

M. JOAQUINA S. A. AMARAL TRIGO
M. ISABEL M. R. ESTEVES BARBEDO
M. ISABEL A. OLIVEIRA SANTOS

Centro de Investigação em Química
Faculdade de Ciências,
Universidade do Porto
4000 PORTO

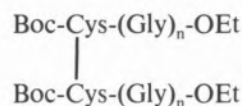


ESTUDO DA SÍNTESE DE PÉPTIDOS SIMÉTRICOS, PROTEGIDOS, DE L-CISTINA E GLICINA

Descreve-se a síntese dos péptidos de L-cistina e glicina: N,N'-bis (terc-butiloxycarbonil)-L-cistinil-bis (glicinato de etilo), N,N'-bis (terc-butiloxycarbonil)-L-cistinil-bis(glicilglicinato de etilo) e N,N'-bis(terc-butiloxycarbonil-L-cistinil-bis(glicilglicilglicinato de etilo), pelos métodos de condensação da N,N'-dicioexilcarbodiimida e dos ésteres activados o e p-nitrofenílicos.

No âmbito de um programa de síntese de péptidos cíclicos heterodéticos de L-cistina e glicina, começou-se por realizar um estudo preliminar de preparação de péptidos simples contendo aqueles aminoácidos, com o fim de seleccionar grupos de protecção e métodos de condensação.

Neste artigo descrevem-se os resultados obtidos nas experiências realizadas para a síntese de três péptidos simétricos, protegidos, de L-cistina e glicina de fórmula geral:



$$n = 1, 2 \text{ e } 3$$

Na síntese destes três péptidos usaram-se como «componente carboxílico» a N,N'-bis (terc-butiloxycarbonil)-L-cistina e como «componentes amino» os ésteres etílicos da glicina, da glicilglicina e da glicilglicilglicina, respectivamente para n = 1, 2 e 3. Utilizaram-se os métodos de condensação da N,N'-dicioexilcarbodiimida e dos ésteres *para*-nitrofenílicos no caso dos três péptidos e, ainda, o método dos ésteres *orto*-nitrofenílicos no caso do péptido correspondente a n = 1.

Verificou-se que os rendimentos das reacções de condensação diminuem com o aumento do número de resíduos de glicina, especialmente, quando se passa de dois para três resíduos.

Nas condensações pelo método da N,N'-dicioexilcarbodiimida verificou-se que a tendência para a formação de N-acilureias aumenta com a temperatura e com o número de resíduos de glicina; na purificação dos péptidos foi também difícil eliminar a contaminação da N,N'-dicioexilureia. Em face destas dificuldades tentou-se a condensação pelo método dos ésteres nitrofenílicos que evita a presença dessas impurezas.

No entanto, só no caso do péptido correspondente a n = 1 o rendimento da condensação foi superior ao obtido pelo método da carbodiimida.

O método dos ésteres *o*-nitrofenílicos foi utilizado apenas no caso de n = 1, uma vez que se provou que não conduzia a melhores rendimentos que o dos ésteres *p*-nitrofenílicos.

No quadro seguinte apresenta-se um resumo dos resultados experimentais.

Quadro Resumo

Péptido	Método de condensação	Rendimento
[Boc- Cys-Gly-OEt] ₂ p.f. 129-130°C [α] _D ²⁴ -112,5° (c 2,00 em MeOH)	<i>N,N'</i> -Dicicloexilcarbodiimida Ésteres <i>p</i> -nitrofenílicos Ésteres <i>o</i> -nitrofenílicos	56% 74% 56%
[Boc- $\text{Cys-(Gly)}_2\text{-OEt}$] ₂ p.f. 120-122°C [α] _D ²⁰ -88,2° (c 2,00 em MeOH)	<i>N,N'</i> -Dicicloexilcarbodiimida Ésteres <i>p</i> -nitrofenílicos	42% 25%
[Boc- $\text{Cys-(Gly)}_3\text{-OEt}$] ₂ p.f. 79-84°C	<i>N,N'</i> -Dicicloexilcarbodiimida Ésteres <i>p</i> -nitrofenílicos	5% 5%

PARTE EXPERIMENTAL

A pureza de todos os compostos foi confirmada por cromatografia em placa de Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) nos quatro seguintes sistemas de solventes: clorofórmio-metanol (9:1), 1-butanol-ácido acético-água (4:1:5), piridina-ácido acético-água (1:2:2) e benzeno-clorofórmio-etanol (12:12:1). Os cromatogramas foram revelados pelo método ZIMINSKI e BOROWSKI [1] (com (NH₄)₂SO₄-H₂SO₄). As evaporações e concentrações foram efectuadas sob pressão reduzida em evaporador rotativo. Os extractos orgânicos foram secos sobre sulfato de magnésio anidro. O éter de petróleo usado refere-se à fracção p.e. 40-60°C. Os espectros de ressonância magnética nuclear foram registados a 33°C com espectrómetros Perkin-Elmer R32 90MHz e Varian 60 MHz. As microanálises foram efectuadas por Dr. Ilse Beetz (Kronach, Alemanha). As rotações ópticas foram medidas com um polarímetro Bellingham e Stanley Pepol 66.

N,N'-Bis(terc-butiloxicarbonil)-L-cistinato de bis(*o*-nitrofenilo)(I) [2].

Dissolveu-se *N,N'*-bis-Boc-L-cistina [3] (2,60g; 0,0059 mol) em acetato de etilo (43 ml). A esta solução arrefecida a -30°C, adicionou-se sucessivamente *N,N'*-dicicloexilcarbodiimida (2,43g; 0,0118 mol) em acetato de etilo (3 ml) e *o*-nitrofenol (1,65g; 0,0119 mol) dissolvido em acetato de etilo (3 ml). Deixou-se a mistura da reacção, com agitação mecânica, à temperatura de -20°C durante 48 horas e à temperatura ambiente durante 24 horas. Em seguida, filtrou-se a ureia e evaporou-se o filtrado, obtendo-se um óleo amarelado que cristalizou de

acetato de etilo. Isolou-se 2,6g (64,7%) do éster de p.f. 140-144°C.

Por recristalização em acetato de etilo a ponto de fusão constante, obteve-se o *N,N'*-bis(terc-butiloxicarbonil)-L-cistinato de bis(*o*-nitrofenilo) (2,2g; 54,7%) de p.f. 145-150°C, [α]_D²⁴-162,7° (c 2,00 em MeOH), τ (CDC1₃) 1,87-2,01 (2H, d, C₆H₄); 2,25-2,82 (6H, complexo, C₆H₄); 4,45-4,75 (2H, d, NH); 4,95-5,30 (2H, complexo, CH); 6,38-6,94 (4H, complexo, CH₂); 8,43-8,80 (18H, s, Bu¹). (Encontrado: C-49,6; H-5,1; N-8,1; S-9,0. C₂₈H₃₄N₄O₁₂S₂ requer C-49,3; H-5,0; N-8,2; S-9,4%).

Cloreto de glicilglicilglicinato de etilo(II)

N-tritolglicina [4] foi condensada com cloreto de glicilglicinato de etilo [5] pelo método da *N,N'*-dicicloexilcarbodiimida, obtendo-se *N*-tritolglicilglicilglicinato de etilo (64%), p.f. 183-185,5°C (lit. [6] p.f. 185,5-186°C, preparado pelo método dos ésteres cianometílicos). O grupo tritilo foi removido por acção de HCl em etanol, obtendo-se o cloreto do tripéptido (81%), p.f. 208-209°C (decompondo-se desde 97°C), (lit. [7] p.f. 213-214°C com decomposição, obtido por reacção da 2-tio-5-tiazolidona com o cloreto de glicilglicinato de etilo na presença de trietilamina, seguida de acidificação).

N,N'-Bis(terc-butiloxicarbonil)-L-cistinil-bis(glicinato de etilo)(III)

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

A uma suspensão de *N,N'*-bis(terc-butiloxicarbonil)-L-cistina (4,40g; 0,01 mol) em diclorometano seco

(28 ml), arrefecida a 0°C e agitada magneticamente, adicionou-se DCCI (4,31g; 0,021 mol) em pequenas porções durante 25 minutos. Em seguida, juntou-se cloreto de glicinato de etilo [8] (2,80g; 0,02 mol) e trietilamina (2,02g; 0,02 mol). Deixou-se a mistura da reacção a 0°C durante 2 horas e à temperatura ambiente durante 65 horas. Filtrou-se a ureia e o cloreto de trietilamónio, adicionando-se ao filtrado ácido acético glacial (0,5 ml) a fim de eliminar os vestígios da DCCI. Após duas horas a 0°C filtrou-se a *N,N'*-dicicloexilureia, e o filtrado foi extraído, sucessivamente, com água, solução aquosa de ácido cítrico a 5%, solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio 1 M e água. A camada orgânica depois de seca (MgSO₄) foi evaporada e o resíduo obtido foi cristalizado de etanol dando 3,9g (63,9%) de composto de p.f. 126-127°C. O péptido assim obtido mostrou, por análise cromatográfica e de R.M.N., estar contaminado com *N,N'*-dicicloexilureia.

Dissolveu-se novamente o composto em acetona e, após 24 horas a 0°C, separou-se por filtração uma pequena quantidade de ureia. O filtrado foi evaporado à secura e o resíduo obtido foi submetido a várias cristalizações de etanol, obtendo-se o *N,N'*-bis(*tert*-butiloxicarbonil)-L-cistinil-bis(glicinato de etilo) (3,4g; 55,7%) de p.f. 129-130°C, $[\alpha]_D^{24}$ -112,5° (c 2,00 em MeOH), $[\alpha]_D^{25}$ -127,7° (c 0,40 em DMF), τ (CDCl₃) 1,80-2,10 (2H, t, NH); 4,30-4,60 (2H, d, NH); 4,90-5,30 (2H, complexo, CH); 5,60-6,30 (8H, complexo, CH₂); 6,70-7,17 (4H, d, SCH₂); 8,40-8,65 (18H, s, Bu); 8,70-8,90 (6H, t, CH₃). (Encontrado: C-47,3; H-7,1; N-9,0; S-11,0. C₂₃H₄₂O₁₀N₄S₂ requer C-47,2; H-6,9; N-9,1; S-10,5%).

B — Método dos ésteres *p*-nitrofenílicos

A uma suspensão de cloreto de glicinato de etilo (0,56g; 0,004 mol) em diclorometano (20 ml), arrefecida num banho de acetona e neve carbónica e com agitação magnética, adicionou-se *N,N'*-bis(*tert*-butiloxicarbonil)-L-cistinato de bis(*p*-nitrofenilo) [9, 10] (1,37g; 0,002 mol) e trietilamina (0,40g; 0,004 mol) em diclorometano (10 ml).

Deixou-se então a mistura da reacção à temperatura ambiente, com agitação magnética, durante três dias. Em seguida extraiu-se a solução sucessivamente com água, solução aquosa de hidrogenocar-

bonato de sódio 1 M, ácido cítrico aquoso a 5% e solução aquosa saturada de cloreto de sódio. A camada orgânica, depois de seca (MgSO₄), foi evaporada à secura e o sólido obtido foi cristalizado de etanol, dando 0,9g (73,7%) do composto cristalino branco de p.f. 126-128°C.

Depois de uma recristalização de etanol e duas de acetato de etilo, o composto apresentava p.f. 129-130°C, $[\alpha]_D^{24}$ -130,2° (c 0,50 em DMF), mostrando portanto ser idêntico ao *N,N'*-bis(*tert*-butiloxicarbonil)-L-cistinil-bis(glicinato de etilo) preparado pelo método da *N,N'*-dicicloexilcarbodiimida.

C — Método dos ésteres *o*-nitrofenílicos [2]

Efectuou-se a condensação do *N,N'*-bis(*tert*-butiloxicarbonil)-L-cistinato de bis(*o*-nitrofenilo) com o cloreto de glicinato de etilo, em condições de reacção idênticas às referidas para o composto III, método B. Obteve-se o péptido com o rendimento de 55,8% de p.f. 125-129°C, $[\alpha]_D^{24}$ -133,5° (c 0,40 em DMF).

N,N'-Bis(*tert*-butiloxicarbonil)-L-cistinil-bis(glicilglicinato de etilo)(IV)

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

Este péptido foi preparado em condições análogas às referidas para o péptido III — método A. A purificação do composto foi conseguida por trituração do resíduo obtido com éter de petróleo seguida de três recristalizações de acetato de etilo. O rendimento da reacção foi de 42% de péptido puro de p.f. 120-122°C e $[\alpha]_D^{20}$ -88,2° (c 2,00 em MeOH). τ [(CD₃)₂SO] 1,70-2,10 (4H, t, NH); 2,71-3,10 (2H, d, NH); 5,68-5,98 (4H, complexo, OCH₂); 5,98-6,30 (19H, complexo, CH e NCH₂); 6,50-6,89 (4H, d, SCH₂); 8,45-8,60 (18H, s, Bu); 8,60-8,85 (6H, t, CH₃). (Encontrado: C-46,4; H-6,7; N-11,6; S-8,9. C₂₈H₄₈O₁₂N₆S₂ requer C-46,8; H-6,8; N-10,9; S-8,9%).

B — Método dos ésteres *p*-nitrofenílicos

Efectuou-se a condensação do *N,N'*-bis(*tert*-butiloxicarbonil)-L-cistinato de bis(*p*-nitrofenilo) com o cloreto de glicilglicinato de etilo, em condições de reacção idênticas às referidas para o composto III, método B.

Após cinco recristalizações de acetato de etilo obteve-se 25% do péptido puro, 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.

N,N'-Bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistinil-bis(glicilglicinato de etilo)(V)

A — Método da *N,N'*-dícicloexilcarbodiimida

Realizou-se a condensação da *N,N'*-bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistina com o cloreto de glicilglicilglicinato de etilo nas condições referidas para o composto III, método A. Dado ter-se manifestado uma grande tendência para a formação de *N*-acilureia efectuou-se então a reacção a -15°C durante quatro dias e à temperatura ambiente durante mais dois dias. Mesmo assim, o sólido obtido mostrava-se muito contaminado e resistiu a todas as tentativas de purificação por cristalização. Recorreu-se então à técnica de cromatografia em coluna para efectuar a separação dos componentes da mistura. O sólido obtido (1,3g) foi dissolvido em clorofórmio (3 ml) e aplicado a uma coluna de gel de sílica ($<0,08$ mm da Merck) (25g) de diâmetro interno 1,7 cm, correspondendo a um comprimento de cerca de 25 cm de enchimento. Usou-se pressão de azoto aplicada no topo da coluna para se conseguir uma velocidade de eluição conveniente.

Usaram-se na separação os seguintes solventes, sucessivamente:

- a) Clorofórmio (550 ml) que separou os vestígios de ureia.
- b) Clorofórmio-etanol (90:5) (160 ml) que permitiu separar as contaminações de $R_f(1)=0,74$; 0,57 e 0,53.
- c) Clorofórmio-etanol (90:10) (420 ml) que separou um composto de $R_f(1)=0,47$ e vestígios de $R_f(1)=0,99$; 0,81 e 0,53.
- d) Clorofórmio-etanol (80:20) (70 ml) que separou o que nos pareceu ser o péptido (0,22g; 5,2%), de p.f. $79-84^{\circ}\text{C}$, $R_f(1)=0,42$.

O péptido foi analisado por espectrometria de R.M.N. $\tau[(\text{CD}_3)_2\text{SO}]$ 1,70-2,07 (6H, complexo, NH); 2,80-3,10 (2H, d, NH); 5,60-6,00 (4H, q, OCH_2); 6,00-6,42 (14H, complexo, CH e NCH_2); 6,75-7,22 (4H, d, SCH_2); 8,50-8,95 (25H,

complexo, Bu^1 e CH_3). (Encontrado: C-45,6; H-6,6; N-11,9; S-7,5. $\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{O}_{14}\text{N}_8\text{S}_2$ requer C-45,8; H-6,5; N-12,4; S-7,6%).

B — Método do ésteres *p*-nitrofenílicos

A condensação do *N,N'*-bis(*terc*-butiloxicarbonil)-L-cistinato de bis(*p*-nitrofenilo) com o cloreto de glicilglicilglicinato de etilo foi realizada de modo idêntico ao descrito para o péptido III, método B.

O residuo obtido mostrou-se muito contaminado tendo sido submetido a cromatografia em coluna de gel de sílica, de acordo com o processo usado na experiência anterior.

Isolou-se apenas 4,5% de composto idêntico ao péptido descrito nessa mesma experiência.

Recebido 14.Maio.1981

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Prof. Doutor Fernando Serrão todo o apoio e encorajamento que nos deu durante a realização deste trabalho. Agradecemos ao extinto Instituto de Alta Cultura a concessão de subsídios de investigação no âmbito do Núcleo de Investigação em Química Orgânica — Projecto P.Q. I.

BIBLIOGRAFIA

- [1] T. ZIMIŃSKI, E. BOROWSKI, *J. Chromatog.*, **23**, 480(1966).
- [2] M. M. da R. DIAS, Seminário em Síntese Peptídica, Anual lectivo 1973/74, Faculdade de Ciências do Porto, Laboratório de Química, Porto, 1974.
- [3] J. J. FERRARO, *Biochem. Prep.*, **13**, 39 (1971).
- [4] G. AMIARD, R. HEYMES, L. VELLUZ, *Bull. Soc. chim. France*, 191 (1955).
- [5] H. F. SCHOTT, J. B. LARKIN, L. B. ROCKLAND, M. S. DUNN, *J. Org. Chem.*, **12**, 490 (1947).
- [6] R. SCHWYZER, B. ISELIN, W. RITTEL, P. SIEBER, *Helv. Chim. Acta.*, **39**, 872 (1956).
- [7] A. H. COOK, A. L. LEVY, *J. Chem. Soc.*, 646 (1950).
- [8] F. O. DOS S. P. SERRÃO, «Síntese de Péptidos Assimétricos, Protegidos, da L-Cistina», Dissertação para doutoramento, Porto, 1960, pág. 194.
- [9] E. ENGELS, «Diplomarbeit Tech. Hochschule», Aachen (1967).
- [10] W. LUNKENHEIMER, H. ZAHN, *Annalen*, **740**, 1 (1970).

ABSTRACT

*The syntheses of the peptides, N,N' -bis(*t*-butyloxycarbonyl)-L-cystinyl-bis(glycine ethyl ester), N,N' -bis(*t*-butyloxycarbonyl)-L-cystinyl-bis(glycylglycine ethyl ester) and N,N' -bis(*t*-butyloxycarbonyl)-L-cystinyl-bis(glycylglycylglycine ethyl ester) by using the N,N' -dicyclohexylcarbodiimide, the *o*- and *p*-nitrophenyl esters condensation methods are described.*