

PREPARAÇÃO DE PEPTÍDEOS C-MODIFICADOS ATRAVÉS DE SOLVÓLISE DE FMOC-PEPTIDIL-RESINA HMBA MEDIADA POR METAIS DIVALENTES

Matheus de Miranda Paes Landim

Dra. Rebeca Garcia Moura

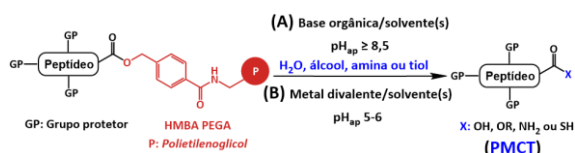
Prof^o Dra. Maria Terêsa Machini

Instituto de Química - Universidade de São Paulo

matheusdemiranda@usp.br, rebeca.garcia.moura@usp.br, mtmachini@iq.usp.br

Objetivos

Peptídeos são biomacromoléculas de grande diversidade funcional e estrutural. A sua modificação C-terminal permite modular propriedades físico-químicas e funcionais conforme o interesse¹ e, por isso, vem sendo amplamente explorada com vistas ao entendimento de modo de ação e/ou desenvolvimento de peptídeos terapêuticos. Geralmente, a modificação feita usando métodos químicos ocorre a partir de peptidil-resinas (PRs) sintéticas em meios reacionais de alto pH (**Esquema 1A**), o que pode causar a enantiomerização do resíduo de aminoácido C-terminal do peptídeo e favorecer outras reações indesejadas.² Na tentativa de desenvolver um método alternativo seletivo, mais brando e amigável para o ambiente e o experimentador, o nosso laboratório pioneiramente propôs, e vem estudando, o ataque por nucleófilos variados da ligação peptídeo-resina promovido por íons metálicos divalentes.³ De fato, a complexação do metal à estrutura peptídica enfraquece tal ligação, tornando-a mais susceptível ao ataque nucleofílico, o que promove o desligamento do peptídeo da resina e a modificação C-terminal em pH aparente (pH_{ap}) 5–6 em meios orgânicos não clorados ou de baixo risco



Esquema 1. Métodos de modificação C-terminal de peptídeos a partir de peptidil-resinas HMBA PEGA

(**Esquema 1B**). Este trabalho deu continuidade a estudos pioneiros do nosso grupo inspirados no achado de Miranda et al., 1991.⁴ Nosso objetivo foi estudar a possibilidade de ocorrência da hidrólise, metanólise e benzólise da ligação peptídeo-HMBA PEGA resina segundo o nosso método usando como modelos sequências peptídicas que contêm o motivo ATCUN Gly-Gly-His (GGH). Este motivo estrutural é conhecido por sua capacidade de quelar os íons metálicos divalentes Ca²⁺, Cu²⁺ e Zn²⁺, quelação esta que pode favorecer ou desfavorecer a complexação peptídeo-metal necessária para produzir peptídeos modificados no C-terminal (**PMCTs**).

Métodos e Procedimentos

Foram sintetizadas sequências peptídicas protegidas correspondentes a fragmentos da Cheferina I, cuja atividade candidacida é estudada por nós.⁵ As sínteses usaram o método da fase sólida a 60 °C assistida por micro-ondas (Biotage/Suécia) usando a

estratégia Fmoc e protocolos já estabelecidos pelo grupo,⁶ sendo estes mais limpos e baratos do que os convencionais. Após a síntese, 5 mg de cada PR foram tratados com 200 µL de NaOH 0,1 M por 15 min; a solução foi neutralizada com HCl 0,1 M, diluída 2x com ACN e analisada por RP-HPLC para verificar a qualidade do peptídeo ligado à resina; os componentes majoritários foram isolados e caracterizados por ESI-MS. Depois, 1 mg da PR foi submetida à hidrólise total ácida a 130 °C por 24 h para determinação do grau de substituição peptídica da resina (**GS**, mmol/g); a solução ácida foi eliminada em presença de KOH em dessecador acoplado a um liofilizador; o resíduo seco foi diluído em 1 mL de água Milli-Q e analisado por HPLC de troca iônica com detecção amperométrica pulsada (Dionex/EUA). Para as reações de desligamento do peptídeo da resina e simultânea C-esterificação promovidas por íons Ca^{2+} e Zn^{2+} em pH_{ap} 5-6,³ a PR foi suspensa em solução contendo 50% DMF ou DMSO e álcool contendo $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ ou ZnCl_2 na razão molar 2:1 (M^{2+} :peptídeo); as misturas foram incubadas a 300 rpm por 24 h a 60 °C, alíquotas retiradas em tempos definidos, diluídas 4x com ACN e analisadas por RP-HPLC; os produtos obtidos foram isolados e caracterizados por ESI-MS (Bruker/Amazon X, Alemanha). Após cada reação, a PR foi novamente analisada para medida do novo GS peptídica e comparação com o GS inicial.

Resultados

A análise por RP-HPLC dos produtos da síntese peptídica, coleta dos componentes majoritários detectados e análises por ESI-MS dos coletados indicaram que, por exemplo, a PR Fmoc-GH(Trt)GGH(Trt)-HMBA PEGA foi obtida. A proporção molar 3Gly:2His obtida para ela corroborou tal estrutura. O GS determinado foi de 0,0493 mmol/g. As reações de hidrólise da ligação peptídeo-resina desta PR promovidas por íons Ca^{2+} em pH_{ap} 5-6 a 60 °C por 24 h foram bem-sucedidas; em 50% $\text{H}_2\text{O}/\text{DMF}$ formou-se GH(Trt)GGH(Trt); em 100% H_2O foram formados GH(Trt)GGH(Trt)

com e sem Fmoc. Para as reações de metanólise da ligação peptídeo-resinada PR promovidas por íons Ca^{2+} e Zn^{2+} em pH_{ap} 5-6 a 60 °C, o melhor resultado foi obtido em 50% MeOH/DMSO contendo Zn^{2+} por 24 h, porém, mesmo em 50 % MeOH/DMF ou MeOH foram formados e GH(Trt)GGH(Trt)-OMe. As reações de benzólise da ligação peptídeo-resina da PR promovidas por íons Zn^{2+} em pH_{ap} 5-6 a 60 °C por 24 h também produziram o éster benzílico de peptídeo. A remoção do grupo Fmoc não parece ser determinada pelo tipo de metal divalente, mas sim tempo reacional.

Conclusões

Os novos resultados descritos confirmam que o nosso método alternativo de etapa única para produzir PMCTs é compatível com o uso da resina HMBA PEGA e com a química Fmoc, é eficiente, bastante seletivo, emprega condições mais limpas e brandas em pH_{ap} 5-6 e concorda com princípios da química verde. Assim sendo, ele deve ser aprofundado e aprimorado.

Os autores declaram não haver conflitos de interesse e agradecem ao CNPq (*bolsas de PIBIC, PDE e Produtividade em Pesquisa, respectivamente*) e FAPESP (auxílio 2022/01825-2 para MTM).

Referências

1. Tanaka, S. et al. *Explor. Drug Sci.* **2023**, 1, 322.
2. Coin, I. et al. *Nature Protocols.* **2007**, 2, 12, 3247.
3. Freire, T. S. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo. **2013**.
4. a) Miranda, M. T. M. et al. *Int. J. Peptide Prot. Res.* **1991**, 37, 299; b) Miranda, M. T. M. et al. *Int. J. Peptide Prot. Res.* **1991**, 37, 451; c) Moraes, C. M. et. al. *J. Pept. Res.* **2000**, 55, 279; d) Proti, P. B. PhD Thesis, Instituto de Química, Universidade de São Paulo. **2007**; e) Proti, P. B. et al. Subjected to the *Chem. Eur. J.* **2025**.
5. Nunes, L. G. P. et al. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2021**, 27, 2945.
6. Okuda-Shinagawa et al. *ACS Omega.* **2017**, 2, 8156-8166.