

SÍNTESE DE PEPTÍDEOS

REAÇÕES DE CLIVAGEM ÁCIDA DE AMINOÁCIDOS E PEPTÍDEOS LIGADOS A POLÍMEROS: RELEVÂNCIA PARA A METODOLOGIA DE SÍNTESE DE PEPTÍDEO

Eduardo Maffud Cilli
Júlia Pinto Piccoli
José Roberto Ernandes
Clovis Ryuichi Nakaie
Guita Nicolaewsky Jubilut

5.1 INTRODUÇÃO

Os primeiros peptídeos foram sintetizados na década de 1950^{1,2}, e a metodologia empregada naquela época foi denominada “clássica”, ou, mais comumente, *em solução*. Nesse método, as etapas sintéticas são efetuadas em solução homogênea, e ele envolve, geralmente, etapas de purificação de cada intermediário obtido, o que significa laboriosos processos de extrações,

cristalizações e caracterizações. Dessa forma, a síntese de pequenos fragmentos peptídicos é muito demorada. Apesar dessa limitação, esse método ainda é utilizado na obtenção de peptídeos comerciais, pois a partir do estabelecimento da rota sintética mais eficiente, essa técnica permite a obtenção de grande quantidade de material.

Apesar dessa vantagem, a dificuldade relacionada à morosidade do método não permitiu atender à enorme demanda de síntese de novas sequências peptídicas, resultado da explosiva procura por moléculas com novas atividades biológicas. O método da síntese de peptídeos denominado em *fase sólida* (SPFS, ou, em inglês, solid phase peptide synthesis – SPPS) surgiu, portanto, nesse contexto histórico. Introduzido por Bruce R. Merrifield na década de 1960³, esse novo protocolo permitiu a obtenção de diferentes peptídeos em intervalos de tempo relativamente curtos (Figura 5.1).

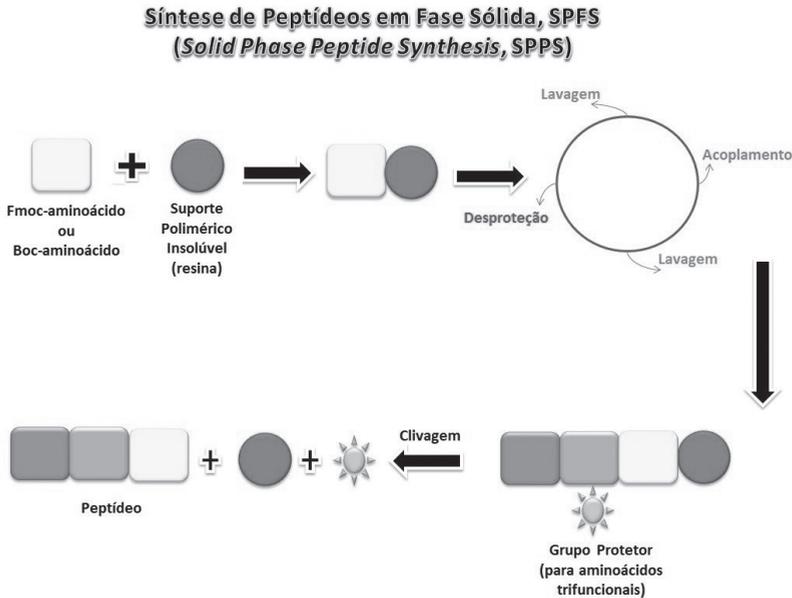


Figura 5.1 Esquema resumido da síntese de peptídeos em fase sólida.

Esse método de síntese está descrito em diversas revisões⁴⁻¹³ e baseia-se no crescimento, resíduo por resíduo, da cadeia peptídica presa covalentemente pelo seu aminoácido carboxiterminal a sítios reativos existentes em um suporte sólido (resina). A característica insolúvel da resina possibilita

que todas as etapas de síntese sejam realizadas em um único frasco de reação contendo uma placa porosa filtrante. Essa placa retém a resina desde o início até o final da síntese, o que evita a troca do frasco de reação, simplificando o manuseio e impedindo perdas de produto. O uso da resina insolúvel permite que a eliminação de todos os reagentes, solventes e subprodutos, das diversas etapas do ciclo sintético, seja feita por simples filtração em placa porosa. Esse procedimento faz com que o método se torne simples e rápido, além de permitir o uso de grandes excessos de reagentes. Esse procedimento também garante reações mais eficientes e quantitativas em todas as etapas do ciclo sintético. Somado a isto, como as etapas sintéticas atualmente são padronizadas e repetitivas, é possível a automação desse método de síntese peptídica.

Apesar da simplicidade e rapidez do método, a SPFS possui uma perigosa limitação decorrente da não purificação dos produtos intermediários. Se a eficiência de cada ciclo sintético não atingir valores muito próximos do ideal (100%), pode-se ter, ao final da síntese, além do produto desejado, uma mistura muito heterogênea de subprodutos, que, dependendo do caso, dificilmente serão separados do peptídeo desejado. Rendimentos apenas razoáveis ou mesmo sofríveis são ainda observados na prática, principalmente provocados pela agregação das cadeias peptídicas no interior do grão de resina, o que causa o aparecimento de sequências com deleção, ou seja, sequências peptídicas caracterizadas pela falta de um ou mais resíduos de aminoácidos^{14,15}. Diversas técnicas têm sido utilizadas para a identificação e estudos dessas sequências, incluindo a medição direta do grão de resina^{7,16,17} a espectroscopia na região do infravermelho (IV)¹⁸, a *high-resolution magic angle spinning* (HRMAS-NMR)^{19,20}, e a ressonância paramagnética eletrônica (RPE, ou, em inglês, *electron paramagnetic resonance* – EPR)^{21,22}.

Desse modo, para que a síntese em fase sólida possa manter as vantagens de rapidez e praticidade, é fundamental que todas as etapas da síntese e também a clivagem final do peptídeo da resina ocorram com rendimentos próximos do ideal.

De acordo com o que já foi dito anteriormente, o polímero que serve como suporte sólido para o crescimento das cadeias peptídicas é fundamental para o sucesso da SPFS, devendo preencher os seguintes requisitos:

- a) ser insolúvel em todos os solventes utilizados;
- b) apresentar completa estabilidade química e física;
- c) conter sítios ativos onde deve ocorrer a ligação do aminoácido carboxiterminal, através de ligação estável covalente;

- d) possuir estrutura que possibilite a rápida difusão dos reagentes até os sítios de reação e que facilite também a remoção de subprodutos, por meio de lavagens por filtração; e
- e) não introduzir impedimentos estéricos significativos nas reações químicas que ocorrem em seu interior.

Embora existam outras opções na literatura, principalmente resinas que empregam copolímeros contendo grupos polares do tipo acrilamida ou derivados^{13,23-25} e polietilenoglicol (PEG)²⁶, o copolímero mais utilizado na síntese peptídica, desde a implantação do método da fase sólida, tem sido o copolímero de estireno contendo 1%, em peso, de intercrossamentos de divinilbenzeno (Figura 5.2). Esse copolímero possui a forma de grãos, diâmetro seco entre 35 mm e 150 mm, é completamente insolúvel em todos os solventes e é bastante estável nas condições usuais da síntese. O tamanho do grão é normalmente reportado em tamanho da malha (*mesh*), o qual é inversamente proporcional ao diâmetro da partícula. As resinas normalmente empregadas são as de 100 *mesh* a 200 *mesh* e de 200 *mesh* a 400 *mesh* (75 mm a 150 mm e 35 mm a 75 mm, respectivamente).

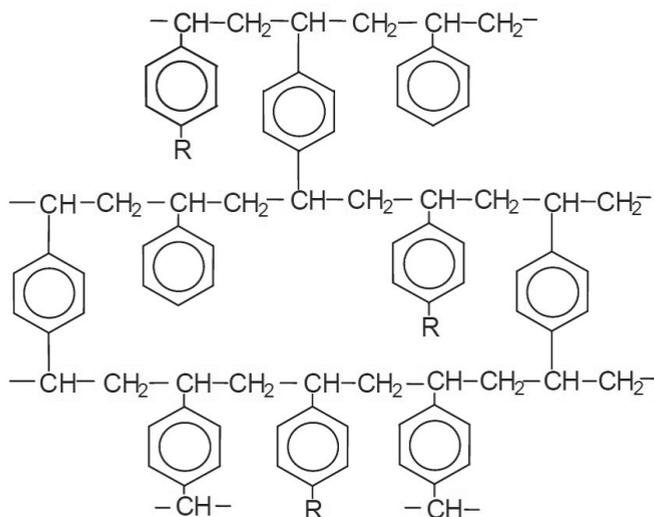


Figura 5.2 Estrutura química do copolímero de estireno, contendo 1% em peso de divinilbenzeno, funcionalizado com grupos R.

A constituição da estrutura química do copolímero de poliestireno, composta predominantemente de anéis benzênicos e grupos metilênicos,

é bastante apolar, possuindo melhor solvatação em solventes apolares (tolueno, diclorometano ou clorofórmio) do que em solventes mais polares (dimetilformamida, álcoois ou água)^{16,27}.

A SPFS nos últimos anos tem apresentado grandes avanços devido à utilização de métodos mais eficientes de acoplamento^{28,29}, uso de alta temperatura, entendimento dos parâmetros que afetam a solvatação do grão de resina e utilização de diferentes grupos para a funcionalização do polímero utilizado, entre outros.

Crítico para a síntese é a escolha de qual grupo deve ser ligado à resina para o acoplamento do primeiro aminoácido da SPFS. Esse grupo é considerado como um grupo protetor bifuncional, que é ligado à molécula desejada por meio de uma ligação lábil e ao polímero por meio de uma ligação mais estável. O número de grupos (*linker*) utilizados é enorme, sendo que é possível a obtenção de moléculas com diferentes grupos funcionais (amina, álcool, amida, ácido carboxílico, cíclicas etc.), o que ocasionou o desenvolvimento da síntese orgânica em fase sólida (SOPF). Apesar da ligação *linker*-molécula desejada ser rompida (clivada) por diferentes métodos (ácido, base, fotolábil etc.), neste capítulo nos dedicaremos ao método mais utilizado na SPFS: a clivagem ácida.

Este capítulo discute a utilização dos grupos proeminentes na funcionalização dos diferentes polímeros, bem como da etapa de clivagem peptídeo/resina e da hidrólise aminoácido/resina.

5.2 CLIVAGEM PEPTÍDEO/RESINA

Após a síntese peptídica, a liberação do peptídeo da resina é fundamental para a obtenção do material desejado. A metodologia mais empregada atualmente na clivagem peptídeo/resina envolve a utilização de uma solução contendo ácido e supressores de reações colaterais. A solução ácida é a responsável pelo rompimento da ligação entre as cadeias peptídicas e o grão de resina, bem como pela desproteção das cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais. Os supressores de reações colaterais possuem como função o sequestro, por meio de reações químicas, dos protetores que são liberados em solução, evitando a reação com outros grupos da cadeia peptídica. Durante a clivagem ácida, carbocátions são formados, podendo reagir com a espécie nucleofílica. Se a espécie nucleofílica é parte da molécula do produto a ser clivada em seguida, a molécula pode ser recolocada na fase sólida

através de uma ligação não lábil, o que resulta em baixos rendimentos de produto clivado.

O ácido e os supressores utilizados nesta etapa variam de acordo com a metodologia de síntese. As duas estratégias de síntese mais utilizadas na obtenção de peptídeos estão descritas abaixo. A primeira e mais antiga, emprega o grupamento ácido lábil t-butiloxicarbonila (Boc) como protetor do α -amino grupo, e derivados benzílicos (Bzl) para a proteção da maioria das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais (Boc/Bzl). Alternativamente, a segunda opção utiliza os grupamentos 9-fluorenilmetiloxicarbonila (Fmoc) (base lábil) e terc-butílicos (tBu), respectivamente (Fmoc/tBu). Em ambas as metodologias, o aminoácido carboxiterminal 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 teor de incorporação dos aminoácidos é usualmente determinado por análise de aminoácidos.

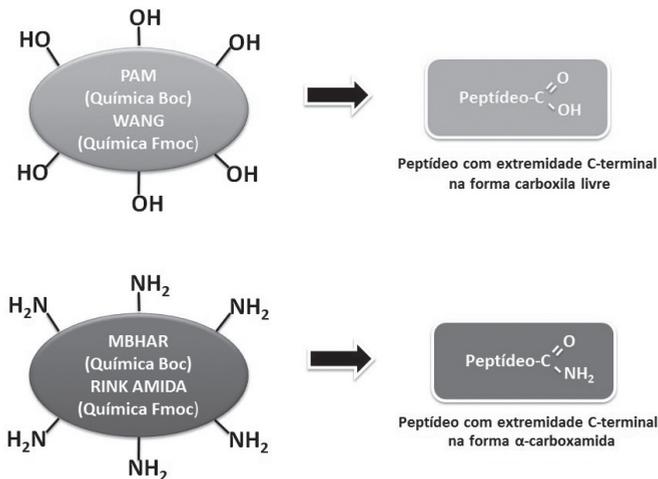


Figura 5.3 Principais resinas utilizadas na síntese de peptídeos em fase sólida para a obtenção de peptídeos carboxila livre e carboxiamidas.

5.3 QUÍMICA BOC/BZL

No caso da estratégia Boc/Bzl, a síntese de peptídeo inicia-se com a remoção do grupo Boc em 30% ácido trifluoracético (TFA) em diclorometano

(DCM), lavagens, desprotonação do amino grupo em 10% N,N,N-trietilamina (TEA) em DCM, lavagens em DCM, seguida da fase de acoplamento do próximo aminoácido (Figura 5.4). A estratégia alternativa Fmoc/tBu é mais simplificada, pois a remoção do grupo protetor Fmoc é feita em meio básico com 20% piperidina em dimetilformamida (DMF), o que já libera o grupo amino na forma desprotonada para a fase seguinte de acoplamento.

Para a clivagem do peptídeo da resina utilizando-se a estratégia contendo o grupo Boc como protetor do grupo amino alfa dos aminoácidos, utilizava-se, prioritariamente o fluoreto de hidrogênio. Devido à dificuldade de obtenção e manuseio desse produto, outros ácidos têm sido utilizados para a clivagem, como a mistura contendo o ácido trifluorometanossulfônico (TFMSA), trifluoracético (TFA) e tioanisol ou o éster de trimetilsililtrifluorometanosulfonato (TMSOTf)³⁰.

A metodologia empregada para a clivagem do peptídeo da resina utilizando a mistura TFMSA/TFA/tioanisol é apresentada no Esquema 1.

5.3.1 Esquema 1: Metodologia para clivagem do peptídeo da resina utilizando TFMSA

Para cada 100 mg de peptidil-resina:

- Adicionar, sob agitação, 200 μ L de tioanisol e 100 μ L de etanoditiol.
- Colocar o frasco em um banho de gelo e espere resfriar.
- Adicionar, sob agitação, 2 mL de ácido trifluoracético.
- Agitar por 2 min.
- Adicionar lentamente, sob agitação, 200 μ L de TFMSA.
- Retirar o frasco do banho de gelo e deixar agitando durante 2 horas a T_{amb} .
- Após este período, adicionar 25 mL de éter etílico.
- Centrifugar e desprezar o sobrenadante. Repetir este procedimento 2 vezes.
- Secar o material obtido (resina + peptídeo).
- Adicionar uma solução contendo água acidulada. Sugestão: 0,045% de ácido trifluoracético em água (dependendo do peptídeo, pode ser necessária a adição de acetonitrila para dissolvê-lo).
- Reservar o sobrenadante (solução contendo o peptídeo). Repetir este procedimento 2 vezes.
- Liofilizar o sobrenadante obtido.

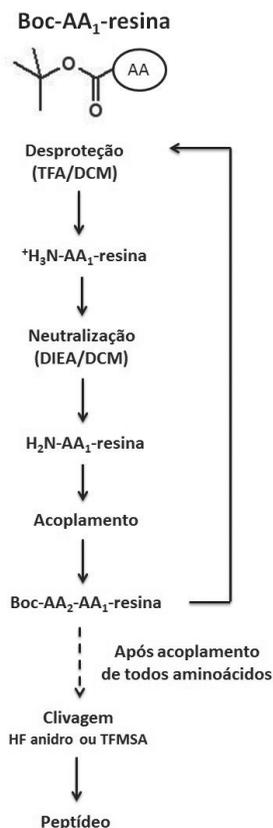


Figura 5.4 Esquema da síntese de peptídeos em fase sólida utilizando a estratégia Boc.

Os estudos de nosso grupo mostraram que³¹, de maneira geral, a clivagem de um peptídeo contendo na extremidade C-terminal (extremidade do peptídeo ligada à resina) um resíduo hidrofóbico ocorre mais lentamente e com um menor rendimento que peptídeos contendo nessa mesma extremidade um resíduo menos apolar (Figura 5.5). Para melhor entender essa limitação, a angiotensina (DRVYIHPF) contendo o aminoácido fenilalanina (hidrofóbico) em sua extremidade C-terminal e um análogo contendo glicina nesta posição foi sintetizada nas principais resinas utilizadas na SPFS com o protocolo Boc/Bzl (Figura 5.4). As resinas avaliadas foram a resina benzidrilamina (BHAR) e resina metilbenzidrilamina (MBHAR), que, ao final da síntese, produzem peptídeos com a extremidade C-terminal amida; a resina clorometilada (CMR) e a resina 4-(aminoaciloximetil)fenilacetamidometila (PAM), que permitem a obtenção de peptídeos com a extremidade

C-terminal na forma de carboxila livre. A metodologia de clivagem foi a que utiliza a mistura TFMSA/TFA/tioanisol em duas temperaturas diferentes (0 °C e 25 °C).

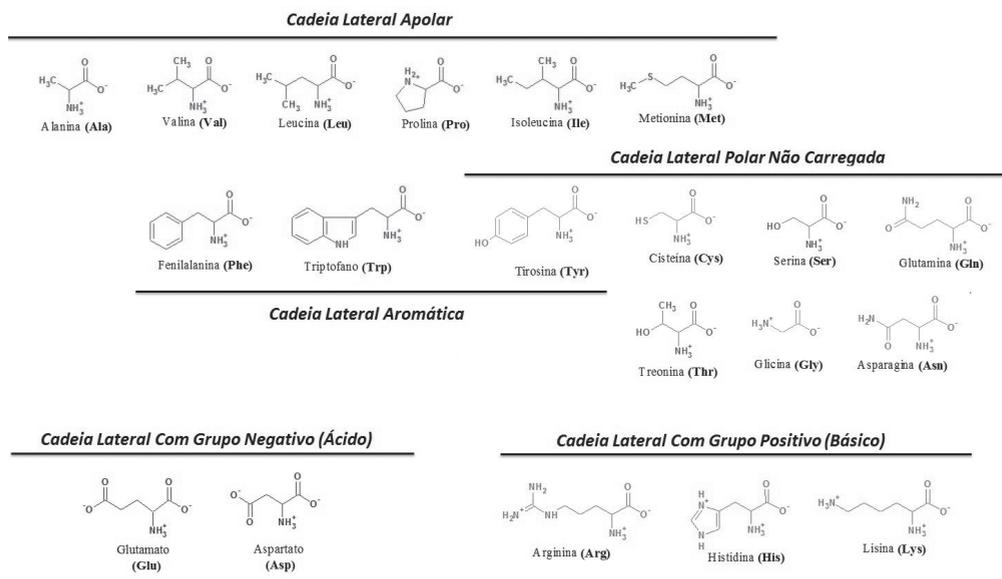


Figura 5.5 Fórmulas estruturais dos aminoácidos classificados de acordo com a natureza da cadeia lateral.

Os resultados mostraram que a ligação peptídeo/suporte sólido nas condições avaliadas para a resina fenilacetamidometila (PAMR), 2 horas de reação a 0 °C, é suficientemente lábil para a remoção de praticamente todo o material, independentemente da polaridade do resíduo de aminoácido ligado a ela (Figura 5.6). No entanto, as resinas BHAR e MBAHR mostraram comportamentos diferentes. A resina BHAR foi adequada para peptídeos contendo resíduo menos apolares na extremidade C-terminal (neste caso representados pela Gly). Para resíduos hidrofóbicos (Phe) essa resina foi inadequada, liberando, mesmo com o aumento de temperatura, apenas 70% das cadeias em duas horas de reação. O uso da resina MBHAR permitiu a liberação de 89% das cadeias peptídicas.

Esses resultados, avaliados isoladamente, mostraram que a resina ideal para a obtenção de peptídeos carboxiamida é a resina MBHAR. No entanto, outro fator deve ser considerado: a liberação das cadeias peptídicas durante a etapa ácida de desproteção do grupo Boc que ocorre durante a síntese.

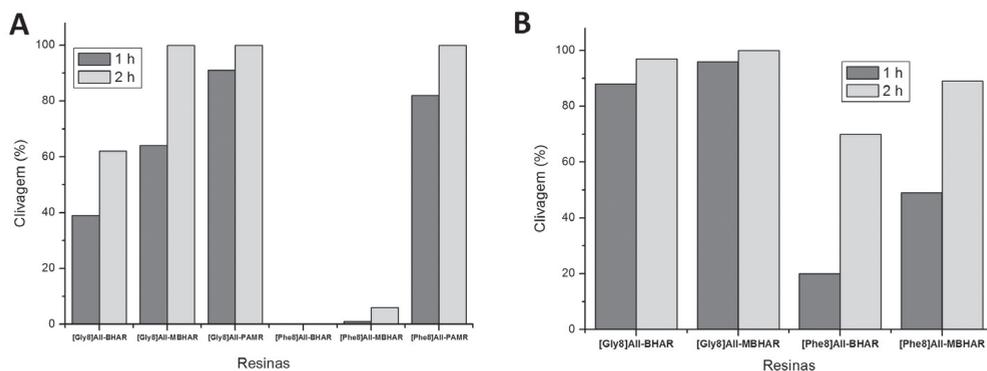


Figura 5.6 Clivagem do peptídeo angio-II ([Phe8]AII) e de seu análogo ([Gly8]AII) em diferentes resinas por meio do método contendo a mistura TFMSA/TFA/tioanisol a 0 °C (A) e 25 °C (B).

O tratamento com TFA, 30% ou 50% em DCM, deveria apenas remover o grupo Boc da extremidade amínica, mas pode, dependendo da resina, do aminoácido ligado a ela e da frequência desse tratamento, induzir a remoção parcial das cadeias peptídicas, consequência de uma inadequada estabilidade da ligação peptidil-resina^{4,5}. O tratamento ácido para a remoção do grupo Boc deve idealmente clivar completamente o grupo Boc, mas não promover a remoção do peptídeo da resina, o que acarretaria perda das cadeias em crescimento, diminuindo o rendimento final da síntese.

Estudos envolvendo a resina clorometilada (grupo clorometila ligado aos anéis aromáticos do polímero de poliestireno) mostraram que 1% das cadeias peptídicas eram perdidas por etapa de desproteção³². Jubilut e colaboradores³³ mostraram que o tratamento de diferentes peptidil-resinas com TFA 30% em DCM por um período máximo de 20 horas, o que corresponderia a 40 ciclos durante a síntese de um peptídeo composto de 40 resíduos de aminoácidos, promove a perda de uma parcela significativa de cadeias peptídicas da resina. A ordem de estabilidade da ligação peptídeo-resina seguiu a sequência decrescente BHAR > MBHAR = PAMR > CMR.

Somado a isto, foi observado que a ligação da Phe (aminoácido hidrofóbico) à resina foi mais estável do que a da Gly (menos polar). Adicionalmente, esse trabalho mostrou que a substituição de Gly por resíduos de Asp e His não afetou a estabilidade dessa ligação. A perda mais significativa de cadeias peptídicas, observada na Figura 5.7, foi notada com a

[Gly8]-AII-CMR, enquanto a mais estável foi a [Phe8]-AII-BAR (perda de 22% e 5% após 20 horas, respectivamente).

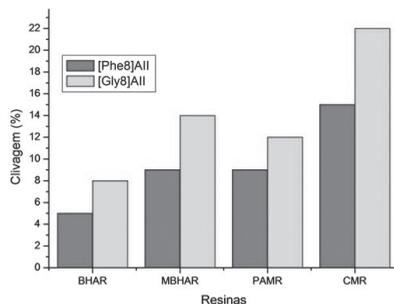


Figura 5.7 Porcentagem de perda de cadeias de angio-II ([Phe8]AII) e de seu análogo ([Gly8]AII), em 40 horas, na presença de 30% TFA/DCM.

De uma forma geral e avaliando os dados detalhados, podemos concluir que, para a obtenção de peptídeos de cadeia longa (por exemplo, com 40 resíduos ou mais) contendo resíduo C-terminal hidrofóbico, a BHAR é mais vantajosa em relação à MBHAR, devido à menor perda nas etapas de desproteção do grupamento Boc. A perda no rendimento em função da estabilidade da ligação peptidil-BHAR na etapa de clivagem é compensada pela maior estabilidade nas repetidas remoções do protetor Boc pelo TFA. No entanto, para peptídeos menores a melhor resina seria a MBHAR.

Como regras gerais para a escolha da melhor resina para a SPFS utilizando a metodologia Boc/Bzl podemos concluir:

- 1) Para peptídeos pequenos (de até 15 resíduos), a utilização da MBHAR é mais vantajosa, independentemente da sequência sintetizada.
- 2) Para peptídeos maiores com um resíduo hidrofóbico na extremidade C-terminal deve-se utilizar a resina MBHAR.
- 3) Para peptídeos maiores com um resíduo polar na extremidade C-terminal deve-se utilizar a resina BHAR.

5.4 QUÍMICA FMOC/TBU

As sínteses que utilizam a estratégia Fmoc/tBu empregam espaçadores mais lábeis para a ligação peptídeo resina (Figura 5.8). Como durante as

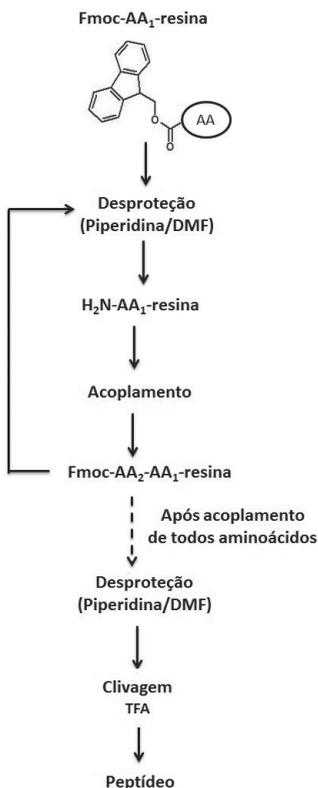


Figura 5.8 Esquema da síntese de peptídeos em fase sólida utilizando a estratégia Fmoc.

etapas de acoplamento não se utiliza ácido, o uso desses espaçadores permite que a clivagem do peptídeo da resina ao final da síntese seja realizada em condições menos agressivas. A clivagem é realizada tratando a peptidil-resina com o ácido TFA (trifluoracético) (Esquema 2). Durante o processo, da mesma forma que na química Boc-Bzl, as cadeias laterais também são clivadas. Dessa forma, espécies catiônicas extremamente reativas são geradas a partir dos grupos protetores dos aminoácidos. Esses compostos podem reverter a ligação clivada e modificar resíduos que contenham grupos funcionais nucleofílicos, como: Trp, Met, Tyr, Cys, entre outros (Figura 5.5). Para prevenir, adicionam-se vários reagentes nucleofílicos, que agem como supressores de cadeias laterais, reagindo e inativando os compostos liberados (Figura 5.9).

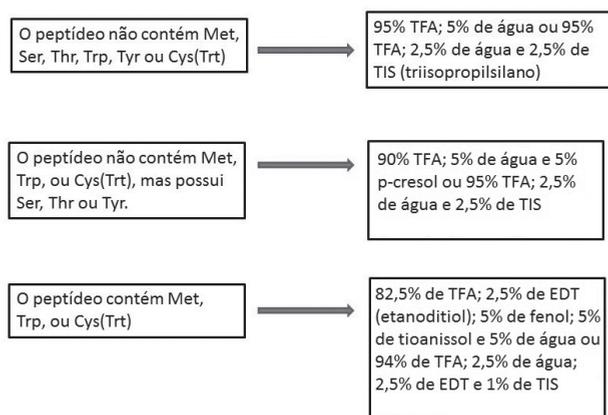


Figura 5.9 Coquetéis utilizados na clivagem de peptídeos da química Fmoc/tBu³⁴.

5.4.1 Esquema 2: Metodologia para clivagem do peptídeo da resina utilizando TFA – Química Fmoc/tBu

Para cada 100 mg de peptidil-resina:

- Adicionar 1 mL da solução descrita na Figura 5.9 de acordo com a composição de aminoácidos do peptídeo. Adicionar, sob agitação, primeiro os supressores de cadeia lateral, e posteriormente o ácido trifluoracético.
- Deixar agitando durante 2 horas ou 4 horas para aminoácidos hidrofílicos ou hidrofóbicos, respectivamente, a T_{amb} .
- Após esse período, adicionar 25 mL de éter etílico.
- Centrifugar e desprezar o sobrenadante. Repetir este procedimento 2 vezes.
- Secar o material obtido (resina + peptídeo).
- Adicionar uma solução contendo água acidulada. Sugestão: 0,045% de ácido trifluoracético em água (dependendo do peptídeo, pode ser necessária a adição de acetonitrila para dissolvê-lo).
- Reservar o sobrenadante (solução contendo o peptídeo). Repetir este procedimento 2 vezes.
- Liofilizar o sobrenadante obtido.

Da mesma maneira que os dados apresentados para as resinas utilizadas na química Boc/Bzl, a natureza do aminoácido ligado à resina também afeta a labilidade da ligação peptídeo/resina nas resinas utilizadas na química Fmoc/tBu. A comprovação foi realizada por Jubilit e cols em 2007³⁵, utilizando novamente os peptídeos [Phe8]AII e seu análogo ([Gly8]AII) em quatro tipos de resinas utilizadas na SPFS empregando a química Fmoc/tBu. As resinas utilizadas neste trabalho foram a que emprega o espaçador ácido 4-hidroximetilfenoxiacético³⁶ (HMPA) ligado ao poliestireno e a resina Wang (polímero funcionalizado com grupos p-alcoxibenzílicos). Ambas as resinas são utilizadas na obtenção de peptídeos com a extremidade C-terminal na forma de carboxilatos. Para as resinas que possibilitam a obtenção de peptídeos carboxiamida foram avaliadas as resinas Rink, que possuem, ligado ao polímero, o grupamento ácido 4-[(2',4'-dimetoxifenil)Fmoc-aminometil]fenoxiacetamido, e a resina contendo o espaçador Knorr³⁷ (ácido 4-[(R,S)- α -[1-(9H-fluoren-9-il)-metoxi-formamida]-2,4-dimetoxibenzil-fenoxiacético).

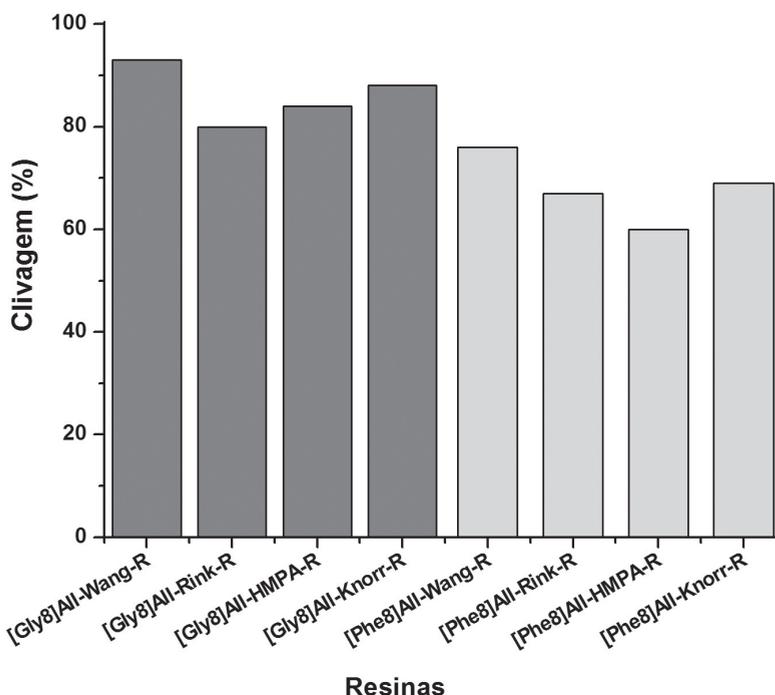


Figura 5.10 Clivagem do peptídeo angio-II ([Phe8] AII) e de seu análogo ([Gly8] AII) em diferentes resinas por meio do método contendo a mistura 82,5% TFA; 2,5% de EDT; 5% de fenol; 5% de tianisol e 5% de água (Reagente K) a T_{amb} por 2 horas³⁶.

Os dados obtidos mostraram que independentemente da resina utilizada, quando o resíduo de aminoácido ligado à resina é hidrofóbico, há necessidade de maior tempo para a remoção do peptídeo da resina, quando comparado a resíduos menos hidrofóbicos. Os dados obtidos também mostraram que isso ocorre independentemente do “coquetel” (mistura) de clivagem utilizada (Figura 5.10). Aminoácidos hidrofóbicos proporcionam maior estabilidade da ligação e maior dificuldade de clivagem, necessitando de um maior tempo para a clivagem.

Os dados obtidos sugerem que, para cadeias contendo como primeiro aminoácido da síntese um resíduo hidrofóbico, o tempo de reação deve ser aumentado em relação ao normalmente utilizado, isto é, de duas horas para quatro horas de reação.

Esses resultados mostraram também que o rendimento da SPFS é altamente dependente da etapa final da síntese: a clivagem do peptídeo da resina.

5.5 HIDRÓLISES DE PEPTÍDEOS

Outro item merecedor de atenção, que também está relacionado ao rompimento da ligação peptídeo/resina, é a etapa que envolve a hidrólise de aminoacil- e peptidil-resinas juntamente com as demais ligações peptídicas. A importância de se obter a hidrólise completa do grupamento ligado à resina e posterior análise de aminoácidos, possui importância quantitativa na síntese de peptídeos e na caracterização de biomateriais.

Para um estudo mais aprofundado da hidrólise ácida da ligação peptídeo/resina avaliamos novamente o tipo de peptídeo e a procedência da resina. Somado a isto, o teor de sítios ativos na resina em função da hidrólise da ligação aminoácido/resina também foi estudado.

Desde a introdução do protocolo utilizando a solução ácida contendo HCl 12 mol.L⁻¹/ácido propiônico (1:1, v/v) a 130 °C por duas horas para aminoacil ou peptidil-resinas^{38,39}, nenhum estudo sistemático foi realizado sobre a aplicabilidade desse procedimento a outras resinas introduzidas posteriormente. Além disso, o papel exato de outros fatores que afetam a reação de hidrólise, tais como a natureza do aminoácido carboxiterminal e o teor de sítios ativos, ainda não tinha sido investigado.

Na literatura, há artigos que descrevem a necessidade de tempos maiores do que duas horas para a hidrólise de algumas peptidil-resinas⁴⁰, enquanto outros sugerem que o aumento de temperatura para 160 °C durante quinze

minutos é suficiente para a hidrólise total⁴¹. Outros artigos sugerem ainda o emprego de micro-ondas para acelerar e otimizar o processo.

A hidrólise de aminoácil-resinas (Gly, Val e Phe) ligadas a BHAR de diferentes graus de substituição (0,47; 0,8 e 2,2 mmol/g) ocorreu com HCl:Prop a 130 °C. Independentemente do tempo de hidrólise, o teor de sítios por grão das resinas de partida (grau de substituição) não afetou a porcentagem de hidrólise. A Tabela 5.1^{35,42} mostra, no entanto, que há uma nítida influência do aminoácido carboxiterminal na velocidade de sua hidrólise. O aminoácido glicina, o menos apolar entre os estudados, mostrou a necessidade de 30 horas de reação para que a sua ligação com a resina fosse rompida. Esse tempo aumentou para 70 e 100 horas para os aminoácidos mais hidrofóbicos Val e Phe, respectivamente.

Tabela 5.1 Porcentagem de hidrólise de aminoácil-BAR de diferentes graus de substituição em HCl:Prop, 130 °C em diferentes tempos

AMINOACIL-BAR /GRAU DE SUBSTITUIÇÃO (mmol/g)	TEMPO DE HIDRÓLISE (h)					
	2	15	30	50	70	100
Gly (0,47)	18	80	100	–	–	–
Gly (0,80)	17	81	100	–	–	–
Gly (2,20)	18	79	100	–	–	–
Val (0,47)	11	36	54	73	100	–
Val (0,80)	10	35	53	72	100	–
Val (2,20)	11	36	54	73	100	–
Phe (0,47)	7	24	38	58	71	100
Phe (0,80)	7	24	38	57	72	100
Phe (2,20)	7	24	37	58	71	100

Devido à constatação da necessidade de tempos prolongados para a hidrólise completa dos aminoácidos ou peptídeos das resinas utilizadas na estratégia Boc, testou-se alternativamente um protocolo que pudesse ser mais rápido e eficiente do que o clássico: HCl 12 mol.L⁻¹/ácido propiônico (1:1, v/v) a 130 °C por duas horas.

Como na literatura já existiam trabalhos envolvendo análise de peptídeos e proteínas, nos quais se substituía o ácido propiônico pelo TFA com

melhores resultados^{43,44}, aplicamos essa opção para o caso de hidrólise de aminoácil e peptidil-resinas. Essa maior eficiência foi atribuída à capacidade de melhor solvatação do copolímero pelo TFA em comparação com o ácido propiônico. Para avaliar a utilização em detalhes do TFA, o primeiro parâmetro estudado foi a melhor proporção entre esse ácido e o ácido clorídrico.

Visto que o objetivo dessa substituição foi o de obtermos condições de hidrólise mais rápida possível, a temperatura escolhida foi 160 °C. Nesses estudos utilizamos a aminoácil-resina Phe-BAR com 0,4 mmol/g de grau de substituição como modelo. Os resultados mostraram que as hidrólises mais rápidas foram alcançadas quando se empregou a proporção 3:1 (v/v) entre HCl 12 mol.L⁻¹ e TFA (Tabela 5.2). Esse resultado indicou que quando se emprega um ácido mais forte que o propiônico, mas com igual ou melhor capacidade solvatante da resina, obtemos hidrólises mais eficientes, independentemente do aminoácido a ela ligado³⁵. A utilização da mistura 3:1 (v/v) entre HCl 12 mol.L⁻¹ e TFA permitiu que o tempo para hidrólise total da ligação Phe-resina diminuísse para 15 horas para as resinas PAM e MBHAR e para 30 horas para a resina BHAR.

Para uma avaliação mais completa dos métodos de hidrólises existentes, a degradação de cada aminoácido nas condições de hidrólise também foi analisada.

Tabela 5.2 Efeito da proporção entre HCl e TFA (v/v) na velocidade de hidrólise (em porcentagem) de Phe-BAR a 160 °C

TEMPO (h)	PROPORÇÕES DE HCL/TFA (V:V)			
	1:2	1:3	1:4	1:9
5	56	64	59	36
20	90	100	92	59

Como o TFA a 160 °C poderia afetar a estabilidade dos aminoácidos, a degradação destes sob essa nova condição de hidrólise foi testada e comparada com a metodologia que utiliza HCl/ácido propiônico (Tabela 5.3). Os dados mostraram que a utilização do TFA aumenta a degradação dos aminoácidos de uma maneira geral. Os aminoácidos Asp, Pro, Gly, Ala, Val, Leu e Phe não são degradados, enquanto Ser, Thr e Cys são degradados totalmente.

Tabela 5.3 Porcentagem de degradação de aminoácidos pelo método do HCl:TFA (3:1) e HCl/Prop (1:1) a 160 °C após 15 horas de reação

AMINOÁCIDO	MÉTODO	
	HCl/TFA (3:1)	HCl/Prop (1:1)
Asp	0	0
Thr	100	100
Ser	100	100
Glu	18	6
Pro	0	0
Gly	0	1
Ala	0	0
Cys	100	100
Val	0	3
Met	54	36
Ile	21	18
Leu	6	0
Tyr	51	20
Phe	2	0
His	16	5
Lys	9	4
Arg	8	0

Neste capítulo foram investigados os fatores que afetam a labilidade da ligação aminoacil ou peptidil-resina e a implicação desses resultados para a metodologia da síntese peptídica em fase sólida. Esta labilidade foi testada frente a diferentes condições ácidas, visando tanto a clivagem do peptídeo da resina como a hidrólise total da ligação, juntamente com a hidrólise do peptídeo.

Em todos os estudos foi possível verificar a importância da natureza do aminoácido na estabilidade da ligação com a resina. Aminoácidos mais hidrofóbicos aumentam a estabilidade da ligação, dificultando seu rompimento.

Os resultados indicam que os tempos de clivagem recomendados por anos na literatura não são suficientes para a remoção quantitativa de peptídeos contendo resíduos hidrofóbicos em sua extremidade C-terminal, fato este que pode afetar de maneira significativa o rendimento final da SPFS.

Os estudos das resinas mais comumente utilizadas na SPFS mostraram que ocorre diferença na labilidade da ligação com o peptídeo dependendo do grupo utilizado na funcionalização do copolímero.

Outro dado interessante foi que a mistura HCl:TFA, na proporção 1:3, v/v, induz hidrólise mais rápida que o tradicional HCl:ácido propiônico, 1:1, v/v, utilizado normalmente nos protocolos tradicionais. No entanto, a degradação de alguns aminoácidos aumenta com a utilização do TFA.

Os dados obtidos mostraram que a padronização dos métodos de clivagem e hidrólise devem levar em conta a natureza do aminoácido ligado à resina. Somado a isto, outros grupos para a funcionalização dos polímeros devem ser estudados, visando aumentar o rendimento da etapa final da síntese, a clivagem.

REFERÊNCIAS

1. Du Vigneaud V. Hormones of the posterior pituitary gland: oxytocin and vasopressin. *Harvey Lect.* 1954;50:1-26.
2. Schwyzer R, Sieber P. Total Synthesis of Adrenocorticotrophic Hormone. *Nature.* 1963;199:172-4.
3. Merrifield RB. Solid-phase Peptide Synthesis. 3. An Improved Synthesis of Bradykinin. *Biochemistry.* 1964;3:1385-90.
4. Barany G, Merrifield RB. Kinetics and Mechanism of the Thiolytic Removal of the Dithiasuccinoyl (Dts) Amino Protecting Group. *J. Am. Chem. Soc.* 1980;102(9):3084-5.
5. Stewart JM, Young JD. Solid phase peptide synthesis. Rockford: Pierce Chemical Company; 1984 Junho; 2: Cap 32.
6. Kent SB. Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annu Rev Biochem.* 1988;57:957-89.
7. Fields GB, Noble RL. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res.* 1990;35(3):161-214.
8. Kates SA, Albericio F, editors. *Solid Phase Synthesis, A Practical Guide.* New York: Marcel Dekker; 2000; 1.
9. Seneci P. *Solid-Phase Synthesis and Combinatorial Technologies.* New York: John Wiley & Sons; 2000.
10. Goodman M, Felix A, Moroder L, Tomiolo C. Synthesis of Peptides and Peptidomimetics. In: Büchel, KH, editor. *Houben-Weyl-Methoden der organischen Chemie*, vol. E22. Stuttgart: Thieme; 2002.
11. Benoiton NL. *Chemistry of Peptide Synthesis.* Boca Raton: CRC Press; 2005.
12. Howl J. *Peptide Synthesis and Applications (Methods in Molecular Biology).* Totowa: Humana Press; 2005.
13. Atherton E, Sheppard RC. *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (The Practical Approach Series).* Published by Oxford University Press, USA; 1989.
14. Remuzgo C, Andrade GF, Temperini ML, Miranda MT. Acanthoscurrin fragment 101-132: total synthesis at 60 degrees C of a novel difficult sequence. *Biopolymers.* 2009;92(1):65-75.
15. Schnolzer M, Alewood P, Jones A, Alewood D, Kent SBH. In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics.* 2007;13(1-2):31-44.
16. Cilli EM, Oliveira E, Marchetto R, Nakaie CR. Correlation between Solvation of Peptide-Resins and Solvent Properties(1). *J Org Chem.* 1996;61(25):8992-9000.
17. Cilli EM, Marchetto R, Schreier S, Nakaie CR. Correlation between the Mobility of Spin-Labeled Peptide Chains and Resin Solvation: An Approach To Optimize the Synthesis of Aggregating Sequences. *J Org Chem.* 1999;64(25):9118-23.

18. Cespedes GF, Vicente EF, Cilli EM. Uso da FTIR na obtenção de resinas e na síntese de peptídeos em fase sólida. *Química Nova*. 2011;34(4):589-94.
19. Keifer PA. Influence of Resin Structure, Tether Length, and Solvent upon the High-Resolution (1)H NMR Spectra of Solid-Phase-Synthesis Resins. *J Org Chem*. 1996;61(5):1558-69.
20. Valente AP, Almeida FC, Nakaie CR, Schreier S, Crusca E, Cilli EM. Study of the effect of the peptide loading and solvent system in SPPS by HRMAS-NMR. *J Pept Sci*. 2005;11(9):556-63.
21. Ribeiro SCF, Schreier S, Nakaie CR, Cilli EM. Effect of temperature on peptide side chain aggregation: an EPR study of model peptidyl-resins. *Tetrahedron Letters*. 2001;42:3243-6.
22. Cilli EM, Vicente EF, Crusca Jr E, Nakaie CR. EPR investigation of influence of side chain protecting groups on peptide-resin solvation of the Asx and Glx model. *Tetrahedron Letters*. 2007 Jul;48(31):5521-4.
23. Atherton E, Clive DL, Sheppard RC. Letter: Polyamide supports for polypeptide synthesis. *J Am Chem Soc*. 1975;97(22):6584-5.
24. Auzanneau FI, Meldal M, Bock K. Synthesis, characterization and biocompatibility of PEGA resins. *J Pept Sci*. 1995;1(1):31-44.
25. Medal MP. PEGA: A flow stable polyethylene glycol dimethyl acrylamide copolymer for solid phase synthesis. *Tetrahedron Letters*. 1992;33(21):3077-80.
26. Bayer E. Towards the Chemical Synthesis of Proteins. *Angewandte Chemie International Edition*. 1991 Feb;30(2):113-216.
27. Wieland BA, Mefferd RB. Identification of periodic components in physiological measurements. *Psychophysiology*. 1969;6(2):160-5.
28. Carpino LA. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J. Am. Chem. Soc*. 1993;115(10):4397-8.
29. El-Faham A, Subirós Funosas R, Prohens R, Albericio F. COMU: a safer and more effective replacement for benzotriazole-based uronium coupling reagents. *Chemistry*. 2009;15(37):9404-16.
30. Yajima H, Kiso Y. Studies on peptides. XLIV. Synthesis of the basic trypsin inhibitor from bovine pancreas (Kunitz and Northrop) by the fragment condensation procedure on polymer support. *Chem Pharm Bull*. 1974;22(5):1087.
31. Nakaie CR, Miranda AD, Miranda MTM, Oliveira ED, Marchetto R, Malavolta L, et al. Acid cleavage reactions of amino acids and peptides bound to polymers: relevance for peptide synthesis methodology. In: Nantes IL, Brochsztain S, editors. *Catalysis and Photochemistry in Heterogeneous Media*. Kerala: Research Signpost; 2007. p. 141-160.
32. Mitchell AR, Erickson BW, Ryabtsev MN, Hodges RS, Merrifield RB. Tert-butoxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl)-phenylacetamidomethyl-resin,

a more acid-resistant support for solid-phase peptide synthesis. *J Am Chem Soc.* 1976;98(23):7357-62.

33. Jubilut GN, Cilli EM, Tominaga M, Miranda A, Okada Y, Nakaie CR. Evaluation of the trifluoromethanesulfonic acid/trifluoroacetic acid/thioanisole cleavage procedure for application in solid-phase peptide synthesis. *Chem Pharm Bull.* 2001;49(9):1089-92.

34. Pennington MW, Byrnes ME. Procedures to improve difficult couplings. In: Pennington MW, Dunn BM, editors. *Peptide synthesis protocols*. Humana Press: Totowa; 1994. (Methods in Molecular Biology; v. 35). p. 1-16.

35. Jubilut GN, Cilli EM, Crusca E, Silva EH, Okada Y, Nakaie CR. Comparative investigation of the cleavage step in the synthesis of model peptide resins: implications for na-9-fluorenylmethoxycarbonyl-solid phase peptide synthesis. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2007;55(3):468-70.

36. King DS, Fields CG, Fields GB. A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. *Int J Pept Protein Res.* 1990;36(3):255-66.

37. Bernatowicz MS, Daniels SB, Koster HA. Comparison of acid labile linkage agents for the synthesis of peptide C-terminal amides. *Tetrahedron Letters.* 1989; 30(35):4645-8.

38. Scotchler J, Lozier R, Robinson AB. Cleavage of single amino acid residues from Merrifield resin with hydrogen chloride and hydrogen fluoride. *J Org Chem.* 1970;35(9):3151-2.

39. Westall FC, Scotchler J, Robinson AB. The use of propionic acid-hydrochloric acid hydrolysis in Merrifield solid-phase peptide synthesis. *J Org Chem.* 1972;37(21):3363-5.

40. Matsueda GR, Stewart JM. A p-methylbenzhydrylamine resin for improved solid-phase synthesis of peptide amides. *Peptides.* 1981;2(1):45-50.

41. Westall F, Hesser H. Fifteen-minute acid hydrolysis of peptides. *Anal Biochem.* 1974;61(2):610-3.

42. Jubilut GN, Marchetto R, Cilli EM, Oliveira Ed, Miranda Ad, Tominaga M, et al. Comparative Time Course Study Of Aminoacyl-And Dipeptidyl-Resin Hydrolysis. *Journal of Brazilian Chemical Society.* 1997;8(1):65-70.

43. Tsugita A, Uchida T, Mewes HW, Ataka T. A rapid vapor-phase acid (hydrochloric acid and trifluoroacetic acid) hydrolysis of peptide and protein. *J Biochem.* 1987;102(6):1593-7.

44. Tsugita A, Scheffler JJ. A rapid method for acid hydrolysis of protein with a mixture of trifluoroacetic acid and hydrochloric acid. *Eur J Biochem.* 1982;124(3):585-8.