lado, as análises comparativas dos brutos Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂ evidenciaram que as suas contaminações por estereoisômeros eram inferiores a 1%. Tais informações indicam que a racemização não é significativamente

aumentada nas condições de SFPS em alta temperatura descritas por Varanda & Miranda (1997).

5) No estudo realizado por nós, não foi possível tirar uma conclusão definitiva em relação à minimização da agregação nas condições experimentais empregadas para a SPFS em alta temperatura. Se por outro lado, observamos uma maior facilidade de síntese do fragmento 14-36 da ph-GnRH (este fato pode estar associado ao pequeno número de cadeias completas que se formaram durante a síntese), por outro detectamos a co-existência no material bruto do peptídeo desejado de contaminantes resultantes de interrupções de um percentual das cadeias peptídicas em crescimento durante o processo sintético. Tal interrupção pode ter ocorrido devido ao fenômeno da agregação ou de uma reação secundária específica. Independente deste fato, tornou-se claro que o estudo do aspecto agregação só pode ser conclusivo se o processo de alongamento por SPFS convencional e em alta temperatura for acompanhado de medidas do grau de solvatação, de medidas microcalorimétricas ou, ainda, por análise por MAS-NMR, IR-FT ou espectrometria RAMAN.

6) Ao se utilizar a estratégia t-Boc, a reação de transformação de glutamina em ácido piroglutâmico pode se agravar nas condições experimentais empregadas para SFPS em alta temperatura. Tal reação secundária pode ser evitada pelo uso de glutamina com a cadeia lateral protegida ou a realização da desproteção para este resíduo em temperatura ambiente. Torna-se imperativo, entretanto, responder a seguinte pergunta: porque nem todos os peptídeos que contém glutamina e são sintetizados pela química t-Boc sofrem interrupção no crescimento da cadeia devido à transformação deste resíduo em ácido piroglutâmico nas condições experimentais descritas por Varanda & Miranda (1997)?

7) a SPFS em alta temperatura, nas condições experimentais empregadas por nós, parece ser aplicável à obtenção de peptídeos longos de sequência complexa tal como a hCCK-22. No caso de peptídeos mais longos e complexos como a hCCK-33 não sulfatada, onde é necessário um aumento do tempo de acoplamento, 25% DMSO/Tolueno e DIC/HOBt parecem não ser os mais adequados. A determinação de condições ótimas desta síntese em muito contribuiria para a ampliação da SPFS em alta temperatura, já que compostos desta complexidade, que demandam síntese manual, também poderiam ser obtidos em tempo menor em relação à síntese convencional.

8) O trabalho realizado forneceu novas informações e evidenciou novos aspectos a serem explorados da SPFS em alta temperatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aimoto, S., 1999. Polypeptide synthesis by the thioester method. *Biopolymers (Peptide Science)*, **51**, 245-246.

Angeletti, R. H. ; Bonewald, L. F. ; Fields, G. B. 1997. Six-Year study of peptide synthesis. In Fields, G. B (Ed.), **Methods in Enzymology**, Volume 289, Academic Press, San Diego, pp. 697-717.

Atherton, E. ; Woolley, V. ; Sheppard, R. C. 1980. Internal association in solid phase peptide synthesis of cytochrome C residues 66-104 on polyamide supports. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 970-971.

Bagley, C. J. ; Otteson, K. M. ; May, B. L. ; Mccurdy, S. N. ; Pierce, L. ; Ballard, F. J. ; Wallace, J. C. 1990. Synthesis of insulin-like growth factor I using N-methyl pyrrolidinone as the coupling solvent and trifluoromethane

sulphonic acid cleavage from the resin. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **36**, 356-361.

Barlos, K. ; Papaioannou, D. ; Patrianakou, S. ; Tsegenidis, T. 1986. Racemisierungsfreie Peptidsynthese bei erhöhter Temperatur. *Liebigs Ann. Chem.* juni. 1950-1955.

Bedford, J. ; Hyde, C. ; Johnson, T. ; Jun, W. ; Owen, D. ; Quibell, M. ; Sheppard, R. C. 1992. Amino acid structure and "difficult sequences" in solid phase peptide synthesis. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **40**, 300-307.

Bodansky, M. & Martinez, J. 1983. Side reactions in peptide synthesis. In Gross, E. ; Meienhofer (Eds.). **The Peptides**, Academic Press, New York, Vol. 5, pp. 111-216.

Bodanszky, M. & Conklin, L. E. 1967, A simple method for the study of racemization in peptide synthesis. *Chem. Commun.* 773- 774.

Bodanszky, M. 1984. Racemization. In Bodanszky, M. (Ed.), **Principles of Peptide Synthesis**, Springer-Verlag, Berlin, pp, 158-173.

Bodanszky, M. 1993. Racemization. In Bodanszky, M. (Ed.), **Peptides Chemistry-a practical textbook**, Springer-Verlag, Berlin, pp. 117-128.

Brandtner, S. ; Schleucher, J. ; Griesinger, C. 1994. Synthesis of an anti-freeze protein, 1994, In Hodges, R. S. and Smith, J. A. (Eds.), *Peptides: Chemistry, Structure and Biology (Proc. 13th. Am. Pept. Symp.)*, Escom Scientific Publ., Leiden, The Netherlands, pp.49.

Bras, J. M. A. ; Laporte, A-M; Benoliel, J. J. ; Bourgoin, S. ; Mauborgne, A. ; Hamon, M. ; Cesselin, F. ; Pohl, M. 1999. Effects of peripheral axotomy on

cholecystokinin neurotransmission in the rat spinal cord. *J. Neurochem.*, **72** (2), 858-867.

Carpino, L. A. 1993. 1-Hidroxy-7-azabenzole an efficient peptide coupling additive. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 4397-4398.

Crawley, J. N. & Corwin, R. L. 1994. Biological actions of cholecystokinin. *Peptides*. **15** (4), 731-755.

Dhalluin, 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.

Eggenweiler, H. M. ; Clausen, N. ; Bayer, E. 1996. A new base-labile linker for Boc solid phase peptide synthesis, In Ramage, R. and Epton, R. (Eds.), *Peptides 1996 (Proc. Eur. Pept. Sym., 24 th.)*, Mayflower Scientific Ltd, KINGSWINFORD, West Midlands, England, pp. 359-360.

El Rahman, S. A. ; Anzinger, H. ; Mutter, M. 1980. Relationship between conformation and physicochemical properties of polypeptides I. Synthesis of homo- and co-oligopeptides by the liquid-phase method. *Biopolymers*, **19**, 173-187.

El-Agnaf, O. M. A. ; Bodles, A. M. ; Guthrie, D. J. S. ; Harriott, P. ; Irvine, B. 1998, The N-terminal region of non-A β component of Alzheimer's disease amyloid is responsible for its tendency to assume β -sheet and aggregate to form fibrils. *Eur. J. Biochem.*, **258**, 157-163.

Fanali, S. 1989. Separation of optical isomers by capillary zone electrophoresis based on host-guest complexation with cyclodextrins. *J. Chromatog.*, **474**, 441-446.

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

Fukuda, H. ; Shimizu, T. ; Nakajima, M. ; Mori, H. ; Shirasawa, T. 1999. Synthesis, aggregation, and neurotoxicity of the Alzheimer's A β 1-42 Amyloid peptide and its isoaspartyl isomers, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **9**, 953-956.

Gassmann, E. ; Kuo, J. E. ; Zare, R. N. 1985. Electrokinetic separation of chiral compounds. *Science.*, **230** (4727), 813-814.

Grossman, P. D. & Colburn, J. C. 1992. **Capillary Electrophoresis Theory and Practice**. Academic Press, San Diego.

Han, H. ; Weinreb, P. H. ; Lansbury, P. T. Jr. 1995. The core Alzheimer's peptide NAC forms amyloid fibrils which seed and are seeded by β -amyloid: is NAC a common trigger or target in neurodegenerative disease? *Chem. Biol.* **2**, 163-169.

、 Hsieh, K. H. ; Demaine, M. M. ; Gurusidaiah, S. 1996. Side reactions in solid-phase peptide synthesis and their applications. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **48**, 292-298.

* Hyde, C. ; Johnson, T. ; Owen, D. ; Quibell, M. ; Sheppard, R. C. 1994. Some "difficult sequences" made easy. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **43**, 431-440.

Izmailov, N. A. & Schraiber, M. S. 1938. *Farmatsiya*. **3**.

Yang, J. J. ; Pitkeathly, M. ; Radford, S. E. 1994. Far-UV Circular dichroism reveals a conformation switch in a peptide fragment from the β -Sheet of hen lysozyme. *Biochemistry*, **33**, 7345-7353.

Johnson E. L. & Stevenson, R. 1978. In Johnson, E. L. & Stevenson, R. (Eds.), **Basic Chromatography**. Varian, California, pp. 1-14.

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.

✂ Kent, S. B. H., 1988. Chemical synthesis of peptides and proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, **57**, 957-989.

Kimura, T. ; Chio, N. ; Kumagaye, S. I. ; Kuroda, H. ; Emura, J. ; Sakakibara, S. 1990. Strategy for the chemical synthesis of large peptides. Synthesis of angiogenin as an example. *Biochem. Soc. Trans.*, **18 (6)**, 1297-1299.

Kirby, D. A. ; Miller, C. L. ; Rivier, J. E. 1993, Separation of neuropeptide Y diastereoisomers by high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis. *J. Chromatog.*, **648**, 257-265.

Knorr, R. ; Trzeciak, A. ; Bannwarth, W. ; Gillessen, D. 1989. New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Lett.*, **30**, 1927-1930.

Konig, W. & Geiger, R. 1970. Racemisierung bei peptidsynthesen. *Chem. Ber.* ,**103**, 2024- 2034.

Kuhn, R. & Erni, F. 1992. Chiral recognition and enantiomeric resolution based on host-guest complexation with crown ethers in capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem.*, **64**, 2815-2820.

Kuhn, R. ; Steinmetz, C. ; Bereuter, T. ; Haas, P. ; Erni, F. 1994. Enantiomeric separations in capillary zone electrophoresis using a chiral crown ether, *J. Chromatog. A*, **666**, 367-373.

Larsen, B. D. & Holm, A. 1998. Sequence-assisted peptide synthesis (SAPS). *J. Pept. Res.*, **52**, 470-476.

Lebl, M. & Krchnák V. 1997. Synthetic Peptide Libraries. In Fields, G. B (Ed.), **Methods in Enzymology**, Volume 289, Academic Press, San Diego, pp. 336-391.

Lehninger, A. L. ; Nelson, D. L. ; Cox, M. M. 1993. Amino acids and peptides. In *Principles of Biochemistry*, Worth publishers, New York, pp. 122-124.

✓ - Lloyd, D. H. ; Petrie, G. M. ; Noble, R. L. ; Tam, J. P. 1990. Increased coupling efficiency in solid-phase peptide synthesis using elevated temperature. In Rivier, J. E. and Marshall, G. R. (Eds.), *Peptides: Chemistry, Structure and Biology* (Proc. 11th. Am. Pept. Symp.), Escom Scientific Publ., Leiden, The Netherlands, pp. 909.

Lloyd-Williams, P. ; Albericio, F. ; Giralt, E. 1993. Convergent solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron*, Vol. **49** (48), 11065-11133.

Manning J. M. & Moore, S. 1968. Determination of D- and L-Amino acids by ion exchange chromatography as L-D and L-L dipeptides. *J. Biol. Chem.* **243**. (21), pp-5591-5597.

Mant, C. T. & Hodges, R. S. 1991. HPLC terminology: practical and theoretical. In Mant, C. T. & Hodges, R. S (Eds.). **High-Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation, Analysis, and Conformation**, CRC press, Boca Raton, pp. 69-94.

Meiser, S. M. & Kent, S. B. H. **1983**. Peptides: Structure and Function, pp. 103-106.

Merrifield, R. B. ; Michell, A. R. ; Clarke, J. E. 1974. Detection and prevention of urethane acylation during solid-phase peptide synthesis by anhydride methods. *J. Org. Chem.*, **39**, 660-668.

Merrifield, R. B. ; Singer, J. ; Chait, B. T. 1988. Mass spectrometric evaluation of synthetic peptides for deletions and insertions. *Anal. Biochem.* **174**, 399-414.

Merrifield, R. B. 1963. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149-2154.

Merrifield, R. B. 1967. In Pincus, G. (Ed.), **Recent Progress in Hormone Research**, Vol. 23, Academic Press, New York. pp 451-482.

Merrifield, R. B. 1995. Cause and correction of incomplete coupling reactions. In Gutte B. (Ed.). **Peptides: Synthesis, Structures, and Applications**. Academic Press. San Diego. pp 137-143.

- Merrifield, R. B. 1997. Concept and early development of solid-phase peptide synthesis. In Fields, G. B. (Ed.), **Methods in Enzymology**, Volume 289, Academic Press, San Diego, pp. 3-13.
- Miller, C. & Rivier, J. 1996. Peptide chemistry: Development of high performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis. *BIOPOLYMERS*. **40** (3) 265-317.
- Milton, R. C. L. ; Milton, S. C. F. ; Adams, P. A. 1990. Prediction of difficult sequences in solid-phase peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 6039-6046.
- *Milton, S. C. F. & Milton, R. C. L. 1990. An improved solid-phase synthesis of a difficult-sequence peptide using hexafluoro-2-propanol., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **36**, 193-196.
- Miranda, M. T. M. ; Craig, A. G ; Miller, C. ; Liddle, R. A. ; Rivier, J. E. 1993. Total synthesis, purification, and characterization of human [Phe(p-CH₂SO₃Na)⁵², Nle^{32,53,56}, Nal⁵⁵]-CCK₂₀₋₅₈, [Tyr⁵², Nle^{32,53,56}, Nal⁵⁵]-CCK-58, and [Phe(p-CH₂SO₃Na)⁵², Nle^{32,53,56}, Nal⁵⁵]-CCK-58. *J. Prot.Chem.*, **12**, (5), 533-544.
- Miranda, M. T. M. ; Liddle, R. A. ; Rivier, J. E. 1993. Synthesis of human CCK₂₆₋₃₃ and CCK-33 related analogues on 2,4-DMBHA and TMBHA. *J. Med. Chem.*, **36**, (12), 1681-1688.
- Miyasaka, K. ; Kanai, S. ; Masuda, M. ; Ibuka, T. ; Nakai, K. ; Fujii, N. ; Funakoshi, A. 1997. Involvement of cholinergic processes in cholecystokinin (CCK182) release by luminal oleic acid. *J. Auton. Nerv. Syst.*, **63** (3), 179-182.

Miyazawa, T. ; Otomatsu, T. ; Yamada, T. ; Kuwata, S. 1992. Racemization studies in peptide synthesis through the separation of protected epimeric peptides by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **39**, 229-236.

Morley, J. E. M. 1982. The ascent of cholecystokinin (CCK) from gut and brain. *Life Sci.*, **30**, 479-493.

Narita, M. ; Doi, M. ; Sugasawa, H. ; Ishikawa, K. 1985. Syntheses and properties of oligo-L-leucines containing α -amino-isobutyric acid residues. The novel strategy for solubility improvement in helical oligopeptides based on the restriction of the values of the backbone dihedral angles ϕ and ψ of α -aminoisobutyric acid residues. *Bull Chem. Soc. Jpn.* **58**, 1473-1479.

Pugh, K. C. ; York, E. J. ; Stewart, J. M. 1992. Effects of resin swelling and substitution on solid phase synthesis. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **40**, 208-213.

Rabinovich, A. K. ; Rivier, J. E. 1994. SPPS using high temperature, In Hodges, R. S. and Smith, J. A. (Eds.), *Peptides: Chemistry, Structure and Biology* (Proc. 13th. Am. Pept. Symp.), Escom Scientific Publ., Leiden, The Netherlands, pp. 71-73.

Riester, D. ; Wiesmuller, K. H. ; Stoll, D. ; Kuhn, R. 1996. Racemization of amino acids in solid-phase peptide synthesis investigated by capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, **68**, 2361-2365.

Sakakibara, S., 1995. Synthesis of large peptides in solution. *Biopolymers (Peptide Science)*, **37**, 17-28.

Saneii, H. H. ; Peterson, M. L. ; Anderson, H. ; Healy, E. T. ; Bizanek, R. G. 1996. Advanced automation for peptides and non-peptidic molecules, In Kaumaya, P. T. P. and Hodgers, R. S. (Eds.), *Peptides: Chemistry, Structure and Biology (Proc. 14th. Am. Pept. Symp.)*, Mayflower Scientific, pp.136-138.

Schnolzer, M. ; Alewood, P. ; Jones, A. ; Alewood, D. ; Kent, S. B. H. 1992. In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. *Int. J. Peptide. Protein Res.*, **40**, 180-193.

Selkoe, D. J. 1996. Amyloid β -Protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.*, **271**, 18295-18298.

Simmonds, R. G. 1996. Use of the Hmb backbone-protecting group in the synthesis of difficult sequences. *Int. J. Peptide Protein Res.* , **47**, 36-41.

Siuzdak, G., 1996. Peptide and protein analysis. In Siuzdak, G. (Ed.). **Mass Spectrometry for Biotechnology**, Academic Press, San Diego, pp.77-99.

Smillie, L. B. & Nattriss, M. 1991. Amino acid analyses of proteins and peptides: an overview. In Mant, C. T. & Hodges, R. S (Eds). **High-Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation, Analysis, and Conformation**, CRC press, Boca Raton, pp. 847-858.

Spackman, D. H. ; Stein, W. H. ; Moore, S. 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, **30**, 1190.

Steinauer, R. ; Chen, F. M. F. ; Benoiton, N. L. 1989. Studies on racemization associated with the use of benzotriazol-1-yl-tris

(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP). *Int. J. Peptide Protein Res.*, **34**, 295-298.

Stewart, J. M. & Young, J. D. 1984. **Solid Phase Peptide Synthesis**. Pierce Chemical Company, Rockford, pp.1-49.

Tam, J. P. & Lu, Y-A. 1995. Coupling difficulty associated with interchain clustering and phase transition in solid phase peptide synthesis. *J. Am. Chem.*, **117**, 12058-12063.

Tam, J. P. 1986. Synthesis of biologically active transforming growth factor alpha. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **29**, 421-431.

Tavares, M. F. 1996. Eletroforese capilar: conceitos básicos, *Química Nova*. **19** (2), 173-181.

Terabe, S. 1994. Separation of enantiomers by capillary electrophoretic techniques (Review). *J. Chromatog. A*, **666**, 295-319.

Tiselius, A. 1937. *Trans. Faraday Soc.* **33**, 524.

Toniolo, C. ; Bonora G. M. ; Salardi, S. ; Mutter, M. 1979. Linear oligopeptides. 57. circular-dichroism study of alpha-helix and beta-structure formation in solution by homooligo-L-methionines. *Macromolecules*, **12**, 620-625.

Varanda, L.M. & Miranda, M.T.M. 1997. Solid-phase peptide synthesis at elevated temperatures: a search for an optimized synthesis condition of unsulfated cholecystokinin-12. *J. Pept. Res.*, **50**, 102-108.

Weinreb, P. H. ; Zhen, W. ; Poon, A. W. ; Conway, K. A. ; Lansbury, P. T. 1996 . NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learnig, is natively unfolded. *Biochemistry*, **35**, 13712-13715.

Williams, J. A. 1982. Cholecystokinin: a hormone and a neurotransmitter. *Biomed. Res.* **3**, 107-121.

Williams, M. W. & Young, G. T. 1963. Amino-acids and peptides. Part XVI. Further studies of racemization during peptide synthesis. *J. Chem. Soc.*, 881.

Wlodawer, A. ; Miller, M. ; Jaskólski, M. ; Sathyanarayana, B. K. ; Baldwin, E. ; Toth, X. ; Weber, I. T. ; Selk, L. M. ; Clawson, L. ; Scheneider, J. ; Kent, L. 1989. Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science*, **245**, 616-621.

CURRICULUM VITAE

MARCOS PAULO DE SOUZA

1. FORMAÇÃO ACADÊMICA

1.1. Graduação

Bacharel em Química pela "Faculdades Oswaldo Cruz" em 1996.

1.2. Estágio de Iniciação Científica.

08/1995 a 02/1997 no IPEN. Projeto desenvolvido:

- a) Determinação do Vanádio em solos, plantas forrageiras e resíduos da agroindústria, utilizados na preparação de ração animal pelo método de Análise por Ativação com Nêutrons.
- b) Estudo da distribuição do Manganês no solo de um campo agrícola, usando o Método de Análise por Ativação com Nêutrons.

1.3 Pós-Graduação

Ingresso no programa de Mestrado do Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, em março de 1997.

As seguintes disciplinas foram cursadas: Métodos Espectroscópicos em Química Orgânica (QFL-780); Estrutura e Função de Proteínas e Peptídeos (QBQ-849); Síntese Química e Enzimática de Peptídeos (QBQ-5859-2); Didática em Bioquímica (QBQ-600).

Participação como monitor do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) durante um semestre na disciplina "Bioquímica Experimental" (QBQ-216).

2. BOLSAS RECEBIDAS

CNPq, 08/1995 a 02/1997 (Bolsa de Iniciação Científica, Programa PIBIC).

FAPESP, 10/1997 a 10/1999 (Bolsa de Mestrado).

CNPq, 12/1999 a 03/2000 (Bolsa de Mestrado).

3. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

19ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química realizada em Poços de Caldas, MG, no período 27 a 30 de maio de 1996, Painel apresentado: Souza, M.P.; Armelin, M.J.A; Cruvinel, P.E. *APLICAÇÃO DA ANÁLISE POR ATIVAÇÃO COM NEUTRÔNS INSTRUMENTAL PARA DETERMINAÇÃO DE VANÁDIO EM AMOSTRAS DE SOLO E FORRAGENS* (QA-088).

4th Meeting on Nuclear Applications, IV ENAN, realizada em Poços de Caldas, MG, no período 18 a 22 de agosto de 1997, Painel apresentado: Souza, M.P.; Armelin, M.J.A; Cruvinel, P.E. *ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DO MANGANÊS NO SOLO DE UM CAMPO AGRÍCOLA USANDO O MÉTODO DE ANÁLISE POR ATIVAÇÃO COM NÊUTRONS* (P-152).

XVIIª Reunião Anual da SBBq realizada em Caxambú, MG, no período 23 a 26 de maio de 1998, Painel apresentado: Souza, M.P.; Tavares M. F. M.; Miranda, M.T.M. *SOLID-PHASE SYNTHESIS AT ELEVATED TEMPERATURE: AMINO ACIDS RACEMIZATION LEVEL* (R-3).

4th Latin-American Symposium on Biomedical, Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis, realizado em São Paulo, SP, no período de 29 de novembro a 01 de dezembro de 1998. Painel apresentado: Souza, M.P.; Tavares M. F. M.; Miranda, M.T.M. *SOLID-PHASE PEPTIDE SYNTHESIS AT ELEVATED TEMPERATURE: EVALUATION OF GRUDE MATERIALS BY REVERSED-PHASE HPLC AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS* (PP-A38).

XVIII Reunião Anual da SBBq realizada em Caxambú, MG, no período 22 a 25 de maio de 1999, Painel apresentado: Souza, M.P.; Tavares M. F. M.; Miranda, M.T.M. *A METHODOLOGICAL STUDY OF SOLID-PHASE*

PEPTIDE SYNTHESIS AT ELEVATED TEMPERATURE: RACEMIZATION AND AGGREGATION (R-18).

16th American Peptide Symposium realizado em Minneapolis, Minnesota, EUA, no período de 26 junho a 1 de julho de 1999, Painei apresentado: Souza, M.P.; Tavares M. F. M.; Miranda, M.T.M. RACEMIZATION AND AGGREGATION STUDIES IN SOLID-PHASE PEPTIDE SYNTHESIS AT ELEVATED TEMPERATURE (P-040).

4. PUBLICAÇÕES

Imediatamente após a defesa da Dissertação de Mestrado iniciaremos a redação de um trabalho completo para publicação em revista internacional.