

QUÍMICA DE PEPTÍDEOS: UMA BREVE REVISÃO DOS PROCESSOS DE SÍNTESE

Luiz Juliano

Escola Paulista de Medicina – Departamento de Biofísica – Rua Três de Maio, 100, 04044, São Paulo, S.P.

Recebido em 20/01/90

Apresentamos nesta revisão um relato resumido da evolução da síntese química de peptídeos e proteínas, uma saga de químicos e biólogos, que tem mais de um século de duração mas, ainda continua nos encantando e desafiando.

Há basicamente quatro métodos gerais de síntese de peptídeos: a) *Síntese em solução*, ou clássica, onde se utilizam os métodos e técnicas convencionais da síntese orgânica, b) *Síntese em fase sólida*, onde o peptídeo é feito crescer preso numa matriz insolúvel e no final liberado da mesma, c) *Síntese enzimática*, onde enzimas proteolíticas, em condições muito específicas, estabelecem ligações peptídicas em vez de hidrolizá-las, d) *Síntese por DNA recombinante*, empregado principalmente para proteínas ou grandes peptídeos.

A contribuição dos químicos, em particular dos especialistas em química orgânica, tem na síntese de peptídeos perspectivas de trabalho muito atraentes. Somente para citar alguns exemplos, a introdução de aminoácidos modificados, as alterações da ligação peptídica e a modelagem molecular computadorizada a partir de dados físico-químicos e biológicos, tem permitido o desenvolvimento de novos medicamentos, principalmente na área de hormônios, vacinas, inibidores de enzimas proteolíticas e ainda, de aditivos alimentares como os adoçantes e salificantes artificiais.

Esta revisão apresenta síntese química de peptídeos tentando obedecer o mais possível um critério cronológico de sua evolução. Incluímos a título de exemplo, a descrição desenvolvida em nossos laboratórios da síntese e purificação da ocitocina, um nonapeptídeo liberado pelo lobo posterior da hipófise de mamíferos que age no útero durante o parto e nas glândulas mamárias provocando ejeção do leite.

1. HISTÓRICO

Há mais de 250 anos, Jacopo Bartolomeo Beccari¹, um estudioso italiano, obteve da farinha de trigo, o primeiro preparado de uma substância proteica, o glúten. A destilação pirogênica desta substância mostrou a presença de produtos alcalinos. Estes resultados foram publicados em 1745, constituindo-se no primeiro artigo conhecido sobre proteínas. No século XVIII e princípio do século XIX várias outras substâncias de caráter proteico, de proveniência animal e vegetal, foram descritas. Estes trabalhos tinham como objetivo a procura de semelhanças entre elas e a comparação com substâncias inorgânicas. É importante ressaltar que já nesta época, mesmo antes do aparecimento da análise elementar,

havia se formado a idéia de que estas substâncias, obtidas tanto dos vegetais como dos animais, tinham propriedades semelhantes.

John Dalton, entre 1808-1810, foi o primeiro a tentar fórmulas estruturais das substâncias proteicas. No entanto, ao longo do século XIX, mesmo com a disponibilidade de dados da composição elementar, pouco foi acrescentado sobre a estrutura e propriedade destas substâncias.

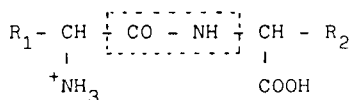
Em meados do século XIX já havia várias demonstrações que, sob a ação de fermentos digestivos (enzimas), as substâncias proteicas se dissociavam em fragmentos, os quais foram denominados peptonas. Foi evidenciado também que entre os produtos formados havia substâncias que não sofriam ação posterior dos fermentos digestivos. Parte das peptonas foi caracterizada como tal, porém outra parte foi demonstrada ser aminoácidos, uma classe de substâncias cuja identificação havia sido iniciada no princípio do século XIX.

A origem da química dos aminoácidos está marcada por três achados. a) Em 1806 Vauquelin e Robiquet² isolaram a asparagina do suco de aspargo, vindo a receber este nome 20 anos depois³. b) Em 1810, Wollaston⁴ descreveu um composto isolado de dois cálculos renais, e pelas suas características de oxidação e por ter se acumulado na bexiga urinária, foi denominado "óxido cístico", e somente muitos anos depois foi caracterizado como cisteína⁵. c) Em 1820 a glicina foi isolada por Braconnot⁶ a partir da gelatina, sendo o primeiro aminoácido a ser obtido por hidrólise ácida de uma proteína; devido ao seu caráter adocicado foi denominado de "sucre de gélatine" e, posteriormente, glicina.

A maioria dos aminoácidos foi descrita a partir da segunda metade do século XIX e início do século XX, assim como as suas propriedades físicas e químicas. Apesar de toda a massa de informações disponíveis até o final do século XIX, as proteínas eram consideradas substâncias de formação complexa, de estrutura desconhecida.

Nesta época, Emil Fischer, já com suas contribuições fundamentais no campo das purinas e na elucidação da estrutura dos açúcares, que lhe valeram o segundo Prêmio Nobel da história da química, passou a estudar as proteínas. A partir das informações disponíveis e principalmente, de posições metodológicas bem fundadas, E. Fischer adotou como hipótese mais provável que as proteínas eram constituídas de aminoácidos unidos uns aos outros por ligações amida as quais foram denominadas *ligações peptídicas* (I).

(I)



Esta hipótese da estrutura das proteínas por E. Fischer e seus colaboradores foi baseada na: a) determinação qualitativa e quantitativa dos produtos de hidrólise completa das proteínas; b) elucidação da estrutura destes produtos; c) síntese de polímeros de aminoácidos contendo as ligações amidas; d) comparação das propriedades destas substâncias sintéticas com as das proteínas ou de seus produtos de degradação.

Este trabalho constitui-se num marco histórico para química, no entanto a individualidade química e biológica, assim como a grande diversidade das proteínas pôde ser estabelecida somente com o advento da determinação da seqüência dos aminoácidos constituintes.

As primeiras determinações de estrutura e síntese de peptídeos de importância biológica ocorreram em 1935: glutatona⁷ e carnosina⁸. Após a II Guerra Mundial, com o advento e aperfeiçoamento de métodos, hoje clássicos, de purificação e degradação de proteínas e análise de aminoácidos, permitindo o sequenciamento, foi possível a determinação da estrutura da primeira proteína, a insulina, por Sanger a partir de 1945 levando à elucidação completa das suas cadeias, incluindo a posição das pontes de dissulfeto, em 1955⁹. Em 1953, du Vigneaud e cols.,¹⁰ e, independentemente, Tuppy e Michl¹¹ elucidaram a estrutura da ocitocina, hormônio polipeptídico do lobo posterior da hipófise, cuja síntese foi feita pelo grupo de du Vigneaud¹². Foi a partir desta época que se multiplicaram as determinações de estrutura e síntese do grande número de peptídeos com atividade biológica.

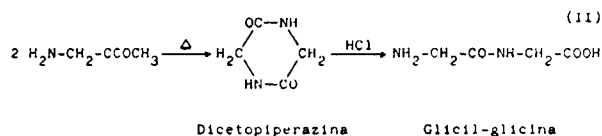
Todas as sínteses eram feitas em solução até 1963 quando, Merrifield¹³ publicou o seu trabalho clássico sobre síntese de peptídeos em fase sólida que utiliza uma matriz (resina) insolúvel à qual se liga o aminoácido C-terminal adicionando-se sucessivamente os outros aminoácidos, sendo que apenas no final da síntese o peptídeo desejado é retirado da resina.

Além dos dois métodos mencionados, existem ainda a síntese enzimática de peptídeos e aquela que utiliza DNA recombinante. A primeira se vale do reverso da hidrólise catalisada por proteases, deslocando o equilíbrio da reação para a formação de ligação peptídica a partir dos componentes utilizando para isso vários mecanismos. A síntese por métodos de DNA recombinante combina a biologia dos plasmídios bacterianos à bioquímica das enzimas de processamento de DNA¹⁴.

2. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS SEM REMOÇÃO OU SEM UTILIZAÇÃO DE GRUPOS PROTETORES

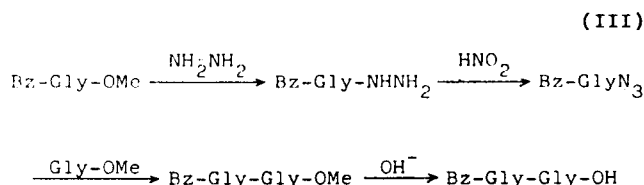
Em 1883 Curtius¹⁵ notou que o éster etílico da glicina transformava-se espontaneamente em "anidrido de glicina" (dicetopiperazina), numa substância que dava teste de biureto positivo. Posteriormente Curtius¹⁶ demonstrou que na ausência de água havia amplo favorecimento da formação de substância biureto-positiva, identificada como sendo o éster etílico da tetraglicina. Frankel e Katchalski¹⁷ em 1942 conseguiram em condições adequadas poliaminoácidos contendo de 20 até 100 resíduos.

A partir das observações de Abenius e Widmark¹⁸ sobre a labilidade de derivados de 2,5-dicetopiperazinas, Fischer e Fournau¹⁹ obtiveram, pela primeira vez, o dipeptídeo livre glicil-glicina pela hidrólise ácida branda da dicetopiperazina (II).

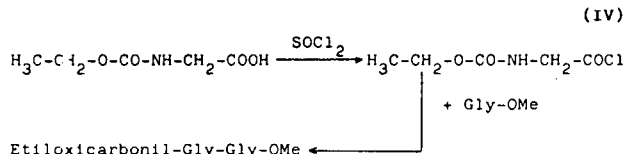


Este método é ainda uma via conveniente para obtenção de glicil-glicina, em vista da facilidade de se obter a dicetopiperazina.

Outro método, que utiliza cloretos e azidas de acilaminoácidos se deve também a Curtius²⁰, que enquanto trabalhava na síntese do ácido hipúrico, observou que um dos produtos da reação de cloreto de benzoila com glicinato de prata era Bz-Gly-Gly. Embora possa ser considerada a primeira descrição bem definida de um derivado de peptídeo, não era um método de aplicação geral. Curtius²¹, após ter descrito a síntese da hidrazina e estudado reações das hidrazidas e azidas, descreveu a azida de benzoilaminoácidos e benzoilpeptídeos. A partir destas azidas chegou a obter até benzoil-heptaglicina²². Este método segue o seguinte esquema geral mostrado em (III).



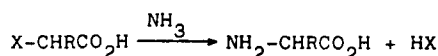
Um ano após Curtius ter descrito o uso de azidas na síntese de peptídeos, Fischer²³ e Fischer e Otto²⁴ obtiveram não só os N-etiloxicarbonilaminoácidos, assim como os correspondentes cloretos de ácido, pelo tratamento com cloreto de tionila. A reação destes cloretos de ácido dos etiloxicarbonilaminoácidos em meio anidro com ésteres de aminoácidos resultava na formação dos peptídeos. É importante ressaltar que já em 1903, E. Fischer²⁵ usava, e foi o primeiro em fazê-lo, o conceito de proteção do α-aminogruppo dos aminoácidos por uretana, a qual é utilizada nas sínteses atuais. Este método segue o seguinte esquema geral mostrado em (IV).



Infelizmente, os grupos benzoila ou etiloxicarbonila não podem ser removidos sem que haja destruição das ligações peptídicas pré-formadas.

A maior entre as inúmeras contribuições importantes de E. Fischer à síntese química de peptídeos foi a introdução dos α-haletos de ácidos carboxílicos, aproveitando-se da reação clássica para síntese de aminoácidos(V).

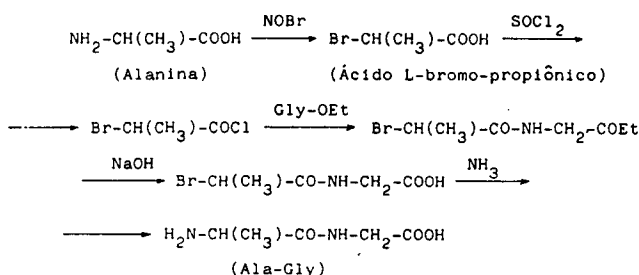
(v)



onde X = Cl ou Br.

O tratamento do α -haleto do ácido carboxílico com pentacloreto de fósforo ou cloreto de tionila gera o correspondente cloreto de acila, o qual pode reagir com o aminogruppo de um aminoácido, peptídeo ou seus respectivos ésteres. O composto formado é tratado com amônia, ocorrendo a substituição do α -haleto pelo α -aminogruppo^{23,24}. O dipeptídeo resultante pode, por sua vez, ser transformado no cloreto de acila correspondente e um novo aminoácido pode ser acrescentado (VI).

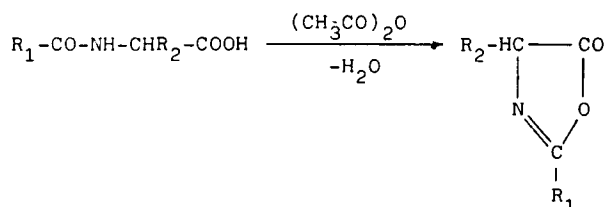
(VI)



A partir deste esquema engenhoso de reação, o qual dispensa as proteções dos α -aminogrupos, pode ser preparada a maioria dos peptídeos sintetizados nas primeiras três décadas do presente século.

É possível a formação de ligações peptídicas não usando cloreto de ácido ou azida de acilaminoácido²⁶ mas *oxazolonas* (*azolactonas*) de *benzilaminoácidos*, obtidos de acilaminoácidos pela eliminação de uma molécula de água, sendo o anidrido acético o desidratante mais utilizado (VII).

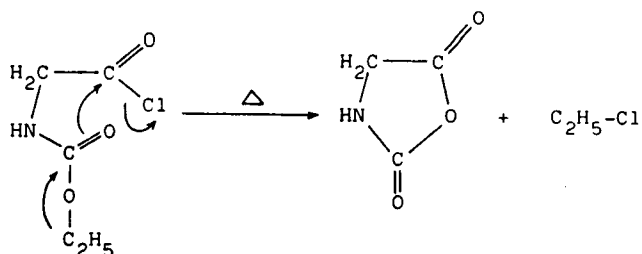
(VII)



A aplicação deste método tomou impulso significativo com os trabalhos de Bergmann e colaboradores²⁷⁻²⁹ sobre síntese de peptídeos contendo fenilalanina e tirosina. As maiores vantagens deste método são a racemização, a instabilidade e a não formação de oxazolona quando a proteção do aminogruppo é do tipo uretana.

As 2,5-oxazolidinodionas podem ser consideradas como anidridos do hipotético ácido carbâmico: $\text{HO}_2\text{C}-\text{NH}-\text{CHR}-\text{CO}_2\text{H}$. Tais compostos são denominados *anidridos de N-carboxiaminoácidos* ou anidridos de Leuchs pelo fato de Leuchs e colaboradores³⁰⁻³² terem demonstrado que os cloretos de alquiloxycarbonilaminoácidos formavam rapidamente os anidridos de N-carboxiaminoácidos. Por exemplo, com a etiloxycarbonil-glicina ocorre como mostrado em (VIII).

(VIII)



O anidrido de Leuchs é também facilmente obtido pela ação de fosgênio sobre soluções ou suspensões de aminoácidos em solventes orgânicos anidros³³.

Os anidridos de N-carboxiaminoácidos, quando tratados com excesso de água, regeneram os aminoácidos, com liberação de CO_2 . No entanto, o tratamento destes anidridos com uma pequena quantidade de um composto nucleofílico iniciador ("primer"), em solvente orgânico, leva à abertura do anel que gera um aminogruppo nucleofílico, que por sua vez ataca nova molécula que se abre formando um novo nucleófilo e assim por diante. Este esquema constitui-se num dos melhores métodos de obtenção de poliaminoácidos³⁴.

Os anidridos de N-carboxiaminoácidos tem sido usados para síntese rápida de dipeptídeos^{35,36}. Esta técnica foi usada de modo intensivo na preparação de fragmentos curtos, na síntese da ribonuclease³⁷. Estes anidridos não tem sido mais extensivamente utilizados devido, possivelmente, à instabilidade do anidrido, aos perigos de sua polimerização e aos cuidados específicos para cada acoplamento³⁸. Uma alternativa tem sido o uso da reação num sistema de dupla-fase (água-solvente orgânico) que parece tornar as condições da reação menos críticas³⁹.

Este processo de síntese, embora necessite para sua execução muita experiência e treinamento, tem sido muito atraente, pois além de apresentar baixo índice de racemização, é rápido, barato e não requer proteção do α -aminogruppo.

3. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS UTILIZANDO GRUPOS PROTETORES REMOVÍVEIS

A união de dois aminoácidos pela formação de uma ligação peptídica, implica a condensação do α -aminogruppo de um aminoácido com a α -carboxila de outro, com eliminação de uma molécula de água. A formação da ligação peptídica pela condensação direta de dois aminoácidos é um processo difícil, não só pela natureza dipolar dos aminoácidos, como pela variação de energia da reação envolvida no processo. Por isso, e pelas dificuldades de síntese que se podem depreender do que já foi descrito, as seguintes etapas devem ser seguidas para acoplamento de aminoácidos com formação da ligação peptídica:

- proteção do α -aminogruppo
- proteção da α -carboxila
- proteção dos grupos funcionais das cadeias laterais dos aminoácidos
- acoplamento
- crescimento da cadeia peptídica
- remoção dos grupos protetores.

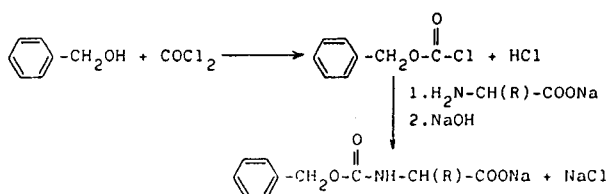
A evolução da síntese de peptídeos necessitou, portanto, de métodos simples de proteção dos grupos funcionais dos aminoácidos assim como métodos delicados para sua remoção,

sem destruir as ligações formadas e os aminoácidos usados. Além disso, foi necessário desenvolver métodos de acoplamento eficientes e que provocassem, o menos possível, reações colaterais.

3.1. PROTEÇÃO DOS α -AMINOGRUPOS

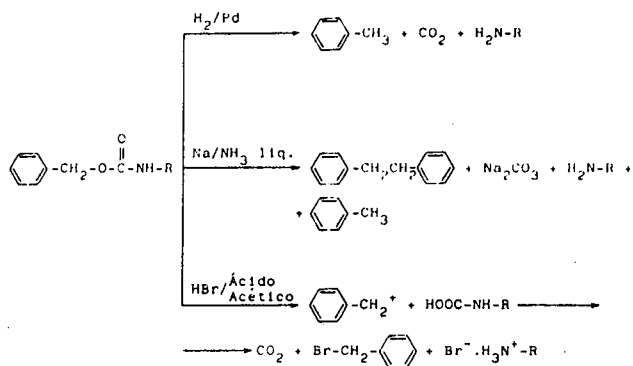
A introdução do grupo benziloxycarbonila ou também denominado carbobenzoila por Bergmann e Zervas⁴⁰, representando o grupo das *uretanas*, e comumente simbolizado pela letra Z em homenagem ao segundo autor, é considerado um marco fundamental na história da síntese de peptídeos. Bergmann e Zervas, impressionados com a rapidez pela qual o grupo benzila era removido das ligações O- e N-benzila por hidrogenação catalítica⁴¹⁻⁴³, prepararam o análogo benzílico do grupo etiloxycarbonila desenvolvido por Fischer²⁵. Estava concebido o extraordinário grupo acil-protetor de aminogrupos. A preparação do agente acilante é bastante fácil, isto é, reação direta de fosgênio com álcool benzílico em tolueno, formando o clorocarbonato de benzila (Z-Cl). Após evaporação do tolueno, pode se fazer reagir diretamente o Z-Cl (IX) com uma solução alcalina de aminoácido (reação tipo Schotten-Baumann). Os derivados de Z-aminoácidos são em geral cristalinos, com exceção da Z-Leu e Z-Ile, e têm baixo índice de racemização.

(IX)



A remoção do grupo Z é feita preferencialmente por hidrogenação catalítica, sob paládio, à pressão atmosférica, dando o peptídeo desejado, CO₂ e tolueno; os dois últimos são de fácil remoção, tornando a desproteção bastante limpa. HBr em ácido acético glacial e sódio em amônia líquida são outros processos de remoção do grupo Z, no entanto, o ácido trifluoroacético, menos agressivo, leva vários dias para completar a reação, necessitando de aquecimento (X).

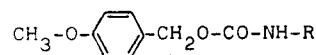
(X)



A introdução de grupos fornecedores de elétrons no radical benzila gera cátions mais estáveis, como por exemplo,

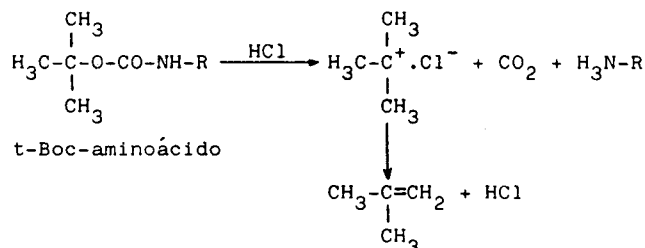
na p-metoxibenziloxycarbonila⁴⁴(XI),

(XI)



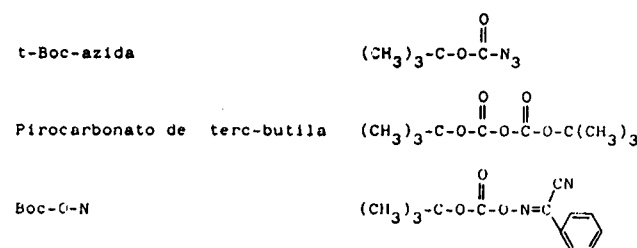
obtendo-se um grupo protetor clivável em condições ácidas mais brandas, tais como HCl diluído em solventes orgânicos ou ácido trifluoroacético a frio. Tal sensibilidade a meios ácidos é também obtida pela substituição do grupo benzila por terc-butila, gerando o cátion terc-butílico, muito mais estável (XII).

(XII)



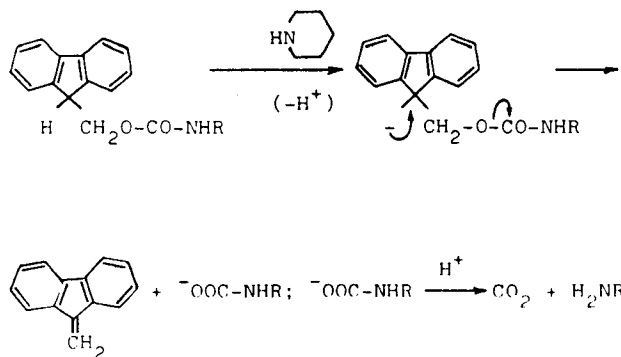
O grupo terc-butiloxycarbonila (t-Boc), descrito por McKay e Albertson⁴⁴ tem sido introduzido nos grupos amino mais frequentemente via t-Boc-azida⁴⁵, pirocarbonato de terc-butila⁴⁶ ou t-Boc-oximino-2-fenilacetnitrila (Boc-ON)⁴⁷ (XIII).

(XIII)



Os grupos Z e t-Boc se complementam, quando se necessita desproteção diferenciada de grupos amino durante a síntese. Assim o grupo t-Boc é resistente à hidrogenólise, à alcali e a sódio em amônia líquida, mas é clivado por ácido trifluoroacético (TFA) a frio e HCl em solvente orgânico. O maior inconveniente durante a desproteção do grupo t-Boc é a formação do cátion terc-butílico que provoca alquilação especialmente no triptofano e metionina⁴⁸. Esta reação é minimizada pelo uso de sequestradores tais como anisol, p-cresol e indol.

Outros grupos protetores do tipo uretana, lábeis a meio alcalino tem tido aplicação crescente na síntese de peptídeos. A remoção destes grupos se faz por mecanismo de β -eliminação, com formação de uma dupla ligação⁴⁹. Por exemplo, a clivagem do grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonila (Fmoc)⁵⁰ se processa da forma mostrada em (XIV).

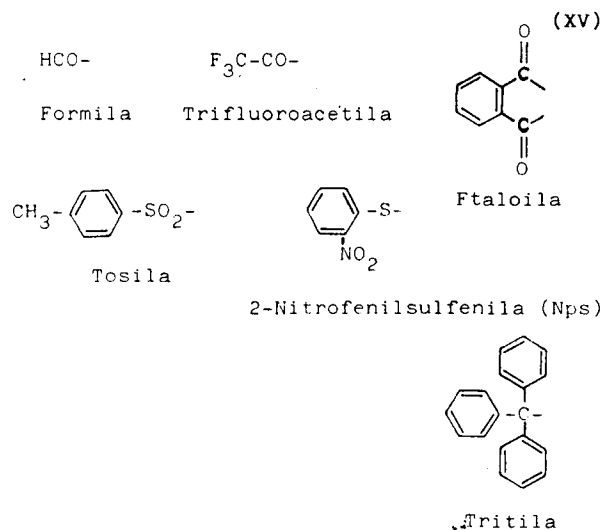


Dentre os grupos protetores *derivados de ácidos carboxílicos*, podemos citar: a) o grupo formila que pode ser removido por HCl/álcool a temperatura ambiente ou por oxidação com H_2O_2 ou por tratamento com hidrazida. b) o grupo trifluoroacetila, introduzido nos aminoácidos por meio de anidrido trifluoroacético⁵¹, podendo ser removido por álcali. c) o grupo ftaloila, facilmente clivável pela ação da hidrazida⁵², é resistente à acidólise, hidrogenólise e ao tratamento alcalino, estando atualmente praticamente em desuso.

Há protetores de aminogrupos derivados de enxofre tais como:

a) 4-toluenosulfonila (tosila), sendo um dos primeiros e mais usados na proteção de aminogrupos; que pode ser removido somente por sódio em amônia líquida, sendo resistente a HBr em ácido acético, HF e hidrogenólise; b) 2-nitrofenilsulfenila (Nps) foi introduzido na síntese de peptídeo por Zervas⁵³, sendo facilmente clivável em meio fracamente ácido, sem atacar o grupo *terc-butila*, ou ainda por tólise⁵⁴, evitando formação do íon sulfênico que ataca o anel indólico do triptofano.

O grupo *trítala* (trifenilmetila) é a única proteção derivado de alquila, importante para a síntese de peptídeos. Esta proteção confere à carboxila significativo impedimento estérico, no entanto tem sido obtidos bons rendimentos nas reações de acoplamento quando se utiliza dicicloexilcarbodiimida na presença ou não de hidroxibenzotriazol⁵⁵. A desproteção é feita por hidrogenação ou, preferencialmente, por ácido fraco⁵⁶(XV).



3.2. PROTEÇÃO DO GRUPO α -CARBOXILA

A síntese de peptídeos sem a proteção do grupo carboxila do componente amínico é em geral, possível na presença de aminas terciárias ou tetrametilguanidina, em meio de dimetilformamida, dioxana ou hexametilsforamida ou ainda numa mistura de um destes solventes e água. Os métodos de acoplamento mais usados para este tipo de reação são o do anidrido misto e do cloreto de ácido, no entanto, o método do éster ativo tem se mostrado mais eficaz⁵⁷. Podem ocorrer reações colaterais no uso do éster ativo, tal como sua hidrólise parcial ou a sua reação com o íon carboxilato formando, neste caso, um anidrido misto^{58,59}.

A proteção do grupo carboxila tem como objetivo aumentar a solubilidade dos reagentes, evitar a reação do carboxilato com os agentes acoplantes ou acilantes e facilitar os processos de isolamento do produto final, aumentando portanto, a eficiência das reações de acoplamento.

Os *ésteres metílico e etílico* foram os primeiros usados na síntese de peptídeos, tendo sido obtidos pela ação direta do HCl sobre o aminoácido em etanol ou metanol absoluto. Para os ésteres metílicos o método mais conveniente utiliza o cloreto de tionila dissolvido em metanol. Dymocky e cols.⁶⁰ desenvolveram método de preparação de ésteres por destilação azeotrópica.

A desproteção do grupo carboxila é feita por hidrólise alcalina branda em solvente orgânico. Pode porém, ocorrer racemização e outras reações colaterais, principalmente em peptídeos contendo serina com a hidroxila livre^{61,62}. Pelo tratamento com hidrazina dos ésteres metílicos e etílicos se obtém facilmente a hidrazida, de grande utilidade na síntese de peptídeos.

Bergmann e cols.⁶³ introduziram na síntese de peptídeos, além do grupo benziloxycarbonila, o éster benzílico, cuja grande vantagem é a sua remoção por hidrogenação catalítica. O grupo benzila pode ser removido também por HBr em ácido acético glacial, mas requer um tratamento prolongado. No entanto, uma alternativa de desproteção muito útil é a possibilidade da redução do éster benzílico por sódio em amônia líquida⁶⁴.

A labilidade do éster benzílico ao HBr em ácido acético, embora menor que a do grupo Z na proteção do grupo amina, torna problemático o uso simultâneo de ambos os protetores nas sínteses em que o tratamento ácido deve ser repetido várias vezes. O éster *p-nitrobenzílico* foi demonstrado ser mais resistente ao HBr^{65,66} e também mais facilmente removido por hidrogenólise.

Os ésteres benzílicos podem ser obtidos a partir de aminoácidos com o grupo amina protegido. Neste caso, dois processos são os mais usados atualmente: a) refluxo do sal de trietilamina de Z-aminoácido com cloreto de *p-nitrobenzila* em acetato de etila⁶⁵, b) reação do sal de céσιο do aminoácido ou peptídeo protegidos no α -amino grupo com o haleto de alquila em DMF⁶⁷.

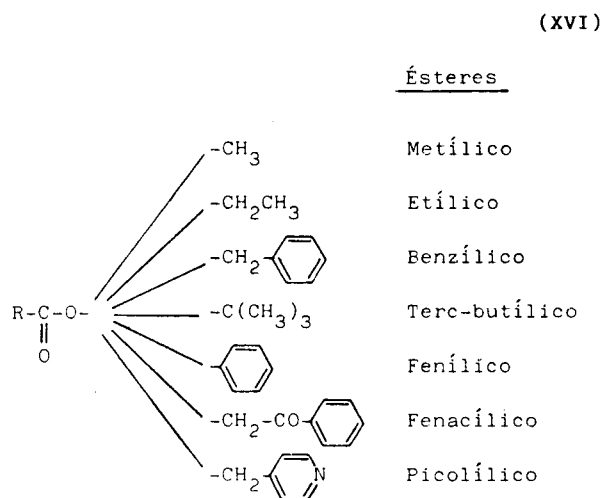
Outro tipo de *ésteres* são os *terc-butílicos* que são clivados em condições ácidas brandas. São particularmente úteis em conjunto com grupos protetores removíveis por hidrogenação (Z, por exemplo). São ainda estáveis durante a desproteção ácida de alguns grupos como Nps e Trt. É interessante notar⁶⁸ que um equivalente de ácido *p-toluenosulfônico* numa mistura éter-etanol cliva a *t-butiloxycarbonila* deixando intato o éster *terc-butílico*.

Os ésteres *terc-butílicos* são resistentes ao ataque de nucleófilos e permanecem intatos ao tratamento alcalino brando,

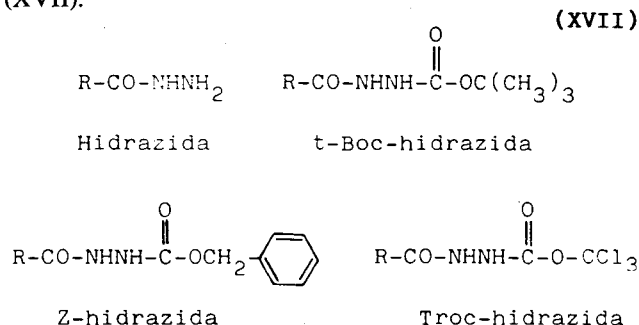
à hidrazida, à amônia e a reagentes similares. Estes ésteres de aminoácidos podem ser destilados e armazenados sem que haja ciclização ou policondensação. São exceções a esta ausência de reatividade as reações intramoleculares dos ésteres terc-butílicos das carboxilas β - do ácido aspártico e γ - do ácido glutâmico. Estes ésteres reagem com os substituintes amínicos da α -carboxila, sejam elas amidas, hidrazidas ou ligação peptídica. Com o ácido aspártico por exemplo, durante o tratamento alcalino brando, ocorre ciclização com formação de aspartimida e subsequente abertura do anel resultando em mistura de α - e β -aspartil-peptídeos⁶⁹.

Os ésteres terc-butílicos são obtidos pela reação do aminoácido livre com isobutileno em dioxana tendo ácido sulfúrico concentrado como catalisador⁶⁹. Quando há problema de solubilidade, como por exemplo com α prolina, usa-se proteger o aminogruppo com o Z, dissolver o aminoácido N-protetido em diclorometano contendo isobutileno e ácido sulfúrico concentrado⁷⁰.

Há ainda outros tipos de ésteres utilizados na síntese de peptídeos como por exemplo: ésteres fenílicos, empregados com sucesso nas sínteses do fragmento 1-75 de um análogo de lisozima⁷¹, 4-picolilésteres e fenacilésteres que permitem desproteção por tiólise, deixando intatos os grupos Z, t-Boc e ésteres benzílicos⁷²(XVI).



As hidrazidas de acilaminoácidos ou peptídeos são intermediários clássicos na síntese de peptídeos via azidas, e a carboxila pode ser regenerada por reações oxidativas⁷³. Os aminogrupos nas hidrazidas não são extremamente reativos, permitindo o aumento da cadeia peptídica pelo método dos ésteres ativos⁷⁴. A prática mais geral é usar hidrazidas protegidas pelos grupos Z⁷⁵, t-Boc⁷⁶ e tricloroetoxicarbonila (Troc)⁷⁷ (XVII).



3.3. PROTEÇÕES DOS GRUPOS FUNCIONAIS DAS CADEIAS LATERAIS E REAÇÕES COLATERAIS

O desenvolvimento da síntese de peptídeos está, como vimos acima, intimamente ligado ao emprego de grupos protetores dos grupos funcionais dos aminoácidos, de tal modo que suportem as condições de síntese, e possam ser removidas sem causar dano aos aminoácidos e às ligações peptídicas formadas. Entre os 20 aminoácidos naturais, 7 tem cadeias laterais que não necessitam de qualquer proteção (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro), 9 tem cadeias laterais cuja proteção é facultativa (Arg, Tyr, Ser, Thr, His, Gln, Asn, Met, Trp), 2 aminoácidos tem cadeias laterais que em algumas situações dispensam proteção (Asp, Glu) e, finalmente, em 2 aminoácidos a proteção é obrigatória (Lys, Cys).

Na síntese de peptídeos em solução, especialmente para aqueles de cadeia longa, existem dois princípios gerais na elaboração da estratégia de síntese, isto é, o da proteção mínima e o da proteção máxima. A proteção mínima é usada quando há previsão de que a desproteção não venha a ser completa ou que possam ocorrer reações colaterais durante este processo. Este tipo de estratégia é particularmente usado na síntese por condensação de fragmentos, e pressupõe que os eventuais produtos colaterais, obtidos na síntese de fragmentos contendo Ser, Thr, His, Arg, possam ser removidos por cuidadosa purificação. Por outro lado, quando se adota a proteção máxima, todos os grupos funcionais são bloqueados para evitar, o mais possível, qualquer reação colateral. Este tipo de procedimento é usado nas sínteses nas quais cada resíduo é acoplado individualmente na seqüência, tal como ocorre na síntese em fase sólida e nas estratégias, em solução, de acoplamento seriado, isto é, um aminoácido após o outro.

Exemplos de uso de proteção mínima são as sínteses do fragmento proteico da ribonuclease-S⁷⁷ e dos fragmentos da ribonuclease-T₁⁷⁸. Proteção total na síntese de peptídeos em solução foi usado, por exemplo, nas sínteses da secretina⁷⁹ e insulina⁸⁰.

Descreveremos a seguir, de maneira sumária, as proteções mais usuais das cadeias laterais dos aminoácidos usados na síntese de peptídeos e as reações colaterais mais freqüentes que ocorrem com cada um dos aminoácidos naturais.

a) *Lisina* – possui o ξ -aminogruppo da cadeia muito semelhante ao α -aminogruppo, e todos os métodos de proteção deste podem ser utilizados. Quando a lisina não é o resíduo N-terminal, há necessidade de diferenciar as proteções do α - e ξ -aminogrupos. Esta proteção diferencial é obtida preparando-se um complexo de Cu⁺⁺, que envolvendo os grupos α -amino e carboxila deixa o ξ -aminogruppo livre para proteção. O Cu⁺⁺ é removido e o α -aminogruppo é então protegido. A combinação BocN ^{α} -ZN ^{ξ} -Lys é muito usada quando a desproteção é feita por acidólise. Entretanto nas sínteses seriadas onde há muitas destas etapas pode haver perda significativa do grupo Z⁸¹. A introdução de substituintes sorvedores de elétrons no anel aromático do grupo Z aumenta a resistência à acidólise, assim BocN ^{α} -[2-cloro]-ZN ^{ξ} -Lys é a forma, atualmente usada, para incorporar Lys em síntese seriadas com acidólise⁸².

b) *Cisteína* – é praticamente impossível a síntese de peptídeos contendo cisteína mantendo-se o grupo SH livre, pois tendo um forte caráter nucleofílico é facilmente

acilado nas reações de acoplamento ou é alquilado nas reações acidolíticas de desproteção. Além disso, o grupo SH é facilmente oxidado pelo ar, formando dissulfetos, e pode ainda se ligar ao grupo indol do triptofano. Há um número considerável de grupos protetores descritos, assim como de condições para desproteção, sendo possível estabelecer, inequivocamente, mais de uma ponte dissulfeto numa mesma molécula de peptídeo. O assunto tem sido amplamente revisado⁸³⁻⁸⁵.

O grupo benzila⁸ é ainda usado apesar das reações colaterais na sua remoção sendo a mais indicada o sódio em amônia líquida. Derivados deste grupo protetor, contendo radicais doadores de elétrons no anel aromático, como a p-metoxibenzila⁸⁶ e a 4-metilbenzila⁸² são removidos por HF à 0°C. Outros grupos tem sido usados como a trifenilmetila, acetamidometila e acila. A transferência S → N do grupo acila, é no entanto a grande desvantagem da proteção do grupo SH por grupos acila.

- c) *Ácidos Aspártico e Glutâmico* – pelo fato de serem ácidos dicarboxílicos, necessitam na maioria das vezes proteção da carboxila lateral durante toda a síntese. Os ésteres mais usados são os benzílicos, terc-butílico e cicloexílico.

Os primeiros são de obtenção mais fácil^{87,88}. Os outros envolvem vários passos, incluindo a proteção do aminogruppo com Z e da α-carboxila por éster benzílico, ou melhor p-NO₂-benzílico e posterior hidrogenólise. Na desproteção dos ésteres destes aminoácidos há ocorrência de várias reações colaterais, entre elas a formação de aspartimida e resíduo β-aspartil em vez da ligação peptídica normal. Para evitar estas reações na desproteção com HF, usa-se tempo reduzido da ação do HF, baixa temperatura ou técnica de "low HF"⁸⁹.

- d) *Asparagina e Glutamina* – não necessitam estritamente de proteção da amida na cadeia lateral. Para evitar a formação de nitrila na cadeia por desidratação da amida, durante ativação da carboxila, utilizam-se os ésteres nitrofenílicos⁹⁰ ou dicitloexilcarbodiimida (DCCI) em presença de hidroxibenzotriazol (HOBt).
- e) *Arginina* – o grupo guanidino da arginina é fortemente básico (pK ≈ 12,5) e nas condições de formação da ligação peptídica ele está protonado não necessitando, portanto, de proteção⁹¹. No entanto, a baixa solubilidade em solvente orgânico dos peptídeos com o grupo guanidino livre, e a forte tendência de formar lactama, fazem com se prefira utilizar este grupo protegido.

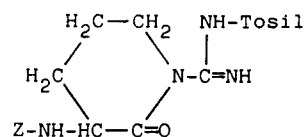
A nitroarginina foi introduzida em 1934 na síntese de peptídeos por Bergmann e cols.⁶³. A proteção pelo nitrogrupo não é completa, o que explica a possibilidade de obter peptídeos contendo nitroarginina somente após o desenvolvimento de métodos mais suaves de acoplamento, tal como o do anidrido misto⁹². A remoção do nitrogrupo pode ser feita por processos redutivos, como a hidrogenação catalítica. A eficácia deste processo é seqüência-dependente e os resultados são bons somente para peptídeos pequenos. HF anidro remove o nitrogrupo a 0°C em 30 min, embora possa formar ornitina⁹³.

Schwyzler e Li⁹⁴ introduziram o grupo tosila, que desde então tem sido o mais amplamente utilizado. Os grupos p-metoxibenzenosulfonila⁹⁵ e mesitileno-2-sulfonila⁹⁶ tem sido alternativas da mesma família de protetores do grupo guanidino. O grupo tosila é resistente a

HBr-ácido acético, TFA e hidrogenólise, sendo removido por HF 0°C, 1 h ou sódio em amônia líquida.

Todos estes tipos de proteção do grupo guanidino não são capazes, no entanto, de evitar a formação de lactama, cuja estrutura é mostrada em (XVIII) para o derivado da Z-Arg(Tos)-OH.

(XVIII)



Esta reação colateral diminui o rendimento dos acoplamentos e para as sínteses em solução requer purificação por cromatografia dos peptídeos solúveis nos solventes orgânicos de processamento das sínteses^{97,98}.

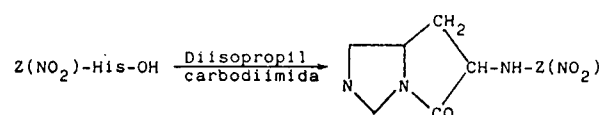
- f) *Tirosina* – tem sido usada na forma desprotegida embora possa ocorrer a acilação de sua hidroxila fenólica nas várias etapas de acoplamento se este for feito em pH alto e com largo excesso do componente acilante. O éter benzílico tem sido a proteção mais usada para a tirosina, podendo ser removido por hidrogenação catalítica ou acidólise (HF ou HBr-ácido acético). Há entretanto, a possibilidade da migração durante a acidólise do radical benzila para a posição 3 da fenoxila da tirosina, provocando alquilação irreversível⁹⁹, cuja incidência pode ser reduzida pela introdução de halógenos no grupo protetor, por exemplo 2,6-diclorobenzila¹⁰⁰.

Outros grupos protetores usados na proteção da tirosina incluem benziloxicarbonila e éter terc-butílico.

- g) *Serina e Treonina* – na síntese de peptídeos como componente amínico não necessitam de proteção, embora como componente carboxílico podem levar a reações indesejáveis conforme o método de acoplamento empregado. As proteções mais usadas são os ésteres benzílico e terc-butílico os quais são removidos por acidólise. A saponificação de peptídeos contendo Ser ou Thr deve ser feita cuidadosamente pois excesso de base pode levar à formação de deidroaminoácido¹⁰¹. Em meio fortemente ácido, tal como HF anidro, ocorre a migração N → O da acila¹⁰², sendo revertida por tratamento alcalino brando.
- h) *Histidina* – a síntese de peptídeos contendo o anel imidazólico desprotegido tem sido feita com facilidade, desde que não seja o resíduo C-terminal. A ativação do grupo carboxila da histidina pode levar a várias reações colaterais, das quais ressaltamos:

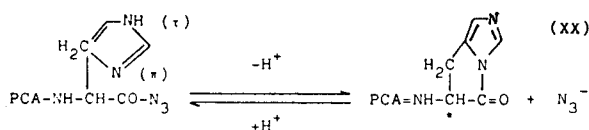
a) Formação de produtos cíclicos envolvendo o anel, tal como observaram Sheehan e cols.¹⁰³ (XIX).

(XIX)



b) A dicioxetilcarbodiimida pode reagir com o anel imidazólico formando com o nitrogênio um derivado amidínico, cuja formação é catalisada por hidroxibenzo-triazol. Esta reação é revertida pelo tratamento do peptídeo com metanol contendo ácido acético ou cloreto de piridina¹⁰⁴.

c) Racemização da histidina ocorre com certa facilidade, especialmente quando o anel imidazólico está livre, sendo provavelmente conseqüência da sua basicidade¹⁰⁵. O método da azida permite a ativação da histidina sem a proteção do anel imidazólico¹⁰⁶, no entanto, Veber¹⁰⁷ mostrou intensa racemização da histidina no acoplamento de PCA-His-N₃ ao pipercolato de metila, na síntese de análogo do fator liberador de tirotrófina. Esta racemização é catalisada por base e implica na reação reversível da azida com o nitrogênio pros (π) do anel, formando um conjunto cíclico, onde o hidrogênio do carbono α pode sair com maior facilidade (XX).



C - Carbono α

Há várias proteções descritas para o anel imidazólico, na expectativa de que os grupos sorvedores de elétrons diminuam a incidência de racemização. No entanto, a experiência tem mostrado que somente o bloqueio do nitrogênio pros (π) evita a racemização e a maioria das proteções descritas protegem o nitrogênio telos (τ) do anel. Relacionamos a seguir os grupos protetores mais utilizados e estudados:

a) Benzila (Bzl): foi introduzido por du Vigneaud e Behrens¹⁰⁸ tratando a histidina com cloreto de benzila em amônia líquida na presença de sódio. A desproteção é feita por sódio em amônia líquida ou hidrogenação catalítica, sendo que este último procedimento tem eficácia duvidosa.

b) Tritila (Trt): foi descrito por Zervas e Theodoropoulos¹⁰⁹ e o derivado Boc-His(Trt)-OH foi obtido por Losse e Krychowski¹¹⁰. A proteção é estável às reações de acoplamento, acidólise e é removida por meios redutivos como hidrogenação, zinco em ácido acético.

c) Uretanas: Z-His(Z)-OH¹¹¹ é instável, formando Z-His-OH quando armazenada, e o grupo imidazólico é desprotegido especificamente com ácido acético a quente. Boc-His(Boc)-OH⁹³ tem sido usada para proteção temporária do anel, uma vez que ambos os grupos t-Boc são removidos em condições ácidas, embora o tratamento alcalino remova especificamente o t-Boc do anel.

d) 2,4-Dinitrofenila (DNP): Z-His(DNP)-OH foi descrito por Siepmann e Zahn¹¹² e Boc-His(DNP) por Chillemi e Merrifield¹¹³. Esta proteção é resistente a TFA, e HBr-ácido acético, sendo removida por tiólise em pH 7-8.

e) Tosila (Tos): Boc-His(Tos)-OH foi descrita por Sakakibara e Fujii¹¹⁴, é resistente às condições de acoplamento usuais, à hidrogenação e à acidólise por TFA, sendo parcialmente resistente a HBr-ácido acético. É

removida por HF, hidrazida, HOBt, e cloridrato de piridina.

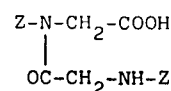
f) Benziloximetila (Bom): Boc-His(π Bom)-OH foi descrita por Brown e cols.¹¹⁵, onde o nitrogênio π é especificamente bloqueado. É resistente à TFA, à base e é removida por hidrogenação catalítica ou HBr em TFA.

i) *Triptofano* - a sua introdução não tem mostrado dificuldades, mas a facilidade com que se oxida e a suscetibilidade à alquilação em meio ácido recomendam o uso de atmosfera inerte, ácidos muito puros e substâncias receptoras de radicais livres. A proteção mais usada para o aminogruppo indólico é a formila, mas a sua remoção também pode levar a reações colaterais.

j) *Metionina* - em geral não apresenta problemas mas durante os processos de desproteção durante a síntese podem ocorrer alquilação do enxofre (acidólise) ou envenenamento do catalisador (hidrogenação catalítica), além de oxidação do SH com formação de sulfóxido. Pode também ocorrer a transformação irreversível de metionina em S-benzil-homocisteína nas reações de desproteção acidolítica envolvendo grupos benzila¹¹⁶. Uma forma de proteger a cadeia lateral é sua transformação em sulfóxido porém tem a desvantagem da diminuição da solubilidade do peptídeo em solventes orgânicos e dificuldade na sua redução.

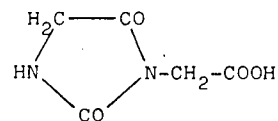
k) *Glicina* - é o aminoácido mais simples, no entanto devido à ausência da cadeia lateral, o aminogruppo apresenta maior reatividade¹¹⁷. Assim, com muita facilidade ocorre diacilação do aminogruppo ou a formação de hidantoínas, através do ataque de uma carbonila ao aminogruppo, no interior da molécula. Esta última reação é uma possibilidade que deve ser considerada toda vez que peptídeos com glicina na segunda posição da sua seqüência são expostos à ação de bases¹¹⁸. Assim na preparação de Z-Gly-Gly podem resultar em diacilação (XXI) e formação de hidantoína (XXII).

(XXI)



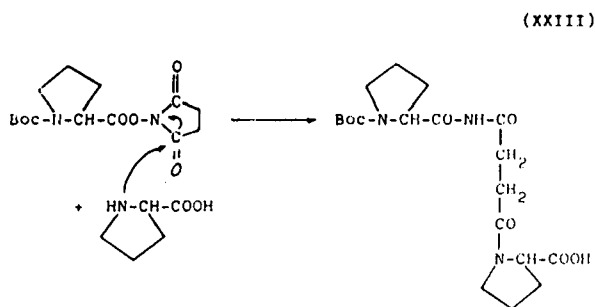
Diacilação

(XXII)

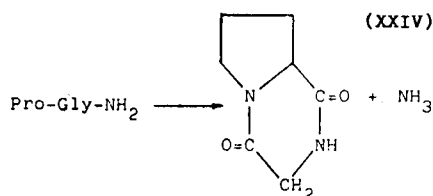


Hidantoína

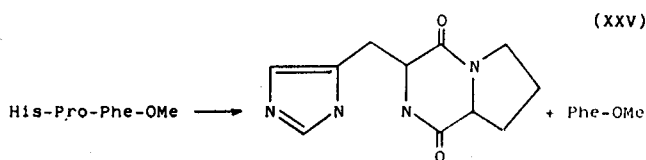
l) *Prolina* - é um aminoácido especial pois é o único que apresenta amina secundária, sendo portanto um iminoácido e não um aminoácido, além disso, a cadeia lateral da prolina tem uma estrutura cíclica, provocando, como conseqüência, um forte impedimento estérico no grupo amino. Assim, por exemplo, durante a síntese do dipeptídeo Boc-Pro-Pro pela reação do éster N-hidroxissuccinimida da Boc-Pro com Pro, Savrda¹¹⁹ descreveu a reação colateral (XXIII).



A geometria da prolina favorece também a formação de dicetopiperazinas e às vezes, dependendo da seqüência, com fragmentação da cadeia (XXIV, XXV).



Referência: (120)



Referência: (121)

m) *Valina e Isoleucina* – estes aminoácidos apresentam ramificações no carbono beta, o que provoca significativo impedimento estérico à reatividade de seus grupos amino e carboxílico. Em decorrência disso, as reações de acoplamento com carbodiimida e azida formam as uréias correspondentes em quantidade significativa.

n) *Fenilalanina* – a cadeia lateral deste aminoácido é pouco reativa, portanto tem pouca tendência a reações colaterais. Merecem atenção, no entanto, dois fatos: a formação de um complexo solúvel em solvente orgânico entre Z-Phe e sais de sódio¹²² e a formação de hexaidrofenilalanina (β -cicloexilalanina) durante hidrogenação catalítica prolongada ou sob pressão¹²³.

4. MÉTODOS DE ACOPLAMENTO

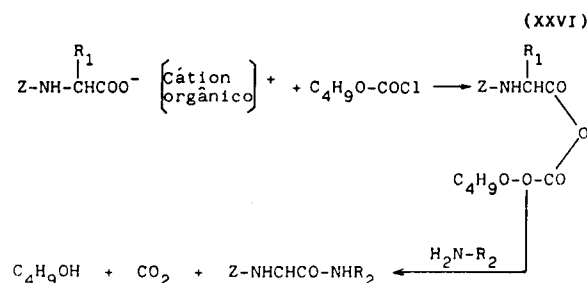
A formação da ligação peptídica segue, de modo geral, uma via química de dois passos: a) ativação do grupo carboxila ou do aminogruppo dos componentes cuja ligação se pretende formar, b) condensação do reagente ativado com o outro componente.

Até cerca de 1950, este procedimento geral estava confinado quase que exclusivamente à conversão da carboxila em azida (N_3) ou cloreto de ácido e sua reação com a amina do

componente amínico em meio aquoso alcalino ou de um solvente orgânico inerte. A partir desta época, apareceu na literatura uma variedade grande de novos métodos de ativação da carboxila, que suplementou o versátil método da azida e permitiu deixar de lado o problemático método do cloreto de ácido. A seguir descrevemos os principais métodos de acoplamento atualmente em uso a partir de componentes com aminogrupos protegidos por grupos de remoção conveniente à síntese.

a) *Anidridos* – a primeira síntese de peptídeos²⁰, Bz-Gly-Gly, a partir do cloreto de benzoila e glicinato de prata, foi uma reação colateral desavisada que envolveu a formação de um anidrido misto. Cerca de 70 anos depois, esse tipo de anidrido foi objeto de estudos detalhados nos laboratórios de Theodor von Wieland, quando foi demonstrado que o hipurilbenzoato era o produto intermediário na formação de Bz-Gly-Gly¹²⁴. A partir destes trabalhos inaugurou-se uma linha de investigação muito fértil em processos de acoplamento que evoluiu rapidamente^{125,126}.

Um dos métodos mais usados na síntese de peptídeos utiliza os anidridos mistos de ácido carbônico, sendo superado somente pelas carbodiimidas. Este método baseia-se na aplicação do ácido carbônico transformado, meio em éster e meio em cloreto, isto é, a reação de um clorocarbonato de alquila com um sal de aminoácido protegido no α -aminogruppo. O clorocarbonato de etila^{127,128} e principalmente o clorocarbonato de isobutila¹²⁹ são os mais usados conforme mostra o esquema (XXVI),

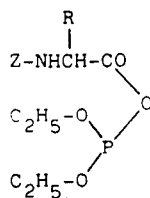


onde, C_4H_9 = isobutila, e o cátion orgânico mais usado é o resultante da neutralização do aminoácido com N-metilmorfolina. A primeira fase da reação é feita a $-15^\circ C$, por 30 s a 5 min, seguida da adição do componente amínico, quando a temperatura pode ser mantida a $-15^\circ C$ ou entre $0-4^\circ C$ por 3-8 horas. Os solventes recomendados para minimizar racemização na primeira fase da reação são tetraidrofurano ou acetato de etila de preferência e na segunda, o componente amínico pode ser dissolvido em qualquer um deles, e também em dimetilformamida (DMF), pois os componentes amínicos são, em geral, pouco solúveis em solventes apolares.

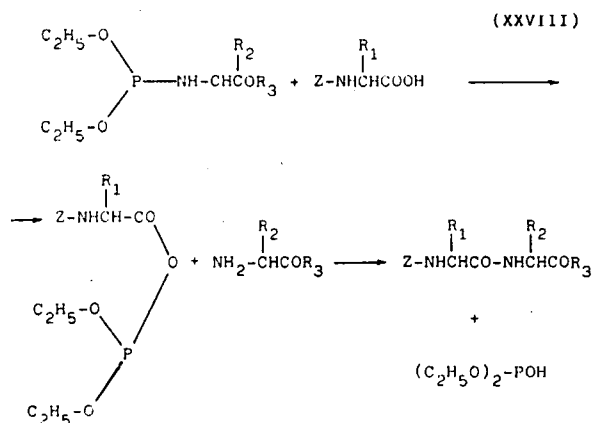
O grande sucesso deste processo, decorre da facilidade de se obter os clorocarbonatos de alquila e de os produtos de reação serem CO_2 e álcool, facilitando o isolamento do peptídeo desejado na mistura de reação. Este método tomou um novo ímpeto com a proposta de Tilkak¹³⁰ de usar excesso do anidrido em sínteses por acoplamentos seriados e destruição do excesso de anidrido por bicarbonato de potássio.

Anderson e cols.¹³¹ descreveram uma série de anidridos mistos de aminoácidos protegidos com derivados do ácido fosforoso, como: cloreto de dietilfosfito, etileno-clorofosfito, tetraetilpirofosfito, dicloro fosfito. Exemplificando, um acilaminoácido reage com cloreto de dietilfosfito, em presença de uma base terciária formando o anidrido (XXVII).

(XXVII)



Estes reagentes podem formar a ligação peptídica combinando-se primeiro com o aminogruppo de um éster de aminoácido, e a amida formada reage com a carboxila (XXVIII).



Utilizando o anidrido simétrico obtido a partir de duas moléculas, de acilaminoácidos na presença de um agente desidratante, dos quais dicitloexilcarbodiimida (DCCI) é o mais usado, chega-se inequivocamente à amida desejada, com um consumo de 2moles do componente carboxílico por mol de amida formada.

b) *O método da azida* – desenvolvido por Curtius²¹, tem a seu favor o fato de ser um método de baixo índice de racemização e por isso, muito utilizado no acoplamento de fragmentos, apesar de terem aparecido acoplamentos mais eficientes e fáceis a partir de 1950.

As hidrazidas dos aminoácidos ou peptídeos protegidos podem ser obtidas pela ação da hidrazina em excesso sobre ésteres metílico, etílico ou benzílico em condições bem determinadas ou acoplado Z-N₂H₃ ou t-Boc-N₂H₃ à carboxila do aminoácido ou peptídeo protegido, usando DCCI e HOBt¹³² ou anidrido misto. Para obter a azida, a hidrazida²¹ é tratada com nitrato de sódio, porém o seu isolamento é trabalhoso e com alto risco de decomposição. Honzl e Rudinger¹³³ observaram que a melhor condição para formar azida é trabalhar em solução homogênea com solvente orgânico ani-

dro, alta acidez, nitrito orgânico (nitrito de n-butila, t-butila, n-amila, iso-amila e cloreto de nitrosila) e baixa temperatura (de -5 a -30°C).

A azida pode ser obtida, ainda, pela reação de difenilfosforazidato com a carboxila do peptídeo ou aminoácido protegido no aminogruppo, na presença de base e em DMF¹³⁴.

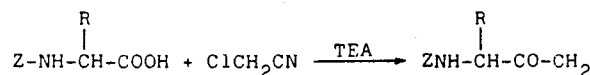
A reação colateral mais preocupante nesta fase é o rearranjo de Curtius¹³⁵ da azida em isocianatos que reagem com aminas, água e álcoois.

c) *Ésteres ativos* – a aminólise de ésteres etílico e metílico de aminoácidos, usados nas primeiras reações de síntese de peptídeos leva à formação de dicetopiperazinas e a polimerizações.

O ataque nucleofílico do aminogruppo ao carbono carbonílico do éster é facilitado quanto maior for o caráter positivo deste carbono. Este efeito é obtido pela incorporação de ésteres cujos radicais do lado alcóolico tem alto poder sorvedor de elétrons. Os ésteres tiofenícos foram introduzidos na síntese de peptídeos por Wieland e cols.¹³⁶. Embora inicialmente tenha sido relacionado a reatividade do éster ao enxofre, logo foi verificado que o efeito era devido ao grupo fenila¹³⁷.

Ésteres cianometílicos foram introduzidos na síntese de peptídeos por Schwyzer¹³⁸, onde o grupo ciano tem um forte efeito indutivo negativo sobre a metila, facilitando o ataque nucleofílico, e este autor chamou-os de “ésteres ativados”. Estes ésteres são obtidos pela reação do aminoácido protegido com cloroacetnitrila na presença de trietilamina (TEA) (XXIX).

(XXIX)

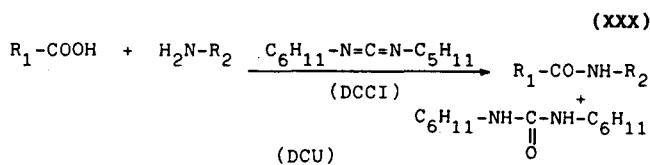


Os ésteres acrílicos formam a classe mais utilizada dos ésteres ativos em síntese de peptídeos. O éster p-nitrofenílico foi introduzido por Bodansky^{139,140} e pela facilidade de obtenção, estabilidade, disponibilidade comercial e custo baixo tem sido o mais popular dos ésteres ativos. O método mais usual de obtenção consiste na reação do aminoácido protegido com DCCI e p-nitrofenol em acetato de etila, exceto Asn e Gly onde é usado DMF⁹⁰.

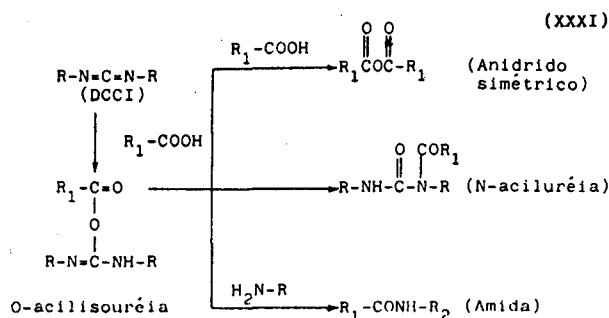
Há possibilidade de reações colaterais tais como formação de aciluréia, de lactona dimérica com Thr, formação de lactama com Arg(NO₂) ou Arg(Tos), acilação das hidroxilas de Ser, Thr e Tyr.

A velocidade da aminólise dos ésteres p-nitrofenílicos é dependente do solvente. Tem sido também usado o éster 2,4-dinitrofenílico, muito reativo e sensível à hidrólise, preparado com DCCI, não necessitando de isolamento¹⁴¹.

d) *O método da carbodiimida*¹⁴² foi introduzido na síntese de peptídeos por Sheehan e Hess¹⁴³ utilizando a dicitloexilcarbodiimida (DCCI) como agente desidratante na formação da ligação peptídica. O DCCI abstrai a água transformando-se em N,N'-dicitloexiluréia (DCU) (XXX).



Este método, usando DCCI, tem sido, de maneira incontestada, o mais utilizado, principalmente levando em conta a sua aplicação na síntese de peptídeos em fase sólida e na preparação dos ésteres ativos. A reação da DCCI com a carboxila forma um composto intermediário, O-acilisouréia, bastante reativo. A partir deste intermediário, várias vias podem ser percorridas pela reação, dependendo da natureza do componente carboxílico, solvente orgânico e presença de aditivos à reação (XXXI).



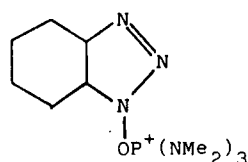
A O-acilisouréia reage com o aminogruppo formando a amida, ou com outra molécula do aminoácido protegido formando anidrido ou ainda, em casos de acoplamentos demorados, ocorre a migração O → N da acila formando uma N-aciluréia. Este composto é estável e leva à perda do componente carboxílico e muitas vezes é um contaminante de isolamento trabalhoso. O anidrido reage com o componente amínico dando também a amida desejada.

A adição de aditivos na síntese com DCCI tem como objetivo transformar a O-acilisouréia em um intermediário um pouco menos reativo, suprimindo a formação da N-aciluréia e da oxazolona. Entre os aditivos mais usados temos 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) desenvolvido por König e Geiger¹⁰⁵ e N-hidroxisuccinimida¹⁴⁴.

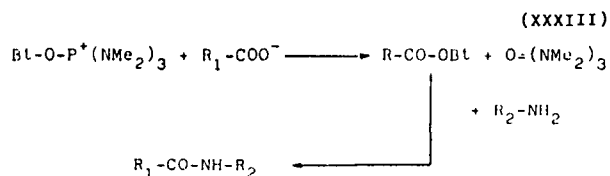
Existem ainda outros métodos de acoplamento entre os quais o do fosfazo e do reagente BOP (benzotriazolil-N-oxidimetilamino-fosfônio).

O método do fosfazo utiliza tricloreto de fósforo e éster de aminoácido ou peptídeo, TEA ou piridina em solvente apolar formando o fosfazo intermediário que ao reagir com o componente carboxílico gera o peptídeo mais o ácido metafosforoso.

O método de acoplamento utilizando reagente BOP¹⁴⁵ cuja estrutura é mostrada em (XXXII),



e desenvolve-se pelo mecanismo esquematizado em (XXXIII),



tem-se mostrado eficiente na síntese de peptídeos em solução e em fase sólida.

5. SÍNTESE EM FASE SÓLIDA

A síntese em fase sólida revolucionou a síntese química de peptídeos, que ao longo de um quarto de século desde que

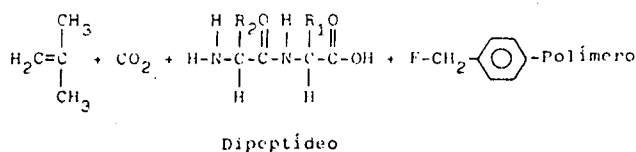
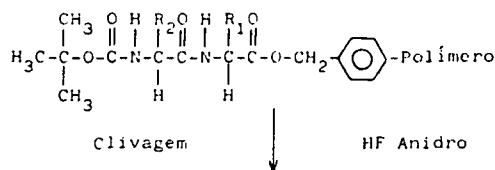
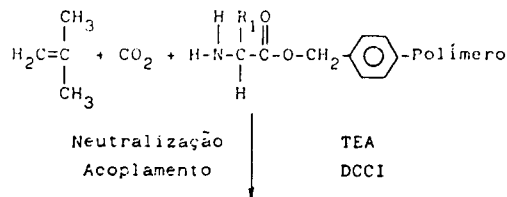
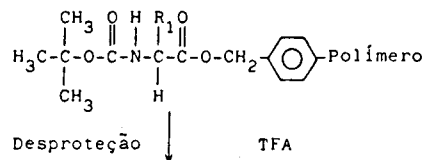
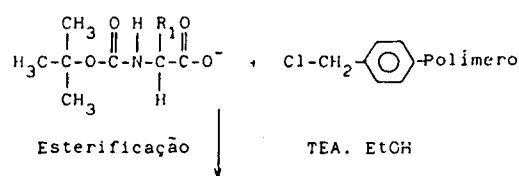


Figura 1. Esquema geral de síntese em fase sólida. TEA - trietilamina, TF - ac.trifluoracético, DCCI - dicitloexilcarbodimida, HF - ac.fluorídrico anidro.

Merrifield¹³ anunciou a primeira síntese (um tetrapeptídeo), graças aos constantes avanços nos processos químicos e de automação, tem permitido obter um número e uma variedade muito grande de peptídeos.

A Figura 1 apresenta o esquema básico e conceitual da síntese em fase sólida, e todos os problemas químicos discutidos acima se aplicam de alguma forma a este tipo de técnica. A síntese em fase sólida sendo feita em mistura heterogênea com um polímero insolúvel, necessita de outros cuidados, tais como: difusão dos reagentes para o interior da resina, tamanho da malha e inchamento da resina, estabilidade da ligação peptídeo-resina. Estes problemas e outros detalhes mais específicos foram amplamente revisados por Barany e Merrifield¹⁴⁶ e Stewart e Young¹⁴⁷.

6. SÍNTESE ENZIMÁTICA DE PEPTÍDEOS

A base teórica da síntese de peptídeos por proteases é a reversibilidade de reações catalíticas, embora seja processo pouco favorável, do ponto de vista termodinâmico, a formação da ligação peptídica a partir dos aminoácidos livres. A primeira síntese catalisada por protease foi obtida por Bergmann e Fraenkel-Conrat¹⁴⁸ formando anilidas a partir de ácido hipúrico com anilina na presença de papaína. Vale notar que nas sínteses enzimáticas há também necessidade de introdução e posterior remoção de grupos protetores, de modo que, mais apropriadamente, se deve falar de síntese de peptídeos enzimotômica. Milne e Carpenter¹⁴⁹ por exemplo desenvolveram um grupo protetor da carboxila, o grupo fenil-hidrazida, usado ainda presentemente. A partir de meados de 1975 este tipo de síntese experimentou um renascimento, permitindo obtenção de peptídeos em escala preparativa. Para revisão sobre o assunto, V. revisão de Jakubke¹⁵⁰.

Para favorecer a síntese do peptídeo na reação catalítica envolvendo proteases há várias possibilidades, baseadas na lei de ação de massas, usando o produto mais barato em excesso e retirando o produto formado da reação por: a) insolubilidade como nas primeiras sínteses; b) extração do produto em fase não polar, exemplificado pelo peptídeo Z-Ala-Phe-Leu-NH₂ acumulado em fase de isoctana, com rendimento de 40 a 60%; c) uso de "trap" molecular, na formação de complexos específicos, como foi feito na condensação catalisada por clostripaína dos fragmentos 1-10 e 11-15 da ribonuclease com "trap" de ribonuclease -S (21-124) para o peptídeo (1-15), com rendimento de 15%. O conhecimento da especificidade do catalisador, isto é, a ligação com o sítio específico no substrato, é de primordial importância para as reações de síntese. A hidrólise de substratos sintéticos fornece dados para a aplicação de proteases na formação de ligações peptídicas especiais. As serino-proteases, como a quimotripsina foram utilizadas na síntese de Leu- e Met-encefalina e a subtilisina no acoplamento de Boc-Val-Tyr(Bz)-OH com H-Val-His(Bz)-Pro-Phe-OEt, com rendimento de 74%. A papaína, representante da classe das cisteíno-proteases também catalisa este acoplamento, importante para a síntese de Asn¹, Val⁵-angiotensina^{II}, com rendimento de 57%.¹⁵¹ Entre as aspartil-proteases, cujo representante mais importante é a pepsina, destaca-se a síntese de seqüência parciais da substância P e eleidosina¹⁵². Finalmente, a termolisina, da classe das metalo-proteases, foi usada na síntese do edulcorante artificial aspartame. Estes são apenas alguns exemplos da aplicação de proteases na síntese parcial ou total de produtos de importância biológica.

7. SÍNTESE POR MÉTODOS DE DNA RECOMBINANTE

O gene para a somatostatina humana foi o primeiro gene clonado a ser expressado de maneira eficiente e sob o controle genético da célula hospedeira¹⁵³. Esta foi também a primeira síntese de um peptídeo a partir de um gene obtido por síntese química. Depois desta publicação centenas de outras têm aparecido ao longo destes últimos anos, relativos a síntese de peptídeos grandes e proteínas por microorganismos preparados por técnicas de DNA recombinante.

8. EXEMPLO DE SÍNTESE DE PEPTÍDEO EM SOLUÇÃO: - OCITOCINA -

A síntese de peptídeos foi introduzida no Brasil em 1971 nos laboratórios de Biofísica da Escola Paulista de Medicina pelo Professor Antonio C. de Mattos Paiva. Inicialmente foram estabelecidas as condições para síntese de peptídeos em fase sólida, porém com a necessidade de peptídeos na quantidade de gramas, iniciamos a partir de 1978 a implantação da síntese de peptídeos em solução. Nestes projetos de síntese em solução incluía o estabelecimento dos métodos de preparação da maioria dos intermediários, derivados de aminoácidos e agentes protetores e acilantes. A ocitocina é um nonapeptídeo bastante usado durante o parto e na secreção de leite tanto em medicina humana como veterinária. O esquema geral da síntese em solução da ocitocina está mostrada na Figura 2.

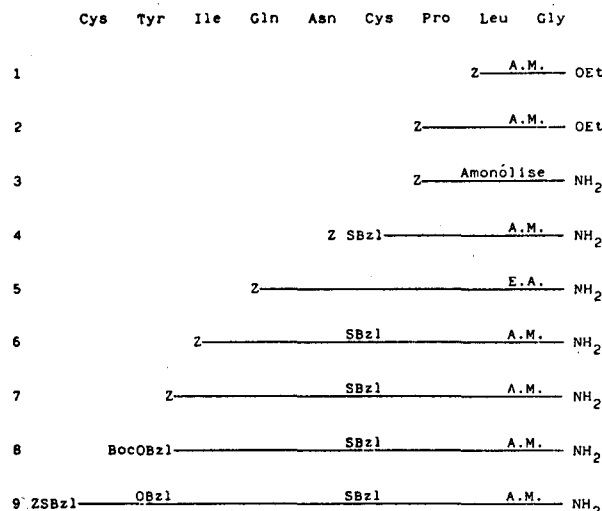


Figura 2. Esquema da síntese da ocitocina A.M. = anidrido misto; E.A. = éster ativo.

Todos os Z-aminoácidos usados foram obtidos a partir dos aminoácidos e Z-Cl em condições adequadas para os diferentes aminoácidos. O Z-Cl foi preparado a partir de solução de foscênio em tolueno e álcool benzílico. Z-Leu e Gly-OEt foram acoplados pelo método do anidrido misto. O dipeptídeo resultante foi desprotegido por hidrogenação catalítica e acoplado à Z-Pro pelo anidrido misto. O tripeptídeo resultante foi tratado com amônia dissolvida em metanol, obtendo-se Z-Pro-Leu-Gly-NH₂ que então foi desprotegido por hidrogenação catalítica e acoplado a Z-Cys(SBzl) pelo método do éster ativo p-nitrofenílico. O tetrapeptídeo resultante foi des-

protegido por HBr-ácido acético e acoplado a Z-Asn pelo método do éster ativo (p-nitrofenílico). O pentapeptídeo obtido, Z-Asn-Cys(SBzl)-Pro-Leu-GlyNH₂, foi desprotegido por HBr-ácido acético e acoplado a Z-Gln pelo método do anidrido misto e o hexapeptídeo resultante desprotegido pelo mesmo reagente e acoplado a Z-Ile, obtendo-se o heptapeptídeo Z-Ile-Gln-Asn-Cys(SBzl)-Pro-Leu-NH₂ que foi desprotegido por HBr-ácido acético.

De outro lado foi acoplado Z-Cys(SBzl) ao Tyr-OMe-HCl pelo método do anidrido misto. O éster resultante foi saponificado com NaOH. O heptapeptídeo acima, desprotegido, foi acoplado a este dipeptídeo pelo método de anidrido misto e a ocitocina, nonapeptídeo, obtida, desprotegida por sódio em amônia líquida. A oxidação dos grupos SH foi feita preferencialmente por ferricianeto de potássio para evitar persistência de monômeros abertos. A atividade biológica após purificação do produto final por troca iônica, ou gel-filtração ou distribuição em contra-corrente foi de cerca 500 UI/mg de peptídeo. A Figura 3 mostra o perfil de HPLC da ocitocina cujo teor de pureza é maior que 96%.

Esta metodologia vem sendo aplicada nos laboratórios de Biofísica da Escola Paulista de Medicina à síntese de outros peptídeos biologicamente ativos: lisil-vasopressina, e dois de seus análogos, desamino-DArg²-vasopressina e felipressina; fator liberador da tirotrófina (TRH); (1-17) angiotensinogênio, este último sintetizado por condensação de fragmentos. Além destes peptídeos que tem uso terapêutico e diagnóstico, outros vem sendo sintetizados para servirem de substratos para enzimas proteolíticas. Neste caso tem sido introduzido na seqüência peptídica radicais cromogênicos¹⁵⁴ ou fluorogênicos que dão produtos coloridos ou fluorescentes após hidrólise enzimática. A importância destes substratos peptídicos tem sido devido ao seu uso nas dosagens enzimáticas de fluidos biológicos tal como na avaliação de fatores de cascata de coagulação sanguínea.

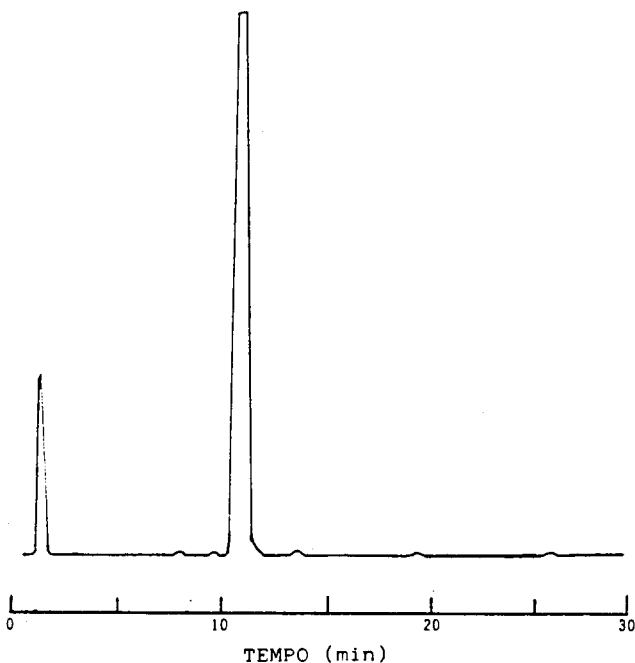


Figura 3. Cromatograma do HPLC da ocitocina sintética, mostrando um grau de pureza acima de 96%. Condições do HPLC: a) Coluna: ODS-5 μ m, 4,6 x 150 mm; b) amostra 100 μ l; c) Solventes: A-NaH₂PO₄-0,1 M e B-acetonitrila:H₂O (1:1); d) Eluição: Gradiente de 30-50% de B em 10 min e isocrático por 10 min; e) Fluxo: 1,5 ml/min; f) Detecção: 220 nm.

9. PERSPECTIVAS

Apresentamos nesta revisão, sem a pretensão de esgotar o assunto, os pontos de maior relevância no desenvolvimento da síntese de peptídeos. Embora o assunto tenha já quase um século de evolução, os diferentes processos de síntese ainda recebem intensa atenção nos seus aspectos químicos, bioquímicos, farmacêuticos, de biologia molecular e de automação.

Este interesse está relacionado ao grande envolvimento dos peptídeos em importantes processos biológicos, com aplicações no diagnóstico, tratamento e prevenção de moléstias tanto em medicina humana como veterinária.

Os métodos de síntese de peptídeos em solução, fase sólida, por enzimas ou DNA recombinante não são mutuamente exclusivos, mas são processos que se completam e a escolha do método depende do tamanho, composição e mesmo da estrutura terciária do peptídeo, além da escala de síntese e da avaliação do custo financeiro de sua produção.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos colegas de formação nas áreas de química e biologia que nos ajudaram a desenvolver à química de peptídeos no Dept. de Biofísica da Escola Paulista de Medicina: Engenheira Química Maria Aparecida Juliano; aos Químicos: Maria Helena Sedenho Cezari, Regina Siqueira Haddad Carvalho, Antonio de Miranda; ao Farmacêutico Bioquímico: Jair Ribeiro Chagas, Biomédica: Sílvia Regina da Silva Moreira e à Bióloga: Izaura Yoshio Hirata. Agradeço ainda ao Dr. Antonio C. M. Paiva e à Dra. Hanna Rothschild pelo auxílio na preparação do manuscrito e à Ana Maria Marques Freire e Sílvia Helena Prado Pinto pelo trabalho datilográfico.

REFERÊNCIAS

1. Beccari, J. B.; Citação tirada de Ivanov, V. T.; Shamin, A. N.; *La Historia de la Síntesis de la Proteína*, (1745), tradução do russo por Fernando Blanco, Ed. Mir. Moscou. pp. 29-33.
2. Vauquelin, L. N.; Robiquet, P. J.; *Ann. Chim.* (1806), **57**, 88.
3. Dulong, A.; *J. Pharm.* (1826), **12**, 278.
4. Wollaston, W. H.; *Trans. Phil. Soc.* (1810), 223.
5. Mörner, K. A. H.; *Z. Physiol. Chem.* (1899), **28**, 595.
6. Braconnot, H.; *Ann. Chim. Phys.* (1820), (2) **13**, 113.
7. Harington, C. R.; Mead, T. H.; *Biochem. J.* (1935), **29**, 1602.
8. Siffered, R. H.; du Vigneaud, V.; *J. Biol. Chem.* (1935), **108**, 753.
9. Sanger, F.; Thompson, E. O. P.; Kitai, R.; *Biochem. J.* (1955), **59**, 509; Smith, E. L.; *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (1979), **325**, 107.
10. du Vigneaud, V.; Ressler, C.; Swan, J. M.; Roberts, C. W.; Katsouyannis, P. G.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1953), **75**, 4879.
11. Tuppy, H.; Michel, H.; *Monatsh. Chem.* (1953), **84**, 1011.
12. du Vigneaud, V.; *Harvey Lectures Ser.* (1954), **50**, 1.
13. Merrifield, R. B.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1963), **85**, 2149.
14. Cohen, S. N.; *Scientific American* (1975), **233**, 24.
15. Curtius, T.; *Ber.* (1883), **16**, 755.
16. Curtius, T.; *Ber.* (1904), **37**, 1284.
17. Fränkel, M.; Katchalski, E.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1942), **64**, 2264, 2268.
18. Abenius, S. W.; Widmark, O.; *Ber.* (1888), **21**, 1662.
19. Fischer, E.; Fourneau, E.; *Ber.* (1901), **34**, 2868.
20. Curtius, T.; *J. prakt. Chem.* (1881), **24**, 239.
21. Curtius, T.; *Ber.* (1902), **35**, 3226.
22. Curtius, T.; Wüstenfeld, R.; *J. prakt. Chem.* (1904), **70**, 73.
23. Fischer, E.; *Ber.* (1903), **36**, 2982.
24. Fischer, E.; Otto, E.; *Ber.* (1903), **36**, 2106.
25. Fischer, E.; *Ber.* (1903), **36**, 2094.
26. Mohr, E.; Strohschein, F.; *Ber.* (1909), **42**, 2521.
27. Bergmann, M.; Stern, F.; Witte, C.; *Ann. Chem.* (1926), **449**, 277.

28. Bergmann, M.; Köster, H.; *Z. physiol. Chem.* (1927), **167**, 91.
29. Bergmann, M.; Zervas, L.; du Vigneaud, V.; *Ber.* (1929), **62**, 1905.
30. Leuchs, H.; *Ber.* (1906), **39**, 875.
31. Leuchs, H.; Manesse, W.; *Ber.* (1907), **40**, 3243.
32. Leuchs, H.; Geiger, W.; *Ber.* (1908), **41**, 1721.
33. Greenstein, J. P.; Winitz, M.; "Chemistry of Amino Acids", (1961), John Wiley & Sons, New York, vol. 2 p. 763.
34. Katchalski, E.; Sela, M.; *Adv. Prot. Chem.* (1958), **8**, 243.
35. Denkwalter, R. G.; Schwam, H.; Strachan, R. G.; Beesley, T. E.; Veber, D. F.; Schoenewaldt, E. F.; Barkemeyer, H.; Paleveda, W. J. Jr.; Jacob, T. A.; Hirschmann, R.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1966), **88**, 3163.
36. Hirschmann, R.; Strachan, R. G.; Schwam, H.; Schoenewaldt, E. F.; Joshua, H.; Barkemeyer, B.; Veber, D. F.; Paleveda, W. J. Jr.; Jacob, T. A.; Beesley, T. E.; Denkwalter, R. G.; *J. Org. Chem.* (1967), **32**, 3415.
37. Hirschmann, R.; *Intra-Sci. Chem. Rep.* (1971), **5**, 203.
38. Jones, H. J.; Em: "The Peptides, Analysis, Synthesis and Biology", (1979), Gross, E.; Meienhofer, J.; eds. Academic Press, New York, p. 65.
39. Katakai, R.; Oya, M.; Toda, F.; Keikichi, V.; Iwakura, Y.; *J. Org. Chem.* (1974), **39**, 180.
40. Bergmann, M.; Zervas, L.; *Ber.* (1932), **65**, 1192.
41. Rothmund, K. W.; Zetzsche, F.; *Ber.* (1921), **54**, 2038.
42. Freudenberg, K.; Dürr, W.; Hochstetter, H.; *Ber.* (1928), **61**, 1735.
43. Fischer, H. O. L.; Baer, E.; *Ber.* (1932), **65**, 337, 345.
44. McKay, F. C.; Albertson, N. F.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1957), **79**, 4686.
45. Schwyzer, R.; Sieber, P.; Kappeler, H.; *Helv. Chim. Acta* (1959), **42**, 2622.
46. Tarbell, D. S.; Yamamoto, Y.; Pope, B. M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1972), **69**, 730.
47. Itoh, M.; Hagiwara, D.; Kamiya, T.; *Tetrahedron Lett.* (1974), 4393.
48. Löw, M.; Kisfaludy, L.; *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* (1979), **360**, 13.
49. Kader, A. T.; Stirling, C. J. M.; *J. Chem. Soc.* (1964), 258.
50. Carpino, L. A.; Han, G. Y.; *J. Am. Chem. Soc.* (1970), **92**, 5748.
51. Weygand, F.; Geiger, R.; *Chem. Ber.* (1956), **89**, 647.
52. Ing, H. R.; Månse, R. H.; *J. Chem. Soc.* (1926), 2348.
53. Zervas, L.; Borovas, D.; Gazis, E.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1963), **85**, 3660.
54. Fontana, A.; Marchiori, F.; Moroder, L.; Scoffone, E.; *Tetrahedron Lett.* (1966), 2985.
55. Wünsch, E.; Deffner, M.; Deimer, K. H.; Jaeger, E.; Stelzel, P.; Thamm, P.; Wendlberger, G.; "Methoden der organischen Chemie". (1974), Houben-Weyl, vol. XV. parte 2. Thieme, Stuttgart.
56. Riniker, B.; Kamber, B.; Sieber, P.; *Helv. Chim. Acta* (1975), **58**, 1086.
57. Roeske, R. W.; Em "The Peptides, Analysis, Synthesis and Biology", (1981), Gross, E.; Meienhofer, J.; eds. Academic Press, New York, vol. 3, p. 101.
58. Bodansky, M.; Em: "Peptides 1968". (1969), Proc. 9th European Peptide Symposium. Bricas, E.; ed. North-Holland Publ. Co. p. 150.
59. Natarajan, S.; Bodansky, M.; *J. Org. Chem.* (1976), **41**, 1269.
60. Dymocky, D.; Mellon, E. F.; Naghski, J.; *Anal. Biochem.* (1971), **41**, 487.
61. Hofmann, K.; Jöhl, A.; Furlenmeier, A.E.; Kappeler, H.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1957), **79**, 1636.
62. Guttmann, St.; Boissonnas, R. A.; *Helv. Chim. Acta* (1958), **41**, 1852.
63. Bergmann, M.; Zervas, L.; Rinke, H.; *Z. physiol. Chem.* (1934), **224**, 40.
64. Roberts, C. W.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1954), **76**, 6203.
65. Schwarz, H.; Arakawa, K.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1959), **81**, 5691.
66. Schwyzer, R.; Sieber, P.; *Helv. Chim. Acta* (1959), **42**, 972.
67. Wang, S. S.; Gisin, B. F.; Winter, D. P.; Makofske, R.; Kuleska, I. D.; Tzougaki, C.; Meienhofer, J.; *J. Org. Chem.* (1977), **42**, 1286.
68. Goodacre, J.; Ponsford, R. J.; Stirling, I.; *Tetrahedron Lett.* (1975), 3609.
69. Roeske, R. W.; *J. Org. Chem.* (1963), **28**, 1251.
70. Anderson, G. W.; Callahan, F. M.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1960), **82**, 3359.
71. Galpin, I. J.; Handa, B. K.; Hudson, D.; Jackson, A. G.; Kenner, G. W.; Ohsen, S. R.; Ramage, R.; Singh, B.; Tyson, R. G.; Em: "Peptides 1976". (1976), Loffet, A.; ed. Editions de l'Université de Bruxelles, Belgium, p. 247.
72. Papadimitriou, J. T.; Yovanidis, C.; Paganou, A.; Zervas, L.; *J. Chem. Soc.* (1967), 1830.
73. Schnyder, J.; Rottenberg, M.; *Helv. Chim. Acta* (1975), **58**, 521.
74. Cheung, H. T.; Blout, E. R.; *J. Org. Chem.* (1965), **30**, 315.
75. Hofmann, K.; Magee, M. Z.; Lindenmann, A.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1950), **72**, 2814.
76. Boissonnas, R. A.; Guttmann, St.; Jaquenoud, P. A.; *Helv. Chim. Acta* (1960), **43**, 1349.
77. Yajima, H.; Kiso, Y.; *Chem. Pharm. Bull.* (1971), **19**, 420.
78. Finn, F. M.; Hofmann, K.; Em: "The Proteins". (1976), Neurath, H. e Hill, R.L., eds. Academic Press, New York, 3rd ed., vol. 2, p. 105.
79. Wünsch, E.; Wendlberger, G.; *Chem. Ber.* (1968), **101**, 3659.
80. Sieber, P.; Kamber, B.; Hartmann, A.; Jöhl, A.; Riniker, B.; Rittel, W.; *Helv. Chim. Acta* (1974), **57**, 2617.
81. Gutte, B.; Merrifield, R. B.; *J. Biol. Chem.* (1971), **246**, 1922.
82. Erickson, B. W.; Merrifield, R. B.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1973), **95**, 3750, 3757.
83. Hiskey, R. G.; Rao, V. R.; Rhodes, W. G.; Em: "Protective Groups in Organic Chemistry". (1973), McOmic, J. F. W.; ed. Plenum Press, London, p. 235.
84. Patai, S.; "The Chemistry of Thiol Groups". (1974), Wiley, New York, partes 1 e 2.
85. Hiskey, R. G.; Em: "The Peptides, Analysis, Synthesis and Biology". (1981), Gross, E.; Meienhofer, J.; eds. Academic Press, New York, vol. 3, p. 137.
86. Akabori, S.; Sakakibara, S.; Shimonishi, Y.; Nobuhara, Y.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* (1964), **37**, 433.
87. Benoiton, L.; *Can. J. Chem.* (1962), **40**, 570.
88. Sachs, H.; Brand, E.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1953), **75**, 4610.
89. Tam, J. P.; Wong, T. W.; Riemen, M. W.; Tjoeng, F. S.; Merrifield, R. B.; *Tetrahedron Lett.* (1979), 4033.
90. Bodansky, M.; du Vigneaud, V.; *Biochem. Prep.* (1963), **9**, 110.
91. Gish, D. T.; Carpenter, F. H.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1953), **75**, 5872.
92. Hofmann, K.; Rheiner, A.; Peckham, W. D.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1953), **75**, 6083.
93. Yamashiro, D.; Blake, J.; Li, C. H.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1972), **94**, 2855.
94. Schwyzer, R.; Li, C. H.; *Nature* (1958), **182**, 1669.
95. Nishimura, O.; Fujino, M.; *Chem. Pharm. Bull.* (1976), **24**, 1568.
96. Yajima, H.; Takeyama, M.; Kanaki, J.; Mitani, K.; *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* (1978), 482.
97. Juliano, L.; Juliano, M. A.; Miranda, A.; Tsuboi, S.; Okada, Y.; *Chem. Pharm. Bull.* (1987), **35**, 2550.
98. Okada, Y.; Tsuboi, S.; Miranda, A.; Juliano, M. A.; Juliano, L.; *An. Acad. Bras. Ci.* (1988), **60**, 281.
99. Iselin, B. M.; *Helv. Chim. Acta* (1962), **45**, 1510.
100. Yamashiro, D.; Li, C. H.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1973), **95**, 1310.
101. Inouye, K.; Otsuka, H.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* (1961), **34**, 1.
102. Lenard, J.; Hess, G. P.; *J. Biol. Chem.* (1964), **239**, 3275.
103. Sheehan, J. C.; Hasspacher, K.; Yeh, Y. L.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1959), **81**, 6086.
104. Rink, H.; Riniker, B.; *Helv. Chim. Acta* (1974), **57**, 831.
105. König, W.; Geiger, R.; *Chem. Ber.* (1970), **103**, 788, 2024.
106. Holley, R. W.; Sondheimer, E.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1954), **76**, 1326.
107. Veber, D. F.; Em "Peptides - Chemistry, Structure, Biology". (1975), Walter, R.; Meienhofer, J.; eds. Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, MI, p. 301.
108. du Vigneaud, V.; Behrens, O. K.; *J. Biol. Chem.* (1937), **117**, 27.
109. Zervas, L.; Theodoropoulos, D. M.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1956), **78**, 1359.
110. Losse, G.; Krychowski, J.; *J. prakt. Chem.* (1970), **312**, 1097.
111. Patchornik, A.; Berger, A.; Katchalski, E.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1957), **79**, 6416.
112. Siepmann, E.; Zahn, H.; *Biochim. Biophys. Acta* (1964), **82**, 412.
113. Chillemi, F.; Merrifield, R. B.; *Biochemistry* (1969), **8**, 4344.
114. Sakakibara, S.; Fujii, T.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* (1969), **42**, 1466.
115. Brown, T.; Jones, J. H.; Richards, J. D.; *J. Chem. Soc. Perkin I.*, (1982), 1553.
116. Dekker, C. A.; Fruton, J. S.; *Biol. Chem.* (1948), **173**, 471.
117. Juliano, L.; Boschcov, P.; Paiva, A. C. M.; *Biochemistry* (1974), **13**, 4263.

118. Bodanszky, M.; Martinez, J.; Em: "The Peptides, Analysis, Synthesis and Biology". (1983), Gross, E.; Meienhofer, J.; eds. Academic Press, New York, p. 111.
119. Savda, J.; *J. Org. Chem.* (1977), **42**, 3199.
120. Geiger, R.; König, W.; Em: "The Peptides, Analysis, Synthesis and Biology". (1981), Gross, E.; Meienhofer, J.; eds. Academic Press, New York, vol. 3, p. 1.
121. Mazur, R. H.; Schlatter, J. M.; *J. Org. Chem.* (1963), **28**, 1025.
122. Grassmann, W.; Wunsch, E.; *Chem. Ber.* (1958), **91**, 462.
123. Windridge, G. C.; Jorgensen, E. C.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1971), **93**, 6318.
124. Wieland, Th.; Sehring, R.; *Ann. Chem.* (1950), **569**, 122.
125. Vaughan, J. R.; Osato, R. L.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1951), **73**, 5553.
126. Zaoral, M.; *Collect. Czech. Chem. Comm.* (1962), **27**, 1273.
127. Boissonnas, R. A.; *Helv. Chim. Acta* (1951), **34**, 874.
128. Wieland, Th.; Bernhard, H.; *Ann. Chem.* (1951), **572**, 190.
129. Vaughan, J. R.; Osato, R. L.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1952), **74**, 676.
130. Tilak, M. A.; *Tetrahedron Lett.* (1970), 849.
131. Anderson, G. W.; Blodinger, J.; Young, R. W.; Welcher, A. D.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1952), **74**, 5304.
132. Wang, S. S.; Kuleska, I. D.; Winter, D. P.; Makofske, R.; Kutny, R.; Meienhofer, J.; *Int. J. Pept. Res.* (1978), **11**, 297.
133. Honzl, J.; Rudinger, J.; *Collect. Czech. Chem. Comm.* (1961), **26**, 2333.
134. Shioiri, T.; Yamada, S.; *Chem. Pharm. Bull.* (1974), **22**, 849, 855, 859.
135. Curtius, T.; *Ber.* (1890), **23**, 3023.
136. Wieland, Th.; Schafer, W.; Bokelmann, E.; *Ann. Chem.* (1951), **573**, 99.
137. Schwyzer, R.; *Helv. Chim. Acta* (1953), **36**, 414.
138. Schwyzer, R.; *Helv. Chim. Acta* (1954), **37**, 674.
139. Bodanszky, M.; *Nature* (1955), **175**, 685.
140. Bodanszky, M.; *Acta Chim. Hung.* (1957), **10**, 335.
141. Bodanszky, M.; Ondetti, M.A.; *Chem. Ind. (Lond.)* (1966), 26.
142. Khorana, H. G.; *Chem. Rev.* (1953), **53**, 788.
143. Sheehan, J. C.; Hess, G. P.; *J. Amer. Chem. Soc.* (1955), **77**, 1067.
144. Wunsch, E.; Drees, F.; *Chem. Ber.* (1966), **99**, 110.
145. Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C.; *Tetrahedron Lett.* (1975), 1219.
146. Barany, G.; Merrifield, R. B.; Em: "The Peptides, Analysis, Synthesis and Biology". (1980), Gross, E.; Meienhofer, J.; eds. Academic Press, New York, p.1.
147. Stewart, J. M.; Yong, J. D.; "Solid Phase Peptide Synthesis". (1984), 2^a ed. Pierce Chemical Co., Rockford, IL.
148. Bergmann, M.; Fraenkel-Conrat, H.; *J. Biol. Chem.* (1937), **119**, 707.
149. Milne, H. B.; Carpenter, F. H.; *J. Org. Chem.* (1968), **33**, 4476.
150. Jakubke, H. D.; Em: "The Peptides - Analysis, Synthesis, Biology". (1987), Udenfriend, S.; Meienhofer, J.; eds. Academic Press. N. York, p. 103.
151. Isowa, Y.; Ohmori, M.; Sato, M.; Mori, K.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* (1977), **50**, 2766.
152. Isowa, Y.; Nagasawa, T.; Kuroiwa, K.; Narita, K.; Schw, P.; 597 158, Março 31, v. *Chem. Abstr.* (1978), **89**, 24823.
153. Itakura, K.; Hirose, T.; Crea, R.; Riggs, A. D.; Heyneker, H. L.; Bolivar, F.; Boyer, H. W.; *Science* (1977), **198**, 1056.
154. Juliano, M. A.; Juliano, L.; *Braz. J. Med. Biol. Res.* (1985), **18**, 435.