

Setembro/2002

## II. INTRODUÇÃO

Desde a fase de técnico de laboratório, passando pela de pós-graduando, sempre estivemos envolvido na metodologia da síntese de peptídeos em materiais poliméricos e portanto, denominada em fase sólida (Barany e Merrifield, 1980, Stewart e Young, 1984, Atterton e Sheppard, 1989, Fields e Noble, 1990). Esta técnica desenvolvida no início da década de sessenta (Merrifield, 1963) e premiada com o prêmio Nobel de Química em 1984 (Bruce R. Merrifield, Rockefeller University, New York) tem se tornado cada vez mais utilizada, tanto pela expansão contínua na parte da aplicação clínica-laboratorial de centenas de tipos de peptídeos quanto na de pesquisa, principalmente agora com o início da fase proteômica nas ciências biológicas.

Embora compentindo portanto em uma área bastante difícil devido ao interesse comercial envolvido, temos obtido bons resultados em alguns dos enfoques de pesquisa desenvolvidos, objetivando a melhoria do rendimento desta metodologia. Como consequência destes estudos que propuseram alterações benéficas em certos protocolos de síntese peptídica, pudemos nos tornar bastante independentes na obtenção da maior parte dos tipos de peptídeos existentes para poder atender a demanda do próprio grupo e também de nossa comunidade científica. Obtêm-se deste modo, desde peptídeos bastante simples e curtos, passando por alguns bem mais problemáticos como os que envolvem sequências com tendência de forte agregação, as alças externas/internas hidrofílicas e finalmente as longas transmembranares, extremamente hidrofóbicas, de receptores peptídicos já conhecidos. Além de peptídeos, e seguindo estratégia adotada há alguns anos, estamos também independentes na síntese de alguns derivados de aminácidos, reagentes e de resinas.

Este aprendizado contínuo de décadas no aspecto de síntese peptídica possibilitou-nos uma boa expansão de nossas linhas de pesquisa, viabilizando por exemplo, estudos clássicos do tipo estrutura-função de diferentes peptídeos de relevância fisiológica. Para isto, tornou-se imprescindível um domínio de uma gama cada vez maior de métodos físico-químicos, na maior parte, espectroscópicos. Dentro deste contexto, parte significativa do presente trabalho abrangeu inicialmente a síntese química de alguns peptídeos de relevância biológica mas contendo marcador espectroscópico (aminoácido paramagnético denominado TOAC) em diferentes posições de suas sequências, seguido da determinação de suas propriedades biológicas comparadas com a do peptídeo nativo. Esta estratégia tem possibilitado, por exemplo, o emprego da técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) para o estudo conformacional destes análogos peptídicos e cujos dados poderão ser associados com os de outros métodos clássicos como o dicroísmo circular, fluorescência, ressonância magnética nuclear, infra-vermelho, etc. Esta investigação de natureza estrutural, tem sido desenvolvida não somente em solução mas também expandindo-a a sistemas membrana-miméticos, objetivando uma melhor correlação com as correspondentes atividades biológicas destes compostos. Saliente-se também neste aspecto que, se no caso do marcador TOAC, não conseguimos obter a sua patente à época, um segundo marcador paramagnético, também do tipo aminoácido (POAC), já teve a sua obtida graças à recente organização estrutural de órgãos de fomento quanto ao apoio a esta parte de proteção intelectual no meio universitário. Detalhes estruturais de TOAC e do POAC e o histórico do surgimentos destes marcadores de spin, relacionado ao estágio atual do emprego dos mesmos serão expostos adiante.

Além desta extensa parte envolvendo estudos de estrutura-função de peptídeos de relevância fisiológica e que já rendeu, em termos tecnológicos, outras duas patentes de peptídeos paramagnéticos com características especiais (pela primeira vez se obteve análogos integralmente

ativos, mesmo após a marcação paramagnética), o trabalho aqui apresentado procurou continuar com a estratégia do aprimoramento da metodologia da síntese peptídica, sob diferentes aspectos. Dentre estes, podemos citar por exemplo, os estudos de estabilidade química da ligação peptidil-resina, cujo conhecimento correto pode implicar em aumento do rendimento da síntese e também na avaliação do uso de novos polímeros, continuamente sendo desenvolvidos em nossos estudos. Bastante ênfase foi dada também ao tópico da investigação do processo crucial de solvatação da resina na eficiência da síntese peptídica (monitorada por exemplo, por microscopia dos grãos da resina ou por RPE de resinas marcadas paramagneticamente). Este item se tornou um dos mais relevantes pois além de possibilitar a proposição de regras de solvatação de materiais poliméricos, permitiu também ao final de alguns anos de estudo, a proposição de uma escala nova e mais apropriada de polaridade no meio científico internacional (escala ou constante anfotérica).

Apesar de todos estes itens estudados, acreditamos que o mais relevante no aspecto de aplicação tecnológica e de benfeitoria para a comunidade foi baseada em uma linha de pesquisa que propunha a quebra de um dogma existente há décadas na metodologia da síntese de peptídeos. Recomendava-se sempre o uso de resinas com o mais baixo teor de sítios reativos (grau de substituição) pois deste modo, o rendimento não caía em função de efeitos de agregações de cadeias no interior do grão da resina. Sintetizando-se pioneiramente e, baseando-se em estudos físico-químicos de polímeros que continham graus de substituição cerca de dez vezes maiores, conseguimos encontrar estratégias que tornavam viável a síntese de peptídeos com resinas de alta substituição. Como consequência, pode-se obter uma enorme economia em todo o processo, facilitando a obtenção de grandes quantidades de peptídeos em uma única síntese. Comentaremos posteriormente, exemplo concreto muito recente da importância destes resultados para efeito de contrato de fornecimento, a baixo custo, de um tipo de medicamento peptídico junto ao sistema de saúde governamental.

Procuramos dar também, grande ênfase a um outro campo de alcance bastante tecnológico que é o da aquisição de independência no desenvolvimento e estudos de diversos tipos de materiais poliméricos, não somente para uso propriamente em síntese peptídica, mas também com potencialidades para emprego alternativo em outros campos. Destacam-se neste aspecto, a possibilidade bastante moderna do emprego na chamada química orgânica em fase sólida, que associada à estratégia da química combinatória, tem sido recentemente um dos procedimentos mais eficazes para a produção de novos medicamentos. Além disto, alguns destes suportes sólidos podem apresentar potencialidades como resinas de cromatografias líquidas em coluna. Demonstraremos pioneiramente que algumas resinas empregadas exclusivamente como suporte sólido de síntese peptídica funcionaram com sucesso, como polímeros com propriedades cromatográficas de trocadora aniônica. E inversamente, algumas resinas comerciais clássicas de troca iônica podem se tornar de síntese peptídica e de cromatografia de afinidade. Todas estas aplicações inusitadas foram também já submetidas a proteção intelectual, via patenteamento.

Em conclusão, a análise dos dados a seguir, discutidos com mais detalhes, irá destacar uma forte associação entre estudos básicos com os de aplicação tecnológica. A complexidade maior de nosso trabalho esteve sempre ligado à característica peculiar de desenvolvermos temas bastante distintos um do outro. Estas vão desde a química orgânica pura no tocante a síntese de pequenas moléculas derivadas de aminoácidos até macromoléculas como peptídeos e polímeros, passando por estudos físico-químicos clássicos como o envolvido no conceito de polaridade, métodos espectroscópicos, temas tipicamente bioquímicos como a cromatografia líquida em coluna e enveredando até pelo campo da farmacologia pura de alguns peptídeos sintetizados. Acreditamos no entanto que, no global, a avaliação de todo este esforço tem sido recompensador por diferentes parâmetros pois, tanto no aspecto dos estudos mais teórico-conceituais quanto no de aplicações práticas, cremos ter em mãos resultados concretos e de bom nível. A seguir os sub-itens que compõem o presente trabalho submetido à avaliação do Comitê Organizador do Prêmio Péter Murányi, este ano com o tema "Desenvolvimento Científico e Tecnológico".

## II - SUB-PROJETOS DESENVOLVIDOS.

### 1) Síntese de resinas

Na fase inicial, sintetizamos lotes de um copolímero de estireno-1% divinilbenzeno mas contendo grupamentos fenilmetilamínicos e denominado benzidrilamino-resina (BAR) eu que foi introduzido na síntese peptídica para a obtenção de peptídeos  $\alpha$ -carboxamida (Pietta e cols., 1974). Estudando-se a cinética de sua síntese, pudemos desenvolver um protocolo (Nakaie e cols., 1988; Marchetto e cols., 1992) que permitiu a obtenção de elevado conteúdo de sítio ativo (entre 2,5 e 3 mmol/g de amino grupos). Estes lotes de BAR foram muito importantes em diversos sub-tópicos de nosso trabalho pois permitiram um estudo mais apropriado da influência da quantidade e do tipo das cadeias peptídicas na solvatação do grão da peptidil-resina. Foi com base no emprego desta resina altamente substituída que se conseguiu desenvolver por exemplo, estudos por microscopia ou por RPE, do fenômeno da solvatação de peptidil-resinas. Ou de aplicação como tracadora aniônica, como iremos ver na sequência. Seguindo protocolos assemelhados, pudemos sintetizar outro tipo de copolímero de estireno e divinilbenzeno mas contendo grupamentos metilamínicos (aminometil-resina) e atingimos valores de substituição ao redor de 6 mmol/g. Por se mostrar uma boa resina de traca aniônica, o seu patenteamento já foi obtido (EPM-1, Patente PI 9904682-2).

Ainda dentro da classe de resinas contendo matriz de estireno e divinilbenzeno, estamos averiguando atualmente a possibilidade de síntese de diversos análogos da BAR contendo grupamentos acíclicos mais hidrofóbicos no anel benzênico do grupamento fenilmetilamínico. Neste caso, parte-se de cloretos de fenacilas já contendo algum grupamento alifático em seu anel aromático, o que poderia afetar, dependendo do grau de incorporação deste grupo, a hidrofobicidade geral da nova resina obtida. Se possível, esta modificação estrutural da BAR trará como conseqüência, além do aumento da sua hidrofobicidade, alterações nas suas propriedades de solvatação, porosidade, etc, afetando a sua potencialidade como suporte sólido de síntese peptídica. Esta alteração estrutural da resina pode afetar também a estabilidade da ligação peptidil-resina, podendo na dependência desta estabilidade, prejudicar ou favorecer o rendimento final da síntese. Este tipo de resina já está em fase final de testes e bons resultados estão sendo obtidos mostrando que poderemos ter um novo suporte sólido para uso em síntese peptídica.

No sentido oposto, em termos de polaridade da resina, já inciamos a síntese destas resinas contendo estireno mas com cruzamentos efetuados com grupamentos mais polares e em quantidades variadas. Uma delas já foi aplicada em estudos que avaliam a solvatação de polímeros e recentemente publicada (Malavolta e cols., 2002). Além destes tipos de polímeros com predominância hidrofóbica, outras mais hidrofílicas estão sendo desenvolvidas dentre as quais uma baseada em matriz ainda de estireno mas com intercruzamento de acrilamida (Kumar e cols., 2000, Malavolta e cols., no prelo) e um outro onde se insere quantidades controladas de grupamentos polares de polietilenoglicol (PEG) na estrutura de resinas hidrofóbicas do tipo BAR. Independentemente da classe de resina sintetizada, planeja-se obtê-las também objetivando compará-las em termos de propriedade de solvatação (com ou sem peptídeo) e também em termos de eficiência na síntese de alguns peptídeos-modelo e possivelmente como suportes sólidos de cromatografia.

### 2) Estudo da estabilidade da ligação aminoacil- e peptidil-resina a diferentes meios ácidos.

A clivagem ácida do peptídeo da resina parece ser muito dependente tanto das características, tanto da resina empregada quanto do aminoácido ligado a ela. Há por exemplo, citações na literatura (Matsueda e Stewart, 1981) indicando que a ligação de qualquer grupamento à BAR é mais ácido-estável que metilbenzidrilamino-resina (MBAR) e que portanto, a clivagem em HF pode ser incompleta, principalmente se o aminoácido a ela ligado é de natureza mais hidrofóbica. Por outro lado, a menor estabilidade desta ligação pode induzir perdas de cadeias peptídicas durante os sucessivos tratamentos de desproteção do Boc com TFA no transcorrer da síntese.

Objetivando o esclarecimento destas dúvidas ainda pendentes, desenvolvemos estudos cinéticos da etapa de hidrólise ácida de aminoacil e peptidil-resinas. Variamos os aminoácidos (Gly, Val e Phe), as resinas e a temperatura da reação (130oC e 160oC). O meio hidrolizante foi o acima mencionado (HCl/ácido propiônico) e os resultados iniciais obtidos indicam que o tempo de hidrólise proposto na literatura (Scotcher e cols, 1970) parece ser insuficiente para a clivagem total de algumas aminoacil ou peptidil-resinas (Jubilut e cols, 1997). Como complemento deste estudo, descobrimos que uma mistura TFA/HCL 12N na proporção 1:3 (v/v) permite hidrólises mais rápidas e que portanto poderá passar a ser a solução ácida de escolha para a hidrólise destes tipos de resinas compostas (Jubilut e cols., 1998).

Desenvolvemos também um outro tópico já mencionado que envolve o estudo comparativo de estabilidade de aminoacil ou peptidil grupos ligados em resinas, frente a tratamentos com HF e TFA.

Diferentes aminoacil- e peptidil-resinas foram submetidas a tratamentos com estes meios ácidos por diferentes tempos e os resultados de clivagens incompletas em HF somadas às que ocorrem durante os tratamentos com TFA foram confrontados para se poder concluir quanto à melhor resina que se deve empregar na síntese peptídica. Com este estudo, foi já possível propor uma regra mais clara da escolha da resina, dependente do peptídeo e do aminoácido C-terminal para o caso da química Boc (Jubilut e cols., 1999). Em complemento a este tópico, ampliamos este estudo para outros métodos alternativos de clivagem existentes. Dentre estes, tem-se o do ácido trifluorometanosulfônico com ácido trifluoroacético e tioanisol (Yajima e cols., 1974) e resultados recentes permitiram propor regras comparativas de uso destes métodos (Jubilut e cols., 2001a e b). Este tópico possui a relevância, não somente de ajudar no desenvolvimento do método da síntese peptídica mas também avaliar a potencialidade de cada tipo de polímero, tanto os tradicionais quanto os novos que estamos continuamente desenvolvendo.

### 3. Solvatação de resinas e peptidil-resinas.

Proposição de uma nova escala de polaridade de solventes.

O método da microscopia dos grãos das resinas (Sarin e cols., 1980, Marchetto e cols., 1992, Tam e cols., 1995) foi empregado para se estimar as propriedades de solvatação de resinas ou peptidil-resinas. Como o objetivo inicial era o de determinar as características solvatantes destes materiais poliméricos, tanto muito hidrofóbicos quanto hidrofílicos, procuramos determinar o grau de inchamento de cada resina em cerca de 30 sistemas de solventes que abrangessem praticamente toda a escala de polaridade de solventes. (Cilli e cols., 1993, 1996). Objetivando correlacionar o grau de solvatação de cada resina com o valor da polaridade do meio, polímeros de diferentes polaridades, sintetizadas por nós ou existentes comercialmente foram estudados. Incluíram-se também neste caso, além das resinas com utilização em síntese peptídica, outras empregadas apenas como suportes sólidos de cromatografias líquidas. O objetivo básico foi o de termos um leque o mais amplo possível de materiais poliméricos, diversificado nas suas características estruturais e físico-químicas.

Em termos do parâmetro de polaridade do solvente empregados neste estudo, comparamos praticamente todos os clássicos existentes na literatura como a constante dielétrica, o parâmetro  $d$  de solubilidade de Hildebrand (Hildebrand, 1949), o termo  $Et_{30}$  de Dimroth-Reichardt (Reichardt, 1994),  $a$  e  $b$ , (Kamlet e cols., 1983) etc, com o que tínhamos introduzido preliminarmente (Cilli e cols., 1993, 1996). Este parâmetro proposto é dado pelo somatório, na proporção 1:1, dos valores das propriedades receptora (AN) e doadora eletrônica (DN) de cada solvente (Gutmann, 1978) e se mostrou mais sensível que os demais mencionados acima para o estudo de solvatação de polímeros em geral, tomados como modelo de soluta na interação com solventes. Figuras que correlacionam grau de inchamento de cada resina (obtido por microscopia dos grãos) em função da polaridade do meio, dada pelo parâmetro (AN+DN) de cada solvente, mostraram curvas com máximos de inchamento características de cada resina (pois cada resina tem o seu valor líquido de polaridade e a solvatação é máxima no solvente com polaridade similar à sua). Nestas figuras de inchamento, notou-se que, independente da resina, sempre houve uma menor dispersão dos pontos, indicando que o parâmetro (AN+DN) é realmente o mais sensível para detectar interação com o meio solvatante. Estes resultados comprovaram que este termo físico-químico de caráter anfotérico, pode ser considerado um novo parâmetro de polaridade de solventes em substituição à maioria dos existentes até o momento (Malavolta e cols., 2002, Malavolta e cols, no prelo).

Além da grande relevância para química como um todo, em paralelo a esta proposição de nova constante de polaridade, estabeleceu-se tentativamente uma regra de solvatação para cada tipo de polímero. Como dissemos, cada um solvata no meio que lhe é mais similar em termos de polaridade e esta regra envolveu resinas neutras, hidrofóbicas, hidrofílicas, ionizadas, etc. Além da importância evidente em termos de conceito básico na área de polímeros em geral, nota-se implicações relevantes no tocante ao aspecto de aplicação tecnológica destes achados. Pode-se prever os melhores solventes para cada tipo de polímero e esta informação é, muitas vezes, crucial para o sucesso ou não de uma síntese a ser efetuada em resinas. Além do campo da síntese peptídica, de oligonucleotídeos (Letsinger e cols., 1975), de carboidratos (Fréchet e cols, 1971), esta informação referente à solvatação do suporte sólido é essencial para a moderna metodologia de síntese de novos medicamentos, via polímeros e, denominada síntese orgânica em fase sólida (Thompson e Ellman, 1996).

4) Aplicação de métodos espectroscópicos para o estudo da solvatação de resinas e peptidil-resinas

Embora não se descarte o uso de espectroscopias aplicáveis para o estudo de sistemas poliméricos como a ressonância magnética nuclear (Deber e cols., 1989) e o infra-vermelho do tipo transformada do Fourier (Henkel e Bayer, 1998), ênfase maior será dada ao da ressonância paramagnética eletrônica (RPE) (Berliner e Reuben, 1989) que é o mais apropriado para se obter informações ao nível de dinâmica molecular de um sistema qualquer, marcado com uma molécula-repórter e denominado marcador de spin. Este marcador é um composto que possui um radical livre estável em sua estrutura (geralmente do tipo nitróxido) e portanto responsável pelo seu paramagnetismo. O derivado paramagnético de aminoácido TOAC (ácido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-óxido-4-amino-4-carboxílico) protegido com o grupo Boc (Nakaie e cols., 1981) ou Fmoc (Marchetto e cols., 1993) que permite a introdução do marcador internamente à cadeia peptídica, foi introduzido por nós na química peptídica e tem sido útil para a obtenção de diversas classes de peptídeos marcados paramagneticamente. Uma cronologia da introdução, em duas etapas (Nakaie e cols., 1981 e Marchetto e cols., 1993) deste marcador em experimentos bioquímicos foi recentemente publicado na seção de Ciência de revista da American Chemical Society (Wilson, 2000), destacando a nossa participação, juntamente com a dos Profs. Shirley Schreier (Dept. Bioquímica, USP) e Antonio C. M. Paiva (Dept. Biofísica, UNIFESP).

Dentre os peptídeos já estudados e contendo o marcador TOAC, destacam-se os peptídeos

vasoativos angiotensina II (Nakaie e cols, 1983, Nakaie e cols., 2002, Vieira e cols, no prelo), bradicinina (Nakaie e cols., 1998, Nakaie e cols., 2002), fragmentos de receptor da angiotensina II (Pertinhez e cols., 1995) e também de peptídeos-modelo para estudos conformacionais (Smithe e cols., 1995, Toniolo e cols., 1995, Monaco e cols., 1999). Mais recentemente, obtivemos o primeiro hormônio peptídico da literatura (hormônio estimulador do melanocito,  $\alpha$ -MSH) que mesmo contendo o marcador de spin TOAC em sua estrutura, manteve integralmente a sua atividade biológica (Barbosa e cols., 1999). O mesmo ocorreu com um potente análogo deste hormônio peptídico (melanotan) e estudos preliminares (Barbosa e cols., 2001) ou já acoplados com dados de fluorescência foi recentemente publicado (Nakaie e cols., 2001). Por serem os primeiros peptídeos marcados paramagneticamente e que mantiveram integralmente a atividade original, ambos os peptídeos contendo o marcador TOAC ( $\alpha$ -MSH e melanotan) foram patenteados (EPM-2, PI 9900595-6 e EPM-3, PI 9906090-6, respectivamente) pois poderão ser úteis em diversos protocolos bioquímicos para o estudos destes peptídeos que controlam a coloração da epiderme de mamíferos.

Em termos de aplicação em polímeros que é o mais apropriado a se destacar no presente trabalho, temos o privilégio do pioneirismo da aplicação da RPE em peptidil-resinas, via TOAC. Os primeiros trabalhos remontam de cerca de uma década (Nakaie e cols., 1988, 1990) e foi mais recentemente estendida para estudos que monitorassem a dinâmica da matriz polimérica, através da determinação da mobilidade das cadeias peptídicas de seqüências agregantes ou não, no grão de resina em função da natureza do solvente (Cilli e cols., 1997, 1999, Ribeiro e cols., 2001, Oliveira e cols, no prelo). Importantes resultados puderam ser coletados com esta estratégia espectroscópica, até o momento, pouco mencionada na literatura internacional. Mas apesar da ênfase no uso de marcadores de spin, estudos de solvatação de peptidil-resinas por outras metodologias clássicas como o NMR já foram também iniciados (Cilli e cols., 2002).

Além do uso do marcador TOAC, patenteamos também [EPM-5, Patente PI 9903137-0 (1999)] um segundo marcador de spin do tipo  $\beta$ -aminoácido, contendo a estrutura 2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-N-oxil-3-amino-4-carboxílico (POAC) protegido com o grupamento Fmoc (Fmoc-POAC), seguido recentemente de sua publicação (Tominaga e cols., 2001). O objetivo seria o de investigar a viabilidade do emprego deste novo "spin label" para a marcação de peptídeos e macroestruturas e analisar diferenças em termos de efeito estrutural nestas situações, induzidas por um anel pentacíclico do tipo pirrolidina e não piperidina como o do TOAC. Dentre os peptídeos a serem marcados com este novo marcador, estão atualmente em desenvolvimento, estudos com os vasoativos All e BK.

##### 5) Síntese de peptídeos em resinas de alto teor de sítios reativos.

Como enfatizamos anteriormente, este item talvez seja o que trouxe o resultado de aplicação tecnológica de maior impacto até o momento. O dogma que persistiu por décadas referente à inviabilidade de uso de resinas com elevado grau de sítios reativos (grau de substituição) foi questionado por nós no final dos anos oitenta, quando resolvemos sintetizar e testar lotes de BAR com teores amínicos bastante elevados na síntese de alguns peptídeos modelos (Nakaie e cols, 1988, 1990, Marchetto e cols., 1991, 1992). Nos anos seguintes, estudos de inchamentos dos grãos de resina em inúmeros solventes, medidos por microscopia dos grãos secos e solvatados, seguido em muitos casos, de estudos de cinética das reações de acoplamento em função do grau de inchamento, foram desenvolvidos objetivando se encontrar condições experimentais que viabilizassem a síntese quando iniciadas em resinas de alto grau de substituição (Cilli e cols., 1993, Oliveira e cols., 1995, Cilli e cols, 1996, Oliveira e cols., 1997, Malavolta e cols., 2002, no prelo).

Além desta estratégia de microscopia dos grãos de resina, já mencionamos também a estratégia

pioneira de marcar-se as resinas com TOAC e monitorar o dinâmica do microambiente que envolve a malha polimérica contendo peptídeos, em sua dependência com o sistema de solventes (Nakaie e cols, 1988, 1990; Cilli e cols., 1997, 1999, 2001; Oliveira e cols, no prelo). Considerando-se portanto estes dados provenientes de estudos de solvatação (por microscopia e por RPE), associados ao de cinética de acoplamento de aminoácidos em diferentes solventes, conseguimos encontrar protocolos experimentais, variando-se o sistema de solventes, temperatura e métodos de acoplamento, para conseguir-se a síntese com bom rendimento, de diversos tipos de resinas. Em muitos casos, as resinas de alta substituição empregadas nas sínteses chegarem a conter ao redor de 80% de cadeias peptídicas no seu interior (em peso), suplantando portanto em muito, a da própria resina de partida.

Com isto, temos sintetizados inúmeros tipos de peptídeos, mesmo os mais comuns em resinas de alta substituição, incluindo-se os tradicionais como a BK, All e todos os seus derivados. Quanto aos de grande potencialidade comercial, já desenvolvemos o hormônio liberador de tireotrofina (TRH), empregado para teste laboratorial da função tireoidal e a Desmopressina, um nonapeptídeo cíclico responsável pelo controle da doença de pacientes acometidos de Diabetes Insipidus. Este peptídeo foi recentemente desenvolvido na quantidade necessária para atender finalmente toda a demanda estadual e portanto, celebrando-se finalmente um contrato de fornecimento contínuo do mesmo entre a Escola Paulista de Medicina-UNIFESP e a Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, via Fundação do Remédio Popular (FURP). Síntese de outros peptídeos de relevância clínica ou laboratorial já estão em fase de pesquisa.

## 6) Síntese e Estrutura-Função de Peptídeos Biologicamente Ativos.

### A. Peptídeos Melanotrópicos.

#### a) Análogos Paramagnéticos:

A primeira classe de peptídeos de relevância para a fisiologia de organismos superiores que será investigada com a incorporação inicialmente do spin label TOAC será a dos peptídeos melanotrópicos. Dentre estes, o hormônio estimulador de melanócito ( $\alpha$ -MSH), produzido pela glândula pituitária de mamíferos e pelo epitélio de alguns vertebrados e que parece estar envolvido não somente com o controle da coloração da epiderme (Vaudry e Eberle, 1993) mas também com obesidade (Fan e cols., 1997), disfunção erétil (Wessels e cols., 1998) e várias outras funções biológicas (Castrucci e cols., 1990). A seqüência tridecapeptídica deste hormônio é acetil-SYMEHFRWGKV-amida e a sua marcação com TOAC inserido entre os resíduos acetil e Ser1 produziu recentemente um análogo (Ac-TOAC0- $\alpha$ -MSH) que manteve integralmente a atividade biológica deste hormônio (medida de reflectância da luz em pele de anfíbio), passando a ser o primeiro exemplo na literatura de um peptídeo marcado com spin label e que manteve integralmente a atividade nativa do peptídeo original (Barbosa e cols., 1999). Baseado neste resultado com o  $\alpha$ -MSH, inseriu-se recentemente (Barbosa, 2000) o marcador TOAC em um potente agonista do  $\alpha$ -MSH denominado melanotan e cuja seqüência primária é Ac-[Nle4, D-Phe7]- $\alpha$ -MSH (Sawyer e cols., 1980). A seqüência obtida foi portanto a Ac-TOAC0-melanotan e, similarmente ao observado com o derivado paramagnético do  $\alpha$ -MSH, este análogo também se mostrou equipotente em termos de atividade biológica em relação ao melanotan original (Nakaie e cols., 2001). Já mencionamos dados do patenteamento de ambos os análogos (EPM-2 e EPM-3) que mesmo contendo esta alteração estrutural (colocação do TOAC), mantiveram integralmente a potência biológica do peptídeo original.

Os resultados obtidos por enquanto dentro desta classe de peptídeos envolveram portanto apenas a parte de síntese e ensaio básico de determinação da atividade biológica destes dois análogos integralmente ativos contendo TOAC na porção N-terminal da seqüência destes peptídeos. O que se pretende é iniciar toda a parte de caracterização conformacional destes dois análogos, sempre comparativamente aos seus peptídeos originais para uma posterior correlação estrutura-atividade biológica. Simultaneamente, se pretende iniciar a síntese de outros análogos contendo TOAC, tanto do  $\alpha$ -MSH quanto do melanotan. Uma das posições a se inserir o marcador paramagnético nas seqüências tetradecapeptídicas destes peptídeos melanotrópicos envolverá certamente a região 6-9,

reconhecidamente essencial para a manutenção de uma conformação ativa desta classe de peptídeos (Castrucci e cols., 1987).

Os dados conformacionais de todos estes análogos paramagnéticos serão obtidos pelos espectros de RPE, baseados principalmente nas variações de tempos de correlação rotacional das moléculas (Berliner e Reuben, 1989), sensibilidade ao grau de ordem da região ao qual se está ligado e em outros parâmetros espectrais que pode fornecer dados de anisotropia de movimento rotacional (Schreier e cols., 1978,). Ao final, pretende-se efetuar a complementação da análise estrutural advinda da metodologia da RPE com as de dicroísmo circular (CD), fluorescência e possivelmente de infra-vermelho, do tipo transformada de Fourier (FT-IR), usualmente empregadas no estudo estrutural de fragmentos peptídicos.

Além deste enfoque a ser desenvolvido em solução, uma parte relevante deste tópico se estenderá para o início do estudo destes peptídeos paramagnéticos em sistemas de maior complexidade como os membrana-miméticos (micelas ou bicamadas lipídicas). Exemplos de emprego de FT-IR (Boden e cols., 1997, Senac e cols., 1999) e RPE e/ou CD (Pertinhez e cols, 1995, 1997) nestes sistemas heterogêneos já são bastante conhecidos. No caso específico dos peptídeos melanotrópicos, já se tem estudos de estruturação destes peptídeos melanotrópicos em vesículas e bicamadas mas lançando-se mão de lipídeos contendo marcador de spin (Biaggi e cols, 1996, Biaggi e cols., 1997). No presente estudo, a possibilidade de se ter em mãos, estes peptídeos marcados com TOAC irá permitir a inversão e complementação deste tipo de enfoque pois o centro paramagnético estará no próprio peptídeo a ser estudado e não nos componentes do sistema onde o peptídeo se acha disperso.

#### a) Análogos Fluorescentes.

A razão do início do emprego de derivados de a-MSH e do melanotan contendo marcador fluorescente se baseia na possibilidade de se lançar mão do conhecido fenômeno da supressão da fluorescência (Birks e cols., 1973, Jost e cols., 1971, Toniolo e cols., 1998) induzida especificamente pelo radical nítróido do TOAC para obtenção de dados adicionais estruturais dos peptídeos. Pode-se com isto, obter parâmetros de distância entre os dois tipos de marcadores (fluorescente e paramagnético), dependente das suas posições e do meio circundante. Dentre os inúmeros marcadores existentes no mercado, pode-se lançar mão da fluoresceína ou do ácido aminobenzóico (Abz) que possui a vantagem de ser uma molécula menor e portanto com menor possibilidade de afetar a atividade biológica original destes peptídeos melanotrópicos. Esta característica tem permitido com sucesso, o estudo do mecanismo de ação de diversas enzimas proteolíticas mas utilizando-se de um outro tipo de supressor de fluorescência (Pimenta e cols., 1999; Almeida e cols., 1999). Deve-se levar em conta também o fato das moléculas de a-MSH e do melanotan conterem resíduos de Trp que são naturalmente fluorescentes. Isto irá tornar, por um lado mais complexa a estratégia experimental acima mencionada pois poderá envolver um marcador paramagnético e dois fluorescentes (um deles natural) mas ao mesmo tempo, poder talvez enriquecer bastante a coleta de dados conformacionais. Estudos iniciais foram recentemente publicados (Ito e cols., 2001).

Já existem diversos trabalhos desenvolvidos nesta área por colegas pesquisadores envolvendo por exemplo, o estudo da supressão de fluorescência do Trp do peptídeo melanotrópico por lipídeos contendo marcadores de spin (Macedo e cols. 1996) ou puramente por análise dos parâmetros de fluorescência do Trp destes peptídeos em bicamadas (Ito e cols., 1993; Turchiello e cols., 1998). Em conclusão, analogamente ao já detalhado para o caso dos peptídeos paramagnéticos, estes contendo marcadores fluorescentes, com ou sem TOAC ou POAC, também poderão ser estudados, não somente por simples fluorescência mas adicionalmente por CD e por FT-IR. Além do mais, como já enfatizado, este protocolo experimental se estenderá também para o caso de estudos em vesículas e bicamadas onde haverá possibilidade do emprego desta última espectroscopia.



## B. Síntese e Estudo de Análogos da All

### a) Análogos paramagnéticos.

Investigação da correlação entre estrutura e função de All contendo TOAC em diferentes posições continuará sendo desenvolvida neste item. O primeiro é o agente hipertensor mais potente até hoje descrito e destacam-se, entre algumas de suas propriedades biológicas, a regulação de uma série de efeitos da natureza cardiovascular, endócrino e neuronal, incluindo-se a produção de aldosterona e a homeostase hidromineral (Catt e cols., 1993; Timmermans e cols., 1993). Em consequência de diferentes enfoques experimentais, variados modelos conformacionais têm sido propostos na literatura para este peptídeo vasoativo, alguns conflitantes entre si (Juliano e Paiva, 1974; Deslauriers e cols., 1975, Turner e cols., 1991; Reimer e cols., 1997), estando uma boa parte destes estudos condensados em revisões (Samanen e Regoli, 1994, Timmerman, 1993).

Como enfatizado anteriormente, já havíamos iniciado o estudo deste peptídeo marcado com TOAC (Nakaie e cols., 1983, Marchetto e cols., 1993, Nakaie e cols., 2002) e dados conformacionais baseados em titulações potenciométricas e de RPE haviam sido correlacionados com as respectivas atividades obtidas em diferentes sistemas biológicos. De um modo geral, a marcação em posição interna (ex. TOAC7-All) aboliu totalmente atividade original deste octapeptídeo (Nakaie e cols., 1998, 2002) enquanto que a marcação na porção N-terminal (ex. TOAC0-All) fez com que a atividade ainda fosse mantida, embora parcialmente (Nakaie e cols., 1983, Nakaie e cols., 2002). Além do emprego da RPE, parte dos estudos com CD também já estão em andamento (Barbosa, 2000) e pretende-se deste modo, a obtenção de novos análogos contendo inserções diferenciadas do TOAC na estrutura da All.

Há anos, o nosso Departamento tem estado envolvido no entendimento do mecanismo de ação da All através de diferentes enfoques (Paiva e cols., 1974, Nakaie e cols., 1982, Zalberg e cols., 1999). Pretende-se portanto continuar a investigação das características farmacológicas destes análogos de All em diferentes sistemas biológicos incluindo-se também uma análise eletrofisiológica do efeito destes compostos em termos de canais iônicos isolados através de metodologias clássicas como a do "patch clamp" (Hamil e cols., 1981) e aplicada já com sucesso no estudo por exemplo na influência de fluxos iônicos na ação da própria All (Silva e cols., 1999). Temos também por outro lado, colaborado na investigação do papel fisiológico deste peptídeo hormonal através da síntese e estudo conformacional de fragmentos do seu receptor (Bumpus e cols., 1991). Deste modo, diversas alças internas ou externas deste receptor já foram sintetizadas por nós e estudadas por diferentes espectroscopias nos últimos anos em colaboração com outros grupos de pesquisa (Pertinhez e cols., 1995; Franzoni e cols., 1997; Pertinhez e cols., 1997; , Pertinhez e cols., 1999; Franzoni e cols., 1999, Pertinhez e cols., 2002; Salinas e cols., 2002). O objetivo portanto deste tópico está sendo o de dar ênfase a este tipo de estudo mas voltado para a molécula de All através de seus análogos paramagnéticos, esperando que os resultados a serem encontrados possam ser, conjuntamente com os advindos dos estudo do seu receptor, valiosos para a elucidação do mecanismo de ação da All.

### b. Outros Análogos.

O estudo de análogos da All contendo grupamentos do tipo TOAC ou mesmo POAC pode ser estendida para outros contendo diferentes resíduos não naturais, principalmente na posição N-terminal deste octapeptídico. Isto se deve ao fato de que além de auxiliar no estudo do fenômeno da

taquifilaxia (dessensibilização celular ao agonista), alterações nesta posição se mostraram relevantes para a distinção entre os dois tipos de receptores de All até o momento conhecidos (Bouley e cols., 1998). Projetos com alunos de iniciação científica da UNIFESP estão em andamento e com resultados surpreendentes em termos do mecanismo da taquifilaxia. A inserção de grupamentos muito hidrofóbicos parecem não estar de acordo com a teoria vigente deste fenômeno farmacológico, deixando em aberto a possibilidade de outros mecanismos para a explicação da taquifilaxia. Este resultado também está sendo acoplado à possibilidade de liberação lenta deste grupamento hidrofóbico em meio fisiológico, possibilitando talvez a obtenção de um protocolo em que a All tenha atividade mais prolongada, em termos de efeitos hipertensivos. Se verdadeiro, análogos deste tipo poderão se tornar importantes no aspecto da aplicação clínica.

### C. Síntese e Estudos de Análogos da Bradicinina.

#### a) Análogos paramagnéticos.

O terceiro peptídeo de importância biológica a ser estudado é o nonapeptídeo vasoativo bradicinina (BK), caracterizado pela sequência RPPGFSPFR e conhecido por estar envolvido também em importantes processos fisiológicos como a hipotensão, inflamação, aumento da permeabilidade vascular, etc. (Regoli e Barabe, 1980; Bhoola e cols., 1992; Stewart, 1995). Este peptídeo já foi preliminarmente marcado em duas posições (Nakaie e cols., 1998, Barbosa, 2000, Nakaie e cols., 2002) e os resultados biológicos mostraram que, similarmente à All, o marcado internamente perdeu completamente a atividade biológica (TOAC3-BK) enquanto que o Toac0-BK manteve cerca de 60% de atividade em útero de rata. Este último derivado é portanto o primeiro análogo paramagnético conhecido da BK e que reteve significativa parcela da potência biológica deste peptídeo vasoativo.

Os primeiros dados conformacionais por RPE e CD destes análogos em solução já foram recentemente obtidos (Barbosa, 2000) e pretendemos desenvolver a ampliação destas investigações como planejados para as duas classes de peptídeos anteriormente mencionadas (All e melanotrópico). Isto incluirá certamente a síntese de novos análogos contendo TOAC em outras posições. Dentre estes, podemos citar por exemplo a substituição dos resíduos de Pro na posição 2 e 7 da BK serão testados já que a da posição 3 resultou em inativação total deste nonapeptídeo. Os resultados estruturais destes análogos, incluindo-se os que serão obtidos em bicamadas e micelas, serão examinados à luz das inúmeras publicações já existentes deste peptídeo (Lintner e cols., 1977; Cann, 1994; Kotovych e cols., 1998). Além da parte de ensaios biológicos em diferentes preparações como íleo de cobaia, útero de rata, aorta de coelho, esperamos desenvolver investigações iniciais no campo eletrofisiológico de canais iônicos, como comentado para o caso da All.

Levando-se em conta que a sequência do receptor B2 da BK (McEarchen e cols., 1991) já havia sido descoberta, havíamos iniciado estudos de fragmentos transmembranares deste receptor com duplo objetivo: o primeiro era de aspecto mais metodológico na parte de síntese pois tomamos como modelo de síntese e purificação difícil, fragmentos transmembranares de 24 e 34 aminoácidos, componentes da segunda alça N-terminal deste receptor. Além de reportar a dificuldade de se sintetizar e purificar segmentos tão hidrofóbicos e insolúveis, este fragmentos transmembranares foram já em parte, estudado em termos conformacionais lançando-se mão dos métodos da fluorescência e de CD (Oliveira e cols., 1995; 1997, 1999, Grijalba e cols., 2000, Vieira e cols., no prelo). Similarmente à All, espera-se portanto que o emprego destes análogos de BK contendo o marcador Toac possa contribuir, em associação com dados estruturais advindos do estudo de fragmentos de seu receptor, para um melhor esclarecimento da interação BK-receptor e portanto do seu mecanismo de ação.

#### b) Outros análogos .

Derivados de BK contendo resíduos não naturais, principalmente na porção N-terminal foram sintetizados e investigados. Além da posição 1, a 9 que também é ocupada por um resíduo básico de Arg, está sendo investigada pois estas duas posições parecem ser importantes para a distinção entre os receptores B1 e B2 deste nonapeptídeo (Roberts, 1989; Burch e Kyle, 1992).

7. Ensaio de polímeros utilizados na síntese peptídica como suportes sólidos para cromatografias líquidas em coluna.

Todas as resinas empregadas como suportes sólidos para a síntese peptídica, independente da sua matriz polimérica, devem solvatar bem em solventes orgânicos pois é neste meio que se desenvolve todas as etapas da síntese peptídica em fase sólida. Ao observarmos no entanto que uma destas resinas (BAR), se contivesse elevados teores de grupos amônio positivos, passava a apresentar bom inchamento em solventes orgânicos polares incluindo água, nos havia levado a postular o seu uso como resina de cromatografia líquida (Marchetto e cols., 1992). Os dados de inchamento desta resina haviam mostrado que quanto maior o teor de grupos amônio, melhor a hidratação de seus grãos.

Como pré-requisito para um possível uso da BAR em cromatografias, tentamos fazer titulações potenciométricas da BAR para a determinação do pKa do seu amino grupo. No entanto, estas tentativas falharam pois a solvatação do grão ficava muito prejudicada em pH alcalino devido à desprotonação do grupamento amínico da resina. Devido a isto, introduzimos uma estratégia para a estimativa do pKa da BAR e que correlaciona os valores de seu inchamento, obtidos por microscopia dos grãos, com o pH do meio solvatante. Considerando-se o ponto de inflexão da curva obtida à medida que se elevava o pH do meio, estimou-se o pK do amino grupo da BAR em torno de 7 a 7,5. Deste modo, estabeleceu-se que os ensaios iniciais de troca aniônica com estas resinas deveriam ser efetuados em pH abaixo de 6,0 para garantir total protonação dos amino grupos da resina. Esta estratégia de se estimar pKa da BAR por inchamento já foi reportado (Etchegaray e cols., 1996) e alguns peptídeos com carga líquida negativa já foram sintetizados e separadas com sucesso nos testes de purificação cromatográfica de troca aniônica com a BAR (Etchegaray e cols., 1994).

Estudos complementares com as BAR de diferentes teores amínicos envolvendo a determinação do seu limite de exclusão, dependência da hidratação à força iônica do meio, capacidade de retenção, etc, foram já desenvolvido. Também já encerramos os ensaios de purificação de outros compostos aniônicos com esta resina contendo elevado teor amínico. Dentre estes, já obtivemos resultados positivos na separação de dissacarídeos (Carvalho e cols., 2000a) e de gangliosídeos (Carvalho e cols., 2000b) com diferentes teores de cargas negativas. Estes estudos terão prosseguimento objetivando-se determinar as reais potencialidades cromatográficas desta resina, até o momento somente empregada em síntese peptídica.

Além do mais, diferentemente das resinas comerciais de troca aniônica que contém grupamentos amínicos terciários ou quaternários, a existência de amino grupo primário na BAR ou MBAR permite algumas derivatizações simples e úteis. Por exemplo, uma simples succinilação deste amino grupo introduzirá agora grupamentos negativos carboxilatos, o que a princípio, torna este derivado da BAR em uma resina agora do tipo trocadora catiônica. Observa-se portanto, que existe uma grande variedade de opções para obter-se novas resinas com objetivos específicos. Incluem-se neste caso, resinas de matrizes diferentes das do poliestireno como já detalhamos anteriormente.

Esperamos que o desenvolvimento deste tópico nos permita obter futuramente resultados similares ao observado com a resina do tipo aminometilada de alto conteúdo amínico (6 mmol/g) e cuja patente como nova matriz trocadora aniônica, já foi requerida [EPM-1; Patente PI 9904682-2.(1999)]. Saliente-se também que, similarmente à BAR, outras resinas que venhamos a desenvolver para fins,

inicialmente de síntese peptídica, serão sempre avaliadas em termos de utilização alternativa como suportes sólidos de cromatografias líquidas em coluna.

8. Ensaio de polímeros comerciais de troca aniônica como suportes sólidos para a síntese peptídica e cromatografia de afinidade.

Os resultados aqui relatados demonstram o quão surpreendente é o campo de polímeros em termos de aplicação tecnológica. Demonstramos recentemente que duas famosas resinas comerciais, de diferentes procedências são factíveis de serem empregadas para a síntese peptídica. Isto se deve ao fato de conter grupamentos amínicos secundários ou mesmo primários, além da terciária dietilaminoetila (DEAE) que as caracteriza, o que propicia o acoplamento de aminoácidos para a síntese peptídica.

Devido a esta propriedade única, pode-se ter uma peptidil-resina para fins de cromatografia de afinidade de macromoléculas (sintetiza-se a sequência desejada previamente) e que ainda mantém a sua capacidade original de trocadora aniônica. Esta é uma característica única entre as resinas conhecidas de cromatografia, e pode ser muito valiosa como protocolo diferenciado (troca iônica e afinidade simultaneamente) para a purificação alternativa de determinados compostos de relevância bioquímica. A confirmação desta característica foi obtida baseada no ensaio de síntese peptídica nestas resinas, seguida da purificação por afinidade, de anticorpos com peso molecular ao redor de 150 kDa e obtidos contra o epítipo antigênico do *Plasmodium falciparum* (malaria). Estes dois tipos de materiais poliméricos, com múltiplas funções, foram recentemente submetidos ao patenteamento [EPM-7 e EPM-8, patentes PI.99060991-4 (1999) e PI.0006348-2 (2000), respectivamente ] e se encontram na fase de sigilo destes processos.

## 9. Avaliação Final

Um total de oito sub-tópicos desenvolvidos nos últimos anos e aqui expostos apresentam correlações direta ou indireta com o tema principal deste trabalho que se relaciona com a síntese, estudos físico-químicos e aplicações tecnológicas de polímeros. Acreditamos que o corpo de dados reportados, destaca uma nítida correlação entre a ciência básica e a aplicada em praticamente todos os sub-tópicos descritos. Neste aspecto, seis patentes foram requisitadas, todas inseridas em um dos temas acima expostos. Um contrato de fornecimento de um medicamento, do tipo peptídeo (spray nasal), foi recentemente concluído entre o nosso laboratório, através da UNIFESP-Escola Paulista de Medicina e a Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. Isto foi possível, como dissemos, ao desenvolvimento de método apropriado para o uso de resinas de alto grau de substituição. De relevante, este é apenas o primeiro exemplo de medicamento do tipo peptídeo. Existem vários outros que poderão seguir o mesmo caminho de produção para a comunidade. O primeiro e mais importante passo foi dado com a Desmopressina.

De modo indireto, a necessidade do contato frequente com equipamentos do tipo HPLC ou de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa, além do conhecimento adquirido no campo de polímeros, impulsionou a nossa participação na implantação de um centro de pesquisa e bioequivalência de medicamentos genéricos na UNIFESP, tornando-se o Coordenador do laboratório analítico do mesmo. Algumas resinas com características estruturais próprias para aplicação nestas metodologias foram desenvolvidas e estão prestes a serem testadas para ensaios comparativos nestas metodologias sofisticadas mencionadas.

Além da relevância da conexão ciência básica-aplicada existente no presente trabalho, alcançamos o pioneirismo nos seguintes resultados:

1) estabelecimento de regra de solvatação de polímeros; 2) comprovação da viabilidade de síntese

peptídica em resinas com alto grau de substituição; 3) introdução de uma nova escala de polaridade de solventes; 4) demonstração da viabilidade do uso de marcadores do tipo TOAC na química de peptídeos; 5) utilização do TOAC no estudo da solvatação de resinas; 6) estudos do tipo estrutura função de peptídeos paramagnéticos; 7) introdução de um segundo marcador de spin, do tipo aminoácido (POAC); 8) obtenção dos dois primeiros peptídeos de relevância biológica contendo marcador de spin e que mantiveram integralmente as atividades originais; 9) confirmação de que uma resina utilizada apenas para a síntese peptídica pode se transformar em uma de troca aniônica; 10) confirmação de que algumas resinas clássicas de troca iônica podem ser utilizadas para a síntese de peptídeos e como consequência, a peptidil-resina obtida funcionar como resina de cromatografia de afinidade e de troca iônica, simultaneamente.

## Métodos e equipamentos

### a). Síntese e purificação de peptídeos

As metodologias Boc e Fmoc foram empregadas para as sínteses peptídicas que serão efetuadas em aparelhos manuais ou automáticos, da marca Advanced ChemTech. Na grande maioria dos casos, a purificação dos peptídeos foi efetuada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) preparativo e a sua caracterização analítica envolverá, não somente o próprio HPLC do tipo analítico, quanto a análise de aminoácidos e espectrometria de massa no Dept. de Biofísica da UNIFESP. Em alguns casos, a cromatografia convencional de baixa pressão foi empregada em um coletor de frações da Amersham Biosciences Inc.

### b). Ensaio biológicos:

No caso dos análogos de All e BK, os ensaios farmacológicos envolveram principalmente testes em íleo de cobaia, útero de rata e aorta de coelho. Quanto aos análogos melanotrópicos, os ensaios foram de medidas de refractância de luz em pele de anfíbio.

### c). Ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

Para o caso dos análogos de All e BK, empregou-se um espectrômetro Bruker, modelo ER 200 e celas de quartzo, com capacidade aproximada de 0,2 ml, proveniente de J. Scalon, Costa Mesa, Califórnia e para os peptídeos melanotrópicos, um aparelho Bruker EMX contendo controlador de temperatura do tipo Bruker BVT-2000.

### d). FT-IR

Os experimentos foram desenvolvidos em um equipamento da marca Shimadzu, no laboratório de equipamentos multiusuários do Instituto Nacional de Farmacologia (INFAR) na UNIFESP.

### e) Dicroísmo circular.

Empregaram-se espectropolarímetros da marca Jobin Yvon CD6 do Dept. de Bioquímica do Instituto de Química da USP ou Bomen-Jasco, no laboratório de equipamentos multiusuários do Instituto Nacional de Farmacologia (INFAR) na UNIFESP.

### f) Fluorescência.

Espectros de fluorescência foram obtidos em aparelho Fluorolog 3 Jobin Yvon-Spex existente também no Instituto de Física da USP.

### g). Microscopia dos grãos de resina

Diâmetros dos grãos de resina (secos e solvatados) foram medidos por microscopia direta, utilizando-se de um microscópio Olympus, modelo SZ11 acoplada a um computador contendo um software para tratamento de imagem Image-Pro Plus, versão 3.0.01.00.

### h). Análise de aminoácidos (AAA)

Utilizou-se um aparelho da marca Beckman, modelo 6300 e que trabalho com a estratégia da troca iônica e detecção via, reação com ninidrina.

### i) Espectrometria de massa (Electrospray)

Os espectros de massa foram obtidos em um sistema LC/MS, constituído por um módulo de separação Alliance modelo 2690, detector photodiode array modelo 996, injetor automático com capacidade de 120 amostras e um espectrômetro de massa Micromass modelo ZMD. O sistema é controlado por uma workstation Compaq modelo AP200. Os peptídeos foram dissolvidos em 50% AcOH/H<sub>2</sub>O, na concentração de 3 mg/mL.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida, P.C., Nantes, I.L., Rizzi, C.C.A., Wagner, A., Júdice, S., Chagas, J.R., Juliano, L., Nader, H.B. e Tersariol, I.L.S. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 30433.
2. Atherton, E. e Sheppard, R.C. (1989), *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, I.L.R. Press, Oxford.
3. Barany, G. e Merrifield, R.B. (Gross, E. & Meinhofer, J., Eds.) (1980), *The Peptides: Analysis, Synthesis and Biology*, vol. 2, pp. 1, Academic Press, New York.
4. Barbosa, S. R. (2000) "Síntese e relação estrutura-atividade de análogos da AII, BK e a-MSH contendo marcador de spin através dos métodos da ressonância paramagnética eletrônica e dicroísmo circular" - tese de Mestrado aprovada em março de 2000.
5. Barbosa, S.R., Cilli, E.M., Lamy-Freund, M.T., Castrucci, A.M.L., e Nakaie, C.R. (1999) *FEBS Lett.* 446, 45.
6. Barbosa, S.R., Casallanovo, F., Cilli, Paiva, A.C.M., Schreier, S., Nakaie, C.R. (2001), *Peptides`2000*, Martinez, J., Fehrentz, J.A., eds., EDK, Paris, France, 451.
7. Berliner, L.J. & Reuben, J. (1989) *Spin Labeling Theory and Applications*, Plenum Press, New York.
8. Bhoola, K.D., Figueroa, C.D. e Worthy, K. (1992) *Pharm. Rev.* 44, 1.
9. Biaggi, M.H., Pinheiro T.J., Watts, A. e Lamy-Freund, M.T. (1996) *Eur. Biophys. J.* 24, 251.
10. Biaggi, M.H., Riske, K.A. e Lamy-Freund, M.T. (1997) *Biophys. Chem.* 67, 139.
11. Birks, J. A., Singer, L. A. e Parkas, F. H. (1973) *J. Chem. Phys.* 58, 2690-2695.
12. Boden, N., Cheng, Y. e Knowles, P.F. (1997) *Biophys. Chem.* 2, 205.
13. Bouley, R., Perodin, J., Plante, H., Rihakova, L., Bernier, S.G., Melentinska, L., Guillemette, G. e Escher, E. (1998) *Eur. J. Pharmacol.* 343, 323.
14. Burch, R. M. e Kyle, D.J. *Life Sci.* 50, 829.
15. Bumpus, F.M., Catt, K.J., Chiu, A.T., DeGasparo M., Goodfriend, T., Husain, A., Peach, M.J., Timmermans, P.B. (1991), *Hypertension* 17, 720.
16. Cann, J.R., Liu, X., Stewart, J.M., Gera, L. e Kotovych, G. (1994) *Biopolymers* 34, 869.
17. Carvalho, R. S. H., Straus, A., Takahashi, H.B, Tersariol, I. L. S., Nader, H., Cilli, E. M. e Nakaie, C. R. (Bajusz, S. e Hudecz, F., Eds.) (1999) *Peptides`1998*, Akadémia Kiadó, Budapest, 294.
18. Carvalho, R.S.H., Straus, A., Takahashi, H. K., Nakaie C.R. (2000) *Chromatographia* 52, 363.
19. Carvalho, R.S.H., Tersariol, I.L.S., Nader, H.B. e Nakaie, C.R. (2000) *Anal. Chim. Acta* 403, 205.
20. Castrucci, A.M.L., Hadley, M.E. e Hruby, V.J. (1984) *Gen. Comp. Endocrinol.* 55, 104.
21. Castrucci, A.M.L., Hadley, M.E. e Hruby, V.J. (1987) *Gen. Comp. Endocrinol.* 66, 374.
22. Castrucci, A.M.L., Sawyer, T.K., Al-Obeidi, F., Hruby, V.J. e Hadley, M.E. (1990) *Drugs of Future* 15, 41.
23. Catt, K.J., Sandberg, K. e Balla, T. (1993) *Cellular and Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System* 307, Raizada, M.K., Phillips, M.I. e Summers, C., eds., CRC Press, Boca Raton.
24. Cilli, E.M., Oliveira, E., Marchetto, R., Paiva, A.C.M. e Nakaie, C.R. (1993), *Peptides`1992*, Schneider, C.H., e Eberle, A.N., eds., Escom, Leiden, 887.
25. Cilli, E.M., Oliveira, E., Marchetto, R. e Nakaie, C.R. (1996) *J. Org. Chem.* 61, 8992.
26. Cilli, E. M., Marchetto, R., Schreier, S., Nakaie, C. R. (1996), *Peptides : Chemistry, Structure and Biology*, Kaumaya, P.T.P. e Hodges, R. S., eds., Escom, Leiden, 103.
27. Cilli, E.M., Marchetto, R., Schreier, S. e Nakaie, C.R. (1997) *Tetrahedron Lett.* 38, 517.
28. Cilli, E.M., Marchetto, R., Schreier, S. e Nakaie, C.R. (1999) *J. Org. Chem* 64, 9118.
29. Cilli, E. M., Jubilut, G. N., Ribeiro, S. C. F., Oliveira, E., Nakaie, C. R. (2000) *J. Braz. Chem. Soc.* 11, 474.
30. Cilli, E.M., Valente, A.P., Ribeira, S. C., Marchetto, R., Almeida, F.A., e Nakaie, C.R. (2002) *Peptides`2002* (no prelo).
31. Deber, C. M., Lutek, M.K., Heimer, F. P. e Felix A. M. (1989) *Pept. Res.* 2, 284.
32. Deslauriers, R., Paiva, A.C.M., Schaumburg, K. e Smith, I.C.P. (1975) *Biochemistry* 14, 878.
33. Etchegaray, A., Carvalho, R.S.H., Marchetto, R. e Nakaie, C.R. (1994). *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*. R.S. Hodges e J.A. Smith, eds., Escom, Leiden, 252.
33. Etchegaray, A., Carvalho, R.S.H., Boschov, P. e Nakaie, C.R. (1996) *Chromatographia* 43, 82.
34. Fan, W., Boston, B.A., Kesterson, R.A., Hruby, V.J. e Cone, R.D. (1997) *Nature* 385, 165.
35. Fields, G.B. e Noble, R.L. (1990) *Int. J. Pep. Prot. Res.* 35, 161.
36. Franzoni, L., Nicastro, G., Pertinhez, T.A., Oliveira, E., Nakaie, C.R., Paiva, A.C.M., Schreier, S. e Spisni, A. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 227.
37. Franzoni, L., Nicastro, G., Petinhez, T.A., Tatò, M., Nakaie, C.R., Paiva, A.C.M., Schreier, S. e

- Spisni, A. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 9734.
38. Fréchet, J. M., Schuerch, C. (1971) *J. Amer.Chem. Soc.* 93, 492.
39. Grijalba, M.T., Schreier, S., Oliveira, E., Nakaie, C. R., Miranda, A., Tominaga, M. e Paiva, A.C.M. (2000): *Peptides for the New Millenium*, Fields, G.B., Tam, J.P. e Barany, G., eds., Kluwer Academic Publishers, 385.
40. Gutmann, V. (1978), *The Donnor-Acceptor Approach to Molecular Interactions*, Plenum Press, New York.
41. Hamil, O.P., Marty, A., Neher, E., Sackmann, B. e Sigworth, F.J. (1981) *Pflügers Arch.* 391, 85.
42. Henckel, B. e Bayer, E. (1998) *J. Pept. Sci.* 4, 461.
43. Hildebrand, J. H.; (1949) *Chem. Rev.* 44, 37
44. Ito, A.S., Castrucci, A.M.L., Hruby, V.J., Hadley, M.E., Krajcarski, T. e Szabo, A. (1993) *Biochemistry* 32, 12264.
45. Ito, A.S., Souza, E.S., Barbosa, S.R., Nakaie, C.R. (2001) *Biophys. J.*, 81, 1180.
46. Jost, P., Waggoner, A. S., Griffith, O. H. (1971) *Structure and Functions of Biological Membranes*, Chapter 3, Academic Press, New York.
47. Jubilut, G.N., Marchetto, R., Cilli, E.M., Oliveira, E., Miranda, A., Tominaga, M. e Nakaie, C.R. (1997) *J. Braz. Chem. Soc.* 8, 65.
48. Jubilut, G.N., Miranda, A., Oliveira, E., Cilli, E.M., Tominaga, M. e Nakaie, C.R. (1998). *Peptides: Frontier of Peptide Science*, J. P. Tam e P.T.P. Kaumaya, eds., Kluwer/Escom, Dordrecht, 805.
49. Jubilut, G.N., Miranda, M.T.M., Tominaga, M., Okada, Y., Miranda, A. e Nakaie, C.R. (1999) *Chem. Pharm. Bull.* 47, 1560.
50. Jubilut, G.N., Cilli, E.M., Tominaga, M., Miranda, A., Okada, Y., Nakaie, C.R. (2001) *Peptides´2000*, Martinez, J., Fehrentz, J.A., eds., EDK, Paris, France, 229.
51. Jubilut, G.N., Cilli, E. M., Tominaga, M., Miranda, A., Okada, Y., Nakaie, C.R. (2001) *Chem. Pharm. Bull.* 49, 1089.
52. Juliano, L. e Paiva, A.C.M. (1974) *Biochemistry* 13, 2445.
53. Kamlet, M. J., Abboud, J. L.M., Abraham, M. H., Taft, R.W. (1983) *J. Org. Chem.* 48, 2877.
54. Kanda, P., Kennedy, R. C. e Sparrow, J. T.; (1991) *Int. J. Peptide Protein Res.* 38, 385.
55. Kotovych, G., Cann, J.R., Stewart, J.M. e Yamamoto, H. (1998) *Biochem. Cell. Biol.* 76, 257.
56. Kumar, K.S., Pillai, V.N.R., Das, M.R. (2000) *J. Pept. Res.* 56, 88.
57. Letsinger, R.L., Fiann, J.L., Heavner, G.A., Lunsford, W.B. (1975) *J. Am. Chem. Soc.* 85, 3278.
58. Lintner, K., Femandjian, S., Regoli, D. e Barabe, J. (1977) *Eur. J. Biochem.* 81, 395.
59. Macedo, Z. S., Furquim, T. A. e Ito, A. Ito (1996) *Biophys. Chem.* 59, 193.
60. Malavolta, L., Oliveira, E., Cilli, E. M., Nakaie, C. R. (2002) *Tetrahedron* 58, 4383.
61. Malavolta, L., Oliveira, E., Cilli, E. M., Jubilut, G. N., Nakaie, C. R.. (no prelo) *Peptides 2002*.
62. Marchetto, R., Oliveira, E., Paiva, A. C. M., Nakaie, C. R. (1991) *Peptides` 1990*, 122.
63. Marchetto, R., Etchegaray, A. e Nakaie, C.R. (1992) *J. Braz. Chem. Soc.* 3, 30.
64. Marchetto, R., Schreier, S. e Nakaie, C.R. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115, 11042.
65. Matsueda, G. R. e Stewart, J. M. (1981) *Peptides* 2, 45.
66. McEarchen, A.E., Shelton, E.R., Bhakta, S., Obernolte, R., Back, C., Zuppan, P., Fujisaki, J., Aldrich, R.W. e Jarganin, K. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7724.
67. Merrifield, R.B. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149.
68. Monaco, V., Formaggio, F., Crisma, M., Toniolo, C., Hanson, P. e Millhauser, G.L. (1999) *Biopolymers* 50, 239.
69. Nakaie, C.R., Goissis, G., Schreier, S. e Paiva, A.C.M. (1981) *Braz. J. Med. Biol. Res.* 14, 173.
70. Nakaie, C. R., Oliveira, M. C. F., Juliano L. e Paiva, A. C. M. (1982) *Biochem. J.* 205, 43.
71. Nakaie, C.R., Schreier, S. e Paiva, A.C.M. (1983) *Bioch. Biophys .Acta* 742, 63.
72. Nakaie, C. R., Marchetto, R., Schreier, S., Paiva, A. C. M. (1988) *Peptides : Chemistry, Structure and Biology*, Marshall, G. R., ed. Escom, Leiden, 249.
73. Nakaie, C. R., Marchetto, R., Schreier, S., Paiva, A. C. M. (1990) *Peptides : Chemistry, Structure and Biology*, Rivier, J., Marshall, G. R., eds. Escom, Leiden, 1022.
74. Nakaie, C. R., Silva, E.G., Cilli, E. M., Marchetto, R., Oliveira, E., Carvalho, R. S. H., Jubilut, G. N., Miranda, A., Tominaga, M., Schreier, S., Paiva, T.B. e Paiva, A. C. M. (1998) *Peptides´ 1996*, Ramage, R., Epton, R., eds., Mayflower Scientific, Birmingham, U.K., 673.
75. Nakaie, C.R., Barbosa, S.R., Vieira, R.F.F., Fernandez, R. M., Cilli, E.M., Castrucci, A.M.L., Visconti, M.A., Ito, A. S., Lamy-Freund, M.T. (2001) *FEBS Lett.* 497, 103.

76. Nakaie, C.R., Silva, E.G., Cilli, E.M., Marchetto, R., Schreier, S., Paiva, T.B., Paiva, A.C.M. (2002) *Peptides* 23, 65.
77. Oliveira, E., Miranda, A., Tominaga, M., Carvalho, R. S. H., Andreu, D. e Nakaie, C.R (1995), *Peptides* 1994, Maia, L.S.H., ed., Escom, Leiden. 789
78. Oliveira, E., Miranda, A., Albericio, F., Andreu, D., Paiva, A.C.M., Nakaie, C.R. e Tominaga, M. (1997) *J. Pep. Res.* 49, 300.
79. Oliveira, E., Miranda, A., Andreu, D., Schreier, S., Paiva, A. C. M., Nakaie, C. R. e Tominaga, M. (1999), *Peptide Science - Present and Future*, Shimonish, Y., ed., Kluwer Academic Publishers, UK, 283.
80. Oliveira, E., Cilli, E. M., Miranda, A., Jubilut, G. N., Albericio, A., Andreu, D., Paiva, A. C. M., Schreier, S., Tominaga, M., Nakaie, C. R. (no prelo). *Eur. J. Org. Chem.*
81. Paiva, T.B., Goissis, G., Juliano, L., Miyamoto, M.E. e Paiva, A.C.M. (1974) *J. Med. Chem.* 17, 238.
82. Patente de Processo PI 9904682-2 (EPM1)- INPI de Brasília : Nakaie, C.R\*, Carvalho, R.S.H., Cilli, E.M. e Jubilut, G.N. (1999).
83. Patente de Invenção PI 9900595-6 (EPM2) - INPI de Brasília : Nakaie, C.R.\*, Barbosa, S.R., Cilli, E.M., Lamy-Freund, M.T. (1999).
84. Patente de Invenção PI 9903137-0 (EPM5)- INPI de Brasília: Nakaie, C. R. \*, Tominaga, M. \*, Paiva, A.C.M., Schreier, S., Marchetto, R., Barbosa, S.R. (1999).
85. Patente de Invenção PI 9906090-6 (EPM3)- INPI de Brasília : Nakaie, C.R. \*, Cilli, E.M., Barbosa, S.R., Lamy-Freund, M.T., Ito, A.S., Visconti, M.A., Castrucci, A.M.L. (1999).
86. Patente de Processo PI 9906091-4 (EPM7) - INPI de Brasília : Nakaie, C.R\*, Ianzer, D.A., Cilli, E.M., Rodrigues, M.M. (1999).
87. Patente de Processo PI 0006348-2 (EPM8) - INPI de Brasília : Nakaie, C.R. \*, Ianzer, D.A., Cilli, E.M., Rodrigues, M.M., Malavolta, L. (2000).
88. Pertinhez, T.A., Krybus, R., Nakaie, C. R., Paiva, A. C. M. , Franzoni, L., Nicastro, G., Spisni, A. e Schreier, S. (1999), *Peptides* 1998, Bajusz, S. e Hudecz, F., eds., Akadémia Kiadó, Budapest, 710.
89. Pertinhez, T.A., Nakaie, C.R., Carvalho, R.S.H., Paiva, A.C.M., Tabak, M., Toma, F. e Schreier, S. (1995) *FEBS Lett.* 375, 239.
90. Pertinhez, T.A., Nakaie, C.R., Paiva, A.C.M. e Schreier, S. (1997) *Biopolymers* 42, 821.
91. Pertinhez, T.A., Krybus, R., Cilli, E.M., Paiva, A.C.M., Nakaie, C.R., Franzoni, L., Sartor, G., Spisni, A., Schreier, S. (2002) *J. Peptide Sci.* 8, 23.
92. Pietta, P.G., Cavallo, P. F., Takahashi, K. e Marshall, G. R.; (1984). *J. Org. Chem.* 39, 44.
93. Pimenta, D.C., Chao, J., Chao, L., Juliano, M.A., Juliano, L. (1999) *Biochem. J.* 339, 473.
94. Reichardt, C.; (1994) *Chem. Rev.* 94, 2319.
95. Regoli, D. e Barabe, J. (1980) *Pharm. Rev.* 32, 1.
96. Reimer, U., Mokdad, N., Schutkowski, M., Fischer, G. (1997) *Biochemistry* 36, 13802.
97. Renil, M., Nagaraj, R. e Pillai, V. N. R.; (1994) *Tetrahedron* 50, 6681.
98. Ribeiro, S.C.F., Schreier, S., Nakaie, C.R., Cilli, E.M. (2001) *Tetrahedron Lett.* 42, 3243.
99. Roberts, R. A. (1989) *Progress in Growth Factor Research* 1, 237.
100. Salinas, R. K., Shida, C.S., Pertinhez, T. A., Spisni, A., Nakaie, C.R., Paiva, A.C.M., Schreier, S. (2002) *Biopolymers* 65, 21-31.
101. Samanen, J. e Regoli, D. (1994), *Angiotensin Receptors*, CRC Press, Boca Raton.
102. Sarin, V.K., Kent, S.B.H. e Merrifield, R.B. (1980) *J. Am. Chem. Soc.* 102, 5463.
103. Sawyer, T.K., Sanfilippo, P.J., Hrubby, V.J., Engel, M.H., Heward, C.B., Burnett, J.B. e Hadley, M.E. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5754.
104. Schreier, S., Polnaszek, C.F. e Smith, I.C.P. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 515, 375.
105. Scotcher, J., Lozier, R., Robinson, A.B. (1970), *J. Org. Chem.* 33, 3151.
106. Senac, D.M.M., Villalain, J. & Gomez Fernandez, J.C. (1999) *Eur. J. Biochem.* 265, 744.
107. Silva, B.A., Viviane, L.A. e Aboulafia, J. (1999) *Am. J. Physiol.* 177, 739.
108. Smythe, M.L., Nakaie, C.R. e Marshall, G.R. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117, 10555.
109. Stewart, J.M. (1995) *Biopolymers (Peptide Science)* 37, 143.
110. Stewart, J.M. e Young, J.D. (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Company, Rockford.
111. Tam, J.P.; Lu, Y.A. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117, 12058.
112. Tegge, W. e Frank, R.; (1997) *J. Peptide Res.* 49, 355.



113. Thompson, L. A., Ellman, J. A. (1996) *Chem. Rev.* 95, 555.
114. Timmermans, P.B.M.W.M., Wong, P.C., Chiu, A.T., Heblin, W.F., Benfield, P., Carini, D.J., Lee, R.J., Wexler, R.R., Saye, J.A.M. e Smith, R.D. (1993) *Pharmacol. Rev.* 45, 205.
115. Tominaga, M., Barbosa, S.R., Poletti, E.F., Zukerman,-Schpector, Marchetto, R., Schreier, S., Paiva, A.C.M e Nakaie, C. R. (2001) *Chem. Pharm. Bull.* 49, 1027.
116. Toniolo, C., Crisma, M. e Formaggio, F. (1998) *Biopolymers* 47, 153.
117. Toniolo, C., Valente, E., Formaggio, F., Crisma, M., Pilloni, G., Corvaja, C., Toffoletti, A., Martinez, G.V., Hanson, M.P., Millhauser, G.L., George, C. e Flippen-Anderson, J.L. (1995) *J. Pep. Sci.* 1, 45.
118. Turchiello, R.F., Lamy-Freund, M.T., Juliano, L. e Ito, A. S. (1998) *Biophys. Chem.* 73, 217.
119. Turner, R.J., Matsoukas, J.M. e Moore, G.J. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1064, 21.
120. Vaudry, H. e Eberle, A.N. (1993), *The Melanotropic Peptides*, New York.
121. Vieira, R.F.F., Casallanovo, F., Barbosa, S.R., Cilli, E. M., Paiva, A.C.M. Schreier, S., Paiva, A.C.M. (2002) *Peptides 2002* (no prelo).
122. Wessells, H., Fuciarelli, K., Hadley, M.E., Hansen, J., Hraby, V.J., Dorr, R. e Levine, N. (1998) *J. Urol.* 160, 389.
123. Wilson, E. K. (2000) *Chem. Eng. News*, maio, 54-59.
124. Yajima, H., Fujii, N., Ogawa, H., Kawatani, H. (1974) *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 107.
125. Zalberg, H., Assimomytis, N., Magafa, V., Manessi-Zoupa, E., Cordopatis, P. e Shimuta, S.I. (1999) *J. Pep. Res.* 53, 678.