

**IRENE MARIA ALLES**

**SÍNTESE EM FASE SÓLIDA, CARACTERIZAÇÃO E  
ESTUDO CONFORMACIONAL DA  $\delta$ -MELANOTROPINA  
E DA  $\delta$ -MELANOTROPINA OXIDADA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**UFSM**

**SANTA MARIA, RS - BRASIL**

**2005**

SÍNTESE EM FASE SÓLIDA, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO  
CONFORMACIONAL DA  $\delta$ -MELANOTROPINA E DA  $\delta$ -MELANOTROPINA  
OXIDADA

por

**IRENE MARIA ALLES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, área de Química Orgânica, da Universidade Federal de Santa Maria (RS), como requisito parcial para obtenção do grau de MESTRE EM QUÍMICA.

Santa Maria, RS – BRASIL

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

a comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação intitulada

**SÍNTESE EM FASE SÓLIDA, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO  
CONFORMACIONAL DA  $\delta$ -MELANOTROPINA E DA  $\delta$ -MELANOTROPINA  
OXIDADA**

elaborada por  
IRENE MARIA ALLES

como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Ademir Farias Morel – Orientador  
UFSM

---

Profa. Dra. Ionara Irion Dalcol  
UFSM

---

Prof. Dr. Eduardo Miranda Ethur  
Centro Universitário UNIVATES

Santa Maria, 12 de março de 2005

Aos meus pais Aloysio e Helga Alles, aos meus irmãos e familiares, pelo incentivo e carinho ao longo desta caminhada. Ao Sergio, amigo e companheiro de todas as horas.

Ao Prof. Dr. Ademir Farias Morel, meu sincero agradecimento pela orientação deste trabalho.

Muito obrigada.

A Profª. Drª. Ionara Irion Dalcol meu sincero agradecimento pela orientação, compreensão e dedicação no decorrer deste trabalho.

Muito obrigada.

## AGRADECIMENTOS

Ao colega Vinícius Caliari, pela participação inicial deste projeto, no qual eu pude dar seqüência e obter bons resultados;

Ao prof. Dr. Eduardo Miranda Ethur, pela sua amizade e contribuição durante este trabalho;

Aos amigos: Adriana, Andréia, Gilvan, Graciela e Miriam, por toda a ajuda e apoio que me foi prestado;

Aos colegas, ex-colegas de laboratório: Álvaro, Anderson, Carla, Carlos, Caroline, Claudia, Euclésio, Juliano, Luciana, Rodrigo, Sandro, Vanessa, Veridiana, Vinícius (Vini) pela contribuição e convívio durante a realização deste trabalho;

Aos funcionários da coordenação do curso de Pós-Graduação em Química, Valéria Velásquez e Ademir Sartori pela ajuda na parte burocrática;

A todas as pessoas que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

## RESUMO

TÍTULO: “SÍNTESE EM FASE SÓLIDA, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO CONFORMACIONAL DA  $\delta$ -MELANTROPINA E DA  $\delta$ -MELANTROPINA OXIDADA”.

AUTOR: Irene Maria Alles

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

A  $\delta$ -Melanotropina é um peptídeo com seqüência H-Ser-Met-Glu-Val-Arg-Gli-Trp-OH. A síntese deste peptídeo foi realizada pela metodologia em fase sólida, sendo a seqüência sintetizada sobre um suporte polimérico mediante a incorporação sucessiva de cada aminoácido. Uma vez sintetizada a seqüência desejada, procedeu-se à sua separação do suporte sólido mediante acidólise com o coquetel R (TFA-tioanisol-EDT-anisol). O suporte empregado foi a resina *p*-metilbenzidrilamina (MBHA) e o separador usado foi o ácido 3-(4-hidroximetilfenoxi) propiônico. Os acoplamentos foram realizados com diisopropilcarbodiimida (DIC) em presença do 1-hidroxibenzotriazol (HOBt). Durante os procedimentos de purificação da  $\delta$ -melanotropia, foi observada sua oxidação parcial, obtendo-se até 35% de H-Ser-Met(O)-Glu-Val-Arg-Gli-Trp-OH. Neste trabalho realizou-se a análise conformacional da  $\delta$ -melanotropia sintética utilizando-se a técnica de espectroscopia de dicroísmo circular. Foram estudados parâmetros como a variação de concentração de trifluoretanol, variação de temperatura e de concentração do peptídeo. Observou-se que a conformação preferencial do peptídeo é desordenada.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Dissertação de Mestrado em Química.

Santa Maria, 12 de Agosto de 2005.



**ABSTRACT**

TITLE: "A SYNTHESIS IN SOLID PHASE, CHARACTERIZATION AND CONFORMATIONAL STUDY OF THE  $\delta$ -MELANTROPIN AND THE  $\delta$ -MELANTROPIN OXIDATED."

AUTHOR: Irene Maria Alles

ACADEMIC ADVISOR: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

The  $\delta$ -melanotropin is a peptide with sequence H-Ser-Met-Glu-Val-Arg-Gli-Trp-OH. The synthesis of this peptide was carried out by the methodology in solid phase, being the sequence synthesized on a polymeric support by means of the successive incorporation of each amino acid. After the desired sequence was synthesized, we proceeded with its cleavage from the solid support by means of acidolysis with cocktail R (TFA-thioanisole-EDT-anisol). The employed support was *p*-methylbenzhydrylamine resin (MBHA) and the handle (linker) used was the 3-(4'-hydroxymethylphenoxy)propionic acid. The coupling reactions were carried out using diisopropylcarbodiimine (DIC) in presence of 1-hydroxybenzotriazole (HOBt). During the procedures of purification of the  $\delta$ -melanotropin, its partial oxidation was observed, getting up to 35% of H-Ser-Met(O)-Glu-Val-Arg-Gli-Trp-OH. In this work it was achieved a conformational analysis of the synthetic  $\delta$ -melanotropin using circular dichroism spectroscopy. There were also studied some parameters as concentration of trifluoretanol, temperature and concentration of the peptide. It was observed that the preferential conformation of the peptide is random coil.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA

POS-GRADUATED PROGRAM IN CHEMISTRY

Masters Dissertation in Chemistry.

Santa Maria, August 12<sup>th</sup>, 2005.

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	vi
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	xii
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xvi
ANEXO I .....	xviii
I INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
II REVISÃO DA LITERATURA .....	5
2.1. Aspectos gerais:.....	5
2.2. Síntese de peptídeos em fase sólida:.....	6
2.2.1. Principais suportes sólidos utilizados em SPPS:.....	9
2.2.2. Separadores peptídeo-resina (“Handle”):.....	10
2.2.3. Grupos protetores para SPPS: .....	11
2.2.4. Métodos de acoplamento em SPPS:.....	12
2.3. Peptídeos contendo Metionina oxidada:.....	14
2.4. Melanotropinas ( $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ - e $\delta$ -MSH).....	17
2.5. Dicroísmo Circular: técnica que permite determinar a estrutura secundária dos peptídeos.....	19
III DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....	21
3.1 Síntese da $\delta$ -Melantropina.....	22
3.1.1. Preparação dos aminoácidos <i>N</i> -protegidos.....	24
3.1.2. Preparação do Separador (“Linker”) .....	26

3.1.3. Síntese da $\delta$ -MSH acoplada ao suporte sólido .....	28
3.1.4. Obtenção e purificação da $\delta$ -MSH livre .....	32
3.1.5. Caracterização da $\delta$ -MSH por RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ .....	35
3.1.6. Síntese da $\delta$ -MSH(O)-resina. ....	41
3.1.6.1. Análise do peptídeo oxidado por RMN.....	43
3.2 Estudo Conformacional por Dicroísmo Circular.....	46
IV PARTE EXPERIMENTAL.....	50
4.1. Reagentes e solventes utilizados: .....	50
4.2. Instrumentos utilizados:.....	50
4.2.1. Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear.....	50
4.2.2. Aparelho de Ponto de Fusão.....	51
4.2.3. Liofilizador .....	51
4.2.4. Espectrômetro de massa .....	51
4.2.5. Espectropolarímetro – Análises por Dicroísmo circular: .....	52
4.3. Métodos Analíticos sobre a resina:.....	52
4.4. Métodos cromatográficos .....	53
4.5. Reveladores usados em Cromatografia em camada delgada para identificação de peptídeos e aminoácidos.....	53
4.5.1. Solução de ninhidrina .....	53
4.5.2. Solução de O-toluidina.....	54
4.6. Obtenção dos aminoácidos protegidos .....	54
4.6.1. <i>tert</i> -Butiloxicarbonil-fenilalanina (Boc-Phe-OH).....	54
4.6.2. 9-Fluorenilmetiloxicarbonil-triptofano (Fmoc-Trp-OH).....	55
4.6.3. 9-Fluorenilmetiloxicarbonil-Glicina (Fmoc-Gli-OH) .....	55
4.6.4. 9-Fluorenilmetiloxicarbonil-valina (Fmoc-Val-OH).....	56
4.6.5. Metionina oxidada [H-Met(O)-OH] .....	56

4.6.6. 9-Fluorenilmetiloxycarbonil-Metionina oxidada [Fmoc-Met(O)-OH] .....	56
4.6.7. 9-Fluorenilmetiloxycarbonil-Metionina (Fmoc-Met-OH) .....	57
4.7. Obtenção do 3-(4'-hidroximetilfenoxi) propionato de pentafluorfenila.....	57
4.8. Síntese em fase sólida e purificação da $\delta$ -Melanotropina .....	59
4.8.1. Tratamento inicial da resina .....	59
4.8.2. Incorporação do terc-butiloxycarbonil fenilalanina (Boc-Phe-OH).....	59
4.8.3. Desproteção do terc-butiloxycarbonil (Boc) .....	60
4.8.4. Incorporação do separador (Handle) .....	60
4.8.5. Incorporação do aminoácido protegido: Fluorenilmetiloxycarbonil Triptofano (Fmoc-Trp-OH).....	61
4.8.6. Acetilação preventiva: .....	61
4.8.7. Acoplamento dos aminoácidos da seqüência da $\delta$ -melanotropina:.....	61
4.8.8. Separação do peptídeo da resina:.....	62
4.9. Coquetéis de clivagem utilizados .....	63
V CONCLUSÃO .....	64
ANEXO II .....	65

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1: Fmoc-aminoácidos preparados pelo procedimento de Bolin e col. <sup>21</sup> .....	25
TABELA 2: Dados de RMN <sup>1</sup> H (D <sub>2</sub> O, capilar de CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da δ-Melanotropina	38
TABELA 3: Dados de RMN <sup>13</sup> C (D <sub>2</sub> O, capilar de CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) da δ-Melanotropina	40
TABELA 4: Dados de RMN <sup>1</sup> H (D <sub>2</sub> O, capilar de CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da δ-MSH(O). .....	44
TABELA 5: Dados de RMN <sup>13</sup> C (D <sub>2</sub> O, capilar de CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) da δ-MSH(O). .....	45

**LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1 - Formação da ligação peptídica.....	1
FIGURA 2 - Estrutura do heptapeptídeo $\delta$ -Melanotropina.....	3
FIGURA 3 – Estrutura da Oxitocina.....	5
FIGURA 4 - Estruturas da vasopressina e alguns análogos.....	6
FIGURA 5 - Esquema básico da síntese em fase sólida.....	8
FIGURA 6 - Estruturas das principais resinas.....	10
FIGURA 7 - Separador ácido 3-(4-hidroximetilfenoxi)propiónico.....	10
FIGURA 8 - Estrutura das espécies ativadas. (A) O-acil-uréia. (B) anidrido simétrico.....	12
FIGURA 9 - Acoplamento com HOBt e DCC.....	13
FIGURA 10: Estrutura do sal hexafluorofosfato de O-(azabenzotriazol-i-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio.....	14
FIGURA 11 : Estrutura da metionina e da metionina oxidada.....	15
FIGURA 12: Reação de redução.....	16
FIGURA 13: Seqüências de aminoácidos para $\alpha$ -MSH, (A), $\beta$ -MSH (B), $\gamma$ -MSH (C) e $\delta$ -MSH (D).....	18
FIGURA 14 - Espectros de DC de proteínas e polipeptídeos em diferentes conformações: $\alpha$ - hélice ( $\circ$ ), folhas $\beta$ -pregueadas ( $\bullet$ ), giros- $\beta$ ( $\Delta$ ) e PPII ( $\blacktriangle$ ).....	20
FIGURA 15 - Estratégia de síntese do fragmento 1-4 da $\delta$ -melanotropina.....	22
FIGURA 16 - Estratégia de síntese do fragmento 5-7 da $\delta$ -melanotropina.....	23
FIGURA 17 - preparação do Fmoc-aa.....	24
FIGURA 18 - Preparação do Fmoc-aa com TMS.....	25

FIGURA 19: Estruturas dos aminoácidos serina, ácido glutâmico e arginina protegidos para síntese. ....	26
FIGURA 20 – Separador acoplado entre o aa de referência interna e o peptídeo em construção. ....	27
FIGURA 21 - Síntese do 3-(4-hidroximetilfenoxi)propionato de pentafluorfenila. ....	28
FIGURA 22 - Desproteção do Fmoc-peptídeo-resina com piperidina. ....	30
FIGURA 23 - Esquema demonstrativo da síntese em fase sólida da $\delta$ -MSH. ....	31
FIGURA 24 - reação da clivagem. ....	32
FIGURA 25 - Espectro de massa MALDI-TOF do peptídeo bruto $\delta$ -MSH, obtido a partir da clivagem com o coquetel “R” (TFA-tioanisol-EDT-anisol; 90:5:3:2). ....	33
FIGURA 26 - Análise por CLAE em fase reversa da $\delta$ -MSH com o sistema de solventes 30% de acetonitrila em H <sub>2</sub> O com 0,1% de TFA. ....	34
FIGURA 27 – Análise por CLAE em fase reversa da $\delta$ -MSH com o sistema de solventes ACN:H <sub>2</sub> O contendo 0,1% de TFA. ....	35
FIGURA 28 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H da $\delta$ -MSH a 400MHz em D <sub>2</sub> O, em presença de capilar de CDCl <sub>3</sub> . ....	36
FIGURA 29: Espectro expandido de RMN <sup>1</sup> H na região de 0,5 – 3,5 ppm da $\delta$ -MSH, a 400MHz em D <sub>2</sub> O. ....	37
FIGURA 30: Espectro expandido de RMN <sup>1</sup> H na região de 3,8 – 4,5 ppm da $\delta$ -MSH, a 400MHz em D <sub>2</sub> O. ....	38
FIGURA 31 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C da $\delta$ -MSH a100MHz em D <sub>2</sub> O, em presença de capilar de CDCl <sub>3</sub> . ....	39
FIGURA 32 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C-DEPT 135° da $\delta$ -MSH a100MHz em D <sub>2</sub> O. ....	40
FIGURA 33 - Esquema demonstrativo da síntese em fase sólida da $\delta$ -MSH(O). ....	42
FIGURA 34 – CLAE analítica em coluna de fase reversa do peptídeo $\delta$ -MSH oxidado. Condições de eluição: isocrático a 30% de acetonitrila em H <sub>2</sub> O com 0,1% TFA. Fluxo= 2 ml/min; 220nm. ....	43
FIGURA 35 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (D <sub>2</sub> O, capilar de CDCl <sub>3</sub> , da $\delta$ -MSH(O). ....	44

FIGURA 36 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ em $\text{CDCl}_3$ da $\delta$ -MSH(O) a 100 MHz. ....	45
FIGURA 37 - Espectros de DC da $\delta$ -melanotropina em tampão fosfato 10 mM a 20°C: (a) 30 $\mu\text{M}$ do peptídeo; (b) 80 $\mu\text{M}$ do peptídeo e (c) 160 $\mu\text{M}$ do peptídeo em presença de 2,2,2-trifluoretanol (TFE). ....	47
FIGURA 38 - Espectros de DC da $\delta$ -melanotropina em tampão fosfato 10 mM a 20°C: (a) em presença de 10% TFE e (b) em presença de 50% TFE.....	48
FIGURA 39 - Espectro de DC da $\delta$ -melanotropina (160 $\mu\text{M}$ ) em tampão fosfato 10 mM com 90% TFE a 20°C.....	49
FIGURA 40 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ em $\text{DDCl}_3$ , da Boc-Phe.....	66
FIGURA 41 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ em $\text{DDCl}_3$ , do Fmoc-Trp.....	66
FIGURA 42 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ em MeOD, do Fmoc-Gli. ....	67
FIGURA 43 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ em $\text{DDCl}_3$ , do Fmoc-Val.....	67
FIGURA 44 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ em MeOD da Fmoc-Met(O).....	68
FIGURA 45 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ em MeOD da Fmoc-Met.....	68
FIGURA 46 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ em $\text{CDCl}_3$ do Separador (Handle).....	69
FIGURA 47: Espectro de RMN de 2D, $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY em $\text{D}_2\text{O}$ a 400 MHz. ....	69
FIGURA 48: Espectro 2D, heteronuclear HMQC em $\text{D}_2\text{O}$ a 400 MHz.....	70



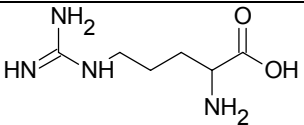
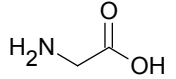
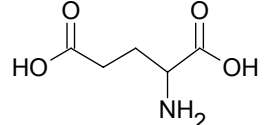
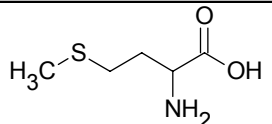
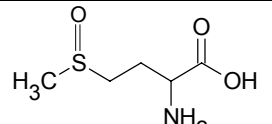
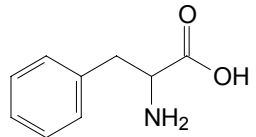
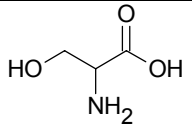
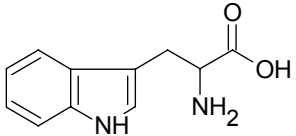
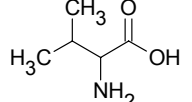
**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

$\delta$	Deslocamento químico
°C	Grau Celcius
aa	Aminoácidos
aa <sub>RI</sub>	Aminoácido de referência interna
Adoc	Adamantiloxicarbonil
Adpoc	1-(1-adamantil)-1-metiletoxicarbonil
AE	Análise Elementar
Bic	5-benziloxazolimetilenoxicarbonil
Boc	<i>t</i> -butiloxicarbonil
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Col.	Colaborador(es)
COSY	Espectroscopia RMN de correlações – <i>do inglês: Correlated Spectroscopy</i>
d	Dubleto
DCC	Dicicloexilcarbodiimida
DCCU	<i>N, N'</i> -dicicloexiluréia
EDT	Etanoditiol
DEPT	“Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer”
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DIEA	Diisopropiletilamina
DMAP	4- <i>N, N'</i> - dimetilamino-piridina

DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
EM FAB	Espectro de massa FAB (“ <i>Fast Atom Bombardment</i> ”)
Fmoc	9-fluorenilmetiloxicarbonil
HMQC	Coerência heteronuclear múltiplo-quântica– <i>do inglês: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HOSu	<i>N</i> -hidroxisuccinamida
Hz	Hertz
iBc	Isobutiril (2-metilpropanoil)
J	Constante de acoplamento
m	Multiplete
MBHA	Metilbenzidrilamina
Met(O)	metionina oxidada
PF	Ponto de fusão
Pmc	2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonil
R	Rendimento
R <sub>f</sub>	Fator de retenção
s	Singleto
t	Triplete
TFA	Ácido trifluoracético
TMS	Tetrametilsilano
Z	Benziloxicarbonil

## ANEXO I

Código de uma letra e três letras, dos aminoácidos empregados na síntese, segundo a IUPAC.

AA		LETRA	ESTRUTURA
Arg	Arginina	R	
Gly	Glicina	G	
Glu	Ácido Glutâmico	E	
Met	Metionina	M	
Met(O)	Metionina oxidada		
Phe	Fenilalanina	P	
Ser	Serina	S	
Trp	Triptofano	T	
Val	Valina	V	

## I INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A evolução na síntese de peptídeos desde o seu início, tem consistido no desenvolvimento de novos grupos de proteção que apresentem condições brandas de desproteção, sem danificar a ligação peptídica, e no desenvolvimento de técnicas de acoplamento eficientes, com o menor número possível de reações laterais. Em qualquer seqüência de síntese de um determinado polipeptídeo, existem dificuldades causadas especificamente pelas cadeias laterais dos aminoácidos individuais. Os problemas encontrados são muito numerosos e variados, entretanto alguns são comuns a todas as sínteses.

Os peptídeos são compostos formados por aminoácidos, que se unem através da ligação entre o grupamento  $\alpha$ -amino de um aminoácido e o grupamento  $\alpha$ -carboxila de outro, para a formação de uma ligação amida (Figura 1). Desta maneira, podem ser formadas cadeias com número variável de aminoácidos, dependendo de cada peptídeo em particular, sendo que os aminoácidos estão ligados entre si numa seqüência específica e possuem uma estereoquímica definida. Isso irá determinar suas propriedades específicas e a atividade biológica do produto encontrado na natureza.

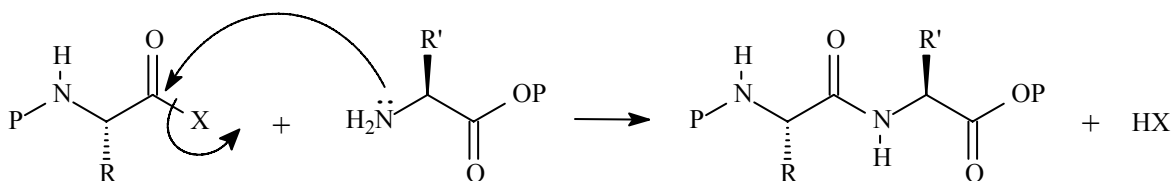


FIGURA 1 - Formação da ligação peptídica.

Os peptídeos fazem parte da estrutura das proteínas e possuem ampla aplicação farmacológica como, por exemplo, hormônios e antibióticos. Os hormônios, oxitocina (presente na maioria das células vivas) e vasopressina, são biosintetizados no hipotálamo e

a insulina, produzida pelo pâncreas<sup>1</sup>. A identificação e a síntese desses e vários outros hormônios é de excepcional importância na química. O estudo dessa classe de compostos teve início com a elucidação da estrutura das proteínas, e desde então, a área de síntese de peptídeos evoluiu no sentido da adequação dos métodos usados na formação das cadeias peptídicas<sup>2</sup>.

O grupo do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN) iniciou seus estudos na área de peptídeos desenvolvendo a síntese em solução (método clássico) da bursina<sup>3</sup> e de pequenos fragmentos da  $\delta$ -melanotropina<sup>4</sup>. O NPPN também vem desenvolvendo estudos de síntese de pequenos fragmentos tripeptídicos constituintes da estrutura de alcalóides ciclopeptídicos isolados de plantas medicinais das famílias Rhamnaceae<sup>5</sup>.

A bursina, tripeptídeo biologicamente ativo, presente no plasma sanguíneo de mamíferos, foi sintetizada com sucesso em 1991 em nosso grupo de pesquisa. A  $\delta$ -Melanotropina (Figura 2) é um peptídeo composto por sete aminoácidos acoplados na seqüência H-Ser-Met-Glu-Val-Arg-Gli-Trp-OH, apresentando um peso molecular de 864 uma. Na sua forma oxidada, apresenta a mesma seqüência de aminoácidos, porém com a cadeia lateral da Metionina oxidada na forma de sulfóxido, sendo seu peso molecular de 880 uma. As melanotropinas e outros hormônios são formados a partir de um mesmo precursor glicoprotéico, a proopiomelanocortina<sup>6</sup>, na hipófise, estando presentes em várias regiões do sistema nervoso central. As melanotropinas são compostas de uma família de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -melanotropinas, e estão envolvidas em vários efeitos fisiológicos como a aprendizagem<sup>7</sup>, estimulam a biossíntese da melanina e atuam na dispersão do melanosoma dentro dos melanóforos<sup>8</sup>. Na literatura há pouco conhecimento quanto à atividade biológica específica da  $\delta$ -Melanotropina, e não há registros de sua síntese na forma oxidada e nem da forma reduzida.

---

<sup>1</sup> Foye, W.O.; Lemke, T.L.; Williams, D.A.; *Principles of Medicinal Chemistry*, fourth Edition, **1995**.

<sup>2</sup> Sanger, F.; *Nature*, **1953**, 171, 1025.

<sup>3</sup> Dalcol, I.; *Dissertação de mestrado*, UFSM, 1991.

<sup>4</sup> Appelt, H.R.; *Dissertação de mestrado*, UFSM, 1996.

<sup>5</sup> Mostardeiro, M. A.; *Dissertação de doutorado*, UFSM, 2001.

<sup>6</sup> Lis, M. e col.; *J.C.E.&M.*, **1981**, 52, 1053.

<sup>7</sup> Haskell-Luevano, C.; Nikiforovich, G.; Sharma, S.D.; Yang, Y.; Dickinson, C.; Hruby, V.J.; Gantz, I.; *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 1738-1748.

<sup>8</sup> Hadley, M.e col.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1982**, 79, 1751.

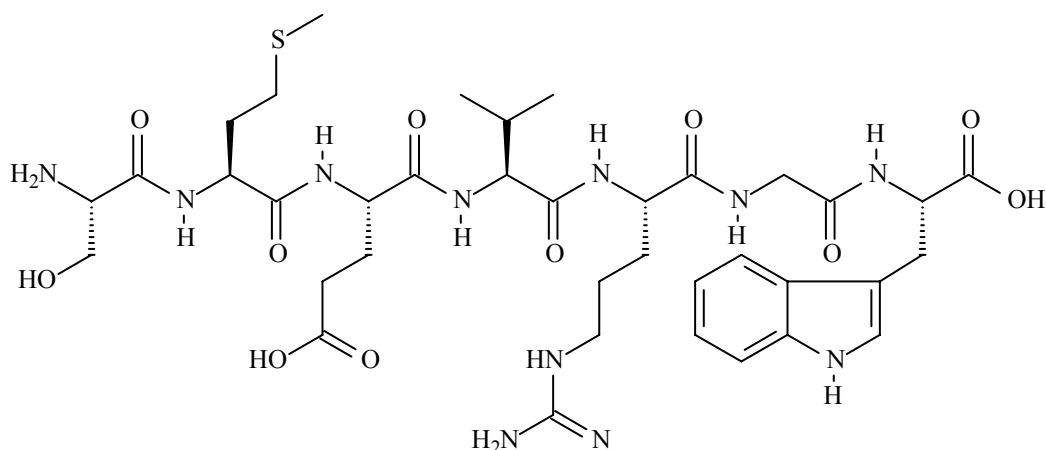


FIGURA 2 - Estrutura do heptapeptídeo  $\delta$ -Melanotropina.

A síntese deste peptídeo é de fundamental importância, pois as atividades fisiológicas *in vivo* e *in vitro* só podem ser comprovadas quando a substância de interesse apresentar-se em quantidades suficientes e com elevado grau de pureza, para que todas as análises necessárias sejam realizadas. Em nosso grupo de pesquisa do NPPN foram realizadas várias tentativas de síntese em solução da  $\delta$ -melanotropina porém, apesar de várias mudanças nas estratégias de síntese pelo método clássico, não foi possível a síntese total deste peptídeo. As dificuldades encontradas são principalmente na extração e cristalização, apresentando também problemas com grupamentos que podem sofrer reações laterais, degradação de fragmentos peptídicos e rendimentos particularmente críticos.

Em continuidade aos estudos na área de peptídeos desenvolvidos pelo NPPN, este trabalho teve como objetivo principal a síntese completa da  $\delta$ -Melanotropina utilizando-se uma metodologia de síntese em fase sólida. Como objetivos específicos deste trabalho, destacam-se:

- Síntese otimizada da  $\delta$ -melanotropina ( $\delta$ -MSH) em suporte sólido utilizando-se uma estratégia sintética do tipo Fmoc/tButil.
- Síntese da  $\delta$ -melanotropina em sua forma oxidada [ $\delta$ -MSH(O)].
- Caracterização e elucidação das estruturas da  $\delta$ -melanotropina e da  $\delta$ -melanotropina oxidada através da cromatografia líquida de alta eficácia e da aplicação de métodos físicos como a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais e espectrometria de massa.

- Estudo conformacional preliminar em solução da  $\delta$ -melanotropina, utilizando-se a técnica espectroscópica de dicroísmo circular, que nos permite determinar a estrutura secundária do peptídeo.

## II REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Aspectos gerais:

Os peptídeos biologicamente ativos vêm sendo usados no desenvolvimento de novas drogas, pois possuem grande potencial terapêutico contra doenças infecciosas como a malária e outras enfermidades. Atualmente não existe uma linha que define claramente a diferença entre um peptídeo e uma proteína, mas uma distinção aceitável é considerar que o peptídeo seja constituído por cadeia de até 30 aminoácidos, sendo cadeias maiores de 30 consideradas como proteínas<sup>9</sup>.

A oxitocina é um nonapeptídeo cíclico de grande importância, pois realiza várias funções fisiológicas relacionadas particularmente com a lactação, sendo também um estimulador nas contrações uterinas. Clinicamente, a oxitocina é usada na indução no trabalho de parto e em hemorragias pós-parto.

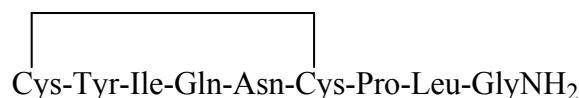


FIGURA 3 – Estrutura da Oxitocina

A Vasopressina é um hormônio anti-diurético. Existem três análogos da vasopressina, todos nonapeptídeos com suas respectivas modificações: a arginina-vasopressina (AVP) é encontrada em humanos, a lisina-vasopressina (LVP) é encontrada em hipopótamos e a fenilpressina (FVP) é encontrada em araras Australianas<sup>10</sup>.

<sup>9</sup> Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giral, E.; *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, Barcelona, Spin, **1997**.

<sup>10</sup> Griffiths, E.C.; *Biologically-ActivePeptides*.



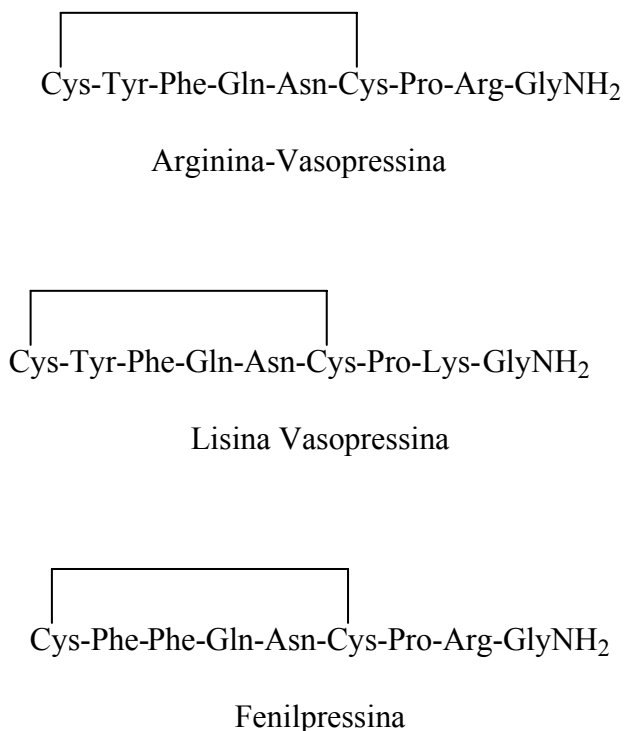


FIGURA 4 - Estruturas da vasopressina e alguns análogos.

## 2.2. Síntese de peptídeos em fase sólida:

A construção de uma cadeia de aminoácidos para formar um determinado peptídeo é um processo muito laborioso a ser executado por um químico sintético. Moléculas como os aminoácidos, que possuem dois ou mais grupos funcionais, devem se combinar em uma ordem muito bem definida. Na síntese de peptídeos, somente um sítio específico em cada um dos aminoácidos envolvidos na formação de uma nova ligação peptídica deve estar disponível para a reação de formação do produto desejado. Os grupos funcionais passíveis de sofrer reações laterais devem ser devidamente protegidos. Muitas etapas são requeridas para a síntese, sendo que o rendimento de cada etapa é particularmente crítico. Assim, a formação da ligação peptídica pela condensação direta de dois aminoácidos é um processo

difícil, não só pela natureza dipolar dos aminoácidos, como pela variação de energia da reação envolvida no processo<sup>11</sup>.

O planejamento de uma síntese em fase sólida começa com a escolha do suporte polimérico. O mesmo deve ser permeável e facilmente solvatado por solventes polares apróticos para minimizar pontes de hidrogênio entre o suporte e o peptídeo, e deve ser insolúvel a todos os solventes utilizados. A síntese em fase sólida revolucionou a síntese química de peptídeos, que desde que Merrifield anunciou a primeira síntese, tem permitido obter um número e uma variedade muito grande de peptídeos<sup>12</sup>.

A Figura 5 apresenta o esquema básico da síntese em fase sólida, aplicado a essa técnica. Neste método, o aminoácido C-terminal de uma cadeia peptídica é ligado a um suporte polimérico insolúvel através de uma ligação éster, seguindo-se o acoplamento sucessivo dos demais aminoácidos da seqüência, um a cada etapa, de maneira a obter-se a seqüência desejada. Desta forma, a construção da cadeia peptídica, realiza-se com o aminoácido protegido na forma de uretana, assim, eliminando praticamente o problema de racemização indesejável durante o processo de síntese.

---

<sup>11</sup> Merrifield, R.; *J.Am.Chem.Soc.*, **1963**, 85, 2149.

<sup>12</sup> Juliano, L.; *Química nova*, **1990**, 13, 176.

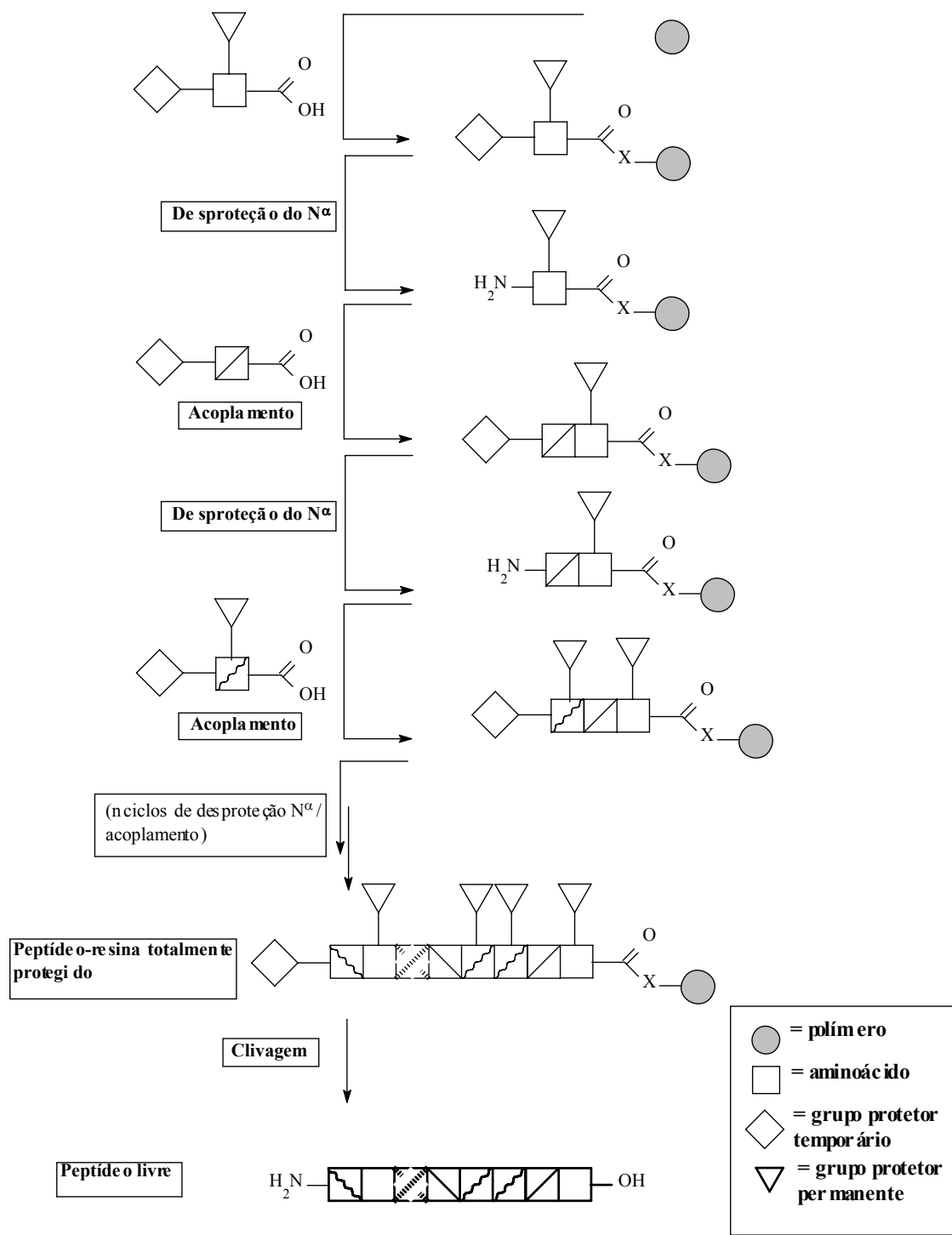


FIGURA 5 - Esquema básico da síntese em fase sólida.

A síntese em fase sólida é muito vantajosa comparada à síntese em solução, quando o peptídeo a ser sintetizado possui uma longa cadeia de aminoácidos. Na síntese em solução de longos peptídeos, há vários problemas quanto à insolubilidade e ao isolamento dos intermediários e do peptídeo desejado. Na síntese em suporte sólido os intermediários

desejados são facilmente separados dos reagentes por simples lavagem do suporte com solventes adequados, sendo que as operações de extração e cristalização tornam-se desnecessárias.

A metodologia de síntese de peptídeos em fase sólida apresenta duas diferentes estratégias básicas, chamadas estratégia *tert*-Butiloxicarbonil/Benzil (Boc/Benzil) e estratégia 9-Fluorenilmetiloxicarbonil/*t*-Butil (Fmoc/*t*-Butil). Na estratégia Boc/Benzil, utiliza-se o grupo Boc para proteger a função  $\alpha$ -amino via pirocarbonato de *tert*-butila, sendo facilmente eliminado por acidólise. Na estratégia Fmoc/*t*Bu o grupo Fmoc é usado para proteger a função  $\alpha$ -amino sendo sua remoção realizada por  $\beta$ -eliminação com uma base fraca como a piperidina, enquanto o grupo *t*-Butil é usado para a proteção das cadeias laterais dos aminoácidos .

Em qualquer das possíveis estratégias de síntese em fase sólida, deve-se saber escolher cuidadosamente o tipo suporte sólido a ser usado, assim como também se deve verificar se há necessidade ou não do uso de separador (chamados “handles”). Estas escolhas estão diretamente vinculadas ao tipo de aminoácidos presentes na seqüência peptídica e ao tipo de grupos protetores que se deve utilizar ao longo da síntese.

### 2.2.1. Principais suportes sólidos utilizados em SPPS:

Atualmente existe no mercado uma grande variedade de resinas para a SPPS. Dentre as mais utilizadas destacam-se a resina *p*-metilbenzidrilamina (MBHA), a resina clorometilpoliestireno/divinilbenzeno (resina de Merrifield), resina Diidropirano (DHP), resina de Hidroxi-alkil (resina de Wang) e a resina de Cloreto de Tritila (resina Trityl) (Figura 6). O suporte polimérico utilizado na síntese desenvolvida neste trabalho é a resina MBHA, que consiste em um copolímero de estireno e 1-2% de divinilbenzeno<sup>13-14-15</sup>.

---

<sup>13</sup> Barlos, K.; Gatos, D.; Kallitsis, J.; Papaphotiu, G.; Sotiriu, P.; Yao, W.; Schaefer, W.; Preparation of protected peptide fragments using triphenylmethyl resins. *Tetrahedron Lett*, **1989**, 30, 3943-3946.

<sup>14</sup> Jubilut, G.N.; Cilli, E.M.; Tominaga, M.; Miranda, A.; Okada, Y.; Nakaie, C.R.; *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, 49, 1089-1092.

<sup>15</sup> Marquardt, M.; Eifler-Lima, V.L.; *Química nova*, **2001**, 24, 846-855.

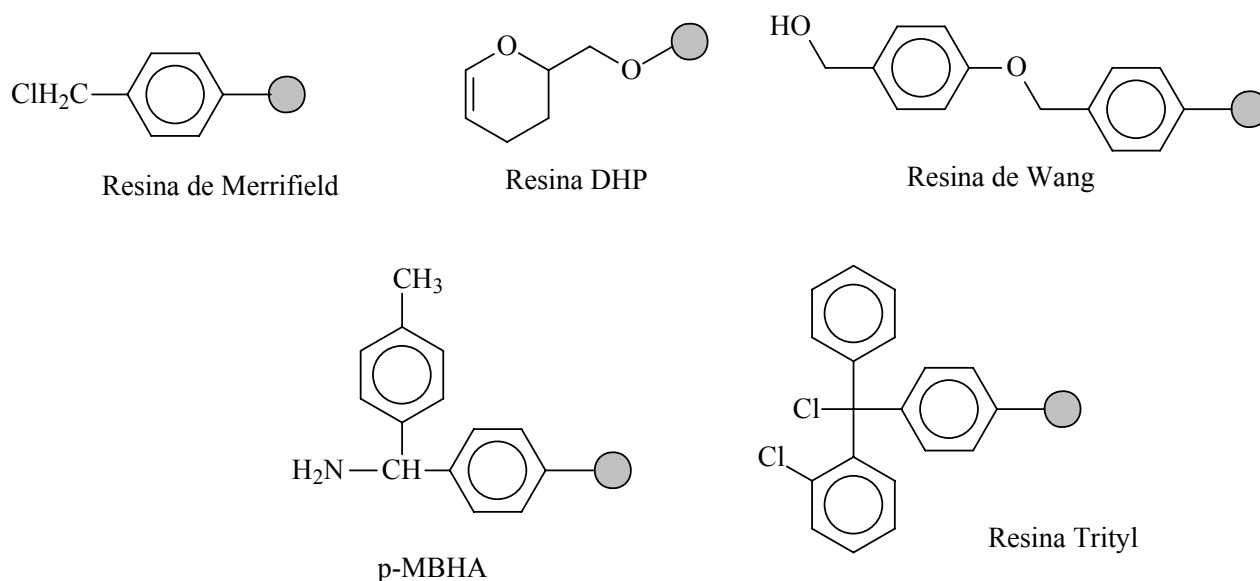


FIGURA 6 - Estruturas das principais resinas.

### 2.2.2. Separadores peptídeo-resina (“Handle”):

O acoplamento do peptídeo ao suporte polimérico deve possuir as seguintes características: ser facilmente formado, ser estável a repetidos ciclos de acilação e desproteção, e ser facilmente clivado no final da síntese sem perigo para as novas ligações peptídicas já formadas. O separador, conhecido como “Handle”, permite que a separação do peptídeo do suporte polimérico seja efetuada ao final da síntese em condições brandas de reação. O separador usado neste trabalho (Figura 7) é um derivado do ácido propiônico, cuja função é separar a cadeia peptídica desejada do aminoácido de referência e da resina<sup>16</sup>.

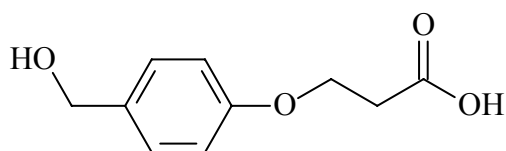


FIGURA 7 - Separador ácido 3-(4-hidroximetilfenoxi)propíonico.

<sup>16</sup> Albericio, F.; Barany, G., *Int. J. Peptide Protein Res.* **1985**, 26, 92-97.

### 2.2.3. Grupos protetores para SPPS:

Dentre os vinte aminoácidos naturais, somente sete apresentam cadeias laterais que não necessitam de qualquer proteção (Gli, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro). Nove tem cadeias laterais cuja proteção é facultativa (Arg, Tir, Ser, Thr, His, Gln, Asn, Met, Trp). Dois aminoácidos apresentam cadeias laterais que em algumas situações dispensam proteção (Asp e Glu). Por fim, em dois aminoácidos a proteção é obrigatória (Lis e Cis). Mesmo nos aminoácidos em que a proteção é facultativa é recomendável que esta seja efetuada, pois, com isso aumentamos a solubilidade dos aminoácidos em solventes orgânicos, o que ocasionará um aumento no rendimento dos acoplamentos.

Dentre todos os grupos protetores disponíveis para a síntese de peptídeos em fase sólida, utilizam-se principalmente protetores da função  $\alpha$ -amino do tipo uretana, pois estes minimizam consideravelmente o problema de racemização e são de fácil remoção. Pode-se citar, por exemplo, o grupo benziloxycarbonil (Z), que possui como características, a facilidade de obtenção, formação de derivados cristalinos e remoção por hidrogenação catalítica. Um método alternativo para remoção do grupo Z é a acidólise com ácidos fortes, como ácido bromídrico em ácido acético. O grupamento t-butiloxycarbonil (Boc) introduzido na síntese de peptídeos por McKay e Albertson<sup>17</sup>, tem como vantagem ser clivado facilmente por adição de HCl anidro, HBr ou ácido trifluoracético, sendo estável sob condições de hidrogenação catalítica. Este grupamento pode ser introduzido na função amino do aminoácido via Boc-azida ou di-t-butildicarbonato. Outro grupo protetor é o 9-fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc), muito utilizado por ser estável em meio ácido e a hidrogenação catalítica. Ele é facilmente removido sob condições fracamente básicas. Existem vários outros grupos protetores uretanas, assim como outros tipos de protetores que não são uretanas, como, por exemplo, *o*-nitrofenilsulfenil (Nps), cuja remoção é feita em condições brandas.

---

<sup>17</sup> McKay, F. and Albertson, N.; *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 4686.

#### 2.2.4. Métodos de acoplamento em SPPS:

O princípio fundamental da maioria dos métodos de acoplamento é a ativação do grupo carboxila que participará da formação da ligação amida. Na ativação, o átomo de carbono da carboxila terá sua eletrofilicidade aumentada por substituintes eletroceptores (efeitos  $-I$ ,  $-M$ ) ligados diretamente a ele, facilitando o ataque do grupo amino (do outro aminoácido) que é nucleofílico.

O Método da carbodiimida é um dos mais utilizados em síntese de peptídeos. Na primeira etapa desta reação há a formação de um intermediário (Figura 8), *O*-acil-uréia (A), sendo que a partir deste intermediário a reação pode seguir via formação de um anidrido simétrico (B) ou via formação da ligação peptídica<sup>18</sup>.

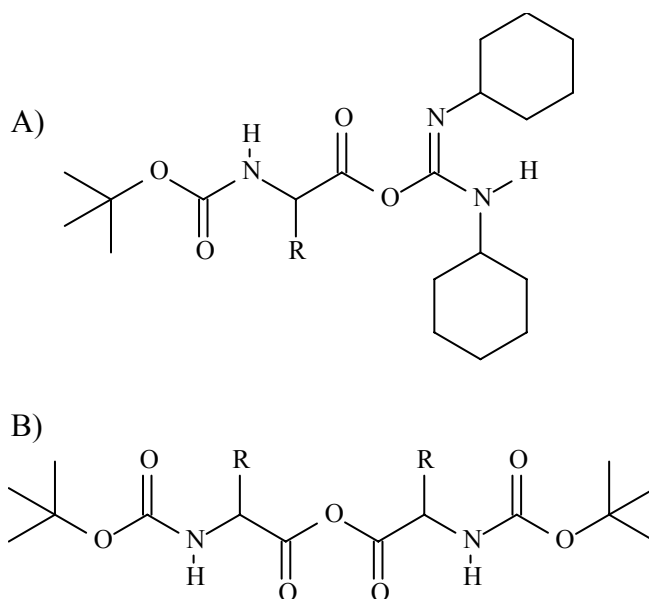


FIGURA 8 - Estrutura das espécies ativadas. (A) *O*-acil-uréia. (B) anidrido simétrico.

A dicioexilcarbodiimida (DCC) e a diisopropilcarbodiimida (DIC) são reagentes de acoplamento que usualmente proporcionam bons rendimentos em curto espaço de tempo, por isto são usados na maioria das etapas de acoplamento na síntese de peptídeos em fase sólida de Merrifield.

<sup>18</sup> Macía, M.J.G.; *Dissertação de Doutorado*, Universidade de Barcelona, 1997.

Em acoplamentos difíceis é utilizado, aliado a DCC ou DIC, o reagente 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) que é um supressor de racemização, forma um éster altamente reativo que reage rapidamente com o aminoácido *N*-terminal. A Figura 9 mostra a reação com DCC e HOBt.

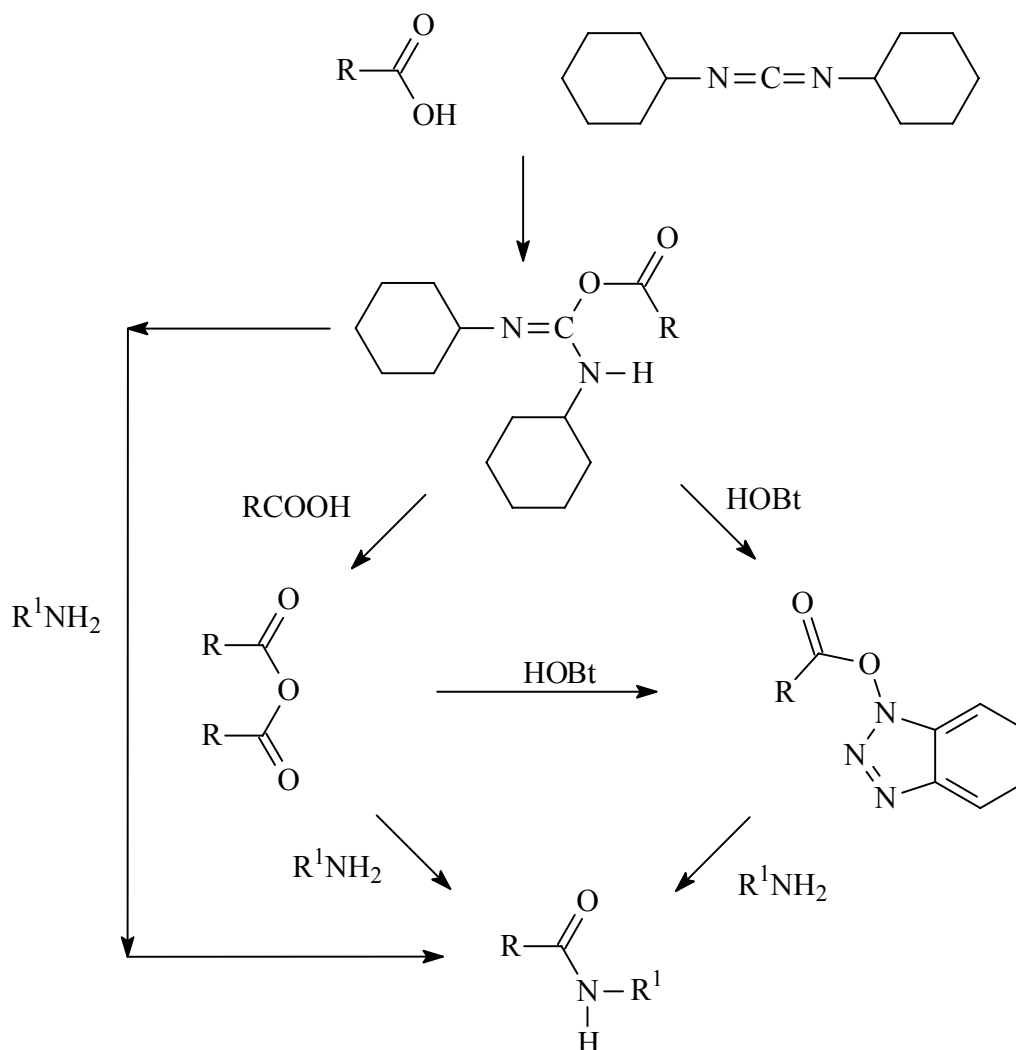


FIGURA 9 - Acoplamento com HOBt e DCC.

O sal hexafluorofosfato de O-(azabenzotriazol-*i*-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HATU) (Figura 10) é considerado mais potente em relação aos demais reagentes, devido a formação



do éster ativo intermediário o qual tem um importante efeito no grupo vizinho, porém o seu exato mecanismo na reação ainda não foi elucidado<sup>19</sup>.

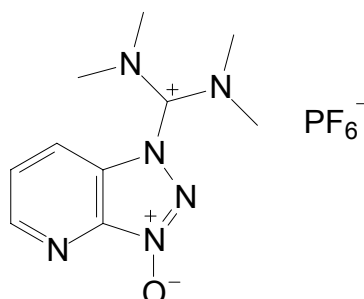


FIGURA 10: Estrutura do sal hexafluorofosfato de O-(azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio.

Após cada acoplamento é realizado o teste de ninidrina, que detecta a presença de  $\text{NH}_2$  livre. O teste positivo apresenta cor violeta, indicando a presença de  $\text{NH}_2$  livre, enquanto que a cor amarela indica a ausência do mesmo. Nos casos dos acoplamentos sobre um suporte polimérico, um teste positivo (a cor violeta sobre a resina) indica que o rendimento de acoplamento foi inferior a 99%, enquanto que um teste negativo (cor amarela), assegura que o acoplamento foi realizado com um rendimento superior a 99%.

### 2.3. Peptídeos contendo Metionina oxidada:

Na síntese de peptídeos em fase sólida, a metionina em geral não apresenta problemas com reações laterais durante as etapas de acoplamento. Porém, na etapa de clivagem dos peptídeos da resina por acidólise, pode ocorrer alquilação do enxofre, assim como a oxidação do enxofre com formação de sulfóxido. A exposição ao ar atmosférico do

---

<sup>19</sup> Dalcol I.D.; *Tese de Doutorado*, Universidade de Barcelona, 1997.

resíduo da metionina em solução, apresenta uma considerável alteração na atividade biológica, devido a sua oxidação<sup>20-21-22</sup>.

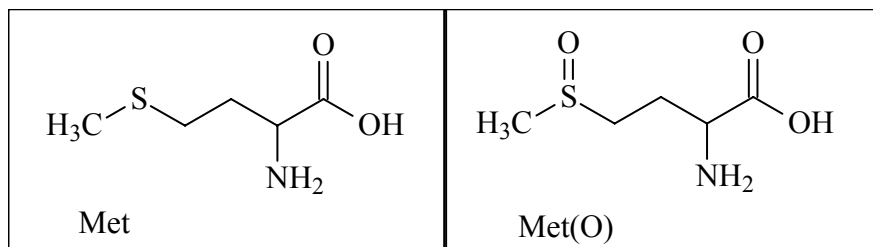


FIGURA 11 : Estrutura da metionina e da metionina oxidada.

Devido a sua flexibilidade, a metionina é um resíduo apropriado para a obtenção de peptídeos com conformação preferencial que pode variar. A cadeia lateral na forma usual de tioéter (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>) tem características hidrofóbicas, e quando na forma oxidada (Met(O)), é convertida a hidrofílica<sup>23</sup>.

A oxidação da metionina ou até a decomposição da proteína ou peptídeo ocorre favoravelmente em sequências de pelo menos quatro ou cinco resíduos de aminoácidos. Na  $\alpha$ -galactosidase da *Trichoderma reesei*, a mudança conformacional é explicada pelo fenômeno da ativação oxidativa, pois a metionina quando oxidada é convertida de um resíduo não polar (hidrofóbico) para um resíduo polar (hidrofílico)<sup>24</sup>.

A atividade de muitas proteínas envolve o início da tradução de numerosos sinais celulares em cascata. A cisteína e a metionina são aminoácidos que tem a possibilidade de oxidar, e como essa oxidação é reversível, ela faz sugerir a possibilidade de ter o papel de regular esse processo celular. No caso da metionina, a redução da metionina-sulfóxido a

<sup>20</sup> Hofmann, K.; Haas, W.; Smithers, M.J.; Wells, R.D.; Wolman, Y.; Yanaihara, N.; Zanetti, G.; *Journal of the American Chemical Society*, **1965**, 87:3.

<sup>21</sup> Iselin, B.; *Helvetica Chimica Acta*, **1961**, 60, 61-78.

<sup>22</sup> Norris, K.; Halstrom, J.; Brunfeldt, K.; *Acta Chem. Scand.*, **1971**, 25, 945-954.

<sup>23</sup> Gregory P. Dado and Samuel H. Gellman ; *J. AM. Chem. Soc.* **1993**, 115, 12609-12610.

<sup>24</sup> Kachurin, A.M.; Golubev, A.M.; Geisow, M.M.; Veselkina, O.S.; Isaeva-Isanova, L.S.; Neustroev, K.N.; *Biochem. J.* **1995**, 308, 955-964.

metionina-tioéter diminui a função hidrofílica. Esse mecanismo de redução foi observado no controle de proteínas enzimáticas na MsrA. A enzima MsrA (peptídeo metionina sulfoxido redutase) é clonada por bactérias, plantas e produzida pela glândula adrenal de bovinos, estando presente também em muitos órgãos como o cérebro, rim e retina<sup>25</sup>.

O mecanismo de oxidação da metionina é muito importante no processo da modificação estrutural secundária do peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ AP). A organização estrutural desse peptídeo é responsável pela toxicologia, que envolve a patologia da doença de Alzheimer. O ponto chave da espécie oxidada é o radical livre ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ ) do peptídeo<sup>26</sup>. A calcitricina é um hormônio produzido pela glândula tireóide em mamíferos e tem por função a regulação do cálcio no organismo. Esse polipeptídeo tem a sua atividade biológica diminuída com a oxidação da metionina, pois essa oxidação produz um desdobramento da estrutura secundária<sup>27</sup>.

O peptídeo não oxidado é regenerado a partir de uma reação de redução do análogo oxidado. As reações dos sulfóxidos com halogênios em presença de ácido, dão lugar ao tioéter quando se utiliza  $\text{I}_2$ . Um mecanismo geral consiste no ataque nucleófilo do halogênio sobre o átomo de enxofre do sulfóxido protonado, formando um composto intermediário com átomo de enxofre tetravalente (Figura 12). Este último sofre uma perda de água para dar lugar a um íon halosulfonado, sendo esta a etapa determinante da reação. A partir dessa etapa, se forma o tioéter e  $\text{I}_2$  como subproduto.

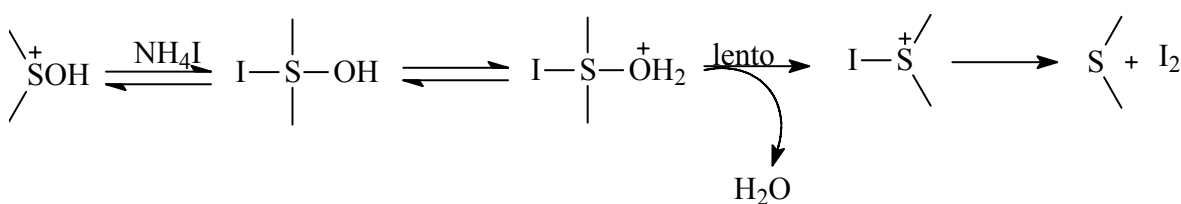


FIGURA 12: Reação de redução.

<sup>25</sup> Ciorba, M. A.; Heinemann, S. H.; weissbach, H.; Brot, N.; Hoshi, T.; *Letters*, **1999**, 442, 48-52.

<sup>26</sup> Pogocki, D; *Acta Neurobiol. Exp.* **2003**, 63, 131-145.

<sup>27</sup> Nabuchi, Y. and Asah Y.; *J. Am Soc Mass Spectrom*, **2004**, 15, 1556-1564.

A utilização de  $\text{NH}_4\text{I}$  para a redução do sulfóxido foi introduzida por Izebout e colaboradores<sup>28</sup>, porém seu uso foi questionado por Yajima e colaboradores<sup>29</sup> devido a escassa estabilidade de pontes dissulfeto em presença de  $\text{NH}_4\text{I}$ , sendo proposto então o uso de uma mistura de  $\text{NH}_4\text{I}$  e  $\text{Me}_2\text{S}$  para resolver esse problema, pois o  $\text{Me}_2\text{S}$  é conhecido redutor do grupo sulfóxido<sup>30</sup>.

A reação de redução de um peptídeo oxidado se processa com o mesmo dissolvido em TFA ([peptídeo]= 1mM ) e a 0°C. A mistura  $\text{Me}_2\text{S}$  (1:1) e o agente redutor  $\text{NH}_4\text{I}$  é acrescentada ao peptídeo, sendo a reação controlada preferencialmente por cromatografia.

#### 2.4. Melanotropinas ( $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ - e $\delta$ -MSH)

Na glândula hipófise de mamíferos é produzida uma série de hormônios. Entre eles podemos citar a corticotropina (ACTH) e  $\beta$ -Lipotropina ( $\beta$ -LPH). Estes dois hormônios, que são formados a partir de um mesmo precursor glicoprotéico, a pró-Opiomelanocortina<sup>31-32</sup>, contêm pequenos componentes peptídicos com atividade biológica: a  $\alpha$ -Melanotropina ( $\alpha$ -MSH), entre outros, é derivada da ACTH, enquanto  $\gamma$ -Lipotropina,  $\beta$ -Melanotropina ( $\beta$ -MSH), endorfinas e outros são elaborados a partir da  $\beta$ -LPH. No entanto, ACTH e  $\beta$ -LPH constituem apenas de um terço à metade do peso molecular deste precursor protéico. Na porção restante encontram-se outros peptídeos de interesse tais como  $\gamma$ -Melanotropina ( $\gamma$ -MSH) e  $\delta$ -Melanotropina ( $\delta$ -MSH).

---

<sup>28</sup> Izebout, E.; Bayerman, H.C.; *Rec. Trav. Chim.*, **1978**, 97, 1-6.

<sup>29</sup> Yajima, H.; Fujii, N.; Funakoshi, S.; Watanabe, T.; Murayama, E.; Otaka, A.; *Tetrahedron*, **1988**, 44, 805-819.

<sup>30</sup> Tam, J.P.; Heath, W.F.; Merrifield, R.B.; *Tetrahedron Lett.*, **1982**, 23, 2939.

<sup>31</sup> Nakanishi, S.; Inoue, A.; Kita, T.; Nakamura, M.; Chang, A.; Cohen, S.N.; Numa, S.; *Nature*, **1979**, 278, 423.

<sup>32</sup> J. e col.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, 74, 648.

Analisando-se a seqüência de aminoácidos para as quatro melanotropinas observam-se vários pontos em comum, entre eles a seqüência His-Phe-Arg-Trp, encontrada na  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -MSH, além dos aminoácidos metionina e triptofano, localizados em posições características. Como pode-se observar na Figura 13, as melanotropinas possuem semelhanças em suas estruturas primárias, o que faz com que suas atividades biológicas sejam semelhantes em muitos aspectos<sup>33</sup>.

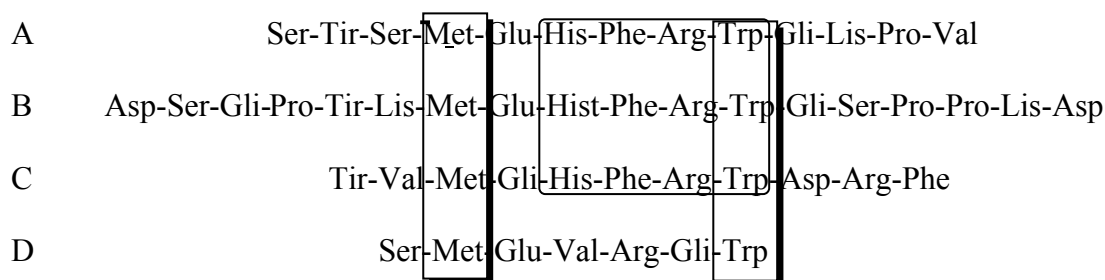


FIGURA 13: Seqüências de aminoácidos para  $\alpha$ -MSH, (A),  $\beta$ -MSH (B),  $\gamma$ -MSH (C) e  $\delta$ -MSH (D).

As  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -melanotropinas tem um grande efeito biológica afetando fatores fisiológicos como a obesidade, memória e atenção, apresentando também efeito analgésico, atuando na regulação cardiovascular e na pigmentação da pele entre outros. O peptídeo  $\delta$ -MSH tem em comum com as outras melanotropinas o aminoácido metionina na posição 2, o ácido glutâmico na posição 3 e o triptofano na posição 6, apresentando especificamente maior similaridade estrutural com a  $\alpha$ -MSH. Na literatura há pouco conhecimento sobre a atividade biológica da  $\delta$ -MSH.

---

<sup>33</sup> Sawyer, T.K.; Hruby, V.J.; Darman, P.S.; Hadley, M.E.; *Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A.* **1982**, 79, 1751).

## 2.5. Dicroísmo Circular: técnica que permite determinar a estrutura secundária dos peptídeos

O dicroísmo circular (DC) é uma técnica que permite estudar a estrutura secundária de moléculas opticamente ativas como os peptídeos e as proteínas. Essas podem apresentar-se em diferentes estruturas secundárias que, em dicroísmo circular, são indicadas por bandas elípticas específicas com comprimentos de onda característicos em um intervalo de  $\lambda$  de 260 a 190 nm. Todos os métodos de análise de DC requerem um conhecimento preciso da concentração dos compostos analisados, pois a diferença de absorvância da luz circular polarizada é medida como elipticidade molar  $[\theta]_M$  em  $\text{deg.cm}^2/\text{dmol}$  (onde  $[\theta]_M = 3300 \Delta A/cl$ ;  $c$  é concentração em mol/litro e  $l$  comprimento da cubeta em cm). O conhecimento da estrutura secundária de moléculas como as proteínas e peptídeos são essenciais para entender a relação que existe entre a função e a atividade destas moléculas de grande interesse biológico<sup>34-35</sup>.

O fenômeno do dicroísmo circular resulta quando grupos cromóforos em um ambiente assimétrico (amostra quiral) interagem com luz circular polarizada. Os grupos cromóforos principais de proteínas e peptídeos são as ligações peptídicas do esqueleto principal e as cadeias laterais aromáticas. Os polipeptídeos e proteínas apresentam regiões de sua estrutura em que seus cromóforos apresentam-se altamente ordenados dando origem a estruturas bem definidas como  $\alpha$ -hélices e folhas  $\beta$ -pregueadas, dependendo da orientação específica das ligações peptídicas. As transições ópticas das ligações amidas (-CONH-) podem ser divididas em múltiplas transições, e a intensidade destas transições pode aumentar ou diminuir. Como consequência, muitas estruturas secundárias bem conhecidas como as  $\alpha$ -hélices, as folhas  $\beta$ -pregueadas, giros  $\beta$  e a estrutura de poli-L-prolina II (PPII), apresentam espectros de DC muito característicos, como mostra a Figura 14<sup>34-35</sup>.

---

<sup>34</sup> Nakanishi, K.; Berova, N.; Woody, R.W.; *Circular Dichroism Principles and Applications*, VCH Publishers, Inc. New York, **1994**.

<sup>35</sup> Greenfield, N.J. *Analytical Biochemistry* **1996**, 235, 1-10

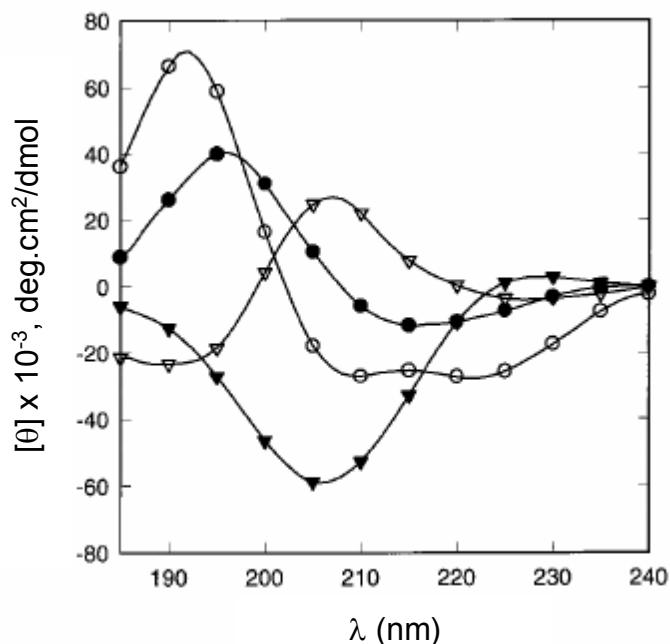


FIGURA 14 - Espectros de DC de proteínas e polipeptídeos em diferentes conformações:  $\alpha$ - hélice ( $\circ$ ), folhas  $\beta$ -pregueadas ( $\bullet$ ), giros- $\beta$  ( $\Delta$ ) e PPII ( $\blacktriangle$ ).

Estudos desenvolvidos por Ito e col.<sup>36</sup> com a  $\alpha$ -melanotropina sobre a relação estrutura-função neste peptídeo indicaram que a conformação adotada pela sequência tetrapeptídica central “mensageira”  $His^{(6)}-Phe^{(7)}-Arg^{(8)}-Trp^{(9)}$  é fundamental para sua atividade biológica. Entretanto, parece ser difícil definir a exata natureza da estrutura secundária da  $\alpha$ -MSH em seu estado ativo, pois se pode ter na conformação ativa fragmentos peptídicos tanto como  $\alpha$ -hélice como em giro  $\beta$  para a interação adequada com o receptor. Segundo Mukhopadhyay<sup>37</sup>, há uma preferência do peptídeo por adotar uma conformação do tipo giro reverso em torno do resíduo de fenilalanina  $Phe^{(7)}$ , proporcionando assim caráter anfifílico a esta região do peptídeo, com os grupos carregados em uma superfície da molécula e os grupos lipofílicos na outra superfície. O solvente orgânico 2,2,2-trifluoetanol (TFE) é conhecido pela sua habilidade de induzir

<sup>36</sup> Ito, A.S.; Castrucci, A.M.; Hruby, V.J.; Hadley, M.E.; Krajcarski, D.T.; Szabo, A.G.; *Biochemistry*, **1993**, *32*, 12264.

<sup>37</sup> Mukhopadhyay, K.; Basak, S.; *Biophysical Chemistry*, **1998**, *74*, 175-186.

estruturas secundárias de peptídeos e proteínas. É consenso geral que a adição de TFE a soluções aquosas de peptídeos auxilia a estabilização da estrutura de hélice  $\alpha$  através da formação de ligações de hidrogênio intramoleculares.

Os solventes promotores de hélice  $\alpha$  mimetizam características dos sistemas *in vivo*, assim são de relevância para aos estudos estruturais realizados por dicroísmo circular. É claro que este fenômeno da indução de conformação pelo TFE só ocorrerá se o peptídeo apresentar seqüência primária de aminoácidos com propensão a estruturar-se como hélice  $\alpha$ . No caso das melanotropinas, Mukhopadhyay e Basak realizaram por dicroísmo circular um estudo da evolução da estrutura secundária de peptídeos MSH sob a adição de quantidades crescentes de trifluoretanol à suas soluções aquosas. Este estudo indicou que o solvente TFE de fato induz a  $\alpha$ -MSH a adquirir em solução estrutura secundária que se aproxima a hélice  $\alpha$ . Desta forma, os autores concluíram que seria provável que a conformação ativa do fragmento “mensageiro” central da  $\alpha$ -MSH estivesse associada a estrutura de hélice  $\alpha$ . Quanto ao estudo com a  $\delta$ -MSH, os autores afirmaram que o solvente TFE também é capaz de induzir este peptídeo a adquirir uma estrutura secundária próxima a uma hélice. O espectro de DC de um polipeptídeo em conformação de hélice  $\alpha$  é caracterizado pela presença de uma banda negativa com máximos separados a  $\lambda_{222}$  e  $\lambda_{208}$  nm. A banda mais utilizada como diagnóstico para confirmação e quantificação da conformação de hélice  $\alpha$  é a banda a 222 nm (Figura 14).



### III DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

#### 3.1 Síntese da $\delta$ -Melantropina.

Em nosso grupo de pesquisa do NPPN foram realizadas algumas tentativas de síntese em solução da  $\delta$ -melanotropina, porém apesar de utilizarem-se diferentes estratégias pelo método clássico de síntese, não foi possível a síntese total deste peptídeo. Neste contexto, H. Appelt<sup>4</sup> apresentou a síntese em solução dos fragmentos protegidos 1-4 e 5-7 da  $\delta$ -MSH seguindo as estratégias sintéticas mostradas nas Figuras 15 e 16, respectivamente.

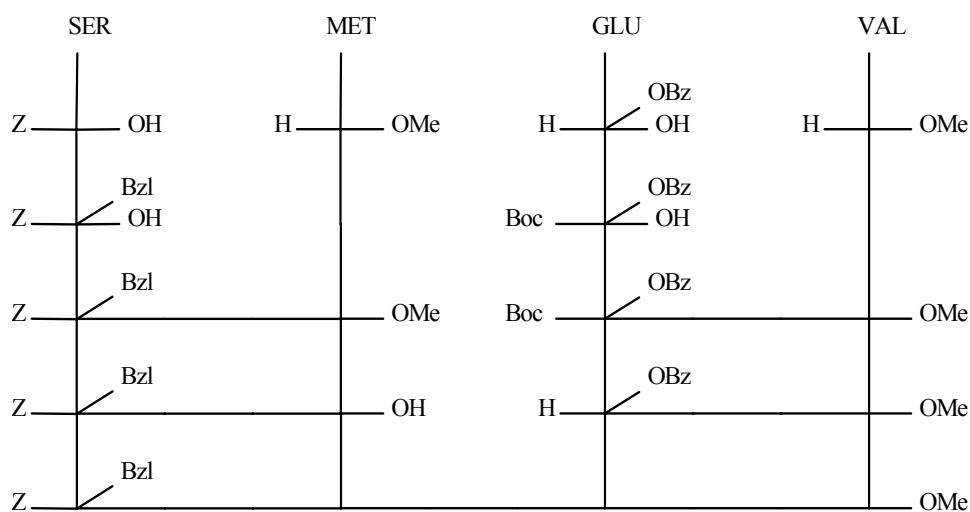


FIGURA 15 - Estratégia de síntese do fragmento 1-4 da  $\delta$ -melanotropina.

(esquemas reproduzidos da Dissertação de Mestrado de H. Appelt)

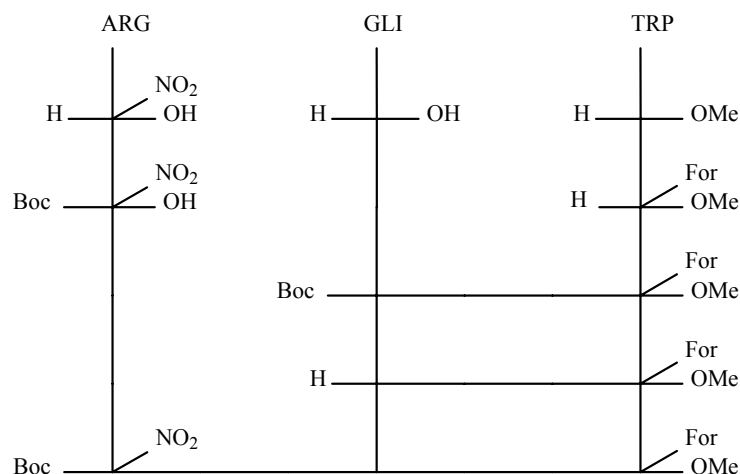


FIGURA 16 - Estratégia de síntese do fragmento 5-7 da  $\delta$ -melanotropina.

(esquemas reproduzidos da Dissertação de Mestrado de H. Appelt)

Na estratégia de síntese da  $\delta$ -MSH apresentada nas Figuras 15 e 16 foram utilizados diferentes grupos de proteção para as funções  $\alpha$ -amino, como os grupamentos benziloxicarbonil e *tert*-butiloxicarbonil. Os grupamentos  $\alpha$ -carboxila foram protegidos na forma de éster metílico. Nas etapas de acoplamento foi utilizada a metodologia que envolve a formação de um anidrido misto intermediário a partir do cloroformiato de isobutila. Desta forma, o fragmento 1-4 foi obtido a partir dos fragmentos dipeptídicos Ser-Met e Glu-Val. Estes dipeptídeos foram preparados como Z-Ser(Bzl)-Met-OH e H-Glu(OBzl)-Val-OMe, sendo então acoplados entre si, formando o fragmento tetrapeptídico Z-Ser(Bzl)-Met-Glu(OBzl)-Val-OMe. Para a síntese do fragmento tripeptídico 5-7 foram usados o dipeptídeo H-Gli-Trp(For)-OMe, sendo acoplado ao extremo *N*-terminal deste dipeptídeo o aminoácido arginina, obtendo-se o tripeptídeo Boc-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gli-Trp(For)-OMe. Neste trabalho de síntese em solução, não consta referência sobre uma possível reação de oxidação do resíduo da metionina durante as etapas de síntese, bem como não foi apresentado o acoplamento final dos dois fragmentos para a síntese total em solução da  $\delta$ -MSH.

Assim, o trabalho apresentado nesta dissertação teve como meta desenvolver a síntese total da  $\delta$ -MSH em fase sólida. Esta síntese sobre um suporte polimérico envolveu diferentes etapas, iniciando-se com a escolha da estratégia sintética apropriada. Uma vez

determinada a estratégia a ser desenvolvida com o suporte sólido disponível, iniciou-se a preparação dos aminoácidos protegidos e do separador (“linker”) adequado<sup>38</sup>.

### 3.1.1. Preparação dos aminoácidos *N*-protegidos

Nesta síntese os aminoácidos pertencentes a sequência da  $\delta$ -MSH foram protegidos em sua função  $\alpha$ -amino com o grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc). Na reação de proteção dos aminoácidos utilizando o reagente Fmoc-Cl pode ocorrer a formação indesejada de pequenas quantidades de di ou tripeptídeos, como é apresentado na Figura 17.

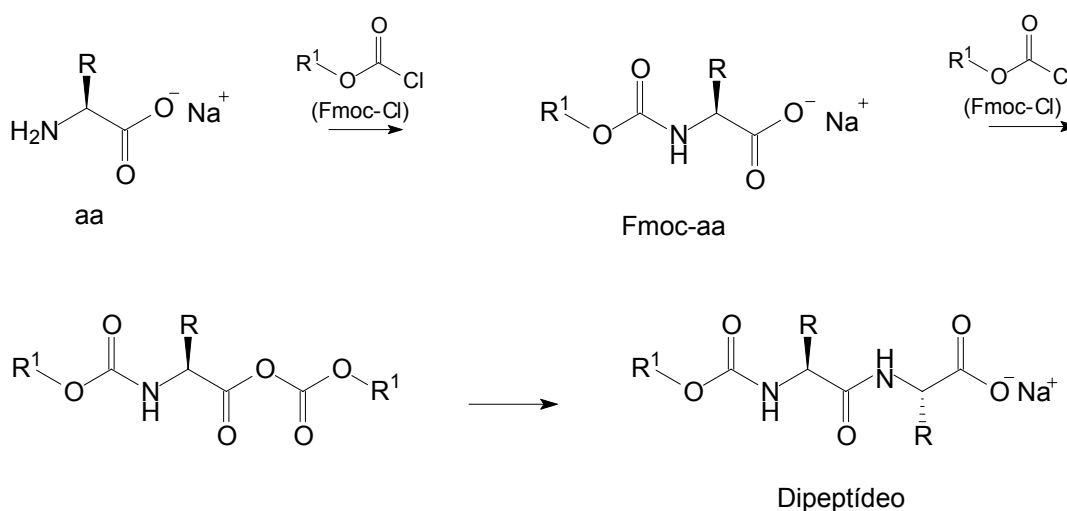


FIGURA 17 - preparação do Fmoc-aa

Para evitar a contaminação dos Fmoc-aminoácidos com di e tripeptídeos, os quais não podem estar presentes no momento da construção da cadeia peptídica para não descaracterizá-la (isto é, para evitar a formação de seqüências peptídicas alteradas), fez-se a proteção dos aminoácidos com Fmoc-Cl seguindo-se a metodologia indicada por Bolin e col.<sup>39</sup>. No método desenvolvido por Bolin é utilizado o grupo trimetilsilil (TMS) para a

<sup>38</sup> Furlán, R.L.; Labadie, G.R.; Pellegrinet, S.C.; Ponzó, V.L.; *Química nova*, **1996**, 19, 411-422.

<sup>39</sup> Bolin, D. R.; Sytwu, I.; Humiec, F.; Meienhofer, J.; *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1989**, 33, 353-359.

proteção temporária da função carboxila do aminoácido. O aminoácido reage com cloreto de trimetilsilano na presença de uma base (tietilamina ou diisopropiletilamina), formando o derivado *O,N*-bis-TMS aminoácido. Este derivado é tratado com o agente acilante Fmoc-Cl. Após a *N*-acilação, o grupo TMS é removido por hidrólise com a formação do produto final Fmoc-aa.

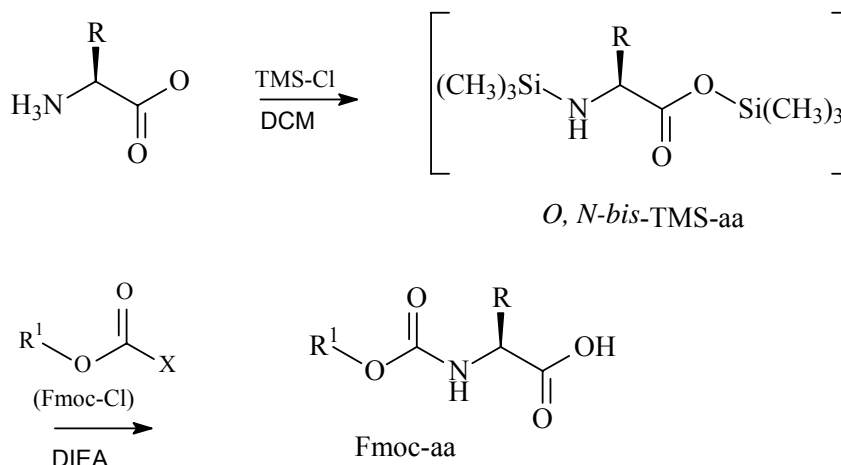


FIGURA 18 - Preparação do Fmoc-aa com TMS.

Neste trabalho, mediante a metodologia de Bolin<sup>39</sup> foram realizadas as proteções dos aminoácidos metionina, metionina oxidada, glicina, triptofano e valina, obtendo-se cada Fmoc-aminoácido com rendimentos que variaram de 50 a 87% (Tabela 1), sendo suas estruturas confirmadas pela análise dos espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

TABELA 1: Obtenção dos Fmoc-aminoácidos.

<i>AMINOÁCIDO</i>	<i>P. F. (°C)</i>	<i>RENDIMENTO %</i>
Fmoc-Met-OH	131-133	75
Fmoc-Met(O)-OH	168-173	50
Fmoc-Val-OH	147-149	68
Fmoc-Gli-OH	176-179	54
Fmoc-Trp-OH	184-186	87

Na síntese de peptídeos em fase sólida normalmente utilizamos como aminoácido de referência interna um resíduo não pertencente à cadeia peptídica a ser sintetizada. Nesta síntese da  $\delta$ -MSH optou-se pela fenilalanina como referência interna. Este aminoácido foi acoplado a resina *p*-metilbenzidrilamina na forma de Boc-Phe-OH. O derivado Boc-Phe-OH foi obtido a partir da reação da fenilalanina com dicarbonato de *tert*-butila em meio básico<sup>40</sup> com rendimento de 77%.

Os aminoácidos Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH e Fmoc-Ser(tBu)-OH foram adquiridos comercialmente. As estruturas destes aminoácidos protegidos são mostradas na Figura 19.

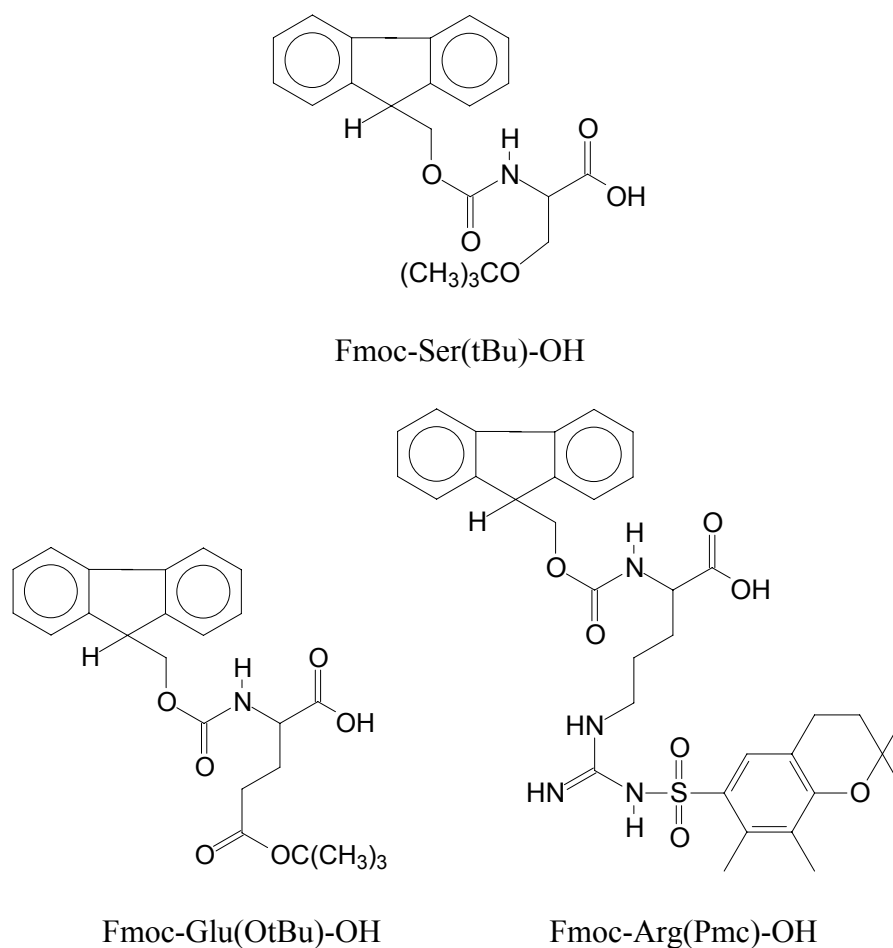


FIGURA 19: Estruturas dos aminoácidos serina, ácido glutâmico e arginina protegidos para síntese.

<sup>40</sup> Bodansky, M. "Principles of Peptide Synthesis". Springer-Verlag Berlin Heidelberg,

### 3.1.2. Preparação do Separador (“Linker”)

Na síntese em fase sólida da  $\delta$ -MSH foi utilizado um separador derivado do ácido propiônico. Este separador foi utilizado para facilitar a clivagem do peptídeo da resina em condições brandas de acidólise, sem afetar as novas ligações amida formadas. Ao mesmo tempo, o uso do ácido 3-(4-hidroximetilfenoxi)propiônico como separador possibilitou o controle qualitativo e quantitativo da síntese por análise de aminoácidos, uma vez que é acoplado entre o aminoácido de referência interna e a cadeia em construção (Figura 20).

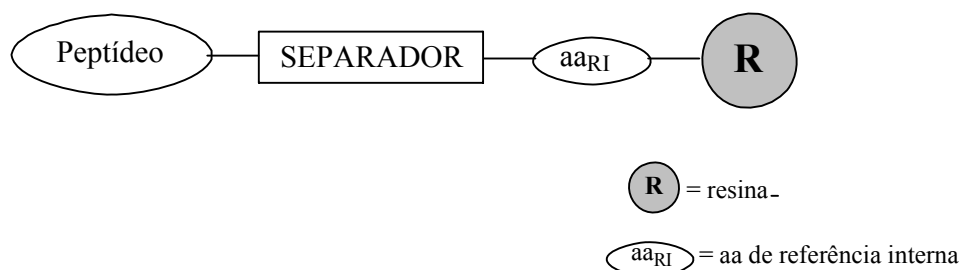


FIGURA 20 – Separador acoplado entre o aa de referência interna e o peptídeo em construção.

Na síntese o separador derivado do ácido propiônico foi ativado na forma do éster 2,4,5-triclorofenílico para ser acoplado ao grupo  $\text{NH}_2$  terminal da fenilalanina-resina. A incorporação do separador a Phe-resina também foi testada a partir da obtenção do éster ativo derivado do pentafluorfenol, obtendo-se resultados igualmente satisfatórios de acoplamento. Este separador, na forma de 3-(4'-hidroximetilfenoxi)propionato de pentafluorfenila, foi sintetizado como indicado na Figura 21. A partir da reação de 4-hidroxibenzaldeído com o ácido 3-bromopropiônico obteve-se o aldeído **1**, que foi reduzido com borohidreto de sódio a ácido 3-(4'-hidroximetilfenoxipropiônico) **2**. A reação do ácido **2** com pentafluorfenol resultou no éster ativo 3-(4'-hidroximetilfenoxi)propionato de pentafluorfenila **3**<sup>16</sup>. O produto formado, 3-(4'-hidroximetilfenoxi)propionato de pentafluorfenila, foi obtido após cristalização com um rendimento de 78%.

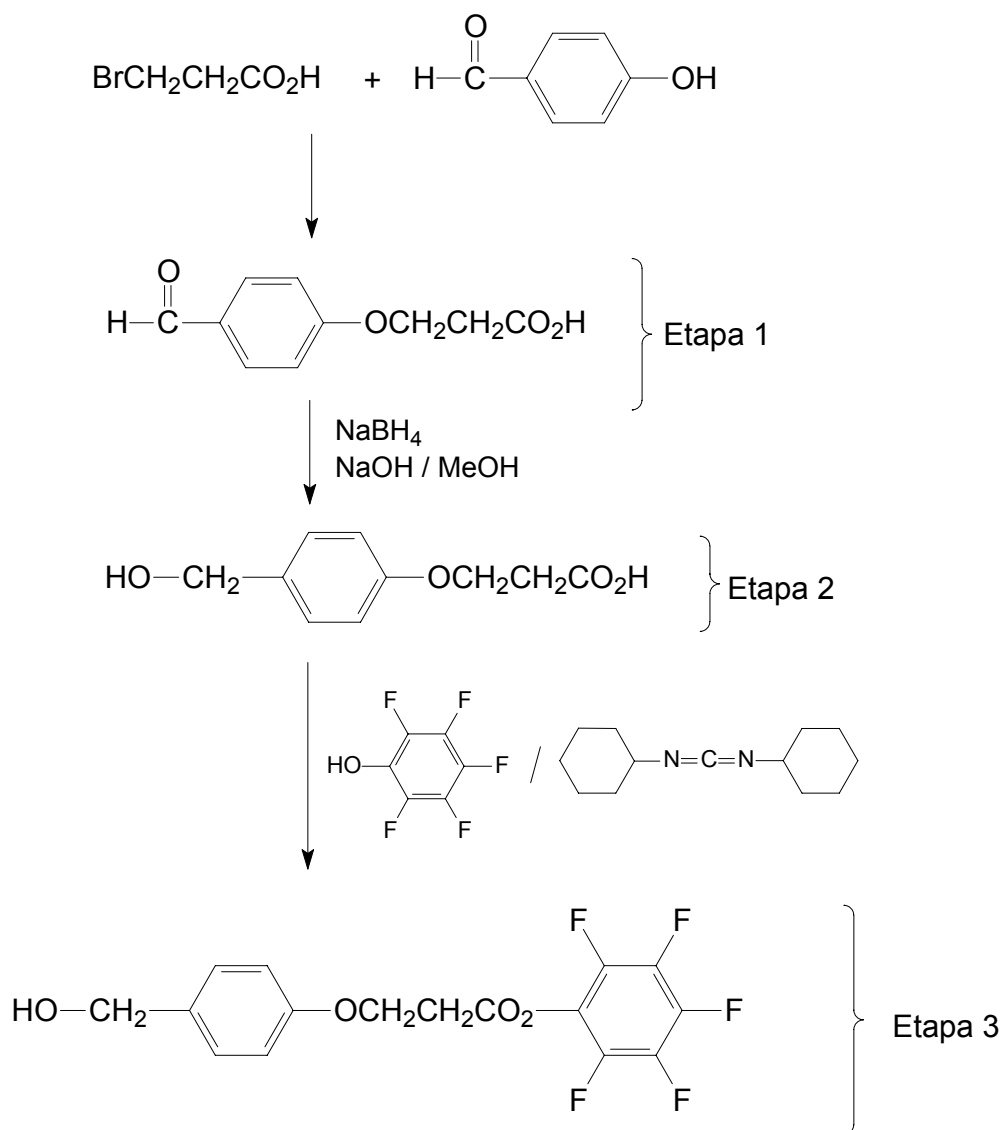


FIGURA 21 - Síntese do 3-(4-hidroximetilfenoxi)propionato de pentafluorfenila.

### 3.1.3. Síntese da $\delta$ -MSH acoplada ao suporte sólido

A síntese da  $\delta$ -MSH foi realizada utilizando-se como suporte sólido a resina *p*-metilbenzidrilamina (MBHA) com funcionalização 0,045 mmol/g. Esta resina foi lavada exaustivamente com diclorometano por um dia, sendo então ativada através do tratamento com 30% TFA/DCM seguido de 5% DIEA/DCM e lavagens com diclorometano. Após, fez-se o acoplamento do aminoácido de referência interna fenilalanina. Este resíduo foi

incorporado a resina mediante o acoplamento de Boc-Phe-OH com diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) em meio diclorometano por 45 minutos. Ao final do acoplamento realizou-se o teste de ninidrina que apresentou resultado negativo, indicando a ausência de grupos amino livres sobre a resina (acoplamento quantitativo). Na etapa seguinte, realizou-se a liberação do grupo Boc ( *t*-butoxicarbonil ) pelo tratamento da Boc-Phe-resina com 40% TFA/DCM e neutralização com 5% de DIEA/DCM. Como esperado, o teste de ninidrina realizado ao final desta etapa de desproteção resultou positivo, indicando a remoção do grupo Boc da resina. Assim, passou-se para a etapa de incorporação sobre a resina do separador 3-(4'-hidroximetilfenoxi) propionato de pentafluorfenila mediante tratamento com uma solução concentrada com HOBt em DMF, com agitação ocasional por 40 minutos seguido de repouso por 12 horas. O teste de ninidrina realizado posteriormente teve resultado negativo.

O primeiro aminoácido da seqüência peptídica, protegido como Fmoc-Trp-OH, foi incorporado ao suporte sólido com diisopropilcarbodiimida e uma quantidade catalítica de 4-dimetilaminopiridina (DMAP). Foram realizados três acoplamentos de 1 hora cada, a fim de garantir a incorporação deste aminoácido com bons rendimentos. Nesta etapa da síntese, o teste de ninidrina não pode ser aplicado, visto que o grupo funcional terminal no suporte é um grupo hidroxila e não um grupo amino. O procedimento tradicionalmente utilizado para o controle do acoplamento do primeiro aminoácido da seqüência é a hidrólise e posterior análise comparativa dos aminoácidos presentes em uma pequena alíquota de aa-separador-aa<sub>RI</sub>-resina. Entretanto, trabalhando-se com o triptofano, este procedimento não é confiável devido a sua degradação parcial na etapa de hidrólise. Assim, optou-se pela realização de uma série de três ciclos repetitivos da reação de acoplamento da Fmoc-Trp-OH. Ao final destes ciclos, os possíveis grupos hidroxila na resina que não reagiram foram então bloqueados por acetilação com anidrido acético e 4-dimetilaminopiridina.

Previamente ao acoplamento de cada um dos demais aminoácidos pertencentes a seqüência da  $\delta$ -MSH desprotegeu-se o grupo  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> do aminoácido acoplado anteriormente, realizando-se o teste de ninidrina para confirmar a desproteção (teste positivo). Nas etapas de remoção do grupo Fmoc foi utilizado uma solução de 20% piperidina em DMF. A remoção deste grupo protetor ocorre através de um mecanismo de eliminação conforme mostrado na Figura 22.



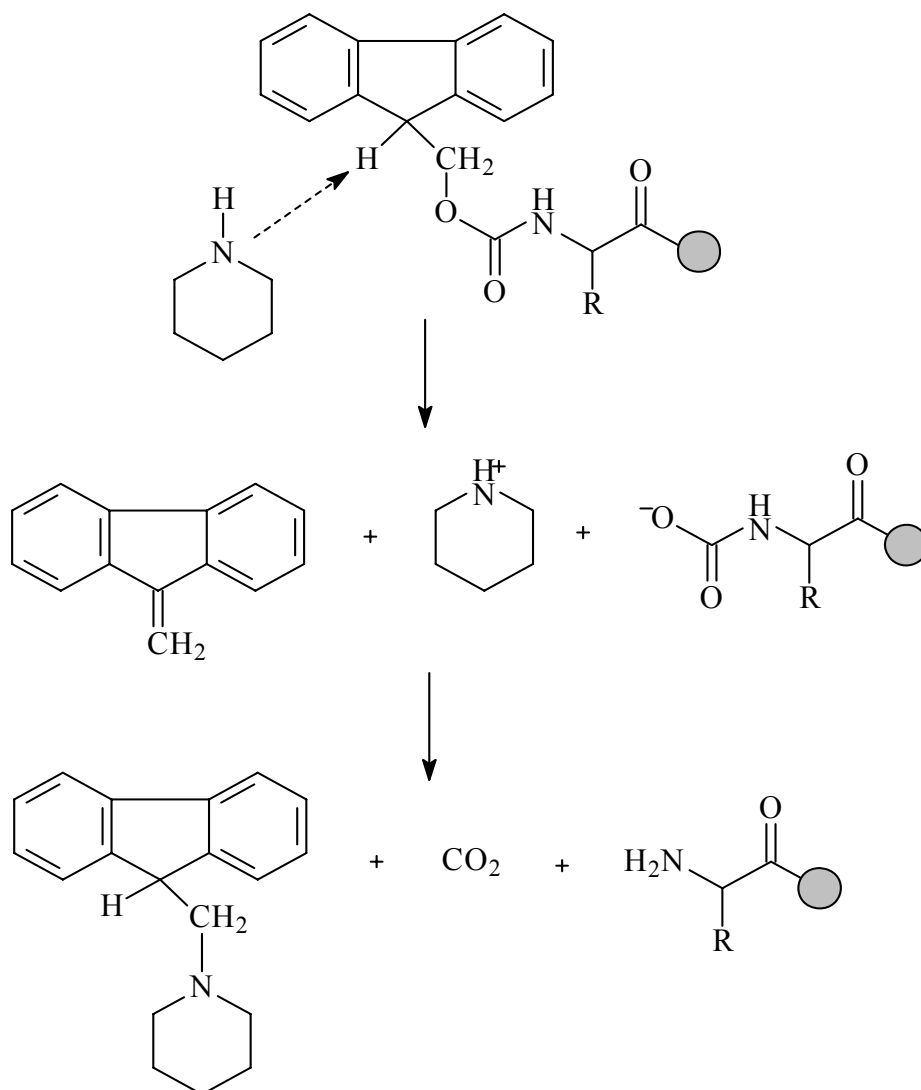


FIGURA 22 - Desproteção do Fmoc-peptídeo-resina com piperidina.

Os demais aminoácidos, protegidos na função  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> com Fmoc, foram incorporados pelo método da DIPCDI e HOBt em DMF, com agitação ocasional por 1 hora. Nestes acoplamentos utilizou-se quantidades em excesso dos aminoácidos (3 equivalentes), calculado em relação a funcionalidade inicial da resina, para termos um rendimento quantitativo em cada acoplamento. Após a incorporação de cada aminoácido foi realizado o procedimento de acetilação preventiva a fim de desativar os possíveis grupos  $\alpha$ -amino que não reagiram durante o acoplamento dos aminoácidos. A acetilação foi realizada com anidrido acético em meio 5% de piridina em diclorometano. A Figura 23 apresenta o esquema básico da síntese em fase sólida da  $\delta$ -MSH.

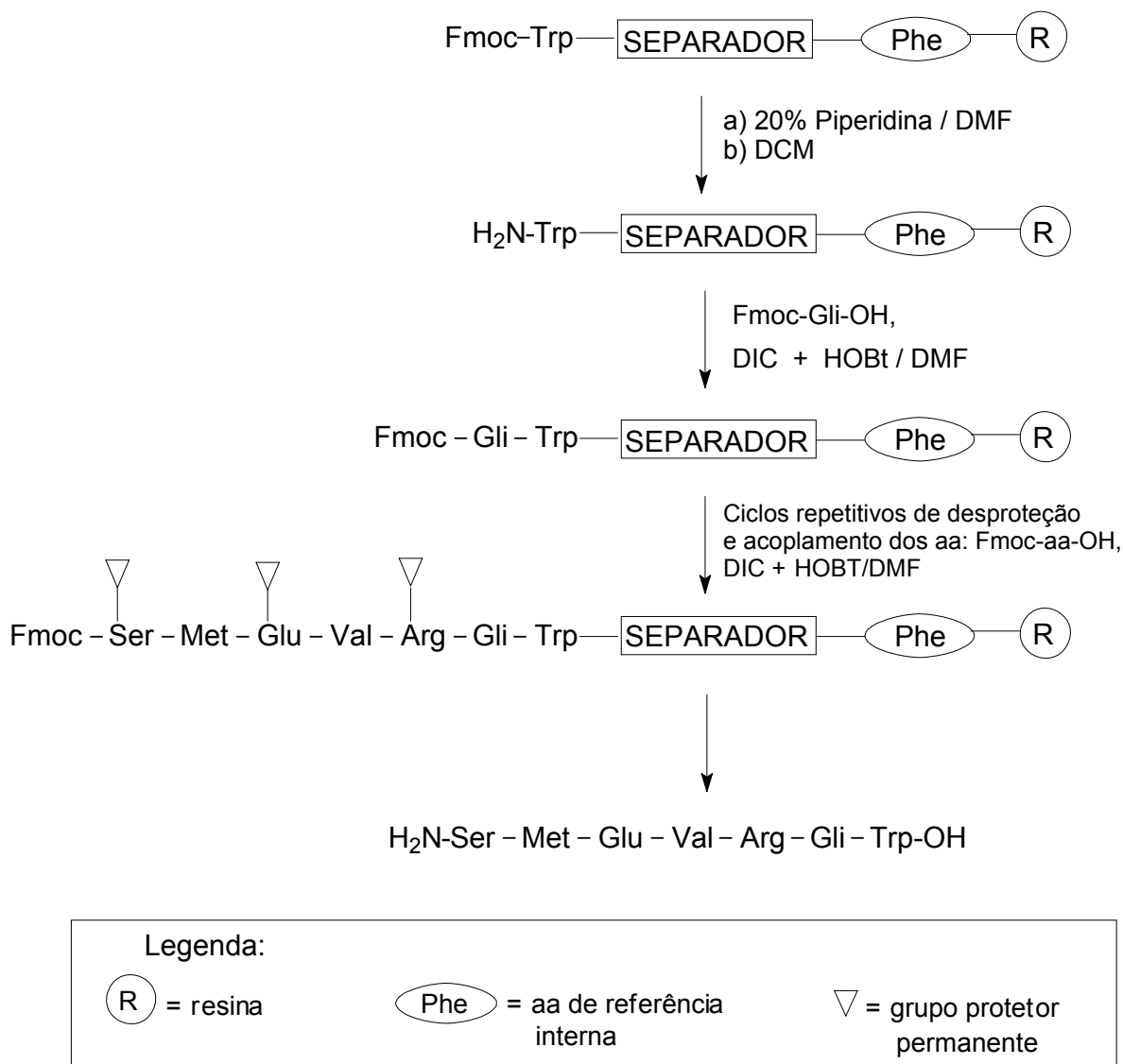


FIGURA 23 - Esquema demonstrativo da síntese em fase sólida da  $\delta$ -MSH.

Uma vez finalizada a síntese, realizou-se a hidrólise de uma alíquota da peptidil-resina e sua análise de aminoácidos, obtendo-se a composição esperada: Ser 0,62 (1); Met 1,00 (1); Glu 1,04 (1); Val 0,94 (1); Arg 0,95 (1); Gli 1,07 (1) e Phe 1,00 (aa<sub>RI</sub>). Como o aminoácido triptofano se decompõe parcialmente durante a hidrólise, este não foi considerado na quantificação. A análise de aminoácidos é muito importante para se determinar a relação molar entre os aminoácidos do peptídeo. O rendimento de síntese, estimado por pesagem da peptidil-resina (seca a peso constante) foi de 80%.

### 3.1.4. Obtenção e purificação da $\delta$ -MSH livre

Antes de proceder-se a separação do peptídeo da resina, foi realizada a desproteção do grupo amino terminal. A separação do peptídeo do suporte sólido (Figura 24) foi realizada por acidólise com ácido trifluoracético, na presença de pequenas quantidades de tioanisol, etanoditiol e anisol (coquetel “R”) que atuam como capturadores de carbocátions, conhecidos como “scavengers”. Após a separação, o peptídeo livre foi precipitado em éter dietílico seco, sendo separado por centrifugação, obtendo-se assim um rendimento de 79% de peptídeo bruto.

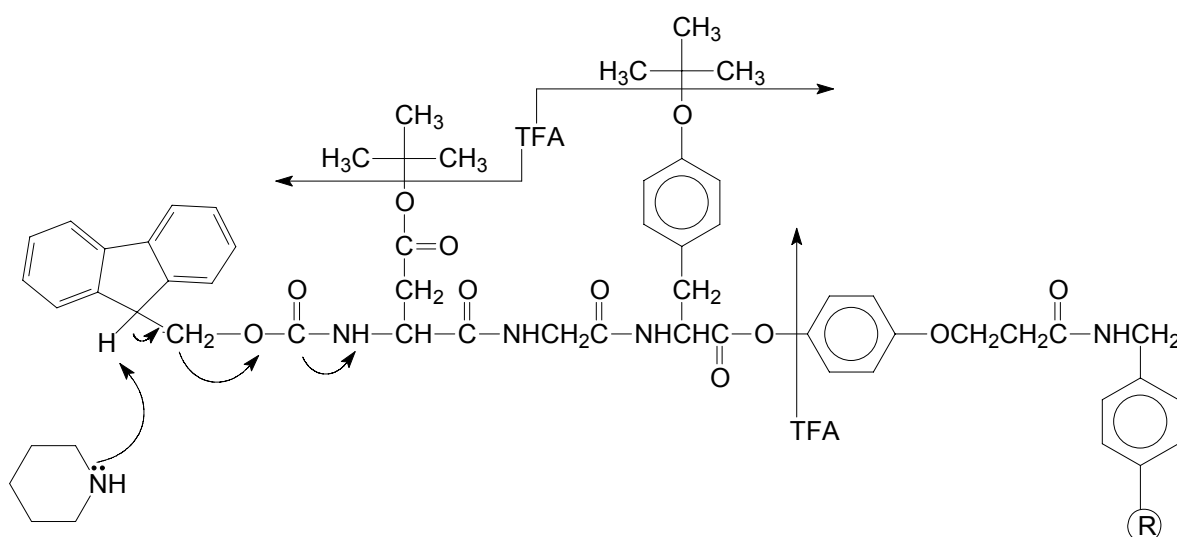


FIGURA 24 - reação da clivagem.

Este procedimento de clivagem foi determinado a partir da realização de testes preliminares de liberação do peptídeo da resina utilizando-se três diferentes coquetéis de clivagem: coquetel K (TFA–DMS–EDT–anisol–H<sub>2</sub>O; 87:5:3:2:3), coquetel P (TFA–fenol–EDT–anisol; 9,4:0,2:0,2:0,2) e o coquetel R (TFA–tioanisol–EDT–anisol; 90:5:3:2). Os peptídeos brutos obtidos nestes testes foram analisados por Espectrometria de massa MALDI-TOF.

No espectrômetro com a técnica EM-MALDI-TOF, um feixe de laser incide sobre a amostra em estudo inserida numa matriz sólida (aa de referência usada em relação ao composto analisado). A ação do laser sobre a matriz dá origem a íons que serão atraídos

até um detector. As medidas de massa obtidas dos íons, em unidade chamada Dalton, oferecem informações preciosas sobre aspectos da química do peptídeo. O espectrômetro permite fazer a dissociação de moléculas, ou seja, dá informação sobre seqüenciamento de peptídeos<sup>41</sup>.

A Figura 25 apresenta o espectro de massa da  $\delta$ -MSH bruto (não purificado) obtido a partir da clivagem da peptidil-resina com o coquetel “R”. Apesar de ser o melhor coquetel de acidólise para a obtenção da  $\delta$ -MSH, com o coquetel “R” ainda observa-se a formação de uma pequena quantidade de peptídeo oxidado (aproximadamente 5% de produto oxidado). Com os coquetéis de clivagem “K” e “P”, chegou-se a obter 25-35% de peptídeo oxidado.

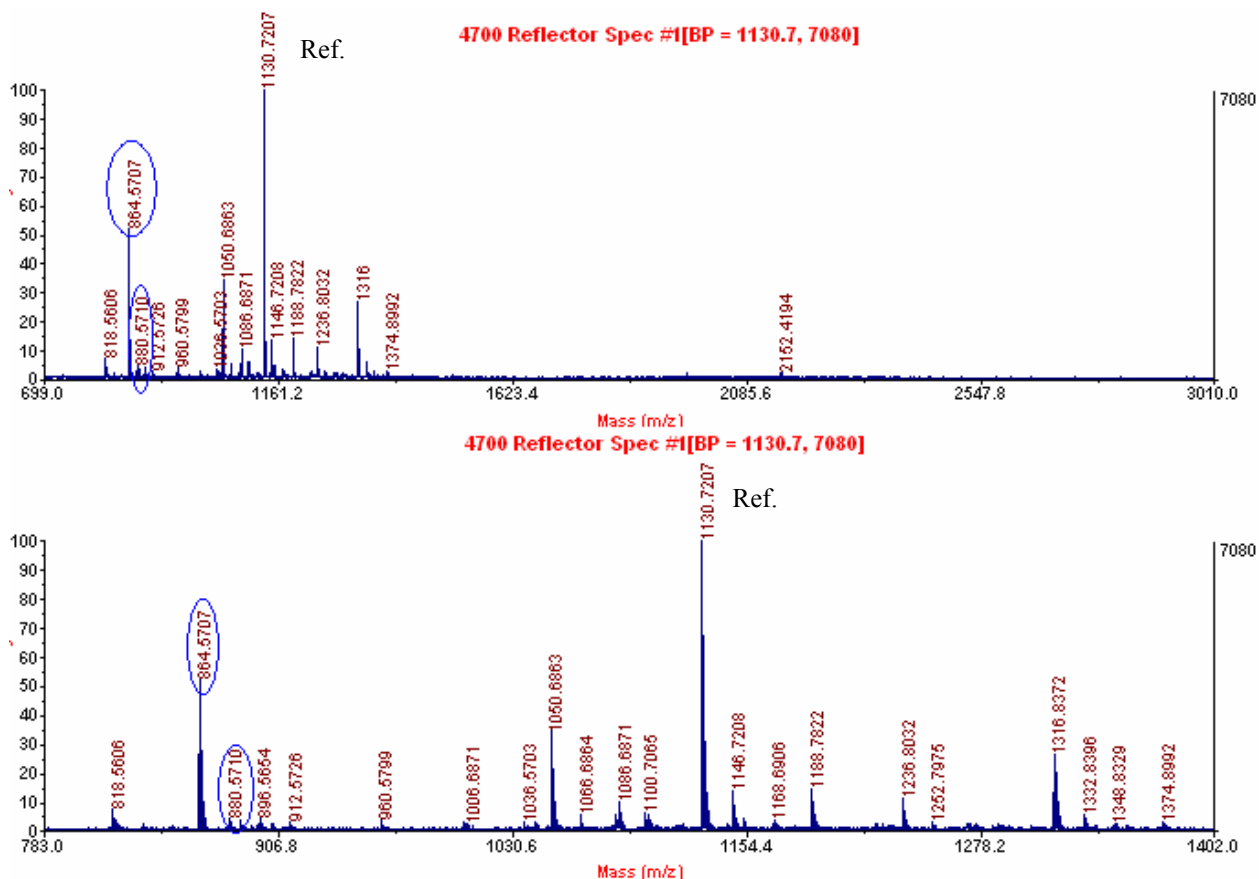


FIGURA 25 - Espectro de massa MALDI-TOF do peptídeo bruto  $\delta$ -MSH, obtido a partir da clivagem com o coquetel “R” (TFA-tioanisól-EDT-anisól; 90:5:3:2).

<sup>41</sup> Esteban, L.; *La espectrometria de massas en Imágenes*, 1993, 105-110.

Uma vez obtido o peptídeo livre, prosseguiu-se a sua purificação por CLAE em coluna de fase reversa. Utilizou-se uma coluna com fase estacionária de octadecilsilano ( $C_{18}$ ) e como fase móvel o sistema de solventes ACN:H<sub>2</sub>O contendo 0,1% de TFA. O ácido trifluoracético normalmente é utilizado como modificador iônico em cromatografia líquida de alta eficácia na análise de peptídeos, pois então tem-se a formação de pares iônicos que apresentam resolução mais elevada.

A Figura 26 mostra um cromatograma analítico do peptídeo  $\delta$ -MSH bruto obtido por acidólise com o coquetel R. Neste cromatograma observou-se a presença de dois picos com tempos de retenção bem definidos:  $t_R$  25 min e  $t_R$  29 min. A presença da metionina oxidada a sulfóxido aumenta a polaridade do peptídeo. Assim, em fase reversa o peptídeo oxidado elui antes que o peptídeo com a metionina reduzida sendo, então, o segundo pico ( $t_R$  29 min) referente ao peptídeo não oxidado. Isso foi confirmado através da coinjeção do bruto de acidólise com uma amostra padrão da  $\delta$ -MSH obtida comercialmente.

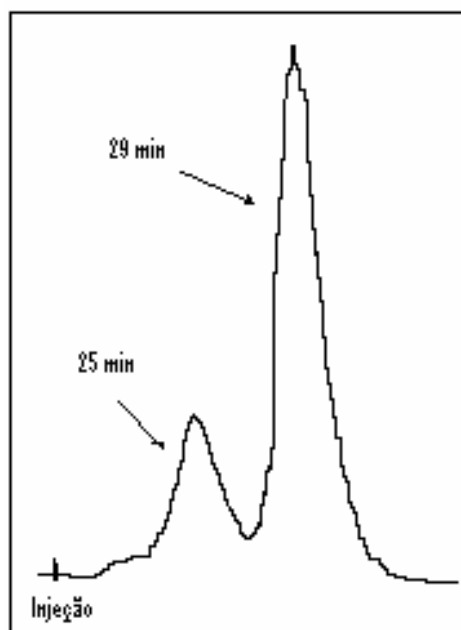


FIGURA 26 - Análise por CLAE em fase reversa da  $\delta$ -MSH com o sistema de solventes 30% de acetonitrila em H<sub>2</sub>O com 0,1% de TFA.

Durante o trabalho com o peptídeo  $\delta$ -MSH verificou-se que este apresenta uma considerável instabilidade quando exposto ao ar, oxidando-se rapidamente como mostra o cromatograma da Figura 27. Esta figura mostra os perfis cromatográficos da mesma amostra de peptídeo  $\delta$ -MSH em processo de oxidação. A primeira injeção mostra o peptídeo  $\delta$ -MSH já oxidado, mas ainda observa-se uma fração de peptídeo não oxidado a  $t_R$  29 min. Na segunda injeção, realizada 48 horas após a primeira, não observa-se mais o pico a  $t_R$  29 min referente ao peptídeo não oxidado. Essa fácil oxidação do peptídeo dificultou a sua purificação e sua obtenção.

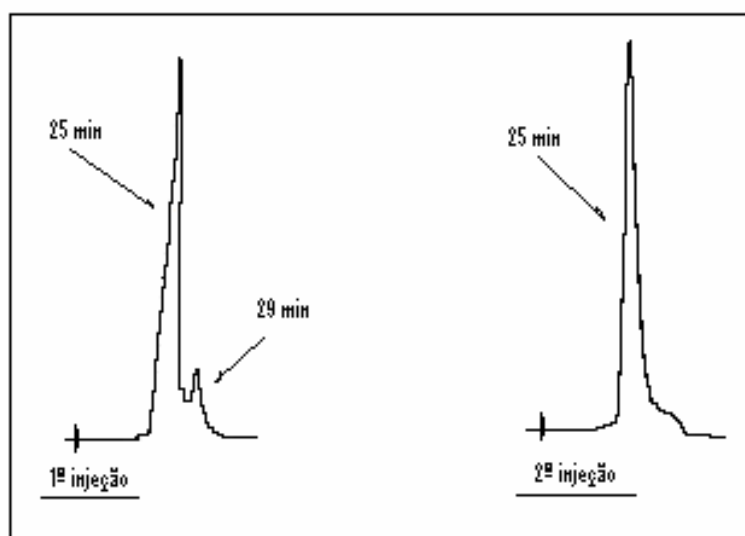


FIGURA 27 – Análise por CLAE em fase reversa da  $\delta$ -MSH com o sistema de solventes ACN:H<sub>2</sub>O contendo 0,1% de TFA.

### 3.1.5. Caracterização da $\delta$ -MSH por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C

Além da caracterização do peptídeo por análise de aminoácidos, cromatografia líquida de alta eficácia em coluna de fase reversa, e por Espectrometria de massa MALDI-TOF também se realizou a caracterização detalhada da  $\delta$ -MSH utilizando-se as técnicas de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C uni e bidimensionais.

A identificação do composto foi iniciada pela análise dos espectros de RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C. No espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 28), observamos os deslocamentos químicos

característicos dos prótons aromáticos do aminoácido triptofano, na região de 7,3 ppm, com uma integração correspondente à 5H. O sinal em 2,8 ppm é referente ao hidrogênio do carbono  $\delta$  da Arg. Observa-se também, as absorções típicas das duas metilas do grupo isopropila do aminoácido valina, em 0,7 ppm.

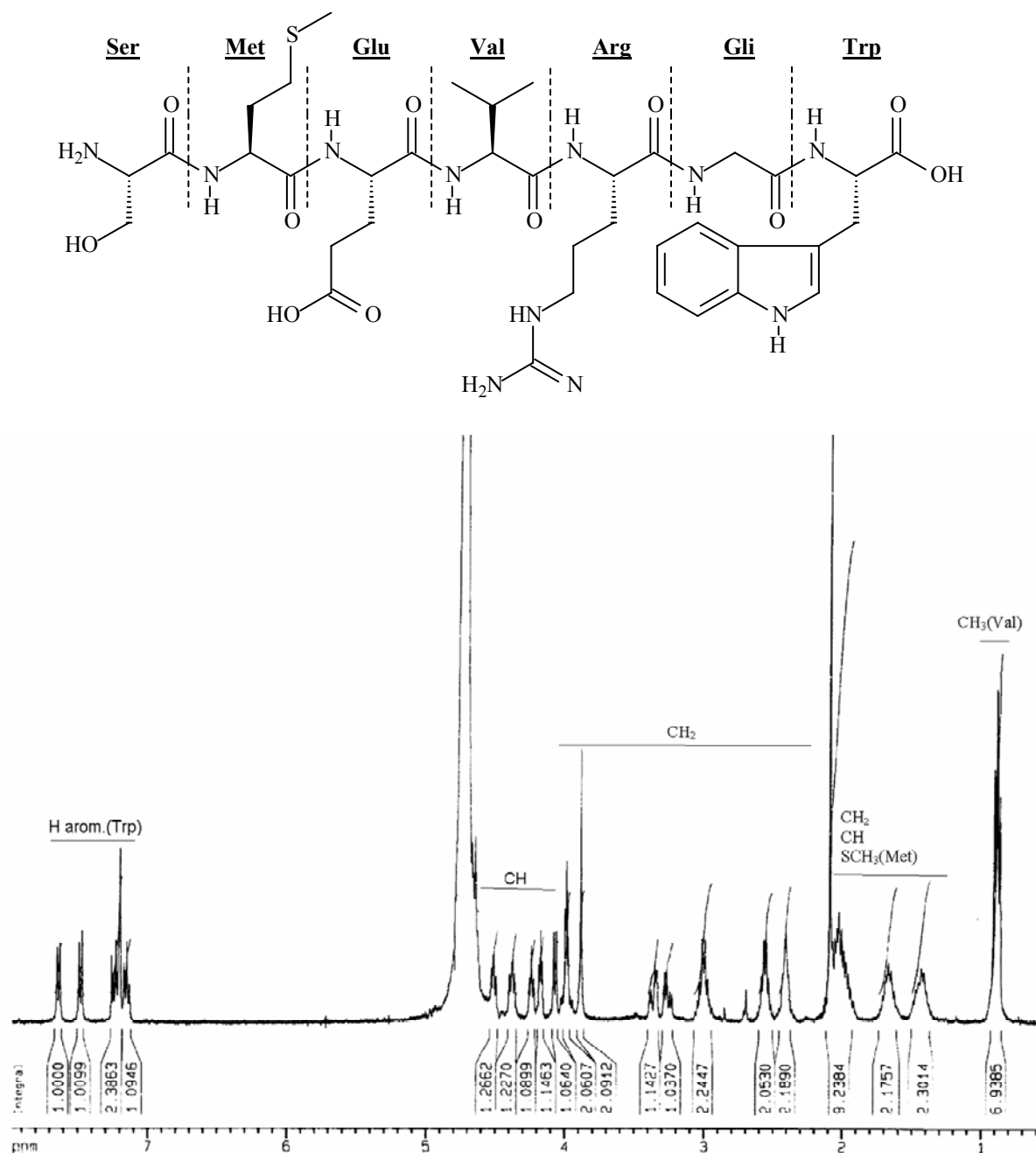


FIGURA 28 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da  $\delta$ -MSH a 400MHz em  $\text{D}_2\text{O}$ , em presença de capilar de  $\text{CDCl}_3$ .

Na região de 1,3 e 1,5 ppm (Figura 29) observamos os prótons dos carbonos  $\beta$  e  $\gamma$ , referentes à cadeia lateral do aminoácido da arginina, e na região 3,2 ppm, se observa os sinais referentes ao  $\beta$ -carbono metilênico do aminoácido triptofano. Os sinais entre 2,2-2,4 ppm são referentes aos prótons dos  $\gamma$ -carbonos do ácido glutâmico e da metionina. Em 1,8-1,9 ppm encontramos os sinais referentes ao  $\text{SCH}_3$  do aminoácido metionina e os hidrogênios referentes aos  $\beta$ -carbonos do ácido glutâmico, metionina e valina.

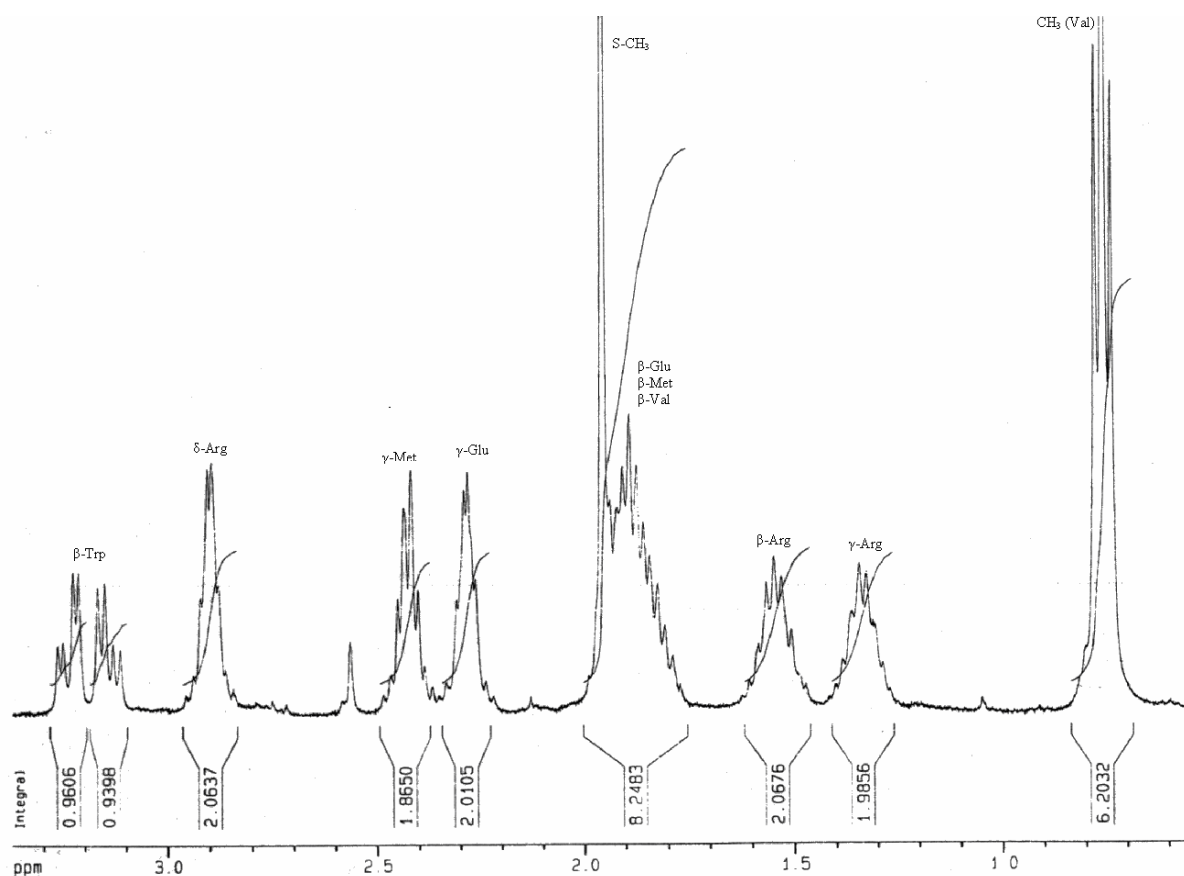


FIGURA 29: Espectro expandido de RMN  $^1\text{H}$  na região de 0,5 – 3,5 ppm da  $\delta$ -MSH, a 400MHz em  $\text{D}_2\text{O}$ .

O espectro expandido de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 30) na região de 3,8 – 4,5 ppm observam-se um singlete com deslocamento químico de 3,7 ppm, do carbono metilênico ligado a carbonila do aminoácido da glicina. Em 3,8 ppm encontra-se um carbono metilênico do aminoácido da serina e os demais sinais são referentes a carbonos metínicos.



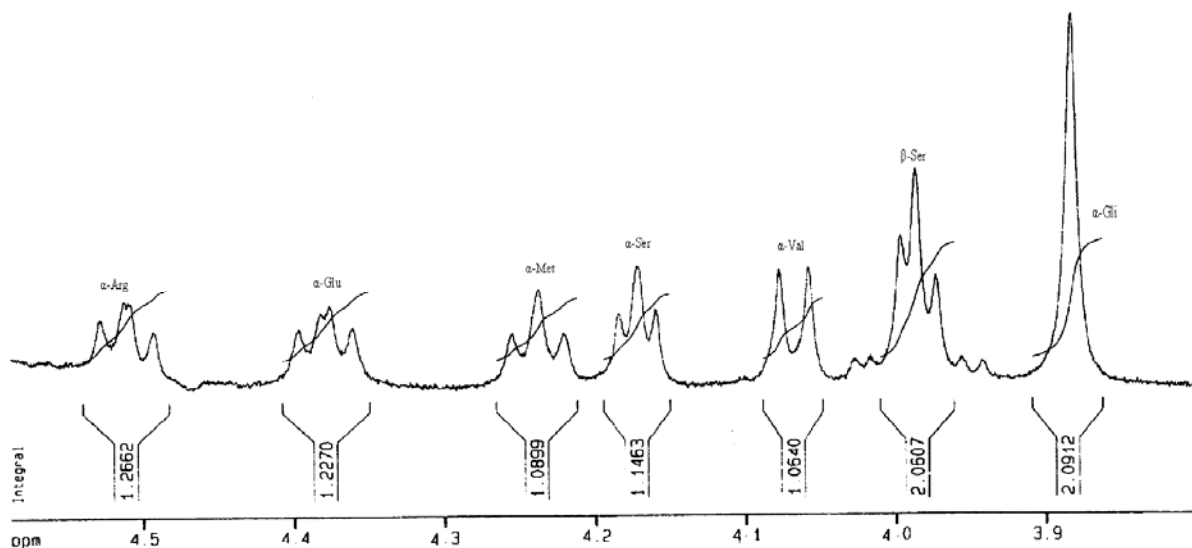


FIGURA 30: Espectro expandido de RMN  $^1\text{H}$  na região de 3,8 – 4,5 ppm da  $\delta$ -MSH, a 400MHz em  $\text{D}_2\text{O}$ .

TABELA 2: Dados de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , capilar de  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da  $\delta$ -Melanotropina

<i>H-Ser-Met-Glu-Val-Arg-Gli-Trp-OH</i>			
$\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$	$\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$
0,73-0,77	$\gamma\text{-CH}_3$ (Val)	3,8	$\alpha\text{-CH}_2$ (Gli)
1,3-1,54	$\beta\text{-CH}_2$ (Arg) + $\gamma\text{-CH}_2$ (Arg)	3,8	$\beta\text{-CH}_2$ (Ser)
1,8-1,9	$\beta\text{-CH}_2$ (Glu) + $\text{SCH}_3$ (Met) $\beta\text{-CH}_2$ (Met) + $\beta\text{-CH}$ (Val)	3,9-4,5	$\alpha\text{-CH}$ (Val) + $\alpha\text{-CH}$ (Glu) $\alpha\text{-CH}$ (Arg) + $\alpha\text{-CH}$ (Ser)
2,2-2,4	$\gamma\text{-CH}_2$ (Glu) + $\gamma\text{-CH}_2$ (Met)		$\alpha\text{-CH}$ (Met) + $\alpha\text{-CH}$ (Trp)
2,8	$\delta\text{-CH}_2$ (Arg)	7,0-7,5	5 CH Ar (Trp)
3,2	$\beta\text{-CH}_2$ (Trp)		

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 31) observam-se os deslocamentos químicos em 109-136 ppm dos carbonos dos anéis aromáticos do triptofano. Os sinais entre 162,7-173,5 ppm são referentes aos carbonos carbonílicos dos aminoácidos (Glu, Met, Arg, Val, Ser, Gli). Em 14,12 ppm encontra-se o sinal correspondente à metila ligada ao enxofre do aminoácido da metionina. Observamos na região em torno de 17-18 ppm os deslocamentos químicos típicos das duas metilas do grupo isopropila do aminoácido valina.

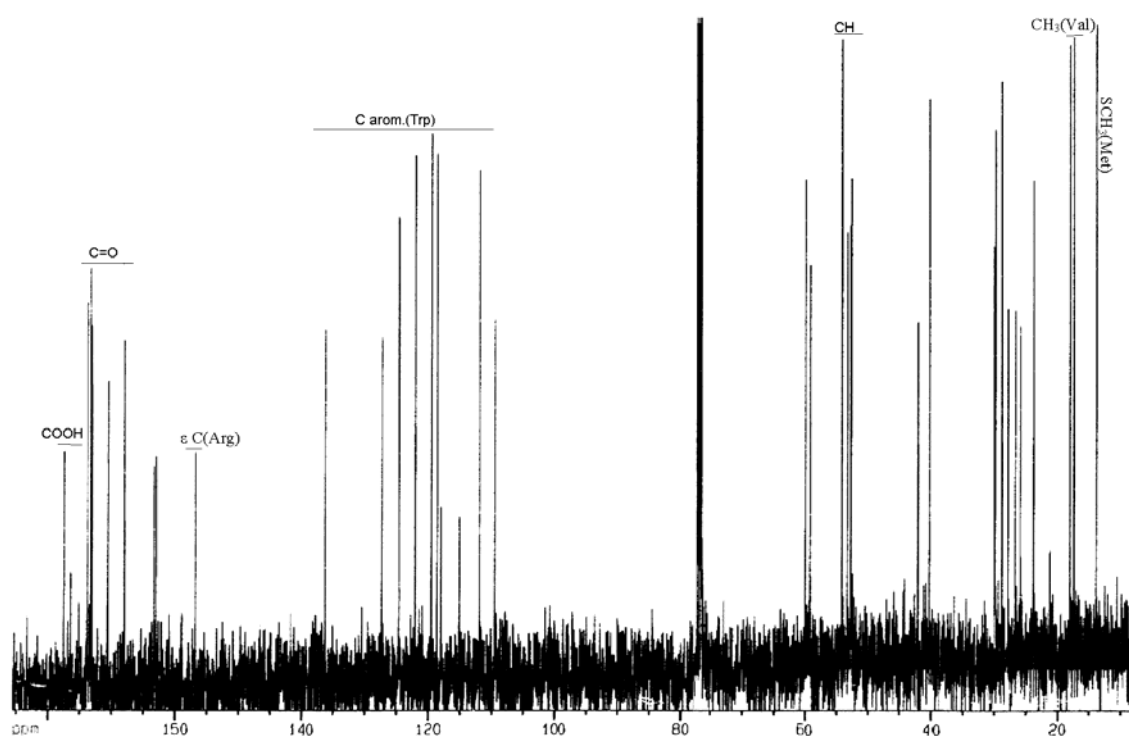


FIGURA 31 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da  $\delta$ -MSH a 100MHz em  $\text{D}_2\text{O}$ , em presença de capilar de  $\text{CDCl}_3$ .

Na análise do espectro RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° (Figura 32), observa-se os carbonos metilênicos do Trp, Ser, Glu, Met, Gli e da Arg. Os outros picos presentes no espectro correspondem aos deslocamentos químicos dos demais carbonos da molécula. Estes deslocamentos químicos dos carbonos, assim como os dos prótons, foram confirmados através do espectro COSY (Figura 47, pág. 69) juntamente com o espectro bidimensional heteronuclear HMQC (Figura 48, pág. 70).

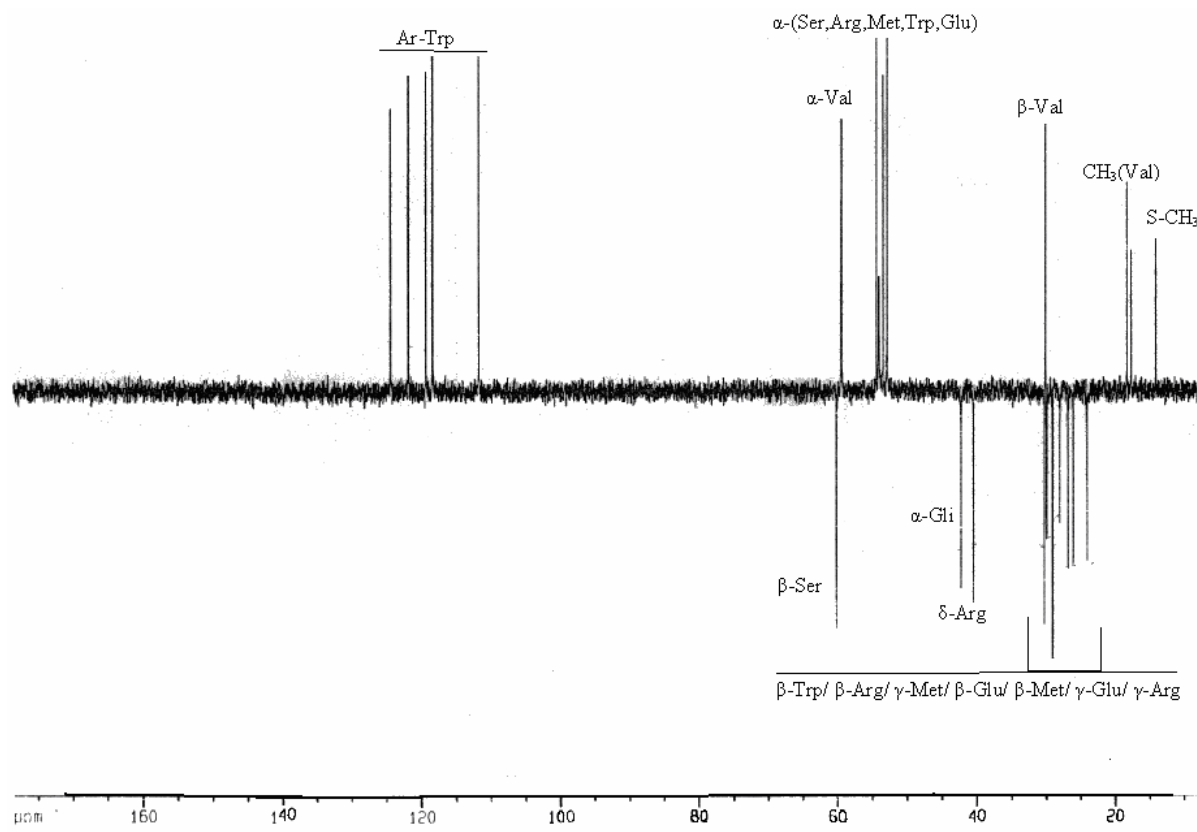


FIGURA 32 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° da  $\delta$ -MSH a 100MHz em  $\text{D}_2\text{O}$ .

TABELA 3: Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , capilar de  $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) da  $\delta$ -Melanotropina

<i>H-Ser-Met-Glu-Val-Arg-Gli-Trp-OH</i>			
$\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$	$\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$
14	SCH <sub>3</sub> (Met)	60	$\beta$ -CH <sub>2</sub> (Ser)
17-18	$\gamma$ -CH <sub>3</sub> (Val)	52; 53; 54	$\alpha$ -CH(Arg) + $\alpha$ -CH(Met)
24	$\gamma$ -CH <sub>2</sub> (Arg)		$\alpha$ -CH(Glu) + $\alpha$ -CH(Ser)
29-30	$\beta$ -CH <sub>2</sub> (Arg) + $\beta$ -CH <sub>2</sub> (Glu)		$\alpha$ -CH(Trp)
	$\gamma$ -CH <sub>2</sub> (Met) + $\beta$ -CH <sub>2</sub> (Trp)	109-136	8C-(Ar)(Trp)
	$\beta$ -CH <sub>2</sub> (Met) + $\gamma$ -CH(Glu)	156	$\epsilon$ -C(Arg)
	$\beta$ -CH(Val)	167-173	CO (Glu)+ (Arg)+ (Met)
40	$\gamma$ -CH <sub>2</sub> (Arg)		(Gli)+ (Val)+ (Ser)
42	$\alpha$ -CH <sub>2</sub> (Gli)	175-177	CO <sub>2</sub> H (Trp)+ (Glu)
59	$\alpha$ -CH(Val)		

### 3.1.6. Síntese da $\delta$ -MSH(O)-resina.

A literatura especializada não apresenta uma comparação concreta entre a  $\delta$ -MSH e as demais melanotropinas, tampouco faz referência a sua função biológica ou a sua facilidade a oxidação. Deste modo, incluiu-se como um dos objetivos do presente trabalho a síntese deste peptídeo em sua forma oxidada, a fim de obter-se material em quantidade suficiente para futuros estudos biológicos. A síntese da  $\delta$ -MSH (O) também foi programada a fim de se ter um peptídeo oxidado como referência para facilitar a caracterização da  $\delta$ -MSH por técnicas comparativas como a cromatografia. A obtenção do peptídeo oxidado deu-se pela incorporação do resíduo de Met(O) no lugar do resíduo de Met. A síntese do peptídeo foi desenvolvida, de forma geral, utilizando-se a mesma estratégia descrita para síntese da  $\delta$ -MSH (item 3.1.3), ou seja, através do acoplamento dos aminoácidos na resina na seqüência desejada.

Assim, a síntese da  $\delta$ -MSH(O) foi realizada utilizando-se o suporte sólido *p*-metilbenzidrilamina (MBHA) com funcionalização 0,045mmol/g, como aminoácido de referência interna usou-se a fenilalanina e como separador também o 3-(4'-hidroximetilfenoxi)propionato de pentafluorfenila. O primeiro aminoácido da seqüência peptídica, protegido como Fmoc-Trp-OH, foi incorporado ao suporte sólido com diisopropilcarbodiimida e uma quantidade catalítica de 4-dimetilaminopiridina (DMAP). Os demais aminoácidos, protegidos na função  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> com Fmoc, foram incorporados pelo método da DIPCDI e HOBt em DMF, com agitação ocasional por 1 hora. Nestes acoplamentos utilizou-se 3 equivalentes de excesso dos aminoácidos, calculado em relação a funcionalidade inicial da resina. Após a incorporação de cada aminoácido foi realizado o procedimento de acetilação preventiva a fim de desativar os possíveis grupos  $\alpha$ -amino que não reagiram durante o acoplamento dos aminoácidos. A acetilação foi realizada com anidrido acético em meio 5% de piridina em diclorometano. A Figura 33 apresenta o esquema básico da síntese em fase sólida da  $\delta$ -MSH.

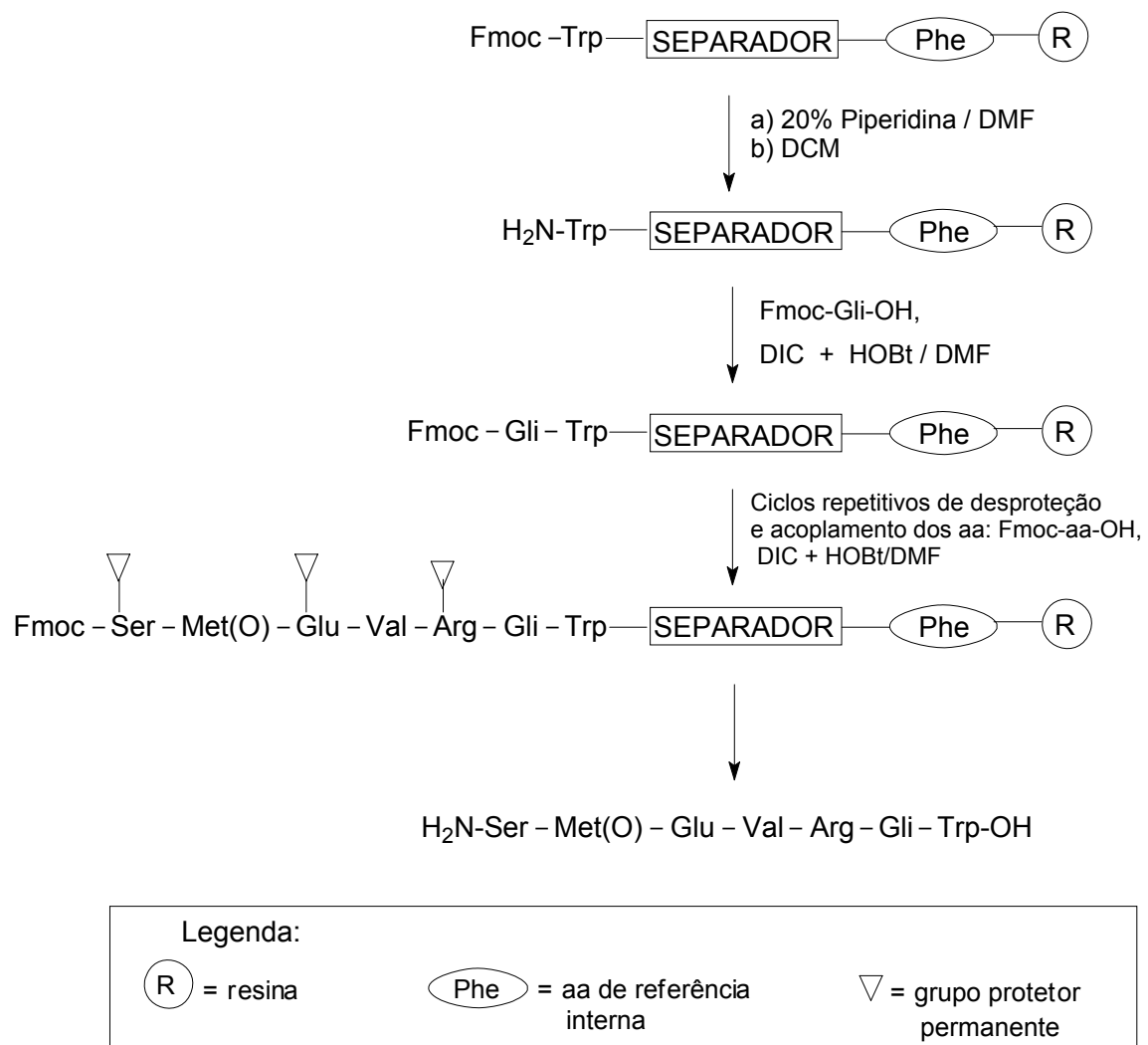


FIGURA 33 - Esquema demonstrativo da síntese em fase sólida da  $\delta$ -MSH(O).

A caracterização da  $\delta$ -MSH(O) por cromatografia foi realizada nas mesmas condições mencionadas no item 3.4, onde observou-se apenas um pico com tempo de retenção  $t_R$  25 min (Figura 34).

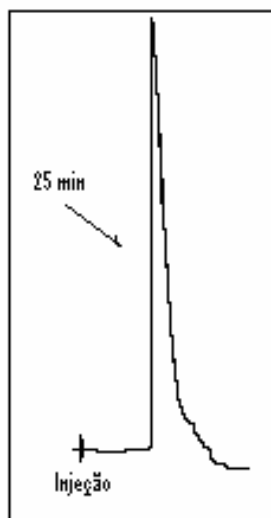


FIGURA 34 – CLAE analítica em coluna de fase reversa do peptídeo  $\delta$ -MSH oxidado. Condições de eluição: isocrático a 30% de acetonitrila em H<sub>2</sub>O com 0,1% TFA. Fluxo= 2 ml/min; 220nm.

#### 3.1.6.1. Análise do peptídeo oxidado por RMN

Através da análise dos espectros de RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C, confirmou-se a formação do peptídeo oxidado, pelos deslocamentos químicos que caracterizam a espécie oxidada, principalmente os sinais correspondentes a Met na seqüência peptídica da  $\delta$ -MSH(O).

No espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 35), observamos os deslocamentos característicos dos prótons do  $-S(O)CH_3$  do aminoácido metionina oxidada na região de 2,5 ppm. Na região de 2,1 ppm observamos os prótons do carbono  $\beta$ , e observam-se também o deslocamento químico dos prótons do  $\gamma CH_2$  em 2,9 ppm, referentes à cadeia lateral do aminoácido da metionina oxidada.

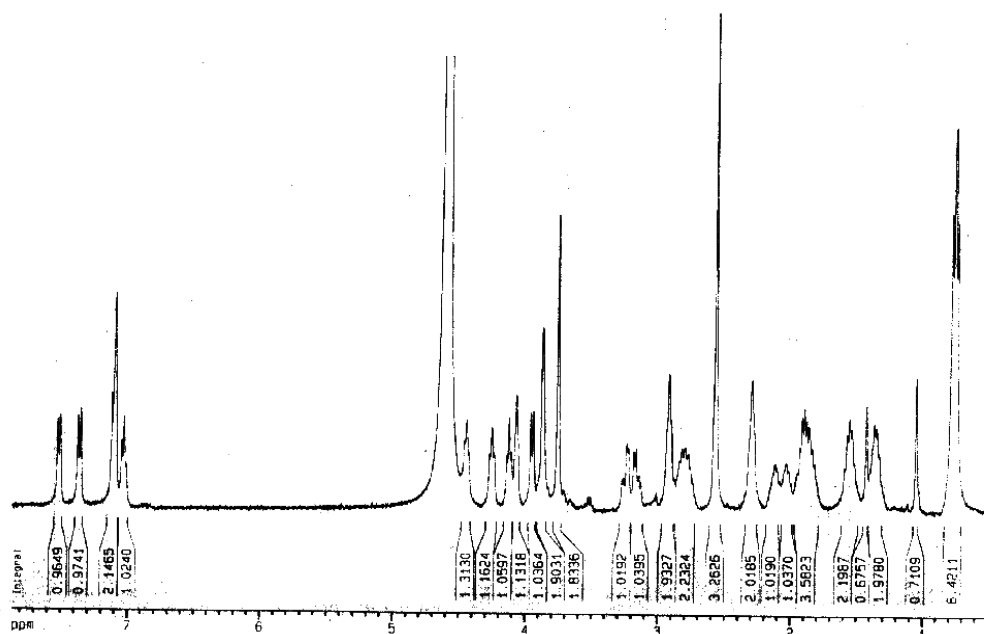


FIGURA 35 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , capilar de  $\text{CDCl}_3$ , da  $\delta\text{-MSH(O)}$ ).

TABELA 4: Dados de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , capilar de  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da  $\delta\text{-MSH(O)}$ .

<i>H-Ser-Met(O)-Glu-Val-Arg-Gli-Trp-OH</i>			
$\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$	$\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$
0,74-0,78	$\gamma\text{-CH}_3$ (Val)	3,2	$\beta\text{-CH}_2$ (Trp)
1,3-1,54	$\beta\text{-CH}_2$ (Arg) + $\alpha\text{CH}_2$ (Arg)	3,7	$\alpha\text{-CH}_2$ (Gli)
1,8-2,1	$\beta\text{-CH}_2$ (Glu) + $\beta\text{CH}$ (Val)	3,8	$\beta\text{-CH}_2$ (Ser)
	$\beta\text{-CH}_2$ (Met(O))	3,8-4,5	$\alpha\text{-CH}$ (Val) + $\alpha\text{-CH}$ (Glu)
2,2	$\gamma\text{-CH}_2$ (Glu)		$\alpha\text{-CH}$ (Arg) + $\alpha\text{-CH}$ (Ser)
2,5	$\text{S(O)CH}_3$		$\alpha\text{-CH}$ (Met) + $\alpha\text{-CH}$ (Trp)
2,8	$\delta\text{-CH}_2$ (Arg)	7,0-7,5	5 CH Ar (Trp)
2,9	$\gamma\text{-CH}_2$ (Met(O))		

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ . (Figura 36) observam-se os deslocamentos químicos característicos, em 36 e 48 ppm dos carbonos  $\beta$  e  $\gamma\text{-CH}_2$  da cadeia lateral da metionina oxidada. Em 36 ppm encontra-se o sinal correspondente à metila ligada ao grupo sulfóxido da metionina oxidada.

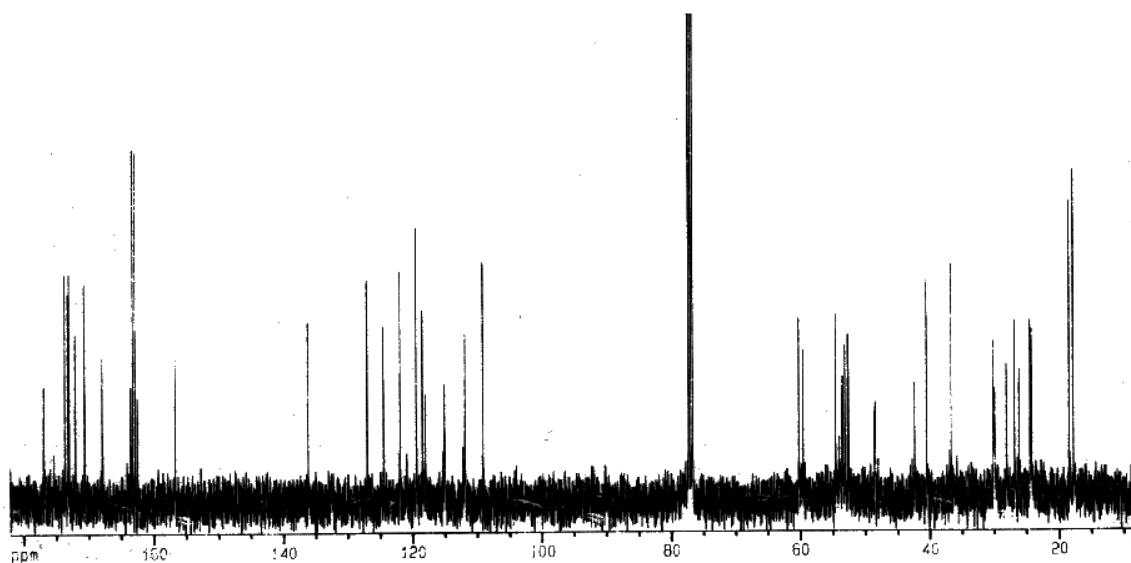


FIGURA 36 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  em  $\text{CDCl}_3$  da  $\delta\text{-MSH(O)}$  a 100 MHz.

TABELA 5: Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , capilar de  $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) da  $\delta\text{-MSH(O)}$ .

<i>H-Ser-Me(O)t-Glu-Val-Arg-Gli-Trp-OH</i>			
$\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$	$\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$
17-18	$\gamma\text{-CH}_3(\text{Val})$	60	$\beta\text{-CH}_2(\text{Ser})$
24	$\gamma\text{-CH}_2(\text{Arg}); \beta\text{-CH}_2(\text{Met(O)})$	52; 53; 54	$\alpha\text{-CH}(\text{Arg}); \alpha\text{-CH}(\text{Met(O)});$ $\alpha\text{-CH}(\text{Glu}); \alpha\text{-CH}(\text{Ser})$
29-30	$\beta\text{-CH}_2(\text{Arg}); \beta\text{-CH}_2(\text{Glu})$ $\beta\text{-CH}(\text{Val}); \beta\text{-CH}_2(\text{Trp})$ $\gamma\text{-CH}(\text{Glu})$	109-136	$\alpha\text{-CH}(\text{Trp})$ $\text{C}(\text{Ar})(\text{Trp})$
36	$\text{SCH}_3(\text{Met(O)})$	156	$\epsilon\text{-C}(\text{Arg})$
40	$\gamma\text{-CH}_2(\text{Arg})$	167-173	$\text{CO}(\text{Glu}); (\text{Arg}); (\text{Met(O)})$ $(\text{Gli}); (\text{Val}); (\text{Ser})$
42	$\alpha\text{-CH}_2(\text{Gli})$	173-176	$\text{CO}_2\text{H}(\text{Trp}); (\text{Glu})$
48	$\gamma\text{-CH}_2(\text{Met(O)})$		
59	$\alpha\text{-CH}(\text{Val})$		

Com a obtenção do peptídeo oxidado, realizou-se uma reação de redução do mesmo, utilizando-se  $\text{NH}_4\text{I}$  e  $\text{Me}_2\text{S/TFA}$  para a redução do grupo sulfóxido. Não foi possível a caracterização do peptídeo reduzido por CLAE. O tempo de retenção do peptídeo oxidado/reduzido é o mesmo dos reagentes usados na reação, e a pouca



quantidade de peptídeo não permitiu novas análises do peptídeo por CLAE para adequar as condições de eluição ótimas para o acompanhamento da reação.

### 3.2 Estudo Conformacional por Dicroísmo Circular.

Neste trabalho foram realizados experimentos de DC com diferentes concentrações de TFE e foi analisado o comportamento conformacional do peptídeo sintético frente a variação de temperatura e de concentração. Assim como Mukhopadhyay e col., foi utilizada a banda a  $\lambda_{222}$  nm como diagnóstico de mudanças conformacionais nos espectros de DC da  $\delta$ -melanotropina.

O efeito da adição de quantidades crescentes do indutor de hélice  $\alpha$  2,2,2-trifluoretanol foi analisado a diferentes concentrações do peptídeo  $\delta$ -MSH (Figura 37). Os resultados obtidos nestes experimentos coincidem com as observações de Mukhopadhyay e Basak, pois observa-se que ao aumentar a concentração de TFE aumenta também  $[\theta]_M$  a  $\lambda_{222}$  nm, indicando assim que o peptídeo apresenta tendência a adquirir uma conformação do tipo hélice  $\alpha$ .

Estudou-se também, o efeito da variação de concentração do peptídeo em solução tampão fosfato 10 mM em presença de 10 e 50% de 2,2,2-trifluoretanol e no intervalo de concentrações entre 30 e 160  $\mu$ M. Os resultados dos experimentos são mostrados na Figura 38. Em nenhum dos espectros apresentados é possível observar-se uma variação significativa de intensidade  $[\theta]_M$  na banda a  $\lambda_{222}$  nm, sendo forte indicativo que a  $\delta$ -melanotropina não tem tendência à agregação, mesmo em presença de 50% de TFE como indutor de conformação.

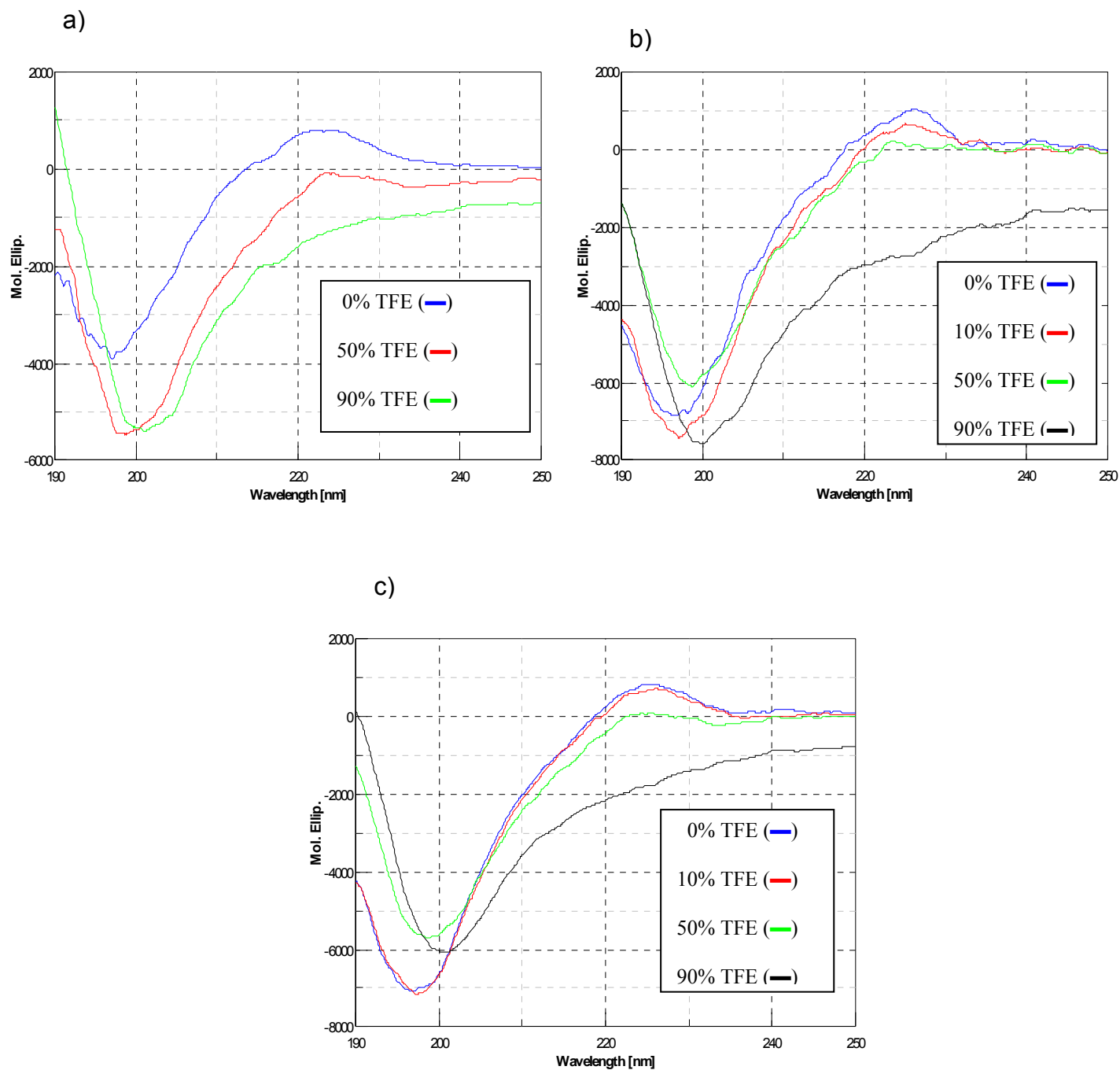


FIGURA 37 - Espectros de DC da  $\delta$ -melanotropina em tampão fosfato 10 mM a 20°C: (a) 30  $\mu$ M do peptídeo; (b) 80  $\mu$ M do peptídeo e (c) 160  $\mu$ M do peptídeo em presença de 2,2,2-trifluoretanol (TFE).

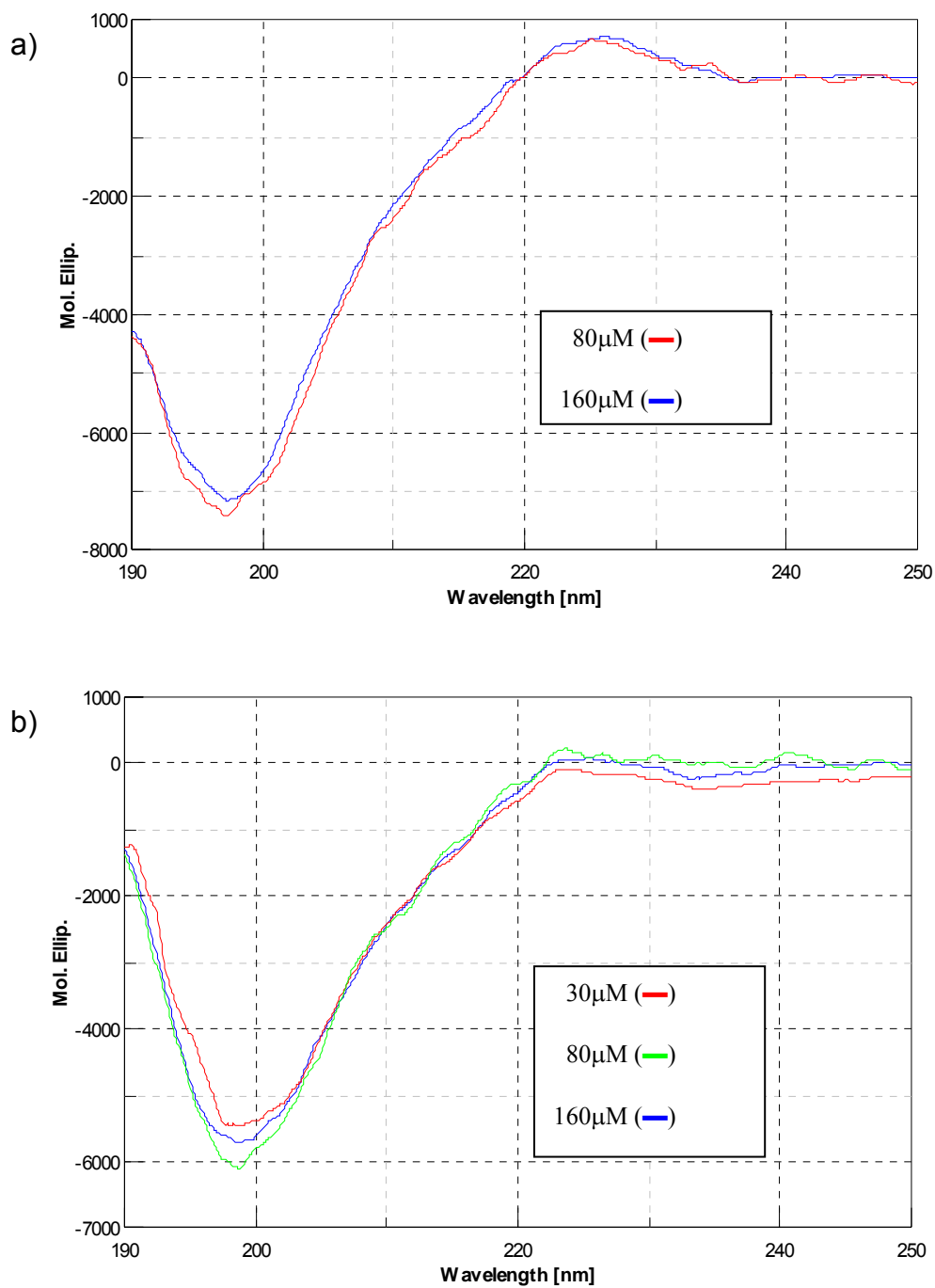


FIGURA 38 - Espectros de DC da  $\delta$ -melanotropina em tampão fosfato 10 mM a 20°C: (a) em presença de 10% TFE e (b) em presença de 50% TFE.

O efeito da temperatura na conformação da  $\delta$ -melanotropina em solução tampão fosfato com 90% de 2,2,2-trifluoretanol foi analisada por dicroísmo circular dentro do

intervalo de temperaturas entre 0 e 90°C (Figura 39). O efeito de desnaturação do peptídeo, ou seja, a transição da conformação adquirida em presença de 90% de solvente indutor de hélice  $\alpha$  para uma conformação totalmente desordenada, chamada “random coil”, foi verificada através da alteração do perfil total do espectro, pois com o aumento de temperatura o perfil do espectro aproximou-se do perfil correspondente ao de um polipeptídeo randômico. Observa-se que as mudanças no espectro de DC do peptídeo não foram muito drásticas, o que indica que, ainda que em presença de uma alta concentração de TFE, a conformação que prevalece para a  $\delta$ -melanotropina é a desordenada. Esta observação está de acordo com o esperado para pequenos peptídeos como o estudado, pois em sua maioria caracterizam-se por não apresentarem uma estrutura secundária altamente ordenada.

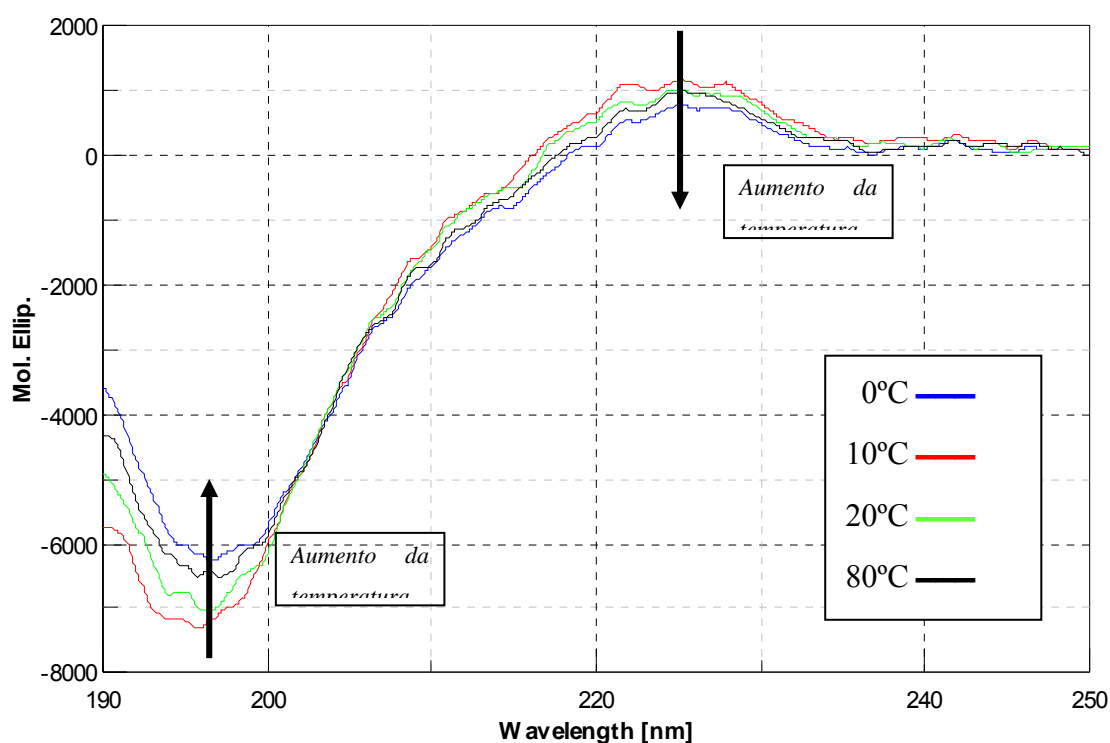


FIGURA 39 - Espectro de DC da  $\delta$ -melanotropina (160  $\mu$ M) em tampão fosfato 10 mM com 90% TFE a 20°C.

## IV PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. Reagentes e solventes utilizados:

Os aminoácidos protegidos, Glu(OtBu)-OH, Arg(Pmc)-OH e Ser(tBu)-OH, foram adquiridos comercialmente por Novabiochem AG (Läufelfingen, Suíça) e Advanced Chem Tech (Maidenhed, Inglaterra). O ácido 3-(4-(hidroximetilfenoxi)propiónico foi adquirido comercialmente (Novabiochem AG) ou sintetizado conforme descrição experimental.

A resina *p*-metilbenzidrilamina (MBHA) é um copolímero de estireno e 1-2% de divinilbenzeno e foi adquirida comercialmente por Novabiochem AG. Os aminoácidos protegidos, o separador e a resina foram cedidos pelo Departamento de Química Orgânica da Universidade de Barcelona.

Os seguintes solventes e reagentes foram usados sem purificação: diclorometano (QUIMEX); dimetilformamida (Vetec); acetato de Etila (Merck); acetonitrila (Tedia); diisopropiletilamina (Merck); Diisopropilcarbodiimida (SIGMA) e ácido trifluoracético (Vetec). O dimetilformamida e a piridina foram destiladas antes de ser usada. O éter dietílico foi destilado previamente, refluxado com sódio e novamente destilado sobre pentóxido de sódio.

A síntese em fase sólida foi realizada manualmente em uma seringa descartável de polipropileno com uma placa filtrante de polietileno poroso.

### 4.2. Instrumentos utilizados:

#### 4.2.1. Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear das substâncias sintetizadas foram realizados em espectrômetro BRUKER DPX 400, do Departamento de Química da

Universidade Federal de Santa Maria, o qual opera a 400,13 MHz para  $^1\text{H}$  e 100,62 MHz para  $^{13}\text{C}$ , em tubos de 5 mm. Utilizou-se como solventes: clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), dimetilsulfóxido deuterado (DMSO), metanol deuterado (MeOD) e água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram apresentados em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Os experimentos foram calibrados em relação ao TMS ( $\delta = 0,00$ ).

Além destes, foram feitos, também, outros experimentos uni e bi-dimensionais (DEPT135, COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  e HMQC) que nos auxiliaram na elucidação das estruturas obtidas.

#### **4.2.2. Aparelho de Ponto de Fusão**

Os pontos de fusão dos compostos obtidos foram determinados em um aparelho MQRPF – 301 do Micro Químico.

#### **4.2.3. Liofilizador**

As amostras foram liofilizadas em um aparelho Liofilizador Terroni - Fauvel LT 12000, equipado com uma bomba modelo C55JXHRL-4205 de HP1/2, marca EMERSON.

#### **4.2.4. Espectrômetro de massa**

Os espectros de massa foram realizados em um instrumento de MALDI-TOF MS – Lasermat 2000 – Universidade de Barcelona.

#### 4.2.5. Espectropolarímetro – Análises por Dicroísmo circular:

Os estudos de dicroísmo circular foram realizados em espectropolarímetro JASCO J700 entre 190 e 250 nm a intervalos de 0,1 nm. Cada espectro de DC representa um espectro médio de 3 acumulações. A linha de base de cada espectro foi corrigida mediante a subtração do espectro do branco. Os dados são apresentados em elipticidade molar por resíduo de aminoácido ( $[\theta]_M$ , deg.cm<sup>2</sup>/dmol). Rotinariamente foi utilizado como solvente tampão fosfato 10 mM a pH 7.

#### 4.3. Métodos Analíticos sobre a resina:

Teste qualitativo de ninidrina – este teste permite a identificação de aminas primárias.

##### REAGENTE A:

Solução 1: 40 g de fenol em 10 ml de etanol absoluto. Aquecer até dissolução completa.

Solução 2: 65 mg de KCN em 100 ml de H<sub>2</sub>O, 2 ml dessa solução são diluídos em 100 ml de piridina (recém destilada sobre ninidrina).

Ambas as soluções são agitadas separadamente durante 45 minutos com 4 g de resina Amberlite MB-3 filtradas e finalmente misturadas.

##### REAGENTE B:

Adiciona-se 5 g de ninidrina em 100 ml de etanol absoluto em um frasco fosco bem fechado em atmosfera de N<sub>2</sub>.

Testes com resina: Para os testes com 0,5 a 2 mg de resina seca, adiciona-se 3 gotas do reagente A e 1-2 gotas do reagente B, paralelamente faz-se uma prova em branco (sem resina) para comparar com a amostra. Os tubos são colocados em um banho de areia a

110°C durante 3 minutos. A presença de aminas primárias (acoplamento < 99%) é indicada pelo aparecimento de cor azul na resina ou no sobrenadante.

#### 4.4. Métodos cromatográficos

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi efetuada sobre placas de cromatofolhas Al de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck). Os reveladores utilizados foram ninidrina e *o*-toluidina.

Relação dos principais sistemas de solventes utilizados em cromatografia delgada na síntese da  $\delta$ -Melanotropina:

Clorofórmio, Metanol, Ácido acético (94:5:1)

Clorofórmio, Metanol (80:20)

Clorofórmio, Metanol (60:40)

A separação cromatográfica por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) analítica foi realizada em um aparelho Shimadzu com uma bomba do tipo LC-8A, um detector espectrofotométrico modelo SPD-6A. A coluna utilizada para HPLC analítica de fase reversa C<sub>18</sub> Latek (250 x 20 cm; 10 $\mu$ ).

#### 4.5. Reveladores usados em Cromatografia em camada delgada para identificação de peptídeos e aminoácidos

##### 4.5.1. Solução de ninidrina

Dissolvem-se 0,1 g de ninidrina [C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COCO.C(OH)<sub>2</sub>] em 50 ml de etanol. Esta solução reage com proteínas em presença de piridina tornando-se azul-arroxeadas.



#### 4.5.2. Solução de *o*-toluidina

Dissolve-se 160 mg de *o*-toluidina em 30 ml de ácido acético glacial e completa-se a solução com H<sub>2</sub>O destilada até 500 ml. Adiciona-se então 1 g de iodeto de potássio.

- Procedimento para revelação das placas cromatográficas: Deixar a placa de CCD em repouso em atmosfera de cloro e após borrifar a solução. Revela NH de peptídeos formando uma cor amarela ou azulada.

#### 4.6. Obtenção dos aminoácidos protegidos

##### 4.6.1. *terc*-Butiloxicarbonil-fenialanina (Boc-Phe-OH)

Uma solução de glicina (0,75 g; 10 mmol) em uma mistura de dioxano (20 ml), água (10 ml) e NaOH 1N (10 ml) é resfriada a 0-5°C sob agitação. Dicarbonato de *t*-butila (2,4 g; 11 mmol) é adicionado, sendo a mistura reacional agitada por 0,5 h a temperatura ambiente. A solução é então concentrada à vácuo até aproximadamente 10-15 ml, resfriada em banho de gelo e recoberta com uma fase de acetato de etila (30 ml). Após acidificação a pH 2-3 com uma solução diluída de KHSO<sub>4</sub>, a fase aquosa é extraída com acetato de etila. A solução orgânica resultante é lavada com água (30 ml) e seca com carbonato de sódio. O solvente é evaporado até *secura* e o óleo formado é cristalizado com acetato de etila/hexano. O Boc-Phe-OH é obtido com um rendimento de 77%.

Ponto de Fusão: 87-88°C (P.F.lit<sup>40</sup>: 88,5- 89,0°C)

CCD: Clorofórmio/ Metanol/Ácido acético 94:5:1, R<sub>f</sub> = 0,26

RMN de <sup>1</sup>H em CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz (Figura 40, pág. 66)

δ(ppm) = α-CH (4,2); β-CH<sub>2</sub> (3,1) Ar (7,2);

#### 4.6.2. 9-Fluorenilmetiloxycarbonil-triptofano (Fmoc-Trp-OH)

37,5 mmol de aminoácido são adicionados a um balão de 250 ml acoplado a condensador e em manta de aquecimento. O sólido é suspenso em 87,5 ml de diclorometano e, sob agitação vigorosa, adiciona-se 9,52 ml (75 mmol) de TMS-Cl. A mistura reacional é refluxada por 1 hora e posteriormente resfriada em banho de gelo. Adiciona-se então DIEA 11,3 ml (65 mmol) e Fmoc-Cl 6,47 g (25 mmol). A agitação continua com resfriamento por 20 minutos e, após este período, a mistura é armazenada a temperatura ambiente por 1 - 1,5 horas. O solvente é eliminado a securo, sendo adicionado ao resíduo 200 ml de éter etílico e 250 ml de NaHCO<sub>3</sub> 2,5%. As fases são separadas, a fase aquosa é extraída com éter etílico, acidificada e extraída com acetato de etila. A fase orgânica é secada e recristalizada. O Fmoc-Trp-OH é obtido com um rendimento de 80%.

Ponto de Fusão: 184-186°C (P.F.lit<sup>39</sup>= 182-185°C).

CCD: Clorofórmio/ Metanol/ Ácido acético 94:5:1, Rf = 0,5

RMN de <sup>1</sup>H em CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz (Figura 41, pág. 66)

δ(ppm) = α-CH (2,17); β-CH<sub>2</sub> (3,02); Ar (6,00-6,68)

#### 4.6.3. 9-Fluorenilmetiloxycarbonil-Glicina (Fmoc-Gli-OH)

O Fmoc-Gli -OH é obtido conforme o item 6.2 com um rendimento de 54%.

Ponto de Fusão: 176-179°C (P.F.lit<sup>39</sup>= 173°C).

CCD: Clorofórmio/ Metanol/ Ácido acético 94:5:1, Rf= 0,64 cm

RMN de <sup>1</sup>H em MeOD a 400 MHz (Figura 42, pág. 67)

δ(ppm) = α-CH<sub>2</sub> (3,89); Ar (7,3-7,7)

#### 4.6.4. 9-Fluorenilmetiloxicarbonil-valina (Fmoc-Val-OH)

O Fmoc-Val-OH é obtido conforme o item 6.2 com um rendimento de 68%.

Ponto de Fusão: 147-149°C (P.F.lit<sup>39</sup>= 145°C)

CCD: Clorofórmio/ Metanol/ Ácido acético 94:5:1, Rf = 0,56 cm

RMN de <sup>1</sup>H em CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz (Figura 43, pág. 67)

δ(ppm) = α-CH (3,7); β-CH<sub>2</sub> (2,22) Ar (7,2-7,7)

#### 4.6.5. Metionina oxidada [H-Met(O)-OH]

Uma solução de metionina (3,0 g; 20 mmol) dissolvida em água destilada (10 ml) é agitada vigorosamente em um banho de água a temperatura ambiente. A esta solução é adicionada lentamente, em um intervalo de 0,5 horas, 2,2 ml de peróxido de hidrogênio a 30%. A solução fica clara. Em seguida é acrescentado etanol absoluto (100 ml) a temperatura ambiente. Após duas horas, os cristais são filtrados e lavados com 95% de etanol (100 ml). A Metionina oxidada é obtida com um rendimento de: 71%

Ponto de Fusão: 253-254°C (p.f.lit<sup>40</sup>= 253°C).

#### 4.6.6. 9-Fluorenilmetiloxicarbonil-Metionina oxidada [Fmoc-Met(O)-OH]

O Fmoc-Met(O)-OH é obtido conforme o item 6.2 com um rendimento de 50%.

Ponto de Fusão: 168-173°C (p.f.lit<sup>40</sup>= 167-171°C).

CCD: Clorofórmio/ Metanol/ Ácido acético 94:5:1, Rf= 0,26

RMN de <sup>13</sup>C em MeOD a 100 MHz (Figura 44, pág. 68)

$\delta(\text{ppm}) = \alpha\text{-CH (53,0); } \beta\text{-CH}_2 \text{ (23,6); } \gamma\text{-CH}_2 \text{ (65,6); S(O)CH}_3 \text{ (37,7) Ar (120,0-143,7)}$

#### 4.6.7. 9-Fluorenilmetiloxycarbonil-Metionina (Fmoc-Met-OH)

O Fmoc-Val -OH é obtido conforme o item 5.2 com um rendimento de 75%.

Ponto de Fusão: 131-133°C (PF.lit<sup>39</sup>= 133°C)

CCD: Clorofórmio/ Metanol/ Ácido acético 94:5:1, Rf= 0,76

RMN de <sup>13</sup>C em MeOD a 100 MHz (Figura 45, pág. 68)

$\delta(\text{ppm}) = \alpha\text{-CH (46,4); } \beta\text{-CH}_2 \text{ (30,9); } \gamma\text{-CH}_2 \text{ (29,4); SCH}_3 \text{ (14,5) Ar (119,2-143,1)}$

#### 4.7. Obtenção do 3-(4'-hidroximetilfenoxi) propionato de pentafluorfenila

##### *1ª Etapa:*

Ácido 3-bromopropiônico (7 g; 0,046 mol) foi dissolvido em H<sub>2</sub>O (6 ml) e carbonato de sódio sólido foi adicionado (3,7 g; 0,035 mol) para ajustar o pH a 9. A esta solução a 70-80° foi adicionada uma solução de 4-hidroxibenzaldeído(4-formilfenol) (2,8 g; 0,033 mol) em H<sub>2</sub>O (30 ml). Após 15 min sob agitação, foi adicionado iodeto de potássio (0,2 g) e em seguida carbonato de sódio (1,75 g) e a solução permaneceu sob agitação toda a noite a mesma temperatura.

Após resfriar a solução a 25°C, adicionou-se HCl 12 N para ajustar o pH a 6, e foram feitas lavagens com éter (3x 15 ml) para remover o 4- formilfenol que não reagiu. A solução aquosa foi acidificada posteriormente com HCl 12 N a pH 2, havendo precipitação a mistura foi mantida toda noite a 4°C, o sólido foi filtrado e dissolvido em acetato de etila quente, tratado com carvão vegetal, filtrado e resfriado a 4°C para obter-se ácido 3-(4-formilfenóxi)propionico) na forma de cristais brancos. Rendimento de 42%.

Ponto de Fusão: 130-131°C (PF.lit<sup>16</sup>= 129,6-132,7°C)

*2ª Etapa:*

O ácido 3-(4-formilfenóxi)propiónico (500 mg; 2,56 mmol) foi dissolvido em NaOH-metanol 1N (1:2) (7,7 ml) e borohidreto de sódio (98 mg; 2,56 mmol) adicionado em pequenas porções durante 30 minutos. Após deixar a solução agitando por uma hora a 25°C, resfriou-se a 4°C, acidificando a solução a pH 2 com HCl 12 N, realizando-se então extrações com acetato de etila (3x15 ml). As fases orgânicas combinadas foram lavadas com solução saturada de NaCl (2x 10 ml), secas com (MgSO<sub>4</sub>), e evaporados a exaustão. O resíduo resultante foi dissolvido em mínima quantidade de metanol-acetato de Etila (1:1) a 25°C, e pentano foi adicionado para iniciar a cristalização. Depois de várias horas a -20°C, cristais brancos de ácido 3-(4-hidroximetilfenóxi)propiónico foram coletados. Rendimento de 78%.

Ponto de Fusão: 146-147°C (PF.lit<sup>16</sup>= 149-150°C)

RMN de <sup>13</sup>C em CDCl<sub>3</sub> a 100 MHz (Figura 46, pág. 69)

δ(ppm) = 39,3; 68,4; 70,3; 120,2; 134,0; 139,4; 163,2; 172,4.

*3ª Etapa:*

Ácido 3-(4-hidroximetilfenóxi)propiónico (350 mg; 1,78 mmol) foi dissolvido em acetato de etila (9,8 ml) e a mistura de 2,3,4,5,6 pentafluorfenol (35,64 mg, 0,12 mmol) em DCC (37,08 mg; 0,18 mmol) dissolvidos em DCM (1,63 ml) foi adicionada. A mistura foi agitada a 25°C durante a noite e então mantida por 2 horas a 4°C, depois, por filtração, foi removida a diciclohexiluréia. O filtrado foi lavado com tampão de bicarbonato com pH igual a 9,5 (3x 10 ml) e com solução aquosa saturada de NaCl (2x 10 ml), seco com MgSO<sub>4</sub> e evaporado a securo. O resíduo foi recristalizado com acetato de etila quente e pentano a 25°C e depois esfriado a 4°C para formar cristais brancos. Rendimento de 76%.

Ponto de fusão: 95 - 95,8°C<sup>16</sup>.

## 4.8. Síntese em fase sólida e purificação da $\delta$ -Melanotropina

### 4.8.1. Tratamento inicial da resina

A resina (0,5 gramas) de funcionalização 0,45 mmol/g foi colocada no reator de síntese, uma seringa de polipropileno com uma placa filtrante de polietileno poroso, e lavou-se exaustivamente a mesma com DCM para promover sua solvatação. Após isso, realizou-se o tratamento da resina conforme o descrito no Protocolo I.

Protocolo I: Tratamento inicial da resina

<i>Tempo</i>	<i>Tratamento</i>
4 x 2 minutos	DCM
1 x 2 minutos	TFA / DCM 40%
1 x 30 minutos	TFA / DCM 40%
4 x 2 minutos	DCM
2 x 2 minutos	DIEA / DCM 5%
1 x 10 minutos	DIEA / DCM 5%
4 x 2 minutos	DCM

### 4.8.2. Incorporação do terc-butiloxicarbonil fenilalanina (Boc-Phe-OH)

Após o tratamento inicial da resina, o aminoácido de referência (Boc-Phe-OH) (265 mg; 0,225 mmol; 3 exc.) foi dissolvido em um mínimo de DCM, sendo transferida esta solução para o reator que contém a resina. A diisopropilcarbodiimida (126 mg; 0,225 mmol; 3 exc.) foi adicionada, formando-se um pasta homogênea semi-sólida, sendo esta agitada ocasionalmente por 45 minutos. Após, lavou-se a resina com DCM e efetuou-se o teste da Ninidrina, que resulto negativo, isto é, igual à prova em branco.

### 4.8.3. Desproteção do terc-butiloxicarbonil (Boc)

Uma vez incorporado o primeiro resíduo de Boc-Phe-OH, realizou-se a desproteção do grupo  $\alpha$ -amino, conforme o Protocolo II a seguir.

Protocolo II: Desproteção da Fenilalanina

<i>Tempo</i>	<i>Tratamento</i>
1 x 1 minutos	TFA / DCM 40%
1 x 10 minutos	TFA / DCM 40%
3 x 30 minutos	DCM
3 x 2 minutos	DIEA / DCM 5%
5 x 30 minutos	DCM

Após a desproteção do resíduo Phe (eliminação do grupo protetor Boc), foi feito o teste com ninidrina que deu resultado positivo (cor violeta), evidenciando a liberação dos grupos amino terminais do aminoácido incorporado a resina.

### 4.8.4. Incorporação do separador (Handle)

3-(4'-hidroximetilfenoxi) propionato de pentafluorfenila (376 mg; 0,225 mmol; 2 exc.) foi solubilizado em pequena quantidade de DMF juntamente com o HOBt (135 mg; 0,225 mmol; 2 exc.). Adicionou-se essa solução ao reator que continha a H-Phe-resina, obtendo-se uma pasta semi-sólida, que foi agitada ocasionalmente por 2 horas e em seguida, permaneceu 20 horas em repouso. Após, a resina foi lavada 5 vezes com DMF seguida de 5 vezes com DCM. Após realizou-se o teste com ninidrina, que apresentou resultado negativo como era esperado.

#### **4.8.5. Incorporação do aminoácido protegido: 9-Fluorenimetiloxicarbonil Triptofano (Fmoc-Trp-OH)**

O primeiro aminoácido da seqüência, Fmoc-Trp-OH (288 mg; 0,225 mmol; 3 exc.) foi solubilizado em pequena quantidade de DMF e transferido para o reator e, adicionando-se também a DMAP (122 mg; 0,225 mmol; 3 exc.) e o DIC (126 mg; 0,225 mmol; 3 exc.) que ficou reagindo por uma hora. Esse processo de acoplamento foi realizado 3 vezes para assegurar a incorporação quantitativa do aminoácido.

#### **4.8.6. Acetilação preventiva:**

Ao final da incorporação do primeiro aminoácido, foi realizada a acetilação da resina com uma solução de anidrido acético (10 eq.; 0,225 mmol) e DMAP (1 eq.; 0,225 mmol), dois ciclos de 20 minutos cada, a fim de bloquear-se possíveis grupos hidroxila livres sobre a resina. Em seguida a resina foi lavada 5 x 30 segundos com DCM.

#### **4.8.7. Acoplamento dos aminoácidos da seqüência da $\delta$ -melanotropina:**

A incorporação dos demais aminoácidos da seqüência peptídica seguiu os protocolos III e IV. Após cada acoplamento e desproteção foi realizado um teste da ninidrina e em seguida, a acetilação preventiva com uma solução de anidrido acético (10 eq.; 0,225 mmol) e 5% de piridina em DCM.

Desta forma foram acoplados ao Fmoc-Trp-Separador-Phe-resina, seguindo-se as etapas indicadas nos Protocolos III e IV os aminoácidos protegidos Fmoc-Gli-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH e Fmoc-Ser(tBu)-OH, até obter-se a seqüência Fmoc-Ser(tBu)-Met-Glu(OtBu)-Val-Arg(Pmc)-Gli-Trp-separador-Phe-resina.



Uma vez obtida essa seqüência, realizou-se a pesagem do peptídeo-resina sob vácuo até o peso constante, com um rendimento de 80%.

Protocolo III: Remoção do grupo Fmoc do aminoácido.

<i>Tratamento</i>	<i>Ciclo</i>
Diclorometano	5 x 30 segundos
Dimetilformamida	5 x 1 minuto
Piperidina-DMF (2:8)	1 x 1 minuto
	3 x 3 minutos
Dimetilformamida	5 x 1 minuto
Diclorometano	5 x 30 segundos

Protocolo IV: Acoplamento dos Fmoc-aminoácidos.

<i>Tratamento</i>	<i>Ciclo</i>
Diclorometano	5 x 30 segundos
Dimetilformamida	5 x 1 minuto
Fmoc-aa-OH (3 excesso) em DMF + DIC (3 excesso)/ HOBt (2 excesso) em DMF, agitação ocasional a t.a.	1 x 60 minutos
Dimetilformamida	5 x 1 minuto
Diclorometano	5 x 30 segundos

#### 4.8.8. Separação do peptídeo da resina:

Após o acoplamento de todos os aminoácidos da seqüência desejada, realizou-se uma etapa crucial da síntese que é a separação do peptídeo da resina. A separação do peptídeo da resina é realizada mediante tratamento com um coquetel específico contendo capturadores de carbocátions (“scavengers”) em ácido trifluoracético.

Nessa síntese foram usados três tipos de coquetéis que apresentam reagentes específicos para captura de carbocátions produzidos na etapa de desproteção. Depois de realizada a desproteção, evaporou-se o coquetel precipitando o peptídeo livre com éter seco. Este é centrifugado e em seguida efetua-se a purificação do mesmo por HPLC.

A pureza das frações se verificou por HPLC em fase reversa em uma coluna C<sub>18</sub> utilizando-se como fase móvel o sistema de solventes ACN:H<sub>2</sub>O contendo 0,1% de TFA. O controle da purificação se realizou com detector de ultravioleta com um comprimento de onda de 220 nm.

#### 4.9. Coquetéis de clivagem utilizados

Coquetel	Composição
<u>Reagente R</u>	TFA – 90% Tioanisol – 5% EDT – 3% Anisol – 2%
<u>Reagente K</u>	TFA – 87% DMS – 5% EDT – 3% Anisol – 2% H <sub>2</sub> O – 3%
<u>Reagente P</u>	TFA – 94% Fenol – 2% EDT – 2% Anisol – 2%

## V CONCLUSÃO

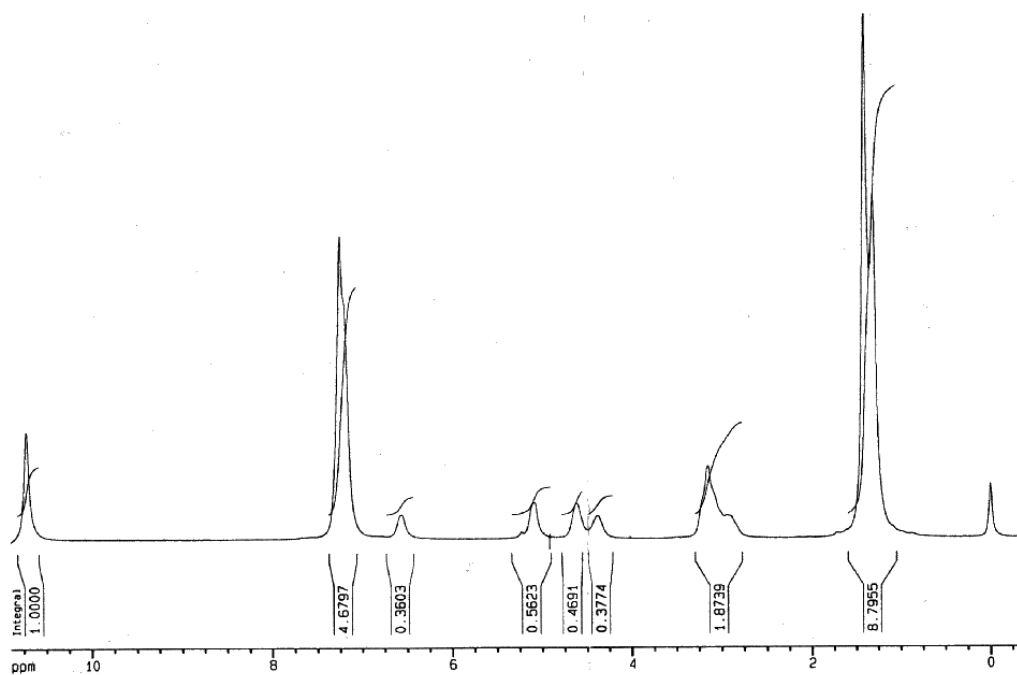
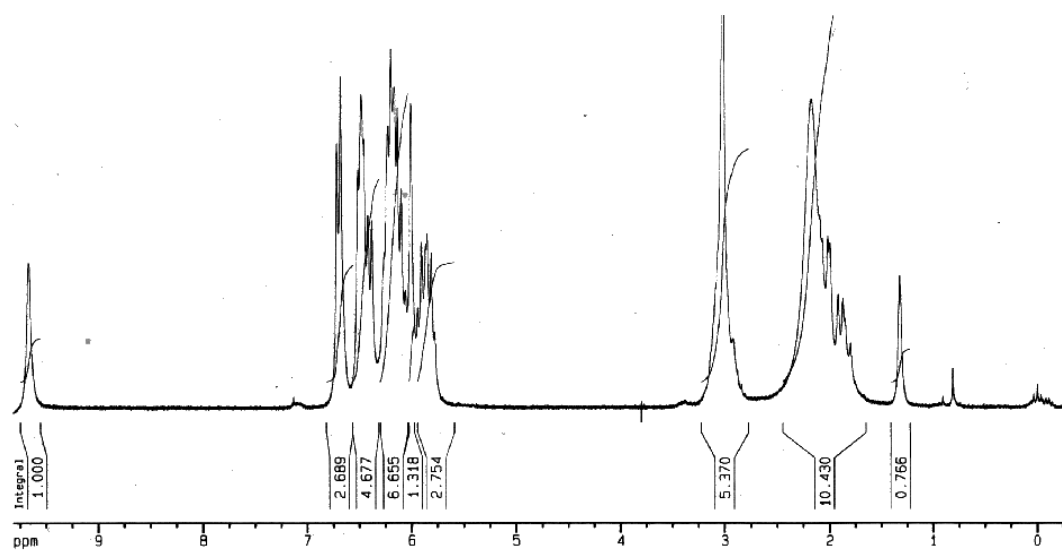
Neste trabalho foram realizadas e otimizadas as sínteses em fase sólida da  $\delta$ -Melanotropina e da  $\delta$ -Melanotropina oxidada. Os métodos utilizados para a caracterização deste peptídeo foram: a CLAE, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons e carbono, análise de aminoácidos e a espectrometria de massa MALDI-TOFF. Foi usada a metodologia de síntese de peptídeos em fase sólida com uma estratégia Fmoc/tButil. Utilizou-se o grupo Fmoc para proteger a função amino via t-Butil e sua remoção se fizeram utilizando uma base fraca.

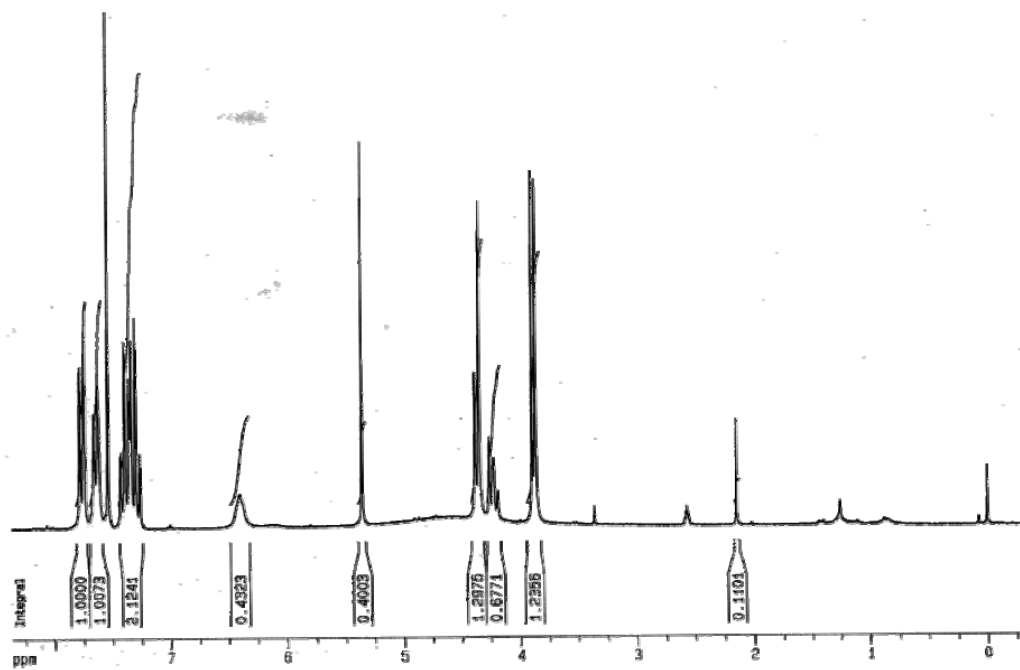
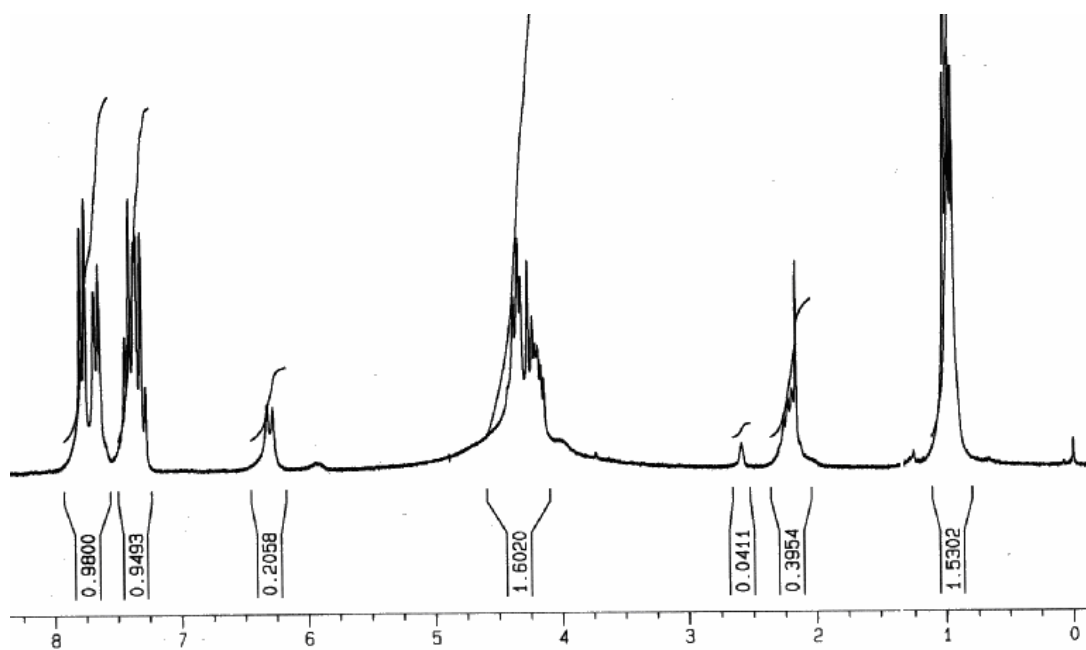
O que se observou por CLAE, utilizando-se como referência a síntese da  $\delta$ -MSH(O), que o produto da síntese da  $\delta$ -MSH apresentava um pico minoritário, correspondente ao peptídeo com seu resíduo de metionina oxidado [H-Ser-Met(O)-Glu-Val-Arg-Gli-Trp], e um pico majoritário correspondente a  $\delta$ -MSH natural. Também na espectrometria de massa MALDI-TOFF, observou-se a presença em pequena quantidade (5%) da  $\delta$ -MSH(O), a partir da clivagem com o coquetel “R” (TFA-tioanisol-EDT-anisol; 90:5:3:2) do peptídeo-resina. A sequência peptídica também foi confirmada pela análise de aminoácidos.

Na caracterização por CLAE do peptídeo reduzido, produto da reação de redução da  $\delta$ -melanotropina oxidada, utilizou-se condições de análise nas quais observou-se um tempo de retenção do peptídeo oxidado/reduzido coincidente a dos reagentes usados na reação, sendo que a pouca quantidade de peptídeo não permitiu uma nova análise desta reação CLAE.

Também se realizou a análise conformacional da  $\delta$ -melanotropia sintética, utilizando-se a técnica de espectroscopia de dicroísmo circular. Foram estudados parâmetros como a variação de concentração de trifluoretanol, variação de temperatura e de concentração do peptídeo. Observou-se que a conformação preferencial do peptídeo é desordenada.

**ANEXO II**

FIGURA 40 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H em DCl<sub>3</sub>, da Boc-Phe.FIGURA 41 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H em DCl<sub>3</sub>, do Fmoc-Trp.

FIGURA 42 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  em MeOD, do Fmoc-Gli.FIGURA 43 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  em DDCl<sub>3</sub>, do Fmoc-Val.

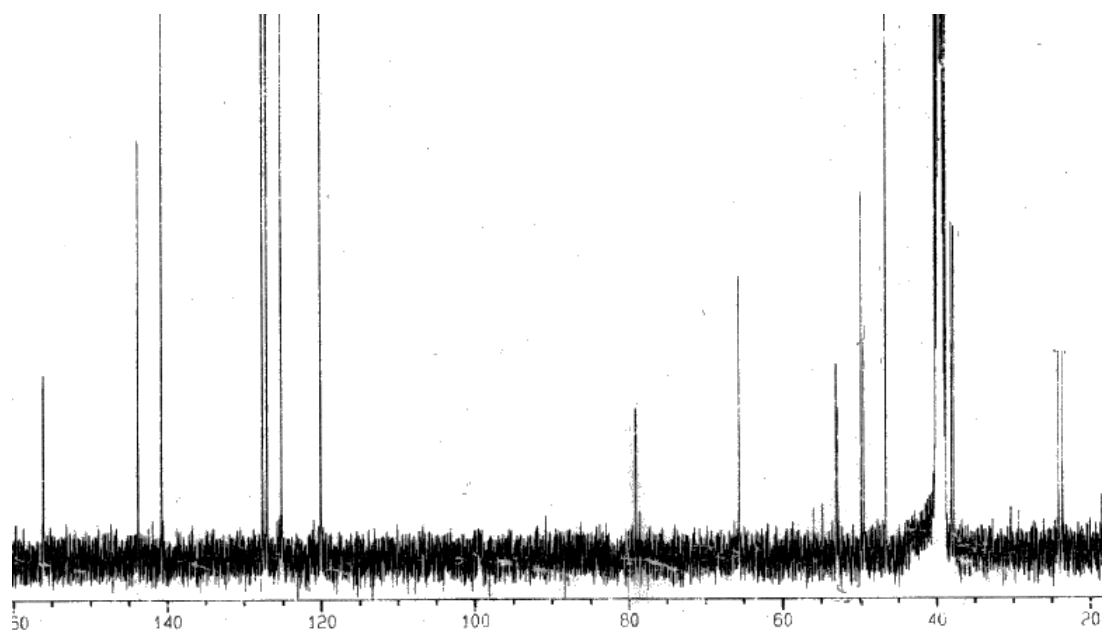


FIGURA 44 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  em MeOD da Fmoc-Met(O).

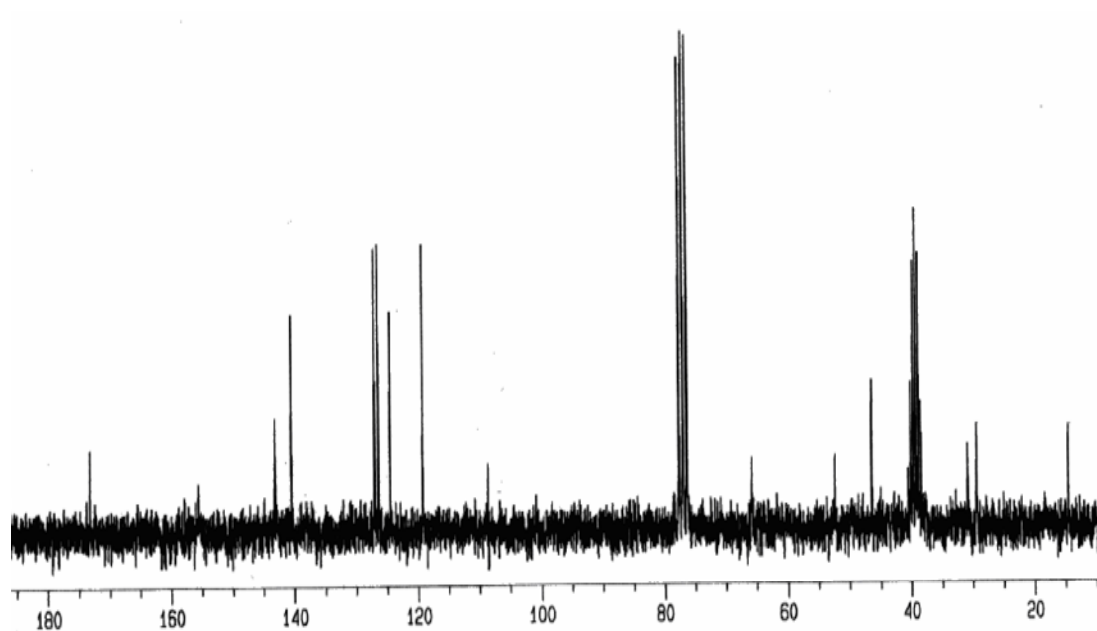
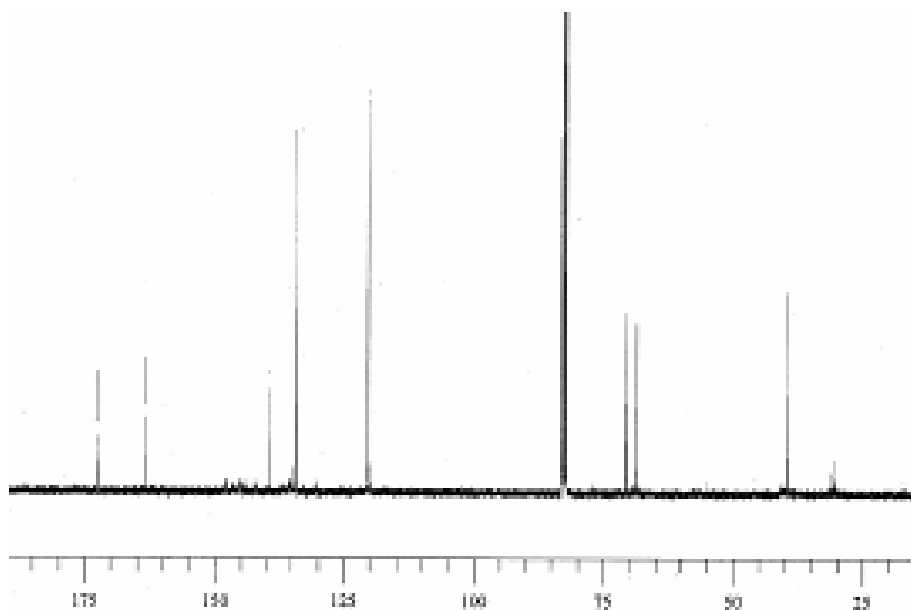
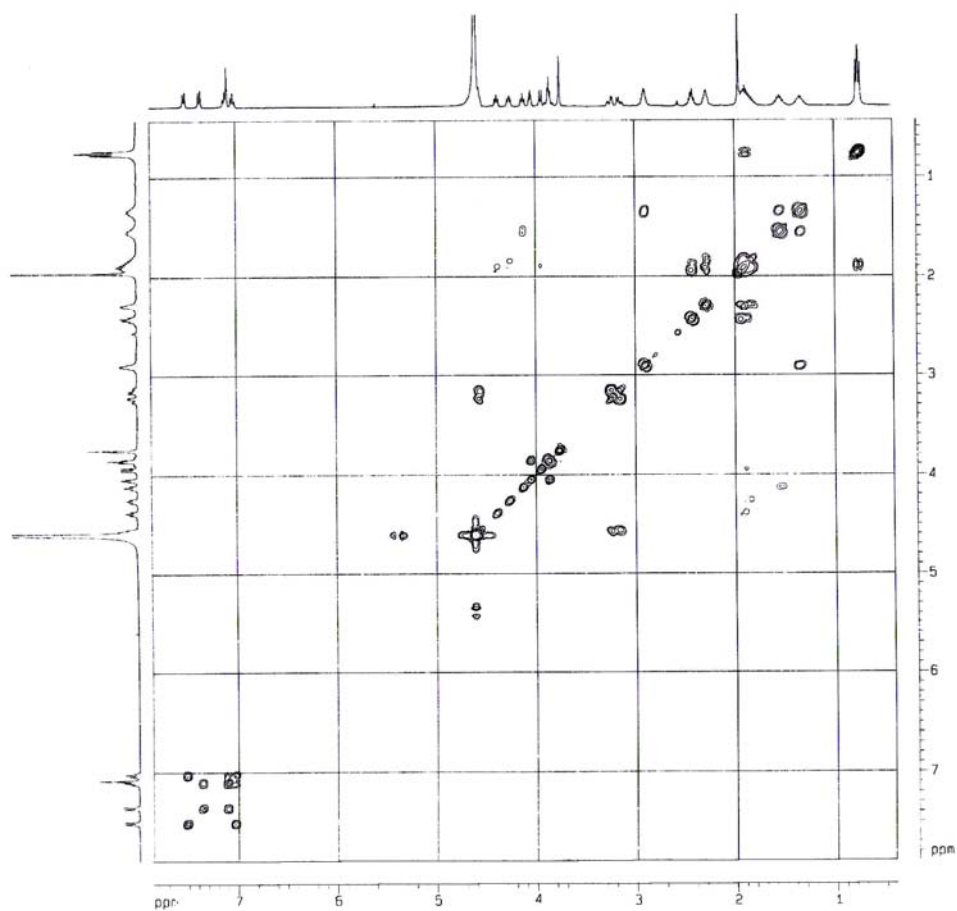


FIGURA 45 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  em MeOD da Fmoc-Met.

FIGURA 46 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  em  $\text{CDCl}_3$  do Separador (Handle).FIGURA 47: Espectro de RMN de 2D,  $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$  COSY em  $\text{D}_2\text{O}$  a 400 MHz.



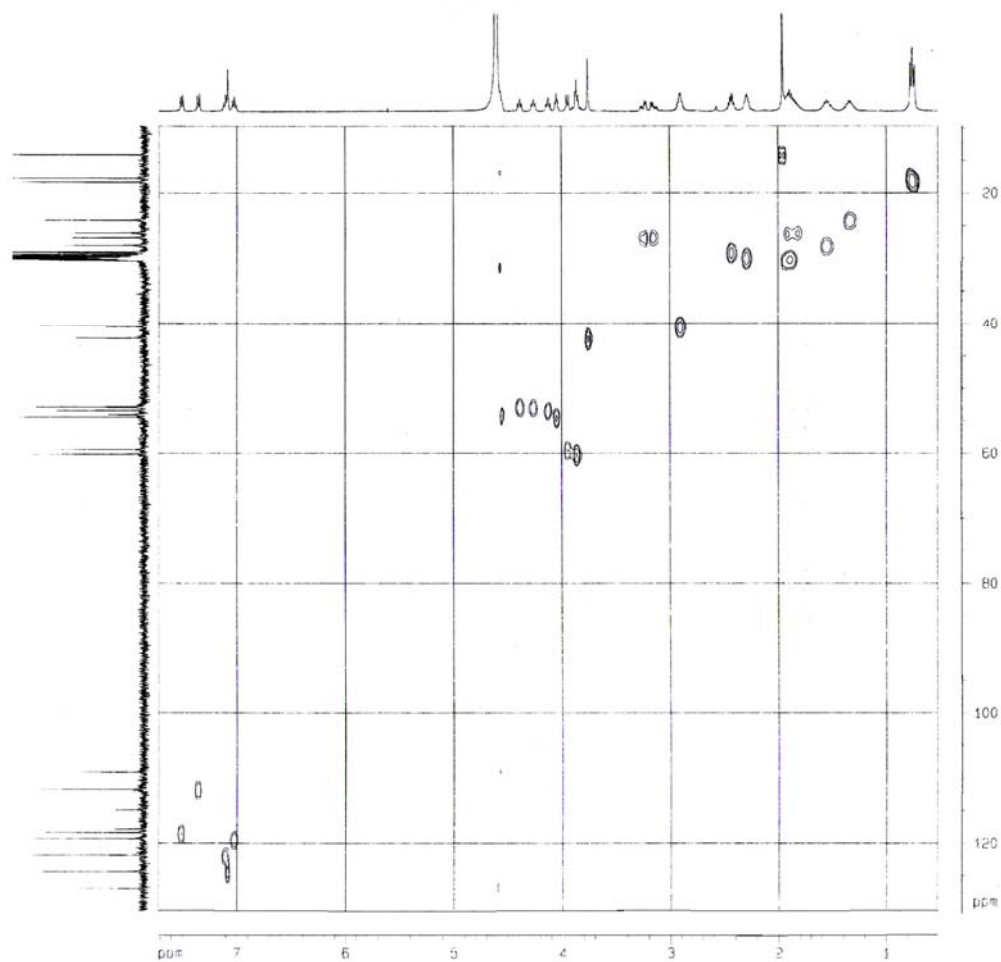


FIGURA 48: Espectro 2D, heteronuclear HMQC em  $\text{D}_2\text{O}$  a 400 MHz.

