

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

PATRÍCIA BARRIENTOS PROTI

**Preparação de Ésteres e Tioésteres de
Peptídeos Protegidos Através de
Solvólise da Ligação Peptidil-Resina
Mediada por Íons Metálicos**

São Paulo
05/09/2007

PATRÍCIA BARRIENTOS PROTI

**Preparação de Ésteres e Tioésteres de
Peptídeos Protegidos Através de
Solvólise da Ligação Peptidil-Resina
Mediada por Íons Metálicos**

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

Orientadora: Prof^a M. Terêsa M. Miranda

São Paulo
2007

Patrícia Barrientos Proti

Preparação de Ésteres e Tioésteres de Peptídeos Protegidos Através de
Solvólise da Ligação Peptidil-Resina Mediada por Íons Metálicos

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

Aprovada em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

ERRATA

Pág.	Local	Onde se lê	Leia-se
5	linha 14	caracterizados quimicamente	caracterizados
7	linha 12	configuração do hidrogênio do carbono alfa	configuração do carbono alfa
8	linha 6	emprego de meios	meios
8	legenda da 2ª figura	R ₁ e R ₂	R ₁ , R ₂ e R ₃
10	linha 2	STC	SEPTC
13	linha 10	RGD	Arg-Gly-Asp
18	linha 16	N ^α -acil-aminoácido ou - peptídeo	N ^α -acil-peptídeo
20	linha 20	Ca ⁺²	Ca(CH ₃ COO) ₂
21	linhas 6 e 12	peptidil-KORs	peptidil-KOR
21	linha 9	por complexar com	por se coordenar com
22	linha 21	Blake, 1981; Blake e col., 1986	Aimoto, 1999
23	carboxila do Peptídeo 4 do esquema	-SR	-OH
24	linhas 17 e 18	p-metilbenzidrilamina (MBHA)	MBHA
26	linha 16	que quando “ativada”	que, quando “ativada”
28	linhas 23 e 24	enzimático e químico	enzimáticos e químicos
31	linha 2	da alcoólise da	das alcoólicas de
31	linha 2	ligação éster formada	ligações ésteres formadas
31	linha 2	gerados	geradas
34	linha 2	Z-Gly-Phe-OH, ambos da	Z-Gly-Phe-OH da
37	linha 6	com DCM e MeOH	com DCM/MeOH/DCM
38	linha 1	peptidil-SAMBHAs	peptidil-SAMBHA
40	linha 1	peptidil-KORs	peptidil-KOR
41	linhas 15 e 16	CaCl ₂ para neutralização	CaCl ₂ .
41	linha 17	extraído	solubilizado
43	linha 3	do peptídeo foi	do peptídeo da resina foi
49	linha 19	também foram submetidas	também submetidas

52	linha 3	permitidas a reagir	permitidas reagir
56	Estrutura da resina HMBA		
58	linhas 7 e 8	éster de oxima, embora a presença do grupo nitro presente na KOR reduza significativamente esta labilidade	éster de oxima.
59	linha 5	peptidil-SAMBHAs	peptidil-SAMBHA
60	linha 1	subproduto B , isômero	subproduto B , provável isômero
69	Esquema 2	Me^{+2}	M^{2+}
69	linha 15	mais longas	mais lentas
71	linhas 4 e 5	mediador, pois diminuiria a disponibilidade de Cu^{+2} livre no meio reacional.	mediador.
73	linha 4	amostra, exceto para Co	amostra.
76	linha 12 da Tabela 5	20% MeOH/DMF	50% MeOH/DMF
90	legenda da Figura 9	90 e 10% ACN/H ₂ O	90 (A) e 10% (B) ACN/H ₂ O
95	linha 3	de serem cumpridas	de serem completadas
95	linha 12	1700 e 1800	1700 a 1800
100	linha 2 da tabela	20% MeOH/DMF	20% HS(CH ₂) ₂ COOEt/DMF
100	linha 3 da tabela	20% MeOH/DMSO	20% HS(CH ₂) ₂ COOEt/DMF
100	linha 4 da tabela	20% MeOH/DMSO	50% HS(CH ₂) ₂ COOEt/DMF
100	linha 5 da tabela	20% MeOH/DMF	50% HS(CH ₂) ₂ COOEt/DMF
103	linha 18	Blake e col., 1986	Aimoto, 1999
103	linha 18	N ^α -acil-peptídeo-SRs	N ^α -acil-peptídeo-SR
111	linhas 1, 2 e 3 da Tabela 9	Bz- D,L -Tyr-pNA (U/g de sólido)	Bz- D,L -Tyr-pNA (U/mg de sólido)
111	linhas 1, 2 e 3 da Tabela 9	Bz- D,L -Arg-pNA (U/g de sólido)	Bz- D,L -Arg-pNA (U/mg de sólido)
111	linha 4 da Tabela 9	1,612	0,0206
111	linha 5 da Tabela 9	1,576	0,0186
111	linha 6 da Tabela 9	1,752	0,0184
149	linhas 34-38	Blake ... até ... 468-476.	—

Dedico esta Tese aos maiores responsáveis por eu ter chegado até aqui: meus queridos pais Didi e Ninha! Muito obrigada pelo apoio, confiança e dedicação de vocês à minha formação!

Um agradecimento mais do que especial ao Beto, meu amorzinho, companheiro da vida toda, que sempre está comigo nos bons ou maus momentos. Amo você muito!

Também agradeço ao meu amado irmão Marcos (cabeça) e minha querida cunhada Janaina. Valeu a torcida: a boneca ficou pronta!

Agradeço, enfim, pelo amor, apoio e compreensão de todos vocês, que mesmo sem entender muito bem o que são “peptícos”, sempre torceram muito para tudo dar certo! Família, vocês são o máximo! Amo muito vocês do fundo do meu coração!

Agradecimentos

A Deus pela vida, pela família, pela saúde e pela minha capacidade.

À Profª Dra. M. Terêsa M. Miranda pela oportunidade, orientação, suporte e dedicação durante todo o desenvolvimento do projeto.

Aos colegas do Laboratório de Química de Peptídeos, de hoje: Cleber, César, Carina, Lalá, Carol e Leonardo; e de antes: Alessandra, Renata, Giuliano, Nicolas, João e Rafael, por me agüentarem, pela ajuda em diversos momentos, pelas conversas científicas (ou não) e principalmente pelas risadas.

Ao Cleber pelas análises de aminoácidos.

À Fernanda M. Prado pela ajuda com as análises por espectrometria de massas.

Ao Prof. Dr. Pedro de Oliveira pelas análises de metais por espectrometria de absorção atômica.

À Profª Dra. Márcia L. A. Temperini e, principalmente, ao Ms. Gustavo F. S. Andrade pelo empenho nas tentativas de investigação do mecanismo de mediação por metal por FT-Raman.

Ao Prof. Dr. Hermi F. de Brito e ao Dr. Ercules E. S. Teotonio pelas tentativas de investigação do mesmo mecanismo por espectroscopia de luminescência.

À Profª Dra. Ana Maria da Costa Ferreira ainda pelas tentativas de investigação por ressonância paramagnética eletrônica (EPR) e pela doação dos sais de cobre.

Aos Professores Dr. Leandro H. de Andrade, Dr. João V. Comasseto e Dr. Roberto de Torresi pelas doações da lipase Cal A (Novozyme 735), da lipase Cal B imobilizada (Novozyme 435) e do líquido iônico [BMIM][BF₄], respectivamente.

Ao Prof. Dr. Sandro R. Marana pela orientação e empréstimo do equipamento para as análises por PAGE-SDS.

À Giovana e ao Marquinhos do Bloco 05 e, especialmente, ao Marcus e à Graziela do Bloco 11 pelas incríveis ajudas com a interpretação dos espectros de RMN de ^1H .

À minha amiga da vida inteira Cláudia, pelos ótimos momentos, pela amizade e apoio incondicionais, que me salvaram tantas vezes.

Aos meus amigos e parentes queridos, que foram muitas vezes privados da minha presença, mas que sempre torceram muito por mim: Crizélia, Ricardo, Nancy, Paulinho, Alexandre, Jota, Andréa, Edison, Thaís, Felipe, Renata, Cleide, Celso, Diego, Anita, Denise, Daniel, Toninho, Jacira, Cláudia, Márcia, Anderson, Thiago, Claudete, Claudine e Júnior.

À FAPESP pela bolsa de Doutorado Direto e pela Reserva Técnica que me propiciou, entre outras coisas, duas oportunidades de viagens ao exterior.

A todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para eu chegar até aqui, MUITO OBRIGADA!

*"A alegria de contemplar e de conhecer é
o melhor presente da natureza".*

Albert Einstein

RESUMO

Proti, P.B. Preparação de ésteres e tioésteres de peptídeos protegidos através de solvólise da ligação peptidil-resina mediada por íons metálicos. 2007. 202p. Tese – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os objetivos do presente trabalho foram: *i*) aprimorar o procedimento alternativo de mediação por íons metálicos da alcoólise da ligação peptidil-resina com vistas à obtenção de ésteres metílicos de peptídeos protegidos (N^{α} -acil-peptídeo protegido-OMe) em condição reacional branda e com alta eficiência; *ii*) investigar a aplicabilidade do procedimento para a preparação de N^{α} -acil-peptídeo protegido-SR e de N^{α} -acil-aminoácido-OR; *iii*) verificar se os N^{α} -acil-peptídeo-OMe obtidos atuariam como doadores de acila em reações de formação de ligação peptídica catalisadas por lipases. Para tanto, na busca da melhor condição de metanolise e comparação com os procedimentos usuais de alcoólise de ligação peptidil-resina, foram usados: o fragmento 22-24 da colecistocinina-33 humana (*tripeptídeo modelo*), Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{+2} e Cu^{+2} (*mediadores*), as resinas oxima de Kaiser (KOR), *p*-hidroximetilfenil acetamidometil, ácido *p*-hidroximetilbenzóico e álcool *p*-benziloxibenzil (*suportes poliméricos*), misturas de MeOH com DCM, DMSO, NMP, THF ou DMF (*solventes*) e 25, 37, 50 ou 60°C. A condição ótima encontrada [KOR, Ca^{+2} (1 eq./eq. de peptídeo), 50% MeOH/DMF, 50°C] foi empregada com sucesso na preparação do N^{α} -acil-heptapeptídeo protegido-OMe, fragmento do peptídeo quimiotático M de *Vespa mandarinia*. Variações dessa condição foram usadas com sucesso nas preparações dos N^{α} -acil-tripeptídeo protegido- $S(CH_2)_2COOEt$ e N^{α} -acil-Ala-OR (R: Me; Bzl), pois eles foram gerados com boas qualidades e rendimentos similares ou superiores aos obtidos via procedimentos usuais. Após desproteção de cadeias laterais, os N^{α} -acil-tripeptídeo-OMe e N^{α} -acil-heptapeptídeo-OMe foram usados em reações de acoplamento com Gly-NH₂ em presença de preparações lipásicas

comerciais. Estes ensaios inéditos também foram bem sucedidos, pois após adequação das condições reacionais, os N^α-acil-tetrapeptídeo-NH₂ e N^α-acil-octapeptídeo-NH₂ foram obtidos com boas qualidades e rendimentos de 65% (1 h) e 55% (24 h), respectivamente.

Palavras-chave: resina de Kaiser, metanólise, tiólise, Ca⁺², biocatálise, lipase, tripsina.

ABSTRACT

Proti, P.B. Preparation of protected peptide esters and thioesters through peptide-resin linkage solvolysis mediated by metal ions. 2007. 202p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The present work aimed to: *i*) improve the alternative procedure based on mediation by metal ions of peptide-resin linkage alcoholysis to obtain fully protected peptide methyl esters (N^{α} -acyl-protected peptide-OMe) under mild reaction condition and with high efficiency; *ii*) investigate the usefulness of the alternative procedure for preparing N^{α} -acyl-protected peptide-SR and N^{α} -acyl-amino acid-OR; *iii*) verify whether the resulting N^{α} -acyl-peptide-OMe would act as acyl donors in peptide bond formation catalyzed by lipases. Thus, in the search for the best methanolysis condition and comparison with the usual procedures for that, we used: fragment 22-24 of human cholecystokinin-33 (*model tripeptide*), Ca^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} and Cu^{+2} (*mediators*), Kaiser oxime resin (KOR), *p*-hydroxymethylphenylacetamido methyl resin, *p*-hydroxymethylbenzoic acid resin and *p*-benzyloxy benzyl alcohol resin (*Polymeric supports*), mixtures of MeOH and DCM, DMSO, NMP, THF or DMF (*solvents*) and 25, 37, 50 or 60°C. The optimal condition found [KOR, Ca^{+2} (1 eq./eq. of peptide), 50% MeOH/DMF, 50°C] was used successfully for preparing N^{α} -acyl-protected heptapeptide-OMe, fragment 1-7 of the chemotactic peptide M produced by *Vespa mandarinia*. Variations of this condition were employed successfully for preparing N^{α} -acyl-protected tripeptide-SR and N^{α} -acyl-Ala-OR (R: Me, Bzl): indeed, these compounds were obtained in good quality and with similar or superior yields than those provided by usual procedures. After side chain deprotections, the N^{α} -acyl-tripeptide and N^{α} -acyl-heptapeptide methyl esters obtained were used in coupling reactions with Gly-NH₂ in the presence of commercial lipase preparations. Those pioneer reactions were also successful, since after optimizing the conditions, N^{α} -acyl-

tetrapeptide-NH₂ and N^α-acyl-octapeptide-NH₂ were obtained in good qualities with yields of 65% (1 h) and 55% (24 h), respectively.

Keywords: Kaiser oxime resin, methanolysis, thiolysis, Ca⁺², biocatalysis, lipase, trypsin.

Lista de abreviações

As abreviações utilizadas estão de acordo com as recomendações da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) e da IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) disponíveis no site <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/>.

Código de três letras para os vinte aminoácidos usuais

Ala: alanina	Leu: leucina
Arg: arginina	Lys: lisina
Asn: asparagina	Met: metionina
Asp: ácido aspártico	Phe: fenilalanina
Cys: cisteína	Pro: prolina
Glu: ácido glutâmico	Ser: serina
Gln: glutamina	Thr: treonina
Gly: glicina	Trp: triptofano
His: histidina	Tyr: tirosina
Ile: isoleucina	Val: valina

Outras abreviações

Ac: acetil
ACN: acetonitrila
Alloc: aliloxicarbonil
APS: persulfato de amônio
BBDI: 1- <i>t</i> -butoxi-2- <i>t</i> -butoxicarbonil-1,2-diidroisoquinolina
BDDC: bis[[4-(2,2-dimetil-1,3-dioxolil)]metil]carbodiimida
[BMIM][BF₄]: tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazólio
[BMIM][PF₆]: hexafluorfosfato de 1-butil-3-metilimidazólio
Boc: <i>t</i> -butiloxicarbonil
Boc-OSu: succinimidato de <i>t</i> -butiloxicarbonila
BOP: hexafluorfosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(pirrolidino)fosfônio
But: butyl
Bz: benzoil
Bzl: benzyl
Cam: carbamoilmetyl
CCK: hormônio colecistocinina
CCL: lipase de <i>Candida cylindracea</i>
cHx: cicloexil
2ClZ: 2-clorobenziloxicarbonil
cPPL: lipase pancreática suína bruta
DBF: dibenzofulveno
DBU: 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undeca-7-eno
DCM: diclorometano

DCC: *N,N'*-dicicloexilcarbodiimida
DCU: *N,N'*-dicicloexiluréia
DIC: *N,N'*-diisopropilcarbodiimida
DIPEA: *N,N'*-diisopropiletilamina
DMAP: *p*-dimetilaminopiridina
DMF: *N,N'*-dimetilformamida
DMSO: dimetilsulfóxido
EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EEDQ: 2-etoxi-1-(etoxicarbonil)-1,2-diidroquinolina
EPR: Ressonância Paramagnética Nuclear
ESI: ionização por eletrospray
Et: etil
EtOH: etanol
Fmoc: 9-fluorenilmetoxicarbonil
For: formil
FT-Raman: espectroscopia Raman com transformada de Fourier
GA: grau de aminoacilação
GF: grau de funcionalização
Gp: *p*-guanidinofenil
GS: grau de substituição
HATU: hexafluorofosfato de 2-(1-H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio
HBTU: hexafluorofosfato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio
HMBA: resina ácido *p*-hidroximetilbenzóico
HOBt: *N*-hidroxibenzotriazol
HOSu: *N*-hidroxisuccinimida
HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
iNoc: isonicotiniloxicarbonil
IV: espectroscopia no infravermelho
KOR: resina oxima de Kaiser (resina *p*-nitrobenzofenona oxima)
LC/ESI-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray
MBHA: resina *p*-metilbenzidrilamina
Me: metil
MeOH: metanol
NBS: *N*-bromosuccinimida
NMM: *N*-metilmorfolina
NMP: *N*-metilpirrolidona
PAM: resina *p*-hidroximetilfenilacetamidometil
pNA: *p*-nitroanilida
PPL: lipase pancreática suína
PPL-DF: lipase pancreática suína livre de diastase
pPPL: lipase pancreática suína purificada
PyAOP: hexafluorofosfato de 7-azabenzotriazol-1-il-oxi-tris(pirrolidino) fosfônio

PyBOP: hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitris(pirrolidino) fosfônio

Rink amida: resina 4-(2',4'-Dimetoxifenilaminometil)-phenoximetil

RP-HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa

RMN: Ressonância Paramagnética Nuclear

SAMBHA: resina 4-succinilamino-2,2',4'-trimetoxibenzidrilamina

SDS: dodecil sulfato de sódio

SEPCC: Síntese Enzimática de Peptídeos Cineticamente Controlada

SEPTC: Síntese Enzimática de Peptídeos Termodinamicamente Controlada

SPFS: Síntese de Peptídeos em Fase Sólida

TBTU: tetrafluorborato de *N*-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3,-tetrametilurônio

TEA: trietilamina

TEMED: *N,N,N',N'*-tetrametilelenodiamino

TFA: ácido trifluoroacético

TFE: 2,2,2-trifluoretanol

Tfe: trifluoretil

TFMSA: ácido trifluormetanosulfônico

THF: tetraidrofurano

TIC: “Total Ion Current”

TIS: triisopropilsilano

TMS-CHN₂: trimetilsilildiazometano

TPCK: tosilfenilalanil clorometil cetona

Tris, Tris-HCl ou Trizma: tampão tris(hidroximetil)aminometano

Troc: 2,2,2-tricloroetoxicarbonil

TsCl: cloreto de *p*-toluenosulfonila ou cloreto de tosila

VesCP-M: peptídeo quimiotático M de *Vespa mandarinia* (sigla em inglês “Vespid chemotactic peptide M”)

Wang: resina álcool *p*-benziloxibenzoil

Z: benziloxicarbonil

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Peptídeos: exemplos e funções.....	1
1.2. Métodos de síntese de peptídeos.....	2
1.3. Síntese de peptídeos catalisada por lipases.....	11
1.4. Importância e métodos de preparação de peptídeos esterificados.....	14
1.5. Importância e métodos de preparação de peptídeos tioesterificados.....	21
1.6. Importância e métodos de preparação de aminoácidos esterificados.....	27
2. OBJETIVOS.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1. Materiais utilizados.....	32
3.2. Métodos preparativos.....	34
3.2.1. Síntese manual de aminoacil- e peptidil-resinas pela SPFS convencional.....	34
a) KOR.....	35
b) H MBA.....	36
c) PAM.....	37
d) Wang.....	37
e) Rink amida e SAMBHA.....	37
3.2.2. Método geral de solvólise da ligação aminoacil- ou peptidil-resina.....	38
a) Metanólise catalisada por base.....	38
b) Alcoólise assistida por íons metálicos.....	38
c) Tiólise mediada por íon metálico.....	39
3.2.3. Obtenção em maior escala de Z-Ala-OR, N ^α -acil-peptídeo protegido-OR e N ^α -acil-peptídeo protegido-SR a partir de solvólise da ligação éster de oxima mediada por Ca ⁺²	39
3.2.4. Remoção das proteções de cadeias laterais de N ^α -acil-peptídeo protegido-OR e N ^α -acil-peptídeo protegido-SR.....	41
3.2.5. Clivagem da resina e desproteção total de peptidil-Rink amida e -SAMBHA.....	41
3.2.6. Purificação de peptídeos por RP-HPLC em escala analítica ou semipreparativa.....	43
3.2.7. Purificação de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe por RP-HPLC em escala preparativa.....	44
3.2.8. Ensaios de hidrólise de éster de N ^α -acil-peptídeo-OR usando cPPL....	44
3.2.9. Incubação de Ac-Ile-Ser-Asp-OMe e Gly-NH ₂ ·HCl na presença de cPPL e CCL.....	45

3.2.10. Incubação de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe com Gly-NH ₂ ·HCl na presença de preparações lipásicas e de tripsina comerciais.....	46
3.3. Métodos analíticos.....	47
3.3.1. Determinação do grau de aminoacilação de aminoacil-resina e do grau de substituição de peptidil-resina.....	47
a) Método do ácido pícrico.....	47
b) Análise de aminoácidos.....	47
3.3.2. Monitoramento da reação de solvólise da ligação peptidil-resina e análise do produto obtido.....	49
3.3.3. Caracterização dos produtos purificados por RMN de ¹ H.....	50
3.3.4. Determinação do rendimento de desligamento de Z-Ala-OR ou de N ^α -acil-peptídeo protegido-XR da resina (X = O ou S).....	50
3.3.5. Determinação do conteúdo de Ca, Zn, Co e Cu em Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-OMe purificado.....	50
3.3.6. Preparação de amostra e obtenção de espectro FT-Raman.....	51
3.3.7. Análise de preparações enzimáticas por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS).....	52
3.3.8. Determinação de atividades enzimáticas de cPPL, pPPL e PPL-DF.....	53
a) Atividade lipásica.....	53
b) Atividade frente a <i>p</i> -nitroanilida de Bz-DL-tirosina.....	54
c) Atividade frente a <i>p</i> -nitroanilida de Bz-DL-arginina.....	54
d) Atividade frente a Z-Gly-Phe-OH.....	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.1. Síntese manual de aminoacil- e peptidil-resinas à temperatura ambiente.....	56
4.2. Assistência por metal da solvólise de ligação peptidil-resina.....	67
4.2.1. Investigação da metanolise.....	67
a) Triagem das condições reacionais da metanolise da ligação éster de oxima de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-KOR.....	67
b) quantificação dos conteúdos de metais nos Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-OMe obtidos via mediação por metal e dessanilizados por RP-HPLC.....	72
c) Metanolises de ligações ésteres de outras peptidil-resinas: estudo comparativo.....	74
4.2.2. Otimização da condição reacional para a metanolise da ligação oxima de Ac-peptidil-KOR mediada por metal.....	83
4.2.3. Preparação em maior escala de N ^α -acil-peptídeo protegido-OMe na condição otimizada de metanolise da ligação éster de oxima de peptidil-KOR mediada por Ca ⁺²	88

a) Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe.....	88
b) Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(2ClZ)-OMe.....	91
4.2.4. Tentativa de investigação por espectroscopia Raman do mecanismo de mediação por metal da metanolise de ligação peptidil-KOR.....	94
4.2.5. Verificação da possibilidade de mediação por Ca^{+2} da tiólise da ligação peptidil-KOR.....	98
4.2.6. Preparação de Ac-Ile-Ser-Asp-S(CH ₂) ₂ COOEt a partir de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-S(CH ₂) ₂ COOEt.....	103
4.2.7. Verificação da possibilidade de mediação por Ca^{+2} da alcoólise da ligação Z-Ala-KOR.....	105
4.3. Estudo da aplicabilidade dos compostos Ac-peptídeo-OMe obtidos em sínteses da ligação peptídica biocatalisadas.....	108
4.3.1. Caracterização de preparações comerciais de lipase de pâncreas suíno.....	108
4.3.2. Tentativa de síntese de Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH ₂ mediada por cPPL a partir de Ac-Ile-Ser-Asp-OMe e Gly-NH ₂	111
4.3.3. Tentativa de síntese enzimática de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-Gly-NH ₂ a partir de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe e Gly-NH ₂	120
4.4. Caracterização química dos compostos obtidos.....	128
5. CONCLUSÕES.....	145
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	148
Apêndice – Espectros de RMN.....	168
CURRICULUM VITAE.....	

1. INTRODUÇÃO

1.1. Peptídeos: exemplos e funções

Há mais de quarenta anos os peptídeos deixaram de ser vistos apenas como produtos de degradação de proteínas e passaram a ser objeto de estudo de diversos pesquisadores, o que ocorreu devido à descoberta da grande diversidade de suas funções. A seguir, alguns exemplos relevantes:

Ocitocina – hormônio secretado pelo hipotálamo e estocado no lobo posterior da hipófise, que em fêmeas de mamíferos estimula as contrações uterinas na hora do parto e a ejeção de leite durante a amamentação e que nos machos também desempenha funções reprodutivas (Thackare e col., 2006);

Bradicinina – hormônio envolvido com a resposta inflamatória dos tecidos e com ação hipotensora em mamíferos (Couture e col., 2001; Batenburg e col., 2005);

Colecistocininas – hormônios com formas moleculares de tamanhos variados que, em vertebrados, mediam funções digestivas e exibem atividades neuromoduladoras e/ou neurotransmissoras (Rehfeld, 2004);

Vasopressina – hormônio com ação antidiurética que leva ao aumento da pressão sangüínea em mamíferos, promovendo a reabsorção de água pelo rim (Ali e col., 2007);

Glutationa – tripeptídeo que constitui o principal sistema celular redox, desempenhando uma variedade de funções, desde desintoxicação a proteção contra danos oxidativos (Chakravarthi e col., 2006);

Encefalinas – pentapeptídeos secretados pelo encéfalo que se ligam a receptores opióides em determinadas células do cérebro, induzindo a analgesia em mamíferos (Gentilucci, 2004);

Gramicidina S – peptídeo cíclico produzido naturalmente pela bactéria *Bacillus brevis* comercializado como antibiótico (McPhee e col., 2005);

Enfuvirtide (Fuzeon) – peptídeo de 36 resíduos de aminoácidos considerado o primeiro

representante de uma nova classe de drogas anti-retrovirais usada como inibidor de fusão do vírus HIV em pacientes infectados com HIV multi-resistente (Matthews e col., 2004);

Conotoxinas – neurotoxinas de tamanhos variados produzidas por algumas espécies de caracóis marinhos que atuam como bloqueadoras de canais iônicos e apresentam, portanto, potencial de aplicação como analgésicos (Olivera, 2006).

Assim sendo, diversos peptídeos têm se mostrado comercialmente importantes como agentes terapêuticos. No caso das conotoxinas, por exemplo, a droga analgésica ziconotide (Prialt®) produzido pelo caracol *Conus magus* foi aprovada em 2004 pelo FDA para tratamento de dores severas (Miljanich, 2004; Olivera, 2006).

Como as quantidades isoladas a partir dos organismos que os produzem são geralmente muito pequenas, a síntese de peptídeos tornou-se uma ferramenta-chave na obtenção desses compostos em quantidades suficientes para a investigação de suas propriedades biológicas, químicas e estruturais, dos seus mecanismos de ação, para o desenvolvimento de novas drogas, além de atender a demanda de produção em escalas variáveis. Neste contexto, torna-se também importante o aprimoramento das metodologias sintéticas visando à obtenção de peptídeos com maior rendimento e melhor qualidade em menor tempo.

1.2. Métodos de síntese de peptídeos

A formação de uma ligação peptídica ocorre através da reação entre a carboxila alfa de um aminoácido (doador de acila) com o grupo amino alfa de outro aminoácido (aceitor de acila) com liberação de água. Grupos aminos são, em geral, bons nucleófilos, mas o grupo hidroxila de uma carboxila é um grupo de partida ruim. Assim, para favorecer a reação, o grupo carboxila deve ser quimicamente ativado (Nelson e col., 2004).

As metodologias atualmente empregadas na obtenção de peptídeos são divididas de acordo com o modo empregado para a ativação da carboxila, a saber:

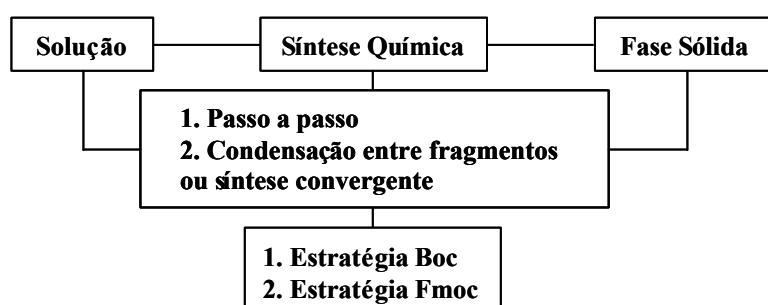
- 1) Síntese química → utiliza reagentes químicos conhecidos como reagentes acopladores;
- 2) Síntese enzimática ou biocatalisada → utiliza enzimas livres ou imobilizadas para a formação do complexo acil-enzima;
- 3) Síntese via tecnologia do DNA recombinante → utiliza tRNA específico para cada aminoácido.

A última modalidade emprega técnicas de clonagem de genes e a maquinaria ribossômica de células variadas para a formação das ligações peptídicas. A tecnologia em células de fago (“phage display”) vem sendo explorada com sucesso com o objetivo de viabilizar diferentes tipos de ensaios de ligação (Szardenings, 2003; Arap, 2005).

Em nosso laboratório, além de empregar a síntese química em fase sólida (SPFS) para o estudo de proteínas (Oyama e col., 1999; Kiyota e col., 2001; Bemquerer e col., 2002) e de peptídeos bioativos (Fogaça e col., 1999; Sforça e col., 2005; Machado e col., 2007), buscamos o aprimoramento e a agilização da SPFS (Varanda e Miranda, 1997; Souza e col., 2004; Proti e col., 2007) e estudamos a síntese enzimática de peptídeos (Liria e col., 1998; Liria e Miranda, 2007). Por esta razão, ambas as metodologias são abordadas abaixo com maior detalhe.

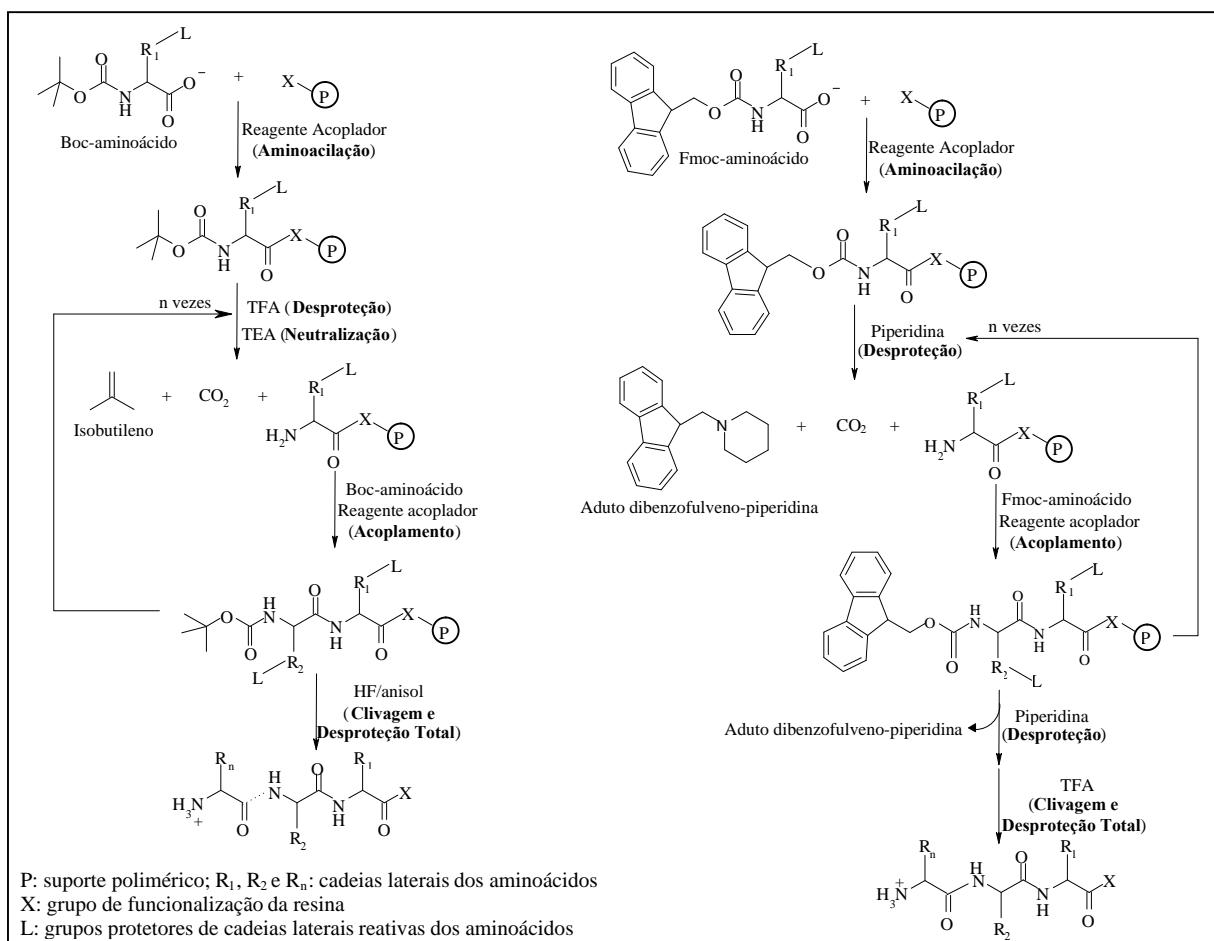
Síntese química:

Nesta metodologia, os grupos funcionais reativos que não estão envolvidos na formação da ligação peptídica devem ser previamente protegidos. O esquema a seguir resume as diferentes modalidades e estratégias empregadas nessa metodologia (Machado e col., 2004):



Na síntese química em solução (clássica), todos os reagentes ficam solúveis no meio reacional. Em geral, a proteção na α -carboxila do aceptor de acila é feita na forma de éster ou de amida. A síntese pode ocorrer no sentido N→C ou C→N (Machado e col., 2004).

A SPFS, introduzida por Bruce Merrifield na década de 60 do século passado, rendeu ao seu criador o Prêmio Nobel de Química em 1984 por apresentar grande utilidade não só na Química de Peptídeos, mas também na Bioquímica e na Química Orgânica. A SPFS ocorre geralmente no sentido C→N e pode ser realizada através de duas estratégias: Boc e Fmoc (**Esquema 1**). Estas estratégias dizem respeito aos tipos de protetores dos grupos α -aminos dos aminoácidos envolvidos na síntese e das cadeias laterais reativas dos aminoácidos, bem como ao tipo de suporte polimérico empregado.



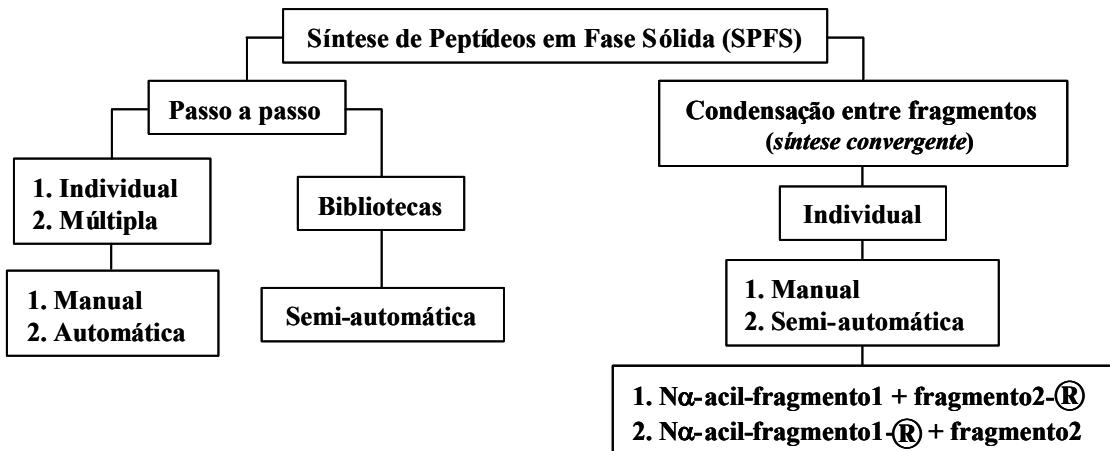
Esquema 1. Etapas da síntese em fase sólida utilizando as estratégias Boc e Fmoc. X: “linker” que contém OH ou NH₂; L: grupos protetores derivados do benzil (estratégia Boc) ou do *t*-butil (estratégia Fmoc); n: número de acoplamentos necessários para a obtenção da seqüência peptídica desejada.

Na estratégia Boc, a proteção do grupo α -amino (temporária) é feita com o *t*-butiloxicarbonil, que é lábil a TFA e a proteção das cadeias laterais reativas dos aminoácidos (semipermanente) é feita com protetores derivados do benzil, que são estáveis a TFA e lábeis a ácidos inorgânicos. Quanto aos suportes poliméricos, são empregados aqueles que estabelecem uma ligação com a seqüência peptídica que seja estável à exposição ao TFA e lábil a ácidos inorgânicos (Aimoto, 2001).

Na estratégia Fmoc, a proteção temporária é feita com o grupo 9-fluorenilmetoxicarbonil, que é lábil a bases orgânicas, e a proteção semipermanente é feita com grupos derivados do *t*-butil, que são estáveis a bases orgânicas e lábeis ao TFA. Os suportes poliméricos utilizados nessa estratégia são os que formam com o peptídeo uma ligação estável a bases orgânicas e lábil ao TFA (Amblard e col., 2006).

A SPFS pode ser feita através da incorporação de um aminoácido por vez à cadeia peptídica em crescimento (síntese passo a passo) ou através da condensação entre fragmentos protegidos previamente sintetizados, purificados e caracterizados quimicamente (síntese convergente). Os reagentes acopladores mais utilizados na SPFS, tanto pela estratégia Boc quanto pela Fmoc, são as carbodiimidas (DIC, DCC, EDC), *N*-hidroxibenzotriazol, sais de fosfônio (BOP, PyBOP, PyAOP) e sais de urônio (TBTU, HBTU, HATU). Com a adição de qualquer um dos reagentes citados, separados ou combinados, o doador de acila com a α -carboxila ativada é formado no próprio meio reacional, na chamada ativação “*in situ*” (Machado e col., 2004).

A SPFS apresenta ainda outras possibilidades que estão apresentadas no esquema a seguir (Machado e col., 2004):



Enquanto na SPFS múltipla são produzidos dezenas de peptídeos que, em geral, têm suas estruturas e localizações definidas, na síntese de bibliotecas de peptídeos podem ser gerados aleatoriamente até milhares ou milhões destes compostos (Lloyd-Williams e col., 1997).

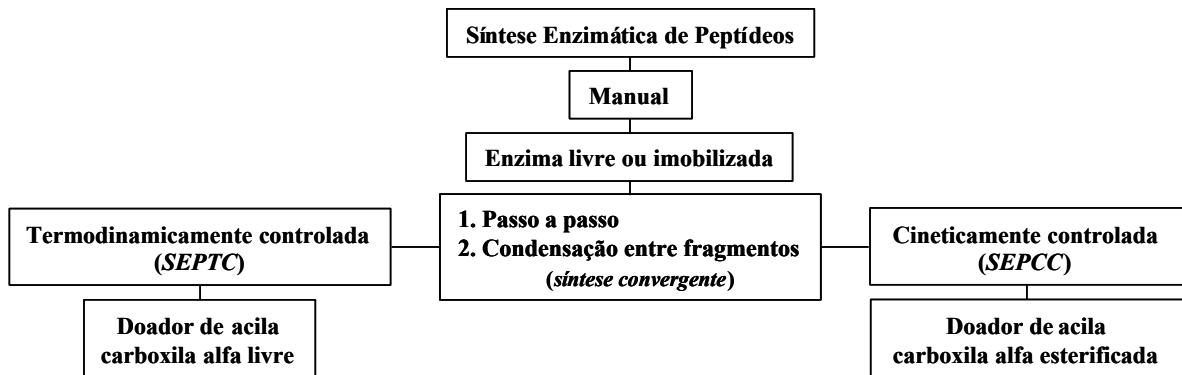
A SPFS é a modalidade mais empregada para a produção de peptídeos no âmbito acadêmico, devido à sua praticidade, rapidez e possibilidade de automação. Entretanto, ela apresenta uma desvantagem: em todas as suas etapas podem ocorrer reações secundárias (não mostradas nos esquemas anteriores), que geram um acúmulo de subprodutos contaminantes do peptídeo desejado, o qual só será purificado após o seu desligamento da resina polimérica e desproteção total. Além disto, dependendo da seqüência peptídica, pode ocorrer agregação das cadeias em crescimento sobre a resina polimérica que dificulta ou inviabiliza a síntese (Albericio e Carpino, 1997; Amblard e col., 2006). Relativamente à síntese clássica, a SPFS é mais cara e menos flexível em termos de aumento de escala. Assim, a pesquisa visando o aprimoramento e a adequação desta poderosa metodologia sintética, assim como a sua combinação com outros métodos, é essencial.

Síntese enzimática:

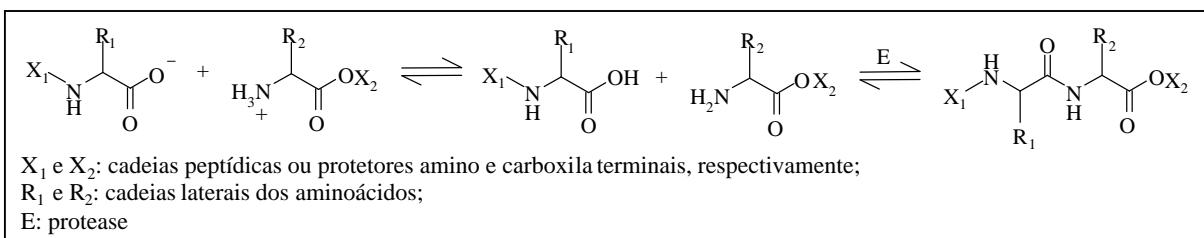
O desenvolvimento desta metodologia teve seu início no fim do século XIX e início do século XX, quando os cientistas postulavam que as proteases eram responsáveis por catalisar

a síntese de proteínas “*in vivo*” através da inversão da hidrólise proteolítica. Os resultados obtidos por Bergman e colaboradores nas sínteses dos dipeptídeos com carboxilas terminais na forma de anilida – Bz-Leu-Leu-NHPh e Bz-Leu-Gly-NHPh – em presença de papaína e α -quimotripsina livres, respectivamente, corroboravam tal hipótese (Bergman e Fraenkel-Conrat, 1938; Bergman e Fruton, 1938). Com a descoberta da síntese protéica ribossomal, a pesquisa em síntese enzimática de peptídeos diminuiu consideravelmente e só foi retomada no final da década de 70 do século passado com o objetivo de torná-la complementar ao método químico.

Assim como na abordagem química, a síntese enzimática ou biocatalisada de peptídeos também apresenta vantagens e desvantagens. O principal ponto positivo é a ausência de reações secundárias inerentes à metodologia química, como a de inversão de configuração do hidrogênio do carbono alfa durante a reação de acoplamento (enantiomerização ou racemização). Além disso, ela não requer proteção total dos reagentes, emprega condições reacionais mais brandas do que a síntese química, o aumento de escala de produção é facilitado e a reciclagem do biocatalisador é teoricamente possível no caso das enzimas imobilizadas em suportes insolúveis. Por outro lado, a síntese biocatalisada de peptídeos não é geral, pois além da especificidade usualmente apresentada pelas enzimas, suas estabilidade e atividade nos meios reacionais que propiciem a solubilização adequada dos reagentes, bem como a proporção apropriada entre os reagentes são parâmetros decisivos para o sucesso do acoplamento desejado. As abordagens possíveis desta modalidade sintética e suas bases teóricas estão descritas a seguir (Machado e col., 2004):

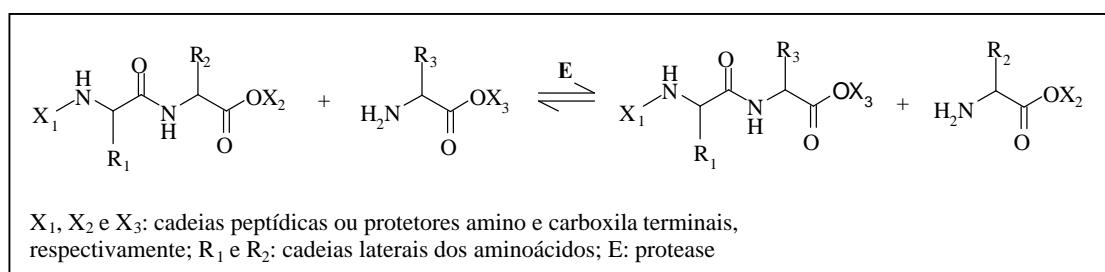


A SEPTC baseia-se na inversão da reação de hidrólise de peptídeos catalisada por enzimas com atividade amidásica (proteases):



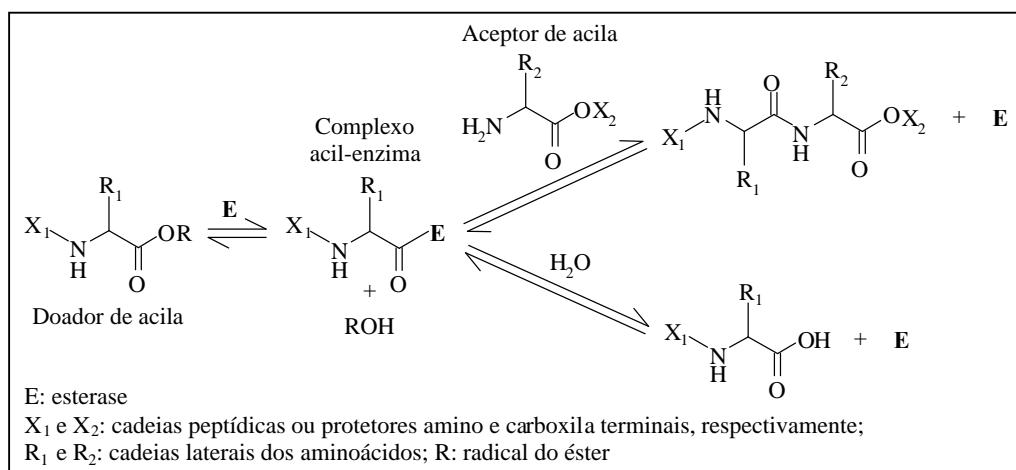
O deslocamento do equilíbrio no sentido da síntese da ligação peptídica é conseguido através do uso de: *i*) protetores nos grupos amino e carboxila não envolvidos na ligação peptídica, o que altera os valores de pKa dos grupos α-amino e α-carboxila que se envolverão na reação e facilita a etapa de deionização; *ii*) um dos reagentes em excesso; *iii*) emprego de meios reacionais anidros ou com baixo conteúdo de água; *iv*) sistemas bifásicos ou micelares, nos quais o produto desejado possa ser extraído, etc. (Faber, 1997; Lombard e col., 2005).

Outra modalidade de SEPTC, usada em menor extensão, é a transpeptidação, na qual o deslocamento do equilíbrio no sentido da formação do peptídeo de interesse é obtido através das mesmas estratégias citadas acima (Faber, 1997):



O exemplo mais relevante deste tipo de abordagem é a obtenção de insulina humana a partir da insulina de porco pela troca do resíduo C-terminal Ala da cadeia β por um resíduo de Thr. Tal processo pode ser realizado em presença de tripsina ou de uma protease de *Achromobacter lyticus* que apresentam especificidade por Lys (o penúltimo resíduo C-terminal da cadeia β) e do éster Thr-OBu, cujo éster *t*-butílico é removível por tratamento com solução de TFA (Morihara e col., 1980; Rose e col., 1983). Anteriormente, o tratamento de *diabetes mellitus* era feito principalmente através de administração de insulina extraída de tecido animal e purificada ou de insulina humana resultante da transpeptidação citada acima. Devido à crescente demanda por esse hormônio no tratamento de diabéticos, a insulina é atualmente produzida via tecnologia do DNA recombinante (Ladisch e Kohlmann, 1992).

A SEPCC, também chamada de aminólise de ésteres, emprega o doador de acila com o grupo α -amino protegido e a α -carboxila esterificada para rapidamente acilar a enzima, que necessariamente, deve ter atividade esterásica (esterase). Após a formação do complexo acil-enzima, há uma competição entre a água eventualmente presente no meio reacional e o grupo α -amino do acceptor de acila, resultando na hidrólise do doador de acila ou na formação da ligação peptídica, respectivamente:



A preponderância da aminólise sobre a hidrólise depende da especificidade da enzima, da natureza e concentração do acceptor de acila, do tipo de éster utilizado, do pH e do meio

reacional usado (Lombard e col., 2005), as quais determinam as suas cinéticas. Relativamente à STC, a SEPCC é, em geral, muito mais rápida.

Diversas proteases vêm sendo utilizadas como catalisadores na formação de ligação amida, via SEPTC ou SEPCC, com vistas à obtenção de peptídeos pequenos, em processos de semi-síntese ou ainda de modificação pontual de biomoléculas. Dentre as proteases mais empregadas estão a termolisina (Miranda e col., 1986; Erbeldinger e col., 1998; Niederhafner e col., 2006), a subtilisina (Kise e Fujimoto, 1988; Jonsson e col., 1996; Shen e col., 2004), a tripsina (Cerovsky, 1990; Itoh e col., 1996; Zakova e col., 2007), a α -quimotripsina (Bizzozero e col., 1988; Jonsson e col., 1996; Shen e col., 2004; Salam e col., 2006) e a papaína (Barbas e Wong, 1987; Mitin e col., 1997; Schechter e Ziv, 2006).

Embora bastante empregada, a síntese enzimática de peptídeos catalisada por proteases ainda demanda muitos estudos para contornar algumas de suas limitações, tais como: 1) hidrólise secundária dos peptídeos formados (Wehofsky e col., 2000); 2) especificidade da maioria das proteases por substratos do tipo L-aminoácidos e derivados (Kullmann, 1987); 3) instabilidade de grande parte das enzimas em meios orgânicos anidros ou que contenham pouca água, o que minimizaria a hidrólise secundária citada acima (West e Wong, 1987); 4) especificidade restrita a alguns aminoácidos apresentada por diversas proteases (Miyazawa e col., 2001). Assim, como estratégias alternativas bastante viáveis, têm sido empregados: substratos miméticos (Bordusa, 2002), mutações sítio-dirigidas das proteases (Joe e col., 2004), modificações químicas destes biocatalisadores (Davis, 2003), líquidos iônicos (Erbeldinger e col., 2000), enzimas com atividade exclusivamente esterásica que sejam capazes de formar o intermediário acil-enzima suscetível a ataques nucleofílicos. Em relação a última estratégia, as lipases são, em teoria, enzimas apropriadas para esse fim, por não apresentarem as limitações das proteases citadas anteriormente (West e Wong, 1987).

1.3. Síntese de peptídeos catalisada por lipases

Existem diversos trabalhos na literatura que relacionam lipases à síntese de peptídeos. No entanto, a maior parte deles refere-se a reações promovidas com derivados de aminoácidos, tais como transesterificação (Miyazawa e col., 2005), amidação (Conde e col., 2000; Conde e López-Serrano, 2002) e resolução de racematos por hidrólise de ésteres (Houng e col., 1996; Miyazawa e col., 2000; Malhotra e Zhao, 2005; Miyazawa e col., 2005). Porém, o número de artigos que relatam o uso dessas enzimas como catalisadores da formação de ligação peptídica é significativamente menor.

Essa modalidade de síntese biocatalisada iniciou-se no final da década de 80 do século passado, com trabalhos que relataram: 1) sínteses de dipeptídeos contendo **L** e **D**-aminoácidos a partir de doadores de acila N^α-protegidos catalisadas por CCL, cPPL e esterase de fígado de porco em meio aquo-orgânico (Matos e col., 1987; West e Wong, 1987); 2) síntese de dipeptídeos catalisada por cPPL em solvente orgânico totalmente anidro (Margolin e Klibanov, 1987); 3) formação de ligação peptídica entre a carboxila α de uma alanina com o grupo amino ε de uma lisina catalisada por lipase de *Pseudomonas sp.* em tolueno anidro (Kitaguchi e col., 1988). A característica recorrente desses trabalhos é a obtenção de dipeptídeos em longos tempos reacionais (16 h a 2 semanas).

Os trabalhos que surgiram a partir da década de 90 enfocavam a busca por melhores condições reacionais para a síntese de dipeptídeos. Em 1993, por exemplo, Kawashiro e colaboradores descreveram os resultados do estudo da influência de diversos fatores sobre a eficiência da síntese dos dipeptídeos Z-Phe-Phe-NH₂ e Z-Phe-Leu-NH₂, tais como a natureza e a proporção do co-solvente orgânico em relação à água no meio reacional monofásico, pH do tampão utilizado, concentração do acceptor de acila, temperatura, natureza do éster do doador de acila, especificidade e enantiosseletividade da cPPL pelo doador de acila. Segundo os autores, a maior vantagem em se usar um sistema de solvente aquo-orgânico monofásico

parecia ser o aumento da solubilidade dos substratos (Kawashiro e col., 1993). O efeito desses estudos sistemáticos refletiu-se na diminuição do tempo de reação: na síntese de Z-Phe-Phe-NH₂ mediada por cPPL com 80% de rendimento, o tempo requerido foi de 6 h.

Outro exemplo bastante interessante foi descrito em 1996 por Chen e colaboradores, que propuseram uma rota sintética aliando a síntese enzimática com a química. Na presença de uma oxima no meio reacional, a lipase de *Pseudomonas sp.* foi capaz de catalisar a transesterificação de um éster de aminoácido ou peptídeo N^α-protegido para formar um éster ativo de oxima, que por sua vez, pode formar ligações peptídicas com outros aminoácidos naturais e não naturais (Chen e col., 1996).

A possibilidade de incorporar D-aminoácidos e outros não usuais em uma síntese catalisada por uma preparação lipásica comercial incentivou mais estudos envolvendo esse aspecto. Com o objetivo de aperfeiçoar as condições reacionais, So e colaboradores investigaram a síntese de dipeptídeos contendo D-aminoácidos catalisada por cPPL em diversos sistemas aquo-orgânicos e encontraram que 3-metil-3-pentanol/H₂O (95% V:5% V) foi a melhor mistura de solventes para a obtenção de Z-L-Tyr-D-Ala-NH₂ em 7 h de reação (87%). Também foi explorada nesse trabalho a ativação da lipase com um surfactante antes da reação de síntese, pois já era conhecido e aceito o modelo em que a PPL frente a uma interface água-lipídeo passa por uma mudança conformacional e, como consequência, expõe seu sítio ativo (Verger, 1997; Secundo e col., 2006). Entretanto, os autores não verificaram nenhuma diferença entre as reações catalisadas por lipases tratadas ou não com o surfactante e inferiram que a conformação ativa da lipase previamente obtida possivelmente tornava-se novamente relaxada quando exposta a um conteúdo maior de água presente no meio reacional (So e col., 1998).

O fator de adesão celular Arg-Gly-Asp (RGD), envolvido em doenças como câncer e trombose (Meyer e col., 2006), tem sido empregado como peptídeo modelo em estudos de

síntese peptídica catalisada por cPPL em meio aquo-orgânico monofásico realizados por Zhang e colaboradores. Esses autores investigaram, por exemplo, o efeito de diversos parâmetros reacionais nas sínteses de Bz-Arg-Gly-NH₂ e Z-Gly-Asp-NH₂, tais como o pH do tampão utilizado, a natureza e a quantidade do co-solvente orgânico, o tempo mínimo necessário e a temperatura ideal. A melhor condição obtida para a síntese de Bz-Arg-Gly-NH₂ foi: 15°C, 40% MeOH/tampão fosfato pH 8,0, 10 h (73,6%); para a obtenção de Z-Gly-Asp-NH₂, a condição ótima foi: 15°C, 50% MeOH/tampão fosfato pH 7,0, 10 h (67,0%) (Zhang e col., 2003).

Em outros dois trabalhos, o mesmo grupo combinou a síntese química com a enzimática para obtenção de derivados maiores do RGD. A obtenção de Bz-Arg-Gly-Asp(NH₂)-NH₂, por exemplo, foi feita a partir do acoplamento catalisado por cPPL entre Bz-Arg-OEt e o fragmento Gly-Asp(NH₂)-NH₂ sintetizado quimicamente (Zhang e col., 2001), enquanto o Bz-Arg-Gly-Asp-Ser-NH₂ foi obtido a partir do acoplamento entre Bz-Arg-OEt e Gly-Asp-Ser-NH₂ também sintetizado quimicamente (Huang e col., 2006). Foram novamente estudadas as condições reacionais para atingir o melhor rendimento no menor tempo possível. A melhor condição obtida para a síntese de Bz-Arg-Gly-Asp(NH₂)-NH₂ foi: 15°C, em 50% DMF/tampão fosfato pH 7,7 por 8 h (76,4%) (Zhang e col., 2001). Para a obtenção de Bz-Arg-Gly-Asp-Ser-NH₂, a condição ótima foi: 10°C, 60% DMF ou 58% DMSO/tampão fosfato pH 7,5 (73,6% ou 70,4%, respectivamente) por 5 h (Huang e col., 2006).

Estes dois últimos trabalhos demonstraram, portanto, a utilidade da PPL na síntese de peptídeos maiores através do acoplamento entre um N^α-acil-aminoácido esterificado e fragmentos peptídicos sintetizados quimicamente.

Por outro lado, estudos feitos pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram, por exemplo, que a cPPL foi capaz de catalisar a hidrólise do éster metílico de diversos Z-aminoácido-OMe em 80% *n*-hexano/tampão Tris 0,5 M, pH 8,0, com certa preferência por

aminoácidos básicos e aromáticos (Liria e Miranda, 2001 e 2002; Liria, 2004). Apesar de estes dados sugerirem uma generalidade do uso de cPPL como catalisador em síntese da ligação peptídica, eles revelaram a possibilidade de a PPL contida na cPPL não ser o catalisador principal das reações bem sucedidas descritas anteriormente na literatura e citadas nos parágrafos acima: de fato, as proteases contidas na cPPL também apresentam atividade esterásica, o que pode ter sido o fator determinante no excelente resultado obtido na síntese de Ac-Tyr-Gly-NH₂ catalisada por cPPL, que contém α -quimotripsina, a partir de Ac-Tyr-OMe e Gly-NH₂: 90% de rendimento em 5 min usando o sistema bifásico 80% *n*-hexano/tampão Tris, pH 8,0, a 37°C (Liria e Miranda, 2001; Liria e col., 2002; Liria, 2004; Liria e Miranda, 2007). A escolha do *n*-hexano foi baseada na estabilidade e eficiência elevadas da PPL nesse solvente em reações de esterificação (Athawale e col., 2002) e transesterificação (Xu e col., 1996). O uso de 80% de *n*-hexano foi baseado na observação anterior de que a síntese de Z-Asp-Gly-NH₂ catalisada por cPPL era favorecida quando altos conteúdos do solvente (70-80%) foram empregados (Liria e Miranda, 2001 e 2002; Liria, 2004, Liria e Miranda, 2007).

1.4. Importância e métodos de preparação de peptídeos esterificados

Com as considerações feitas acima, torna-se bastante óbvio o nosso interesse pelos peptídeos esterificados. Estes compostos apresentam-se basicamente em três formas: aqueles que apresentam o grupo amino terminal e as cadeias laterais dos aminoácidos livres (peptídeo-OR); os que contêm o grupo amino terminal protegido e as cadeias laterais dos aminoácidos livres (N^{α} -acil-peptídeo-OR); aqueles que são protegidos tanto no amino terminal quanto nas cadeias laterais reativas dos aminoácidos (N^{α} -acil-peptídeo protegido-OR).

Os N^{α} -acil-peptídeo-OR são amplamente empregados como doadores de acila em condensações enzimáticas cineticamente controladas catalisadas por proteases. Esses ésteres podem ser metílicos ou etílicos ($R = OCH_3$ ou OCH_2CH_3 ; Bordusa e col., 1999; Bacheva e col., 2000; So e col., 2000; Getun e col., 2001), benzílicos ou alílicos ($R = OCH_2C_6H_5$ ou

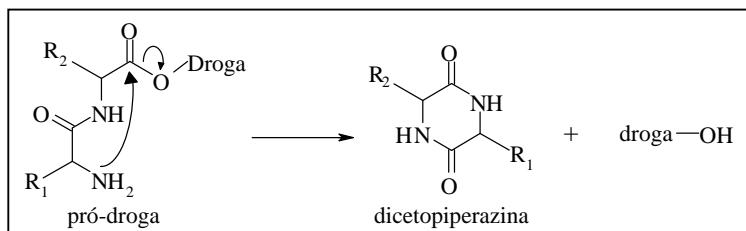
OCH₂CHCH₂; Ruiz e col., 1997; Fite e col., 2002), ativos como os ésteres carbamoilmetílicos (R = OCH₂CONH₂; Miyazawa e col., 2002 e 2003) e trifluoretílicos (R = OCH₂CF₃; Miyazawa e col., 2001) ou ésteres que mimetizam substratos específicos (Bordusa, 2002; Lombard e col., 2005) como o Boc-peptídeo-OGp (éster *p*-guanidinofenílico de Boc-peptídeo), que é reconhecido por tripsina (Cerovsky e Bordusa, 2000).

Entretanto, esse não é o único emprego possível para os peptídeos esterificados. Os exemplos abaixo ilustram a importância e a versatilidade desses compostos:

- 1)** O adoçante aspartame, um éster do tipo peptídeo-OR (Asp-Phe-OMe), produzido atualmente por um dos dois métodos: *i*) processo da empresa Tosoh em que Z-Asp-OH é enzimaticamente acoplado a Phe-OMe usando termolisina como catalisador, seguido de desproteção do grupo Z por hidrogenólise (Irino e col., 1994); *ii*) método desenvolvido pela Monsanto em que o anidrido interno de For-Asp-OH é quimicamente condensado com Phe-OH dando uma mistura de aproximadamente 8:2 de α - e β -For-Asp-Phe-OH, que é subsequente deformilado e simultaneamente esterificado pelo tratamento com HCl/água/metanol resultando em uma mistura de cloridrato de α - e β -aspartame (Hill e Gelman, 1990).
- 2)** Ésteres dos tipos peptídeo-OR e N $^{\alpha}$ -acil-peptídeo-OR são empregados como substratos em estudos de caracterização e cinética enzimática (Sekizaki e col., 1996).
- 3)** N $^{\alpha}$ -acil-peptídeo-OR e peptídeo-OR podem atuar como inibidores de proteases envolvidas em doenças como AIDS e Mal de Alzheimer (Hertel e col., 2004; Morohashi e col., 2006) e como análogos de peptídeos opióides que apresentem propriedades analgésicas e causem menos efeitos colaterais (Gao e col., 2005), sendo relevantes, portanto, na busca por novas drogas.
- 4)** O peptídeo quimiotático For-Met-Leu-Phe-OMe (fMLPOMe) envolvido com o sistema humano de defesa contra infecções bacterianas. Este composto interage com receptores

específicos de membranas celulares, ativando uma cascata complexa de transdução de sinal, desencadeando, por sua vez, diversas funções dos neutrófilos, como a quimiotaxe, a produção de ânion superóxido e a secreção de enzimas lisossomais (Spisani e col., 1996). Assim, os grupos de Cavicchioni e Spisani têm se dedicado a estudar o fMLPOMe e seus análogos com os objetivos de esclarecer os mecanismos pelos quais o peptídeo quimiotático se liga aos receptores específicos nos neutrófilos e de verificar as consequências biológicas de substituir os resíduos do fMLPOMe por aminoácidos usuais e não usuais (Cavicchioni e Spisani, 2001; Cavicchioni e col., 2005 e 2006).

5) Dipeptídeos esterificados podem também ser usados como transportadores de drogas que contenham um grupo hidroxila. Estes compostos recebem o nome de pró-drogas, pois em condições fisiológicas (pH 7,4 e 37°C), liberam a droga através de um processo não enzimático de ciclização intramolecular formando a dicetopiperazina correspondente (Santos e col., 2005):



Para diminuir a suscetibilidade das pró-drogas à ação de peptidases não específicas, o uso de aminoácidos não usuais, tais como o ácido 2-aminoisobutírico e a *N*-metil glicina, tem sido uma estratégia empregada com sucesso na preparação de dipeptídeos esterificados com drogas, tais como o aciclovir, a ciclosporina e o paracetamol (Anand e col., 2003; Hamel e col., 2003; Santos e col., 2005).

6) Os peptídeos esterificados também podem ser empregados como precursores químicos. Compostos do tipo peptídeo-OR, por exemplo, são substratos de partida em um processo patenteado de preparação de peptídeos amidados da empresa Carlsberg S.A. (Dinamarca), no qual os ésteres reagem com aminas primárias na presença de tripsina ou de uma

carboxipeptidase, resultando em produtos do tipo peptídeo-NHR, que por sua vez, são transformados em amidas primárias através de clivagem química (Buchardt e col., 1996).

7) N^α-acil-peptídeo protegido-OR podem servir como precursores de fragmentos na forma N^α-acil-peptídeo protegido-OH, reagentes usados na síntese química convergente em solução ou em fase sólida. É o caso do éster hidroxipiperídico de peptídeo totalmente protegido, que pode ser convertido ao correspondente N^α-acil-peptídeo protegido-OH por tratamento com Zn/H₃CCOOH (Kaiser, 1989; Hendrix e Lansbury, 1992; Mihara e col., 1993).

8) N^α-acil-peptídeo-OR e peptídeo-OR são empregados como compostos modelos em desenvolvimento e aprimoramento de técnicas analíticas, tais como a espectrometria de massas para investigação de padrões de ionização de peptídeos (Reid e col., 1998; Farrugia e col., 2001; Anbalagan e col., 2003) e a espectroscopia no infravermelho em duas dimensões para estudo de mudanças conformacionais de peptídeos (Maekawa e col., 2006).

Diante de tantas aplicações possíveis, é natural que, desde o final da década de 60 do século passado, procedimentos sintéticos cada vez mais eficientes e seletivos tenham sido propostos. Os mais antigos se baseiam na geração de ésteres metílicos por tratamento de peptidil-resinas de Merrifield com MeOH/NH₃ (Bodanszky e Sheehan, 1966) ou com MeOH em presença de uma resina de troca aniônica (íons OH⁻; Halpern e col., 1968). O inconveniente do primeiro procedimento era a possibilidade de formação do peptídeo totalmente protegido também na forma amidada, devido ao uso de amônia no processo sintético. E no segundo caso, as cadeias laterais de Asp e Glu protegidas com ésteres benzílicos eram transesterificadas a ésteres metílicos.

Atualmente, a síntese de peptídeos esterificados pode ser dividida em enzimática ou química. A primeira geralmente ocorre com as cadeias laterais reativas dos aminoácidos desprotegidas, gerando, portanto, ésteres dos tipos peptídeo-OR e N^α-acil-peptídeo-OR. Podem ser empregadas enzimas livres ou enzimas imobilizadas em suportes insolúveis. Os

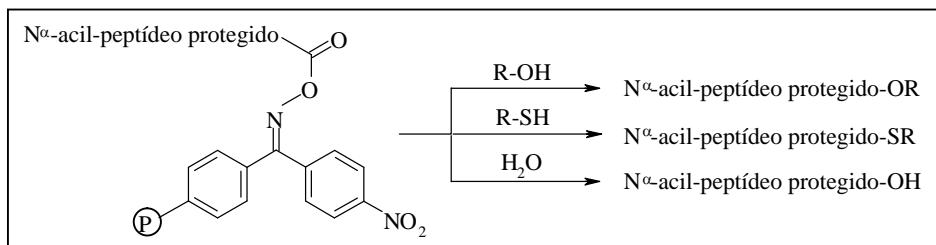
exemplos mais abundantes são os acoplamentos termodinamicamente controlados entre um doador de acila com carboxila livre (N^{α} -acil-aminoácido ou -peptídeo) e um aceptor de acila esterificado (aminoácido-OR) catalisados por: tripsina (Rose e col., 1988), pepsina (Bemquerer e col., 1994), papaína (Mitin e col., 1997), subtilisina (Liu e Tam, 2001) e termolisina (Isono e Nakajima, 2002). Como exemplos de síntese enzimática cineticamente controlada de peptídeos esterificados, podemos citar: 1) a preparação seqüencial de ésteres de peptídeos parcialmente protegidos de tamanhos crescentes a partir de um N^{α} -acil-aminoácido protegido-OEt, usando proteases diferentes a cada etapa de aminólise dos ésteres (Gill e col., 1995); 2) a síntese de um fragmento de CCK na forma Z-peptídeo-OEt através da aminólise de éster ativo carbamoilmétilico catalisada por α -quimotripsina (Capellas e col., 1996).

Os métodos químicos são bem mais diversificados. Eles podem ser realizados em solução ou em fase sólida e requerem proteção total dos grupos reativos das cadeias laterais dos aminoácidos. Portanto, podem ser gerados ésteres dos três tipos: peptídeo-OR, N^{α} -acil-peptídeo-OR e N^{α} -acil-peptídeo protegido-OR.

Basicamente existem dois procedimentos para sintetizar quimicamente peptídeos esterificados em solução: 1) através da ativação da carboxila livre do N^{α} -acil-aminoácido ou -peptídeo com DCC (Heimbrook e col., 1989; Merhi e col., 1996; Anand e col., 2003), BOP (Kim e Patel, 1994) ou TBTU (Santos e col., 2005) seguida de exposição do produto ativado a diferentes álcoois; 2) via catálise ácida com solução de HCl em álcool (Kowalak e Walsh, 1996; Reid e col., 1998; Farrugia e col., 2001; Kim e col., 2005) ou com solução de HNO_3 diluída em álcool (Anbalagan e col., 2003). Os ésteres carbamoilmétilicos de peptídeos utilizados em condensações catalisadas por proteases também são sintetizados em solução através da reação de sais de césio do N^{α} -acil-peptídeo-OH com 2-cloroacetamida (Martinez e col., 1985; Capellas e col., 1997; Miyazawa e col., 2002 e 2003).

Com respeito aos métodos químicos em fase sólida, é importante ressaltar a introdução

da resina *p*-nitrobenzofenona oxima, popularmente conhecida por resina oxima de Kaiser (KOR; DeGrado e Kaiser, 1980). O éster de oxima formado entre a cadeia peptídica e este suporte polimérico é suscetível ao ataque nucleofílico de uma variedade de compostos, tais como álcoois, tióis e água, gerando respectivamente, peptídeos protegidos esterificados, tioesterificados e com carboxila livre (Lloyd-Willians e col., 1997):



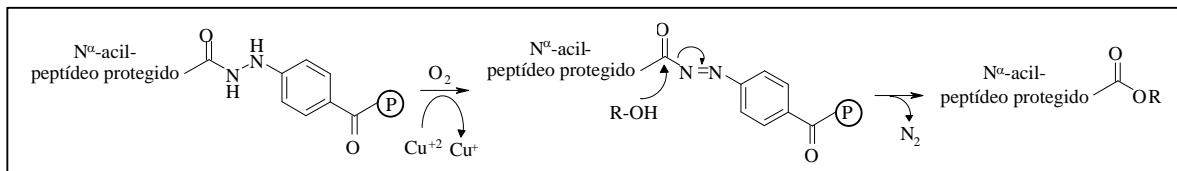
O procedimento de obtenção de N^{α} -acil-peptídeo protegido-OR proposto por DeGrado e Kaiser ocorre através da aminólise de peptidil-KOR por aminoácido esterificado catalisada por H_3CCOOH (De Grado e Kaiser, 1980 e 1982). Empregando este procedimento e etapas de desproteção das cadeias laterais por hidrogenação catalítica, Cerovsky e Bordusa sintetizaram três diferentes substratos miméticos do tipo N^{α} -acil-peptídeo-OR que foram usados com sucesso em condensações entre fragmentos mediadas por tripsina, protease V8 e α -quimotripsina (Cerovsky e Bordusa, 2000).

Apesar da proposição original da catálise ácida como mediação à aminólise da ligação éster de oxima de peptidil-KOR, compostos do tipo N^{α} -acil-peptídeo protegido-OR são mais freqüentemente obtidos através de alcoólise catalisada por bases, tais como TEA (resina de Merrifield; Reddy e col., 1985), DBU (Resinas PAM, Wang e KOR; Seebach e col., 1991; Pichette e col., 1997) e DIPEA (resina HMBA; Mellor e col., 2000).

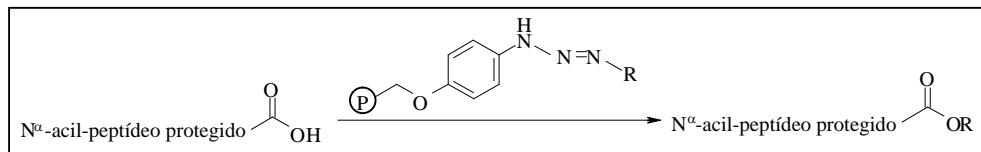
O “linker” ácido 3-mercaptopropiônico, introduzido por Camarero e colaboradores (Camarero e col., 1998), forma com a cadeia peptídica uma ligação tioéster que, assim como o éster de oxima, é suscetível ao ataque de diversos nucleófilos, permitindo a obtenção de diferentes peptídeos modificados em seus grupos carboxilos terminais. A geração de éster

metílico, por exemplo, é feita através do tratamento da N^α-acil-peptidil-resina, previamente desprotegida em suas cadeias laterais por reação com HF, a uma solução de metóxido de sódio em MeOH (Camarero e col., 2000). O emprego de tal “linker”, portanto, leva a obtenção de compostos do tipo N^α-acil-peptídeo-OR.

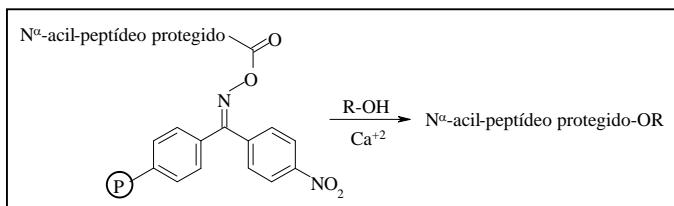
Existem dois procedimentos recentemente introduzidos para a síntese de ésteres do tipo N^α-acil-peptídeo protegido-OR. O primeiro deles envolve a resina 4-Fmoc-hidrazinobenzoil, que forma com a cadeia peptídica uma ligação estável a ácidos e bases, sendo compatível tanto com a estratégia Boc quanto com a Fmoc. A alcoólise é promovida, em presença de um oxidante [Cu(CH₃COO)₂ ou *N*-bromosuccinimida], de piridina e obviamente do álcool apropriado, como mostrado no esquema a seguir (Millington e col., 1998; Ludolph e col., 2002; Peters e Waldmann, 2003):



O segundo procedimento propõe uma reação em solução assistida por um polímero funcionalizado (PASP – “polymer-assisted solution phase”). O processo é realizado em duas etapas, sendo que a primeira é a funcionalização do suporte polimérico (resina de Merrifield), realizada com um alquiltriazeno, e a segunda é a esterificação do peptídeo ou do aminoácido protegido assistida por esse polímero (Rademann e col., 2001; Smerdka e col., 2004):



Um procedimento alternativo de geração de ésteres do tipo N^α-acil-peptídeo protegido-OR é aquele proposto por nós que utiliza condições reacionais brandas, pois dispensa o uso de ácidos ou bases, e ocorre em apenas uma etapa: a alcoólise mediada por Ca⁺² da ligação oxima formada entre a cadeia peptídica e a resina de Kaiser (Moraes, 2000):



A concepção desse procedimento alternativo surgiu com a observação da ocorrência de transesterificação do éster etílico a metílico de um N^α -acil-tripeptídeo bruto que continha Ca^{+2} durante a sua recristalização em MeOH/água (Miranda e col., 1991a). A partir dessa reação indesejada, a mediação por Ca^{+2} foi empregada com sucesso em metanólises das ligações peptidil-resinas de Merrifield (Miranda e col., 1991b), metanólises e hidrólises de ligações ésteres de oxima de peptidil-KORs (Moraes e col., 2000 e 2001; Proti e col., 2007).

Ainda com relação à primeira observação de transesterificação mediada por Ca^{+2} , resultados obtidos através de experimentos de RMN de ^1H indicaram que no caso da transesterificação citada acima, o íon metálico assistiu a metanolise por complexar com átomos de oxigênio carbonílicos, tornando o carbono carbonílico do éster etílico mais eletrofílico e, portanto, mais suscetível ao ataque de nucleófilos (Miranda e col., 1991a). O mesmo provavelmente ocorre nos casos das peptidil-resinas de Merrifield e peptidil-KORs estudadas, hipótese que também encontra sustentação na transesterificação de óleos vegetais catalisada por complexos metálicos, objetivando a produção de biodiesel (Abreu e col., 2004 e 2005; Sreeprasanth e col., 2006).

1.5. Importância e métodos de preparação de peptídeos tioesterificados

Estes compostos podem ser obtidos em quatro formas diferentes: aqueles que apresentam o grupo amino terminal e cadeias laterais dos aminoácidos livres (peptídeo-SR); os que possuem o extremo amino protegido e as cadeias laterais dos aminoácidos livres (N^α -acil-peptídeo-SR); aqueles que são protegidos no amino terminal e nas cadeias laterais reativas dos aminoácidos (N^α -acil-peptídeo protegido-SR) e aqueles que são protegidos nos

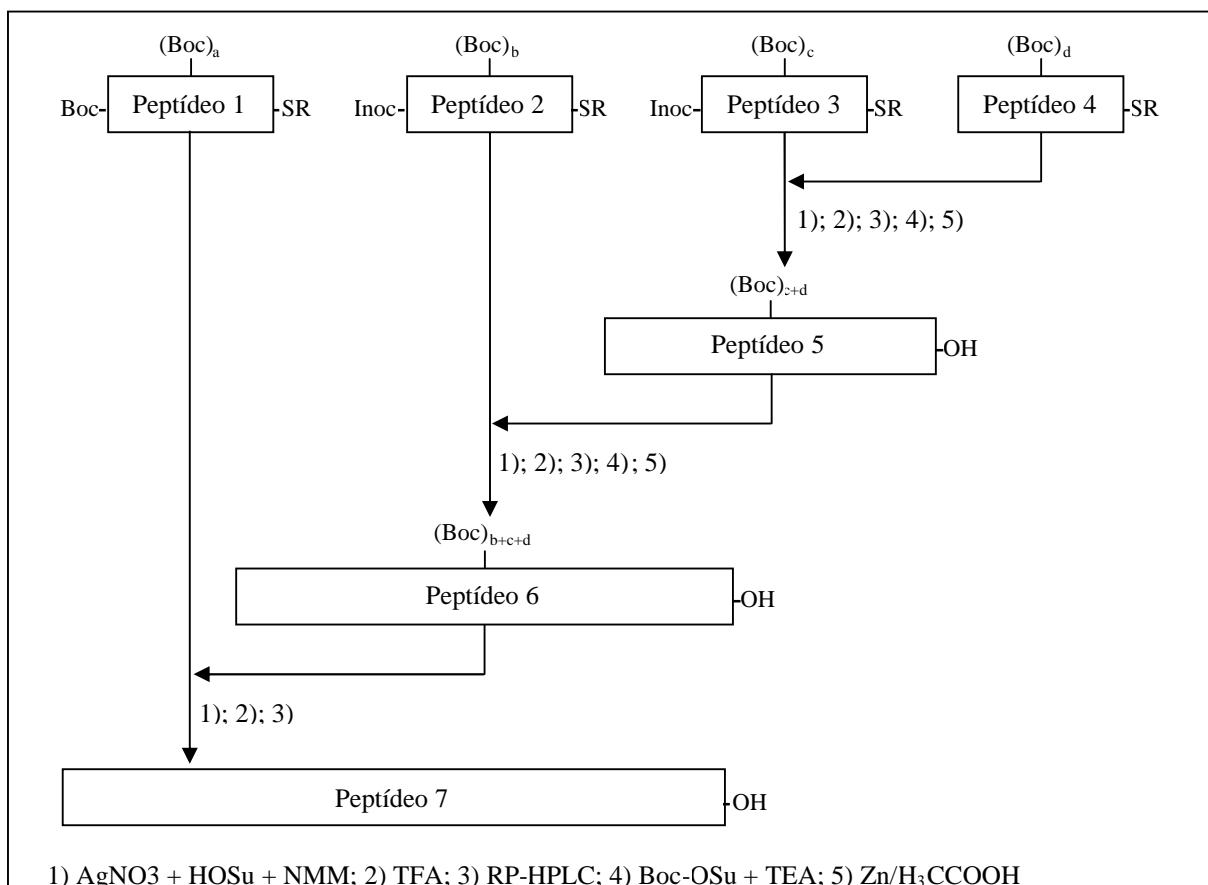
grupos aminos terminal e das cadeias laterais dos aminoácidos básicos (N^{α} -acil-peptídeo parcialmente protegido-SR).

Na presença de proteases, os tioésteres dos tipos peptídeo-SR e N^{α} -acil-peptídeo-SR apresentam altas velocidades de formação do complexo acil-enzima e baixas velocidades de hidrólise espontânea. Os ensaios enzimáticos envolvendo este tipo de composto podem ser facilmente monitorados espectrofotometricamente, pois o tiol liberado pode reagir com a 4,4'-ditiodipiridina formando um composto cromogênico (Powers e Kam, 1995). Assim, estes tioésteres têm sido usados como substratos na caracterização de diferentes proteases (McRae e col., 1981; Powers e col., 2000; Rukamp e col., 2004) e como reagentes em condensações enzimáticas catalisadas por elas (Mihara e col., 1995). Ésteres tiobenzílicos de peptídeos, por exemplo, são utilizados em condensações catalisadas por subtiligase (Welker e Scheraga, 1999) ou por α -quimotripsina, nesse último caso, como miméticos de substratos (Wehofsky e col., 2003). Mais recentemente, os peptídeo-SR e os N^{α} -acil-peptídeo-SR também passaram a ser empregados como substratos de peptídeo sintetasas não ribossomais envolvidas na geração de antibióticos peptídicos produzidos naturalmente por certas bactérias Gram-positivas (Tseng e col., 2002; Grunewald e col., 2004; Mahlert e col., 2005).

Não há dúvidas, entretanto, de que a maior aplicação dos peptídeos tioesterificados é na síntese de peptídeos e de proteínas através da condensação química de fragmentos em solução. Existem basicamente duas estratégias de síntese convergente utilizando tioésteres como blocos construtores: 1) ativação do grupo tioéster da carboxila terminal de um N^{α} -acil-peptídeo parcialmente protegido-SR com $AgNO_3$ e HOSu (Blake, 1981; Blake e col., 1986); 2) condensação entre um fragmento peptídeo-SR com outro totalmente desprotegido através da “native chemical ligation” (Dawson e col., 1994).

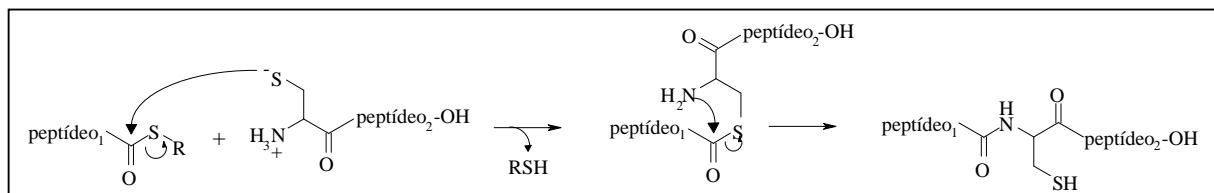
A primeira estratégia, utilizada em sínteses de domínios de proteínas e de glicoproteínas (Hojo e col., 2001; Kawakami e col., 2001; Haginoya e col., 2006; Hojo e

Nakahara, 2007), envolve a condensação entre fragmentos dos tipos N^α-acil-peptídeo parcialmente protegido-SR e peptídeo parcialmente protegido-OH na presença de HOSu, AgNO₃ e NMM. Somente a carboxila terminal tioesterificada do doador de acila é convertida ao correspondente éster succinimídico devido à presença do sal de prata na solução. Por isso, as eventuais cadeias laterais de aspartato e glutamato não necessitam de proteção. O grupo α-amino livre do acceptor de acila ataca a carboxila ativada formando a ligação peptídica. Portanto, a única proteção necessária nos fragmentos peptídicos é a de outros grupos aminos que possam reagir com a carboxila ativada. Essa proteção pode ser feita com o grupo Boc. O grupo isonicotiniloxicarbonil (iNoc; Veber e col., 1977) pode ser usado como protetor do extremo amino do doador de acila tioesterificado. O peptídeo assim formado tem seus grupos Boc removidos por TFA e o grupo iNoc por tratamento com Zn/CH₃COOH (Aimoto, 1999):



A “native chemical ligation”, por sua vez, não requer proteção alguma dos fragmentos

peptídicos a serem condensados, mas sim uma Cys como resíduo amino terminal do aceptor de acila. O grupo tiol da Cys N-terminal ataca a carboxila tioesterificada, formando um tioéster de Cys. Esse intermediário se rearranja espontaneamente, gerando a ligação peptídica entre os dois fragmentos, como mostrado no esquema abaixo (Lloyd-Williams e col., 1997):

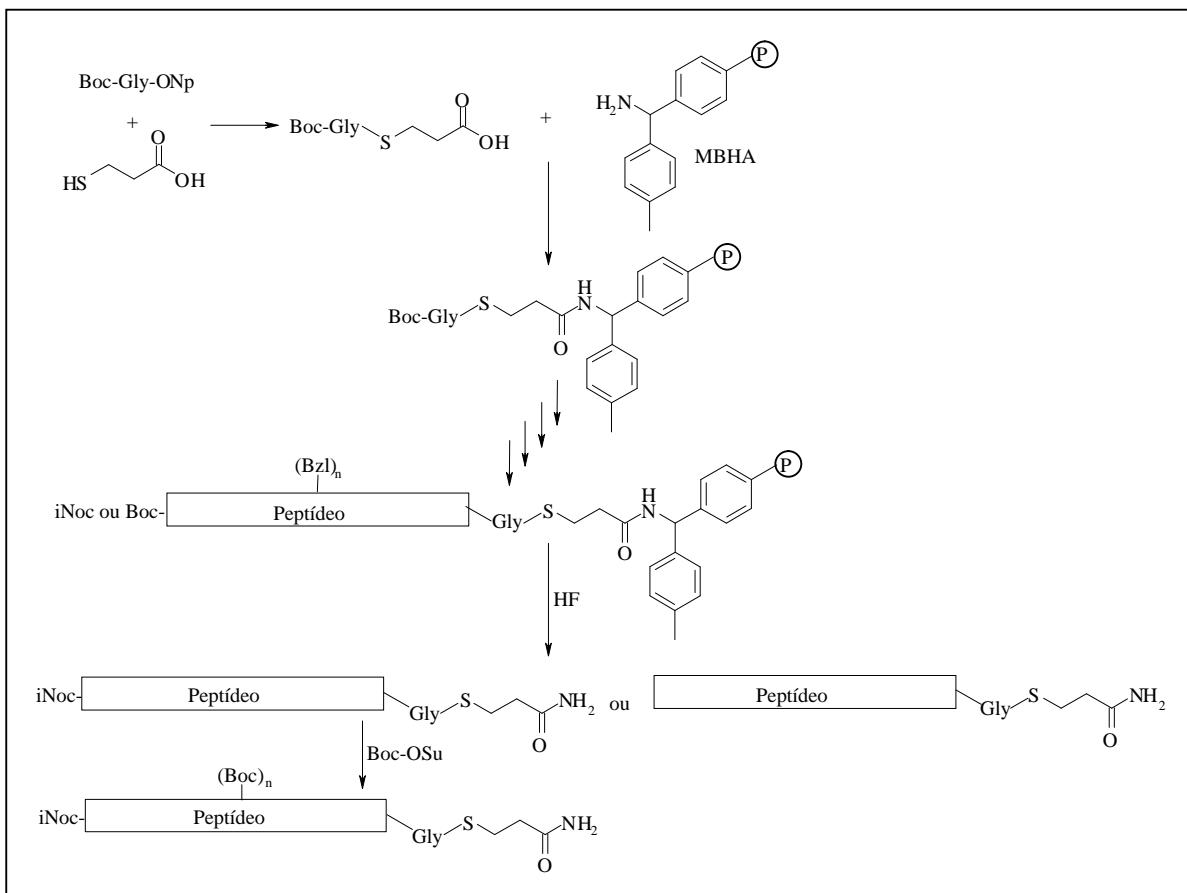


A “native chemical ligation” é considerada uma das metodologias mais práticas para a síntese total de proteínas nativas. Centenas de proteínas biologicamente ativas de famílias diversas já foram sintetizadas usando tal estratégia, permitindo que diversos estudos fossem realizados, tais como: elucidação de funções de genes, determinação de estruturas protéicas tridimensionais por RMN ou cristalografia de raios-X, entre outras descobertas (Dawson e Kent, 2000; Nilsson e col., 2005; Yang e Fitzgerald, 2006; Durek e col., 2007).

Para qualquer um dos métodos citados acima, os tioésteres podem ser sintetizados pelo método da fase sólida, empregando tanto a estratégia Boc quanto a Fmoc.

Pela estratégia Boc, a síntese de compostos dos tipos peptídeo-SR e N^{α} -acil-peptídeo parcialmente protegido-SR pode ser feita através da formação inicial do tioéster a partir da reação do ácido 3-mercaptopropiônico com Boc-Gly (Gly é o aminoácido usualmente empregado como resíduo C-terminal de um fragmento, devido à impossibilidade de racemização durante a condensação). O tioéster formado é então incorporado à resina *p*-metilbenzidrilamina-(MBHA) na presença de um reagente acoplador, seguindo-se a síntese normal da seqüência peptídica desejada. O último aminoácido é incorporado com o grupo α -amino protegido com Boc ou iNoc. Para a obtenção de peptídeo-SR, a Boc-peptidil-MBHA é submetida à reação com HF. Já para a geração de N^{α} -acil-peptídeo parcialmente protegido-SR, a iNoc-peptidil-MBHA após ser submetida ao tratamento com HF, é submetida à reação

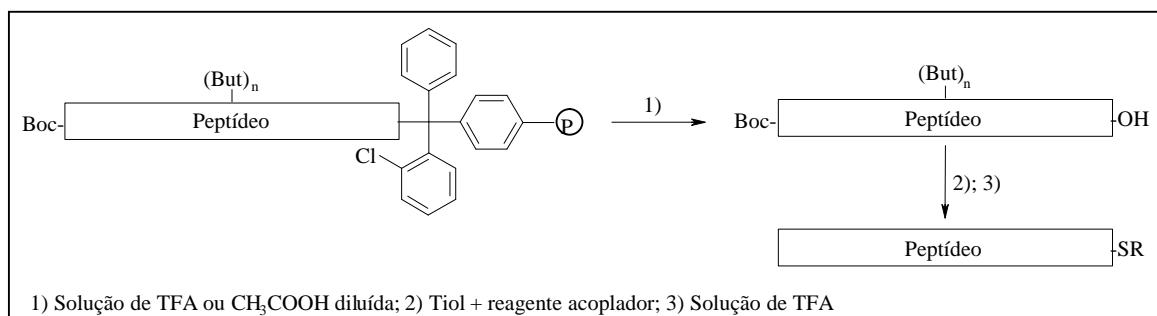
com Boc-OSu para proteger novamente os grupos aminos não envolvidos na condensação entre fragmentos (Lloyd-Williams e col., 1997):



De maneira similar, a síntese de tioésteres pela estratégia Boc pode ser feita partindo de resina PAM livre ou aminoacilada [Boc-Gly-S(CH₂)₂CO-Leu-OCH₂-PAM; Haginoya e col., 2006]. O já mencionado “linker” ácido 3-mercaptopropiônico, usado na obtenção de ésteres do tipo N^α-acil-peptídeo-OR, também pode ser empregado na obtenção de N^α-acil-peptídeo-SEt, devido à suscetibilidade da ligação tioéster formada entre este “linker” e o peptídeo ao ataque de nucleófilos e à estabilidade de tal ligação ao tratamento com HF. A geração do tioéster em questão é feita através do tratamento da N^α-acil-peptidil-resina (remanescente de reação com HF) com uma solução de EtSH em 25% tampão fosfato/DMF (V/V) (Camarero e col., 2000).

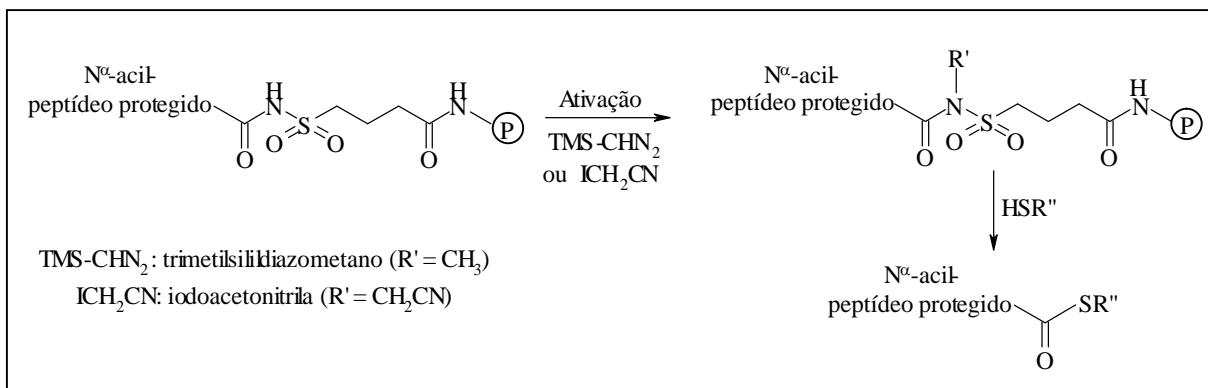
Com relação à estratégia Fmoc, as tentativas iniciais para contornar o problema de

labilidade das ligações tioésteres em meios básicos envolveram a substituição da solução usual de clivagem do grupo Fmoc (20% piperidina em DMF) por outras mais compatíveis com estas ligações, como a solução 1-metilpirrolidina (25%), hexametilenoimina (2%) e HOBr (2%) em NMP/DMSO (1:1, v:v; Li e col., 1998). Outro procedimento usado envolve o uso da resina 2-clorotritil e tioesterificação em solução. Neste caso, o N^{α} -acil-peptídeo protegido-OH obtido a partir da peptidil-resina correspondente reage com o tiol apropriado na presença de um reagente acoplador e DIPEA, gerando o N^{α} -acil-peptídeo protegido-SR, que, por sua vez, é totalmente desprotegido através do tratamento com TFA (von Eggelkrau-Gottanka e col., 2003):



Em uma variante desse procedimento, utilizando-se protetores de grupos aminos adequados, o tioéster final pode ser gerado como N^{α} -acil-peptídeo parcialmente protegido-SR (Futaki e col., 1997; Kitagawa e col., 2004).

A síntese de tioésteres pela estratégia Fmoc empregando exclusivamente a SPFS tem sido feita atualmente com resinas funcionalizadas com “linkers” totalmente estáveis a ácidos e bases (“safety-catch linker”), como os alquenosulfonamidas que formam com a cadeia peptídica uma ligação que quando “ativada”, torna-se suscetível ao ataque nucleofílico do tiol de interesse (Ingenito e col., 1999; Quaderer e Hilvert, 2001; Harris e col., 2007). Este é o exemplo da resina 4-sulfamilbutiril aminometil:



Analogamente ao procedimento de obtenção de N^α-acil-peptídeo protegido-OR usando a resina 4-Fmoc-hidrazinobenzoil (descrito no item 1.4), pode-se também obter N^α-acil-peptídeo protegido-SR com essa resina, empregando não um tiol como nucleófilo, e sim um aminoácido tioesterificado, já que a peptidil-resina na forma do intermediário oxidado (acil diazeno) reage eficientemente com N- e O-nucleófilos, mas não com S-nucleófilos (Peters e Waldmann, 2003; Camarero e col., 2004; Camarero e Mitchell, 2005).

1.6. Importância e métodos de preparação de aminoácidos esterificados

Assim como os ésteres de peptídeos, os N^α-acil-aminoácido-OR são usados como doadores de acila em sínteses enzimáticas cineticamente controladas catalisadas por proteases e lipases. Esses ésteres também podem ser metílicos ou etílicos (West e Wong, 1986 e 1987; Kawashiro e col., 1993; So e col., 1998; Liria e Miranda, 2001; Huang e col., 2006), benzílicos (Wang e col., 1997; Fite e col., 1998), trifluoretílicos (Miyazawa e col., 2001), carbamoilmetílicos (Miyazawa e col., 2002; Salam e col., 2005 e 2006) ou glicerílicos (Mitin e col., 1997).

N^α-acil-aminoácido-OR também podem atuar como substratos miméticos (Itoh e col., 1996; Bordusa e col., 1997; Thormann e col., 1999), como o Bz-Gly-OGp que é reconhecido por tripsina devido à presença do grupo guanidino (Wehofsky e col., 2000). Eles são amplamente empregados na caracterização de enzimas com atividade esterásica (Bienvenue e col., 2002), como inibidores específicos de enzimas [o éster metílico de nitro-arginina é

inibidor da enzima óxido nítrico sintase (Davani e col., 2007)] e como intermediários em síntese química, como na obtenção de N-[3-(2-furyl)-acryloyl-L-methionine] (FA-Met), um substrato cromogênico de acilase de porco (Brunel e col., 2005).

Outro importante uso para os aminoácidos esterificados tem sido a busca de enzimas e condições reacionais adequadas para a resolução de misturas racêmicas de ésteres de aminoácidos sintetizados quimicamente. A resolução enzimática via hidrólise enantioseletiva é um dos métodos mais simples e eficientes de produzir aminoácidos enantiomericamente enriquecidos (Malhotra e Zhao, 2005). Com esse fim, ésteres metílicos, etílicos, carbamoilmetílicos, trifluoretílicos, *i*-butílicos, *n*-butílicos e benzílicos têm sido utilizados em combinação com diferentes proteases e lipases (Miyazawa e col., 2000, 2005 e 2006; Houng e col., 2002; Malhotra e Zhao, 2005).

Assim como para os peptídeos esterificados, os aminoácido-OR têm se mostrado uma valiosa alternativa terapêutica como pró-drogas de agentes anti-tumorais, como a floxuridina (Landowski e col., 2005) e a gencitabina (Toschi e col., 2005) e de compostos anti-virais, como a estavudina (anti-HIV, Sriram e col., 2004), o penciclovir e o aciclovir (dois anti-vírus da herpes humana, Kim e col., 1999; Anand e col., 2004). De fato, o uso destes compostos com este objetivo apresenta diversas vantagens, tais como: *i*) os aminoácidos são comercialmente disponíveis; *ii*) ésteres de aminoácidos como pró-drogas são mais seguros do que os alquílicos, por exemplo; *iii*) a química de aminoácidos é bastante conhecida; *iv*) pró-drogas deste tipo podem ser direcionadas para proteínas transmembranares transportadoras de pequenos peptídeos (Rubio-Aliaga e Daniel, 2002), aumentando a eficiência de seu transporte através das membranas celulares dos tecidos alvos (Vig e col., 2003).

Os métodos de síntese destes compostos também podem ser divididos em enzimático e químico. No primeiro, a síntese é promovida sem qualquer proteção das cadeias laterais reativas dos aminoácidos, podendo ser gerados N^α-acil- ou aminoácido-OR. A catálise é feita

por enzimas que possuam atividade esterásica (proteases e lipases), podendo ser através da inversão da reação de hidrólise de éster (termodinamicamente controlada) ou por transesterificação (cineticamente controlada). As seguintes proteases têm sido empregadas: α -quimotripsina (Lozano e col., 2001; Deschrevel e col., 2003), tripsina (Simon e col., 2000; Yesiloglu e Kilic, 2004), papaína (Mitin e col., 1997) e subtilisina (Boyer e col., 2001; Liu e Tam, 2001). Dentre as lipases, pode-se citar a de *Candida antarctica* B [Cal B; empregada na transesterificação de éster metílico de piroglutamato com 1-dodecanol, gerando um éster importante da indústria de cosméticos (Villeneuve e col., 2004)] e a PPL [usada como catalisador na esterificação de N^α-acil-aminoácidos com álcoois secundários (Shih e col., 1997) e na obtenção de aminoácidos esterificados com carboidratos (Vijayakumar e col., 2004; Lohith e Divakar, 2005; Somashekar e Divakar, 2007)].

Os métodos químicos de esterificação de aminoácidos são mais numerosos e, além de agentes acopladores específicos para ativar a carboxila a ser esterificada, freqüentemente fazem uso de ácidos, bases ou aquecimento (Otera, 2003). Além disso, estes métodos necessitam de proteção tanto no grupo amino terminal (para evitar a formação de ligação peptídica entre as moléculas de aminoácido), quanto na eventual cadeia lateral reativa (para evitar que indesejáveis ligações éster, tioéster ou amida ocorram). O método químico clássico é a chamada esterificação de Fischer e consiste na reação do aminoácido devidamente protegido com excesso do álcool de interesse na presença de um ácido, usualmente HCl (Bruice, 2004).

As carbodiimidas estão entre os reagentes mais utilizados na síntese química de ésteres de aminoácidos (Hassner e Alexanian, 1978; Heimbrook e col., 1989; Benoiton e col., 1993). Dentre elas, o DCC, em combinação com a base DMAP, é o reagente acoplador de escolha para a obtenção dos aminoácidos esterificados com agentes anti-tumorais e anti-virais, as pró-drogas (Kim e col., 1999; Vig e col., 2003; Landowski e col., 2005; Shin e col., 2006); a

esterificação com DCC, entretanto, gera um subproduto insolúvel no meio reacional, a dicicloexiluréia (DCU). Alternativamente, pode-se fazer uso da bis[[4-(2,2-dimetil-1,3-dioxolil)]metil]carbodiimida (BDDC), que proporciona a geração de um derivado de uréia mais solúvel do que o DCU, dispensa o uso de base, mas necessita de quantidade catalítica de CuCl ou aquecimento a 70°C (Gibson e col., 1994).

Um método que emprega condições reacionais mais brandas para a esterificação de aminoácidos utiliza a 2-etoxi-1-(etoxicarbonil)-1,2-diidroquinolina (EEDQ), um reagente acoplador que dispensa o uso de ácidos ou bases. A reação da EEDQ com a carboxila de um aminoácido N^a-protegido gera um anidrido misto de aminoácido e de H₃CCOOH que, em presença de excesso do álcool apropriado, forma o éster desejado (Zacharie e col., 1995). O álcool de interesse deve estar em excesso, pois durante a formação do anidrido misto também é gerado o EtOH, que pode reagir com o anidrido resultando no éster etílico do aminoácido como subproduto. Para contornar esse problema, pode-se usar um reagente semelhante à EEDQ, a 1-*t*-butoxi-2-*t*-butoxicarbonil-1,2-diidroisoquinolina (BBDI), que leva à geração do álcool *t*-butílico que, por impedimento estérico, não ataca o anidrido misto formado (Saito e col., 2005).

Outro método químico que emprega condições brandas para a esterificação de aminoácidos faz uso da combinação cloreto de tosila (TsCl) e *N*-metilimidazol: inicialmente, ocorre a formação do anidrido misto entre a carboxila do aminoácido e o TsCl, com geração simultânea do cloridrato de *N*-metilimidazol; a seguir, o anidrido é transformado num sal de acil amônio pela presença do *N*-metilimidazol; este sal é um intermediário bastante reativo e se condensa com o álcool apropriado, formando o éster desejado (Wakasugi e col., 2003).

2. OBJETIVOS

O objetivo inicial desta Tese foi aprofundar o estudo do procedimento alternativo de mediação por Ca^{+2} da alcoólise da ligação éster formada entre peptídeos e resinas gerados pela SPFS. Este procedimento proposto pelo nosso grupo de pesquisa (Miranda e col., 1991b; Moraes e col., 2000) permite a preparação de ésteres de peptídeos totalmente protegidos (N^{α} -acil-peptídeo protegido-OR) sob condições reacionais mais brandas do que as usadas convencionalmente. Tais compostos apresentam versatilidade funcional e, portanto, alto valor agregado. Neste contexto, buscou-se:

1) verificar se outros íons metálicos – Zn^{+2} , Co^{+2} e Cu^{+2} – também poderiam ser usados como mediadores da alcoólise em estudo; **2)** encontrar condições ótimas para a metanolise da ligação éster de oxima de peptidil-KOR mediada por metal, que permitissem a obtenção dos ésteres metílicos correspondentes com eficiência comparável ou superior às conferidas pelos procedimentos convencionais; **3)** tentar empregar o procedimento alternativo de mediação por metal para metanolises de ligações ésteres formadas entre peptídeo e outras resinas (HMBA, Wang e PAM); **4)** usar o procedimento mais adequado para obter ésteres metílicos dos fragmentos acetilados do hormônio CCK-33 e da porção N-terminal do peptídeo antimicrobiano VesCP-M; **5)** tentar investigar o mecanismo de mediação por metal da metanolise da ligação éster de oxima de peptidil-KOR por espectroscopia Raman;

Em função dos dados promissores obtidos, passamos a:

6) verificar a possibilidade de mediação por Ca^{+2} da tiólise da ligação éster de oxima de peptidil-KOR para a obtenção de N^{α} -acil-peptídeo protegido-SR; **7)** tentar utilizar a mediação por Ca^{+2} da alcoólise da ligação éster de oxima de Z-Ala-KOR para gerar Z-Ala-OR; **8)** após desproteção das cadeias laterais, usar os N^{α} -acil-peptídeo-OMe obtidos como doadores de acila em tentativas de acoplamento a derivado de aminoácido ou peptídeo usando preparações enzimáticas comerciais como catalisadores.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais utilizados

Todas as resinas utilizadas nas sínteses em fase sólida tinham como base o copolímero de poliestireno-divinilbenzeno com 1% de ligações cruzadas (Marquardt e Eifler-Lima, 2001) e porosidade de 200 a 400 mesh. Foram usadas a resina de Kaiser produzida no nosso laboratório a partir do polímero Bio-Beads® SX-1 da Bio-Rad (EUA) segundo o método descrito por DeGrado e Kaiser (DeGrado e Kaiser, 1980), a resina HMBA da Novabiochem Corp. (EUA) e as seguintes resinas adquiridas da Bachem Inc. (EUA): PAM aminoacilada com Boc-Asp(OcHx), Wang aminoacilada com Fmoc-Asp(Obut), Rink amida e SAMBHA.

Os derivados de aminoácidos empregados nas sínteses – Boc-Asp(OcHx)-OH, Boc-Asp(Obzl)-OH, Boc-Ile-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Lys(2ClZ)-OH, Boc-Pro-OH, Boc-Leu-OH, Boc-Phe-OH, Boc-Gly-OH, Fmoc-Asp(Obut)-OH, Fmoc-Ser(But)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ser(But)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH – eram da Bachem Inc. (EUA) e Z-Ala-OH da Sigma Chemical Co. (EUA).

Os reagentes acopladores utilizados foram: DIC (Sigma Chemical Co., EUA), DCC (Aldrich Chemical Co., EUA), HOBT (Protein Research Foundation, Japão), TBTU (Advanced ChemTech, EUA), HBTU (Sigma Chemical Co., EUA) e BOP (Novabiochem Corp., EUA).

Outros reagentes requeridos foram: anisol, TIS, TEA, DIPEA, DMAP, DBU, piperidina, HF, TFA, HNO_3 , ácido pícrico, anidrido acético, benzilmercaptana, *n*-butanotiol e etil-3-mercaptopropionato. Todos eles eram de grau analítico ou de síntese, provenientes da Merck KGaA (Alemanha), Sigma Chemical Co. (EUA), Fluka Chemie GmbH (Alemanha), Aldrich Chemical (EUA), Novabiochem (Suíça), Applied Biosystems (EUA), Quírios Produtos Químicos Ltda (Brasil) ou EM Science (EUA) e foram empregados sem purificação

prévia.

Os solventes empregados foram: *n*-hexano, DCM, MeOH (graus analítico e super seco), NMP, DMF, éter diisopropílico, acetato de etila, isopropanol, EtOH, TFE, DMSO e THF, procedentes da Merck KGaA (Alemanha), Sigma Chemical Co. (EUA), Fluka Chemie GmbH (Alemanha), EM Science (EUA), Applied Biosystem (EUA) ou Synth (Brasil). Com exceção do THF, que era de grau espectroscópico, os outros solventes eram de grau analítico ou de síntese e foram empregados sem qualquer tratamento prévio.

Para o monitoramento das sínteses de peptidil-resinas através do teste de Kaiser (Kaiser e col., 1970), foram empregadas as soluções 76% fenol/EtOH (V/V), 0,20 mM de KCN em piridina e 0,28 M de ninidrina em EtOH, todas de grau de síntese e provenientes da Applied Biosystem (EUA).

Os sais Ca(CH₃COO)₂ (94%), ZnCl₂ (99,9%), CoCl₂ (99,9%), CuCl₂·2H₂O e Cu(NO₃)₂·3H₂O, eram da Aldrich Chemical Co. (EUA), sendo que os dois sais de cobre foram doados pela Prof^a Dra. Ana Maria da Costa Ferreira do Departamento de Química Fundamental do IQ-USP.

Na preparação das soluções para as análises e purificações por RP-HPLC foram utilizados ACN da EM Science (EUA) e da Vetec (Brasil) e TFA da Merck KGaA (Alemanha), todos de graus espectroscópicos.

Para as hidrólises ácidas de aminoacil- e peptidil-resinas foram usados HCl fumegante 37% da Merck KGaA (Alemanha) e ácido propiônico 99% da Aldrich Chemical Co. (EUA). Para as hidrólises ácidas dos peptídeos foram usados HCl 6 N e fenol, ambos da Sigma Chemical Co. (EUA).

Nas determinações iniciais de atividades enzimáticas, foram usadas as preparações lipásicas: cPPL [Sigma Chemical Co. (EUA)], pPPL e PPL-DF [ICN Biomedicals Inc. (EUA)], o kit-diagnóstico “Lipase Titrimetric Determination”, os substratos *p*-nitroanilida de

Bz-DL-tirosina e cloridrato de *p*-nitroanilida de Bz-DL-arginina obtidos da Nakarai Chemicals Ltda. (Japão) e o peptídeo Z-Gly-Phe-OH, ambos da Sigma Chemical Co. (EUA). Além da cPPL, as preparações CCL e tripsina bovina tratada com TPCK usadas nas sínteses foram obtidas da Sigma Chemical Co. (EUA). Cal A (Novozyme 735, preparação líquida) e Cal B (Novozyme 435, imobilizada em resina acrílica) foram respectivamente doadas pelos Professores Dr. Leandro H. de Andrade e Dr. João V. Comasseto do Departamento de Química Fundamental do IQ-USP. A Gly-NH₂·HCl usada era proveniente da Sigma Chemical Co. (EUA).

Os líquidos iônicos usados foram: [BMIM][PF₆] da Aldrich Chemical Co. (EUA) e [BMIM][BF₄] sintetizado e doado pelo Prof. Dr. Roberto de Torresi do Departamento de Química Fundamental do IQ-USP.

O tampão Tris e os sais KH₂PO₄ e Na₂HPO₄·12H₂O usados na preparação de tampão fosfato foram adquiridos da Merck KGaA (Alemanha).

Os experimentos de RMN de ¹H foram realizados com CD₃OD (99,8% de átomos D) adquirido da Sigma Chemical Co. (EUA).

3.2. Métodos preparativos

3.2.1. Síntese manual de aminoacil- e peptidil-resinas pela SPFS convencional

Aminoacil-resinas: Z-Ala-KOR, Leu-KOR e Asp(OcHx)-KOR;

Peptidil-resinas: Fmoc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR, Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR, Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-KOR, Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(2ClZ)-KOR, Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(Obut)-HMBA, Boc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-PAM, Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(Obut)-Wang, Leu-Leu-Ser(But)-Gly-Leu-Leu-Rink amida, Ac-Ile-Ser(But)-Asp(Obut)-Gly-SAMBHA, Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(Boc)-Gly-SAMBHA, Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(Boc)-Leu-Leu-Ser(But)-Gly-Leu-Leu-SAMBHA.

Todas as sínteses foram realizadas em frascos providos de placa de vidro sinterizado e iniciaram com lavagens do material sólido com DCM e MeOH (com exceção da HMBA). Todas as etapas foram monitoradas pelo teste de ninidrina. Resumidamente, grãos das resinas livres, aminoacil e peptidil-resinas foram incubados por 3 min com as soluções 76% fenol/EtOH (V/V), 0,20 mM de KCN em piridina e 0,28 M de ninidrina em EtOH a 110°C e a cor resultante foi observada, indicando se havia ou não necessidade da etapa em questão ser repetida. As peptidil-resinas resultantes foram secas sob pressão reduzida, pesadas e tiveram seus valores de GS_{inicial} determinados através de análise de aminoácidos (item 3.3.1.b).

O teste de ninidrina revela a presença de grupos amino livres no material testado: todos os aminoácidos que possuem como grupo α -amino uma amina primária (19 dos 20 usuais), ao serem aquecidos em presença de excesso de ninidrina, formam um produto de cor púrpura; como a prolina possui uma amina secundária como grupo α -amino ela forma com a ninidrina um produto amarelo (Kaiser, 1970).

a) KOR

Aminoacilação – Com base no grau de funcionalização (GF) da KOR (0,87 mmol/g), foram adicionados 2 eq. de N^α-acil-aminoácido protegido-OH dissolvidos em DCM e 2 eq. de DCC. Após 24 h de reação sob agitação, a solução reacional foi drenada e a N^α-acil-aminoácido protegido-KOR foi lavada com DCM, DCM/EtOH (2/1, V/V) e EtOH (Nakagawa e Kaiser, 1983). Posteriormente, ela foi tratada com solução 25% TFA/DCM (V/V) por 30 min para remover o grupo protetor Boc ou somente para solubilizar e eliminar o DCU formado (Albericio e Carpino, 1997). Após drenagem da solução reacional, a aminoacil-KOR foi lavada alternadamente com DCM e isopropanol (Nakagawa e Kaiser, 1983). O GA foi determinado por análise de aminoácidos ou método do ácido pícrico (item 3.3.1).

Alongamento da cadeia peptídica – Os acoplamentos dos aminoácidos seguintes foram realizados empregando 2,5 eq. de Boc-aminoácido protegido-OH, 2,5 eq. de TBTU e

DIPEA suficiente para manter o pH aparente entre 8 e 9. A seguinte rotina foi adotada: **1)** formação da ligação peptídica usando TBTU/DIPEA em DMF por 1 h com agitação; **2)** lavagens alternadas com DMF e isopropanol; **3)** lavagens alternadas com DCM e isopropanol; **4)** remoção do grupo Boc com solução 25% TFA/DCM (V/V) por 30 min com agitação; **5)** lavagens alternadas com DCM e isopropanol. Ao término da síntese, ainda foram realizadas as etapas: **6)** acetilação com solução 50% anidrido acético/DCM (V/V) por 10 min; **7)** lavagens rápidas e alternadas com DCM e solução 10% TEA/DCM (V/V); **8)** lavagens alternadas com DCM e isopropanol (adaptado de Varanda e Miranda, 1997 e de Nakagawa e Kaiser, 1983).

Na síntese de Fmoc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR, após o acoplamento do resíduo de Ile, as etapas 4-8 não foram realizadas.

b) HMBA

Aminoacilação – A resina foi inicialmente deixada em repouso com DMF por 30 min. Após a drenagem do solvente, com base no grau de funcionalização da HMBA (0,80 mmol/g), foram adicionados 3 eq. de Fmoc-Asp(Obut)-OH, 2,5 eq. de HBTU, 0,1 eq. de DMAP e 3 eq. de DIPEA. A aminoacilação foi realizada em DMF sob agitação por 24 h (Hudson e col., 2002). Ao final deste tempo, a solução reacional foi drenada e a Fmoc-Asp(Obut)-HMBA foi então lavada alternadamente com DCM e MeOH. O GA foi determinado por análise de aminoácidos (item **3.3.1.b**).

Alongamento da cadeia peptídica – A incorporação dos outros aminoácidos foi feita usando 2,5 eq. de Fmoc-aminoácido protegido-OH, 2,5 eq. de TBTU e DIPEA suficiente para manter o pH aparente entre 8 e 9. O seguinte procedimento foi seguido: **1)** remoção do grupo Fmoc com solução 20% piperidina/DMF (V/V) por 20 min sob agitação; **2)** lavagens alternadas com DMF e MeOH; **3)** formação da ligação peptídica usando TBTU/DIPEA em DMF por 1 h com agitação; **4)** lavagens alternadas com DMF e MeOH (Varanda e Miranda,

1997).

c) PAM (Varanda e Miranda, 1997)

Partindo de Boc-Asp(OcHx)-PAM (GA = 0,70 mmol/g), o alongamento da cadeia peptídica foi feito com 2,5 eq. de Boc-aminoácido protegido-OH, 2,5 eq. de TBTU e DIPEA suficiente para manter o pH aparente entre 8 e 9. A seguinte rotina foi adotada: **1**) lavagens iniciais alternadas com DCM e MeOH; **2**) remoção do grupo Boc com solução 40% TFA/DCM (V/V) por 20 min com agitação; **3**) lavagens alternadas com DCM e MeOH; **4**) formação da ligação peptídica usando TBTU/DIPEA em DMF por 1 h com agitação; **5**) lavagens alternadas com DMF e MeOH; **6**) lavagens alternadas com DCM e MeOH.

d) Wang

Partindo de Fmoc-Asp(Obut)-Wang (GA = 0,32 mmol/g), o alongamento do peptídeo foi feito com 2,5 eq. de Fmoc-aminoácido protegido-OH, 2,5 eq. de HOBr e 2,5 eq. de DIC dissolvido em DCM. O seguinte protocolo foi seguido: **1**) remoção do Fmoc com solução 20% piperidina/DMF (V/V) por 20 min com agitação; **2**) lavagens alternadas com DMF e MeOH; **3**) formação da ligação peptídica usando DIC/HOBt em DMF por 1 h sob agitação; **4**) lavagens alternadas com DMF e MeOH; **5**) lavagens alternadas com DCM e MeOH (Varanda e Miranda, 1997).

e) Rink amida e SAMBHA (Miranda e col., 1993; Varanda e Miranda, 1997)

Para as sínteses destas peptidil-resinas, dois sistemas de acopladores foram alternativamente usados: **1**) 2,5 eq. de Fmoc-aminoácido protegido-OH, 2,5 eq. de HOBr e 2,5 eq. de DIC dissolvido em DCM; **2**) 2,5 eq. de Fmoc-aminoácido protegido-OH, 2,5 eq. de TBTU ou BOP, 1 eq. de HOBr e 7,5 eq. de DIPEA. Tanto a etapa de aminoacilação quanto a de acoplamento foram realizadas segundo o mesmo protocolo descrito para a síntese da Fmoc-peptidil-Wang (item 3.2.1.d), com exceção das etapas de remoção inicial do Fmoc desnecessária para a resina SAMBHA, de remoção final de Fmoc do último resíduo para

todas as peptidil-resinas e de acetilação nas peptidil-SAMBHAs, sendo este último passo realizado segundo o protocolo descrito nas etapas 6-8 do item **3.2.1.a**, com substituição do isopropanol por MeOH.

3.2.2. Método geral de solvólise da ligação aminoacil- ou peptidil-resina

Para todas as solvólises realizadas, foram promovidas incubações da peptidil-resina em solução contendo o nucleófilo de interesse (MeOH ou tiol) e outro solvente orgânico na presença de aditivo (base ou sal). Também foram promovidas incubações-controle (sem catalisador ou mediador). Todas elas ocorreram sob agitação orbital de 300 rpm e foram monitoradas por RP-HPLC (item **3.3.2**). Alíquotas referentes aos seus terminos foram também analisadas por LC/ESI-MS (item **3.3.2**).

a) Metanólise catalisada por base

Foi empregado o método geral descrito acima, usando as condições descritas abaixo:

Condição	Natureza e quantidade de base	Quantidade de peptidil-resina	Volume e composição do sistema de solvente	T (°C)
1 ^a	9,1 µL de DBU (3,5 eq.)	17,5 µmol	1,25 mL de MeOH	25
2 ^b	9,1 µL de DBU (3,5 eq.)	17,5 µmol	1,25 mL de 20% MeOH/DCM (V/V)	25
3 ^c	0,10 mL de DIPEA	22 mg	1,0 mL de 50% MeOH/DMF (V/V)	25 ou 50
4 ^d	0,26 mL de TEA	22 mg	1,10 mL de 50% MeOH/DMF (V/V)	25 ou 50

Referências: ^a Pichette e col., 1997; ^b adaptado de Pichette e col., 1997; ^c Mellor e col., 2000; ^d Stewart e Young, 1984.

b) Alcoólise assistida por íons metálicos

Foi empregado o método geral descrito acima. Estas incubações foram realizadas com 17,5 µmol de peptidil-resina (baseado no valor de GS) em 1,25 mL de solução reacional, segundo as condições descritas a seguir:

Condição	Natureza e quantidade de sal	Sistema de solvente (V/V)	T (°C)
5	35,0 µmol de Ca(CH ₃ COO) ₂	20% MeOH/solv. org. ^a	37, 50 ou 60
6	35,0 µmol de Ca(CH ₃ COO) ₂	50% MeOH/DMF	50
7	35,0 µmol de Ca(CH ₃ COO) ₂	50% álcool benzílico/DMF	50
8	17,5 µmol de Ca(CH ₃ COO) ₂	50% MeOH/DMF	50
9	35,0 µmol de ZnCl ₂	20% MeOH/solv. org. ^b	37 ou 50
10	35,0 µmol de ZnCl ₂	50% MeOH/DMF	25 ou 50
11	35,0 µmol de CoCl ₂	20% MeOH/solv. org. ^c	37 ou 50
12	35,0 µmol de CoCl ₂	50% MeOH/DMF	50
13	35,0 µmol de CuCl ₂ ·2H ₂ O	20% MeOH/DCM	37
14	35,0 µmol de Cu(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O	20% MeOH/solv. org. ^c	37 ou 50
15	35,0 µmol de Cu(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O	50% MeOH/DMF	50

^a solv. org.: DCM, DMSO, NMP, THF, DMF ou 50% DMF/TFE (V/V); ^b solv. org.: DCM, DMSO, DMF, NMP ou THF; ^c solv. org.: DCM, DMF ou THF

c) Tiólise mediada por íon metálico

Foi empregado o método geral descrito acima. Estas incubações foram realizadas com 17,5 µmol de peptidil-resina (baseado no valor de GS) em 1,25 mL de solução reacional, segundo as condições descritas abaixo:

Condição	Natureza e quantidade de sal	Sistema de solvente (V/V)	T (°C)
16	35,0 µmol de Ca(CH ₃ COO) ₂	20% benzilmercaptana/DMF	60
17	35,0 µmol de ZnCl ₂	20% benzilmercaptana/DMF	60
18	17,5 µmol de Ca(CH ₃ COO) ₂	20% <i>n</i> -butanotiol/DMF	60
19	17,5 µmol de Ca(CH ₃ COO) ₂	20% etil-3-mercaptopropionato/DMF	60
20	17,5 µmol de Ca(CH ₃ COO) ₂	50% etil-3-mercaptopropionato/DMF	50

3.2.3. Obtenção em maior escala de Z-Ala-OR, N^α-acil-peptídeo protegido-OR e N^α-acil-peptídeo protegido-SR a partir de solvólise da ligação éster de oxima mediada por Ca⁺²

Foram empregadas as condições reacionais ótimas pré-determinadas. Os aumentos de escala foram feitos obedecendo à proporção entre número de equivalentes de aminoacil- ou peptidil-resina, volume de solução reacional e número de equivalentes de Ca(CH₃COO)₂ descrita no item 3.2.2.

As reações de alcoólise de Z-Ala-KOR mediadas por Ca⁺² foram promovidas nas condições 6 e 7 (item 3.2.2) por 4 ou 6 h. Os compostos Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe e Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(2ClZ)-OMe foram obtidos através de metanólises das

peptidil-KORs correspondentes conduzidas nas condições 6 e 8 (item 3.2.2) por 2 ou 4 h. Já a obtenção de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-S(CH₂)₂COOEt se deu via tiólise da peptidil-KOR correspondente realizada sob as condições 19 e 20 (item 3.2.2) por 2 h.

Ao fim das reações de solvólise, as suspensões foram filtradas e as resinas remanescentes lavadas alternadamente com DCM e MeOH. Os filtrados dos produtos Z-Ala-OBzl e Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-S(CH₂)₂COOEt foram reservados para purificação por: RP-HPLC (item 3.2.6), no caso de Z-Ala-OBzl; por cartucho “Sep-Pak”, no caso do tioéster (procedimento descrito a seguir). Os filtrados de Z-Ala-OMe, Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe e Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(2ClZ)-OMe foram submetidos à evaporação rotatória para eliminação total dos solventes. O resíduo proveniente de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe foi dissolvido em 90% ACN/H₂O (V/V) contendo 0,09% de TFA, liofilizado e submetido à posterior purificação por RP-HPLC (item 3.2.6).

Os resíduos correspondentes a Z-Ala-OMe e Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(2ClZ)-OMe foram submetidos à extração com acetato de etila na tentativa de eliminar o Ca(CH₃COO)₂ usado nas metanolases. As fases orgânicas foram lavadas duas vezes com solução 5% HCl/H₂O (V/V) e uma vez com H₂O. O solvente foi eliminado das frações orgânicas e os resíduos foram dissolvidos em solução ACN/H₂O (V/V) contendo 0,09% de TFA contendo ACN em porcentagem apropriada. Análises por RP-HPLC (item 3.3.2) foram feitas com essas soluções antes de serem submetidas à liofilização. As frações aquosas também foram liofilizadas, dissolvidas em água pura e analisadas por RP-HPLC (adaptado de Saito e col., 2005).

Com respeito ao composto Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-S(CH₂)₂COOEt, outro procedimento foi seguido no intuito de eliminar o Ca(CH₃COO)₂ e o próprio tiol usado na solvólise. Resumidamente, cerca de 500 µL do filtrado obtido anteriormente foi “carregado” em uma seringa de 5 mL conectada a um cartucho Sep-Pak Plus C₁₈ da Waters (Waters

Technologies do Brasil Ltda.). Em seguida, foram feitas lavagens do cartucho com 5 mL de solução 0,1% TFA/H₂O (V/V), 5 mL de 10% ACN/H₂O (V/V) contendo 0,09% de TFA, 5 mL de 40% ACN/H₂O (V/V) contendo 0,09% de TFA, 5 mL com 80% ACN/H₂O (V/V) contendo 0,09% de TFA, 10 mL de MeOH e 10 mL de solução 50% ACN/H₂O (V/V). Todas as soluções de eluição foram coletadas e analisadas por RP-HPLC (item 3.3.2) para detecção do tioéster desejado. Aquela que continha o produto de interesse também foi analisada por LC/ESI-MS (item 3.3.2) e liofilizada.

3.2.4. Remoção das proteções de cadeias laterais de N^α-acil-peptídeo protegido-OR e N^α-acil-peptídeo protegido-SR (Stewart & Young, 1984)

Os compostos Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHex)-OMe, Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(2ClZ)-OMe e Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-S(CH₂)₂COOEt liofilizados foram tratados com HF. Resumidamente, ao recipiente contendo o peptídeo, foi adicionado 0,5 mL de anisol e o frasco foi conectado a um sistema de HF mantido sob alto vácuo. Após resfriamento do frasco, foram transferidos 10 mL do gás condensado. A mistura foi permitida reagir a 4°C por 90 min, ao fim dos quais, o HF foi totalmente transferido para um “trap” de CaCl₂ para neutralização. O peptídeo foi então precipitado com éter diisopropílico e filtrado. Em seguida, ele foi extraído usando solução 0,1% TFA/H₂O (V/V) e solução ACN/H₂O (V/V) contendo 0,09% de TFA com a porcentagem adequada de ACN, a saber: 20% ACN para Ac-Ile-Ser-Asp-OMe e 90% ACN para Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe e Ac-Ile-Ser-Asp-S(CH₂)₂COOEt. Após liofilização, uma pequena parte do material foi dissolvida com solução ACN/H₂O (V/V) contendo 0,09% de TFA para análises posteriores.

3.2.5. Clivagem da resina e desproteção total de peptidil-Rink amida e -SAMBHA

Para avaliar as qualidades da peptidil-Rink amida e das três peptidil-SAMBHA sintetizadas e determinar as melhores condições de clivagem e desproteção total para cada

uma delas, alíquotas dessas peptidil-resinas foram tratadas com solução de TFA. Para Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(Boc)-Leu-Leu-Ser(But)-Gly-Leu-Leu-SAMBHA e Leu-Leu-Ser(But)-Gly-Leu-Leu-Rink amida, foram usadas duas soluções diferentes de clivagem: 1) 95% TFA/H₂O (V/V) (Atherton e col., 1978); 2) 95% TFA/2,5% H₂O/2,5% TIS (V/V/V; Pearson e col., 1989), enquanto que para Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(Boc)-Gly-SAMBHA e Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-Gly-SAMBHA, somente a primeira solução foi empregada.

Resumidamente, a 10 mg de peptidil-resina foram adicionados 100 µl da solução de clivagem e a suspensão foi incubada a 37°C por até 8 h sob agitação orbital de 300 rpm. Alíquotas de 5 µL das soluções reacionais foram retiradas a cada 2 h, transferidas para "eppendorfs" e diluídas com 15 µL de solução 40% ACN/H₂O (V/V) contendo 0,09% de TFA. As suspensões resultantes foram centrifugadas e alíquotas das soluções sobrenadantes foram analisadas por RP-HPLC (item 3.3.2). Ao término da reação, foram adicionados 800 µL de éter diisopropílico e a suspensão resultante foi homogeneizada, centrifugada e o sobrenadante reservado. Esta operação foi repetida mais quatro vezes e o éter residual foi evaporado. O resíduo sólido, contendo o peptídeo livre e a resina, foi suspenso em solução ACN/H₂O (V/V) contendo 0,09% de TFA com a porcentagem adequada de ACN, a saber: 10% ACN para Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂ e 60% para os outros três peptídeos. A suspensão foi centrifugada e uma alíquota da solução sobrenadante foi analisada por RP-HPLC e LC/ESI-MS (item 3.3.2).

A obtenção dos peptídeos citados acima em quantidades maiores foi feita com aumento de escala de 10 mg de peptidil-resina para 100 mg para as peptidil-SAMBHA e para 150 mg para a peptidil-Rink amida usando 1,0 e 1,5 mL da solução de clivagem 95% TFA/H₂O (V/V), respectivamente (Atherton e col., 1978). As reações foram conduzidas à temperatura ambiente sob agitação orbital de 300 rpm por 3 h (peptidil-resinas menores) ou 5

h (peptidil-SAMBHA maior). Após o término de cada reação, foram feitas quatro lavagens de 8,0 mL cada de éter diisopropílico (precipitação do peptídeo) seguidas de filtração sob pressão reduzida. Após troca do kitassato e reserva da fase etérea, a extração do peptídeo foi feita, promovendo-se três lavagens de 10 mL cada de solução 0,1% TFA/H₂O (V/V) seguidas de filtração e, finalmente, mais três lavagens de 10 mL cada de solução ACN/H₂O (V/V) contendo 0,09% de TFA (a porcentagem de ACN era a seguinte: 10% ACN para Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂ e 60% para os outros três peptídeos). O material coletado no segundo kitassato foi liofilizado e uma pequena parte do sólido resultante foi dissolvida em solução ACN/H₂O (V/V) contendo 0,09% para análises posteriores.

3.2.6. Purificação de peptídeos por RP-HPLC em escala analítica ou semipreparativa

A purificação da maioria dos derivados de peptídeos e aminoácidos foi assim realizada, pois estes compostos foram obtidos em quantidades relativamente pequenas devido ao uso de escalas reduzidas de produção.

O cromatógrafo, os comprimentos de onda e o gradiente linear utilizados nessas purificações foram os mesmos descritos no item 3.3.2. Em escala analítica, as purificações foram realizadas com coluna Vydac C₁₈ analítica (0,45 cm x 25,0 cm, 5 µm, 300 Å) e fluxo de 1 mL/min. Na escala semipreparativa, as purificações ocorreram em coluna Vydac C₁₈ semipreparativa (1 cm x 25,0 cm, 5 µm e 300 Å) e fluxo de 3 mL/min. As porcentagens de ACN na solução B variaram de acordo com a hidrofobicidade do composto em questão.

Resumidamente, o peptídeo bruto foi dissolvido em solução ACN/H₂O (V/V) contendo 0,09% de TFA com a porcentagem adequada de ACN e diversas injetões de 100 µL no cromatógrafo descrito no item 3.3.2 foram realizadas. As frações coletadas contendo os produtos purificados foram liofilizadas e pequenas quantidades dos sólidos resultantes foram dissolvidas em solução ACN/H₂O (V/V) contendo 0,09% de TFA para análises posteriores.

3.2.7. Purificação de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe por RP-HPLC em escala preparativa

Parte do total produzido deste peptídeo (134,81 mg) foi dissolvida em 12 mL de solução 0,1% TFA/H₂O (V/V) contendo 6% de ACN e 8% de DMF (usado para facilitar a dissolução). Da solução resultante, foram feitas 3 injeções de 4 mL no equipamento da Waters (EUA) composto por um detector Waters 2487, bombas Waters Delta 600 (controlador: 600 Controller) e um injetor Rheodyne 7725i. A coluna utilizada foi uma Vydac C₁₈ preparativa (2,2 cm x 25 cm, 10 µm e 300 Å). A purificação foi realizada utilizando dois sistemas de solvente – A: solução 0,1% TFA/H₂O (V/V); B: solução 60% ACN/H₂O (V/V) contendo 0,09% de TFA – e gradiente linear de 40 a 70% de solução B em 60 min. O fluxo usado foi de 10 mL/min e o comprimento de onda, de 220 nm. O “screening” das frações obtidas foi feito no mesmo cromatógrafo descrito no item 3.3.2, usando as mesmas soluções A e B empregadas na purificação e a condição isocrática de 50% de solução B.

3.2.8. Ensaios de hidrólise de éster de N^α-acil-peptídeo-OR usando cPPL

O procedimento geral consistiu na incubação de 0,02 M (Ac-Ile-Ser-Asp-OMe) ou 0,025 M (Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe) de substrato e 50 mg/mL da cPPL em mistura de 80% n-hexano/tampão Tris 0,5 M, pH 8,0 (V/V) a 37°C sob agitação orbital de 300 rpm.

As reações foram realizadas em diversos “eppendorfs”, cada um deles contendo 20 µL de meio reacional e representando diferentes tempos reacionais. Para Ac-Ile-Ser-Asp-OMe, os tempos foram: 0, 1, 4, 8 e 24 h, sendo promovidas reações-controle apenas em 0 e 24 h. Para Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe, os tempos foram: 0, 1, 3 e 6 h, sem a realização de reações-controle.

As reações foram interrompidas pela adição de 980 µL de solução 50% ACN/H₂O (V/V) contendo 0,1% de TFA. A formação de produtos com C-terminal livre em função do

tempo de incubação foi verificada através de análises por RP-HPLC e LC/ESI-MS (item **3.3.2**) das amostras obtidas com a diluição final.

3.2.9. Incubação de Ac-Ile-Ser-Asp-OMe e Gly-NH₂·HCl na presença de cPPL e CCL

O procedimento geral consistiu na mistura de 0,05 M deste doador de acila com 0,5 M de Gly-NH₂·HCl neutralizado com TEA e 50 mg/mL de cPPL em diferentes sistemas de solvente, a saber: 80% n-hexano/tampão Tris 0,5 M, pH 8,0 (V/V), 80% n-hexano/tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5 (V/V), 60% DMF/tampão Tris 0,5 M, pH 8,0 (V/V), 80% [BMIM][BP₆]/tampão Tris 0,5 M, pH 8,0 (V/V) e 80% [BMIM][BF₄]/tampão Tris 0,5 M, pH 8,0 (V/V). Outra incubação usando 80% n-hexano/tampão Tris 0,5 M, pH 8,0 (V/V) foi promovida na presença de CCL, usando as mesmas concentrações de doador e acceptor de acila e enzima descritas anteriormente.

As incubações foram realizadas a 37°C sob agitação orbital de 300 rpm em diferentes “eppendorfs”, cada um deles contendo 20 µL de meio reacional e representando os tempos reacionais de 0, 10 e 30 min, 1, 2 e 4 h (não foram promovidas incubações-controle). Seqüencialmente, elas foram interrompidas pela adição de 480 µL de uma solução 10% ACN/H₂O (V/V) contendo 0,09% de TFA a cada “eppendorf”. As soluções obtidas com a diluição final foram analisadas por RP-HPLC, sendo algumas delas também analisadas por LC/ESI-MS (item **3.3.2**).

Os rendimentos relativos de formação de Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂ para cada tempo reacional nas diferentes condições empregadas foram determinados a partir das áreas do pico relativo ao produto desejado obtidas dos cromatogramas registrados e utilização de uma curva padrão (concentração x área do pico correspondente no cromatograma) previamente obtida com Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂ sintetizado quimicamente e purificado (sabendo-se que a concentração máxima do tetrapeptídeo na solução reacional final seria de 2,0 mM, a curva padrão foi construída usando 7,0 µL de cinco soluções de Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂ nas

concentrações: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mM).

3.2.10. Incubação de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe com Gly-NH₂·HCl na presença de preparações lipásicas e de tripsina comerciais

O procedimento geral consistiu na mistura de 0,025 M deste doador de acila com 0,25 M de Gly-NH₂·HCl pré-neutralizado com TEA. A ela foi adicionada a preparação enzimática [50 mg/mL para as preparações sólidas (cPPL, CCL, Cal B imobilizada e tripsina) e 5% em volume para a Cal A, que é uma preparação líquida]. À mistura assim formada, foi adicionada uma mistura de solventes que envovia *n*-hexano, DCM, DMF, [BMIM][BP₆], [BMIM][BF₄], tampão Tris 0,5 M, pH 8,0 e tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5.

As incubações foram realizadas a 37°C sob agitação orbital de 300 rpm em diferentes “eppendorfs”, cada um deles contendo 20 µL de meio reacional e representando os tempos reacionais de 0, 6, 12 e 24 h (não foram promovidas incubações-controle). Seqüencialmente, elas foram interrompidas pela adição de 980 µL de uma solução 60% ACN/H₂O (V/V) contendo 0,09% de TFA a cada “eppendorf”. As soluções obtidas com a diluição final foram analisadas por RP-HPLC, sendo algumas delas também analisadas por LC/ESI-MS (item 3.3.2).

Os rendimentos relativos de formação de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-Gly-NH₂ para cada tempo reacional nas diferentes condições empregadas foram determinados a partir dos valores das áreas dos picos relativos ao heptapeptídeo esterificado de partida (em t₀ = 0) e ao produto desejado obtidos dos cromatogramas registrados e pela utilização de duas curvas padrões (concentração x área do pico correspondente no cromatograma) previamente geradas com Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-Gly-NH₂ e Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe sintetizados quimicamente e purificados (sabendo-se que as concentrações máximas do hepta e do octapeptídeo na solução reacional final seriam de 0,5 mM, as curvas padrões foram construídas usando 10 µL de cinco soluções de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-Gly-NH₂ e

de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe nas concentrações: 0,05; 0,15; 0,25; 0,5 e 1,0 mM).

3.3. Métodos analíticos

3.3.1. Determinação do grau de aminoacilação de aminoacil-resina e do grau de substituição de peptidil-resina

a) Método do ácido pícrico (Gisin, 1972)

Este procedimento destinou-se à determinação dos valores de GA das Boc-aminoacil-resinas. Resumidamente, 10 mg das Boc-aminoacil-KOR (triplicatas) foram transferidos para um funil de placa porosa, lavados com solução 25% TFA/DCM (V/V) e deixados nessa solução por 30 min (remoção do grupo Boc). Após essa etapa de desproteção, a solução reacional foi drenada e lavagens rápidas e alternadas com DCM e solução 10% TEA/DCM (V/V) foram feitas. Em seguida, a reação ácido-base entre o ácido pícrico e o grupo α -amino do aminoácido foi promovida através da adição da solução 0,15 M de ácido pícrico em DCM. A suspensão resultante foi deixada em repouso por 5 min, após os quais a solução reacional foi drenada. Esta etapa da reação ácido-base foi repetida mais quatro vezes. A aminoacil-resina foi então lavada com EtOH e DCM alternadamente até a solução de lavagem se tornar incolor (remoção do excesso de picrato).

A extração do picrato retido na aminoacil-resina como contra-íon foi feita com solução 10% TEA/DCM (V/V). O extrato foi diluído com 100 mL de etanol e a concentração de picrato de trietilamônio desta solução foi determinada por leitura espectrofotométrica ($\lambda = 358$ nm, $\epsilon_{358} = 14500$ L/mol·cm).

b) Análise de aminoácidos

Este procedimento, também realizado em triplicatas, destinou-se às determinações dos valores de GA de Z-Ala-KOR ($GA_{inicial}$), de N^α -acil-aminoacil-resinas intermediárias da SPFS e dos valores de GS das peptidil-resinas obtidas ($GS_{inicial}$). Além disso, a análise de

aminoácidos serviu ao propósito de caracterizar todos os compostos peptídicos obtidos.

As aminoacil- e peptidil-resinas foram submetidas à hidrólise ácida total a 130°C em uma estação de trabalho Pico-Tag (Waters, EUA) na presença de solução 50% HCl/ácido propiônico (V/V) por 24 h. Já os peptídeos purificados foram submetidos à hidrólise ácida total a 110°C na mesma estação de trabalho, na presença de HCl 6 N e fenol por 24 h (Moraes, 2000; Moraes e col., 2000). Neste processo, além do desligamento do peptídeo da resina, ocorre também hidrólise das ligações peptídicas e desproteção total dos aminoácidos. As amostras hidrolisadas foram secas sob pressão reduzida, diluídas, filtradas em unidades filtrantes com poros de 0,22 µm (Millipore Inc., EUA) e finalmente submetidas à análise de aminoácidos.

Para a etapa de análise, dois equipamentos foram usados: 1) analisador automático System 7300 High Performance Analyzer (Beckman Instruments Inc., EUA) acoplado a um computador com o programa System Gold 406 para controle e aquisição de dados; 2) analisador automático Dionex BioLC® Chromatography Sistem (Dionex, EUA) também acoplado a um computador com a programa “Chromeleon” para aquisição e tratamento dos dados. O primeiro equipamento emprega o método de derivatização pós-coluna, no qual os aminoácidos da amostra são separados por HPLC com coluna de troca iônica do tipo poliestireno sulfonada (0,40 cm x 12 cm) e detectados como produtos de reação com ninidrina a 440 ou 570 nm. (Mant e Hodges, 1991). Já no segundo sistema, não há derivatização pré- ou pós-coluna. Os aminoácidos são também separados em coluna de troca iônica AminoPac PA10 (2,0 cm x 25 cm), mas são detectados por amperometria integrada com detector eletroquímico ED50. Nos dois equipamentos, a quantidade de cada aminoácido é calculada a partir da análise de uma mistura padrão contendo 19 aminoácidos em concentrações conhecidas.

3.3.2. Monitoramento da reação de solvólise da ligação peptidil-resina e análise do produto obtido

O seguinte procedimento foi adotado: alíquotas de 20 µL das soluções reacionais foram retiradas, transferidas para "eppendorfs" e diluídas com 60 µL de ACN ou de solução 90% ACN/H₂O (V/V) contendo 0,09% de TFA. As soluções resultantes foram passadas através de unidades filtrantes com poros de 0,22 µm (Millipore Inc., EUA). Alíquotas dos filtrados foram analisadas por RP-HPLC em equipamento da LDC (EUA) composto por um detector do tipo SpectroMonitor 3100, por bombas ConstaMetric 3200 e 3500 e um injetor Rheodyne 7125. A coluna utilizada foi uma Vydac C₁₈ analítica (0,45 cm x 25,0 cm, 5 µm e 300 Å).

As eluições foram realizadas utilizando dois sistemas de solvente – A: solução 0,1% TFA/H₂O (V/V); B: solução ACN/H₂O (V/V) contendo 0,09% de TFA – e gradiente linear de 5 a 95% de solução B em 30 min. A porcentagem de ACN contida em B variou conforme o caráter hidrofóbico dos compostos analisados. Foram usados o fluxo de 1 mL/min e o comprimento de onda de 210 ou 220 nm. Análises por RP-HPLC de produtos brutos ou purificados obtidos após liofilização e dissolução também foram feitas no equipamento acima citado.

Algumas alíquotas obtidas durante o monitoramento das reações, assim como amostras de produtos purificados obtidos no decorrer do trabalho foram também foram submetidas à análise por LC/ESI-MS para identificação e caracterização dos compostos. O aparelho utilizado foi um cromatógrafo líquido da Shimadzu (Japão) composto por duas bombas Shimadzu LC-10AD, um detector Shimadzu SDP-10AV e um injetor Rheodyne 7125 acoplado a um espectrômetro de duplo quadrupolo da Micromass (Reino Unido), modelo Quattro II, que emprega a técnica de ionização por eletrospray (este é um equipamento multi-usuário alocado no laboratório do Prof. Dr. Paolo di Mascio no Instituto de Química – USP).

Nestas análises foram empregadas a coluna e as condições cromatográficas citadas acima.

3.3.3. Caracterização dos produtos purificados por RMN de ^1H

Além da caracterização por análise de aminoácidos (item 3.3.1.b) e por LC/ESI-MS (item 3.3.2), alguns dos produtos purificados obtidos no decorrer do trabalho também foram caracterizados por RMN de ^1H . As amostras foram secas por 4 h em aparato Abder-Halden com acetona ou em dessecador com “trap” de gelo seco e álcool e foram mantidas sob vácuo até o momento da análise, quando finalmente foram dissolvidas em CD₃OD. Os espectros de ressonância foram obtidos em um espectrômetro Bruker DRX500 (EUA) a 500 MHz na Central Analítica do Instituto de Química - USP.

3.3.4. Determinação do rendimento de desligamento de Z-Ala-OR ou de N $^\alpha$ -acil-peptídeo protegido-XR da resina (X = O ou S)

Ao término de cada reação de solvólise, a solução reacional foi separada da aminoacil-ou peptidil-resina remanescente por filtração em placa sinterizada e reservada. A aminoacil-ou peptidil-resina remanescente foi lavada alternadamente com DCM e MeOH, seca sob pressão reduzida e submetida à hidrólise total seguida de análise do seu conteúdo de aminoácidos (item 3.3.1.b). Os valores de GA_{final} ou GS_{final} assim determinados junto com os valores de GA_{inicial} ou GS_{inicial} (item 3.3.1.b) permitiram calcular os rendimentos das reações de solvólise realizadas através da fórmula $[(\text{GA}_{\text{inicial}} - \text{GA}_{\text{final}})/\text{GA}_{\text{inicial}}] \times 100$ ou $[(\text{GS}_{\text{inicial}} - \text{GS}_{\text{final}})/\text{GS}_{\text{inicial}}] \times 100$.

3.3.5. Determinação do conteúdo de Ca, Zn, Co e Cu em Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-OMe purificado

Essas análises por espectrometria de absorção atômica foram gentilmente realizadas pelo Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira do Departamento de Química Fundamental do IQ-USP. Para tal, os compostos Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-OMe obtidos nas metanólicas da

peptidil-KOR correspondente mediadas por Ca^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} e Cu^{+2} , após purificação por RP-HPLC (item 3.2.8) e liofilização, foram dissolvidos em THF de forma que as concentrações finais das soluções peptídicas fossem de aproximadamente 1mM. A seguir, volumes conhecidos destas soluções foram submetidos à evaporação total e à hidrólise gasosa a 110°C em uma estação de trabalho Pico-Tag (Waters, EUA) na presença de HCl 6 N e fenol por 24 h. Os hidrolisados foram dissolvidos em solução 0,1% $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}$ (V/V) com os mesmos volumes usados na hidrólise e submetidos à análise por espectrometria de absorção atômica.

A amostra contendo Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-OMe gerado por metanólise da peptidil-KOR correspondente catalisada por DIPEA foi obtida pelo mesmo procedimento para servir como “branco”, ou seja, as concentrações de metais nela encontradas foram descontadas das amostras citadas acima.

Para a determinação do conteúdo de Zn, Co e Cu, foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica eletrotérmica em forno de grafite e detecção simultânea (SIMAATM 6000), fabricado pela Perkin-Elmer (EUA). O equipamento é dotado de policromador Echelle, aquecimento transversal do atomizador, tudo de grafite com plataforma integrada recoberta com grafite pirolítico, corretor de radiação de fundo por efeito Zeeman longitudinal e amostrador automático para introdução de soluções no interior do atomizador. A determinação de Ca foi feita em um espectrômetro de absorção atômica com atomização por chama da Analytic Jena AG (AAS vario 6; Alemanha).

3.3.6. Preparação de amostra e obtenção de espectro FT-Raman

Os espectros foram obtidos no laboratório da Prof^a Dra. Márcia L. A. Temperini pelo doutorando Ms. Gustavo F. S. Andrade, ambos do Departamento de Química Fundamental do IQ-USP.

Enquanto as amostras secas de aminoacil-KOR foram colocadas no porta-amostra sem qualquer tratamento prévio, as amostras de Ac-peptidil-KOR foram analisadas no estado

sólido após serem obtidas como descrito a seguir. Inicialmente, foram realizadas reações como descrito no item **3.2.2**, utilizando 20% MeOH/DMF na presença e na ausência de Ca(CH₃COO)₂. As suspensões foram permitidas a reagir por 1,5 h a 50°C sob agitação orbital de 300 rpm. Ao final das reações, as peptidil-resinas foram filtradas, lavadas rapidamente com DCM, secas sob pressão reduzida e colocadas no porta-amostra do equipamento.

Os espectros foram obtidos em um espectrômetro FT-Raman Bruker modelo RFS 100/S (EUA). A radiação excitante usada foi um laser de Nd/YAG (1064 nm) com potência máxima de 500 mW. O número de acumulações para cada amostra foi de 4096. A potência do laser empregada na obtenção dos espectros foi de 200 mW e a resolução usada foi de 4 cm⁻¹.

3.3.7. Análise de preparações enzimáticas por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) (Sambrook, 1989)

Esta análise foi realizada no sistema de eletroforese do Prof. Dr. Sandro Roberto Marana do Departamento de Bioquímica do IQ-USP. O método usado foi aquele que utiliza o sistema para eletroforese em placa Mini-Protean II da Bio-Rad Lab. Inc. (EUA).

Para o gel de separação (15% de gel em tampão Tris 0,375 M, pH 8,8) foram utilizados 1,2 mL de H₂O destilada, 2,5 mL de solução A (29,2% de acrilamida e 0,8% de N',N'-bis-metíleno-acrilamida), 1,25 mL de solução B (tampão Tris 1,5 M, pH 8,8), 50 µL de solução 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 50 µL de solução 10% de persulfato de amônio (APS) e 5 µL de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamino (TEMED). Para o gel de empilhamento (4,0% de gel em tampão Tris 0,125 M, pH 6,8) foram utilizados 2,03 mL de H₂O destilada, 0,43 mL de solução A, 0,83 mL de solução C (tampão Tris 0,5 M, pH 6,8), 33,3 µL de solução 10% de SDS, 33,3 µL de solução 10% de APS e 6,6 µL de TEMED.

Foram preparados 10µL de solução de cada preparação enzimática (cPPL: 80mg/mL, pPPL: 80mg/mL, PPL-DF: 80mg/mL), às quais foram adicionados 10µL de tampão de

amostra (4,0 mL de H₂O destilada, 1,0 mL de solução C, 0,80 mL de glicerol, 1,6 mL de solução 10% de SDS, 0,40 mL de 2-β-mercaptopetanol e 0,20 mL de solução 0,05% de azul de bromofenol). As soluções resultantes foram aquecidas em banho-maria por 5 min. Foram aplicados 20μL de cada solução no gel de empilhamento. Como padrões de massa molecular, foram usados 20μL de uma solução contendo fosforilase B (97,4 kD), albumina (66,2 kD), ovoalbumina (45,0 kD), anidrase carbônica (31,0 kD), inibidor de tripsina (21,5 kD) e lisozima (14,4 kD).

A eletroforese foi realizada a 200 V utilizando 800 mL de tampão de corrida (3 g/L de tampão Tris, 14,4 g/L de glicina e 1 g/L de SDS). O sistema foi desligado quando a linha do corante azul de bromofenol atingiu a extremidade inferior do gel.

O gel obtido foi corado à temperatura ambiente por 40 minutos com uma solução 0,1% de “Coomassie Blue R-250” em solução fixadora (50% de água, 40% de metanol e 10% de ácido acético). O descoramento ocorreu à temperatura ambiente por 1 hora em solução fixadora. Após o descoramento, o gel foi estocado em água.

3.3.8. Determinação de atividades enzimáticas de cPPL, pPPL e PPL-DF

As medidas foram realizadas em nosso laboratório com o auxílio do estudante de Iniciação Científica Nicolas Nishikido Rodovalho e do Dr. Cleber Wanderlei Liria.

a) Atividade lipásica (Tietz e Fiereck, 1966)

O procedimento baseou-se na hidrólise de triglicerídeos contidos em uma emulsão 50% óleo de oliva/água (V/V) produzindo diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol. Após a adição dos reagentes: 1 mL de solução 2 mg/mL da preparação lipásica em tampão Tris (0,2 M, pH 8,0), 2,5 mL de água, 1,0 mL de tampão Tris (0,2 M, pH 8,0) e 3,0 mL do substrato, o tubo reacional foi fechado, agitado vigorosamente por 5 s e depois mantido a 37°C por 6 h sob agitação orbital de 300 rpm. Após esse tempo, foram adicionados 3,0 mL de etanol (95%) para inativar a preparação enzimática. A atividade lipásica foi

calculada a partir da quantidade liberada de ácidos graxos livres. Estes, por sua vez, foram quantificados pela titulação da mistura com uma solução 0,05 N de NaOH, usando timolftaleína como indicador ácido-base. As medidas foram feitas em duplicatas para cada preparação, assim como para o “branco”, que não continha enzima. A unidade de atividade lipásica (U) foi expressa em μeq . de ácidos graxos formados por hora e a atividade lipásica foi expressa em U/mg de preparação enzimática.

b) Atividade frente a *p*-nitroanilida de Bz-DL-tirosina (Shaw, 1967)

Esta medida foi determinada usando 0,2 mL de solução da preparação enzimática (1mg/mL em HCl 0,01M) e 2,8 mL de uma solução 12 mM do substrato cromogênico *p*-nitroanilida de Bz-DL-tirosina (Bz-DL-Tyr-pNA) em tampão fosfato (0,07 M, pH 7,6), substrato este reconhecível pela α -quimotripsina. A reação enzimática ocorreu em espectrofotômetro Shimadzu (Japão), modelo UV-160 1PC, acoplado a um computador, o qual possibilitou acompanhar a variação de absorbância por minuto a 405 nm durante os primeiros 5 min de reação. A unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de preparação enzimática que catalisou a transformação de 1 μmol de substrato por minuto e a atividade foi expressa em U/mg de preparação lipásica.

c) Atividade frente a *p*-nitroanilida de Bz-DL-arginina (Shaw e col., 1965)

Esta medida foi determinada misturando 0,2 mL de solução da preparação enzimática (12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em HCl 0,01M) com 0,3 mL de tampão fosfato (0,03 M, pH 8,0) e 2,5 mL de uma solução 4 mM do substrato cromogênico *p*-nitroanilida de Bz-DL-arginina (Bz-DL-Arg-pNA) em água destilada, substrato este reconhecível pela tripsina. A reação enzimática e o acompanhamento durante os primeiros 5 min foram feitos como descrito no item anterior (3.3.8.b). A unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de preparação enzimática que catalisou a transformação de 1 μmol de substrato por minuto e a atividade foi expressa em U/mg de preparação lipásica.

d) Atividade frente a Z-Gly-Phe-OH (Auld e Holmquist, 1974)

O procedimento consistiu na incubação de 0,02 M do substrato Z-Gly-Phe-OH (reconhecível pela carboxipeptidase A) com 50 mg/mL de cada preparação enzimática em solução 80% n-hexano/Tris 0,5 M, pH 8,0 (V/V) a 37°C sob agitação orbital de 300 rpm.

As reações foram realizadas em diversos “eppendorfs”, cada um deles contendo 20 µL de meio reacional e representando diferentes tempos reacionais para cada preparação enzimática: 0, 10, 20, 30, 40 e 60 min. Reações-controle que não continham a preparação lipásica foram realizadas apenas para os tempos reacionais 0 e 60 min. As reações foram interrompidas pela adição de 980 µL de uma solução 50% ACN/H₂O (V/V) contendo 0,1% de TFA. Alíquotas de cada “eppendorf” foram analisadas por RP-HPLC, utilizando 100 µL de cada solução final obtida com a diluição. Com uma solução padrão de Z-Gly-Phe-OH de concentração conhecida, o consumo do substrato foi acompanhado pela diminuição da área do pico referente a ele para cada preparação enzimática. A unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade em µmol de substrato consumida por minuto e a atividade foi expressa em U/mg de preparação lipásica.

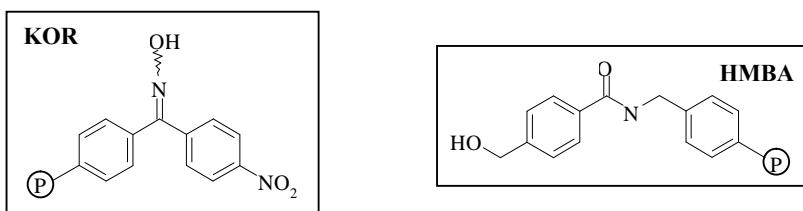
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese manual de aminoacil- e peptidil-resinas à temperatura ambiente

Todos os dados quantitativos referentes às sínteses realizadas estão apresentados na

Tabela 1.

A aminoacilação de resinas como a KOR e a HMBA (estruturas mostradas abaixo) ocorre através da formação de uma ligação éster entre aminoácido e a resina (no caso da KOR, um éster de oxima é formado). Como este processo apresenta usualmente baixa eficiência, são requeridos tempos reacionais longos e excesso de reagentes (Lloyd-Williams e col., 1997; Ravn e col., 2003; Jia e col., 2006; Danieli e col., 2007).



Como a aminoacilação deste tipo de resina pode não ser quantitativa, a determinação do valor de GA obtido no início da síntese da respectiva peptidil-resina é relevante, pois possibilita o cálculo das quantidades apropriadas de N^{α} -acil-aminoácido-OH e de reagentes acopladores que devem ser empregadas no alongamento da cadeia peptídica, assegurando as eficiências das reações de acoplamento subsequentes e simultaneamente, evitando o desperdício de reagentes e solventes.

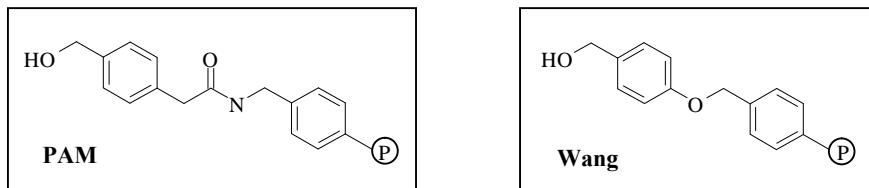
Comparativamente ao valor do grau de funcionalização (GF), a eficiência da aminoacilação da KOR (63%) foi inferior à da HMBA (98%) provavelmente devido à maior proximidade do grupo OH à malha polimérica na estrutura da KOR em relação à da HMBA, o que confere maior impedimento estérico ao redor da hidroxila envolvida na formação do éster de oxima.

Tabela 1. Dados quantitativos referentes às sínteses manuais de aminoacil e peptidil-resinas

Aminoacil ou peptidil-resina	GF ou GA (mmol/g)	m _{inicial} (mg)	GA (mmol/g)	GS (mmol/g)	Ganho de massa (mg)	Proporção molar entre os aminoácidos *
Z-Ala-KOR	0,87	1004,35	0,55	—	113,25	—
Leu-KOR	0,87	1000,24	0,47	—	ND ^a	—
Asp(OcHx)-KOR ^b	0,87	2011,60	0,53	—	ND ^{a,b}	—
Fmoc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR ^b	0,87	2011,60	0,53	0,39	ND ^b	Ile: 1,0; Asp: 0,9
Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR ^b	0,87	2011,60	0,53	0,32	ND ^b	Ile: 1,0; Asp: 1,0
Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-KOR	0,87	2000,45	0,47	0,31	285,48	Ile: 1,0; Asp: 1,1
Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(2ClZ)-KOR	0,87	1007,61	0,46	0,27	263,35	Phe: 0,9; Leu: 1,3; Pro: 1,0; Ile: 2,0; Gly: 0,9; Lys: 0,7
Boc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-PAM	0,70	502,05	0,70	0,39	36,04	Ile: 1,0; Asp: 1,1
Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(Obut)-Wang	0,32	1016,15	0,32	0,21	72,28	Ile: 1,0; Asp: 1,2
Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(Obut)-HMBA	0,80	1007,41	0,78	0,40	88,43	Ile: 1,0; Asp: 1,1
Leu-Leu-Ser(But)-Gly-Leu-Leu-Rink amida	0,30	706,03	ND ^c	0,29	49,79	Leu: 4,0; Gly: 0,9
Ac-Ile-Ser(But)-Asp(Obut)-Gly-SAMBHA	0,41	518,36	ND ^c	0,28	76,65	Ile: 1,0; Asp: 0,9; Gly: 0,9
Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(Boc)-Gly-SAMBHA	0,41	299,85	ND ^c	0,23	64,02	Phe: 1,1; Leu: 1,0; Pro: 1,1; Ile: 2,1; Gly: 2,1; Lys: 1,0
Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(Boc)-Leu-Leu-Ser(But)-Gly-Leu-Leu-SAMBHA	0,41	506,79	ND ^c	0,14	109,73	Phe: 0,9; Leu: 4,9; Pro: 1,0; Ile: 2,0; Gly: 1,8; Lys: 0,9

GF: grau de funcionalização; GA: grau de aminoacilação; GS: grau de substituição; ND: não determinado. * Serina é parcial ou totalmente degradada durante a hidrólise ácida. ^a Estas aminoacil-resinas eram intermediárias de sínteses de peptidil-resinas. ^b As três sínteses foram realizadas a partir de uma quantidade comum de KOR. ^c Os valores de GA não são usualmente determinados para resinas funcionalizadas com grupos aminos.

As resinas PAM e Wang, cujas estruturas estão mostradas abaixo, também formam com a cadeia peptídica uma ligação do tipo éster, mas foram adquiridas já nas formas aminoaciladas.



A pequena diferença existente entre os valores de GS obtidos nas sínteses de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR e Fmoc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR (0,32 e 0,39 mmol/g, respectivamente) pode ser explicada pela certa instabilidade ao TFA apresentada pela ligação éster de oxima, embora a presença do grupo nitro presente na KOR reduza significativamente esta labilidade (Guillier e col., 2000). Apesar de ambas peptidil-resinas apresentarem os mesmos três resíduos, a Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR passou por uma etapa adicional de remoção do grupo Boc (por tratamento com solução de TFA) antes do passo de acetilação.

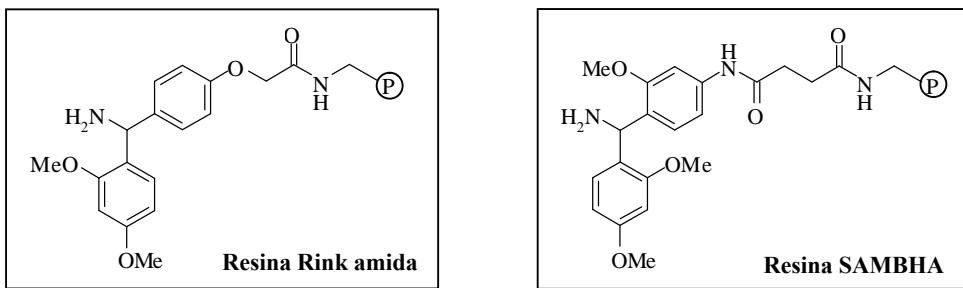
A tendência decrescente nos valores de GS para as peptidil-resinas contendo maior número de aminoácidos reflete uma das maiores limitações apresentadas pela SPFS: a forte dependência entre a eficiência global da síntese e a eficiência individual de cada etapa de desproteção e acoplamento:

Número de resíduos no peptídeo final	Rendimento global	
	Rendimento individual de cada etapa = 99,8%	Rendimento individual de cada etapa = 96,0%
11	98	66
21	96	44
31	94	29
51	90	13
100	82	1,7

(adaptado de Nelson e col., 2004)

Apenas um dos peptídeos amidados foi sintetizado na resina Rink amida, pois as incorporações dos derivados de aminoácidos a ela não foram completas. Assim, ela foi substituída pela resina SAMBHA para a obtenção dos outros peptídeos amidados. A diferença

observada entre as sínteses nas duas resinas pode estar associada ao fato da resina SAMBHA possuir um “linker” que posiciona o grupo amino envolvido na ligação com o peptídeo mais favoravelmente em relação à malha polimérica do que o faz o “linker” da Rink amida, como sugerem as estruturas a seguir:



Neste ponto cabe mencionar que as peptidil-SAMBHAs e a peptidil-Rink amida foram sintetizadas para fornecer os peptídeos que posteriormente seriam usados como padrões (Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂, Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-Gly-NH₂ e Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-Leu-Leu-Ser-Gly-Leu-Leu-NH₂) e como acceptor de acila (Leu-Leu-Ser-Gly-Leu-Leu-NH₂) em reações enzimáticas de formação de ligação peptídica. Assim, tratamentos com soluções de TFA em pequena escala foram promovidos com as respectivas peptidil-resinas para determinar a melhor condição de clivagem do peptídeo da resina e desproteção total, além de comprovar o sucesso das sínteses. Como as duas soluções de TFA empregadas (item 3.2.5) forneceram produtos de qualidades similares tanto para a reação com Leu-Leu-Ser(But)-Gly-Leu-Leu-Rink amida quanto com Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(Boc)-Leu-Leu-Ser(But)-Gly-Leu-Leu-SAMBHA, apenas a solução 95% TFA/H₂O (V/V) foi usada para as demais.

Com respeito às reações com Leu-Leu-Ser(But)-Gly-Leu-Leu-Rink amida em escala de 10 mg, o monitoramento por RP-HPLC indicou que 2 h eram suficientes para o desligamento da resina e desproteção total do peptídeo. A análise por LC/ESI-MS (**Figura 1**) comprovou a boa qualidade do peptídeo bruto obtido e permitiu identificar nele os seguintes componentes:

“Scan” de massas	Fragmentos detectados *	Composto correspondente
A	Leu-Leu-Ser-Gly-Leu-Leu (596,8); Leu-Leu-Ser-Gly-Leu (483,6)	Leu-Leu-Ser-Gly-Leu-NH ₂ ([MH] ⁺ = 613,8) (<i>peptídeo desejado</i>)
B	Leu-Leu-Ser-Gly-Leu-Leu (596,8); Leu-Leu-Ser-Gly-Leu (483,6)	Isômero do peptídeo desejado ([MH] ⁺ = 613,8)
C	Leu-Leu-Ser(But)-Gly-Gly-Leu-Leu (709,9); Leu-Leu-Ser(But)-Gly-Gly-Leu (596,8)	Leu-Leu-Ser(But)-Gly-Gly-Leu-Leu-NH ₂ ([MH] ⁺ = 727,0; [MNa] ⁺ = 750,0)

* Identificados com o auxílio do programa Peptide Companion (CSPS Pharmaceuticals Inc., EUA)

O subproduto **B**, isômero do produto desejado, foi gerado provavelmente durante as etapas de ativação dos derivados de aminoácidos em meio básico. De fato, embora a racemização seja bastante minimizada na SPFS usando os protocolos descritos (Varanda e Miranda, 1997), ela pode acontecer em uma pequena extensão, principalmente durante o acoplamento de aminoácidos, tais como His, Cys e Ser (Lloyd-Williams e col., 1997; Fenza e col., 1998). A formação do subproduto **C**, que contém uma glicina adicional, deve ter ocorrido durante a incorporação da Fmoc-Gly-OH à cadeia peptídica em crescimento, uma vez que o excesso de base usado nessa reação pode levar à remoção em pequena extensão do grupo Fmoc da Fmoc-Gly já incorporada (Bodanszky e col., 1979).

Em relação a Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-Gly-SAMBHA, o monitoramento por RP-HPLC indicou que o tempo necessário para a clivagem do peptídeo da resina e desproteção total era de 2 h. A análise por LC/ESI-MS (**Figura 2**) comprovou a boa qualidade do peptídeo bruto obtido e permitiu identificar nele os seguintes componentes:

“Scan” de massas	Fragmentos detectados*	Composto correspondente
A	Ac-Ile-Ser-Asp-Gly (415,4); Ser-Asp-Gly-NH ₂ (277,2); Ac-Ile (128,2; 156,2)	Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH ₂ ([MH] ⁺ = 432,4; [MNa] ⁺ = 454,4) (<i>peptídeo desejado</i>)
B	—	Subproduto não identificado

* Identificados com o auxílio do programa Peptide Companion (CSPS Pharmaceuticals Inc., EUA)

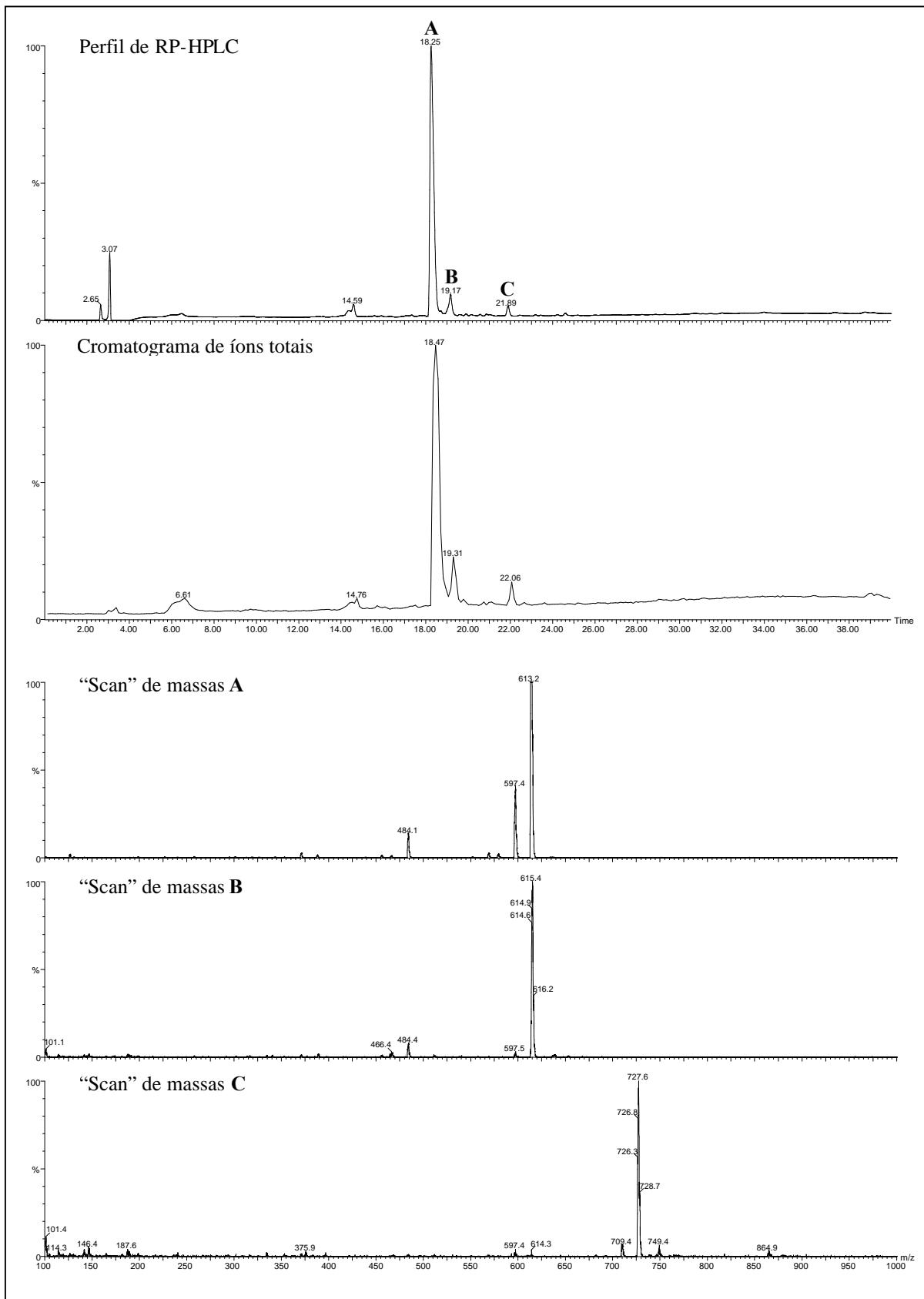


Figura 1. Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total de Leu-Leu-Ser(But)-Gly-Leu-Leu-Rink amida em 95% TFA/H₂O a 37°C por 8 h. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 60% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 210 nm (λ); 1 mL/min (fluxo); 5-95 % B em 30 min (gradiente linear); 37 V (voltagem do cone), ES⁺ (modo de ionização).

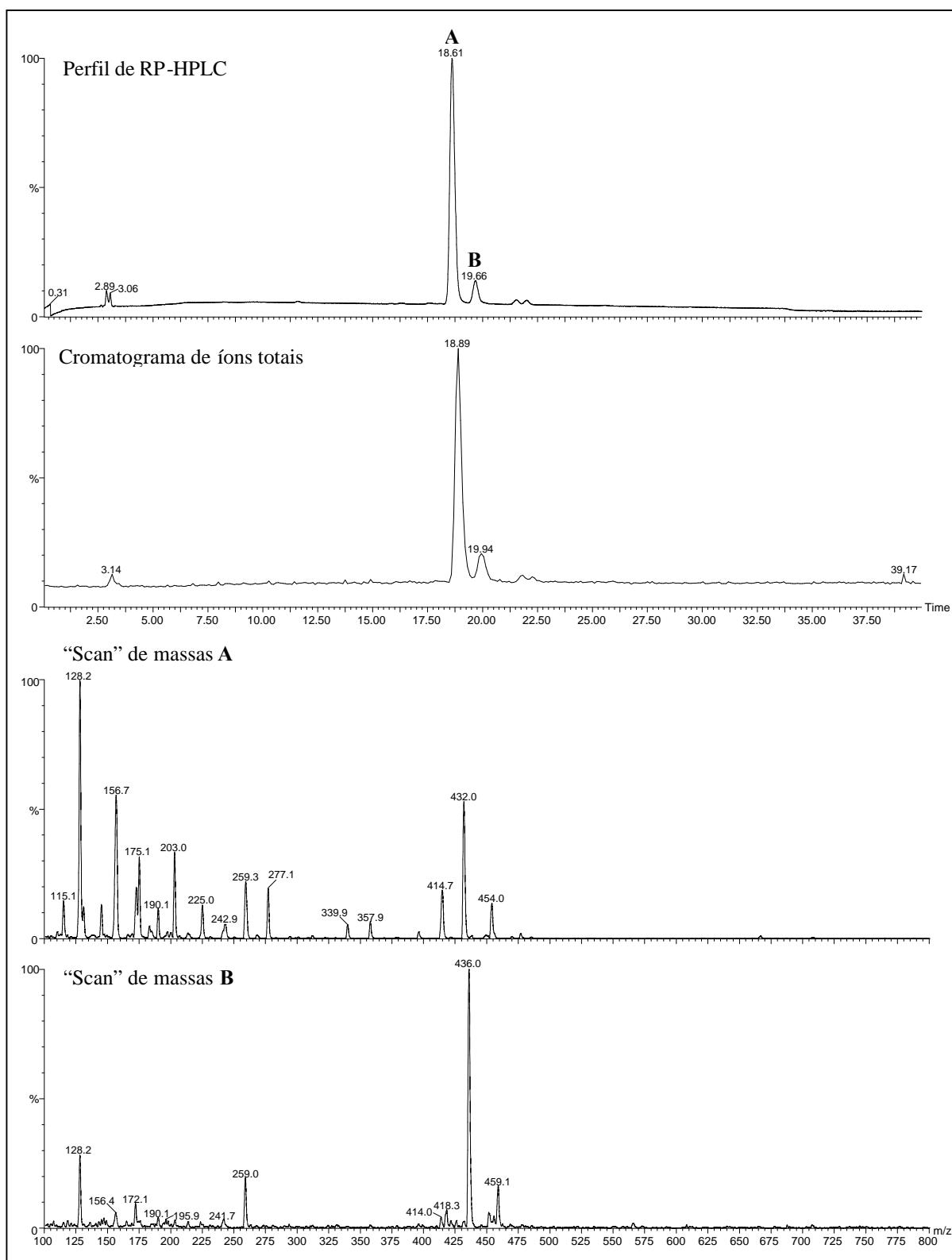


Figura 2. Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total de Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-Gly-SAMBHA em 95% TFA/H₂O a 37°C por 6h. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 10% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 210 nm (λ); 1 mL/min (fluxo); 5-95 % B em 30 min (gradiente linear); 60 V (voltagem do cone), ES⁺ (modo de ionização).

O subproduto **B** ($m/z = 436,0$), que apresenta 4 unidades a mais no valor m/z do que o peptídeo desejado, não pôde ser identificado. Entretanto, o perfil cromatográfico sugere que ele foi gerado em pequena quantidade.

O monitoramento por RP-HPLC da reação de clivagem do peptídeo da resina e desproteção total de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(Boc)-Gly-SAMBHA demonstrou que o tempo mínimo necessário era de 2 h. A análise por LC/ESI-MS (**Figura 3**) comprovou a boa qualidade do peptídeo bruto obtido e permitiu identificar nele os seguintes componentes:

“Scan” de massas	Fragmentos detectados*	Composto correspondente
A	Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-Gly-NH ₂ (696,9); Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-Gly-NH ₂ (583,7); Ile-Gly-Lys-Gly-NH ₂ (373,5)	Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-Gly-NH ₂ ([MH] ⁺ = 886,1; [MNa] ⁺ = 909,1) <i>(peptídeo desejado)</i>
B	—	Subproduto não identificado

* Identificados com o auxílio do programa Peptide Companion (CSPS Pharmaceuticals Inc., EUA)

Infelizmente, não foi possível identificar o subproduto **B** a partir do padrão de fragmentação apresentado no “scan” de massas B. Entretanto, o perfil cromatográfico sugere que ele foi gerado em pequena quantidade.

Em relação a Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(Boc)-Leu-Leu-Ser(But)-Gly-Leu-Leu-SAMBHA, o monitoramento por RP-HPLC indicou que 4 h eram suficientes para o desligamento da resina e desproteção total do peptídeo. A análise por LC/ESI-MS (**Figura 4**) do peptídeo bruto obtido comprovou que a síntese foi bem sucedida. Os componentes nele identificados estão apresentados na **Tabela 2**. O subproduto **A**, isômero do produto desejado, possivelmente foi gerado durante a etapa de ativação para incorporação de derivados de aminoácidos à peptidil-resina em crescimento, mais provavelmente durante o acoplamento de Ser (Lloyd-Williams e col., 1997; Fenza e col., 1998). Os subprodutos de deleção **B** e **C** devem ser resultantes de acoplamentos incompletos, usualmente observados para aminoácidos

impedidos estericamente (Albericio e Carpino, 1997). Embora os resíduos de Ile e Leu possuam a mesma massa, a inferência sobre a deleção de Ile e não de Leu baseia-se na detecção dos fragmentos descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2. Identificação dos fragmentos detectados na análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto obtido na clivagem do peptídeo da resina e desproteção total de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(Boc)-Leu-Leu-Ser(But)-Gly-Leu-Leu-SAMBHA

“Scan” de massas	Fragmentos detectados*	Composto correspondente
A	Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-Leu-Leu-Ser-Gly-Leu-Leu-NH ₂ ([MH ₂] ⁺² = 713,4)	Isômero do peptídeo desejado ([MH] ⁺ = 1425,8)
B	Ac-Leu-Pro-Ile-Gly-Lys-Leu-Leu-Ser-Gly-Leu-Leu-NH ₂ ([MH ₂] ⁺² = 583,2); Lys-Leu-Leu-Ser-Gly-Leu-Leu-NH ₂ ([MH] ⁺ = 726,0)	Ac-Leu-Pro-Ile-Gly-Lys-Leu-Leu-Ser-Gly-Leu-Leu-NH ₂ ([MH] ⁺ = 1165,5) (subproduto de deleção de Ile e Phe)
C	Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Gly-Lys-Leu-Leu-Ser-Gly-Leu-Leu-NH ₂ ([MH ₂] ⁺² = 656,8); Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Gly-Lys-Leu (784,1); Lys-Leu-Leu-Ser-Gly-Leu-Leu-NH ₂ (769,0)	Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Gly-Lys-Leu-Leu-Ser-Gly-Leu-Leu-NH ₂ ([MH] ⁺ = 1312,7) (subproduto de deleção de Ile)
D	Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-Leu-Leu-Ser-Gly-Leu-Leu-NH ₂ ([MH ₂] ⁺² = 713,4)	Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-Leu-Leu-Ser-Gly-Leu-Leu-NH ₂ ([MH] ⁺ = 1425,8) (peptídeo desejado)

* Identificados com o auxílio do programa Peptide Companion (CSPS Pharmaceuticals Inc., EUA)

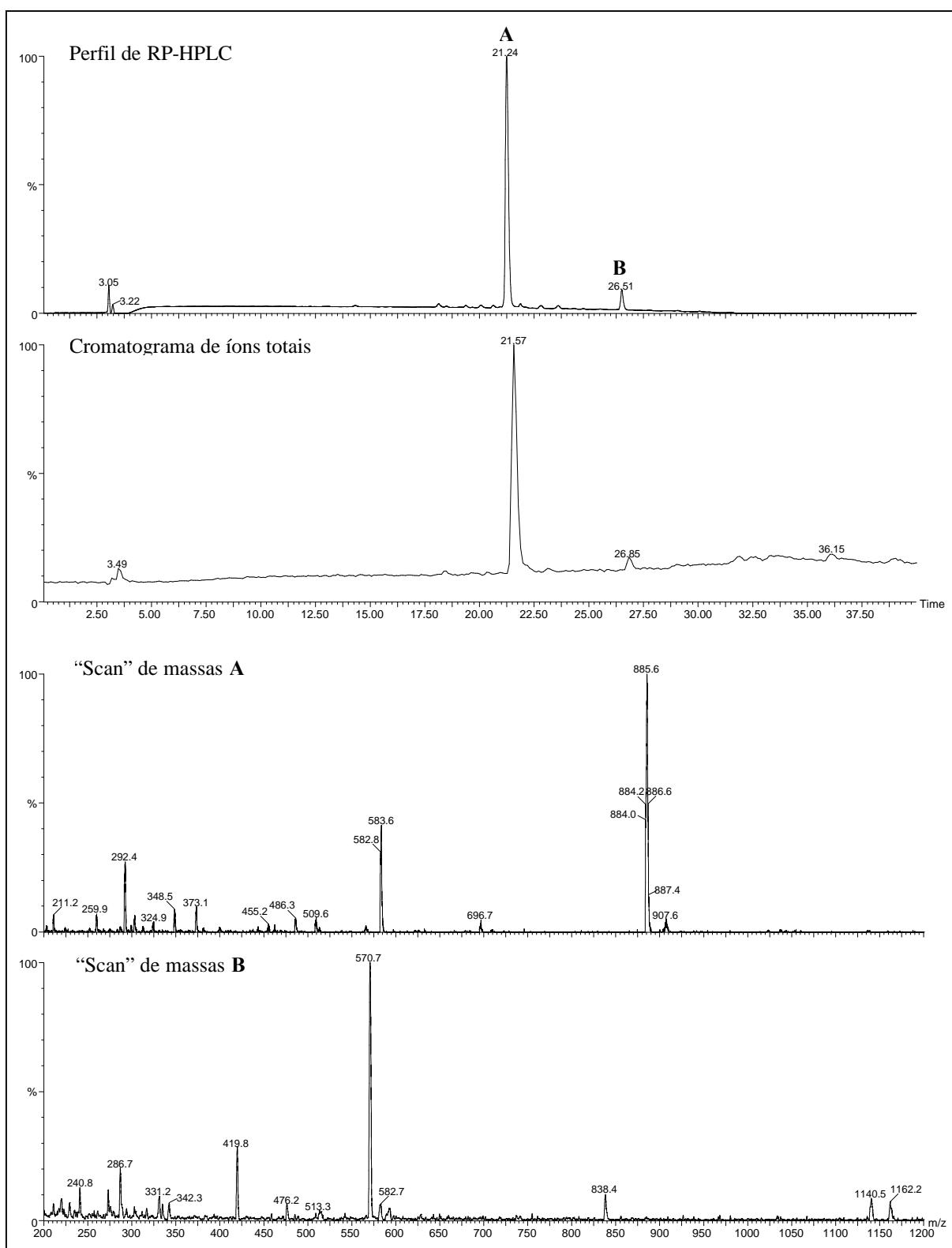


Figura 3. Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(Boc)-Gly-SAMBHA em 95% TFA/H₂O a 37°C por 6 h. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 60% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 210 nm (λ); 1 mL/min (fluxo); 5-95 % B em 30 min (gradiente linear); 37 V (voltagem do cone), ES⁺ (modo de ionização).

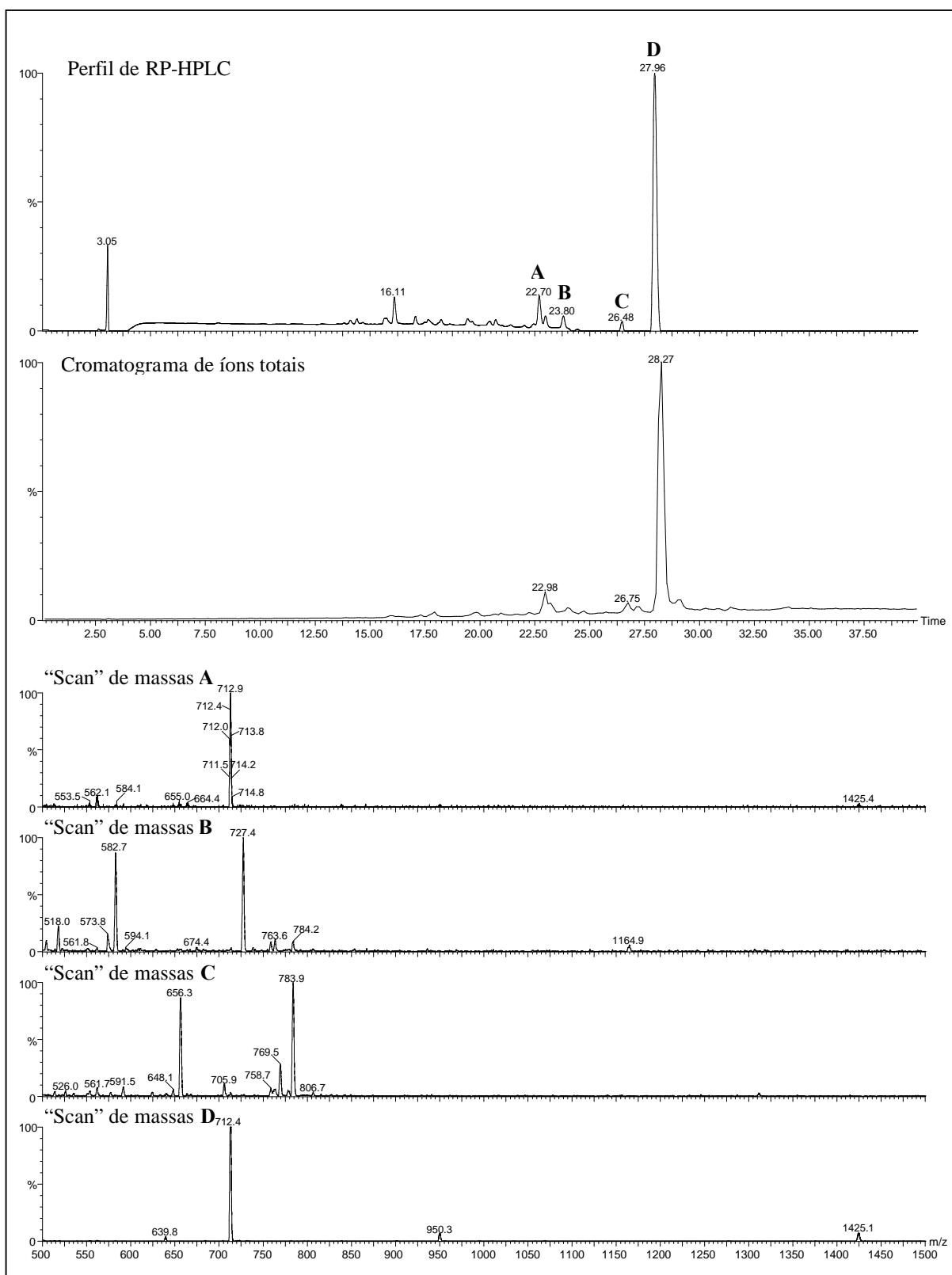


Figura 4. Análise por LC/ESI-MS do peptídeo bruto resultante da clivagem da resina e desproteção total de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(Boc)-Leu-Leu-Ser(But)-Gly-Leu-Leu-SAMBHA em 95% TFA/H₂O a 37°C por 8 h. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 90% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvete B); 210 nm (λ); 1 mL/min (fluxo); 5-95 % B em 30 min (gradiente linear); 10 V (voltagem do cone), ES⁺ (modo de ionização).

4.2. Assistência por metal da solvólise de ligação peptidil-resina

4.2.1. Investigaçāo da metanólise

Com base nos resultados dos trabalhos prévios do nosso grupo sobre a mediação por Ca^{+2} da solvólise de ligação éster de peptidil-resina de Merrifield e éster de oxima de peptidil-KOR (Miranda e col., 1991a e 1991b; Moraes, 2000; Moraes e col., 2000 e 2001; Proti e col., 2007), o objetivo do presente estudo foi investigar se tal procedimento poderia ser, de fato, alternativo aos métodos convencionais, como a catálise básica, por exemplo, na geração de compostos do tipo N^{α} -acil-peptídeo protegido-OMe. Nesse contexto, propusemo-nos a: *i*) encontrar condições reacionais ótimas para a metanólise da ligação peptidil-KOR que permitissem a obtenção dos produtos desejados de boa qualidade em quantidades razoáveis e menor tempo possível; *ii*) verificar se outros íons metálicos poderiam assistir tal reação; *iii*) avaliar o conteúdo de metal remanescente nos N^{α} -acil-peptídeo protegido-OMe purificados; *iv*) tentar aplicar o nosso procedimento alternativo a modelos peptídicos ligados a outras resinas poliméricas compatíveis com a estratégia Boc e, mais ainda, com a química Fmoc.

Os resultados obtidos serviriam como base para a escolha de um procedimento adequado à síntese de um fragmento peptídico do tipo N^{α} -acil-peptídeo protegido-OMe derivado do peptídeo antimicrobiano “Vespid chemotactic peptide M” de *Vespa mandarinia* (VesCP-M; Yasuhara e col., 1983; Yang e col., 2003). Este fragmento, após desproteção total das cadeias laterais, poderia ser testado posteriormente como doador de acila em reação de formação de ligação peptídica mediada por preparações lipásicas comerciais.

a) Triagem das condições reacionais da metanólise da ligação éster de oxima de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-KOR

Os estudos propostos foram realizados utilizando a seqüênciā peptídica modelo Ile-Ser-Asp, fragmento 22-24 do hormônio humano CCK-33 já empregado nos nossos trabalhos anteriores (Moraes e col., 2000 e 2001; Proti e col., 2007). Apesar de simples, esta seqüênciā

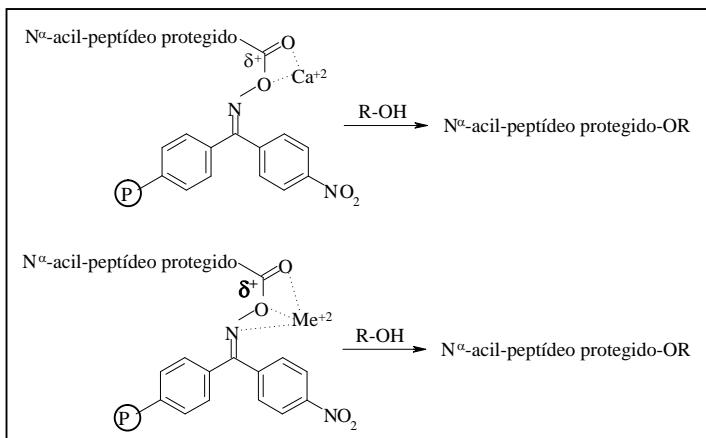
pareceu conveniente porque contém um aminoácido hidrofóbico com cadeia lateral volumosa e dois hidrofílicos que necessitam de proteção nas cadeias laterais reativas durante o processo sintético. Como o éster benzílico é suscetível a transesterificação a éster metílico durante a metanolise da ligação peptidil-KOR catalisada por DBU (Pichette e col., 1997), ele foi usado como protetor da carboxila β da cadeia lateral de Asp para verificar a ocorrência ou não desta reação indesejada durante as metanolises estudadas.

Uma vez que nas condições reacionais descritas por nós anteriormente (Moraes e col., 2000 e 2001), a metanolise do éster de oxima de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-KOR mediada por Ca^{+2} era muito lenta (~ 72 h; Moraes e col., 2000 e 2001), a busca por condições adequadas para agilizar essa reação incluiu diversos solventes, diferentes proporções de MeOH em relação ao co-solvente orgânico, aumento de temperatura, uso dos íons Zn^{+2} , Co^{+2} e Cu^{+2} e uso de bases orgânicas.

Considerando o fato de o Ca^{+2} formar complexos com ligantes doadores de O (Lee, 1999) e considerando a comprovação feita via experimentos de RMN de ^1H de que a coordenação do Ca^{+2} com oxigênios carbonílicos do peptídeo Moz-Asn-Leu-Gly-OEt facilita a transesterificação do éster etílico a metílico (item 1.4; Miranda e col., 1991a), é razoável considerar a hipótese de que a assistência por Ca^{+2} da metanolise de ligação peptidil-resina ocorre via coordenação (**Esquema 2**). Assim, a escolha dos outros metais (Zn^{+2} , Co^{+2} e Cu^{+2}) baseou-se no fato de eles serem capazes de formar complexos não só com ligantes doadores de O, mas também com doadores de N (Lee, 1999). Com o metal coordenando-se aos átomos de N e O da ligação éster de oxima formada entre peptídeo e KOR (**Esquema 2**), o carbono carbonílico poderia se tornar mais eletrofílico e, portanto, mais suscetível ao ataque de nucleófilos.

Além do DBU, TEA e DIPEA também foram usadas nessas primeiras reações, devido a já citada possibilidade de transesterificação indesejada do éster benzílico presente em Ac-

Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-KOR catalisada por DBU (Pichette e col., 1997) e por serem estas as bases empregadas nos procedimentos convencionais de preparação de N^α-acil-peptídeos protegidos-OR (Stewart e Young, 1984; Mellor e col., 2000).



Esquema 2. Modelo proposto para a mediação de Ca²⁺, Zn²⁺, Co²⁺ e Cu²⁺ da alcoólise da ligação peptidil-KOR.

Os dados mostrados na **Tabela 3** demonstraram que todos os cátions metálicos investigados foram capazes de assistir a reação em estudo. A ordem de eficiência foi a seguinte: Co²⁺ << Cu²⁺ ≈ Zn²⁺ < Ca²⁺. As melhores condições reacionais foram: Ca²⁺ – 20% MeOH/DMSO (V/V), 60°C, 2 h e 20% MeOH/DMF (V/V), 50°C, 7 h; Zn²⁺, Co²⁺ e Cu²⁺ – 20% MeOH/DMF (V/V), 50°C, 4, 10 e 5 h, respectivamente.

A presença de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-OH em algumas das metanólises mediadas por Cu²⁺ (condições 28 e 29 da **Tabela 3**) pode ser explicada pela presença de água no meio reacional oriunda da hidratação do sal de cobre usado [Cu(NO₃)₂·3H₂O]. Já nas metanólises conduzidas nas condições 9, 14, 19 e 24 da **Tabela 3**, a sua formação pode ser explicada pela presença de uma quantidade residual de água nos solventes THF e NMP. Embora em menor quantidade do que o MeOH, a água também pode atuar como um nucleófilo, especialmente na presença dos metais mediadores em reações mais longas a 50°C (Proti e col., 2007).

Tabela 3. Triagem das condições de metanólise da ligação éster de oxima de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-KOR mediada por metal ou catalisada por base

Condição	Metal ou base	Sistema de solventes (V/V)	T (°C)	t (h)	Desligamento do peptídeo da KOR (%)	Relação produto desejado/subproduto ^a
1	Ca ⁺²	20% MeOH/DCM	37	48	81	— ^b
2	Ca ⁺²	20% MeOH/DCM	37	24	58	— ^b
3	Ca ⁺²	20% MeOH/DMSO	37	48	100	9
4	Ca ⁺²	20% MeOH/DMSO	37	4	71	— ^b
5	Ca ⁺²	20% MeOH/DMSO	60	24	100	3
6	Ca ⁺²	20% MeOH/DMSO	60	8	100	6
7	Ca ⁺²	20% MeOH/DMSO	60	4	100	14
8	Ca ⁺²	20% MeOH/DMSO	60	2	100	— ^b
9	Ca ⁺²	20% MeOH/NMP	60	24	100	13 ^c
10	Ca ⁺²	20% MeOH/DMF	37	24	67	13
11	Ca ⁺²	20% MeOH/DMF	50	24	100	5
12	Ca ⁺²	20% MeOH/DMF	50	7	95	— ^b
13	Ca ⁺²	20% MeOH/DMF	60	24	100	4
14	Ca ⁺²	20% MeOH/THF	50	24	39	— ^c
15	Zn ⁺²	20% MeOH/DCM	37	24	66	— ^b
16	Zn ⁺²	20% MeOH/DMSO	37	24	< 20	— ^b
17	Zn ⁺²	20% MeOH/NMP	37	24	21	— ^b
18	Zn ⁺²	20% MeOH/THF	37	24	36	— ^b
19	Zn ⁺²	20% MeOH/THF	50	24	54	— ^c
20	Zn ⁺²	20% MeOH/DMF	37	24	100	4
21	Zn ⁺²	20% MeOH/DMF	50	24	100	0,5
22	Zn ⁺²	20% MeOH/DMF	50	4	94	— ^b
23	Co ⁺²	20% MeOH/DCM	37	24	31	— ^b
24	Co ⁺²	20% MeOH/THF	50	24	47	— ^c
25	Co ⁺²	20% MeOH/DMF	37	24	100	— ^b
26	Co ⁺²	20% MeOH/DMF	50	24	100	3
27	Co ⁺²	20% MeOH/DMF	50	10	84	— ^b
28	Cu ⁺²	20% MeOH/DCM	37	24	100	— ^c
29	Cu ⁺²	20% MeOH/THF	50	24	100	— ^c
30	Cu ⁺²	20% MeOH/DMF	50	24	100	4
31	Cu ⁺²	20% MeOH/DMF	50	5	100	— ^b
32	DBU	MeOH	25	2	74	— ^d
33	DBU	MeOH	25	0,25	100	— ^d
34	DBU	20% MeOH/DCM	25	1	100	0,4
35	DBU	20% MeOH/DCM	25	0,25	100	2
36	TEA	50% MeOH/DMF	25	15	100	2
37	TEA	50% MeOH/DMF	25	3	100	— ^b
38	TEA	50% MeOH/DMF	25	1	100	— ^b
39	DIPEA	50% MeOH/DMF	25	15	100	0,7
40	DIPEA	50% MeOH/DMF	25	3	100	5
41	DIPEA	50% MeOH/DMF	25	1	100	— ^b

^a Produto desejado: Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-OMe – ESI-MS [MH]⁺: 570,4 (encontrado), 570,7 (teórico), subproduto: Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OMe)-OMe – ESI-MS [MH]⁺: 494,6 (encontrado), 494,6 (teórico); a relação foi calculada a partir das áreas dos picos correspondentes a esses compostos nos perfis de RP-HPLC. ^b Nenhum subproduto foi detectado. ^c Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-OH {ESI-MS [MH]⁺: 556,1 (encontrado), 556,6 (teórico)} também foi detectado. ^d Apenas o subproduto Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OMe)-OMe foi detectado.

Nas reações mediadas por Cu⁺², o sal Cu(NO₃)₂·3H₂O foi preferido a CuCl₂·2H₂O, já que o cloreto constitui um melhor ligante para Cu⁺² do que o nitrato (Lee, 1999). Considerando que a assistência da metanolise por metal realmente ocorra por coordenação, o uso do sal CuCl₂·2H₂O reduziria o efeito mediador, pois diminuiria a disponibilidade de Cu⁺² livre no meio reacional. De fato, enquanto a incubação de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-KOR em 20% MeOH/DCM (V/V) a 37°C por 24 h com CuCl₂·2H₂O resultou em 55% de desligamento do peptídeo protegido da resina, a reação conduzida nas mesmas condições usando Cu(NO₃)₂·3H₂O resultou em desligamento quantitativo do peptídeo da KOR.

As baixas porcentagens de desligamento do peptídeo desejado da KOR nas reações conduzidas com Zn⁺² em DMSO e NMP (condições 16 e 17 da **Tabela 3**) forneceram outro indício de que a assistência em estudo ocorre devido à coordenação do metal com átomos da ligação éster de oxima. De fato, o íon Zn⁺², além de formar complexos com ligantes doadores de O, o faz também com ligantes doadores de N e S (Lee, 1999); como DMSO e NMP possuem esses doadores, a interação entre íon e solvente deve diminuir a disponibilidade de Zn⁺² livre no meio reacional, reduzindo a eficiência da mediação.

Dentre as bases usadas como catalisadores da metanolise, TEA e DIPEA foram as mais apropriadas, uma vez que nas incubações da peptidil-resina por 1 h em suas presenças, o produto desejado foi desligado quantitativamente da resina sem a geração concomitante do subproduto Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OMe)-OMe. Em contrapartida, DBU se mostrou o pior mediador usado, pois apesar das altas porcentagens de desligamento do peptídeo da KOR obtidas, o subproduto transesterificado foi produzido exclusivamente (condições 32 e 33 da **Tabela 3**; Pichette e col., 1997). A adição de DCM ao meio reacional não reduziu significativamente a transesterificação indesejada (condições 34 e 35 da **Tabela 3**).

Em resumo, os resultados apresentados demonstraram que os metais podem ser mediadores tão eficientes quanto TEA e DIPEA e, certamente, mais específicos do que DBU

(Proti e col., 2006).

b) quantificação dos conteúdos de metais nos Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-OMe obtidos via mediação por metal e dessanilizados por RP-HPLC

Se a assistência por metais realmente ocorre por coordenação, verificar se os peptídeos desligados da resina mantinham os metais coordenados era bastante relevante. Caso isso ocorresse, esta seria uma desvantagem do nosso procedimento alternativo, pois a presença de metal poderia comprometer o uso desses peptídeos esterificados em sínteses biocatalisadas, por exemplo, já que a presença de metais, principalmente os de transição, pode inibir a atividade enzimática (Bozcaarmutlu e Arinc, 2007).

Por esta razão, os peptídeos obtidos através das metanolases mediadas por cada metal foram dessalinizados por RP-HPLC, hidrolisados e analisados quanto ao conteúdo de metais por espectrometria de absorção atômica. As massas de peptídeo usadas, os volumes de THF empregados na dissolução, os volumes das soluções peptídicas e os números de mol de peptídeo submetidos à hidrólise ácida total e análise por absorção atômica estão apresentados na tabela a seguir:

Mediator	Massa de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-OMe (mg)	V _{THF} (μL)	V _{análise} (μL)	Nº de mol de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-OMe
Ca ⁺²	0,51	1060	600	4,8·10 ⁻⁷ mol
Zn ⁺²	0,35	730	300	2,4·10 ⁻⁷ mol
Co ⁺²	0,63	1310	900	7,2·10 ⁻⁷ mol
Cu ⁺²	0,56	1160	900	7,2·10 ⁻⁷ mol
DIPEA (Branco)	0,35	730	300	2,4·10 ⁻⁷ mol

Massa molar de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-OMe: 569,7 g

Os resultados das análises por espectrometria de absorção atômica foram fornecidos em concentração (m/V). A partir desses valores e dos volumes utilizados em cada amostra (tabela anterior), a massa e o número de mol de cada um dos metais foram determinadas. Para avaliar os dados obtidos, foram obtidas as relações molares peptídeo/metal para serem comparadas com a relação inicial de 1/2 empregada nas metanolases.

Os resultados obtidos (**Tabela 4**) permitem perceber que em todas as metanólises mediadas por metais, a mudança na relação molar peptídeo/metal inicial de 1/2 foi bastante significativa. Também se pode notar que o conteúdo de cada metal foi maior em sua respectiva amostra, exceto para Co. Mesmo com todos os cuidados sobre a pureza da água, do ácido nítrico, dos solventes, Ca e Zn estavam presentes em todas as amostras. Por ser um metal mais raro dentre os analisados, Co foi detectado somente na amostra referente à mediação por este metal em uma quantidade bastante pequena. Finalmente, cobre só não estava presente na amostra correspondente à metanólise mediada por Zn^{+2} , tendo sido detectado nas outras em pequeníssimas quantidades. Em suma, as quantidades de metal encontradas em todas as amostras foram desprezíveis, sugerindo que a interação do metal com o peptídeo, embora efetiva em termos de mediação, deva ser relativamente fraca. Além disso, estes dados confirmaram a viabilidade do nosso procedimento alternativo para a geração de N^{α} -acil-peptídeo protegido-OR.

Tabela 4. Conteúdos de metais nos Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-OMe desligados da KOR via mediação por metal e dessalinizados por RP-HPLC

Metal	Mediação por Ca^{+2}		Mediação por Zn^{+2}	
	Concentração (mg/L)	Peptídeo/metal (mol)	Concentração (mg/L)	Peptídeo/metal (mol)
Ca	$6,6 \pm 0,8$	5:1	$3,8 \pm 0,6$	8:1
Zn	$(1,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$	$29 \cdot 10^3 : 1$	$(21 \pm 2) \cdot 10^{-3}$	25:1
Co	< LD	—	< LD	—
Cu	$(3,3 \pm 0,7) \cdot 10^{-3}$	$15 \cdot 10^3 : 1$	< LD	—
Mediação por Co^{+2}				
Metal	Mediação por Co^{+2}		Mediação por Cu^{+2}	
	Concentração (mg/L)	Peptídeo/metal (mol)	Concentration (mg/L)	Peptídeo/metal (mol)
Ca	$2,1 \pm 0,9$	15:1	$3,4 \pm 1,1$	9:1
Zn	$(3,5 \pm 1,2) \cdot 10^{-3}$	$15 \cdot 10^3 : 1$	$(6,8 \pm 1,2) \cdot 10^{-3}$	$77 \cdot 10^2 : 1$
Co	$(3,4 \pm 0,4) \cdot 10^{-3}$	$14 \cdot 10^3 : 1$	< LD	—
Cu	$(6,5 \pm 0,6) \cdot 10^{-3}$	$78 \cdot 10^2 : 1$	$(12,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-3}$	$41 \cdot 10^2 : 1$

LD: limite de detecção. Massas atômicas utilizadas: Ca = 40,078; Zn = 65,409; Co = 58,933195; Cu = 63,546 (segundo a IUPAC – <http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac/AtWt/>).

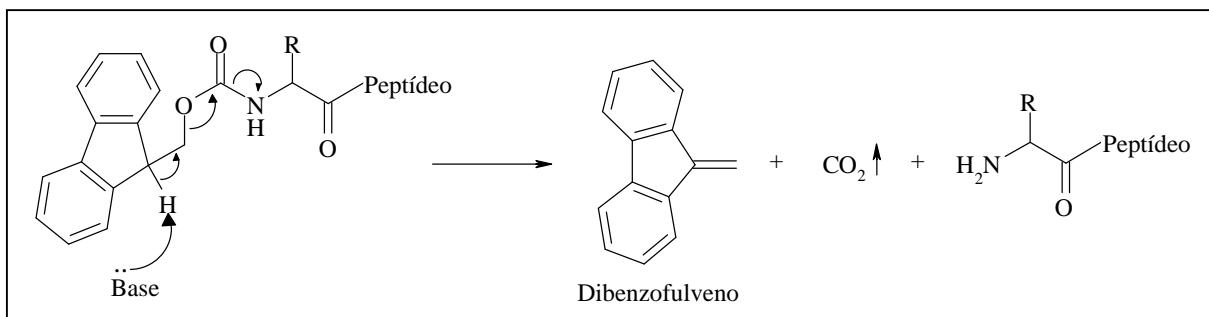
c) Metanólises de ligações ésteres de outras peptidil-resinas: estudo comparativo

Como todas as resinas empregadas em síntese de peptídeos, a KOR apresenta vantagens e desvantagens. Apesar de a ligação éster de oxima ser suscetível ao ataque de uma variedade de nucleófilos (Lloyd-Willians e col., 1997), a KOR é compatível apenas com a química Boc.

A química Boc requer o uso repetitivo de solução de TFA durante o crescimento da cadeia peptídica e tratamento com HF (produto altamente corrosivo e banido dos laboratórios na maior parte do mundo) para a desproteção total das cadeias laterais e clivagem do peptídeo da resina (Aimoto, 2001). Por isto, ela passou a ser menos empregada na obtenção de peptídeos. Por outro lado, o menor custo em relação à estratégia Fmoc, a possibilidade de uso de procedimentos alternativos ao tratamento com HF e a comercialização deste em alguns países, inclusive no Brasil, mantém o interesse pelo uso da química Boc (Chiva e col., 2003; Clark e col., 2006) e em procedimentos envolvendo resinas compatíveis com ela, como a KOR (Dolence e col., 2001).

Uma vez que a estratégia Fmoc é atualmente a mais usada para a obtenção de peptídeos (Amblard e col., 2006; Harris e col., 2007; Porzig e col., 2007), foi também investigada a possibilidade de usar o nosso procedimento alternativo de mediação por metal na obtenção de N^α-acil-peptídeo protegido-OMe a partir de resinas compatíveis com esta estratégia. Para tanto, foram usados o mesmo fragmento oriundo da CCK-33 humana como modelo peptídico e as resinas Wang, HMBA (compatíveis com a estratégia Fmoc) e PAM (compatível com a estratégia Boc), as quais estabelecem com a cadeia peptídica uma ligação do tipo éster, que, em princípio, também é suscetível ao ataque de nucleófilos. A resina (ou mesmo o “linker”) HMBA, por exemplo, tem sido utilizada na síntese de peptídeos com carboxilas terminais amidadas (Story e Aldrich, 1992; Camperi e col., 2005) e esterificadas (Mellor e col., 2000;), enquanto Wang e PAM já foram usadas na síntese de peptídeos

esterificados (Seebach e col., 1991). Nestes casos, os ataques às ligações peptidil-resinas pelos nucleófilos de interesse foram promovidos em meios básicos, procedimento que apresenta a limitação de promover a remoção parcial ou total do grupo Fmoc:



Assim, se nosso procedimento alternativo fosse compatível com o uso das resinas HMBA e Wang, ele talvez pudesse ser mais adequado do que o procedimento convencional na preparação de N^α -acil-peptídeo protegido-OMe via estratégia Fmoc.

→ *Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-HMBA*

Os resultados obtidos nas incubações da Fmoc-peptidil-HMBA (**Tabela 5**) revelaram que os quatro íons empregados foram capazes de mediar o desligamento do peptídeo da resina com eficiências segundo a ordem: $\text{Cu}^{+2} < \text{Ca}^{+2} \ll \text{Co}^{+2} < \text{Zn}^{+2}$. Aparentemente, os íons também demonstraram eficiências diferentes em relação à mediação da reação indesejada de remoção do grupo Fmoc. A ordem obtida foi: $\text{Co}^{+2} \approx \text{Cu}^{+2} < \text{Zn}^{+2} \ll \text{Ca}^{+2}$.

Como se observa, o nosso procedimento alternativo de mediação por metal não só pôde ser aplicado à metanolise de uma Fmoc-peptidil-HMBA, como foi superior aos procedimentos convencionais. De fato, a catálise por DBU resultou na maior porcentagem de desligamento do peptídeo (95%) a 25°C, porém todo o produto desejado teve o grupo Fmoc removido originando Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OMe e dibenzofulveno (DBF). Os íons Co^{+2} e Zn^{+2} apresentaram um bom desempenho tanto em relação ao desligamento do peptídeo quanto à manutenção do grupo Fmoc, com destaque para o Zn^{+2} que promoveu o desligamento do peptídeo da resina com a maior eficiência (84%) e a melhor qualidade (o produto majoritário

era o Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(Obut)-OMe) a 25°C em 24 h (Proti e col., 2006).

Tabela 5. Metanólises da ligação peptidil-resina de Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(Obut)-HMBA para a geração de Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(Obut)-OMe

Mediator	Sistema de solventes (V/V)	T (°C)	t (h)	Desligamento do peptídeo (%)	Relação produto desejado/subproduto ^a
—	20% MeOH/DMSO	37	48	2	— ^b
—	20% MeOH/DMSO	60	48	8	— ^b
—	20% MeOH/DMF	50	48	7	— ^b
DBU	20% MeOH/DCM	25	24	95	— ^c
Ca ⁺²	20% MeOH/DMSO	37	48	11	0,02
Ca ⁺²	20% MeOH/DMSO	60	48	45	— ^c
Cu ⁺²	20% MeOH/DMF	50	48	38	1
DIPEA	50% MeOH/DMF	25	24	54	0,08
Co ⁺²	20% MeOH/DMF	50	48	60	0,5
Zn ⁺²	20% MeOH/DMF	50	48	83	0,1
Zn ⁺²	20% MeOH/DMF	50	24	82	1
Zn ⁺²	20% MeOH/DMF	25	24	84	3

^a Produto desejado: Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(Obut)-OMe {ESI-MS [MH]⁺: 682,5 (encontrado), 682,8 (teórico)}; subproduto: dibenzofulveno {ESI-MS [MH]⁺: 179,1 (encontrado), 178,2 (teórico)}; a relação foi calculada a partir das áreas dos picos relativos a esses compostos nos perfis de RP-HPLC. ^b Apenas DBF foi detectado. ^c Apenas DBF e o subproduto Ile-Ser(But)-Asp(Obut)-OMe {ESI-MS [MH]⁺: 460,2 (encontrado), 459,6 (teórico)} foram detectados.

Uma possível causa da ocorrência da perda indesejável do grupo Fmoc ocorrida nas reações-controle seria a presença de base residual na Fmoc-peptidil-HMBA, mais especificamente de traços de piperidina utilizada durante a síntese da peptidil-resina, não elimináveis mesmo com todas as lavagens cuidadosas da peptidil-resina realizadas. Para investigar tal hipótese, foram promovidas metanólises do éster de oxima de Fmoc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR mediadas por Ca⁺² em diferentes condições. Esta peptidil-resina foi usada, pois apesar de o aminoácido N-terminal (Ile) ter sido incorporado à seqüência peptídica com o grupo α-amino protegido com Fmoc, sua síntese foi realizada usando-se somente a estratégia Boc, que dispensa o uso de piperidina (o grupo Boc é removível por tratamento com solução de TFA, item 1.2).

A primeira metanólise realizada com esta Fmoc-tripeptidil-KOR ocorreu em 20% MeOH/DMSO (V/V) a 50°C por 6 h, sendo o DMSO escolhido por ter sido o melhor solvente para metanólise de ligação oxima mediada por Ca^{+2} (**Tabela 3**) e por não conter aminas contaminantes que poderiam catalisar a remoção do Fmoc. O monitoramento por RP-HPLC e a análise por LC/ESI-MS da alíquota de 6 h (**Figura 5**) demonstraram que a metanólise forneceu não só o produto desejado, mas também o DBF e o subproduto Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe. Na ausência de Ca^{+2} , nenhum produto foi detectado em 6 h de incubação, o que sugere que a remoção de Fmoc verificada na incubação da Fmoc-peptidil-HMBA na ausência de aditivos (reação-controle) pode mesmo ter ocorrido devido a traços de piperidina usada durante a síntese. Por outro lado, ele indicou que os metais empregados, especialmente o Ca^{+2} , devem assistir a remoção do Fmoc, que forma com o grupo amino terminal da peptidil-HMBA uma ligação éster de uretana.

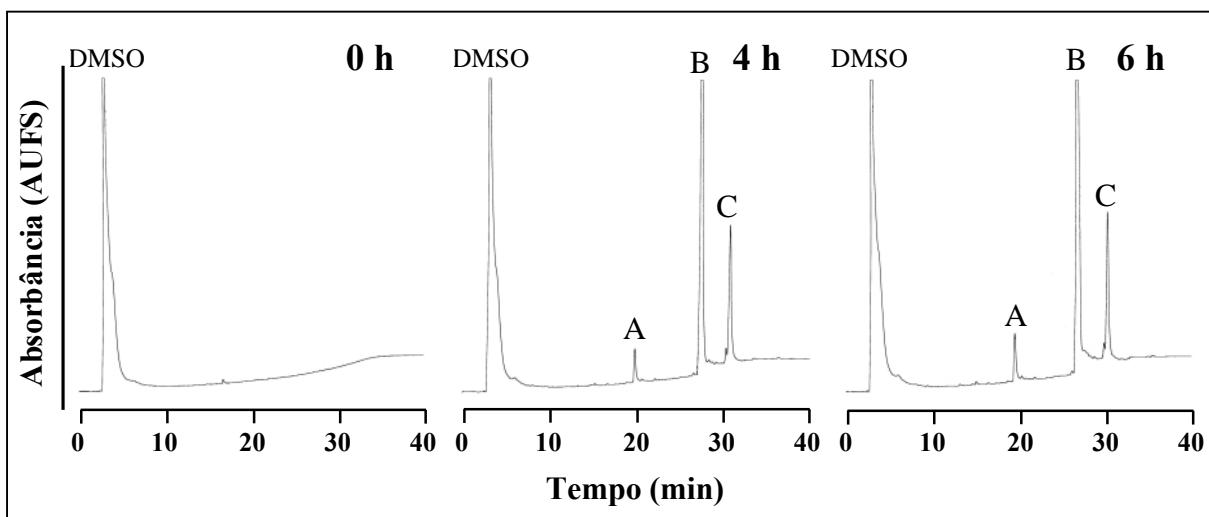


Figura 5. Perfis de RP-HPLC resultantes do monitoramento da reação de metanólise da ligação éster de oxima de Fmoc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR mediada por Ca^{+2} em 20% MeOH/DMSO a 50°C. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 90% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 220 nm (λ); 1,0 mL/min (fluxo); 5-95% B em 30 min (gradiente linear). A: Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe; ESI-MS [MH]⁺: 519,9 (encontrado), 519,6 (teórico). B: DBF; ESI-MS [MH]⁺: 179,0 (encontrado), 178,2 (teórico). C: Fmoc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe; ESI-MS [MH]⁺: 742,3 (encontrado), 742,9 (teórico).

Também foi promovida a reação usando DMF, o segundo melhor solvente para as metanólises da ligação éster de oxima mediadas por Ca^{+2} (**Tabela 3**). O monitoramento por

RP-HPLC e a análise por LC/ESI-MS da alíquota relativa a 6 h (**Figura 6**) indicaram que em 4 h a proporção entre as áreas dos picos correspondentes ao produto desejado e ao DBF era invertida em relação à obtida na reação de 4h em DMSO. O desligamento do peptídeo da resina também pareceu mais lento para a reação com DMF. Ao longo do tempo houve um aumento no pico relativo ao DBF no perfil cromatográfico com o concomitante surgimento do pico referente ao subproduto Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe. Portanto, relativamente à reação em DMSO, a reação com DMF foi mais lenta, mas forneceu o produto desejado em maior quantidade.

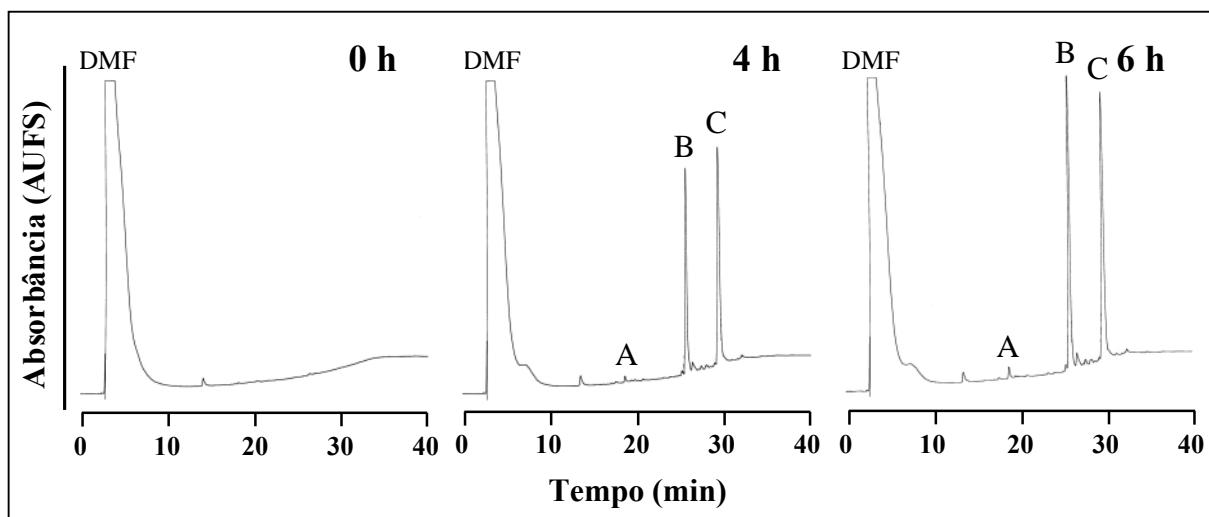


Figura 6. Perfis de RP-HPLC resultantes do monitoramento da reação de metanólise da ligação éster de oxima de Fmoc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR mediada por Ca^{+2} em 20% MeOH/DMF a 50°C. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 90% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 220 nm (λ); 1,0 mL/min (fluxo); 5-95% B em 30 min (gradiente linear). A: Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe; ESI-MS [MH]⁺: 519,9 (encontrado), 519,6 (teórico). B: DBF; ESI-MS [MH]⁺: 179,0 (encontrado), 178,2 (teórico). C: Fmoc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe; ESI-MS [MH]⁺: 742,3 (encontrado), 742,9 (teórico).

Foi promovida ainda uma metanólise em 50% DMF/TFE (V/V). O TFE foi escolhido como co-solvente devido ao sucesso do uso desse álcool para a minimização da remoção do Fmoc durante a condensação termodinamicamente controlada entre Fmoc-Ile-Ser-Asp-Arg-OH e Phe-NH₂ catalisada por tripsina (Liria e col., 1998). O monitoramento da metanólise por RP-HPLC e a análise por LC/ESI-MS da alíquota relativa a 6 h (**Figura 7**) demonstraram que em 2 h foram formados dois produtos majoritários no meio reacional: o peptídeo desejado e o

éster trifluoretílico do N^α-acil-peptídeo protegido (Fmoc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OTfe). Embora essa tenha sido uma reação secundária, a formação de tal subproduto mediada por Ca⁺² abriu uma nova perspectiva para o uso de nosso procedimento alternativo: a preparação de ésteres ativados de N^α-acil-peptídeos que possam ser utilizados como reagentes em síntese enzimática da ligação peptídica: de fato, o éster trifluoretílico de peptídeo é mais ativo que o metílico, por exemplo, podendo funcionar como um doador de acila mais eficiente em reações enzimáticas de formação de ligação peptídica cineticamente controladas (Miyazawa e col., 2001). Ao longo da reação, verificou-se realmente esta superioridade, pois o pico do cromatograma relativo ao éster trifluoretílico foi diminuindo, enquanto o correspondente ao produto de metanólise foi aumentando, sugerindo a ocorrência de transesterificação do éster trifluoretílico pelo metanol presente no meio reacional. Os resultados obtidos demonstraram ainda que a presença do TFE conferiu maior estabilidade ao grupo Fmoc, como desejado.

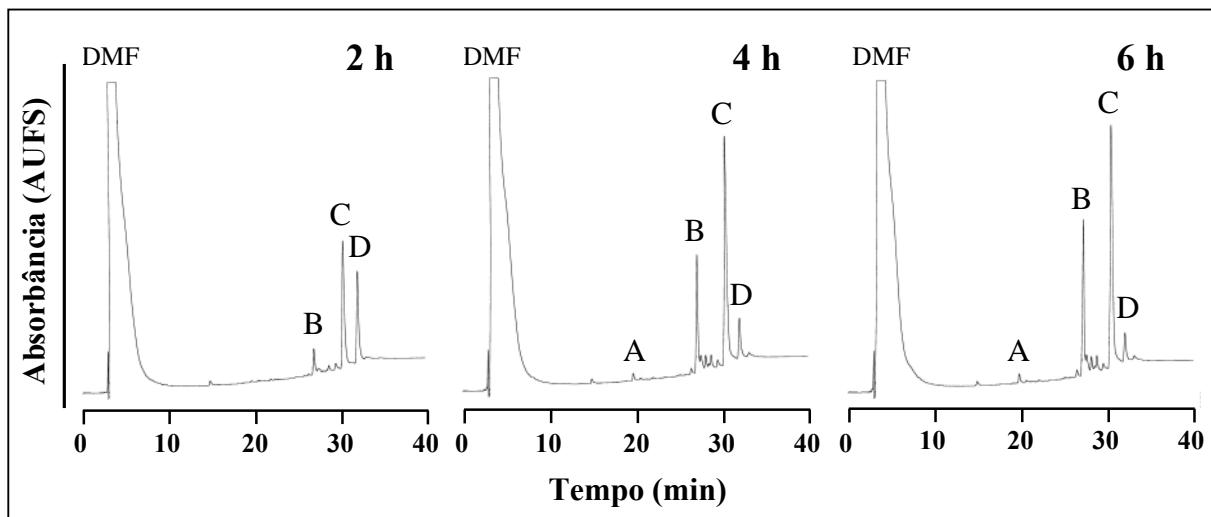


Figura 7. Perfis de RP-HPLC resultantes do monitoramento da reação de metanolise da ligação éster de oxima de Fmoc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR mediada por Ca⁺² em 20% MeOH/40% DMF/40% TFE (V/V/V) a 50°C. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 90% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 220 nm (λ); 1,0 mL/min (fluxo); 5-95% B em 30 min (gradiente linear). A: Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe; ESI-MS [MH]⁺: 520,4 (encontrado), 519,6 (teórico). B: DBF; ESI-MS [MH]⁺: 178,7 (encontrado), 178,2 (teórico). C: Fmoc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe; ESI-MS [MH]⁺: 742,6 (encontrado), 742,9 (teórico). D: Fmoc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OTfe; ESI-MS [MH]⁺: 810,6 (encontrado), 810,9 (teórico). O cromatograma referente a 0 h é idêntico ao da Figura 6.

Embora as reações tenham gerado mais de um produto, as porcentagens de desligamento obtidas nas metanólises da ligação oxima de Fmoc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR mediadas por Ca^{+2} a 50°C por 6 h foram calculadas e estão apresentadas a seguir:

Sistema de solvente (V/V)	Desligamento (%)	Produtos detectados por LC/ESI-MS
20% MeOH/DMSO (sem Ca^{+2})	10	—
20% MeOH/DMSO (com Ca^{+2})	88	Fmoc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe, Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe, DBF
20% MeOH/DMF	69	Fmoc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe, Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe, DBF
20% MeOH/40% DMF/40% TFE	86	Fmoc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe, Fmoc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OTf, Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe, DBF

Em resumo, verificou-se que na geração de N^{α} -acil-peptídeo protegido-OMe a partir de metanólise da ligação peptidil-resina de uma Fmoc-peptidil-resina catalisada por bases (procedimentos usuais) ou assistida por íons metálicos (nossa procedimento), a remoção parcial do Fmoc é inevitável. A observação de que o uso do sistema 20% MeOH/DMF na metanólise da Fmoc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR mediada por Ca^{+2} resultou num peptídeo bruto de melhor qualidade abre a perspectiva de adequação das condições reacionais de forma a minimizar tal reação secundária.

→ *Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-Wang*

Diante do exposto acima, somente o nosso procedimento alternativo foi usado nas metanólises da ligação peptidil-resina de Fmoc-peptidil-Wang sintetizada também pela estratégia Fmoc. Os resultados obtidos (**Tabela 6**) demonstraram que a remoção do grupo Fmoc ocorreu em todas as metanólises realizadas, inclusive naquelas realizadas na ausência de metal, neste caso, devido provavelmente à presença de traços de piperidina usada durante a síntese nas malhas do suporte polimérico. Em relação à desproteção indesejada, os íons demonstraram a seguinte ordem de eficiência: $\text{Cu}^{+2} \ll \text{Co}^{+2} < \text{Zn}^{+2} \ll \text{Ca}^{+2}$. Com respeito às

porcentagens de desligamento do peptídeo da resina, a mediação por Zn^{+2} foi a mais eficiente. Ainda assim, os longos tempos requeridos para atingir porcentagens razoáveis de desligamento do peptídeo desejado demonstraram que a resina Wang é menos adequada para a preparação de N^{α} -acil-peptídeo protegido-OMe do que a HMBA.

Tabela 6. Metanólises da ligação peptidil-resina de Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-Wang para a geração de Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OMe

Cátion	Sistema de solvente (V/V)	T (°C)	t (h)	Desligamento do peptídeo (%)	Relação produto desejado/subproduto ^a
—	20% MeOH/DMF	50	48	2	— ^b
—	20% MeOH/DMSO	60	48	8	— ^b
Cu^{+2}	20% MeOH/DMF	50	48	10	2
Ca^{+2}	20% MeOH/DMSO	60	48	12	— ^c
Co^{+2}	20% MeOH/DMF	50	48	16	0,2
Zn^{+2}	20% MeOH/DMF	50	48	68	0,1

^a Produto desejado: Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OMe {ESI-MS [MH]⁺: 682,1 (encontrado), 682,8 (teórico)}; subproduto: DBF {ESI-MS [MH]⁺: 179,0 (encontrado), 178,2 (teórico)}; a relação foi calculada a partir das áreas dos picos correspondentes a esses compostos nos perfis de RP-HPLC. ^b Apenas DBF foi detectado. ^c Apenas DBF e o subproduto Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OMe {ESI-MS [MH]⁺: 460,2 (encontrado), 459,6 (teórico)} foram detectados.

→Boc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OCHx)-PAM

Como os objetivos destes ensaios eram verificar se o nosso procedimento alternativo poderia ser utilizado no desligamento de N^{α} -acil-peptídeo protegido-OMe da resina PAM e comparar a mediação por metal com os procedimentos convencionais (catálise básica) usados no desligamento, o éster benzílico protetor da carboxila β de Asp foi substituído pelo cicloexílico, que é quimicamente mais estável (Tam e col., 1979). Contudo, os resultados obtidos (**Tabela 7**) revelaram a ocorrência de formação do subproduto de transesterificação Boc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OMe)-OMe em algumas das condições reacionais testadas. Eles demonstraram também que o desligamento do N^{α} -acil-peptídeo protegido-OMe é bastante lento, exceto para a condição reacional que emprega DBU como catalisador. Esta, na verdade, foi a melhor condição testada para a reação em questão.

Pôde-se verificar que os três cátions utilizados foram capazes de assistir a metanólise da ligação peptidil-resina de Boc-peptidil-PAM. Os íons Ca^{+2} e Cu^{+2} apresentaram comportamentos semelhantes, sendo menos eficientes do que DIPEA. A formação do Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OH na metanólise mediada por Cu^{+2} pode ser explicada pela presença de água no meio reacional oriunda da hidratação do sal de cobre utilizado. A mediação por Zn^{+2} , embora tenha promovido a formação do subproduto transesterificado, foi mais eficiente do que a catálise por DIPEA, sendo inferior somente à catálise por DBU, que por sua vez, resultou no desligamento quantitativo do peptídeo desejado da resina PAM em 3 h a 25°C, com a melhor relação produto desejado/subproduto. Foi verificado também, que inversamente ao Fmoc, o grupo protetor Boc se manteve estável nas condições reacionais empregadas.

Tabela 7. Metanólices da ligação peptidil-resina de Boc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-PAM para gerar Boc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe

Mediador	Sistema de solvente (V/V)	T (°C)	t (h)	Desligamento do peptídeo (%)	Relação produto desejado/subproduto ^a
Cu^{+2}	20% MeOH/DMF	50	48	45	— ^b
Ca^{+2}	20% MeOH/DMSO	60	48	56	— ^c
DIPEA	50% MeOH/DMF	25	48	69	— ^c
Zn^{+2}	20% MeOH/DMF	50	48	100	5
Zn^{+2}	20% MeOH/DMF	50	24	94	8
Zn^{+2}	50% MeOH/DMF	25	48	100	6
DBU	20% MeOH/DCM	25	18	100	6
DBU	20% MeOH/DCM	25	3	100	10

^a Produto desejado: Boc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe {ESI-MS [MH]⁺: 620,3 (encontrado), 620,8 (teórico)}, subproduto: Boc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OMe)-OMe {ESI-MS [MH]⁺: 552,3 (encontrado), 552,6 (teórico)}; a relação foi calculada a partir das áreas dos picos correspondentes a esses compostos nos perfis de RP-HPLC. ^b Boc-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OH {ESI-MS [MH]⁺: 606,2 (encontrado), 606,7 (teórico)} também foi detectado.

^c Nenhum subproduto foi detectado.

Neste ponto, algumas considerações merecem ser feitas: 1) a mediação por metal foi empregada com sucesso nas metanólices de todas as ligações peptidil-resinas propostas; 2) dentre as quatro resinas empregadas nesse estudo, a KOR se mostrou a mais adequada para a preparação de compostos do tipo N^{α} -acil-peptídeo protegido-OMe e dentre as resinas compatíveis com a estratégia Fmoc, a HMBA demonstrou ser a mais adequada para esse fim;

3) em relação à metanólise da ligação éster de oxima da Ac-peptidil-KOR, a catálise básica apresentou ligeira superioridade em relação à mediação por metais; dentre estes, o Ca^{+2} foi o mediador mais efetivo seguido de Zn^{+2} e Cu^{+2} , sendo estes três cátions mediadores muito mais eficientes do que Co^{+2} ; 4) com respeito à metanólise da ligação peptidil-resina da Fmoc-peptidil-HMBA, a mediação por Zn^{+2} foi o procedimento mais efetivo, sendo superior, inclusive, aos procedimentos convencionalmente usados.

4.2.2. Otimização da condição reacional para a metanólise da ligação oxima de Ac-peptidil-KOR mediada por metal

De posse de todos os resultados obtidos, a etapa seguinte do presente estudo envolveu o aprimoramento da condição reacional para a metanólise de ligação peptidil-KOR, visando, em última instância, a obtenção de compostos N^{α} -acil-peptídeo-OMe de boa qualidade, que possam ser empregados como doadores de acila em ensaios de condensação enzimática de fragmentos peptídicos. Para tanto, mais algumas condições foram estudadas usando agora a peptidil-resina Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR. Algumas incubações-controle na ausência de aditivos ou bases orgânicas foram também promovidas. Embora os resultados obtidos (**Tabela 8**) tivessem demonstrado, por exemplo, que a solução 20% MeOH/DMSO (V/V) contribuiu para a maior eficiência da mediação por Ca^{+2} (condições 8-10), o alto ponto de ebulição do DMSO (189°C) dificultou a sua remoção após a reação de desligamento do produto desejado. Assim, a solução 20% MeOH/DMF (V/V) foi escolhida (condições 11-13), tendo sido esta a segunda melhor mistura de solventes para as reações mediadas por Ca^{+2} apresentadas na **Tabela 3**. Em um teste previamente realizado com solução 20% MeOH/DMF (V/V), o DMF (p.e.: 153°C) pôde ser totalmente eliminado por evaporação rotatória sob pressão reduzida a 40°C.

Portanto, a mistura 50% MeOH/DMF (V/V) foi testada também em reações mediadas

pelos quatro íons metálicos estudados, com base nos bons resultados obtidos na mediação por Zn^{+2} da metanólise da ligação peptidil-HMBA conduzida neste sistema de solvente (item 4.2.1.c). Curiosamente, o aumento na porcentagem de MeOH acarretou a elevação da eficiência de metanólise da ligação éster de oxima principalmente quando o Ca^{+2} foi usado (condições 11-15) e, em menor grau, quando Zn^{+2} foi empregado (condições 17 e 18), mas conferiu efeito oposto na eficiência da mediação por Co^{+2} ou Cu^{+2} (condições 19-22).

Tabela 8. Metanólises da ligação éster de oxima de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR para gerar Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe

Condição	Mediator	Sistema de solvente (V/V)	T (°C)	t (h)	Desligamento do peptídeo (%)
1	—	20% MeOH/DMSO	60	4	17
2	—	20% MeOH/DCM	25	1	13
3	—	20% MeOH/DMF	50	10	13
4	—	20% MeOH/DMF	50	4	14
5	—	20% MeOH/DMF	50	2,5	13
6	—	50% MeOH/DMF	25	2	11
7	—	50% MeOH/DMF	50	1	11
8	Ca^{+2}	20% MeOH/DMSO	50	8	100
9	Ca^{+2}	20% MeOH/DMSO	60	4	100
10	Ca^{+2}	20% MeOH/DMSO	60	2	100
11	Ca^{+2}	20% MeOH/DMF	50	8	90
12	Ca^{+2}	20% MeOH/DMF	50	6	84
13	Ca^{+2}	20% MeOH/DMF	50	1,5	55
14	Ca^{+2}	50% MeOH/DMF	50	2	88
15	Ca^{+2}	50% MeOH/DMF	50	1	77
16	Zn^{+2}	20% MeOH/DMF	50	15	100
17	Zn^{+2}	20% MeOH/DMF	50	4	94
18	Zn^{+2}	50% MeOH/DMF	50	1	44
19	Co^{+2}	20% MeOH/DMF	50	10	79
20	Co^{+2}	50% MeOH/DMF	50	1	9
21	Cu^{+2}	20% MeOH/DMF	50	2,5	100
22	Cu^{+2}	50% MeOH/DMF	50	1	39
23	DBU	20% MeOH/DCM	25	1	100
24	DIPEA	50% MeOH/DMF	50	15	100
25	DIPEA	50% MeOH/DMF	25	2	100
26	TEA	50% MeOH/DMF	25	3	100
27	TEA	50% MeOH/DMF	25	2	100

Com relação aos procedimentos convencionais que empregam base como catalisador

para a metanólise em questão (condições 23-27 da **Tabela 8**), aquele usando DBU (Pichette e col., 1997) pareceu o mais eficiente, pois enquanto as catálises por TEA (Stewart e Young, 1984) e DIPEA (Mellor e col., 2000) a 25°C promoveram o desligamento quantitativo do peptídeo desejado em 2 h, a mediação por DBU forneceu o mesmo resultado em apenas 1 h.

A análise geral de todos os resultados permite concluir que, dentre as condições estudadas, a mais adequada para a obtenção de compostos do tipo N^α-acil-peptídeo protegido-OMe usando o nosso procedimento alternativo de mediação por metais foi a metanólise da ligação oxima de peptidil-KOR mediada por Ca⁺² em 50% MeOH/DMF (V/V) a 50°C.

Neste ponto é importante mencionar que embora a KOR seja compatível somente com a estratégia Boc, o que representa certa desvantagem em relação à resina 4-Fmoc-hidrazinobenzoil, por exemplo, o seu uso em nosso procedimento alternativo para a obtenção de N^α-acil-peptídeo-OMe não é limitado pela disponibilidade de um sistema de HF no laboratório, pois a desproteção total das cadeias laterais dos aminoácidos pode também ser obtida usando as misturas HBr-TFA (Stewart, 1997), ácido trifluormetanosulfônico (TFMSA)-TFA-dimetilsulfeto (Tam e col., 1986) e éster trimetilsilílico de TFMSA (TMSOTf)-tioanisol-TFA (Fujii e col., 1987). Além destas soluções, existem protetores de cadeias laterais que conferem proteção ortogonal, ou seja, estes grupos são estáveis em meios ácidos ou básicos e são seletivamente removíveis por mecanismos de clivagem alternativos (Albericio, 2000). Como exemplos desses grupos, temos: 1) alguns derivados do grupo benzil, como o grupo Z, por exemplo, que são removíveis por hidrogenação catalítica (Kawasaki e col., 1994); 2) os derivados de alil, para os quais o passo de desproteção envolve a transferência catalisada por paládio da unidade alílica para diferentes nucleófilos (“scavengers”) na presença de uma fonte de prótons (Guibe, 1998); 3) os derivados do *p*-nitrobenzil que podem ser clivados por agentes redutores, tais como Na₂S, Na₂S₂O₄ ou SnCl₂ em solventes orgânicos aquosos (Lammert e col., 1978; Guibe-Jampel e Wakselman, 1982;

Romanovskis e Spatola, 1998); 4) o protetor iNoc para grupos aminos removível por tratamento com pó de Zn em solução de ácido acético (Veber e col., 1977).

Além da comparação já realizada entre a mediação por Ca^{+2} e os procedimentos usuais que empregam catálise básica na síntese de ésteres de peptídeos protegidos a partir de peptidil-resinas correspondentes (Stewart e Young, 1984; Pichette e col., 1997; Mellor e col., 2000), faz-se também necessário comparar nosso procedimento alternativo com outros atualmente empregados na síntese de N^{α} -acil-peptídeo protegido-OR:

- Embora seja classificada como uma reação em solução assistida por resina (“PASP”, sigla em inglês), a esterificação de peptídeos usando resinas funcionalizadas com alquiltriazenos (item 1.4) constitui um procedimento passível de comparação. Segundo seus criadores, sínteses do tipo “PASP” combinam os méritos da síntese clássica com as vantagens da síntese em fase sólida, tais como a remoção de reagentes por filtração e a possibilidade de automação (Smerdka e col., 2004). Entretanto, os dados de esterificação assim obtidos demonstraram que este é um procedimento bastante trabalhoso e demorado. De fato, é relatado que a etapa de esterificação de peptídeos contendo de dois a quinze resíduos de aminoácidos (alguns com cadeias laterais reativas e devidamente protegidas) ocorreu em 6-8 h, mas a etapa de preparação da resina funcionalizada com o alquiltriazeno de interesse (metil, benzil ou alil) requereu de 27 h (partindo de 0,5 g de resina; Rademann e col., 2001) a 43,5 h (partindo de 10 g de resina; Smerdka e col., 2004).

- Em um procedimento mais similar ao proposto por nós, o uso da resina 4-Fmoc-hidrazinobenzoil (compatível com as estratégias Boc e Fmoc) demonstra uma praticidade significativamente maior do que a estratégia “PASP” citada anteriormente. A esterificação do peptídeo ocorre através do ataque do álcool apropriado ao intermediário ativo acil-diazeno obtido por oxidação “*in situ*” com $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ou em etapa anterior com *N*-bromosuccinimida (item 1.4). De fato, na síntese de Fmoc-Val-Phe-Gly-OMe, os tempos de

esterificação foram bastante razoáveis para ambos oxidantes: 2 h – sal de cobre e 3 h – NBS (após 5 min de oxidação prévia). Entretanto, as porcentagens de desligamento obtidas para esse tripeptídeo, que não contém aminoácidos com cadeias laterais que necessitem de proteção, foram de apenas 55% [$\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$] e 64% (NBS) (Peters e Waldmann, 2003). Na síntese de um peptídeo esterificado maior – Alloc-Gly-Cys(Pal)-Met-Gly-Leu-Pro-Cys(Far)-OMe (onde Pal = palmitoil e Far = farnesil) – a etapa de esterificação conduzida com $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ por 2 h forneceu o produto desejado bruto com 42% de rendimento (Brunsveld e col., 2006).

- O procedimento de obtenção de peptídeos protegidos esterificados através da aminólise da ligação peptidil-KOR por aminoácido esterificado catalisada por H_3CCOOH forneceu ésteres metílicos, etílicos e *t*-butílicos de peptídeos contendo até cinco resíduos de aminoácidos em 12-24 h com 100% de desligamento da resina (De Grado e Kaiser, 1980 e 1982), bem como ésteres guanidinofenílico e fenílico de hexa- e pentapeptídeos protegidos em 4h e 50 h, com rendimentos de 73% e 55%, respectivamente (Cerovsky e Bordusa, 2000).

Portanto, os dados acima descritos revelam que: 1) o nosso procedimento alternativo de mediação por Ca^{+2} da metanolise de ligação éster de oxima de peptidil-KOR é bastante competitivo, eficiente e de grande utilidade na obtenção de compostos do tipo N^α -acil-peptídeo protegido-OMe; 2) o presente trabalho contribuiu significativamente para o aprimoramento do nosso procedimento: por exemplo, enquanto a metanolise mediada por Ca^{+2} de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR conduzida em 20% MeOH/DCM a 37°C por 72 h fornecia 63% do peptídeo esterificado (Moraes e col., 2000), a mesma reação promovida em 20% MeOH/DMSO a 60°C por 2 h resultou no desligamento quantitativo do peptídeo desejado e em 50% MeOH/DMF a 50°C por 2 h permitiu a liberação do peptídeo esterificado bruto com 88% de rendimento (Proti e col., 2006; Proti e Miranda, 2007).

4.2.3. Preparação em maior escala de N^α-acil-peptídeo protegido-OMe na condição otimizada de metanólise da ligação éster de oxima de peptidil-KOR mediada por Ca⁺²

a) Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe

Foram promovidas três reações, cada qual com objetivos distintos: 1^a) determinar o rendimento de obtenção do Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe bruto em 2h de reação usando o nosso procedimento alternativo; 2^a) obter o peptídeo desejado em maior quantidade para proceder a sua caracterização química por análise de aminoácidos, espectrometria de massas e RMN de ¹H e o seu tratamento com HF para gerar Ac-Ile-Ser-Asp-OMe (composto a ser testado como doador de acila em ensaios de síntese enzimática da ligação peptídica); 3^a) avaliar o efeito da quantidade de Ca(CH₃COO)₂ na eficiência da mediação da metanólise em estudo.

No caso da 1^a *reação*, nenhuma alíquota foi retirada para monitoramento para que não houvesse perda do produto desejado. Após realizar as etapas descritas no item 3.2.3, a massa de material obtida foi de 13,21 mg, sendo que desse total 4,80 mg era de Ca(CH₃COO)₂ adicionado no início da reação. Após a pesagem, uma alíquota do material foi analisada por RP-HPLC para avaliação da qualidade do material bruto obtido. O perfil apresentado na **Figura 8** revelou a boa qualidade do Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe produzido na 1^a reação. A análise por LC/ESI-MS confirmou a sua identidade, mas não permitiu a atribuição dos subprodutos detectados. Admitindo que a porcentagem de desligamento do peptídeo da resina (88%) corresponesse apenas ao peptídeo desejado, considerando o valor de GS_{inicial} (0,32 mmol/g) e a massa de peptidil-KOR utilizada na reação (61,16 mg), a quantidade de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe obtida deveria ser 9,67 mg (100% de rendimento teórico). Como foram obtidos 8,41 mg de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe, o rendimento experimental foi de 87%. As diferenças em questão podem ser atribuídas às transferências de material que devem ter levado a pequenas perdas de massa.

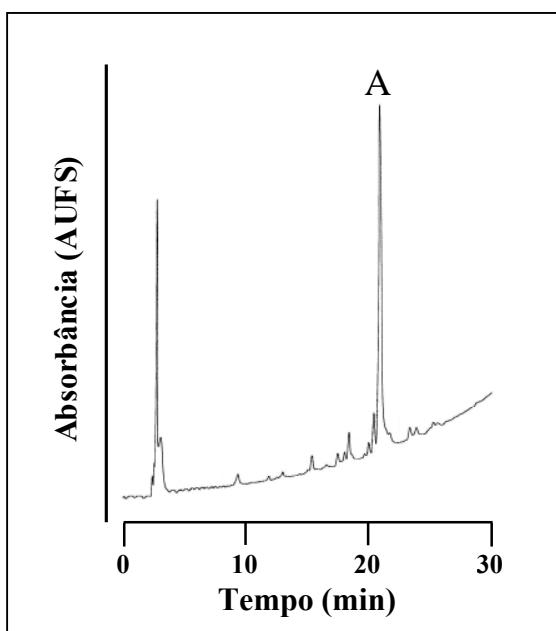


Figura 8. Perfil de RP-HPLC do material bruto obtido na metanólise da ligação oxima de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR mediada por Ca^{+2} em 50% MeOH/DMF a 50°C por 2 h. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 90% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 220 nm (λ); 1,0 mL/min (fluxo); 5-95% B em 30 min (gradiente linear). A: Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe; ESI-MS [MH]⁺: 562,2 (encontrado), 562,7 (teórico).

A 2^a reação ocorreu a partir da peptidil-KOR correspondente (843,25 mg) em 50% MeOH/DMF a 50°C por 4 h. O tempo reacional foi aumentado para maximizar a obtenção do produto desejado. A análise por RP-HPLC do peptídeo bruto obtido forneceu perfil similar ao apresentado na **Figura 8**. Após purificação em escala analítica (item 3.2.6), parte do material purificado foi reservada para caracterização e parte foi submetida ao tratamento com HF para remoção dos grupos protetores de Ser e Asp. As análises por RP-HPLC e LC/ESI-MS de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe e de Ac-Ile-Ser-Asp-OMe purificados (**Figura 9**) demonstraram que o nosso procedimento alternativo aliado ao tratamento com HF permitiram a obtenção do N^α-acil-peptídeo-OMe desejado com sucesso. As caracterizações químicas destes dois compostos por análise de aminoácidos, LC/ESI-MS e RMN de ¹H estão descritas nos itens 4.4.c e d.

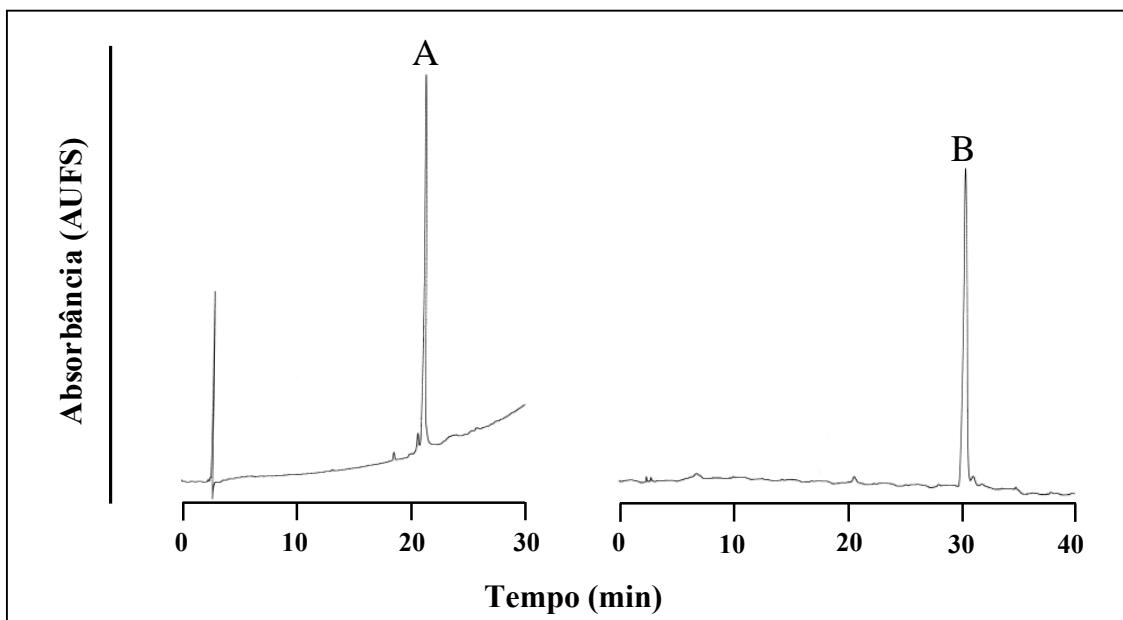


Figura 9. Perfis de RP-HPLC de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe e Ac-Ile-Ser-Asp-OMe purificados. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 90 e 10% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA, respectivamente (solventes B); 210 nm (λ); 1,0 mL/min (fluxo); 5-95% B em 30 min (gradiente linear). A: Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe; ESI-MS [MH]⁺: 562,2 (encontrado), 562,7 (teórico). B: Ac-Ile-Ser-Asp-OMe; ESI-MS [MH]⁺: 390,1 (encontrado), 390,4 (teórico).

O monitoramento por RP-HPLC da 3^a reação de metanólise da ligação éster de oxima de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR promovida com 1 eq. de Ca⁺² (ao invés de 2 eq.) e a análise por LC/ESI-MS da alíquota referente a 2 h (Figura 10) demonstraram que Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe foi obtido com boa qualidade e, aparentemente, com a mesma velocidade que na metanólise conduzida com 2 eq. de Ca⁺². As porcentagens de desligamento do peptídeo desejado da KOR apresentadas abaixo indicaram que nosso procedimento alternativo não demanda um excesso molar de íons Ca⁺²:

Quantidade de Ca(CH ₃ COO) ₂	Desligamento do peptídeo (%)
1 equivalente	84
2 equivalentes	88

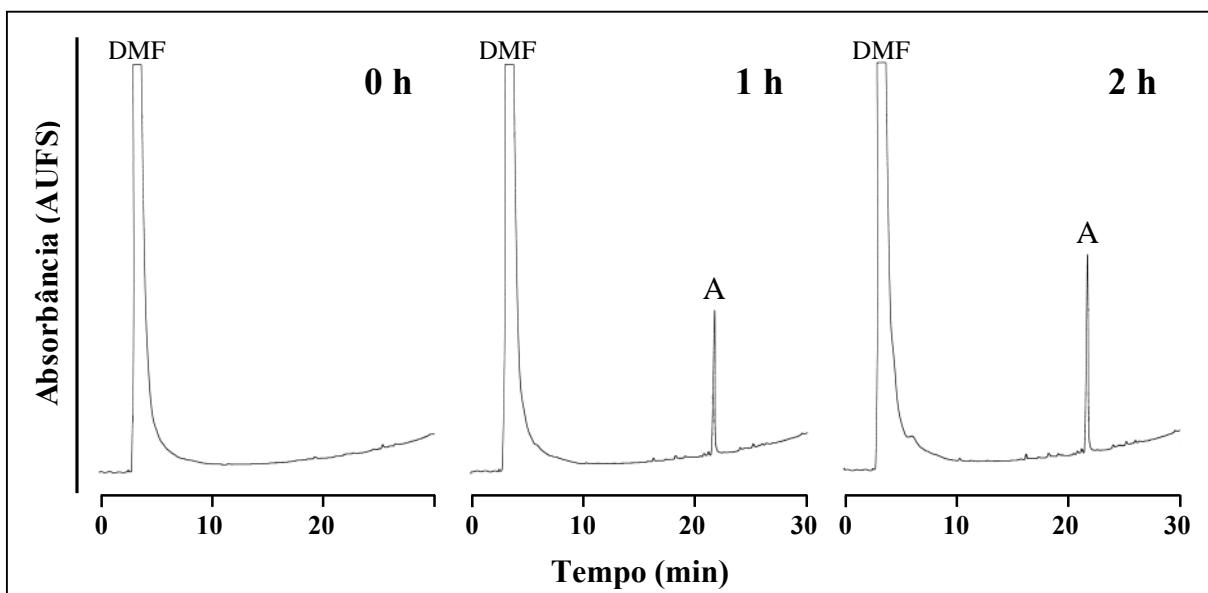


Figura 10. Perfis de RP-HPLC resultantes do monitoramento da reação de metanólise da ligação oxima de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR mediada por Ca^{+2} (1 eq.) em 50% MeOH/DMF a 50°C. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 90% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 220 nm (λ); 1,0 mL/min (fluxo); 5-95% B em 30 min (gradiente linear). A: Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe; ESI-MS [MH]⁺: 562,2 (encontrado), 562,7 (teórico).

b) Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(2ClZ)-OMe

Como citado anteriormente, um dos objetivos do presente trabalho era aprimorar nosso procedimento alternativo de mediação por metal da metanólise de ligação peptidil-resina para aplicá-lo na obtenção de N^α-acil-peptídeo protegido-OMe, precursor de N^α-acil-peptídeo-OMe, que por sua vez seria testado como doador de acila em reação de formação da ligação peptídica catalisada por esterases. Assim, além do fragmento 22-24 da CCK-33 (Ile-Ser-Asp), o heptapeptídeo correspondente à porção N-terminal do derivado acetilado do peptídeo antimicrobiano VesCP-M (Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-Leu-Leu-Ser-Gly-Leu-Leu-NH₂) também precisou ser obtido em quantidade suficiente para este estudo.

A metanólise do éster de oxima de 24,15 mg de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(2ClZ)-KOR foi permitida ocorrer por 6 h nas condições otimizadas anteriormente para a preparação de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe. O seu monitoramento por RP-HPLC a cada 2 h e a análise por LC/ESI-MS da alíquota referente a 6 h (**Figura 11**) revelaram que o produto desejado, Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(2ClZ)-OMe, foi obtido com boa qualidade

e que a metanólise atingiu o equilíbrio entre 2 e 4 h. A porcentagem de desligamento do peptídeo da KOR em 6 h de reação foi de 97%. Assim, ficou demonstrado que o nosso procedimento alternativo também pôde ser usado com sucesso na obtenção de um N^α-acil-heptapeptídeo protegido-OMe.

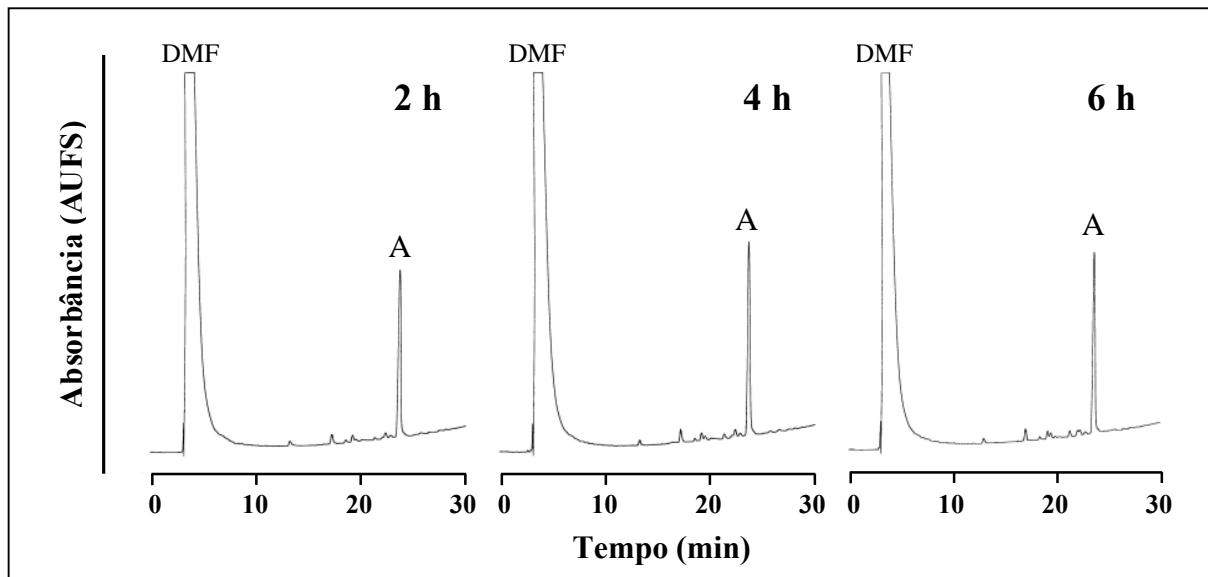


Figura 11. Perfis de RP-HPLC resultantes do monitoramento da reação de metanólise da ligação oxima de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(2ClZ)-KOR mediada por Ca⁺² em 50% MeOH/DMF a 50°C. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 90% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 220 nm (λ); 1,0 mL/min (fluxo); 5-95% B em 30 min (gradiente linear). A: Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(2ClZ)-OMe; ESI-MS [MH]⁺: 1011.7 (encontrado), 1011.7 (teórico).

Duas reações de 4 h em maior escala foram promovidas: uma usando 1 eq. de Ca⁺² em relação ao peptídeo (200,16 mg de peptidil-KOR) e outra com 2 eq. de Ca⁺² (199,44 mg de peptidil-KOR). Nenhuma alíquota foi retirada para monitoramento para evitar desperdício. As porcentagens de desligamento do peptídeo da KOR que estão apresentadas abaixo confirmam os dados descritos anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (Moraes e col., 2000) e para a metanólise de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR (item 4.2.3.a; Proti e Miranda, 2007): em condições experimentais apropriadas, a eficiência da reação de metanólise do éster de oxima de peptidil-KOR mediada por Ca⁺² não é dependente do excesso molar do metal:

Quantidade de Ca(CH ₃ COO) ₂	Desligamento do peptídeo (%)
1 equivalente	91
2 equivalentes	95

Durante o processo de extração com acetato de etila para eliminar o $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, houve a formação de três fases visíveis no funil de separação: a fase aquosa (camada inferior), sólido branco (camada intermediária) e fase orgânica um pouco turva (camada superior). O sólido branco, portanto, não foi solúvel em solução 5% $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$, H_2O ou acetato de etila. Mesmo assim, foi possível obtê-lo isento de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, já que a solubilidade deste é muito alta em água. A análise por RP-HPLC da solução correspondente à fase aquosa demonstrou a ausência do produto desejado, como esperado. O N^α -acil-peptídeo protegido-OMe foi então submetido ao tratamento com HF. Os perfis de RP-HPLC de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(2ClZ)-OMe e Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe e as análises por LC/ESI-MS (**Figura 12**) demonstraram que ambos foram obtidos com excelente qualidade. Suas caracterizações químicas por análise de aminoácidos e LC/ESI-MS estão descritas nos itens **4.4.h e i.**

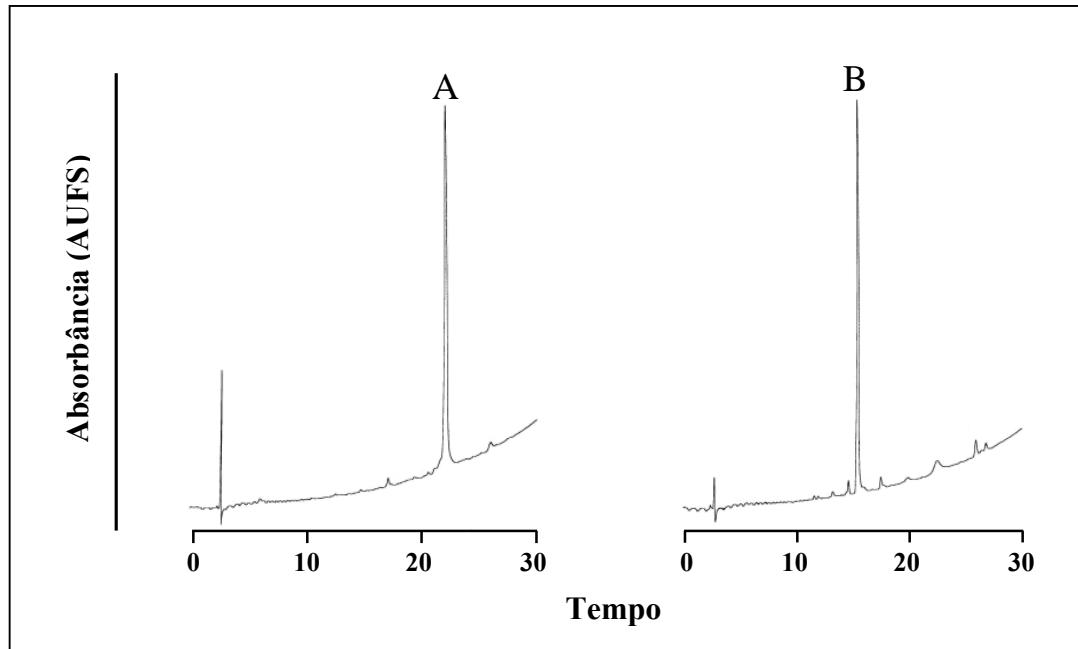


Figura 12. Perfis de RP-HPLC de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(2ClZ)-OMe e Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe brutos. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 90% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 220 nm (λ); 1,0 mL/min (fluxo); 5-95% B em 30 min (gradiente linear). A: Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(2ClZ)-OMe; ESI-MS [MH]⁺: 1011,7 (encontrado), 1011,7 (teórico). B: Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe; ESI-MS [MH]⁺: 843,6 (encontrado), 843,1 (teórico).

Admitindo que a porcentagem de desligamento do peptídeo da KOR na forma protegida, Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(2ClZ)-OMe, tenha sido a média entre os valores da tabela anterior (93%) e considerando os valores de GS_{inicial} (0,27 mmol/g) e da massa de peptidil-KOR utilizada na reação (399,60 mg), a quantidade esperada de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe gerada após tratamento com HF era de 84,59 mg. Como foram obtidos 63,44 mg, o rendimento do processo total foi de 75%.

4.2.4. Tentativa de investigação por espectroscopia Raman do mecanismo de mediação por metal da metanolise de ligação peptidil-KOR

Sabendo que o Ca⁺² é capaz de formar complexos com ligantes doadores de O (Lee, 1999) e considerando a comprovação experimental feita por intermédio de experimentos de RMN de ¹H de que a coordenação do Ca⁺² com oxigênios carbonílicos do peptídeo Moz-Asn-Leu-Gly-OEt facilita a transesterificação do éster etílico a metílico (Miranda e col., 1991a), a hipótese de que assistência por Ca⁺² da metanolise de ligação peptidil-resina ocorre via coordenação é bastante razoável.

Com vistas a tentar obter evidências espectroscópicas que corroborassem tal hipótese, foi empregada a espectroscopia Raman com transformada de Fourier (FT-Raman). Esta técnica pareceu adequada a este propósito, na medida em que vem sendo empregada no monitoramento de mudanças de estrutura secundária de peptídeos causadas por ligações com metal, seja em solução (Oku e col., 2007) ou em fase sólida (Stair e Holcombe, 2007). Além disso, a espectroscopia FT-Raman tem sido usada na caracterização de polímeros funcionalizados usados em síntese orgânica em fase sólida (Altava e col., 2001; Blakey e col., 2003; Fenniri e col., 2003) e no monitoramento de SPFS no sentido de acompanhar a eventual formação de folhas β nas cadeias peptídicas durante a SPFS (Larsen e col., 1993; Ryttersgaard e col., 1997; Hansen e col., 2002), as quais podem estar associadas à ocorrência

de agregação. Este é um dos problemas mais sérios da SPFS, pois devido a esse fenômeno, as etapas de acoplamento e/ou desproteção podem ser dificultadas ou, em alguns casos, impossibilitadas de serem cumpridas (Albericio e Carpino, 1997; Amblard e col., 2006).

Nos espectros Raman, os deslocamentos de número de onda ($\Delta\bar{v}$) de um grupo químico são idênticos aos respectivos números de onda (\bar{v} , comumente chamados de freqüência) nos espectros de infravermelho (Skoog e col., 2002). Devido a essa correspondência entre as duas espectroscopias, os valores de $\Delta\bar{v}$ foram atribuídos usando tabelas de \bar{v} de infravermelho (Nakanishi, 1962).

Com o intuito de identificar as bandas relativas aos ésteres de oxima e de cadeia lateral de Asp presentes em Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OR)-KOR (onde R = Bzl ou cHx), foram inicialmente registrados os espectros das seguintes amostras: KOR, Leu-KOR e Asp(OcHx)-KOR. Na **Figura 13** estão mostradas apenas as regiões de 1630 a 1730 cm^{-1} e 1700 e 1800 cm^{-1} , pois era esperado que as bandas relativas aos ésteres estivessem entre 1700 e 1800 cm^{-1} e a banda fraca correspondente ao estiramento da ligação C = N da KOR aparecesse próxima a 1660 cm^{-1} (Yan e col., 1999). Esta última banda estaria contida na região conhecida como amida I (1655-1680 cm^{-1}), cujo modo vibracional predominante é o estiramento C = O (Skoog e col., 2002).

Com respeito à interpretação dos espectros da **Figura 13**, as bandas fracas em 1664 e 1665 cm^{-1} referem-se provavelmente ao estiramento C = N citado. A banda em 1729 cm^{-1} deve corresponder ao estiramento C = O do éster cicloexílico protetor da cadeia lateral de Asp, já que nessa região nem KOR, nem Leu-KOR apresentaram banda. As bandas em 1773 e 1774 cm^{-1} devem ser relativas à carbonila do éster de oxima, uma vez que somente KOR não apresentou banda em tal região.

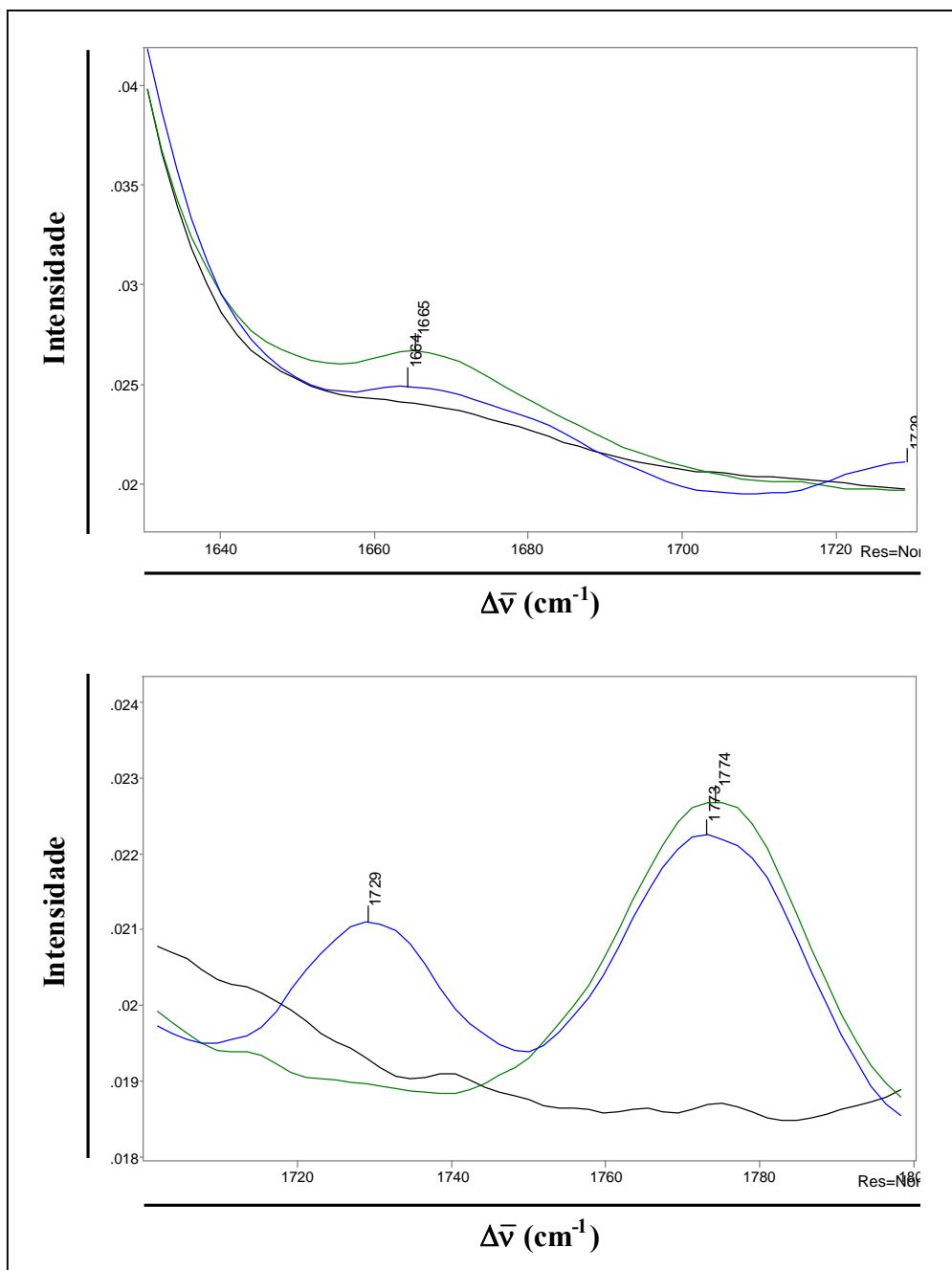


Figura 13. Espectros Raman não normalizados de: — KOR; — Leu-KOR; — Asp(OcHex)-KOR.

De posse deste conhecimento, foram registrados os espectros de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OR)-KOR (onde R = Bzl ou cHx) remanescentes de metanólises conduzidas na presença e na ausência de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$. As amostras preparadas segundo os procedimentos descritos no item 3.3.6 forneceram resultados similares (Figuras 14 e 15): não há deslocamentos significativos das bandas. Na região da carbonila do éster de oxima, onde eram esperadas

mudanças pelo fato do desligamento do peptídeo da KOR ocorrer através de metanolise da ligação éster de oxima, o deslocamento da banda foi de apenas 2 cm^{-1} . Estes resultados sugerem que a interação do metal com a peptidil-resina, embora efetiva em termos de mediação, seja relativamente fraca.

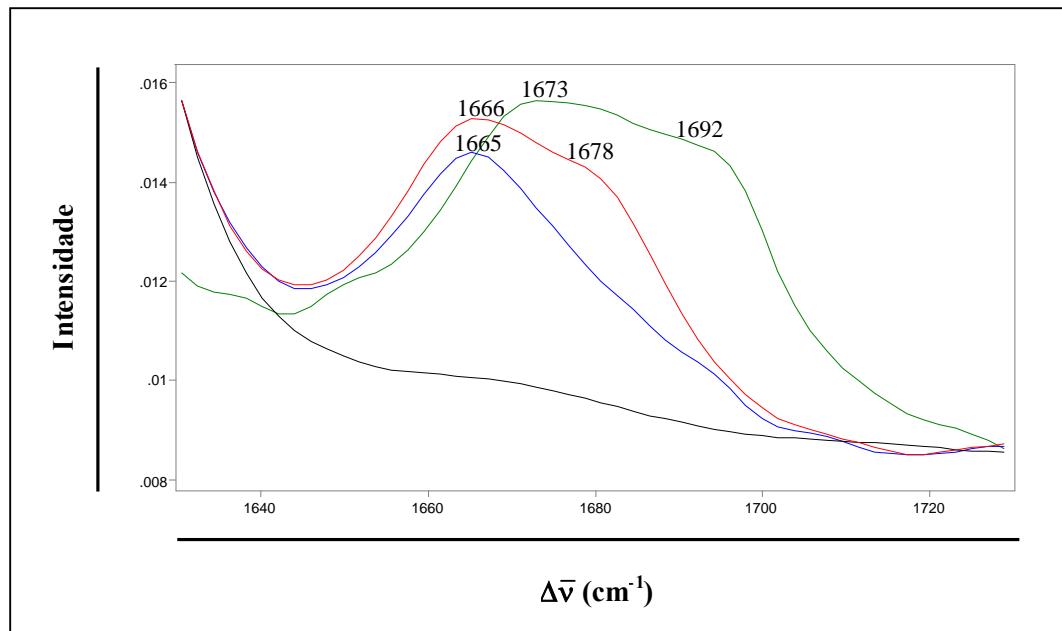


Figura 14. Espectros Raman não normalizados de: — KOR; — $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$; — Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-KOR remanescente de metanolise sem Ca^{+2} ; — Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-KOR remanescente de metanolise com Ca^{+2} .

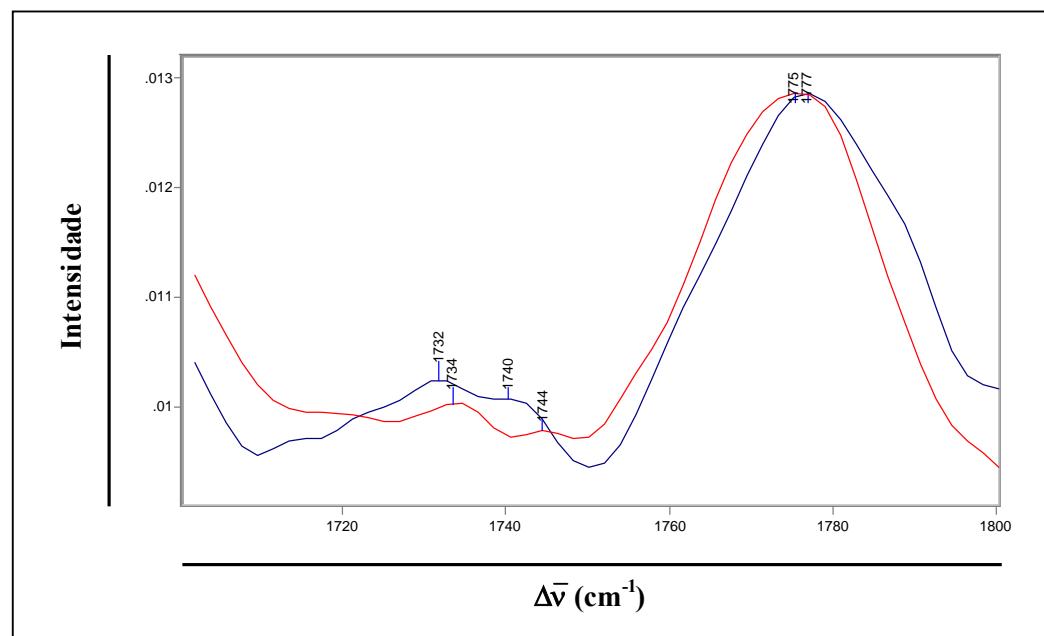


Figura 15. Espectros Raman não normalizados de: — Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR remanescente de metanolise sem Ca^{+2} ; — Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR remanescente de metanolise com Ca^{+2} .

4.2.5. Verificação da possibilidade de mediação por Ca⁺² da tiólise da ligação peptidil-KOR

Diante da importância dos peptídeos tioesterificados anteriormente mencionada e da suscetibilidade ao ataque de nucleófilos da ligação éster de oxima de peptidil-KOR, foram realizadas tentativas de geração desses compostos a partir de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR usando o nosso procedimento alternativo.

O primeiro tiol testado foi a benzilmercaptana. Tal escolha visou a obtenção de compostos do tipo N^α-acil-peptídeo protegido-SBzl, que são precursores de substratos enzimáticos (McRae e col., 1981; Powers e col., 2000) e de fragmentos empregados em sínteses convergentes de peptídeos e proteínas (Biancalana e col., 2001; Manabe e col., 2007). Foram realizadas três reações: uma com Ca(CH₃COO)₂, uma com ZnCl₂ e outra sem qualquer aditivo. Foi observada uma baixa solubilidade dos sais de Ca⁺² e Zn⁺² nos meios reacionais, principalmente a de Ca(CH₃COO)₂. Mesmo assim, as três reações foram acompanhadas por RP-HPLC por 24 h. Este monitoramento e as análises por LC/ESI-MS das alíquotas referentes a 24 h demonstraram que o produto desejado Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-SBzl foi obtido nas três reações [ESI-MS [MH]⁺: 654,8 (encontrado); 654,8 (teórico)] e que as velocidades das reações aparentemente seguiram a ordem: Zn⁺² < Ca⁺² < sem metal. Este resultado pode estar associado principalmente a dois fatores: 1) a baixa solubilidade dos sais nos meios reacionais, o que os tornou heterogêneos e dificultou a difusão do nucleófilo por entre as malhas da Ac-peptidil-KOR; 2) a propriedade apresentada pelo Zn⁺² de formar complexos com doadores de S (Lee e col., 1999), o que pode ter diminuído a disponibilidade de Zn⁺² livre no meio reacional.

Assim, duas novas reações usando *n*-butanotiol foram promovidas por 48 h: uma na ausência de aditivo e outra usando 1 eq. de Ca⁺² em relação ao peptídeo. Com essa alteração, além obviamente da mudança do tiol, a solubilidade do Ca(CH₃COO)₂ no meio reacional

aumentou significativamente. O monitoramento por RP-HPLC e as análises por LC/ESI-MS das alíquotas referentes a 48 h indicaram que a reação em presença de Ca^{+2} gerou mais Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-SBut [(ESI-MS $[\text{MH}]^+$: 620,6 (encontrado); 621,2 (teórico)] do que aquela realizada na ausência de aditivo.

Estas últimas observações foram inspiradoras para o teste com o tiol etil-3-mercaptopropionato [$\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{COOEt}$], pois o tipo de peptídeo tioesterificado correspondente é um dos mais empregados em sínteses químicas convergentes de peptídeos e proteínas em solução (Futaki e col., 1997; Ingenito e col., 1999; Quaderer e Hilvert, 2001; Kitagawa e col., 2004). Inicialmente, foram promovidas duas tiólises de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR com etil-3-mercaptopropionato: uma na ausência e outra na presença de Ca^{+2} usando 20% MeOH/DMF (V/V) a 60°C por 6 h. O monitoramento das reações por RP-HPLC e as análises por LC/ESI-MS demonstraram a ocorrência da mediação por Ca^{+2} da tiólise em estudo, para a qual o tempo necessário para estabelecimento do equilíbrio foi inferior a 6 h. As porcentagens de desligamento do peptídeo da resina em 6 h foram de 49% e 94% para as reações conduzidas na ausência e presença de Ca^{+2} , respectivamente.

Duas novas tiólises de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR com etil-3-mercaptopropionato mediadas por Ca^{+2} foram então realizadas reduzindo o tempo reacional para 2 h: uma em 20% MeOH/DMF a 60°C e outra em 50% MeOH/DMF a 50°C. Reações-controle sem $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ também foram promovidas. O monitoramento por RP-HPLC e as análises por LC/ESI-MS das alíquotas de 2 h (**Figura 16**) confirmaram a eficiência do metal como mediador da preparação de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-S(CH_2)₂COOEt e auxiliaram na identificação do principal subproduto formado no meio reacional: o dímero do tiol, também gerado quando etil-2-mercaptopropionato foi incubado com $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ em DMF a 60°C na ausência da peptidil-KOR. Descritas a seguir, as porcentagens de desligamento obtidas em 2 h indicaram que as duas condições usadas foram apropriadas:

Mediator	Sistema de solvente (V/V)	T (°C)	Desligamento do peptídeo (%)
Ca^{+2}	20% MeOH/DMF	60	28
	20% MeOH/DMSO	60	93
Ca^{+2}	20% MeOH/DMSO	50	53
	20% MeOH/DMF	50	92

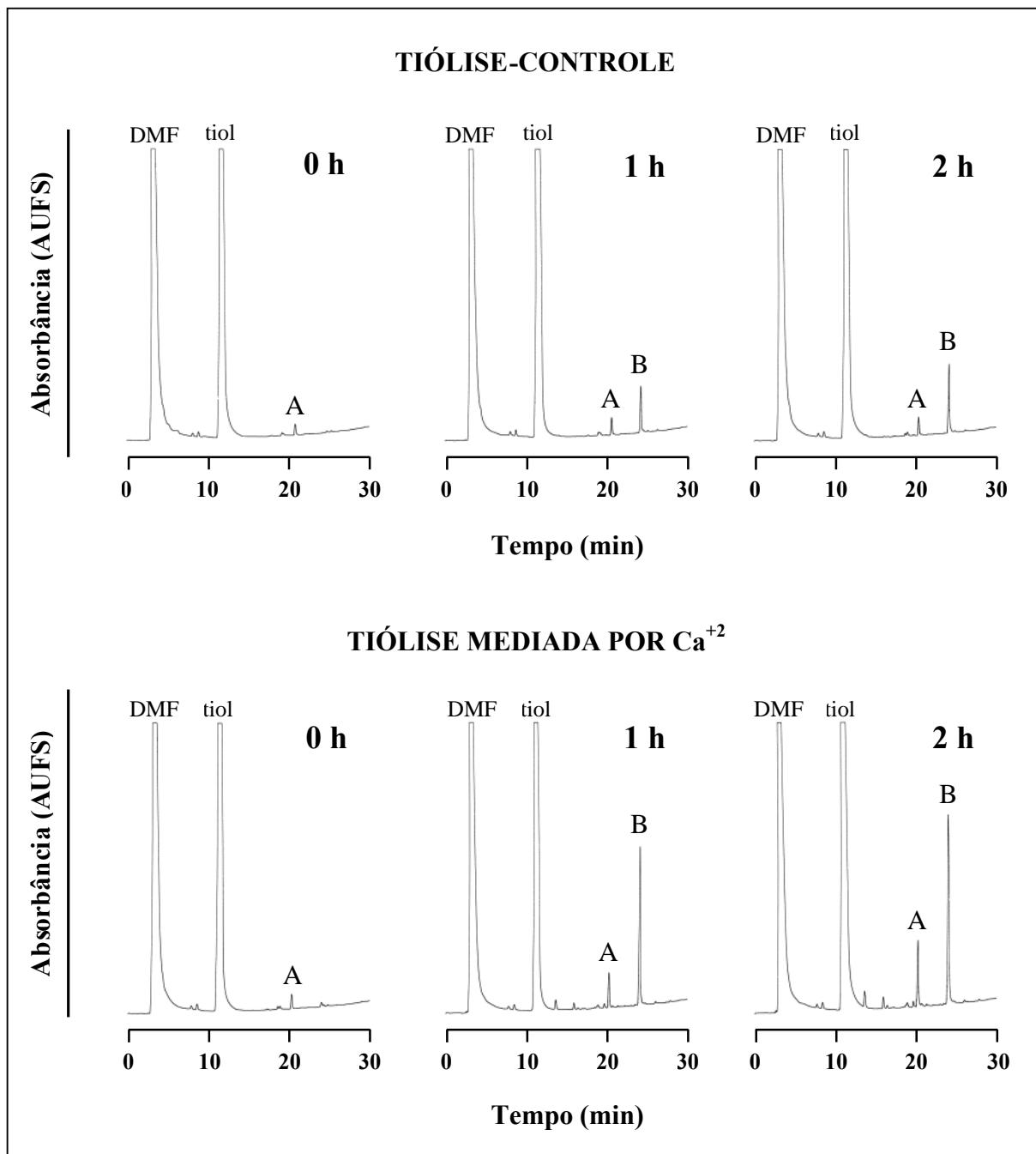


Figura 16. Perfis de RP-HPLC resultantes do monitoramento da reação de tiólise da ligação oxima de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR em 50% etil-3-mercaptopropionato/DMF a 50°C. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 90% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 220 nm (λ); 1,0 mL/min (fluxo); 5-95% B em 30 min (gradiente linear). A: EtOOC(CH₂)₂S-S(CH₂)₂COOEt; ESI-MS [MH]⁺: 266,9 (encontrado), 266,4 (teórico). B: Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-S(CH₂)₂COOEt; ESI-MS [MH]⁺: 664,6 (encontrado), 664,8 (teórico).

Na tentativa de eliminar simultaneamente o tiol e o Ca(CH₃COO)₂, foi promovida a eluição da solução reacional final por uma coluna Sep-Pak C₁₈ (item 3.2.3). As análises por RP-HPLC de todas as frações obtidas e por LC/ESI-MS da fração eluída com solução 80% ACN/H₂O (V/V) contendo 0,09% de TFA demonstraram que a remoção do tiol em excesso foi bem sucedida, restando apenas o dímero do tiol como contaminante do peptídeo desejado. A presença deste composto não afetou a etapa posterior de desproteção das cadeias laterais de Asp e Ser por tratamento com HF (discutido a seguir). Por outro lado, a formação de tal contaminante poderia ser minimizada se o procedimento de tiólise fosse realizado em atmosfera inerte, o que não seria possível, por exemplo, no procedimento que emprega condições oxidantes com a resina 4-Fmoc-hidrazinobenzoil para a geração do peptídeo protegido tioesterificado (item 1.5; Camarero e col., 2004).

A caracterização química por análise de aminoácidos, LC/ESI-MS e RMN de ¹H do Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-S(CH₂)₂COOEt purificado está apresentada no item 4.4.e.

A relevância dos resultados obtidos se torna evidente se considerados os procedimentos atualmente empregados na síntese de N^α-acil-peptídeo protegido-SR similares ao estudo por nós, que estão apresentados a seguir.

Em termos de estratégia Boc, os tioésteres obtidos geralmente são dos tipos: peptídeo-S(CH₂)₂CONH₂, -S(CH₂)₂CO-Leu-OH ou -S(CH₂)₂CO-Leu-NH₂ (Hackeng e col., 1999; Hojo e col., 2001; Kawakami e col., 2001; Haginoya e col., 2006). Estes compostos são sintetizados através da tioesterificação inicial de Boc-aminoácido-OH com HS(CH₂)₂COOH, seguida da incorporação deste tioéster à resina MBHA (ou PAM), alongamento da cadeia peptídica e tratamento final com HF (item 1.5). Assim, os peptídeos tioesterificados produzidos através desta estratégia possuem as cadeias laterais totalmente desprotegidas. Existem apenas dois relatos de obtenção de N^α-acil-peptídeo protegido-SRs fazendo uso da KOR: a aminólise de ligação éster de oxima de Boc-Trp-Ile-Ile-Leu-KOR com Gly-S(CH₂)₂COOH catalisada por

H_3CCOOH (Cerovsky e Bordusa, 2000) e a tiólise da ligação oxima de Ac-Ala-Gly-Lys(2ClZ)-KOR com etanotiol mediada por Ca^{+2} (Moraes e col., 2000). A característica comum às duas reações foi o longo tempo requerido: 50 e 75 h, respectivamente.

Com respeito à estratégia Fmoc, no procedimento que envolve a resina 2-clorotritil, a síntese do peptídeo protegido tioesterificado ocorre em duas etapas: **1)** desligamento do peptídeo protegido com carboxila livre usando solução ácida diluída (0,5-2 h); **2)** tioesterificação da carboxila terminal do peptídeo protegido usando reagentes acopladores (item 1.5). Nos trabalhos envolvendo o tiol $\text{HS(CH}_2)_2\text{COOEt}$, a etapa 2 demandou grandes excessos de acopladores e longos tempos de reação: 20 eq. de DIC, temperatura ambiente, 48 h ou 10 eq. de EDC, 4°C, 12 h (Futaki e col., 1999) ou 15 eq. de EDC e 15 eq. de HOBt, 4°C, 20 h (Kitagawa e col., 2004). Embora o uso de apenas 3 eq. de PyBOP tenha levado a uma redução de 75% no tempo de tioesterificação de um peptídeo totalmente protegido com *p*-acetamidotiofenol, tal acoplador não foi tão eficiente quando o $\text{HS(CH}_2)_2\text{COOEt}$ foi usado (von Eggelkrau-Gottanka e col., 2003).

Os procedimentos que fazem uso das resinas 4-Fmoc-hidrazinobenzoil e 4-sulfamilbutiril aminometil (também compatíveis com a estratégia Fmoc) são similares ao nosso por envolver o desligamento do peptídeo já na forma tioesterificada. Com respeito à primeira (item 1.4), apenas peptídeos protegidos na forma de etiltioéster foram sintetizados. Neste caso, tanto a etapa de formação do intermediário ativo acil diazeno (oxidação) quanto a da aminólise com aminoácido tioesterificado foram bastante rápidas (10 e 30 min, respectivamente), porém, a preparação prévia do aminoácido tioesterificado com HSCH_2CH_3 demandou cerca de 7 h (Camarero e col., 2004).

No procedimento que emprega a resina 4-sulfamilbutiril aminometil, a síntese do peptídeo protegido tioesterificado também é feita em duas etapas: **1)** ativação da ligação estabelecida entre peptídeo e resina; **2)** tiólise desta ligação com o tiol de interesse (item 1.5).

Nos trabalhos envolvendo o tiol $\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{COOEt}$, os tempos requeridos nas etapas de ativação variaram com a natureza do ativador usado: iodoacetonitrila, 24 h; trimetilsilildiazometano, 2-3 h. Porém, em ambos os casos, as etapas de tiólise foram bastante lentas: 24 h (Ingenito e col., 1999; Quaderer e Hilvert, 2001). O procedimento de tioesterificação com benzilmercaptana usando iodoacetonitrila como ativador se mostrou tão lento quanto os anteriormente citados (Harris e col., 2007).

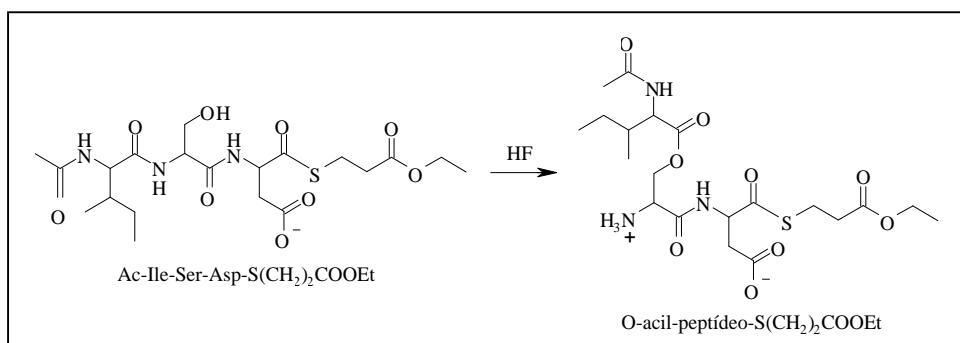
Portanto, o nosso procedimento alternativo de mediação por Ca^{+2} da tiólise da ligação éster de oxima de peptidil-KOR usando $\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{COOEt}$ demonstrou ser bastante competitivo, eficiente e útil (Proti e Miranda, 2007). Com relação ao uso dos outros tióis testados, são necessários estudos sobre os parâmetros reacionais como, por exemplo, a quantidade mínima de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ necessária para a mediação da tiólise e que não comprometa a homogeneidade do meio reacional.

4.2.6. Preparação de Ac-Ile-Ser-Asp-S(CH_2)₂COOEt a partir de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-S(CH_2)₂COOEt

Para serem empregados em sínteses químicas convergentes em solução, os peptídeos tioesterificados devem estar na forma peptídeo-SR (“native chemical ligation”; Dawson e col., 1994), N^α -acil-peptídeo parcialmente protegido-SR (ativação do tioéster com AgNO_3 e N-hidroxisuccinimida; Blake e col., 1986) ou N^α -acil-peptídeo-SRs (condensações de fragmentos peptídicos catalisadas por proteases; Wehofsky e col., 2003).

Para verificar se nosso procedimento alternativo de mediação por Ca^{+2} seria compatível com a preparação de compostos do tipo N^α -acil-peptídeo-SR, o tioéster Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-S(CH_2)₂COOEt obtido anteriormente deveria ter as cadeias laterais de Ser e Asp desprotegidas por tratamento com HF. Assim, após a etapa de remoção do excesso de tiol e do sal de cálcio em cartucho Sep-Pak C₁₈, o Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-

$\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{COOEt}$, contendo o dímero do tiol como contaminante, foi tratado com HF. As análises por RP-HPLC e LC/ESI-MS do material proveniente desta reação (**Figura 17**) demonstraram que, como era esperado, o tioéster foi estável ao ácido e que o dímero do tiol não interferiu na reação de desproteção e nem foi detectado na solução que continha Ac-Ile-Ser-Asp- $\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{COOEt}$, tendo sido provavelmente extraído na fase etérea na etapa final de precipitação do peptídeo após remoção total do HF. Também foi identificado um isômero do produto desejado, cuja formação poderia estar associada à enantiomerização ocorrida ou no desligamento do peptídeo ou durante a síntese da peptidil-KOR. Há duas hipóteses que explicariam por que esse isômero não havia sido detectado antes do tratamento com HF: 1) a presença dos protetores de cadeias laterais de Ser e Asp ter contribuído para que as hidrofobicidades do peptídeo desejado e do isômero fossem parecidas e, por isso, a separação cromatográfica só tenha ocorrido quando ambos perderam seus grupos protetores; 2) o isômero ter sido formado não antes, mas durante o tratamento com HF, em uma reação secundária conhecida como “N-O shift”, que decorre da migração intramolecular do grupo acila da ligação peptídica para o grupo hidroxila de Ser na presença de ácidos fortes anidros (Stewart e Young, 1984):



Embora esta reação secundária possa ser revertida pelo tratamento do O-acyl-peptídeo com solução básica aquosa (Stewart e Young, 1984), este procedimento não pôde ser realizado devido à conhecida labilidade dos tioésteres a bases (Li e col., 1998).

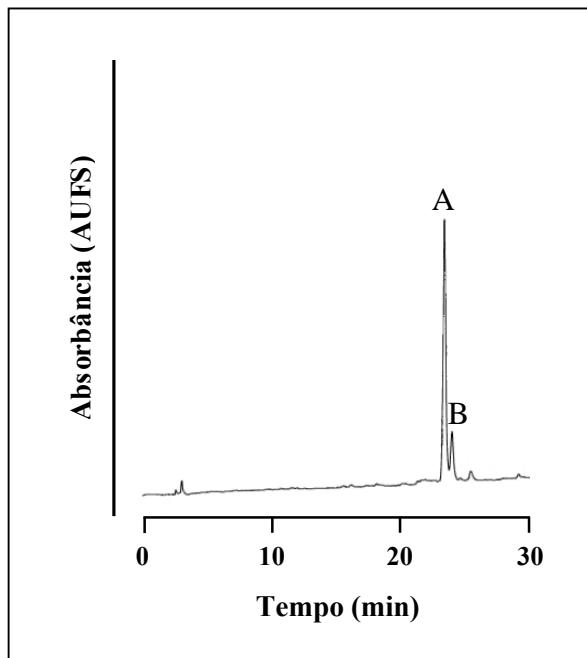


Figura 17. Perfil de RP-HPLC de Ac-Ile-Ser-Asp-S(CH₂)₂COOEt bruto. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 40% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 220 nm (λ); 1,0 mL/min (fluxo); 5-95% B em 30 min (gradiente linear). A: Ac-Ile-Ser-Asp-S(CH₂)₂COOEt; ESI-MS [MH]⁺: 492,3 (encontrado), 492,6 (teórico). B: isômero de A (provável subproduto resultante de “N-O shift”) ESI-MS [MH]⁺: 492,2 (encontrado), 492,6 (teórico).

A caracterização química por análise de aminoácidos, LC/ESI-MS e RMN de ¹H do Ac-Ile-Ser-Asp-S(CH₂)₂COOEt purificado está apresentada no item 4.4.f.

4.2.7. Verificação da possibilidade de mediação por Ca⁺² da alcoólise da ligação Z-Ala-KOR

Como citado na Introdução, compostos do tipo N^α-acil-aminoácido-OR são de grande interesse na Bioquímica e, em particular, na Química de Peptídeos, pois podem atuar, por exemplo, como doadores de acila em sínteses enzimáticas cineticamente controladas. Como nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo projetos enfocando a síntese de dipeptídeos catalisadas por lipases (Liria e Miranda, 2001; Liria e col., 2002; Liria, 2004; Liria e Miranda, 2007), foi investigada a possibilidade de usar o procedimento alternativo de mediação por Ca⁺² da alcoólise de ligação aminoacil-KOR para a preparação de Z-Ala-OR (onde R = Me ou Bzl), que seriam testados como doadores de acila em sínteses biocatalisadas dos precursores

do dipeptídeo amargo Z-Ala-Phe-OH (Trusek-Holownia, 2003).

Foram promovidas duas alcoólises de Z-Ala-KOR mediadas por Ca^{+2} em 50% álcool/DMF a 50°C: uma com metanol e outra com álcool benzílico. Os perfis de RP-HPLC correspondentes ao monitoramento das duas reações e as análises por LC/ESI-MS (Figuras 18 e 19) demonstraram que em cada uma delas, foi produzido apenas o éster desejado.

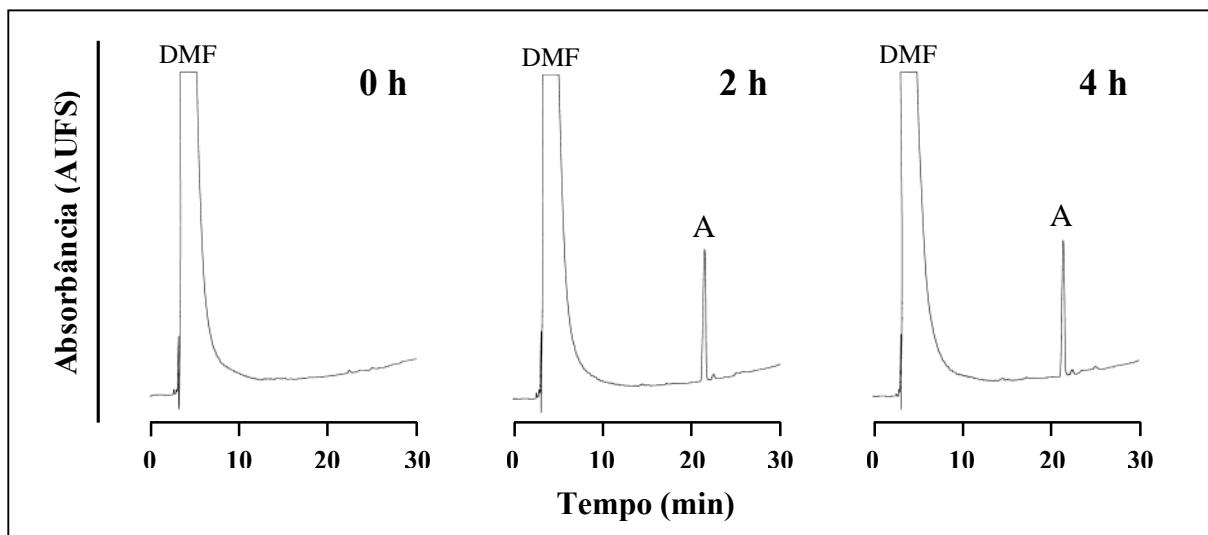


Figura 18. Perfis de RP-HPLC resultantes do monitoramento da metanólise da ligação oxima de Z-Ala-KOR mediada por Ca^{+2} em 50% MeOH/DMF a 50°C. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna), 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 60% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 220 nm (λ); 1,0 mL/min (fluxo); 5-95% B em 30 min (gradiente linear). A: Z-Ala-OMe; ESI-MS [MH]⁺: 238,4 (encontrado), 238,3 (teórico).

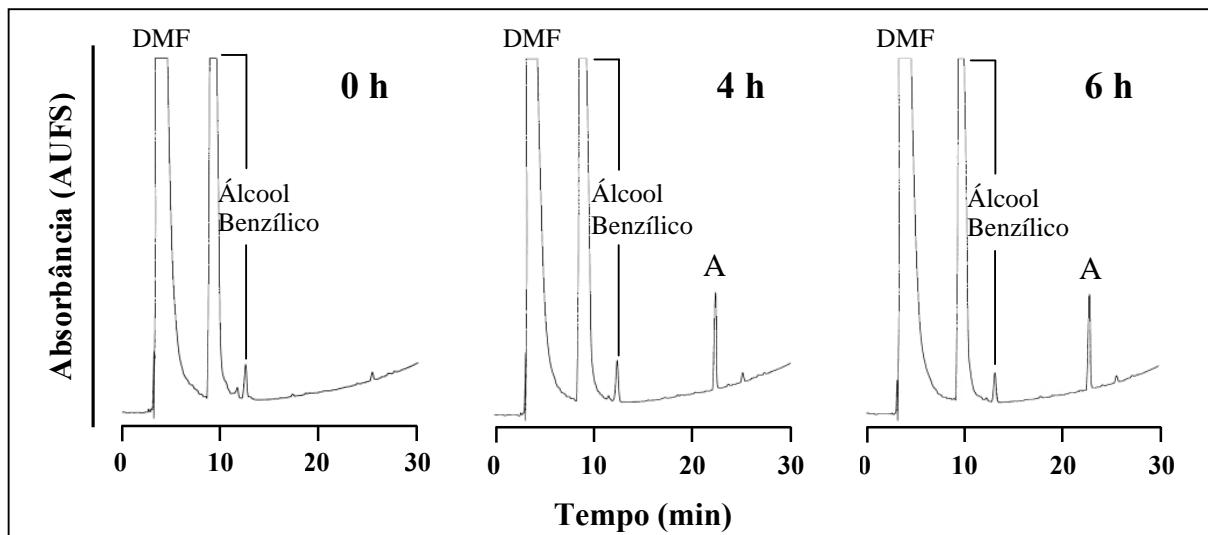


Figura 19. Perfis de RP-HPLC resultantes do monitoramento da benzólise da ligação oxima de Z-Ala-KOR mediada por Ca^{+2} em 50% álcool benzílico/DMF a 50°C. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna), 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 90% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 220 nm (λ); 1,0 mL/min (fluxo); 5-95% B em 30 min (gradiente linear). A: Z-Ala-OBzl; ESI-MS [MH]⁺: 314,1 (encontrado), 314,4 (teórico).

Os rendimentos de desligamento de Z-Ala-OR da resina e os tempos de cada reação foram os seguintes:

Álcool utilizado	Tempo de alcoólise (h)	Desligamento do Z-Ala-OR (%)
Metanol	4	99
Álcool benzílico	6	65

Tais porcentagens são coerentes com as nucleofilicidades relativas dos álcoois utilizados: a eficiência da benzólise dessa ligação é inferior a da metanólise. Pelos perfis apresentados nas **Figuras 18 e 19**, os tempos necessários para os equilíbrios das reações de metanólise e de benzólise serem atingidos parecem ser de 2 e 4 h, respectivamente. As caracterizações químicas por LC/ESI-MS e RMN de ^1H de Z-Ala-OMe e Z-Ala-OBzl purificados estão apresentadas nos itens **4.4.a e b**.

Assim, foi comprovada a utilidade da mediação por Ca^{+2} também para a alcoólise da ligação aminoacil-KOR, possibilitando a geração de Z-Ala-OMe e Z-Ala-OBzl. Embora o nosso procedimento alternativo envolva duas etapas, sendo a primeira a síntese da aminoacil-KOR e a segunda a alcoólise da ligação éster de oxima, ele apresenta a vantagem de empregar condições reacionais mais brandas, em relação aos demais métodos químicos de síntese de derivados esterificados de aminoácidos.

Em termos de eficiência, pode-se comparar o nosso procedimento alternativo para a obtenção, por exemplo, de Z-Ala-OMe com outros métodos químicos de geração deste éster a partir de Z-Ala-OH, que fazem uso de reagentes acopladores específicos. A carbodiimida BDDC, por exemplo, permitiu a obtenção de Z-Ala-OMe em 16 h com 93% de rendimento à temperatura ambiente (Gibson e col., 1994). O uso de derivados de quinolina e isoquinolina forneceu resultados similares: Z-Ala-OMe foi obtido “overnight” com 80% de rendimento empregando EEDQ (Zacharie e col., 1995) e em 20 h com 86% de rendimento utilizando BBDI (Saito e col., 2005), ambos à temperatura ambiente. Usando TsCl e *N*-metilimidazol a

-38°C, Wakasugi e colaboradores obtiveram Z-Ala-OMe com 89% de rendimento em 2,5 h (Wakasugi e col., 2003). Nossa procedimento alternativo demonstrou, portanto, ser competitivo em relação àqueles que empregam reagentes químicos ativadores (Proti e Miranda, 2007). Além do $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ser mais barato do que os reagentes descritos acima, teoricamente a KOR pode ser reaproveitada após desligamento do aminoácido esterificado, o que tornaria o procedimento ainda mais atraente do ponto de vista econômico.

Para eliminar o $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ usado na metanólise de Z-Ala-KOR foi realizada a extração com acetato de etila e água (item 3.2.3), operação essa realizada em diversos trabalhos para a recuperação de Z-Ala-OMe do meio reacional (Gibson e col., 1994; Zacharie e col., 1995; Saito e col., 2005). Para verificar a extensão da perda do produto desejado na fase aquosa, foram feitas análises por RP-HPLC e LC/ESI-MS das amostras liofilizadas correspondentes à fase aquosa e à fase orgânica (Figura 20). As análises demonstraram que a primeira continha um pouco de Z-Ala-OMe, provavelmente devido à pequena solubilidade deste éster em água, bem como Z-Ala-OH, possivelmente oriundo da hidrólise do éster metílico de Z-Ala-OMe mediada por Ca^{+2} . A amostra referente à fase orgânica demonstrou conter apenas o produto desejado, indicando que a operação simples de extração com acetato de etila, além de bem sucedida, foi compatível com nosso procedimento alternativo de geração de Z-Ala-OMe.

4.3. Estudo da aplicabilidade dos compostos Ac-peptídeo-OMe obtidos em sínteses da ligação peptídica biocatalisadas

4.3.1. Caracterização de preparações comerciais de lipase de pâncreas suíno

Sabendo que a cPPL que vem sendo usada com sucesso em nosso laboratório na síntese de dipeptídeos é uma preparação enzimática bruta, que contém PPL, α -quimotripsina, tripsina, carboxipeptidases A e B (Liria e Miranda, 2001 e 2002; Liria, 2004; Liria e Miranda,

2007), outras duas lipases comerciais foram analisadas por PAGE-SDS: uma vendida como purificada e padronizada (pPPL) e outra, como livre de diastase, ou seja, de α e β -amilases (PPL-DF).

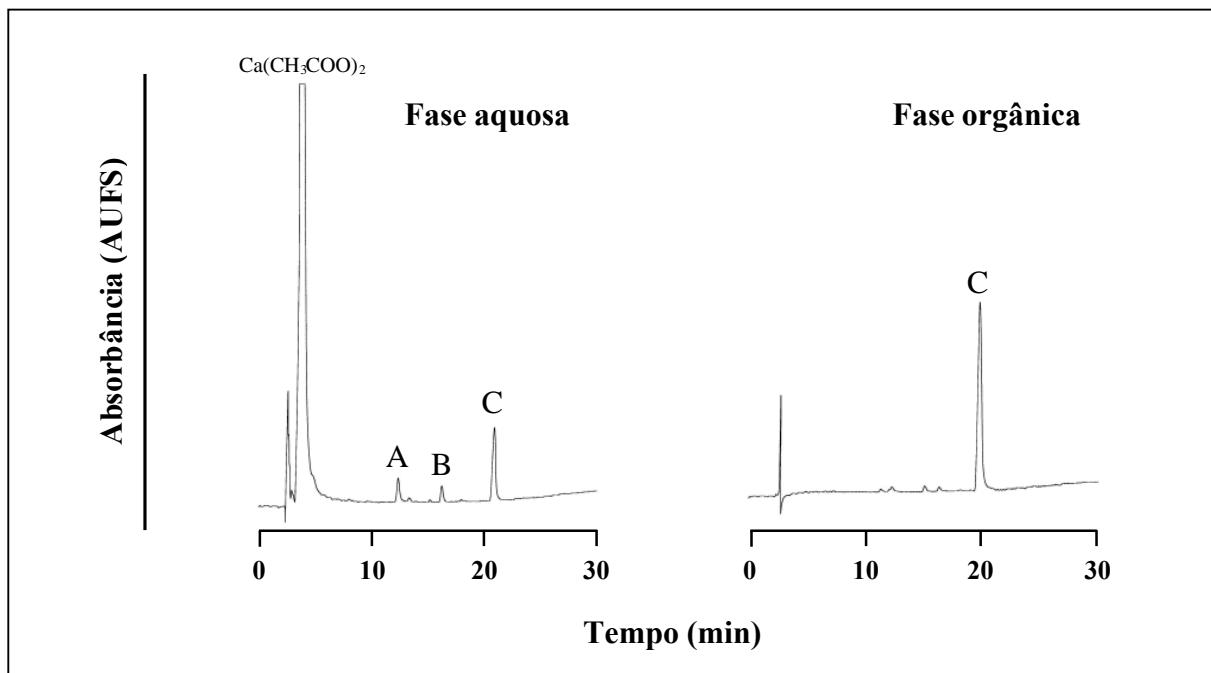


Figura 20. Perfis de RP-HPLC das soluções obtidas da fase aquosa e orgânica da extração de Z-Ala-OMe com acetato de etila, 5% HCl/H₂O e H₂O. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 60% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 220 nm (λ); 1,0 mL/min (fluxo); 5-95% B em 30 min (gradiente linear). A: subproduto não ionizável; B: Z-Ala-OH; ESI-MS [MH]⁺: 224,4 (encontrado), 224,2 (teórico); C: Z-Ala-OMe; ESI-MS [MH]⁺: 238,4 (encontrado), 238,3 (teórico).

Nota-se na **Figura 21** que a banda referente à PPL (45-66,2 kDa) apareceu somente nas pistas referentes a cPPL e pPPL, sugerindo que a PPL-DF contenha pouca PPL em relação aos outros componentes detectados. Pode-se observar também que, assim como a cPPL, as preparações pPPL e PPL-DF apresentaram bandas na região 21,5-31 kDa, provavelmente referentes a tripsina e α -quimotripsina, e na região 31-45 kDa, provavelmente relativas às carboxipeptidases A e B. O grande número de bandas na extremidade inferior do gel pode ser explicado pela presença de compostos de baixas massas moleculares, provavelmente oriundos de hidrólises parciais das próprias enzimas catalisadas pelas proteases presentes.

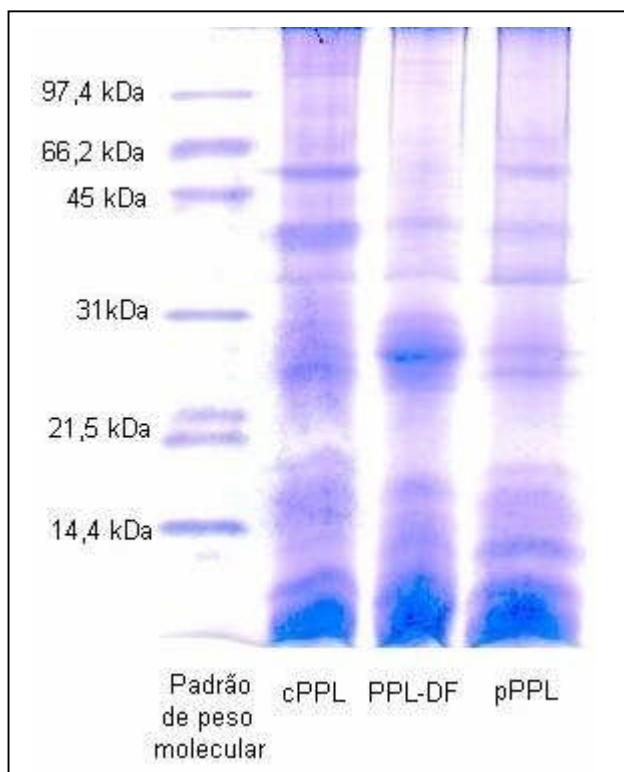


Figura 21. Análise por PAGE-SDS das preparações lipásicas oriundas de pâncreas suíno.

Os resultados de atividades das enzimas contidas em cada uma das preparações (**Tabela 9**) corroboraram as inferências feitas com base no resultado da análise por PAGE-SDS. Com respeito à atividade lipásica, por exemplo, verifica-se o mesmo padrão apresentado na eletroforese, ou seja, aparentemente a cPPL contém mais lipase do que a pPPL, que por sua vez, contém mais dessa enzima do que a PPL-DF. Em relação às atividades frente a Bz-DL-Tyr-pNA e Bz-DL-Arg-pNA (bons substratos cromogênicos de tripsina e α -quimotripsina, respectivamente; Shaw, 1965; Shaw e col., 1967), a PPL-DF e a pPPL apresentaram atividades significativamente maiores do que a cPPL. As atividades frente a Z-Gly-Phe-OH (bom substrato de carboxipeptidase A; Auld e Holmquist, 1974) foram bastante similares para as três preparações analisadas.

Tabela 9. Atividades enzimáticas apresentadas pelas preparações lipásicas de pâncreas suíno

Preparação	Lipásica (U/mg de sólido)	Frente a Bz-DL-Tyr-pNA (U/g de sólido)	Frente a Bz-DL-Arg-pNA (U/g de sólido)	Frente a Z-Gly-Phe-OH (U/mg de sólido)
cPPL	42,4	19,61	14,31	1,612
PPL-DF	27,3	185,5	61,64	1,576
pPPL	31,9	338,5	46,97	1,752

Diante destes resultados e considerando que: *i*) a cPPL é muito mais barata do que a pPPL e a PPL-DF também disponíveis comercialmente: cPPL – US\$ 0,79; pPPL – US\$ 39,70; PPL-DF – US\$ 43,70 [valores para 1 g disponíveis no catálogo 2006-2007 da MP Biomedicals (antiga ICN Biomedicals) e no site: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/L3126>]; *ii*) a cPPL tem sido empregada com sucesso na síntese de di, tri e tetrapeptídeos com derivados esterificados de aminoácidos como doadores de acila e aminoácidos ou fragmentos peptídicos como aceptores de acila (Zhang e col., 2001 e 2003; Huang e col., 2006), a cPPL foi eleita como a principal preparação esterásica a ser utilizada na investigação da aplicabilidade dos Ac-tripeptídeo-OMe e Ac-heptapeptídeo-OMe obtidos como doadores de acila em sínteses enzimáticas de ligação peptídica. Foram empregadas também as lipases oriundas de microorganismos: CCL, Cal A e Cal B.

4.3.2. Tentativa de síntese de Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂ mediada por cPPL a partir de Ac-Ile-Ser-Asp-OMe e Gly-NH₂

Os ensaios iniciais visaram a verificação da ocorrência de catálise por cPPL da hidrólise do éster metílico deste fragmento em 80% *n*-hexano/tampão Tris pH 8,0 a 37°C, condição usada com sucesso na síntese catalisada por cPPL de Ac-Tyr-Gly-NH₂ a partir de Ac-Tyr-OMe e Gly-NH₂ realizada por nosso grupo (Liria e Miranda, 2001; Liria e col., 2002; Liria, 2004; Liria e Miranda, 2007). Os resultados informariam se o complexo acil-enzima entre Ac-Ile-Ser-Asp-OMe e cPPL teria se formado, complexo este que poderia sofrer o

ataque nucleofílico da água gerando o Ac-Ile-Ser-Asp-OH. Em caso positivo, este complexo levaria também à formação da ligação peptídica na presença de Gly-NH₂.

Os cromatogramas obtidos para as alíquotas retiradas em diferentes tempos reacionais (item 3.2.8) e as análises por LC/ESI-MS de algumas delas indicaram que: 1) Ac-Ile-Ser-Asp-OMe [ESI-MS [MH]⁺: 390,2 (encontrado), 390,4 (teórico)] foi quase totalmente consumido após 24 h; 2) o produto de hidrólise do éster metílico Ac-Ile-Ser-Asp-OH [ESI-MS [MH]⁺: 376,4 (encontrado), 376,4 (teórico)] foi formado em quantidade apreciável; 3) a reação sem enzima (controle) não ocorreu mesmo após 24 h de incubação. Estes resultados se mostraram bastante promissores, pois anteriormente à nossa observação de que a cPPL pôde ser usada na síntese de Z-Asp-Gly-NH₂ (Liria e Miranda, 2001; Liria e col., 2002; Liria, 2004; Liria e Miranda, 2007), o Z-Asp-OMe havia sido descrito na literatura como inadequado para atuar como doador de acila em sínteses catalisadas por cPPL (So e col., 1998).

O passo seguinte foi verificar se a cPPL também seria capaz de mediar o acoplamento entre Ac-Ile-Ser-Asp-OMe e Gly-NH₂. Devido à presença já constatada de proteases na cPPL (item 4.3.1), a possibilidade de utilizar CCL, uma preparação lipásica praticamente pura, também foi investigada.

Como controle dessas reações, a incubação de Ac-Ile-Ser-Asp-OMe (doador de acila) com Gly-NH₂ (aceptor de acila) na ausência de enzima também foi promovida. O monitoramento das reações por RP-HPLC demonstrou que tanto na reação-controle quanto na reação promovida na presença de CCL, não houve formação de ligação peptídica em 24 h. Os perfis cromatográficos obtidos para a reação com cPPL mostraram que em 10 min já havia ocorrido a formação de quatro produtos menos hidrofóbicos que o doador de acila. Em 2 h de reação, o peptídeo esterificado já havia sido quase totalmente consumido e o equilíbrio da reação parece ter sido atingido entre 2 e 4 h. Com as análises por LC/ESI-MS das alíquotas referentes a 0 e 4 h, foi possível identificar o produto desejado Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂ [ESI-

MS [MH]⁺: 432,2 (encontrado), 432,4 (teórico)] e o tripeptídeo com carboxila livre Ac-Ile-Ser-Asp-OH [ESI-MS [MH]⁺: 376,4 (encontrado), 376,4 (teórico)], como dois dos quatro produtos formados. Os outros dois subprodutos que não puderam ser identificados [principais picos presentes nos “scans” de massas correspondentes: 1) 102,0 e 127,6; 2) 102,0 e 119,6] podem ser resultantes de degradação proteolítica das enzimas contidas na cPPL.

Desse modo, verificou-se que a CCL não foi um bom catalisador para o acoplamento pretendido, concordando com as observações prévias feitas pelo nosso grupo de que a eficiência da CCL na síntese de dipeptídeos é bastante inferior do que a da cPPL, embora a estabilidade dos produtos formados seja maior na reação catalisada por CCL devido à ausência de proteases (Liria, 2004; Liria e Miranda, 2007). Por outro lado, a cPPL foi capaz de catalisar o acoplamento inédito entre um N^α-acil-tripeptídeo esterificado (Ac-Ile-Ser-Asp-OMe) e um derivado de aminoácido (Gly-NH₂). De fato, somente Huang e colaboradores tinham relatado a síntese catalisada por cPPL de outro tetrapeptídeo, o Bz-Arg-Gly-Asp-Ser-NH₂, mas ele foi obtido a partir de um derivado de aminoácido (Bz-Arg-OEt) e de um tripeptídeo amidado (Gly-Asp-Ser-NH₂; Huang e col., 2006). Como a cPPL é uma preparação bruta contendo contaminantes proteásicos, cujas especificidades estão descritas na **Tabela 10**, o bom resultado obtido por estes autores pode estar relacionado à tripsina. O mesmo não deve ter ocorrido na síntese de Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂, uma vez que as proteases com ação esterásica contidas na cPPL não apresentam especificidade por Asp, sendo provavelmente, a PPL contida na cPPL a responsável pela catálise em questão.

Tabela 10. Especificidades de endo- e exopeptidases (adaptado de Voet e Voet, 1990)

Endopeptidases		
Enzima	Especificidade	Observações
Tripsina	$R_{n-1} =$ resíduos positivamente carregados (Arg, Lys); $R_n \neq$ Pro	Altamente específica
α -Quimotripsina	$R_{n-1} =$ resíduos volumosos hidrofóbicos (Phe, Trp, Tyr); $R_n \neq$ Pro	Cliva mais lentamente com $R_{n-1} =$ Asn, His, Met, Leu
Exopeptidases		
$R_n =$ resíduo C-terminal		
Enzima	Especificidade	
Carboxipeptidase A	$R_n \neq$ Arg, Lys, Pro; $R_{n-1} \neq$ Pro	
Carboxipeptidase B	$R_n =$ Arg, Lys; $R_{n-1} \neq$ Pro	

Como a condensação em questão gerou, além do peptídeo desejado Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂, o Ac-Ile-Ser-Asp-OH resultante de hidrólise do éster metílico de Ac-Ile-Ser-Asp-OMe, a determinação do rendimento do acoplamento enzimático entre Ac-Ile-Ser-Asp-OMe e Gly-NH₂ deveria ser feita a partir de uma curva-padrão que relacionasse a área do pico obtido no perfil de RP-HPLC com a concentração de Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂. Para que esta pudesse ser construída, era necessário obter o tetrapeptídeo Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂ bruto e purificá-lo. Assim, foi promovida a clivagem e desproteção das cadeias laterais de 100,31 mg de Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-SAMBHA, seguida de purificação do material obtido em escala semi-preparativa usando 10% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA como solvente B. Os perfis cromatográficos do peptídeo bruto e purificado e as análises por LC/ESI-MS (**Figura 22**) demonstraram que a purificação foi muito bem sucedida. A equação de reta fornecida pela curva-padrão construída com o purificado foi: $C = 0,01358 + 6,08769 \cdot 10^{-7} \cdot A$ ($R = 0,99969$), onde C é a concentração de Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂ em mM e A, a área do pico relativo a esse composto no cromatograma.

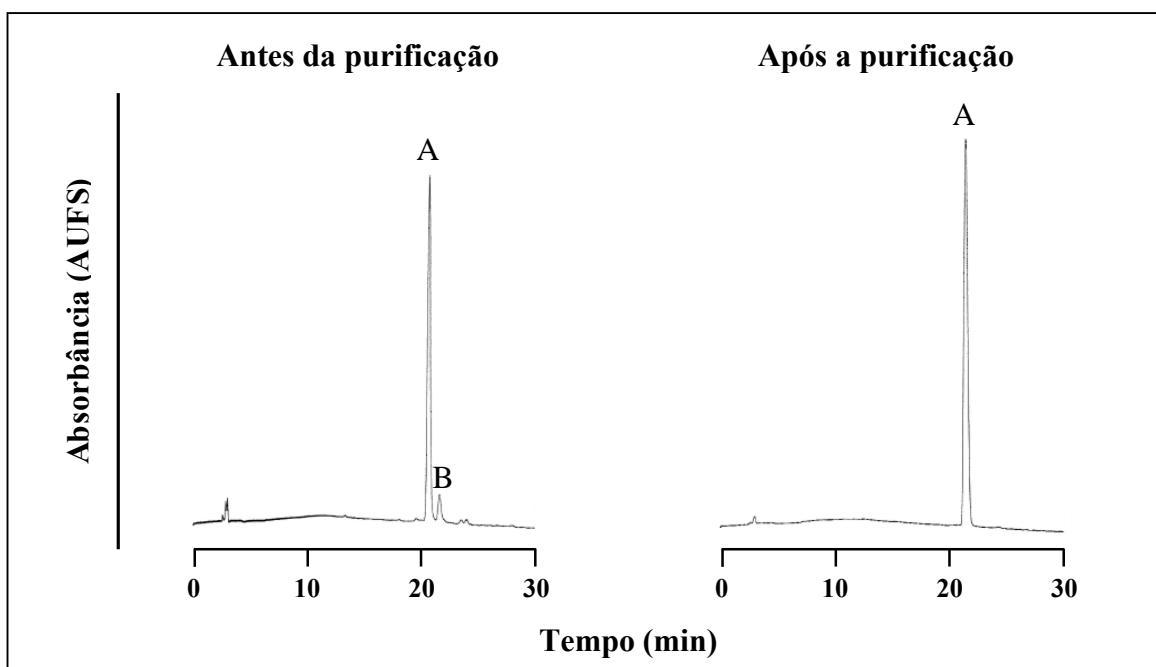


Figura 22. Perfis de RP-HPLC de Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂ bruto e purificado. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 10% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 210 nm (λ); 1,0 mL/min (fluxo); 5-95% B em 30 min (gradiente linear). A: Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂; ESI-MS [MH]⁺: 432,2 (encontrado), 432,4 (teórico). B: subproduto não identificado.

Novas incubações de Ac-Ile-Ser-Asp-OMe e Gly-NH₂ com cPPL nos tempos 0, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h e 4 h foram promovidas. As análises por RP-HPLC de alíquotas de 7 μ L dos meios reacionais diluídos correspondentes a cada tempo forneceram os resultados mostrados na **Figura 23**. A partir deles e da equação citada acima foram calculadas as porcentagens de formação do Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂ em função tempo (**Figura 24**), as quais indicaram que o equilíbrio da reação foi atingido em 1 h e que o rendimento máximo do acoplamento foi de 65%.

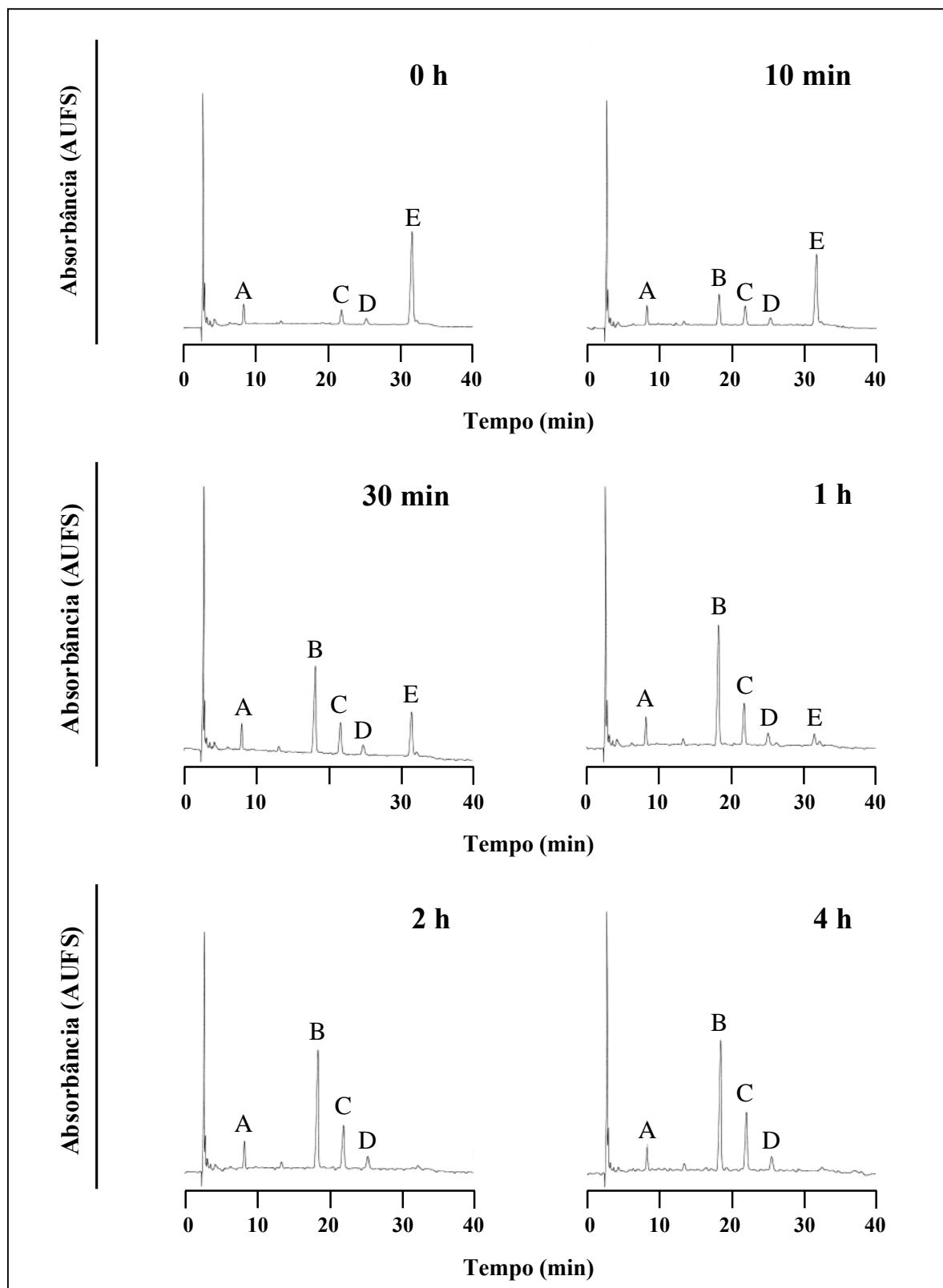


Figura 23. Perfis de RP-HPLC resultantes do monitoramento do acoplamento de Ac-Ile-Ser-Asp-OMe com Gly-NH₂ catalisado por cPPL em 80% *n*-hexano/tampão Tris a 37°C. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 10% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 210 nm (λ); 1,0 mL/min (fluxo); 5-95% B em 30 min (gradiente linear). A: subproduto não identificado. B: Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂; ESI-MS [MH]⁺: 432,2 (encontrado), 432,4 (teórico). C: Ac-Ile-Ser-Asp-OH; ESI-MS [MH]⁺: 376,4 (encontrado), 376,4 (teórico). D: subproduto não identificado. E: Ac-Ile-Ser-Asp-OMe; ESI-MS [MH]⁺: 390,2 (encontrado), 390,4 (teórico).

A fim de verificar qual dos tampões – Tris 0,5 M, pH 8,0 ou fosfato 0,1 M, pH 7,5, seria o mais adequado para o acoplamento em estudo, foram promovidas novas reações usando o sistema 80% *n*-hexano/tampão fosfato (V/V). Os rendimentos destas reações também estão apresentados na **Figura 24** e indicaram que o tampão Tris é o mais apropriado, pois com o tampão fosfato o equilíbrio da reação e o rendimento máximo só foram atingidos em aproximadamente 3 h. A partir deste resultado, também foram realizadas reações no sistema de solventes usado por Huang e colaboradores (60% DMF/tampão), substituindo o tampão fosfato pelo Tris (Huang e col., 2006). Os resultados apresentados na **Figura 24** demonstraram que nem a formação do tetrapeptídeo nem a hidrólise do éster do doador de acila ocorreram neste sistema. Este conjunto de dados reforça a estreita dependência existente entre o sucesso de uma síntese enzimática e os diversos parâmetros reacionais envolvidos, tais como a natureza, concentração e solubilidade dos reagentes, a estabilidade e atividade da enzima, a temperatura e o pH (Miranda e col., 1986; Kawashiro e col., 1993; So e col., 2000; Zhang e col., 2003; Wang e col., 2004; Huang e col., 2006).

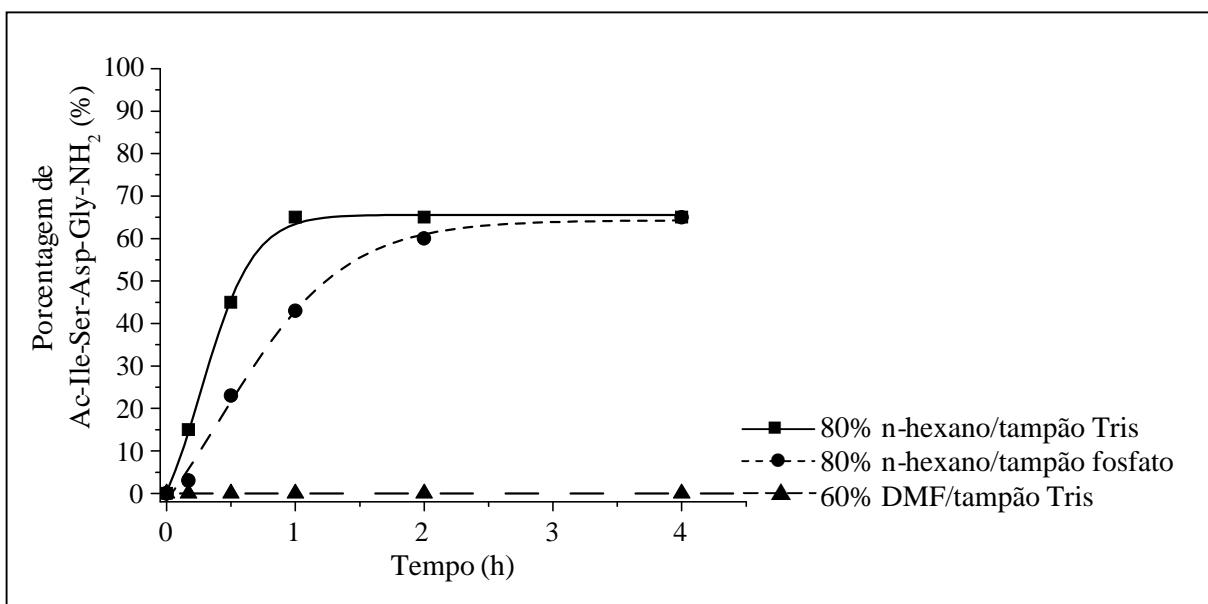


Figura 24. Cinéticas das sínteses de Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂ a partir de Ac-Ile-Ser-Asp-OMe e Gly-NH₂ usando cPPL.

Embora sejam seqüências diferentes, pode-se comparar a eficiência obtida neste

acoplamento com aquela da obtenção do tetrapeptídeo Bz-Arg-Gly-Asp-Ser-NH₂ por Huang e colaboradores. Enquanto estes autores obtiveram o tetrapeptídeo com rendimento máximo de 73,6% em 5 h de reação a partir de Bz-Arg-OEt (50 mM), Gly-Asp-Ser-NH₂ (400 mM) em 60% DMF/tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5 a 10°C (Huang e col., 2006), nós obtivemos Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂ com 65% de rendimento máximo em 1 h de reação partindo de Ac-Ile-Ser-Asp-OMe (50 mM), Gly-NH₂ (500 mM) em 80% n-hexano/tampão Tris 0,5 M, pH 8,0 a 37°C (Proti e Miranda, 2007). Em outras palavras, a produtividade do nosso acoplamento, pioneiro em utilizar um fragmento peptídico como doador de acila em síntese de peptídeos catalisada por lipase, foi significativamente superior.

Os meios reacionais oriundos das incubações enzimáticas realizadas em 80% *n*-hexano/tampão (Tris ou fosfato) contendo Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂ foram purificados em escala analítica. A caracterização química do tetrapeptídeo foi então realizada por análise de aminoácidos, LC/ESI-MS e RMN de ¹H e está apresentada no item 4.4.g.

Os líquidos iônicos têm sido atualmente empregados com sucesso em reações enzimáticas, substituindo os sistemas orgânicos ou aquo-orgânicos. Estes compostos são sais orgânicos, líquidos até 300°C, formados por cátions como o 1,3-dialquilimidazólio, 1,4-dialquilpiridínio, tetralquilamônio e 1,1- dialquilpirrolidínio e ânions como o tetrafluorborato, hexafluorfosfato, nitrato, acetato, trifluoracetato e metilsulfato. Estes sais possuem grande estabilidade química e térmica, não são inflamáveis ou voláteis. O uso desses sais em biocatálise permite a dissolução de uma grande variedade de substratos, através de modificações dos cátions ou dos ânions constituintes. Em líquidos iônicos, algumas enzimas apresentam atividade, estabilidade e seletividade maiores do que em sistemas orgânicos ou aquo-orgânicos (Yang e Pan, 2005).

As lipases constituem a maioria das enzimas usadas atualmente em líquidos iônicos, sendo assim utilizadas em reações de alcoólise, amonólise e hidrólise (Yang & Pan, 2005).

Como exemplo, pode-se citar a melhoria na atividade e enantiosseletividade da Cal B na hidrólise de **D,L**-fenilglicina-OMe a **D**-fenilglicina-OH conduzida em sistemas contendo [BMIM][BF₄] em substituição a outros solventes orgânicos comumente usados (Lou e col., 2006). Outro exemplo é a própria PPL, que quando utilizada na resolução enzimática de Ac-aminoácido-OR em solução aquosa de trifluoracetato de N-etil-piridínio forneceu rendimentos comparáveis e maiores porcentagens de excesso enantiomérico do que quando empregada em ACN/H₂O (Malhotra e Zhao, 2005).

Na tentativa de investigar o efeito do uso de líquidos iônicos nos rendimentos de formação do tetrapeptídeo em estudo, foram feitas duas novas incubações de Ac-Ile-Ser-Asp-OMe e Gly-NH₂ com cPPL em sistemas usando a proporção 80% líquido iônico/tampão com os líquidos iônicos [BMIM][PF₆] e [BMIM][BF₄] e o tampão Tris 0,5 M pH 8,0. Embora fosse perceptível o desaparecimento do doador de acila ao longo do tempo, principalmente na reação conduzida em 80% [BMIM][PF₆]/tampão Tris, não foi possível acompanhar a formação do produto por RP-HPLC, uma vez que os líquidos iônicos usados apresentam grande absorbância no comprimento de onda usado (210 nm) e possuem polaridade parecida com a do tetrapeptídeo Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂.

Na tentativa de solucionar esse problema de forma simples, foram registrados os espectros de absorção de duas soluções em 10% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA: 1) Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂ (2,0 mM) e 2) [BMIM][PF₆] + [BMIM][BF₄] (1,6% em volume de cada líquido iônico – mesma proporção da solução final das amostras de reação). O intuito era identificar um comprimento de onda em que a absorbância dos líquidos iônicos fosse mínima e a do peptídeo, máxima. Como se pode perceber na **Figura 25**, não fomos bem sucedidos. Ainda assim, vale ressaltar que estas últimas reações constituem o primeiro relato de utilização de líquidos iônicos em síntese de peptídeos mediada por preparações lipásicas comerciais.

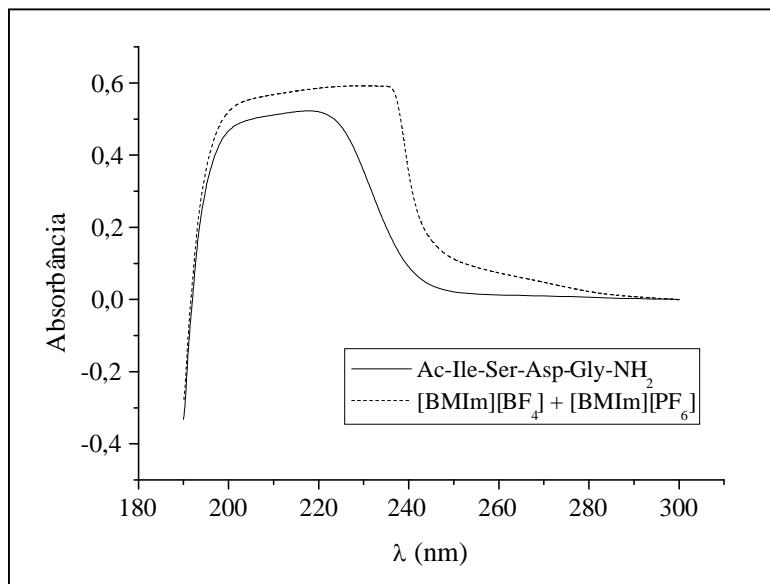


Figura 25. Espectros de absorbância das soluções de Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂ e de [BMIM][PF₆] + [BMIM][BF₄] em 10% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA.

4.3.3. Tentativa de síntese enzimática de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-Gly-NH₂ a partir de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe e Gly-NH₂

Assim como foi feito com Ac-Ile-Ser-Asp-OMe, o ensaio preliminar realizado foi a verificação da catálise por cPPL da hidrólise do éster metílico de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe. Embora tenhamos constatado previamente que a solubilidade deste fragmento era muito baixa em *n*-hexano, o ensaio foi realizado em 80% *n*-hexano/tampão Tris 0,5 M, pH 8,0. A persistência em se usar o *n*-hexano baseia-se nas já citadas estabilidade e eficiência elevadas da PPL nesse solvente (Xu e col., 1996; Athawale e col., 2002).

As análises de cada uma das misturas reacionais (0, 1, 3 e 6 h) feitas por RP-HPLC e a análise por LC/ESI-MS da alíquota de 6 h (**Figura 26**) demonstraram que o Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe continha Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OH, possivelmente oriundo de hidrólise do éster ocorrida durante a remoção do Ca(CH₃COO)₂ do Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe bruto (item 4.2.3.b).

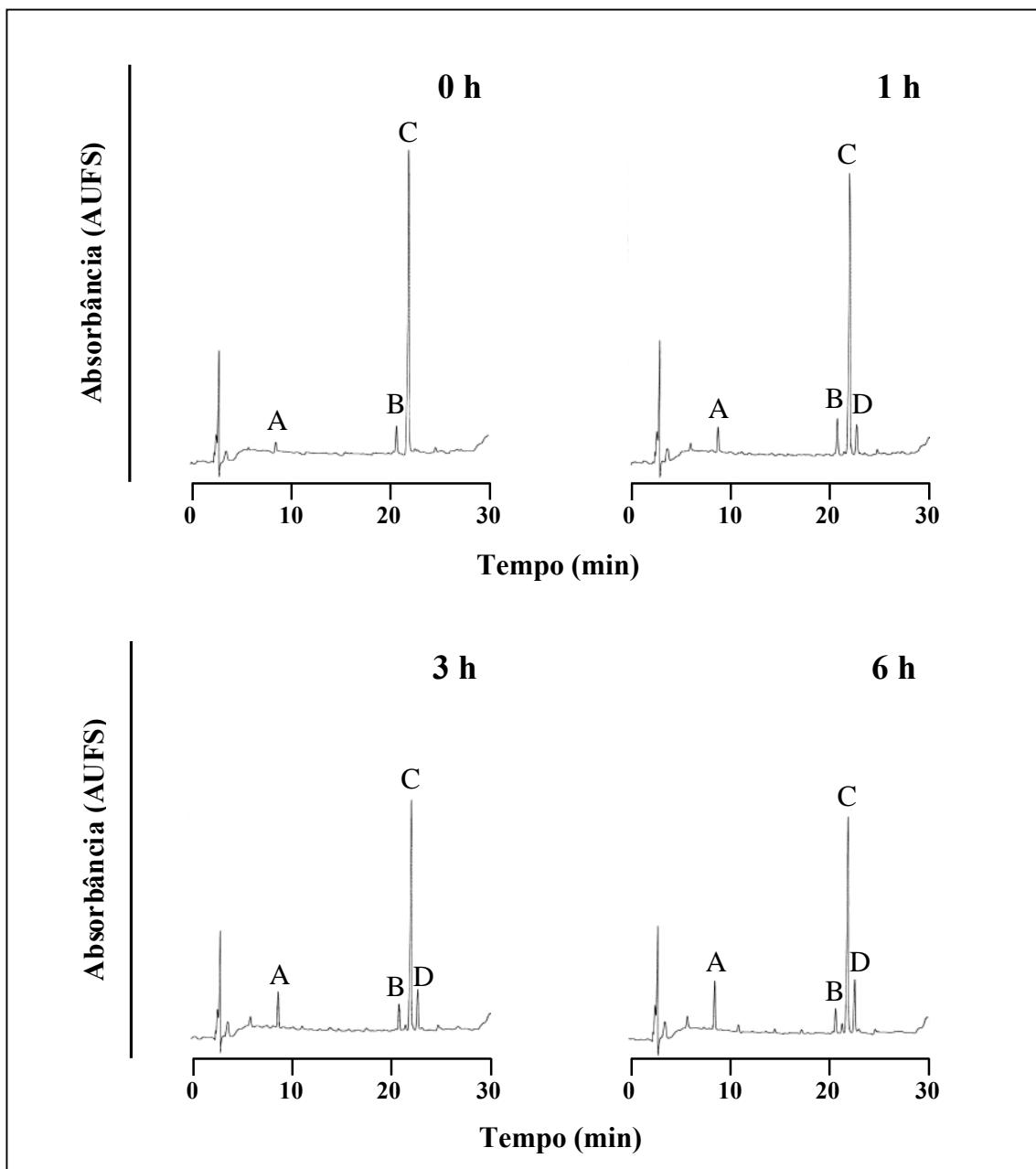


Figura 26. Perfis de RP-HPLC resultantes do monitoramento da hidrólise de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe catalisada por cPPL. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 60% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 210 nm (λ); 1,0 mL/min (fluxo); 5-95% B em 30 min (gradiente linear). A: subproduto não ionizável nas condições de análise. B: Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OH; ESI-MS [MH]⁺: 829,6 (encontrado), 830,1 (teórico). C: Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe; ESI-MS [MH]⁺: 843,7 (encontrado), 844,1 (teórico). D: Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-OH; ESI-MS [MH]⁺: 701,1 (encontrado), 701,9 (teórico).

Como pode se observar, em 1 h de reação, ocorreu o surgimento de um subproduto mais hidrofóbico no meio reacional. De fato, a análise por LC/ESI-MS confirmou que se tratava de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-OH resultante provavelmente da ação da carboxipeptidase B contida na cPPL (Tabela 10) sobre o Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Gly-Lys-

OH formado. O aumento do pico correspondente a esse subproduto no decorrer da reação e a manutenção do pico relativo ao Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OH sugeriram que a hidrólise do éster metílico catalisada pela PPL tenha ocorrido com a mesma velocidade que a hidrólise da ligação peptídica Gly-Lys. Um consumo discreto (~ 30%) do éster de partida foi observado após 6 h de incubação, o que pode estar associado à sua baixa solubilidade no solvente empregado. O composto cujo tempo de retenção era próximo de 10 min não pôde ser identificado por não ter sido ionizável na análise por LC/ESI-MS. Embora conduzido em condições reacionais não ideais, o ensaio realizado demonstrou que Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe, um N^α-acil-heptapeptídeo esterificado pôde ser reconhecido como substrato pelas enzimas presentes na cPPL, formando o complexo acil-enzima, que por sua vez, sofreu o ataque nucleofílico da água.

Analogamente ao que foi feito para Ac-Ile-Ser-Asp-OMe, a determinação dos rendimentos dos acoplamentos entre Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe e Gly-NH₂ que seriam posteriormente promovidos deveria ser feita a partir de uma curva padrão que relacionasse as áreas dos picos obtidos nos perfis de RP-HPLC com as concentrações de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-Gly-NH₂. Para que esta pudesse ser construída, era necessário obter o octapeptídeo Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-Gly-NH₂ bruto e purificá-lo. Assim, foi promovida a clivagem e desproteção das cadeias laterais de 99,34 mg de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(Boc)-Gly-SAMBHA, seguida de purificação em escala analítica usando 60% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA como solvente B.

Os perfis cromatográficos do peptídeo bruto e purificado e as análises por LC/ESI-MS (**Figura 27**) demonstraram que a purificação foi bem sucedida. A equação de reta fornecida pela curva padrão construída foi: C = -0,00369 + 9,09755·10⁻⁸·A (R = 0,99974) onde C é a concentração de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-Gly-NH₂ em mM e A, a área do pico relativo a esse composto no cromatograma.

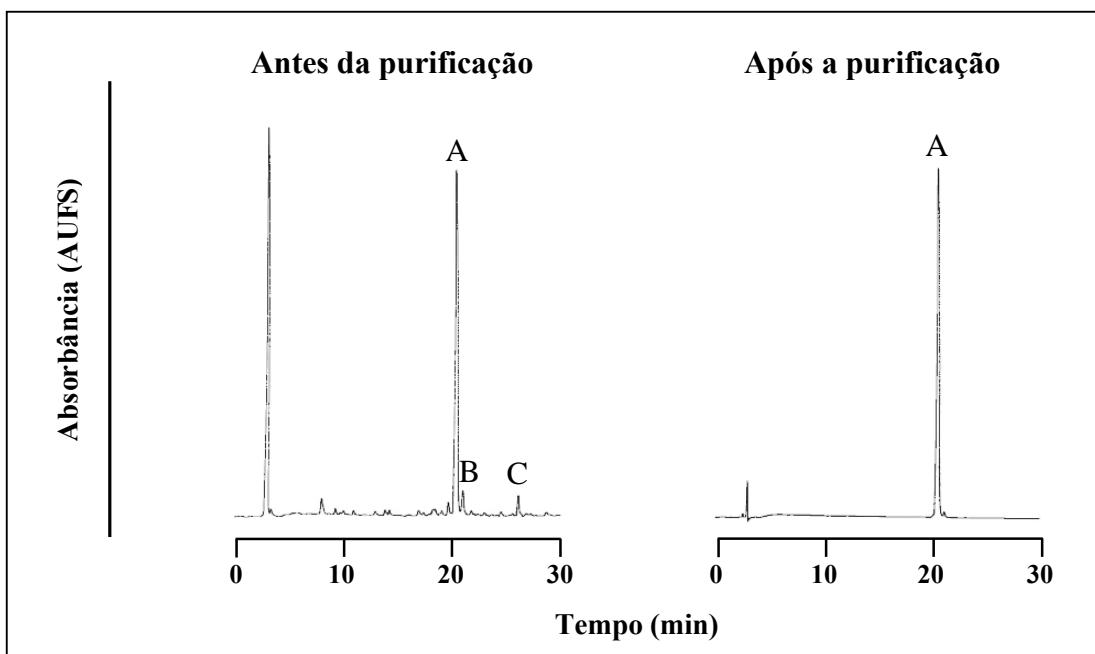


Figura 27. Perfis de RP-HPLC de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-NH₂ bruto e purificado dissolvidos em solvente 60% ACN/H₂O contendo 0,09% TFA. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 60% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 210 nm (λ); 1,0 mL/min (fluxo); 5-95% B em 30 min (gradiente linear). A: Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-NH₂; ESI-MS [MH]⁺: 885,7 (encontrado), 886,1 (teórico). B: isômero de A. C: subproduto não identificado.

Neste caso em particular, além da curva padrão referente ao produto desejado, era necessária a construção de outra curva padrão para a determinação dos rendimentos dos acoplamentos subseqüentes. Esta curva deveria relacionar a área do pico obtido no perfil de RP-HPLC com a concentração inicial de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe, pois este éster de partida estava contaminado com uma pequena quantidade de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OH (Figura 26). Para tanto, o Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe disponível foi submetido à purificação em escala preparativa. Os perfis cromatográficos do material antes e após a purificação e as análises por LC/ESI-MS (Figura 28) demonstraram que a eliminação do contaminante foi bem sucedida. A equação de reta fornecida pela curva padrão construída com o purificado foi: $C = 0,00205 + 1,04217 \cdot 10^{-7} \cdot A$ ($R = 0,99931$), onde C é a concentração de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe em mM e A, a área do pico relativo a esse composto no chromatograma.

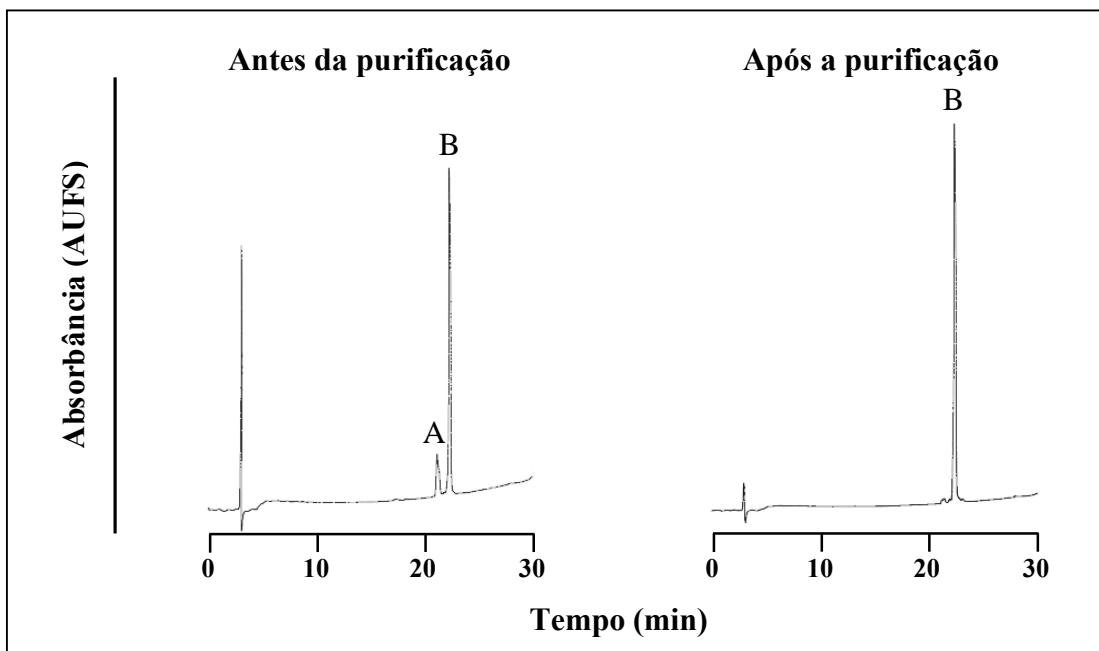


Figura 28. Perfis de RP-HPLC de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe bruto e purificado dissolvidos em solvente 60% ACN/H₂O contendo 0,09% TFA. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 60% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 210 nm (λ); 1,0 mL/min (fluxo); 5-95% B em 30 min (gradiente linear). A: Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OH; ESI-MS [MH]⁺: 829,8 (encontrado), 830,1 (teórico). B: Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe; ESI-MS [MH]⁺: 843,5 (encontrado), 844,1 (teórico).

Incubações de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe e Gly-NH₂ com cPPL, CCL, Cal A e Cal B em diversas condições reacionais foram promovidas, cada uma delas com quatro tempos de reação: 0, 6, 12 e 24 h (Tabela 11). As análises por RP-HPLC referentes a todos os tempos de cada condição reacional foram realizadas usando 10 μ L de cada solução final obtida com a diluição. Com os cromatogramas referentes a cada uma dessas reações (um conjunto deles está representado pela Figura 29) e a utilização das duas curvas padrões previamente geradas, foi possível determinar os rendimentos de formação de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-Gly-NH₂, os quais estão apresentados na Tabela 11.

Este conjunto de dados demonstrou, entre outras coisas, que as preparações enzimáticas oriundas de microorganismos foram, em geral, catalisadores pouco eficientes para o acoplamento em estudo, sendo que dentre elas, a preparação lipásica líquida Cal A apresentou o melhor desempenho. Para este biocatalisador, o melhor sistema de solvente empregado foi a mistura bifásica 80% *n*-hexano/tampão Tris (condição 14 da Tabela 11),

seguida por 80% [BMIM][PF₆]/Tris 0,5 M, pH 8,0 (condição 13), outro sistema com duas fases. Os melhores rendimentos obtidos para as reações conduzidas na presença de CCL e Cal B por 24 h foram insignificantes: 2 e 3%, respectivamente (condições 4 e 8).

Tabela 11. Rendimentos obtidos nos acoplamentos enzimáticos entre Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe e Gly-NH₂

Condição	Enzima	Sistema de Solvente (V/V)	0 h	Rendimento (%)	24 h
				6 h	12 h
1	CCL	80% [BMIM][PF ₆]/Tris ^a	0	0	0
2		80% [BMIM][BF ₄]/Tris ^a	0	0	0,09
3		60% DMF/Tris ^a	0	0	0,6
4		80% n-hexano/Tris ^a	0	0	0,7
5	Cal B	80% [BMIM][PF ₆]/Tris ^a	0	0	0
6		80% [BMIM][BF ₄]/Tris ^a	0	0	0,4
7		80% n-hexano/Tris ^a	0	0	0,2
8		60% DMF/Tris ^a	0	0,5	1
9	Cal A	60% [BMIM][PF ₆]/n-hexano	0	0	0
10		80% [BMIM][BF ₄]/Tris ^a	0	0	0,5
11		60% DMF/Tris ^a	0	0,6	0,9
12		80% [BMIM][PF ₆]/n-hexano	0	4	1
13		80% [BMIM][PF ₆]/Tris ^a	0	3	3
14		80% n-hexano/Tris ^a	0	7	13
15	cPPL	80% DMF/[BMIM][BF ₄]	0	0	0
16		95% DMF/Tris ^a	0	0	0
17		90% DMF/Tris ^a	0	0	0,04
18		60% DMF/[BMIM][BF ₄]	0	0	0,4
19		20% [BMIM][BF ₄]/Tris ^a	0	0,1	0
20		40% [BMIM][BF ₄]/Tris ^a	0	2	0
21		80% n-hexano/Tris ^a	0	2	0
22		[BMIM][PF ₆]	0	3	0,8
23		80% [BMIM][PF ₆]/Tris ^a	0	6	7
24		80% DCM/Tris ^a	0	9	6
25		60% [BMIM][BF ₄]/Tris ^a	0	18	6
26		60% DMF/Fosfato ^b	0	17	20
27		60% DMF/Tris ^a	0	20	29
28		80% [BMIM][BF ₄]/Tris ^a	0	33	35
29		80% DMF/Tris ^a	0	4	45
30	Tripsina	95% DMF/Tris ^a	0	0	0,9
31		90% DMF/Tris ^a	0	0,7	0,5
32		80% DMF/Tris ^a	0	51	49

^a tampão Tris 0,5 M, pH 8,0; ^b tampão fosfato 0,1 M, pH 7,5.

O sistema 80% *n*-hexano/tampão Tris 0,5 M, pH 8,0, que havia sido o melhor para as

reações com Cal A, foi um dos piores para as reações conduzidas na presença de cPPL (condição 21 da **Tabela 11**), sendo inclusive pior do que o [BMIM][PF₆] puro (condição 22). É interessante observar que tanto para o acoplamento entre Z-Tyr-OEt e Gly-NH₂ (Liria e Miranda, 2001; Liria e col., 2002; Liria, 2004; Liria e Miranda, 2007) quanto para aquele entre Ac-Ile-Ser-Asp-OMe e Gly-NH₂ catalisado por cPPL (item **4.3.2**; Proti e col., 2007), o uso desta mistura bifásica havia levado a produtividades bastante elevadas (rendimentos máximos de 91 e 65% em apenas 5 min e 1 h de reação, respectivamente).

Os melhores solventes para as reações realizadas na presença de cPPL foram [BMIM][BF₄] e DMF combinados com 20% de tampão Tris (condições 28 e 29) resultando em misturas monofásicas. Assim como observado no acoplamento entre Ac-Ile-Ser-Asp-OMe e Gly-NH₂, o tampão Tris 0,5 M, pH 8,0 pareceu mais adequado do que o fosfato 0,1 M, pH 7,5 às incubações com cPPL em 60% DMF/tampão (condições 26 e 27 da **Tabela 11**). A tendência decrescente do rendimento nas reações conduzidas em misturas [BMIM][BF₄]/tampão Tris 0,5 M, pH 8,0 em função do aumento da quantidade de tampão (condições 19, 20, 25 e 28) pode ser explicado pelo favorecimento da reação de hidrólise do éster em relação à de formação da ligação peptídica.

Como pode ser observado na **Figura 29**, o doador de acila foi quase totalmente consumido após 24 h de incubação em 80% DMF/tampão Tris 0,5 M, pH 8,0. O subproduto Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-OH, detectado anteriormente no ensaio de hidrólise de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe catalisada por cPPL (**Figura 26**) e também nas condições 19-28 da **Tabela 11**, não foi detectado nas incubações com cPPL feitas em 80% DMF/tampão Tris 0,5 M, pH 8,0 (condição 29). Como consequência, os rendimentos obtidos para essa condição foram os mais altos, já que apenas o subproduto de hidrólise do éster metílico de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe foi gerado: Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OH. Na tentativa de minimizar a formação deste último, foram estudados meios com pouca ou

nenhuma água (condições 15-18 e 22 da **Tabela 11**). Todas elas, contudo, resultaram em rendimentos insignificantes do produto desejado (0 a 3%).

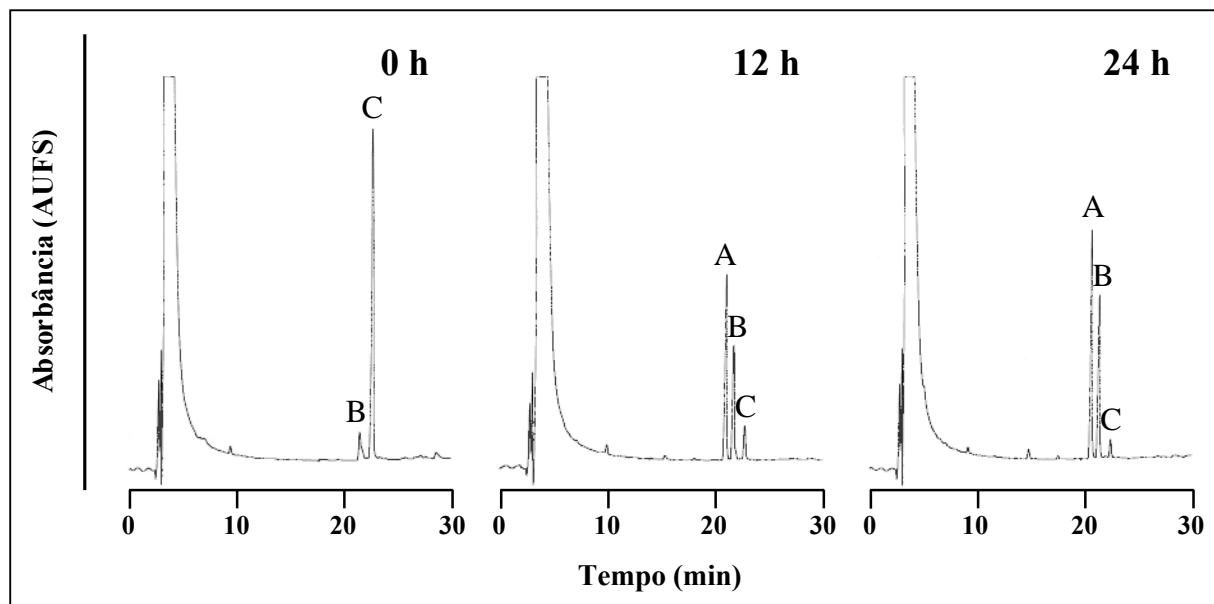


Figura 29. Perfis de RP-HPLC do monitoramento do acoplamento de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe e Gly-NH₂ catalisado por cPPL em 80% DMF/tampão Tris a 37°C. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 60% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 210 nm (λ); 1,0 mL/min (fluxo); 5-95% B em 30 min (gradiente linear). A: Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-Gly-NH₂; ESI-MS [MH]⁺: 885,7 (encontrado), 886,1 (teórico). B: Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OH; ESI-MS [MH]⁺: 829,4 (encontrado), 830,1 (teórico). C: Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe; ESI-MS [MH]⁺: 843,7 (encontrado), 844,1 (teórico).

Sabendo que a cPPL contém tripsina como um dos contaminantes proteásicos (**Tabela 10**) e que o doador de acila empregado era esterificado no resíduo C-terminal de Lys, pareceu provável que o bom rendimento obtido na condição 29 da **Tabela 11** fosse em grande parte, devido à ação esterásica desta protease. A realização de incubações na condição 32 serviu para investigar tal hipótese. Nota-se que já em 6 h, o rendimento máximo (51%) tinha sido atingido. Assim como na condição 29, o doador de acila foi quase totalmente consumido e o único subproduto gerado foi Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OH.

Assim, ficou evidente que a tripsina contida na cPPL pode ter contribuído para a eficiência do acoplamento em estudo. Este ponto deverá ser melhor estudado, já que estudo anterior do nosso grupo demonstrou que a cPPL tratada com um inibidor específico de tripsina foi capaz de catalisar as hidrólises dos ésteres de Z-Arg-OMe e Z-Lys-OMe com a

mesma eficiência do que a cPPL não tratada (Liria, 2004). Entretanto, também ficou evidente que, sob o ponto de vista sintético, o uso da cPPL ao invés de tripsina apresentou pelo menos duas vantagens: 1) menor ocorrência de subprodutos no meio reacional (oriundos de autólise), o que facilitaria a purificação do produto desejado e levaria a um melhor rendimento final; 2) por ser comercializada como bruta, a cPPL é uma preparação enzimática muito mais barata do que a tripsina: 100 g de cPPL – R\$ 154,20 (R\$ 1,54/g); 1 g de tripsina – R\$ 920,56 (valores disponíveis nos sites: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIAL/T1426> e <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/L3126>).

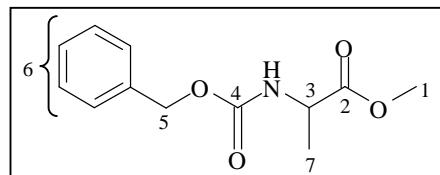
Embora todos os resultados acima descritos tenham reafirmado que o sucesso de cada acoplamento enzimático está intrinsecamente relacionado aos diversos parâmetros reacionais envolvidos, foram realizadas algumas tentativas de acoplamento enzimático entre Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe e Leu-Leu-Ser-Gly-Leu-Leu-NH₂ visando a obtenção do derivado acetilado do peptídeo antimicrobiano VesCP-M (item 4.2.1). Foram promovidas duas reações nos tempos 0, 6, 12 e 24 h empregando 25 mM do doador de acila e 62,5 mM do acceptor de acila (excesso de 2,5x) e as condições 29 e 32 da **Tabela 11**. O monitoramento por RP-HPLC e as análises por LC/ESI-MS das alíquotas referentes a 24 h demonstraram que a única reação ocorrida em ambas condições, foi a hidrólise do éster metílico de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe, mais pronunciada nas reações com tripsina, mas menos intensa do que quando as duas condições foram empregadas no acoplamento entre Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe e Gly-NH₂.

4.4. Caracterização química dos compostos obtidos

Todos os espectros de RMN de ¹H obtidos, bem como suas ampliações, estão apresentados em **Apêndice - Espectros de RMN de ¹H**. Os espectros de massas foram interpretados com o auxílio do programa Peptide Companion (CSPS Pharmaceuticals Inc.,

EUA).

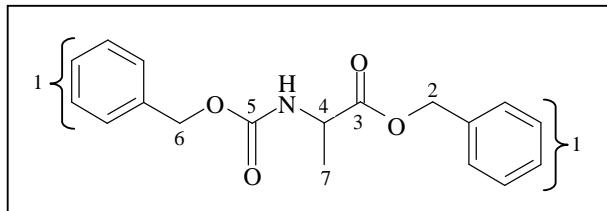
a) Z-Ala-OMe



RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) δ : 1,36 (d; $J = 7,3$ Hz; 3H; H-C.7); 3,70 (s; 3H; H-C.1); 4,21 (q; $J = 7,3$ Hz; 1H; H-C.3); 5,07 (s; 2H; H-C.5); 7,27-7,35 (m; 5H; H-C.6).

LC/ESI-MS (Figura 30): $[\text{MK}]^+$: 275,7 (encontrado), 276,4 (teórico); $[\text{MNa}]^+$: 259,8 (encontrado), 260,2 (teórico); $[\text{MH}]^+$: 237,9 (encontrado), 238,3 (teórico).

b) Z-Ala-OBzl



RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) δ : 1,37 (d; $J = 7,3$ Hz; 3H; H-C.7); 4,25 (q; $J = 7,3$ Hz; 1H; H-C.4); 5,07 (dd; $J = 12,7$ Hz e 14,9 Hz; 2H; H-C.2*); 5,15 (dd; $J = 12,3$ Hz e 20,0 Hz; 2H; H-C.6*); 7,26-7,34 (m; 10H; H-C.1). * A atribuição pode estar invertida.

LC/ESI-MS (Figura 31): $[\text{MNa}]^+$: 335,9 (encontrado), 336,3 (teórico); $[\text{MH}]^+$: 313,8 (encontrado), 314,4 (teórico); pico em 180,8 relativo ao fragmento Ala-OBzl (teórico: 180,2).

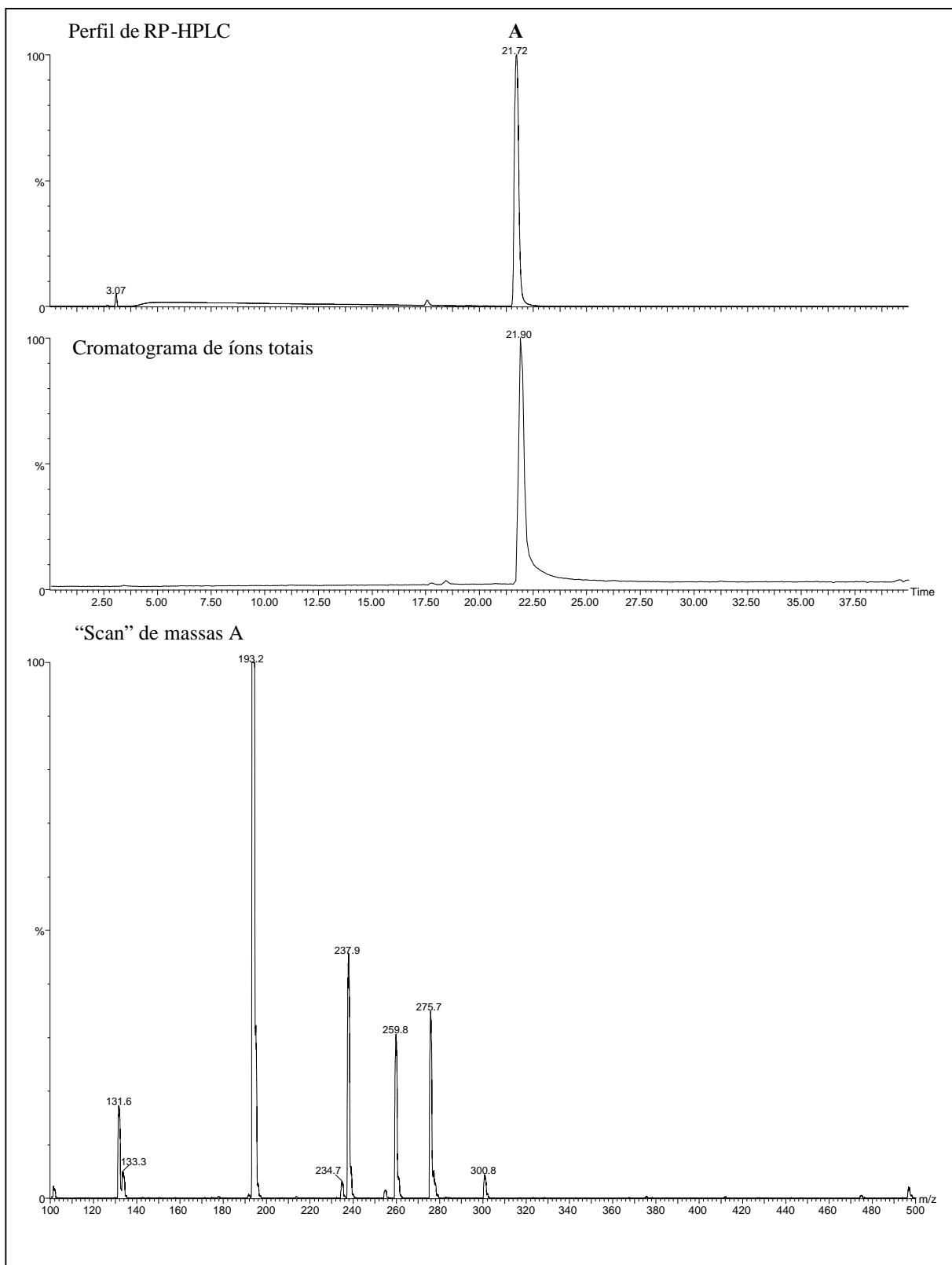


Figura 30. Análise por LC/ESI-MS de Z-Ala-OMe purificado. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 60% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 210 nm (λ); 1 mL/min (fluxo); 5-95 % B em 30 min (gradiente linear); 20 V (voltagem do cone), ES⁺ (modo de ionização).

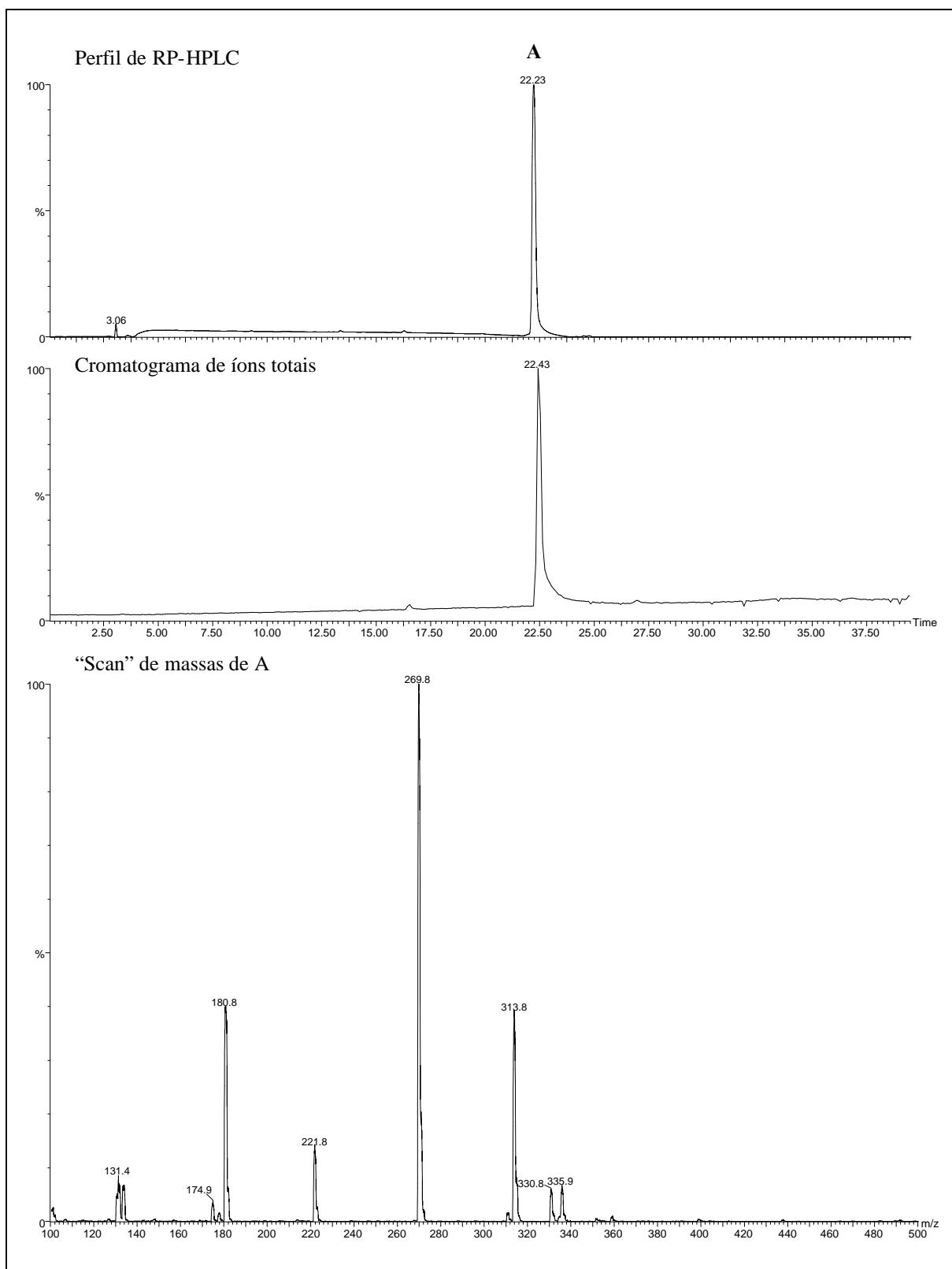
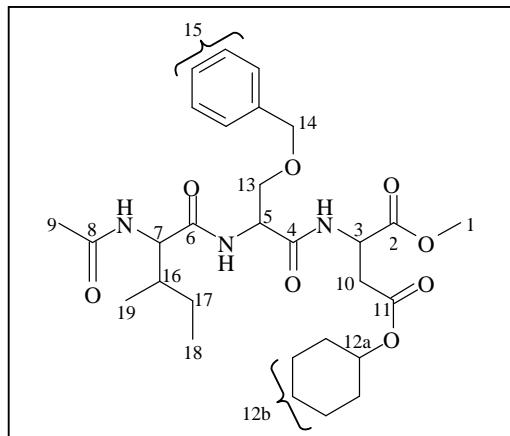


Figura 31. Análise por LC/ESI-MS de Z-Ala-OBzl purificado. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 90% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 210 nm (λ); 1 mL/min (fluxo); 5-95 % B em 30 min (gradiente linear); 20 V (voltagem do cone), ES⁺(modo de ionização).

c) Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe



RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) δ : 0,89 (t; $J = 7,4$ Hz; 3H; H-C.18); 0,93 (d; $J = 6,8$ Hz; 3H; H-C.19); 1,14-1,86 (m; 13H; H-C.12b, H-C-16 e H-C.17); 1,97 (s; 3H; H-C.9); 2,82 (dd; $J = 2,5$ Hz e 6,0 Hz; 2H; H-C.10); 3,68 (s; 3H; H-C.1); 3,73 (dd; $J = 5,4$ Hz e 8,5 Hz; 2H; H-C.13); 4,22 (d; $J = 7,4$ Hz; 1H; H-C.7); 4,63 (t aparente – dd; 1H; H-C.3); 4,70-4,73 (m; 1H; H-C.12a); 7,24-7,36 (m; 5H; H-C.15); os sinais de H-C.5 e H-C.14 devem estar encobertos pelo pico muito intenso em 4,87 ppm (H_2O) e devem ser um duplo doubleto (acoplamento com H-C.13 diastereotópicos) e um singlet, respectivamente.

Relação molar entre aminoácidos: Ile: 1,0; Asp: 1,1 (Ser é parcial ou totalmente degradada durante hidrólise ácida).

LC/ESI-MS (Figura 32): $[MK]^+$: 600,0 (encontrado), 600,8 (teórico); $[MNa]^+$: 584,0 (encontrado), 584,7 (teórico); $[MH]^+$: 562,2 (encontrado), 562,7 (teórico); pico em 406,6 relativo ao fragmento Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe (teórico: 407,5); pico em 332,9 relativo ao fragmento Ac-Ile-Ser(Bzl) (teórico: 333,4); pico em 229,8 relativo ao fragmento Asp(OcHx)-OMe (teórico: 230,3).

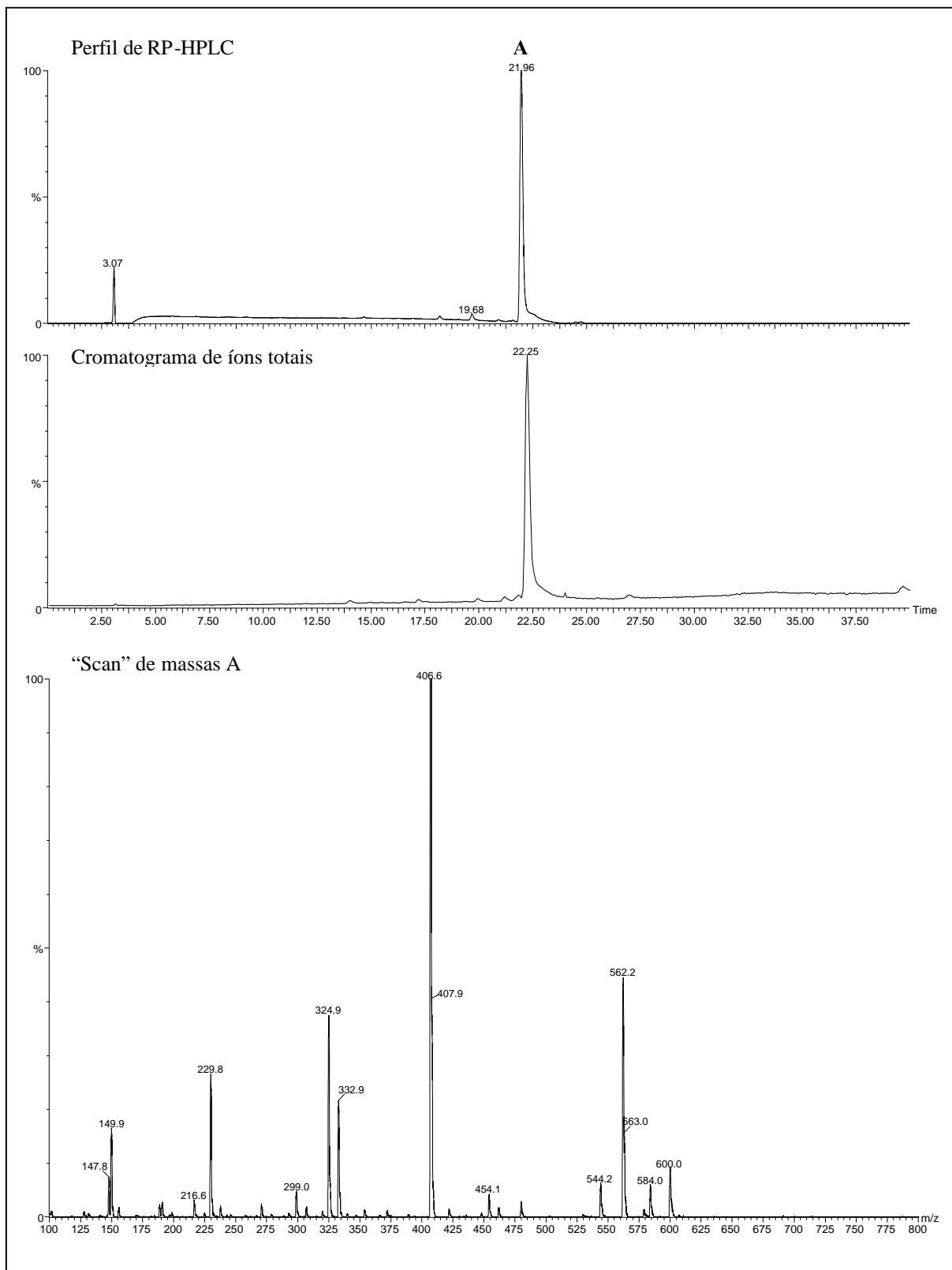
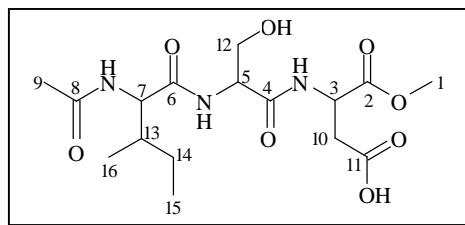


Figura 32. Análise por LC/ESI-MS de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe purificado. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvete A); 90% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvete B); 210 nm (λ); 1 mL/min (fluxo); 5-95 % B em 30 min (gradiente linear); 37 V (voltagem do cone), ES⁺ (modo de ionização).

d) Ac-Ile-Ser-Asp-OMe



RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) δ : 0,91 (t; $J = 7,2$ Hz; 3H; H-C.15); 0,95 (d; $J = 8,0$ Hz; 3H; H-C.16); 1,19 (hepteto; $J = 7$ Hz; 1H; H-C.13); 1,54 (m aparente - quinteto; 1H; H-C.14); 1,83 (m aparente - quinteto; 1H; Hb-C.14); 1,99 (s; 3H; H-C.9); 2,81-2,90 (m aparente - dd; 2H; H-C.10); 3,71 (s; 3H; H-C.1); 3,78 (d aparente - dd; 2H; H-C.12); 4,21 (d; $J = 7,0$ Hz; 1H; H-C.7); 4,48 (m aparente - dd; 1H; H-C.5); 4,76 (m aparente - dd; 1H; H-C.3).

Relação molar entre aminoácidos: Ile: 1,0; Asp: 0,9 (Ser é parcial ou totalmente degradada durante hidrólise ácida).

LC/ESI-MS (Figura 33): $[\text{MH}]^+$: 390,1 (encontrado), 390,4 (teórico); pico em 243,0 relativo ao fragmento Ac-Ile-Ser (teórico: 243,3); pico em 235,0 relativo ao fragmento Ser-Asp-OMe (teórico: 235,2); pico em 156,2 relativo ao fragmento Ac-Ile (teórico: 156,2); pico em 147,8 relativo ao fragmento Asp-OMe (teórico: 148,1).

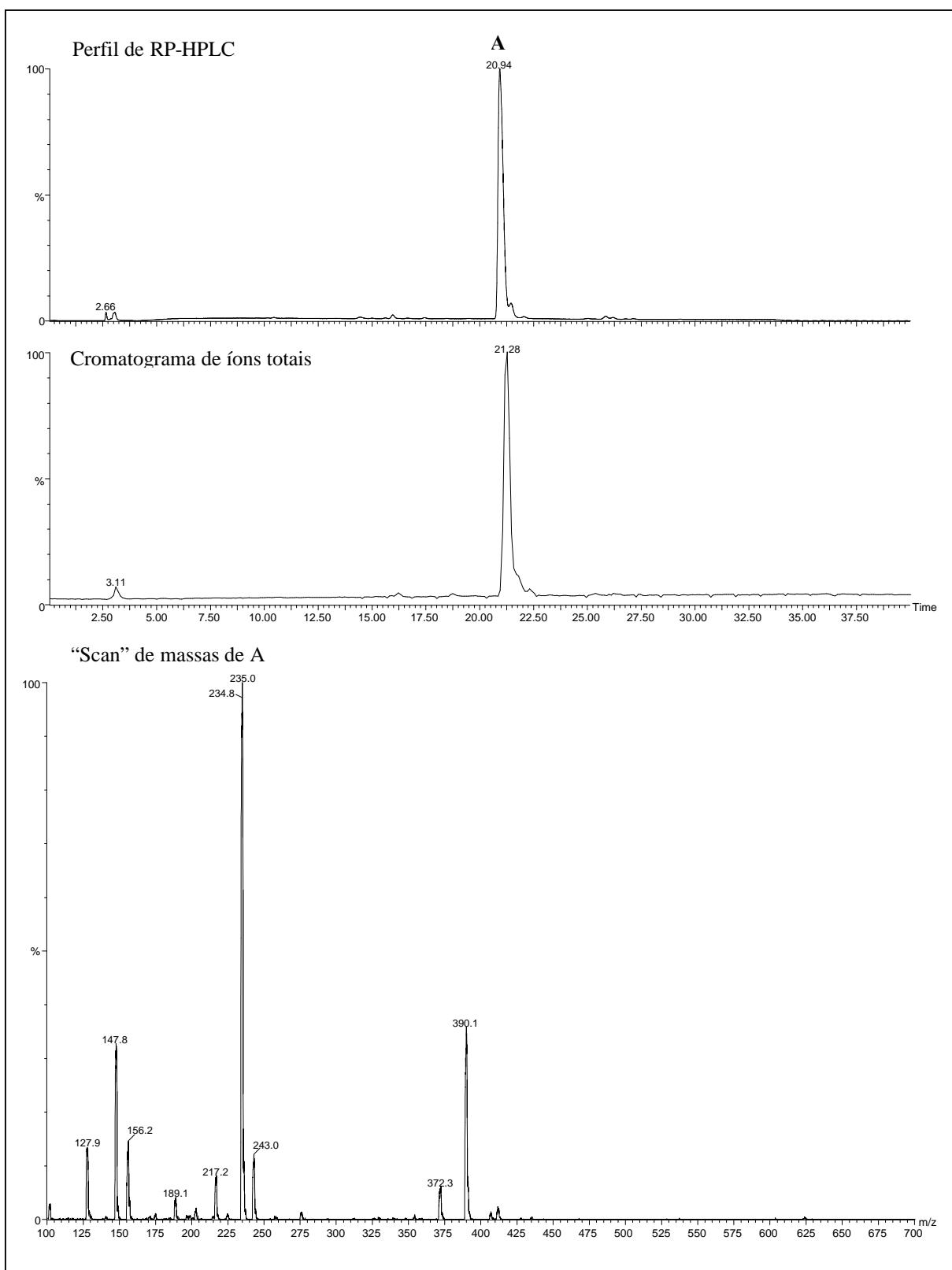
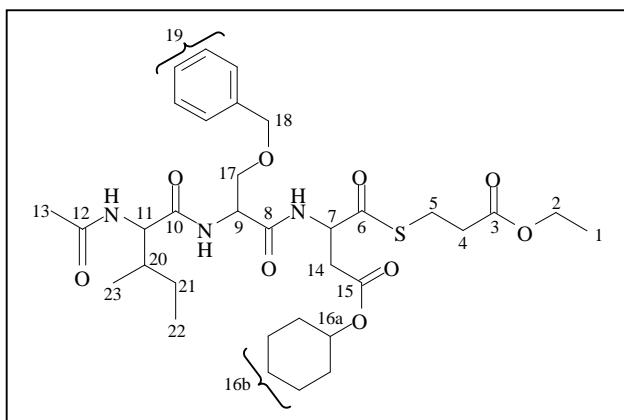


Figura 33. Análise por LC/ESI-MS de Ac-Ile-Ser-Asp-OMe purificado. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 20% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 210 nm (λ); 1 mL/min (fluxo); 5-95 % B em 30 min (gradiente linear); 37 V (voltagem do cone), ES⁺ (modo de ionização).

e) Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-S(CH₂)₂COOEt



RMN de ¹H (CD₃OD, 500 MHz) δ: 0,80 (t; J = 7,5 Hz; 3H; H-C.22); 0,84 (d; J = 6,5 Hz; 3H; H-C.23); 1,16-1,76 (m; 13H; H-C.16b, H-C-20 e H-C.21); 1,14 (t; J = 7,0 Hz; 3H; H-C.1); 1,89 (s; 3H; H-C.13); 2,45 (t; J = 7,2 Hz; 2H; H-C.5*); 2,66 (dd; J = 7,2 Hz e 16,7 Hz; 1H; Ha-C.14); 2,74 (dd; J = 5,5 Hz e 16,5 Hz; 1H; Hb-C.14); 2,95 (t; J = 7,0 Hz; 2H; H-C.4*); 3,70 (dd; J = 1,5 Hz e 5,5 Hz; 2H; H-C.17); 4,00 (q; J = 7,0 Hz; 2H; H-C.2); 4,14 (d; J = 7,0 Hz; 1H; H-C.11); 4,46 (s; 2H; H-C.18); 4,56 (t; J = 5,2 Hz; 1H; H-C.9); 4,61 (m aparente - quinteto; 1H; H-C.16a); 4,85 (dd; J = 5,5 Hz e 7,0 Hz; 1H; Ha-C.7); 7,17-7,26 (m; 5H; H-C.19). * A atribuição pode estar invertida.

Relação molar entre aminoácidos: Ile: 1,0; Asp: 1,0 (Ser é parcial ou totalmente degradada durante hidrólise ácida).

LC/ESI-MS (Figura 34): [MNa]⁺: 686,1 (encontrado), 686,8 (teórico); [MH]⁺: 664,1 (encontrado), 664,8 (teórico); pico em 509,1 relativo ao fragmento Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-S(CH₂)₂COOEt (teórico: 509,6); pico em 333,4 relativo ao fragmento Ac-Ile-Ser(Bzl) (teórico: 333,4); pico em 332,5 relativo ao fragmento Asp(OcHx)-S(CH₂)₂COOEt (teórico: 332,4); pico em 156,0 relativo ao fragmento Ac-Ile (teórico: 156,2).

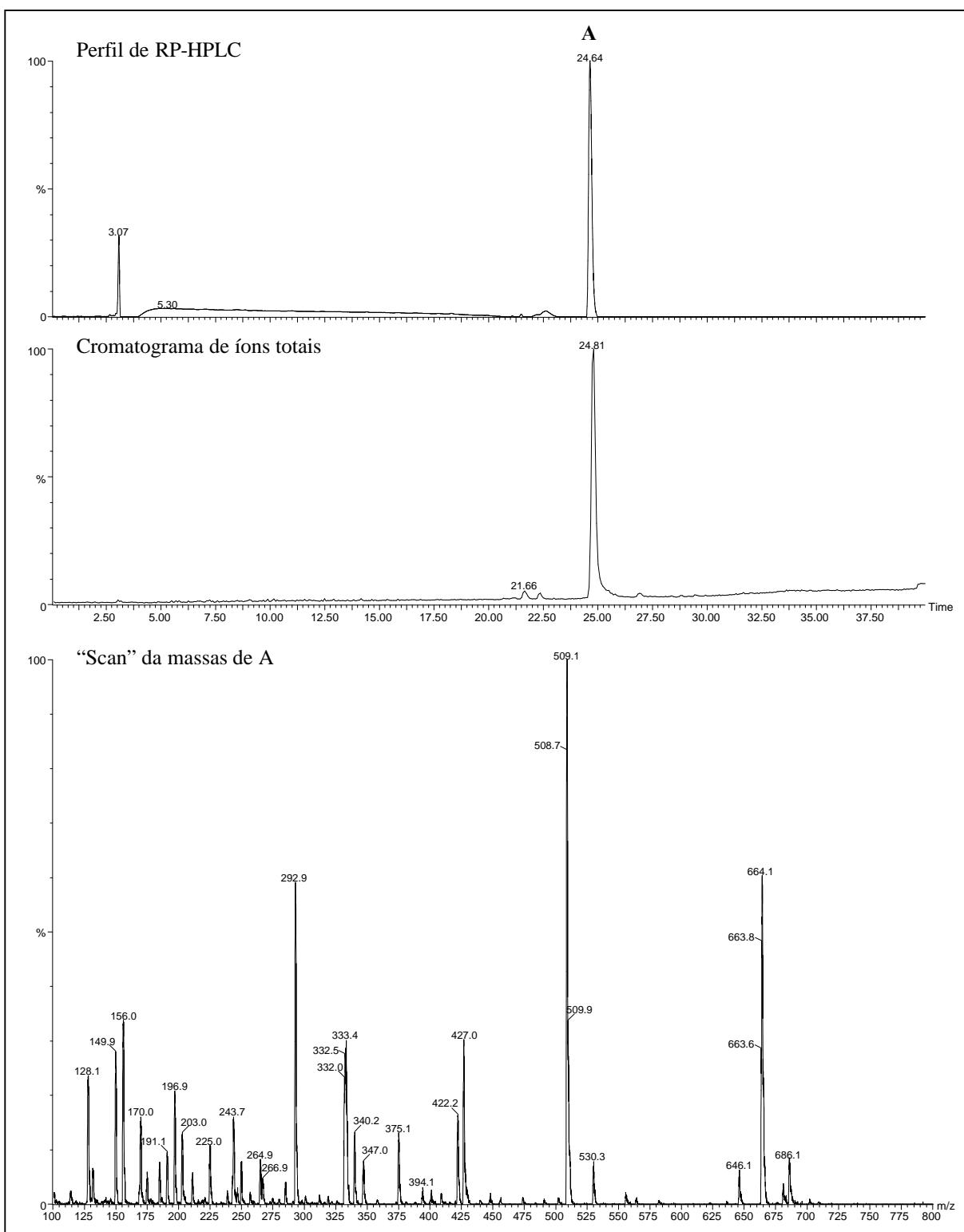
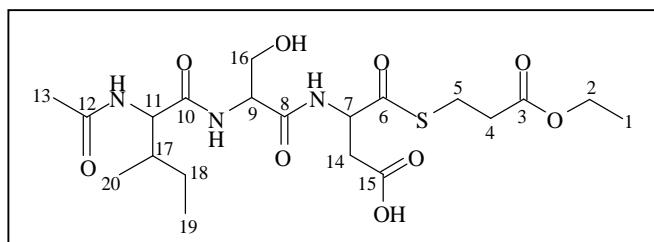


Figura 34. Análise por LC/ESI-MS de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-S(CH₂)₂COOEt purificado. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 90% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 210 nm (λ); 1 mL/min (fluxo); 5-95 % B em 30 min (gradiente linear); 50 V (voltagem do cone), ES⁺ (modo de ionização).

f) Ac-Ile-Ser-Asp-S(CH₂)₂COOEt



RMN de ¹H (CD₃OD, 500 MHz) δ: 0,82 (t; J = 7,5 Hz; 3H; H-C.19); 0,87 (d; J = 7,0 Hz; 3H; H-C.20); 1,15 (t; J = 7,2 Hz; 3H; H-C.1); 1,44-1,48 (m aparente - quinteto; 1H; Ha-C.18); 1,74-1,77 (m aparente - quinteto; 1H; Hb-C.18); 1,91 (s; 3H; H-C.13); 2,49 (t; J = 7,0 Hz; 2H; H-C.5*); 2,73 (t aparente - dd; 2H; H-C.14); 2,99 (t; J = 7,2 Hz; 2H; H-C.4*); 3,74 (d; J = 5,5 Hz; 2H; H-C.16); 4,03 (q; J = 7,0 Hz; 2H; H-C.2); 4,13 (d; J = 7,0 Hz; 1H; H-C.11); 4,42 (t; J = 5,5 Hz; 1H; H-C.9); 4,77-4,81 (m aparente - dd; 1H; H-C.7); o sinal de H-C.17 (hepteto) parece encoberto pelo sinal de H-C.1 em 1,15 ppm. * A atribuição pode estar invertida.

Relação molar entre aminoácidos: Ile: 1,0; Asp: 1,0 (Ser é parcial ou totalmente degradada durante hidrólise ácida).

LC/ESI-MS (Figura 35): [MH]⁺: 492,1 (encontrado), 492,6 (teórico); pico em 337,1 relativo ao fragmento Ser-Asp-S(CH₂)₂COOEt (teórico: 337,4); pico em 250,1 relativo ao fragmento Asp-S(CH₂)₂COOEt (teórico: 250,3); pico em 243,2 relativo ao fragmento Ac-Ile-Ser(Bzl) (teórico: 243,3); pico em 156,3 relativo ao fragmento Ac-Ile (teórico: 156,2).

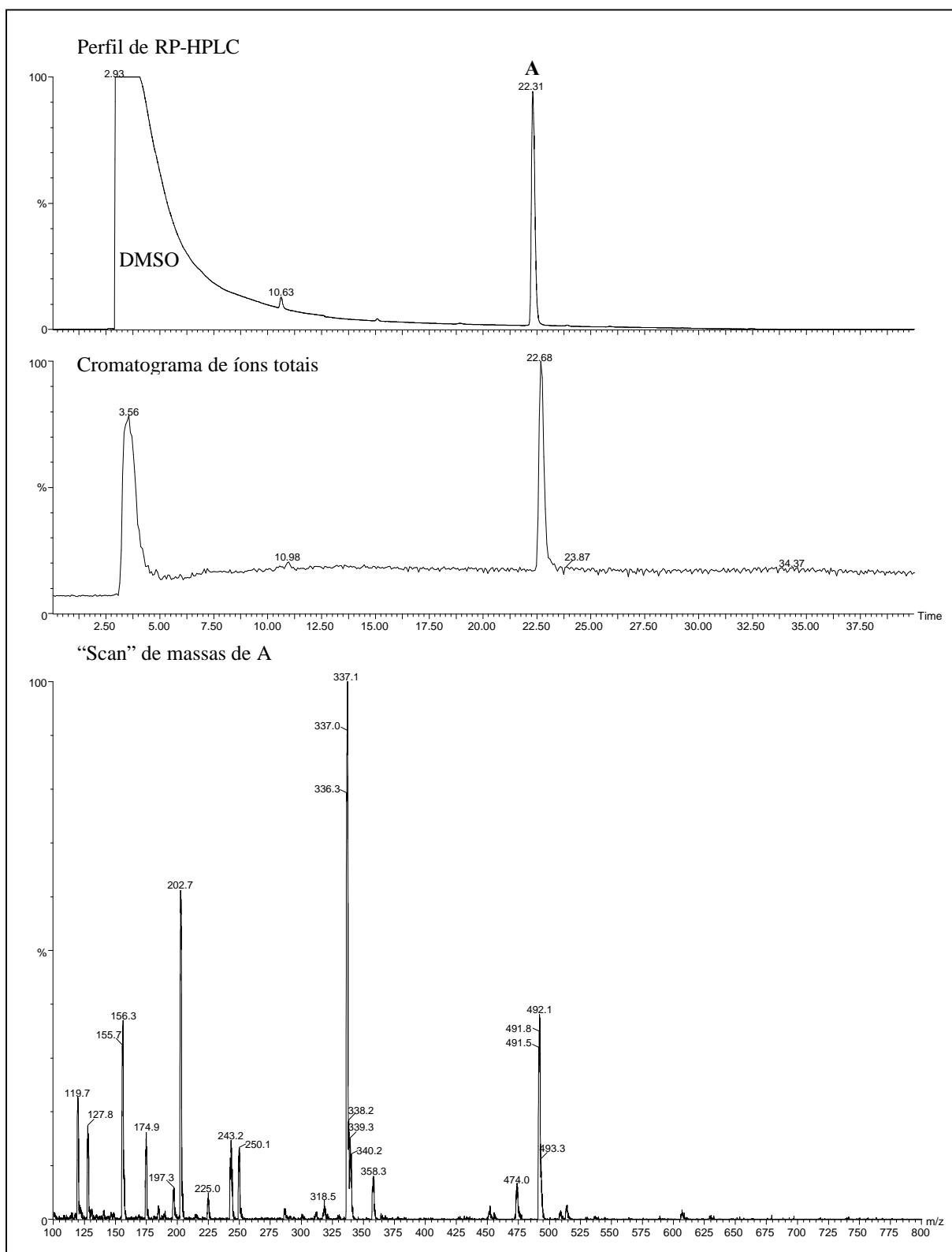
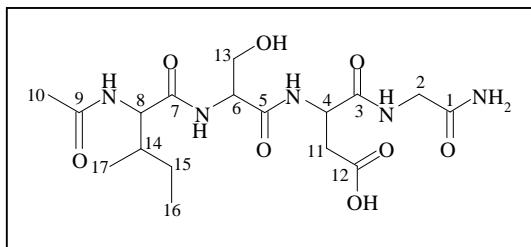


Figura 35. Análise por LC/ESI-MS de Ac-Ile-Ser-Asp-S(CH₂)₂COOEt purificado. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 40% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 210 nm (λ); 1 mL/min (fluxo); 5-95 % B em 30 min (gradiente linear); 37 V (voltagem do cone), ES⁺ (modo de ionização).

g) Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂



RMN de ¹H (CD₃OD, 500 MHz) δ: 0,82 (t; J = 7,5 Hz; 3H; H-C.16); 0,87 (d; J = 7,0 Hz; 3H; H-C.17); 1,19-1,24 (m aparente - hepteto; 1H; H-C.14); 1,42-1,47 (m aparente - quinteto; 1H; Ha-C.15); 1,72-1,75 (m aparente - quinteto; 1H; Hb-C.15); 1,90 (s; 3H; H-C.10); 2,78 (dd; J = 2,2 Hz e 5,7 Hz; 2H; H-C.11); 3,63-3,82 (m; 4H; H-C.2 e H-C.13); 4,09 (d; J = 7,5 Hz; 1H; H-C.8); 4,34 (t; J = 6,0 Hz; 1H; H-C.6); 4,61 (t; J = 6,0 Hz; 1H; H-C.4).

Relação molar entre aminoácidos: Ile: 1,0; Asp: 0,9; Gly: 0,9 (Ser é parcial ou totalmente degradada durante hidrólise ácida).

LC/ESI-MS (Figura 36): [MNa]⁺: 454,1 (encontrado), 454,4 (teórico); [MH]⁺: 431,9 (encontrado), 432,4 (teórico); pico em 415,3 relativo ao fragmento Ac-Ile-Ser-Asp-Gly (teórico: 415,4); pico em 358,4 relativo ao fragmento Ac-Ile-Ser-Asp (teórico: 358,4); pico em 277,1 relativo ao fragmento Ser-Asp-Gly (teórico: 277,2); pico em 242,8 relativo ao fragmento Ac-Ile-Ser (teórico: 243,3); pico em 189,8 relativo ao fragmento Asp-Gly-NH₂ (teórico: 190,2); pico em 156,3 relativo ao fragmento Ac-Ile (teórico: 156,2).

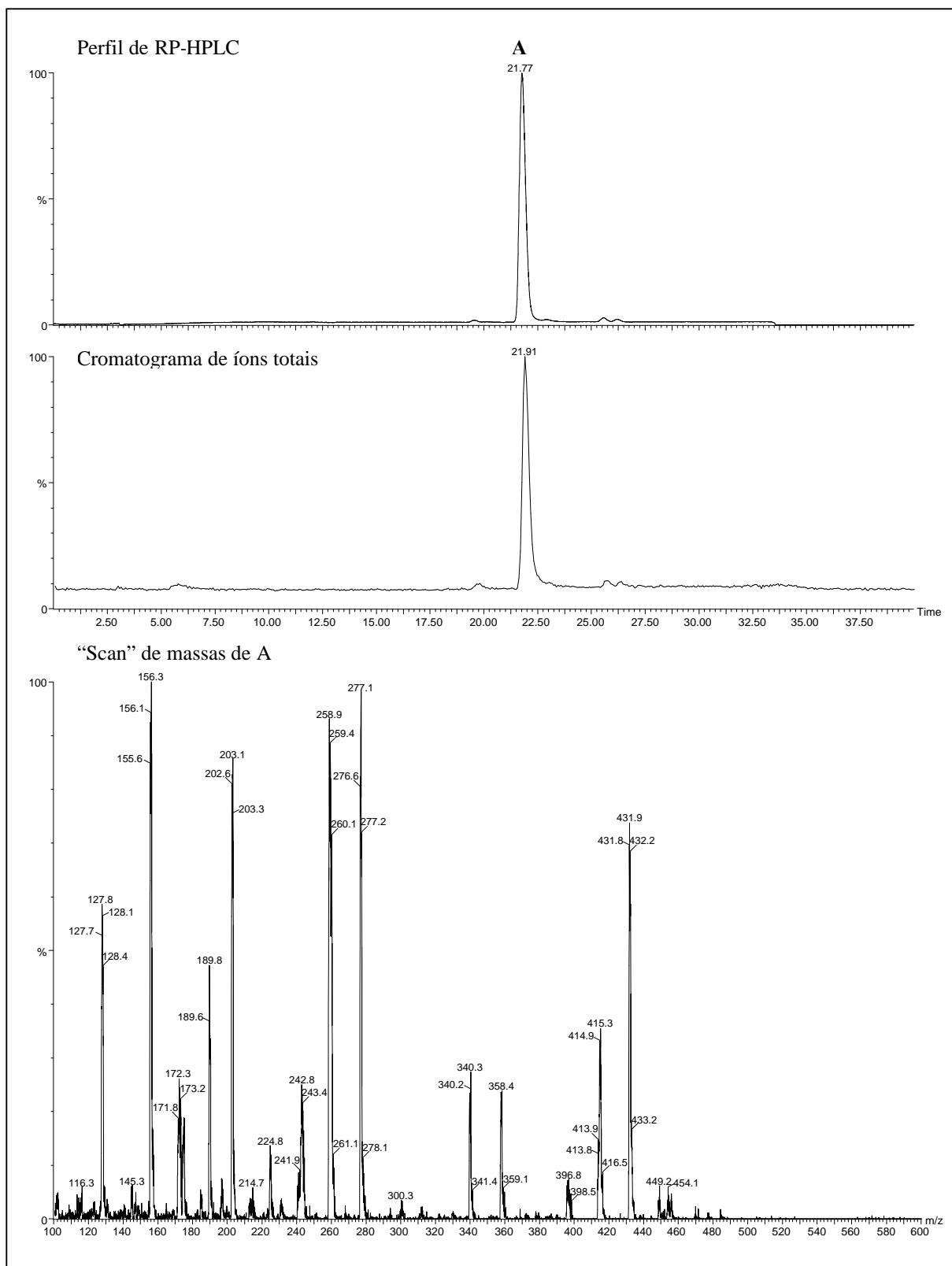


Figura 36. Análise por LC/ESI-MS de Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂ purificado. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 10% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 210 nm (λ); 1 mL/min (fluxo); 5-95 % B em 30 min (gradiente linear); 37 V (voltagem do cone), ES⁺ (modo de ionização).

h) Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(2ClZ)-OMe

Relação molar entre aminoácidos: Phe: 1,0; Leu: 1,1; Pro: 1,0; Ile: 1,6; Gly: 1,0; Lys: 0,9.

LC/ESI-MS (Figura 37): $[MNa]^+$: 1033,5 (encontrado), 1034,6 (teórico); $[MH]^+$: 1011,7 (encontrado), 1012,7 (teórico); pico em 822,4 relativo ao fragmento Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(2ClZ)-OMe (teórico: 823,4); pico em 709,4 relativo ao fragmento Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(2ClZ)-OMe (teórico: 710,3); pico em 683,2 relativo ao fragmento Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly (teórico: 683,9); pico em 626,3 relativo ao fragmento Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile (teórico: 626,8); pico em 513,1 relativo ao fragmento Ac-Phe-Leu-Pro-Ile (teórico: 513,7); pico em 499,2 relativo ao fragmento Ile-Gly-Lys(2ClZ)-OMe (teórico: 500,0).

i) Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe

Relação molar entre aminoácidos: Phe: 1,0; Leu: 1,2; Pro: 1,0; Ile: 1,7; Gly: 0,9; Lys: 0,9.

LC/ESI-MS (Figura 38): $[MH]^+$: 843,7 (encontrado), 844,1 (teórico); pico em 654,6 relativo ao fragmento Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe (teórico: 654,9); pico em 541,1 relativo ao fragmento Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe (teórico: 541,7); pico em 331,0 relativo ao fragmento Ile-Gly-Lys-OMe (teórico: 331,4); pico em 218,1 relativo ao fragmento Gly-Lys-OMe (teórico: 218,3).

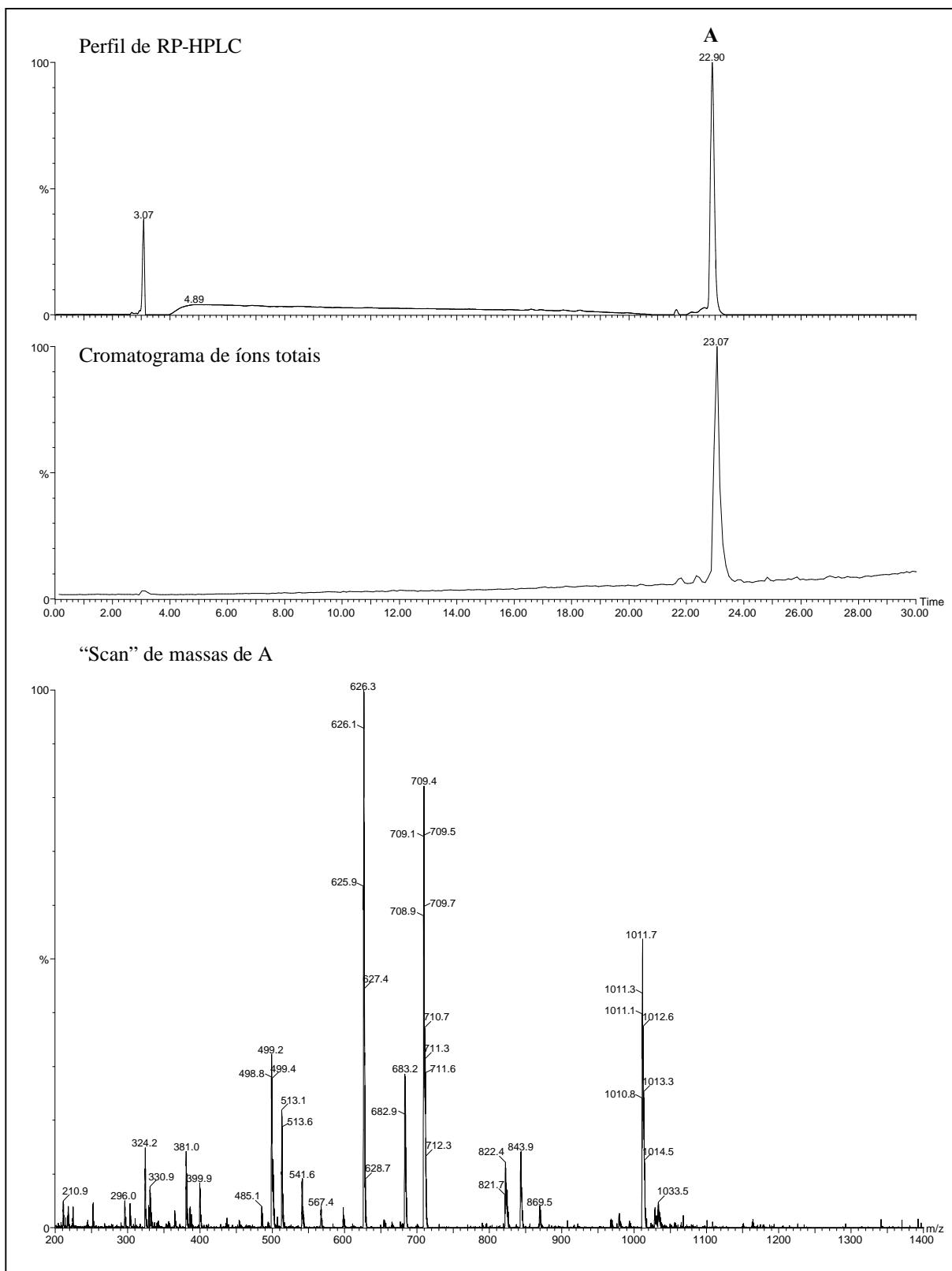


Figura 37. Análise por LC/ESI-MS de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys(2ClZ)-OMe purificado. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 90% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 210 nm (λ); 1 mL/min (fluxo); 5-95 % B em 30 min (gradiente linear); 37 V (voltagem do cone), ES⁺ (modo de ionização).

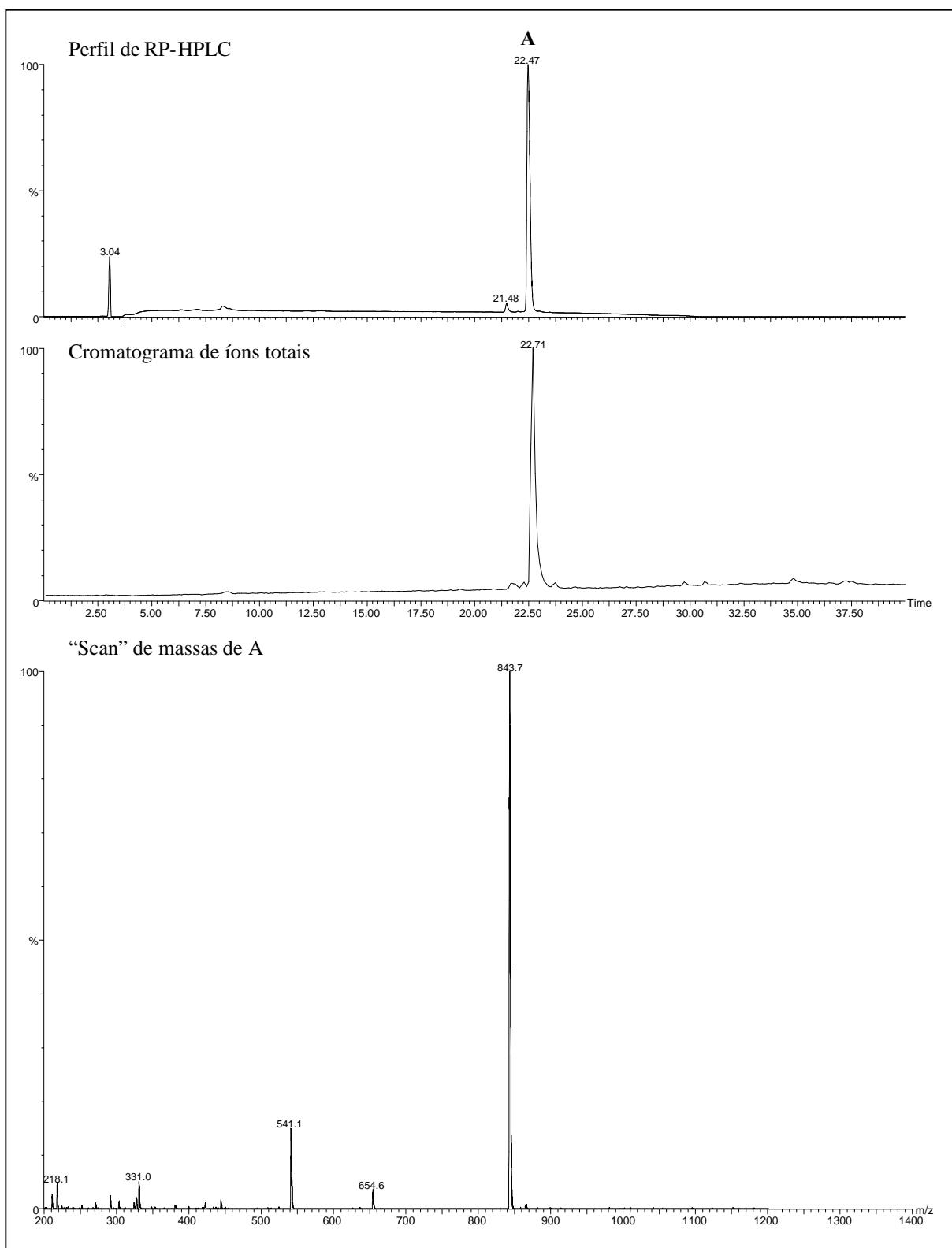


Figura 38. Análise por LC/ESI-MS de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe purificado. Condições analíticas: Vydac C₁₈ (coluna); 0,1% TFA/H₂O (solvente A); 60% ACN/H₂O contendo 0,09% de TFA (solvente B); 210 nm (λ); 1 mL/min (fluxo); 5-95 % B em 30 min (gradiente linear); 37 V (voltagem do cone), ES⁺ (modo de ionização).

5. CONCLUSÕES

- Todos os metais investigados (Ca^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} e Cu^{+2}) foram capazes de mediar as metanólises de ligações ésteres das peptidil-resinas propostas, sendo que dentre as quatro resinas empregadas nesse estudo [KOR e PAM (estratégia Boc), HMBA e Wang (Fmoc)], a KOR demonstrou ser a mais apropriada para a obtenção de N^{α} -acil-peptídeo protegido-OMe. Dentre as compatíveis com a estratégia Fmoc, a mais adequada para esse fim foi a HMBA.
- Com relação à metanólise da ligação éster de oxima de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-KOR, o procedimento convencional que emprega a catálise básica apresentou ligeira superioridade em relação à mediação por metais; dentre estes, Ca^{+2} foi o mediador mais efetivo, seguido de Zn^{+2} e Cu^{+2} , sendo estes três mediadores muito mais eficientes do que Co^{+2} .
- A mediação por Ca^{+2} se mostrou apropriada até mesmo para a trifluoroetanólise da ligação peptidil-KOR, gerando ésteres trifluoretílicos de peptídeos protegidos, compostos de grande utilidade na síntese enzimática da ligação peptídica.
- Com respeito à metanólise da ligação peptidil-resina de Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-HMBA, a mediação por Zn^{+2} foi o procedimento mais efetivo, sendo superior, inclusive, aos convencionalmente usados (catálise básica). Foi também observado que tanto a catálise básica quanto a mediação por Ca^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} e Cu^{+2} levaram à remoção indesejada do grupo Fmoc em maior ou menor extensão.
- Apesar da superioridade discreta das bases (TEA, DIPEA e DBU) em relação aos metais, o procedimento eleito como o mais adequado para obtenção de N^{α} -acil-peptídeo protegido-OMe, por utilizar condições reacionais mais brandas, foi a metanólise da ligação peptidil-KOR mediada por Ca^{+2} (1 eq./eq. de peptídeo) em 50% MeOH/DMF a 50°C. Esta condição foi usada com sucesso na obtenção de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe e Ac-Phe-Leu-Pro-

Ile-Ile-Gly-Lys(2ClZ)-OMe com eficiências similares ou mesmo superiores às de outros procedimentos atualmente empregados.

- As tentativas de confirmar a hipótese de coordenação como mecanismo de assistência por metal da metanolise da ligação peptidil-KOR usando a espectroscopia FT-Raman sugeriram que a interação do metal com a peptidil-resina, embora efetiva em termos de mediação, deva ser relativamente fraca.
- A mediação por Ca^{+2} também foi aplicável à solvólise e alcoólise da ligação éster de oxima para gerar Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-S(CH₂)₂COOEt a partir da respectiva peptidil-KOR e Z-Ala-OR (R = Me ou Bzl) a partir de Z-Ala-KOR. As condições usadas levaram a eficiências comparáveis ou até superiores às conferidas por procedimentos atualmente usados.
- Após desproteção das cadeias laterais, os Ac-Ile-Ser-Asp-OMe e Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-OMe obtidos foram reconhecidos como doadores de acila em acoplamentos enzimáticos com Gly-NH₂. Neste ponto deve-se destacar que:
 - i)* este é o primeiro relato de uso de cPPL em acoplamentos de fragmentos peptídicos esterificados com aminoácido amidado (65% de Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂ em 1 h e 55% de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-Gly-NH₂ em 24 h). Como esta preparação contém proteases (fato confirmado por análise de PAGE-SDS e ensaios de atividade frente a substratos cromogênicos de proteases) que não apresentam especificidade por Asp, a enzima responsável pela catálise na síntese de Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂ deve ter sido a própria PPL, enquanto que na síntese de Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-Gly-NH₂, os catalisadores devem ter sido a tripsina, a PPL ou ambas. De fato, a tripsina também mediou o acoplamento entre Ac-Phe-Leu-Pro-Ile-Ile-Gly-Lys-Gly-OMe e Gly-NH₂, porém, o produto gerado com rendimento similar ao da cPPL apresentou qualidade inferior em relação ao obtido com a preparação lipásica, que, por sinal, é cerca de 600 vezes mais barata;

- ii)* este é o primeiro relato de utilização de líquidos iônicos em reação de formação de ligação peptídica usando preparações lipásicas comerciais;
- iii)* para os acoplamentos envolvendo cPPL, o tampão Tris se mostrou ligeiramente superior ao fosfato;
- iv)* as preparações lipásicas oriundas de leveduras foram, em geral, catalisadores pouco eficientes para os acoplamentos estudados; dentre elas, a Cal A apresentou o melhor resultado na formação de ligação peptídica entre o heptapeptídeo e Gly-NH₂ (15% em 24 h), sendo este o primeiro relato de utilização da Cal A em síntese enzimática da ligação peptídica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, F.R.; Lima, D.G.; Hamu, E.H.; Wolf, C.; Suarez, P.A.Z. (2004) Utilization of metal complexes as catalysts in the transesterification of Brazilian vegetable oils with different alcohols. *J. Mol. Catal., A Chem.*, **209**, 29-33.
- Abreu, F.R.; Alves, M.B.; Macedo, C.C.S.; Zara, L.F.; Suarez, P.A.Z. (2005) New multi-phase catalytic systems based on tin compounds active for vegetable oil transesterification reaction. *J. Mol. Catal., A Chem.*, **227**, 263-267.
- Aimoto. S. (1999) Polypeptide synthesis by the thioester method. *Biopolymers*, **51**, 247-265.
- Aimoto, S. (2001) Contemporary methods for peptide and protein synthesis. *Curr. Org. Chem.*, **5**, 45-87.
- Albericio, F.; Carpino, L.A. (1997) Coupling reagents and activation. *Methods Enzymol.*, **289**, 104-126.
- Albericio, F. (2000) Orthogonal protecting groups for N^{α} -amino and C-terminal carboxyl functions in solid-phase peptide synthesis. *Biopolymers*, **55**, 123-139.
- Ali, F.; Guglin, M.; Vaitkevicius, P.; Ghali, J.K. (2007) Therapeutic potential of vasopressin receptor antagonists. *Drugs*, **67**, 847-858.
- Altava, B.; Burguete, M.I.; Garcia-Verdugo, E.; Luis, S.V.; Vicente, M.J. (2001) The use of NIR-FT-Raman spectroscopy for the characterization of polymer-supported reagents and catalysts. *Tetrahedron*, **57**, 8675-8683.
- Amblard, M.; Fehrentz, J.A.; Martinez, J.; Subra, G. (2006) Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Mol. Biotechnol.*, **33**, 239-254.
- Anand, B.S.; Nashed, Y.E.; Mitra, A.K. (2003) Novel dipeptide prodrugs of acyclovir for ocular herpes infections: bioreversion, antiviral activity and transport across rabbit cornea. *Curr. Eye Res.*, **26**, 151-163.
- Anand, B.S.; Katragadda, S.; Nashed, Y.E.; Mitra, A.K. (2004) Amino acid prodrugs of acyclovir as possible antiviral agents against ocular HSV-1 infections: Interactions with the neutral and cationic amino acid transporter on the corneal epithelium. *Curr. Eye Res.*, **29**, 153-166.
- Anbalagan, V.; Patel, J.N.; Niyakorn, G.; Stipdonk, M.J.V. (2003) McLafferty-type rearrangement in the collision-induced dissociation of Li^+ , Na^+ and Ag^+ cationized esters of N-acetylated peptides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 291-300.
- Arap, M.A. (2005) Phage display technology – Applications and innovations. *Genet. Mol. Biol.*, **28**, 1-9.
- Athawale, V.; Manjrekar, N.; Athawale, M. (2002) Lipase-catalyzed synthesis of geranyl methacrylate by transesterification: study of reaction parameters. *Tetrahedron Lett.*, **43**, 4797-4800.

- Atherton, E.; Fox, H.; Harkiss, D.; Logan, C.J.; Sheppard, R.C.; Williams, B.J. (1978) A mild procedure for solid phase peptide synthesis: use of fluorenylmethoxycarbonylamino-acids. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 537-539.
- Auld, D.S.; Holmquist, B. (1974) Carboxypeptidase A. Differences in the mechanisms of ester and peptide hydrolysis, *Biochemistry*, **13**, 4355-4361.
- Bacheva, A.V.; Filippova, I.Y.; Lysogorskaya, E.N.; Oksenoit, E.S. (2000) Stability and catalytic properties of subtilisin in acetonitrile/dimethylformamide mixtures with low water content. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, **11**, 89-96.
- Barbas, C.; Wong, C.-H. (1987) Papain catalysed peptide synthesis: control of amidase activity and the introduction of unusual amino acids. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 533-534.
- Batenburg, W.W.; Tom, B.; Schuijt, M.P.; Danser, A.H. (2005) Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation. Focus on bradykinin, NO and endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). *Vascul Pharmacol.*, **42**, 109-118.
- Bemquerer, M.P.; Adlercreutz, P.; Tominaga, M. (1994) Pepsin-catalyzed peptide-synthesis in organic media - Studies with free and immobilized enzyme. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **44**, 448.
- Bemquerer, M.P.; Bloch, C.; Brito, H.F.; Teotonio, E.E.S.; Miranda, M.T.M. (2002) Steady-state luminescence investigation of the binding of Eu(III) and Tb(III) ions with synthetic peptides derived from plant thionins. *J. Inorg. Biochem.*, **91**, 363-370.
- Benoiton, N.L.; Lee, Y.C.; Chen, F.M. (1993) Identification and suppression of decomposition during carbodiimide-mediated reactions of Boc-amino acids with phenols, hydroxylamines and amino acid ester hydrochlorides. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **41**, 587-94.
- Bergman, M.; Fraenkel-Conrat, H. (1938) The enzymatic synthesis of peptide bonds. *J. Biol. Chem.*, **124**, 1-6.
- Bergman, M.; Fruton, J.S. (1938) Some synthetic and hydrolytic experiments with chymotrypsin. *J. Biol. Chem.*, **124**, 321-329.
- Biancalana, S.; Hudson, D.; Songster, M.F.; Thompson, S.A. (2001) Fmoc chemistry compatible thio-ligation assembly of proteins. *Lett. Pept. Sci.*, **7**, 291-297.
- Bienvenue, D.L.; Mathew, R.S.; Ringe, D.; Holz, R.C. (2002) The aminopeptidase from Aeromonas proteolytica can function as an esterase. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **7**, 129-135.
- Bizzozero, S.A.; Dutler, H.; Ruckert, P. (1988) Chymotrypsin-catalyzed peptide-synthesis – Kinetic-analysis of the kinetically controlled peptide-bond formation. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **32**, 64-73.
- Blake, J. (1981) Peptide segment coupling in aqueous medium: silver ion activation of the thiocarboxyl group. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **17**, 273-274.
- Blake, J.; Yamashiro, D.; Ramasharma, K.; Li, C.H. (1986) Chemical synthesis of alpha-inhibin-92 by the thiocarboxyl segment coupling method. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **28**, 468-476.

- Blakey, I.; Day, G.; Girjes, E.; Hunter, D.S.; Rasoul, F. (2003) Characterisation of grafted supports used for solid-phase synthesis. *Polym. Int.*, **52**, 1734-1739.
- Bodanszky, M.; Sheehan, J.T. (1966) Active esters and resins in peptide synthesis. *Chem. Ind.*, 1597-1598.
- Bodanszky, M.; Deshmane, S.S.; Martinez, J. (1979) Side reactions in peptide synthesis. 11. Possible removal of the 9-fluorenylmethyloxycarbonyl group by the amino components during coupling. *J. Org. Chem.*, **44**, 1622-1625.
- Bordusa, F.; Ullmann, D.; Elsner, C.; Jakubke, H.-D. (1997) Substrate mimetic mediated peptide synthesis: an irreversible ligation strategy that is independent of substrate specificity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **36**, 2473-2475.
- Bordusa, F.; Dahl, C.; Jakubke, H.-D.; Burger, K.; Koksch, B. (1999) Synthesis of α -fluoroalkyl substituted peptides via enzymatic fragment condensation. *Tetrahedron Asymmetry*, **10**, 307-313.
- Bordusa, F. (2002) Substrate mimetics in protease catalysis: characteristics, kinetics, and synthetic utility. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **3**, 159-180.
- Boyer, V.; Stanchev, M.; Fairbanks, A.J.; Davis, B.G. (2001) Ready protease-catalyzed synthesis of carbohydrate–amino acid conjugates. *Chem. Commun.*, 1908-1909.
- Bozcaarmutlu, A.; Arinc, E. (2007) Effect of mercury, cadmium, nickel, chromium and zinc on kinetic properties of NADPH-cytochrome P450 reductase purified from leaping mullet (*Liza saliens*). *Toxicol. In Vitro*, **21**, 408-416.
- Bruice, P.Y. (2004) *Organic chemistry, 4th edition*. Pearson Prentice Hall: New Jersey.
- Brunel, J.M.; Salmi, C.; Letourneux, Y. (2005) Efficient peptide coupling method of conjugated carboxylic acids with methyl ester amino acids hydrochloride. Application to the synthesis of Fa-Met, an important enzymatic substrate. *Tetrahedron Lett.*, **46**, 217-220.
- Brunsveld, L.; Kuhlmann, J.; Waldmann, H. (2006) Synthesis of palmitoylated Ras-peptides and -proteins. *Methods*, **40**, 151-165.
- Buchardt; O.; Breddam, K.; Henriksen, D. (1996) Process for the preparation of C-terminally amidated peptides. US Patent 5580751.
- Camarero, J.A.; Cotton, G.J.; Adeva, A.; Muir, T.W. (1998) Chemical ligation of unprotected peptides directly from a solid support. *J. Pept. Res.*, **51**, 303-316.
- Camarero, J.A.; Adeva, A.; Muir, T.W. (2000) 3-Thiopropionic acid as a highly versatile multidetectable thioester resin linker. *Lett. Pept. Sci.*, **7**, 17-21.
- Camarero, J.A.; Hackel, B.J.; Yoreo, J.J.; Mitchell, A.R. (2004) Fmoc-based synthesis of peptide α -thioesters using an aryl hydrazine support. *J. Org. Chem.*, **69**, 4145-4151.
- Camarero, J.A.; Mitchell, A.R. (2005) Synthesis of proteins by native chemical ligation using Fmoc-based chemistry. *Protein Pept. Lett.*, **12**, 723-728.

- Camperi, S.A.; Marani, M.M.; Iannucci, N.B.; Cote, S.; Albericio, F.; Cascone, O. (2005) An efficient strategy for the preparation of one-bead-one-peptide libraries on a new biocompatible solid support. *Tetrahedron Lett.*, **46**, 1561-1564.
- Capellas, M.; Benaiges, M.D.; Caminal, G.; Gonzalez, G.; Lopez-Santin, J.; Clapes, P. (1996) Enzymatic synthesis of a CCK-8 tripeptide fragment in organic media. *Biotechnol. Bioeng.*, **50**, 700-708.
- Capellas, M.; Caminal, G.; Gonzalez, G.; Lopez-Santin, J.; Clapes, P. (1997) Enzymatic condensation of cholecystokinin CCK-8 (4-6) and CCK-8 (7-8) peptide fragments in organic media. *Biotechnol. Bioeng.*, **56**, 456-463.
- Cavicchioni, G.; Spisani, S. (2001) A hydrophilic residue at position 2 can improve specific biological responses in fMLP-OMe analogs. *J. Pept. Res.*, **58**, 257-262.
- Cavicchioni, G.; Fraulini, A.; Turchetti, M.; Varani, K.; Falzarano, S.; Pavan, B.; Spisani, S. (2005) Biological activity of for-Met-Leu-Phe-OMe analogs: Relevant substitutions specifically trigger killing mechanisms in human neutrophils. *Eur. J. Pharmacol.*, **512**, 1-8.
- Cavicchioni, G.; Fraulini, A.; Falzarano, S.; Spisani, S. (2006) Structure-activity relationship of for-L-Met-L-Leu-L-Phe-OMe analogues in human neutrophils. *Bioorg. Chem.*, **34**, 298-318.
- Cerovsky, V. (1990) Free trypsin-catalyzed peptide synthesis in acetonitrile with low water content. *Biotechnol. Lett.*, **12**, 899-904.
- Cerovsky, V.; Bordusa, F. (2000) Protease-catalyzed fragment condensation via substrate mimetic strategy: a useful combination of solid-phase peptide synthesis with enzymatic methods. *J. Pept. Res.*, **55**, 325-329.
- Chakravarthi, S.; Jessop, C.E.; Bulleid, N.J. (2006) The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Rep.*, **7**, 271-275.
- Chen, S.T.; Tsai, C.F.; Wang, K.T. (1996) Incorporation of unnatural amino acid derivatives into a peptide bond *via* an oxime ester catalysed by papain or lipase. *Chem. Commun.*, 165-166.
- Chiva, C.; Barthe, P.; Codina, A.; Gaini, M.; Molina, F.; Granier, C.; Pugniere, M.; Inui, T.; Nishio, H.; Nishiuchi, Y.; Kimura, T.; Sakakibara, S.; Albericio, F.; Giralt, E. (2003) Synthesis and NMR structure of P41icf, a potent inhibitor of human Cathepsin L. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 1508-1517.
- Clark, T.D.; Sastry, M.; Brown, C.; Wagner, G. (2006) Solid-phase synthesis of backbone-cyclized β -helical peptides. *Tetrahedron*, **62**, 9533-9540.
- Conde, S.; López-Serrano, P.; Martínez, A. (2000) Regioselective lipase-catalysed γ -monoamidation of D-glutamic acid diesters: effects of the N-protecting group. *Tetrahedron Asymmetry*, **11**, 2537-2545.
- Conde, S.; López-Serrano, P. (2002) Regioselective lipase-catalysed amidation of N-blocked L- and D-aspartic acid diesters. *Eur. J. Org. Chem.*, 922-929.

- Couture, R.; Harrisson, M.; Vianna, R.M.; Cloutier, F. (2001) Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur. J. Pharmacol.*, **429**, 161-176.
- Danieli, E.; Trabocchi, A.; Menchi, G.; Guarna, A. (2007) Synthesis and conformational analysis of constrained β -turn mimetics incorporating a bicyclic turn inducer by use of the petasis three-component reaction on solid phase. *Eur. J. Org. Chem.*, 1659-1668.
- Davani, S.; Vergely, C.; Royer, B.; Bouhaddi, M.; Reyssie, H.; Rochette, L.; Kantelip, J. (2007) Delayed 24 hours N-omega-nitro-(L)-arginine methyl ester injection induces pharmacological cardioprotection against reperfusion injury. *Cell. Mol. Biol.*, **52**, 868-873.
- Davis, B.G. (2003) Chemical modification of biocatalysts. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**, 379-386.
- Dawson, P.E.; Muir, T.W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S.B.H. (1994) Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*, **266**, 776-779.
- Dawson, P.E.; Kent, S.B.H. (2000) Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 923-960.
- DeGrado, W.F.; Kaiser, E.T. (1980) Polymer-bound oxime esters as supports for solid-phase peptide synthesis. Preparation of protected peptide fragments. *J. Org. Chem.*, **45**, 1295-1300.
- DeGrado, W.F.; Kaiser, E.T. (1982) Solid-phase of protected peptides on a polymer-bound oxime: preparation of segments comprising the sequence of a cytotoxic 26-peptide analogue. *J. Org. Chem.*, **47**, 3258-3261.
- Deschrevel, B.; Vincent, J.C.; Ripoll, C.; Thellier, M. (2003) Thermodynamic parameters monitoring the equilibrium shift of enzyme-catalyzed hydrolysis/synthesis reactions in favor of synthesis in mixtures of water and organic solvent. *Biotechnol. Bioeng.*, **81**, 167-177.
- Dolence, E.K.; Dolence, J.M.; Poulter, C.D. (2001) Solid-phase synthesis of a radiolabeled, biotinylated, and farnesylated $\text{Ca}_1\text{a}_2\text{X}$ peptide substrate for Ras- and a-mating factor converting enzyme. *Bioconjugate Chem.*, **12**, 35-43.
- Durek, T.; Torbeev, V.Y.; Kent, S.B.H. (2007) Convergent chemical synthesis and high-resolution x-ray structure of human lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 4846-4851.
- von Eggelkraut-Gottanka, R.; Klose, A.; Beck-Sickinger, A.G.; Beyermann, M. (2003) Peptide thioester formation using standard Fmoc-chemistry. *Tetrahedron Lett.*, **44**, 3551-3554.
- Erbeldinger, M.; Ni, X.; Halling, P.J. (1998) Effect of water and enzyme concentration on thermolysin-catalyzed solid-to-solid peptide synthesis. *Biotechnol. Bioeng.*, **59**, 68-72.
- Erbeldinger, M.; Mesiano, A.J.; Russell, A.J. (2000) Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid - an alternative to enzymatic catalysis in organic solvents. *Biotechnol. Prog.*, **16**, 1129-1131.
- Faber, K. (1997) *Biotransformations in Organic Chemistry*. 3rd, completely rev. ed. Springer: Berlin.

- Farrugia, J.M.; Taverner, T.; O'Hair, R.A.J. (2001) Side-chain involvement in the fragmentation reactions of the protonated methyl esters of histidine and its peptides. *Int. J. Mass Spectrom.*, **209**, 99-112.
- Fenniri, H.; Chun, S.; Ding, L.; Zyrianov, Y.; Hallenga, K. (2003) Preparation, physical properties, on-bead binding assay and spectroscopic reliability of 25 barcoded polystyrene-poly(ethylene glycol) graft copolymers. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 10546-10560.
- Fenza, A.D.; Tancredo, M.; Galippini, C.; Rovero, P. (1998) Racemization studies of Fmoc-Ser(tBu)-OH during stepwise continuous-flow solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 8529-8532.
- Fite, M.; Alvaro, G.; Clapes, P.; Lopez-Santin, J.; Benaiges, M.D.; Caminal, G. (1998) Reactivity of easily removable protecting groups for glycine in peptide synthesis using papain as catalyst. *Enzyme Microb. Technol.*, **23**, 199-203.
- Fite, M.; Clapes, P.; Lopez-Santin, J.; Benaiges, M.D.; Caminal, G. (2002) Integrated process for the enzymatic synthesis of the octapeptide PhAcCCK-8. *Biotechnol. Prog.*, **18**, 1214-1220.
- Fogaça, A.; Silva, P.; Miranda, M.T.M.; Bianchi, A.; Miranda, A.; Ribolla, P.; Daffre, S. (1999) Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.*, **274**, 25330-25334.
- Fujii, N.; Otaka, A.; Ikemura, O.; Akaji, K.; Funakoshi, S.; Hayashi, Y.; Kuroda, Y.; Yajima, H. (1987) Trimethylsilyl trifluoromethanesulphonate as a useful deprotecting reagent in both solution and solid phase peptide syntheses. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 274-275.
- Futaki, S.; Sogawa, K.; Maruyama, J.; Asahara, T.; Niwa, M. (1997) Preparation of peptide thioesters using Fmoc-solid-phase peptide synthesis and its application to the construction of a template-assembled synthetic protein (TASP). *Tetrahedron Lett.*, **38**, 6237-6240.
- Gao, Y.; Liu, X.; Wei, J.; Zhu, B.; Chen, Q.; Wang, R. (2005) Structure-activity relationship of the novel bivalent and C-terminal modified analogues of endomorphin-2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 1847-1850.
- Gentilucci, L. (2004) New trends in the development of opioid peptide analogues as advanced remedies for pain relief. *Curr. Top. Med. Chem.*, **4**, 19-38.
- Getun, I.V.; Filippova, I.Y.; Lysogorskaya, E.N.; Oksenoit, E.S. (2001) SDS-subtilisin catalyzed synthesis of tetra-peptides containing multifunctional amino acid residues in ethanol. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, **15**, 105-110.
- Gibson, F.S.; Park, M.S.; Rapoport, H. (1994) Bis[[4-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolyl)methyl]carbodiimide (BDDC) and its application to residue-free esterifications, peptide couplings, and dehydrations. *J. Org. Chem.*, **59**, 7503-7507.
- Gill, I.; Lopez-Fandino, R.; Vulfson, E. (1995) Enzymatic oligopeptide synthesis using a minimal protection strategy: sequential assembly of a growing oligopeptide chain. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 6175-6181.
- Gisin, B. F. (1972) The monitoring of reactions in solid-phase peptide synthesis with picric

acid. *Anal. Chim. Acta*, **58**, 248-249.

Grunewald, J.; Sieber, S.A.; Marahiel, M.A. (2004) Chemo- and regioselective peptide cyclization triggered by the N-terminal fatty acid chain length: the recombinant cyclase of the Calcium-dependent antibiotic from *Streptomyces coelicolor*. *Biochemistry*, **43**, 2915-2925.

Guibe, F. (1998) Allylic protecting groups and their use in a complex environment. Part II: allylic protecting groups and their removal through catalytic palladium π -allyl methodology. *Tetrahedron*, **54**, 2967-3042.

Guibe-Jampel, E.; Wakselman, M. (1982) Selective cleavage of *p*-nitrobenzyl esters with sodium dithionite. *Synth. Commun.*, **12**, 219-223.

Guillier, F.; Orain, D.; Bradley, M. (2000) Linkers and cleavage strategies in Solid-Phase Organic Synthesis and Combinatorial Chemistry. *Chem. Rev.*, **100**, 2091-2157.

Haginoya, E.; Hojo, H.; Nakahara, Y.; Nakahara, Y.; Nabeshima, K.; Toole, B.P.; Watanabe, Y. (2006) Synthesis of a glycosylated peptide thioester by the Boc strategy and its application to segment condensation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1338-1349.

Halpern, B.; Chew, L.; Close, V.; Patton, W. (1968) Removal of peptides from "Merrifield solid phase" by transesterification with an anion exchange resin. *Tetrahedron Lett.*, **9**, 5163-5164.

Hamel, A.R.; Hubler, F.; Carrupt, A.; Wenger, R.M.; Mutter, M. (2003) Cyclosporin A prodrugs: design, synthesis and biophysical properties. *J. Pept. Res.*, **63**, 147-154.

Hansen, C.L.; Hansen, P.R.; Callisen, T.H.; Bauer, R.; Nielsen, O.F. (2002) Secondary structure and association of melittin during and after solid-phase synthesis: a Raman and static light scattering study. *J. Raman Spectrosc.*, **33**, 142-146.

Harris, P.W.R.; Brimble, M.A.; Dunbar, R.; Kent, S.B.H. (2007) Synthesis of a C-terminal thioester derivative of the lipopeptide Pam(2)CSKKKG using Fmoc SPPS. *Synlett.*, **5**, 713-716.

Hassner, H.; Alexanian, V. (1978) Direct room temperature esterification of carboxylic acids. *Tetrahedron Lett.*, **19**, 4475-4478.

Heimbrook, D.C.; Saari, W.S.; Balishin, N.L.; Friedman, A.; Moore, K.S.; Riemen, M.W.; Kiefer, D.M.; Rotberg, N.S.; Wallen, J.W.; Oliff, A. (1989) Carboxyl-terminal modification of a gastrin releasing peptide derivative generates potent antagonists. *J. Biol. Chem.*, **264**, 11258-11262.

Hendrix, J.C.; Lansbury, P.T. (1992) Synthesis of a protected peptide corresponding to residues 1-25 of the β -amyloid protein of Alzheimer's disease. *J. Org. Chem.*, **57**, 3421-3426.

Hertel, J.; Struthers, H.; Horj, C.B.; Hruz, P.W. (2004) A structural basis for the acute effects of HIV protease inhibitors on GLUT4 intrinsic activity. *J. Biol. Chem.*, **279**, 55147-55152.

Hill, J.B.; Gelman, Y. (1990) Process for the preparation of α -L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester hydrochloride by use of isolated *N*-formyl L-aspartic anhydride. US Patent

4946988.

Hojo, H.; Watabe, J.; Nakahara, Y.; Nakahara, Y.; Ito, Y.; Nabeshimad, K.; Toole, B.P. (2001) Synthesis of the extracellular Ig domain I of Emmprin carrying a chitobiose unit. *Tetrahedron Lett.*, **42**, 3001-3004.

Hojo, H.; Nakahara, Y. (2007) Recent progress in the field of glycopeptide synthesis. *Biopolymers*, **88**, 308-324.

Houng, J.-Y.; Wu, M.-L.; Chen, S.-T. (1996) Kinetic resolution of amino acid esters catalyzed by lipases. *Chirality*, **8**, 418-422.

Huang, Y.-B.; Cai, Y.; Yang, S.; Wang, H.; Hou, R.-Z.; Xu, L.; Xiao-Xia, W.; Zhang, X.-Z. (2006) Synthesis of tetrapeptide Bz-RGDS-NH₂ by a combination of chemical and enzymatic methods. *J. Biotechnol.*, **125**, 311-318.

Hudson, R.H.E.; Li, G.; Tse, J. (2002) The use of Sonogashira coupling for the synthesis of modified uracil peptide nucleic acid. *Tetrahedron Lett.*, **43**, 1381-1386.

Ingenito, R.; Bianchi, E.; Fattori, D.; Pessi, A. (1999) Solid phase synthesis of peptide C-terminal thioester by Fmoc/t-Bu chemistry. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 11369-11374.

Irino, S.; Oyama, K.; Nakamura, S.-I.; Van Dooren, T.J.; Quaedflieg, P.J.L. (1994) Enzymatic coupling of L-phenylalanine methyl ester and N-benzyloxycarbonyl-aspartic acid. European Patent, EP 0664338.

Isono, Y.; Nakajima, M. (2002) Synthesis of aspartame precursor using protease suspended in microaqueous molten amino acids mixture. *Biocatal. Biotransformation*, **20**, 391-395.

Itoh, K.; Sekizaki, H.; Toyota, E.; Fujiwara, N.; Tanizawa, K. (1996) Application of inverse substrates to trypsin-catalyzed peptide synthesis. *Bioorg. Chem.*, **24**, 59-68.

Jia, C.; Qi, W.; He, Z.; Yang, H.; Qiao, B. (2006) Synthesis of heptapeptides and analysis of sequence by tandem ion trap mass spectrometry. *Cent. Eur. J. Chem.*, **4**, 285-298.

Joe, K.; Borgford, T.J.; Bennet, A.J. (2004) Generation of a thermostable and denaturant-resistant peptide ligase. *Biochemistry*, **43**, 7672-7677.

Jonsson, A.; Wehtje, E.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B. (1996) Temperature effects on protease catalyzed acyl transfer reactions in organic media. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, **2**, 43-51.

Kaiser, E.; Colescott, R.L.; Bossinger, C.D.; Cook, P.I. (1970) Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides, *Anal. Biochem.*, **34**, 595-598.

Kaiser, E.T. (1989) Synthetic approaches to biologically active peptides and proteins including enzymes. *Acc. Chem. Res.*, **22**, 47-54.

Kawakami, T.; Hasegawa, K.; Teruya, K.; Akaji, K.; Horiuchi, M.; Inagaki, F.; Kurihara, Y.; Uesugi, S.; Aimoto, S. (2001) Polypeptide synthesis using an expressed peptide as a building block for condensation with a peptide thioester: application to the synthesis of phosphorylated p21Max protein(1-101). *J. Pept. Sci.*, **7**, 474-487.

- Kawasaki, Y.; Konishi, H.; Morita, M.; Kawanari, M.; Dosako, S.; Nakajima, I. (1994) Application of hydrogen storage alloy to remove protecting groups. *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 1238-1242.
- Kawashiro K.; Kaiso, K.; Minato, D.; Sugiyama, S.; Hayashi, H. (1993) Lipase-catalyzed peptide synthesis using Z-amino acid esters as acyl donors in aqueous water-miscible organic solvents. *Tetrahedron*, **49**, 4541-4548.
- Kim, D.K.; Lee, N.; Kim, Y.W.; Chang, K.Y.; Im, G.J.; Choi, W.S.; Kim, K.H. (1999) Synthesis and evaluation of amino acid esters of 6-deoxypenciclovir as potential prodrugs of penciclovir. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **7**, 719-424.
- Kim, M.H.; Patel, D.V. (1994) "BOP" as a reagent for mild and efficient preparation of esters. *Tetrahedron Lett.*, **35**, 5603-5606.
- Kim, T.-Y.; Brun, Y.V.; Reilly, J.P. (2005) Effects of tryptic peptide esterification in MALDI mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **77**, 4185-4193.
- Kise, H.; Fujimoto, K. (1988) Enzymatic reactions in aqueous-organic media. VIII. Medium effect and nucleophile specificity in subtilisin-catalyzed peptide synthesis in organic solvents. *Biotechnol. Lett.*, **10**, 883-888.
- Kitagawa, K.; Adachi, H.; Sekigawa, Y.; Yagami, T.; Futaki, S.; Gu, Y.J.; Inoue, K. (2004) Total chemical synthesis of large CCK isoforms using a thioester segment condensation approach. *Tetrahedron*, **60**, 907-918.
- Kitaguchi, H.; Tai, D.-F.; Klibanov, A.M. (1988) Enzymatic formation of an isopeptide bond involving the ε-amino group of lysine, *Tetrahedron Lett.*, **29**, 5487-5488.
- Kiyota, S.; Franzoni, L.; Nicastro, G.; Benedetti, A.; Oyama, S., Jr.; Viviani, W.; Gambarini, A.G.; Spisni, A.; Miranda, M.T.M. (2003) Introduction of a chemical constraint in a short peptide derived from human acidic fibroblast growth factor elicits mitogenic structural determinants. *J. Med. Chem.*, **46**, 2325-2333.
- Kowalak, J.A.; Walsh, K.A. (1996) β-Methylthio-aspartic acid: identification of a novel posttranslational modification in ribosomal protein S12 from *Escherichia coli*. *Protein Sci.*, **5**, 1625-1632.
- Kullmann, W. (1987) *Enzymatic peptide synthesis*. CRC Press: Florida.
- Ladisch, M.R.; Kohlmann, K.L. (1992) Recombinant human insulin. *Biotechnol. Prog.*, **8**, 469-478.
- Lammert, R.; Ellis, A.I.; Chauvette, R.R.; Kukolja, S. (1978) Azetidinone antibiotics. 19. A simple method for the removal of *p*-nitrobenzyl acid protective group. *J. Org. Chem.*, **43**, 1243-1244.
- Landowski, C.P.; Song, X.Q.; Lorenzi, P.L.; Hilfinger, J.M.; Amidon, G.L. (2005) Flouxuridine amino acid ester prodrugs: enhancing Caco-2 permeability and resistance to glycosidic bond metabolism. *Pharm. Res.*, **22**, 1510-1518.
- Larsen, B.D.; Christensen, D.H.; Holm, A.; Zillmer, R.; Nielsen, O.F. (1993) The Merrifield

peptide synthesis studied by Near-Infrared Fourier-Transform Raman spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 6247-6253.

Lee, J.D. (1999) *Química Inorgânica não tão concisa – tradução da 5^a edição inglesa*. Tradutores: Toma, H.E.; Araki, K.; Rocha, R. Editora Edgard Blücher Ltda.: São Paulo.

Li, X.; Kawakami, T.; Aimoto, S. (1998) Direct preparation of peptide thioesters using an Fmoc solid-phase method. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 8669-8672.

Liria, C.W.; Bemquerer, M.P.; Miranda, M.T.M. (1998) Premature removal of N-alpha-9-fluorenylmethyloxycarbonyl in thermodynamically controlled enzymatic coupling trials. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 4207-4210.

Liria, C.W.; Miranda, M.T.M (2001) Influence of reaction conditions on peptide bond formation catalyzed by lipases. Em *Peptides 2000 – Proceedings of the 26th European Peptide Symposium* (Martinez, J.; Fehrentz, J.-A., eds.). EDK: Paris, p. 331-332.

Liria, C.W.; Bordusa, F.; Miranda, M.T.M (2002) Peptide synthesis mediated by lipases: further studies and new perspective. Em *Peptides 2002 – Proceedings of the 27th European Peptide Symposium* (Benedetti, E.; Pedone, C., eds.). Edizioni Ziino: Napoli, p. 222-223.

Liria, C.W. (2004) Novas observações e perspectivas do uso de lipases na síntese de peptídeos [tese]. São Paulo: Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Liria, C.W.; Miranda, M.T.M. (2007) Peptide bond synthesis in biphasic medium using commercial lipase preparations. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, submetido.

Liu, C.-F.; Tam, J.P. (2001) Subtilisin-catalyzed synthesis of amino acid and peptide esters. Application in a two-step enzymatic ligation strategy. *Org. Lett.*, **3**, 4157-4159.

Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. (1997) *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*. CRC Press: Florida.

Lohith, K.; Divakar, S. (2005) Lipase-catalyzed synthesis of L-phenylalanyl-D-glucose. *J. Biotechnol.*, **20**, 49-56.

Lombard, C.; Saulnier, J.; Wallach, J.M. (2005) Recent trends in protease-catalyzed peptide synthesis. *Protein Pept. Lett.*, **12**, 621-629.

Lou, W.-Y.; Zong, M.-H.; Liu, Y.-Y.; Wang, J.-F. (2006) Efficient enantioselective hydrolysis of d,l-phenylglycine methyl ester catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase B in ionic liquid containing systems. *J. Biotechnol.*, **125**, 64-74.

Lozano, P.; de Diego, T.; Guegan, J.P.; Vaultier, M.; Iborra, J.L. (2001) Stabilization of alpha-chymotrypsin by ionic liquids in transesterification reactions. *Biotechnol. Bioeng.*, **75**, 563-569.

Ludolph, B.; Eisele, F.; Waldmann, H. (2002) Solid-phase synthesis of lapidated peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 5954-5955.

Machado, A.; Liria, C.W.; Proti, P.B.; Remuzgo, C.; Miranda, M.T.M. (2004) Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. *Quim. Nova*, **27**, 781-789.

- Machado, A.; Sforça, M.L.; Miranda, A.; Daffre, S.; Pertinhez, T.A.; Spisni, A.; Miranda, M.T.M. (2007) Truncation of amidated fragment 33-61 of bovine alpha-hemoglobin: effects on the structure and anticandidal activity. *Biopolymers*, **88**, 413-426.
- Maekawa, H.; Toniolo, C.; Moretto, A.; Broxterman, Q.B.; Ge, N.-H. (2006) Different spectral signatures of octapeptide 3_{10} - and α -helices revealed by two-dimensional infrared spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*, **110**, 5834-5837.
- Mahlert, C.; Sieber, S.A.; Grunewald, J.; Marahiel, M.A. (2005) Chemoenzymatic approach to enantiopure streptogramin B variants: characterization of stereoselective pristinamycin I cyclase from Streptomyces pristinaespiralis. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 9571-9580.
- Malhotra, S.V.; Zhao, H. (2005) Enantioseparation of the esters of α -N-acetyl amino acids by lipase in ionic liquid. *Chirality*, **17**, S240-S242.
- Manabe, S.; Sugioka, T.; Ito, Y. (2007) Facile peptide thioester synthesis via solution-phase tosylamide preparation. *Tetrahedron Lett.*, **48**, 849-853.
- Mant, C.T.; Hodges, R.S. (1991) *High-performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation, Analysis and Conformation*. CRC Press: Florida.
- Margolin, A.L.; Klibanov, A.M. (1987) Peptide synthesis catalyzed by lipases in anhydrous organic solvents, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 3802-3804.
- Marquardt, M. e Eifler-Lima, V.L. (2001) A síntese orgânica em fase sólida e seus suportes poliméricos mais empregados. *Quim. Nova*, **24**, 846-855.
- Martinez, J.; Laur, J.; Castro, B. (1985) On the use of carboxamidomethyl esters (Cam esters) in the synthesis of model peptides. Scope and limitations. *Tetrahedron*, **41**, 739-743.
- Matos, J.R.; West, J.B.; Wong, C.-H. (1987) Lipase catalysed synthesis of peptides: preparation of a Penicillin G precursors and other peptides. *Biotechnol. Lett.*, **9**, 233-236.
- Matthews, T.; Salgo, M.; Greenberg, M.; Chung, J.; DeMasi, R.; Bolognesi, D. (2004) Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **3**, 215-225.
- McPhee, J.B.; Scott, M.G.; Hancock, R.E.W. (2005) Design of host defence peptides for antimicrobial and immunity enhancing activities. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, **8**, 257-272.
- McRae, B.J.; Lin, T.-Y.; Powers, J.C. (1981) Mapping the substrate binding site of human ClF and C1S with peptide thioesters. *J. Biol. Chem.*, **256**, 12362-12366.
- Mellor, S.L.; Wellings, D.A.; Fehrentz, J.-A.; Paris, M.; Martinez, J.; Ede, N.J.; Bray, A.M.; Evans, D.J.; Bloomberg, G.B. (2000) Synthesis of modified peptides. Em *Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach* (White, P.D. & Chan, W.C., eds). Oxford University Press: Oxford, p.141-149.
- Merhi, G.; Colleman, A.W.; Devissaguet, J.-P.; Barratt, G.M. (1996) Synthesis and immunostimulating properties of lipophilic ester and ether muramyl peptide derivatives. *J. Med. Chem.*, **39**, 4483-4488.

Meyer, A.; Auemheimer, J.; Modlinger, A.; Kessler, H. (2006) Targeting RGD recognizing integrins: drug development, biomaterial research, tumor imaging and targeting. *Curr. Pharm. Des.*, **12**, 2723-2747.

Mihara, H.; Chmielewski, J.A.; Kaiser, E.T. (1993) Synthesis of the 60 amino acid homeo domain and smaller fragments of the *Drosophila* gene regulatory protein *Antennapedia* by a segment synthesis-condensation approach. *J. Org. Chem.*, **58**, 2209-2215.

Mihara, H.; Maeda, S.; Kurosaki, R.; Ueno, S.; Sakamoto, S.; Niidome, T.; Hojo, H.; Aimoto, S.; Aoyagi, H. (1995) Peptide-synthesis mediated by thiolsubtilisin using peptide thioester as building-block. *Chem. Lett.*, 397-398.

Miljanich, G.P. (2004) Ziconotide: neuronal Calcium channel blocker for treating severe chronic pain. *Curr. Med. Chem.*, **11**, 3029-3040.

Millington, C.R.; Quarrel, R.; Lowe, G. (1998) Aryl hydrazides as linkers for solid phase synthesis which are cleavable under mild oxidative conditions. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 7201-7204.

Miranda, M.T.M.; Cheng, E.; Muradian, J.; Seidel, W.F.; Tominaga, M. (1986) Thermolysin as a catalyst in enzymatic synthesis of asparagine-containing peptides. *Bioorg. Chem.*, **14**, 182-193.

Miranda, M.T.M. ; Morita, H.; Tominaga, M. (1991a) Transesterification of Moz-Asn-Leu-Gly-Oet in methanol - confirmation of Ca^{+2} mediated catalysis. *Int. J. Peptide Prot. Res.*, **37**, 299-305.

Miranda, M.T.M.; Theobaldo, F.C.;Tominaga, M. (1991b) Transesterification of peptide esters and peptidyl resins in methanol-containing calcium acetate. *Int. J. Peptide Prot. Res.*, **37**, 451-456.

Miranda, M.T.M.; Liddle, R.A.; Rivier, J. (1993) Synthesis of human CCK26-33 and CCK-33 related analogues on 2,4-DMBHA and TMBHA. *J. Med. Chem.*, **36**, 1681-1688.

Mitin, Y.V.; Braun, K.; Kuhl, P. (1997) Papain catalyzed synthesis of glyceryl esters of N-protected amino acids and peptides for the use in trypsin catalyzed peptide synthesis. *Biotechnol. Bioeng.*, **54**, 287-290.

Miyazawa, T.; Iwanaga, H.; Uej, S.; Yamada, T. (2000) Optical resolution of non-protein amino acids by lipase-catalyzed ester hydrolysis. *Biocatal. Biotrans.*, **17**, 445-458.

Miyazawa, T.; Nakajo, S.; Nishikawa, M.; Hamahara, K.; Imagawa, K.; Ensatsu, E.; Yanagihara, R.; Yamada, T. (2001) α -Chymotrypsin-catalysed peptide synthesis via the kinetically controlled approach using activated esters as acyl donors in organic solvents with low water content: incorporation of non-protein amino acids into peptides. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 82-86.

Miyazawa, T.; Ensatsu, E.; Hiramatsu, M.; Yanagihara, R.; Yamada, T. (2002) α -Chymotrypsin-catalyzed segment condensations via the the kinetically controlled approach using carbamoylmethyl esters as acyl donors in organic media. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 396-401.

- Miyazawa, T.; Hiramatsu, M.; Murashima, T.; Yamada, T. (2003) Utilization of proteases from *Aspergillus* species for peptide synthesis via the kinetically controlled approach. *Biocatal. Biotransformation*, **21**, 93-100.
- Miyazawa, T.; Onishi, K.; Murashima, T.; Yamada, T.; Tsai, S.-W. (2005) Resolution of non-protein amino acids via *Carica papaya* lipase-catalyzed enantioselective transesterification. *Tetrahedron Asymmetry*, **16**, 2569-2573.
- Miyazawa, T.; Minowa, H.; Yamada, T. (2006) Enhancement of enantioselectivity in the *Bacillus subtilis* protease-catalyzed hydrolysis of N-free amino acid esters using the ester grouping-modification approach. *Biotechnol. Lett.*, **28**, 295-299.
- Morihara, K.; Oka, T.; Tsuzuki, H.; Tochino, Y.; Kanaya, T. (1980) *Achromobacter* protease I-catalyzed conversion of porcine insulin into human insulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 396-402.
- Moraes, C. M. (2000). Preparação de ésteres de peptídeos através de solvólise e aminólise de peptidil-resinas de Kaiser assistidas por Ca^{+2} [tese]. São Paulo: Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
- Moraes, C. M.; Bemquerer, M.P.; Miranda, M.T.M (2000) Solvolysis and aminolysis on peptidyl-Kaiser oxime resin assisted by Ca^{+2} and Eu^{+3} : a mild procedure to prepare α -methyl and -ethyl esters of protected peptides. *J. Pept. Res.*, **55**, 279-288.
- Moraes, C. M.; Vieira, L.A.O.; Silva, K.N.; Miranda, M.T.M. (2001) Methanolysis and hydrolysis on peptidyl-Kaiser oxime resin assisted by metal ions. Em *Peptides 2000, Proceedings of the 26th European Peptide Symposium* (Martinez, J. & Fehrentz, J.-A., eds). EDK: Paris, p. 255-256.
- Morohashi, Y.; Kan, T.; Tominari, Y.; Fuwa, H.; Okamura, Y.; Watanabe, N.; Sato, C.; Natsugari, H.; Fukuyama, T.; Iwatsubo, T.; Tomita, T. (2006) C-terminal fragment of presenilin is the molecular target of a dipeptidic γ -secretase-specific inhibitor DAPT (*N*-[*N*-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine *t*-butyl ester. *J. Biol. Chem.*, **281**, 14670-14676.
- Nakagawa, S.H.; Kaiser, E.T. (1983) Synthesis of protected peptide segments and their assembly on a polymer-bound oxime: application to the synthesis of a peptide model for plasma apolipoprotein A-I, *J. Org. Chem.*, **48**, 678-685.
- Nakanishi, K. (1962) *Infrared Absorption Spectroscopy – Practical*. Holden-Day Inc.: San Francisco e Nankodo Company Limited: Tokyo.
- Nelson, D.L.; Lehninger, A.L.; Cox, M.M. (2004) *Lehninger - Principles of Biochemistry*, 4th ed. W. H. Freeman & Co.: New York.
- Niederhafner, P.; Safarik, M.; Sebestik, J.; Gut, V.; Malon, P.; Hlavacek, J. (2006) Synthesis of protected peptides from the human IgG1 hinge region on PEG support using disulfide bond synthons and alkaline or enzymatic detachment. *Tetrahedron Lett.*, **47**, 1023-1025.
- Nilsson, B.L.; Soellner, M.B.; Raines, R.T. (2005) Chemical synthesis of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **34**, 91-118.

- Oku, H.; Kimura, Y.; Ohama, M.; Ueyama, N.; Yamada, K.; Katakai, R. (2007) Synthesis, crystal structure, and coordination properties of a helical peptide having β -(3-pyridyl)-l-alanine and l-glutamic acid residues. *J. Organomet. Chem.*, **692**, 79-87.
- Olivera, B.M. (2006) Conus peptides: biodiversity-based discovery and exogenomics. *J. Biol. Chem.*, **281**, 31173-31177.
- Otera, J. (2003) *Esterification methods reaction and applications*. Wiley-VCH: Weinheim.
- Oyama, S., Jr.; Miranda, M.T.M.; Kiyota, S.; Gambarini, A. (1999) Molecular modeling as a powerful tool for the mapping of fibroblast growth factor receptor-1 ligand binding determinants. *J. Mol. Model.*, **5**, 90-96, 1999.
- Pearson, D.; Blanchette, M.; Baker, M.L.; Guindon, C.A. (1989) Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.*, **30**, 2739-2742.
- Peters, C.; Waldmann, H. (2003) Solid-phase synthesis of peptide esters employing the hydrazide linker. *J. Org. Chem.*, **68**, 6053-6055.
- Pichette, A.; Voyer, N.; Larouche, R.; Meillon, J.-C. (1997) A useful method for the preparation of fully protected peptide acids and esters. *Tetrahedron Lett.*, **38**, 1279-1282.
- Robert Porzig, R.; David Singer, D.; Ralf Hoffmann, R. (2007) Epitope mapping of mAbs AT8 and Tau5 directed against hyperphosphorylated regions of the human tau protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **358**, 644-649.
- Powers, J.C.; Kam, C.-M. (1995) Peptide thioester substrates for serine peptidases and metalloendopeptidases. *Methods Enzymol.*, **248**, 3-18.
- Powers, J.C.; Kam, C.-M.; Ricketts, K.M.; Casillas, R.P. (2000) Cutaneous protease activity in the mouse ear vesicant model. *J. Appl. Toxicol.*, **20**, S177-S182.
- Proti, P.B.; Oliveira, P.V.; Miranda, M.T.M. (2006) Further studies on an alternative approach to prepare esterified protected peptides under mild conditions. Em *Understanding Biology Using Peptides* (Blondelle, S.E., ed.). Springer: New York, p. 82-83.
- Proti, P.B.; Remuzgo, C.; Miranda, M.T.M. (2007) Comparison of procedures for directly obtaining protected peptide acids from peptide-resins. *J. Pept. Sci.*, **13**, 386-392.
- Proti, P.B.; Miranda, M.T.M. (2007) Preparation of C-terminal modified peptides through alcoholsysis and thiolysis mediated by metal ions. Em *Peptides for Youth*, submetido.
- Quaderer, R.; Hilvert, D. (2001) Improved synthesis of C-terminal peptide thioesters on “safety-catch” resins using LiBr/THF. *Org. Lett.*, **3**, 3181-3184.
- Rademann, J.; Smerdka, J.; Jung, G.; Grosche, P.; Schmid, D. (2001) Alkylating polymers: resin-released carbenium ions as versatile reactive intermediates in Polymer-Assisted Solution-Phase Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 381-385.
- Ravn, J.; Ankersen, M.; Begtrup, M.; Lau, J.F. (2003) A novel solid-phase synthesis of di- and trisubstituted N-acyl ureas. *Tetrahedron Lett.*, **44**, 6931-6935.

- Rehfeld, J.F. (2004) Cholecystokinin. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, **18**, 569-586.
- Reddy, G.L.; Bikshapathy, E.; Nagaraj, R. (1985) Solid phase synthesis of signal sequence fragments employing the transesterification method of cleavage. *Tetrahedron Lett.*, **26**, 4257-4260.
- Reid, G.E.; Simpson, R.J.; O'Hair, R.A.J. (1998) A mass spectrometric and Ab Initio study of the pathways for dehydration of simple glycine and cysteine-containing peptide [M+H]⁺ ions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **9**, 945-956.
- Romanovskis, P.; Spatola, A.F. (1998) Preparation of head-to-tail cyclic peptides via side-chain attachment: implications for library synthesis. *J. Pept. Res.*, **52**, 356-374.
- Rose, K.; De Pury, H.; Offord, R.E. (1983) Rapid preparation of human insulin and insulin analogues in high yield by enzyme-assisted semi-synthesis. *Biochem. J.*, **211**, 671-676.
- Rose, K.; Herrero, C.; Proudfoot, A.E.I.; Offord, R.E.; Wallace, C.J.A. (1988) Enzyme-assisted semisynthesis of polypeptide active esters and their use. *Biochem. J.*, **249**, 83-88.
- Rubio-Aliaga, I. & Daniel, H. (2002) Mammalian peptide transporters as targets for drug delivery. *Trends Pharmacol. Sci.*, **23**, 434-440.
- Ruiz, S.; Feliu, J. A.; Caminal, G.; Alvaro, G.; Lopez-Santin, J. (1997) Reaction engineering for consecutive enzymatic reactions in peptide synthesis: application to the synthesis of a pentapeptide. *Biotechnol. Prog.*, **13**, 783.
- Rukamp, B.J.; Kam, C.M.; Natarajan, S.; Bolton, B.W.; Smyth, M.J.; Kelly, J.M.; Powers, J.C. (2004) Subsite specificities of granzyme M: a study of inhibitors and newly synthesized thiobenzyl ester substrates. *Arch. Biochem. Biophys.*, **422**, 9-22.
- Ryttersgaard, J.; Larsen, B.D.; Holm, A.; Christensen, D.H.; Nielsen, O.F. (1997) Monitoring of a solid phase peptide synthesis by NIR-FT-Raman spectroscopy, *Spectrochim. Acta Part A, Mol. Biomol. Spectrosc.*, **53**, 91-98.
- Saito, Y.; Yamaki, T.; Kohashi, F.; Watanabe, T.; Ouchi, H.; Takahata, H. (2005) Simple and mild esterification of N-protected amino acids with nearly equimolar amounts of alcohols using 1-*tert*-butoxy-2-*tert*-butoxycarbonyl-1,2-dihydroisoquinoline. *Tetrahedron Lett.*, **46**, 1277-1279.
- Salam, S.M.A.; Kagawa, K.; Kawashiro, K. (2005) α -chymotrypsin-catalyzed peptide synthesis using N-protected D-amino acid carbamoylmethyl esters as acyl donors. *Biotechnol. Lett.*, **27**, 1199-1203.
- Salam, S.M.A.; Kagawa, K.; Kawashiro, K. (2006) α -Chymotrypsin-catalyzed peptide synthesis in frozen aqueous solution using N-protected amino acid carbamoylmethyl esters as acyl donors. *Tetrahedron Asymmetry*, **17**, 22-29.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor: New York.
- Santos, C.; Mateus, M.L.; Santos, A.P.; Moreira, R.; Oliveira, E.; Gomes, P. (2005)

Cyclization-activated prodrugs. Synthesis, reactivity and toxicity of dipeptide esters of paracetamol. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 1595-1598.

Schechter, I.; Ziv, E. (2006) Inhibitors can activate proteases to catalyze the synthesis and hydrolysis of peptides. *Biochemistry*, **45**, 14567-14572.

Secundo, F.; Carrea, G.; Tarabiono, C.; Gatti-Lafranconi, P.; Brocca, S.; Lotti, M.; Jaeger, K.-E.; Puls, M.; Eggert, T. (2006) The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, **39**, 166-170.

Seebach, D.; Thaler, A.; Blaser, D.; Ko, S.Y. (1991) Transesterifications with 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene/lithium bromide (DBU/LiBr) – Also applicable to cleavage of peptides from resins in Merrifield syntheses. *Helv. Chim. Acta*, **74**, 1102-1118.

Sekizaki, H.; Itoh, K.; Toyota, E.; Tanizawa, K. (1996) Synthesis and tryptic hydrolysis of *p*-guanidinophenyl esters derived from amino acids and peptides. *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1577-1579.

Sforça, M.L.; Machado, A.; Figueredo, R.C.R.; Oyama, S.; Silva, F.D.; Miranda, A.; Daffre, S.; Miranda, M.T.M.; Spisni, A.; Pertinhez, T.A. (2005) The micelle-bound structure of an antimicrobial peptide derived from the alpha-chain of bovine hemoglobin isolated from the tick *Boophilus microplus*. *Biochemistry*, **44**, 6440-6451.

Shaw, E.; Mares-Guia, M.; Cohen, W. (1965) Evidence for an active-center histidine in trypsin through use of a specific reagent, 1-Chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone, the chloromethyl ketone derived from N^α-Tosyl-L-lysine. *Biochemistry*, **4**, 2219-2224.

Shaw, E. (1967) Site-specific reagents for chymotrypsin and trypsin, *Method. Enzymol.*, **11**, 677-686.

Shen, H.-Y.; Tian, G.-L.; Ye, Y.-H. (2004) Synthesis of dermorphin-(1–4) derivatives catalyzed by proteases in organic solvents. *J. Pept. Res.*, **65**, 143-148.

Shih, I.-L.; Chiu, L.-C.; Lai, C.T.; Liaw, W.-C.; Tai, D.-F. (1997) Enzymes catalyzed esterification of N-protected amino acids with secondary alcohols. *Biotechnol. Lett.*, **19**, 857-859.

Shin, H.-C.; Kim, J.S.; Vig, B.S.; Song, X.; Drach, J.C.; Amidon, G.L. (2006) Interaction of intestinal nucleoside transporter hCNT2 with amino acid ester prodrugs of floxuridine and 2-bromo-5,6-dichloro-1-β-dribofuranosylbenzimidazole. *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 247-252.

Simon, L.M.; Kotorman, M.; Maraczi, K.; Laszlo, K. (2000) N-acetyl-L-arginine ethyl ester synthesis catalysed by bovine tripsin in organic media. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, **10**, 565-570.

Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A. (2002) *Princípios de análise instrumental*, 5th ed. Bookman: Porto Alegre.

Smerdka, J.; Rademann, J.; Jung, G. (2004) Polymer-bound alkyltriazenes for mild racemization-free esterification of amino acid and peptide derivatives. *J. Pept. Sci.*, **10**, 603-611.

So, J.-E.; Kang, S.-H.; Kim, B.-G. (1998) Lipase-catalyzed synthesis of peptides containing

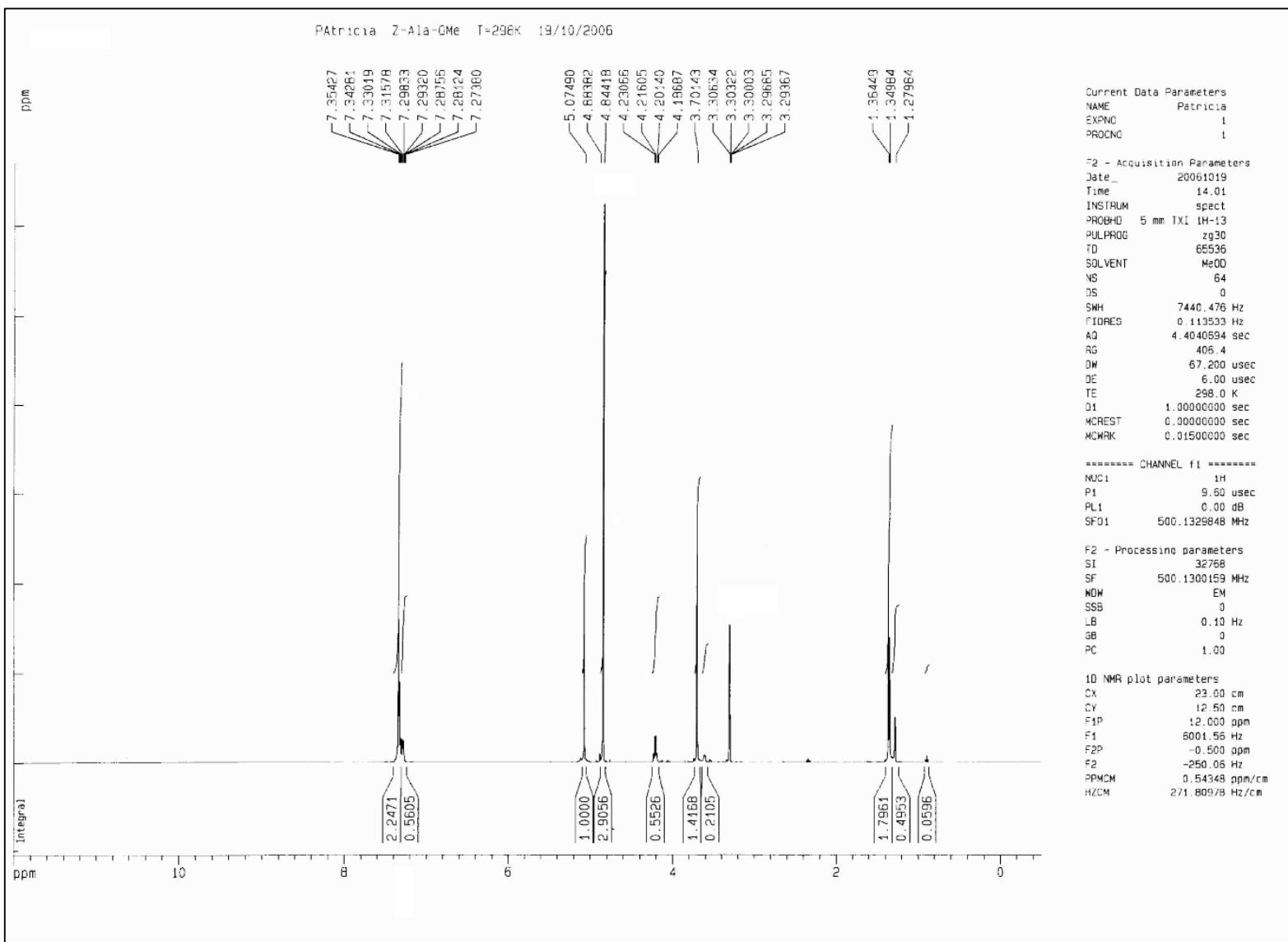
- D-amino acid. *Enzyme Microb. Technol.*, **23**, 211-215.
- So, J.-E.; Shin, J.-S.; Kim, B.-G. (2000) Protease-catalyzed tripeptide (RGD) synthesis. *Enzyme Microb. Technol.*, **26**, 108-114.
- Somashekar, B.R.; Divakar, S. (2007) Lipase catalyzed synthesis of L-alanyl esters of carbohydrates. *Enzyme Microb. Technol.*, **40**, 299-309.
- Souza, M.P.; Tavares, M.F.M.; Miranda, M.T.M. (2004) Racemization in stepwise solid-phase peptide synthesis at elevated temperatures. *Tetrahedron*, **60**, 4671-4681.
- Spisani, S.; Breveglieri, A.; Fabbri, E.; Vertuani, G.; Rizzuto, O.; Cavicchioni, G.; (1996) Modification of the amide bond at position 3 in fMLP analogs select neutrophil functions. *Pept. Res.*, **9**, 279-282.
- Sreeprasant, P.S.; Srivastava, R.; Srinivas, D.; Ratnasamy, P. (2006) Hydrophobic, solid acid catalysts for production of biofuels and lubricants. *Appl. Catal. A Gen.*, **314**, 148-159.
- Sriram, D.; Yogeeshwari, P.; Srichakravarthy, N.; Bal, T.R. (2004) Synthesis of stavudine amino acid ester prodrugs with broad-spectrum chemotherapeutic properties for the effective treatment of HIV/AIDS. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 1085-1087.
- Stair, J.L.; Holcombe, J.A. (2007) Metal binding characterization and conformational studies using Raman microscopy of resin-bound poly(aspartic acid). *Anal. Chem.*, **79**, 1999-2006.
- Stewart, J.M.; Young, J.D. (1984) *Solid phase peptide synthesis, 2nd edition*. Pierce Chemical Company: Rockford.
- Stewart, J.M. (1997) Cleavage methods following Boc-based solid-phase peptide synthesis. *Methods Enzymol.*, **289**, 29-44.
- Story, S.C.; Aldrich, J.V. (1992) Preparation of protected peptide amides using the Fmoc chemical protocol – comparison of resins for solid-phase synthesis. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **39**, 87-92.
- Szardenings, M. (2003) Phage display of random peptide libraries: applications, limits, and potential. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, **23**, 307-349.
- Tam, J.P.; Wong, T.-W.; Riemen, M.W.; Tjoeng, F.-S.; Merrifield, R.B. (1979) Cyclohexyl ester as a new protecting group for aspartyl peptides to minimize aspartimide formation in acidic and basic treatments. *Tetrahedron Lett.*, **20**, 4033-4036.
- Tam, J.P.; Heath, W.F.; Merrifield, R.B. (1986) Mechanisms for the removal of benzyl protecting groups in synthetic peptides by trifluoromethanesulfonic acid-trifluoroacetic acid-dimethyl sulfide. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 5242-5251.
- Thackare, H.; Nicholson, H.D.; Whittington, K. (2006) Oxytocin – its role in male reproduction and new potential therapeutic uses. *Hum. Reprod. Update*, **12**, 437-448.
- Thormann, M.; Thust, S.; Hofmann, H.-J.; Bordusa, F. (1999) Protease-catalyzed hydrolysis of substrate mimetics (inverse substrate): a new approach reveals a new mechanism. *Biochemistry*, **38**, 6056-6062.

- Tietz, N.W.; Fiereck, E.A. (1966) A specific method for serum lipase determination, *Clin. Chim. Acta*, **13**, 352-358.
- Toschi, L.; Finocchiaro, G.; Bartolini, S.; Gioia, V.; Cappuzzo, F. (2005) Role of gemcitabine in cancer therapy. *Future Oncol.*, **1**, 7-17.
- Trusek-Holownia, A. (2003) Synthesis of ZAlaPheOMe, the precursor of bitter dipeptide in the two-phase ethyl acetate-water system catalysed by thermolysin. *J. Biotechnol.*, **102**, 153-63.
- Tseng, C.C.; Bruner, S.D.; Kohli, R.M.; Marahiel, M.A.; Walsh, C.T.; Sieber, S.A. (2002) Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase. *Biochemistry*, **41**, 13350-13359.
- Varanda, L.; Miranda, M.T.M. (1997) Solid-phase peptide synthesis at elevated temperatures: a search for an optimized synthesis condition of unsulfated cholecystokinin-12. *J. Pept. Res.*, **50**, 102-108.
- Veber, D.F.; Paleveda, W.J.; Lee, Y.C.; Hirschmann, R. (1977) Isonicotinyloxycarbonyl, a novel amino protecting group for peptide synthesis. *J. Org. Chem.*, **42**, 3286-3288.
- Verger, R. (1997) 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.*, **15**, 32-38.
- Vig, B.S.; Lorenzi, P.J.; Mittal, S.; Landowski, C.P.; Shin, H.-C.; Mosberg, H.I.; Hilfinger, J.M.; Amidon, G.L. (2003) Amino acid ester prodrugs of floxuridine: synthesis and effects of structure, stereochemistry, and site of esterification on the rate of hydrolysis. *Pharm. Res.*, **20**, 1381-1388.
- Vijayakumar, G.R.; Lohith, K.; Somashekhar, B.R.; Divakar, S. (2004) Lipase catalyzed synthesis of L-alanyl, L-leucyl and L-phenylalanyl esters of D-glucose using unprotected amino acids. *Biotechnol Lett.*, **26**, 1323-1328.
- Villeneuve, P.; Barea, B.; Barouh, N.; Turon, F.; Figueroa-Espinoza, M.; Piombo, G.; Dhuique-Mayer, C.; Pina, M. (2004) Toward the synthesis of pyroglutamate lauroyl ester: biocatalysis versus chemical catalysis. *Biotechnol. Lett.*, **26**, 193-196.
- Wakasugi, K.; Iida, A.; Misaki, T.; Nishii, Y.; Tanabe, Y. (2003) Simple, mild, and practical esterification, thioesterification, and amide formation utilizing *p*-toluenesulfonyl chloride and *N*-methylimidazole. *Adv. Synth. Catal.*, **345**, 1209-1214.
- Wang, N.; Huang, Y.-B.; Xu, L.; Wu, X.-X.; Zhang, X.-Z. (2004) Trypsin-catalyzed kinetically controlled synthesis of a precursor dipeptide of thymopentin in organic solvents, using a free amino acid as nucleophile. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **34**, 45-56.
- Wang, Y.-F.; Yakovlevsky, K.; Zhang, B.; Margolin, A. L. (1997) Cross-linked crystals of subtilisin: versatile catalyst for organic synthesis. *J. Org. Chem.*, **62**, 3488-3495.
- Wehofsky, N.; Kirbach, S.W.; Haensler, M.; Wissmann, J.-D.; Bordusa, F. (2000) Substrate mimetics and freezing strategy: a useful combination that broadens the scope of proteases for synthesis. *Org. Lett.*, **2**, 2027-2030.

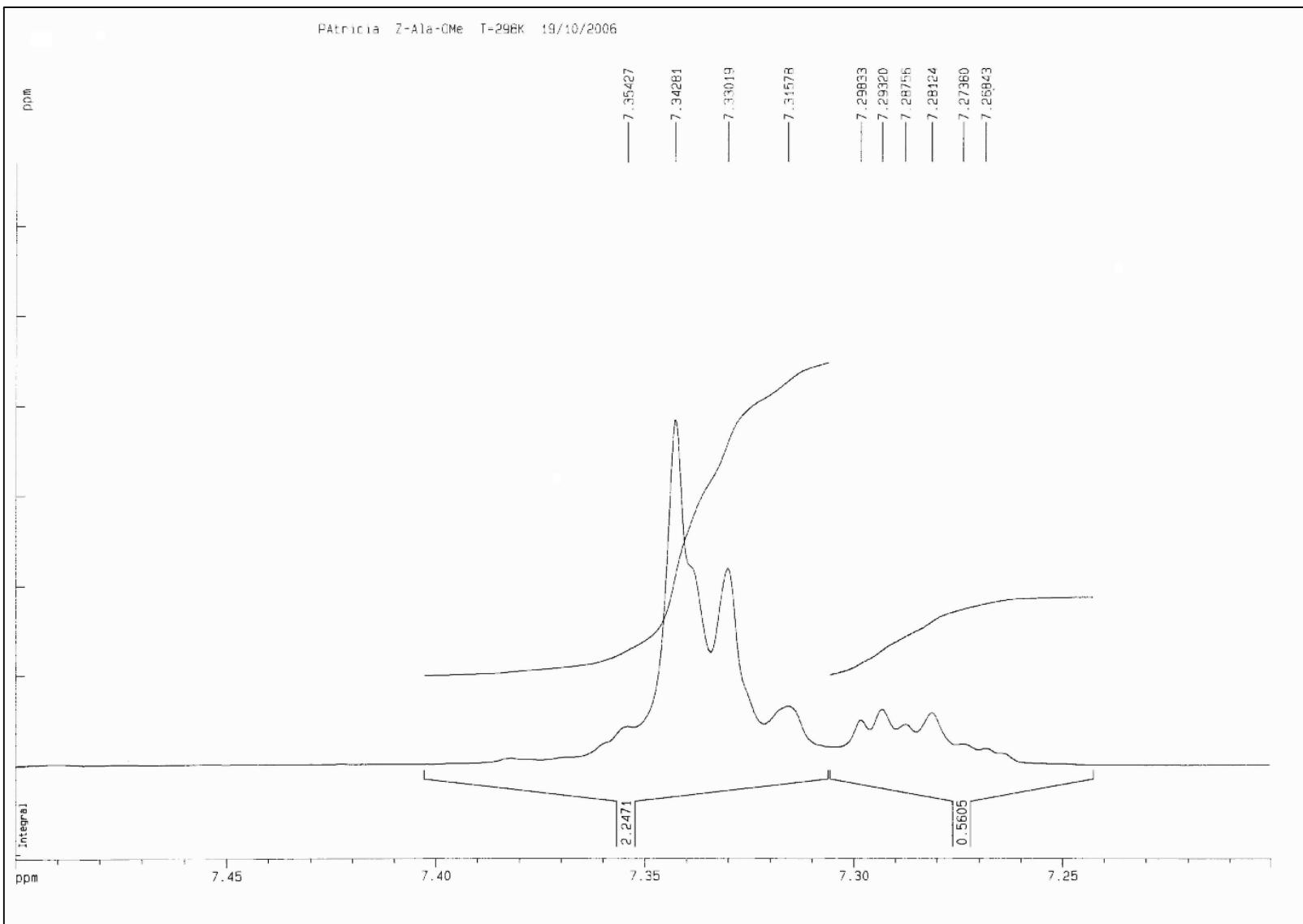
- Wehofsky, N.; Koglin, N.; Thust, S.; Bordusa, F. (2003) Reverse proteolysis promoted by in situ generated peptide ester fragments. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 6126-6133.
- Welker, E. & Scheraga, H.A. (1999) Use of benzyl mercaptana for direct preparation of long polypeptide benzylthio esters as substrates of subtiligase. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **254**, 147-151.
- West, J.B.; Wong, C.-H. (1986) Enzyme-catalyzed irreversible formation of peptides containing D-amino acids. *J. Org. Chem.*, **51**, 2728-2735.
- West, J.B.; Wong, C.-H. (1987) Use of nonproteases in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.*, **28**, 1629-1632.
- Xu, J.; Gross, R.A.; Kaplan, D.L.; Swift, G. (1996) Chemoenzymatic route to poly(3-hydroxybutyrate) stereoisomers. *Macromolecules*, **29**, 3857-3861.
- Xue, C.B.; Becker, J.M.; Naider, F. (1991) Synthesis of s-alkyl and c-terminal analogs of the *Saccharomyces-cerevisiae* a-factor – Influence of temperature on the stability of Fmoc and OFm groups toward HF. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **37**, 476-486.
- Yan, B.; Gremlich, H.-U.; Moss, S.; Coppola, G.M.; Sun, Q.; Liu, L. (1999) A comparison of various FTIR and FT Raman methods: applications in the reaction optimization stage of Combinatorial Chemistry. *J. Comb. Chem.*, **1**, 46-54.
- Yang, D.; Chen, Q.; Oppenheim, J.J.; Kuusela, P.; Taylor, J.W.; Wade, D. (2003) Temporin/VesCP (T/V)-like antibiotic peptides, derived from frogs and wasps, induce migration of human monocytes and neutrophils. *Lett. Pept. Sci.*, **10**, 99-110.
- Yang, X.Y.; Fitzgerald, M.C. (2006) Total chemical synthesis of the B1 domain of protein L from *Peptostreptococcus magnus*. *Bioorg. Chem.*, **34**, 131-141.
- Yang, Z.; Pan, W. (2005) Ionic liquids: green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme Microb. Technol.*, **37**, 19-28.
- Yasuhara, T.; Nakajima, T.; Fukuda, K.; Tsukamoto, Y.; Mori, M.; Kitada, C.; Fujino, M. (1983) Structure activity of chemotactic peptide from the venom sac of *Vespinae*. Em: *Peptide Chemistry 1983* (Munekata, E., ed.). Protein Research Foundation: Osaka, p. 185-190.
- Yesiloglu, Y.; Kilic, I. (2004) Polyvinyl alcohol-trypsin as a catalyst for amino acid ester synthesis in organic media. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **34**, 365-75.
- Zacharie, B.; Connolly, T.P.; Penney, C.L. (1995) A simple one-step conversion of carboxylic acids to esters using EEDQ. *J. Org. Chem.*, **60**, 7072-7074.
- Zakova, L.; Zyka, D.; Jezek, J.; Hanclova, I.; Sanda, M.; Brzozowski, A.M.; Jiracek, J. (2007) The use of Fmoc-Lys(Pac)-OH and penicillin G acylase in the preparation of novel semisynthetic insulin analogs. *J. Pept. Sci.*, **13**, 334-341.
- Zhang, L.-Q.; Zhang, Y.-D.; Xu, L.; Li, X.-L.; Yang, X.-C.; Xu, G.-L.; Wu, X.-X.; Gao, H.-Y.; Du, W.-B.; Zhang, X.-T.; Zhang, X.-Z. (2001) Lipase-catalyzed synthesis of RGD diamide in aqueous water-miscible organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.*, **29**, 129-135.

Zhang, L.-Q.; Xu, L.; Yang, X.-C.; Wu, X.-X.; Zhang, X.-Z. (2003) Lipase-catalyzed synthesis of precursor dipeptides of RGD in aqueous water-miscible organic solvents. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **33**, 1-12.

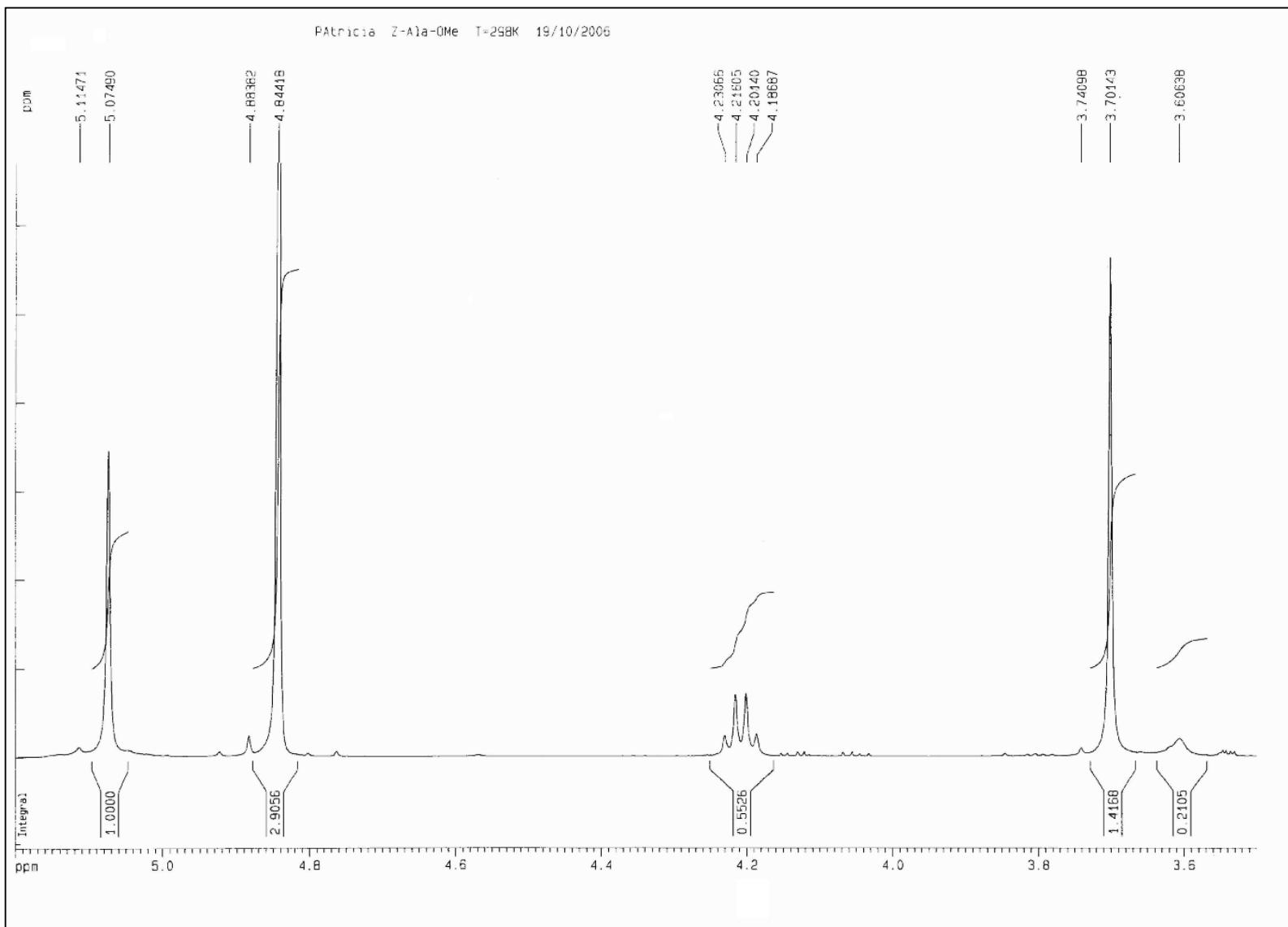
Apêndice Espectros de RMN de ^1H



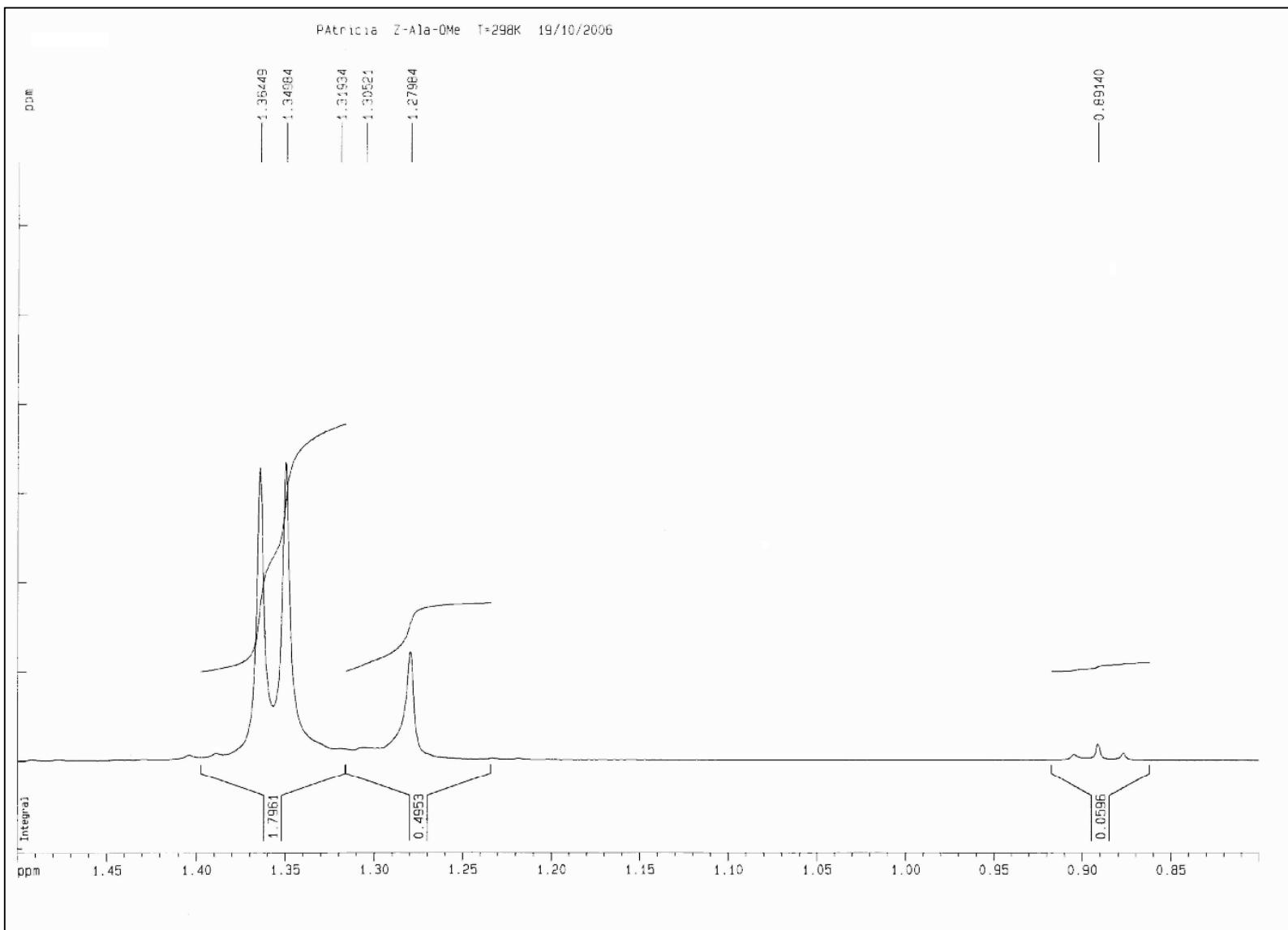
Espectro de Z-Ala-OMe



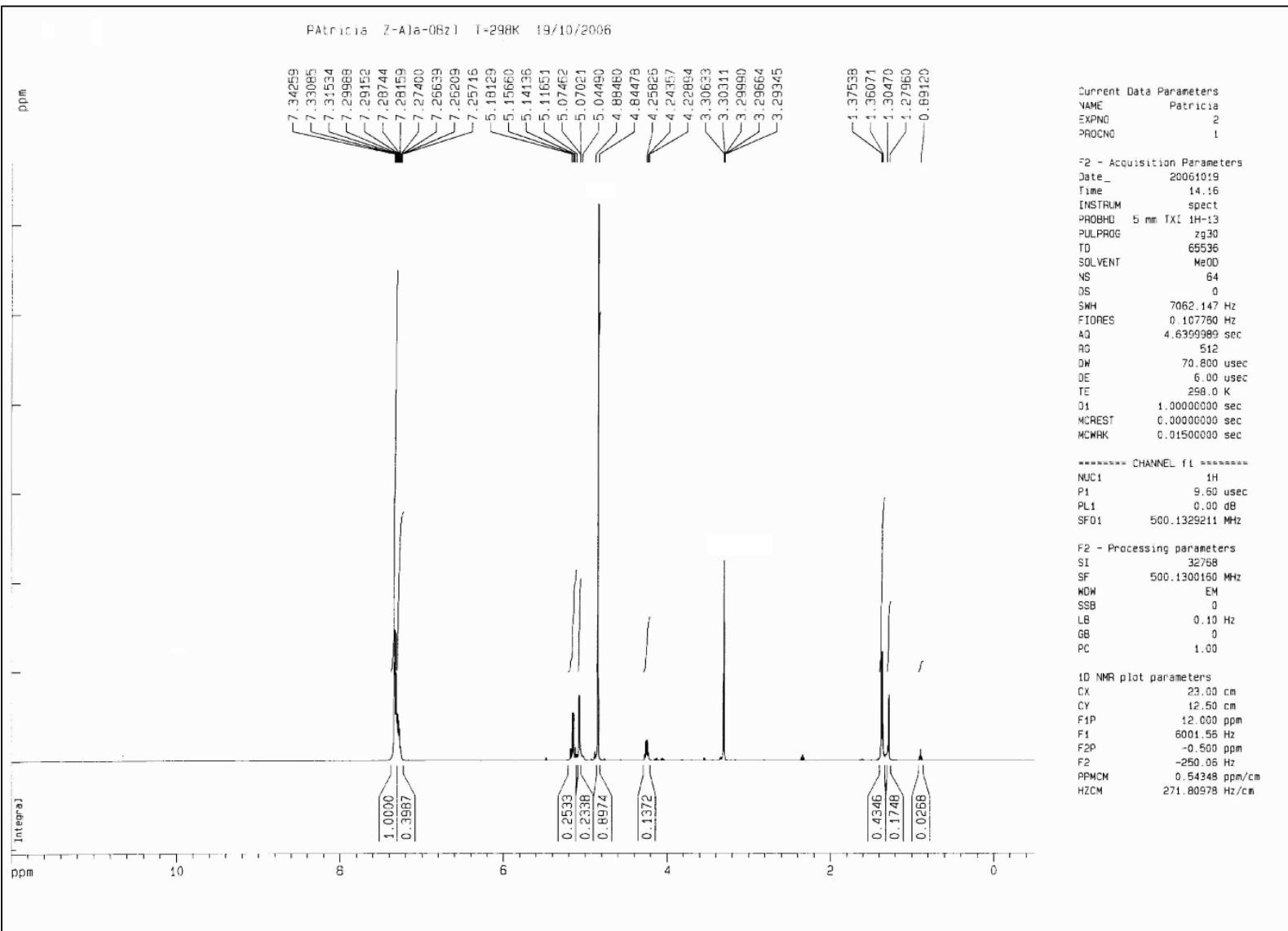
Espectro de Z-Ala-OMe – Expansão 1



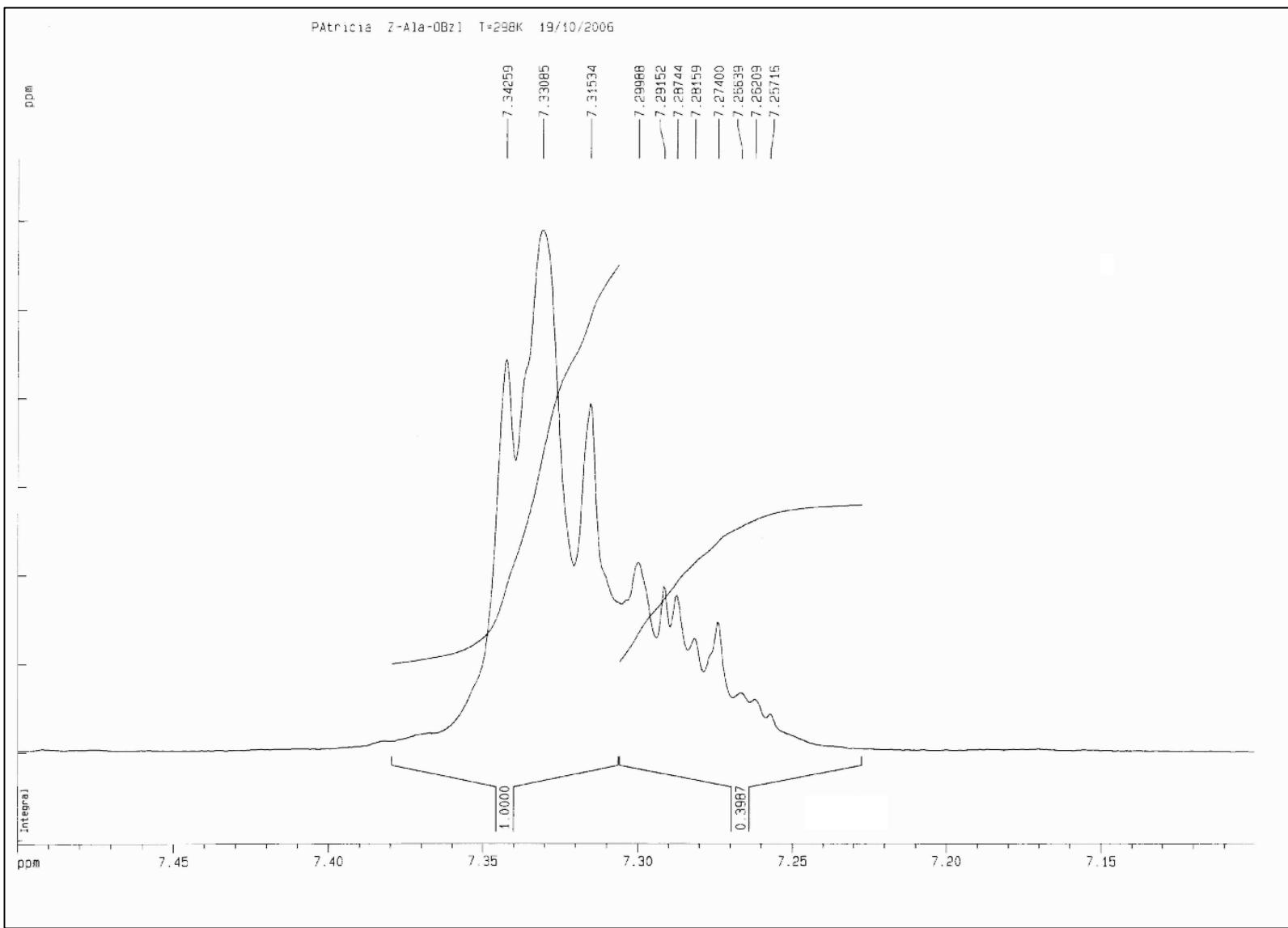
Espectro de Z-Ala-OMe – Expansão 2



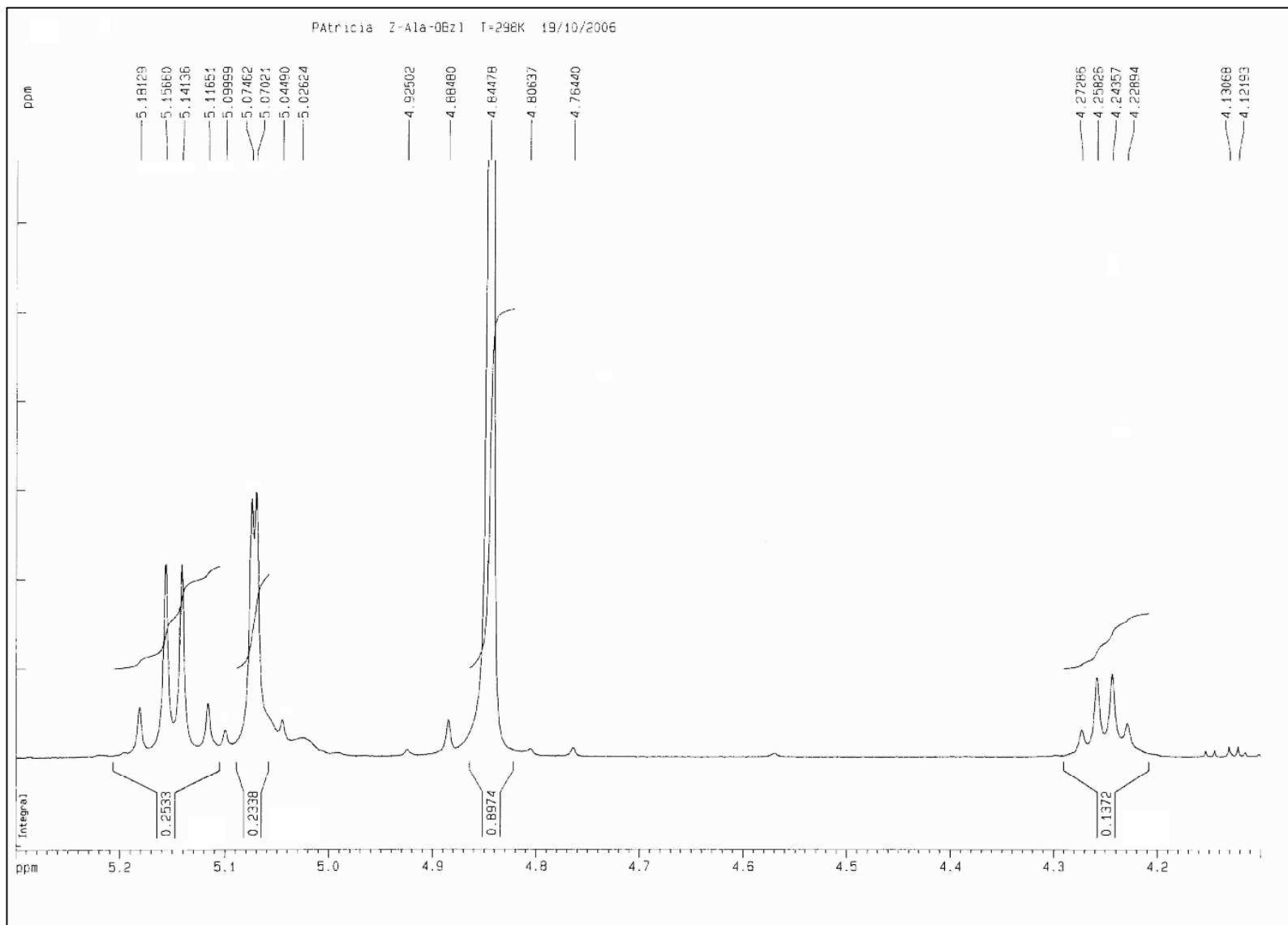
Espectro de Z-Ala-OMe – Expansão 3



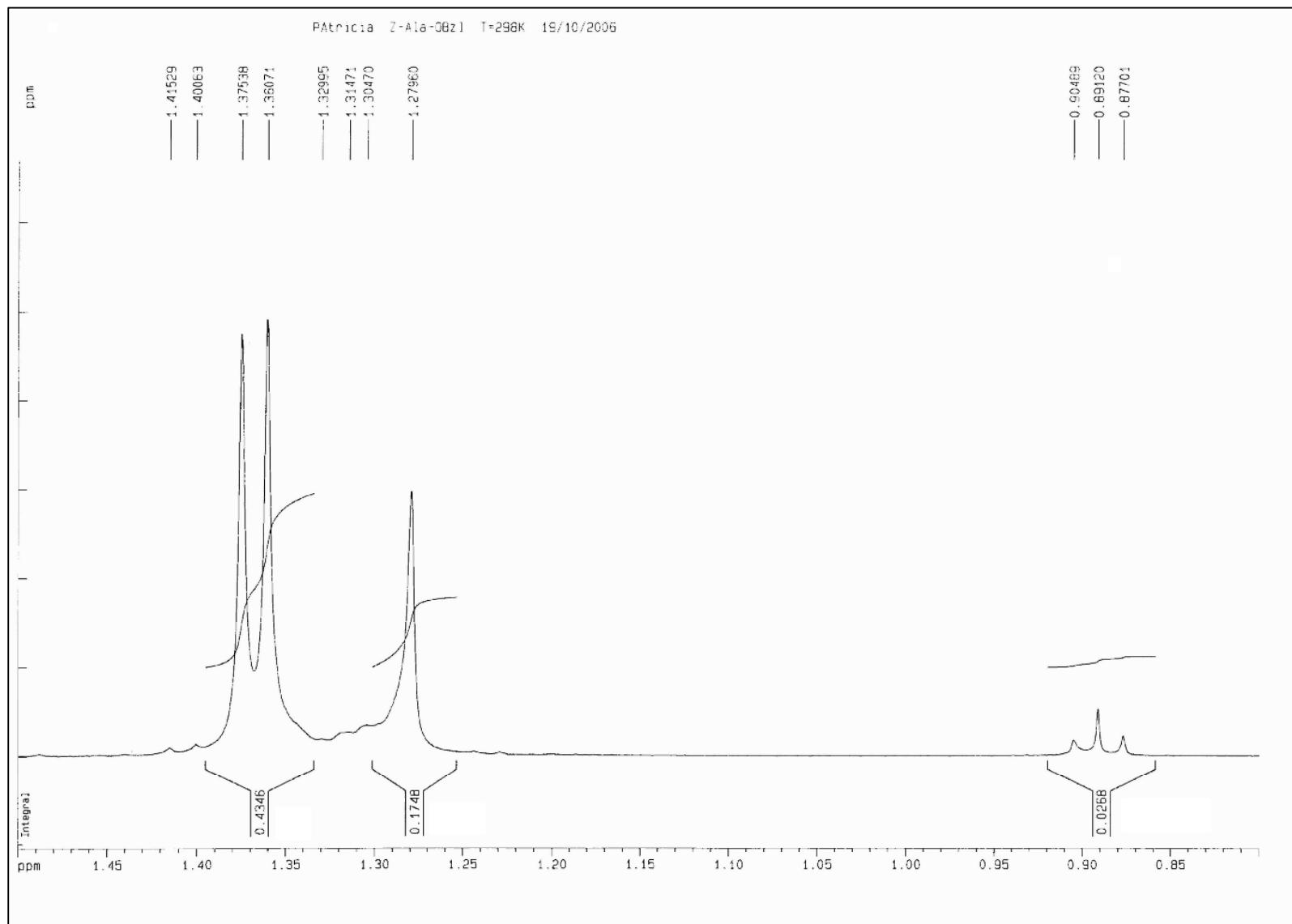
Espectro de Z-Ala-OBzI



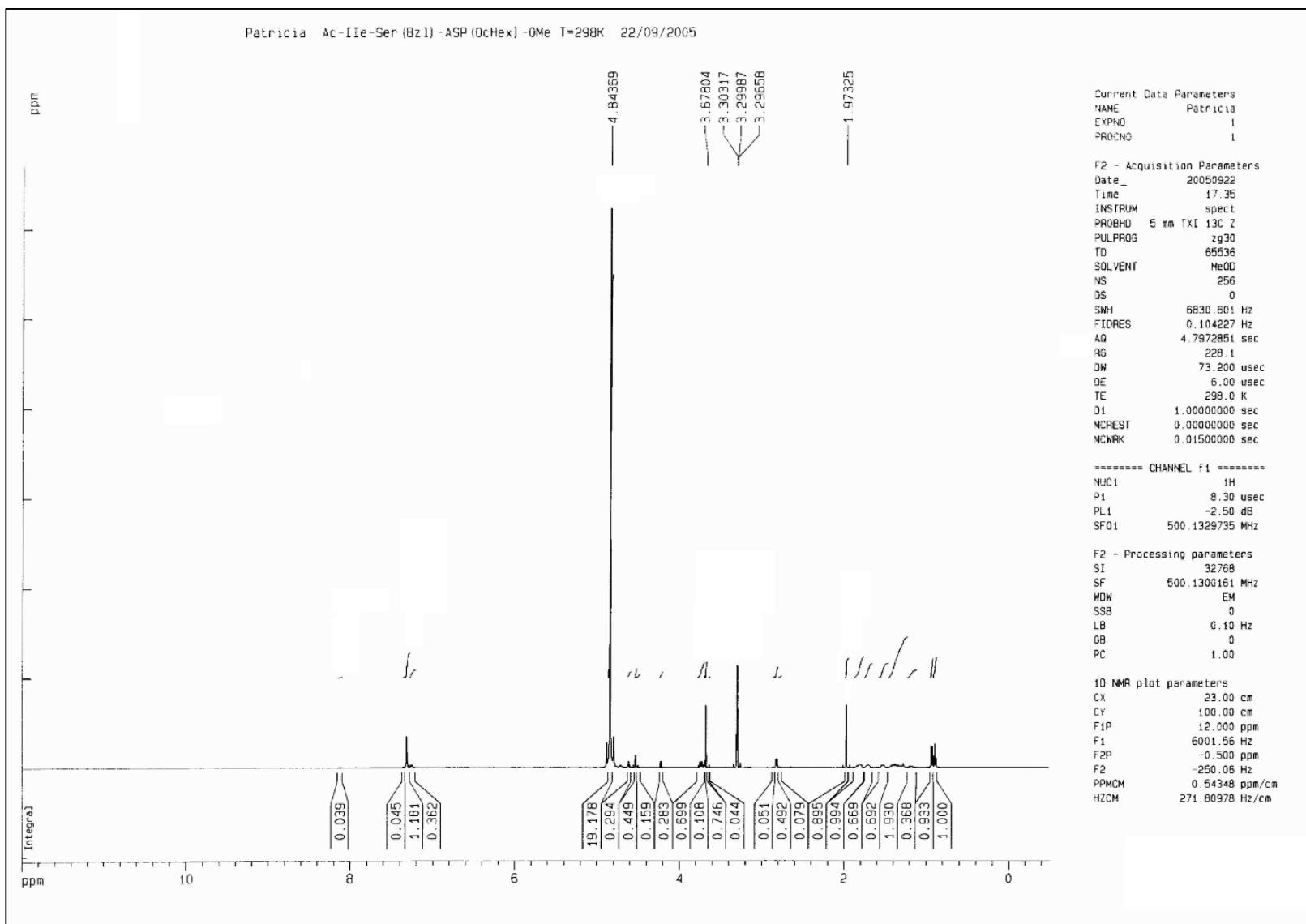
Espectro de Z-Ala-OBzl – Expansão 1



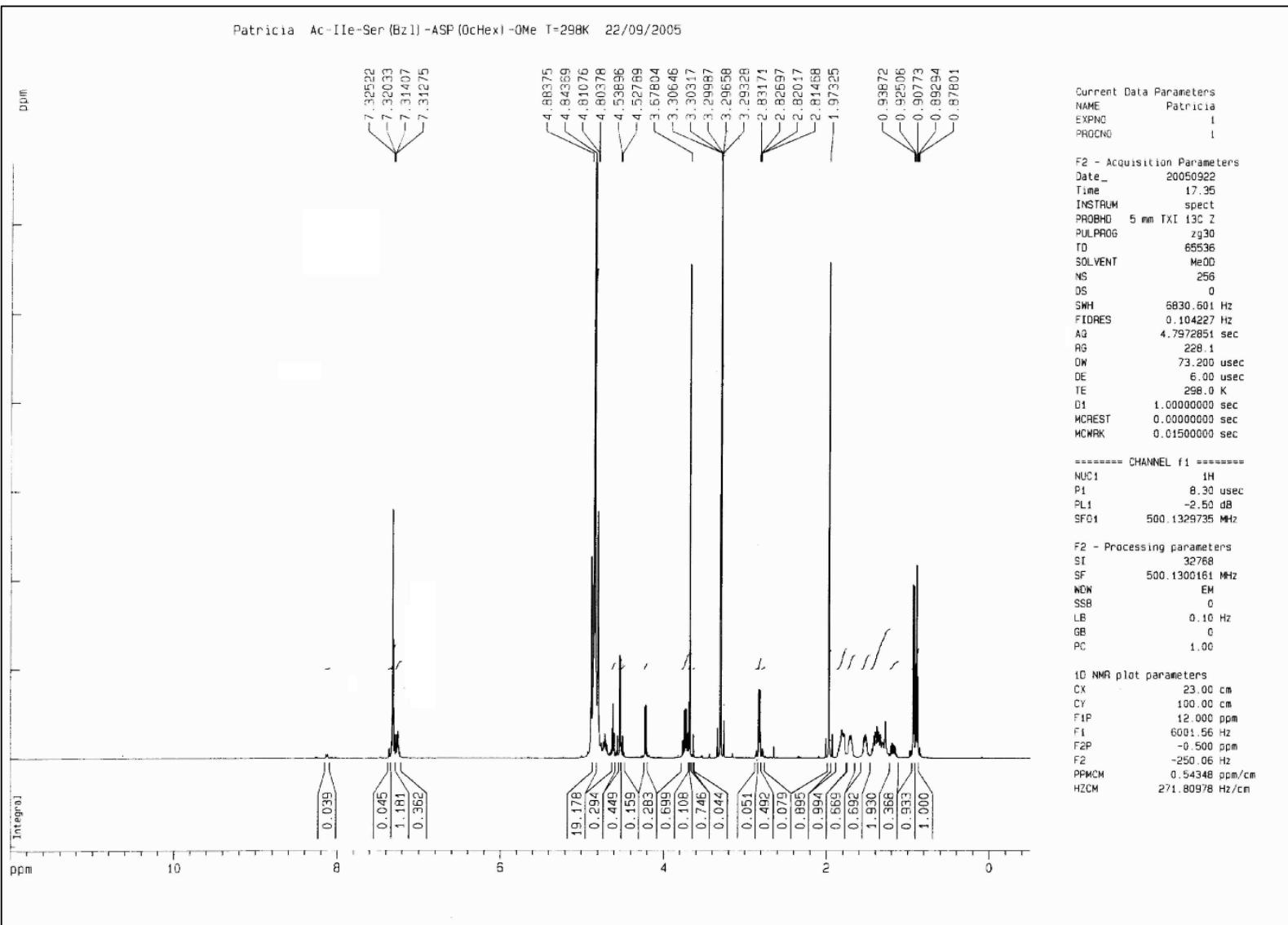
Espectro de Z-Ala-OBzl – Expansão 2



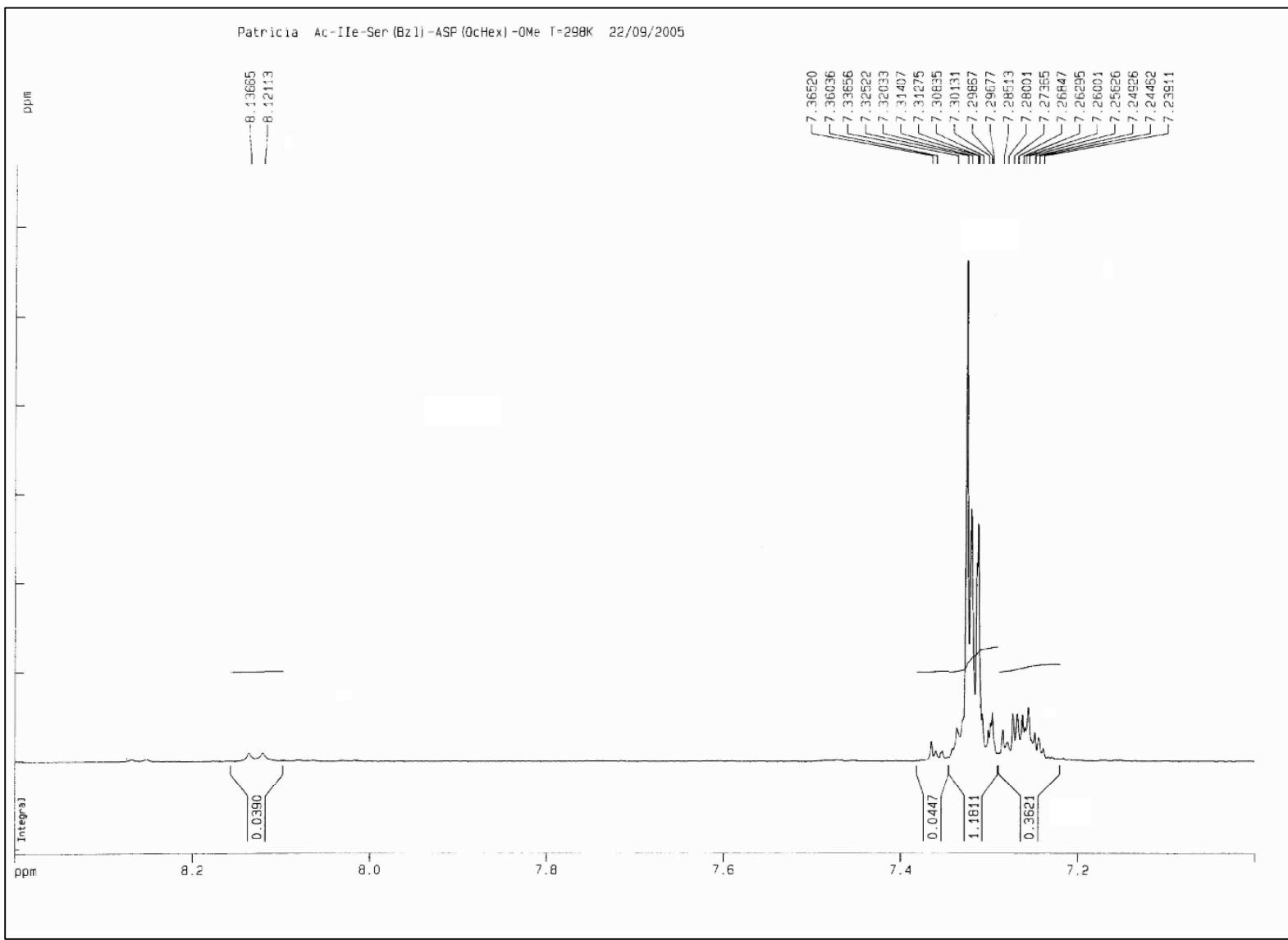
Espectro de Z-Ala-OBzl – Expansão 3



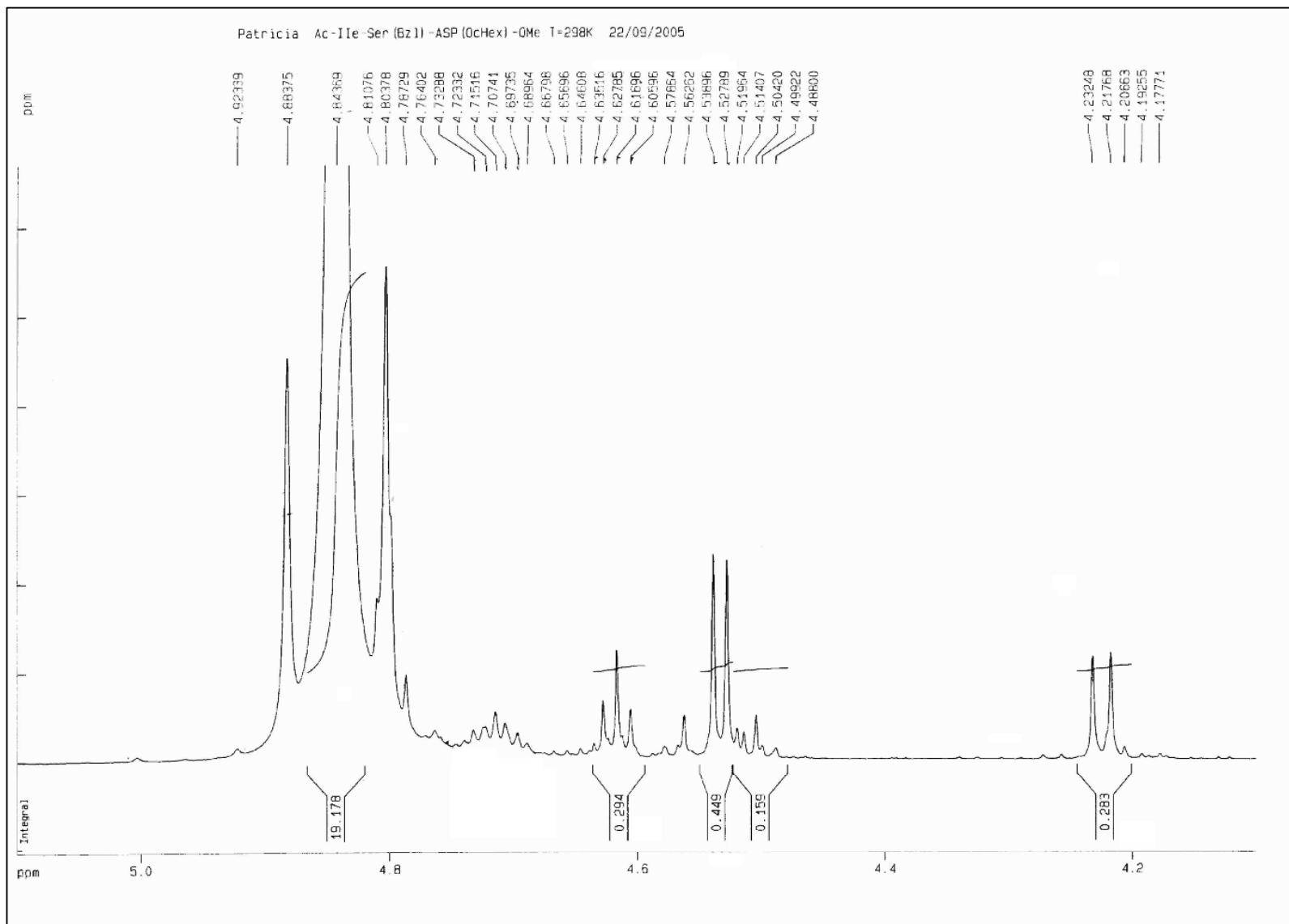
Espectro de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe



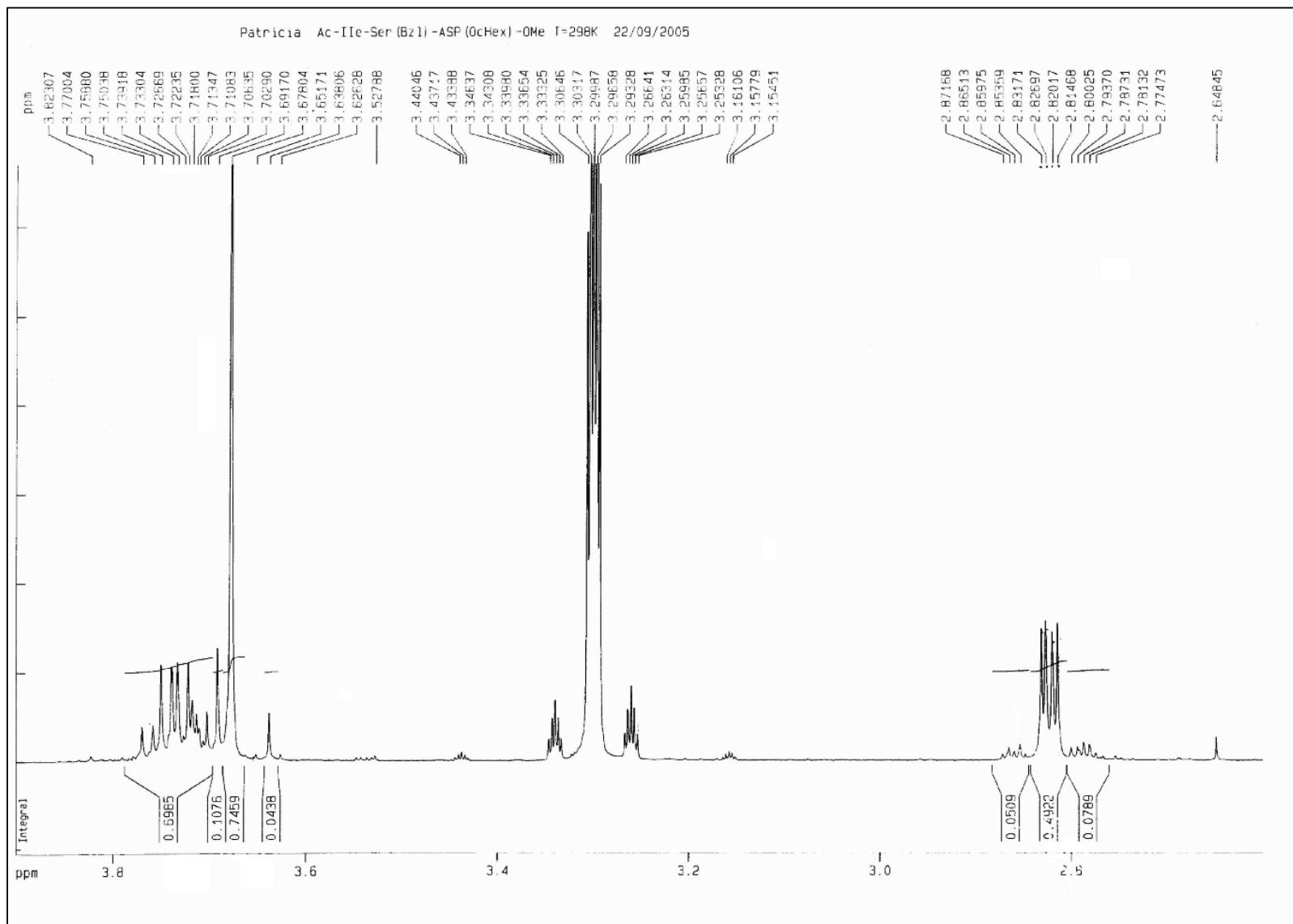
Espectro de Ac-Ile-Ser(BzI)-Asp(OcHex)-OMe – Expansão 1



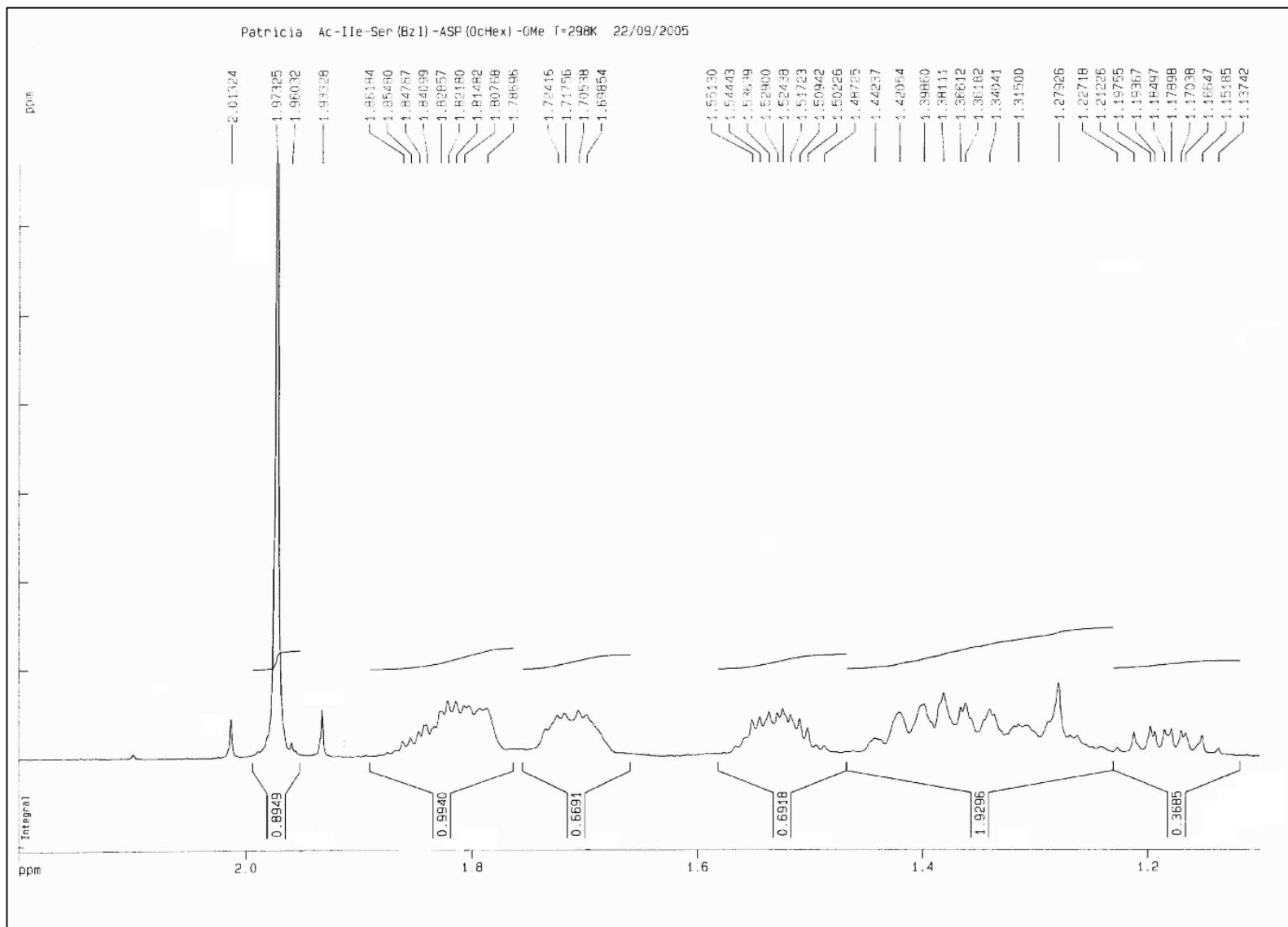
Espectro de Ac-Ile-Ser(BzI)-Asp(OcHx)-OMe – Expansão 2



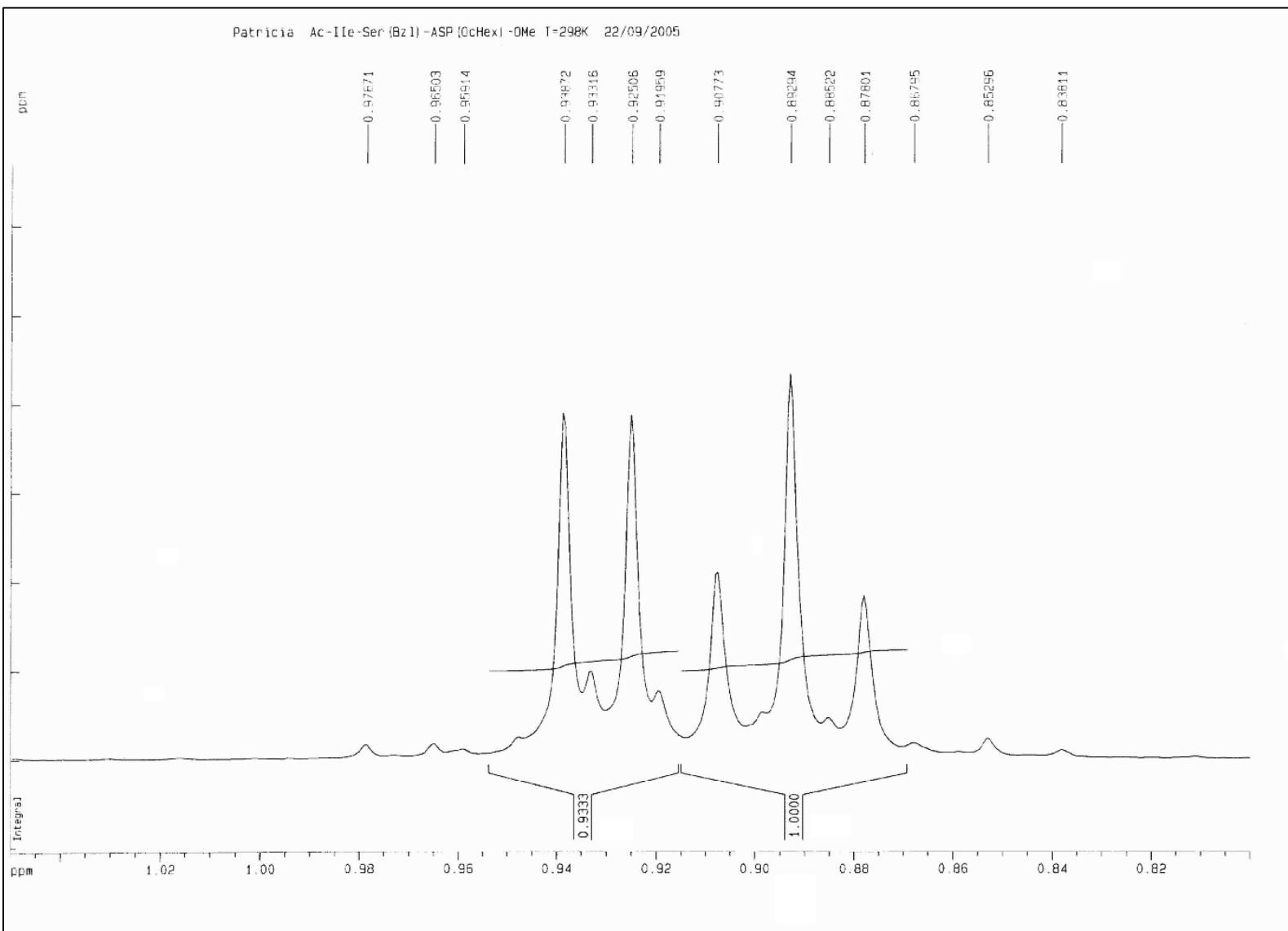
Espectro de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe – Expansão 3



Espectro de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe – Expansão 4



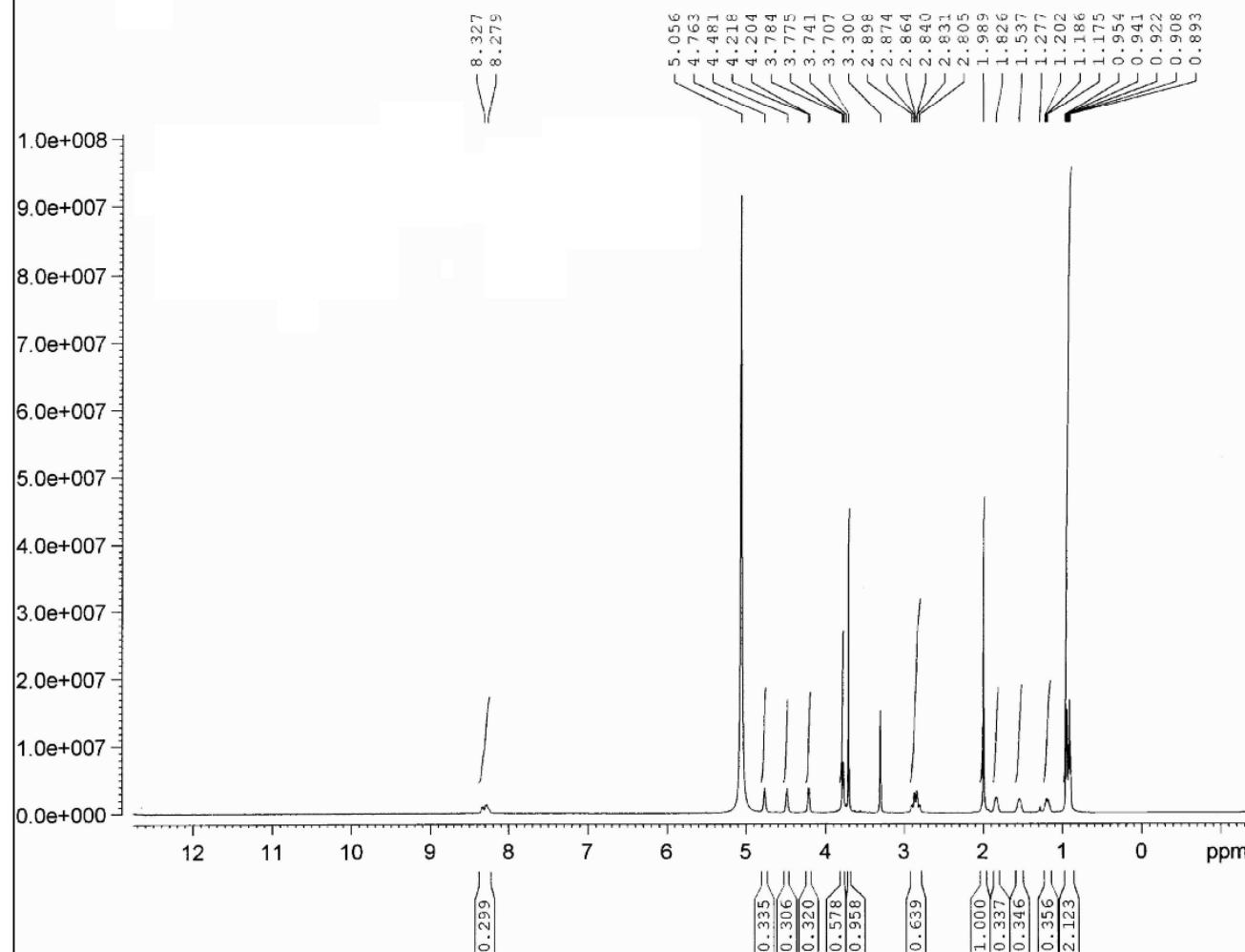
Espectro de Ac-Ile-Ser(BzI)-Asp(OcHx)-OMe – Expansão 5

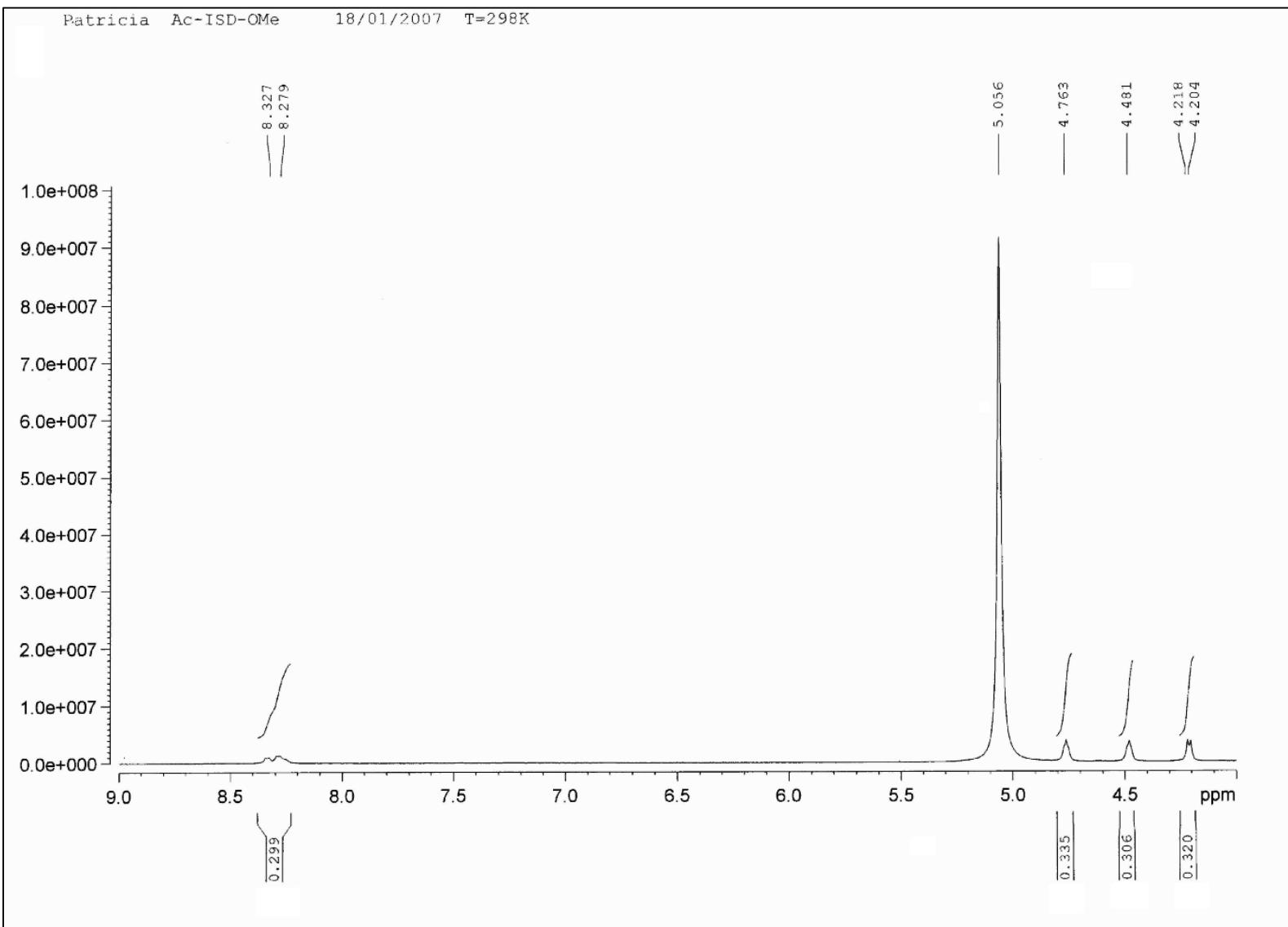


Espectro de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-OMe – Expansão 6

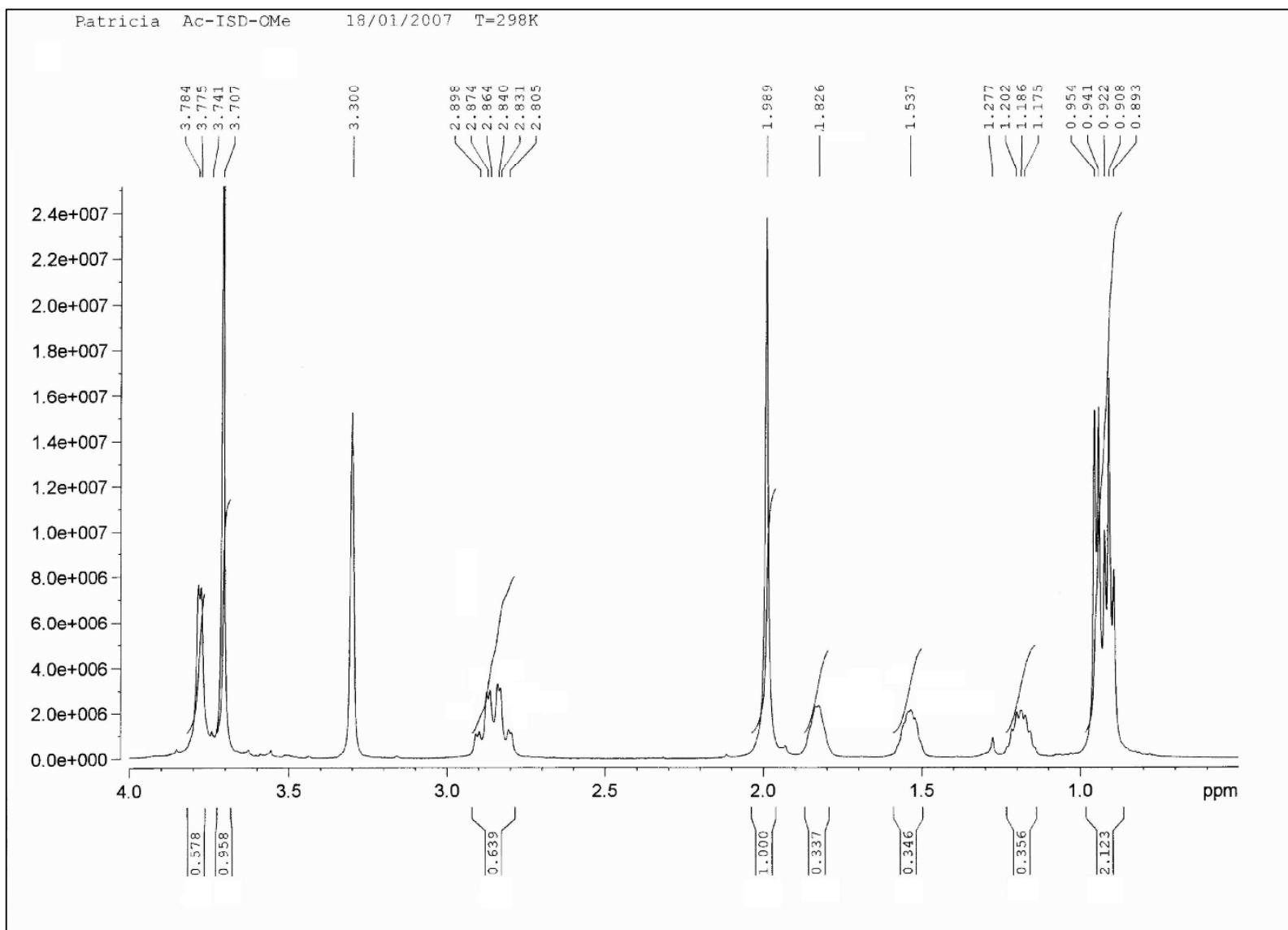
Patrícia Ac-ISD-OMe

18/01/2007 T=298K



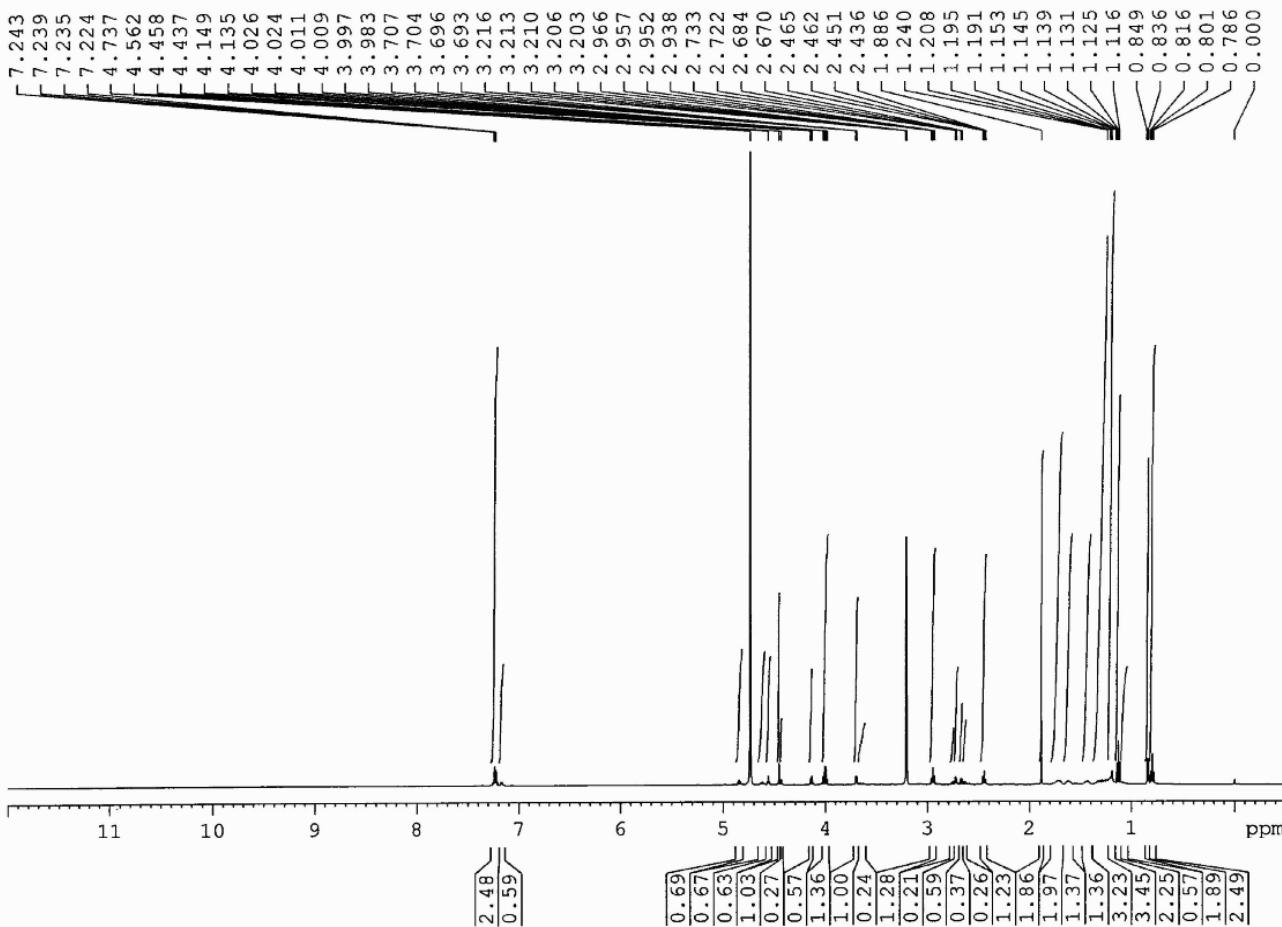


Espectro de Ac-Ile-Ser-Asp-OMe – Expansão 1



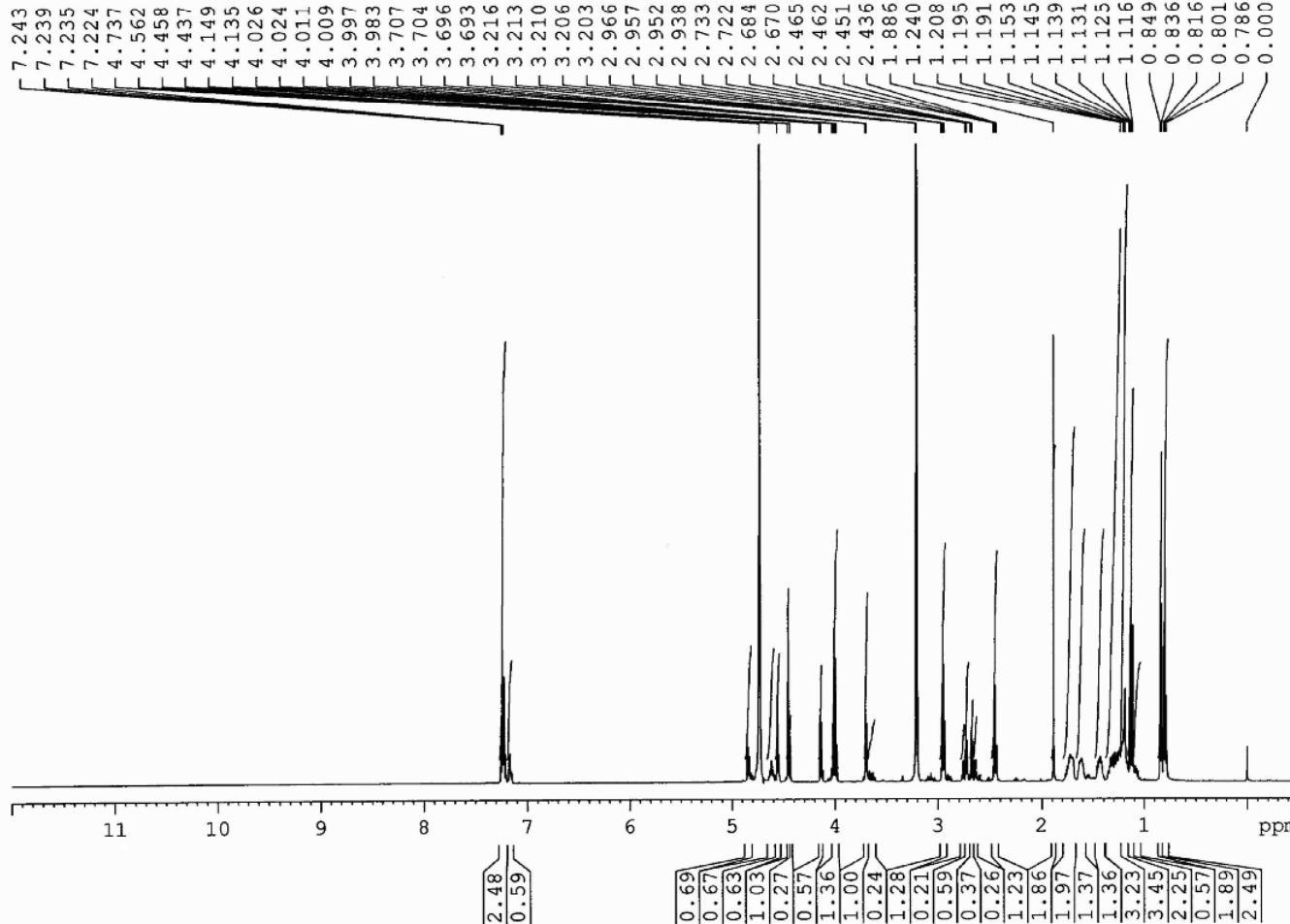
Espectro de Ac-Ile-Ser-Asp-OMe – Expansão 2

Patricia Ac-IS(Bzl)D(OcHx)-Set3 T=25C 12/06/2007



Espectro de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-S(CH₂)₂COOEt

Patricia Ac-IS(Bzl)-D(OcHx)-Set3 T=25C 12/06/2007



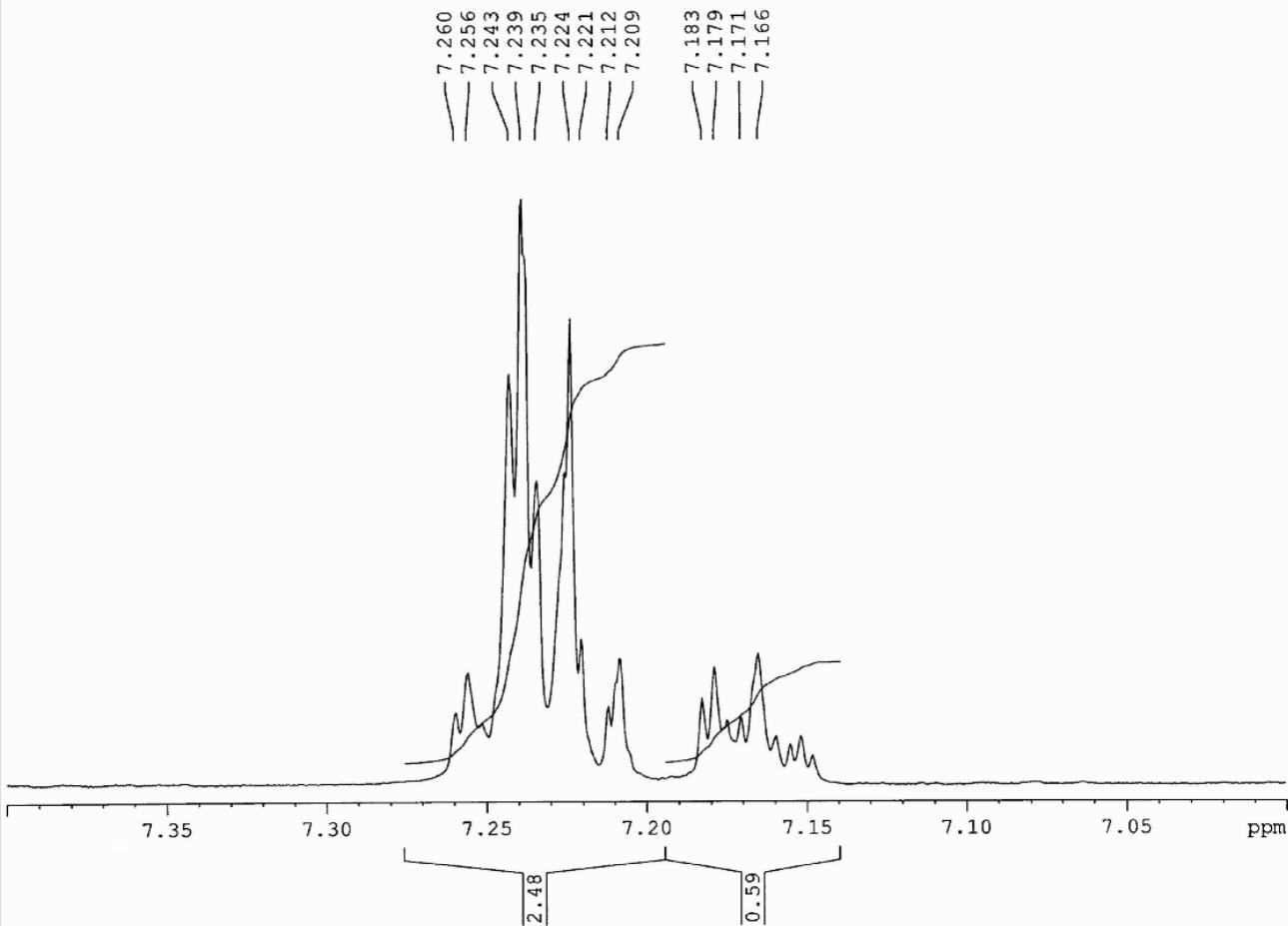
Current Data Parameters
NAME Patricia
EXPNO 5
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20070612
Time_ 18.28
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TXI 1H-13
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDC13
NS 128
DS 0
SWH 7022.472 Hz
FIDRES 0.107154 sec
AQ 4.6662130 sec
RG 362
DW 71.200 usec
DE 10.00 usec
TE 298.2 K
DI 1.0000000 sec
TD0 1

CHANNEL f1
NUC1 1H
PI 9.60 usec
PL1 0.09 dB
SF01 500.1329623 MHz
F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 500.1300609 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.10 Hz
GB 0
PC 1.00

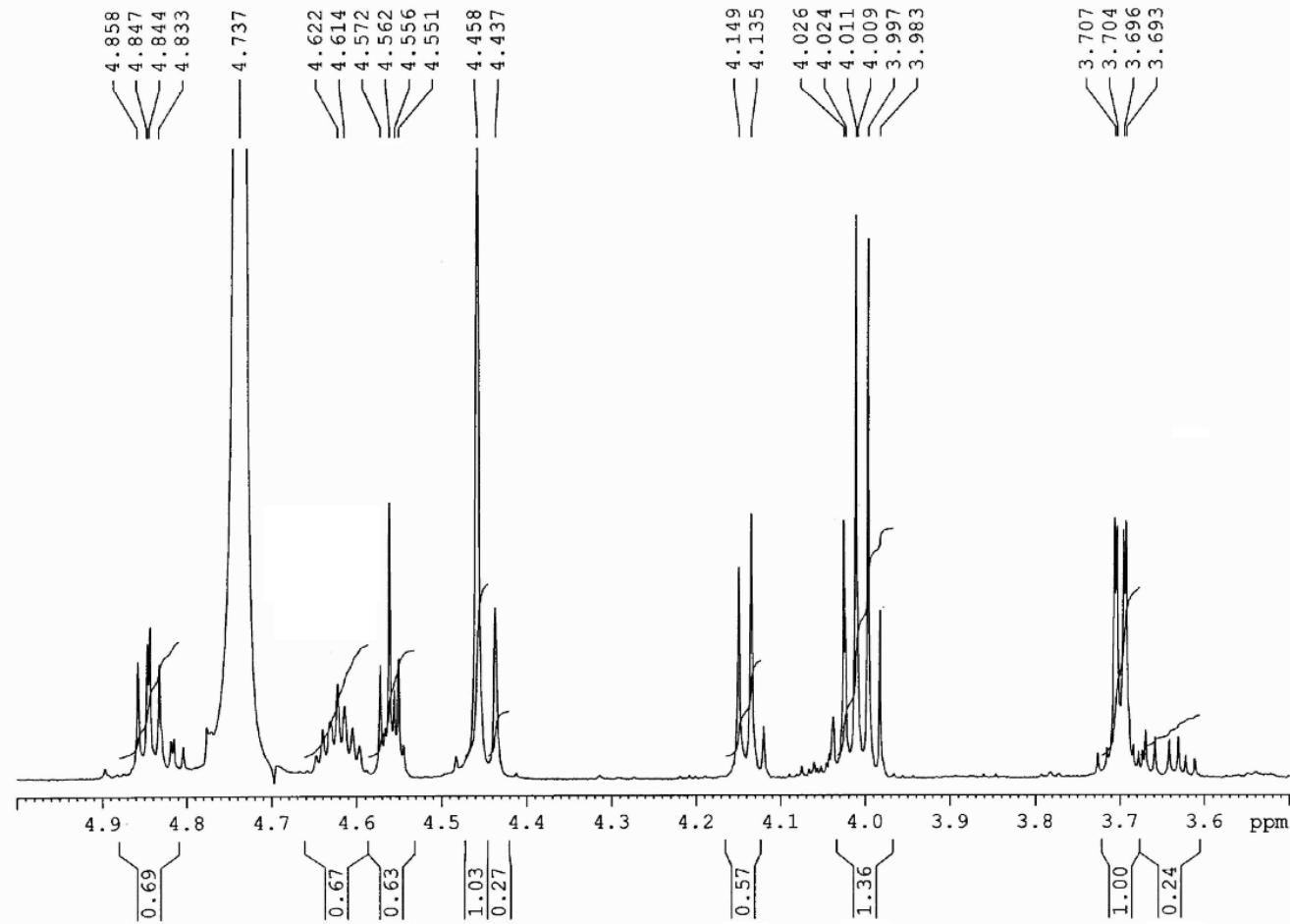
Espectro de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-S(CH₂)₂COOEt – Expansão 1

Patricia Ac-IS(Bz1)D(OcHx)-Set3 T=25C 12/06/2007



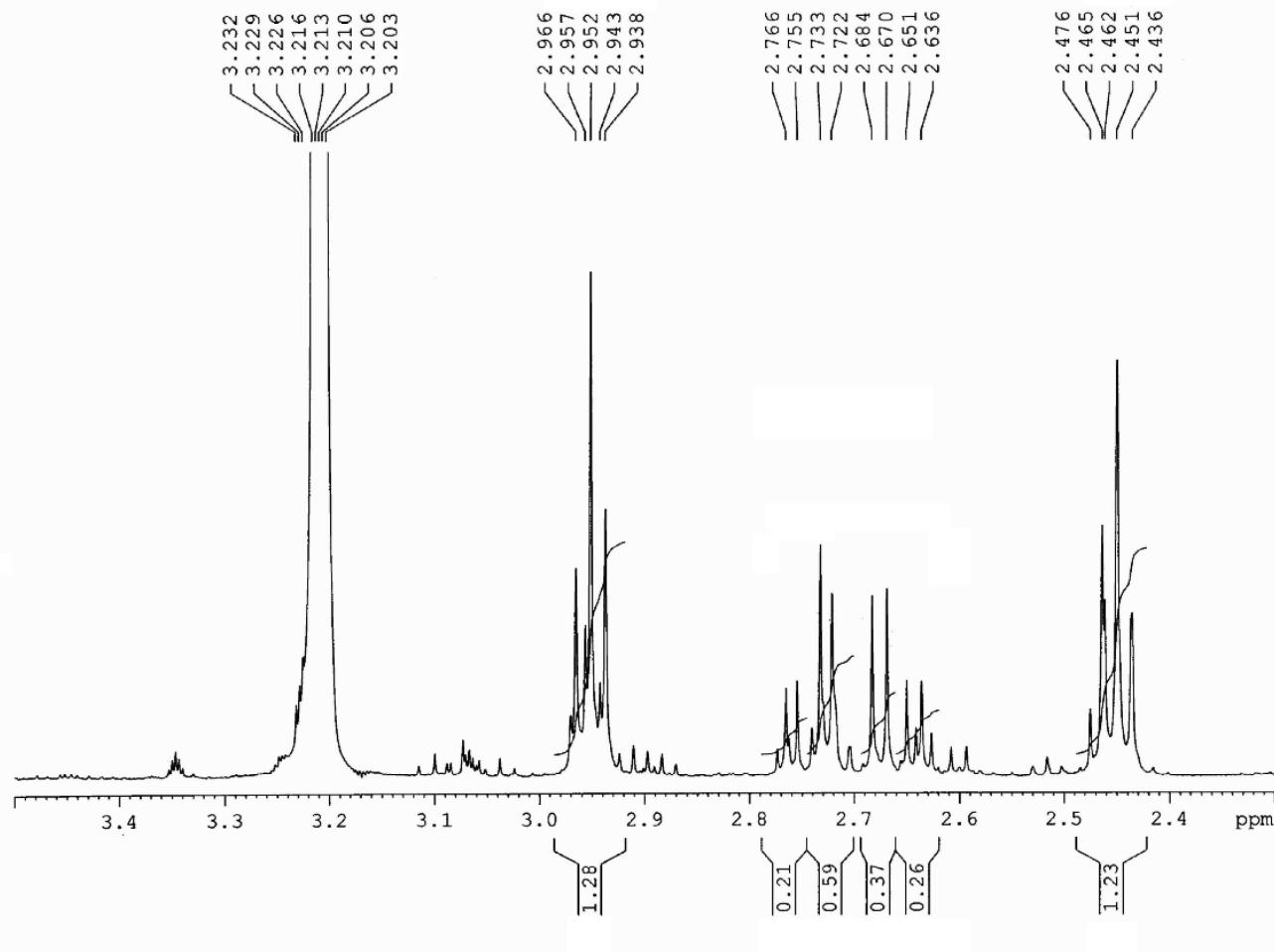
Espectro de Ac-Ile-Ser(Bz1)-Asp(OcHx)-S(CH₂)₂COOEt – Expansão 2

Patricia Ac-IS(Bzl)D(OcHx)-Set3 T=25C 12/06/2007



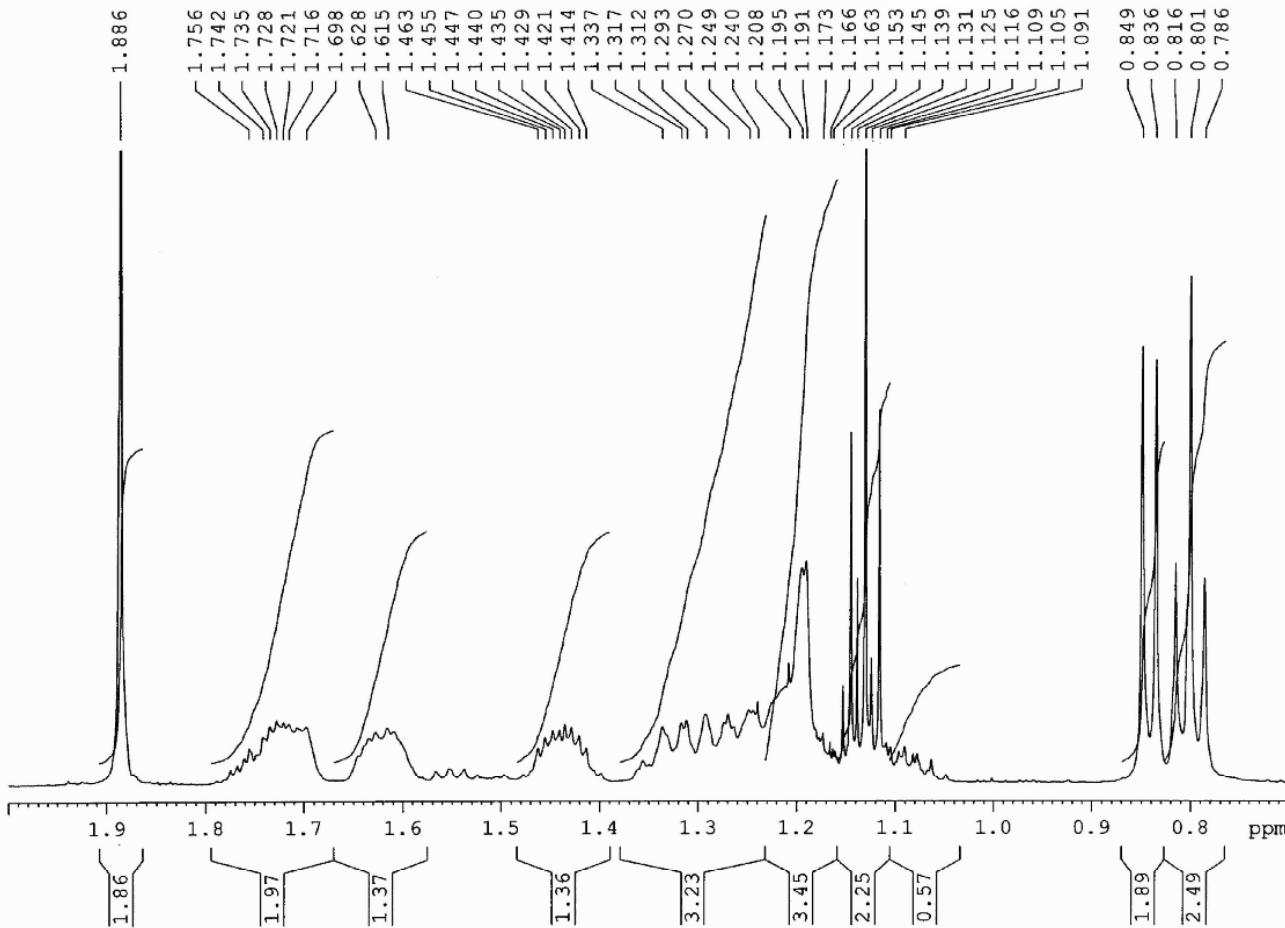
Espectro de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-S(CH₂)₂COOEt – Expansão 3

Patricia Ac-IS(Bzl)-D(OcHx)-Set3 T=25C 12/06/2007



Espectro de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-S(CH₂)₂COOEt – Expansão 4

Patricia Ac-IS(Bzl)D(OcHx)-Set3 T=25C 12/06/2007



Current Data Parameters
NAME Patricia
EXPNO 5
PROCNO 1

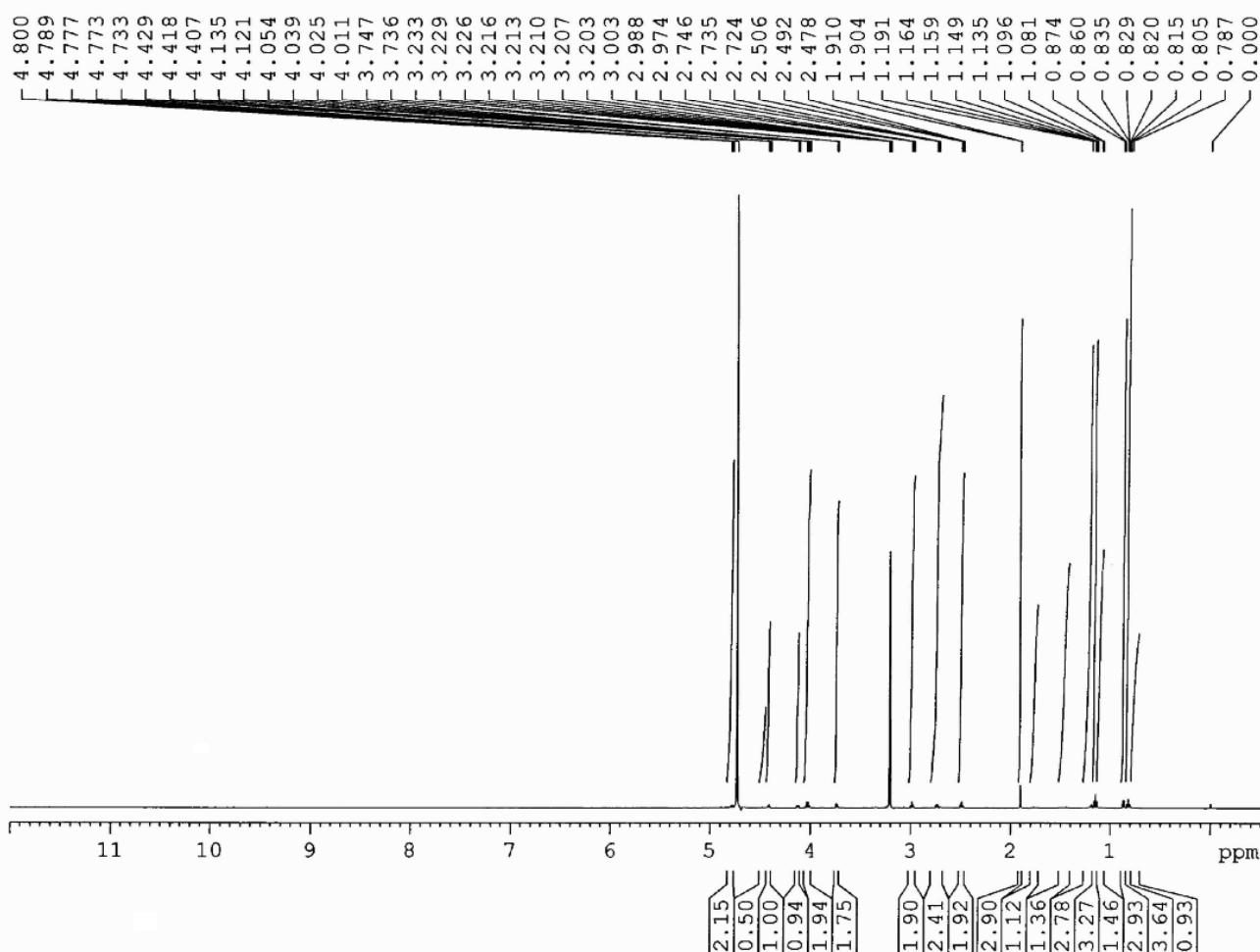
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20070612
Time_ 18.28
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TXI 1W-13
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 128
DS 0
SWH 7022.472 Hz
FIDRES 0.107152 Hz
AQ 4.6662130 sec
RG 362
DW 71.200 usec
DE 10.00 usec
TE 298.2 K
D1 1.0000000 sec
TDC 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 9.60 usec
PL1 0.00 dB
SF01 500.1329623 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 500.1300609 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.10 Hz
GB 0
PC 1.00

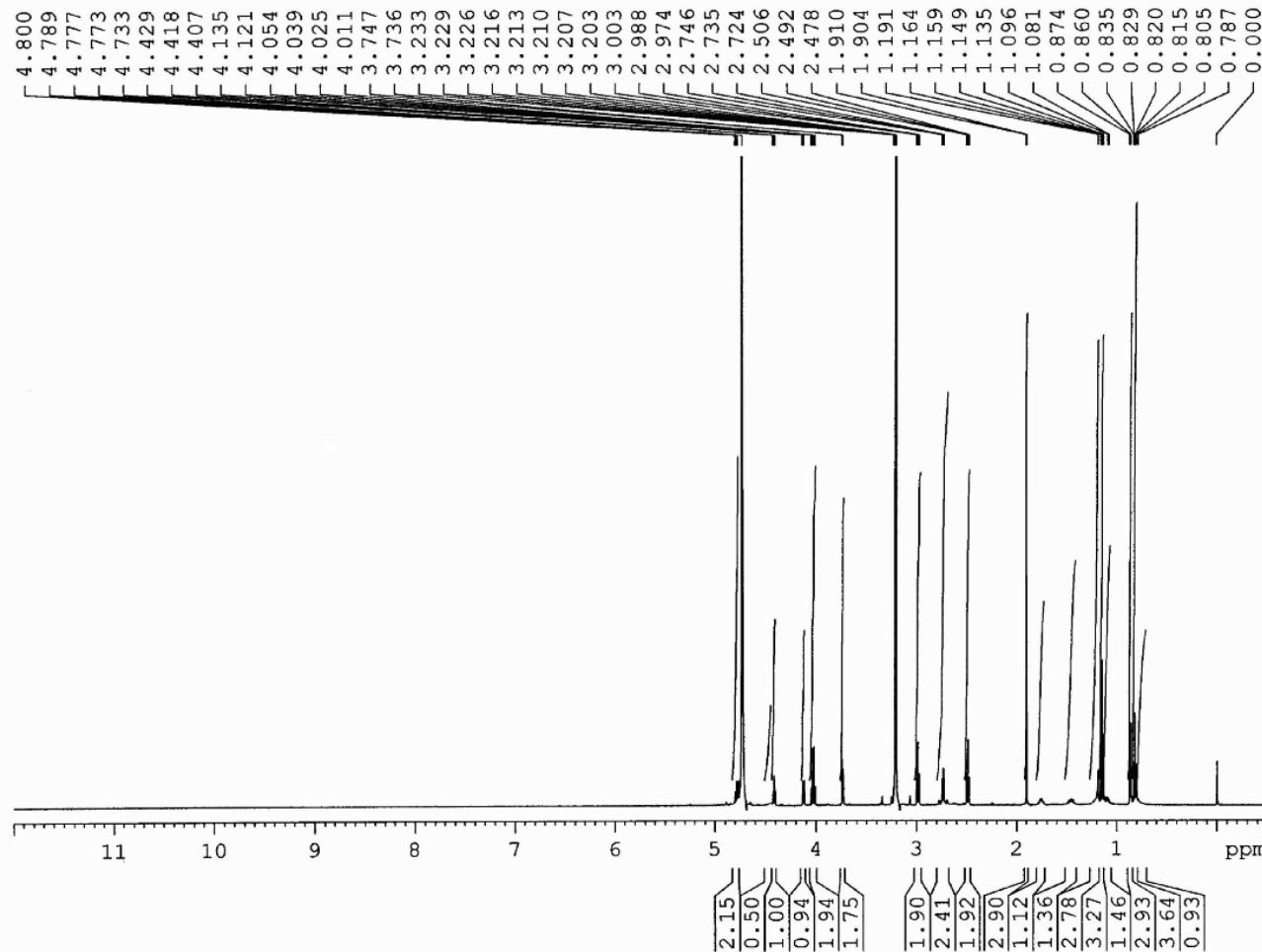
Espectro de Ac-Ile-Ser(Bzl)-Asp(OcHx)-S(CH₂)₂COOEt – Expansão 5

Patricia Ac-ISD-Set3 T=25C 12/06/2007



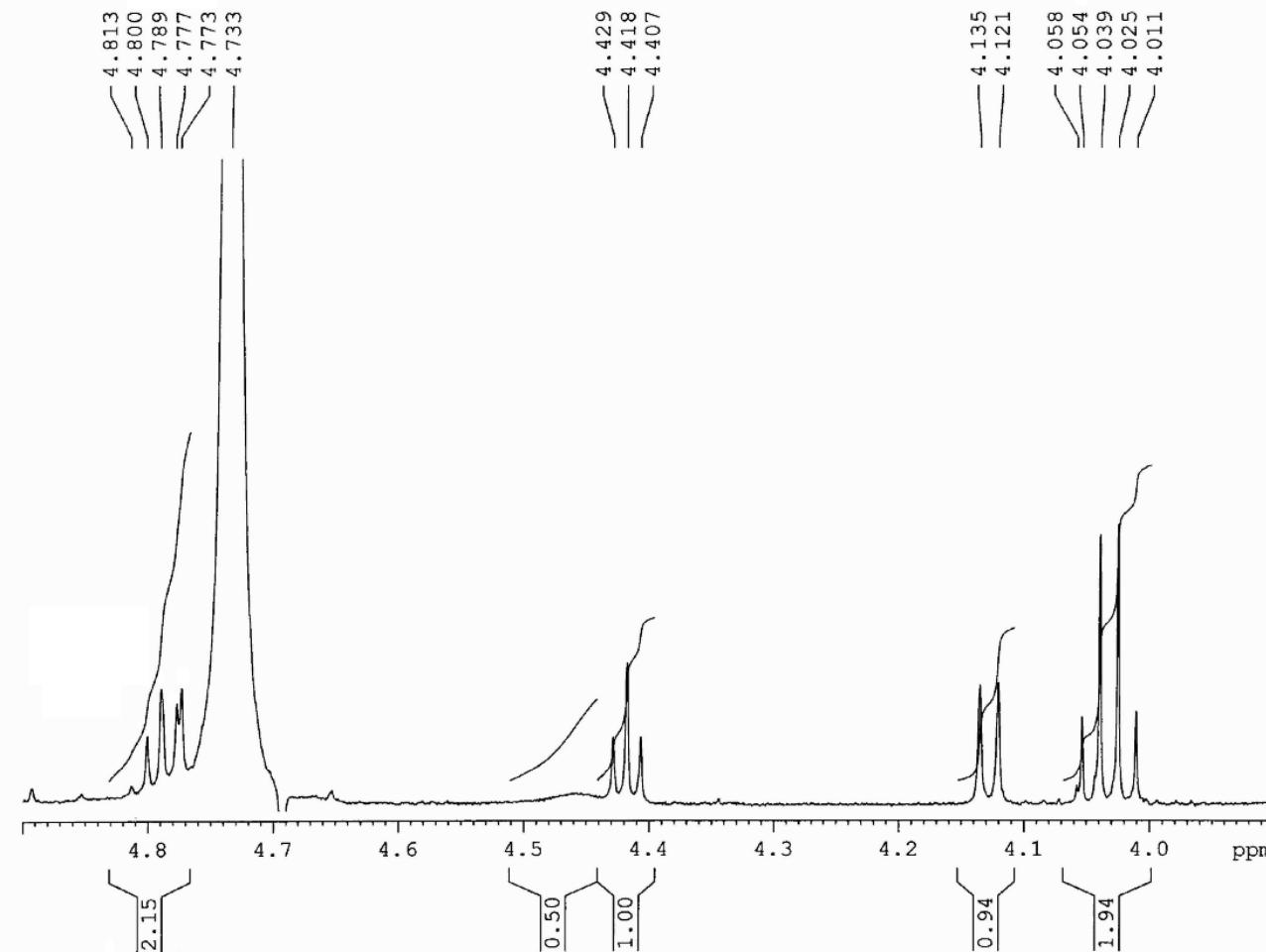
Espectro de Ac-Ile-Ser-Asp-S(CH₂)₂COOEt

Patricia Ac-ISD-Set3 T=25C 12/06/2007



Espectro de Ac-Ile-Ser-Asp-S(CH₂)₂COOEt – Expansão 1

Patricia Ac-ISD-Set3 T=25C 12/06/2007



Current Data Parameters
NAME Patricia
EXPNO 2
PROCNO 1

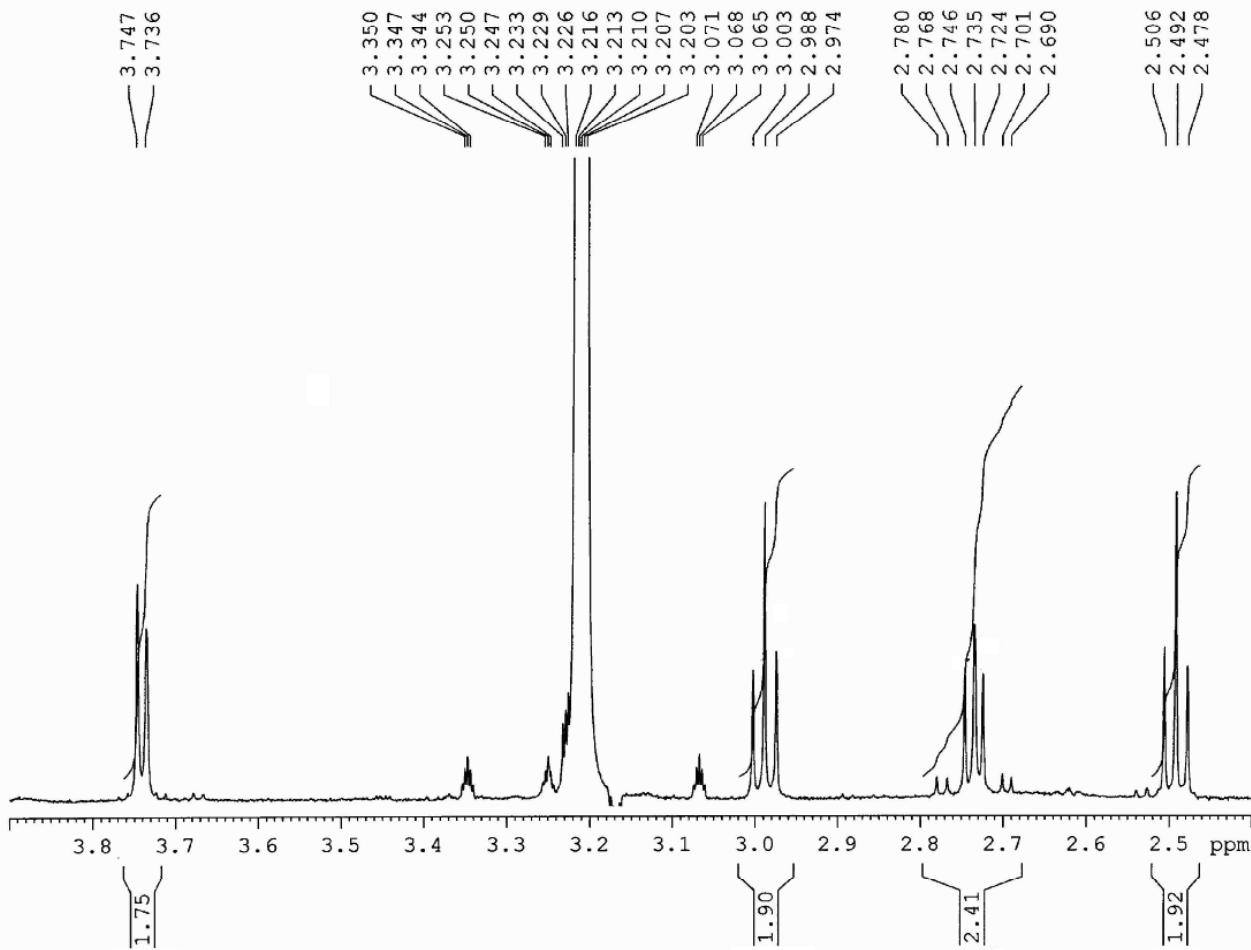
F2 - Acquisition Parameters
Date 20070612
Time 10.08
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TXI 1H-13
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl₃
NS 64
DS 0
SWH 6613.757 Hz
FIDRES 0.100918 Hz
AQ 4.9545717 sec
RG 574.7
DW 75.600 usec
DE 10.00 usec
TE 298.5 K
D1 1.0000000 sec
TDO 1 sec

----- CHANNEL f1 -----
NUC1 1H
PL1 9.60 usec
PLL 0.00 dB
SF01 500.1328645 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 500.1300609 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.10 Hz
GB 0
PC 1.00

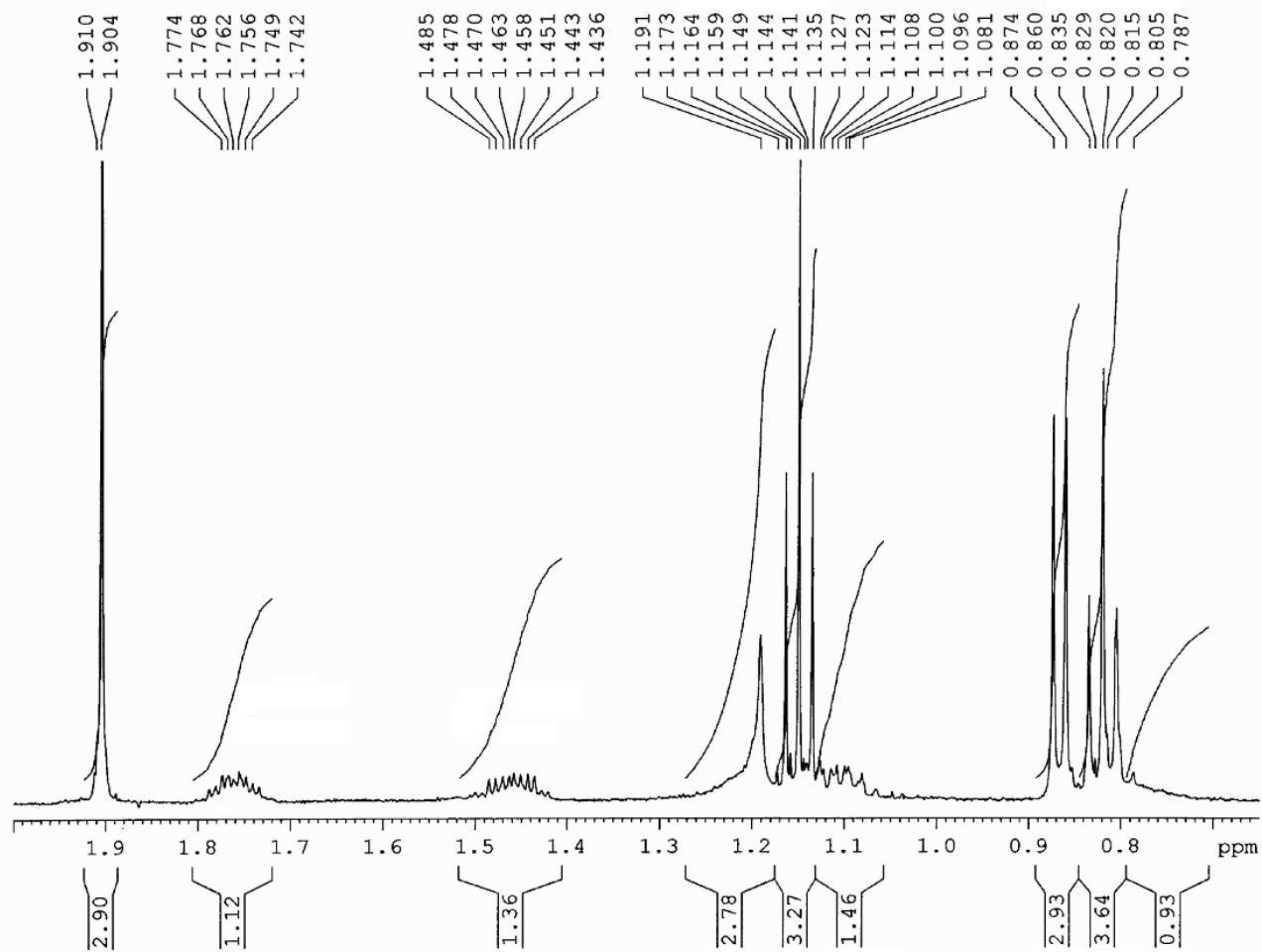
Espectro de Ac-Ile-Ser-Asp-S(CH₂)₂COOEt – Expansão 2

Patricia Ac-ISD-Set3 T=25C 12/06/2007



Espectro de Ac-Ile-Ser-Asp-S(CH₂)₂COOEt – Expansão 3

Patricia Ac-ISD-Set3 T=25C 12/06/2007



Current Data Parameters
NAME Patricia
EXPNO 2
PROCNO 1

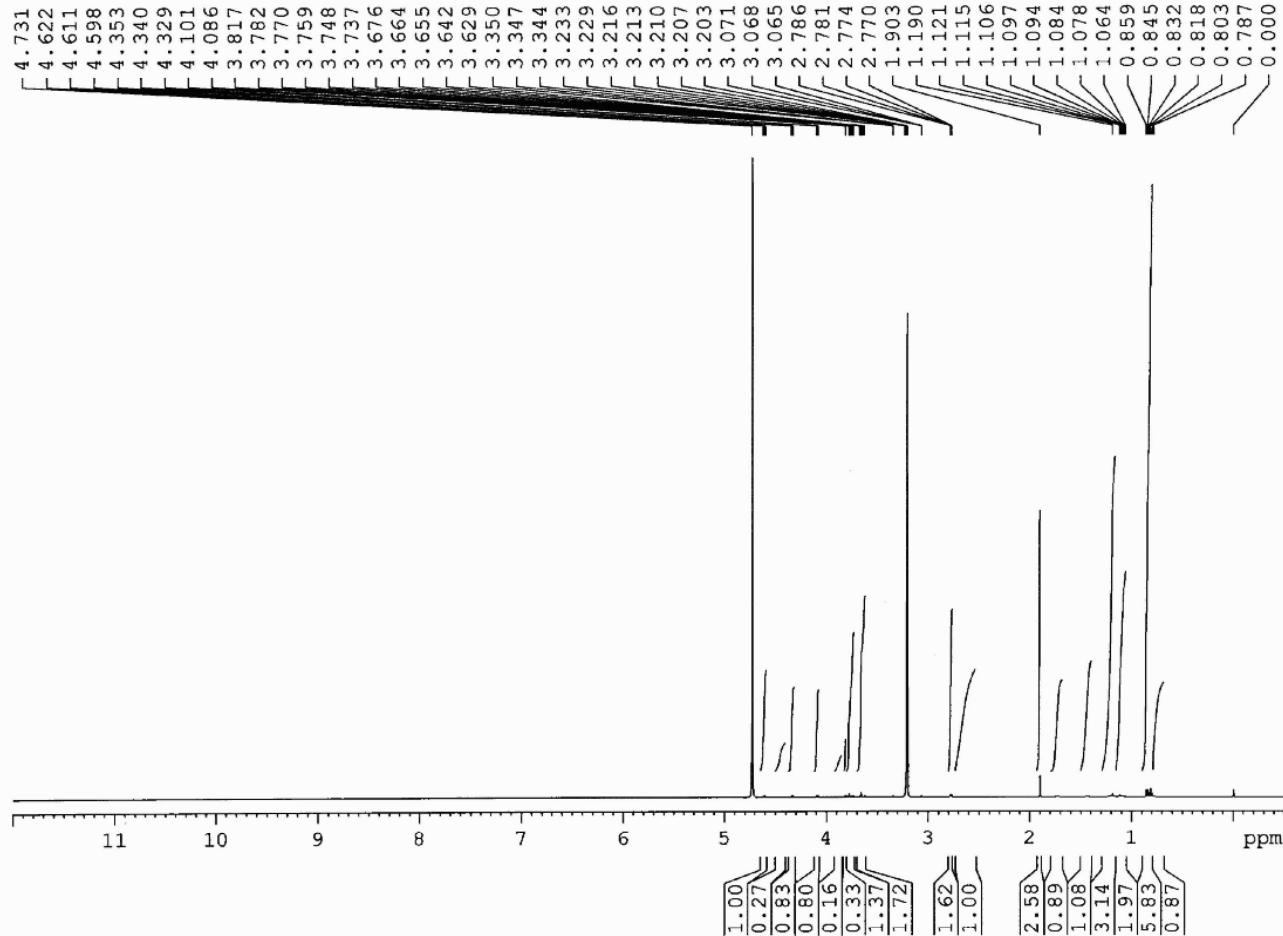
F2 - Acquisition Parameters
Date 20070612
Time 10.08
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TXI 1H-13
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 64
DS 0
SWH 6613.75' Hz
FIDRES 0.100918 Hz
AQ 4.9545717 sec
RG 574.7
DW 75.600 usec
DE 10.00 usec
TE 298.5 K
D1 1.0000000 sec
TDO 1

----- CHANNEL f1 -----
NOCL 1H
P1 9.60 usec
PL1 0.00 dB
SF01 500.1328645 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 500.1300609 MHz
WDW
SSB 0
LB 0.10 Hz
GB 0
PC 1.00

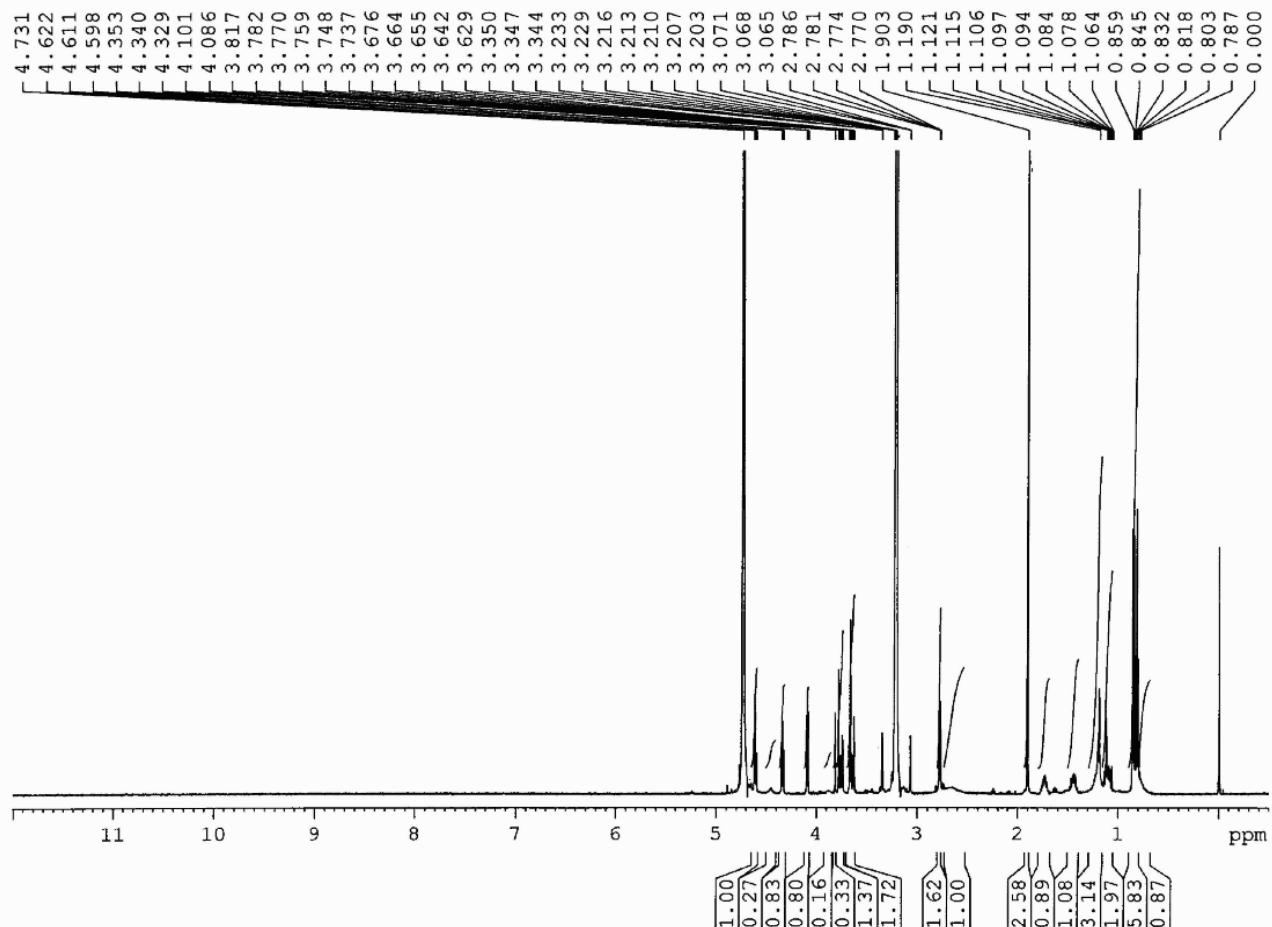
Espectro de Ac-Ile-Ser-Asp-S(CH₂)₂COOEt – Expansão 4

Patricia Ac-ISDG-NH2 T=25C 12/06/2007



Espectro de Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂

Patricia Ac-ISDG-NH₂ T=25C 12/06/2007



Current Data Parameters
NAME Patricia
EXPNO 4
PROCNO 1

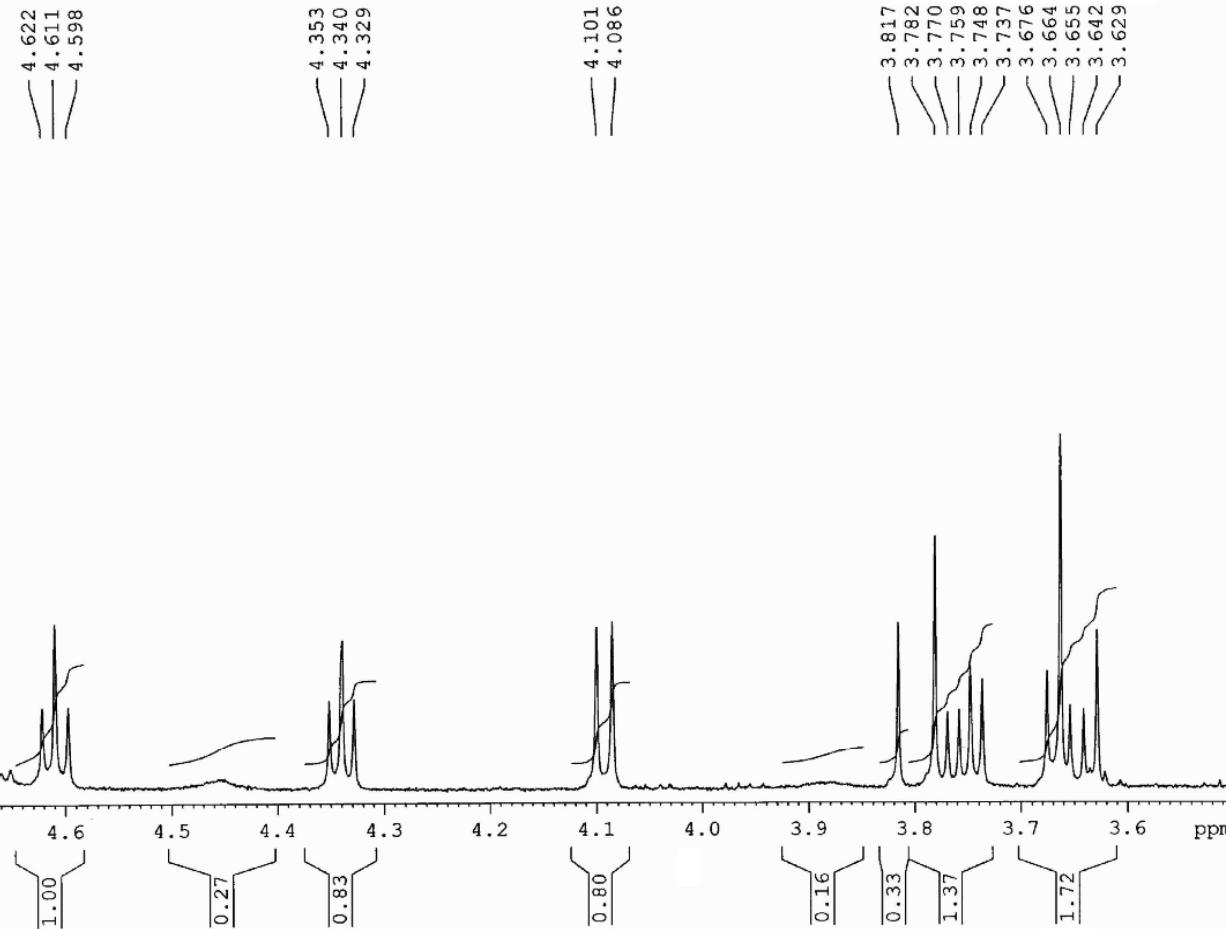
F2 - Acquisition Parameters
Date 20070612
Time 11.21
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TXI 1H-13
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl₃
NS 256
DS 0
SWH 6830.601 Hz
FIDRES 0.10427 Hz
AQ 4.7972851 sec
RG 645.1
DW 73.200 usec
DE 10.00 usec
TE 298.7 K
D1 1.0000000 sec
TDO I

CHANNEL f1
NUC1 1H
P1 9.60 usec
PL1 0.00 dB
SF01 500.1329153 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 500.1300610 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.10 Hz
GB 0
PC 1.00

Espectro de Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂ – Expansão 1

Patricia Ac-ISDG-NH₂ T=25C 12/06/2007



Current Data Parameters
NAME Patricia
EXPNO 4
PROCNO 1

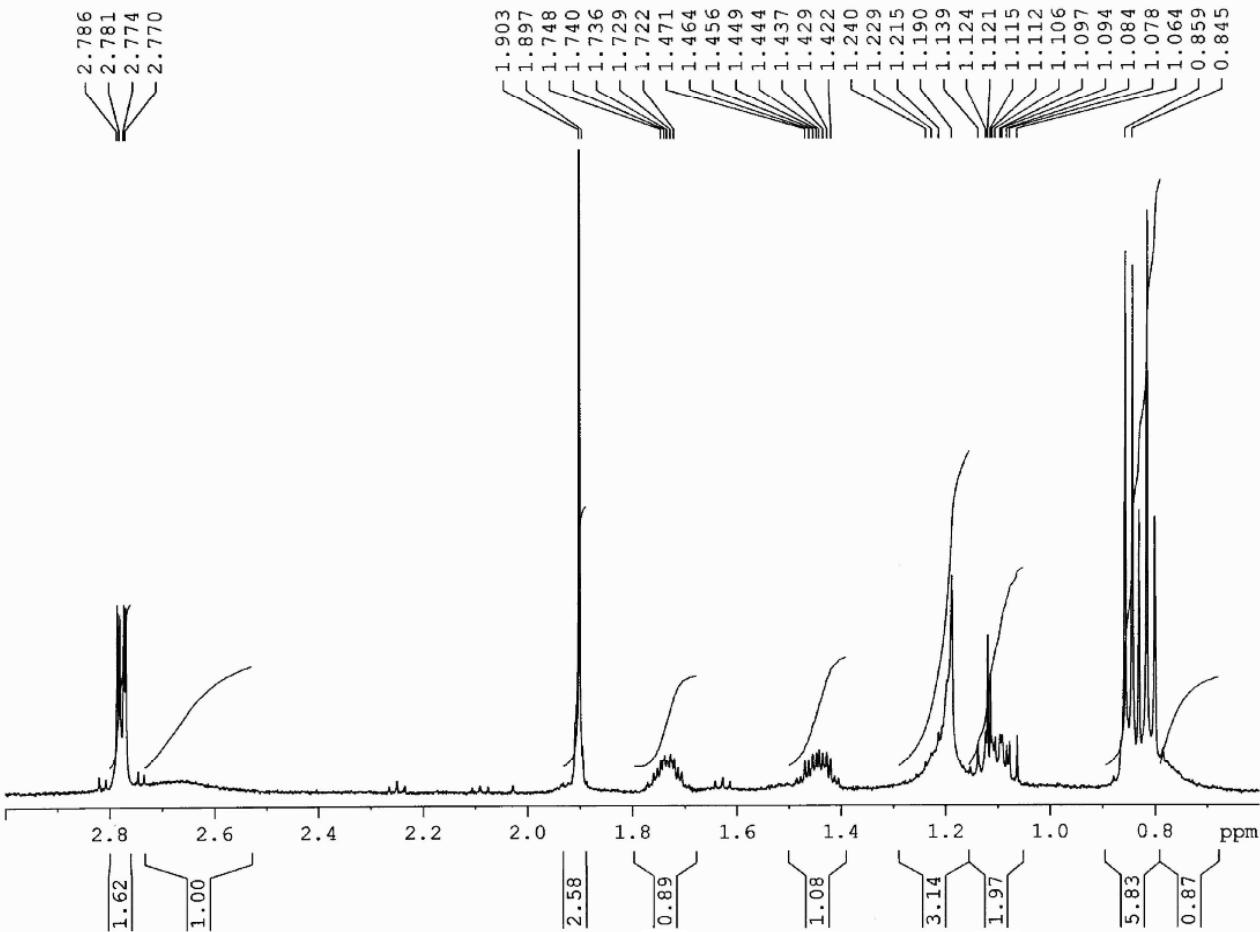
F2 - Acquisition Parameters
DMe 20070612
Time 11.21
INSTRUMT 5 mm TXI 1H-13
PROBHD 65536
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl₃
NS 256
DS 0
SWH 6830.601 Hz
FIDRES 0.104227 Hz
AQ 4.7972851 sec
RG 645.1
DW 73.200 usec
DE 10.00 usec
TB 298.7 K
D1 1.0000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 9.60 usec
PLL 0.00 dB
SF01 500.1329153 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 500.1300610 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.10 Hz
GB 0
PC 1.00

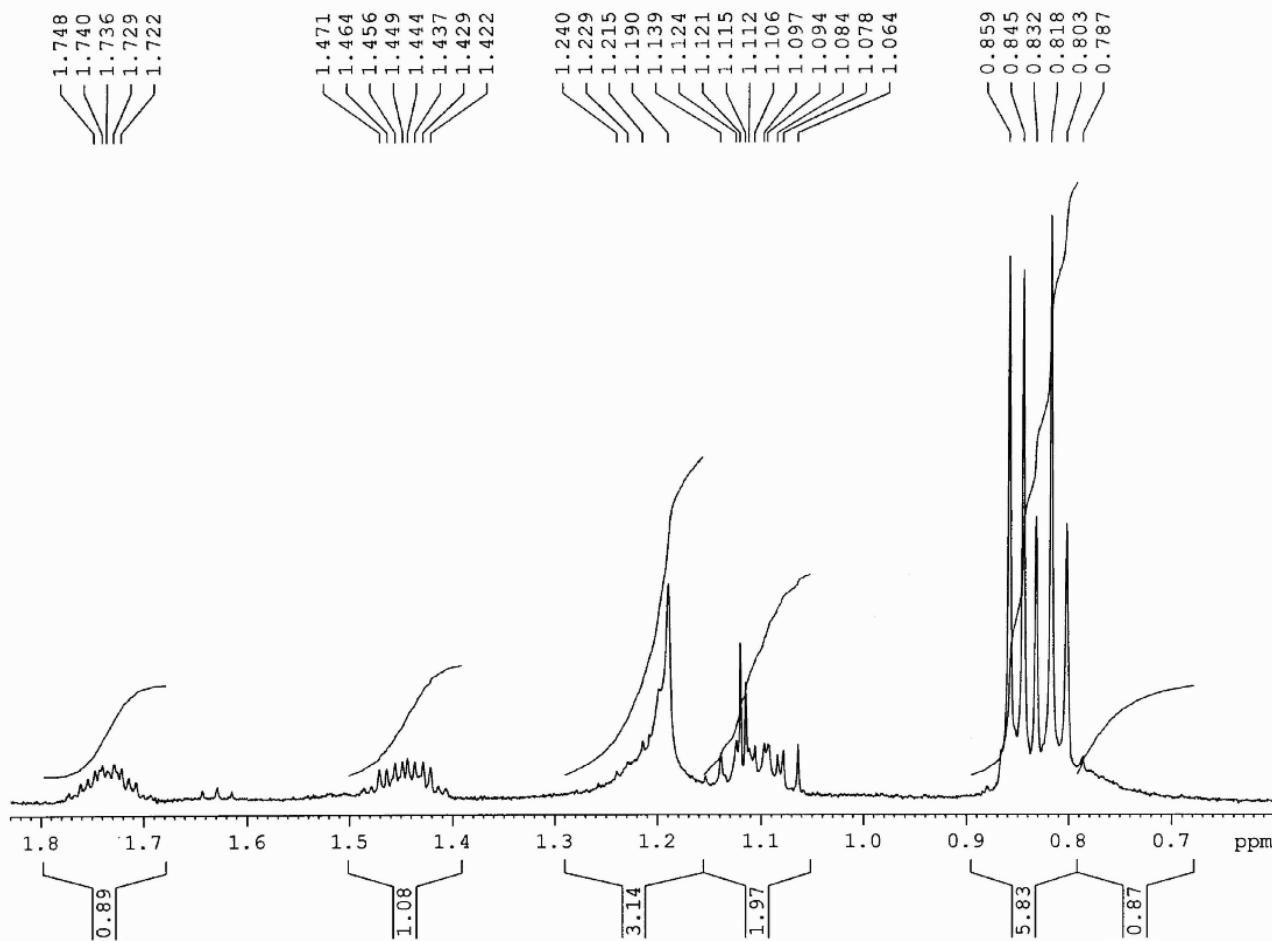
Espectro de Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂ – Expansão 2

Patricia Ac-ISDG-NH₂ T=25C 12/06/2007



Espectro de Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂ – Expansão 3

Patricia Ac-ISDG-NH₂ T=25C 12/06/2007



F2 - Acquisition Parameters
Date 20070612
Time 11.21
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm TXI 1H-13
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 256
DS 0
SWH 6830.601 Hz
FIDRES 0.104227 Hz
AQ 4.7972851 sec
RG 645.1
DW 73.200 usec
DE 10.00 usec
TE 298.7 K
D1 1.0000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 9.60 usec
PL1 0.00 dB
SF01 500.1329153 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 500.1300610 MHz
WDM EM
SSB 0
LB 0.10 Hz
GB 0
PC 1.00

Espectro de Ac-Ile-Ser-Asp-Gly-NH₂ – Expansão 4

C U R R I C U L U M V I T A E

DADOS PESSOAIS

Nome: Patrícia Barrientos Proti

Local e data de nascimento: São Paulo, 26 de maio de 1976

FORMAÇÃO ACADÊMICA

— Instituto de Química da Universidade de São Paulo

Bacharelado em Química: fev/1998 – dez/2001

— Instituto de Química da Universidade de São Paulo

Licenciatura em Química: fev/1999 – dez/2002

— Instituto de Química da Universidade de São Paulo

Doutorado em Bioquímica: fev/2003 – atual

BOLSAS RECEBIDAS

- mai/2001 – abr/2002 Iniciação Científica. FAPESP

- mar/2003 – ago/2007 Doutorado Direto. FAPESP

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos em periódicos

- 1) Machado, A.; Liria, C.W.; Proti, P.B.; Remuzgo, C.; Miranda, M.T.M. (2004) Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. *Quim. Nova*, **27**, 781-789.
- 2) Proti, P.B.; Remuzgo, C.; Miranda, M.T.M. (2007) Comparison of procedures for directly obtaining protected peptide acids from peptide-resins. *J. Pept. Sci.*, **13**, 386-392.

- 3) Proti, P.B.; Miranda, M.T.M. Synthesis of protected peptides esters through metal ion-mediated alcoholysis of peptide-resin linkage. Em preparação.
- 4) Proti, P.B.; Miranda, M.T.M. Ca^{+2} -mediated thiolysis of oxime ester bond: a mild procedure for preparing protected peptide thioester from peptide-KOR. Em preparação.

Trabalhos completos em anais de congressos

- 1) Proti, P.B.; Oliveira, P.V.; Miranda, M.T.M. (2006) Further studies on an alternative approach to prepare esterified protected peptides under mild conditions. Em *Understanding Biology Using Peptides* (Blondelle, S.E., ed.). Springer: New York, p. 82-83.
- 2) Proti, P.B.; Miranda, M.T.M. Preparation of C-terminal modified peptides through alcoholysis and thiolysis mediated by metal ions. Em *Peptides for Youth* (Escher, E.; Lubell, W.D.; Valle, S.D., eds.). Submetido.

Artigos de Divulgação Científica

- Miranda, M.T.M.; Proti, P.B. (2004) Impacto decisivo na Bioquímica. *Ciência Hoje*, **35**, 74-76.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

- 1) Proti, P.B.; Moraes, C.M.; Vieira, L.A.O.; Silva, K.N.; Mondino, M.G.; Miranda, M.T.M. Metanolise e hidrólise da ligação oxima de peptidil-resinas de Kaiser assistidos por íons metálicos, *V Congresso do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química - USP*, São Paulo, 07-09/02/2001.
- 2) Proti, P.B.; Vieira, L.A.O.; Miranda, M.T.M. Preparação de fragmentos peptídicos protegidos através de solvólise mediada por íons Ca^{+2} , *18ª Semana da Química do Instituto de Química - USP*, São Paulo, 24-28/09/2001.
- 3) *Workshop de Biocatálise em Química Orgânica*, São Paulo, 18-22/02/2002.

- 4) Proti, P.B.; Miranda, M.T.M. Peptide detachment from the resin through hydrolysis of oxime ester bond assisted by metal ions”, XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, 18-21/05/2002.
- 5) Remuzgo, C.; Proti, P.B.; Miranda, M.T.M. Further studies on the preparation of N^α-acylated side-chain protected peptide fragments, *VI Congresso do Departamento de Bioquímica*, São Paulo, fev/2003.
- 6) Remuzgo, C.; Proti, P.B.; Miranda, M.T.M. Further studies on the preparation of N^α-acylated side-chain protected peptide fragments, *XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, Caxambu, 17-20/05/2003.
- 7) *Oficina de Ressonância Magnética Nuclear em Biologia* (evento satélite da XIV Reunião Anual de Usuários do LNLS), Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, 11/02/2004.
- 8) Proti, P.B.; Miranda, M.T.M. Preparation of protected peptide methyl esters through methanolysis of oxime ester bond assisted by metal ions *VII Congresso do Departamento de Bioquímica*, São Paulo, 05 e 06/04/2004.
- 9) Proti, P.B.; Miranda, M.T.M. Preparation of protected peptide methyl esters through methanolysis of oxime ester bond assisted by metal ions, *XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBQ*, Caxambu, 15-18/05/2004.
- 10) *II Congresso do Instituto de Química*, IQ-USP, São Paulo, 16 e 17/12/2004.
- 11) Proti, P.B.; Oliveira, P.V.; Miranda, M.T.M. Further studies on an alternative approach to prepare esterified protected peptides under mild conditions, *19th American Peptide Society Symposium*, San Diego, EUA, 18-23/06/2005, P015 (Biopolymers – Pept. Science, 80 (4), 520, 2005).
- 12) Proti, P.B.; Oliveira, P.V.; Miranda, M.T.M., Further studies on an alternative approach to prepare esterified protected peptides under mild conditions, *XXXIV Reunião Anual da*

Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBQ, Águas de Lindóia, 02-05/07/2005.

- 13) *III Workshop de Biocatálise e II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones*, São Paulo, 07-10/02/2006.
- 14) Proti, P.B.; Miranda, M.T.M. Procedimento alternativo de preparação de ésteres de peptídeos protegidos mediante assistência por íons metálicos, *29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Química é Energia: transforma a vida e preserva o ambiente*, Águas de Lindóia, 19-22/05/2006.
- 15) Proti, P.B.; Miranda, M.T.M. Assistência por metal e biocatálise na síntese de um tetrapeptídeo, *30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Águas de Lindóia, 31/05/2006-03/06/2006.
- 16) Proti, P.B.; Miranda, M.T.M. Preparation of C-terminal modified peptides through alcoholysis and thiolysis mediated by metal ions, *20th American Peptide Society Symposium*, Montreal, Canadá, 26-30/06/2007, P351 (Biopolymers – Pept. Science, 88 (4), 601, 2005).

PARTICIPAÇÃO NO PROGRAMA DE APERFEIÇOAMENTO DE ENSINO (PAE)

- Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo (QBQ-2454) - professoras Dra. M. Terêsa M. de Miranda (coordenadora) e Dra. Gláucia Mendes Souza, Bacharelado em Química, 1º sem/2006.

ATIVIDADES DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA

- *A Universidade e as Profissões*, Apresentação do Laboratório de Química de Peptídeos do IQ-USP, São Paulo, 14/08/2004.
- *Dia de Portas Abertas do IQ-USP*, São Paulo, 20/08/2005.