MARIA ISABEL ANDRADE DE OLIVEIRA SANTOS

LICENCIADA EM CIÊNCIAS FÍSICO-QUÍMICAS (U.P.)

TÉCNICO-INVESTIGADOR DA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO

ESTUDO DA SÍNTESE DE PÉPTIDOS CÍCLICOS SIMÉTRICOS, PROTEGIDOS, DE L-CISTINA

DISSERTAÇÃO PARA DOUTORAMENTO NA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO

PORTO
1 9 8 2

Publicação subsidiada pelo Instituto Nacional de Investigação Científica

MARIA ISABEL ANDRADE DE OLIVEIRA SANTOS

LICENCIADA EM CIÊNCIAS FÍSICO-QUÍMICAS (U P.)

TÉCNICO-INVESTIGADOR DA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO

ESTUDO DA SÍNTESE DE PÉPTIDOS CÍCLICOS SIMÉTRICOS, PROTEGIDOS, DE L-CISTINA

DISSERTAÇÃO PARA DOUTORAMENTO NA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO

PORTO
1 9 8 2

AOS MEUS PAIS
AOS MEUS IRMÃOS
AO MEU MARIDO
AO MEU FILHO

À memória do Professor Doutor FERNANDO SERRÃO a quem estou muito reconhecida por me ter aceite para o seu grupo de investigadores e, ainda, por todo o apoio e encorajamento concedidos ao longo da realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado no âmbito do projecto de investigação do INIC sobre Síntese Orgânica (Linha 1) do Centro de Investigação em Química da Universidade do Porto, sob a orientação da Professora Doutora M. Joaquina S. A. Amaral Trigo.

Ao INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGAÇÃO CIENTÍFICA agradeço a oportunidade de ter sido integrada no grupo de investigação da referida Linha.

À Professora Doutora MARIA JOAQUINA S.A. AMARAL TRIGO agradeço a valiosa orientação, o apoio, o estímulo e a amizade dispensados durante a realização deste trabalho.

Aos MEUS COLEGAS DE INVESTIGAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA agradeço a camaradagem e simpatia que sempre me dedicaram.

Ao Dr. J. A. BETTENCOURT BAPTISTA agradeço a boa vontade com que deu apoio técnico ao longo da realização experimental deste trabalho, especialmente a obtenção dos espectros de R.M.N.

À Sra. D. MARIA HELENA M. A. BARBOSA, agradeço o cuidado que pôs na dactilografia desta dissertação.

Quero ainda agradecer a todas as pessoas que, de algum modo, contribuiram para que este trabalho fosse levado a bom termo.

São hoje conhecidos muitos péptidos e proteínas naturais que contêm ligações dissulfureto, unindo resíduos de L-cisteína. A confirmação das respectivas estruturas bem como o estudo da relação entre a estrutura e a actividade biológica têm incentivado a pesquisa de métodos adequados de síntese destes produtos naturais e seus modelos.

A síntese de péptidos e proteínas com ligações dissulfureto tem-se baseado na obtenção de cadeias peptídicas contendo resíduos de L-cisteína S-protegidos. As ligações dissulfureto são então estabelecidas, fundamentalmente, de acordo com uma das duas seguintes estratégias: a) formação de todas as ligações dissulfureto, num só passo, por oxidação simultânea dos resíduos de cisteína; b) formação das ligações dissulfureto, selectivamente, em fases diferentes da síntese. Este segundo método tem vindo a ser cada vez mais utilizado, graças aos progressos realizados no âmbito do estudo e aplicação de métodos de remoção selectiva de grupos de S-protecção. A utilização de métodos de conversão directa de grupos SH protegidos em dissulfuretos, desenvolvidos pela escola de HISKEY e pelo grupo de investigação da CIBA-GEIGY, têm contribuído dum modo muito especial para o desenvolvimento desta estratégia.

O presente trabalho, realizado no Departamento de Química da Faculdade de Ciências do Porto, sob orientação da Professora Doutora M. JOAQUINA S.A. AMARAL TRIGO, teve como objectivo o estudo da síntese de péptidos cíclicos simétricos, protegidos, da L-cistina do tipo $[X\text{-}Cys\text{-}(Gly)_n\text{-}Cys\text{-}OY]_2$ ($n = 0,1$ e 2; X,Y - grupos de protecção). Na síntese destes péptidos procurou-se estabelecer um novo método baseado na utilização simultânea de derivados adequados de L-cisteína e de L-cistina. Deste modo, uma das ligações S-S é introduzida directamente, através do resíduo de L-cistina, sendo a outra estabelecida no final da síntese.

Os resultados obtidos constituem a parte essencial e original desta dissertação, na qual se inclui também uma breve revisão sobre o papel das ligações dissulfureto em péptidos e proteínas naturais e sobre a metodologia que tem sido seguida na síntese destes compostos.

Foi possível sintetizar, pelo novo método, péptidos cíclicos simétricos, protegidos, da L-cistina e glicina do tipo $[Boc\text{-}Cys\text{-}(Gly)_n\text{-}Cys\text{-}OBu^t]_2$ *(n = 0, 1 e 2) que parecem ser descritos pela primeira vez.*

*Usou-se como derivado da L-cistina, o L-cistinato de bis(*terc*-butilo) o qual foi preparado por dois processos: a) esterificação directa da L-cistina; b) síntese do N,N'-diftaloil-L-cistinato de bis(*terc*-butilo), seguida da remoção do grupo ftaloílo.*

*Por condensação, pelo método da N,N'-dicicloexilcarbodiimida, do L-cistinato de bis(*terc*-butilo) com os compostos N-*terc*-butiloxicarbonil-S--tritil-L-cisteína, N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicina e N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicilglicina, obtiveram-se os compostos* $[Boc\text{-}Cys(Trt)\text{-}(Gly)_n\text{-}Cys\text{-}OBu^t]_2$ *(n = 0, 1 e 2). Por remoção oxidativa do grupo S-tritilo destes péptidos obtiveram-se, então, os péptidos cíclicos* $[Boc\text{-}Cys\text{-}(Gly)_n\text{-}Cys\text{-}OBu^t]_2$ *(n = 0, 1 e 2), atrás referidos.*

Dos resultados conseguidos, espera-se que o método estudado venha a ser útil na síntese de outros péptidos cíclicos da L-cistina.

I N D I C E

Págs.

Lista das abreviaturas..... 12

PARTE I

PÉPTIDOS E PROTEÍNAS COM LIGAÇÕES DISSULFURETO

1 - A ligação dissulfureto em péptidos e proteínas naturais 15

1.1 - Introdução..... 15
1.2 - Hormonas da neuro-hipófise..... 17
1.3 - Insulina..... 20
1.4 - Calcitocina..... 22
1.5 - Somatotropina..... 24
1.6 - Enzimas..... 25
1.7 - Conclusões..... 28

2 - Metodologia da síntese de péptidos cíclicos contendo L-cistina..... 30

2.1 - Introdução..... 30
2.2 - Formação das ligações dissulfureto numa só fase.. 31
2.2.1 - Síntese de péptidos com uma só ligação dissulfureto intramolecular..... 31
2.2.1.1 - Protecção dos grupos tiol dos resíduos de cisteína..... 33

Págs.

2.2.1.2 - Estudo da oxidação de péptidos modelos contendo cisteína..... 37
2.2.3 - Síntese de péptidos com duas ou mais ligações dissulfureto intramoleculares..... 40
2.2.4 - Síntese de péptidos com duas ou mais ligações dissulfureto intermoleculares..... 41
2.3 - Formação selectiva de ligações dissulfureto em diferentes fases..... 46
2.3.1 - Grupos de S-protecção usados..... 47
2.3.2 - Métodos de conversão oxidativa directa de grupos SH protegidos em dissulfuretos.... 50
2.3.3 - Aplicação em síntese de produtos naturais 55
2.4 - Conclusões..... 61

PARTE 2

ESTUDO DE UM NOVO MÉTODO DE SÍNTESE DE PÉPTIDOS CÍCLICOS SIMÉTRICOS DE L-CISTINA

1 - Objectivos do trabalho e discussão dos resultados..... 63

1.1 - Introdução..... 63
1.2 - Plano de trabalho..... 64
1.3 - Escolha dos grupos de protecção..... 66
1.4 - Estudos preliminares..... 66
1.5 - Estudo prévio da aplicação do L-cistinato de bis-(*terc*-butilo) em síntese peptídica..... 73
1.6 - Síntese do péptido cíclico S,S-S',S'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-L-hemicistinil-L-hemicistinato de *terc*-butilo)..... 79
1.7 - Síntese do péptido cíclico S,S-S',S'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-L-hemicistinilglicil-L-hemicistinato de *terc*-butilo)..... 81
1.8 - Síntese do péptido cíclico S,S-S',S'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-L-hemicistinilglicilglicil-L-hemicistinato de *terc*-butilo)..... 84

Págs.

1.9 - Resumo dos resultados..... 88
1.10- Conclusões gerais..... 88

2 - Descrição das experiências..... 93

2.1 - Notas gerais..... 93
2.2 - Estudos preliminares..... 95

Exp. 1 - Preparação da N,N'-bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistina..... 95
Exp. 2 - Preparação do cloreto de glicilglicina.. 95
Exp. 3 - Preparação do cloreto de glicilglicinato de etilo..... 96
Exp. 4 - Preparação do N,N'-bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistinato de bis(*p*-nitrofenilo) 96
Exp. 5 - Preparação do N,N'-bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistinil-bis(glicilglicinato de etilo..... 96
Exp. 6 - Tentativa de preparação da hidrazida da N,N'-bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistinil-bis(glicilglicina)..... 100
Exp. 7 - Preparação da N-etiloxicarbonilftalimida 100
Exp. 8 - Preparação da N,N'-diftaloil-L-cistina.. 102
Exp. 9 - Preparação do N,N'-diftaloil-L-cistinato de dibenzidrilo..... 104
Exp.10 - Tentativas de preparação do L-cistinato de dibenzidrilo..... 106
Exp.11 - Preparação do N,N'-diftaloil-L-cistinato de bis(*terc*-butilo)..... 107
Exp.12 - Remoção do grupo ftaloílo do N,N'-diftaloil-L-cistinato de bis(*terc*-butilo)... 111
Exp.13 - Preparação do L-cistinato de bis(*terc*-butilo)..... 111
2.3 - Estudo prévio da aplicação do L-cistinato de bis (*terc*-butilo) em síntese peptídica..... 114

Exp. 14 - Preparação do clorotrifenilmetano..... 114

Págs.

Exp.15 - Preparação da N-tritilglicina..... 114
Exp.16 - Preparação da N-tritilglicilglicina..... 114
Exp.17 - Preparação do N,N'-bis(N-tritilglicilglicil)-L-cistinato de bis(*terc*-butilo).... 115
2.4 - Síntese do péptido cíclico S,S-S',S'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-L-hemicistinil-L-hemicistinato de *terc*-butilo)..... 118
Exp.18 - Preparação da S-tritilcisteína..... 118
Exp.19 - Preparação da N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteína..... 118
Exp.20 - Preparação do N,N'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinil)-L-cistinato de bis(*terc*-butilo)..... 119
Exp.21 - Preparação do S,S-S',S'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-L-hemicistinil-L-hemicistinato de *terc*-butilo)..... 121
2.5 - Síntese do péptido cíclico S,S-S',S'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-L-hemicistinilglicil-L-hemicistinato de *terc*-butilo)..... 126
Exp.22 - Preparação do éster N-hidroxissuccinimídico da N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteína..... 126
Exp.23 - Preparação da N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicina..... 126
Exp.24 - Preparação do N,N'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicil)-L-cistinato de bis(*terc*-butilo)..... 129
Exp.25 - Preparação do S,S-S',S'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-L-hemicistinilglicil-L-hemicistinato de *terc*-butilo)..... 132
2.6 - Síntese do péptido cíclico S,S-S',S'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-L-hemicistinilglicilglicil-L-hemicistinato de *terc*-butilo)..... 135
Exp.26 - Preparação do éster N-hidroxissuccinimídico da N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicina..... 135

Págs.

Exp.27 - Preparação da N-*terc*-butiloxicarbonil-S--tritil-L-cisteinilglicilglicina..... 136
Exp.28 - Preparação do N,N'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicilglicil)-L-cistinato de bis(*terc*-butilo).... 140
Exp.29 - Preparação do S,S-S',S'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-L-hemicistinilglicilglicil-L-hemicistinato de *terc*-butilo)..... 143

Aminoácidos protegidos e péptidos sintetizados..... 146

Outros compostos preparados..... 148

Bibliografia..... 149

Resumo..... 159

Abstract..... 160

LISTA DAS ABREVIATURAS

Ac	acetilo
Acm	acetamidometilo
Asu	ácido 2-aminooctanodióico
Boc	*terc*-butiloxicarbonilo
Bpoc	2-(*p*-bifenil)isopropiloxicarbonilo
Bu^t	*terc*-butilo
Bz	benzoílo
Bzh	benzidrilo
Bzl	benzilo
DCCI	N,N'-dicicloexilcarbodiimida
DCHA	dicicloexilamina
DCU	N,N'-dicicloexilureia
Ddz	α,α-dimetil-3,5-dimetoxibenziloxicarbonilo
DKP	dicetopiperazina
DME	dimetoxietano
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO-d_6	sulfóxido de dimetilo hexadeuterado
DTT	1,4-dimercapto-2,3-butanodiol (isómero treo)
Ec	etilcarbamoílo
EI-MS	"electron impact-mass spectrometry"
Et	etilo
Exp.	experiência
FD-MS	"field desorption - mass spectrometry"
HFIP	hexafluoroisopropanol
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HONSu	N-hidroxissuccinimida
lit.	literatura

Mbzl	*p*-metoxibenzilo
Me	metilo
Np	*p*-nitrofenilo
Nps	*o*-nitrofeniltio
ONp	éster *p*-nitrofenílico
ONSu	éster N-hidroxissuccinimídico
p.e.	ponto de ebulição
p.f.	ponto de fusão
Ph	fenilo
Pht	ftaloílo
p.p.m.	partes por milhão
R.M.N.	ressonância magnética nuclear
SBu^t	*terc*-butiltio
TEA	trietilamina
TFA	ácido trifluoroacético
TFE	trifluoroetanol
Thp	tetra-hidropiranilo
Tos	tosilo (*p*-toluenossulfonilo)
Trt	tritilo (trifenilmetilo)
Z	benziloxicarbonilo

NOTA:

As abreviaturas usadas para os resíduos dos aminoácidos são as recomendadas pela I.U.P.A.C.-I.U.B. e que foram publicadas na revista Pure Applied Chem., 1974, 40, 315.

PARTE 1

PEPTIDOS E PROTEÍNAS COM LIGAÇÕES DISSULFURETO

1 - A LIGAÇÃO DISSULFURETO EM PÉPTIDOS E PROTEÍNAS NATURAIS

1.1 - INTRODUÇÃO

A ligação dissulfureto representa um aspecto estrutural importante em muitos péptidos e proteínas naturais. Entre estes compostos destaca-se um grande número de hormonas, enzimas e outros polipéptidos biologicamente activos (toxinas, inibidores, etc.) (Quadro 1) e também proteínas não fisiologicamente activas (tais como as queratinas, a fibrina de seda, etc.).

Para muitas hormonas, enzimas e ainda outros péptidos e proteínas biologicamente activos, está bem estabelecido que as respectivas ligações dissulfureto servem para estabilizar a conformação da cadeia polipeptídica resultante da interacção das cadeias laterais dos aminoácidos. Com efeito, a ruptura de todas as ligações dissulfureto dum péptido ou proteína conduz geralmente à destruição da respectiva estrutura macromolecular natural e, portanto, à perda de actividade biológica. Em alguns produtos naturais, todavia, parece ser possível a ruptura de algumas ligações S-S, sem que haja redução das respectivas actividades [5,71,105].

É pois atribuído à ligação S-S um papel de relevo na manutenção da actividade biológica, se bem que, para uma determinada proteína, as respectivas ligações dissulfureto podem não ser todas igualmente importantes para manter a conformação biologicamente activa.

QUADRO 1 - Alguns produtos naturais que contêm ligações dissulfureto

Composto	*Nº de ligações dissulfureto*	*Classificação bioquímica*
Malformina	1	Toxina
Apamina	2	Toxina
Ocitocina	1	Hormona
Vasopressina	1	Hormona
Calcitocina	1	Hormona
Somatotropina	2	Hormona
Insulina	3	Hormona
Desoxirribonucléase	2	Enzima
Ribonucléase	4	Enzima
Lisozima	4	Enzima
Tripsina	6	Enzima
Quimotripsina	5	Enzima
Inibidor da tripsina pancreática	3	Inibidor
Inibidor da tripsina da semente de soja	2	Inibidor
Somatostatina	1	Inibidor

A importância da ligação dissulfureto em péptidos e proteínas naturais é ilustrada a seguir com os resultados mais significativos de investigações efectuadas com alguns produtos naturais: hormonas e enzimas.

1.2 - HORMONAS DA NEURO-HIPÓFISE

As hormonas do lobo posterior da glândula pituitária (neuro-hipófise) têm todas uma estrutura semelhante: são nonapéptidos que contêm uma ligação dissulfureto, formando um anel (Quadro 2).

Estas hormonas têm sido objecto de intenso trabalho de síntese. A utilidade de novos processos de síntese e de diversos grupos de protecção tem sido demonstrada, muitas vezes, através da sua aplicação em sínteses destes produtos naturais. Um grande número de modelos tem sido também preparado com o fim de estudar relações entre estrutura e actividade. No que se refere, em particular, a duas possíveis acções da ligação dissulfureto - funcional e estérea - tem interesse mencionar os resultados obtidos com a síntese de:

a) - Modelos cíclicos (por exemplo, da ocitocina [53,56,66], da arginina-vasopressina [36,54] e da lisina-vasopressina [36]) em que um ou os dois átomos de enxofre da ligação dissulfureto foram substituídos por grupos metileno.

b) - Modelos acíclicos (por exemplo, da ocitocina [78,85], da arginina-vasopressina [50] e da lisina-vasopressina [50]) em que os resíduos de cisteína foram substituídos por resíduos de alanina ou serina.

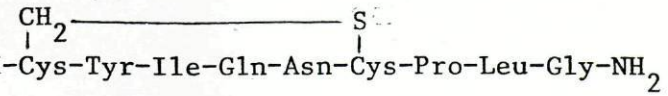
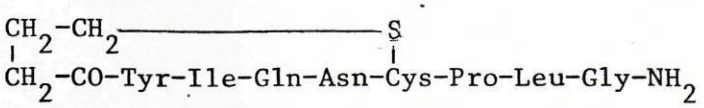
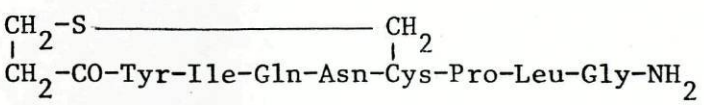
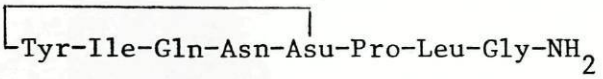
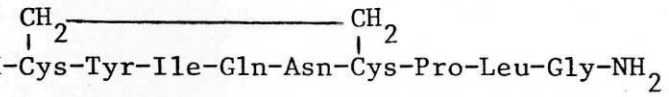
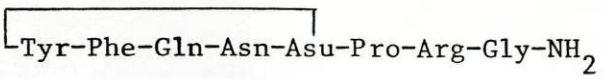
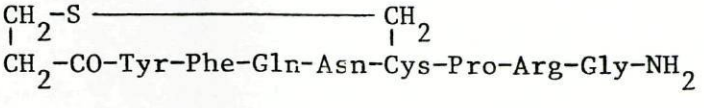
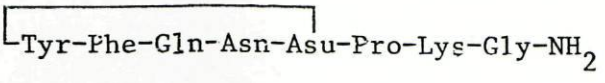
Enquanto os modelos cíclicos mostraram ser biologicamente activos, os modelos acíclicos não apresentaram actividade biológica (Quadro 3).

Estes resultados levaram a concluir que a ligação dissulfureto, embora não participe no mecanismo de acção daquelas hormonas é, no entanto, fundamental para manter a conformação biologicamente activa das referidas hormonas.

QUADRO 2 - Hormonas naturais da neuro-hipófise

Hormona	*Estrutura*
Arginina-vasopressina	H-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH_2
Lisina-vasopressina	H-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly-NH_2
Ocitocina	H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH_2
Arginina-vasotocina ([Arg^8] ocitocina)	H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH_2
Isotocina ([Ser^4, Ile^8] ocitocina)	H-Cys-Tyr-Ile-Ser-Asn-Cys-Pro-Ile-Gly-NH_2
Mesotocina ([Ile^8] ocitocina)	H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Ile-Gly-NH_2
Glumitocina ([Ser^4, Gln^8] ocitocina)	H-Cys-Tyr-Ile-Ser-Asn-Cys-Pro-Gln-Gly-NH_2

QUADRO 3 - Alguns modelos de síntese das hormonas da neuro-hipófise, com o sistema dissulfureto modificado ou ausente

Hormona	*Modelo sintetizado*	*Actividade biológica*	*Ref.*[a]
Ocitocina		Activo	53
		Activo	91
		Activo	56
		Activo	55,66
		Activo	64
	H-Ala-Tyr-Ile-Gln-Asn-Ala-Pro-Leu-Gly-NH_2	Praticamente inactivo	64,85
	H-Ser-Tyr-Ile-Gln-Asn-Ser-Pro-Leu-Gly-NH_2	Praticamente inactivo	85,78
Arginina-vasopressina		Activo	36
		Activo	54
	H-Ala-Tyr-Phe-Gln-Asn-Ala-Pro-Arg-Gly-NH_2	Praticamente inactivo	50
Lisina-vasopressina		Activo	36
	H-Ala-Tyr-Phe-Gln-Asn-Ala-Pro-Lys-Gly-NH_2	Praticamente inactivo	50

1.3 - INSULINA

A insulina, hormona produzida no pâncreas, é constituída por duas cadeias peptídicas A e B, apresentando três ligações dissulfureto, uma na cadeia A (A6-A11) e duas entre as cadeias A e B (A7-B7 e A20-B19) (Fig. 1).

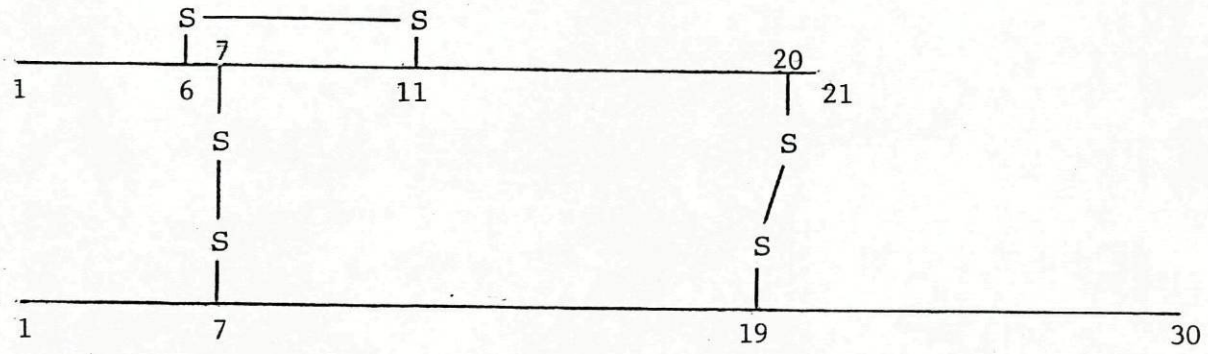


Figura 1. Representação esquemática das ligações dissulfureto na insulina

Várias equipas de investigação se têm dedicado ao problema da síntese da insulina. A metodologia que tem sido seguida na síntese desta hormona é referida no capítulo seguinte. Note-se desde já, que, dada a complexidade da sua estrutura, só em 1974 o problema da síntese da insulina foi resolvido satisfatoriamente.

No caso desta hormona está bem estabelecido que a ruptura das três ligações dissulfureto provoca a sua total desactivação [97]. Não está ainda inteiramente esclarecida, no entanto, a contribuição parcial de cada uma delas para a estabilização da conformação biologicamente activa da hormona.

Os estudos efectuados neste domínio são ainda em reduzido número, só se tendo chegado a conclusões definitivas no que se refere ao papel da ligação dissulfureto A6-A11 na estabilização da conformação biologicamente activa da hormona. No caso desta ligação dissulfureto, citam-se,a seguir,os resultados mais significativos de investigações realizadas.

a) ZAHN e seus colaboradores [14] efectuaram a ruptura selectiva da ligação dissulfureto A6-A11 da insulina por redução electroquímica em HCl 0,1 M, contendo isopropanol. Por carboximetilação subsequente obtiveram a A6,A11-bis(S-carboximetil)-insulina. Este derivado apresentava 10% da actividade biológica da insulina.

b) KATSOYANNIS e seus colaboradores [61], por sua vez, sintetizaram um modelo da insulina em que os resíduos de cisteína nas posições A6 e A11 foram substituídos por resíduos de alanina, eliminando assim o sistema dissulfureto da cadeia A. Este modelo apresentava também cerca de 10% da actividade biológica da insulina.

Dos resultados acabados de referir pode-se concluir que a ligação dissulfureto A6-A11, não sendo absolutamente necessária para a manifestação da actividade biológica da insulina, dá, no entanto, uma contribuição muito importante para a estabilização da conformação da hormona natural.

No que se refere à ligação dissulfureto A7-B7, foram realizados alguns trabalhos de investigação, na escola de ZAHN, com o fim de determinar a relação entre esta ligação e a actividade da insulina.

Para isso, os investigadores da referida escola efectuaram a ruptura dessa ligação na hormona natural, em diferentes condições, obtendo derivados da insulina substituídos com diferentes grupos [14,18] (carboximetilo, sulfonato, carboximetiltio), nas posições A7 e B7, os quais mostraram ser biologicamente activos. Os valores de actividade determinados eram, no entanto, diferentes de derivado para derivado. Não foi possível explicar a discrepância dos resultados obtidos com os diferentes grupos, nem estabelecer a relação entre a sua estrutura e a redução de actividade da hormona natural. Parece portanto ser necessário, ainda, a síntese de modelos adequados que permitam tirar conclusões mais precisas sobre a contribuição efectiva da ligação dissulfureto A7-B7.

As novas estratégias recentemente desenvolvidas para a síntese da insulina, as quais parecem poder estender-se também à sín-

tese de modelos, irão provavelmente permitir estudos decisivos no âmbito das relações estrutura-actividade biológica desta hormona.

1.4 - CALCITOCINA

A calcitocina é uma hormona cuja estrutura primária consiste numa cadeia peptídica de 32 aminoácidos, contendo uma ligação dissulfureto intramolecular (Fig. 2).

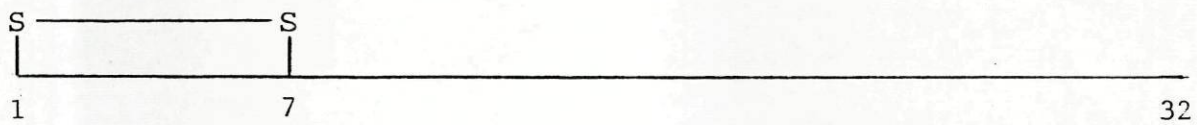


Figura 2. Representação esquemática da ligação dissulfureto na calcitocina

Esta hormona tem uma acção hipocalcémica, sendo segregada, nos mamíferos, pela glândula tiroíde.

No quadro 4 estão representadas as estruturas primárias de calcitocinas de três espécies. Com é habitual para outras hormonas, a sequência de aminoácidos varia de espécie para espécie, mantendo-se neste caso, apenas nove posições constantes.

Estudos efectuados recentemente com a calcitocina humana[89], sobre relações estrutura-actividade parecem indicar um grande paralelismo entre os resultados obtidos com modelos da calcitocina e os observados com modelos semelhantes das hormonas da neuro-hipófise.

Em particular, tal como para a ocitocina e as outras hormonas do lobo posterior da pituitária, a ligação dissulfureto parece ser fundamental à manifestação de actividade biológica da calcitocina.

QUADRO 4 - Sequência de aminoácidos de algumas calcitocinas

a) Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH_2

1 7 32

b) Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Ser-Ala-Tyr-Trp-Arg-Asn-Leu-Asn-Asn-Phe-His-Arg-Phe-Ser-Gly-Met-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu-Thr-Pro-NH_2

1 7 32

c) Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH_2

1 7 32

a) Calcitocina humana b) Calcitocina do porco c) Calcitocina do salmão

* Aminoácidos comuns às três sequências

Assim, verificou-se que a ruptura da ligação S-S na calcitocina do porco conduzia à inactivação desta hormona [16]. Por outro lado, confirmando o resultado anterior, verificou-se também que um modelo de síntese, acíclico, onde os resíduos de cisteína foram substituídos por normetionina, apresentava uma actividade biológica drasticamente reduzida [89] (0,18% da actividade da hormona natural).

É curioso notar que foi através da síntese, com elevado rendimento, do fragmento 1-9 da calcitocina do porco que KAMBER e RITTEL [60] demonstraram a eficácia da utilização de iodo em metanol, como método de conversão de péptidos protegidos contendo S-tritil-cisteínas em péptidos de cistina (ver 2.3.2).

1.5 - SOMATOTROPINA

A somatotropina é uma hormona produzida no lobo anterior da glândula pituitária. Esta hormona, cuja principal acção consiste em promover o crescimento somático, é também designada por "hormona do crescimento".

A estrutura primária da somatotropina humana consiste numa sequência de 191 aminoácidos numa única cadeia polipeptídica, apresentando duas ligações dissulfureto intramoleculares [6] (Fig.3).

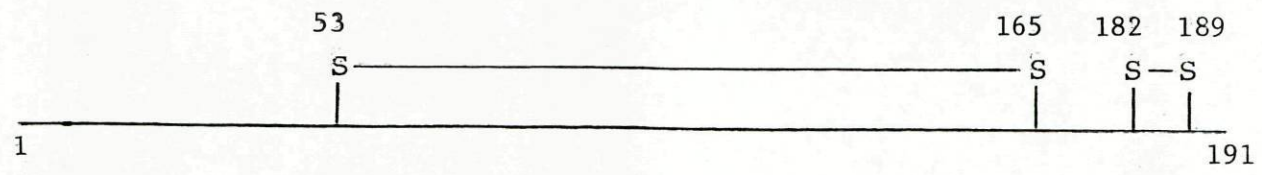


Figura 3. Representação esquemática das ligações dissulfureto na somatotropina humana

Esta hormona apresenta a particularidade curiosa das respectivas ligações dissulfureto não serem indispensáveis à manifestação da sua actividade biológica.

Com efeito, BEWLEY e colaboradores [5] verificaram que a hormona totalmente reduzida e tetra-S-carbamidometilada retinha praticamente a mesma actividade que a hormona natural. Mais tarde, investigações efectuadas por GRÁF e colaboradores [32], vieram confirmar este resultado.

Todavia, o facto de o derivado carbamidometilado referido ser mais sensível ao ataque pela tripsina do que a hormona natural [5], permite atribuir às ligações S-S um papel que, não sendo tão decisivo como no caso das hormonas referidas anteriormente (1.2, 1.3 e 1.4), é ainda importante na estabilização da estrutura macromolecular da hormona contra acções perturbadoras.

1.6 - ENZIMAS

Várias enzimas contendo cistina têm sido objecto de estudos relativos ao papel das ligações S-S na estabilização das respectivas conformações naturais.

Estes estudos têm sido baseados em modificações químicas efectuadas nas enzimas naturais, por acção de reagentes devidamente escolhidos, que conduzem à ruptura de todas ou apenas algumas ligações dissulfureto.

As investigações efectuadas permitiram demonstrar que a ruptura de todas as ligações S-S de várias enzimas (ribonucléase, desoxirribonucléase, lisozima, tripsina, pepsina, etc.) leva ao desaparecimento completo da actividade biológica.

Para certas enzimas foi possível estabelecer condições de ruptura selectiva de algumas das suas ligações dissulfureto, tendo-se verificado, nalguns casos, uma retenção total da actividade (Quadro 5).

QUADRO 5 - Efeito sobre a actividade biológica, da ruptura selectiva de ligações S-S, em algumas enzimas

Enzima	*Nº total de ligações S-S*	*Nº de ligações S-S rompidas*	*Efeito sobre a actividade biológica*	*Ref.ª*
Ribonucléase	4	1	retenção total	105
		2	retenção total	79
Lisozima	4	1	retenção total	20
Tripsina	6	1	retenção de 80-90%	72
Desoxirribonucléase	2	1	retenção total	86

De entre as proteínas contendo cistina, cujas estruturas se conhecem, a enzima ribonucléase (Fig. 4) parece ter sido a mais intensamente estudada.

Os trabalhos de SELA e colaboradores [99] mostraram que as ligações dissulfureto estabilizam a conformação biologicamente activa desta enzima. Com efeito, estes investigadores verificaram que a ribonucléase era totalmente desactivada quando se efectuava a redução de todas as ligações S-S, por acção de ácido mercaptoacético.

Por outro lado, a actividade catalítica da enzima não depende de todas as ligações S-S. A ruptura selectiva da ligação dissulfureto na posição Cys65-Cys72 da cadeia peptídica foi efectuada por acção de 1,4-dimercapto-2,3-butanodiol [105]. A proteína parcialmente reduzida foi convertida num derivado dicarboximetilado ou dimercúrico do tipo ...S-Hg^+. Estes derivados mostraram não diferir da ribonucléase natural, quer nas propriedades catalíticas, quer na resistência ao ataque pela tripsina.

A ligação S-S anteriormente referida não é, portanto, indispensável à manifestação da actividade biológica da enzima.

Foi também efectuada a ruptura de duas ligações S-S da ribonucléase (uma entre os resíduos de cisteína nas posições 65 e 72 e outra entre os resíduos de cisteína nas posições 58 e 110), por acção de monotiofosfato de sódio [79]. A enzima assim modificada, embora apresentasse a mesma actividade que a ribonucléase natural com respeito ao ácido ribonucleico, mostrou-se mais sensível ao ataque pela tripsina. A ruptura das duas ligações referidas parece, portanto, provocar alterações conformacionais, responsáveis por uma diminuição da estabilidade da enzima.

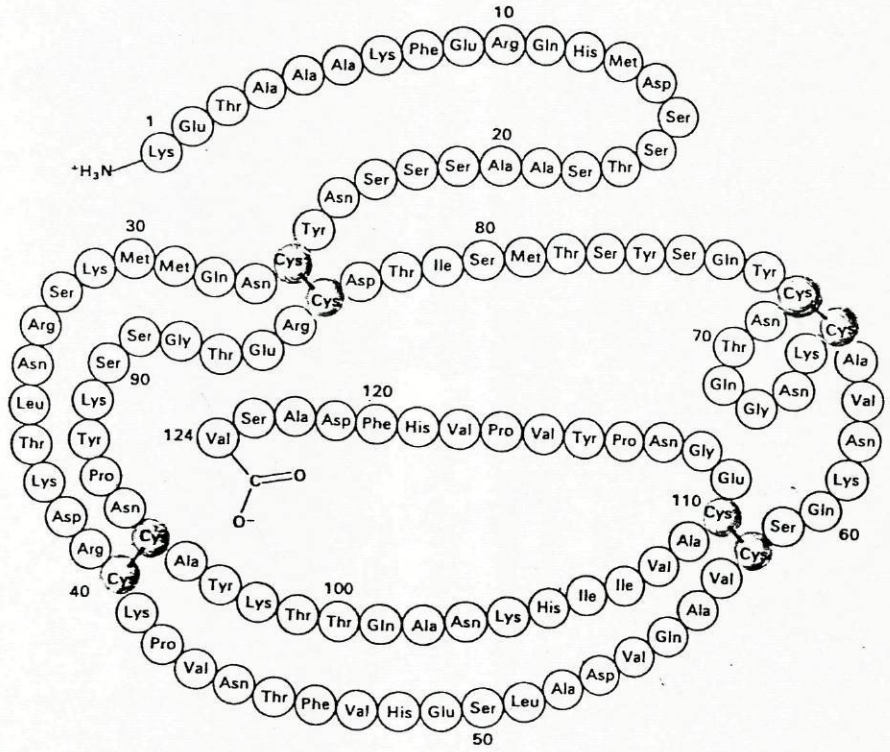


Figura 4. Estrutura primária da ribonucléase do pâncreas do boi

É interessante comparar os resultados acabados de referir com os estudos conformacionais efectuados por TAMBURRO e colaboradores [108], com base em espectros de dicroísmo circular, quer com a ribonucléase natural quer com a enzima total ou parcialmente reduzida.

Estes investigadores verificaram que o espectro de dicroísmo

circular da ribonucléase apresentava grandes alterações após redução de todas as suas ligações dissulfureto. Por outro lado, o espectro da enzima parcialmente reduzida (obtida por ruptura de duas ligações S-S, por acção de monotiofosfato de sódio [79]) mostrava-se muito semelhante ao da proteína natural.

Estes factos confirmam que a conformação é profundamente modificada por redução das quatro ligações S-S, não sendo, no entanto, significativamente afectada pela ruptura das duas ligações dissulfureto referidas.

Os mesmos autores [108] aplicaram ainda a mesma técnica espectrométrica ao estudo das conformações da lisozima total e parcialmente reduzida, tendo chegado a resultados semelhantes aos referidos para a ribonucléase.

Do conjunto de resultados mencionados pode concluir-se que, para a ribonucléase e outras enzimas, as ligações S-S se apresentam como elementos estruturais fundamentais à estabilização da estrutura macromolecular natural. A actividade biológica destas enzimas está, por consequência, intimamente relacionada com a existência das ligações S-S indicadas nas respectivas estruturas. Em algumas enzimas, nem todas as ligações dissulfureto se mostram indispensáveis à manifestação de actividade biológica. No entanto, elas devem contribuir para manter a conformação natural especialmente em condições tendentes a enfraquecer outros factores que a estabilizam.

1.7 - CONCLUSÕES

Foram referidos alguns resultados de investigações efectuadas, com o fim de estabelecer a importância das ligações dissulfureto na actividade biológica de péptidos e proteínas naturais.

Daí poder concluir-se que as ligações dissulfureto constituem, sem dúvida, um factor de estabilização das estruturas macromolecula-

res. Na maior parte dos casos, as ligações S-S têm um papel decisivo na manutenção da conformação biologicamente activa, uma vez que a ruptura dessas ligações provoca o desaparecimento da actividade biológica. Em alguns casos, porém, essa relação não é tão evidente uma vez que à ruptura das ligações dissulfureto não corresponde uma diminuição de actividade.

Os estudos referidos foram realizados quer directamente em produtos naturais nos quais se introduziram modificações estruturais adequadas, quer em modelos desses produtos obtidos por síntese. Este segundo processo permite tirar conclusões de maior confiança e, o facto de não ter sido utilizado em muitos casos, parece dever-se a uma de duas razões fundamentais:

a) não ter sido ainda possível encontrar um método de síntese desses produtos e seus modelos;
b) não serem totalmente satisfatórios (por exemplo, em rendimentos) os métodos de síntese já existentes.

O caso da insulina exemplifica a segunda razão apontada. Se bem que, desde 1963, algumas escolas tenham descrito a síntese desta hormona, só recentemente o problema da síntese desta proteína parece ter sido efectivamente resolvido com a estratégia desenvolvida pelo grupo de investigação da CIBA-GEIGY [104].

Outras equipas de investigação têm realizado um grande esforço no sentido de encontrar os melhores métodos de síntese de péptidos contendo cistina. Espera-se, consequentemente, um grande incremento nos estudos das relações estrutura-actividade de péptidos e proteínas contendo ligações dissulfureto.

No capítulo seguinte expõe-se a metodologia que tem sido geralmente seguida na síntese destes péptidos. Por último, apresenta-se o que foi realizado, como contribuição pessoal, no campo da metodologia da síntese de péptidos cíclicos de cistina.

2 - METODOLOGIA DA SÍNTESE DE PÉPTIDOS CÍCLICOS CONTENDO L-CISTINA

2.1 - INTRODUÇÃO

A síntese de péptidos cíclicos contendo L-cistina tem sido efectuada a partir da introdução nas cadeias peptídicas de resíduos de L-cisteína com os grupos tiol convenientemente protegidos. A desprotecção dos grupos SH e a formação de ligações dissulfureto são realizadas, oportunamente, de acordo com a estratégia de síntese estabelecida.

Nos casos em que na estrutura da cadeia peptídica aparece mais do que uma ligação dissulfureto, têm sido utilizadas as duas seguintes estratégias gerais:

a) Formação das ligações dissulfureto, numa só fase, por oxidação simultânea dos resíduos de cisteína da cadeia peptídica.

b) Formação das ligações dissulfureto, selectivamente, em passos diferentes da síntese.

A estratégia referida em a) foi a primeira a ser utilizada em várias sínteses de produtos naturais como, por exemplo, ribonucléase A, S-proteína da ribonucléase A, insulina e alguns modelos destas proteínas.

A segunda estratégia é mais recente e de aplicação mais geral, tendo sido já usada com êxito, por exemplo, na síntese da

insulina e de alguns isómeros desta hormona.

2.2 - FORMAÇÃO DAS LIGAÇÕES DISSULFURETO NUMA SÓ FASE

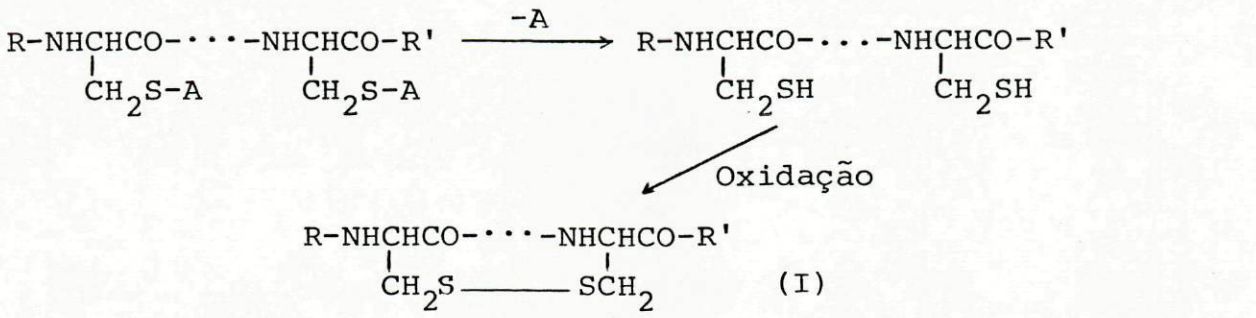
Numa síntese de péptidos cíclicos de L-cistina pela estratégia de formação das ligações dissulfureto numa só fase, introduzem-se na cadeia peptídica os resíduos de L-cisteína S-protegidos com o mesmo grupo de protecção. No final da síntese,após remoção desse grupo,as ligações dissulfureto são estabelecidas simultâneamente, por oxidação.

Este método, em princípio, pode dar misturas de produtos mais ou menos complexas, especialmente nos casos em que existem várias ligações S-S.

Referir-se-á,em primeiro lugar,a metodologia que tem sido geralmente seguida no caso mais simples da síntese de péptidos cíclicos de L-cistina com uma só ligação dissulfureto. O respectivo esquema de síntese não difere, fundamentalmente, do adoptado para o caso de péptidos de cistina, cíclicos, com duas ou mais ligações dissulfureto. Por outro lado, o facto de existir um grande número de produtos naturais e modelos com actividade biológica, contendo apenas uma ligação S-S intramolecular, parece justificar que seja apresentado o esquema que tem sido mais frequentemente seguido nas respectivas sínteses.

2.2.1 - Síntese de péptidos com uma só ligação dissulfureto intramolecular

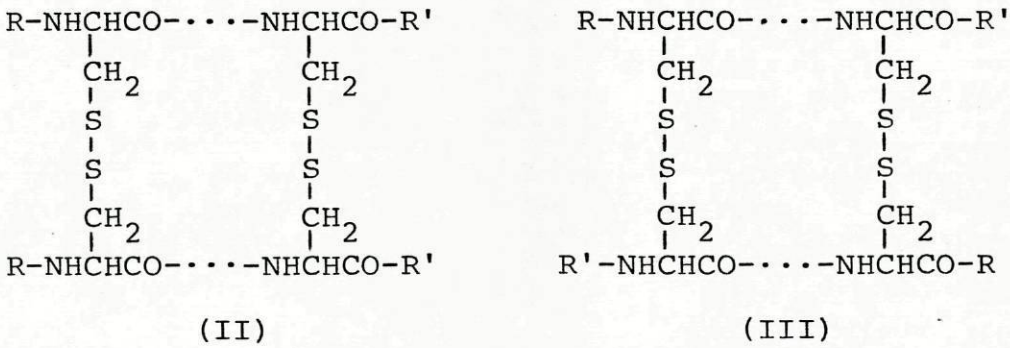
A síntese de péptidos que apresentam apenas uma ligação dissulfureto intramolecular, tem sido realizada de acordo com o esquema 1.



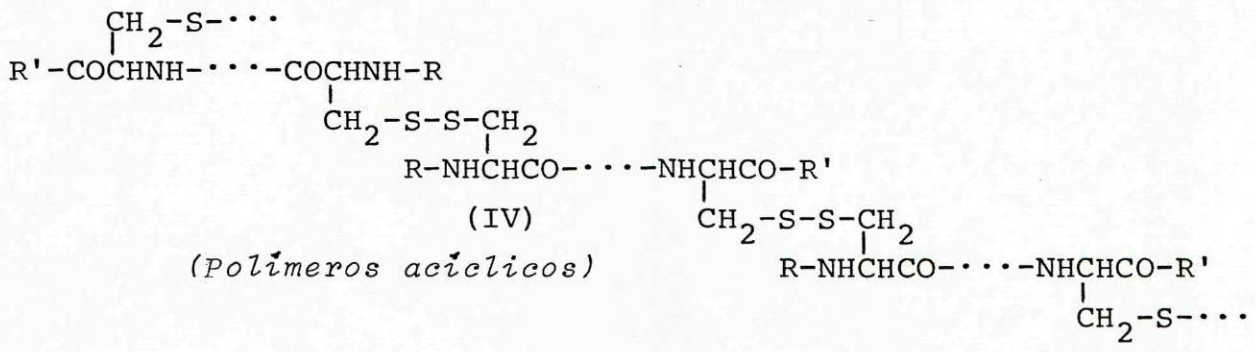
Esquema 1

Neste esquema, os dois resíduos de cisteína são introduzidos na cadeia peptídica com o grupo tiol protegido com o mesmo grupo de protecção (A). Uma vez sintetizada a cadeia, efectua-se a remoção da S-protecção e procede-se à oxidação dos grupos tiol.

A aplicação deste esquema pode conduzir, em princípio, não só ao monómero desejado (I) mas também a dímeros (II e III) e polímeros acíclicos (IV) e cíclicos.



(Dímero cíclico paralelo) *(Dímero cíclico antiparalelo)*



(Polímeros acíclicos)

+ (Outros polímeros cíclicos)

A oxidação em solução diluída, como é óbvio, favorece a reacção no sentido da formação do monómero.

2.2.1.1 - Protecção dos grupos tiol dos resíduos de cisteína

Diversos investigadores efectuaram a síntese da ocitocina e das outras hormonas da neuro-hipófise, baseando-se num esquema análogo ao referido (Esquema 1).

Assim, por exemplo, a primeira síntese da ocitocina realizada por DU VIGNEAUD e colaboradores [113] envolveu as seguintes fases fundamentais:

1 - Preparação do nonapéptido S,N-protegido, de cadeia aberta, de estrutura

$$Z\text{-}\underset{\underset{Bzl}{|}}{Cys}\text{-}Tyr\text{-}Ile\text{-}Gln\text{-}Asn\text{-}\underset{\underset{Bzl}{|}}{Cys}\text{-}Pro\text{-}Leu\text{-}Gly\text{-}NH_2$$

em que os grupos SH dos resíduos de cisteína estão protegidos pelo grupo benzilo.

2 - Remoção simultânea dos grupos de protecção N-benziloxicarbonilo e S-benzilo do péptido S,N-protegido, por acção de sódio em amoníaco líquido.

3 - Oxidação, pelo ar, do péptido livre com obtenção da ocitocina.

Outras sínteses desta hormona foram posteriormente realizadas quer ainda pela equipa de DU VIGNEAUD [12,11], quer por outros grupos de investigação [13,29,34,68,83,90,92,93,112,50a].

Em todas estas sínteses foram preparados nonapéptidos protegidos semelhantes ao referido, como intermediários chave, diferindo um caso de outro, apenas nos esquemas de síntese por fases utilizados.

Nas sínteses das hormonas da neuro-hipófise realizadas na

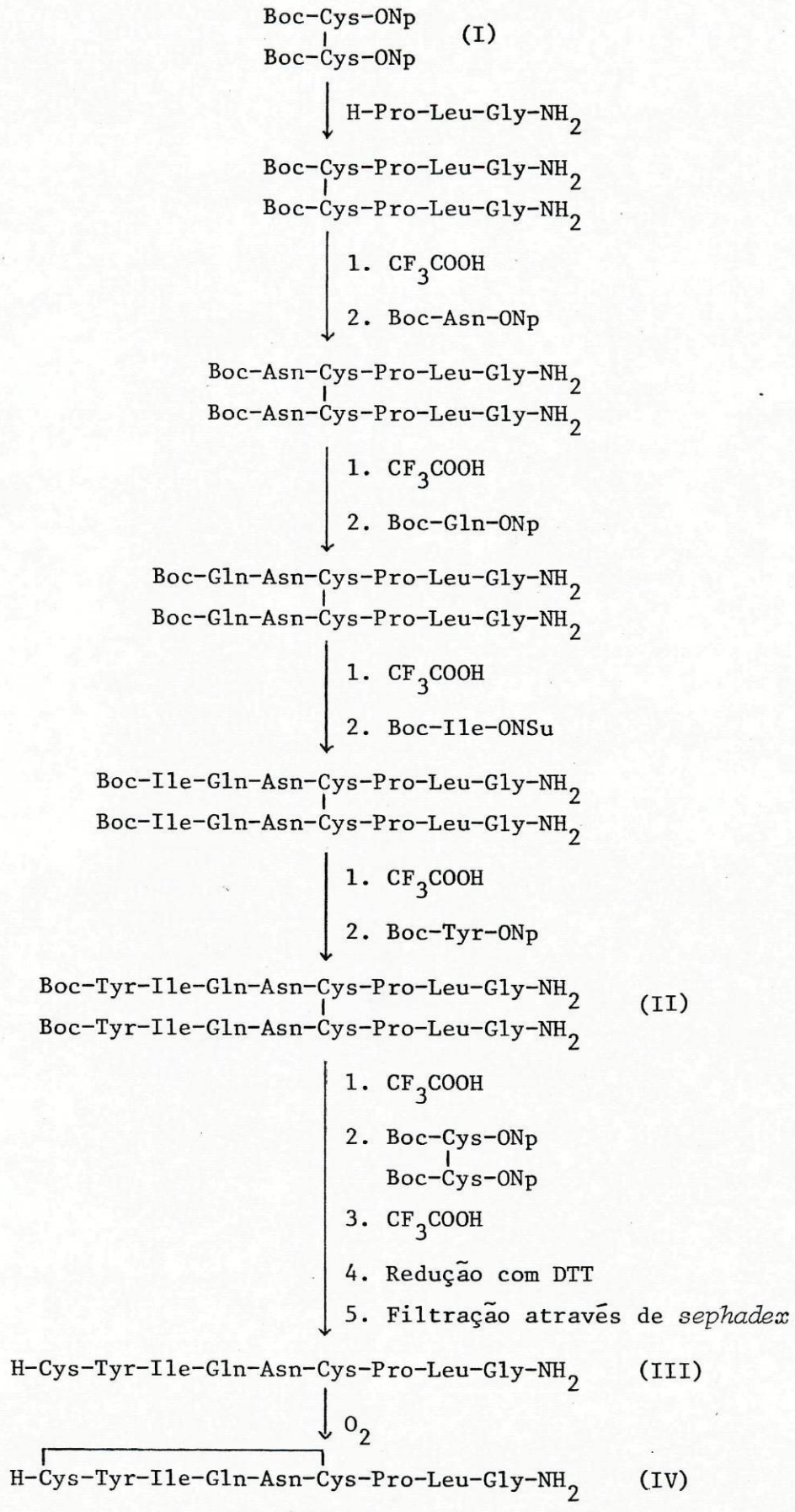
escola de DU VIGNEAUD, foi usado o grupo benzilo como S-protecção dos resíduos de cisteína. Embora este grupo tenha sido o mais frequentemente utilizado, outras equipas de investigação usaram ainda outros grupos de S-protecção na concretização das sínteses dos nonapéptidos. No quadro 1 apresenta-se, como exemplo, uma série de grupos de S-protecção utilizados em sínteses da ocitocina.

QUADRO 1 - Grupos de S-protecção utilizados em sínteses da ocitocina

Nome do Grupo	*Fórmula*	*Referência*
Benzilo	$C_6H_5CH_2$-	11,12,13,27,65,68,113
Benzoílo	C_6H_5CO-	83
Benziloxicarbonilo	$C_6H_5CH_2OCO$-	83
p-Metoxibenzilo	*p*-$MeOC_6H_4CH_2$-	29,92
Tritilo	$(C_6H_5)_3C$-	112
p-Metilbenzilo	*p*-$CH_3C_6H_4CH_2$-	73
Etiltio	EtS-	50a
Etilcarbamoílo	EtNHCO-	34

Além dos grupos de S-protecção indicados, há que referir ainda o uso de dissulfuretos simétricos de cistina, como alternativa para a S-protecção dos resíduos de cisteína. Nesta estratégia de protecção os resíduos de cisteína são introduzidos, indirectamente, na cadeia polipeptídica através de derivados de cistina simétricos.

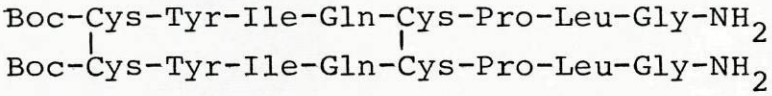
Os péptidos de cistina obtidos, no momento oportuno, são reduzidos a péptidos de cisteína com os grupos SH livres. Estes péptidos por sua vez, podem ser convertidos, se for conveniente, em derivados de cisteína adequadamente protegidos para uso poste-



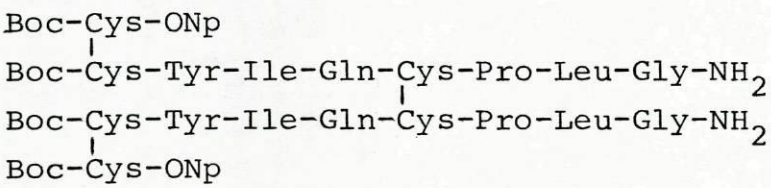
Esquema 2 - Síntese da ocitocina realizada por HASE e WALTER [37].

rior.

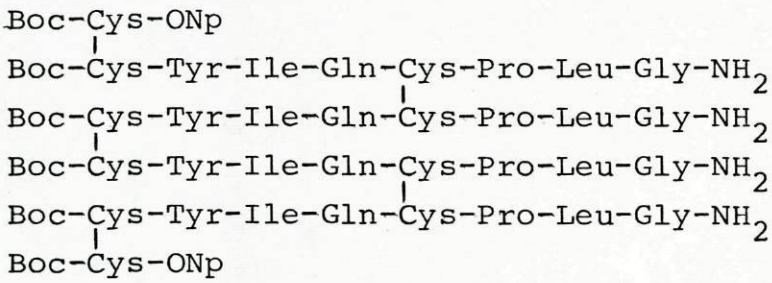
Em 1973, HASE e WALTER [37] apresentaram uma síntese da ocitocina, em que utilizaram esta estratégia de S-protecção (Esquema 2). Nesta síntese, o péptido simétrico de cistina (II) foi obtido por elongação conveniente da cadeia peptídica,a partir do derivado N,N'-bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistinato de bis(*p*-nitrofenilo) (I). O referido péptido (II), após remoção do grupo *terc*-butiloxicarbonilo, foi acilado por acção do mesmo derivado da L-cistina (I), tendo sido usada a proporção molar 1:2 respectivamente. Os produtos desta reacção poderiam ser, em princípio, os indicados a seguir (1), (2) e (3) ou ainda outros polímeros de massa molecular mais elevada.



(1)



(2)



(3)

No entanto, apesar de se poder obter uma mistura complexa de produtos, a remoção do grupo *terc*-butiloxicarbonilo seguida da redução das ligações S-S dos componentes da mistura obtida, conduziu predominantemente ao péptido (III),isto é, à ocitoceína,contendo dois resíduos de cisteína com os grupos SH livres (Esquema 2). Por oxidação do referido péptido (III),foi obtida a ocito-

cina, (IV).

É curioso notar que este tipo de S-protecção tenha sido já utilizado na preparação do tetrapéptido C-terminal da ocitocina [88], na primeira síntese daquela hormona em 1954.

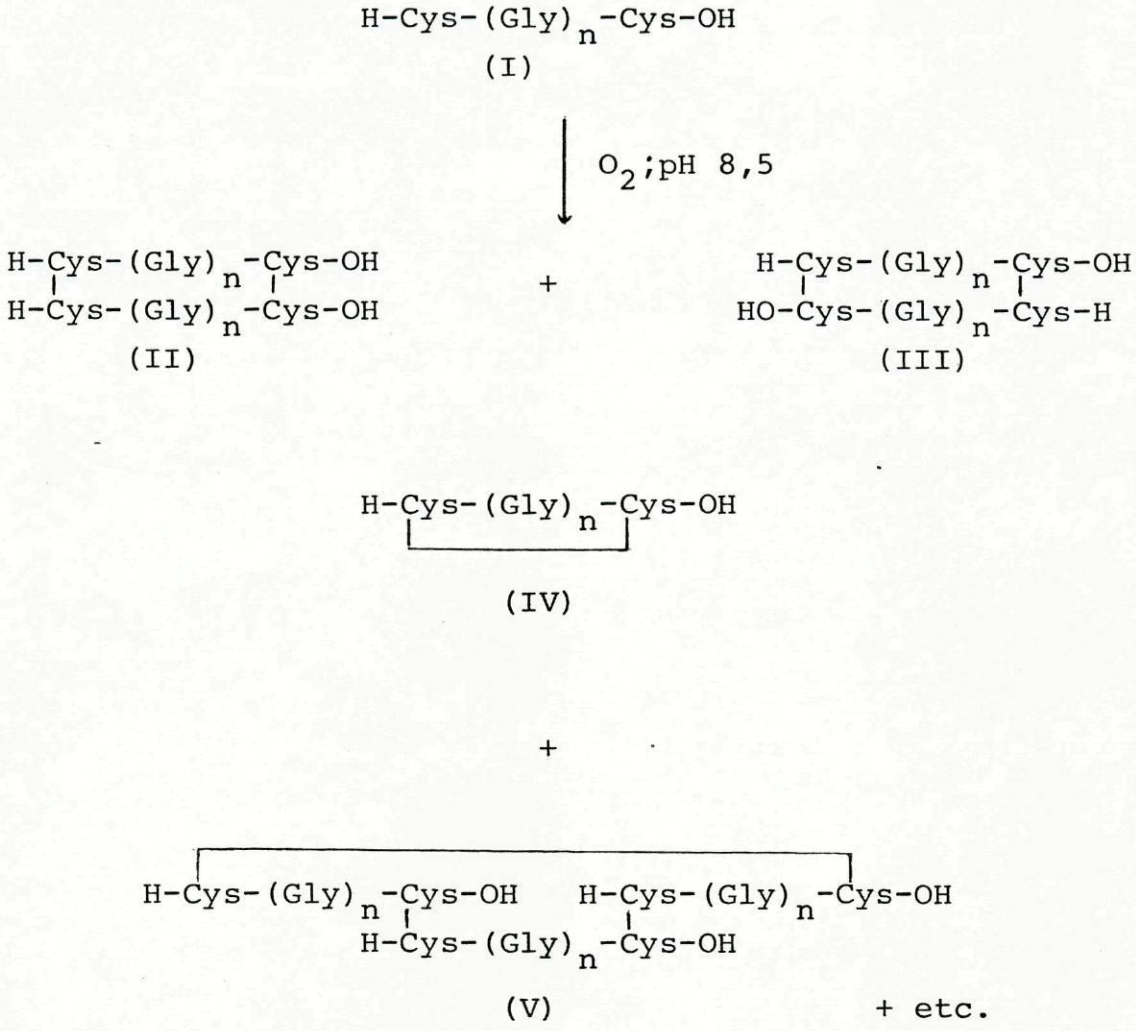
ZAHN e SCHMIDT [120] usaram também este método na síntese da cadeia B da insulina.

2.2.1.2 - Estudo da oxidação de péptidos modelos contendo cisteína

Como se disse, na síntese de péptidos com uma ligação dissulfureto intramolecular, como é o caso da ocitocina e das outras hormonas do lobo posterior da glândula pituitária, pode haver combinação de grupos SH de modo a dar outros produtos além do monómero.

Parece ser de interesse referir, neste ponto, as investigações efectuadas no sentido de avaliar a relação entre a natureza dos produtos de oxidação e o número de resíduos de aminoácidos existentes entre os dois resíduos de cisteína duma cadeia peptídica.

Estas investigações foram realizadas por RYDON e seus colaboradores [35,38,51,69] que estudaram a oxidação, pelo oxigénio do ar, de L-cisteinil-poliglicil-L-cisteína (I) (n= 1-9, 12 e 15). Conforme se indica no esquema seguinte (Esquema 3), são vários os produtos possíveis desta oxidação.



Esquema 3

No quadro 2 apresentam-se as percentagens de cada um dos produtos obtidos na oxidação de (I). Dos resultados mencionados pode-se inferir que:

- Em nenhum caso se forma o dímero paralelo. A formação preferencial do dímero antiparalelo deve-se provavelmente a interacções iónicas entre os grupos carboxilo e amino das duas cadeias.
- Os primeiros termos da série ($n \leqslant 3$), dão, por oxidação, misturas variáveis do monómero cíclico (IV) e de dímero antiparalelo (III), sendo este o produto principal.
- À medida que o número de resíduos de glicina aumenta ($n \geqslant 4$) o monómero cíclico (IV) torna-se o produto predominante. As respectivas

QUADRO 2 - Composição (%) dos produtos de oxidação de H-Cys-(Gly)$_n$-Cys-OH

n	*Monómero(IV)*	*Dímero antiparalelo(III)*	*Dímero paralelo(II)*	*Trímero e/ou superior*	*Ref.*[a]
1	—	80	—	—	38
2	15	20	—	25	38
3	40	55	—	—	38
4	90	—	—	—	38,69
	75	15	—	10	35
5	90	—	—	—	51
	65	30	—	5	35
6	90	—	—	—	51
7	65	25	—	10	35
8	45	—	—	—	35
9	75	25	—	—	35
12	80	20	—	—	35
15	45	—	—	—	35

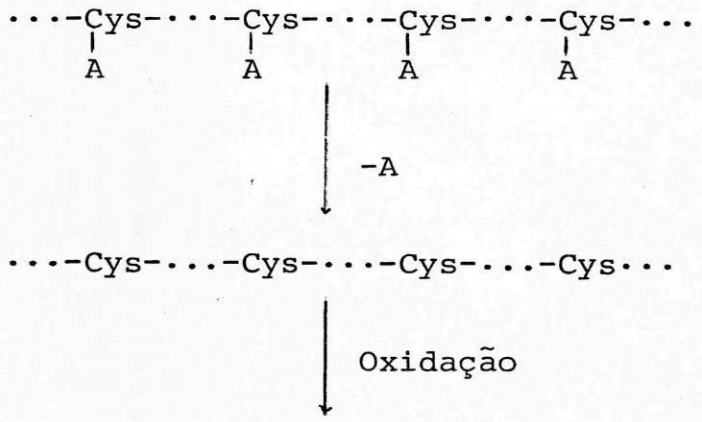
percentagens estão de acordo com as calculadas por uma teoria estatística segundo a qual a natureza dos produtos de oxidação é controlada, principalmente, pela probabilidade de encontro dos dois grupos tiol. Dada a insuficiente flexibilidade dos primeiros termos da série, a teoria referida não é aplicável a estes casos.

Dos resultados acima apresentados, os autores concluem, ainda, que a natureza dos produtos de oxidação para outros ditióis semelhantes depende, principalmente, da probabilidade de encontro dos grupos tiol, desde que a cadeia peptídica que os une seja sufi -

cientemente longa (dezasseis ou mais ligações entre os dois átomos de enxofre). Note-se que a ocitocina e as outras hormonas da neuro-hipófise correspondem ao caso de n=4 em que o número de ligações entre os dois átomos de enxofre é dezanove. Isto pode explicar, em parte, que se obtenha, predominantemente, ocitocina (monómero) por oxidação da ocitoceína.

2.2.3 - Síntese de péptidos com duas ou mais ligações dissulfureto intramoleculares

A aplicação da estratégia de formação de ligações S-S, numa só fase, à síntese de péptidos contendo duas ou mais ligações dissulfureto, segue as linhas gerais adoptadas na síntese da ocitocina já referida, podendo ser assim esquematizada:



A-Grupo de S-protecção

Esquema 4

Neste esquema os resíduos de cisteína são também introduzidos na cadeia polipeptídica com os grupos tiol protegidos com o mesmo grupo de protecção. Uma vez sintetizada a cadeia polipeptídi-

ca, remove-se a S-protecção, procedendo-se em seguida à oxidação dos grupos tiol, com a formação simultânea de duas ou mais ligações dissulfureto.

A situação, neste caso da síntese de péptidos de cistina com duas ou mais ligações dissulfureto, é todavia mais complexa do que para o caso da ocitocina, com apenas uma ligação S-S.

Por exemplo, para a ribonucléase, com uma cadeia peptídica contendo oito resíduos de cisteína, poderiam obter-se, em princípio, por oxidação, 105 estruturas resultantes dos possíveis emparelhamentos dos resíduos de cisteína.

Todavia, experiências realizadas por ANFINSEN e colaboradores [3,99] mostraram ser possível oxidar a ribonucléase, previamente reduzida, de modo a restaurar largamente os emparelhamentos originais dos resíduos de cisteína, obtendo a ribonucléase inicial biologicamente activa. Estas observações levaram a estabelecer que a sequência natural de aminoácidos dum péptido ou duma proteína contém toda a informação necessária ao controlo da conformação (certamente, a conformação mais estável) e portanto ao emparelhamento correcto dos resíduos de cisteína [3a,107].

Isto, em princípio, significa que, uma vez obtida a sequência natural dum péptido ou proteína, se pode utilizar o método da oxidação simultânea com relativo êxito.

A aplicação deste método, por exemplo, nas sínteses da ribonucléase A [28,33] da S-proteína da ribonucléase A [39], do polipéptido inibidor da tripsina pancreática [109] e da apamina [111] parece confirmar a hipótese de ANFINSEN.

2.2.4 - Síntese de péptidos com duas ou mais ligações dissulfureto intermoleculares

O método de oxidação simultânea tem sido também aplicado na síntese de péptidos contendo ligações S-S entre duas cadeias peptídicas independentes.

A aplicação deste método à síntese da insulina tem sido perspectivada segundo duas vias:

a) Formação das ligações S-S por combinação das duas cadeias A e B separadas.

Várias equipas de investigação [63,67,76], efectuaram a síntese da insulina utilizando esta estratégia.

Por exemplo, a síntese da insulina efectuada por KATSOYANNIS e colaboradores [63] (Esquema 5), envolveu as seguintes fases:

1) Síntese de cada uma das cadeias A e B com os resíduos de cisteína S-sulfonados.
2) Tiólise da cadeia A com excesso de tiol (mercaptoetanol) para obtenção desta cadeia com os grupos SH livres.
3) Oxidação pelo ar, a pH 9,6, duma mistura das cadeias A (com os grupos SH livres) e B (na forma S-sulfonato), formando-se as ligações S-S, simultâneamente, com obtenção da insulina.

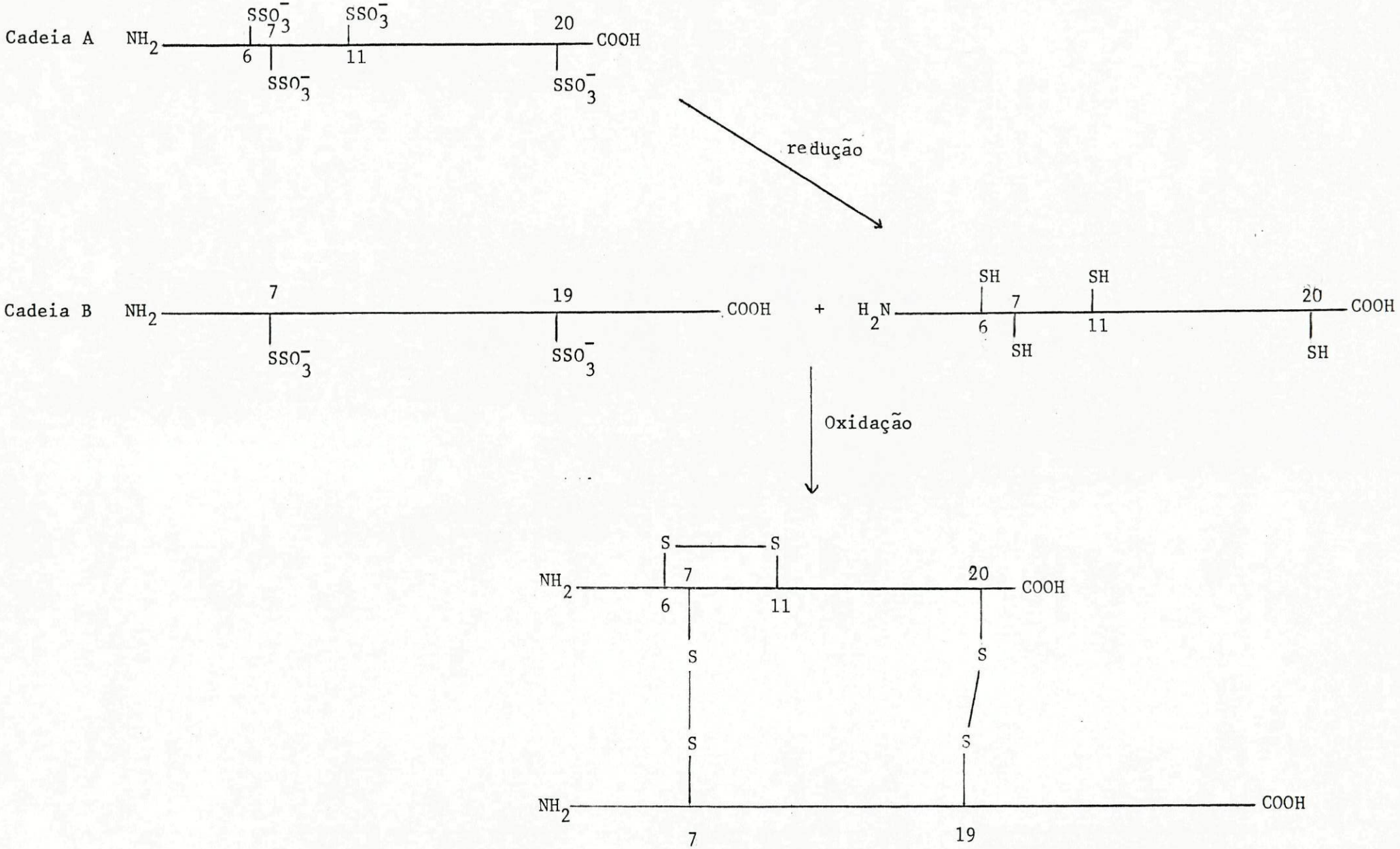
A síntese da mesma hormona foi efectuada também por oxidação, pelo ar, duma mistura de duas cadeias A e B, ambas com os grupos SH livres [67,76].

Em qualquer dos casos referidos, as três ligações dissulfureto da insulina são formadas ao mesmo tempo e ao acaso no passo final da síntese.

Várias equipas de investigação [24,52,62,118,119] procuraram estabelecer as condições óptimas de combinação das cadeias com vista à obtenção de melhores rendimentos em insulina. Todavia, a aplicação do método de oxidação simultânea à síntese da hormona referida, parece não ter levado a um rendimento superior a 20% [31,63], no processo de combinação das cadeias de síntese.

b) Síntese via "mini-proinsulina", isto é, formação das ligações S-S da insulina, por combinação das duas cadeias A e B unidas por uma "ponte" de ligação (Fig. 1)

Com a elucidação do processo de biossíntese da insulina [106], através de uma cadeia percursora única - proinsulina (Fig. 2) - - e, ainda, com o conhecimento do arranjo espacial das duas ca-



Esquema 5 - Síntese da insulina[63] por interacção da cadeia B (na forma S-sulfonato) com a cadeia A (com os grupos SH livres).

deias A e B na molécula de insulina [9], surgiu uma perspectiva de melhores resultados no processo de síntese desta hormona.

Nos cristais da insulina, o grupo α-amino do resíduo de glicina na posição 1 da cadeia A (Gly A1) e o grupo ε-amino do resíduo de lisina na posição 29 da cadeia B (Lys B29) estão muito próximos[9].

Com base nestes factos alguns investigadores [70] sugeriram que se estudasse a possibilidade de sintetizar uma insulina com as cadeias A e B unidas através dos referidos grupos amino, por uma "ponte" de ligação, obtendo-se assim um modelo da proinsulina (Fig. 1).

Verificou-se que estas mini-proinsulinas após redução e reoxidação originavam os derivados iniciais com rendimento elevado [15].

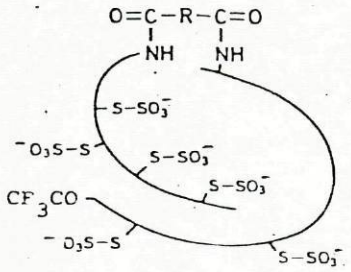
Em face destes factos e sugestões, alguns investigadores [30] prepararam a insulina a partir duma mini-proinsulina (Fig. 1) de acordo com um esquema que envolve os seguintes passos:

1) Estabelecimento duma ponte de ligação entre os grupos amino atrás mencionados das cadeias A e B(S-sulfonadas);
2) Tiólise, com mercaptoetanol, dos grupos SSO_3^- das cadeias A e B;
3) Oxidação, pelo ar, com formação das ligações dissulfureto;
4) Remoção da "ponte" referida em 1).

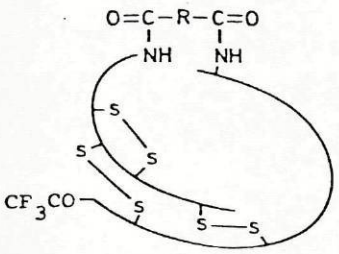
Com é evidente, os reagentes a utilizar para se estabelecer a ponte de ligação têm de ser tais que essa ponte possa ser removida no final da síntese sem provocar qualquer dano nas ligações peptídicas ou dissulfureto.

Vários reagentes têm sido propostos para este fim [17,30,80]. GEIGER e OBERMEIER [30], no processo de síntese acima esquematizado, usaram o ácido 2,7-diaminooctanodióico, o qual é removível nas condições de degradação de EDMAN.

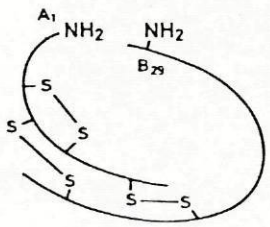
A síntese total da insulina, via mini-proinsulina, parece, no entanto, não ter sido ainda realizada. A equipa de investigação que efectuou a síntese acima referida utilizou derivados S-sulfonato das cadeias naturais A e B. Uma síntese total impli-



1) Tiólise
2) Oxidação



1) CF_3COOH
2) Degradação de Edman
3) Piperidina



R = $-CH-(CH_2)_4-CH-$
NH-Boc NH-Boc

Figura 1. Síntese da insulina via "mini-proinsulina"[30]

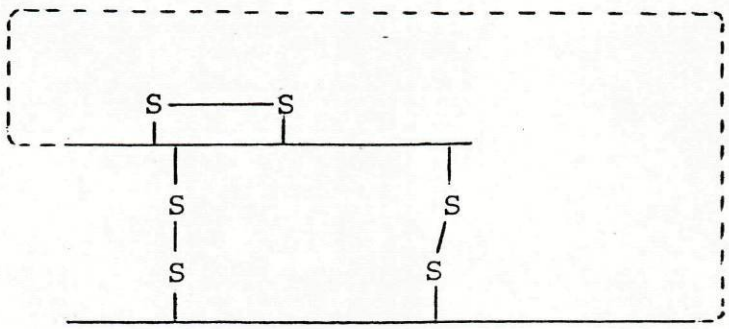


Figura 2. Representação esquemática da proinsulina. No processo de conversão da proinsulina em insulina separa-se uma cadeia peptídica de 33 aminoácidos, representada a traço interrompido.

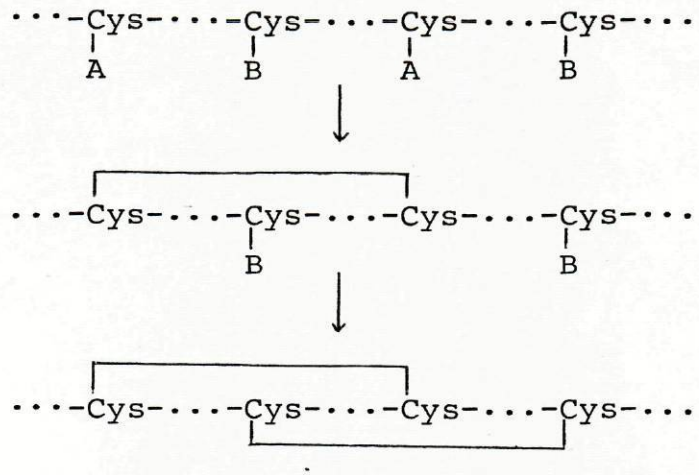
cará a utilização de cadeias A e B obtidas também por síntese.

Entretanto, o problema da síntese total da insulina viria a ser resolvido [103], com bons resultados, através da estratégia de formação das ligações dissulfureto por fases.

2.3 - FORMAÇÃO SELECTIVA DE LIGAÇÕES DISSULFURETO EM DIFERENTES FASES

A síntese de péptidos cíclicos de cistina, segundo a estratégia de formação das ligações S-S, por fases, foi iniciada por ZERVAS e PHOTAKI [121] e tem sido desenvolvida, principalmente, por HISKEY e colaboradores [43,47] e pelo grupo de investigação da CIBA-GEIGY [59,102,103,104].

A formação selectiva de ligações dissulfureto pode ser resumida do seguinte modo (Esquema 6):



A, B - Grupos de protecção selectivamente removíveis

Esquema 6

A aplicação deste esquema de síntese exige a utilização de grupos de S-protecção (A,B,...) selectivamente removíveis e cujas condições de remoção não afectem, evidentemente, nem as ligações peptídicas nem qualquer ligação dissulfureto já existente.

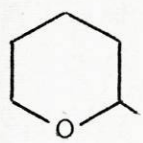
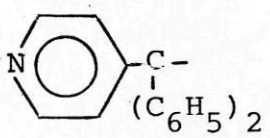
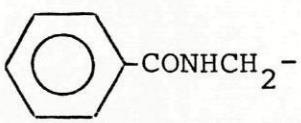
Os progressos realizados na síntese de péptidos cíclicos de cistina, com formação das ligações dissulfureto por fases, devem-se sem dúvida ao estudo e aplicação de métodos de remoção selectiva de grupos de protecção. A utilização de métodos de conversão oxidativa directa de grupos SH protegidos em dissulfuretos foi, talvez, o que mais contribuíu para um largo incremento desta estratégia.

2.3.1 - Grupos de S-protecção usados

Actualmente dispõe-se de um número considerável de grupos de protecção da função tiol cujas condições de remoção selectiva foram devidamente estudadas. No quadro 3 apresentam-se alguns destes grupos de S-protecção. Os grupos tritilo, benzidrilo, acetamidometilo e benzoílo parecem ter sido os mais frequentemente

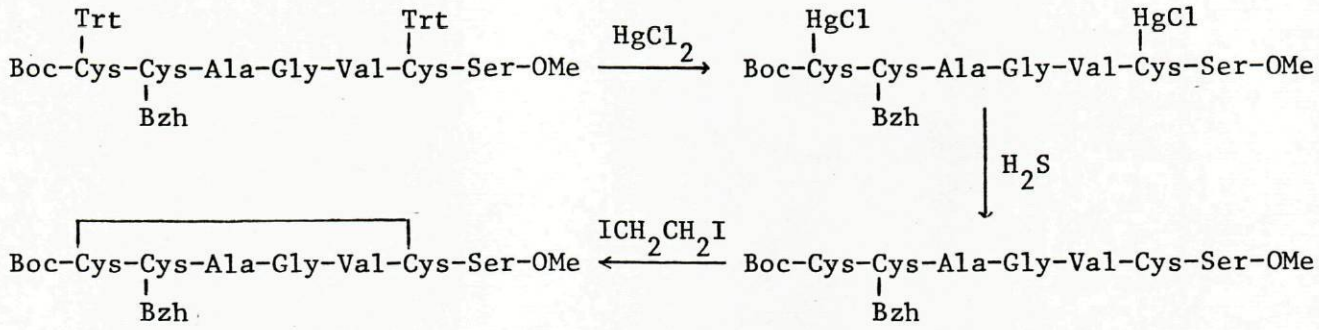
utilizados.

QUADRO 3

$(C_6H_5)_3C-$	$(C_6H_5)_2CH-$	C_6H_5CO-
Tritilo	Benzidrilo	Benzoílo
$CH_3CONHCH_2-$	$CH_3O-C_6H_4-CH_2-$	$(CH_3)_3C-S-$
Acetamidometilo	*p*-Metoxibenzilo	*terc*-butiltio
	EtNHCO-	$(CH_3)_2CHCH_2OCH_2-$
Tetra-hidropiranilo	Etilcarbamoílo	Isobutiloximetilo
CH_3CH_2S-		
Etiltio	Difenil-4-piridilmetilo	Benzamidometilo

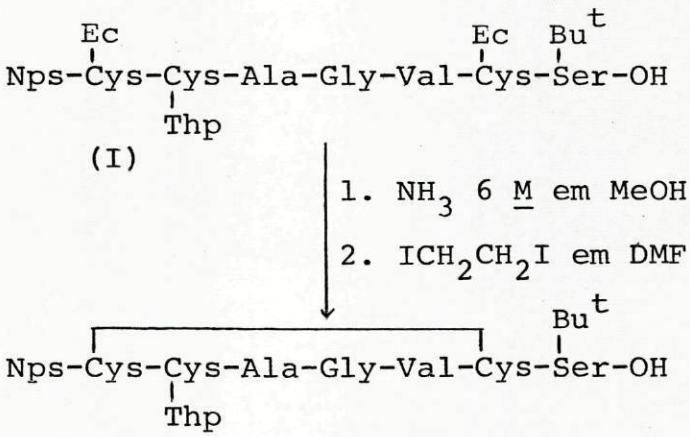
A formação selectiva de uma ligação dissulfureto foi conseguida, pela primeira vez[22,122], num péptido contendo três resíduos de cisteína protegidos com os grupos S-tritilo e S-benzidrilo (Esquema 7).

O primeiro destes grupos foi removido, selectivamente, por acção sucessiva de cloreto de mercúrio (II) e sulfureto de hidrogénio. A ligação dissulfureto foi formada, a seguir, por acção de 1,2-diiodoetano sobre o péptido obtido com dois grupos SH livres.



Esquema 7

Posteriormente, outros investigadores resolveram problemas semelhantes a este, na síntese de fragmentos da cadeia A da insulina, quer utilizando outros métodos de remoção selectiva, quer usando outros grupos de S-protecção [41,103,115]. Assim, por exemplo, a síntese do fragmento da cadeia A da insulina (II) a partir do péptido (I) foi efectuada [115], utilizando condições de remoção selectiva do grupo etilcarbamoílo (Ec) na presença do grupo tetra-hidropiranilo (Thp) (Esquema 8).



(II)

Esquema 8

2.3.2 - Métodos de conversão oxidativa directa de grupos SH protegidos em dissulfuretos

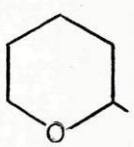
A remoção, com oxidação simultânea, das S-protecções tem sido efectuada por dois processos:

a) Por acção de tiocianogénio ou sulfeniltiocianatos.

O estudo da conversão oxidativa directa em dissulfuretos, de certos tioéteres e hemitioacetais, foi realizada por HISKEY e colaboradores [44,45,46,48].

Estes investigadores verificaram ser possível a conversão directa em dissulfuretos, por acção de tiocianogénio, de grupos SH protegidos com os seguintes grupos: tritilo, benzidrilo, tetra-hidropiranilo e isobutiloximetilo.

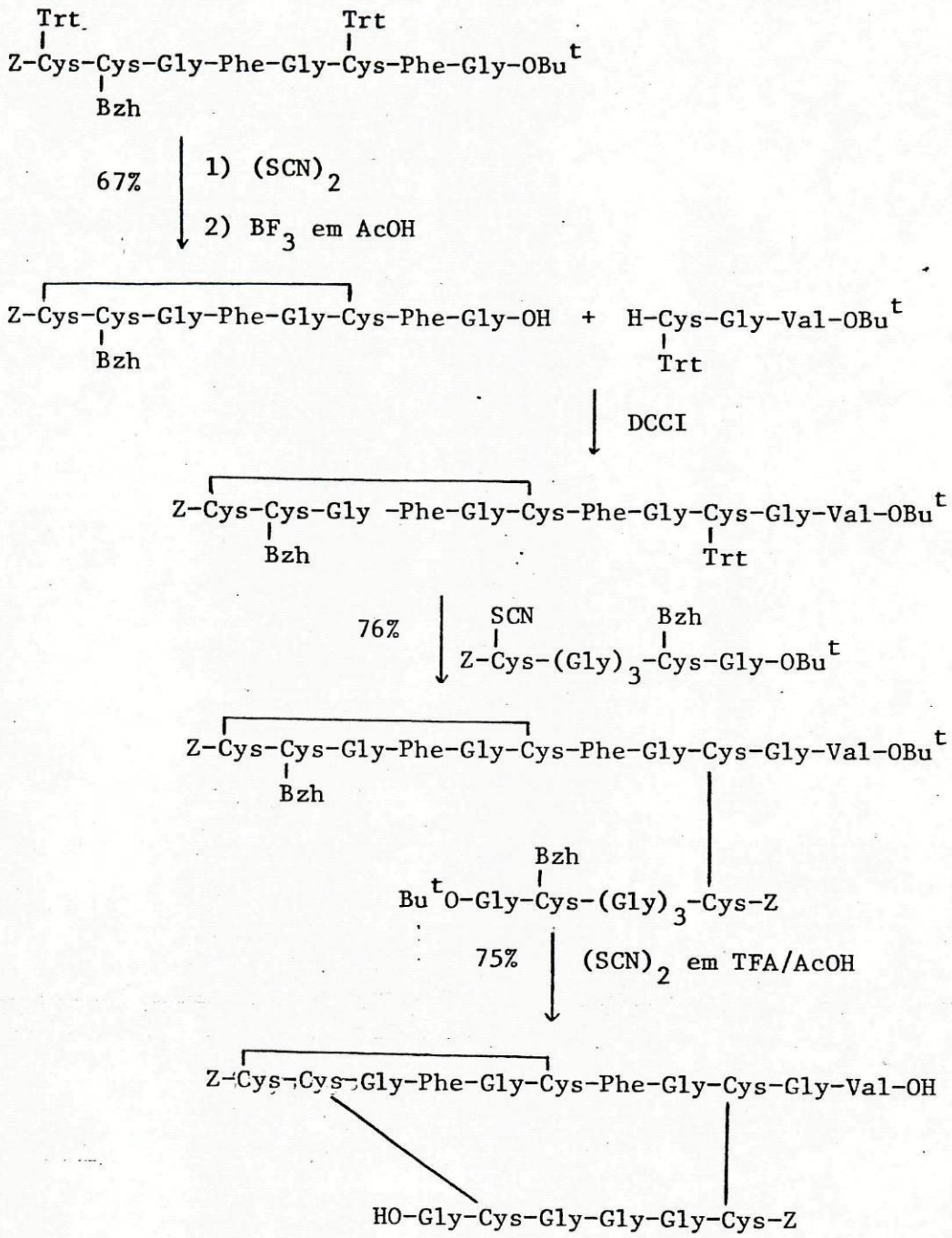
$$R\text{-}S\text{-}X \xrightarrow{(SCN)_2} R\text{-}S\text{-}SCN \xrightarrow{R'\text{-}S\text{-}X} R\text{-}S\text{-}S\text{-}R' + X\text{-}SCN$$

$$X = H, (C_6H_5)_3C\text{-}, (C_6H_5)_2CH\text{-}, \text{  }, (CH_3)_2CHCH_2OCH_2\text{-}$$

SCHRÖDER e LÜBKE [87a], por outro lado, verificaram também ser possível a remoção, por acção de tiocianogénio, do grupo S-acetamidometilo de resíduos de cisteína.

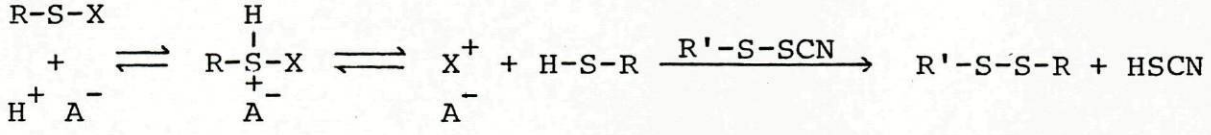
Parece que a reacção de tiocianogénio ou sulfeniltiocianatos com tioéteres envolve a forma ionizada do tioéter [87b]. Assim, se o grupo de S-protecção puder originar um catião estável, como é o caso do grupo tritilo, o grau de ionização é elevado, mesmo em solventes não polares e a reacção dá-se rapidamente:

$$R\text{-}S\text{-}X \rightleftharpoons R\text{-}S^-X^+ \xrightarrow{R'\text{-}S\text{-}SCN} R'\text{-}S\text{-}S\text{-}R + X^+ SCN^-$$

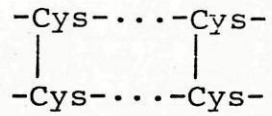

Trt
Trt
Z-Cys-Cys-Gly-Phe-Gly-Cys-Phe-Gly-OBu^t
Bzh
67%
1) $(SCN)_2$
2) BF_3 em AcOH
Z-Cys-Cys-Gly-Phe-Gly-Cys-Phe-Gly-OH + H-Cys-Gly-Val-OBu^t
Bzh
Trt
DCCI
Z-Cys-Cys-Gly -Phe-Gly-Cys-Phe-Gly-Cys-Gly-Val-OBu^t
Bzh
Trt
76%
SCN
Bzh
Z-Cys-$(Gly)_3$-Cys-Gly-OBu^t
Z-Cys-Cys-Gly-Phe-Gly-Cys-Phe-Gly-Cys-Gly-Val-OBu^t
Bzh
Bzh
Bu^tO-Gly-Cys-$(Gly)_3$-Cys-Z
75%
$(SCN)_2$ em TFA/AcOH
Z-Cys-Cys-Gly-Phe-Gly-Cys-Phe-Gly-Cys-Gly-Val-OH
HO-Gly-Cys-Gly-Gly-Gly-Cys-Z

Esquema 9

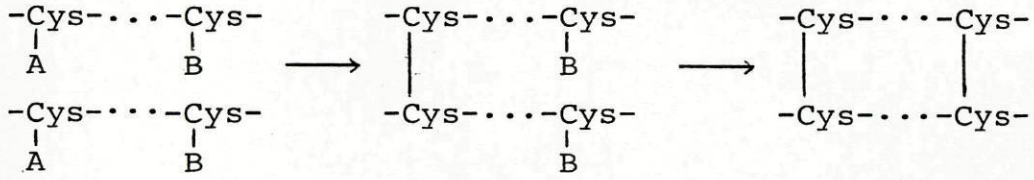
Quando se usa como S-protecção o grupo benzidrilo, o grau de ionização do tioéter resultante é baixo, em solventes não polares. Pode-se,no entanto,favorecer a ionização por adição de ácido, catalisando-se assim a reacção com tiocianogénio ou sulfeniltiocianatos:



O estudo da aplicação do método do tiocianogénio à síntese de péptidos contendo L-cistina, foi também efectuado pela escola de HISKEY [41,49]. O método foi usado pela mesma escola na síntese de vários péptidos cíclicos,contendo aquele aminoácido, dos quais se destacam um modelo de insulina [47] (Esquema 9) e uma série de péptidos simétricos com dois resíduos de L-cistina [43] da forma



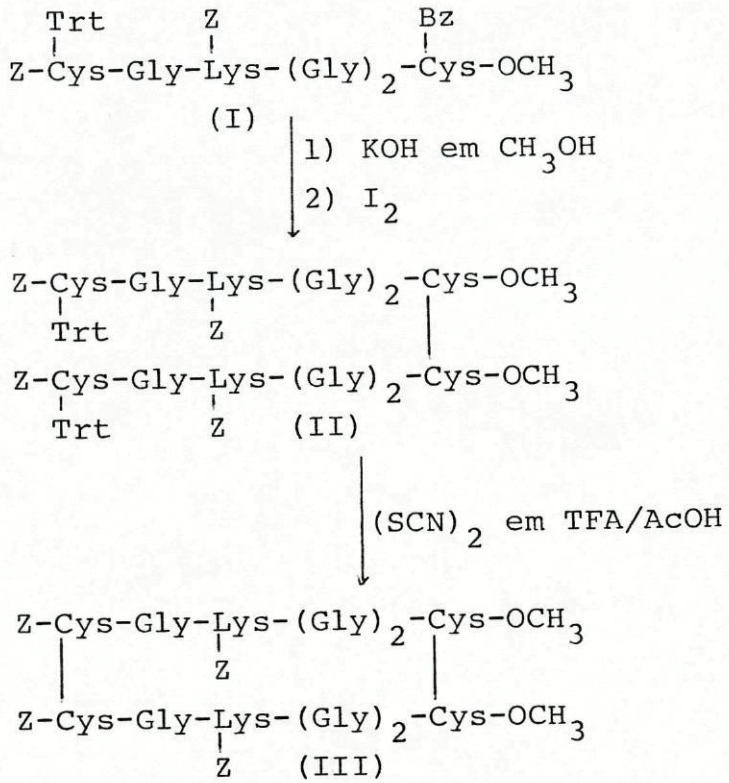
A estratégia de síntese destes péptidos simétricos pode resumir-se do seguinte modo (Esquema 10):



A e B - Grupos de S-protecção selectivamente removíveis

Esquema 10

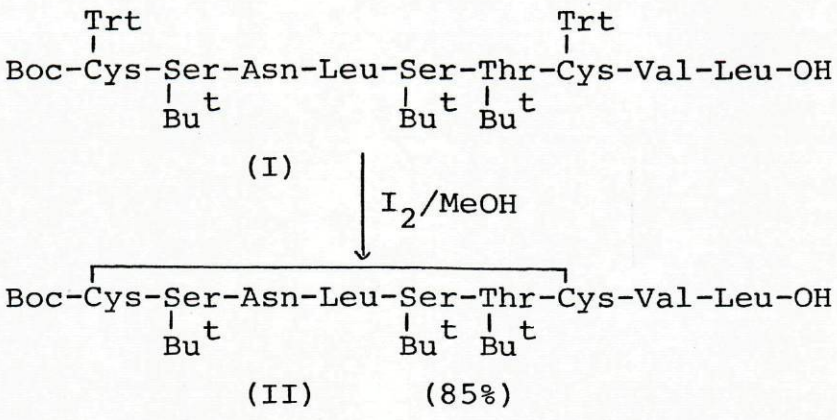
Na concretização deste esquema foi utilizado o método do tiocianogénio como se exemplifica, a seguir, com a síntese do péptido simétrico de L-cistina (III) (Esquema 11).



Esquema 11

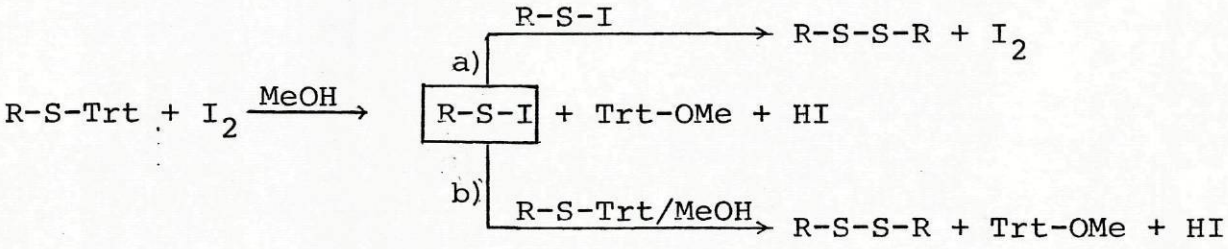
b) Por acção do iodo

A conversão directa de grupos SH adequadamente protegidos em dissulfuretos, por acção de iodo, foi utilizada pela primeira vez na síntese de péptidos de cistina por KAMBER e RITTEL [60]. A síntese do fragmento 1-9 da calcitocina (II) a partir do derivado di-S-tritilado (I), por acção de iodo em metanol (Esquema 12), com rendimento elevado (85%), demonstrou a utilidade deste processo. KAMBER e RITTEL [60] usaram nesta síntese o grupo S-tritilo,



Esquema 12

tendo proposto o seguinte esquema, para os dois mecanismos que consideraram possíveis para a transformação de tritiltioéteres em dissulfuretos (Esquema 13):



Esquema 13

Foi ainda verificada a possibilidade de conversão directa em dissulfuretos de grupos SH de resíduos de cisteína, protegidos com os seguintes grupos de protecção: acetamidometilo [58], benzamidometilo [4] e difenil-4-piridilmetilo [23].

Dos grupos citados, os que têm sido mais utilizados são os

grupos acetamidometilo e tritilo. Por exemplo, na síntese total da insulina efectuada, recentemente, pelo grupo de investigação da CIBA-GEIGY [103,104] (Esquema 14), as ligações S-S foram formadas, sucessivamente, por acção de iodo sobre grupos SH protegidos com os grupos tritilo e acetamidometilo, em condições de selectividade estabelecidas por aquela escola (ver 2.3.3).

KAMBER [60] refere que a conversão de S-benzidrilcisteínas em dissulfuretos, por acção de iodo em metanol, se efectua com um rendimento de apenas 20%. Os grupos S-benzilo e S-*terc*-butilo mostraram ser estáveis à acção do iodo. Os outros grupos de S-protecção conhecidos parece não terem sido ainda estudados no que se refere à possibilidade de remoção oxidativa, por acção de iodo.

2.3.3 - Aplicação em síntese de produtos naturais

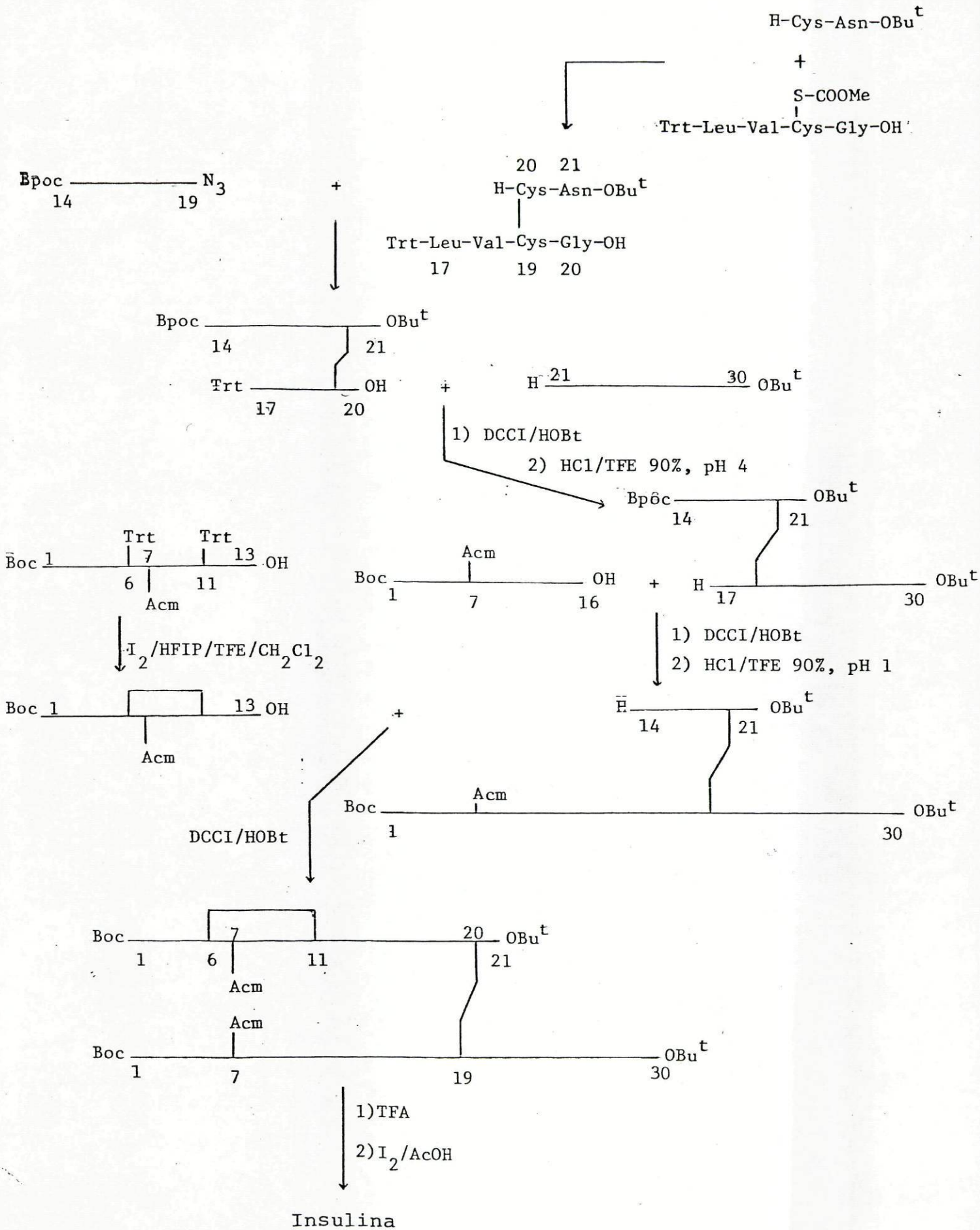
A estratégia de síntese de péptidos cíclicos, com controlo de formação das ligações dissulfureto, foi já aplicada com êxito na síntese de produtos naturais.

A síntese total da insulina [103] (Esquema 14) realizada em 1974, com formação das ligações dissulfureto por fases, representa a concretização mais relevante desta estratégia de síntese, no campo da síntese de péptidos e proteínas com interesse biológico.

Os autores desta síntese usaram grupos de protecção já antes utilizados em síntese peptídica. No entanto, a sua aplicação neste caso (Esquema 14) exigiu o estudo e consequente utilização de novos métodos de remoção selectiva de grupos de protecção que a seguir se mencionam:

1) Remoção selectiva do grupo N-tritilo, na presença do grupo N-[2-(*p*-bifenil)isopropiloxicarbonilo], por acção de HCl em trifluoroetanol a 90%, a pH 4.

2) Remoção selectiva do grupo N-[2-(*p*-bifenil)isopropiloxicarbonilo] na presença do grupo *terc*-butilo, por acção de HCl em trifluoroetanol aquoso a 90%, a pH 1.



Esquema 14 - Síntese total da insulina, com formação das ligações dissulfureto em fases diferentes da síntese [59, 103].

3) Conversão de duas S-tritilcisteínas em cistina, sem afectar o grupo acetamidometilo usado como protecção da função tiol doutro resíduo de cisteína, por acção de iodo em trifluoroetanol.

É de notar o elevado rendimento obtido (70%) na ciclização final (correspondente à formação da ligação dissulfureto A7-B7).

O mesmo grupo de investigação efectuou a síntese de dois isómeros da insulina [102] (II e III) (Fig. 3), que diferem da hormona natural na posição de duas das três ligações dissulfureto.

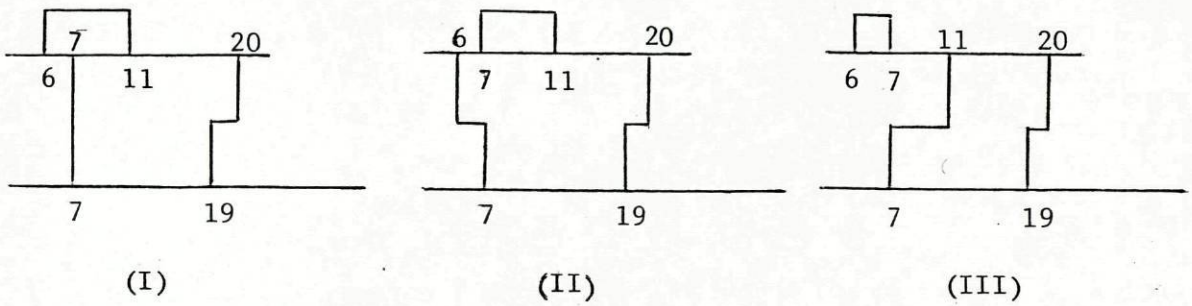


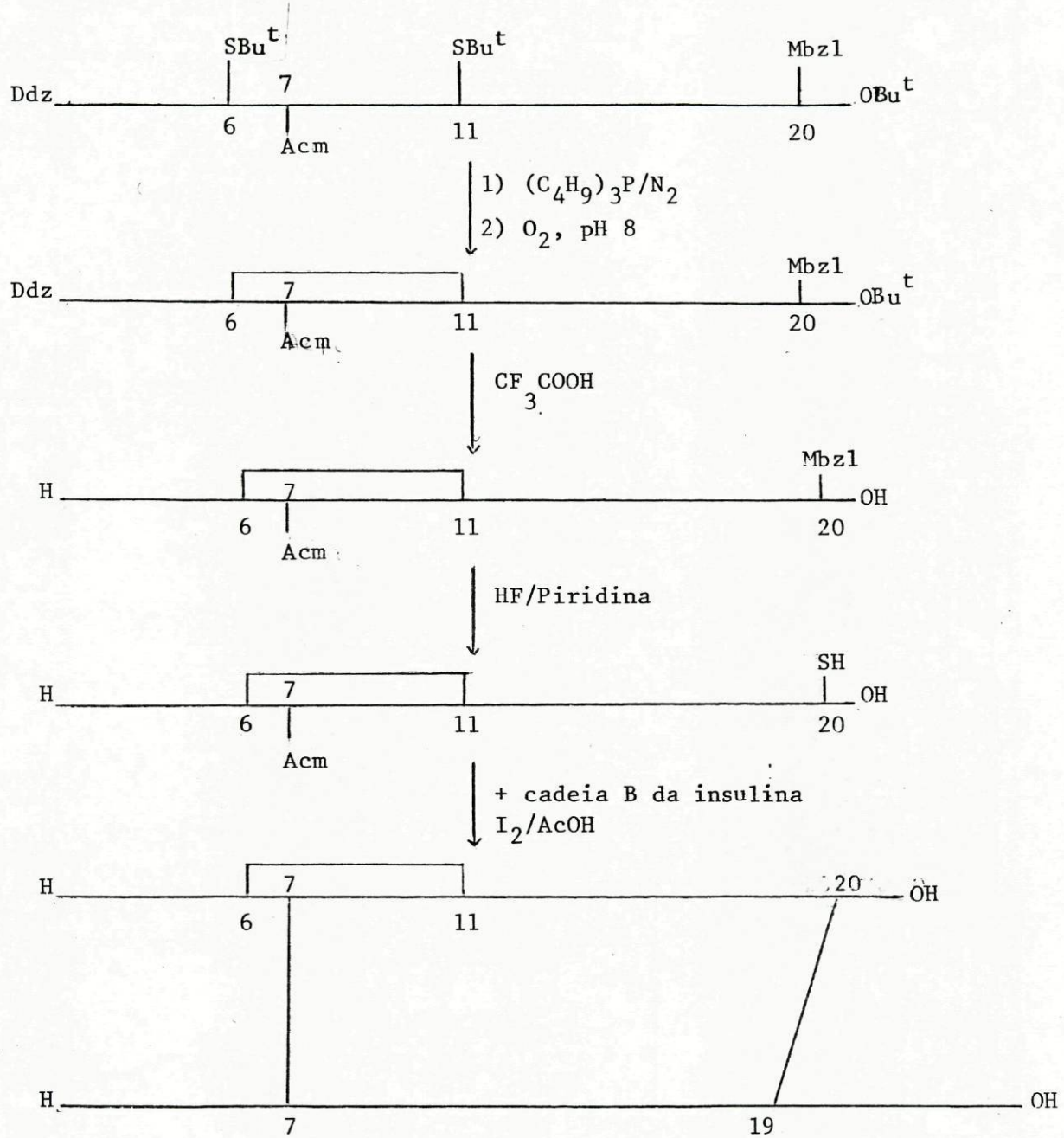
Figura 3. Representação esquemática da insulina (I) e dos isómeros [A7-A11, A6-B7-cistina]insulina (II) e [A6-A7,A11-B7-cistina]insulina (III)

Na síntese destes isómeros foi utilizada a estratégia desenvolvida pela mesma equipa para a síntese da insulina [103].

O êxito destas sínteses confirma que o método de formação selectiva de ligações dissulfureto permite uma estratégia de aplicação mais geral, extensiva à síntese de produtos não naturais.

Muito recentemente um outro grupo de investigadores [7] realizou uma síntese parcial da insulina,com formação das ligações S-S por fases, utilizando um esquema de síntese (Esquema 15) muito diferente do usado pela escola da CIBA-GEIGY.

Os referidos investigadores sintetizaram a cadeia A, contendo grupos de S-protecção selectivamente removíveis (o grupo *terc*-butiltio como S-protecção dos resíduos de cisteína nas posições A6 e A11; o grupo acetamidometilo como S-protecção do resíduo de



Esquema 15 – Passos finais da síntese parcial da insulina, com formação das ligações S-S em passos diferentes da síntese [7]

cisteína na posição A7 e o grupo *p*-metoxibenzilo como S-protecção do resíduo de cisteína na posição A20). Por remoção selectiva dos grupos de S-protecção dos resíduos de cisteína nas posições A6 e A-11, seguida de oxidação, formou-se a ligação intramolecular A6-A11. O grupo de S-protecção *p*-metoxibenzilo do resíduo de cisteína na posição A20 foi selectivamente removido com HF em piridina, na presença de anisol. A cadeia resultante com um grupo tiol livre foi combinada com uma cadeia B natural, na forma reduzida, formando-se sucessivamente as ligações A20-B19 e A7-B7, por acção de iodo em ácido acético.

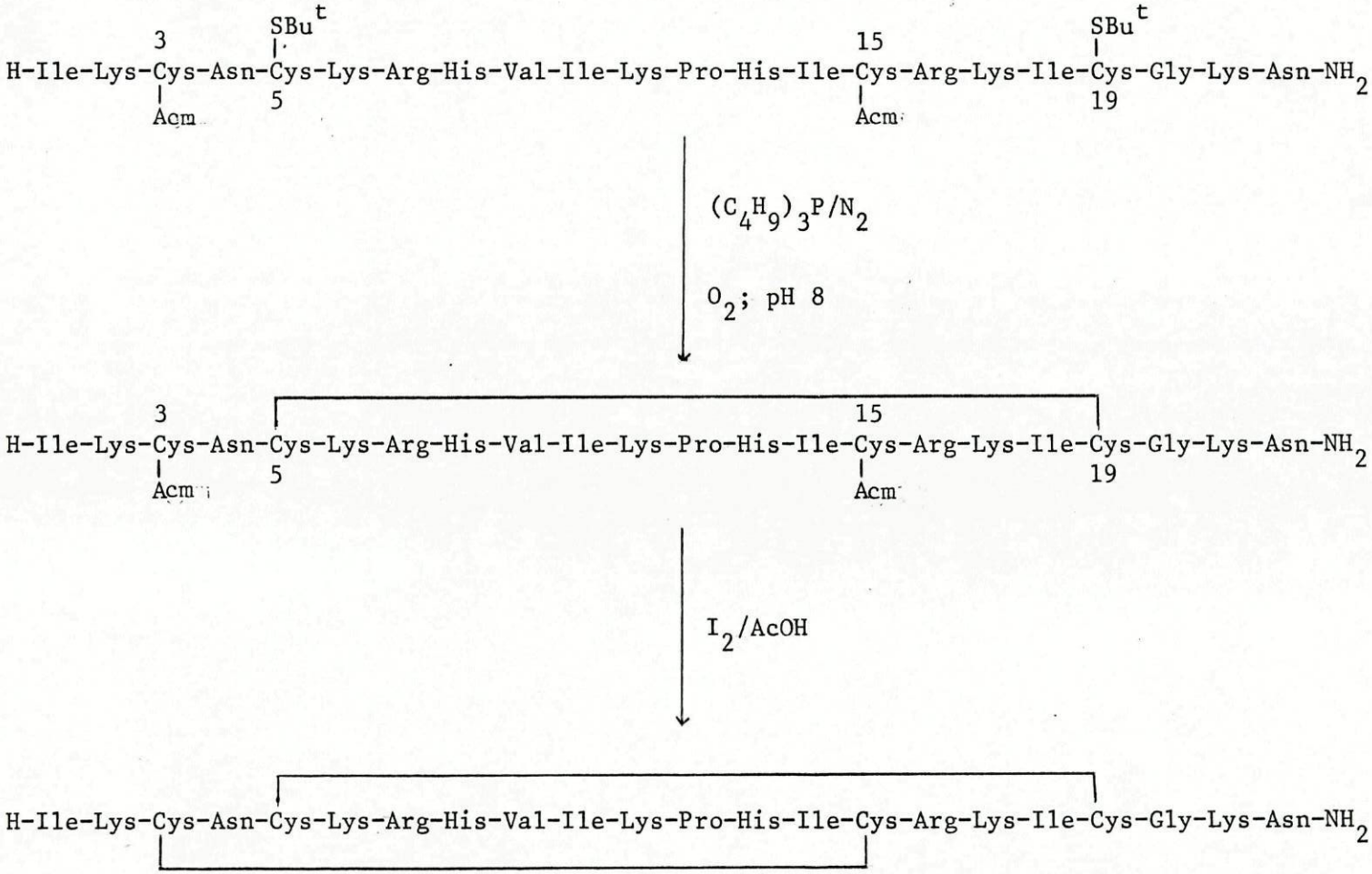
Os autores desta síntese referem terem aumentado o rendimento de combinação das cadeias A e B em mais de 100%, quando comparado com o rendimento obtido segundo a estratégia de formação de ligações S-S simultâneamente, ao acaso, no passo final da síntese.

Todavia, nesta síntese utilizaram-se grupos de S-protecção selectivamente removíveis apenas na cadeia A. É de esperar, tal como é afirmado pelos autores, que o esquema seguido nesta síntese conduza ainda a melhores resultados se a cadeia B a utilizar tiver os resíduos de cisteína adequadamente protegidos, com grupos de protecção selectivamente removíveis.

A síntese do "Mast Cell Degranulating (MCD) Peptide" também recentemente realizada [8] constitui um outro exemplo da aplicação da referida estratégia à síntese de péptidos de cistina com ligações dissulfureto intramoleculares (Esquema 16).

O "MCD peptide" é um componente do veneno da abelha e é constituído por uma cadeia peptídica única com 22 aminoácidos, apresentando duas ligações S-S intramoleculares. Este péptido tem suscitado o interesse farmaceutico, em virtude das suas propriedades anti-inflamatórias superiores às de todos os outros fármacos já conhecidos.

Na síntese deste péptido utilizaram-se como grupos de S-protecção selectivamente removíveis, os grupos acetamidometilo (Acm) e *terc*-butiltio (SBu^t). Por acção de tributilfosfina foram removidos os grupos *terc*-butiltio das posições 5 e 19, estabelecendo-se a ligação dissulfureto 5-19 por acção do oxigénio do ar, a pH 8. A remoção dos grupos acetamidometilo das posições 3 e 15, com formação simultânea da ligação dissulfureto 3-15, foi em seguida



Esquema 16 - Passos finais da síntese do "MCD peptide" [8].

efectuada,por acção de iodo em ácido acético.

2.4 - CONCLUSÕES

Neste capítulo,foram apresentadas as duas estratégias fundamentais que têm sido utilizadas na síntese de péptidos cíclicos contendo L-cistina.

A primeira estratégia descrita tem sido aplicada em sínteses de péptidos e proteínas naturais e baseia-se na hipótese de que a sequência natural, controlando a conformação da cadeia peptídica, favorece o emparelhamento correcto dos resíduos de L-cisteína. A síntese de modelos,por aplicação desta estratégia, é problemática, dado que as modificações introduzidas nas sequências naturais podem, eventualmente, impedir que se obtenha uma conformação adequada.

A segunda estratégia descrita, começou por ser usada com bons resultados na síntese de péptidos modelos e foi aplicada também na síntese de alguns produtos naturais. Em princípio, não surgem quaisquer dificuldades no que se refere à síntese de modelos de péptidos ou proteínas, como se deduz do êxito conseguido nas sínteses de isómeros da insulina, anteriormente referidas. Dados os resultados já alcançados parece poder afirmar-se que a estratégia de síntese de péptidos cíclicos de L-cistina, com formação selectiva das ligações dissulfureto, apresenta boas perspectivas tanto no que respeita à síntese de produtos naturais como à de seus modelos.

PARTE 2

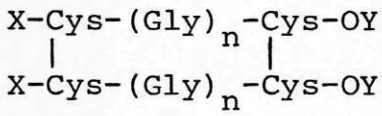
ESTUDO DE UM NOVO MÉTODO DE SÍNTESE DE PEPTIDOS CÍCLICOS, SIMÉTRICOS, DE L-CISTINA

1. OBJECTIVOS DO TRABALHO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

1.1 - INTRODUÇÃO

Como se pode inferir dos capítulos anteriores, vários investigadores se têm vindo a dedicar à síntese de péptidos cíclicos, quer naturais quer modelos, contendo cistina. É considerável o trabalho realizado no sentido de estabelecer métodos que conduzam à possibilidade de formar ligações dissulfureto, selectivamente.

O objectivo do trabalho que me foi proposto consistia no estudo da síntese por fases, de péptidos cíclicos heterodéticos, protegidos, de L-cistina e glicina de fórmula geral:



X, Y - Grupos de protecção

Nestas sínteses seria usado um método novo, misto, baseado na utilização simultânea de derivados adequados de L-cistina e L-cisteína. Deste modo, uma das ligações dissulfureto era introduzida, directamente, por intermédio do resíduo de cistina, sendo a outra estabelecida no final da síntese.

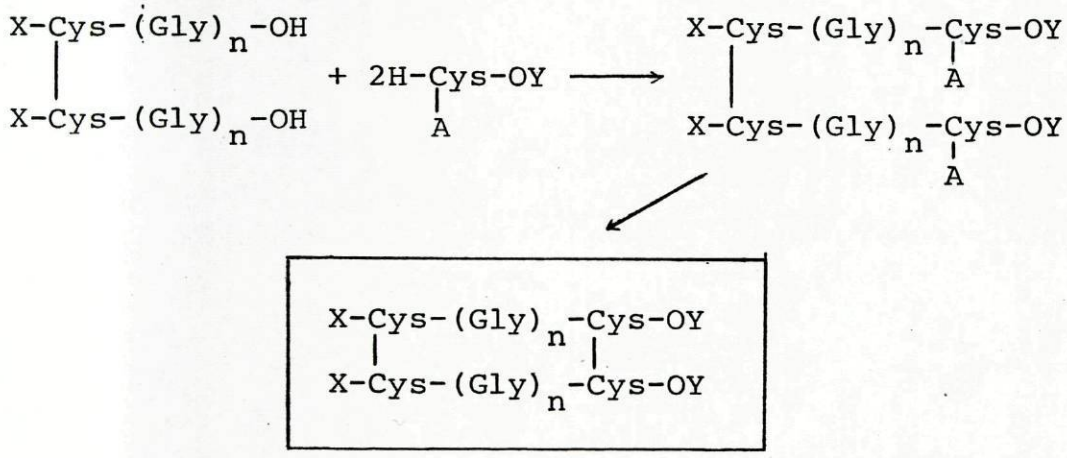
HISKEY e seus colaboradores [43], como se descreveu no capítulo anterior (2.3.2), tinham desenvolvido um método de síntese

de péptidos cíclicos simétricos de L-cistina. Este método baseava-se na utilização de cadeias peptídicas, contendo resíduos de cisteína, protegidos com grupos de protecção diferentes, selectivamente removíveis e permitindo, assim, a formação sucessiva das ligações dissulfureto.

O método que se pretendia estudar apresentava-se como uma alternativa ao método descrito por aqueles investigadores.

1.2 - PLANO DE TRABALHO

Com o fim de se estabelecer o novo método de síntese de péptidos cíclicos, protegidos, de cistina e glicina escolheram-se, em princípio, dois esquemas de síntese por fases a utilizar. Um deles (Esquema 1) envolvia a utilização, como componente amino do penúltimo passo das sínteses, de um derivado adequado da

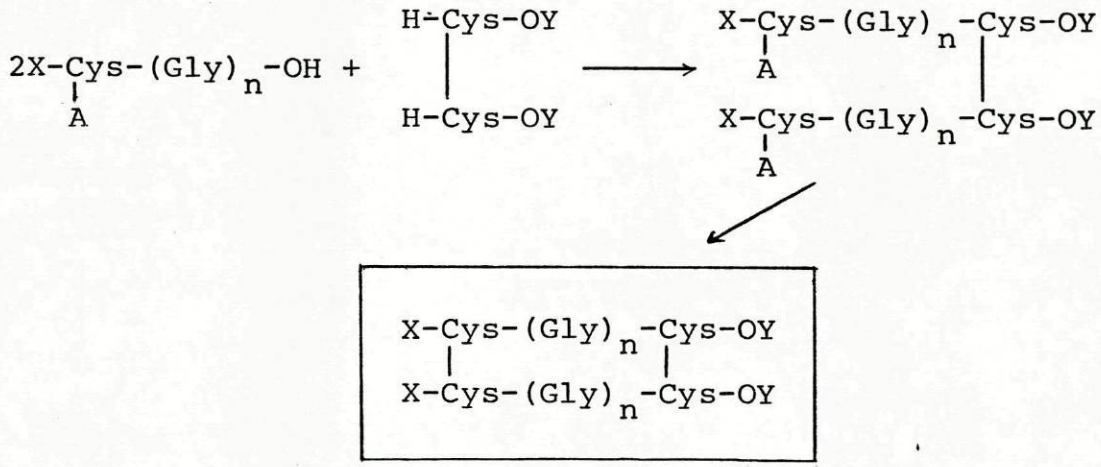


n = 0, 1, 2

A, X, Y - Grupos de protecção

Esquema 1

L-cisteína e, como componentes carboxílicos, de um derivado N-protegido da L-cistina (para n = 0) ou péptidos N-protegidos de L-cistina e glicina (para n = 1 e n = 2). O segundo esquema (Esquema 2) envolvia a utilização, como componente amino, de um diéster da L-cistina (a estudar) e, como componentes carboxílicos, de um derivado da L-cisteína (para n = o) ou péptidos de L-cisteína e glicina (para n = 1 e n = 2).



n = 0, 1, 2

A, X, Y - Grupos de protecção

Esquema 2

Ambos os esquemas satisfazem a condição de serem utilizados, simultâneamente, derivados da L-cisteína e da L-cistina. Uma vez que uma das ligações dissulfureto é introduzida, directamente, através do resíduo de L-cistina, surge apenas o problema da formação duma segunda ligação que se apresenta, em princípio, favorecida desde que se utilize uma diluição conveniente.

Começou por se fazer um estudo preliminar de cada um dos dois esquemas de síntese referidos para se poder optar pelo mais adequado. A escolha recaiu sobre o segundo esquema pois foi o que permitiu obter resultados mais positivos.

1.3 - ESCOLHA DOS GRUPOS DE PROTECÇÃO

Antes de pôr em prática qualquer dos esquemas de síntese, foi necessário escolher os grupos de protecção X, Y e A a utilizar.

Para N-protecção (X) escolheu-se o grupo *terc*-butiloxicarbonilo. Para protecção carboxílica pensou-se utilizar o éster benzidrílico ou o éster *terc*-butílico. Qualquer destas protecções carboxílicas podia ser removida, em meio ácido, (TFA), conjuntamente com o grupo *terc*-butiloxicarbonilo, num só passo, no final das sínteses [40,10].

Para utilização destes grupos de protecção carboxílica, no segundo esquema, seria no entanto necessário estudar os melhores métodos de preparar os correspondentes derivados da L-cistina, uma vez que não estavam descritos.

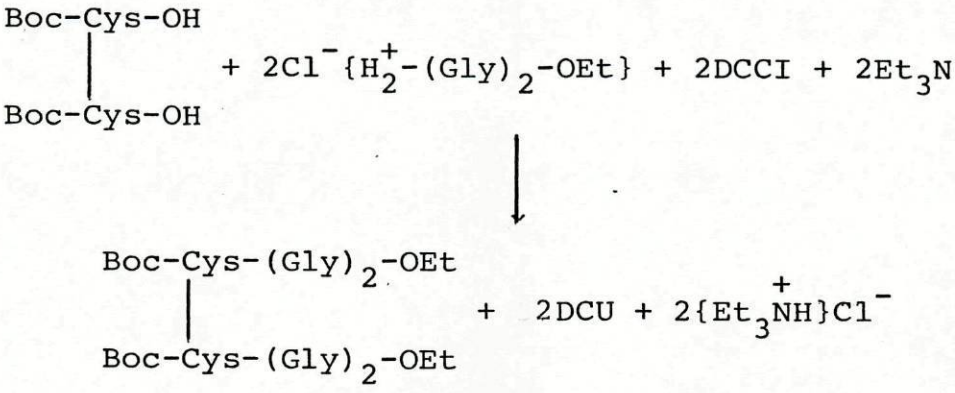
Para protecção do grupo tiol dos resíduos de cisteína a introduzir nas cadeias peptídicas escolheu-se o grupo tritilo. Por acção de iodo em metanol, os grupos tritilo de dois resíduos de cisteína podiam ser removidos com formação simultânea duma ligação dissulfureto [60]. Este é um método muito simples e directo de conversão de tioéteres em dissulfuretos.

1.4 - ESTUDOS PRELIMINARES

Como já se disse, começou por se fazer um estudo preliminar paralelo de ambos os esquemas de síntese esboçados.

Com vista à execução do primeiro esquema, realizou-se a síntese do péptido N,N'-bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistinil-bis(glicilglicinato de etilo).

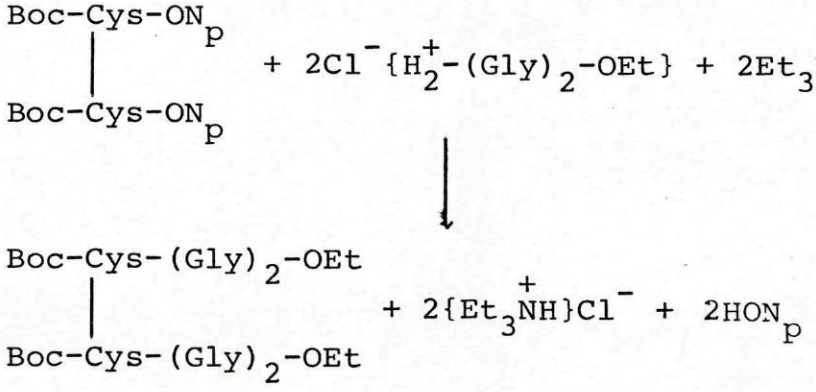
Este péptido foi preparado, primeiramente, por condensação da N,N'-bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistina [26,94] com o cloreto de glicilglicinato de etilo [100], pelo método da N,N'-dicicloexilcarbodiimida, de acordo com a equação:



Este péptido, que parece ser descrito pela primeira vez, foi isolado cromatograficamente puro, com rendimento de 42%, após várias cristalizações de acetato de etilo e foi caracterizado por análise elementar e por espectrometria de R.M.N. (Exp. 5A).

Os compostos N,N'-bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistina e cloreto de glicilglicinato de etilo, intervenientes nesta condensação, foram previamente preparados segundo métodos já descritos na literatura [26,94,100].

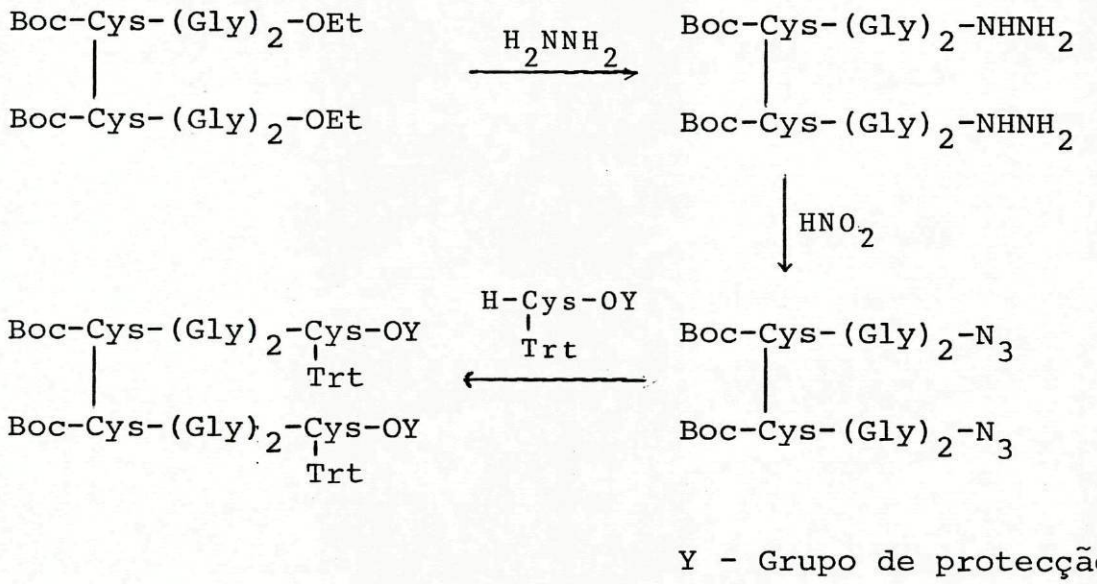
O mesmo péptido N,N'-bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistinil-bis(glicilglicinato de etilo) foi ainda sintetizado (Exp. 5B) pelo método dos ésteres *p*-nitrofenílicos, de acordo com a equação:



No entanto, a utilização deste método não conduziu a melhores rendimentos que os obtidos pelo método da DCCI.

O éster *p*-nitrofenílico da N,N'-bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistina, usado neste esquema de síntese do péptido referido, foi previamente preparado por um método já descrito na literatura [25,75].

Sintetizado o péptido N,N'-bis(*terc*-butiloxicarbonil)--L-cistinil-bis(glicilglicinato de etilo), pensou-se em efectuar a sua condensação com um derivado adequado de cisteína da forma H-Cys(Trt)-OY, usando o método das azidas (Esquema 3).



Esquema 3

A aplicação deste esquema exigia, em primeiro lugar, a síntese da hidrazida do péptido N,N'-bis(*terc*-butiloxicarbonil)--L-cistinil-bis(glicilglicinato de etilo).

Fez-se então uma tentativa de síntese desta hidrazida por acção da hidrazina em excesso, à temperatura ambiente, sobre o péptido N,N'-bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistinil-bis(glicilglicinato de etilo) (Exp. 6). O composto obtido mostrou cristalizar apenas de etanol-água (1:1). No entanto, após várias cristalizações apresentava-se ainda impuro, tendo-se verificado, além disso,

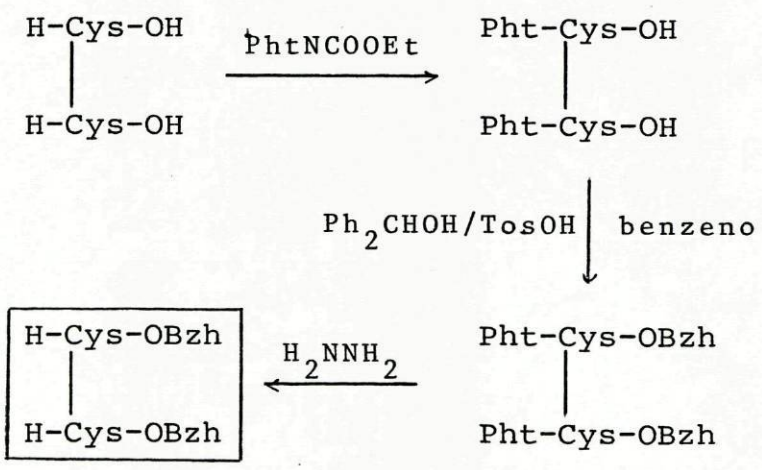
que em cada cristalização o rendimento baixava em cerca de 50%. Tentou-se a purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica mas não se conseguiu um sistema de solventes adequado à obtenção da hidrazida pura. Em face destas dificuldades decidiu-se abandonar este esquema de síntese.

Entretanto, com o fim de executar o segundo esquema proposto (Esquema 2, pág.65), iniciou-se o estudo da preparação do componente amino a utilizar no penúltimo passo das sínteses.

Os grupos de protecção haviam sido escolhidos de acordo com as respectivas estabilidades, permanecendo, quanto à protecção carboxílica da L-cistina, a possibilidade de se utilizar o éster benzidrílico ou o éster *terc*-butílico.

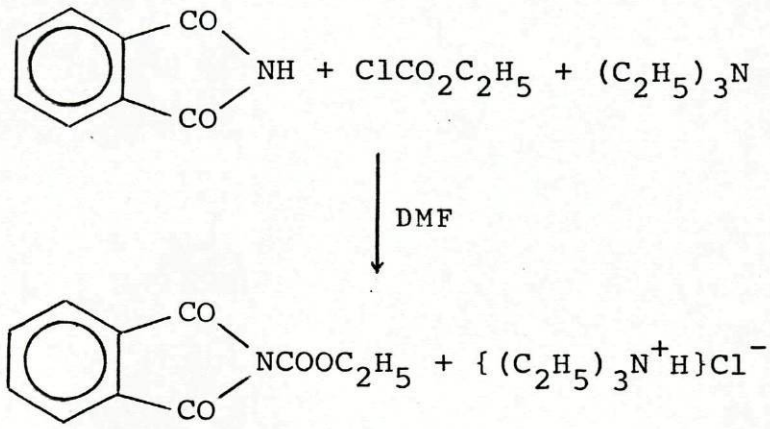
Começou por se tentar preparar o derivado L-cistinato de dibenzidrilo. HISKEY e seus colaboradores [40] efectuaram, sem êxito, tentativas de esterificação de aminoácidos livres, com benzidrol, em meio ácido, por destilação azeotrópica. Por isso, procurou-se preparar, primeiramente, o éster benzidrílico da N,N'--diftaloil-L-cistina, a partir do qual, por remoção do grupo ftaloílo, se esperava obter o L-cistinato de dibenzidrilo.

Planeou-se esta preparação do seguinte modo (Esquema 4):



Esquema 4

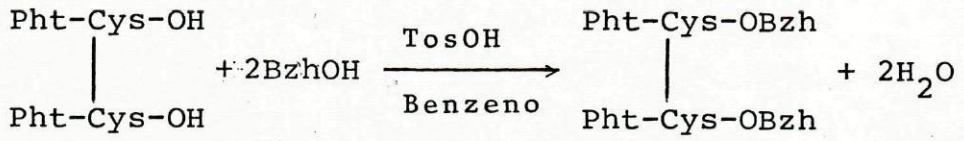
Com vista à síntese da N,N'-diftaloil-L-cistina, foi necessário preparar o reagente inicial, N-etiloxicarbonilftalimida, com base no método descrito por NEFKENS e seus colaboradores [77], que envolve a reacção da ftalimida com clorometanoato de etilo, na presença de trietilamina, de acordo com a equação:



Introduziram-se, no entanto, algumas alterações que parecem ter contribuído para facilitar a obtenção do reagente puro (Exp. 7). Assim, utilizaram-se maiores quantidades de trietilamina e N,N-dimetilformamida (para facilitar a dissolução da ftalimida) e de clorometanoato de etilo (o que pareceu ser necessário para a reacção ser completa). Quando estas modificações não eram introduzidas, a N-etiloxicarbonilftalimida vinha bastante contaminada com ftalimida, sendo a purificação por cristalização muito difícil ou mesmo impossível.

A N,N'-diftaloil-L-cistina foi preparada por um método descrito por NEFKENS e seus colaboradores [77], por reacção da L-cistina com a N-etiloxicarbonilftalimida, em meio alcalino, tendo-se usado um excesso de 2% de N-etiloxicarbonilftalimida e uma pequena quantidade de N,N-dimetilformamida para favorecer a solubilização da L-cistina (Exp. 8).

A síntese do éster dibenzidrílico da N,N'-diftaloil-L-cistina foi conseguida por esterificação deste derivado com benzidrol, por destilação azeotrópica, utilizando-se o ácido *p*-toluenossulfónico, como catalisador, de acordo com a equação:



O éster obtido, N,N'-diftaloil-L-cistinato de dibenzidrilo, que parece ser descrito pela primeira vez, foi caracterizado por análise elementar e espectrometria de R.M.N. (Exp. 9).

A remoção do grupo ftaloílo foi tentada por acção do hidrato de hidrazina, quer à temperatura ambiente durante 18 horas [19] (Exp. 10A), quer à ebulição durante alguns minutos [40] (Exp. 10B), com base em métodos descritos na literatura para outros N-ftaloilaminoácidos.

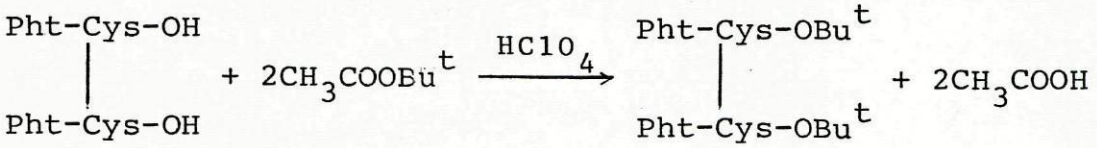
Infelizmente, as tentativas efectuadas não foram bem sucedidas. No primeiro caso parece ter-se recuperado o composto inicial. No segundo caso verificou-se que havia decomposição por ruptura da ligação dissulfureto.

Em face destas dificuldades referidas, pensou-se na possibilidade de utilização do grupo *terc*-butilo para protecção carboxílica da L-cistina.

Poder-se-ia tentar a esterificação directa da L-cistina ou a esterificação da N,N'-diftaloil-L-cistina, seguida de remoção do grupo ftaloílo.

Foi-me atribuída esta última tarefa, tendo a outra ficado a cargo doutro elemento do nosso grupo de investigação.

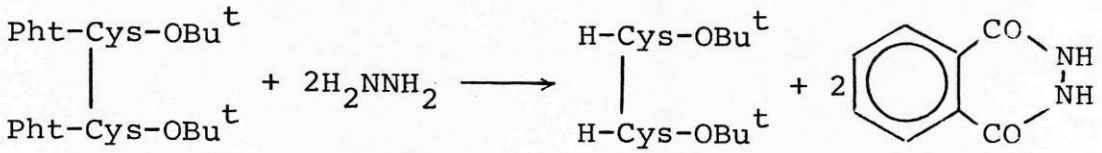
A síntese do N,N'-diftaloil-L-cistinato de bis(*terc*-butilo) [1b] foi conseguida por reacção da N,N'-diftaloil-L-cistina com acetato de *terc*-butilo [82], na presença de ácido perclórico a 60% como catalisador, com base num método descrito na literatura [110] para outros aminoácidos, de acordo com a equação:



O éster *terc*-butílico da N,N'-diftaloil-L-cistina resistiu a todas as tentativas de purificação por recristalização. No entanto, por cromatografia em coluna de gel de sílica, conseguiu-se obter o diéster puro.

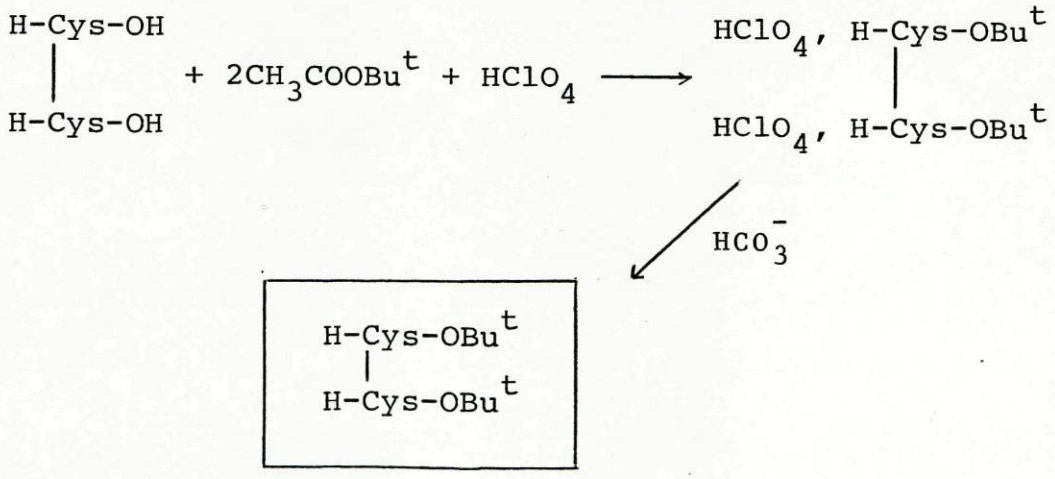
Este composto, que parece ser descrito pela primeira vez, foi caracterizado por análise elementar e por espectrometria de R.M.N. (Exp. 11).

Procurou-se então remover o grupo ftaloílo do composto acabado de referir. Isto foi conseguido por acção de hidrato de hidrazina, à temperatura ambiente, durante 18 horas, com base num método já descrito para outros aminoácidos [19] (Exp. 12).



O L-cistinato de bis(*terc*-butilo) assim obtido apresentava-se como um óleo branco e, por cromatografia, mostrou ser idêntico ao preparado, entretanto, no nosso laboratório, por esterificação directa da L-cistina [1a] (Exp. 13).

A possibilidade de preparação do L-cistinato de bis(*terc*-butilo) por esterificação directa da L-cistina (Esquema 5),



Esquema 5

levou ao abandono do esquema de esterificação indirecta que se torna mais trabalhoso e mais demorado, por envolver maior número de passos.

Ficou, então, em princípio, decidido utilizar o L-cistinato de bis(*terc*-butilo) na concretização do segundo esquema (Esquema 2, pág.65) proposto para síntese de péptidos cíclicos de L-cistina e glicina.

Antes, porém, retomou-se o processo de esterificação directa da L-cistina e procurou-se estabelecer as condições óptimas de síntese do referido ester *terc*-butílico.

Obtidas estas condições (Exp. 13), antes de se utilizar este éster na síntese de péptidos cíclicos de L-cistina, foi feito um estudo prévio sobre a viabilidade da sua utilização em síntese peptídica.

1.5 - ESTUDO PRÉVIO DA APLICAÇÃO DO L-CISTINATO DE BIS(*TERC*-BUTILO) EM SÍNTESE PEPTÍDICA

Este estudo foi feito no nosso laboratório através da aplicação do L-cistinato de bis(*terc*-butilo) na síntese de dois péptidos : N,N'-bis(tritilglicil)-L-cistinato de bis(*terc*-butilo) e N,N'-bis(tritilglicilglicil)-L-cistinato de bis(*terc*-butilo).

Foi-me atribuída a tarefa de preparação deste último péptido. A respectiva síntese foi realizada por condensação da N-tritilglicilglicina com o L-cistinato de bis(*terc*-butilo), pelo método da N,N'-dicicloexilcarbodiimida, de acordo com a equação:

$$2\text{Trt-(Gly)}_2\text{-OH} + \begin{array}{l}\text{H-Cys-OBu}^t\\ \vert\\ \text{H-Cys-OBu}^t\end{array} + 2\text{DCCI} \longrightarrow \begin{array}{l}\text{Trt-(Gly)}_2\text{-Cys-OBu}^t\\ \vert\\ \text{Trt-(Gly)}_2\text{-Cys-OBu}^t\end{array} + 2\text{DCU}$$

Este péptido, que parece ser descrito pela primeira vez, foi obtido cromatograficamente puro, após várias recristalizações de acetato de etilo e foi caracterizado por análise elementar e por espectrometria de R.M.N. (Exp. 17).

O composto N-tritilglicilglicina usado nesta condensação foi sintetizado por dois processos, ambos conduzindo a bons rendimentos (Exp. 16).

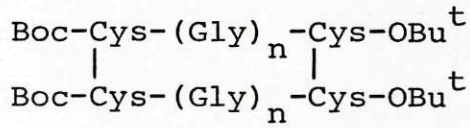
Um dos métodos consistiu na condensação da N-tritilglicina com cloreto de glicinato de etilo, pelo método da DCCI, obtendo-se N-tritilglicilglicinato de etilo. Por hidrólise [101 b] deste péptido obteve-se a N-tritilglicilglicina (Exp. 16 A).

O outro método usado, já descrito na literatura [101 b], envolveu a reacção do clorotrifenilmetano com cloreto de glicilglicinato de etilo em clorofórmio, na presença de trietilamina, obtendo-se N-tritilglicilglicinato de etilo. Por hidrólise [101 b] deste composto obteve-se a N-tritilglicilglicina (Exp. 16 B).

Entretanto, o péptido N,N'-bis(tritilglicil)-L-cistinato de bis(*terc*-butilo) foi também sintetizado no nosso laboratório, tendo sido convenientemente caracterizado [1a].

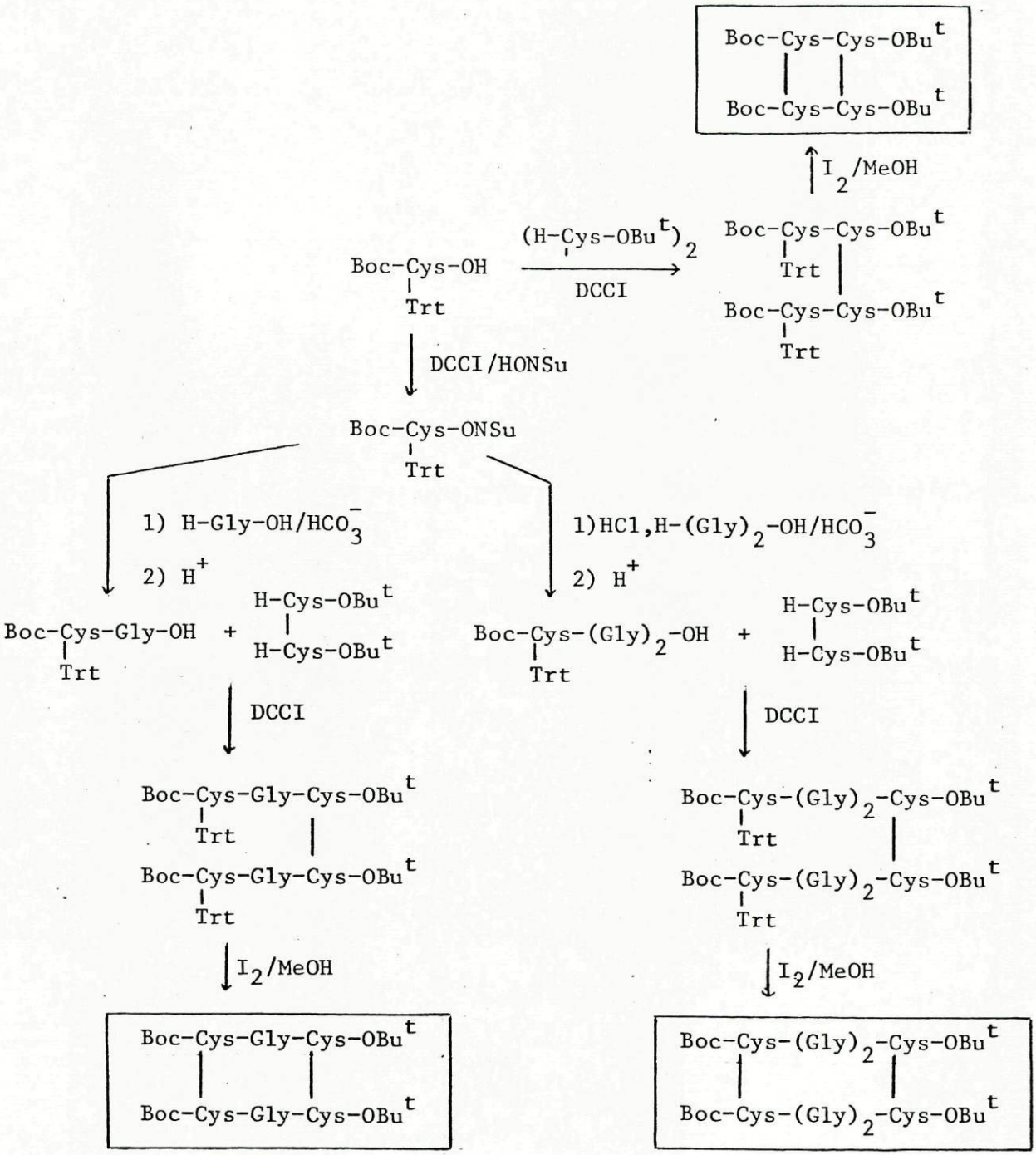
Em face dos bons resultados obtidos na síntese dos dois péptidos referidos, N,N'-bis(tritilglicilglicil)-L-cistinato de bis(*terc*-butilo) e N,N'-bis(tritilglicil)-L-cistinato de bis(*terc*-butilo), ficou definitivamente decidida a utilização do grupo *terc*-butilo para protecção carboxílica da L-cistina.

Elaborou-se então um plano de trabalho para a síntese de péptidos cíclicos de L-cistina e glicina de fórmula geral:

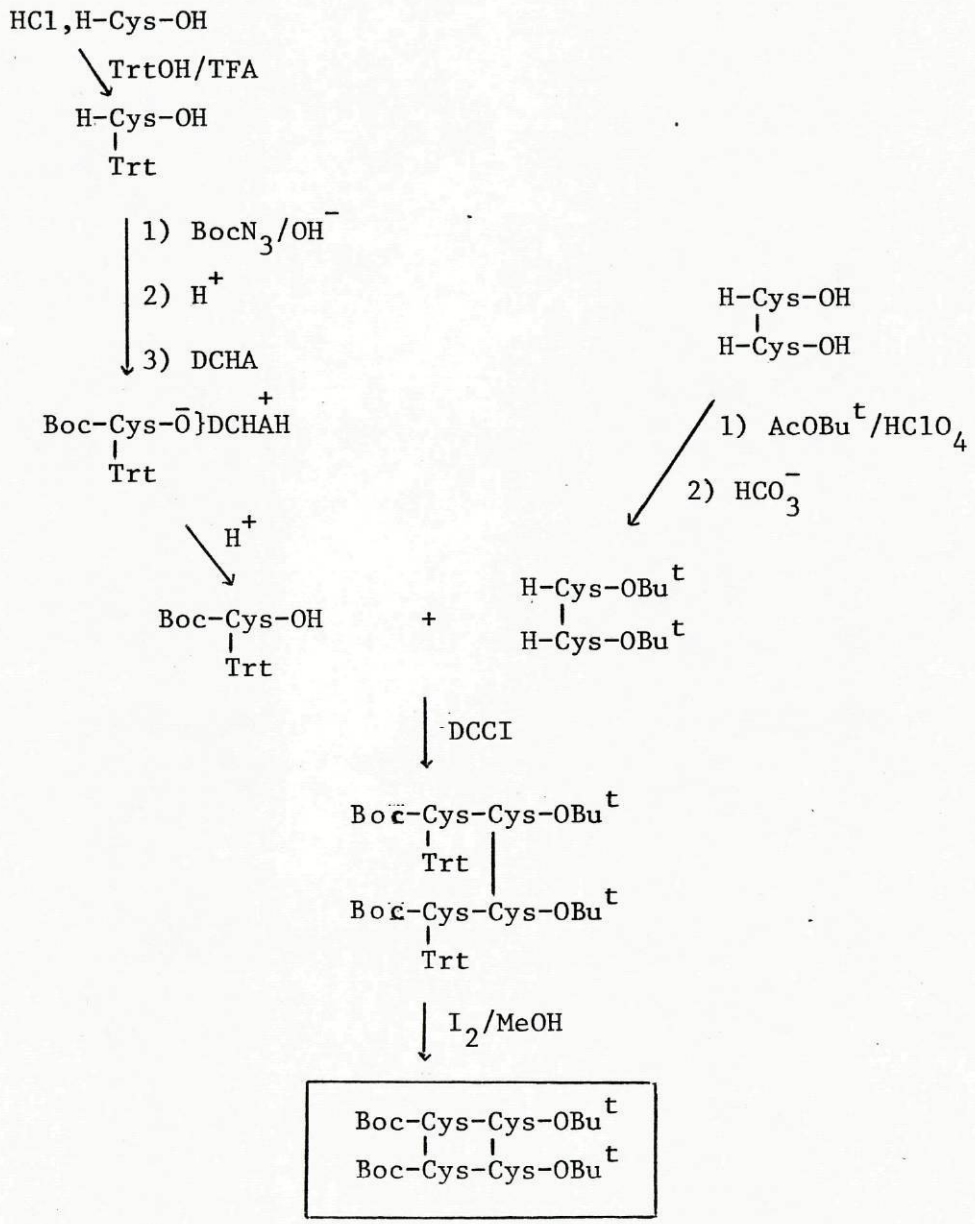


n = 0, 1, 2

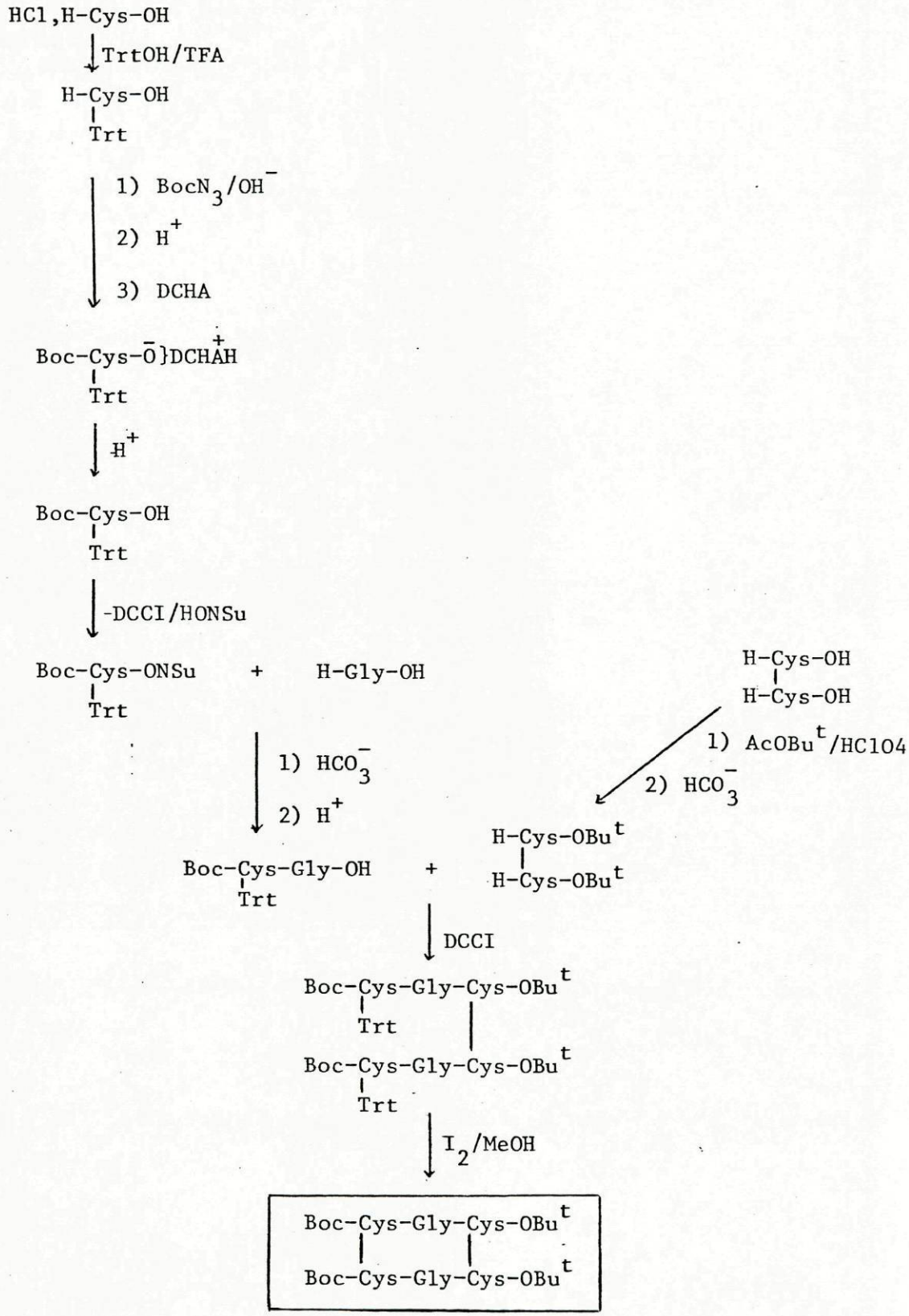
que está resumido no esquema 6. O plano elaborado está de acordo com as linhas gerais traçadas no esquema 2 (pág.65), utilizando simultâneamente derivados adequados de L-cisteína e L-cistina, e foi posto efectivamente em prática, com bons resultados, para os


Boc-Cys-Cys-OBu^t
Boc-Cys-Cys-OBu^t
I2/MeOH
Boc-Cys-OH
Trt
(H-Cys-OBu^t)2
DCCI
Boc-Cys-Cys-OBu^t
Trt
Boc-Cys-Cys-OBu^t
Trt
DCCI/HONSu
Boc-Cys-ONSu
Trt
1) H-Gly-OH/HCO3-
2) H+
1)HCl,H-(Gly)2-OH/HCO3-
2) H+
Boc-Cys-Gly-OH
Trt
H-Cys-OBu^t
H-Cys-OBu^t
Boc-Cys-(Gly)2-OH
Trt
H-Cys-OBu^t
H-Cys-OBu^t
DCCI
DCCI
Boc-Cys-Gly-Cys-OBu^t
Trt
Boc-Cys-Gly-Cys-OBu^t
Trt
Boc-Cys-(Gly)2-Cys-OBu^t
Trt
Boc-Cys-(Gly)2-Cys-OBu^t
Trt
I2/MeOH
I2/MeOH
Boc-Cys-Gly-Cys-OBu^t
Boc-Cys-Gly-Cys-OBu^t
Boc-Cys-(Gly)2-Cys-OBu^t
Boc-Cys-(Gly)2-Cys-OBu^t

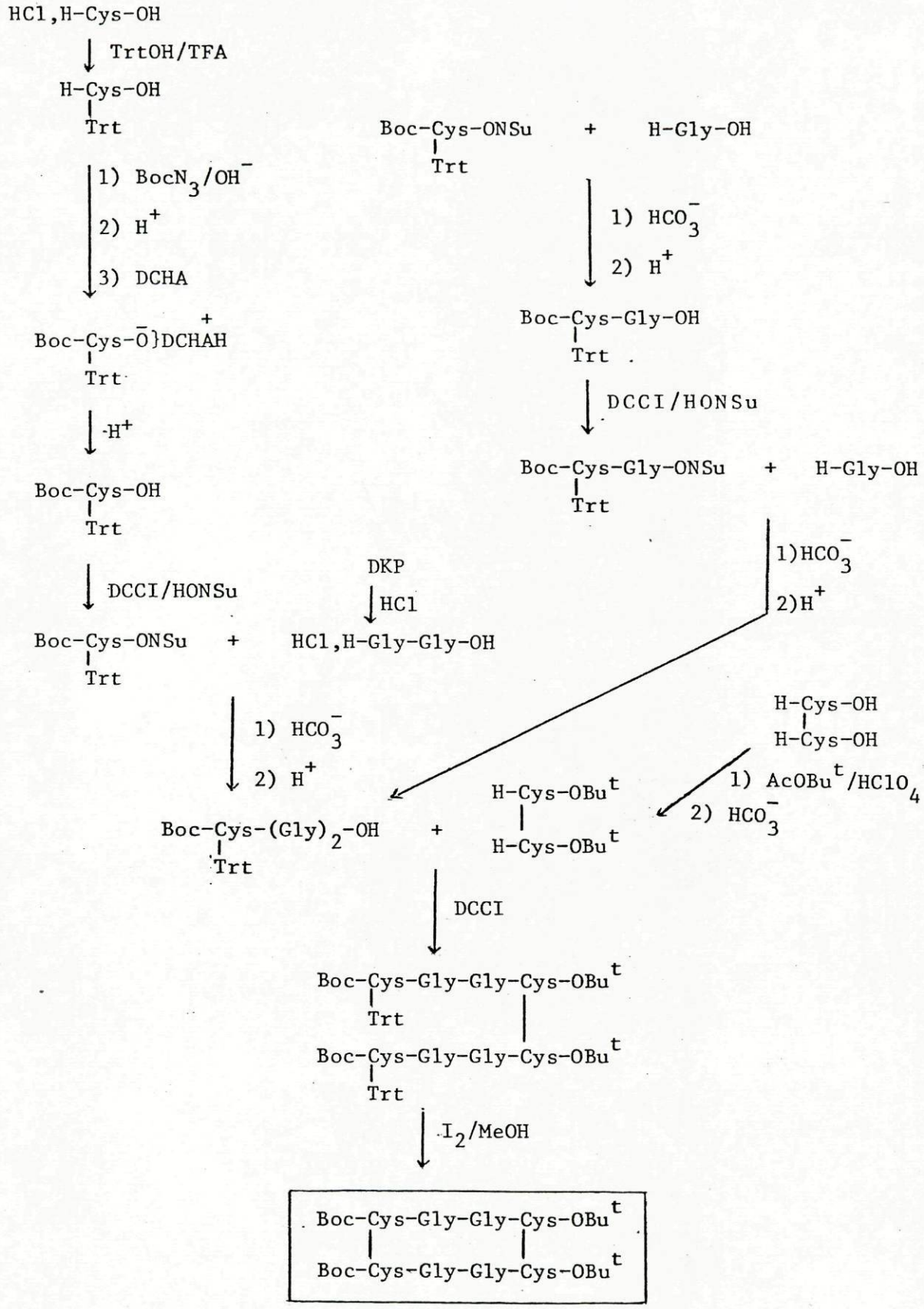
Esquema 6


HCl,H-Cys-OH
TrtOH/TFA
H-Cys-OH
Trt
1) BocN3/OH−
2) H+
3) DCHA
Boc-Cys-O}DCHAH+
Trt
H+
Boc-Cys-OH
Trt
+
H-Cys-OH
H-Cys-OH
1) AcOBut/HClO4
2) HCO3−
H-Cys-OBut
H-Cys-OBut
DCCI
Boc-Cys-Cys-OBut
Trt
Boc-Cys-Cys-OBut
Trt
I2/MeOH
Boc-Cys-Cys-OBut
Boc-Cys-Cys-OBut

Esquema 7


HCl,H-Cys-OH
TrtOH/TFA
H-Cys-OH
Trt
1) BocN3/OH−
2) H+
3) DCHA
Boc-Cys-O−}DCHAH+
Trt
H+
Boc-Cys-OH
Trt
-DCCI/HONSu
Boc-Cys-ONSu + H-Gly-OH
Trt
1) HCO3−
2) H+
Boc-Cys-Gly-OH
Trt
H-Cys-OH
H-Cys-OH
1) AcOBut/HClO4
2) HCO3−
H-Cys-OBut
H-Cys-OBut
+
DCCI
Boc-Cys-Gly-Cys-OBut
Trt
Boc-Cys-Gly-Cys-OBut
Trt
I2/MeOH
Boc-Cys-Gly-Cys-OBut
Boc-Cys-Gly-Cys-OBut

Esquema 8


HCl,H-Cys-OH
TrtOH/TFA
H-Cys-OH
Trt
1) BocN3/OH⁻
2) H⁺
3) DCHA
Boc-Cys-O⁻}DCHAH⁺
Trt
H⁺
Boc-Cys-OH
Trt
DCCI/HONSu
Boc-Cys-ONSu
Trt
Boc-Cys-ONSu + H-Gly-OH
Trt
1) HCO3⁻
2) H⁺
Boc-Cys-Gly-OH
Trt
DCCI/HONSu
Boc-Cys-Gly-ONSu + H-Gly-OH
Trt
1)HCO3⁻
2)H⁺
DKP
HCl
HCl,H-Gly-Gly-OH
1) HCO3⁻
2) H⁺
Boc-Cys-(Gly)2-OH
Trt
H-Cys-OH
H-Cys-OH
1) AcOBut/HClO4
2) HCO3⁻
H-Cys-OBut
H-Cys-OBut
DCCI
Boc-Cys-Gly-Gly-Cys-OBut
Trt
Boc-Cys-Gly-Gly-Cys-OBut
Trt
I2/MeOH
Boc-Cys-Gly-Gly-Cys-OBut
Boc-Cys-Gly-Gly-Cys-OBut

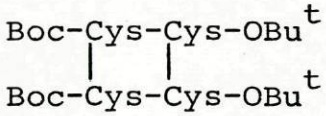
Esquema 9

péptidos correspondentes a n = 0, 1 e 2.

As fases de síntese de cada um destes péptidos cíclicos, são apresentadas em pormenor nos esquemas 7, 8 e 9.

1.6 - SÍNTESE DO PÉPTIDO CÍCLICO S,S-S',S'-BIS(N-*TERC*-BUTILOXICARBONIL-L--HEMICISTINIL-L-HEMICISTINATO DE *TERC*-BUTILO)

Resolvido o problema da protecção carboxílica da L-cistina, começou-se a trabalhar no sentido da execução do esquema 7 para a síntese do péptido cíclico:

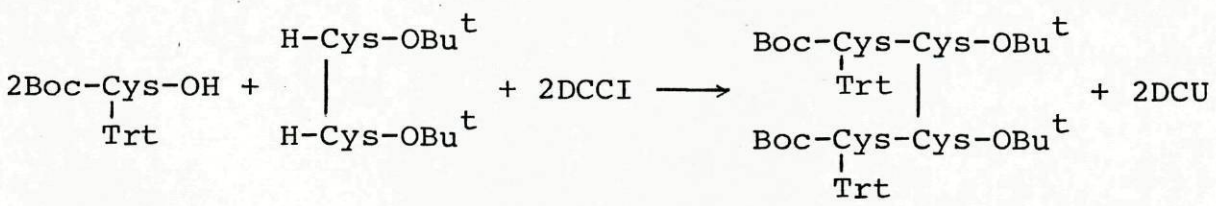


Assim, preparou-se a S-tritil-L-cisteína por um processo descrito por PHOTAKI e seus colaboradores [84], tendo-se obtido este derivado da cisteína, cromatograficamente puro e com bom rendimento (91%) (Exp. 18).

Em seguida, efectuou-se a síntese da N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteína, com base num processo descrito por HISKEY e seus colaboradores [41] que envolve a reacção da S-tritil-L-cisteína [84] com azidometanoato de *terc*-butilo [21], em meio alcalino. Nesta preparação aumentou-se o tempo de reacção para 48 horas. O composto foi isolado, primeiramente, sob a forma de sal de dicicloexilamónio, tendo sido obtido cromatograficamente puro após duas recristalizações de metanol. Por neutralização do referido sal com ácido sulfúrico (0,25 M), obteve-se a N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteína, tendo-se conseguido isolá-la cromatograficamente pura e com bom rendimento (85%) após várias triturações com éter de petróleo (p.e. 40-60°C), a quente (Exp.19).

A síntese do péptido N,N'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tri-

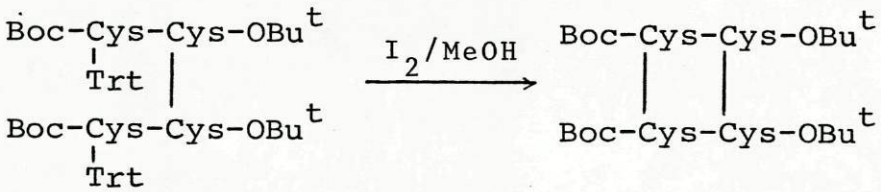
til-L-cisteinil)-L-cistinato de bis(*terc*-butilo), foi efectuada por condensação, pelo método da carbodiimida, da N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteína com o L-cistinato de bis (*terc*-butilo) recentemente preparado, de acordo com a equação:



O referido péptido foi isolado puro, após várias triturações com éter de petróleo, seguida de duas cristalizações de etoxietano (Exp. 20).

Este péptido, que parece ser novo, foi caracterizado por análise elementar e por espectrometria de R.M.N.

A síntese do péptido cíclico S,S-S',S'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-L-hemicistinil-L-hemicistinato de *terc*-butilo), com a qual se completou o esquema 7, foi conseguida por oxidação, com excesso de iodo em metanol, do péptido N,N'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinil)-L-cistinato de bis(*terc*-butilo) em solução metanólica diluída, segundo a equação:



O excesso de iodo usado na oxidação foi eliminado por acção de tiossulfato de sódio, no final da reacção. Após concentração da solução, o péptido impuro foi precipitado por adição de água.

A purificação do péptido mostrou-se difícil e morosa. O péptido cíclico obtido, aparecia, por cromatografia, levemente contaminado com uma ou duas impurezas e todas as tentativas de purificação por cristalização foram mal sucedidas.

Finalmente tentou-se a purificação por cromatografia em co-

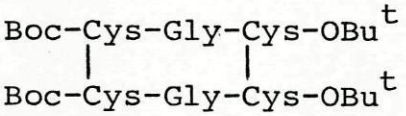
luna de gel de sílica. Verificou-se, por cromatografia em placa, que o composto tinha melhorado em grau de pureza mas não estava ainda totalmente puro.

Conseguiu-se, no entanto, obter o composto cromatograficamente puro, submetendo-o, a seguir, a duas cristalizações de clorofórmio-acetato de etilo (Exp. 21).

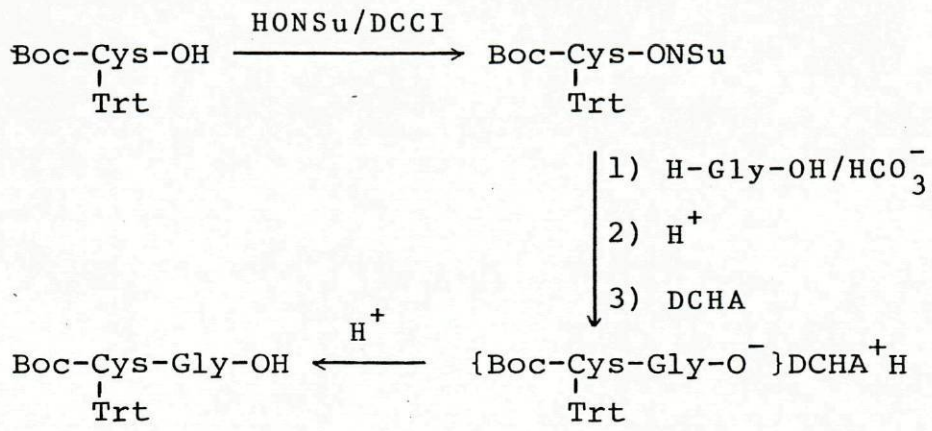
O péptido cíclico assim obtido, que parece ser descrito pela primeira vez, foi caracterizado por análise elementar, espectrometria de R.M.N. e espectrometria de massa.

1.7 - SÍNTESE DO PÉPTIDO CÍCLICO, S,S-S',S'-BIS(N-*TERC*-BUTILOXICARBONIL-L--HEMICISTINILGLICIL-L-HEMICISTINATO DE *TERC*-BUTILO)

Sintetizado o péptido cíclico correspondente a n = 0, já referido, começou-se a trabalhar na execução do esquema 8, que conduziria ao péptido cíclico:

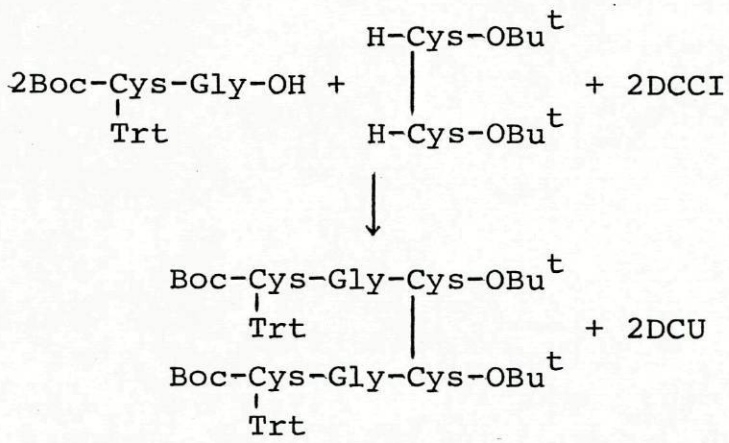


Assim, o dipéptido N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicina foi preparado por condensação do éster N-hidroxissuccinimídico da N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteína (recentemente preparado) com glicina, em meio alcalino. Nas primeiras experiências realizadas isolou-se o composto sob a forma de sal de dicicloexilamónio [42] o qual foi a seguir neutralizado com ácido sulfúrico 1 M, com base na descrição de WILLIAMS [114] e de acordo com o esquema seguinte (Exp. 23·A):



Nas experiências seguintes tentou-se isolar o dipéptido puro sem prévia preparação do respectivo sal de dicicloexilamónio. Isto foi conseguido por cristalização do produto da reacção, sucessivamente, de etoxietano e etoxietano-metanol. Foi portanto este processo que passou a ser utilizado (Exp. 23 B).

O péptido N,N'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicil)-L-cistinato de bis(*terc*-butilo), um dos compostos chave no nosso esquema de síntese, foi obtido por condensação da N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicina com o L-cistinato de bis(*terc*-butilo), usando a N,N'-dicicloexilcarbodiimida como agente de condensação, segundo a equação:

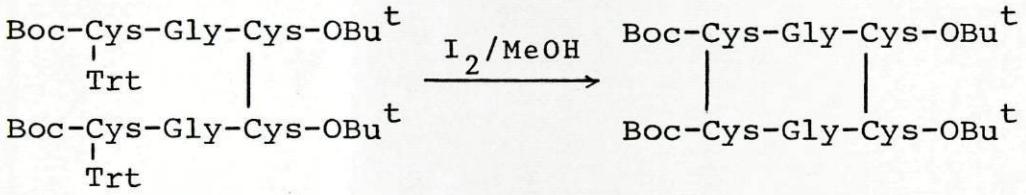


A purificação do composto foi efectuada por trituração sucessiva com éter de petróleo, etoxietano e, por fim, cristalização de acetato de etilo (Exp. 24).

Este péptido, que parece ser descrito pela primeira vez, foi caracterizado por análise elementar e por espectrometria de R.M.N.

Uma vez que a remoção do grupo tritilo, como S-protecção dos resíduos de cisteína, tinha sido bem sucedida, por acção de iodo em metanol, na síntese do péptido cíclico correspondente a n = 0, recorreu-se ao mesmo método de conversão oxidativa directa de tioéteres em dissulfuretos, para a preparação do péptido cíclico, S,S-S',S'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-L-hemicistinilglicil-L-hemicistinato de *terc*-butilo).

Assim, este péptido foi obtido por oxidação, com excesso de iodo em metanol, do péptido N,N'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil--S-tritil-L-cisteinilglicil)-L-cistinato de bis(*terc*-butilo) em solução metanólica diluída (Exp. 25), de acordo com a equação:



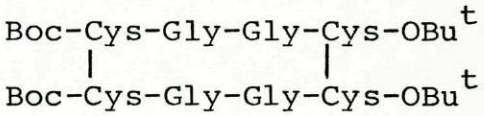
Uma vez mais, surgiram dificuldades na purificação deste composto. Após uma primeira cristalização de metanol, o produto da reacção apresentava-se praticamente insolúvel nos solventes habituais. Depois de goradas todas as tentativas de recristalização do composto, tentou-se a purificação por trituração com diferentes solventes. Verificou-se então que uma primeira cristalização de metanol, seguida de trituração com metanol e etoxietano, conduzia ao composto puro (Exp. 25).

A caracterização deste péptido cíclico que parece ser novo, foi feita por análise elementar, espectrometria de R.M.N. e pela técnica de espectrometria de massa "Field Desorption".

Com a síntese deste péptido cíclico ficou completado o esquema 8.

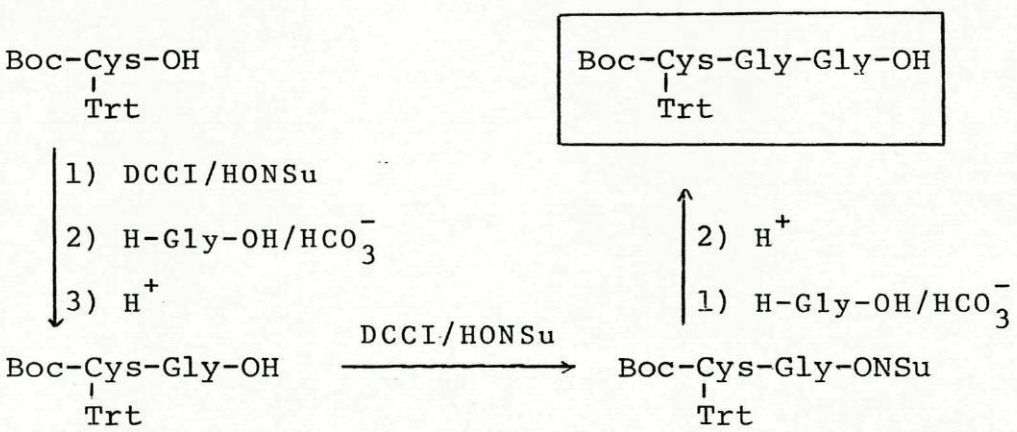
1.8 - SÍNTESE DO PÉPTIDO CÍCLICO S,S-S',S'-BIS(N-*TERC*-BUTILOXICARBONIL-L--HEMICISTINILGLICILGLICIL-L-HEMICISTINATO DE *TERC*-BUTILO)

Passou-se em seguida a trabalhar no sentido de executar o esquema 9 que levaria à síntese do péptido cíclico



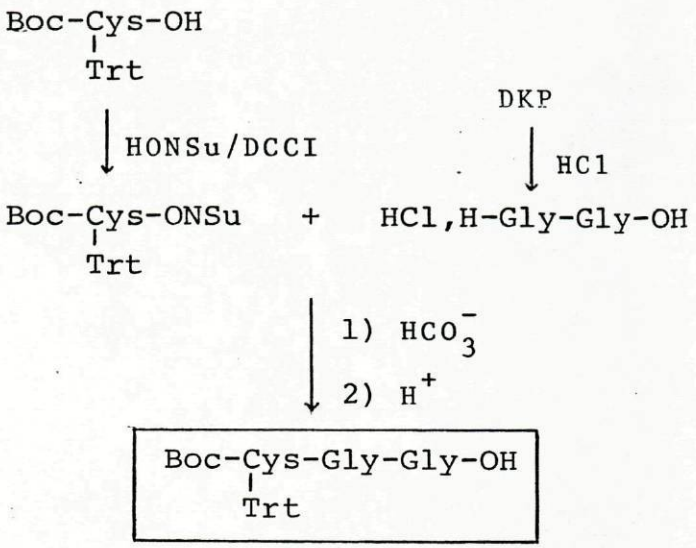
Alguns compostos iniciais tiveram que voltar a ser preparados e outros foram sintetizados pela primeira vez.

Assim, o péptido N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicilglicina foi sintetizado por duas vias diferentes. Num dos processos, preparou-se e isolou-se o éster N-hidroxissuccinimídico da N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicina (Exp. 26) o qual por reacção com glicina, em meio alcalino, conduziu ao composto requerido (Esquema 10) (Exp. 27 A).



Esquema 10

Usou-se ainda outro processo, que conduziu a resultados idênticos, efectuando-se a condensação do éster N-hidroxissuccinimídico da N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteína com cloreto de glicilglicina em meio alcalino, segundo o esquema 11 (Exp. 27 B).



Esquema 11

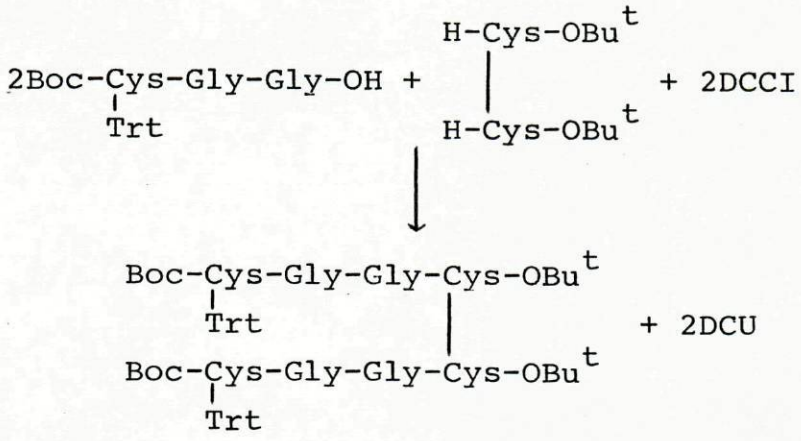
Foram infrutíferas todas as tentativas de purificação, por cristalização, do péptido obtido por ambos os processos mencionados. Preparou-se então o respectivo sal de dicicloexilamónio na esperança de, por neutralização deste, obter o péptido puro ou em estado de mais fácil purificação por cristalização. No entanto, também não se conseguiu, por este processo, a purificação do composto.

Recorreu-se então à cromatografia em coluna de gel de sílica, tendo-se conseguido a purificação do péptido, por eluição sucessiva com clorofórmio e clorofórmio-ácido acético (18:1).

Após evaporação do solvente de eluição, o resíduo obtido foi triturado várias vezes com éter de petróleo, o que facilitou a remoção de vestígios de ácido acético. O composto apresentou-se como um sólido branco, cromatograficamente puro (Exp. 27 A).

A caracterização do péptido assim obtido, N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicilglicina, que parece ser novo, foi feita por análise elementar e por espectrometria de R.M.N.

A síntese do péptido N,N'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-S--tritil-L-cisteinilglicilglicil)-L-cistinato de bis(*terc*-butilo), foi realizada por condensação da N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicilglicina, acabada de referir, com o L-cistinato de bis(*terc*-butilo), utilizando a N,N'-dicicloexilcarbodiimida como agente de condensação (Exp. 28), de acordo com a equação:



Nesta reacção verificou-se a necessidade de manter a temperatura abaixo de -10°C (-10°C a -20°C) durante todo o tempo de reacção (cerca de quinze dias).

Nas primeiras experiências realizadas, em que a temperatura de reacção era mantida abaixo de -10°C durante a adição de carbodiimida e apenas mais uma ou duas horas, o composto vinha fortemente contaminado com uma impureza, possivelmente uma N-acilureia.

A purificação do produto da reacção não foi possível, uma vez mais, por simples processo de recristalização.

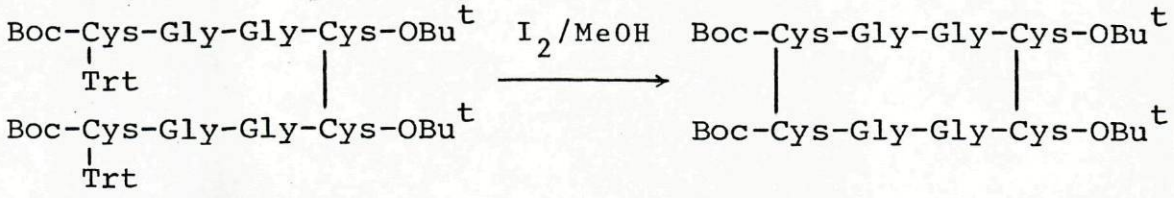
O composto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica. Após várias experiências, encontrou-se o sistema de solventes mais adequado para a purificação do composto. Assim, fez-se a eluição sucessivamente com clorofórmio o que permitiu eliminar algumas das contaminações e clorofórmio-etanol (9:1) o que permitiu extrair o péptido requerido.

Deste modo, na maior parte das experiências realizadas, o composto foi recolhido cromatograficamente puro. Quando tal não aconteceu, a purificação foi completada com uma cristalização de acetona (Exp. 28).

O péptido puro assim obtido, que parece ser novo, foi caracterizado por análise elementar e por espectrometria de R.M.N.

A síntese do péptido cíclico, S,S-S',S'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-L-hemicistinilglicilglicil-L-hemicistinato de *terc*-butilo) foi efectuada por oxidação, com iodo em metanol, do péptido N,N'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicilglicil)-L-cistinato de bis(*terc*-butilo), em solução metanóli-

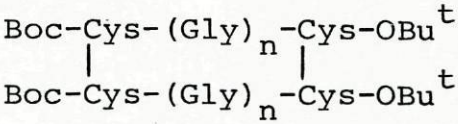
ca diluída, em condições idênticas às utilizadas para os outros péptidos cíclicos já referidos (Exp. 29).



O composto resistiu às tentativas de purificação por cristalização. Recorreu-se mais uma vez à cromatografia em coluna de gel de sílica. Por eluição com clorofórmio-etanol (19:1) foram extraídas, sucessivamente, algumas impurezas e depois o péptido cíclico ainda levemente contaminado. A purificação foi conseguida com uma cristalização de metanol.

O péptido cíclico assim obtido, que parece ser novo, foi caracterizado por análise elementar, pela técnica de espectrometria de massa "Field Desorption" e por espectrometria de R.M.N.

Com a síntese deste péptido cíclico, ficou completado o esquema 9, e também o programa que me tinha sido atribuído que consistia na síntese de péptidos cíclicos de L-cistina e glicina de fórmula geral:



n = 0, 1, 2

1.9 - RESUMO DOS RESULTADOS

No quadro 1 apresentam-se as características dos péptidos sintetizados do tipo

$$[\text{Boc-}\underset{\underset{\text{Trt}}{|}}{\text{Cys}}\text{-(Gly)}_n\text{-}\underset{|}{\text{Cys}}\text{-OBu}^t]_2$$

e no quadro 2 as dos péptidos cíclicos de fórmula geral

$$[\text{Boc-}\underset{|}{\text{Cys}}\text{-(Gly)}_n\text{-}\underset{|}{\text{Cys}}\text{-OBu}^t]_2$$

1.10 - CONCLUSÕES GERAIS

Foi realizado o estudo de um novo método de síntese de péptidos cíclicos simétricos, protegidos, de L-cistina, baseado na utilização simultânea de derivados adequados de L-cisteína e L-cistina. Do estudo efectuado destacam-se os seguintes resultados:

A - Sintetizaram-se, com bons rendimentos, os seguintes péptidos cíclicos simétricos, protegidos, de L-cistina e glicina:

(a) S,S -S',S'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-L-hemicistinil-L--hemicistinato de *terc*-butilo)

(b) S,S-S',S'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-L-hemicistinilglicil-L-hemicistinato de *terc*-butilo)

QUADRO 1

Péptido	*p.f./ °C*	$[\alpha]_D^{20}$	*η(%)*
$[Boc\text{-}Cys(Trt)\text{-}Cys\text{-}OBu^t]_2$	114(a)	-3,4° (c 0,50 em $CHCl_3$)	50
$[Boc\text{-}Cys(Trt)\text{-}Gly\text{-}Cys\text{-}OBu^t]_2$	155(b)	+25,7° (c 1,00 em $CHCl_3$)	40
$[Boc\text{-}Cys(Trt)\text{-}(Gly)_2\text{-}Cys\text{-}OBu^t]_2$	122-124(c)	+18,0° (c 0,90 em $CHCl_3$)	55

(a) purificado por cristalização de etoxietano; (b) purificado por cristalização de acetato de etilo; (c) purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica, usando sucessivamente os solventes $CHCl_3$ e $CHCl_3$/EtOH (9:1), seguida de uma cristalização de acetona, quando necessário.

QUADRO 2

Péptido cíclico	*p.f. / °C*	*η(%)*	*Massa molecular (m/e)*
$[Boc\text{-}Cys\text{-}Cys\text{-}OBu^t]_2$	198-199[a]	56	757 (EI-MS)[d]
$[Boc\text{-}Cys\text{-}Gly\text{-}Cys\text{-}OBu^t]_2$	200-202[b]	53	871 (FD-MS em piridina)[e]
$[Boc\text{-}Cys\text{-}(Gly)_2\text{-}Cys\text{-}OBu^t]_2$	164[c]	73	985 (FD-MS em metanol)[f]

(a) purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (usando o solvente $CHCl_3$) seguida de duas cristalizações de $CHCl_3$/AcOEt; (b) purificado por cristalização de metanol seguida de trituração com metanol e etoxietano, sucessivamente; (c) purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica, usando o solvente $CHCl_3$/EtOH (19:1), seguida de uma cristalização de metanol; (d) $C_{30}H_{52}N_4O_{10}S_4$ requer 757; (e) $C_{34}H_{58}N_6O_{12}S_4$ requer 871; (f) $C_{38}H_{64}N_8O_{14}S_4$ requer 985.

(c) S,S-S',S'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-L-hemicistinilglicilglicil-L-hemicistinato de *terc*-butilo).

Estes péptidos parecem ser descritos pela primeira vez.

B - Como intermediários importantes na execução dos esquemas de síntese adoptados, prepararam-se os péptidos de L-cisteína e L-cistina do tipo $\left[\text{Boc-}\underset{\text{Trt}}{\text{Cys}}\text{-(Gly)}_n\text{-Cys-OBu}^t\right]_2$ (n = = 0, 1 e 2). Estes péptidos, que parecem ser descritos pela primeira vez, foram sintetizados por condensação de derivados de cisteína e glicina do tipo $\text{Boc-}\underset{\text{Trt}}{\text{Cys}}\text{-(Gly)}_n\text{-OH}$ (n = 0, 1 e 2) com o L-cistinato de bis(*terc*-butilo), utilizando o método da N,N'-diciclohexilcarbodiimida.
O controlo da temperatura mostrou ser importante na síntese do péptido $\left[\text{Boc-}\underset{\text{Trt}}{\text{Cys}}\text{-(Gly)}_2\text{-Cys-OBu}^t\right]_2$. Durante toda a reacção de condensação a temperatura teve de ser mantida abaixo de $-10^{\circ}C$.

C - O componente amino das sínteses referidas na alínea anterior, L-cistinato de bis(*terc*-butilo), foi preparado por dois processos diferentes:

(a) por remoção do grupo ftaloílo do composto N,N'-diftaloil-L-cistinato de bis(*terc*-butilo), previamente sintetizado;
(b) por esterificação directa da L-cistina.

Foi este último processo que veio a ser utilizado por envolver menor número de fases.

D - A utilização de iodo em metanol, como método de conversão directa de tritiltioéteres em dissulfuretos, mostrou ser ainda muito adequada nas ciclizações efectuadas. Estas ci-

clizações realizaram-se com rendimentos entre 50% e 70% e a execução laboratorial foi simples.

E - Dum modo geral, a purificação dos compostos mostrou ser muito trabalhosa, mas foi possível estabelecer as melhores condições de obter os compostos puros, tendo-se recorrido frequentemente à cromatografia em coluna de gel de sílica.

F - Finalmente, parece poder concluir-se que o método usado neste programa de investigação se pode estender à síntese doutros péptidos cíclicos simétricos de L-cistina.

2 - DESCRIÇÃO DAS EXPERIÊNCIAS

2.1 - NOTAS GERAIS

A pureza dos compostos foi confirmada por cromatografia em placas de gel de sílica (60 F_{254} da Merck), usando-se os seguintes sistemas de solventes:

(1) Clorofórmio-metanol (9:1)
(2) Benzeno-clorofórmio-etanol (12:12:1)
(3) Ácido acético-clorofórmio (1:9)
(4) Clorofórmio
(5) Benzeno-clorofórmio-etanol (12:24:1)
(6) Etanol-clorofórmio (1:18)
(7) Acetato de etilo-metanol (40:1)
(8) 1-Butanol-ácido acético-água (4:1:5)
(9) Piridina-ácido acético-água (1:2:2)

Os compostos com o grupo amino livre foram revelados por pulverização com uma solução de ninidrina a 0,3% em 1-butanol seguida de aquecimento a 100°C durante 10 minutos. Os outros compostos foram revelados pelo método do hidrogenossulfato de amónio [123]. Os valores de R_F referidos na parte experimental são dados como uma indicação geral e não como constantes para definir os diferentes compostos.

Na cromatografia em coluna utilizou-se gel de sílica (< 0,08 mm) da Merck, especial para esse fim.

As evaporações dos solventes foram efectuadas em evaporador rotativo, sob pressão reduzida.

Os extractos orgânicos foram secos sobre sulfato de magnésio. O diclorometano usado foi seco ($CaCl_2$) e destilado. A trietilamina foi destilada na presença de P_2O_5.

O éter de petróleo usado refere-se à fracção de p.e. 40-60°C.

As rotações ópticas foram medidas com um polarímetro Bellingham e Stanley Pepol 66.

A análise por espectrometria de ressonância magnética nuclear foi realizada a 33°C com espectrómetros Perkin - Elmer R 32, 90 MHZ e Varian 60 MHZ. Os espectros de R.M.N. foram, na maior parte, registados pelo Dr. J. A. Bettencourt Baptista, no Departamento de Química da Faculdade de Ciências do Porto.

Os compostos enviados para análise elementar foram secos sob vácuo, na presença de P_2O_5. As microanálises foram efectuadas por Dr. Ilse Beetz (Kronach, Alemanha).

Os pontos de fusão foram determinados pelo método do capilar e não foram corrigidos.

Os espectros de massa foram registados por Dr. J. H. Jones (The Dyson Perrins Laboratory, Oxford) e Mr. J. C. Promé (Centre de Recherche de Biochimie et Génétique Céllulaire du CNRS, Toulouse).

2.2 - ESTUDOS PRELIMINARES

Exp. 1 - Preparação da N,N'-bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistina

A - *Preparação do azidometanoato de terc-butilo*

Este composto foi preparado por um processo descrito na literatura [21], com rendimento de 89%, sendo utilizado com bons resultados sem prévia purificação por destilação.

B - *Acilação da L-cistina*

A N,N'-bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistina foi preparada por um método descrito na literatura [26], por acção do azidometanoato de *terc*-butilo sobre uma solução de L-cistina em meio alcalino. No entanto, adicionou-se hidróxido de sódio aquoso, durante três dias, por meio dum autotitulador de modo a manter o pH da solução a cerca de 9,8 conforme vem descrito no trabalho de SCHNABEL [94]. Isolou-se este derivado da L-cistina com rendimento de 84%, $R_F(9) = 0,67$, p.f. 144-146°C, $[\alpha]_D^{24}$-134,2° (c 2,00 em MeOH), (lit. [26] p.f. 144,5-145°C, $[\alpha]_D^{25}$-133,2° (c 1,20 em MeOH).

Exp. 2 - Preparação do cloreto de glicilglicina

Este péptido foi preparado de acordo com o processo descrito por SCHOTT e seus colaboradores [96], com rendimento de 89% e p.f. 139-141°C (lit.[100] p.f. 142-143°C).

Exp. 3 - Preparação do cloreto de glicilglicinato de etilo

Por esterificação directa do cloreto de glicilglicina, com etanol em meio ácido anidro [100], obteve-se o éster etílico correspondente com o rendimento de 86%, p.f. 182-184°C (lit.[100] p.f. 181°C).

Exp. 4 - Preparação do N,N'-bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistinato de bis(*p*-nitrofenilo)

Este éster activado da L-cistina foi preparado pelo método de ZAHN e seus colaboradores [25,75], fazendo-se reagir a N,N'-bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistina com *p*-nitrofenol por acção da DCCI. O rendimento do composto puro foi de cerca de 50%, p.f. 167-170°C (lit. [25] p.f. 170-172°C).

Exp. 5 - Preparação do N,N'-bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistinil-bis(glicilglicinato de etilo)

A - *Método da N,N'-dicicloexilcarbodiimida*

$$\begin{array}{l} \text{Boc-Cys-OH} \\ \quad\vert \\ \text{Boc-Cys-OH} \\ \quad 440{,}6 \end{array} + 2Cl^{-}\{\overset{+}{H}_2\text{-(Gly)}_2\text{-OEt}\} + 2DCCI + 2Et_3N \longrightarrow$$

$$\longrightarrow \begin{array}{l} \text{Boc-Cys-(Gly)}_2\text{-OEt} \\ \quad\vert \\ \text{Boc-Cys-(Gly)}_2\text{-OEt} \\ \quad 724{,}9 \end{array} + 2DCU + 2\{\overset{+}{Et_3NH}\}\ Cl^{-}$$

A uma suspensão de N,N'-bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistina (6,60 g; 0,015 mol) em diclorometano seco (60 ml), arrefecida a -10°C, adicionou-se em pequenas porções e com agitação,

N,N'-dicicloexilcarbodiimida (6,60 g; 0,032 mol).

Após 10 minutos, juntou-se uma mistura de cloreto de glicilglicinato de etilo (5,88 g; 0,030 mol) e trietilamina (3,03 g; 0,030 mol) em diclorometano (30 ml). A mistura da reacção foi mantida, com agitação, a 0°C durante 4 horas e à temperatura ambiente durante mais 4 dias.

Filtrou-se a mistura da reacção e adicionou-se ao filtrado ácido acético glacial (0,2 ml). Após 2 horas a 0°C, filtrou-se a N,N'-dicicloexilureia precipitada e extraiu-se o filtrado, sucessivamente, com água, solução aquosa de ácido cítrico a 5%, solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio 1 M e água. Depois de seca ($MgSO_4$) a solução foi evaporada, obtendo-se um sólido amarelado que foi dissolvido em acetona (30 ml).

Após 24 horas a 0°C, separou-se por filtração uma nova quantidade de ureia. Evaporou-se a solução de novo à secura, obtendo-se um sólido que foi em seguida triturado com éter de petróleo e cristalizado de acetato de etilo.

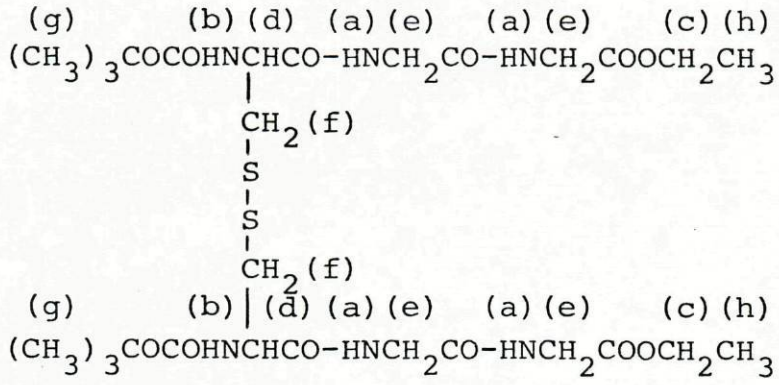
Isolaram-se 5,3 g (49%) do composto de p.f. 98°C. Após duas recristalizações de acetato de etilo, obtiveram-se 4,6 g (42%) de péptido puro de p.f. 120-122°C $[\alpha]_D^{20}$ -88,2° (c 2,00 em MeOH), $R_F(9) = 0,90$, $R_F(1) = 0,34$.

A análise elementar do composto, que parece ser descrito pela primeira vez, deu os seguintes resultados:

	C%	H%	N%	S%
Encontrado:	46,4	6,7	11,6	8,9
$C_{28}H_{48}O_{12}N_6S_2$ requer:	46,8	6,8	10,9	8,9

724,9

O espectro de R.M.N. do péptido, em DMSO-d_6 (Fig. 1), está de acordo com a estrutura:



Protões	τ(p.p.m.)	Intensidade relativa
a	1,70-2,00	4
b	2,71-3,10	2
c	5,68-5,98	4
d+e	5,98-6,30	10
f	6,50-6,89	4
g	8,45-8,60	18
h	8,60-8,85	6

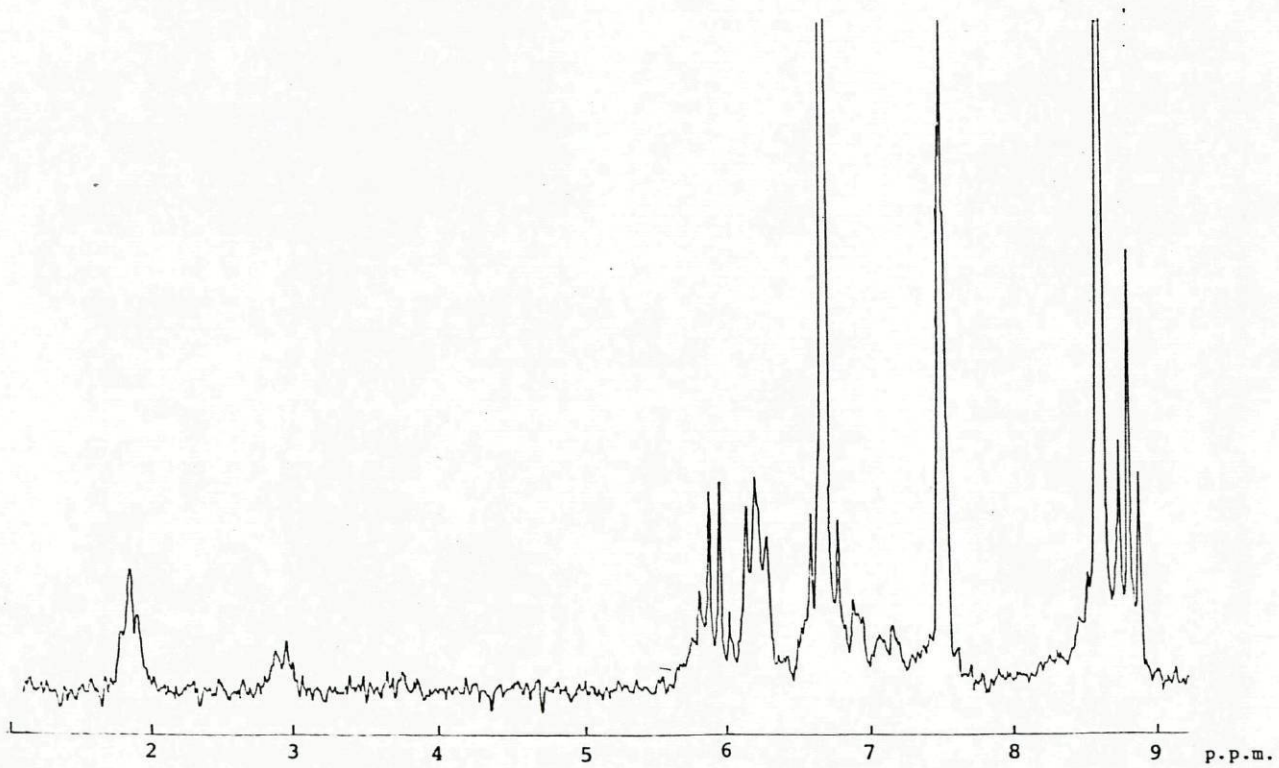
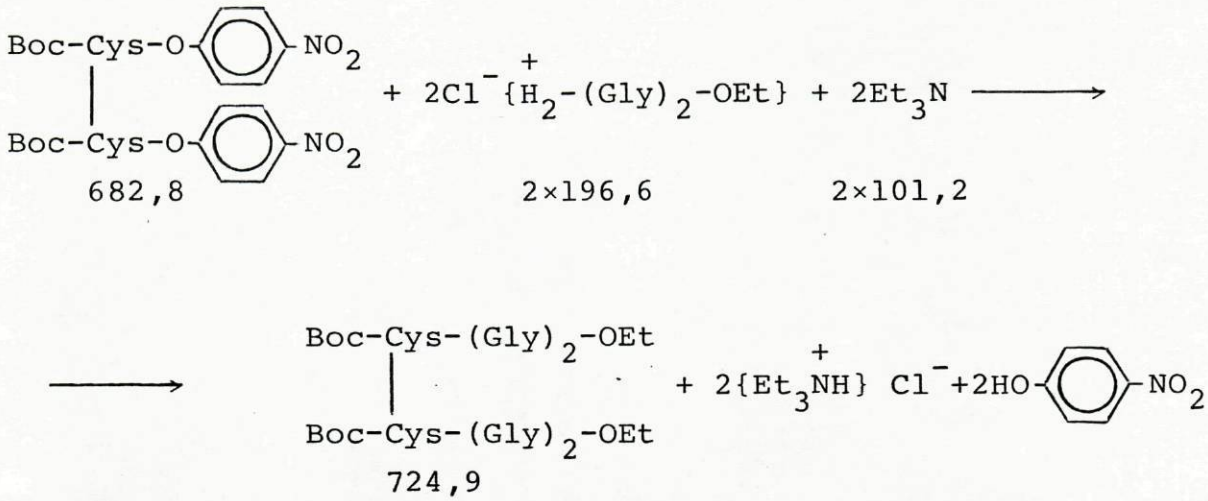


Fig. 1 - Espectro de R.M.N. do $[Boc\text{-}Cys\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}OEt]_2$ em DMSO-d6

B - *Método dos ésteres p-nitrofenílicos*

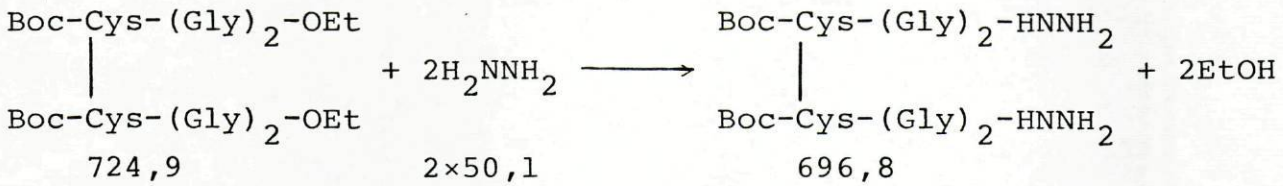


A uma suspensão de cloreto de glicilglicinato de etilo (0,786 g; 0,004 mol) em diclorometano seco (20 ml), arrefecida a -20°C e agitada magneticamente, adicionou-se N,N'-bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistinato de bis(*p*-nitrofenilo) (1,37 g; 0,002 mol) e trietilamina (0,404 g; 0,004 mol).

A mistura de reacção foi mantida com arrefecimento durante 30 minutos e à temperatura ambiente durante 4 dias, tendo-se em seguida extraído sucessivamente com água, solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio 1 M (até desaparecimento da cor amarela devida ao *p*-nitrofenol), solução aquosa de ácido acético a 5% e solução saturada de cloreto de sódio. Depois de seca ($MgSO_4$) a camada orgânica foi evaporada à secura, tendo-se obtido um sólido levemente amarelado devido a vestígios de *p*-nitrofenol.

Após 5 recristalizações de acetato de etilo, obteve-se 0,36 g (25%) de um sólido branco que, por cromatografia e ponto de fusão, mostrou ser idêntico ao péptido N,N'-bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistinil-bis(glicilglicinato de etilo), preparado pelo método da DCCI.

Exp. 6 - Tentativa de preparação da hidrazida da N,N'-bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistinil-bis(glicilglicina)

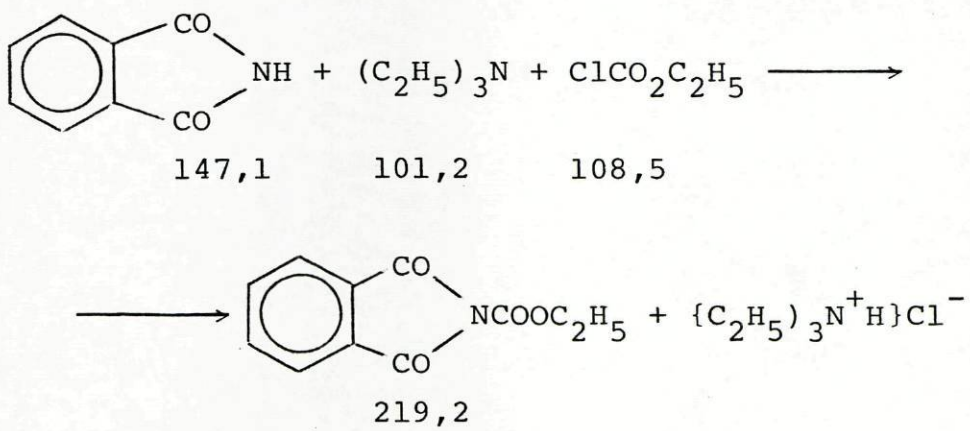


A uma solução de N,N'-bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistinil-bis(glicilglicinato de etilo) (1,00 g; 0,0014 mol) em etanol (22 ml) adicionou-se hidrato de hidrazina (1,0 ml).

A mistura foi deixada com agitação durante 8 dias. Em seguida filtrou-se um sólido impuro (0,54 g; 55%) com aspecto gelatinoso.

Após várias cristalizações de etanol-água (1:1), o composto mostrou-se sempre cromatograficamente impuro. Em face das dificuldades encontradas na obtenção da hidrazida pura, recorreu-se a um esquema de síntese para os péptidos cíclicos em que não foi necessária a utilização deste composto.

Exp. 7 - Preparação da N-etiloxicarbonilftalimida



Este composto foi preparado com base num processo descrito na literatura [77] por acção do clorometanoato de etilo sobre ftalimida dissolvida numa mistura de N,N-dimetilformamida e

trietilamina. No entanto, usaram-se maiores quantidades de DMF e de TEA (para facilitar a dissolução da ftalimida) e maior volume de clorometanoato de etilo (o que pareceu ser necessário para que a reacção fosse completa).

Assim, dissolveu-se ftalimida (14,5 g; 0,1 mol) numa mistura de DMF (90 ml) e trietilamina (11,4 ml).

À solução, arrefecida a 5-10°C e agitada vigorosamente, juntou-se clorometanoato de etilo (19,4 ml) em pequenas porções, mantendo sempre a mistura da reacção àquela temperatura.

Depois de completada a adição do clorometanoato de etilo, deixou-se a mistura da reacção à temperatura ambiente, sempre com agitação, durante mais uma hora.

A solução, amarelo-acastanhada, foi lançada sobre 300 ml de água, com agitação forte, tendo precipitado um sólido. Este foi separado por filtração, lavado abundantemente com água e seco em exsicador. Após uma cristalização de etanol, obteve-se o composto (15,4 g; 70%), cromatograficamente puro de p.f. 82-86°C (lit. [77] p.f. 80°C).

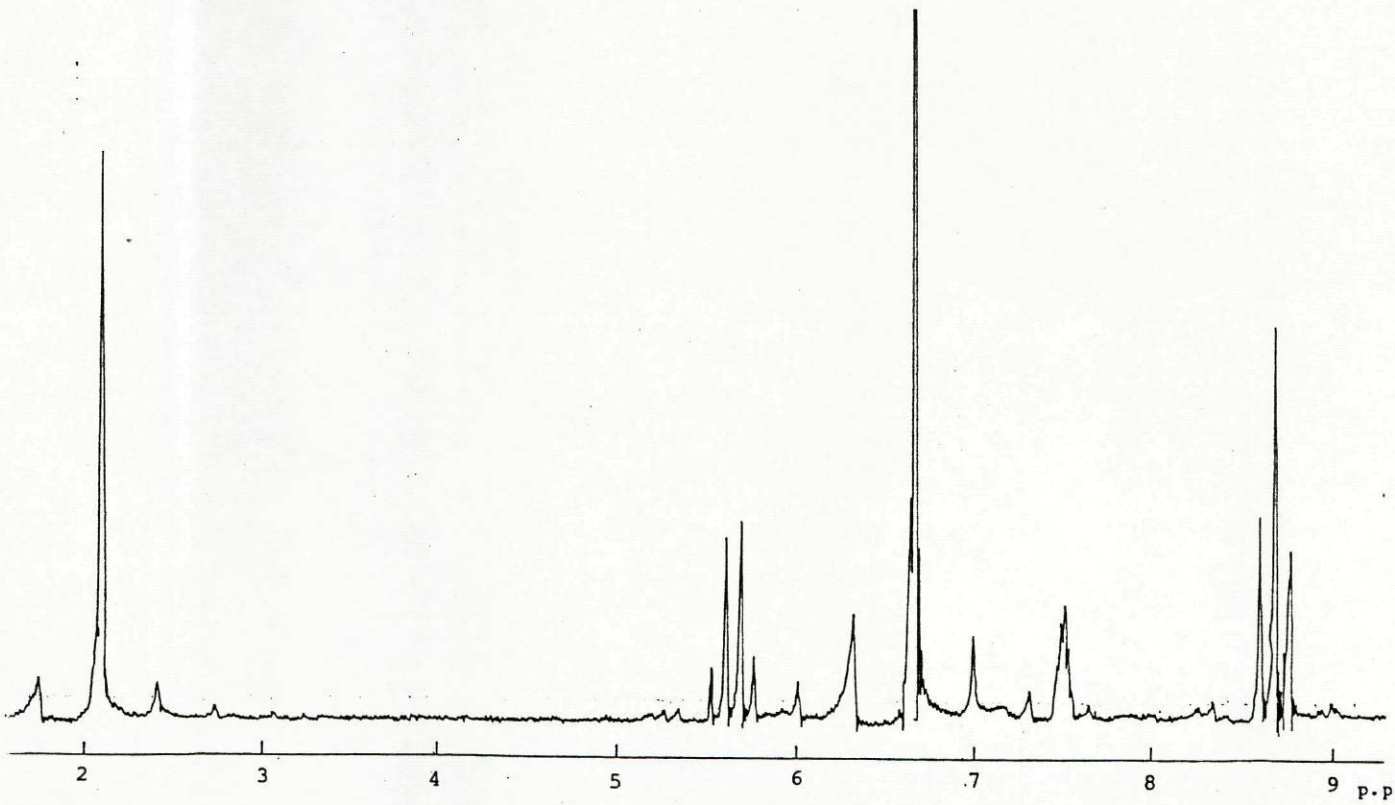
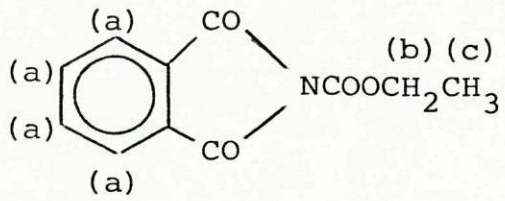


Fig. 2 - Espectro de R.M.N. da PhtNCOOEt em DMSO-d6

O espectro de R.M.N. da etiloxicarbonilftalimida, em DMSO-d_6 (Fig. 2), foi interpretado do seguinte modo:



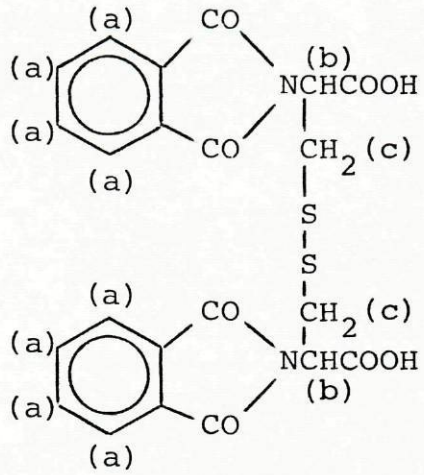
Protões	τ (p.p.m.)	Intensidade relativa
a	2,00-2,20	4
b	5,51-5,79	2
c	8,54-8,78	3

Exp. 8 - Preparação da N,N'-diftaloil-L-cistina

Este derivado da cistina foi preparado por um processo descrito por NEFKENS e seus colaboradores [77] que envolve a reacção da L-cistina com etiloxicarbonilftalimida, em meio alcalino. No entanto, usou-se uma pequena quantidade de DMF para favorecer a solubilização da L-cistina e utilizaram-se tempos de reacção de cerca de 2 horas.

O composto foi isolado puro com rendimento de 75%, $R_F(8) = 0,98$, $R_F(9) = 0,55$, p.f. 104-115°C, $[\alpha]_D^{18}$ -288,0° (c 1,00 em DMF), (lit. [77] p.f. 120°C, $[\alpha]_D^{22,5}$ -289,7° (c 1, em DMF).

O espectro de R.M.N. deste derivado da L-cistina, em DMSO-d_6 (Fig. 3), foi interpretado do seguinte modo:



Protões	τ (p.p.m.)	Intensidade relativa
a	2,02-2,30	8
b	4,82-5,10	2
c	6,42-6,72	4

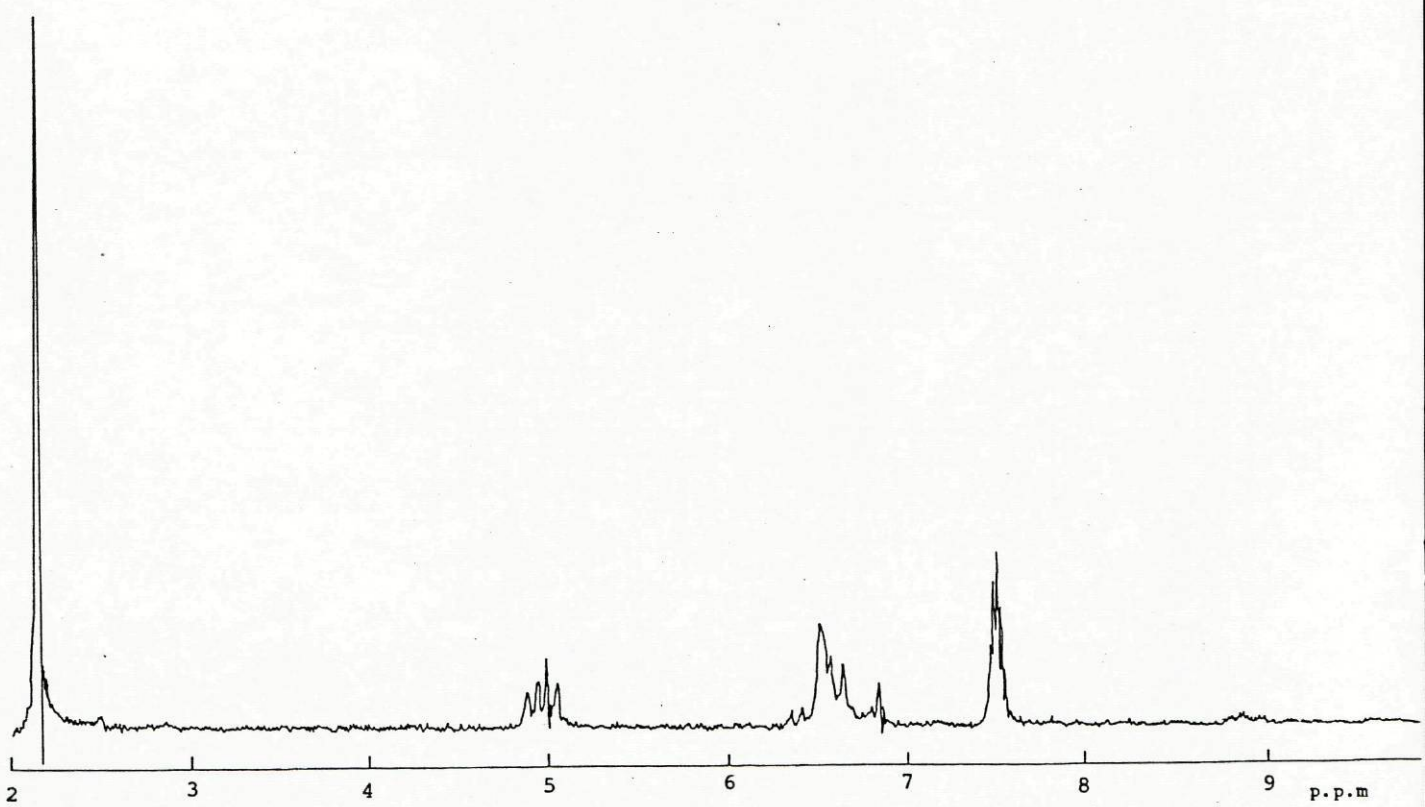
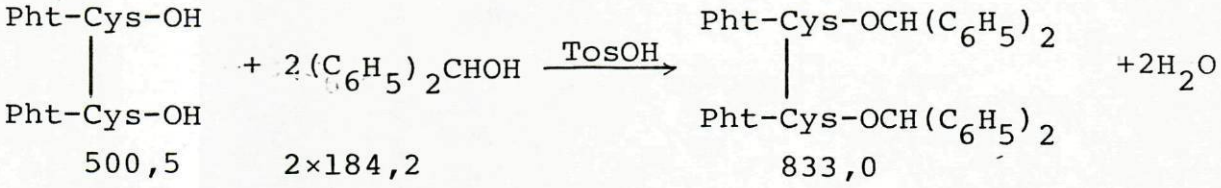


Fig. 3 - Espectro de R.M.N da $[Pht\text{-}Cys\text{-}OH]_2$ em DMSO-d6

Exp. 9 - Preparação do N,N'-diftaloil-L-cistinato de dibenzidrilo



Num balão de 150 ml, dissolveu-se benzidrol (1,93 g; 0,0104 mol) em benzeno seco (80 ml). À solução obtida, juntou-se N,N'-diftaloil-L-cistina (2,50g; 0,005 mol) e ácido *p*-toluenossulfónico como monoidrato (0,09 g; 0,0005 mol).

Adaptou-se ao balão um aparelho de DEAN e STARK e refluxou-se a mistura de reacção durante 24 horas.

Após este período, separou-se por filtração uma pequena porção de sólido em suspensão. O filtrado, depois de arrefecido à temperatura ambiente, foi lavado com solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio 0,1 M, solução aquosa saturada de cloreto de sódio, seco ($MgSO_4$) e evaporado à secura.

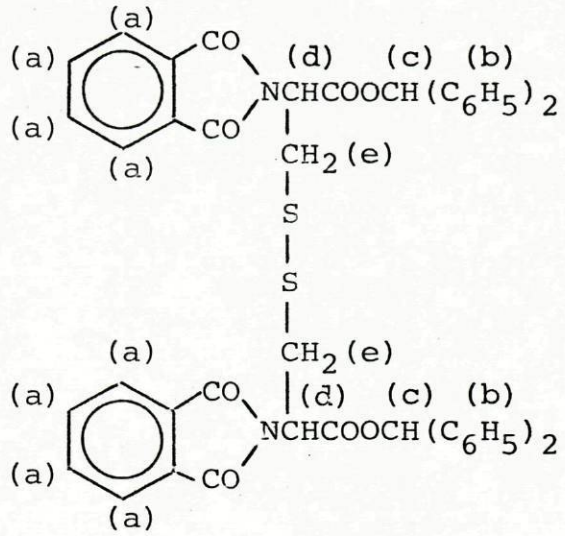
O resíduo obtido foi triturado com éter de petróleo, dando um sólido (2,8 g; 67%) de p.f. 76°C (amolecendo desde 64°C).

Após duas recristalizações de acetato de etilo-éter de petróleo e outras duas de acetato de etilo-etanol, obteve-se o éster desejado, cromatograficamente puro (2,1 g; 50%) de p.f. 112-114°C, $[\alpha]_D^{20}$ -210,0° (c 1,00 em $CHCl_3$), $R_F(1) = 0,92$.

A análise elementar do composto, que parece ser descrito pela primeira vez, deu os seguintes resultados:

	C%	H%	N%	S%
Encontrado:	68,7	4,4	3,5	7,6
$C_{48}H_{36}N_2O_8S_2$ requer: 833,0	69,2	4,4	3,4	7,7

O espectro de R.M.N. do composto, em $CDCl_3$ (Fig. 4), está de acordo com a estrutura:



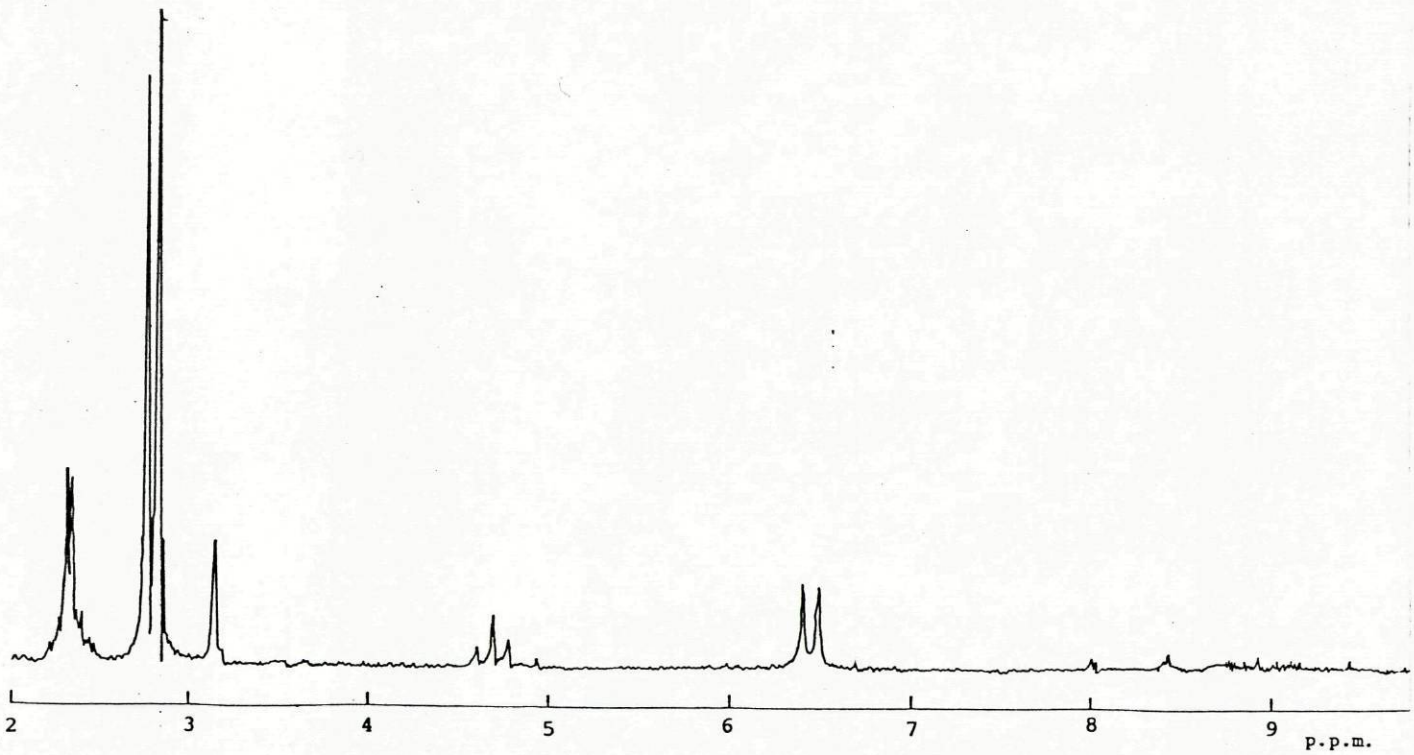
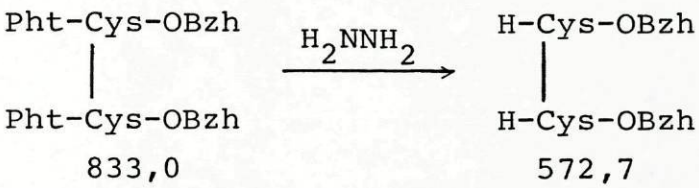


Fig. 4 - Espectro de R.M.N. do $[Pht\text{-}Cys\text{-}OBzh]_2$ em $CDCl_3$

Protões	τ (p.p.m.)	Intensidade relativa
a	2,20-2,40	8
b	2,40-2,78	20
c	3,10-3,20	2
d	4,42-4,80	2
e	6,30-6,60	4

Exp. 10 - Tentativas de preparação do L-cistinato de dibenzidrilo



A remoção do grupo ftaloílo do composto N,N'-diftaloil--L-cistinato de dibenzidrilo foi tentada por acção de hidrato de hidrazina, quer à temperatura ambiente [19], quer à ebulição [40], com base em métodos descritos na literatura para outros N-ftaloilaminoácidos.

A - *Por acção de hidrato de hidrazina, à temperatura ambiente*

Dissolveu-se N,N'-diftaloil-L-cistinato de dibenzidrilo (0,208 g; 0,00025 mol) em benzeno (1 ml). À solução, agitada magneticamente, juntou-se hidrato de hidrazina (0,031 g; 0,00062 mol) e deixou-se reagir durante 18 horas, à temperatura ambiente. Após este período, filtrou-se e o filtrado foi evaporado à secura, obtendo-se um óleo branco (0,15 g) que foi dissolvido em acetato de etilo.

A solução obtida foi lavada com solução aquosa de carbona-

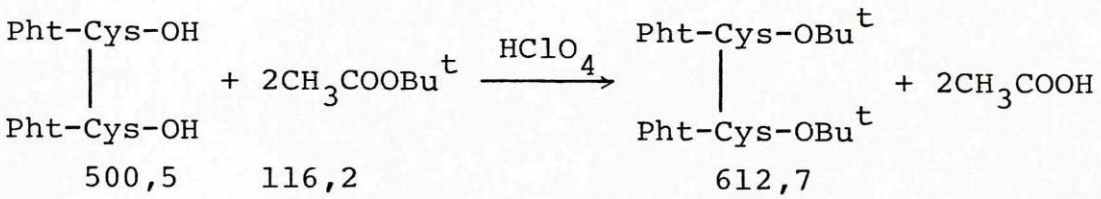
to de potássio a 6%, solução aquosa saturada de cloreto de sódio e água.

Depois de seca ($MgSO_4$) a solução foi evaporada à secura, obtendo-se um óleo branco que, por trituração com etoxietano, deu um sólido (0,1 g), cromatograficamente puro, de p.f. 112°C e $R_F(1) = 0,90$. Este sólido mostrou, por cromatografia, ponto de fusão e espectrometria de R.M.N. ser idêntico ao composto inicial.

B - *Por acção de hidrato de hidrazina, à ebulição*

Refluxou-se durante 4 minutos uma mistura, em proporções estequiométricas, de N,N'-diftaloil-L-cistinato de dibenzidrilo e hidrato de hidrazina em metanol. Verificou-se que havia decomposição com libertação de sulfureto de hidrogénio, pelo que se desistiu destas condições de reacção.

Exp. 11 - Preparação do N,N'-diftaloil-L-cistinato de bis(*terc*-butilo)



A uma suspensão de N,N'-diftaloil-L-cistina (1,00 g; 0,002 mol) em acetato de *terc*-butilo (20 ml), juntou-se ácido perclórico aquoso, a 60% (0,086 g; 0,0005 mol). A solução obtida foi mantida à temperatura ambiente durante três dias, com agitação ocasional.

Após este período, a solução foi diluída com acetato de etilo (40 ml) e lavada, sucessivamente, com solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio 0,1 M e água até se obter uma solução neutra.

Secou-se ($MgSO_4$) e evaporou-se a solução, tendo-se obtido um óleo que solidificou por arrefecimento e trituração com éter de petróleo.

Por cristalização de metanol, obteve-se um sólido branco que, por cromatografia, se verificou ser uma mistura de dois componentes (um de $R_F(1)$ muito elevado, praticamente junto à frente do solvente, correspondente ao diéster desejado e o outro de $R_F(1) = 0,40$, provavelmente o monoéster).

A purificação do composto foi feita por cromatografia em coluna de gel de sílica, do seguinte modo:

Dissolveu-se o composto (0,46 g) em clorofórmio (~1 ml) e aplicou-se a uma coluna de gel de sílica em clorofórmio. Utilizaram-se 7,0 g de gel, o que corresponde a cerca de 9,0 cm de enchimento numa coluna de 1,2 cm de diâmetro interno.

A eluição foi feita com clorofórmio, verificando-se o seguinte:

a) A primeira fracção recolhida (~10 ml) continha 0,28 g de diéster cromatograficamente homogéneo de $R_F(1)=0,96$.

b) A segunda fracção (~15 ml) continha ainda diéster (0,11 g) contaminado com uma impureza de $R_F(1) = 0,40$, correspondendo provavelmente ao monoéster.

c) As fracções seguintes já não continham diéster e apresentavam, por cromatografia, duas manchas correspondendo, possivelmente, ao monoéster de $R_F(1) = 0,40$ e a outra contaminação não identificada de $R_F(1) = 0,76$.

O resíduo da segunda fracção, referida em b), foi dissolvido em clorofórmio. A solução obtida foi misturada e agitada com uma suspensão de gel de sílica (2,90 g) em clorofórmio. Em seguida, a mistura foi filtrada através de funil de porcelana com *Kieselguhr* e lavada com clorofórmio. As primeiras porções de filtrado revelaram, por cromatografia, a presença do diéster puro (0,08 g).

No total, conseguiu-se 0,36 g (29%) de N,N'-diftaloil-L-cistinato de bis(*terc*-butilo) de p.f. 129-131°C, $[\alpha]_D^{20}$ -286,4° (c 1,00 em $CHCl_3$), $R_F(1) = 0,96$, $R_F(2) = 0,96$, $R_F(8) = 0,90$.

A análise elementar do composto, que parece ser descrito pela primeira vez, deu os seguintes resultados:

	C%	H%	N%	S%
Encontrado:	58,5	5,7	4,4	10,1
$C_{30}H_{32}N_2O_8S_2$ requer: 612,7	58,8	5,3	4,6	10,5

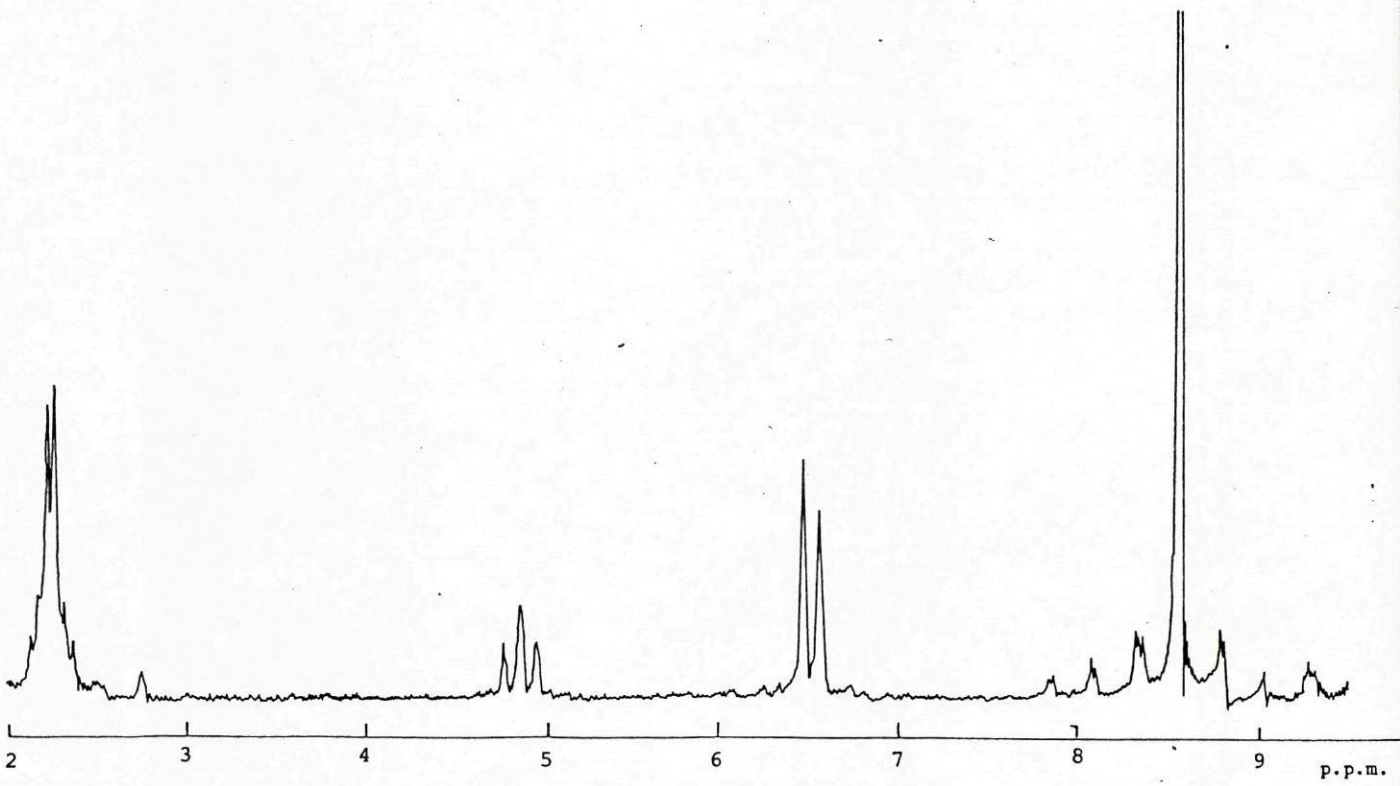
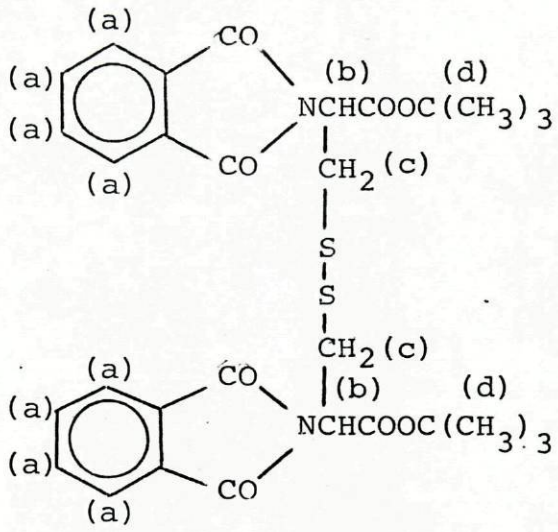


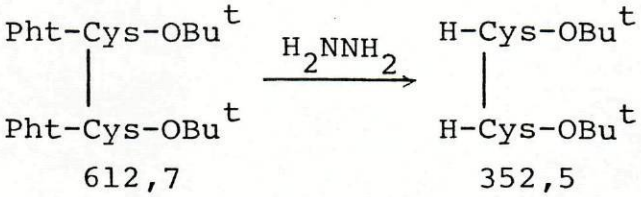
Fig. 5 - Espectro de R.M.N. do $[Pht\text{-}Cys\text{-}OBu^t]_2$ em $CDCl_3$

O espectro de R.M.N. do composto, em $CDCl_3$ (Fig. 5), foi interpretado do seguinte modo:



Protões	τ (p.p.m.)	Intensidade relativa
a	1,90-2,60	8
b	4,60-5,00	2
c	6,39-6,70	4
d	8,30-8,70	18

Exp. 12 - Remoção do grupo ftaloílo do N,N'-diftaloil-L-cistinato de bis(*terc*-butilo)



Dissolveu-se N,N'-diftaloil-L-cistinato de bis(*terc*-butilo) (0,612 g; 0,001 mol) em etanol (2,5 ml) contendo hidrato de hidrazina (0,125 g; 0,0025 mol).

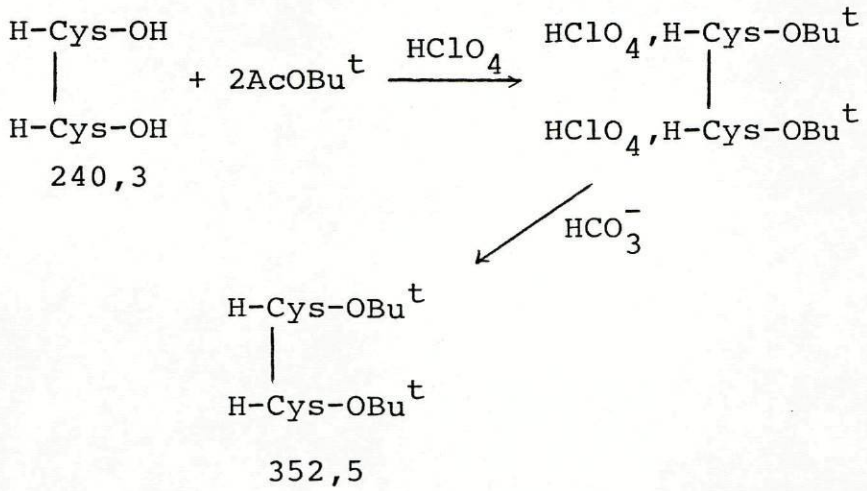
A solução, levemente amarelada, foi mantida à temperatura ambiente, durante 18 horas, com agitação magnética.

Após este período, separou-se por filtração a ftalazina precipitada e o filtrado foi evaporado à secura, tendo-se obtido um óleo que foi dissolvido numa mistura de etoxietano (20 ml) e solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio 1 M (5 ml).

A camada orgânica foi lavada com solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio 1 M, solução aquosa saturada de cloreto de sódio, seca ($MgSO_4$) e evaporada à secura, obtendo-se um óleo branco cromatograficamente puro (0,15 g; 43%).

Este óleo apresentava-se cromatograficamente idêntico a uma amostra de L-cistinato de bis(*terc*-butilo), preparado por esterificação directa da L-cistina (Exp. 13).

Exp. 13 - Preparação do L-cistinato de bis(*terc*-butilo)



Dissolveu-se L-cistina (1,92 g; 0,008 mol) em ácido perclórico aquoso a 60% (5,88 g;0,0352 mol), com agitação suave.

Juntou-se acetato de *terc*-butilo (50 ml) e agitou-se vigorosamente até se obter uma solução homogénea (cerca de 2 horas).

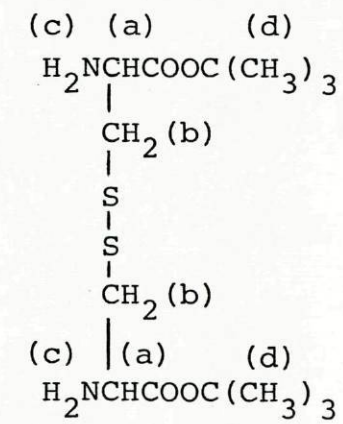
Deixou-se a mistura de reacção em repouso, à temperatura ambiente, durante 2 dias. Precipitou um sólido branco de perclorato de L-cistinato de bis(*terc*-butilo) (por vezes foi necessário triturar a solução com uma espátula, para promover a precipitação deste sólido).

Após arrefecimento a 0°C, durante 24 horas, o sólido foi separado por filtração, lavado abundantemente com etoxietano e, em seguida, dissolvido numa mistura de etoxietano (50 ml) e de hidrogenocarbonato de sódio aquoso 1 M (25 ml).

A camada orgânica foi lavada, sucessivamente, com solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio 1 M (15 ml) e solução aquosa saturada de cloreto de sódio até se obter uma solução neutra.

Depois de seca ($MgSO_4$), a solução foi evaporada, obtendo-se um óleo branco, cromatograficamente puro (1,9 g; 67%), $[\alpha]_D^{20}$ -8,2° (c 2,02 em MeOH), R_F(1) = 0,70. Ocasionalmente, o produto foi obtido sob a forma de um sólido branco, de baixo ponto de fusão.

O espectro de R.M.N. do composto, em DMSO-d_6 (Fig. 6), está de acordo com a estrutura:



Protões	τ (p.p.m.)	Intensidade relativa
a	6,33-6,55	2
b+c	6,70-7,20	8
d	8,50-8,62	18

Notas:

a) O L-cistinato de bis(*terc*-butilo) deve ser utilizado dentro de alguns dias pois tem tendência a sofrer decomposição, tornando-se amarelado.

b) O perclorato de L-cistinato de bis(*terc*-butilo) pode manter-se durante alguns meses, em exsicador, sem se alterar.

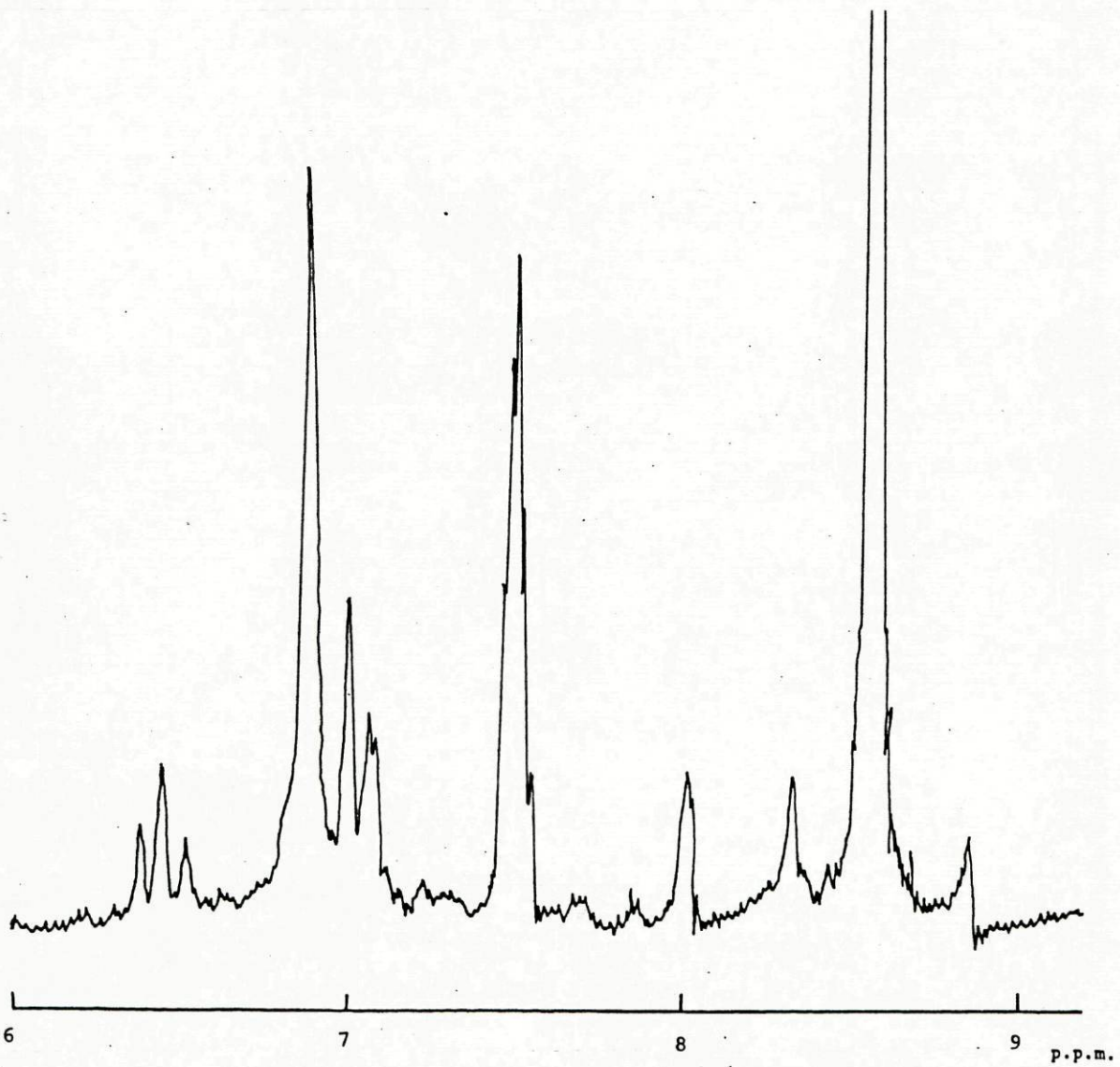


Fig. 6 - Espectro de R.M.N. do $[H\text{-}Cys\text{-}OBu^t]_2$ em DMSO-d6

2.3 - ESTUDO PRÉVIO DA APLICAÇÃO DO L-CISTINATO DE BIS(*TERC*-BUTILO) EM SÍNTESE PEPTÍDICA

Exp. 14 - Preparação do clorotrifenilmetano

Este composto foi preparado por um processo descrito na literatura [81] que envolve a reacção do trifenilmetanol com o cloreto de acetilo, tendo sido isolado com bom rendimento (83%) e p.f. 111°C (lit. [81] p.f.111-112°C).

Exp. 15 - Preparação da N-tritilglicina

Este composto foi preparado por um processo descrito na literatura [101 a], tendo sido obtido com bom rendimento (89%) e p.f. 188-190°C (com decomposição desde 178°C) (lit. [101 a] p.f. 189-191°C com decomposição desde 168-170°C).

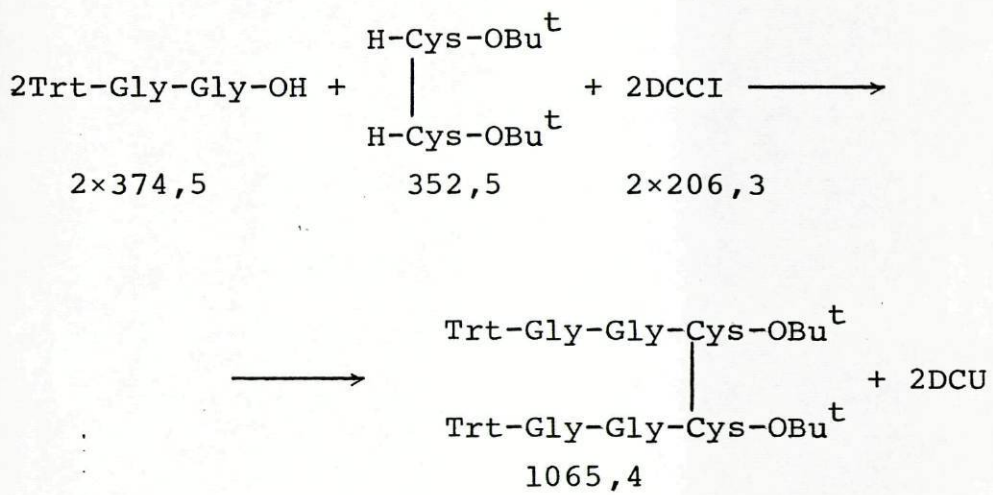
Exp. 16 - Preparação da N-tritilglicilglicina

A síntese deste péptido foi realizada por dois métodos que conduziram a idênticos resultados:

A - Por condensação da N-tritilglicina com cloreto de glicinato de etilo, pelo método da N,N'-dicicloexilcarbodiimida, obteve-se N-tritilglicilglicinato de etilo (80%) de p.f. 160-162°C (lit. [2] p.f. 163-164°C; lit [98] p.f. 159°C). Por hidrólise deste péptido [101 b] obteve-se a N-tritilglicilglicina (93%) de p.f. 179°C (lit. [98] p.f. 168°C; lit. [101 b] p.f. 174-177°C).

B - Por reacção do clorotrifenilmetano com cloreto de glicilglicinato de etilo em clorofórmio contendo trietilamina, de acordo com um método descrito na literatura [101 b], obteve-se N-tritilglicilglicinato de etilo. Por hidrólise deste composto, obteve-se a N-tritilglicilglicina (90%) de p.f. 179°C (lit. [101 b] p.f. 174-177°C).

Exp. 17 - Preparação do N,N'-bis(N-tritilglicilglicil)-L-cistinato de bis(*terc*-butilo)



Suspendeu-se N-tritilglicilglicina (3,37 g: 0,009 mol) em diclorometano seco (20 ml). A esta suspensão, agitada magneticamente e arrefecida a -10°C, juntou-se, aos poucos, N,N'-diciclohexilcarbodiimida (1,85 g; 0,009 mol).

Em seguida, adicionou-se uma solução de L-cistinato de bis(*terc*-butilo) (1,59 g; 0,0045 mol) em diclorometano (10 ml).

A mistura de reacção foi mantida a -10°C durante 2 horas e à temperatura ambiente durante 6 dias.

Após este período, separou-se por filtração a N,N'-diciclohexilureia precipitada e o filtrado foi lavado, sucessivamente, com solução aquosa de ácido cítrico a 5%, solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio 1 M e solução aquosa saturada de cloreto de sódio. Depois de seca ($MgSO_4$), a solução foi evaporada e

o resíduo obtido foi dissolvido em acetona.

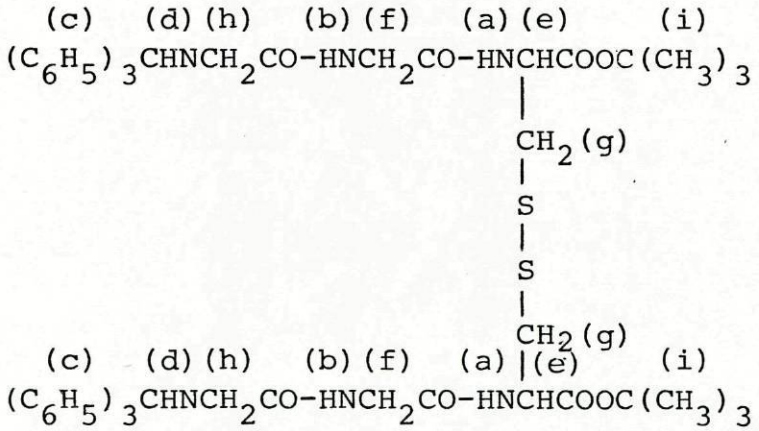
Após 24 horas a 0°C, separou-se por filtração uma nova quantidade de ureia. O filtrado foi evaporado e o resíduo obtido foi triturado com éter de petróleo. Após 4 recristalizações de acetato de etilo, obteve-se o péptido desejado, cromatograficamente puro (2,04 g; 43%), p.f. 161-162°C, $[\alpha]_D^{25}$ -24,75° (c 1.00 em MeOH), $R_F(5) = 0,58$, $R_F(1) = 0,98$, $R_F(8) = 0,95$, $R_F(9) = 0,92$.

A análise elementar do composto, que parece ser descrito pela primeira vez, deu os seguintes resultados:

	C%	H%	N%	S%
Encontrado:	67,5	6,5	7,9	6,0
$C_{60}H_{68}N_6O_8S_2$ requer:	67,6	6,4	7,9	6,0

1065,4

O espectro de R.M.N. do composto, em $CDCl_3$ (Fig.7), está de acordo com a estrutura:



Protões	τ(p.p.m.)	Intensidade relativa
a+b	1,70-2,20	4
c+d	2,50-3,00	32
e	5,10-5,40	2
f	5,80-6,10	4
g	6,80-6,98	4
h	7,00-7,20	4
i	8,30-8,70	18

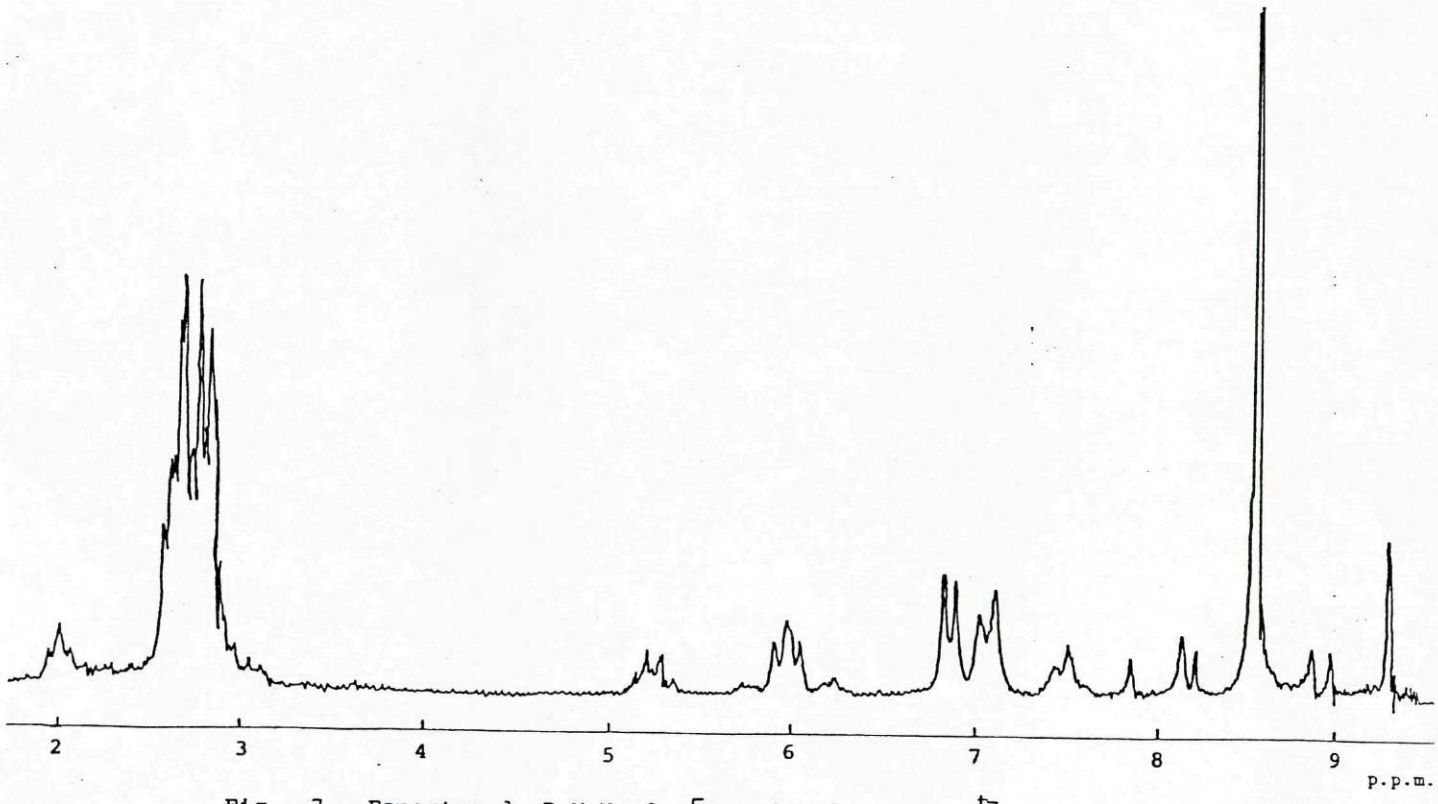


Fig. 7 - Espectro de R.M.N. do $[Trt\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Cys\text{-}OBu^t]_2$ em $CDCl_3$

2.4 - SÍNTESE DO PÉPTIDO CÍCLICO S,S-S',S'-BIS(N-*TERC*-BUTILOXICARBONIL-L-HEMICISTINIL-L-HEMICISTINATO DE (*TERC*-BUTILO)

Exp. 18 - Preparação da S-tritil-L-cisteína

Este derivado da cisteína foi preparado segundo um processo descrito por PHOTAKI e seus colaboradores [84], por reacção de cloreto de cisteína com trifenilmetanol, em ácido trifluoroacético. O composto foi obtido com o rendimento de 91% e p.f. 174-176°C (lit. [84] p.f. 177-179°C).

Exp. 19 - Preparação da N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteína

A - *Preparação do N-terc-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteínato de diciclohexilamónio*

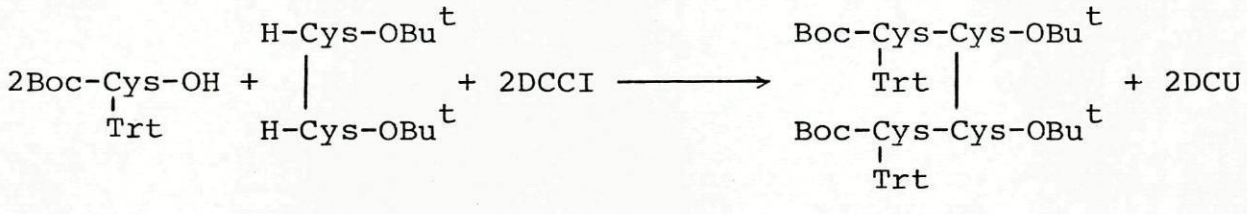
Este derivado da L-cisteína foi preparado com base num processo descrito na literatura [41], por acção do azidometanoato de *terc*-butilo, recentemente preparado, sobre a S-tritilcisteína, em meio alcalino. No entanto, aumentou-se o tempo de reacção (48 horas) e a purificação do composto foi efectuada por meio de duas recristalizações de metanol, obtendo-se 11,9 g (74%) do sal cromatograficamente puro de p.f. 210°C (lit. [41] 210-211°C).

B - *Neutralização do sal de diciclohexilamónio*

A neutralização deste sal foi efectuada de acordo com o processo descrito por HISKEY e seus colaboradores [41], por acção de ácido sulfúrico 0,25 M sobre uma suspensão de sal de diciclohexilamónio em acetato de etilo. No entanto, conseguiu-se isolar a

N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteína, cromatograficamente pura (7,26 g; 85%) de p.f. 144-146°C (lit. [74] p.f. 146°C), após trituração com várias porções de éter de petróleo, com aquecimento.

Exp. 20 - Preparação do N,N'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinil)-L-cistinato de bis(*terc*-butilo)



2×463,6 352,5 2×206,3 1243,7

A uma solução de N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteína (1,420 g; 0,0031 mol) em diclorometano seco (4 ml), arrefecida a -10°C e agitada magneticamente, adicionou-se em pequenas porções N,N'-dicicloexilcarbodiimida (0,631 g; 0,0031 mol).

Em seguida juntou-se L-cistinato de bis(*terc*-butilo), recentemente preparado (0,528 g; 0,0015 mol), em diclorometano seco (3 ml).

A mistura de reacção foi mantida a -10°C durante 2 horas e à temperatura ambiente durante mais 4 dias.

Em seguida, a mistura de reacção foi filtrada e o filtrado foi lavado, sucessivamente, com solução aquosa saturada de cloreto de sódio, soluções aquosas de ácido cítrico a 5%, hidrogenocarbonato de sódio 1 M e de cloreto de sódio saturada.

Depois de seca ($MgSO_4$), a solução foi evaporada e o resíduo obtido (1,89 g) foi dissolvido em acetona, a quente, e deixado a 0°C durante 24 horas.

Após este período, filtrou-se uma pequena porção de dicicloexilureia precipitada e o filtrado foi evaporado à secura. O resíduo obtido foi triturado com éter de petróleo, após o que foi recristalizado duas vezes de etoxietano, tendo-se obtido o péptido desejado, cromatograficamente puro (0,84 g; 50%) de p.f. 114°C

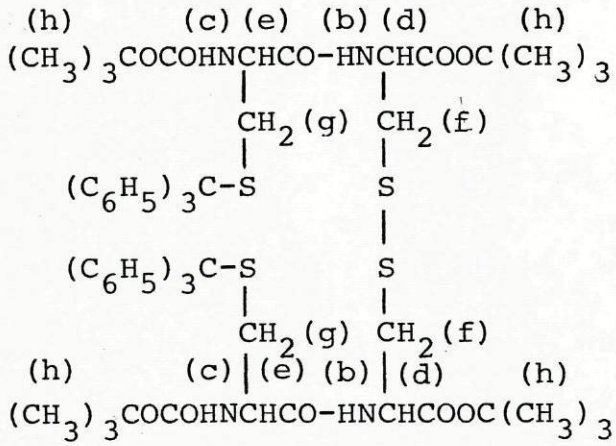
(amolecendo desde 99°C), $[\alpha]_D^{20}$ -3,4° (c 0,5 em $CHCl_3$), $R_F(1)$ = = 0,98, $R_F(4)$ = 0,12.

A análise elementar do composto, que parece ser descrito pela primeira vez, deu os seguintes resultados:

	C%	H%	N%	S%
Encontrado:	66,0	6,5	4,5	11,2
$C_{68}H_{82}N_4O_{10}S_4$ requer:	65,7	6,6	4,5	10,3

1243,7

O espectro de R.M.N. do composto, em $CDCl_3$, está representado na figura 8 e foi assim analisado:



Protões	τ (p.p.m.)	Intensidade relativa
a	2,40-3,00	30
b	3,00-3,18	2
c	4,70-5,00	2
d	5,27-5,60	2
e	5,94-6,28	2
f	6,80-7,10	4
g	7,22-7,50	4
h	8,40-8,73	36

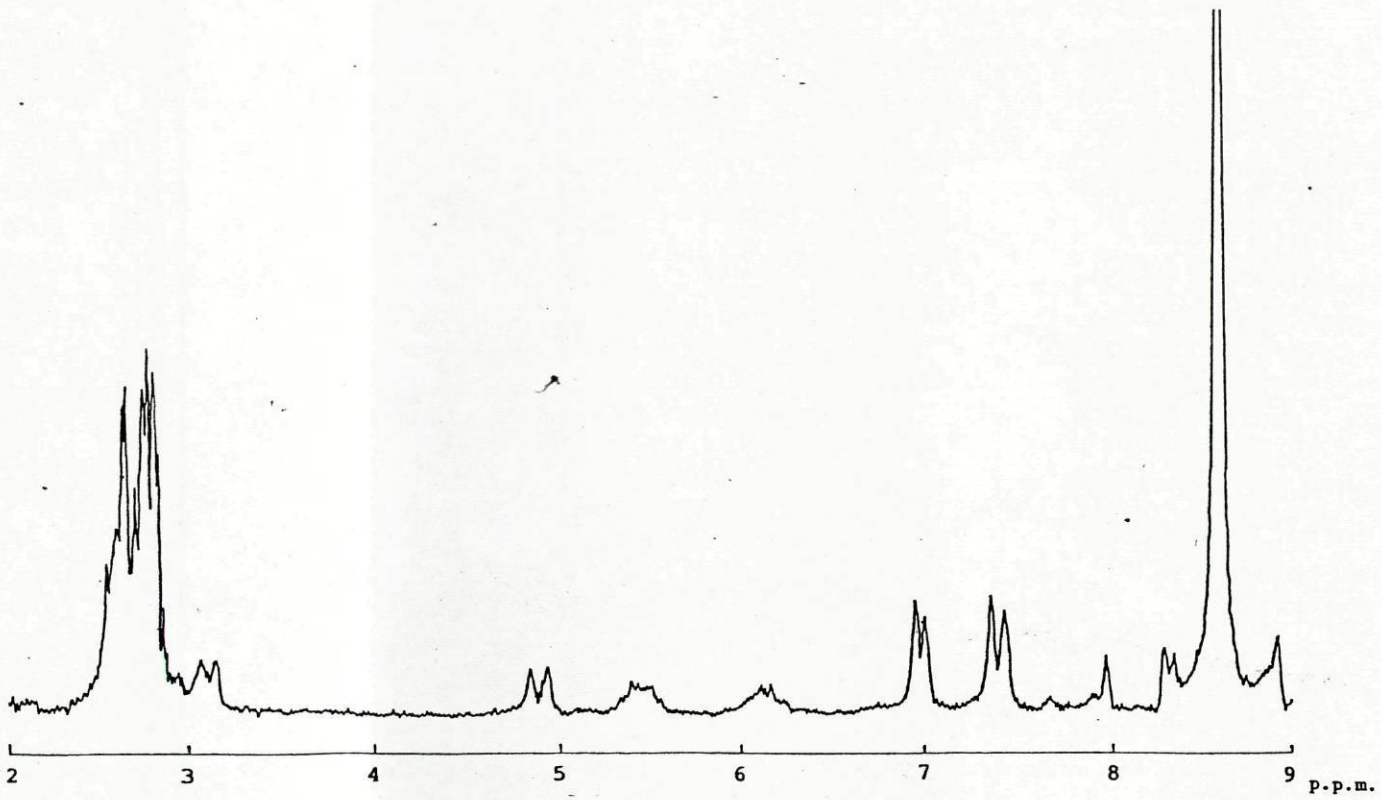
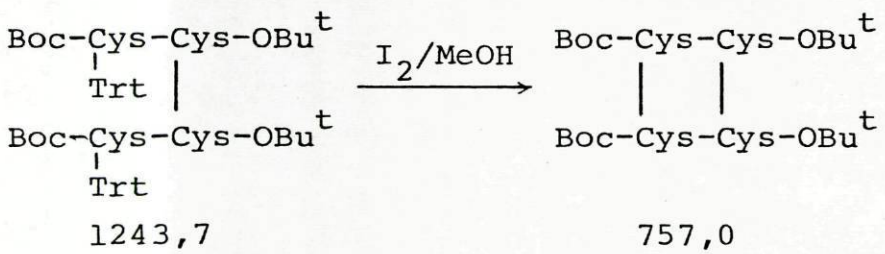


Fig. 8 - Espectro de R.M.N do $[Boc\text{-}Cys(Trt)\text{-}Cys\text{-}OBu^t]_2$ em $CDCl_3$

Exp. 21 - Preparação do S,S-S',S'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-L-hemicistinil-L-hemicistinato de *terc*-butilo)



1243,7 757,0

A uma solução de N,N'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinil)-L-cistinato de bis(*terc*-butilo) (0,249 g; 0,0002 mol) em metanol (100 ml), agitada magneticamente, adicionou-se, gota a gota, uma solução de iodo (0,245 g; 0,001 mol) em metanol (25 ml), durante cerca de 90 minutos .

A mistura de reacção foi mantida à temperatura ambiente, com agitação vigorosa, durante mais 35 minutos.

Após este período, a solução foi arrefecida a 0°C e descorada com solução aquosa de tiossulfato de sódio 1 M (~2,6 ml).

Em seguida a solução foi concentrada sob vácuo a um volume de cerca de 15 ml.

Por adição de água (~120 ml) precipitou um sólido branco, que foi filtrado e lavado abundantemente com água.

Depois de seco em exsicador, o sólido foi triturado com várias porções de etoxietano, obtendo-se 0,14 g (93%) dum sólido que, por cromatografia, apresentava três manchas: uma correspondente ao péptido cíclico desejado de $R_F(4) = 0,25$, outra de $R_F(4) = 0,20$ e outra de $R_F(4) = 0$.

A reacção foi repetida, nas mesmas condições, a fim de se obter mais composto.

A seguir recorreu-se à cromatografia em coluna de gel de sílica para purificação do péptido cíclico.

Assim, dissolveu-se uma amostra de 0,5 g do péptido impuro obtido, em clorofórmio (~1 ml) e aplicou-se a uma coluna de gel de sílica em clorofórmio. Foram utilizados cerca de 10 g de gel o que corresponde a um comprimento de cerca de 13,5 cm de enchimento numa coluna de diâmetro interno de 1,2 cm.

Usou-se apenas clorofórmio como eluente e pressão de azoto aplicada no topo da coluna, para se obter uma velocidade de eluição adequada.

Verificou-se o seguinte:

a) as primeiras fracções recolhidas continham o composto mas ainda contaminado com a impureza de $R_F = 0,20$;

b) depois de recolhido todo o péptido cíclico as fracções seguintes continham a impureza de $R_F = 0,20$;

c) a impureza de $R_F = 0$ ficou retida na coluna.

Misturaram-se então as fracções que continham o péptido ainda contaminado. A solução resultante foi evaporada e o resíduo obtido foi recristalizado duas vezes, de clorofórmio/acetato de etilo, tendo-se obtido o péptido cíclico cromatograficamente puro (0,30g;56%) de p.f. 198-199°C, $[\alpha]_D^{25}$ +102,4° (c 0,50 em $CHCl_3$), $R_F(4) = 0,25$.

Este péptido, que parece ser descrito pela primeira vez, foi caracterizado por análise elementar, espectrometria de R.M.N. e espectrometria de massa.

A análise elementar do composto, deu os seguintes resultados:

	C%	H%	N%	S%
Encontrado:	47,4	6,9	7,6	16,4
$C_{30}H_{52}N_4O_{10}S_4$ requer:	47,6	6,9	7,4	16,9

757,0

O espectro de R.M.N. do composto, em $CDCl_3$ (Fig. 9), foi assim analisado:

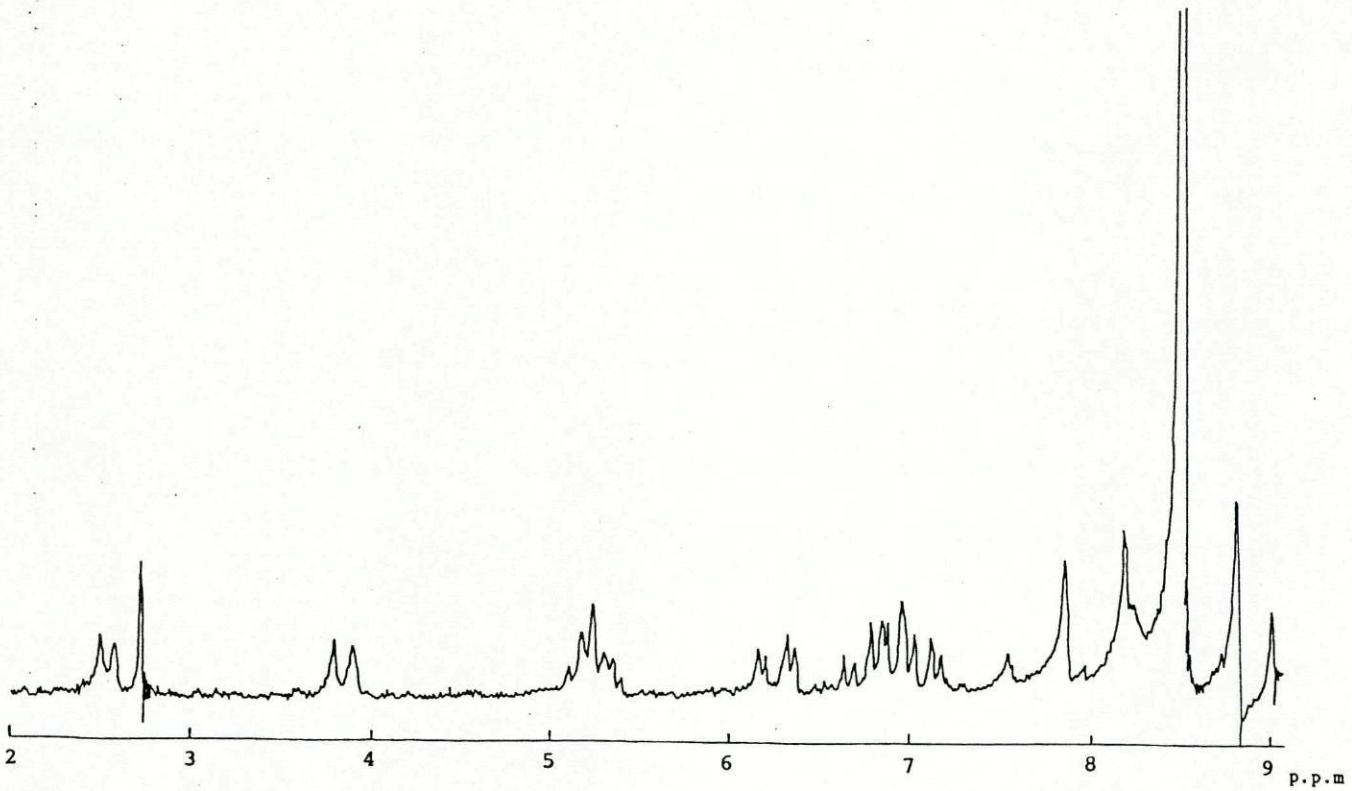
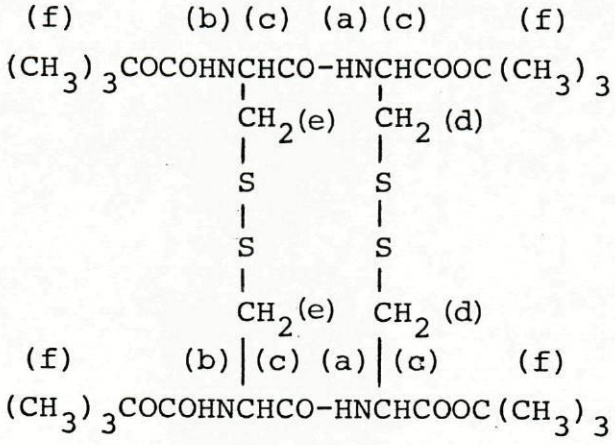


Fig. 9 - Espectro de R.M.N. do $[Boc\text{-}Cys\text{-}Cys\text{-}OBu^t]_2$ em $CDCl_3$



Protões	τ(p.p.m)	Intensidade relativa
a	2,42-2,67	2
b	3,72-4,00	2
c	5,07-5,47	4
d	6,00-6,45	4
e	6,76-7,02	4
f	8,30-8,62	36

O espectro de massa (EI-MS), representado na figura 10, confirma a estrutura do péptido cíclico.

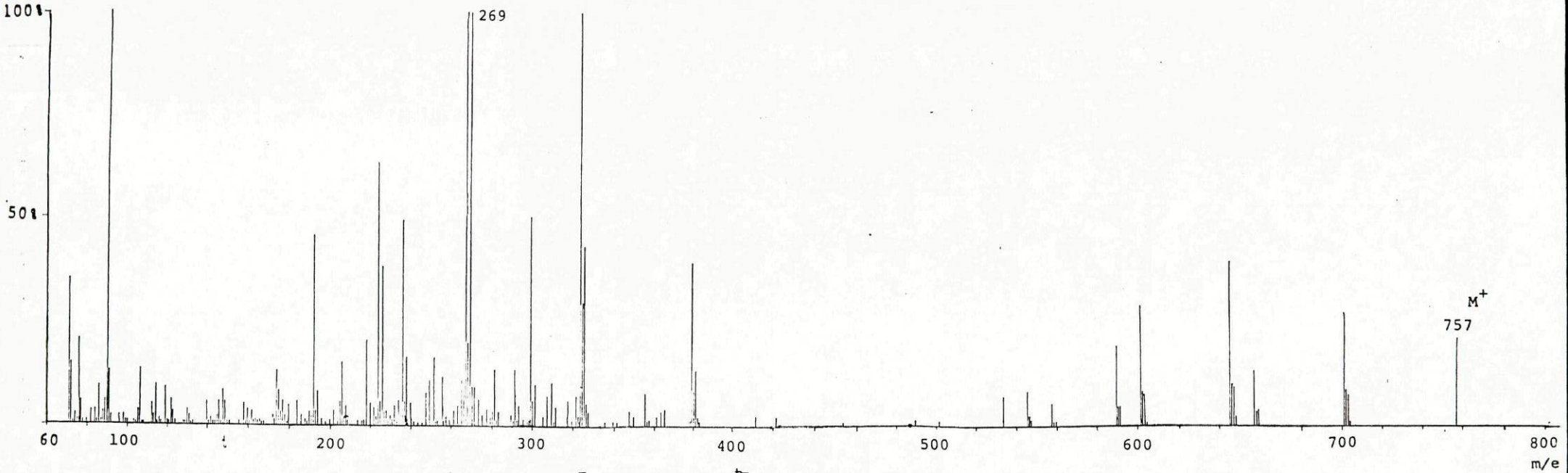


Fig. 10 - Espectro de massa do $[Boc\text{-}\dot{C}ys\text{-}\dot{C}ys\text{-}OBu^t]_2$. Intensidade relativa das bandas correspondentes aos iões de m/e=60 a m/e=800, tomando por referência a banda m/e=269.

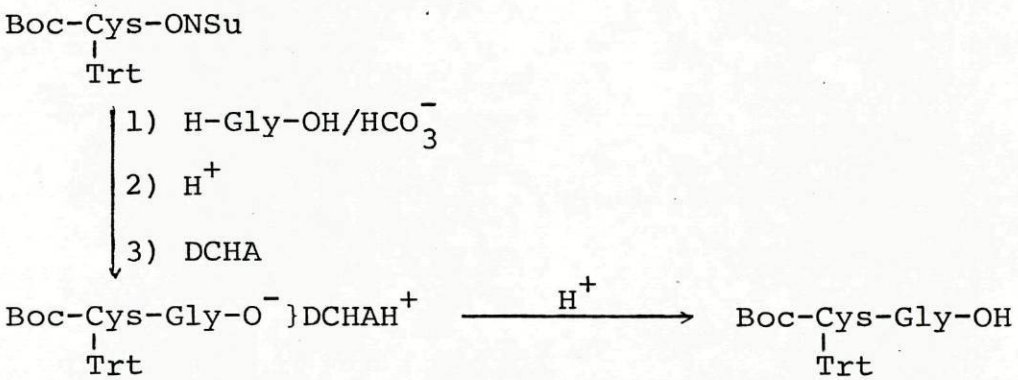
2.5 - SÍNTESE DO PÉPTIDO CÍCLICO, S,S-S',S'-BIS(N-*TERC*-BUTILOXICARBONIL--L-HEMICISTINILGLICIL-L-HEMICISTINATO DE *TERC*-BUTILO)

Exp. 22 - Preparação do éster N-hidroxissuccinimídico da N--*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteína

Este composto foi preparado por um método descrito na literatura [42], tendo sido utilizado, com bons resultados, sem prévia purificação.

Exp. 23 - Preparação da N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicina

A - *A partir do sal de dicicloexilamônio*



Nas primeiras experiências realizadas, este péptido foi preparado, por um processo descrito por HISKEY e seus cloboradores [42], sob a forma de sal de dicicloexilamônio, o qual foi isolado cromatograficamente puro com p.f. 129-130°C (lit. [42] p.f. 130,5-133°C), $R_F(3) = 0,73$, $R_F(8) = 0,73$. Uma suspensão do sal em acetato de etilo foi, a seguir, tratada com ácido sulfúrico 1 M até dissolução completa. A camada orgânica foi lava-

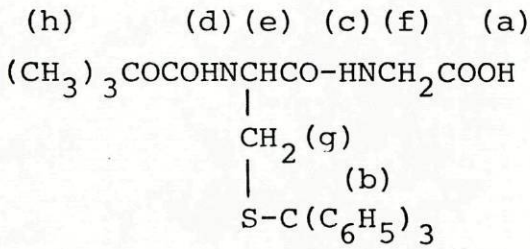
da com água e solução aquosa saturada de cloreto de sódio. Depois de seca ($MgSO_4$), a solução foi evaporada e o resíduo obtido foi triturado várias vezes com éter de petróleo. Por cristalizações sucessivas de etoxietano e etoxietano-metanol obteve-se a N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicina, cromatograficamente homogénea de p.f. 113°C (amolecendo desde 94-95°C) (lit. [95], obtida por outro método, p.f. 114°C, amolecendo desde 98°C), $R_F(3) = 0,68$, $[\alpha]_D^{29} + 18,2^\circ$ (c 1,00 em MeOH).

B - *Sem prévia preparação do sal de dicicloexilamónio*

$$\text{Boc-Cys(Trt)-ONSu} + \text{H-Gly-OH} \xrightarrow[2)\ H^+]{1)\ HCO_3^-} \text{Boc-Cys(Trt)-Gly-OH}$$

A síntese deste péptido foi ainda realizada com base no processo descrito por WILLIAMS [114]. No entanto usaram-se tempos de reacção superiores aos utilizados por esse investigador e não se precipitou o composto sob a forma de sal. Em vez disso, o produto da reacção foi cristalizado, sucessivamente, de etoxietano e etoxietano-metanol, tendo-se assim obtido a N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicina, cromatograficamente pura de p.f. 117-118°C (amolecendo desde 94-95°C), $[\alpha]_D^{29} + 18,2^\circ$ (c 1,00 em MeOH).

O espectro de R.M.N. do composto (Fig. 11), em $CDCl_3$, está de acordo com a estrutura:



Protões	τ(p.p.m.)	Intensidade relativa
a	0,60-0,95	1
b	2,30-3,02	15
c	3,10-3,31	1
d	4,60-5,00	1
e+f	5,80-6,21	3
g	7,20-7,53	2
h	8,30-8,80	9

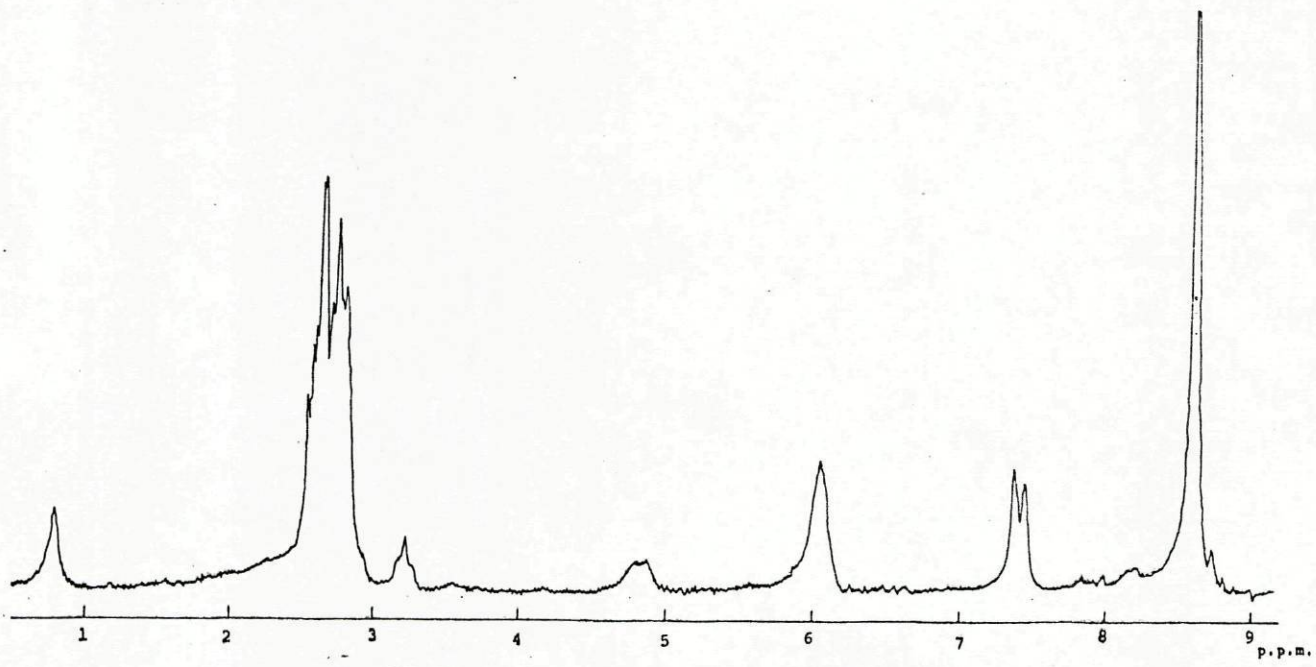
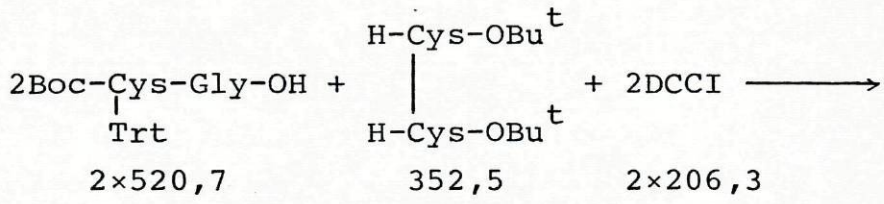
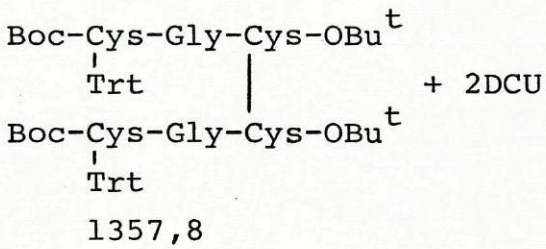


Fig. 11 - Espectro de R.M.N. da Boc-Cys-Gly-OH em $CDCl_3$
|
Trt

Exp. 24 - Preparação do N,N'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicil)-L-cistinato de bis(*terc*-butilo)





A uma suspensão de N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicina (2,120 g; 0,0041 mol) em diclorometano seco (6 ml), arrefecida a -10°C e agitada magneticamente, adicionou-se em pequenas porções N,N'-dicicloexilcarbodiimida (0,865 g; 0,0042 mol).

Em seguida, juntou-se uma solução de L-cistinato de bis(*terc*-butilo) recentemente preparado (0,705 g; 0,0020 mol), em diclorometano seco (~6 ml).

A mistura de reacção foi mantida a -10°C durante 2 horas e à temperatura ambiente durante 4 dias, sempre com agitação.

Em seguida, a mistura de reacção foi filtrada e o filtrado foi lavado, sucessivamente, com soluções aquosas de cloreto de sódio saturada, de ácido cítrico a 5%, de hidrogenocarbonato de sódio 1 M e de cloreto de sódio saturada.

Depois de seca ($MgSO_4$) a solução foi evaporada à secura, obtendo-se um resíduo que foi dissolvido em acetona a quente.

Após 24 horas a 0°C, separou-se por filtração uma pequena quantidade de ureia e evaporou-se a solução novamente à secura, triturando-se o resíduo obtido com duas porções de éter de petróleo.

Depois de seco (exsicador), o sólido foi triturado com etoxietano a quente e a suspensão obtida foi deixada a 0°C durante 24 horas.

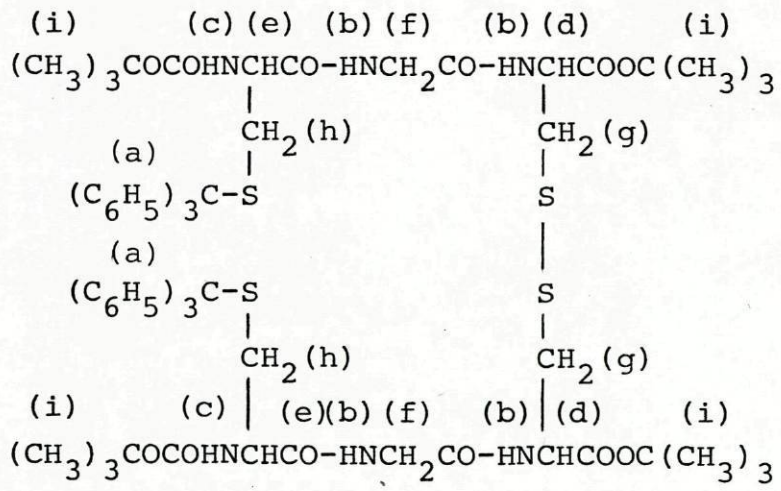
Filtrou-se e o sólido obtido foi submetido ao tratamento anterior. Depois de seco em exsicador, o composto foi cristalizado de acetato de etilo, dando 1,08 g (40%) de péptido cromatograficamente puro de p.f. 155°C (amolecendo desde 112°C), $[\alpha]_D^{22}$ +25,7° (c 1,00 em $CHCl_3$), $R_F(1) = 0,92$.

Este péptido, que parece ser novo, foi caracterizado por análise elementar e espectrometria de R.M.N.

A análise elementar do composto deu os seguintes resultados:

	C%	H%	N%	S%
Encontrado:	62,4	6,5	6,2	9,8
$C_{72}H_{88}N_6O_{12}S_4$ requer:	63,6	6,5	6,2	9,4
1357,8				

O espectro de R.M.N. do péptido, em $CDCl_3$ (Fig. 12), foi interpretado do seguinte modo:



Protões	τ(p.p.m.)	Intensidade relativa
a+b	2,43-3,00	34
c	4,72-5,02	2
d	5,12-5,50	2
e+f	5,90-6,30	6
g	6,90-7,15	4
h	7,20-7,50	4
i	8,40-8,68	36

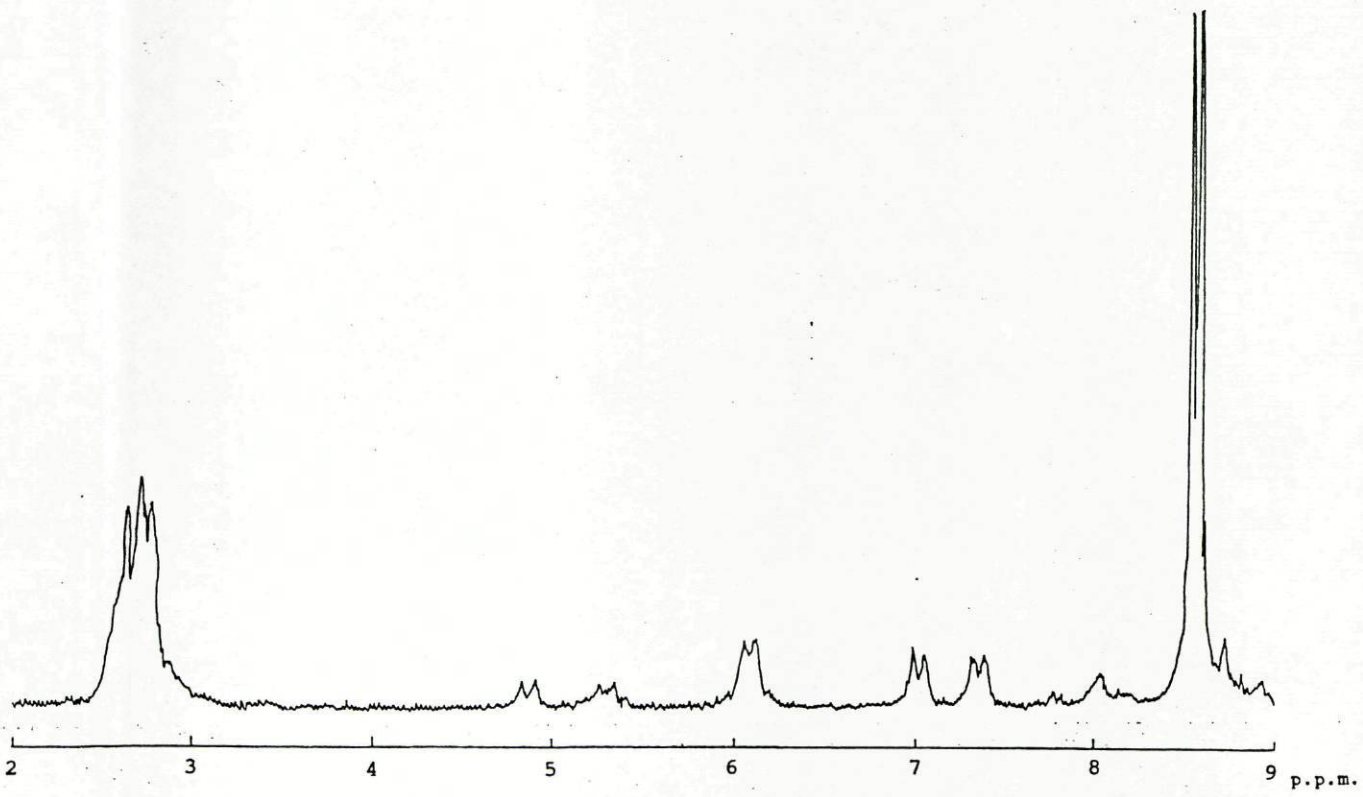
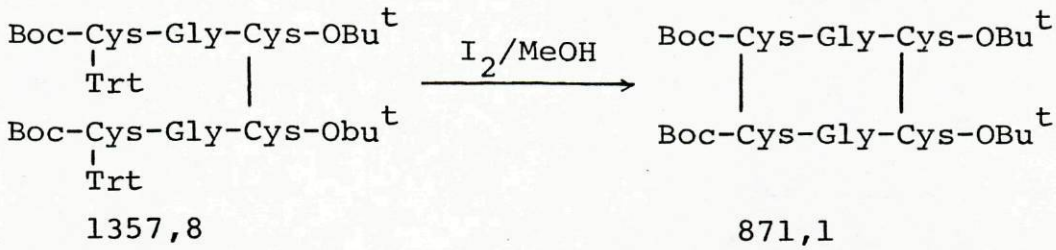


Fig. 12 - Espectro de R.M.N. do $[Boc\text{-}Cys(Trt)\text{-}Gly\text{-}Cys\text{-}OBu^t]_2$ em $CDCl_3$

Exp. 25 - Preparação do S,S-S',S'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil--L-hemicistinilglicil-L-hemicistinato de *terc*-butilo)



1357,8 871,1

A uma solução de N,N'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicil)-L-cistinato de bis(*terc*-butilo) (0,271 g; 0,0002 mol) em metanol (100 ml), agitada magneticamente, adicionou-se, gota a gota, durante um período de 90 minutos, uma solução de iodo (0,254 g; 0,001 mol) em metanol (25 ml).

A mistura de reacção foi mantida à temperatura ambiente, com forte agitação, durante mais 45 minutos.

Após este período, a solução foi arrefecida a 0°C e descorada com solução aquosa de tiossulfato de sódio 1 M (≃2,5 ml).

Em seguida a solução foi concentrada, sob vácuo, a um volume de cerca de 20 ml.

Por adição de água (≃100 ml), em pequenas porções e com arrefecimento, precipitou um sólido branco que foi filtrado e lavado abundantemente com água.

Depois de seco em exsicador, o sólido foi cristalizado de metanol, obtendo-se 0,14 g de composto quase puro.

Este composto foi em seguida triturado, sucessivamente, com etanol e etoxietano, dando o péptido cíclico desejado, cromatograficamente puro (0,090 g; 53%) de p.f. 200-202°C (com decomposição), $R_F(6) = 0,56$, $R_F(5) = 0,20$, $R_F(4) = 0,05$.

O péptido, que parece ser descrito pela primeira vez, foi caracterizado por análise elementar, espectrometria de R.M.N. e espectrometria de massa.

A análise elementar do composto deu os seguintes resultados:

	C%	H%	N%	S%
Encontrado:	46,9	6,7	9,6	14,3
$C_{34}H_{58}N_6O_{12}S_4$ requer: 871,1	46,9	6,7	9,6	14,7

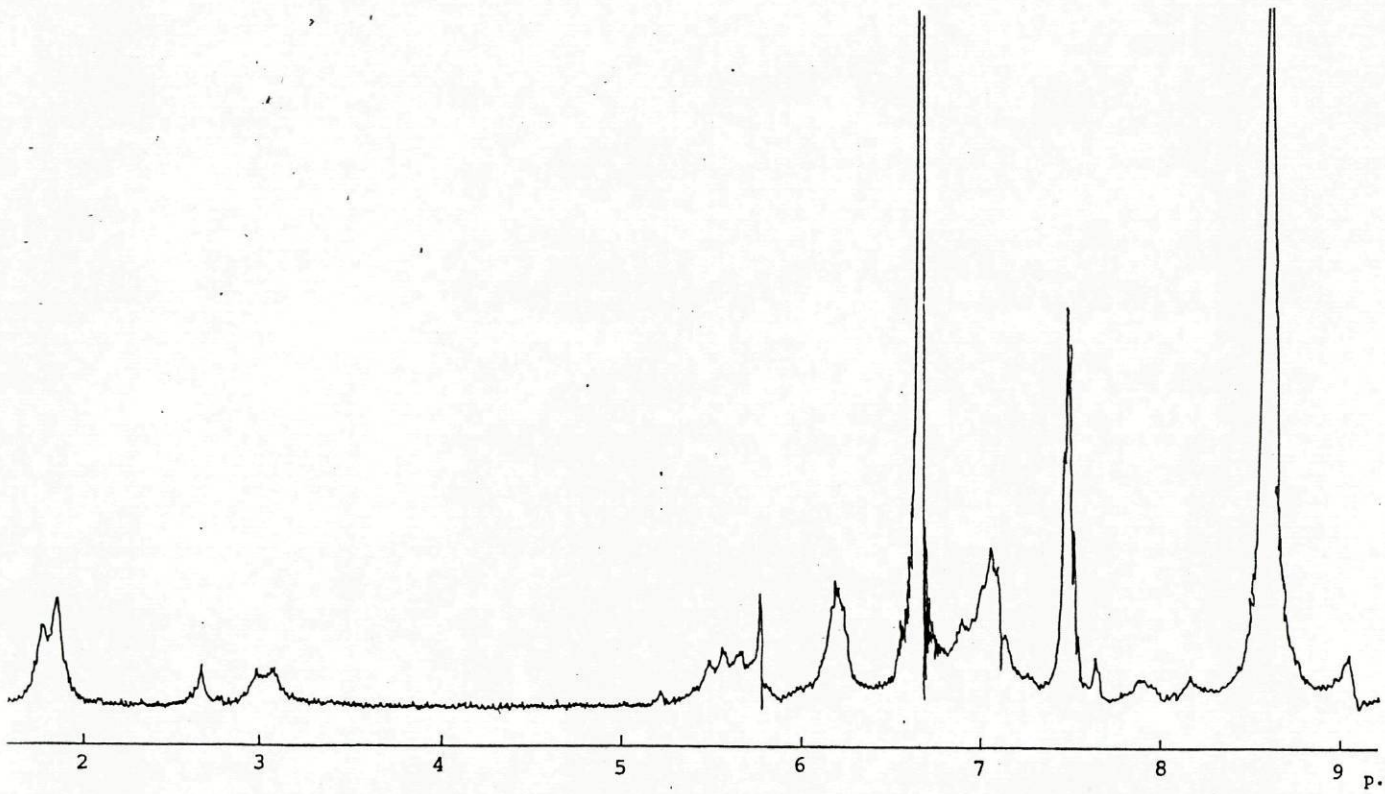
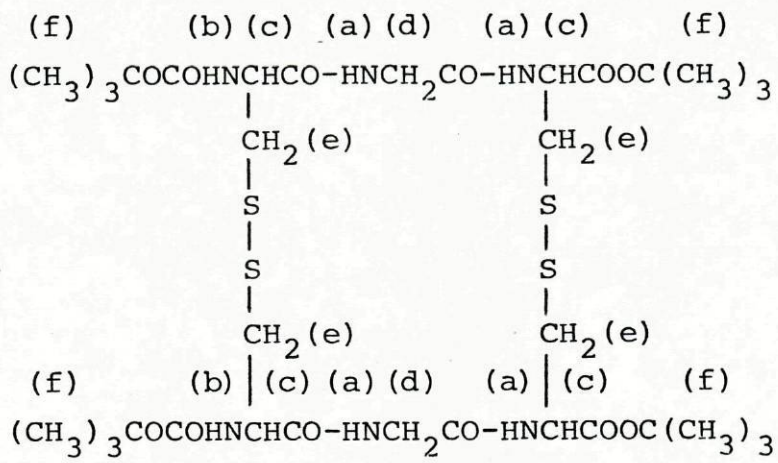


Fig. 13 - Espectro de R.M.N. do $[Boc\text{-}Cys\text{-}Gly\text{-}Cys\text{-}OBu^t]_2$ em DMSO-d6

O espectro de R.M.N. do composto, em DMSO-d_6, está representado na figura 13 e foi analisado do seguinte modo:

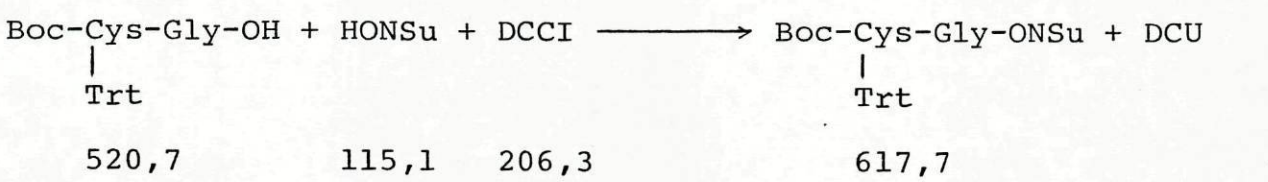


Protões	τ (p.p.m.)	Intensidade relativa
a	1,60-2,00	4
b	2,80-3,20	2
c	5,30-5,83	4
d	6,10-6,35	4
e	6,85-7,15	8
f	8,30-8,90	36

Este péptido foi ainda caracterizado por espectrometria de massa ("Field Desorption"), tendo sido confirmada, deste modo, a massa molecular do composto.

2.6 - SÍNTESE DO PÉPTIDO CÍCLICO, S,S -S',S'-BIS(N-*TERC*-BUTILOXICARBONIL--L-HEMICISTINILGLICILGLICIL-L-HEMICISTINATO DE *TERC*-BUTILO)

Exp. 26 - Preparação do éster N-hidroxissuccinimídico da N-*terc*--butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicina



Este éster activado foi preparado com base num método descrito na literatura [114], tendo-se no entanto introduzido algumas modificações no processo de purificação do composto.

Assim, dissolveu-se N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L--cisteinilglicina (0,920 g; 0,00177 mol) em dimetoxietano seco (3,8 ml), contendo N-hidroxissuccinimida (0,215 g; 0,00187 mol).

À solução, agitada magneticamente e arrefecida a -10°C, juntou-se, aos poucos, N,N'-dicicloexilcarbodiimida (0,385 g; 0,00187 mol).

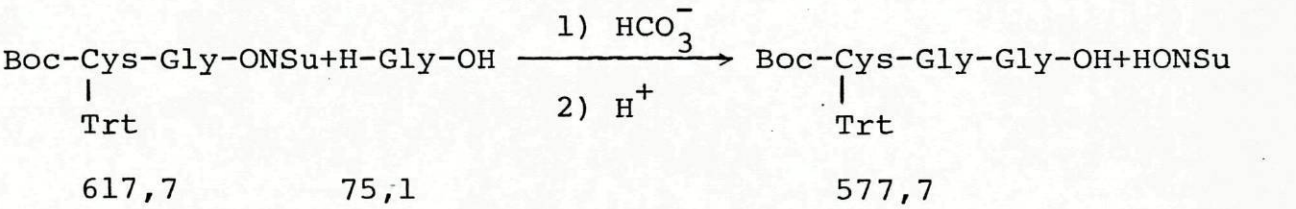
A mistura de reacção foi mantida a -10°C durante mais 90 minutos e à temperatura ambiente durante 27 horas, sempre com agitação.

Em seguida filtrou-se a ureia formada e o filtrado foi evaporado, obtendo-se um óleo branco. Este óleo foi triturado com várias porções de etoxietano, dando um sólido branco que por cromatografia se apresentava homogéneo (0,81 g; 74%) de p.f. 105°C (amolecendo desde 90°C) (lit. [114] p.f. 86,5-88°C).

Exp. 27 - Preparação da N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicilglicina

Este péptido foi preparado por dois processos que conduziram a resultados idênticos.

A - *Condensação do éster N-hidroxissuccinimídico da N-terc-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicina com glicina, em meio alcalino*



Dissolveu-se o éster N-hidroxissuccinimídico da N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicina (0,926 g; 0,0015 mol) em dimetoxietano (3,0 ml).

À solução, arrefecida a 0°C e agitada magneticamente, juntou-se uma solução de glicina (0,124 g; 0,00165 mol) em água (3,0 ml) contendo hidrogenocarbonato de potássio (0,165 g; 0,00165 mol).

A mistura de reacção foi mantida à temperatura ambiente durante 24 horas.

Em seguida, levou-se a solução a pH 3 com ácido sulfúrico 1 M, tendo precipitado um óleo que foi extraído com etoxietano.

A camada orgânica foi lavada com água e solução aquosa saturada de cloreto de sódio.

Depois de seca ($MgSO_4$), a solução foi evaporada, obtendo-se um óleo branco que, por trituração com éter de petróleo, deu um sólido (0,90 g).

O composto obtido foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica. Dissolveu-se o composto (0,5 g) em clorofórmio (~0,5 ml) e aplicou-se a uma coluna de 1,2 cm de diâmetro interno, contendo 10 g de gel de sílica, o que corresponde a um comprimento de cerca de 13,5 cm de enchimento.

Usaram-se como eluentes, sucessivamente, clorofórmio e clorofórmio/ácido acético (18:1), utilizando-se pressão de azoto, aplicado no topo da coluna a fim de se obter uma conveniente velocidade de eluição.

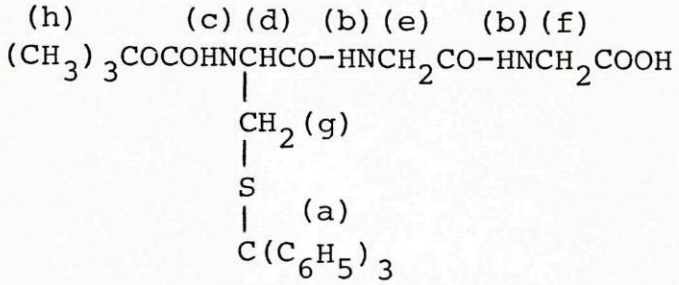
Fez-se a eluição primeiramente com uma pequena porção de clorofórmio e depois com clorofórmio/ácido acético (18:1). Separou-se em primeiro lugar uma impureza de $R_F(3) = 0,98$ e depois o tripéptido, de início, ainda contaminado com uma impureza de $R_F(3) = 0,90$ e, em seguida, puro.

Juntaram-se todas as fracções que, cromatograficamente, mostravam conter apenas o composto. Após evaporação do solvente de eluição, o resíduo obtido foi triturado várias vezes com éter de petróleo (o que facilitou a remoção de vestígios de ácido acético), obtendo-se a N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicilglicina, cromatograficamente pura (0,3 g; 62%) com p.f. 104°C (amolecendo desde 82°C), $[\alpha]_D^{20}$ +19,1° (c 1,00 em MeOH), $R_F(3) = 0,24$.

A análise elementar do composto, que parece ser descrito pela primeira vez, deu os seguintes resultados:

	%C	%H	%N	%S
Encontrado:	64,8	6,3	7,2	5,1
$C_{31}H_{35}N_3O_{16}S$ requer: 577,7	64,6	6,1	7,3	5,5

O espectro de R.M.N. do composto, em $CDCl_3$ (Fig. 14), está de acordo com a estrutura:



Protões	τ(p.p.m.)	Intensidade relativa
a+b	2,50-3,15	17
c	4,60-5,00	1
d+e+f	5,80-6,40	5
g	7,20-7,50	2
h	8,40-8,80	9

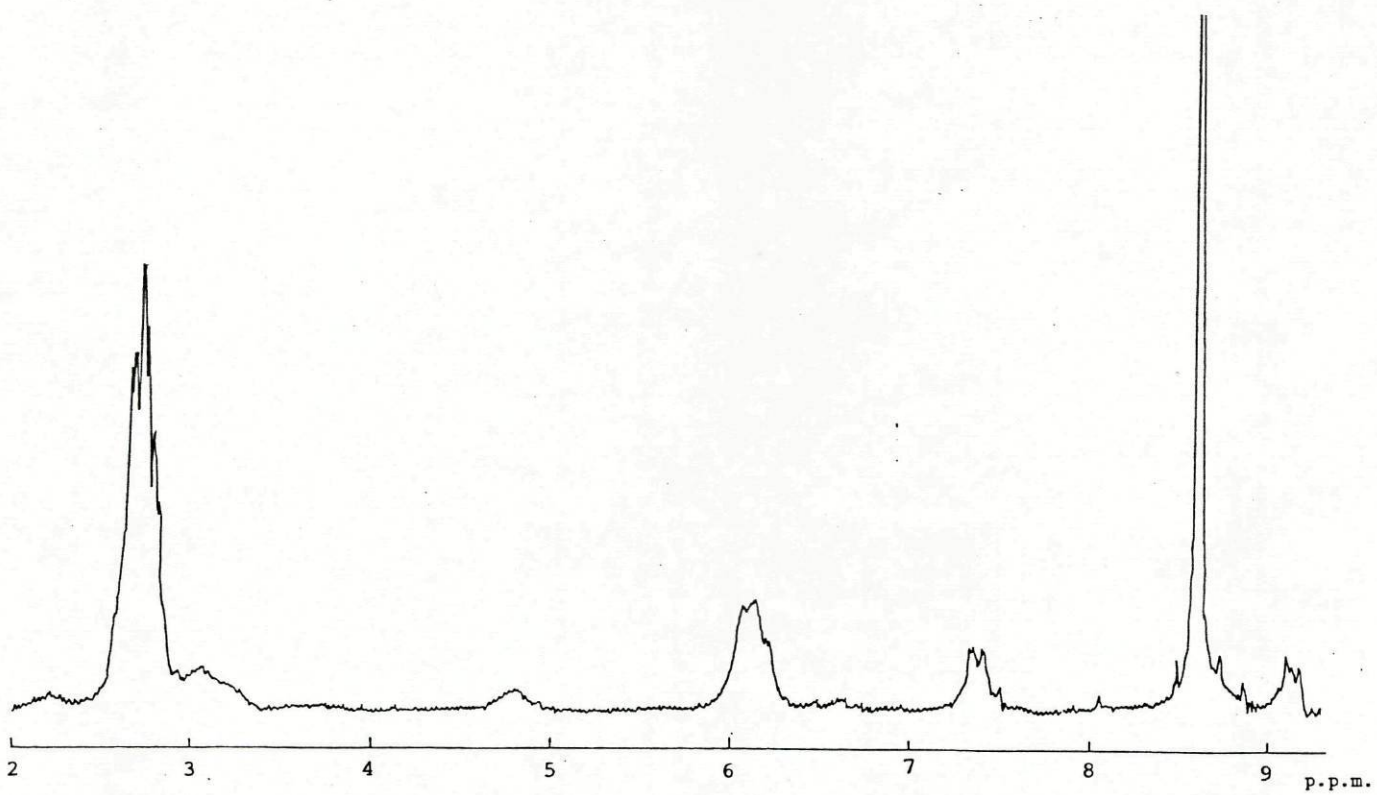
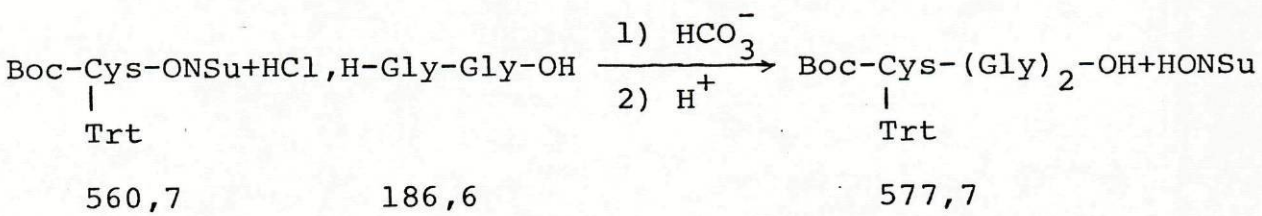


Fig. 14 - Espectro de R.M.N. da Boc-Cys-Gly-Gly-OH em $CDCl_3$

Trt

B - *Condensação do éster N-hidroxissuccinimídico da N-terc-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteína com o cloreto de glicilglicina, em meio alcalino.*



Dissolveu-se cloreto de glicilglicina (1,49 g; 0,008 mol) em água (16 ml) contendo hidrogenocarbonato de potássio (2,00 g; 0,002 mol).

À solução, agitada magneticamente, adicionou-se, aos poucos, uma solução de éster N-hidroxissuccinimídico da N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteína (4,48 g; 0,008 mol) em DME (16 ml).

A mistura de reacção foi mantida à temperatura ambiente durante 19 horas.

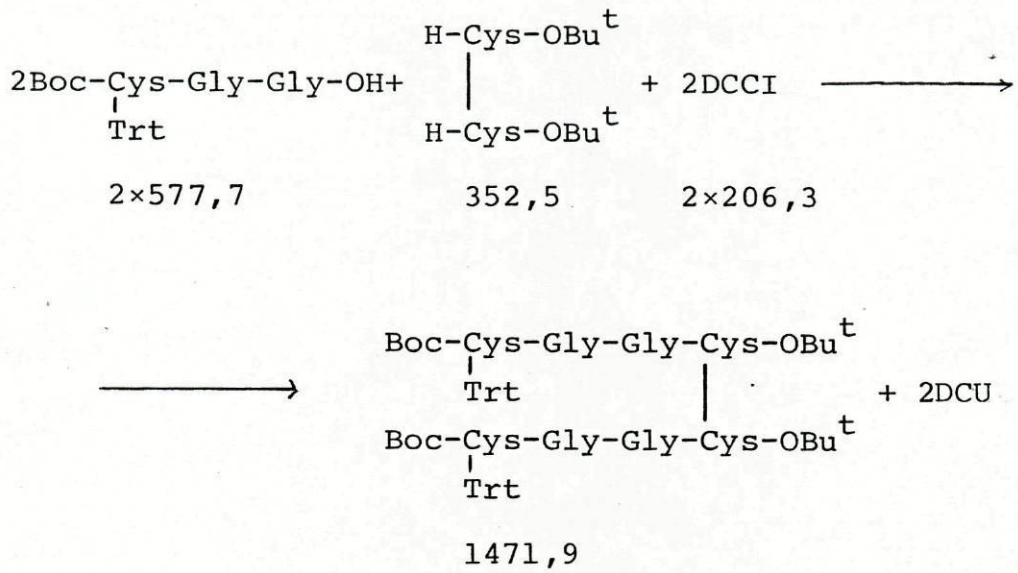
Em seguida, a solução foi levada a pH 3 com ácido sulfúrico 1 M, tendo precipitado um óleo que foi extraído com etoxietano (~50 ml).

A camada orgânica foi então lavada, sucessivamente, com água e solução aquosa saturada de cloreto de sódio.

Depois de seca ($MgSO_4$), a solução foi evaporada e o resíduo obtido foi triturado com éter de petróleo, dando um sólido (4,0 g; 87%), levemente impuro.

O composto foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica conforme se descreve na experiência anterior, tendo sido isolado cromatograficamente puro, com p.f. 104°C (amolecendo desde 82°C), $[\alpha]_D^{20}$ +19,1° (c 1,00 em MeOH).

Exp. 28 - Preparação do N,N'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicilglicil)-L-cistinato de bis(*terc*-butilo)



A uma solução de N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicilglicina (0,295 g; 0,00051 mol) em diclorometano seco (~0,6 ml), arrefecida a -20°C e agitada magneticamente, juntou-se em pequenas porções N,N'-dicicloexilcarbodiimida (0,105 g; 0,00051 mol).

Em seguida, juntou-se uma solução de L-cistinato de bis(*terc*-butilo) (0,088 g; 0,00025 mol), recentemente preparado, em diclorometano seco (0,4 ml).

A mistura de reacção foi deixada com agitação, durante 12 dias, mantendo a temperatura entre -15° e -20°C.

Após este período, filtrou-se a dicicloexilureia formada e o filtrado foi lavado, sucessivamente, com solução saturada de cloreto de sódio, solução aquosa de ácido cítrico a 5%, solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio a 10% e novamente solução saturada de cloreto de sódio.

Depois de seca ($MgSO_4$), a solução foi evaporada à secura e o resíduo obtido foi dissolvido em acetona a quente.

Depois de 24 horas a 0°C, separou-se por filtração uma pequena quantidade de ureia precipitada e evaporou-se a solução

filtrada novamente à secura.

O composto impuro obtido (0,24 g) foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica.

Assim, dissolveu-se o composto (0,24 g) em clorofórmio (~1,5 ml) e aplicou-se a uma coluna de gel de sílica em clorofórmio. Foram utilizados cerca de 8 g de gel o que corresponde a um comprimento de cerca de 10,5 cm de enchimento numa coluna de diâmetro interno de 1,2 cm.

Usaram-se, sucessivamente, os seguintes eluentes:

a) - clorofórmio (cerca de 90 ml) que permitiu eliminar algumas das contaminações, com valores de $R_F(1)$ = = 0,11; 0,78; 0,84 e 0,90.

b) - clorofórmio/etanol (9:1) (cerca de 20 ml) que extraiu o péptido puro (0,20 g, 55%) de p.f. 122-124°C (amolecendo desde 104°C), $[\alpha]_D^{25}$ + 18,0° (c 0,90 em clorofórmio), $R_F(1)$ = 0,57, $R_F(2)$ = 0,13.

Nota:

Por vezes, o composto extraído da coluna foi obtido ainda levemente contaminado com uma impureza de $R_F(1)$ = 0,45. Quando tal aconteceu, a purificação foi conseguida com uma cristalização adicional de acetona.

O composto, que parece ser descrito pela primeira vez, foi caracterizado por análise elementar e por espectrometria de R.M.N.

A análise elementar deu os seguintes resultados:

	C%	H%	N%	S%
Encontrado:	61,4	6,3	7,8	8,4
$C_{76}H_{94}N_8O_{14}S_4$ requer:	61,0	6,4	7,6	8,7

1471,9

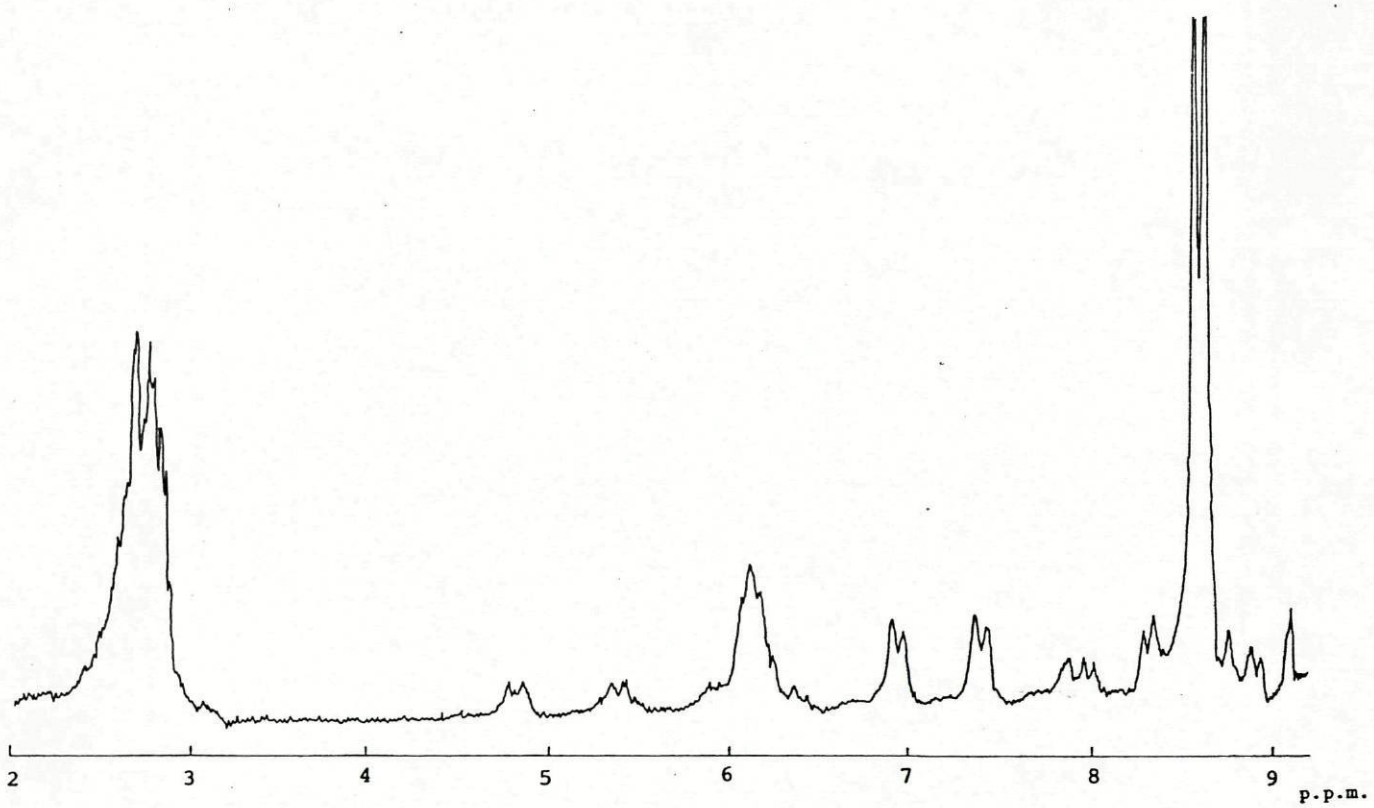
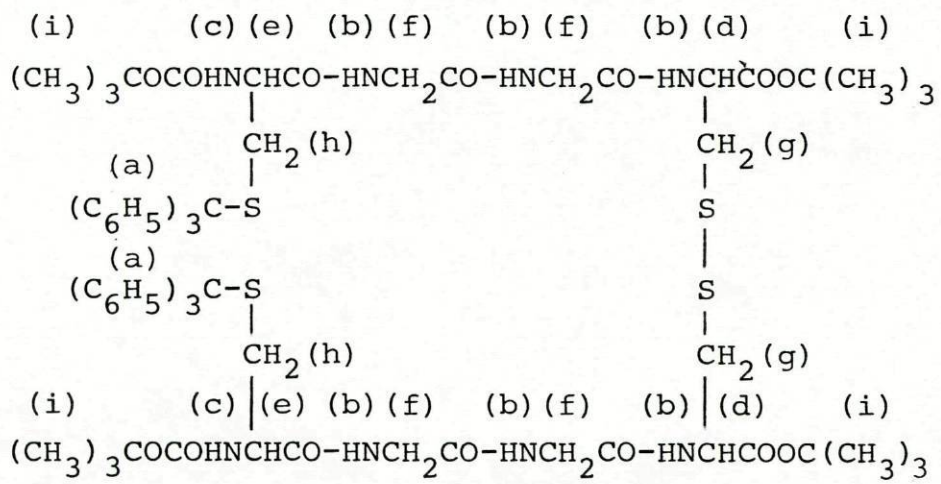


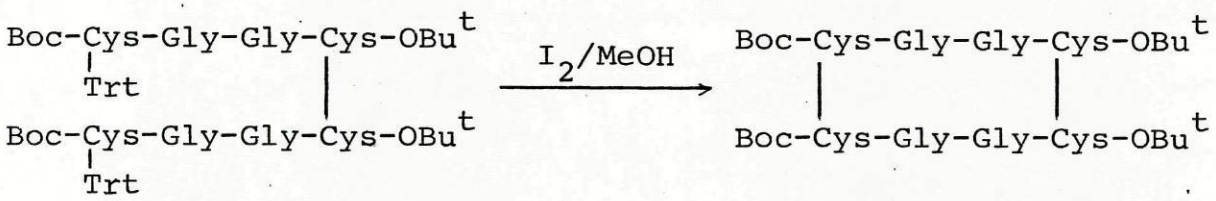
Fig. 15 - Espectro de R.M.N. do $[\text{Boc-Cys(Trt)-Gly-Gly-Cys-OBu}^t]_2$ em $CDCl_3$

O espectro de R.M.N., em $CDCl_3$, representado na figura 15, foi assim analisado:



Protões	τ(p.p.m.)	Intensidade relativa
a+b	2,20-3,20	36
c	4,68-4,96	2
d	5,20-5,56	2
e+f	5,82-6,50	10
g	6,80-7,10	4
h	7,23-7,53	4
i	8,30-8,83	36

Exp. 29 - Preparação do S,S-S',S'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil--L-hemicistinilglicilglicil-L-hemicistinato de *terc*--butilo)



1471,9 985,3

A uma solução de N,N'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicilglicil)-L-cistinato de bis(*terc*-butilo) (0,147 g; 0,0001 mol) em metanol (150 ml), agitada magneticamente, adicionou-se, gota a gota, durante cerca de 2 horas e 30 minutos, uma solução de iodo (0,127 g; 0,0005 mol) em metanol (12,5 ml).

A mistura de reacção foi deixada à temperatura ambiente, com agitação forte, durante mais 50 minutos, após o que foi arrefecida a 0°C e descorada com solução aquosa de tiossulfato de sódio 1 M (~1,2 ml).

Em seguida, a solução foi evaporada sob vácuo a um volume de cerca de 20 ml. Por adição de água (~90 ml), em pequenas porções, precipitou um sólido branco que foi filtrado e lavado abun-

dantemente com água.

O composto impuro obtido (0,149 g) foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica.

Assim, dissolveu-se o composto em cerca de 1,5 ml de clorofórmio/etanol (19:1) e aplicou-se a uma coluna de gel de sílica em clorofórmio. Utilizaram-se cerca de 7 g de gel o que corresponde a um comprimento de cerca de 9,4 cm de enchimento numa coluna de diâmetro interno de 1,2 cm.

A eluição foi feita com $CHCl_3$/EtOH (19:1), tendo-se aplicado pressão de azoto no topo da coluna para se obter uma velocidade de eluição adequada.

Verificou-se o seguinte:

a) Por eluição com clorofórmio/etanol (19:1) ($\tilde{=}$ 14 ml) extraiu-se a impureza trifenilmetoximetano ($\tilde{=}$50 mg).

b) Por eluição com mais cerca de 20 ml de clorofórmio/etanol (19:1) extrairam-se vestígios de quatro impurezas não identificadas, com valores de $R_F(1)$ compreendidos entre 0 e 0,8.

c) Por eluição com mais cerca de 45 ml de clorofórmio/etanol (19:1) extraiu-se o péptido cíclico (m $\tilde{=}$0,1 g), levemente contaminado com uma impureza de $R_F(1) = 0$.

O composto referido na alínea c) foi a seguir cristalizado de metanol, tendo-se obtido 0,072 g (73%) do péptido cíclico puro de p.f. 164°C (amolecendo desde 154°C), $R_F(1) = 0,59$, $R_F(7) = 0,10$, $R_F(2) = 0,0$.

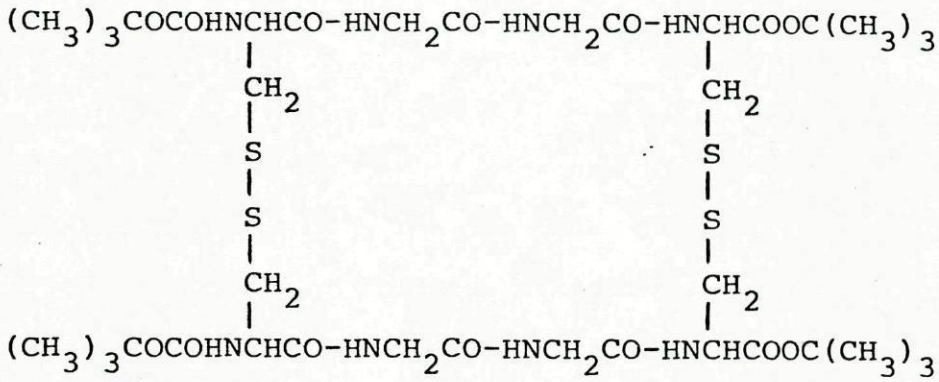
A análise elementar deste péptido cíclico, que parece ser descrito pela primeira vez, deu os seguintes resultados:

	C%	H%	N%	S%
Encontrado:	44,8	6,6	11,4	12,0
$C_{38}H_{64}N_8O_{14}S_4$ requer:	46,3	6,5	11,4	13,0
$C_{38}H_{64}N_8O_{14}S_4.2H_2O$ requer:	44,6	6,7	11,0	12,5

1021,3

A análise sugere que o composto contém duas moléculas de água.

O espectro de R.M.N. do composto em CD_3OD está representado na figura 16. A presença de duas bandas intensas, atribuídas ao solvente utilizado e, provavelmente ainda, à água associada ao composto, não permitiram uma interpretação pormenorizada do referido espectro. Este, porém, não parece estar em desacordo com a estrutura do péptido cíclico.



Por espectrometria de massa ("Field Desorption"), confirmou-se a massa molecular deste péptido.

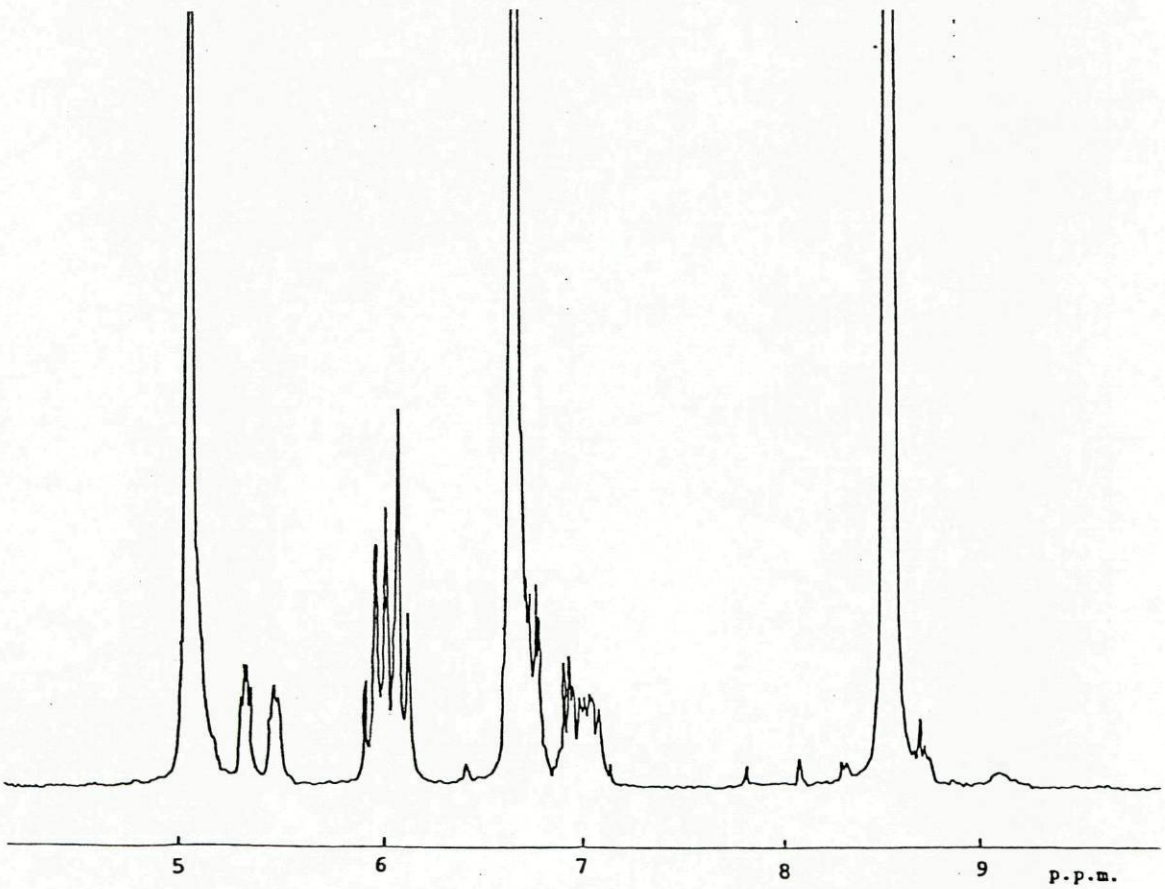


Fig. 16 - Espectro de R.M.N. do $[Boc\text{-}Cys\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Cys\text{-}OBu^t]_2$ em CD_3OD

AMINOÁCIDOS PROTEGIDOS E PÉPTIDOS SINTETIZADOS

	Pág.	p.f./°C	Referência
$[Boc\text{-}Cys(1)\text{-}OH]_2$	95	144-146	26,94
$[Boc\text{-}Cys(1)\text{-}ONp]_2$	96	167-170	25,75
$[Boc\text{-}Cys(1)\text{-}Cys(2)\text{-}OBu^t]_2$	121	198-199	novo
$[Boc\text{-}Cys(1)\text{-}Gly\text{-}Cys(2)\text{-}OBu^t]_2$	132	200-202(com decomposição)	novo
$[Boc\text{-}Cys(1)\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Cys(2)\text{-}OBu^t]_2$	143	164(amolecendo desde 154)	novo
$[Boc\text{-}Cys(1)\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}OEt]_2$	96	120-122	novo
Boc-Cys(Trt)-OH	118	144-146	41,74
{Boc-Cys(Trt)-O^-}$DCHA^+H$	118	210	41
Boc-Cys(Trt)-ONSu	126	—	42
Boc-Cys(Trt)-Gly-OH	126	117-118(amolecendo desde 95°C)	114,95
{Boc-Cys(Trt)-Gly-O^-}$DCHA^+H$	126	129-130	42
Boc-Cys(Trt)-Gly-ONSu	135	105(amolecendo desde 90)	114

	Pág.	p.f./°C	Referência
Boc-Cys(Trt)-Gly-Gly-OH	136	104(amolecendo desde 82)	novo
[Boc-Cys(Trt)-Cys-OBu^t]$_2$	119	114(amolecendo desde 99)	novo
[Boc-Cys(Trt)-Gly-Cys-OBu^t]$_2$	129	155(amolecendo desde 112)	novo
[Boc-Cys(Trt)-Gly-Gly-Cys-OBu^t]$_2$	140	122-124(amolecendo desde 104)	novo
$Cl^-\{H_2^+$-Gly-Gly-OH$\}$	95	139-141	96,100
$Cl^-\{H_2^+$-Gly-Gly-OEt$\}$	96	182-184	100
H-Cys(Trt)-OH	118	174-176	84
[H-Cys-OBu^t]$_2$	111	—	1a
[Pht-Cys-OH]$_2$	102	104-115	77
[Pht-Cys-OBu^t]$_2$	107	129-131	novo
[Pht-Cys-OBzh]$_2$	104	112-114	novo
Trt-Gly-OH	114	188-190	101a
Trt-Gly-Gly-OH	114	179	98,101b
Trt-Gly-Gly-OEt	114	160-162	98, 2
[Trt-Gly-Gly-Cys-OBu^t]$_2$	115	161-162	novo

OUTROS COMPOSTOS PREPARADOS

	Pág.	p.f./°C	Referência
$(CH_3)_3COCON_3$	95	—	21
PhtNCOOEt	100	82-86	77
TrtCl	114	111	81

BIBLIOGRAFIA

1. a) AMARAL, M.J.S.A., M.A. MACEDO e M.I.A. OLIVEIRA, *J. Chem. Soc., Perkin I*, 1977, 205; b) AMARAL, M.J.S.A. e M.I.A. OLIVEIRA, *Rev. Port. Quím.*, 1978, *20*, 161

2. AMIARD, G., R. HEYMÈS e L. VELLUZ, *Bull. Soc. chim. France*, 1955, 191.

3. a) ANFINSEN, C.B., *Science*, 1973, *181*, 223; b) ANFINSEN, C.B. e E. HABER, *J. Biol. Chem.*, 1961, *236*, 1361.

4. ARS, G., O. MIKSTA, O.S. PAPSUEVICH, *Tezisy Dokl. - Vses Simp. Khim. Pept. Belkov*, 3rd, 1974, 13 Akad. Nauk Ukr,SSR, Kiev, USSR; *Chem. Abs.*, 1977, *86*, 30041g.

5. BEWLEY, T.A., J. BROVETTO-CRUZ e C.H. LI, *Biochemistry*, 1969, *8*, 4701.

6. BEWLEY, T.A., J.S. DIXON e C.H. LI, *Internat. J. Peptide Protein Res.*, 1972, *4*, 281.

7. BIRR, C. e R. PIPKORN, *Angew. Chem. Internat. Edn*, 1979, *18*, 536.

8. BIRR, C. e M. WENGERT-MULLER, *Angew. Chem. Internat. Edn.*, 1979, *18*, 147.

9. BLUNDELL, T.L., G.G. DODSON, E. DODSON, D.C. HODGKIN e M. VIJAYAN, *Recent Progr. Hormone Res.*, 1971, *27*, 1.

10. BODANSZKY, M. e M.A. ONDETTI - "Peptide Synthesis", Interscience Publishers - John Wiley and Sons, Inc., New York, 1966, pág. 30 e 47.

11. BODANSZKY, M. e V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1959, *81*, 2504.

12. BODANSZKY, M. e V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1959, *81*, 5688.

13. BOISSONNAS, R.A., St. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD e J.-P. WALLER, *Helv. Chim. Acta*, 1955, *38*, 1491.

14. BRANDENBURG, D., W.-D. BUSSE, H.-G. GATTNER e H. ZAHN, "Peptides 1972", Proceedings of the twelfh European Peptide Symposium, Reinhardsbrunn Castle, German Democratic Republic, September 1972, ed. H. Hanson e H.-D. Jakubke,North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1973, pág. 270.

15. BRANDENBURG, D. e A. WOLLMER, *Z. physiol. Chem.*, 1973, *354*, 613.

16. BREWER, H.B., Jr., *Fed. Proc.*, 1969, *28*, 383.

17. BUSSE, W.-D. e F.H. CARPENTER, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1974, *96*, 5947.

18. BUSSE, W.-D. e H.-G. GATTNER, *Z. physiol Chem.*, 1973, *354*, 147.

19. CALLAHAN, F.M., G.W. ANDERSON, R. PAUL e J.E. ZIMMERMAN, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1963, *85*, 201.

20. CAPUTO, A. e R. ZITO, *Second Symposium on Lysozyme*, Milan, 1961, *1*, 29.

21. CARPINO, L.A., B.A. CARPINO, P.Y. CROWLEY, C.A. GIZA e P.H. TERRY, *Org. Synth.*, 1964, *44*, 15.

22. COSMATOS,A., I. PHOTAKI e L. ZERVAS, "Peptides: Proceedings of the Sixth European Symposium, Athens, September 1963", ed. L. Zervas, Pergamon Press, Oxford, 1965, pág. 301.

23. COYLE, S. e G.T. YOUNG, *Chem. Comm*, 1976, 980.

24. DU, Y.-C., R.-Q. JIANG e C.-L. TSOU, *Sci. Sinica*, 1965, *14*, 229.

25. ENGELS, E., "Diplomarbeit Techn. Hochschule", Aachen, 1967.

26. FERRARO, J.J., *Biochem. Prep.*, 1971, *13*, 39.

27. FLOURET, G., S. TERADA, T. KATO, R. GUALTIERI e A. LIPKOWSKI, *Internat. J. Peptide Protein Res.*, 1979, *13*, 137.

28. FUJII, N., H. YAJIMA, *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1981, 381.

29. FUJINO, M. e O. NISHIMURA, *Chem. Comm.*, 1976, 998.

30. GEIGER, R. e R. OBERMEIER, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1973, *55*, 60.

31. GEIGER, R. e R. OBERMEIER, "Diabetes Research Today", Symp. Med. Hoechst, Capri, 1976, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart, pág. 25.

32. GRÁF, L., J. BORVENDÉG, E. BARÁT, I. HERMANN e A. PATTHY, *Febs. Letters*, 1976, *66*, 233.

33. GUTTE, B. e R.B. MERRIFIELD, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1969, *91*, 501.

34. GUTTMANN, St., *Helv. Chim. Acta*, 1966, *49*, 83.

35. HARDY, P.M., B. RIDGE, H.N. RYDON e F.O. dos S.P. SERRÃO, *J. Chem. Soc.(C)*, 1971, 1722.

36. HASE, S., S. SAKAKIBARA, M. WAHRENBURG, M. KIRCHBERGER, I.L. SCHWARTZ e R. WALTER, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1972, *94*, 3590.

37. HASE, S. e R. WALTER, *Internat. J. Peptide Protein Res.*, 1973, *5*, 283.

38. HEATON, G. S., H.N. RYDON e J.A. SCHOFIELD, *J. Chem. Soc.*, 1956, 3157.

39. HIRSCHMANN, R., R.F. NUTT, D.F. VEBER, R.A. VITALI, S.L. VARGA, T.A. JACOB, F.W. HOLLY e R.G. DENKEWALTER, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1969, *91*, 507.

40. HISKEY, R.G. e J.B. ADAMS, Jr., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1965, *87*, 3969.

41. HISKEY, R.G., L.M. BEACHAM e V. G. MATL, *J. Org. Chem.*, 1972, *37*, 2472.

42. HISKEY, R.G., L.M. BEACHAM, III, V.G. MATL, J.N. SMITH, E.B. WILLIAMS,Jr., A.M. THOMAS e E.T. WOLTERS, *J. Org. Chem.*, 1971, *36*, 488.

43. HISKEY, R.G., G.W. DAVIS, M.E. SAFDY, T. INUI, R.A. UPHAM e W.C. JONES, Jr., *J. Org. Chem.*, 1970, *35*, 4148.

44. HISKEY, R.G. e M.A. HARPOLD, *Tetrahedron*, 1967, *23*, 3923.

45. HISKEY, R.G. e D.N. HARPP, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1965, *87*, 3965.

46. HISKEY, R.G. e J.T. SPARROW, *J. Org. Chem.*, 1970, *35*, 215.

47. HISKEY, R.G., A.M. THOMAS, R.L. SMITH e W.C. JONES, Jr., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1969, *91*, 7525.

48. HISKEY, R.G. e W.P. TUCKER, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1962, *84*, 4789.

49. HISKEY, R.G. e B.F. WARD, Jr., *J. Org. Chem.*, 1970, *35*, 1118.

50. HUGUENIN, R.L. e St. GUTTMANN, *Helv. Chim. Acta*, 1965, *48*, 1885.

50a. INUKAI, N., K. NAKANO e M. MURAKAMI, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1967, *40* 2913.

51. JARVIS, D., H.N. RYDON e J.A. SCHOFIELD, *J. Chem. Soc.*, 1961, 1752.

52. JIANG, R.-Q., Y.-C. DU e C.-L. TSOU, *Sci. Sinica*, 1963, *12*, 452.

53. JOŠT, K., T. BARTH, I. KREJČI, L. FRUHAUFOVÁ, Z. PROCHÁZKA e F. ŠORM, *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 1973, *38*, 1073.

54. JOŠT, K., Z. PROCHÁZKA, J.H. CORT, T. BARTH, J. ŠKOPKOVÁ, Z. PRUSÍK e F. ŠORM, *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 1974, *39*, 2835.

55. JOŠT, K. e J. RUDINGER, *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 1967, *32*, 1229.

56. JOŠT, K. e F. ŠORM, *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 1971, *36*, 234.

57. KAMBER, B., *Helv. Chim. Acta*, 1971, *54*, 398.

58. KAMBER, B., *Helv. Chim. Acta*, 1971, *54*, 927.

59. KAMBER, B., A. HARTMANN, A. JÖHL, F. MARKI, B. RINIKER, W. RITTEL e P. SIEBER, "Peptides: Chemistry, Structure and Biology", Proceedings of the Fourth American Peptide Symposium, New York, June 1975, ed. R. Walter e J. Meienhofer, Ann Arbor Science Publishers, Inc., Ann Arbor, Michigan, 1975, pág. 477.

60. KAMBER, B. e W. RITTEL, *Helv. Chim. Acta*, 1968, *51*, 2061.

61. KATSOYANNIS, P.G., Y. OKADA, C. ZALUT, *Biochemistry*, 1973, *12*, 2516.

62. KATSOYANNIS, P.G. e A. TOMETSKO, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1966, *55*, 1554.

63. KATSOYANNIS, P.G., A.C. TRAKATELLIS, C. ZALUT, S. JOHNSON, A. TOMETSKO, G. SCHWARTZ e J. GINOS, *Biochemistry*, 1967, *6*, 2656.

64. KELLER, O. e J. RUDINGER, *Helv. Chim. Acta*, 1974, *57*, 1253.

65. KHAN, S.A., K.M. SIVANANDAIAH, *Tetrahedron Letters*, 1976, 199.

66. KOBAYASHI, A., S. HASE, R. KIYOI e S. SAKAKIBARA, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1969, *42*, 3491.

67. KUNG, Y., Y. DU, W. HUANG, C. CHEN, L. KE, S. HU, R. JIANG, S. CHU, C. NIU, J. HSU, W. CHANG, L. CHEN, H. LI, Y. WANG, T. LOH, A. CHI, C. LI, P. SHI, Y. YIEH, K. TANG e C. HSING, *Sci. Sinica*, 1966, *15*, 544.

68. KUROMIZU, K. e J. MEIENHOFER, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1974, *96*, 4978.

69. LARGE, D.G., H.N. RYDON e J.A. SCHOFIELD, *J. Chem. Soc.*, 1961, 1749.

70. LINDSAY, D. G., *Febs Letters*, 1972, *21*, 105.

71. LIU, W.K. e J. MEIENHOFER, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1968, *31*, 467.

72. LIU, W. K., H. TRZECIAK, H. SCHÜSSLER e J. MEIENHOFER, *Biochemistry*, 1971, *10*, 2849.

73. LIVE, D.H., W.C. AGOSTA e D. COWBURN, *J. Org. Chem.*, 1977, *42*, 3556.

74. LUNKENHEIMER, W., "Merrifield - Synthese Symmetrischer Cystinpeptide", Westdeutscher Verlag, Köln, 1970, pág. 48.

75. LUNKENHEIMER, W. e H. ZAHN, *Annalen*, 1970, *740*, 1.

76. MEIENHOFER, J., E. SCHNABEL, H. BREMER, O. BRINKHOFF, R. ZABEL, W. SROKA, H. KLOSTERMEYER, D. BRANDENBURG, T. OKUDA e H. ZAHN, *Z. Naturforsch*, 1963, *18b*, 1120.

77. NEFKENS, G.H.L., G.I. TESSER e R.J.F. NIVARD, *Rec. Trav. chim.*, 1960, *79*, 688.

78. NESVADBA, H., K. JOŠT, J. RUDINGER e F. ŠORM, *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 1968, *33*, 3790.

79. NEUMANN, H., I.Z. STEINBERG, J.R. BROWN, R.F. GOLDBERGER e M. SELA, *European J. Biochem.*, 1967, *3*, 171.

80. OBERMEIER, R. e R. GEIGER, *Z. physiol. Chem.*, 1975, *356*, 1631.

81. "Organic Synthesis", Coll. vol. III, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1962, pág. 841.

82. "Organic Synthesis", Coll. vol. III, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1962, pág. 141.

83. PHOTAKI, I., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1966, *88*, 2292.

84. PHOTAKI, I., J. TAYLOR-PAPADIMITRIOU, C. SAKARELLOS, P. MAZARAKIS e L. ZERVAS, *J. Chem. Soc. (C)*, 1970, 2683.

85. POLACEK, I., I. KREJČI, H. NESVADBA e J. RUDINGER, *European J. Pharmacol.*, 1970, *9*, 239.

86. PRICE, P.A., W.H. STEIN, S. MOORE, *J. Biol. Chem.*, 1969, *244*, 929.

87. "Protective Groups in Organic Chemistry" ed. J.F.W. McOMIE, Plenum Press, New York, 1973; a) pág. 286; b) pág. 265.

88. RESSLER, C. e V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1954, *76*, 3107.

89. RITTEL, W., R. MAIER, M. BRUGGER, B. KAMBER, B. RINIKER e P. SIEBER, *Experientia*, 1976, *32*, 246.

90. RUDINGER, J., J. HONZL e M. ZAORAL, *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 1956, *21*, 202.

91. RUDINGER, J. e K. JOŠT, *Experientia*, 1964, *20*, 570.

92. SAKAKIBARA, S. e Y. NOBUHARA, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1965, *38*, 120.

93. SAKAKIBARA, S. e Y. SHIMONISHI, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1965, *38*, 1412.

94. SCHNABEL, E., *Annalen*, 1967, *702*, 188.

95. SCHNABEL, E., H. KLOSTERMEYER e H. BERNDT, *Annalen*, 1971, *749*, 90.

96. SCHOTT, H. F., J.B. LARKIN, L.B. RUCKLAND e M.S. DUNN, *J. Org. Chem.*, 1947, *12*, 490.

97. SCHRÖDER, E. e K. LÜBKE - "The Peptides", Academic Press, New York, 1966, vol. II, pág. 374.

98. SCHWYZER, R., B. ISELIN, W. RITTEL e P. SIEBER, *Helv. Chim. Acta*, 1956, *39*, 872.

99. SELA, M., F.H. WHITE, Jr. e C.B. ANFINSEN, *Science*, 1957, *125*, 691.

100. SERRÃO, F.O. dos S.P. - "Péptidos Assimétricos da L-Cistina - Síntese de Dois Oligopéptidos da L-Cisteína e Glicina", Faculdade de Ciências do Porto, 1969, pág. 42.

101. SERRÃO, F.O. dos S.P. - "Síntese de Péptidos Assimétricos Protegidos, da L-Cistina", Dissertação para Doutoramento, Universidade do Porto, 1960; a) pág. 159; b) pág. 185.

102. SIEBER, P., K. EISLER, B. KAMBER, B. RINIKER, W. RITTEL, F. MÄRKI e M. DE GASPARO, *Z. physiol. Chem.*, 1978, *359*, 113.

103. SIEBER, P., B. KAMBER, A. HARTMANN, A. JÖHL, B. RINIKER e W. RITTEL, *Helv. Chim. Acta*, 1974, *57*, 2617.

104. SIEBER, P., B. KAMBER, A. HARTMANN, A. JÖHL, B. RINIKER e W. RITTEL , *Helv. Chim. Acta*, 1977, *60*, 27.

105. SPERLING, R., Y. BURSTEIN e I. Z. STEINBERG, *Biochemistry*, 1969, *8*, 3810.

106. STEINER, D.F. e P.E. OYER, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1967, *57*,473.

107. SUND, H. e K. WEBER, *Angew. Chem. Internat. Edn.*, 1966, *5*, 231.

108. TAMBURRO, A.M., E. BOCCU e L. CELOTTI, *Internat. J. Protein Res.*, 1970, *2*, 157.

109. TAN, N.H. e E.T. KAISER, *J. Org. Chem.*, 1976, *41*, 2787.

110. TASCHNER, E., C. WASIELEWSKI e J.F. BIERNAT, *Annalen*, 1961, *646*,119.

111. VAN RIETSCHOTEN, J., C. GRANIER, H. ROCHAT, S. LISSITZKY e F. MIRANDA, *European J. Biochem.*, 1975, *56*, 35.

112. VELLUZ,L., G. AMIARD, J. BARTOS, B. GOFFINET e R. HEYMÈS, *Bull. Soc. chim. France*, 1956, 1464.

113. VIGNEAUD, V. DU, C. RESSLER, J.M. SWAN, C.W. ROBERTS e P.G. KATSOYANNIS, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1954, *76*, 3115.

114. WILLIAMS, E.B., Jr.,"Ph. D. Thesis",University of North Carolina,1970.

115. WITTINGHOFER, A., *Annalen*, 1974, 290.

116. YAJIMA, H., Y. KISO, Y. OKADA e H. WATANABE, *Chem. Comm.*, 1974,106.

118. ZAHN, H., E.DRECHSEL e W. PULS, *Z. physiol Chem.*, 1968, *349*, 385.

119. ZAHN, H., B. GUTTE e O. BRINKHOFF, *Angew. Chem. Internat. Edn.*, 1965, *4*, 528.

120. ZAHN, H. e G. SCHMIDT, *Annalen*, 1970, *731*, 101.

121. ZERVAS, L. e I. PHOTAKI, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1962, *84*, 3887.

122. ZERVAS, L. I. PHOTAKI, A. COSMATOS e D. BOROVAS, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1965, *87*, 4922.

123. ZIMIŃSKI, T. e E. BOROWSKI, *J. Chromatog.*, 1966, *23*, 480.

RESUMO E ABSTRACT

R E S U M O

Nesta dissertação descreve-se um estudo realizado com o fim de estabelecer um novo método de síntese de péptidos cíclicos simétricos, contendo L-cistina.

Os resultados obtidos constituem a parte essencial e original deste trabalho. Inclui-se, ainda, uma breve revisão sobre o papel da ligação dissulfureto em péptidos e proteínas naturais e sobre a metodologia que tem sido geralmente seguida na síntese destes compostos.

O método estabelecido, baseado na utilização simultânea de derivados adequados de L-cisteína e de L-cistina, conduziu à síntese, com bons rendimentos, dos seguintes péptidos cíclicos simétricos, protegidos, de L-cistina: S,S-S',S'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-L-hemicistinil-L-hemicistinato de *terc*-butilo; S,S-S',S'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-L-hemicistinilglicil-L--hemicistinato de *terc*-butilo) e S,S-S',S'-bis(N-*terc*-butiloxicarbonil-L-hemicistinilglicilglicil-L-hemicistinato de *terc*-butilo).

Usou-se, como derivado de L-cistina, o L-cistinato de bis(*terc*-butilo), o qual foi preparado por dois processos: a) esterificação directa da L-cistina; b) síntese do N,N'-diftaloil-L-cistinato de bis(*terc*-butilo) seguida de remoção do grupo ftaloílo.

Por condensação, pelo método da N,N'-dicicloexilcarbodiimida, do L-cistinato de bis(*terc*-butilo) com os compostos N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L--cisteína, N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicina e N-*terc*-butiloxicarbonil-S-tritil-L-cisteinilglicilglicina , obtiveram-se os compostos $[\text{Boc-Cys}(\text{Trt})\text{-(Gly)}_n\text{-Cys-OBu}^t]_2$ (n = 0, 1 e 2).

Por remoção oxidativa do grupo S-tritilo destes péptidos, obtiveram-se então, os péptidos cíclicos $[\text{Boc-Cys}(\text{Trt})\text{-(Gly)}_n\text{-Cys-OBu}^t]_2$ (n = 0, 1 e 2).

Os resultados obtidos parecem indicar que o método usado neste trabalho de investigação pode ser útil na síntese doutros péptidos cíclicos da L-cistina.

A B S T R A C T

A new method for the preparation of cyclic symmetrical peptides of L-cystine, by using derivatives of L-cystine and L-cysteine, simultaneously, has been investigated.

The results obtained during this research are the main subject of this dissertation, which includes also a brief review on the role of the disulphide bond in natural peptides and proteins and on the methodology commonly used in their synthesis.

The new approach has led to the synthesis, with good yields, of the following L-cystine symmetrical protected peptides: S,S-S',S'-bis(N-*tert*-butyloxycarbonyl-L-hemicystinyl-L-hemicystine *tert*-butyl ester), S,S-S',S'-bis(N-*tert*-butyloxycarbonyl-L-hemicystinylglycyl-L-hemicystine-*tert*-butyl ester) and S,S-S',S'-bis(N-*tert*-butyloxycarbonyl-L-hemicystinylglycylglycyl-L-hemicystine *tert*-butyl ester).

A convenient derivative of L-cystine, the L-cystine bis-*tert*-butyl ester, was used. The preparation of this ester was achieved using two routes: a) direct esterification of L-cystine; b) synthesis of N,N'-diphthaloyl-L-cystine bis-*tert*-butyl ester followed by removal of the phthaloyl grouping.

By condensation of L-cystine bis-*tert*-butyl ester with the compounds N-*tert*-butyloxycarbonyl-S-trityl-L-cysteine, N-*tert*-butyloxycarbonyl-S-trityl-L-cysteinylglycine and N-*tert*-butyloxycarbonyl-S-trityl-L-cysteinylglycylglycine, the peptides $\left[\text{Boc-}\underset{\text{Trt}}{\text{Cys}}\text{-(Gly)}_n\text{-Cys-OBu}^t\right]_2$ (n = 0, 1 and 2) were obtained. The condensations were carried out by the N,N'-dicyclohexylcarbodiimide procedure.

The syntheses of the protected cyclic peptides, $\left[\text{Boc-Cys-(Gly)}_n\text{-Cys-OBu}^t\right]_2$ (n = 0, 1 and 2) were achieved, then, by oxidative removal of the S-trityl group from the corresponding peptides containing L-cystine and L-cysteine.

From the results obtained it is expected that this method can be useful for the synthesis of other cyclic peptides containing L-cystine.