

- Silvestri, Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev., 17(3), 255 (1978).
- ⁵⁴ C.D. Chang e A.J. Silvestri, U.S. Patent, 3 894 106 (1975).
- ⁵⁵ H.H. Storch, N. Golumbic e R.B. Anderson, "The Fischer-Tropsch and Related Synthesis", John Wiley & Sons, New York, 1951.
- ⁵⁶ E.G. Derouane, P. Dejaifve, J.B. Nagy, J.H.C. van Hoof, B.P. Spekman, J.C. Védrine e C. Naccache, J. Catal., 53, 40 (1978).
- ⁵⁷ C.D. Chang, W.H. Lang e A.J. Silvestri, U.S. Patent, 3 998 898 (1976).
- ⁵⁸ S.A. Butter, A.T. Jurewicz e W.W. Kaeding, U.S. Patent, 3 894 107 (1975).
- ⁵⁹ P. Wiseman, "Industrial Organic Chemistry", Wiley & Sons, New York, 1972.
- ⁶⁰ P.B. Weisz, Pure and Applied Chemistry, 52, 2091 (1980).
- ⁶¹ N.Y. Chen, W.W. Kaeding e F.G. Dwyer, J. Am. Chem. Soc., 101, 6783 (1979).
- ⁶² W.W. Kaeding, J. Catal., 69, 392 (1981).
- ⁶³ J.R. Anderson, K. Fogar, T. Mole, R.A. Rajadhyaksha e J.V. Sanders, J. Catal., 58, 114 (1979).
- ⁶⁴ W.O. Haag e D.H. Olson, U.S. Patent, 4 177 026 (1978).
- ⁶⁵ S.L. Meisel, J.P. McCullough, C.H. Lechthaler e P.B. Weisz, Leo Friend Symp. - A.C.S., Ind. Eng. Div., Chicago, Aug., 1977.
- ⁶⁶ B.E. Langer, Appl. Catal, 2, 289 (1982).
- ⁶⁷ J. Haggin, Chem. Eng. News, 59(8), 39 (1981).
- ⁶⁸ P.L. Lyman, Chem. Eng. News, 60(39), 10 (1982).

REVISÃO

A SÍNTESE QUÍMICA DE ADN – UM INSTRUMENTO INDISPENSÁVEL ÀS MANIPULAÇÕES GENÉTICAS

Alfredo Cravador

Consultor do IICA (Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura) – CENARGEN – EMBRAPA e Groupe d'Expression Génétique, Département de Biologie Moléculaire. Université Libre de Bruxelles (U.L.B.) – Belgique

Recebido em: 16/07/84

PREÂMBULO

Há menos de 10 anos, à síntese química de ADN era um domínio esotérico, apanágio de alguns químicos especializados. Calculava-se, em 1975, que seriam necessários 20 anos para sintetizar um gene de 100 nucleotídeos segundo um esquema otimizado por computador¹.

Atualmente é possível realizar este trabalho em poucas semanas: por exemplo nós sintetizamos recentemente um gene de 270 nucleotídeos em cerca de um mês a partir de dinucleotídeos protegidos. Esta proeza técnica, ao alcance de um número crescente de laboratórios, só é possível graças ao desenvolvimento acelerado das técnicas de síntese química, catalisado pelo advento das técnicas da Engenharia Genética. O alargamento contínuo do campo de aplicação dos fragmentos sintéticos de ADN, assim como o aspecto mais fundamental do estudo estrutural de certas seqüências particulares, constituíram estímulos poderosos para os químicos orgânicos cujos esforços conduziram ao ajustamento e ao aperfeiçoamento das técnicas de síntese.

Apresentamos neste artigo um apanhado geral da química usada na síntese de ADN, tal como ela é praticada atualmente.

PRINCÍPIOS DA SÍNTESE QUÍMICA DE ADN.

a) Resumo das etapas da síntese

A síntese química em solução de um oligodesoxinucleotídeo comporta as seguintes etapas:

1 – Preparação dos quatro desoxinucleotídeos, correspondentes a desoxitimidina, desoxicitidina, desoxiadeno-sina e desoxiguanosina completamente protegidos, "building blocks" de base da síntese.

2 – Desproteção seletiva de dois desoxinucleotídeos a condensar-se um com o outro, de maneira a liberar em cada um dos blocos unicamente as funções implicadas na formação da ligação internucleotídica.

3 – Condensação dos compostos assim gerados para formar um dímero inteiramente protegido.

4 – Extensão da cadeia de ADN repetindo as reações das etapas 2 e 3 até a obtenção de um oligodesoxiribonucleotídeo completamente protegido.

5 – Desproteção seqüencial e controlada do oligodesoxiribonucleotídeo.

6 – Isolamento, purificação e caracterização.

Quanto à extensão da cadeia desoxiribonucleotídica, realizada em fase sólida, são necessárias algumas etapas suplementares:

i) – funcionalização de um polímero insolúvel.

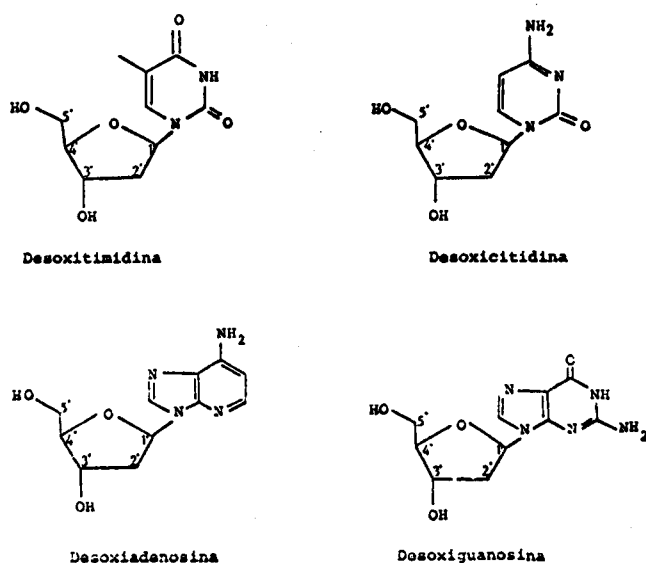
ii) – fixação do primeiro desoxiribonucleotídeo protegido da cadeia oligodesoxiribonucleotídica a sintetizar, sobre a função do suporte sólido.

iii) – clivagem da cadeia de ADN do suporte sólido.

b) Preparação dos blocos de base da síntese.

As substâncias de base da síntese de ADN são os quatro desoxiribonucleosídeos: desoxitimidina, desoxicitidina,

ESQUEMA 1



desoxiadenosina e desoxiguanosina; (obtidos por degradação de ADN de origem natural). (Esquema 1).

Na molécula desoxinucleosídica podem-se distinguir três centros que vão ser objeto de três formações distintas: as bases, as funções hidroxílicas em posição 5' e em posição 3'.

1) Proteção das funções amins exocíclicas.

As bases que possuem funções amins primárias (a timidina não possui) têm que ser protegidas.

Esta proteção é permanente, visto que o centro amina não está implicado nas reações de extensão oligomérica. Portanto os grupos protetores devem ser estáveis ao longo de todas as etapas de síntese. No entanto eles devem poder ser retirados no fim da síntese em condições que preservem a integridade da molécula final. Os grupos que, nas estratégias de síntese mais utilizadas, melhor satisfizeram estas condições, são o grupo bensoilo para a desoxicitidina e a desoxiadenosina e o grupo isobutanoilo para a desoxiguanosina². A sua introdução tem que ser seletiva a fim de não bloquear os grupos hidroxílicos do ciclo desoxiribofuranosilo. Estes grupos são objeto de uma proteção transitória que pode ser especificamente removida após acilação dos grupos aminados³ (Exemplo: esquema 2).

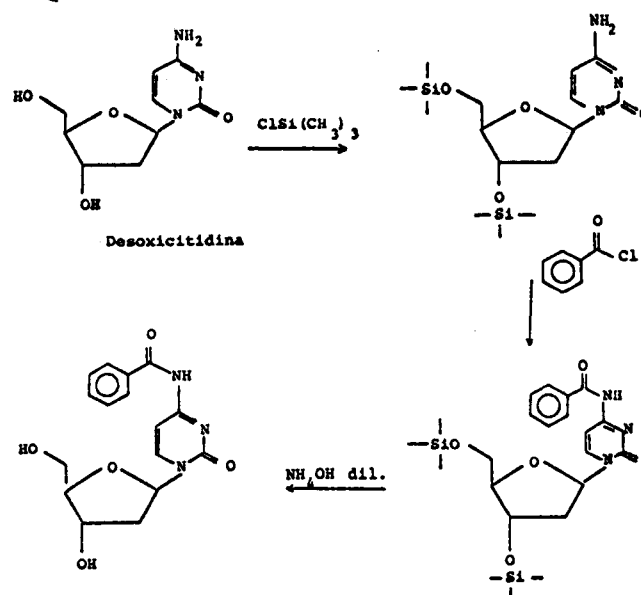
Uma proteção suplementar original foi recentemente introduzida por várias equipes, destinada a proteger a função lactâmica da desoxiguanosina, fonte de reações secundárias durante as reações de condensação e de fosforilação⁴.

2) Transformação dos grupos hidroxílicos

As funções hidroxílicas em posição 5' e 3' têm de ser uma protegida por um grupo protetor transitório, a outra fosforilada. A escolha do centro a fosforilar depende da estratégia adotada.

A estratégia que consiste em fosforilar a posição 3' deu até agora os melhores resultados através dos métodos co-

ESQUEMA 2



nhecidos pelos nomes gerais de fosfatotriéster e de fosfitotriéster.

A proteção do grupo hidroxílico em posição 5' tem de ser temporária. Ela tem que ser removida antes de cada etapa de condensação, durante a extensão da cadeia desoxiribonucleotídica. O grupo protetor deve, neste caso, possuir as propriedades seguintes:

- poder ser introduzido seletivamente em posição 5' deixando intacta a função hidroxílica em posição 3';
- poder ser retirado em condições suaves que não dêem lugar a nenhuma reação secundária;
- ser estável em todas as etapas de síntese, de desproteção e de purificação que se seguem à sua introdução;
- eventualmente facilitar, pela sua introdução, a purificação dos intermediários de síntese.

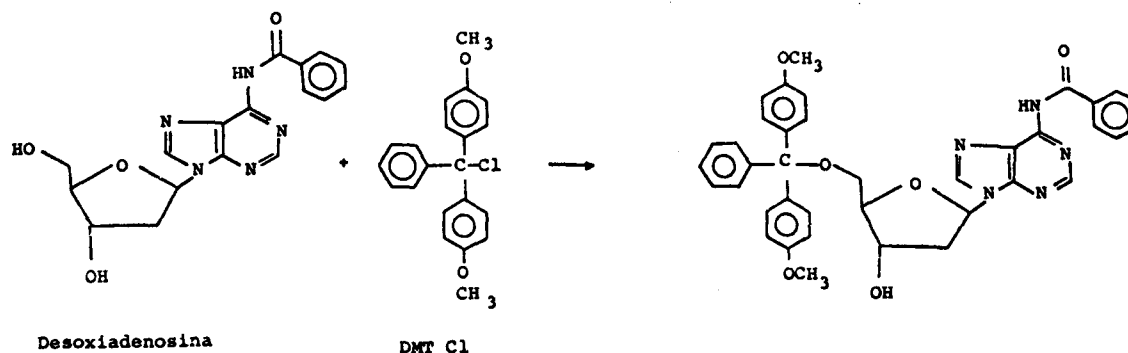
Entre outros grupos introduzidos com bons resultados, o 4,4'-dimetoxitritilo é um dos mais corretamente adotados⁵. É introduzido através do seu cloreto tirando benefício da sua seletividade pela posição 5' condicionada por fatores estéricos. (Exemplo: esquema 3).

O grupo 4,4'-dimetoxitritilo pode ser quantitativo e rapidamente retirado em condições de baixa acidez (Ex.: ácido dicloroacético, brometo de zinco) sem ruptura ou com ruptura insignificante da ligação glicosídica; esta reação conduz à formação do cátion dimetoxitritilo de cor laranja, cuja absorbância pode ser medida espectrofotometricamente. Esta medida é particularmente útil na síntese em fase sólida pois ela é a única indicação da eficácia das reações de condensação durante a construção da cadeia oligonucleotídica.

(3) A fosforilação em posição 3' dos nucleosídeos protegidos nas bases e no grupo hidroxílico em 5' pode conduzir, segundo a estratégia escolhida, a um bloco completamente protegido, ou a uma espécie fosforilada ativa capaz de reagir diretamente com outro bloco desoxinucleotídico desprotegido em posição 5' para formar uma ligação inter-nucleotídica.

Numerosos agentes de fosforilação têm sido utilizados

ESQUEMA 3



em síntese de oligodesoxiribonucleotídeos, sobretudo na metodologia do fosfatotriéster (Esquema 4).

Um dos substituintes do átomo de fósforo protege de maneira permanente o anion fosfato, responsável pelos baixos rendimentos das reações de condensação, assim como pelas dificuldades crescentes de purificação e de solubilidade com o comprimento dos oligômeros, surgidas na metodologia inicial dos fosfatodiéster⁶.

O outro substituinte tem um papel de proteção temporária, destinada a ser substituída pela ligação fosfato internucleotídica.

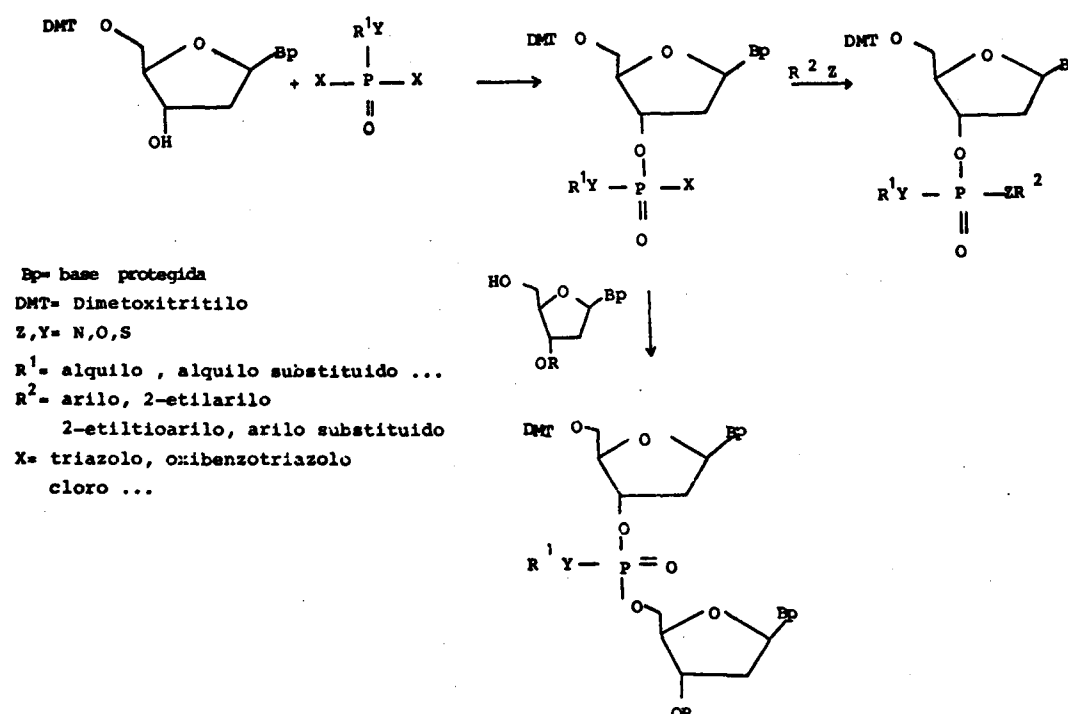
O grupo protetor permanente deve possuir uma estabilidade total durante as reações de eliminação dos grupos protetores temporários e durante as reações de condensação. Não deve interferir negativamente com o rendimento e a eficácia destas últimas. Ele tem no entanto que ser retirado especificamente no fim da síntese sem provocar a ruptura concorrente das ligações internucleotídicas.

O grupo protetor transitório deve ser suficientemente estável para permitir o isolamento, a purificação e a estocagem dos blocos desoxinucleotídicos completamente protegidos. A sua eliminação deve ser específica e rápida em condições que preservem os grupos protetores permanentes e o grupo protetor temporário em posição 5'.

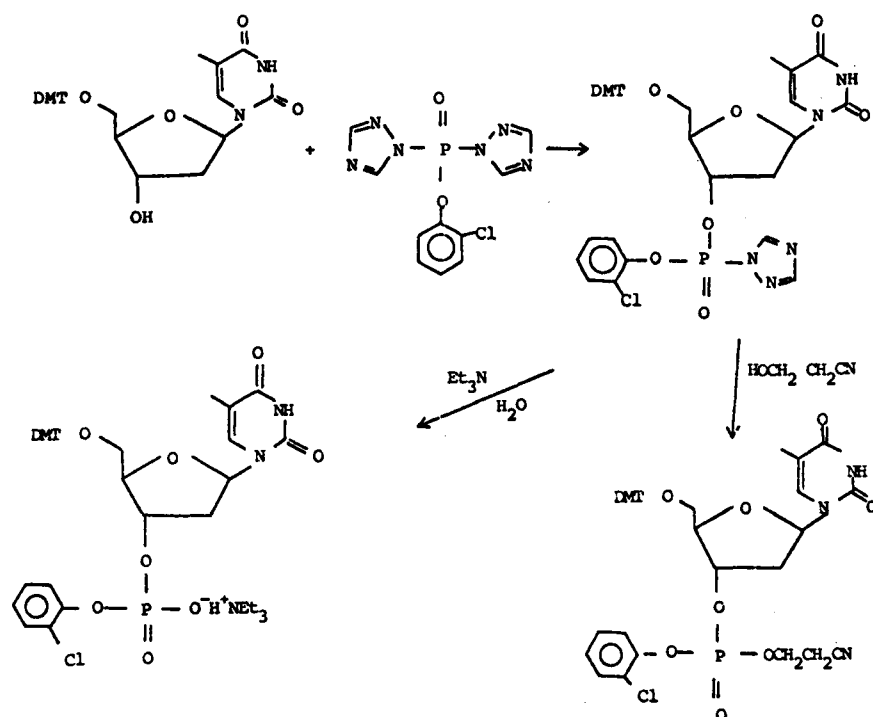
Os grupos ortoclorofenilo (com Y = O) permanente e o cianoetilo (R = CH₂CH₂CN, com Z = O) temporário são exemplos de grupos muito utilizados na metodologia dos fosfatotriéster⁷ (Exemplo: esquema 5).

O grupo protetor permanente correntemente utilizado na metodologia do fosfitotriéster é o radical metilo. O terceiro substituinte do átomo do fósforo é um grupo azodialquilo introduzido em substituição de um átomo de cloro, o qual confere uma reatividade particularmente forte ao intermediário fosfocloridrito (utilizado durante o desenvolvimento inicial do método)⁸, que o torna instável e de emprego pouco cômodo.

ESQUEMA 4



ESQUEMA 5



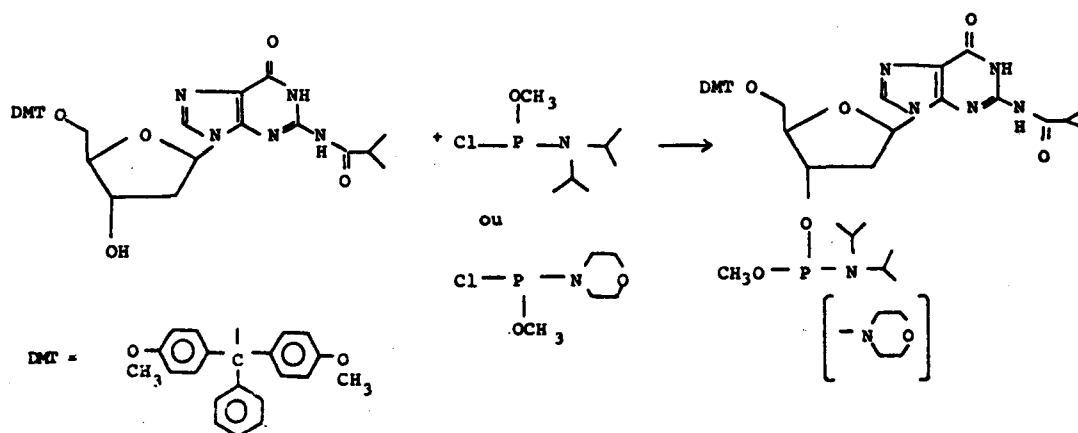
Os compostos diisopropilamino -e morfolino-fosforoamido possuem um bom compromisso reatividade-estabilidade (Exemplo: esquema 6).

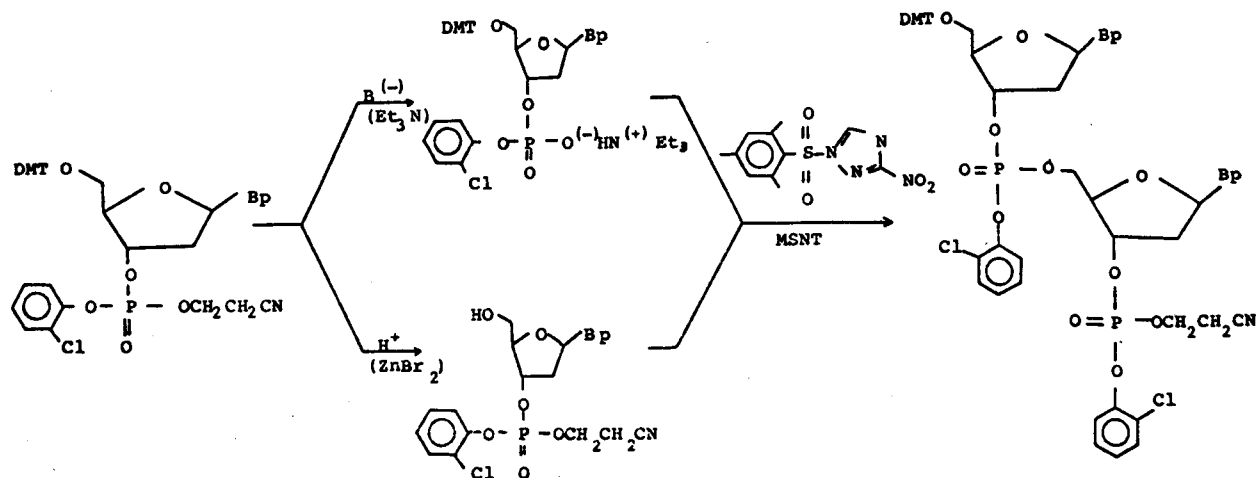
É importante sublinhar que o sucesso da síntese química de ADN baseia-se sobretudo na preparação destes blocos de base, isto é, na escolha dos diferentes grupos protetores, no rendimento das diferentes reações e na pureza dos desoxinucleotídeos completamente protegidos.

c) Reação de condensação

Para poder condensar dois desoxinucleotídeos pelo método do fosfatotriéster, é necessário liberar separadamente por um lado a função fosfato e por outro o grupo hidroxílico em 5' das suas proteções temporárias. Por exemplo, o grupo dimetoxitritilo é retirado em condições ácidas suaves e o grupo cianoetilo, em condições básicas suaves. Evi-

ESQUEMA 6





dentemente a reação de condensação necessita da formação de espécies ativas capazes de reagir com bons rendimentos, sem formação de produtos secundários.

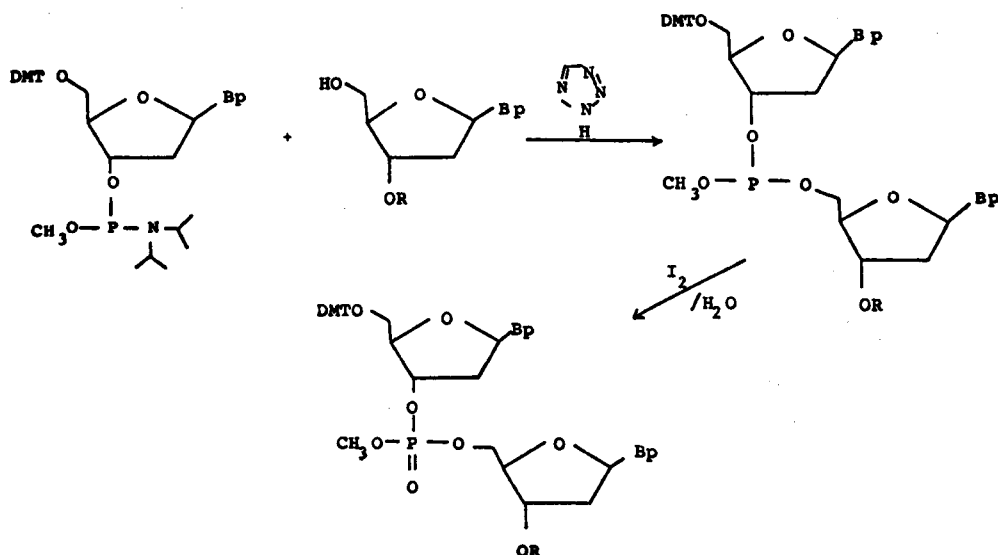
A ativação do fosfatodiéster é frequentemente realizada pela ação conjugada de um cloreto de arilosulfonilo e de uma amina heterocíclica, ou de uma sulfonamida preparada antecipadamente a partir deste tipo de compostos¹⁰ (Esquema 7).

A ativação dos fosforoamiditos é realizada por um agente de protonação, ácido fraco (Ex.: o tetrazolico, $pK_a = 4,9$) que acelera a partida do grupo dialquilamina e favoriza o ataque pela função hidroxílica que vai estabelecer a ligação internucleotídica¹¹. Não é portanto possível dentro desta metodologia eliminar o grupo dimetoxitritilo em condições ácidas em presença do grupo fosforoamidito (Esquema 8)

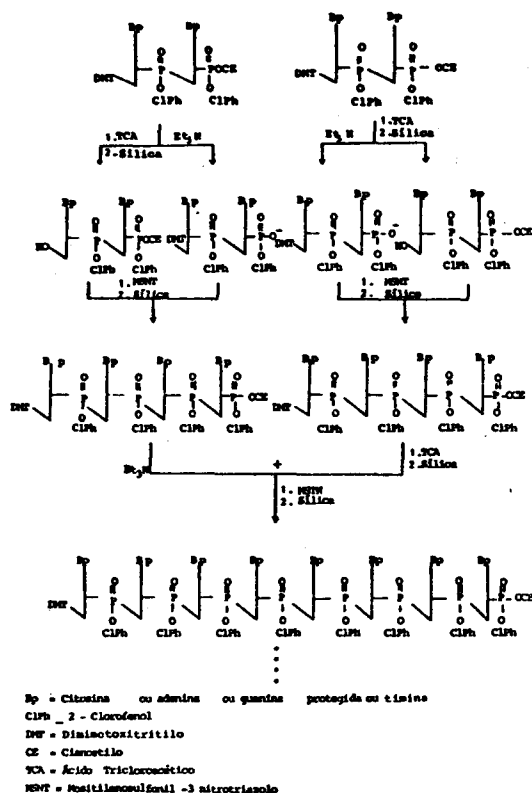
d) Construção da cadeia oligodesoxinucleotídica

Na síntese em solução e pela metodologia do fosfato-triéster, pode-se fazer a extensão da cadeia polinucleotídica de maneira alternada no sentido 3'→5' ou 5'→3' visto que se pode desproteger o grupo hidroxílico na extremidade 5', ou o trifosfato na posição 3' do oligômero em construção. Dois oligômeros podem igualmente ser condensados um com o outro. Devido à sensibilidade dos fosforoamiditos às condições ligeiramente ácidas esta flexibilidade própria aos triésterfosfatos não se aplica ao método do fosfitotriéster que não foi desenvolvido em solução. A síntese em solução permite a detecção de reações secundárias de maneira mais direta que a síntese em fase sólida; ela permite a identificação e a compreensão da origem dos produtos

ESQUEMA 8



ESQUEMA 9

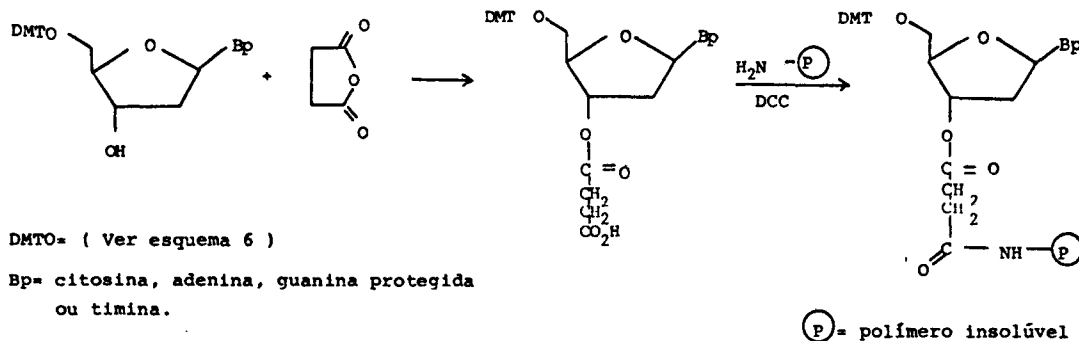


REACÇÃO DA CADEIA OLIGONUCLEOTÍDICA EM SOLUÇÃO

parasitas e portanto possibilita a intervenção sobre os parâmetros corretores (Esquema 9).

A extensão da cadeia de ADN em fase sólida realiza-se numa só direção (em geral 3'→5') a partir de um desoxiribonucleosídeo fixo por uma das funções hidroxílicas a um suporte sólido. A fixação efetua-se, em geral, através da formação de uma ligação amídica entre um 2'-desoxi-3'-succinilribonucleosídeo e um polímero insolúvel aminado (P-NH₂)¹² (Esquema 10).

ESQUEMA 10



O poliestirenodivinilbenzeno, a resina composta polidimetilacrilamida-kieselguhr, a sílica, as esferas de vidro de porosidade controlada, a celulose, o co-polímero teflon-poliestireno são exemplos de polímeros insolúveis correntemente utilizados.

A extensão da cadeia polinucleotídica em fase sólida consiste na repetição de um ciclo que compreende essencialmente:

1) A reação de desproteção do grupo hidroxílico em 5' do primeiro nucleosídeo (ou da cadeia em crescimento) fixo no polímero insolúvel.

2) A reação de condensação entre a função hidroxílica liberada e a espécie nucleotídica introduzida em solução e ativada "in situ" no átomo de fósforo em posição 3'.

Com o método do fosfatotriéster uma terceira reação de oxidação do fosfito em fosfato é necessária. Uma reação suplementar é por vezes efetuada. Ela visa o bloqueamento da ligeira percentagem dos grupos hidroxílicos que não reagiram na reação de condensação a fim de desativá-los para as reações ulteriores.

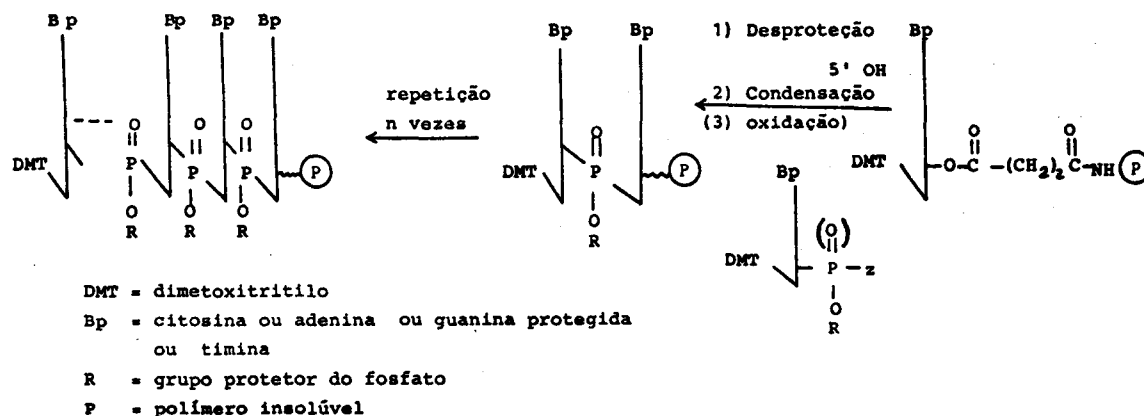
Os reagentes em excesso, os subprodutos e os solventes das reações e de lavagem são eliminados por simples filtração do suporte sólido (Esquema 11).

O isolamento do produto ligado ao polímero insolúvel é, por consequência, simples e rápido em relação aos métodos convencionais em solução. O conjunto das operações presta-se bem à automatização.

Uma desvantagem da fase sólida é a cinética desfavorável. Para conseguir reações completas dentro de tempos razoáveis é indispensável utilizar excessos importantes de reagentes cuja pureza é portanto crítica. Traços de impurezas reativas podem inibir completamente a reação de condensação.

Em fase sólida, a acumulação de produtos indesejáveis é inevitável visto não haver purificação em nenhuma etapa da extensão do fragmento de ADN. Uma maneira de minimizar este inconveniente consiste em utilizar dímeros ou trímeros preparados em solução, estratégia que nós adotamos e que diminui de um fator 2 ou 3 o número de reações efetuadas no polímero insolúvel.

ESQUEMA 11



O comprimento do fragmento de ADN, que é possível obter por síntese química, depende evidentemente do rendimento da etapa de condensação que tem que ser mantido o mais alto possível (90 a 95%) de maneira reprodutível. Nós preparamos corretamente fragmentos de 30 a 40 nucleotídeos pelo método do fosfatotriéster. Do ponto de vista das vantagens e inconvenientes, os métodos do fosfatotriéster e do fosfitotriéster são equivalentes no momento atual.

e) Desproteção, isolamento e purificação

A desproteção do fragmento de ADN é uma operação delicada que deve preservar a integridade do edifício molecular. Reações incompletas ou uma degradação parcial conduzem a uma mistura complexa de produtos.

A desproteção compõe-se de 3 etapas distintas:

- I) — transformação dos grupos triésterfosfatos em diésterfosfatos;
- II) — Desproteção das bases;
- III) — A desproteção da função OH terminal em 5'.

I) A desproteção dos grupos fosfatos é uma fonte possível de ruptura internucleotídica. Esta pode ser minimizada utilizando reagentes seletivos antes de desproteger as bases.

Se a extensão da cadeia de ADN for realizada pelo método do fosfatotriéster em fase sólida, a clivagem do suporte insolúvel efetua-se com o mesmo reagente de desproteção dos grupos fosfatos clorofenilados, por exemplo com o

2-nitrofenilcarbaldoximato de tetrametilguanidina. O grupo metilo utilizado com o método do fosfitotriéster é deslocado por ataque nucleofílico pelo anion tiofenalato antes da clivagem. Esta é efetuada com amoníaco em condições suaves.

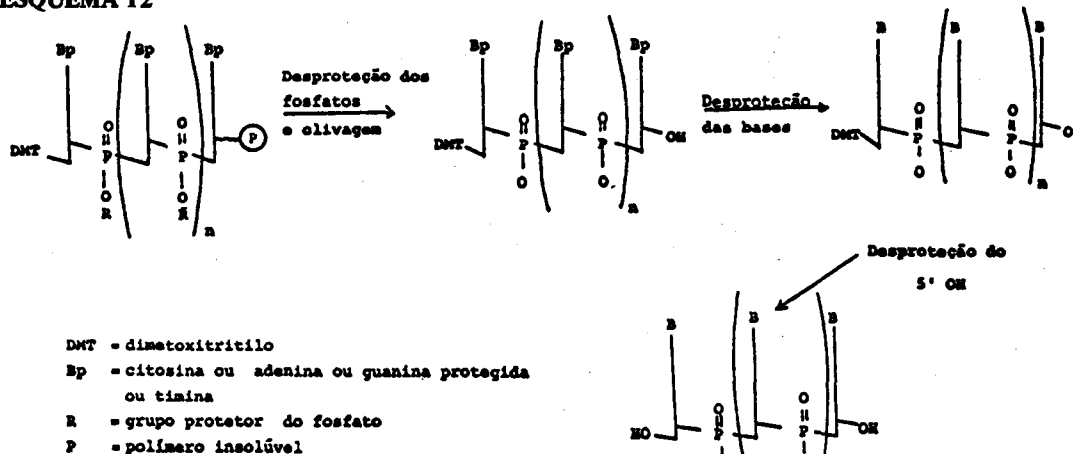
II) As aminas exocíclicas das bases são desaciladas por amonólise a 50°C. Este tratamento provoca uma ruptura, que não é desprezível, das ligações fosfatos internucleotídicas quando o fosfato está na forma de triéster; esta é a razão pela qual se converte antecipada e seletivamente o fosfatotriéster em fosfatodiéster.

III) O grupo protetor da função hidroxílica em posição 5' é o último a ser retirado (pelo ácido acético 80% no caso do grupo dimetoxitritilo). É conservado até o fim para impedir a formação de triésteres fosfóricos cíclicos que conduzem a estruturas oligodesoxiribonucleotídicas com ligações 5' → 5', durante as primeiras etapas de desproteção. Devido ao seu caráter hidrófobo, o grupo dimetoxitritilo protetor da função 5'OH facilita o isolamento do produto por cromatografia de sílica em fase inversa (Esquema 12).

Os métodos de isolamento e de purificação correntemente utilizados são a cromatografia de DEAE-celulose, de Sephadex, de camada fina de sílica, a cromatografia líquida a alta pressão (HPLC) com coluna de sílica de fase inversa ou de troca de cátions e a eletroforese preparativa em poliacrilamida.

A caracterização do produto isolado e marcado numa das extremidades com um radioisótopo pode ser efetuada

ESQUEMA 12



pelo método de seqüenciamento de ADN de Maxam e Gilbert¹³. É no entanto necessário um reajustamento das condições das reações aos fragmentos de pequeno comprimento¹⁴. Um outro método, conhecido pelo nome de "Wandering spot", baseia-se na análise em duas dimensões (eletroforese em acetato de celulose, seguida de cromatografia em camada fina de DEAE-celulose) dos fragmentos do oligonucleotídeo sintético marcado numa extremidade, obtidos por digestão parcial com uma exonuclease¹⁵. Este método restringe-se a fragmentos de comprimento inferior a 20 nucleotídeos.

ALGUMAS APLICAÇÕES RECENTES DA SÍNTESE DE ADN NO NOSSO LABORATÓRIO DA U.L.B.

As aplicações dos oligodesoxiribonucleotídeos de seqüência definida cobrem quase todos os aspectos da investigação que implicam a recombinação de ADN, tanto no que diz respeito à construção, à identificação e à caracterização de clones bacterianos particulares, como à manipulação do ADN clonado com o fim de modificar a sua estrutura.

Nos campos da determinação de seqüências de ADN, do estudo das inter-reações proteína-ADN ou da análise estrutural do ADN, os oligodesoxiribonucleotídeos sintéticos têm-se revelado uma arma extremamente útil.

A nossa equipe de síntese química de ADN, do departamento de Biologia da U.L.B. (Université Libre de Bruxelles) faz parte de um grupo de investigadores formados em diferentes disciplinas tais como a Biologia, a Genética, a Química e a Imunologia. A coordenação das competências e a conjugação dos esforços conduziram a alguns sucessos no domínio da Engenharia Genética aplicada à Medicina. O nosso trabalho consiste em fornecer sondas de oligodesoxiribonucleotídeos de seqüência definida que possibilitaram a varredura ("screening") de bancos de clones e o isolamento de cepas de bactérias que produzem proteínas humanas de interesse terapêutico, tais como a alfa-1-antitripsina, a antitrombina III e a uroquinase¹⁶. Efetuamos igualmente a síntese total da seqüência de ADN que codifica para a somatocrinina humana (140 pares de bases) e introduzimo-la num vetor plasmídico afim de exprimir este fator hormonal na bactéria. Estes exemplos ilustram de maneira não limitativa a importância da química de síntese dos ácidos nucleicos em qualquer programa de Engenharia Genética: podemos prever, sem alguma dúvida, que esta importância continuará a aumentar intensivamente no futuro.

AGRADECIMENTOS

Desejo deixar aqui expresso os meus agradecimentos às seguintes pessoas pela sua colaboração:

Dr. A. Herzog, P. Jacobs, P. Hérion, T. Cabezón, B. Colau, J. Urbain e A. Bollen, Srs. (Sras.) A. Vander Straten, F. Brockly, O. Chuchana, R. Lauriau, A. Van Elsen e D. Siberdt, do Departamento de Biologia Molecular da U.L.B. (Université Libre de Bruxelles).

Este trabalho foi efetuado graças ao apoio da Region Wallonne-C.G.C. T., l'IRSIA, UCB-Bioproducts, Smith-Kline/Rit e o FNRS (Fonds National de la Recherche Scientifique), Bélgica.

Brasília, Fevereiro de 1984.

Referências:

- ¹ G.J. Powers, R.L. Jones, C.A. Randall, M.H. Caruthers, J.H. van de Sande e H.G. Khorana. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 975 (1975).
- ² E.L. Brown, R. Belagaje, M.J. Ryan e H.G. Khorana. *Methods in Enzymology* **68**, 109 (1979).
- ³ G.S. Ti, B.L. Gaffney e R.A. Jones. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 1316 (1982).
- ⁴ S.S. Jones, C.B. Reese, S. Sibanda e A. Ubasawa. *Tet. Lett.* **22**(47) 4755 (1981).
 - b) H.P. Daskolov, M. Sekine e T. Hata. *Bull. Chem. Soc. Japan* **54**, 3076 (1981).
 - c) B.L. Gaffney e R.A. Jones. *Tet. Lett.* **23**(22) 2257 (1982).
 - d) T. Trichtinger, R. Charubala e W. Pfeleiderer. *Tet. Lett.* **24**(7) 711 (1983).
 - e) M. Sekine, J. Matsuzaki e T. Hata. *Tet. Lett.* **23**(50) 5287 (1982).
 - f) T. Kamimura, M. Tsuchiya, K. Koura, M. Sekine e T. Hata. *Tet. Lett.* **24**(27) 2775 (1983).
- ⁵ K.L. Agarwal, A. Yamasaki, P.J. Cashion e H.G. Khorana. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **11**, 451 (1972).
- ⁶ H.G. Khorana. *Science* **203**, 614 (1979).
- ⁷ N. Katagiri, K. Itakura e S.A. Narang. *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 7332 (1975).
- ⁸ R.L. Letsinger e W.B. Lursford. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 3655 (1976).
- ⁹ L.J. McBride e M.H. Caruthers. *Tet. Lett.* **24**(3) 245 (1983).
- ¹⁰ S.S. Jones, B. Rayner, C.B. Reese, A. Ubasawa e M. Ubasawa. *Tetrahedron* **3075** (1980).
 - b) V.A. Efimov, S.V. Reverdatto e O.G. Chakhmakhcheva. *Tet. Lett.* **23**(9) 961 (1982).
- ¹¹ S.L. Beaucage e M.H. Caruthers. *Tet. Lett.* **22**(20) 1859 (1981).
- ¹² a) H. Ito, Y. Ike, S. Ito e K. Itakura. *Nucl. Acids Res.* **10**, 1755 (1982).
 - b) M.J. Gait, H.W.D. Matthes, M. Singh e R.C. Titmas, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **37** (1982).
- ¹³ A.M. Maxam e W. Gilbert. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* **74**, 560 (1977).
- ¹⁴ a) E. Jay, A.K. Seth, Y. Rommens, A. Sood, G. Jay; *Nucl. Acids. Res.* **10**(20), 6319 (1982).
 - b) A.M. Banaszuk, K.V. Deugou, J. Sherwood, M. Michalak, B.R. Glick, *Anal. Bioch.* **128**, 281 (1983).
- ¹⁵ C.P.D. Tu, E. Jay, C. Pm Bahl e R. Wu. *Anal. Biochem.* **74**, 73 (1976).
- ¹⁶ Bollen, A., *Chimie Nouvelle* (Fevr. 1984).