

## USO DA FTIR NA OBTENÇÃO DE RESINAS E NA SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA

Graziely Ferreira Cespedes, Eduardo Festozo Vicente e Eduardo Maffud Cilli\*

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, R. Francisco Degni, s/n, 14800-900 Araraquara- SP, Brasil

Guia Nicolaewsky Jubilit e Clovis Ryuichi Nakaie

Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, R. Três de Maio, 100, 04004-020 São Paulo- SP, Brasil

Recebido em 3/5/10; aceito em 12/11/10; publicado na web em 18/2/11

USE OF FTIR IN THE OBTENTION OF RESINS AND PEPTIDES SYNTHESIS IN SOLID PHASE. Despite the increase in peptide chain aggregation, which decreases the rate of coupling reactions, the synthesis and use of very highly substituted resins still remains as a controversial point in the SPFS, due to its clear economical advantages (lesser solvent consumption and higher amount of peptide per synthesis). In order to better investigate the synthesis and the use of very highly substituted resins, the FTIR, NMR and EPR were compared. By FTIR techniques it was possible to follow all the steps of resin synthesis and the factors affecting the aggregation of the chains inside the peptidil-BHAR and MBHAR.

Keywords: FTIR; SPFS; resin.

### INTRODUÇÃO

A síntese peptídica tem proporcionado um grande avanço nos estudos biológicos nas últimas décadas. Em grande parte esse progresso se deve à eficiência do método chamado de síntese peptídica em fase sólida (SPFS).<sup>1-10</sup> Esse método de síntese se baseia no crescimento, resíduo por resíduo, da cadeia peptídica presa covalentemente pelo seu aminoácido carboxi-terminal a um suporte sólido (resina). Esta resina deve ser inerte e insolúvel nas condições utilizadas na SPFS. O fato de a resina ser insolúvel e do produto desejado ficar ligado a ela permite a eliminação dos reagentes, solventes e da maioria dos subprodutos das diversas etapas do ciclo sintético por simples processo de filtração em uma placa porosa. Desta forma, o método é simples, rápido e vantajoso, além de permitir o uso de excesso de reagentes para garantir reações mais eficientes e quantitativas em cada uma das etapas do ciclo sintético. Somado a isto, o fato das etapas serem padronizadas e repetitivas permitiu a automação da SPFS.

Apesar das vantagens descritas acima, a SPFS esconde uma perigosa limitação decorrente da não purificação dos produtos intermediários. Neste aspecto, se a eficiência de cada ciclo sintético não atingir valor muito próximo da ideal (100%), e devido ao grande número de etapas envolvidas até o final de uma síntese, pode-se obter grande quantidade de contaminantes que, dependendo do caso, dificilmente serão separados do peptídeo desejado. Por exemplo, um octapeptídeo como a angiotensina II terá um rendimento final de 43%, se cada um de seus oito ciclos tiver uma eficiência de 90%.

Embora existam outras opções na literatura, principalmente as que empregam suportes bastante polares à base de acrilamida ou derivados,<sup>7,11,12</sup> as resinas mais utilizadas na SPFS são as constituídas do copolímero de estireno com 1% de divinilbenzeno.

A constituição da estrutura química, com predominância de anéis benzênicos e grupos metilênicos (Figura 1S, material suplementar), se caracteriza por ser apolar, obtendo-se solvatação e, portanto, inchamento mais favorecido dos grãos da resina em solventes do tipo

tolueno,<sup>13</sup> diclorometano (DCM) ou clorofórmio, do que em solventes mais polares como dimetilformamida (DMF), alcoóis ou água.<sup>14,15</sup> Esta característica própria de resinas do tipo poliestireno pode ser, no entanto, profundamente alterada, dependendo da natureza e da quantidade dos grupos ligados a ela (Figura 1S, material suplementar). Por exemplo, a inserção progressiva de ligações peptídicas que contêm grupos C=O e N-H, de caráter polar, e/ou o aumento do teor de cadeias peptídicas presas ao grão da resina promovem melhor inchamento em solventes mais polares do tipo DMF,<sup>16</sup> N-metilpirrolidona, NMP<sup>8</sup> e dimetilsulfóxido, DMSO.<sup>17</sup> Alternativamente, a presença de grandes quantidades de grupamentos ionizados na resina (carga positiva ou negativa) pode também afetar drasticamente a propriedade de solvatação da resina.<sup>18</sup> Desta forma, resinas contendo grupamentos amônio carregados positivamente (benzidrilamino-resina, BAR) passam a ter uma boa solvatação também em meio aquoso, tornando-se, em princípio, uma nova resina do tipo trocadora aniônica para cromatografia em coluna.<sup>19-23</sup> Somado à polaridade da resina e do peptídeo, outro fator que afeta a solvatação é a presença de agregações intermoleculares entre as cadeias peptídicas em crescimento, ou delas com a própria estrutura polimérica. O fator acima descrito é sequência-dependente, sendo que a extremidade N-terminal reativa do peptídeo ligada à resina pode ficar impedida momentaneamente, devido à deficiência dos processos difusionais dos reagentes dentro da matriz polimérica, dificultando a reação de acoplamento do próximo aminoácido.<sup>6,24</sup> Após o progressivo alongamento da cadeia, esta extremidade pode ser liberada, provocando, ao final, a formação de sequências peptídicas caracterizadas pela falta de um ou mais resíduos de aminoácidos (sequências com deleção). As sequências que apresentam este tipo de problema são denominadas de “sequências difíceis”.<sup>13,25,26</sup> Desta forma, o estudo da solvatação é fundamental para contornar este tipo de problema, um dos mais sérios nesta metodologia.

As técnicas mais utilizadas no estudo da solvatação de peptidil-resinas são a medição direta do grão de resina,<sup>8,15,16,18</sup> a espectroscopia no infravermelho (IV),<sup>27-33</sup> a ressonância magnética nuclear (RMN)<sup>34-36</sup> e a ressonância paramagnética eletrônica (RPE).<sup>18,37,38</sup> A RPE é utilizada ligando-se à extremidade amino-terminal da peptidil-resina

\*e-mail: cilli@iq.unesp.br

o ácido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil-4-amino-4-carboxílico (Toac) que é um composto paramagnético.<sup>39</sup>

Somado à solvatação da resina, outro problema ainda encontrado na SPFS é a obtenção de pequenas quantidades de peptídeos. Isto ocorre devido ao baixo conteúdo de grupos funcionais das resinas utilizadas. O uso de resinas com grau de substituição (teor de sítios por grama de resina) cerca de 3 a 5 vezes maiores<sup>40</sup> do que a normalmente encontrada (0,6 mmol/g) pode, no entanto, solucionar esse problema, além de proporcionar um gasto menor de tempo e de solventes para a obtenção da mesma quantidade de peptídeo. Além disso, se analisarmos do ponto de vista da técnica de *peptide library*,<sup>41-43</sup> um grão de resina com uma quantidade maior de peptídeos por grão pode ser interessante.

Desta forma, visando avaliar em pormenor a obtenção de algumas resinas empregadas na SPFS contendo alto grau de substituição, foram obtidas as resinas BAR e MBAR com diferentes graus de funcionalização e os protocolos de síntese e análise (FTIR) otimizados. Após a obtenção destas resinas, o peptídeo VQAIDYING foi sintetizado utilizando resinas de alto e baixo grau de funcionalização e suas propriedades físico-químicas foram avaliadas, durante e ao final da síntese, buscando um melhor entendimento dos fatores que afetam a agregação das cadeias no interior do grão na SPFS. A técnica empregada nestes estudos foi a FTIR, e os dados comparados com outros já descritos pelo nosso grupo na literatura por meio da <sup>1</sup>H HRMAS-RMN<sup>36</sup> e da RPE.<sup>18</sup>

## RESULTADOS

As resinas benzidrilamino (BAR) e metilbenzidrilamino (MBAR) foram sintetizadas de acordo com os procedimentos descritos na literatura.<sup>19, 44-46</sup> O protocolo de obtenção destas duas resinas foi o mesmo, diferenciando apenas quanto ao agente acilante utilizado, cloreto de benzoíla ou toluíla para a BAR e MBAR, respectivamente. Resumidamente, a obtenção destas resinas foi realizada em 3 etapas: acilação de Friedel-Crafts; aminação redutiva de Leuckart e, hidrólise ácida (Figura 2S, material suplementar).

As sínteses das resinas foram monitoradas pela FTIR. Os espectros obtidos na síntese da resina BAR de 3,0 mmol/g estão apresentados na Figura 1. Pode-se notar que, após a primeira etapa da síntese, aparece um pico em 1650 cm<sup>-1</sup> característico do grupo carbonila que foi introduzido na resina. Após a etapa de redução de Leuckart, na qual o grupo C=O é reduzido a NH-COH, há o desaparecimento deste pico, aparecendo outro em 1690 cm<sup>-1</sup>. Por fim, ao se realizar a terceira etapa da síntese - hidrólise ácida - este grupo é convertido em NH<sub>3</sub><sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>, desaparecendo este pico do espectro.

Apesar dos procedimentos experimentais serem adequadamente escritos, um grande problema encontrado na síntese destas duas resinas é a determinação do grau de substituição (teor de funcionalização em mmol/g). Este parâmetro, importante para a SPFS, é determinado somente ao final do processo de síntese das resinas utilizando o método do ácido pícrico,<sup>47</sup> ou por meio do acoplamento de um aminoácido e posterior análise usando um analisador de aminoácidos, ou ainda, alternativamente, por meio do acréscimo da massa de material obtido. Neste trabalho, utilizando a FTIR, desenvolvemos um método para determinar este valor na primeira etapa da síntese das resinas funcionalizadas com grupo benzidrilamino. Esta medida foi realizada por meio da relação das áreas do pico em 1600 cm<sup>-1</sup>, relativo aos anéis aromáticos do copolímero, e a área do pico em 1650 cm<sup>-1</sup>, relativo ao grupo carbonila introduzido no copolímero através de uma reação de Friedel-Crafts (1ª etapa). A Figura 2 mostra a relação entre o grau de substituição obtido ao final da síntese das resinas por análise de aminoácido e pelo método do ácido pícrico e a razão das áreas entre os picos descritos acima.

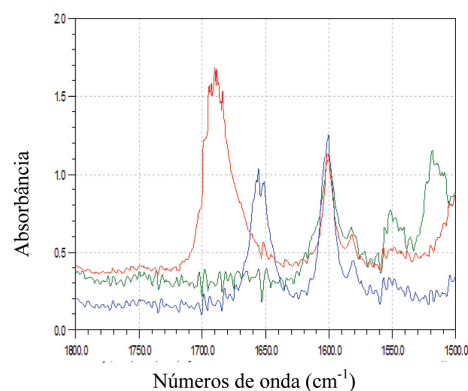


Figura 1. Espectros na região do infravermelho das diferentes etapas da síntese da BAR de 0,3 mmol/g: (—) 1ª etapa, (—) 2ª etapa e (—) 3ª etapa

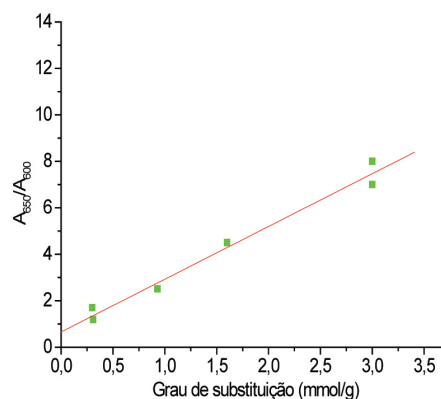


Figura 2. Relação entre o grau de substituição das resinas obtidas ao final da síntese e a razão entre as áreas dos picos em 1650 e 1600 cm<sup>-1</sup> obtidas na primeira etapa da síntese

Podemos verificar que a curva obtida é linear na faixa de 0,3 até 3,0 mmol/g, mostrando uma relação direta entre o grau de substituição e a razão das áreas dos picos obtidos pela FTIR, sendo que a equação que representa esta reta é:

$$GS = 0,65 + 2,27 \times \text{razão } A_{650}/A_{600}$$

Esta equação é útil na síntese das resinas BAR e MBAR, pois permite a determinação com precisão do grau de substituição da resina na primeira etapa da síntese, o que não era possível anteriormente.

## Aplicação na síntese peptídica

Um dos grandes problemas ainda encontrados na SPFS é a síntese de sequências agregantes. Este tipo de sequência é caracterizada principalmente por apresentar a formação de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares entre os grupos carbonila de um aminoácido e amina de outro, dificultando a solvatação da resina e a síntese peptídica. O entendimento de como acontecem estas interações e a intensidade em que elas ocorrem dentro do grão de resina podem propiciar informações sobre como evitá-las. As peptídil-resinas escolhidas para este estudo foram as ING-BARS com graus de substituição crescentes, isto é, com o aumento do número de sítios ativos na resina. A sequência ING corresponde ao fragmento 72 a 74 da proteína carregadora de grupos acila.<sup>42</sup> Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de <sup>13</sup>C desta sequência tripeptídica mostraram intensa agregação intercadeias,<sup>48,49</sup> principalmente em solventes apolares. Testes de acoplamento do aminoácido seguinte da sequência (Tyr)

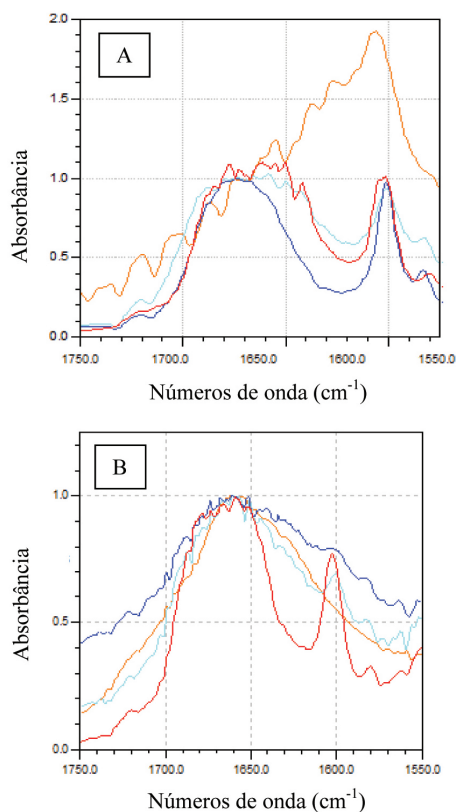
confirmaram esta tendência agregante, com velocidade de reação bastante reduzida em DCM.<sup>50</sup> Adicionalmente, estudos de RPE<sup>18</sup> e <sup>1</sup>H-HRMAS-RMN<sup>36</sup> confirmaram a alta capacidade agregante deste peptídeo.

Neste trabalho, diferentemente dos estudos citados acima, a ferramenta utilizada foi a FTIR, onde são avaliadas as regiões de absorção da Amida I (deformação axial da ligação C=O), Amida II (deformação angular da ligação N-H) e da Amida A (deformação axial da ligação N-H). A Tabela 1 mostra as variações nas bandas da Amida I, II e A, e as estruturas relacionadas a elas.<sup>32</sup> Durante este trabalho a banda que apresentou melhor definição foi a da Amida I, sendo esta a região escolhida para análise. A região da amida A não foi utilizada por sofrer influência da vibração da deformação axial de N-H do amino grupo terminal, atrapalhando a interpretação do espectro.

**Tabela 1.** Bandas na região do infravermelho características da Amida I, II e A<sup>32</sup>

Conformação	Amida I (cm <sup>-1</sup> )	Amida II (cm <sup>-1</sup> )	Amida A (cm <sup>-1</sup> )
Estrutura ao acaso ( <i>random coil</i> )	≈ 1655	1520-1545	3300
β-estrutura	1685 (fraca) 1630 (forte)	1525-1530	3425
α-hélice	1650	1540-1545	-

A Figura 3 (A) mostra os espectros na região do infravermelho da peptidil-resina ING-BAR com quatro diferentes graus de substituição, no solvente DCM. O estudo da região da amida I mostrou que a banda em 1650 cm<sup>-1</sup>, característica da estrutura ao acaso



**Figura 3.** Espectros na região do infravermelho do tripeptídeo ING sintetizado em resinas com diferentes graus de substituição (—) BAR 0,2 mmol/g, (—) BAR 0,3 mmol/g, (—) BAR 0,6 mmol/g e (—) BAR 3,0 mmol/g nos solventes (A) DCM e (B) DMSO

(*random coil*), foi alargada e deslocada para a região de 1630 cm<sup>-1</sup>, que corresponde à estrutura secundária denominada de β-estrutura. Estas mudanças espectrais indicaram o aumento da estruturação do peptídeo e da sua agregação. Estas mesmas alterações foram observadas por Henkel e Bayer<sup>32</sup> e por Hendrix *et al.*,<sup>28</sup> que visualizaram, respectivamente, o aumento da agregação peptídica durante a síntese do fragmento 80-99 da protease-1 do HIV, e a diminuição da agregação entre as cadeias peptídicas no interior de resinas com a adição do brometo de lítio em THF (tetra-hidrofurano). Os espectros também mostraram que a peptidil-resina de 0,2 mmol/g foi a que apresentou menor presença de β-estrutura, menor absorbância em 1630 cm<sup>-1</sup>, seguida pelas ING-BARs de 0,3; 0,6 e 3,0 mmol/g. Estes dados estão em concordância com os obtidos pela RPE,<sup>18</sup> que mostraram que a resina de 0,2 mmol/g e com 6% de conteúdo peptídico apresentou alta mobilidade em DCM. Adicionalmente, o espectro de FTIR da ING-BAR de 3,0 mmol/g (47% de conteúdo peptídico) mostrou alto teor de estruturação, coerente com o obtido pela RPE que apresentou para esta resina um sistema altamente imóvel, semelhante a amostras policristalinas (espectro de pó – Tabela 2)<sup>18</sup>. Os dados obtidos também estão coerentes com os obtidos pela <sup>1</sup>H-HRMAS-RMN<sup>36</sup>, que mostraram uma piora dos espectros obtidos em CDCl<sub>3</sub> (polaridade semelhante ao diclorometano) com o aumento do grau de substituição, indicando uma menor mobilidade do sistema.

**Tabela 2.** Valores de W<sub>0</sub> obtidos dos espectros de RPE durante a síntese do peptídeo VQAAIDYING nas resinas de baixo e alto teor de sítios reativos

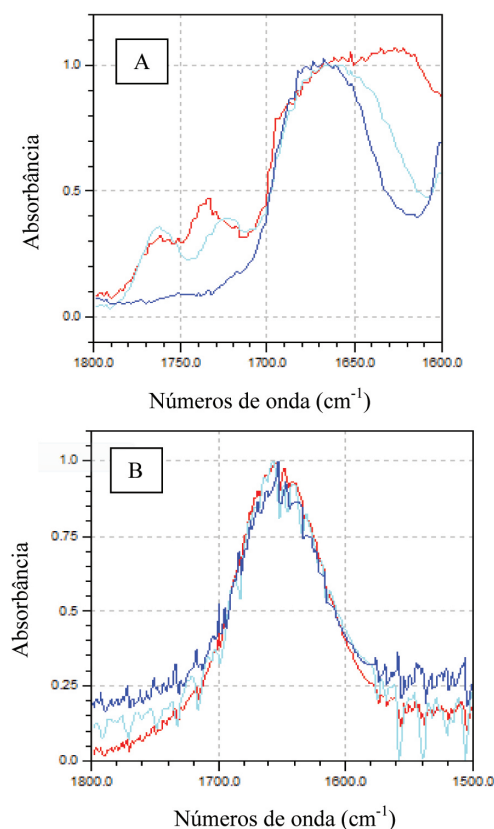
Peptidil-resina	W <sub>0</sub> (G)	
	DCM	DMSO
BAR 0,3 mmol/g		
ING	1,9	4,1
AIDYING	4,4	2,8
VQAAIDYING	espectro de pó	3,5
BAR 3,0 mmol/g		
ING	espectro de pó	3,0
AIDYING	espectro de pó	3,0
VQAAIDYING	espectro de pó	3,1

Visando analisar o comportamento destas resinas em um solvente polar, o mesmo estudo foi realizado utilizando o solvente DMSO (Figura 3 B). Nos espectros obtidos por meio da FTIR, a ING-BAR de 0,2 mmol/g mostrou a maior agregação, caracterizada pelo alargamento e deslocamento da banda para 1630 cm<sup>-1</sup>, indicando maior formação de β-estrutura. De maneira oposta, a menor agregação foi observada na ING-BAR de 0,6 mmol/g, banda mais estreita e deslocada para 1650 cm<sup>-1</sup>. A menor solvatação da ING-BAR de 0,2 mmol/g pode ser atribuída ao maior teor de matriz polimérica - característica apolar - nesta peptidil-resina (94% em relação ao peso total). O alto teor do componente apolar proporciona um melhor inchamento em solventes como o diclorometano, e um baixo inchamento em solventes polares como o DMSO.<sup>15</sup> Uma maior mobilidade para resinas com valor intermediário de grau de substituição também foi obtida anteriormente por meio da RMN em DMSO, onde uma resina contendo 1,6 mmol/g mostrou o melhor espectro e, desta forma, a maior mobilidade.<sup>36</sup> Este resultado também foi concordante com os dados obtidos por meio da RPE, onde Cilli e colaboradores mostraram que a resina de 0,6 mmol/g apresentou a maior mobilidade e, conseqüentemente, menor quantidade de β-estrutura neste solvente.<sup>18</sup> Este resultado mostrou a necessidade da utilização de solventes polares no uso de resinas de grau de substituição intermediário.

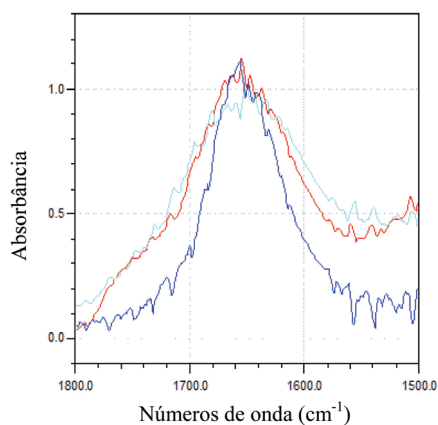
### Efeito no crescimento da cadeia peptídica

A utilização da FTIR também foi avaliada durante o crescimento das cadeias peptídicas nas BARs de 0,3 e 3,0 mmol/g (Figuras 4 e 5). Para este intento, a sequência VQAAIDYING foi escolhida, pois da mesma maneira que o tripeptídeo contido em sua extremidade C-terminal, este decapeptídeo também é descrito na literatura como agregante.<sup>36,48-53</sup>

Os espectros obtidos pela FTIR indicaram que durante o crescimento da cadeia peptídica, especificamente nas posições 3, 7 e 10 da síntese da peptidil-resina VQAAIDYING-BAR 0,3 mmol/g,



**Figura 4.** Espectros na região do infravermelho do peptídeo VQAAIDYING na BAR de 0,3 mmol/g nas posições (---) 3, (—) 7 e (···) 10 da síntese nos solventes (A) DCM e (B) DMSO



**Figura 5.** Espectros na região do infravermelho do peptídeo VQAAIDYING na BAR de 3,0 mmol/g nas posições (---) 3, (—) 7 e (···) 10 da síntese no solvente DMSO

ocorreu o alargamento/deslocamento da banda para a região de 1630  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 4A) no solvente DCM, indicando um aumento da quantidade de  $\beta$ -estrutura. Estes dados estão de acordo com os obtidos anteriormente por Cilli e colaboradores por meio da RPE, onde ocorreu um aumento nos valores de  $W_0$  (largura do pico central do espectro) durante o crescimento desta cadeia peptídica (Tabela 2), o que indicou um aumento da imobilidade do sistema. Dados similares também foram obtidos pela  $^1\text{H}$  HRMAS-RMN<sup>36</sup> no solvente apolar clorofórmio, que apresentou espectros sem picos para estas peptidil-resinas, indicando uma grande imobilidade do sistema.

No solvente polar DMSO (Figura 4B), os espectros de FTIR para as peptidil-resinas de 0,3 mmol/g mostraram um aumento de imobilização na ING-BAR e uma diminuição para o AIDYING e o VQAAIDYING, em comparação com o solvente DCM. Estas alterações foram atribuídas ao aumento de polaridade do sistema devido ao crescimento do peptídeo, o que possibilita uma maior solvatação em solventes polares como o DMSO.<sup>15</sup> Os espectros também mostraram que não foi possível diferenciar o teor de agregação para as 3 resinas estudadas por meio da FTIR. Estes dados divergem dos valores encontrados na RPE (Tabela 2), que mostraram valores diferentes de mobilidade para estas peptidil-resinas neste solvente. Esta diferença pode ser atribuída a uma maior sensibilidade da RPE ou ainda uma diferença entre as técnicas, onde nos estudos realizados por meio da RPE foi avaliada principalmente a mobilidade da extremidade amino-terminal, enquanto na FTIR o peptídeo foi estudado como um todo.

A avaliação da mobilidade durante o crescimento da cadeia peptídica também foi realizada na BAR de 3,0 mmol/g em DMSO. A Figura 5 mostrou que a ING-BAR foi a que apresentou maior mobilidade (pico mais estreito) em relação às demais peptidil-resinas. Este dado é discordante dos resultados de RPE (Tabela 2), que apresentou valores de  $W_0$  e, portanto, mobilidade semelhante para estas peptidil-resinas. Esta divergência deve-se provavelmente à especificidade de cada técnica; enquanto a RPE permite um estudo principalmente da região onde está ligada a sonda paramagnética, a FTIR gera informações do peptídeo como um todo. Outra explicação é a presença no espectro de RPE de um segundo componente mais imóvel<sup>36</sup> para a VQAAIDYING-BAR (dados não mostrados), o que pode estar sendo detectado pela FTIR.

A comparação global dos dados obtidos pelas técnicas espectroscópicas acima indicou uma maior sensibilidade da RPE e da FTIR no estudo das interações que ocorrem no interior do grão de resina, em relação à  $^1\text{H}$  HRMAS-NMR.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Obtenção das resinas

#### Acilação de Friedel-Crafts

Cloreto de alumínio anidro (previamente triturado) e cloreto de benzoíla ou p-metil-benzoíla (para a BAR ou MBAR, respectivamente) dissolvidos em DCM ou nitrobenzeno foram adicionados lentamente, sob agitação e a frio no copolímero de estireno com 1% de divinilbenzeno. Após a adição, a mistura foi agitada à temperatura constante por tempos variados. A quantidade dos reagentes, o tempo e a temperatura de reação foram calculados de acordo com o grau de substituição desejado.<sup>19</sup> Após o término da reação, coletou-se a resina em um funil de placa porosa e lavou-se 6 vezes por filtração com DCM ou nitrobenzeno, EtOH, EtOH:H<sub>2</sub>O (1:1), H<sub>2</sub>O, MeOH e DCM, encerrando-se com repetidos processos de suspensão em DCM e sedimentação em EtOH (feitos em funil de separação), para a retirada dos “finos” (grãos de resinas quebrados). A secagem final foi feita sob P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, a vácuo até peso constante, obtendo-se o benzoil- ou o p-metil-benzoil-copolímero.

### Aminação redutiva de Leuckart

Os copolímeros funcionalizados obtidos na etapa anterior foram submetidos separadamente a um tratamento com formiato de amônio, formamida e ácido fórmico 98% em nitrobenzeno como solvente. O aquecimento prévio desta solução a 150 °C permitiu a eliminação de H<sub>2</sub>O, sendo posteriormente agitada a 170 °C por 30 h, utilizando-se um aparato do tipo Dean-Stark. Este protocolo garante a conversão total dos grupos carbonila em formila. Após o término da reação, a resina foi recolhida em um funil de placa porosa e lavada por filtração, com nitrobenzeno, EtOH, EtOH/H<sub>2</sub>O (1:1), H<sub>2</sub>O, MeOH e DCM e seca sob P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, a vácuo, até peso constante.

### Hidrólise ácida

A terceira e última etapa para a obtenção da BAR e MBAR envolveu a hidrólise ácida simples dos lotes de polímeros formilados obtidos na etapa anterior. Neste processo a resina foi hidrolisada com HCl 12 mol L<sup>-1</sup> e ácido propiônico (1:1), sob agitação mecânica e temperatura de 85 °C por 5 h. Todo o processo de lavagem e secagem final, envolvendo filtrações em funil de placa porosa e também suspensão em DCM e sedimentação em alcoóis para a eliminação de “finos”, foram os mesmos anteriormente descritos para a obtenção de p-metil-benzoil- ou benzoil-resinas. Para se reduzir mais a dispersão do tamanho dos grãos, as resinas foram peneiradas em tamises especiais de diversos tamanhos, normalmente entre 0,030 e 0,100 mm. O grau de substituição da resina foi determinado por meio do método do ácido pícrico,<sup>47</sup> por análise elementar ou utilizando a análise de aminoácidos (após o acoplamento de um Boc-aminoácido).

### Síntese de peptídeos

Os peptídeos ou peptidil-resinas sintetizados foram obtidos manualmente, por meio do método da fase sólida, a partir das técnicas Boc/Bzl utilizando-se as resinas MBAR (metilbenzidrilamino resina) e BAR (benzidrilamino resina).<sup>36</sup> As clivagens finais das peptidil-resinas foram feitas em HF. Os peptídeos brutos obtidos foram caracterizados por CLAE e seus pesos moleculares determinados por espectrometria de massas.

### Espectros na região do infravermelho

Os espectros FTIR foram obtidos com o espectrômetro FTIR Shimadzu 8300 por meio da técnica de transmissão (resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, região espectral 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> e 50 varreduras). As resinas foram analisadas na forma de pastilhas produzidas na proporção de 3 mg de amostra para 300 mg de KBr. Para os espectros das peptidil-resinas, este material foi solvatado por 24 h no solvente em estudo e adicionado entre dois cristais de KBr.

### Espectros de RPE

Foi empregado um espectrômetro Bruker, modelo ER 200 e celas de quartzo, com capacidade aproximada de 0,2 mL, proveniente de J. Scalon, Costa Mesa, Califórnia.

As resinas foram marcadas com uma pequena quantidade do marcador de spin Fmoc-Toac, embebidas previamente no solvente desejado e uma pequena porção adicionada à cela de quartzo para a obtenção dos espectros de RPE. Os espectros das peptidil-resinas foram obtidos a 25 °C. Foram feitos, em geral de dois a três experimentos para cada amostra. A quantidade de marcador adicionado foi calculada de tal modo que não permitisse a presença de interações do tipo spin-spin.

De modo geral, o tempo de varredura foi de 4 min, 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 intervalos de campo de 100 G e, havendo necessidade, de 200 G. Os espectros foram feitos centralizando-se, no centro do espectro, o pico central.

### CONCLUSÕES

Os dados obtidos mostraram que foi viável o acompanhamento de todas as etapas das sínteses das resinas BAR e MBAR por meio da FTIR. Somado a isto, por meio da FTIR e da relação entre o grau de substituição e da área do pico correspondente ao grupo carbonila, foi possível a determinação do grau de substituição na primeira etapa de síntese destas resinas, já que as duas outras etapas ocorrem com 100% de eficiência.

O estudo da agregação das peptidil-resinas pela FTIR mostrou uma clara correlação com os dados obtidos por meio da RPE e da RMN. O aumento do grau de substituição mostrou resultados semelhantes nas 3 técnicas estudadas, isto é aumento de β-estrutura em DCM e diminuição em DMSO. Em DMSO, a melhor solvatação foi encontrada em peptidil-resinas com grau de substituição intermediário, ao redor de 0,6 mmol/g, indicando que resinas com este teor de funcionalização são as melhores para a síntese peptídica. O aumento da cadeia peptídica também foi avaliado nas resinas de 0,3 e 3,0 mmol/g. Na síntese da VQAAIDYING-BAR de 0,3 mmol/g, em DCM, foi possível verificar o aumento da quantidade de β-estrutura com o aumento da cadeia peptídica; estes dados estão coerentes com os obtidos na RPE, que mostrou um aumento dos valores de W<sub>0</sub> com o aumento da cadeia. Em DMSO esta concordância não foi seguida, sendo que na FTIR os espectros obtidos foram similares para as peptidil-resinas, enquanto que na RPE houve variações nos valores de W<sub>0</sub>.

Este trabalho mostrou que os resultados obtidos por meio da RPE, da RMN e da FTIR foram similares. Esta conclusão é importante porque valida os resultados encontrados pela RPE, na qual há críticas de que a introdução da sonda paramagnética (TOAC) poderia afetar o sistema.

### MATERIAL SUPLEMENTAR

Estão disponíveis gratuitamente em <http://quimicanova.s bq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre, as Figuras: 1S, que apresenta a estrutura química do polímero de estireno contendo 1% de divinilbenzeno utilizado nas sínteses; 2S, que apresenta as reações químicas e as etapas utilizadas na síntese das resinas BAR e MBAR; 3S e 4S, que mostram a caracterização do peptídeo VQAAIDYING obtido na síntese utilizando a resina de 3,0 mmol/g. Também é possível encontrar a Tabela 1S, que apresenta os rendimentos em massa obtidos para a síntese do peptídeo VQAAIDYING nas resinas de 0,3 e 3,0 mmol/g.

### AGRADECIMENTOS

À FAPESP, CNPq e CAPES pelas bolsas e apoios financeiros concedidos.

### REFERÊNCIAS

1. Merrifield, R. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
2. Albericio, F.; *Biopolymers* **2000**, *55*, 2.
3. Miranda L. P.; Alewood, P. F.; *Biopolymers* **2000**, *55*, 217.
4. Barany, G.; Merrifield, R. B.; *The peptides 2*; Gross, E.; Meinhofer, J., eds.; Academic Press: New York, 1980.
5. Stewart, J. M.; Young, J. D.; *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2<sup>nd</sup> ed., Pierce Chemical Company: Rockford, 1984.
6. Kent, S. B. H.; *Ann. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 957.
7. Atherton, E.; Sheppard, R. C.; *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press: Oxford, 1989.

8. Fields, G. B.; Noble, R. L.; *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 161.
9. Juliano, L.; *Quim. Nova* **1990**, *13*, 3.
10. Machado, A.; Liria, C. W.; Proti, P. B.; Remuzgo, C.; Miranda, M. T. M.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 781.
11. Atherton, E.; Clive, D. L. J.; Sheppard, R. C.; *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 6587.
12. Auzanneau, F. I.; Medal, M.; Bock, K.; *J. Pept. Sci.* **1995**, *1*, 31.
13. Remuzgo, C.; Andrade, G. F. S.; Temperini, M. L. A.; Miranda, M. T. M.; *Biopolymers* **2009**, *92*, 65.
14. Wieland, T.; Birr, C.; Flor, F.; *Justus Liebiges Ann. Chem.* **1969**, 727, 130.
15. Cilli, E. M.; Oliveira, E.; Marchetto, R.; Nakaie, C. R.; *J. Org. Chem.* **1996**, *81*, 8992.
16. Sarin, V. K.; Kent, S. B. H.; Merrifield, R. B. J.; *Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5463.
17. Nakaie, C. R.; Marchetto, R.; Schreier, S.; Paiva, A. C. M. In *Peptides: chemistry, structure and biology*; Rivier, J. E.; Marshall, G. R., eds.; Escom: Leiden, 1990, p. 1022.
18. Cilli, E.; Marchetto, R.; Schreier, S.; Nakaie, C. R.; *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9118.
19. Marchetto, R.; Etchegaray, A. Jr.; Nakaie, C. R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1992**, *3*, 30.
20. Etchegaray, A.; Carvalho, R. S. H.; Marchetto, R.; Nakaie, C. R. In *Peptides: chemistry, structure and biology*; Hogds, R. S.; Smith, J. A., eds.; Escom: Leiden, 1994, p. 252.
21. Etchegaray, A.; Carvalho, R. S. H.; Boschov, P.; Nakaie, C. R.; *Chromatographia* **1996**, *43*, 82.
22. Silva, E. H.; Etchegaray, A.; Carvalho, R. S. H.; Jubilut, G. N.; Miranda, A.; Nakaie, C. R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 171.
23. Carvalho, R. S. H.; Ianzer, D. A.; Malavolta, L.; Rodrigues, M. M.; Cilli, E. M.; Nakaie, C. R.; *J. Chromatogr.* **2005**, *817*, 231.
24. Pennington, M. W.; Byrnes, M. E. In *Peptide synthesis protocols*; Pennington, M. W.; Dunn, B. M., eds.; Humana Press: Totowa, 1994, p. 1.
25. Schnolzer, M.; Alewood, P.; Jones, A.; Alewood, D.; Kent, S. B. H.; *Int. J. Pept. Res. Therapeutics* **2007**, *13*, 31.
26. Coin, I.; Beyermann, M.; Bienert, M.; *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 3247.
27. Narita, M.; Honda, S.; Umeyama, H.; Obana, S.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, *61*, 281.
28. Hendrix, J. C.; Halverson, K. J.; Jarret, J. T.; Lansbury, P. T.; *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4517.
29. Narita, M.; Umeyama, H.; Yoshida, T.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, *62*, 3582.
30. Zhang, Y. P.; Lewis, R. N. A. H.; Hodges, R. S.; McElhaney, R. N.; *Biochemistry* **1992**, *31*, 11572.
31. Bing, Y.; *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 621.
32. Henkel, B.; Bayer, E.; *J. Pept. Sci.* **1998**, *4*, 461.
33. Rahman, S. S.; Busby, D. J.; Lee, D. C.; *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6196.
34. Warrass, R.; Wieruszski, J. M.; Boutillon, C.; Lippens, G.; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1789.
35. Keifer, P. A.; *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1558.
36. Valente, A. P.; Almeida, F. C. L.; Nakaie, C. R.; Schreier, S.; Crusca Jr, E.; Cilli, E. M.; *J. Pept. Sci.* **2005**, *11*, 9.
37. Ribeiro, S. C. F.; Schreier, S.; Nakaie, C. R.; Cilli, E. M.; *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 19.
38. Cilli, E. M.; Vicente, E. F.; Crusca Jr, E.; Nakaie, C. R.; *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5521.
39. Marchetto, R.; Schreier, S.; Nakaie, C. R. J.; *Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11042.
40. Cilli, E.; Marchetto, R.; Schreier, S.; Nakaie, C. R.; *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 517.
41. Gallop, M. A.; Barrett, R. W.; Dower, W. J.; Fodor, S. P. A.; Gordon, E. M.; *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1233.
42. Gordon, E. M.; Gallop, M. A.; Patel, D. V.; *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 144.
43. Andrews, P. C.; Leonard, D. M.; Cody, W. L.; Sawyer, T. K. In ref. 24, p. 305.
44. Pietta, P. G.; Cavallo, P. F.; Takahashi, K.; Marshall, G. R.; *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 44.
45. Matsueda, G. R.; Stewart, J. M.; *Peptides* **1981**, *2*, 45.
46. Nakaie, C. R.; Marchetto, R.; Schreier, S.; Paiva, A. C. M. In *Peptides: chemistry and biology*; Marshall, G. R., ed.; Escom: Leiden, 1988, p. 249.
47. Cilli, E. M.; Jubilut, G. N.; Ribeiro, S. C. F.; Nakaie, C. R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2000**, *11*, 474.
48. Kent, S. B. H.; Merrifield, R. B. In *Peptides 1980*; Brunfeldt, K., ed.; Scriptor: Copenhagen, 1981, p. 328.
49. Merrifield, R. B.; *Brit. Polym. J.* **1984**, *16*, 173.
50. Atherton, E.; Dryland A.; Sheppard, R. C.; Wade, J. D. In *Peptide: structure and function*; Hruby, V. J.; Rich, D. H., eds.; Pierce Chemical Company: Rockford, 1983, p. 44.
51. Hancock, W. S.; Prescott, D. J.; Vagelos, P. R.; Marshall, G. R.; *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 774.
52. Varanda, L. M.; Miranda, M. T. M.; *J. Pept. Res.* **1997**, *50*, 102.
53. Larsen, B. D.; Holm, A.; *J. Pept. Res.* **1998**, *52*, 470.