



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Cátia Daniela Figueiredo Martins

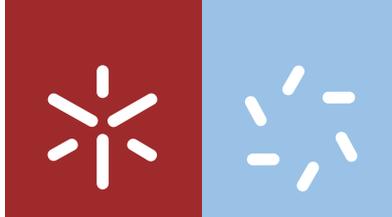
Substratos peptídicos da Granzyme B como sondas fluorescentes: estudos de FRET para aplicação num sistema de libertação controlada de fármacos para o cancro colorretal

Cátia Daniela Figueiredo Martins **Substratos peptídicos da Granzyme B como sondas fluorescentes: estudos de FRET para aplicação num sistema de libertação controlada de fármacos para o cancro colorretal**



UMinho | 2019

outubro de 2019



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Cátia Daniela Figueiredo Martins

Substratos peptídicos da Granzyme B como sondas fluorescentes: estudos de FRET para aplicação num sistema de libertação controlada de fármacos para o cancro colorretal

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho efetuado sob a orientação de
Professora Doutora Susana Paula Graça Costa
e da
Professora Doutora Maria Manuela Marques Raposo

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE POR UM PERÍODO DE CINCO ANOS.

Universidade do Minho, 10 de outubro de 2019.

Ao concluir esta dissertação, gostaria de agradecer a algumas pessoas que, direta ou indiretamente, foram essenciais durante esta aventura na química orgânica, que contribuíram para o meu crescimento quer científico quer pessoal.

Primeiramente, agradeço à Professora Doutora Susana Costa por toda a ajuda tanto a nível laboratorial como na escrita da tese, mas sobretudo por impulsionar e permitir desenvolver esta vontade que tenho de fazer investigação. Pela inspiração que me proporcionou pelo mundo da química orgânica e química analítica, conduzindo-me a um grande interesse por estas áreas. Por me ensinar que muitas vezes somos nós que nos temos de adaptar ao laboratório e não o contrário e que para se fazer ciência é preciso ter persistência e arriscar porque “ou vai ou racha”.

À Professora Doutora Manuela Raposo pelo reconhecimento, auxílio, por também impulsionar e apoiar a vontade que tenho de fazer investigação e pela oportunidade concedida para a realização deste projeto.

Gostaria de agradecer ao Departamento de Química/Centro de Química da Universidade do Minho, por permitir a realização deste projeto nos seus laboratórios e ainda à Fundação da Ciência e Tecnologia (FCT) pelo financiamento do projeto onde este trabalho foi inserido, projeto PTDC/QUI-COL/28052/2017.

À Dra. Elisa e Dra. Vânia, pela disponibilidade e rapidez manifestadas na realização dos espetros de RMN.

Aos investigadores do INL, Juan e Milene pela partilha de ideias e auxílio durante este ano.

Agradeço à Professora Doutora Sílvia Lima pela ajuda concedida nos primeiros passos da síntese peptídica utilizando o micro-ondas e pela disponibilidade mostrada ao longo da dissertação.

Às colegas de laboratório, Ana, Sandra e Mariana pelo bom ambiente de trabalho, pelo companheirismo e interajuda. Agradeço em especial à Raquel, pela partilha de ideias e apoio incondicional. Aos meninos do laboratório 6, António e Artem pelo auxílio concedido em certas situações e aos colegas dos outros laboratórios pelos momentos de animação proporcionados.

Por fim, agradeço aos meus amigos pela camaradagem e por me apoiarem e me motivarem a cada dia que passa. Agradeço a toda a minha família, em especial à minha mãe por todas as palavras reconfortantes e por todo o carinho que sempre me abraça, ao meu pai que me incentiva a cada dia a ser melhor, a ser mais forte e persistente e ao meu irmão, que me ensina sobretudo que com calma e ponderando bem as situações consigo fazer tudo.

Declaração de Integridade

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração. Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Substratos peptídicos da Granzyme B como sondas fluorescentes: estudos de FRET para aplicação num sistema de libertação controlada de fármacos para o cancro colorretal

O cancro colorretal (CCR) é o terceiro tipo de tumor maligno mais diagnosticado em todo o mundo. As opções atuais de tratamento focam-se na eliminação direta das células cancerígenas, mas carecem de especificidade que se traduz em danos graves nos tecidos saudáveis. Uma potencial alternativa terapêutica é a imunoterapia, isto é, os fármacos atuam especificamente no sistema imunológico do paciente, em vez de eliminar as células tumorais diretamente. A nanotecnologia pode desempenhar um papel crucial nesta estratégia, ajudando na libertação de fármacos imunoestimulantes no microambiente tumoral. O Imiquimod é um fármaco imunoestimulante que tem como alvos principais as células imunes T CD8⁺ e NK (*Natural Killers*). Quando estas células são ativadas, libertam compostos que levam à morte celular. A Granzyme B (GzmB) é uma serina protease envolvida num dos dois mecanismos dominantes pelos quais essas células medeiam a morte de células cancerígenas.

O objetivo deste trabalho consistiu na síntese e caracterização de sondas fluorescentes para a GzmB, utilizando um fluoróforo (Edans) e um *quencher* (Dabcyl) ligados a uma sequência específica para esta enzima (Ala-Ala-Asp), com um aminoácido adicional como ponto de ancoragem (Lys). Estas sondas servem como prova de conceito de um projeto que tem como objetivo aplicar sondas fluorescentes mais complexas para a GzmB e através de técnica baseadas em FRET para monitorizar um sistema de libertação controlada de fármacos imunoestimulantes utilizado no tratamento do cancro colorretal.

Os péptidos foram sintetizados com os grupos laterais amino e ácido carboxílico da Lys e Asp, protegidos com o grupo Boc e *t*Bu, respetivamente, e foram obtidos por síntese peptídica em fase sólida assistida por micro-ondas, aplicando a estratégia Fmoc e uma resina de cloreto de 2-clorotritilo. A ligação do par FRET Edans/Dabcyl foi realizada por síntese em fase sólida e em solução. As sondas obtidas foram purificadas por HPLC semi-preparativo e caracterizadas por espectroscopia de RMN de ¹H, de ¹³C e bidimensional (HMBC e HMQC), por espectroscopia de absorção UV/Vis e de fluorescência. Foram realizados também estudos de FRET em solução, em que se avaliou o *quenching* intermolecular de fluorescência do Edans com o Dabcyl.

Foram ainda realizadas sínteses para obter intermediários de cianina do tipo 5 (Cy5) e de *Black Hole Quencher 3* (BHQ-3), como par FRET mais indicado para estudos celulares.

Palavras-chave: Cancro colorretal; FRET; Granzyme B; péptidos; sondas fluorescentes

Granzyme B peptide substrates as fluorescent reporters: FRET studies in the characterization of a drug delivery system for colorectal cancer

Colorectal cancer (CRC) is the third most diagnosed malignant tumor type worldwide. Current treatment options are focused on the direct depletion of cancer cells, but lack specificity that translates into severe damage to healthy tissues. A potential therapeutic alternative is immunotherapy, that is, drugs act specifically on the patient's immune system rather than directly eliminating tumor cells. Nanotechnology can play a crucial role in this strategy, helping deliver immunostimulating drugs to the tumor microenvironment. Imiquimod is an immunostimulating drug that has as main targets CD8⁺ T and NK (Natural Killers) immune cells. When these cells are activated, they release compounds responsible for cell death. Granzyme B (GzmB) is a serine-protease involved in one of the two dominant mechanisms by which these cells mediate cancer cell death.

The aim of this work was the synthesis and characterization of fluorescent probes for GzmB using a fluorophore (Edans) and a quencher (Dabcyl) linked to a specific sequence for this enzyme (Ala-Ala-Asp), with an additional amino acid as anchoring point (Lys). These probes serve as proof of concept for a project that aims to apply more complex fluorescent probes for GzmB and by applying FRET-based techniques to monitor a controlled release system of immunostimulating drugs used in the treatment of colorectal cancer.

The peptides were synthesized with the side chain amino and acid groups of Lys and Asp, protected with the Boc and *t*Bu group, respectively, and the peptides were obtained by microwave assisted solid phase peptide synthesis, applying the Fmoc strategy and a 2-chlorotriylchloride resin. The linking of the FRET Edans/Dabcyl pair was performed by solid phase and solution synthesis. The obtained probes were purified by semi-preparative HPLC and characterized by ¹H, ¹³C and two-dimensional NMR spectroscopy (HMBC and HMQC), UV/Vis absorption and fluorescence spectroscopy. Solution FRET studies were also performed, in which the intermolecular fluorescence quenching of Edans with Dabcyl was evaluated.

Furthermore, syntheses were performed to obtain cyanine type 5 (Cy5) and Black Hole Quencher 3 (BHQ-3) intermediates, as a more suitable FRET pair for cellular assays.

Keywords: Colorectal cancer; fluorescent probes; FRET; Granzyme B; peptides

Declaração.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Declaração de Integridade.....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Índice.....	vii
Índice de Figuras.....	x
Índice de Esquemas.....	xiii
Índice de Tabelas.....	xv
Abreviaturas e Símbolos.....	xvi
Comunicações em congressos.....	xx
Notas introdutórias.....	xxi
Capítulo 1: Introdução.....	1
1.1. Substratos peptídicos para a Granzyme B no tratamento do cancro colorretal.....	2
1.1.1. Tratamento do cancro colorretal.....	2
1.1.2. Imunoterapia combinada com nanotecnologia como tratamento alternativo.....	3
1.1.3. Granzyme B e os seus principais substratos.....	5
1.2. Síntese peptídica.....	9
1.2.1. Formação da ligação peptídica.....	9
1.2.2. Síntese peptídica em fase sólida.....	12
1.2.2.1. Conceito de SPPS desenvolvido por Merrifield.....	12
1.2.2.2. Grupos protetores.....	13
1.2.2.3. Suporte sólido.....	15
1.2.2.4. SPPS sequencial e convergente.....	16
1.2.2.5. Síntese peptídica em fase sólida assistida por micro-ondas.....	18
1.3. Aplicação da técnica FRET no desenvolvimento de sondas fluorescentes.....	20
1.3.1. Espectroscopia de fluorescência.....	20

1.3.2. Transferência de energia por ressonância de Förster, FRET	22
1.3.3. Pares FRET utilizados em sondas para ensaios enzimáticos.....	24
Capítulo 2: Resultados e Discussão	31
2.1. Síntese de precursores	34
2.1.1. Proteção do grupo α -amino da H-Ala-OH.....	34
2.1.2. Síntese do Dabcyl	35
2.1.3. Adição de espaçadores no Dabcyl e no Edans.....	36
2.1.3.1. Síntese do derivado do Dabcyl com terminal amina (DBA)	36
2.1.3.2. Síntese do derivado do Edans com terminal ácido carboxílico (EDA).....	38
2.1.4. Síntese dos substratos peptídicos Ala-Ala-Asp(O β Bu)-Lys(Boc) e Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O β Bu).....	39
2.2. Síntese e caracterização de sondas fluorescentes com o par FRET Edans/Dabcyl	49
2.2.1. Síntese e caracterização da sonda Dabcyl-Ala-Ala-Asp(O β Bu)-Lys(Boc)-Edans	49
2.2.2. Síntese e caracterização da sonda EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O β Bu)-DBA.....	53
2.3. FRET em solução com o par Edans/Dabcyl.....	57
2.3.1. Estudo do <i>quenching</i> intermolecular de fluorescência do Edans com o Dabcyl.....	57
2.3.2. Espectroscopia de absorção no UV/Vis e de fluorescência de compostos sintetizados	63
2.4. Síntese de intermediários do fluoróforo Cy5 e do <i>quencher</i> BHQ-3.....	64
2.4.1. Síntese de intermediários para a obtenção de cianinas do tipo Cy5	64
2.4.2. Síntese do BHQ-3	67
Capítulo 3: Conclusões e Perspetivas Futuras.....	68
Capítulo 4: Secção Experimental	73
4.1. Materiais e Reagentes.....	74
4.2. Síntese de precursores	75
4.2.1. Síntese da <i>N</i> (9-fluorenilmetoxicarbonil)-alanina (Fmoc-Ala-OH, 1).....	75
4.2.2. Síntese do ácido 4-[[4'-(<i>N,N</i> -dimetilamino)fenil]diazetil] benzóico (Dabcyl, 2a).....	76

4.2.3. Adição de espaçadores no Dabctl e no Edans.....	77
4.2.3.1. Síntese do derivado do Dabctl com terminal amina (DBA, 2b)	77
4.2.3.2. Síntese do derivado do Edans com terminal ácido carboxílico (EDA, 3).....	78
4.3. Síntese em fase sólida assistida por micro-ondas	79
4.3.1. Procedimentos gerais	79
4.3.1.1. Ligação dos Fmoc-aminoácidos à resina de cloreto de 2-clorotritilo	79
4.3.1.2. Determinação do <i>loading</i> da resina	79
4.3.1.3. Desproteção dos aminoácidos por clivagem do grupo Fmoc	80
4.3.1.4. Acoplamento dos Fmoc-aminoácidos com DIC/Oxyma	80
4.3.1.5. Clivagem do péptido da resina	80
4.3.2. Síntese do tetrapéptido Ala-Ala-Asp(O <i>t</i> Bu)-Lys(Boc), 4	81
4.3.3. Síntese do tetrapéptido Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O <i>t</i> Bu), 5	82
4.3.4. Síntese do Dabctl-Ala-Ala-Asp(O <i>t</i> Bu)-Lys(Boc), 6	83
4.3.5. Síntese do EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O <i>t</i> Bu), 8	84
4.4. Síntese do Dabctl-Ala-Ala-Asp(O <i>t</i> Bu)-Lys(Boc)-Edans, 7	85
4.5. Síntese do EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O <i>t</i> Bu)-DBA, 9	87
4.6. FRET em solução com o par Edans/Dabctl.....	88
4.6.1. Estudo do <i>quenching</i> intermolecular de fluorescência do Edans com o Dabctl.....	88
4.6.2. Espectroscopia de absorção no UV/Vis e de fluorescência de compostos sintetizados	89
4.7. Síntese de intermediários do fluoróforo Cy5 e do <i>quencher</i> BHQ-3.....	90
4.7.1. Síntese de intermediários para a obtenção de cianinas do tipo Cy5	90
4.7.1.1. 2,3,3-Trimetil-3 <i>H</i> -indole-5-sulfonato de potássio (10 a).....	90
4.7.1.2. 1-Metil-2,3,3-trimetil-3 <i>H</i> -indolium-5-sulfonato (10 b).....	90
4.7.1.3. 1-(5-Carboxipentil)-2,3,3-trimetil-3 <i>H</i> -indolium-5-sulfonato (10 c)	91
4.7.2. Síntese do BHQ-3, 11	92
Capítulo 5: Referências Bibliográficas	93

Figura 1: Número estimado de casos de cancro em todo o mundo em 2018. O gráfico foi obtido do <i>Global Cancer Observatory</i> com base nas informações do GLOBOCAN 2018, adaptado da referência 4.....	2
Figura 2: Constituição de uma nanopartícula utilizada em <i>drug delivery</i> , adaptada da referência 9.	4
Figura 3: Vias para apoptose mediada pela GzmB, adaptada da referência 19.....	5
Figura 4: Representação tridimensional usada para destacar os determinantes na estrutura da GzmB com os aminoácidos do tipo substrato P1 a P4 (Ile-Glu-Pro-Asp) (laranja). A triade catalítica (Ser195, His57 e Asp102) e os determinantes estruturais não modificados são mostrados a vermelho, adaptada da referência 26.....	6
Figura 5: Substratos peptídicos para a GzmB: Ac-Ile-Glu-Pro-Asp-pNA (a) e Z-Ile-Glu-Thr-Asp-AFC (b). .	7
Figura 6: Reagentes de acoplamento mais utilizados na síntese peptídica, adaptada da referência 33.....	9
Figura 7: Carbodiimidias que podem ser usadas como reagentes de acoplamento em síntese peptídica, adaptada da referência 34.	10
Figura 8: Alguns aditivos usados nas reações de acoplamento, adaptada da referência 33.....	12
Figura 9: Grupos de proteção α -amino geralmente utilizados, Fmoc e Boc.....	14
Figura 10: Grupos protetores geralmente utilizados para proteger as cadeias laterais dos aminoácidos.....	15
Figura 11: Estrutura da resina de cloreto de 2-clorotritilo, adaptada da referência 54.....	16
Figura 12: Vaso de reação sob aquecimento por micro-ondas, adaptada da referência 60.	18
Figura 13: Efeito da energia de micro-ondas durante o crescimento da cadeia peptídica: (esquerda) na ausência de micro-ondas; (direita) com irradiação micro-ondas, adaptada da referência 62.....	19
Figura 14: Diagrama de Jablonski (a) e ilustração das posições relativas dos espectros de absorção, fluorescência e fosforescência (b), adaptada das referências 67 e 68.	21
Figura 15: Requisitos específicos para ocorrer FRET, adaptada da referência 71.....	22
Figura 16: Influência da distância entre o par dador/aceitador no mecanismo FRET, adaptada da referência 68.	23
Figura 17: Modelo de conceção de uma sonda com um par fluoróforo (F)/ <i>quencher</i> (Q), adaptada da referência 76.....	25

Figura 18: Estrutura do grupo Dansyl	25
Figura 19: Estruturas e propriedades fluorescentes do par Edans/Dabcyl (a) e estrutura do substrato fluorogénico para a HIV-1, em que a transferência por ressonância de energia de fluorescência (FRET) do estado excitado do Edans para o cromóforo Dabcyl resulta no <i>quenching</i> , o sinal é obtido após a clivagem proteolítica do péptido (b), adaptada da referência 80 e 84.	26
Figura 20: Estrutura dos corantes <i>Black Hole Quencher</i> , BHQ-1, BHQ-2 e BHQ-3.....	28
Figura 21: Estruturas base dos corantes fluorescentes, fluoresceína, rodamina, BODIPY e estrutura do Cy5.....	29
Figura 22: Representação de um tratamento alternativo para o CCR combinando imunoestimulação local e hipertermia.....	32
Figura 23: Modelos da sonda fluorescente para a GzmB pela incorporação de um par dador/aceitador no péptido Ala-Ala-Asp-Lys, Modelo 1 (esquerda) e no péptido Lys-Ala-Ala-Asp, Modelo 2 (direita).	33
Figura 24: Estrutura do tetrapéptido sintetizado Ala-Ala-Asp(O β Bu)-Lys(Boc) 4	42
Figura 25: Espectros de RMN para o tetrapéptido Ala-Ala-Asp(O β Bu)-Lys(Boc) 4 : a) HMQC e b) HMBC em DMSO- d_6	44
Figura 26: Estrutura do tetrapéptido sintetizado Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O β Bu) 5	46
Figura 27: Espectros de RMN para o tetrapéptido Lys-Ala-Ala-Asp: a) HMQC e b) HMBC em DMSO- d_6	48
Figura 28: Estrutura do composto Dabcyl-Ala-Ala-Asp(O β Bu)-Lys(Boc)-Edans 7	51
Figura 29: Estrutura do composto EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O β Bu)-DBA 9	55
Figura 30: Absorção do Edans e do Dabcyl 2a e emissão do Edans em solução 1×10^{-5} M em tampão fosfato de pH=7,5.	57
Figura 31: Variação da intensidade de fluorescência da solução de Edans com concentração 5×10^{-6} M com a adição sucessiva de uma solução de Dabcyl 2a com concentração 1×10^{-3} M em tampão fosfato pH=7,5.....	58
Figura 32: Variação da intensidade de fluorescência de uma solução de Edans de concentração 5×10^{-6} M com uma concentração de $4,76 \times 10^{-5}$ M de Dabcyl 2a após 5 e 10 minutos da primeira medição.	59
Figura 33: Concentração do Dabcyl 2a (M) em função de F_0/F	60
Figura 34: Estrutura do composto Dabcyl-Ala-Ala-Asp(O β Bu)-Lys(Boc)-Edans 7 tendo em conta a sua estereoquímica.	61

Figura 35: Estrutura tridimensional do composto Dabcyl-Ala-Ala-Asp(O t Bu)-Lys(Boc)-Edans 7 obtida através do programa Chem3D.	61
Figura 36: Estrutura do composto EDA-Lys(Boc)Ala-Ala-Asp(O t Bu)-DBA 9 tendo em conta a sua estereoquímica.	62
Figura 37: Estrutura tridimensional do composto EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O t Bu)-DBA 9 obtida através do programa Chem3D.	62
Figura 38: Estrutura das cianinas do tipo Cy5.	64

Esquema 1: Substrato peptídico para a GzmB: Boc-Ala-Ala-Asp-S-Bzl, adaptado da referência 28. ..8	
Esquema 2: Acoplamento entre aminoácidos mediado por um reagente de acoplamento, adaptado da referência 32..... 9	9
Esquema 3: Formação de oxazolona, adaptado da referência 35..... 10	10
Esquema 4: Ativação do ácido carboxílico através da carbodiimida, adaptado da referência 37.11	
Esquema 5: Esquema geral da síntese sequencial em fase sólida (SPPS), adaptado das referências 50 e 54..... 17	17
Esquema 6: Síntese da Fmoc-Ala-OH 1: i) Na ₂ CO ₃ 5%, 1,4-dioxano, 0 °C, 4 h; ii) temperatura ambiente, 18 h..... 34	34
Esquema 7: Síntese do DabcyI 2a: a) i) HCl 1 M, HCl 6 M, temperatura ambiente; ii) NaNO ₂ , H ₂ O, 0 °C, 30 min; b) AcOH glacial, H ₂ O..... 35	35
Esquema 8: Síntese do DBA, 2b: a) DCC, HOBT, DMF seca, 0 °C, 30 min; b) i) etilenodiamina, temperatura ambiente, 15 h; ii) 120 °C, 2 h. 37	37
Esquema 9: Síntese do EDA, 3: i) Et ₃ N, acetona, temperatura ambiente, 19 h. 38	38
Esquema 10: Reação do primeiro Fmoc-aminoácido com a resina de cloreto de 2-clorotritilo: i) DIPEA, DCM seco, temperatura ambiente, 5 h. 39	39
Esquema 11: Clivagem do grupo Fmoc com piperidina e formação de dibenzofulveno (DBF), esquema adaptado da referência 102..... 40	40
Esquema 12: Síntese em fase sólida assistida por micro-ondas do tetrapéptido Ala-Ala-Asp(O β Bu)-Lys(Boc) 4: a) 20% de piperidina em DMF; b) Fmoc-Asp(O β Bu)-OH, Oxyma, DIC, DMF; c) i) 20% de piperidina em DMF, ii) Fmoc-Ala-OH, Oxyma, DIC, DMF, repetição de c) i e ii ; d) i) 20% de piperidina em DMF, ii) AcOH glacial/TFE/DCM (1:2:7)..... 41	41
Esquema 13: Síntese em fase sólida assistida por micro-ondas do tetrapéptido Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O β Bu) 5: a) 20% de piperidina em DMF; b) Fmoc-Ala-OH, Oxyma, DIC, DMF; c) i) 20% de piperidina em DMF, ii) Fmoc-Ala-OH, Oxyma, DIC, DMF, repetição de c) i , iii) Fmoc-Lys(Boc), Oxyma, DIC, DMF; d) i) 20% de piperidina em DMF, ii) AcOH glacial/TFE/DCM (1:2:7). 45	45
Esquema 14: Síntese do composto DabcyI-Ala-Ala-Asp(O β Bu)-Lys(Boc)-Edans 7: Síntese em fase sólida assistida por micro-ondas: a) 20% de piperidina em DMF; b) Fmoc-Asp(O β Bu)-OH, Oxyma, DIC, DMF; c) i) 20% de piperidina em DMF, ii) Fmoc-Ala-OH, Oxyma, DIC, DMF, repetição de c) i e ii ; d) i) 20% de piperidina em DMF, ii) DabcyI 2a , Oxyma, DIC, DMF; e) AcOH glacial/TFE/DCM	

(1:2:7); Síntese em solução: f i) HOSu, EDC.HCl, Et ₃ N, DMF seca, 0 °C, 30 min; ii) Edans, Et ₃ N, temperatura ambiente, 5 h.	50
Esquema 15: Síntese do composto EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O ^t Bu)-DBA 9 : Síntese em fase sólida assistida por micro-ondas: a) 20% piperidina em DMF; b) Fmoc-Ala-OH, Oxyma, DIC, DMF; c) i) 20% piperidina em DMF, ii) Fmoc-Ala-OH, Oxyma, DIC, DMF, repetição de c) i) , iii) Fmoc-Lys(Boc)-OH, Oxyma, DIC, DMF; d) i) 20% piperidina em DMF, ii) EDA 3 , Oxyma, DIC, DMF; e) AcOH glacial/TFE/DCM (1:2:7); Síntese em solução: f) i) HOSu, EDC.HCl, Et ₃ N, DMF seca, 0 °C, 30 min; ii) DBA 2b , temperatura ambiente, 7 h.	54
Esquema 16: Síntese de intermediários de cianina 10 a - c : a) 3-metil-2-butanona, AcOH, 118 °C, 3 h; b) iodometano, 40 °C, 12 h; c) ácido 6-bromohexanóico, clorobenzeno, 110 °C, 12 h; d) i) Ac ₂ O, 120 °C, 30 min; ii) 10 b , piridina, temperatura ambiente, 12 h.	65
Esquema 17: Síntese do BHQ-3 11 : a) i) HCl 1 M, HCl 6 M, temperatura ambiente; ii) NaNO ₂ , ACN seco, 0 °C, 30 min; b) i) ACN seco.	67

Tabela 1: Dados dos comprimentos de onda de absorção e emissão máxima dos corantes fluorescentes e <i>quencher</i> s comuns aplicados na marcação de biomoléculas..	30
Tabela 2: Sinais de RMN de ^1H do composto Fmoc-Ala-OH 1 em CDCl_3 .	34
Tabela 3: Sinais de RMN de ^1H do DabcyI 2a em $\text{DMSO}-d_6$.	36
Tabela 4: Sinais de RMN de ^1H do DBA 2b em $\text{DMSO}-d_6$.	37
Tabela 5: Sinais de RMN de ^1H do EDA 3 em $\text{DMSO}-d_6$.	38
Tabela 6: <i>Loading</i> da resina e rendimentos obtidos na síntese do péptido Ala-Ala-Asp(O <i>t</i> Bu)-Lys(Boc) 4 .	42
Tabela 7: Sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C do tetrapéptido Ala-Ala-Asp(O <i>t</i> Bu)-Lys(Boc) 4 em $\text{DMSO}-d_6$.	43
Tabela 8: <i>Loading</i> da resina e rendimentos obtidos na síntese do péptido Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O <i>t</i> Bu) 5 .	46
Tabela 9: Sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C do tetrapéptido Lys-Ala-Ala-Asp em $\text{DMSO}-d_6$.	47
Tabela 10: Sinais de RMN de ^1H do composto DabcyI-Ala-Ala-Asp(O <i>t</i> Bu)-Lys(Boc)-Edans 7 em $\text{DMSO}-d_6$.	52
Tabela 11: Dados dos comprimentos de onda de absorção e emissão e do desvio de Stokes do Edans e do DabcyI 2a em solução com concentração de 1×10^{-5} M em tampão fosfato pH=7,5.	57
Tabela 12: Dados dos comprimentos de onda de absorção e emissão de soluções dos compostos 6 , 7 e 8 com concentração na gama dos 10^{-5} M em tampão fosfato pH=7,5.	63
Tabela 13: Sinais de RMN de ^1H para os intermediários de cianina 10 a - 10 c em D_2O .	66

Abs – Absorvância

Ac – Grupo acetilo

ACN – Acetonitrilo

AFC – 7-amino-4-trifluorometilcumarina

Ala – Alanina

Arg – Arginina

Asn – Asparagina

Asp – Ácido aspártico

BHQ – *Black Hole Quencher*

Boc – Grupo *tert*-butiloxicarbonilo

BODIPY – 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indaceno

Bzl – Grupo benzilo

CCR – Cancro colorretal

Células NK – Células *Natural Killers*

Cy5 – (2*Z*)-2-[(2*E*,4*E*)-5-[1-(5-carboxipentil)-3,3-dimetil-5-sulfoindole-1-ium-2-il]penta-2,4'-dienilideno]-1-metil-3,3-dimetilindole-5-sulfonato

Cys – Cisteína

d – Duplete

DBF – Dibenzofulveno

Dabcyl – Ácido 4-[[4'-(*N,N*-dimetilamino)fenil]diazenil] benzóico

DBA – Derivado do Dabcyl com terminal amina

Dansyl – Grupo 5-(*N,N*-dimetilamino)naftaleno-1-sulfonilo

DCC – *N,N'*-Diciclo-hexilcarbodiimida

DCM – Diclorometano

dd – Duplo duplete

DEPT – Aumento sem distorção por transferência de polarização (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*)

DIC – *N,N'*-Diisopropilcarbodiimida

DIPEA – *N,N'*-Diisopropiletilamina

DMF – *N,N'*-Dimetilformamida

- DMF-*d*₇ – *N,N'*-Dimetilformamida heptadeuterada
- DMSO-*d*₆ – Dimetilsulfóxido hexadeuterado
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)
- dt – Duplo tripleto
- DTNB – Ácido 5,5' -ditio-*bis*-(2-nitrobenzóico)
- DVB – Divinilbenzeno
- EDA – Derivado do Edans com terminal ácido carboxílico
- Edans – Ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno sulfônico
- EDC.HCl – Hidroclorato de *N*-etil-*N'*-[3-(dimetilamino)propil]carbodiimida
- eq. – Equivalente(s)
- Et – Grupo etilo
- F₀ – Intensidade de fluorescência na ausência do *quencher*
- F – Intensidade de fluorescência na presença do *quencher*
- FAM – Ácido 2-(6-hidroxi-3-oxo-3*H*-xanten-9-il)benzóico
- K_q – Constante de velocidade do *quenching*
- K_{sv} – Constante de *quenching* de Stern-Volmer
- Fmoc – Grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo
- FRET – Transferência de energia por ressonância de Förster (*Förster Resonance Energy Transfer*)
- Gln – Glutamina
- Glu – Ácido glutâmico
- GzmB – Granzyme B
- His – Histidina
- HMBC – Correlação heteronuclear através de múltiplas ligações (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*)
- HMQC – Correlação heteronuclear quântica múltipla (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*)
- HNE – Elastase neutrofílica humana (*Human Neutrophil Elastase*)
- HOBt – *N*-Hidroxibenzotriazole
- HOSu – *N*-Hidroxisuccinimida
- HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)
- Ile – Isoleucina

IUPAC – União internacional de química pura e aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

J – Constante de acoplamento

J – Integral da sobreposição espectral da emissão do dador e da absorção do aceitador

K² – Fator de orientação dos momentos dipolares do dador e aceitador

Lys – Lisina

m – Multiplete

MeOH – Metanol

n – Índice de refração do meio

NIR – Infravermelho próximo (*Near Infrared*)

Oxyma – 2-Ciano-2-(hidroxiimino) acetato de etilo

Pbf – Grupo 2,2,4,6,7-pentametil-dihidrofurano-5-sulfonilo

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

ϕ_f – Rendimento quântico de fluorescência

pNA – p-Nitroanilina

pNIPAM – Poli(*N*isopropilacrilamida)

Pro – Prolina

q – Quarteto

Q₀ – Rendimento quântico de fluorescência do dador na ausência do aceitador

qui – Quinteto

R₀ – Raio de Förster

RMN de ¹³C – Ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN de ¹H – Ressonância magnética nuclear de próton

RNA – Ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

s – Singleto

S₀ – Estado eletrónico fundamental singleto

S₁ – Primeiro estado eletrónico excitado singleto

Ser – Serina

S_n – Estado eletrónico excitado singleto

SPPS – Síntese peptídica em fase sólida (*Solid Phase Peptide Synthesis*)

t – Tripleto

T₁ – Primeiro estado eletrônico excitado tripleto

TAMRA – Carboxitetrametilrodamina

tBu – Grupo *terc*-butilo

TFA – Ácido trifluoroacético

TFE – 2,2,2-Trifluoretanol

Thr – Treonina

TLC – Cromatografia em camada fina (*Thin Layer Chromatography*)

TMR – Tetrametilrodamina

Trp – Triptofano

Trt – Grupo tritilo

Tyr – Tirosina

UV/Vis – Ultravioleta/Visível

Val – Valina

Z – Grupo benziloxycarbonilo

δ – Desvio químico em ressonância magnética nuclear

ε – Absortividade molar

η – Rendimento

λ_{abs} – Comprimento de onda de absorção máxima

λ_{emi} – Comprimento de onda de emissão máxima

λ_{exc} – Comprimento de onda de excitação

τ – Tempo de vida de fluorescência

Parte do trabalho aqui descrito foi apresentado em encontros científicos sob a forma de comunicações em painel:

Martins, C. D. F.; Raposo, M. M. M.; Costa, S. P. G. “Synthesis and characterization of peptide substrates for Granzyme B”, P16, XII Encontro Nacional de Estudantes de Bioquímica, Aveiro, Portugal, 12-15 de abril de 2019.

Martins, C. D. F.; Raposo, M. M. M.; Costa, S. P. G. “MW-SPPS of a Granzyme B substrate and characterization by two-dimensional NMR spectroscopy”, P07, 4º Simpósio de Química Medicinal da Universidade do Minho, Braga, Portugal, 24 de maio de 2019.

Alguns termos foram utilizados na língua original em inglês e surgem ao longo do texto na forma original em itálico.

Os termos são:

- *drug delivery* – libertação de fármacos;
- *linker* – espaçador colocado entre a resina e o local onde vai ocorrer a reação;
- *loading* – grau de funcionalização da resina;
- *swelling* – capacidade de dilatação da resina em solventes;
- *quenching* – processo que diminui a intensidade de fluorescência;
- *quencher* – molécula responsável pela diminuição da intensidade de fluorescência;
- *capping* – processo para bloquear permanentemente quaisquer grupos reativos.

Na atribuição dos nomes aos diferentes compostos optou-se por usar o nome IUPAC apenas na primeira vez que são citados e por uma questão prática usaram-se as designações usuais e abreviaturas destes compostos ao longo desta dissertação, como por exemplo no caso do Dabcyl e Edans.

Capítulo 1: Introdução

1.1.Substratos peptídicos para a Granzyme B no tratamento do cancro colorretal

1.1.1.Tratamento do cancro colorretal

O cancro continua a ser uma das doenças mais mortíferas para a humanidade, tendo sido responsável por cerca de 9,6 milhões de mortes em 2018.¹ Em particular, o cancro colorretal (CCR), que se manifesta como um neoplasma maligno na mucosa do cólon ou do reto,^{2,3} é o terceiro tipo de tumor mais diagnosticado em todo o mundo, com 1 849 518 novos casos em 2018 (**Figura 1**).⁴ Face a estes números existe uma necessidade crescente de desenvolvimento de novas terapias anticancerígenas.

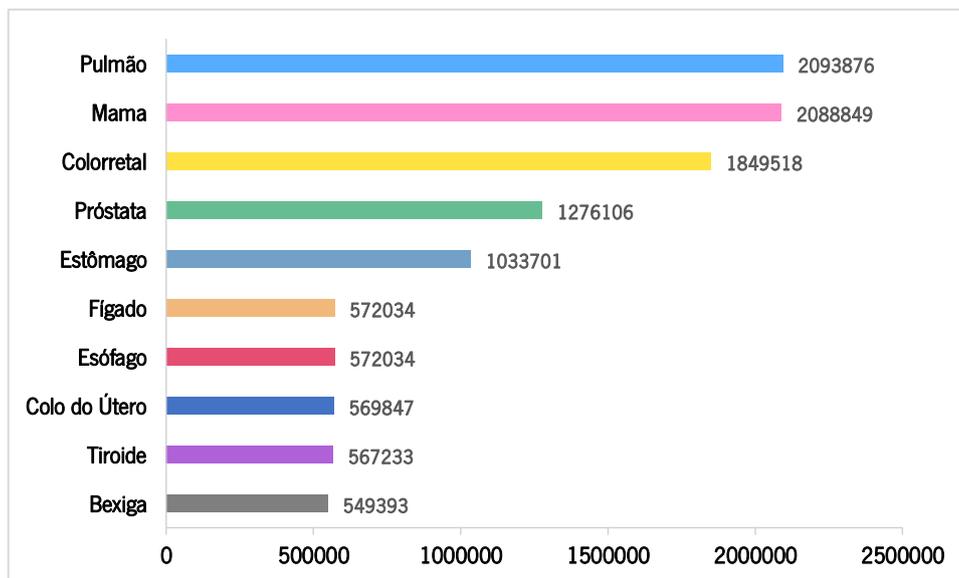


Figura 1: Número estimado de casos de cancro em todo o mundo em 2018. O gráfico foi obtido do *Global Cancer Observatory* com base nas informações do GLOBOCAN 2018, adaptado da referência 4.

As opções atuais de tratamento do cancro incluem a intervenção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia ou uma combinação destes procedimentos.⁵ Os protocolos terapêuticos comumente utilizados no tratamento do CCR envolvem a coadministração de diferentes agentes quimioterapêuticos numa série de ciclos do tratamento, tais como FOLFOX (combinação de oxaliplatina, leucovorina e 5-fluorouracilo) e FOLFIRI (combinação de irinotecano, leucovorina e 5-fluorouracilo).⁶

Estes agentes quimioterapêuticos demonstraram ser altamente eficazes para tratar o CCR, no entanto, não são seletivos e o seu direcionamento não específico pode danificar tecidos normais saudáveis, causando uma série de efeitos colaterais indesejáveis, tais como fadiga, perda de cabelo, perda de apetite, náuseas e vômitos.^{3,7} Estes efeitos adversos severos induzidos pelos agentes quimioterapêuticos em tecidos e órgãos saudáveis são a principal razão da alta taxa de mortalidade do paciente com cancro. Adicionalmente, como a biodisponibilidade destes agentes para os tecidos tumorais é relativamente baixa, são necessárias doses mais elevadas, conduzindo a toxicidade nas células normais e a um desenvolvimento de resistência múltipla a fármacos.⁵

1.1.2. Imunoterapia combinada com nanotecnologia como tratamento alternativo

Recentemente, a imunoterapia tornou-se uma importante alternativa terapêutica, isto é, as terapias anticancerígenas são projetadas para atuar especificamente no sistema imunológico do paciente, em vez de eliminar as células tumorais diretamente.⁸ A nanotecnologia combinada com a imunoterapia permitiu contornar uma das principais limitações da nanomedicina até agora, a falta de acumulação dos fármacos no tecido desejado. A capacidade do sistema imunitário de se auto-regular e amplificar a resposta a um estímulo inicial, significa que mesmo formulações com capacidades de direcionamento fracas a moderadas, serão capazes de iniciar uma cascata de eventos que levarão à eliminação do tumor.⁸

O desenvolvimento destas estratégias terapêuticas para o tratamento do cancro baseado em nanopartículas gerou avanços significativos na farmacologia, diminuindo os efeitos colaterais dos fármacos convencionais e melhorando a sua eficácia, solubilidade, farmacocinética e biodistribuição.³

A libertação controlada de fármacos (*drug delivery*) é uma das principais áreas da nanotecnologia que está a revolucionar o tratamento do cancro. Atualmente, os complexos em nanoescala em desenvolvimento consistem em dois componentes principais: a nanopartícula em si, que é usada como agente de transporte e o fármaco quimioterapêutico (**Figura 2**).⁹ Este sistema permite a libertação seletiva do agente terapêutico nas células tumorais levando ao aumento da concentração do mesmo no alvo e à minimização do dano provocado nas células saudáveis. Desta forma, é possível diminuir a quantidade de fármaco administrada, e aumentar o intervalo de tempo

entre cada administração. Esta libertação do fármaco na célula tumoral pode ser feita por difusão simples ou através de mecanismos que requerem atividade enzimática ou mudanças das condições fisiológicas, tais como pH, temperatura ou alteração do equilíbrio osmótico celular.

A conjugação de moléculas pequenas como anticorpos, péptidos, oligonucleótidos e outras moléculas na superfície de nanopartículas como vetores para o reconhecimento celular tem levado ao desenvolvimento de uma nova geração de nanopartículas para a terapia do cancro.^{3,10,11}

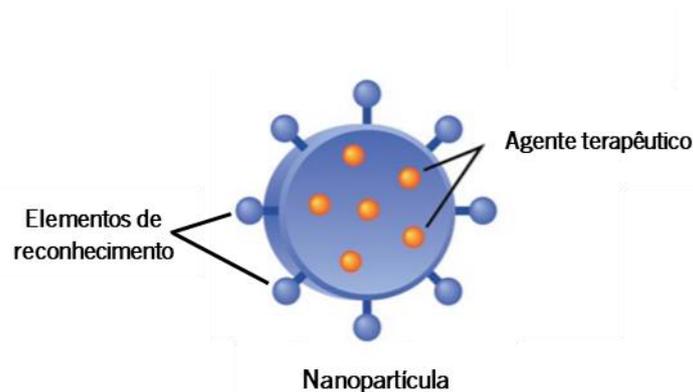


Figura 2: Constituição de uma nanopartícula utilizada em *drug delivery*, adaptada da referência 9.

Os agentes terapêuticos imunoestimulantes ativam o sistema imunológico do paciente, pois interagem com as moléculas que desempenham um papel na ativação de células imunes, tais como as células T citotóxicas ou T CD8⁺, células T auxiliares ou T CD4⁺, células NK ou (*Natural Killers*), macrófagos e células dendríticas.^{8,12}

Dentro dos vários fármacos imunoestimulantes, o Bortezomib e o Imiquimod têm sido amplamente utilizados no tratamento do cancro. O Bortezomib inibe o proteassoma 26S afetando múltiplos sinais de cascata dentro da célula, resultando na morte de células cancerígenas.¹³ O Imiquimod é um agonista do recetor *Toll-like 7* usado para o tratamento tópico de cancros de pele.⁸

Estes fármacos têm como alvos principais as células T CD8⁺ e NK. Após a sua ativação, estas células libertam compostos que levam à morte celular. A Granzyme B (GzmB) é uma enzima envolvida num dos dois mecanismos dominantes pelos quais essas células medeiam a morte de células cancerígenas.^{14,15}

1.1.3. Granzyme B e os seus principais substratos

A Granzyme B (GzmB) é uma serina protease produzida por células T CD8⁺ e células NK que medeia a morte celular quando libertada por estes.^{16,17} A função clássica da GzmB é a indução de apoptose em células-alvo por um mecanismo dependente da perforina, proteína que forma poros nas membranas celulares, permitindo que a GzmB aceda ao citosol da célula-alvo. Ao entrar no citosol da célula-alvo, a GzmB promove a apoptose através de vias dependentes ou independentes de caspases, ou através da permeabilização mitocondrial provocada pela clivagem da proteína Bid, havendo a libertação do citocromo c. A permeabilização mitocondrial resulta na ativação da caspase-9 via apoptossoma e consequentemente na ativação de caspases efetoras -3 e -7, traduzindo o sinal apoptótico.^{15,18,19} Estas vias que levam à apoptose através da GzmB estão descritas na **Figura 3**.

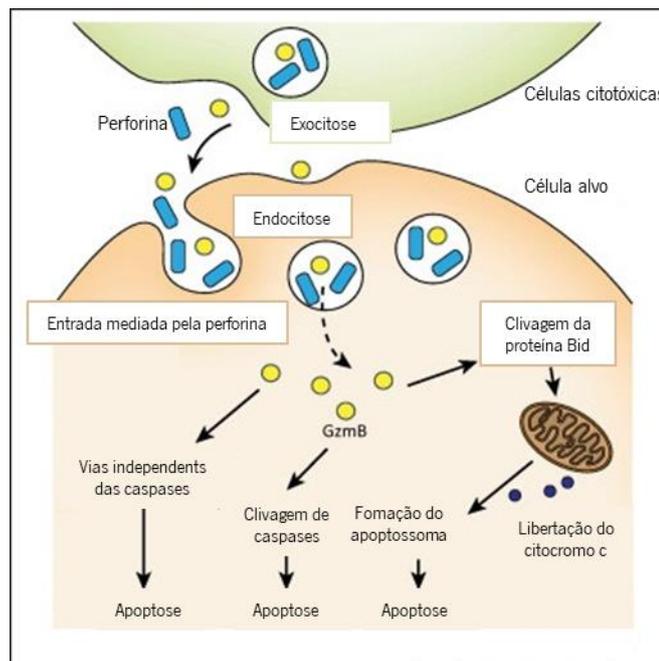


Figura 3: Vias para apoptose mediada pela GzmB, adaptada da referência 19.

Estudos recentes focam-se na GzmB devido à sua preferência invulgar por clivar ligações peptídicas do substrato após resíduos ácidos, principalmente de ácido aspártico (Asp). Embora a GzmB seja a única serina protease de mamífero conhecida por apresentar esta especificidade de clivagem, esta preferência é compartilhada com a família de cisteína proteases, as caspases.^{20,21}

Esta especificidade primária para o ácido aspártico ocorre através de uma interação lateral com o resíduo Arg226 da GzmB.²² No seu local catalítico, a GzmB apresenta uma tríade de resíduos chave (Ser195, His57 e Asp102).^{18,23}

Com base em estudos que definem a preferência peptídica pela abordagem combinatória, o substrato de reconhecimento ideal para a GzmB contém a sequência P4-P3-P2-P1 ótima (nomenclatura para as posições dos aminoácidos em substratos em que Pn, Pn-1, ..., P2, P1 com hidrólise da ligação amida a ocorrer após P1) como sendo Ile-Glu-Pro-Asp (Figura 4).^{24,25,26}

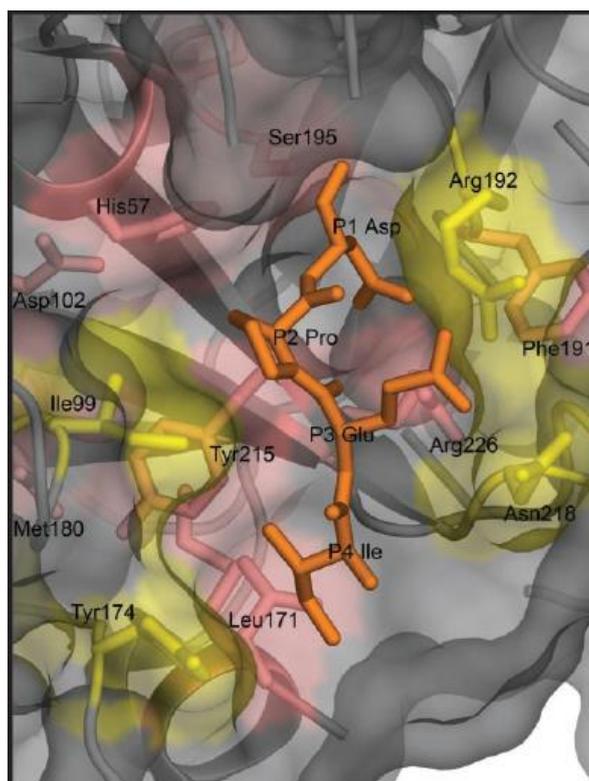


Figura 4: Representação tridimensional usada para destacar os determinantes na estrutura da GzmB com os aminoácidos do tipo substrato P1 a P4 (Ile-Glu-Pro-Asp) (laranja). A tríade catalítica (Ser195, His57 e Asp102) e os determinantes estruturais não modificados são mostrados a vermelho, adaptada da referência 26.

Tanto na literatura como nos catálogos de produtos comerciais, estão disponíveis vários substratos para estudos da atividade da GzmB. Destes substratos peptídicos, os mais utilizados contêm grupos de saída cromogênicos ou fluorogênicos tais como a *p*-nitroanilina (*p*NA) ou 7-amino-4-trifluorometilcumarina (AFC) que podem ser quantificados espectralmente ou fluorimetricamente.²⁷ Dentro destes, destacam-se os substratos Ac-Ile-Glu-Pro-Asp-*p*NA e Z-Ile-Glu-Thr-Asp-AFC.

A clivagem do substrato Ac-Ile-Glu-Pro-Asp-*p*NA pela caspase-8 ou GzmB liberta a *p*NA, que pode ser detetada a 405 nm (**Figura 5 - a**).²⁸ Já o Z-Ile-Glu-Thr-Asp-AFC é um substrato fluorogênico para a caspase-8 e a GzmB que, após a clivagem enzimática, liberta a AFC e a sua fluorescência pode ser usada para quantificar a atividade destas enzimas. A AFC exibe um máximo de excitação/emissão de 380/500 nm, respetivamente (**Figura 5 - b**).²⁹

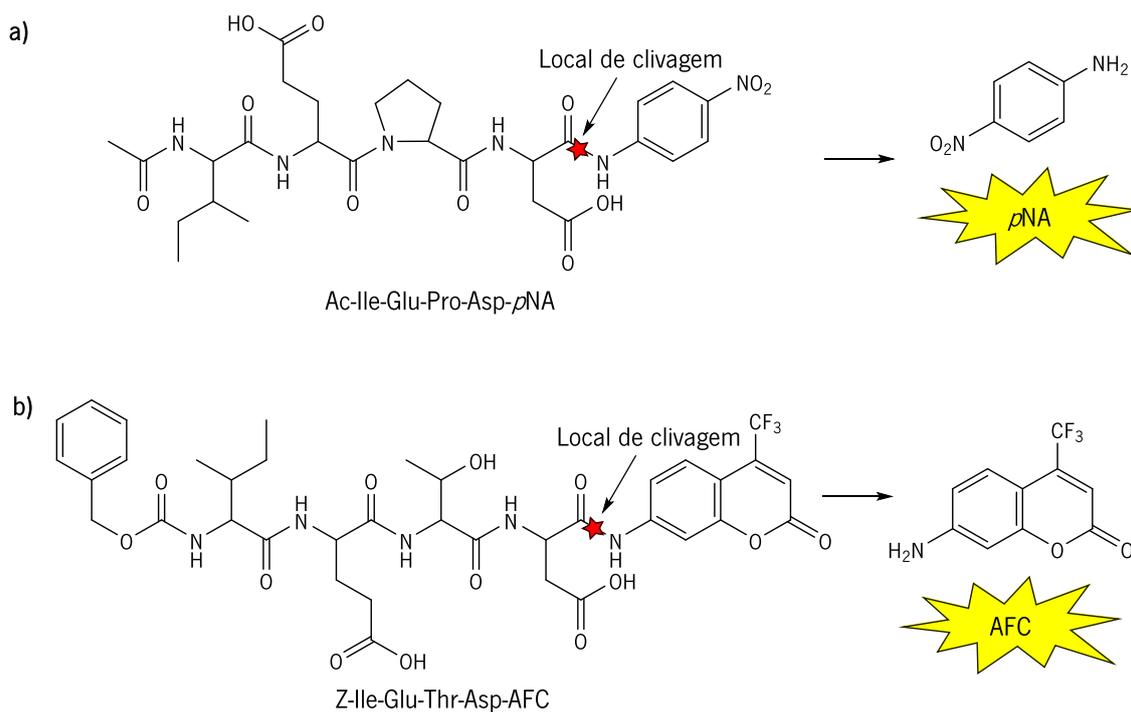
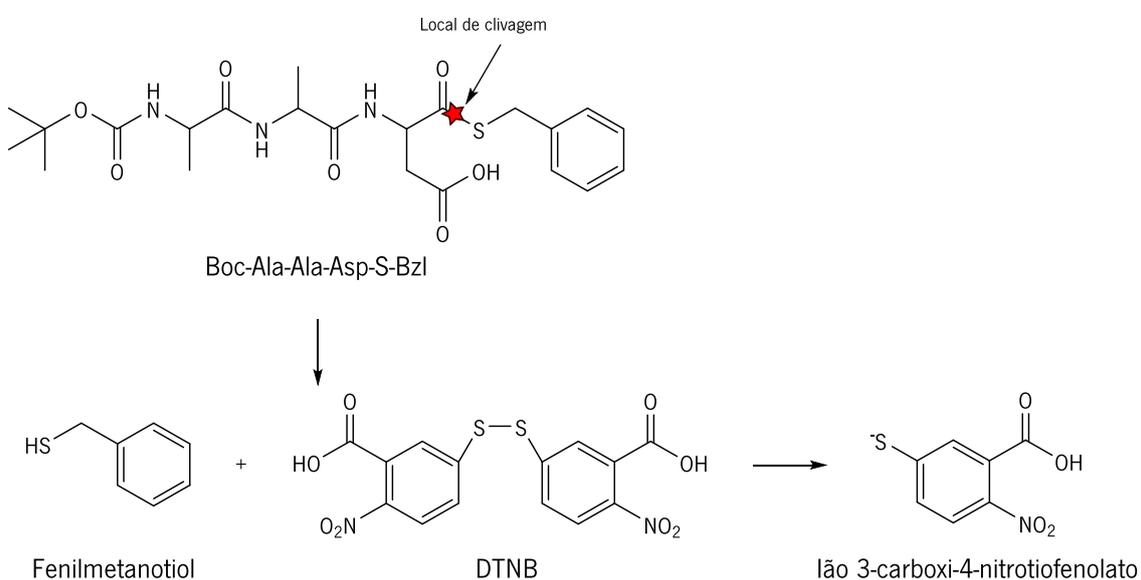


Figura 5: Substratos peptídicos para a GzmB: Ac-Ile-Glu-Pro-Asp-*p*NA (a) e Z-Ile-Glu-Thr-Asp-AFC (b).

No entanto, os substratos Ile-Glu-Pro-Asp e Ile-Glu-Thr-Asp não apresentam especificidade para a GzmB, pois podem ser clivados por caspases.³⁰ Neste sentido, outros substratos peptídicos têm sido desenvolvidos para que não sejam reconhecidos por caspases ou outras granzymes que são estruturalmente ou funcionalmente semelhantes à GzmB.

O substrato Boc-Ala-Ala-Asp-S-Bzl apresenta esta característica única de clivagem pela GzmB. Quando esta enzima cliva o substrato Boc-Ala-Ala-Asp-S-Bzl após o ácido aspártico em P1, liberta o fenilmetanotiol, que por sua vez interage com o ácido 5,5'-ditio-*bis*-(2-nitrobenzóico) (DTNB) para formar o ião 3-carboxi-4-nitrotiofenolato, que pode ser detetado a 405 nm (**Esquema 1**).²⁸



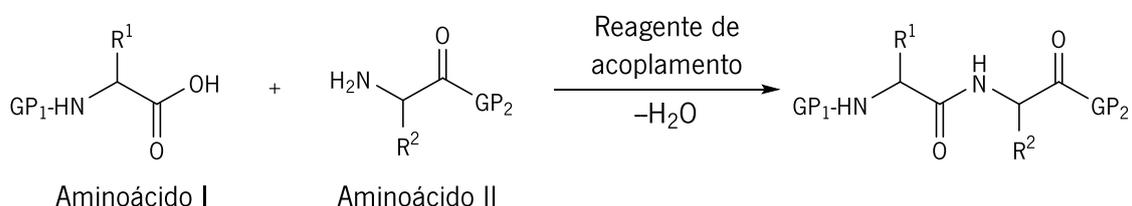
Esquema 1: Substrato peptídico para a GzmB: Boc-Ala-Ala-Asp-S-Bzl, esquema adaptado da referência 28.

1.2. Síntese peptídica

1.2.1. Formação da ligação peptídica

A etapa chave na síntese de péptidos é a formação da ligação peptídica, que envolve a formação de uma ligação covalente do tipo amida, através da reação entre um ácido carboxílico e uma amina. No entanto, a reação destes dois grupos funcionais não ocorre espontaneamente à temperatura ambiente, uma vez que a eliminação da molécula de água só ocorre a altas temperaturas, condições que são tipicamente prejudiciais à integridade dos substratos.³¹

Por essa razão, é necessário primeiro ativar o ácido carboxílico do aminoácido I, utilizando um reagente de acoplamento apropriado para converter o -OH do grupo carboxílico num bom grupo de saída, e só depois de ativado, o ácido carboxílico reage com a amina do aminoácido II para formar a ligação peptídica (**Esquema 2**). Também é essencial que os restantes grupos reativos presentes (α -carboxilo e α -amina e outros grupos reativos da cadeia lateral) estejam bloqueados com grupos protetores (GP1 e GP2) para evitar reações secundárias.³²



Esquema 2: Acoplamento entre aminoácidos mediado por um reagente de acoplamento, adaptado da referência 32.

Dentro dos vários reagentes de acoplamento disponíveis comercialmente, os mais utilizados são as carbodiimidas, os sais de fosfônio e de amínio/urónio (**Figura 6**).³³

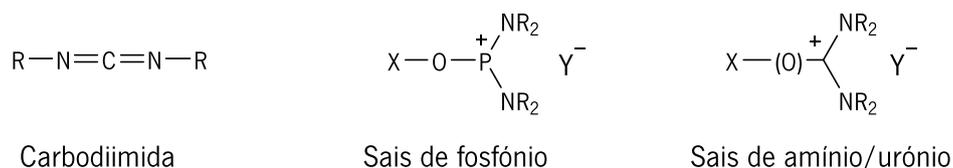


Figura 6: Reagentes de acoplamento mais utilizados na síntese peptídica, adaptada da referência 33.

As carbodiimidas, *N,N'*-diciclo-hexilcarbodiimida (DCC), *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) e o hidrocloreto de *N*-etil-*N'*-[3-(dimetilamino)propil]carbodiimida (EDC.HCl) são frequentemente usadas para a formação da ligação amida em síntese peptídica devido à sua atividade moderada e também ao seu baixo custo (Figura 7).^{34,35}

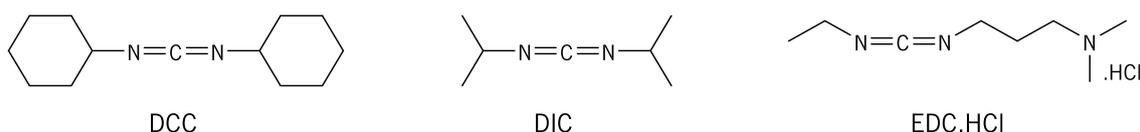
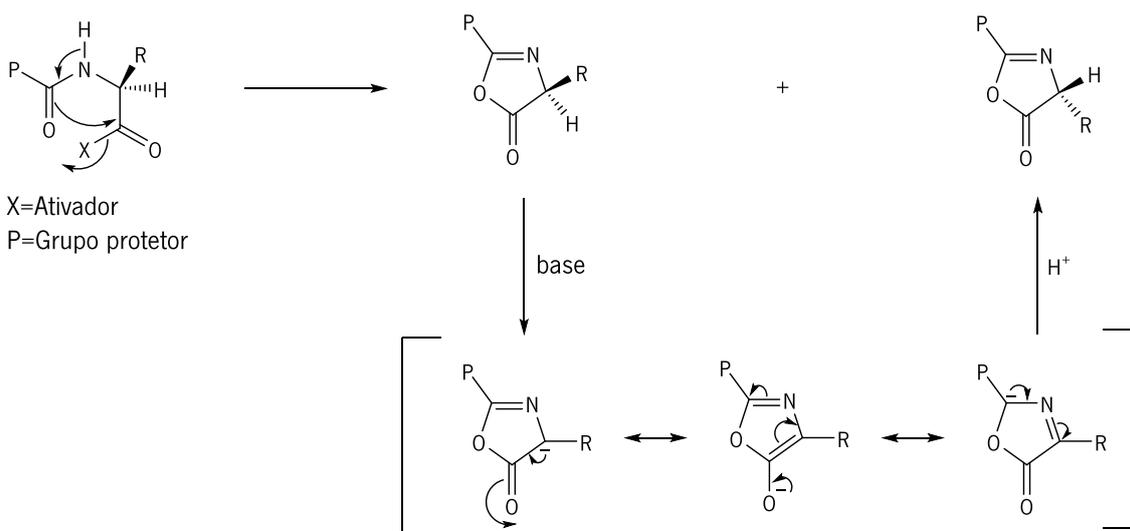


Figura 7: Carbodiimidas que podem ser usadas como reagentes de acoplamento em síntese peptídica, adaptada da referência 34.

Outro desenvolvimento importante no âmbito dos reagentes de acoplamento foi a descoberta de supressores de racemização. Uma vez que todos os aminoácidos naturais são quirais, à exceção da glicina, em que o grupo da cadeia lateral é um hidrogênio, a síntese peptídica ocorre com a formação de uma ligação amida entre monómeros opticamente ativos.^{36,33} Sendo que a manutenção da integridade quiral dos monómeros deve ser um fator importante na síntese peptídica, é crucial a compreensão dos mecanismos de racemização.

A racemização pode ocorrer no terminal C do aminoácido durante a reação de acoplamento devido à remoção do hidrogênio no carbono α e/ou a formação de um intermediário do tipo oxazolona (Esquema 3).³⁵



Esquema 3: Formação de oxazolona, adaptado da referência 35.

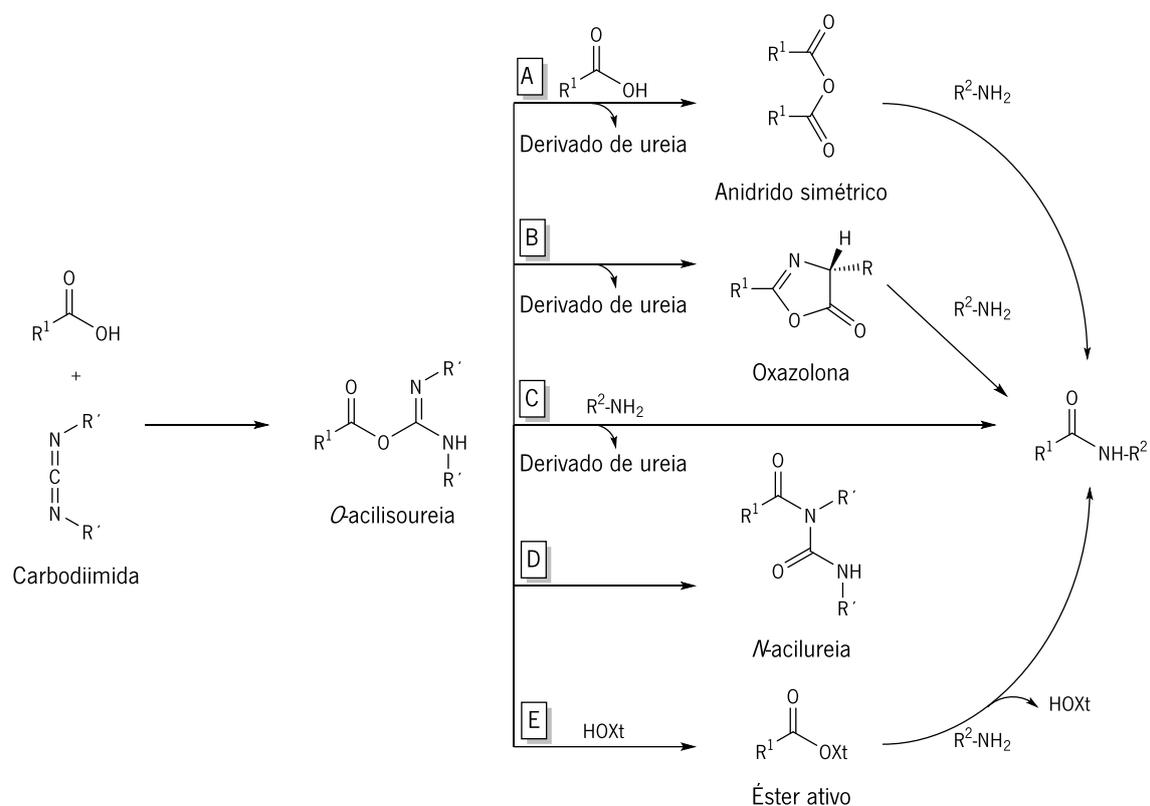
A reação de um ácido carboxílico protegido com uma carbodiimida leva à formação de *O*-acilisourea. Este intermediário pode originar vários produtos diferentes antes de reagir com a função amina para se obter a ligação amida (**Esquema 4**).³⁷

Se 2 equivalentes de ácido carboxílico são usados, o intermediário *O*-acilisourea reage com o segundo equivalente originando o correspondente anidrido simétrico (**Via A, Esquema 4**).^{31,33}

O intermediário *O*-acilisourea também pode ciclizar formando oxazolonas (**Via B, Esquema 4**). No entanto, a oxazolona é menos reativa podendo ocorrer racemização, como já referido.

Quando a *O*-acilisourea formada é muito reativa pode dar-se o acoplamento direto com a amina para originar a ligação amida (**Via C, Esquema 4**).

Uma quarta opção, que é indesejável, consiste no rearranjo por acil-transferência da *O*-acilisourea para a *N*-acilureia, que não é reativa (**Via D, Esquema 4**). Este rearranjo pode ser suprimido pela presença de um aditivo de acoplamento, como um derivado de hidroxilamina (HOXt).³³ Estes aditivos são nucleófilos que reagem com a *O*-acilisourea formando um éster ativo capaz de reagir com a função amina formando a ligação amida desejada (**Via E, Esquema 4**).



Esquema 4: Ativação do ácido carboxílico através da carbodiimida, adaptado da referência 37.

Existe uma gama variada de aditivos que são usados nas reações de acoplamento mediadas por carbodiimidas, tais como o *N*-hidroxibenzotriazole (HOBt), a *N*-hidroxisuccinimida (HOSu) e o 2-ciano-2-(hidroxiimino) acetato de etilo, cujo nome comercial é Oxyma (Figura 8).³³

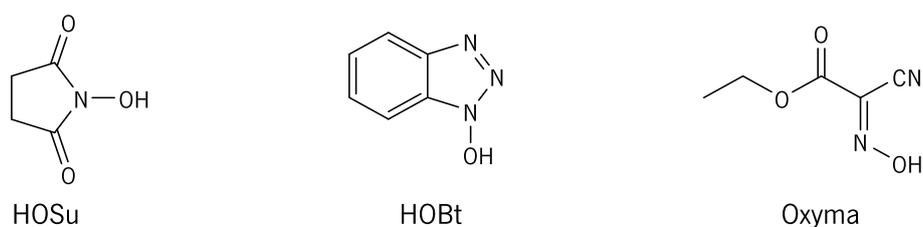


Figura 8: Alguns aditivos usados nas reações de acoplamento, adaptada da referência 33.

A utilização destes aditivos permite evitar reações colaterais como a formação de *N*-acilureias, acima referida, e a eventual racemização do aminoácido ativado, caso se forme uma oxazolona.³⁸

1.2.2. Síntese peptídica em fase sólida

1.2.2.1. Conceito de SPPS desenvolvido por Merrifield

O sucesso da aplicação de péptidos em química medicinal resultou de uma variedade de síntese peptídicas, quer em fase sólida, em solução ou numa mistura destes dois tipos de síntese.

A síntese peptídica em fase sólida (SPPS – *Solid Phase Peptide Synthesis*) desenvolvida por Merrifield em 1963, tornou-se o principal método de preparação de péptidos sintéticos que são essenciais para a investigação em biologia, biomedicina e na descoberta de novos fármacos.^{39,40} Este trabalho inovador de Merrifield foi reconhecido pela atribuição do Prémio Nobel de Química em 1984.⁴¹

O conceito básico de Merrifield consiste em ligar covalentemente o primeiro aminoácido a um suporte sólido (resina polimérica insolúvel), aumentar a cadeia peptídica a partir deste, com a incorporação dos restantes aminoácidos, através de uma sequência de acoplamentos e desproteções. Após obtenção do péptido, com a sequência de aminoácidos pretendida, este é clivado da resina.⁴²

Os métodos clássicos de síntese de péptidos em solução são demorados, de baixos rendimentos, requerem o isolamento e purificação dos intermediários, e a solubilidade do péptido diminui à medida que aumenta o tamanho da cadeia peptídica.^{42,43,44}

A técnica em fase sólida mostrou ter vantagens relativamente à síntese em solução, uma vez que as reações de acoplamento são mais completas obtendo-se altos rendimentos, porque se utiliza um excesso de reagentes, que pode ser facilmente removido por filtração e lavagens sucessivas da resina com solventes adequados. Adicionalmente, as perdas de material na síntese em fase sólida são minimizadas, porque as reações e a purificação ocorrem sem remover o suporte polimérico do vaso de reação.⁴¹

O uso de grande excesso de reagentes na SPPS também permite que as reações de acoplamento sejam mais rápidas do que em solução, minimizando assim a perda de configuração por racemização. Embora seja amplamente aceite que, para cada passo, na SPPS o risco de racemização é praticamente nulo, isto não é completamente verdade e a possibilidade de perda de configuração deve ser sempre mantida em mente, especialmente para os aminoácidos sensíveis, como a cisteína ou a histidina.³³

Atualmente as reações de SPPS têm vindo a ser automatizadas, pois são repetitivas e reprodutíveis, podendo-se sintetizar rapidamente péptidos com bons rendimentos globais e com um bom grau de pureza.^{42,45}

1.2.2.2. Grupos protetores

O sucesso da síntese peptídica depende da combinação eficiente dos grupos protetores e dos reagentes de acoplamento. Os grupos protetores têm como função impedir a formação de ligações indesejáveis durante a reação e para tal, existem duas categorias de grupos protetores, os grupos que permitem a proteção temporária dos grupos α -amino e α -carboxilo da cadeia principal dos aminoácidos, designados por grupos protetores temporários e os grupos de proteção permanentes que bloqueiam as funcionalidades da cadeia lateral dos aminoácidos durante o crescimento da sequência peptídica. Estes últimos devem suportar as condições das clivagens repetitivas do grupo protetor temporário, e geralmente são removidos aquando da clivagem da ligação entre o péptido e resina.^{46,47}

Na SPPS os grupos protetores geralmente utilizados para bloquear o grupo α -amino dos aminoácidos são o 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) e o *tert*-butiloxycarbonilo (Boc) (Figura 9). O grupo Fmoc é clivado em meio básico, com 20% de piperidina ou morfolina dissolvida num solvente orgânico. Contrariamente, o grupo Boc é removido na presença de ácidos, como o ácido sulfúrico, o ácido trifluoroacético (TFA) e o ácido clorídrico.⁴⁸ Como a remoção destes grupos protetores é feita em condições diferentes, quando se recorre a uma síntese em fase sólida escolhe-se uma estratégia de síntese utilizando todos os aminoácidos *N*-protegidos com somente um destes grupos.

A clivagem do péptido da resina também está dependente da estratégia que é utilizada. Numa estratégia Fmoc o péptido é clivado da resina em meio ácido, normalmente com ácido acético. Na estratégia Boc, a clivagem do péptido da resina é realizada com ácido fluorídrico anidro. A estratégia Fmoc é usada mais frequentemente, comparativamente à estratégia Boc, pois esta última requer o uso de HF que apresenta propriedades tóxicas e corrosivas.^{49,50}

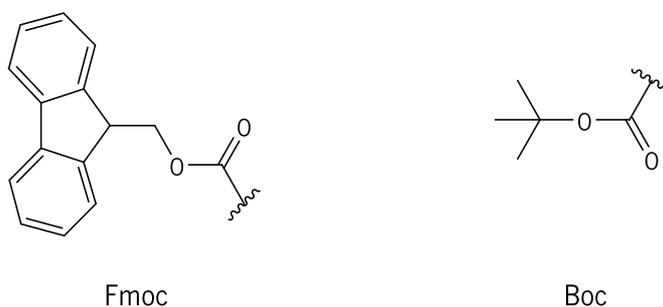


Figura 9: Grupos de proteção α -amino geralmente utilizados, Fmoc e Boc.

Os grupos de proteção da cadeia lateral para a estratégia Fmoc têm sido extensivamente estudados durante as últimas décadas. Para os resíduos de aminoácidos trifuncionais (por exemplo, Cys, Asp, Glu, Lys e Arg) a proteção da cadeia lateral é essencial para o sucesso da síntese de péptidos. Os grupos protetores geralmente utilizados são grupo o *tert*-butilo (*t*Bu) para os aminoácidos Glu, Asp, Ser, Thr e Tyr, o grupo 2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofurano-5-sulfonilo (Pbf) para Arg, o grupo tritilo (Trt) para Cys, Asn, Gln e His e o grupo Boc para Lys e Trp (Figura 10).^{40,51} Os restantes aminoácidos não apresentam grupos funcionais na cadeia lateral.⁵²

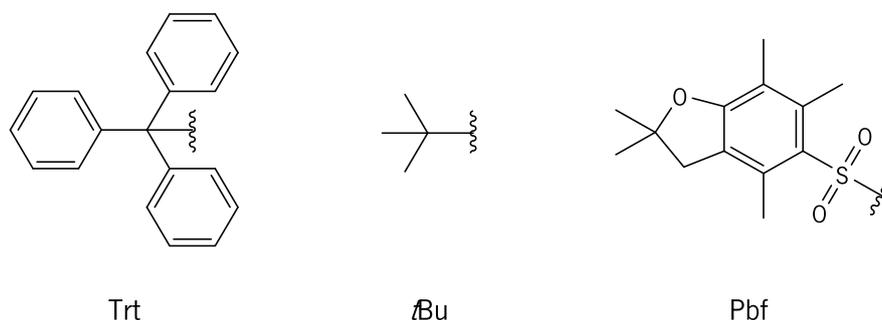


Figura 10: Grupos protetores geralmente utilizados para proteger as cadeias laterais dos aminoácidos.

1.2.2.3. Suporte sólido

A escolha do suporte sólido (resina) para a síntese peptídica depende do péptido que se pretende sintetizar, das condições de reação, dos grupos protetores que serão usados e, ainda do tipo de clivagem a ser feita na resina após a síntese do péptido pretendido.⁴²

As resinas geralmente utilizadas na síntese em fase sólida têm uma matriz de poliestireno reticulado com 1% de DVB (divinilbenzeno) e apresentam-se sob forma de esferas com um tamanho suficiente de modo a permitir a remoção rápida dos solventes por filtração. As resinas devem ser fisicamente estáveis e inertes a todos os reagentes e solventes utilizados durante a síntese. É necessário também, que o suporte sólido tenha uma boa capacidade de dilatação (*swelling*) nos solventes usados durante a síntese, permitindo que todos os reagentes penetrem rapidamente nas partículas do polímero.⁴²

A resina deve ter um grau de funcionalização (*loading*) adequado, pois um nível elevado de *loading* inicial pode resultar num decréscimo da eficácia da síntese. O espaço disponível dentro da resina torna-se pequeno, e assim à medida que aumenta a cadeia peptídica, as reações cruzadas entre diferentes cadeias peptídicas ligadas à resina estão mais predispostas a acontecer.⁵³

Para permitir a ligação do primeiro aminoácido, o suporte de poliestireno deve ser quimicamente modificado para se tornar reativo.⁴² Esta ligação pode ser feita diretamente, como demonstrado no trabalho original de Merrifield, ou através de um espaçador, *linker*.⁴¹

Existe uma ampla variedade de resinas, que possuem diferentes grupos funcionais, onde os péptidos podem ser sintetizados do terminal amino para o terminal ácido, ou do terminal ácido para o terminal amino (mais usado).⁴⁵ Existem resinas funcionalizadas que permitem obter péptidos com terminais com grupos ácidos livres, amidas, álcoois, entre outros.^{45,54} Nesta dissertação foi utilizada a resina de cloreto de 2-clorotritilo que permite obter o terminal na forma de ácido (**Figura 11**).

A resina de cloreto de 2-clorotritilo não é sensível a bases, permitindo a utilização de aminoácidos com o grupo Fmoc como grupo protetor temporário. Os Fmoc-aminoácidos podem ser ligados à resina de cloreto de 2-clorotritilo essencialmente sem racemização. A presença do átomo de cloro na posição 2 proporciona uma maior sensibilidade a ácidos, podendo os péptidos ser clivados da resina com tratamento com ácido muito suave, sendo por isso suficiente uma mistura de clivagem utilizando ácido acético (AcOH)/2,2,2-trifluoroetanol (TFE)/diclorometano (DCM) para a separação do péptido na forma de ácido livre.^{47,55}

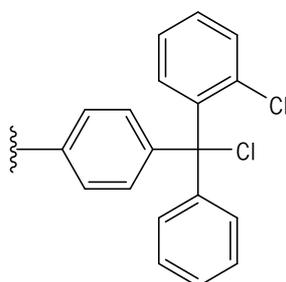
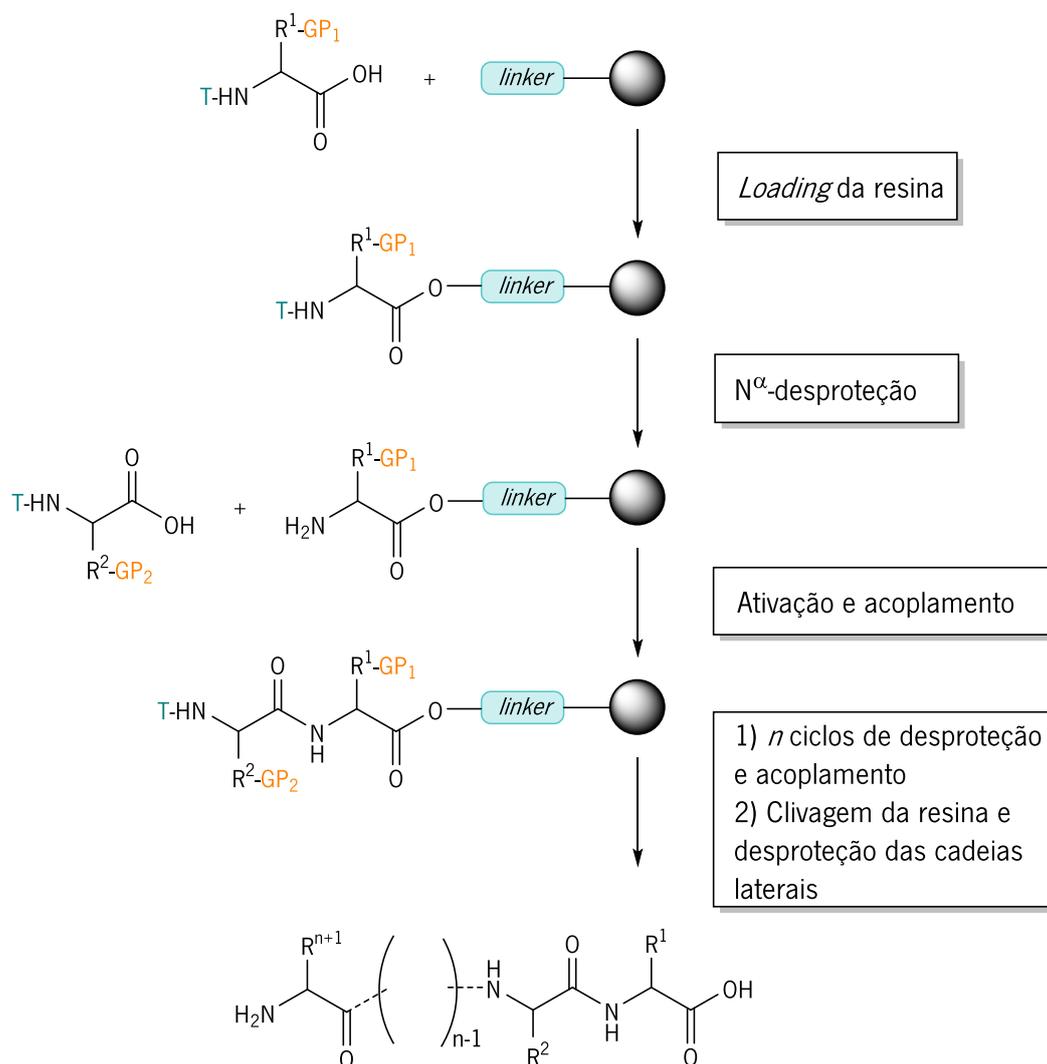


Figura 11: Estrutura da resina de cloreto de 2-clorotritilo.

1.2.2.4. SPPS sequencial e convergente

Existem dois tipos de estratégia sintética em fase sólida, a SPPS sequencial e a SPPS convergente. A SPPS sequencial (**Esquema 5**) corresponde à estratégia definida por Merrifield, com acoplamentos e desproteções repetitivas para a introdução dos aminoácidos, um de cada vez. No final, o péptido pretendido é separado do suporte sólido e os grupos protetores das cadeias laterais são normalmente removidos ao mesmo tempo.⁴² Esta estratégia é aplicada na síntese de péptidos de sequência curta ou média, não ultrapassando os 50 resíduos de aminoácidos.⁵⁶



Suporte sólido
 GP- Grupo protetor da cadeia lateral
 T- Grupo protetor temporário α-amino

Esquema 5: Esquema geral da síntese sequencial em fase sólida (SPPS), esquema adaptado das referências 50 e 54.

A estratégia SPPS convergente é usada para a síntese de péptidos de sequência longa, em que inicialmente se recorre à SPPS sequencial para formar segmentos peptídicos pequenos que são purificados e posteriormente ligados entre si de forma a obter o péptido pretendido.⁴⁷

A síntese em fase sólida pode ser realizada manualmente ou através de um equipamento utilizando a irradiação micro-ondas. A principal diferença entre estes dois métodos é a temperatura a que são submetidas as reações e consequentemente, o tempo reacional das mesmas.

1.2.2.5. Síntese peptídica em fase sólida assistida por micro-ondas

A utilização da irradiação por micro-ondas na síntese peptídica em fase sólida foi aplicada pela primeira vez em 1991 por Wang e, desde então, tem sido amplamente usada, permitindo obter péptidos com melhores rendimentos, mais puros e realizar reações químicas em minutos, em vez de horas ou mesmo dias.^{57,58,59}

No aquecimento convencional condutivo, a energia é transferida para a mistura de reação através de correntes convectivas ou condutividade térmica, enquanto que o aquecimento por micro-ondas ocorre pela incidência da energia diretamente no solvente e em alguns reagentes, devido às interações do material com o campo elétrico alternado, levando a um aumento rápido da temperatura (**Figura 12**).^{40,60}

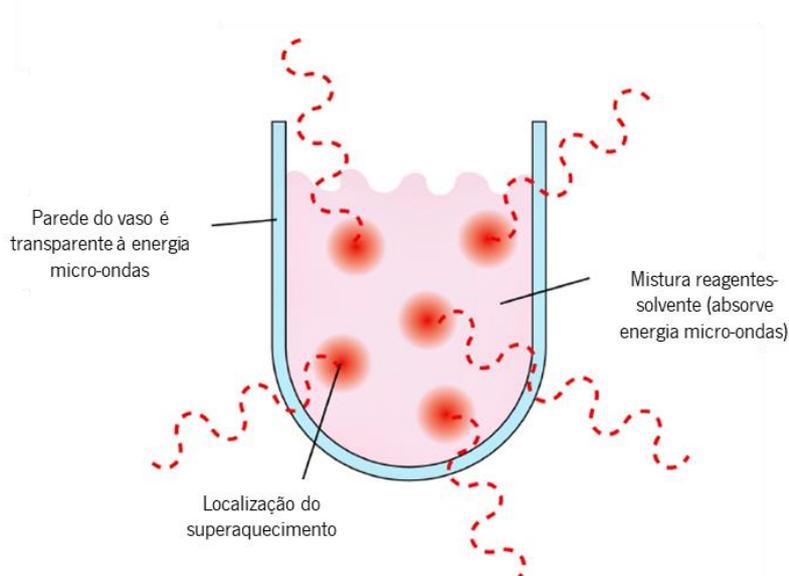


Figura 12: Vaso de reação sob aquecimento por micro-ondas, adaptada da referência 60.

Para que a temperatura da mistura reacional aumente rapidamente é importante escolher um solvente que tenha a capacidade de absorver a energia de micro-ondas e de converter essa energia absorvida em calor.⁶¹ Para tal, são usados os solventes *N,N*'-dimetilformamida (DMF), acetonitrilo, butanol, cetonas e água.⁶⁰

Embora, a irradiação micro-ondas não afete o valor da energia de ativação dos reagentes, a energia aplicada é capaz de fornecer o impulso para superar a barreira e completar a reação mais rapidamente do que os outros métodos convencionais de aquecimento.⁶⁰

Para além da rapidez das reações, o aquecimento por micro-ondas tem-se revelado um sucesso porque reduz a agregação inter- e intramolecular que tende a existir nos aminoácidos que são propensos a formar folhas β . Estes aminoácidos, frequentemente levam à agregação durante o crescimento da cadeia peptídica, provavelmente devido à possibilidade de ligações de hidrogénio e forças hidrofóbicas, especialmente em péptidos que contêm uma alta proporção de Ala, Val, Ile, Asn ou Gln. Com o aquecimento por micro-ondas a agregação tende a deixar de existir, ficando as cadeias numa forma mais estendida e, assim, os locais de acoplamento ficam mais acessíveis (Figura 13).^{40,62}

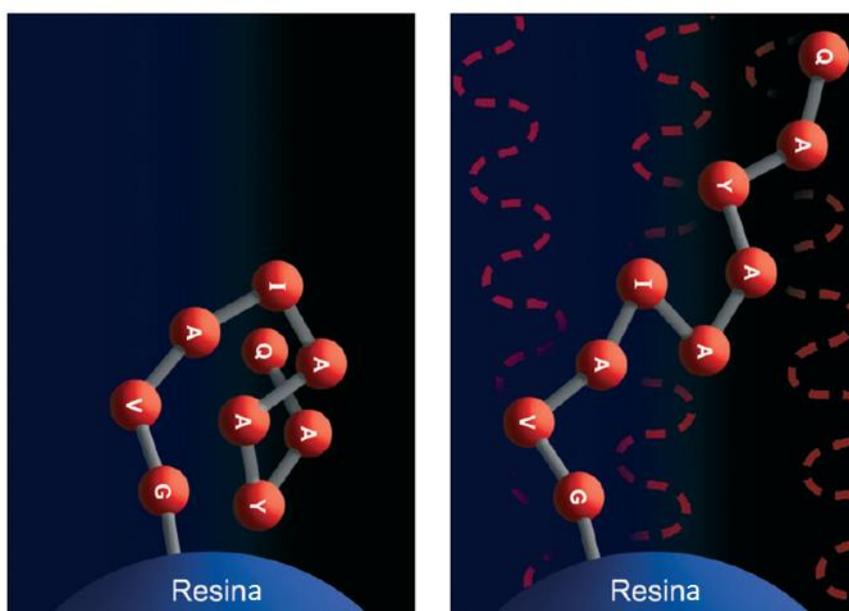


Figura 13: Efeito da energia de micro-ondas durante o crescimento da cadeia peptídica: (esquerda) na ausência de micro-ondas; (direita) com irradiação micro-ondas, adaptada da referência 62.

1.3. Aplicação da técnica FRET no desenvolvimento de sondas fluorescentes

1.3.1. Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma das técnicas analíticas mais sensível, versátil e de fácil acesso, desempenhando um papel importante em diferentes áreas de investigação, nomeadamente na química analítica, na bioquímica e na biologia celular.

Em particular, a marcação por fluorescência de biomoléculas é uma ferramenta essencial para o estudo da localização e expressão dessas moléculas nas células, e pode ser realizada com compostos com absorção e/ou fluorescência desde a região ultravioleta até a região do infravermelho próximo do espectro eletromagnético.^{63,64}

A marcação por fluorescência pode ser utilizada nesta ampla faixa de comprimentos de onda usando nanocristais semicondutores, proteínas fluorescentes ou moléculas orgânicas. Estas moléculas orgânicas podem marcar compostos através de uma ligação covalente usando um grupo reativo (-SH, -OH, -COOH, -NH₂) para originar sondas fluorescentes.^{63,64}

Várias sondas fluorescentes têm sido desenvolvidas principalmente para marcar péptidos e nucleótidos,^{65,66} sendo crucial compreender os mecanismos responsáveis pela fluorescência para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de novas sondas fluorescentes.

A fluorescência é um processo no qual ocorre a emissão de fótons por relaxação de um estado eletrónico excitado. Quando uma espécie absorve radiação na região do ultravioleta e visível, ocorre uma transição eletrónica do estado eletrónico fundamental (S_0) para um estado de energia superior, denominado estado excitado (S_1). Deste estado excitado, a molécula passa ao estado excitado de menor energia (S_1) dissipando a energia para o ambiente envolvente, num processo geralmente designado por conversão interna.

A partir do estado S_1 , a molécula retorna ao seu estado fundamental por transições não radiativas (conversão interna) entre os dois estados eletrónicos ou através de transições radiativas, mantendo a mesma multiplicidade, no caso da fluorescência, ou o eletrão pode inverter o spin e transitar para um nível vibracional de energia semelhante do primeiro estado excitado tripleto (T_1), por um processo designado por cruzamento intersistemas. Quando no estado tripleto, a molécula pode decair para o estado fundamental singlete (S_0) de forma não radiativa (conversão interna) ou

por emissão, processo designado por fosforescência. Estes processos são geralmente esquematizados pelo diagrama de Jablonski (Figura 14 - a).^{67,68}

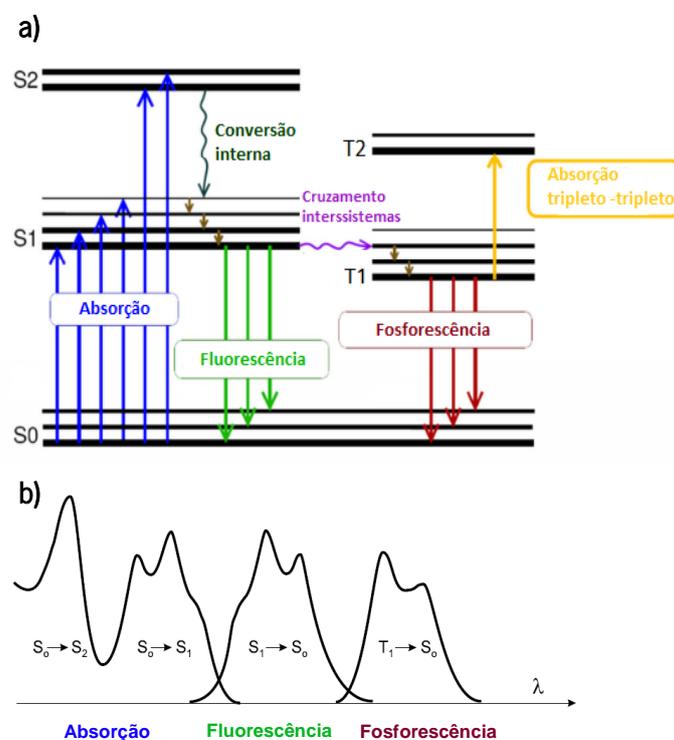


Figura 14: Diagrama de Jablonski (a) e ilustração das posições relativas dos espectros de absorção, fluorescência e fosforescência (b), adaptada das referências 67 e 68.

O espectro de fluorescência costuma ser a imagem no espelho do espectro de absorção (Figura 14 – b) e o intervalo entre os comprimentos de onda de emissão máxima e absorção máxima é designado de desvio de Stokes.

Uma molécula fluorescente ideal deve apresentar um desvio de Stokes elevado, permitindo assim detetar os fotões emitidos isoladamente dos fotões absorvidos. Além disso, um fluoróforo deve ter uma elevada absortividade molar (ϵ), garantindo uma absorção da radiação a um dado comprimento de onda; deve apresentar um alto rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f), pois é a razão entre o número de fotões emitidos e o número de fotões absorvidos, sendo indicadora da eficiência do processo de fluorescência; deve também ter um tempo de vida de fluorescência (τ) longo, de modo que seja possível observar a emissão de fluorescência do fluoróforo continuamente excitado, valor que varia entre os nanossegundos a picossegundos.⁶⁹

Diferentes processos podem provocar a diminuição da intensidade de fluorescência, fenómeno designado por *quenching*. Estes processos podem ocorrer no estado excitado das moléculas (*quenching* dinâmico) ou no estado fundamental, por formação de complexos não fluorescentes (*quenching* estático).⁶⁹ Atualmente, a maioria das técnicas de deteção de fluorescência baseiam-se no *quenching* dinâmico por transferência de energia de um fluoróforo para outro fluoróforo ou para uma molécula não fluorescente (*quencher*).⁷⁰ Este é um dos mecanismo mais utilizados por sondas fluorescentes e será descrito na próxima secção.

1.3.2. Transferência de energia por ressonância de Förster, FRET

A transferência de energia ressonante ocorre entre duas moléculas, um dador (fluoróforo) e um aceitador (fluoróforo ou cromóforo), em que a excitação é transferida do dador no estado excitado para o aceitador no estado fundamental por interações dipolo-dipolo de longo alcance – processo designado por transferência de energia por ressonância de Förster (FRET - *Förster Resonance Energy Transfer*).^{67,69} Neste processo, o espectro de absorção do aceitador deve sobrepor-se ao espectro de emissão do dador. Uma sobreposição de mais de 30% é a condição mínima para uma deteção eficiente, precisa e confiável de FRET.⁷¹ Para além disso, o dador e o aceitador devem estar a uma distância de 1-10 nm e a orientação relativa dos dipolos de transição do dador e do aceitador deve ser paralela (**Figura 15**).⁷¹

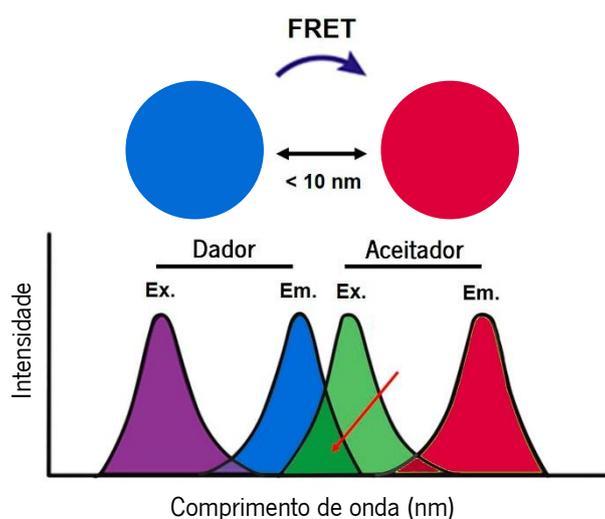


Figura 15: Requisitos específicos para ocorrer FRET, adaptada da referência 71.

A distância em que a eficiência da transferência de energia é reduzida em 50%, ou seja, 50% dos dadores no estado excitado são desativados pelo FRET, define-se como o raio de Förster (R_0).⁷² O valor de R_0 (em angström) depende das propriedades espectrais do dador e aceitador, a expressão é dada pela **Equação 1**:

$$R_0 = 9,7 \times 10^3 (Q_0 n^{-4} k^2 J)^{\frac{1}{6}} \text{ \AA} \text{ (Equação 1)}$$

onde Q_0 corresponde ao rendimento quântico de fluorescência do dador na ausência do aceitador, n ao índice de refração do meio, k^2 é o fator de orientação dos momentos dipolares do dador e aceitador e J corresponde à integral (área) da sobreposição espectral da emissão do dador e da absorção do aceitador.

No caso de usar dois fluoróforos, o mecanismo FRET pode ser detetado pela extinção da fluorescência do dador, quando a distância entre o dador-aceitador é grande ou pelo aparecimento da fluorescência induzida do aceitador para pequenas distâncias entre dador-aceitador (**Figura 16**).⁶⁸

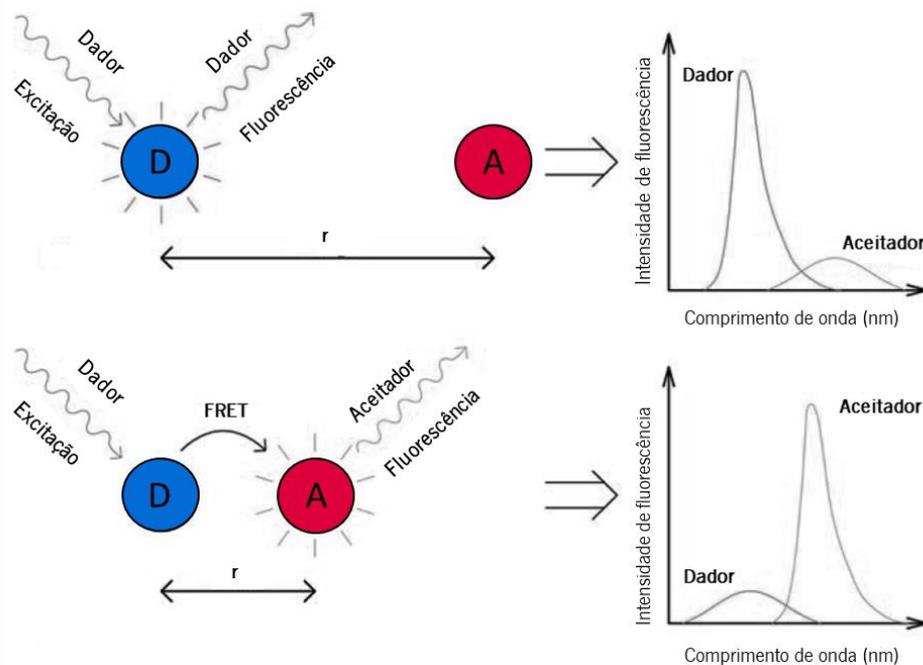


Figura 16: Influência da distância entre o par dador/aceitador no mecanismo FRET, adaptada da referência 68.

Desta forma, a extensão da transferência de energia de Förster pode ser monitorizada pelas intensidades relativas de fluorescência das moléculas dadoras e aceitadoras. Isto fornece uma ferramenta muito sensível e útil para medir a proximidade de biomoléculas marcadas por fluorescência na escala de nm.⁶⁸ Além disso, o FRET pode ser aplicado para detetar alterações conformacionais numa proteína quando a distância entre o dador e o aceitador muda.⁷³

Os avanços atuais na microscopia de fluorescência aliados ao desenvolvimento de novas sondas fluorescentes, fazem da transferência de energia por ressonância de fluorescência uma poderosa técnica para estudar as interações moleculares *in vivo* com melhor resolução espacial (angströms) e temporal (nanossegundos) numa gama ampla de aplicações.⁷⁴

A aplicação de sondas usando esta técnica é também bastante usada numa infinidade de aplicações que monitorizam vários tipos de reações de DNA e RNA, incluindo nas reações em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*), hibridização, ligação, clivagem, recombinação e síntese.⁷⁵

Nos estudos da atividade de enzimas, o FRET é aplicado através da incorporação de um dador (fluoróforo) e um aceitador (outro fluoróforo ou *quencher*) em substratos cliváveis, originando sondas fluorescentes.

1.3.3. Pares FRET utilizados em sondas para ensaios enzimáticos

O envolvimento da atividade enzimática na progressão de uma doença faz com que o desenvolvimento de técnicas para detetar enzimas específicas seja crucial para obter informações sobre determinada doença e também para desenvolver testes de diagnóstico. Em particular, a expressão de uma determinada enzima pode ser indicativa da progressão de um tumor e da suscetibilidade a um determinado tratamento.⁷⁶

Estas técnicas usadas para o estudo de enzimas requerem uma sonda fluorescente capaz de detetar com precisão a localização da enzima alvo. As propriedades fluorescentes precisas de muitos fluoróforos dependem da sua estrutura molecular e do seu microambiente (por exemplo, a sua proximidade a outros fluoróforos). Isto permite o desenvolvimento de sondas que exibem alterações significativas nas suas propriedades espectroscópicas após a interação com certas enzimas.

Um dos modelos de sonda mais comumente utilizados para medir a atividade de uma enzima é descrito esquematicamente na **Figura 17**. Inicialmente, um par fluoróforo/*quencher* complementar é ligado a cada extremidade de um substrato enzimático. Após a clivagem enzimática do substrato, o fluoróforo e o *quencher* são separados e observa-se a emissão do fluoróforo, produzindo um sinal ótico que está diretamente correlacionado com a atividade da enzima.⁷⁶



Figura 17: Modelo de concepção de uma sonda com um par fluoróforo (F)/*quencher* (Q), adaptada da referência 76.

Os primeiros exemplos destas sondas foram desenvolvidos no início dos anos 70, utilizando as propriedades fluorescentes intrínsecas do aminoácido triptofano. Num dos primeiros exemplos, Latt e os seus colaboradores ligaram o grupo 5-(*N,N*-dimetilamino)naftaleno-1-sulfonilo (Dansyl) (**Figura 18**) ao terminal N do dipéptido Gly-Trp. O sinal fluorescente do aminoácido pode ser detetado após hidrólise com carboxipeptidase A, resultando num aumento da fluorescência de 100 vezes.⁷⁷ Pouco tempo depois, foi sintetizada a primeira sonda com um dador e um aceitador não natural, o naftaleno e antraceno, respetivamente.⁷⁸ Mais uma vez, a clivagem do dipéptido, neste caso pela tripsina, resultou na deteção da fluorescência do dador.

Uma limitação importante destes exemplos de sonda é a exigência de que o fluoróforo orgânico seja conjugado a um dos resíduos onde ocorre a hidrólise da ligação amida (resíduos P1 ou P1'), limitando a gama de enzimas que podem ser analisadas.

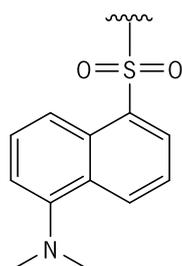


Figura 18: Estrutura do grupo Dansyl

Para contornar este problema, Kraft e os seus colaboradores introduziram como um novo par fluoróforo/*quencher*, o ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno sulfónico (Edans) e o ácido 4-[[4'-(*N,N*-dimetilamino)fenil]diazenil] benzóico (Dabcyl), respetivamente (**Figura 19 – a**). Este par foi introduzido num octapéptido como sonda para a protease associada ao HIV-1 (**Figura 19 – b**).⁷⁹

A principal característica responsável pelo *quenching* eficiente da fluorescência é a excelente sobreposição do estado excitado do fluoróforo ($\lambda_{\text{emi}} = 490 \text{ nm}$) e a absorção do Dabcyl ($\lambda_{\text{abs}} = 470\text{-}520 \text{ nm}$, dependendo do pH).⁸⁰

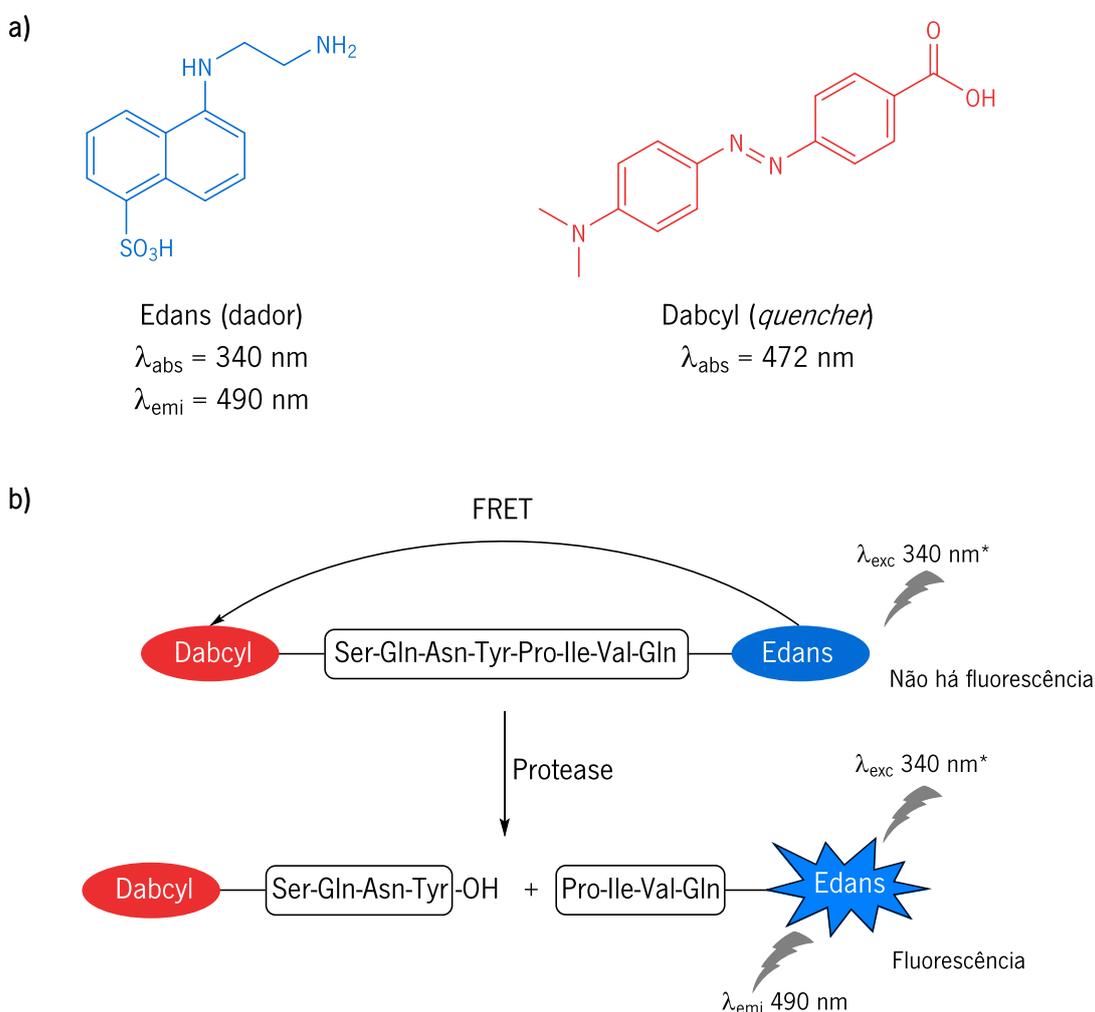


Figura 19: Estruturas e propriedades fluorescentes do par Edans/Dabcyl (**a**) e estrutura do substrato fluorogénico para a HIV-1, em que a transferência por ressonância de energia de fluorescência (FRET) do estado excitado do Edans para o cromóforo Dabcyl resulta no *quenching*; o sinal é obtido após a clivagem proteolítica do péptido (**b**), adaptada da referência 80 e 84. *O λ_{exc} corresponde ao λ_{abs} do Edans.

Após a clivagem do péptido pela enzima, foi observado um aumento na emissão do Edans de 40 vezes, comprovando a eficácia da sonda. Para além da sobreposição espectral entre o espectro de emissão do Edans e o espectro de absorção do Dabcyl, a seleção deste par foi feita também com base no longo tempo de vida do Edans (13 ns) e a elevada absorvidade molar do Dabcyl.⁸⁰

Para o par Edans/Dabcyl, a distância Förster para 50% de transferência de energia (R_0) é de 33 Å. A distância máxima reportada num substrato entre o Edans e Dabcyl é de 11 aminoácidos que, assumindo uma conformação estendida para o péptido, corresponde a $R = 39,8$ Å, com aumento de 10 vezes na fluorescência após a clivagem do substrato.^{81,82}

Dadas estas propriedades espectroscópicas excelentes, este par dador/aceitador tem sido aplicado com sucesso em ensaios baseados em fluorescência de outras enzimas para além da protease associada ao HIV-1, tais como a protease do vírus da hepatite C,^{82,83} a protease do tipo 3CL^{pro} do coronavírus da síndrome respiratória aguda grave⁸⁴ e da elastase neutrofílica humana (HNE).⁸⁵

Outros pares FRET que também têm sido incorporados neste tipo de sonda incluem como aceitadores os corantes *Black Hole Quencher* (BHQ) (**Figura 20**).⁸⁶ A principal vantagem que estas moléculas oferecem sobre as moléculas fluorescentes é a eliminação da fluorescência de fundo que é originada da excitação direta do aceitador ou da re-emissão.⁸⁷

Neste contexto, os corantes BHQ surgem como verdadeiros *quencher*s sem emissão nativa devido à sua estrutura azo-poliaromática. Além disso, esta família de três membros (BHQ-1, BHQ-2 e BHQ-3) cobre o espectro eletromagnético desde o comprimento de onda de 480 nm até à região do infravermelho próximo (NIR - *Near Infrared*).⁸⁸

Atualmente, o desenvolvimento de sondas na região do infravermelho próximo (650-900 nm) é muito estudado. Nesta região espectral, é mínima a interferência da dispersão e absorção da luz pela amostra biológica e da autofluorescência celular.^{89,90} Sendo assim, moléculas com absorção e emissão a comprimentos de onda nesta região são especialmente necessárias para a conceção deste tipo de sondas.

No entanto, existem poucas classes de corantes na região do infravermelho próximo disponíveis, o que tem levado ao desenvolvimento de compostos com melhores propriedades fotofísicas através de modificações da estrutura de base de certas moléculas adequadas para o efeito.

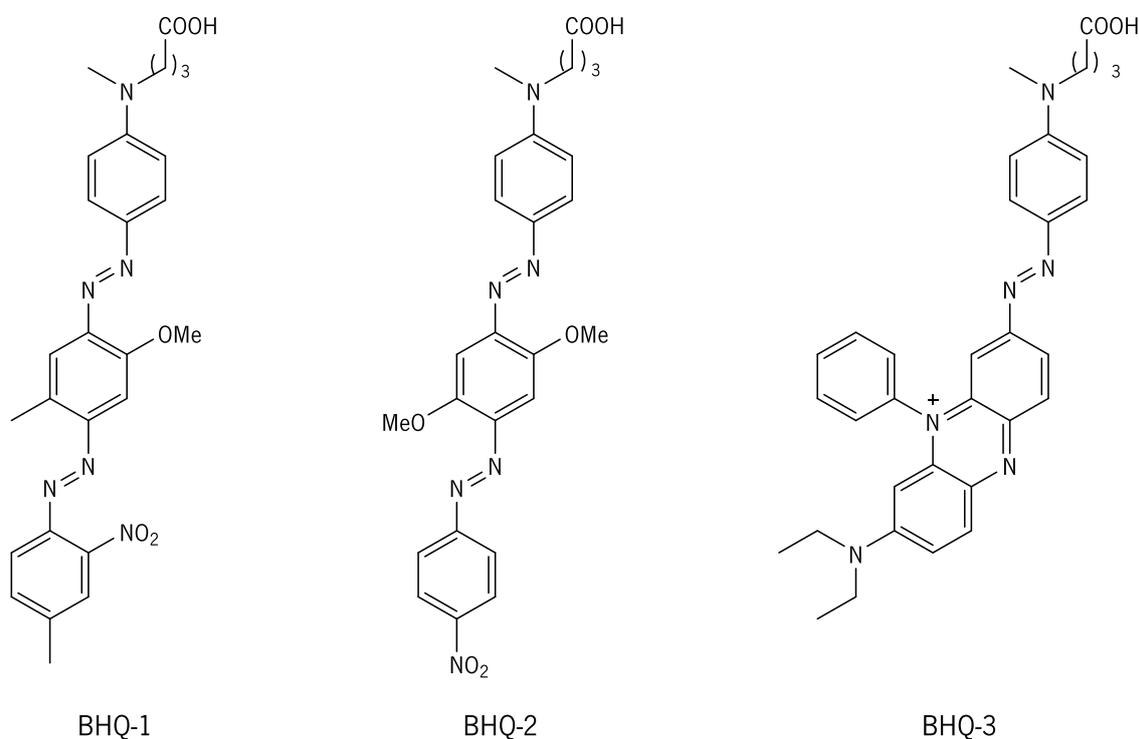


Figura 20: Estrutura dos corantes *Black Hole Quencher*, BHQ-1, BHQ-2 e BHQ-3.

As propriedades espectrais de fluorescência podem ser ajustadas por alterações na estrutura base, através da introdução de diferentes grupos substituintes, permitindo adequar os valores do comprimento de onda de emissão máxima e do comprimento de onda de absorção máxima. Entre estas estruturas, destacam-se as fluoresceínas, rodaminas, derivados de BODIPY e os derivados de cianinas (**Figura 21**).

A fluoresceína (ácido (2-(6-hidroxi-3-oxo-3H-xanten-9-il)benzóico), FAM, apresenta uma absorvidade molar relativamente elevada, rendimento quântico de fluorescência excelente e boa solubilidade em água. Este composto apresenta um comprimento de onda de excitação máximo a 494 nm, valor próximo dos 488 nm em que operam os lasers de argon, podendo este fluoróforo ser usado em aplicações que envolvam microscopia confocal de varrimento a laser e citometria de fluxo.⁶⁴

Tal como as fluoresceínas, as rodaminas pertencem à classe dos xantenos. Estes corantes têm sido vastamente investigados como sondas fluorescentes devido às suas características fotofísicas favoráveis, tais como a elevada absorvidade molar e a resistência à fotodegradação.⁸⁹ Em especial, a tetrametilrodamina (TMR) e a carboxitetrametilrodamina (TAMRA) têm sido recorrentemente usadas em aplicações que envolvam o FRET.⁹¹

Os fluoróforos derivados de BODIPY são baseados na molécula de 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-sindaceno e exibem propriedades óticas melhoradas relativamente à fluoresceína e à tetrametilrodamina. Estes compostos apresentam diversas características vantajosas tais como estabilidade fotoquímica, absorção acentuada com alta intensidade desde a região do visível à do NIR e elevados rendimentos quânticos de fluorescência.⁹²

As cianinas apresentam uma ponte polimetínica e a extensão desta conduz a desvios batocrômicos das bandas de absorção, onde os derivados com cinco carbonos na cadeia metínica (Cy5) podem apresentar máximos de absorção na região do NIR.⁹³

Na sua grande maioria as cianinas possuem um elevado rendimento quântico de fluorescência, bandas de absorção estreitas e altas absorvidades molares, geralmente de 200 000 M⁻¹ cm⁻¹.⁹⁴

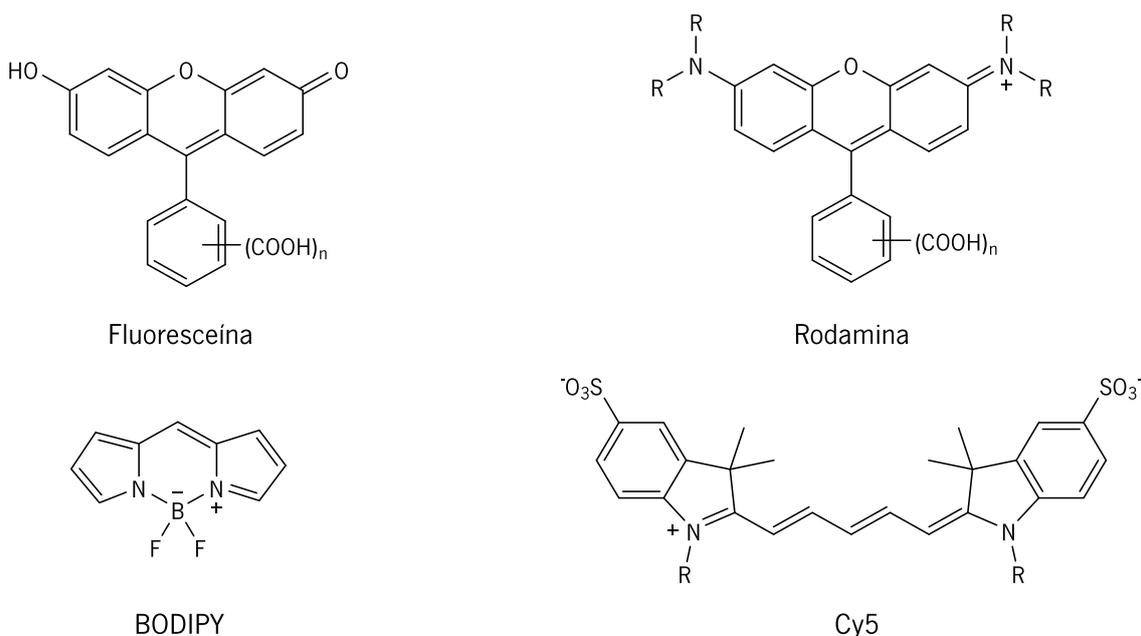


Figura 21: Estruturas base dos corantes fluorescentes, fluoresceína, rodamina, BODIPY e estrutura do Cy5.

Os derivados de cianinas, devido às suas excelentes propriedades óticas, nomeadamente no infravermelho próximo, têm sido amplamente aplicados como sondas de monitorização em técnicas sensíveis, como a regeneração de tecidos ou mesmo localização e marcação de células cancerígenas.⁹⁵ Em especial, as cianinas do tipo Cy5 podem ser usadas facilmente na deteção de células cancerígenas, sendo por isso consideradas excelentes sondas para a obtenção de imagens de fluorescência nessa mesma região.

Os derivados de fluoresceína, rodamina e cianina podem ser incorporados no modelo de sonda anteriormente descrito, comportando-se como dador, quando interagem com os *Black Hole Quencher* (BHQ-1 a BHQ-3). Tendo em conta, a sobreposição espectral entre estes compostos, novos pares FRET têm sido usados em diversas aplicações, tais como FAM/BHQ-1,⁹⁶ TAMRA/BHQ-2,⁹⁷ Cy5/BHQ-3.^{98,99} Os valores de absorção e emissão máxima destes compostos encontram-se descritos na **Tabela 1**.^{87,89}

Tabela 1: Dados dos comprimentos de onda de absorção e emissão máxima dos corantes fluorescentes e *quencher*s comuns aplicados na marcação de biomoléculas.

		λ_{abs} (nm)	λ_{emi} (nm)
Fluoróforos	FAM	495	520
	TAMRA	540	565
	Cy5	646	668
Quencher	BHQ-1	534	—
	BHQ-2	579	—
	BHQ-3	672	—

Capítulo 2: Resultados e Discussão

Esta dissertação insere-se num projeto financiado pela Fundação da Ciência e Tecnologia a decorrer no Centro de Química da Universidade do Minho e no INL - *International Iberian Nanotechnology Laboratory*, com o título *Self-reporting immunostimulating formulation for on-demand cancer therapy with real-time treatment response monitoring* (Self-i).

O projeto Self-i tem como objetivo a preparação, caracterização e validação *in vitro* de um sistema de transporte de fármacos imunoestimulantes, composto por nanopartículas de magnetite (Fe_3O_4) com uma camada de sílica (SiO_2) e revestidas por polímeros à base de poli(*N*-isopropilacrilamida) (pNIPAM) (Figura 22). Este sistema será acoplado a uma sonda com o par FRET Cy5/BHQ-3 ligado à sequência Ala-Ala-Asp, específica para a GzmB.

A aplicação local de hipertermia magnética (temperaturas entre os 40 °C e os 45 °C)⁹ desencadeia a libertação do fármaco imunoestimulante, ativando o sistema imunológico. Esta ativação da resposta imune faz com que as células NK e T CD8⁺ libertem a GzmB que medeia a morte das células cancerígenas. Quando a enzima cliva o substrato peptídico depois do resíduo de Asp, o fluoróforo e o *quencher* são separados e observa-se a emissão do fluoróforo, produzindo um sinal ótico. Este sinal fluorescente correlaciona-se com a ativação do sistema imunológico e com uma resposta positiva do paciente ao tratamento do CCR.

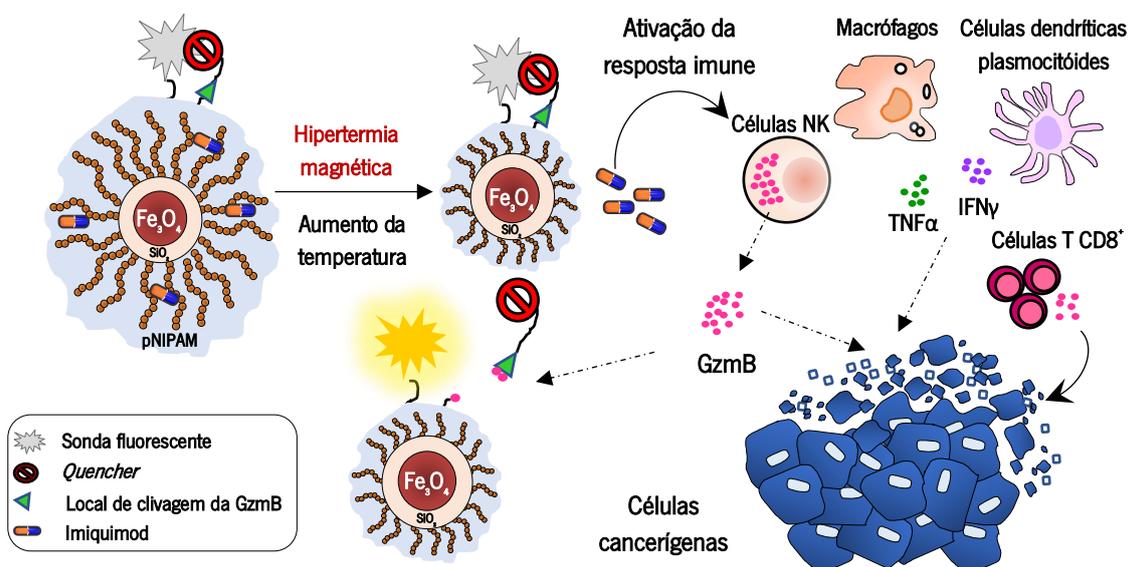


Figura 22: Representação de um tratamento alternativo para o CCR combinando imunoestimulação local e hipertermia.

O presente trabalho insere-se no projeto Self-i, no que diz respeito à síntese de sondas fluorescentes para a GzmB pela ligação do par FRET Edans/Dabcyl à sequência Ala-Ala-Asp. Este par foi utilizado como prova de conceito, embora se pretenda que as nanopartículas sejam ligadas a sondas com o par Cy5/BHQ-3, devido aos comprimentos de onda elevados que apresentam, permitindo estudos a nível celular.

O Edans e Dabcyl foram escolhidos para testar as condições da síntese das sondas, uma vez que são moléculas mais simples quando comparadas com o Cy5 e o BHQ-3 e apesar de ainda não terem sido reportados estudos com a GzmB para ambos os pares FRET, existe disponível uma vasta informação da aplicação do Edans/Dabcyl no estudo de outras enzimas.^{80,81,82,84,85}

Como o objetivo é também seguir a nanopartícula após a clivagem enzimática, o fluoróforo (dador) foi acoplado a um resíduo de Lys, tanto no início como no fim da sequência, para permitir a ancoragem à nanopartícula, surgindo assim dois modelos de síntese (**Figura 23**). No **modelo 1**, o aceitador e o dador foram ligados aos terminais N e C do péptido Ala-Ala-Asp-Lys enquanto que, no **modelo 2** o mesmo par foi ligado aos terminais do péptido Lys-Ala-Ala-Asp. Os péptidos foram sintetizados com o grupo lateral amino da Lys e ácido do Asp protegidos com o grupo Boc e *t*Bu, respetivamente, de forma a que a ligação do Edans e Dabcyl com o péptido fosse na cadeia principal.

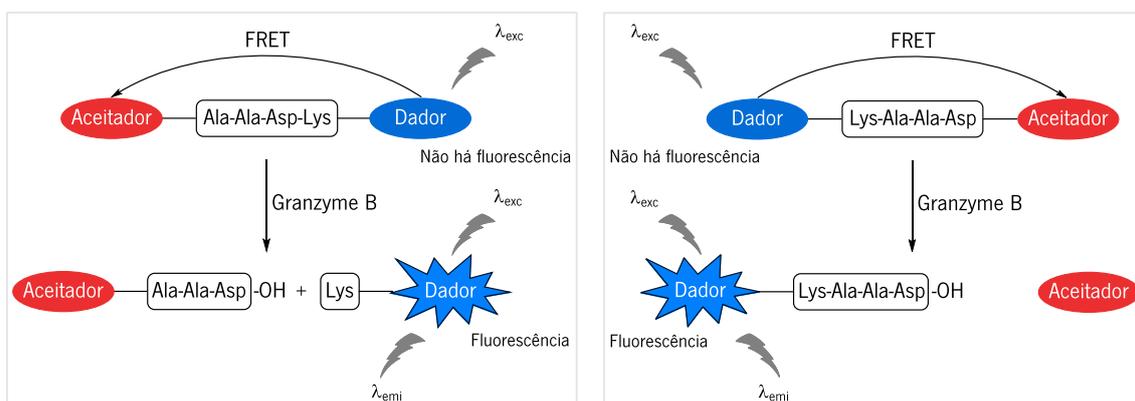


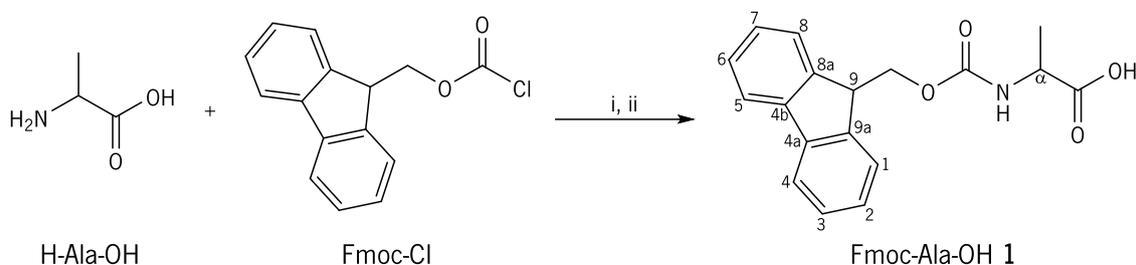
Figura 23: Modelos da sonda fluorescente para a GzmB pela incorporação de um par dador/aceitador no péptido Ala-Ala-Asp-Lys, **Modelo 1** (esquerda) e no péptido Lys-Ala-Ala-Asp, **Modelo 2** (direita).

Os precursores sintetizados para a obtenção destas sondas foram a Fmoc-Ala-OH **1**, o Dabcyl **2a**, o derivado do Dabcyl com terminal amina (DBA, **2b**), o derivado do Edans com terminal ácido carboxílico (EDA, **3**) e os tetrapéptidos Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)-Lys(Boc) **4** e Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu) **5**. Os restantes precursores foram obtidos comercialmente.

2.1. Síntese de precursores

2.1.1. Proteção do grupo α -amino da H-Ala-OH

A *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-alanina (Fmoc-Ala-OH, **1**) foi sintetizada de acordo com o método descrito por Carpino e Han.¹⁰⁰ Neste método, a função amina dos aminoácidos é protegida com o grupo Fmoc, utilizando como reagente de proteção o cloreto de 9-fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc-Cl) e a reação ocorre na presença de uma solução aquosa de carbonato de sódio. Por tratamento da mistura reacional com ácido foi possível isolar o aminoácido protegido na função amina com um excelente rendimento de 93% (**Esquema 6**).



Esquema 6: Síntese da Fmoc-Ala-OH **1**: i) Na₂CO₃ 5%, 1,4-dioxano, 0 °C, 4 h; ii) temperatura ambiente, 18 h.

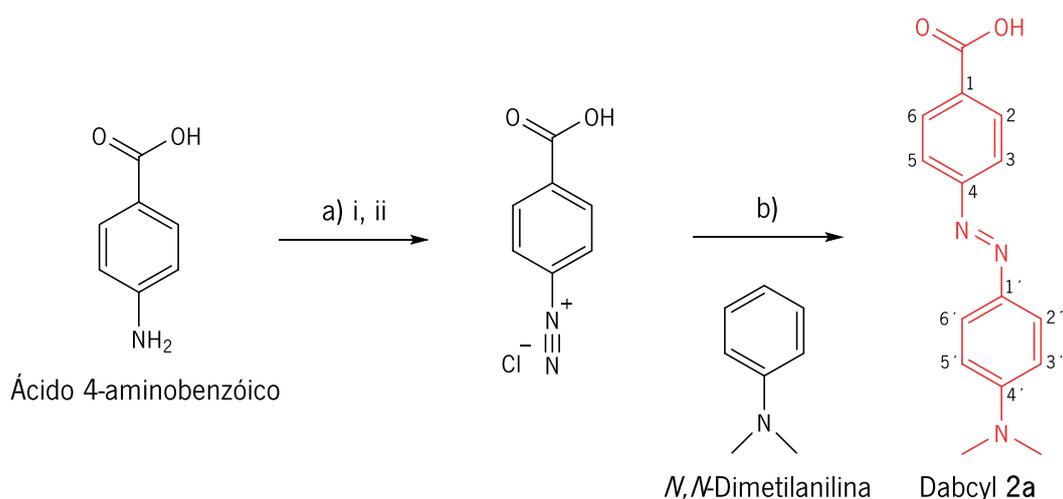
A estrutura da Fmoc-Ala-OH **1** foi confirmada por espectroscopia de RMN de ¹H (CDCl₃). No espectro obtido é possível observar a presença de um duplete a 5,30 ppm que corresponde ao NH da ligação amida entre o aminoácido alanina e o grupo Fmoc. No espectro de RMN de ¹H, verifica-se também a presença de um duplete a 1,50 ppm correspondente ao CH₃ da alanina, bem como um multiplete a 4,39-4,48 ppm que pertence aos prótons do CH₂ do grupo Fmoc e o α -CH da alanina. Estes sinais estão descritos na **Tabela 2**, assim como os restantes sinais correspondentes aos prótons do grupo Fmoc.

Tabela 2: Sinais de RMN de ¹H do composto Fmoc-Ala-OH **1** em CDCl₃.

	CH ₃	H-9	CH ₂ , α -CH	NH	H-2, H-7	H-3, H-6	H-4, H-5	H-1, H-8
δ (ppm)	1,50	4,24	4,39-4,48	5,30	7,32	7,41	7,60	7,77

2.1.2. Síntese do DabcyI

O ácido 4-[[4'-(*N,N*-dimetilamino)fenil]diazenil] benzóico (DabcyI, **2a**) foi obtido através de uma reação de diazotação seguida de um acoplamento do tipo azo (**Esquema 7**). A diazotação consistiu em transformar a amina primária do ácido 4-aminobenzóico, num catião diazônio, usando como agente nitrosante o ácido nitroso (HNO_2). O ácido nitroso foi obtido a partir de uma solução aquosa de nitrito de sódio (NaNO_2), contendo o ácido clorídrico necessário à formação do agente nitrosante. Após a diazotação ocorreu um acoplamento azo, que consiste na reação de substituição eletrofílica aromática (SE_Ar) entre o sal de diazônio preparado anteriormente e a *N,N*-dimetilaniIina.¹⁰¹ Para obter a massa do composto **2a** necessária para as seguintes sínteses, este procedimento foi realizado duas vezes, com rendimentos de 89% e 91%.



Esquema 7: Síntese do DabcyI **2a**: **a) i)** HCl 1 M, HCl 6 M, temperatura ambiente; **ii)** NaNO_2 , H_2O , 0 °C, 30 min; **b)** AcOH glacial, H_2O .

A estrutura do DabcyI **2a** foi caracterizada por espectroscopia de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$). No espectro obtido observa-se que os prótons *ortho* relativamente ao grupo ácido do composto **2a**, prótons 2 e 6, surgem na forma de um duplete com o maior desvio químico atribuído ($\delta = 8,06$ ppm) devido aos efeitos mesomérico e indutivo retirador de elétrons deste grupo. Por outro lado, os prótons 3' e 5' são os prótons aromáticos que surgem a menor desvio químico ($\delta = 6,84$ ppm) devido ao efeito dador de elétrons do grupo dimetilamino do DabcyI **2a**. Estes sinais e os restantes sinais dos prótons constituintes do composto **2a** estão descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3: Sinais de RMN de ^1H do Dabcyl **2a** em $\text{DMSO-}d_6$

	2-CH ₃	H-3', H-5'	H-3, H-5, H-2', H-6'	H-2, H-6
δ (ppm)	3,07	6,84	7,82	8,06

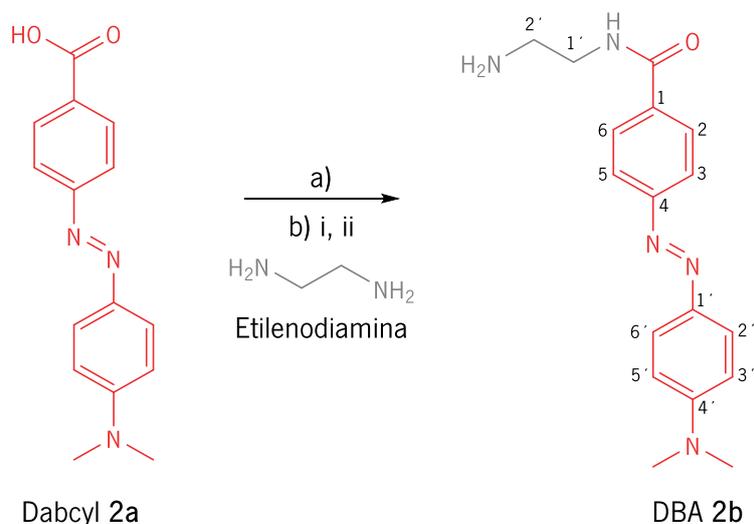
2.1.3. Adição de espaçadores no Dabcyl e no Edans

No modelo **2** de sonda apresentado, o Dabcyl **2a** que contém como grupo reativo um ácido carboxílico foi ligado à extremidade ácida do péptido Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O t Bu) **5**, através de um espaçador com dois grupos metileno e um grupo terminal amino. Inicialmente, ocorreu o acoplamento do Dabcyl **2a** com o espaçador, para posteriormente ser possível a ligação do espaçador ao péptido **5**. De uma forma semelhante, para ligar o grupo amino do Edans à extremidade amina do péptido Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O t Bu) **5** foi introduzido um espaçador entre estes dois precursores com dois grupos metileno e um grupo terminal ácido carboxílico.

No caso do Dabcyl **2a** foi utilizada a etilenodiamina, obtendo-se o derivado do Dabcyl com terminal amina (DBA, **2b**). Quanto ao Edans, foi usado um reagente com o mesmo tamanho de cadeia carbonada, o anidrido succínico. O acoplamento destes dois reagentes resultou no derivado do Edans com terminal ácido carboxílico (EDA, **3**).

2.1.3.1. Síntese do derivado do Dabcyl com terminal amina (DBA)

O derivado do Dabcyl com terminal amina (DBA, **2b**) foi obtido por uma reação típica de acoplamento entre o ácido carboxílico do Dabcyl **2a** e a etilenodiamina (**Esquema 8**). Inicialmente ocorreu ativação do ácido carboxílico utilizando como reagente de acoplamento uma carbodiimida, a DCC e como aditivo o HOBt. Ao éster ativo formado adicionou-se a amina à temperatura ambiente. No entanto, após 15 h verificou-se por TLC (cromatografia em camada fina - *Thin Layer Chromatography*) que não houve progressão da reação, submetendo-se a mistura reacional durante 2 h a 120 °C. Após este período, observou-se por TLC a formação de um produto. Este composto foi purificado em coluna de sílica, obtendo-se o produto pretendido com um rendimento de 35%.



Esquema 8: Síntese do DBA, **2b**: **a)** DCC, HOBT, DMF seca, 0 °C, 30 min; **b) i)** etilendiamina, temperatura ambiente, 15 h; **ii)** 120 °C, 2 h.

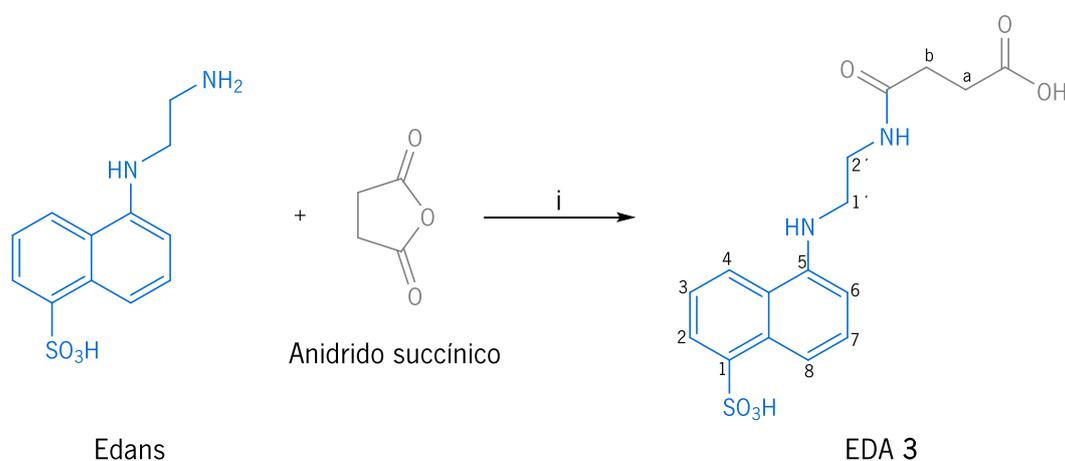
O acoplamento da etilendiamina com o DabcyI **2a** foi confirmado por espectroscopia de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$). No espectro obtido para o composto DBA **2b** são observados os prótons NH, confirmando a formação da ligação amida. É possível, também observar que os prótons 2 e 6 do composto **2b** surgem na forma de um duplete a desvio químico inferior ($\delta = 7,96$ ppm) relativamente ao desvio químico destes prótons do composto **2a** ($\delta = 8,06$ ppm). Esta diferença deve-se ao maior efeito mesomérico retirador do grupo ácido do DabcyI **2a** sobre os prótons *orto* (H-2 e H-6). Os restantes prótons do composto DBA **2b** surgem com desvios químicos muito similares aos atribuídos para a estrutura do DabcyI **2a** (Tabela 4).

Tabela 4: Sinais de RMN de ^1H do DBA **2b** em $\text{DMSO-}d_6$

	2-CH ₃	CH ₂ -1', CH ₂ -2'	H-3', H-5'	H-3, H-5, H-2', H-6'	H-2, H-6	NH ₂	NH
δ (ppm)	3,07	3,29	6,84	7,81	7,96	8,04	8,12

2.1.3.2. Síntese do derivado do Edans com terminal ácido carboxílico (EDA)

O Edans comercial, que estava na forma de cloridrato, foi neutralizado pela adição de trietilamina (Et₃N) no acoplamento com o anidrido succínico. A formação da ligação amida entre estes dois reagentes originou o derivado do Edans com terminal ácido carboxílico (EDA, **3**) (Esquema 9). Este procedimento foi realizado três vezes, a fim de obter a massa necessária do composto **3** para os acoplamentos com os péptidos. A massa final obtida apresentava a contribuição do sal formado (NEt₃.HCl), que não foi possível separar, e o rendimento destas reações foi quantitativo.



Esquema 9: Síntese do EDA, **3**: i) Et₃N, acetona, temperatura ambiente, 19 h.

O acoplamento do Edans com o anidrido succínico foi confirmado por espectroscopia de RMN de ¹H (DMSO-*d*₆). No espectro obtido para o composto EDA **3** é possível observar a presença de dois tripletos a 8,23 e 8,79 ppm, que correspondem aos prótons 5-NH e 2'-NH da ligação amida entre o Edans e o anidrido succínico. É também possível observar a presença dos prótons CH₂-a e CH₂-b a 2,39 e 2,32 ppm, respectivamente. O duplo duplete do próton 2, que se encontra na posição *ortho* relativamente ao grupo SO₃H é o que apresenta maior desvio químico ($\delta = 8,10$ ppm) quando comparado com os outros prótons aromáticos, devido ao efeito mesomérico e indutivo retirador de elétrons deste grupo. Estes sinais, assim como os restantes sinais de próton atribuídos para este composto estão descritos na **Tabela 5**.

Tabela 5: Sinais de RMN de ¹H do EDA **3** em DMSO-*d*₆.

	CH ₂ -b	CH ₂ -a	CH ₂ -1', CH ₂ -2'	H-6	H-4	H-3, H-7	H-8	H-2	5-NH	2'-NH
δ (ppm)	2,32	2,39	3,02	6,52	7,04	7,22-7,30	7,28	8,10	8,23	8,79

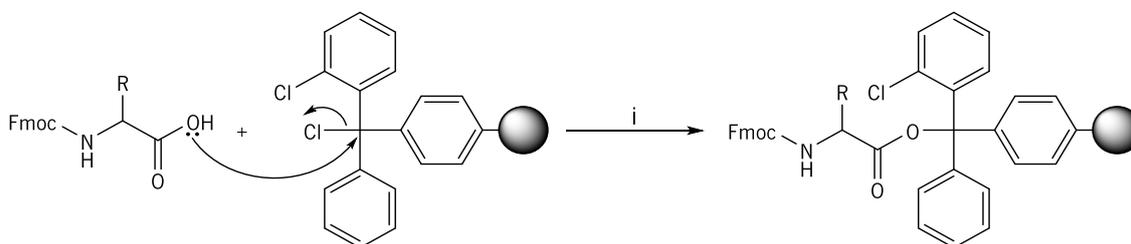
2.1.4. Síntese dos substratos peptídicos Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)-Lys(Boc) e Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)

Os péptidos pretendidos foram obtidos através da síntese sequencial em fase sólida assistida por micro-ondas, utilizando um sintetizador peptídico CEM-Discover SPS e aplicando a estratégia do grupo Fmoc. Como grupos protetores das cadeias laterais da Lys e do Asp foram usados os grupos Boc e *t*Bu, respetivamente. O grupo Boc é completamente resistente a bases e à hidrogenólise catalítica, a remoção deste grupo é normalmente realizada por dissolução em ácido trifluoroacético puro ou diluído em diclorometano (DCM), geralmente 25-50 % de TFA em DCM. A estabilidade e labilidade do grupo *t*Bu é semelhante à do grupo Boc, no entanto, a clivagem do grupo *t*Bu requer maiores concentrações de TFA (90% de TFA em DCM).⁴⁸

Tendo em conta que se pretendia que após a clivagem dos péptidos do suporte sólido se mantivessem os grupos protetores das cadeias laterais, utilizou-se uma resina em que as condições de clivagem não afetassem a ligação destes grupos. Para tal, os péptidos Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)-Lys(Boc) **4** e Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu) **5** foram sintetizados recorrendo a uma resina de cloreto de 2-clorotritilo, com um grau de funcionalização de 1,3 mmol/g.

A fim de obter a quantidade necessária de péptidos para os acoplamentos com o par FRET foram realizadas três sínteses da sequência Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)-Lys(Boc) **4** e três sínteses da sequência Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu) **5**.

Na SPPS, o primeiro passo consistiu na ligação do Fmoc-aminoácido à resina do através de uma reação de substituição nucleofílica utilizando um excesso de Fmoc-aminoácido e uma base, a *N,N*-di-isopropiletilamina (DIPEA) (**Esquema 10**).

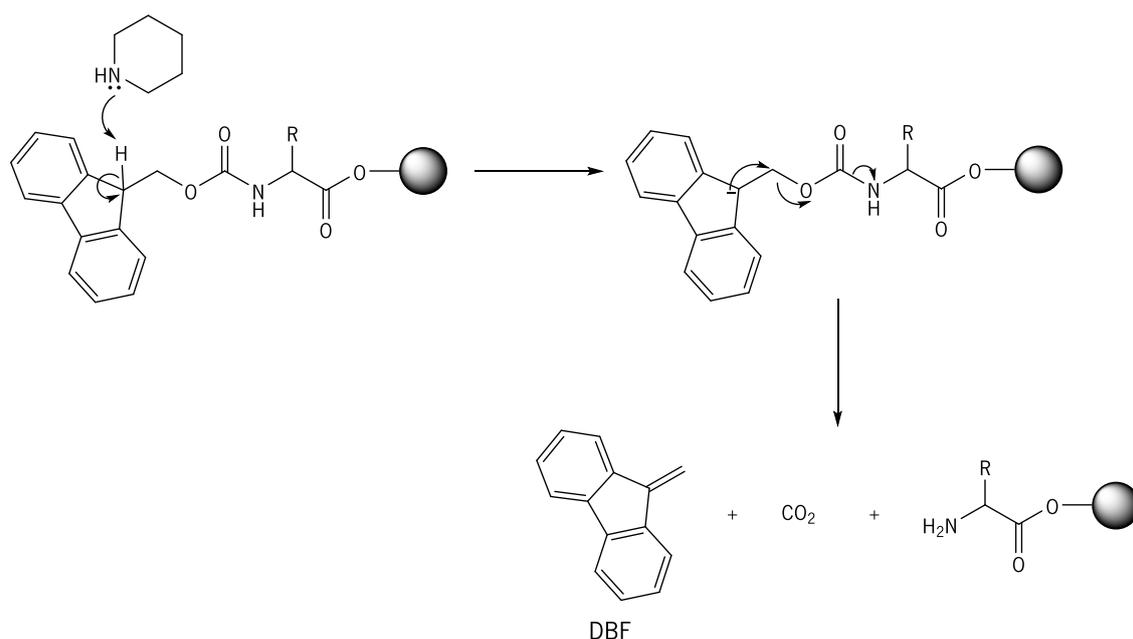


Esquema 10: Reação do primeiro Fmoc-aminoácido com a resina de cloreto de 2-clorotritilo: **i)** DIPEA, DCM seco, temperatura ambiente, 5 h.

Após a ligação do primeiro aminoácido à resina, fez-se o *capping* desta para converter os grupos clorotritilo que não reagiram em grupos metoxitritilo, impedindo que os grupos clorotritilo disponíveis reagissem com outros Fmoc-aminoácidos dando origem a péptidos com seqüências indesejadas. Para tal, a resina foi lavada com uma mistura diclorometano/metanol/*N,N*-diisopropiletilamina (DCM/MeOH/DIPEA) (25,5:3:1,5) mL.

Depois do *capping*, lavou-se a resina com os solventes DCM e DMF, que provocam dilatação do suporte sólido e com os solventes MeOH e éter etílico que provocam a contração da resina.

A quantificação do Fmoc-aminoácido ligado à resina (*loading*) foi efetuada por espectroscopia de UV/Vis utilizando a quantificação do dibenzofulveno (DBF) libertado na clivagem do grupo Fmoc em meio básico (solução 20% de piperidina em DMF) (Esquema 11).¹⁰²

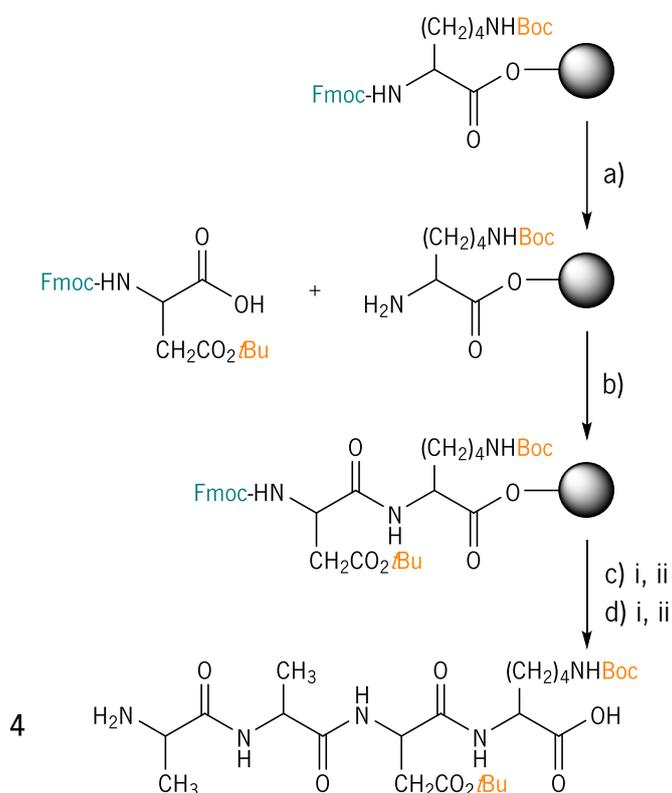


Esquema 11: Clivagem do grupo Fmoc com piperidina e formação de dibenzofulveno (DBF), adaptado da referência 102.

Depois da ligação do primeiro aminoácido e respetiva desproteção, seguiram-se acoplamentos de novos Fmoc-aminoácidos e ciclos de remoção do grupo Fmoc com soluções de 20% de piperidina em DMF utilizando os programas pré-definidos no aparelho CEM-Discover SPS. Após as desproteções do grupo Fmoc seguiram-se as lavagens da resina com DMF (3 vezes) e seguidamente com MeOH (3 vezes), em 4 ciclos de lavagem e depois dos acoplamentos de novos Fmoc-aminoácidos, realizaram-se as lavagens com DMF (3 vezes) e posteriormente com MeOH (3 vezes), em 3 ciclos de lavagem.

Em todos os acoplamentos realizados em SPPS utilizou-se como reagente de acoplamento uma carbodiimida, a DIC, em que o derivado de ureia formado é solúvel em solventes orgânicos, o que facilita a sua remoção por filtração e como aditivo de acoplamento utilizou-se a Oxyma.

Na síntese do péptido **4**, após a ligação da Fmoc-Lys(Boc)-OH à resina foi determinado o *loading*, descrito na **Tabela 6** e acoplaram-se sequencialmente os aminoácidos Fmoc-Asp(O*t*Bu)-OH, Fmoc-Ala-OH e Fmoc-Ala-OH (**Esquema 12**).



Esquema 12: Síntese em fase sólida assistida por micro-ondas do tetrapéptido Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)-Lys(Boc) **4**: **a)** 20% de piperidina em DMF; **b)** Fmoc-Asp(O*t*Bu)-OH, Oxyma, DIC, DMF; **c) i)** 20% de piperidina em DMF, **ii)** Fmoc-Ala-OH, Oxyma, DIC, DMF, repetição de **c) i** e **ii**; **d) i)** 20% de piperidina em DMF, **ii)** AcOH glacial/TFE/DCM (1:2:7).

O acoplamento do último aminoácido do péptido e a respetiva desproteção do grupo Fmoc foi seguido da remoção do péptido da resina por tratamento da mesma com uma mistura de AcOH glacial/TFE/DCM (1:2:7), obtendo-se os péptidos pretendidos (**Figura 24**) com os rendimentos descritos na **Tabela 6**.

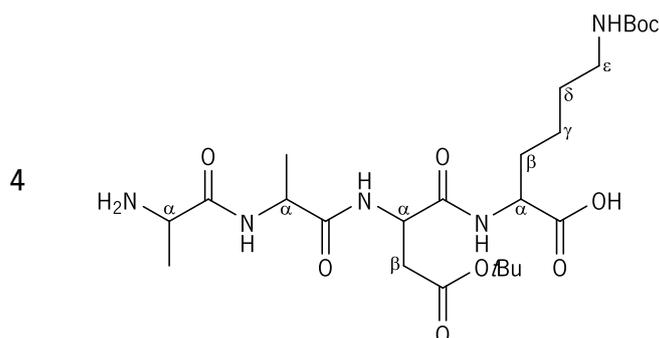


Figura 24: Estrutura do tetrapéptido sintetizado Ala-Ala-Asp(OtBu)-Lys(Boc) **4**.

Tabela 6: *Loading* da resina e rendimentos obtidos na síntese do péptido Ala-Ala-Asp(OtBu)-Lys(Boc) **4**.

Péptido	<i>Loading</i> (mmol/g)	Rendimento (%)
Ala-Ala-Asp(OtBu)-Lys(Boc) 4	0,4615	36
	0,5675	37
	0,3852	56

O péptido **4** obtido foi caracterizado por espectroscopia RMN de ^1H (DMSO- d_6) e de ^{13}C e com as técnicas DEPT-135 e a correlação bidimensional HMBC e HMQC (**Figura 25**) foi possível fazer a atribuição inequívoca dos sinais de próton e carbono dos aminoácidos, assim como dos grupos protetores das cadeias laterais, Boc e tBu (**Tabela 7**). Desta forma, foi possível confirmar o acoplamento eficiente entre os aminoácidos e verificar que as condições de clivagem do péptido da resina não afetaram os grupos Boc e tBu, tal como esperado.

Tabela 7: Sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C do tetrapéptido Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)-Lys(Boc) **4** em DMSO-*d*₆.

	δ_{H} (ppm)	Tipo de sinal	Nº de prótons	Atribuição de H	δ_{C} (ppm)	Atribuição de C	
2xAla	1,16-1,38	m	6	2xCH ₃	18,36 18,50	2xCH ₃	
	3,82-3,90	m	1	2x α -CH	48,55	2x α -CH	
	4,28	s	1		48,84		
	8,35	d	1	NH Ala 2	171,45	C=O Ala 1	
	ou 8,43	s			171,92	C=O Ala 2	
Asp(O<i>t</i>Bu)	1,16-1,38	m	9	3xCH ₃ O <i>t</i> Bu	27,68 ou 28,29	3xCH ₃ O <i>t</i> Bu	
	-	-	-	-	77,34 ou 80,15	<u>C</u> (CH ₃) O <i>t</i> Bu	
	-	-	-	-	172,14	C=O O <i>t</i> Bu	
	2,39-2,48	m	1	β -CH ₂	37,38	β -CH ₂	
	2,69	dd	1				
	4,51-4,56	m	1	α -CH	49,65	α -CH	
	8,35	d	1	NH	169,44	C=O	
	ou 8,43	s					
	Lys(Boc)	1,16-1,38	m	9	3xCH ₃ Boc	27,68 ou 28,29	3xCH ₃ Boc
		-	-	-	-	77,34 ou 80,15	<u>C</u> (CH ₃) Boc
6,65		s	1	NH Boc	155,55	C=O Boc	
2,81-2,88		m	2	ϵ -CH ₂	39,50	ϵ -CH ₂	
1,16-1,38		m	2	δ -CH ₂	29,40	δ -CH ₂	
1,16-1,38		m	2	γ -CH ₂	22,26	γ -CH ₂	
1,45-1,58		m	2	β -CH ₂	31,54	β -CH ₂	
3,82-3,90		m	1	α -CH	53,33	α -CH	
7,50		d	1	NH	173,30	C=O	

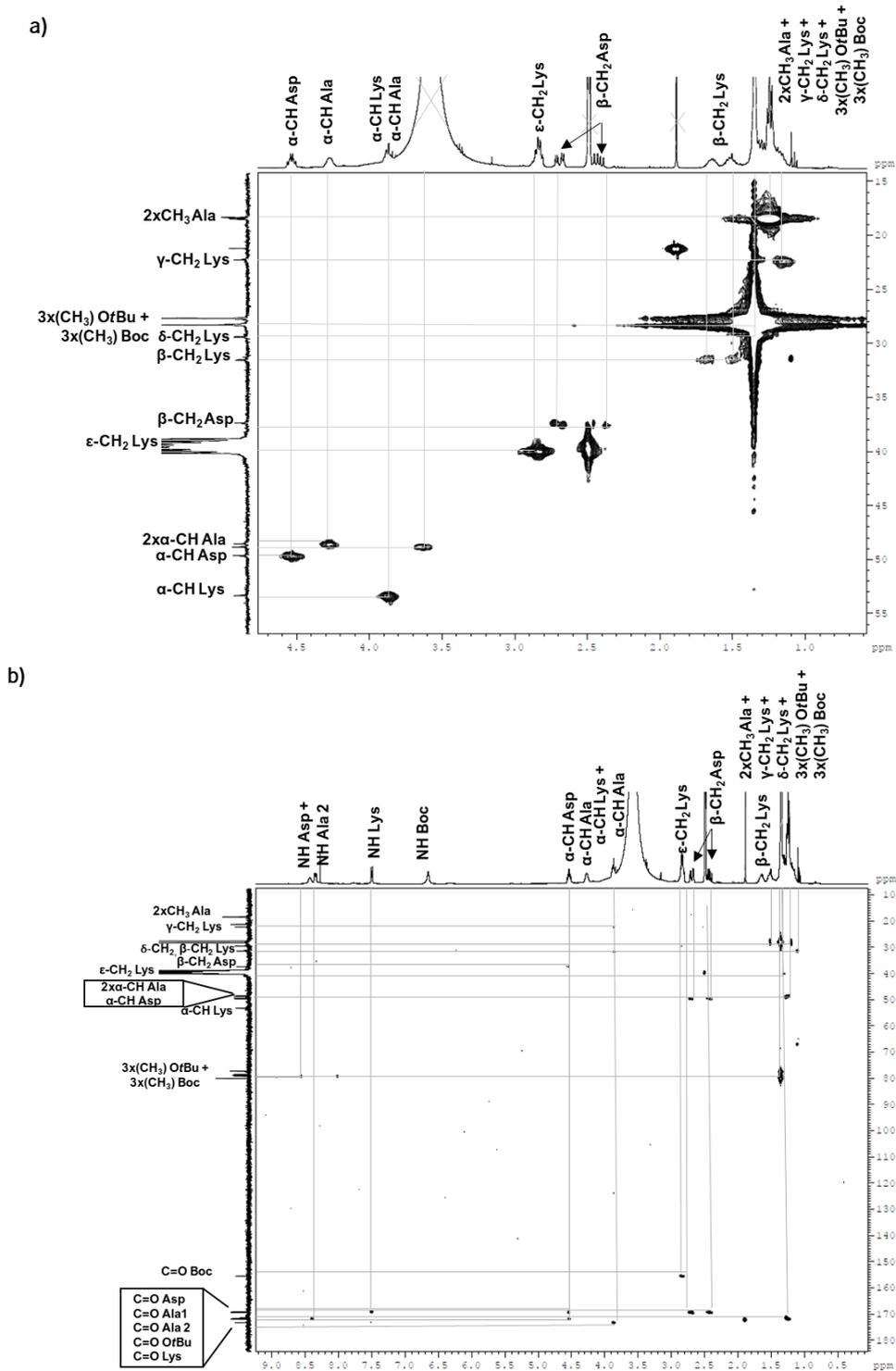
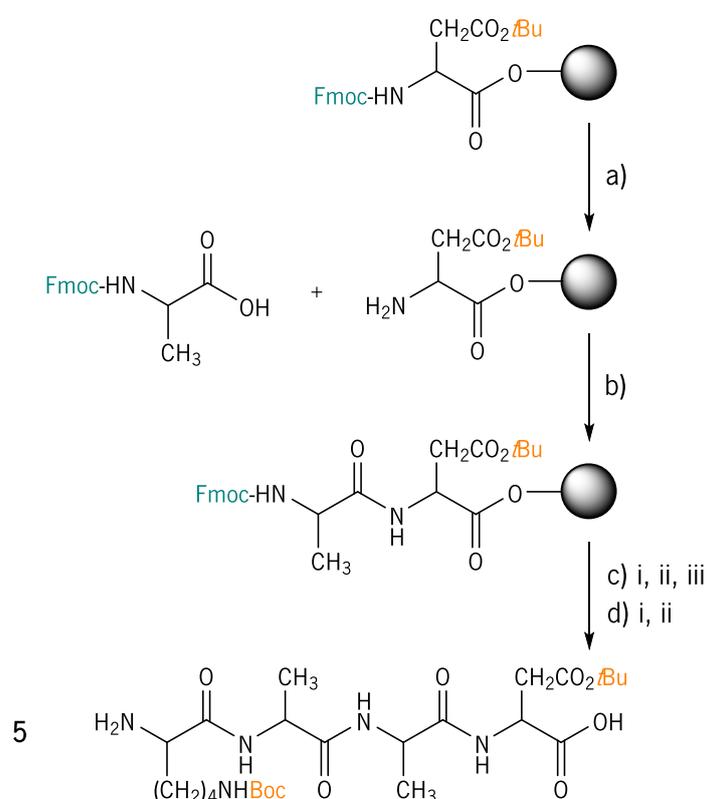


Figura 25: Espectros de RMN para o tetrapéptido Ala-Ala-Asp(OtBu)-Lys(Boc) 4: a) HMQC e b) HMBC em DMSO- d_6 .

Na síntese do péptido Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O β Bu) **5**, após a ligação do Fmoc-Asp(O β Bu)-OH acoplaram-se sequencialmente os aminoácidos Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH e Fmoc-Lys(Boc)-OH (**Esquema 13**). O acoplamento do último aminoácido do péptido e a respetiva desproteção do grupo Fmoc foi seguido da remoção do péptido da resina por tratamento da mesma com uma mistura de AcOH glacial/TFE/DCM (1:2:7), obtendo-se o péptido pretendido (**Figura 26**) com os rendimentos de 20, 21 e 26%, em três sínteses (**Tabela 8**).



Esquema 13: Síntese em fase sólida assistida por micro-ondas do tetrapéptido Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O β Bu) **5**: **a)** 20% de piperidina em DMF; **b)** Fmoc-Ala-OH, Oxyma, DIC, DMF; **c) i)** 20% de piperidina em DMF, **ii)** Fmoc-Ala-OH, Oxyma, DIC, DMF, repetição de **c) i, iii)** Fmoc-Lys(Boc), Oxyma, DIC, DMF; **d) i)** 20% de piperidina em DMF, **ii)** AcOH glacial/TFE/DCM (1:2:7).

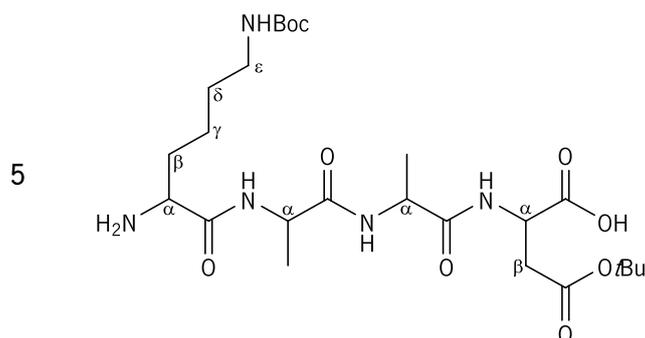


Figura 26: Estrutura do tetrapéptido sintetizado Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(OtBu) 5.

Tabela 8: *Loading* da resina e rendimentos obtidos na síntese do péptido Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(OtBu) 5.

Péptido	<i>Loading</i> (mmol/g)	Rendimento (%)
	0,5152	20
Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(OtBu) 5	0,6451	21
	0,7225	26

O péptido 5 foi caracterizado por espectroscopia RMN de ^1H (DMSO-*d*₆). Nos espectros obtidos observam-se os sinais de próton característicos dos aminoácidos protegidos. No entanto, não foi possível fazer uma caracterização de RMN de ^{13}C e de correlação bidimensional não permitindo desta forma, fazer a atribuição inequívoca dos sinais de próton e carbono do péptido na forma protegida, devido a problemas de solubilidade na maior parte dos solventes testados. No entanto, foi possível caracterizar o péptido 5 na forma desprotegida por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 9) e os espectros apresentam-se na Figura 27.

Os rendimentos obtidos na síntese dos péptidos 4 e 5 poderiam ter sido melhorados utilizando outra resina, mas na escolha desta estiveram envolvidos alguns fatores: os aminoácidos disponíveis estavam protegidos com o grupo Fmoc, por isso era necessária uma resina adequada para Fmoc-aminoácidos e as condições de clivagem do péptido do suporte sólido não poderiam afetar a ligação do grupo Boc e tBu ligados à Lys e ao Asp respetivamente.

Por outro lado, poder-se-ia ter usado outro reagente de acoplamento ou outro aditivo, no entanto, de acordo com Collins e os seus colaboradores a DIC/Oxyma é uma combinação ideal para a síntese de péptidos em SPPS assistida por micro-ondas.¹⁰³

Tabela 9: Sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C do tetrapéptido Lys-Ala-Ala-Asp em $\text{DMSO-}d_6$.

	δ_{H} (ppm)	Tipo de sinal	Nº de prótons	Atribuição de H	δ_{C} (ppm)	Atribuição de C
2xAla	1,20	d	3	CH_3	18,09	2x CH_3
	1,24	d	3	CH_3	18,20	
	4,36	q	1	$\alpha\text{-CH Ala 1}$	48,24	$\alpha\text{-CH Ala 1}$
	4,28	qui	1	$\alpha\text{-CH Ala 2}$	47,93	$\alpha\text{-CH Ala 2}$
	8,61	d	1	NH Ala 1	171,40	C=O Ala 1
	8,08	d	1	NH Ala 2	171,70	C=O Ala 2
	ou 8,12	d				
Asp	-	-	-	-	172,25	C=O lateral
	2,56-2,69	m	2	$\beta\text{-CH}_2$	36,00	$\beta\text{-CH}_2$
	4,51	q	1	$\alpha\text{-CH}$	48,49	$\alpha\text{-CH}$
	8,08	d	1	NH	171,89	C=O
	ou 8,12	d				
Lys	7,81	s	3	NH_3^+ lateral	-	-
	2,74	s	2	$\epsilon\text{-CH}_2$	38,51	$\epsilon\text{-CH}_2$
	1,49-1,56	m	2	$\delta\text{-CH}_2$	26,46	$\delta\text{-CH}_2$
	1,32-138	m	2	$\gamma\text{-CH}_2$	21,00	$\gamma\text{-CH}_2$
	1,66-1,71	m	2	$\beta\text{-CH}_2$	30,45	$\beta\text{-CH}_2$
	3,77	d	1	$\alpha\text{-CH}$	51,84	$\alpha\text{-CH}$
	8,07-8,20	s largo	3	NH_3^+	168,10	C=O

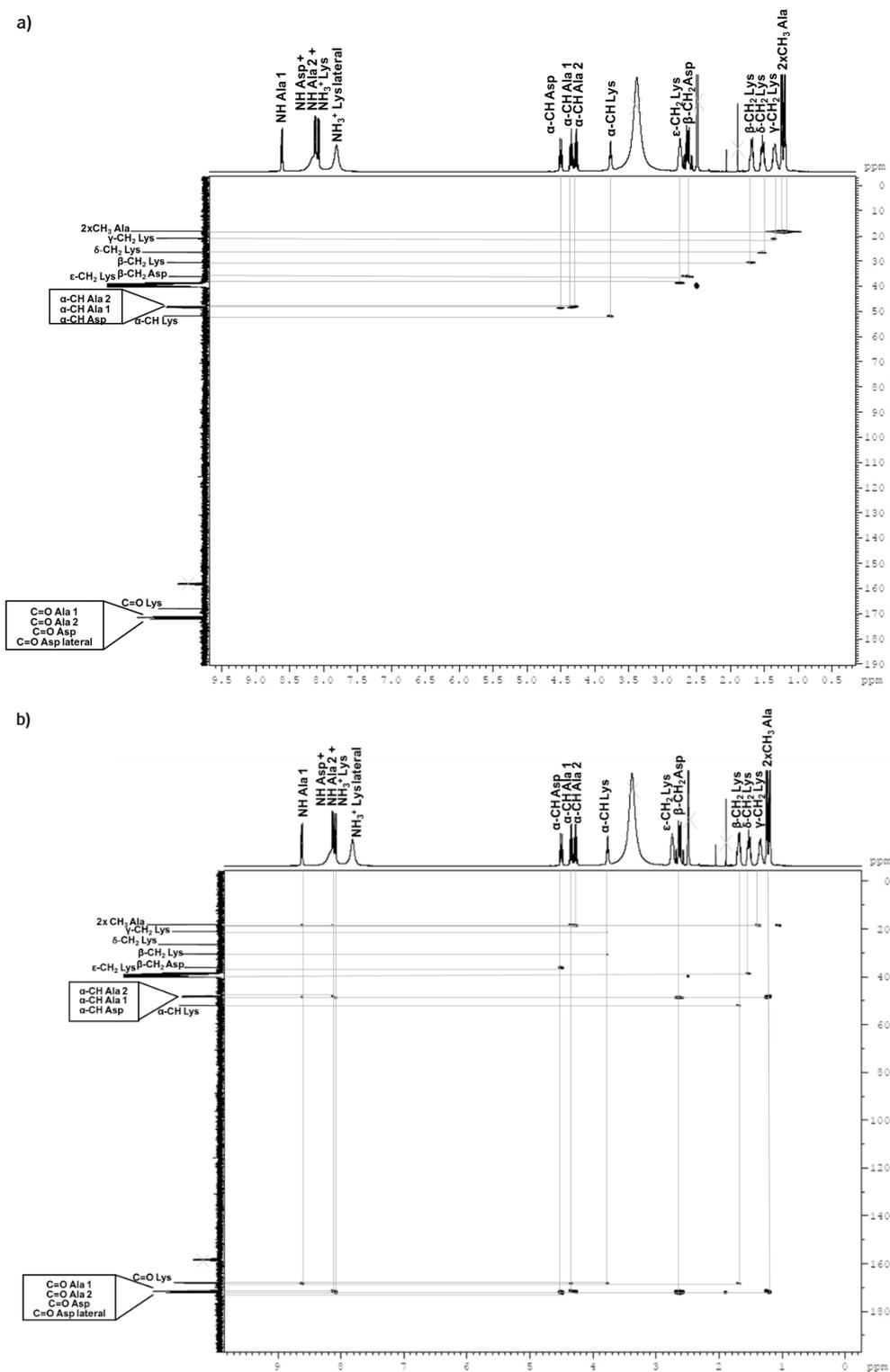


Figura 27: Espectros de RMN para o tetrapéptido Lys-Ala-Ala-Asp: a) HMQC e b) HMBC em DMSO-*d*.

2.2. Síntese e caracterização de sondas fluorescentes com o par FRET Edans/Dabcyl

Os tetrapéptidos **4** e **5** foram utilizados para testar em solução as condições de acoplamento com o par FRET. No entanto, dada a dificuldade presente nestes acoplamentos optou-se por sintetizar em fase sólida assistida por micro-ondas os péptidos **4** e **5** com o respetivo dador/aceitador ligado no terminal amino do péptido e após a clivagem destes compostos da resina, realizar o acoplamento em solução do dador/aceitador ao terminal ácido do péptido, através das condições ideais testadas anteriormente.

2.2.1. Síntese e caracterização da sonda Dabcyl-Ala-Ala-Asp(O β Bu)-Lys(Boc)-Edans

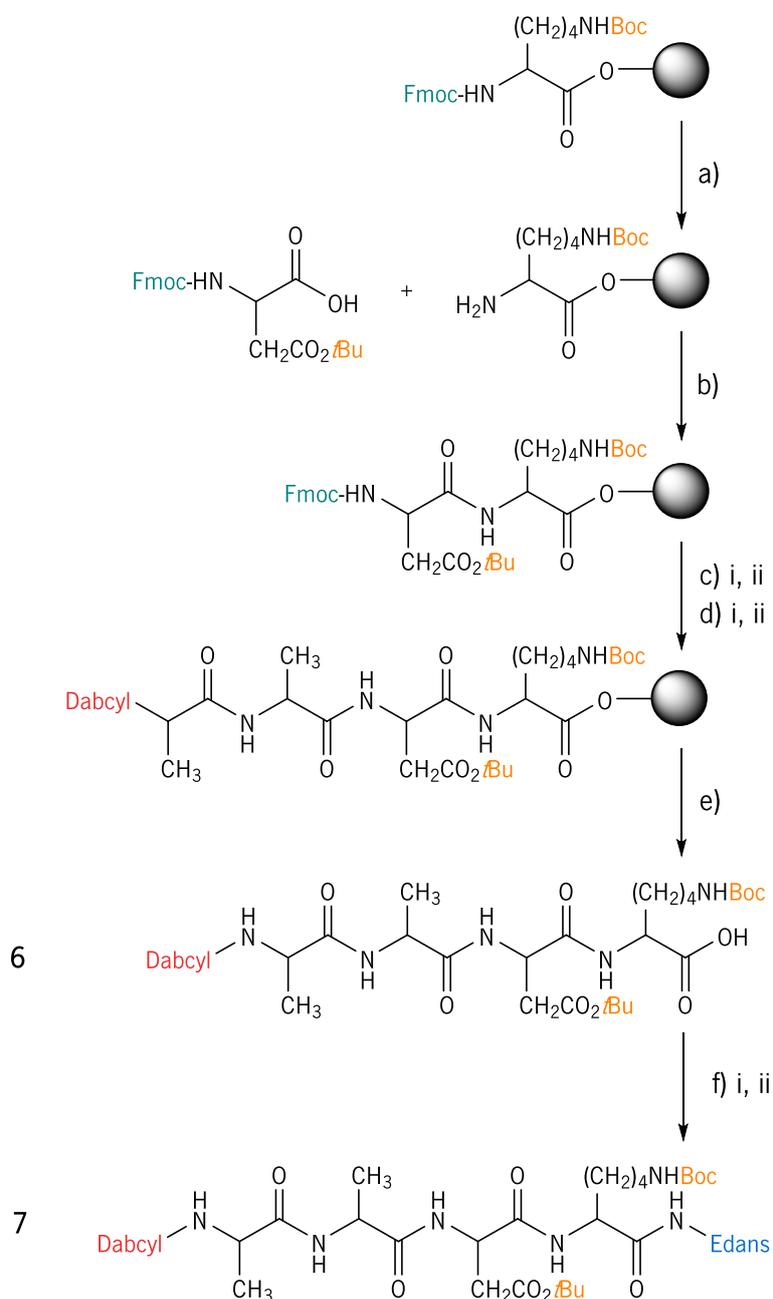
A sonda fluorescente de acordo com o **modelo 1 (Figura 23)** foi obtida por síntese sequencial em fase sólida assistida por micro-ondas, originando o composto Dabcyl-Ala-Ala-Asp(O β Bu)-Lys(Boc) **6** e posteriormente, por síntese em solução obteve-se a sonda Dabcyl-Ala-Ala-Asp(O β Bu)-Lys(Boc)-Edans **7 (Esquema 14)**.

Na SPPS seguiu-se o mesmo método utilizado para obter os péptidos **4** e **5**, utilizou-se uma resina de cloreto de 2-clorotritilo com um grau de funcionalização de 1,3 mmol/g e aplicou-se uma estratégia Fmoc. Após a ligação da Fmoc-Lys(Boc)-OH à resina, obteve-se um *loading* de 0,4872 mmol/g e seguiram-se ciclos de remoção do grupo Fmoc com soluções de 20% de piperidina em DMF e o acoplamento sequencial dos aminoácidos Fmoc-Asp(O β Bu)-OH, Fmoc-Ala-OH e Fmoc-Ala-OH utilizando DIC/Oxyma.

Após o acoplamento do último aminoácido do péptido e a respetiva desproteção do grupo Fmoc foi acoplado o Dabcyl **2a** ao grupo amino livre, utilizando DIC/Oxyma. Seguidamente ocorreu a remoção do composto da resina por tratamento da mesma com uma mistura de AcOH glacial/TFE/DCM (1:2:7) resultando no composto Dabcyl-Ala-Ala-Asp(O β Bu)-Lys(Boc) **6**.

Este composto foi caracterizado por espectroscopia RMN de ^1H e ^{13}C e com as técnicas DEPT-135 e correlação bidimensional HMBC e HMQC foi possível fazer atribuição dos sinais de próton e carbono dos aminoácidos protegidos e do Dabcyl.

Na síntese em solução aplicou-se o método descrito por Kraft e os seus colaboradores.⁸⁰ Neste método, o acoplamento do grupo amino do Edans ao terminal ácido do péptido foi realizado usando como reagente de acoplamento a carbodiimida EDC.HCl na presença do aditivo *N*-hidroxisuccinimida (HOSu), obtendo-se o composto Dabcyl-Ala-Ala-Asp(O β Bu)-Lys(Boc)-Edans **7**.



Esquema 14: Síntese do composto DabcyL-Ala-Ala-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Edans **7**: Síntese em fase sólida assistida por micro-ondas:

a) 20% de piperidina em DMF; **b)** Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Oxyma, DIC, DMF; **c) i)** 20% de piperidina em DMF, **ii)** Fmoc-Ala-OH, Oxyma, DIC, DMF, repetição de **c) i** e **ii**; **d) i)** 20% de piperidina em DMF, **ii)** DabcyL **2a**, Oxyma, DIC, DMF; **e)** AcOH glacial/TFE/DCM (1:2:7); **Síntese em solução:** **f) i)** HOSu, EDC.HCl, Et₃N, DMF seca, 0°C, 30 min; **ii)** Edans, Et₃N, temperatura ambiente, 5 h.

O composto **7** foi purificado por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência - *High Performance Liquid Chromatography*) semi-preparativa. Nesta purificação utilizou-se como eluente uma mistura de ACN/H₂O (3:1) com um fluxo de 1,0 mL/min e o cromatograma foi traçado por detecção de absorção UV/Vis no comprimento de onda 432 nm. Este composto foi de difícil purificação tendo-se isolado várias frações com tempos de retenção diferentes. Foram realizadas 10 injeções e procedeu-se à filtração da fração com um tempo de retenção médio de 16,33 min que apresentava um sólido suspenso.

O sólido obtido desta filtração revelou por espectroscopia de RMN de ¹H ser o composto **7** (**Figura 28**) que foi isolado com uma massa de 5 mg e conseqüentemente, com um rendimento de 4,9% após a purificação por HPLC. Após a liofilização, as frações foram caracterizadas por espectroscopia de RMN de ¹H. Dada a dificuldade tanto na síntese como na purificação deste composto, justifica-se o custo elevado dos substratos para a GzmB inicialmente apresentados na introdução desta dissertação.^{104,105,106}

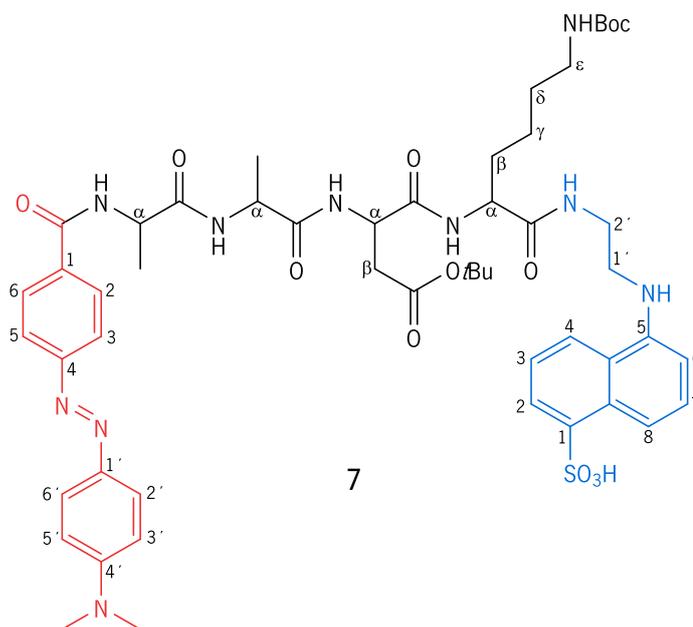


Figura 28: Estrutura do composto Dab-cyl-Ala-Ala-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Edans **7**.

A estrutura do composto **7** purificado por HPLC foi caracterizada por espectroscopia RMN de ¹H e ¹³C e com as técnicas DEPT-135 e correlação bidimensional HMBC e HMQC foi possível fazer atribuição inequívoca dos sinais de próton (**Tabela 10**).

Tabela 10: Sinais de RMN de ^1H do composto Dabcyl-Ala-Ala-Asp(O t Bu)-Lys(Boc)-Edans **7** em DMSO- d_6 .

	δ_{H} (ppm)	Tipo de sinal	Nº de prótons	Atribuição de H
Dabcyl	3,07	s	6	2xCH ₃
	6,84	d	2	H-3', H-5'
	7,61-7,83	m	4	H-3, H-5, H-2', H-6'
2xAla	8,02	dd	2	H-2, H-6
	1,22-1,35	m	6	2xCH ₃ Ala
	4,26	t	1	α -CH Ala2
	4,46-4,56	m	1	α -CH Ala1
	8,10-8,14 ou	m	1	NH Ala 2
	8,17	d		
	8,59	d	1	NH Ala 1
Asp(O t Bu)	1,22-1,35	m	9	3xCH ₃ O t Bu
	2,44-2,54	m	2	β -CH ₂
	4,46-4,56	m	1	α -CH
	8,10-8,14 ou	m	1	NH
	8,17	d		
Lys(Boc)	1,22-1,35	m	9	3xCH ₃ Boc
	6,63-6,68	t	1	NH Boc
	2,58-2,71	m	2	ϵ -CH ₂
	1,22-1,35	m	2	δ -CH ₂
	1,22-1,35	m	2	γ -CH ₂
	1,47-1,65	m	1	β -CH ₂
	1,66-1,68	m	1	
	4,15-4,19	m	1	α -CH
7,57	d	1	NH	
Edans	3,33-3,43	m	4	CH ₂ -1' -CH ₂ -2'
	7,17	d	1	H-4
	7,27-7,34	m	2	H-3, H-7
	7,61-7,83	m	2	H-6, H-8
	8,10-8,14	m	1	H-2
	6,63-6,68	t	1	2'-NH
	8,24	s	1	5-NH

2.2.2. Síntese e caracterização da sonda EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O t Bu)-DBA

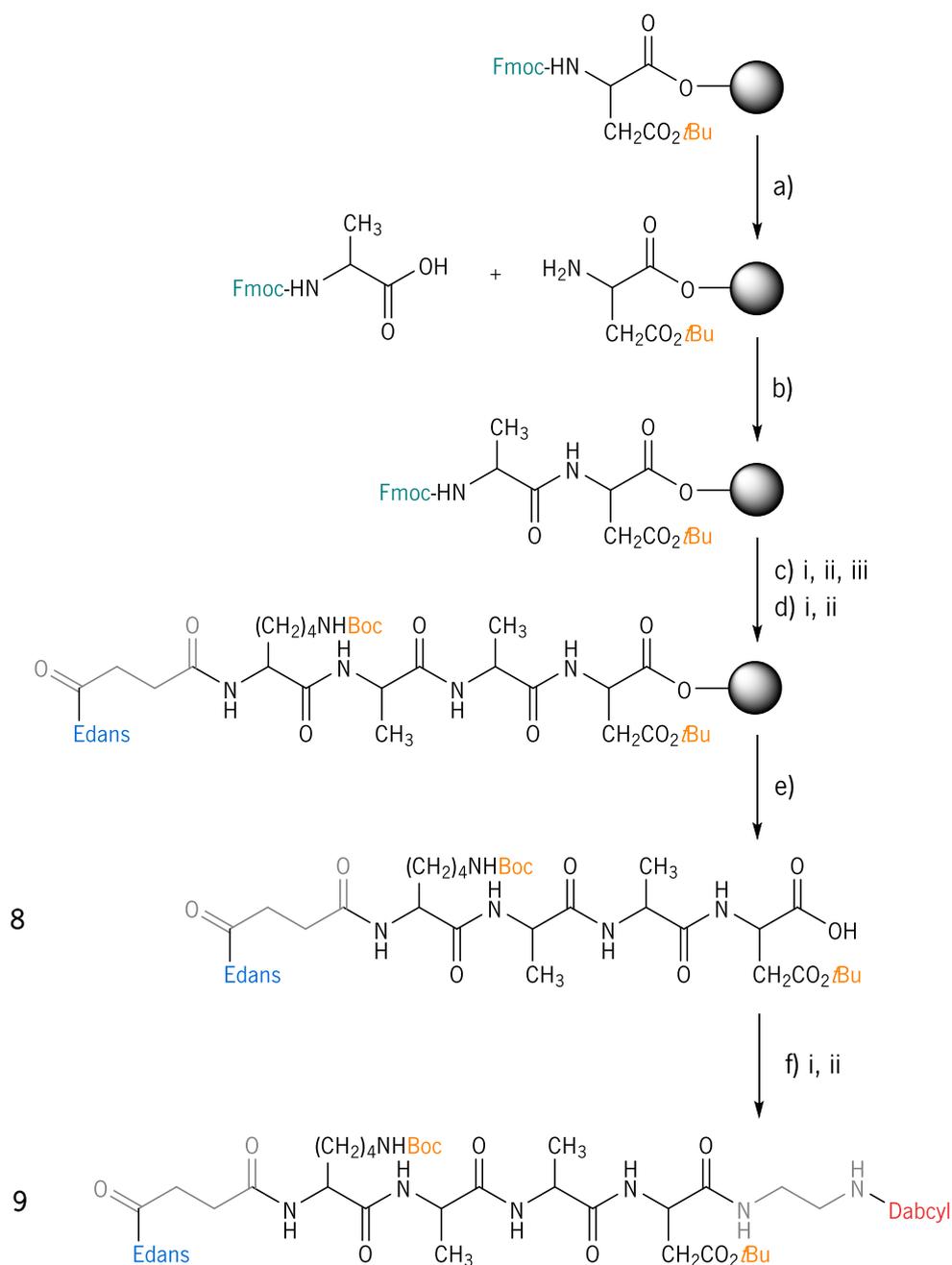
A sonda fluorescente de acordo com **modelo 2 (Figura 23)** foi obtida por síntese sequencial em fase sólida assistida por micro-ondas, originando o composto EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O t Bu) **8** e posteriormente, por síntese em solução tentou-se obter a sonda EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O t Bu)-DBA **9 (Esquema 15)**.

Na SPPS seguiu-se o mesmo método utilizado anteriormente, utilizou-se uma resina de cloreto 2-clorotritilo com um grau de funcionalização de 1,3 mmol/g e aplicou-se uma estratégia Fmoc. Após a ligação da Fmoc-Asp(O t Bu)-OH à resina, obteve-se um *loading* de 0,5207 mmol/g e seguiram-se ciclos de remoção do grupo Fmoc com soluções de 20% de piperidina em DMF e o acoplamento sequencial dos aminoácidos Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH e Fmoc-Lys(Boc)-OH utilizando DIC/Oxyma.

Após o acoplamento do último aminoácido do péptido e a respetiva desproteção do grupo Fmoc foi acoplado o EDA **3** ao grupo amino livre utilizando DIC/Oxyma. Seguidamente ocorreu a remoção do composto da resina por tratamento da mesma com uma mistura de AcOH glacial/TFE/DCM (1:2:7) resultando no composto EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O t Bu) **8**.

Este composto foi caracterizado por espectroscopia de RMN de ^1H (DMF-*d*₇). No espectro obtido, observou-se a presença dos principais sinais do composto **8** e segundo a integração, os prótons correspondentes ao EDA **3** apresentam semelhante valor quando comparados com os prótons correspondentes ao péptido, confirmando a formação da ligação amida entre estes dois reagentes. No entanto, não se realizou uma análise de espectroscopia de RMN de ^{13}C , uma vez que a quantidade obtida de composto era necessária para o passo seguinte de síntese, optando-se por fazer uma caracterização de RMN de ^{13}C e de correlação bidimensional apenas do produto da síntese seguinte.

Na síntese em solução aplicou-se o mesmo método descrito anteriormente, em que a ligação do grupo amino do DBA **2b** ao terminal ácido do péptido foi realizada usando como reagente de acoplamento a EDC.HCl na presença do aditivo HOSu.



Esquema 15: Síntese do composto EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(OtBu)-DBA **9**: **Síntese em fase sólida assistida por micro-ondas:** a) 20% piperidina em DMF; b) Fmoc-Ala-OH, Oxyma, DIC, DMF; c) i) 20% piperidina em DMF, ii) Fmoc-Ala-OH, Oxyma, DIC, DMF, repetição de c) i, iii) Fmoc-Lys(Boc)-OH, Oxyma, DIC, DMF; d) i) 20% piperidina em DMF, ii) EDA **3**, Oxyma, DIC, DMF; e) AcOH glacial/TFE/DCM (1:2:7); **Síntese em solução:** f) i) HOSu, EDC.HCl, Et₃N, DMF seca, 0°C, 30 min; ii) DBA **2b**, temperatura ambiente, 7 h.

O composto **9** foi purificado por HPLC semi-preparativo, utilizando como eluente uma mistura de ACN/H₂O (3:1) com um fluxo de 1,0 mL/min e o cromatograma foi traçado por detecção de absorção UV/Vis no comprimento de onda 432 nm. Foram realizadas 10 injeções, tendo-se isolado várias frações com tempos de retenção diferentes.

Após a liofilização, as frações foram caracterizadas por espectroscopia de RMN de ¹H e verificou-se que a fração com tempo de retenção médio de 16,18 min correspondia ao composto **9** (Figura 29). No entanto, pelo espectro obtido e por TLC verificou-se que esta amostra também apresentava os componentes das frações com tempo de retenção próximo. Para tal, purificou-se a amostra recorrendo a uma cromatografia em coluna de sílica e obteve-se o composto pretendido que foi isolado com uma massa de 5,4 mg. Ainda assim, não foi possível obter um composto completamente puro.

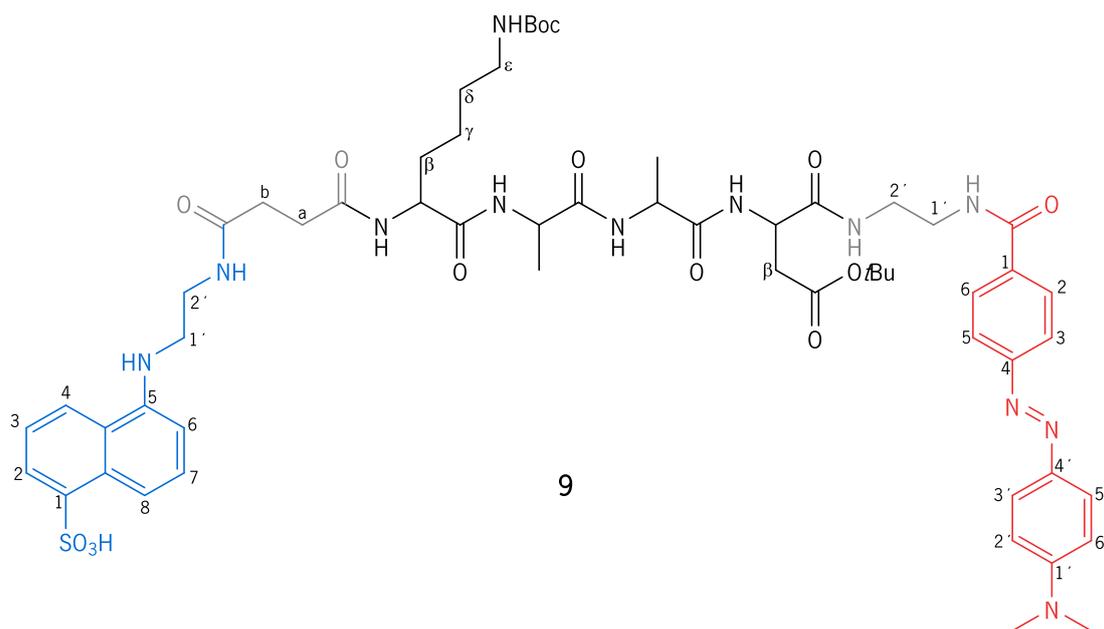


Figura 29: Estrutura do composto EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(OtBu)-DBA **9**.

A estrutura do composto **9** purificado por HPLC e por cromatografia em coluna foi caracterizado por espectroscopia RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$). Nos espectros obtidos observaram-se os sinais de próton característicos do composto pretendido. No entanto, como não foi possível obter um composto puro não se realizou uma caracterização de RMN de ^{13}C e de correlação bidimensional não permitindo desta forma, fazer a atribuição inequívoca dos sinais de próton e carbono.

Dada a dificuldade tanto na síntese como purificação do composto **9**, uma alternativa seria realizar toda esta síntese em fase sólida assistida por micro-ondas, como já reportado noutros estudos para outras enzimas, através da introdução do primeiro aminoácido à resina já com o grupo DabcyI.^{82,83} Existe comercialmente disponível o Fmoc-Lys(DabcyI)-OH ou mesmo na literatura encontra-se disponível a síntese deste composto.^{82,83,107} Por falta de tempo não foi possível tentar esta abordagem.

Desta forma, obtinha-se um composto equivalente à sonda **9**, o composto EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O β Bu)-Lys(DabcyI), não comprometendo o **modelo 2** proposto na síntese deste composto, em que após a clivagem enzimática depois do resíduo de Asp o fluoróforo e *quencher* separaram-se e o EDA permanecia ligado ao aminoácido Lys protegido com o grupo Boc.

No futuro, pretende-se clivar os grupos Boc e β Bu das sondas sintetizadas **7** e **9** de acordo com as condições de clivagem já referidas e fazer ensaios para medir a atividade enzimática da GzmB na presença dos compostos **7** e **9**, o que não foi possível fazer por falta de amostra suficiente e tempo.

2.3. FRET em solução com o par Edans/Dabcyl

2.3.1. Estudo do *quenching* intermolecular de fluorescência do Edans com o Dabcyl

Inicialmente foram realizadas medições espectrofotométricas e espectrofluorimétricas de soluções de Edans e de Dabcyl **2a** com concentração de 1×10^{-5} M em tampão fosfato de pH= 7,5. Nestas medições, obtiveram-se os comprimentos de absorção e emissão máxima (**Tabela 11**) semelhantes aos descritos na literatura tanto para o Edans ($\lambda_{\text{abs}} = 340$ nm e $\lambda_{\text{emi}} = 490$ nm) como para o Dabcyl **2a** ($\lambda_{\text{abs}} = 472$ nm)⁸⁴. Pelo traçado dos espectros de absorção e emissão verificou-se um dos pré-requisitos para que ocorra FRET, a sobreposição espectral da absorção do Dabcyl **2a** que atua como aceitador e da emissão do Edans que atua como dador. Neste estudo, obteve-se um elevado desvio de Stokes para o Edans de 154 nm, permitindo assim detetar os fotões emitidos isoladamente dos fotões absorvidos (**Figura 30**).

Tabela 11: Dados dos comprimentos de onda de absorção e emissão e do desvio de Stokes do Edans e do Dabcyl **2a** em solução com concentração de 1×10^{-5} M em tampão fosfato pH=7,5.

Composto	Absorção		Fluorescência	
	λ_{abs} (nm)	$\log \epsilon$	λ_{emi} (nm)	Desvio de Stokes (nm)
Edans	342	3,57	496	154
Dabcyl 2a	463	4,37	-	-

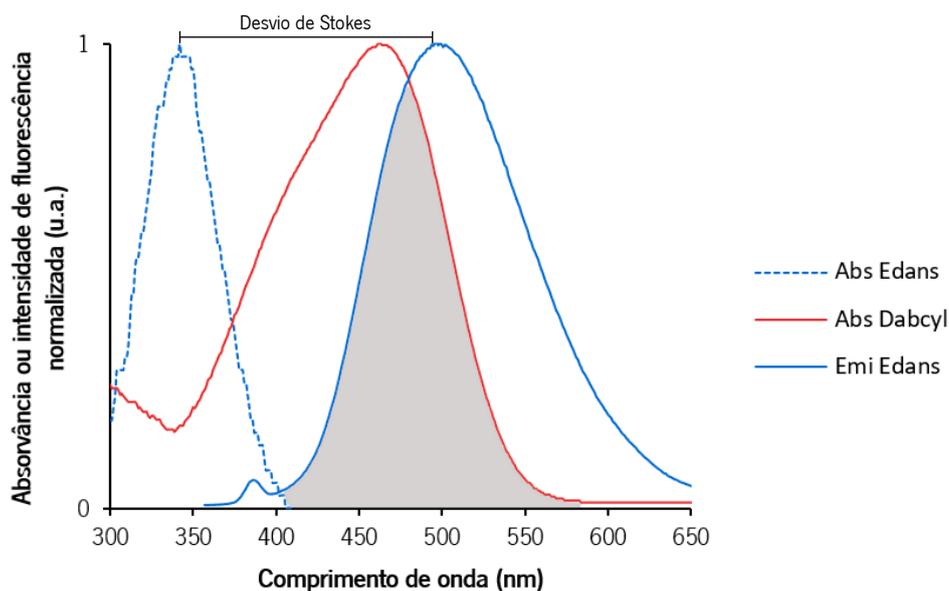


Figura 30: Absorção do Edans e do Dabcyl **2a** e emissão do Edans em solução 1×10^{-5} M em tampão fosfato de pH=7,5.

Seguidamente, para avaliar o *quenching* intermolecular de fluorescência do Edans com o Dabcyl **2a** foram adicionados sucessivamente volumes iguais de uma solução de Dabcyl **2a** com concentração de 1×10^{-3} M em tampão fosfato a uma solução de Edans de concentração de 5×10^{-6} M em tampão fosfato de pH= 7,5 e o espectro de fluorescência foi traçado cerca de 3 min após cada adição (Figura 31).

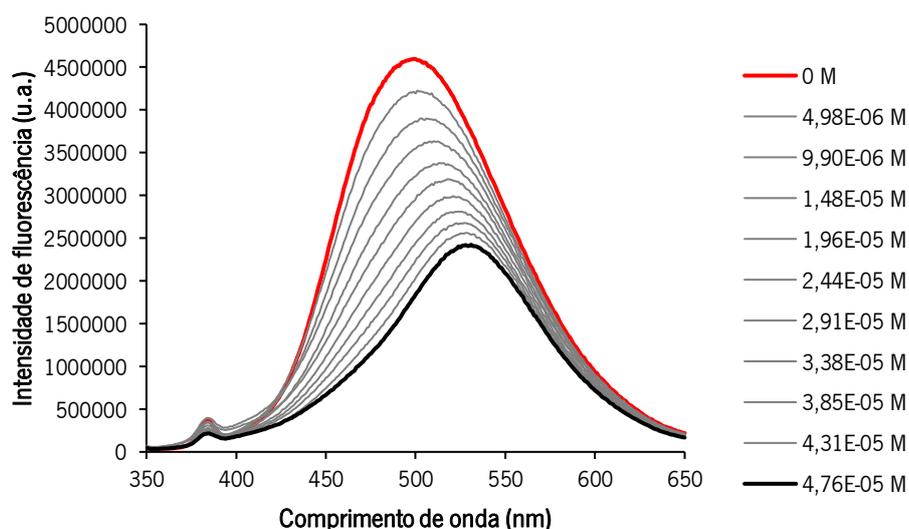


Figura 31: Variação da intensidade de fluorescência da solução de Edans com concentração 5×10^{-6} M com a adição sucessiva de uma solução de Dabcyl **2a** com concentração 1×10^{-3} M em tampão fosfato pH=7,5.

Neste estudo, verificou-se que com o aumento da concentração do Dabcyl **2a** (*quencher*) a intensidade de fluorescência do Edans diminui, tal como esperado. Observou-se também um desvio batocrômico, dependente da concentração que pode estar relacionado com a formação de complexos de transferência de carga entre o Edans e o Dabcyl **2a**, sendo o estado excitado do Edans perturbado pela proximidade das moléculas do *quencher*. A formação do complexo Edans-Dabcyl **2a**, pode dever-se eventualmente às interações π - π ou por pontes de hidrogénio.

Para verificar se era relevante o tempo de interação entre o Edans e Dabcyl **2a** durante o tempo que medeia a adição e obtenção do espectro, traçou-se o espectro de fluorescência após 3, 10 e 15 min para a solução com concentração de $4,76 \times 10^{-5}$ M de Dabcyl **2a** em tampão fosfato (Figura 32).

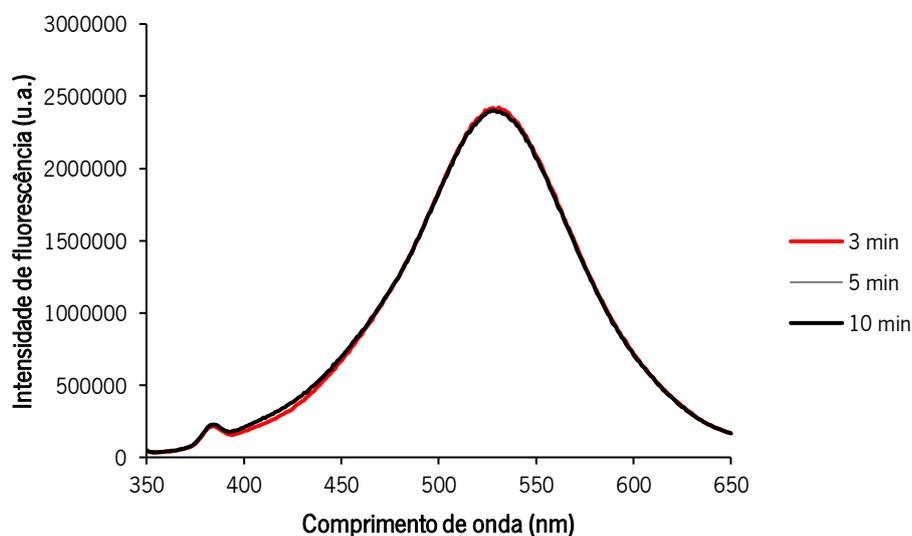


Figura 32: Variação da intensidade de fluorescência de uma solução de Edans de concentração 5×10^{-6} M com uma concentração de $4,76 \times 10^{-5}$ M de DabcyI após 5 e 10 minutos da primeira medição.

Neste estudo, observou-se que o tempo de interação entre o fluoróforo e o *quencher* não era relevante para a obtenção do espectro de fluorescência.

Para estudar a diminuição da fluorescência resultante da interação entre o Edans no estado excitado e DabcyI **2a** foi aplicada a equação de Stern-Volmer (**Equação 2**).⁶⁷

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \text{ (Equação 2)}$$

Onde F_0 corresponda à intensidade de fluorescência na ausência do DabcyI **2a**, F à intensidade de fluorescência na presença do DabcyI **2a**, Q diz respeito à concentração do *quencher* e K_{SV} é a constante do *quenching* Stern-Volmer. Para tal, traçou-se o gráfico $[Q]$ em função de F_0/F (**Figura 33**).

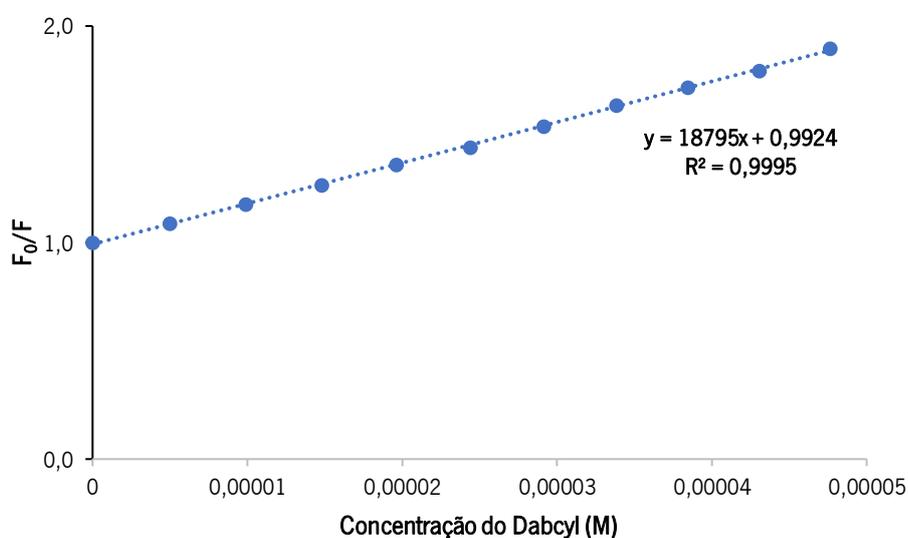


Figura 33: Concentração do Dabcyll **2a** (M) em função de F_0/F .

Pelo declive da reta obteve-se a constante de *quenching* (K_{sv}) com o valor de 18795 M^{-1} . Como se observa uma relação linear pode-se afirmar que o *quenching* de fluorescência do Edans com o Dabcyll **2a** é puramente dinâmico. Tendo isto em conta e como o tempo de vida do estado excitado do Edans é conhecido ($\tau = 1,3 \times 10^{-8} \text{ s}$),⁸⁰ pode-se aplicar a **Equação 3** para obter a constante de *quenching* expressa como o produto da constante de velocidade do *quenching* (K_Q) e o tempo de vida de fluorescência (τ).⁶⁷

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_Q \tau [Q] \text{ (Equação 3)}$$

Pela aplicação desta equação, obteve-se um valor da constante de velocidade do *quenching* de $1,45 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Estes estudos permitiram confirmar o *quenching* intermolecular de fluorescência do Edans com o Dabcyll **2a**. No entanto, para tentar prever a possibilidade de ocorrer *quenching* intramolecular nas sondas sintetizadas, Dabcyll-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)-Lys(Boc)-Edans **7** e EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)-DBA **9**, foram desenhadas as suas estruturas tridimensionais com o software Chem3D (versão 15) tendo em conta a estereoquímica dos aminoácidos usados (em todos os casos foi o enantiómero L) (**Figura 34-37**) e foram determinadas as distâncias aproximadas entre fluoróforo e o *quencher* nestas moléculas.

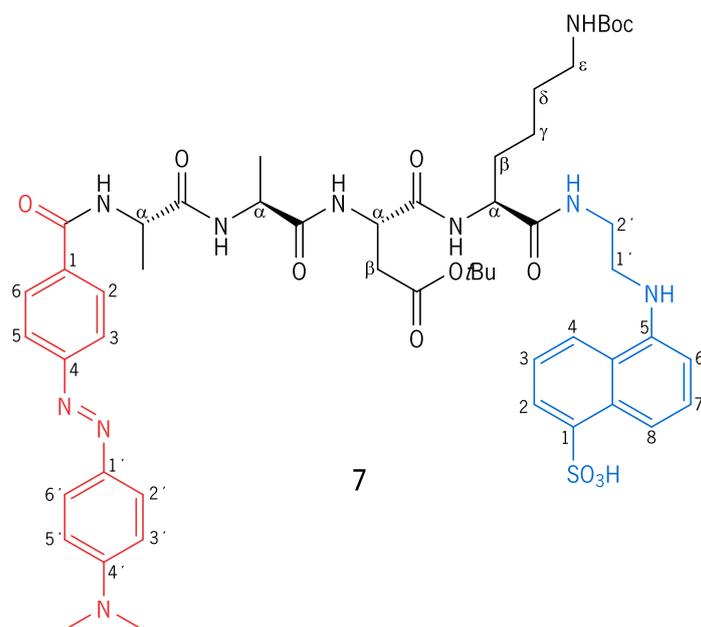


Figura 34: Estrutura do composto DabcyL-Ala-Ala-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Edans **7** tendo em conta a sua esterequímica.

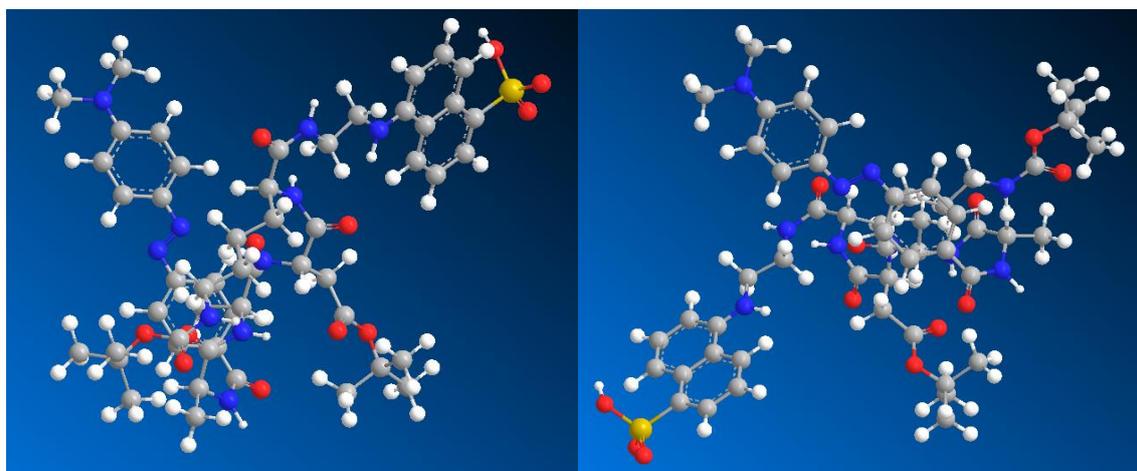


Figura 35: Estrutura tridimensional do composto DabcyL-Ala-Ala-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Edans **7** obtida através do programa Chem3D.

A distância calculada utilizando o programa Chem3D entre a ligação amida do DabcyL ao péptido e a ligação amida do Edans ao péptido foi de 9,860 Å.

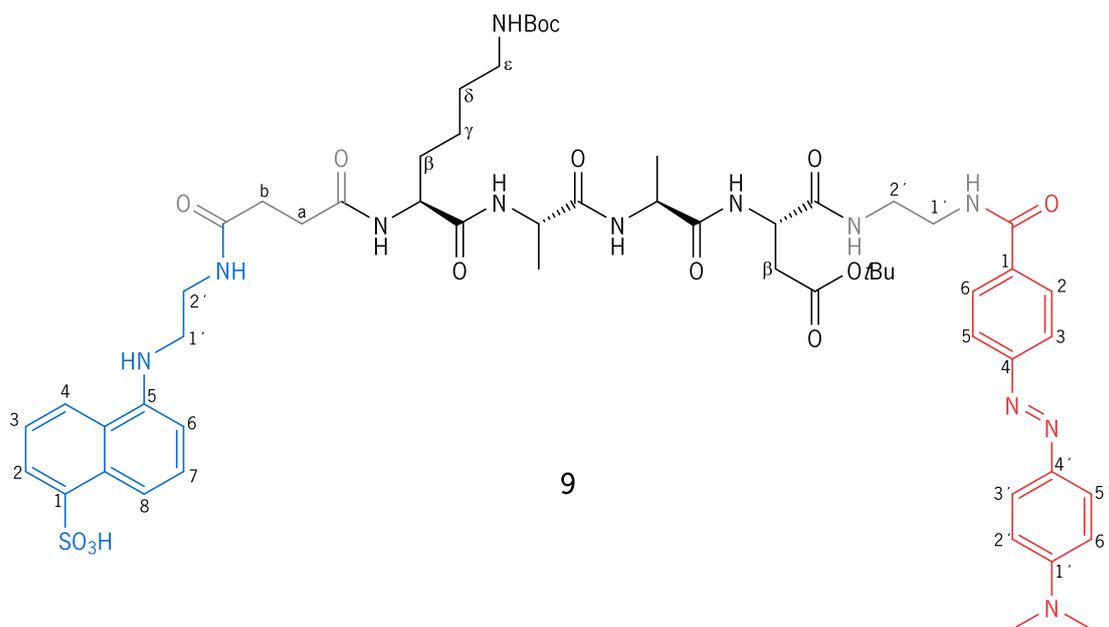


Figura 36: Estrutura do composto EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O.tBu)-DBA **9** tendo em conta a sua estereoquímica.

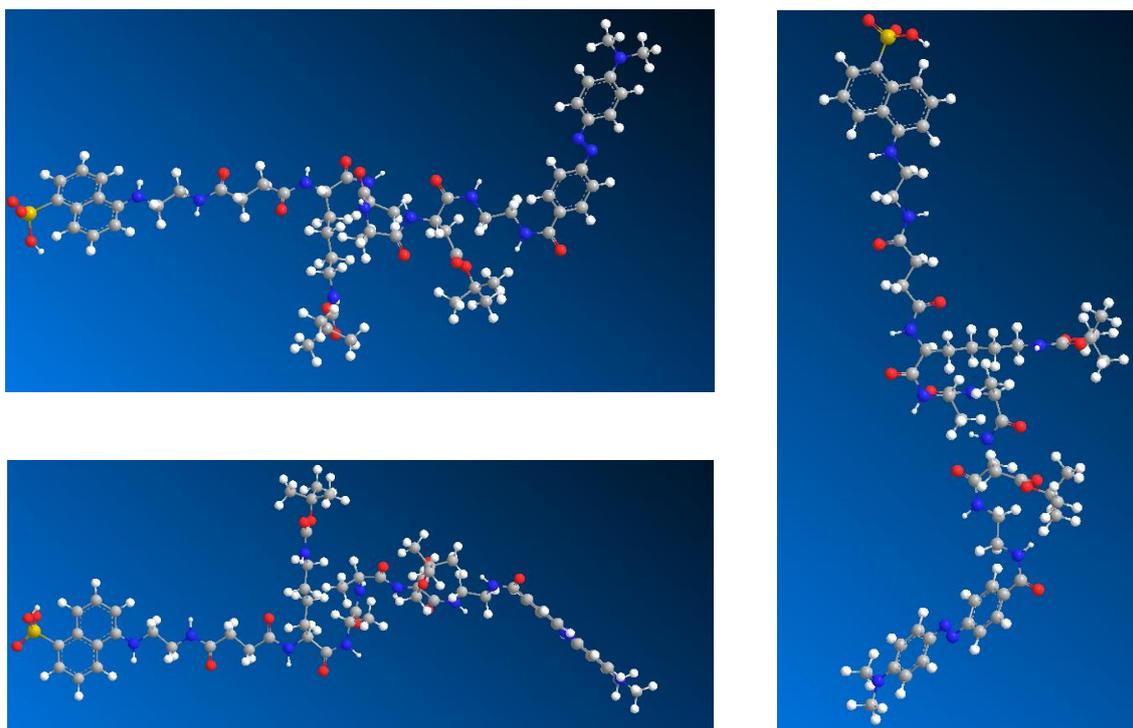


Figura 37: Estrutura tridimensional do composto EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O.tBu)-DBA **9** obtida através do programa Chem3D.

A distância calculada entre a ligação amida do EDA à ligação amida do DBA foi de 19,904 Å. Comparando as estruturas nas Figuras 35 e 37 é notória a diferença entre ambos os compostos:

no composto **9** o péptido apresenta uma conformação estendida enquanto que no composto **7** a conformação do péptido é mais “enrolada”. Esta diferença pode estar relacionada com a proximidade de dois aminoácidos com as cadeias laterais muito volumosas (Asp e Lys) e o conseqüente arranjo tridimensional de forma a diminuir o impedimento espacial. Tendo em conta os valores das distâncias calculadas entre o fluoróforo e o *quencher* para ambas as sondas, será de esperar que haja um maior efeito do *quenching* intramolecular de fluorescência do Edans com o Dabcyl para o composto Dabcyl-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)-Lys(Boc)-Edans **7**, em que a distância entre o fluoróforo e o *quencher* é menor, quando comparada com a distância calculada para o composto EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)-DBA **9**.

2.3.2. Espectroscopia de absorção no UV/Vis e de fluorescência de compostos sintetizados

Foram realizadas medições espectrofotométricas e espectralfluorimétricas de soluções dos compostos Dabcyl-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu) **6**, Dabcyl-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)-Lys(Boc)-Edans **7** e EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu) **8** na gama dos 10^{-5} M em tampão de fosfato de pH=7,5. Nestas medições, foram obtidos os comprimentos de absorção e emissão máxima para estes compostos, descritos na **Tabela 12**.

O comprimento de absorção máxima obtido para o composto **6** é como seria de esperar semelhante ao do Dabcyl **2a** ($\lambda_{abs} = 463$ nm), observando-se um pequeno desvio batocrómico. O λ_{abs} obtido para a sonda fluorescente **7** é igual do Dabcyl **2a** e apresenta um λ_{emi} semelhante ao do Edans ($\lambda_{emi} = 496$ nm). No entanto, o baixo valor de contagens obtido na emissão da sonda **7** indica haver *quenching* intramolecular de fluorescência do Edans com o Dabcyl **2a**.

Na síntese da sonda fluorescente **9** para a GzmB, o precursor obtido por síntese em fase sólida, composto **8**, apresenta como seria de esperar o mesmo λ_{abs} que o Edans ($\lambda_{abs} = 342$ nm) e um λ_{emi} semelhante ao do Edans, com um ligeiro desvio batocrómico. Quanto à sonda EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)-DBA **9**, não foram realizadas medições espectrofotométricas e espectralfluorimétricas uma vez que este composto apresentava impurezas, como já referido.

Tabela 12: Dados dos comprimentos de onda de absorção e emissão de soluções dos compostos **6**, **7** e **8** com concentração na gama dos 10^{-5} M em tampão fosfato pH=7,5 (* $\lambda_{exc} = 342$ nm).

Composto	λ_{abs} (nm)	λ_{emi} (nm)
Dabcyl-Ala-Ala-Asp(O <i>t</i> Bu)-Lys(Boc) 6	470	-
Dabcyl-Ala-Ala-Asp(O <i>t</i> Bu)-Lys(Boc)-Edans 7	462	494*
EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O <i>t</i> Bu) 8	342	505

2.4. Síntese de intermediários do fluoróforo Cy5 e do *quencher* BHQ-3

Paralelamente à síntese das sondas fluorescentes com o par Edans/Dabcyl incorporado, foram realizados trabalhos para sintetizar o fluoróforo e *quencher* do par FRET Cy5/BHQ-3 que irá ser usado no projeto Self-i. Este par apresenta uma excelente sobreposição espectral e além disso, estas moléculas permitem o desenvolvimento de sondas na região do NIR, devido aos seus comprimentos de absorção e emissão, já apresentados na introdução desta dissertação. Tanto o Cy5 como o BHQ-3 estão disponíveis comercialmente, mas apresentam um custo muito elevado pelo que se resolveu proceder à sua síntese.

De forma semelhante ao realizado na síntese das sondas com o par Edans/Dabcyl, pretende-se sintetizar os dois modelos de sonda apresentados. No **modelo 1**, o Cy5 e o BHQ-3 serão ligados aos terminais N e C do péptido Ala-Ala-Asp-Lys enquanto que, no **modelo 2** o mesmo par irá ser ligado às extremidades do péptido Lys-Ala-Ala-Asp.

No **modelo 1** de sonda apresentado, o Cy5 que se pretende sintetizar contém como grupo reativo um ácido carboxílico que será ligado à extremidade ácida do péptido Ala-Ala-Asp(O β Bu)-Lys(Boc) **4**, através de um espaçador com dois grupos amino, a etilendiamina. De uma forma semelhante, para ligar o grupo amino do BHQ-3 à extremidade amina do péptido Ala-Ala-Asp(O β Bu)-Lys(Boc) **4** irá ser introduzido um espaçador entre estes dois precursores.

2.4.1. Síntese de intermediários para a obtenção de cianinas do tipo Cy5

Começou-se por sintetizar os intermediários para a obtenção da cianina do tipo Cy5 adaptando o método descrito por Mujumdar e seus colaboradores.¹⁰⁸ O nome IUPAC do Cy5 é (2 \mathcal{Z})-2-[(2*E*,4*E*)-5-[1-(5-carboxipentil)-3,3-dimetil-5-sulfoindole-1-ium-2-il]penta-2,4dienilideno]-1-metil-3,3-dimetilindole-5-sulfonato (**Figura 38 – a**) mas será designado por Cy5 nesta dissertação.

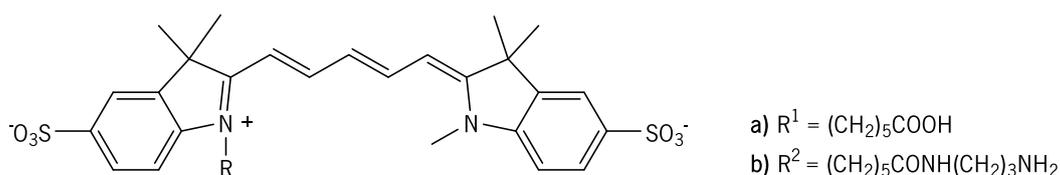


Figura 38: Estrutura das cianinas do tipo Cy5.

Após a síntese dos sais quaternários **10 b** e **10 c**, pretendia-se obter o composto Cy5 por condensação do sal quaternário heterocíclico 2-metilsustituído **10 c** com a difenilformamida, originando um sal anilinovinilo. Por condensação deste sal quaternário com o sal quaternário **10 b**, obtinha-se o composto pretendido. No entanto, os sais quaternários formados são muito solúveis no meio reacional e polares sendo difícil o seu isolamento e manuseamento, e devido a esta dificuldade e à falta de tempo não foi possível realizar este passo reacional.

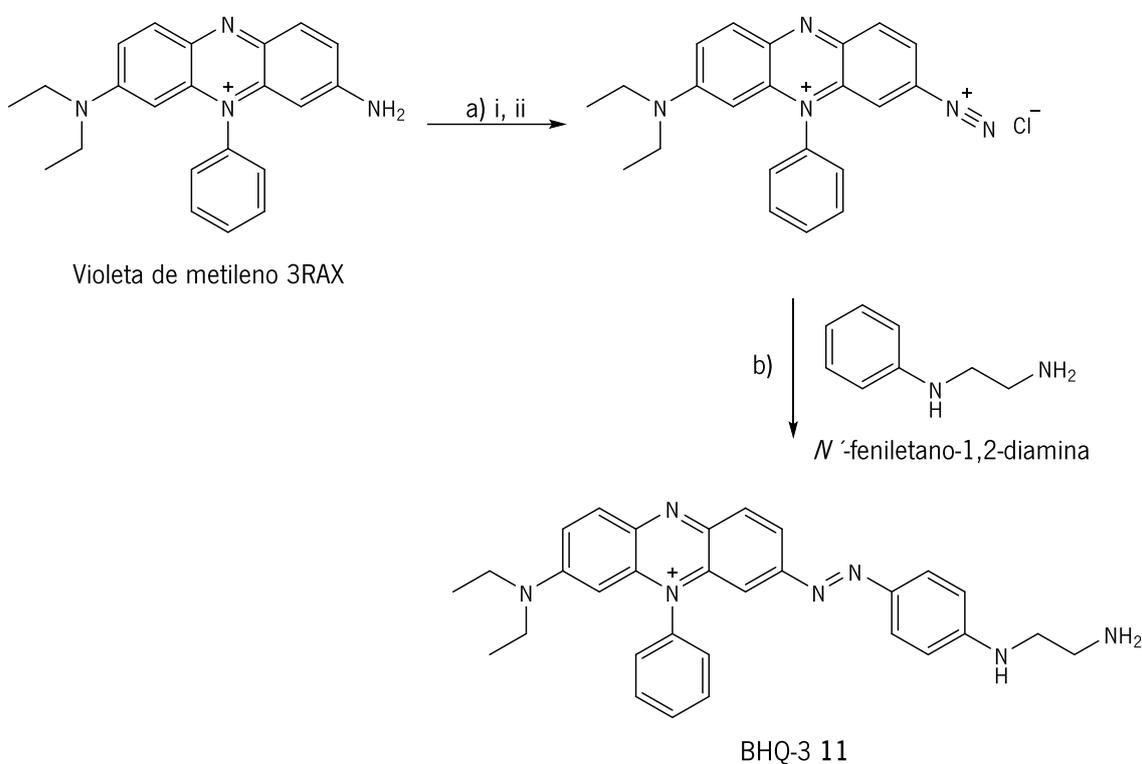
As estruturas dos intermediários **10 a - 10 c** de cianina sintetizados foram caracterizadas por espectroscopia de RMN de ^1H (D_2O). Nos espectros obtidos observa-se a presença dos prótons característicos do indole (H-4, H-6 e H-7) e dos grupos metilo do carbono 3, já o grupo metilo do carbono 2 não foi visível em D_2O , tal como referido na literatura.¹⁰⁸ Para além destes sinais, na **Tabela 13** estão descritos os sinais correspondentes aos substituintes ligados na posição 1 do indole para obter o intermediário **10 b** e **10 c**.

Tabela 13: Sinais de RMN de ^1H para os intermediários de cianina **10 a - 10 c** em D_2O .

δ (ppm)	2x-C3-									
	CH_3	H-7	H-6	H-4	N- CH_3	$\text{CH}_2\text{-c}$	$\text{CH}_2\text{-d}$	$\text{CH}_2\text{-b}$	$\text{CH}_2\text{-e}$	$\text{CH}_2\text{-a}$
10 a	1,38	7,60	7,83	7,88	-	-	-	-	-	-
10 b	1,45	7,39	7,62	7,67	3,86	-	-	-	-	-
10 c	1,57- 1,64	7,87	8,00	8,09	-	1,40- 1,45	1,57- 1,64	1,93- 2,03	2,43	2,34

2.4.2. Síntese do BHQ-3

Para obter o BHQ-3 **11** aplicou-se o mesmo método utilizado na síntese do Dabcy1 **2a**. A estratégia de síntese baseou-se numa reação de acoplamento azo entre um sal, o 2-*N,N*-dietil-10-fenilfenazin-10-ium-2,8-diamina (disponível comercialmente como Violeta de metileno 3RAX) e a *N'*-feniletano-1,2-diamina, com um grupo amino para a subsequente conjugação com o terminal ácido do péptido na síntese do **modelo 2** (Esquema 17).



Esquema 17: Síntese do BHQ-3 **11**: a) i) HCl 1 M, HCl 6 M, temperatura ambiente; ii) NaNO₂, ACN seco, 0 °C, 30 min; b) ACN seco.

Por dificuldades de isolamento e purificação e conseqüentemente, por falta de tempo não foi possível obter um rendimento, nem a caracterização por espectroscopia de RMN do composto sintetizado. O composto pretendido parece ter sido obtido pois a cor púrpura que se formou na mistura reacional está de acordo com o descrito na literatura.⁸⁸

Capítulo 3: Conclusões e Perspetivas Futuras

Neste trabalho pretendeu-se sintetizar e caracterizar sondas fluorescentes específicas para a GzmB com o par FRET Edans/Dabcyl ligado aos terminais N e C dos péptidos Ala-Ala-Asp(O β Bu)-Lys(Boc) **4** e Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O β Bu) **5**.

Estes péptidos resultaram da ligação peptídica entre os aminoácidos com o grupo α -amino protegido com o grupo Fmoc, nomeadamente a Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asp(O β Bu)-OH e Fmoc-Ala-OH **1**. Os dois primeiros Fmoc-aminoácidos foram obtidos comercialmente, a Fmoc-Ala-OH **1** resultou da proteção da H-Ala-OH utilizando como reagente de proteção o Fmoc-Cl, originando o composto pretendido com um rendimento excelente de 93%.

Relativamente ao par FRET, o Edans foi obtido comercialmente e o Dabcyl **2a** foi sintetizado através de uma reação de diazotação seguida de um acoplamento do tipo azo com rendimentos de 89 e 91%. Adicionalmente, para ligar o Edans e o Dabcyl **2a** ao péptido **5** foi introduzido um espaçador no Dabcyl **2a**, obtendo-se o composto DBA **2b** com 35 % de rendimento. Quanto ao Edans, utilizou-se como espaçador o anidrido succínico originando o composto EDA **3** com rendimento quantitativo.

Os péptidos foram sintetizados por síntese peptídica em fase sólida assistida por micro-ondas aplicando a estratégia do grupo Fmoc e utilizando uma resina de cloreto de 2-clorotritilo. Os péptidos com a sequência Ala-Ala-Asp(O β Bu)-Lys(Boc) **4** foram obtidos com rendimentos de 20, 21 e 26% e os péptidos com a sequência Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O β Bu) **5** com rendimentos de 36, 37 e 56%. Os rendimentos poderiam ter sido melhorados utilizando outra resina, mas na escolha desta estiveram envolvidos alguns fatores: os aminoácidos disponíveis estavam protegidos com o grupo Fmoc, por isso era necessária uma resina adequada para Fmoc-aminoácidos e as condições de clivagem do péptido do suporte sólido não poderiam afetar a ligação do grupo Boc e β Bu ligados à Lys e ao Asp respetivamente. Por outro lado, poder-se-ia ter usado outro reagente e aditivo de acoplamento, no entanto, de acordo com a literatura a DIC/Oxyma já é uma combinação ideal para a síntese de péptidos em SPPS assistida por micro-ondas.

Inicialmente, foram realizadas tentativas com o objetivo de ligar o fluoróforo e o *quencher* aos terminais dos péptidos sintetizados em solução. No entanto, dadas as dificuldades optou-se por sintetizar em fase sólida assistida por micro-ondas os péptidos **4** e **5** com o respetivo dador/aceitador ligado no terminal amino do péptido e após a clivagem destes compostos da resina

procedeu-se ao acoplamento do dador/aceitador no terminal ácido do péptido em solução, através das condições ideais testadas anteriormente.

Tendo isto em conta, a sonda fluorescente de acordo com **modelo 1** foi obtida por síntese sequencial em fase sólida assistida por micro-ondas, originando o composto DabcyL-Ala-Ala-Asp(O β Bu)-Lys(Boc) **6** e posteriormente, por síntese em solução obteve-se a sonda DabcyL-Ala-Ala-Asp(O β Bu)-Lys(Boc)-Edans **7**. Este composto foi purificado por HPLC semi-preparativo e revelou ser de difícil purificação, pois apenas se obteve 5 mg do composto pretendido **7**, com um rendimento de 4,9%. A estrutura do composto **7** purificado por HPLC foi caracterizada por espectroscopia RMN de ^1H e ^{13}C e com as técnicas DEPT-135 e correlação bidimensional HMBC e HMQC foi possível fazer a atribuição inequívoca dos sinais de protão e carbono. Dada a dificuldade tanto na síntese como na purificação, justifica-se o custo elevado dos substratos para a GzmB inicialmente apresentados na introdução desta dissertação.

A sonda fluorescente de acordo com **modelo 2** foi obtida por síntese sequencial em fase sólida assistida por micro-ondas, originando o composto EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O β Bu) **8** e posteriormente, por síntese em solução pretendeu-se obter a sonda EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O β Bu)-DBA **9**. Apesar deste composto ter sido purificado por HPLC semi-preparativo e ainda por cromatografia em coluna, obteve-se 5,4 mg do composto **9** ainda impuro. A estrutura do composto **9** após estas purificações foi caracterizada por espectroscopia RMN de ^1H , observando-se os principais sinais de protão característicos do composto pretendido. No entanto, como não foi possível obter um composto puro não se realizou uma caracterização de RMN de ^{13}C e de correlação bidimensional não permitindo desta forma, fazer a atribuição inequívoca dos sinais de protão e carbono.

Uma alternativa para obter um composto equivalente à sonda **9** seria realizar toda a sua síntese em fase sólida assistida por micro-ondas, através da introdução do primeiro aminoácido à resina já com o grupo DabcyL, originando o composto EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O β Bu)-Lys(DabcyL), não comprometendo o **modelo 2** proposto na síntese desta sonda.

Para avaliar o *quenching* intermolecular de fluorescência do Edans com o DabcyL **2a** foram realizadas medições espectrofotométricas e espectralfluorimétricas de soluções de Edans e de DabcyL **2a** em que se obtiveram comprimentos de absorção e emissão máxima semelhantes aos da literatura. Pelo traçado dos espectros de absorção e emissão confirmou-se a sobreposição espectral

da absorção do Dabcyl **2a** e da emissão do Edans. Neste estudo, verificou-se que com o aumento da concentração do *quencher*, a intensidade de fluorescência de uma solução de Edans diminuiu, tal como esperado. Nestas medições, observou-se também que o tempo de interação entre o fluoróforo e o *quencher* não era relevante para a obtenção do espectro de fluorescência. Pela aplicação da equação de Stern-Volmer obteve-se a constante de *quenching* (K_{sv}) com o valor de 18795 M^{-1} e como se observou uma relação linear pode-se afirmar que o *quenching* de fluorescência do Edans com o Dabcyl **2a** é puramente dinâmico, sendo possível determinar constante de velocidade do *quenching*, obtendo-se um valor de $1,45 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Foram ainda calculadas as distâncias aproximadas entre o fluoróforo e o *quencher* para os compostos Dabcyl-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)-Lys(Boc)-Edans **7** e o EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)-DBA **9**, observando-se uma maior distância entre Dabcyl e o Edans para o composto **9**, de acordo com as estruturas tridimensionais geradas por Chem3D.

Através de medições espectralométricas e espectralométricas de soluções dos compostos Dabcyl-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)-Lys(Boc) **6**, Dabcyl-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)-Lys(Boc)-Edans **7** e EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu) **8** foram obtidos os comprimentos de absorção e emissão máxima para estes compostos. Como seria de esperar, o λ_{abs} do composto **6** é semelhante ao do Dabcyl **2a**. O λ_{abs} obtido para o composto **7** é igual do Dabcyl **2a** e apresenta um λ_{emi} semelhante ao do Edans, no entanto, o baixo valor de contagens obtido na emissão da sonda **7** indica haver *quenching* intramolecular de fluorescência do Edans com o Dabcyl **2a**. O composto **8**, apresenta como seria de esperar os mesmos valores de λ_{abs} e de λ_{emi} que o Edans.

Paralelamente, foram ainda iniciados trabalhos para sintetizar intermediários de cianina do tipo 5 (Cy5) e do BHQ-3. Na síntese de cianinas, o ácido *para*-hidrazinobenzeno sulfónico foi inicialmente transformado em indolenina **10 a** aplicando uma síntese do tipo indole de Fischer com 27% de rendimento. Este composto foi quaternizado usando iodeto de metilo e o ácido 6-bromohexanóico para originar o composto **10 b** e o composto **10 c**, respetivamente. Estes intermediários foram caracterizados por espectroscopia de RMN de ^1H . No entanto, devido às dificuldades no isolamento e manuseamento e à falta de tempo não foi possível obter o composto final pretendido, o Cy5.

Na síntese do BHQ-3 **11**, procedeu-se a uma diazotação, seguida de um acoplamento

do tipo azo, mas por dificuldades de isolamento e purificação e conseqüentemente, por falta de tempo não foi possível obter o produto puro pelo que não se efetuou a caracterização por espectroscopia de RMN do composto sintetizado.

Em suma, a utilização do par FRET Edans/Dabcyl como prova de conceito do projeto Self-i revelou ser muito importante para estudar as condições ideais de síntese para obter as sondas para a GzmB através dos modelos apresentados. Neste sentido e de modo a completar o trabalho realizado, pretende-se futuramente terminar a síntese do Cy5 e do BHQ-3 **11** e sintetizar as sondas para a GzmB segundo as condições de síntese testadas com o par Edans/Dabcyl. Pretende-se também, clivar os grupos Boc e *t*Bu das sondas sintetizadas nesta dissertação, composto **7** e **9** de acordo com as condições de clivagem já referidas e fazer ensaios para medir a atividade enzimática da GzmB na presença destes compostos e seguir o processo por técnicas de fluorescência de modo a confirmar a existência de FRET intramolecular.

Capítulo 4: Secção Experimental

4.1. Materiais e Reagentes

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C foram obtidos no aparelho Bruker Avance III 400 numa frequência de 400 MHz para ^1H e 100,6 MHz para ^{13}C , utilizando como padrão interno o tetrametilsilano (TMS). Os solventes deuterados usados foram o clorofórmio (CDCl_3), o dimetilsulfóxido ($\text{DMSO-}d_6$), a água (D_2O) e a *N,N'*-dimetilformamida ($\text{DMF-}d_7$). As constantes de acoplamento (J) foram obtidas em Hertz (Hz) e os deslocamentos químicos (δ) em partes por milhão (ppm). A atribuição de sinais no caso dos átomos de carbono primários, secundários, terciários e quaternários foi feita usando a sequência de DEPT com um pulso de 135° , utilizando o pico do solvente como referência. A atribuição completa dos sinais de próton e carbono foi feita recorrendo a técnicas de correlação heteronuclear bidimensional, nomeadamente HMBC e HMQC.

Os espectros de ultravioleta e visível (UV/Vis) foram efetuados num espectrofotómetro Shimadzu UV/2501PC. Os espectros de fluorescência foram obtidos num espectralfluorímetro FluoroMax-4.

As cromatografias em camada fina (TLC) foram realizadas em placas de sílica gel 60 com indicador de fluorescência F_{254} (Merck) e reveladas pela incidência de radiação UV/Vis ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 e 365 nm) numa câmara CN-6 (Wilber-Lourmart). Nas cromatografias em coluna utilizou-se sílica gel 60 (0,035-0,070 mm) (Acros Organics).

A síntese em micro-ondas foi realizada num sintetizador peptídico Discover SPS (CEM Corporation). O suporte sólido usado foi a resina de cloreto de 2-clorotritilo (100-200 mesh) 1% DVB, com uma capacidade de 1,3 mmol/g e adquirida à AAPPTec.

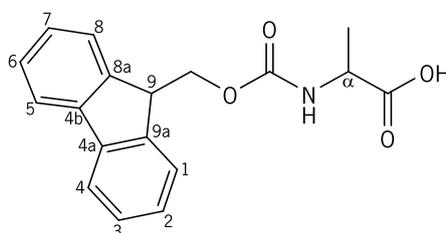
A purificação por HPLC preparativo foi realizada com uma coluna Europa Peptide 120 C18 (5 μm) (Teknocroma) num sistema composto por uma bomba Shimadzu LC-8A, acoplada a um detetor UV/Vis JASCO 875-UV e um registador Shimadzu C-RGA Chromatopac.

Todo o material de vidro e metálico foi seco em estufa, à temperatura de aproximadamente 50°C . Para o caso de reações que exigiam ausência de humidade, o material foi posteriormente arrefecido num exsiccador sob vácuo.

Os reagentes e os solventes secos utilizados foram adquiridos comercialmente (Acros Organics, Aldrich, Merck, AAPPTec), exceto DMF e MeOH, que foram reciclados por destilação e utilizados nas lavagens intercalares do acoplamento e desproteção. A resina e os aminoácidos que não foram preparados no laboratório foram adquiridos comercialmente (AAPPTec).

4.2. Síntese de precursores

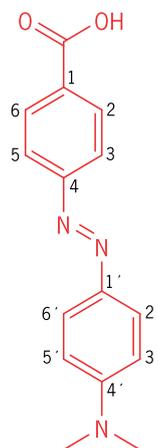
4.2.1. Síntese da *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-alanina (Fmoc-Ala-OH,1)



Dissolveu-se o aminoácido H-Ala-OH (2,0004 g; $2,25 \times 10^{-2}$ mol, 1 eq.) numa solução aquosa de Na_2CO_3 5% (80 mL) e adicionou-se 1,4-dioxano (60 mL). Colocou-se a mistura sob agitação num banho de gelo e adicionou-se lentamente o cloreto de 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc-Cl) (6,4161 g; $2,48 \times 10^{-2}$ mol; 1,1 eq.) previamente dissolvido em 1,4-dioxano. Mediu-se o pH da solução e ajustou-se o pH a 8 com Na_2CO_3 5% quando necessário. Deixou-se a mistura reacional sob agitação no banho de gelo durante 4 h. Após este período, removeu-se o banho de gelo e deixou-se em agitação à temperatura ambiente durante a noite.

Realizaram-se extrações com éter etílico (3x50 mL). Com a fase aquosa, num banho de gelo, acidificou-se com HCl concentrado até pH=1, colocou-se no frio durante a noite e filtrou-se o sólido incolor formado sob vácuo (6,4906 g; $\eta = 93\%$).

RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} = 1,50 (3H, d, $J = 6,8$ Hz, CH_3); 4,24 (1H, t, $J = 6,8$ Hz, H-9); 4,39-4,48 (3H, m, $\text{CH}_2 + \alpha\text{-CH}$); 5,30 (1H, d, $J = 7,2$ Hz, NH); 7,32 (2H, dt, $J = 0,8$ Hz e 7,6 Hz, H-2+H-7); 7,41 (2H, t, $J = 7,6$ Hz, H-3+H-6); 7,60 (2H, s largo, H-4+H-5); 7,77 (2H, d, $J = 7,6$ Hz, H-1+H-8) ppm.

4.2.2. Síntese do ácido 4-[[4'-(*N,N*-dimetilamino)fenil]diazenil] benzóico (Dabcyl, 2a)

Dissolveu-se, sob agitação e à temperatura ambiente, o ácido 4-aminobenzóico (0,5003 g; $3,65 \times 10^{-3}$ mol; 1 eq.) numa solução de HCl 1 M (7,5 mL) e HCl 6 M (0,42 mL). Arrefeceu-se a solução utilizando um banho de gelo, adicionou-se uma a 0 °C de nitrito de sódio (0,2515 g; $3,65 \times 10^{-3}$ mol; 1 eq.) em água destilada (1,25 mL) e manteve-se sob agitação durante 30 min a 0 °C.

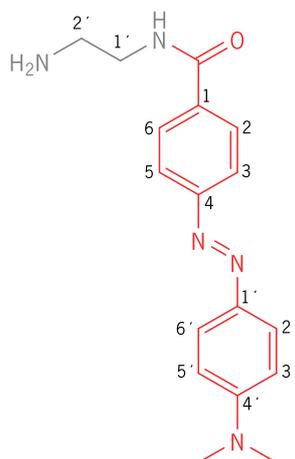
Preparou-se uma solução de *N,N*-dimetilaminilina (0,46 mL; $3,65 \times 10^{-3}$ mol; 1 eq.) em ácido acético glacial (1,25 mL) e água destilada (0,83 mL). Adicionou-se a esta solução o sal de diazónio (solução anterior), lentamente sob agitação e à temperatura ambiente. Ajustou-se o pH final a 4, por adição de uma solução aquosa saturada de acetato de sódio (CH₃COONa).

Após 30 min, filtrou-se o precipitado formado sob vácuo e lavou-se com água destilada e com DCM. O sólido vermelho-alaranjado obtido foi seco na estufa a 45 °C (0,8925 g; $\eta = 91\%$). Esta síntese foi repetida, partindo do ácido 4-aminobenzóico (0,3782 g; $2,76 \times 10^{-3}$ mol; 1 eq.) e mantendo-se o número de equivalentes dos restantes reagentes utilizado na primeira síntese deste composto (0,6648 g; $\eta = 89\%$)

RMN de ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ_{H} = 3,07 (6H, s, 2xCH₃); 6,84 (2H, d, $J = 9,2$ Hz, H-3' + H-5'); 7,82 (4H, d, $J = 6,8$ Hz, H-3 + H-5 + H-2' + H-6'); 8,06 (2H, d, $J = 6,4$ Hz, H-2 + H-6) ppm.

4.2.3. Adição de espaçadores no DabcyI e no Edans

4.2.3.1. Síntese do derivado do DabcyI com terminal amina (DBA, 2b)

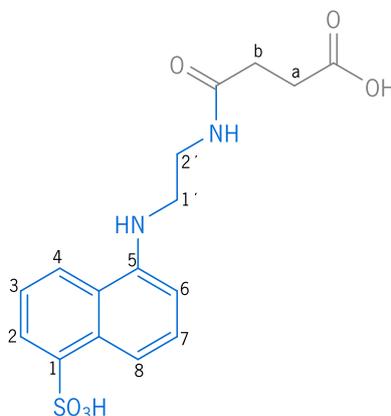


Dissolveu-se o DabcyI **2a** (0,1730 g; $6,42 \times 10^{-4}$ mol; 1 eq.) em DMF seca (2 mL) e colocou-se num banho de gelo. Após 5 min sob agitação, adicionou-se HOBt (0,0868 g; $6,42 \times 10^{-4}$ mol; 1 eq.) e depois de 10 min sob agitação, adicionou-se DCC (0,1325 g; $6,42 \times 10^{-4}$ mol; 1 eq.). Deixou-se agitar durante 30 min e adicionou-se a etilendiamina (0,042 mL; $6,42 \times 10^{-4}$ mol; 1 eq.). Deixou-se em agitação durante 15 h à temperatura ambiente. Após este período, verificou-se por TLC que não houve progressão da reação e colocou-se a mistura reacional durante 2 h a 120 °C. Depois deste tempo, verificou-se por TLC a formação de um produto.

Evaporou-se o solvente e realizou-se uma purificação por cromatografia em coluna com sílica gel, usando um gradiente de polaridade crescente DCM e misturas de DCM e MeOH até DCM/MeOH (20:1). Obteve-se o produto puro de cor laranja (0,0695 g; $\eta = 35\%$).

RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ_{H} = 3,07 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3$); 3,29 (4H, t, $J = 6,4$ Hz, CH_2 -1' + CH_2 -2'); 6,84 (2H, d, $J = 9,2$ Hz, H-3' + H-5'); 7,81 (4H, d, $J = 9,2$ Hz, H-3 + H-5 + H-2' + H-6'); 7,96 (2H, d, $J = 8,8$ Hz, H-2 + H-6); 8,04 (2H, s largo, 2' - NH_2); 8,12 (1H, s largo, 1' - NH) ppm.

4.2.3.2. Síntese do derivado do Edans com terminal ácido carboxílico (EDA, 3)



Dissolveu-se o Edans.HCl (0,0506 g; $1,89 \times 10^{-4}$ mol; 1 eq.), a Et₃N (0,026 mL; $1,89 \times 10^{-4}$ mol; 1 eq.) o anidrido succínico (0,0189 g; $1,89 \times 10^{-4}$ mol; 1 eq.) em acetona (5 mL) e deixou-se sob agitação à temperatura ambiente, durante 19 h.

Evaporou-se o solvente e obteve-se um óleo de cor púrpura (0,0882 g). Esta síntese foi repetida duas vezes, na segunda síntese partindo do Edans (0,1003 g; $3,77 \times 10^{-4}$ mol; 1 eq.) obteve-se 0,1865 g e na terceira síntese partindo do Edans (0,3005 g; $1,13 \times 10^{-3}$ mol; 1 eq.) na terceira síntese obtendo-se 0,5956 g, mantendo-se o número de equivalentes dos restantes reagentes utilizado na primeira síntese deste composto. As massas obtidas destes compostos apresentam a contribuição do NEt₃.HCl e os rendimentos destas sínteses foram quantitativos.

RMN de ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ_{H} = 2,32 (2H, s, CH₂-b); 2,39 (2H, s, CH₂-a); 3,02 (4H, q, $J = 7,2$ Hz, CH₂-1' + CH₂-2'); 6,52 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, H-6); 7,04 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, H-4); 7,22-7,30 (2H, m, H-3+H-7); 7,28 (1H, dd, $J = 1,2$ Hz e 8,4 Hz, H-8); 8,10 (1H, dd, $J = 1,6$ Hz e 7,6 Hz, H-2); 8,23 (1H, t, $J = 5,2$ Hz, 5-NH); 8,79 (1H, t, $J = 5,2$ Hz, 2'-NH) ppm.

4.3. Síntese em fase sólida assistida por micro-ondas

4.3.1. Procedimentos gerais

4.3.1.1. Ligação dos Fmoc-aminoácidos à resina de cloreto de 2-clorotritilo

Dissolveu-se o Fmoc-aminoácido (1,5/2 eq. relativamente à funcionalização da resina) em DCM seco (10 mL) e adicionou-se DIPEA (4 eq. relativamente ao aminoácido). Esta mistura foi adicionada à resina de cloreto de 2-clorotritilo previamente dilatada em DCM e deixou-se em agitação durante 5 h à temperatura ambiente.

Filtrou-se o solvente e lavou-se a resina sequencialmente com uma mistura DCM/MeOH/DIPEA (25,5:3,0:1,5; 3x10 mL), DCM (3x10 mL), DMF (3x10 mL), MeOH (3x10 mL) e éter etílico (2x10 mL), agitando cerca de 5 min entre cada lavagem. Colocou-se a resina a secar no exsicador (com KOH) até ao dia seguinte.

4.3.1.2. Determinação do *loading* da resina

Num balão volumétrico de 5 mL, adicionou-se 0,002 g da resina seca, perpez-se o volume com solução de piperidina 20% em DMF e deixou-se em agitação durante 20 min. Fez-se uma diluição (1:10) e mediu-se a absorvância da solução com a resina a 301 nm ($\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) em células de quartzo com 1 cm de percurso ótico.

Aplicou-se a lei de Beer-Lambert (**Equação 4**) para obter a concentração da solução diluída.

$$\text{Abs} = \epsilon \times C \times l \Leftrightarrow C = \frac{\text{Abs}}{\epsilon \times l} \text{ (Equação 4)}$$

Onde Abs diz respeito a absorvância, ϵ corresponde à absortividade molar ($\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$), C à concentração da solução expressa em $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e l refere-se ao percurso ótico, largura da célula que usualmente é 1 cm. De seguida, calculou-se a concentração da solução original tendo em conta o fator de diluição. A partir deste concentração determinou-se o número de moles da solução original e determinou-se o *loading* da resina expresso em mmol/g.

4.3.1.3. Desproteção dos aminoácidos por clivagem do grupo Fmoc

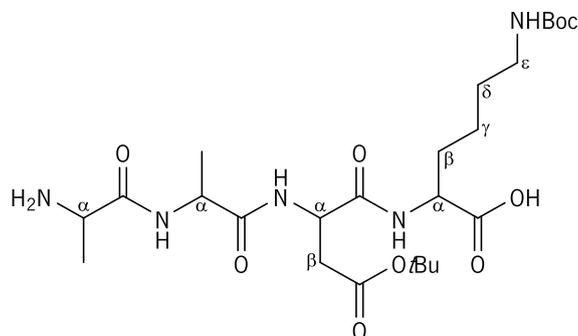
Submeteu-se a resina a uma desproteção, usando uma solução de piperidina 20% em DMF (5 mL/g de resina) durante 30 s, sob irradiação de micro-ondas (P= 50 W, T= 75 °C). Descartou-se a solução, adicionou-se uma nova solução de piperidina 20% em DMF (7 mL/g de resina) e deixou-se reagir durante 3 min, sob irradiação de micro-ondas (P= 50 W, T= 75 °C). Lavou-se a resina com DMF (3x) e seguidamente com MeOH (3x). Repetiu-se este ciclo de lavagem quatro vezes.

4.3.1.4. Acoplamento dos Fmoc-aminoácidos com DIC/Oxyma

Dissolveu-se o Fmoc-aminoácido (5 eq. relativamente ao *loading* da resina) em 6 mL de DMF seca, adicionou-se DIC (5 eq.) e Oxyma (5 eq.) previamente dissolvidos na quantidade necessária de DMF seca e deixou-se sob agitação durante 5 min. Adicionou-se a mistura à resina e submeteu-se a suspensão a dois ciclos de irradiação por micro-ondas de 5 min cada (P= 50 W, T= 75 °C), deixando arrefecer entre os ciclos. Após o tempo de reação, lavou-se a resina com DMF (3x) e seguidamente com MeOH (3x). Repetiu-se este ciclo de lavagem três vezes.

4.3.1.5. Clivagem do péptido da resina

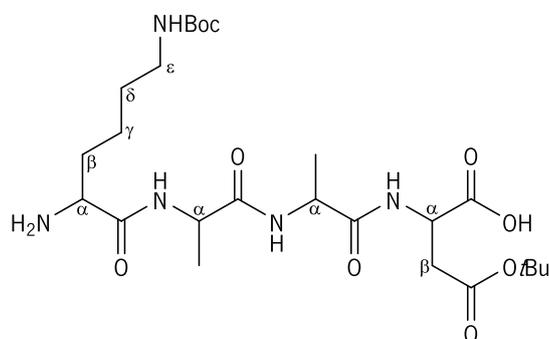
Transferiu-se a resina para um balão de fundo redondo e colocou-se em agitação com uma solução de ácido acético glacial/TFE/DCM 1:2:7 à temperatura ambiente, durante pelo menos 1 hora. Deixou-se a resina na mesma mistura, em repouso à temperatura ambiente, durante a noite. Filtrou-se a solução e lavou-se a resina com 10 mL TFE/DCM (2:8) (2x). Seguidamente evaporou-se o solvente até ao volume restante ser menos de 5 mL. Adicionou-se éter etílico e colocou-se no frigorífico durante a noite. Centrifugou-se a solução para separação do sólido formado e secou-se num exsiccador sob vácuo.

4.3.2. Síntese do tetrapéptido Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)-Lys(Boc), **4**

Seguiram-se os procedimentos gerais de síntese em fase sólida descritos anteriormente para obter o tetrapéptido Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)-Lys(Boc) **4** em três preparações. Utilizou-se 1,00 g de resina e 1,5 eq. relativamente à funcionalização da resina de Fmoc-Lys(Boc)-OH, obtendo-se o respetivo *loading* expresso em mmol/g. O péptido **4** foi obtido na forma de um sólido incolor/cru (0,0927 g; 0,4615 mmol/g $\eta = 36\%$), (0,1172 g; 0,5675 mmol/g; $\eta = 37\%$) e (0,1201 g; 0,3852 mmol/g; $\eta = 56\%$).

RMN de ^1H (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ_{H} = 1,16-1,38 (28H, m, 2x-CH₃ Ala + γ -CH₂ Lys + δ -CH₂ Lys + 3xCH₃ Boc+ 3xCH₃ O*t*Bu); 1,45-1,58 (2H, m, β -CH₂ Lys); 2,39-2,48 (1H, m, β -CH₂ Asp); 2,69 (1H, dd, $J = 5,6$ Hz e 17,0 Hz, β -CH₂ Asp); 2,81-2,88 (2H, m, ϵ -CH₂ Lys); 3,82-3,90 (2H, m, α -CH Lys+ α -CH Ala); 4,28 (1H, s, α -CH Ala); 4,51-4,56 (1H, m, α -CH Asp); 6,65 (1H, s, NH Boc); 7,50 (1H, d, $J = 6,8$ Hz, NH Lys); 8,35 (1H, d, $J = 7,2$ Hz NH Asp ou NH Ala 2); 8,43 (1H, s, NH Asp ou NH Ala 2) ppm.

RMN de ^{13}C (DMSO-*d*₆, 100,6 MHz) δ_{C} = 18,36 (CH₃ Ala); 18,50 (CH₃ Ala); 22,26 (γ -CH₂ Lys); 27,68 (CH₃ Boc ou CH₃ O*t*Bu); 28,29 (CH₃ Boc ou CH₃ O*t*Bu); 29,40 (δ -CH₂ Lys); 31,54 (β -CH₂ Lys); 37,38 (β -CH₂ Asp); 39,50 (ϵ -CH₂ Lys); 48,55 (α -CH Ala 1 ou α -CH Ala 2); 48,84 (α -CH Ala 1 ou α -CH Ala 2); 49,65 (α -CH Asp); 53,33 (α -CH Lys), 77,34 (C(CH₃) Boc ou C(CH₃) O*t*Bu); 80,15 (C(CH₃) Boc ou C(CH₃) O*t*Bu); 155,55 (C=O Boc); 169,44 (C=O Asp); 171,45 (C=O Ala 1); 171,92 (C=O Ala 2); 172,14 (C=O O*t*Bu); 173,30 (C=O Lys) ppm.

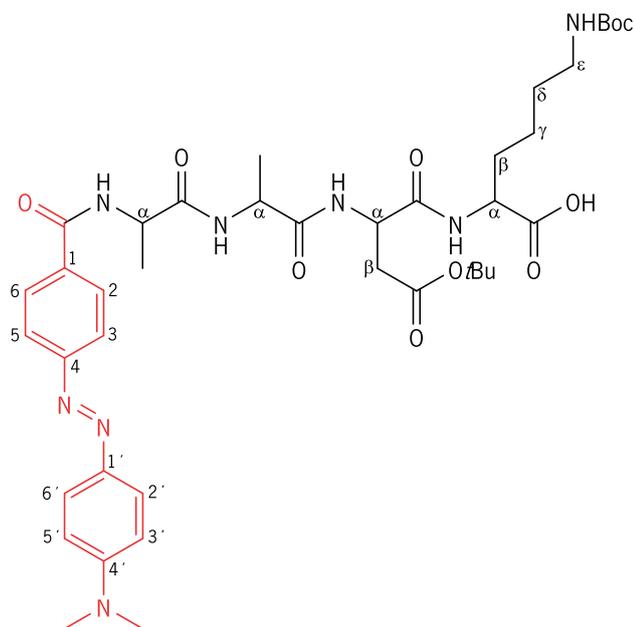
4.3.3. Síntese do tetrapéptido Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu), 5

Seguiram-se os procedimentos gerais de síntese em fase sólida descritos anteriormente para obter o tetrapéptido Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu) **5** em três preparações. Utilizou-se 1,00 g de resina e 1,5 eq. relativamente à funcionalização da resina da Fmoc-Asp(O*t*Bu)-OH, obtendo-se o respetivo *loading* expresso em mmol/g. O péptido foi obtido na forma de um sólido incolor/cru (0,5152 mmol/g; 0,0567 g; $\eta = 20\%$), (0,6451 mmol/g; 0,0761 g; $\eta = 21\%$) e (0,7225 mmol/g; 0,1070 g; $\eta = 26\%$).

Não foi possível caraterizar por RMN de ^1H e ^{13}C o péptido **5** na forma protegida devido a problemas de solubilidade na maior parte dos solventes deuterados testados, no entanto, foi possível fazer esta caraterização na forma desprotegida.

RMN de ^1H (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ_{H} = 1,20 (3H, d, $J = 7,2$ Hz, CH₃ Ala); 1,24 (3H, d, $J = 6,8$ Hz, CH₃ Ala); 1,32-1,38 (2H, m, γ -CH₂ Lys); 1,49-1,56 (2H, m, δ -CH₂ Lys); 1,66-1,71 (2H, m, β -CH₂ Lys); 2,56-2,69 (2H, m, β -CH₂ Asp); 2,74 (2H, s, ϵ -CH₂ Lys); 3,77 (1H, d, $J = 6,4$ Hz, α -CH Lys); 4,28 (1H, qui, α -CH Ala 2); 4,36 (1H, q, α -CH Ala 1); 4,51 (1H, q, α -CH Asp); 7,81 (1H, s, NH₃⁺ Lys lateral); 8,07-8,20 (3H, s largo NH₃⁺Lys); 8,08 (1H, d, $J = 8$ Hz, NH Asp ou NH Ala 2); 8,12 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, NH Asp ou NH Ala 2); 8,61 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, NH Ala 1) ppm.

RMN de ^{13}C (DMSO-*d*₆, 100,6 MHz) δ_{C} = 18,09 (CH₃ Ala); 18,20 (CH₃ Ala); 21,00 (γ -CH₂ Lys); 26,46 (δ -CH₂ Lys); 30,45 (β -CH₂ Lys); 36,00 (β -CH₂ Asp); 38,51 (ϵ -CH₂ Lys); 47,93 (α -CH Ala 2); 48,24 (α -CH Ala 1); 48,49 (α -CH Asp); 51,84 (α -CH Lys), 168,10 (C=O Lys); 171,40 (C=O Ala 1); 171,70 (C=O Ala 2); 171,89 (C=O Asp); 172,25 (C=O Asp lateral) ppm.

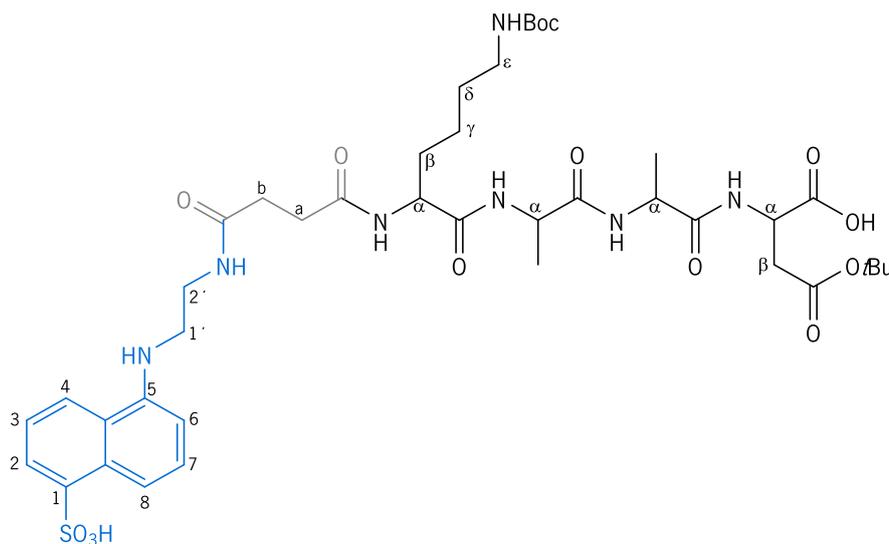
4.3.4. Síntese do Dabcyl-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)-Lys(Boc), 6

Seguiram-se os procedimentos gerais de síntese em fase sólida descritos anteriormente. Utilizou-se 1,00 g de resina e 2 eq. relativamente à funcionalização da resina da Fmoc-Lys(Boc)-OH, obtendo-se um *loading* de 0,4872 mmol/g. Após a desproteção do último aminoácido, dissolveu-se o Dabcyl **2a** (5 eq. relativamente ao *loading* da resina; 0,6561 g) em 6 mL de DMF seca, adicionou-se DIC (5 eq.) e Oyma (5 eq.) previamente dissolvidos na quantidade necessária de DMF seca. Deixou-se agitar durante 5 min. Adicionou-se a mistura à resina e submeteu-se a suspensão a quatro ciclos de irradiação por micro-ondas de 5 min cada (P= 50 W, T= 75 °C), deixando arrefecer entre os ciclos. Após o tempo de reação, lavou-se a resina com DMF (3x) e seguidamente com MeOH (3x). Repetiu-se este ciclo de lavagem seis vezes. O composto **6** foi obtido na forma de um sólido laranja (0,0821 g; η = 30%).

RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ_{H} = 1,05-1,29 (28H, m, 2xCH₃ Ala + γ -CH₂ Lys + δ -CH₂ Lys + 3xCH₃ Boc + 3xCH₃ O \bar{t} Bu); 1,49-1,59 (1H, m, β -CH₂ Lys); 1,62-1,70 (1H, m, β -CH₂ Lys); 2,39-2,50 (2H, m, β -CH₂ Asp); 2,78-2,89 (2H, m, ϵ -CH₂ Lys); 3,06 (6H, s, 2xCH₃DabcyI); 3,92-3,97 (1H, m, α -CH Lys); 4,24-4,31 (1H, m, α -CH Ala 2); 4,45-4,59 (2H, m, α -CH Ala 1+ α -CH Asp); 6,69 (1H, t, J = 5,2 Hz, NH Boc); 6,84 (2H, d, J = 9,2 Hz, H-3' +H-5'); 7,55 (1H, d, J = 7,2 Hz, NH Lys); 7,81 (4H, dd, J = 2,8 Hz e 9,2 Hz, H-3+H-5+H-2' +H-6'); 8,03 (2H, d, J = 8,8 Hz, H-2+H-6); 8,12 (1H, d, J = 7,2 Hz, NH Ala 2 ou NH Asp); 8,23 (1H, d, J = 8,4 Hz, NH Ala 2 ou NH Asp); 8,64 (1H, d, J = 6,8 Hz, NH Ala 1) ppm.

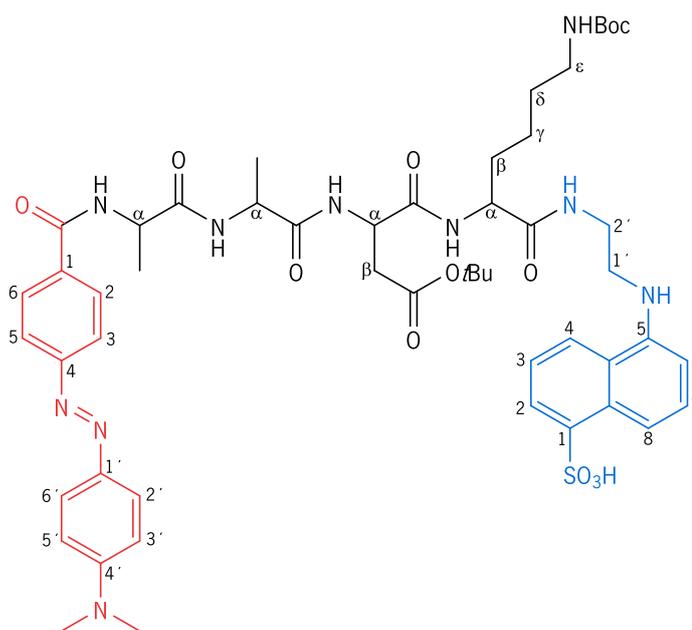
RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100,6 MHz) δ_{C} = 17,79 (CH₃ Ala); 18,31 (CH₃ Ala); 22,34 (γ -CH₂ Lys); 27,64 (CH₃ Boc ou CH₃ O \bar{t} Bu); 28,29 (CH₃ Boc ou CH₃ O \bar{t} Bu); 29,33 (δ -CH₂ Lys); 31,40 (β -CH₂ Lys); 37,37 (β -CH₂ Asp); 39,55 (ϵ -CH₂ Lys); 48,29 (α -CH Ala 2); 49,26 (α -CH Ala 1 ou α -CH Asp); 49,46 (α -CH Ala 1 ou α -CH Asp); 52,93 (α -CH Lys), 64,95 (2xCH₃ DabcyI); 77,36 (C(CH₃) Boc ou C(CH₃) O \bar{t} Bu); 80,18 (C(CH₃) Boc ou C(CH₃) O \bar{t} Bu); 111,61 (CH-3' +CH-5'); 121,44 (CH-3+CH-5); 125,15 (CH-2' +CH-6'); 128,73 (CH-2+CH-6); 134,27(C4); 142,68 (C4'); 152,90 (C1'); 154,12 (C1); 155,57 (C=O Boc); 165,73 (C=O Asp); 169,36 (C=O Ala 1); 169,42 (C=O Ala 2); 172,23 (C=O O \bar{t} Bu); 173,56 (C=O Lys) ppm.

4.3.5. Síntese do EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O \bar{t} Bu), 8



Seguiram-se os procedimentos gerais de síntese em fase sólida descritos anteriormente. Utilizou-se 1,00 g de resina e 2 eq. relativamente à funcionalização da resina da Fmoc-Asp(O*t*Bu)-OH, obtendo-se um *loading* da resina de 0,5207 mmol/g. Após a desproteção do último aminoácido, dissolveu-se o EDA **3** (4,5 eq. relativamente ao *loading* da resina; 0,8703 g) em 6 mL de DMF seca, adicionou-se DIC (5 eq.) e Oxyma (5 eq.) previamente dissolvidos na quantidade necessária de DMF seca. Deixou-se agitar durante 5 min. Adicionou-se a mistura à resina e submeteu-se a suspensão a dois ciclos de irradiação por micro-ondas de 5 min cada (P= 50 W, T= 75 °C), deixando arrefecer entre os ciclos. Após o tempo de reação, lavou-se a resina com DMF (3x) e seguidamente com MeOH (3x). Repetiu-se este ciclo de lavagem quatro vezes. O composto **8** foi obtido na forma de um óleo de for púrpura (0,1263 g; η = 30%).

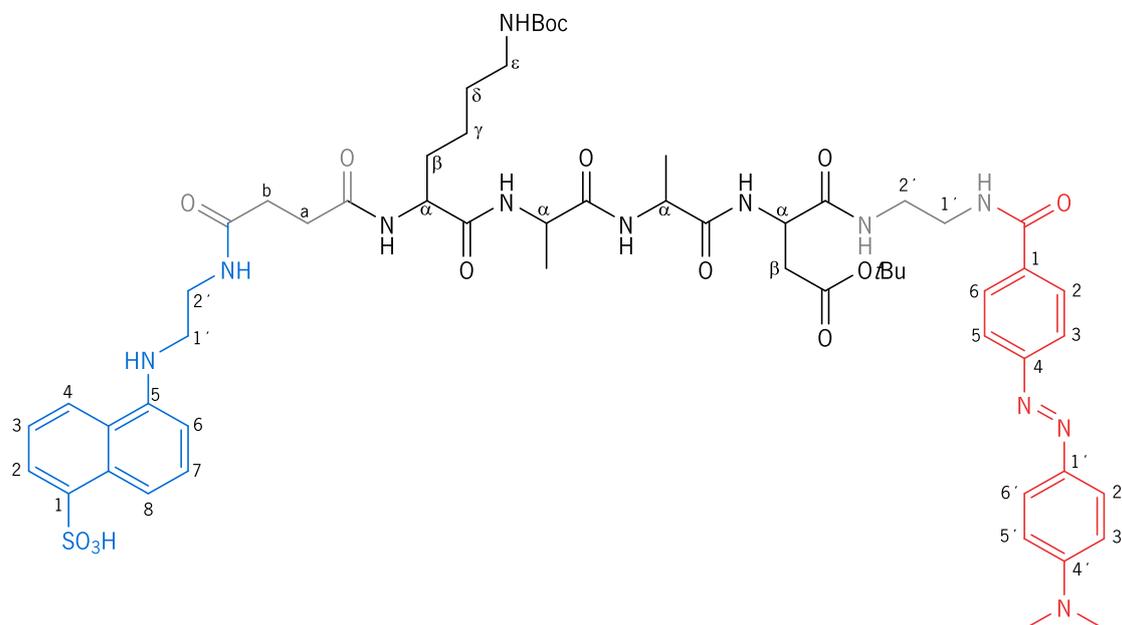
4.4. Síntese do DabcyL-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)-Lys(Boc)-Edans, **7**



Dissolveu-se o DabcyL-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)-Lys(Boc) **6** (0,0781 g; $9,63 \times 10^{-5}$ mol; 1 eq.) em DMF seca (5 mL) e colocou-se num banho de gelo. Após 5 min sob agitação, adicionou-se HOSu (0,0741 g; $6,43 \times 10^{-4}$ mol; 6,68 eq.) e depois de 10 min sob agitação, adicionou-se EDC.HCl (0,0849 g; $4,43 \times 10^{-4}$ mol; 4,61 eq.) e Et₃N (62 μ L). Deixou-se agitar durante 30 min e adicionou-se Edans (0,0525 g; $1,97 \times 10^{-4}$ mol; 2,05 eq.) e Et₃N (27 μ L). Deixou-se em agitação durante 5 h à temperatura ambiente.

O composto resultante impuro foi obtido na forma de um sólido laranja (0,3882 g) após evaporação sob vácuo da mistura reacional. Esta amostra foi suspensa em 10 mL de uma mistura de ACN/H₂O (3:1) e purificada por HPLC usando uma coluna Europa C-18 semipreparativa. A amostra e o eluente (mistura de ACN/H₂O (3:1)) foram filtrados num filtro Milipore do tipo HN 0,45 µm e desgaseificados por ultra-sons antes da sua utilização. O cromatograma foi traçado por deteção de absorção UV/Vis no comprimento de onda 432 nm e aplicando um fluxo de 1,0 mL/min. Foram realizadas 10 injeções e isolaram-se catorze frações com tempos de retenção diferentes. Antes da liofilização das frações, procedeu-se à filtração da fração com um tempo de retenção médio de 16,33 min que apresentava um sólido no fundo do tubo de Falcon. Este sólido de cor laranja revelou ser o composto **7** (0,0050 g; η = 4,9%).

RMN de ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ_H = 1,22-1,35 (28H, m, 2xCH₃ Ala + γ-CH₂ Lys + δ-CH₂ Lys + 3xCH₃ Boc + 3xCH₃ O*t*Bu); 1,47-1,65 (1H, m, β-CH₂ Lys); 1,66-1,68 (1H, m, β-CH₂ Lys); 2,44-2,54 (2H, m, β-CH₂ Asp); 2,58-2,71 (2H, m, ε-CH₂ Lys); 3,07 (6H, s, 2xCH₃ DabcyI); 3,33-3,43 (4H, m, CH₂-1' +CH₂-2'); 4,15-4,19 (1H, m, α-CH Lys); 4,26 (1H, t, *J*=7,2 Hz, α-CH Ala 2); 4,46-4,56 (2H, m, α-CH Ala 1 + α-CH Asp); 6,63-6,68 (2H, t, *J*= 5,2 Hz, NH Boc + 2'-NH Edans); 6,84 (2H, d, *J*= 9,2 Hz, H-3' +H-5' DabcyI); 7,17 (1H, d, *J*= 8,0 Hz, H-4 Edans); 7,27-7,34 (2H, m, H-3+H-7 Edans); 7,57 (1H, d, *J*= 8,0 Hz, NH Lys); 7,61-7,83 (6H, m, H-3+H-5+H-2' +H-6' DabcyI + H-6+H-8 Edans); 8,02 (2H, dd, *J*= 2,0 Hz e 6,8 Hz, H-2+H-6 DabcyI); 8,10-8,14 (2H, m, NH Ala 2 ou NH Asp + H-2 Edans); 8,17 (1H, d, *J*= 8,0 Hz, NH Ala 2 ou NH Asp); 8,24 (1H, s, 5-NH Edans); 8,59 (1H, d, *J*= 7,2 Hz, NH Ala 1) ppm.

4.5. Síntese do EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)-DBA, **9**

Dissolveu-se o EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu) **8** (0,0922 g; $1,01 \times 10^{-4}$ mol; 1 eq.) em DMF seca (5 mL) e colocou-se num banho de gelo. Após 5 min sob agitação, adicionou-se HOSu (0,0775 g; $6,74 \times 10^{-4}$ mol; 6,68 eq.) e depois de 10 min sob agitação, adicionou-se EDC.HCl (0,0892 g, $4,65 \times 10^{-4}$ mol; 4,61 eq.) e Et₃N (65 μ L). Deixou-se agitar durante 30 min e adicionou-se DBA **2b** (0,0644 g; $2,07 \times 10^{-4}$ mol; 2,05 eq) e deixou-se em agitação durante 7 h à temperatura ambiente.

O composto resultante impuro foi obtido na forma de um óleo de cor púrpura (0,3792 g). Esta amostra foi suspensa em 10 mL de uma mistura de ACN/H₂O (3:1) e purificada por HPLC usando uma coluna Europa C-18 semipreparativa. A amostra e o eluente (mistura de ACN/H₂O (3:1) foram filtrados num filtro Milipore do tipo HN 0,45 μ m e degaseificados por ultra-sons antes da sua utilização. O cromatograma foi traçado por deteção de absorção UV/Vis no comprimento de onda 432 nm e aplicando um fluxo de 1,0 mL/min. Foram realizadas 10 injeções e isolaram-se sete frações com tempos de retenção diferentes. Após a liofilização, obteve-se o composto **9** impuro com um tempo de retenção médio de 16,18 min. Este composto foi purificado em cromatografia em coluna de sílica gel usando como eluente uma mistura de AcOEt/MeOH (9:1), no entanto, obteve-se o 0,0054 g do composto **9** ainda com impurezas, o que impediu a atribuição inequívoca dos sinais no espetro de RMN de ¹H e ¹³C.

4.6. FRET em solução com o par Edans/Dabcyl

4.6.1. Estudo do *quenching* intermolecular de fluorescência do Edans com o Dabcyl

As medições espectrofotométricas e espectrofluorimétricas foram realizadas com soluções desgaseificadas (por ultrasons) em tampão fosfato de pH 7,5 (0,1 M NaH_2PO_4 e 0,1 M Na_2HPO_4). Nestas medições foram usadas células de quartzo de absorção e fluorescência com percurso ótico de 1 cm.

Espetroscopia de absorção no UV/Vis e de fluorescência do Edans

Preparou-se uma solução de Edans com concentração 1×10^{-3} M em tampão fosfato. Por diluição da solução concentrada, preparou-se uma solução de Edans em tampão fosfato com concentração de 1×10^{-5} M. Traçou-se o espectro de absorção UV/Vis entre 300 e 700 nm e determinou-se o comprimento de onda máximo de absorção (λ_{abs}) e o respectivo valor de absorvância.

Traçou-se o espectro de fluorescência da solução de Edans com concentração de 1×10^{-5} M em tampão fosfato, excitando no comprimento de onda de 342 nm. Determinou-se o comprimento de onda máximo de emissão (λ_{emi}), a respectiva área da curva de fluorescência e o desvio de Stokes.

Espetroscopia de absorção no UV/Vis do Dabcyl

Preparou-se uma solução de Dabcyl **2a** com concentração 1×10^{-3} M em tampão fosfato. Por diluição da solução concentrada, preparou-se uma solução de Dabcyl **2a** em tampão fosfato com concentração de 1×10^{-5} M. Traçou-se o espectro de absorção UV/Vis entre 300 e 700 nm e determinou-se o λ_{abs} e o respectivo valor de absorvância.

Estudo do *quenching* intermolecular de fluorescência do Edans com o Dabcyl

Por diluição da solução de Edans em tampão fosfato com concentração 1×10^{-5} M, preparou-se uma solução de Edans em tampão fosfato com concentração de 5×10^{-6} M. Traçou-se o espectro de fluorescência da solução de Edans com concentração de 5×10^{-6} M em tampão fosfato, excitando no comprimento de onda de 342 nm. Determinou-se o λ_{emi} e a respectiva área da curva de fluorescência.

De seguida, adicionou-se a esta solução 10 μL da solução de Dabcyl **2a** com a concentração 1×10^{-3} M em tampão fosfato. Homogeneizou-se a solução, esperou-se 3 min e traçou-se o espectro de fluorescência desta solução, excitando no comprimento de onda de 342 nm. Determinou-se o λ_{em} e a respetiva área da curva de fluorescência. Repetiu-se este procedimento 10 vezes com adição sucessiva de Dabcyl **2a**.

Por fim, para avaliar se era relevante o tempo de interação entre o Edans e o Dabcyl **2a**, entre a adição e obtenção do espectro, para a solução contendo 100 μL , traçou-se o espectro de fluorescência após 3, 10 e 15 min, excitando no comprimento de onda de 342 nm. Determinou-se o λ_{em} e a respetiva área da curva de fluorescência.

4.6.2. Espectroscopia de absorção no UV/Vis e de fluorescência de compostos sintetizados

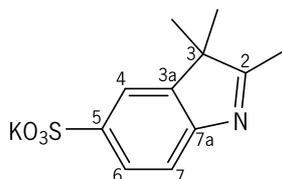
Foram preparadas soluções na gama dos 10^{-5} M dos compostos Dabcyl-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu) **6**, Dabcyl-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu)-Lys(Boc)-Edans **7** e EDA-Lys(Boc)-Ala-Ala-Asp(O*t*Bu) **8** em tampão de fosfato de pH=7,5. Traçou-se o espectro de absorção UV/Vis entre 300 e 700 nm e determinou-se o λ_{abs} e o respetivo valor de absorvância.

Traçou-se o espectro de fluorescência dos compostos **7** e **8**, excitando no comprimento de onda de 342 nm. Determinou-se o λ_{em} e a respetiva área da curva de fluorescência.

4.7. Síntese de intermediários do fluoróforo Cy5 e do *quencher* BHQ-3

4.7.1. Síntese de intermediários para a obtenção de cianinas do tipo Cy5

4.7.1.1. 2,3,3-Trimetil-3H-indole-5-sulfonato de potássio (10 a)

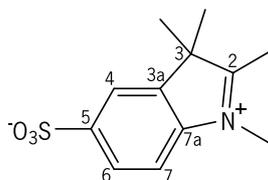


Dissolveu-se o ácido *para*-hidrazinobenzeno sulfónico (25,004 g; $1,21 \times 10^{-1}$ mol; 1 eq.) e a 3-metil-2-butanona (40 mL; $3,63 \times 10^{-1}$ mol; 3 eq.) em AcOH (75 mL). Esta mistura ficou sob refluxo durante 3 h sob agitação a 118 °C.

Após este período de tempo, arrefeceu-se a solução a 4 °C e o produto final foi recolhido por filtração e lavado com metanol. A este resíduo obtido adicionou-se lentamente solução saturada de KOH em isopropanol. O produto foi recolhido por filtração e lavado com isopropanol e por fim com éter etílico. Colocou-se o sólido obtido de cor rosa claro na estufa a 45 °C durante a noite (8,4182 g; $\eta = 27\%$).

RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) δ_{H} = 1,38 (6H, s, 2x-C3-CH₃); 7,60 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-7); 7,83 (1H, dd, $J = 1,6$ e 8,4 Hz, H-6); 7,88 (1H, s, H-4) ppm. O grupo C2-CH₃ não foi visível em D_2O , tal como referido na literatura.¹⁰⁸

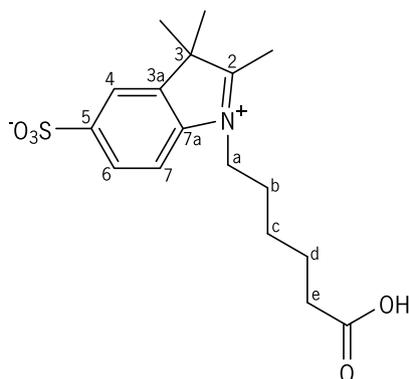
4.7.1.2. 1-Metil-2,3,3-trimetil-3H-indolium-5-sulfonato (10 b)



Dissolveu-se o composto **10 a** (4,0011 g; $1,56 \times 10^{-2}$ mol; 1 eq.) em iodometano (15 mL) e deixou-se a mistura reacional sob agitação a 40 °C por 6 h. O precipitado foi recolhido por filtração e lavado com acetona. Colocou-se o produto de cor púrpura na estufa a 45 °C e posteriormente no exsicador. Não foi possível determinar a massa do composto **10 b**, por ser um sólido oleoso que ficou retido nas paredes do funil utilizado.

RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) δ_{H} = 1,45 (6H, m, 2x-C3-CH₃); 3,86 (3H, s, N-CH₃); 7,39 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-7); 7,62 (1H, dd, J = 1,6 e 8,4 Hz, H-6); 7,67 (1H, d, J = 1,6 Hz, H-4) ppm. O grupo C2-CH₃ não foi visível em D_2O , tal como referido na literatura.¹⁰⁸

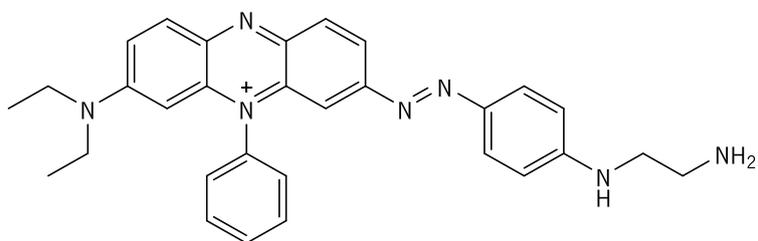
4.7.1.3. 1-(5-Carboxipentil)-2,3,3-trimetil-3H-indolium-5-sulfonato (10 c)



Dissolveu-se o composto **10 a** (4,0008 g; $1,18 \times 10^{-2}$ mol; 1 eq.) e o ácido 6-bromohexanóico (3,2575 g; $1,67 \times 10^{-2}$ mol; 1,5 eq.) em clorobenzeno (35 mL) e deixou-se a mistura reacional sob agitação a 110 °C por 12 h. O produto foi decantado, o residuo foi triturado com isopropanol, recolhido por filtração e lavado com isopropanol. Colocou-se o produto de cor púrpura na estufa a 45 °C e posteriormente no exsicador. Não foi possível determinar a massa do composto **10 c**, por ser um sólido oleoso que ficou retido nas paredes do funil utilizado.

RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) δ_{H} = 1,40-1,45 (2H, m, CH₂-c); 1,57-1,64 (8H, m, 2x-C3-CH₃+CH₂-d); 1,93-2,03 (2H, m, CH₂-b); 2,34 (2H, t, J = 7,2 Hz, CH₂-e); 4,47 (2H, t, J = 7,6 Hz, CH₂-a); 7,87 (1H, d, J = 8,8 Hz, H-7); 8,00 (1H, dd, J = 1,6 e 8,4 Hz, H-6); 8,09 (1H, d, J = 1,6 Hz, H-4) ppm. O grupo C2-CH₃ não foi visível em D_2O , tal como referido na literatura.¹⁰⁸

4.7.2. Síntese do BHQ-3, 11



Dissolveu-se, sob agitação e à temperatura ambiente, o metileno de violeta 3RAX (0,0502 g; $1,32 \times 10^{-4}$ mol; 1 eq.) numa solução de HCl 1 M (269 μ L) e HCl 6 M (14 μ L). Arrefeceu-se a solução utilizando um banho de gelo, adicionou-se uma solução a 0 °C de nitrito de sódio (0,0091 g; $1,32 \times 10^{-4}$ mol; 1 eq.) em ACN seco (0,5 mL) e manteve-se sob agitação durante 30 min à temperatura ambiente.

Adicionou-se a *N'*-feniletano-1,2-diamina (17 μ L; $1,32 \times 10^{-4}$ mol; 1 eq) ao sal de diazónio (solução anterior), lentamente com agitação e à temperatura ambiente, juntamente com ACN seco (0,5 mL). Por falta de tempo, não foi possível fazer a purificação por HPLC semi-preparativo.

Capítulo 5: Referências Bibliográficas

- (1) Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Mathers, C.; Parkin, D. M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Estimating the Global Cancer Incidence and Mortality in 2018: GLOBOCAN Sources and Methods. *Int. J. Cancer* **2019**, *144*, 1941–1953.
- (2) Arvelo, F.; Sojo, F.; Cotte, C. Biology of Colorectal Cancer. *Ecancermedicalscience* **2015**, *9*, 196–201.
- (3) Cisterna, B. A.; Kamaly, N.; Choi, W. Il; Tavakkoli, A.; Farokhzad, O. C.; Vilos, C. Targeted Nanoparticles for Colorectal Cancer. *Nanomedicine* **2016**, *11*, 2443–2456.
- (4) Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424.
- (5) Senapati, S.; Mahanta, A. K.; Kumar, S.; Maiti, P. Controlled Drug Delivery Vehicles for Cancer Treatment and Their Performance. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2018**, *3*, 1–19.
- (6) Mohelnikova-Duchonova, B.; Melichar, B.; Soucek, P. FOLFOX/FOLFIRI Pharmacogenetics: The Call for a Personalized Approach in Colorectal Cancer Therapy. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 10316–10330.
- (7) Arruebo, M.; Vilaboa, N.; Sáez-Gutierrez, B.; Lambea, J.; Tres, A.; Valladares, M.; González-Fernández, A. Assessment of the Evolution of Cancer Treatment Therapies. *Cancers* **2011**, *3*, 3279–3330.
- (8) Marabelle, A.; Kohrt, H.; Caux, C.; Levy, R. Intratumoral Immunization: A New Paradigm for Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 1747–1756.
- (9) Thakor, A. S.; Gambhir, S. S. Nanooncology: The Future of Cancer Diagnosis and Therapy. *CA Cancer J. Clin.* **2013**, *63*, 395–418.
- (10) Wang, A. Z.; Gu, F.; Zhang, L.; Chan, J. M.; Radovic-Moreno, A.; Shaikh, M. R.; Farokhzad, O. C.; Farokhzad, O. C. Biofunctionalized Targeted Nanoparticles for Therapeutic Applications. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2008**, *8*, 1063–1070.
- (11) Wang, E. C.; Wang, A. Z. Nanoparticles and Their Applications in Cell and Molecular Biology. *Integr. Biol.* **2014**, *6*, 9–26.
- (12) Guinn, B.; Kasahara, N.; Farzaneh, F.; Habib, N. A.; Norris, J. S.; Deisseroth, A. B. Recent Advances and Current Challenges in Tumor Immunology and Immunotherapy. *Mol. Ther.* **2007**, *15*, 1065–1071.

- (13) Vanneman, M.; Dranoff, G. Combining Immunotherapy and Targeted Therapies in Cancer Treatment. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 237–251.
- (14) Larimer, B. M.; Wehrenberg-Klee, E.; Dubois, F.; Mehta, A.; Kalomeris, T.; Flaherty, K.; Boland, G.; Mahmood, U. Granzyme B PET Imaging as a Predictive Biomarker of Immunotherapy Response. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 2318–2327.
- (15) Cullen, S. P.; Brunet, M.; Martin, S. J. Granzymes in Cancer and Immunity. *Cell Death Differ.* **2010**, *17*, 616–623.
- (16) Bird, C. H.; Hitchen, C.; Prescott, M.; Harper, I.; Bird, P. I. Immunodetection of Granzyme B Tissue Distribution and Cellular Localisation. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *844*, 237–250.
- (17) Ida, H.; Utz, P. J.; Anderson, P.; Eguchi, K. Granzyme B and Natural Killer (NK) Cell Death. *Mod. Rheumatol.* **2005**, *15*, 315–322.
- (18) Andrade, F.; Casciola-Rosen, L. A.; Rosen, A. Granzyme B-Induced Cell Death. *Acta Haematol.* **2004**, *111*, 28–41.
- (19) Hiebert, P. R.; Granville, D. J. Granzyme B in Injury, Inflammation, and Repair. *Trends Mol. Med.* **2012**, *18*, 732–741.
- (20) Estébanez-Perpiñá, E.; Fuentes-Prior, P.; Belorgey, D.; Braun, M.; Kiefersauer, R.; Maskos, K.; Huber, R.; Rubin, H.; Bode, W. Crystal Structure of the Caspase Activator Human Granzyme B, a Proteinase Highly Specific for an Asp-P1 Residue. *Biol. Chem.* **2000**, *381*, 1203–1214.
- (21) Harris, J. L.; Peterson, E. P.; Hudig, D.; Thornberry, N. A.; Craik, C. S. Definition and Redesign of the Extended Substrate Specificity of Granzyme B. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 27364–27373.
- (22) Waugh, S. M.; Craik, C. S.; Harris, J. L.; Fletterick, R. The Structure of the Pro-Apoptotic Protease Granzyme B Reveals the Molecular Determinants of Its Specificity. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 762–765.
- (23) Trapani, J. A. Granzymes: A Family of Lymphocyte Granule Serine Proteases. *Genome Biol.* **2001**, *2*, 3014.1-3014.7.
- (24) Rotonda, J.; Garcia-Calvo, M.; Bull, H. G.; Geissler, W. M.; McKeever, B. M.; Willoughby, C. A.; Thornberry, N. A.; Becker, J. W. The Three-Dimensional Structure of Human Granzyme B Compared to Caspase-3, Key Mediators of Cell Death with Cleavage Specificity for Aspartic Acid in P1. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 357–368.
- (25) Mahrus, S.; Craik, C. S. Selective Chemical Functional Probes of Granzymes A and B Reveal

- Granzyme B is a Major Effector of Natural Killer Cell-Mediated Lysis of Target Cells. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 567–577.
- (26) Ruggles, S. W.; Fletterick, R. J.; Craik, C. S. Characterization of Structural Determinants of Granzyme B Reveals Potent Mediators of Extended Substrate Specificity. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 30751–30759.
- (27) Grahn, S.; Ullmann, D.; Jakubke, H.-D. Design and Synthesis of Fluorogenic Trypsin Peptide Substrates Based on Resonance Energy Transfer. *Anal. Biochem.* **1998**, *265*, 225–231.
- (28) Hagn, M.; Sutton, V. R.; Trapani, J. A. A Colorimetric Assay that Specifically Measures Granzyme B Proteolytic Activity: Hydrolysis of Boc-Ala-Ala-Asp-S-Bzl. *J. Vis. Exp.* **2014**, *93*, e52419.
- (29) Nie, Z.; Phenix, B. N.; Lum, J. J.; Alam, A.; Lynch, D. H.; Beckett, B.; Krammer, P. H.; Sekaly, R. P.; Badley, A. D. HIV-1 Protease Processes Procaspase 8 to Cause Mitochondrial Release of Cytochrome c, Caspase Cleavage and Nuclear Fragmentation. *Cell Death Differ.* **2002**, *9*, 1172–1184.
- (30) Li, J.; Figueira, S. K.; Vrazo, A. C. A.; Binkowski, B. F.; Butler, B. L.; Tabata, Y.; Filipovich, A.; Jordan, M. B.; Risma, K. A. Real-Time Detection of CTL Function Reveals Distinct Patterns of Caspase Activation Mediated by Fas versus Granzyme B. *J. Immunol.* **2014**, *193*, 519–528.
- (31) Valeur, E.; Bradley, M. Amide Bond Formation: Beyond the Myth of Coupling Reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606–631.
- (32) Prasad, K. V. S. R. G.; Bharathi, K.; Haseena Banu, B. Applications of Peptide Coupling Reagents - An Update. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2011**, *8*, 108–119.
- (33) Al-Warhi, T. I.; Al-Hazimi, H. M. A.; El-Faham, A. Recent Development in Peptide Coupling Reagents. *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, *16*, 97–116.
- (34) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827–10852.
- (35) Han, S.-Y.; Kim, Y.-A. Recent Development of Peptide Coupling Reagents in Organic Synthesis. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447–2467.
- (36) Ulijn, R. V.; Smith, A. M. Designing Peptide Based Nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 664.
- (37) El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557–6602.

- (38) Joullie, M. M.; Lassen, K. M. Evolution of Amide Bond Formation. *Arkivoc* **2010**, *2010*, 189–250.
- (39) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- (40) Pedersen, S. L.; Tofteng, A. P.; Malik, L.; Jensen, K. J. Microwave Heating in Solid-Phase Peptide Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1826–1844.
- (41) Benoiton, N. L. *Chemistry of Peptide Synthesis*; Boca Raton: CRC Press, **2006**, pp. 125-139.
- (42) Kates, S. A.; Albericio, F. *Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide*; New York: Marcel Dekker, **2000**, pp. 1-30, pp. 79-91.
- (43) Kent, S. B. H. Chemical Synthesis of Peptides and Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 957–989.
- (44) Carpino, L. A.; Ghassemi, S.; Ionescu, D.; Ismail, M.; Sadat-Aalae, D.; Truran, G. A.; Mansour, E. M. E.; Siwruk, G. A.; Eynon, J. S.; Morgan, B. Rapid, Continuous Solution-Phase Peptide Synthesis: Application to Peptides of Pharmaceutical Interest. *Org. Process Res. Dev.* **2003**, *7*, 28–37.
- (45) Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*; Boca Raton: CRC Press LCC, **1997**, pp. 99-105, pp. 139-174.
- (46) *Peptide User Guide: A Brief Introduction into Synthesis Methods, Handling and Design of Peptides*; Bachem Holding AG, **2009**.
- (47) Albericio, F.; Lloyd-Williams, P.; Giralt, E. Convergent Solid-Phase Peptide Synthesis. *Methods Enzymol.* **1997**, *289*, 313–336.
- (48) Isidro-Llobet, A.; Álvarez, M.; Albericio, F. Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455–2504.
- (49) Hjørringgaard, C. U.; Pedersen, J. M.; Vosegaard, T.; Nielsen, N. C.; Skrydstrup, T. An Automatic Solid-Phase Synthesis of Peptaibols. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1329–1332.
- (50) Fields, G. B. Introduction to Peptide Synthesis. In *Current Protocols in Protein Science*; Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. **2012**, pp. 1.8.1.1.-1.8.1.13.
- (51) Mäde, V.; Els-Heindl, S.; Beck-Sickinger, A. G. Automated Solid-Phase Peptide Synthesis to Obtain Therapeutic Peptides. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1197–1212.
- (52) Jones, J. *Amino Acid and Peptide Synthesis*; New York: Oxford University Press, **1997**, pp. 52.
- (53) Scott, P. J. H. *Linker Strategies in Solid-Phase Organic Synthesis*; Chichester: John Wiley &

- Sons, Ltd, **2009**, pp. 3-23.
- (54) Amblard, M.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Subra, G. Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. *Mol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 239–254.
- (55) Guillier, F.; Orain, D.; Bradley, M. Linkers and Cleavage Strategies in Solid-Phase Organic Synthesis and Combinatorial Chemistry. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091–2158.
- (56) Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J.; Khrestchatskiy, M. Synthetic Therapeutic Peptides: Science and Market. *Drug Discov. Today* **2010**, *15*, 40–56.
- (57) Yu, H. M.; Chen, S. T.; Wang, K. T. Enhanced Coupling Efficiency in Solid-Phase Peptide Synthesis by Microwave Irradiation. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4781–4784.
- (58) Chandrudu, S.; Simerska, P.; Toth, I. Chemical Methods for Peptide and Protein Production. *Molecules* **2013**, *18*, 4373–4388.
- (59) Molteni, V.; Ellis, D. Recent Advances in Microwave-Assisted Synthesis of Heterocyclic Compounds. *Curr. Org. Synth.* **2005**, *2*, 333–375.
- (60) Hayes, B. L. *Microwave Synthesis : Chemistry at the Speed of Light*, Matthews, NC: CEM Pub, **2002**.
- (61) Wathey, B.; Tierney, J.; Lidström, P.; Westman, J. The Impact of Microwave-Assisted Organic Chemistry on Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2002**, *7*, 373–380.
- (62) Palasek, S. A.; Cox, Z. J.; Collins, J. M. Limiting Racemization and Aspartimide Formation in Microwave-Enhanced Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*, 143–148.
- (63) Miksa, B. Fluorescent Dyes Used in Polymer Carriers as Imaging Agents in Anticancer Therapy. *Med. Chem.* **2016**, *6*, 611–639.
- (64) Gonçalves, M. S. T. Fluorescent Labeling of Biomolecules with Organic Probes. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 190–212.
- (65) Johansson, M. K.; Cook, R. M. Intramolecular Dimers: A New Design Strategy for Fluorescence-Quenched Probes. *Chem. A Eur. J.* **2003**, *9*, 3466–3471.
- (66) Katherine Johansson, M. Choosing Reporter-Quencher Pairs for Efficient Quenching Through Formation of Intramolecular Dimers. *Fluoresc. Energy Transf. Nucleic Acid Probes* **2006**, *335*, 17–30.
- (67) Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*; Weinheim: Wiley-VCH, **2012**, pp. 53-61, pp. 143-154.
- (68) Walla, P. J. *Modern Biophysical Chemistry: Detection and Analysis of Biomolecules*; Weinheim: Wiley-VCH, **2014**, pp. 33-39, pp. 84-98.

- (69) Albani, J. R. *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*, Oxford: Blackwell Science, **2007**, pp. 139-159, pp. 198-202.
- (70) Marras, S. A. E. Selection of Fluorophore and Quencher Pairs for Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes. *Methods Mol Biol.* **2006**, *335*, 3–16.
- (71) Chen, T.; He, B.; Tao, J.; He, Y.; Deng, H.; Wang, X.; Zheng, Y. Application of Förster Resonance Energy Transfer (FRET) Technique to Elucidate Intracellular and *in vivo* Biofate of Nanomedicines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *143*, 177–205.
- (72) Liao, J.; Song, Y.; Liu, Y. A New Trend to Determine Biochemical Parameters by Quantitative FRET Assays. *Acta Pharmacol. Sin.* **2015**, *36*, 1408–1415.
- (73) Neefjes, J.; Dantuma, N. P. Fluorescent Probes for Proteolysis: Tools for Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 58–69.
- (74) Sekar, R. B.; Periasamy, A. Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy Imaging of Live Cell Protein Localizations. *J. Cell Biol.* **2003**, *160*, 629–633.
- (75) Didenko, V. V. DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications. *Biotechniques* **2001**, *31*, 1106–1121.
- (76) Drake, C. R.; Miller, D. C.; Jones, E. F. Activatable Optical Probes for the Detection of Enzymes. *Curr. Org. Synth.* **2011**, *8*, 498–520.
- (77) Latt, S. A.; Auld, D. S.; Vallee, B. L. Fluorescence Determination of Carboxypeptidase A Activity Based on Electronic Energy Transfer. *Anal. Biochem.* **1972**, *50*, 56–62.
- (78) Carmel, A.; Zur, M.; Yaron, A.; Katchalski, E. Use of Substrates with Fluorescent Donor and Acceptor Chromophores for the Kinetic Assay of Hydrolases. *FEBS Lett.* **1973**, *30*, 11–14.
- (79) Matayoshi, E.; Wang, G.; Krafft, G.; Erickson, J. Novel Fluorogenic Substrates for Assaying Retroviral Proteases by Resonance Energy Transfer. *Science* **1990**, *247*, 954–958.
- (80) Wang, G. T.; Matayoshi, E.; Jan Huffaker, H.; Krafft, G. A. Design and Synthesis of New Fluorogenic HIV Protease Substrates Based on Resonance Energy Transfer. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6493–6496.
- (81) Holskin, B. P.; Bukhtiyarova, M.; Dunn, B. M.; Baur, P.; Dechastonay, J.; Pennington, M. W. A Continuous Fluorescence-Based Assay of Human Cytomegalovirus Protease Using a Peptide Substrate. *Anal. Biochem.* **1995**, *227*, 148–155.
- (82) Taliani, M.; Bianchi, E.; Narjes, F.; Fossatelli, M.; Urbani, A.; Steinkühler, C.; De Francesco, R.; Pessi, A. A Continuous Assay of Hepatitis C Virus Protease Based on Resonance Energy Transfer Depsipeptide Substrates. *Anal. Biochem.* **1996**, *240*, 60–67.

- (83) Taliani, M.; Bianchi, E.; Pessi, A. An Improved Solid-Phase Synthesis of Resonance Energy Transfer Fluorescent Peptides and Depsipeptides Employing the EDANS/DABCYL Donor-Acceptor Pair. *Letts. Pept. Sci.* **1997**, *4*, 101–106.
- (84) Shuai Chen, Li-li Chen, Haibin Luo, Tao Sun, Jing Chen, Fei Ye, Jian-hua Cai, Jing-kang Shen, Xu Shen, H. J. Enzymatic Activity Characterization of SARS Coronavirus 3C-like Protease by Fluorescence Resonance Energy Transfer Technique. *Acta Pharmacol. Sin.* **2005**, *26*, 99–106.
- (85) Ferreira, A. V.; Perelshtein, I.; Perkash, N.; Gedanken, A.; Cunha, J.; Cavaco-Paulo, A. Detection of Human Neutrophil Elastase (HNE) on Wound Dressings as Marker of Inflammation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 1443–1454.
- (86) Chevalier, A.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. Straightforward Synthesis of Bioconjugatable Azo Dyes. Part 1: Black Hole Quencher-1 (BHQ-1) Scaffold. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 6759–6763.
- (87) Sapsford, K. E.; Berti, L.; Medintz, I. L. Materials for Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis: Beyond Traditional Donor–Acceptor Combinations. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2006**, *45*, 4562–4589.
- (88) Chevalier, A.; Massif, C.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. Bioconjugatable Azo-Based Dark-Quencher Dyes: Synthesis and Application to Protease-Activatable Far-Red Fluorescent Probes. *Chem. - A Eur. J.* **2013**, *19*, 1686–1699.
- (89) Yi, X.; Wang, F.; Qin, W.; Yang, X.; Yuan, J. Near-Infrared Fluorescent Probes in Cancer Imaging and Therapy: An Emerging Field. *Int. J. Nanomedicine* **2014**, *9*, 1347–1365.
- (90) Tsai, C. L.; Chen, J. C.; Wang, W. J. Near-Infrared Absorption Property of Biological Soft Tissue Constituents. *J. Med. Biol. Eng.* **2001**, *21*, 7–14.
- (91) Lavis, L. D.; Raines, R. T. Bright Ideas for Chemical Biology. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142–155.
- (92) Lo Presti, M.; Martínez-Mañez, R.; Ros-Lis, J. V.; Batista, R. M. F.; Costa, S. P. G.; Raposo, M. M. M.; Sancenón, F. A Dual Channel Sulphur-Containing a Macrocyclic Functionalised BODIPY Probe for the Detection of Hg (II) in a Mixed Aqueous Solution. *New J. Chem.* **2018**, *42*, 7863–7868.
- (93) Dost, T. L.; Gressel, M. T.; Henary, M. Synthesis and Optical Properties of Pentamethine Cyanine Dyes With Carboxylic Acid Moieties. *Anal. Chem. Insights* **2017**, *12*, 1–6.
- (94) Mojzych, M.; Henary, M. Synthesis of Cyanine Dyes. *Top. Heterocycl. Chem.* **2008**, *14*, 1–9.
- (95) An, F.-F.; Kommidi, H.; Chen, N.; Ting, R. A Conjugate of Pentamethine Cyanine and ¹⁸F as

- a Positron Emission Tomography/Near-Infrared Fluorescence Probe for Multimodality Tumor Imaging. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1214.
- (96) Zhang, J.; Chai, X.; He, X.-P.; Kim, H.-J.; Yoon, J.; Tian, H. Fluorogenic Probes for Disease-Relevant Enzymes. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 683–722.
- (97) Dorjsuren, D.; Wilson, D. M.; Beard, W. A.; McDonald, J. P.; Austin, C. P.; Woodgate, R.; Wilson, S. H.; Simeonov, A.; Simeonov, A. A Real-Time Fluorescence Method for Enzymatic Characterization of Specialized Human DNA Polymerases. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1–12.
- (98) Simard, B.; Tomanek, B.; van Veggel, F. C. J. M.; Abulrob, A. Optimal Dye-Quencher Pairs for the Design of an “Activatable” Nanoprobe for Optical Imaging. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, *12*, 1824–1829.
- (99) Farzan, V. M.; Aparin, I. O.; Veselova, O. A.; Podkolzin, A. T.; Shipulin, G. A.; Korshun, V. A.; Zatsepin, T. S. Cy5/BHQ Dye-Quencher Pairs in Fluorogenic QPCR Probes: Effects of Charge and Hydrophobicity. *Anal. Methods* **2016**, *8*, 5826–5831.
- (100) Han, G. Y. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404–3409.
- (101) Chevalier, A.; Renard, P. Y.; Romieu, A. Azo-Based Fluorogenic Probes for Biosensing and Bioimaging: Recent Advances and Upcoming Challenges. *Chem. Asian J.* **2017**, *12*, 2008–2028.
- (102) Luna, O. F.; Gomez, J.; Cárdenas, C.; Albericio, F.; Marshall, S. H.; Guzmán, F. Deprotection Reagents in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: Moving Away from Piperidine? *Molecules* **2016**, *21*, 1–12.
- (103) Jad, Y. E.; de la Torre, B. G.; Govender, T.; Kruger, H. G.; El-Faham, A.; Albericio, F. Oxyma-T, Expanding the Arsenal of Coupling Reagents. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 3523–3525.
- (104) Granzyme B Substrate II, http://www.merckmillipore.com/PT/en/product/Granzyme-B-Substrate-II-Fluorogenic-Calbiochem,EMD_BIO-368059#anchor_orderingcomp (acedido em 1 de agosto de 2019).
- (105) Ac-IEPD-pna | Sigma-Aldrich <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=Ac-iepd-pna&interface=All&N=0&mode=matchpartialmax&lang=pt®ion=PT&focus=product> (acedido em 1 de agosto de 2019).
- (106) Boc-Ala-Ala-Asp-Thiobenzyl Ester <http://en.chembase.cn/substance-130976.html> (acedido em 1 de agosto de 2019).
- (107) Fmoc-Lys(DabcyI)-OH <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/852096?lang=pt&>

region=PT (acedido em 3 de setembro de 2019).

- (108) Mujumdar, R. B.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J.; Waggoner, A. S. Cyanine Dye Labeling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters. *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 105–111.