

Síntese em fase sólida de peptídeos: otimização da etapa de clivagem do peptídeo da resina/desproteção total em presença de TFMSA

Jonathas Silva Santos¹ (IC)*, Cleber Wanderlei Liria¹ (TC), M. Terêsa Machini Miranda¹ (PQ)

jonathas.santos@usp.br*, mtmirand@iq.usp.br

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP-SP, Brasil.

Palavras Chave: química de macromoléculas, estratégia Boc.

Introdução

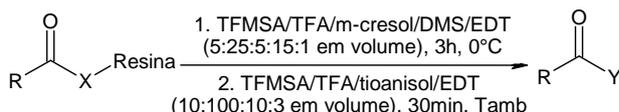
Peptídeos são macromoléculas essenciais à vida, pois podem atuar como hormônios, antibióticos, neurotransmissores e analgésicos¹. Devido às suas baixas concentrações nas fontes naturais, foram desenvolvidos métodos, estratégias e protocolos que permitem as suas sínteses em quantidades e qualidades adequadas aos estudos químico, estrutural e biológico.

O método mais usado é o da fase sólida (SPFS), que se baseia na construção da cadeia peptídica ligada a uma resina polimérica na direção C→N². Durante a síntese, as cadeias laterais reativas dos aminoácidos estão protegidas. Ao término da mesma usando a estratégia química Boc, o peptídeo é desligado da resina/desprotegido em meio ácido, gerando o peptídeo bruto que será caracterizado e purificado.

O agente usualmente empregado para tal é o fluoreto de hidrogênio (HF)³. Como ele é extremamente tóxico e corrosivo, demanda aparato específico para manipulação e tem comercialização limitada, assim o ácido trifluorometanosulfônico (TFMSA) é empregado como alternativa⁴. Diante dos baixos rendimentos relatados⁴ e da importância da estratégia Boc para a síntese de peptídeos em geral e, mais especificamente, para a síntese de peptídeos tioesterificados via solvólise da ligação peptídeo-resina mediada por íons cálcio⁵, decidimos otimizar a clivagem do peptídeo da resina/desproteção total em presença de TFMSA.

Resultados e Discussão

As condições reacionais de partida, as resinas e as peptidil-resinas modelo estão descritas abaixo:



R: dodeca-, nona-, tetra- ou tripeptídeo. X: NH ou O; Resina: PAM; SAMBHA ou de Merrifield. Y: NH₂ ou OH.

As peptidil-resinas foram sintetizadas manualmente por SPFS, via estratégia Boc, segundo protocolos estabelecidos por nós^{6,7}. Elas foram caracterizadas

por hidrólise ácida total seguida de análise de aminoácidos. As reações de clivagem do peptídeo da resina/desproteção total foram feitas segundo o protocolo "low-high"⁶ em condições variáveis de temperatura e tempo. Os rendimentos foram calculados com base nos graus de substituição das peptidil-resinas iniciais e residuais. Os peptídeos brutos obtidos foram caracterizados por RP-HPLC e LC-ESI/MS.

Os resultados mostraram que: 1) enquanto a etapa "low" leva à clivagem do peptídeo da resina/desproteção parcial, a "high" é necessária para a desproteção total; 2) a melhor condição experimental encontrada para as peptidil-resinas estudadas foi: etapa "low": TFMSA/TFA/m-cresol/DMS/EDT (5:25:5:15:1, em volume), 1h a 0°C e 2h a Tamb; etapa "high": TFMSA/TFA/tioanisol/EDT (10:100:10:3, em volume), 30 min a T amb. De fato, nela os rendimentos de clivagem do peptídeo da resina foram 62, 59, 82 e 99% para os dodeca-, nona-, tetra- e tripeptidil-resina, respectivamente. Por outro lado, os perfis de LC-ESI/MS revelaram que o tosil (Tos; protetor dos grupos guanido e imidazol) e o ciclohexil (cHex; protetor de carboxila) não foram totalmente removidos, comprometendo a qualidade dos peptídeos brutos.

Conclusões

Os resultados obtidos nos permitiram avaliar as vantagens e limitações do uso de TFMSA na SPFS. Ficou evidente que: 1) os rendimentos e qualidade dos peptídeos brutos dependem da sequência-alvo e da resina empregada; 2) enquanto algumas sequências peptídicas não requerem a etapa "high" (já que demandam proteções facilmente removíveis na etapa "low"), outras não são totalmente desprotegidas mesmo após as duas etapas em condições otimizadas.

Agradecimentos

À FAPESP, pelos financiamento e bolsa.

¹ Konno, K. et al. *Peptides* **2008**, 29, 1293.

² Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149.

³ Haginoya, E. et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, 70, 1338.

⁴ Heavner, G. A. et al. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 4583.

⁵ Proti, P. B.; Miranda, M. T. M. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 3853.

⁶ Machado, A. et al. *Biopolymers* **2007**, 88, 413.

⁷ Loffredo, C. et al. *J. Pept. Sci.* **2009**, 15, 808.