## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

## THIAGO DE SOUZA FREIRE

### Solvólise da Ligação Peptidil-Resina Mediada por Íons Metálicos Divalentes: Método Alternativo de Obter Peptídeos Modificados no C-terminal

Versão corrigida da dissertação

São Paulo Data do depósito 05/03/2013

## THIAGO DE SOUZA FREIRE

## Solvólise da Ligação Peptidil-Resina Mediada por Íons Metálicos Divalentes: Método Alternativo de Obter Peptídeos Modificados no C-Terminal

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção de Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Maria Teresa Machini

São Paulo 2013

Dedico esta Dissertação aos meus professores, Zenilda minha primeira professora com a qual aprendi a ler, Ana Paula minha professora do terceiro ano do ensino fundamental, que me ensinou a amar a ciência, Adriana e Marcelo meus atenciosos professores de inglês que sempre me fizeram sentir parte de uma família e por fim ao professor e mestre Massa que dedicou muitos sábados e domingos para que meus colegas e eu tivéssemos alguma oportunidade de passar no vestibular. Sem duvidas vocês foram fundamentais, para que eu pudesse estar aqui hoje. muito obrigado!

## Agradecimentos

À Natureza pelo tempo, espaço, vida e oportunidade de existir.

À Prof<sup>a</sup> M. Teresa Machini pela orientação e oportunidade de fazer parte do Laboratório Química de Peptídeos.

Aos colegas de Laboratório, pelo companheirismo e amizade.

Ao Cleber pelas análises de aminoácidos.

Ao prof. Rômulo pelas análises de infravermelho.

Ao prof. Leandro pela ajuda nas questões teóricas envolvendo Química Orgânica.

Ao CNPq pela bolsa de Mestrado.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

"Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez". Thomaz Edison

#### RESUMO

Freire, T. S. Solvólise da Ligação Peptidil-Resina Mediada por Íons Metálicos Divalentes: Método Alternativo de Obter Peptídeos Modificados no C-Terminal. 2012. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Este estudo enfocou a mediação por íons metálicos divalentes da solvólise da ligação éster formada entre peptídeos e resinas, método desenvolvido por nós para a preparação de peptídeos C-modificados. Os objetivos foram: i) adaptá-lo para a estratégia Fmoc de síntese, ii) buscar resinas adequadas para tal propósito, iii) verificar qual íon metálico é mais eficiente para mediar tal reação; iv) investigar o possível mecanismo pelo qual os íons metálicos mediam as reações estudadas. Para isso, foram testadas as resinas derivadas do ácido p-hidroximetilbenzóico (HMBA-AM, HMBA-PEGA, HMBA-TG) e do álcool *p*-benziloxibenzílico (Wang), os mediadores metálicos Ca<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>, condições reacionais determinadas em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (50% nucleófilo/ DMF) e os solventes nucleófilos metanol, etanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, álcool benzílico, butilamina e hexilamina. O desligamento de aminoácidos e peptídeos esterificados das resinas ocorreu com altos rendimentos (72 – 98%). A resina HMBA-AM e o íon Zn<sup>2+</sup> demonstraram ser a combinação mais eficiente. Análises de espectroscopia de infravermelho na presença e ausência do íon metálico indicaram um mecanismo de reação no qual a coordenação do íon Zn<sup>2+</sup> com o álcool facilita a formação do íon alcóxido, o qual é um nucleófilo melhor que o álcool e com capacidade de atacar o carbono da carbonila da ligação éster entre o peptídeo e a resina.

**Palavras chave:** Resina HMBA, alcoólise, Zn<sup>2+</sup>, aminoácido esterificado, peptídeo esterificado.

#### ABSTRACT

Freire, T. S. Solvolysis of Peptidyl-Resin Linkage Promoted by Divalent Metal Ions: Alternative Method to obtain C-terminal Modified Peptides. 2012. Dissertation -Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The present study was focused on divalent metal ions-mediated solvolysis of the ester linkage formed between peptides and resins, a method developed by us for the preparation of C-modified peptides. The aims were: i) to adapt it for the Fmoc synthesis strategy; ii) to search resins suitable for such purpose; iii) to determine which divalent metal ion is the most efficient reaction mediator; iv) to investigate the mechanism by which the metal ion mediates the solvolysis reactions studied. Therefore, we employed the resins *p*-hydroxymethylbenzoic acid (HMBA-AM, HMBA-PEGA, HMBA-TG) and *p*-benzyloxybenzyl (Wang) alcohol, the metal ions Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>, the optimized solvolysis conditions found in our previous studies (50% nucleophile/DMF) and the nucleophilic solvents methanol, ethanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, benzyl alcohol, butylamine and cyclohexylamine.

Detachment of esterified amino acids or peptides from resins gave high yields (72-98%). HMBA-AM resin and  $Zn^{2+}$  ion showed to be the most effective combination of resin and metal ion. Infrared spectroscopy analysis of the peptide-resins in absence and presence of such metal ion suggested a mechanism of reaction where the coordination of  $Zn^{2+}$  ion with the alcohol promotes its deprotonation to give the alkoxide ion, which is a better nucleophile and can attack the carbonyl carbon of the ester linkage formed between the amino acid and the resin.

**Keywords**: Resin HMBA, alcoholysis, Zn<sup>2+</sup>, esterified amino acid, esterified peptide.

## Lista de abreviações

As abreviações utilizadas estão de acordo com as recomendações da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) e da IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) disponíveis no site <a href="http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/">http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/</a>

### Código de três letras para os vinte aminoácidos usuais

Ala: alanina
Arg: arginina
Asn: asparagina
Asp: ácido aspártico
Cys: cisteína
Glu: ácido glutâmico
Gly: glicina

His: histidina
Ile: isoleucina
Leu: leucina
Lys: lisina
Met: metionina
Phe: fenilalanina
<b>Pro</b> : prolina

Ser: serina Thr: treonina Trp: triptofano Tyr: tirosina Val: valina	
Thr: treonina Trp: triptofano Tyr: tirosina Val: valina	Ser: serina
Trp: triptofano Tyr: tirosina Val: valina	Thr: treonina
Tyr: tirosina Val: valina	Trp: triptofano
Val: valina	<b>Tyr</b> : tirosina
	Val: valina

Ac: acetil

ACN: acetonitrila

Boc: *t*-butiloxicarbonil

But: butil

Bzl: benzil

DBF: dibenzofulveno

DBU: 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undeca-7-eno

DCM: diclorometano

**DIPEA**: *N*,*N*<sup>-</sup> diisopropiletilamina

DMAP: p-dimetilaminopiridina

DMF: N,N'-dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

ESI: ionização por eletrospray

Et: etil

EtOH: etanol

Fmoc: 9-fluorenilmetoxicarbonil

For: formil

GA: grau de aminoacilação

HBTU: hexafluorofosfato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio

HMBA: resina ácido p-hidroximetilbenzóico

HOBt: N-hidroxibenzotriazol

IV: espectroscopia de infravermelho

**KOR**: resina oxima de Kaiser (resina *p*-nitrobenzofenona oxima)

LC/ESI-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com

ionização por eletrospray

Me: metil

MeOH: metanol

RP-HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa

RMN: ressonância magnética nuclear

SPFS: síntese de peptídeos em fase sólida

**TBTU**: tetrafluorborato de N-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio

TFA: ácido trifluoroácetico

TFMSA: ácido trifluorometanosulfônico

Wang: resina álcool p-benziloxibenzil

# ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Peptídeos	15
1.2. Métodos de síntese de peptídeos	15
1.3. Importância dos α-ésteres de aminoácidos e peptídeos	18
1.4. Síntese de peptídeos esterificados C-terminal	24
1.5. Solvólise da ligação peptidil-resina mediada por íons de cálcio	27
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Materiais utilizados	32
3.2. Aminoacilação das resinas HMBA-AM, HMBA-PEGA e HMBA-TG	32
3.3. Alongamento da cadeia peptídica	33
3.4. Análise de aminoácidos	33
3.5. Determinação do grau de aminoacilação das resinas	33
3.6. Reação de solvólise da ligação peptidil-resina	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1. Ocorrência de alcóolise da ligação entre Fmoc-Gly e Resinas Wa	ing,
ou HMBA-AM	36
4.2. Alcoólise da ligação Fmoc-Ala-resina: Estudo comparativo envolve	ndo
diferentes resinas compatíveis com a estratégia Fmoc	38
4.3. Alcooólise da ligação Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-HMBA-AM: Est	udo
comparativo entre o efeito do íon metálico e do nucleófilo	39

4.4. Investigando a remoção do grupo Fmoc					
4.5. Alcoólise da ligação Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-HMBA-AM					
4.6. Síntese do tripeptídeo Ac-Met-Leu-Phe-OMe		48			
4.7. Transesterificação de Ac-Ile-Ser-Asp-OMe		50			
4.8. Estudo do mecanismo de metanólise		52			
4.9. Aminólise da ligação Ac-Met-Leu-Phe-HMBA-AM		59			
5. MONITORAMENTO DAS REAÇÕES ESTUDADAS COM VI	STAS	A			
CARACTERIZAR OS PRODUTOS FORMADOS		61			
6. CONCLUSÕES		78			
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		80			
CURRICULUM VITAE		85			

## 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1 Peptídeos

Os peptídeos compõem um grupo de biomoléculas que apresentam uma ampla gama de funções, tais como hormonal, antimicrobiana, liberadora de hormônios e analgésica (Sewald e col., 2008). A natureza é rica nestes compostos, mas as quantidades disponíveis provenientes de fontes naturais nem sempre são suficientes para uso ou estudo desses compostos. Portanto, uma vez isolado e caracterizado o peptídeo de interesse, opta-se por sua síntese em quantidade suficiente para estudo e diferentes aplicações.

#### **1.2 Métodos de síntese de peptídeos**

<u>Síntese química em solução</u>: se baseia na síntese orgânica convencional na qual, em todas as inúmeras etapas do processo os reagentes estão dissolvidos (ou em solução). Utiliza-se um agente químico para ativar a carboxila α de um aminoácido (o doador de acila) que reagirá com o grupamento amino α de outro (o aceptor de acila) para formar a ligação peptídica (Tsuda e col., 2011). Esta metodologia exige proteção das cadeias laterais reativas dos aminoácidos, a separação, a purificação e caracterização química de todos os produtos intermediários do processo sintético (**Esquema 1).** 



**Esquema 1.** Formação da ligação peptídica via método químico. X<sub>1</sub>: grupo protetor do N-terminal, X: grupo protetor do C-terminal, R: ciclohexil, diisopropil, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>: cadeias laterais dos aminoácidos.

<u>Síntese química em fase sólida:</u> é uma metodologia alternativa na qual, o aceptor de acila está preso a um suporte polimérico (resina insolúvel no meio reacional), o que facilita as etapas de separação do peptídeo-resina do meio reacional após a adição de cada aminoácido à cadeia peptídica em crescimento (Machado e col., 2004., Miranda e col., 2011).

A síntese química em fase sólida pode ser realizada por duas estratégias químicas:

1. A estratégia Boc, que utiliza t-butiloxicarbonil como protetor do grupo amina α de aminoácidos que serão adicionados à cadeia peptídica em crescimento. Nesta estratégia, os protetores das cadeias laterais são derivados do benzil, de forma que enquanto o grupo Boc é removido com ácido trifluoroacético (TFA), os protetores das cadeias laterais são removidos apenas com ácidos mais fortes [fluoreto de hidrogênio (HF), ácido trifluorometanosulfônico (TFMSA), entre outros].

2. A estratégia Fmoc, que utiliza 9-fluorenilmetoxicarbonil como protetor do grupo amino α dos aminoácidos. Os protetores das cadeias laterais são derivados do tbutil, de forma que enquanto o grupo Fmoc é removido com bases orgânicas, os protetores das cadeias laterais são removidos com TFA. Assim, quando se realiza uma etapa de desproteção parcial para adição de um aminoácido á cadeia crescente, garante-se que os protetores das cadeias laterais não sejam removidos (Merrifiled, 1963; Sheppard e col.,1989; Machado e col., 2004; Carganico e col., 2011; **Esquema 2**).

A síntese química é uma boa ferramenta para geração dos peptídeos originais em quantidades adequadas e também torna possível a geração de peptídeos com modificações dirigidas e não usuais (análogos). O emprego de peptídeos como agentes terapêuticos, aditivos alimentares, cosméticos e ferramentas de pesquisa aumentou muito a necessidade de vias sintéticas que permitam a introdução de modificações químicas nestes compostos. Por exemplo, a esterificação da carboxila terminal de peptídeos é uma abordagem usada para melhorar a permeabilidade das membranas celulares a eles; a hidrólise do éster catalisada por esterases intracelulares restaurará a carboxila original (Liederer e col., 2006).



**Esquema 2.** Etapas da SPFS. (Esfera azul = Resina, XH = HO- ou  $H_2N$ -).

#### 1.3 Importância dos α-ésteres de aminoácidos e peptídeos

Esses compostos apresentam uma ampla gama de aplicações, tais como: - Inibidores enzimáticos (Richard e col., 2009). Hertel e colaboradores, por exemplo, estudaram o feito de sete inibidores de protease do vírus HIV (**Figura 1**) na redução da atividade da enzima 2-deoxiglicose (Hertel e col., 2004) e a partir da análise das estruturas desses inibidores foram sintetizados dipeptídeos e tripeptídeos que mimetizassem as regiões hidrofóbicas presentes nas estruturas dos inibidores.



**Figura 1**. Características estruturais de inibidores de protease do HIV: A, amprenavir; B, indinavir; C, ritonavir; D, lopinavir (adaptado de Hertel e col., 2004).

Os resultados mostraram que quando esterificados no C-terminal tais peptídeos foram inibidores mais eficientes da enzima 2-deoxiglicose (**Figura 2**).

- Ligantes de receptores de membranas (Richard e col., 2009). Mullen e colaboradores, por exemplo, descreveram a síntese do fator-a, um éster metílico de dodecapeptídeo modificado de *Saccharomyces cerevisiae*. O peptídeo sintético ligase a receptores acoplados a proteína G e portanto, serve como um sistema simples

para o estudo das interações entre o peptídeo e seu receptor (Mullen e col. 2011; **Figura 3**).



**Figura 2**. Inibição da absorção de 2-deoxiglicose por peptídeos aromáticos em adipócitos de ratos (**z** = benziloxicarbonil; extraído de Hertel e col., 2004).

- Doadores de acila em condensações enzimáticas entre fragmentos peptídicos parcialmente protegidos (Getun e col., 2001; Fite e col.,2002). Nesta abordagem, o fragmento peptídico esterificado no C terminal (**Fragmento 1**) reage com uma enzima (que apresenta função de esterase) formando o intermediário acil-enzima, que é capaz de reagir com outro fragmento peptídico que possui o grupo amino livre (**Fragmento 2**) para formar um peptídeo maior (Sekizaki e col., 1996; **Esquema 3**).



Figura 3. Fator-a de Saccharomyces cerevisiae (extraída de Mullen e col. 2010).



**Esquema 3**. Condensação enzimática entre fragmentos peptídicos ( $R_1$  = protetor do grupo amina;  $R_2$  e  $R_3$  = grupo alquila; Sekizaki e col., 1996).

- Como fragmentos peptídicos totalmente desprotegidos na condensação química entre fragmentos via "Native Chemical Ligation" (Dawson e col., 1994; Danishefsky e col.,2004). Nesse método o fragmento peptídico 1 (**Peptídeo**<sub>1</sub>) apresenta o C-terminal esterificado e um grupo sulfidrila na posição β protegido através de ligação de enxofre. A adição de tiofenol e o ajuste de pH (6,5) remove a ligação de enxofre e libera o grupo sulfidrila. A proximidade entre o grupo –SH e a ligação éster no C terminal do fragmento peptídico 1 torna possível a reação de transtioesterificação intramolecular. O fragmento peptídico 1 tioesterificado pode reagir com outro fragmento peptídico (**Peptídeo**<sub>2</sub>) para formar um peptídeo maior (**Esquema 4**).

- Como reagentes (aminoácidos e peptídeos esterificados no C-terminal) na síntese quimioenzimática de peptídeos (Liria e col., 2001; Huang e col., 2006; Timo e col., 2010).



**Esquema 4.** Reação de condensação entre fragmentos peptídicos via "Native Chemical Ligation" (Danishefsky e col.,2004).

Essa estratégia de síntese de peptídeos consiste na formação da ligação peptídica catalisada pela alcalase (uma serino-endopeptidase). Tal enzima catalisa a reação entre um éster alquílico de aminoácido com o grupo amina protegido e um terc-butil éster de aminoácido formando um éster terc-butílico de dipeptídeo com o grupo amina protegido. A adição de um álcool (metanol) converte o dipeptídeo a um éster metílico que pode reagir com outro éster terc-butílico de aminoácido promovendo o crescimento da cadeia peptídica no sentido N  $\rightarrow$  C (**Esquema 5**).

- Como formadores de canais iônicos (Ferdani e col., 2006; Gokel e col., 2007). Natasha e colaboradores, por exemplo, estudaram cinco derivados do heptapeptídeo formador de canal de cloreto, [CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>]NCO-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CO-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Gly-Gly-OR (R = etil, 2-propil, heptil, benzil e ciclohexilmetil). Neste estudo foi observado que o transporte de ânions cloreto através de bicamadas fosfolipídicas variava significativamente em função do grupo R. Quando ele era etil e isopropil o composto era inativo; quando R era cicloexilmetil e n-heptil, o heptapeptídeo apresentava grande atividade no transporte de Cl<sup>-</sup>, permitindo a conclusão que o grupo R serve como uma ancora que auxilia na interação do peptídeo formador de canal iônico com a membrana (Natasha e col., 2003; **Figura 4**).



**Esquema 5**. Síntese quimioenzimática de peptídeos (X = protetor do grupo N; Y = cadeia lateral do aminoácido; R = grupo alquila; Adaptado de Timo e col.,2010).



Figura 4. Heptapeptídeo formador de canal iônico (extraído de Natasha e col., 2003).

- Como antiinflamatórios (Spinasil e col., 2006). O derivado do tripeptídeo For-Met-Leu-Phe-OMe, por exemplo, é um análogo de For-Met-Leu-Phe-OH, subproduto do metabolismo bacteriano, que interage com receptores específicos de membrana de neutrófilos e ativa uma cascata complexa de sinais que induzem a produção de ânion e a secreção de enzimas lisossomais que levam à morte do neutrófilo (Cavicchionia e col., 2005).

- Como pró-droga (Hamel e col., 2003; Santos e col., 2005). Santos e colaboradores estudaram a estabilidade química, citotoxicidade e atividade antiviral de dipeptídeos esterificados ao antiviral aciclovir. O estudo revelou que o composto Phe-Gly-aciclovir possui alta atividade contra cepas *Herpes Simplex 1* (**Figura 5**; Santos e col., 2009).



**Figura 5**. Pró-droga Phe-Gly-Aciclovir ( $\mathbf{R}^2 = CH_2C_6H_6$ ;  $\mathbf{R}^1 = H$ ; adaptado de Santos e col.,2009).

- Como analgésicos (Gentilucci, 2004; Janecka e col., 2010). Goldberg estudou a possibilidade de utilizar peptídeos opióides esterificados no C-terminal como uma nova classe de analgésicos, tendo demonstrado que no desenvolvimento de peptídeos opiódes para serem aplicados como analgésicos apresenta dificuldades, tais como a identificação de compostos ativos (peptídeos que apresentam função analgésica), a sua síntese, a sua biodisponibilidade, a sua estabilidade no plasma frente a peptidases e esterases, a necessidade de atravessar a barreira hematoencefálica, entre outras, sendo a esterificação no C-terminal capaz de aumentar a estabilidade plasmática e a passagem através da barreira hematoencefálica (Goldberg, 2011). Exemplo é o éster etílico do dipeptídeo opióide Tyr-Pro que tem estrutura similar a do agente anestésico, Etamidato (**Figura 6**).



**Figura 6**. Similaridades estruturais do analgésico Etomidato e do dipeptídeo Tyr-Pro-OEt (adaptado de Goldberg, 2011).

Portanto, devido ao grande número de aplicações que os peptídeos esterificados no C-terminal apresentam, a sua síntese é de grande interesse científico.

#### 1.4 Síntese de peptídeos esterificados no C-terminal

O método mais antigo conhecido de síntese de peptídeos estericados emprega MeOH ou EtOH para transesterificação da ligação peptidil-resina sob condições básicas e requer tempos reacionais de 2 a 24 h (Halpern e col., 1968). Outra metodologia emprega cianeto de potássio para promover a transesterificação da ligação peptídeo-resina de Merrifield com álcool benzilico em altas temperaturas (Moore, e Kwok, 1980). Também é possível empregar a resina 4-Fmochidrazinobenzoil, que forma com a cadeia peptídica gerada pela estratégia Boc ou Fmoc, uma ligação estável a ácidos e bases; nesta abordagem a sua alcoólise é realizada na presença de acetato de cobre ou *N*-bromosuccinimida (oxidante), piridina e do álcool de interesse (Peters e Waldmann, 2003; **Esquema 6**). Outro procedimento descreve a esterificação de peptídeos com carboxila livre em solução mediada por um polímero funcionalizado (PASP – "polymer-assisted solution phase"), que é realizada em duas etapas: a primeira é a funcionalização da resina de Merrifield com um alquiltriazeno, a segunda é a esterificação do peptídeo mediada por esse polímero (Smerdka e col., 2004; **Esquema 7**).



**Esquema 6.** Formação de peptídeo C-terminal esterificado via oxidação do linker hidrazida (**Oxidante** = acetato de cobre ou N-bromosuccinimida; **PG** = protetor de grupo amina; **R** = grupo alquila; Peters e Waldmann, 2003).





Weber e Lokey descreveram um método efetivo de converter peptídeos ligados à resina 2-clorotritil ou Wang aos seus ésteres metílico, etílico, isopropílico, nbutílico, ciclopentílico e benzílico correspondentes: após o alongamento do peptídeo na resina pelo método convencional em fase sólida pela estratégia Fmoc, é realizado tratamento com HCI ( $0,2 - 3 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e o álcool de interesse (Weber e Lokey, 2010; **Esquema 8**).

**Esquema 8.** Alcoólise mediada por solução HCl anidro (R = metil, etil, isopropil, n-butil, ciclopentil,benzil; Weber e Lokey, 2010).

Recentemente, Distefano e colaboradores descreveram um novo método de síntese de peptídeos contendo císteina C-terminal metil esterificada. Este método consiste na ligação (através do grupo –SH da cadeia lateral) de Fmoc-Cys-OCH<sub>3</sub> a resina 2-CITrt-CI ou Trt-CI, seguida da síntese do peptídeo desejado usando a estratégia Fmoc e desligamento do peptídeo da resina (Distefano e col., 2012; **Esquema 9**).





Apesar da grande diversidade de métodos sintéticos para geração de peptídeos C-terminal esterificados, a maioria requer tempos longos de reação e/ou

condições reacionais drásticas o que gera a necessidade de novas abordagens sintéticas.

#### 1.5 Solvólise da ligação peptidil-resina mediada por íons cálcio

O nosso grupo foi o primeiro a observar que durante a recristalização de um tripeptídeo etil éster (**Moz-Asn-Leu-Gly-OEt**) em MeOH contendo Ca<sup>2+</sup> ocorria a sua transesterificação formando o correspondente éster metílico (**Moz-Asn-Leu-Gly-OMe**) (Miranda e col., 1991 a; **Esquema 10**). Posteriormente, foram estudadas a transesterificação de outras sequências peptídicas (**Tabela 1**), demonstrando que o método poderia ser aplicado a peptídeos etil e benzil (mas não terc-butil, ver **Tabela 1**) ésteres com rendimentos de 12-100% em 24 horas.

Dados conformacionais obtidos por <sup>1</sup>H-RMN de alta resolução sugeriram um modelo no qual o íon metálico auxilia a metanólise por se coordenar com átomos de oxigênio da molécula, tornando o carbono carbonílico do éster etílico mais eletrofílico e, portanto, mais suscetível ao ataque de nucleófilos (**Figura 7**).



**Esquema 10**. Transesterificação em solução do tripeptídeo, Moz-Asn-Leu-Gly-OEt, mediada por Ca<sup>2+</sup> (**Moz** = metoxibenziloxicarbonil, **OEt** = etoxi).

Peptídeo protegido	Transesterificação (%		
	6 h	24 h	
Z-Asn-Leu-OEt	5	13	
Z-Asn-Phe-OEt	11	73	
Boc-Leu-Gly-OEt	21	56	
Z-Asn-Leu-OBzl	7	41	
Z-Asn-Phe-OBzl	20	67	
Boc-Ile-Gly-OBzl	45	92	
Z-Asn-Cys(Bzl)-OtBu	0	0	
Z-Cys(Bzl)-Tyr-OtBu	0	0	
Moz-Asn-Leu-Gly-OEt	36	72	
Boc-Asn-Leu-Gly-OEt	28	64	
Z-Asn-Leu-Gly-OEt	36	75	
Moz-Asn-Leu-Ala-OEt	4	12	
Moz-Asn-Ile-Gly-OEt	44	67	
Moz-Gln-Leu-Gly-OEt	26	60	
Z-Pro-Leu-Gly-OEt	17	49	
Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl	63	98	
Moz-Asn-Ile-Gly-OBzl	68	100	
Moz-Asn-Leu-Gly-OtBu	0	0	
Z-Cys(Bzl)-Tyr-Ile-OtBu	0	0	

**Tabela 1**. Transesterificação de ésteres de peptídeos protegidos em metanol/CaAc $_2$  (adaptado de Miranda e col., 1991).





Diante destes resultados e como o peptídeo pode formar ligação éster com a resina empregada na síntese em fase sólida, a mediação por Ca<sup>2+</sup> foi empregada com sucesso em transesterificações das ligações peptidil-resina de Merrifield (Miranda e col., 1991b) e peptidil-KOR (Moraes e col., 2000, Moraes e col., 2001; **Esquema 11**).

Os resultados da metanólise da ligação Ac-Ala-Gly-X-Kaiser (onde X = Gly, Ala, Phe ou Lys) apresentaram rendimentos de 72-100% em 72 horas (**Tabela 2**). Estudos posteriores demonstraram que nosso método poderia ser empregado para geração de peptídeos C-terminal tioesterificados com rendimentos superiores a 90% como exemplificados na **Tabela 3** (Proti e col., 2008; **Esquema 12**).

Nosso método de solvólise mediada por Ca<sup>2+</sup> para geração de peptídeos modificados no C-terminal apresenta diversas vantagens em relação aos demais métodos descritos na literatura, pois emprega condições reacionais brandas, dispensa o uso de ácidos e bases e ocorre em uma única etapa. Contudo, até o início do presente trabalho seu uso estava restrito a estratégia Boc de síntese que devido à necessidade da utilização de HF na etapa de clivagem e desproteção total dos peptídeos, tem sido progressivamente substituída pela estratégia Fmoc de síntese, que dispensa o HF.



**Esquema 11.** Transesterificação da ligação entre o peptídeo e a resina KOR assistida por  $Ca^{2+}$  (**Esfera azul** = resina; **R** = grupo alquila; Proti e col., 2007).

Tempo de solvólise (h						
X Re	<b>6</b> endimer	48 nto de cliv	72 /agem (%)			
Lys(2-CI-Z)	9	68	.72			
Gly	46	89	100			
Ala	30	85	92			
Phe	10	78	81			

**Tabela 2**. Metanólise da ligação Ac-Ala-Gly-X-Resina oxima de Kaiser (adaptado de Moraes e col., 2000).

**Tabela 3**. Reação de desligamento do peptídeo da resina KOR através da tiólise da ligação éster de oxima com etil-3-mercaptopropionato por 2 h (adaptado de Proti e col., 2008).

Mediador	Sistema de solventes (V/V)	T (°C)	Desligamento do peptídeo (%)
_	20% Tiol/DMF	60	28
Ca <sup>2+</sup>	20% Tiol/DMF	60	93
_	50% Tiol/DMF	50	53
Ca <sup>2+</sup>	50% Tiol/DMF	50	92



**Esquema 12.** Transtioesterificação da ligação entre o peptídeo e a resina KOR assistida por Ca<sup>2+</sup>. (**Esfera azul** = resina; Proti e col., 2008).

## 2. OBJETIVOS

Diante do exposto anteriormente, este trabalho teve o objetivo de estudar a possibilidade de adequação do método de solvólise da ligação peptidil-resina mediada por íons metálicos divalentes à estratégia Fmoc de síntese, que é a mais utilizada atualmente. Neste contexto, buscou-se:

 Investigar quais resinas compatíveis com tal estratégia Fmoc de síntese seriam as mais adequadas.

2) Verificar qual o íon metálico seria o mais eficiente.

 Tentar empregar o método para geração de aminoácidos e peptídeos esterificados no C-terminal.

 Estudar o emprego de diferentes alcoóis com o objetivo de obter ésteres de diferentes naturezas.

5) Investigar qual seria o possível mecanismo pelo qual os íons metálicos assistem as reações de solvólise em questão.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 3.1. Materiais utilizados

Foram utilizados para a síntese das aminoacil-resinas e peptidil-resinas, a resina HMBA-AM (0,8 mmol/g, Novabiochem), HMBA–PEGA (0,40 mmol/g, Merck) e NovaSyn TG HMBA (0,22mmol/g, Merk), os derivados de aminoácidos Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asp(OBut)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ser(But)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH e Fmoc-Ala-OH (Bachem), os acopladores HBTU e TBTU (Sigma), as bases orgânicas DMAP e DIPEA (Applied Bioystems), os solventes DMF (Vetec), MeOH (Merk), EtOH 96% (Vetec), EtSH (Adrich Chemical) e Etil-3-mercaptopropionato (Aldrich Chemical), de grau analítico água MilliQ, bem como ACN (Vetec) e TFA (Sigma) de grau espectroscópico.

As aminoacil-resinas Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-HMBA 0,40mmol/g, Fmoc-Gly-Wang 0,61 mmol/g, Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-Wang 0,21 mmol/g, e o peptídeo esterificado Ac-Ile-Ser-Asp-OCH<sub>3</sub>, que já se encontravam disponíveis em nosso laboratório.

## 3.2. Aminoacilação das resinas HMBA-AM, HMBA – PEGA e NovaSyn TG HMBA

A resina foi deixada em repouso em DMF por 30 minutos. Após este período, o solvente foi drenado e foram adicionados 3 eq. de Fmoc-aminoácido, 2,5 eq. de HBTU, 0,1 eq. de DMAP, 3 eq. de DIPEA e DMF (5 mL). A mistura foi agitada por 24 horas. Ao término das 24 horas, o solvente foi drenado, a resina lavada alternadamente com DCM e MeOH por três vezes cada e seca (Proti., 2007).

#### **3.3. Alongamento da cadeia peptídica** (Varanda e Miranda, 1997).

Após a aminoacilação da resina, a incorporação dos demais aminoácidos foi feita usando 2,5 eq. de Fmoc-aminoácido protegido-OH, 2,5 eq. de TBTU e 2,5 eq. de DIPEA. As etapas foram as seguintes: 1) remoção do grupo Fmoc com solução 20% piperidina/DMF (v/v) por 7 minutos, sob agitação a 60°C; 2) lavagens alternadas com DMF e MeOH; 3) formação da ligação peptídica usando TBTU/DIPEA em DMF por 30 minutos com agitação a 60°C; 4) lavagens alternadas com DMF e MeOH.

#### 3.4. Análise de aminoácidos

A aminoacil-resina ou peptidil-resina foi seca em dessecador à vácuo. Amostras de 1mg cada foram pesadas e a elas acrescentados 600 µL de solução 50% HCl/ácido propiônico (v/v). A mistura foi matinda a 130°C por 24 horas. O hidrolisado obtido foi diluído em 1mL de água MilliQ e então analisado por HPLC (coluna de troca iônica) com detecção amperométrica pulsada em analisador automático Dionex BioLC® Chromatography System (Dionex, EUA) acoplado a um computador com o programa Chromeleon para aquisição e tratamento dos dados

#### 3.5. Determinação do grau de aminocilação das resinas

#### a) Curva padrão usando DBF

Foram preparadas soluções de concentrações conhecidas de Fmoc-Gly-OH em 20% piperidina/DMF. Elas foram agitadas por 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram feitas as leituras espectrofotométricas em 300 nm (comprimento de onda de absorção característico de DBF formado), usando espectrofotômetro da Shimadzu, modelo UV - Visible Spectrophotometer (UV – 1601 PC). A partir dessas medidas foi construída a curva padrão que abaixo relaciona quantidade em mols de Fmoc-aminoácido com a absorbância da solução contendo DBF.

b) Amostras

Uma quantidade de aproximadamente 4 mg de aminoacil-resina foi suspensa em 5 mL de solução 20% piperidina em DMF e agitada por 20 minutos a temperatura ambiente. Ao final deste período, foi feita a leitura de absorbância da solução sobrenadante. Usando a equação da curva padrão foi determinada a quantidade em mols do Fmoc-aminoácido acoplado à resina.

#### **3.6. Reação de solvólise da ligação peptidil-resina** (Proti e col., 2007).

Aminoacil-resina ou peptídil-resina foi suspensa em solução composta por DMF, o nucleófilo de interesse (álcool ou amina) e o sal do íon metálico divalente  $(Ca^{2+} \text{ ou } Zn^{2+})$  nas formas de acetato ou cloreto (as quantidades estão indicadas nas tabelas de resultados). As misturas foram agitadas a 300 rpm. Alíquotas do meio reacional foram retiradas em determinados intervalos de tempo definidos, diluídas com ACN 2x e analisadas por RP-HPLC em sistema LDC composto por um detector modelo SpectroMonitor 3100, bombas ConstaMetric (3200 e 3500) e um injetor Rheodyne 7125. A coluna utilizada é uma Vydac C<sub>18</sub> analítica (0,45 cm x 25,0 cm, 5µm e 300 Å). Os produtos formados foram caracterizados por LC/ESI-MS em um sistema de RP-HPLC da Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan, fluxo 0,2ml/min) composto por um degaseificador modelo DGU-20A<sub>3</sub>, duas bombas modelo LC-20AD, um injetor Rheodyne 8125, um forno de coluna modelo CTO-20A, uma precoluna C<sub>18</sub> (5 x 2 mm, 4,6 mm) Shim-pack GVP-ODS e uma coluna C<sub>18</sub> (150 x 2 mm, 4,6 mm) Shim-pack VP-ODS acoplada a um espectrômetro de massas AmaZon X da

Bruker Daltonics (Fahrenheitstrasse, Germany) com fonte de ionizacao do tipo electrospray, modo ESI positivo e com analisador do tipo lon trap.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4.1. Ocorrência de alcóolise da ligação entre Fmoc-Gly e Resinas Wang, ou HMBA-AM

O estudo da solvólise da ligação aminoácido-resina mediada por íons metálicos divalentes foi iniciado empregando este modelo simplificado, foram escolhidas as resinas HMBA e Wang por serem capazes de formar ligação éster com o aminoácido ou peptídeo ligado (**Figura 8**). O objetivo era testar se o nosso método poderia ser aplicado a resinas compatíveis com a estratégia Fmoc como as escolhidas, cujas estruturas são mostradas na **Figura 8**. Para isso, foram empregadas condições reacionais que se mostraram apropriadas em estudos anteriores do nosso grupo (Moraes e col., 2000 e 2001; Proti e col., 2007).

A **Tabela 4** resume as condições experimentais e os resultados obtidos (as análises de LC/ESI-MS dos aminoácidos esterificados obtidos encontram-se no item **5**). Eles mostram que o método foi aplicado com sucesso para geração do produto desejado (Fmoc-Gly-OR<sub>1</sub>). Entretanto, também foi formado no meio reacional H<sub>2</sub>N-Gly-OR<sub>1</sub>, decorrente da perda do grupo Fmoc (**Esquema 13**).



Figura 8. Estruturas dos *linkers* das resinas empregadas no presente estudo (Esfera azul = resina).

A partir desses resultados preliminares é possível concluir que a alcoólise mediada por íons metálicos Ca<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup> pode ser aplicada para a geração de Fmocglicina esterificada a partir de Fmoc-Gly-resinas HMBA-AM e Wang. A reação colateral de remoção do grupo Fmoc será discutida em maiores detalhes no item **"4.4. Investigando a remoção do grupo Fmoc"**.

Tabela 4. Resultados do estudo da alcoólise da ligação Fmoc-Gly-resina

Entrada	AA-Resina	Solvente	Aditivo	T (°C)	t (h)	Deslig. (%) <sup>1</sup>	Produto	Subproduto
1	А	20% MeOH/DMF	Ca <sup>2+</sup>	60	48	96	С	DBF
2	А	20% EtOH/DMF	Ca <sup>2+</sup>	60	48	2	-	DBF
3	А	50% EtOH/DMF	Ca <sup>2+</sup>	60	48	48	D	DBF
4	А	50% EtOH/DMF	Zn <sup>2+</sup>	60	48	98	D	DBF
5	А	50% Propan-1-ol	Zn <sup>2+</sup>	60	48	97	Е	DBF
6	А	50% Propan-2-ol	Zn <sup>2+</sup>	60	48	98	F	DBF
7	В	50% MeOH/DMF	Ca <sup>2+</sup>	60	48	39	С	DBF
8	В	50% EtOH/DMF	Ca <sup>2+</sup>	60	48	2	-	DBF
9	В	50% EtOH/DMF	Zn <sup>2+</sup>	60	48	94	D	DBF

<sup>1</sup>Desligamento do aminoácido da resina

<sup>2</sup>Análise não foi realizada por não apresentar formação de produto desejado

- A = Fmoc-Gly-HMBA-AM (0,58mmol/g)
- B = Fmoc-Gly-Wang (0,61mmol/g)
- C = Fmoc-Gly-OMe
- D = Fmoc-Gly-OEt
- $E = Fmoc-Gly-O(CH_2)_2CH_3$
- $F = Fmoc-Gly-OCH(CH_3)_2$

Os resultados para alcóolise da ligação Fmoc-Gly-resina mostraram que MeOH foi o nucleófilo mais efetivo quando comparado ao EtOH, 96 e 48% de desligamento do aminoácido da resina respectivamente (Entradas 1 e 3; **Tabela 4**). Íons Zn<sup>2+</sup> foram mais eficientes do que os íons Ca<sup>2+</sup>, 98 e 48% respectivamente (Entradas 3 e 4 ;**Tabela 4**). E a resina HMBA-AM forneceu melhores resultados (96 e 98%, Entradas 1 e 4; **Tabela 4**) dos que foram obtidos quando empregada a resina Wang (39 e 94%, Entradas 7 e 9; **Tabela 4**). Esses resultados preliminares foram estudados mais detalhadamente e mostraram estar de acordo para alcóolise da ligação peptidil-resina, como será visto nos itens mais adiante.


**Esquema 13.** Reações observadas na tentativa de alcoólise da ligação aminoácido-Resina de Fmoc-Gly-Resina mediada por íons metálicos divalentes.

# 4.2. Alcoólise da ligação entre Fmoc-Ala e Resina: Estudo comparativo entre diferentes resinas compatíveis com a estratégia Fmoc

Com o objetivo de verificar qual resina dentre as escolhidas era a mais adequada (fornecia maior rendimento) para o método de solvólise mediada por íons metálicos divalentes, foram realizadas a metanólise da ligação Fmoc-Ala-resina (resinas HMBA-AM, HMBA-PEGA, HMBA-TG e Wang) empregando-se uma condição reacional que se mostrou satisfatória no estudo prévio envolvendo a alcoólise da ligação Fmoc-Gly-resina (**Esquema 14**). A **Tabela 5** resume as condições reacionais empregadas e os resultados obtidos. A partir desses resultados é possível concluir que todas as resinas foram compatíveis com o método de solvólise, sendo a resina HMBA-AM a que forneceu os melhores resultados (rendimentos maiores em relação às demais resinas). Esse resultado está de acordo com uma tendência que já era observada no estudo prévio envolvendo a alcoólise da ligação Fmoc-Gly-resina, na qual a resina HMBA-AM forneceu resultados superiores de metanólise e etanólise (96 e 98% respectivamente) em relação aos obtidos quando empregada a resina Wang (39 e 94% respectivamente).

A partir desse resultado poderemos avançar nosso estudo para a alcóolise da ligação de peptídil-resinas para a geração de peptídeos C-terminal esterificados.



Esquema 14. Reação de alcoólise da ligação Fmoc-Ala-Resina mediada por íons Ca<sup>2+</sup>.

Entrada	AA-Resina	Solvente	Aditivo	T (°C)	t (h)	Deslig. (%) <sup>1</sup>	Produto	Subproduto
1	А	50% MeOH/DMF	Ca <sup>2+</sup>	60	8	88	Е	DBF
2	В	50% MeOH/DMF	Ca <sup>2+</sup>	60	8	25	Е	DBF
3	С	50% MeOH/DMF	Ca <sup>2+</sup>	60	8	73	Е	DBF
4	D	50% MeOH/DMF	Ca <sup>2+</sup>	60	8	70	Е	DBF

Tabela	5.	Metanólise	da	ligação	Fmoc-Ala-resina
Tabela	5.	Metanólise	da	ligação	Fmoc-Ala-resina

<sup>1</sup>Desligamento do aminoácido da resina

A = Fmoc-Ala-HMBA-AM (0,66 mmol/g)

B = Fmoc-Ala-HMBA-TG (0,30 mmol/g)

C = Fmoc-Ala-HMBA-PEGA (0,11 mmol/g)

D = Fmoc-Ala-Wang (0,61 mmol/g)

E = Fmoc-Ala-OMe

# 4.3. Alcoólise da ligação Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-HMBA-AM:

### Estudo comparativo entre o efeito do íon metálico e do nucleófilo

Dispondo da informação de que a resina HMBA-AM fornece os melhores resultados, foi iniciado um estudo com o tripeptídeo-Resina, Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-HMBA-AM, com o objetivo de verificar a viabilidade do método de

solvólise mediada por íons metálicos divalentes para geração de peptídeos esterificados no terminal C (**Esquema 15**).

Esse peptídeo modelo apresenta aminoácidos com cadeia lateral protegida (Serina e Aspartato) sendo, portanto, uma oportunidade para verificar se o método de solvólise poderia causar transesterificação dos grupos protetores das cadeias laterais, uma reação plausível de acontecer visto que os grupos protetores estão ligados às cadeias laterais através de ligações ésteres.

Estudos anteriores em nosso laboratório demonstraram que íons de Ca<sup>2+</sup> são os melhores mediadores nas reações de solvólise da ligação peptidil-KOR (Moraes e col., 2001). Contudo, os experimentos prévios (etanólise da ligação Fmoc-Gly-HMBA-AM mediada por Ca<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup> tiveram rendimentos de 48 e 98% respectivamente) indicaram que íons Zn<sup>2+</sup> são mediadores mais eficientes quando se emprega resinas compatíveis com a estratégia Fmoc. A Tabela 6 resume as condições reacionais e os resultados obtidos (as análises dos peptídeos esterificados obtidos encontram-se no item 5). Esses resultados mostram que o método de solvólise mediada por íons metálicos divalentes pode ser empregado na geração de peptídeos esterificados no terminal C. Não ocorre transesterificação dos grupos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos. Íons Zn2+ foram mais eficientes do que íons Ca<sup>2+</sup> em todas as reações testadas, apenas a metanólise ocorre na ausência de íons metálicos. Como havia sido discutido acima, esses resultados estão de acordo com o esperado e confirmam a hipótese de que íons Zn<sup>2+</sup> são os melhores mediadores na solvólise da ligação peptidil-resina compatível com a estratégia Fmoc.

Em termos de rendimentos de desligamento do peptídeo da resina (72-91%, média  $84 \pm 7\%$ ) os resultados estão de acordo com os encontrados por Proti em um estudo

preliminar no qual investigou-se apenas a metanólise da ligação Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-HMBA-AM obtendo-se  $83 \pm 1\%$  de desligamento do peptídeo da resina quando eram empregados íons Zn<sup>2+</sup> (Proti e col.,2007).

Uma observação importante feita durante esse estudo foi de que a velocidade de alcóolise segue a seguinte ordem:

#### MeOH > EtOH ~ Propan-1-ol ~ Butan-1-ol > Propan-2-ol

Essa relação parece estar relacionada com o pK<sub>a</sub> do álcool e será melhor discutida no item **Estudo do mecanismo de metanólise.** 





H<sub>2</sub>N-IIe-Ser(But)-Asp(OBut)-OR



Entrada	Solvente	Aditivo	T (°C)	t (h)	Deslig. (%) <sup>1</sup>	Produto	Subproduto
1	50% MeOH/DMF	-	60	48	8	A e B	DBF
2	50% MeOH/DMF	Ca <sup>2+</sup>	60	48	68	A e B	DBF
3	50% MeOH/DMF	Zn <sup>2+</sup>	60	48	87	A e B	DBF
4	50% EtOH/DMF	-	60	48	0	-	DBF
5	50% EtOH/DMF	Ca <sup>2+</sup>	60	48	19	C e D	DBF
6	50% EtOH/DMF	Zn <sup>2+</sup>	60	48	82	C e D	DBF
7	50% Propan-1-ol/DMF	-	60	48	0	-	DBF
8	50% Propan-1-ol/DMF	Ca <sup>2+</sup>	60	48	0	-	DBF
9	50% Propan-1-ol/DMF	Zn <sup>2+</sup>	60	48	72	E e F	DBF
10	50% Propan-2-ol/DMF	-	60	48	0	-	DBF
11	50% Propan-2-ol/DMF	Ca <sup>2+</sup>	60	48	0	-	DBF
12	50% Propan-2-ol/DMF	Zn <sup>2+</sup>	60	48	34	GeH	DBF
13	50% Butan-1-ol/DMF	Zn <sup>2+</sup>	60	48	91	l e J	DBF
14	50% Álcool Benzílico/DMF	Zn <sup>2+</sup>	60	48	86	L e M	DBF

Tabela 6. Alcoólise da ligação Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-HMBA-AM.

1Desligamento do peptídeo da resina

A = Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OMe

- $B = H_2N$ -IIe-Ser(But)-Asp(OBut)-OMe
- C = Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OEt
- $D = H_2 N$ -Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OEt
- $E = Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-O(CH_2)_2CH_3$ F = H\_2N-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-O(CH\_2)\_2CH\_3

 $G = Fmoc-lle-Ser(But)-Asp(OBut)-O(CH_2)_2CH_3$ 

 $H = H_2N$ -IIe-Ser(But)-Asp(OBut)-OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

 $I = Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-O(CH_2)_3CH_3$ 

 $J = H_2N-IIe-Ser(But)-Asp(OBut)-O(CH_2)_3CH_3$ 

L = Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OBzI

 $M = H_2N$ -IIe-Ser(But)-Asp(OBut)-OBzI

#### 4.4. Investigando a remoção do grupo Fmoc

Durante todas as reações estudadas foi observada a ocorrência da remoção do grupo Fmoc que gera o subproduto DBF. Essa reação colateral transforma, após longos períodos de reação, o produto esterificado protegido no grupo amino (Fmoc-aminoácido-OR ou Fmoc-peptídeo-OR) em produto esterificado com o grupo amino desprotegido (H<sub>2</sub>N-aminoácido-OR ou H<sub>2</sub>N-peptídeo-OR). Apesar da ocorrência dessa reação indesejada, ela não torna o método de solvólise mediada por íons metálicos divalentes menos eficiente dado que é possível substituir o grupo Fmoc por outro grupo protetor que não é removido nas condições reacionais empregadas (como será discutido mais adiante no item **4.5**) e por ser aplicável à geração dos aminoácidos e peptídeos com o grupo amino desprotegido que, como foi discutido

na **Introdução**, são importantes reagentes na síntese enzimática de peptídeos (Timo e col., 2010).

Mesmo que reação de remoção do grupo Fmoc, não fosse aqui uma reação colateral expressiva, seria interessante investigar por qual possível mecanismo ela estaria ocorrendo e encontrar condições nas quais essa reação colateral se torna menos pronunciada. Analisando os resultados obtidos, foi feita uma observação importante: as reações que empregaram CaAc<sub>2</sub> como aditivo tiveram a remoção do grupo Fmoc ocorrendo mais rapidamente do que aquelas em que se empregaram ZnCl<sub>2</sub>. Essa observação já tinha sido feita por Proti e colaboradores em um estudo preliminar, na qual foi concluído que íons de Ca<sup>2+</sup> eram os responsáveis por promover a remoção mais rápida do grupo Fmoc (Proti e col., 2007). Contudo, sabese que, geralmente, a remoção do grupo Fmoc é catalisada por base como mostra o **Esquema 16**. Assim, foi levantada a hipótese de que o íon acetato poderia agir como catalisador básico e acelerar a remoção do grupo Fmoc. Para testá-la foram realizadas três reações empregando como aditivos CaAc<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> e NaAc, as quais foram comparadas para verificar em qual delas ocorreria formação de DBF mais rapidamente (**Esquema 17**).



Esquema 16. Reação de remoção do grupo Fmoc.

Com base nos perfis cromatográficos é possível perceber que a formação de DBF inicia após 2 horas de reação quando foi empregado acetato (de cálcio ou sódio como aditivo), mas somente após 24 horas de reação na que empregou CaCl<sub>2</sub>. Esses resultados confirmam a hipótese de que a presença do ânion acetato é capaz de acelerar a reação de remoção do grupo Fmoc. Contudo, mesmo na ausência do ânion acetato, a reação também ocorre, sugerindo que outra espécie presente nas reações de solvólise mediada por íons metálicos divalentes também é capaz de promover a formação de DBF. Essa questão será levantada novamente no item **4.8**.



Esquema 17. Metanólise de Fmoc-Ala-Wang.



Experimento com acetato de cálcio

**Figura 9.** Análise por HPLC da metanólise da ligação Fmoc-Ala-Wang mediada por acetato de cálcio. Condições analíticas: Vydac C<sub>18</sub> (coluna); H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% (solvente A); ACN 90%/H<sub>2</sub>O/TFA 0,09% (solvente B); 210 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); Produto desejado (**A**) : Fmoc-Ala-OMe; Subproduto (**B**): DBF.

#### Experimento com cloreto de cálcio



**Figura 10.** Análise por HPLC da metanólise da ligação Fmoc-Ala-Wang mediada por cloreto de cálcio. Condições analíticas: Vydac C<sub>18</sub> (coluna); H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% (solvente A); ACN 90%/H<sub>2</sub>O/TFA 0,09% (solvente B); 210 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); Produto desejado (**A**) : Fmoc-Ala-OMe; Subproduto (**B**): DBF.



#### Experimento com acetato de sódio

**Figura 11**. Análise por HPLC da metanólise da ligação Fmoc-Ala-Wang mediada por acetato de sódio. Condições analíticas: Vydac C<sub>18</sub> (coluna); H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% (solvente A); ACN 90%/H<sub>2</sub>O/TFA 0,09% (solvente B); 210 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); Produto desejado (A) : Fmoc-Ala-OMe; Subproduto (B): DBF.

# 4.5. Alcoólise da ligação Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-HMBA-AM medida por íons Zn<sup>2+</sup>

Com o objetivo de estudar tal reação sem a interferência da reação de remoção do grupo Fmoc foi realizado um estudo substituindo o protetor do grupo amino do tripeptídeo modelo de Fmoc para Ac (grupo acetila). Dessa forma, esperava-se obter um único produto de reação: o éster desejado (**Esquema 18**). Para esse estudo foram empregados íons Zn<sup>2+</sup> por fornecer melhores resultados que íons Ca<sup>2+</sup> como foi observado em todos os experimentos anteriores.

Os resultados mostram que o método de solvólise foi aplicado com sucesso para geração de peptídeos esterificados no C terminal, os percentuais de desligamentos do peptídeo ( $87,5\pm9,9\%$ ) foram semelhantes aos do estudo envolvendo Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-HMBA-AM ( $83,6\pm7,2\%$ ), indicando que a

reação de remoção do grupo Fmoc não interferiu nos rendimentos das reações de alcoólise que foram realizadas anteriormente. Como havia sido previsto não foi observada a ocorrência de reações colaterais e subprodutos. A **Tabela 7** resume as condições reacionais empregadas e os resultados obtidos (as análises de LC/ESI-MS dos produtos obtidos encontram-se no item **5**).



Ac-IIe-Ser(But)-Asp(OBut)-HMBA-AM

Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OR

Esquema 18. Alcoólise da ligação Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBu)-HMBA-AM.

Entrada	Solvente	Aditivo	T (°C)	t (h)	Deslig. (%) <sup>1</sup>	Produto
1	50% MeOH/DMF	Zn <sup>2+</sup>	60	48	95	Α
2	50% EtOH/DMF	Zn <sup>2+</sup>	60	48	92	В
3	50% Propan-2-ol/DMF	Zn <sup>2+</sup>	60	48	20	С
4	50% Butan-1-ol/DMF	Zn <sup>2+</sup>	60	48	90	D
5	50% Álcool Benzílico/DMF	Zn <sup>2+</sup>	60	48	73	Е

Tabela 7. Alcoólise da ligação Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-HMBA-AM.

<sup>1</sup>Desligamento do peptídeo da resina

- A = Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OMe
- B = Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OEt
- $C = Ac-IIe-Ser(But)-Asp(OBut)-OCH(CH_3)_2$
- $D = Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-O(CH_2)_3CH_3$
- E = Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OBzl

#### 4.6. Síntese do tripeptídeo Ac-Met-Leu-Phe-OMe

Com o objetivo de verificar se o método de alcoólise mediada por íons Zn<sup>2+</sup> poderia ser aplicado na síntese em larga escala de peptídeos esterificados no terminal C, foi sintetizado o tripeptídeo-resina, Ac-Met-Leu-Phe-HMBA-AM. A sequência peptídica do peptídeo antiinflamatório (For-Met-Leu-Phe-OMe, Cavicchionia e col., 2005), para a síntese do análogo Ac-Met-Leu-Phe-OMe (**Esquema 19**). A **Tabela 8** resume as condições reacionais empregadas e os resultados obtidos.



Esquema 19. Metanólise da ligação peptídeo-resina de Ac-Met-Leu-Phe-HMBA-AM.

Tabela 8. Metanólise da ligação Ac-Met-Leu-Phe-HMBA-AM.

Tripeptídeo-HMBA-AM	Solvente	Aditivo	T (°C)	t (h)	Deslig. (%) <sup>1</sup>	Pureza
Ac-Met-Leu-Phe	50% MeOH / DMF	Zn <sup>2+</sup>	60	48	93,5	83

<sup>1</sup>Desligamento do peptídeo da resina determinado por análise de aminoácidos

Abaixo está a análise por LC/ESI-MS do meio reacional contendo o peptídeo esterificado Ac-Met-Leu-Phe-OMe (**A**). O perfil de RP-HPLC mostra que o produto desejado (Ac-Met-Leu-Phe-OMe) foi formado como único produto da reação. Assim sendo, o rendimento de sua formação deve ser próximo à porcentagem de desligamento do peptídeo da resina, comprovando a eficiência do nosso método.



**Figura 12.** Análise por LC/ESI-MS da metanólise da ligação Ac-Met-Leu-Phe-HMBA. Condições analíticas: Vydac C<sub>18</sub> (coluna); H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% (solvente A); ACN 90%/H<sub>2</sub>O/TFA 0,09% (solvente B); 210 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); ES<sup>+</sup> (modo de ionização). Produto desejado **A**: Ac-Met-Leu-Phe-OMe – LC-ESI/MS [MH]<sup>+</sup>: 466,2 (encontrado), 466,6 (teórico); [MNa]<sup>+</sup>: 488,3 (encontrado), 488,6 (teórico).

#### 4.7. Transesterificação de Ac-IIe-Ser-Asp-OMe

Nosso grupo já havia demonstrado que era possível realizar transesterificação de peptídeos etil ésteres à ésteres metílicos mediada por Ca<sup>2+</sup> (Miranda e col. 1991 a). Diante dos bons resultados que foram obtidos empregando íons Zn<sup>2+</sup> para promover a metanólise da ligação peptidil-resina foi decidido investigar a possibilidade de converter peptídeos metil ésteres em ésteres alquílicos mais complexos via transesterificação em solução mediada por íons Zn<sup>2+</sup> (**Esquema 20**).



Esquema 20. Transesterificação em solução de Ac-Ile-Ser-Asp-OMe.

Se possível, essa abordagem tornaria o nosso método de geração de peptídeos esterificados mais geral, visto que possibilitaria produzir ésteres com grupos alquilas mais complexos a partir de peptídeos metil esterificados. A geração de peptídeos esterificados com grupos alquilas complexos é muito importante para a obtenção de peptídeos que atuam interagindo com lipídeos de membranas, por exemplo, a esterificação do terminal C com grupos alquilas altamente hidrofóbicos (por exemplo, butil e benzil) serve como âncora, aumentado a afinidade do peptídeo à membrana (Natasha e col., 2003). A **Tabela 9** resume as condições reacionais empregadas e os resultados obtidos. Os resultados obtidos mostram que o método de solvólise mediada por íons  $Zn^{2+}$  pode ser aplicado na conversão de peptídeos

metil ésteres à etil, isopropil, n-butil e benzíl ésteres com bons rendimentos (30 – 85% exceto para propan-2-ol, média  $65\pm24\%$ ), sendo que o melhor resultado ocorre quando é empregado EtOH (**Figura 13**). Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Miranda na transesterificação de peptídeos esterificados em metanol contendo CaAc<sub>2</sub>, onde foram observados rendimentos altos de 12 – 100% em 24h de reação (média  $63\pm26\%$ ; ver **Tabela**, Miranda e col., 1991), sendo que os melhores resultados são obtidos quando empregado peptídeos benzil ésteres (41 – 100%).

Tabela 9. Transesterificação de Ac-Ile-Ser-Asp-OMe mediada por íons Zn<sup>2+</sup>.

Entrada	Solvente	Aditivo	T (°C)	t (h)	rendimento (%)	Produto
1	50% EtOH/DMF	Zn <sup>2+</sup>	60	24	85	А
2	50% Propan-2-ol/DMF	Zn <sup>2+</sup>	60	24	30	В
3	50% Butan-1-ol/DMF	Zn <sup>2+</sup>	60	24	73	С
4	50% Álcool Benzílico/DMF	Zn <sup>2+</sup>	60	24	70	D

A = Ac-IIe-Ser-Asp-OEt

B = Ac-IIe-Ser-Asp-OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

 $C = Ac-IIe-Ser-Asp-O(CH_2)_3CH_3$ 

D = Ac-Ile-Ser-Asp-OBzl





**Figura 13**. Transesterificação de Ac-IIe-Ser-Asp-OMe. Condições analíticas: Vydac C<sub>18</sub> (coluna); H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% (solvente A); ACN 90%/H<sub>2</sub>O/TFA 0,09% (solvente B); 210 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); Produto partida (**A**) :Ac-IIe-Ser-Asp-OMe – LC-ESI/MS [MH]<sup>+</sup>: 390,1 (encontrado), 390,4 (teórico); Produto de transesterificação (**B**): Ac-IIe-Ser-Asp-OEt – LC-ESI/MS [MH]<sup>+</sup>: 404,1 (encontrado), 404,4 (teórico).

#### 4.8. Estudo do mecanismo de metanólise

Durante o presente estudo da solvólise da ligação peptidil-resina mediada por íons metálicos divalentes foram obtidos resultados que forneceram indícios de qual seria o possível mecanismo pelo qual os íons metálicos poderiam catalisar as reações de alcoólise. Por exemplo, a relação entre a velocidade de alcoólise e o álcool empregado: MeOH > EtOH ~ Propan-1-ol ~ Butan-1-ol > Propan-2-ol.

Essa relação parece estar associada ao valor de pK<sub>a</sub> do álcool, MeOH (15,5); EtOH (15,9); propan-1-ol (16,0); butan-1-ol (~16,0); propan-2-ol (16,5) e parece indicar que o nucleófilo (o álcool empregado) deve estar desprotonado para fazer o ataque nucleofílico ao carbono da carbonila da ligação éster entre o peptídeo e a resina. Com base nessa observação foi levantada a hipótese de que se o íon alcóxido fosse o nucleófilo na reação em questão, a adição de pequena quantidade de ácido poderia causar uma diminuição na velocidade de reação por diminuir a concentração de íons alcóxidos no meio reacional (**Esquema 21**). Para testar esta hipótese foi realizada a metanólise da ligação Fmoc-Ala-HMBA-AM na presença de HOAc, ZnCl<sub>2</sub> e HOAc / ZnCl<sub>2</sub>.



Esquema 21. Resultados previstos para a metanólise de Fmoc-Ala-HMBA.



Metanólise da ligação Fmoc-Ala-HMBA-AM em presença de HOAc

**Figura 14.** Análise por HPLC da metanólise da ligação Fmoc-Ala-HMBA mediada por HOAc. Condições analíticas: Vydac C<sub>18</sub> (coluna); H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% (solvente A); ACN 90%/H<sub>2</sub>O/TFA 0,09% (solvente B); 210 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); Produto desejado (**A**) : Fmoc-Ala-OMe; Subproduto (**B**): DBF.



Metanólise da ligação Fmoc-Ala-HMBA-AM com ZnCl<sub>2</sub>

**Figura 15.** Análise por HPLC da metanólise da ligação Fmoc-Ala-HMBA mediada por ZnCl<sub>2</sub>. Condições analíticas: Vydac C<sub>18</sub> (coluna); H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% (solvente A); ACN 90%/H<sub>2</sub>O/TFA 0,09% (solvente B); 210 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); Produto desejado (**A**) : Fmoc-Ala-OMe; Subproduto (**B**): DBF.



Metanólise da ligação Fmoc-Ala-HMBA-AM com ZnCl<sub>2</sub> e HOAc

**Figura 16.** Análise por HPLC da metanólise da ligação Fmoc-Ala-HMBA mediada por ZnCl<sub>2</sub> e HOAc . Condições analíticas: Vydac C<sub>18</sub> (coluna); H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% (solvente A); ACN 90%/H<sub>2</sub>O/TFA 0,09% (solvente B); 210 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); Produto desejado (**A**) : Fmoc-Ala-OMe; Subproduto (**B**): DBF.

Os perfis cromatográficos mostram que a reação que empregou apenas o ácido gerou apenas DBF produto resultante da remoção do grupo Fmoc, mostrando que o ácido não apresenta ação catalítica na formação do produto desejado Fmoc-Ala-OMe. Já a reação realizada na presença de apenas ZnCl<sub>2</sub> gerou o produto desejado (96% de desligamento do aminoácido da resina) em 5 horas. No entanto, na reação que empregou ZnCl<sub>2</sub> e HOAc ocorreu a formação de produto e de DBF apenas após 24 horas de reação.

Esses resultados estão de acordo com o esperado, de que a adição de ácido diminuiria a velocidade de formação de produto por dificultar a formação do nucleófilo desprotonado, confirmando a hipótese de que a concentração de íons alcóxidos deve ser um fator importante para a velocidade de reação de alcoólise.

Outra observação importante que foi feita durante o presente estudo era de que a mistura de solventes empregada na reação de solvólise apresentava  $pH_{ap}$  (aparente) de 6 antes da adição do íon metálico e  $pH_{ap}$  de 5 após a adição de  $Zn^{2+}$ . Sabendo que a velocidade de reação de alcoólise parece estar relacionada com o  $pK_a$  do nucleófilo (como foi discutido acima), essa observação sugere que íons  $Zn^{2+}$  poderiam mediar as reações de alcoólise por serem capazes de promover a diminuição do  $pK_a$  do nucleófilo (o álcool empregado).

É conhecido que enzimas que apresentam zinco no seu centro catalítico podem atuar pelo **mecanismo Zn-hidróxido** (**Esquema 22**), nesse mecanismo o átomo de zinco se coordena com o oxigênio da molécula de água tornando o seu pK<sub>a</sub> menor, promovendo a formação do íon hidróxido (um nucleófilo melhor que a água) que pode atacar o átomo de C da carbolina, um exemplo de enzima que apresenta este mecanismo é a anidrase carbônica (Shiver & Atikins, 2008).



Esquema 22. Mecanismo Zn-hidróxido (extraído de Shiver & Atikins, 2008).

Se, de fato, íons Zn<sup>2+</sup> se coordenam com os átomos de oxigênio do álcool, é possível levantar a hipótese de que essa interação cause uma diminuição na energia de ligação O-H tornando-a mais fraca (ou seja, aumentando o comprimento da ligação), o que facilitaria a formação do íon alcóxido. Para testá-la foram analisados por espectroscopia de infravermelho MeOH e uma solução de MeOH e ZnCl<sub>2</sub>.

A frequência de vibrações moleculares é calculada usando a seguinte equação:

$$v_m = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

onde  $\mu$  é a massa reduzida dos átomos envolvidos na ligação e k é a constante de força da ligação química, que é uma medida da sua rigidez (Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A., 2002). Com base nela espera-se observar na solução de MeOH/ZnCl<sub>2</sub> que ocorra o deslocamentos para frequências menores de picos que correspondam à ligação O-H, indicando uma diminuição na constante de força, o que confirmaria a hipótese levantada.



**Figura 17**. Espectros de infravermelho (região de 1250 - 500 cm<sup>-1</sup>) de metanol puro e solução de metanol com Zn<sup>2+</sup>.

De fato, é possível verificar que ocorreram muitas modificações nos espectros de IR, sendo as mais marcantes as que ocorreram no intervalo de frequências entre 1000 e 500 cm<sup>-1</sup>, região que corresponde às ligações C-O-H. No espectro de IR de metanol puro é possível observar dois picos (952 e 683cm<sup>-1</sup>) que correspondem às ligações C-O-H. No espectro de IR de ZnCl<sub>2</sub> em MeOH, esses dois picos foram deslocados para frequências menores (842 e 621cm<sup>-1</sup>; **Figura 17**).



**Esquema 23**. Possível mecanismo de alcoólise da ligação peptídeo-resina mediada por íons Zn<sup>2+</sup> (**Observações:** A interação de Zn<sup>2+</sup> com o R-OH causa diminuição da ligação O-H aqui representada pelo aumento no comprimento dessa ligação. Em enzimas Zn<sup>2+</sup> apresenta-se tetracoordenado).

Esses resultados estão de acordo com a hipótese de que a interação de íons Zn<sup>2+</sup> com o álcool causa o enfraquecimento da ligação O-H e, portanto, sugerem um mecanismo no qual, íons Zn<sup>2+</sup> são capazes de coordenar com o oxigênio das moléculas do álcool diminuído a energia da ligação O-H (aumentando seu comprimento) dessa forma favorecendo sua desprotonação e, portanto, aumentando a velocidade da reação de alcoólise por facilitar a formação de íons alcóxidos nas proximidades da ligação éster entre o peptídeo e a resina (**Esquema 23**).

#### 4.9. Aminólise da ligação Ac-Met-Leu-Phe-HMBA-AM

Peptídeos amidados no terminal C estão ganhando atenção nós últimos anos devido as suas propriedades biológicas. Por exemplo, peptídeos etilamidados apresentam estabilidade aumentada frente a peptidases (Tamamura e col., 2003). Também podem apresentar afinidade aumentada para alvos biológicos específicos (Li e col., 2000). A alquilação do terminal C de peptídeos pode aumentar a sua lipofilicidade o que facilita a sua penetração em membranas biológicas (Conradi e col., 1992). Por isso, foi investigada a possibilidade de sua a síntese através da aminólise da ligação peptidil-resina mediada por Zn<sup>2+</sup> (**Esquema 24**; **Tabela 10**).



Esquema 24. Reação de aminólise da ligação Ac-Met-Leu-Phe-HMBA-AM.

Entrada	Solvente	Aditivo	T (°C)	t (h)	Deslig. (%) <sup>1</sup>	Produto
1	20% Butilamina/DMF	-	60	24	95	А
2	20% Butilamina/DMF	Zn <sup>2+</sup>	60	24	91	А
3	20% Hexilamina/DMF	-	60	24	94	В
4	20% Hexilamina/DMF	Zn <sup>2+</sup>	60	24	92	В

Tabela 10. Aminólise da ligação Ac-Met-Leu-Phe-HMBA-AM.

<sup>1</sup>Desligamento do peptídeo da resina A = Ac-Met-Leu-Phe-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub> B = Ac-Met-Leu-Phe-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>

Os resultados preliminares mostraram que tanto as condições que empregaram Zn<sup>2+</sup>, quanto aquelas que não empregaram o íon, foram efetivas na geração do peptídeo amidado (os rendimentos das aminólises da ligação peptídil-resina com e sem íons Zn<sup>2+</sup> foram superiores a 90%). Esses resultados eram esperados, já que aminas primárias são nucleófilos superiores aos alcoóis e geram produtos termodinamicamente mais estáveis.

Uma possível explicação para falta de atividade catalítica dos íons Zn<sup>2+</sup> nas reações de aminólise é o fato de aminas primárias apresentarem pK<sub>a</sub> por volta de 35 (Vollhard e Schore, 2003). Por isso, as suas desprotonações ocorrem apenas na presença de bases fortes. Com base no modelo de mediação proposto para metanólise da ligação aminoácido-resina mediada por íons Zn<sup>2+</sup>, esperava-se que não houvesse mesmo influência de íons metálicos na velocidade da aminólise estudada. Contudo, os bons resultados obtidos tornam essa abordagem interessante e mais estudos devem ser feitos com o objetivo de determinar quais condições seriam melhores para geração de peptídeos amidados no terminal C.

## 5. Monitoramento das reações estudadas com vistas a caracterizar

#### os produtos formados

1) Fmoc-Gly-OMe



Massa = 311,3

Intens. Perfil de RP-HPLC 4000 3000 Α 2000 1000 DMF 0 20 5 10 15 25 Time [min] e 2 5horas 1\_01\_255.d: UV Chromatogram, 210 nm Intens x10<sup>9</sup> 1.0 Cromatograma de íons totais Α 0.8 0.6 0.4 0.2 0.0 10 15 20 25 5 Time [min] Metanolise 2 5horas\_-1\_01\_255.d: TIC +All MS Inter +MS, 27.2min #3030 x107 623.0 Espectro de massas de A 2.0 312.0 1.5 179.0 1.0 0.5 134.0 334.1 644.6 0.0 100 200 300 500 600 400 m/z

**Figura 19.** Análise por LC/ESI-MS da metanólise da ligação Fmoc-Gly-HMBA. Condições analíticas: Vydac C<sub>18</sub> (coluna); H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% (solvente A); ACN 75%/H<sub>2</sub>O/TFA 0,09% (solvente B); 210 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); ES<sup>+</sup> (modo de ionização). Produto desejado **A**: Fmoc-Gly-OMe – LC-ESI/MS [MH]<sup>+</sup>: 312,0 (encontrado), 312,3 (teórico); [MNa]<sup>+</sup>: 334,1 (encontrado), 334,3 (teórico) [2MH]+: 623,0 (encontrado), 623,4 (teórico); [2MNa]<sup>+</sup>: 644,6(encontrado), 645,0 (teórico).

#### 2) Fmoc-Gly-OEt



Massa = 325,4



**Figura 20.** Análise por LC/ESI-MS da Etanólise da ligação Fmoc-Gly-HMBA. Condições analíticas: Vydac C<sub>18</sub> (coluna); H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% (solvente A); ACN 75%/H<sub>2</sub>O/TFA 0,09% (solvente B); 210 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); ES<sup>+</sup> (modo de ionização). Produto desejado **A**: Fmoc-Gly-OEt – LC-ESI/MS [MH]<sup>+</sup>: 326,1 (encontrado), 326,4 (teórico); [MNa]<sup>+</sup>: 348,2 (encontrado), 348,4 (teórico) [MK]<sup>+</sup>: 364,1 (encontrado), 364,4 (teórico).

#### 3) Fmoc-Gly-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>



Massa = 339,4



**Figura 21.** Análise por LC/ESI-MS da propanólise (com propan-1-ol) da ligação Fmoc-Gly-HMBA. Condições analíticas: Vydac C<sub>18</sub> (coluna); H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% (solvente A); ACN 75%/H<sub>2</sub>O/TFA 0,09% (solvente B); 210 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); ES<sup>+</sup> (modo de ionização). Produto desejado **A**: Fmoc-Gly-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> – LC-ESI/MS [MH]<sup>+</sup>: 340,1 (encontrado), 340,4 (teórico); [MNa]<sup>+</sup>: 362,1 (encontrado), 362,4 (teórico); [2MH]<sup>+</sup>: 679,2 (encontrado), 679,8 (teórico).

#### 4) Fmoc-Gly-O-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>



Massa = 339,4



**Figura 22.** Análise por LC/ESI-MS da propanólise (com propan-2-ol) da ligação Fmoc-Gly-HMBA. Condições analíticas: Vydac C<sub>18</sub> (coluna); H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% (solvente A); ACN 75%/H<sub>2</sub>O/TFA 0,09% (solvente B); 210 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); ES<sup>+</sup> (modo de ionização). Produto desejado **A**: Fmoc-Gly-OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> – LC-ESI/MS [MH]<sup>+</sup>: 340,1 (encontrado), 340,4 (teórico); [MNa]<sup>+</sup>: 362,1 (encontrado), 362,4 (teórico); 2MH]+: 679,2 (encontrado), 679,8 (teórico); [MNa]+: 701,1 (encontrado), 701,8 (teórico).

#### 4) Fmoc-Ala-OMe





**Figura 23.** Análise por LC/ESI-MS da metanólise da ligação Fmoc-Ala-HMBA. Condições analíticas: Vydac C<sub>18</sub> (coluna); H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% (solvente A); ACN 75%/H<sub>2</sub>O/TFA 0,09% (solvente B); 210 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); ES<sup>+</sup> (modo de ionização). Produto desejado **A**: Fmoc-Ala-OMe – LC-ESI/MS [MH]<sup>+</sup>: 326,1 (encontrado), 326,4 (teórico); [MNa]<sup>+</sup>: 348,1 (encontrado), 348,4 (teórico) [2MH]+: 650,7 (encontrado), 651,8 (teórico); [2MNa]+: 672,7(encontrado), 673,8 (teórico).

# 6) Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OMe





**Figura 24.** Análise por LC/ESI-MS da metanólise da ligação Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-HMBA. Condições analíticas: Vydac C<sub>18</sub> (coluna); H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% (solvente A); ACN 90%/H<sub>2</sub>O/TFA 0,09% (solvente B); 210 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); ES<sup>+</sup> (modo de ionização). Produto desejado **A**: Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OMe – LC-ESI/MS [MH]<sup>+</sup>: 682,3 (encontrado), 682,8 (teórico); [MNa]<sup>+</sup>: 704,4 (encontrado), 704,8 (teórico). Subproduto **B**: H-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OMe – LC-ESI/MS [MH]<sup>+</sup>: 482,3 (encontrado), 482,6 (teórico).

#### 7) Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OEt







**Figura 25.** Análise por LC/ESI-MS da etanólise da ligação Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-HMBA. Condições analíticas: Vydac  $C_{18}$  (coluna);  $H_2O/TFA 0,1\%$  (solvente A); ACN 90%/ $H_2O/TFA 0,09\%$  (solvente B); 210 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); ES<sup>+</sup> (modo de ionização). Produto desejado A: Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OEt – LC-ESI/MS [MH]<sup>+</sup>: 696,3 (encontrado), 696,8 (teórico); [MNa]<sup>+</sup>: 718,4 (encontrado), 718,8 (teórico). Subproduto B: H-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OEt – LC-ESI/MS [MH]<sup>+</sup>: 496,4 (encontrado), 496,6 (teórico).

# 8) Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>





**Figura 26.** Análise por LC/ESI-MS da propanólise (com propan-1-ol) da ligação Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-HMBA. Condições analíticas: Vydac  $C_{18}$  (coluna);  $H_2O/TFA$  0,1% (solvente A); ACN 90%/ $H_2O/TFA$  0,09% (solvente B); 210 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); ES<sup>+</sup> (modo de ionização). Produto desejado **A**: Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> – LC-ESI/MS [MH]<sup>+</sup>: 710,3 (encontrado), 710,8 (teórico); [MNa]<sup>+</sup>: 732,4 (encontrado), 732,8 (teórico). Subproduto **B**: H-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> – LC-ESI/MS [MH]<sup>+</sup>: 510,4 (encontrado), 510,6 (teórico).

#### 9) Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>







**Figura 27.** Análise por LC/ESI-MS da propanólise (com propan-2-ol) da ligação Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-HMBA. Condições analíticas: Vydac C<sub>18</sub> (coluna); H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% (solvente A); ACN 90%/H<sub>2</sub>O/TFA 0,09% (solvente B); 210 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); ES<sup>+</sup> (modo de ionização). Produto desejado **A**: Fmoc-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> – LC-ESI/MS [MH]<sup>+</sup>: 710,3 (encontrado), 710,8 (teórico); [MNa]<sup>+</sup>: 732,5 (encontrado), 732,8 (teórico).

#### 10) Ac-IIe-Ser(But)-Asp(OBut)-OMe







**Figura 28.** Análise por LC/ESI-MS da metanólise da ligação Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-HMBA. Condições analíticas: Vydac C<sub>18</sub> (coluna); H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% (solvente A); ACN 90%/H<sub>2</sub>O/TFA 0,09% (solvente B); 210 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); ES<sup>+</sup> (modo de ionização). Produto desejado **A**: Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OMe – LC-ESI/MS [MH]<sup>+</sup>: 502,2 (encontrado), 502,6 (teórico); [MNa]<sup>+</sup>: 524,3 (encontrado), 524,6 (teórico).

#### 11) Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OEt







**Figura 29.** <u>Análise por LC/ESI-MS da etanólise da ligação Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-HMBA</u>. Condições analíticas: Vydac C<sub>18</sub> (coluna); H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% (solvente A); ACN 90%/H<sub>2</sub>O/TFA 0,09% (solvente B); 210 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); ES<sup>+</sup> (modo de ionização). Produto desejado **A**: Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OEt – LC-ESI/MS [MH]<sup>+</sup>: 516,2 (encontrado), 516,6 (teórico).

#### 12) Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>






**Figura 30.** Análise por LC/ESI-MS da propanólise (com propan-2-ol) da ligação Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-HMBA. Condições analíticas: Vydac C<sub>18</sub> (coluna); H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% (solvente A); ACN 90%/H<sub>2</sub>O/TFA 0,09% (solvente B); 210 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); ES<sup>+</sup> (modo de ionização). Produto desejado **A**: Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> – LC-ESI/MS [MH]<sup>+</sup>: 530,2 (encontrado), 530,6 (teórico); [MNa]<sup>+</sup>: 552,3 (encontrado), 552,6 (teórico).

#### 13) Ac-IIe-Ser(But)-Asp(OBut)-OCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>







**Figura 31.** Análise por LC/ESI-MS da butanólise (com butan-1-ol) da ligação Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-HMBA. Condições analíticas: Vydac C<sub>18</sub> (coluna); H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% (solvente A); ACN 90%/H<sub>2</sub>O/TFA 0,09% (solvente B); 210 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); ES<sup>+</sup> (modo de ionização). Produto desejado **A**: Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> – LC-ESI/MS [MH]<sup>+</sup>: 544,2 (encontrado), 544,6 (teórico); [MNa]<sup>+</sup>: 566,3 (encontrado), 566,6 (teórico).

#### 14) Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OBzl







**Figura 32.** Análise por LC/ESI-MS da benzanólise da ligação Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-HMBA. Condições analíticas: Vydac C<sub>18</sub> (coluna); H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% (solvente A); ACN 90%/H<sub>2</sub>O/TFA 0,09% (solvente B); 280 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); ES<sup>+</sup> (modo de ionização). Produto desejado **A**: Ac-Ile-Ser(But)-Asp(OBut)-OBzI – LC-ESI/MS [MH]<sup>+</sup>: 578,2 (encontrado), 578,7 (teórico); [MNa]<sup>+</sup>: 600,4 (encontrado), 600,7 (teórico).

#### 15) Ac-Met-Leu-Phe-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>









**Figura 33.** Análise por LC/ESI-MS da Aminólise (com butilamina) da ligação Ac-Met-Leu-Phe-HMBA. Condições analíticas: Vydac C<sub>18</sub> (coluna); H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% (solvente A); ACN 90%/H<sub>2</sub>O/TFA 0,09% (solvente B); 280 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); ES<sup>+</sup> (modo de ionização). Produto desejado **A**: Ac-Met-Leu-Phe-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub> – LC-ESI/MS [MH]<sup>+</sup>: 507,2 (encontrado), 507,7 (teórico).

### 16) Ac-Met-Leu-Phe-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>







**Figura 34.** Análise por LC/ESI-MS da Aminólise (com hexilamina) da ligação Ac-Met-Leu-Phe-HMBA. Condições analíticas: Vydac C<sub>18</sub> (coluna); H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% (solvente A); ACN 90%/H<sub>2</sub>O/TFA 0,09% (solvente B); 280 nm ( $\lambda$ ); 1ml/min (fluxo); 5-95 B em 30 min (gradiente linear); ES<sup>+</sup> (modo de ionização). Produto desejado **A**: Ac-Met-Leu-Phe-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> – LC-ESI/MS [MH]<sup>+</sup>: 536,3 (encontrado), 536,7 (teórico).

# 6. CONCLUSÕES

O método de solvólise da ligação aminoácido-resina e peptídil-resina mediada por
Ca<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup> mostrou-se eficiente para a geração de aminoácidos e peptídeos esterificados.

 Dentre essas resinas, compatíveis com a estratégia Fmoc, a resina HMBA-AM foi a mais adequada fornecendo os melhores rendimentos de desligamento do aminoácido ou peptídeo a partir da resina.

- Os íons Zn<sup>2+</sup> foram os mediadores mais eficientes das alcoólises estudadas.

- Os resultados indicam que elas ocorreram por um mecanismo no qual a interação do íon Zn<sup>2+</sup> com o álcool favorece a geração de alcóxido um nucleófilo melhor que pode atacar o átomo de C da carbonila da ligação éster entre o peptídeo e a resina compatível com a estratégia Fmoc.

 Nas reações estudadas e condições empregadas não ocorreu transesterificação dos grupos protetores das cadeias laterais.

 Reações que empregaram sais acetato (Na<sub>2</sub>Ac e CaAc) levaram à formação de DBF e, portanto, remoção do grupo Fmoc mais rápida indicando que o íon acetato pode agir como catalisador básico. Contudo, mesmo na sua ausência a formação de DBF é observada, o que está de acordo com o modelo proposto de mediação pelo íon Zn<sup>2+</sup>, visto que o íon alcóxido (nucleófilo formado) também pode agir como catalisador básico.

- A utilização do grupo Ac como protetor do terminal N fornece o produto desejado com o grupo amina protegido.

 O método pode ser aplicado à transesterificação de ésteres metílicos de peptídeos para a geração de outros ésteres alquílicos

- O método estudado apresenta diversas vantagens sobre os demais métodos de síntese (ver item 1.4), tais como simplicidade à esterificação (reação ocorre em apenas uma única etapa), condições reacionais brandas (não requer uso de ácidos e bases), bons rendimentos de desligamento do aminoácido ou peptídeo da resina e baixa agressividade ao meio ambiente.

## 7. Referências Bibliográficas

Atherton, E.; Sheppard, R.C. Solid phase peptide synthesis: A practical approach. Oxyford: IRL press, 1989, 216p.

Atikins P. W.; Shriver D. F; Overton T. L.; Rouker J. P.; Weller M. T.; Armastrong F. A..Química Inorgânica. 2008. 4º Ed. 757-758.

Bodanszky, M. Racemization. Em: Principles of Peptide Synthesis, vol. 16, Bodanszky, M.; Eds., Springer-Verlag, Berlin, 1984, p. 158-173. *Chem. Soc.* 2004, **126**, 6576 – 6578.

Cavicchioni, G.; Fraulini, A.; Falzarano, S.; Spisani, S. (2006) Structure–activity relationship of for-I-Met I-Leu-I-Phe-OMe analogues in human neutrophils. *Bioorg. Chem.* **5**, 298-318.

Carganico S.; Anna M. P. (2011) Orthogonal Protecting Groups and Side-Reactions in Fmoc/tBu Solid-Phase Peptide Synthesis. Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry. Vol.3, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Conradi, R. A.; Hilgers, A. R.; Ho, N. E. H.; Burton, P. S. *Pharm. Res.* 1992, **9**, 435-439.

Dawson, P.E.; Muir, T.W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S.B.H (1994) Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*, **266**, 776-779.

Janecka A, Perlikowska R, Gach K, Wyrebska A, Fichna J. 2010 Development of opioid peptide analogs for pain relief. *Curr Pharm Des.* 16(**9**):1126–35.

Ferdani, R.; Gokel, W.G. (2006) Planar bilayer studies reveal multiple conductance states for synthetic anion transporters. *Org. Biomol. Chem.* **4**, 3746-3750.

Fite, M.; Clapes, P.; Lopez-Santin, J.; Benaiges, M.D; Caminal, G. (2002) Integrated process for enzymatic synthesis of the octapeptide PhAcCCK-8. *Biotechnol. Prog.*, **18**, 1214-1220.

Gentilucci L. 2004 New trends in the development of opioid peptide analogues as advanced remedies for pain relief. *Curr Top Med Chem.* 4(1):19–38.

Getun,I.V.; Filippova, I.Y.; Lysogorskaya, E.N.; Oksenoit, E.S. (2001) SDS-subtilisin catalyzed synthesis of tetra-peptides containing multifunctional amino acid acid residues in ethanol. *J. Mol. Catal., B Enzym.*, **15**, 105-110.

Cavicchionia G., Fraulinia A., Turchettia M., Varani K., Falzaranod S., Pavanc B., Spisanid S., Eur. *J. Pharmacol.* 2005, **512**, 1-8.

Goldberg J. S. Low Molecular Weight Opioid Peptide Esters Could be Devoloped as a New Class Analgesics. *Persp. In Med. Chemistry.*, 2011, **5**, 19-26.

Halpern, B.; Chew, L.; Close, V.; Patton, W. Tetrahedron Lett. 1968, 5163-5164.

Hamel, A.R.; Hubler, F.; Carrupt, A.; Wenger, R.M.; Mutter, M. (2003) Cyclosporin A prodrugs: design, synthesis and biophysical properties. *J. Pept. Res.*, **63**, 147-154.

Hertel, J.; Struthers, H.; Horj, C.B.; Hruz, P.W. (2004) A structural basis for the acute effects of HIV protease inhibitors on GLUT4 intrinsic activity. *J. Biol. Chem.*, **279**, 55147-55152.

Huang, Y.B.; Cai, Y.; Yang, S.; Wang, H.; Hou, R.Z.; Xu, L.; Xiao-Xia, W.; Zhang, X.Z. (2006) Synthesis of tetrapeptide Bz-RGDS-NH<sub>2</sub> by a combination of chemical and enzymatic methods. *J. Biotechnol.*, **125**, 311-318.

Itoh,K.;Sekizaki,H.;Toyota,E.;Fujiwara,N.;Tanizawa,K.(1996)Applicationofinverse substratestotrypsin-catalyzedpeptidesynthesis. *Bioorg.Chem.*, **24**,59-68.

J. D. Warren, J. S. Miller, S. J. Keding, S. J. Danishefsky, J. Am. Li, Q.; Moutiez, M.; Charbonnier, J. B.; Vaudry, K.; Menez, A.; Quemeneur, E.; Dugave, C. *J Med Chem* 2000, **43**, 1770-1779.

Keith B.; Sheraz G.; Richard, W. P. (2009) Recognition, Specificity, Catalysis, nhibition, and Linguitstcs. Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry. Vol.2, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Liederer, B.M.; Borchardt, R.T.J. Pharm. Sci. 2006, 95, 1177-1195.

Liria, C.W.; Miranda, M.T.M (2001) Influence of reaction conditions on peptide bond formation catalyzed by lipases. *Peptides 2000- Proceedings of the 26<sup>th</sup> European Peptide Symposium* (Martinez, J.; Fehrentz, J.A., eds.). EDK: Paris, p. 331-332.

Merrifield, R.B. Solid phase peptide synthesis / synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, vol. **85**, p. 2149-2154.

Miranda, M. T. M.; Morita, H.; Tominaga, M.(1991 a) Transesterification of Moz-Asn-Leu-Gly-OEt in methanol - confirmation of Ca<sup>2+</sup> mediated catalysis. Int. *J. Peptide Prot. Res.*, **37**, 299-305.

Miranda, M. T. M.; Theobaldo, F.C.; Tominaga, M.(1991 b) Transesterification of peptide esters and peptidyl resins in methanol-containing calcium acetate. *Int. J. Peptide Prot. Res.*, **37**, 451-456.

Miranda, M.T.M; Liria, C.W; Remusgo, C.M. (2011). Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry. Vol. 3, Ed. Andrew B. H. **16**, 549-564.

Moore, G. J.; Kwok, Y. C Can. U. Biochem 1980, 58, 641-643.

Moraes, C. M.; Bemquerer, M.P.; Miranda, M.T.M (2000) Solvolysis and aminolysis on peptidil-Kaiser oxime resin assisted by  $Ca^{2+}$  and  $Eu^{+3}$ : a mild procedure to prepare  $\alpha$ -methyl and  $\alpha$ -ethyl esters of protected peptides. *J. Pept. Res.*, **55**, 279-288.

Mullen, G. D.; Kyro, K.; Hauser, M.; Gustavsson, M.; Veglia, G.; Becker, J. F.; Naider, F.; Distefano, M. D. (2011) Synthesis of a-factor peptide from Saccharomyces cerevisiae and photoactive analogues via Fmoc solid phase methodology. *Bioorg. & Med. Chem.*, **19**, 490-497.

Natasha Djedovic, Riccardo Ferdani, Egan Harder, Jolanta Pajewska, Robert Pajeuski, Paul H. Schlesinger and George W. Gokel. The C-terminal ester of membrane anchored peptide ion channels affects anion transport. *Chem. Commun.*, 2003, 2862-2863.

Peters, C.; Waldmann, H. (2003) Solid-phase synthesis of peptide esters employing the hydrazide linker. *J. Org. Chem.*, **68**, 6053-6055.

Proti, P.B. (2007) Preparação de ésteres e tioésteres de peptídeos protegidos através de solvólise da ligação peptidil-resina mediada por íons metálicos. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química. Universidade de São Paulo. 202p.

Proti, P.B. (2007) Preparação de ésteres e tioésteres de peptídeos protegidos através de solvólise da ligação peptidil-resina mediada por íons metálicos. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química. Universidade de São Paulo. 202p.

Pajewski, R.; Pajewska, J.; Li, R.; Megan M.D.; Elizabeth A.F.; Gokel, G.W. (2007) The effect of midpolar regime mimics on anion transport mediated by amphiphilic heptapeptides. *New J. Chem.* **31**, 1960-1972.

Santos, C.; Mateus, M.L.; Santos, A.P.; Moreira, R.; Oliveira, E.; Gomes, P. (2005) Cyclization-ativated prodrugs. Synthesis, reactivity and toxicity of dipeptide esters of paracetamol. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 1595-1598.

Santos, C.R.; Capela, R., Pereira, C.S.G.P; Valente, E.; Gouveia, L.; Pannecouque, C.; Clercq, E.; Moreira, R.; Gomes, P. (2009) Struture-activity relationships for

dipeptide prodrugs of acyclovir: Implications for prodrug desing. *Europen Journal of Med. Chem.* 44(**6**), 2339-2346.

Sewald, N.; Jakubke, H. D. (2008) Peptides: Chemistry and Biology, 2<sup>th</sup> Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. (2002) Princípios de análise instrumental, 5<sup>th</sup> Ed. Bookman: Porto Alegre.

Smerdka, J.; Rademann, J.; Jung, G. (2004) Polymer-bound alkyltriazenes for mild racemization-free esterification fo amino acid and peptide derivatives. *J. Pept. Sci.*, **10**, 603-611.

Tamamura, H.; Hiramatsu, K.; Mizumoto, M.; Ueda, S.; Kusano, S.; Terakubo, S.; Akamatsu, M.; Yamamoto, N.; Trent, J. O.; Wang, Z; Peiper, S. C.; Nakashima, H.; Otaka, A.; Fujii, N.; *Org. Biomol Chem.* 2003, **1**, 3663-3669.

Timo Nuijens, Claudia Cusan, Theodorus J. G. M. van Dooren, Harold M. Moody, Remco Merkx, John A. W. Kruijtzer, Dirk T.S. Rijkers, Rob M. J. Liskamp and Peter J. L. M. Quaedflieg. Fully Enzymatic Peptide Synthesis using C-Terminal tert-Butyl Ester Interconversion. *Adv.Synth. Catal.* 2010, **352**, 2399-2404.

Tsuda Y.; Okada Y. (2011) Solution-Phase Peptide Synthesis. Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry. Vol.3, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Varanda, L.; Miranda, M.T.M. (1997) Solid-phase peptide synthesis at elevated temperatures: a search for an optimized synthesis condition of unsulfated cholecystokinin-12. *J. Pept. Res.*, **50**, 102-108.

Verinica, D.R.; Mullen, D. G., Ganusova, E.; Becker, J. M.; Distefano, M. D. (2012) Synthesis of Peptides Containing *C*-Terminal Methyl Esters Using Trityl Side-Chain Anchoring: Application to the Synthesis of a-Factor and a-Factor Analogs. *Org. Lett.*, 14(22), 5648-5651. Volhardt, K. P. C.; Shore, N. E. (2003) Organic Chemistry: Structure and Function, 4<sup>th</sup> Ed. Bookman: Porto Alegre.

Weber J. R.; Lokey R. S. (2010) Direct Conversion of Resin-Bound Peptides to C-Terminal Esters. *Org. Letters.*, **12**, 1852-1855.

# **CURRICULUM VITAE**

#### DADOS PESSOAIS

Nome: Thiago de Souza Freire Local e data de nascimento: Osasco, 30 de abril de 1986

## FORMAÇÃO ACADÊMICA

- Instituto de Química da Universidade de São Paulo

Licenciatura em Química: fev/2006 - jun/2010

- Instituto de Química da Universidade de São Paulo

Mestrado em Bioquímica: ago/2010 – atual

### **BOLSAS RECEBIDAS**

- set/2010 - ago/2012 Mestrado. CNPq

# PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

T.S Freire; C. W. Liria; M.T. Machini. Geração de peptídeos C-terminal esterificados via solvólise da ligação peptidil-resina mediada por íons divalentes, *35<sup>ª</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química,* Águas de Lindóia, 28 a 31 de maio de 2012.

### ATIVIDADE DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA

VI Curso de Inverno: Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular – 04/07/2011 – 15/07/2011.

#### MONITORIA

QBQ 2463 – Bioquímica Experimental – para alunos do curso de Bacharelado em Química (IQ-USP)

#### **DISCIPLINAS CURSADAS**

Noções Básicas de Segurança em Laboratório de Pesquisa em Química e Bioquímica: 10/08/2010 – 20/08/2010 Biologia Molecular do Gene: 04/08/2010 – 27/10/2010 Tópicos de Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular I: 19/08/2010 – 02/12/2010 Bioquímica Avançada: 15/03/2011 – 09/06/2011 Tópicos de Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular II: 17/03/2011 –

30/06/2011

Prática de Ensino de Química e Bioquímica: 15/08/2011 - 30/11/2011