

# Síntese total de colecistocinina a 60°C: métodos de fase sólida passo a passo e convergente, aquecimento convencional e por micro-ondas

Vinicius Millie Rodrigues Milan<sup>1</sup> (IC)\*, Carina Loffredo<sup>1</sup> (PG), Diego Pereira dos Santos (PG)<sup>2</sup>, Márcia Laudelina Arruda Temperini<sup>2</sup> (PQ), Maria Terêsa Machini Miranda<sup>1</sup> (PQ)

vinicius.milan@usp.br\*, mtmirand@iq.usp.br

Departamentos de Bioquímica<sup>1</sup> e Química Fundamental<sup>2</sup>, Instituto de Química, USP-SP, Brasil.

Palavras Chave: Peptídeos, Síntese, Micro-ondas

## Introdução

Peptídeos são macromoléculas de grande importância biológica e ampla aplicabilidade na pesquisa e na indústria. Portanto, o interesse em estudar as suas sínteses totais é totalmente justificável. O método da síntese em fase sólida tem sido o preferido devido à sua praticidade, rapidez e possibilidade de utilização em sínteses individual, múltipla e geração de bibliotecas (síntese combinatória). Ele pode ser realizado passo a passo (*acoplamento seqüencial dos aminoácidos à resina; SPFS*) ou de modo convergente (*acoplamento seqüencial de segmentos peptídicos sintéticos à resina; SCPFS*). Apesar de o modo convergente ser mais adequado para peptídeos longos e de seqüência complexa, ele ainda é pouco estudado. Por outro lado, quando aplicável a estes casos, a SPFS convencional ( $T_{amb}$ ) é bastante lenta<sup>1</sup>. Este trabalho descreve o estudo da possibilidade de síntese a 60°C da forma não sulfatada do hormônio colecistocinina (*CCK-33 NS*), peptídeo longo de seqüência complexa<sup>2</sup> que atua como hormônio gastrointestinal, neuromodulador e é de difícil obtenção pela SPFS convencional. Para tanto, empregamos a SPFS e a SCPFS, bem como o aquecimento convencional<sup>3</sup> e as micro-ondas<sup>4</sup>.

## Resultados e Discussão

A estrutura da *CCK-33 NS* (a) e as estratégias sintéticas estudadas (b, c) estão mostradas abaixo:

- (a)  $K^1APSGRSIVKLNQLDPSHRISDRDYMGMDF^{33}-NH_2$   
(b) SPFS: ...  $M^{31} + DF-resina \leftarrow D^{32} + F-resina \leftarrow F^{33} + resina$   
(c) SCPFS:  $K^1APSG + RMSIVK + NLQNLDP + SHRISDRDYMGMDF^{33}-resina$   
(1-5) (6-11) (12-18) (19-33)

As SPFS convencional e a 60°C foram realizadas manualmente usando protocolos estabelecidos em nosso laboratório<sup>3,4,7</sup>. As peptidil-resinas em crescimento foram analisadas por espectroscopia FT-Raman. A clivagem dos peptídeos da resina que atuam como doadores de acila (DA) na SCPFS foi realizada em mistura TFA/DCM (1:100, v/v) por 20 min a 27°C. O desligamento dos peptídeos da resina/desproteção total foi feito em TFA/H<sub>2</sub>O/fenol/EDT/tioaniso (82,5:5:2,5:5; em volume) por 6 h a 37°C<sup>2</sup>. Os peptídeos brutos obtidos foram caracterizados por RP-HPLC, LC/MS-ESI.

As SPFS passo a passo da *CCK-33 NS* foram bem sucedidas, independentemente da temperatura e do modo de aquecimento usado (aquecimento convencional: frasco jaquetado com circulação de água; micro-ondas: sistema SPS Discover<sup>TM</sup>, CEM Corporation). As dificuldades de acoplamento dos derivados de aminoácidos à peptidil-resina encontradas durante a SPFS passo a passo resultam de alterações conformacionais do peptídeo em crescimento, que foram confirmadas por espectroscopia FT-Raman. Os fragmentos peptídicos protegidos usados como reagentes na SCPFS foram obtidos pela SPFS com êxito. Ao contrário do reagente acoplador TBTU, eles se mostraram solúveis em NMP, 25% DMSO/tolueno (v/v) e DMF. Em DMF, as tentativas de acoplamento de F<sub>1-5</sub> e F<sub>6-11</sub> ao AA (F<sub>19-33</sub>) ligado à resina não foram bem sucedidas mesmo após 72h a 60°C empregando o aquecimento convencional. O uso das micro-ondas possibilitou que em 12h tais condensações ocorressem em extensão satisfatória.

## Conclusões

Em nossas condições, a SPFS a 60°C assistida por micro-ondas foi eficiente o bastante para permitir a síntese total da *CCK-33 NS* com qualidade e rendimentos compatíveis à sua complexidade química. Como esperado, a 60°C o processo sintético foi mais rápido (2 e 4 vezes para aquecimento convencional e micro-ondas, respectivamente). A SCPFS apresenta dificuldades inerentes ao tamanho e à natureza dos fragmentos reagentes e grupos protetores usados, as quais podem ser contornáveis pelos fatores térmicos e não térmicos das micro-ondas. Em ambas as estratégias sintéticas, a agitação foi determinante para o sucesso das reações.

## Agradecimentos

À FAPESP (financiamento/bolsa) e à RUSP (bolsa).

<sup>1</sup>Souza, M.P *Dissertação de Mestrado*, IQ-USP, 2000, 120 pp.

<sup>2</sup>Miranda, M.T.M. et al. *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 1681-1688.

<sup>3</sup>Varanda, L.M.; Miranda, M.T.M. *J. Pept. Res.*, **1997**, 50, 102-108.

<sup>4</sup>Souza, M.P et al. *Tetrahedron*, **2004**, 60, 4671-4681.

<sup>5</sup>Bacsa et al., *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 7532-7542.

<sup>6</sup>Loffredo, C. et al. in *Peptides for Youth*, (Eds.: S. Del Valle, E. Escher, W. D. Lubell), Springer, New York, **2009**, 611, 165-166.

<sup>7</sup>Loffredo, C. et al. *J. Pept. Sci.*, **2009**, 15, 808-817.