

# PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS: APRIMORAMENTO DA SÍNTESE EM POLÍMEROS ATRAVÉS DO USO DA RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)

Clovis Ryuichi Nakaie  
Luciana Malavolta  
Shirley Schreier  
Eduardo Maffud Cilli  
Reinaldo Marchetto

## 6.1 INTRODUÇÃO

No mundo contemporâneo, a síntese química de *peptídeos* tem obtido cada vez mais importância devido à contínua descoberta de inúmeras atividades dessas macromoléculas tanto no organismo animal quanto vegetal. Embora existam outras metodologias que levem à produção desse tipo de macromolécula, e que mencionaremos adiante, a mais empregada por

laboratórios de pesquisa e indústrias farmacêuticas e de produtos químicos em geral, movimentando um mercado de centenas de bilhões de dólares anualmente, lança mão da síntese, via polímeros. Nesse procedimento, a sequência peptídica desejada é sintetizada quimicamente ancorada em uma matriz polimérica, através da sua extremidade carboxiterminal. Essa metodologia é denominada de *síntese de peptídeos em fase sólida* (SPFS) e tem sido alvo de um contínuo processo de aprimoramento desde a sua introdução, há cerca de três décadas (por Bruce R. Merrifield, que recebeu o prêmio Nobel de Química em 1984 pela proposição dessa técnica)<sup>1</sup>. Diferentes aspectos desse método sintético têm sido investigados, objetivando seu aprimoramento como um todo. Dentre essas tentativas, uma que nosso grupo de trabalho tem enfatizado, e de modo praticamente exclusivo, envolve o emprego da ressonância paramagnética eletrônica (RPE), conjuntamente com a estratégia de avaliação do grau de inchamento de grãos de peptidil-resinas. O objetivo tem sido o de entender cada vez melhor os complexos detalhes físico-químicos do processo de solvatação de cadeias peptídicas quando espalhadas no interior dos grãos de peptidil-resinas. Tem-se testado algumas dezenas de sistemas de solventes em uma ampla variedade de peptidil-resinas, utilizadas como solutos-modelo, objetivando, ao final, esclarecer os complexos fatores que governam a dinâmica do crescimento de cadeias peptídicas dentro da malha polimérica. Esses testes auxiliarão a proposição de alterações experimentais para o aprimoramento dessa metodologia química.

Para tanto, fez-se necessário o desenvolvimento prévio de um composto orgânico com característica especial denominado comumente de marcador de *spin* (ou *spin label*) e que contém em sua estrutura um grupamento do tipo radical livre, estável nas condições normais de pH e temperatura. O elétron desemparelhado presente nesse grupamento radicalar lhe dá a propriedade paramagnética a qual permite que esse marcador absorva radiações de baixa frequência (cerca de  $10^{-12}$  Hertz – região das micro-ondas), emitido adequadamente pelo espectrômetro de RPE. Com isso, obtêm-se espectros que fornecem informações em termos da dinâmica e ordenamento molecular dentro de um sistema no qual se encontra ligado esse marcador ou sonda paramagnético. Esse composto, abreviadamente denominado TOAC (ácido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-óxido-4-amino-4-carboxílico), que foi derivado apropriadamente para poder ser utilizado na química de peptídeos e outras macromoléculas, funciona como uma espécie de molécula repórter do sistema em estudo quanto à solvatação de peptidil-resinas, sendo portanto bastante valioso para uma possível otimização da metodologia da SPFS. Em tópicos subsequentes, iremos detalhar melhor alguns dos termos que

mencionamos até o momento nesta etapa introdutória, dentre os quais o de peptídeos, SPFS, os pré-requisitos necessários para determinados polímeros servirem de suporte sólido para a SPFS, a técnica da RPE, o marcador de *spin* e a versatilidade da RPE para demonstrar possível correlação que possa existir entre o grau de solvatação de cadeias peptídicas no interior da matriz polimérica e o rendimento de uma síntese peptídica. Espera-se, portanto, apresentar um conjunto de investigações já efetuadas e expostas até o momento na literatura mundial e que têm trazido, acreditamos, principalmente via emprego alternativo da RPE, significativos avanços em termos de conhecimentos mais aprofundados de fatores que afetam o sucesso ou não da síntese de um peptídeo, via SPFS. Espera-se, com isto, demonstrar a relevância desses estudos na biotecnologia moderna com clara aplicação, principalmente na área da saúde e mesmo no amplo campo da química de polímeros em geral.

### 6.1.1 Peptídeos

Sucintamente, define-se *peptídeo* ou *peptídio* como um composto orgânico formado por dois ou mais aminoácidos (até um máximo de cerca de 40 unidades), acoplados entre si por um tipo especial de ligação química denominada peptídica<sup>2,3</sup>. Macromoléculas contendo mais do que esse número de resíduos de aminoácidos já passam a ser usualmente denominadas proteínas. A especificidade estrutural e conformacional da denominada *ligação peptídica* (ver as representações de sua estrutura e de um pentapeptídeo na Figura 6.1) está relacionada com as seguintes características: i) a sua formação exige a eliminação de uma molécula de água e é feita entre os  $\alpha$ -amino e  $\alpha$ -carboxigrupos presentes nas estruturas de dois aminoácidos adjacentes, respectivamente; ii) em termos de ressonância eletrônica, essa ligação possui característica única que é intermediária entre a de uma ligação simples e a de uma dupla; iii) os quatro átomos que a formam (C, H, N e O) se posicionam em uma conformação planar rígida, onde a rotação somente é possível no C $^{\alpha}$ ; iv) celularmente, as etapas de sua formação e hidrólise requerem uma maquinaria bastante complexa, muito diferente da que ocorre em reações químicas efetuadas em solução *in vitro*.

Os aminoácidos que compõem a estrutura de um peptídeo possuem, assim, esses grupamentos em seus C $^{\alpha}$  e também cadeias laterais próprias que os diferencia entre si. Essas unidades estruturais podem, portanto, ser neutras, hidrofílicas ou hidrofóbicas, e, com exceção da glicina, são todas

enantiômeras da forma L em termos de configuração estrutural. As moléculas de peptídeos encontradas em animais e vegetais podem apresentar algumas alterações estruturais, como a amidação de sua extremidade C<sup>α</sup>-carboxílica, acetilação da amínica, fosforilação ou sulfatação de um ou mais aminoácidos hidroxilados (serina, treonina ou tirosina) etc. Algumas podem assumir uma estruturação cíclica, via formação de pontes de dissulfeto com dois resíduos de cisteína. Excepcionalmente, não apresentam aminogrupos livres em sua extremidade, encontrando-se nessa posição resíduos não naturais, como é o caso do resíduo de ácido pirrolutâmico.

Por conter resíduos de aminoácidos de diferentes tipos e em diferentes

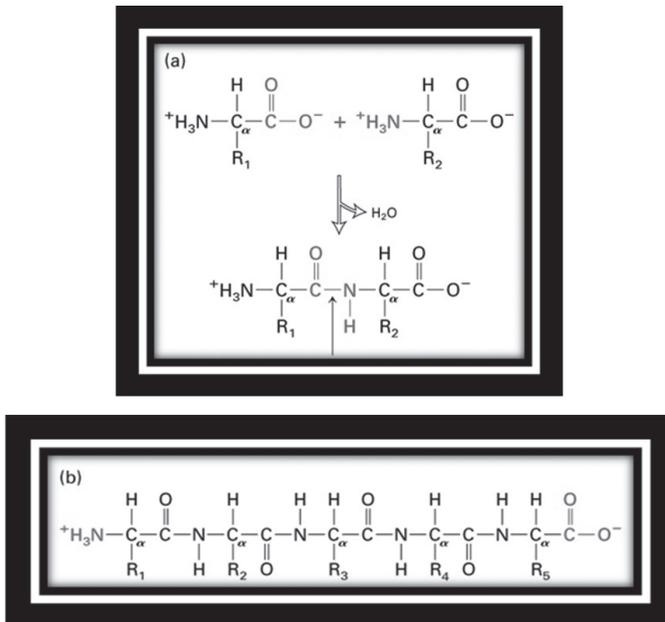


Figura 6.1 Representação da formação de uma ligação peptídica e estrutura de um pentapeptídeo.

seqüências, cada peptídeo possui, portanto, uma característica única. Em sua estrutura podem existir, a depender do pH do meio, sítios carregados eletricamente, devido, por exemplo, a grupamentos amínicos protonados ou carboxílicos negativos das extremidades de sua seqüência, mas também das cadeias laterais de aminoácidos básicos ou ácidos, respectivamente.

Conjuntamente, esses resíduos que compõem um determinado segmento peptídico podem lhe dar características próprias como as apresentadas na

Tabela 6.1. Nota-se nos exemplos expostos nesse caso que o efeito do pH é extremamente relevante, induzindo alta solubilidade em pH ácido no denominado peptídeo  $\beta$ -amiloide (42 aminoácidos), que parece formar agregados fibrilares (placas) neuronais, induzindo a doença de Alzheimer<sup>4,5</sup>. Por outro lado, nota-se no fragmento TM-32, que corresponde à porção 66 a 97 do receptor B2 do peptídeo hipotensor bradicinina<sup>6,7</sup>, uma forte solubilização em pH alcalino. Finalizando, um simples octapeptídeo, conhecido pela sua pouca solubilidade<sup>8</sup>, se mostrou completamente insolúvel, independentemente do pH do meio. Esses dados foram obtidos como complemento de parte de trabalho já publicado, cujo objetivo era a investigação de fatores que afetam ou não as propriedades físicas de diferentes tipos de sequências peptídicas em solução<sup>9,10</sup>.

Tabela 6.1 Solubilidade dos peptídeos  $\beta$ -amiloide (1-42)\*, TM-32\*\* e VVLGAAIV-amida em função do pH do meio

PEPTÍDEOS	SOLUBILIDADE (%)		
	pH = 3,0	pH = 7,4	pH = 9,0
$\beta$ -amiloide (1-42)	86	6	0
TM-32	0	11	65
VVLGAAIV-amida	0	0	0

<sup>a</sup> Solubilidade: solução de 10 mg/mL de peptídeo em solução aquosa.

\* DAEFRHDSGYDVHHQKLVFFAEDVGSQKGAINGLMVGGVVIA-COOH.

\*\* VAEIYLGNLGAKLILASGLPFWAITIANNFD-amida.

Os peptídeos possuem enorme importância tanto na vida animal quanto vegetal, e acredita-se que praticamente todos são produtos provenientes de hidrólises de diferentes tipos de proteínas, efetuadas usualmente por enzimas proteolíticas. No animal, as funções dessas macromoléculas estão voltadas principalmente para o funcionamento celular e fisiológico do organismo, com atividades hormonais, analgésicas, antibactericidas, de neurotransmissão etc. Nos vegetais, essas funções estão mais voltadas para a defesa (toxinas) e também aos processos de sinalização celular.

O contínuo interesse em se estudar peptídeos na vida moderna e com enormes gastos se deve primeiramente à necessidade do suprimento de alguns tipos de peptídeos no organismo, cuja ausência ou diminuição na concentração fisiológica pode levar a conhecidas doenças, como a diabetes

do tipo *mellitus* (falta de insulina) e do tipo *insipidus* (falta de vasopressina), a doenças que envolvem a tireoide (tireoliberina ou TRH), a alterações na coloração de pele (hormônio estimulador de melanócito,  $\alpha$ -MSH) e no crescimento (hormônio liberador do hormônio do crescimento, GHRH), a doenças neurodegenerativas (mal de Alzheimer, Parkinson) etc. A Tabela 6.2 lista exemplos de alguns peptídeos denominados bioativos, o número de resíduos de aminoácidos que os compõem e a sua atuação no organismo animal.

**Tabela 6.2** Alguns exemplos de peptídeos biologicamente ativos

PEPTÍDEOS	PROCESSOS BIOLÓGICOS/DOENÇAS
1. Tireoliberina TRH (n = 3 aa)	Doença da tireoide
2. Angiotensina II (n = 8 aa)	Hipertensão arterial
3. Bradicinina (n = 9 aa)	Hipertensão, inflamação
4. Ocitocina (n = 9 aa)	Parto e aleitamento
5. Vasopressina (n = 9 aa)	Diabetes <i>insipidus</i>
6. $\alpha$ -MSH (n = 13 aa, N <sup>α</sup> -acetilado)	Coloração da pele
7. Gastrina (n = 17 aa)	Secreção gástrica
8. Leptina (n = 49 aa)	Obesidade
9. GHRF (n = 44 aa)	Crescimento
10. Insulina (n = 51 aa)	Diabetes <i>mellitus</i>
11. $\beta$ -amiloide (n = 42 aa)	Doença de Alzheimer
12. Amilina IAPP (n = 37 aa)	Diabetes tipo II

Além desse objetivo, o principal foco no estudo de peptídeos reside, na realidade, na procura por potenciais derivados que possam funcionar como novas drogas terapêuticas, inibindo ou ativando diferentes processos biológicos no organismo. Para se atingir esse objetivo, no entanto, faz-se necessário o estudo do mecanismo de ação de tais processos *in vivo*, tornando, portanto, indispensável não somente a síntese do peptídeo natural, mas também a de vários derivados que poderão facilitar a elucidação da atividade natural desses peptídeos. Nas últimas décadas, diversos mecanismos de funcionamento de peptídeos, principalmente no organismo humano, têm sido esclarecidos com a introdução no mercado farmacêutico de novos

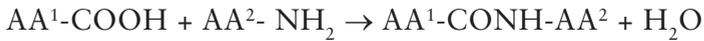
medicamentos do tipo derivados peptídicos. De qualquer forma, a maioria dos processos de mau funcionamento ou de doenças em geral em que há a participação de peptídeos continua à espera de uma elucidação completa do mecanismo de ação no organismo de cada peptídeo e, por conseguinte, à espera da proposição de novas drogas de efeito terapêutico. Explica-se, desse modo, o grande investimento financeiro observado há décadas no campo farmacêutico e também em laboratórios de pesquisa espalhados pelo mundo, salientando-se o imprescindível domínio da tecnologia de obtenção de peptídeos de modo rápido, prático e com grande eficiência.

Nesse aspecto, existem na atualidade procedimentos de síntese peptídica alternativa, como o que emprega DNA recombinante<sup>11</sup>, com o uso de protocolos clássicos no campo da biologia molecular (expressão gênica, clonagem, mutação etc.); a que lança mão de bactérias como “produtoras” de peptídeos, sendo mais empregada na produção de peptídeos de sequências mais longas e de difícil obtenção química. Uma das limitações desse método reside no fato de que somente se podem produzir sequências peptídicas naturais, isto é, sem alterações estruturais induzidas pela introdução, por exemplo, de compostos orgânicos não naturais na estrutura peptídica em estudo. Similarmente a esse método, existe outro que se vale de enzimas específicas promotoras da formação de ligação peptídica entre dois resíduos de aminoácidos em condições experimentais específicas<sup>12,13</sup>. Embora também promissora, existem ainda restrições a essa técnica, pois não há uma regra clara de que enzima se necessita para cada tipo de acoplamento entre diferentes aminoácidos. Desse modo, o que se observa atualmente é o emprego maciço da técnica já mencionada SPFS e, em parte, também via metodologia da síntese em *solução* ou *clássica* por praticamente todos os centros de pesquisa e empresas de produção de peptídeos.

## 6.1.2 Síntese química de peptídeos

### 6.1.2.1 Método da síntese de peptídeos em solução ou clássico

O primeiro método químico testado para a produção de peptídeos foi o chamado método em *solução ou clássico*<sup>14</sup>. Nesse procedimento, dois resíduos de aminoácidos são acoplados por uma ligação peptídica entre os seus  $\alpha$ -amino e carboxilgrupos, conforme esquema a seguir:



Nesse método, lança-se mão de um ativador químico (agente acoplante) que faz a ligação peptídica destacada acima com concomitante liberação de uma molécula de água. Embora ainda em uso, principalmente para peptídeos específicos para escalas maiores, essa técnica tem ficado mais restrita ao campo industrial, pois é bem mais trabalhosa e lenta, necessitando, por exemplo, inicialmente, de uma proteção temporária do amino grupo do  $AA^1$  e da carboxila do  $AA^2$  por algum grupamento químico, a fim de se evitar reações de acoplamento entre os mesmos aminoácidos. Além disso, caso envolva sequências peptídicas que contêm aminoácidos, por exemplo, com cadeias reativas como a lisina (possui grupamento amínico no  $C^d$ ) ou ácido aspártico (possui grupo carboxílico no  $C^b$ ), estas deverão conter também grupos protetores temporários que somente serão eliminados ao final da síntese.

Também é relevante o fato de que, como a reação é feita em solução, há sempre a necessidade de, após o término da formação da ligação peptídica, perder-se um enorme tempo nos processos de purificação dessa solução, que ainda contém todos esses componentes e mais parte dos aminoácidos que não reagiram. Para tanto, torna-se necessário o emprego de protocolos clássicos de extração, precipitação, cristalização etc., para finalmente se ter em mão o dipeptídeo puro, mas ainda contendo os mencionados grupamentos protetores. O passo seguinte deverá envolver a retirada do protetor do grupo carboxílico do  $AA^2$ , a fim de livrá-lo para posterior reação com o próximo aminoácido. Nota-se, portanto, que é um protocolo experimental de síntese peptídica bastante complexo e demorado, não atendendo, assim, às necessidades mais recentes de obtenção de uma grande quantidade de sequências peptídicas diferenciadas em um curto espaço de tempo, principalmente para a pesquisa laboratorial. Procurando contornar essa séria limitação, principalmente no aspecto da necessidade de maior rapidez na produção de peptídeos, o professor Robert Bruce Merrifield, da Rockefeller University, propôs a metodologia sintética alternativa já mencionada<sup>1</sup>, baseada no emprego de materiais poliméricos como suporte sólido para o alongamento químico de um segmento peptídico (*síntese de peptídeos em fase sólida* – SPFS).

### 6.1.2.2 Método da síntese peptídica em fase sólida (SPFS)

O raciocínio básico da metodologia da SPFS envolve a ligação do aminoácido C-terminal à matriz polimérica, e todos os demais aminoácidos da sequência peptídica desejada são acoplados sucessivamente, por estratégias apropriadas, sem a necessidade de purificar-se cada fragmento peptídico intermediário. Apenas ao final da síntese cliva-se o peptídeo do suporte sólido e, após isso, parte-se para uma etapa laboriosa de separação dos subprodutos formados, além do peptídeo desejado. A insolubilidade da resina utilizada (detalhes no tópico seguinte) faz com que todas as reações químicas necessárias para o crescimento da cadeia peptídica possam ser efetuadas, do início ao final da síntese, em um único frasco de reação contendo uma placa porosa para a retenção dos grãos insolúveis da peptidil-resina. Dessa forma, o excesso dos reagentes e outros produtos formados nas diversas etapas dos ciclos sintéticos são eliminados por simples filtração.

Apesar de ser vantajoso no sentido de rapidez e praticidade e permitir também a automatização de toda a síntese, o fator negativo do processo reside em não se efetuar nenhuma etapa de purificação dos fragmentos intermediários, como acontece com a síntese em solução. Fica, portanto, evidente que a utilização do método da SPFS, embora extremamente rápida e prática, depende fundamentalmente de obterem-se rendimentos perto da idealidade (100%) em cada etapa do ciclo sintético. Devido a esse pré-requisito básico, tem-se observado na literatura um contínuo e progressivo aprimoramento dessa metodologia, mesmo após quase cinco décadas desde a sua introdução, refletido nas inúmeras publicações especializadas referentes a essa metodologia<sup>15-18</sup>.

A Figura 6.2 mostra uma representação esquemática do processo de crescimento da cadeia peptídica ancorada pela sua extremidade carboxílica em um suporte polimérico (fase sólida). Em complemento, a Figura 6.3 detalha melhor essa metodologia, revelando os ciclos sintéticos dos dois métodos existentes atualmente de SPFS, cuja diferença básica reside no fato de que o protetor temporário do  $\alpha$ -amino grupo dos aminoácidos é removido ou em meio ácido (grupo terc-butiloxicarbonila/Boc)<sup>15,16</sup> ou em meio básico (grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonila – Fmoc)<sup>17,18</sup>. No caso da estratégia Boc, o ciclo sintético inicia-se com a remoção do grupo Boc do aminoácido N-terminal, utilizando-se uma solução de 30% ácido trifluoracético (TFA)/diclorometano (DCM) (30 minutos), seguido da desprotonação do grupamento amínico, realizada com 10% trietilamina (TEA)/DCM (10 minutos), e, finalmente, a etapa crítica do acoplamento do aminoácido subsequente.



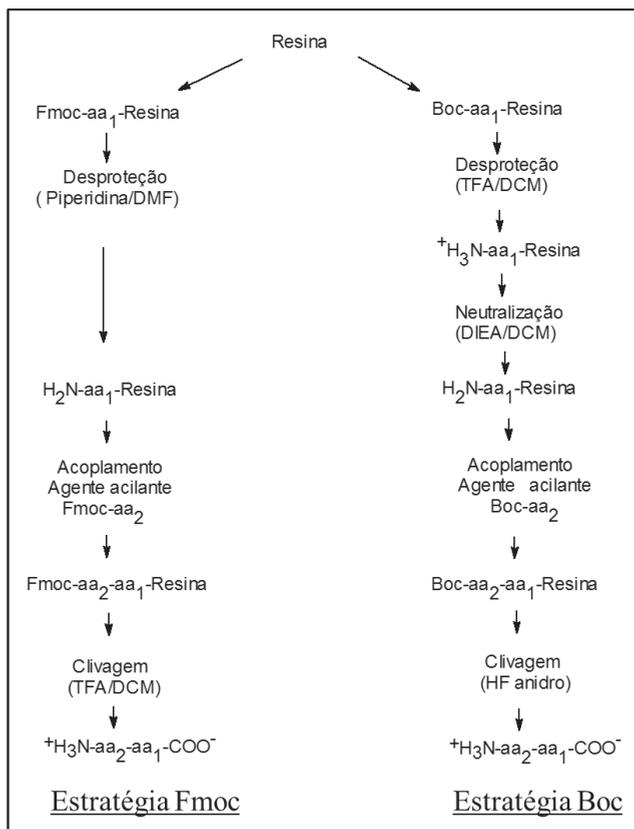


Figura 6.3 Esquema de estratégias opcionais (Fmoc e Boc) de síntese em fase sólida.

de aminoácido é monitorado pelo método qualitativo de ninidrina<sup>20</sup>, que detecta colorimetricamente a presença de aminogrupos livres que ainda não reagiram (coloração púrpura). Caso se obtenha um teste positivo (coloração azul ou marrom apenas no caso da prolina), repete-se o acoplamento do aminoácido, e, em muitos casos, alterando-se, por exemplo, os sistemas de solventes (mudança no efeito de solvatação dos grãos), tipos de agentes acilantes, temperatura da reação etc. Após o encerramento dessa etapa, reinicia-se o próximo ciclo até o acoplamento de todos os resíduos de aminoácidos da sequência peptídica desejada.

No caso da estratégia Boc de síntese, a clivagem final do peptídeo da resina e a remoção dos grupos protetores das cadeias laterais é geralmente feita em uma única etapa de tratamento por uma ou duas horas, a 0 °C com HF anidro, em presença de o-cresol e anisol (5% cada, v/v), os quais agem

como supressores de reações colaterais induzidas por carbocátions liberados durante esse tratamento com ácido forte, por cerca de duas horas, a 0 °C<sup>15,16</sup>. Alternativamente, existe o método da clivagem com o ácido trifluorometanosulfônico (TFMSA), que, em proporção entre 10% e 20% (v/v) com TFA, contendo também supressores de reações colaterais como o-cresol e o etanoditiol, pode servir para remoção das cadeias peptídicas do suporte sólido<sup>21</sup>.

No caso da química Fmoc, normalmente se adiciona um espaçador químico específico entre o suporte sólido e o aminoácido C-terminal, tornando mais lábil a remoção do peptídeo da resina. Com isso, pode-se fazer a clivagem em meio ácido mais fraco do que o HF anidro da química Boc, sendo o mais comumente empregado uma mistura do ácido trifluoroacético (TFA) em DCM (cerca de 80% a 90% do ácido)<sup>18</sup> e mais alguns dos supressores de reações colaterais mencionados na clivagem em HF ou TFMSA. Após essa etapa de remoção das cadeias peptídicas, a resina é lavada com éter etílico para remoção de subprodutos provenientes dessa clivagem, sendo o peptídeo bruto extraído com solução aquosa ácida (5% ácido acético ou 80% a 90% TFA, para a química Boc e Fmoc, respectivamente). No primeiro caso, após essa lavagem, o extrato ácido é finalmente liofilizado para obter-se o peptídeo bruto em forma de pó branco, amorfo. No caso da química Fmoc, o extrato de TFA contendo o peptídeo é extraído com éter etílico, e a solução ácida é evaporada e novamente dissolvida em meio ácido mais fraco (ácido acético ou mesmo TFA) para posterior liofilização.

Por fim, há a necessidade da escolha prévia da resina a ser utilizada, dependendo da química escolhida e também se o terminal carboxílico deve ficar em forma de carboxamida ou carboxílico. No caso da estratégia Boc, existem resinas como a metilbenzidrilamino-resina (MBAR) e a (benzidrilamino-resina) BAR que, após clivagem, fornecem peptídeos-amida, enquanto resinas denominadas clorometiladas ou PAM-resinas<sup>22</sup>, por formarem ligação éster com o peptídeo, liberam-no em forma de carboxilato. Na química Fmoc, existem grupos químicos específicos (espaçadores) que são acoplados inicialmente em sítios reativos de resinas e que, ao sofrer clivagem, liberam o peptídeo em forma de carboxamida ou carboxilato.

Embora quase meio século tenha se passado desde a introdução dessa técnica revolucionária, restam ainda problemas em diferentes pontos do ciclo sintético que não foram totalmente contornados até o momento<sup>15,17,23,24</sup>. Assim, sucintamente, podemos destacar a clivagem apenas parcial tanto dos grupos protetores das cadeias laterais reativas dos aminoácidos, mas principalmente das cadeias peptídicas ancoradas ao suporte sólido, durante a clivagem final ácida do peptídeo da resina. Esse problema foi particularmente

um dos pontos investigados por nosso grupo, pois pode significar a perda de significativa parcela das cadeias peptídicas sintetizadas, tendo sido possível até o momento, a proposição de regras mais claras entre o peptídeo a ser sintetizado e a resina correspondente a ser utilizada, tanto na química Boc-clivagem em HF anidro<sup>25</sup> ou TFMSA<sup>26</sup>. De modo similar, esse problema da estabilidade da ligação peptidil-resina foi também investigada na química Fmoc<sup>27</sup>. Uma revisão de todos esses esforços, todos voltados especificamente para esse tópico totalmente negligenciado no estudo da SPFS, foi também publicado<sup>28</sup>.

Na química Fmoc, esse volumoso e hidrofóbico protetor amínico apresenta, em algumas situações, dificuldades na etapa de remoção efetuada em meio básico (20% piperidina/DMF), característica esta dependente da tendência agregante ou não da sequência peptídica em crescimento dentro do grão de resina<sup>29</sup>. Além das dificuldades relatadas acima, tem sido reportada também na literatura a ocorrência das denominadas sequências “difíceis”<sup>15,30-32</sup> devido a problemas conformacionais da sequência desejada, agravada possivelmente por algum tipo de interação da cadeia peptídica com a matriz da resina. De modo geral, essas sequências possuem forte tendência agregante e que induz impedimentos espaciais na extremidade aminoterminal do peptídeo, dificultando ou mesmo inviabilizando o acoplamento eficiente do aminoácido seguinte da sequência desejada. Em complemento, a síntese efetuada em condições de elevado conteúdo peptídico (CP) na resina – aquela que se inicia com resinas contendo grande quantidade de sítios reativos – continua sendo um outro protocolo sintético considerado “problemático” e até, em muitos casos, “proibitivo”, pois maximiza muito as agregações peptídicas dentro do grão, dificultando ou mesmo impedindo o sucesso das reações de acoplamento<sup>33</sup>. Um modo alternativo de, pelo menos parcialmente, contornar esse tipo de limitação foi proposto recentemente<sup>34</sup>, pois existe enorme vantagem em se produzir no mesmo tempo uma quantidade maior (cerca de dez vezes) de peptídeos por essa estratégia com o emprego de resinas de alto grau de substituição.

Foi basicamente com o objetivo de se contornar essa limitação prática da SPFS que deliberadamente se iniciou o estudo de sínteses peptídicas em alto conteúdo na resina. E, para isso, um melhor entendimento das propriedades de solvatação dos grãos de peptidil-resinas certamente seria fundamental para a proposição de alternativas experimentais vantajosas. Desse modo, foram iniciados estudos que em uma primeira etapa partiram para a investigação da síntese e propriedades de resinas empregadas na síntese peptídica, mas deliberadamente com alto grau de substituição<sup>35</sup>, seguidos de

estudos que avaliaram as regras que podem estar controlando o processo de *solvatação* durante o crescimento peptídico nessas resinas. Essa investigação foi desenvolvida tanto por medidas de microscopia de grãos de resina quanto pela RPE<sup>36,37</sup> de peptidil-resinas contendo o marcador paramagnético TOAC já mencionado. Desse modo, antes de entrarmos no tópico que comprova a importância crucial do grau de solvatação de peptidil-resinas na SPFS e os principais esforços feitos até o momento, o denominado *suporte sólido* (polímero) utilizado na SPFS será melhor detalhado a seguir.

### ○ suporte sólido: características e a natureza de sua função

Em relação à SPFS, admite-se que o suporte sólido não possui apenas a função de apoio para o crescimento peptídico, mas parece afetar, de modo direto ou não, o rendimento final dependendo da natureza de sua estrutura química, da sequência peptídica a ser obtida, das suas características solvantes durante as diversas reações químicas de um ciclo sintético etc. De um modo mais amplo, considera-se ideal que a matriz desse polímero preencha os seguintes requisitos:

- a) conter sítios ativos onde deve ocorrer a ligação do aminoácido carboxiterminal, através de ligação estável covalente;
- b) possuir estrutura que possibilite a rápida difusão dos reagentes até os sítios de reação e que facilite também a remoção de subprodutos, através de lavagens por filtração;
- c) não introduzir impedimentos espaciais significativos nas reações químicas que ocorrem em seu interior;
- d) não apresentar nenhum outro sítio reativo que possa induzir reações ou interações indesejadas;
- e) ser insolúvel em todos os solventes utilizados; e
- f) apresentar completa estabilidade química e física.

Desde a introdução da síntese peptídica, a resina mais empregada tem sido a que contém o copolímero de estireno com 1%, em peso, de intercruzamentos de divinilbenzeno, derivado com diferentes grupos funcionais (R), como mostra a Figura 6.4. A estrutura química representada, constituída predominantemente por anéis benzênicos, é de natureza hidrofóbica, obtendo-se solvatação e, portanto, inchamento mais favorecido dos grãos da

resina em solventes do tipo tolueno, diclorometano ou clorofórmio do que em solventes mais polares como álcoois ou água.

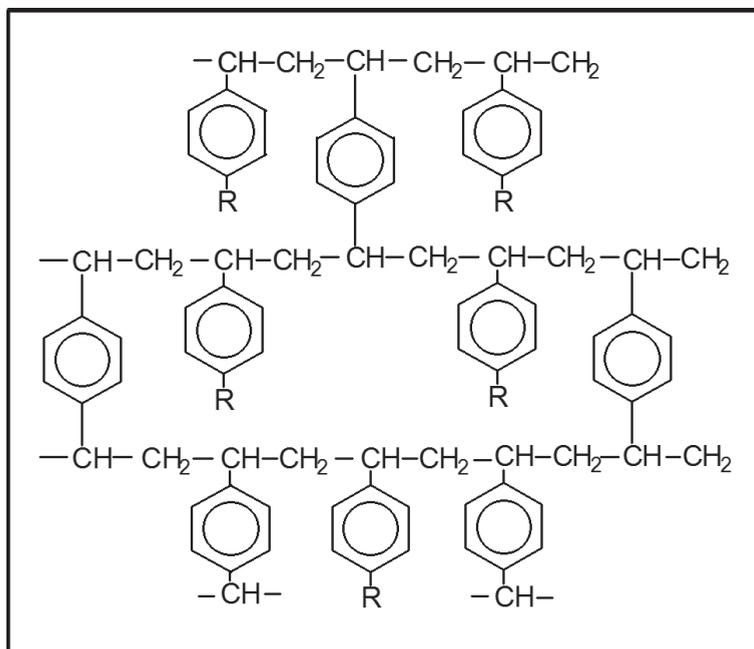


Figura 6.4 Estrutura química do copolímero de estireno, contendo 1%, em peso, de divinilbenzeno.

Com base nessa característica desse tipo de matriz polimérica, admite-se, portanto, que todos os processos de difusão, acoplamento de aminoácidos, desproteções e neutralizações do grupamento amínico, lavagens de reagentes e subprodutos, deverão estar otimizados com o uso de solventes orgânicos apolares.

Esse perfil característico de inchamento de resinas do tipo poliestireno pode ser, no entanto, profundamente alterado, dependendo da natureza e da quantidade do sítio reativo R da resina (Figura 6.4) e também da estrutura química que venha a se ligar a esse grupamento. Por exemplo, no caso da síntese peptídica, a natureza hidrofóbica da matriz de poliestireno pode ser alterada pela inserção progressiva de cadeias peptídicas que, através da presença de seus grupamentos  $\text{C}=\text{O}$  e  $\text{N}-\text{H}$ , de caráter polar, podem afetar significativamente a característica original da matriz polimérica. Nesse aspecto, já se observou que, quanto maior o teor de cadeias peptídicas presas ao grão

da resina, melhor o seu inchamento em solventes mais polares, mas do tipo aprótico como o DMF<sup>38</sup>, N-Metil-2-pirrolidona (NMP)<sup>18</sup>, dimetilsulfóxido (DMSO)<sup>39</sup>. O aumento do nível de polaridade desta estrutura hidrofóbica tem sido também conseguido através da introdução de quantidades controladas de polietilenoglicol (PEG), de diferentes massas moleculares<sup>40</sup>. Alternativamente, a presença de grandes quantidades de grupamentos ionizados em R (carga positiva ou negativa) pode também afetar drasticamente a propriedade de solvatação da resina.

Devido a essas considerações, os estudos foram iniciados com a síntese da benzidrilamino-resina (BAR)<sup>41</sup> ou metilbenzidrilamino-resina (MBAR)<sup>42</sup> para a obtenção de peptídeos  $\alpha$ -carboxamidas terminais pela técnica da SPFS. O esquema de síntese dessa resina se encontra detalhado na Figura 6.5. Ao se forçar principalmente as condições de síntese da primeira etapa

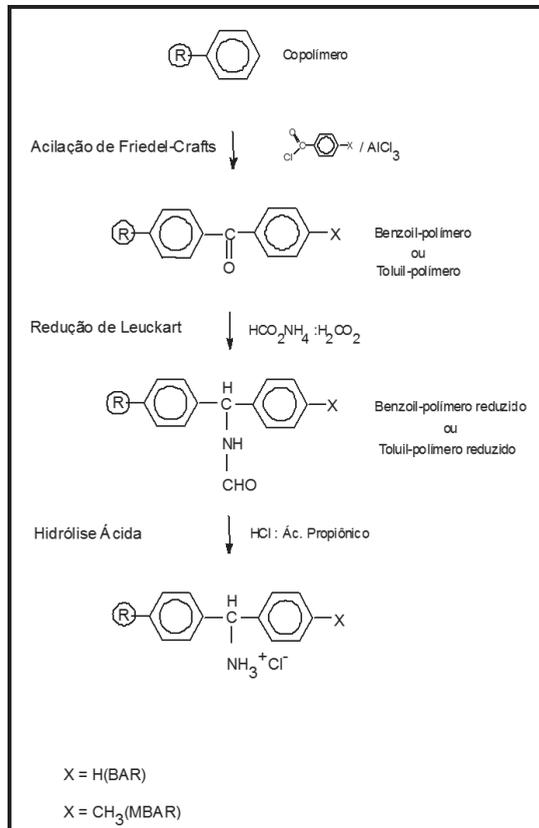


Figura 6.5 Esquema de síntese da BAR e MBAR.

(acilação), conseguiu-se obter lotes com teores de grupamentos fenilmetilamínicos acima de 2 mmol/g<sup>35</sup>, valores que são bem mais elevados que os existentes comercialmente, que ficam na faixa de 0,4 mmol/g. Além disso, essas investigações permitiram encontrar detalhes experimentais que facilitam a obtenção controlada de resinas com grau de substituição amínica desejada, com pequena margem de variação. A autonomia na obtenção desse polímero já foi estendida para o caso da MBAR.

Existem na realidade outros tipos de copolímeros diferentes do hidrofóbico estireno-divinilbenzeno. Esses materiais possuem estruturas poliméricas com características mais polares e são mais frequentemente empregados na química Fmoc. Usualmente encontram-se grupos acrilamidas que dão esse caráter mais polar a essa classe de copolímeros, e em que se produzem também sítios amínicos para o início da síntese peptídica. Alternativamente, existem protocolos que ligam certos grupamentos químicos, chamados espaçadores, e que, ligados nesses sítios amínicos, permitem o acoplamento do primeiro aminoácido da sequência peptídica pela química Fmoc. Nesse caso, resinas como a MBAR servem perfeitamente para a ligação desses espaçadores.

## **6.2 IMPORTÂNCIA DA SOLVATAÇÃO DO SUPORTE SÓLIDO PARA A SPFS**

### **6.2.1 Estudos da solvatação de peptidil-resinas por microscopia dos grãos**

Admite-se que, quanto melhor o nível de solvatação dos grãos de peptidil-resinas, mais otimizados devem estar os processos difusionais de reagentes e solventes dentro da malha polimérica na SPFS. Nesse contexto, objetivando-se um melhor entendimento dessa característica fundamental da SPFS, diversos laboratórios, inclusive o nosso, têm há muitos anos investigado o complexo fenômeno de solvatação de resinas. Como enfatizado no tópico anterior, conseguiu-se autonomia no domínio da síntese da BAR e da MBAR, ambas contendo estrutura de copolímero de estireno e divinilbenzeno. Outras resinas inéditas mais polares ou mesmo derivadas da BAR também vêm sendo sintetizadas e estão atualmente em vias de avaliação. De qualquer modo, a primeira etapa do estudo da solvatação, via medidas de inchamento por microscopia dos grãos de resinas e peptidil-resinas, seguiu o protocolo experimental descrito a seguir.

### 6.2.1.1 Metodologia da medida do tamanho dos grãos de resinas por microscopia ótica

Os diâmetros dos grãos de resina (secos ou solvatados) foram medidos por microscopia direta<sup>35,38</sup>, usando-se uma lupa Olympus modelo SZ11 acoplada a um computador contendo o *software* para tratamento de imagem Image-Pro Plus, versão 3.0.01.00, calibrado com escala 1/100 cm. Antes da leitura por microscopia, os lotes das resinas secas são submetidos a uma etapa de peneiramento em diversos tamises de 37  $\mu\text{m}$  a 210  $\mu\text{m}$ , visando obter a menor dispersão de tamanho possível dos grãos. Após esse tratamento, o desvio padrão das medidas dos diâmetros fica na faixa de 5%. Seguindo-se o protocolo experimental anteriormente publicado<sup>35,43</sup>, entre 150 e 200 grãos são medidos por lote de resina, tanto secos quanto embebidos previamente durante uma noite no solvente apropriado. O estudo de inchamento é realizado com resinas contendo aminogrupos na forma desprotonada (após tratamento prévio com TEA) e lavagens com DCM e secagem. Em termos práticos, as resinas são tratadas em funil de placa porosa, com DCM (6  $\times$  2 min), com TEA 10 % (v/v) em DCM e DCM (6  $\times$  2 min). Utilizaram-se como parâmetros de inchamento o valor do volume do solvente absorvido pelo grão (volume do grão solvatado – volume do grão seco) e este volume de solvente absorvido relacionado com o volume total do grão solvatado, em porcentagem [(volume do solvente absorvido/volume do grão solvatado)  $\times$  100].

A Figura 6.6 exemplifica esse procedimento experimental com os dados obtidos de uma amostra padrão (MBAR) e apresenta os parâmetros de inchamento para melhor esclarecimento. A figura mostra os grãos da resina ainda na forma bruta, antes da purificação por peneiramento em tamises de metais.

**Tabela 6.3** Microscopia ótica dos grãos de resina\*

Resina	DCM			
	Diâmetro grãos secos <sup>a</sup> ( $\mu\text{m}$ )	Diâmetro grãos solvatados <sup>a</sup> ( $\mu\text{m}$ )	Volume do solvente por grão <sup>b</sup> ( $10^5 \mu\text{m}^3$ )	Solvente dentro do grão <sup>c</sup> (%)
MBAR 0,8 mmol/g	45	75	1,7	78

<sup>a</sup> Médias geométricas; <sup>b</sup> volume grão solvatado – volume grão seco; <sup>c</sup> porcentagem do volume do grão solvatado ocupado pelo solvente.

\* Resina bruta antes do peneiramento.

Para enfatizar quão dependente é o grau de inchamento da natureza do tipo de polímero em relação ao do solvente, a Figura 6.7 faz a representação

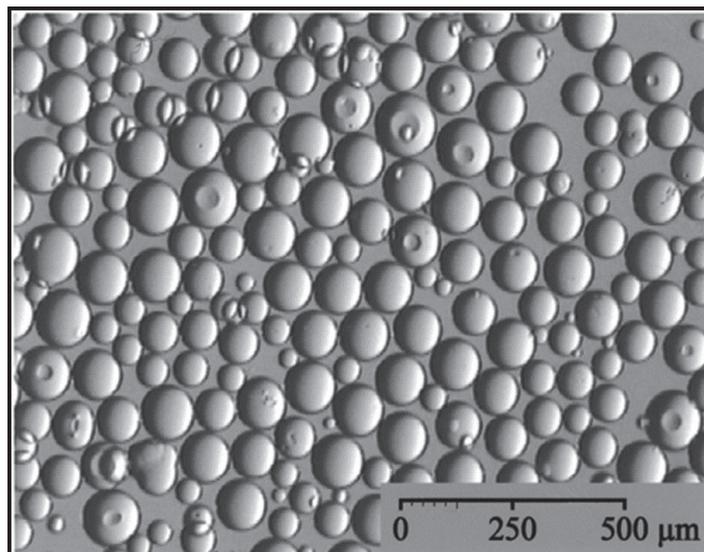


Figura 6.6 Grãos da MBAR (0,8 mmol/g) quando embebidos em DCM e os valores de inchamento obtidos por microscopia.

comparativa do inchamento da BAR de 1,4 mmol/g de grupamentos amínicos e esta mesma resina contendo o hexadecapeptídeo hidrofílico (NANP)<sub>4</sub> ligado à estrutura polimérica<sup>44</sup>. Observa-se nesse caso uma grande diferença de solvatação, com inchamentos mais pronunciados da apolar BAR em DCM e, contrariamente, no polar aprótico DMSO, quando essa resina originalmente apolar contém alternativamente grande quantidade de cadeias peptídicas de natureza polar. O conteúdo peptídico nessa última amostra atinge o valor de cerca de 70% (m/m), isto é, essa peptidil-resina sintetizada a partir de um lote de BAR de alto grau de substituição (1,4 mmol/g) atingiu ao final da síntese uma amostra contendo peptídeo e base polimérica na proporção 7:3 aproximadamente, justificando a enorme alteração do grau de inchamento na fase inicial (BAR sozinha) e contendo o segmento polar (NANP)<sub>4</sub> ligado a sua estrutura.

Como exemplo de expansão desse tipo de estudo de solvatação de polímeros e peptidil-polímeros por microscopia dos grãos, selecionou-se uma série de 22 sistemas de solventes, potencialmente utilizáveis na metodologia da SPFS e que abrange quase totalmente a escala de polaridade conhecida até o momento (Tabela 6.4). O objetivo seria o de verificar melhor a possível correlação entre grau de inchamento de cada peptidil-resina e a polaridade do solvente. Essa tabela destaca os sistemas de solventes utilizados,

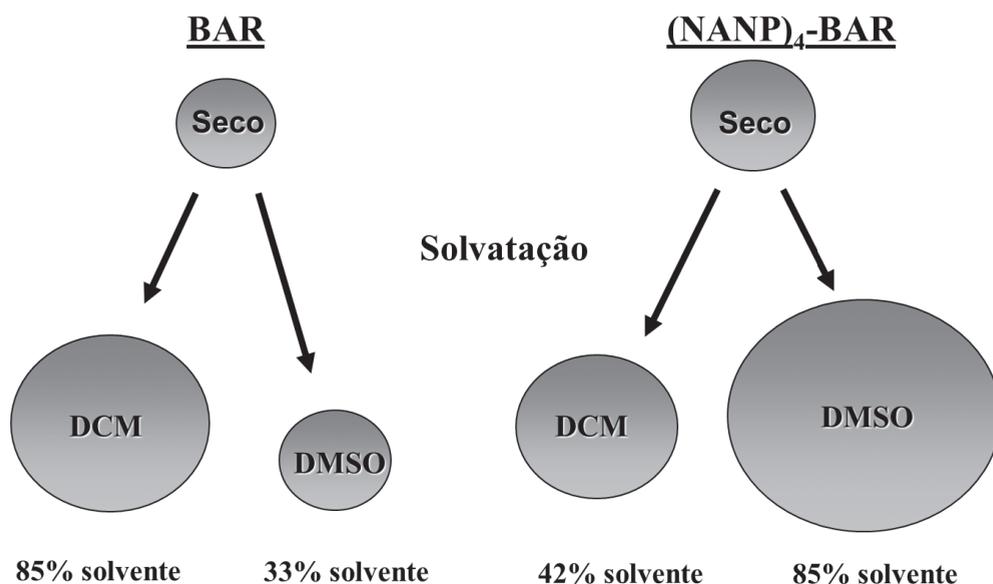


Figura 6.7 Inchamento da BAR (1,4 mmol/g) e da (NANP)<sub>4</sub>-BAR (68% de conteúdo peptídico).

com destaque para os valores dos parâmetros de solvente AN e DN<sup>45</sup>, a nova escala de polaridade (AN + DN) que introduzimos anteriormente na literatura<sup>43,44,46,47</sup> e, por fim, os valores de inchamento das amostras MBAR (0,3 mmol/g) e da VHHQKLVFFAEDV-MBAR (grau de substituição de 2,6 mmol/g), em porcentagem<sup>48</sup>.

Os termos AN e DN representam as propriedades eletrofílica (ou receptora eletrônica) e nucleofílica (doadora eletrônica), respectivamente, determinadas anteriormente para dezenas de solventes<sup>45</sup>. O que se descobriu em estudos sequenciais é que a soma destes dois termos na proporção 1:1 fornecia um termo representativo adimensional, prático e bastante aceitável relacionado com a polaridade de uma molécula de solvente. Essa escala (AN + DN) se mostrou melhor do que as conhecidas até o momento na literatura, como a constante dielétrica ( $\epsilon$ ), o coeficiente  $E_T(30)$  de Dimroth-Reichardt<sup>49</sup>, o parâmetro de Hildebrand  $d^{50}$  etc. Ela foi proposta baseada em estudos de várias dezenas de resinas e peptidil-resinas, escolhidas como solutos-modelos e solvatadas em grande quantidade de sistema de solventes de diferentes polaridades. Essa escala varia de zero (tolueno, benzeno) a 129,1 (ácido trifluorometanosulfônico – mais polar)<sup>44</sup>.

Desse modo, a análise da Tabela 6.4 permite detectar significativas diferenças nos graus de inchamento de cada amostra em função do solvente utilizado, o que vem comprovar claramente a dependência entre a polaridade da resina em relação à dos sistemas de solventes.

**Tabela 6.4** Grau de inchamento (solvente dentro do grão, em %) de resinas

	SOLVENTES	RESINAS <sup>A</sup>				
		AN	DN	(AN+DN)	1	2
1	Tolueno	3,3	0,1	3,4	87	40
2	DCM	20,4	1,0	21,4	84	52
3	Clorofórmio	23,1	4,0	27,1	83	64
4	NMP	13,3	27,3	40,6	67	64
5	DMF	16,0	26,6	42,6	70	57
6	DMSO	19,3	29,8	49,1	51	65
7	TFE	53,5	0,0	53,5	28	60
8	EtOH	37,1	32,0	69,1	19	40
9	MeOH	41,3	30,0	71,3	17	41
10	Formamida	39,8	24,0	63,8	23	46
11	50% TFE/Tolueno	28,4	0,1	28,5	71	64
12	20% TFE/DCM	27,0	0,8	27,8	72	60
13	50% TFE/DCM	36,9	0,5	37,4	56	58
14	80% TFE/DCM	46,9	0,2	47,1	42	65
15	20% DMSO/NMP	14,5	27,8	42,3	73	61
16	50% DMSO/THF	13,7	24,9	38,6	65	55
17	65% NMP/THF	11,5	24,8	36,3	79	66
18	50% DCM/DMF	18,2	13,8	32,0	70	61
19	50% DCM/DMSO	19,9	15,4	35,3	68	65
20	50% MeOH/DMSO	30,3	29,9	60,2	25	56

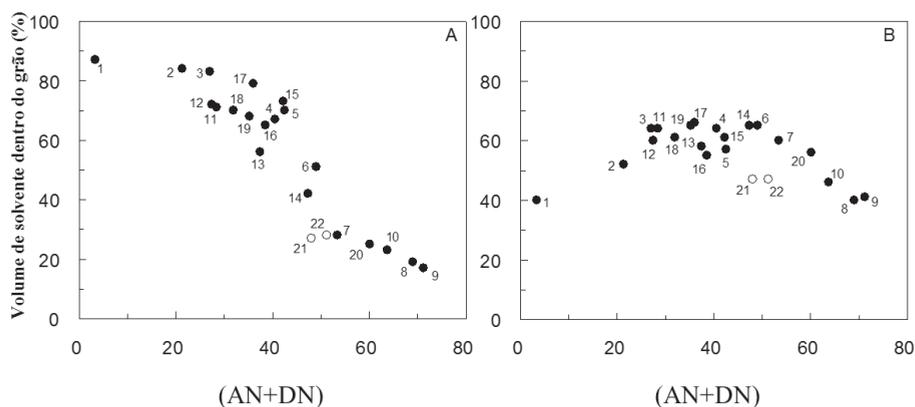
		RESINAS <sup>A</sup>				
	SOLVENTES	AN	DN	(AN+DN)	1	2
21	50% TFE/DMF	34,8	13,3	48,1	27	47
22	50% TFE/DMSO	36,4	14,9	51,3	28	47

<sup>a</sup>  $[(\text{Volume solvatado} - \text{Volume seco}) / \text{Volume solvatado}] \times 100$  utilizando os seguintes valores para as medidas dos diâmetros dos grãos secos: Resinas: (1) BHAR, 0,3 mmol/g = 50 mm; (2) VHHQKLVFFAEDV-MBHAR, 2,6 mmol/g = 94 mm.

**Legenda:** DCM, diclorometano; DMF, dimetilformamida; DMSO, dimetilsulfóxido; EtOH, etanol; MeOH, metanol; NMP, N-Metil-2-pirrolidona; TFE, trifluoetanol; THF, tetrahidrofurano

Visualmente, a Figura 6.8 abaixo destaca esses valores apresentados nesta Tabela 6.4. Observa-se que a MBAR apresenta inchamentos mais favorecidos (região de máximo inchamento) em solventes apolares – valores de (AN + DN) menores, enquanto a peptidil-resina mais polar contendo um fragmento menor do peptídeo  $\beta$ -amiloide<sup>4</sup> já apresenta deslocamento do pico de máximo de inchamento para solventes com maior polaridade – valores de (AN + DN) ao redor de 40.

Como uma importante observação de caráter físico-químico relacionado com as propriedades de solventes e mesmo de solutos, nota-se na Figura 6.8 que os solventes 21 e 22 (bolas vazias), constantes na Tabela 6.4, se afastaram principalmente da curva da peptidil-resina (painel B), apresentando valores de inchamento menores do que seria de se esperar considerando os valores de polaridade com o termo (AN + DN) desses dois solventes



**Figura 6.8** Inchamento das resinas BAR, 0,3 mmol/g (A) e VHHQKLVFFAEDV-MBAR, 2,6 mmol/g (B) em função dos valores de polaridade (AN + DN) dos solventes.

mistos (DMF/TFE e DMSO/TFE), respectivamente. Esse efeito observado é de enorme importância no complexo fenômeno da interação soluto-solvente, pois indica que em casos de solventes mistos, não é adequado se produzir os chamados *heterogêneos*, isto é, com propriedades antagônicas em termos de eletrofilicidade e nucleofilicidade. Este é o caso acima, no qual solventes fortemente doadores eletrônicos (valor alto de DN, nucleofílicos como DMF e DMSO) são misturados com o fortemente receptor eletrônico (eletrofílico) como é o caso do TFE (valor de AN alto). Nesse caso, os dois solventes da mistura tendem a se associar entre si em vez de romperem interações de cadeias peptídicas dentro do grão da resina. Desse modo, a força de inchamento dessas duas misturas heterogêneas fica enfraquecida, justificando, portanto, a razão do deslocamento dos pontos de inchamentos dos solventes 21 e 22 da curva geral de solvatação da peptidil-resina acima mencionada. Por outro lado, esse efeito não é muito significativo na MBAR, pois tal resina não contém segmentos peptídicos que poderiam se agregar, forçando os dois solventes da mistura a se associarem como no composto 2 da tabela. Essas conclusões foram tiradas também de estudos de inchamentos de diversas outras peptidil-resinas e foram melhor detalhadas em diferentes trabalhos<sup>9,43,44</sup>.

Esse efeito físico-químico envolvendo os conceitos de AN e DN são muito importantes também para o caso da escolha de solventes, objetivando agora a predição da solubilização de determinados peptídeos livres em solução. Certamente as misturas 21 e 22 não serão as melhores para solubilizar sequências fortemente agregadas, e mesmo no caso de envolver a água como um dos componentes da mistura, o mesmo cuidado deve ser considerado para formar as misturas adequadas. A água possui elevado valor de AN, pois é um composto receptor eletrônico forte ou altamente eletrofílico como o TFE<sup>45</sup>, e sua mistura não deve ser feita com solventes antagônicos como, por exemplo, o DMSO, que é um forte doador eletrônico. Ambos se associam fortemente e não conseguem dissolver, como os conhecidos peptídeos insolúveis (amiloidais) envolvidos na formação de placas amiloidais em pacientes com a doença de Alzheimer. Essas observações deixam claro que a escolha de solventes para o uso em determinadas reações ou processos de dissolução de diversos solutos não pode ser aleatória como tem sido feito até agora na literatura, necessitando de uma prévia análise dos componentes da mistura para uma melhor eficiência de uma mistura de solventes. O trabalho de Malavolta et al. (2006)<sup>10</sup> apresenta mais exemplos de aplicação desses conceitos físico-químicos e as implicações reais no complexo item da interação soluto-solvente em geral.

Finalizando este tópico de estudo sobre a importância da solvatação dos grãos de resina no rendimento da SPFS, os dados constantes na Tabela 6.5 mostram, como exemplo, como o grau de inchamento de uma peptidil-resina, no caso contendo um fragmento transmembranar do receptor B2 do peptídeo hipotensor bradiginina<sup>6,51</sup>, afeta a velocidade da reação de acoplamento. Melhor resultado se observa com o solvente que proporcionou mais inchamento dos grãos (20% DMSO/NMP), se comparado ao clássico DMF, bastante empregado na SPFS. Esses dados corroboram definitivamente que há uma relação direta entre o grau de solvatação e a eficiência de reações químicas dentro do grão de resinas, como descrito previamente<sup>43,52,53</sup>. Os dados apresentados nessa tabela fizeram parte especificamente de estudos desenvolvidos anteriormente<sup>46</sup>. Essa conclusão é bastante relevante, pois facilita a escolha do melhor solvente para a viabilização da síntese de qualquer sequência, contanto que se possa determinar previamente os graus de solvatação das peptidil-resinas.

**Tabela 6.5** Influência do inchamento dos grãos de resina na velocidade da reação de acoplamento de Boc-Leu à PFWAITIANNND-BAR<sup>a</sup>

SOLVENTE	VOLUME DE SOLVENTE DENTRO DO GRÃO <sup>b</sup> (%)	VELOCIDADE DE REAÇÃO DE ACOPLAMENTO (MIN.)			
		5	15	45	60
DMF	37	29	44	58	71
NMP/DMSO (8:2)	78	40	64	78	86

<sup>a</sup> BAR de 0,34 mmol/g; <sup>b</sup> (Volume do grão solvatado – Volume do grão seco) / Volume do grão solvatado × 100.

## 6.2.2 Estudos da solvatação de peptidil-resinas por RPE

Para se estudar as características de solvatação de resinas e peptidil-resinas, via RPE, é preciso partir inicialmente do detalhamento dessa técnica espectroscópica e também do histórico da introdução do marcador de *spin* TOAC, já mencionado, e sua aplicação em peptídeos e peptidil-resinas. Uma explicação sucinta dessa espectroscopia de ressonância irá iniciar este tópico.

### 6.2.2.1 Método da ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

O método da RPE ou do marcador de *spin* é uma técnica espectroscópica que, conforme já mencionado, se baseia na absorção de radiação eletromagnética na região das micro-ondas ( $\sim 10^{12}$  Hz) e consiste no emprego de uma molécula “sonda” paramagnética (marcador de *spin*) que contém um elétron desemparelhado. O espectro de absorção que é obtido pode fornecer informações de caráter estrutural a respeito do sistema ou local ao qual ela se encontra ligada. Essas informações podem versar sobre o grau de liberdade de movimento na posição onde a molécula “sonda” está ligada, dependendo de fatores como colisões intermoleculares, ordenamento molecular, geometria local e presença de outras espécies paramagnéticas. Essa técnica espectroscópica tem sido objeto de considerável número de livros e artigos de revisão abrangendo sua teoria, metodologia e aplicação em diversos campos de pesquisa<sup>36,54,55</sup>.

O momento magnético do *spin* ( $m_s$ ) do elétron desemparelhado da sonda paramagnética, normalmente um radical livre do tipo nitróxido (N-O), pode assumir, em presença de um campo magnético externo, dois níveis energéticos correspondentes à orientação paralela e antiparalela a esse campo magnético (caracterizados por  $m_s = +\frac{1}{2}$  e  $-\frac{1}{2}$ ). O fenômeno simples de ressonância envolve a transição do *spin* do elétron do estado de menor para o de maior energia, induzida pela absorção de radiação eletromagnética na região de micro-ondas (Figura 6.9A). Se a frequência ( $\nu$ ) da radiação incidente for mantida constante, a diferença de energia ( $\Delta E$ ) entre os dois níveis permitidos para o *spin* do elétron será proporcional ao campo magnético aplicado ( $H_0$ ), e é dada por:

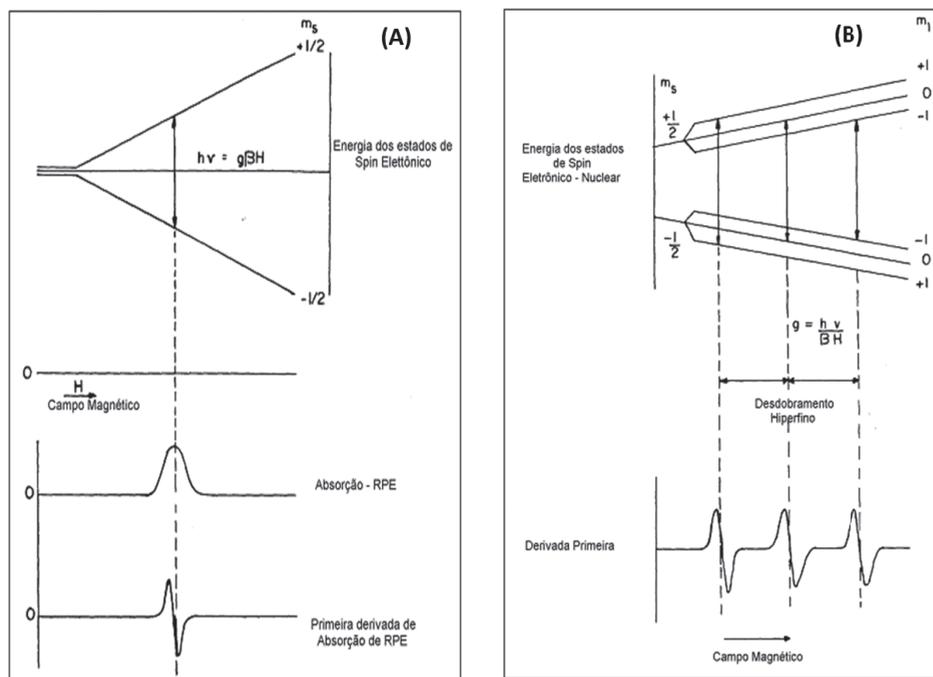
$$\text{(Equação 6.1)} \quad \Delta E = h\nu = g_e\beta_e H_0$$

em que  $h$  é a constante de Planck,  $g_e$  é característica do elétron numa espécie particular e  $\beta_e$  é magneton de Bohr para o elétron.

O espectro de RPE torna-se mais complexo quando ocorre interação entre o *spin* eletrônico e o *spin* nuclear igual a um ( $I = 1$ ) e, portanto, quando esse núcleo é submetido a um campo magnético, o momento magnético de *spin* nuclear ( $m_1$ ), pode assumir três valores (+1; 0 e -1). Nesse caso, cada um dos níveis eletrônicos será desdobrado em três subníveis (Figura 6.9B), devido ao *spin* nuclear do  $^{14}\text{N}$  poder alinhar-se de forma paralela ( $m_1 = +1$ ), antiparalela ( $m_1 = -1$ ) ou perpendicularmente ( $m_1 = 0$ ) ao momento magnético

do elétron. Nesse sistema, as transições permitidas são aquelas nas quais somente o *spin* do elétron varia ( $\Delta m_s = 1$ ), sem alterar o *spin* do núcleo ( $\Delta m_l = 0$ ).

Mantendo-se a frequência ( $\nu$ ) da radiação incidente, as condições de ressonância serão dadas pela Equação 6.1, e essas condições agora estarão satisfeitas em três diferentes valores de campo magnético. Obtêm-se deste modo três picos de absorção, que usualmente são apresentados na forma de primeira derivada. A distância que separa linhas de absorção vizinhas é conhecida como desdobramento hiperfino ( $a_N$ ), e o fator  $g$  determina a posição dessas linhas no campo magnético.



**Figura 6.9** (A) Desdobramento dos níveis do *spin* eletrônico em presença de um campo magnético; (B) Desdobramento dos níveis de energia do *spin* eletrônico para um átomo com *spin* nuclear  $I = 1$ .

## Sensibilidade ao movimento molecular

Conforme os valores da velocidade rotacional da molécula obtêm-se diferentes alargamentos das três linhas de absorção nos espectros de RPE

(Figura 6.10), o que é exemplificado com os marcadores de *spin* Tempo e Tempol em diferentes temperaturas. Por exemplo, para graus maiores de imobilização (temperaturas mais baixas), observam-se alargamentos mais acentuados devido à sobreposição de contribuições individuais de diferentes orientações da molécula repórter. A grande utilidade dessa técnica na identificação da conformação de peptídeos ou detalhes dinâmicos do interior de uma matriz polimérica provém basicamente dessa sensibilidade dos espectros de RPE à mobilidade rotacional, pois o sistema em estudo pode apresentar alterações físico-químicas dependentes do solvente ou pH empregados, e que se refletem também numa variação da velocidade de rotação da sonda presente nesse sistema.

Em termos quantitativos, a velocidade e difusão rotacional das moléculas são analisadas usualmente através do cálculo do tempo de correlação rotacional ( $\tau$ ), cuja unidade é segundo/radiano. A teoria para o cálculo de  $\tau$  de radicais nitróxidos, a partir de larguras e alturas dos três picos de absorção,

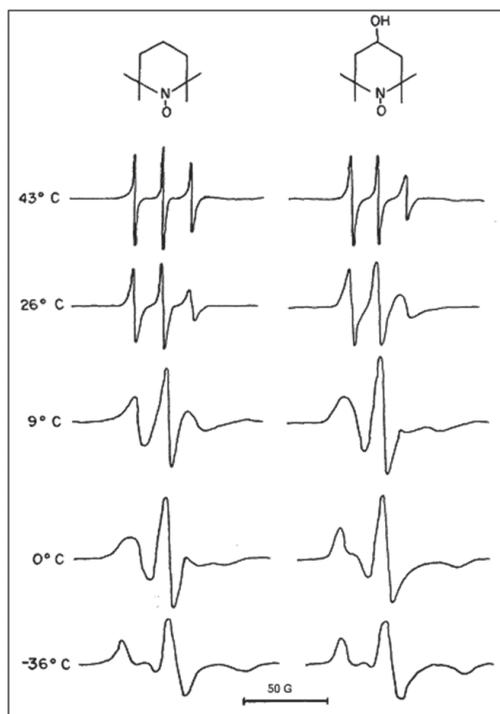


Figura 6.10 Espectros marcadores de *spin* Tempo e Tempol em glicerol.

foi desenvolvida anteriormente<sup>56,57</sup> e gera dois valores de  $\tau$  ( $\tau_B$  e  $\tau_C$ ), a partir de duas expressões diferentes descritas por Cannon<sup>58</sup>.

$$\text{(Equação 6.2)} \quad \tau_C = 6,55 \times 10^{-10} W_0 [(h_0/h_{+1})^{1/2} + [(h_0/h_{-1})^{1/2} - 2] \text{ s/rad}$$

$$\text{(Equação 6.3)} \quad \tau_B = 5,90 \times 10^{-10} W_0 [(h_0/h_{-1})^{1/2} - [(h_0/h_{+1})^{1/2}] \text{ s/rad}$$

em que  $W_0$  é a largura da linha central em Gauss, e  $h_{-1}$ ,  $h_0$  e  $h_{+1}$  são, respectivamente, as amplitudes das primeiras derivadas das linhas de absorção do campo alto, médio e baixo.

A utilização desse parâmetro  $\tau$  limita-se, na realidade, a movimentos bastante rápidos e isotrópicos, como é o caso de marcadores pequenos livres em solução ou ligados a macromoléculas pequenas, como é o caso dos peptídeos. Nesse caso, quanto menor o valor de  $\tau$ , mais rápida é a rotação molecular. Os valores de  $\tau$  atingem escalas ao redor de  $10^{-11}$  a  $10^{-10}$  s<sup>-1</sup>. Em casos em que o marcador se encontra agora ligado a estruturas maiores, como em polímeros ou peptidil-polímeros, ocorre a sobreposição de espectros de componentes de diferentes mobilidades (mais lentos), inviabilizando a utilização de  $\tau$ . Lança-se mão, então, usualmente, do termo  $W_0$  (largura em Gauss do pico central). Quanto maior esse valor, mais imóvel e ordenado se encontra o sítio onde o marcador de *spin* se encontra ligado. Além do uso do  $W_0$  para essas situações, há a proposição do uso do termo espectral  $h-1/h_0$ . Contrariamente ao  $W_0$ , quanto maior o seu valor, maior é a velocidade motricional do local do sistema marcado<sup>46,59-61</sup>.

Ao final, existe outra importante aplicação da RPE relacionada à sensibilidade do espectro do radical nítróxido à polaridade do meio, e isto se deve basicamente à existência de duas formas canônicas desse composto (Figura 6.11).

Na estrutura I, o elétron desemparelhado está preferencialmente localizado no átomo de oxigênio. Na estrutura II, encontra-se no de nitrogênio. Quando o radical está em meio bastante polar, como a água, a tendência é a de predominar a estrutura II, o inverso ocorrendo em um meio mais apolar. A avaliação da localização do elétron desemparelhado e, conseqüentemente da polaridade do meio, é feita através dos valores do desdobramento hiperfino isotrópico ( $a_N$ ) e do fator  $g$  isotrópico. Quanto mais o elétron desemparelhado interagir com núcleo de nitrogênio (estrutura II), maior será o valor de  $a_N$  e menor o de  $g$ <sup>62</sup>. Em geral,  $a_N$  varia aproximadamente de 14,5 Gauss em solventes apolares, como benzeno ou dioxano, a valores ao redor de 16,0 Gauss em água.

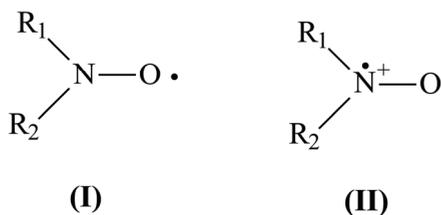


Figura 6.11 Formas canônicas do radical nitróxido.

### Experimentos de RPE: marcação das amostras por TOAC e detalhes operacionais

Experimentos foram efetuados em um espectrômetro Bruker modelo ER 200 e celas de quartzo, com capacidade aproximada de 0,2 mL, proveniente de J. Scalon, Costa Mesa, Califórnia e que se encontra instalado no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP). Os espectros de resinas e peptidil-resinas foram obtidos à temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C), em diferentes solventes orgânicos (). Foram feitos, em geral, de dois a três experimentos para cada amostra. As resinas foram marcadas com o composto Fmoc-TOAC, pelo método DIC/HOBT em DMF por duas horas, embebidas por uma noite no solvente desejado, e uma pequena porção foi adicionada à cela de quartzo para a obtenção dos espectros de RPE. Acopla-se usualmente apenas cerca de 5% (mol/mol) do marcador Fmoc-TOAC em relação ao teor de grupos amínicos da resina. Essa baixa marcação evita o surgimento de interações do tipo *spin-spin*<sup>36,54</sup> entre os marcadores dentro do grão da resina, afetando as larguras dos picos espectrais da RPE e dificultando a determinação correta dos parâmetros espectrais desejados. Após a marcação, trata-se a resina com solução de 20% piperidina em DMF por 20 minutos para remoção do grupo Fmoc. Após isso, lava-se várias vezes a peptidil-resina marcada com DMF e DCM, em funil de placa porosa.

De um modo geral, o tempo de varredura foi de 4 minutos, a constante de tempo de 0,1; a amplitude de modulação até um máximo de 0,5 G, a potência de micro-ondas de 5 mW e a frequência de 9,5 GHz. Todos os espectros foram feitos em intervalo de campo de 100 G, centralizando-se o pico central ao redor de 3.450 G, a 22 °C.

## 6.2.3 TOAC: histórico e aplicação em estudos de peptídeos e de solvatação de peptidil-resinas

### 6.2.3.1 Histórico

Apesar de décadas terem se passado após a introdução da RPE, este método espectroscópico que se baseia na introdução de um composto radicalar estável no sistema em estudo havia sido esparsamente empregado no estudo conformacional de peptídeos biologicamente ativos. Isso se devia, em parte, à inexistência de um marcador de *spin* do tipo aminoácido disponível comercialmente. Nosso laboratório foi o primeiro a introduzir, no início da década de 1980, uma estratégia química que permitiu o uso do TOAC<sup>63</sup> (ver Figura 6.12) na SPFS. A derivação desse marcador de *spin* com o protetor amínico ácido-lábil terc-butiloxicarbonila (Boc), empregado rotineiramente na estratégia Boc da SPFS, viabilizou finalmente a ligação covalente desse composto radicalar na extremidade N-terminal de cadeias peptídicas<sup>64,65</sup>. Obtiveram-se, assim, com o emprego do composto Boc-TOAC, os primeiros peptídeos paramagnéticos contendo esse marcador, dentre os quais o dipeptídeo Toac-Gly e os análogos (Toac<sup>0</sup>- e Toac<sup>1</sup>-AngII), em que AngII é o peptídeo hipertensor angiotensina II, caracterizado pela sequência DRVYIHPF<sup>66,67</sup>.

Não havia, no entanto, naquela época, uma estratégia que permitisse a introdução do TOAC em posições internas de uma cadeia peptídica, pois esse radical livre parece sofrer degradação irreversível nas sucessivas etapas de tratamento da peptidil-resina com ácido trifluoroacético (TFA), necessárias para a remoção do grupo protetor amínico Boc e posterior acoplamento

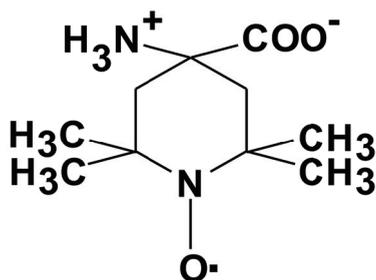


Figura 6.12 TOAC: ácido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-óxido-4-amino-4-carboxílico.

do resíduo seguinte da cadeia peptídica (Figura 6.3). Embora o radical nítróxi seja bastante estável graças ao arcabouço formado pelas quatro metilas vizinhas ao radical N-O, à ausência de H nos carbonos adjacentes e à existência de formas ressonantes desse grupamento<sup>68</sup>, esse tipo de radical pode sofrer, em meio ácido forte, um processo de protonação seguido de desproporcionamento e posterior decomposição<sup>69</sup>.

Foi somente após mais de uma década que foi proposta na literatura uma estratégia química de introdução do TOAC em posições internas de sequências peptídicas<sup>70</sup>. Isso foi possível através da utilização alternativa do protetor amínico base-lábil Fmoc<sup>18,71</sup>, já descrito. Com o emprego do derivado Fmoc-TOAC, tornou-se viável o crescimento da cadeia peptídica mesmo após a introdução do TOAC, fazendo-o através do método alternativo de síntese Fmoc. Nesse protocolo alternativo, o composto radicalar TOAC não é submetido em nenhum momento a tratamento ácido com TFA até o final da síntese, mantendo-se, portanto a integridade de sua estrutura.

Como, contudo, na etapa final de clivagem do peptídeo da resina por esta estratégia de síntese emprega-se um tratamento ácido forte que contém cerca de 80% (v/v) de TFA (reagente K)<sup>18</sup>, que degrada bastante o TOAC, essa solução foi substituída pelo HF anidro, utilizado na estratégia inicial de síntese peptídica já mencionada e que emprega a proteção Boc (ver Figura 6.3). Nesse meio ácido anidro, observou-se que ocorre apenas protonação do grupo N-O, que pode ser revertido por tratamento em meio alcalino<sup>64,65</sup>. Essa estratégia química alternativa que permite a introdução de TOAC internamente em cadeias peptídicas envolve, portanto, uma mistura dos protocolos dos métodos de síntese, via Boc, para a etapa de clivagem final do peptídeo da resina, e via Fmoc, para o do crescimento da cadeia peptídica. O análogo TOAC<sup>7</sup>-AngII sintetizado por essa estratégia transformou-se, desse modo, no primeiro exemplo de peptídeo da literatura com um marcador de *spin*<sup>70</sup>, contido internamente em sua estrutura primária.

Diferentemente de estratégias opcionais de marcação paramagnética de macromoléculas em que se empregam marcadores de *spin* mais longos ou mais flexíveis, usualmente na cadeia lateral da cisteína<sup>72</sup> (ver Figura 6.13), o uso de um marcador do tipo aminoácido, como o TOAC, é mais conveniente. Isso se deve à estrutura especial desse marcador. Seu C<sup>α</sup>, que contém os grupamentos amínicos e carboxílicos para a sua inserção no meio da cadeia peptídica, está no mesmo anel cíclico que contém o centro paramagnético nítróxi. Desse modo, esse marcador de *spin* é mais sensível a qualquer alteração no sistema ao qual se encontra ligado, pois não existem tantas ligações simples separando-os como ocorre com outros marcadores de *spin*.



(CD), tanto em solução<sup>75-78</sup> quanto em micelas<sup>79,80</sup>. Estudo similar tem sido desenvolvido também com o peptídeo vasoativo AngII<sup>65,76</sup>. Além disso, o peptídeo responsável, entre diversas outras funções fisiológicas, pela coloração da epiderme de mamíferos (peptídeo estimulador de  $\alpha$ -melanócito, ou  $\alpha$ -MSH)<sup>81</sup> e um análogo mais potente<sup>82</sup> também foram marcados com TOAC e investigados em termos conformacionais em solução e em sistema membrana-mimético<sup>78,83</sup>. Além desses exemplos, outros, como estudos via TOAC do neuropeptídeo Y<sup>84</sup>, da substância P<sup>85</sup> e de peptídeos antimicrobianos<sup>86,87</sup>, continuam em andamento.

Além desse tipo de enfoque voltado mais para peptídeos de relevância fisiológica, existem outros que empregam o TOAC para fins de enfoques estruturais de peptídeos em geral. Dentre estes, há menção a estruturas especiais em  $\alpha$ -hélice de segmentos peptídicos-modelo<sup>88</sup> e outros correlatos desenvolvidos principalmente pelo grupo de Toniolo e colaboradores e nos últimos anos de outros pesquisadores, que aplicaram inclusive a estratégia de simples ou dupla marcação com TOAC de cadeias peptídicas<sup>89-91</sup>. Além desse tipo de aplicação de relevância estrutural de peptídeos, tem-se estendido também o estudo das características do próprio marcador TOAC<sup>92,93</sup> e seu emprego na análise da interação de fragmentos peptídicos em bicamadas e micelas<sup>94,95</sup> ou de mecanismo de ação de receptores, do tipo GPCR<sup>96-98</sup>, e mesmo de especificidade de enzimas<sup>99</sup>.

Por fim, além do TOAC, nosso laboratório também procurou encontrar um outro marcador do tipo aminoácido que possuísse um grupamento amínimo mais reativo que o do TOAC. Foi desse modo que iniciamos os estudos do POAC (2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-1-oxil-3-amino-4-carboxílico, Figura 6.14), descrito inicialmente por Rassat e Rey (1967)<sup>63</sup>, mas utilizado pelo nosso grupo para marcação de cadeias peptídicas<sup>100</sup>. Por ser um composto quiral, alguns trabalhos procuraram obter formas enantioméricas purificadas desse composto cíclico<sup>101,102</sup>. Nosso grupo tem procurado resolver o problema da separação quiral dos componentes do POAC por meio de protocolos cromatográficos alternativos<sup>103</sup>.

### **6.2.3.3 Estudo da solvatação de peptidil-resinas pela espectroscopia da RPE**

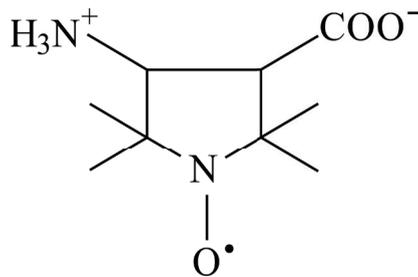
Este último tópico procura mostrar alguns avanços e potencialidades de aplicação da RPE via emprego do marcador TOAC, pioneiramente utilizado para complementação dos estudos de solvatação de peptidil-resina,

já iniciada com a metodologia da leitura dos grãos em microscopia ótica comum. O objetivo final tem sido o de ajudar a entender melhor esse complexo processo do crescimento da cadeia peptídica dentro do grão de polímeros, dependente de inúmeros fatores, e, assim, ajudar no aprimoramento da SPFS. O emprego alternativo da RPE permite, com o uso da molécula repórter TOAC, obter dados físico-químicos da dinâmica das cadeias peptídicas em conjugação com o de uma matriz polimérica no estado solvatado.

Diversos trabalhos puderam ser publicados, os quais serão listados adiante, mas os pontos principais para entender a validade dessa estratégia alternativa e única estão na obtenção de dados de alguns parâmetros espectrais da RPE, que já descrevemos como relevantes para a avaliação de dados de mobilidade e existência ou não de algum tipo de impedimento espacial na cadeia peptídica em crescimento. Dentre esses, temos o  $W_0$ , que corresponde à largura do pico central do espectro de RPE, e foi possível ainda propor alternativamente o termo também espectral  $h-1/h_0$ . Quanto maior o valor de  $W_0$  ou menor o de  $h-1/h_0$ , maior a imobilização do local onde se encontra localizada a sonda TOAC<sup>36,46,59,61</sup>.

Antes de apresentar dados mais concretos, numéricos, relativos a essas afirmações, é preciso observar que claras diferenciações espectrais existem entre um marcador pequeno livre em solução; um já ligado a uma molécula maior, como um peptídeo; e, finalmente um ligado a uma macromolécula de dimensões bem maiores, representada pelo grão de uma peptidil-resina”.

A Figura 6.15A destaca essa diferenciação espectral entre esses três casos, notando-se picos mais estreitos no TOAC, seguido do TOAC-peptídeo e,



**POAC**

Figura 6.14 POAC: Ácido 2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-N-óxido-3-amino-4-carboxílico.

finalmente, quando esse marcador se encontra ligado à extremidade peptídica da sequência AAAAD acoplado à MBAR. Observa-se que esse alargamento é mais facilmente observável no pico de campo magnético mais alto ( $h-1$ ), pois é o mais sensível a alterações motricionais do meio, se comparado com os outros dois de absorção em campos magnéticos menores. A Figura 6.15B destaca os espectros da TOAC-AAAAD-MBAR, mas em três solventes diferentes, indicando maior mobilidade em DMF e menor em DMSO, exatamente de acordo com o grau de inchamento dessa peptidil-resina nesses solventes e pelos valores de  $W_0$ <sup>104</sup>.

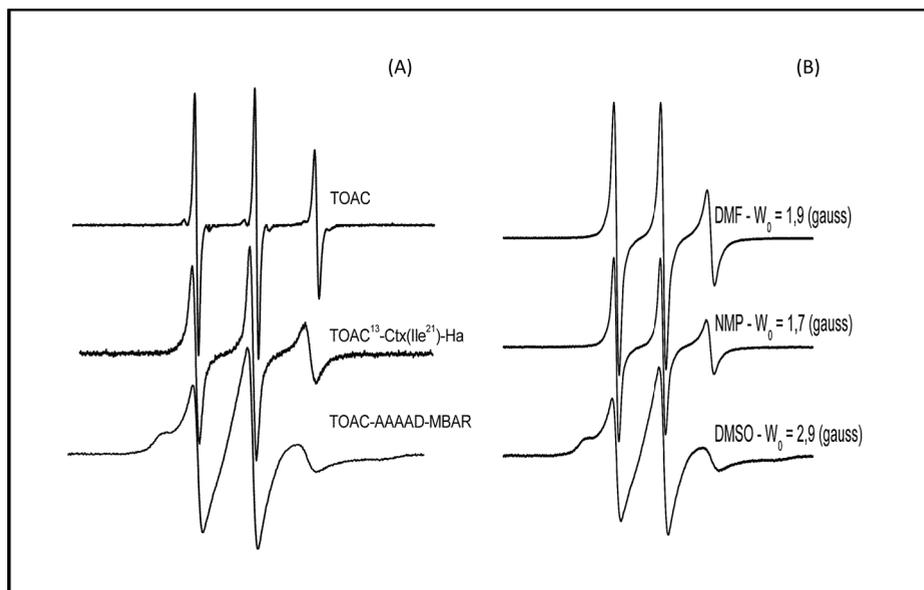
A Tabela 6.6 abaixo reforça essas informações, destacando a já observada correlação entre grau de inchamento por microscopia e grau de mobilidade, indicado pelos valores de  $W_0$ , mas agora apresentando também os dados de velocidade da reação de acoplamento. A correlação é direta entre esses termos, sendo o solvente polar DMSO o mais indicado para essa síntese, por ter se mostrado em melhor condição de solvatação dessa peptidil-resina. Por conter elevado conteúdo peptídico (mais de 50%), tende a ser melhor solvatada no DMSO do que nos mais comumente utilizados DCM ou DMF. Esses dados são complementares de estudos ainda em andamento<sup>60</sup>.

**Tabela 6.6** Correlação entre grau de inchamento,  $W_0$  e rendimento de acoplamento (5%) da Boc-Ala na AAV-BHAR (53% conteúdo peptídico)

SOLVENTE	VOLUME DE SOLVENTE NO GRÃO <sup>a</sup> (%)	$W_0$ (GAUSS)	ACOPLAMENTO <sup>b</sup> (%)
DCM	38	4.6	11
DMF	48	3.2	27
DMSO	72	1.6	49

<sup>a</sup>  $[(\text{volume solvatado} - \text{volume seco})/\text{volume solvatado}] \times 100$ ; <sup>b</sup> Acoplamento após 15 min. com o método da carbodiimida. Agentes acilantes em  $2,5 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> e com excesso molar de  $1,5 \times$  sobre o total de componente amínico.

Ainda apresentando dados que reforçam a importância do emprego da RPE nesse tipo de investigação, a Figura 6.16 nos mostra o acompanhamento do acoplamento do Boc-TOAC em uma peptidil-resina, monitorada agora pelos valores espectrais de  $h-1/h_0$ <sup>61</sup>. Observa-se que esse parâmetro espectral da RPE vai tendo o seu valor aumentado à medida que o tempo de acoplamento ocorre, atingindo-se um patamar ao redor de 200 minutos a 300 minutos. Esse dado é, portanto indicativo de que a imobilização crescente detectada pelo aumento dos valores de parâmetro deve-se ao



**Figura 6.15** (A) Espectros de RPE de TOAC (em tampão PBS, pH 7), TOAC13-Ctx(Ile21) - Ha\* (em tampão fosfato, pH 7) e TOAC-AAAAD-MBAR em DMSO; (B) espectros de RPE de TOAC-AAAAD-MBAR (0,5 mmol/g) em DCM, NMP e DMSO e os correspondentes valores de  $W_0$ .

acoplamento tempo-dependente de todas as moléculas do marcador, ligando-se em uma macromolécula bem maior (peptidil-resina), responsável, portanto pelo aumento de sua imobilização molecular e estabilização com valores ao redor de 0,27.

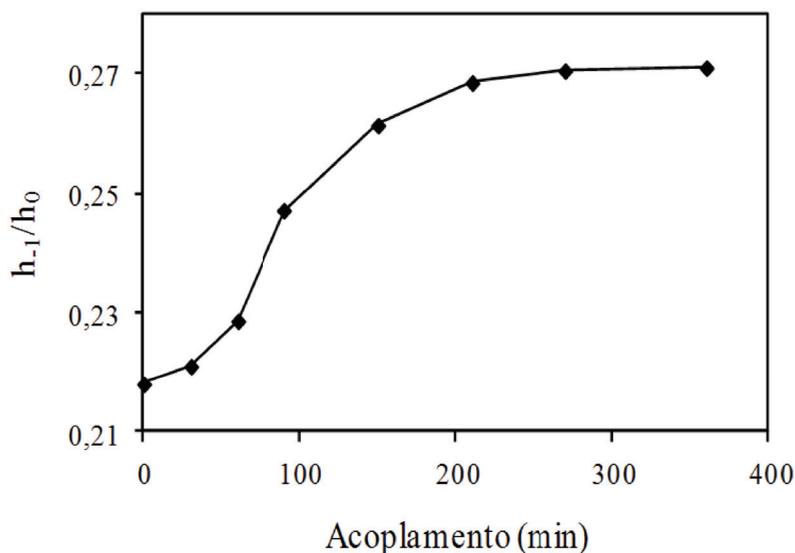
Um aspecto relevante nesse tipo de estudo da solvatação por RPE, se comparado ao da estratégia de medidas de grãos por microscopia, reside no fato de se poder, por exemplo, via emprego do TOAC, desenvolver um trabalho mais diferenciado nessa área<sup>60</sup>, que propõe uma estratégia de obtenção de informações estruturais inéditas como, por exemplo, o número de sítios peptídicos por grão de cada resina e também a distância entre estes, em Å. Essas informações adicionais se tornaram bastante úteis na interpretação de alguns resultados da SPFS, pois confirmaram que quanto maior a distância entre os sítios, menor o impedimento espacial e, portanto, maior a velocidade na reação da entrada de um novo aminoácido durante o crescimento peptídico. A Tabela 6.7 exemplifica com o estudo do acoplamento comparativo (em DCM) de um resíduo de aminoácido em três lotes de uma

mesma peptidil-resina, mas com conteúdos peptídicos diferentes no grão. Essas amostras possuem, portanto, valores de distância intercadeias distintas e calculadas pela estratégia mencionada<sup>60</sup>. Os valores de distância entre os sítios variam de 38 Å a 17 Å nessas peptidil-resinas; na que apresenta o maior valor de distância, ocorre reação de acoplamento mais eficiente (86% contra 21%, respectivamente), devido ao menor grau de impedimento espacial dentro do grão.

**Tabela 6.7** Correlação entre acoplamento de Boc-(2-BzZ)-Tyr e valores de distância entre sítios da peptidil-resina ING-MBAR, em DCM

ING-MBAR (MMOL/G) <sup>a</sup>	DISTÂNCIA ENTRE SÍTIOS (Å)	ACOPLAMENTO <sup>b</sup> (%)
0,19	38	86
0,54	33	63
1,16	17	21

**Legenda:** <sup>a</sup> Grau de substituição de ING; <sup>b</sup> Rendimento de acoplamento de Boc-(2BzZ)Tyr (15 minutos, a 25 °C), método anidrido simétrico, em condições equimolares (10 mmol L<sup>-1</sup> de concentração dos reagentes).



**Figura 6.16** Correlação entre os valores espectrais de  $h_{-1}/h_0$  e o tempo de acoplamento de Boc-TOAC em (NANP)4-MBAR (1,5 mmol/g). As reações ocorreram a 25 °C em DMF pelo método da carbodiimida, em condições equimolares dos reagentes (2 mmol.L<sup>-1</sup>).

Em conclusão, percebe-se que dados adicionais, específicos do microambiente, onde ocorre o crescimento da cadeia peptídica, podem ser obtidos conjugando-se RPE e valores de inchamento obtidos por microscopia, deixando em aberto possibilidades de proposição de melhorias em algumas etapas do método da SPFS. Talvez por essas razões, o artigo que introduz essa estratégia de determinação de parâmetros estruturais inéditos do interior dos grãos de peptidil-resinas, desenvolvidas via emprego conjugado de RPE-TOAC e inchamento<sup>60</sup>, acabou sendo selecionado na época da publicação para compor, em termos figurativos, a capa do volume de uma importante revista da área de química orgânica, o *Journal of Organic Chemistry* (ver Figura 6.17).

Existem na literatura, logicamente, outros métodos espectroscópicos que procuram também obter informações físico-químicas relevantes quanto à solvatação de peptidil-resinas. Esse é o caso da ressonância magnética nuclear (NMR)<sup>105,106</sup>, do dicroísmo circular (CD)<sup>107</sup>, da fluorescência<sup>108</sup> e do infravermelho do tipo transformada de Fourier (FT-IR)<sup>31,109,110</sup>. De qualquer modo, comparativamente, a técnica da RPE apresenta uma vantagem única sobre todas essas espectroscopias em termos de aplicação no aprimoramento da SPFS: contrariamente aos demais métodos, que detectam detalhes nutricionais e ordenamento do sistema como um todo, a RPE fornece dados específicos a respeito de onde o marcador se encontra, isto é, usualmente na extremidade amínica da cadeia peptídica em crescimento. Essa informação é crucial para a SPFS, pois permite antever uma maior ou menor liberdade de rotação dessa extremidade amínica para a importante etapa de acoplamento, sem estar refletindo a dinâmica de todo o sistema marcado.

### 6.3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Como enfatizado na parte introdutória, o objetivo deste capítulo foi o de descrever, de forma sucinta, a aplicação de uma estratégia diferenciada que emprega a RPE e um marcador de *spin* adequado, do tipo aminoácido (TOAC), para acoplar-se em peptídeos-resina, objetivando entender adequadamente o complexo processo de solvatação durante o crescimento das cadeias peptídicas com base na mundialmente empregada metodologia da síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS). Um conjunto de dados experimentais foi descrito, dentro do limite disponível, mas acreditamos que foram suficientes para que fossem visualizadas importantes assertivas relacionadas a essa metodologia. Dentre estas, pode-se destacar a importância crítica

de uma boa solvatação, refletida em um aumento da dinâmica e redução do grau de impedimento espacial no interior da matriz polimérica de uma peptidil-resina. Como consequência, obtém-se aumento da eficiência, por exemplo, da importante reação de acoplamento de aminoácidos. Por ser uma estratégia alternativa e ainda pouco empregada, acredita-se que essa



**Figura 6.17** Capa da revista de junho de 2005 do *Journal of Organic Chemistry*. Reimpresso com permissão de Marchetto et al., 2005<sup>60</sup>. Copyright (2005) American Chemical Society.

conjugação da RPE-inchamento por microscopia dos grãos é extremamente valiosa para se entender melhor detalhes físico-químicos no microambiente em que ocorre o crescimento peptídico, possibilitando a visualização de contínuas proposições de alternativas para as diferentes etapas químicas que

estão presentes na SPFS. Pela importância atual de peptídeos na área da saúde, prevemos o surgimento de diversas sublinhas de pesquisa no decorrer dos próximos anos, juntamente com a também extensa área que envolve polímeros em geral.

## REFERÊNCIAS

1. Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis 1. Synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*. 1963;85(14):2149-54.
2. Kastin AJ. *Handbook of Biologically Active Peptides*. Burlington: Elsevier Inc.; 2006.
3. Campbell MK. *Bioquímica*. 3. ed. São Paulo: Artmed; 2000.
4. Lansbury PT. In Pursuit of the Molecular-Structure of Amyloid Plaque – New Technology Provides Unexpected and Critical Information. *Biochemistry*. 1992;31(30):6865-70.
5. De Felice FG, Vieira MNN, Meirelles MNL, Morozova-Roche LA, Dobson CM, Ferreira ST. Formation of amyloid aggregates from human lysozyme and its disease-associated variants using hydrostatic pressure. *Faseb Journal*. 2004;18(7):1366-72.
6. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacology Reviews*. 2005;57(1):27-77.
7. McEachern AE, Shelton ER, Bhakta S, Obernolte R, Bach C, Zuppan P, Fujisaki J, Aldrich RW, et al. Expression cloning of a rat B2 bradykinin receptor. *National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(17):7724-8.
8. Narita M, Umeyama H, Yoshida T. Peptide segment separation by tertiary peptide-bonds [X-Pro and X-(Z)Y]. Synthesis and conformational-analysis of cross-linked polystyrene resin-bound human proinsulin C-peptide fragments. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 1989;62(11):3577-81.
9. Malavolta L, Nakaie CR. Peptide dissociation in solution or bound to a polymer: comparative solvent effect. *Tetrahedron*. 2004;60(42):9417-24.
10. Malavolta L, Pinto MRS, Cuvero JH, Nakaie CR. Interpretation of the dissolution of insoluble peptide sequences based on the acid-base properties of the solvent. *Protein Science*. 2006;15(6):1476-88.
11. Itakura K, Hirose T, Crea R, Riggs AD, Heyneker HL, Bolivar F, Boyer HW. Expression in *Escherichia-Coli* of a chemically synthesized gene for hormone Somatostatin. *Science*. 1977;198(4321):1056-63.
12. Jakubke HD. Enzymatic Peptide Synthesis. In: Judenfriend S, Meienhofer J, editors. *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. New York: Academic Press; 1987. p. 103-165.
13. Miranda MTM, Morita H, Tominaga M. Transesterification of Moz-Asn-Leu-Gly-Oet in methanol – confirmation of Ca-2+ mediated catalysis. *International Journal of Peptide and Protein Research*. 1991;37(4):299-305.
14. Du Vigneaud V, Katsoyannis PG. The synthesis of p-toluenesulfonyl-L-isoleucyl-L-glutaminyL-L-asparagine and related peptides. *Journal of the American Chemical Society*. 1954;76(12):3113-5.

15. Barany G, Merrifield RB. The Peptides: Analysis, Synthesis and Biology. In: Gross E, Meienhofer J, editors. *Special Methods in Peptide Synthesis*. Vol. II. New York: Academic Press; 1980. p. 1-284.
16. Stewart JM, Young JD. *Solid Phase Peptide Synthesis*. Rockford: Pierce Chemical Company; 1984.
17. Atherton E, Sheppard RC. *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. Oxford: I. L. R. Press; 1989.
18. Fields GB, Noble RL. Solid-phase peptide-synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-acids. *International Journal of Peptide and Protein Research*. 1990;35(3):161-214.
19. Martin L, Ivancich A, Vita C, Formaggio F, Toniolo C. Solid-phase synthesis of peptides containing the spin-labeled 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl-4-amino-4-carboxylic acid (TOAC). *Journal of Peptide Research*. 2001;58(5):424-32.
20. Kaiser E, Colescot RL, Bossing CD, Cook PI. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry*. 1970;34(2):595-8.
21. Yajima H, Fujii N, Ogawa H, Kauatani H. Trifluoromethanesulphonic acid, as a deprotecting reagent in peptide chemistry. *Journal of the Chemical Society*. 1974:107-8.
22. Mitchell AR, Erickson BW, Ryabtsev MN, Hodges RS, Merrifield RB. Tert-Butoxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl)-phenylacetamidomethyl-resin, a more acid-resistant support for solid-phase peptide-synthesis. *Journal of the American Chemical Society*. 1976;98(23):7357-62.
23. Meldal M. *Methods in Enzymology: Solid Phase Peptide Synthesis*. G.B. Fields, editor. Academic Press; 1997. p. 83-103.
24. Kates SA, Albericio F. *Solid-Phase Synthesis. A Practical Guide*, in *Solid-Phase Synthesis*. New York: M. Dekker; 2000. p. 275-330.
25. Jubilot GN, Miranda MT, Tominaga M, Okada Y, Miranda A, Nakaie CR. Resin selection based on the lability of peptidyl-resin linkage towards HF and TFA steps: Dependence on the C-terminal amino acid and peptide length. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1999;47(11):1560-3.
26. Jubilot GN, Cilli EM, Tominaga M, Miranda A, Okada Y, Nakaie CR. Evaluation of the trifluoromethanesulfonic acid/trifluoroacetic acid/thioanisole cleavage procedure for application in solid-phase peptide synthesis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2001;49 (9):1089-92.
27. Jubilot GN, Cilli EM, Crusca E, Silva EH, Okada Y, Nakaie CR. Comparative investigation of the cleavage step in the synthesis of model peptide resins: implications for N-alpha-9-fluorenylmethoxycarbonyl-solid phase peptide synthesis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2007;55(3):468-470.

28. Nakaie CR, Miranda A, Miranda MTM, Oliveira E, Marchetto R, Malavolta L, Cilli EM, Tominaga M, Okada Y, Jubilit GN. Acid cleavage reactions of amino acids and peptides bound to polymers: Relevance for peptide synthesis methodology. In: Nantes IL, Brochsztain S, editors. *Catalysis and Photochemistry in Heterogeneous Media*. Kerala: Research Signpost; 2007. p. 141-60.
29. Bedford J, Hyde C, Johnson T, Jun W, Owen D, Quibell M, Sheppard RC. Amino-acid structure and difficult sequences in solid-phase peptide-synthesis. *International Journal of Peptide and Protein Research*. 1992;40(3-4):300-3.
30. Hancock WS, Prescott DJ, Vagelos PR, Marshall GR. Solvation of polymer matrix – source of truncated and deletion sequences in solid-phase synthesis. *Journal of Organic Chemistry*. 1973;38(4):774-81.
31. Remuzgo C, Andrade GFS, Temperini MLA, Miranda MTM. Acanthoscurrin fragment 101-132: total synthesis at 60 °C of a novel difficult sequence. *Biopolymers*. 2009;92(1):65-75.
32. Cilli EM, Marchetto R, Schreier S, Nakaie CR. Use of spin label EPR spectra to monitor peptide chain aggregation inside resin beads. *Tetrahedron Letters*. 1997;38(4):517-20.
33. Kent SBH. Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annual Review of Biochemistry*. 1988;57:957-89.
34. Nakaie CR, Oliveira E, Vicente EF, Jubilit GN, Souza SEG, Marchetto R, Cilli EM. Solid-phase peptide synthesis in highly loaded conditions. *Bioorganic Chemistry*. 2011;39(1-3):101-9.
35. Marchetto R, Etchegaray A, Nakaie CR. Kinetics of synthesis and swelling studies of highly substituted benzhydrylamine-resins: implications for peptide synthesis and perspectives for use as anion exchanger resin. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 1992;3(1 e 2):30-7.
36. Berliner LJ, Reuben J. *Spin Labeling: Theory and Applications*. New York: P. Press; 1989.
37. Wertz J, Bolton JR. *Eletron Spin Resonance: Elementary Theory and Practical Applications*. New York: Mc Graw-Hill; 1972.
38. Sarin VK, Kent SBH, Merrifield RB. Properties of swollen polymer networks – solvation and swelling of peptide-containing resins in solid-phase peptide-synthesis. *Journal of the American Chemical Society*. 1980;102(17):5463-70.
39. Nakaie CR, Marchetto R, Schreier S, Paiva ACM. High-loading effect in solid phase peptide synthesis. In: Rivier J, Marshall GR, editors. *Peptide: Chemistry, Structure and Biology*. Leiden: ESCOM; 1990.
40. Becker H, Lucas HW, Maul J, Pillai VNR, Anzinger H, Mutter M. Polyethyleneglycols grafted onto crosslinked polystyrenes – a new class of hydrophilic polymeric supports for peptide-synthesis. *Makromolekulare Chemie-Rapid Communications*. 1982;3(4):217-23.

41. Pietta PG, Cavallo PF, Takahash K, Marshall GR. Preparation and use of benzhydrylamine polymers in peptide-synthesis .2. Syntheses of thyrotropin releasing hormone, thyrocalcitonin 26-32, and eledoisin. *Journal of Organic Chemistry*. 1974;39(1):44-8.
42. Matsueda GR, Stewart JM. A P-Methylbenzhydrylamine resin for improved solid-phase synthesis of peptide amides. *Peptides*. 1981;2(1):45-50.
43. Cilli EM, Oliveira E, Marchetto R, Nakaie CR. Correlation between solvation of peptide-resins and solvent properties. *Journal of Organic Chemistry*. 1996;61(25):8992-9000.
44. Malavolta L, Oliveira E, Cilli EM, Nakaie CR. Solvation of polymers as model for solvent effect investigation: proposition of a novel polarity scale. *Tetrahedron*, 2002;58(22):4383-94.
45. Gutmann V. *The Donor-Acceptor Approach to Molecular Interactions*. New York: Plenum Press; 1978. p. 595.
46. Oliveira E, Cilli EM, Miranda A, Jubilit GN, Albericio F, Andreu D, Paiva ACM, Schreier S, Tominaga M, Nakaie CR. Monitoring the chemical assembly of a transmembrane bradykinin receptor fragment: Correlation between resin solvation, peptide chain mobility, and rate of coupling. *European Journal of Organic Chemistry*. 2002;21:3686-94.
47. Malavolta L, Poletti EF, Silva EH, Schreier S, Nakaie CR. Application of electron paramagnetic resonance spectroscopy for validation of the novel (AN+DN) solvent polarity scale. *International Journal of Molecular Sciences*. 2008;9(7):1321-32.
48. Malavolta L, Pinto MR, Nakaie CR. Assessment of the aggregation propensity of the beta-amyloid peptide during the synthesis and when free in solution. *Protein and Peptide Letters*. 2013;20:848-55.
49. Dimroth K, Reichardt C, Siepmann T, Bohlman F. Über pyridinium-N-phenol-betaine und ihre verwendung zur charakterisierung der polarität von lösungsmitteln. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*. 1963;661(1):1-37.
50. Hildebrand JH. A critique of the theory of solubility of non-electrolytes. *Chemical Reviews*. 1949;44(1):37-45.
51. Regoli D, Barabe J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacological Reviews*. 1980;32(1):1-46.
52. Cilli EM, Jubilit GN, Ribeiro SCF, Oliveira E, Nakaie CR. Importance of the solvation degree of peptide-resin beads for amine groups determination by the picric acid method. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2000;11(5):474-8.
53. Ribeiro SCF, Schreier S, Nakaie CR, Cilli EM. Effect of temperature on peptide chain aggregation: an EPR study of model peptidyl-resins. *Tetrahedron Letters*. 2001;42(19):3243-6.

54. Schreier S, Polnaszek CF, Smith ICP. Spin labels in membranes: problems in practice. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*. 1978;515(4):375-436.
55. Hubbell WL, McConnell HM. Motion of steroid spin labels in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1969;63(1):16-22.
56. Kivelson D. Theory of ESR linewidths of free radicals. *Journal Chemistry Physics*. 1960;33:1094-1106.
57. Freed JH, Fraenkel GK. Theory of linewidths in electron spin resonance spectra. *Journal of Chemical Physics*. 1963;39(2):326-348.
58. Cannon B, Polnaszek CF, Butler KW, Eriksson LE, Smith IC. The fluidity and organization of mitochondrial membrane lipids of the brown adipose tissue of cold-adapted rats and hamsters as determined by nitroxide spin probes. *Arch Biochem Biophys*. 1975;167(2):505-18.
59. Cilli EM, Marchetto R, Schreier S, Nakaie CR. Correlation between the mobility of spin-labeled peptide chains and resin solvation: An approach to optimize the synthesis of aggregating sequences. *Journal of Organic Chemistry*. 1999;64(25):9118-23.
60. Marchetto R, Cilli EM, Jubilut GN, Schreier S, Nakaie CR. Determination of site-site distance and site concentration within polymer beads: A combined swelling-electron paramagnetic resonance study. *Journal of Organic Chemistry*. 2005;70(12):4561-8.
61. Nakaie CR, Malavolta L, Schreier S, Trovatti E, Marchetto R. Direct electron paramagnetic resonance monitoring of the peptide synthesis coupling reaction in polymeric support. *Polymer*. 2006;47(13):4531-6.
62. Briere R, Lemaire H, Rassat A. Nitroxides XV: Synthèse et étude de radicaux libres stables piperidiniques et pyrrolidiniques. *Bulletin de la Societe Chimique de France*. 1965:3273-83.
63. Rassat A, Rey P. Nitroxides. 23. Preparation of amino-acid free radicals and their complex salts. *Bulletin de la Societe Chimique de France*. 1967;3:815-8.
64. Nakaie CR, Goissis G, Schreier S, Paiva ACM. pH-dependence of electron-paramagnetic-res spectra of nitroxides containing ionizable groups. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1981;14(2-3):173-80.
65. Nakaie CR, Schreier S, Paiva ACM. Synthesis and properties of spin-labeled angiotensin derivatives. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1983;742(1):63-71.
66. Catt KJ, Sandberg K, Balla T. Angiotensin II receptors and signal transduction mechanisms. In: Raizada MK, Phillips I, Summers C, editors. *Cellular and Molecular Biology of Renin-Angiotensin System*. Boca Raton: CRC Press; 1993. p. 307-56.
67. Oliveira L, Costa-Neto CM, Nakaie CR, Schreier S, Shimuta SI, Paiva AC. The angiotensin II AT1 receptor structure-activity correlations in the light of rhodopsin structure. *Physiological Reviews*. 2007;87(2):565-92.
68. Kochi JK. *Free Radicals*. New York: Wiley-Interscience; 1973. p. 493.

69. Rozantsev EG. Free Nitroxyl Radicals. Hazzard BJ, editor. New York/London: Plenum Press; 1970. p. 551-552.
70. Marchetto R, Schreier S, Nakaie CR. A novel spin-labeled amino-acid derivative for use in peptide-synthesis – (9-fluorenylmethoxycarbonyl)-2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-N-oxyl-4-amino-4-carboxylic acid. *Journal of the American Chemical Society*. 1993;115(23):11042-3.
71. Carpino LA, Han GY. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. *Journal of the American Chemical Society*. 1970;92(19):5748-9.
72. Miick SM, Martinez GV, Fiori WR, Todd AP, Millhauser GL. Short alanine-based peptides may form 3(10)-helices and not alpha-helices in aqueous-solution. *Nature*. 1992;359(6396):653-5.
73. Schreier S, Bozelli JC, Marin N, Vieira RF, Nakaie CR. The spin label amino acid TOAC and its uses in studies of peptides: chemical, physicochemical, spectroscopic, and conformational aspects. *Biophysical Reviews*. 2012;4(1):45-66.
74. Wilson EK. A New Spin: Peptide Probes. *Chemical & Engineering News*. 2000;78(22):54-9.
75. Schreier S, Barbosa SR, Casallanovo F, Vieira RDF, Cilli EM, Paiva ACM, Nakaie CR. Conformational basis for the biological activity of TOAC-labeled angiotensin II and bradykinin: electron paramagnetic resonance, circular dichroism, and fluorescence studies. *Biopolymers*. 2004;74(5):389-402.
76. Nakaie CR, Silva EG, Cilli EM, Marchetto R, Schreier S, Paiva TB, Paiva ACM. Synthesis and pharmacological properties of TOAC-labeled angiotensin and bradykinin analogs. *Peptides*. 2002;23:65-70.
77. Nakaie CR, Silva EG, Cilli EM, Marchetto R, Carvalho RSH, Jubilut GN, Miranda A, Tominaga M, Schreier S, Paiva TB, Paiva ACM, et al. Synthesis and biological activity of angiotensin II and bradykinin analogues containing the Toac spin label. In: Rodgers R, Epton R, editors. *Peptides*. Birmingham: Mayflower Scientific; 1998. p. 673-4.
78. Barbosa SR, Cilli EM, Lamy-Freund MT, Castrucci AML, Nakaie CR. First synthesis of a fully active spin-labeled peptide hormone. *FEBS Letters*. 1999;446(1):45-8.
79. Vieira RFF, Casallanovo F, Cilli EM, Paiva ACM, Schreier S, Nakaie CR. Conformational studies of TOAC-labeled bradykinin analogues in model membranes. *Letters in Peptide Science*. 2002;9(2-3):83-9.
80. Vieira RF, Casallanovo F, Marin N, Paiva AC, Schreier S, Nakaie CR. Conformational properties of angiotensin II and its active and inactive TOAC-labeled analogs in the presence of micelles. Electron paramagnetic resonance, fluorescence, and circular dichroism studies. *Biopolymers*. 2009;92(6):525-37.
81. Vaudry H. The Melanotropic Peptides. In: Bagnara JT, editor. *General and Comparative Endocrinology*. New York: Academic Press, 1994. p. 294.

82. Sawyer TK, Sanfilippo PJ, Hruby VJ, Engel MH, Heward CB, Burnett JB, Hadley ME. 4-Norleucine, 7-D-phenylalanine- $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone – a highly potent  $\alpha$ -melanotropin with ultralong biological-activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*. 1980;77(10):5754-8.
83. Fernandez RM, Vieira RF, Nakaie CR, Ito AS, Lamy MT. Peptide-lipid interaction monitored by spin labeled biologically active melanocortin peptides. *Peptides*. 2005;26(10):1825-34.
84. Bettio A, Gutewort V, Poppl A, Dinger MC, Zschorning O, Arnold K, Toniolo C, Beck-Sickinger AG. Electron paramagnetic resonance backbone dynamics studies on spin-labelled neuropeptides Y analogues. *Journal of Peptide Science*. 2002;8(12):671-82.
85. Shafer AM, Nakaie CR, Deupi X, Bennett VJ, Voss JC. Characterization of a conformationally sensitive TOAC spin-labeled substance P. *Peptides*. 2008;29(11):1919-29.
86. Moraes LGM, Fazio MA, Vieira RFF, Nakaie CR, Miranda MTM, Schreier S, Daffre S, Miranda A. Conformational and functional studies of gomesin analogues by CD, EPR and fluorescence spectroscopies. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007;1768(1):52-8.
87. Vicente EF, Basso LGM, Cespedes GF, Lorenzon EN, Castro MS, Mendes-Giannini MJS, Costa AJ, Cilli EM. Dynamics and conformational studies of TOAC spin labeled analogues of Ctx(Ile(21))-Ha peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. *Plos One*. 2013;8(4):e60818.
88. Smythe ML, Nakaie CR, Marshall GR. Alpha-helical versus 3(10)-helical conformation of alanine-based peptides in aqueous-solution – an electron-spin-resonance investigation. *Journal of the American Chemical Society*. 1995;117 (42):10555-62.
89. Toniolo C, Crisma M, Formaggio F. TOAC, a nitroxide spin-labeled, achiral C( $\alpha$ )-tetrasubstituted  $\alpha$ -amino acid, is an excellent tool in material science and biochemistry. *Biopolymers*. 1998;47(2):153-8.
90. McNulty JC, Silapie JL, Carnevali M, Farrar CT, Griffin RG, Formaggio F, Crisma M, Toniolo C, Millhauser GL. Electron spin resonance of TOAC labeled peptides: folding transitions and high frequency spectroscopy. *Biopolymers*. 2000;55(6):479-85.
91. Pispisa B, Mazzuca C, Palleschi A, Stella L, Venanzi M, Formaggio F, Toniolo C, Mazaleyra JP, Wakselman M. Spectroscopic properties and conformational features of short linear peptides in solution: A fluorescence and molecular mechanics investigation. *Journal of Fluorescence*. 2003;13(2):139-47.
92. Toniolo C, Valente E, Formaggio F, Crisma M, Pilloni G, Corvaja C, Toffoletti A, Martinez GV, Hanson MP, Millhauser GL. Synthesis and conformational studies of peptides containing TOAC, a spin-labelled C  $\alpha$ ,  $\alpha$ -disubstituted glycine. *Journal of Peptide Science*. 1995;1(1):45-57.

93. Marsh D. Orientation of TOAC amino-acid spin labels in alpha-helices and beta-strands. *Journal of Magnetic Resonance*. 2006;180(2):305-10.
94. Pertinhez TA, Nakaie CR, Paiva AC, Schreier S. Spin-labeled extracellular loop from a seven-transmembrane helix receptor: studies in solution and interaction with model membranes. *Biopolymers*. 1997;42(7):821-9.
95. Milov AD, Samoilova RI, Tsvetkov YD, De Zotti M, Formaggio F, Toniolo C, Handgraaf JW, Raap J. Structure of self-aggregated alamethicin in EPC membranes detected by pulsed electron-electron double resonance and electron spin echo envelope modulation spectroscopies. *Biophysical Journal*. 2009;96(8):3197-3209.
96. Lopes DD, Vieira RFF, Malavolta L, Poletti EF, Shimuta SI, Paiva ACM, Schreier S, Oliveira L, Nakaie CR. Short peptide constructs mimic agonist sites of AT(1)R and BK receptors. *Amino Acids*. 2013; 44 (3): 835-846.
97. Lopes DD, Poletti EF, Vieira RFF, Jubilut GN, Oliveira L, Paiva ACM, Schreier S, Nakaie CR. A proposed EPR approach to evaluating agonist binding site of a peptide receptor. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2008;14(2):121-6.
98. van Eps N, Anderson LL, Kisselev OG, Baranski TJ, Hubbell WL, Marshall GR. Electron paramagnetic resonance studies of functionally active, nitroxide spin-labeled peptide analogues of the C-terminus of a G-protein alpha subunit. *Biochemistry*. 2010;49(32):6877-86.
99. de Deus Teixeira LG, Bersanetti PA, Schreier S, Carmona AK, Nakaie CR. Analogues containing the paramagnetic amino acid TOAC as substrates for angiotensin I-converting enzyme. *FEBS Lett*. 2007;581(13):2411-5.
100. Tominaga M, Barbosa SR, Poletti EF, Zukerman-Schpector J, Marchetto R, Schreier S, Paiva ACMM, Nakaie CR. Fmoc-POAC: [(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-N-oxyl-3-amino-4-carboxylic acid]: A novel protected spin labeled beta-amino acid for peptide and protein chemistry. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2001;49(8):1027-9.
101. Wright K, Formaggio F, Toniolo C, Torok R, Peter A, Wakselman M, Mazaleyra JP. First access to the spin-labelled beta-amino acid POAC in an enantiopure state by resolution through its binaphthyl esters. *Tetrahedron Letters*. 2003;44(22):4183-6.
102. Wright K, Dutot L, Wakselman M, Mazaleyra JP, Crisma M, Formaggio F, Toniolo C. Synthesis, resolution and assignment of absolute configuration of trans 3-amino-1-oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-4-carboxylic acid (POAC), a cyclic, spin-labelled beta-amino acid. *Tetrahedron*. 2008;64(19):4416-26.
103. Vieira JPF, Poletti EF, Vieira RFF, Veredas V, Santana CC, Nakaie CR. Alternative and simple normal-phase HPLC enantioseparation of a chiral amino acid-type spin label derivative. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2013;24(11):1840-5.

104. Cilli EM, Vicente EF, Crusca E, Nakaie CR. EPR investigation of the influence of side chain protecting groups on peptide-resin solvation of the Asx and Glx model containing peptides. *Tetrahedron Letters*. 2007;48(31):5521-4.
105. Warrass R, Wieruszkeski JM, Boutillon C, Lippens G. High-resolution magic angle spinning NMR study of resin-bound polyalanine peptides. *Journal of the American Chemical Society*. 2000;122(8):1789-95.
106. Valente AP, Almeida FCL, Nakaie CR, Schreier S, Crusca E, Cilli EM. Study of the effect of the peptide loading and solvent system in SPPS by HRMAS-NMR. *Journal of Peptide Science*. 2005;11(9):556-63.
107. Pillai VNR, Mutter M. Conformational studies of poly(oxyethylene)-bound peptides and protein sequences. *Accounts of Chemical Research*. 1981;14(4):122-30.
108. Vaino AR, Goodin DB, Janda KD. Investigating resins for solid phase organic synthesis: The relationship between swelling and microenvironment as probed by EPR and fluorescence spectroscopy. *Journal of Combinatorial Chemistry*. 2000;2(4):330-6.
109. Yan B. Monitoring the progress and the yield of solid phase organic reactions directly on resin supports. *Accounts of Chemical Research*. 1998;621-630.
110. Cespedes GF, Vicente EF, Cilli EM, Jubilut GN, Nakaie CR. Use of FTIR in the obtention of resins and peptides synthesis in solid phase. *Química Nova*. 2011;34(4):589-94.

