

Síntese manual de peptídeos: abordagens clássica e a 60°C usando aquecimentos convencional e com energia de microondas

Carina Loffredo¹ (PG)*, Nilson Assunção¹ (PQ), Maria Terêsa M. Miranda¹ (PQ) carinalf@iq.usp.br, mtmirand@iq.usp.br

¹Departamento de Bioquímica, IQ-USP, C.P. 26077, 05513-970, São Paulo, Brasil

Palavras Chave: síntese de peptídeos, temperatura elevada, microondas, reações secundárias, enantiomerização.

Introdução

Desde que o método de Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS clássica) foi concebido, os químicos têm buscado a sua agilização. As tentativas eram restritas à formação da ligação peptídica até que, em 1994, foram descritas SPFS manuais usando aquecimento convencional em todas as etapas do processo sintético¹. Posteriormente, o nosso grupo estudou vários aspectos desta nova abordagem sintética (sistema de solventes, temperatura, adequação de resinas poliméricas e incidência de enantiomerização)^{2,3}. Recentemente, outros grupos introduziram a SPFS com aquecimento via energia de microondas em todas as etapas^{4,5}.

Uma vez que novas abordagens sintéticas só têm valor prático se levam a produtos de boa qualidade e rendimentos satisfatórios, decidimos realizar o primeiro estudo comparativo das SPFS clássica, SPFS a 60°C-aquecimento convencional e SPFS a 60°C-aquecimento com energia de microondas. Com base em dados obtidos anteriormente com peptídeos restritos aos aminoácidos Ile, Gly, Phe, Tyr, Trp, Lys e Thr³, nos propusemos a: 1) sintetizar manualmente novos modelos, fragmentos de peptídeos bioativos contendo Asp, His, Ser, Cys, Met e Arg, via as três abordagens usando protocolos pré-estabelecidos por nós; 2) determinar condições adequadas às análises dos peptídeos brutos obtidos; 3) identificar os subprodutos nele contidos e, quando possível, quantificar a enantiomerização.

Resultados e Discussão

Ac-Ala-Cys-Pro-Lys, Gly-Cys-Phe-NH₂, Ac-Pro-Ser-His-Arg e Asp-Arg-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (CCK₂₄₋₃₃), foram sintetizados manualmente a partir dos derivados de L-aminoácidos. Após desligamento das resinas e desproteção total, os peptídeos brutos obtidos foram analisados, na forma intacta, por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC), eletroforese capilar (EC) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/ESI-MS). Isômeros dos tri- e tetrapeptídeos foram preparados pela SPFS clássica para servirem de padrões em experimentos de coeluição que permitiriam a quantificação da enantiomerização.

Os resultados dos experimentos de coeluição por RP-HPLC dos modelos Ac-Ala-Cys-Pro-Lys e Gly-29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

Cys-Phe-NH₂ mostraram que a SPFS a 60°C-aquecimento convencional forneceu produtos de qualidades semelhantes às aquelas dos obtidos pela SPFS clássica, ou seja, a enantiomerização da Cys ocorreu em extensão aceitável (< 5%). Já na SPFS a 60°C-aquecimento com energia de microondas, a enantiomerização foi 2-4 vezes maior. Para o modelo Ac-Pro-Ser-His-Arg, as coeluições por EC realizadas até o momento indicaram que os brutos resultantes das SPFS clássica e SPFS a 60°C-aquecimento convencional não contêm isômeros em quantidades detectáveis. Finalmente, para o modelo CCK₂₄₋₃₃, as SPFS a 60°C-aquecimento convencional e com energia de microondas forneceram brutos de qualidade superior à do resultante da SPFS clássica. Em todos os casos, os mesmos subprodutos, oriundos de deleções e adições de aminoácidos, foram detectados.

Conclusões

1) Assim como a SPFS clássica, a SPFS a 60°C-aquecimento convencional em 25% DMSO/tolueno pôde ser utilizada com sucesso na síntese dos tri- e tetrapeptídeos estudados contendo Cys, His e Ser, sem comprometimento das suas integridades ópticas. Já a SPFS a 60°C-aquecimento com energia de microondas no mesmo solvente não se mostrou adequada à obtenção destes peptídeos, pois levou à intensificação da enantiomerização deste aminoácido; 2) Para o peptídeo contendo Asp, Arg e Met, tanto a SPFS a 60°C-aquecimento convencional quanto a SPFS a 60°C-aquecimento com energia de microondas em 25% DMSO/tolueno se mostraram bastante adequadas para fornecer produtos de boa qualidade; 3) O trabalho realizado evidenciou vantagens do aquecimento convencional em relação àquele com energia de microondas e confirmou a possibilidade de quantificação da enantiomerização em peptídeos intactos.

Agradecimentos

Ao CNPq, à FAPESP, ao C.W. Liria e F. M. Prado.

¹Rivier, J. E., Miranda, M. T. M., *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, Chapter 4, **2001**, 806-813; ²Varanda, L. M., Miranda, M. T. M., *J. Peptide Res.* **1997**, 50, 102-108; ³Souza, M. P., Tavares, M. F. M. e Miranda, M. T. M., *Tetrahedron* **2004**, 60, 4671-4681; ⁴Yu, H., Chen, S., Wang, K., *J. Org. Chem.* **1992**, 18, 4781-4784; ⁵Palasek, S. A., Cox, Z. J., Collins, J. M., *J. Pept. Sci.* **2007**, 13, 143-148.