UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

CARINA LOFFREDO

**Estudo das sínteses de peptídeos em fase sólida
passo a passo e convergente a 60 °C usando
aquecimento convencional e micro-ondas**

São Paulo

Data do Depósito na SPG
14/10/2009

CARINA LOFFREDO

Estudo das sínteses de peptídeos em fase sólida passo a passo e convergente a 60 °C usando aquecimento convencional e micro-ondas

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Orientadora: Profa. Dra. Maria Terêsa Machini de Miranda

São Paulo
2009

Carina Loffredo

Estudo das sínteses de peptídeos em fase sólida passo a passo e convergente a 60 °C
usando aquecimento convencional e micro-ondas

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Aprovada em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICO MINHA TESE

Aos meus pais Amnérís e João Leonardo, que eu tanto amo, pelo amor e apoio incondicional à busca pelo conhecimento que eu tanto desejava.

Ao amor da minha vida Daniel, pela paciência, amor e apoio em todos os momentos difíceis.

Aos meus queridos padrinhos e sogros Solange e José Roberto, por toda força e amor que me deram.

AGRADEÇO

A Deus, pela vida, pelos familiares, pelos amigos e pelas oportunidades que me deu.

A minha orientadora Prof. Dra. Maria Terêsa Machini de Miranda pela orientação, aprendizado, dedicação, carinho e amizade.

Aos atuais amigos do laboratório: Cleber, César, Jonathas, Raphaella, Thaís, Thiago, Dóris e aos amigos que já foram embora do laboratório: Ivanilde, Juliana, Elaine, Patrícia, Alessandra, Carolina, Nicolás e João pela amizade e apoio em todos os momentos. Ao Vinícius, em especial, pela amizade e por toda ajuda que me deu.

Aos Profa. Dra. Márcia L. A. Temperini e Diego P. dos Santos (Depto. QFL-IQUSP) pela colaboração no monitoramento por espectroscopia NIR-FT-Raman das peptidil-resinas em crescimento obtidas nas sínteses em fase sólida passo a passo da colecistocinina não sulfatada.

Ao Dr. Jürgen Gerhardt (C.A.T. GmbH & Co Chromatographie und Analysentechnik KG, Alemanha) pela realização das análises quirais de aminoácidos de peptídeos brutos.

Ao Prof. Dr. Etelvino J. H. Bechara (Depto. BQ-IQUSP) pela permissão de uso do equipamento de eletroforese capilar.

Ao Dr. Nilson A. Assunção (então no Depto. BQ-IQUSP) pela colaboração nas tentativas de separação por eletrofores capilar dos estereoisômeros formados durante as SPFS de alguns dos peptídeos estudados.

Ao Prof. Dr. Omar A.M. Abou El Seoud (Depto. QFL-IQUSP) pela colaboração no estudo inicial de solvatocromismo.

Ao Dr. Cleber W. Liria (do nosso grupo de pesquisa) pelas análises de aminoácidos de peptídeos brutos e purificados.

À Fernanda M. Prado pelo auxílio na utilização do espectrômetro de massas.

À FAPESP pelo apoio financeiro ao nosso laboratório e projetos.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado direto.

Às amigas de sempre: Margareth, Giovanna, Crizélia, Patrícia, Elaine, Rita, Graziela, Cassiana e Fabiane.

E a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste projeto. Muito obrigada!

“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seus semelhantes.”

Albert Schweitzer

“Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado, mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado.”

Albert Einstein

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

As abreviaturas dos aminoácidos estão de acordo a IUPAC [União Internacional de Química Pura e aplicada, *Eur. J.Biochem.* 138:9-37 (1984)]

Código de uma e de três letras para os vinte aminoácidos usuais					
A	Ala	Alanina	M	Met	Metionina
C	Cys	Cisteína	N	Asn	Asparagina
D	Asp	Ácido aspártico	P	Pro	Prolina
E	Glu	Ácido glutâmico	Q	Gln	Glutamina
F	Phe	Fenilalanina	R	Arg	Arginina
G	Gly	Glicina	S	Ser	Serina
H	His	Histidina	T	Thr	Treonina
I	Ile	Isoleucina	V	Val	Valina
K	Lys	Lisina	W	Trp	Triptofano
L	Leu	Leucina	Y	Tyr	Tirosina

β-CD: β-ciclodextrina

(CH₃CO)₂O: anidrido acético

18C6H₄: ácido (+)-2,3,11,12-tetracarboxílico

2,6-Cl₂Bzl: 2,6-diclorobenzil

2-Br-Z : 2-bromo-benziloxycarbonil

2-Cl-Trt: 2-cloro-tritil

2-Cl-Z : 2-cloro-benziloxycarbonil

6-Cl-HOBt: 6-cloro-a-hidroxi-1H-benzotriazol

A.A.: aceptor de acila

Acm: acetamidometil

ACN : acetonitrila

AOMP: 5-(1*H*-7-azabenzotriazol-1-iloxi)-3,4-diidro-1-metil 2*H*-pirrolíum hexacloroantimoniado

BDMP: 5-(1*H*-benzotriazol-1-iloxi)-3,4-diidro-1-metil 2*H*-pirrolíum hexacloroantimoniado

Boc : *N*^α-*tert*-butiloxycarbonil

Bom: benziloximetil

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

BPMP: 1-(1*H*-benzotriazol-1-iloxi)fenilmetileno pirrolidínio hexacloroantimoniado

BuQMBr₂: 2,6-di-bromo-4-[(E)-2-(1-butilquinolinium-4-il)etenil] fenolato

But : *t*-butil

Bzl : benzil

D.A.: doador de acila

DBU : 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undeca-7-eno

DCC: *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida

DCI/D₂O: solução de ácido clorídrico deuterado

DCM : diclorometano

DCP : dicetopiperazina

DIC : *N,N'*-diisopropilcarbodiimida

DIPEA : *N,N'*-diisopropiletilamina

DMAP : dimetilaminopiridina

DMF : *N,N'*-dimetilformamida

DMF: dimetilformamida

DMS: dimetilsulfeto

DMSO : dimetilsulfóxido

Doc: 2,4 dimetilpentil-3-oxicarbonil

Doc: 2,4-Dimetilpentiloxicarbonil

DTT: ditionitrosol

EC: eletroforese capilar

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EDT: 1,2-etanoditiol

ET: energia de transição

FDNP-Ala-NH₂: 1-flúor-2,4-dinitrofenil-5-L-alanina amida ("Reagente de Marfey")

Fmoc : 9-fluorenilmetiloxicarbonil

GITC: 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glicopiranosil isotiocianato

GS : grau de substituição

HATU : hexafluorofosfato de 2-(1-*H*-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio

HBTU: 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio hexafluorofosfato

HF : fluoreto de hidrogênio

HFIP : 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol

Hmb : 2-hidroxi-4-metoxibenzil

HMBA: 4-hidroximetil-ácido benzóico

HMP/PAB: 4-hidroximetilfenóxiacetil-4'-metilbenzidrilamina/α-fenilacetamidobenzil-poliestireno

HMPB : ácido 4-(4-hidroximetil-3-metoxifenoxi)-butírico

HOAt: hidroxí-7-azabenzotriazol

HOBt : *N*-hidroxibenzotriazol

HODhbt: 3-hidróxi-3,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriazina

HOObt: 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina

IEX-HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica

***i*PrOH**: 2-propanol

LC/ESI-MS: cromatografia líquida em interface com espectrometria de massas de ionização por eletrospray

LiCl : cloreto de lítio

MbzI: *S*-(4-metilbenzil)

MeOH : metanol

Mmt: 4-metoxifenildifenilmetil

NIR-FT-Raman: espectroscopia Raman próximo ao infravermelho com transformada de Fourier

Nle: norleucina

NMM: *N*-metilmorfolina

NMP : *N*-metilpirrolidona

Nps: *o*-nitrofenilsulfenil

NS: não sulfatada

OBut : éster *t*-butílico

OcHex: éster ciclohexílico

OPA: *o*-ftalaldeído

Pmc : 2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonil

PVA: álcool polivinílico

PVP: polivinilpirrolidona

PyAOP: 7-azabenzotriazol-1-iloxi)-tris(pirrolidino)fosfônio hexafluorofosfato

PyBOP: 1H-1,2,3-benzotriazol-1-iloxi)-tris(pirrolidino)-fosfônio hexafluorofosfato

Resina CLEAR : resina com ligações cruzadas de etoxileno e acrilamida

Resina KOR: resina oxima ou de Kaiser

Resina MBHA: resina 4-metilbenzidrilamina

Resina PAL: tris(alcóxi)benzilamida

Resina PAM: resina 4-hidroximetil-fenilacetamidometila

Resina Rink amida : resina 4-(2',4'-dimetóxiifenil-Fmoc-aminometil)-fenóximetila

Resina SAMBHA: (4-succinilamido-2', 2', 4'-trimetoxi)benzidrilamina

RMN ¹H: ressonância magnética nuclear de próton

RP-HPLC : cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa

SCPFS: Síntese Convergente de Peptídeos em Fase Sólida

SPFS: Síntese de Peptídeos em Fase Sólida

TBTU : tetrafluoroborato de 2-(1-*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio

TEA : trietilamina

TEAP: trietil fosfato de amônio

TFA : ácido trifluoroacético

TFE : 2,2,2-trifluoroetanol

TFMSA : ácido trifluorometanosulfônico

THF : tetrahidrofurano

TIS: triisopropilsilano

TMBHA: 4-(benziloxi)-2',4'-dimetoxibenzidrilamina

Tmob: S-2,4,6-trimetoxibenzil

TMP: trimetilpiridina

Tos: *p*-tolueno-sulfonil

TRIS: tris-hidroximetil-aminometano

Trt : tritil

UV: ultravioleta

WB: 2,6-di-cloro-4-(2,4,6-trifenil piridinium-1-il) fenolato

RESUMO

Loffredo, C. Estudo das sínteses de peptídeos em fase sólida passo a passo e convergente a 60 °C usando aquecimento convencional e micro-ondas. 2009. (179 pp). Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Instituto de Química. Universidade de São Paulo. São Paulo.

É sabido que: (i) as sínteses individual e múltipla (manual e automática), bem como a construção de bibliotecas e micro-arranjos de peptídeos sintéticos empregam a metodologia da fase sólida (SPFS); (ii) apesar do desenvolvimento atual desta metodologia sintética, os químicos de peptídeos continuam se deparando com problemas e limitações inerentes a ela; (iii) muitos trabalhos relatam a sua agilização pelo uso de altas temperaturas, mas poucos revelam preocupação com a integridade quiral dos peptídeos-alvo. Portanto, o presente trabalho objetivou dar continuidade à nossa investigação pioneira das: 1) incidência da enantiomerização dos aminoácidos e/ou de outras reações secundárias nas SPFS passo a passo de peptídeos a 60 °C; 2) viabilidade de realização de todas as etapas da síntese convergente em fase sólida (SCPFS) a 60 °C.

Em relação ao tópico 1, os peptídeos-alvo escolhidos tinham tamanho e sequência variáveis que incluíam os aminoácidos trifuncionais problemáticos Cys, Ser, His, Met e Trp. Todos eles foram obtidos por SPFS passo a passo convencional e a 60 °C usando aquecimento convencional e micro-ondas. A identificação e a quantificação dos isômeros contaminantes foram feitas com a ajuda de padrões resultantes da SPFS passo a passo convencional e de métodos analíticos (RP-HPLC, LC-ESI/MS, CE e análise quiral de aminoácidos) em condições estabelecidas por nós. Foi constatado que: (i) as nossas condições de acoplamento são mais econômicas que as usuais, pois empregam menor concentração e excesso molar de N-acil-aminoácidos; (ii) nelas, a SPFS a 60 °C usando o aquecimento convencional é simples, prática, de custo relativamente baixo, demanda ½ do tempo da SPFS convencional e não compromete

significativamente a integridade quiral dos aminoácidos; (iii) nas condições similares, a SPFS passo a passo a 60 °C assistida por micro-ondas é mais rápida (realizada em ¼ do tempo gasto na SPFS convencional), porém mais cara e acompanhada de aumento significativo da enantiomerização da Cys; (iv) a mistura 25% DMSO/tolueno, nunca antes utilizada na SPFS assistida por micro-ondas, favoreceu a formação de contaminantes contendo Met oxidadas a sulfóxidos durante as sínteses do fragmento CCK₂₄₋₃₃ NS, mas o mesmo ocorreu quando DMF foi usado nas sínteses da CCK-33 NS; (v) outras reações secundárias típicas da SPFS passo a passo não foram intensificadas significativamente nas nossas condições sintéticas a 60 °C.

Quanto ao tópico 2, foi escolhida a CCK-33 NS como modelo peptídico. Foi constatado que: (i) a etapa de obtenção dos fragmentos peptídicos protegidos que atuariam como doadores de acila (D.A.) e aceitor de acila (A.A.) de partida pode ser ágil e bem sucedida pela SPFS passo a passo a 60 °C nas nossas condições experimentais usando o aquecimento convencional; (ii) DMF, NMP e 25% DMSO/Tolueno foram adequados à solubilização dos fragmentos D.A. e dos reagentes necessários à sua ativação a 60 °C; (iii) a 60 °C, tais solventes também intumesceram satisfatoriamente a CCK₂₄₋₃₃NS-resina Rink amida, A.A. de partica; (iv) o aquecimento convencional permitiu que algumas reações de acoplamento entre os D.A. e A.A. escolhidos fossem realizadas com sucesso; na maioria dos casos em que isso não ocorreu, o uso combinado das micro-ondas e agitação sob atmosfera inerte mediaram a formação do produto desejado; (v) a natureza dos fragmentos D.A. e A.A. é fator limitante na SCPFS, mesmo a 60 °C e usando o aquecimento convencional ou as micro-ondas, e, portanto, ele precisa ser melhor estudado.

Palavras chaves: peptídeos sintéticos, enantiomerização de aminoácidos, síntese química, alta temperatura, forno de micro-ondas, racemização, condensação de segmentos peptídicos, colecistocinina.

ABSTRACT

Loffredo, C. 2009. Study of stepwise and convergent solid-phase peptide syntheses at 60°C using conventional and microwave heatings (179 pages). PhD Thesis- Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química. Universidade de São Paulo. São Paulo.

It is well known that: (i) individual and multiple peptide syntheses (manual and automatic) as well as construction of synthetic peptide libraries and micro-arrays are all based on solid phase chemistry (SPPS); (ii) despite the current development of such synthetic methodology, peptide chemists are still facing its problems and inherent limitations; (iii) many previous works employed high temperatures to accelerate stepwise SPPS, but only a few showed concern about the preservation of the chiral integrity of the target peptide. Therefore, the main goal of the present work was to continue our pioneering investigation of: 1) the incidence of amino acids enantiomerization and/or other side-reactions in the stepwise SPPS at 60°C, 2) the viability of performing all steps of the convergent synthesis on a solid support (CSPPS) at 60°C.

With regard to the topic 1, the peptides chosen as targets had variable size and sequence, which included the tricky trifunctional amino acids Cys, Ser, His, Met and Trp. The peptides were synthesized by conventional stepwise SPFS and at 60 °C using conventional or microwave heating. Identification and quantification of the contaminant isomers was done with the aid of standards resultant from conventional stepwise SPPS and of analytical methods (RP-HPLC, LC-ESI/MS, CE and chiral amino acids analysis) in conditions established in our laboratory. It was shown that: (i) our coupling conditions are cheaper than the usual ones as they employ lower concentration and excess of N-acyl-amino acids; (ii) under them, stepwise SPPS at 60 °C using the conventional heating is simple, practical, relatively low-cost, demands half of the time required by conventional stepwise SPPS and does not cause the enhancement of amino acids enantiomerization; (iii) under similar conditions, microwave-assisted stepwise SPPS at 60 °C is faster (it demands only one-fourth of the time spent in the conventional

stepwise SPPS), but it is more expensive and causes significant damage specially to the chiral integrity of Cys; (iv) the binary mixture 25% DMSO/toluene, never used earlier in microwave-assisted stepwise SPPS, led to the formation of contaminants with Met oxidized to its sulfoxides during the synthesis of CCK₂₄₋₃₃NS; however, it also occurred when DMF was used in the synthesis of CCK-33 NS; (v) other side reactions typical of stepwise SPPS were not significantly intensified under our conditions at 60 °C.

Concerning to the topic 2, CCK-33 NS was chosen as the model peptide. It was shown that: (i) the synthesis of the protected peptides that would act as acyl donor (A.D.) or as the starting acyl acceptor (A.A.) can be fast and successfully achieved at 60 °C under our experimental conditions using conventional heating; (ii) DMF, NMP and 25% DMSO/toluene dissolved all A.D. and the reagents required for their activation at 60 °C; (iii) at this temperature, such solvents were also able to properly swell CCK₂₄₋₃₃NS-Rink amide resin, the starting A.A.; (iv) the conventional heating allowed for some coupling reactions between A.D. and A.A., but in most cases in which it did not occur, the combined use of microwaves and stirring under inert atmosphere mediated the formation of the desired products; (v) the nature of fragments A.D. and A.A. is a limiting factor in the CSPPS even at 60 °C and using the conventional or microwave heating; therefore, it should be further studied.

Keywords: synthetic peptides, amino acid enantiomerization, chemical synthesis, high temperature, microwave oven, racemization, peptide segments condensation, cholecystokinin.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Peptídeos	18
1.2. Síntese Química de Peptídeos	20
1.3. Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS)	22
1.3.1 Enantiomerização (“racemização”) na SPFS passo a passo	27
1.4. Ciclizações indesejadas na SPFS	32
a) Formação de dicetopiperazinas	32
b) Formação de aspartimidas	33
c) Formação de ácido piroglutâmico	34
1.5. Desproteções e acoplamentos incompletos	35
1.6. Agregação Peptídica	36
1.7. Síntese Convergente de Peptídeos em Fase Sólida (SCPFS)	38
1.8. Temperaturas elevadas em SPFS	45
1.9. Colecistocinina (CCK): um peptídeo difícil de sintetizar	51
2. OBJETIVOS	55
3. MATERIAIS E MÉTODOS	58
3.1. Resinas	58
3.2. Derivados de aminoácidos	58
3.3. Reagentes acopladores	58
3.4. Solventes e outros reagentes	58
3.5. Aminoacilação na resina 2-Cl-Trt	60
3.6. Síntese manual das peptidil-resinas	61
3.7. Caracterização das peptidil-resinas obtidas por análise de aminoácidos	63
3.8. Desligamento do peptídeo protegido da 2-Cl-Trt	65
3.9. Clivagem do peptídeo da resina e desproteção total	66
3.10. Caracterização dos peptídeos brutos: RP-HPLC	66
3.11. Caracterização dos peptídeos brutos: LC/ESI-MS	67
3.12. Caracterização dos peptídeos brutos: EC	67
3.13. Redução de Ac-Glic ₁₂₋₁₅ bruto com DTT	68
3.14. Purificação dos peptídeos	68
3.15. Estimativa relativa da extensão da enantiomerização dos aminoácidos durante a SPFS	68
a) por RP-HPLC a partir dos peptídeos íntegros	68
b) por GC-MS a partir do peptídeo totalmente hidrolisado	69
3.16. Tentativas de condensação entre os fragmentos a 60 °C (escala analítica)	70
3.17. Determinação do inchamento da resina da resina MBHA em misturas binárias NMP/tolueno a 60 °C	71

3.18. Espectroscopia Near infrared-Fourier transformed (NIR-FT) Raman	71
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
4.1. Estudo da enantiomerização nas SPFS passo a passo a 60 °C.....	72
4.2. Estudo de outras reações secundárias na SPFS a 60 °C: aquecimento convencional <i>versus</i> aquecimento micro-ondas	115
4.3. Estudo da SPFS passo a passo a 60 °C	117
4.4. Estudo da SCPFS a 60 °C	128
4.4.1. Obtenção dos fragmentos D.A.....	130
a) Fmoc-CCK ₁₉₋₂₃ : Fmoc-Ser(But)-His(Trt)-Arg(Pmc)-Ile-Ser(But)-OH...	130
b) Fmoc-CCK ₁₂₋₁₈ : Fmoc-Asn-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp(OBut)-Pro-OH.....	131
c) Fmoc-CCK ₆₋₁₁ : Fmoc-Arg(Pmc)-Met-Ser(But)-Ile-Val-Lys(Boc)-OH ..	134
d) Fmoc-CCK ₁₋₅ : Fmoc-Lys(Boc)-Ala-Pro-Ser(But)-Gly-OH	134
4.4.2. Tentativas de condensação entre os fragmentos D.A. e A.A.....	134
a) Teste de solubilidade dos doadores de acila e reagentes acopladores nos solventes selecionados.....	137
b) Determinação do grau de intumescimento da resina/ peptidil-resina.	137
c) Reação de Fmoc-Ser ¹⁹ (But)-His(Trt)-Arg(Pmc)-Ile-Ser ²³ (But)-OH com CCK ₂₄₋₃₃ -NS Rink amida	138
d) Reação de Fmoc-Asn ¹² -Leu-Gln-Asn-Leu-Asp(OBut)-Pro ¹⁸ -OH com CCK ₂₄₋₃₃ - NS Rink amida	143
e) Reação de Fmoc-Arg ²¹ (Pmc)-Ile-Ser ²³ (But)-OH com CCK ₂₄₋₃₃ -NS Rink amida	145
4.4.3. SPFS do novo fragmento A.A.: CCK ₁₉₋₃₃ -NS Rink amida	146
a) Reação de Fmoc-Asn ¹² -Leu-Gln-Asn-Leu-Asp(OBut)-Pro ¹⁸ -OH com CCK ₁₉₋₃₃ -NS Rink amida	146
b) Reação de Fmoc-Arg ⁶ (Pmc)-Met-Ser(But)-Ile-Val-Lys ¹¹ (Boc)-OH com CCK ₁₉₋₃₃ -NS Rink amida	150
c) Reação de Fmoc-Lys ¹ (Boc)-Ala-Pro-Ser(But)-Gly ⁵ -OH com CCK ₁₉₋₃₃ -NS Rink amida	153
5. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	157
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	164
7. ANEXOS	180

1. INTRODUÇÃO

1.1. Peptídeos

Os peptídeos podem atuar como hormônios [angiotensina II (ARAKAMA et al., 1967), glucagon (FARAH, 1983), ocitocina (DU VIGNEAUD et al., 1953), colecistocinina (VILLANUEVA et al., 1982) e somatostatina (BRAZEAU et al., 1973)], analgésicos [quiotorfina (TAKAGI et al., 1979; KOLAEVA et al., 2000), encefalinas (HUGHES et al., 1975)], antimicrobianos [gramicidina S (MCPHEE et al., 2005), magainina (ZASLOFF, 1987), gomesina (SILVA et al., 2000)], toxinas [α -conotoxina (EGUCHI et al., 1994), pardaxina (RENNER et al., 1987)], adoçante (MAZUR, 1976), neuromoduladores [neuropeptídeo NPY (ALLEN et al., 1983) ou fatores liberadores de hormônios [hormônio liberador de gonadotrofina (MILLAR et al., 1987)].

Em virtude das quantidades presentes nas fontes naturais serem muito pequenas, surgiu a necessidade de se sintetizar tais compostos em escala suficiente para possibilitar o estudo de suas fisiologias, estruturas químicas e mecanismos de ação. Para tal, foram desenvolvidas diferentes metodologias de síntese de peptídeos: em solução ou em fase sólida.

Com o passar dos anos, a síntese química de peptídeos foi aprimorada, tornando-se uma valiosa ferramenta para, por exemplo:

a) desenvolver drogas anti-virais e inibidoras de proteases. O peptídeo Fuzeon® ou enfuvirtide, constituído por 36 aminoácidos (Ac-Tyr-Thr-Ser-Leu-Ile-His-Ser-Leu-Ile-Glu-Glu-Ser-Gln-Asn-Gln-Gln-Glu-Lys-Asn-Glu-Leu-Leu-Gln-Leu-Asp-Lys-Trp-Ala-Ser-Leu-Trp-Asn-Trp-Phe-NH₂), inibe a replicação do vírus HIV-1 e sua fusão com células não infectadas e vem sendo utilizado no tratamento de pacientes multi-resistentes (WILD et al., 1994; DANDO; PERRY, 2003); já os peptídeos Ac-Ser-Thr-Leu-Asn-Phe-OH e Pro-Gln-Ile-Thr-Leu-Trp-OH, derivados das regiões C- e N-terminal da protease HIV-1, são inibidores potentes desta protease retroviral (FRANCISKOVICH et al., 1993).

b) desenvolver candidatos a vacinas contra diversas patologias. O peptídeo Cys-Ile-Arg-Leu-Arg-His-Glu-Asn-Lys-Asp-Leu-Lys-Ala-Arg-Leu-Glu-Asn-Ala-Met-Glu-Val-OH, derivado da região N-terminal da proteína M de *Streptococcus pyogenes*, mostrou ser um candidato potencial à vacina contra *Streptococcus* do tipo A, uma vez que sua administração em modelos animais levou à formação de anticorpos e à diminuição da colônia bacteriana (BRUNER et al., 2003). Os peptídeos Lys-Val-Asn-Gly-Lys-Leu-Ile-Ser-Val-His-Cys-Glu-Arg-Asp-Pro-OH e Gly-Lys-Gly-Ala-Ser-Tyr-Glu-Glu-Ile-Lys-Ala-Ala-Val-Lys-Ala-Ala-Ala-Ser-OH, derivados da enzima gliceraldeído-3-fosfatase desidrogenase de *Schistosoma mansoni*, tem o potencial para atuar como vacinas para combater a esquistossomose em humanos (TALLIMA et al., 2003).

c) direcionar marcadores específicos a organelas específicas. De fato, o peptídeo Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-OH tem sido utilizado para direcionar fluoróforos ao núcleo de células, abrindo novas oportunidades para o estudo de sua morfologia, degradação e seus parâmetros internos (PAP et al., 2001).

d) produzir ácidos nucleicos de peptídeos [PNAs, cadeias poliamidas constituídas por aminoetilglicinas ligadas covalentemente a bases nitrogenadas do DNA (**Figura 1**); utilizadas em procedimentos de diagnósticos genéticos dado que eles hibridizam com os ácidos nucleicos complementares com maior afinidade do que os próprios ácidos nucleicos (PELLESTOR et al., 2004)]. Os PNAs de sequências de bases CGCCAATATT, CGCCTATATT, ACAGTTCTTC e CAAGTGCAAT foram utilizados como sondas de pequenos RNAs que controlam a expressão gênica no nível pós-transcrição (ENDO et al., 2009).

e) estudar/aprimorar a metodologia de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), visando o seu aprimoramento ou a solução de problemas/limitações que ela ainda apresenta. Neste sentido, o peptídeo Val-Tyr-Trp-Thr-Ser-Pro-Phe-Met-Lys-Leu-Ile-His-Glu-Gln-Cys-Asn-Arg-Ala-Asp-Gly-NH₂ (contendo a ligação Asp-Gly, susceptível à

formação de aspartimida) foi sintetizado para o estudo da formação de aspartimida na SPFS assistida por micro-ondas (PALASEK et al., 2007). Os peptídeos Ac-Ile-Gly-OH, D-Tyr-Lys-Trp-OH, Ile-Phe-Thr-NH₂ foram sintetizados para o estudo da ocorrência da enantiomerização durante a etapa de acoplamento nas SPFS à temperatura ambiente e a 60 °C usando o aquecimento convencional (SOUZA et al., 2004).

Figura 1. Estrutura básica de um PNA. Bases: Adenina, Guanina, Timina e Citosina; Esqueleto: unidades de 2-aminoetilglicina.

f) estudar a relação estrutura-atividade de peptídeos biologicamente ativos, tal como tem sido feito com os hormônios tireoideanos (TOYODA et al., 1997), a colecistocinina-15 (ALBRIZIO et al., 2002) e os antimicrobianos fragmento 33-61 da cadeia α da hemoglobina bovina (MACHADO et al., 2007) e dermaseptina (28-34 aminoácidos) (FEDER et al., 2000).

g) produzir micro-arranjos de peptídeos utilizados na determinação de biomarcadores (ANDRESEN; GRÖTZINGER, 2009), identificação e seleção de substratos e inibidores de enzimas (SALISBURY; MALY, ELLMAN, 2002) e identificação de potenciais candidatos a drogas (REIMER; REINEKE; SCHNEIDER-MERGENER, 2002).

1.2. Síntese Química de Peptídeos

A síntese química de peptídeos é aquela que emprega um reagente químico para ativar o grupo carboxílico do N α -ácil-aminoácido (doador de acila, D.A.) que sofrerá o ataque nucleofílico do grupo α -amino do outro aminoácido (aceptor de acila, A.A.) para formar a ligação amídica ou peptídica. Para tal, os aminoácidos devem ter

os seus grupos funcionais reativos protegidos, com exceção do grupo α -amino do aminoácido A.A. e do grupo α -carboxílico do D.A. (BODANSZKY, 1984; 1993; MACHADO et al., 2004). Existem duas modalidades de síntese química de peptídeos: a síntese em solução (OKADA, 2001; EGGEN et al., 2005) e a síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS; MERRIFIELD, 1963; BENOITON, 2005; AMBLARD, 2006).

A síntese em solução (ou clássica), exclusivamente utilizada para a obtenção de peptídeos até 1963 quando Robert Bruce Merrifield descreveu a SPFS, é aquela em que todos os reagentes estão solúveis no meio reacional. Assim, a formação de um dipeptídeo em solução é feita a partir do acoplamento entre dois aminoácidos, um protegido em seu grupo amino- α (proteção temporária) e o outro protegido na sua carboxila α (geralmente na forma de um éster ou amida), sendo ambos devidamente protegidos em suas cadeias laterais reativas (proteção semipermanente que deverá ser removida somente ao término da síntese). Formada a ligação peptídica, o dipeptídeo totalmente protegido é isolado do meio reacional, purificado e caracterizado. Em seguida, o protetor do grupo amino- α ou carboxila- α é removido e o dipeptídeo parcialmente desprotegido é isolado do meio reacional e caracterizado para ser posto a reagir com o próximo derivado de aminoácido de interesse. A necessidade de se isolar e caracterizar os produtos resultantes de cada etapa do processo, torna esta modalidade trabalhosa e demorada. Porém, ela é a mais adequada para sínteses em larga escala (RITTEL et al., 1968; KIM et al., 2007). Por isso, muitos peptídeos ainda são obtidos por ela que pode (BRAY, 2003), inclusive, ser assistida por micro-ondas (BABU et al., 2005).

A SPFS foi concebida na época em que a cromatografia de troca iônica em grãos de poliestireno funcionalizados era o método mais recomendado para a purificação e análise de compostos ionizáveis de baixa massa molar. Tendo a necessidade de sintetizar peptídeos e notando o quão trabalhosa e demorada era a síntese em solução, Merrifield pensou em ligar o aminoácido C-terminal do peptídeo-

alvo, devidamente protegido em seu grupo amino- α e nas cadeias laterais reativas, a um polímero insolúvel para que a eliminação dos reagentes não consumidos fosse feita por simples filtração. A ligação desse aminoácido ao suporte deveria resistir a todos os reagentes químicos empregados nas etapas sucessivas de desproteção do seu grupo amino- α e acoplamento a ele do próximo derivado de aminoácido. Após a suposta construção da sequência desejada, uma desproteção final removeria os grupos protetores das cadeias reativas dos aminoácidos e desligaria o peptídeo do suporte (MERRIFIELD, 1963; FIELDS; GUY, 1997). A SPFS trouxe, portanto, a minimização de perdas devido ao menor número de manipulações realizadas e do tempo de síntese (BENOITON, 2005). Como ela foi a metodologia empregada durante todo o desenvolvimento deste projeto, ela será melhor detalhada a seguir.

1.3. Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS)

Nesta metodologia sintética, o alongamento da cadeia peptídica geralmente ocorre no sentido C $\rightarrow$ N terminal (MERRIFIELD, 1997; FIELDS; GUY, 1997; ALBERICIO, 2004). Como mostra a **Figura 2**, a SPFS se inicia com a ligação do aminoácido (protegido no grupo α -amino e, se houver, na cadeia lateral reativa) da sequência peptídica de interesse a um suporte sólido (reação de aminoacilação). Em seguida, o protetor do grupo amino- α da aminoacil-resina é removido (reação de desproteção) e, se necessário (na estratégia química Boc), é feita uma lavagem com solução de base orgânica para que o grupo α -amino seja desprotonado (neutralização) e, portanto, possa atuar como um nucleófilo reagindo com o novo derivado de aminoácido quimicamente ativado na sua α -carboxila (reação de acoplamento). As reações de desproteção e acoplamento são repetidas até que a sequência peptídica desejada seja construída, o que, em parte, é assegurado pelos testes de ninidrina (KAISER et al., 1970) de amostras da peptidil-resina em crescimento. A peptidil-resina é, então, submetida à clivagem da ligação peptídeo-

resina e sua desproteção total, separação do peptídeo da resina e secagem (STEWART; YOUNG, 1984; BORGIA; FIELDS, 2000). O peptídeo bruto obtido é devidamente caracterizado e, se necessário, purificado antes do seu uso.

A SPFS pode ser feita empregando duas estratégias químicas diferentes: a Boc (MERRIFIELD, 1963; STEWART; YOUNG, 1984) que utiliza o Boc como protetor temporário do grupo amino- α e a Fmoc, que utiliza o Fmoc (ATHERTON; SHEPPARD, 1989) como grupo protetor temporário do grupo amino- α . Tais estratégias se baseiam em um sistema de proteção ortogonal que consiste na utilização de grupos protetores temporários e semipermanentes com estabilidades/labilidades opostas em meios orgânicos contendo ácidos ou bases (**Figura 3**). Assim, na estratégia Boc o protetor temporário *t*-Boc é lábil a TFA e os protetores semipermanentes são derivados do grupo benzil, estáveis ao TFA e lábeis a ácidos inorgânicos (**Figura 3A**), tais como o HF e o TFMSA. As resinas empregadas são aquelas que estabelecem uma ligação com o peptídeo que seja estável à exposição ao TFA e lábil a ácidos inorgânicos, tais como as resinas MBHA e PAM (STEWART; YOUNG, 1984; AIMOTO, 2001). A reação de clivagem do peptídeo da resina com desproteção total simultânea é feita na presença de HF a 0 °C, TFMSA a 25 °C (ou de 0 °C- 5 °C no modo de clivagem “low-high”, TAM et al., 1983) na presença de captors de carbocátions (os “scavengers”), tais como o DMS, anisol e m-cresol. A formação de carbocátions é consequência da remoção dos grupos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos (**Figura 4**, STEWART; YOUNG, 1984; BENOITON, 2005).

Na estratégia Fmoc, o protetor temporário é o grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonil, lábil a bases orgânicas e os protetores semipermanentes são derivados do grupo *t*-butil, estáveis a bases orgânicas e lábeis ao TFA (**Figura 3B**). As resinas utilizadas na estratégia Fmoc são aquelas que formam com o peptídeo uma ligação estável a bases orgânicas e lábil ao TFA, tais como as resinas Rink amida e 2-Cl-Tritil (FIELDS; NOBLE, 1990).

Figura 2. Esquema da síntese de peptídeos em fase sólida passo a passo. **X:** Grupo sacador de elétron; **●**: resina funcionalizada com o grupo químico amina (ou uma hidroxila livre); **R:** cadeia lateral do aminoácido; **P₁:** grupo protetor de grupo amino- α (Fmoc ou Boc); **PR:** grupos protetores das cadeias laterais reativas dos aminoácidos; derivados do benzil (estratégia Boc) ou do *t*-butil (estratégia Fmoc).

Dessa forma, a clivagem do peptídeo da resina é feita em TFA contendo proporções adequadas de “scavengers”, tais como o EDT, tioanisol, fenol e triisopropilsilano (ATHERTON; SHEPPARD, 1989; FIELDS; GUY, 1997).

Figura 3. Esquema de proteção ortogonal característico das estratégias Boc/Bzl (A) e Fmoc/t-Bu (B). R= suporte polimérico; 2,6-Cl₂Bzl= 2,6 diclorobenzil; OcHex= éster ciclo hexílico; HF= fluoreto de hidrogênio; Boc= N^α-*tert*-butiloxycarbonil; TFA= ácido trifluoroacético; PAM= 4-hidroximetil-fenilacetamidometil; Fmoc= 9-fluorenilmetiloxycarbonil; t-Bu= *tert*-butil; HMP/PAB= 4-hidroximetilfenóxiacetil-4'-metilbenzidrilamina/α-fenilacetamidobenzil-poliestireno (extraído de FIELDS et al., 1992).

Figura 4. Desproteção do grupo Trt, protetor de cadeia lateral de aminoácidos e formação do carbocátion Trt⁺ (adaptado de BENOITON, 2005).

A SPFS passo a passo apresenta as seguintes vantagens em relação à síntese em solução: 1) maior rapidez, visto que não há a necessidade de se isolar e

caracterizar os produtos resultantes de cada etapa do processo sintético; 2) possibilidade de ser automatizada; 3) fácil remoção dos reagentes que não foram consumidos por lavagens/filtrações, uma vez que as cadeias peptídicas em crescimento estão ligadas a um polímero insolúvel; 4) maior praticidade, visto que ela se baseia em ciclos repetidos de reações e lavagens; 5) menor chance de perdas durante o alongamento da sequência peptídica (FIELDS; GUY, 1997; MERRIFIELD, 1997; ALBERICIO, 2004). Por outro lado, a SPFS passo a passo também apresenta as seguintes inconveniências e limitações:

- 1) Formação de epímeros de peptídeos: devido principalmente à necessidade da ativação da α -carboxila dos aminoácidos na presença de base, muitos aminoácidos têm suas configurações parcialmente invertidas durante a etapa de acoplamento. De acordo com Carpino e colaboradores, esta reação ocorre em menor extensão na síntese em solução (CARPINO et al., 1994), sendo considerada inaceitável por Han e colaboradores quando superior a 5% (HAN; ALBERICIO; BARANY, 1997).
- 2) Ocorrência de reações secundárias que geram subprodutos que permanecem ligados à resina e diminuem o rendimento das reações (BODANSZKY et al., 1979; BODANSZKY, 1983; STEWART; YOUNG, 1984; MERRIFIELD, 1997);
- 3) Desproteções e acoplamentos incompletos geram subprodutos deletados ou com aminoácidos adicionais. Muitas vezes estas reações não são quantitativas devido à formação de estruturas do tipo folha β resultantes de ligações de hidrogênio intercadeias em crescimento que dificultam ou até impossibilitam o término da síntese, fenômeno este sequência-dependente conhecido como agregação (MILTON; MILTON; 1990; HYDE et al., 1994; LLOYD-WILLIAMS et al., 1997; REMUZGO et al., 2009).

Os problemas e limitações inerentes da SPFS justificam a necessidade do seu estudo e busca por aprimoramento. Por estes motivos o nosso grupo de pesquisa tem estudado diferentes aspectos da SPFS passo a passo a 60 °C (VARANDA; MIRANDA, 1997; SOUZA et al., 2004; LOFFREDO et al., 2009), da síntese convergente de peptídeos em fase sólida (SCPFS, REMUZGO, 2003; PROTI, 2007), da SPFS

assistida por micro-ondas (LOFFREDO et al., 2009; LOFFREDO et al., no prelo), assim como a síntese de peptídeos que sabidamente sofrem agregação durante a mesma (REMUZGO et al., 2009).

1.3.1. Enantiomerização (“racemização”) na SPFS passo a passo

Com exceção da Gly, todos os aminoácidos usuais são compostos quirais e, portanto, estão sujeitos à perda parcial ou total de sua integridade óptica em determinadas condições. Na síntese química de peptídeos esta perda deve ser minimizada, pois a função biológica está diretamente relacionada à quiralidade do peptídeo.

Por definição, se um aminoácido tiver somente um centro estereogênico e se houver perda dessa integridade, ele será dito enantiomerizado. Embora o termo mais utilizado seja “racemizado”, este não é correto, pois a racemização implica na formação de enantiômeros na proporção de 1:1 (CLAYDEN et al., 2000; BENOITON, 1994). A enantiomerização ocorre em todas as etapas da síntese química de peptídeos, porém, é mais acentuada durante o processo de ativação do aminoácido, uma vez que o efeito indutivo provocado pelo grupo ativador (X) ligado à carboxila torna o próton do carbono α mais ácido e, portanto, mais sensível à abstração do hidrogênio do carbono assimétrico pela base utilizada durante a ativação. Esta reação não ocorre, portanto, com os derivados de aminoácidos não ativados, pois em meio alcalino as carboxilas livres são ânions que previnem a formação de um segundo ânion, principalmente no carbono α (BODANSZKY, 1983; 1984).

Os mecanismos catalisados por base que levam à enantiomerização em questão são os seguintes:

i- Abstração direta do próton α

A abstração do próton α de um derivado de aminoácido ativado forma um carbânion que pode ser re-protonado por ambas as faces, levando à formação dos enantiômeros L e D (**Figura 5**).

Figura 5. Enantiomerização de derivado de aminoácido ou peptídeo via abstração direta do próton α . R= cadeia lateral do aminoácido; B= base; X= grupo sacador de elétrons (adaptado de BENOITON, 2005).

A extensão da enantiomerização depende de diversos fatores. Assim, se a abstração do próton α for facilitada pela estabilidade do ânion gerado, ela ocorrerá em maior proporção.

ii- Via β -eliminação reversível

Este mecanismo se adequa aos derivados S-alquil-Cys ativados na presença de base (**Figura 6**). A β -eliminação ocorre até mesmo se o grupo amino da Cys estiver protegido por um grupo que faz com ele uma ligação do tipo uretana (BODANSZKY, 1983).

Figura 6. Enantiomerização na síntese de peptídeos via β -eliminação. X= grupo sacador de elétrons; Y= grupo protetor temporário (adaptado de BODANSZKY, 1983).

iii- Formação e epimerização de 5(4H)-Oxazolonas

Este é o principal mecanismo catalisado por base que leva à enantiomerização durante a síntese química de peptídeos (BERGMANN et al., 1928; GOODMAN; LEVINE, 1964; CRISMA et al., 1995). Neste processo, ocorre a abstração do próton da amida com o fechamento simultâneo do anel, formando a oxazolona. A abstração do próton α da oxazolona gera um carbânion estabilizado por ressonância, o qual pode ser re-protonado pelo outro lado e levar à uma oxazolona, a qual pode ser aberta dando origem ao enantiômero do aminoácido (**Figura 7**).

Figura 7. Enantiomerização na síntese de peptídeos via formação de oxazolona. B= base; X= grupo sacador de elétrons; R1= grupo protetor α -amino; R2= cadeia lateral do aminoácido (adaptado de LLOYD-WILLIAMS et al., 1997).

A velocidade de formação da oxazolona depende: 1) da natureza do substituinte presente no grupo α -amino: quanto menos impedido ele for, maior será sua velocidade de formação (ATHERTON et al., 1981; ANTONOVICS et al., 1967) (a Pro, um aminoácido N-alquilado, é uma exceção a este caso devido à rigidez do seu

anel de cinco membros); 2) da polaridade do solvente utilizado, quanto maior, maior será a isomerização durante a SPFS, uma vez que a formação da oxazolona é favorecida em solventes polares (HAN; ALBERICIO; BARANY, 1997); 3) da temperatura do meio reacional: quanto menor for a temperatura utilizada, menor será a enantiomerização; de fato, uma diminuição significativa (6x) na extensão da epimerização de Ac-Val-OH durante o acoplamento de Ac-Val-OH com Lys-OBzl mediado por DCC em DMF foi observada quando a temperatura foi diminuída de 10 °C (BENOITON et al., 1981).

As oxazolonas também podem também ser formadas na ausência de base (**Figura 8**), condição em que o cátion oxazolônio é gerado na ciclização (LLOYD-WILLIAMS et al., 1997) ou através da catálise ácida, como por exemplo, durante a hidrólise de peptídeos na presença de HCl e temperaturas elevadas (GERHARDT; NICHOLSON, 1994). Tal mecanismo ocorre via protonação do átomo de oxigênio da amida seguido de uma enolização.

Figura 8. Formação da oxazolona na ausência de base. X= grupo sacador de elétrons; R1= protetor do grupo α -amino; R2= cadeia lateral do aminoácido (adaptado de LLOYD-WILLIAMS et al., 1997).

A enantiomerização é uma reação tão indesejada durante a síntese de peptídeos que, ao longo dos anos, diversos pesquisadores estudaram a influência de solventes (BENOITON; KURODA; CHEN, 1981), reagentes acopladores (CARPINO; EL-FAHAM; ALBERICIO, 1994; HAN; ALBERICIO; BARANY, 1997) e temperatura (BENOITON; KURODA; CHEN, 1981; SOUZA et al., 2004) na extensão da enantiomerização.

Sabendo que a ativação de Fmoc-Cys(Trt)-OH mediada por base leva a quantidades consideráveis de enantiômeros, Kaiser e colaboradores propuseram que a ativação deste aminoácido poderia ser feita na ausência de base, via anidrido simétrico em DMF, visto que este tipo de procedimento levou à enantiomerização em extensões negligenciáveis ($\leq 1\%$; KAISER et al., 1996). No ano seguinte, Han e colaboradores estudaram a enantiomerização de Cys na SPFS utilizando o peptídeo Gly-Cys-Phe-NH₂ como modelo (HAN; ALBERICIO; BARANY, 1997), os grupos protetores da Cys Acn, Trt, Tmob, Xan, os reagentes acopladores BOP, HBTU, HATU, PyAOP e aditivos HOBt, HOAt, as bases DIPEA, NMM, TMP e os solventes DMF, DCM/DMF (1:1), TFE-CHCl₃, tendo proposto que a utilização de DCM/DMF (quantidade mínima deste último), TMP e BOP, HATU ou HBTU minimizam tal reação indesejada. Em 1998, Di Fenza e colaboradores obtiveram altos níveis de enantiomerização de Ser na SPFS automatizada do peptídeo Gly-Ser-Phe-NH₂ em diferentes condições reacionais e relataram que se por um lado a utilização de NMM levou a índices inaceitáveis do isômero Fmoc-D-Ser(But)-OH, o uso de TMP, uma base estericamente mais impedida, reduziu a enantiomerização consideravelmente (DI FENZA et al., 1998). Dois anos depois, Li e Xu descreveram que os reagentes acopladores BDMP, BPMP e AOMP, derivados do HOBt e do HOAt, apresentaram reatividades elevadas, levaram a baixos níveis de enantiomerização ($\leq 3,1\%$) e forneceram produtos com bons rendimentos (LI; XU, 2000).

A separação dos isômeros de peptídeos também foi investigada: Steinauer e colaboradores estudaram a separação cromatográfica de pares de epímeros de dipeptídeos das séries Xxx-Lys-OH e Lys-Yyy-OH e tripeptídeos das séries Gly-Xxx-Lys-OH e Gly-Lys-Yyy-OH, onde Xxx e Yyy= Ala, Pro, Val, Leu, Ile, Tyr, Phe, Trp empregando a coluna C₁₈ Bondapak, concluíram que a estereoquímica, a sequência de aminoácidos e o pH do eluente do HPLC interferem na retenção dos peptídeos e sugeriram a utilização de seus peptídeos como modelos em futuros estudos da

enantiomerização em síntese química de peptídeos (STEINAUER; CHEN; BENOITON, 1985).

Em 2001, Stenberg e colaboradores utilizaram o aspartame como modelo para estimar a enantiomerização na síntese peptídica e empregaram micro-ondas (6M de HCl por 360 s a 115°C) ou forno convencional (3M de HCl por 3 h e 110°C) para realizar a hidrólise, tendo chegado a níveis de isômeros inferiores (0,19-0,30% de D-Asp e 0,15-0,30% de D-Phe) aos obtidos usualmente (4,8% de D-Asp e 3,0% de D-Phe; STENBERG et al., 2001). Em 2004, Souza e colaboradores descreveram que a SPFS a 60 °C utilizando aquecimento convencional, 25% DMSO/tolueno e DIC/HOBt, não intensificaram a extensão da enantiomerização de Phe, Ile, Thr, Lys e Tyr quando comparado com a SPFS convencional (SOUZA et al., 2004)

1.4. Ciclizações indesejadas na SPFS

a) Formação de dicetopiperazinas

A SPFS passo a passo de alguns peptídeos requer um protocolo especial para o acoplamento do terceiro aminoácido à dipeptidil-resina, pois o grupo amino livre da mesma pode realizar um ataque nucleofílico à ligação peptídeo-resina formando os dipeptídeos cíclicos conhecidos como dicetopiperazinas (**Figura 9**) (LUNKENHEIMER et al., 1970; GISIN; MERRIFIELD, 1972) e levando à redução dos rendimentos de alongamento dos peptídeos nas resinas.

Vários são os fatores que governam a extensão desse tipo de reação: tipo de ligação do peptídeo à resina, natureza dos aminoácidos constituintes do dipeptídeo e natureza do método de acoplamento utilizado. Por exemplo, quando o peptídeo é ligado à resina sob a forma de éster benzílico esta reação é facilitada, pois este é um bom grupo de partida. Já a presença de Gly-Pro ou de N-alquil-aminoácidos ligados à resina pode levar a quantidades expressivas de dicetopiperazina. Se o aminoácido a ser ligado à dipeptidil-resina for estericamente impedido, a aminólise intramolecular será favorecida (LLOYD-WILLIAMS et al., 1997). Por outro lado, a formação de

dicetopiperazina pode ser evitada quando a resina apresenta grupos de grande impedimento estérico, como é o caso da resina 2-Cl-Trt (BARLOS et al., 1989; AKAJI et al., 1990).

Figura 9. Formação de dicetopiperazina durante a incorporação do derivado de aminoácido à dipeptidil-resina. P= grupo protetor; R1, R2 e R3 = cadeia lateral dos aminoácidos 1, 2 e 3, respectivamente; ● = resina (adaptado de LLOYD-WILLIAMS et al., 1997).

b) Formação de aspartimidas

Esta é a reação secundária relacionada com resíduos de Asp que ocorre com maior frequência na SPFS. É resultante do fechamento do anel entre o átomo de nitrogênio da amida e o grupo carboxílico da cadeia lateral do Asp (**Figura 10**), com simultânea perda do grupo éster protetor de cadeia lateral. Esta reação secundária é catalisada por ácidos ou bases e é particularmente preocupante na SPFS via estratégia Fmoc, uma vez que a piperidina usada para remover o grupo Fmoc a favorece. As sequências Asp-Gly, Asp-Ala e Asp-Ser são particularmente susceptíveis a esta ciclização (TAM et al., 1988) e sua consequência é a formação do peptídeo desejado (α -peptídeo) e do β -peptídeo, que apresenta o grupo carboxílico da cadeia lateral do Asp fazendo parte do esqueleto peptídico.

Esta reação pode ser evitada utilizando o derivado Fmoc-Asp(OBut)-(Hmb)Gly-OH (MERGLER et al., 2003) ou adicionando HOBt à solução de desproteção do Fmoc (LAUER; FIELDS; FIELDS, 1995).

Figura 10. Formação da aspartimida e sua consequência na SPFS (extraído de LLOYD-WILLIAMS et al., 1997).

c) Formação de ácido piroglutâmico

Esta reação secundária da SPFS passo a passo decorre da ciclização intramolecular da glutamina N-terminal e causa a interrupção do processo sintético, pois indisponibiliza o grupo α -amino do aminoácido N-terminal (**Figura 11**). Ela é catalisada por ácidos fracos e pode ocorrer durante a remoção do grupo Boc (DIMARKI et al., 1982) ou durante o acoplamento do próximo aminoácido protegido no seu N $^{\alpha}$ à Gln-peptidil-resina em crescimento (ORLOWSKA et al., 1987).

A formação de piroglutamil-peptídeo é minimizada: i) evitando-se o uso de HOBt na etapa de acoplamento do aminoácido seguinte a Gln, uma vez que ele forma espécies ácidas que catalisam a reação; ii) utilizando-se derivados de Gln que apresentem proteção em sua cadeia lateral; iii) evitando-se a estratégia Boc uma vez

que a solução TFA/DCM (1:1), utilizada durante a remoção do grupo Boc, favorece tal reação (ORLOWSKA et al., 1987).

Figura 11. Formação de piroglutamil-peptídeo durante a SPFS via estratégia Boc (extraído de LLOYD-WILLIAMS et al., 1997).

1.5. Desproteções e acoplamentos incompletos

Se as reações de desproteção e acoplamento não forem quantitativas, nem todas as cadeias peptídicas em crescimento terão os seus protetores de grupo α -amino removidos ou o próximo resíduo de aminoácido incorporado. Assim, subprodutos contendo peptídeos deletados são comumente observados ao término da SPFS, dificultando a etapa de purificação do peptídeo desejado. Por esta razão, os químicos de peptídeos constantemente buscam por métodos que possam aumentar os rendimentos de reação (MONTALBETTI; FALQUE, 2005; SRIVASTAVA, K.; DAVIS, 2009).

1.6. Agregação peptídica

“Difficult peptides” é a denominação dada a sequências peptídicas que durante a SPFS passo a passo apresentam repetitivas reações de desproteção e/ou acoplamento difíceis ou impossíveis de serem completadas até mesmo quando resinas de baixo grau de substituição são empregadas ou quando a estratégia química e o tipo de suporte sólido são alterados (MILTON; MILTON, 1990). A causa é a formação de estruturas secundárias do tipo folha β -pregueada (**Figura 12**) em consequência da formação de ligações de hidrogênio intra- e intercadeias envolvendo os grupos carbonila e hidrogênio da amida que tornam o grupo amino- α do resíduo de aminoácido N-terminal da peptidil-resina em crescimento inacessível à acilação pelos novos derivados de aminoácidos. Tal estrutura é mais comumente observada quando existem quantidades elevadas dos aminoácidos Ala, Val, Ile, Asn ou Gln na sequência que está sendo sintetizada (McNAMARA et al., 2000; CARPINO et al., 2004).

Figura 12. Representação de uma folha β -pregueada formada pela ligação de hidrogênio entre as cadeias peptídicas (extraído do site da Universidade de Stanford, <http://cmgm.stanford.edu/>). O= bola vermelha; N= bola azul; C= bola preta; H= bola branca e cadeia lateral dos aminoácidos= bola roxa.

O fenômeno da agregação traz consequências à SPFS: desde a formação de contaminantes deletados, que dificultam a purificação do peptídeo desejado, até a interrupção do crescimento da cadeia peptídica impossibilitando a obtenção do peptídeo alvo (ZINIERIS et al., 2006; BACSA et al., 2008). Por isso, vários

procedimentos têm sido propostos para evitar ou minimizar este problema. O primeiro deles consiste em alterar o ambiente no qual o peptídeo está sendo sintetizado de modo a manter a peptidil-resina em crescimento devidamente intumescida, uma vez que quanto maior for sua solvatação maior será sua flexibilidade e, portanto, menor será a chance de ocorrer a agregação (BAGLEY et al., 1990). Os solventes mais recomendados para este propósito são: DMF, TFE, NMP, DMSO e HFIP. A adição de sais caotrópicos (LiBr, LiCl e NaClO₄) a eles também tem sido empregada (WESTALL et al., 1970; YAMASHIRO et al., 1976; MILTON; MILTON, 1990; STEWART; KLIS, 1990). Yamashiro e colaboradores, por exemplo, verificaram que o uso de 20% TFE/DCM durante os acoplamentos de Boc-Lys(2-Br-Z)-OH à peptidil-resina levou a rendimento de 99,7% (YAMASHIRO et al., 1976).

Como a agregação ocorre principalmente quando os grupos amino estão desprotonados, Schnölzer e colaboradores propuseram que a etapa de neutralização do grupo α -amino desprotegido da peptidil-resina em crescimento fosse feita *in situ* (simultaneamente ao acoplamento) usando altas concentrações do éster de benzotriazol do Boc-aminoácido (> 0,2 M) na presença de base (SCHNÖLZER et al., 1992).

Outra medida proposta para evitar ou minimizar a agregação consiste em inserir, a cada quatro ou cinco resíduos, derivados de aminoácidos contendo o hidrogênio da amina protegido que impedem a formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias peptídicas. De fato, o grupo Hmb, protetor de grupo NH de ligação amida, tem sido empregado durante SPFS via estratégia Fmoc/But (MEISTER; KENT, 1983) tal como as dos fragmentos 65-74 da proteína carregadora de acila (JOHNSON et al., 1993), 106-126 da proteína príon humana (JOBBLING et al., 1999) e 101-132 da acantoscurreina (REMUZGO et al., 2009).

A utilização de temperaturas elevadas durante a SPFS também tem se mostrado uma ferramenta valiosa no que diz respeito à minimização da agregação. Enquanto o nosso grupo de pesquisa vem se dedicando ao estudo da SPFS a 60 °C

de “difficult peptides” empregando o aquecimento convencional (VARANDA; MIRANDA, 1997; SOUZA, 2000; RIVIER; MIRANDA, 2002; 2004; REMUZGO et al., 2009), outros têm sugerido que a irradiação de micro-ondas pode levar à desagregação do esqueleto peptídico devido à sua interação direta (devido à natureza polar da ligação amida) com o campo elétrico da radiação (COLLINS; LEADBEATER, 2007). Por exemplo, para prevenir a formação de estruturas em folha β durante a SPFS de oligo-Ala(10), Rahman e colaboradores empregaram as micro-ondas e N-Tmob-Ala-OH, N-Hmb-Ala-OH, Pro-OH ou D-Ala-OH (incorporados a cada cinco resíduos): o tempo gasto em cada acoplamento foi de 1,5 min ao invés de 2 h (RAHMAN et al., 2007). A Gramicidina A, peptídeo antimicrobiano de sequência hidrofóbica, foi obtida através das SPFS convencional e assistida por micro-ondas, sendo que a última possibilitou a obtenção do peptídeo alvo em menor tempo e com maior rendimento (70% ao invés de 20%; RIZZOLO et al., 2007). A síntese do peptídeo Gly-Ile-Leu-Tyr-Val-Ser-Val-Ala-Val-OH, também foi realizada usando aquecimento convencional, irradiação de micro-ondas e as resinas Tentagel (poliestireno modificado com polietilenoglicol), ChemMatrix (polietilenoglicol) e a resina Rink amida MBHA (poliestireno/divinilbenzeno) (BACSA et al., 2008).

1.7. Síntese Convergente de Peptídeos em Fase Sólida (SCPFS)

A SCPFS é uma variante da SPFS que envolve as seguintes etapas (**Figura 13**): a) o desenho de uma rota sintética; b) SPFS passo a passo dos fragmentos protegidos que servirão como D.A. nas reações de acoplamento; c) clivagem dos D.A. das resinas com manutenção das proteções dos grupos amino e de cadeia lateral; d) se necessário, purificação dos D.A.; e) caracterização química dos D.A.; f) SPFS passo a passo da peptidil-resina que servirá como A.A. nas reações de acoplamento; g) caracterização de A.A.; h) reações de acoplamento (condensação) sequencial dos fragmentos D.A. ao A.A.; i) a cada condensação, uma amostra da peptidil-resina é submetida à clivagem do peptídeo da resina/ desproteção total seguida de análise do

peptídeo bruto para confirmação do sucesso da condensação; j) ao término de todas as condensações, clivagem do peptídeo da resina e remoção total dos grupos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos; k) a análise e caracterização do peptídeo bruto final (ALBERICIO, 2004; BORGIA; FIELDS, 2000).

Figura 13. Esquema da SCPFS. P_1 = Protetor do grupamento amino; PR = Protetor de cadeia lateral reativa, Círculo Amarelo = resina, D.A.= fragmento doador de acila.

A SCPFS é vista como uma metodologia alternativa para a obtenção de peptídeos longos e/ou agregantes com qualidade e rendimento satisfatórios (KISO; YAJIMA, 1995; GOULAS et al., 2006). Entretanto, inúmeros cuidados devem ser tomados:

Desenho da rota sintética: é importante que, se possível, os fragmentos D.A. contenham Gly ou Pro no C-terminal, os quais não epimerizam durante as reações de condensação (BORGIA; FIELDS, 2000). Se isso não for possível, deve-se preferir o aminoácido com cadeia lateral de pequeno volume, não funcionalizada, tal como a Ala (BENZ, 1994).

SPFS dos D.A.: a síntese dos fragmentos D.A. deverá ser feita utilizando resinas e “linkers” que possibilitem o desligamento do peptídeo da resina em condições que mantenham os grupos protetores semipermanentes. Da mesma forma, o protetor temporário deverá permanecer intacto. Uma resina comumente utilizada para este propósito é a 2-Cl-Trt, que além de estabelecer uma ligação com o peptídeo que é lábil a soluções ácidas diluídas, dificulta a enantiomerização do aminoácido durante a aminoacilação da resina e a formação de dicetopiperazina durante o acoplamento do terceiro aminoácido à resina (ATHANASSOPOULOS et al., 1995; LLOYD-WILLIAMS et al., 1997; BARLOS; GATOS, 1999). As seguintes resinas também podem ser usadas para esse propósito: (i) resina SASRIN, porém a sua aminoacilação envolve uma ativação eletrofílica que pode favorecer a enantiomerização (MERGLER et al., 1988); (ii) resina KOR, adequada à estratégia Boc, uma vez que a ligação éster de oxima formada entre a resina e o peptídeo é sensível a ataques nucleofílicos e bases (DeGRADO; KAISER, 1980; PICHETT et al., 1997); (iii) resinas fotolábeis como, por exemplo, a 3-nitro-4-bromometilbenzidrilamina que permite a obtenção de peptídeos protegidos a partir da incidência de radiação em 350 nm (GIRALT et al., 1986).

Solubilidade dos fragmentos D.A.: alguns acabam sendo inevitavelmente insolúveis nos solventes a serem empregados nas reações de condensação e, portanto, impossíveis de serem ativados (NISHIUCHI et al., 2000). Por este motivo, é recomendável que as solubilidades dos D.A. protegidos sejam testadas em diversos solventes previamente às tentativas de condensação (WEBER; ANDRÉ, 1975; BENZ, 1994; NISHIUCHI et al., 2007).

Escolha e SPFS da peptidil-resina que funcionará como A.A.: é recomendável que o fragmento C-terminal não seja longo e de sequência altamente susceptível às reações secundárias típicas da SPFS passo a passo de modo a minimizar a probabilidade de haver deleções e maximizar a qualidade do A.A. (LLOYD-WILLIAMS et al., 1997).

A natureza do suporte sólido influenciará profundamente as reações de condensação (LOSSE et al., 1973). De fato, Albericio e colaboradores verificaram que a condensação quantitativa do fragmento Fmoc-Thr(Bzl)-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Ile-Val-Lys(Z)-Ser(Bzl)-Pro-OH às peptidil-resinas Leu-Cys(Acm)-Met-O-poliestireno-divinilbenzeno e Leu-Cys(Acm)-Met-O-poliacrilamida requereu menos tempo (7 e 24 h, respectivamente) do que quando o A.A. estava ligado à resina Kel-F-g-estireno (48h). Os autores sugeriram que os graus de substituição devem ser baixos (0,2-0,4 mmol/g de resina), de modo que, ao término da síntese, o conteúdo de peptídeo protegido não exceda 50% da massa da resina (ALBERICIO et al., 1989).

Fragmentos peptídicos são maiores do que os derivados de aminoácidos e, por isso, é fundamental que a malha da resina contendo o A.A. esteja suficientemente intumescida para permitir o acesso dos D.A. ativados. Athanassopoulos e colaboradores comprovaram que diferentes Fmoc-aminoácidos esterificam a resina 2-Cl-Trt mais rapidamente do que fragmentos protegidos, sendo as velocidades de reação inversamente proporcionais aos seus tamanhos já que o fragmento 149-153 do fator de necrose de tumor (Fmoc- α TNF₁₄₉₋₁₅₃) esterificou a resina 2-Cl-Trt em aproximadamente 45 min, tempo muito menor do que o Fmoc- α TNF₉₄₋₁₀₈ (ATHANASSOPOULOS et al., 1996).

Ativação do D.A. e condensação: Problemas de solubilidade e o alto custo de fragmentos peptídicos fazem com que soluções diluídas dos D.A. (em excesso de 1,25-4,0 mol em relação ao A.A.; YAJIMA; KAWATANI; WATANABE, 1970) sejam usados e que a reação de condensação demande horas-dias para se completar. Os seguintes reagentes ativadores de grupos carboxila têm sido utilizados durante tais reações: DCC/HOBt em DMF (PEDROSO et al., 1982; GRANDAS et al., 1989;

NISHIUCHI et al., 2007) ou DCM (QUIBELL et al., 1996) ou DMSO (GOULAS et al., 2006), PyBOP/HOBt/NMM em DMF (KITAGAWA et al., 2001) e DIC/6-Cl-HOBt em fenol-clorofórmio (NISHIUCHI et al., 2007).

A epimerização durante a condensação dos fragmentos também se constitui num problema. Interessados em minimizar esta reação indesejada, Quibell e colaboradores estudaram a influência de diferentes reagentes acopladores/solventes orgânicos na extensão da epimerização da Phe durante a condensação de Fmoc-Asp(OBut)-Phe-OH à Lys(Boc)-resina, tendo verificado que a melhor combinação foi DIC/HOBt (1:1) em DCM (QUIBELL et al., 1996).

Provavelmente dada a sua complexidade, relativamente poucos grupos de pesquisa estudaram e/ou utilizaram a SCPFS. Seguem abaixo alguns exemplos:

- 1) Sabendo que as estratégias convergentes para a síntese de proteínas dependem da disponibilidade dos métodos para acoplamento dos segmentos peptídicos, muitos têm estudado a eficiência dos tioésteres de N-acil-fragmentos protegidos como D. A. (CASI et al., 2003; PROTI, 2007). Métodos de obtenção destes compostos também têm sido investigados (AIMOTO, 1999; HAGINOYA et al., 2006; PROTI; MIRANDA, 2008).
- 2) Em nosso laboratório, Remuzgo estudou pela primeira vez alguns aspectos da SCPFS a 60 °C empregando a estratégia química tBoc e utilizando como modelo a CCK-33 não sulfatada (CCK-33 NS). Para tal, o peptídeo-alvo foi dividido nos fragmentos Boc-Lys(2-Cl-Z)-Ala-Pro-Ser(Bzl)-Gly-OH (A), Boc-Arg(Tos)-Met-Ser(Bzl)-Ile-Val-Lys(2-Cl-Z)-Asn-Leu-Gln-Asn-Leu-OH (B) e Asp(OcHex)-Pro-Ser(Bzl)-His(Tos)-Arg(Tos)-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-Arg(Tos)-Asp(OcHex)-Tyr(2-Br-Z)-Met-GlyTrp-Met-Asp(OcHex)-Phe-resina MBHA (C). As sínteses de A e B foram feitas na resina KOR (PROTI, 2007). Não foi possível desligar o fragmento B da resina mesmo após exposição da peptidil-KOR a DBU, NaOH (ATHERTON; SHEPPARD, 1989) ou $\text{Ca}^{+2}/\text{H}_2\text{O}$ (REMUZGO, 2003; PROTI, 2007). Assim, Remuzgo estudou a condensação entre A e C para gerar um análogo truncado da CCK-22 NS. Dentre as diversas

condições estudadas, aquela que empregou DMF como solvente, 60 °C e TBTU/DIPEA como reagentes acopladores foi a que possibilitou a obtenção do produto de condensação de melhor qualidade e em menor tempo (8 h *versus* 48 h na SCPFS convencional) (REMUZGO, 2003);

3) Goulas e colaboradores estudaram a SCPFS da hirudina, uma pequena proteína (65 aminoácidos) inibidora da trombina, que possui três pontes dissulfeto, a partir da condensação de oito fragmentos protegidos D.A ao A.A. ligado à resina 2-Cl-Trt (ALBERICIO, 2004): Asp(But)⁵⁵-Phe-Glu(But)-Glu(But)-Ile-Pro-Glu(But)-Glu(But)-Tyr(But)-Leu-Gln⁶⁵-Cl-Trt, Fmoc-Gln(Trt)⁴⁹-Ser(But)-His(Trt)-Asn(Trt)-Asp(But)-Gly⁵⁴-OH, Fmoc-Glu(But)⁴³-Gly-Thr(But)-Pro-Lys(Boc)P⁴⁸-OH, Fmoc-GluBut³⁵-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Cys(Mmt)-Val-Thr(But)-Gly⁴²-OH, Fmoc-Asn(Trt)²⁶-Lys(Boc)-Cys(Acm)-Ile-Leu-Gly-Ser(But)-Asp(But)Gly³⁴-OH, Fmoc-S(But)¹⁹N(Trt)VC(Mmt)GQ(Trt)G²⁵-OH, Fmoc-Q(Trt)¹¹N(Trt)LC(Mmt)LC(Acm)E(But)G¹⁸OH, Fmoc-Val²-Tyr(But)-Thr(But)-Asp(But)-Cys(Mmt)-Thr(But)-Glu(But)-Ser(But)-Gly¹⁰-OH, Boc-Val¹-OH. As condensações empregaram soluções 0,05-0,10 M dos D.A. em DMSO (excesso molar de 3 vezes) e DIC/HOBt. As reações ocorreram durante a noite à temperatura ambiente, sendo que ao contrário das duas primeiras condensações ao A.A., a terceira necessitou de reacoplamento para ser completada e que a quarta condensação não se completou mesmo após reacoplamento. A síntese de novos fragmentos Fmoc-35-42, Fmoc-19-25, Fmoc-11-18 e Fmoc-2-10, contendo o grupo protetor da cadeia lateral da Cys Mmt, ao invés de Acm, melhorou a solubilidade e reatividade do mesmo, mas não resolveu o problema. Assim, ao invés de empregar D.A. em excesso molar de 3 vezes, os autores realizaram acoplamentos repetitivos de cada fragmento usando excesso do A.A. em DMSO por 6 h cada, tendo obtido a hirudina com rendimento de 12% após a formação das três pontes dissulfeto (GOULAS et al., 2006).

4) Yoshiya e colaboradores descreveram a abordagem de SCPFS baseada no “O-acil-isopeptídeo”, eficiente para a obtenção de “difficult peptides” como peptídeo β -amilóide (FORLONI et al., 1996). A abordagem proposta consiste na isomerização da ligação amida de um hidróxi-aminoácido, como a Ser, a uma ligação éster seguida de uma migração de acila O-N intramolecular (**Figura 14**). A principal vantagem é que a isomerização do esqueleto peptídico, formando uma ligação éster em uma única posição da sequência desfavorece a formação da estrutura secundária da cadeia peptídica, aumentando a eficácia das reações de acoplamento e desproteção durante a SPFS. Além disso, esta é uma abordagem que minimiza a ocorrência da enantiomerização por dificultar a formação de oxazolonas (YOSHIYA et al., 2006).

Figura 14. SCPFS empregando a abordagem “O-acil-isopeptídeo”. Boc= N^{α} -*tert*-butiloxicarbonil (adaptado de YOSHIYA et al., 2006).

5) Nishiuchi e colaboradores utilizaram a SCPFS para obter peptídeos β -amilóides, considerados “difficult sequences” (COMBE et al., 2007) e valiosos para estudos do processo neurodegenerativo crônico que ocorre, por exemplo, na doença de Alzheimer. Os autores dividiram o peptídeo β -amilóide nos fragmentos protegidos (Asp¹-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly⁹-OH), (Tyr¹⁰-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe¹⁹-OH), (Phe²⁰-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly²⁹-OH), (Ala³⁰-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly³⁷-OH), sintetizados passo a passo na resina HMFS via estratégia Boc, e (Gly³⁸-Val-Val⁴⁰-

PAM) sintetizado e mantido ligado à resina PAM. As condensações foram realizadas utilizando um excesso de 1,5 x dos D.A., DIC/HOBt ou DIC/HOAt como reagentes acopladores e fenol:clorofórmio (1:3) como solvente capaz de romper folhas β pregueadas que levam à agregação das cadeias peptídicas em crescimento (SAKAKIBARA et al., 1999). Com exceção do fragmento 10-19 que não foi condensado à peptidil-PAM mesmo após acoplamento e reacoplamento, todos se completaram em 8 h (NISHIUCHI et al., 2007).

6) Spengler e colaboradores propuseram uma nova estratégia para proteção/ativação de β -hidroxiácidos e seu uso em SCPFS com a finalidade de minimizar a epimerização durante a condensação de fragmentos. Os β -hidroxiácidos foram colocados para reagir com hexafluoroacetona e carbodiimidas formando lactonas carboxi-ativadas com bons rendimentos; as lactonas ativadas reagiram com aminas resultando nas amidas. Esta estratégia envolveu segmentos peptídicos contendo Ser ou Thr no C-terminal, resultando em baixos índices de epimerização ($< 1\%$). Além disso, a ativação carboxílica e a formação da ligação amida procederam concomitantemente, rapidamente e a reação foi sítio-seletiva (SPENGLER et al., 2008).

Por outro lado, a literatura é repleta de trabalhos de síntese convergente que utilizam a metodologia de SPFS para a obtenção dos fragmentos protegidos, porém, as condensações entre os segmentos peptídicos são feitas em solução (NISHIUCHI et al., 2000; MUCSI et al., 2002; GRACIA et al., 2006).

1.8. Temperaturas elevadas em SPFS

Sabendo que o aumento da temperatura leva a um maior número de choques entre os reagentes e, portanto, aumenta a velocidade das reações químicas, os químicos de peptídeos empregaram temperaturas altas para acelerar a SPFS. Inicialmente, eles se limitaram à etapa de acoplamento. De fato, em 1987, Tam agilizou acoplamentos difíceis durante a SPFS do fator transformador de crescimento-

α (TGF- α ; 50 aminoácidos) empregando NMP e anidrido simétrico a 50 °C por 2 horas (TAM et al., 1987) e obteve o peptídeo alvo com rendimento total de 31%. Posteriormente, Lloyd e colaboradores realizaram acoplamentos a 40, 50 e 60 °C durante as sínteses do peptídeo Gly-Phe-Phe-Tyr-Cys-Asn-Thr-Thr-Gln-Phe-Phe-Asn-Asn-OH e do fragmento 1-28 do fator anti-natriurético de rato e observaram que, em ambos os casos, os acoplamentos feitos a 60 °C levaram a produtos brutos de melhor qualidade (LLOYD et al., 1990). Assim, até 1993, o uso de temperatura elevada em todas as etapas da SPFS passo a passo ainda não havia sido descrito.

Em 1994, Rabinovich e Rivier, utilizando o neuropeptídeo Y suíno e o fator liberador da corticotrofina de rato como modelos, propuseram alterações nos protocolos convencionais de síntese manual com esta finalidade. Como o emprego da mistura 25% DMSO/tolueno a 75 °C levou a uma redução do tempo total da síntese, estes autores sugeriram que ambos poderiam ser utilizados na SPFS passo a passo automatizada (RABINOVICH; RIVIER, 1994), tentativa esta que, posteriormente, não foi bem sucedida (SANEII et al., 1996).

Nesta época, o nosso grupo de pesquisa passou a estudar sistematicamente a SPFS passo a passo manual em temperatura elevada com vistas a torná-la de uso rotineiro. O primeiro trabalho abordou aspectos nunca estudados, tais como: temperatura ótima, eficiências dos reagentes acopladores, estabilidades física e química das resinas, bem como suas propriedades de inchamento nas condições empregadas. Para tal, foram escolhidos o fragmento 65-74 da proteína transportadora de acila (ACP₆₅₋₇₄), descrita como uma sequência agregante típica (HANCOCK et al., 1973), e a colecistocinina-12 (CCK-12; FINK et al., 1998) não sulfatada (NS) como peptídeos-alvo. Como resultado, foi constatado que os solventes 25% DMSO/tolueno, DMF e NMP a 60 °C intumesciam adequadamente as resinas PAM, MBHA, HMP, TMBHA, Rink amida e SAMBHA e que, portanto, poderiam ser utilizados sem problemas. Além disso, foi determinada a seguinte condição para a SPFS da colecistocinina-12 (CCK-12) NS, de excelente qualidade, que poderia ser conveniente

para a SPFS de suas formas moleculares maiores: estratégia Fmoc, resina Rink amida, 25% DMSO/tolueno, DIC/HOBt, 60 °C (VARANDA; MIRANDA, 1997; RIVIER; MIRANDA, 2001/2004).

Preocupados com as reações secundárias típicas da síntese química, posteriormente, nós estudamos a incidência da enantiomerização na SPFS passo a passo manual a 60 °C, na condição descrita acima e utilizando como modelos os seguintes peptídeos: Ile-Phe-Gly-Thr-NH₂, (D-Tyr)-Lys-Trp-OH e Ac-Ile-Gly-OH. As análises por RP-HPLC, por IEX-HPLC e EC dos peptídeos brutos obtidos nas SPFS convencional e a 60 °C demonstraram que ambas as abordagens levavam a produtos de qualidades idênticas e a uma porcentagem de enantiomerização insignificante (SOUZA, 2000; SOUZA et al., 2004). Tais observações levaram à SPFS a 60 °C bem sucedida da CCK-22 NS (SOUZA, 2000).

Buscando condições e protocolos que permitissem a obtenção da CCK-33 NS com qualidade satisfatória, Remuzgo foi o primeiro a estudar a possibilidade de SCPFS a 60 °C. Dentre as condições utilizadas, aquela que empregou DMF como solvente e TBTU/DIPEA como reagentes acopladores foi a que possibilitou a condensação dos fragmentos Boc-Lys(2-Cl-Z)-Ala-Pro-Ser(Bzl)Gly-OH e Asp(OcHex)-Pro-Ser(Bzl)-His(Tos)-Arg(Tos)-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-Arg(Tos)-Asp(OcHex)-Tyr(2-Br-Z)-Met-Gly-Trp-Met-Asp(OcHex)-Phe-MBHA a 60 °C em tempo significativamente menor (6x) do que aquele necessário para a reação à temperatura ambiente (REMUZGO, 2003).

Enquanto todos os trabalhos acima empregaram formas convencionais de aquecimento, outros descreveram o uso da energia de micro-ondas na síntese orgânica em fase sólida (LARHED; HALLBERG, 2001; GRAEBIN; EIFLER-LIMA, 2005). A primeira aplicação na SPFS se restringiu à etapa de acoplamento, usando forno doméstico que não dispunha de um controlador de temperatura e potência e que, portanto, não fornecia resultados reprodutíveis (CHEN et al., 1991; YU; CHEN, WANG, 1992; CHEN et al., 1997; ERDÉLYI; GOGOLL, 2002; OLIVOS et al., 2002).

Em 2002, Erdélyi e Gogoll utilizaram as micro-ondas para acelerar a reação de acoplamento de aminoácidos estericamente impedidos durante a SPFS manual dos peptídeos Fmoc-Thr-Val-Ile-NH₂, Fmoc-Ala-Ile-NH₂ ou Fmoc-Thr-Ile-NH₂ em DMF. As análises dos peptídeos brutos por LC-MS e RMN ¹H revelaram que não houve enantiomerização dos aminoácidos constituintes (ERDÉLYI; GOGOLL, 2002). No mesmo ano, Olivos e colaboradores acoplaram o ácido bromoacético à resina Tentagel Rink em 30 s, em uma rota de síntese de peptídeos. O acoplamento foi realizado com duas exposições a micro-ondas para controle da temperatura do meio reacional, pois o forno utilizado também era doméstico (OLIVOS et al., 2002). Os rendimentos dos produtos foram de 60- 90% (na SPFS mediada por micro-ondas), 63- 80% (na SPFS a 37 °C) e 25- 70% (na SPFS à temperatura ambiente).

Com o advento dos reatores de micro-ondas que permitem o controle das temperatura e potência, todas as etapas da SPFS (acoplamentos, desproteções e clivagens do peptídeo da resina) puderam ser realizadas sob assistência de micro-ondas. Trabalhos envolvendo sínteses em equipamentos manuais ou automáticos foram publicados. A **Tabela 1** descreve os peptídeos-alvo e as condições empregadas.

Como mostra a tabela, sínteses de bibliotecas combinatórias de β-peptídeos têm sido assistidas por micro-ondas, pois eles são uma classe importante de peptídeos que assumem estruturas secundárias do tipo hélice-14, são estáveis à ação de proteases e podem servir como transportadores de substâncias para dentro das células (MURRAY et al., 2005). Como os peptídeos cíclicos possuem diversas funções biológicas, há um grande interesse em otimizar o processo de ciclização que apresenta limitações, tais como o tamanho do anel a ser formado e a natureza dos aminoácidos que o compõem (MONROC et al., 2006; BYK et al., 2006). De fato, Robinson e colaboradores relataram aumento de rendimento da ciclização de peptídeos ligados às respectivas resinas quando a energia de micro-ondas foi utilizada (ROBINSON et al., 2007). Recentemente, Katritzky e colaboradores propuseram uma

nova rota de SPFS, que é assistida por micro-ondas e N-(Fmoc-R-aminoacil)benzotriazol, usando como alvos as seguintes “difficult sequences” Val-Val-Ser-Val-Val-NH₂, Val-Val-Ser-Val-Val-NH₂, Val-Ile-Val-Ile-Gly-OH, Thr-Val-Thr-Val-Thr-Val-Thr-Val-NH₂, Val-Lys-Asp-Gly-Tyr-Ile-NH₂ e Val-Lys-Asp-Val-Tyr-Ile-NH₂ (KATRITZKY et al., 2009).

Todos esses trabalhos, entretanto, demonstram pouca preocupação com a possibilidade de intensificação das reações secundárias em função do uso de micro-ondas.

Tabela 1. Exemplos de sínteses mediadas por micro-ondas já publicadas

Processo/composto	Resina	Solvente	Temp. de ajuste (°C)	Potência (W)	T _{desprot.} (min)	T _{acoplam} (min)	Referência
Análogo da urotensina II ^a	Fmoc-Val-Wang	DMF	50	450	----	10	CAMPAGLIA et al., 2004
Glicopeptídeo MUC1 ^a	Ala-Rink amida	DMF	50	2450 Hz	3	10-20	MATSUSHITA et al., 2005
β-peptídeos ^a	Wang	DMF	50	----	4	6	MURRAY; et al., 2005
Fosfopeptídeos ^a	BAL e Rink	NMP	60	0-20	6	2-10	BRANDT et al., 2006
pseudo-peptídeos ^a	MBHA	DMF	80	150	----	8,5	PARK et al., 2007
Gramicidina A e o glicopeptídeo CSF114 ^a	2-Cl-Trt e Wang	DMF	70-75	25	3,5	5	RIZZOLO et al., 2007
(Oligo-Ala) _{10,15,19} ^a	PS-PEG	DMF	----	200	0,5-8	1,5-7,0	RAHMAN et al., 2007
Fmoc-K[COO]L-NH ₂ ^a pseudodipeptídeo	MBHA	DMF	90	150	30	12	JOSHI et al., 2008
Urotensina II humana ^a	Wang	DMF	até 60	2450 MHz	4	7	ZHANG et al., 2007
Ciclotídeos, peptídeos macrocíclicos ^b	PAM	DMF	75- 87	35		5	CEMAZAR; CRAIK, 2008
Influência do GS da resina na SPFS de Ac-GCDPDRHCA-NH ₂ ^a	Rink amida	DMF	75	variável	3	5	COANTIC;SUBRA; MARTINEZ, 2008
Peptídeo-dendrímico ^a	Rink amida	DMF	60	----	20	20	DIAZ-MOCHON et al., 2008
Biblioteca de peptídeos ^a	Rink amida	DMF	70-80	600	4	6	MURRAY; GELLMAN, 2007
Macrociclicação de melanocortina ^a	Rink amida	DMF	50	450	----	10	GRIECO et al., 2008
“Difficult peptídeo” ^a	Tentagel	DMF	60	----	10	10	FARA et al., 2006

^a Estratégia Fmoc, ^b estratégia Boc, Desprot = desproteção, Acoplam = acoplamento.

Enquanto realizávamos o trabalho descrito na presente Tese, os poucos grupos que o fizeram estão descritos a seguir:

1) Bacsa e colaboradores estudaram a SPFS do nonapeptídeo Trp-Asp-Thr-Val-Arg-Ile-Ser-Phe-Lys-OH, fragmento da calmodulina, assistida por micro-ondas e

empregando a estratégia Fmoc. Durante as etapas de desproteção e acoplamento, os autores refrigeraram o meio reacional para que a enantiomerização e a remoção precoce dos grupos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos fossem minimizadas, pois elas eram intensificadas a 100 °C, a 30 W em DMF (BACSA et al., 2006).

2) Palasek e colaboradores utilizaram um peptídeo contendo os 20 aminoácidos usuais como modelo para estudar o efeito da energia de micro-ondas na extensão da enantiomerização e na formação de aspartimida (LAUER et al., 1995). Frente aos resultados obtidos, eles propuseram: i) uma diminuição da temperatura de 80 °C para 50 °C durante as etapas de acoplamento para minimizar a enantiomerização; ii) o uso de temperatura ambiente durante os acoplamentos dos derivados de Cys e His, iii) a utilização de uma base estericamente impedida como a colidina, para minimizar a incidência da enantiomerização. Com relação à formação de aspartimida, a adição de HOBt à solução reacional de desproteção e/ou substituição da piperidina por piperazina levou à sua minimização (PALASEK et al., 2007).

3) Bacsa e colaboradores investigaram o efeito da temperatura na incidência da enantiomerização durante as SPFS dos peptídeos Gly-Ile-Leu-Tyr-Val-Ser-Val-Ala-Val-OH e Cys(Trt)-Gly-Ile-Gly-Lys(Boc)-Phe-Leu-His(Trt)-Gly-Ala-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Gly-Lys(Boc)-Ala-Phe-Val-Gly-Glu(OBut)-Ile-Met-Asn(Trt)-Ser(But)-NH₂ à temperatura ambiente e a 86 °C sob assistência de micro-ondas, tendo observado que para o primeiro modelo, a extensão da enantiomerização foi desprezível (< 0,26 %), mas para o segundo ela foi significativa para His (7 e 2% para His e Cys, respectivamente) (BACSA et al., 2008).

4) Loidl e colaboradores estudaram diferentes protocolos buscando otimizar o acoplamento de Fmoc-Cys(Trt)-OH e Fmoc-Cys(Acm)-OH à uma peptidil-resina em crescimento e concluíram que a utilização de DIC/HOBt na ausência de base, empregando DMF ou NMP como solvente a 15-25 °C levou a extensão da enantiomerização inferior a 1% (LOIDL et al., 2009).

Para finalizar, vale ressaltar que estudos como estes muitas vezes propõem pequenas alterações nos protocolos ou cuidados a serem tomados que promovem uma melhoria na qualidade do peptídeo bruto final, o que reduz o tempo e o custo das etapas de purificação posteriores.

1.9. Colecistocinina (CCK): um peptídeo difícil de sintetizar

A CCK é encontrada no sistema gastrointestinal e no sistema nervoso central de mamíferos exibindo muitas funções biológicas, tais como:

- a) gástrica: está relacionada com a contração da vesícula biliar, estimulação da secreção de α -amilases pancreáticas, inibição da secreção gástrica e motilidade intestinal (CRAWLEY; CORWIN, 1994; TIRASSA et al., 2002);
- b) neurotransmissora: é o peptídeo mais abundante no córtex cerebral e no hipocampo. Está co-localizado com a dopamina e é diretamente relacionado com a neurotransmissão e neuromodulação, além de induzir ansiedade. De fato, a administração de CCK em humanos estimula o surgimento de sintomas da síndrome do pânico, a qual pode ser tratada com antagonistas do receptor CCK B (BEINFELD, 2001). A CCK também está relacionada com os processos de aprendizagem e memória (ITOH et al., 1989);
- c) diferenciadora sexual: está envolvida na diferenciação sexual e no comportamento reprodutivo de roedores através de sua interação com o estrógeno e opióides endógenos (CRAWLEY; CORWIN, 1994);
- d) termoreguladora: está relacionada com a febre e com a hipotermia (ITOH, 1981; BEINFELD, 2001; LANGMESSER et al., 2007), além de induzir a dilatação em vasos cerebrais e mesenquimais (RUIZ-GAYO et al., 2006).
- e) analgésica: um aumento na sua concentração contribui para a manutenção do estado de dor por reduzir a eficiência de peptídeos endógenos de ação opióide (FARIS et al., 1983). Assim, antagonistas da CCK podem ser importantes para o tratamento da dor crônica.

A CCK foi originalmente isolada do intestino do porco como um peptídeo de 33 resíduos de aminoácidos (CCK-33) (MUTT; JORPES, 1971). Posteriormente, foram descobertas múltiplas formas fisiologicamente ativas derivadas da clivagem do pré-hormônio Pro-CCK: CCK-83, CCK-58, CCK-39, CCK-33, CCK-22 e CCK-8, sendo todas elas sendo nomeadas de acordo com o número de resíduos de aminoácidos que possuem a partir de seus C-terminais (CRAWLEY; CORWIN, 1994). Sabe-se que o processamento pós-traducional deste peptídeo envolve a sulfatação da Tyr⁷ (a partir do C-terminal) e a amidação da Phe C-terminal, descritas como essenciais para sua atividade biológica total. Entretanto, fragmentos menores como o pentapeptídeo e o tetrapeptídeo C-terminais apresentam atividade biológica mesmo sem a sulfatação (ALBRIZIO, 2002). De fato, mesmo o tetrapeptídeo CCK-4 é ativo no cérebro (FINK et al., 1998). A maior forma de CCK presente no plasma de mamíferos, incluindo o homem, é a CCK-58 (EYSSELEIN et al., 1987; EBERLEIN et al., 1988), mas as formas predominantes são a CCK-33 e a CCK-22 (REHFELD et al., 2001).

Conhecendo as importâncias das formas da CCK e sabendo que as fontes naturais apresentam quantidades ínfimas das mesmas, os químicos de peptídeos vêm buscando métodos para obtê-las em quantidades e com qualidades necessárias para viabilizar o estudo de suas fisiologias. Porém, cabe ressaltar que devido à complexidade química das diferentes isoformas da CCK (CCK-8, CCK-22, CCK-33, CCK-58), as sínteses são complicadas (KURANO et al., 1987).

Kurano e colaboradores foram os primeiros a sintetizar a CCK-33 de porco utilizando a metodologia clássica em solução, empregando peptídeos com proteção máxima em suas cadeias laterais e realizando-se a sulfatação no final da síntese (KURANO et al., 1987). No ano seguinte, a síntese da CCK-33 humana foi realizada por meio da condensação em solução entre 7 fragmentos seguida da sulfatação da Tyr⁷ por esterificação seletiva com piridina-SO₃ (FUJII et al., 1988). Em seguida, Penke e Nyerges empregaram a metodologia da fase sólida e sintetizaram a CCK-33 sulfatada de porco usando a estratégia química Boc e a resina MBHA. Devido ao

baixíssimo rendimento global obtido (1%), estes autores utilizaram a estratégia Fmoc e desenvolveram a resina SAMBHA, tendo evidenciado que as dificuldades em obter as CCKs decorrem principalmente da química de alguns aminoácidos constituintes da mesma (PENKE; NYERGES, 1991).

Posteriormente, Miranda e colaboradores descreveram a SFS passo a passo de análogos das CCK-58, CCK-39, CCK-33 e CCK-8, utilizando a estratégia Fmoc: a Tyr(SO₃H) foi substituída por Phe(p-CH₂SO₃Na), as Met foram substituídas por Nle e o Trp por 2-naftil-Ala, de modo a aumentar a estabilidade química dos mesmos durante a síntese, desproteção final e clivagem do peptídeo da resina, mas também observaram rendimentos extremamente baixos (MIRANDA et al., 1993 a; 1993 b). Em 1997, Kitagawa e colaboradores descreveram a SPFS passo a passo das CCK-12 e CCK-33 usando Fmoc-Tyr(SO₃Na) e a resina 2-Cl-Trt, resina que forma uma ligação peptídeo-resina altamente lábil a ácido. Os autores realizaram a clivagem do peptídeo da resina e desproteção total em duas etapas: 1) EtOH:TFE:DCM (1:1:3 v/v/v a 25 °C por 45 min); 2) 90% TFA/H₂O a 4 °C por 5 h e obtiveram a CCK-33 com rendimento de 10%. Este baixo rendimento pôde ser justificado, em parte, pela oxidação das Met presentes (KITAGAWA et al., 1997).

Em 2004, Reeve e colaboradores realizaram a síntese da CCK-58 sulfatada de rato utilizando a metodologia de fase sólida, um sintetizador automático, a estratégia química Fmoc e a resina PAL. A melhor condição de clivagem do peptídeo da resina que possibilitou a sua obtenção na forma sulfatada (60%) foi a utilização da mistura TFA/EDT/tioanisol/anisol (89/5/3/3; v/v/v/v) a 4 °C por 7 h. A razão massa de peptídeo bruto obtido/ massa de peptidil-resina clivada foi de 36% (REEVE et al., 2004). Também em 2004, Kitagawa e colaboradores estabeleceram uma abordagem de síntese convergente em solução, mediada por íons Ag⁺, a partir de fragmentos D.A. parcialmente protegidos na forma de tioéster, abordagem que se mostrou indicado para peptídeos contendo Tyr(SO₃H), pois as CCK-33, -39 e -58 sulfatadas foram obtidas com sucesso (**Esquema 1**; KITAGAWA et al., 2004).

Por fim, cabe ressaltar que os trabalhos descritos na literatura evidenciam que:

- i) as diferentes isoformas da CCK podem ser vistas como modelos de sínteses complicadas; ii) apesar das formas maiores da CCK (-33, -39 e -58) já terem sido sintetizadas, elas nunca foram obtidas via SCPFS. Fica evidente, portanto, o interesse em estudar a SCPFS a 60 °C empregando um modelo de síntese complexa, tal como a CCK-33.

Esquema 1. Estratégia sintética adotada para a síntese convergente em solução da CCK-58 sulfatada. Fmoc= 9-fluorenilmetiloxycarbonil, Boc= N^α-*tert*-butiloxycarbonil, DMF= *N,N'*-dimetilformamida, HOObt= 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina, DIPEA= *N,N'*-diisopropiletilamina.

2. OBJETIVOS

Sabendo que a condição de SPFS a 60 °C anteriormente determinada pelo nosso grupo empregando o aquecimento convencional (SOUZA, 2000; SOUZA et al., 2004) mostrou-se adequada à síntese de diversos peptídeos-modelo, não intensificou a enantiomerização de Ile, Lys, Thr, Tyr e Trp e nunca foi usada para a SPFS assistida por micro-ondas, bem como que acoplamentos entre fragmentos peptídicos a temperatura ambiente são reações extremamente lentas e que a SCPFS é ainda pouco estudada, o presente trabalho objetivou:

1) investigar a aplicabilidade da SPFS a 60 °C empregando as nossas condições (SOUZA et al., 2004) e o aquecimento por micro-ondas para a síntese de sequências peptídicas contendo os aminoácidos mais susceptíveis à enantiomerização (Ser, His e Cys) e à oxidação (Met e Trp) dentre os vinte usuais. Para tanto, foram escolhidos como modelos os peptídeos Gly-Cys-Phe-NH₂, Ac-Ala-Cys-Pro-Lys (**Ac-Glic₁₂₋₁₅**), Ac-His-Gly-Ser-Ala (**Ac-Hb₅₀₋₅₃**), Ac-Pro-Ser-His-Arg (**Ac-CCK₁₈₋₂₁**) e Asp-Arg-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (**CCK₂₄₋₃₃ NS**).

2) estudar a possibilidade de realizar todas as etapas da SCPFS a 60 °C (REMUZGO, 2003). Para tanto, foi usada a estratégia Fmoc de síntese e examinados os seguintes aspectos: tamanho e natureza do fragmento D.A., natureza do solvente, estabilidade das resinas Rink amida, CLEAR e 2-Cl-Trt a 60 °C, influência do modo de aquecimento (convencional ou por micro-ondas) na eficiência e tempo de acoplamento entre os fragmentos. Pelas razões já expostas nesta tese, a CCK-33 NS foi escolhida como modelo peptídico.

Os **Esquemas 2 e 3** resumem as abordagens experimentais empregadas.

Esquema 2. Resumo da abordagem experimental empregada no estudo da enantiomerização e de outras reações secundárias na SPFS passo a passo a 60 °C.

Esquema 3. Resumo da abordagem experimental empregada no estudo da SCPFS a 60 °C.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Resinas

As Boc-L-Lys(CIZ)OCH₂-resina PAM (0,52 mmol/g) e Boc-L-Ala-PAM (0,80 mmol/g) foram adquiridas da Applied Biosystems (Foster City/CA, EUA). As Boc-L-Arg(Tos)-PAM resina (0,42 mmol/g) e Rink amida resina (0,40 e 0,45 mmol/g) eram da Bachem California (Torrance/CA, EUA). As resinas 2-Cl-Trt (0,9 mmol/g) e CLEAR amida (0,48 mmol/g) foram obtidas da Advanced ChemTech (Louisville/KY, EUA) e Peptide International, Inc. (Louisville/KY, EUA), respectivamente. Todas elas apresentavam tamanho de partícula de 100 a 200 mesh.

3.2. Derivados de aminoácidos

Os derivados de aminoácidos: Boc-L-Ser(Bzl), Boc-D-Ser(Bzl), Fmoc-L-Ser(But), Boc-Gly, Boc-L-His(Tos), Boc-D-His(Tos), Fmoc-L-His(Trt), Boc-L-Pro, Boc-D-Pro, Fmoc-L-Pro, Boc-L-Cys(Mbz), Boc-D-Cys(Mbz), Fmoc-L-Cys(Trt), Fmoc-D-Cys(Trt), Boc-L-Ala, Boc-D-Ala, Fmoc-L-Phe, Fmoc-Gly, Fmoc-L-Asp(OBut), Fmoc-L-Arg(Pmc), Fmoc-L-Tyr(But), Fmoc-L-Met, Fmoc-L-Trp(Boc), Fmoc-L-Ile, Fmoc-L-Asn, Fmoc-L-Leu, Fmoc-L-Gln, Fmoc-L-Val, Fmoc-L-Lys(Boc), Fmoc-L-Phe e Fmoc-D-Phe foram adquiridos da Bachem (Torrance/CA, EUA), da Applied Biosystems (Foster City/CA, EUA) ou da Protein Research Foundation (Osaka, Japão).

3.3. Reagentes acopladores

Foram utilizados: DIC (Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Saint Louis/MO, EUA), EDC (Sigma- Aldrich Chemical Co. (St Saint Louis/MO, EUA), HOBt (Protein Research Foundation; Osaka, Japão), TBTU e BOP da Advanced ChemTech (Louisville/KY, EUA).

3.4. Solventes e outros reagentes

Os solventes DCM, DMF, MeOH, isopropanol, etanol 96%, éter diisopropílico, DMSO e tolueno eram procedentes da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha), Sigma-

Aldrich Chemical Co. (St Saint Louis/MO, EUA) ou da Applied Biosystem (Foster City/CA, EUA). Todos eram de grau analítico ou de síntese, tendo sido empregados sem qualquer tratamento prévio.

O solvente NMP era de grau cromatográfico e foi adquirido da EM Science (Gibbstown/NJ, USA). Os solventes DMF e o éter diisopropílico eram de grau analítico e foram adquiridos da Vetec Química Fina Ltda. (Rio de Janeiro/RJ/ Brasil).

O anisol, m-cresol, TFA, TEA, piperidina, DIPEA, NMP, TIS e anidrido acético empregados eram de grau analítico ou de síntese, sendo provenientes da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha), Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Saint Louis/MO, EUA) ou da Applied Biosystems (Foster City/CA, EUA). O HF era proveniente da Quírios Produtos Químicos Ltda (São Paulo/SP/ Brasil). O sistema ao qual o cilindro for conectado era da Peptide Institute, Inc. (Osaka, Japão).

O sal caotrópico LiCl era de grau analítico e proveniente da Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda. (São Paulo/SP, Brasil).

Para o monitoramento dos acoplamentos por meio do teste de ninidrina (KAISER et al., 1970) das resinas ou peptidil-resinas foram empregadas as misturas comerciais provenientes da Applied Biosystems (Foster City/CA, EUA): fenol/etanol 76% (v/v) (monitor 1), cianeto de potássio/ piridina 0,2 mM (monitor 2), ninidrina/etanol 0,28 M (monitor 3). Todos eram de grau síntese.

As hidrólises ácidas das peptidil-resinas foram realizadas em presença da mistura HCl fumegante 37% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha)/ácido propiônico 99% (1:1, v:v; Sigma- Aldrich Chemical Co. (St Saint Louis/MO, EUA).

Na preparação dos eluentes para RP-HPLC e LC/ESI-MS foram utilizados ACN (Vetec Química Fina Ltda/ RJ/ Brasil) e TFA (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) de grau espectroscópico.

O reagente quiral $18C_6H_4$ utilizado nas análises por EC foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Saint Louis/MO, EUA). O capilar utilizado era revestido por PVA e foi adquirido da Polymicro Technologies [Phoenix/ AZ/ EUA; diâmetro interno: 75 μ m; comprimento do capilar até o detector: 45 cm.

As sondas usadas durante os experimentos de termo-solvatocromismo foram fornecidas pelo Prof. Dr. Omar El-Seoud do Departamento de Química Fundamental do IQ-USP. A resina MBHA necessária ao estudo de inchamento frente a diferentes misturas binárias apresentava grau de substituição de 0,2 mmol/g e foi adquirida da Advanced Chem Tech (Louisville/KY, EUA).

Todos os solventes e os reagentes foram utilizados sem purificação prévia. A água utilizada para preparar os solventes para RP-HPLC foi purificada em um deionizador (Millipore, Bedford/MA/ EUA).

3.5. Aminoacilação na resina 2-Cl-Trt

Esta reação foi feita sob agitação com barra magnética em um balão de fundo redondo adaptado a um tubo contendo $CaCl_2$ para fornecer grau de acilação na faixa de 0,4 a 0,6 mmol/g. O Fmoc-aminoácido foi dissolvido em DCM contendo o volume de DMF seco suficiente para dissolver o Fmoc-aminoácido. Cerca de 1/3 do volume correspondente a 2,5 equivalentes de DIPEA foi adicionado para a solubilização do Fmoc-derivado. A mistura foi agitada por 5 min. O restante do DIPEA (2/3 do total) foi então adicionado juntamente com DCM (1:1; v/v) e a mistura final foi deixada reagir sob agitação. Após 60 min, foi adicionado MeOH (0,8 mL/g de resina) ao meio reacional e a mistura foi agitada por 10 min. A resina foi lavada com DCM, DMF, isopropanol, DMF, isopropanol, metanol e éter etílico. O éter foi removido por evaporação. A aminoacil-resina resultante foi seca e pesada (ATHANASSOPOULOS, 1995).

Aproximadamente 1 mg da aminoacil-2-Cl-Trt resina obtida foi submetida à hidrólise ácida em 600 μ L de 50% TFA/DCM por 2 h. O hidrolisado foi seco em

dessecador à vácuo, ressuspendido em 1 mL de água MilliQ e o aminoácido foi identificado/quantificado. A sua análise de aminoácidos forneceu o número de mol de aminoácido presente em 25 μ L da amostra (visto que este foi o volume injetado no analisador de aminoácidos). A partir deste valor calculou-se o número de mol de aminoácido presente em 1 mL de amostra e a seguinte relação é feita: n° mol de aminoácido/ massa de aminoacil-resina submetida à hidrólise. Como tal procedimento foi feito para triplicatas, de posse dos três valores de grau de aminoacilação, calculou-se o valor médio.

3.6. Síntese manual das peptidil-resinas

Todas elas empregaram o método da fase sólida, a estratégia química tBoc ou Fmoc e um protocolo convencional para a síntese à temperatura ambiente (MIRANDA et al., 1993) ou protocolos adaptados por nós para a SPFS a 60 °C usando aquecimento convencional (VARANDA; MIRANDA, 1997; RIVIER; MIRANDA, 2001/2004; REMUZGO et al., 2009). O protocolo utilizado nas SPFS a 60 °C usando aquecimento por micro-ondas foi adaptado daquele sugerido pela CEM Corporation, de modo que cada etapa do processo sintético durasse metade do tempo gasto na SPFS a 60 °C usando aquecimento convencional.

Na SPFS a 60 °C- aquecimento convencional foi utilizado um frasco de vidro com placa de vidro sinterizado de menor porosidade e jaquetado para a circulação de água aquecida no banho termostatizado da PolyScience (Niles/IL, USA), modelo 8001. Na SPFS a 60 °C empregando a energia de micro-ondas, utilizamos o frasco de reação que acompanha o sistema de SPFS Discover™ (CEM Corporation, Charlotte/ NC, EUA).

Os grupos protetores dos aminoácidos foram escolhidos segundo a estratégia química empregada (STEWART; YOUNG, 1984; ATHERTON; SHEPPARD, 1989; BENOITON, 2005). Os peptídeos sintetizados, as estratégias, o tipo de SPFS e as resinas utilizadas estão listados na **Tabela 2**. Os protocolos de síntese utilizados estão

descritos na **Tabela 3** (VARANDA; MIRANDA, 1997; RIVIER; MIRANDA, 2004; SOUZA et al., 2004).

Tabela 2. Peptídeos estudados, tipos de SPFS e resinas utilizadas.

Peptídeo	SPFS ^a	Estratégia química	Resina ou aminoacil-resina (mmol/g)
Ac-Glic ₁₂₋₁₅	convencional 60 °C- aq. conv. 60 °C- aq. mic.	Boc	Boc- L-Lys(2-ClZ)OCH ₂ -PAM (0,52)
[D-Ala ¹²] Ac-Glic ₁₂₋₁₅	convencional		
[D-Cys ¹³] Ac-Glic ₁₂₋₁₅	convencional		
[D-Ala ¹² ,D-Cys ¹³] Ac-Glic ₁₂₋₁₅	convencional		
Ac-CCK ₁₈₋₂₁	convencional 60 °C- aq. conv. 60 °C- aq. mic.	Boc	Boc-L-Arg(Tos)OCH ₂ -PAM (0,42)
[D-Ser ¹⁹] Ac-CCK ₁₈₋₂₁	convencional		
[D-His ²⁰] Ac-CCK ₁₈₋₂₁	convencional		
[D-Ser ¹⁹ ,D-His ²⁰] Ac-CCK ₁₈₋₂₁	convencional		
Ac-Hb ₅₀₋₅₃	convencional 60 °C- aq. conv. 60 °C- aq. mic.	Boc	Boc-L-AlaOCH ₂ -PAM (0,80)
[D-Ser ⁵²] Ac-Hb ₅₀₋₅₃	convencional		
[D-His ⁵⁰] Ac-Hb ₅₀₋₅₃	convencional		
[D-Ser ⁵² ,D-His ⁵⁰] Ac-Hb ₅₀₋₅₃	convencional		
Gly-Cys-Phe-NH ₂	convencional 60 °C- aq. conv. 60 °C- aq. mic. ^b 60 °C- aq. mic. ^c 60 °C- aq. mic. ^d 60 °C- aq. mic. ^e	Fmoc	Rink amida (0,40)
Gly-D-Cys-Phe-NH ₂	convencional	Fmoc	MBHA (0,50)
Gly-Cys-D-Phe-NH ₂	convencional		
Gly-D-Cys-D-Phe-NH ₂	convencional		
Fmoc-CCK ₁₂₋₁₈	convencional	Fmoc	2-Cl-Trt (0,9)

Fmoc-CCK ₂₁₋₂₃	convencional	Fmoc	2-Cl-Trt (0,9)
Fmoc-CCK ₂₂₋₂₃	convencional	Fmoc	2-Cl-Trt (0,9)
CCK-33 NS	convencional	Fmoc	CLEAR (0,46)
CCK ₂₄₋₃₃ NS	convencional 60 °C- aq. conv. 60 °C- aq. mic.	Fmoc	Rink amida (0,35)
CCK ₁₉₋₃₃ NS	convencional	Fmoc	Rink amida (0,35)
	60 °C- aq. conv.		
	60 °C- aq. mic.		
Fmoc-CCK ₁₂₋₁₈	convencional 60 °C- aq. conv. 60 °C- aq. mic.	Fmoc	2-Cl-Trt (1,6)

^aconvencional = SPFS a temperatura ambiente; 60 °C- aq. conv. = SPFS a 60 °C usando aquecimento convencional; 60 °C- aq. mic. = SPFS a 60 °C usando aquecimento por micro-ondas. Etapa de acoplamento em: ^b25%DMSO/tolueno, ^cDMF, ^dNMP, ^e20%NMP/tolueno.

3.7. Caracterização das peptidil-resinas obtidas por análise de aminoácidos

Todas as peptidil-resinas (1 mg) obtidas foram submetidas à hidrólise em uma mistura de HCl 6N e ácido propiônico (600 µl; 1:1, v/v) por 24 h a 130 °C no interior de uma estação de trabalho Pico-Tag (Waters-Millipore, Billerica/MA, EUA). Posteriormente, as amostras foram secas à vácuo em dessecador contendo pastilhas de KOH.

As composições molares dos aminoácidos presentes nos hidrolisados foram determinadas nos seguintes analisadores automáticos:

1) Beckman, modelo 6300 (Beckman Instruments, Fullerton/CA, EUA) acoplado a um computador que utiliza o programa System Gold 406 para controle e aquisição de dados. Este analisador emprega o método de derivatização pós-coluna, no qual os aminoácidos são separados por cromatografia de troca iônica utilizando uma coluna aniônica AminoPac PA10 da Dionex (2,0 x 25 cm, <10 µm, 8,5 µm) e uma coluna de troca catiônica da Beckman do tipo poliestireno sulfonada (0,4 x 12,0 cm) e detectados a 440 a 570 nm como produtos da reação com ninidrina (SMILLIE; NATTRISS, 1991);

Tabela 3. Condições experimentais empregadas nas SPFS (LOFFREDO et al., 2009; LOFFREDO et al., no prelo).

Etapa	SPFS convencional (T. ambiente)	SPFS a 60 °C- aq. convencional^a	SPFS a 60 °C- aq. micro-ondas^b
Lavagem Inicial^c	DCM, MeOH, 10%TEA/DCM (Boc); DCM, MeOH (Fmoc)	25%DMSO/Tolueno, MeOH, Tolueno	25%DMSO/Tolueno, MeOH, Tolueno
Desproteção	50%TFA/DCM/1% anisol, 20' (Boc); 20% piperidina/ DMF, 10' (Fmoc)	50%TFA/Tolueno,10'(Boc); 20%piperidina/ DMF, 5' (Fmoc)	50%TFA/Tolueno,5', 20 W (Boc); 20% piperidina/DMF, 5', 20 W (Fmoc)
Lavagem pós desproteção^c	DCM, 1% anisol/isopropanol, DCM, 10%TEA/DCM, MeOH (Boc); DCM, MeOH (Fmoc)	25% DMSO/Tolueno, MeOH, 10% TEA/Tolueno, Tolueno (Boc); 25%DMSO/Tolueno, MeOH, Tolueno (Fmoc)	25%DMSO/Tolueno, MeOH, 10% TEA/Tolueno, Tolueno (Boc); 25%DMSO/Tolueno, MeOH, Tolueno (Fmoc)
Acoplamento	2,5 Boc- ou Fmoc-AA em DCM ou DMF + 2,5 DIC/HOBt ou TBTU/DIPEA, 60'	2,5 Boc- ou Fmoc-AA + 2,5 DIC/HOBt em 25% DMSO/Tolueno ou TBTU/DIPEA em DMF, 30'	2,5 Boc- ou Fmoc-AA + 2,5 DIC/HOBt em 25% DMSO/Tolueno ou TBTU/DIPEA em DMF, 15', 20 W
Lavagem pós-acoplamento^c	DCM, MeOH	25%DMSO/Tolueno, MeOH, Tolueno	25%DMSO/Tolueno, MeOH, Tolueno
Acetilação N-terminal	50% anidrido acético/DCM, 10'	50% anidrido acético/Tolueno, 10'	50% anidrido acético/Tolueno, 10'
Lavagem final^c	DCM, MeOH	25%DMSO/Tolueno, MeOH, Tolueno	25%DMSO/Tolueno, MeOH, Tolueno

^aCom exceção da etapa de acetilação, todas as demais foram realizadas a 60 °C; ^bSomente as etapas de desproteção e acoplamento/reacoplamento foram assistidas por micro-ondas; as demais etapas foram feitas à temperatura ambiente. ^cApós a lavagem, a peptidil-resina foi submetida ao teste de ninidrina (KAISER et al., 1970).

2) Dionex BioLC® Chromatography System (Dionex Corporation, Sunnyvale/CA, EUA) acoplado a um computador que utiliza a plataforma “Chromeleon” (composto por bombas GS50, detector eletroquímico ED50 e forno cromatográfico LC25). Este emprega a determinação direta via detecção por amperometria pulsada (IPAD - Integrated Pulsed Amperometric Detection) com detector eletroquímico ED50. Neste, os aminoácidos livres são separados também por HPLC de troca iônica utilizando uma coluna AminoPac PA10 (2,0 cm x 25 cm) da Dionex Corporation (Sunnyvale/CA, EUA).

A proporção molar de cada aminoácido foi determinada a partir de uma curva de calibração resultante da análise de uma solução padrão de aminoácidos de concentração conhecida (SMILLIE; NATTRISS, 1991). As mesmas permitiram determinar os conteúdos de aminoácidos e, conseqüentemente, os graus de substituição das peptidil-resinas.

3.8. Desligamento do peptídeo protegido da 2-Cl-Trt

Terminada a síntese total do peptídeo a partir da aminoacil-resina, a peptidil-resina obtida foi seca em dessecador à vácuo e uma amostra de aproximadamente 10 mg foi submetida à clivagem da ligação peptídeo-resina como se segue (SHEPPARD; WILLIAMS, 1982; PROTI et al., 2007): 1) A peptidil-resina foi colocada em funil de placa sinterizada e permitida intumescer em DCM por 15 min. O excesso de DCM foi removido por sucção; 2) A solução (1% TFA/DCM) foi adicionada ao funil, o qual foi coberto com filme plástico. A suspensão resultante foi agitada por 2 min. A solução foi então coletada por filtração em um kitassato contendo solução de 10 % piridina/MeOH; 3) O passo 2 foi repetido por 9 vezes; 4) A resina foi lavada com as seguintes soluções: DCM, MeOH, DCM e MeOH; 5) Os filtrados foram combinados e submetidos à redução de volume (até 5%) por evaporação sob pressão reduzida. O peptídeo foi então precipitado com água MilliQ gelada. A fase aquosa foi removida, o peptídeo bruto foi solubilizado no solvente adequado e analisado por RP-HPLC e LC/ESI-MS.

3.9. Clivagem do peptídeo da resina e desproteção total

Estratégia Boc/Bzl (STEWART; YOUNG, 1984; VARANDA; MIRANDA, 1997; PROTI, 2007): aproximadamente 300 mg de peptidil-resina Ac-Glic₁₂₋₁₅-PAM, Ac-Hb₅₀₋₅₃-PAM ou Ac-CCK₁₈₋₂₁-PAM e 1 mL de anisol/DMS (para o modelo Ac-Glic₁₂₋₁₅-PAM) ou de anisol (para Ac-Hb₅₀₋₅₃-PAM e Ac-CCK₁₈₋₂₁-PAM) foram colocados em um frasco conectado a um sistema de teflon mantido sob alto vácuo. Após resfriamento deste frasco a -70 °C, foram transferidos para ele 10 mL de HF condensados. A reação foi deixada a ocorrer a 4 °C por 60 (ou 120 min quando o grupo Tos foi usado como protetor do grupo amino da cadeia lateral). Após este período, o HF foi removido para um "trap" de CaCO₃ com auxílio de uma bomba de vácuo na saída do sistema. Eliminado totalmente o ácido, o peptídeo livre totalmente desprotegido foi precipitado com éter diisopropílico gelado, extraído com misturas ACN/0,09% TFA/H₂O, liofilizado e pesado.

Estratégia Fmoc/But (ATHERTON; SHEPPARD, 1989, MIRANDA et al., 1993): aproximadamente 10 mg de peptidil-resina foram suspensas em 100 µL da mistura 82,5 TFA: 5,0 H₂O: 5,0 fenol: 5,0 tioanisol: 2,5 EDT (v/v/v/v/v; para todos os fragmentos da CCK) ou 94,0 TFA: 2,5 H₂O: 2,5 EDT: 1,0 TIS (v/v/v/v para o modelo Gly-Cys-Phe-NH₂). A suspensão foi deixada a reagir por 6 h, sob agitação, em um shaker a 37 °C. Terminada a reação, 800 µL de éter diisopropílico gelado foram adicionados ao meio reacional para precipitar o peptídeo. A suspensão foi centrifugada a 5000 rpm por 3 min e o sobrenadante (fase etérea) foi removido. Este procedimento foi repetido por 4 vezes. O precipitado foi seco por passagem de N₂ e, em seguida, submetido à extração do peptídeo usando a solução ACN/0,09%TFA/H₂O adequada. A solução de extração foi liofilizada para fornecer o peptídeo seco, que foi pesado.

3.10. Caracterização dos peptídeos brutos: RP-HPLC

As análises dos peptídeos brutos e purificados (MANT; HODGES, 1991; REMUZGO et al., 2009) foram realizadas usando um sistema da LDC Analytical

composto por um controlador de gradiente automático, duas bombas (ConstaMetric 3500 e ConstaMetric 3200), um detector UV (Milton Roy, spectromonitor 3100), um injetor de amostras manual (Rheodyne 7125), um integrador (TermoSeparation Products, Data Jet integrator) e uma coluna analítica (Vydac C₁₈, 5 µm, 300 Å, 0,46 x 25 cm).

3.11. Caracterização dos peptídeos brutos: LC/ESI-MS

Os peptídeos sintetizados foram solubilizados no solvente mais adequado (ACN/0,09%TFA/H₂O ou 0,1%TFA/H₂O) de modo a gerar uma solução de concentração 1 mg/mL. Cerca de 10 µL destas soluções foram injetadas em um sistema de RP-HPLC da Shimadzu composto por duas bombas Shimadzu LC-10AD, um detector Shimadzu SDP-10AV, um injetor Rheodyne 7125 e coluna acoplado a um espectrômetro de massas multi-usuário de nosso Departamento do tipo triplo quadrupolo, modelo Quattro II da Micromass com fonte de ionização por electrospray (ESI-MS) (REMUZGO et al., 2009).

Para as análises dos espectros obtidos foi utilizado o software MassLynx™ para Windows NT. Os solventes utilizados no LC, assim como as voltagens de ionização, foram ajustados caso a caso.

3.12. Caracterização dos peptídeos brutos: EC

As análises foram realizadas com o auxílio do Dr. Nilson Antônio de Assunção, então pós-doutorando do Departamento de Bioquímica do IQ-USP sob supervisão do Prof. Dr. Etelvino J. H. Bechara. Capilares revestidos por PVA foram utilizados nas análises. Os eletrólitos utilizados foram éter coroa 6 mM/TRIS 18 mM, pH 2,7 titulado com ácido cítrico (SOUZA et al., 2004). As amostras foram injetadas no equipamento P/ACE System 5510 da Beckman pelo método hidrodinâmico por 3 s, sendo que na extremidade posterior à amostra do capilar fez-se vácuo por um período de tempo estabelecido e a solução foi aspirada. A detecção foi feita em 214 nm. A temperatura foi mantida a 25 °C na condição de separação otimizada. As condições analíticas testadas estão descritas em Resultados e Discussão.

3.13. Redução de Ac-Glic₁₂₋₁₅ bruto com DTT

A massa de 0,5 mg do peptídeo foi colocada em 500 µL de uma solução 0,1% TFA/H₂O contendo DTT num excesso de 5 vezes em relação ao grupo tiol (WADA et al., 2001). A mistura foi incubada em um banho de água a 80 °C por 6 h. A cada hora foi retirada uma alíquota da mesma, que foi analisada por RP-HPLC. Alíquotas da reação-controle, DTT em 0,1% TFA/H₂O, também foram analisadas para que os subprodutos gerados em decorrência do aquecimento do DTT fossem identificados posteriormente por LC/ESI-MS.

3.14. Purificação dos peptídeos

Os peptídeos brutos (10-50 mg) foram purificados usando sistema de RP-HPLC Waters (EUA), modelo 600E preparativo, composto de uma bomba quaternária (Waters Delta 600 Pump), um detector UV (Waters 2487 Dual Absorbance Detector), um injetor de amostras manual (Rheodyne 3725i-119), um controlador de gradiente automatizado (Waters 600 Controller), um registrador Kipp & Zonen SE 124 e uma coluna preparativa (Vydac C₁₈, 10 µm, 300 Å, 2,2 x 25 cm).

Quando a quantidade de peptídeo bruto a ser purificado era muito pequena (< 10 mg) a purificação foi realizada em escala analítica, utilizando o equipamento descrito em 3.10. e uma coluna Vydac C₁₈ analítica (0,46 x 25 cm, 5 µm, 300 Å).

Foram utilizadas as seguintes condições: solvente A= 0,1%TFA/H₂O, solvente B= ACN/0,09% TFA/H₂O, gradiente linear= 5% a 95% B em 30 min, fluxos= 1,0 mL/min (condição analítica) ou 9,0 mL/min (condição preparativa) e λ= 210 nm.

3.15. Estimativa relativa da extensão de enantiomerização dos aminoácidos durante a SPFS

a) por RP-HPLC a partir dos peptídeos íntegros

Um volume de 10 μ L de uma solução 1 mg/mL de cada peptídeo bruto foi injetado em coluna analítica. As áreas dos picos do cromatograma obtido correspondentes a cada um dos isômeros esperados foram somadas e a esta somatória foi atribuído o valor de 100%. A área do pico correspondente a cada um dos isômeros esperados foi dividida pela área total para determinar a que porcentagem do total ela correspondia. Quando não foi possível separar todos os conteúdos no peptídeo bruto, foi feita uma somatória das áreas dos picos correspondentes aos isômeros que não o peptídeo-L desejado e a ela foi relacionada a área do mesmo.

b) por GC-MS a partir do peptídeo totalmente hidrolisado (KEMP, 1979; GERHARDT; NICHOLSON, 1994)

Tal estimativa foi feita pelo Dr. Juergen Gerhardt no C.A.T. GmbH & Co Chromatographie und Analysentechnik, Alemanha. Resumidamente, a peptidil-resina (1 mg; em triplicatas) foi submetida à hidrólise total em DCI/D₂O 6 M por 8-24 h a 110 °C. De posse do hidrolisado total, a solução de hidrólise foi removida por um jato de nitrogênio e os aminoácidos foram esterificados na presença de 4 M de DCI/MeOH a 110 °C por 15 min. A mistura foi resfriada e evaporada por passagem de um jato de N₂. O resíduo foi dissolvido em TFA/DCM (1:9) e a solução foi aquecida por 10 min a 130-140 °C. Após resfriamento, o excesso de reagente foi removido por passagem de N₂ gasoso, fornecendo o resíduo final para análise. As condições analíticas empregadas foram: gás de arraste= H₂; fluxo= 1,5 mL/min, temperaturas= 190 °C (injetor), 65 °C isoterma por 3 min e 4 °C/min até 190 °C (forno). Os aminoácidos foram identificados através de seus tempos de retenção e espectros de massas.

Para a análise de His, cloroformato butílico ou isopropílico foi adicionado à amostra e a mistura foi aquecida a 100 °C por 10 min. Novamente, o excesso de reagente foi removido através de um jato de N₂. De posse do resíduo final, o mesmo foi

dissolvido em tolueno e analisado por CG acoplado a um espectrômetro de massas. A coluna utilizada na separação por CG foi a Chirasil-Val.

Para cada aminoácido, foi monitorado e identificado um íon característico contendo próton (mas não deutério) no carbono assimétrico, o qual funciona como um padrão. A porcentagem de pureza óptica foi determinada de acordo com a equação: % D = $(\text{Área D} / (\text{Área D} + \text{Área L})) * 100$.

3.16. Tentativas de condensação entre os fragmentos a 60 °C (escala analítica)

As reações sob aquecimento convencional foram permitidas a ocorrer em um frasco jaquetado para circulação de água aquecida no banho termostatzado da Polyscience, modelo 8001. As assistidas por micro-ondas foram feitas em frasco de vidro colocado no frasco que acompanha o forno DiscoverTM (CEM Corporation, Charlotte/ NC, EUA).

A peptidil-resina que serviria como aceptor de acila na condensação entre fragmentos teve o Fmoc (protetor de grupamento amino) removido após exposição à uma solução 20% piperidina/DMF por 5 min a 60 °C (aquecimento convencional ou micro-ondas). Após lavagem segundo a **Tabela 2**, a mesma foi seca. À ela (0,86 µmol) foram adicionados o fragmento doador de acila (1,72 µmol), o reagente acoplador (1,72 µmol), 500 µL de solvente e DIPEA até pH aparente 9-10. Algumas reações também foram realizadas partindo-se de 7,4 µmol da peptidil-resina aceptor de acila, 14,8 µmol do fragmento doador de acila, 14,8 µmol de reagente acoplador, 1,0 mL de solvente e DIPEA até pH aparente 9-10.

Os detalhes relativos à cada uma das condições experimentais empregadas estão apresentados em Resultados e Discussão, item **4.4**. As reações eram interrompidas no tempo desejado por escoamento do meio reacional, lavagem da peptidil-resina aceptor de acila e seu teste de ninidrina (KAISER et al., 1970).

3.17. Determinação do inchamento da resina MBHA em misturas binárias NMP/tolueno a 60 °C

Aproximadamente 200 mg da resina MBHA foram transferidas para um frasco graduado e jaquetado para circulação de água a 60 °C. A resina foi lavada com 5 mL de MeOH por 5 vezes. Drenado o MeOH, o volume ocupado pela resina foi medido por simples leitura na escala do frasco (V_{inicial}). Em seguida, a resina foi lavada com DMSO, NMP ou misturas binárias deles (contendo de 10-90% de DMSO em NMP) por 3 vezes. Na 4ª lavagem, a resina foi deixada inchar por 15 min, após os quais o solvente foi drenado. O novo volume ocupado pela resina foi anotado (V_{final}). O procedimento foi feito em triplicata. As diferenças entre os V_{final} e os V_{inicial} forneceram os volumes de inchamento médios (VARANDA; MIRANDA, 1997).

3.18. Espectroscopia Near infrared-Fourier transformed (NIR-FT) Raman

Os espectros foram coletados pelo doutorando Diego P. dos Santos, orientado da Profa. Dra. Márcia L. A. Temperini do Departamento de Química Fundamental do IQ-USP, a partir dos grãos secos das peptidil-resinas em um espectrômetro Raman RFS 100/S da Bruker Optics Inc. equipado com um detector de germânio refrigerado com nitrogênio líquido. Como fonte excitante foi utilizado um laser Nd/YAG com 1064 nm com uma saída máxima de 200 mW. A configuração do espalhamento do laser foi de 180° (back scattering) e a resolução do espectro foi de 4 cm⁻¹. Foram realizadas um total de 512 acumulações com ganho de 16 por amostra. Os espectros foram analisados com o software GRAMS AI da Thermo Galactic Corporation.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo da enantiomerização nas SPFS passo a passo a 60 °C (LOFFREDO et al., 2009; LOFFREDO et al., no prelo)

Para viabilizar este estudo selecionamos como modelos quatro peptídeos pequenos (tri- e tetrapeptídeos) que contivessem os aminoácidos mais susceptíveis à enantiomerização dentre os vinte usuais contidos nos peptídeos biologicamente ativos (Ser, His e Cys, BENOITON, 2005). Os modelos deveriam ser pequenos para que poucos diastereoisômeros pudessem ser formados durante suas SPFS (o número de isômeros formados é igual a 2^n , onde n é o número de carbonos quirais, BRUICE, 2006). Assim sendo, escolhemos: Gly-Cys-Phe-NH₂ (HAN et al., 1997) e Ac-Ala-Cys-Pro-Lys-OH (fragmento acetilado 12-15 da glicoproteína gp120 do vírus HIV-1; **Ac-Glic₁₂₋₁₅**), peptídeos que contém o aminoácido Cys, Ac-Pro-Ser-His-Arg-OH (fragmento acetilado 18-21 da colecistocinina; **Ac-CCK₁₈₋₂₁**) e Ac-His-Gly-Ser-Ala-OH (fragmento acetilado 50-53 da cadeia α da hemoglobina bovina; **Ac-Hb₅₀₋₅₃**) que contém His e Ser. Além disso, selecionamos Asp-Arg-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (fragmento 24-33 não sulfatado da colecistocinina; **CCK₂₄₋₃₃**), peptídeo maior que contém aminoácidos que poderiam favorecer as seguintes reações secundárias: a formação de lactamas durante a etapa de ativação da Arg (MACHADO et al., 2003), oxidação de Met (BECK; JUNG, 1994) e Trp (JIAMBO et al., 1997) durante a SPFS ou na etapa de clivagem do peptídeo da resina, além da formação de aspartimida durante a remoção do grupo Fmoc do Asp (TAM et al., 1988).

Os peptídeos-modelo foram sintetizados manualmente empregando as três abordagens sintéticas: SPFS convencional (à temperatura ambiente), SPFS a 60 °C usando aquecimento convencional e SPFS a 60 °C usando aquecimento por micro-ondas. Os dados de ganho de massa obtidos e de recuperação do peptídeo bruto a partir da

peptidil-resina estão descritos na **Tabela 4**. Todos os possíveis isômeros dos modelos estudados também foram sintetizados manualmente pelo método convencional, pois eles atuariam como padrões para a identificação dos isômeros formados durante as diferentes sínteses. A **Figura 15** mostra os perfis de LC/ESI-MS de todos os isômeros sintetizados.

Tabela 4. Dados de síntese e da etapa de clivagem do peptídeo da resina/desproteção total

Peptídeo	Tipo de SPFS	Massa de resina (mg)	Massa de peptidil-resina (mg)	Recuperação do peptídeo da resina
Ac-Glic ₁₂₋₁₅	convencional ^a	757,19	744,52	0,24
	a 60 °C- aq. conv. ^b	751,66	742,20	0,14
	a 60 °C - aq. mic. ^b	101,12	90,02	0,18
Ac-CCK ₁₈₋₂₁	convencional ^a	509,22	534,00	0,29
	a 60 °C - aq. conv. ^b	513,54	613,81	0,31
	a 60 °C - aq. mic. ^b	202,03	259,98	0,27
Ac-Hb ₅₀₋₅₃	convencional ^a	1003,2	1247,42	0,42
	a 60 °C - aq. conv. ^b	504,78	491,53	0,33
	a 60 °C - aq. mic. ^b	104,58	138,12	0,21
Gly-Cys-Phe-NH ₂	convencional ^a	101,38	88,29	0,23
	a 60 °C - aq. conv. ^b	100,74	106,37	0,20
	a 60 °C - aq. mic. ^b	102,80	87,87	0,16
	a 60 °C - aq. mic. ^c	152,28	154,62	0,15
	a 60 °C - aq. mic. ^d	151,94	160,29	0,15
	a 60 °C - aq. mic. ^e	151,18	160,24	0,15
CCK ₂₄₋₃₃ NS	convencional ^a	200,10	308,21	0,24
	a 60 °C - aq. conv. ^b	201,51	277,92	0,24
	a 60 °C - aq. mic. ^b	252,03	362,1	0,26

Solvente: ^a DCM ou DMF; ^b 25% DMSO/tolueno; ^c DMF; ^d 20% DMSO/NMP; ^e NMP. Recuperação =

$m_{\text{peptídeo bruto}} / m_{\text{peptidil-resina}}$

Abs (%)

Abs (%)

**Espectro de
Massas de E** **Espectro de
Massas de F** **Espectro de
Massas de G** **Espectro de
Massas de H**

Figura 15. Perfis de LC/ESI-MS dos isômeros padrões: Gly-D-Cys-Phe-NH₂ (A), Ac-D-Ala-Cys-Pro-Lys-OH (B), Ac-Ala-D-Cys-Pro-Lys-OH (C), Ac-D-Ala-D-Cys-Pro-Lys-OH (D), Ac-Pro-D-Ser-His-Arg-OH (E), Ac-Pro-Ser-D-His-Arg-OH (F), Ac-Pro-D-Ser-D-His-Arg-OH (G), Ac-His-Gly-D-Ser-Ala-OH (H), Ac-D-His-Gly-Ser-Ala-OH (I), Ac-D-His-Gly-D-Ser-Ala-OH (J). Condições de RP-HPLC: Coluna Vydac C₁₈, solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 10% ACN/0,09% TFA/H₂O ou 60% ACN/0,09% TFA/H₂O (Gly-D-Cys-Phe-NH₂), λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear : 5% -95% B em 30 min, v: 10 μ L. Condições de ESI: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. A: [M+H]⁺ 325,5 g/mol; B: [M+H]⁺ 459,57 g/mol; C: [M+H]⁺ 459,57 g/mol; D: [M+H]⁺ 459,57 g/mol; E: [M+H]⁺ 537,3 g/mol; F: [M+H]⁺ 537,3 g/mol; G: [M+H]⁺ 537,3 g/mol; H: 413,41 g/mol; I: 413,41 g/mol; J: 413,41 g/mol.

Gly-Cys-Phe-NH₂ (HAN et al., 1997)

As análises de aminoácidos dos hidrolisados das peptidil-resinas obtidas forneceram os seguintes resultados: SPFS convencional (esperado/obtido): Gly (1,0/1,0),

Cys* (1,0/0,5), Phe (1,0/0,9); SPFS a 60 °C- aquecimento convencional: Gly (1,0/1,0), Cys* (1,0/0,5), Phe (1,0/0,9) e SPFS a 60 °C-aquecimento por micro-ondas: Gly (1,0/1,0), Cys* (1,0/0,5), Phe (1,0/0,9), sendo que a Cys e Phe são parcialmente degradadas durante o processo de hidrólise (DARRAGH et al., 1996). Portanto, eles condizem com os valores esperados. A **Figura 16** mostra os perfis de RP-HPLC dos três brutos obtidos.

Figura 16. Perfis de RP-HPLC obtidos das análises dos Gly-Cys-Phe-NH₂ brutos resultantes da SPFS convencional (A), da SPFS a 60 °C- aquecimento convencional (B) e da SPFS a 60 °C- aquecimento micro-ondas (C). Condições de RP-HPLC: Coluna Vydac C₁₈, solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear : 5% -95% B em 30 min, V: 10 μ L.

As análises dos peptídeos brutos por LC/ESI-MS (**Figuras 17, 18, 19**) nos permitiram identificar os compostos formados durante as três sínteses. A saber: peptídeo desejado (pico 1), análogo contendo uma Phe adicional (Gly-Cys-Phe-Phe-NH₂; pico 2) e um isômero do peptídeo desejado (pico 3).

Figura 17. Resultados da análise por LC/ESI-MS do Gly-Cys-Phe-NH₂ bruto resultante da SPFS convencional. Condições de RP-HPLC: injeção: 10 µL, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5%-95% B em 30 min. Condições de ESI: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componentes 1: peptídeo desejado [M+H]⁺ 325,5 g/mol; 2: Gly-Cys-Phe-Phe-NH₂ [M+H]⁺ 470,19 g/mol.

Figura 18. Resultados da análise por LC/ESI-MS do Gly-Cys-Phe-NH₂ bruto resultante da SPFS a 60 °C- aq. convencional. Condições de RP-HPLC: injeção: 10 µL, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210 nm, fluxo:1,0 mL/min e gradiente linear: 5%-95% B em 30 min. Condições de ESI: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componentes 1: peptídeo desejado [M+H]⁺ 325,5 g/mol; 2: Gly-Cys-Phe-Phe-NH₂ [M+H]⁺ 470,19 g/mol; 3: isômero do peptídeo desejado [M+H]⁺ 325,5 g/mol.

Figura 19. Resultados da análise por LC/ESI-MS do Gly-Cys-Phe-NH₂ bruto resultante da SPFS a 60 °C- aq. micro-ondas. Condições de RP-HPLC: injeção: 10 µL, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210 nm, fluxo:1,0 mL/min e gradiente linear: 5%-95% B em 30 min. Condições de ESI: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componentes 1: peptídeo desejado [M+H]⁺ 325,5 g/mol; 2: Gly-Cys-Phe-Phe-NH₂ [M+H]⁺ 470,19 g/mol; 3: isômero do peptídeo desejado [M+H]⁺ 325,5 g/mol.

Sabendo que o componente 3 correspondia a um isômero do peptídeo desejado, restava-nos identificá-lo. Tendo em mãos os isômeros Gly-Cys-D-Phe-NH₂, Gly-D-Cys-Phe-NH₂ e Gly-D-Cys-D-Phe-NH₂ (**Figura 15**), realizamos o experimento de “spiking” utilizando Gly-D-Cys-Phe-NH₂ (LDL) e o peptídeo bruto proveniente da SPFS a 60 °C-aquecimento convencional, cujos resultados estão descritos na **Figura 20**.

Figura 20. Experimento de coeluição do peptídeo Gly-Cys-Phe-NH₂ (LLL) obtido por SPFS a 60 °C- aq. convencional (A) com o isômero Gly-D-Cys-Phe-NH₂ (LDL; B); perfil resultante da coeluição de A + B (C). Condições de RP-HPLC: Coluna Vydac C₁₈, solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5% -95% B em 30 min. * Refere-se ao análogo Gly-Cys-Phe-Phe-NH₂.

Ficou evidente que o isômero presente nos brutos resultantes das SPFS a 60 °C usando aquecimento convencional e por micro-ondas (pico 3 das **Figuras 16 B e 16 C**), era justamente aquele com inversão do centro estereogênico na cisteína (LDL). Como a condição analítica permitia a total separação do peptídeo LLL, dos seus possíveis isômeros e a absorvidade molar (ϵ) de isômeros é idêntica, foi possível calcular a

extensão da enantiomerização da Cys nos brutos resultantes das três abordagens de SPFS através da relação entre as áreas dos picos dos cromatogramas obtidos (**Tabela 5**). Como podemos notar, não houve enantiomerização da Cys em extensão detectável por RP-HPLC na SPFS convencional, o que não ocorreu com as abordagens a 60 °C, particularmente quando as micro-ondas foram usadas.

Tabela 5. Extensão da enantiomerização ocorrida durante as SPFS de Gly-Cys-Phe-NH₂

Abordagem de SPFS	peptídeo-D-Cys/ peptídeo-L ^a
	(%)
convencional	0 ^b
a 60 °C- aquecimento convencional	0,8 ^b
a 60 °C- aquecimento micro-ondas	3,6 ^b

^a Calculado a partir das áreas dos picos presentes nos perfis de RP-HPLC obtidos dos peptídeos intactos. ^b Somente o epímero D-Cys foi considerado para o cálculo.

Resultados similares foram descritos por Palasek e colaboradores, que estudaram o acoplamento de Fmoc-aminoácidos à peptidil-resina em crescimento mediado por micro-ondas a 50 e 80 °C empregando diferentes reagentes acopladores. Os autores verificaram que o uso de HBTU/DIPEA em DMF a 80 °C e micro-ondas resultou em porcentagens elevadas de enantiomerização: [9,6% (D-Asp), 4,5% (D-Cys) e 9,4% (D-His)] e que tais porcentagens foram significativamente reduzidas a 50 °C ou à temperatura ambiente ou quando uma base estericamente impedida como a colidina (2,4,6-trimetil piridina) foi utilizada em substituição à DIPEA (PALASEK et al., 2007). Por outro lado, eles também relataram que tal substituição levou à redução da eficiência do acoplamento. De forma similar, Bacsa e colaboradores verificaram que os acoplamentos a 86 °C assistidos por micro-ondas e empregando DIC/HOBt como reagentes acopladores e NMP como solvente resultaram em porcentagens significativas de enantiomerização das His e Cys durante a SPFS do peptídeo Cys(Trt)-Gly-Ile-Gly-Lys(Boc)-Phe-Leu-His(Trt)-Gly-Ala-

Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-Gly-Lys(Boc)-Ala-Phe-Val-Gly-Glu(OBut)-Ile-Met-Asn(Trt)-Ser(But)-NH₂ (7% e 2%, respectivamente). Como valores próximos foram obtidos mesmo quando as SPFS foram realizadas a 86 °C empregando o aquecimento convencional, os autores concluíram que os acoplamentos envolvendo Fmoc-Cys(Trt)-OH e a peptidil-resina em crescimento devem ser feitos segundo sugestão de Palasek e colaboradores (BACSA et al., 2008).

É importante observar que: 1) apesar de a utilização de micro-ondas ter intensificado a enantiomerização da Cys, nas nossas condições experimentais a porcentagem encontrada 3,6% é ainda considerada baixa (< 5%). Além disso, a abordagem que emprega o aquecimento convencional, sob nossas condições experimentais, levou à enantiomerização em extensão negligenciável;

Sabíamos que a mistura 25% DMSO/tolueno permite a solubilização de todos os derivados de aminoácidos e reagentes acopladores usados na SPFS, é quimicamente estável a 60 °C, apresenta taxa de evaporação praticamente negligenciável nesta temperatura e, provavelmente por conter DMSO, se mostrou adequada à minimização da agregação peptídica durante a síntese do ACP₆₅₋₇₄ (VARANDA; MIRANDA, 1997). Por outro lado, constatamos que a mistura 25% DMSO/tolueno favoreceu a oxidação da cadeia lateral da Met a sulfóxido (REMUZGO, 2003; LOFFREDO, 2009) e a enantiomerização da Cys. Assim, sintetizamos o modelo Gly-Cys-Phe-NH₂, utilizando os seguintes solventes/misturas de solventes: DMF [solvente mais empregado em SPFS sob irradiação de micro-ondas, (MURRAY et al., 2007)], 20% DMSO/NMP [solvente usado com sucesso para a formação de ligações lactama a 60 °C usando aquecimento convencional; MACHADO et al., 2003], 25% NMP/tolueno e NMP. Os protocolos de síntese utilizados foram os mesmos das SPFS assistidas por micro-ondas. As extensões da enantiomerização foram determinadas conforme já havia sido feito. Os resultados

obtidos (**Tabela 6**) revelaram que DMF e a mistura 20% DMSO/NMP mostraram-se mais adequadas ao acoplamento da Fmoc-L-Cys(Trt) à Phe-resina Rink amida, uma vez que neles a porcentagem de enantiomerização da Cys foi consideravelmente menor.

Tabela 6. Influência do solvente na porcentagem de enantiomerização de Cys a 60 °C usando aquecimento por micro-ondas.

Solvente	peptídeo-D-Cys / peptídeo-L (%)
DMF	1,4
20% DMSO/NMP	1,8
25% NMP/tolueno	2,8
25% DMSO/tolueno	3,6
NMP	9,2

Diante de todos estes resultados, recomendamos que o acoplamento de Fmoc-L-Cys(Trt)-OH à resina ou peptidil-resina em crescimento possa ser feito a 60 °C usando aquecimento convencional, nas nossas condições usando aquecimento por micro-ondas e DMF ou 20% DMSO/NMP, pois a temperatura alta agiliza o processo sem comprometer a integridade quiral do produto.

Ac-Glic₁₂₋₁₅: Ac-Ala-Cys-Pro-Lys-OH

Os resultados obtidos das análises de aminoácidos dos hidrolisados das peptidil-resinas foram: SPFS convencional (esperado/obtido): Ala (1,0/1,0), Cys* (1,0/0,4), Pro (1,0/0,9), Lys (1,0/1,0); SPFS a 60 °C- aq. conv.: Ala (1,0/1,0), Cys* (1,0/0,4), Pro (1,0/0,9), Lys (1,0/1,0) e SPFS a 60 °C- aq. mic.: Ala (1,0/1,0), Cys* (1,0/0,4), Pro (1,0/0,9), Lys (1,0/1,0), sendo que a Cys é parcialmente degradada na condição de hidrólise utilizada (DARRAGH et al., 1996). Portanto, os conteúdos de aminoácidos

calculados a partir deles para as três peptidil-resinas Ac-Glic₁₂₋₁₅-PAM sintetizadas estão de acordo com os esperados.

Os dados de RP-HPLC (**Figura 21**) e de LC/ESI-MS obtidos para os peptídeos brutos (**Figuras 22, 23, 24**) revelaram que: i) a SPFS a 60 °C não intensificou nenhuma reação secundária esperada para a sequência peptídica em questão, como a inserção de uma Gly adicional à sequência; ii) os subprodutos detectados eram diastereoisômeros do peptídeo desejado (pico 2 da **Figura 23**: forma monomérica; pico 3: forma dimérica, resultante da formação de ponte dissulfeto intermolecular).

Figura 21. Perfis de RP-HPLC obtidos das análises dos Ac-Glic₁₂₋₁₅ brutos resultantes da SPFS convencional (A), da SPFS a 60 °C- aquecimento convencional (B) e da SPFS a 60 °C- aquecimento micro-ondas (C). Condições de RP-HPLC: Coluna Vydac C₁₈, solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 10% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear : 5% -95% B em 30 min, V: 10 μ L.

Figura 22. Resultados da análise por LC/ESI-MS do Ac-Glic₁₂₋₁₅ bruto resultante da SPFS convencional. Condições de RP-HPLC: injeção: 10 μ L, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 10% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5%-95% B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componentes 1: peptídeo desejado [M+H]⁺ 459,57 g/mol; 2: peptídeo desejado [M+H]⁺ 459,57 g/mol; 3: dímero do peptídeo desejado.

Figura 23. Resultados da análise por LC/ESI-MS do Ac-Glic₁₂₋₁₅ bruto resultante da SPFS a 60 °C -aq. convencional. Condições de RP-HPLC: injeção: 10 µL, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 10% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5% -95% B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componentes 1: peptídeo desejado [M+H]⁺ 459,57 g/mol; 2: peptídeo desejado [M+H]⁺ 459,57 g/mol; 3: dímero do peptídeo desejado.

Figura 24. Resultados da análise por LC/ESI-MS do Ac-Glic₁₂₋₁₅ bruto resultante da SPFS a 60 °C- aq. micro-ondas. Condições de RP-HPLC: injeção: 10 µL, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 10% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5% -95% B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componentes 1: peptídeo desejado [M+H]⁺ 459,57 g/mol; 2: peptídeo desejado [M+H]⁺ 459,57 g/mol; 3: dímero do peptídeo desejado.

Como a presença de dímeros no material bruto nos impossibilitaria determinar a verdadeira extensão da enantiomerização, tivemos que, primeiramente, reduzir os dímeros às formas monoméricas (na presença de DTT, item 3.13 de Materiais e Métodos) para que estas fossem identificadas através dos experimentos de coeluição em RP-HPLC com os peptídeos padrões. A **Figura 25** apresenta os perfis cromatográficos obtidos durante a redução do peptídeo bruto resultante da SPFS convencional.

Figura 25. Perfis de RP-HPLC obtidos durante o monitoramento da redução de Ac-Glic₁₂₋₁₅ resultante da SPFS convencional. A: antes da adição do DTT; B: após 6 h de redução. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 10% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5% -95% B em 30 min.

Concluída a redução e de posse dos isômeros padrões [D-Ala¹²] Ac-Glic₁₂₋₁₅, [D-Cys¹³] Ac-Glic₁₂₋₁₅ e [D-Ala¹²,D-Cys¹³] Ac-Glic₁₂₋₁₅ (**Figura 15**) foi realizado um experimento de “spiking” (**Figura 26**) em que os diastereoisômeros foram adicionados sequencialmente ao peptídeo bruto reduzido.

Figura 26. Experimento de coeluição em RP-HPLC do Ac-Glic₁₂₋₁₅ resultante da SPFS a 60°C- aquecimento convencional (A). B: com os estereoisômeros [D-Ala¹²] Ac-Glic₁₂₋₁₅. C: [D-Ala¹²] Ac-Glic₁₂₋₁₅ e [D-Cys¹³] Ac-Glic₁₂₋₁₅. D: [D-Ala¹²] Ac-Glic₁₂₋₁₅, [D-Cys¹³] Ac-Glic₁₂₋₁₅ e [D-Ala¹², D-Cys¹³] Ac-Glic₁₂₋₁₅. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 10% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5%-95% B em 30 min.

Com isso, foi possível constatar que os peptídeos brutos continham o isômero LLLL desejado e [D-Cys¹³] Ac-Glic₁₂₋₁₅ (t_R = 18,35 min) e [D-Ala¹²] Ac-Glic₁₂₋₁₅ (t_R = 19,30 min), ou seja, ocorreu inversão parcial de configuração durante a incorporação da Ala e da Cys à tripeptidil-resina e dipeptidil-resina, respectivamente, tendo ocorrido em maior extensão durante o acoplamento da última.

Uma vez que não foi possível separá-los totalmente do peptídeo-L e que a absorvidade molar (ϵ) de diastereoisômeros é a mesma, as razões peptídeo-D

(diastereoisômeros contaminantes)/peptídeo-L (isômero desejado) foram determinadas a partir das relações entre as áreas dos picos correspondentes dos cromatogramas obtidos nas três abordagens de síntese (**Figura 27**). Eles estão descritos na **Tabela 7**.

Figura 27. Perfis de RP-HPLC obtidos das análises dos Ac-Glic₁₂₋₁₅ reduzidos. **A:** SPFS convencional. **B:** SPFS a 60 °C- aq. convencional. **C:** SPFS a 60°C- aq. micro-ondas. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 10% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5% -95% B em 30 min.

Tabela 7. Extensão da enantiomerização ocorrida durante as SPPS de Ac-Glic₁₂₋₁₅

Abordagem de SPPS	peptídeo-D/peptídeo-L ^a
	(%)
convencional	16,0
a 60 °C- aq. convencional	12,0
a 60 °C- aq. micro-ondas	25,0

^aD-peptídeo se refere a soma dos epímeros D-Cys-peptídeo e D-Ala-peptídeo.

Conforme se pode notar, nas nossas condições reacionais, a SPFS a 60 °C- aquecimento convencional, não levou à intensificação da enantiomerização da Cys e Ala em relação à abordagem convencional. Por outro lado, a SPFS a 60 °C- aquecimento micro-ondas o fez. Sendo assim, em virtude dos resultados obtidos e dos dados da literatura (SOUZA et al., 2004; PALASEK et al., 2007; BACSA et al., 2008), confirmamos que as nossas condições experimentais de SPFS a 60 °C usando aquecimento convencional pode também ser considerada uma alternativa ágil para tal proposta.

Ac-CCK₁₈₋₂₁: Ac-Pro-Ser-His-Arg-OH

Os resultados obtidos a partir das análises de aminoácidos dos hidrolisados das peptidil-resinas foram: SPFS convencional (esperado/observado): His (1,0/1,0), Pro (1,0/1,0), Arg (1,0/0,9), Ser (1,0/0,3); SPFS a 60 °C- aquecimento convencional: His (1,0/1,0), Pro (1,0/0,9), Arg (1,0/1,0), Ser (1,0/0,5) e SPFS a 60 °C- aquecimento microondas: His (1,0/1,0), Pro (1,0/1,0), Arg (1,0/1,0), Ser (1,0/0,5); sendo que a Ser é parcialmente degradada na condição de hidrólise utilizada (DARRAGH et al., 1996). Portanto, os conteúdos de aminoácidos encontrados condizem com os valores esperados.

Os perfis cromatográficos resultantes das análises dos brutos obtidos das SPFS convencional, a 60 °C- aquecimento convencional e a 60 °C- aquecimento micro-ondas são muito semelhantes (**Figura 28**), sendo que o pico majoritário de cada um deles é assimétrico, sugerindo a presença de mais de um composto de mesmo comportamento cromatográfico.

De fato, as análises por LC/ESI-MS (**Figuras 29, 30, 31**) demonstraram que diastereoisômeros foram formados durante as sínteses.

Figura 28. Perfis de RP-HPLC obtidos das análises dos Ac-CCK₁₈₋₂₁ brutos resultantes da SPFS convencional (A), da SPFS a 60 °C- aquecimento convencional (B) e da SPFS a 60 °C- aquecimento micro-ondas (C). Condições de RP-HPLC: Coluna Vydac C₁₈, solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 10% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear : 5% -95% B em 30 min, V: 10 μ L.

Na tentativa de separar tais isômeros para quantificá-los, utilizamos as colunas que fase reversa que dispúnhamos em nosso laboratório (**Tabela 8**). Além disso, o uso de fases móveis contendo porcentagens variadas de ACN, alterações nos gradientes e troca do par iônico (MANT; HODGES, 1991) também foram ineficazes.

Tendo conhecimento que a técnica de EC vem sendo aplicada com sucesso na separação de diastereoisômeros de peptídeos utilizando seletos quirais (WAN; BLOMBERG, 2000), tais como: ciclodextrinas (GUO et al., 2003), éteres-coroa (CONRAD et al., 2005) e antibióticos macrocíclicos (SCRIBA, 2003), resolvemos utilizá-la na tentativa de separação os diastereoisômeros contidos nos peptídeos brutos em estudo.

Figura 29. Resultados da análise por LC/ESI-MS do Ac-CCK₁₈₋₂₁ bruto resultante da SPFS convencional. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 10% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5% -95% B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componente 1: peptídeo desejado $[M+H]^+$ 537,3 g/mol; $[M+2H]^+2$ 269,7 g/mol.

Figura 30. Resultados da análise por LC/ESI-MS do Ac-CCK₁₈₋₂₁ bruto resultante da SPFS a 60°C- aquecimento convencional. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 10% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5% -95% B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componente 1: peptídeo desejado $[M+H]^+$ 537,3 g/mol; $[M+2H]^+$ 269,7 g/mol.

Figura 31. Resultados da análise por LC/ESI-MS do Ac-CCK₁₈₋₂₁ bruto resultante da SPFS a 60 °C- aquecimento micro-ondas. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 10% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5% -95% B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componente 1: Ac-His-Arg $[M+H]^+$ 354,4 g/mol; 2: peptídeo desejado $[M+H]^+$ 538,3 g/mol; $[M+2H]^+2$ 269,7 g/mol; 3: Ac-Pro-Ser-His-His-Arg $[M+H]^+$ 675,7 g/mol.

Tabela 8. Condições de RP-HPLC usadas nas análises dos peptídeos Ac-CCK₁₈₋₂₁

Coluna Vydac	Solvente B	Gradiente ^a	Perfil /tempo _{Retenção} (min)
C ₁₈ , 5 µ, 300 Å	10% ACN/0,09% TFA/H ₂ O	5%-95% B	Pico assimétrico/ 14
C ₁₈ , 90 Å	10% ACN/0,09% TFA/H ₂ O	5%-95% B	Pico assimétrico/ 16
C ₁₈ , 100 Å	10% ACN/0,09% TFA/H ₂ O	5%-65% B	Picos mal resolvidos / 16
C ₁₈ , 100 Å	40% ACN/0,09% TFA/H ₂ O	5%-95% B	Pico assimétrico/ 9
C ₁₈ , 100 Å	20% ACN/0,09% TFA/H ₂ O	5%-95% B	Pico assimétrico/ 11
C ₁₈ , 100 Å	10% ACN/TEAP	5%-95% B	Picos mal resolvidos / 3-5
C ₁₈ , 100 Å	10% ACN/TEAP	5% B ^b	Picos mal resolvidos / 3-5
C ₄ , 300 Å	10% ACN/0,09% TFA/H ₂ O	5%-95% B	Picos mal resolvidos / 3-5
Cianopropilsilano	10% ACN/TEAP	5%-95% B	Picos mal resolvidos / 3-5

^a Gradiente de 30 min. ^b Modo isocrático. Solvente A: H₂O/0,1% TFA ou TEAP, fluxo: 1 mL/min, λ: 210 nm.

Inicialmente, utilizamos a condição anteriormente empregada em nosso laboratório (Tris 30 mM contendo 18C6H₄ 10 mM, pH ajustado para 2,0 com ácido cítrico 1,5 M), visto que ela permitiu a separação efetiva entre isômeros de peptídeos (SOUZA et al., 2004). Como esta não permitiu a separação desejada, testamos outras condições alterando a concentração do seletor quiral no eletrólito, a temperatura e a voltagem (**Tabela 9**). Em todas elas, foi utilizado o capilar de sílica revestido por PVA, uma vez que este minimiza a interação de peptídeos carregados positivamente ao capilar, como ocorre comumente nos capilares de sílica convencionais (ULLSTEN et al., 2004; ERNY et al., 2006). A condição 7 é a que permitiu a resolução entre os isômeros e, por isso ela foi usada para a análise comparativa dos três peptídeos brutos obtidos (**Figura 32**).

Tabela 9. Condições de EC empregadas nas análises dos Ac-CCK₁₈₋₂₁ brutos

Condição	[Tris] (mM)	[18C6H ₄] (mM)	Temperatura (°C)	Voltagem (kV)
1	30	10	25	25
2	30	10	20	15
3	24	6	25	20
4	18	6	25	25
5	18	6	25	15
6	18	6	25	30
7	18	6	25	20
8	18	6	15	20
9	18	6	20	20
10	18	6	10	20
11	12	6	25	20

Com exceção da primeira condição, o pH foi ajustado com solução de ácido cítrico 1,5 M até 2,7; λ : 214 nm; capilar revestido com PVA de diâmetro interno de 75 μ m; comprimento do capilar até o detector: 45 cm (55 cm total); injeção: 2 s a 0,5 psi, temperatura: 20 °C.

É possível observar que durante as diferentes sínteses não houve formação, em extensão detectável por EC, dos produtos de enantiomerização da Ser e His, visto que nenhum deles parece estar presente nos brutos resultantes das três sínteses. Como a mistura resultante da coeluição de Ac-CCK₁₈₋₂₁ resultante da SPFS a 60 °C- aquecimento convencional e do isômero [D-His²⁰] Ac-CCK₁₈₋₂₁ (**Figura 32 E**) não pôde ser totalmente resolvida e tendo conhecimento de que a quantificação da enantiomerização ocorrida durante as SPFS também poderia ser feita através da identificação dos aminoácidos constituintes dos peptídeos brutos obtido, decidimos estudar esta possibilidade. Ela envolveria a hidrólise ácida total dos mesmos seguida da derivatização dos aminoácidos resultantes e posterior separação/quantificação dos diastereoisômeros formados.

Figura 32. Eletroferogramas obtidos das análises do Ac-CCK₁₈₋₂₁ bruto resultante das SPFS convencional (A), SPFS a 60 °C- aquecimento convencional (B), SPFS a 60 °C- aquecimento micro-ondas (C) e resultante dos experimentos de coeluição entre B e o isômero [D-Ser¹⁹] Ac-CCK₁₈₋₂₁ (D) , [D-His²⁰] Ac-CCK₁₈₋₂₁ (E) ou [D-Ser¹⁹, D-His²⁰] Ac-CCK₁₈₋₂₁ (F). Condições da análise: capilar revestido com PVA de diâmetro interno de 75 µm; comprimento do capilar até o detector: 45 cm (55 cm total); 6 mM éter coroa, 18 mM TRIS, pH 2.7; voltagem: 20 kV, λ: 214 nm; injeção: 2 s a 0,5 psi, temperatura: 25 °C.

Como a própria hidrólise ácida pode favorecer a enantiomerização dos aminoácidos (GOODLETT et al., 1995), decidimos optar pela hidrólise total dos peptídeos brutos Ac-CCK₁₈₋₂₁ resultantes dos três tipos de SPFS, derivatização dos aminoácidos, separação quiral e identificação dos aminoácidos por GC-MS conforme descrito em

Materiais e Métodos, item 3.15 b. Diversos reagentes derivatizantes de aminoácidos têm sido empregados com este propósito, tais como: i) o FDNP-Ala-NH₂, "Reagente de Marfey" (ADAMSON et al., 1992); ii) o GITC (NISHI et al., 1990); iii) OPA e N-acetilcisteína (HOUBEN et al., 1993). O Dr. Juergen Gerhardt (C.A.T. GmbH & Co. Chromatographie und Analystechnik KG, Tübingen, Alemanha) usou 4 N de DCI/MeOH para nossos hidrolisados, tendo obtido os resultados listados na **Tabela 10**.

Tabela 10. Quantificação por GC-MS dos D-aminoácidos presentes nos hidrolisados totais dos Ac-CCK₁₈₋₂₁ brutos

Abordagem de SPFS	Conteúdo de D-aminoácido ^a (%)			
	Pro	Ser	His	Arg
convencional	< 0,1	<0,1	0,5	<0,1
a 60 °C- aquecimento convencional	< 0,1	0,2	0,8	<0,1
a 60 °C- aquecimento micro-ondas	< 0,1	0,4	0,9	0,2

^a Calculado a partir da equação % D= (Área D/ Área D + Área L) *100.

Pode-se verificar que a enantiomerização dos aminoácidos ocorreu em uma extensão praticamente negligenciável (< 1%) nas três SPFS realizadas, resultados estes que corroboram aqueles obtidos através dos experimentos de coeluição por EC com os isômeros padrões previamente sintetizados e analisados (**Figura 32**). Cabe ressaltar que, ainda que menor que 1%, dentre os quatro aminoácidos presentes no modelo em questão, a His foi o aminoácido que apresentou os maiores índices de enantiomerização. Conforme já discutido, este resultado corrobora a descrição de que a His é particularmente sensível à inversão de configuração durante as etapas de ativação e acoplamento, mesmo quando o seu grupo amino N^α está protegido com uretanas

(ATHERTON et al., 1981). Isso pode acontecer através de dois mecanismos específicos envolvendo a cadeia lateral deste aminoácido: a) o nitrogênio π atua como nucleófilo atacando intramolecularmente a carbonila ativada, formando um cátion (**A**); b) O nitrogênio π atua como base levando à formação direta do enolato zwitteriônico (**B**). A enolização levará à perda de atividade óptica:

Por outro lado, cabe ressaltar que a extensão de D-His observada nas três abordagens sintéticas estudadas, principalmente na SPFS a 60 °C assistida por micro-ondas, é muito baixa quando comparada com os trabalhos descritos na literatura. De fato, como já citado, Palasek e colaboradores observaram 9,4% de enantiomerização da His durante a síntese do peptídeo Val-Tyr-Trp-Thr-Ser-Pro-Phe-Met-Lys-Leu-Ile-His-Glu-Gln-Cys-Asn-Arg-Ala-Asp-Gly-NH₂ por SPFS a 80 °C assistida por micro-ondas e empregando HBTU/DIPEA em DMF nas reações de acoplamento (PALASEK et al., 2007). Basca e colaboradores descreveram que os acoplamentos realizados a 86 °C usando DIC/HOBt e assistidos por micro-ondas levaram a 7% de enantiomerização da His durante a SPFS do peptídeo Cys(Trt)-Gly-Ile-Gly-Lys(Boc)-Phe-Leu-His(Trt)-Gly-Ala-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Phe-

Gly-Lys(Boc)-Ala-Phe-Val-Gly-Glu(OBut)-Ile-Met-Asn(Trt)-Ser(But)-NH₂ (BACSA et al., 2008).

Portanto, podemos concluir que as SPFS a 60 °C utilizando nossos protocolos e o aquecimento convencional ou a irradiação por micro-ondas forneceram peptídeos brutos de qualidades equivalentes à daquele resultante da SPFS convencional. O tempo de síntese foi reduzido em 50% na SPFS a 60 °C- aquecimento convencional e em 75% na SPFS a 60 °C- aquecimento micro-ondas, quando comparados com a SPFS convencional.

Ac-Hb₅₀₋₅₃: Ac-His-Gly-Ser-Ala-OH

Da mesma forma que para os demais modelos, este peptídeo foi obtido através das três abordagens sintéticas, fornecendo suas respectivas peptidil-resinas. Amostras de cada peptidil-resina foram submetidas à hidrólise total. As análises dos hidrolisados das peptidil-resinas forneceram os seguintes resultados: SPFS convencional (esperado/observado): His (1,0/1,0), Gly (1,0/1,0), Ala (1,0/1,0), Ser (1,0/0,4); SPFS a 60 °C-aquecimento convencional: His (1,0/1,0), Gly (1,0/1,0), Ala (1,0/1,0), Ser (1,0/0,3); SPFS a 60 °C- aquecimento micro-ondas: His (1,0/1,0), Gly (1,0/1,0), Ala (1,0/1,0), Ser (1,0/0,4). Como podemos notar, todos os conteúdos de aminoácidos concordam com os valores esperados, com exceção da Ser que é parcialmente degradada durante a hidrólise ácida realizada (DARRAGH et al., 1996).

As análises dos peptídeos brutos obtidos por RP-HPLC forneceram perfis cromatográficos muito semelhantes, indicando que os mesmos subprodutos foram obtidos nas três sínteses, mas em extensões diferentes (**Figura 33**).

Figura 33. Resultados da análise por RP-HPLC dos Ac-Hb₅₀₋₅₃ brutos resultantes das SPFS convencional (A), SPFS a 60 °C- aquecimento convencional (B) e SPFS a 60 °C- aquecimento micro-ondas (C). Condições de RP-HPLC: Coluna LiChrospher C18 (Merck), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 10% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear : 5% -95% B em 30 min.

As análises por LC/ESI-MS (**Figuras 34, 35 e 36**) indicaram que os produtos formados eram: isômero do peptídeo desejado (pico1), peptídeo desejado (pico 2), Ac-His-His-Gly-Ser-Ala-OH (pico 3), Ac-His(Ac)-Gly-Ser-Ala-OH (pico 4). A explicação para a formação deste último subproduto é a seguinte: o grupo tosil do imidazol His é susceptível à clivagem por HOBt, em pequena extensão, na etapa de acoplamento (FUJII; SAKAKIBARA, 1974).

Figura 34. Resultados da análise por LC/ESI-MS do Ac-Hb₅₀₋₅₃ bruto resultante da SPFS convencional. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 10% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5% -95% B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componente 1: isômero de Ac-Hb₅₀₋₅₃ [M+H]⁺ 413,41 g/mol; 2: peptídeo desejado [M+H]⁺ 413,41 g/mol; 3: Ac-His-His-Gly-Ser-Ala [M+H]⁺ 550,55 g/mol; 4: Ac-His(Ac)-Gly-Ser-Ala [M+H]⁺ 455,44.

Figura 35. Resultados da análise por LC/ESI-MS do Ac-Hb₅₀₋₅₃ bruto resultante da SPFS a 60 °C- aquecimento convencional. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 10% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5% -95% B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componente 1: subproduto não identificado, não constitui isômero de Ac-Hb₅₀₋₅₃; 2: isômero de Ac-Hb₅₀₋₅₃ [M+H]⁺ 413,41 g/mol; 3: peptídeo desejado [M+H]⁺ 413,41 g/mol; 4: Ac-His-His-Gly-Ser-Ala [M+H]⁺ 550,55 g/mol; 5: subproduto não identificado, não é isômero de Ac-Hb₅₀₋₅₃.

Figura 36. Resultados da análise por LC/ESI-MS do Ac-Hb₅₀₋₅₃ bruto resultante da SPFS a 60 °C- aquecimento micro-ondas. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 10% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5% -95% B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componente 1: isômero de Ac-Hb₅₀₋₅₃ $[M+H]^+$ 413,41 g/mol; 2: peptídeo desejado $[M+H]^+$ 413,41 g/mol; 3: subproduto não identificado, não constitui isômero de Ac-Hb₅₀₋₅₃; 4: Ac-His-His-Gly-Ser-Ala $[M+H]^+$ 550,55 g/mol; 5: fraca ionização, não é isômero de Ac-Hb₅₀₋₅₃; 6: Ac-His(Ac)-Gly-Ser-Ala $[M+H]^+$ 455,44.

Foi tentado um experimento de coeluição do peptídeo resultante da SPFS a 60 °C- aquecimento convencional com os padrões com a finalidade de elucidar qual era o isômero contaminante. Para nossa surpresa, os dados mostrados na **Figura 37** indicaram que o isômero correspondente ao pico 1 da **Figura 33** não era os LLDL, DLLL e DLDL.

Com o intuito de confirmar tal indicação e, se possível, determinar a extensão da enantiomerização tentamos fazer um novo experimento de coeluição na mesma condição de EC usada na análise do modelo Ac-CCK₁₈₋₂₁. Os eletroferogramas obtidos (**Figura 38**) a partir das análises dos brutos e dos experimentos de coeluição com os padrões nos permitiram inferir que o isômero correspondente ao pico 1 poderia ser o DLDD, que os diastereoisômeros Ac-His-Gly-D-Ser-Ala e Ac-D-His-Gly-D-Ser-Ala não foram formados durante a síntese de Ac-Hb₅₀₋₅₃, mas que o DLLL sim.

Figura 37. Experimentos de coeluição entre Ac-Hb₅₀₋₅₃ obtido na SPFS 60 °C- aquecimento convencional e [D-Ser⁵²] Ac-Hb₅₀₋₅₃ (A), ou [D-His⁵⁰] Ac-Hb₅₀₋₅₃ (B) ou [D-His⁵⁰, D-Ser⁵²] Ac-Hb₅₀₋₅₃ (C). Condições de RP-HPLC: Coluna LiChrospher C18 (Merck), solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 10% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear : 5% -95% B em 30 min.

Figura 38. Eletroferogramas obtidos das análises dos Ac-Hb₅₀₋₅₃ brutos resultantes da SPFS convencional (A), da SPFS a 60 °C- aquecimento convencional (B), da SPFS a 60 °C- aquecimento micro-ondas (C) e resultante dos experimentos de coeluição entre (B) e os isômeros [D-Ser⁵²] Ac-Hb₅₀₋₅₃ (D); [D-His⁵⁰] Ac-Hb₅₀₋₅₃ (E) e [D-His⁵⁰, D-Ser⁵²] Ac-Hb₅₀₋₅₃ (F). Condições da análise: capilar revestido (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA); diâmetro interno: 75 µm; comprimento do capilar até o detector: 45 cm (55 cm total); 6 mM éter coroa, 18 mM TRIS, pH 2,7; voltagem: 20 kV, λ: 214 nm; injeção: 2 s a 0,5 psi, temperatura: 25 °C.

Como tal diastereoisômero DLLL coeluiu com o peptídeo desejado (**Figura 38 E**), realizamos a hidrólise total, derivatização do hidrolisado, identificação e quantificação de D-aminoácidos que já empregada para o modelo Ac-CCK₁₈₋₂₁, tendo obtido os resultados

descritos na **Tabela 11**. Estes revelaram que a enantiomerização da His ocorreu em maior extensão nas sínteses feitas a 60 °C (6,5-8,5 vezes em relação à ocorrida para a SPFS convencional). Apesar de superiores às obtidas para o modelo Ac-CCK₁₈₋₂₁, as porcentagens de D-His foram inferiores a 2,0%, sendo também inferiores às obtidas por Palasek e colaboradores (9,4%) (PALASEK et al., 2007) e Bacsá e colaboradores (7,0%) (BACSA et al., 2008).

Tabela 11. Quantificação por GC-MS dos D-aminoácidos presentes nos hidrolisados totais dos Ac-Hb₅₀₋₅₃

Abordagem de SPFS	Conteúdo de D-aminoácido ^a (%)		
	Ser	His	Ala
convencional	<0,1	0,2	<0,1
a 60 °C- aquecimento convencional	<0,1	1,7	0,2
a 60 °C- aquecimento micro-ondas	<0,1	1,3	0,1

^a Calculado a partir da equação % D= (Área D/ Área D + Área L) *100.

CCK₂₄₋₃₃ NS: Asp²⁴-Arg-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe³³-NH₂

As SPFS convencional, a 60 °C- aquecimento convencional e a 60 °C- aquecimento micro-ondas utilizando a resina Rink amida ocorreram sem nenhum problema aparente. Obtidas as três peptidil-resinas, cerca de 1 mg de cada foi submetida à hidrólise total para a análise e quantificação de aminoácidos do hidrolisado. Como os valores obtidos não eram totalmente condizentes com os teóricos, não foi possível concluir se as peptidil-resinas eram de boa qualidade. Assim, realizamos mini-clivagens dos peptídeos das resinas/desproteção total descrita no item 3.9 de Materiais e Métodos. Os dados de síntese e as relações massa de peptídeo bruto/peptidil-resina estão

descritos na **Tabela 12**. Os perfis de RP-HPLC dos peptídeos brutos encontram-se na **Figura 39**.

Tabela 12. Dados de síntese, desligamento do peptídeo da resina/desproteção total e massas dos peptídeos brutos obtidos.

Tipo de SPFS	Massa de resina (mg)	Massa de peptidil-resina (mg)	Ganho de massa (mg)	Recuperação*
convencional	200,0	308,2	108,2	0,24
a 60 °C- aq. convencional	200,0	277,9	77,9	0,24
a 60 °C- aq. micro-ondas	252,0	362,1	110,1	0,26

* $m_{\text{peptídeo bruto}}/m_{\text{peptidil-resina}}$

Figura 39. Perfis obtidos nas análises por RP-HPLC dos CCK₂₄₋₃₃ NS brutos resultantes das SPFS convencional (A), SPFS a 60 °C- aquecimento convencional (B) e SPFS a 60 °C- aquecimento micro-ondas (C). Condições de RP-HPLC: Coluna: Vydac C₁₈, solvente A: 0,1% TFA/H₂O, solvente B: 90% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min, gradiente: 5%-95% B em 30 min. Componente 1: análogo deletado em Tyr; 2: peptídeo desejado; 3: análogo deletado em Arg; 4: análogo deletado em Arg e Tyr; 5: análogo com Met(O).

As análises por LC/ESI-MS (**Figuras 40, 41 e 42**) revelaram que os picos majoritários correspondiam ao peptídeo desejado (pico 2 da **Figura 39**) e que os subprodutos eram os peptídeos: 1= deletado na Tyr (Asp-Arg-Asp-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂), 3= deletado na Arg (Asp-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂), 4= deletado nas Arg e Tyr (Asp-Asp-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂), 5= CCK₂₄₋₃₃ NS contendo uma Met oxidada a seu sulfóxido (Asp-Arg-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met(O)-Asp-Phe-NH₂ ou Asp-Arg-Asp-Tyr-Met(O)-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂). Portanto, não foi detectada a presença de isômeros pelas análises realizadas.

Assim, hidrolisamos os peptídeos brutos e realizamos a análise de aminoácidos como feito para os modelos Ac-CCK₁₈₋₂₁ e Ac-Hb₅₀₋₅₃. Os resultados obtidos (**Tabela 13**) indicam um aumento significativo na extensão da enantiomerização de Asp, Met, Phe e Trp no peptídeo obtido da SPFS a 60 °C- aquecimento convencional quando comparado com aqueles resultantes das SPFS convencional e sob aquecimento por micro-ondas. Este aumento pode ser decorrente do maior tempo de exposição dos aminoácidos ativados durante a etapa de acoplamento a 60 °C (30 min na SPFS-aquecimento convencional e 15 min na SPFS assistida por micro-ondas). Mesmo assim, todos os valores são ≤ 1,5%, valor considerado tolerável segundo Han e colaboradores (HAN et al., 1997).

Tabela 13. Extensão da enantiomerização ocorrida durante as SPFS de CCK₂₄₋₃₃ NS

Abordagem de SPFS	Conteúdo de D-aminoácido ^a (%)					
	Arg	Asp	Met	Phe	Tyr	Trp
convencional	0,2	0,5	1,0	0,2	0,2	0,1
a 60 °C- aquecimento convencional	0,3	1,4	1,4	0,8	0,5	1,5
a 60 °C- aquecimento micro-ondas	0,3	0,7	0,9	0,5	0,3	0,3

^a Calculado a partir da equação % D= (Área D/ Área D + Área L) *100.

Figura 40. Resultados da análise por LC/ESI-MS do CCK₂₄₋₃₃ NS bruto obtido da SPFS convencional. Condições de RP-HPLC: injeção: 20 μ L, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5% - 95% B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componente 1: análogo deletado em Tyr; 2: análogo deletado em Arg e Tyr; 3: peptídeo desejado; 4: análogo deletado em Arg; 5: fraca ionização, subproduto não identificado; 6: fraca ionização, subproduto não identificado.

Figura 41. Resultados da análise por LC/ESI-MS do CCK₂₄₋₃₃ NS bruto obtido da SPFS a 60 °C- aquecimento convencional. Condições de RP-HPLC: injeção: 20 µL, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5% -95% B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componente 1: análogo com Met(O); 2: análogo com Gly adicional; 3: peptídeo desejado; 4: análogo deletado em Arg; 5: fraca ionização, subproduto não identificado; 6: fraca ionização, subproduto não identificado.

Figura 42. Resultados da análise por LC/ESI-MS do CCK₂₄₋₃₃ NS bruto obtido da SPFS a 60 °C- aquecimento micro-ondas. Condições de RP-HPLC: injeção: 20 µL, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5% -95% B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componente 1: análogo contendo Met oxidada; 2: análogo deletado em Tyr; 3: peptídeo desejado; 4: análogo deletado em Arg; 5: fraca ionização, subproduto não identificado; 6: fraca ionização, subproduto não identificado.

4.2. Estudo de outras reações secundárias na SPFS a 60 °C: aquecimento convencional *versus* aquecimento micro-ondas

Algumas reações secundárias típicas da SPFS convencional (ver Introdução) são intensificadas nas SPFS sob altas temperaturas, tais como: a) a oxidação da Met (REMUZGO, 2003), b) terminação do crescimento da cadeia peptídica devido a ciclização de Gln e formação de piroglutamil-peptídeo (SOUZA, 2000), c) desidratação de Asn (RABINOVICH; RIVIER, 1994), d) deleção de Arg em consequência da formação de γ -lactama durante a ativação do grupo α -carboxila de seus derivados (WHITE et al., 2005), e) a formação de aspartimida (MERGLER et al., 2003). Dessa forma, achamos apropriado também examinar a incidência das reações secundárias nas SPFS de CCK₂₄₋₃₃ NS, através do método convencional, a 60 °C- aquecimento convencional e a 60 °C- aquecimento micro-ondas, pois tal peptídeo é formado por diversos aminoácidos trifuncionais. Para tal, usamos os resultados das análises dos peptídeos brutos já mostrados (**Figuras 40-42**).

A formação de análogos deletados em um ou mais aminoácidos decorrente de acoplamentos e desproteções incompletas é comum na SPFS (LARSEN; HOLM, 1994; RIZZOLO et al., 2007). Apesar de monitorarmos todas as etapas de nossas sínteses manuais através do teste de ninidrina (KAISER et al., 1970), suspeitamos que nem todas foram, de fato, quantitativas, o que explicaria a ocorrência de deleções.

Já a presença do análogo contendo uma Met oxidada se explica pelo fato de não termos realizado as sínteses manuais em atmosfera inerte. Além disso, devemos lembrar que: i) da mesma maneira que a energia térmica acelera as reações desejadas, ela também o faz para as indesejadas (HARWOOD; MOODY; PERCY, 1999); ii) a própria presença do DMSO, um solvente oxidante (MacGREGOR, 2006) presente na mistura 25% DMSO/tolueno, pode ter contribuído para a oxidação dos aminoácidos mais

susceptíveis. Por outro lado, a oxidação de Met ao seu sulfóxido e sulfona durante a SPFS a 60 °C também tem sido observada por nós quando DMF (e não DMSO) é utilizado como solvente (REMUZGO, 2003; Resultados e Discussão, item 4.3).

Além disso, a estimativa da porcentagem relativa do produto desejado nos peptídeos brutos resultantes das diferentes abordagens de SPFS, feita através da relação entre a área do pico correspondente ao produto desejado e a somatória das áreas sobre todos os picos presentes no cromatograma forneceu as seguintes porcentagens do primeiro: SPFS convencional (21%), SPFS a 60 °C-aquecimento convencional (28%) e SPFS a 60 °C- aquecimento micro-ondas (33%), ou seja, a síntese mediada por micro-ondas foi a forneceu a maior quantidade do peptídeo desejado. Além disso, o tempo de síntese foi 1/4 daquele gasto na SPFS convencional.

Tais resultados corroboram trabalhos prévios que mostram que a energia de micro-ondas agiliza o processo sintético e possibilita a obtenção do peptídeo desejado com rendimento superior àquele resultante da SPFS convencional. De fato, Rizzolo e colaboradores descreveram que a energia de micro-ondas facilitou a SPFS da gramicidina A, um peptídeo de síntese difícil, uma vez que as reações de acoplamentos foram rápidas (30 min ao invés de 2 h) e seus rendimentos foram altos (70% ao invés de 20%) (RIZZOLO et al., 2007). Palasek e colaboradores descreveram que: i) a SPFS assistida por micro-ondas promoveu um aumento de rendimento de obtenção do produto desejado 68,4% (SPFS convencional) para 84,0-86,7%; ii) as etapas de desproteção e acoplamento foram mais rápidas quando as micro-ondas foram utilizadas (PALASEK et al., 2007). Rahman e colaboradores descreveram que a energia de micro-ondas facilitou o acoplamento de Hmb-Ala a oligo-Ala-resina HMBA, além de prevenir a formação de estrutura do tipo folha- β que evidencia a ocorrência de agregação durante a SPFS (RAHMAN et al., 2007).

4.3. Estudo da SPFS passo a passo a 60 °C

Como citado na Introdução, Varanda e Miranda estudaram a SPFS passo a passo a 60 °C empregando o aquecimento convencional e o fragmento 65-74 da proteína carreadora de acila (de sequência agregante) e a CCK-12 NS como modelos. Eles determinaram uma condição para a obtenção de ambos com boa qualidade que empregava 25% DMSO/tolueno como solvente, DIC e HOBt como reagentes acopladores e Rink amida, TMBHA e SAMBHA como resinas (VARANDA; MIRANDA, 1997).

Em 2000, Souza descreveu as SPFS passo a passo a 60 °C das CCK-22 e CCK-33 NS empregando os protocolos de Varanda e Miranda, a resina Rink amida e 25% DMSO/tolueno como solvente. O alongamento da cadeia peptídica ocorreu sem problemas até a incorporação do 22º aminoácido. Parte da peptidil-resina CCK-22-NS Rink amida foi então separada e reservada. O restante foi alongado por mais 11 aminoácidos de modo a obter a CCK-33 NS. As recuperações dos peptídeos brutos (massa de peptídeo obtida: massa de peptidil-resina submetida à clivagem da resina/desproteção total) foram ligeiramente superiores às daquelas resultantes da SPFS convencional realizada em DMF. As CCK-22 NS brutas resultantes dos dois tipos de síntese tinham qualidades equivalentes. Por outro lado, o peptídeo bruto CCK-33 NS resultante da SPFS a 60 °C apresentou qualidade muito inferior em relação ao bruto resultante da SPFS à temperatura ambiente e as recuperações dos peptídeos brutos a partir das peptidil-resinas obtidas nas SPFS convencional e a 60 °C- aquecimento convencional foram 45% e 17%, respectivamente (SOUZA, 2000).

No presente trabalho nós utilizamos DMF como solvente e CLEAR amida como resina. Esta resina foi desenvolvida por Kempe e Barany, tornou-se comercialmente disponível em 1997 e, desde então, tem se demonstrado excelente para a SPFS, uma vez que o seu intumescimento nos solventes DCM, DMF, THF, MeOH e H₂O é superior aos das resinas baseadas no co-polímero poliestireno-divinilbenzeno

(KEMPE; BARANY, 1996). Por essas razões, ela tem sido particularmente indicada para sequências agregantes ou de “difficult sequences” (KEMPE; BARANY, 1996; REMUZGO et al., 2009). Além disso, ela é quimicamente estável às micro-ondas (VIGIL-CRUZ et al., 2005).

As sínteses procederam sem grandes problemas, porém, em todas elas houve a necessidade de se realizar reacoplamentos para as incorporações dos aminoácidos 13, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28 e 30 para a SPFS convencional, 24, 27, 30, 31 e 33 para a SPFS a 60 °C- aquecimento convencional e 3, 4, 5, 6, 7, 9, 16, 21, 23 e 33 para a SPFS a 60 °C- aquecimento por micro-ondas (neste caso, as reações ocorreram sem agitação mecânica até a incorporação do 7° aminoácido). Em todas elas, a remoção do grupo Fmoc tornou-se mais difícil após o 11° aminoácido, sendo necessária a utilização de solução de piperidina/DMF mais concentrada (30% ao invés de 20%). A dificuldade de acoplamentos dos aminoácidos 23-28 à peptidil-resina em crescimento encontradas na SPFS à temperatura ambiente, foi minimizada nas SPFS a 60 °C.

As sínteses foram monitoradas pelo TN da peptidil-resina em crescimento e através da retirada de amostras da mesma após a incorporação dos aminoácidos 7, 10, 15, 22, 28 e 33. Uma vez secas, tais amostras eram submetidas à clivagem do peptídeo da resina/ desproteção total para análise dos brutos. A **Tabela 14** descreve as recuperações dos peptídeos brutos a partir de 10 mg das peptidil-CLEAR amida.

Tabela 14. Dados de recuperação da CCK-33 NS bruta da resina e de suas purificações

Abordagem de SPPS	Massa peptidil-resina (mg)	Massa peptídeo bruto (mg)	Recuperação do peptídeo	Rendimento da purificação (%)	Massa peptídeo purificado (mg)
convencional	10,00	4,41 ^a	0,44	27	1,21
60° C- aq. convencional	10,01	4,56 ^a	0,46	40	1,81
60° C- aq. micro-ondas	10,18	4,23	0,42	62	2,63

^aEm trabalho anterior do nosso laboratório, M.P. Souza obteve 4,63 e 4,30 mg, respectivamente (SOUZA, 2000)

Os perfis de RP-HPLC das CCK-7, CCK-15, CCK-22, CCK-28 e CCK-33 NS resultantes das diferentes SPFS estão mostrados na **Figura 43**. Como podemos observar, independentemente da abordagem de síntese utilizada, houve uma piora na qualidade do peptídeo bruto após o acoplamento do 22º aminoácido à peptidil-resina, o que corrobora os nossos dados anteriores (**Tabela 14; Figura 44**) (SOUZA, 2000). A observação de piora significativa do perfil cromatográfico da CCK-28 NS nos levou a investigar a causa da mesma.

Com a colaboração da Profa. Dra. Márcia L. A. Temperini e do doutorando Diego Pereira dos Santos (Departamento de Química Fundamental IQ-USP), realizamos análises por NIR-FT-Raman da resina CLEAR amida e das peptidil-resinas CCK-7-, CCK-15-, CCK-22-, CCK-28- e CCK-33 NS-CLEAR amida. De fato, esta técnica espectroscópica tem a vantagem de possibilitar o uso de amostras em filmes, géis, pós amorfos e soluções. Dentre os nove modos vibracionais originados do esqueleto peptídico, a banda de amida I ($1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$, estiramento da ligação C=O) e a banda de amida III ($1200\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$, estiramento da ligação C-N acoplado com o “bending” de N-H) têm intensidade Raman suficiente para ser útil na determinação de estrutura secundária de peptídeos.

As frequências e intensidades das bandas de amida I e III estão relacionadas com a geometria molecular e ligação de H do esqueleto peptídico que determina as subestruturas específicas de peptídeos e proteínas, tais como α -hélice e folha β -pregueada (FABIAN, 1993). Tal correlação é possível de ser feita, uma vez que as frequências e as formas das bandas espectrais referentes aos modos normais de vibração de uma molécula peptídica são dependentes, dentre outros fatores, de sua estrutura tridimensional e das interações intra/inter moleculares que se estabelecem (MIYAZAWA, 1960). Os resultados obtidos estão mostrados na **Figura 45**.

Abs 210 nm

(A)

(B)

Figura 43. Perfil de RP-HPLC das CCK-7, CCK-15, CCK-22, CCK-28 e CCK-33 NS brutas resultantes das SPFS convencional (A), SPFS a 60 °C- aq. convencional (B) e SPFS a 60 °C- aq. micro-ondas (C). Condições de RP-HPLC: injeção: 10 μ L, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 90% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5%- 95% B em 30 min.

Figura 44. Perfil de RP-HPLC das CCK-22 NS resultantes das SPFS convencional (A) e a 60 °C- aq. convencional (B) e das CCK-33 NS resultantes das SPFS convencional (C) e a 60 °C- aq. convencional (D). Condições de RP-HPLC: injeção: 10 μ L, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 90% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5%- 95% B em 30 min. Componentes 1: peptídeo desejado; 2: peptídeo contendo uma Met oxidada ao seu sulfóxido (SOUZA, 2000).

Figura 45. Espectros de NIR-FT-Raman nas regiões de amida I e de amida III da resina CLEAR amida e das peptidil-resinas CCK-10-, CCK-15-, CCK-22-, CCK-28- e CCK-33 NS -CLEAR amida obtidas na SPFS a 60 °C- aquecimento convencional.

Enquanto o espectro de FT-Raman da resina CLEAR amida não apresentou nenhuma banda na região de amida I, o da CCK-10 NS-CLEAR amida mostrou uma banda bem definida na região de amida I em 1673 cm^{-1} , indicativa de uma estruturação do tipo folha β pregueada (Tabela 15, FABIAN, 1993; COLTHUP et al., 1990; REMUZGO et al., 2009). Por outro lado, analisando a região de amida III verificamos que embora exista uma banda com um máximo em 1238 cm^{-1} , indicativa de folha β pregueada, existem outras em 1249 e em 1260 cm^{-1} que indicam ausência de conformação definida e estruturação em hélice, respectivamente. Para a CCK-15 NS-CLEAR amida, a banda em 1673 cm^{-1} é menos intensa e ocorre o aparecimento de outra banda na região de 1658 cm^{-1} , sugestiva de estrutura do tipo α -hélice (FABIAN, 1993; COLTHUP et al., 1990), e na região da amida III também estão presentes bandas indicativas de estrutura randômica e em hélice. Considerando a deconvolução das bandas da região de amida III, o pequeno tamanho da cadeia peptídica em crescimento na resina, a ausência de dificuldade na síntese e a boa qualidade do peptídeo bruto obtido, especulamos que a estruturação predominante da CCK-10 NS-

CLEAR amida não tem conformação preferencial, mas apresenta maior tendência a adquirir conformação em folha β pregueada do que em hélice, o contrário da CCK-15 NS-CLEAR.

Tabela 15. Posições aproximadas (cm^{-1}) das bandas de amida I e III nos espectros FT-Raman para várias conformações polipeptídicas (FABIAN, 1993; PETICOLAS, 1975)

Conformação	Amida I/ tipo da banda	Amida III/ tipo da banda
α -Hélice	1645-1660/ intensa	1260-1300/ fraca
Folha β pregueada	1665-1680/ intensa	1230-1240/ intensa
Randômica	1660-1670/ média e larga	1240-1250/ média

Como no espectro da CCK-22 NS-CLEAR amida a banda em 1658 cm^{-1} tornou-se única e intensa e, curiosamente, a partir deste ponto foram necessários reacoplamentos dos aminoácidos 23 a 28 durante a SPFS em temperatura ambiente e considerando ainda que a qualidade do peptídeo bruto caiu significativamente, especulamos que a peptidil-resina CCK-22 NS-CLEAR apresenta grande tendência a se estruturar em hélice tornando a sua amina terminal menos exposta aos reagentes. Finalmente, os espectros das CCK-28 e CCK-33 NS-CLEAR amida apresentaram bandas na região de amida I com máximos em 1670 cm^{-1} e na região de amida III com máximo em 1238 cm^{-1} , indicando que elas apresentam tendência à conformação em β -pregueada.

Com base nestes resultados, decidimos eliminar a possibilidade de a estruturação diferenciada da CCK-22 NS-CLEAR amida estar relacionada ao estabelecimento de interações entre as cadeias peptídicas e a malha da resina CLEAR amida. Dessa forma, os espectros de FT-Raman dos peptídeos livres CCK-22

NS e CCK-33 NS secos foram coletados nas mesmas condições empregadas nas análises das respectivas peptidil-resinas (**Figura 46**).

Figura 46. Espectros de NIR-FT-Raman na região de amida I (1600-1700 cm^{-1}) dos peptídeos livres CCK-22 e CCK-33 NS obtidos.

Os espectros obtidos revelaram que os peptídeos também se estruturam de forma similar às respectivas peptidil-CLEAR amida, ou seja, os espectros das CCK-22 NS apresentam bandas com máximos em 1654 e 1664 cm^{-1} , sugestivas de estrutura do tipo α -hélice, e da CCK-33 NS em 1670 cm^{-1} , indicativa de estrutura do tipo β -pregueada (PETICOLAS, 1975). Portanto, o comportamento estrutural das peptidil-resinas em questão parece ser decorrente das suas sequências de aminoácidos. Em resumo, os resultados sugerem que a mudança de estrutura randômica para α -hélice da sequência peptídica em crescimento na CLEAR explique as dificuldades sintéticas referentes às regiões 15-22 e 22-28. De fato, após o acoplamento do 22º aminoácido à peptidil-resina, com exceção dos três últimos aminoácidos 31, 32 e 33, todos os outros só foram incorporados após reação de reacoplamento.

Embora a estrutura da CCK-33 ainda não seja conhecida, a da CCK-15 em solução foi determinada por Albrizio e colaboradores através da utilização de espectroscopia de RMN e da modelagem molecular (ALBRIZIO et al., 2002). As

análises por RMN em diferentes solventes indicaram que a CCK-15 sulfatada apresenta uma tendência intrínseca de adquirir a estrutura do tipo α -hélice, resultados condizentes com as nossas observações (**Figura 45**). Por outro lado, Giragossian e colaboradores observaram por RMN que os aminoácidos N-terminais da CCK-15 apresentavam-se altamente desordenados sem que houvesse uma conformação preferencial em um sistema mimético de membrana composto por dodecilmfosfolina (GIRAGOSSIAN et al., 2002).

Em paralelo com os experimentos espectroscópicos, realizamos o fracionamento por RP-HPLC em escala analítica das CCK-33 NS resultantes das três diferentes SPFS a fim de possibilitar a identificação dos principais subprodutos e o cálculo de seus rendimentos. As frações devidamente liofilizadas foram analisadas por LC/ESI-MS. Os resultados revelaram que, além do peptídeo desejado, houve a formação dos seguintes subprodutos (**Figura 47**): *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(Q)-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂* ou *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(Q)-Asp-Phe-NH₂* ou *Lys-Ala-Pro-Ser-Gly-Arg-Met(Q)-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* (FR 1 da SPFS convencional; FR 2 da SPFS a 60 °C- aquecimento micro-ondas), *Lys-Ala-Pro-Ser-Gly-Arg-Met(Q)-Ser-Ile-Val-Lys-Asn-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp-Pro-Ser-His-Arg-Ile-Ser-Asp-Arg-Asp-Tyr-Met(Q)-Gly-Trp-Met(Q)-Asp-Phe-NH₂* (FR 3 e FR 4 da SPFS a 60 °C- aquecimento convencional; FR 4 da SPFS a 60 °C- aquecimento micro-ondas), *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-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂* ou *Lys-Ala-Pro-Ser-Gly-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* (FR 3 da SPFS convencional) e *Lys-Ala-Pro-Ser-Gly-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-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂*

(FR 6 da SPFS a 60 °C- aquecimento convencional; FR 5 da SPFS a 60 °C- aquecimento micro-ondas).

Além disso, tais análises demonstraram que embora o perfil da CCK-33 NS resultante da SPFS convencional parecesse ser de melhor qualidade, isso não era verdadeiro: ela apresentou grande quantidade do análogo contendo uma metionina oxidada ao seu sulfóxido (FR 1, **Figura 47**) e do análogo contendo uma Gly adicional (frações intermediária II e 3). A presença deste último contaminante pode ser explicada pela remoção prematura do grupo Fmoc da Fmoc-Gly já acoplada à peptidil-resina em crescimento na presença de TBTU/DIPEA, o que ocorre devido à alta labilidade do grupo Fmoc da Fmoc-Gly frente à base DIPEA e o longo tempo de acoplamento (BODANSZKY et al., 1983).

Como podemos notar, com exceção do análogo contendo uma Gly adicional, todos os demais subprodutos formados durante as SPFS da CCK-33 NS são decorrentes da oxidação da Met ao seu sulfóxido. Como vimos na **Figura 44**, o análogo da CCK-33 NS contendo uma Met oxidada ao seu sulfóxido foi o principal subproduto obtido nas SPFS convencional e a 60 °C quando 25% DMSO/tolueno foi empregado. Assim, dentre as três SPFS, aquela a 60 °C usando o aquecimento por micro-ondas foi a que forneceu o maior rendimento de purificação (62%), uma vez que a qualidade do peptídeo bruto resultante era superior. Possíveis explicações são: 1) o fato de a SPFS assistida por micro-ondas ter sido feita em atmosfera inerte; 2) as reações de acoplamento na SPFS mediada por micro-ondas terem sido deixadas ocorrer em ½ do tempo da SPFS usando o aquecimento convencional e em ¼ daquele consumido na SPFS convencional.

Os resultados aqui apresentados revelaram, portanto, que a combinação da resina CLEAR amida, de DMF e do protocolo de SPFS passo a passo assistida por micro-ondas por nós desenvolvido permitiu a obtenção de um peptídeo complexo tal como a CCK-33 NS em maior quantidade e menor tempo do que as SPFS passo a passo convencional ou a 60 °C usando aquecimento convencional.

Figura 47. Perfis de RP-HPLC das CCK-33 NS brutas resultantes das SPFS convencional (A), SPFS a 60 °C- aq. convencional (B) e SPFS a 60 °C- aq. microondas (C) das respectivas CCK-33 purificadas (A1, B1, C1). Espectros de massas de A1, B1, C1 (A2, B2, C2). Condições de RP-HPLC: injeção: 10 μ L, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 90% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5%- 95% B em 30 min. Legenda: FR= fração, Inter= fração intermediária.

4.4. Estudo da SCPFS a 60 °C

Como descrito na Introdução, a SCPFS envolve os seguintes passos: a) desenho da rota sintética a ser adotada e, portanto, escolha dos fragmentos D.A. e A.A.; b) SPFS passo a passo (e, se necessário, purificação e caracterização) dos fragmentos protegidos a serem utilizados como D.A.; c) SPFS passo a passo do fragmento A.A.- resina, seguida por sua caracterização; d) acoplamento sequencial dos fragmentos D.A. ao A.A.-resina; e) após cada acoplamento, caracterização da peptidil-resina resultante via clivagem do peptídeo da resina/desproteção total em escala analítica; f) ao término de todas as condensações, clivagem do peptídeo da resina/remoção total dos grupos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos, análise e caracterização do peptídeo bruto final. Tais etapas têm sido realizadas de forma convencional: a temperatura ambiente (BARLOS; GATOS, 1999; NISHIUCHI et al., 2007). De fato, não existem relatos de todas estas etapas terem sido realizadas em altas temperaturas.

Conforme mostrado no item anterior (4.3), a CCK-33 NS tem sido um excelente modelo para os nossos estudos da SPFS a 60 °C (VARANDA; MIRANDA, 1997; SOUZA et al., 2004). Por outro lado, os rendimentos finais da SPFS passo a passo convencional deste peptídeo e seus análogos são extremamente baixos (MIRANDA et al., 1993 a; MIRANDA et al., 1993b), o que foi corroborado nesta Tese. O **Esquema 4** mostra os fragmentos escolhidos para atuarem como D.A. ou A.A. no nosso estudo da SCPFS a 60 °C usando a CCK-33 NS como modelo. Como se observa, o CCK₂₄₋₃₃-NS Rink amida foi escolhido para atuar como fragmento A.A. porque ele já tinha sido obtido durante o estudo de enantiomerização através das três abordagens sintéticas, tendo, por isso, sido devidamente caracterizado (item 4.2).

Esquema 4. Proposta da SCPFS a 60 °C estudada por nós.

A obtenção dos fragmentos D.A. e A.A. de boa qualidade é etapa determinante na SCPFS. De fato, visando estudar a SCPFS da hirudina (65 aminoácidos) convencionalmente, Goulas e colaboradores dividiram-na em um fragmento A.A. (23 aminoácidos) e outros cinco fragmentos D.A. Uma vez que as SPFS realizadas usando a abordagem convencional não forneceram fragmentos de boa qualidade e que o D.A. Fmoc-Asn(Trt)-Lys(Boc)-Cys(Acm)-Ile-Leu-Gly-Ser(But)-Asp(But)-Gly-OH foi muito pouco solúvel em DMSO (solvente escolhido para as reações de condensação entre os fragmentos), os autores tiveram de redefinir os fragmentos D.A. para novas tentativas (GOULAS et al., 2006). Nishiuchi e colaboradores resintetizaram o D.A. Boc-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-OH empregando o derivado Boc-His(Doc)-OH ao invés de Boc-His(Bom)-OH, uma vez que a utilização deste último forneceu um D.A. que não foi condensado à peptidil-resina Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-PAM mesmo após dois reacoplamentos (NISHIUCHI et al., 2007).

4.4.1. Obtenção dos fragmentos D.A.

a) Fmoc-CCK₁₉₋₂₃: Fmoc-Ser(But)-His(Trt)-Arg(Pmc)-Ile-Ser(But)-OH

Este fragmento peptídico foi sintetizado a 60 °C- aquecimento convencional na resina 2-Cl-Trt sem problemas aparentes. A **Tabela 16** descreve a quantidade de resina usada e o respectivo ganho de massa em função do processo sintético. O perfil de LC/ESI-MS do peptídeo protegido bruto obtido (**Figura 48**) revelou que ele continha o Fmoc-CCK₁₉₋₂₃ protegido desejado como produto majoritário e qualidade satisfatória para ser utilizado como D.A. sem purificação prévia.

Tabela 16. Dados de síntese dos D.A., massa inicial de resina, massa de peptidil-resina obtida e ganho de massa.

Doador de Acila	Abordagem de síntese	Massa inicial (mg)	Massa final (mg)	Ganho de massa (mg)
Fmoc-CCK ₁₉₋₂₃	60 °C- aq. conv.	1196	13806	184
Fmoc-CCK ₁₂₋₁₈	convencional	805	682 ^a	—
Fmoc-CCK ₆₋₁₁	60 °C- aq. conv.	800	1045	245
Fmoc-CCK ₁₋₅	60 °C- aq. conv.	806	892	87

^a A perda de massa se deve à retirada de diversas amostras de peptidil-resina para a verificação do andamento da síntese em decorrência de TN não conclusivos.

b) Fmoc-CCK₁₂₋₁₈: Fmoc-Asn¹²-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp(OBut)-Pro¹⁸-OH

Este fragmento foi sintetizado na resina 2-Cl-Trt pela SPFS convencional. Os testes de ninidrina (KAISER et al., 1970) das peptidil-resinas em crescimento, utilizados para monitorar o andamento das etapas de desproteção e acoplamento, não foram conclusivos, ou seja, os testes realizados pós-desproteção e pós-acoplamento forneceram solução e grãos de resina de cor amarela; a cor púrpura resultante da formação de complexo com a maioria dos aminoácidos desprotegidos nos seus N-terminal (KAISER et al., 1970) só foi observada após as desproteções da Leu¹³ e da Leu¹⁶. Por isso, para verificar se esta síntese estava sendo bem sucedida, recolhemos alíquota da peptidil-resina e com ela realizamos o desligamento do peptídeo em crescimento da resina e o analisamos por LC/ESI-MS. Os resultados confirmaram que a síntese ocorria sem problemas (dados não mostrados). A análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto final confirmou que o peptídeo protegido desejado foi obtido com sucesso e com boa qualidade (Tabela 16, Figura 49).

Figura 48. Resultados da análise por LC/ESI-MS do Fmoc-Ser¹⁹(But)-His(Trt)-Arg(Pmc)-Ile-Ser²³(But)-OH bruto resultante da SPFS a 60 °C- aquecimento convencional. Condições de RP-HPLC: injeção: 10 µL, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 90% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5% -95% B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componente 1: Fmoc-S¹⁹(But)HR(Pmc)IS²³(But)-OH; [M+H]⁺ 1199,49; 2: peptídeo deletado em Ile: Fmoc-S¹⁹(But)H(Trt)R(Pmc)S²³(But)-OH, [M+H]⁺ 1329,65; 3: peptídeo desejado Fmoc-S¹⁹(But)H(Trt)R(Pmc)IS²³(But)-OH, [M+H]⁺ 1442,81.

Figura 49. Resultados da análise por LC/ESI-MS do Fmoc-N¹²LQNLD(OBut)P¹⁸-OH bruto resultante da SPFS convencional. Condições de RP-HPLC: injeção: 10 µL, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5% - 95% B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componente 1: peptídeo desejado Fmoc-N¹²LQNLD(OBut)P¹⁸-OH, [M+H]⁺ 869,0.

c) Fmoc-CCK₆₋₁₁: Fmoc-Arg⁶(Pmc)-Met-Ser(But)-Ile-Val-Lys(Boc)¹¹-OH

A síntese deste fragmento D.A. ocorreu na resina 2-Cl-Trt usando o método convencional, tendo ocorrido sem nenhum problema aparente. Os resultados estão mostrados na **Tabela 16**. A análise do material bruto por LC/ESI-MS (**Figura 50**) demonstrou que o peptídeo protegido desejado foi obtido e que ele apresentava ótima qualidade, não sendo necessário purificá-lo previamente às tentativas de sua condensação ao fragmento A.A.

d) Fmoc-CCK₁₋₅: Fmoc-Lys¹(Boc)-Ala-Pro-Ser(But)-Gly⁵-OH

Este peptídeo D.A. foi obtido na resina 2-Cl-Trt pela SPFS convencional, que ocorreu sem nenhum problema. Os dados de síntese estão descritos na **Tabela 16**. A análise do peptídeo protegido bruto por LC/ESI-MS (**Figura 51**) revelou que o mesmo foi obtido com uma pureza suficiente para atuar como D.A. na SCPFS a 60 °C.

4.4.2. Tentativas de condensação entre os fragmentos D.A. e A.A.

Obtidos todos os fragmentos protegidos com qualidades satisfatórias, passamos a estudar um aspecto essencial à etapa de acoplamento da SCPFS: a escolha do solvente orgânico a ser utilizado. Como candidatos selecionamos aqueles ou suas misturas que: i) solubilizassem todos os Fmoc-aminoácidos e os fragmentos D.A. (GRANT, 2002); ii) fossem estáveis e que tivessem baixa taxa de volatilização a 60 °C em um longo período de tempo (6-48 h) (VARANDA; MIRANDA, 1997); iii) fossem estáveis às micro-ondas (HAYES, 2002); iv) intumescessem bem a peptidil-resina Rink amida (VARANDA; MIRANDA, 1997); v) tivessem sido utilizados em SPFS assistidas por micro-ondas (HAYES, 2002). Assim, os solventes/misturas de solventes utilizados foram: DMF, 25% DMSO/tolueno, NMP e 25% NMP/tolueno. Os solventes DMF, NMP e DMSO são compatíveis com micro-ondas, pois apresentam elevados pontos de ebulição, absorvem e transmitem para os reagentes a radiação de maneira eficiente (HAYES, 2002).

Figura 50. Resultados da análise por LC/ESI-MS do Fmoc-R⁶(Pmc)MS(But)IVK¹¹(Boc)-OH bruto resultante da SPFS convencional. Condições de RP-HPLC: injeção: 10 μ L, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 90% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5% -95% B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componente 1: peptídeo desejado Fmoc-R⁶(Pmc)MS(But)IVK¹¹(Boc)-OH, [M+H]⁺ 1378,8; [M+2H]²⁺ 689,9.

Figura 51. Resultados da análise por LC/ESI-MS do Fmoc-K¹(Boc)APS(But)G⁵-OH bruto resultante da SPFS convencional. Condições de RP-HPLC: injeção: 10 µL, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 90% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5% -95% B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componentes 1: Fmoc-K¹APS(But)G⁵-OH [M+H]⁺ 737,9; 2: peptídeo desejado Fmoc-K¹(Boc)APS(But)G⁵-OH, [M+H]⁺ 837,9.

a) Teste de solubilidade dos doadores de acila e reagentes acopladores nos solventes selecionados

A **Tabela 17** descreve os resultados obtidos nos testes realizados. Eles demonstraram que os fragmentos D.A. escolhidos são solúveis nos solventes e misturas de interesse. No que se refere aos reagentes acopladores, o HOBt foi solúvel em todos eles; o TBTU foi insolúvel em 25% NMP/tolueno na concentração pretendida (a mesma a ser empregada na reação de acoplamento) e, portanto, ficou claro que tal combinação não poderia ser empregada.

Tabela 17. Teste de solubilidade dos reagentes acopladores e dos fragmentos D.A.

Reagente acoplador ou D.A.	Solúvel ^a em
Fmoc-R ²¹ (Pmc)IS ²³ (But)-OH	DMF; 25% NMP/Tolueno; NMP; 25% DMSO/Tolueno
Fmoc-R ²¹ (Mtr)IS ²³ (But)-OH	DMF; 25% NMP/Tolueno; NMP; 25% DMSO/Tolueno
Fmoc-S ¹⁹ (But)H(Trt)R(Pmc)IS ²³ (But)-OH	DMF; 25% NMP/Tolueno; NMP; 25% DMSO/Tolueno
Fmoc-S ¹⁹ (But)H(Boc)R(Mtr)IS ²³ (But)-OH	DMF; 25% NMP/Tolueno; NMP; 25% DMSO/Tolueno
Fmoc-N ¹² LQNL(DOBt)P ¹⁸ -OH	DMF; 25% NMP/Tolueno; NMP; 25% DMSO/Tolueno
Fmoc-R ⁶ (Pmc)MS(But)IVK ¹¹ (Boc)-OH	DMF; 25% NMP/Tolueno; NMP; 25% DMSO/Tolueno
Fmoc-K ¹ (Boc)APS(But)G ⁵ -OH	DMF; 25% NMP/Tolueno; NMP; 25% DMSO/Tolueno
TBTU	DMF; NMP; 25% DMSO/Tolueno
HOBt	DMF; 25% NMP/Tolueno; NMP; 25% DMSO/Tolueno

^a Concentração de D.A. e de reagente acoplador: 3,6 mM.

b) Determinação do grau de intumescimento da resina/ peptidil-resina

Conforme descrito na Introdução, quanto maior for o intumescimento da peptidil-resina A.A. no solvente escolhido para realizar a condensação entre fragmentos, maior

será o acesso do D.A. ativado ao seu grupo α -amina reativo e, conseqüentemente, maior será a probabilidade de a reação ser bem sucedida. Por isso, estudamos o intumescimento da resina Rink amida e do fragmento A.A. (CCK₂₄₋₃₃-NS Rink amida) na presença dos solventes DMF, NMP, 25% NMP/tolueno e 25% DMSO/tolueno (**Tabela 18**).

Tabela 18. Intumescimento da resina Rink amida e da CCK₂₄₋₃₃-NS Rink amida

Solvente	ΔV^* (mL) a 60 °C	
	Rink amida	CCK ₂₄₋₃₃ -NS Rink amida
DMF	0,57 $\pm$ 0,05	0,40 $\pm$ 0,05
NMP	0,68 $\pm$ 0,05	0,45 $\pm$ 0,05
25% NMP/ Tolueno	0,55 $\pm$ 0,05	0,35 $\pm$ 0,05
25% DMSO/tolueno	0,50 $\pm$ 0,05	0,38 $\pm$ 0,05

* ΔV (mL) a 60 °C consiste na variação de volume da resina ou peptidil-resina após intumescimento nos solventes e misturas de solventes especificados.

Conforme podemos notar, o solvente NMP foi o que promoveu o melhor intumescimento da resina Rink amida a 60 °C, confirmando os resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório (VARANDA; MIRANDA, 1997). Por outro lado, os outros solventes e misturas estudados intumesceram bem a peptidil-resina CCK₂₄₋₃₃-NS Rink amida a 60 °C.

c) Reação de Fmoc-Ser¹⁹(But)-His(Trt)-Arg(Pmc)-Ile-Ser²³(But)-OH com CCK₂₄₋₃₃-NS Rink amida

Seguindo a proposta sumarizada no **Esquema 4**, realizamos a primeira tentativa de condensação entre os fragmentos peptídicos em escala analítica. A condição utilizada foi idêntica àquela descrita por Remuzgo para a condensação entre Boc-Lys¹(2-Cl-Z)-Ala-Pro-Ser(Bzl)-Gly⁵-OH (D.A.) e Asp(OcHex)-Pro-Ser(Bzl)-His(Tos)-Arg(Tos)-Ile-Ser(Bzl)-

Asp(OcHex)-Arg(Tos)-Asp(OcHex)-Tyr(2-Br-Z)-Met-Gly-Trp'-Met-Asp(OcHex)-Phe-resina MBHA (A.A.): D.A. 3,44 mM (2 vezes de excesso molar em relação ao A.A.), DMF como solvente, TBTU como reagente acoplador, 60 °C, agitação circular (REMUZGO, 2003). O teste de ninidrina da peptidil-resina foi positivo mesmo após 48 h de reação a 60 °C. A filtração e lavagem da peptidil-resina seguida da clivagem do peptídeo da resina e análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto obtido indicou que o peptídeo Fmoc-Ser¹⁹(But)-His(Trt)-Arg(Pmc)-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-Arg(Pmc)-Asp(OBut)-Tyr(But)-Met-Gly-Trp(Boc)-Met-Asp(OBut)-Phe³³-NH₂ desejado não foi formado. Dessa forma, decidimos estudar a influência de alguns fatores nesta reação, tais como: solvente, reagente acoplador, uso ou não de agitação e modo de aquecimento. Foram feitas nove tentativas de incorporação de Fmoc-Ser¹⁹(But)-His(Trt)-Arg(Pmc)-Ile-Ser²³(But)-OH à peptidil-resina CCK₂₄₋₃₃-NS Rink amida (**Tabela 19**).

Todas as reações de condensação foram monitoradas a cada 2 h por TN da peptidil-resina (KAISER et al., 1970). Após os tempos descritos na tabela acima, as peptidil-resinas foram filtradas, lavadas alternadamente com DMF e DCM e secas em dessecador à vácuo. Amostras foram submetidas à clivagem do peptídeo da resina e desproteção total. Os peptídeos brutos resultantes foram solubilizados em 60% ACN/0,09% TFA/H₂O e analisados por LC/ESI-MS. Apesar de o grupo Pmc não ter sido removido, os resultados revelaram que somente a reação 2 (**Tabela 19**) produziu o peptídeo desejado, porém, em quantidade mínima mesmo quando foi feita tentativa de reacoplamento, procedimento comum na SCPFS (GOULAS et al., 2006; NISHIUCHI et al., 2007).

Tabela 19. Condições empregadas nas tentativas de condensação entre Fmoc-Ser¹⁹(But)-His(Trt)-Arg(Pmc)-Ile-Ser²³(But)-OH e CCK₂₄₋₃₃-NS Rink amida

Reação	Condições	Tempo (h)	TN	Ausência/pre-sença do PD
1	DMF, TBTU/DIPEA, pH 9, 60 °C- agitação horizontal	48	--+	ausência
2	DMF, TBTU/DIPEA, pH 9, 60 °C- aq. convencional, agitação vertical	69 + 43	--+	presença (traços)
3	DMF, TBTU/DIPEA, pH 9, 60 °C- aq. micro-ondas	5	+++	ausência
4	DMF, BOP/DIPEA (3x excesso), 60 °C- aq. convencional, agitação vertical	49	+++	ausência
5	DMF, BOP/DIPEA (3x excesso), 60 °C- aq. convencional, agitação vertical	32,5	--+	ausência
6	DMF, BOP/DIPEA (3x excesso), 60 °C- aq. micro-ondas	5	+++	ausência
7	25% DMSO/tolueno, TBTU/DIPEA, pH 9, 60 °C, agitação vertical	30	++-	ausência
8	25% DMSO/tolueno, TBTU/ DIPEA, pH 9, 60 °C- aq. convencional, agitação vertical	51	++-	ausência
9	25% DMSO/tolueno, TBTU/ DIPEA, pH 9, 60 °C- aq. micro-ondas	5	+++	ausência

PD: produto desejado

Tal insucesso não pôde ser explicado pelo uso de TBTU ou BOP, visto que estes reagentes acopladores foram os mais eficientes entre os testados no acoplamento de Boc-Lys¹(2-Cl-Z)-Ala-Pro-Ser(Bzl)-Gly⁵-OH e Asp¹⁷(OcHex)-Pro-Ser(Bzl)-His(Tos)-Arg(Tos)-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-Arg(Tos)-Asp(OcHex)-Tyr(2-Br-Z)-Met-Gly-Trp-Met-Asp(OcHex)-Phe³³- MBHA em DMF a 60 °C (REMUZGO, 2003).

Goulas e colaboradores solubilizaram os D.A. Boc-Val¹-OH, Fmoc-Val²-Tyr(But)-Thr(But)-Asp(But)-Cys(Mmt)-Thr(But)-Glu(But)-Ser(But)-Gly¹⁰-OH, Fmoc-Gln(Trt)¹¹-Asn(Trt)-Leu-Cys(Mmt)-Leu-Cys(Acm)-Glu(But)-Gly¹⁸-OH, Fmoc-Ser(But)¹⁹-Asn(Trt)-Val-Cys(Mmt)-Gly-Gln(Trt)-Gly²⁵-OH, Fmoc-Asn(Trt)²⁶-Lys(Boc)-Cys(Acm)-Ile-Leu-Gly-

Ser(But)-Asp(But)-Gly³⁴-OH, Fmoc-Glu(But)³⁵-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Cys(Mmt)-Val-Thr(But)-Gly⁴²-OH, Fmoc-Glu(But)⁴³-Gly-Thr(But)-Pro-Lys(Boc)-Pro⁴⁸-OH, Fmoc-Gln(Trt)⁴⁹-Ser(But)-His(Trt)-Asn(Trt)-Asp(But)-Gly⁵⁴-OH em DMSO de modo que suas concentrações fossem de 0,05- 0,10 M (3x de excesso molar em relação ao A.A.) e utilizaram DIC/HOBt (3x de excesso molar) na tentativa de acoplamento (GOULAS et al., 2006). Embora esta condição fosse adequada para as condensações de Fmoc-Gln(Trt)⁴⁹-Ser(But)-His(Trt)-Asn(Trt)-Asp(But)-Gly⁵⁴-OH a Asp(But)⁵⁵-Phe-Glu(But)-Glu(But)-Ile-Pro-Glu(But)-Glu(But)-Tyr(But)-Leu-Gln⁶⁵-Cl-Trt, de Fmoc-Glu(But)⁴³-Gly-Thr(But)-Pro-Lys(Boc)-Pro⁴⁸-OH a Fmoc-Gln(Trt)⁴⁹-Ser(But)-His(Trt)-Asn(Trt)-Asp(But)-Gly⁵⁴-Asp(But)⁵⁵-Phe-Glu(But)-Glu(But)-Ile-Pro-Glu(But)-Glu(But)-Tyr(But)-Leu-Gln⁶⁵-Cl-Trt e de Fmoc-Glu(But)³⁵-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Cys(Mmt)-Val-Thr(But)-Gly⁴²-OH a Fmoc-Glu(But)⁴³-Gly-Thr(But)-Pro-Lys(Boc)-Pro⁴⁸-Gln(Trt)⁴⁹-Ser(But)-His(Trt)-Asn(Trt)-Asp(But)-Gly⁵⁴-Asp(But)⁵⁵-Phe-Glu(But)-Glu(But)-Ile-Pro-Glu(But)-Glu(But)-Tyr(But)-Leu-Gln⁶⁵-Cl-Trt, a condensação de Fmoc-Asn(Trt)²⁶-Lys(Boc)-Cys(Acm)-Ile-Leu-Gly-Ser(But)-Asp(But)-Glu³⁴-OH a Fmoc-Glu(But)³⁵-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Cys(Mmt)-Val-Thr(But)-Gly⁴²-Glu(But)⁴³-Gly-Thr(But)-Pro-Lys(Boc)-Pro⁴⁸-Gln(Trt)⁴⁹-Ser(But)-His(Trt)-Asn(Trt)-Asp(But)-Gly⁵⁴-Asp(But)⁵⁵-Phe-Glu(But)-Glu(But)-Ile-Pro-Glu(But)-Glu(But)-Tyr(But)-Leu-Gln⁶⁵-Cl-Trt não foi bem sucedida devido à baixa solubilidade do D.A. no solvente. Assim, os autores empregaram o grupo Acm como protetor de cadeia lateral da Cys ao invés de Mmt para tornar o fragmento solúvel em DMSO, o que garantiu o sucesso da condensação.

Mihala e colaboradores estudaram o acoplamento entre o fragmento hidrofóbico D.A. Boc-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-OH (presente em seis repetições na elastina humana) e a peptidil-resina Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-PAM resina usando DMF ou a mistura clorofórmio: fenol (3:1, v/v), diferentes excessos do D.A. e DIC/HODhbt ou HODhbt:TBA*ODhbt como reagentes acopladores. Quando DMF foi utilizado, dímeros e

trímeros foram detectados no material bruto obtido. Por outro lado, nenhum oligômero foi observado quando a mistura clorofórmio: fenol (3:1, v/v), 1,5 equivalente de D.A. e HODhbt:TBA*ODhbt (2,5:0,5) foram utilizados (MIHALA et al., 2001).

Grandas e colaboradores obtiveram a toxina II de *Androctonus australis Hector* (64 resíduos) por SCPFS a partir da condensação sequencial dos seguintes fragmentos à peptidil-resina de partida Pro¹-Gly-Arg(Tos)-Cys(Acm)-His⁴-resina MBHA: Boc-Val-Lys(Z)-Asp(OBut)-Gly-OH, Fmoc-Tyr⁵(OcHex)-Ile-Val-Asp(Bzl)-Asp(Bzl)-Val-Asn-Cys(Acm)-Thr(Bzl)-Tyr(OcHex)-Phe-Cys(Acm)-Gly¹⁷-OH, Fmoc-Arg¹⁸(Tos)-Asn-Ala-Tyr(OcHex)-Cys(Acm)-Asn-Glu(Bzl)-Glu(Bzl)-Cys(Acm)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-Leu-Lys(Z)-Gly³¹-OH, Boc-Glu³²(Bzl)-Ser(Bzl)-Gly³⁴-OH, Fmoc-Tyr³⁵(OcHex)-Cys(Acm)-Gln-Trp-Ala-Ser(Bzl)-Pro-Tyr(OcHex)-Gly⁴³-OH, Boc-Asn⁴⁴-Ala-Cys(Acm)-Tyr(OcHex)-Cys(Acm)-Tyr(OcHex)-Lys(Z)-Leu-Pro⁵²-OH e Boc-Asp⁵³(Bzl)-His-Val-Arg(Tos)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-Gly⁵⁹-OH. Os D.A. (1,3-2,8 equivalentes) foram dissolvidos em DMF e adicionados à peptidil-resina juntamente com HOBt/DMF. Após 2 min, DCC (equimolar ao D.A.) foi adicionado e a mistura foi agitada por 2 h a 0 °C e deixada à temperatura ambiente por mais 16-48 h, dependendo do fragmento a ser condensado (GRANDAS et al., 1989).

Diante destas informações, suspeitamos que o impedimento estérico ou as dimensões do D.A. Fmoc-Ser¹⁹(But)-His(Trt)-Arg(Pmc)-Ile-Ser²³(But)-OH (**Figura 52**) pudesse ser o fator responsável pelo insucesso de nossas tentativas de condensação descritas acima. Por isso, decidimos tentar condensar o fragmento Fmoc-CCK₁₂₋₁₈ (aparentemente menos impedido estericamente) ao mesmo fragmento CCK₂₄₋₃₃-NS Rink amida A.A. na condição da **Tabela 19** que forneceu o TN menos positivo (reação 2).

Figura 52. Estruturas estáticas de Fmoc-Ser¹⁹(But)-His(Trt)-Arg(Pmc)-Ile-Ser²³(But)-OH (A) e de Fmoc-Asn¹²-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp(OBut)-Pro¹⁸-OH (B). Legenda: bola azul claro: carbono, bola azul escuro: nitrogênio, bola vermelha: oxigênio, bola amarela: enxofre.

d) Reação de Fmoc-Asn¹²-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp(OBut)-Pro¹⁸-OH com CCK₂₄₋₃₃-NS
Rink amida

Tal reação foi monitorada através do TN (KAISER et al., 1970) de amostra de peptidil-resina a cada 2 h. Após 24 h, o TN apresentou-se quase negativo, o que sugeriu acoplamento com bom rendimento. A peptidil-resina foi filtrada, lavada alternadamente com DMF e DCM e seca em dessecador à vácuo. Aproximadamente 10 mg foram submetidas à reação de clivagem do peptídeo da resina e desproteção total. O peptídeo bruto obtido foi analisado por LC/ESI-MS (**Figura 53**), revelando que, de fato, o produto desejado foi formado, embora ainda restasse quantidade significativa do fragmento CCK₂₄₋₃₃ NS, correspondente ao A.A. não consumido.

Figura 53. Resultados da análise por LC/ESI-MS do peptídeo resultante da condensação entre Fmoc-Asn¹²-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp(OBut)-Pro¹⁸-OH e CCK₂₄₋₃₃-NS Rink amida após clivagem da resina/desproteção total. Condições de RP-HPLC: injeção: 10 µL, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 90% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5%-95% B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componentes 1: Aceptor de acila CCK₂₄₋₃₃, [M+H]⁺ 1335,5, [M+2H]²⁺ 668,8. 2: produto desejado Fmoc-N¹²LQNLPDRDYMGMWDMF³³-NH₂, [M+H]⁺ 2349,98.

Tal resultado indicou que a natureza do fragmento D.A., mais especificamente de sua região C-terminal, é fator determinante na SCPFS. A análise da literatura revelou que a maioria das SCPFS descritas emprega D.A. com pouca ou nenhuma proteção nas cadeias laterais dos aminoácidos e Gly ou Pro como resíduo C-terminal (GRANDAS et al., 1989). Embora a condensação bem sucedida citada acima requeresse 24 h a 60 °C, vale ressaltar que nossas condições empregaram concentrações de D.A. de 1,72 µM em excesso de 2x em relação ao A.A., enquanto que as condensações entre fragmentos nas SCPFS descritas na literatura empregam concentrações e excessos molares muito superiores. Goulas e colaboradores, por exemplo, utilizaram os D.A. 0,05-0,10 M (3x de excesso molar em relação ao A.A.) durante a síntese convergente em fase sólida da hirudina à temperatura ambiente (GOULAS et al., 2006); Grandas e colaboradores realizaram a SCPFS da toxina II usando excessos de D.A. (1,3-2,8 x de excesso em relação ao A.A.) para que as reações fossem completadas em 16-48 h à temperatura ambiente (GRANDAS et al., 1989).

e) Reação de Fmoc-Arg²¹(Pmc)-Ile-Ser²³(But)-OH com CCK₂₄₋₃₃-NS Rink amida

Diante do resultado obtido na condensação acima descrita, sintetizamos um homólogo do Fmoc-CCK₁₉₋₂₃, o Fmoc-CCK₂₁₋₂₃ (truncado na porção N-terminal) para avaliar se este poderia ou não ser condensado com sucesso à peptidil-resina CCK₂₄₋₃₃-NS Rink amida para gerar a CCK₂₁₋₃₃-NS Rink amida. A condensação do fragmento Fmoc-Arg²¹(Pmc)-Ile-Ser²³(But)-OH ao A.A. CCK₂₄₋₃₃-NS Rink amida foi feita nas mesmas condições que a anterior: TBTU/DIPEA (pH 9), DMF, 60 °C- aquecimento convencional, sob agitação. Após 24 h de reação, a mesma foi interrompida e a peptidil-resina foi filtrada e lavada. Não tendo obtido um TN (KAISER et al., 1970) negativo para a peptidil-resina, realizamos um reacoplamento de 16 h. Novamente, a peptidil-resina foi filtrada, lavada, seca e submetida à clivagem do peptídeo da resina/desproteção total. O peptídeo obtido

foi analisado por LC/ESI-MS (**Figura 54**), revelando a formação do produto desejado, embora sem o consumo total do A.A.

4.4.3 SPFS do novo fragmento A.A.: CCK₁₉₋₃₃-NS Rink amida

Uma vez que os resultados das condensações entre Fmoc-Arg²¹(Pmc)-Ile-Ser²³(But)-OH e CCK₂₄₋₃₃-NS Rink amida e entre Fmoc-Asn¹²-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp(OBut)-Pro¹⁸-OH e CCK₂₄₋₃₃-NS Rink amida permitiram a obtenção do produto desejado, concluímos, que, de fato, impedimento estérico no fragmento 19-23 seja o responsável pelo insucesso da primeira condensação. Assim, decidimos alongar passo a passo a peptidil-resina CCK₂₄₋₃₃-NS Rink amida resultante da SPFS convencional para gerar a peptidil-resina CCK₁₉₋₃₃-NS Rink amida que passaria a atuar como um novo A.A. nas futuras condensações a fragmentos D.A. A análise do peptídeo bruto CCK₁₉₋₃₃ NS por LC/ESI-MS revelou que o pico majoritário correspondia ao produto desejado e que outros subprodutos foram formados em pequena extensão, tal como o análogo contendo uma Met oxidada ao seu sulfóxido (**Figura 55**) e isômeros.

a) Reação de Fmoc-Asn¹²-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp(OBut)-Pro¹⁸-OH com CCK₁₉₋₃₃-NS Rink amida

Esta condensação foi feita unicamente para testar a reatividade do novo D.A. a fragmentos A.A. não impedidos estericamente. Foram usadas condições idênticas a da condensação entre Fmoc-Asn¹²-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp(OBut)-Pro¹⁸-OH e CCK₂₄₋₃₃-NS Rink amida. O avanço da reação foi monitorado por TN (KAISER et al., 1970) a cada 2 h que indicou a necessidade de realizar dois reacoplamentos, por 24 e 20 h. Após este período, a peptidil-resina foi filtrada, lavada, seca e incubada com o coquetel de clivagem do peptídeo da resina/ desproteção total. O peptídeo bruto foi analisado por LC/ESI-MS revelando que o pico majoritário correspondia ao produto desejado (**Figura 56**).

Figura 54. Resultados da análise por LC/ESI-MS do bruto resultante da condensação entre Fmoc-Arg²¹(Pmc)-Ile-Ser²³(But)-OH e CCK₂₄₋₃₃-NS Rink amida após clivagem da resina/desproteção total. Condições de RP-HPLC: injeção: 10 µL, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 90% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5%-95% B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componentes 1: A.A. CCK₂₄₋₃₃ NS, $[M+H]^+$ 1335,5. 2: peptídeo desejado contendo as duas Arg protegidas com Pmc (não removidos durante a clivagem) sendo m/z: 2402,1 (fragmento Fmoc-R²¹(Pmc)ISDR(Pmc)DYMGWMDF³³) e m/z: 1627,0 (fragmento D²⁴R(Pmc)DYMGWMDF³³-NH₂).

Figura 55. Resultados da análise por LC/ESI-MS do CCK₁₉₋₃₃ NS bruto resultante da SPFS convencional. Condições de RP-HPLC: injeção: 10 µL, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 90% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5%-95% B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componentes **1**: peptídeo contendo 1 Met oxidada a sulfóxido [M+2H]⁺⁺ 966,5. **2**: não identificado, ionização precária. **3**: S¹⁹HRISDRDYMGMDF³³-NH₂ [M+2H]⁺⁺ 958,6. **4**: não identificado. **5**: não identificado, ionização precária. **6**: "scavenger" utilizado durante a clivagem do peptídeo da resina.

Figura 56. Resultados da análise por LC/ESI-MS do produto da condensação a 60 °C- aquecimento convencional entre Fmoc-Asn¹²-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp(OBut)-Pro¹⁸-OH e CCK₁₉₋₃₃-NS Rink amida após clivagem da resina/desproteção total. Condições de RP-HPLC: injeção: 10 µL, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 90% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5% -95% B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componente 1: peptídeo desejado; N¹²LQNLDPshrisDRDYMGWMDf³³-NH₂ [M+H]⁺ 2579,2; Fmoc-N¹²LQNLDPshrisDRDYM²⁸ [M+H]⁺ 2296,3.

b) Reação de Fmoc-Arg⁶(Pmc)-Met-Ser(But)-Ile-Val-Lys¹¹(Boc)-OH com CCK₁₉₋₃₃-NS

Rink amida

Tendo condensado o D.A. Fmoc-Asn¹²-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp(OBut)-Pro¹⁸-OH à peptidil-resina CCK₁₉₋₃₃-NS Rink amida, fomos estudar se a condição reacional usando aquecimento convencional poderia ser utilizada para condensar o fragmento CCK₆₋₁₁ NS à uma peptidil-resina. De fato, apesar de mais curto do que o Fmoc-Asn¹²-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp(OBut)-Pro¹⁸-OH, tal fragmento D.A. contém mais proteções e um C-terminal mais impedido estericamente.

A condensação foi realizada em condições idênticas à anterior, sendo também necessária a realização de dois reacoplamentos para a obtenção de TN (KAISER et al., 1970) negativo da peptidil-resina, que foi lavada, seca e incubada com o coquetel de clivagem do peptídeo da resina/desproteção total. A análise do peptídeo bruto por LC/ESI-MS revelou que o peptídeo desejado não foi formado e que o pico majoritário do cromatograma correspondia ao A.A. que não reagiu (**Figura 57**). Duas seriam as possibilidades de explicação deste resultado: 1) a condição reacional utilizada não foi adequada; por outro lado, nela o grau de intumescimento da peptidil-resina A.A. era satisfatório e os reagentes eram solúveis. Por isso, decidimos empregar as micro-ondas, mantendo as condições experimentais até então utilizadas. 2) as proteções empregadas poderiam estar dificultando a reação; de fato, durante a síntese convergente da hirudina, Goulas e colaboradores verificaram que a utilização do D.A. em grande excesso molar e longos tempos reacionais não foram suficientes para garantir a condensação entre dois fragmentos, o que ocorreu quando o grupo protetor da cadeia lateral da Cys foi substituído por outro de menor volume. Embora os autores tenham atribuído tal melhoria à maior solubilização do novo D.A. em DMSO, sugerimos que o menor “volume espacial” do novo D.A. também possa ter sido determinante (GOULAS; GATOS; BARLOS, 2006).

Figura 57. Resultados da análise por LC/ESI-MS do bruto resultante da condensação a 60 °C- aquecimento convencional de Fmoc-Arg⁶(Pmc)-Met-Ser(But)-Ile-Val-Lys¹¹(Boc)-OH com CCK₁₉₋₃₃-NS Rink amida após clivagem da resina/desproteção total. Condições de RP-HPLC: injeção: 10 µL, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 90% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5% - 95% B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componentes **1**: Aceptor de acila CCK₁₉₋₃₃, [M+H]⁺ 958,3. **2**: não identificado. **3**: Aceptor de acila contendo 1 Met oxidada a sulfóxido, [M+H]⁺ 1932,9. **4**: peptídeo desejado, [M+2H]⁺² 1426,9; [M+3H]⁺³ 951,5. **5**: “scavenger” utilizado durante a reação de clivagem do peptídeo da resina.

Durante as tentativas assistidas por micro-ondas usando 20 W e temperatura de trabalho de 60 °C, foi observado que a temperatura de reação atingiu o máximo de 66 °C (LOFFREDO et al., no prelo). Observação similar foi feita por Bacsa e colaboradores em NMP, cuja temperatura atingiu o máximo de 86 °C usando 10 W e temperatura de trabalho de 75 °C (BACSA et al., 2008). Tal aumento indesejado, conhecido como “overshooting”, decorre do fato de a maioria dos solventes orgânicos absorverem fortemente a radiação de micro-ondas e a converterem em energia térmica. Esta transformação, conhecida como perda dielétrica, é tão intensa que, mesmo tendo cessado a emissão de micro-ondas, a temperatura do sistema continua a aumentar (HERRERO et al., 2008). Também foi observado que a temperatura de trabalho 60 °C era atingida em até 1 min, o que fazia com que a emissão das micro-ondas fosse interrompida até que a temperatura chegasse a 56 °C (LOFFREDO et al., no prelo). Em outras palavras, no cômputo geral, o meio reacional foi exposto à radiação de micro-ondas por aproximadamente 20% de reação. Por isso, a potência de 20 W, considerada baixa frente aquelas empregadas na SPFS assistida por micro-ondas (25 W, RIZZOLO et al., 2007; 50 W, PALASEK et al., 2007), foi diminuída, o máximo de temperatura no meio reacional passou a atingir 60 °C e o tempo de exposição às microondas aumentou para 37 % do tempo reacional.

Assim, a tentativa de condensação assistida por micro-ondas do fragmento Fmoc-Arg⁶(Pmc)-Met-Ser(But)-Ile-Val-Lys¹¹(Boc)-OH com a peptidil-resina CCK₁₉₋₃₃-NS Rink amida foi feita empregando DMF, TBTU/DIPEA (sendo o primeiro equimolar ao D.A. e a base utilizada em 3 vezes de excesso molar), 5 W por 3 h em atmosfera inerte. Não tendo obtido TN (KAISER et al., 1970) negativo da peptidil-resina, ela foi lavada e submetida a dois reacoplamentos de 3 h em condições idênticas que levaram a um TN negativo da peptidil-resina. Esta foi seca e submetida à clivagem do peptídeo da resina e desproteção

total. A análise do peptídeo bruto por LC/ESI-MS (**Figura 58**), revelou que o componente majoritário era o peptídeo desejado e que o contaminante (pico 2) é um análogo contendo uma das Met oxidadas ao seus sulfóxidos.

A oxidação da Met ao seu sulfóxido é um problema comum da SPFS. Ela é ainda mais agravante na síntese múltipla, na qual a porcentagem de peptídeo oxidado pode chegar a 50 % (dependendo da posição da Met na sequência) (BECK; JUNG, 1994). Linde e colaboradores relataram que a utilização dos solventes MeOH/0,1% TFA/H₂O e 90% ACN/0,1% TFA empregados na extração/análise de peptídeos sintéticos favorecem tal oxidação e que a quantidade de peptídeo modificado é inversamente proporcional à quantidade manipulada (LINDE et al., 1990). Portanto, os nossos dados condizem com tais relatos. De fato, os solventes utilizados nas análises dos peptídeos por RP-HPLC foi 90% ACN/0,09%TFA/H₂O.

c) Reação de Fmoc-Lys¹(Boc)-Ala-Pro-Ser(But)-Gly⁵-OH com CCK₁₉₋₃₃-NS Rink amida

As micro-ondas também foram usadas para assistir a condensação do fragmento Fmoc-Lys¹(Boc)-Ala-Pro-Ser(But)-Gly⁵-OH à peptidil-resina CCK₁₉₋₃₃-NS Rink amida, uma vez que a tentativa empregando o aquecimento convencional não foi bem sucedida: a análise por LC/ESI-MS (**Figura 59**) do peptídeo bruto resultante revelou que ele não continha o peptídeo desejado, apenas subprodutos.

O emprego da condição experimental descrita no item acima, permitiu a obtenção do peptídeo desejado, após 12 h de reação, conforme indicado na **Figura 60** que mostra os resultados da caracterização do peptídeo bruto por LC/ESI-MS.

Em conjunto, os resultados acima revelaram que os fatores não térmicos das micro-ondas podem ter agilizado as condensações que não haviam sido bem sucedidas usando o aquecimento convencional.

Figura 58. Resultados da análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da condensação a 60 °C- aquecimento micro-ondas de Fmoc-Arg⁶(Pmc)-Met-Ser(But)-Ile-Val-Lys¹¹(Boc)-OH com CCK₁₉₋₃₃-NS Rink amida após clivagem da resina/desproteção total. Condições de RP-HPLC: injeção: 10 µL, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 90% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5% - 95% B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componentes 1: Aceptor de acila CCK₂₄₋₃₃ NS, [M+H]⁺ 1335,5. 2: peptídeo desejado contendo uma Met oxidada a sulfóxido; [M+2H]²⁺ 1434,9; [M+3H]³⁺ 956,8. 3: Peptídeo desejado, [M+2H]²⁺ 1426,8; [M+3H]³⁺ 951,6. 4: “scavengers”.-

Figura 59. Resultados da análise por LC/ESI-MS do produto da condensação a 60 °C- aquecimento convencional de Fmoc-Lys¹(Boc)-Ala-Pro-Ser(But)-Gly⁵-OH com CCK₁₉₋₃₃-NS Rink amida após clivagem da resina/desproteção total. Condições de RP-HPLC: injeção: 10 µL, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 90% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5% - 95% B em 30 min. Condições de ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺.

Embora nosso modelo peptídico de estudo da SCPFS fosse a CCK-33 NS, acabamos não fazendo as condensações sequenciais dos fragmentos D.A. CCK₆₋₁₁ e CCK₁₋₅ à peptidil-resina obtida referente à CCK₁₂₋₃₃ conforme descrito no Esquema 4 porque não houve tempo hábil para preparar todos os fragmentos em escala suficiente. De fato, após cada reação de condensação, toda a peptidil-resina era submetida à clivagem do peptídeo da resina /desproteção total para caracterização do peptídeo bruto obtido. Além disso, vale ressaltar que desejávamos investigar alguns aspectos da SCPFS a 60 °C empregando o aquecimento convencional e o mediado pelas micro-ondas e não simplesmente obter a molécula-alvo. Assim, este é o primeiro relato da utilização das micro-ondas na SCPFS de um peptídeo.

Figura 60. Resultados da análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da condensação a 60 °C- aquecimento micro-ondas de Fmoc-Lys¹(Boc)-Ala-Pro-Ser(But)-Gly⁵ com CCK₁₉₋₃₃-NS Rink amida após clivagem da resina/desproteção total. Condições de RP-HPLC: injeção: 10 µL, coluna Vydac C₁₈, solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 90% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ: 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5%- 95% B em 30 min. ESI-MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. Componentes 1: peptídeo contendo 2 Met (O), [M+2H]⁺+2 1305,6. 2: peptídeo contendo 1 Met(O); [M+2H]⁺+2 1297,6. 3: Peptídeo desejado, [M+2H]⁺+2 1289,7; [M+3H]⁺+3 860,1. 4: “scavenger”, não ionizou.

5. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

As informações contidas nesta Tese deixam claro que: 1) as sínteses manual e automática individual, múltipla, de bibliotecas e micro arranjos de peptídeos empregam a metodologia da fase sólida; 2) apesar do desenvolvimento atual desta metodologia ainda há muito a se estudar na SPFS, já que os químicos de peptídeos continuam se deparando com problemas e limitações inerentes a ela, tais como a ocorrência de aminoacilações e desproteções incompletas (que geram análogos deletados, (BODANSZKY; DESHMANE; MARTINEZ, 1979; RIZZOLO et al., 2007; BACSA et al., 2008), remoções prematuras de protetores de grupo amino- α (que produzem análogos contendo aminoácidos adicionais, BODANSZKY; DESHMANE; MARTINEZ, 1979; REMUZGO et al., 2009), reações secundárias diversas (que levam a interrupções do processo sintético; STEWART; YOUNG, 1984; ISHIGURO; EGUCHI, 1989; FLORA et al., 2005) ou modificações na sequência tal como a formação de piperidinil-alanina quando Cys é o aminoácido C-terminal da sequência sintetizada via estratégia Fmoc (BARANY et al., 2003) e, finalmente, baixos rendimentos sintéticos e de purificação. Obviamente, tais problemas e limitações são intensificadas nos casos de sínteses múltiplas, nas quais diversas sequências diferentes são alongadas em condições idênticas, sem que as cinéticas de reação sejam consideradas (SCHNORRENBURG; GERHARDT, 1989; JUNG; BECK-SICKINGER, 1992).

A lentidão de determinadas acilações e desproteções na SPFS podem ser contornada com o emprego de temperaturas elevadas. O nosso laboratório foi um dos pioneiros no estudo de diferentes aspectos da SPFS passo a passo usando temperaturas altas em todas as etapas da SPFS (VARANDA; MIRANDA, 1997; RIVIER; MIRANDA, 2002; SOUZA et al., 2004; REMUZGO et al., 2009; LOFFREDO et al., 2009) ou na maior parte delas (LOFFREDO et al., prelo), mas atualmente muitos pesquisadores também o fazem. Como foi descrito na Introdução, dois tipos de aquecimento têm sido empregados: o convencional (banho de óleo ou água) e o decorrente da utilização das micro-ondas. Com o desenvolvimento de fornos que

permitiriam o controle das potências e temperaturas, a SPFS assistida por micro-ondas passou a predominar (CAMPAGLIA et al., 2004; MATSUSHITA et al., 2005; MURRAY; et al., 2005; BRANDT et al., 2006; FARA et al., 2006; PARK et al., 2007; RIZZOLO et al., 2007; MURRAY; GELLMAN, 2007; JOSHI et al., 2008; ZHANG et al., 2007; CEMAZAR; CRAIK, 2008; COANTIC et al., 2008; DIAZ-MOCHON et al., 2008; GRIECO et al., 2008). Entretanto, poucos são os estudos feitos com o intuito de especular qual dos fatores das micro-ondas (térmico ou não-térmico) é o responsável pela obtenção de peptídeos com melhor rendimento ou pela intensificação de determinadas reações secundárias (SOUZA, 2000; ERDÉLYI; GOGOLL, 2002; MAVANDADI et al., 2004; BACSA et al., 2006; PALASEK et al., 2007; BACSA et al., 2008; LOIDL et al., 2009; LOFFREDO et al., 2009).

Dentre as inúmeras reações secundárias que podem ser intensificadas na SPFS com a utilização de altas temperaturas, a enantiomerização é a mais indesejada. Porém, nem sempre ela é detectada durante as análises dos peptídeos obtidos devido às semelhanças que os pares de enantiômeros apresentam frente a colunas de RP-HPLC convencionalmente utilizadas para a análise e purificação de peptídeos sintetizados (CZERWENKA; MAIER; LINDNER, 2004). Assim, se faz necessária a utilização de mais uma técnica analítica empregando um seletor quiral para que todos os estereoisômeros sejam detectados e identificados (CZERWENKA; MAIER; LINDNER, 2004). Exemplos disto foram as análises dos modelos Ac-Hb₅₀₋₅₃ e Ac-CCK₁₈₋₂₁ que não puderam ser resolvidos de seus diastereoisômeros contendo D-His quando as técnicas RP-HPLC e EC (inclusive utilizando seletor quiral) foram utilizadas.

Existem duas maneiras de detectar e quantificar a extensão desta reação: identificação dos isômeros nas suas formas íntegras (MIYAZAWA et al., 1992; RIESTER et al., 1996; DESAI; ARMSTRONG, 2004) ou a partir da hidrólise total do peptídeo e identificação dos D-aminoácidos (direta ou indiretamente). Quando a abordagem escolhida envolve a hidrólise dos peptídeos, os hidrolisados podem ser analisados sem derivatização prévia empregando uma fase estacionária quiral ou

indiretamente através de derivatização pré-coluna com reagente quiral e a posterior separação dos diastereoisômeros em um sistema aquiral (PÉTER et al., 2004). Os reagentes derivatizantes mais utilizados são: o 1-fluor-2,4-dinitrofenil-5-L-Ala amida (FDNP-Ala-NH₂, "Reagente de Marfey"; ADAMSON et al., 1992), o 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glicopiranosil isotiocianato (GITC; NISHI et al., 1990) e o o-ftalaldeído (OPA) e a *N*-acetil-Cys (HOUBEN et al., 1993).

Dando continuidade a investigação iniciada por Souza e colaboradores (SOUZA et al., 2004), estudamos sistematicamente a incidência da enantiomerização na SPFS a 60 °C (em todas as etapas) de modelos contendo os aminoácidos mais susceptíveis a esta reação (Ser, His e Cys) dentre os 20 usuais, empregando a mistura 25% DMSO/tolueno e os aquecimentos convencional e pelas micro-ondas. Enquanto realizávamos o trabalho iniciado em 2004, Palasek e colaboradores e Bacsa e colaboradores também se interessaram em investigar se o aumento de temperatura (sob assistência das micro-ondas) tinha influência na extensão da enantiomerização (PALASEK et al., 2007; BACSA et al., 2008). Porém, enquanto o primeiro grupo utilizou DMF, o segundo empregou o NMP, solventes comumente empregados na SPFS assistida por micro-ondas, nós utilizamos a mistura 25% DMSO/tolueno. Esta mistura binária foi selecionada com base em relatos de que ela: apresenta estabilidade térmica e baixa taxa de evaporação a 60-70 °C, promove a solubilização de todos os Boc- e Fmoc-derivados de aminoácidos (RABINOVICH; RIVIER, 1994), intumescce bem as resinas constituídas de poliestireno-divinilbenzeno e parece evitar a agregação inter-cadeias peptídicas (VARANDA; MIRANDA, 1997), bem como não intensifica a enantiomerização dos Boc- e Fmoc-Ile, -Phe, -Thr, -Lys, e -Tyr nas SPFS usando o aquecimento convencional (SOUZA, 2000; SOUZA et al., 2004). Além disso, também consideramos que esta mistura binária aprótica teria o potencial para absorver as micro-ondas por comparação com os seguintes solventes apróticos que tem este potencial e valores de constante dielétrica (ϵ'), perda dielétrica (ϵ'' ; quantidade de energia que é convertida a calor) e $\tan \delta$ [(ϵ''/ϵ') ; habilidade do

solvente em absorver as micro-ondas] conhecidos: NMP (ϵ' , ϵ'' e $\tan \delta$: 32,2, 8,855 e 0,275) e DMF (ϵ' , ϵ'' e $\tan \delta$: 37,7, 6,070 e 0,161) (HAYES, 2002). De fato, (i) a partir do gráfico de ϵ versus a razão DMSO: tolueno (MAERTENS et al., 1999), estimamos que o ϵ' da mistura 25% DMSO/tolueno é 31,5 [muito próximo do ϵ' do NMP, utilizado com sucesso em SPFS assistidas por micro-ondas (BACSA et al., 2008)]; (ii) todas as nossas SPFS em 25% DMSO/tolueno assistidas por micro-ondas forneceram os peptídeos desejados como produtos majoritários, não tendo levado ao comprometimento de suas integridades quirais em extensão significativa (exceção da Cys).

Nas nossas condições experimentais, a extensão da enantiomerização da Boc-His(Tos)-OH (0,8-1,7%) foi similar àquela obtida por Palasek e colaboradores para o Fmoc-His(Trt)-OH a 50 °C (1,6%; PALASEK et al., 2007) e inferior à descrita por Bacsa e colaboradores a 60-75 °C para o mesmo derivado de aminoácido (BACSA et al., 2008). Porém, quando o derivado Fmoc-Cys(Trt)-OH foi acoplado a peptidil-resina em crescimento mediante assistência de micro-ondas, a formação de D-Cys elevou-se para 3,6% (o mesmo não ocorreu durante a SPFS convencional). Tendo verificado a formação de D-Cys em quantidade significativa (4,5% a 80 °C), Palasek e colaboradores sugeriram que o acoplamento de Fmoc-Cys(Trt)-OH fosse feito por 2 min a 0 W seguido por 4 min a 40 W, de modo que a temperatura fosse mantida a 50 °C (3,2% de D-Cys a 50 °C) ou à temperatura ambiente (1,1% de D-Cys). Em relação aos outros aminoácidos contidos nos modelos estudados, os nossos resultados evidenciaram que enquanto os aminoácidos Pro, Ser Arg, Ala e Tyr não foram afetados pela temperatura, solvente ou modo de aquecimento empregado, os Asp, Met, Phe, His e Trp tiveram suas integridades quirais comprometidas a 60 °C, embora em pequena extensão (0,8-1,7%). Como esperado, o Boc-L-His(Tos)-OH foi o mais comprometido (1,7%), sendo sua extensão similar a descrita por Palasek e

colaboradores a 50 °C para Fmoc-*L*-His(Trt)-OH e menor do que a obtida a 60-75 °C por Bacsá e colaboradores.

Assim, o presente estudo revelou um modo mais seguro de se acoplar Cys em metade do tempo gasto convencionalmente e sem o comprometimento de sua integridade quiral. Além disso, ele evidenciou que o nosso protocolo econômico, que emprega 2,5 vezes de excesso de soluções 0,04-0,08 M de Fmoc ou Boc aminoácidos e quantidades equimolares de DIC/HOBt (1:1) ou TBTU/DIPEA (1:3), na SPFS a 60 °C usando o aquecimento convencional leva à baixa extensão de enantiomerização dos aminoácidos, ele é também aplicável à SPFS assistida por micro-ondas.

Por outro lado, outras reações secundárias eram passíveis de ocorrer em maior extensão durante as SPFS a 60 °C nas nossas condições reacionais quando um modelo mais complexo, tal como o decapeptídeo CCK₂₄₋₃₃ NS, fosse o alvo. Dentre elas estavam a oxidação da Met (SUN; GARDELLA Jr., 2000), ciclização de Gln com formação de piroglutamil-peptídeo e, conseqüente, interrupção do crescimento da cadeia peptídica (STEWART; YOUNG, 1984), desidratação de Asn (GAUSEPOHL; KRAFT; FRANK, 1989), deleção de Arg devido a formação de γ -lactama (CEZARI; JULIANO, 1996), formação de aspartimida (TAM et al., 1988), “N $\rightarrow$ O shift” de Ser (SAKAKIBARA; SHIN; HESS, 1962), formação de dicetopiperazina (ISIDRO-LLOBET et al., 2005), porém nos peptídeos brutos resultantes de SPFS a 60 °C empregando as nossas condições experimentais, somente detectamos subprodutos resultantes da oxidação de Met, da deleção de Arg e/ou Tyr.

Também enquanto realizávamos o trabalho descrito, em nosso laboratório Remuzgo se deparou com uma “difficult sequence”, o fragmento 101-132 da acantoscurreína, tendo solucionado o problema da agregação peptídica quando utilizou a resina CLEAR amida e a mistura 20% DMSO/NMP a 60 °C (REMUZGO et al., 2009). Interessados em complementar o estudo da SPFS passo a passo a 60 °C usando

aquecimento convencional e as micro-ondas de um modelo de síntese reconhecidamente difícil e demorada e levando em consideração os resultados previamente obtidos por Remuzgo e colaboradores (REMUZGO, 2003; REMUZGO et al., 2009) e Souza e colaboradores com a CCK-33 NS (SOUZA, 2000), utilizamos a resina CLEAR amida para completar a nossa investigação sistemática. Assim, este é o primeiro relato da SPFS passo a passo da CCK-33 NS a 60 °C, sob aquecimento convencional e assistida por micro-ondas e que foi monitorada por espectroscopia Raman para acompanhar mudanças conformacionais da peptidil-resina em crescimento que são responsáveis pela dificuldade de acesso ao seu grupo N-terminal. Ficou evidente que a SPFS a 60 °C assistida por micro-ondas foi a que possibilitou a maior recuperação do peptídeo desejado em menor tempo, resultado que pode ser explicado pelo menor tempo de exposição de Met à temperatura elevada ($\frac{1}{2}$ do tempo do aquecimento convencional) e pelo uso de atmosfera inerte.

Nesta Tese é feito o primeiro relato da utilização das micro-ondas na SCPFS. Da mesma forma que para o estudo da SPFS passo a passo a 60 °C, a CCK-33 NS foi usada como modelo. De fato, afora estudar a possibilidade de agilizar a SCPFS, tínhamos a expectativa de comparar as duas abordagens sintéticas. Conforme é descrito, a obtenção dos fragmentos D.A. e A.A. por SPFS passo a passo a 60 °C usando aquecimento convencional foi bem sucedida ao contrário de algumas tentativas de condensação entre eles, o que não pôde ser atribuído à insolubilidade dos fragmentos D.A., uma vez que eles se mostraram solúveis nos solventes empregados para as reações. Particularmente, a condensação entre o Fmoc-S(But)H(Trt)R(Pmc)IS(But)-OH ao CCK₂₄₋₃₃-Rink Amida não foi possível mesmo após longos tempos a 60 °C utilizando diferentes condições reacionais. Porém, a redução do D.A. ao Fmoc-R(Pmc)IS(But)-OH e o emprego de outro D.A. (Fmoc-NLQNLD(OBut)P-OH) evidenciaram que: 1) a alta temperatura não foi capaz de minimizar a importância da natureza e de suas proteções de cadeia lateral do fragmento D. A na SCPFS; 2) justificou a incorporação passo a passo dos

aminoácidos protegidos contidos no Fmoc-S(But)H(Trt)R(Pmc)IS(But)-OH à CCK₂₄₋₃₃-Rink Amida (síntese do CCK₁₉₋₃₃-Rink amida) para que a peptidil-resina resultante pudesse atuar como o fragmento A.A. em condensações com o Fmoc-NLQNLD(OBut)P-OH. Novamente, o uso do aquecimento convencional não foi suficiente para condensar o Fmoc-K(Boc)APS(But)G-OH ou o Fmoc-R(Pmc)MS(But)IVK(Boc)-OH à CCK₁₉₋₃₃-Rink amida, mas as micro-ondas a 60°C possibilitaram a obtenção dos produtos desejados após 12 h de reação. Esses resultados sugeriram que os fatores não-térmicos das micro-ondas tiveram contribuição decisiva na agilização destas reações.

Dado que a SCPFS é uma abordagem de alto custo uma vez que os testes de solubilidade e as tentativas de condensação em escala analítica acabam consumindo quantidades significativas dos fragmentos protegidos (D.A.) previamente obtidos por SPFS passo a passo, que muitas vezes precisam ser previamente purificados e caracterizados, o presente estudo permitiu concluir que a SPFS passo a passo a 60 °C assistida por micro-ondas (sob atmosfera inerte) empregando nosso protocolo é suficientemente ágil para a obtenção de sequências longas e de sínteses não-triviais. Obviamente, é preciso ressaltar que, para tais casos, este tipo de síntese leva à baixíssimos rendimentos finais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMSON, J. G.; HOANG, T.; CRIVICI, A.; LAJOIE, G. A. Use of Marfey's reagent to quantitate racemization upon anchoring of amino acids to solid supports for peptide synthesis. *Anal. Biochem.*, 1992, vol. 202, p. 210-214.
- AIMOTO, S. Polypeptide synthesis by the thioesters method, *Biopolymers (J. Pept. Sci.)*, 1999, vol. 51, p. 247-265.
- AIMOTO, S. Contemporary Methods for Peptide and Protein Synthesis. *Curr. Org. Chem.*, 2001, vol. 5, p. 45-87.
- AKAJI, K.; KISO, Y.; CARPINO, L. A. Fmoc-based solid-phase peptide-synthesis using a new tert-alcohol type 4-(1',1'-dimethyl-1'-hydroxypropyl) phenoxyacetyl handle (DHPP) resin. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1990, vol. 7, p. 584-586.
- ALBERICIO, F. Developments in peptide and amide synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2004, vol. 8, p. 211-221.
- ALBERICIO, F.; RUIZ-GAYO, M.; PEDROSO, E.; GIRALT, E. On the use of polystyrene-1%-divinylbenzene and Kel-F-g-styrene for the simultaneous synthesis of peptides. *Reactive Polym.*, 1989, vol. 10, p. 259-268.
- ALBRIZIO, S.; CAROTENUTO, A.; FATTORUSSO, C.; MORODER, L.; PICONE, D.; TEMUSSI, P.A.; D'URSI, A. Environmental mimic of receptor interaction: conformational analysis of CCK-15 in solution, *J. Med. Chem.*, 2002, vol. 45, p. 762-769.
- ALLEN, Y.S.; ADRIAN, T.E.; ALLEN, J.M.; TATEMOTO, K.; CROW, T.J.; BLOOM, S.R.; POLAK, J.M. Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science*, 1983, vol. 221, p. 877-879.
- AMBLARD, M.; FEHRENTZ, J.; MARTINEZ, J.; SUBRA, G. Methods and protocols of modern Solid-Phase Peptide Synthesis. Em: Molecular Biotechnology, vol. 33, Humana Press, 2006, p. 239-254.
- ANDRESEN, H.; GRÖTZINGER, C. Deciphering the antibodyome - peptide arrays for serum antibody - Biomarker Diagnostics. *Curr. Proteomics*, 2009, vol. 6, p. 1-12.
- ANTONOVICS, I; YOUNG, G. T. Amino-acids and peptides. Part XXV. The mechanism of the base-catalysed racemisation of the p-nitrophenyl esters of acylpeptides, *J. Chem. Soc., Perkin transactions*, 1967, vol. 1, p. 595-601.
- ARAKAMA, M.; NAKATANI, A.; MINOHARA, A.; NAKAMURA, M. Isolation and Amino Acid Composition of Human Angiotensin I. *Biochem. J.*, 1967, vol. 104, p. 900-906.
- ATHANASSOPOULOS, P.; BARLOS, K.; GATOS, D.; HATZI, O.; TZAVARA, C. Application of 2-chlorotriyl chloride in Convergent Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.*, 1995, vol. 36 (31), p. 5645-5648.
- ATHANASSOPOULOS, P.; BARLOS, K.; HATZI, O.; GATOS, D.; TZAVARA, C. Phase change during peptide synthesis. Em: Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis & Combinatorial Libraries, R. Epton Ed., Mayflower Scientific Limited, Birmingham, 1996, p. 243-246.
- ATHERTON, E.; BENOITON, N.L.; BROWN, E.; SHEPPARD, R.C.; WILLIAMS, B.J. Racemisation of activated, urethane-protected amino-acids by p-dimethyl-aminopyridine. Significance in Solid-phase Peptide Synthesis. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1981, p. 336-337.
- ATHERTON, E.; SHEPPARD, R.C. Solid Phase Peptide Synthesis: A practical approach, Oxford: IRL press, 1989, 216 p.

- BABU, V.V.S.; RAO, R.V.R. Microwave irradiated high-speed solution synthesis of peptide acids employing Fmoc-amino acid pentafluorophenyl esters as coupling agents. *Indian Journal of Chemistry Including Medicinal Chemistry*, 2005, vol. 44B (11), p. 2328-2332.
- BACSA, B.; DESAI, B.; DIBÓ, G.; OLIVER KAPPE, C. Rapid solid-phase peptide synthesis using thermal and controlled microwave irradiation. *J. Pept. Sci.*, 2006, vol. 12 (10), p. 633-638.
- BACSA, B.; HORVÁTI, K.; BÓSZÉ, S.; ANDREAE, F.; KAPPE, C.O. Solid-Phase Synthesis of Difficult Peptide Sequences at Elevated Temperatures: A Critical Comparison of Microwave and Conventional Heating Technologies. *J. Org. Chem.*, 2008, vol. 73 (19), p. 7532-7542.
- BAGLEY, C.J.; OTTESON, K.M.; MAY, B.L.; MCCURDY, S.N.; PIERCE, L.; BALLARD, F.J.; WALLACE, J.C. Synthesis of insulin-like growth factor using n-methyl pyrrolidinone as the coupling solvent and trifluoromethane sulfonic-acid cleavage from the resin, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1990, vol. 36, p. 356-361.
- BARANY, G.; HAN, Y.; HARGITTAI, B.; LIU, R.; VARKEY, J.T. Side-chain anchoring strategy for solid-phase synthesis of peptide acids with C-terminal cysteine. *Biopolymers (J. Pept. Sci.)*, 2003, vol. 71, p. 652-666.
- BARLOS, K.; GATOS, D. 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl/tbutyl-based convergent protein synthesis. *Biopolymers (J. Pept. Sci.)*, 1999, vol. 51, p. 266-278.
- BARLOS, K.; GATOS, D.; KAPOLOS, S.; PAPAPHOTIU, G.; SCHÄFER, W.; WENQING, Y. Esterification of partially protected peptide-fragments with resins-Utilization of 2-chlorotriethylchloride for synthesis of Leu-15-GASTRIN-I, *Tetrahedron Lett.*, 1989, vol. 30, p. 3947-3950.
- BECK, W.; JUNG, G. Convenient reduction of S-oxides in synthetic peptides, lipopeptides and peptide libraries. *Lett. Pept. Sci.*, 1994, vol. 1, p. 31-37.
- BEINFELD, M.C. An introduction to neuronal cholecystokinin. *Peptides*, 2001, vol. 22, p. 1197-1200.
- BENOITON, N. L. Sometimes it is neither a racemization nor an epimerization but an enantiomerisation- A plea for preciseness in the use of terms describing stereomutations that occur in peptide-synthesis, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1994, vol. 44 (4), p. 399-400.
- BENOITON, N.L. *Chemistry of Peptide Synthesis*; Taylor & Francis, Boca Raton, 2005, 304 pp.
- BENOITON, N.L.; KURODA, K.; CHEN, F.M.F. The dependence of asymmetric induction on solvent polarity and temperature in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.*, 1981, vol. 22(35), p. 3361-3364.
- BENOITON, N.L.; KURODA, K.; CHEN, F.M.F. The relative susceptibility to racemization of L- and D-residues in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.*, 1981, vol. 22 (35), p. 3359-3360.
- BENZ, H. The role of Solid-phase fragment condensation (SPFC) in peptide synthesis. *Synthesis*, 1994, vol. 4, p. 337-358.
- BERGMAN, M.; ZERVAS, L. Über katalische racemization Von aminosäuren und peptiden. *Biochem. Z.*, 1928, p. 205-280.
- BODANSZKY, M. Racemization. In: *Principles of Peptide Synthesis*, vol. 16, Bodanszky, M.; Eds., Springer-Verlag, Berlin, 1984, p. 158-173.

- BODANSZKY, M.; DESHMANE, S.S.; MARTINEZ, J. Side reactions in peptide synthesis: Possible removal of the 9-fluorenylmethoxycarbonyl group by the amino acid components during coupling. *J. Org. Chem.*, 1979, vol. 10, p. 1622-1625.
- BODANSZKY, M.; MARTINEZ, J. Side reactions in peptide synthesis. Em: The Peptides, vol. 5, Gross, E., Meienhofer; Eds., Academic Press, New York, 1983, p. 111-216.
- BORGIA, J. A.; FIELDS, G. B. Chemical synthesis of proteins. *Tibtech*, 2000, vol. 18, p. 243-251.
- BRANDT, M.; GAMMELTOFT, S.; JENSEN, K.J. Microwave heating for solid-phase peptide synthesis: general evaluation and application to 15-mer phosphopeptides. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 2006, vol. 12(4), p. 349-357.
- BRAY, B.L. Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis. *Nat. rev. Drug Discov.*, 2003, vol. 2, p. 587-593.
- BRAZEAU, P.; VALE, W.; BURGUS, R.; LING, N.; BUTCHER, M.; RIVIER, J.; GUILLEMIN, R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, 1973, vol. 179(68), p. 77-79.
- BRUCE, P.Y. Organic Chemistry, 4th Edition, Prentice Hall, 2003, 1344 pp.
- BRUNER, M.; JAMES, A.; BEALL, B.; CARLONE, G.M.; ADES, E.; JOHNSON, S.; GUARNER, J.; SAMPSON, J. Evaluation of synthetic, M type-specific peptides as antigens in a multivalent group A streptococcal vaccine. *Vaccine*, 2003, vol. 21, p. 2698-2703.
- BYK, G; COHEN-OHANA, M.; RAICHMAN, D. Fast and versatile Microwave-Assisted Intramolecular Heck Reaction in Peptide Macrocyclization using microwave energy, *Biopolymers*, 2006, vol. 81, p. 274-282.
- CAMPAGLIA, P.; GOMEZ-MONTERREY, I.; LONGOBARDO, L.; LAMA, T.; NOVELLINO, E.; GRIECO, P. An efficient approach for monosulfide bridge formation in solid-phase peptide synthesis, *Tetrahedron Lett.*, 2004, vol. 45, p. 1453-1456.
- CARPINO, L.A., EL-FAHAM, A.; ALBERICIO, F. Racemization studies during solid-phase peptide synthesis using azabenzotriazole-based coupling reagents. *Tetrahedron Lett.*, 1994, vol. 35(15), p. 2279-2282.
- CARPINO, L.A., KRAUSE, E., SFERDEAN, C.D., SCHÜMANN, M., FABIAN, H., BIENERT, M., BEYERMANN, M. Synthesis of "Difficult" Peptide Sequences: Application of a Dipeptide Technique to the Jung-Redemann 10- and 26-mers and the Amyloid Peptide A (1-42), *Tetrahedron Lett.*, 2004, vol. 45, p. 7519-7523.
- CASI, G.; HILVERT, D. Convergent protein synthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2003, vol. 13, p. 589-594.
- CEMAZAR, M.; CRAIK, D.J. Microwave-assisted Boc-solid phase peptide synthesis of cyclic cysteine-rich peptides. *J. Pept. Sci.*, 2008, vol. 14, p. 683-689.
- CEZARI, M.H.; JULIANO, L. Studies on lactam formation during coupling procedures of N alpha-N omega-protected arginine derivatives. *J. Pept. Res.*, 1996, vol. 9(2), p. 88-91.
- CHAN, W.C.; WHITE, P.D. Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach. Chemistry, structure and biology, Leiden: Escom Science Publishers, 2000, 346 pp.
- CHEN, S. T.; TSENG, P. H.; YU, H. M.; WU, C. Y.; HSIAO, K. F.; WU, S. H.; WANG, K. T. The studies of microwave effects on the chemical reactions, *J. Chin. Chem. Soc.*, 1997, vol. 44 (3), p. 169-182.

- CHEN, S.T.; CHIOU, S. H.; WANG, K. T. Enhancement of chemical-reactions by microwave irradiation, *J. Chin. Chem. Soc.*, 1991, vol. 38 (1), p. 85-91.
- CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. Organic Chemistry, Oxford University Press, 2000, 1536 pp.
- COANTIC, S.; SUBRA, G.; MARTINEZ, J. Microwave-assisted solid phase peptide synthesis on high loaded resins. *Int. J. Pept. Res. Ther* 2008, vol. 14, p. 143-147.
- COLLINS, J.M.; LEADBEATER, N.E. Microwave energy: a versatile tool for the biosciences. *Org. Biomol. Chem.*, 2007, vol. 5, p. 1141-1150.
- COLTHUP, N.B.; DALY, H.L.; WIBERLEY, S.E. Introduction to infrared and Raman spectroscopy. Academic Press, Boston, U.S.A., 1990, 547 pp.
- COMBE, N.; FRENKEL, D. Simple off-lattice model to study the folding and aggregation of peptides. *Mol. Phys.*, 2007, vol. 105 (4), p. 375-385.
- CONRAD, U.; CHANKVETADZE, B.; SCRIBA, G.K.E. High performance liquid chromatographic separation of dipeptide and tripeptide enantiomers using a chiral crown ether stationary phase. *J. Sep. Sci.*, 2005, vol. 28, p. 2275-2281.
- CRAWLEY, J.N.; CORWIN, R.L. Biological actions of cholecystokinin. *Peptides*, 1994, vol. 15, p. 731-755.
- CRISMA, M.; VALLE, G.; MORETTO, V.; FORMAGGIO, F.; TONIOLO, C. First 3-D structure determination of a peptide oxazol-5(4H)- One with a chiral protein amino-acid in the heterocyclic moiety- An X-ray-diffraction analysis of the enantiomeric and racemic Goodman oxazolone, *J. Pept. Res.*, 1995, vol. 8, p. 187-190.
- CZERWENKA, C.; MAIER, N.M.; LINDNER, W. Liquid chromatographic-mass spectrometric separation of oligoalanine peptide stereoisomers: influence of absolute configuration on enantioselectivity and two-dimensional separation of diastereomers and enantiomers, *J. Chromatogr. A*, 2004, vol. 1038, p. 85-95.
- DANDO, T.M.; PERRY, C.M. Enfuvirtide. *Drugs*, 2003, vol. 63(24), p. 2755-2766.
- DARRAGH, A.J.; GARRICK, D.J.; MOUGHAN, P.J.; HENDRIKS, W.H. Correction for amino acid loss during acid hydrolysis of a purified protein. *Anal. Biochem.*, 1996, vol. 236 (2), p.199-207.
- DeGRADO, W.F.; KAISER, E.T. Polymer-bound oxime esters as supports for solid-phase peptide synthesis. Preparation of protected peptide fragments. *J. Org. Chem.*, 1980, vol. 45, p. 1295-1300.
- DESAI, M.J.; ARMSTRONG, D.W. Analysis of native amino acid and peptide enantiomers by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, 2004, vol. 39, p. 177-187.
- DI FENZA, A., TANCREDI, M.; GALOPPINI, C.; ROVERO, P. Racemization studies of Fmoc-Ser(But)-OH during stepwise continuous-flow solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.*, 1998, vol. 39, p. 8529-8532.
- DIAZ-MOCHON, J. J.; FARA, M.A.; SANCHEZ-MARTIN, R.M.; BRADLEY, M. Peptoid dendrimers- microwave-assisted solid-phase synthesis and transfection agent evaluation. *Tetrahedron Lett.*, 2008, vol. 49, p. 923-926.
- DIMARCHI, R.; TAM, J. P.; KENT, S. B. H.; MERRIFIELD, R. B. Weak acid-catalyzed pyrrolidone carboxylic-acid formation from glutamine during solid-phase peptide-synthesis- Minimization by rapid coupling, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1982, vol. 19, p. 88-93.

- DU VIGNEAUD, V.; RESSLERM C.; TRIPPETT, S. The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J. Biol. Chem.*, 1953, vol. 205(2), p. 949-957.
- EBERLEIN, G.A.; EYSSELEIN, V.E.; GOEBELL, H. Cholecystokinin-58 is the major molecular form in man, dog and cat but not in pig, beef and rat intestine. *Peptides*, 1988, vol. 9, p. 993-998.
- EGGEN, V.F.; BAKELAAR, F.T.; PETERSEN, A.; KORTENAAR, O.B.W.T.; ANKONE, N.H.S.; BIJSTERVELD, H.E.J.M.; BOURS, G.H.L.; BELLAJ, F.E.L.; HARTSUIKER, M.J.; KUIPER, G.J.; VOERT, E.J.M.T. A novel method for repetitive peptide synthesis in solution without isolation of intermediates. *J. Pept. Sci.*, 2005, vol. 11(10), p. 633-641.
- EGUCHI, S.; HIRATA, Y.; IWASAKI, H.; SATO, K.; WATANABE, T.X.; INUI, T.; NAKAJIMA, K.; SAKAKIBARA, S.; MARUMO, F. *Endocrinology*, 1994, vol. 135, p. 2454.
- ENDO, T.; KITAMATSU, M.; SISIDO, M.; OHTSUKI, T. PNA Arrays for miRNA detection. *Chem. Lett.*, 2009, vol. 38(5), p. 438-439.
- ERDÉLYI, M.; GOGOLL, A. Rapid microwave-assisted solid phase peptide synthesis, *Synthesis*, 2002, vol. 11, p. 1592-1596.
- ERNY, G.L.; ELVIRA, C.; ROMÁN, J.S.; CIFUENTES, A. Capillary electrophoresis using copolymers of different composition as physical coatings: A comparative study. *Electrophoresis*, 2006, vol. 27, p. 1041-1049.
- EYSSELEIN, V.E.; EBERLEIN, G.A.; HESSE, W.H.; SINGER, M.V.; GOEBELL, H.; REEVE, JR. Cholecystokinin-58 is the major circulating form of cholecystokinin in canine blood. *J Biol Chem.*, 1987, vol. 262, p. 214-217.
- FABIAN, H. New developments in Raman spectroscopy of biological systems. *Vib. Spectrosc.*, 1993, vol. 4, p. 125-148.
- FARA, M.A.; DIÁZ-MOCHÓN, J.J.; BRADLEY, M. Microwave-assisted coupling with DIC/HOBt for the synthesis of difficult peptoids and fluorescently labeled peptides- a gentle heat goes a long way. *Tetrahedron Lett.*, 2006, vol. 47, p. 1011-1014.
- FARAH, A.E. Glucagon and the circulation. *Pharmacol. Rev.*- The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1983, vol. 35(3), p. 181-217.
- FARIS, P.L.; KOMISARUK, B.R.; WATKINS, L.R.; MEYER, D.J. Evidence for the neuropeptide cholecystokinin as an antagonist of opiate analgesia. *Science*, 1983, vol. 219, p. 310-312.
- FEDER, R.; DAGAN, A.; MOR, A. Structure-activity relationship study of antimicrobial dermaseptin S4 showing the consequences of peptide oligomerization on selective cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275(6), p. 4230-4238.
- FIELDS, G. B.; GUY, C. A. Trifluoroacetic acid cleavage and deprotection of resin-bound peptides following synthesis by Fmoc chemistry, Em: *Methods in Enzymology*, vol. 289, Academic Press, San Diego, 1997, p. 67-83.
- FIELDS, G. B.; TIAN, Z.; BARANY, G. Principles and practice of solid-phase peptide synthesis. Em: *Synthetic Peptides: A user's guide*, Grant, G.A. Ed.; W.H. Freeman and Company, USA, 1992, p. 77-183.
- FIELDS, G.B.; NOBLE, R.L. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1990, vol. 35(3), p. 161-214.
- FINK, H.; REX, A.; VOITS, M.; VOIGT, JÖRG-PETER. Major biological actions of CCK-

a critical evaluation of research findings. *Exp. Brain Res.*, 1998, vol. 123, p. 77-83.

FLORA, D.; MO, H.; MAYER, J.O.; KHAN, A.; YAN, L.Z. Detection and control of aspartimide formation in the sintesis of cyclic peptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, vol. 15, p. 1065-1068.

FORLONI, G.; TAGLIAVINI, F.; BUGIANI, O.; SALMONA, M. Amyloid in Alzheimer's disease and prion-related encephalopathies: studies with synthetic peptides. *Prog. Neurobiol.*, 1996, vol. 49, p. 287-315.

FRANCISKOVICH, J.; HOUSEMAN, K.; MUELLER, R.; CHMIELEWSKI, J. A systematic evaluations of the inhibition of HIV-1 protease by its C and N-terminal peptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, vol. 3, p. 765-768.

FUJII, N.; FUTAKI, S.; FUNAKOSHI, S.; AKAJI, K.; MORIMOTO, H.; DOI, R.; INOUE, K.; KOGIRE, M.; SUMI, S.; YUN, M.; TOBE, T.; AONO, M.; MATSUDA, M.; NARUSADA, H.; MORIGA, M.; YAGIMA, H. Studies On Peptides 160 Synthesis of a 33-Residue Peptide Corresponding to the Entire Amino-Acid Sequence of Human Cholecystokinin (HCKK-33), *Chem. Pharm. Bull.*, 1988, vol. 36, p. 3281-3291.

FUJII, T.; SAKAKIBARA, S. Studies on the synthesis of histidine peptides. I. *N*^m-tosylhistidine derivatives as starting materials. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1974, vol. 47(12), p. 3146-3151.

GAUSEPOHL, H.; KRAFT, M.; FRANK, R.W. Asparagine coupling in Fmoc solid phase peptide synthesis. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1989, vol. 34(4), p. 287-294.

GERHARDT, J.; NICHOLSON, G.J. Unambiguous determination of the optical purity of peptides via GC-MS. Em: Peptides: Chemistry, Structure and Biology, Hodges, R.S., Smith, J.A.; Eds., Escom Science Publishers BV, Leiden, The Netherlands, 1994, p. 241-243.

GIRAGOSSIAN, C., STONE, S., PAPINI, A.M., MORODER, L., MIERKE, D.F. Conformational and molecular modeling studies of sulfated cholecystokinin-15. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, vol. 293, p. 1053-1059.

GIRALT, E.; ERITJA, R.; PEDROSO, E.; GRANIER, C.; VANRIETSCHOTEN, J. Convergent solid-phase peptide synthesis. III. Synthesis of the 44-52 protected segment of the toxin-II of *Androcronus australis Hector*. *Tetrahedron*, 1986, vol. 42, p. 691-698.

GISIN, B. F.; MERRIFIELD, R. B. Carboxyl-catalyzed intramolecular aminolysis- Side reaction in solid-phase peptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, vol. 94, p. 3102-3106.

GOODLETT, D.R.; ABUAF, P.A., SAVAGE, P.A., KOWALSKI, K.A., MUKHERJEE, T.K., TOLAN, J.W., CORKUM, N., GOLDSTEIN, G., CROWTHER, J.B. Peptide chiral pority determination: hydrolysis in deuterated acid, derivatization with Marfey's reagent and analysis using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *J.Chromatog. A*, 1995, vol. 707(2), p. 233-244.

GOODMAN, M.; LEVINE, L. Peptide synthesis via active esters- Racemization + ring-opening reactions of optically active oxazolones, *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, vol. 86 (14), p. 2918-2922.

GOULAS, S.; GATOS, D., BARLOS, K. Convergent Solid-Phase Synthesis of Hirudin. *J. Pept. Sci.*, 2006, vol. 12, p. 116-123.

GRACIA, C.; ISODRO-LLOBET, A.; CRUZ, L.J.; ACOSTA, G.A.; ÁLVAREZ, M.; CUEVAS, C.; GIRAKT, E.; ALBERICIO, F. Convergent approaches for the synthesis of the antitumoral peptide, Kahalalide f. Study of orthogonal protecting groups. *J. Org. Chem.*, 2006, vol. 71 (19), p. 7196-7204.

- GRAEBIN, C. S.; EIFLER-LIMA, V. L. O uso do forno de microondas na síntese orgânica em fase sólida, *Quim. Nova*, 2005, vol. 28, p. 73-76.
- GRANDAS, A.; ALBERICIO, F.; JOSA, J.; GIRALT, E.; PEDROSO, E.; SABATIER, J.M.; RIETSCHOTEN, J.V. Convergent Solid Phase Peptide Synthesis. VII. Good yields in the coupling of protected segments on a solid support. *Tetrahedron*, 1989, vol. 45 (14), p. 4637-4648.
- GRANT, G.A. Synthetic peptides: a user's guide. Oxford University Press, USA, 2nd edition, 2002, 390 pp.
- GRIECO, P.; CAI, M.; LIU, L.; MAYOROV, A.; CHANDLER, K.; TRIVERDI, D.; LIN, G.; CAMPIGLIA, P.; NOVELLINO, E.; HRUBY, V.J. Design and microwave-assisted synthesis of novel macrocyclic peptides active at melanocortin receptors: discovery of potent and selective hMC5R receptor antagonists. *J. Med. Chem.*, 2008, vol. 51, p. 2701-2707.
- GUO, L.; LIN, S.J.; YANG, Y.F.; QI, L.; WANG, M.X.; CHEN, Y. Fast enantioseparation of arylglycine amides by capillary electrophoresis with highly sulfated- β -cyclodextrin as a chiral selector. *J. Chromatog. A*, 2003, vol. 998, p. 221-228.
- HAGINOYA, E.; HOJO, H.; NAKAHARA, NABESHIMA, K.; TOOLE, B.P.; WATANABE, Y. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2006, vol. 70, p. 1338-1349.
- HAN, Y.; ALBERICIO, F.; BARANY, G. Occurrence and Minimization of cysteine racemization during stepwise solid-phase peptide synthesis. *J. Org. Chem.*, 1997, vol. 62, p. 4307-4312.
- HANCOCK, W.S.; PRESCOTT, D.J.; VAGELOS, P.R.; MARSHALL, G.R. Solvation of the Polymer Matrix. Source of Truncated and Deletion Sequences in Solid Phase Synthesis, *J. Org. Chem.*, 1973, vol. 38, p. 774-779.
- HARWOOD, L.M.; MOODY, C.J.; PERCY, J.M. Experimental organic chemistry: standard and microscale. Backwell Publishing, 2nd edition, 1999, 716 pp.
- HAYES, B.L. Microwave Synthesis: Chemistry at the Speed of Light, CEM Publishing: Matthews, NC, 2002, p. 29-75.
- HERRERO, M.A.; KREMSNER, J.M.; KAPPE, C.O. Nonthermal microwave effects revisited: On the importance of internal temperature monitoring and agitation in microwave chemistry. *J. Org. Chem.*, 2008, vol. 73(1), p. 36-47.
- HOUBEN, R. J. H.; GIELEN, H.; VAN DER WAL, S.J. Automated Preparation derivatization on a capillary electrophoresis instrument, *J. Chromatogr.*, 1993, vol. 634 (2), p. 317-322.
- HUGHES, J.; SMITH, T.W.; KOSTERLITZ, H.W.; FOTHERGILL, L.A.; MORGAN, B.A.; MORRIS, H.R. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, 1975, vol. 258 (5536), p. 577-580.
- HYDE, C.; JOHNSON, T.; OWEN, D.; QUIBELL, M.; SHEPPARD, R. C. Some "difficult sequences" made easy. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1994, vol. 43, p. 431-440.
- ISHIGURO, T.; EGUCHI, C. Unexpected chain-terminating side reaction caused by histidine and acetic anhydride in solid-phase peptide synthesis. *Chem. Pharm. Bull.*, 1989, vol. 37(2), p. 506-508.
- ISIDRO-LLOBET, A.; GUASCH-CAMELL, J.; ÁLVAREZ, M.; ALBERICIO, F. p-Nitrobenzyloxycarbonyl (pNZ) as a temporary N^α-protecting group in orthogonal solid-phase peptide synthesis- avoiding diketopiperazine and aspartimide formation. *Eur. J. Org. Chem.*, 2005, vol. 2005(14), p. 3031-3039.
- ITOH, K.G. Effect of cholecystinin octapeptide on body temperature in the rat. *Jap. J. Physiology*, 1981, vol. 31, p. 849-858.

- ITOH, S.; TAKASHIMA, A.; IGANO, K. Memory effect of caerulein, and its analogs in active, and passive avoidance. *Peptides*, 1989, vol. 10, p. 843-848.
- JIANBO, L.; FUSHI, Z.; YU, Z.; GUQUN, Z.; YINGWU, T.; XINQI, S. Influence of peptide bond on photosensitized oxidation of tryptophan, tyrosine and histidine dipeptides. *Chin. Sci. Bull.*, 1997, vol. 42(19), p. 1624-1628.
- JOBLING, M.F.; BARROW, C.J.; WHITE, A.R.; MASTERS, C.L.; COLLINS, S.J.; CAPPAL, R. The synthesis and spectroscopic analyses of the neurotoxin prion peptide 106-126. Comparative use of manual Boc and Fmoc chemistry. *Lett. Pept. Sci.*, 1999, vol. 6, p. 129-134.
- JOHNSON, T.; QUIBELL, M.; OWEN, D.; SHEPPARD, R.C. A reversible protecting group for the amide bond in peptides. Use in the synthesis of difficult sequences. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1993, vol. 11, p. 369-372.
- JOSHI, B.P.; PARK, J.; KIM, J.; LAHANI, C.R.; CHO, H.; LEE, K. Application of microwave method to the solid phase synthesis of pseudopeptides containing ester bond. *Tetrahedron Lett.*, 2008, vol. 49, p. 98-101.
- JUNT, G.; BECK-SICKINGER, A.G. Multiple peptide synthesis methods and their applications. New synthetic methods. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1992, vol. 31(4), p. 367-383.
- KAISER, E.; COLESCOTT, R. L.; BOSSINGER, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.*, 1970, vol. 34, p. 595-598.
- KAISER, T.; NICHOLSON, G.J.; KOHLBAU, H.J.; VOELTER, W. Racemization studies of Fmoc-Cys(Trt)-OH during stepwise Fmoc-solid phase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.*, 1996, vol. 37(8), p. 1187-1190.
- KATRITZKY, A.R.; HAASE, D.N.; JOHNSON, J.V.; CHUNG, A. Benzotriazole-Assisted Solid-Phase assembly of Leu-Enkephalin, Amyloid segment 34-42, and other "Difficult" Peptide Sequences. *J. Org. Chem.*, 2009, vol. 74, p. 2028-2032.
- KEMP, D. The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Gross E., Meienhoefer, J.; Eds., Academic Press: New York, 1979, 315 pp.
- KEMPE, M.; BARANY, G. CLEAR: A novel family of highly cross-linked polymeric supports for solid-phase peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, vol. 118(30), p. 7083-7093.
- KISO, Y.; YAJIMA, H. Amide formation, deprotection, and disulfide formation in peptide synthesis. Em: *Peptides: Synthesis, Structures and Applications*, Elsevier Inc., Gutte, B.; Ed., 1995, p. 39-91.
- KITAGAWA, K.; ADACHI, H.; SEKIGAWA, Y.; YAGAMI, T.; FUTAKI, S.; GU, Y.J.; INOUE, K. Total chemical synthesis of large CCK isoforms using a thioester segment condensation approach. *Tetrahedron*, 2004, vol. 60, p. 907-918.
- KITAGAWA, K.; AIDA, C.; FUJIWARA, H.; YAGAMI, T.; FUTAKI, S. Efficient Solid-Phase Synthesis of Sulfated Tyrosine-Containing Peptides Using 2-Chlorotrityl Resin: Facile Synthesis of Gastrin/ Cholecystokinin Peptides. *Tetrahedron Lett.*, 1997, vol. 38(4), p. 599-602.
- KITAGAWA, K.; AIDA, C.; FUJIWARA, H.; YAGAMI, T.; FUTAKI, S. Facile Solid-Phase Synthesis of sulfated tyrosine-containing peptides: Part II. Total synthesis of human big gastrin-II and its C-terminal glycine-extended peptide (G34-Gly sulfate) by the Solid-Phase Segment Condensation Approach. *Chem. Pharm. Bull.*, 2001, vol. 49 (8), p. 958-963.

KITAGAWA, K.; AIDA, C.; FUJIWARA, H.; YAGAMI, T.; FUTAKI, S.; KOGIRE, M.; IDA, J. AND INOUE, K. Facile Solid-Phase Synthesis of Sulfated Tyrosine-Containing Peptides: Total Synthesis of Human Big Gastrin-liand Cholecystokinin (CCK)-39, *J. Org. Chem.*, 2001a, vol. 66, p. 1-10.

KOLAEVA, S.G.; SEMENOVA, T.P.; SANTALOVA, I.M.; MOSHKOV, D.A.; ANOSHKINA, I.A.; GOLOZUBOVA, V. Effects of L-tyrosyl-L-arginine (kytorphin) on the behavior of rats and goldfish. *Peptides*, 2000, vol. 21, p. 1331-1336.

KURANO, Y.; KIMURA, T.; SAKAKIBARA, S. Total Synthesis of Porcine Cholecystokinin-33 (CCK-33), *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1987, vol. 5, p. 323-325.

LANGMESSER, S.; CEREZO-GUISADO, M.I.; LORENZO, M.J.; GARCIA-MARIN, L.J.; BRAGADO, M.J. CCK1 and 2 receptors are expressed in immortalized rat brain neuroblasts: intracellular signals after cholecystokinin stimulation. *J. Cell. Biochem.*, 2007, vol. 100, p. 851-864.

LARHED, M.; HALLBERG, A. Microwave-assisted high-speed chemistry: a new technique in drug discovery, *Drug Discov. Today*, 2001, vol. 6, p. 406-416.

LARSEN, B.D.; HOLM, A. Incomplete Fmoc deprotection in solid-phase synthesis of peptides. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1994, vol. 43(1), p. 1-9.

LAUER, J.L.; FIELDS, C.G.; FIELDS, G.B. Sequence dependence of aspartimide formation during 9-fluorenylmethoxycarbonyl solid-phase peptide synthesis, *Lett. Pept. Sci.*, 1995, vol. 1 (4), p. 197-205.

LI, P.; XU, J. HOBt and HOAt – derived immonium salts: new and highly efficient coupling reagents for peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.*, 2000, vol. 41, p. 721-724.

LINDE, S.; NIELSEN, J.H.; HANSEN, B.; WELINDER, B.S. High-performance liquid chromatography of rat and mouse islet polypeptides: potential risk of oxidation of methionine residues during sample preparation. *J. Chromatogr.*, 1990, vol. 530, p. 29-37.

LLOYD, D. H.; PETRIE, G. M.; NOBLE, R. L.; TAM, J. P. Increased coupling efficiency in solid-phase peptide synthesis using elevated temperature. Em: *Peptides: Chemistry, Structure and Biology* (Proc. 11th. Am. Pept. Symp.), RIVIER, J. E.; MARSHALL, G. R.; Eds., Escom Scientific publ., Leiden, The Netherlands, 1990, p. 909.

LLOYD-WILLIAMS, P.; ALBERICIO, F.; GIRALT, E. Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins (New Directions in Organic & Biological Chemistry), CRC Press: Boca Raton, New York, Washington, D.C., 1997, 278 pp.

LLOYD-WILLIAMS, P.; ALBERICIO, F.; GIRALT, E. Convergent Solid-Phase Peptide Synthesis, *Tetrahedron*, 1993, vol. 49, p. 11065-11133.

LOFFREDO, C.; ASSUNÇÃO, N.A.; GERHARDT, J.; MIRANDA, M.T.M. Microwave-assisted solid-phase peptide synthesis at 60 °C: alternative conditions with low enantiomerization, *J. Pept. Sci.*, no prelo.

LOFFREDO, C.; ASSUNÇÃO, N.A.; MIRANDA, M.T.M. Further Studies on Solid-Phase Peptide Synthesis at High Temperature. Em: *Peptides for Youth- Advances in Experimental Medicine and Biology* (Proc. 20th. Am. Pept. Symp.), Del Valle, S., Escher, E.; Lubell, W. D.; Eds., Springer, New York, USA, 2009, vol. 611, p.165-166.

LOIDL, G.; DICK, F.; MERGLER, M.; SCHOENLEBER, R.O. Optimized coupling protocols for the incorporation of Cys derivatives during Fmoc-SPPS. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2009, vol. 611, p. 163-164.

LOSSE, A. Über den einsatz makroporösen harze in der festphasen-peptidsynthese. *Tetrahedron*, 1973, vol. 29, p. 1203-1208.

- LUNKENHEIMER, W.; ZAHN, H., Merrifield-synthesis of symmetrical cysteine peptides. *Liebigs Ann. Chem.*, 1970, vol. 740, p. 1-17.
- MacGREGOR, W.S. The chemical and physical properties of DMSO. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2006, vol. 141, p. 3-12
- MACHADO, A. ; Xavier, G. C. ; LIMA, G. H. ; MIRANDA, A. ; MIRANDA, M. T. M. . Lactam bridge formation at high temperature. Em: *Peptide Revolution: Genomics, Proteomics & Therapeutics* (Proc. 18th. Am. Pept. Symp.), CHOREV, M; SAWYER, T.K.; Eds., Kluwer Academic Pub, 2003, p. 192-193.
- MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M.T.M. Sínteses químicas e enzimáticas de peptídeos: princípios básicos e aplicações. *Quim. Nova*, 2004, vol. 27, p. 781-789.
- MACHADO, A.; SFORÇA, M. L.; MIRANDA, A.; DAFFRE, S.; PERTINHEZ, T. A.; SPISNI, A.; MIRANDA, M.T.M. Truncation of amidated fragment 33- 61of bovine alpha-hemoglobin. *Biopolymers*, 2007, vol. 88, p. 413-426.
- MAERTENS, C.; DETREMBLEUR, C.; DUBOIS, P.; JEROME, R.; BOUTTON, C.; PERSOONS, A.; KOGEJ, T.; BREÂDAS, J.L. Structure-second-order polarizability relationship in chromophores incorporation a spacer: A joint experimental and theoretical study. *Chem. Eur. J.*, 1999; vol. 5(1), p. 369-380.
- MANT, C. T.; HODGES, R. S. High-Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins-Separation, Analysis and Conformation, CRC Press, Inc., 1991, p. 379-388.
- MATSUSHITA, T.; HINOUE, H.; KUROGOCHI, M.; SHIMIZU, H.; NISHIMURA, S-I. Rapid microwave-assisted solid-phase glycopeptide synthesis. *Org. Lett.*, 2005, vol. 7(5), p. 877-880.
- MAVANDADI, F.; LIDSTRÖM, P. Microwave-Assisted Chemistry in drug Discovery, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2004, vol. 4, p. 773-792.
- MAZUR, R.H. Aspartame- a sweet surprise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1976, vol. 2(1), p. 243-249.
- McNAMARA, J.F.; LOMBARDO, H.; PILLAI, S.K.; JENSEN, I.; ALBERICIO, F.; KATES, S.S. An efficient solid-phase strategy for the construction of chemokines, *J. Pept. Sci.*, 2000, vol. 6(1), p. 512-518.
- McPHEE, J. B.; SCOTT, M.G.; HANCOCK, R.E.W. Design of Host Defence Peptides for Antimicrobial and Immunity Enhancing Activities. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 2005, vol. 8(3), p. 257-272(16).
- MEISTER, S. M.; KENT, S. B. H. Em: *Peptides. Structure and Function* (Proc. 8th Am. Pept. Symp.), HRUBY, V. J.; RICH, D. H.; Eds., Pierce Chemical Company, Rockford, IL, 1983, p. 103-106.
- MERGLER, M.; DICK, F.; SAX, B.; WEILER, P.; VORHERR, T. The aspartimide Problem in Fmoc-based SPPS. Part I. *J. Pept. Sci.*, 2003, vol. 9, p. 36-46.
- MERGLER, M.; NYFELER, R.; TANNER, R.; GOSTELI, J.; GROGG, P. Peptide synthesis by a combination of solid-phase and solution methods I: A new very acid-labile anchor group for the solid phase synthesis of fully protected fragments. *Tetrahedron Lett*, 1988, vol. 29, p. 4005-4008.
- MERRIFIELD, R. B. Concept and early development of solid-phase peptide synthesis. Em: *Methods in Enzymology*, v. 289, FIELDS, G. B.; Ed., Academic Press, San Diego, 1997, p. 3-13.

- MERRIFIELD, R.B. Solid phase peptide synthesis I synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, vol. 85, p. 2149-2154.
- MIHALA, N.; BÓDI, J.; GÖMÖRY, A.; SÜLI-VARGHA, H. An alternative Solid Phase Peptide Fragment Condensation protocol with improved efficiency, *J. Pept. Sci.*, 2001, vol. 7(10), p. 565-568.
- MILLAR, R.P.; KING, J.A.; DAVIDSON, J.S.; MILTON, R.C. Gonadotrophin-releasing hormone-diversity of functions and clinical applications. *S. Afr. Med. J.*, 1987, vol. 72(11), p. 748-755.
- MILTON, S. C. F; MILTON, R. C. D. L. An improved solid-phase synthesis of a difficult sequence peptide using hexafluoro-2-propanol. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1990, vol. 36, p. 193-196.
- MIRANDA, M. T. M.; LIDDLE, R. A.; RIVIER, J. E. Synthesis of human CCK26-33 and CCK-33 related analogues on 2,4-DMBHA and TMBHA. *J. Med. Chem.*, 1993a, vol. 36(12), p. 1681-1688.
- MIRANDA, M.T.M.; CRAIG, A.G.; MILLER, C.; LIDDLE, R.A.; RIVIER, J.E. Total synthesis, purification, and characterization of human [Phe(p-CH₂SO₃Na)₅₂, Nle_{32,53,56}, Nal₅₅]-CCK-58. *J. Prot. Chem.*, 1993b, vol. 12 (5), p. 533-544.
- MIYAZAWA, T. Perturbation treatment of the characteristic vibrations of polypeptide chains in various configurations. *J. Chem. Phys.*, 1960, vol. 32, p. 1647-1652.
- MIYAZAWA, T.; OTOMATSU, T.; YAMADA, T.; KUWATA, S. Racemization studies in peptide synthesis through the separation of protected epimeric peptides by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1992, vol. 39, p. 229-236.
- MONROC, S.; FELIU, L.; PLANAS, M.; BARDAJÍ, E. Microwave-Assisted Cyclization of Peptides on SynPhaseTM Lanterns, *SYNLETT*, 2006, vol. 9, p. 1311-1314.
- MONTALBETTI, C.A.G.N.; FALQUE, V. Amide Bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, 2005, vol. 61, p. 10827-10852.
- MUCSI, Z.; PERCZEL, A; OROSZ, G. Engineering new peptidic inhibitors from a natural chymotrypsin inhibitor. *J. Pept. Sci.*, 2002, vol. 8, p. 643-655.
- MURRAY, J. K., GELLMAN, S. H. Application of Microwave Irradiation to the Synthesis of 14-Helical β -Peptides, *Org. Lett.*, 2005, vol. 7 (8), p. 1517-1520.
- MURRAY, J.K.; GELLMAN, S.H. Parallel synthesis of peptide libraries using microwave irradiation. *Nat. Protoc.*, 2007, vol. 2(3), p. 624-631.
- MUTT, V.; JORPES, E. Hormonal polypeptides of the upper intestine. *Biochem J.*, 1971, vol. 125 (3), p. 57-58.
- NISHI, H.; FUKYAMA, T.; MATUSO, M. Resolution of optical isomers of 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl isothiocyanate (GITC)-derivatized DL-amino acids by micellar electrokinetic chromatography, *J. Microcol. Sep.*, 1990, vol. 2, p. 234-240.
- NISHIUCHI, Y.; NISHIO, H.; INUI, T.; BÓDI, J.E.; KIMURA, T. Combined solid-phase and solution approach for the synthesis of large peptides or proteins. *J. Pept. Sci.*, 2000, vol. 6, p. 84-93.
- NISHIUCHI, Y.; NISHIO, H.; ISHIMARU, M.; KIMURA, T. Convergent Solid-phase Peptide Synthesis performed in a CHCl₃-phenol mixed solvent: synthesis of amyloid β -peptides as examples with a difficult sequence. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 2007, vol. 13, p. 119-128.
- OKADA, Y. Synthesis of Peptides by Solution Methods. *Curr. Org. Chem.*, 2001, vol. 5, p. 1-43.

- OLIVOS, H. J.; ALLURI, P. G.; REDDY, M. M.; SALONY, D.; KODADEK, T. Microwave-Assisted solid-phase síntesis of peptoids, *Org. Lett.*, 2002, vol. 4 (23), p. 4057-4059.
- ORLOWSKA, A.; WITKOWSKA, E.; IZDEBSKI, J. Sequence dependence in the formation of pyroglutamyl peptides in solid phase peptide synthesis. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1987, vol. 30, p. 141-144.
- PALASEK, S.; COX, Z.J.; COLLINS, J.M. Limiting racemization and aspartimide formation in microwave-enhanced Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. *J. Pept. Sci.*, 2007, vol. 13, p. 143-148.
- PAP, E.H.W.; DANSEN, T.B.; VAN SUMMEREN, R.; WIRTZ, K.W.A. Peptide-based targeting of fluorophores to organelles in living cells. *Exp. Cell. Res.*, 2001, vol. 265(2), p. 288-293.
- PARK, M.; OH, H.; CHO, H.; LEE, K. Microwave-assisted solid-phase synthesis of pseudopeptides containing reduced amide bond. *Tetrahedron Lett.*, 2007, vol. 48, p. 1053-1057.
- PEDROSO, E.; GRANDAS, A.; SARALEGUI, M.A.; GIRALT, E.; GRANIER, C.; RIETSCHOTEN, J.V. Convergent solid phase peptide synthesis. I. Synthesis of protected segments on a hydroxymethylphenyloxymethyl resin using the base labile Fmoc- α -amine protection. Model synthesis of LHRH. *Tetrahedron*, 1982, vol. 38(9), p. 1183-1192.
- PELLESTOR, F.; PAULASOVA, P. The peptide nucleic acids (PNAs): introduction to a new class of probes for chromosomal investigation. *Chromosoma*, 2004, vol. 112, p. 375-380.
- PENKE, B.; NYERGES, L. Solid-phase synthesis of porcine cholecystokinin-33 a new resin via Fmoc-strategy. *J. Pept. Res.*, 1991, vol. 4, p. 289-295.
- PÉTER, A.; ÁRKI, A.; VÉKES, E.; TOURWÉ, D.; LÁZÁR, L.; FÜLÖP, F.; ARMSTRONG, D.W. Direct and indirect high-performance liquid chromatographic enantioseparation of β -amino acids. *J. Chromatogr. A*, 2004, vol. 1031, p. 171-178.
- PETICOLAS, W.L. Applications of Raman spectroscopy to biological macromolecules. *Biochimie*, 1975, vol. 57(4), p. 417-428.
- PICHETTE, A.; VOYER, N.; LAROUCHE, R.; MEILLON, J.C. A useful method for the preparation of fully protected peptide acids and esters. *Tetrahedron Lett.*, 1997, vol. 38, p. 1279-1282.
- PROTI, P.B. Preparação de Ésteres e Tioésteres de Peptídeos Protegidos Através de Solvólise da Ligação Peptidil-Resina Mediada por Íons Metálicos, 2007, Tese de Doutorado, Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
- PROTI, P.B.; MIRANDA, M.T.M. Ca^{+2} – mediated thiolysis of peptide-resin linkage as na option for preparing protected peptide thioesters. *Tetrahedron Lett.*, 2008, vol. 49, p. 3853-3857.
- PROTI, P.B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M.T.M. Comparison of procedures for directly obtaining protected peptide acids from peptide-resins. *J. Pept. Sci.*, 2007, vol. 13, p. 386-392.
- QUIBELL, M.; PACKMAN, L.C.; JOHNSON, T. Identification of coupling conditions proceeding with low C-terminal epimerization during the assembly of fully protected backbone-substituted peptide segments. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1996, vol. 1, p. 1219-1226.

- RABINOVICH, A. K.; RIVIER, J. E. SPPS using high temperature. Em: *Peptides: Chemistry, Structure and Biology* (Proc. 13th. Am. Pept. Symp.), Hogges, R. S.; Smith, J. A.; Eds., Escom Scientific Publ., Leiden, The Netherlands, 1994, p. 71-73.
- RAHMAN, S.A.; EL-KAFRAWY, A.; HATTABA, A.; ANWER, M.F. Optimization of solid-phase synthesis of difficult peptide sequences via comparison between different improved approaches. *Amino Acids*, 2007, vol. 33, p. 531-536.
- REEVE, J.R.; WU, S.V.; KEIRE, D.A.; FAULL, K.; CHEW, P.; SOLOMON, T.E.; GREEN, G.M.; COSKUN, T. Differential bile-pancreatic secretory effects of CCK-58 and CCK-8. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2004, vol. 286(3), p. G395-402.
- REHFELD, J.F.; SUN, G.; CHRISTENSEN, T.; HILLINGSO, J.G. The predominant cholecystokinin in human plasma and intestine is cholecystokinin-33. *J. Clin. Endocrinol Metab.*, 2001, vol. 86 (1), p. 251-258.
- REIMER, U.; REINEKE, U.; SCHNEIDER-MERGENER, J. Peptide arrays: from macro to micro. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002, vol. 13(4), p. 315-320.
- REMUZGO, C.; ANDRADE, G.F.S.; TEMPERINI, M.L.A., MIRANDA, M.T.M. Acanthoscurrin fragment 101-132: Total synthesis at 60 °C of a novel difficult sequence. *J. Pept. Sci.*, 2009, vol. 92, p. 65-75.
- REMUZGO, C.M.R. Estudo da Síntese Convergente de Peptídeos em Fase sólida: Abordagem Clássica e uso de Temperatura Alta, 2003, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
- RENNER, P.; CARATSCH, C.G.; WASER, P.G.; LAZAROVICI, P.; PRIMOR, N. Presynaptic effects of the Pardaxins, polypeptides isolated from the gland secretion of the flatfish *Pardachirus marmoratus*, *Neuroscience*, 1987, vol. 23(1), p. 319-325.
- RIESTER, D.; WIESMULLER, K. H.; STOLL, D.; KUHN, R. Racemization of amino acids in solid-phase peptide synthesis investigated by capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, 1996, vol. 68, p. 2361-2365.
- RITTEL, W.; BRUGGER, M.; KAMBER, B.; RINIKER, B.; SIEBERM P. *Helv. Chim. Acta*, 1968, vol. 51, p. 924.
- RIVIER, J.E.; MIRANDA, M.T.M. Solid-Phase Peptide Synthesis at Elevated Temperature. Em: *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics: Commemorating 100 years of Peptide Research.*, Chapter 4, 2001/2004, p. 806-813.
- RIZZOLO, F.; SABATINO, G.; CHELLI, M.; ROVERO, P.; PAPINI, A. M. A convenient microwave-enhanced solid-phase synthesis of difficult peptide sequences: case study of gramicidin A and CSF114(glc). *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 2007, vol. 13, p. 203-208.
- ROBINSON, A. J.; ELARIDI, J.; VAN LIEROP, B. J.; MUJCINOVIC, S.; JACKSON, R. J. Microwave –assisted rcm for the synthesis of carbocyclic peptides. *J. Pept. Sci.*, 2007, vol. 13, p. 280-285.
- RUIZ-GAYO, M.; GONZÁLEZ, M.C.; FERNÁNDEZ-ALFONSO, S. Vasodilatory effects of cholecystokinin: new role for an old peptide? *Regul. Pept.*, 2006, vol. 137, p. 179-184.
- SAKAKIBARA, S. Chemical Synthesis of Proteins in Solution. *Biopolymers- J. Pept. Sci.*, 1999, vol. 51, p. 279–296.
- SAKAKIBARA, S.; SHIN, K.H. HESS, G.P. An Approach to the Specific Cleavage of Peptide Bonds. I. The Acyl Migration in Dipeptides Containing Hydroxyamino Acids in Anhydrous Hydrogen Fluoride. *J. Am. Chem.Soc.*, 1962, vol. 84, p. 4921-4928.

- SALISBURY, C.M.; MALY, D.J.; ELLMAN, J.A. Peptide microarrays for the determination of protease substrate specificity. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, vol. 124, p. 14868-14870.
- SANEIL, H. H.; PETERSON, M. L.; ANDERSON, H.; HEALY, E. T.; BIZANEK, R.G. Advanced automation for peptides and non-peptidic molecules. Em: *Peptides: Chemistry, Structure and Biology* (Proc. 14th Am. Pept. Symp.), Kaumaya, P.T.P.; Hodgess, R.S.; Eds, Mayflower Scientific, 1996, p. 136-138.
- SCHNÖLZER, M.; ALEWOOD, P.; JONES, A.; ALEWOOD, D.; KENT, S. B. H. In situ neutralization in Boc-chemistry solid-phase peptide-synthesis- Rapid, high-yield assembly of difficult sequences, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1992, vol. 40, p. 180-193.
- SCHNORRENBURG, G.; GERHARDT, H. Fully automatic simultaneous multiple peptide synthesis in micromolar scale - rapid synthesis of series of peptides for screening in biological assays. *Tetrahedron*, 1989, vol. 45(24), p. 7759-7764.
- SCRIBA, G.K.E. Review: Recent Advances in Enantioseparation of Peptides by Capillary Electrophoresis. *Electrophoresis*, 2003, vol. 24, p. 4063-4077.
- SHEPPARD R.C.; WILLIAMS B.J. A new protecting group combination for solid phase synthesis of protected peptides. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1982, vol. 11, p. 587-589.
- SILVA, P.I Jr.; DAFFRE, S.; BULET, P. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, p. 33464-33470.
- SMILLIE, L.B.; NATRISS, M. Amino acid analyses of proteins and peptides: an overview. Em: *High performance liquid chromatography of peptides and proteins: Separation, analyses and conformation*. Mant, C.T.; Hodges, R.S.; Eds., CRC Press, Florida, U.S.A., 1991, p. 847-858.
- SOUZA, M. P. Síntese em fase sólida em alta temperatura: seqüências difíceis, colecistocininas-22 e 33 não sulfatadas e racemização, 2000, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 120 pp.
- SOUZA, M. P.; TAVARES, M.F.M; MIRANDA, M.T.M. Racemization in stepwise solid-phase peptide synthesis at elevated temperatures. *Tetrahedron*, 2004, vol. 60, p. 4671-4681.
- SPENGLER, J.; RUÍZ-RODRÍGUEZ, J.; YRAOLA, F.; ROYO, M.; WINTER, M.; BURGER, K.; ALBERICIO, F. A novel protecting/activating strategy for β -hydroxy acids and its use in Convergent Peptide Synthesis. *J. Org. Chem.*, 2008, vol. 73, p. 2311-2314.
- SRIVASTAVA, K.; DAVIS, M. A comparative examination of two Fmoc removal reagents for process improvement to produce peptide drugs. Em: *Peptides for Youth-Advances in Experimental Medicine and Biology* (Proc. 20th Am. Pept. Symp.), Del Valle, S., Escher, E.; Lubell, W. D.; Eds., Springer, New York, USA, 2009, vol. 611, p.585-591.
- STEINAUER, R.; CHEN, F.M.F.; BENOITON, N.L. Determination of epimeric peptides for assessing enantiomeric purity of starting materials and studying racemization in peptide synthesis using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 1985, vol. 325, p. 111-126.
- STENBERG, M.; MARKO-VARGA, G.; ÖSTE, R. Racemization of amino acids during classical and microwave oven hydrolysis- application to aspartame and a Maillard reaction system. *Food Chem.*, 2001, vol. 74, p. 217-224.

STEWART, J. M.; KLIS, W. A. Peptides, polypeptides and oligonucleotides. Macro-organic reagents and catalysts and biomedical applications. Em: Innovation and Perspectives in solid phase synthesis and related technologies, Epton, R.; Ed., Mayflower Worldwide Ltd, Birmingham, 1990, p. 1–9.

STEWART, J. M.; YOUNG, J.D. Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Company, Rockford, USA. 1984, p. 1-49.

SUN, L.; GARDELLA JR, J.A. The solid state oxidation of methionine containing peptide: a preliminary study using time of flight secondary ion mass spectrometry. *Pharm. Res.*, 2000, vol. 17(7), p. 859-862.

TAKAGI, H.; SHIOMI, H.; UEDA, H.; AMANO, H. Morphine-like analgesia by a new dipeptide, L-tyrosyl-L-arginine (Kyotorphin) and its analogue. *Eur. J. Pharmacol.*, 1979, vol. 55, p. 109-111.

TALLIMA, H.; MONTASH, M.; VEPREK, P.; VELEK, J.; JEZEK, J.; EL RIDI, R. Differences in immunogenicity and vaccine potencial of peptides from *Schistosoma mansoni* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Vaccine*, 2003, vol. 21, p. 3290-3300.

TAM, J.P. Synthesis of biologically active transforming growth factor alpha. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1987, vol. 29(3), p. 421-31.

TAM, J.P.; HEATH, W.F.; MERRIFIELD, R.B. An SN2 deprotection of synthetic peptides with a low concentration of hydrofluoric acid in dimethyl sulfide: evidence and application in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, vol. 105 (21), p. 6442–6455.

TAM, J.P.; RIEMEN, M.W.; MERRIFIELD, R.B. Mechanisms of aspartimide formation: the effects of protecting groups, acid, base, temperature and time. *J. Pept Res.*, 1988, p. 6-18.

TIRASSA, P.; MANNI, L.; ALOE, L.; LUNDEBERG, T. 2002. Cholecystokinin-8 and nerve growth factor: Two endogenous molecules working for the upkeep and repair of the nervous system. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.*, 2002, vol. 1, p. 495-510.

TOYODA, N.; KAPTEIN, E.; BERRY, M.J.; HARNEY, J.W.; LARSEN, P.R.; VISSER, T.J. Structure-activity relationships for thyroid hormone deiodination by mammalian type I iodothyronine deiodinases. *Endocrinology*, 1997, vol. 138(1), p. 213-219.

ULLSTEN, S.; ZUBEROVIC, A.; WETTERHALL, M.; HARDENBORG, E.; MARKIDES, K.E.; BERGQUIST, J. A polyamine coating for enhanced capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry of proteins and peptides. *Electrophoresis*, 2004, vol. 25, p. 2090-2099.

VARANDA, L.M.; MIRANDA, M.T.M. Solid-phase peptide synthesis at elevated temperature: a search for an optimized synthesis condition of unsulfated cholecystokinin-12. *J. Pept. Res.*, 1997, vol. 50(2), p. 102-108.

VIGIL-CRUZ, S.C.; PECK, A.M.; ALDRICH, J.V. Determination of an optimal solid support for use with microwave-assisted solid-phase peptide synthesis. Em: Understanding Biology Using Peptides, 2005, American Peptide Society, p. 162-163.

VILLANUEVA, M. L.; COLLINS, S. M.; JENSEN, R. T.; GARDNER, J. D. Structural requirements for action of cholecystokinin on enzyme secretion from pancreatic acini. *Am. J. Physiol.*, 1982, vol. 242, p. G416–G422.

WADA, R.; KITABATAKE, N. β -lactoglobulin a with n-ethylmaleimide-modified sulfhydryl residue, polymerized through intermolecular disulfide bridge on heating in the presence of dithiothreitol. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, vol. 49, p. 4971-4976.

WAN, H.; BLOMBERG, L.G. Chiral separation of amino acids and peptides by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 2000, vol. 875, p. 43-88.

- WEBER, U.; ANDRÉ, M. Synthesis of a [Glu⁵, Ala¹², Ala¹⁸, Ala²¹]sheep insulin-A-chain by fragment condensation on a polymer support. *Hoppe Seylers Z Physiol. Chem.*, 1975, vol. 356(6), p. 701-704.
- WESTALL, F. C. e ROBINSON, A. B. Solvent modification in Merrifield solid-phase peptide synthesis, *J. Org. Chem.*, 1970, vol. 35, p. 2842-2844.
- WILD, C.T.; SHUGARS, D.C.; GREENWELL, T.K. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1994, vol. 91(21), p. 9770-9774.
- YAJIMA, H.; KAWATANI, H.; WATANABE, H. Studies on Peptides. XXVII. Synthesis of the Decapeptide, ACTH-(5-14), as an Example of Peptide-Fragment Condensation on the Polymer Support. *Chem. Pharm. Bull.*, 1970, vol. 18(7), p. 1333-1339.
- YAMASHIRO, D.; BLAKE, J.; LI, C. H. Use Of Trifluoroethanol For Improved Coupling In Solid-Phase Peptide-Synthesis, *Tetrahedron Lett.*, 1976, vol. 18, p. 1469-1472.
- YOSHIYA, T.; SOHMA, Y.; KIMURA, T.; HAYASHI, Y.; KISO, Y. "O-acyl isopeptide method": Racemization-free segment condensation in Solid Phase Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.*, 2006, vol. 47, p. 7905-7909.
- YU, H.; CHEN, S.; WANG, K. Enhanced coupling efficiency in solid-phase peptide synthesis by microwave irradiation, *J. Org. Chem.*, 1992, vol. 57 (18), p. 4781-4784.
- ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1987, vol. 84, p. 5449-5453.
- ZHANG, H.B.; CHI, Y.S.; HUANG, W.L.; NI, S.J. Total synthesis of human urotension-II by microwave-assisted solid phase method. *Chin. Chem. Lett.*, 2007, vol. 18, p. 902-904.
- ZINIERIS, N.; ZIKOS, C.; FERDERIGOS, N. Improved solid-phase peptide synthesis of "difficult peptides" by altering the microenvironment of the developing sequence. *Tetrahedron Lett.*, 2006, vol. 47, p. 6861-6864.

Súmula Curricular

Qualificação

Bacharel em Química, com experiência didática de 3 anos em Ensino Médio e 6 anos em pesquisa científica. Esta última possibilitou o aprendizado dos fundamentos e aplicações das metodologias de síntese de compostos orgânicos de baixa massa molar, de síntese química de peptídeos (manual e automatizada), cromatografia líquida de alta eficiência (análise e purificação de peptídeos), cromatografia gasosa, análise de peptídeos por espectrometria de massas dos tipos (MALDI-ToF) e (LC/ESI-MS), eletroforese capilar e ressonância magnética nuclear.

Experiência Profissional

- **Colégio Mário Schenberg** *Out/06 – Dez/07*: Professora de Química (Ensino Médio)
- **Instituto do Coração-Incor** *Set/02 – Jun/04*: Técnica especializada responsável por síntese, análise e purificação de peptídeos, assim como análises e purificações de proteínas (Proteoma).
- **Colégio Albert Sabin** *Fev/02 – Set/02*: Professora de laboratório de Ciências para o Ensino Fundamental.
- **Colégio Expansão** *Jan/01 – Jan/02*: Professora de Ciências para o Ensino Fundamental.
- **Cursinho pré-vestibular Rede Medicina** *Mar/99–Nov/00*: Professora e Plantonista do Curso Preparatório para o vestibular das disciplinas de Química, Biologia, Matemática e Física. Revisora de material didático.
- **Aulas Particulares** *1995 até o presente*: Disciplinas de Química, Física, Matemática, Biologia e Bioquímica (Ensinos fundamental, médio e superior).

Formação Acadêmica

- **Instituto de Química da USP- Bacharelado em Química** *Fev98-Dez/01*
- **Instituto de Química da USP- Iniciação Científica** *Set/99–Ago/00*
Projeto: Síntese de um Precursor do Fármaco *Indinavir*, utilizado no tratamento da AIDS. Área: Química Orgânica. Orientadora: Profa Dra Liliana Marzoratti. Bolsista pela FAPESP
- **Instituto de Química da USP- Doutorado em Bioquímica** *Jun/04- Nov/09*
Projeto: Estudo das sínteses de peptídeos em fase sólida passo a passo e convergente a 60 °C usando aquecimento convencional e micro-ondas. Orientadora: Profa Dra M. Terêsa Machini de Miranda.

Premiação

- Prêmio Lavoisier de melhor aluna do Instituto de Química–USP Bacharelado 1998/2001. Prêmio do CRQ IV- Região.

Idiomas

- Inglês – nível intermediário
- Alemão – nível básico

Cursos Extracurriculares

- Curso de Extensão em Análise Proteômica, Unesp – C.E.I.S.- Centro de Estudos de Insetos Sociais (*Ago/03*)
- Curso 2D Electrophoresis, Instituto do Coração- InCor (*Mai/03*)
- Bioquímica do Envelhecimento, Instituto de Química da USP (*Fev/01*)
- Preparação e Propriedades Físicas de Óxidos, Instituto de Física da USP (*Fev/01*)
- Bioquímica da Mente, Instituto de Química da USP (*Jan/99*)
- Bioquímica e Doenças, Instituto de Química da USP (*Jan/99*)
- Noções sobre Oceanografia, Instituto Oceanográfico da USP (*Jun/97*)

Participação em eventos científicos

- “A Universidade e as profissões”, Dia de portas abertas, IQ-USP, 14/08/2004.
- Loffredo, C.; Remuzgo, C.; Miranda, M.T.M., “Stepwise solid-phase peptide synthesis at elevated temperature”, XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindóia, SP, 2- 5/07/05, S47.
- “1º Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular”, 09–20/01/2006 (80 horas).
- “A Universidade e as profissões”, Dia de portas abertas, IQ-USP, 12/08/2006.
- Loffredo, C.; Gerhardt, J.; Assunção, N. A.; Miranda, M.T.M., “Síntese de Peptídeos em Fase Sólida em Temperatura Elevada”, “30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química”, Águas de Lindóia, SP, 31/05-03/06/2007, QO163.
- Loffredo, C.; Assunção, N. A.; Miranda, M.T.M., “Further Studies on Solid-Phase Peptide Synthesis at High Temperature”, *Biopolym. – Pept. Sci.*, 88(4), 601, 2007. Apresentação de Pôster (no. 349) no 20th American Peptide Society Symposium, 26-30/06/2007, Montreal, Canadá.
- Loffredo, C.; Gerhardt, J.; Assunção, N. A.; Miranda, M.T.M., “Is the microwave approach a good choice for peptide synthesis?”, “XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular”, Águas de Lindóia, SP, 17-20/05/2008, S45.

Atividades de monitoria

- Monitoria do “2º Curso de Inverno em Bioquímica e Biologia Molecular”, 16–27/07/2007 (16 horas).
- Monitoria da “III Escola de Verão em Química Verde-IQ/USP”- Graduação, 28/01 a 01/02/2008 (16 horas).
- Monitoria do 3º Curso de Inverno “Temas Avançados em Bioquímica e Biologia Molecular-IQ/USP”- Pós-graduação, 21/07-01/08/2008 (16 horas).
- Apresentação de Pôster no evento “Alunos na Ciência-IQ/USP”, 14/06/2008 (4 horas).

Publicações

- Loffredo, C.; Miranda, M.T.M. Um marco na bioquímica e na medicina. *Ciência Hoje*, 2005, p. 75-77.
- Loffredo, C.; Miranda, M.T.M. Um marco na Bioquímica e na Medicina. In: Alicia Ivanissevich; Antonio Augusto Passos Videira. (Org.). *Memória hoje*. 1 ed. Rio de Janeiro: Instituto Ciência Hoje, 2008, v. 1, p. 165-168.
- Loffredo, C.; Assunção, N.A.; Miranda, M.T.M. Further Studies on Solid-Phase Peptide Synthesis at High Temperature. In: *Peptides for Youth- Advances in Experimental Medicine and Biology (Proc. 20th Am. Pept. Symp.)*, Del Valle, S., Escher, E.; Lubell, W. D.; Eds., Springer, New York, USA, 2009, vol. 611, p.165-166.
- Loffredo, C.; Assunção, N. A.; Gerhardt, J.; Miranda, M.T.M., “ Enantiomerization in Solid-Phase Peptide Synthesis at 60°C using conventional heating and microwave irradiation”, *J. Pept. Sci.*, no prelo.

Seminários Ministrados

- “ A Síntese de Peptídeos em Fase Sólida em Temperaturas Elevadas” no Departamento de Imunologia e Alergologia do Instituto do Coração (Incor), 03/03/2008.
- “ A Síntese de Peptídeos em Fase Sólida” na disciplina QBQ-2454 Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo, coordenada pelo prof. Dr. Bayardo Baptista, 17/09/2008.

Conhecimentos em Informática

- Conhecimento dos programas: Word, Excel, Power Point e Origin, Curso de Linguagem C.