

ESTUDO DOS PROTETORES DAS CADEIAS LATERAIS DOS RESÍDUOS TRI-FUNCIONAIS NA SÍNTESE PEPTÍDICA EM FASE SÓLIDA ATRAVÉS DA RPE NA SEQUÊNCIA XING.

Eduardo Festozo Vicente, Eduardo Maffud Cilli, Simone Cristina Barbosa, Edson Crusca Junior. - Bioquímica - Farmácia Bioquímica - Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química - Instituto de Química - Campus de Araraquara.

A síntese peptídica tem proporcionado um grande avanço nos estudos biológicos durante os últimos dez anos. Em grande parte esse progresso deve-se à eficiência do método chamado de síntese peptídica em fase sólida (SPFS) (MERRIFIELD, 1963). Esse método de síntese baseia-se no crescimento, resíduo por resíduo, da cadeia peptídica presa covalentemente pelo seu aminoácido carboxi-terminal a sítios reativos existentes em um suporte sólido (resina) (ALBERICIO, 2000; ATHERTON et al., 1989). O método da fase sólida possui duas estratégias principais, uma emprega o grupamento ácido-lábil terc-butiloxicarbonila (Boc) como protetor do α -amino grupo e derivados benzílicos (Bzl) para a proteção da maioria das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos tri-funcionais (Boc/Bzl). Alternativamente, a segunda opção utiliza os grupamentos 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc - grupo base-lábil) e terc-butílicos (tBu), respectivamente (Fmoc/tBu). Tanto na estratégia Boc/Bzl quanto na Fmoc/tBu, o aminoácido carboxi-terminal é ligado covalentemente à resina através de uma ligação éster para obtenção de peptídeos com carboxilatos livres, ou de uma ligação amida para a obtenção de peptídeos com extremidade α -carboxamida após a clivagem final em meio ácido. O método da fase sólida apresenta, como principal vantagem, a obtenção de uma grande quantidade de seqüências peptídicas diferentes em um curto espaço de tempo. Isso ocorre principalmente devido a três fatores: 1) a automação do processo de síntese, que permite que todos os ciclos sintéticos ocorram em um único frasco de reação contendo uma placa porosa filtrante. Essa placa irá reter a resina desde o início até o final da síntese da seqüência desejada, evitando-se, portanto, a troca do frasco de reação, simplificando bastante o processo e evitando perdas do produto; 2) a eliminação de todos os solventes, reagentes e subprodutos, das diversas etapas do ciclo sintético, por simples filtração, permitindo o uso em excesso de solventes e reagentes. Este procedimento pode ser realizado devido a insolubilidade da resina em todos os solventes utilizados na química de peptídeos; 3) a otimização dos métodos de acoplamento, dos protetores de cadeias laterais, das resinas utilizadas, da técnica de clivagem e dos solventes utilizados. Apesar destes avanços, um grande problema ainda é encontrado: a obtenção de seqüências com deleção ao final da síntese, provocada principalmente pela formação de agregações entre as cadeias peptídicas dentro do grão de resina (KENT, 1985; VAN WOERKOM; VAN NISPEEN, 1991). Visando avaliar em pormenores a influência dos diferentes protetores dos resíduos tri-funcionais nesta agregação, principalmente comparando-se os da química Boc/Bzl e Fmoc/tBu, diferentes peptidil-resinas foram sintetizadas e estudadas em função de sua mobilidade na extremidade amino-terminal utilizando a ressonância paramagnética eletrônica (RPE) (CILLI et al., 1997; CILLI et al., 1999; RIBEIRO et al., 2001). A seqüência utilizada neste estudo foi a X-Ile-Asn-Gly, onde o grupo X é o aminoácido em análise na ausência e na presença dos protetores normalmente encontrados na SPFS para os resíduos tri-funcionais nos dois protocolos citados acima. A presença do aminoácido em estudo na posição 1 da seqüência permitirá o estudo de sua influência na extremidade amino-terminal, local onde ocorre o acoplamento do próximo aminoácido. As sínteses destes peptídeos foram realizadas, manualmente, pelas químicas Boc/Bzl e Fmoc/tBu, dependendo do protetor em estudo, utilizando as resinas MBAR de baixo e alto grau de substituição. Esta última proporciona, por conter um maior número de sítios por grão, uma maior interação entre as cadeias peptídicas facilitando a determinação de agregação dentro do grão. A razão de se utilizar a resina MBAR, normalmente usada somente para a química Boc/Bzl, para todos os estudos é fundamentada em dois pontos: primeiramente, a utilização do mesmo suporte e com a mesma funcionalização permite uma melhor comparação entre os protetores da química Boc/Bzl e Fmoc/tBu; segundo, o uso do protocolo Fmoc/tBu na síntese de peptídeos utilizando a resina MBAR, permitirá a obtenção de peptidil-resinas livres de protetores. Isto ocorre devido ao fato da ligação peptídeo-resina ser estável ao ácido trifluoracético quando do uso da resina MBAR. O mesmo não ocorre com os protetores das cadeias laterais utilizadas na química

Fmoc/tBu que são removidos na presença deste ácido, permitindo a obtenção do peptídeo livre de protetores. Este procedimento permitiu a obtenção da mesma sequência em 3 formas diferentes: com protetores da química Boc/Bzl, com protetores da química Fmoc/tBu e sem protetores. Os aminoácidos usados neste estudo e seus respectivos grupos protetores das cadeias laterais foram: 1) asparagina (Asn) e glutamina (Gln), usando os protetores xantila (Xan - química Boc) e tritila (Trt - química Fmoc) e 2) ácido aspártico (Asp) e ácido glutâmico (Glu), usando os protetores ciclohexila (OcHx) e benzila (Bzl) para a química Boc e o grupo tert-butila (tBu) para a química Fmoc. Os aminoácidos com cadeia lateral amida (Asn e Gln) também foram estudados na forma livre, ou seja, desprovido de proteção da cadeia lateral. A avaliação do teor da agregação foi realizada nos solventes DMF, NMP e DMSO utilizando a RPE. Para a utilização da RPE inicialmente as resinas foram marcadas com o composto paramagnético Toac (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-óxido-4-amino-4-carboxílico), protegido em seu amino grupo com o protetor Fmoc. Este método, também chamado de marcador de spin, consiste no emprego de uma molécula "sonda" paramagnética, onde, através do espectro de ressonância paramagnética eletrônica, procura-se obter informações a respeito do sistema na qual ela se encontra ligada. Essas informações podem ser sobre a liberdade de movimento na posição onde as moléculas "sondas" estão ligadas, colisões intermoleculares, ordenamento molecular, geometria local e presença de O₂ ou de outras espécies paramagnéticas. De conformidade, com os valores da velocidade rotacional da molécula, obtêm-se diferentes alargamentos das três linhas de absorção nos espectros de RPE. Por exemplo, para graus maiores de imobilização observam-se alargamentos mais acentuados devidos à sobreposição de contribuições individuais de diferentes orientações da molécula repórter com diferentes valores de A e g_e. A grande utilidade dessa técnica, na identificação do fenômeno de solvatação em resinas, provém basicamente dessa sensibilidade dos espectros de RPE à mobilidade rotacional, pois o sistema em estudo pode apresentar alterações físico-químicas dependentes do solvente empregado, e que se refletem, também, numa variação da velocidade de rotação da molécula repórter presente nesse sistema. Em termos quantitativos, a mobilidade da molécula foi analisada através do uso da largura do pico central (W₀) que representa a contribuição de todas as populações do sistema. Para os aminoácidos ácidos glutâmico e aspártico sintetizados na MBAR de 0,52 mmol/g, os menores valores da largura do pico central (W₀) listados na tabela 1, mostraram que a maior mobilidade foi encontrada utilizando o protetor tert-butil (química Fmoc), seguido dos grupos OcHx e Bzl utilizados na química Boc/Bzl. Uma única exceção foi encontrada no solvente DMF, na qual este protetor mostrou apenas o segundo menor valor de W₀. Estes dados apontam que, o protocolo Fmoc/tBu é o mais conveniente para a SPFS de peptídeos contendo estes resíduos.

Estudando-se agora as peptidil-resinas com alto grau de substituição, estas apresentaram as maiores mobilidades também utilizando o protetor tert-butil (química Fmoc), exceção ao NMP com o aminoácido Asp e em DMSO para o aminoácido Glu. Estes dados confirmam os resultados acima, de que a síntese utilizando aminoácidos ácidos o melhor protocolo seria o Fmoc/tBu.

No estudo dos resíduos com cadeia lateral amida, podemos observar que a asparagina, ancorada nos dois tipos de resina testadas, apresentou menores valores de largura do pico central - maior mobilidade entre as cadeias peptídicas, na forma sem protetor (exceção em NMP na Bar de 0,52 mmol/g). Contrariamente, o grupo protetor Trt na resina de baixo grau de substituição (0,52 mmol/g) mostrou os maiores valores da largura do pico central em DMF e DMSO, portanto não seria uma boa opção para a síntese peptídica usando estes solventes por provocar a agregação intercadeias. Em contrapartida, notamos que em NMP este protetor obteve a menor largura entre os aminoácidos estudados, sendo este solvente uma alternativa adequada para a SPFS utilizando este protetor. Já para a glutamina, os resultados obtidos mostraram que de uma maneira geral o grupo Trt (química Fmoc) foi o que apresentou uma maior largura do pico central W₀ e, portanto, maior agregação entre as cadeias. As maiores mobilidades foram também neste aminoácido encontradas no foram sem protetor (exceção para os solventes DMF e DMSO na resina de baixo grau de substituição), sendo esta forma a melhor para a síntese peptídica neste tipo de resina, já que, além da menor agregação o aminoácido na forma livre é também o mais barato. Numa breve conclusão, vemos que por estes resultados, os peptídeos contendo Asn e Gln sem protetores apresentaram menor agregação no interior do grão de resina; já os contendo Glu e Asp o grupo tBu, do protocolo Fmoc/tBu, possui maior mobilidade intercadeias, sendo os mais efetivos para uso na SPFS. Os melhores solventes, em resinas de baixo grau de substituição, foram DMF e NMP; já em resinas de alto grau, DMSO e DMF obtiveram melhores resultados. Desta

forma podemos sugerir que para a síntese de peptídeos contendo estes aminoácidos o melhor protocolo seria o Fmoc/tBu utilizando resíduo de Asn e Gln sem protetores da cadeia lateral.

Tabela 1: Largura do pico central em função do solvente e dos protetores da cadeia lateral dos aminoácidos aspártico e glutâmico em baixo e alto grau de substituição.

	Largura do pico central - W_0 (G)					
	MBAR 0,52 mmol/g			MBAR 2,35 mmol/g		
Tipo de Protetor	DMF	NMP	DMSO	DMF	NMP	DMSO
Asp (tBu)	1,94	1,89	1,88	1,94	2,20	1,89
Asp (Bzl)	1,82	2,17	2,06	2,17	2,50	2,14
Asp (OcHx)	2,33	2,69	2,28	2,01	2,15	2,09
Glu (tBu)	1,86	1,80	1,79	1,91	1,98	2,02
Glu (Bzl)	1,97	1,97	1,91	1,95	2,24	1,95
Glu (OcHx)	1,91	1,86	2,04	2,00	2,21	1,98

Tabela 2: Largura do pico central em função do solvente e dos protetores da cadeia lateral dos

	Largura do pico central - W_0 (G)					
	MBAR 0,52 mmol/g			MBAR 2,35 mmol/g		
Tipo de Protetor	DMF	NMP	DMSO	DMF	NMP	DMSO
Asn (Xan)	2,3	2,8	2,1	2,3	3,4	2,0
Asn (NH ₂)	1,9	2,3	2,0	2,0	2,2	2,3
Asn (Trt)	2,4	1,8	8,5	2,5	2,5	2,7
Gln (Xan)	2,0	2,0	2,3	2,0	2,4	1,8
Gln (NH ₂)	2,1	1,8	2,4	2,0	2,3	1,7
Gln (Trt)	4,1	2,2	3,8	2,1	2,2	2,4

aminoácidos asparagina e glutamina em baixo e alto grau de substituição.

Referências Bibliográficas

- [1] ALBERICIO, F. Orthogonal protecting groups for N alpha-amino and C-terminal carboxyl functions in solid-phase peptide synthesis. **Biopolymers**, v. 55, n. 2, p. 123-139, 2000.

- [2] ATHERTON, E.; SHEPPARD, R. C. **Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach**. Oxford: I.R.L. Press at Oxford University Press., 1989, p.
- [3] CILLI, E. M.; MARCHETTO, R.; SCHREIER, S.; NAKAIE, C. R. Use of spin label EPR spectra to monitor peptide chain aggregation inside resin beads. **Tetrahedron Letters**, v. 38, n. 4, p. 517-520, 1997.
- [4] CILLI, E. M.; MARCHETTO, R.; SCHREIER, S.; NAKAIE, C. R. Correlation between the mobility of spin-labeled peptide chains and resin solvation: An approach to optimize the synthesis of aggregating sequences. **Journal of Organic Chemistry**, v. 64, n. 25, p. 9118-9123, 1999.
- [5] KENT, S. B. H. Difficult sequences in stepwise peptide synthesis: common molecular origins in solution and solid phase? **American Peptide Symposium**. p. 407-414, 1985.
- [6] MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. **Journal of American Chemical Society**, v. 85p. 2149-2153, 1963.
- [7] RIBEIRO, S. C. F.; SCHREIER, S.; NAKAIE, C. R.; CILLI, E. M. Effect of temperature on peptide chain aggregation: an EPR study of model peptidyl-resins. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n. 19, p. 3243-3246, 2001.
- [8] VAN WOERKOM, W. J.; VAN NISPEN, J. W. Difficult couplings in stepwise solid phase peptide synthesis: predictable or just a guess? **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 38, n. 2, p. 103-113, 1991.

Bolsa: CNPq/PIBIC