Universidade de São Paulo

Instituto de Química

Síntese enzimática de peptídeos contendo asparagina e transesterificação em metanol de ésteres de peptídeos na presença de Ca(II).

Maria Terêsa Machini de Miranda

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor.

1989

Tese preparada no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Orientador: Profa.Dra. Mineko Tominaga

Dedico esta tese

ao Antonio, meu esposo e amigo, que com incentivo e apoio sempre me auxiliou,

ao meu filhinho João, que torna meus dias mais felizes,

aos meus pais, Delício e Therezinha, que com esforço e incentivo possibitaram a minha formação.

Agradeço à Profa.Dra. Mineko Tominaga pela oportunidade, ensinamentos, incentivo e pela amizade a mim dedicada.

Agradeço

Aos Profs.Drs. Antonio C.M. Paiva, Henrique E. Toma, Liliana Marzoratti, Luíz Juliano, Laerte de Oliveira, Massayoshi Yoshida e Iolanda M. Cuccovia pelas valiosas opiniões dadas.

A Elisabeth Cheng, companheira de Mestrado e Doutorado, pelas discussões, ajuda e amizade no decorrer destes anos.

A Francesca C. Theobaldo por sua eficiente colaboração na análise e acompanhamento cinético das reações por HPLC, pela amizade e incentivo.

A Elisabete Lira, pelo apoio técnico, paciente ajuda no levantamento bibliográfico realizado e por sua amizade.

Ao Marcelo P. Bemquerer pelo auxílio na correção datilográfica desta tese.

Aos Drs. Yoshio Okada e Hiroshi Morita pela obtenção dos espectros de ressonância magnética protônica a 400 MHz.

Aos Profs.Drs. Elisabeth de Oliveira, Keichi Tanaka e K. Min pelas análises por absorção atômica realizadas.

Ao Prof.Dr. Yoshio Kawano pela realização dos espectros Raman.

A Profa.Dra. Aldelaide Faljoni pela determinação de α_D.

A Profa.Dra. Dulcinéia S.P. Abdalla pelas leituras por densitometria.

Ao Prof.Dr. José Muradian pelo auxílio na atribuição dos espectros de ressonância magnética protônica.

Ao Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina pela realização das análises de aminoácidos, por alguns peptídeos cedidos e pela oportunidade de preparação de peptidil-resinas.

as análises elementares.

Ao Roque da Central Analítica pela obtenção dos espectros de ressonância magnética protônica a 200 MHz.

A Aninha pelo paciente e cuidadoso serviço datilográfico.

A todos que comigo conviveram nestes anos e que tenham de alguma forma auxiliado na execução deste trabalho.

Ao CNPq e FAPESP pelas bolsas concedidas.

Abreviações Usadas

Os resíduos de aminoácidos e as sequências peptídicas foram abreviados de acordo com as normas de IUPAC-IUB Comission on Biochemical Nomenclature (J. Biol. Chem., 242: 255-57, 1967).

Ac- = acetil

AcOEt = acetato de etila

Boc- = terc-butiloxicarbonil

Boc-aa = terc-butilixocarbonil-aminoácido

Boc-ON = Z-t-butiloxicarbonilaxiimino-2-fenilacetonitrila

Boc-SDP = tiorcarbonato t-butil-S-4,6-dimetil-2-pirimidina

Bzh = benzidril

-Bzl = benzil

$Ca(Ac)_2$ = acetato de cálcio

$CaCl_2$ = cloreto de cálcio

CCD = cromatografia em camada delgada

CCl_4 = tetracloreto de carbono

DCC = diciclohexilcarbodiimida

DCM = diclorometano

DCU = N,N'-diciclohexiluréia

DMF = dimetilformamida

$DMSO-d_6$ = dimetilsulfóxido deuterado

EDTA = sal dissódico do ácido etilenodinitrilotetra-acético

EE = éter etílico

EP = éter de petróleo

EQ = equivalente

EtOH = etanol

ΔG_{hid} = variação de energia livre de Gibbs de hidrólise

ΔG_{ion} = variação de energia livre de Gibbs e ionização

.HCl = cloridrato

HCl = ácido clorídrico

H_2O = água

HOBt = 1-hidroxibenzotriazol

HPLC = cromatografia líquida de alta eficiência

K_{cat} = constante de catálise

K_{hid} = constante de hidrólise

K_{ion} = constante da ionização

K_m = constante de afinidade

K_{sint} = constante de síntese

Lit. = literatura

MeOH = metanol

MHz = megahertz

m/m = massa/massa

Moz- = p-metoxibenziloxicarbonil

Moz-SDP = Z-tiocarbonato de p-metoxibenzil-S-4,6-dimetil-pirimidina

m/v = massa/volume

NaAc = acetato de sódio

NaOH = hidróxido de sódio

n-Bu = n-butanol

n-HOSu = n-hidroxisuccinimida

$-NH_2$ = amida

$-NHCH_3$ = metilamida

Obs. = observado

$-OBu^t$ = éster terc-butílico

-OBzl = éster benzílico

-OEt = éster etílico

-OMe = éster metílico

-ONp = éster p-nitrofenílico

PF = ponto de fusão

ppm = partes/milhão

-Res = resina de Merrifield (polímero de poliestireno e divinilbenzeno)

^{1}RM H = ressonância magnética protônica

TEA = trietilamina

TFA = ácido trifluoroacético

THF = tetrahidrofurano

TMS = tetrametilsilano

.Tos = tosilato

tr = tempo de retenção

Tris/HCl = solução tampão de cloridrato de tris-hidroximetil-amino-metano e ácido clorídrico

v/v = volume/volume

Z- = benziloxicarbonil

ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO PG.

1. Síntese de peptídeos ..... 1.

2. Síntese enzimática de peptídeos ..... 2.

2.1. Introdução ..... 2.

2.2. Inversão da reação de hidrólise ..... 4.

2.3. Aminólise de ésteres ..... 8.

2.4. Aminólise de amidas ou transpeptidação ..... 11.

2.5. Enzimas ..... 12.

3. Síntese de peptídeos contendo asparagina ..... 14.

3.1. Incorporação de N_{α}-acil-asparagina a derivados de aminoácidos e peptídeos pelo método químico ..... 14.

3.2. Termolisina como catalisador da síntese de di- e tripeptídeos contendo asparagina ..... 17.

4. Complexação de Ca(II) a peptídeos. ..... 21.

5. Hidrólise de ésteres de aminoácidos e de peptídeos catalisada por íons metálicos ..... 23.

II - OBJETIVOS ..... 25.

III - MATERIAIS E MÉTODOS ..... 26.

1. Reagentes e Solventes ..... 26.

2. Métodos analíticos ..... 26.

2.1. Cromatografia em camada delgada ..... 26.

2.2. Ponto de fusão ..... 27.

pg.

2.3. Análise elementar ..... 27.

2.4. Análise de aminoácidos ..... 28.

2.5. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ..... 28.

2.6. Poder rotatório específico ..... 29.

2.7. Ressonância magnética protônica ..... 29.

2.8. Espectrometria de massas ..... 29.

2.9. Espectroscopia Raman ..... 29.

2.10. Densitometria ..... 30.

2.11. Espectroscopia de absorção atômica ..... 30.

3. Métodos preparativos ..... 30.

3.1. Síntese de derivados de aminoácidos e de peptídeos por método químico ..... 30.

3.1.1. Moz-Asn-OH ..... 30.

3.1.2. Moz-Gln-OH ..... 31.

3.1.3. Boc-Asn-OH ..... 32.

3.1.4. Boc-Leu-OH.H_2O ..... 32.

3.1.5. Boc-Ile-OH ..... 33.

3.1.6. Boc-Cys(S-Bzl)-OH ..... 33.

3.1.7. Boc-Cys(S-Bzl)-ONp ..... 34.

3.1.8. H-Ala-OEt.HCl ..... 35.

3.1.9. H-Gly-OBzl.Tos ..... 35.

3.1.10. H-Cys-(S-Bzl)-OBu^t.HCl ..... 36.

3.1.11. Boc-Leu-Gly-OEt..... 37.

3.1.12. Boc-Leu-Gly-OBzl ..... 37.

3.1.13. Boc-Leu-Gly-OBu^t ..... 38.

3.1.14. Boc-Ile-Gly-OEt ..... 38.

3.1.15. Boc-Leu-Ala-OEt ..... 39.

pg.

3.1.16. Remoção do grupo Boc- com ácido trifluoroacético ..... 39.

3.1.17. Boc-Pro-Leu-Gly-OEt ..... 40.

3.1.18. Boc-Pro-Leu-Gly-NH_2 ..... 40.

3.1.19. Z-Pro-Leu-Gly-NH_2 ..... 41.

3.1.20. Moz-Asn-Leu-Gly-NH_2 ..... 41.

3.1.21. H-Pro-Leu-Gly-NH_2 ..... 41.

3.1.22. Boc-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 ..... 42.

3.1.23. Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 ..... 43.

3.1.24. Boc-Leu-Gly-Res ..... 44.

3.1.25. Moz-Asn-Leu-Gly-Res ..... 46.

3.2. Síntese enzimática de peptídeos contendo asparagina ..... 46.

3.2.1. Método geral empregado na formação de ligações peptídicas ..... 46.

a. Reações em sistemas homogêneos ..... 46.

b. Reações em sistemas heterogêneos ..... 47.

3.2.2. Z-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^t ..... 47.

3.2.3. Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^t ..... 48.

3.2.4. Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 ..... 49.

3.2.5. Moz-Asn-Leu-Gly-OEt ..... 51.

3.2.6. Z-Asn-Leu-Gly-OEt, Boc-Asn-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl, Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^t, Moz-Gln-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Leu-Ala-OEt e Moz-Asn-Ile-Gly-OEt ..... 52.

4. Transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt em metanol.. 52.

4.1. Transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto.. 52.

pg.

4.1.1. Recristalização de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B em metanol/ água ..... 52.

4.1.2. Estudo das condições de separação por HPLC entre Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B e o produto obtido após sua recristalização em metanol/ água ..... 53.

4.1.3. Determinação por HPLC das porcentagens relativas de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B e do produto obtido após sua recristalização em metanol/ água ..... 53.

4.1.4. Cinética da transformação de Moz-Asn-Leu-Leu-Gly-OEt 3B dissolvido em metanol .... 54.

4.1.5. Transformação total de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B dissolvido em metanol e identificação do produto obtido ..... 54.

4.1.6. Cinética de transesterificação dos Moz-Asn-Leu-Gly-OEt brutos 3B,4B,5B,6B e 7B ..... 55.

4.1.7. Homogeneização dos Moz-Asn-Leu-Gly-OEt brutos ..... 55.

4.1.8 Cinética de transesterificação dos vários Moz-Asn-Leu-Gly-OEt brutos homogeneizados ..... 55.

4.1.9. Estudo da influência da temperatura no processo de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B homogeneizado ..... 56.

4.1.10. Estudo do efeito da diluição de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B-homogeneizado no processo de sua transesterificação ..... 56.

pg.

4.1.11. Transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B-homogeneizado na presença de o-fenantrolina ..... 57.

4.1.12. Transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B-homogeneizado na presença de EDTA .... 57.

4.1.13. Estudo da influência da concentração de EDTA na transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B-homogeneizado ..... 58.

4.2. Transesterificação em metanol de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt- recristalizado ..... 58.

4.2.1. Recristalização de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B e 10B em etanol/ água ..... 58.

4.2.2. Incubação de em metanol Moz-Asn-Leu-Gly-OEt recristalizado ..... 59.

4.2.3. Cinética de transesterificação em metanol de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B e 10R na presença de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B e 8B ..... 59.

4.2.4. Cinética de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B em soluções metanólicas de diferentes concentrações de acetato de cálcio ..... 60.

4.2.5. Cinética de transesterificação em soluções metanólicas de acetato de cálcio de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 10R em diferentes concentrações ..... 61.

4.2.6. Cinética de transesterificação de Moz-Ans-

pg.

cloreto de cálcio, acetato de sódio e cloreto de sódio ..... 62.

4.2.7. Cinética de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B em soluções metanólicas da mistura cloreto de cálcio/acetato de sódio ..... 62.

4.3. Estudo conformacional de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B, (OEt) 3B, 8B e 3R ..... 63.

5. Transesterificação de Z-Asn-Leu-Gly-OEt (A), Boc-Asn-Leu-Gly-OEt (B), Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl (C), Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^{t} (D), Moz-Gln-Leu-Gly-OEt (E), Moz-Asn-Ile-Gly-OEt (F) e Moz-Asn-Leu-Ala-OEt (G) em metanol . 63.

5.1. Incubação em metanol de A,B,C,D,E,F e G brutos .. 63.

5.2. Cinética de transesterificação de B,C,D,F e G brutos em soluções metanólicas de acetato de cálcio ..... 64.

5.3. Recristalização de A,B,C,D,E,F e G brutos..... 65.

5.4. Cinética de transesterificação em soluções metanólicas de acetato de cálcio de A,B,C,D,E,F e G recristalizados ..... 65.

6. Transesterificação de ésteres de peptídeos em soluções metanólicas de acetato de cálcio..... 65.

6.1. Método geral ..... 65.

6.2. Estudo qualitativo ..... 66.

6.3. Estudo quantitativo ..... 66.

6.4. Transesterificação total de Z-Asn-Leu-Gly-OEt, Boc-Leu-Gly-OEt e Boc-Ile-Gly-OBzl e caracterização dos produtos obtidos ..... 67.

pg.

7. Transesterificação de Boc-Gly-Res, Boc-Ala-Res, Boc-Val-Res, Boc-Leu-Gly-Res e Moz-Asn-Leu-Gly-Res em soluções metanólicas de acetato de cálcio ..... 67.

7.1. Estudo qualitativo ..... 67.

7.2. Estudo quantitativo ..... 68.

7.3. Caracterização dos produtos obtidos ..... 68.

IV - RESULTADOS

1. Síntese de derivados de aminoácidos e de peptídeos por método químico ..... 69.

1.1. Derivados de aminoácidos ..... 69.

1.2. Peptídeos .....

1.2.1. Síntese em solução ..... 69.

1.2.2. Síntese em fase sólida ..... 72.

2. Síntese enzimática de peptídeos ..... 72.

2.1. Z-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^{t} ..... 72.

2.2. Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^{t} ..... 74.

2.3. Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 ..... 74.

2.4. Moz-Asn-Leu-Gly-OEt ..... 80.

2.5. Z-Asn-Leu-Gly-OEt, Boc-Asn-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl, Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^{t}, Moz-Gln-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Ile-Gly-OEt e Moz-Asn-Leu-Ala-OEt .....

3. Transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt em metanol.. 88.

3.1. Transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto ..... 88.

pg.

3.1.1. Recristalização de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B em metanol/ água ..... 88.

3.1.2. Estudo das condições de separação por HPLC entre Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B e o produto obtido após sua recristalização em metanol/ água ..... 88.

3.1.3. Cinética da transformação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B dissolvido em metanol ..... 88.

3.1.4. Identificação do produto obtido na transformação total de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B dissolvido em metanol ..... 92.

3.1.5. Cinética de transesterificação dos Moz-Asn-Leu-Gly-OEt brutos 3B,4B,5B,6B e 7B .. 93.

3.1.6. Cinética de transesterificação dos vários Moz-Asn-Leu-Gly-OEt brutos homogeneizados ..... 93.

3.1.7. Determinação do conteúdo de íons Ca(II) nos vários Moz-Asn-Leu-Gly-OEt ..... 93.

3.1.8. Estudo da influência da temperatura no processo de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B-homogeneizado ..... 93.

3.1.9. Estudo do efeito da diluição de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B-homogeneizado no processo de sua transesterificação ..... 100.

pg.

3.1.10. Transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B- homogeneizado na presença de o-fenantrolina ..... 100.

3.1.11. Transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B -homogeneizado na presença de EDTA ..... 105.

3.1.12. Influência da concentração de EDTA na transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B-homogeneizado ..... 106.

3.2. Transesterificação em metanol de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt- recristalizado ..... 106.

3.2.1. Caracterização do Moz-Asn-Leu-Gly-OEt-recristalizado 3R ..... 106.

3.2.2. Cinética de transesterificação em metanol de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt- recristalizado ... 109.

3.2.3. Cinética de transesterificação em metanol de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B e 10R na presença de Moz-Asn-Leu- Gly-OEt 5B e 8B ..... 111.

3.2.4. Cinética de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B em soluções metanólicas de diferentes concentrações de acetato de cálcio e caracterização do produto obtido nestas reações ..... 111.

3.2.5. Cinética de transesterificação em soluções metanólicas de acetato de cálcio de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 10R em diferentes concentrações ..... 116.

3.2.6. Cinética de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B em soluções metanólicas de

pg.

cloreto de cálcio, acetato de sódio e cloreto de sódio ..... 120.

3.2.7. Cinética de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B em soluções metanólicas da mistura cloreto de cálcio/acetato de sódio ..... 120.

4. Estudo conformacional de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B,8B e 3R ..... 120.

5. Transesterificação de A,B,C,D,E,F e G em metanol ..... 129.

5.1. Transesterificação de A,B,C,D,E,F e G brutos .... 129.

5.2. Transesterificação de B,C,D,F e G brutos em soluções metanólicas de acetato de cálcio ..... 129.

5.3. Transesterificação em soluções metanólicas de cetato de cálcio de A,B,C,D,E,F e G recristalizados ..... 133.

6. Transesterificação de ésteres de peptídeos em soluções metanólicas de acetato de cálcio ..... 133.

6.1. Estudo qualitativo ..... 133.

6.2. Estudo quantitativo..... 138.

6.3. Caracterização dos produtos obtidos na transesterificação total de Z-Asn-Leu-Gly-OEt, Boc-Leu-Gly-OEt e Boc-Ile-Gly-OBzl..... 140.

7. Transesterificação de Boc-Gly-Res, Boc-Ala-Res, Boc-Val-Res, Boc-Leu-Gly-Res e Moz-Asn-Leu-Gly-Res em soluções metanólicas de acetato de cálcio ..... 144.

7.1. Estudo qualitativo ..... 144.

7.2. Estudo quantitativo e caracterização dos produtos obtidos ..... 144.

pg.

V - DISCUSSÃO

1. Análise e discussão dos resultados

1.1. Síntese química de derivados de aminoácidos e peptídeos ..... 151.

1.2. Síntese enzimática de peptídeos ..... 152.

1.2.1. Z-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^t e Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^t ..... 152.

1.2.2. Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 ..... 155.

1 2.3. Moz-Asn-Leu-Gly-OEt ..... 158.

1.2.4. Z-Asn-Leu-Gly-OEt, Boc-Asn-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl, Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^t, Moz-Gln-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Ile-Gly-OEt e Moz-Asn-Leu-Ala-OEt ..... 159.

1.3. Transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt em metanol . 162.

1.4. Estudo conformacional de 3B, 3R e 8B ..... 172.

1.5. Transesterificação de Z-Asn-Leu-Gly-OEt, Boc-Asn-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl, Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^t, Moz-Gln-Leu-Gly-OBu^t, Moz-Asn-Ile-Gly-OEt e Moz-Asn-Leu-Leu-Ala-OEt em metanol ..... 176.

1.6. Transesterificação de ésteres de peptídeos em soluções metanólicas de acetato de cálcio ..... 177.

1.7. Transesterificação de Boc-aminoacil- e peptidil-resinas em soluções metanólicas de acetato de cálcio ..... 179.

pg.

2. - Discussão Geral 181.

VI - CONCLUSÕES 188.

VII - SUMÁRIO 191.

VIII - SUMARY 192.

IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 193.

I - INTRODUÇÃO

1. Síntese de peptídeos

Nos últimos anos a síntese de peptídeos tem se tornado indispensável para o desenvolvimento de pesquisa em diversas áreas da biologia. Esta afirmação se baseia no fato desta metodologia possibilitar a obtenção de: a- peptídeos biologicamente ativos em grande quantidade para uso acadêmico, clínico e terapêutico; b- de substratos peptídicos necessários para o estudo de especificidade e mecanismo de ação enzimática de proteases; c- de análogos e homólogos de hormônios peptídicos para o estudo da relação estrutura-atividade biológica dos mesmos; d- de sequências peptídicas imunogênicas para diagnósticos de determinadas doenças e produção de vacinas.

A primeira síntese total de um peptídeo biologicamente ativo foi realizada por Bodanszky e du Vigneau (1959). Nos anos seguintes, inúmeros grupos protetores de aminogrupo, carboxila e outros grupos reativos das cadeias laterais dos aminoácidos foram desenvolvidos e vários métodos químicos de ativação, acoplamento e desproteção foram estudados. Como consequência, o método químico de síntese (que utiliza reagentes químicos para a formação de ligação peptídica) se tornou usual para a obtenção de peptídeos em laboratório, culminando com a automação do mesmo em 1963 (Merrifield, 1963). Esta metodologia, entretanto, apresenta alguns problemas inerentes ao método (Bodanszky, 1984). Por essa razão, o método enzimático de síntese (que utiliza proteases para a formação de ligação peptídica) tem se desenvolvido como alternativa à obtenção destes compostos (Jakubke, 1987; Morihara, 1987).

O processo de síntese de um peptídeo, independentemente do método usado, consiste das seguintes etapas: 1. Proteção dos grupos funcionais dos aminoácidos que não participam da reação de formação da ligação peptídica. Esta proteção é necessária para a obtenção de sequências inequívocas; 2. Ativação da carboxila do componente carboxílico e ligação peptídica entre os componentes amínico e carboxílico (esquema 1, página 3); 3. Desproteção parcial para a elongação desejada. 4. Adição do novo resíduo de aminoácido ou fragmento peptídico protegido a ser acoplado. Estas etapas são repetidas até ser completada a sequência desejada, quando o peptídeo é totalmente desprotegido, purificado e analisado (Bodanszky, 1984).

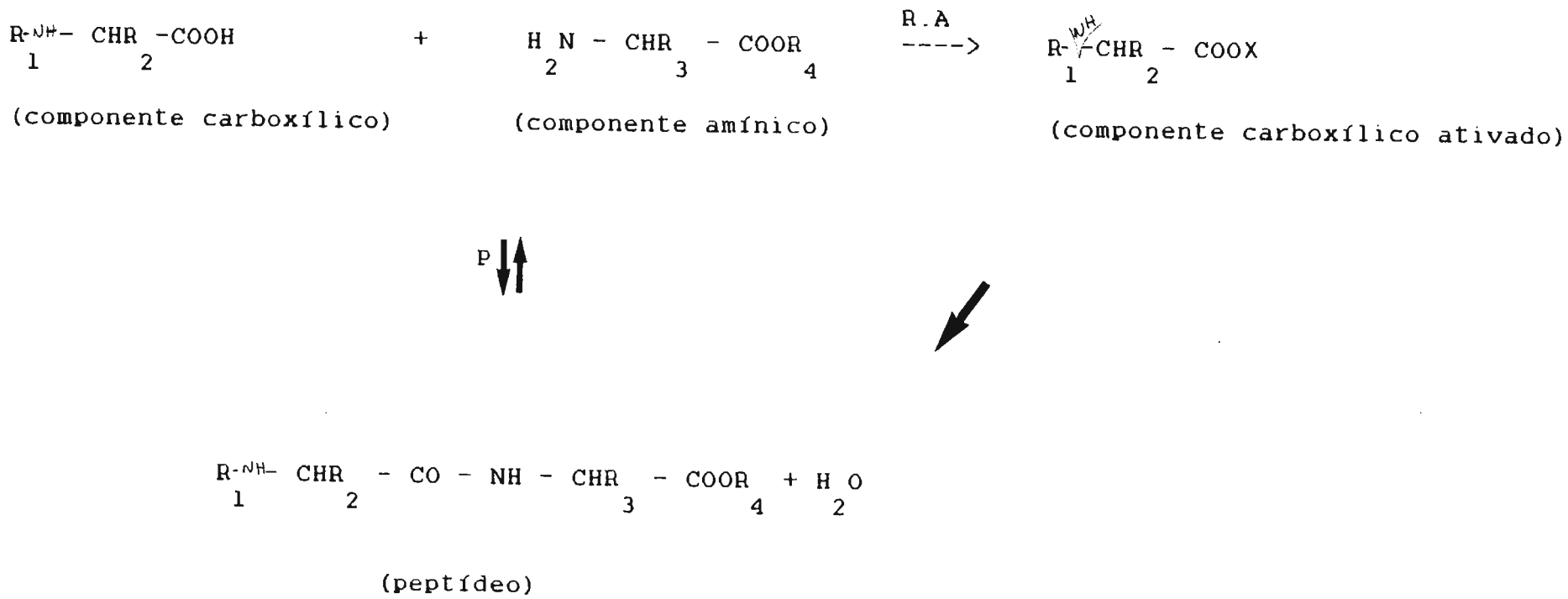
Atualmente, através da utilização dos métodos químico (em solução ou em fase sólida) e enzimático de síntese é possível obter peptídeos de peso molecular elevado com razoável grau de pureza (Kullmann, 1987; Bodanszky, 1984; Baramy e col., 1987).

2. Síntese enzimática de peptídeos

2.1. Introdução

Apesar de o método de síntese enzimática de ligações peptídicas ter se tornado conhecido apenas recentemente, desde o início do século se investigava a possibilidade de proteases catalisarem a condensação entre dois aminoácidos. As primeiras comprovações experimentais foram apresentadas em 1937 e 1938 por Bergmann e Fraenkel-Conrat (1937, 1938), que descreveram a condensação de N_{α} -acil-L-aminoácidos com anilidas de L-aminoácidos catalisada por papaina e α-quimotripsina. Em seguida, vários derivados de aminoácidos e peptídeos foram

Esquema 1. Formação de ligação peptídica



R_1 = protetor de α-aminogrupo, R_2 e R_3 = cadeias laterais de aminoácidos, R_4 = protetor de α-carboxila, X = grupo captor eletrônico, P = protease, R.A. = reagente acoplador.

sintetizados mediante catálise por proteases (Fruton, 1949). O objetivo destes estudos era esclarecer o mecanismo de biossíntese de proteínas, o qual foi elucidado no início da década de 1950. Em consequência, apenas um número reduzido de pesquisadores deu continuidade a estudos nesta área (Fruton e col., 1951; Milne e Carpenter, 1968). Na década de 1970, entretanto, ressurgiu o interesse pela síntese enzimática de peptídeos (Ingalls e col., 1975; Morihara e Oka, 1977; Isowa e col., 1978). Desde então, o número de trabalhos descritos na literatura tem aumentado e a metodologia tem se desenvolvido rapidamente (Kullmann, 1987)

A síntese de ligação peptídica mediante catálise por proteases é possível através de: 1. Inversão da reação hidrólise; 2. Aminólise de ésteres; 3. Aminólise de amidas (Widmer e Johansen, 1985).

2.2. Inversão da reação da hidrólise

De uma forma geral, a reação de hidrólise de uma ligação peptídica por uma protease em solução aquosa pode ser esquematizada da seguinte maneira:

$$R_1 - CO - NH - R_2 + H_2O \overset{P}{\rightleftharpoons} R_1 - COO^- + NH_3^+ - R_2$$

onde R_1 e R_2 são ~~grupos protetores~~ ~~ou~~ cadeias peptídicas e P é a protease.

Este processo reversível, entretanto, consiste de duas etapas distintas:

$$R_1 - CO - NH - R_2 + H_2O \overset{K_{hid}}{\rightleftharpoons} R_1 - COOH + NH_2 - R_2 \overset{K_{ion}}{\rightleftharpoons} R_1 - COO^- + H_3N^+ - R_2$$

sendo que a etapa de hidrólise da ligação peptídica resultando em

produtos não ionizados é uma reação endergônica ($\Delta G_{hid} > 0$) e a etapa de ionização destes produtos é exergônica ($\Delta G_{ion} < 0$) (Petkov, 1982; Carpenter, 1960). Como $\Delta G_{ion} > \Delta G_{hid}$, o processo é termodinamicamente favorecido no sentido de hidrólise da ligação peptídica ($\Delta G_{hid} < 0$).

A síntese de uma ligação peptídica em solução aquosa, por outro lado, é desfavorecida termodinamicamente ($\Delta G_{sint} > 0$). De fato em 1952 Linderstron-Lang (Linderstron-Lang, 1952) encontrou valores de ΔG_{sint} entre 3,11 e 4,09 kcal/mol para a formação de dipeptídeos a partir de aminoácidos e em 1985 Jakubke e col. relataram que a constante de equilíbrio para o acoplamento entre eles era inferior a 10^{-5} ($K_{sint} < 10^{-5}$) (Jakubke e col., 1985).

Como o valor de ΔG_{hid} (e portanto de ΔG_{sint}) é aproximadamente igual para ligações peptídicas típicas, para que a reação de síntese enzimática de um peptídeo se torne termodinamicamente favorável em solução aquosa, é necessário contornar a barreira correspondente à etapa de ionização dos componentes de partida (Carpenter, 1960) ou acoplar o processo á uma reação fortemente exergônica (Fruton, 1982). Isto é conseguido através de: 1- diminuição do valor de ΔG_{ion}, de forma que se torne $\Delta G_{hid} > \Delta G_{ion}$; 2- remoção do produto formado do meio reacional.

1.Diminuição do ΔG_{ion}

A diminuição do valor de ΔG_{ion} e consequentemente a inversão da reação de hidrólise para a síntese pode ser conseguida através de duas abordagens: 1- introdução de grupos protetores nos aminoácidos de partida; 2- adição de solvente orgânico miscível ou imiscível ao meio de reação.

Para um determinado pH, o ΔG_{ion} está diretamente relacionado aos valores de pKa dos componentes carboxílico e amínico através da equação:

$$\Delta G_{ion} = - RT \ln K \left(1 + 10^{pH-pK_1} + 10^{pk_2-pH} + 10^{pk_2-pk_1}\right)$$

onde R é a constante dos gases, T a temperatura absoluta, pK_1, o pKa da carboxila do componente carboxílico e pK_2 o pKa do aminogrupo do componente amínico (Petkov, 1982). Através da aproximação dos valores de pK_1 e PK_2, portanto, é possível diminuir o valor de ΔG_{ion}.

O trabalho clássico de Perrin demonstra que a introdução de grupos protetores nos aminoácidos ou peptídeos leva à alteração de seus pKa. Os valores de pKa de carboxila de aminoácidos aumentam de uma unidade após a acilação do aminogrupo e os de pKa do aminogrupo diminuem mais de uma unidade após o bloqueamento da carboxila (Perrin, 1965). De fato, os pK_1 e pK_2 de Gly em solução aquosa a 25 °C são 2,3 e 9,6 o pK_1 de Ac-Gly-OH é 3,6 e o pK_2 de $H-Gly-NH_2$ é 8,2 (Jakubke, e col., 1985).

A adição de solventes orgânicos miscíveis ou imiscíveis ao meio de reação também leva à aproximação entre os valores de pKa dos compostos de partida através do aumento do valor de PK_1 (Jakubke e col., 1985). Isto ocorre devido à redução da constante dielétrica do meio reacional, que provoca uma diminuição da hidratacão das formas iônicas (Kullman, 1987). Homandberg e seus colaboradores (1978) estudaram a influência de solventes orgânicos sobre o pKa dos componentes carboxílicos Z-Trp-OH e amínico $H-Gly-NH_2$ e observaram que o valor de pK_1 de Z-Trp-OH varia com a mudança de solvente, enquanto que o pK_2 de

H-Gly-NH_2 permanece inalterado. Como consequência desta aproximação, encontraram os seguintes valores de K_{sint} para a formação do dipeptídeo Z-Trp-Gly-NH_2 a partir de Z-Trp-OH e H-Gly-NH_2 catalisada por α-quimotripsina: 0.45 M^{-1} para solução aquosa, pH 6,7; 2,1 M^{-1} para solução aquosa pH 6,7 contendo glicerol (60%) e 3,6 M^{-1} para solução aquosa pH 6,7 contendo 1,4 butanodiol (85%).

Além de possibilitar a diminuição do valor do ΔG_{ion}, a aproximação entre os pKa favorece a síntese de ligações peptídicas pela lei de ação das massas, pois propicia o aumento da concentração das formas não iônicas no meio de reação.

2. Remoção do produto formado do meio reacional

O processo endergônico de síntese enzimática de ligações peptídicas em solução aquosa pode se tornar termodinamicamente favorecido através do seu acoplamento a um processo exergônico, tal como a remoção do produto formado do meio reacional (Fruton, 1982). Esta remoção também favorece o deslocamento do equilíbrio da reação para o sentido de síntese pela lei de ação das massas.

A precipitação do peptídeo é a técnica mais simples e antiga de favorecer a sua síntese por catálise enzimática em solução aquosa. Em 1938, Bergmann e Fruton sintetizaram Bz-Tyr-Gly-NH_2 mediante catálise por α-quimotripsina a partir de Bz-Tyr-OH e H-Gly-NH_2 (Bergmann e Fruton, 1938), sendo o sucesso desta síntese atribuído à insolubilidade do dipeptídeo na solução aquosa utilizada (Petkov, 1982). Tal atribuição foi baseada no trabalho de Kozlov e col (1966) que encontraram um valor de 0.49 kcal/mol para a variação de energia livre de hidrólise deste dipeptídeo a compostos iônicos .

A precipitação é conseguida através da utilização de grupos protetores hidrofóbicos (Isowa e Ichikawa, 1979), do aumento da concentração dos reagentes no meio reacional (Morihara e Oka, 1982) ou ainda pelo aumento da força iônica do meio de reação. Este último está diretamente associado à adição de sais inorgânicos ao meio de reação ou à utilização de soluções aquosas salinas de concentração elevada (Machini de Miranda, 1985; Cheng e col, 1988).

A remoção do produto do meio de reação também é realizada através da utilização de sistema bifásico de reação constituído por mistura de solução aquosa e solvente orgânico imiscível. Nestes sistemas, a enzima está dissolvida na fase aquosa e os substratos se particionam entre as fases aquosa e orgânica, reagem e formam o peptídeo, que é removido para a fase orgânica por difusão. Os rendimntos de reação encontrados são geralmente superiores aos obtidos em solução aquosa (Kuhl, 1987; Nakanishi e col., 1986; Khmelnitzky e col., 1984; Martinek e col., 1981).

O uso de complexantes específicos tem sido descrito como forma de remover o produto do meio em reações particulares. Um exemplo clássico é a síntese do fragmento 1-15 da ribonuclease S em que a ribonuclease S foi adicionada à reação para agir como complexante do fragmento sintetizado (Homandberg e col., 1982).

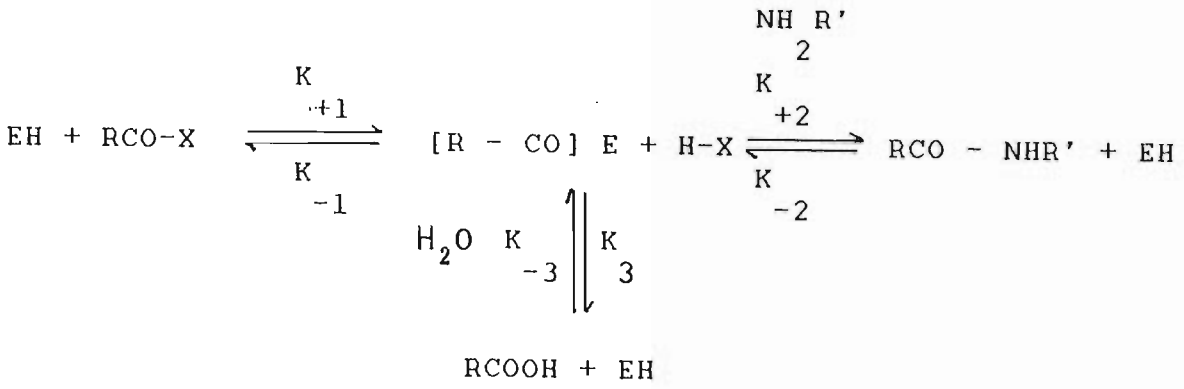
2.3. Aminólise de ésteres

Em 1966, Kozlov e colaboradores obtiveram um valor de ΔG_{hid} de -6,0 kcal/mol para a reação de hidrólise de Ac-Phe-OMe a pH 7 (Kozlov e col., 1966). Este dado sugeriu que reações similares à de síntese de Ac-Phe-Tyr-OEt a partir de Ac-Phe-OMe e

H-Tyr-OEt catalisada por α-quimotripsina eram fortemente exergônicas (Fruton, 1982). Vários trabalhos posteriores descreveram diversas sínteses enzimáticas de peptídeos bem sucedidas utilizando componentes carboxílicos esterificados (Kullmann, 1987). Atualmente, este tipo de reação é amplamente empregado na obtenção de peptídeos mediante catálise por proteases, sendo denominado de "síntese controlada cineticamente" (Bratanova col., 1988; Jakubke e col., 1987; Morihara, 1987). Tal denominação deriva do fato de que a reação é interrompida antes que o equilíbrio seja atingido, de forma que os produtos acumulados são aqueles produzidos mais rapidamente (Esquema 2, página 10). Como mostrado neste esquema, a enzima EH reage com o componente carboxílico esterificado R-COX e forma o intermediário acil-enzima [R-CO]E. Este sofre o ataque nucleofílico da água ou do componente amínico, resultando na hidrólise do éster do componente carboxílico (RCOOH) ou na formação do peptídeo (RCONHR) dependendo das velocidades relativas das duas reações. Em 1973, Fastrez e Ferhst encontraram velocidades de síntese de Ac-Phe-Gly-NH_2 e Ac-Phe-Ala-NH_2 por α-quimotripsina, partindo-se de Ac-Phe-OMe e H-Gly-NH_2 (1 M) ou H-Ala-NH_2 (1 M) 11 e 44 vezes superiores à de hidrólise do éster de Ac-Phe-OMe ($[H_2O]$ = 55) M (Fastrez e Ferhst, 1973). Posteriormente, Schellenger e Jakubke demonstraram que a deacilação de maleil-Phe-quimotripsina por H-Leu-NH_2 era mais rápida que para H-Val-NH_2 ou H-Ala-NH_2 (Schellenger e Jakubke, 1986).

Estas considerações evidenciam que o sucesso da "síntese controlada cineticamente" é dependente da nucleofilicidade e da

Esquema 2. Aminólise e hidrólise enzimática de substratos esterificados (Kullman, 1987)



onde EH = protease (serino-protease), R e R' = grupo protetor ou cadeia peptídica, X = OMe ou OEt.

concentração dos componentes amínicos empregados.

É importante salientar que: 1- as velocidades destas sínteses são bastantes elevadas; 2- as concentrações de enzima utilizadas são muito inferiores às empregadas nas reações de inversão da hidrólise (Morihara, 1987); 3- evidentemente apenas as enzimas que apresentam atividades esterásica e amidásica (serino e tiol proteases) podem ser utilizadas neste tipo de reação, o que consiste em uma desvantagem deste tipo de síntese (Widmer e Johansen, 1985).

2.4. Aminólise de amidas ou transpeptidação

De forma similar à de ésteres, a aminólise de amidas é um processo fortemente exergônico (Fruton, 1982). Já em 1937, Bergman e Fraenkel-Conrat descreveram a síntese de Bz-Gly-NHPh a partir de Bz-Gly-NH_2 e anilina mediante catálise por papaina (Bergmann e Fraenkel-Conrat, 1937). Em 1950, Fruton denominou esta troca direta da amida pela anilina de "reação de transamidação ou transpeptidação" (Fruton, 1950). Atualmente este tipo de reação também é considerada como "síntese controlada cineticamente" (Jakubke e col., 1987), sendo válidas para elas as etapas descritas no esquema 2, página 10 , com a mudança de X para NH_2 ou NH-R" (R" é uma cadeia peptídica ou aminoácido). Também são válidas as outras considerações feitas no ítem anterior referentes à nucleofilicidade e concentração dos componentes amínicos, velocidade de reação, concentração e tipo de proteases utilizadas. Uma das aplicações mais bem sucedidas de transpeptidação é a conversão direta da insulina suina em insulina humana (Breddam e col., 1981; Breddam e Johansen, 1984; Morihara e Oka, 1983; Rose e col., 1984).

2.5. Enzimas

O uso de enzimas como catalisadores na síntese de peptídeos possibilita a obtenção de produtos opticamente puros em condições suaves de reação, usando a mínima proteção necessária nos grupos reativos das cadeias laterais dos aminoácidos (Kullmann, 1987).

Dentre as proteases empregadas estão as serino-proteases α-quimotripsina (Bizzozero e col., 1988), tripsina (Konnecke e col., 1983) e carboxipeptidase Y (Konopinska e Muzalewisky, 1983), a tiol-protease papaina (Barbas & Wong, 1987) e a metaloprotease termolisina (Adisson e col., 1988). Também tem sido utilizadas a subtilisina BPN', a elastase, a pepsina e a quimopapaina.

A escolha da protease a ser empregada como catalisador de uma determinada reação de acoplamento é baseada na sua especificidade primária (tabela 1, página 13). Desta forma, para obter o dipeptídeo Z-Phe-Gly-OMe a partir de Z-Phe-OH e H-Gly-OMe é necessário escolher uma protease específica para Z-Phe-OH, por exemplo, a α-quimotripsina. Para a realização de acoplamentos entre fragmentos, entretanto, é necessário considerar também a especificidade secundária das proteases como forma de assegurar uma maior interação entre os substratos e a enzima e a não ocorrência de reações de hidrólise secundária (Kullmann, 1987).

Em síntese de peptídeos, as enzimas tem sido usadas na forma livre (Sakina e col., 1988), solubilizadas em micelas reversas (Luthi e Luisi, 1984) ou imobilizadas (Noritomi e Kise,

Tabela 1. Especificidade primária de algumas proteases utilizadas nas sínteses de peptídeos (Widmer e Johansen, 1985).

PROTEASE	ESPECIFICIDADE PRIMÁRIA
quimotripsina	Trp, Tyr, Phe, Leu, Met (P_1)
termolisina	Leu, Ile, Val, Phe (P'_1)
tripsina	Lys, Arg (P_1)
elastase	pequenos resíduos hidrofóbicos (P_1)
carboxipeptidase Y	não específica
papaina	resíduos hidrofóbicos (P_2)

P_1, P'_1 e P_2 referem-se à posição dos resíduos de aminoácidos indicados (Schecheter & Berger, 1967).

1987). O uso de enzimas na forma livre pode levar à perda parcial de sua atividade durante as reações. De fato, vários trabalhos descreveram a diminuição da atividade de diversas proteases em reações de acoplamento catalisadas pelas mesmas (West e Wong, 1986). Este decréscimo, entretanto, depende da natureza e quantidade do solvente orgânico contido no meio reacional, do tempo de reação e temperatura empregados (Kise e Shirato, 1985). A imobilização da protease propicia um aumento da sua estabilidade nos meios de reação, permitindo a reutilização da mesma (Konnecke e col., 1983). O uso de micelas reversas leva à proteção parcial da protease devido à sua compartimentalização.

Recentemente, foram descritas sínteses de peptídeos utilizando lipases. Tais reações ocorreram nos seguintes solventes orgânicos puros: tolueno, tetrahidrofurano (Margolin & Klibanov, 1987), álcool terc-amílico (Margolin e col., 1987) e acetato de etila (West e Wong, 1987). Os rendimentos encontrados foram, em geral, superiores a 60%.

O desenvolvimento futuro da metodologia de síntese enzimática de peptídeos está diretamente associado à descoberta,

isolamento e produção em larga escala de novas enzimas com diferentes especificidades e à possibilidade de alteração da especificidade e estabilidade das já existentes comercialmente (Widmer & Johansen, 1985; West e col., 1988; Zaks & Klibanov, 1988)

3. Síntese de peptídeos contendo asparagina

3.1. Incorporação de N_{α}-acil-asparagina a derivados de aminoácidos e peptídeos pelo método químico.

A reação de incorporação de N_{α}-acil-asparagina a derivados de aminoácidos e peptídeos é uma das reações de acoplamento consideradas problemáticas em síntese química de peptídeos.

Vários estudos descritos na literatura demonstram que durante a ativação da N_{α}-acil-L-asparagina por reagentes acopladores tais como N,N'-diciclohexilcarbodiimida, anidridos mistos e pirofosfito ocorre a desidratação de sua cadeia lateral carboxamida (Gish e col., 1956; Ressler, 1956; Bodanszky e du Vigneau, 1959; Ressler e Ratzkin, 1961; Kisfaludy e col., 1975). Como resultado da ocorrência desta reação secundária, o asparaginil-peptídeo é obtido juntamente com o β-cianoalanil-peptídeo. Este subproduto é de difícil separação havendo, portanto, a necessidade de realizar recristalizações sucessivas do produto para a obtenção do asparaginil-peptídeo puro. Como consequência destes fatores, os rendimentos destas reações são baixos.

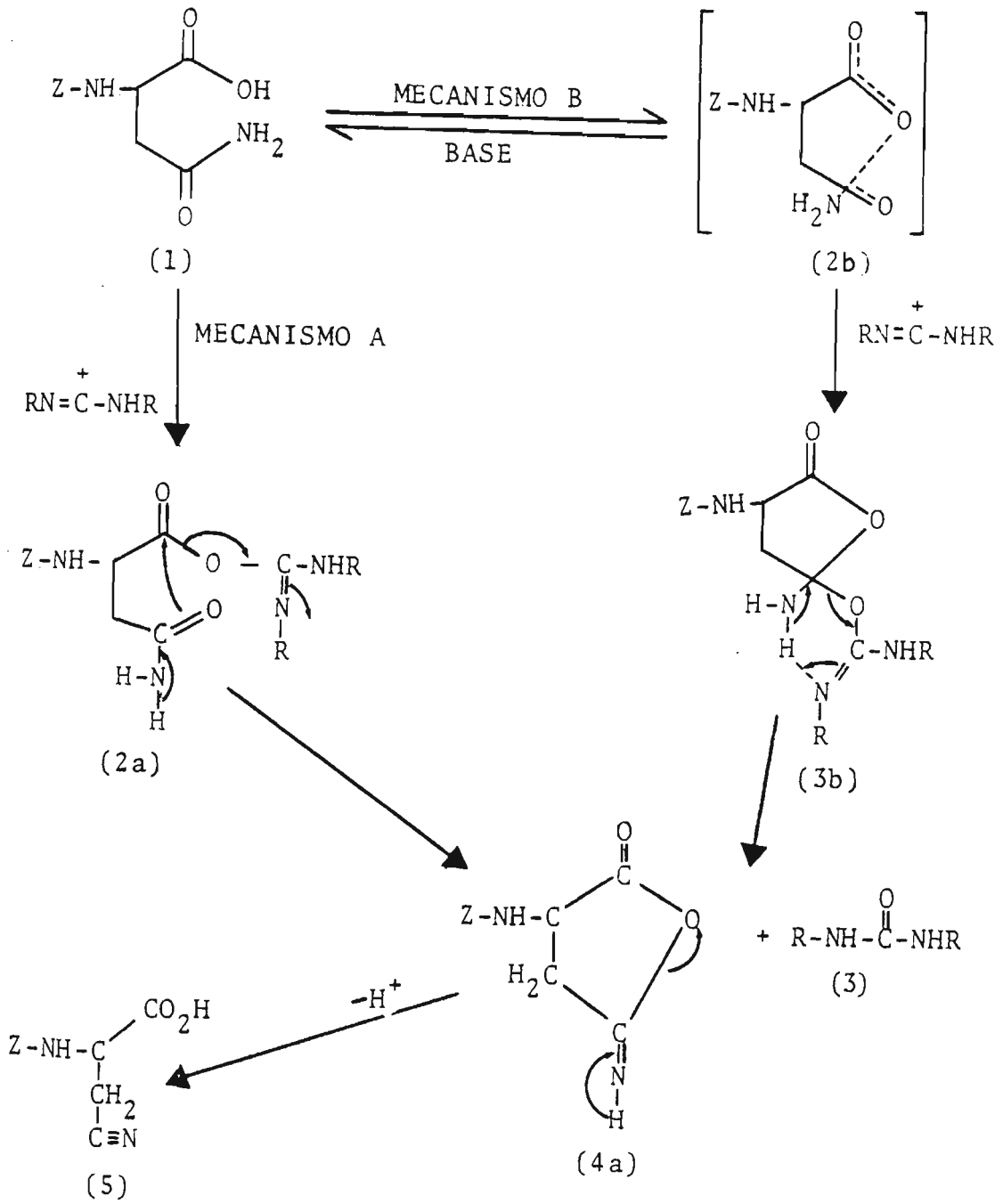
O mecanismo pelo qual ocorre esta desidratação foi bastante estudado, sendo que em 1961 Stammer sugeriu a formação de uma isoimida intermediária através da interação intramolecular

do grupo carboxamida e a carboxila ativada de Z-Asn-OH. O mecanismo por ele proposto (Mecanismo A do Esquema 3, página 16) teria como primeiro passo, a ligação da carboxila de Z-Asn-OH (1) e a carbodiimida para dar o composto 2a. Em seguida, o oxigênio da amida atacaria a carboxila ativada de 2a, formando uma isoimida cíclica 4a e a diciclo-hexiluréia (3). A reação posterior de 4a com a base produziria a nitrila (5) (Stammer, 1961). Um mecanismo alternativo, proposto por Liberek (1962) sugeria a formação de um composto cíclico 2b a partir de Z-Asn-OH na presença de base. Este seria, em seguida, atacado pela N,N' diciclo-hexilcarbodiimida protonada resultando num intermediário reativo 3b , o qual desidrataria através da formação de uma isoimida cíclica (4a) e diciclo-hexiluréia (3). A perda do próton de 4a resultaria na formação de nitrila (5), conforme mostra o Mecanismo B do Esquema 3, página .

Estudos posteriores (Kashelikar e Ressler 1964; Paul e Kende, 1964) permitiram concluir que a reação de formação de nitrila se processa preferencialmente pelo mecanismo A. Concomitantemente, B ou outro mecanismo diferente de A e B pode ocorrer, porém em pequena extensão.

Para contornar o problema exposto, os acoplamentos de N_{α}-acil-L-asparagina tem sido realizados através do método do éster ativo (Bodanzky & du Vigneau, 1959). O rendimento do processo total de síntese, entretanto, é insatisfatório e as reações exigem longos períodos de tempo (Mojsov e col., 1980). Outros métodos alternativos têm sido estudados tais como a realização dos acoplamentos via óxido-redução (Mukaiyama e col., 1968) ou anidridos simétricos (Hemmasi & Bayer, 1974) e a adição de 1-hidroxibenzotriazol juntamente com a N,N'-diciclohexilcarbodiimida (König & Geiger, 1970a). Todos estes métodos, entretanto,

Esquema 3. Mecanismos propostos por Stammer (1961) e Liberek (1962) para a formação de nitrila a partir de Z-Asn-OH e N,N'-diciclohexilcarbodiimida.



Onde Z = C_6H_5-CH_2-O-CO e R = ciclo-hexil.

não conseguem eliminar totalmente a ocorrência da desidratação (Mojsov e col., 1980). A proteção da função amida da asparagina com o grupo 4,4'-dimetoxibenzidril (Mbh) descrita por König e Geiger, (1970b) tem se mostrado bastante efetiva na prevenção da formação de nitrila. Esta proteção, porém, nem sempre propicia altos rendimentos de acoplamento, além de requerer mais uma etapa na preparação do aminoácido protegido (Mojsov e col., 1980). Uma forma alternativa de proteção da função amida descrita por Liberek (1961) é a sua transformação total em nitrila, que é então utilizada nas reações de acoplamento. Obtido o β-ciano-alanil-peptídeo, a nitrila pode ser reidratada na presença de brometo de hidrogênio/ ácido acético glacial ou de carbonato de sódio/peróxido de hidrogênio. Esta reidratação, entretanto, não é quantitativa (Liberek, 1961).

3.2. Termolisina como catalisador de síntese de di- e tripeptídeos contendo asparagina

A não ocorrência de reações secundárias envolvendo os grupos funcionais das cadeias laterais dos aminoácidos durante a formação de ligação peptídica é uma das vantagens da metodologia de síntese enzimática de peptídeos.

Com base neste fato e no conhecimento do problema acima discutido sobre a incorporação química de N_{α}-acil-asparagina a derivados de aminoácidos e peptídeos, estudamos a síntese enzimática vários di- e tripeptídeos contendo asparagina (Machini de Miranda, 1985; Machini de Miranda e col., 1986).

A protease escolhida foi a termolisina que é uma metaloendopeptidase, termoestável e de peso molecular 37 500,

isolada do Bacillus thermoproteolyticus (Ohta e col., 1966). Esta protease contém Zn(II) no sítio ativo e sua termoestabilidade depende da presença de quatro íons Ca(II), os quais se situam em três sítios distintos localizados na superfície da enzima (Latt e col., 1969; Feder e col., 1971; Dalhquist e col., 1976). O seu mecanismo de ação envolve a participação dos resíduos Glu 143 e His 231 e do Zn(II) (Kester e Mathews, 1977; Hangauer e col., 1984), mas a sequência de ação desta enzima é ainda discutível (Holden e Mathews, 1988). No que se refere à especificidade, a termolisina hidrolisa preferencialmente ligações peptídicas onde P_1 é um resíduo de aminoácido hidrofóbico (tabela 1, página 13) e esta preferência é acentuada pela presença de um resíduo hidrofóbico em P_1 (Morihara, 1974). Esta protease não apresenta atividade esterásica ou amidásica, (~~Pangburn e Walsh, 1975~~ Isowa e col., 1978), sendo que Isowa e col. (1977) e Isowa e Ichikawa (1979) já haviam utilizado a mesma como catalisador na síntese de Z-Asn-Phe-Phe-OBu^t e Z-Asn-Ile-OMe, respectivamente, com sucesso.

O estudo realizado por nós para a elaboração da Dissertação de Mestrado consistiu inicialmente em determinar as condições ótimas de síntese do dipeptídeo Boc-Asn-Ile-OBzl, através da análise da influência do pH, tempo de reação, concentração de enzima, concentração e volume da solução de acetato de sódio (que foi utilizada como solvente), da variação da proporção entre os componentes carboxílico e amínico e da temperatura sobre sua extensão de síntese. A melhor condição encontrada foi a seguinte: Boc-Asn-OH: $9,5 \times 10^{-2}$ M; H-Ile-OBzl: $4,7 \times 10^{-2}$ M; termolisina: $1,3 \times 10^{-7}$ M; solvente: acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M; tempo de reação: 48 horas; temperatura: 38 °C. Tal estudo forneceu conhecimentos teóricos e técnicos valiosos para a obtenção dos

di- e tripeptídeos mostrados na tabela 2, página 20. Para cada um destes peptídeos, foram estudadas diversas condições de síntese. As que forneceram melhores resultados estão mostradas na tabela 2, página . Os resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho nos possibilitaram concluir que:

1. N_{α}-acil-L-asparagina pode ser incorporada a derivados de L-aminoácidos e a peptídeos mediante catálise por termolisina com bons rendimentos, sendo os produtos obtidos isentos de contaminação por nitrilas ou quaisquer outros subprodutos.
2. Os excelentes rendimentos conseguidos se deviam à precipitação dos produtos nos meios de reação, pois a mesma favorece a formação de ligação peptídica termodinâmica e cineticamente (Fruton, 1982).
3. O valor do pH ótimo de síntese encontrado para as reações catalisadas por termolisina estava de acordo com o mecanismo de ação da mesma (Kester & Matthews, 1977).
4. Entre os grupos protetores Boc-, Z-, e Moz- utilizados, Z- e Moz- permitiram a obtenção de dipeptídeos com excelentes rendimentos, provavelmente devido à menor solubilidade dos produtos formados nos meio de reação e maior interação do grupo protetor com o subsítio S_2 da termolisina.
5. Os tripeptídeos requereram para sua síntese menores concentrações de enzima e tempo de reação em relação aos dipeptídeos.
6. No método enzimático de formação de ligação peptídica as características estruturais dos reagentes e produtos tem importância relevante, motivo pelo qual as condições ótimas de síntese diferiram de um peptídeo para outro.
7. Uma vez estabelecido, o método enzimático de incorporação de N_{α}-acil-L-asparagina a resíduos de aminoácidos e a peptídeos

Tabela 2. Resumo das melhores condições encontradas para a síntese enzimática de peptídeos estudados

Peptídeo	Comp. carboxílico / amínico ($.10^{-3}$ mol)	Concentração de enzimas ($.10^{-5}$ M)	Volume de solução[a] de acetato de sódio 0,2M, pH 6,0 (ml)	Solução de NaOH 1M ($.10^{-3}$ mol)	Tempo de reação (h)	Rendimento (%)
Boc-Asn-Ile-OBzl	2:1	2,54	20,0	1	48	83
Z-Asn-Ile-OBzl	2:1	2,54	20,0	1	48	96
Moz-Asn-Ile-OBzl	2:1	2,54	20,0	1	48	95
Boc-Asn-Leu-OBzl	2:1	2,54	20,0	1	48	34
Z-Asn-Leu-OBzl	1:1	2,54	20,0	1	48	79
Z-Asn-Leu-OEt	1:1	2,42	10,0[b]	1	24	62
Moz-Asn-Leu-OBzl	2:1	2,54	20,0	1	48	94
Boc-Asn-Phe-OBzl	1:1	0,76	35,0	1	72	64
Z-Asn-Phe-OBzl	1:1	1,52	35,0	1	72	78
Z-Asn-Phe-OEt	1:1	2,40	10,0[b]	1	24	80
Moz-Asn-Phe-OBzl	1:1	1,52	35,0	1	72	95
Z-Asn-Val-OBzl	2:1	3,81	-[c]	1	72	49
Moz-Asn-Val-OBzl	2:1	2,54	20,0	1	48	91
Moz-Asn-Ile-Gly-OBzl	1:1	0,56	20,0	1	5	88
Moz-Asn-Ile-Ala-OEt	1:1	1,33	20,0	1	6	95
Moz-Asn-Ile-Leu-OBzl	1:1	0,56	20,0	1	5	88
Moz-Asn-Ile-OBzl	1:1	0,56	20,0	1	5	89

[a] A solução contém $Ca(Ac)_2$ 5×10^{-2} M. [b] A mistura de reação foram adicionados 2,0 de $(NH_4)_2SO_4$. [c] Os reagentes foram dissolvidos em uma mistura constituída por 10,5 ml de solução tampão Tris/HCl 0,2 M, pH 8, contendo $Ca(Ac)_2$ $5,0 \times 10^{-2}$ M, 2 ml de MeOH e 1,5 ml de DMF. Todos os acoplamentos foram realizados a 38 °C sob agitação, com exceção de Z-Asn-Leu-OEt e Z-Asn-Phe-OEt que foram realizados a 48 °C.

pode se tornar valioso na obtenção de cadeias peptídicas contendo este aminoácido.

4. Complexação de Ca(II) a peptídeos

A ligação de Ca(II) a biomoléculas tem sido amplamente estudada devido ao fato deste íon estar envolvido em diversos processos biológicos essenciais à vida. Sua complexação a um grande número de peptídeos e proteínas parece estar diretamente associada ao seu transporte e armazenamento no organismo ou à estabilização da estrutura destas moléculas (Laurie, 1987).

A natureza dos sítios de ligação de Ca(II) a estes compostos vem sendo estudada através da realização de estudos de análise conformacional de diversos peptídeos cíclicos e lineares em vários solventes contendo sais de cálcio. Os mesmos possibilitam também a determinação do efeito causado na molécula em decorrência desta ligação.

Campbell e colaboradores (1986) sintetizaram alguns peptídeos bicíclicos com o intuito de obter modelos que possibilitassem estudar suas estruturas tridimensionais e suas interações com cátions, mimetizando proteínas nativas dependentes de Ca(II) e outros íons. Kimura e Imanishi (1983) estudaram a complexação de ciclo-(Phe-Pro)$_4$ e [Lys(Z)-Pro]$_4$ a metais alcalino-terrosos em soluções alcoólicas e acetonitrila, visando determinar a interação destes íons a ionóforos naturais. As conformações dos peptídeos ciclo-(Gly-Pro-Gly-D-Ala-Pro), (D-Phe-Pro-Gly-D-Ala-Pro) e (Ala-Pro-Gly-D-Phe-Pro) foram estudadas por Yenal e col (1983) na presença de percloratos de cálcio e na ausência deles. Da mesma forma, as conformações de ciclo-(L-Pro-Gly)$_3$ (Kartha e col, 1982), ciclo-(Phe-Pro)$_4$, (Leu-Pro)$_4$ e

(Lys(Z)-Pro)$_4$ (Kimura e Imanishi, 1981), [Gly-L-Cys(Bzl(OMe)-Sar L-Pro] (Shimizu e col., 1982) e (Gly-Gly- Val-Pro)$_3$ (Urry e col., 1973) foram estudados. Usando técnicas espectroscópicas de dicroísmo circular, Raman, ressonância magnética protônica e cristalografia de raio-X, estes pesquisadores constataram alterações conformacionais destes peptídeos na presença de Ca(II).

No que se refere à peptídeos lineares, um número menor deles em relação aos cíclicos tem sido estudados em sua interação com Ca(II). Anathanarayanan e Shastri (1987) relataram a importância da existência de uma dobra na estrutura secundária de proteínas que ligam este íon, após realizarem estudos conformacionais de Pro-Gly-Ala-$NHCH_3$, Boc-Pro-Pro-Gly-Pro-$NHCH_3$, Boc-Pro-Pro-Ala-Pro-OH e Boc-Leu-Pro-Tyr-Ala-$NHCH_3$. O tetrapeptídeo Ac-Asp-Ala-OH foi estudado como modelo da ligação de Ca(II) a determinadas proteínas tais como parvalbumina de carpa, termolisina e calmodulina por Asso e colaboradores (1985). Em 1985, Hollosi e colaboradores sugeriram que o pentapeptídeo Met-encefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) forma complexos com este íon (Hollosi e col., 1985) e baseados nos dados destes autores Siemion e colaboradores (1985) sugeriram um modelo desta ligação. Em 1988, alguns oligopeptídeos do tipo Boc-Leu(Leu-Gln)$_n$ - OBzl (n = 1,3,5) foram analisados por espectroscopia nas regiões de ultra-violeta e infravermelho e por dicroismo circular na presença de Ca(II) por D'alagni e Manigrasso. Os resultados obtidos por estes autores demonstraram que os hepta- e undecapeptídeos sofreram mudanças conformacionais em misturas de trifluoroetanol e água causadas por sua complexação a Ca(II). Tal ligação leva à uma dobra na molécula destes peptídeos (D'alagni e Manigrasso, 1988).

Os resultados obtidos nos estudos acima citados, indicaram que em peptídeos o Ca(II) se coordena preferencialmente aos oxigênios provenientes de grupos carboxila e carbonila presentes em suas estruturas. Alguns modelos destes complexos foram propostas Asso e col., 1985; Siemion e col, 1985; Kartha e col., 1982.

5. Hidrólise de ésteres de aminoácidos e de peptídeos catalisada por íons metálicos

Desde a década de 1950 é conhecida a habilidade de vários íons metálicos catalisarem a hidrólise de ésteres de determinados aminoácidos, peptídeos e seus derivados .

Bender e Turnquest (1957) estudaram a hidrólise do éster etílico de glicina e D,L- fenilalanina em solução aquosa pH 7,3 na presença de Cu(II) e sugeriram que nas condições utilizadas ocorria um aumento da velocidade de hidrólise em relação à hidrólise básica. Assumiram que este íon ativava o éster pela coordenação à sua carbonila. Posteriormente, Angelici e Leach (1967, 1968) descreveram que metais de transição promoviam a hidrólise de ésteres de aminoácidos e seus derivados. Paralelamente, foi descrito que Cd(II), Ni(II), Mn(II), Co(II), Fe(II), Zn(II), La(II), Cu(II), Pd(II), Nd(II), Gd(II), Sm(III), Dy(III), Er(III), Yd(III) e Lu(III) catalisavam a hidrólise de ésteres etílicos de N,N'-diacetato de alanina em água e proposto um mecanismo de reação no qual o hidróxido atacava o carbono carbonílico do éster coordenado ao íon metálico (Leach e Angelici, 1968). Mecanismos similares foram propostos por Hay e Nolan (1974) para a hidrólise de ésteres de glicil-glicina, glicil – alanina e glicil-leucina catalisada por Cu(II) e por

Hay e Pujari (1986) para a hidrólise de ésteres metílicos de glicil-leucina, glicil-alanina e alanil-glicina catalisada por Pd(II). Estes trabalhos demonstraram claramente que a capacidade destes íons catalisarem tais reações está diretamente relacionada à sua coordenação ao carbono carbonílico dos ésteres, o que leva à ativação dos mesmos.

Não estão descritos na literatura entretanto, reações de hidrólise ou de transesterificação de ésteres de peptídeos e de aminoácidos catalisadas por íons metálicos do grupo dos alcalino-terrosos tais como Ca(II), Ba(II) e Mg(II), apesar de conhecida a habilidade de complexação deste íons a tais compostos (ítem anterior, página 21).

II - OBJETIVOS

Inicialmente, este trabalho tinha o objetivo de dar continuidade ao estudo da incorporação de N_{α}-acil-L-asparagina a derivados de L-aminoácidos e a peptídeos mediante catálise por termolisina (Machini de Miranda e col., 1986), através da síntese de Z-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^t, Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^t e Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 Estes peptídeos foram escolhidos por serem necessários para a continuação do projeto de síntese enzimática de ocitocina em desenvolvimento em nosso laboratório (Tominaga e col., 1983; Pinheiro da Silva, 1984; Cheng e col., 198).

Durante o decorrer do trabalho experimental, entretanto, foram feitas observações inéditas sobre reações de transesterificação na presença de Ca(II), que nos levaram a ampliar nosso objetivo. Por essa razão, nos dedicamos também a estudar:

1. a síntese de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt, Z-Asn-Leu-Gly-OEt, Boc-Asn-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl, Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^t, Moz-Gln-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Ile-Gly-OEt e Moz-Asn-Leu-Ala-OEt mediante catálise por termolisina;
2. a transesterificação destes ésteres de peptídeos em metanol e de ésteres de diversos outros peptídeos em soluções metanólicas contendo Ca(II);
3. a transesterificação de Boc-aminoacil- e peptidil-resina de Merrifield em soluções metanólicas contendo Ca(II);
4. a conformação preferencial de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt através de montagem de modelo, ressonância magnética de prótons e espectrosocopia Raman.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

1. Reagentes e solventes

Foram empregados reagentes de diversas procedências: L-aminoácidos (Ajinomoto do Brasil S/A); Z-Asn-OH, H-Cys(S-Bzl)-OH, Boc-Val-Res, Boc-Gly-Res, Boc-Ala-Res e Z-Cys(S-Bzl)-Tyr-Ile-OBu^t (Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina); Boc-Pro-OH, H-Gly-OEt.HCl, H-Gly-OBu^t, Z-Cys(S-Bzl)-Tyr-OBu^t, Z-Pro-Leu-Gly-OBzl e Z-Pro-Leu-Gly-OEt (sintetizados em nosso laboratório); Z-Asn-Leu-OEt, Z-Asn-Leu-OBzl, Z-Asn-Phe-OEt, Z-Asn-Phe-OBzl e Moz-Asn-Ile-Gly-OBzl (sintetizados no trabalho de Mestrado; Machini de Miranda e col. 1986); Boc-SDP, Moz-SDP e termolisina (Protein Research Foundation) e o-fenantrolina (Laboratório de Química Inorgânica, Instituto de Química da Universidade de São Paulo). Os demais reagentes e solventes utilizados foram adquiridos da Merck, Reagen, Grupo Química, Inlab e Riedel.

A termolisina foi utilizada sem purificação prévia e apresentou a atividade específica de 9.000 - 10.000 PU. mg^{-1}. A mesma contém acetato de cálcio 20% (m/m).

O metanol saturado de amônia foi preparado em nosso laboratório.

2. Métodos analíticos

2.1. Cromatografia em camada delgada

As cromatografias em camada delgada realizadas para o acompanhamento das reações em estudo e determinação do valor de

Rf dos produtos sintetizados foram feitas em placas de sílica-gel G-60 (Merck) de 0,25 mm de espessura preparadas em nosso laboratório.

Nas cromatografias realizadas para posterior leitura em densitômetro foram empregadas placas de celulose microcristalina 0.1 mm (Polygram Cel . 400, Macherey-Nagel & Co - Duren).

Os sistemas de solventes empregados foram: clorofórmio/metanol (v/v): 98:2 (A); 95:5 (B), 70:30 (C): clorofórmio/metanol/ ácido acético (v/v/v): 95:5:3 (D), 85:10:5 (E), 70:20:10 (F); acetona/ água (v/v): 70:30 (G); clorofórmio/ metanol hidróxido de amônio 17%, 30:30:15 (v/v/v) e fenol/ água, 75:25, (m/v) (I).

As cromatografias em camada delgada realizadas foram indicadas como CCD_A, CCD_B, CCD_C, CCD_D, CCD_E, CCD_F, CCD_G, CCD_H e CCD_I, os valores de Rf determinados para os compostos sintetizados foram indicados como Rf_A, Rf_B, Rf_C, Rf_D, Rf_E, Rf_F, Rf_G, Rf_H e Rf_I, sendo os índices correspondentes aos sistemas de solventes acima descritos.

2.2. Ponto de fusão.

Os pontos de fusão dos derivados de aminoácidos e dos peptídeos sintetizados foram determinados em um aparelho da Arthur H. Thomas Company, sem correção das temperaturas de fusão observadas.

2.3. Análise elementar

As quantidades percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram determinadas em um microanalisador do tipo

CHN, modelo 240 da Perkin-Elmer, na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

2.4. Análise de aminoácidos

As hidrólises dos peptídeos foram realizadas usando cerca de 1,0 mg de material na presença de ácido clorídrico 6 N a 110 °C por 72 horas. As amostras hidrolisadas foram secas em um evaporador rotatório, diluídas em 2 ml de tampão citrato de sódio, pH 2,2 (0,2 M) e analisadas pelo método de Moore e Stein (1954) modificado por Moore (1968), em um analisador Beckman, modelo 120 C, provido de válvulas injetoras de amostras de 0,25 ml. A estimativa da relação molar dos aminoácidos no hidrolisado foi feita considerando-se unitária a concentração do aminoácido mais próximo da média para todos os resíduos. Estas análises foram realizadas no Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina.

2.5. Cromatografia líquida de alta eficiência

Foi utilizado um cromatógrafo da Waters composto por bomba M-45, injetor universal U-6K, módulo de compressão radial RCM-100, espectrofotômetro Lambda-Max, modelo 481, registrador LKB-2210 e uma coluna de compressão radial do tipo Novapak C-18, 4 u, 8 x 100 mm (sílica de fase reversa).

Foram utilizados metanol de grau cromatográfico (Merck) e água (Milli-Q) para a preparação das misturas eluentes utilizadas.

As condições de análise empregadas foram diversas estando descritas no item 3, seção de materiais e métodos.

2.6. Poder rotatório específico

As medidas de rotação específica foram feitas em um espectrofotômetro Cary 60. O solvente utilizado para a dissolução das amostras foi dimetilformamida.

2.7. Ressonância magnética protônica

Os espectros de ressonância magnética protônica apresentados foram obtidos em espectrofotômetros Bruker AM 200 e AM 400, tendo sido realizados na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e nas Faculty of Pharmaceutical Science, (Kobe-Gakuin University, Kobe) e Tokyo College of Pharmacy, (Tóquio).

O solvente utilizado foi dimetilsulfóxido deuterado ($DMSO-d_6$).

2.8. Espectrometria de massas

Os espectros de massa foram realizados na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e na Tokyo College of Pharmacy, (Tóquio, Japão), tendo sido obtidos nos aparelhos Hewlett-Packard 5988 A e Hitachi M-80, respectivamente.

2.9. Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram feitos no laboratório de Físico-Química do Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, usando as amostras na forma sólida. O aparelho utilizado foi um espectrofotômetro

Jarel-Ash modelo 25-300, laser íon argônio, λ= 514,5 nm.

2.10. Densitometria

As leituras de densitometria foram feitas em um aparelho Quick Quant II-Scan Fluor Vis, Helena Laboratories no laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

2.11. Espectroscopia de absorção atômica

As determinações do conteúdo de Ca(II) das amostras peptídicas por absorção atômica foram realizadas no Departamento de Química Fundamental do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (utilizando o espectrômetro 403 de Perkin-Elmer) e na Faculty of Nutrition, Kobe-Gakuin University, Japão.

As amostras a serem analisadas foram dissolvidas em metanol, metanol/ ácido clorídrico ou em dimetilformamida. Também foram feitas dosagens das mesmas após sua hidrólise total com ácido clorídrico 6 N por 18 horas a 110 ^{o}C, remoção do ácido, secagem à vácuo sob pastilhas de hidróxido de sódio e dissolução do resíduo hidrolisado em água acidificada.

3. Métodos preparativos

3.1. Síntese de derivados de aminoácidos e de peptídeos por método químico

3.1.1. Moz-Asn-OH (Nagasawa e col., 1973)

A uma solução contendo 1,0 x 10^{-1} mol (13,2 g) de L-asparagina, 55 ml de água e 21 ml de trietilamina foi adicionado 1,2 x 10^{-1} mol (33,4 g) de 2-tiocarbonato de p-metoxi-benzil-S-4,6-dimetil-pirimidina (Moz-SDP) dissolvido em 55 ml de dioxano. A mistura resultante foi mantida à temperatura ambiente por tempo variável (20-24 horas) e o desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD_F. Após o seu término, a mistura foi diluída com 150 ml de água, sendo o Moz-SDP que não reagiu extraído com 200 ml (2 x 100 ml) de acetato de etila. A fração aquosa, resfriada a 0 ^{o}C e acidificada com ácido clorídrico 5 N até pH 2, foi deixada na geladeira por uma noite para a cristalização do produto. Após filtração, lavagem com água gelada e secagem à vácuo na presença de pentóxido de fósforo, o produto foi analisado e mostrou-se cromatrograficamente puro. O rendimento da reação e os valores de ponto de fusão e de Rf_F do produto estão expressos na tabela 4, página 70 , seção de resultados.

3.1.2. Moz-Gln-OH (Nagasawa e col., 1973)

Este composto foi sintetizado de acordo com o método descrito no ítem 3.1.1., página 30, partindo-se de 1,0 x 10^{-1} mol (14,6g) de L-glutamina, 55 ml de água, 21 ml de trietilamina, 1,2 x 10^{-1} mol (32,6g) de Moz-SDP e 55 ml de dioxano. O produto foi cristalizado e recristalizado no sistema de solventes metanol/ água e mostrou-se cromatograficamente puro (CCD_D). O rendimento da reação e os valores de ponto de fusão e

Rf_D do produto estão mostrados na tabela 4 , página 70, seção de resultados.

3.1.3. Boc-Asn-OH (Nagasawa e col., 1973)

Este derivado de L-asparagina foi obtido através do método descrito no ítem 3.1.1., página 30, partindo-se de $1,0 \times 10^{-1}$ mol (13,2g) de L-asparagina, 55 ml de água, 21 ml de trietilamina, $1,1 \times 10^{-1}$ mol (26,4 g) de tiocarbonato de t-butil-S-4,5-dimetil-2-pirimidina (Boc-SDP) e 55 ml de dioxano. O produto cristalizado foi filtrado, lavado com etanol gelado, recristalizado em etanol, filtrado e seco à vácuo. O rendimento da reação e os valores de ponto de fusão e Rf_F do produto obtido, o qual se mostrou cromatograficamente puro, estão descritos na tabela 4, página 70, seção de resultados.

3.1.4. Boc-Leu-OH.H_2O (Nagasawa e col., 1973)

$5,0 \times 10^{-1}$ ml (120 g) de Boc-SDP foram adicionados à uma solução contendo $4,0 \times 10^{-1}$ mol (52,5 g) de L-leucina, 84 ml de trietilamina, 220 ml de água destilada e 220 ml de dioxano. A mistura resultante foi mantida a temperatura ambiente sob agitação por 24 horas e o desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD_D . Após o seu término, a mistura foi diluída com 500 ml de água destilada e o Boc-SDP que não reagiu extraído com 200 ml (2 x 100 ml) de acetato de etila. A fração aquosa foi resfriada a $0^{o}C$, seu pH ajustado para 2 pela adição de ácido clorídrico 5 N e o produto extraído com 750 ml de acetato de etila (1 x 150 ml, 2 x 300 ml). As frações acetálicas foram reunidas, lavadas com ácido clorídrico 1 N (2 x 150 ml),

solução saturada de cloreto de sódio (1 x 100 ml) e seca sobre sulfato de sódio anidro por uma noite a 4 °C. Após filtração, o solvente foi eliminado à pressão reduzida e o resíduo obtido foi cristalizado e recristalizado no sistema metanol/ água, filtrado e seco à vácuo. O rendimento da reação e dados de ponto de fusão e Rf_D do produto puro obtido estão expressos na tabela 4, página 70, seção de resultados.

3.1.5. Boc-Ile-OH (Nagasawa e col., 1973)

Este composto foi sintetizado segundo o método descrito no item 3.1.4., página 32, a partir de 1,0 x 10^{-1} mol (23,2 g) de L-isoleucina, 55 ml de água, 21 ml de trietilamina, 1,1 x 10^{-1} mol (26,4 g) de Boc-SDP e 55 ml de dioxano. Após o término da reação, detectado por CCD_A, o produto foi extraído da fração aquosa ácida, com 300 ml (2 x 150 ml) de acetato de etila. A fração acetálica foi lavada como descrito no item anterior com 100 ml de solução ácida e 100 ml de solução saturada de cloreto de sódio. O produto cristalizado após eliminação de parte do acetato de etila, foi recristalizado com acetato de etila/ éter de petróleo, filtrado e seco à vácuo. Quando analisado, mostrou-se cromatograficamente puro (CCD_A). O rendimento da reação e os valores de ponto de fusão e Rf_D do produto estão descritos na tabela 4, página 70, seção de resultados.

3.1.6. Boc-Cys(S-Bzl)-OH (Itoh e col., 1975)

A uma solução contendo 1,0 x 10^{-2} mol (2,1 g) de H-Cys(S-Bzl)-OH, 8 ml de água, 2 ml de trietilamina e 6 ml de

dioxano, foi adicionado $1,0 \times 10^{-2}$ mol (2,7 g) de 2-t-butiloxi-carboniloxiimino-2-fenilacetonitrila (Boc-ON). A mistura resultante foi deixada à temperatura ambiente sob agitação e o desenvolvimento da reação acompanhado por CCD_D. Completada a reação, o dioxano foi eliminado por evaporação à pressão reduzida e após a adição de 15 ml de água à mistura, o Boc-ON residual foi extraído com 15 ml de acetato de etila. A fração aquosa foi então resfriada a 0 °C, o pH ajustado para 2 e o produto extraído com 40 ml (2 x 20 ml) de acetato de etila. A fração acetálica foi lavada com 20 ml (2 x 10 ml) de água e seca sobre sulfato de sódio anidro. Após filtração, o acetato de etila foi eliminado em evaporador rotatório e o produto foi cristalizado e recristalizado em éter anidro/ éter de petróleo, filtrado e seco à vácuo. Sua pureza foi confirmada por CCD_D. Alguns dados de sua caracterização e o rendimento obtido estão expressos na tabela 4, página 70, seção de resultados e discussão.

3.1.7. Boc-Cys(S-Bzl)-ONp (Beyerman e col., 1968)

Em 60 ml de acetato de etila foram dissolvidos $3,0 \times 10^{-2}$ mol (9,3 g) de Boc-Cys(Bzl)-OH e $6,0 \times 10^{-2}$ mol (8,3 g) de p-nitrofenol. Após o resfriamento em banho de gelo seco e etanol, foram adicionados à mistura $3,3 \times 10^{-2}$ mol (6,9 g) de N, N'-diciclohexil-carbodiimida (DCC) e a reação foi deixada por 30 min. no mesmo banho e em seguida à temperatura ambiente por uma noite. Após análise do meio reacional por CCD_D, a diciclohexiluréia (DCU) formada foi filtrada e o solvente eliminado em evaporador rotatório. O resíduo oleoso resultante foi cristalizado no sistema etanol/ éter de petróleo. Os cristais obtidos foram recristalizados no mesmo sistema até se

apresentarem puros em CCD_D. O rendimento da reação e os valores de ponto de fusão e Rf_D do produto estão na tabela 4, página 70, seção de resultados.

3.1.8. H-Ala-OEt.HCl (Goodman e McGahren, 1967)

A suspensão de $5,0 \times 10^{-2}$ mol (4,4 g) de L-alanina em 100 ml de etanol saturado com cloreto de hidrogênio anidro foi agitada até a dissolução total do aminoácido. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD_C. Terminada a reação, o etanol e o cloreto de hidrogênio foram eliminados à pressão reduzida. O resíduo obtido foi seco à vácuo e analisado por CCD_C, mostrando-se puro. O rendimento da reação e alguns dados de caracterização do produto estão mostrados na tabela 4, página 70, seção de resultados.

3.1.9. H-Gly-OBzl.Tos (Cipera e Nicholls, 1955)

Em um balão de 500 ml contendo 50 ml de álcool benzílico e 100 ml de benzeno foram colocados $1,0 \times 10^{-1}$ mol 7,5 g) de glicina e $1,2 \times 10^{-1}$ mol (32,8 g) de ácido p-tolueno-sulfônico monohidratado. Este balão foi adaptado ao aparelho de Dean - Stark e aquecido em banho de óleo mantido a 100-110 °C. O desenvolvimento da reação foi acompanhada por CCD_E e após o seu término, foram adicionados ao meio reacional 160 ml de éter etílico e 160 ml de éter de petróleo para a cristalização do produto. Este foi filtrado, recristalizado no sistema metanol/éter etílico, seco à vácuo e sua pureza confirmada por CCD_E. O rendimento obtido e os dados de ponto de fusão e Rf_E do produto estão expressos na tabela 4, página 70, seção de resultados.

3.1.10. H-Cys(S-Bzl)-OBu^t (Roeske, 1963)

O isobutileno necessário para a preparação do éster butílico da S-benzil-L-cisteína foi obtido conforme o método de Senderens (1912), gotejando-se álcool terc-butílico sobre ácido sulfúrico 20% contido em um balão de três bocas e mantendo-se a temperatura entre 95 e 100 ^oC com o uso de manta aquecedora. O isobutileno gasoso gerado passou através de um condensador de um metro de altura montado para refluxo e por um frasco lavador contendo sulfato de cálcio anidro mantido a 0 ^oC. Foi então coletado em um balão de 250 ml mergulhado em banho de gelo seco e acetona. 85 ml deste isobutileno líquido foram transferidos para um balão contendo uma mistura de 75 ml de dioxano destilado (seco sobre fio de sódio), 7,5 ml de ácido sulfúrico concentrado e 5,0 x 10^{-2} mol (10,5 g) de S-benzil-L-cisteína. O balão contendo esta mistura foi fechado hermeticamente e deixado à temperatura ambiente por uma noite, sob agitação. Após resfriamento em banho de gelo seco e acetona, foram adicionados à mistura 500 ml de éter etílico juntamente com 350 ml de hidróxido de sódio 1 N. A fase etérea foi separada da fase aquosa, que foi lavada com mais 300 ml (2 x 150 ml) de éter etílico. Todas as fases orgânicas foram então reunidas e secas sobre sulfato de sódio anidro. Após filtração do sal, o filtrado foi submetido à evaporação à pressão reduzida, resultando em um produto oleoso. O mesmo foi dissolvido em etanol e transformado em cloridrato pela adição de solução de ácido clorídrico 3 N à solução etanólica. Os cristais assim obtidos mostraram-se puros em CCD. O rendimento da reação e os valores do ponto de fusão e Rf_D do produto estão descritos na tabela 4, página 70, seção de resultados.

3.1.11. Boc-Leu-Gly-OEt (König e Geiger, 1970)

$5,5 \times 10^{-2}$ mol (5,3 g) de H-Gly-OEt.HCl foram dissolvidos em 100 ml de diclorometano gelado (em banho de gelo seco e acetona) e neutralizado com trietilamina. A solução resultante foram adicionados $5,0 \times 10^{-2}$ mol (11,6 g) de Boc-Leu-OH.H_2O, $5,0 \times 10^{-2}$ mol (10,3 g) de N,N'diciclohexil-carbodiimida (DCC) e $5,0 \times 10^{-2}$ mol (6,8 g) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt). A reação foi deixada em banho de gelo seco e acetona por 30 minutos e posteriormente à temperatura ambiente, sendo seu desenvolvimento acompanhado por CCD_D. Seu pH foi verificado em intervalos de tempo regulares. Terminada a reação, a diciclohexiluréia (DCU) formada foi filtrada e o solvente eliminado à pressão reduzida. O resíduo obtido foi dissolvido em acetato de etila, lavado com ácido clorídrico 1 N, água, bicarbonato de sódio 5% (m/v) e água e seco sobre sulfato de sódio anidro. Após filtração e eliminação parcial do acetato de etila, o produto foi cristalizado no sistema acetato de etila/ éter de petróleo, recristalizado no mesmo sistema de solventes e seco à vácuo. Sua pureza foi confirmada por CCD_D. O rendimento obtido, bem como alguns dados de caracterização do mesmo estão mostrados na tabela 5, página 71 , seção de resultados.

3.1.12. Boc-Leu-Gly-OBzl (König e Geiger, 1970)

Este peptídeo foi sintetizado segundo o método descrito no item 3.1.11., página 37 , a partir de $7,0 \times 10^{-3}$ mol (1,62 g) de Boc-Leu-OH.H_2O, $7,2 \times 10^{-3}$ mol (1,2 g) de H-Gly-OBzl.Tos, $7,0 \times 10^{-3}$ mol (1,4 g) de DCC, $7,0 \times 10^{-3}$ mol (1,0 g) de

HOBt e 40 ml de diclorometano. A fração acetálica foi lavada até ser constatada a pureza do peptídeo nela contido através de CCD_D. Após eliminação total do acetato de etila, o resíduo oleoso foi seco à vácuo e estocado a 4 °C. O rendimento da reação e o Rf_D do produto estão mostrados na tabela 5, página 71, seção de resultados.

3.1.13. Boc-Leu-Gly-OBu^t (König e Geiger, 1970)

Este peptídeo foi obtido de acordo com o método descrito no item 3.1.11., página 37, partindo-se de $6,5 \times 10^{-3}$ mol (1,5 g) de Boc-Leu-OH.H_2O, $7,0 \times 10^{-3}$ mol (1,0 g) de H-Gly-OBu^t, $7,0 \times 10^{-3}$ mol (1,4 g) de DCC, $7,0 \times 10^{-3}$ mol (1,0 g) de HOBt, 40 ml de diclorometano e 1 ml de dimetilformamida. A fração acetálica foi lavada até a constatação por CCD_D da pureza do produto nela contido. Após a eliminação total do acetato de etila e secagem à vácuo, o mesmo foi estocado na forma de óleo. O rendimento da reação e o Rf_D de dipeptídeo obtido estão expressos na tabela 5, página 71, seção de resultados.

3.1.14. Boc-Ile-Gly-OEt (König e Geiger, 1970)

Boc-Ile-Gly-OEt foi sintetizado segundo o método descrito no ítem 3.1.11., página 37, a partir de $5,0 \times 10^{-3}$ mol (1,2 g) de Boc-Ile-OH, $5,0 \times 10^{-3}$ mol (0,5 g) de H-Gly-OEt.HCl, $5,0 \times 10^{-3}$ mol (1,0 g) de DCC, $5,0 \times 10^{-3}$ mol (0,7 g) de HOBt, 50 ml de diclorometano e 2 ml de dimetiformamida. Durante a eliminação parcial do acetato de etila em evaporador rotatório, ocorreu a cristalização do produto. O mesmo foi recristalizado no sistema acetato de etila/ éter de petróleo, seco à vácuo e

mostrou-se puro quando analisado por CCD_D. O rendimento da reação e alguns dados de caracterização do peptídeo obtido estão descritos na tabela 5, página 71, seção de resultados.

3.1.15. Boc-Leu-Ala-OEt (König e Geiger, 1970)

Este composto foi obtido segundo o método descrito no item 3.1.11, página 37, partindo-se de $5,0 \times 10^{-3}$ mol (1,2 g) de Boc-Leu-OH, $5,0 \times 10^{-3}$ mol (0,7 g) de H-Ala-OEt.HCl, $5,0 \times 10^{-3}$ mol (1,0 g) de DCC, $5,0 \times 10^{-3}$ mol (0,7 g) de HOBt, 55 ml de diclorometano e 2 ml de dimetilformamida. A fração acetálica foi lavada até ser constatada por CCD_D a pureza do produto nela contido. O acetato de etila foi eliminado e o resíduo oleoso seco à vácuo. O rendimento da reação e o Rf_D do produto estão expressos na tabela 5, página 71, seção de resultados.

3.1.16. Remoção do grupo Boc- com ácido trifluoroacético (Schnabel e col., 1968)

O composto contendo o grupo Boc- como protetor de α-aminogrupo foi suspenso em diclorometano e resfriado em banho de gelo seco e acetona. A suspensão resultante foi adicionado o ácido trifluoroacético. Após 10 minutos a $-70^{o}C$, a reação foi deixada à temperatura ambiente sob agitação. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD_D e após o seu término, o solvente e o ácido trifluoroacético foram eliminados à pressão reduzida em evaporador rotatório. Ao resíduo obtido foi adicionado éter etílico anidro, que foi em seguida eliminado da mesma maneira. Esta operação foi repetida por três vezes. Nos

casos em que ocorreu precipitação do produto em éter etílico, este foi filtrado e seco à vácuo. Quando não houve precipitação, o óleo resultante da evaporação do éter etílico foi seco à vácuo na presença de hidróxido de potássio por uma noite.

3.1.17. Boc-Pro-Leu-Gly-OEt (König e Geiger, 1970)

Este peptídeo foi sintetizado de acordo com o método descrito no item 3.1.11., página 37, partindo-se de $2,6 \times 10^{-2}$ mol (5,6 g) de Boc-Pro-OH, $2,6 \times 10^{-2}$ mol (3,5 g) de HOBt, $2,6 \times 10^{-2}$ mol (5,4 g) de DCC e do produto resultante da desproteção de $3,6 \times 10^{-2}$ mol (8,3 g) de Boc-Leu-Gly-OEt (conforme o ítem 3.1.16, página 39) dissolvidos em 120 ml de diclorometano e 5 ml de dimetilformamida. O produto foi cristalizado e recristalizado no sistema acetato de etila/ éter de petróleo até se mostrar cromatograficamente puro em CCD_D. O rendimento da reação e os valores de ponto de fusão e Rf_D do produto estão expressos na tabela 5, página 71, seção de resultados.

3.1.18. Boc-Pro-Leu-Gly-NH_2 (Ressler e du Vigneau, 1954)

$2,3 \times 10^{-2}$ mol (9,6 g) de Boc-Pro-Leu-Gly-OEt foram dissolvidos em 150 ml de metanol saturado de amônia gelado em um balão de paredes reforçadas. Após vedação adequada, a reação foi deixada a ocorrer em repouso por 48 horas à temperatura ambiente. Constatada a transformação total em amida através de CCD_E, a mistura foi então resfriada em banho de gelo seco e acetona. O solvente foi eliminado à pressão reduzida. Ao resíduo resultante foi adicionado acetato de etila e a mistura

foi deixada em geladeira para a cristalização do produto, o qual mostrou-se cromatograficamente puro. O rendimento da reação e alguns dados da caracterização do peptídeo amonolisado estão mostrados na tabela 5, página 71 , seção de resultados.

3.1.19. Z-Pro-Leu-Gly-NH_2 (Ressler e du Vigneau, 1954)

$7,9 \times 10^{-3}$ mol (3,5 g) de Z-Pro-Leu-Gly-OEt foram dissolvidos em 200 ml de metanol saturado de amônia a 0 °C. Após vedação adequada, a mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente por 72 horas. O solvente foi eliminado por evaporação à pressão reduzida e ao resíduo resultante foi adicionado acetato de etila para cristalização. O produto obtido, recristalizado no mesmo solvente e seco à vácuo, mostrou-se cromatograficamente puro (CCD_E). O rendimento da reação e o Rf_E do mesmo estão expressos na tabela 5 , página 71 , seção de resultados.

3.1.20. Moz-Asn-Leu-Gly-NH_2 (Ressler e du Vigneau, 1954)

Este composto foi preparado segundo o método descrito no ítem 3.1.18., página 40 , a partir de $1,0 \times 10^{-3}$ mol (0,5 g) de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt e 50 ml de metanol saturado de amônia. O rendimento da reação e os dados de caracterização do produto obtido estão expressos no ítem 2.3., seção de resultados.

3.1.21. H-Pro-Leu-Gly-NH_2

A $7,3 \times 10^{-3}$ mol (3.1 g) de Z-Pro-Leu-Gly-NH_2 dissolvidos em 50 ml de metanol, foi adicionado carvão paladiado 10% umedecido. A mistura foi deixada à temperatura ambiente, sob

agitação, a 60 psi (4 atm) de H_2 em uma bomba Parr. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD_D. Completada a hidrogenação, o carvão foi filtrado em camada de celulose microcristalina umedecida e o etanol foi eliminado por evaporação à pressão reduzida. O resíduo obtido foi utilizado sem cristalização prévia.

3.1.22. Boc-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2

Método 1 (Weygand e col., 1966):

O tetrapeptídeo Boc-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 foi obtido segundo o método descrito no item 3.1.11, página 37, modificado, partindo-se de 7, 3 x 10^{-3} mol (2,3 g) de Boc-Cys-(S-Bzl)-OH, 7,3 x 10^{-3} mol (1,5 g) de DCC, 7,3 x 10^{-3} mol de n-hidroxisuccinimida (HOSu) e de H-Pro-Leu-Gly-NH_2 (resultante da hidrogenação catalítica, ítem 3.1.21., página 41) dissolvidos em 10 ml de dimetilformamida. Após a filtração da DCU e sua lavagem com metanol, este solvente foi eliminado à pressão reduzida. O meio reacional foi deixado em geladeira por uma noite na presença de 20 ml de acetato de etila e 20 ml de éter de petróleo para cristalização do produto. O produto precipitado foi recristalizado em metanol/ água. O rendimento obtido bem como os valores de ponto de fusão e Rf_E estão expressos na tabela 5, página 71, seção de resultados.

Método 2 (Bodanszky, 1955):

A solução contendo o produto resultante da desproteção de 2,2 x 10^{-3} mol (0,9 g) de Boc-Pro-Leu-Gly-NH_2

(ítem 3.1.16, página 39) e 4 ml de dimetilformamida, foi resfriada em banho de gelo-seco e acetona, 2,0 x 10^{-2} mol (0,9 g) de Boc-Cys(S-Bzl)-ONp e N-metilmorfolina até pH 7,8 foi em seguida adicionado à mistura sendo a reação deixada à temperatura ambiente, sob agitação. O desenvolvimento de reação foi acompanhado por CCD_E e o pH verificado em intervalos de tempo regulares. Completada a reação, o produto foi precipitado pela adição da mistura acetato de etila/ éter de petróleo (1:1, v/v). Após filtração, o produto foi recristalizado no sistema metanol/ água e seco à vácuo. O rendimento da reação e alguns dados de caracterização do produto estão mostrados na tabela 5 , página 71 , seção de resultados.

3.1.23. Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 (König e Geiger, 1970)

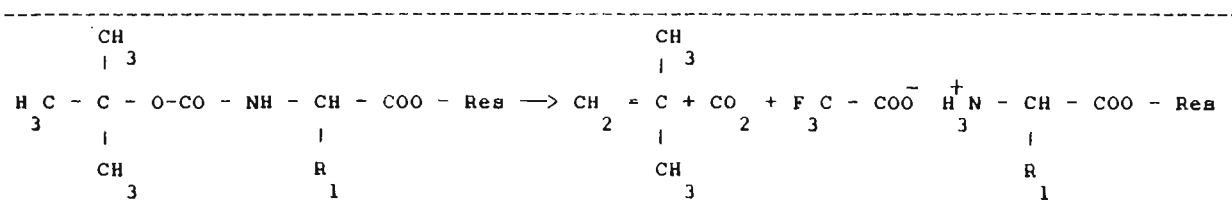
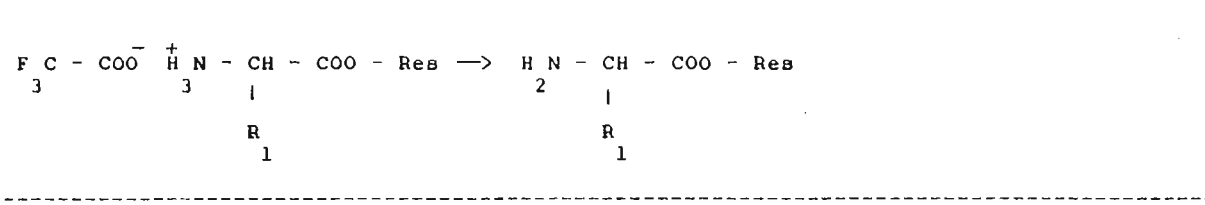
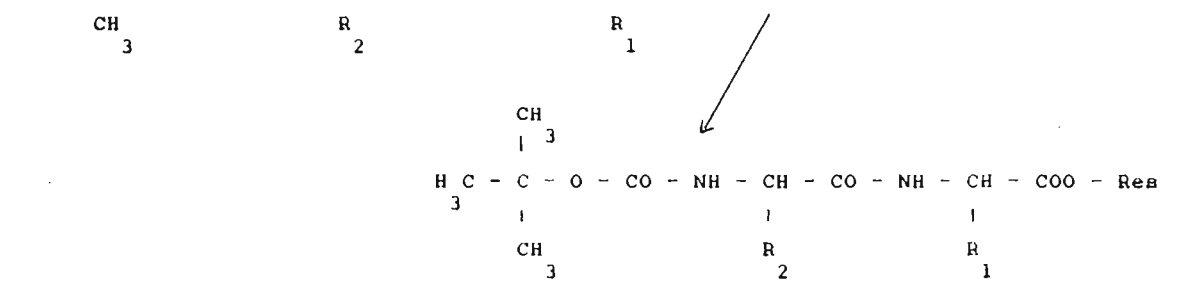
Este pentapeptídeo foi sintetizado segundo o método descrito no item 3.1.11., página 37 , a partir de 2,6 x 10^{-4} mol (70 mg) de Moz-Asn-OH, 5,2 x 10^{-4} mol (70 mg) de HOBt, 5,2 x 10^{-4} mol (107 mg) de DCC e do produto resultante da desproteção de 2,5 x 10^{-4} mol (147 mg) de Boc-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 (ítem 3.1.16., página 39) dissolvidos em 4 ml de diclorometano e 2 ml de dimetilformamida. Após a filtração da DCU e da elimininação do diclorometano à pressão reduzida, foram adicionados ao meio reacional 40 ml de acetato de etila. Após uma noite em geladeira, o produto cristalino obtido foi filtrado, recristalizado no sistema metanol/ éter etílico e seco à vácuo. O rendimento da reação e os valores de ponto de fusão e Rf_f do produto estão expressos na tabela 5 e ítem 1.2., páginas 71 e e 69 , seção de resultados.

3.1.24. Boc-Leu-Gly-Res (Merrifield, 1969; Stewart e Young, 1969 e 1984)

Este Boc-dipeptidil-resina foi obtido pelo método de síntese em fase sólida partindo-se de 0,46 g de Boc-Gly-Res (Res = Polímero de poliestireno e divinilbenzeno). As etapas de síntese e as operações realizadas estão enumeradas no esquema 4, página 45 .

Inicialmente o Boc-aminoacil-resina é suspenso em diclorometano e lavado (operação 1) para posterior desproteção com ácido trifluoroacético 30% em diclorometano (operação 2-4) e neutralização com trietilamina 10% em diclorometano (operação 3-7). Em seguida é realizado o acoplamento do Boc-aminoácido desejado ao aminoacil-Res utilizando um excesso de 2,5 vezes do primeiro e de DCC dissolvidos em diclorometano (operação 8). O desenvolvimento da reação é monitorado segundo o método de Kaiser (Kaiser e col., 1970), o qual permite detectar a quantidade de aminogrupos livres. Em geral este monitoramento é realizado após 2 horas de reação (operação 9). Caso o resultado seja positivo (desenvolvimento de coloração azul na suspensão), o aminoacil-Resina ou peptidil-Resina é lavado (operação 10) e subtmetido ao reacoplamento nas mesmas condições já descritas na operação 8. Se o teste é negativo (suspensão levemente amarela), prossegue-se a síntese (operações 10-13). Estas etapas são repetidas para a elongação da cadeia peptídica até a obtenção do Boc-peptidil-Resina desejado, que é seco à vácuo e analisado (operações 14-15).

O rendimento da reação e os resultados da análise de aminoácidos realizada estão descritos no ítem 1.2.2., página 72.

ETAPAS	ESQUEMA	OPERAÇÕES
Desproteção do α-aminogrupo		1. DCM por 2' (3 vezes) 2. TFA/DCM 30% por 1,5' 3. TFA/DCM 30% por 30' 4. lavagem com DCM por 2' (6 vezes)
Neutralização do α-aminogrupo		5. TEA/DCM 10% por 1.5' 6. TEA/DCM 10% por 10' 7. lavagem com DCM por 2' (6 vezes)
Acoplamento		8. Boc-aa + DCC (2,5 EQ) em DCM 9. monitoramento da reação 10. lavagem com DCM por 2' (6 vezes) 11. lavagem com DCM/EtOH (50%) (2 vezes) 12. lavagem com EtOH (3 vezes) 13. lavagem com EtOH/DCM (50%) (2 vezes)
Isolamento e Caracterização		14. secagem à vácuo 15. análise de aminoácidos

Esquema 4 . Etapas de síntese em fase sólida de Boc-peptidil-resina de Merrifield. R_1 e R_2 referem-se às cadeias laterais dos aminoácidos.

3.1.25. Moz-Asn-Leu-Gly-Res

Moz-Asn-Leu-Gly-Res foi sintetizado de acordo com o método descrito no ítem 3.1.24., página 44 , a partir de 1,17 g de Boc-Leu-Gly-Res. O rendimento da reação e os resultados da análise de aminoácidos realizada estão descritos no ítem 1.2.2., página 72 .

3.2. Síntese enzimática de peptídeos contendo asparagina

3.2.1. Método geral empregado na formação de ligações peptídicas

a. Reação em sistemas homogêneos

Os componentes carboxílicos e amínico foram dissolvidos em tampão ou solução salina de pH e concentração conhecidos ou em misturas dos mesmos com solventes orgânicos miscíveis. Após a dissolução completa ou parcial destes reagentes, quantidade estequiométrica de solução de hidróxido de sódio 1 M foi adicionada ao meio de reação para neutralização do componente amínico, que se encontrava em forma de cloridrato ou de trifluoroacetato. A enzima foi então adicionada e a mistura reacional incubada à temperatura definida por intervalo de tempo definido, sob agitação moderada. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD.

b. Reações em sistemas heterogêneos

A enzima foi dissolvida no tampão ou em solução salina de pH e concentração conhecidos. Após suave agitação, necessária para a hidratação da mesma, foram adicionados à mistura os componentes carboxílico e amínico, quantidade estequiométrica a do componente amínico de solução de hidróxido de sódio 1 M e volume conhecido de solvente orgânico imiscível. A mistura reacional foi incubada à temperatura definida por intervalo de tempo definido, sob vigorosa agitação. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD.

Em ambos os sistemas de reação, quando a enzima utilizada foi termolisina, as soluções salinas continham acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M. Quando se usou papaína, foi borbulhado N_2 na mistura e adicionado β-mercaptoetanol ao meio de reação antes da adição da mesma.

Nos casos em que ocorreu precipitação do produto no meio reacional, o mesmo foi filtrado (em funil de placa porosa previamente tarado), lavado com ácido clorídrico 1 M, água, solução de bicarbonato de sódio e água (m/v) e seco a vácuo na presença de pentóxido de fósforo até peso constante. O rendimento da reação foi determinado por gravimetria.

Nos casos em que o produto formado era solúvel no meio reacional, o rendimento foi determinado por HPLC através da injeção de quantidades conhecidas das misturas de reação diluídas e comparação das áreas de picos obtidos às de curva-padrões feita com padrões autênticos.

termolisina foi estudada nas condições experimentais mostradas na tabela 6, do ítem 2.1., página 73 , segundo o método descrito no ítem 3.2.1., página 46.

A presença (+) ou ausência (-) do produto desejado nos meios reacionais, detectada por CCD_D , estão indicadas na mesma tabela.

Este dipeptídeo foi também sintetizado utilizando papaína na seguinte condição experimental: $5,0 \times 10^{-4}$ mol (150 mg) de Z-Asn-OH, $5,0 \times 10^{-4}$ mol (140 mg) de H-Cys(S-Bzl)-OBu^t.HCl, 6 ml de tampão fosfato 0,2 M (pH 5,5), 2,8 ml de etanol, $2,3 \times 10^{-6}$ mol (48 mg) de papaína e 2 gotas de β-mercaptoetanol, 72 horas, 38 °C. O produto precipitado obtido foi isolado como descrito no ítem 3.2.1., página 46 e recristalizado em etanol, sendo utilizado como padrão nas reações de síntese com termolisina. O rendimento da reação e os dados de caracterização do mesmo estão expressos no item 2.1., página 72, seção de resultados.

3.2.3. Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^t

Sua síntese catalisada por termolisina foi estudada nas condições experimentais descritas na tabela 6, do ítem 2.2., página 74 , segundo o método geral de formação de ligações peptídicas (ítem 3.2.1., página 46). A presença (+) ou ausência (-) do produto desejado nos meios reacionais, detectada por CCD_D , estão indicadas na mesma tabela.

Este composto também foi sintetizado mediante catálise por papaína na seguinte condição experimental: $5,0 \times 10^{-4}$ mol (150 mg) de Moz-Asn-OH, $5,1 \times 10^{-4}$ mol (140 mg) de H-Cys(S-Bzl)-OBu^t.HCl, 6 ml de tampão fosfato 0,2 M (pH 5,5), 2,8 ml de etanol, $1,0 \times 10^{-6}$ mol (21 mg) de papaína e 2 gotas de

β-mercaptoetanol, 90 horas, 38 °C. O produto precipitado obtido foi isolado como descrito no ítem 3.2.1., página 46 e recristalizado em etanol. O rendimento da reação e os dados de caracterização do dipeptídeo, o qual foi usado como padrão na reação de síntese do mesmo com termolisina, estão mostrados no ítem 2.1., página 72.

3.2.4. Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2

Sua síntese utilizando termolisina como catalisador foi estudada nas condições experimentais mostradas na tabela 3, página 50, de acordo com o método descrito no item 3.2.1., página 46. A presença (+) ou a ausência (-) do produto foi detectada por HPLC, em condições adequadas analisando-se os meios reacionais estudados após sua filtração em membranas Durapore GVWP de 0,22 u da Millipore.

As condições de análise foram determinadas previamente através de um estudo da separação entre os reagentes Moz-Asn-OH e H-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2.TFA e o produto Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 dissolvidos em metanol (2,5 mg/ml), usando como eluentes as misturas metanol/ água 8:2, 7:3 e 6:4 (v/v), fluxo = 1,0 ml/min, detecção = 254 nm, sensibilidade = 0,2, registro = 0,1 mm/seg. Os resultados obtidos estão descritos no ítem 2.3., página 74, seção de resultados. Nos casos em que foi confirmada a presença de produto solúvel na reação, foi feita a quantificação do mesmo como descrito no ítem 3.2.1., página 46.

O precipitado obtido na síntese C, foi filtrado, lavado e seco à vácuo na presença de pentóxido de fósforo como descrito no ítem 3.2.1., página 46, e em seguida o hidrolisado

Tabela 3. Síntese de Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 catalisada por termolisina

Reação	Moz-Asn-OH (.10^{-4} mol)	H-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 .TFA (.10^{-4} mol)	NaAc, 0,2 M* pH 6 (ml)	AcOEt (ml)	Termolisina (. 10^{-7} mol)	Tempo (h)
A	2,5	2,6	2,50	3,75	1,1	48
B	2,5	2,6	1,25	3,75	1,1	48
C	2,5	2,5	2,50	7,50	1,1	48
D	2,5	2,5	5,00	5,00	1,1	48
E	2,5	2,5	0,45[a]	5,00	1,1	48
F	2,5	2,5	3,50[a]	-[b]	1,1	48
G	2,5	2,5	0,40[a]	-[c]	1,1	48
H	2,5	2,5	1,90[a]	-[d]	1,1	48
I	2,5	2,5	1,00	9,00	1,1	48
J	2,5	2,5	-[a]	9,00	1,1	48
K	2,5	2,5	1,00	5,00	1,1	48
L	2,5	2,5	1,00	5,00	1,1	4,5
M	2,5	2,5	1,00	5,00	1,1	4,5
N	2,5	2,5	4,50	-[e]	1,1	24
O	2,5	2,5	4,50	-[e]	1,1	24
P	2,5	2,5	9,00	1,00	1,1	48
Q	2,5	2,5	7,50	2,50	1,1	24

[a] Foi utilizado tampão Tris/HCl, 0,2 M, pH 8. [b,c,d] Foram utilizados 0,75 ml de DMF e 1,2 ml de MeOH, 0,6 ml de THF, 3,8 ml de EtOH respectivamente. [e] Foram usados 2,0 e 4,0 ml de 1,4-butanodiol respectivamente. Todas as incubações foram feitas a 48 °C, sob agitação, sendo que o trifluoroacetato do componente amínico foi neutralizado com n-metilmorfolina ou NaOH 1 M. [f] Estas reações não foram analisadas por HPLC. * A solução continha acetato de cálcio 5,0 x 10^{-2} M.

com ácido clorídrico 6 N por 60 horas a 110 °C. Após a eliminação do ácido por evaporação à pressão reduzida, o produto hidrolisado foi dissolvido em 2 ml de água destilada e submetido à cromatografia bidimensional em camada delgada nos sistemas de solventes H e I juntamente com uma mistura padrão dos aminoácidos Asp, Pro, Leu e Gly.

O meio reacional e o precipitado obtido na síntese K foram analisados por HPLC e CCD juntamente com soluções-padrão de Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 sintetizado quimicamente, termolisina, Moz-Asn-OH e H-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2.TFA. Este precipitado foi submetido à determinação de Rf e ponto de fusão, análise elementar e de aminoácidos, espetrometria de massa e RM^1H.

Os precipitados obtidos nas sínteses I,J,K,L e M (filtrados e secos) foram analisados por CCD : I,J,L ou por HPLC: I,J,K,L e M (condições descritas no ítem 3.2.4., página 49).

Os precipitados L e M obtidos foram pesados para cálculo de rendimento das reações.

Os resultados destes estudos estão descritos no ítem 2.3., página 74 , seção de resultados.

3.2.5. Moz-Asn-Leu-Gly-OEt

Este tripeptídeo foi sintetizado de acordo com o método geral de formação de ligação peptídica em sistemas homogêneos de reação (item 3.2.1.a, página 46) nas condições experimentais descritas na tabela 8, página 82 . Os produtos precipitados foram isolados, lavados e secos como descrito no mesmo ítem e sua pureza confirmada por CCD . Os mesmos serão chamados de brutos (B). Os rendimentos obtidos estão mostrados na

mesma tabela. Os dados da caracterização do produto precipitado bruto 3B estão mostrados no ítem 2.4, página 80 . O mesmo foi analisado por RM^1H e por espectrometria de massa, sendo que os espectros obtidos estão mostrados nas figuras 5 e 6, páginas 84 e 85 , seção de resultados.

3.2.6. Síntese de Z-Asn-Leu-Gly-OEt, Boc-Asn-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl, Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^t Moz-Gln-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Leu-Ala-OEt e Moz-Asn-Ile-Gly-OEt

Todos estes tripeptídeos foram obtidos segundo o método descrito (no ítem 3.2.1.a, página 46) para sistemas homogêneos nas condições experimentais expressas na tabela 9, página 86 , seção de resultados. Os produtos precipitados foram isolados, lavados e secos, segundo descrito no mesmo ítem e sua pureza comprovada por CCD_D e HPLC. Os mesmos serão chamados de brutos. Os rendimentos de reação estão mostrados na mesma tabela. Os dados de caracterização destes produtos recristalizados em etanol/ água estão expressos no ítem 2.5. e tabela 10, páginas 83 e 87 .

4. Transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt em metanol

4.1. Transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto

4.1.1. Recristalização de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B em metanol/ água

O tripeptídeo bruto 3B (tabela 8, página 82)

foi dissolvido em metanol aquecido à cerca de 40 °C. Em seguida, a solução resultante foi filtrada em papel, deixada à temperatura ambiente para resfriamento e à ela adicionada água destilada até que a mesma se tornasse turva. Após uma noite em geladeira, o precipitado formado foi filtrado, seco e analisado por HPLC: concentração de amostra = 3,0 mg/ml, eluente = metanol/ água, 7:3 (v/v), fluxo = 1,0 ml/min, detecção = 254 nm, sensibilidade = 0,2, registro = 0,1 mm/seg. Os resultados obtidos estão mostrados no ítem 3.1.1., página 88 , seção de resultados.

4.1.2. Estudo das condições de separação por HPLC entre Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B e o produto obtido após sua recristalização em metanol/ água

Este estudo foi realizado utilizando o sistema eluente metanol/ água nas seguintes proporções (v/v): 90:10 (1); 80:20 (2); 70:30 (3); 65:35 (4); 60:40 (5); 50:50 (6) e fluxo = 1,0 e 0,5 ml/min., concentração da amostra = 3,0 mg/ml, detecção = 254 nm, sensibilidade = 0,2, registro = 0,1 mm/seg. Os resultados obtidos estão descritos no ítem 3.1.2., página 88 , seção de resultados.

4.1.3. Determinação por HPLC das porcentagens relativas de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt e do produto obtido após sua recriatalização em metanol/ água

As amostras foram analisadas em 254 nm sendo tais porcentagens calculadas relacionando-se as alturas dos picos

correspondentes ao peptídeo original Moz-Asn-Leu-Gly-OEt (X) e ao peptídeo transformado (Y) presentes nos cromatogramas. A somatória de suas alturas (W) refere-se a 100% de peptídeo e as porcentagens relativas de cada um correspondem a $\frac{100 \times X}{W}$ % e $\frac{100 \times Y}{W}$ % de X e Y respectivamente.

4.1.4. Cinética da transformação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B dissolvido em metanol

$6,0 \times 10^{-6}$ mol (3,0 mg) de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto 3B (tabela 8, página 82) foram dissolvidos em 1 ml de metanol e a solução resultante mantida a 28 °C por 24 horas em repouso num banho termostatizado. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por HPLC (eluente = metanol/ água 7:3 (v/v), fluxo = 1,0 ml/min, detecção = 254 nm, sensibilidade = 0,2, registro = 0,1 mm/seg) através da injeção da solução incubada em tempos diferentes (0, 2, 4, 6 e 24 horas de reação). Os resultados encontrados estão expressos no ítem 3.1.3., página 88, e figura 8, página 91, seção de resultados.

4.1.5. Transformação total de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B dissolvido em metanol e identificação do produto bruto

$6,0 \times 10^{-4}$ mol (0,3 g) de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto 3B (tabela 8, página 91) foram dissolvidos em 100 ml de metanol e a solução resultante foi mantida a 28 °C por 69 horas, sob agitação. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD e após o seu término, o metanol foi eliminado por evaporação à vácuo. O produto obtido foi analisado por determinação de Rf,

determinação do ponto de fusão, análise de aminoácidos, análise elementar, espectroscopia de infravermelho e de massa e por RM^1H. Os resultados obtidos estão descritos no ítem 3.1.4., página 92, e nas figuras 9 e 10, páginas 94 e 95, seção de resultados.

4.1.6. Cinética de transesterificação dos Moz-Asn-Leu-Gly-OEt brutos 3B, 4B, 5B, 6B e 7B

$6,0 \times 10^{-6}$ mol (3,0 mg) de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt brutos 3B, 4B, 5B, 6B e 7B (tabela 8, página 82) foram dissolvidos em 1 ml de metanol e a solução resultante mantida a 38 °C num banho termostatizado em repouso por 24 horas. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por HPLC (item 4.1.4., página 54) através da injeção da solução metanólica contendo o peptídeo em tempos determinados (0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas de reação). Os resultados obtidos estão expressos na tabela 12, do ítem 3.1.5., página 93, seção de resultados.

Paralelamente, foram feitas várias determinações da concentração de Ca(II) nos Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B-7B através de absorção atômica nas condições descritas na tabela 13, página . Os resultados obtidos estão descritos na mesma.

4.1.7. Homogeneização dos Moz-Asn-Leu-Gly-OEt brutos

As amostras peptídicas foram colocadas em almofariz de ágata e homogeneizadas com pistilo do mesmo material até que o sólido se tornasse um pó extremamente fino. O almofariz e o pistilo foram previamente lavados com água Milli-Q.

4.1.8. Cinética de transesterificação dos vários Moz-Asn-Leu-Gly-OEt brutos homogeneizados

Este estudo foi realizado como descrito no ítem 4.1.6., página 55 , partindo-se dos tripeptídeos 3B-10B (tabela 8 , página 82). As porcentagens relativas de transesterificação encontradas nos diferentes tempos de incubação testados estão descritas na tabela 14, do ítem 3.1.6., página 98 , seção de resultados.

Diferentes amostragens de 5B, 7B e 8B foram analisadas por absorção atômica para determinação do seu teor de Ca(II). Os resultados encontrados estão descritos na figura 11, página 99 , seção de resultados.

4.1.9. Estudo da influência da temperatura no processo de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B-homogeneizado

$6,0 \times 10^{-6}$ mol (3,0 mg) de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B (tabela 8, página 82) foram dissolvidos em 1 ml de metanol e incubados a 28 °C, 38 °C, e 48 °C. O desenvolvimento das reações foi acompanhado por HPLC através da injeção dos meios reacionais nos tempos 0, 2, 4 e 6 horas de reação nas condições descritas no ítem 4.1.4., página 54 . As porcentagens relativas de transesterificação encontradas estão expressas na figura 12, página 101, seção de resultados.

4.1.10. Estudo do efeito de diluição de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B - homogeneizado no processo de sua transesterificação

1 ml de uma solução metanólica de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B (tabela 8, página 82) de concentração 4,5 mg/ml (A)

foi diluído com metanol para 2 ml (B), 5 ml (C), 10 ml (D) e 20 ml (E). As soluções resultantes A,B,C,D e E foram em seguida incubadas a 38 °C. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por HPLC (ítem 4.1.4., página 54) através da injeção de alíquotas das soluções nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas de reação. Os resultados estão expressos na figura 13, página 102 , seção de resultados.

4.1.11. Transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B-homogeneizado na presença de o-fenantrolina

$6,1 \times 10^{-6}$ mol (3,0 mg) do tripeptídeo bruto 3B (tabela 8, página 82) foram dissolvidos em: (A) 1 ml de uma solução metanólica 10×10^{-3} M ($1,0 \times 10^{-6}$ mol) de o-fenantrolina; (B) 1 ml de metanol. Ambas as soluções foram incubadas a 38 °C. O desenvolvimento da reação foi acompanhada CCD nos tempos 0, 24 e 48 horas de reação. Também foi realizada uma cromatografia em camada delgada em placa de celulose microcristalina (ítem 2.1., página 26) no sistema de solventes D, para posterior leitura em densitômetro nos tempos 0 e 48 horas de reação. Os resultados obtidos nestas análises estão descritos no ítem 3.1.10., página 100 e figura 15, página 104 , seção de resultados.

4.1.12. Transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto 5B-homogeneizado na presença de EDTA

$6,1 \times 10^{-6}$ mol (3,0 mg) do tripeptídeo bruto 3B (tabela 8, página 82) foram dissolvidos em: (A) 0,7 ml de metanol e 0,3 ml de água (B); 0,7 ml de metanol e 0,3 ml de

solução aquosa de $Na_2EDTA\ 2H_2O$ $4,0 \times 10^{-2}$ M ($6,1 \times 10^{-6}$ mol). As soluções foram incubadas a 38 °C, e alíquotas das mesmas foram analisadas por HPLC nos tempos 0,4,8,24 e 48 horas de reação nas condições descritas no ítem 4.1.4., página 54, Os resultados obtidos estão mostrados na tabela 15, página 105, seção de resultados.

4.1.13. Estudo da influência da concentração de EDTA na transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B-homogeneizado

$6,1 \times 10^{-6}$ mol (3,0 mg) do tripeptídeo bruto (3B) (tabela 8, página 82) foram dissolvidos em: (A) 0,7 ml de metanol e 0,3 ml de água; (B) 0,7 ml de metanol, 0,28 ml de água e 15 ul de solução de $Na_2EDTA: 2H_2O$ ($6,0 \times 10^{-6}$ mol); (C) 0,7 ml de metanol, 0,15 ml de água e 0,15 ml de solução de $Na_2EDTA.2\ H_2O$ 4×10^{-3} M ($6,0 \times 10^{-7}$ mol);(D) 0,7 ml de metanol e 0,3 ml de solução de $Na_2EDTA.\ 2H_2O$ 2×10^{-3} M ($6,0 \times 10^{-6}$ mol). As soluções foram incubadas a 38 °C e analisadas por HPLC (condições descritas no ítem, 4.1.4., página 54) nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas de reação. As porcentagens relativas de transesterificação do tripeptídeo obtidas estão mostradas na figura 16, página 107 , seção de resultados.

4.2. Transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt-recristalizado

4.2.1. Recristalização de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B e 10B em etanol/ água

Moz-Asn-Leu-Gly-OEt brutos 3B e 10B (tabela 8,

página 82) foram suspensos em etanol e as suspensões aquecidas até que as mesmas se tornassem soluções turvas. Após filtração e resfriamento lento, foi adicionada água Milli-Q a estas soluções e as mesmas foram mantidas em geladeira por uma noite. Os precipitados obtidos foram filtrados e secos em dessecador à vácuo na presença de pentóxido de fósforo. Os Moz-Asn-Leu-Gly-OEt recristalizados 3R e 10R foram analisados por determinação de Rf e ponto de fusão, análise elementar e de aminoácidos, espectrometria de massa e de RM^1H. Os resultados obtidos para 3R estão mostrados no ítem 3.2.1., página 88 , seção de resultados. O espectro de RM^1H está mostrado na figura 18, página 110 , da mesma seção.

4.2.2. Incubação em metanol de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt-recristalizado

$6,1 \times 10^{-6}$ mol (3,0 mg) dos tripeptídeos resultantes da recristalização descrita no ítem 4.2.1., página 58, (3R e 10R) foram dissolvidos em 1 ml de metanol. As soluções resultantes foram incubadas e analisadas por HPLC como descrito no ítem 4.1.4, página 54 , nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas de reação. Os resultados obtidos e as condições de análise estão expressos no item 3.2.2., página 47 , seção de resultados.

4.2.3. Cinética de transesterificação em metanol de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B e 10R na presença de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B e 8B

$3,0 \times 10^{-6}$ mol (1,5 mg) de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B

(A) e 10R (B) e $3,0 \times 10^{-6}$ mol (1,5 mg) de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B foram dissolvidos em 1 ml de metanol. As soluções resultantes foram mantidas a 38 °C por 48 horas. Nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas de reação, alíquotas das mesmas foram injetadas em HPLC para análise nas condições descritas no ítem 4.1.4., página . O mesmo estudo foi realizado com 10R na presença de 8B. Os resultados obtidos estão mostrados na tabela 16, página 112 , seção de resultados.

Também foi realizado o estudo da influência da variação da concentração de 5B na transesterificação de 7B em metanol: 0,01, 0,2, 0,3 e 0,5 ml de uma solução $1,0 \times 10^{-2}$ M de 5B foram adicionados a 1, 0,84, 0,67, 0,51 e 0,18 ml de uma solução $6,1 \times 10^{-3}$ M de 7B, respectivamente. Estas misturas foram em seguida diluídas para o volume de 1 ml com metanol. Alíquotas das soluções resultantes, incubadas a 38 °C, foram injetadas e analisadas em HPLC nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas nas condições descritas no ítem 4.1.4., página 54 . As porcentagens relativas de transesterificação encontradas estão mostradas na figura 19, página 113, seção de resultados.

4.2.4. Cinética de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B em soluções metanólicas de diferentes concentrações de acetato de cálcio

$6,1 \times 10^{-6}$ mol (3,0 mg) do tripeptídeo 7B (tabela 8, página 82) foram dissolvidos em: (A) 1 ml de metanol, (B) 1 ml de metanol e 6,1 ul de solução metanólica de acetato de cálcio $1,0 \times 10^{-3}$ M, (C) 1 ml de metanol e 61 ul de solução metanólica de acetato de cálcio $1,0 \times 10^{-3}$ M, (D) 1 ml de metanol e 61 ul de solução metanólica de acetato de cálcio 1,0 x

10^{-2} M, (E) 0,7 ml de metanol e 0,3 ml de solução metanólica de acetato de cálcio 1×10^{-2} M, (F) 0,4 ml de metanol e 0,6 ml de solução metanólica de acetato de cálcio 1×10^{-2} M, (G) 1 ml de solução metanólica de acetato de cálcio 3×10^{-2} M. As soluções A,B,C,D,E,F e G foram incubadas a 38 °C, e analisadas por HPLC (ítem 4.1.4., página 54) nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas de reação. Os resultados obtidos estão descritos na figura 21, página , seção de resultados.

A incubação F foi realizada em maior escala paralelamente ao estudo acima. Após transesterificação total, o produto foi isolado, recristalizado em etanol/ água e analisado por determinação de Rf, tempos de retenção, ponto de fusão, análise elementar , espectrometria de massa e RM ^{1}H. Os resultados estão mostrados no ítem 3.2.4., página 111, seção de resultados.

4.2.5. Cinética de transesterificação em soluções metanólicas de acetato de cálcio de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 10R em diferentes concentrações

Misturas contendo 6,1 ml de solução metanólica de $Ca(Ac)_2$ 1×10^{-2} M, 3,9 ml de metanol e 10 ml de solução metanólica de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 10R nas concentrações: a- 3 mg/ml, b- 1,5 mg/ml, c- 0,6 mg/ml, d- 0,3 mg/ml e e- 0,15 mg/ml, foram incubadas a 38 °C. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por HPLC injetando-se alíquotas de a,b,c e d nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas nas condições descritas no ítem 4.1.4., página 54 . As porcentagens relativas de transesterificação observadas estão expressas na figura 24, página 119, seção de resultados.

Acrescentar a frase: A mesma incubação também foi realizada na presença de quantidade equimolar a de peptídeo de EDTA.

4.2.6. Cinética de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B em soluções metanólicas de cloreto de cálcio, acetato de sódio e cloreto de sódio

$6,1 \times 10^{-6}$ mol (3,0 mg) de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B (tabela 8, página 82), foram incubados a 38 °C em 0,4 ml de metanol e 0,6 ml de solução metanólica de cloreto de cálcio 1×10^{-2} M, acetato de sódio 1×10^{-2} M, e cloreto de sódio 1×10^{-2} M. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por HPLC (ítem 4.1.4 página 54) através da injeção de alíquotas das soluções A,B e C nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas de reação. As porcentagens de transesterificação relativas observadas estão descritas na tabela 17, página 122, seção de resultados.

4.2.7. Cinética de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B em soluções metanólicas de cloreto de cálcio/acetato de sódio

$6,0 \times 10^{-6}$ mol (3,0 mg) de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B (tabela 8, página 82) foram dissolvidos em 0,4 ml de metanol e 0,6 ml de solução metanólica de: a- $CaCl_2$ 1×10^{-2} M, b- $CaCl_2$ 1×10^{-2} M contendo NaAc 1×10^{-2} M, c- $CaCl_2$ 1×10^{-2} M contendo NaAc 5×10^{-2} M. As misturas foram incubadas a 38 °C, por 48 horas e o desenvolvimento da reação foi acompanhado por HPLC (ítem 4.1.4, página 54) através da injeção de alíquotas das soluções a,b e c nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas de reação. Os resultados obtidos estão mostrados na tabela 17, página 122 , seção de resultados.

4.3. Estudo conformacional de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B, 8B e 3R

Amostras de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt brutos 3B e 8B e de 3R foram dissolvidas em: dimetilsulfóxido deuterado (3B, 8B e 3R) ou mistura de dimetilsulfóxido deuterado/cloreto de cálcio (1 mol de 3R/1 mol de sal) e analisadas por RM ^{1}H bidimensional, unidimensional com dupla irradiação e diferencial, a 400 MHZ, para determinação de NOE (Nuclear Overhauser Effect) entre diferentes prótons da molécula. Os espectros obtidos, as frequências utilizadas, as atribuições dos picos e as porcentagens de NOE encontradas estão mostradas no ítem 4, página 120 , seção de resultados.

Também foram realizados espectros Raman de 3B, 8B e 3R em pastilhas de KBr.

5. Transesterificação de Z-Asn-Leu-Gly-OEt (A), Boc-Asn-Leu-Gly-OEt (B), Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl (C), Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^{t} (D), Moz-Gln-Leu-Gly-OEt (E), Moz-Asn-Ile-Gly-OEt (F) e Moz-Asn-Leu-Ala-OEt (G) em metanol

5.1. Incubação em metanol de A,B,C,D,E,F e G brutos

3,0 mg de A,B,C,D,E,F e G brutos (homogeneizados em almofariz de ágata) foram dissolvidos em 1 ml (A,D,E e G) ou 2 ml (B,C e F) de metanol. As soluções resultantes foram filtradas em membranas Durapore GVWP de 0,22 u da Millipore e incubadas a 38° C. O desenvolvimento das reações foi acompanhado pela análise por HPLC de alíquotas A,B,C,D,E,F e G coletadas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas de incubação. As porcentagens relativas de transesterificação encontram-se na tabela 19, página

131 , seção de resultados, juntamente com as condições de análise utilizadas.

5.2. Cinética de transesterificação de B,C,D,F e G brutos em soluções metanólicas de acetato de cálcio

3,0 mg de B,C,D,F e G brutos foram dissolvidos em mistura de metanol (1) e solução metanólica de acetato de cálcio (2) 1×10^{-2} M nas seguintes proporções: B, 1,3 ml de (1) e 0,7 ml de (2); C, 1,47 ml de (1) e 0,53 ml de (2); D, 0,43 ml de (1) e 0,57 de (2); F e G, 1,4 ml de (1) e 0,6 ml de (2). As misturas foram filtradas em membranas Durapore GVWP de 0,22 u da Millipore e incubadas a 38°C. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por HPLC através da análise nas condições descritas no ítem 5.1., página 63 , de alíquotas de B,C,D,F e G coletadas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas de incubação. Os resultados obtidos estão mostrados na tabela 20, página 132 , seção de resultados.

As porcentagens de transesterificação de A,B,E,F e G foram calculadas de acordo com o método descrito no item 4.1.3., página . Para C, entretanto, as mesmas foram calculadas pela medida da diminuição da altura do pico correspondente a ele em função do tempo. Por tal método, a altura (X) medida no início da reação corresponde a 100% do peptídeo original e a porcentagem de transesterificação correspondente à $\frac{100 \times Y}{X}$ %, sendo Y a diferença entre X e a altura do pico correspondente ao peptídeo original no momento da análise. Nestes casos foram realizados três incubações simultâneas para que fosse tirada a média das porcentagens de transesterificação obtidas.

5.3. Recristalização de A,B,C,D,E,F e G brutos

Estes tripeptídeos foram recristalizados de acordo com o método descrito no ítem 4.2.1., página 58. Os produtos secos foram analisados por CCD A,B e E e por HPLC (condições experimentais descritas na tabela 20, página 87). Os produtos obtidos apresentaram as características descritas na tabela 10, página , seção de resultados.

5.4. Cinética de transesterificação em soluções metanólicas de acetato de cálcio de A,B,C,D,E,F e G recristalizados

Este estudo foi realizado segundo o método descrito no ítem 5.2, página 64 , utilizando-se A,B,C,D,E,F e G recristalizados. As porcentagens relativas de transesterificação observadas (calculadas segundo descrito no mesmo ítem e as condições de análise por HPLC estão expressas na tabela 21 , página 135, seção de resultados.

6. Transesterificação de ésteres de vários peptídeos em soluções metanólicas de acetato de cálcio

6.1. Método geral

O peptídeo foi suspenso em solução metanólica de acetato de cálcio 0,01 M (quantidade equimolar a de peptídeo) e a suspensão resultante foi adicionado metanol. Após dissolução completa do peptídeo, a solução foi filtrada em membrana Durapore GVWP de 0,22 u da Millipore e uma alíquota foi imediatamente analisada por HPLC em condições de análise adequadas. A solução

foi incubada a 38 °C, sem agitação. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por HPLC através da análise de alíquotas das soluções coletadas em tempos diversos.

Nos casos em que não era adicionado acetato de cálcio ao meio reacional, o peptídeo foi dissolvido em metanol.

6.2. Estudo qualitativo

O estudo qualitativo da transesterificação dos ésteres de peptídeos Z-Asn-Leu-OEt, Z-Asn-Phe-OEt, Boc-Leu-Gly-OEt, Z-Pro-Leu-Gly-OEt, Z-Asn-Leu-OBzl, Z-Asn-Phe-OBzl, Boc-Ile-Gly-OBzl, Moz-Asn-Ile-Gly-OBzl, Z-Pro-Leu-Gly-OBzl, Z-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^t, Z-Cys(S-Bzl)-Tyr-OBu^t e Z-Cys(S-Bzl)-Tyr-Ile-OBu^t na presença e ausência de acetato de cálcio foi realizado de acordo com o método descrito no ítem 6.1, página 65, nas condições experimentais descritas na tabela 22, página 136. As condições analíticas utilizadas para HPLC e os resultados obtidos neste estudo estão mostrados nas mesmas tabelas.

6.3. Estudo quantitativo

O estudo quantitativo da transesterificação dos ésteres de peptídeos descritos no ítem 6.2., página 66, em soluções metanólicas de acetato de cálcio, foi realizado de acordo com o método geral (item 6.1., página 65), nas condições experimentais e de análise por HPLC descritos na tabela 23, página 138, seção de resultados.

Também foi realizado um estudo comparativo da transesterificação em soluções metanólicas de acetato de cálcio de todos os ésteres de peptídeos utilizados no trabalho (o acima

descrito e dos obtidos enzimaticamente recristalizados (ítem 5.3., página 65) nas condições experimentais descritas na tabela 24 , página 139 . As condições usadas para análise em HPLC e as porcentagens de transesterificação encontradas estão expressas na mesma tabela.

Em ambos os estudos as porcentagens de transesterificação detectadas foram calculadas como descrito no item 5.2., página 64.

6.4. Transesterificação total de Z-Asn-Leu-Gly-OEt (A), Boc-Leu-Gly-OEt (B) e Boc-Ile-Gly-OEt (C) e caracterização dos produtos obtidos

$2,9 \times 10^{-4}$ mol (90 mg) de A, $1,6 \times 10^{-4}$ mol (60 mg) de B e $1,9 \times 10^{-4}$ mol (90 mg) de C foram dissolvidos em 36 ml, 16 ml, 19 ml de solução de acetato de cálcio 0,01 M, e 4 ml, 4 ml e 11 ml de metanol, respectivamente. Após a transformação total, comprovada por CCD e HPLC, o solvente foi evaporado e os resíduos obtidos foram recristalizados em etanol/ água (A) ou acetato de etila/ éter de petróleo (B e C) e secos à vácuo para posteriores análises (determinação de ponto de fusão e Rf, análises elementar e de aminoácidos e RM^1H). Os resultados obtidos estão mostrados no ítem 6.3, página 66 , figuras 34, 35 e 36, páginas 142, 143 e 145.

7. Transesterificação de Boc-Gly-Res (1), Boc-Ala-Res (2), Boc-Val-Res (3), Boc-Leu-Gly-Res (4) e Moz-Asn-Leu-Gly-Res (5) em soluções metanólicas de acetato de cálcio

7.1. Estudo qualitativo

1, 2, 3, 4 e 5 foram suspensos em misturas constituídas

por metanol e diclorometano ou por metanol, solução metanólica de acetato de cálcio 1×10^{-2} M e diclorometano nas quantidades expressas na tabela 25, página 146. As suspensões resultantes foram incubadas a 38 °C, sem agitação e o desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD por 48 horas. Os resultados encontrados na mesma tabela, na seção de resultados.

7.2. Estudo quantitativo

360 mg de 4 e 230 mg de 5 (grau de substituição: 0,277 mmol/g) foram suspensos em: 6,2 ml de solução metanólica de acetato de cálcio 1×10^{-2} M, 56,4 ml de metanol, 15,6 ml de diclorometano (4) e 10 ml de solução metanólica de acetato de cálcio 1×10^{-2} M, 88 ml de metanol, 24,5 ml de diclorometano (5) As suspensões resultantes foram incubadas a 38 °C. Após 48 horas de incubação, as reações foram interrompidas, o solvente evaporado a vácuo e os resíduos obtidos foram dissolvidos em acetato de etila. Após lavagem com água, as frações acetálicas foram secas sobre sulfato de sódio, filtradas, o solvente evaporado e os resíduos secos à vácuo na presença de pentóxido de fósforo. Em seguida, estas amostras foram dissolvidas em metanol e analisadas por HPLC, juntamente com padrões de Boc-Leu-Gly-OMe e Moz-Asn-Leu-Gly-OMe. O metanol foi evaporado e os resíduos secos em Abder-Halden.

7.3. Caracterização dos produtos obtidos

Os produtos obtidos no estudo quantitativo descrito no item 7.2, página 68, foram analisados por determinação de Rf, tempo de retenção e ponto de fusão, análises elementar e de aminoácidos espectrometria de massa e RM ^{1}H (ítem 7.2., página 68 e figuras 37 e 38, página 148 e 149).

IV - Resultados

1. Síntese de derivados de aminoácidos e de peptídeos por método químico.

1.1. Derivados de aminoácidos.

Na tabela 4, página 70 , estão expressos os rendimentos encontrados na síntese dos derivados de aminoácidos Moz-Asn-OH, Moz-Gln-OH, Boc-Asn-OH, Boc-Leu-OH.H_2O, Boc-Ile-OH, Boc-Cys(S-Bzl)-OH, Boc-Cys(S-Bzl)-ONp, H-Ala-OEt.HCl, H-Gly-OBzl.Tos e H-Cys(S-Bzl)-OBu^t.HCl obtidos segundo os métodos descritos nos ítens 3.1.1. a 3.1.10, páginas 30 a 36 . A mesma tabela mostra alguns dados da caracterização destes compostos (solvente de recristalização, ponto de fusão e Rf).

1.2. Peptídeos.

1.2.1. Síntese em solução.

A tabela 5, página 71 , mostra os rendimentos encontrados e alguns dados da caracterização dos peptídeos Boc-Leu-Gly-OEt, Boc-Leu-Gly-OBzl, Boc-Leu-Gly-OBu^t , Boc-Ile-Gly-OEt, Boc-Leu-Ala-OEt, Boc-Pro-Leu-Gly-OEt, Boc- Pro-Leu-Gly-NH_2 , Z-Pro-Leu-Gly-NH_2 , Boc-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 e Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 sintetizados de acordo com os métodos descritos nos ítens 3.1.11 a 3.1.23, página 37 a 43 .

O pentapeptídeo Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 apresentou os seguintes resultados de análises elementar e de aminoácidos:

Tabela 4. Síntese química de derivados de L-aminoácidos

Composto	Rendimento (%)	Solvente de recristalização	Ponto de fusão (°C) Obs.	Ponto de fusão (°C) Lit.	R_f
Moz-Asn-OH	75	-	158-160	160-163[a]	0,69[F]
Moz-Gln-OH	70	MeOH/H_2O	145-148	146-147[a]	0,64[D]
Boc-Asn-OH	70	EtOH	174-176	175-177[a]	0,65[D]
Boc-Leu-OH.H_2O	85	MeOH/H_2O	59-61	67-74[a]	0,52[D]
Boc-Ile-OH	67	EP	68-70	68-71[a]	0,72[D]
Boc-Cys(S-Bzl)-OH	35	EE/EP	89-91	66-68[a]	0,66[D]
Boc-Cys(S-Bzl)-ONp	63	EtOH/EE	92-94	95-96[b]	0,76[D]
H-Ala-OEt.HCl	50	-	-	62[c]	0,41[F]
H-Gly-OBzl.Tos	87	MeOH/EE	133-135	132-134[d]	0,37[E]
H-Cys(S-Bzl)-OBu^t.HCl	80	EtOH	197-196[g]	195-196[e]	0,71[C]

Os índices C,D,E e F referem-se aos sistemas de solventes empregados nas cromatografias em camada delgada. [a] Nagasawa e col, 1973; [b] Bergerman e col., 1968; [c] Aldrich Chemical Company Ltd; [d] Greenstein e Winitz, 1961; [e] Tashner e col., 1961.

H-Ala-OEt.HCL foi obtido na forma de óleo.

Tabela 5. Síntese química de peptídeos

Peptídeos	Rendimento (%)	Solvente de Recristalização	Rf Obs	Ponto de fusão (°C) Obs.	Lit.
Boc-Leu-Gly-OEt	70	AcOEt/EP	0,76[D]	79-81	80-82[a]
Boc-Leu-Gly-OBzl	46	-	0,78[D]	-	-
Boc-Leu-Gly-OBu[t]	43	-	0,76[D]	-	-
Boc-Ile-Gly-OEt	30	AcOEt/EP	0,74[B]	106-107	104[b]
Boc-Leu-Ala-OEt	57	-	0,65[D]	-	82-84[c]
Boc-Pro-Leu-Gly-OEt	89	AcOEt	0,72[D]	101-103	95-97[d]
Boc-Pro-Leu-Gly-NH_2	77	AcOEt	0,65[E]	122-124	150-151[e]
Z-Pro-Leu-Gly-NH_2	93	AcOEt	0,32[D]	-	163-163,5[f]
Boc-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2	78	MeOH/H_2O	0,72[E]	173-175	172-173[g]
Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2	35	MeOH/H_2O	0,62[F]	200-202	-

Os índices B,D,E e F referem-se aos sistemas de solventes empregados para cromatografia em camada delgada. [a] Woodman e col., 1973; [b] Kim e col., 1985; [c] Sato e col., 1983; [d] Zaoral e Kirchnàk, 1977; [e,g] Dutta e Morley, 1971; [f] Furtner, 1982. Os compostos cujos pontos de fusão observados não estão indicados foram obtidos na forma de óleo. Os compostos cujos pontos de fusão da literatura não estão descritos não foram encontrados.

Elementar (%) Calculado: C 57,13; N 12,95; H 6,66

Observado: C 56,26; N 12,73; H 6,52

Aminoácidos: Asp 1,05, Pro 1,02, Leu 0,97, Cys(S-Bzl) 0,94, Gly 1,03

1.2.2. Síntese em fase sólida.

Boc-Leu-Gly-Res e Moz-Asn-Leu-Gly-Res obtidos segundo o método descrito nos itens 3.1.24 e 3.1.25, páginas 44 e 46 , apresentaram os seguintes resultados de análise de aminoácidos: Boc-Leu-Gly-Res: Leu 0,97, Gly 1,03; Moz-Asn-Leu-Gly-Res: Asp 1,03, Leu 0,99, Gly 0,98. Foram obtidas 1,15 g de Boc-Leu-Gly-Res e 1,20 g de Moz-Asn-Leu-Gly-Res, o que corresponde a 95,8 e 82,8% de rendimento respectivamente (calculado a partir da ~~Boc~~-Res empregada).

2. Síntese enzimática de peptídeos.

2.1. Z-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^{t}.

Este composto foi obtido mediante catálise por papaína nas condições descritas no item 3.2.2., página 47 , com 29% de rendimento. Após recristalização em etanol, o mesmo se mostrou cromatograficamente puro e apresentou as seguintes características:

P.F. = 131-133 ^{o}C (Lit = 110-112 ^{o}C; Pinheiro da Silva, 1984)

CCD : Rf_{B} = 0,50; Rf_{D} = 0,68; Rf_{E} = 0,71.

Análise elementar (%) = Calculado: C 60,59; N 8,15; H 6,45

Observado: C 59,67; N 8,82; H 6,33

Análise de aminoácidos = Asp 1,06, Cys(S-Bzl) 0,94

Tabela 6. Síntese enzimática de Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^t e Z-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^t mediante catálise por termolisina

Z-Asn-OH ($.10^{-4}$ mol)	Moz-Asn-OH ($.10^{-4}$ mol)	H-Cys(S-Bzl)-OBu^t.HCl[b] ($.10^{-4}$ mol)	NaAc[a] 0,2M, pH 6 (ml)	Tris/HCl[a] 0,2M, pH 8 (ml)	EtOH (ml)	AcOEt (ml)	Termolisina (mg)	Tempo (h)	Presença de produto em CCD
2,5	-	2,5	-	4,0[c]	2,5	-	10,0	48[d]	+
5,0	-	5,0	-	10,0	4,0	-	10,0	48[d]	-
2,0	-	2,5	-	4,0	0,1	-	4,0	48	+
5,0	-	5,0	10,0	-	4,0	-	10,0	48[d]	-
5,0	-	5,0	7,5[c]	-	3,5	-	5,0	24	-
2,5	-	2,5	1,0	-	-	1,0	2,5	24	+
2,0	-	2,5	1,0	-	-	1,0	2,0	24	+
2,0	-	2,5	1,4	-	-	0,6	2,0	50	-
2,0	-	2,5	-	1,4	-	0,6	2,0	50	+
2,0	-	2,5	6,0	-	-	-	4,0	48	-
2,5	-	3,0	1,0	-	-	1,0	2,5	5	+
2,5	-	3,0	1,0	-	-	-	2,5[e]	24	-
2,5	-	3,0	1,0	-	-	-	2,5[f]	1	-
2,5	-	3,0	1,0	-	-	-	2,5[g]	24	-
-	4,5	5,0	7,5[c]	-	3,5	-	5,0	24	+
-	2,0	2,5	6,0	-	-	-	4,0	48	+
-	2,0	2,5	-	4,0	-	0,5	4,0	48	+
-	2,0	2,5	1,7	-	3,5	1,7	2,0	3	+
-	2,0	2,5	-	1,7	-	1,7	2,0	30	-
-	10,0	10,0	30,0	-	-	-	10,0	72	-

[a] As soluções de NaAc 0,2M, pH 6 e o tampão Tris/HCl 0,2M, pH 8 continham $Ca(Ac)_2$ $5,0 \times 10^{-2}$ M; O cloridrato foi neutralizado pela adição de quantidade equimolar de solução de NaOH 1M ao meio de reação; [c] foi adicionado ao meio reacional 1 g de $(NH_4)_2SO_4$; [d] Reações realizadas a 38 °C; [e,f,g] Reações realizadas na presença de 1,0 ml de CCl_4, DCM e n-Bu respectivamente. Todas as incubações foram realizadas sob agitação.

Os resultados encontrados no estudo da síntese deste dipeptídeo mediante catálise por termolisina estão mostrados na tabela 6, página 73 , juntamente com as condições experimentais utilizadas.

2.2. Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^t .

O rendimento obtido na síntese deste dipeptídeo catalisada por papaína, nas condições descritas no item 3.2.3., página 48 , foi de 12%. Após recristalização em metanol/ água, o produto se mostrou cromatograficamente puro e apresentou as seguintes características:

P.F. = 155 - 157 ^oC

CCD: Rf_B = 0,50; Rf_D = 0,85; Rf_E = 0,82

Análise elementar (%) = Calculado: C 59,43; N 7,70; H 6,46

Observado: C 59,73; N 8,02; H 6,41

Análise de aminoácidos = Asp 0,98, Cys(S-Bzl) 1,02

O estudo da síntese de Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^t mediante catálise por termolisina forneceu os resultados mostrados na tabela 6, página 73 .

2.3. Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2

A figura 1, página 75 , mostra o perfil cromatográfico obtido por HPLC da mistura-padrão contendo Moz-Asn-OH, H-Cys (S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 .TFA e Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 quando foi utilizado o sistema eluente metanol/ água, 7:3 (v/v). Este sistema foi escolhido para o monitoramento das reações de síntese enzimática do pentapeptídeo descritas na tabela 7,

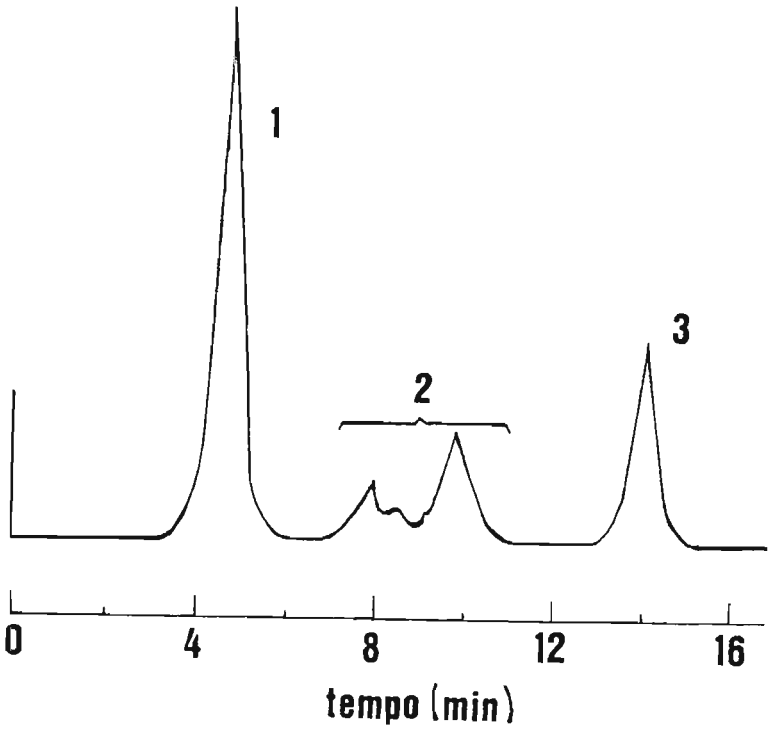


Figura 1. Perfil cromatográfico da mistura contendo Moz-Asn-OH (1), H-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2.TFA (2) e Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 (3). Condições de análise por HPLC: eluente = MeOH/H_2O, 7:3 (v/v), detecção = 254 nm, fluxo = 0,5 ml/min; sensibilidade = 0,2, registro = 0,1 mm/seg. Tempos de retenção: (1) 2,2 min; (2) 4,8 min; (3) 6,9 min.

Tabela 7. *Síntese de Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 usando termolisina*

Reação	Moz-Asn-OH ($.10^{-4}$ mol)	H-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2.TFA ($.10^{-4}$ mol)	NaAc, 0,2 M* pH 6 (ml)	AcOEt (ml)	Termolisina ($.10^{-7}$ mol)	Tempo (h)	Presença de produto por HPLC
A	2,5	2,6	2,50	3,75	1,1	48	-[f]
B	2,5	2,6	1,25	3,75	1,1	48	-[f]
C	2,5	2,5	2,50	7,50	1,1	48	+
D	2,5	2,5	5,00	5,00	1,1	48	+
E	2,5	2,5	0,45[a]	5,00	1,1	48	+
F	2,5	2,5	3,50[a]	-[b]	1,1	48	+
G	2,5	2,5	0,40	-[c]	1,1	48	+
H	2,5	2,5	1,90[a]	-[d]	1,1	48	+
I	2,5	2,5	1,00	9,00	1,1	48	+
J	2,5	2,5	-[a]	9,00	1,1	48	+
K	2,5	2,5	1,00	5,00	1,1	48	+
L	2,5	2,5	1,00	5,00	1,1	4,5	+
M	2,5	2,5	1,00	5,00	1,1	4,5	+
N	2,5	2,5	4,50	-[e]	1,1	24	+
O	2,5	2,5	4,50	-[e]	1,1	24	+
P	2,5	2,5	9,00	1,00	1,1	48	+
Q	2,5	2,5	7,50	2,50	1,1	24	+

[a] Foi utilizado tampão Tris/HCl, 0,2 M, pH 8. [b,c,d] Foram utilizados 0,75 ml de DMF e 1,2 ml de MeOH, 0,6 ml de THF, 3,8 ml de EtOH respectivamente. [e] Foram usados 2,0 e 4,0 ml de 1,4-butanodiol respectivamente. Todos as incubações foram feitas a 18 °C, sob agitação, sendo que o trifluroacetato do componente amínico foi neutralizado com n-metilmorfolina ou solução de NaOH 1 M. [f] Estas reações não foram analisadas por CCD. * A solução continha $Ca(Ac)_2$ $5,0 \times 10^{-2}$ M.

página 76. Nos casos em que foi detectada a presença de Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2, foram realizadas diversas injeções dos meios reacionais para a quantificação do mesmo através da curva-padrão feita com o peptídeo obtido na síntese descrita no ítem 3.1.23., página 43. Para todas as reações analisadas foram encontrados rendimentos de 1-2%.

A cromatografia bidimensional em camada delgada do precipitado C (P.F. = 193 - 200 °C) hidrolisado demonstrou a presença de cinco manchas de Rf correspondentes aos de Asp, Cys(S-Bzl), Pro, Leu e Gly, sendo as correspondentes a Asp, Leu e Gly mais intensas.

A análise do meio reacional K por CCD não demonstrou a presença da mancha correspondente a H-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2, mas revelou a de um composto de Rf superior ao de Moz-Asn-OH e inferior ao do pentapeptídeo desejado. A figura 2, página 78, mostra os perfis cromatográficos obtidos por HPLC deste meio e do precipitado nele formado após 48 horas de reação. Este precipitado apresentou as seguintes características:

P.F = 210-212 °C

CCD : Rf_D = 0,17; Rf_E = 0,26; Rf_F = 0,86; Rf_G = 0,86

HPLC: t_R = 3,5 min ($MeOH/H_2O$, 7:3 (v/v); 1,0 ml/min)

Análise de aminoácidos: Asp 1,05 ; Leu 1,04; Gly 1,02.

Análise elementar (%): Observado: C 54,28; N 6,99; H 14,87

O espectro de RM^1H obtido está mostrado na figura 3, página .

A análise por CCD e HPLC dos meios reacionais I,J,L e M demonstrou: 1. presença de duas manchas adicionais às de Rf correspondentes aos dos padrões Moz-Asn-OH, H-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2.TFA e Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 ; 2. presença de dois picos adicionais aos de tempo de retenção correspondentes à

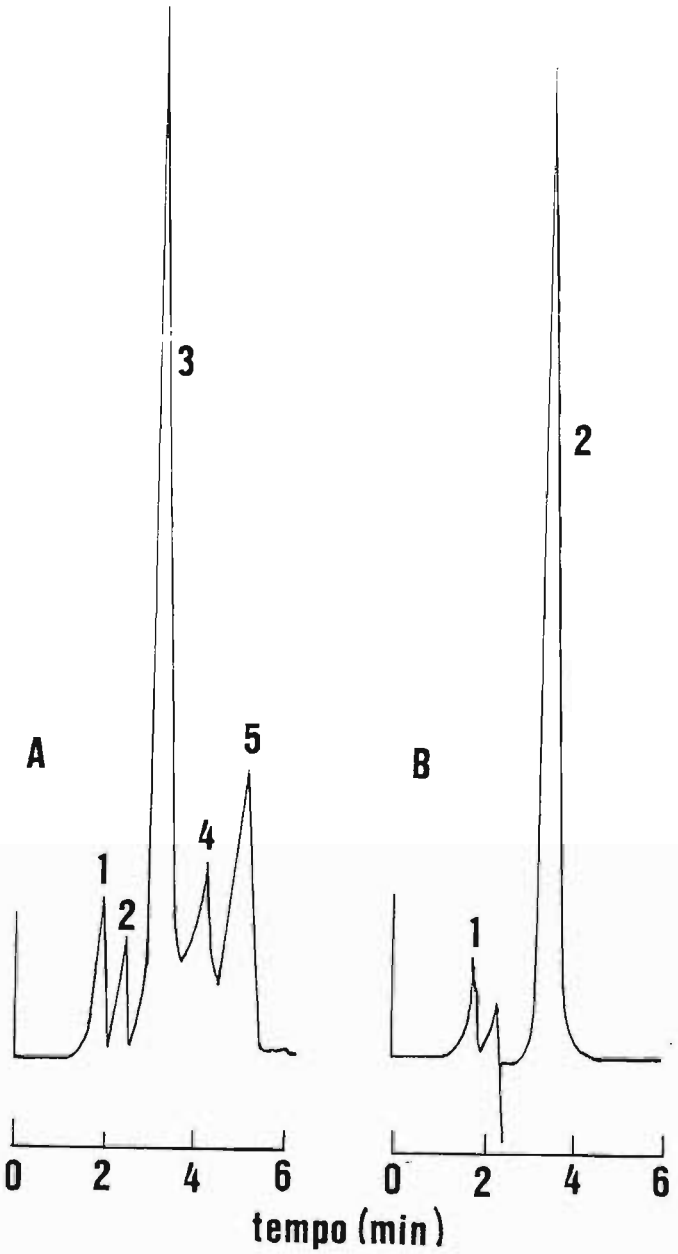


Figura 2. Perfil cromatográfico da mistura reacional (A) e do precipitado na síntese K (B) (tabela ~~3~~ 7, página ~~50~~ 76). Condições de análise por HPLC: vide ítem 4.1.4., página 64. Tempos de retenção: A1 = 1,9 min, A2 = 2,5 min, A3 = 3,3 min, A4 = 4,3 min, A5 = 5,2 min; B1 = 1,8 min, B2 = 3,5 min.

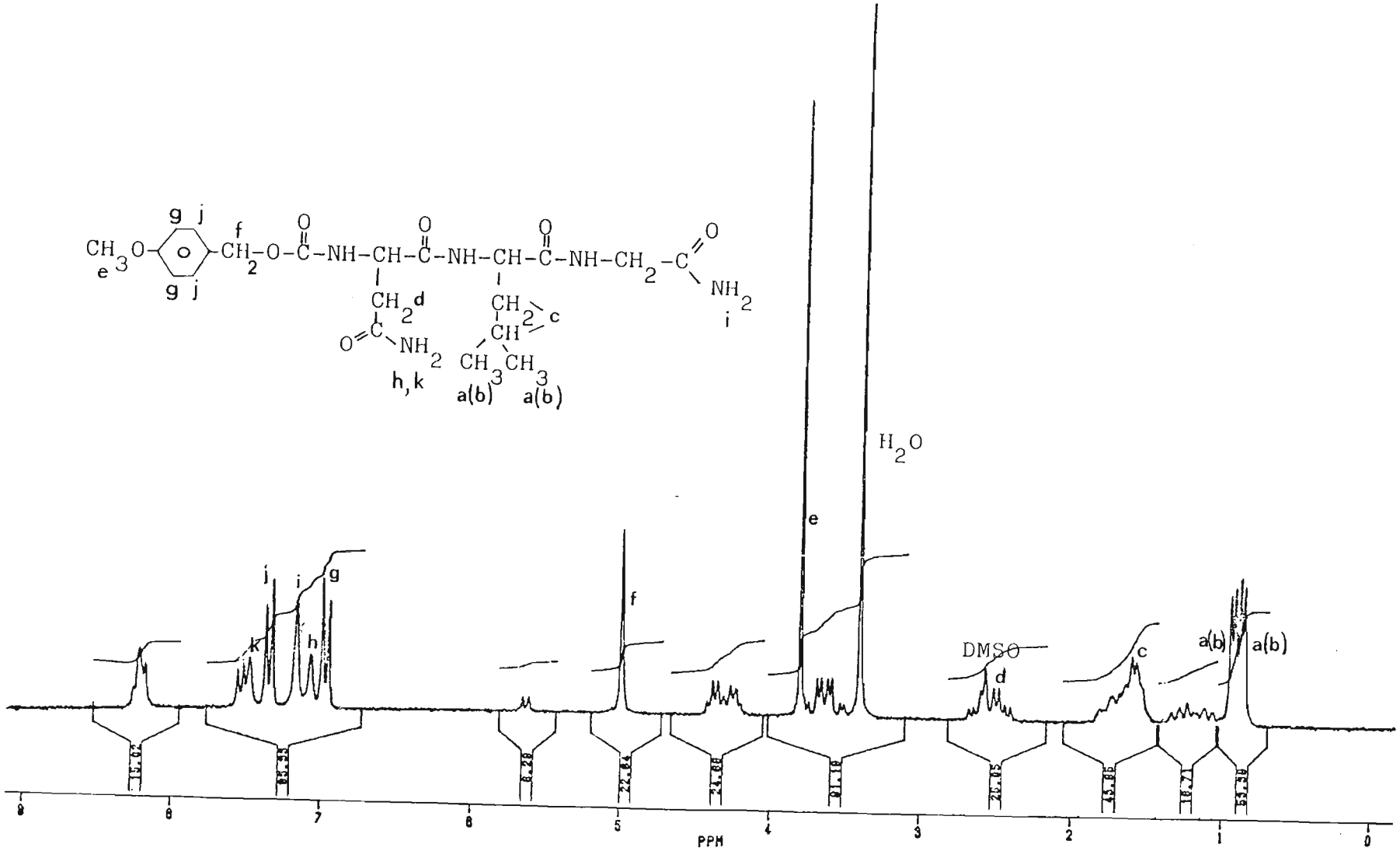


Figura 3. Espectro de RM ^{1}H do precipitado obtido na síntese K (tabela 3 , página) em DMSO-d_6 , 200 MHz.

Moz-Asn-OH e H-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly- NH_2. Já a análise por HPLC dos precipitados I,J,L e M forneceu os perfis cromatográficos mostrados na figura 4, página 81 .

Foram obtidas 30 e 60 mg dos precipitados L e M respectivamente (condições de síntese e isolamento descritas na tabela 8, página 82 e ítem 3.2.4., página 49).

2.4. Moz-Asn-Leu-Gly-OEt

Os rendimentos obtidos e as condições experimentais utilizadas no estudo da síntese de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt mediante catálise por termolisina estão descritos na tabela 8 , página 82. Os produtos obtidos na forma de precipitado, isolados e secos de acordo com o método descrito no ítem 3.2.1., página 46 , (1B-10B, sendo B = bruto) mostraram-se cromatograficamente puros em CCD e HPLC (eluente = metanol/ água, 7:3 (v/v), fluxo = 1,0 ml/min, detecção = 254 nm, sensibilidade = 0,2, registro = 0,1 mm/seg) e apresentaram os mesmos valores de Rf_D (0,22-0,26) e de t_R (4,8 min).

O tripeptídeo 3B apresentou as seguintes características:

P.F. = 179-183 °C

CCD: Rf_D = 0,24; Rf_E = 0,33; Rf_F = 0,68

Análise elementar (%): Calculado: C 55,86; N 11,34; H 6,94

Observado: C 55,71; N 11,68; H 6,88

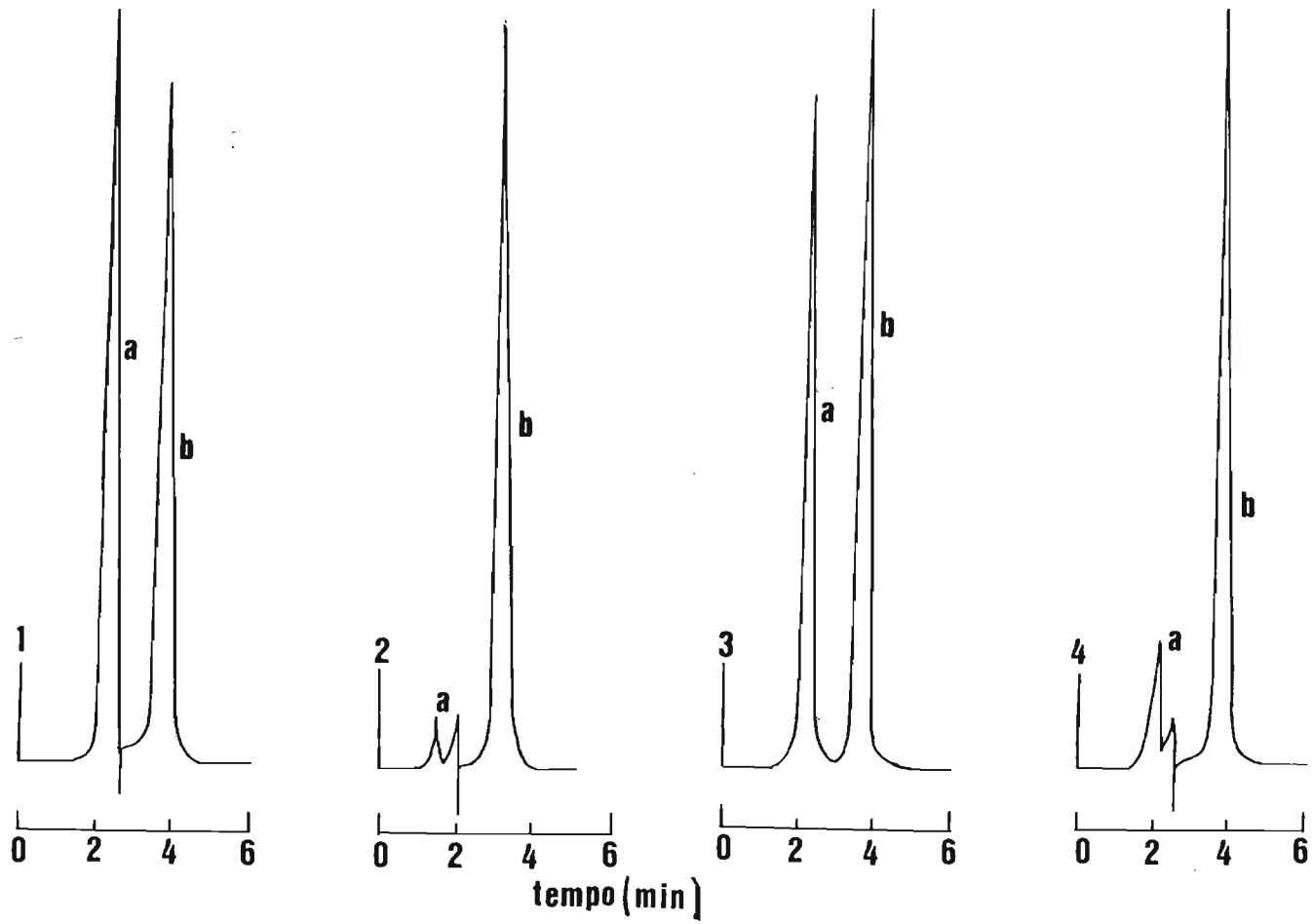
Análise de aminoácidos: Asp 0,97; Leu 1,02; Gly 1,01

α_D = 12,6 (DMF, 1%)

Quando analisado por espectrometria de massas e por RM^1H, tal composto apresentou:

E.M. = pico íon molecular = 494

RM^1H (400 MHz, DMSO-d_6, TMS)

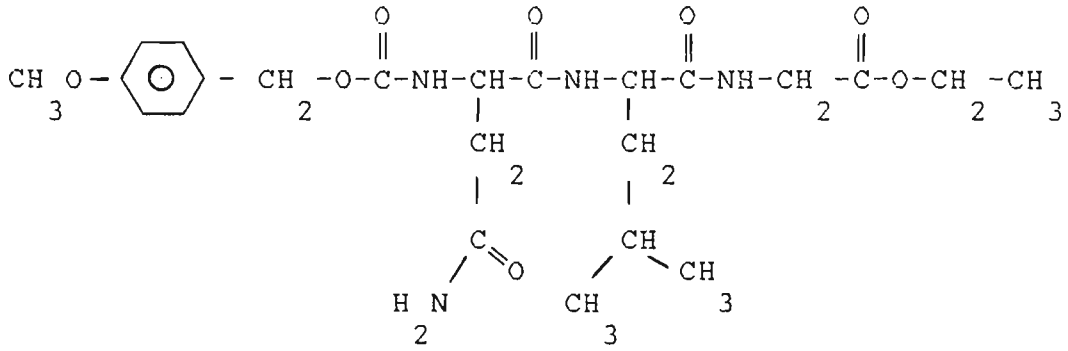


igura 4. Perfil cromatográfico de HPLC dos precipitados I (1), J (2), L (3), M (4) obtidos nas sínteses I,J,L e M tabela 3 , página). Tempos de retenção: 1a = 2.0 min, 1b = 3.6 min, 2a = 1.6 min, 2b = 3.0 min, 3a = 2.0 min, 3b = .6 min, 4a = 2.0 min, 4b = 3.7 min. Condições de análise por HPLC: vide ítem 4.1.4., página

Tabela 8. Síntese de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt mediante catálise por termolisina

Síntese (No.)	Moz-Asn-OH ($.10^{-3}$ mol)	H-Leu-Gly-OEt.TFA ($.10^{-3}$ mol)	NaAc, 0,2M, pH 6 (ml)[a]	Termolisina ($.10^{-7}$ mol)	Tempo (h)	Rendimento (%)
1	3,0	3,0	60	8,0	21	44
2	2,0	2,0	30	5,0	24	62
3	5,7	5,5	50	14,0	65	70
4	11,0	11,0	95	26,0	65	52
5	5,7	5,6	52	13,0	65	66
6	1,0	1,0	8	2,7	72	57
7	1,0	1,0	8[b]	2,7	72	55
8	3,0	3,0	30[c]	8,6	24	65
9	5,0	5,0	50[b]	14,2	64[d]	16
10	3,1	3,0	30[b]	8,6	24	19

[a] A solução continha $Ca(Ac)_2$ $5,0 \times 10^{-2}$ M. [b] A solução de NaAc não continha $Ca(Ac)_2$. [c] Foi utilizada uma solução de $Ca(Ac)_2$ 0,25 M. [d] Esta reação foi realizada a 48 °C. O componente amínico, que se encontrava na forma de trifluroacetato, foi neutralizado pela adição de quantidades equimolares de NaOH ao meio de reação. Todas as incubações foram feitas a 38 °C, sob agitação.



(ppm) (a): 0,82 (d, 3H) (h): 4,10 (q, 2H)

(b): 0,90 (d, 3H) (i): 4,95 (s, 2H)

(c): 1,19 (t, 3H) (j): 6,90 (d, 2H, J = 8,8 Hz)

(d): 1,48 (m, 2H) (k): 6,93 (d, 2H, J = 8,0 Hz)

(e): 1,63 (m, 1H) (l): 7,29 (d, 2H, J = 8,8 Hz)

(f): 2,40 (d, 2H) (m): 7,40 (m, 1H)

(g): 3,75 (s, 3H) (n): 8,30 (d, 1H)

(o): 8,35 (t, 1H)

Os espectros estão mostrados nas figuras 5 e 6, páginas 84 e 85 , respectivamente.

2.5. Z-Asn-Leu-Gly-OEt, Boc-Asn-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl, Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^{t}, Moz-Gln-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Ile-Gly-OEt e Moz-Asn-Leu-Ala-OEt.

A tabela 9, página 86 , descreve os rendimentos obtidos e as condições experimentais utilizadas na síntese destes tripeptídeos catalisada por termolisina. Após recristalização em etanol/ água, os mesmos se mostraram cromatograficamente puros e apresentaram os valores de $Rf_{B,D,E}$, tempo de retenção, ponto de fusão e os dados de análise elementar e de aminoácidos descritos na tabela 10, página 87 .

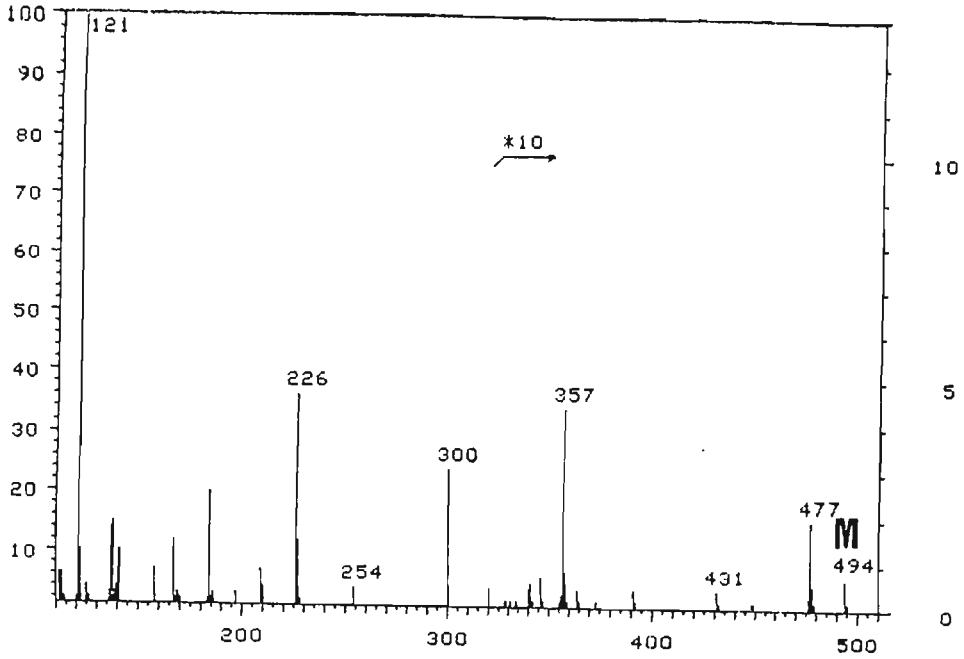


Figura 5. Espectro de massa de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto 3B (tabela 8 , página 82). M = pico do íon molecular.

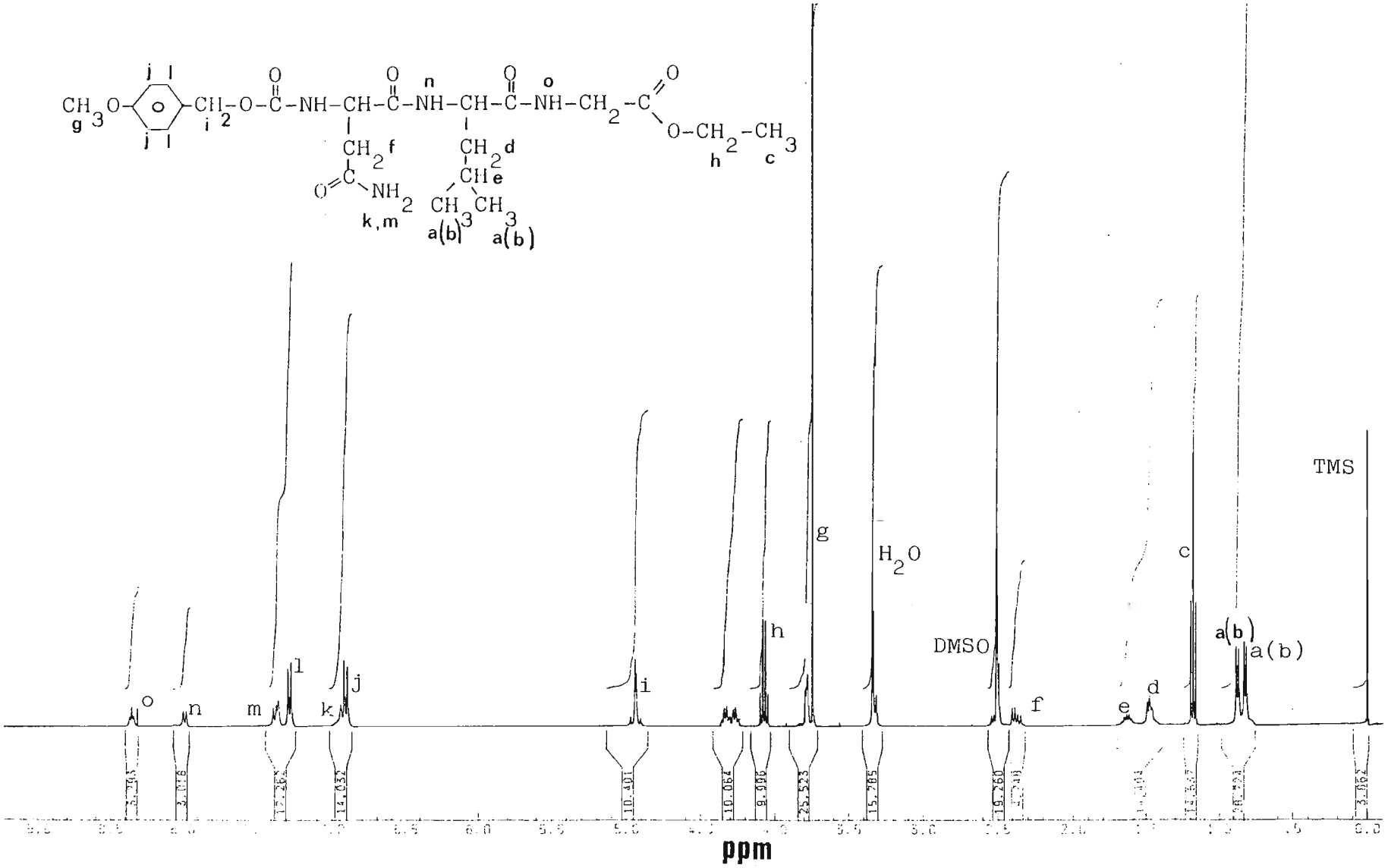


Figura 6. Espectro de RMH^1 de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto 3B (tabela 8 , página 82) em DMSO-d_6 , 400 MHz.

Tabela 9. Síntese enzimática de tripeptídeos mediante catálise por termolisina

Peptídeo	Componente carboxílico ($.10^{-4}$ mol)	Componente amínico ($.10^{-4}$ mol)	NaAc, 0,2M,[a] pH 6 (ml)	Termolisina ($.10^{-7}$ mol)	Tempo (h)	Rendimento (%)
Z-Asn↓Leu-Gly-OEt	50,0	55,0	25	13,3	24	65
Boc-Asn↓Leu-Gly-OEt	60,0	30,0	15[b]	8,0	65	25
Moz-Asn↓Leu-Gly-OBzl	25,0	27,0	30	8,0	62	50
Moz-Asn↓Leu-Gly-OBu^t	27,0	27,0	27	7,2	48	22
Moz-Gln↓Leu-Gly-OEt	10,0	10,0	10	2,7	24	80
Moz-Asn↓Ile-Gly-OEt	5,1	5,2	50	1,3	24	51
Moz-Asn↓Leu-Ala-OEt	10,0	11,0	55	2,7	24	67

↓indica a ligação peptídica formada nas condições descritas. [a] A solução continha $Ca(Ac)_2$ 0,05M. [b] Após 24 horas de reação foram adicionados 2g de $(NH_4)_2SO_4$ ao meio reacional. Os componentes amínicos que se encontravam na forma de trifluoroacetato foram neutralizados pela adição de quantidades equimolares de NaOH ao meio de reação. Todas as incubações foram feitas a 38 °C, sob agitação.

Tabela 10. Caracterização dos tripeptídeos sintetizados enzimaticamente

No.	Peptídeo	Rf obs. B	D	E	t_R [a]	Ponto de fusão °C	Análise Elementar Obs. C	H	N	Teor. C	H	N	Análise de aminoácidos
1	Z-Asn-Leu-Gly-OEt	0,22	0,33	0,68	5,2	198-200	56,68	7,07	12,27	56,89	6,94	12,06	Asp 0,98 Leu 1,01 Gly 1,01
2	Boc-Asn-Leu-Gly-OEt	0,21	0,30	0,66	5,0	171-174	47,79	7,45	10,97	53,01	7,96	13,0	Asp 1,01 Leu 1,00 Gly 0,99
3	Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl	0,24	0,45	0,75	5,3	202-204	60,70	6,49	10,01	60,42	6,52	10,07	Asp 0,96 Leu 1,05 Gly 0,99
4	Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^t	0,24	0,44	0,78	4,8	183-187	60,22	7,83	10,51	57,46	7,33	10,73	Asp 0,98 Leu 1,00 Gly 1,02
5	Moz-Gln-Leu-Gly-OEt	0,20	0,35	0,71	3,3	207-209	52,24	6,42	10,06	56,67	7,13	11,01	Glu 0,99 Leu 1,01 Gly 1,00
6	Moz-Asn-Leu-Ala-OEt	0,22	0,26	0,61	5,5	209-212	55,69	6,88	10,48	56,67	7,13	11,01	Asp 1,03 Leu 0,97 Ala 0,99
7	Moz-Asn-Ile-Gly-OEt	0,19	0,33	0,71	5,0	208-211	55,33	6,91	10,43	55,86	6,93	11,33	Asn 1,00 Ile 1,03 Gly 0,97

B,D e E referem-se aos sistemas de solventes utilzados para CCD. Os compostos cujos pontos de fusão esperados não estão mostrados, não foram encontrados na literatura. Todos eles foram recristalizados em EtOH/H_2O. [a] Condições experimentais: eluente: MeOH/H_2O, 7:3 (v/v), sensibilidade: 254 nm (1,3,4,5,6,7) e 260 nm (2), fluxo: 0,1 ml/min (1,2,6), 1,5 ml/min (3,4,5) e 2,0 ml/min (7), registro = 0,1 mm/seg.

3. Transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt em metanol.

3.1. Transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto.

3.1.1. Recristalização de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B em metanol/ água.

A figura 7, página 89, mostra o perfil cromatográfico em HPLC do tripeptídeo bruto 3B antes da recristalização (A) e após a recristalização no sistema metanol/ água (B). Os tempos de retenção observados foram A = 4,8 min, B1 = 4,5 min e B2 = 5,3 min, quando se utilizou como eluente o sistema metanol/ água, 7:3 (v/v) e fluxo de 1,0 ml/min.

3.1.2. Estudo das condições de separação por HPLC entre Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B e o produto obtido após sua recristalização em metanol/ água

O sistema eluente escolhido para ser utilizado nos estudos de transformação deste tripeptídeo bruto foi metanol/ água 7:3 (v/v), o qual se mostrou mais adequado à separação desejada dentre os vários testados (ítem 4.1.2., página 53).

3.1.3. Cinética de transformação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B dissolvido em metanol.

As porcentagens relativas de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt (X) e do produto de transformação do mesmo em metanol (Y) (calculadas de acordo com o método descrito no ítem 4.1.3., página 53), encontradas no estudo cinético realizado com o tripeptídeo

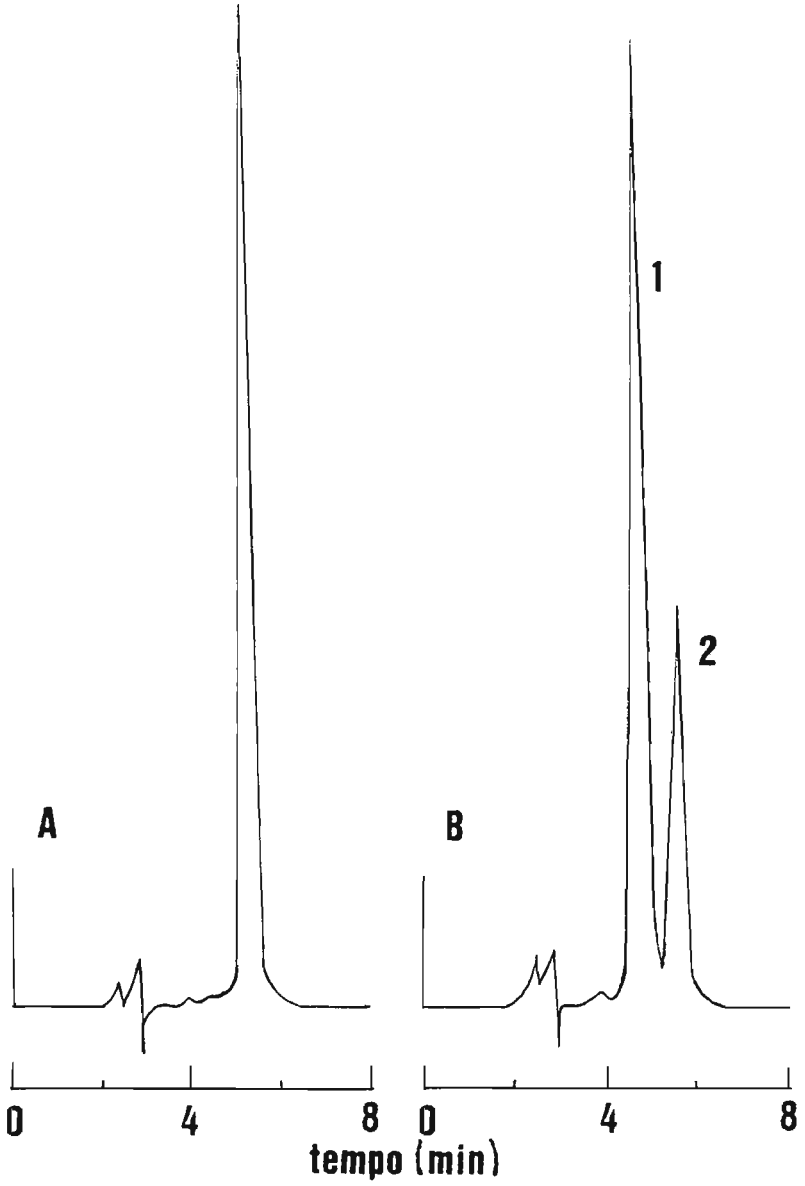


Fig. 7. Perfil cromatográfico de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B (A) e do produto obtido após transformação parcial em metanol (B). Tempos de retenção observados: A = 5,0 min, B1 = 4,5 min, B2 = 5,3 min. Condições de análise por HPLC: vide ítem 4.1.4., página . 3B refere-se ao Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto obtido na síntese 3 (tabela 8 , página 82).

bruto 3B estão expressas na tabela abaixo e figura 8 , página 91 .

Tabela 11. Cinética de transformação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B dissolvido em metanol.

Tempo (h)	Moz-Asn-Leu-Gly-OEt (%)	Produto de transformação (%)
0	100	0
1	77	23
2	66	34
3	68	32
4	52	48
5	48	52
6	44	56
7	42	58
8	39	61
24	18	82

3B refere-se ao Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto obtido na síntese 3 (tabela 8 , página 82). Condições experimentais: $6,0 \times 10^{-6}$ mol de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt, 1,0 ml de metanol, 28 °C. Condições de análise por HPLC: ver ítem 4.1.4., página 53 . As porcentagens de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt e do produto de transformação foram calculados como descrito no ítem 4.1.3., página 54 .

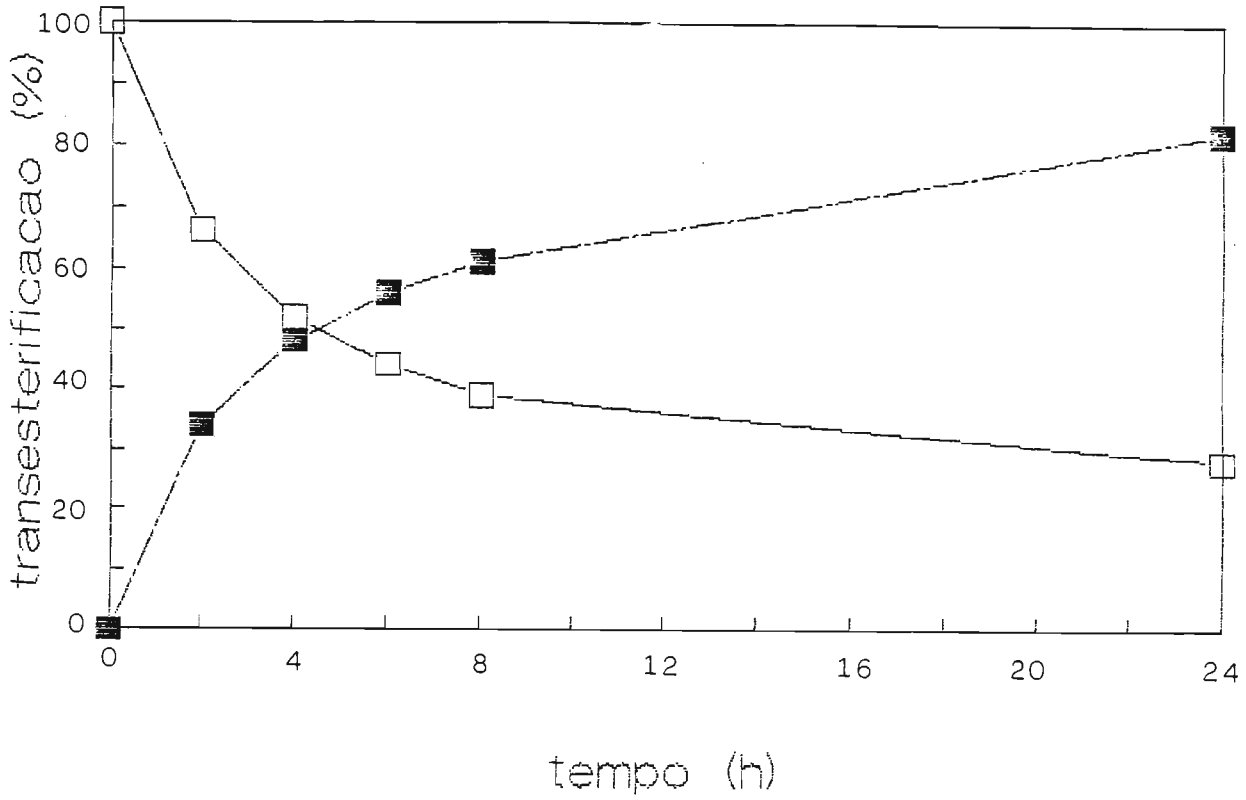


Figura 8. Cinética de transformação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B□ em metanol. Condições experimentais: 6,0 x 10^{-6} mol de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt, 1,0 ml de metanol; 28 °C. Condições de análise por HPLC: vide ítem 4.1.4., página 54 . As porcentagens de transesterificação foram calculadas como descrito no ítem 4.1.3., página 53 . 3B refere-se ao Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto obtido na síntese 3 (tabela 8 , página 82). ■: transformado.

3.1.4. Identificação do produto obtido na transformação total de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B dissolvido em metanol

O produto obtido na transformação total do tripeptídeo 3B em metanol (descrita no ítem 4.1.5., página 54) mostrou-se cromatograficamente puro e apresentou as seguintes características:

PF = 170-174 °C

CCD: Rf_B = 0,18; Rf_D = 0,30; Rf_E = 0,65

HPLC: t_R = 4,5 min ($MeOH/H_2O$, 7:3 (v/v), 1,0 ml/min)

Análise elementar (%) = Calculado: C 54,99; N 11,66; H 6,71

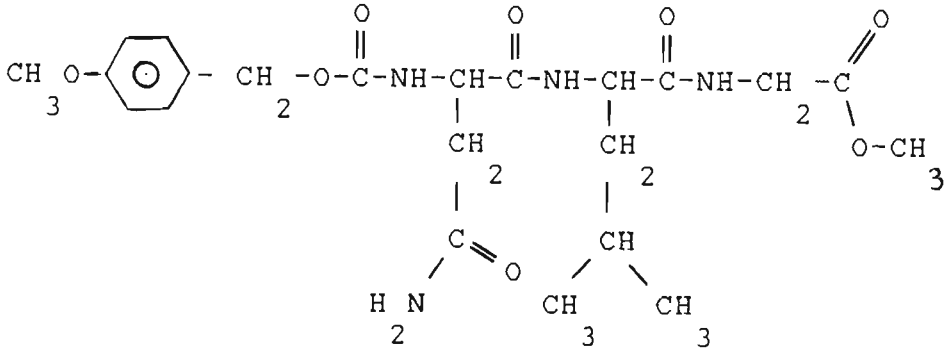
Observado: C 53,92; N 11,68; H 6,53

Análise de aminoácidos = Asp 1,02; Leu 0,99; Gly 0,99

α_D = 18,8 (DMF, 1%)

EM: pico íon molecular = 480

RM^1H (400 MHZ, DMSO-d_6 , TMS) =



(a): 0,83 (d, 3H)

(b): 0,88 (d, 3H)

(c): 1,48 (m, 2H)

(d): 1,63 (m, 1H)

(e): 2,35 (d, 2H)

(f): 3,63 (s, 3H)

(g): 3,75 (s, 3H)

(h): 3,80 (d, 2H)

(i): 4,95 (s, 2H)

(j): 6,90 (d, 2H, J = 8,8 Hz)

(k): 6,93 (s, 1 H)

(l): 7,30 (d, 2H, J = 8,0 Hz)

(m): 7,38 (1, m, 2H)

(n): 8,0 (d, 1H)

(o): 8,35 (t, 1H)

Os espectros estão mostrados nas figuras 9 e 10, páginas 94 e 95, respectivamente.

3.1.5. Cinética de transesterificação dos vários Moz-Asn-Leu-Gly-OEt brutos 3B, 4B, 5B, 6B e 7B

A tabela 12, página 96, mostra as porcentagens relativas de transesterificação em metanol dos Moz-Asn-Leu-Gly-OEt brutos 3B, 4B, 5B e 6B.

3.1.6. Cinética de transesterificação em metanol dos vários Moz-Asn-Leu-Gly-OEt brutos homogeneizados.

Os resultados comparativos da incubação em metanol dos Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B-10B homogeneizados (ítem 4.1.8., página 55) estão expressos na tabela 1~~3~~4, página 9~~7~~8.

3.1.7. Determinação do conteúdo de íons Ca(II) nos vários Moz-Asn-Leu-Gly-OEt.

A tabela 1~~4~~3, página 9~~8~~7, expressa as concentrações de Ca(II) nas diferentes amostragens dos tripeptídeos brutos 3B-7B determinados por absorção atômica. As mesmas foram preparadas de acordo com o descrito no ítem 2.11., página 30.

A figura 11, página 99, mostra o espectro de absorção obtido para diferentes amostras dos peptídeos brutos 5B, 7B e 8B. As concentrações de Ca(II) encontrada, para cada um deles estão expressas na mesma figura.

3.1.8. Estudo da influência da temperatura no processo de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B-homogeneizado.

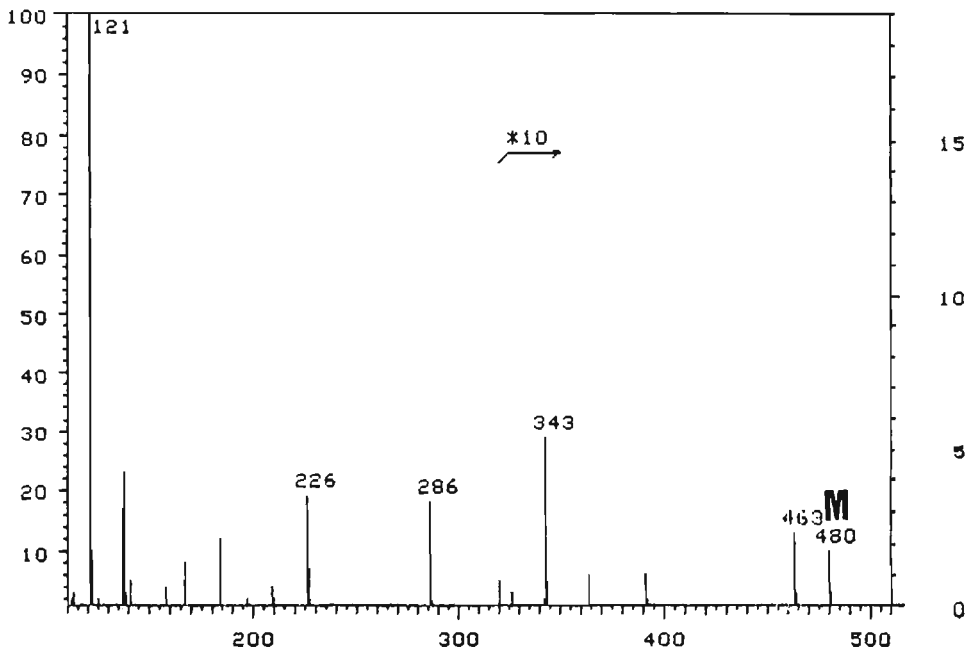


Figura 9. Espectro de massas do produto obtido na transformação total de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B (tabela 8 , página 82) em metanol. M = pico do íon molecular.

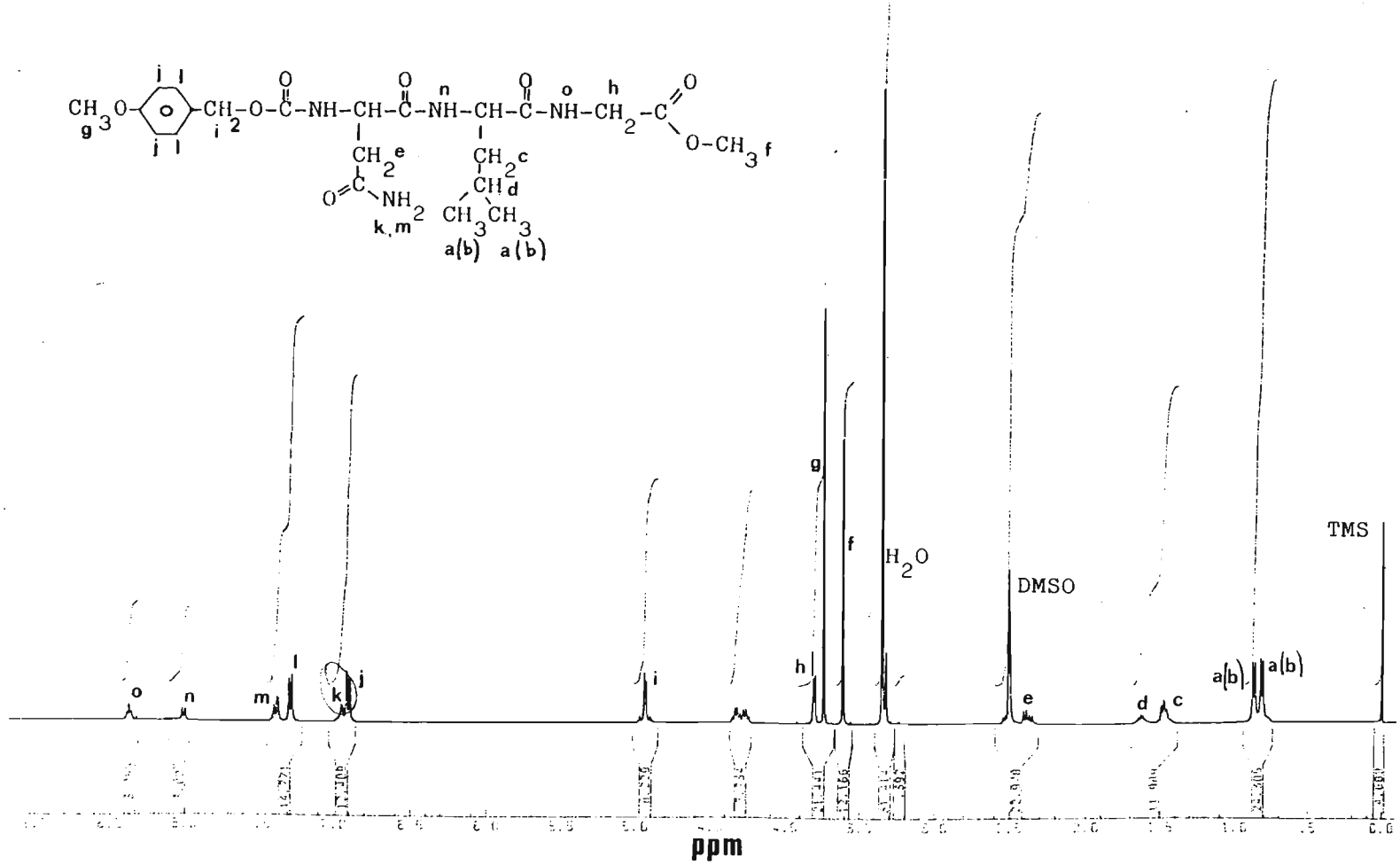


Figura 10. Espectro de RMH^1 em $DMSO-d_6$ do produto obtido na transformação total de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B em metanol, 400 MHz. 3B refere-se ao Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto obtido na síntese 3 (tabela 8, página 82).

Tabela 12. Transesterificação dos Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B, 4B, 5B, 6B e 7B em metanol

	Transesterificação (%)				
TEMPO (h)	3B	4B	5B	6B	7B
0	0	0	0	0	0
2	34	9	28	0	0
4	48	14	45	0	0
6	56	19	55	0	0
8	61	22	62	0	0
24	82	36	82	2	0
48	-	44	-	3	0

3B, 4B, 5B, 6B e 7B referem-se aos Moz-Asn-Leu-Gly-OEt brutos obtidos nas sínteses 3,4,5,6 e 7 (tabela 8 , página 82). Condições experimentais: 6,1 x 10^{-6} mol de peptídeo, 1 ml de metanol, 38 ^{o}C. Condições de análise por HPLC: vide ítem 4.1.4., página 54 . As porcentagens de transesterificação foram calculadas como descrito no ítem 4.1.3., página 53.

Tabela 13. Determinação da concentração de íons Ca(II) nos Moz-Asn-Leu-Gly-OEt brutos 3B, 4B, 5B, 6B e 7B

	Quantidade (ug CaII/mg peptídeo)									
Amostras	1[a]	2[b]	3[c]	4[d]	5[e]	6[f]	7[g] 1	7[g] 2	8[h] 1	8[h] 2
3B	3,4	11	0,6	0,03	0	0	-	-	21,99	-
4B	2,7	38	0,6	0,03	-	-	0,1	0,03	1,84	2,54
5B	4,1	32	0,6	0,03	-	-	0	0,1	1,44	2,02
6B	-	-	0,3	0,08	-	-	0,08	0,04	3,24	0,88
7B	-	-	0,1	0	-	0	0	-	5,62	-

[a,b,c,e] As amostras foram dissolvidas em DMF. [d,f] A amostra foi dissolvida em MeOH. [g] Foi utilizada a mistura MeOH/HCl 6N para a dissolução das amostras (5 mg/ 4,6 ml MeOH + 0,4 ml HCl 6N). [h] A amostra foi hidrolisada com HCL 6N e o hidrolisado dissolvido em água deionizada. 1 e 2 referem-se aos valores encontrados para duas determinações diferentes realizadas. 3B, 4B, 5B, 6B e 7B referem-se aos Moz-Asn-Leu-Gly-OEt brutos obtidos nas sínteses 3,4,5,6, e 7 (tabela 8 , página 82).

Tabela 14. Transesterificação em metanol dos vários Moz-Asn-Leu-Gly-OEt homogeneizados

Tempo	Transesterificação (%)							
(h)	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	4	2	16	0	0	27	2	2
4	7	3	32	0	0	46	4	3
6	11	4	40	1	0	57	6	4
8	14	5	46	2	0	64	7	5
24	36	14	79	2	0	89	17	12
48	64	29	89	6	0	93	28	19

3B, 4B, 5B, 6B, 7B, 8B, 9B e 10B referem-se aos Moz-Asn-Leu-Gly-OEt brutos obtidos nas sínteses 3,4,5,6,7,8,9 e 10 (tabela 8, página 82). Condições experimentais: $6,1 \times 10^{-6}$ mol (3 mg) de peptídeo, 1 ml de metanol, 38 °C. Condições de análise por HPLC: vide ítem 4.1.4., página 54. As porcentagens de transesterificação foram calculadas como descrito no ítem 4.1.3., página 53.

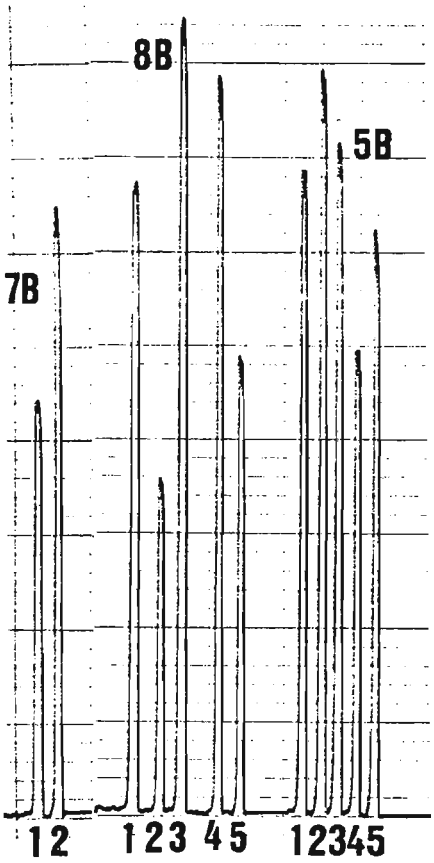


Figura 11. Determinação da porcentagem de íons Ca(II) presente em diferentes amostragens dos peptídeos brutos 5B,7B e 8B. 5B: 5= 0,0735%, 4 = 0,0501%, 3 = 0,0653%, 2 = 0,121%, 1 = 0,0635%; 7B: 2 = 0,935%, 1 = 0,130%; 8B: 5 = 0,0864%, 4 = 0,386%, 3 = 0,165%, 2 = 0,131%, 1 = 0,308%. Estas porcentagens foram determinadas por comparação à padrões cujas concentrações de Ca(II) são conhecidas. 5B,7B e 8B referem-se aos Moz-Asn-Leu-Gly-OEt brutos obtidos nas síntese 5,7 e 8 (tabela 8 , página 82).

A figura 12, página 101, mostra os resultados obtidos neste estudo, o qual foi realizado de acordo com o método descrito no ítem 4.1.9., página 56.

3.1.9. Estudo do efeito da diluição de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B - homogeneizado no processo de sua transesterificação

Os resultados encontrados neste estudo realizado de acordo com o método descrito no ítem 4.1.10., página 56, estão mostrados na figura 13, página 102. O efeito da concentração de peptídeo sobre a velocidade de sua transesterificação está mostrado na figura 14, página 103.

3.1.10. Transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B-homogeneizado na presença de o-fenantrolina.

Os resultados obtidos neste estudo realizado de acordo com o método descrito no ítem 4.1.11., página 57, foram os seguintes:

a- A CCD de A e B realizada nos tempos 0 e 48 horas de incubação demonstraram a presença de manchas de Rf_D correspondentes à Moz-Asn-Leu-Gly-OEt e Moz-Asn-Leu-Gly-OMe.

b- A análise por densitometria das CCD realizadas forneceu as porcentagens relativas de transesterificação de ~~46~~ 67 e ~~33~~ 54% para as incubações de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt em soluções metanólicas de o-fenantrolina e em metanol respectivamente. (figura 15, página 104.

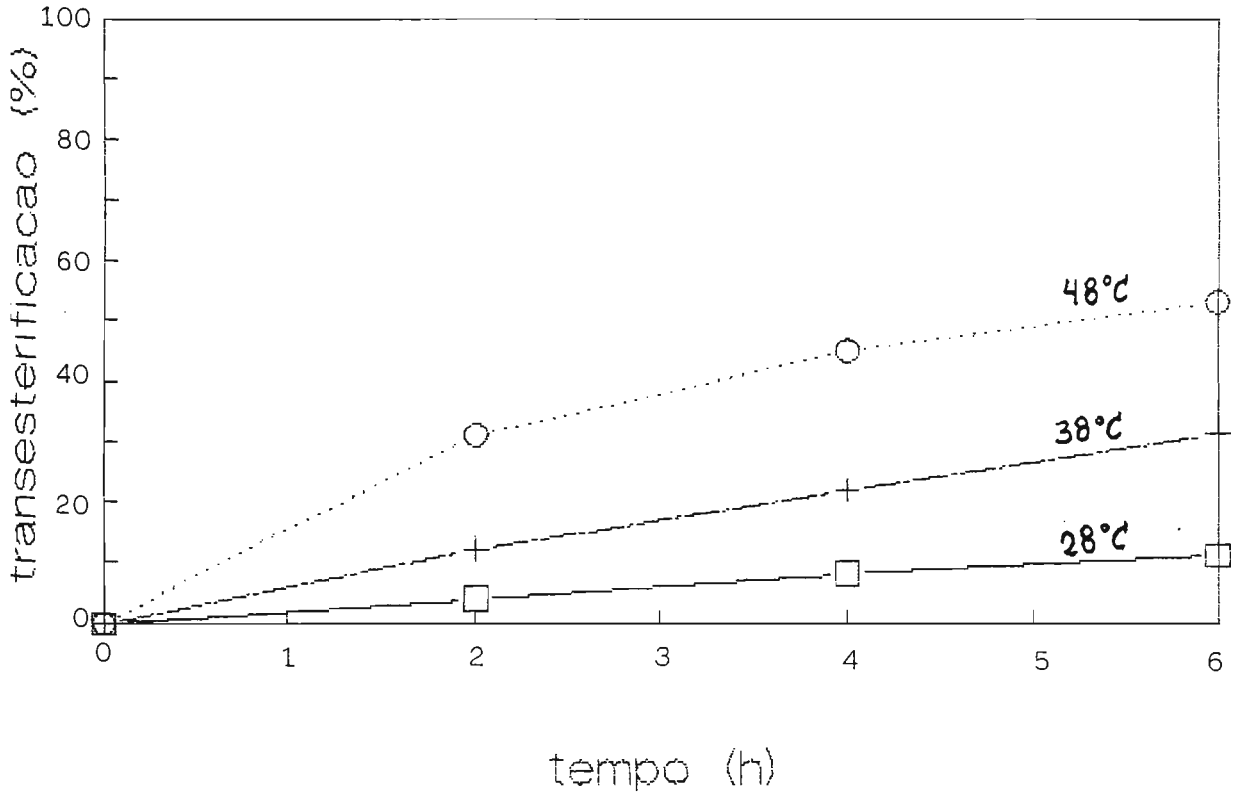


Figura 12. Cinética de transesterificação em metanol de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto 5B-homogeneizado em diferentes temperaturas. Condições experimentais: 6,0 x 10^{-6} mol (3,0 mg) de peptídeo, 1 ml de metanol. Condições de análise por HPLC: vide ítem 4.1.4., página 54 . As porcentagens de transesterificação foram calculadas como descrito no ítem 4.1.3., página 53 . 5B refere-se ao Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto obtido na síntese 5 (tabela 8 , página 82).

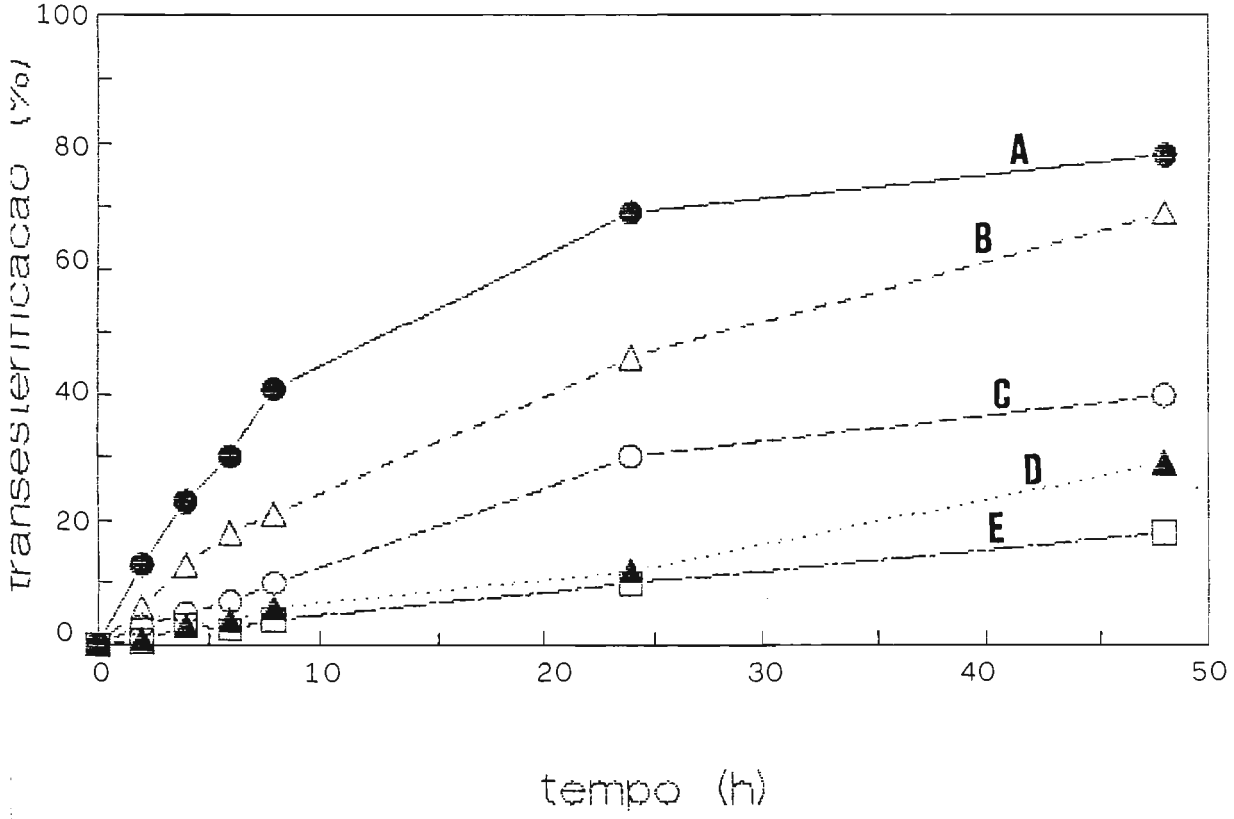


Figura 13. Cinética de transesterificação em metanol de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B - homogeneizado em diferentes concentrações. Condições experimentais: ítem 4.1.10., página 56 . Condições de análise por HPLC: vide ítem 4.1.4., página 54 . As porcentagens de transesterificação foram calculadas como descrito no ítem 4.1.3., página 53. 5B refere-se à Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto obtido na síntese 5 (tabela 8 , página 82).

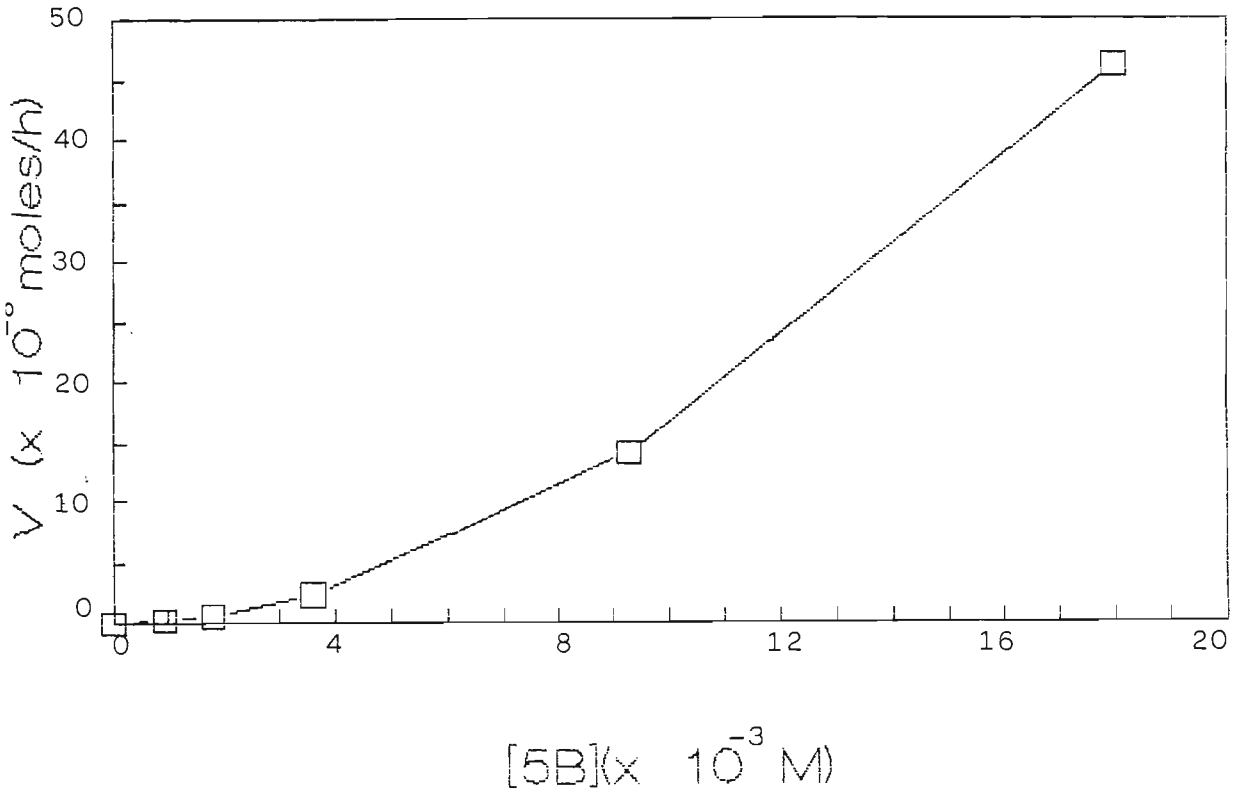


Figura 14. Efeito da concentração de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B-homogeneizado sobre a velocidade de sua transesterificação em metanol. Condições experimentais: ítem 4.1.4., página 54 . Condições de análise por HPLC: vide ítem 4.1.4., página 54 . As velocidades de transesterificação foram calculadas a partir das porcentagens de transesterificação obtidas em 6 horas de reação. 5B refere-se à Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto obtido na síntese 5 (tabela 8 , página 82).

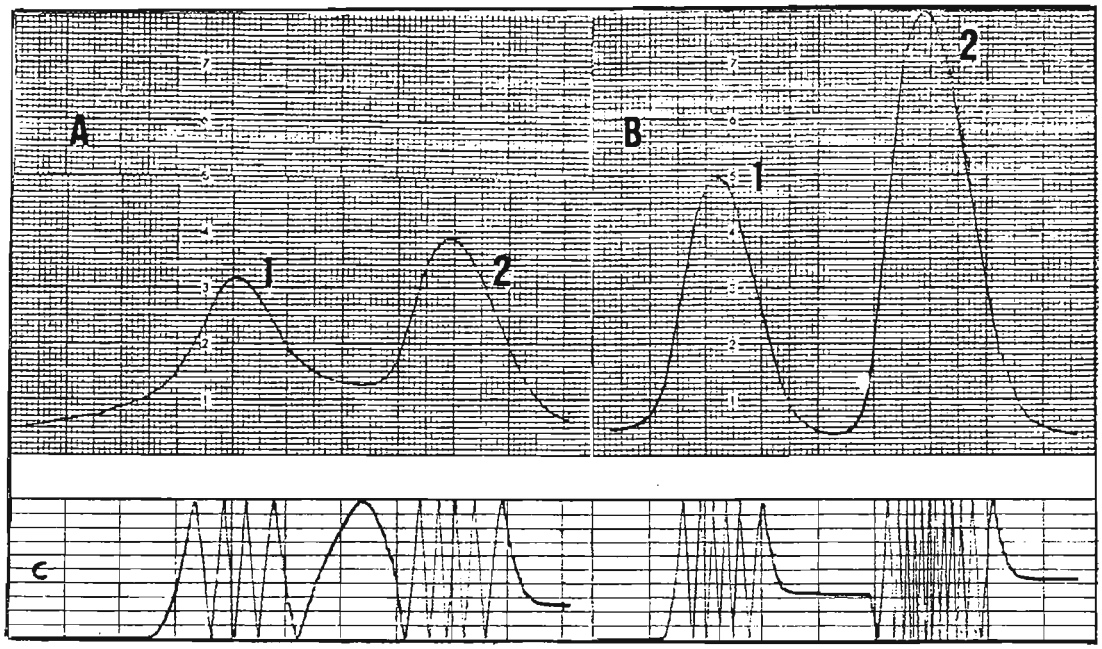


Figura 15. Perfil obtido por densitometria da transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B-homogeneizado em metanol na ausência (A) e presença de o-fenantrolina (B). 1 = Moz-Asn-Leu-Gly-OEt, 2 = Moz-Asn-Leu-Gly-OMe. Condições experimentais: $6,1 \times 10^{-6}$ mol (3 mg) de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt, 1 ml de metanol (A) ou solução metanólica de o-fenantrolina 1×10^{-3} M (B), 38 °C. As porcentagens de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt e Moz-Asn-Leu-Gly-OMe referem-se às porcentagens relativas calculadas através da integração dos picos (c): 2A = 54% e 2B = 64%

3.1.11. Transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B- homogeneizado na presença de EDTA.

As incubações do tripeptídeo em metanol na ausência e presença de EDTA, realizadas conforme descrito no ítem 4.1.12., página 57 e analisadas por HPLC, forneceram os valores de porcentagens relativas de transesterificação descritos na tabela abaixo:

Tabela 15. Transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B- homogeneizado na presença de EDTA

TEMPO DE REAÇÃO (h)	TRANSESTERIFICAÇÃO (%)	
	MeOH [a]	MeOH + EDTA [b]
0	0	0
4	15	0
8	24	0
24	39	0
48	48	0

5B refere-se ao Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto obtido na síntese 5 (tabela 8 , página 82). Condições experimentais: 6,1 x 10^{-6} mol de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B, 0,7 ml de metanol e 0,3 ml de água deionizada (a) ou 0,3 ml de solução aquosa de EDTA 4,0 x 10^{-2} M (b), 38 ^{o}C. Condições de análise por HPLC: vide ítem 4.1.4., página 54. As porcentagens de transesterificação foram calculadas como descrito no ítem 4.1.3., página 53.

No caso em que o EDTA estava presente no meio reacional foi observado o aparecimento de um precipitado branco após 8 horas de reação.

3.1.12. Influência da concentração de EDTA na transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B homogeneizado

A figura 16, página 107, mostra as porcentagens relativas de transesterificação observadas para as misturas reacionais A, B, C e D nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas de reação (ítem 4.1.13., página 58).

A influência da concentração de EDTA na velocidade de reação está mostrada na figura 17, página 108 .

3.2. Transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt-recristalizado.

3.2.1. Caracterização de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt- recristalizado 3R.

O peptídeo 3R obtido após recristalização de 3B no sistema de solvente etanol/ água, apresentou as seguintes características:

PF = 193-196 ^{o}C

HPLC: t_R = 4.8 min (MeOH/H_2O, 7:3 (v/v); 1,0 ml/min)

CCD: Rf_B = 0,22; Rf_D = 0,51; Rf_E = 0,71

Análise elementar: Calculado: C 55,86; N 11,34; H 6,94

Observado: C 55,45; N 10,73; H 7,02

α_D = (DMF, 1%)

$RM\ ^1H$ (200 MHz, DMSO-d_6 , TMS):

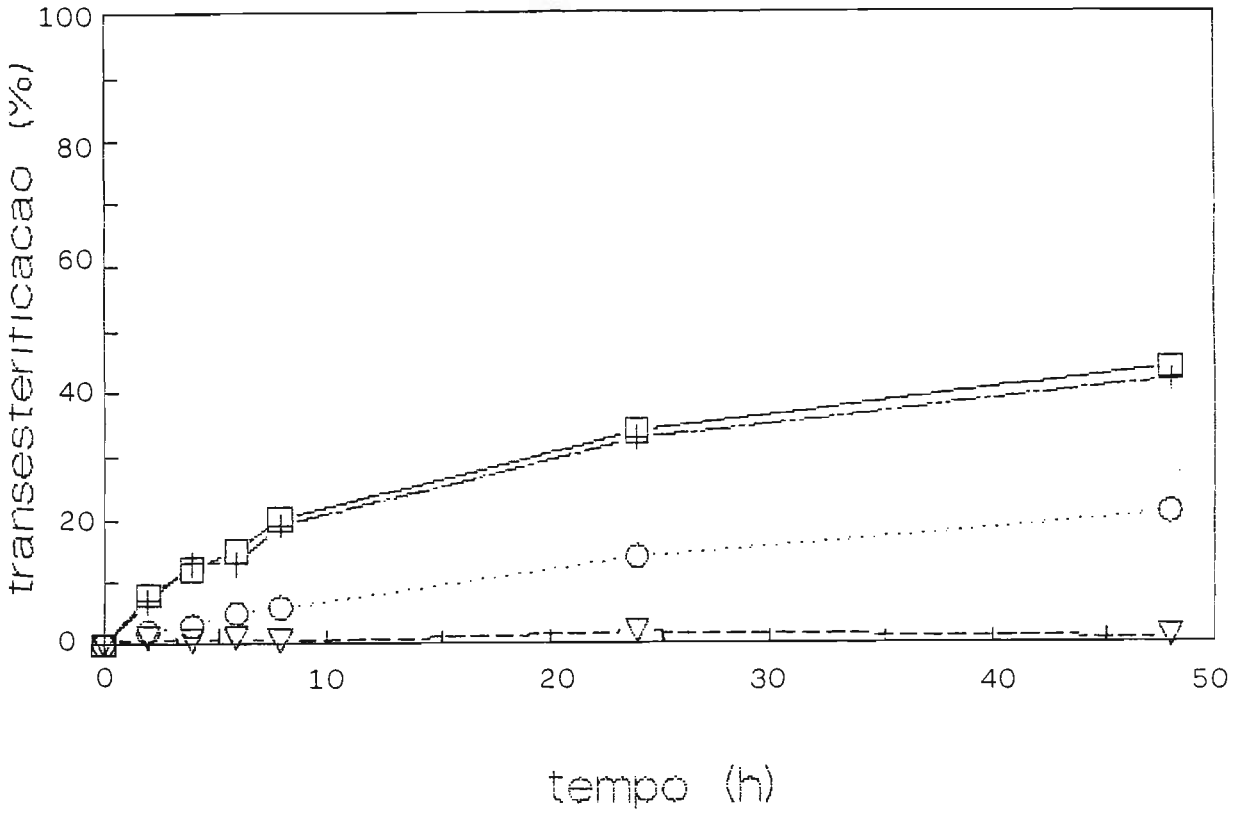


Figura 16. Cinética de transesterificação em metanol de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B - homogeneizado na presença de EDTA. Condições experimentais: 6,1 x 10^{-6} mol (3,0 mg) de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt; 0,7 ml de metanol e (□) 0,3 ml de água, (+) 0,28 ml de água e 15 ul de EDTA 4 x 10^{-3} M, (O) 0,15 ml de água e 0,15 ml de EDTA 4,0x 10^{-3} M, (▽) 0,3 ml de EDTA 4,0 x 10^{-3} M; 38 ^{o}C. Condições de análise: vide ítem 4.1.4., página 54 . As porcentagens de transesterificação foram calculadas como descrito no ítem 4.1.3., página 53. 5B refere-se ao Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto obtido na síntese 5 (tabela 8 , página 82).

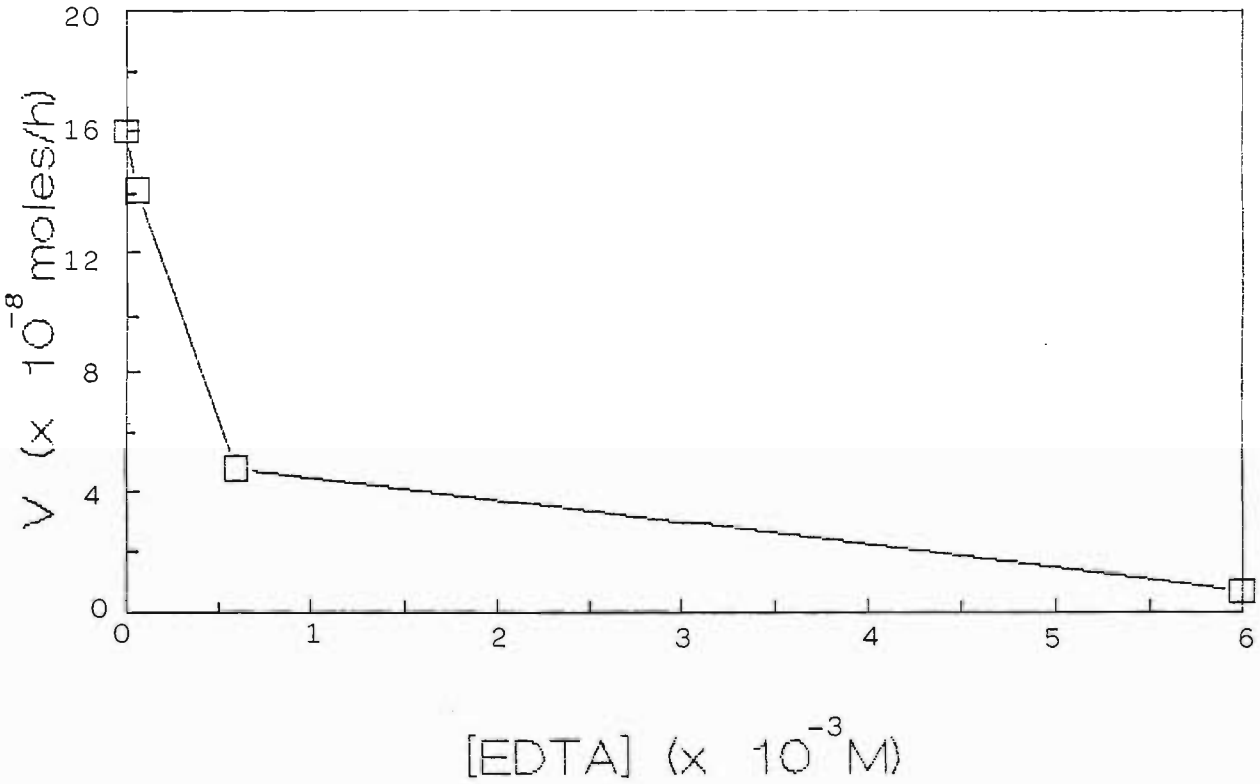
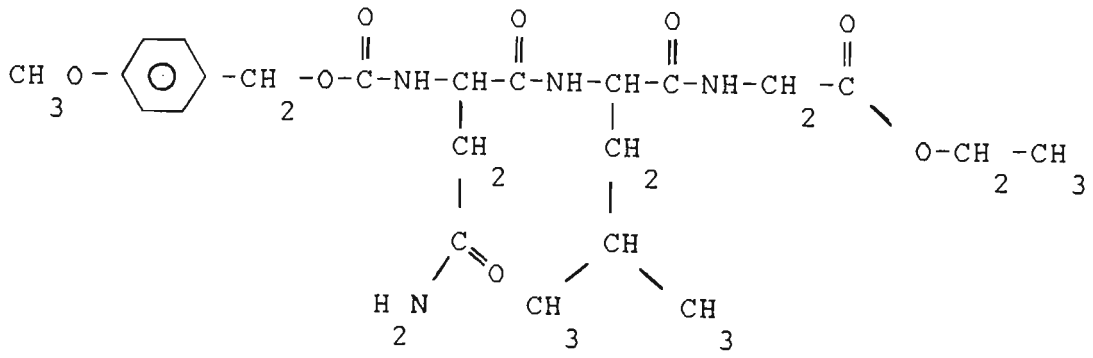


Figura 17. Influência da concentração de EDTA na velocidade de transesterificação em metanol de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B-homogeneizado. Condições experimentais: vide figura anterior, página 107. Condições de análise por HPLC: vide ítem 4.1.4., página 54. As velocidades foram calculadas a partir das porcentagens de transesterificação encontradas em 6 horas de reação.



(a): 0,82 (d, 3H)	(h): 3,77 (d, 2H)
(b): 0,87 (d, 3H)	(i): 4,07 (q, 2H)
(c): 1,18 (t, 3H)	(j): 4,94 (s, 2H)
(d): 1,48 (m, 2H)	(k): 6,94 (d, 2H, J = 8,8 Hz)
(e): 1,62 (m, 1H)	(l): 7,38 (d, 2H, J = 8,8 Hz)
(f): 2,38 (d, 2H)	(m): 7,31 (s, 1H)
(g): 3,72 (s, 3H)	(n): 8,00 (d, 1H)
	(o): 8,30 (t, 1H)

O espectro obtido está mostrado na figura 18, página 110.

Os peptídeos 4R, 5R e 10R, obtidos após a recristalização de 4B, 5B e 10R em etanol/ água, apresentaram características idênticas às acima descritas para 3R.

3.2.2. Cinética de transesterificação em metanol de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt-recristalizado

Os peptídeos 3R, 4R, 5R e 10R não sofreram transesterificação quando incubados em metanol nas condições descritas no ítem 4.2.2., página 59 .

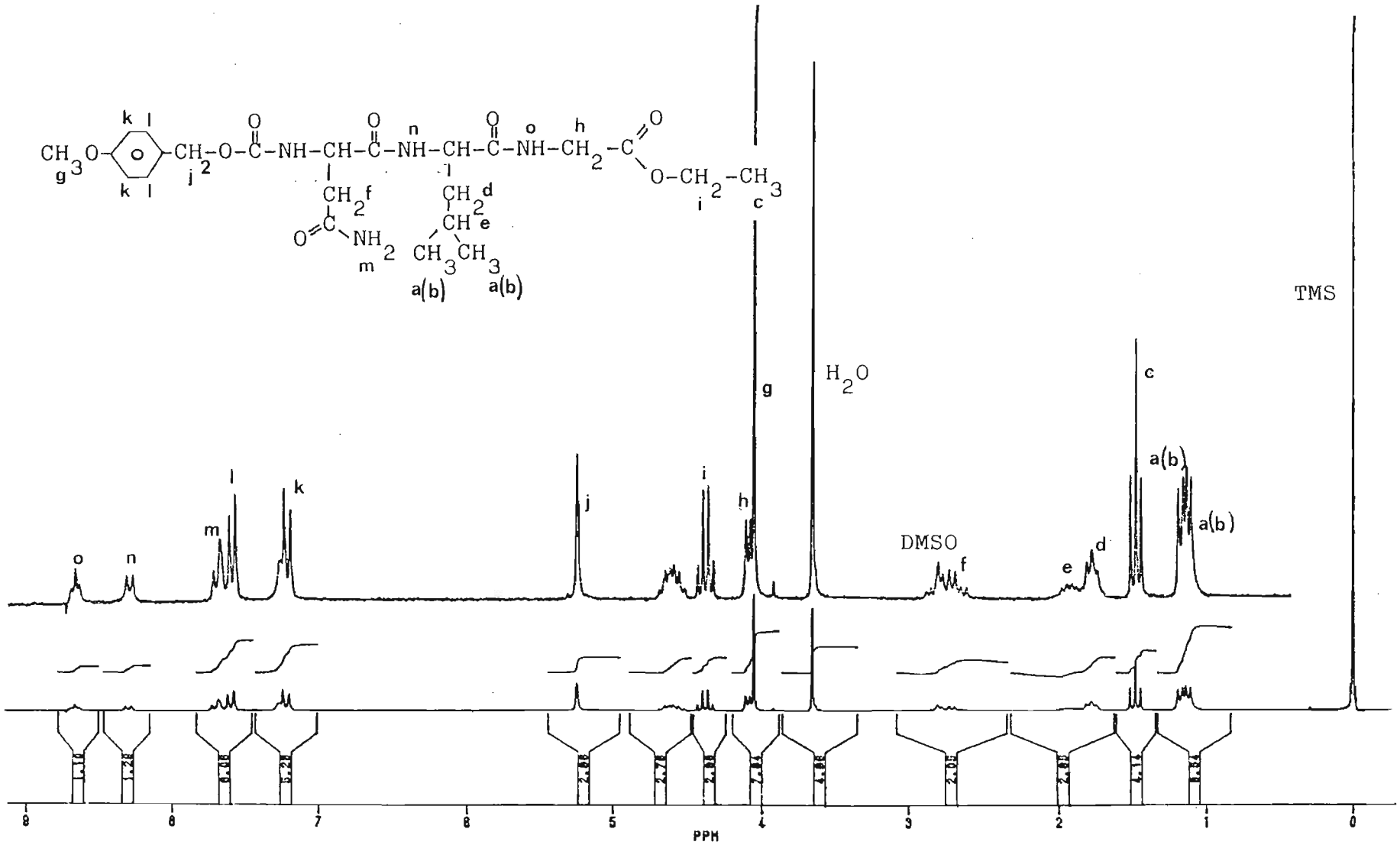


Figura 18. Espectro de RM^{1}H de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3R em DMSO-d_6, 200MHz. 3R refere-se ao Moz-Asn-Leu-Gly-OEt recristalizado em EtOH/H_2O

3.2.3. Cinética de transesterificação em metanol de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B e 10R na presença de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B e 8B.

Os resultados obtidos no estudo comparativo da transesterificação de 5B ou 8B em metanol, de 7B e 10R em soluções metanólicas de 5B e de 8B realizado como descrito no ítem 4.2.3., página 59 , estão expressos na tabela 16 , página 112 .

As figuras 19 e 20, páginas 113 e 114, mostram os resultados da cinética de transesterificação de 7B na presença de diferentes concentrações de 5B e a influência da concentração do peptídeo 5B na velocidade de transesterificação de 7B em metanol respectivamente.

3.2.4. Cinética de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B em soluções metanólicas de diferentes concentrações de acetato de cálcio e caracterização do produto obtido nestas reações.

A figura 21, página 115, expressa os resultados da cinética de transesterificação do tripeptídeo encontradas no estudo realizado de acordo com o método descrito no ítem 4.2.4., página 60 . O produto obtido na incubação F apresentou as seguites características após recristalização em etanol/ água:

PF = 199-201 ^{o}C

HPLC: t_R = 4,2 min ($MeOH/H_2O$, 7:3 (v/v), 1,0 ml/min)

CCD: Rf_B = 0,17; Rf_D = 0,40; Rf_E = 0,67

Análise elementar: Calculado: C 54,99; N 11,66; H 6,71

Observado: C 51,08; N 10,56; H 6,20

Tabela 16. Transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B e 10R na presença de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B e 8B.

Tempo (h)	7B[a]	10R[a]	5B[a]	8B[a]	7B + 5B[b]	10R + 5B[b]	10R + 8B[b]
0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	16	22	5	7	14
4	0	0	32	36	11	11	23
6	0	0	40	45	16	14	29
8	0	0	46	51	21	20	35
24	0	0	79	77	50	44	64
48	0	0	89	87	73	60	81

5B, 7B e 8B referem-se aos Moz-Asn-Leu-Gly-OEt brutos obtidos nas sínteses 5,7,8 (tabela 8 , página 82). 10R refere-se a Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 10B recristalizado em EtOH/H_2O. Condições experimentais: [a] $6,0 \times 10^{-6}$ mol (3,0 mg) de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto, 1 ml de metanol, 38 °C. [b] $3,0 \times 10^{-6}$ mol (1,5 mg) de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B ou 10R, $3,0 \times 10^{-6}$ mol (1,5 mg) de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B ou 8B, 1 ml de metanol, 38 °C. Condições de análise por HPLC: vide ítem 4.1.4., página 54 . As porcentagens de transesterificação foram calculadas como descrito no ítem 4.1.3., página 53. Para 5B e 8B foram usadas as médias das porcentagens obtidas em duas incubações simultâneas em metanol.

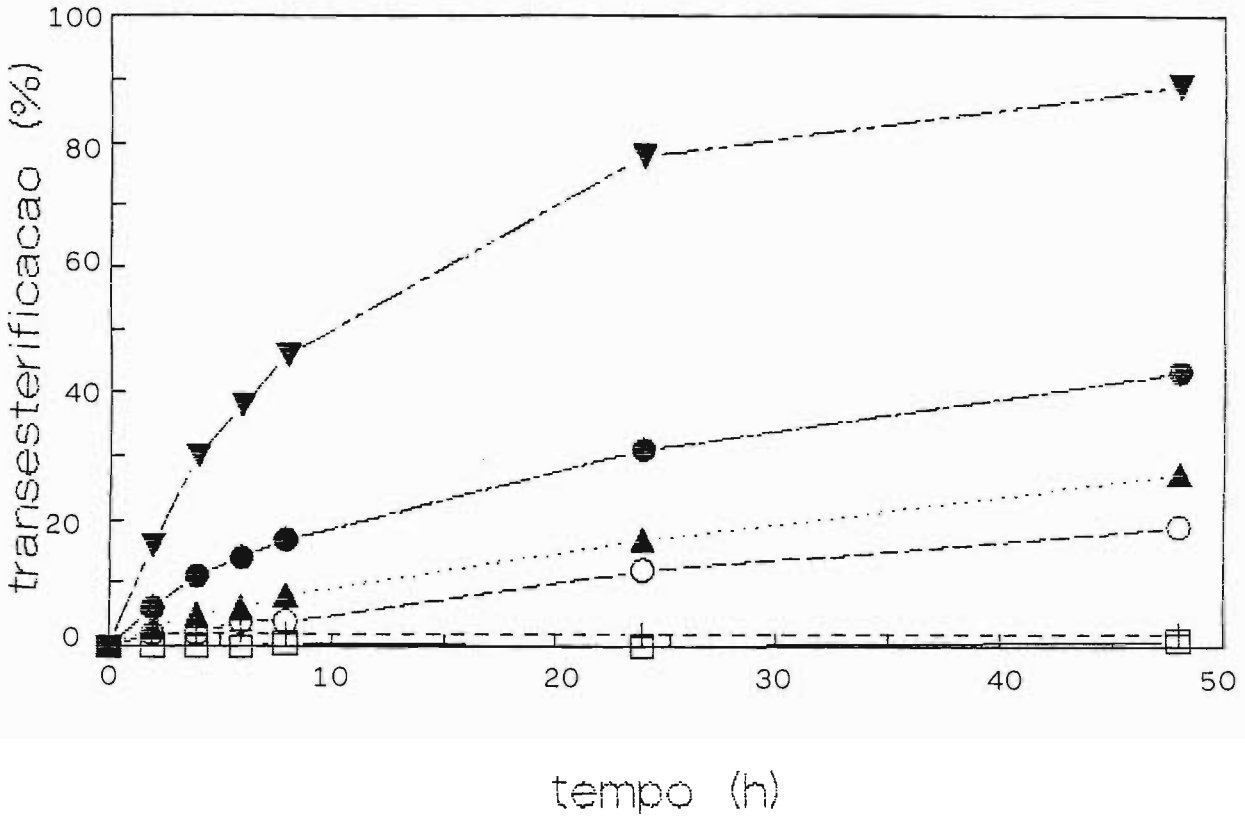


Figura 19. Cinética de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B em metanol na presença de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B. Condições experimentais: $6,1.10^{-6}$ mol de 10R ( ), $5,1.10^{-6}$ mol de 10R e $1,0.10^{-6}$ mol 5B ( ); $4,1.10^{-6}$ mol de 10R e $2,0.10^{-6}$ mol de 5B ( ), $3,1.10^{-6}$ mol de 10R e $3,0.10^{-6}$ mol de 5B ( ); $1,0.10^{-6}$ mol de 10R e $4,0 \times 10^{-6}$ mol de 5B ( ); $6,1.10^{-6}$ mol de 5B ( ); volume total = 1 ml, metanol 38 °C. Condições de análise por HPLC: vide ítem 4.1.4., página 54. As porcentagens de transesterificações foram calculdas como descrito no ítem 4.1.3., página 53 . 5B refere-se à Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto obtido na síntese 5 (tabela 8 , página 82). 10R refere-se ao 10B recristalizado em $EtOH/H_2O$.

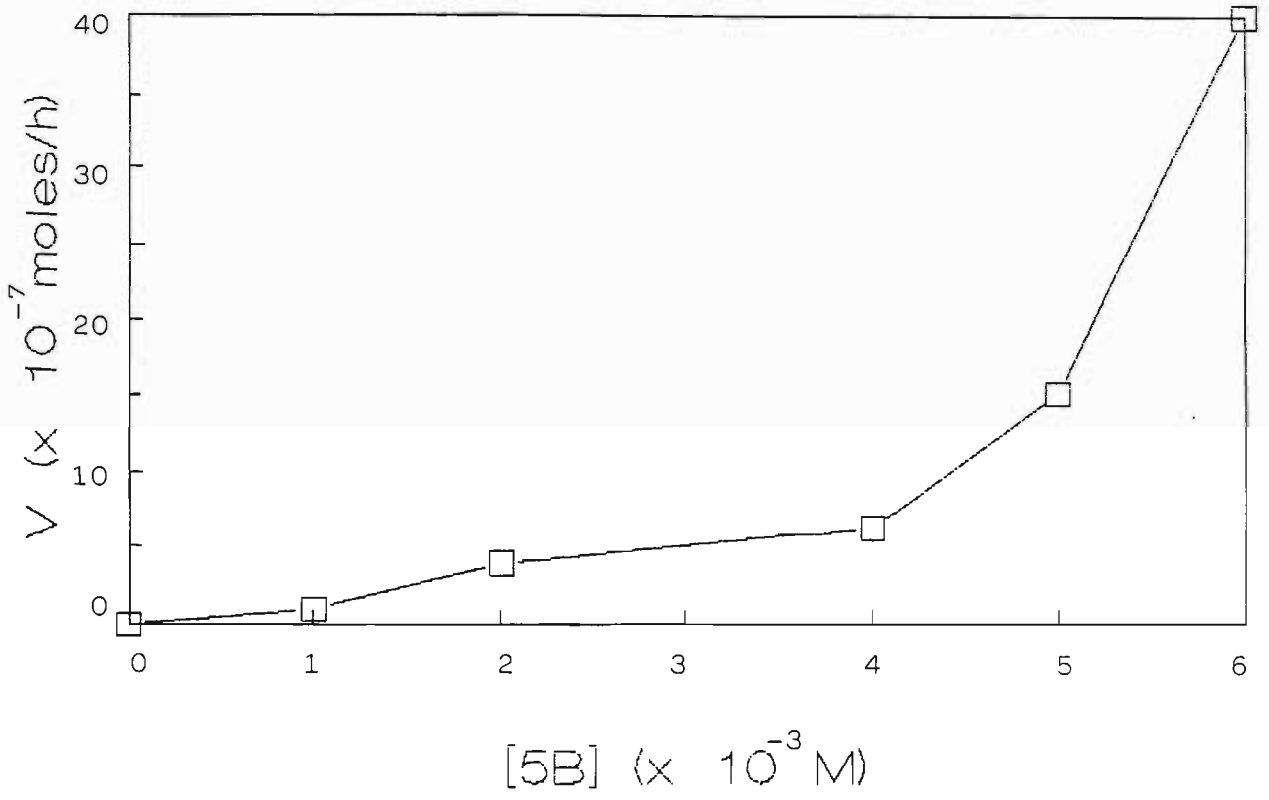


Figura 20. Efeito da concentração de 5B sobre a velocidade de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B em metanol. Condições experimentais: vide figura anterior, página 113. Condições: vide ítem 4.1.4., página 54 , As velocidades foram calculadas a partir das porcentagens de transesterificação encontradas em 6 horas de reação.

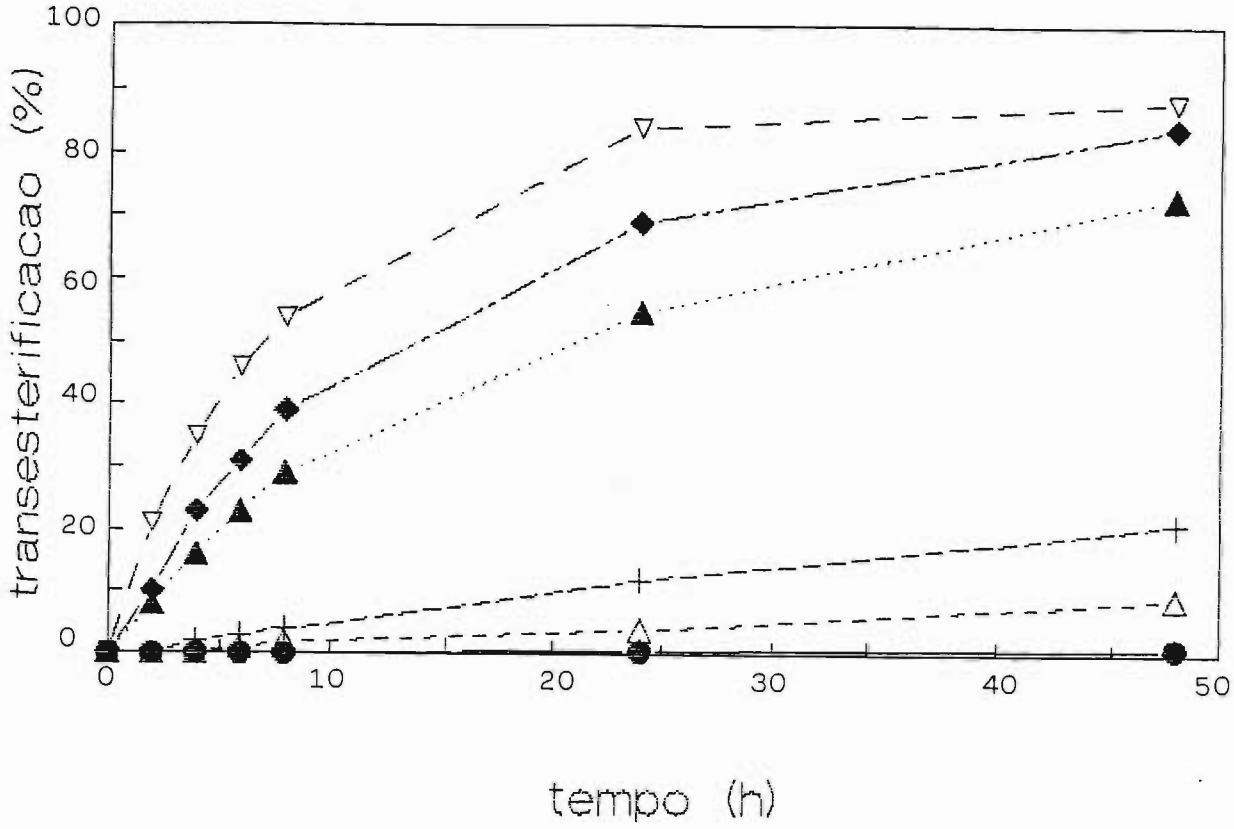
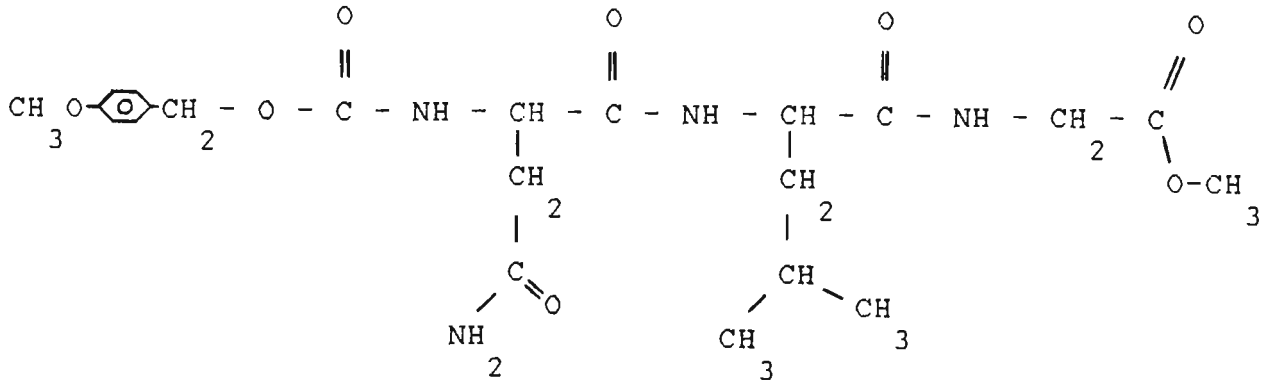


Figura 21. Cinética de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt ~~10R~~ 10B em soluções metanólicas de diferentes concentrações de $Ca(Ac)_2$. Condições experimentais: 6,1 x 10^{-6} mol (3 mg) de peptídeo e 1 ml de solução metanólica contendo $Ca(Ac)_2$ nas seguintes quantidades: 6.1 x 10^{-9} mol (●); (△), 6,1 x 10^{-8} mol; (+), 6,1 x 10^{-7} mol; (▲), 3,0 x 10^{-6} mol; (◆), 6,0 x 10^{-6} mol; (▽), 3,0 x 10^{-5} mol de 38 °C. Condições de análise por HPLC: vide ítem 4.1.4., página 54. As porcentagens de transesterificação foram calculadas como descrito no ítem 4.1.3., página 53. 10R refere-se a Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 10B (tabela 8, página 82) recritalizado em EtOH/H_2O.

^{1}RM H (200 MHz, DMSO-d_6, TMS):



(a): 0,88 (d, 3H)

(b): 0,93 (d, 3H)

(c): 1,54 (m, 2H)

(d): 1,70 (m, 1H)

(e): 2,50 (d, 2H)

(f): 3,68 (s, 3H)

(g): 3,81 (s, 3H)

(h): 3,87 (d, 2H)

(i): 5,00 (s, 2H)

(j): 6,97 (d, 2H, J = 8,8 Hz)

(k): 7,02 (s, 1H)

(l): 7,35 (d, 2H, J = 8,8 Hz)

(m): 7,45 (s, 1H)

(n): 8,06 (d, 1H)

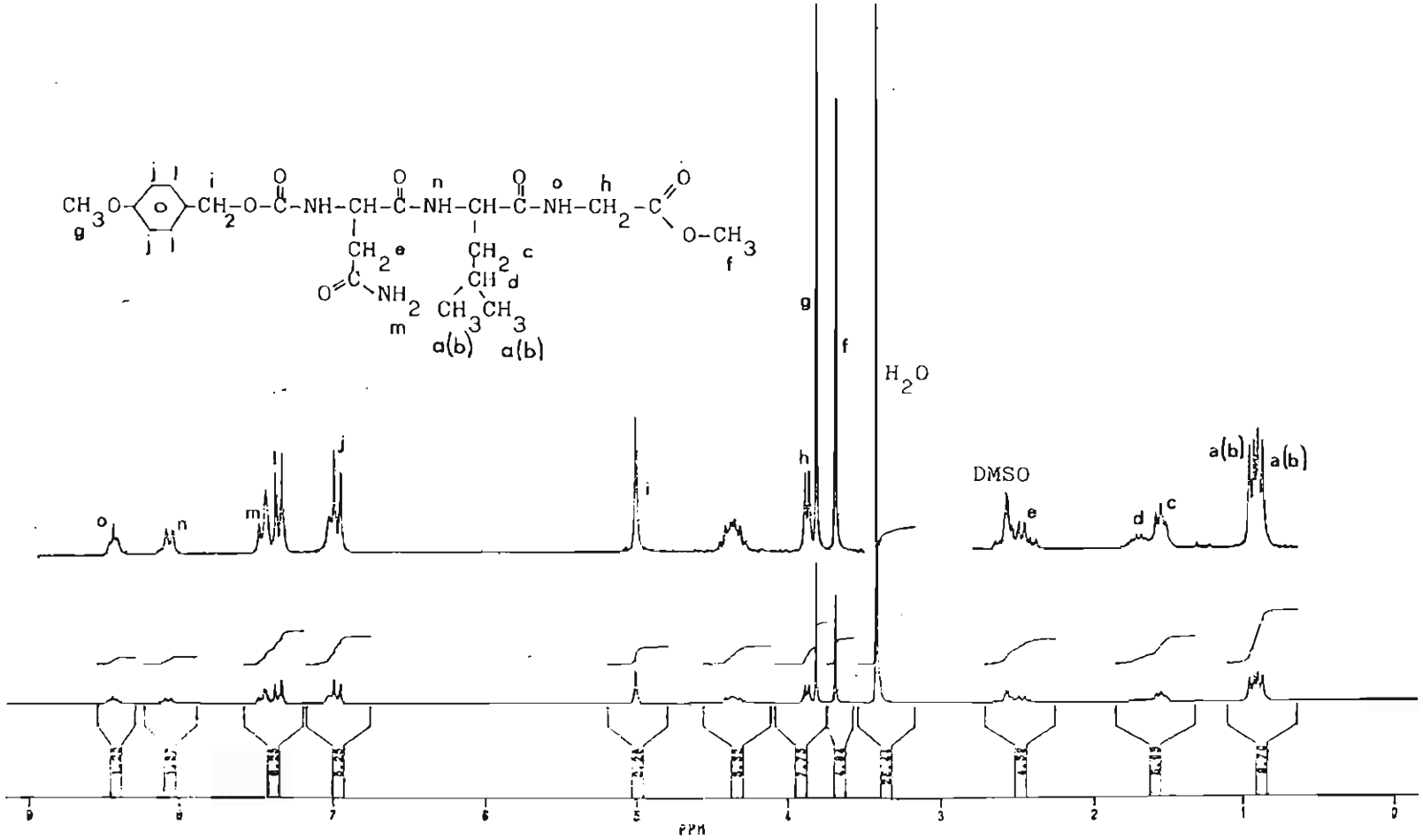
(o): 8,45 (t, 1H)

O espectro obtido está mostrado na figura 22, página 117.

A figura 23 , página 118 , mostra o efeito da concentração de acetato de cálcio na velocidade da reação de transesterificação em metanol do tripeptídeo 7B.

3.2.5. Cinética de transesterificação em soluções metanólicas de acetato de cálcio de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 10R em diferentes concentrações

A figura 24, página 119, mostra os resultados obtidos no estudo da influência da concentração de Moz-Asn-Leu-



igura 22. Espectro de RM ^{1}H em DMSO-d_6 de Moz-Asn-Leu-Gly-OMe resultante na transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B m solução metanólica de $Ca(Ac)_2$, 400 MHz.

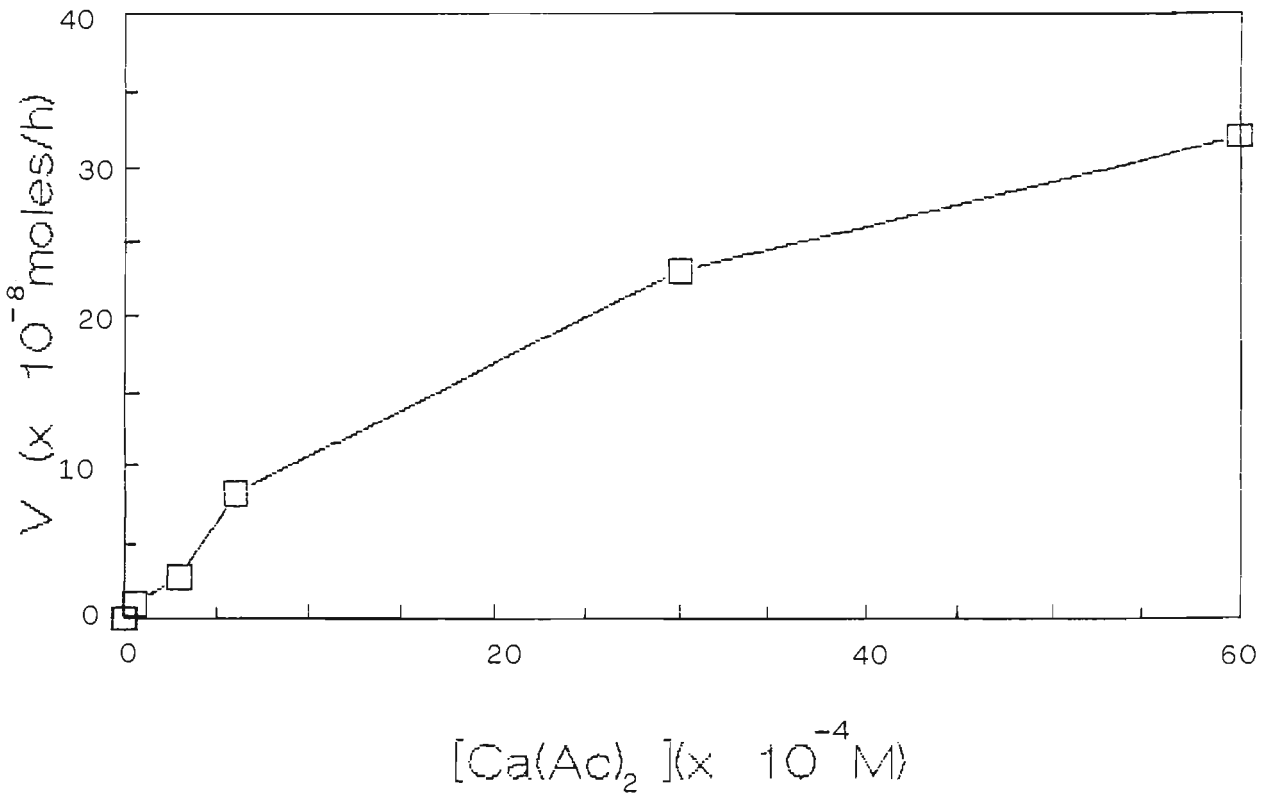


Figura 23. Influência da concentração de $Ca(Ac)_2$ na velocidade de transesterificação em metanol de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt ~~10R~~ 7a. Condições experimentais: vide tabela anterior, página 112. Condições de análise por HPLC: vide ítem 4.1.4., página 54 . As velocidades foram calculadas a partir das porcentagens de transesterificação encontradas em 6 horas de reação.

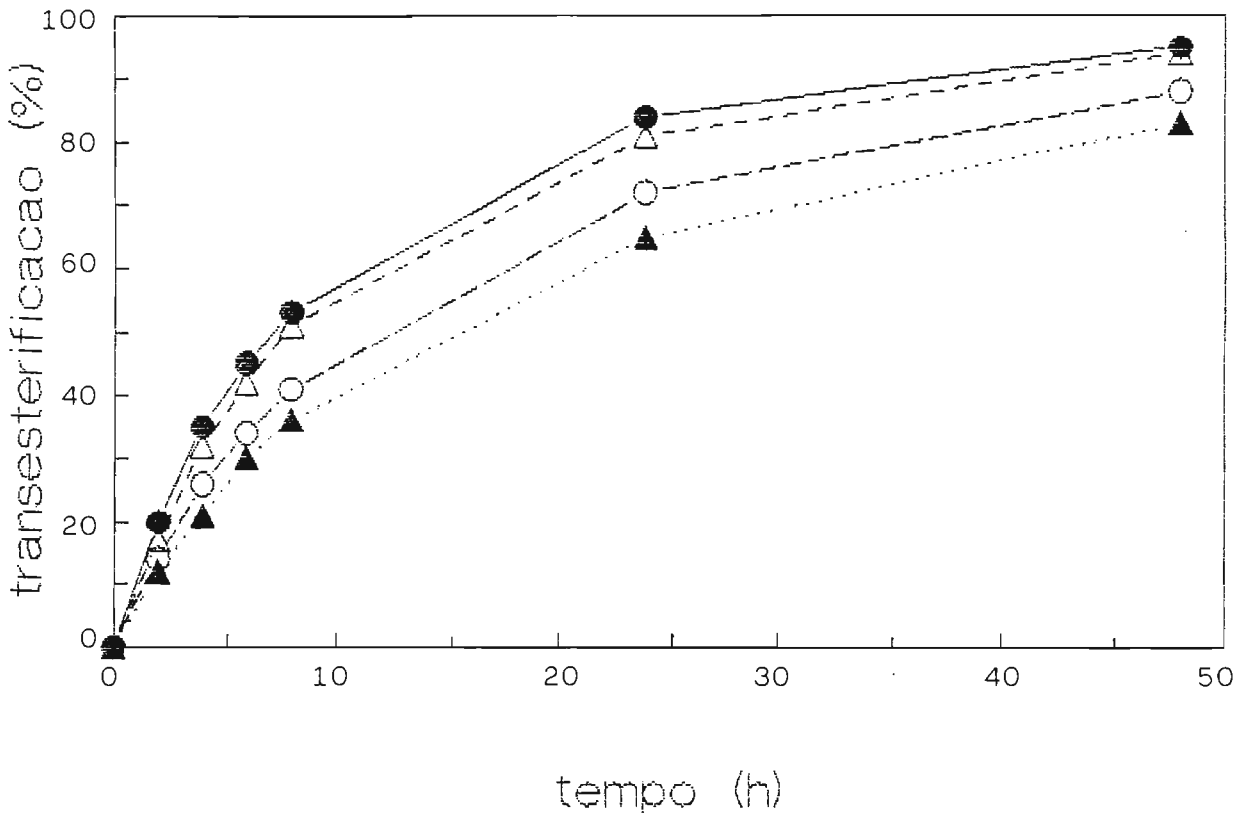


Figura 24. Cinética de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 10R em diferentes concentrações na presença de $Ca(Ac)_2$. Condições experimentais: (●) $6,1 \times 10^{-6}$ mol (3 mg), (Δ) $3,0 \times 10^{-6}$ mol (1,5 mg), (○) $6,1 \times 10^{-6}$ mol (0,6 mg), (▲) $3,0 \times 10^{-6}$ mol (0,3 mg) de peptídeo, $6,1 \times 10^{-6}$ mol (0,61 ml de solução metanólica 1×10^{-2} M) de $Ca(Ac)_2$, 3,4 mol de MeOH (volume total = 20 ml), 38 °C. Condições de análise por HPLC: vide ítem 4.1.4., página 54. As porcentagens de transesterificação foram calculad s como descrito no ítem 4.1.3., página 53. 10R refere-se ao Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 10B (tabela 8, página 82) recristalizado em EtOH/H_2O água.

Gly-OEt na porcentagem de sua transesterificação em metanol, realizado segundo o método descrito no ítem 4.2.5., página 61. O gráfico em função da velocidade de reação está mostrado na figura 25, página 14 .

3.2.6. Cinética de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B em soluções metanólicas de cloreto de cálcio, acetato de sódio e cloreto de sódio.

Os resultados obtidos no estudo da transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B na presença destes sais na proporção peptídeo:sal 1:1 (mol/mol), realizado conforme descrito no ítem 4.2.6., página 62, estão mostrados na tabela 17, página 122 .

3.2.7. Cinética de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B em soluções metanólicas da mistura cloreto de cálcio/ acetato de sódio.

As porcentagens relativas de Moz-Asn-Leu-Gly-OMe formado a partir da transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B, realizada nas condições descritas no ítem 4.2.7., página 62 , encontram-se expressas na tabela 17, página 122.

4. Estudo conformacional de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B, 8B e 3R

Os espectros de RM ^{1}H, (400 MHz) em DMSO-d_6 de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B e 8B- homogeneizados e recristalizado 3R estão mostrados nas figuras 26, 27, 28, 29, 30 e 31 , páginas 123 ,124 125 , 126 , 127 e 128 . As porcentagens de "Nuclear

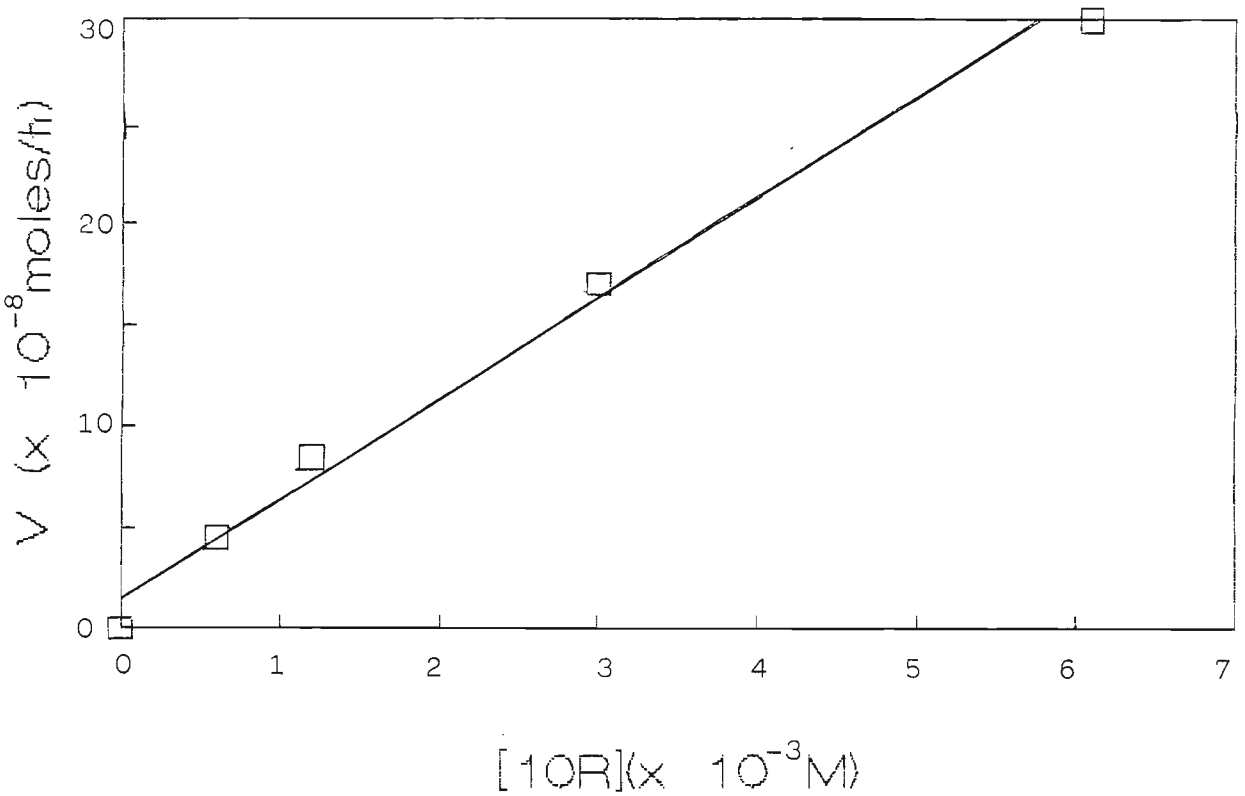


Figura 25. Efeito da concentração de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 10R na sua transesterificação em soluções metanólicas de $Ca(AC)_2$. Condições experimentais: vide tabela anterior, página 112. Condições de análise por HPLC: vide ítem 4.1.3., página 53. As velocidades foram calculadas a partir das porcentagens de transesterificação encontradas em 6 horas de reação.

Tabela 17. Transesterificação em metanol de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt ~~5R~~ 18 na presença de diversos sais:

Tempo (h)	Transesterificação (%)							
	7B	$Ca(Ac)_2$	$CaCl_2$	NaAc	NaCl	$CaCl_2$/NaAc		
						1/0,5	1/1	1/2
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	12	0	0	0	7	10	10
4	0	22	0	2	0	13	17	18
6	0	31	1	4	0	18	22	24
8	0	36	1	5	0	22	25	28
24	0	64	2	11	0	42	49	50
48	0	83	5	28	1	61	64	65

Condições experimentais: $6,0 \times 10^{-6}$ mol (3 mg) de peptídeo, 0,6 de solução metanólica de $Ca(Ac)_2$, $CaCl_2$, NaAc ou NaCl 0,01 M e 0,4 ml de metanol ou 0,6 ml de solução metanólica de $CaCl_2$/NaAc (0,01 M)/0,005 M; 0,01 M/0,001 M; 0,01 M/0,02 M) e 0,4 ml de metanol, 38 °C. As porcentagens de transesterificação indicadas referem-se às porcentagens relativas de Moz-Asn-Leu-Gly-OMe, detectadas nos meios reacionais por HPLC. 7B refere-se ao peptídeo obtido na síntese 7 (tabela 8, página 82).

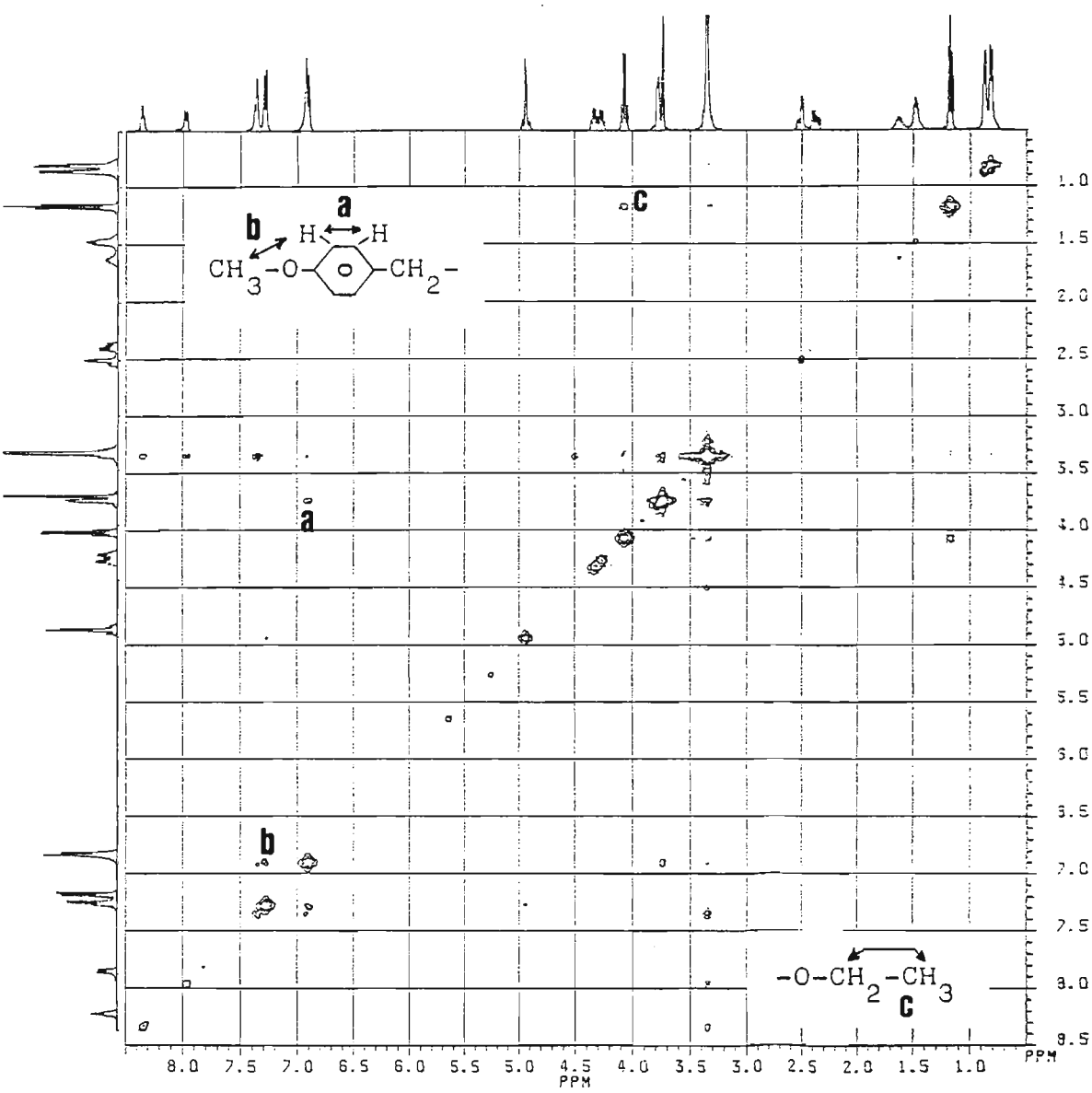


Figura 26. Espectro bidimensional de RMH^1 em DMSO-d_6 de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B-homogeneizado, 400 MHz (NOESY). 3B refere-se ao Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto na síntese 3 (tabela 8 , página 82).

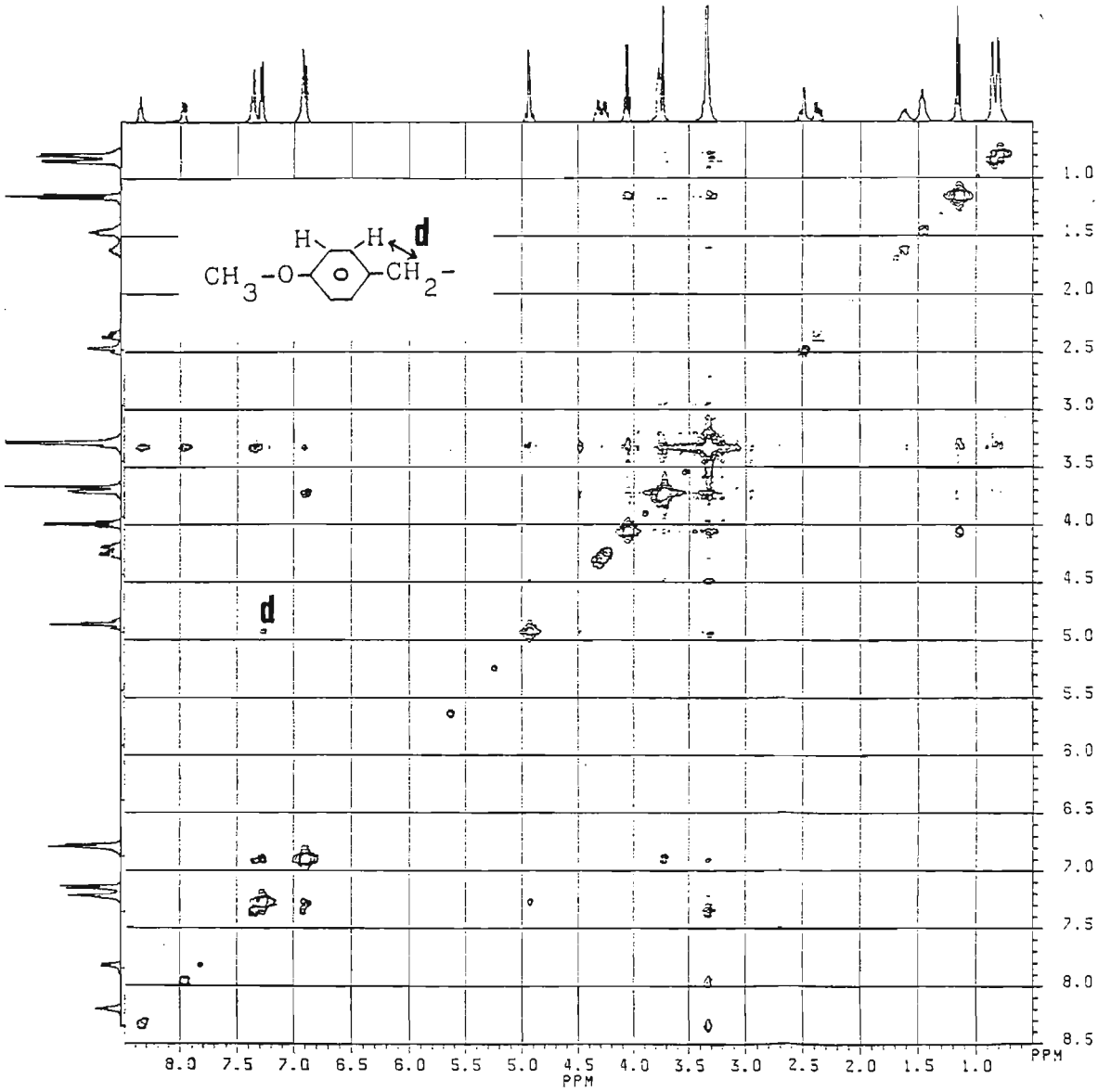


Figura 27. Espectro bidimensional de RMH^1 em DMSO-d_6 de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B-homogeneizado, 400 MHz (NOESY). 3B refere-se ao Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto na síntese 3 (tabela 8 , página 82).

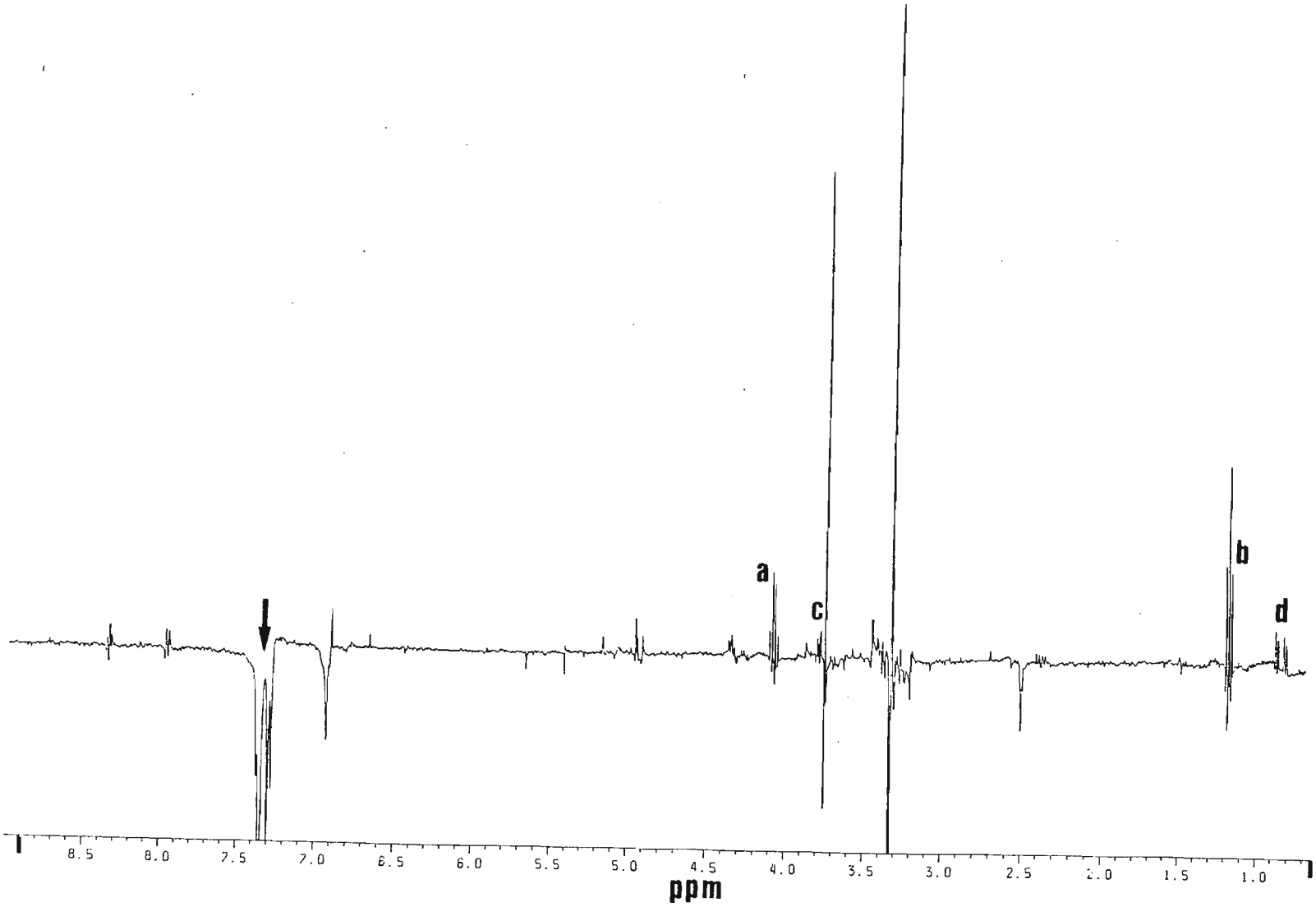


Figura 28. Espectro diferencial de RMH^{1} em DMSO-d_6 de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B-homogeneizado, 400 MHz (NOESY). 3B refere-se ao Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto obtido na síntese 3 (tabela 8 , página 82).

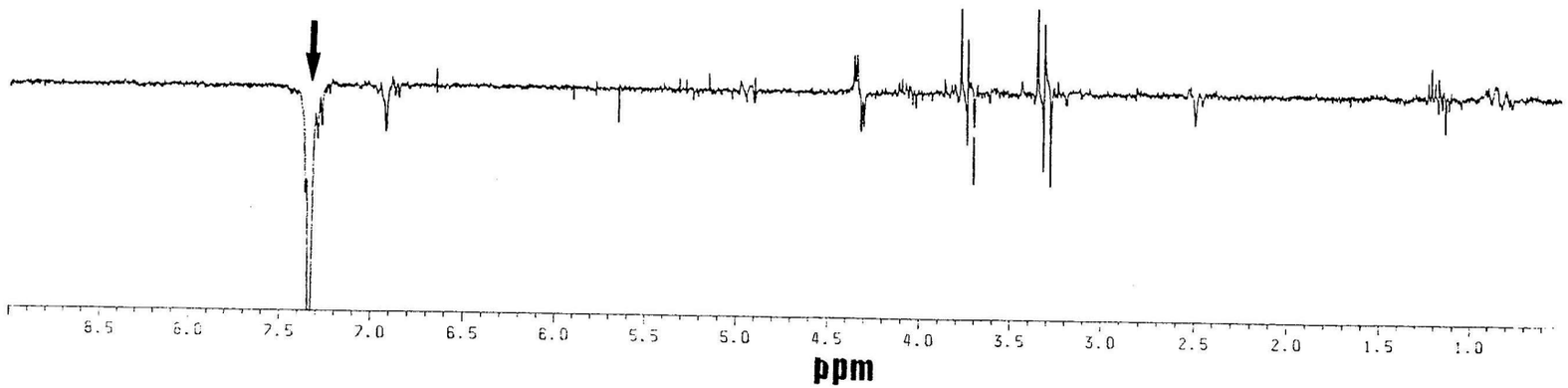


Figura 29. Espectro diferencial de RMH^1 em DMSO-d_6 de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3R, 400 MHz (NOESY). 3B refere-se ao Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B (tabela 8 , página 82) recristalizado em EtOH/H_2O.

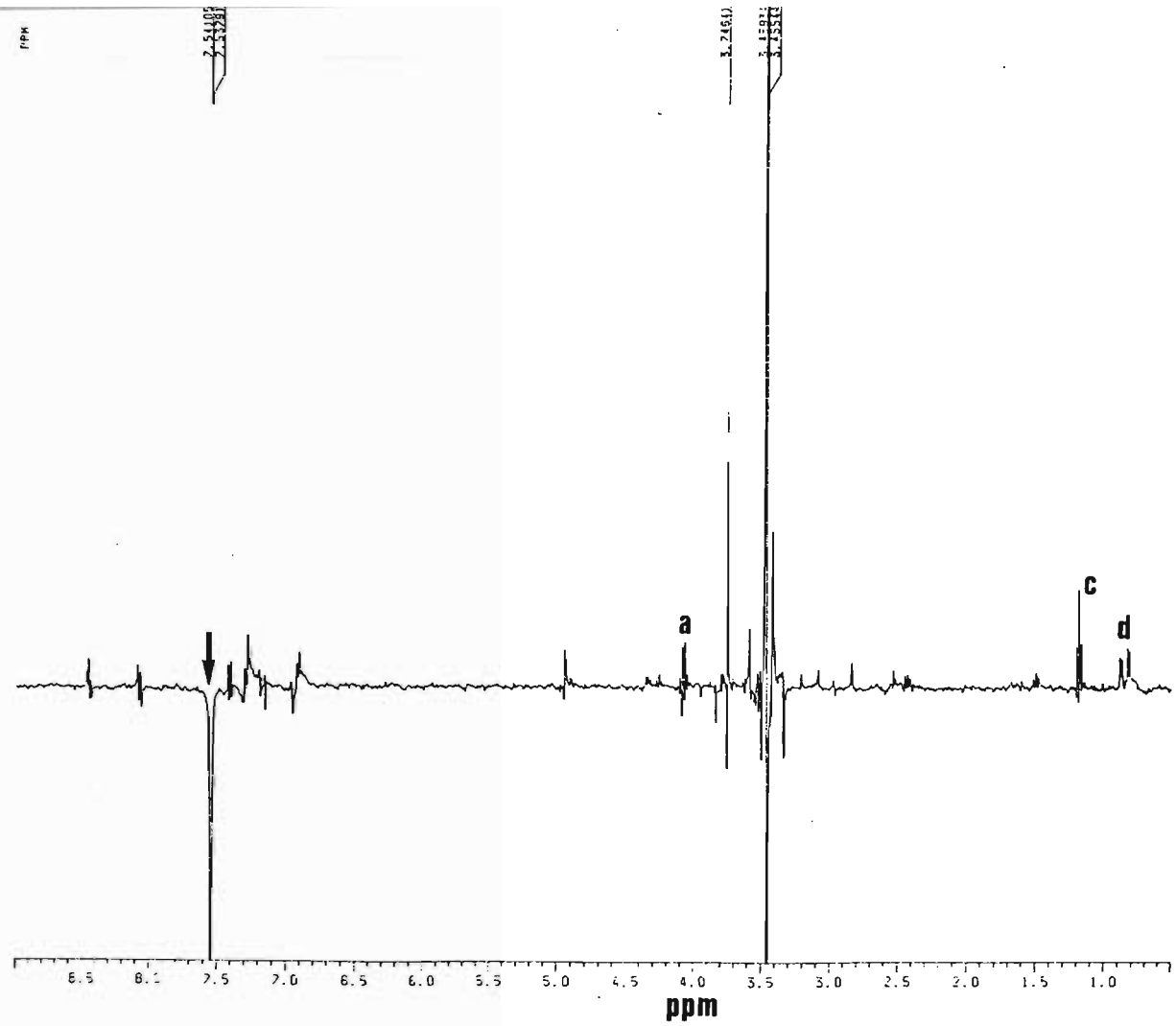


Figura 30. Espectro diferencial de RMH^1 em DMSO-d_6 de 8B-homogeneizado, 400 MHz (NOESY). 8B refere-se ao Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto obtido na síntese 8 (tabela 8, página 82).

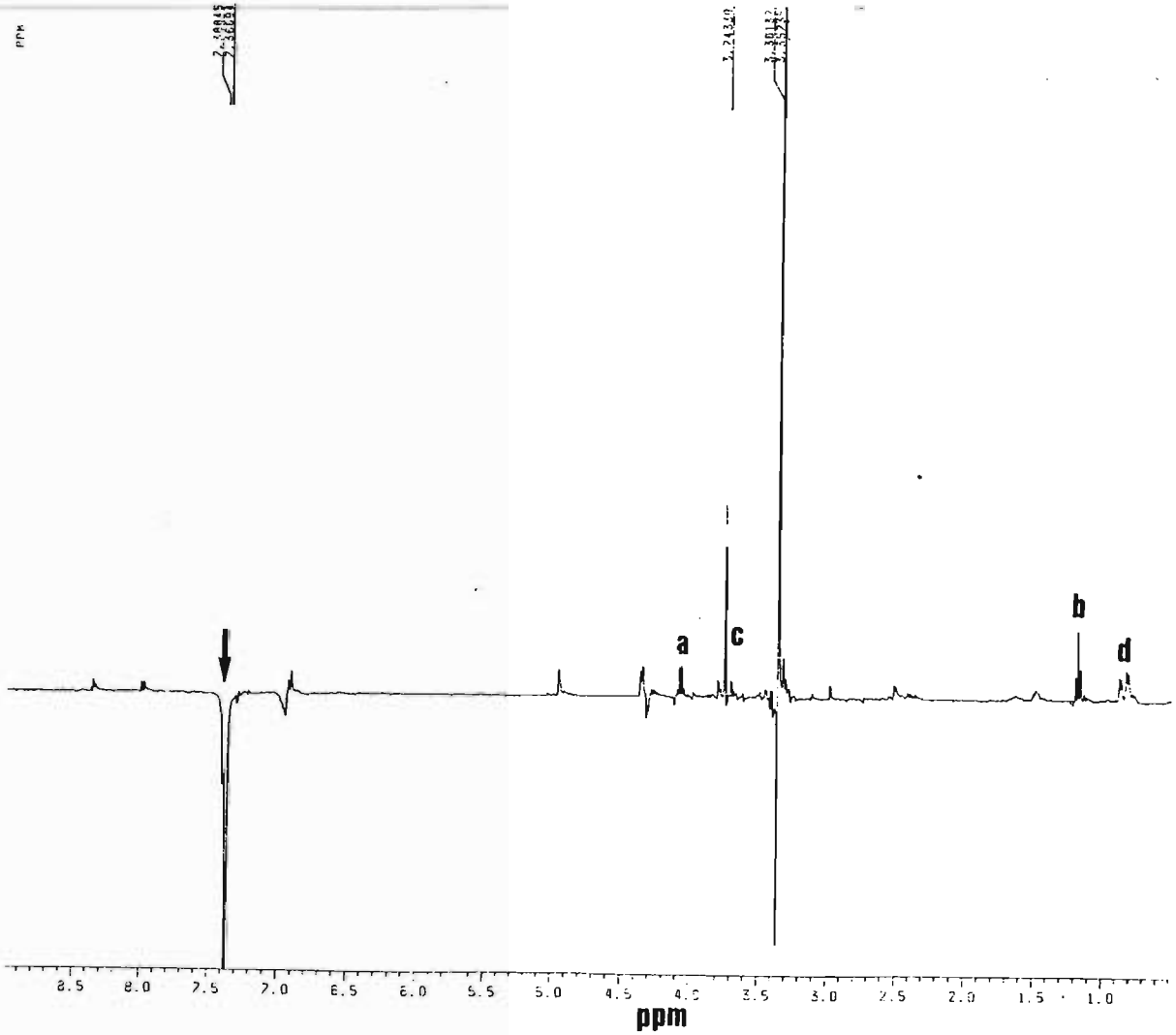


Figura 31. Espectro diferencial de RMH^1 em DMSO-d_6 de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3R na presença de $CaCl_2$. 3R refere-se ao Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto obtido na síntese 3 (tabela 8, página 82) recristalizado em EtOH/H_2O.

Overhauser Effect" (NOE) detectadas estão mostrados nos respectivos espectros juntamente com as atribuições dos picos.

Os espectros Raman realizados não foram apresentados, sendo que uma explicação adequada pode ser encontrada na discussão dos resultados, página 175 .

Os resultados obtidos nos espectros RM^1H a (400 MHz) $DMSO-d_6$ contendo cloreto de cálcio do tripeptídeo recristalizado 3R realizados (ítem 4.3., página 63) estão mostrados na tabela 18 , página 130 .

5. Transesterificação de Z-Asn-Leu-Gly-OEt (A), Boc-Asn-Leu-Gly-OEt (B), Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl (C), Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^t (D), Moz-Gln-Leu-Gly-OEt (E), Moz-Asn-Ile-Gly-OEt (F) e Moz-Asn-Leu-Ala-OEt (G) em metanol.

5.1. Transesterificação de A,B,C,D,E,F e G brutos.

As porcentagens relativas de transesterificação encontradas no estudo realizado segundo o método descrito no ítem 5.1., página ~~129~~ 63, estão expressas na tabela 19, página ~~63~~ 131 , juntamente com as condições utilizadas para análise por HPLC.

5.2. Transesterificação de B,C,D,F e G brutos em soluções metanólicas de acetato de cálcio.

A tabela 20, página 132, mostra os resultados obtidos no estudo da transesterificação dos peptídeos brutos B,C,D,F e G em soluções metanólicas de acetato de cálcio (condições descritas no ítem 5.2., página 64). Também estão expressas as condições de análise por HPLC utilizadas.

Tabela 18. Porcentagem de NOE detectadas entre diferentes prótons de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt

Peptídeo	Próton irradiado	Próton acoplado	NOE (%)
3B	$-NH^{a}$	$-CH_2-$ (e)	1,2
	$-NH^{a}$	$-CH_3$ (j)	5,8
	$-NH^{a}$	$-CH_2-$ (Gly)	1,0
8B	$-NH^{a}$	$-CH_2-$ (e)	4,9
		$-CH_3$ (j)	3,9
	$-NH^{b}$	$-CH_2-$ (e)	34,7
		$-CH_3$ (j)	42,4
	$-CH_3$ (j)	$-CH_2-$ (e)	26,8
		NH^{a}	24,1
	$-CH_2-$(e)	NH^{b}	40,0
		$-CH_3$ (j)	42,4
$3R + CaCl_2$	$-NH^{a}$	$-CH_2-$ (e)	-38,5
		$-CH_3$ (j)	-39,5
	$-CH_2-$ (e)	NH^{a}	-7,7
		$-CH_3$ (j)	-5,8
	$-CH_3$ (j)	NH^{a}	-41,5
		$-CH_2-$ (e)	-42,1

[a] Refere-se a um dos prótons do NH_2 da amida da asparagina (7,4 ppm). [b] Refere-se a um dos prótons do NH_2 da asparagina e os prótons do anel aromático do Moz (6,9 ppm). [e,j] Referem-se aos picos e e j do espectro de RM ^1H de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt. 3B

Tabela 19 . Transesterificação de tripeptídeos brutos em metanol.

Tempo (h)	Transesterificação (%)						
	A	B	C	D	E	F	G
0	0	0	0	0	0	0	0
2	9	0	0	0	10	1	0
4	16	0	0	0	20	0	0
6	29	0	0	0	28	2	0
8	39	0	0	0	34	1	0
24	44	0	0	0	63	1	0
48	73	0	0	0	80	2	0

A,B,C,D,E,F e G referem-se à Z-Asn-Leu-Gly-OEt (A), Boc-Asn-Leu-Gly-OEt (B), Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl (C), Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^t (D), Moz-Gln-Leu-Gly-OEt (E), Moz-Asn-Ile-Gly-OEt (F) e Moz-Asn-Leu-Ala-OEt (G) respectivamente. Condições experimentais: 3 mg de peptídeo bruto, 1 ml (A,D,E,F,G) ou 2 ml (B,C) de metanol, 38 °C. Condições de análise por HPLC: eluente = MeOH/H_2O, 7:3 (v/v), detecção = 254 nm (B = 206 nm), fluxo = 1,0 ml/min (A,F,G) ou 1,5 ml/min (B,D) ou 2 ml/min (C,E), sensibilidade = 0,1 (C,E,F,G) ou 0,2 (A,D) ou 0,5 (B), volume injetado = 10 ul, registro = 0,1 mm/seg). As porcentagens de transesterificação foram calculadas como descrito no ítem 4.1.4, página 54 .

Tabela 20. Transesterificação de tripeptídeos brutos em soluções metanólicas de $Ca(Ac)_2$

Tempo (h)	Transesterificação						
	A[a]	B	C	D	E[a]	F	G
0	-	0	0	0	-	0	0
2	-	4	16	0	-	1	7
4	-	5	31	0	-	1	13
6	-	9	45	0	-	0	9
8	-	10	63	0	-	2	23
24	-	24	91	0	-	7	49
48	-	43	100	0	-	13	71

A,B,C,D,E,F e G referem-se à Z-Asn-Leu-Gly-OEt, Boc-Asn-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl, Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^t, Moz-Gln-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Ile-Gly-OEt e Moz-Asn-Leu-Ala-OEt, respectivamente. Condições experimentais: 3 mg de tripeptídeo (B), 0,7 ml solução de $Ca(Ac)_2$ 1×10^{-2} M (B, 0,7 ml; C, 0,53 ml; D, 0,57 ml; F, 0,61 ml; G, 0,59 ml) e metanol para completar 1 ml (D) ou 2 ml (B,C,F,G); 38 °C. Condições de análise por HPLC: eluente = $MeOH/H_2O$, 7:3 (v/v), detecção = 254 nm (B = 206 nm), fluxo = 1,0 ml/min (A,F e G) ou 1,5 ml (B,D) ou 2,0 ml/min (C,E), sensibilidade = 0,1 (C,E,F e G) ou 0,2 (A,D) ou 0,5 (B); volume injetado = 10 ul, registro = 0,1 mm/seg. As porcentagens de transesterificação foram calculadas como descrito no ítem 4.1.4., página 54. [a] Estes peptídeos não foram incubados na presença de $Ca(Ac)_2$ (1:1), pois os mesmos transesterificam em metanol na ausência deste sal.

A figura 32, página 134, mostra o perfil cromatográfico de Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl em solução metanólica de acetato de cálcio (condições descritas no ítem 5.2., página 64) em 0 e 6 horas de incubação a 38 °C.

5.3. Transesterificação em soluções metanólicas de acetato de cálcio de A,B,C,D,E,F e G recristalizados.

Os resultados encontrados no estudo cinético da incubação de A,B,C,D,E,F e G recristalizados em soluções metanólicas de acetato de cálcio (peptídeo/Ca(II), 1:1 (mol/mol)) nas condições descritas no ítem 5.4., página 65 , estão mostrados na tabela 21 , página 135 . Na mesma tabela estão expressas as condições utilizadas para análise por HPLC.

6. Transesterificação de ésteres de peptídeos em soluções metanólicas de acetato de cálcio.

6.1. Estudo qualitativo

A tabela 22, página 136, mostra as condições experimentais utilizadas e os resultados obtidos no estudo preliminar qualitativo da incubação em solúcões metanólicas de acetato de cálcio dos peptídeos Z-Asn-Leu-OEt, Z-Asn-Phe-OBzl, Boc-Leu-Gly-OEt, Z-Pro-Leu-Gly-OEt, Boc-Ile-Gly-OBzl, Z-Asn-Leu-OBzl, Z-Asn-Phe-OEt, Moz-Asn-Ile-Gly-OBzl, Z-Pro-Leu-Gly-OBzl, Z-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^t, Z-Cys(S-Bzl)-Tyr-OBu^t e Z-Cys(S-Bzl)Tyr-Ile-OBu^t, o qual foi realizado segundo o método geral descrito no ítem 6.1., página 65.

A figura 33, página 137 , mostra o perfil cromatográfico

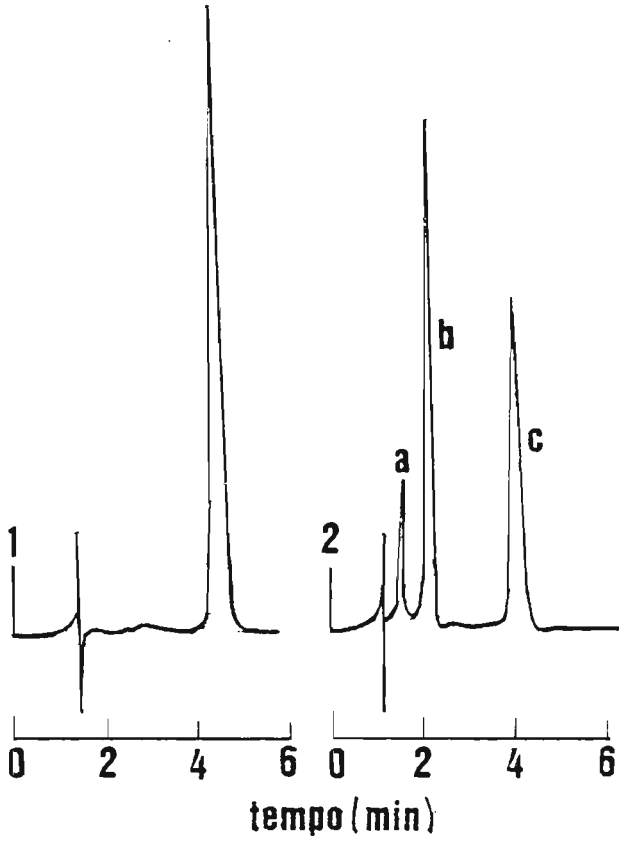


Figura 32. Perfil cromatográfico de Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl imediatamente após sua dissolução em solução metanólica de $Ca(Ac)_2$ 1 x 10^{-2} M (1) e após 6 horas de incubação a 38 °C (2) Condições de análise: eluente = $MeOH/H_2O$, 7:3 (v/v), fluxo = 2 ml/min, detecção = 254 nm, sensibilidade = 0,1, registro = 0,1 mm/seg. Tempos de retenção: 2a = 1,5 min, 2b = 2,2 min, 2c = 4,0 min.

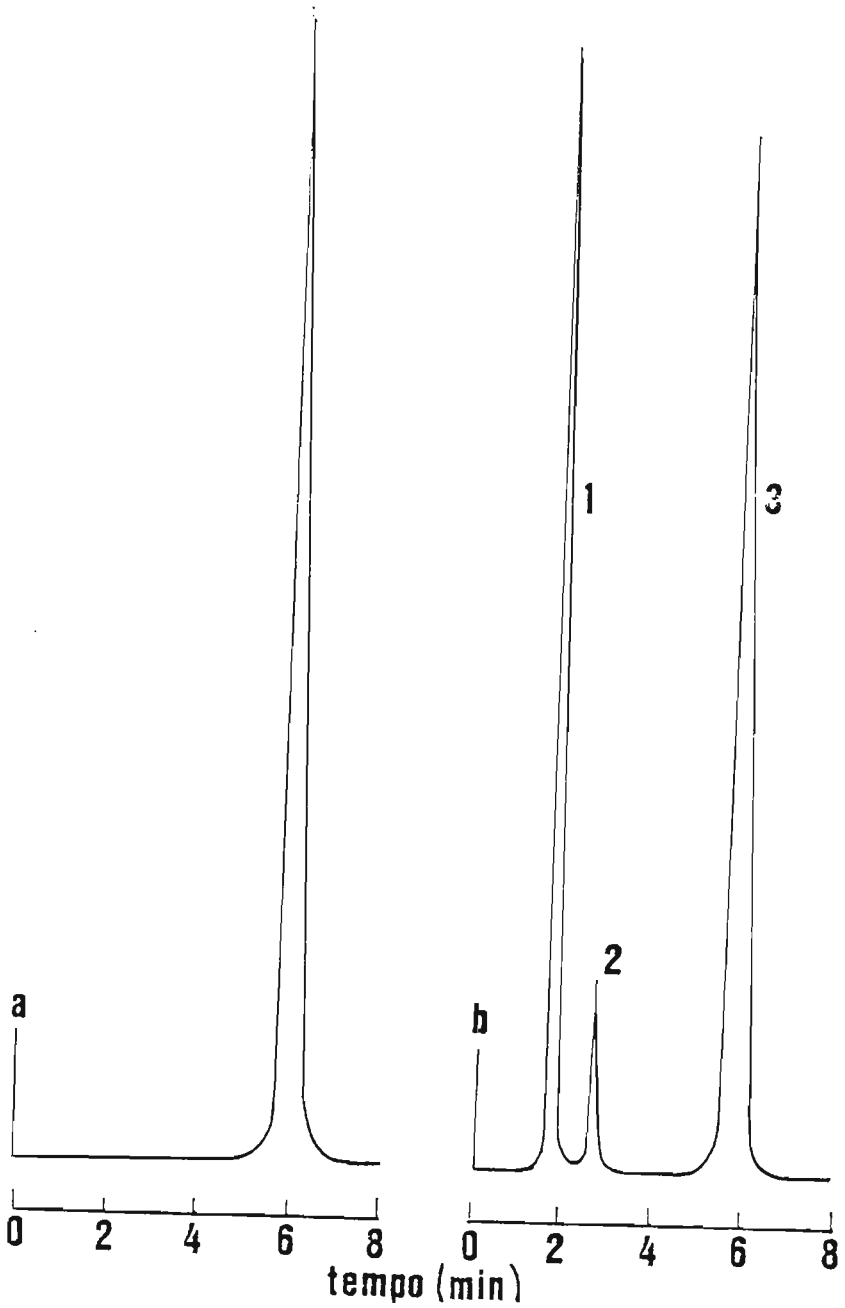
Tabela 21. Transesterificação de tripeptídeos

Peptídeo	Transesterificação (%) Tempo (h)	
	6	24
A) Z-Asn-Leu-Gly-OEt	36	75
B) Boc-Asn-Leu-Gly-OEt	28	64
C) Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl	63	98
D) Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^t	0	0
E) Moz-Gln-Leu-Gly-OEt	26	60
F) Moz-Asn-Ile-Gly-OEt	44	67
G) Moz-Asn-Leu-Ala-OEt	4	12

Condições experimentais: 6,1 x 10^{-6} mol de peptídeo, 2,4 ml de $Ca(Ac)_2$ 0,01 M, 1,6 ml de MeOH, 6 horas, 38 ^{o}C. Condições de análise por HPLC: eluente = MeOH/H_2O, 7:3 (v/v), detecção = 254 nm e 206 (B), fluxo = 1 ml/min (A,F,G) ou 1,5 ml (B,D) ou 2 ml/min (C,E), sensibilidade = 0,1 (C,E,F,G) ou 0,2 (A,D) ou 0,5 (B), volume injetado = 10 µl, registro = 0,1 mm/seg. As porcentagens de transesterificação foram calculadas como descrito no ítem 5.2., página 64.

Peptídeo	Quantidade de peptídeo ($.10^{-6}$ mol)	Sol. metanólica de $Ca(Ac)_2$ 0,001 M (ml)	Metanol (ml)	Tempo de incubação (h)	Temperatura (°C)	Transesterificação detectada por HPLC
1) Z-Asn-Leu-Gly-OEt[a]	6,5	---	1,00	24	28	+ + +
2) Boc-Leu-Gly-OEt	9,5	---	1,00	24	28	-
	9,5	0,10	0,90	31	38	+
	9,5	0,10[b]	0,90	163	38	+ + +
3) Z-Asn-Leu-OEt	7,4	0,74	0,26	72	38	+
4) Z-Asn-Phe-OEt	6,8	0,68	0,32	47	38	+
5) Z-Pro-Leu-Gly-OEt	6,7	0,37	0,33	26	38	+
6) Z-Asn-Leu-OBzl	6,4	0,64	0,36	47	38	+ +
7) Z-Asn-Phe-OBzl	6,0	0,60	0,40	47	38	+
8) Boc-Ile-Gly-OBzl	7,9	0,80	0,20	24	38	+ + +
9) Z-Pro-Leu-Gly-OBzl	5,8	0,58	0,42	24	38	+ + +
10) Moz-Asn-Ile-Gly-OBzl	5,4	0,54	0,46	24	38	+
11) Z-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu[t]	5,8	0,58	0,42	72	38	-
	5,6	0,58[b]	0,42	74	38	+
12) Z-Cys(S-Bzl)-Tyr-OBu[t]	5,3	0,53	0,47	26	38	-
	5,3	0,53[b]	0,47	74	38	-
13) Z-Cys(S-Bzl)-Tyr-Ile-OBu[t]	4,5	0,45[b]	0,55	73	38	-

Os peptídeos utilizaodos foram previamente recristalizados e quando incubados em metanol a 38 °C não sofreram transesterificação. [a] O Z-Asn-Leu-Gly-OEt utilizado foi obtido enzimaticamente e recristalizado em etanol/ água. [b] Foi usada uma solução metanólica de $Ca(Ac)_2$ 0,01 M. Condições de análise por HPLC: eluente = MeOH/H_2O, 7:3 (v/v); detecção = 254 nm e 206 nm, (2 e 8); fluxo = 1 ml/min (3: 1,5 ml/min); sensibilidade = 0,1 (3,5), 0,2 (1,4,6,7,9,10,11,13), 0,5 (12) e 1 (2,8); volume injetado = 10 µl (1,2,8,13), 20 ul (3,5,7,9,10,11,12), 15 µl (4,6); registro = 0,1 mm/seg. +++, ++, + e - indicam as porcentagens aproximadas de transesterificação (+++ = superior a 50%, ++ = 25-50%, + = inferior a 25%, - = não transesterificou)



'igura 33. Perfil cromatográfico de HPLC de Boc-Ile-Gly-OBzl mediatamente após a dissolução em solução metanólica de $Ca(Ac)_2$ a) e após 3 horas (b) a 38 °C. Tempos de retenção observados: a = ,8 min; b_1 = 1,7; b_2 = 2,7 e b_3 = 5,8 min. Condições de análise: luente = $MeOH/H_2O$, 7:3 (v/v); fluxo = 1 ml/min, detecção = 206 m, sensibilidade: 1, volume injetado = 10 ul, registro = 0,1 m/seg.

obtido imediatamente após a dissolução de Boc-Ile-Gly-OBzl em solução metanólica de acetato de cálcio e após 3 horas de incubação a 38 °C.

6.2. Estudo quantitativo

O estudo quantitativo realizado segundo o ítem 6.3., página 66, forneceu as porcentagens de transesterificação descritas na tabela abaixo para 72 horas de incubação:

Tabela 23. Transesterificação de diversos peptídeos em metanol na presença de $Ca(Ac)_2$.

Peptídeo	Transesterificação (%)
Z-Asn-Leu-OEt	26
Z-Asn-Phe-OEt	36
Boc-Leu-Gly-OEt	90
Z-Pro-Leu-Gly-OEt	81
Z-Asn-Leu-OBzl	73
Z-Asn-Phe-OBzl	91
Boc-Ile-Gly-OBzl	100
Moz-Asn-Ile-Gly-OBzl	53

As incubações foram realizadas a 38 °C por 72 horas. Condições de análise por HPLC: vide tabela anterior, página 136. As porcentagens de transesterificação foram calculadas como descrito no ítem 5.2., página 64.

A tabela 24, página 139, mostra as porcentagens de transesterificação dos peptídeos acima descritos encontrados no estudo comparativo de sua transesterificação em soluções metanólicas de acetato de cálcio em condições experimentais idênticas.

Tabela 24. Transesterificação de diversos peptídeos em soluções metanólicas de $Ca(Ac)_2$.

Peptídeo	Transesterificação (%) 6 horas	24 horas
(1) Z-Asn-Leu-OEt	5	13
(2) Z-Asn-Phe-OEt	11	73
(3) Boc-Leu-Gly-OEt	21	56
(4) Z-Asn-Leu-OBzl	7	41
(5) Z-Asn-Phe-OBzl	20	67
(6) Boc-Ile-Gly-OBzl	45	92
(7) Moz-Asn-Leu-Gly-OEt	36	72
(8) Boc-Asn-Leu-Gly-OEt	28	64
(9) Z-Asn-Leu-Gly-OEt	36	75
(10) Moz-Asn-Leu-Ala-OEt	4	12
(11) Moz-Asn-Ile-Gly-OEt	44	67
(12) Moz-Gln-Leu-Gly-OEt	26	60
(13) Z-Pro-Leu-Gly-OEt	17	49
(14) Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl	63	98
(15) Moz-Asn-Ile-Gly-OBzl	68	100
(16) Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^t	0	0

Condições experimentais: 6.1×10^{-6} mol de peptídeo, 2.4 ml de solução de $Ca(Ac)_2$ 0.01 M, 1.6 ml de metanol, 38 °C. Condições de análise por HPLC: eluente = $MeOH/H_2O$, 7:3 (v/v); detecção = 254 nm (206 nm: (Boc-Leu-Gly-OEt e Boc-Asn-Leu-Gly-OEt); sensibilidade = 0,05 (9,13,4,5,6,15), 0,1 (1,2,7,10,11,14,15, 16), 0,2 (12), 0,5 (3) e 1,0 (8), fluxo = 1,0 ml/min (3,7,8,9,10,11), 1,2 ml/min (1,2), 1,5 ml/min (12,13,16), 2,0 ml/min (4,5,6,14,15), volume injetado = 10 ul, registro = 0,1 mm/seg. As porcentagens de transesterificação foram calculadas como descrito nos ítem 4.1.3., página 53, e 5.2., página 64.

6.3. Caracterização dos produtos obtidos na transesterificação total de Z-Asn-Leu-Gly-OEt (A), Boc-Leu-Gly-OEt (B) e Boc-Ile-Gly-OBzl (C)

Os produtos obtidos na transesterificação dos peptídeos A,B e C em metanol realizada de acordo com o método descrito no ítem 6.4., página 67 , apresentaram as seguintes caracterís-rísticas:

Peptídeo A:

Análise elementar (%): Calculado: C 55,99; N 12, 44; H 6,71

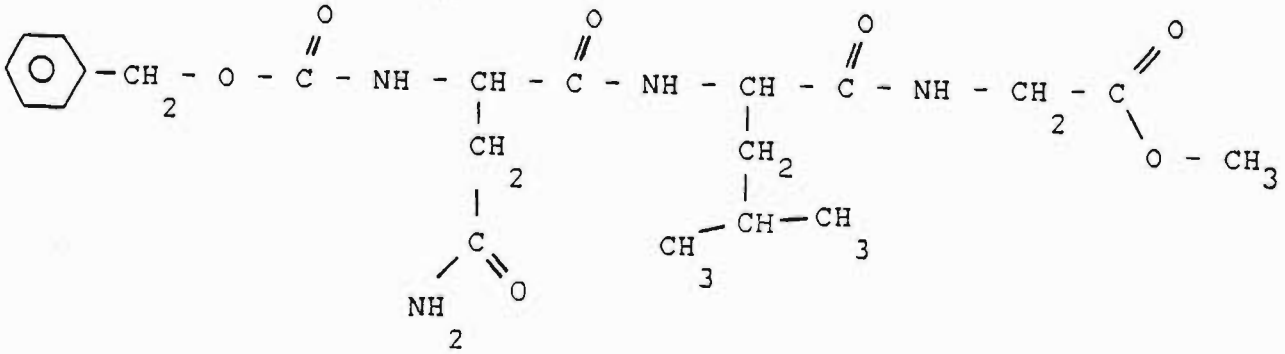
Encontrado: C 46,06; N 15,67; H 6,70

P.F. = 189-191 °C

HPLC: t_R = 4,8 min (MeOH/H_2O, 7:3 (v/v); 1,0 ml/min)

CCD: Rf_1 = 0,17; Rf_B = 0,40; Rf_D = 0,69; Rf_E = 0,69

RM H: (400 MHz, DMSO-d_6, TMS):



(ppm): (a): 0,81 (d, 3H)
(b): 0,87 (d, 3H)
(c): 1,45 (t, 2H)
(d): 1,65 (m, 1H)
(e): 2,42 (d, 2H)
(f): 3,32 (s, 3H)
(g): 3,80 (d, 2H)
(h): 4,30-4,35 (m, 2H)
(i): 5,02 (m, 2H)
(j): 6,95 (s, 2H)
(l): 7,34 (s, 4H)
(m): 7,40 (s, 1H)
(n): 7,50 (d, 1H)
(o): 8,05 (t, 1H)
(p): 8,40 (t, 1H)

O espectro de RM^1H está mostrado na figura 34, página 142.

Peptídeo B:

Análise elementar: Calculado: C 55,61; N 9,26; H 8,67

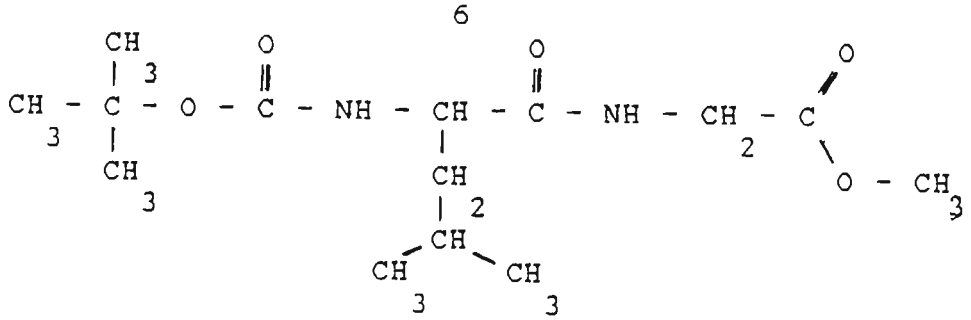
Encontrado: C 54,09; N 8,82; H 8,75

P.F. = 134-135 °C (Lit = 104-105 °C, Dutta e Morley, 1971)

HPLC: t_R = 5,2 min (MeOH/H_2O, 7:3 (v/v); 1,0 ml/min)

CCD: Rf_B = 0,60; Rf_D = 0,67; Rf_E = 0,86

RM^1H = (400 MHz, DMSO-d_6, TMS):



(ppm): (a): 0,83 (d, 3H)

(b): 0,86 (d, 3H)

(c): 1,38 (s, 3H)

(d): 1,43 (d, 2H)

(e): 1,56-1,63 (m, 1H)

(f): 3,60 (s, 3H)

(g): 3,70-3,90 (dq, 1H)

(h): 3,95-4,05 (m, 2H)

(i): 6,88 (d, 1H)

(j): 8,20 (t, 1H)

O espectro RM^1H obtido está mostrado na figura 35, página 143.

Peptídeo C:

Análise elementar (%): Calculado: C 55,61; N 9,26; H 8,67

Encontrado: C 52,38; N 11,19; H 6,37

P.F. = 83-85 °C (Lit = 83-84 °C; Niedrich, 1967)

HPLC: t_R = 2.9 min (MeOH/H_2O, 7:3 (v/v); 2,0 ml/min)

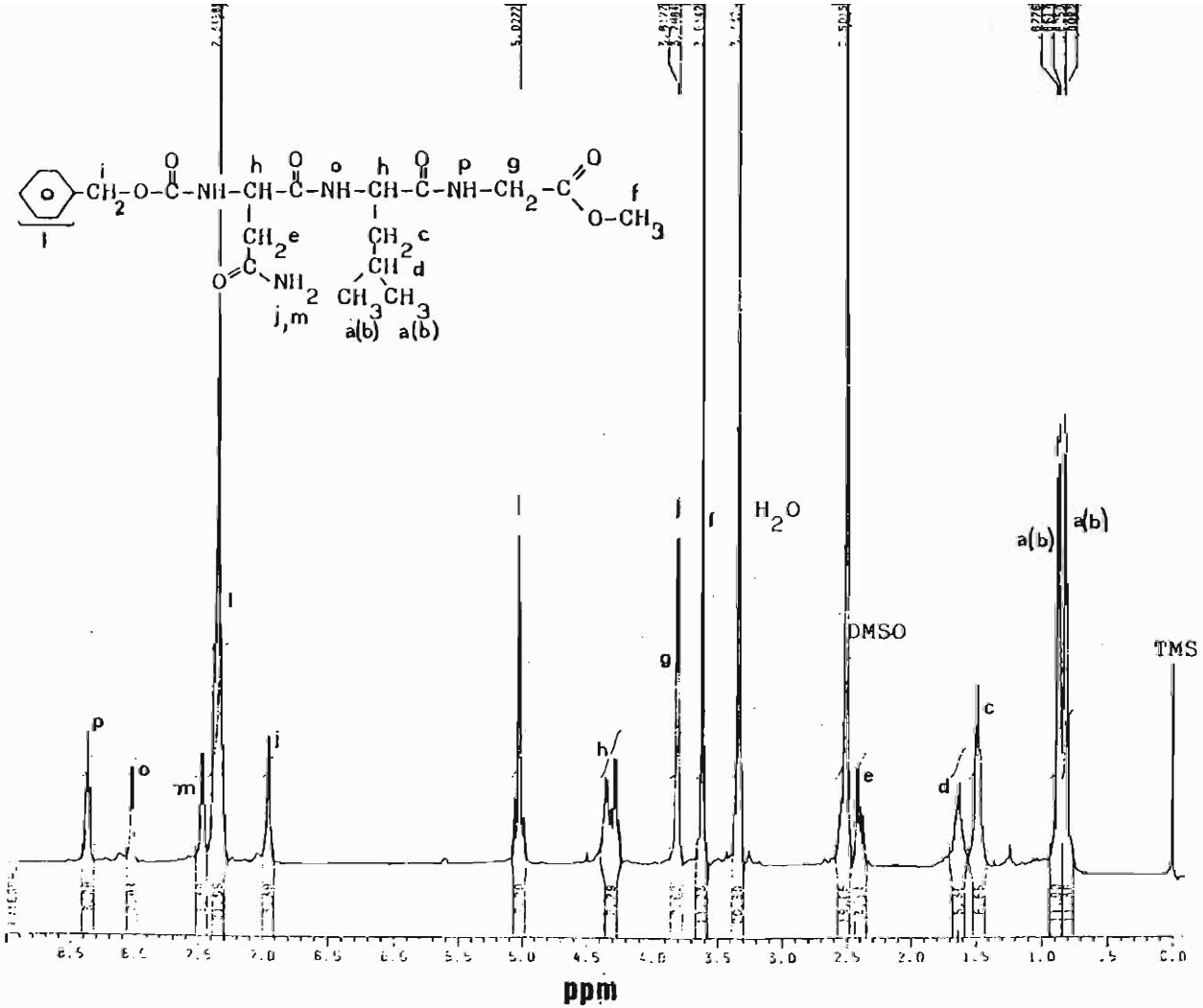


Figura 34. Espectro de RM ^{1}H em DMSO-d_6 de Z-Asn-Leu-Gly-OMe resultante da transesterificação de Z-Asn-Leu-Gly-OEt em solução metanólica de $Ca(Ac)_2$, 400 MHz.

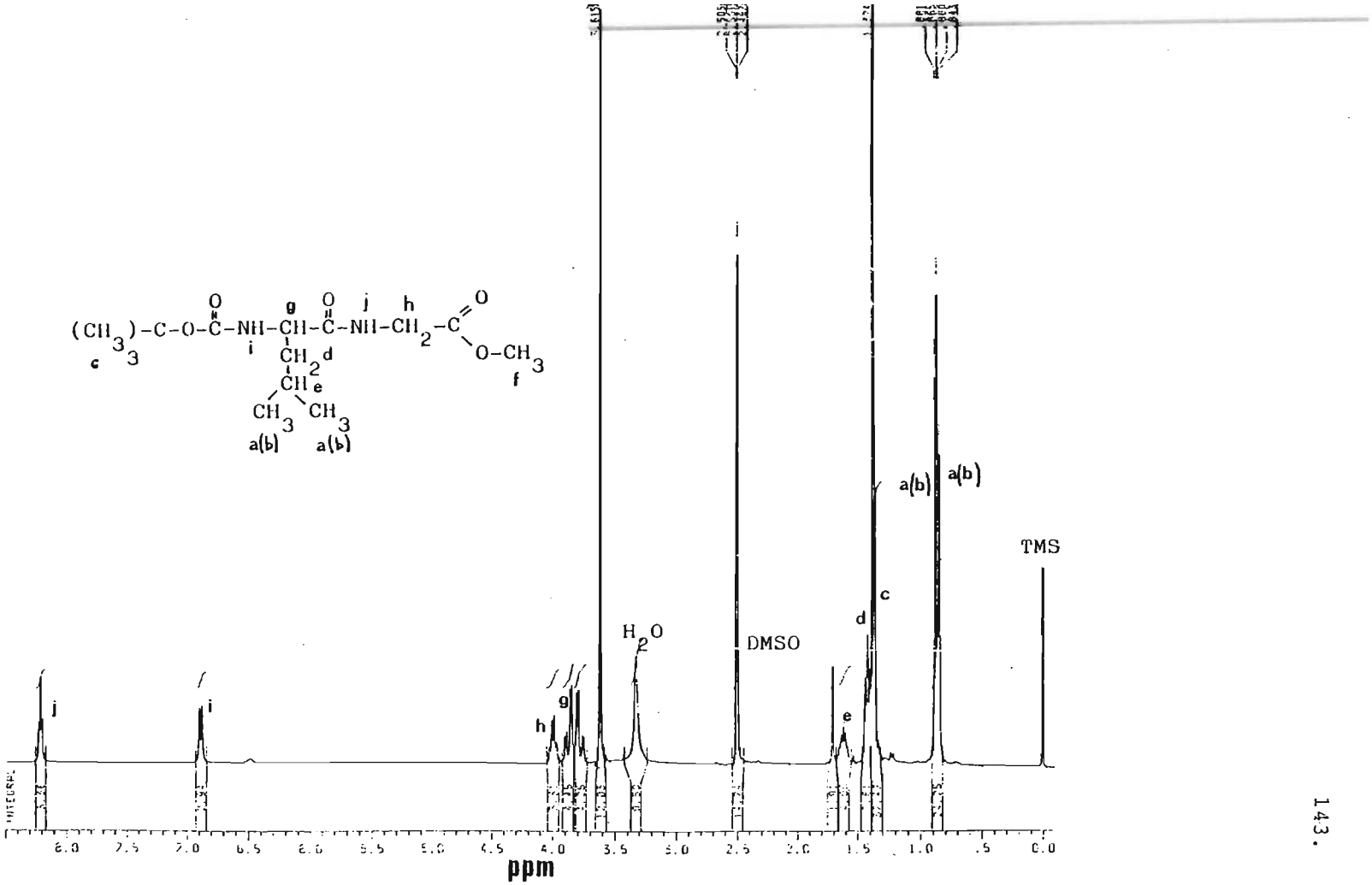
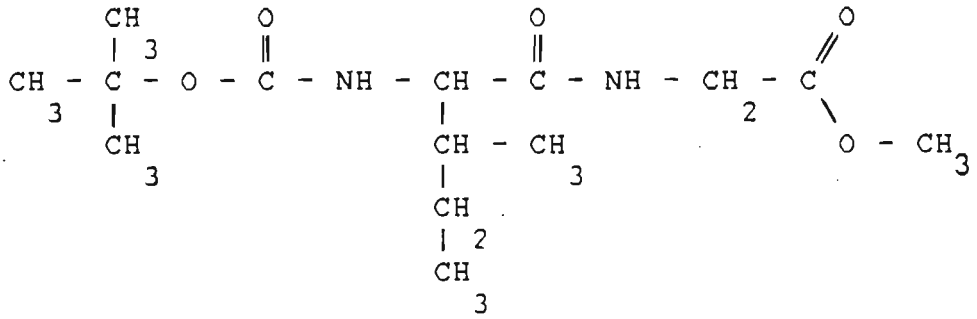


Figura 35. Espectro de RM ^{1}H de Boc-Leu-Gly-OMe resultante da transesterificação de Boc-Leu-Gly-OEt em solução metanólica de $Ca(Ac)_2$, 400 MHz.

CCD: $Rf_A = 0,67$; $Rf_B = 0,70$; $Rf_D = 0,65$

RM^1H (400 MHz, DMSO-d_6, TMS):



(ppm): (a): 0,80 (m, 3H) (e): 1,72 (s, 2H)

(b): 0,83 (m, 3H) (f): 3,61 (s, 3H)

(c): 1,10-1,20 (m, 1H) (g) 3,75-3,95 (m, 3H)

(d): 1,37 (s, 3H) (h): 8,30 (t, 1H)

O espectro de RM^1H está mostrado na figura 36, página 145.

7. Transesterificação de Boc-Gly-Res (1), Boc-Ala-Res (2), Boc-Val-Res (3), Boc-Leu-Gly-Res (4) e Moz-Asn-Leu-Gly-Res (5) na presença de acetato de cálcio.

7.1. Estudo qualitativo

Este estudo realizado conforme o método descrito no ítem 7.1., página 67 , nas condições experimentais expressas na tabela 25, página 146, forneceu os resultados mostrados na mesma tabela.

7.2. Estudo quantitativo e caracterização dos produtos obtidos

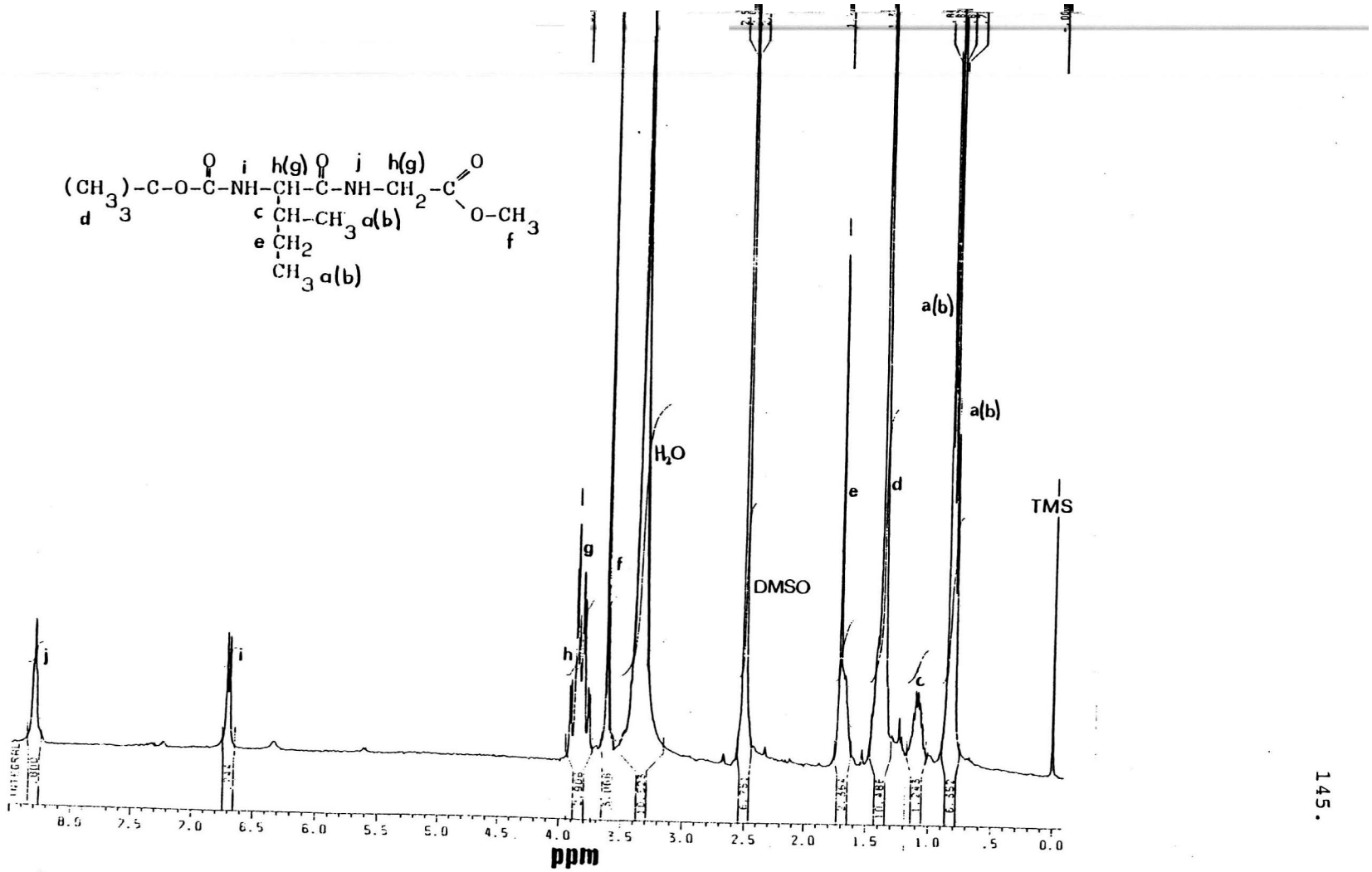


Figura 36. Espectro de RM ^{1}H em DMSO-d_6 de Boc-Ile-Gly-OMe resultante da transesterificação de Boc-Ile-Gly-OEt em solução metanólica de $Ca(Ac)_2$, 400 MHz.

Tabela 25. Transesterificação de Boc-aminoacil e peptidil-Res em soluções metanólicas de $Ca(Ac)_2$.

Composto	Quantidade do composto (mg)	Sol. metanólica de $Ca(Ac)_2$ 0,01 M (ml)	DCM (ml)	MeOH (ml)	Transesterificação detectada por CCD[D]
1) Boc-Gly-Res	50	0,52	3,4	13,1	+
	3	0,31[a]	0,2	0,49	-
2) Boc-Ala-Res	50	1,8	3,4	11,8	+
	3	0,11[a]	0,2	0,69	-
3) Boc-Val-Res	50	2,0	3,4	11,6	+
	3	0,11[a]	0,2	0,68	-
4) Boc-Leu-Gly-Res	50	1,4	3,4	12,2	+
	3	0,8	0,2	-	-

[D] refere-se ao sistema de solventes utilizado. Todas as incubações foram feitas a 38 °C por 48 horas utilizando Boc-Gly-Res (0,104 mmol/g) Boc-Ala-Res (0,37 mmol/g), Boc-Val-Res (0,401 mmol/g), Boc-Leu-Gly-Res e Moz-Asn-Leu-Gly-Res (0,277 mmol/g). [a] Foi utilizada solução metanólica de $Ca(Ac)_2$ 0,001 M. [b] A presença de produto transesterificado foi confirmada por HPLC por comparação a padrões.

Foram obtidos 9,8 mg e 75,0 mg dos produtos da transesterificação de 4 e 5 em soluções metanólicas de acetato de cálcio (ítem 7.2, página 68). Todos eles se mostraram cromatograficamente puros e apresentaram as seguintes caracterísiticas:

Produto 4:

Análise elementar (%): Calculado: C 55,61; N 9,26; H 8,67

Encontrado: C 55,92; N 8,65; H 8,78

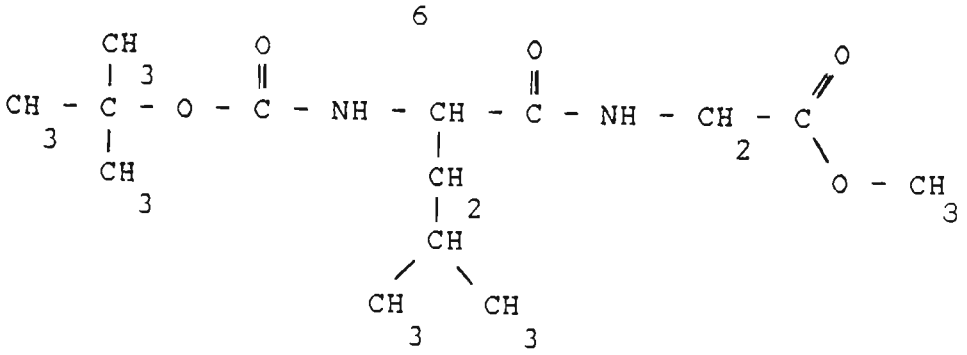
Análise de aminoácidos: Leu 0,97; Leu 1,03

P.F. = 131-132 °C (Lit = 104-105 °C, Dutta e Morley, 1971).

HPLC: t_R = 5.3 min (MeOH/H_2O, 7:3 (v/v), 1,0 ml/min)

CCD: Rf_B = 0,61; Rf_D = 0,68; Rf_E = 0,72

^{1}RM H (200 MHz, DMSO-d_6, TMS):



(ppm): (a): 0,83 (d, 3H) (f): 3,60 (s, 3H)

(b): 0,86 (d, 3H) (g): 3,77-3,91 (dq, 1H)

(c): 1,40 (s, 3H) (h): 3,93-4,00 (m, 2H)

(d): 1,43 (d, 2H) (i): 6,88 (d, 1H)

(e): 1,57-1,63 (m, 1H) (j): 8,22 (t, 1H)

O espectro de ^{1}RM H está mostrado na figura 37, página 148 .

Produto 5:

Análise elementar (%): Calculado: C 55,22; N 11,66; H 6,71

Encontrado: C 54,99; N 11,93; H 7,03

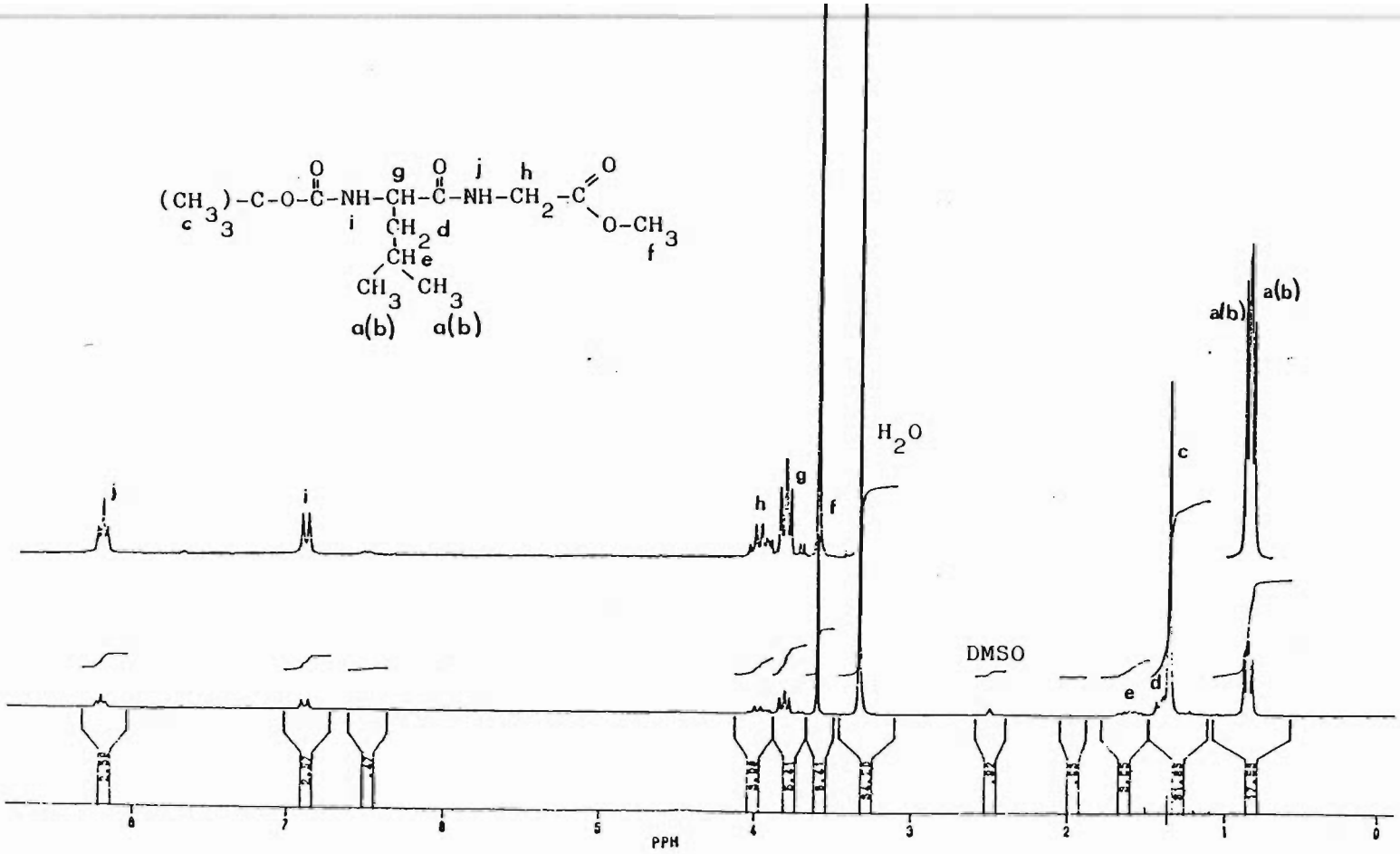


Figura 37. Espectro de RM ^{1}H em DMSO-d_6 de Boc-Leu-Gly-OMe resultante da transesterificação de Boc-Leu-Gly-Res em solução metanólica de $Ca(Ac)_2$, 200 MHz.

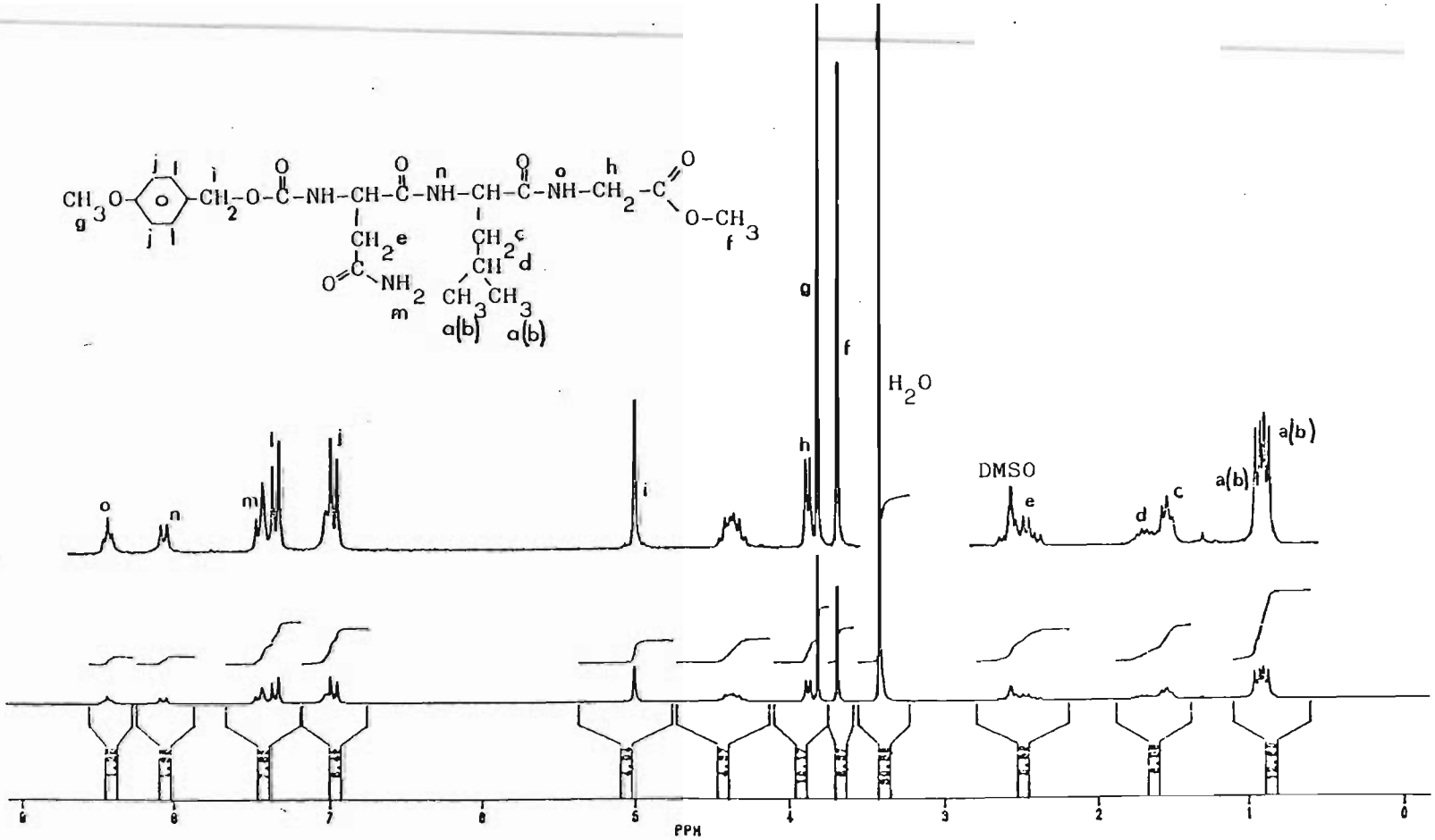


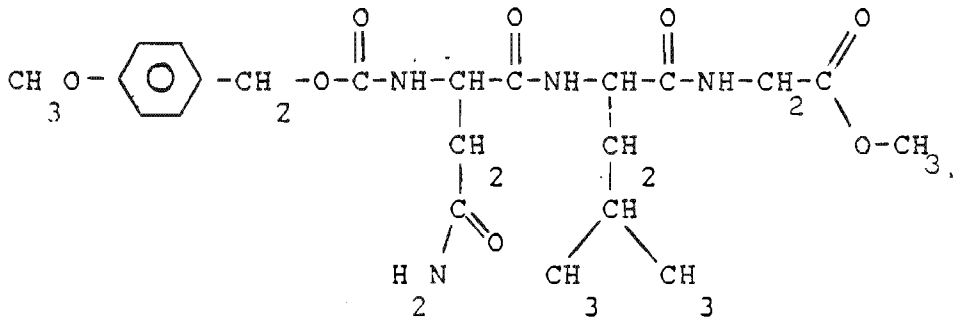
Figura 38. Espectro de RM ^{1}H em DMSO-d_6 de Moz-Asn-Leu-Gly-OMe resultante da transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-Res em solução metanólica de $Ca(Ac)_2$, 200 MHz.

P.F. = 202-203 °C

HPLC: t_R = 4,2 min (MeOH/H_2O, 7:3 (v/v), 1,0 ml/min)

CCD: Rf_B = 0,18; Rf_D = 0,24; Rf_E = 0,63

RM^1H (200 MHz, DMSO-d_6, TMS):



(ppm): (a): 8,45 (t, 1H)
(b): 8,06 (d, 1H)
(c): 7,45 (m, 2H)
(d): 6,97 (d, 3H)
(e): 7,35 (d, 3H)
(f): 5,00 (s, 2H)
(g): 3,87 (d, 2H)
(h): 3,68 (s, 3H)
(i): 3,68 (s, 3H)
(j): 1,70 (m, 1H)
(l): 1,54 (t, 2H)
(m): 0,94 (d, 3H)
(n): 0,88 (d, 3H)

O espectro e RM^1H está mostrado na figura 38, página 149.

V - DISCUSSÃO

1. Análise e discussão dos resultados

1.1. Síntese química de derivados de aminoácidos e peptídeos

Os derivados de aminoácidos descritos na tabela 4, página 70 , foram sintetizados com o objetivo de utilizá-los como reagentes na preparação química de peptídeos (ítem 3.1., página 30), com exceção de Moz-Gln-OH, Moz-Asn-OH, Boc-Asn-OH e H-Cys(S-Bzl)-OBu^t.HCl que foram usados como substratos em reações enzimáticas (ítem 3.2., página 46). Os peptídeos mostrados na tabela 5, página 71 , foram utilizados como substratos em sínteses enzimáticas (ítem 3.2., página 46) ou como padrões autênticos durante o desenvolvimento do trabalho.

Como se pode observar nestas tabelas, todos estes compostos foram caracterizados por determinação de ponto de fusão e de Rf em sistemas de solventes adequados, exceto H-Ala-OEt.HCl, Boc-Leu-Gly-OBzl, Boc-Leu-Gly-OBu^t, Boc-Leu-Ala-OEt e Z-Pro-Leu-Gly-NH_2, os quais foram obtidos na forma de óleo e analisados apenas por determinação de Rf. Os peptídeos Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 e Moz-Asn-Leu-Gly-NH_2 foram submetidos à análise elementar e de aminoácidos (ítem 1.2.1. e 2.3., páginas 69 e 74), as quais forneceram resultados bastante próximos dos esperados. Tal cuidado se justifica pelo fato de os mesmos não estarem descritos na literatura e terem sido sintetizados para servirem de padrões autênticos nas reações de síntese enzimática descritas no ítem 3.2.4., página 49 .

De um modo geral, os compostos cristalinos apresentaram valores de ponto de fusão bastante próximos dos esperados, com

exceção de Boc-Leu-OH.H_2O, Boc-Cys(S-Bzl)-OH e Boc-Pro-Leu-Gly-NH_2. Tal diferença pode ser explicada pela utilização de sistemas de recristalização diferentes dos descritos na literatura ou ainda pelos diferentes graus de pureza dos compostos sintetizados por nós e os nela descritos. Os compostos cujos pontos de fusão esperados não estão descritos nas tabelas apresentadas, não foram encontrados na literatura.

Síntese de Boc-Leu-Gly-Res e Moz-Asn-Leu-Gly-Res

Como descrito no ítem 1.2.2., página 72 , os peptidil-resina Boc-Leu-Gly-Res e Moz-Asn-Leu-Gly-Res foram obtidos com 95,8 e 82,8% de rendimento respectivamente, calculando-se a partir da Boc-Gly-Res empregada, cujo grau de substituição era 0,277 mmol/g. Já o rendimento da reação de síntese do tripeptidil-resina a partir de Boc-Leu-Gly-Res foi de 96.7%. Estes compostos foram analisados em sua composição de aminoácidos e os resultados encontrados (ítem 1.2.2., página 72) revelaram a proporção esperada, o que confirma a sua obtenção. Os mesmos foram sintetizados para serem usados nas reações de transesterificação descritas no ítem 7, página 67 .

1.2. Síntese enzimática de peptídeos

1.2.1. Z-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^t e Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^t

O estudo da síntese destes dipeptídeos mediante catálise por termolisina foi realizado com o objetivo de verificar a viabilidade desta protease catalisar os acoplamentos entre Z-Asn-OH ou Moz-Asn-OH e H-Cys(S-Bzl)-OBu^t.HCl. Além disso, como

descrito no ítem II, página 25 , a obtenção deste peptídeo acrescentaria dados ao estudo da síntese enzimática de ocitocina em desenvolvimento no nosso laboratório.

A escolha da proteção da cadeia lateral do componente amínico foi feita baseando-se no fato de que a termolisina é uma endopeptidase que requer resíduos de aminoácidos hidrofóbicos como doadores de aminogrupos tanto para hidrólise, como para a síntese de ligações peptídicas (Morihara, 1974). A presença do grupo benzil na cisteína mimetiza este caráter.

As condições de síntese testadas (tabela 6, página 73) foram escolhidas com base na solubilidade dos reagentes e produtos nos meios reacionais, bem como em sínteses de diversos peptídeos contendo asparagina já descritas na literatura (Machini de Miranda e col., 1986; Isowa e col., 1977; Isowa e Ichikawa, 1979). As mesmas, entretanto, não tiveram objetivos de comparar os rendimentos de reação em função de um determinado fator experimental (concentração de reagentes, enzima ou tampões utilizados, tempo de reação, proporção entre os componentes carboxílicos e amínicos ou volume de solvente orgânico adicionado) e por este motivo em muitas reações realizadas ocorreu variação simultânea de dois ou mais fatores. Todos os testes foram realizados em pequena escala e os produtos formados foram detectados por cromatografia em camada delgada através da comparação com os padrões autênticos obtidos por catálise de papaína. Como se pode observar nesta tabela, em vários meios reacionais testados ocorreu a formação do produto desejado. Em nenhum deles, entretanto, as quantidades de produto eram significativas para que os mesmos fossem isolados e quantificados.

Estes resultados sugeriram que o componente amínico H-Cys

(S-Bzl)-OBu^t .HCl fosse inadequado como substrato para a termolisina (apesar de seu caráter hidrofóbico adquirido pela proteção), já que Z-Asn-OH e Moz-Asn-OH se mostraram excelentes componentes carboxílicos em reações catalisadas por esta enzima (Machini de Miranda e col., 1986). Tal inadequação não pode ser atribuída à presença do átomo de enxofre da sulfidrila, pois Isowa e Ichikawa (1979) obtiveram os dipeptídeos Moz-Glu(O-Bzl)-Met-NH_2, Moz-Met-Met-NH_2 e Moz-Leu-Met-NH_2 com rendimentos superiores a 80%. Também não pode ser atribuída à presença do grupo benzílico como protetor da sulfidrila, pois os derivados de L-fenilalanina tem se mostrado ótimos substratos para esta protease (Isowa e Ichikawa, 1979 e Isowa e col., 1979). O grupo terc-butil usado como protetor da carboxila também não deve ser o responsável pelo fato deste componente amínico não ser um substrato adequado para esta protease, já que Oka e Morihara (1980) obtiveram Z-Phe-Leu-OBu^t com 86% de rendimento mediante catálise por termolisina. Por outro lado, é sabido que o subsítio S'_1 do sítio ativo desta enzima consiste em uma cavidade hidrofóbica restrita, incapaz de acomodar a cadeia lateral do triptofano (Holden e Matthews, 1988). De fato, Morihara e Tsuzuki (1970) mostraram que a relação K_{cat}/K_M para a hidrólise de Z-Gly-Leu-NH_2 é 2,7 $seg^{-1} \times mM^{-1}$, enquanto que para Z-Gly-Trp-NH_2 este valor é negligível. A análise do modelo Courtauld de H-Cys(S-Bzl)-OBu^t demonstrou que a presença simultânea do átomo de enxofre e do grupo benzil torna a cadeia lateral da cisteína mais volumosa em relação à de fenilalanina e metionina. Provavelmente, tal volume excede o tamanho aceitável para a interação ao subsítio S'_1 da termolisina (de forma similar à cadeia lateral do triptofano), tornando este substrato inadequado a ela.

Os padrões autênticos de Z-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^t e Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^t utilizados foram obtidos com rendimentos 29 e 12% respectivamente, através da catálise por papaína nas condições experimentais empregadas (ítens 3.2.2., 3.2.3., 2.1. e 2.2., páginas 47, 48,72e 74). Tais sínteses foram realizadas com base no trabalho de Pinheiro da Silva (1984) que obteve Z-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^t usando esta tiol-protease.

1.2.2. Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2

Apesar de Matsubara e colaboradores (Matsubara e col., 1969) já terem descrito que a termolisina não hidrolisa ligações peptídicas do tipo X-↓Y-Z onde Z é um resíduo de prolina, decidimos estudar a síntese de Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 a partir de Moz-Asn-OH e H-Cys(S-Bzll)-Pro-Leu-Gly-NH_2 usando termolisina como catalisador. Esta tentativa se justifica pelas razões descritas no ítem II, página 25 e pelo nosso conhecimento de trabalhos da literatura que mostram dados controversos acerca da capacidade de certas enzimas hidrolisar e sintetizar determinadas ligações peptídicas. Em 1968, por exemplo, Morihara e colaboradores descreveram que a hidrólise de Z-Pro-Leu-NH_2 por termolisina era insignificante (Morihara e col., 1968). Entretanto, em 1970 Morihara e Tsuzuki demonstraram que 41% de Z-Gly-Pro-Leu-Gly-OH era hidrolisado na ligação Pro-Leu por esta enzima (Morihara e Tsuzuki, 1970) e em 1979 Isowa e Ichikawa obtiveram o dipeptídeo Z-Pro-Leu-NH_2 com 53% de rendimento usando termolisina como catalisador (Isowa e Ichikawa, 1979). Estes mesmos dados, por outro lado, também sugeriram que paralelamente à síntese de Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 pudesse ocorrer a hidrólise secundária da ligação Pro-Leu do

componente amínico H-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2. Este tipo de hidrólise secundária, entretanto, é comum em síntese enzimática de fragmentos peptídicos e depende das condições experimentais empregadas, sendo possível minimizá-la e obter o produto desejado com bom rendimento optimizando as condições de reação (Nakanishi e col., 1986).

Como se observa na tabela 7, página 76, foram testados vários meios reacionais diferentes. A maioria deles são sistemas bifásicos formados de soluções salinas ou tampão e acetato de etila. Nestes sistemas, os reagentes e produtos são mais solúveis na fase orgânica em relação à aquosa, o que diminui a exposição dos mesmos à enzima que permanece dissolvida na fase aquosa (Nakanishi e col., 1986). Em nenhuma delas a quantidade de pentapeptídeo formado, detectada pela análise dos meios reacioais por HPLC, foi superior a 2%. Em várias, entretanto, ocorreu a formação de um precipitado (C,I,J,K,L,M) que foi isolado por filtração, lavado e seco (ítem 3.2.1., página 46).

Conforme descrito no ítem 2.3., página 74 , os resultados obtidos na análise por CCD do precipitado C hidrolisado sugeriram que o pentapeptídeo pudesse ser obtido como precipitado nas condições experimentais da reação C. A intensidade das manchas correspondentes a Asp, Leu e Gly, entretanto, era visivelmente maior em relação às correspondentes à Pro e Cys(S-Bzl). A análise do meio reacional K por CCD não demonstrou a presença da mancha correspondente a H-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2, mas revelou a presença de um composto de Rf superior ao de Moz-Asn-OH e inferior ao do pentapeptídeo desejado. Foi observado por HPLC, como mostrado na figura 2, página 78, a presença do pico A-3 de tempo de retenção igual ao do precipitado K obtido (B-2), superior ao de Moz-Asn-OH (A-1 e B-1) e inferior ao do pentapep-

tídeo, além de A-2. Os perfis cromatográficos obtidos em CCD e HPLC dos meios reacionais I,J, K,L e M e dos precipitados neles obtidos (Figura 4, página 81) forneceram resultados idênticos aos encontrados para a síntese K.

Estes resultados sugeriram que nestas reações, ocorreu a hidrólise da ligação Pro-Leu do componente amínico H-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 e formação do tripeptídeo Moz-Asn-Leu-Gly-NH_2, resultante da reação entre Moz-Asn-OH e o H-Leu-Gly-NH_2. Por ser pouco solúvel nos sistemas de solventes utilizados, o tripeptídeo precipitou.

Para comprovar tal hipótese, foram realizadas: 1- síntese de um padrão autêntico de Moz-Asn-Leu-Gly-NH_2 através do acoplamento entre Moz-Asn-OH e H-Leu-Gly-OEt catalisado por termolisina (tabela 8, página 82) e amonólise do produto obtido (ítem 3.1.20., página 41); 2- as análises simultâneas do mesmo e do precipitado obtido na síntese K mostrado no ítem 2.3., página 74 . A análise cromatográfica do padrão (P) e precipitado K (K) forneceu valores similares de Rf (P: 0,82; K: 0,84) e t_R (P: 3,3 min; K: 3,5 min). As porcentagens do conteúdo de carbono, nitrogênio e hidrogênio observadas para o precipitado K (C = 54,87, N = 14,87 e H = 6,99) foram próximas às teóricas previstas para Moz-Asn-Leu-Gly-NH_2 (C = 54,18; N = 15,04; H = 6,71) e as observadas para o padrão (C = 54,31; N = 14,87; H = 6,86). Os espectros de RM^1H e os resultados da análise de aminoácidos (figura 3 e ítem 2.3., páginas 79 e 74) confirmaram que o precipitado K era o tripeptídeo Moz-Asn-Leu- Gly-NH_2.

Apenas os precipitados J e M foram pesados devido ao fato de terem se mostrado razoavelmente puros em HPLC (Figura 4, página 81). Os rendimentos brutos foram de 24 e 32% respectivamente.

É importante salientar que as reações M e N foram realizadas na presença de 1,4 butanodiol. Este solvente tem sido utilizado em reações enzimáticas de semi-síntese de insulina com o objetivo de proteger a insulina de hidrólise secundária (Rose e col., 1983). Os resultados obtidos mostraram que nestas reações também ocorreu a hidrólise secundária de componente amínico e subsequente formação de Moz-Asn-Leu-Gly-NH_2 (precipitado), indicando que não houve a proteção de H-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2. Isto pode ser explicado pela maior especificidade do subsítio S'_1 pelo resíduo de leucina em relação ao de cisteína protegida com o grupo benzil.

1.2.3. Moz-Asn-Leu-Gly-OEt

Este tripeptídeo foi sintetizado com o intuito de obter o padrão Moz-Asn-Leu-Gly-NH_2 (ítem anterior, página 155) através de sua amonólise. Para tanto, foi realizado o acoplamento entre Moz-Asn-OH e H-Leu-Gly-OEt via catálise por termolisina. O mesmo havia sido previamente realizado com DCC e HOBt com rendimento bruto de 20% (escala de síntese = 1 mmol), sendo a quantidade de tripeptídeo obtida muito pequena para submeter à purificação e amonólise.

A síntese No. 1 realizada nas condições descritas na tabela 8, página 82 , forneceu o produto desejado com 44% de rendimento. Suas análises confirmaram a sua natureza química e a ausência quaisquer de contaminantes orgânicos. Entretanto, como precaução, o mesmo foi submetido à recristalização em metanol/ água para posterior amonólise. Durante sua dissolução em metanol, ocorreu transformação parcial do tripeptídeo evidenciada por CCD e HPLC (~~figura 7, página 89~~). O subproduto formado

apresentou Rf_F e t_R ligeiramente menores (Rf_F = 0,65; t_R = 4,5 min) que os observados para o peptídeo original (Rf_F = 0,68, t_R = 4,8 min). Por essa razão, foi realizada a síntese No. 2 que forneceu o tripeptídeo puro com 62% de rendimento. O mesmo foi amonolisado após a lavagem e secagem à vácuo, para a obtenção do padrão autêntico de Moz-Asn-Leu-Gly-NH_2 necessário (ítem 2.3.), página 74 . Os rendimentos encontrados nestas sínteses mostram que o método enzimático demonstrou ser mais adequado à obtenção de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt que o químico, o que confirma nossos dados anteriores de síntese enzimática de outros tripeptídeos de estrutura semelhante contendo asparagina (Machini de Miranda e col., 1986).

As outras sínteses descritas (tabela 8, página 82) foram feitas em condições similares e em escalas diversas com o intuito de obter várias partidas de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt, que nos possibitassem estudar mais detalhadamente a transformação observada em metanol. Como se observa no ítem 2.4., página 80 , todos eles apresentaram os mesmos valores de Rf e t_R do Moz-Asn-Leu-Gly-OEt obtido na síntese 3 (3B) e por essa razão não foram submetidos à outras análises.

A síntese de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt não está descrita na literatura e por isso o ponto de fusão esperado não foi apresentado.

1.2.4. Z-Asn-Leu-Gly-OEt, Boc-Asn-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl, Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^t , Moz-Gln-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Ile-Gly-OEt e Moz-Asn-Leu-Ala-OEt.

Estes tripeptídeos foram sintetizados enzimatica-

mente nas condições descritas na tabela 9, página 86 e os rendimentos obtidos foram superiores a 50%, com exceção de Boc-Asn-Leu-Gly-OEt (25%) e Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^{t} (22%). Estes rendimentos são significativamente menores que os encontrados por nós na síntese de Moz-Asn-Ile-Gly-OBzl (88%), Moz-Asn-Ile-Ala-OBzl (95%), Moz-Asn-Ile-Leu-OBzl (88%) e Moz-Asn-Ile-Phe-OBzl (89%) em condições de reação similares (Machini de Miranda e col., 1986). Esta diferença pode ser atribuída ao fato de não ter sido realizado um estudo metodológico para a determinação das condições ótimas de síntese destes tripeptídeos. Tal estudo não foi realizado porque o nosso interesse era obter estes compostos apenas em quantidades suficientes para sua utilização como reagentes nos estudos descritos no ítem 5, página 63 , cujos resultados serão discutidos no ítem 1.5., página 176 , desta seção. Evidentemente, também nos interessava testar a possibilidade de obtenção destes compostos via catálise por termolisina para dar continuidade ao estudo de incorporação de N_{α}-acil-L-asparagina a peptídeos pelo método enzimático.

Na tabela 10, página 87 , são encontrados os valores de $Rf_{B,D,F}$, tempo de retenção, ponto de fusão, conteúdo de aminoácidos e porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio dos tripeptídeos sintetizados recristalizados em etanol/ água. Estes resultados demonstraram que os produtos obtidos são realmente os peptídeos desejados. É possível, entretanto, observar nesta tabela algumas diferenças entre os valores do conteúdo de carbono, hidrogênio e nitrogêno teóricos e encontrados para os peptídeos Boc-Asn-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^{t} e Moz-Asn-Ile-Gly-OEt. Estes compostos, como já foi citado acima, se mostraram cromatograficamente puros em CCD e HPLC, faixa estreita de fusão e composição de aminoácidos

esperados, o que nos impossibilita explicar tais diferenças.

Devido ao fato das reações de síntese terem sido realizadas em condições experimentais similares mas não idênticas e em escalas diferentes, não nos foi possível comparar os rendimentos obtidos. Entretanto, pudemos concluir que:

1. Boc-Asn-Leu-Gly-OEt foi obtido com menor rendimento em relação à Z-Asn-Leu-Gly-OEt e Moz-Asn-Leu-Gly-OEt provavelmente devido à dois fatores: a- maior solubilidade no meio reacional, a qual foi confirmada pela necessidade de adição de $(NH_4)_2SO_4$ à reação para sua precipitação; b- menor interação do grupo Boc- com o subsítio S_2 da termolisina. Esta última hipótese é baseada no trabalho de Fruton que determinou que o valor de K_{cat}/K_m ($min^{-1}.mM^{-1}$) na síntese de Boc-Phe-Leu-NHPh é 49 ± 3 e de Z-Phe-Leu-NHPh é 73 ± 5 (Fruton, 1983).
2. H-Leu-Gly-OBu^t se mostrou quase insolúvel no meio de reação, o que provavelmente acarretou uma menor extensão de síntese de Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^t em relação a Moz-Asn-Leu-Gly-OEt e Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl.
3. Em geral nas condições experimentais utilizadas, foram necessários tempos de reação mais longos que os usados na síntese dos tripeptídeos Moz-Asn-Ile-Gly-OBzl, Moz-Asn-Ile-Ala-OBzl, Moz-Asn-Ile-Leu-OBzl e Moz-Asn-Ile-Phe-OBzl por nós anteiormente sintetizados (Machini de Miranda e col., 1986), provavelmente porque as condições empregadas não eram as condições ótimas de síntese destes compostos.
4. Através de catálise por termolisina é possível obter os tripeptídeos em discussão, os quais precipitam no meio de reação e após lavagem e secagem são cromatograficamente puros.

Tais compostos não estão descritos na literatura e por essa razão não foram apresentados os valores esperados de ponto

de fusão.

1.3. Transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt em metanol

Como descrito no ítem 1.2.3., página 158, o tripeptídeo bruto 1B (tabela 8, página82) foi submetido à recristalização no sistema metanol/ água e durante a dissolução em metanol, o mesmo foi parcialmente transformado (~~figura 7, página 89~~). Esta transformação nos pareceu interessante pelas seguintes razões: 1- o tripeptídeo a ser recristalizado mostrou-se cromatográficamente puro; 2- o metanol utilizado era de grau analítico; 3- o pH aparente do mesmo e da solução metanólica do peptídeo era neutro (6-7); 4- a dissolução foi realizada à temperatura ambiente; 5- nas condições experimentais em que foi realizada a dissolução não era possível ocorrer a quebra do grupo protetor Moz-.

Com o intuito de comprovar a ocorrência desta transformação realizamos a síntese No. 3 (tabela 8, página 82) e com o peptídeo bruto 3B obtido foram feitos o estudo descrito no ítem 4.1.4., página 54, que consistiu em dissolver o peptídeo 3B em metanol e acompanhar a cinética de sua transformação por HPLC. Os resultados encontrados (tabela 11 e figura 8, páginas 90 e ~~82~~ 91) mostraram que a transformação era bastante rápida a 28 °C. Como pode ser observado, 52% do produto original foi transformado em 5 horas de incubação e após 24 horas apenas 28% do peptídeo original foi detectado. Estes dados sugeriram que em tempos longos a transformação poderia ser total, o que facilitaria o isolamento do produto formado para sua identificação como descrito no ítem 4.1.5., página 54.De fato, após 169 horas de incubação em metanol a 28 °C, todo o

Moz-Asn-Leu-Gly-OEt foi transformado. A análise do mesmo através de espectrometria de massas e RM^1H (figuras 9 e 10, páginas 94 e 95), análises elementar e de aminoácidos (ítem 3.1.4., página 92) indicaram que o composto resultante era Moz-Asn-Leu-Gly-OMe e, portanto, a reação de transformação observada era uma reação de transesterificação.

Diante desta evidência passamos a investigar a razão da ocorrência desta reação. A possibilidade de catálise da transesterificação pela termolisina foi descartada, pois a mesma não possui atividade esterásica (Inowa e col., 1978 ~~Pangburn e Walsh, 1975~~) e nem contaminantes com tal atividade. A presença de contaminantes de natureza orgânica no peptídeo com tal capacidade também foi descartada, já com base nos resultados das análises realizadas. Trabalhos da literatura, entretanto, mostram que alguns íons metálicos tais como Cu (II) e Pd (II), são capazes de promover a hidrólise de ésteres de peptídeos (Hay e Pujari, 1986; Hay e Nolan, 1974) em solução aquosa. Também é descrito que Ca(II) se complexa a peptídeos e proteínas conferindo a eles maior estabilidade estrutural (Asso e col., 1985; Dahlquist e col., 1976).

Com base nestes dados foram levantadas as seguintes hipóteses para explicar a reação de transesterificação observada: 1. Presença de íons metálicos no peptídeo ou no metanol que promoveriam a reação, a exemplo da hidrólise de ésteres de peptídeos; 2. Complexação do peptídeo com Ca(II) durante o processo de síntese e ocorrência da reação de transesterificação devido à sua presença; o Ca(II) seria proveniente do meio reacional, pois este contém $Ca(Ac)_2$ $5,0 \times 10^{-2}$ M necessário à estabilização da termolisina (tabela 8, página 82. Cabe salientar que nos pareceu inviável que o $Ca(Ac)_2$ tivesse sido apenas

arrastado com o peptídeo durante a sua precipitação, pois este sal é extremamente solúvel no meio reacional e além disso, o peptídeo precipitado foi lavado várias vezes com soluções aquosas após sua filtração (ítem 3.2.1., página 46).

Visando comprovar as hipóteses acima realizamos os seguintes experimentos:

- Recristalização de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B em $EtOH/H_2O$, dissolução e incubação do recristalizado em metanol a 38 °C (ítens 4.2.1. e 4.2.2., páginas 58 e 59).
- Incubação do tripeptídeo bruto 3B em soluções metanólicas de o-fenantrolina ou de EDTA (ítens 4.1.11. e 4.1.12., páginas 57 e 58).
- Dosagem do conteúdo de Ca(II) no tripeptídeo 3B.

A hipótese 1 foi invalidada pelos resultados descritos no ítem 3.1.10. e figura 15, páginas 100 e 104 , que mostram que o tripeptídeo 3B é transesterificado em metanol na presença de o-fenantrolina (67% em 48 horas a 38 °C). Na ausência da mesma foi observado 54.6% de transesterificação.

A recristalização do tripeptídeo 3B em etanol/ água não provocou mudanças estruturais no mesmo, pois as características do recristalizado 3R são idênticas às observadas para 3B (figura 18, página 110. Apenas o valor do ponto de fusão foi superior (193-196 °C) ao encontrado para o peptídeo 3B (179-183 °C), o que é compreensível já que o composto foi submetido à recristalização. A incubação de 3R em metanol (ítens 4.2.2. e 3.2.2., páginas 59 e 109) demonstrou que o mesmo não sofria transesterificação por 48 horas a 38 °C, o que indicou a perda do "fator catalítico da reação" durante a recristalização. Segundo a hipótese 2 este fator estaria associado à presença de Ca(II) em 3B.

A incubação de 3B em solução metanólica de EDTA (ítens

4.1.12., e 4.1.13, páginas 57 e 58) forneceu os resultados mostrados na tabela 15, página 105 e figura 16, página 107 . Fica evidente que na presença deste quelante (proporção molar peptídeo/EDTA, 1:1) não ocorreu a transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt. Este resultado sugeriu que o EDTA tenha se complexado ao "catalisador" (provavelmente Ca(II) presente em 3B) evitando que o fenômeno ocorresse. O aparecimento de precipitado no meio reacional confirmou tal complexação. A determinação do conteúdo de Ca(II) em 3B por absorção atômica (tabela 13, página 97) comprovou a presença deste íon no mesmo. Estes resultados confirmaram a hipótese 2 por nós levantada, indicando que o Ca(II) está diretamente envolvido no processo de transesterificação de 3B em metanol.

Com o objetivo de obter maiores informações e compreender melhor o processo de transesterificação e o envolvimento do Ca(II) no mesmo, realizamos os seguintes estudos:

1- Novas sínteses de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt em condições similares ás empregada para a obtenção de 3B, determinação do conteúdo de Ca(II) nos peptídeos resultantes de cada uma das síntese e sua incubação em metanol a 38 ^{o}C (ítens 3.2.5. e 4.1.6., páginas 51 e 55).

Nas condições expressas na tabela 8, página 82 , foram sin sintetizados os Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 4B,5B,6B,7B,8B,9B e 10B. Como descrito no ítem 2.4., página 80, todos foram obtidos na forma cromatograficamente pura e apresentaram caracterísitcas idênticas a 3B. A síntese 4 foi realizada com o objertico de dispormos de maior quantidade de tripeptídeo bruto para dar continuidade aos nossos estudos. O mesmo (4B) foi obtido com 52% de rendimento e quando incubado em metanol a 38 ^{o}C (ítem 4.1.6., página 55),

apresentou diferenças de velocidade de transesterificação em relação a 3B (tabela 13, página 97) . Realizamos então as sínteses 5 e 6 usando a escala utilizada na síntese No. 3 (5) e a escala de 1 mmol (6). Os produtos 5B e 6B apresentaram velocidade de transesterificação em metanol diferentes das obtidas nas incubações de 3B e 4B (tabela 13, página 97). Tais dados sugeriram que estes tripeptídeos contivessem diferentes conteúdos de Ca(II) (provavelmente em decorrência da escala de síntese usada) e que por essa razão transesterificavam com velocidades diferentes nas mesmas condições experimentais.Para confirmar esta suspeita, foi realizada a dosagem de Ca(II) dos Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 4B,5B e 6B por absorção atômica. Foram encontrados conteúdos diversos de Ca(II) em diferentes amostragens de cada um dos Moz-Asn-Leu-Gly-OEt analisados (tabela 14, página 98), o que nos levou a realizar a homogeneização cuidadosa dos mesmos descrita no ítem 4.1.7., página 55 ,seguida de sua incubação em metanol a 38 ^{o}C para acompanhamento cinético. Paralelamente, a estes estudos foram realizadas as sínteses 7,8,9 e 10 (8 foi sintetizado em solução contendo $Ca(Ac)_2$ 2,5 x 10^{-1} M e e 7,9 e 10 em solução isenta deste sal) em diferentes escalas de síntese. Os tripeptídeos 7B,8B,9B e 10B foram submetidos aos mesmos estudos e homogeneização realizados para 3B,4B,5B e 6B (ítens 4.1.6. e 4.1.7., páginas 55 e 55) e os resultados apresentados mostraram que: 1. 7B não sofreu transesterificação em 48 horas a 38 ^{o}C apesar de conter Ca(II) (tabela 13, página 97); 2. 9B e 10B foram transesterificados em 28 e 19% respectivamente após 48 horas; 3. a transesterificação de 8B em metanol é mais rápida que para os outros Moz-Asn-Leu-Gly-OEt.

É interessante notar que 7B,9B e 10B foram sintetizados em solução de acetato de sódio isenta de acetato de cálcio e por

isso era esperado que estes peptídeos não contivessem Ca(II) e portanto não transesterificassem quando incubados em metanol. Entretanto, como citado acima, 9B e 10B transesterificam lentamente neste solvente. Além disso, a figura 11, página 99 , mostra que 7B (que não transesterifica) contém Ca(II). Como as reações de síntese destes compostos foram realizadas em escala diferentes, usando uma amostra de termolisina que contém 20% de acetato de cálcio, levantamos a hipótese de formação de dois ou mais tipos de complexos entre Ca(II) e as moléculas de peptídeos, dependendo da disponibilidade de Ca(II) no meio e das condições de síntese. Um deles levaria à transesterificação.

Como é possível observar, também não obtivemos valores reprodutíveis do conteúdo de Ca(II) dos Moz-Asn-Leu-Gly-OEt sintetizados 5B,7B e 8B (figura 11, página 99). Seguramente, as variações encontradas se devem à natureza das amostras, pois, as análises de padrões realizadas paralelamente forneceram resultados reprodutíveis. Nossa suposição é a de que o Ca(II) nas amostras não esteja sendo liberado total e igualmente em todas as análises, o que certamente forneceria resultados variados. Por essas razões, adotamos os valores médios das diferentes determinações realizadas como sendo o conteúdo real de Ca(II) dos Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 5B, 7B e 8B: 0.08%, 0.50% e 0.22%, respectivamente. Não é correto adotar tais valores para os outros Moz-Asn-Leu-Gly-OEt, pois as várias dosagens foram feitas em condições diversas.

A comparação entre a transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B-10B homogeneizados forneceu as porcentagens de transesterificação em metanol descritas na tabela 13, página 97. De uma forma geral, as velocidades de transesterificação encontradas foram inferiores às obtidos antes da homogeneização

(tabela 12, página 96) . Nos parece que a única explicação plausível para o fato é a de que o processo de trituração induz à uma perda parcial da capacidade de transesterificação dos mesmos, provavelmente devido à destruição do complexo Ca(II)-peptídeo envolvido no processo.

O fato de que os Moz-Asn-Leu-Gly-OEt brutos obtidos nas diferentes sínteses transesterificarem com velocidade diversas não pode ser explicado por seus conteúdos de Ca(II), como havíamos suposto anteriormente devido as razões acima discutidas. Acreditamos que o mais importante seja a maneira como o Ca(II) se liga ao peptídeo no momento de sua precipitação no meio reacional, o que dependeria não só de das condições experimentais empregadas mas também da escala na qual a síntese é realizada. Como sugerido acima, mais de um tipo de complexo Ca(II)-peptídeo poderia estar se formando e apenas um deles levaria à transesterificação.

2- Estudo da influência da temperatura, da concentração de peptídeo e da concentração de EDTA na transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto 5B (ítens 4.1.9., 4.1.10. e 4.1.12, páginas 56 e 57).

As figuras 12 e 14 , páginas 101 e 103 , demonstram que a velocidade de transesterificação aumenta com o aumento da temperatura e da concentração de tripeptídeo.

A influência da concentração de EDTA sobre a velocidade de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt foi analisada através da variação da sua quantidade no meio reacional contendo o tripeptídeo ~~3~~5B e metanol (ítem 4.1.12. e figura 16, páginas 57 e 107) . Como se observa na figura 17, página 108 , a

velocidade da reação diminui com o aumento da concentração de EDTA, sendo necessário uma concentração equimolar à de peptídeo para interromper a reação. Como as dosagens do conteúdo de Ca(II) presente em 5B mostraram que em $6,0 \times 10^{-6}$ mol do mesmo contém apenas $6,0 \times 10^{-8}$ moles deste íon, fica evidente que nestas condições ocorre competição do EDTA pelo Ca(II) fortemente ligado ao peptídeo.

3- Estudo da viabilidade de transesterificação do Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B e 10R em soluções metanólicas do tripeptídeo 5B ou 8B acetato de calcio

Diante da constatação de que os tripeptídeos 7B e 10R não sofrem transesterificação quando incubados em metanol (ítem 3.2.2., página 109) e de que 5B e 8B transesterificam rapidamente nas mesmas condições experimentais realizamos os estudos descritos nos ítens 4.2.3. e 4.2.4., páginas 59 e 60.

Os resultados apresentados na tabela 16, página 112, mostram que na presença de quantidades equimolares de 5B ou de 8B os tripeptídeos 7B e 10R são transesterificados em metanol. Em 24 horas de incubação a 38 °C, 50, 44 e 64% de Moz-Asn-Leu-Gly-OMe foram detectados nos meios reacionais contendo 7B + 5B, 10R + 5B e 10R + 8B respectivamente. Se 7B e 10R não tivessem sido transesterificados estas porcentagens seriam inferiores, pois segundo a figura 13, página 102, a porcentagem de transesterificação é dependente da concentração do peptídeo bruto que nestas reações estava reduzida pela metade. Quando se analisou o efeito da variação da concentração de 5B em um meio constituído por 7B, sendo concentração total de peptídeo fixa (figura 20, página 114), foi observado que ocorre o aumento da

velocidade de transesterificação com o aumento da concentração de 5B.

A incubação de 7B em soluções metanólicas de acetato de cálcio (figura 21, página 115, demonstrou que este tripeptídeo sofre transesterificação quando em presença deste sal e que a velocidade da reação aumenta com o aumento de sua concentração no meio reacional (figura 23, página 118): a mesma é diretamente proporcional à concentração de acetato de cálcio até $6,0 \times 10^{-4}$ M e acima desta concentração tende a um patamar. Apesar da ocorrência da transesterificação ter sido detectada por HPLC, o produto da incubação F (realizada em maior escala), em que a transformação foi total, foi isolado e identificado como sendo Moz-Asn-Leu-Gly-OMe através das análises descritas no ítem 3.2.4., página 111, e do espectro de RM^1H obtido (figura 22, página 117)

O fato de o tripeptídeo 7B não ter sofrido transesterificação quando incubado solução metanólica de acetato de cálcio (proporção peptídeo: Ca(II): 1:1) na presença de EDTA (ítem 3.2.4.1. página 116) demonstra o envolvimento do íon Ca(II) no processo. Entretanto, é imprescindível ressaltar que enquanto 30% de 5B ([Ca(II)] = 0.08%) é transesterificado em metanol em 6 horas de incubação, 35% de 7B se transforma em Moz-Asn-Leu-Gly-OMe em soluções metanólicas de acetato de cálcio ([Ca(II)] = 15%) no mesmo tempo, o que sugere diferenças mecanísticas entre os processos.

Estes experimentos nos permitiram concluir que Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto 5B e 8B e acetato de cálcio são capazes de promover a reação de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B em metanol, porém com velocidades diferentes.

4- Estudo de transesterificação em soluções metanólica de acetato de cálcio de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 10R em diferentes concentrações (ítem 4.2.5., página 61)

Este estudo foi realizado com o objetivo de determinar a influência da concentração de peptídeo na velocidade da reação de transesterificação do mesmo em soluções metanólicas de concentração fixa de acetato de cálcio. A figura 25, página 121, mostra a dependência encontrada: com a diluição do peptídeo ocorre uma diminuição da velocidade de transesterificação.

5- Incubação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B em soluções metanólicas de acetato de cálcio, acetato de sódio, cloreto de sódio e misturas de cloreto de cálcio/acetato de sódio

Diante da constatação de que o acetato de cálcio era capaz de catalisar a transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B em metanol, investigamos se o acetato estaria ou não envolvido no processo. Para tanto realizamos as cinéticas descritas nos ítens 4.2.6. e 4.2.7., página 62. Os resultados obtidos estão sumarizados na tabela 17, página 122, mostraram a ocorrência de transesterificação em pequena extensão na presença de $CaCl_2$ ou de NaAc. Já em soluções metanólicas das misturas $CaCl_2$/NaAc foi encontrado que o tripeptídeo Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 7B era transesterificado em maior extensão. Além disso, o aumento da concentração de NaAc na mistura provoca o aumento da velocidade de reação até a proporção $CaCl_2$: NaCl, 1:1 (mol/mol). Acima desta proporção não ocorreu variação. Como se observa, na tabela

17, página 122, em 48 horas de incubação apenas 28% de tripeptídeo foi transesterificado em presença de NaAc, mas quando a mistura $CaCl_2$/NaAc (1:2, mol/mol) foi utilizada 65% sofreu transesterificação. Embora, com eficiência inferior tal mistura mimetiza o efeito de $Ca(Ac)_2$ na reação (83% em 48 horas de incubação). Tais resultados sugerem que o acetato é importante no processo, possivelmente como contra- íon do Ca(II) no complexo formado entre ele e as moléculas de peptídeo. Também foi realizada a incubação de 7B em solução de NaCl com o objetivo de descartar a possibilidade de envolvimento do íon sódio no processo. De fato não ocorreu transesterificação como esperado (tabela 17, página 122)

1.4. Estudo conformacional de 3B,3R e 8B

Este estudo foi realizado com o intuito de obter informações que nos possibilitassem determinar a conformação preferencial de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B,3R e 8B e consequentemente compreender melhor a sua ligação com o Ca(II) e a transesterificação dos mesmos em metanol.

Inicialmente, foi feita a montagem do modelo Courtauld de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt, o qual evidenciou uma proximidade entre o anel aromático do grupo protetor Moz- e a cadeia lateral da leucina. Como consequência, os grupos carboxamida da asparagina e o etila do éster etílico tenderam a se aproximar, formando uma cavidade adequada ao alojamento do Ca(II).

Para evidenciar experimentalmente a possível aproximação entre estes grupos, realizamos a análise conformacional através de RM^1H de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B,3R e 8B mostrada no ítem 4 página 120, da seção de resultados.

Os espectros bidimensionais de 3B (figuras 26 e 27,

páginas 123 e 124) obtidos usando a técnica de NOESY, através da qual o efeito NOE entre diferentes prótons da molécula pode ser detectado (Derome, 1987), demonstraram a existência de NOE apenas entre: 1- os prótons da metoxila e os prótons da posição orto do anel aromático do grupo protetor; 2- entre os prótons da posição orto e meta deste anel aromático; 3- entre os prótons dos grupos $-CH_2-$ e $-CH_3$ do éster etílico; 4- entre os prótons da posição meta do anel aromático do grupo protetor e os do grupo $-CH_2-$ a ele ligado. Não foi possível, entretanto, detectar NOE entre os outros prótons da molécula. Devido à limitação do aparelho utilizado, apenas NOE intensos são detectados para compostos de massas moleculares inferiores a 500 daltons usando esta técnica (Hiroshi Morita, informação pessoal).

Por essa razão, foram feitos os espectros de RM^1H unidimensionais diferenciais de 3B (figura 28 , página 125), utilizando um programa denominado NOE DIFF da Brucker. De acordo com esta técnica, o espectro diferencial é resultado da diferença entre um espectro normal de RM^1H do composto e um espectro realizado com desacoplamento parcial do próton escolhido como referência, sendo que somente os prótons a ele acoplados (que apresentam NOE) aparecem no espectro. O próton escolhido por nós como referência foi um dos prótons do grupo $-NH_2$ da carboxamida da asparagina (7,4 ppm). Como se pode observar, foi possível evidenciar a existência de NOE entre este próton e: os prótons da etila do éster etílico (a e b), os prótons do grupo $-CH_2-$ da glicina (c) e os prótons do grupo $-CH_3$ da isopropila da leucina (d). Os outros prótons da molécula não estão acoplados a ele. Para calcular as porcentagens de NOE observados, foram feitos espectros unidimensionais com dupla irradiação. Foram encontrados os valores de porcentagens de NOE descritos na tabela 18 , página 130:

1.2% (próton de referência e os prótons do $-CH_2-$ do éster etílico), 5.8% (próton de referência e os prótons do $-CH_3$ do éster etílico) e 1.04% (próton de referência e os prótons do $-CH_2-$ da glicina).

O espectro similar de 8B (figura 30, página 127) apresentou os picos a,b,c e d e portanto a existência de NOE entre os prótons descritos para 3B. Para determinar as porcentagens dos NOE observados também foram feitos os espectros unidimensionais de dupla irradiação, cujos resultados podem ser analisados na tabela 18, página 130 . Como é possível observar, as porcentagens detectadas em 8B entre os prótons do NH_2 da carboxamida da asparagina e os prótons da etila do éster são superiores às observadas para 3B. As outras porcentagens obtidas para 8B não foram determinadas para 3B, não sendo possível por isso compará-las. Os valores obtidos, entretanto variam na faixa de 20-45%. A diferença de porcentagem de NOE observada entre os prótons $-NH^a$ e $-CH_3$ (j) quando NH^a foi irradiado (3.9%) ou quando os prótons $-CH_3$ (j) foram irradiados (24,1%) pode ser devida à natureza dos átomos que sustentam os prótons irradiados (N e C).

Como a existência de NOE entre prótons está associada à proximidade espacial entre eles, ficou evidente que Moz-An-Leu-Gly-OEt 3B e 8B pode assumir em DMSO-d_6 uma conformação preferencial na qual um dos prótons da amida da cadeia lateral está próximo aos prótons da etila do éster etílico, dos prótons do $-CH_2-$ da glicina e dos prótons dos grupos $-CH_3$ da isopropila da leucina. Além disso, foi observada em 8B a aproximação entre os prótons do anel aromático do Moz- e os prótons da etila do éster ($-CH_3$, 34,7%; $-CH_2-$, 42,4%).

Como mostrado no espectro 31, pàgina 128 , também foi

detectada para 3R dissolvido em dimetilsulfóxido deuterado contendo cloreto de cálcio a existência de NOE entre o próton de referência e os prótons da etila do éster (a e b) e entre ele e um dos prótons dos CH_3 da isopropila da leucina (c). As porcentagens calculadas (tabela 18, página 130), entretanto, são numericamente comparáveis às observadas para 8B mas de sinal contrário, o que sugere diferenças na maneira de transesterificação do efeito NOE entre os prótons analisados em relação a 3B e 8B.

Já o espectro unidimensional diferencial de 3R (figura 30, página 127), demonstrou a ausência dos picos a, b, c, e d observados para 3B e portanto a inexistência de NOE entre os prótons estudados para 3B.

Estes resultados sugerem que o peptídeo recristalizado 3R apresenta uma conformação preferencial distinta de 3B e 8B na qual não existe a aproximação espacial entre os prótons estudados. Ao adicionar cloreto de cálcio ao meio, entretanto, 3R tende a assumir uma a conformação preferencial onde tal aproximação ocorre.

É importante salientar que $DMSO-d_6$ foi utilizado para estes estudos por que Moz-Asn-Leu-Gly-OEt é bastante solúvel apenas em DMF, DMSO e MeOH. Este último não foi usado porque ocorria transesterificação de 3B e 8B durante os experimentos.

Paralelamente, realizamos um estudo de 3B, 8B e 3R por espectroscopia Raman. Esta técnica foi escolhida por ser amplamente empregada em estudos conformacionais de peptídeos e proteínas (Carey, 1982; Tu, 1982) e por possibilitar a visualização de ligações metal-quelante em diversos compostos contendo íons metálicos (Adams, 1967). Foram feitos espectros dos peptídeos sólidos 3B,8B e 3R e dissolvidos em DMSO. Todos eles,

entretanto, não demonstraram bandas que evidenciassem a ligação com Ca(II). Estes resultados sugeriram que tal técnica fosse inadequada à obtenção das informações desejadas, provavelmente devido à natureza de nossas amostras (baixo conteúdo de Ca(II)). Por essa razão, os espectros Raman não foram apresentados.

1.5. Transesterificação de Z-Asn-Leu-Gly-OEt, Boc-Asn-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl, Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^t, Moz-Gln-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Ile-Gly-OEt e Moz-Asn-Leu-Ala-OEt em metanol

Tendo comprovado que Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto sofre transesterificação quando dissolvido em metanol e de posse dos resultados encontrados no estudo conformacional deste peptídeo, nos perguntamos: 1- se peptídeos de estrutura semelhante à de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt poderiam ser sintetizados com sucesso pelo método enzimático, em condições experimentais similares às já utilizadas; 2- se uma vez obtidos, estes peptídeos brutos sofreriam transesterificação em metanol; 3- caso esta transesterificação não ocorresse, se na presença de acetato de cálcio tal reação ocorreria.

Com o intuito de responder as perguntas acima, foram realizados os experimentos descritos nos ítens 3.2.6., 5.1 e 5.2., páginas 52 , 63 e 64 . Os resultados da tabela 19, página 131 , mostram que Z-Asn-Leu-Gly-OEt e Moz-Gln-Leu-Gly-OEt brutos foram transesterificados quando dissolvidos em metanol nas condições experimentais utilizadas. Moz-Asn-Ile-Gly-OEt também sofreu transesterificação porém em pequeníssima extensão e os outros peptídeos brutos sintetizados não foram transesterificados na mesmas condições. Entretanto, todos eles sofreram

transesterificação ao serem incubados em soluções metanólicas de acetato de cálcio (tabela 20, página 132), com exceção de Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^t.

Não nos foi possível estabelecer uma comparação entre as diferentes velocidades de reação observada para os diferentes peptídeos brutos testados, pois foram usadas concentrações diversas dos mesmos, devido à suas solubilidades em MeOH serem diferentes.

Os resultados obtidos, porém, nos sugeriram que provavelmente os peptídeos que sofrem transesterificação continham Ca(II) complexado de forma similar a Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto, enquanto que os outros não, havendo por isso a necessidade de adicioná-lo para que a reação ocorresse.

Todos os tripeptídeos brutos foram recristalizados e incubados em metanol ou em soluções metanólicas de acetato de cálcio nas mesmas condições experimentais (tabela 21, página 135). Nenhum deles sofreu transesterificação em metanol na ausência de acetato de cálcio. Na sua presença, entretanto com excessão de Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^t todos os peptídeos sofreram transesterificação.

Apesar do produto obtido não ter sido isolado para caracterização, a ocorrência de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl em soluções metanólicas de acetato de cálcio foi evidenciada pelo cromatograma mostrado na figura 32, página 134, onde a corresponde ao Moz-Asn-Leu-Gly-OMe, b ao álcool benzílico e c ao produto original.

1.6. Transesterificação de ésteres de peptídeos em soluções metanólicas de acetato de cálcio

transesterificação em soluções metanólicas de acetato de cálcio de ésteres etílicos e benzílicos de peptídeos de estrutura semelhante à Moz-Asn-Leu-Gly-OEt, passamos a estudar a possibilidade de transesterificação de ésteres de outros peptídeos de estruturas diversas.

Com este intuito, foi realizado o experimento descrito no ítem 6.2., página 66 , cujos resultados (tabela 22, página 136) indicaram que vários dos peptídeos testados poderiam ser transesterificados em soluções metanólicas de acetato de cálcio. Os ésteres terc-butílicos não sofreram transesterificação nas condições utilizadas, da mesma foram que Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^{t} . Estes resultados preliminares serviram para demonstrar quais eram as melhores condições a serem utilizadas para o acompanhamento cinético da reação por HPLC, as diferenças de solubilidades dos diversos peptídeos nas soluções metanólicas usadas e as diferenças de velocidade de transesterificação entre eles. Os tempos de acompanhamento mostrados na mesma tabela ~~23~~, página 138 , referem-se aos tempos necessários para detectar com segurança a ocorrência da reação, sendo 24 horas a tempo mínimo. Com base nestes resultados e com o intuito de obter dados que nos possibilitassem estabelecer a relação entre estrutura e velocidade de transesterificação, realizamos a incubação destes peptídeos e dos outros descritos no ítem 5.2 , página 64 em soluções metanólicas de acetato de cálcio nas mesmas condições experimentais. Os resultados (tabela 24, página 139) encontrados em 6 e 24 horas de incubação mostraram diferenças de velocidade de reação. Como se observa, a ordem crescente de velocidade é a seguinte para 6 horas de incubação: Moz-Asn-Leu-Ala-OEt ~ Z-Asn-Leu-OEt ~ Z-Asn-Leu-OBzl < Z-Asn-Phe-OEt < Z-Pro-Leu-Gly-OEt < Z-Asn-Phe-OBzl ~ Boc-Leu-Gly-OEt < Moz-Gln-Leu-Gly-OEt

Boc-Asn-Leu-Gly-OEt < Z-Asn-Leu-Gly-OEt ~ Moz-Asn-Leu-Gly-OEt < Moz-Asn-Ile-Gly-OEt ~ Boc-Ile-Gly-OBzl < Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl ~ Moz-Asn-Ile-Gly-OBzl.

A análise das características descritas no ítem 6.3., página 66 e das figuras 34,35 e 36, páginas 142, 143 e 145, demonstra que os compostos analisados são Z-Asn-Leu-Gly-Oe, Boc-Leu-Gly-OMe e Boc-Ile-Gly-OMe, o que torna inequívoca a ocorrência de transesterificação de Z-Asn-Leu-Gly-OEt, Boc-Leu-Gly-OEt e Boc-Ile-Gly-OEt em soluções metanólicas de acetato de cálcio.

1.7. Transesterificação de Boc-aminoacil e peptidil-resinas em metanol na presença de acetato de cálcio.

Diante da evidência de transesterificação de vários ésteres benzilílicos de peptídeos em soluções metanólicas de acetato de cálcio e do conhecimento de que Nα-acil-aminoácidos e peptídeos se ligam à resina de Merrifield através de um éster benzílico (Stewart e Young, 1984; Bodanszky, 1984), nos pareceu lógico investigar a possibilidade de ocorrência de transesterificação destes ésteres em soluções metanólicas de acetato de cálcio. Tal reação resultaria no desligamento do Nα-acil-L- aminoácido ou peptídeo da resina, através da formação dos seus ésteres metílicos.

Para tanto, Boc-Gly-Res, Boc-Ala-Res, Boc-Val-Res, Boc-Leu-Gly-Res e Moz-Asn-Leu-Gly-Res foram incubados em metanol e em soluções metanólicas de acetato de cálcio nas condições experimentais descritas no ítem 7.1., página 67. Como mostrado na tabela 25, página 146, não foi detectada a presença de produto de transesterificação por CCD ou HPLC na ausência de acetato de

cálcio. Na sua presença, entretanto, Boc-Gly-OMe, Boc-Ala-OMe, Boc-Val-OMe, Boc-Leu-Gly-OMe e Moz-Asn-Leu-Gly-OMe foram detectados após 48 horas de incubação.

Visando isolar o produto transesterificado para comprovar a ocorrência da reação foi realizado o estudo descrito no ítem 7.2., página 68, para Boc-Leu-Gly-Res e Moz-Asn-Leu-Gly-Res. Apesar de não ter sido possível determinar o rendimento da transesterificação, as análises realizadas dos compostos obtidos forneceram os resultados (Figuras 37 e 38, páginas 148 e 149) esperados para Moz-Asn-Leu-Gly-OMe e Boc-Leu-Gly-OMe, tornando indiscutível o desligamento dos peptídeos da resina de Merrifield através de transesterificação.

2. Discussão Geral

Os resultados encontrados no desenvolvimento deste trabalho confirmaram nossa constatação anterior (Machini de Miranda e col., 1986) de que o método de incorporação de N_{α}-acil-asparagina a derivados de aminoácidos e peptídeos mediante catálise por termolisina é adequado para a síntese de peptídeos contendo asparagina a partir de componentes amínicos, onde P'_1 corresponde a um aminoácido hidrofóbico (Leu, Phe, Ile, Val). Os rendimentos de reação são bons, não há necessidade de uso de excesso de reagentes e os produtos obtidos são isentos de contaminação por subprodutos. Este fato, torna a metodologia extremamente valiosa para a obtenção de diversos peptídeos contendo este aminoácido. Entretanto, foi observado por nós que quando a reação envolve a utilização de um componente amínico contendo Cys(S-Bzl) em P'_1, a extensão da incorporação se torna dependente da natureza da proteção de sua carboxila ou da sequência da cadeia peptídica da qual o resíduo faz parte. Se a proteção foi realizada na forma de um éster terc-butílico, a reação de incorporação de N_{α}-acil-asparagina ao derivado H-Cys(S-Bzl)-OBu^t ocorrerá em pequeníssima extensão. Se a sequência da cadeia peptídica ligada a Cys(S-Bzl) contiver um resíduo de aminoácido hidrofóbico, a enzima exibirá pronunciada preferência em clivar a ligação peptídica que envolve este aminoácido e provavelmente incorporará o fragmento resultante à N_{α}-acil-asparagina, formando um peptídeo não desejado. Isto se deve à especificidade restrita de termolisina em soluções aquosas na presença ou ausência de solventes orgânicos (Morihara e Tsuzuki, 1980) em que estas reações foram realizadas. Tais fatos sugeriram que o método de incorporação é inadequado para componentes

amínicos contendo aminoácidos não específicos em P'_1.

O desenvolvimento de estudos de síntese enzimática em solventes orgânicos, entretanto, tem demonstrado que a especificidade das proteases pode ser alterada na presença de alguns destes (Zaks e Klibanov, 1988). Esta alteração também pode ser conseguida através de modificações estruturais das enzimas (West e cols., 1988). Estas possibilidades abrem perspectivas de que a metodologia de incorporação de N_α-acil-asparagina a derivados de aminoácidos e a peptídeos usando termolisina venha se tornar adequada também para componentes amínicos contendo aminoácidos considerados não específicos em P'_1.

A síntese de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt mediante catálise por termolisina, além de servir aos propósitos desejados nos possibilitou evidenciar a transesterificação de seu éster em metanol catalisada por Ca(II). Os dados por nós obtidos indicam que este peptídeo se complexa a Ca(II) proveniente do $Ca(Ac)_2$ presente no meio reacional no momento de sua síntese. Tal complexação parece depender das condições experimentais e escala de síntese, sendo possível que ocorra a formação de mais de um tipo de complexo. Um deles, deve ser o responsável pela ocorrência de transesterificação de Moz-Asn-Leu- Gly-OEt bruto em metanol, pois alguns Moz-Asn-Leu-Gly-OEt brutos obtidos não transesterificam apesar de conter Ca(II). Quando o peptídeo bruto é recristalizado em $EtOH/H_2O$, possivelmente a estrutura deste complexo se desfaz, já que o tripeptídeo recristalizado não sofre transesterificação em metanol. Apesar de não dispormos de dados cinéticos, com base nos dados conformacionas obtidos por RM^1H e em dados da literatura sobre proposta de complexação entre Ca(II) e peptídeos (ver ítem 4, página 21), sugerimos os seguintes modelos da ligação de Ca(II) ao Moz-Asn-Leu-Gly-OEt

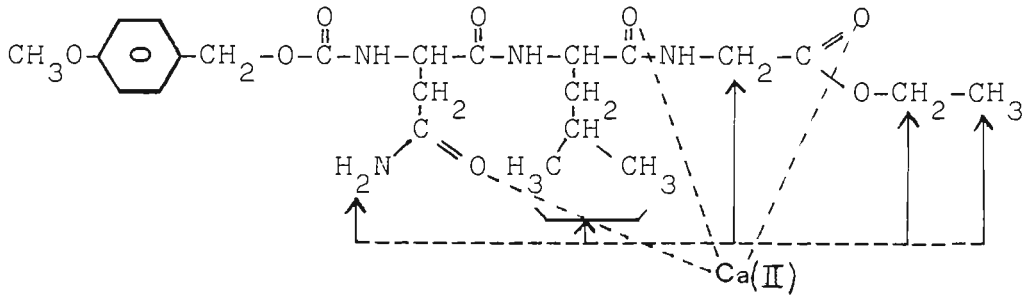
bruto e da sequência da reação de transesterificação do mesmo em metanol:

1- durante o processo de síntese e precipitação, o tripeptídeo formado se complexa a Ca(II), sendo que esta complexação se dá através de sua coordenação às carbonilas da carboxamida da asparagina, da carboxila esterificada e da carbonila da leucina, levando à uma aproximação entre os prótons dos grupos $-NH_2$ da carboxamida, $-CH_2-CH_3$ do éster, $-CH_2-$ da glicina e $-CH_3$ da leucina (esquema 5, página 184); 2- uma vez que o conteúdo de Ca(II) do tripeptídeo é muito baixo e que o complexo peptídeo-Ca(II) que leva à transesterificação é bastante estável em metanol, nos parece viável que apenas estas moléculas complexadas catalisem a transesterificação das outras moléculas de peptídeo da seguinte maneira: o peptídeo a ser transesterificado se aproxima de complexo catalítico, se liga a ele através da coordenação ao Ca(II) e sofre transesterificação resultante da ativação do carbono carbonílico do éster pela coordenação ao Ca(II) e ataque nucleofílico do metanol.

A adição de acetato de cálcio ao Moz-Asn-Leu-Gly-OEt recristalizado (ou mesmo ao 7B que tem comportamento similar a ele) resulta na sua transesterificação em metanol, provavelmente por um mecanismo diferente do proposto para Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto, pois a disponibilidade de Ca(II) no meio reacional é maior (1 mol de peptídeo: 1 mol de Ca(II)) e a velocidade da reação menor (ítem 3.2.4., página 111). Tal hipótese se baseia também no estudo conformacional realizado. Sugerimos a seguinte sequência de reação para Moz-Asn-Leu-Gly- OEt-recristalizado: 1- o peptídeo se complexa a Ca(II) de maneira distinta à proposta para Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto envolvendo, entretanto, sua coordenação ao

Esquema 5. Modelos da ligação entre Ca(II) e o peptídeo originando o complexo catalítico (a) e da sequência de reação da transesterificação em metanol de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto (b).

(a)



(b) Moz-Asn-Leu-Gly-OEt-Ca(II) + Moz-Asn-Leu-Gly-OEt ---> MeOH
[Moz-Asn-Leu-Gly-OEt-Ca(II)] Moz-Asn-Leu-Gly-OEt --->
Moz-Asn-Leu-Gly-OEt-Ca(II) + Moz-Asn-Leu-Gly-OMe +
EtOH.

carbono carbonílico da carboxila esterificada e a participação do acetato como contra- íon; 2- o carbono carbonílico ativado pela coordenação ao Ca(II) sofre o ataque nucleofílico do metanol (esquema 6, página 185). A etapa lenta da reação é possivelmente a complexação do Ca(II) ao peptídeo.

A formação de um complexo similar ao proposto para Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto e Ca(II) também pode ocorer no momento da síntese de outros peptídeos de estrutura semelhante a ele. Tal complexação, entretanto, parece depender da estrutura do peptídeo, já que foram sintetizados sete análogos de Moz-Asn-Leu-

Esquema 6. Modelo da reação de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt recristalizado em soluções metanólicas de acetato de cálcio.

$$\text{Moz-Asn-Leu-Gly-OEt} + Ca(Ac)_2 \xrightarrow{\quad} [\text{Moz-Asn-Leu-Gly-OEt-Ca(II)-}Ac^-] \xrightarrow{\text{MeOH}} \text{Moz-Asn-Leu-Gly-OMe ou } [\text{Moz-Asn-Leu-Gly-OMe-Ca(II)-}Ac^-] + \text{EtOH}.$$

Gly-OEt em condições similares às empregadas na síntese do mesmo e apenas Z-Asn-Leu-Gly-OEt, Moz-Gln-Leu-Gly-OEt e Moz-Asn-Ile-Gly-OEt brutos foram transesterificados ao serem dissolvidos em metanol. Para a ocorrência desta complexação em solução aquosa de acetato de cálcio, portanto, deve ser essencial na estrutura do peptídeo a presença simultânea de: um grupo aromático no protetor de aminogrupo, uma etila no éster, carboxamida no resíduo P_1 e do resíduo de glicina como doador da carboxila esterificada. Estes grupos provavelmente determinam a conformação destes compostos propiciando a formação de tal complexo.

Já a complexação de Ca(II) a peptídeos em soluções metanólicas de acetato de cálcio, que leva à transesterificação

de seus ésteres se mostrou menos específica em relação a caracterísiticas estruturais, pois com exceção dos ésteres terc-butílicos todos os ésteres etílicos e benzílicos testados foram transesterificados. Entretanto, os resultados obtidos no estudo comparativo de transesterificação realizados nos possibilitaram concluir que:

1- A benzila é melhor grupo deixante que a etila e provavelmente por essa razão os ésteres benzílicos de tripeptídeos apresentaram velocidades de transesterificação superiores às observadas para os ésteres etílicos.

2- A presença do resíduo de glicina como doador da carboxila esterificada se mostrou importante para a transesterificação dos ésteres de tripeptídeos, pois a sua troca por alanina levou à uma diminuição acentuada da velocidade de reação.

3- A troca do resíduo de leucina por isoleucina não alterou a velocidade de transesterificação dos ésteres etílicos de tripeptídeos.

4- A mudança do resíduo de asparagina por glutamina não levou à alteração da velocidade de transesterificação do éster etílico de tripeptídeos, o que não ocorreu com a troca do mesmo por prolina que, pela ausência da carboxamida ou/e pela rigidez ao anel, provocou uma diminuição relevante da mesma.

5- A troca do grupo Moz- por Z- ou Boc- não influiu no processo.

6- As velocidades iniciais de transesterificação dos ésteres de dipeptídeos são, em geral, menores que as dos tripeptídeos indicando que a formação do complexo Ca(II)-dipeptídeo é mais lenta.

7- Da mesma forma que para os tripeptídeos, os ésteres de dipeptídeos contendo glicina como doador da carboxila esterificada foram transesterificados rapidamente. A presença de

fenilalanina na mesma posição favoreceu a transesterificação dos ésteres estudados, o que não ocorreu com a leucina.
8- O Boc-Ile-Gly-OBzl parece reunir características estruturais adequadas à formação rápida do complexo dipeptídeo-Ca(II).

Os ésteres terc-butílicos de di- e tripeptídeos testados não sofreram transesterificação provavelmente devido ao fato de terc-butila ser um grupo volumoso, desfavorecendo a complexação do Ca(II) ao peptídeo através de impedimento estérico. É importante salientar que os peptídeos estudados não apresentam características estruturais muito variadas, o que limita nossas conclusões a di- e tripeptídeos de estrutura semelhante a eles.

A utilização de ésteres benzílicos como protetores de carboxila de componentes amínicos em reações enzimáticas do tipo inversão de hidrólise é comum devido à diminuição da solubilidade dos produtos formados no meio reacional. Dependendo da estratégia de síntese utilizada, tais produtos podem ser usados como componentes carboxílicos para o acoplamento enzimático a outros fragmentos peptídicos em reações de aminólise de ésteres. Nestes casos, a possibilidade de transformação dos mesmos em ésteres metílicos na presença de Ca(II) se mostra extremamente valiosa.

O fato de Moz-Asn-Leu-Gly-Res e Boc-Leu-Gly-Res terem sido transesterificados em soluções metanólicas de acetato de cálcio demonstra que este método pode ser particularmente interessante para a obtenção de fragmentos peptídicos protegidos a partir de peptidil-resinas. Tais fragmentos podem ser utilizados como reagentes em síntese química ou enzimática de peptídeos maiores.

VI - CONCLUSÕES

1. H-Cys(S-Bzl)-OBu^t se mostrou um substrato inadequado à termolisina durante o estudo da síntese de Z-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^t e Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^t, provavelmente devido à presença simultânea do enxofre e do grupo benzila na molécula.

2. Não nos foi possível obter o pentapeptídeo Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 com rendimento superior a 2% a partir de Moz-Asn-OH e H-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 usando termolisina, apesar de terem sido utilizados diferentes sistemas de reação. Em vários deles, esta protease demonstrou acentuada preferência em clivar a ligação Pro-Leu e acoplar o dipeptídeo resultante Leu-Gly-NH_2 a Moz-Asn-OH, resultando na formação de Moz-Asn-Leu-Gly-NH_2 no meio reacional.

3. Moz-Asn-Leu-Gly-OEt, Boc-Asn-Leu-Gly-OEt, Z-Asn-Leu-Gly-OEt, Moz-Gln-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Ile-Gly-OEt, Moz-Asn-Leu-Ala-OEt, Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl e Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^t podem ser obtidos na forma precipitada mediante catálise por termolisina. Tais peptídeos são cromatograficamente puros e os rendimentos de reação são bons.

4. A reação de transformação observada quando Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto é dissolvido em metanol é uma reação de transesterificação dependente da temperatura e concentração do peptídeo.

5. Nossos estudos sugeriram que tal reação ocorre devido à existência de um complexo catalítico formado entre algumas moléculas de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto e o Ca(II). Tal complexo se forma durante a reação de síntese deste composto, sendo o Ca(II) proveniente do acetato de cálcio presente no meio reacional.

6. O complexo Moz-Asn-Leu-Gly-OEt Ca(II) bruto é bastante estável em metanol havendo a necessidade de quantidades equimolares de peptídeo e EDTA no meio para que a reação de transesterificação não ocorra.

7. Sínteses diferentes de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt forneceram produtos brutos que transesterificam com velocidades diversas, apesar de terem sido empregadas condições experimentais similares.

8. Não nos foi possível determinar o real conteúdo de Ca(II) nos diferentes Moz-Asn-Leu-Gly-OEt sintetizados devido à problemas inerentes às amostras. A média, entretanto, é da ordem de 0,1-0,2%.

9. Moz-Asn-Leu-Gly-OEt recristalzado não transesterifica (apesar de conter Ca(II)) em metanol, mas na presença de $Ca(Ac)_2$, tal reação ocorre com velocidade dependente da concentração do sal e de peptídeo. Também é possível observá-la em soluções metanólicas de cloreto de cálcio e acetato de sódio misturas de cloreto de cálcio/acetato de sódio.

10. Moz-Asn-Leu-Gly-OEt 3B e 8B assumem em $DMSO-d_6$ uma conformação preferencial idêntica, porém, diferente da assumida por 3R no mesmo solvente. Na presença de cloreto de cálcio, 3R adquire uma nova conformação.

11. A reação de transesterificação de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt em soluções metanólicas de $Ca(Ac)_2$ deve ocorrer também através de complexação entre o peptídeo e Ca(II), porém por mecanismo que não envolve o complexo catalítico presente em Moz-Asn-Leu-Gly-OEt bruto.

12. Z-Asn-Leu-Gly-OEt, Moz-Gln-Leu-Gly-OEt e Moz-Asn-Ile-Gly-OEt brutos também são transesterificados quando dissolvidos em metanol, o que sugere formação de complexo catalítico

semelhante à de Moz-Asn-Leu-Gly-OEt-Ca(II) no momento da síntese destes compostos.

13. Todos os ésteres etílicos e benzílicos testados sofreram transesterificação ao serem incubados em solução metanólica de $Ca(Ac)_2$ $1,0 \times 10^{-2}$ M com velocidades diferentes. Os ésteres terc-butílicos de peptídeos estudados permaneceram intactos neste meio.

14. Boc-Leu-Gly-Res e Moz-Asn-Leu-Gly-Res transesterificam em soluções metanólicas de $Ca(Ac)_2$ $1,0 \times 10^{-2}$ M formando Boc-Leu-Gly-OMe e Moz-Asn-Leu-Gly-OMe.

15. A transesterificação estudada pode se tornar um método valioso em síntese química e enzimática de peptídeos por sua simplicidade e utilização de condições suaves de reação.

VII - SUMÁRIO

Visando dar continuidade ao estudo de incorporação de N - acil-asparagina a derivados de aminoácidos e a peptídeos mediante catálise por termolisina, foi estudada a viabilidade de síntese dos peptídeos Z-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^t e Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2. Durante a síntese do pentapeptídeo Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 foi constatada a formação de um subproduto cuja estrutura foi elucidada a partir da comparação ao padrão autêntico Moz-Asn-Leu-Gly-NH_2. Para a obtenção deste padrão, sintetizamos o tripeptídeo Moz-Asn-Leu-Gly-OEt a partir de Moz-Asn-OH e H-Leu-Gly-OEt na presença de termolisina. A recristalização deste peptídeo em MeOH/H_2O levou à transformação do mesmo em Moz-Asn-Leu-Gly-OMe, confirmada pelo isolamento e caracterização do produto por espectrometria de massa e ressonância magnética protônica, análise elementar e de aminoácidos e por determinação do tempo de retenção por HPLC. Estudos posteriores demonstraram o envolvimento do íon Ca(II) no processo e nos permitiram sugerir um modelo da ligação deste íon ao peptídeo e da sequência de reação da transesterificação estudada. Também foi investigada a possibilidade de diversos ésteres de peptídeos e de peptidil-resinas de Merrifield sofrerem transesterificação quando incubados em metanol na presença de Ca(II). Para tanto, os tripeptídeos Z-Asn-Leu-Gly-OEt, Boc-Asn-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl, Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^t, Moz-Gln-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Ile-Gly-OEt e Moz-Asn-Leu-Ala-OEt foram sintetizados mediante catálise por termolisina. Também foram testados vários outros peptídeos disponíveis no laboratório e Boc-Leu-Gly-Res e Moz-Asn-Leu-Gly-Res. Com exceção dos ésteres terc-butílicos, todos sofreram transesterificação em soluções metanólicas de acetato de cálcio.

VIII - SUMMARY

The main objective was the study of thermolysin catalyzed incorporation of N-acyl-asparagine into amino acid and peptide derivatives. Both Z-Asn-Cys(S-Bzl)-OBu^t and Moz-Asn-Cys(S-Bzl)-Pro-Leu-Gly-NH_2 syntheses have been studied. The formation of a by-product occurred during the synthesis of the later pentapeptide. By comparison with an authentic standard this by-product was identified as Moz-Asn-Leu-Gly-NH_2.

The standard Moz-Asn-Leu-Gly-NH_2 was obtained by aminolysis of Moz-Asn-Leu-Gly-OEt. This peptide was synthesized by coupling Moz-Asn-OH with H-Leu-Gly-OEt using thermolysin as catalyst. During the recrystallization in MeOH/H_2O, the transformation of Moz-Asn-Leu-Gly-OEt to its methyl-ester was obtained. This observation has been confirmed by purification and caracterization of the peptide by: Mass Spectroscopy, Nuclear Magnetic Ressonance, Amino Acid and Elemental Analysis and HPLC.

Later studies have shown that the Ca(II) ion participates in the process. A model for the binding of this ion to the peptide and for the transesterification reaction has been suggested.

Further studies have been performed with (1) the newly synthesized peptides Z-Asn-Leu-Gly-OEt, Boc-Asn-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Leu-Gly-OBzl, Moz-Asn-Leu-Gly-OBu^t, Moz-Gln-Leu-Gly-OEt, Moz-Asn-Ile-Gly-OEt and Moz-Asn-Leu-Ala-OEt; (2) several other peptides available in our laboratory; and (3) Boc-Leu-Gly-Res and Moz-Asn-Leu-Gly-Res. With the exception of t-butyl-esters, all peptides tested have transesterified in methanolic calcium acetate solutions.

II - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

dams, D.M. - Metal-Ligant and Related Vibrations. A Critical Survey of the Infrared and Raman Spectra of Metallic and Organometallic Compounds. London, Edward Arnold (Publishers) Ltd., 1967.

disson, L.; Botte, J.; Demuynck, C.; Mani, J.C. - Enzymatic Synthesis of Aspartyl - Containing Dipeptides, Tetrahedron, 44(8): 2185-2191, 1988.

ldrich Chemical Company Ltd - Catalog hand book of fine chemicals, 1988-1989, p. 42.

nanthanarayanan, V.S. & Shastri, B.P. - Cation Binding and Translocation Properties of Linear Synthetic Peptides, Proc. Am. Pept. Symp., 1987.

ngelici, R.J. & Leach, B.E. - Copper (II) and Samarium (III) Catalysis of the Hydrolysis of Ethyl Glycinate - N,N-diacetic Acid. J. Am. Chem. Soc., 89: 4605-10, 1967.

sso, M.; Granier, C.; Van Rietschoten, J.; Benlian, D. - Calcium and praseodynium complexes in solution, Int. J. Pept. Protein. Res., 26: 10-20, 1985.

aramy, G.; Kneib-Cordonier, N.; Mullen, D.G.- Solid-phase peptide synthesis; a silver anniversary report, Int. J. Peptide Protein Res., 30(6): 705-39, 1987.

arbas, C.F. & Wong, C.H. - Papain Catalyzed Peptide synthesis: Control of Amidase Activity and the Introduction of Unusual Amino Acids., J. Chem. Soc. Chem. Commun: 533-534, 1987.

arbas, C.F. & Wong, C.H. - One-Pot Tripeptide Synthesis from three single amino acid derivatives catalyzed by papain, Tetrahedron Lett., 29(24): 2907-10, 1988.

ender, M.L. & Turnquest, B.W. - The Kinetics and Oxygen Exchange of the Cupric Ion-catalyzed Hydrolysis of α-Amino Esters. J. Am. Chem. Soc., 79: 1889-96, 1957.

ergmann, M. & Fraenkel-Conrat, H. - The role of specificity in the enzymatic synthesis of proteins. Synthesis with intracellular enzymes, J. Biol. Chem., 119: 707-20, 1937.

ergmann, M. & Fraenkel-Conrat, H. - The enzymatic synthesis of peptide bonds, J. Biol. Chem., 124: 1-6, 1938.

ergmann, M. & Fruton, J.S. - Some synthetic and hydrolytic experiments with chymotrypsin, J. Biol. Chem., 124: 321-9, 1938.

eyerman, H.C.; Boers-Boonekamp, C.A.M.; Maaseen Van Den Brink-Zimmermannová, H. - Synthesis of oxytocinoic acid and oxytocin on a solid support via triazolides from active esters. Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 87(3): 257-73, 1968.

Bizzozero, S.A.; Dutler, H.; Ruckert, P. - Chymotrypsin catalyzed peptide synthesis, Int. J. Peptide Protein Res., 32: 64-73, 1988.

Bodanszky, M. - Synthesis of peptides by aminolysis of p-nitrofenyl esters, Nature, 175 (4459): 685, 1955.

Bodanszky, M. - Side reactions in peptide synthesis. In: Principles of Peptide Synthesis. Berlin, Springer-Verlag, 1984, p. 158-201 (Reactivity and Structure Concepts in Organic Chemistry, 16).

Bodanszky, M. & du Vigneau, V. - A method of synthesis of long peptide chains using a synthesis of oxytocin as an example, J. Am. Chem. Soc., 81(21): 5688-95, 1959.

Bratavanova, E.K.; Stoineva, I.B.; Petkov, D.D. - Yield optimization in the kinetically controlled Enzymic Peptide Synthesis. Tetrahedron, 44(12): p. 3633-37, 1988.

Breddam, K. & Johansen, J.T. - Semisynthesis of human insulin utilizing chemically modified carboxipeptidase Y, Carlsberg. Res. Commun, 49: 463, 1984.

Breddam, K.; Widmer, F.; Johansen, J.T. - Carboxipeptidase Y catalyzed C-terminal modification in the -Chain of porcine insulin, Carlsberg Res. Commun, 46: 361-72, 1981.

Campbell, B.E.; Easwaran, K.R.K.; Zanotti, G.C.; Staples, M.A.; Fossel, E.T.; Blout, E.R. - Bicyclic Peptides IV. Conformation and Ion Binding of Cyclo (Glu-Leu-Pro-Gly-Lys-Leu-Pro-Gly)-Cyclo (1 --> 5) Gly, Biopolymers, 25:547-560, 1986.

Carey, P.R. - Biochemical Applications of Raman and Ressonance Raman Spectroscopies, Academic Press, 1982.

Carpenter, F.H. - The free energy change in hidrolytic reactions: the non-ionized compound convention, J. Am. Chem. Soc., 82(5): 1111-22, 1960.

Cheng, E.; Miranda, M.T.M.; Tominaga, M. - Termolysin and α-chymotrypsin mediated synthesis of tripeptides containing proline, Int. J. Pept. Protein Res., 31: 116-25, 1988.

Cipera, J.D. & Nicholls, R.V.V. - Preparation of benzyl esters amino acids. J.D. Cipera and R.V.V. Nicholls (McGill Univ., Montreal, Can.) Chemistry & Industry, 1955, 16-17, Apud: Chem. Abs, 50: 810a, 1956.

Dalagni, M. & Manigrasso, M. - Synthesis and conformational study in solution and in solid state of oligopeptides containing L-leucine and glycine, Int. J. Pept. Protein Res., 32(3): 230-9, 1988.

Dalhquist, F.W.; Long, J.W.; Bigbee, W.L. - Role of calcium in the thermal stability of thermolysin, Biochemistry, 15(5): 1103-11, 1976.

Derome, A.E. - The nuclear Overhauser Effect. In: Modern NMR Techniques for Chemistry Research, Pergamon Press, 1987. p. 97-127.

du Vigneau, V.; Ressler, C.; Swan, J.M.; Roberts, C.W.; Katsoyannis, P.G.; Gordon, S. - The synthesis of a nonapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin, J. Am. Chem. Soc., 75: 4879, 1953.

Dutta, A.S. & Morley, J.S. - Polypeptides. Part XII. The preparation of 2-pyridyl esters and their use in peptide synthesis. J. Chem. Soc.: 2896-902, 1971.

Fostrez, J. & Fersht, A.R. - Demonstration of the acylenzyme mechanism for the hydrolysis of peptides and anilides by chymotrypsin, Biochemistry, 12(11): 2025-34, 1973.

Feder, J.; Garret, L.R.; Wildi, B.S. - Studies on the role of calcium in thermolysin, Biochemistry, 10(24): 4552-5, 1971.

Fruton, J.S. - The synthesis of peptides. Adv. Protein Chem., 5: 1-82, 1949.

Fruton, J.S. - Proteinase-catalyzed synthesis of peptide bonds, Adv. Enzymol. Relat. Areas-Mol. Biol., 53: 239-306, 1982.

Fruton, J.S.; Johnston, R.B.; Fried, M. - Elongation of peptide chains in enzyme-catalyzed transamidation reactions, J. Biol. Chem., 190, 39-53, 1951.

Furtner, V. - Proteção do grupo sulfidrila na síntese da ocitocina, Dissertação de Mestrado - Escola Paulista de Medicina, 1982.

Gish, D.T.; Katsoyannis, P.G.; Hess, L.P.; Stedman, R.J. - Unexpected formation of anydro compounds in the synthesis of asparagynyl and glutaminyl peptides, J. Am. Chem. Soc., 78(22): 5954, 1956.

Goodman, M. & McGahren, W.J. - Mechanistic studies of Peptide Oxazolone racemization, Tetrahedron, 23:2031-50, 1967.

Greenstein, J.P. & Winitz, M. - Chemical procedures for the synthesis of peptides. In: Chemistry of the Amino Acids. New York, John Wiley, 1961, v. 2, p. 763-1295.

Hay, R.W. & Nolan, K.B. - Coper (II)-promoted Hydrolysis of Ethyl Glycylglicinate, Ethyl Glycyl-β-alaninate, and Ethyl Glycyl-L-leucinate, J. Chem. Soc., Dalton Trans. 2542-5, 1974.

Hay, R.W. & Pujari, M.P. - The Palladium (II) Promoted Hydrolysis of the Methyl Esters of Glycyl-L-leucine, Glycyl-L-alanine and L-Alanylglycine, Inorg. Chim. Acta., 123: 175-9, 1986.

Hemmasi, B. & Bayer, E. - Coupling of glutamine by the carbodiimide method in the solid-phase synthesis of two C-terminal peptides of secretin, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 355(4): 481-9, 1974.

Hipp, C.J. & Bush, D.H. - Ligant Reactions the Effect of Metal Complexes. In: ACS Monograph, 174, Washington, A.E. Maktell Ed., 1978, p. 385-471 (Coordination Chemistry, 2).

Holden, H.M. & Matthews, B.W. - The binding of L-valyl-L-tryptophan to crystalline thermolysin illustrates the mode of interaction of a product of peptide hydrolysis, J. Biol. Chem., 263(7): 3256-60, 1988.

Hollósi, M.; Dobolyi, Z.; Bajusz, S. - CD studies on enkephalin and its pro -analogs, FEBS Lett., 10(1): 136-40, 1980.

Homandberg, G.A.; Komoriya, A.; Chaiken, I.M. - Enzymatic condensation of nonassociated peptide fragments using a molecular trap, Biochemistry, 21: 3385-9, 1982.

Homandberg, G.A.; Mattis, J.A.; Laskowiski Jr., M. - Synthesis of peptide bonds by proteinases. Addition of organic cosolvents shifts peptide bond equilibria toward synthesis, Biochemistry, 17(24): 5220-7, 1978.

Ingalls, R.G.; Squires, R.G., Butler, L.G. - Reversal of Enzymatic Hydrolysis: Rate and Extent of Ester Synthesis as Catalyzed by Chymotrypsin and Subtilisin Carlsberg at Low Water Concentrations, Biotechnol. Bioeeng., XVIII: 1627-37, 1975.

Isowa, Y. & Ichikawa, T. - Synthesis of N-acyl-dipeptide derivatives by metalloproteases, Bull. Chem. Soc. Jpn, 52(3): 796-800, 1979.

Isowa, Y.; Ichikawa, T.; Ohmori, M. - Peptide synthesis with proteinases. Fragment condensation of Z-Leu-Gln-Gly-OH or Z-Gln-Gly-OH with H-Leu-Val-NH_2 using metaloproteinases, Bull. Chem. Soc. Jpn., 51(1):271-6, 1978.

Isowa, Y.; Ohmori, M.; Ichikawa, T. & Mori, K. - The thermolysin-catalyzed condensation reactions of N-substituted aspartic and glutamic acids with phenylalanine alkyl esters, Tetrahedron Lett., 28: 2611-2612, 1979.

Isowa, Y.; Ohmori, M.; Ichikawa, T.; Kurita, H.; Sato, M.; Mori, K. - The synthesis of peptides by means of proteolytic enzymes, Bull. Chem. Soc. Jpn., 50(10): 2762-5, 1977.

Itoh, M.; Hagiwara, D. & Kamiya, T. - A new tert-butyl- oxycarbonylating reagent, 2-terc-butyloxycarbonyloxyimino-2-phenylacetonitrile, Tetrahedron Lett., 49: 4393-4, 1975.

Jakubke, H.D. - Enzymatic peptide synthesis. In: Udenfried, S. & Meienhofer, J. The peptides: Analysis, Synthesis, Biolo San Diego, Academic Press, 1987, p. 103-165.

Jakubke, H.D.; Kuhl, P.; Konnecke, A - Basic Principles of Protease-Catalyzed Peptie Bond Formation, **Angew. Chem. Int. Engl.**, 24(2): 85-93, 1985.

Kaiser, E.; Colescott, R.L.; Bossinger, C.D. & Cook, P.I. - Color test for detection of free terminal amino groups in the solid phase synthesis of peptides, **Anal. Biochem.**, 34: 595-8, 1970.

Kartha, G.; Varughese, K.I.; Aimoto, S. - Conformation of cyclo (-L-Pro-Gly) and its Ca and Mg complexes, **Proc.Natl. Acad. Sci. USA**, 79: 4519-22, 1982.

Kashelikar, D.V. & Ressler, C - An oxygen-18 study of the dehydration of asparagine amide with N,N'-diciclorexyl-carbodiimide and p-toluenosulfonyl chloride, **J. Am. Chem. Soc.**, 86(12): 2467-73, 1964.

Kester, W.R. & Mattews, B.W. - Crystallographic study of the binding of dipeptide inhibitors to thermolysin: Implications for the mechanism of catalysis. **Biochemistry**, 16(11): 2506-516, 1977.

Khmel'Nitski, Y.L.; Dien, F.K.; Semenov, A.N.; Martinek, K. - Optimization of Enzyme catalyzed peptide synthesis in a "Water-water- immiscible organic solvent" Biphasic system, **Tetrahedron**, 40(21): 4425-32, 1984.

Kim, S.; Chang, H.; Ko, Y.K. - Benzotriazol-1-yl Diethyl Phosphate. A new convenient coupling reagent for the synthesis of amides and peptides, **Tetrahedron Lett.**, 26(10): 341-2, 1985.

Kimura, S. & Imanishi, Y. - Synthesis, Conformation and Interactions with Metal Ions and Ions Transport of cyclic Octapeptides, cyclo (Phe-Pro) , Cyclo (Leu-Pro) , Cyclo (Lys (Z)-Pro) . In: **Peptide Chemistry, 1981**, T. Shiori (Ed), Osaka. Protein Research Foundation 1982, p. 187-90.

Kimura, S. & Imanishi, Y. - Earth Metal Ions of Cyclic Octapeptides, Cyclo (Phe-Pro) , Cyclo (Leu-Pro) and Cyclo [Lys (Z)-Pro] , **Biopolymers**, 22: 2383-2395, 1983.

Kise, H. & Shirato, H. - Synthesis of Aromatic Amino Acid Ethyl Esters by α-chymotrypsin in Solutions of High Ethanol Concentrations, **Tetrahedron Lett.**, 26(49): 6081, 1985.

Kisfaludy, L.; Schion, I.; Renyer, M.; Görög, S. - Competitive intramolecular displacement of the neutral amide group. Rearrangement and dehydration reactions of asparagine and glutamine, **J. Am. Chem. Soc.**, 97(19): 5588-9, 1975.

Klibanov, A.M.; Margolin, A.L. - Peptide synthesis catalyzed by lipases in anhydrous organic solvents, **J. Am. Chem. Soc.**, 109: 3802-3804, 1987.

Konnecke, A.; Bullerjahn, R.; Jakubke, H.D. - Peptide synthesis by means of immobilized enzymes I. Immobilized α-chymotrypsin.

Konnecke, A.; Hansler, M.; Schellenberger, V.; Jakubke H.D - Peptidsynthesen with immobilisierten Enzymen II. Immobilisiertes Trypsin, Thermolysin und Papain. Monatsh. Chem., 114: 433-444, 1983.

König , W. & Geiger, R. - A new method for the synthesis of peptides: Activation of the carboxyl group with diciclohexilcarbodiimide by using 1-hydroxibenzotriazoles as additives, Chem. Ber., 103, 788, 1970a.

König , W. & Geiger, R. - New amide protecting group. Chem. Ber., 103: 2041-51, 1970b.

Konopinska, D. & Muzalewski, F. - Proteolitic enzymes in peptide synthesis, Mol. Cell. Biochem., 51: 165-175, 1983.

Koslov, L.V.; Ginodman, L.M.; Orekhovic, V.N. and Valueva, T.A. - Free energy of hydrolysis of the peptide bond and enzymatic synthesis of esters of N-acetyl dipeptides, Biokhymiya, 31: 315-321, 1966 .

Kuhl, P.; Schaaf, R.; Jakubke, H.D. - Studies on Enzymatic Peptide Synthesis in Biphasic Aqueous-Organic Systems with Product Extraction, Monatsh. Chem., 118, 1279-88, 1987.

Kullmann, W. - Enzymatic Synthesis of Biologically active peptides, In: Enzymatic Peptide Synthesis. Boca Raton, CRC Press, Inc. 1987, p. 61-82.

Latt, S.A.; Holmquist, B.; Valle, B.L. - Thermolysin: a zinc metalloenzyme, Biochem. Biophys. Res. Commun., 37(2): 333-9, 1969.

Laurie, S.H. - Amino acids, peptides and proteins, In: Comprehensive Coordination Chemistry, Oxford, Pergamon Press, 1987. p. 739-774, (Ligands, 2).

Leach, B.E. & Angelici, R.J. - Metal-ion Catalysis of the Hydrolysis of Some Amino acids Ester N,N-Diacetic Acids, J. Am. Chem. Soc., 90(10): 2505-8, 1968.

Libereck, B. - Tertiary butyl esters of protected -ciano-L-alanyl peptides as possible intermediates in the preparations of L-asparaginil peptides, Chem. Ind., 26: 987-9, 1961.

Libereck, B. - Nitrile groups in peptide chemistry II. Intramollecular assistance of amide dehidration by neighboring carboxylate anion in carbobenzoxyl-L-asparagine, Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Chim., 10: 227-31, 1962.

Linderstrom-Long, K. - Lane Medical Lectures. Proteins and Enzymes, Stanford, Stanford University Press, 1952. p. 93-115.

Luthi, P. & Luisi, P.L. - Enzymatic Synthesis of hydrocarbon-soluble Peptides with Reverse Micelles, J. Am. Chem. Soc. 106: 72085-86, 1984.

Machini de Miranda, M.T. - Termolisina como catalisador na síntese de di- e tripeptídeos contendo asparagina. São Paulo, 1985. 131P. [Dissertação de Mestrado - Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Machini de Miranda, M.T; Cheng, E.; Seidel, W.F.; Muradian, J. & Tominaga, M. - Thermolysin as a catalyst in enzymatic synthesis of asparagine containing peptides, Bioorg. Chem., 14: 182-193, 1986.

Margolin, A.L. & Klibanov, A.M. - Peptide Synthesis Catalyzed by Lipases in Anhydrous Organic Solvents, J. Am. Chem. Soc., 109: 3802-3804, 1987.

Margolin, A.L.; Tai, D.F.; Klibanov, A.M. - Incorporation of D-amino acids into Peptides via Enzymatic condensation in Organic Solvents, J. Am. Chem. Soc., 109: 7885-87, 1987.

Martinek, K.; Semenov, A.N.; Berezin, I. - Enzymatic synthesis in biphasic aqueous-organic systems. I. Chemical equilibrium shift, Biochim. Biophys. Acta, 658(1): 76-89, 1981.

Matsubara, H.; Singer, A.; Sasaki, R.M. - Effect of proline residue on the hydrolysis of substrates by thermolysin, Biochem. Biophys. Res. Commun., 34(5): 719-23, 1968.

Merrifield, R.B. - Solid phase peptide synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-54, 1963.

Merrifield, R.B. - Solid phase peptide synthesis, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 32: 221-96, 1969.

Milne, H.B. & Conpenter, F.H. - Peptide synthesis via oxidation of N-acyl-α-aminoacid phenylhydrazides. III. Dialanylinsulin and diphenylalanyl-insulin, J. Org. Chem., 33: 4476-9, 1968.

Mojsov, S.; Mitchell, A.R.; Merrifield, R.B. - A quantitative evaluation of methods for coupling asparagine, J. Org. Chem., 45(4): 555-60, 1980.

Monzingo, A.F. & Matthews, B.W. - An Interactive Computer Graphics study of Thermolysin-Catalyzed Peptide Cleavage and Inhibition by N-carboxymethyl Dipeptides, Biochemistry, 23: 5730-41, 1984.

Morihara, K. - Comparative specificity of microbial proteinases, Adv. Enzymol., 41: 179-243, 1974.

Morihara, K. - Using proteases in peptide synthesis, TIBTECH, 5: 164-70, 1987.

Morihara, K. & Oka, T. - α-Chymotrypsin as the catalyst for peptide synthesis, Biochem. J., 163(3): 531-42, 1977.

Morihara, K. & Oka, T. - The complex active sites of bacterial neutral proteases in relation to their specificities, Biochem. Biophys. Res. Commun, 30(6): 625-30, 1968.

Morihara, K. & Oka, T. - Enzymatic Semisynthesis of Human Insulin by Transpeptidation method with Achromobacter Protease: Comparison with the coupling method. In: S. Sakakibara Ed.: Peptide Chemistry, 1982, Protein Research Foundation, 1983, p. 231-6.

Morihara, K. & Tsuzuki, H. - Thermolysin: Kinetic Study with Oligopeptides, Eur. J. Biochem., 15(2): 374-80, 1970.

Moore, S. - Amino acids analysis: aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for ninhydrin reaction, J. Biol. Chem., 243(23): 6281-3, 1968.

Moore, S. & Stein, W.H. - A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds, J. Biol. Chem., 211: 907-13, 1954.

Mukaiyama, T.; Ueki, M.; Maruyama, H.; Matsuda, R. - A new method for peptide synthesis by oxidation-reduction condensation, J. Am. Chem. Soc., 90(16): 4490-1, 1968.

Nagasawa, T.; Kuroiwa, K.; Narita, K.; Isowa, Y. - New agents for butyloxycarbonylation and p-methoxybenzyloxycarbonylation of amino acids, Bull. Chem. Soc. Jpn., 46(4): 1269-72, 1973

Nakanishi, K.; Kimura, Y.; Matsumo, R. - Design of proteinase-catalyzed synthesis of oligopeptides in an aqueous-organic biphasic systhem, Biotchnology, 4: 452-4, 1986.

Nakanishi, K.; Kimura, Y.; Matsuno, R. - Proteinase-catalyzed oligopeptide synthesis in an organic solvent. In: Y. Kiso (ed.). Peptide Chemistry, 1985, Osaka, Protein Research Foundation, 1986. p. 83-88.

Niedrich, H. - Synthese des Eledoisin- (4-11)- Octapeptides Lys-Asp (NH_2)-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Lut-NH_2 und scines Heterologen mit Hydrazinoessigsaure statt Glysin, Chem. Ber., 100: 3273-82, 1967.

Noritomi, H. & Kise, H. - Enzymatic Reactions in Aqueous Organic media III. Peptide synthesis by α-chymotrypsin immobilized with polyvinyl alcohol in ethanol, Biotechnology Lett., 9(6): 383-386, 1987.

Oka, T. & Morihara, K. - Peptide bond synthesis catalyzed by thermolysin, J. Biochem., 88: 807-13, 1980.

Okashi, R. & Isowa, Y. - Use of hydrolases in synthesis, Kasaku to Seibutsu, 16(8): 536-46, 1978.

Ohta, Y.; Ogura, Y.; Wada, A. - Thermostable protease from thermophilia bacteria. I. Thermostability, physiocochemical properties and amino acid compsition, J. Biol. Chem., 241(24): 5919-25, 1966.

Paul, R. & Kende, A. - A mechanism for the N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-caused dehydration of asparagine and maleamic acid derivatives, J. Am.Chem. Soc., 86(19): 4162-6, 1964.

Pangburn, M.K. & Walsh, K.A. - Thermolysin and Neutrol Protease: Mechanistic Considerations. Biochem., 14(18): 4050-4, 1975.

Perrin, D.D. - Dissociation constant of organic bases in aqueous solution (Pure and Applied Chemistry). London: Butte worths, 1965. p. 473. Apud: Chem. Abs., 63: 68, 1965.

Petkov, D.D. - Enzyme peptide synthesis and semisynthesis: Kinetic and thermodynamic aspects, J. Theor. Biol., 98(31): 419-25, 1982.

Pinheiro da Silva Filho, L. - Proteases como catalisadores na síntese de peptídeos e de ésteres de N-acilaminoácidos. São Paulo, 1984, 142 p. [Tese de Doutoramento - Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Ressler, C. - Formation of α,γ-diaminobutyric from asparagine containing peptides, J. Am. Chem. Soc., 78(22): 5956-7, 1956.

Ressler, C. & du Vigneau, V. - The synthesis of the tetrapeptide amide S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-leucyl-glycinamide. J. Am. Chem. Soc., 76: 3107-9, 1954.

Ressler, C. & Ratzkin, H. - Synthesis of β-cyano-L-alanine and γ-cyano-α-aminobutylic acid, dehydration products of L-asparagine and L-glutamine; a new synthesis of amino acid nitriles, J. Org. Chem., 26(9): 3356-60, 1961.

Roeske, R. - Preparation of t-butyl esters of free amino acids. J. Org. Chem., 28: 1251-3, 1963.

Rose, K.; Gladstone, J. Offord, R.E. - A mass spectrometric investigation of the mechanism of the semisynthetic transformation of pig insulin into an ester of insulin of human sequence. Biochem. J., 220: 189-96, 1984.

Sakina, K.; Kawazura, K.; Morihara, K. - Enzymatic synthesis of delta sleep inducing peptide, Int. J. Peptide Protein Res., 31(2): 245-52, 1988.

Sato, J.; Kawai, M.; Nagai, U. - Studies on the β-turn of peptides. II - Synthesis and conformational properties of N-(2,4-Dinitrophenyl) Tetrapeptide p-nitroanilides related to the β-turn part if gramicidin S. Bull. Chem. Soc. Jp. 56(5): 1527-31, 1983.

Schechter, I. & Berger, A. - On the size of the active site in proteases. I. Papain, Biochem. Biophys. Res. Commun. 27: 157-62, 1967.

Schellenberger, V. & Jakubke, H.D. - A spectrosphotometric assay for the characterization of the S' subsite specificity of α-chymotrypsin, Biochim. Biophys. Acta., 869: 54-60 1960.

Schnabel, E.; Herzog, H.; Hoffmann, P.; Klauke, E.; Ugo, J. - Synthese und Verwendung von tert-butyloxy-carbonyl fluorid unde anderen fluorKohlensäureestern zur Darstellung Saurelabiler Urethan-derivative von aminosauren, Justus Liebig's Ann. Chem., 716: 175-85, 1968.

Senderens, J.B. - Deshydration catalytique des alcools forméniques par voie humide au moyen d'acide sulfurique, C.R. Hebd. Séances de L'acad. Sci., 154: 777-9, 1912.

Shimizu, T.; Tanaka, Y.; Tsuda, K. - Multiple Conformations and Conformational change in the Acetonitrile of Cation-binding Cyclic Tetrapeptide, Cyclo [Gly-L-Cys(-Bzl(OMe))-Sar-L-Pro], Bull. Chem. Soc. Jpn., 55: 3817-23, 1982.

Siemion, L.Z.; Jankowski, A.; Sobczky, K.; Szewczuk, Z. - Mode of calcium binding to enkephalins, Int. J. Peptide Protein Res., 25: 280-9, 1985.

Stammer, C.H. - The synthesis of two peptides containing methylene-L-asparagine, J. Org. Chem., 26(7): 2556-60, 1961.

Stewart, J.M. & Young, J.D., Solid phase peptide synthesis, San Francisco, W.H., Freeman and Company,1969.

Stewart, J.M. & Young, J.D. - Solid phase peptide synthesis, Illinois, Pierce Chemical Company, 1984.

Taschner, E.; Chimiak, A.; Bator, B.; Sokolowska, T. - Darstellung von tert-Butylestern frier Aminosauren, Justus Liebig's Ann. Chem., 646: 134-6, 1961.

Tominaga, M. & Miranda, M.T.M. - Calcium ion catalyzed transesterification of ethyl and benzyl esters of N -protected di- and tripeptides, In: T. Shiba & S. Sakakibara (Ed.), Peptide Chemistry 1987, Osaka. Protein Research Foundation, 1988. p. 227-30.

Tominaga, M.; Pinheiro da Silva Filho, L.; Muradian, J.; Seidel, W.F. - Papain and chymotrypsin as catalysts for peptide synthesis. In: Sakakibara, S. -Peptide Chemistry, 1982, Osaka, Protein Research Foundation, 1983, p. 271-5.

Tu, A.T. - Raman spectroscopy in Biology. Principles and Applications. New York, John Wiley & Sons, 1982.

Urry, D.W.; Cunnigham, W.D.; Ohnishi, T. - A neutral polypeptide calcium ion complex, Biochim. Biophys. Acta., 292: 854-7, 1973.

Wayne, S.I. & Fruton, J.S. - Thermolysin-catalyzed peptide bond synthesis, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80: 3241-3244, 1983.

West, J.B.; Scholten, J.; Stolowich, N.J.; Hogg, J.L.; Scott, A.I.; Wong, C.H. - Modification of Proteases to Esterases for Peptide Synthesis: Methylchymotrypsin, J. Am. Chem. Soc., 110: 3709-10, 1988.

West, J.B. & Wong, C.H. - Enzyme-Catalyzed Irreversible Formation of Peptides Containing D-Amino Acids, J. Org. Chem., 51: 2728-2735, 1986.

Weygand, F.; Hoffmann, D. & Wunsch, E. - Synthesis of peptides with dicyclohexylcarbodiimide by addition of N-hydroxysuccinimide, Z. Naturforsch b21(5): 426-428, 1966.

Widmer, F.; Bayne, S.; Hown, G.; Thorbek, P.; Johansen, J.T. - Enzymatic Peptide Synthesis: Current Possibilities and Future Prospects - In Prolide, Pergamon Press, 19.

Widmer, F. & Johansen, J.T. - Use of proteolytic enzymes in peptide synthesis: current possibilities and future prospects, In: Synthetic Peptides in Biology and Medicine, Elsevier Science Publishens B.V. (Biochemical Division), 1985. p. 79-87.

Woodman, D.J.; Butler, L.C.; Steward, J. - Expedited isolation in the synthesis of peptides by ion exchange, Tetrahedron Lett., 17: 1557-60, 1973.

Yenal, K.; Rockwell, A.L.; Cook, J.P.; Dworetsky, S.; Gierasch, L.M. - Comparision of Cation Binding by three Cyclic Pentapeptides. In: Peptides - Structure and Function, Illinois, Pierce Chemical Company, 1983. p. 499-502.

Zaks, A. & Klibanov, A.M. - Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents, J. Biol. Chem., Baltimore, 263(7): 3194-201, 1988.

Zaoral, M. & Kirchnák, V. - Cyclooxytocin and oxytocin analogue with a enhanced stability of the secondary structure, Collect. Czech. Chem. Commun., 42(12): 3500-9, 1977.

rências Bibliográficas-:

igneau e colaboradores (1954) está citada em Bodanszky e du Vigneaud (1959)

scentar: West ,J.B. & Wong,C.H. - Use of nonproteases in peptide syntheses, ahedron Lett. , 28(15): 1629-32,1987.