

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**NOVAS OBSERVAÇÕES E PERSPECTIVAS DO USO DE
LIPASES NA SÍNTESE DE PEPTÍDEOS**

CLEBER WANDERLEI LIRIA

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP para a obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS.

Área de concentração: Bioquímica

Orientadora: Prof. Dra. Maria Terêsa M. de Miranda

SÃO PAULO

2004

Aos meus pais, Pedro e Pedrina
pela razão da minha existência

Agradecimentos

À Deus.

Em especial à minha amiga e orientadora Profa. Dra. Maria Terêsa M. Miranda pela ciência, pelo profissionalismo, pela amizade e pela grande oportunidade.

Aos meus amigos do laboratório: Alessandra, Patrícia, César, Giuliano, Renata, Nicolas e Rafael pela amizade, pela compreensão e pelo apoio impagável.

À Crizélia pelo auxílio na execução de alguns experimentos.

Ao Prof. Dr. Antonio de Miranda (UNIFESP) e Clécio F. Klizcke (laboratório do Prof. Dr. Paolo di Mascio, IQ-USP) pelas análises por espectrometria de massas.

Ao Prof. Dr. Shaker Chuck Farah, a Profa. Dra. Sirlei Daffre e ao Lourivaldo S. Pereira pelo auxílio nos experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida.

Ao Prof. Dr. Sandro Roberto Marana pelo auxílio na tentativa de purificação dos componentes da lipase pancreática suína e pelas valiosas discussões.

À Profa. Dra. Clélia Ferreira e ao Prof. Dr. Walter Ribeiro Terra por valiosas discussões.

Ao Dr. Frank Bordusa, nosso atual colaborador, pelas discussões sobre a remoção do grupo Z.

À FAPESP pelo financiamento deste projeto.

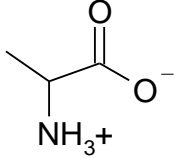
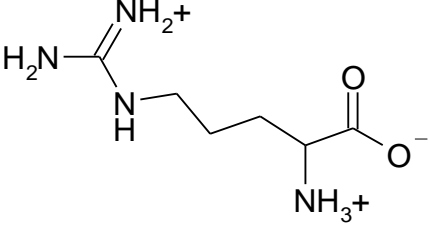
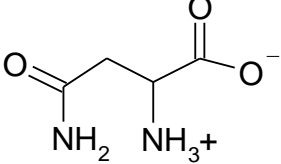
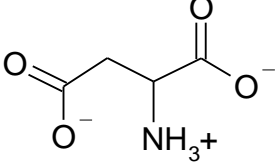
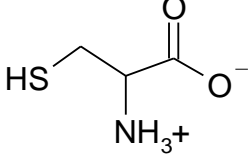
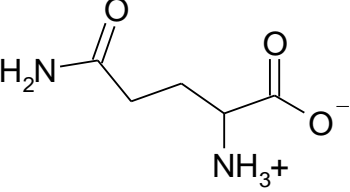
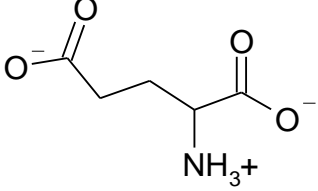
LISTA DE ABREVIações

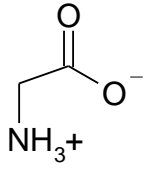
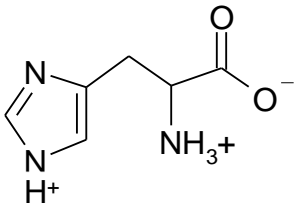
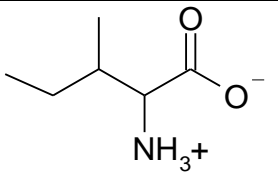
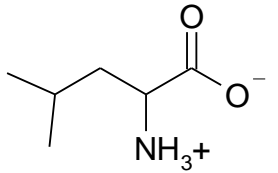
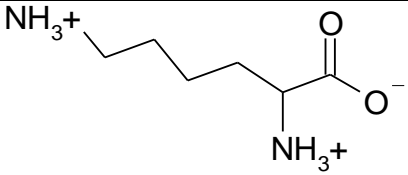
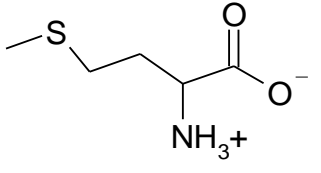
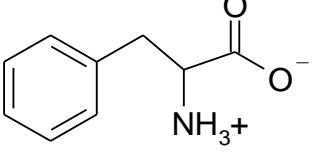
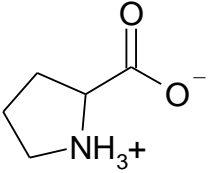
As abreviações utilizadas estão de acordo com as recomendações da “IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature” (J. Biol. Chem., 264: 668-673, 1989).

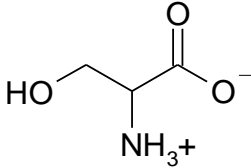
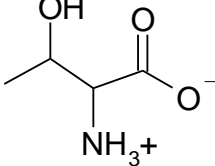
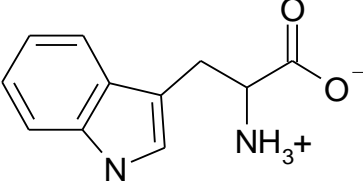
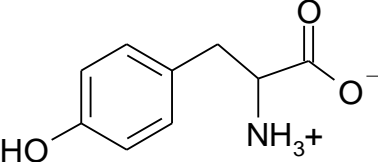
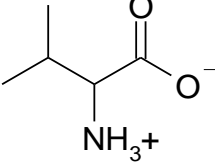
AA:	Aceptor de grupo acila
Ac:	Acetila
ACN:	Acetonitrila
AGalOC:	Tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosiloxicarbonil
AGIOC:	Tetra-O-acetil-D-glicopiranosiloxicarbonil
Boc:	Tert-butiloxicarbonil
Bu ^s :	Sec-butila
Bu ^t :	Tert-Butila
Bz:	Benzoila
Bzl:	Benzila
CCD:	Cromatografia em camada delgada
cPPL:	Lipase não purificada de pâncreas suíno
DA:	Doador de grupo acila
DCM:	Diclorometano
DIC:	N,N-Diisopropilcarbodiimida
DMF:	N,N-Dimetilformamida
ESI-MS:	Espectrometria de massas com ionização por electrospray
Et:	Etila
EtCl:	Cloreto de etila
Fmoc:	9-Fluorenilmetiloxicarbonila
For:	Formila
HAc:	Ácido acético
HF:	Fluoreto de hidrogênio
HOBt:	1-Hidroxibenzotriazol
IEX-HPLC:	Cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica
LC/ESI-MS:	Cromatografia líquida em interface com espectrometria de massas de ionização por electrospray

MBHA:	Resina 4-metilbenzilidrilamina
Me:	Metila
MeOH:	Metanol
NHNaph ^m	β -naftilamida
Oct:	Octila
PAGE-SDS:	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
pCCL:	Lipase purificada de <i>Candida cylindracea</i>
Ph:	Fenila
PhH	fenil-hidrazida
pNA:	p-nitroanilida
pPPL:	Lipase purificada de pâncreas suíno
RP-HPLC:	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
SBu ^t :	Tert-mercapto-butila
SDS:	Dodecil sulfato de sódio
TEA:	Trietilamina
TFA:	Ácido trifluoroacético
TLCK:	Clorometilcetona de p-tosil-lisina
TPCK:	Clorometilcetona de p-tosil-fenilalanina
Tris-HCl:	Tampão tris(hidroximetil)aminometano
VI:	Valeroila
Z:	Benziloxycarbonila
η :	Rendimento

**LISTA DAS ESTRUTURAS E ABREVIÇÕES DE UMA E DE TRÊS LETRAS
DOS 20 AMINOÁCIDOS NATURAIS**

Ala A Alanina	
Arg R Arginina	
Asn N Asparagina	
Asp D Ácido aspártico	
Cys C Cisteína	
Gln Q Glutamina	
Glu E Ácido glutâmico	

Gly G Glicina	
His H Histidina	
Ile I Isoleucina	
Leu L Leucina	
Lys K Lisina	
Met M Metionina	
Phe F Fenilalanina	
Pro P Prolina	

Ser S Serina	
Thr T Treonina	
Trp W Triptofano	
Tyr Y Tirosina	
Val V Valina	

ÍNDICE

RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XIII
1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 -Métodos de síntese de peptídeos	1
1.2 -Bases teóricas da síntese de peptídeos biocatalisada.....	6
1.3 -Evolução da síntese de peptídeos biocatalisada	12
1.4 -Aspectos cinéticos e estruturais das lipases	14
1.5 -Uso de lipases na química de aminoácidos e peptídeos.....	20
1.6 -Preferência de lipases por ésteres de aminoácidos	24
2 - OBJETIVOS.....	29
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 -Materiais	30
3.2 -Métodos analíticos	31
3.2.1 -Cromatografia Líquida	31
3.2.2 - Análise de aminoácidos	32
3.2.3 - Espectrometria de massas	32
3.2.4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)	33
3.2.5 - Atividade α -quimotríptica	33
3.2.6 - Atividade tríptica	34
3.2.7 - Atividade lipásica	34
3.3 -Métodos preparativos	35
3.3.1 - Síntese química do dipeptídeo Ac-Tyr-Gly-NH ₂	35
3.3.2 - Síntese enzimática do dipeptídeo Ac-Tyr-Gly-NH ₂	36
3.3.3 - Síntese enzimática do dipeptídeo Z-Asp-Gly-NH ₂	37
3.3.4 - Obtenção de cPPL tratada com TLCK	38
3.3.5 - Obtenção de cPPL tratada com TPCK	38

3.3.6 - Estudo da hidrólise de ésteres de derivados de aminoácidos catalisada por cPPL	39
3.3.7 - Estudo da remoção do grupo Z de Z-aminoácidos catalisada por cPPL	40
3.3.8 - Tentativa de remoção do grupo Z de Z-Gly-Phe catalisada por cPPL.....	41
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 - Estudo da síntese de Ac-Tyr-Gly-NH ₂ mediada por lipases.....	43
4.2 - Estudo do efeito do conteúdo n-hexano na eficiência da síntese de Z-Asp-Gly-NH ₂	51
4.3 - Estudo da preferência de cPPL na hidrólise de ésteres metílicos de N α -acil-aminoácidos.....	57
4.4 - Estudo da influência da natureza do éster e do protetor de grupo α -amino na hidrólise do éster de N α -acil-aminoácidos catalisada por cPPL.....	69
4.5 - Estudo da remoção do grupo Z de Z-aminoácidos catalisada por cPPL.	73
4.6 - Tentativa preliminar de remoção do grupo Z do dipeptídeo Z-Gly-Phe catalisada por cPPL.....	82
5 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	85
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
CURRICULUM VITAE.....	107

RESUMO

Esta tese é composta de estudos realizados com a finalidade de encontrar condições experimentais e gerar informações confiáveis que possam ser utilizadas em síntese de peptídeos mediada por lipases. Inicialmente, foram caracterizadas por eletroforese do tipo PAGE-SDS e medida de atividade em óleo de oliva duas lipases purificadas de *Candida cylindracea* (CCL) e duas pancreáticas suínas, purificada (pPPL) e bruta (cPPL). As CCLs apresentaram atividades lipásicas e graus de purezas superiores às PPLs. Dentre os contaminantes das PPLs, foram identificadas a tripsina e a α -quimotripsina (α -QT). Em seguida, foi realizado um estudo sistemático da síntese do dipeptídeo modelo Ac-Tyr-Gly-NH₂. A melhor condição experimental encontrada foi: mistura de n-hexano/tampão Tris-HCl, 0,5M, pH 8,0, (80/20,v/v), 50mg/mL de cPPL, 0,05M de Ac-Tyr-OEt, 0,5M de Gly-NH₂, 37°C e agitação de 300 rpm, que forneceu rendimento de ~90 % em 5 min de reação. Porém, nesta condição foi observada a hidrólise secundária do produto formado, a qual foi extinta pelo tratamento da cPPL com um inibidor específico de α -QT. A condição otimizada de síntese de Ac-Tyr-Gly-NH₂ também se mostrou adequada à preparação de Z-Asp-Gly-NH₂ a partir de Z-Asp-OMe e de Gly-NH₂. Quando se estudou a influência da percentagem de n-hexano na eficiência da formação de ligação peptídica, ela também foi a melhor condição. Tendo escolhido a lipase e o meio reacional, iniciou-se um estudo sistemático da hidrólise do éster de onze Z-aminoácidos-OMe, o qual visou gerar informações que possibilitassem prever quais aminoácidos deveriam compor o doador de acila esterificado a ser empregado em síntese de peptídeos catalisada por cPPL. A ordem de preferência desta preparação enzimática na hidrólise de ésteres dos Z-aminoácidos-OMe testados foi a seguinte: (Lys, Arg e His)>(Phe e Tyr)>(Asp, Glu, Gln, Ser, Thr e Leu). Também foi estudada a influência da natureza do éster e do protetor de grupo α -amino na hidrólise de ésteres de N α -acil-Asp ou -Glu. A cPPL preferiu hidrolisar o éster benzílico de Z ou Boc-Asp e de Z-Glu. Em algumas incubações para a hidrólise do éster de Z-aminoácidos-OMe foi observada uma reação secundária com possível aplicação na química de peptídeos: a remoção do grupo Z com formação do aminoácido livre correspondente. Esta ocorreu mesmo quando a tripsina e a α -QT foram inibidas irreversivelmente. Assim, Z-aminoácidos foram incubados com a cPPL e os resultados obtidos demonstraram que ela foi capaz de remover o grupo Z de onze deles com velocidades iniciais que obedecem a seguinte ordem:

Tyr>Phe>Ser>Gln>Lys>His>Trp>Leu>Met>Arg>Ile. A remoção em questão também foi observada quando o dipeptídeo Z-Gly-Phe foi incubado em presença de cPPL. A formação de glicina no meio reacional decorreu da hidrólise da ligação peptídica. Sumarizando, as contribuições mais relevantes deste trabalho são: 1) a proposição inédita de um sistema bifásico para a formação da ligação peptídica catalisada por cPPL; 2) a demonstração inequívoca da presença de tripsina e α -QT e a sugestão de contaminação por carboxipeptidase A na cPPL. Estes contaminantes podem contribuir para a eficiência das sínteses de peptídeos catalisadas por esta preparação enzimática; 3) a constatação de que apesar de mais impura, a cPPL catalisou mais eficientemente do que as CCLs a formação de ligação peptídica via aminólise de ésteres; 4) a obtenção de resultados de um estudo sistemático de hidrólise de ésteres de Z-aminoácidos que podem auxiliar na escolha de doadores de acila a serem usados em sínteses de peptídeos catalisadas por cPPL; 5) a observação inédita de remoção do grupo Z de alguns Z-aminoácidos em presença de cPPL que indicou a possibilidade de novas aplicações desta preparação enzimática em química de peptídeos e, provavelmente, em síntese orgânica.

ABSTRACT

This work aimed to determine experimental conditions and reliable information to be used in peptide synthesis mediated by lipases. Thus, two *Candida cylindracea* lipases (CCL) and two porcine pancreatic lipases, a purified (pPPL) and a crude (cPPL), were characterized by PAGE-SDS electrophoresis and activity in olive oil. CCLs presented higher purities and enzymatic activities than PPLs. Trypsin (T) and α -chymotrypsin (α -CT) were identified among the cPPL contaminants. A systematic investigation of Ac-Tyr-Gly-NH₂ was then performed using the CCLs, the PPLs and several experimental conditions. The best combination was: 0.05M Ac-Tyr-OEt, 0.5M Gly-NH₂, 50mg/mL cPPL, mixture of n-hexane/Tris-HCl buffer 0.5M, pH 8.0, (80/20,v/v), temperature of 37°C, shaking at 300 rpm (yield near 90% in 5 min of reaction). As secondary hydrolysis occurred in long-lasting reactions, cPPL was treated with the irreversible inhibitor of α -CT and had the amidase activity extinguished. The optimized synthesis conditions were also suitable for the preparation of Z-Asp-Gly-NH₂. When the effect of the n-hexane content on coupling efficiency was examined, those were confirmed as the best conditions to be used. A further systematic investigation aiming to determine which esterified N α -acyl-amino acids are good substrates for cPPL was then conducted using Z-amino acids-OMe. The results obtained in the monitoring of the ester hydrolysis indicated the following preference: (Z-Lys-OMe, -Arg-, -His-)>(Z-Phe-OMe, -Tyr-)>(Z-Asp-OMe, -Glu-, -Gln-, -Ser-, -Thr-, -Leu-). The natures of the ester and N α -protecting group influenced the ester hydrolyses of N α -acyl-Asp and -Glu. The best substrates were Z or Boc-Asp-OBzl and Z-Glu-OBzl. Surprisingly, Z-group removal occurred in a few ester hydrolysis reactions since the resulting Z-amino acids were consumed and the corresponding free amino acids were formed. This unexpected reaction was not avoided when cPPL was treated with irreversible inhibitors of T or of α -QT. Incubation of cPPL with 11 of the 20 Z-amino acids tested gave Z-group removal initial rates that followed the order: Tyr>Phe>Ser>Gln>Lys>His>Trp>Leu>Met>Arg>Ile. In the presence of cPPL the Z-group was also removed from the dipeptide Z-Gly-Phe. Interestingly, free Gly was also detected in the reaction medium. In summary, the most relevant contributions of the present work are: 1) the proposal of a biphasic solvent system suitable for peptide bond formation catalyzed by cPPL; 2) the unequivocal demonstration that T and α -QT are contaminants of cPPL and the suggestion that carboxypeptidase A can also be present in it (all of them may

interfere in the efficiency of peptide formation catalyzed by cPPL); 3) the verification that, although impure, cPPL catalyzed dipeptide synthesis more efficiently than the CCLs; 4) the performance of the first systematic study of ester hydrolysis of Z-amino acids catalyzed by cPPL; 5) the observation of Z group removal during some Z-amino acid ester hydrolyses catalyzed by cPPL and the confirmation that this is also feasible for some Z-amino acids and a Z-dipeptide.

1 - INTRODUÇÃO

Os peptídeos (moléculas formadas por aminoácidos ligados entre si por ligações amidas) são funcionalmente muito versáteis: muitos atuam como fatores liberadores de hormônios (*Chaillou e col., 2002*) ou hormônios (*Behan e col., 1996, Kopchick, 2003*); outros são neurotransmissores, neuropeptídeos (*Holman e col., 1999, Hökfelt e col., 2000, Baranowska e col., 2001*), toxinas (*Cartier e col., 1996, Jacobsen e col., 1999*), antibióticos naturais (*Juvvadi e col., 1999, Sanchez-Barrena e col., 2003*), adoçantes (*Sturtevant, 1985, Duerfahrt e col., 2003*) ou substratos de proteases (*Lowther & Dunn, 1998*).

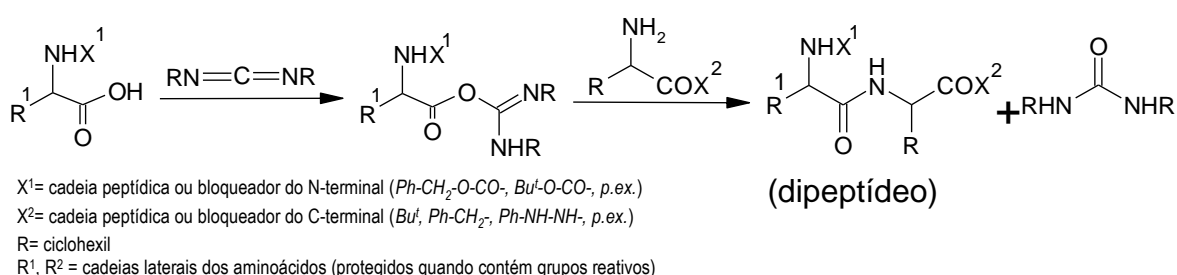
Na década de 1950, hormônios como o glucagon (*Bromer e col., 1956*), a insulina (*Sanger e col., 1955*), a ocitocina (*Davoll e col., 1951*), a vasopressina (*Du Vigneaud e col., 1953*) e o hormônio estimulador de melanócitos (*Harris & Lerner, 1957*) foram descobertos e tiveram as suas estruturas químicas elucidadas, o que despertou o interesse pelos peptídeos e pelo estabelecimento de metodologias para as suas purificações, caracterizações química e biológica e quantificações.

Como as fontes naturais continham estes compostos em quantidades pequeníssimas (o que demandava tempo, dinheiro e quantidades enormes das fontes de partida para isolá-los em quantidades suficientes para estudo) surgiu a necessidade de desenvolver métodos para construir estas biomoléculas e seus análogos (derivados com modificações pontuais) em escalas variadas. Assim, os sintéticos serviriam para confirmar a estrutura do peptídeo natural. Posteriormente, entretanto, eles passaram a ser usados para explorar a relação entre estrutura e atividade destes compostos, estudar o seu modo de ação, buscar inibidores de proteases e, finalmente, produzir os peptídeos em escala industrial para uso terapêutico ou alimentício. Isto fez com que métodos eficientes de síntese fossem desenvolvidos (*Jakubke, 1994; Bodanszky, 1993, Fields, 1997*).

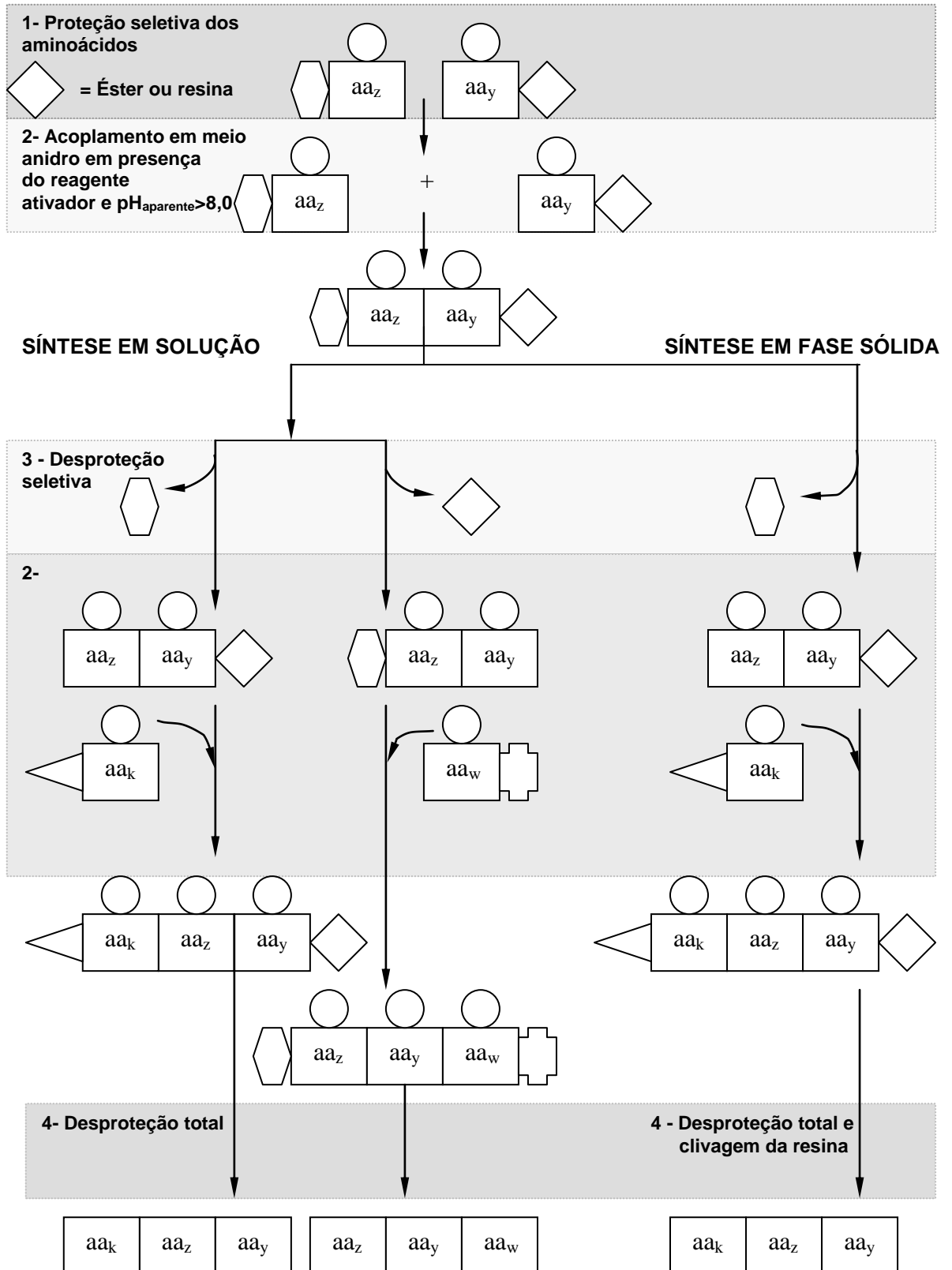
1.1 – Métodos de síntese de peptídeos

Existem três métodos para produzir peptídeos em diferentes escalas laboratoriais ou industriais:

Síntese química: Metodologia geral e bem estabelecida que se baseia na utilização de reagentes químicos para ativar a carboxila do aminoácido ou do fragmento peptídico (*doador de acila*) que sofrerá o ataque nucleofílico do grupo amino de um outro aminoácido ou fragmento peptídico (*acceptor de acila*). O resultado é a formação da ligação peptídica entre eles (*Bodanszky, 1993*) como mostra a reação abaixo que utiliza uma carbodiimida como reagente ativador ou acoplador:



As diferentes etapas do processo sintético (ESQUEMA 1) podem ser realizadas em solução (*síntese clássica: todos os reagentes e produtos estão solúveis no meio reacional, Bodansky, 1993, Sakakibara, 1995*) ou em presença de um suporte polimérico (*síntese em fase sólida: se o acceptor de acila estiver ligado a uma resina insolúvel no meio reacional, Merrifield, 1963, Stewart & Young, 1984, Marshall, 2003, Machado e col., 2004*). As duas metodologias demandam proteção máxima das cadeias laterais quimicamente reativas e proteção seletiva dos grupos amino e carboxila que não participarão da formação da ligação amida entre os dois aminoácidos. O acoplamento ocorre pelo ataque nucleofílico do acceptor de acila à carboxila ativada do doador de acila em meio anidro e $\text{pH}_{\text{aparente}} > 8,0$. Depois do acoplamento entre os aminoácidos, o produto é desprotegido seletivamente: i) grupo α -amino, caso o alongamento do peptídeo seja feito no sentido $\text{C} \rightarrow \text{N}$, ii) no grupo α -carboxila, caso o alongamento ocorra no sentido $\text{N} \rightarrow \text{C}$. Em seguida, ocorre uma nova série de etapas de ativação, acoplamento, isolamento e caracterização do produto que se repete a cada aminoácido a ser incorporado ao peptídeo.



ESQUEMA 1: Etapas da síntese química de tripeptídeos em solução e em fase sólida.

Na síntese em fase sólida, o sentido do alongamento é C→ N. Assim, após a reação de acoplamento do 2º resíduo de aminoácido à aminoacil-resina, inicia-se uma série de etapas de desproteção seletiva do α-grupo amino do acceptor de acila, ativação e acoplamento de um novo doador de acila, que se repete a cada aminoácido incorporado ao peptídeo.

Uma vez terminada a construção do peptídeo em solução é feita a desproteção total do peptídeo bruto e o produto desejado é isolado e caracterizado. Na síntese em fase sólida a desproteção total ocorre simultaneamente à clivagem da resina.

Ambas as metodologias podem ser realizadas passo a passo (incorporando um aminoácido de cada vez, *Fields, 1997, Varanda & Miranda, 1997*) ou via condensação entre segmentos peptídicos preparados previamente (*Borgia & Fields, 2000, Ruiz, 2003*).

A síntese de peptídeos em solução é mais antiga e mais utilizada na produção industrial por apresentar facilidade no aumento de escala (*Verlander, 2002*).

A síntese em fase sólida, por ser mais rápida, versátil e passível de automatização, é mais utilizada na produção de peptídeos para pesquisas científicas (*Merrifield, 1963, Fields, 1997, Cebrian e col., 2003, He e col., 2003*). Apesar de bem estabelecida, muitos buscam agilizá-la. O emprego de temperaturas elevadas (*Yu e col., 1992, Rabinovich & Rivier, 1994, Varanda & Miranda, 1997, Rivier & Miranda, 2001, Erdélyi & Gogoll, 2002*) ou excesso de reagentes (*Miranda & Alewood, 1999*) são exemplos atuais desta busca. A versatilidade desta metodologia permite sintetizar um peptídeo por vez (síntese individual), vários peptídeos (síntese múltipla, *Gorman, 1984, Luu e col., 1996*) ou milhares de peptídeos ao mesmo tempo (biblioteca de peptídeos, *Geysen & Mason, 1993, Cantley & Turk, 2003*), ou mesmo “micro-chips” contendo várias seqüências peptídicas (*Frank, 2002, Reimer e col., 2002, Huang e col., 2003*).

Síntese via tecnologia do DNA recombinante: Baseia-se nos métodos modernos de clonagem genética de células para a produção de peptídeos heterólogos (*Rourke e col., 1997*). Muitos laboratórios utilizam bactérias como

vetores de expressão (Hara & Yamakawa, 1996; Kim e col., 1998; Harrison e col., 1999, Wong e col., 2003); outros utilizam leveduras, células de insetos ou de mamíferos quando são necessárias modificações pós-tradução (Lorenzini e col., 2003, Wang e col., 2003); outros ainda utilizam a técnica de bibliotecas de peptídeos apresentadas em fagos (“phage display”, Smith, 1985, Burritt e col., 1996, Brígido & Maranhão, 2002, Kelly & Jones, 2003).

A FIGURA 1 ilustra de maneira simplificada a transformação de bactérias para a expressão de um peptídeo heterólogo. Relativamente à síntese química, esta metodologia ainda é muito menos empregada para a preparação de peptídeos curtos e médios contendo modificações químicas (amidação, fosforilação, sulfatação, acetilação ou ciclização).

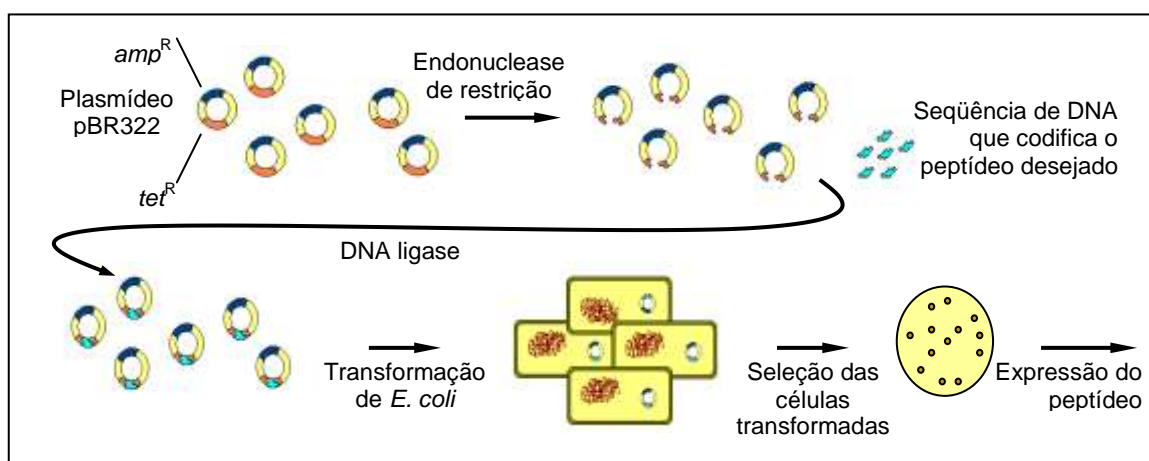


FIGURA 1: Esquema simplificado de transformação de *E. coli* utilizando o plasmídeo pBR322 (adaptado de Lehninger e col., 1993).

Síntese enzimática ou biocatalisada: Metodologia em desenvolvimento que utiliza enzimas livres ou imobilizadas para catalisar a formação das ligações peptídicas entre os aminoácidos. As proteases tem sido as mais utilizadas (Bordusa, 2002a, Machado e col., 2004). Neste tipo de síntese, a ativação da carboxila do doador de acila é desnecessária e a proteção das cadeias laterais dos aminoácidos é mínima. O alongamento da cadeia peptídica também pode ser realizado passo a passo (Guo e col., 2003) ou via condensação entre segmentos peptídicos preparados previamente. Estes fragmentos podem ser obtidos

enzimática- (Gill e col., 1995) ou quimicamente (síntese químico-enzimática, Bemquerer e col., 1998, Cerovsky & Bordusa, 2000). Maiores detalhes sobre esta metodologia são apresentados a seguir.

1.2 – Bases teóricas da síntese de peptídeos biocatalisada

A TABELA 1 fornece dados para a comparação entre a síntese química e a enzimática de peptídeos. Nela é possível observar as vantagens e desvantagens destas tecnologias.

TABELA 1: Comparação entre a síntese química e enzimática de peptídeos (Matos e col., 1987, Herrmann, 1991, Jakubke, 1995, Faber, 1997, Fadnavis & Deshpande, 2002).

	Química	Enzimática
Enantiosseletividade	Baixa	Alta
Regiosseletividade	Baixa	Alta
Tamanho e natureza do aminoácido	Todos	Limitado
Necessidade de grupos protetores	Alta	Baixa
Necessidade de pureza dos reagentes e solventes	Alta	Moderada
Sub-produtos formados/gerados	Vários	Alguns
Perigo de racemização	Existe	Nenhum
Reaproveitamento dos reagentes ou enzimas	Baixo	Elevado
Facilidade no aumento de escala	Baixa (em SPFS) Média (em solução)	Elevada
Tolerância à presença de água no meio reacional	Nenhuma	Elevada
Condições de pH	Extremas	Moderada
Necessidade de solventes clorados	Elevada	Nenhuma

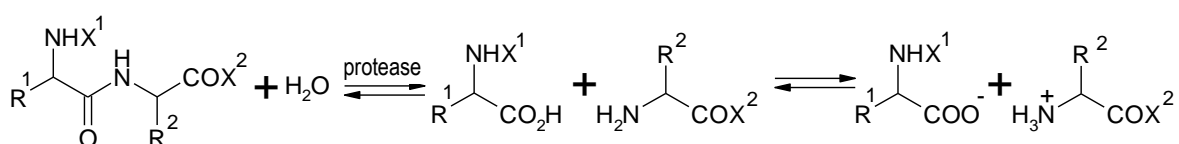
De todas as características apresentadas na TABELA anterior, talvez a que desperte maior interesse nos químicos sintéticos de peptídeos seja a elevada especificidade das enzimas pelos substratos. Para os ecologistas esta abordagem biotecnológica, que evita o uso de solventes clorados, é bem-vinda.

As abordagens experimentais para se conseguir a formação de uma ligação peptídica mediante catálise por uma enzima se baseiam na inversão da reação de hidrólise (também chamada de aminólise de amidas ou transpeptidação) ou ainda na aminólise de ésteres. A inversão da hidrólise e a aminólise de amidas são termodinamicamente controladas. A aminólise de

ésteres é irreversível, podendo também ser considerada cineticamente controlada (Schellenberger & Jakubke, 1991).

Inversão da hidrólise da ligação peptídica

Como mostrado abaixo, em solução aquosa a hidrólise da ligação peptídica catalisada por uma protease se processa em duas etapas distintas: a formação de produtos não ionizados, endergônica ($\Delta G_{\text{hid}} > 0$), e a ionização e solvatação destes produtos, exergônica ($\Delta G_{\text{ion}} < 0$). Uma vez que nestas condições o valor do ΔG_{ion} é maior do que o do ΔG_{hid} , a hidrólise da ligação peptídica é termodinamicamente favorecida.



X¹= cadeia peptídica ou bloqueador do N-terminal (*Ph-CH₂-O-CO-*, *Bu^t-O-CO-*, p.ex.)

X²= cadeia peptídica ou bloqueador do C-terminal (*Bu^t*, *Ph-CH₂-*, *Ph-NH-NH-*, p.ex.)

R¹, R² = cadeias laterais dos aminoácidos

Portanto, para promover a inversão da reação de hidrólise (síntese representada pela curva A da FIGURA 2) é necessário diminuir a barreira energética correspondente à etapa de deionização dos grupos α -amino e α -carboxila dos substratos. Isto é conseguido pelo bloqueamento dos grupos α -amino do doador de acila e carboxila do acceptor de acila, adição de solventes orgânicos ao meio reacional (estas duas ações provocam o aumento do valor do pKa do doador de acila e diminuição do valor do pKa do acceptor de acila e, conseqüentemente, a diminuição do valor do ΔG_{ion} , Jakubke e col., 1985), uso de excesso de um dos substratos (deslocamento do equilíbrio da reação para o sentido de síntese pela lei de ação das massas, Xing e col., 1998) e/ou remoção do produto formado do meio reacional por precipitação ou extração (Ulijn e col., 2003).

Outra alternativa que favorece a síntese da ligação peptídica é a minimização da hidrólise secundária dos reagentes ou do produto formado por

meio do: i) uso de sistemas de solventes contendo elevadas percentagens de solventes orgânicos (*Bemquerer e col., 1994, Davey e col., 1995, Deschrevel e col., 2003*) que, além de elevar o rendimento de formação da ligação peptídica em detrimento da hidrólise, também pode contribuir com a síntese por alterar algumas propriedades da enzima (atividade, estabilidade e/ou especificidade, *Liu e col., 2002*); ii) do emprego de sistemas de solventes aquosos congelados (-15°C) que garantem a diminuição da atividade de água (*Haensler e col., 1998*).

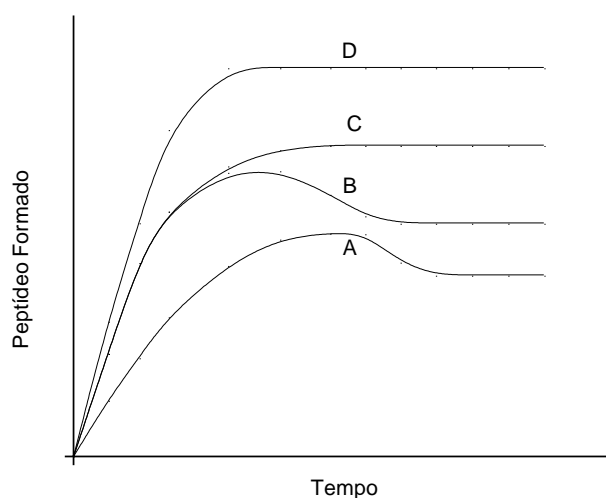
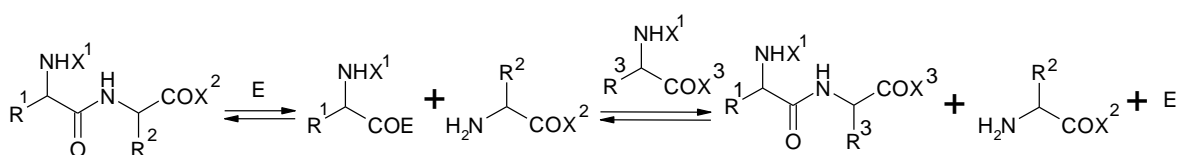


FIGURA 2: Formação de peptídeos em condições termodinamicamente e cineticamente controlada. (A) via inversão da reação de hidrólise ou por transpeptidação catalisada por proteases em meio contendo água, (B) via aminólise de ésteres catalisada por proteases em meio contendo água, (C) via aminólise de ésteres catalisada por lipases em meio contendo água e (D) via aminólise de ésteres catalisada por lipases ou proteases em meio anidro.

Transpeptidação

As reações a seguir mostram que na presença de uma protease pode ocorrer a quebra da ligação peptídica existente em um dado peptídeo com formação do intermediário ativo enzima-substrato. Na presença de um peptídeo ou aminoácido bloqueado em sua α -carboxila este intermediário pode sofrer o ataque nucleofílico com conseqüente formação de uma nova ligação peptídica (*Schellenberger & Jakubke, 1991*).

Esta estratégia sintética é chamada transpeptidação. Através dela pode-se transformar peptídeos como foi feito para a obtenção *in vitro* do fator liberador do hormônio de crescimento GRF(1-29)-NH₂ a partir de seu precursor não amidado (Breddam e col., 1991). Esta transformação, mediada pela carboxipeptidase Y, envolveu a troca da alanina da carboxila terminal não amidada (GRF(1-27)-Ser-Ala) por uma arginina amidada resultando no produto desejado (GRF(1-27)-Ser-Arg-NH₂). A transpeptidação da imunoglobulina G por Cys em presença de carboxipeptidase Y é um outro exemplo bem sucedido (Lin & Lowe, 2000).



X¹= cadeia peptídica ou bloqueador do N-terminal (*Ph-CH₂-O-CO-*, *Bu^t-O-CO-*, p.ex.)
 X², X³= cadeia peptídica ou bloqueador do C-terminal (*Bu^t*, *Ph-CH₂-*, *Ph-NH-NH-*, p.ex.)
 R¹, R², R³= cadeias laterais dos aminoácidos
 E= protease

Embora a carboxipeptidase Y seja a protease mais utilizada para esta modalidade por reconhecer aminoácidos posicionados na extremidade C-terminal de peptídeos e proteínas, outras também foram utilizadas em sínteses descritas na literatura: pepsina pancreática suína (Cho & Northrop, 1998) e papaina (Ferjancicbia e col., 1993), por exemplo.

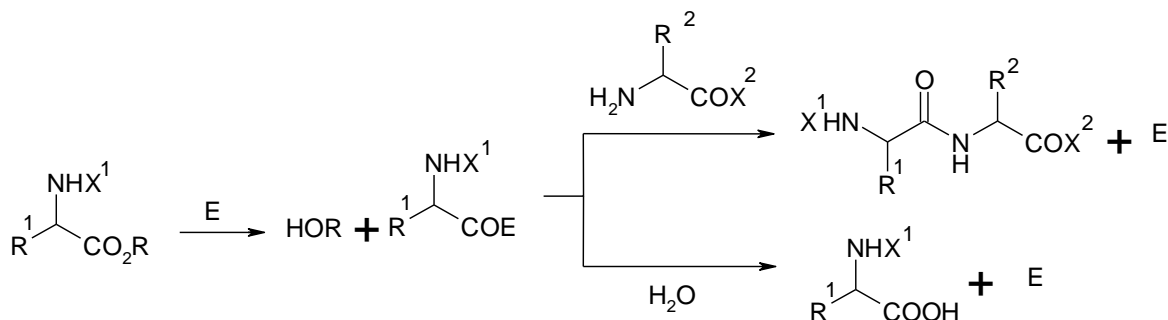
Da mesma forma que na inversão da reação de hidrólise, e também pelos mesmos motivos, para deslocar o equilíbrio da reação para o sentido da síntese é necessário recorrer às proteções dos grupos α -amino e carboxila dos substratos, adicionar solventes orgânicos aos meios reacionais, usar excesso de um dos substratos e/ou promover a remoção dos produtos dos meios reacionais. A formação do produto também pode ser representada pela curva A da FIGURA 2.

Sempre que o meio contiver água também será possível gerar subprodutos resultantes de hidrólise da ligação peptídica dos substratos ou do produto (Bemquerer e col., 1998).

Aminólise de ésteres

A hidrólise de um éster de aminoácido ou peptídeo protegido em seu

grupo α -amino e esterificado em sua α -carboxila catalisada por uma esterase (protease ou não) ocorre via formação do intermediário ativo acil- ou peptidil-enzima com liberação do álcool correspondente para o meio reacional. Em seguida ocorre o ataque nucleofílico do intermediário pela água.



X^1 = cadeia peptídica ou bloqueador do N-terminal (*Ph-CH₂-O-CO-*, *Bu^t-O-CO-*, p.ex.)

X^2 = cadeia peptídica ou bloqueador do C-terminal (*Bu^t*, *Ph-CH₂-*, *Ph-NH-NH-*, p.ex.)

R^1 , R^2 = cadeias laterais dos aminoácidos

R = Me, Et, Bzl

E= esterase

Como esta última consiste na etapa limitante do processo, pode-se promover a formação de uma ligação peptídica pela adição ao meio reacional de um aminoácido ou peptídeo com grupo α -amino livre e carboxila terminal bloqueada. Nestas condições, deverá ocorrer a competição entre a água e este novo nucleófilo pelo ataque ao intermediário acil-enzima (*Miyazawa e col., 2002*). Assim, a natureza do éster empregado (*Ivanov e col., 1997*), a nucleofilicidade e a concentração do acceptor de acila são os fatores determinantes da reação de síntese ou de hidrólise em questão.

Até mesmo o doador de acila esterificado pode ser obtido enzimaticamente por alcoólise de um aminoácido ou peptídeo utilizando a estratégia termodinamicamente controlada (*Deschrevel e col., 2003*).

Sob o ponto de vista do catalisador, se for usada uma protease com atividade esterásica em meio reacional contendo água, poderão ocorrer a síntese da amida e as hidrólises do éster e/ou da própria ligação peptídica recém-formada (curva B da Figura 2). Se for utilizada uma esterase sem atividade amidásica em meio reacional contendo água, é possível ocorrer a síntese da ligação peptídica e a hidrólise do éster do doador de acila (*Kitaguchi, 1996, Zhang e col., 2001 e 2003*) (curva C da FIGURA 2). No entanto, ocorrerá apenas a formação da ligação

peptídica se for utilizada uma esterase em meio orgânico anidro (*Margolin e Klibanov, 1987*).

Assim sendo, a formação da ligação peptídica via a aminólise de ésteres, que se trata da estratégia cineticamente controlada (curvas B, C e D da FIGURA 2), é em geral mais rápida (*Liria e Miranda, 2001*) do que via a inversão da hidrólise ou transpeptidação, que são estratégias termodinamicamente controladas (curva A da FIGURA 2) (*Bemquerer e col., 1998, Miranda & Tominaga, 1991, Miranda e col., 1991, Persichetti e col., 1995, Ivanov e col., 1997*).

Talvez por ser a mais rápida, esta é a modalidade mais utilizada pelos pesquisadores. Muitos peptídeos pequenos (di, tri, tetra e pentapeptídeos, *Clapes e col., 2001, Miyazawa e col., 2002, Klein e col., 2000*) foram sintetizados seguindo esta estratégia, mas atualmente existe uma forte tendência por parte dos pesquisadores em aplicá-la na síntese de peptídeos maiores via condensação entre fragmentos peptídicos (síntese quimio-enzimática, *Cerovsky e col., 2000*).

Como já comentado anteriormente, as proteases (muitas também exibem atividade esterásica), enzimas responsáveis pela quebra da ligação peptídica *in vivo* foram inicialmente eleitas como os catalisadores mais adequados para a síntese biocatalisada de peptídeos. As mais utilizadas foram a termolisina (*Miranda & Tominaga, 1991, Miranda e col., 1991, Persichetti e col., 1995*), a pepsina (*Bemquerer e col., 1994*), a subtilisina (*Moree e col., 1997*), a tripsina (*Bemquerer e col., 1998, Ivanov e col., 1997, Liria e col., 1998, Zhou e col., 2003*), a α -quimotripsina (*Cheng e col., 1988, Deschrevel e col., 2003*), a papaína (*Fite e col., 1998, Fan e col., 2001*), a clostripaína (*Bordusa e col., 1999, Wehofsky e col., 2003*) e a carboxipeptidase-Y (*Kunugi e col., 1997*). As V8 protease (*Gill e col., 1995*), elastase (*Haensler e col., 1998*), ficina (*Haensler e col., 1995*) e a glutamil-transpeptidase (*Suzuki e col., 2002*) também foram empregadas com sucesso.

Entretanto, a observação de que, simultaneamente à catálise da síntese de ligação peptídica, estas enzimas mediavam a hidrólise secundária do peptídeo formado ou dos fragmentos peptídicos reagentes (*Xu e col., 2001*) levou à busca de outros biocatalisadores que não apresentassem atividade amidásica ou que

aceitassem D-aminoácidos e aminoácidos não usuais. Por esta razão, as aminoaciltransferases [transferases responsáveis pela transferência de grupos acila (Sugihara e col., 2002)], alguns complexos enzimáticos responsáveis pela síntese de peptídeos *in vivo* via não ribossomal (Bordusa, 2001, Kohli e col., 2002, Duerfahrt e col., 2003) e as lipases [esterases capazes de hidrolisar ésteres de triacilglicerol liberando glicerol, ácidos graxos, mono- e diglicerídeos (Voet e col., 2002, Faber, 1997)] também foram testadas, sendo as lipases as mais utilizadas.

Mais adiante serão fornecidos maiores detalhes sobre as lipases e a sua aplicação em síntese de peptídeos.

1.3 - Evolução da síntese de peptídeos biocatalisada

A constante preocupação dos pesquisadores da área de síntese orgânica em encontrar novas rotas sintéticas que sejam enantiosseletivas, que consumam menos energia, que exijam menos matérias-primas não renováveis, que não utilizem solventes clorados, que formem produtos com maior segurança à humanidade e que resultem em menor emissão de poluentes para o meio ambiente (tecnologias limpas) tem contribuído com as principais bases da química verde ou auto-sustentável (green chemistry) (Tundo e col., 2000, Lenardão e col., 2003). Neste contexto, a síntese de compostos orgânicos catalisada por enzimas (síntese biocatalisada) ocupa lugar de destaque e é vista com grande interesse pelos cientistas da atualidade.

Ao contrário da contemporaneidade da síntese de compostos orgânicos biocatalisada, a síntese de peptídeos biocatalisada já vem sendo estudada desde o final do século 19. Mais precisamente, em 1886, Danilewiski observou pela primeira vez a formação de uma ligação peptídica catalisada enzimaticamente. Naquela ocasião, este pesquisador conseguiu inverter a hidrólise de fibrina em presença de renina e papaína. No final da década de 1930, foram relatadas por Bergmann e Fraenkel-Conrat (1938) as sínteses de dois dipeptídeos catalisadas por papaína. O doador de acila utilizado foi Bz-Leu e os aceptores de acila foram Leu-NHC₆H₅ ou Gly-NHC₆H₅. Naquele momento, os pesquisadores não buscavam gerar conhecimentos sobre a tecnologia de síntese enzimática de peptídeos, mas sim compreender a biossíntese de proteínas que se acreditava

ocorrer via síntese enzimática. Com a descoberta da maquinaria ribossomal na década de 1950 (Watson & Crick, 1953), as pesquisas em síntese de peptídeos biocatalisada foram redirecionadas para a produção destes compostos.

Nas décadas de 1970 e 1980, foram conseguidos muitos avanços nesta tecnologia, pois se conseguiu maximizar a produção com a otimização das condições reacionais e minimização do tempo e dos custos nas sínteses de peptídeos de tamanhos variados: dipeptídeos, (aspartame, Asp-Phe-OMe, *Isowa e col.*, 1979), tripeptídeos (Z-Cys(S-Bzl)-Tyr-Ile-OBu^t, *Irokawa, 1989*) ou maiores (Boc-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH₂, *Jakubke e col.*, 1985). Neste período, também foram conseguidas a transformação da insulina suína em insulina humana pela transpeptidação catalisada por tripsina (*Morihara e col.*, 1980) e a condensação entre segmentos peptídicos da colecistocinina (*Sakina e col.*, 1988) e foram relatadas as primeiras tentativas de usar enzimas imobilizadas em suportes sólidos na síntese de peptídeos (*Klibanov, 1979, Reslow e col.*, 1988).

Desde então, alguns autores buscaram compreender os benefícios da presença de solvente orgânico na síntese biocatalisada da ligação peptídica. Eles seriam: aumento da solubilidade dos substratos, minimização das reações de hidrólise secundária e alteração dos pKs dos doadores de acila e aceptor de acila (*Bemquerer e col.*, 1994, *Kuhl e col.*, 1995). Neste contexto, Nishino e colaboradores (1992a, b e c) propuseram um sistema de solvente contendo 4% de água e uma mistura 2,2,2-trifluoroetanol ou 1,1,1,3,3,3-hexafluorisopropanol e dimetilformamida (50:50, v:v) que, segundo os autores, estabeleceriam ligações de hidrogênio entre si minimizando os seus efeitos danosos sobre a tripsina freqüentemente utilizada em síntese de peptídeos (*Nishino e col.*, 1992a, b e c, *Mihara e col.*, 1993). Porém, alguns anos depois, Bemquerer e colaboradores (1998) perceberam que este mesmo sistema aquo-orgânico provocava uma diminuição na atividade trípica, graças às alterações causadas na estrutura da enzima, e favorecia a remoção do grupo Fmoc (*Liria e col.*, 1998).

No contraposto do uso de solvente orgânico na síntese enzimática de peptídeos Jakubke e colaboradores propuseram o uso de sistemas aquosos congelados (-15°C) como alternativa (*Gerisch e col.*, 1995, *Ullmann e col.*, 1996, *Haensler e col.*, 1998). De fato, estes pesquisadores conseguiram melhoras significativas na

eficiência da síntese da ligação peptídica mediada por α -quimotripsina, tripsina, subtilisina, papaína e clostripaína.

Na literatura atual é possível perceber que os pesquisadores ainda se dedicam a investigar o papel do solvente orgânico na formação da ligação peptídica biocatalisada (*Clapes e col., 2001, De Martin e col., 2001, Liu e col., 2002a, Shin & Kim, 2002, Deschrevel e col., 2003*), a estudar a viabilidade de imobilização das enzimas empregadas (*Liu e col., 2002b, Fadnavis & Deshpande, 2002, Guo e col., 2003*) e a explorar novas idéias como a de utilizar miméticos de substratos (compostos de baixa interação com uma dada enzima que foram modificados estruturalmente a fim de se tornar bons substratos para ela, *Bordusa, 2002b, Rall & Bordusa, 2002*). A possibilidade de usar enzimas na síntese de um peptídeo ligado em um suporte insolúvel também tem sido estudada (*Bordusa e col., 1999 e Ulijn e col., 2002, Altreuter e col., 2003*).

É interessante observar que os tamanhos dos peptídeos sintetizados enzimaticamente na atualidade não variaram muito em relação aos sintetizados nas décadas passadas (dipeptídeos, *Fan e col., 2001*, tripeptídeos, *Miyazawa e col., 2002*, tetrapeptídeos, *Getun e col., 2001*, pentapeptídeos, *Klein e col., 2000*, hexapeptídeos, *Wehosfsky e col., 2000* e octapeptídeos, *Fite e col., 2002*).

Pelo exposto acima se conclui que: 1) o sucesso da síntese peptídica biocatalisada cinética- ou termodinamicamente depende dos seguintes fatores: natureza da enzima, sistema de solvente (orgânico, aquo-orgânico, monofásico ou bifásico), tipos/concentrações/solubilidades dos substratos e tipo/solubilidade do produto; 2) apesar de ter se tornado uma importante ferramenta biotecnológica esta metodologia ainda se encontra em desenvolvimento.

É importante finalizar dizendo também que a síntese biocatalisada de peptídeos gera informações que são importantes não só para própria área, mas também para a enzimologia e química orgânica sintética em geral.

1.4 – Aspectos cinéticos e estruturais das lipases

Na década de 50, Sarda e Desnuelle (1958) estudaram a hidrólise dos

seguintes substratos catalisada por lipase pancreática suína: 1,2,3-tri[cis-9-octadecanoil]glicerol, insolúvel em água em qualquer concentração, e 1,2,3-triacetilglicerol, solúvel em água em baixas concentrações e insolúvel em concentrações maiores. Eles constataram que na hidrólise de 1,2,3-tri[cis-9-octadecanoil]glicerol a atividade da enzima era influenciada pela concentração do substrato no meio reacional e pela área da interface hidrofóbica presente na emulsão. Aos resultados obtidos foi possível aplicar o modelo de Michaelis e Menten (os valores da área da interface hidrofóbica foram plotados na abcissa e os valores da atividade enzimática na ordenada). No entanto, quando foi utilizado o 1,2,3-triacetilglicerol a atividade lipásica foi insignificante até o substrato atingir a concentração crítica micelar (CMC) e teve o seu valor aumentado em torno de 10 vezes em concentrações superiores à CMC.

Assim, ficou claro que as reações catalisadas por lipases exibem um comportamento cinético diferente daquele exibido pelas enzimas michaelianas: em concentrações abaixo da CMC a relação atividade-concentração de substrato varia pouco e linearmente com o aumento da sua concentração, para concentrações do substrato acima da CMC a atividade sofre um aumento abrupto como indicado na FIGURA 3. O mecanismo da ativação enzimática é mostrado na FIGURA 4.

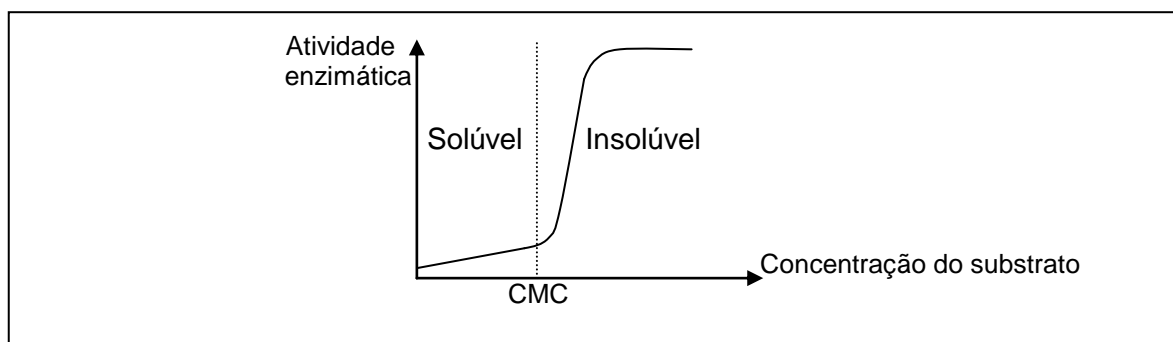


FIGURA 3: Cinética de ativação interfacial enzimática exibida pelas lipases (*Sarda & Desnuelle, 1958, Faber, 1997*).

Graças aos avanços na elucidação da estrutura tridimensional de vários tipos de lipases na década de 1990 (TABELA 2) foi possível propor que o mecanismo catalítico das lipases é do tipo serina-hidrolases (*Brady e col., 1990*).

Logo, a serina está envolvida neste mecanismo e faz parte da tríade catalítica juntamente com o ácido aspártico e a histidina como ilustrado na FIGURA 5 a seguir.

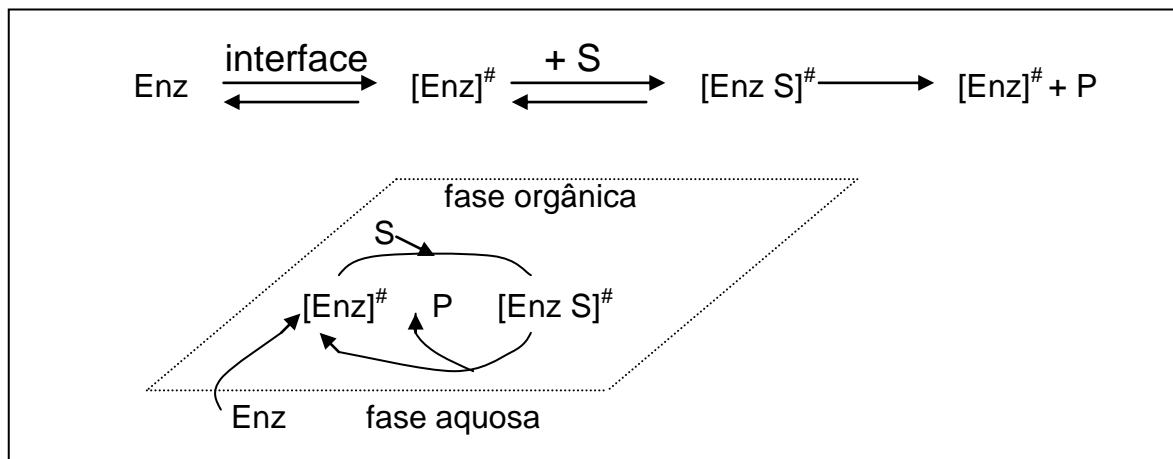


FIGURA 4: Mecanismo de ativação das lipases pela presença da interface hidrofóbica. Onde, Enz = Lipase inativa e Enz[#] = Lipase ativa (Rubin, 1994).

TABELA 2: Algumas das lipases cujas estruturas tridimensionais já foram determinadas.

Fonte	Número de resíduos	PM (D)	Referência
<i>Geotrichum candidum</i>	544	59552	Schrag e col., 1991
<i>Rhizomucor miehei</i>	269	29486	Derewenda e col., 1992
Pâncreas suíno	449	49926	Van Tilbeurgh e col., 1992
<i>Candida cylindracea</i>	534	57084	Grochulski e col., 1993
<i>Pseudomonas cepacia</i>	320	33115	Kim e col., 1997
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	388	43248	Tyndall e col., 2002

As características estruturais desta classe de enzimas serviram para explicar o fenômeno da ativação interfacial proposto por Sarda e Desnuelle (1958) em nível molecular e estão descritas abaixo:

i) estas enzimas possuem uma conformação inativa (FIGURAS 6a e 7a) e uma ativa (FIGURAS 6b e 7b) que diferem entre si;

ii) a ativação interfacial consiste em uma alteração estrutural da enzima (*Brzozowski e col., 1991, Riddihough, 1993*);

iii) na conformação inativa a tríade catalítica (Ser¹⁴⁴-Asp²⁰³-His²⁵⁷ na lipase de *R. miehei* e Ser¹⁵²-Asp¹⁷⁶-His²⁶³ na lipase pancreática suína) se encontra em uma depressão topológica da estrutura globular da enzima e protegida do solvente por uma “tampa” (uma alça em α -hélice composta pelo fragmento 82-96 na lipase de *R. miehei* FIGURA 6, e por duas alças em folha β compostas pelos fragmentos 77-83 e 240-260 na lipase pancreática suína, FIGURA 7);

iv) em meio aquoso a conformação inativa é estabilizada pela interação de resíduos polares situados na superfície externa da tampa (Arg⁸⁶ e Asp⁹¹ na lipase de *R. miehei* e Asn²⁴⁰ na lipase pancreática suína) com a água;

v) a alteração estrutural ocorre quando a enzima é exposta a uma interface apolar e consiste de um movimento rotacional da(s) tampa(s) que protege(m) o sítio catalítico. Este movimento resulta na exposição dos resíduos apolares localizados na superfície interna da tampa (Ile⁸⁵, Trp⁸⁸, Ile⁸⁹, Leu⁹², Phe⁹⁴, Val²⁰⁵, Leu²⁰⁸, Phe²¹³, Val²⁵⁴, Leu²⁵⁵, Leu²⁵⁸, Leu²⁶⁷ na lipase de *R. miehei* e Phe⁷⁷, Tyr¹¹⁴, Pro¹⁸⁰, Leu²⁰², Ile²⁰⁹ e Phe²¹⁵ na lipase pancreática suína) para interação com a interface também apolar e conseqüente exposição da tríade catalítica;

vi) a conformação ativa também é estabilizada pelo favorecimento da interação dos resíduos polares localizados na parte superior da tampa (Arg⁸⁰ e Arg⁸⁶ da lipase de *R. miehei* e Asn²⁴⁰ da lipase pancreática suína) com outros resíduos igualmente polares localizados nas proximidades (Asp⁶¹ e Glu¹¹⁷ na lipase de *R. miehei* e Glu¹⁵ localizado na estrutura da colipase).

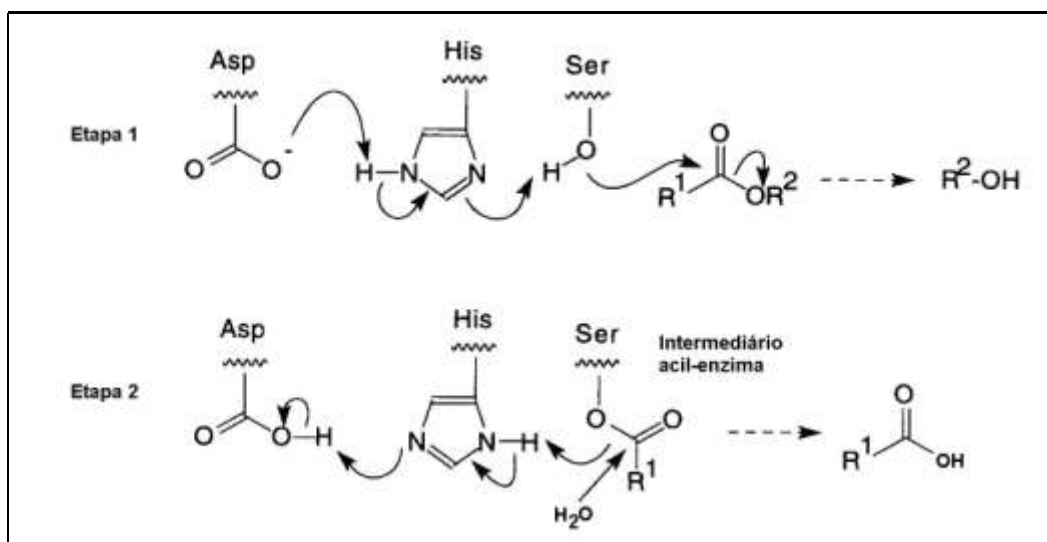


FIGURA 5: Representação esquemática do mecanismo de ação de uma enzima do tipo serina-hidrolase (adaptado de *Faber, 1997*).

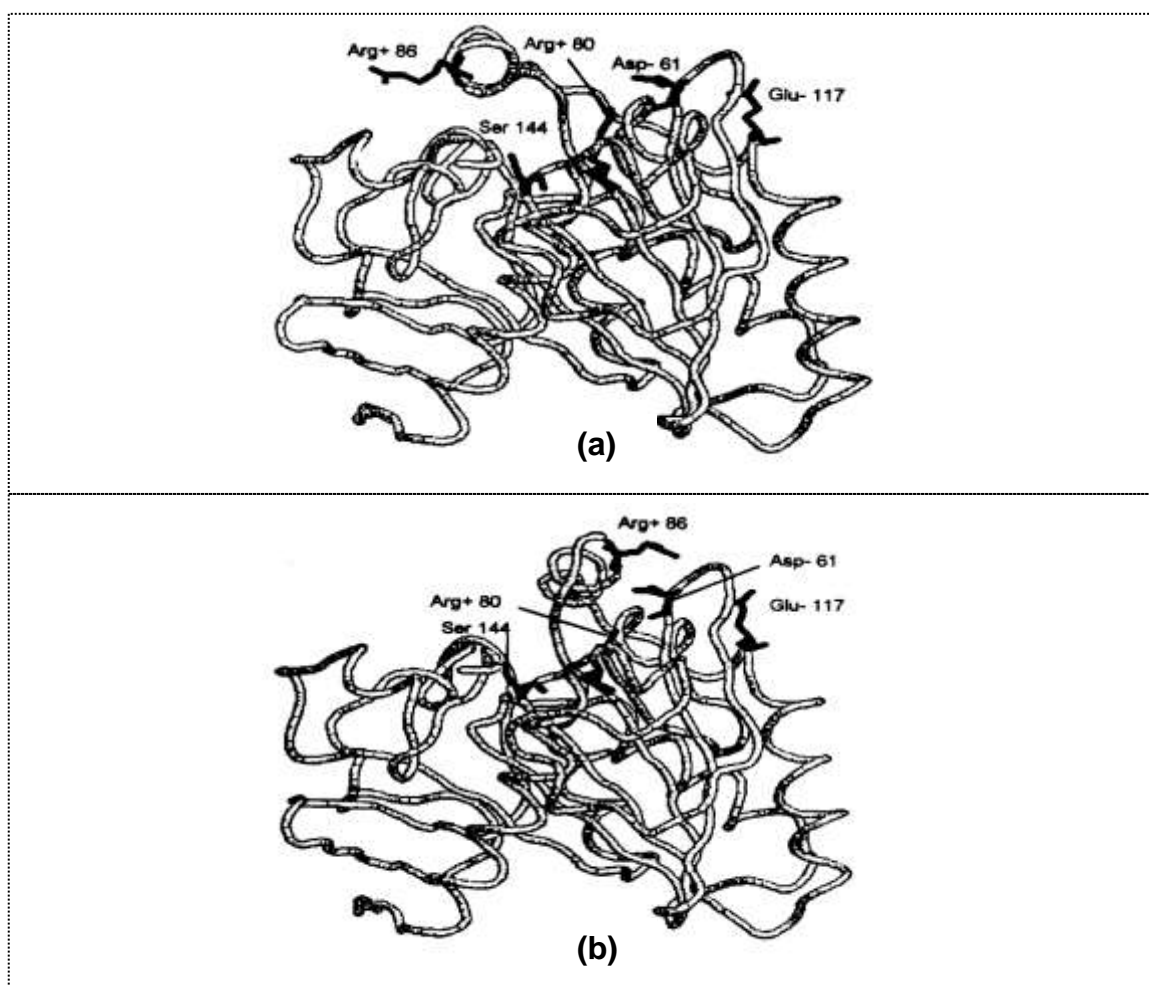


FIGURA 6: Estrutura tridimensional de lipase de *R. miehei* na forma inativa (a) e ativa (b) (extraída de *Benedetti e col., 1996*).

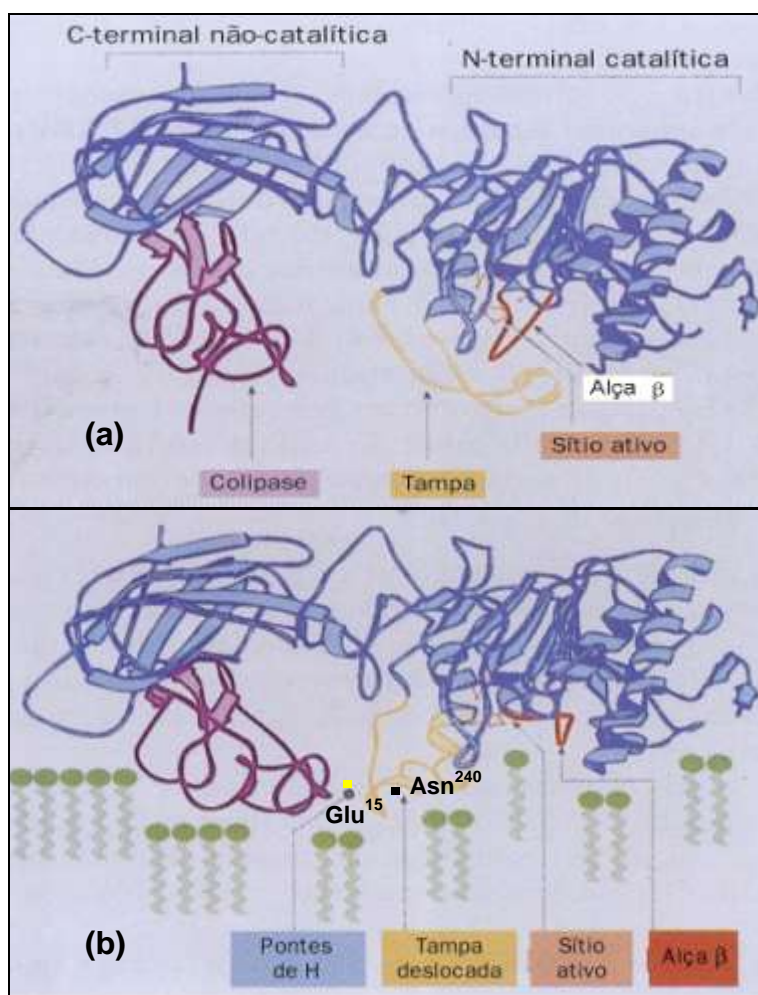


FIGURA 7: Estrutura tridimensional de lipase pancreática suína na forma inativa (a) e ativa (b). Colipase é uma proteína de 95 resíduos (PM = 10317) que faz parte da estrutura quaternária desta enzima (extraída de *Voet e col., 2002* e *Riddihough, 1993*).

1.5 – Uso de lipases na química de aminoácidos e peptídeos

Como descrito anteriormente, as lipases são esterases que *in vivo* catalisam a hidrólise da ligação éster de triacilgliceróis via formação de um intermediário acil-enzima seguida do ataque nucleofílico pela água com geração de mono- e diglicerídeos, glicerol e ácidos graxos livres (Voet e col., 2002, Faber, 1997).

Apesar destas enzimas apresentarem preferência por ésteres de álcoois secundários e de cadeias carbônicas longas (Matos e col., 1987), muitas delas podem catalisar também a hidrólise de ésteres de outra natureza. Portanto, estes catalisadores biológicos tem sido extensivamente utilizados em uma grande variedade de reações orgânicas, tais como a desproteção regioseletiva de carboxila (Faber, 1997, Ghanem, 2003), a hidrólise enantiosseletiva de ésteres (resolução de álcoois, Borregero e col., 2001, Garcia-Urdiales e col., 2001, Easwar & Argade, 2003), a aminólise de ésteres (amidação, Sanchez e col., 1999, Garcia-Urdiales e col., 2000, Lopez-Garcia e col., 2003), a alcoólise de óleos vegetais (produção de biodiesel, Nascimento e col., 2001) e a hidrólise de gorduras lácticas (otimização das características organolépticas de queijos, Collins e col., 2003).

Estas enzimas também são capazes de catalisar uma grande variedade de reações em química de aminoácidos e peptídeos (resolução de aminoácidos, proteção, desproteção, glicosilação e transesterificação de aminoácidos e peptídeos), o que justifica a importância delas nesta área (TABELA 3).

Em 1987, os grupos de pesquisa de Margolin & Klibanov (1987) e o de Matos e colaboradores (1987) demonstraram pela primeira vez que durante a quebra de um éster de aminoácido catalisada por lipase em meio contendo solvente orgânico pode ocorrer a formação de uma ligação peptídica (aminólise de ésteres) se um outro aminoácido com grupo amino livre estiver presente. Desde então, as lipases utilizadas para este fim tem sido: a pancreática suína (Liria & Miranda, 2001, Zhang e col., 2001 e 2003, Liria e col., 2002), a de *Candida cylindracea* (West & Wong, 1987, Matos e col., 1987) e a de *Pseudomonas* sp. (West & Wong, 1987, Matos e col., 1987).

TABELA 3: Aplicação de lipases na química de aminoácidos e peptídeos.

Processo	Fonte da Lipase	Referência
Hidrólise de ésteres de aminoácidos usuais e não usuais (N α -acilados ou não)	Pâncreas suíno, <i>Aspergillus niger</i> <i>Geotrichum candidum</i> , <i>C. cilindracea</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp	Miyazawa e col., 1989 Chiou e col., 1992 Houng e col., 1996 Janes & Kazlauskas, 1997
Aminoacilação seletiva de dipeptídeos	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Aspergillus niger</i> , <i>Chromobacterium viscosum</i>	Gardossi e col., 1991
Amidação regio- e enantiosseletiva do diéster etílico de N α -acil-Glu	<i>C. antarctica</i>	Chamorro e col., 1995 Conde e col., 1997 Martinez e col., 2000
Transesterificação de éster 2,2,2 trifluoroetílico de Z-aminoácidos não usuais	Pâncreas suíno, <i>C. cilindracea</i> , <i>Chromobacterium viscosum</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>Rhizopus javanicus</i>	Miyazawa e col., 1992
Aminoacilação de nucleosídeos via síntese de ligação éster de oxima	<i>C. antarctica</i> <i>P. cepacia</i>	Morris & Gotor., 1994
Transesterificação de ésteres de N α -acil-aminoácido ou -peptídeo para síntese do éster de oxima	<i>Pseudomonas</i>	Chen e col., 1996
Hidrólise de ésteres de peptídeos para a síntese de peptídiil-acetil-hidroxi-aminina	Pâncreas suíno	Chen e col., 1992
Hidrólise de ésteres dietileno-glicólicos e polietileno-glicólicos de peptídeos e glicopeptídeos	<i>Rhizopus niveus</i> <i>Humicola lanuginosa</i>	Kunz e col., 1994
Hidrólise de ésteres 2-(2-metoxietoxi)etílicos de glicopeptídeos	<i>Rizopus niveus</i> <i>Aspergillus niger</i>	Gewehr e col., 1998
Hidrólise de ésteres de Fmoc- e Boc-aminoácidos	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>C. cilindracea</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , Pâncreas suíno	Marczak & Lipkowski, 1999
Inibição de lipase e fosfolipase A2 por lipopeptídeos	Pâncreas suíno	Nicolaou e col., 1998
Dessimetração de derivados de tirosina para fosforilação	<i>P. cepacia</i>	Yokomatsu e col., 1998
Deacetilação para remoção de AGIOC e AGalOC de peptídeos	Pâncreas suíno	Gum e col., 2000
Glicosilação do éster trifluoroetílico de Ac-Phe-OCH ₂ CF ₃	<i>C. cilindracea</i> , <i>Mucor javanicus</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>P. fluorescens</i>	Maruyama e col., 2002.

Z: benziloxycarbonil; **AgIOC**: Tetra-O-acetil-D-glicopiranosiloxycarbonil; **AgalOC**: Tetra-O-acetil-beta-D-galactopiranosiloxycarbonil; **Ac**: Acetil

As principais vantagens em usar lipases ao invés de proteases na síntese enzimática de peptídeos são as seguintes: i) possibilidade da ausência de atividade amidásica (*Maruyama e col., 2003*); ii) alta estabilidade do catalisador em solventes orgânicos, principalmente em n-hexano (*Ader e col., 1997*); iii) aumento de atividade do catalisador em presença de uma interface hidrofóbica (*Sarda & Desnuelle, 1958, Verger, 1997*); iv) possibilidade de usar aminoácidos não usuais e derivados de D-aminoácidos como aceptores de acila (*West e Wong, 1987, Kawashiro e col., 1993, So e col., 1998*). Apesar delas, o número de trabalhos da literatura sobre o assunto ainda é pequeno. A TABELA 4 resume os exemplos de sínteses bem sucedidas mediadas por lipases.

As condições reacionais empregadas para os acoplamentos entre os derivados de aminoácidos são muito variadas dificultando a comparação entre as produtividades encontradas. Por outro lado, é possível notar uma preferência pelo uso de lipase pancreática suína como catalisador e por sistemas monofásicos de solventes, tais como: i) solventes orgânicos anidros puros como o tolueno (*Margolin & Klibanov, 1987, Kitaguchi e col., 1988*), o tetraidrofurano (*Margolin & Klibanov, 1987*), a dimetilformamida (*Kawashiro e col., 1993*) e o acetato de etila (*West & Wong, 1987, Matos e col., 1987*); ii) misturas aquo-orgânicas como éter etílico/tampão fosfato, 0,1M, pH 8,0 (90:10, v:v), (*West & Wong, 1987, Matos e col., 1987*), DMF/tampão Tris-HCl, 0,1M, pH 8,0 (95:5, v:v) (*Kawashiro e col., 1993*), dimetilsulfóxido/tampão Tris-HCl, 0,1M, pH 8,0 (95:5, v:v) (*Kawashiro e col., 1993*), acetonitrila/tampão Tris-HCl, 0,1M, pH 8,0 (95:5, v:v) (*So e col., 1998*) e 3-metil-3-pentanol/tampão Tris-HCl, 0,1M, pH 8,0 (95:5, v:v) (*So e col., 1998*). Na maioria delas, emprega-se de 1,5 a 10 vezes de excesso molar do aceptor de acila em relação ao doador de acila e de 4 a 100 mg/mL de enzima livre. Até o momento, apenas um grupo de pesquisa relatou a realização de síntese de peptídeos catalisada por lipase de *C. cylindracea* imobilizada em amberlite (*Matos e col., 1987, West & Wong, 1987*).

TABELA 4: Uso de lipases na síntese de peptídeos.

Produto	Fonte da Lipase	Produtividade* (%/h)	Referência
VI-Gly-Gly-PhH Z-Phe-Ala-OC ₃ H ₇ Boc-Cys(SBu ^t)-D-Val-OBzl	<i>C. cylindracea</i>	3	Matos e col., 1987
Ac-Phe-Ala-NH ₂ Ac-Phe-Phe-NH ₂ Ac-Phe-Leu-NH ₂ Ac-Phe-Leu-NHNaph ^m	Ac-Phe-Ala-OMe Ac-Phe-Leu-NH ₂ Ac-Tyr-Leu-NH ₂ Ac-Met-Leu-NH ₂	1	Margolin & Klibanov, 1987
Z-D-Phe-Ala-OBu ^s Z-Gly-Ala-OBu ^s Ac-Cys(SBu ^t)-D-Val-Bzl	Z-Phe-Ala-OBu ^s VI-Gly-Gly-PhH For-Gly-Gly-PhH	5 3	West & Wong, 1987
Ac-Ala-Lys-OBu ^t	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,5	Kitaguchi e col., 1988
Z-Phe-Phe-NH ₂ Z-Ala-Ala-NH ₂	Z-Phe-Ala-NH ₂ , Z-D-Ala-Ala-NH ₂	27	Kawashiro e col., 1993
Bz-Tyr-Ala-NH ₂ Bz-Tyr-D-His-OMe Bz-Tyr-Thr-OMe Bz-Tyr-D-Ala-NH ₂ Bz-His-D-Ala-NH ₂	Bz-Tyr-D-Ala-NH ₂ Bz-Tyr-Ser-OMe Bz-Tyr-D-Thr-OMe Bz-Ala-D-Ala-NH ₂ Ac-Trp-D-Ala-NH ₂	19	So e col., 1998
Bz-Arg-Gly-NH ₂	Z-Gly-Asp-NH ₂ Bz-Arg-Gly-Asp-NH ₂	13	Zhang e col., 2001 e 2003

* Produtividade (rendimento/tempo reacional) referente a síntese mais eficiente relatada.

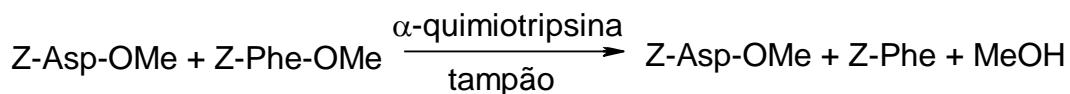
VI: valerolil; PhH: fenil-hidrazida; C₃H₇: isopropil; SBu^t: Tert-mercaptop-butil; NHNaph^m: β-naftilamida

Nas décadas de 1980 e 1990, Tominaga e seu grupo de pesquisa realizaram vários estudos sistemáticos da síntese de peptídeos catalisada por proteases (*Miranda e col., 1986, Cheng e col., 1988, Miranda & Tominaga, 1991, Bemquerer e col., 1991, Theobaldo e col., 1991, Bemquerer e col., 1994*). Posteriormente, o nosso grupo de pesquisa realizou novos estudos tendo descrito dificuldades de aplicação destas enzimas no acoplamento entre fragmentos peptídicos (*Bemquerer e col., 1998, Liria e col., 1998*). Considerando o nosso conhecimento em síntese de peptídeos e aquele disponível na literatura sobre lipases, decidimos utilizá-las como biocatalisadores na formação da ligação amida entre derivados de aminoácidos (*Liria & Miranda, 2000, Liria e col. 2002*).

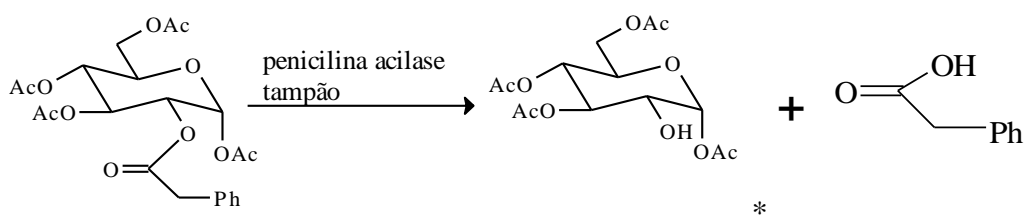
1.6 - Preferência de lipases por ésteres de aminoácidos

A grande justificativa para a utilização de enzimas na catálise de reações orgânicas é a sua elevada especificidade, a qual compreende três níveis: i) quimiosseletividade; ii) regioseletividade e diasterosseletividade; iii) enantioseletividade (*Koskinen e Klibanov, 1996*).

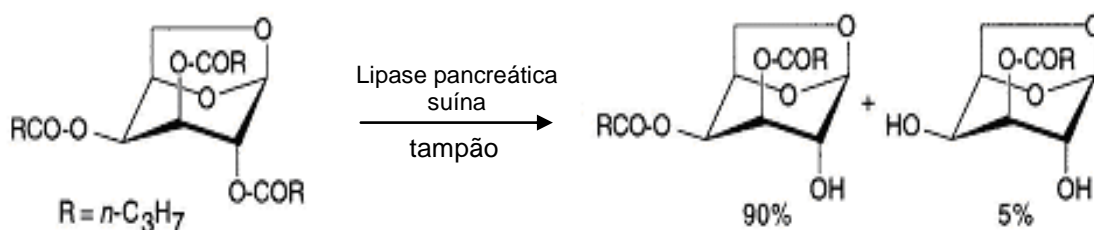
A reação abaixo ilustra a seletividade exibida pela α -quimiotripsina (protease com atividade esterásica) para a catálise da hidrólise de ésteres de aminoácidos com formação de álcool no meio reacional: apenas o éster de Z-Phe foi reconhecido (*Keil, 1971, Schellenberger e col., 1994*).



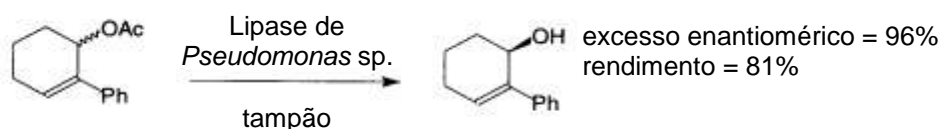
A quimiosseletividade é a capacidade da enzima reconhecer um dado grupo funcional de um substrato ignorando os outros grupos existentes na molécula. Esta está relacionada às características químicas dos resíduos de aminoácidos que compõem o sítio catalítico da enzima (*Koskinen & Klibanov, 1996*) e pode ser ilustrada pela preferência da penicilina acilase em catalisar a hidrólise do éster de fenilacetato ao invés da hidrólise dos demais ésteres presentes na molécula do substrato em questão (*Faber, 1997*).



Regiosseletividade é a possibilidade de distinguir entre grupos funcionais idênticos e situados em diferentes regiões da molécula do substrato. Esta característica decorre da complexa estrutura tridimensional das enzimas que impedem a formação do complexo enzima-substrato com substratos estericamente impedidos (Koskinen & Klibanov, 1996). No exemplo abaixo a lipase pancreática suína preferiu catalisar a hidrólise do éster butírico na posição 2 do 1,6-anidro-2,3,4-tri-*O*-butanoil-galactopiranoose (Ballesteros e col., 1989).



A enantiosseletividade é a capacidade de uma enzima distinguir um D-substrato de um L-substrato, levando a valores de velocidades diferentes na formação do complexo enzima-substrato. Esta característica pode ser explicada pelo fato das enzimas, em sua grande maioria, serem formadas por L-aminoácidos, sendo, portanto, catalisadores quirais e com capacidade de reconhecer a quiralidade do substrato (Suckling, 1984, Faber, 1997). Para ilustrar a enantiosseletividade, é mostrada abaixo a reação de resolução do álcool alílico catalisada pela lipase de *Pseudomonas* sp (Allen & Williams, 1996).



O conhecimento da especificidade de uma dada enzima pelos substratos é valioso, pois: i) auxilia na escolha de reações passíveis de serem catalisadas por ela aumentando as chances de êxito; ii) possibilita o controle regio- e estereoespecífico da reação, o que leva a um aumento do rendimento reacional e da pureza química do produto obtido (Borreguero e col., 2001); iii) permite a concepção de miméticos de substratos (Suckling, 1984, Günther e col., 2000) e de inibidores enzimáticos (Schoellman & Shaw, 1963, Shaw, 1967, Yang e col., 1997); iv) possibilita o desenvolvimento de modelos que auxiliam no entendimento desta propriedade tão valiosa das enzimas (Borreguero e col., 2001).

O conhecimento das especificidades das diferentes proteases por aminoácidos e seus derivados já é bem definido, o que facilita o trabalho dos químicos sintéticos de peptídeos que empregam a metodologia enzimática. Para as lipases já são bem conhecidas suas especificidades para ésteres de compostos orgânicos que não aminoácidos (Högberg e col., 1993, Cygler e col., 1994, Franssen e col., 1996, Janssen e col., 1996, Byron, 1997, Botta e col., 1997, García-Urdiales e col., 2000, Borreguero e col., 2001). Os trabalhos disponíveis na literatura que poderiam fornecer informações a respeito das especificidades destas enzimas para ésteres de aminoácidos e peptídeos não são em grande número e não se referem a estudos sistemáticos (TABELA 3). As informações fornecidas por eles permitem concluir que:

1) a lipase pancreática suína catalisa mais eficientemente a formação de ligação peptídica quando os substratos são ésteres de Arg, Lys, Met, Phe, Tyr e Trp. O contrário ocorre para substratos derivados de Asp, Asn, Thr, Ser, His, Ala e Gly (TABELA 5).

2) a lipase pancreática suína bem como a de *C. antarctica*, de *Aspergillus niger*, de *Geotrichum candidum*, de *C. cylindracea*, de *Pseudomonas* sp e de *Rhizopus* sp preferem hidrolisar o L-éster do derivado de aminoácidos de uma mistura contendo D e L (Chamorro e col., 1995, Conde e col., 1997, Conde e col., 2000, Conde & López-Serrano, 2002, West & Wong, 1987, Kawashiro e col., 1993, Chiou e col., 1992, Houg e col., 1996, Janes & Kazlauskas, 1997).

3) a lipase pancreática suína catalisa a síntese da ligação peptídica tanto a partir de aceptores de acila derivados de L- como de D-aminoácidos como aceptores de acila (West & Wong, 1987, Margolin & Klibanov, 1987, So e col., 1998).

4) a lipase de *C. antarctica* prefere amidar as carboxilas α de derivados de ácido aspártico e ácido glutâmico protegidos em seus grupos aminos e esterificados em suas carboxilas α , β e γ . Segundo os autores deste trabalho a regioseletividade desta enzima independe da natureza do protetor de grupo α -amino empregado (Chamorro e col., 1995, Conde e col., 1997, Conde e col., 2000, Conde e López-Serrano, 2002).

TABELA 5: Substratos empregados *versus* produtividades em sínteses da ligação peptídica mediadas por lipases pancreáticas suínas.

Substratos empregados		Referência
Elevada Produtividade*	Baixa Produtividade*	
Bz-Arg-OEt Bz-Tyr-OEt	Z-Gly-OEt, Z-Thr-OMe, Z-Asn-OBu ¹ , Z-Ser-OMe, Bz-His-OMe, Bz-Ala-OMe	So e col., 1998
Ac-Tyr-OEtCl, Ac-Tyr-OEt, Ac-Phe-OEtCl, Z-Phe-OMe Z-Phe-OMe		Margolin & Klivanov, 1987 ¹ West & Wong, 1987 ¹ Kawashiro e col., 1993 ¹
Met-OMe, Arg-OEt Tyr-OMe, Phe-OMe, Lys-OEt,	Thr-OEt, His-OEt	Houng e col., 1996
Bz-Arg-OEt		Zhang e col., 2001 e 2003 ²

* Esta classificação se baseou na produtividade que foi calculada fazendo-se a divisão dos rendimentos obtidos pelos tempos reacionais descritos nos trabalhos.

¹ Os substratos empregados se restringiram a ésteres de N α -acil-aminoácidos aromáticos. ² Bz-Arg-OEt foi o único substrato empregado.

Um outro fator importante a ser citado é a influência da natureza do protetor de grupo α -amino na preferência das lipases na hidrólise de ésteres de aminoácidos. Esta foi detectada, por exemplo, por West e Wong (1987) que compararam as eficiências da lipase pancreática suína em catalisar a formação da ligação peptídica usando valeroil- e formil-Gly-O-C₈H₁₇ como doadores de acila e Gly-N₂H₂C₆H₅ como acceptor de acila. Eles relataram que o tamanho do grupo protetor influenciou a preferência da lipase pelo substrato, pois a presença de um bloqueador de cadeia carbônica mais longa (valeroil-) resultou num rendimento de acoplamento duas vezes maior. Dez anos depois, Conde e colaboradores (1997) afirmaram que as diferenças observadas entre as velocidades de hidrólise de ésteres de N α -acil-ácido glutâmico catalisada por lipase de *C. antarctica* não eram devido ao tamanho ou volume do protetor de grupo α -amino, mas sim à natureza química deles. Alguns anos depois, os mesmos autores afirmaram que esta lipase preferiu Z-Glu(OEt)-OEt a Boc-Glu(OEt)-OEt (Conde e col., 2000, Conde e López-

Serrano, 2002).

De modo contrário, alguns autores sugerem que não existe influência da natureza do éster na velocidade da aminólise de $N\alpha$ -acil-aminoácidos esterificados catalisada por lipases, pois não foram observadas diferenças entre os rendimentos da síntese de Ac-Phe-Leu-NH₂ a partir de Ac-Phe-OEtCl e de Ac-Phe-OEt (doadores de acila) e Leu-NH₂ (acceptor de acila), nem tão pouco na síntese de Z-Gly-Ala-OBu^s a partir de Z-Gly-OOct e Z-Gly-OMe (doadores de acila) e Ala-OBu^s (acceptor de acila) (*Margolin e Klibanov, 1987, West e Wong, 1987*).

Concluindo, os dados apresentados acima tornam evidente a necessidade da realização de estudos sistemáticos sobre a preferência das lipases na hidrólise de ésteres dos diferentes $N\alpha$ -acil-aminoácidos. Estes forneceriam informações confiáveis aos químicos sintéticos que desejam utilizar estas enzimas como catalisadores da formação da ligação peptídica.

2 – OBJETIVOS

Como destacado no item 1.5 desta tese, uma das linhas de pesquisa já bem consolidada do laboratório de Química de Peptídeos do IQ-USP refere-se ao desenvolvimento de processos enzimáticos que permitam produzir peptídeos sintéticos de forma enantiosseletiva e compatível com a filosofia da química auto-sustentável. Na intenção de contribuir para o desenvolvimento da referida linha de pesquisa, foi proposto o sub-projeto em questão centrado no estudo da síntese de peptídeos catalisada por lipases. Assim, os objetivos deste trabalho foram:

- * Comparar a eficiência de lipases de diferentes fontes e graus de pureza como catalisadores da síntese de dois dipeptídeos modelos (Ac-Tyr-Gly-NH₂ e Z-Asp-Gly-NH₂) utilizando a aminólise de ésteres como abordagem experimental;
- * Estudar alguns dos parâmetros que influenciam o processo, tais como temperatura, natureza do sistema de solventes aquo-orgânicos, concentração do acceptor de acila e contaminação das preparações enzimáticas por proteases;
- * Identificar a melhor condição reacional e a preparação lipásica mais adequada. Estudar, de maneira sistemática, a preferência desta na hidrólise de ésteres de N α -acil-aminoácidos. Neste caso, as influências da natureza do aminoácido, do éster e do protetor de grupo amino na hidrólise do éster foram examinadas;
- * Elucidar possíveis reações secundárias que ocorrerão durante as reações biocatalisadas em estudo.

Os resultados obtidos serviriam de base para futuras investigações de síntese enantiosseletiva passo a passo de determinados peptídeos de baixa massa molecular (2 a 5 resíduos) e/ou condensação entre segmentos peptídicos visando à produção de peptídeos maiores.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Materiais

O suporte polimérico utilizado na síntese em fase sólida foi a resina 4-metilbenzilhidrilamina (MBHA, 100-200 mesh, da Bachem Califórnia Inc., EUA). Os $N\alpha$ -t-butiloxicarbonil-aminoácidos (Boc-aminoácidos), protegidos ou não em suas cadeias laterais, foram obtidos da Bachem Califórnia Inc. (EUA). O reagente acoplador *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIC) foi obtido da Sigma Chemical Co. (EUA) e o 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) foi obtido da Protein Research Foundation, (PRF, Japão). Os outros reagentes requeridos foram: anisol, ácido trifluoroacético (TFA), trietilamina (TEA), fluoreto de hidrogênio (HF) e anidrido acético. Todos eles eram de grau analítico ou de síntese, provenientes da Merck KGaA (Alemanha), Sigma Chemical Co. (EUA), Aldrich Chemical Co. (EUA) ou da EM Science (EUA) e foram empregados sem purificação prévia. Os solventes diclorometano (DCM), *N,N*-dimetilformamida (DMF), metanol (MeOH) e éter diisopropílico eram procedentes da Merck KGaA (Alemanha), Sigma Chemical Co. (EUA), Riedel-De Haen AG (Alemanha), EM Science (EUA) ou da Applied Biosystem (EUA). Todos eram de grau analítico ou de síntese e foram empregados sem qualquer tratamento prévio.

Para o monitoramento das reações de formação da ligação peptídica por meio do teste de ninidrina foram empregadas as misturas fenol/etanol 76% (V/V) (monitor 1), cianeto de potássio/piridina 0,0002 M (monitor 2), ninidrina/etanol 0,28 M (monitor 3) de grau síntese e obtidos da Applied Biosystems (EUA). Dado à alta toxicidade destes reagentes, este procedimento foi executado obedecendo todas as regras de segurança.

Na preparação dos eluentes ou solventes A e B para as análises por RP-HPLC e LC/ESI-MS foram utilizados acetonitrila (EM Science, EUA) e TFA (Merck KGaA, Alemanha) de grau espectroscópico.

Nas reações biocatalisadas foram empregadas as lipases purificada de *Candida cylindracea* (pCCL), lipase não purificada de pâncreas suíno (cPPL) e tripsina de pâncreas bovino da Sigma Chemical Co. (EUA). A lipase purificada de pâncreas suíno era da Elastin Products Co., Inc (EUA) e a α -quimotripsina de

pâncreas bovino era da Biobrás - Bioquímica do Brasil S.A. (Brasil). Embora recentemente o nome *Candida cylindracea* tenha sido trocado para *Candida rugosa*, neste trabalho foi mantido o nome *Candida cylindracea*. Os valores das atividades indicadas nos rótulos de cada frasco de enzima eram os seguintes: era 55 U/mg de sólido para a cPPL (Sigma-L3126), sendo 1U = 1 μ eq de ácido graxo gerado a partir do triglicerídeo em 1 h e pH 7,7, 17300 U/mg de sólido para a pCCL (Sigma-L9767) e 1010 U/mg de sólido para a pCCL (Sigma-L1754), sendo 1U = 1 μ eq de ácido graxo gerado a partir do triglicerídeo em 1 h em pH 7,2 a 37°C em 30 minutos de reação e 16 U/mg de sólido para a pPPL (Elastin Products). Os substratos utilizados, tais como os N α -benziloxycarbonil-aminoácidos (Z-aminoácidos), cloridrato de glicina amidada (Gly-NH₂), os ésteres de N α -fluorenilmetiloxycarbonil- (Fmoc-), Z-, Boc- e acetil-aminoácidos eram provenientes da Protein Research Foundation, Japão, ou da Bachem Califórnia Inc. (EUA). Todos os derivados de aminoácidos utilizados tinham configuração L.

O ácido clorídrico (HCl), hidróxido de sódio (NaOH), o n-hexano, o sal CaCl₂.2H₂O e o tampão tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl ou Trisma) empregados eram da Merck KGaA (Alemanha).

O kit-diagnóstico para determinação da atividade lipásica "Lipase Titrimetric Determination" era da marca Sigma Chemical Co. (EUA).

Os substratos específicos utilizados na determinação das atividades enzimáticas de α -quimotripsina (4-nitroanilida de N α -benzoil-DL-tirosina) e tripsina (cloridrato da 4-nitroanilida de N α -benzoil-DL-arginina), e os seus respectivos inibidores específicos clorometilcetona de p-tosil-fenilalanina (TPCK) e clorometilcetona de p-tosil-lisina (TLCK) eram da Nakarai Chemicals Ltd. (Japão).

3.2 – Métodos analíticos

3.2.1 – Cromatografia líquida

Em geral, as análises de alíquotas das reações biocatalisadas foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência empregando uma coluna de sílica de fase reversa da Vydac (EUA) (C₁₈, 0,46 cm x 25,00 cm, 5 μ M, 300Å). Estas análises foram realizadas num cromatógrafo composto de uma bomba

Constametric 3500 da Thermo Separation Products (TSP), uma bomba Constametric 3200 da TSP, um injetor automático Spectrasystem AS3000 da TSP, um detector Spectromonitor 3100 da LDC analytical e um integrador Data Jet da TSP.

A separação dos componentes presentes nas soluções injetadas ocorreram em gradientes lineares que utilizavam dois solventes. O solvente A era 0,1% de TFA em água e o solvente B era 0,09% de TFA em uma mistura acetonitrila/água. A percentagem de acetonitrila no solvente B dependia das características químicas do(s) analito(s) em questão. O fluxo era 1mL/min e o comprimento de onda (λ) era 210nm.

3.2.2 – Análise de aminoácidos *(Mant & Hodges, 1991)*

Os dipeptídeos obtidos por síntese química e enzimática foram submetidos à hidrólise ácida gasosa a 110°C por 24 horas, em presença de HCl 6M e de cristais de fenol sob atmosfera de N₂, em uma estação de trabalho Pico Tag da Waters Millipore (EUA). O hidrolisado total foi seco a vácuo na mesma estação de trabalho e posteriormente diluído para a determinação da composição molar dos aminoácidos em analisador automático modelo 7300 da Beckman Instruments, Inc. (EUA).

Este sistema emprega o método de derivatização pós-coluna, no qual os aminoácidos provenientes de hidrólise ácida são separados por cromatografia líquida de alta eficiência empregando uma coluna de troca iônica poliestireno sulfonada da Beckman Instruments, Inc. (0,40 cm x 12,00 cm) e detectados como produtos de uma reação com ninidrina a 440 ou 570 nm. A quantidade de cada aminoácido é calculada baseando-se na análise de uma mistura padrão contendo 19 aminoácidos de concentração conhecida.

Os aminoácidos livres presentes nas reações enzimáticas também foram identificados e quantificados utilizando a mesma técnica analítica e equipamento.

3.2.3 – Espectrometria de massas

As massas moleculares dos dipeptídeos foram determinadas em um espectrômetro da Micromass duplo quadropolo, modelo Quatro II, através da

técnica de ionização por electrospray (ESI-MS).

As análises dos dipeptídeos purificados ocorreram por injeção direta em módulo positivo, cone = 20V, capilar = 3 kV, fluxo do gás secante = 35L/h e o fluxo do gás nebulizante = 15L/h. Os dipeptídeos brutos foram analisados por LC/ESI-MS. Portanto, eles foram injetados em um sistema de RP-HPLC da Shimadzu composto por duas bombas Shimadzu LC-10AD, uma coluna Vydac (C₁₈, 0,46 cm x 25,00 cm, 5 μ M e 300Å) e um detector Shimadzu SDP-10AV o qual estava acoplado ao espectrômetro de massas citado acima.

Em ambos os casos utilizou-se o software MassLynx™ para Windows NT nas análises dos espectros.

3.2.4 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS; *Sambrook, 1989*)

Esta técnica foi utilizada a fim de analisar as preparações enzimáticas comerciais empregadas. O método usado foi aquele que utiliza o sistema para eletroforese em placa Mini-Protean II da BioRad (EUA). O gel de empilhamento continha 5% de acrilamida e o de separação continha 15%. 10 μ L das soluções a serem analisadas foram acrescidas de 10 μ L tampão de amostra à base de dodecil sulfato de sódio (SDS) e azul de bromofenol, aquecidas em banho-maria a 100°C por 5 min e, então foram aplicados no gel 10 μ L de cada solução (CCL-L1754=8mg/mL, CCL-L9767=1mg/mL, pPPL=20mg/mL, cPPL=40mg/mL, Tripsina=4mg/mL, α -Quimotripsina=4mg/mL). A eletroforese foi realizada a 200V e interrompida quando a linha do corante azul de bromofenol atingiu a extremidade inferior do gel. Foi usada como padrão de massa molecular uma solução contendo fosforilase B (97,0kD), albumina (66,0kD), ovoalbumina (45,0kD), anidrase carbônica (30,0kD), inibidor de tripsina (20,1kD) e α -lactoalbumina (14,4kD).

O gel obtido foi corado a temperatura ambiente por 2 horas com azul de Coomassie Blue R-250 (4%) em solução contendo 50% de etanol e 10% de ácido acético. O descoramento ocorreu à temperatura ambiente por 8 horas em solução contendo 50% de etanol e 7% de ácido acético.

3.2.5 – Atividade α -quimotríptica (*Shaw, 1967*)

A atividade α -quimotríptica em cPPL foi determinada usando 0,2 mL de

uma solução de cPPL (1mg/mL em HCl 0,01M) e 2,8 mL de uma solução 12 mM do substrato 4-nitroanilida de N α -benzoil-DL-tirosina dissolvido em tampão fosfato 0,07M, pH 7,6. A reação enzimática ocorreu em um espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-160 1PC, acoplado a um computador que registrou a variação de absorbância por minuto a 405nm ($\Delta A_{405}/\text{min}$) durante os primeiros 5 minutos de reação. A unidade de atividade α -quimotríptica (U) foi definida como a quantidade de enzima que, nas condições do teste, catalisou a transformação de 1 μmol de substrato por minuto. A atividade α -quimotríptica (A) foi expressa em U/mg de sólido.

3.2.6 – Atividade tríptica (*Shaw e col., 1965*)

A atividade tríptica em cPPL foi determinada misturando 0,2 mL de uma solução de cPPL (12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em HCl 0,01M) com 2,5 mL de uma solução 4mM do substrato cloridrato da 4-nitroanilida de N α -benzoil-DL-arginina (DL-BAPA) dissolvido em água destilada e 0,3 mL de tampão fosfato 0,03M, pH 8,0. A reação enzimática ocorreu em condições não termostatizadas, em um espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-160 1PC, acoplado a um computador que registrou a variação de absorbância a 405nm por minuto ($\Delta A_{405}/\text{min}$) durante os primeiros 5 minutos de reação. A unidade de atividade tríptica (U) foi definida como a quantidade de enzima que, nas condições do teste, catalisou a transformação de 1 μmol de substrato por minuto. A atividade tríptica (A) foi expressa em U/mg de sólido.

3.2.7 – Atividade lipásica (*Tietz & Fiereck, 1966*)

A atividade lipásica foi determinada usando o kit-diagnóstico “Lipase Titrimetric Determination” da Sigma Chemical Co. (EUA). O procedimento se baseou na hidrólise dos triglicerídeos contidos em uma emulsão óleo de oliva:água (50:50,v:v) em condições específicas [1 mL de uma solução 2 mg/mL de cPPL em tampão trisma (0,2 M e pH 8,0), 2,5 mL de água, 1 mL de trisma e 3,0 mL do substrato] produzindo diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol. Após a adição dos reagentes, o tubo reacional foi fechado e agitado vigorosamente por 5 segundos e depois mantido à 37°C por 6h em agitador

rotativo a 300 rpm. Após 6h de reação foram adicionados 3 mL de etanol 95% à mistura a fim de inativar a cPPL. A atividade lipásica foi calculada a partir da quantidade de ácidos graxos livres formada na reação de hidrólise. Estes, por sua vez foram quantificados pela titulação da mistura, com uma solução 0,05N de NaOH em presença de 4 gotas de uma solução 0,9% de timolftaleína. A unidade de atividade lipásica (U) foi expressa em μeq de ácidos graxos formados por hora e a atividade lipásica (A) foi expressa em U/mg de cPPL. Também foi preparado um branco que não continha a enzima.

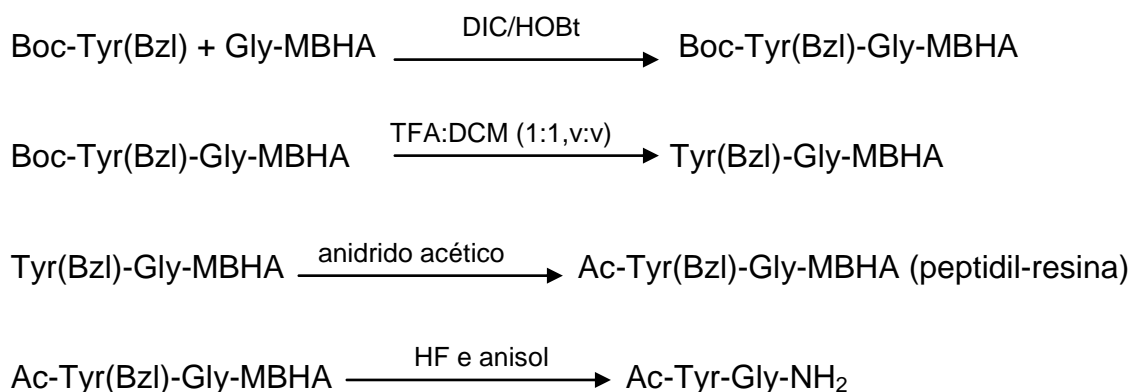
3.3 – Métodos preparativos

3.3.1 – Síntese química do dipeptídeo Ac-Tyr-Gly-NH₂ (Varanda & Miranda, 1997)

A síntese em fase sólida deste peptídeo ocorreu manualmente em escala de 0,2 mmol empregando-se a resina MBHA (0,77 mmol/g) e a estratégia Boc/benzil em temperatura ambiente de acordo com o ESQUEMA 1. As reações de acoplamento foram mediadas por DIC/HOBt em mistura DCM/DMF (1:1, v:v), utilizando-se 1,5 vezes de excesso molar dos doadores de acila [Boc-Tyr(Bzl) e Boc-Gly] e monitoradas pelo teste de ninidrina (Kaiser e col., 1970). O grupo Boc foi removido em TFA:DCM (1:1,v:v) por 20 minutos. A acetilação do grupo amino realizada após remoção do Boc da Tyr(Bzl) incorporada ocorreu em presença de anidrido acético por 10 min. Ambas reações foram monitoradas pelo teste de ninidrina (Kaiser e col., 1970).

Toda a peptidil-resina obtida (286,3 mg) foi submetida à desproteção total e desligamento da resina em presença de 10 mL de HF e 0,5 mL de anisol a 0°C por 90 min, sob agitação constante. Após eliminação do ácido à vácuo, o peptídeo foi precipitado com éter diisopropílico (3x30 mL) e extraído com 50mL de solução 0,1% de TFA em água (A) e 50 mL de solução 50% de ACN/H₂O contendo 0,1% de TFA (B).



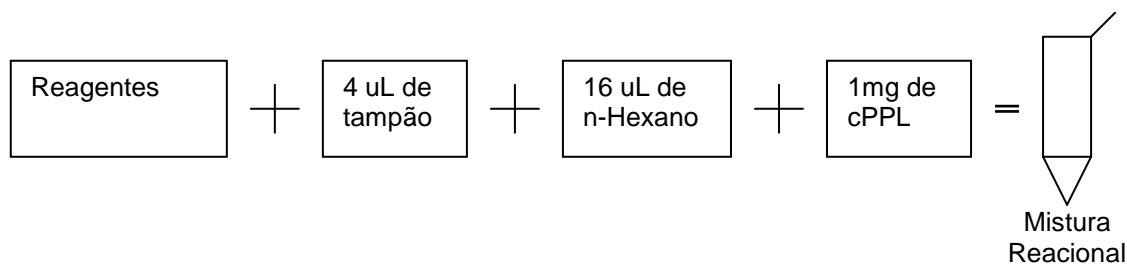


A solução resultante foi concentrada à aproximadamente 1mL em liofilizador e injetada em cromatógrafo líquido para purificação do peptídeo por RP-HPLC utilizando coluna preparativa Vydac (EUA) (C₁₈, 2,2 cm x 25 cm, 5 μm, 300 Å), fluxo de 10mL/min, gradiente linear de 5 a 95% do solvente B em 30 min e comprimento de onda de 210 nm. O solvente A era 0,1% de TFA e o solvente B era 20% de ACN/H₂O contendo 0,1% de TFA. As frações coletadas do cromatógrafo preparativo foram analisadas por RP-HPLC em coluna e condições citadas no item 3.2.1. O peptídeo obtido exibiu pureza superior a 98%. O rendimento não foi calculado, já que o peptídeo se mostrou muito higroscópico impossibilitando a sua pesagem exata.

3.3.2 – Síntese enzimática do dipeptídeo Ac-Tyr-Gly-NH₂ (Liria & Miranda, 2000)

O procedimento geral consistiu na mistura de 0,05 M do doador de acila (Ac-Tyr-OEt), 0,07 ou 0,5 M do acceptor de acila (Gly-NH₂; neutralizada ou não pela adição equimolar de TEA) e 50 mg/mL de enzima com o sistema de solvente aquoso (monofásico: tampão Tris-HCl, 0,5 M, pH 8,0) ou aquo-orgânico (bifásico: n-hexano/tampão, 80/20, v/v) seguida de incubação a 22 ou 37°C sob agitação constante de 300 rpm (a reação química de síntese será apresentada no capítulo Resultados e Discussão).

Como mostrado abaixo, para as reações em sistema bifásico foram utilizados diversos frascos onde cada um representava um tempo reacional a ser analisado:



Para cada tempo foi feito um “branco” sem enzima. Cada reação foi realizada em duplicata e, portanto, para cada um dos tempos 0, 24, 48 e 72h foram preparados dois frascos reacionais iguais aos mostrados acima. Nos tempos citados, as reações foram interrompidas pela adição de 980 μ L de uma solução 50% ACN/H₂O contendo 0,1% de TFA.

A formação do dipeptídeo foi detectada via análise por RP-HPLC de amostras das diferentes soluções reacionais nas seguintes condições experimentais: gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min, sendo o solvente A 0,1% de TFA/H₂O e o solvente B 20% de ACN/H₂O contendo 0,1% de TFA, o fluxo de 1mL/min e o λ de 210nm. A identidade do dipeptídeo formado foi confirmada pela coeluição com o padrão obtido previamente pelo método químico (item 3.3.1), pela análise do conteúdo de aminoácidos do seu hidrolisado total e por ESI-MS.

3.3.3 – Síntese enzimática do dipeptídeo Z-Asp-Gly-NH₂ (*Liria & Miranda, em preparação*)

O procedimento geral consistiu na mistura de 0,05 M do doador de acila (Z-Asp-OMe), 0,5 M do aceptor de acila (Gly-NH₂, neutralizada pela adição equimolar de TEA) e 50 mg/mL de enzima com o sistema de solvente aquoso (monofásico: tampão Tris-HCl, 0,5 M, pH 8,0) ou aquo-orgânico (bifásico: n-hexano/tampão nas proporções 10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 60/40, 70/30 e 80/20, v/v) seguida de incubação a 37°C sob agitação de 300rpm (a reação química de síntese será apresentada no capítulo Resultados e Discussão).

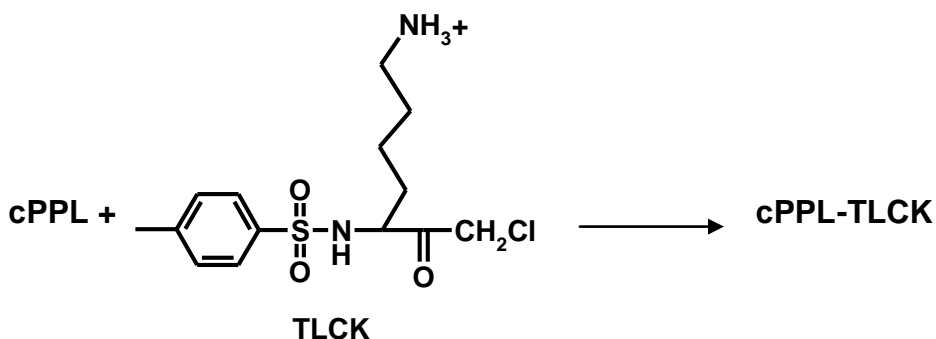
As reações foram realizadas conforme descrito no item 3.3.2. Assim, foram necessários 26 frascos correspondentes aos tempos 0, 20, 30 e 40 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 24 e 48 h e 6 outros correspondentes aos “brancos” para os

tempos 0, 1, 4, 8, 24 e 48 h. O processamento e a análise foram feitos conforme descrição no item 3.3.2 acima. Neste caso, o produto obtido foi purificado por RP-HPLC preparativa utilizando as mesmas condições empregadas nas análises das alíquotas reacionais. A identidade do produto purificado foi confirmada pela análise do conteúdo de aminoácidos do seu hidrolisado total e por ESI-MS.

3.3.4 – Obtenção de cPPL tratada com TLCK (Harald e col., 1992)

A tripsina presente em cPPL foi inibida irreversivelmente pela exposição ao composto clorometilcetona de p-tosil-lisina (TLCK).

Para a reação de inibição foram incubados 500 mg de cPPL em 100 mL de uma solução 56,2 μ M de TLCK recém-dissolvido em tampão tris-HCl 0,05 M contendo 0,01 M de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7,0, por 4 horas a 25°C sob agitação constante de 300 rpm. A atividade trípica foi medida durante o processo de inibição a fim de garantir a inibição total. Para tanto, foram retiradas alíquotas de 100 μ L do meio reacional que foram diluídas para 1000 μ L com HCl 0,01 M. 200 μ L desta solução foram ensaiados conforme descrito no item 3.2.6.

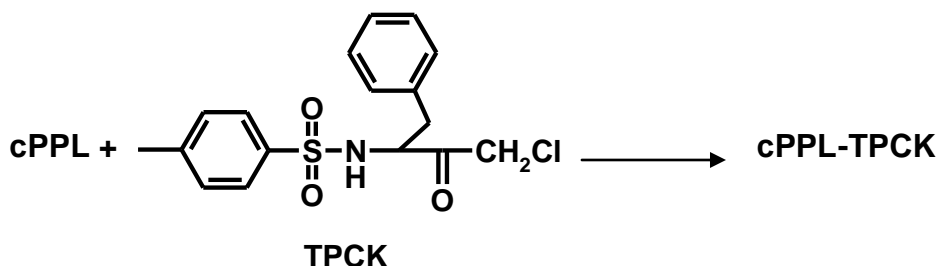


Concluída a inibição, o pH do meio reacional foi diminuído para 4,0, a solução foi dializada por 12 h em água bidestilada deionizada a 4°C e depois liofilizada para fornecer 100 mg de cPPL tratada com TLCK.

3.3.5 – Obtenção de cPPL tratada com TPCK (Schoellmann & Shaw, 1963)

A α -quimotripsina presente em cPPL foi inibida irreversivelmente pela exposição ao composto clorometilcetona de p-tosil-fenilalanina (TPCK). Para a reação de inibição foram incubados 14 mL da solução metanólica de TPCK (4

mg/mL) em 1 L de solução de cPPL (0,5 g/L em tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0) por 24 h a 37°C sob agitação de 300 rpm. A atividade α -quimiotríptica foi medida durante o processo de inibição a fim de garantir a inibição total. Para tanto, foram retiradas alíquotas de 200 μ L do meio reacional que foram diluídas para 1000 μ L com HCl 0,01M. 200 μ L desta solução foram ensaiados conforme descrito no item 3.2.5.



Concluída a inibição, o pH do meio reacional foi diminuído para 4,0, a solução foi dializada em água bidestilada deionizada por 12 h a 4°C e depois liofilizada fornecendo 52 mg de cPPL tratada com TPCK.

3.3.6 - Estudo da hidrólise de ésteres de derivados de aminoácidos catalisada por cPPL (*Liria e col., 2002*)

O procedimento geral consistiu na incubação de 0,02 M do substrato e 50 mg/mL da preparação enzimática em mistura de n-hexano e tampão Tris-HCl, 0,5 M, pH 8,0 (80/20, v/v) a 37°C sob agitação constante de 300 rpm. Os substratos testados foram os ésteres metílicos de Z-Leu, Z-Phe, Z-Tyr, Z-Gln, Z-Ser, Z-Thr, Z-Lys, Z-Arg, Z-His, Z-Asp e Z-Glu, os ésteres benzílicos de Boc-Asp e Boc-Glu, o éster benzílico de Boc-Asp, o éster terc-butílico de Boc-Asp, o éster metílico de Boc-Cys, o éster terc-butílico de Fmoc-Asp, os ésteres metílico e benzílico de Fmoc-Asp (a reação química de hidrólise será apresentada no capítulo Resultados e Discussão).

As reações foram realizadas em duplicata envolvendo diversos frascos reacionais a fim de que cada um deles representasse uma amostra temporal conforme descrito nos itens 3.3.2 e 3.3.3. Assim, foram necessários 26 frascos

correspondentes aos tempos 0, 20, 30 e 40 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 24 e 48 h e outros 6 correspondentes aos “brancos” para os tempos 0, 1, 4, 8, 24 e 48 h. As reações eram interrompidas pela adição de 980 μ L de uma solução 50% ACN/H₂O contendo 0,1% de TFA. A formação dos derivados de aminoácidos com carboxila livre foi detectada através da análise de alíquotas por RP-HPLC nas seguintes condições experimentais: gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min, sendo o solvente A 0,1% de TFA/H₂O e o solvente B ACN/H₂O contendo 0,1% de TFA, fluxo de 1mL/min e λ de 210nm. A percentagem de acetonitrila no solvente B dependia da natureza do derivado de aminoácido em questão: 80% para os derivados de Leu, Phe, Tyr e Gln e 40% para os derivados de Lys, Arg, His, Asp e Glu.

Os resultados das hidrólises foram expressos em valores percentuais calculados a partir da comparação entre áreas dos picos cromatográficos correspondentes aos substratos no início da incubação (100%) e nos diferentes tempos reacionais (x%). Assim, as percentagens de N α -acil-aminoácidos formados ao longo do tempo foram inferidos a partir das percentagens de desaparecimento dos substratos.

Para as reações em que ocorreu consumo dos Z-aminoácidos formados, foram realizadas análises de aminoácidos nos tempos 0, 1, 4, 8, 24 e 48 h. As somatórias entre as quantidades detectadas e as residuais de substratos forneceram as percentagens de Z-aminoácidos presentes nos meios reacionais nos diferentes tempos de incubação.

O cálculo das velocidades iniciais de hidrólise dos ésteres derivados de Aso e Glu se baseou na diminuição das áreas dos picos cromatográficos correspondentes aos substratos ao longo do tempo.

3.3.7 - Estudo da remoção do grupo Z de Z-aminoácidos catalisada por cPPL

O procedimento experimental consistiu da incubação de 0,02 M do substrato e 50 mg/mL da preparação enzimática em mistura de n-hexano e tampão Tris-HCl, 0,5 M, pH 8,0 (80/20, v/v) a 37°C sob agitação constante de 300 rpm. Os substratos testados foram os Z-Asp, Z-Glu, Z-Arg, Z-His, Z-Lys, Z-Ser, Z-Gln, Z-Met, Z-Thr, Z-Cys, Z-Asn, Z-Gly, Z-Ala, Z-Val, Z-Pro, Z-Ile, Z-Leu, Z-Trp, Z-

Phe e Z-Tyr (a reação química de remoção do grupo Z catalisada por cPPL será apresentada no Esquema 2).

As reações foram realizadas em duplicata envolvendo diversos frascos reacionais a fim de que cada um deles representasse uma amostra temporal conforme já descrito nos itens 3.3.2 e 3.3.3. Assim, foram necessários 26 frascos correspondentes aos tempos 0, 20, 30 e 40 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 24 e 48 h e outros 6 correspondentes aos “brancos” para os tempos 0, 1, 4, 8, 24 e 48 h. As reações eram interrompidas pela adição de 980 μL de uma solução 50% ACN/ H_2O contendo 0,1% de TFA. Alíquotas eram analisadas por RP-HPLC nas seguintes condições experimentais: gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 min, sendo o solvente A 0,1% de TFA/ H_2O e o solvente B ACN/ H_2O contendo 0,1% de TFA, fluxo de 1mL/min e λ de 210nm. A percentagem de acetonitrila no solvente B dependia da natureza do derivado de aminoácido em questão: 80% para os derivados de Phe, Trp, Met, Val, Ile e Tyr, 60% para os derivados de Leu e Cys e 40% para os derivados de Glu, Asp, Gln, Gly, Ala, Ser, Thr, His, Pro, Asn, Lys, e Arg. Análises de aminoácidos também foram realizadas nos tempos 0, 1, 4, 8, 24 e 48 h. O cálculo das velocidades iniciais de remoção do grupo Z se baseou na diminuição das áreas dos picos cromatográficos correspondentes aos substratos ao longo do tempo.

3.3.8 – Tentativa de remoção do grupo Z de Z-Gly-Phe catalisada por cPPL

O procedimento experimental consistiu da incubação de 0,02 M de Z-Gly-Phe e 50 mg/mL da preparação enzimática em mistura de n-hexano e tampão Tris-HCl, 0,5 M, pH 8,0 (80/20, v/v) a 37°C sob agitação constante de 300 rpm.

A reação foi realizada em duplicata envolvendo diversos frascos reacionais a fim de que cada um deles representasse uma amostra temporal conforme já descrito nos itens 3.3.2 e 3.3.3. Assim, foram necessários 26 frascos correspondentes aos tempos 0, 20, 30 e 40 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 24 e 48 h e outros 6 correspondentes aos “brancos” para os tempos 0, 1, 4, 8, 24 e 48 h. As reações eram interrompidas pela adição de 980 μL de uma solução 50% ACN/ H_2O contendo 0,1% de TFA. Alíquotas eram analisadas por RP-HPLC nas seguintes condições experimentais: gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30

min, sendo o solvente A 0,1% de TFA/H₂O e o solvente B 60% ACN/H₂O contendo 0,1% de TFA, fluxo de 1mL/min e λ de 210nm.

O monitoramento da reação por cromatografia em camada delgada (CCD) foi feito em placa de sílica-gel G60 F₂₅₄ empregando amostras de 0 e 1 h de incubação, o peptídeo padrão Z-Gly-Phe comercial, e o sistema de solventes CHCl₃:MeOH:HOAc, 85:10:5, (v:v:v). Uma das placas foi revelada pela exposição à lâmpada UV ($\lambda=254\text{nm}$), uma segunda pelo borifamento de solução 0,2% de ninidrina em acetona e posterior aquecimento e a terceira pelo borifamento sequencial das soluções HBr:HOAc 1:1, (v:v) e 0,2% de ninidrina em acetona seguido de aquecimento.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Estudo da síntese de Ac-Tyr-Gly-NH₂ mediada por lipases

Para a realização deste estudo foi utilizado o Ac-Tyr-OEt e a Gly-NH₂ como doador e acceptor de acila, respectivamente. A escolha destes derivados de aminoácidos foi baseada nos seguintes pontos: i) ésteres de N α -acil-tirosina já haviam sido utilizados com sucesso em sínteses de outros dipeptídeos catalisadas por lipases (TABELA 4); ii) o acetil (Ac) é um protetor de grupo amino quimicamente estável em diferentes pHs e frente a lipases (TABELA 4); iii) o éster etílico de N α -acil-aminoácidos é hidrolisável por lipases, propriedade necessária à abordagem sintética de aminólise de ésteres; iv) a Gly-NH₂, além de ser um bom nucleófilo (a amidação de sua carboxila provoca uma diminuição do pKa do seu grupo amino) já foi utilizado anteriormente como acceptor de acila em síntese mediada por lipase descrita por Zang e colaboradores (TABELA 4).

Selecionados o acceptor e o doador de acila, foram escolhidas as lipases a serem utilizadas. Foi necessário examinar a literatura para verificar quais delas já tinham sido empregadas em sínteses que envolvessem os substratos escolhidos e comparar os seus custos. Assim, as lipases de *C. cylindracea* e a de pâncreas suíno foram pensadas como os possíveis biocatalisadores a serem usados neste trabalho. Quatro preparações enzimáticas foram adquiridas no comércio e caracterizadas quanto às suas atividades esterásicas frente a triglicerídeos contidos no óleo de oliva (Tietz & Fiereck, 1966): duas lipases comerciais purificadas de *Candida cylindracea* (CCL-L9767 e CCL-L1754), uma purificada de pâncreas suíno (pPPL) e outra não purificada de pâncreas suíno (cPPL). A pCCL-L9767 mostrou ser significativamente mais ativa (4045 U/mg) do que a pCCL-L1754, (116 U/mg), a cPPL (48 U/mg) e a pPPL (19 U/mg).

Uma vez que várias enzimas podem contaminar as preparações lipásicas, todas as quatro foram também caracterizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (PAGE-SDS). O peso molecular esperado para a CCL era 57084 Da, enquanto que para a PPL era 49926 Da. A α -quimotripsina, que é um contaminante potencial de lipases pancreáticas

(TABELA 6) e que apresenta alta especificidade por ésteres de N α -acil-tirosina (West & Wong, 1986), foi incluída no gel de análise. A FIGURA 8 abaixo mostra os resultados obtidos.

TABELA 6: Possíveis contaminantes enzimáticos encontrados nas lipases pancreáticas suínas comerciais (Faber, 1997).

Enzima	Número de resíduos		Referência
	de aminoácidos	PM (D)	
α -quimotripsina	241	25.193	Yennawar e col., 1995
Tripsina	222	23.177	Sandler e col., 1998
Fosfolipase A2	124	13.994	Van den Berg e col., 1995
Esterase de Colesterol	559	63.553	Wang e col., 1997
Carboxipeptidase A	307	35268	Auld & Holmquist, 1974
Carboxipeptidase B	308	34606	Schmid & Herriot, 1976

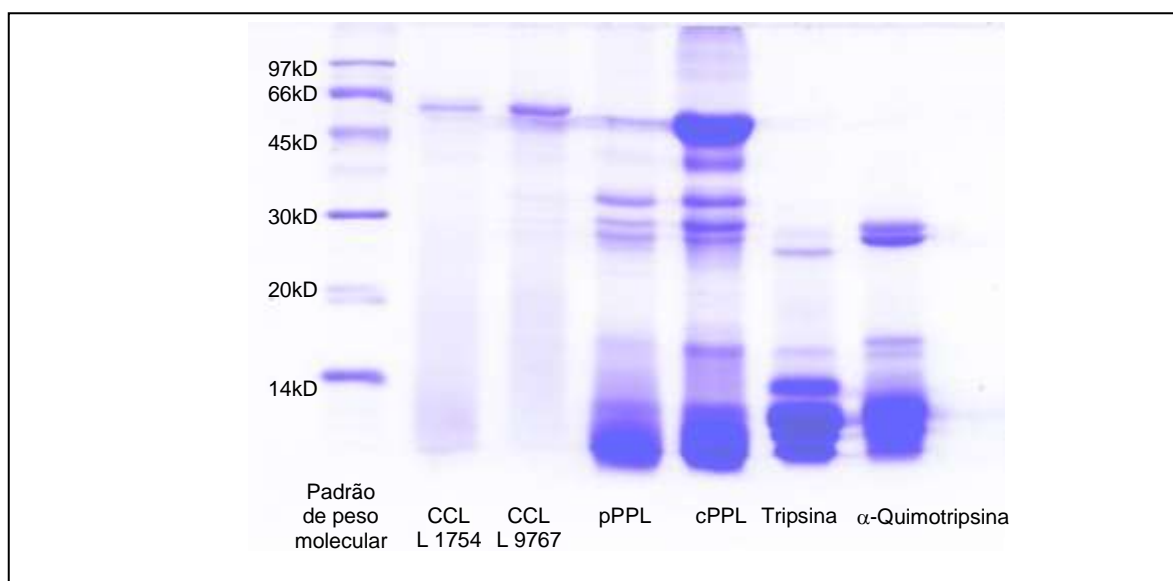
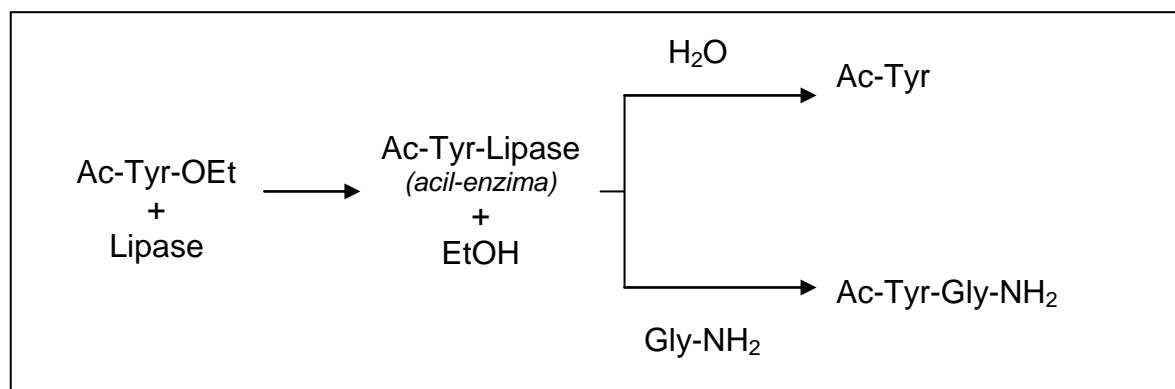


FIGURA 8: Caracterização por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) das lipases de *C. cylindracea* e de pâncreas suíno e de tripsina e α -quimotripsina de pâncreas bovino.

Através deles foi possível concluir que as lipases microbianas (CCLs) eram mais puras do que as pancreáticas suínas (PPLs). Surpreendentemente, ficou evidente que a pPPL, adquirida da Elastin Products Co., Inc (EUA) como

lipase purificada, continha menos lipase e as mesmas impurezas contidas na preparação bruta cPPL da Sigma Chemical Co. (EUA). Algumas destas impurezas apresentaram mobilidade eletroforética compatíveis com as de α -quimotripsina e tripsina. Os peptídeos de pesos moleculares inferiores a 14 kD devem corresponder a hormônios pancreáticos ou resultam da ação destas proteases sobre proteínas pancreáticas. É possível que as proteínas de pesos moleculares entre 30 e 40kD se refiram às carboxipeptidases A e B (TABELA 6). Tais suposições estão sendo confirmadas em nosso laboratório.

O estudo sistemático do acoplamento enzimático entre Ac-Tyr-OEt e Gly-NH₂.HCl foi então iniciado objetivando determinar condições experimentais e lipase que pudessem ser empregadas em futuros acoplamentos. Por esta razão, as quatro preparações enzimáticas testadas foram empregadas. De fato, embora as CCLs fossem mais ativas na hidrólise dos ésteres do óleo de oliva do que as PPLs, estas últimas tem sido mais empregadas em síntese de peptídeos (*Margolin & Kibanov, 1987, West & Wong, 1987, Kawashiro e col., 1993, So e col., 1998, Zhang e col., 2001 e 2003*). Além disso, as PPLs são biocatalisadores muito mais baratos (*C. cylindracea* da Sigma Chemical Co. (EUA): US\$ 1,46/g e a preparação enzimática de pâncreas suíno: US\$ 0,15/g). As reações utilizaram 0,05M de Ac-Tyr-OEt e 0,07 ou 0,50M de Gly-NH₂.HCl (com o cloridrato neutralizado ou não) em sistemas monofásico (tampão 0,5M de Tris-HCl, pH 8,0) ou bifásico (n-hexano/tampão, 80/20, v:v) de solventes contendo 50mg/mL de preparação enzimática, sob agitação de 300 rpm a 22 ou 37°C. São mostrados abaixo que dois produtos eram passíveis de serem formados na presença das preparações enzimáticas: o dipeptídeo desejado e o Ac-Tyr resultante da hidrólise do éster de Ac-Tyr-OEt:



Por esta razão, as incubações foram acompanhadas via análise dos meios reacionais por RP-HPLC. A FIGURA 9 apresenta alguns cromatogramas referentes a uma delas. A identidade do dipeptídeo formado foi confirmada pela coeluição com um padrão obtido previamente por métodos químicos (proporção molar de aminoácidos no hidrolisado: Tyr 1,0:Gly 1,0, $[M+H]^+$ esperado = 280,3; $m/z_{\text{observado}} = 280,2$), pela proporção molar entre os aminoácidos detectados no seu hidrolisado total (Tyr 1,0:Gly 1,0) e pela sua análise por espectrometria de massas ($[M+H]^+$ esperado = 280,3; $m/z_{\text{observado}} = 280,2$). O dipeptídeo não foi formado nas reações-controle que não continham enzima.

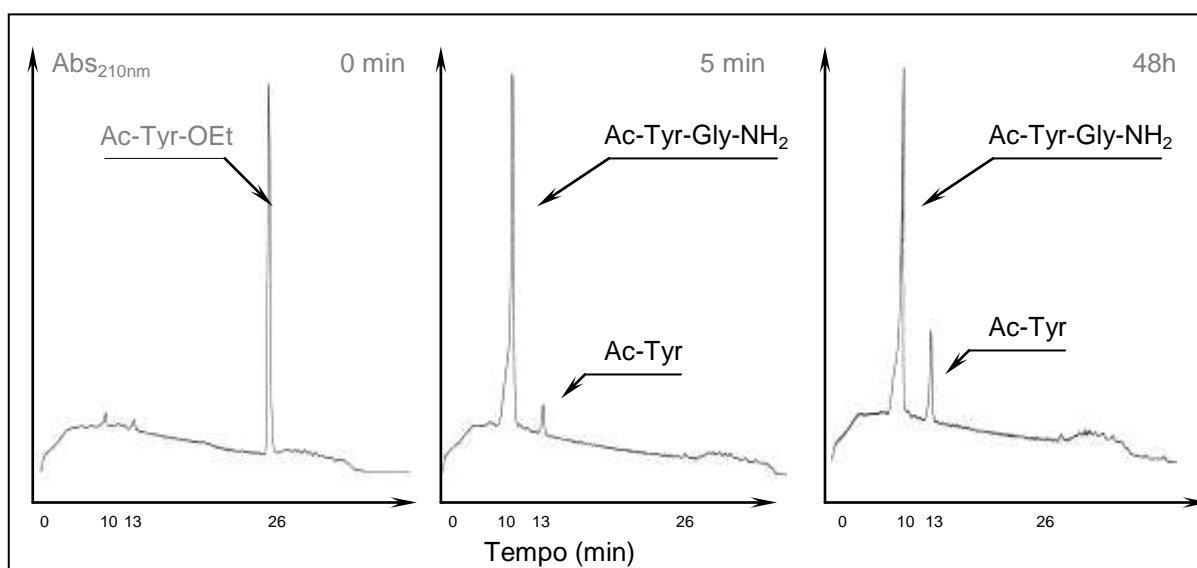


FIGURA 9: Perfis de RP-HPLC de reação de síntese de Ac-Tyr-Gly-NH₂ catalisada por cPPL. Condição de análise: gradiente linear = 5 a 95% de B em 30min, solvente A = 0,1% de TFA em água, solvente B = 20% de ACN em água contendo 0,1% de TFA, coluna = C₁₈ Vydac, 5μm, 300Å, 0,46 cm x 25cm, fluxo = 1mL/min e λ = 210nm.

Para facilitar a compreensão dos resultados, a TABELA 7 sumariza as diversas condições testadas, bem como os rendimentos reacionais (η) obtidos. Estes estão representados na FIGURA 10.

De todas as condições reacionais testadas até o momento, a que se mostrou mais eficiente foi a seguinte: sistema bifásico constituído por n-hexano e tampão Tris-HCl 0,5M, pH 8,0, na proporção 80/20, (v:v), 50mg/mL de cPPL, 0,05M de DA e 0,5M de AA neutralizado com trietilamina, 37°C e agitação de 300 rpm. Esta forneceu o produto desejado em 5 minutos com um rendimento de 90%.

Na maioria dos casos, a diminuição da temperatura causou diminuição no rendimento de síntese. A mudança de enzima para pPPL não levou a alterações. Contudo, foram observadas mudanças no rendimento reacional para a pPPL com a utilização de sistema monofásico a 22°C ($\eta=67\%$), com a diminuição da concentração de AA para 0,05M ($\eta=57\%$) e também quando foi disponibilizado o AA não neutralizado ($\eta=30\%$).

Os rendimentos das reações catalisadas pelas CCL em condições similares às anteriores e após 24 h de reação foram baixos (~26%). A redução da temperatura de 37°C para 22°C e o uso do AA não neutralizado levaram à uma redução no rendimento de formação de ligação peptídica para a metade.

Fica, portanto, evidente que apesar de menos ativas frente aos triglicerídeos contidos no óleo de oliva, as PPLs foram catalisadores mais eficientes da formação da ligação peptídica entre Ac-Tyr-OEt e Gly-NH₂ do que as CCLs. No entanto, elas catalisaram hidrólise secundária mais expressiva (30 a 40% do total de produto formado em 48 h) do que as CCLs (5% do total de produto formado em 48 h), o que pode ser atribuído à sua contaminação por proteases como já indicado no item 4.1 deste capítulo. Neste caso, o contaminante que estaria hidrolisando o dipeptídeo Ac-Tyr-Gly-NH₂ seria a α -quimotripsina que possui elevada especificidade por ligações peptídicas contendo tirosina na posição P1.

Até o momento, apenas alguns autores que utilizaram PPLs em síntese de peptídeos comentaram sobre a possibilidade de elas estarem contaminadas por proteases (*West & Wong, 1987, So e col., 1998*). Entretanto nenhum deles comprovou tal possibilidade ou se preocupou em demonstrar e/ou quantificar a influência dos contaminantes na eficiência de síntese peptídica.

A fim de tentar elucidar a contribuição da atividade da α -quimotripsina na eficiência de síntese de Ac-Tyr-Gly-NH₂ catalisada pela cPPL foi feito um tratamento desta preparação lipásica com clorometilcetona de p-tosil-L-fenilalanina (TPCK - inibidor específico de α -quimotripsina, *Schoellmann & Shaw, 1963*). A cPPL resultante foi utilizada em novas reações de síntese. Os rendimentos obtidos evidenciaram que em 5 min de incubação o rendimento de formação do peptídeo desejado foi de 50% chegando a 74% em 48 h.

TABELA 7: Condições reacionais e os rendimentos obtidos na síntese de Ac-Tyr-Gly-NH₂ em n-hexano/tampão, 80/20 (v:v).

Enzima 50mg/mL	Temp. (°C)	Reação	AA (M)	η (%)				
				0 min	5 min	24 h	48 h	72 h
CCL-L1754	22	1	0,07	0	0	6	11	6
		2 ^a	0,07	0	0	9	13	13
		3	0,50	0	0	4	7	14
		4 ^a	0,50	0	0	9	10	17
	37	5	0,07	0	0	26	31	29
		6 ^a	0,07	0	0	7	8	6
		7	0,50	0	0	15	16	16
		8 ^a	0,50	0	0	23	35	41
CCL-L9767	37	9	0,07	0	0	11	6	6
		10 ^a	0,07	0	0	14	20	38
pPPL	22	11	0,07	0	14	13	10	22
		12 ^a	0,07	0	58	24	12	11
		13	0,50	0	42	42	59	59
		14 ^a	0,50	0	92	84	63	51
		15 ^b	0,50	0	67	59	54	39
	37	16	0,07	0	32	19	6	-
		17 ^a	0,07	0	57	30	24	20
		18	0,50	0	80	58	58	35
		19 ^a	0,50	0	90	59	63	69
cPPL	37	20 ^a	0,50	0	91	53	57	61

Em todas as reações foi utilizado 0,05M de doador de acila. ^a reações em que o aceptor de acila foi neutralizado por TEA. ^b reação realizada em 100% de tampão.

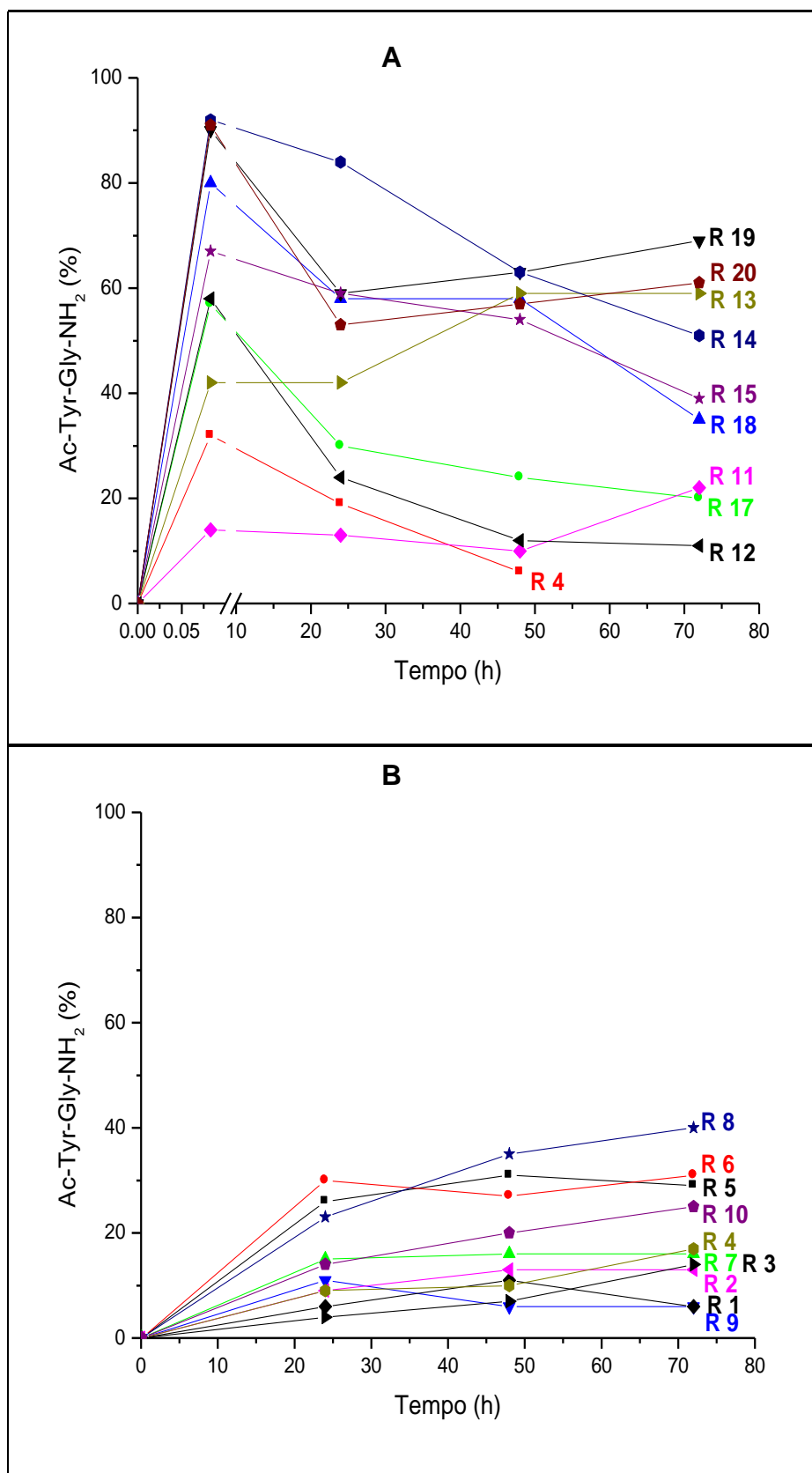


FIGURA 10: Desenvolvimento das reações de síntese de Ac-Tyr-Gly-NH₂ catalisadas por cPPL (A) e CCL (B).

Nestas condições, não foi observada a hidrólise secundária do produto ao longo do tempo de incubação (FIGURA 11). O pequeno decréscimo de rendimento observado de 48 para 72 h de reação é atribuído a erros experimentais.

Todos estes resultados indicaram que: 1) a cPPL foi a preparação lipásica dentre as testadas mais barata e eficiente na catálise da síntese do dipeptídeo modelo mesmo após excluída a contribuição da α -quimotripsina nela contida, uma possível inibição da PPL por TPCK, ou ainda, qualquer inativação parcial dela; 2) a condição reacional ótima encontrada é muito apropriada à catálise da formação de ligação peptídica em questão; 3) esta preparação deveria ser empregada no estudo da influência de outros parâmetros reacionais e cinéticos na eficiência de formação da ligação peptídica em tempos curtos; 4) a α -quimotripsina era a responsável pela hidrólise secundária do dipeptídeo formado nos meios reacionais; 5) a lipase pancreática suína não apresenta atividade amidásica, o que corrobora os recentes dados de Maruyama e colaboradores (2003), os quais observaram que a atividade amidásica apresentada pela cPPL por eles empregada provinha de seus contaminantes proteásicos, sendo um deles a α -quimotripsina (a cPPL foi ativa frente ao substrato 4-nitroanilida de N α -benzoil-D,L-tirosina, o qual é específico para esta protease).

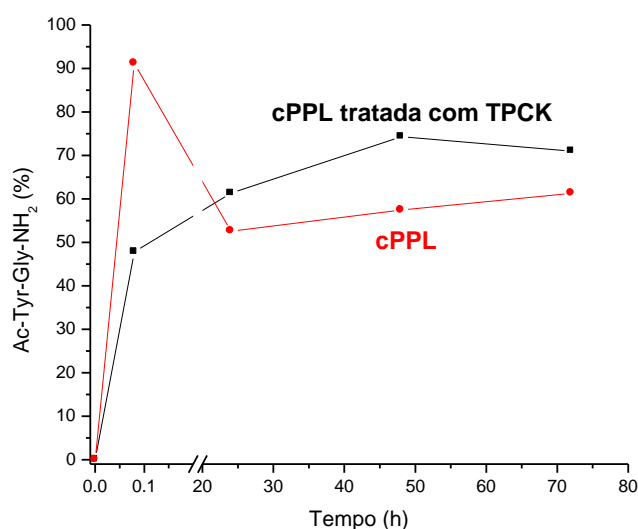


FIGURA 11: Desenvolvimento das reações de síntese de Ac-Tyr-Gly-NH₂ catalisadas por cPPL e por cPPL tratada com TPCK.

O rendimento de síntese de ~90% obtido em 5 min de reação pode ser considerado superior àqueles descritos na literatura para reações de formação da ligação peptídica mediada por cPPL (*Kawashiro e col., 1993, So e col., 1998, Zhang e col., 2001*), o que deve estar relacionado aos seguintes fatores: 1) o sistema aquo-orgânico empregado proporciona elevada estabilidade de cPPL (*Ader e col., 1997*) e as condições necessárias ao favorecimento da formação da ligação peptídica (item 1.2 da Introdução); 2) ao contrário de todos os já utilizados em trabalhos prévios de síntese de peptídeos catalisada por cPPL, ele é bifásico e, portanto, gera a interface hidrofóbica essencial para a ativação de lipase e partição do produto formado (transferência de fase) (*Sarda & Desnuelle, 1958*); 3) Ac-Tyr-OEt é um excelente substrato para a cPPL confirmando trabalho anterior da literatura (*Margolin & Klibanov, 1987*) ; 4) Gly-NH₂ é um nucleófilo potente.

4.2 – Estudo do efeito do conteúdo de n-hexano na eficiência da síntese de Z-Asp-Gly-NH₂

Foram realizadas tentativas de síntese deste dipeptídeo utilizando o sistema reacional composto por proporções variáveis de n-hexano e tampão (de 0:100 até 80:20, v:v), 50mg/mL de cPPL, 0,05M de Z-Asp-OMe (DA) e 0,50M de Gly-NH₂.HCl (AA) neutralizado com trietilamina. Não foram usadas percentagens superiores a 80% de n-hexano devido à grande dificuldade de manutenção do volume reacional constante em função do tempo (ocorria evaporação parcial do solvente orgânico já que o ponto de ebulição do n-hexano é 69°C) e também devido à insolubilidade dos materiais de partida Z-Asp-OMe e Gly-NH₂.HCl. Assim, os meios reacionais se mostraram bifásicos para todas as misturas de n-hexano e tampão utilizadas.

Z-Asp-OMe foi escolhido como DA, pois: 1) o éster metílico deste aminoácido não seria hidrolisável pelos contaminantes proteásicos confirmados na cPPL (α -quimotripsina e tripsina) excluindo a contribuição deles na formação da ligação peptídica; 2) benziloxycarbonil (Z), o protetor de grupo amino que possui em sua estrutura um anel aromático (FIGURA 12) está presente em vários substratos empregados em sínteses peptídicas catalisadas por lipases. Além

disso, ele deve favorecer o acompanhamento da reação por RP-HPLC (retenção e detecção).

Estando a água e o AA em excesso molar no meio reacional novamente, como mostrado na FIGURA 12 a seguir, dois produtos eram passíveis de serem gerados já que a formação do intermediário acil-enzima (etapa limitante do processo) é seguida do ataque nucleofílico pela água (etapa 2a para originar Z-Asp) e ou pelo AA (etapa 2b para gerar formando Z-Asp-Gly-NH₂).

A identidade do dipeptídeo foi confirmada por análise do seu conteúdo de aminoácidos após isolamento e hidrólise total (Asp 1,0 e Gly 1,0) e por espectrometria de massas utilizando LC-MS ($[M+H]^+$ esperado = 323,31, m/z observado = 323). As FIGURAS 13 e 14 mostram alguns cromatogramas das reações de síntese, utilizando como solvente 20% n-hexano/80% tampão e 80% n-hexano/20% tampão, para exemplificar o monitoramento delas por RP-HPLC. É importante esclarecer que os picos não identificados nos cromatogramas eram provenientes da cPPL e que o dipeptídeo não foi formado nas reações-controle que não continham a preparação enzimática.

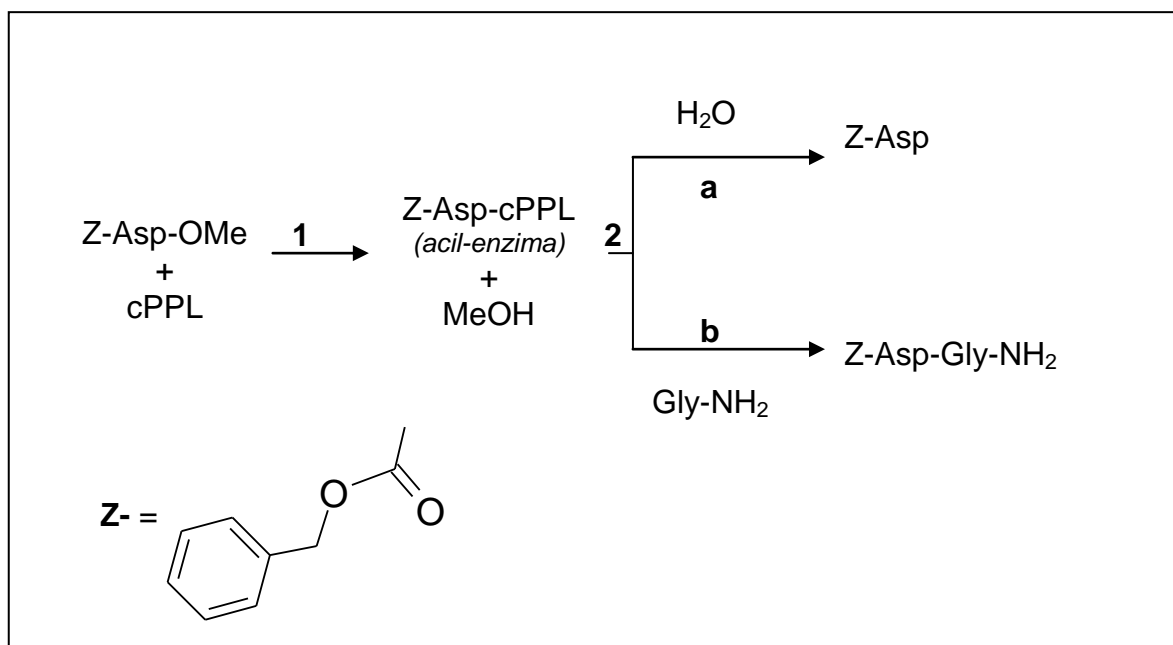


FIGURA 12: Possibilidades sintéticas para a reação catalisada por cPPL a partir de Z-Asp-OMe e Gly-NH₂.HCl em diferentes percentagens de n-hexano no meio reacional (0, 10, 20, 30, 40, 60, 70 e 80%).

Os percentuais de consumo de Z-Asp-OMe, formação de Z-Asp e da síntese de Z-Asp-Gly-NH₂ nas oito proporções testadas são mostrados na FIGURA 15. A FIGURA 16 resume os resultados obtidos em 24 h de todas as reações.

Nelas, é possível observar que para conteúdos de n-hexano de até 40%, a percentagem de Z-Asp-Gly-NH₂ formado é sempre inferior do que a de Z-Asp e, portanto, a etapa 2a da FIGURA 12 predomina. No entanto, esta situação é invertida a partir de 50% de n-hexano, condições experimentais em que a etapa 2b passa a predominar. Em outras palavras, altos conteúdos de n-hexano favorecem a formação da ligação peptídica. Este favorecimento deve decorrer de uma somatória de fatores benéficos, tais como: a presença da interface hidrofóbica, a alta estabilidade da preparação enzimática em n-hexano, a redução do pK_a do grupo α -amino do AA e altas solubilidades dos reagentes e produto nos meios reacionais. De fato, So e colaboradores (1998), os únicos além de nós a utilizar um substrato derivado de um aminoácido ácido como DA em sínteses mediadas por cPPL, não observaram a formação da ligação peptídica a partir de Z-Asp-OMe e D-Ala-NH₂ em meio monofásico contendo 3-metil-3-pentanol/tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,0 (95:5, v:v). É, portanto, provável que o uso da mistura n-hexano:tampão (80:20, v:v) seja a chave para o sucesso de sínteses de dipeptídeos catalisadas por cPPL em que os substratos são totalmente solúveis em tampão.

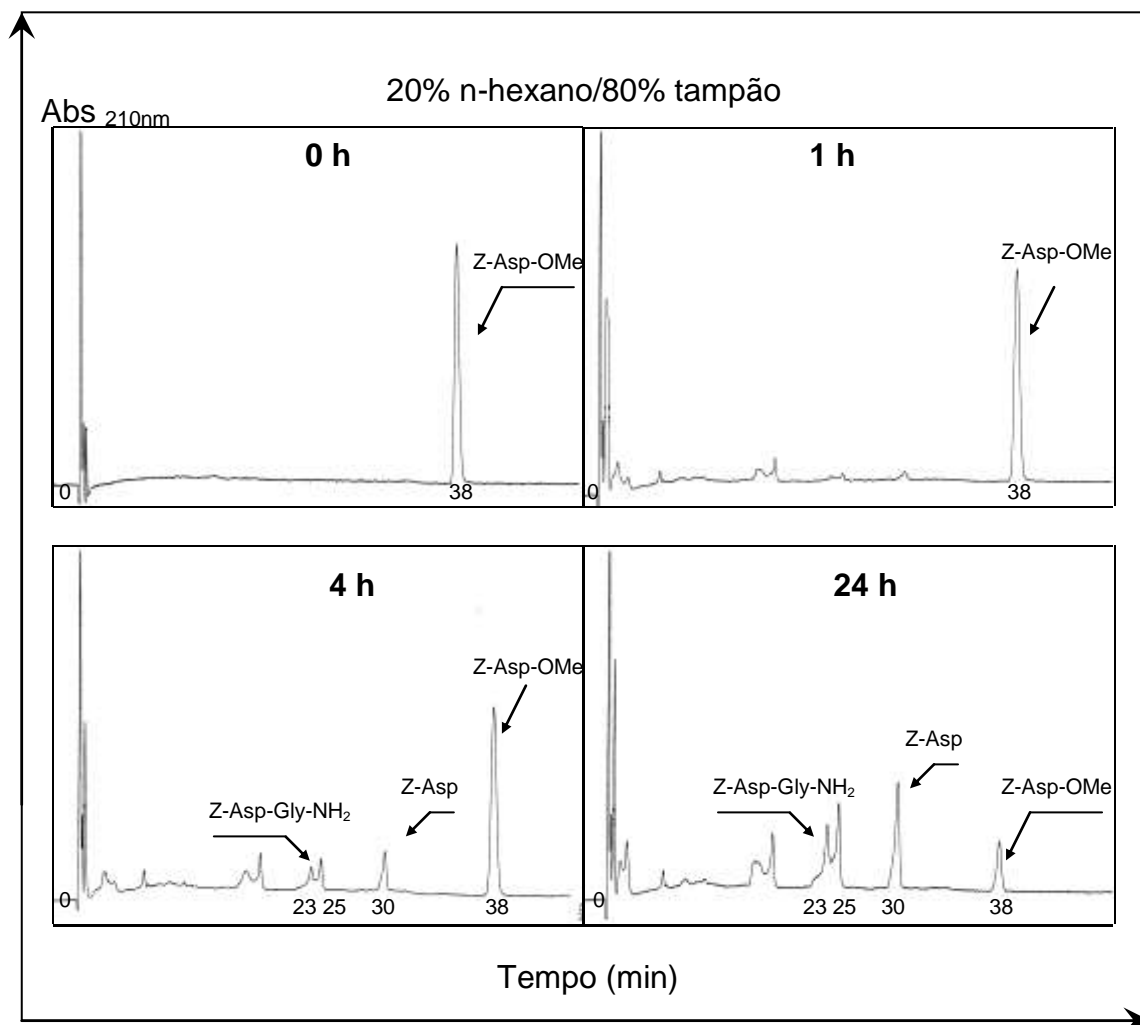


FIGURA 13: Perfis de RP-HPLC da reação de síntese de Z-Asp-Gly-NH₂ catalisada por cPPL em 20% n-hexano/80% tampão. Condição de análise: gradiente linear = 5 a 95% de B em 30min, solvente A = 0,1% de TFA em água, solvente B = 20% de ACN em água contendo 0,1% de TFA, coluna = C₁₈ Vydac, 5μm, 300Å e 0,46 cm x 25cm, fluxo = 1mL/min e λ = 210nm.

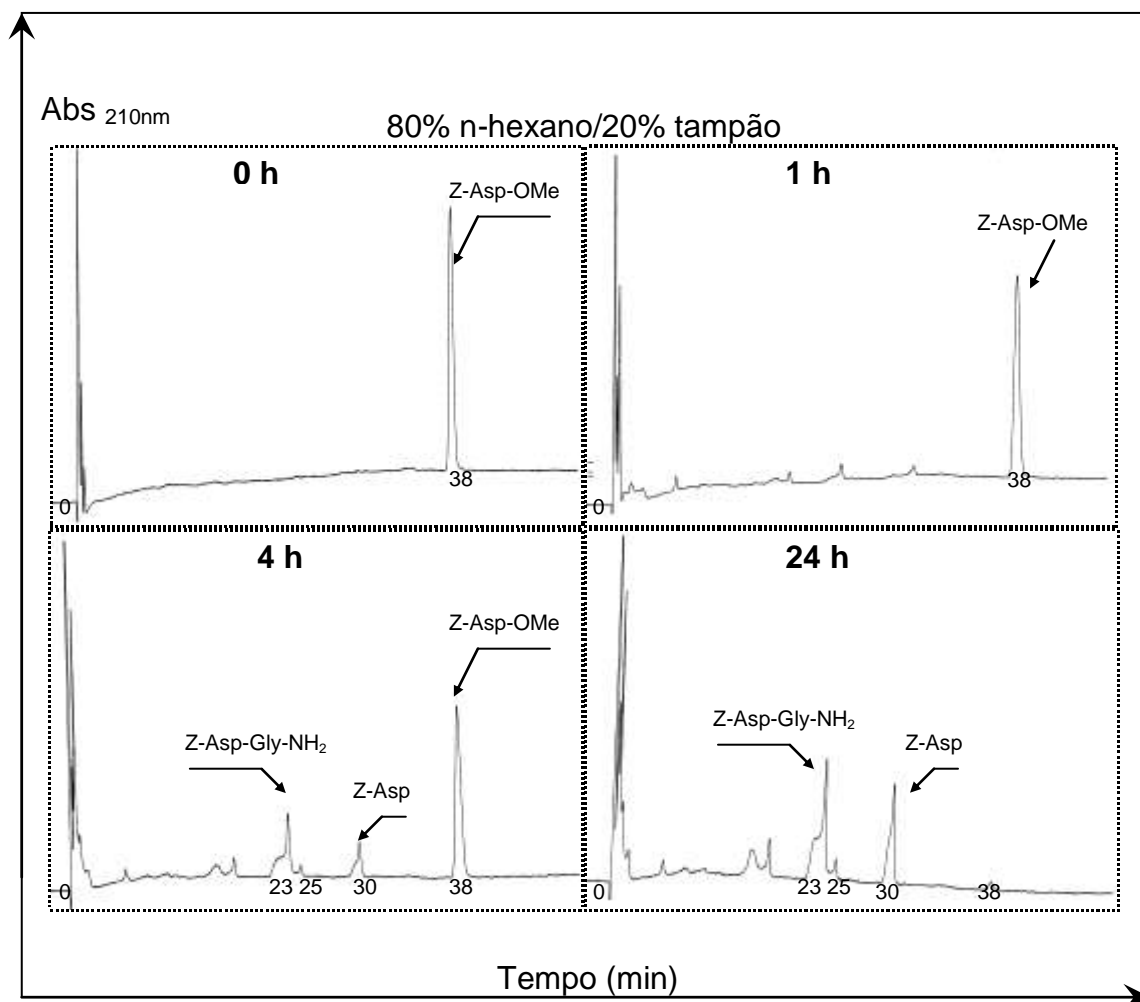


FIGURA 14: Perfis de RP-HPLC da reação de síntese de Z-Asp-Gly-NH₂ catalisada por cPPL em 80% n-hexano/20% tampão. Condição de análise: gradiente linear = 5 a 95% de B em 30min, solvente A = 0,1% de TFA em água, solvente B = 20% de ACN em água contendo 0,1% de TFA, coluna = C₁₈ Vydac, 5μm, 300Å e 0,46 cm x 25cm, fluxo = 1mL/min e λ = 210nm.

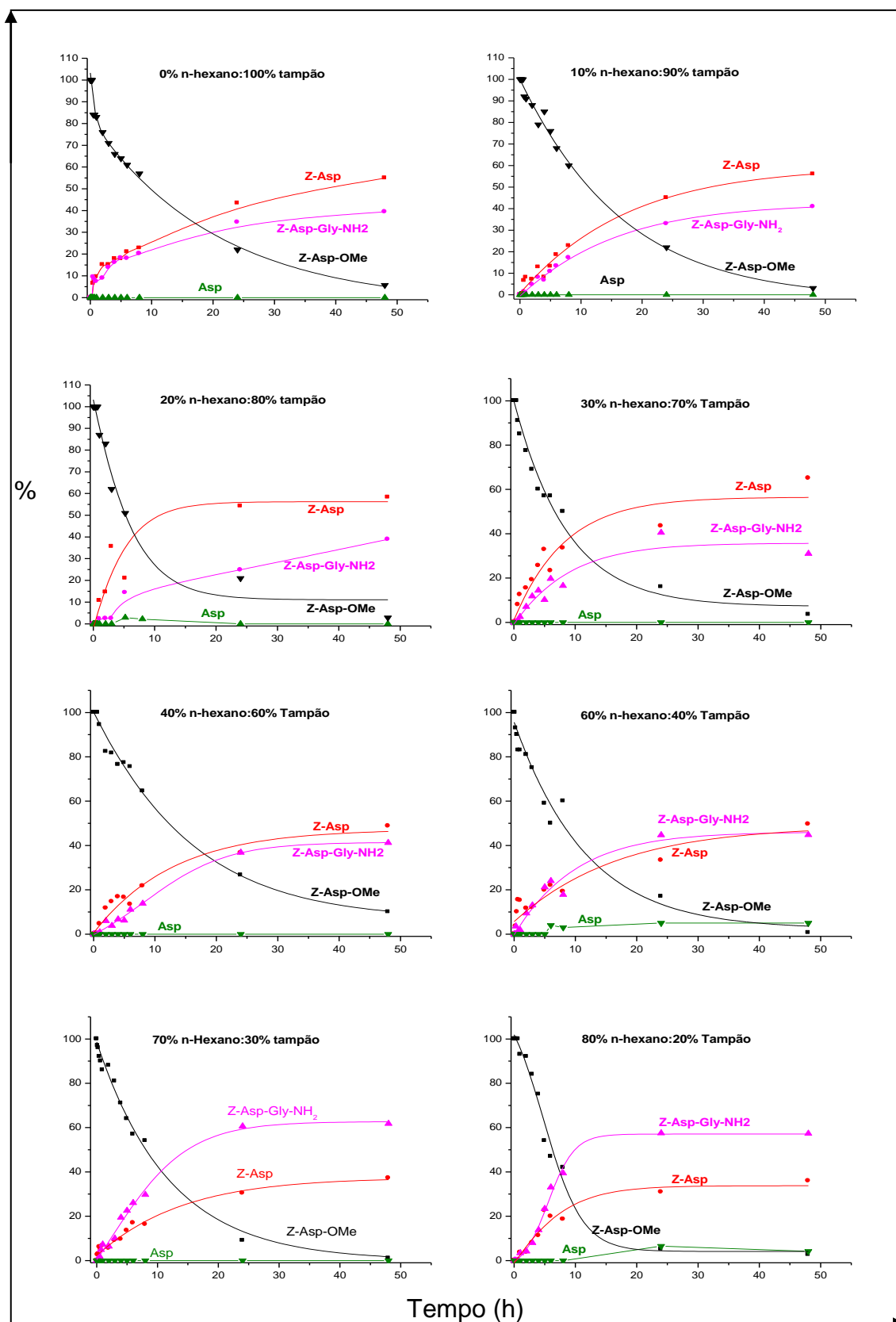


FIGURA 15: Desenvolvimento das reações de síntese de Z-Asp-Gly-NH₂ catalisadas por cPPL e realizadas utilizando diferentes percentagens de n-hexano (0, 10, 20, 30, 40, 60, 70 e 80%).

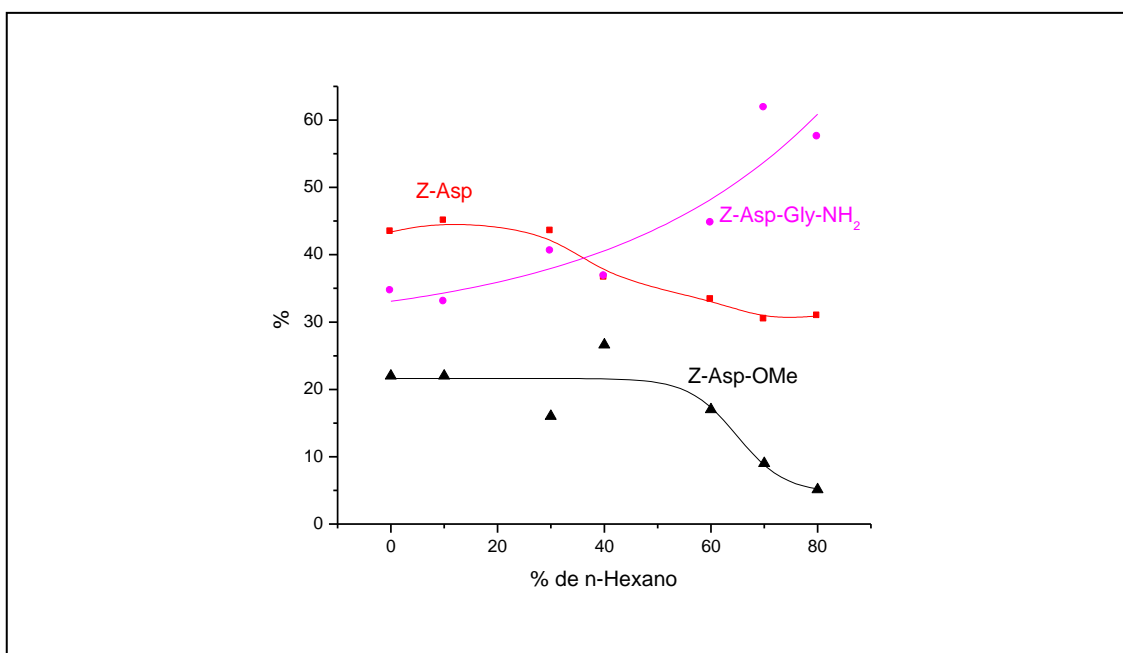
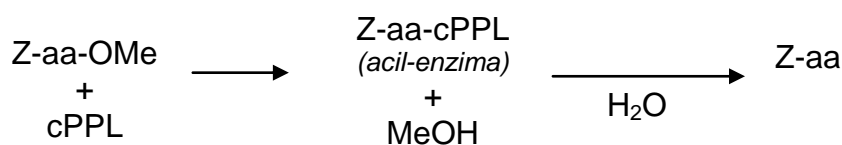


FIGURA 16: Influência do conteúdo de n-hexano no consumo de Z-Asp-OMe, formação de Z-Asp-Gly-NH₂ e de Z-Asp em 24 horas de reação.

4.3 – Estudo da preferência de cPPL na hidrólise de ésteres metílicos de N α -acil-aminoácidos

Como já foi comentado anteriormente no item 1 desta Tese, a literatura relata várias sínteses de di- e tripeptídeos catalisadas por cPPL, bem como tentativas de determinação da preferência dela por derivados de aminoácidos (TABELA 4, *Margolin & Klibanov, 1987, West & Wong, 1987, Kawashiro e col., 1993, So e col., 1998, Zhang e col. 2001 e 2003*). Entretanto, os estudos realizados não são sistemáticos e tão pouco empregam as mesmas condições reacionais, dificultando a comparação entre os resultados obtidos.

A fim de tentar estabelecer a preferência da cPPL na hidrólise de ésteres de N α -acil-aminoácidos empregados em síntese biocatalisada de peptídeos, foi realizado um estudo sistemático em que reações de hidrólise do éster metílico de diversos Z-aminoácidos ocorreram numa única condição experimental na presença desta preparação enzimática:



O grupo Z foi novamente escolhido, por ser um protetor de grupo amino muito usado em síntese orgânica clássica (Kocienski, 1994, Jarowicki & Kocienski, 2001, Schwinn & Bannwarth, 2002), síntese de peptídeos em solução (como protetor do grupo α -amino) e na síntese de peptídeos em fase sólida [usado na proteção de grupos amino de cadeia lateral como $-\epsilon\text{NH}_2$ da Lys (Stewart & Young, 1984)]. Esta escolha também foi baseada na sua elevada estabilidade a hidrazinas, nucleófilos, bases e determinados ácidos. De fato, a sua remoção exige tratamentos com ácidos inorgânicos fortes (HF e HBr; Stewart & Young, 1984), redução por metais (Na e Li p. ex.; Kocienski, 1994, Allevi e col., 2001) ou hidrogenação catalítica (H_2 /carvão paladiado; Bodanszky, 1984), condições estas drásticas, pouco seguras e nem sempre compatíveis com a química verde ou auto-sustentável. Além disso, vários trabalhos de síntese mediada por tripsina (Waldmann & Sebastian, 1994), α -quimotripsina (West & Wong, 1986), cPPL (Matos e col., 1987, West & Wong, 1987 e Kawashiro e col., 1993) e lipases de outras fontes (Waldmann & Sebastian, 1994) também empregam aminoácidos e/ou peptídeos protegidos com o grupo Z.

O sistema reacional utilizado foi aquele empregado na condição ótima de síntese do dipeptídeo Ac-Tyr-Gly-NH₂ descrita anteriormente: n-hexano/tampão Tris-HCl 0,5M, pH 8,0 (80/20, v:v), 50mg/mL de cPPL, 37°C e agitação de 300 rpm. Os derivados de aminoácidos testados foram: Z-Phe-OMe, Z-Tyr-OMe, Z-Lys-OMe, Z-Arg-OMe, Z-Asp-OMe, Z-Glu-OMe, Z-Gln-OMe, Z-Ser-OMe, Z-Thr-OMe, Z-His-OMe e Z-Leu-OMe. Novamente, foram realizadas reações-controle contendo apenas a cPPL ou os substratos. O desenvolvimento das reações foi acompanhado por RP-HPLC. Em geral, os perfis obtidos evidenciaram dois picos predominantes: um correspondente ao substrato (Z-aminoácido-OMe) e outro ao produto de hidrólise do éster metílico (Z-aminoácido). Os outros picos presentes correspondiam a materiais provenientes da preparação enzimática.

As FIGURAS 17 e 18 mostram alguns cromatogramas referentes às reações de hidrólise do éster de Z-Asp-OMe e Z-Arg-OMe, respectivamente. A

identidade dos produtos de hidrólise foi confirmada por experimentos de “spiking” empregando Z-aminoácidos comerciais: os meios reacionais eram analisados por RP-HPLC antes e após contaminação com eles (resultados não mostrados).

A FIGURA 19 reúne os resultados obtidos para os Z-aminoácidos-OMe empregados. Analisados em conjunto eles indicaram uma elevada preferência da cPPL para a hidrólise dos ésteres de Z-Lys, Z-Arg e Z-His, uma preferência moderada para a hidrólise dos ésteres de Z-Phe e Z-Tyr e uma baixa preferência para a hidrólise dos ésteres de Z-Asp, Z-Glu, Z-Gln, Z-Ser, Z-Thr e Z-Leu. Na ausência de cPPL, o éster metílico de todos os Z-aminoácidos testados se mostrou estável por 8 horas.

Em função da constatação de contaminação da cPPL por proteases e dos dados mostrados na FIGURA 11, suspeitamos que a elevada preferência pelo éster de Z-Lys e Z-Arg poderia ser devida à tripsina e a moderada preferência pelo éster de Z-Phe e Z-Tyr poderia ser devido à α -quimotripsina. Por esta razão, a cPPL foi tratada com TPCK (inibidor específico e irreversível de α -quimotripsina, *Schoellmann & Shaw, 1963*) ou com TLCK (inibidor específico e irreversível de tripsina, *Shaw e col., 1965*). Após diálise e liofilização, os materiais resultantes da inibição tiveram medidas as suas atividades lipásica, α -quimiotríptica e tríptica utilizando os substratos óleo de oliva, N α -benzoil-DL-tirosina-4-nitroanilida (Bz-Tyr-pNA) ou N α -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (Bz-Arg-pNA), respectivamente. As atividades são mostrados na FIGURA 20.

Como é possível observar, a cPPL original exibiu atividade α -quimiotríptica e tríptica, confirmando uma vez mais a contaminação pelas duas proteases. Os tratamentos com TPCK e TLCK levaram à redução das atividades α -quimiotríptica e tríptica de 98 e 80%, respectivamente. Por outro lado, a atividade lipásica não foi alterada quando a cPPL foi tratada com TLCK e reduzida em 40% quando tratada com TPCK. Duas podem ser as explicações para estes resultados: 1) o TLCK não inibe a PPL e o TPCK o faz parcialmente; 2) o tratamento com TPCK por 24 h pode ter facilitado a ação proteolítica das proteases contaminantes sobre a PPL que apresenta 21 argininas, 22 lisinas, 25 fenilalaninas, 6 triptofanos e 16 tirosinas em sua seqüência (*Van Tilbeurgh e col., 1992*). O mesmo não ocorreu quando a cPPL foi tratada com TLCK por apenas 4h.

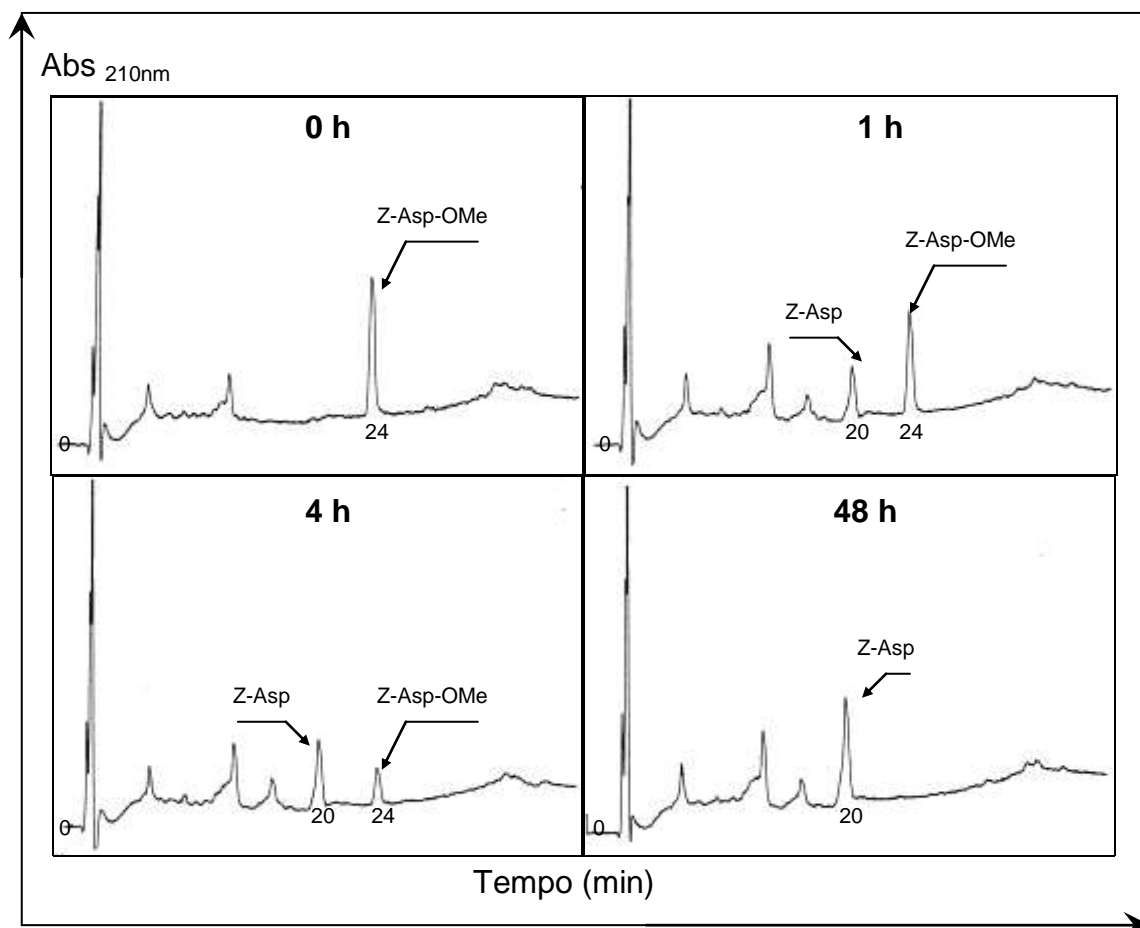


FIGURA 17: Perfis de RP-HPLC da reação de hidrólise do éster de Z-Asp-OMe catalisada por cPPL. Condição de análise: gradiente linear = 5 a 95% de B em 30min, solvente A = 0,1% de TFA em água, solvente B = 40% de ACN em água contendo 0,1% de TFA, coluna = C₁₈ Vydac, 5 μ m, 300Å, 0,46 cm x 25cm, fluxo = de 1mL/min e λ = 210nm.

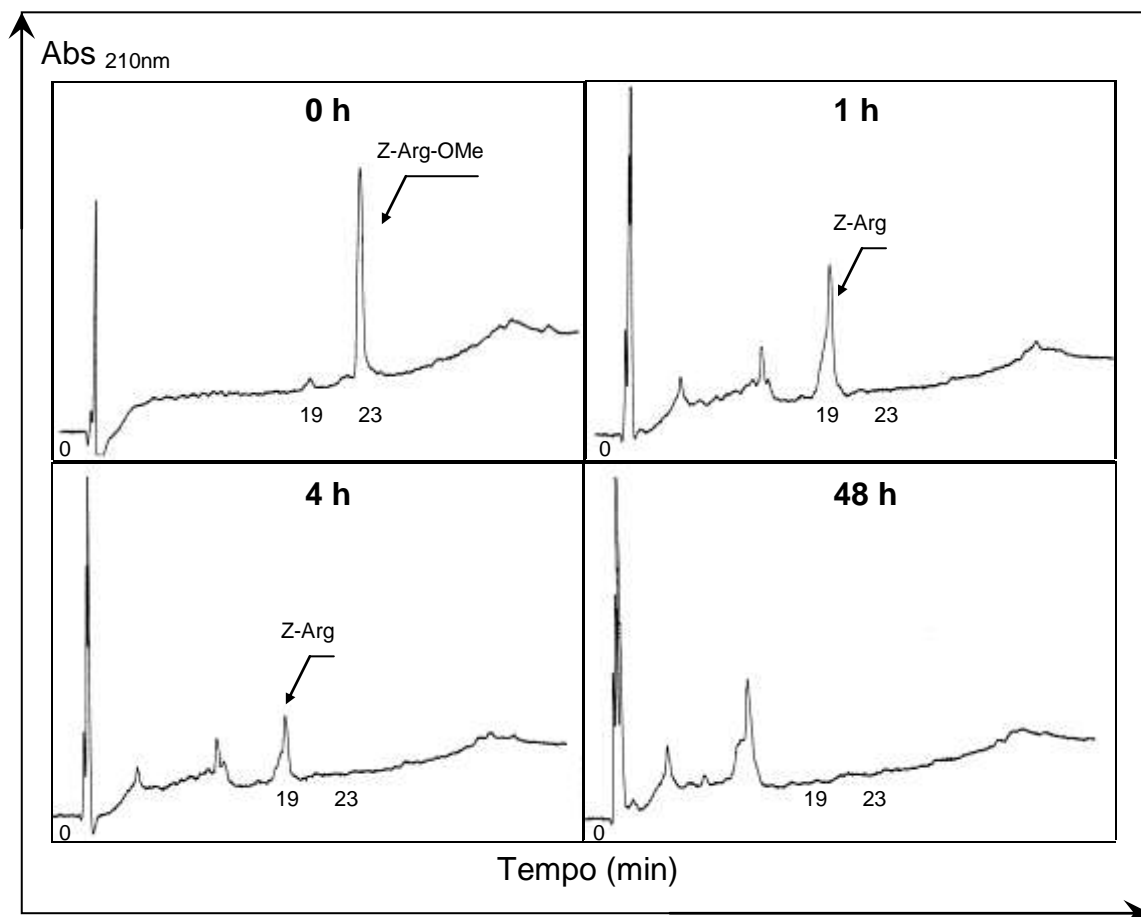


FIGURA 18: Perfis de RP-HPLC da reação de hidrólise do éster de Z-Arg-OMe catalisada por cPPL. Condição de análise: gradiente linear = 5 a 95% de B em 30min, solvente A = 0,1% de TFA em água, solvente B = 40% de ACN em água contendo 0,1% de TFA, coluna = C₁₈ Vydac, 5 μ m, 300Å, 0,46 cm x 25cm, fluxo = 1mL/min e λ = 210nm.

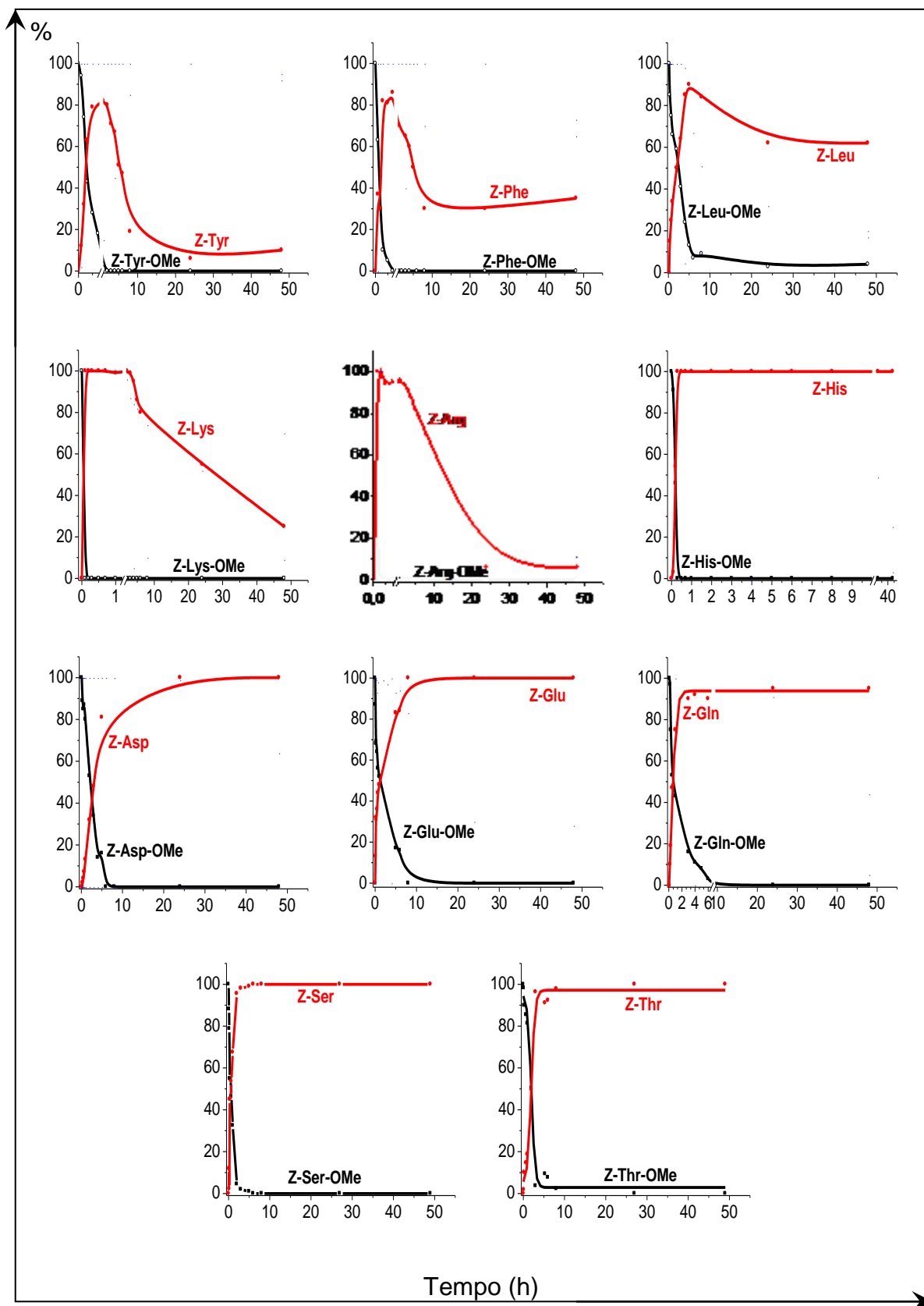


FIGURA 19: Desenvolvimento das reações de hidrólise do éster metílico de Z-aminoácidos-OMe catalisadas por cPPL.

A cPPL tratada com TPCK foi então usada na hidrólise do éster metílico de Z-Phe, Z-Tyr e Z-Leu, aminoácidos específicos para o S₁ da α -quimotripsina (Keil, 1971, Schellenberger e col., 1994), e a cPPL tratada com TLCK foi usada na hidrólise do éster metílico de Z-Arg e Z-Lys, aminoácidos específicos para o S₁ da tripsina (Widmer & Johansen, 1985). As percentagens de hidrólise do éster e de formação do derivado de aminoácido com carboxila livre obtidas por RP-HPLC são mostrados nas FIGURAS 21 e 22.

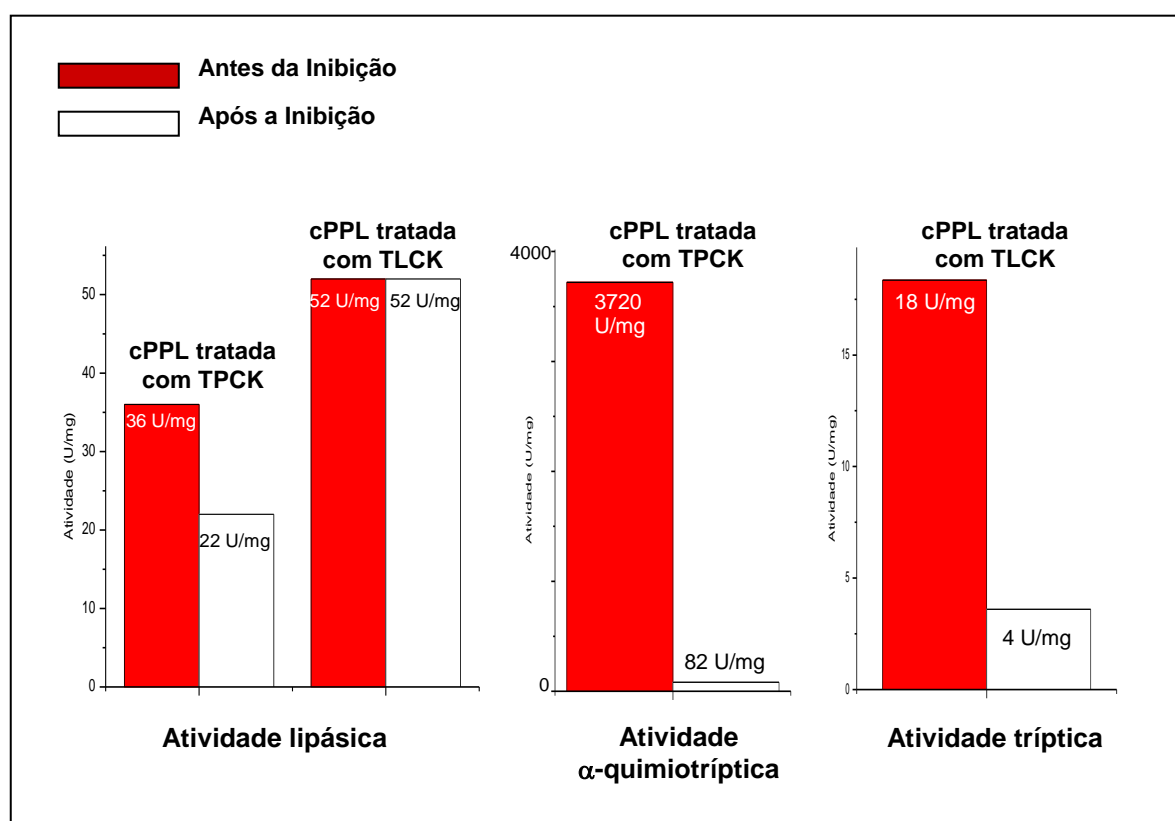


FIGURA 20: Atividades lipásica, α -quimiotríptica e tríptica de cPPL antes e após tratamento com TPCK e TLCK respectivamente.

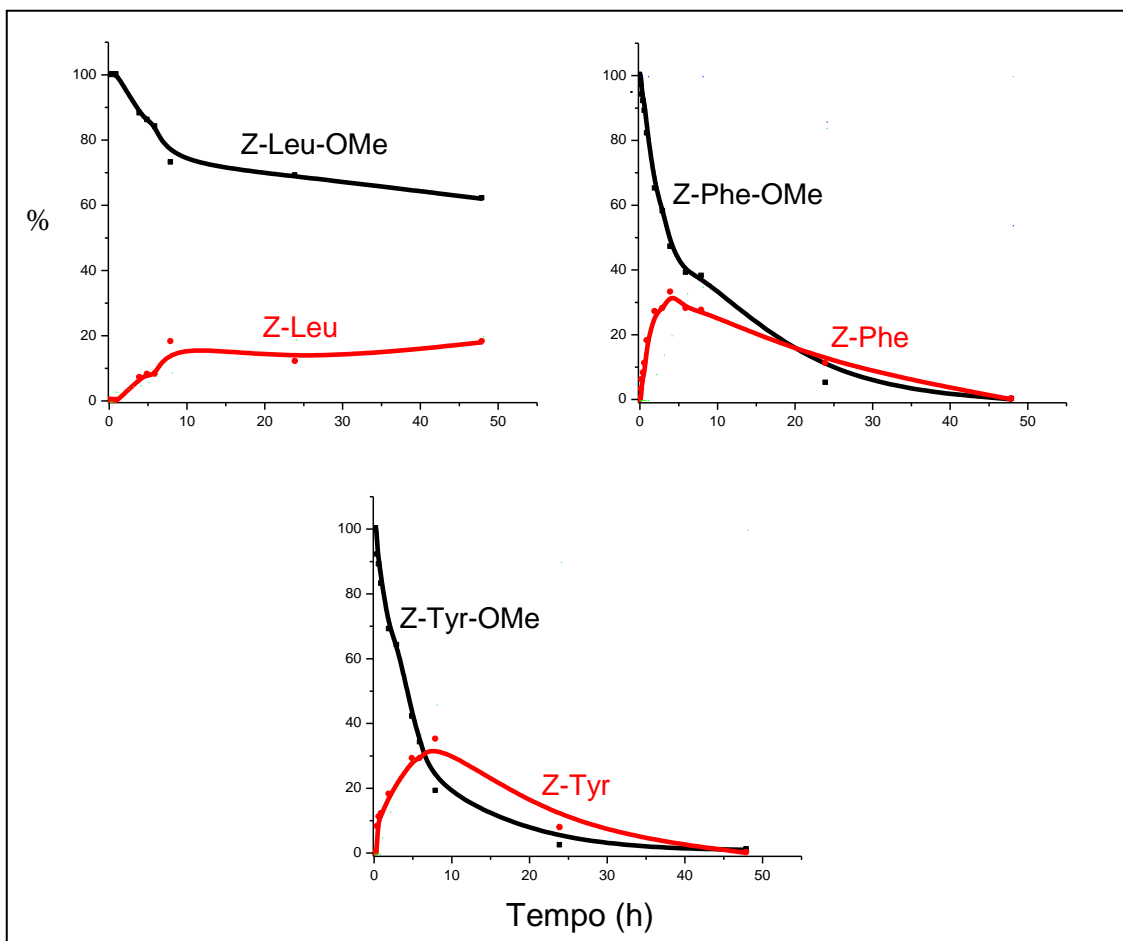


FIGURA 21: Desenvolvimento das reações de hidrólise do éster metílico de Z-Leu, Z-Phe e Z-Tyr catalisada por cPPL tratada com TPCK.

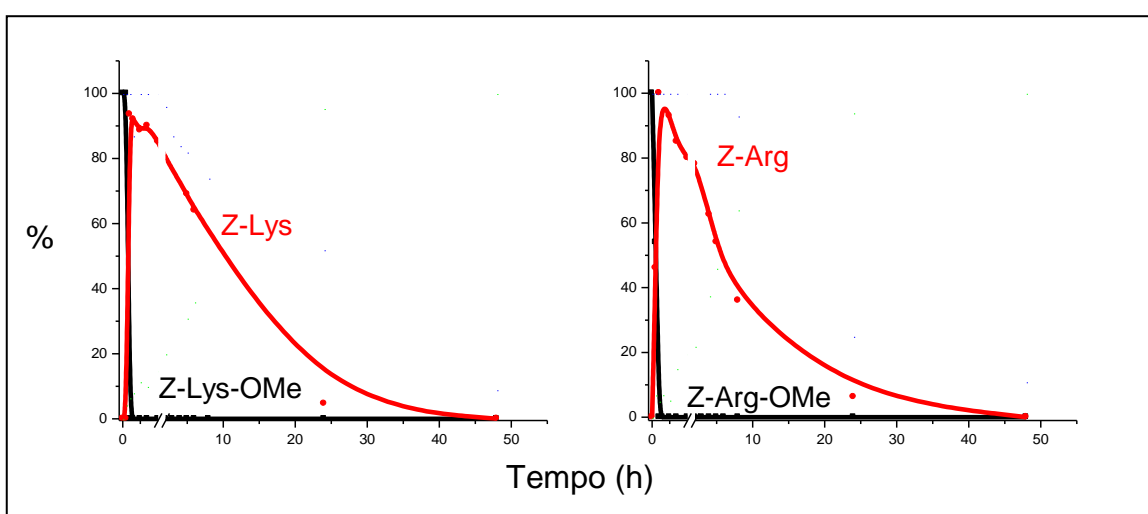


FIGURA 22: Desenvolvimento das reações de hidrólise do éster metílico de Z-Lys-OMe e de Z-Arg-OMe catalisadas por cPPL tratada com TLCK.

Fica claro que a cPPL tratada com TPCK se mostrou menos ativa nas hidrólises dos ésteres de Z-Phe, Z-Tyr e Z-Leu quando comparada à cPPL original. Ao contrário, as hidrólises dos ésteres de Z-Lys e Z-Arg catalisadas por cPPL tratada com TLCK não tiveram os seus desenvolvimentos alterados em relação às mediadas pela cPPL original, apesar da preparação enzimática tratada ter mantido 20% da atividade trípica. Se considerado que as reduções das atividades α -quimiotríptica e lipásica após o tratamento com TPCK foram de 98 e 40%, respectivamente, e que as percentagens de hidrólise do éster de Z-Tyr-OMe em 1 hora de reação em presença de cPPL e de cPPL tratada com TPCK foram de 80 e 10%, respectivamente, pode-se concluir que a atividade esterásica de α -quimotripsina pode estar contribuindo para a atividade esterásica exibida pela cPPL.

Assim, a preferência de cPPL por ésteres metílicos dos Z-aminoácidos testados foi resumida na TABELA 8.

TABELA 8: Preferência exibida pela cPPL na hidrólise do éster metílico de Z-aminoácido.

Aminoácido	Preferência*
Lys, Arg e His	Elevada (não influenciada pela tripsina)
Phe e Tyr	Média (possivelmente influenciada pela α -quimotripsina)
Asp, Glu, Gln, Ser, Thr e Leu	Baixa

* Não exclui a possibilidade de influência por carboxipeptidase A, possível contaminante da cPPL empregada.

A preferência mostrada acima é ligeiramente diferente daquela sugerida pelos dados da TABELA 5 gerada a partir dos dados da literatura. Esta comparação, entretanto, fica comprometida pelo fato de que os grupos protetores e os meios reacionais utilizados pelos autores da literatura são diferentes entre si e alguns são diferentes dos usados neste trabalho. Outro ponto que também dificulta a comparação é que alguns rendimentos apresentados na literatura e usados para a confecção da TABELA 5 referiram-se à hidrólise do éster e outros à formação da ligação peptídica. A cPPL, portanto, parece apresentar uma

especificidade parecida com as de α -quimotripsina e tripsina para P₁. Esta, porém, não é idêntica às destas proteases, pois as mesmas jamais hidrolisariam ésteres de Z-Asp e Z-Glu (Keil, 1971, Schellenberger e col., 1994).

Um outro fato que causou surpresa e merece comentários é a instabilidade de alguns Z-aminoácidos resultantes da hidrólise do éster de Z-aminoácidos-OMe catalisada por cPPL, cPPL tratada com TPCK e cPPL tratada com TLCK (FIGURAS 19, 21 e 22). Esta instabilidade sugere a possibilidade de hidrólise da ligação éster da uretana formada entre o Z e o grupo α -amino com conseqüente formação de aminoácido livre, a única reação secundária passível de ocorrer no caso. Para confirmar esta possibilidade alíquotas das amostras reacionais foram injetadas em um analisador automático de aminoácidos que utiliza a cromatografia de troca iônica (IEX-HPLC) como método de separação e a derivatização pós-coluna por ninidrina para detecção (Arrizon-Lopez e col., 1991). A FIGURA 23 é um exemplo de cromatogramas obtidos para diferentes tempos reacionais. Os percentuais de formação de aminoácidos totalmente livres são mostrados na FIGURA 24 a qual também exhibe as curvas já mostradas nas FIGURAS 19, 21 e 22.

Os resultados revelaram que em tempos longos de reação tanto a cPPL quanto as cPPLs tratadas com TPCK ou TLCK foram capazes de catalisar a remoção do grupo Z e, portanto, esta atividade só pode ser atribuída à lipase pancreática suína ou aos outros contaminantes enzimáticos contidos na cPPL. De fato, a α -quimotripsina (contaminante de cPPL) não deve catalisar tal remoção, já que West & Wong (1986) utilizaram esta protease como catalisador da síntese de dipeptídeos em que os doadores de acila eram o Z-Tyr-OMe ou o Z-Phe-OMe e os aceptores de acila eram D-Met-OMe, D-Ser-OMe, D-Phe-OMe, D- e L-Arg-OMe, D-Ala-OMe, D-Leu-OMe, D- e L-Val-OMe e D-Val-NH₂ sem relatarem qualquer ocorrência de remoção do grupo Z destes substratos. A tripsina (contaminante de cPPL) também não deve ser responsável por esta remoção pois Tsuzuki e colaboradores (1980) relataram o uso desta protease como catalisador da síntese de dipeptídeos (Z-Arg-Leu-X, X = -NH₂, -OEt, -OBu^t e -NHC₆H₅) a partir de Z-Arg-OH sem comentarem sobre uma possível instabilidade do grupo Z nos meios reacionais.

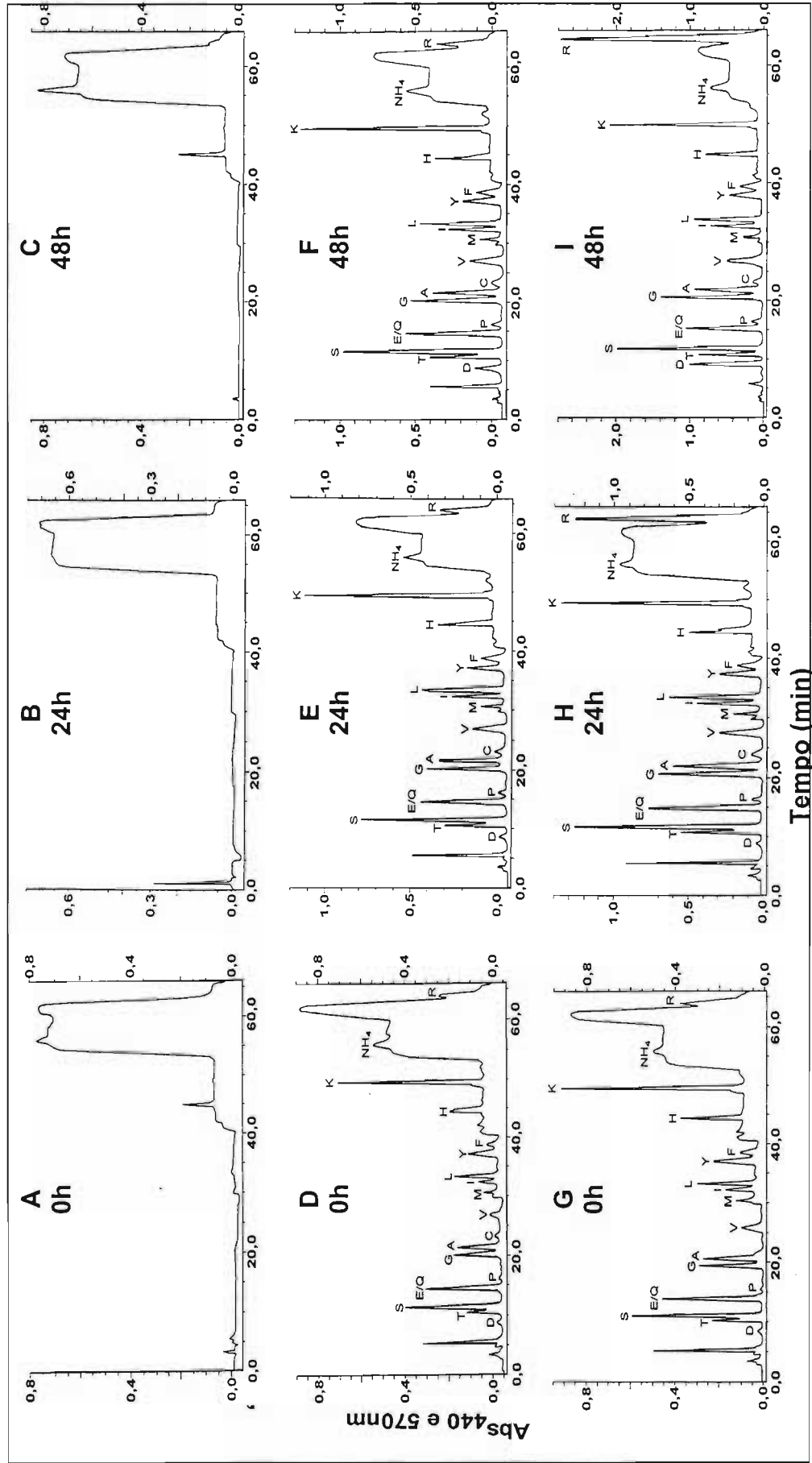


FIGURA 23: Perfis de IEX-HPLC de Z-Arg-OMe no meio reacional (A, B e C), de cPPL no meio reacional (D, E e F) e da reação de hidrólise do éster metílico de Z-Arg-OMe catalisada por cPPL (G, H e I). Condição de análise: solvente NaE = tampão citrato, pH 3,28 (0 a 23,8 min); solvente NaF = tampão citrato, pH 4,25 (23,8 a 36,0 min); solvente NaD = tampão citrato, pH 6,30 (36,0 a 66 min); coluna = poliestireno sulfonado de troca iônica Beckman, 0,40 cm x 12,00 cm; gradiente de aquecimento = 48 a 65°C em 11min, 65 a 77°C em 34 min e 77°C em 34 min e 77°C em 34 min; fluxo = 0,35 mL/min e λ = 440 e 570 nm.

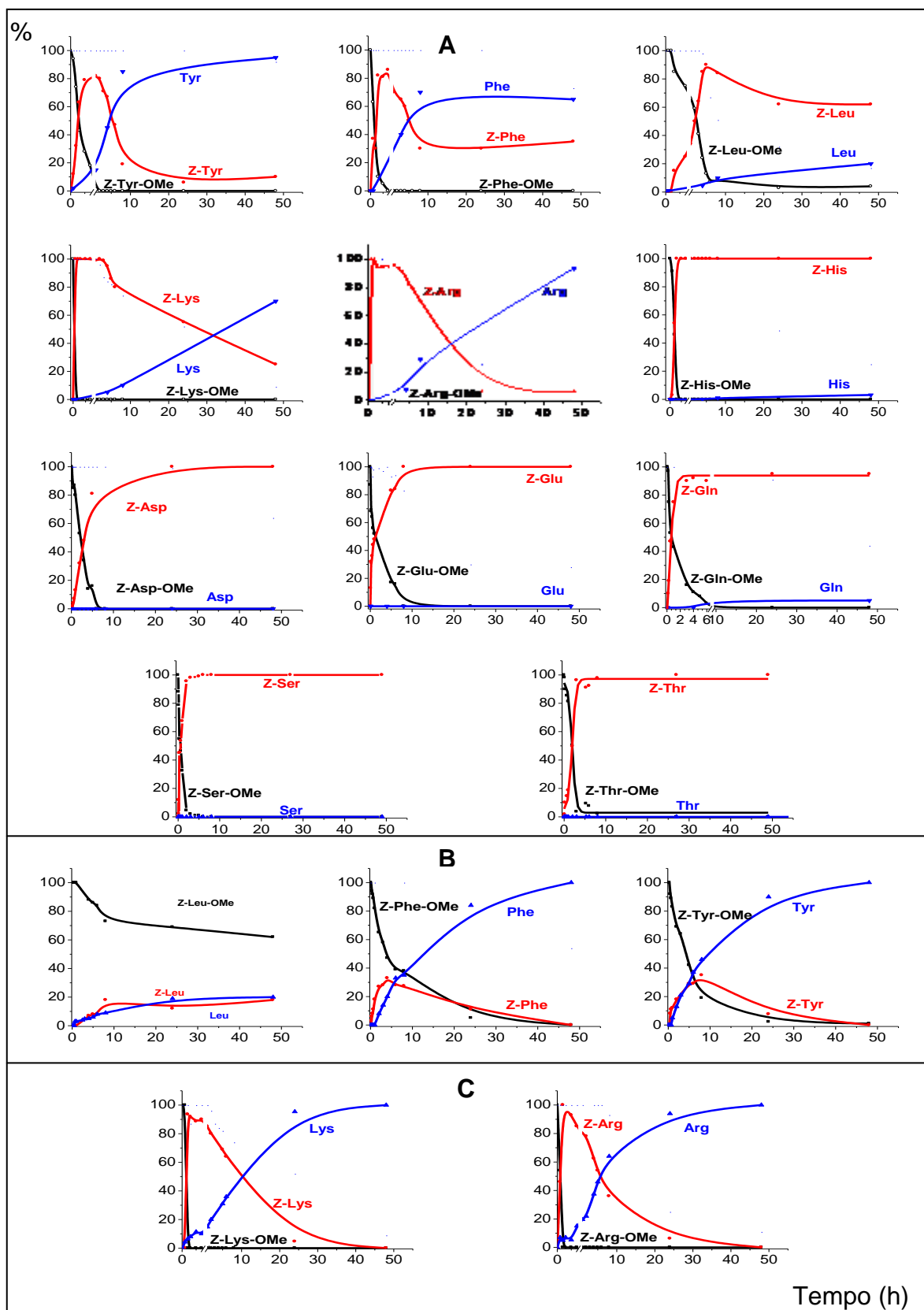


FIGURA 24: Desenvolvimento das reações de hidrólise do éster metílico de Z-aminoácidos-OMe catalisadas por cPPL (A), cPPL tratada com TPCK (B) e cPPL tratada com TLCK (C).

Apesar da elucidação desta reação secundária ter dado uma nova perspectiva ao projeto (discussão a seguir), a sua ocorrência impossibilitou os cálculos das velocidades iniciais de hidrólise dos ésteres metílicos dos Z-aminoácidos testados. Esta é a razão pela qual não foi possível realizar os experimentos que permitiriam determinar as constantes cinéticas k_m e k_{cat} e a relação entre elas. Para tal, será necessário realizar um novo estudo empregando ésteres de aminoácidos $N\alpha$ -acilados com um grupo totalmente estável frente a cPPL.

4.4 – Estudo da influência da natureza do éster e do protetor de grupo α -amino na hidrólise do éster de $N\alpha$ -acil-aminoácidos catalisada por cPPL

Foram realizados experimentos utilizando os seguintes substratos: Z-Asp-OMe, Z-Asp-OBzl, (OBzl = éster benzílico) Z-Glu-OBzl, Z-Glu-OMe, Boc-Asp-OBzl (Boc = t-butiloxicarbonil), Boc-Asp-OBu^t (OBu^t = éster t-butílico), Fmoc-Asp-OMe (Fmoc = fluorenilmetiloxicarbonil) e Fmoc-Asp-OBzl. Os aminoácidos Asp e Glu foram escolhidos como modelos de aminoácidos empregados em síntese de peptídeos pelos quais cPPL apresenta baixa preferência, minimizando qualquer possibilidade de hidrólise do éster da uretana formada entre o grupo Z, Boc e Fmoc e o grupo α -amino destes aminoácidos, item 4.3).

Em geral, os perfis obtidos evidenciaram dois picos predominantes: um correspondente ao substrato esterificado ($N\alpha$ -acil-aminoácido-OR) e outro ao produto de hidrólise do éster ($N\alpha$ -acil-aminoácido). Outros picos presentes correspondiam a materiais provenientes da própria preparação enzimática. Na FIGURA 25 são mostrados alguns dos cromatogramas obtidos para a reação de hidrólise do éster de Z-Glu-OBzl. Nenhuma reação ocorreu na ausência de cPPL.

Na FIGURA 26 são mostrados os percentuais de consumo do substrato e de formação dos produtos.

A partir das curvas foram calculadas as velocidades iniciais de formação de produto que são mostradas na FIGURA 27 a seguir.

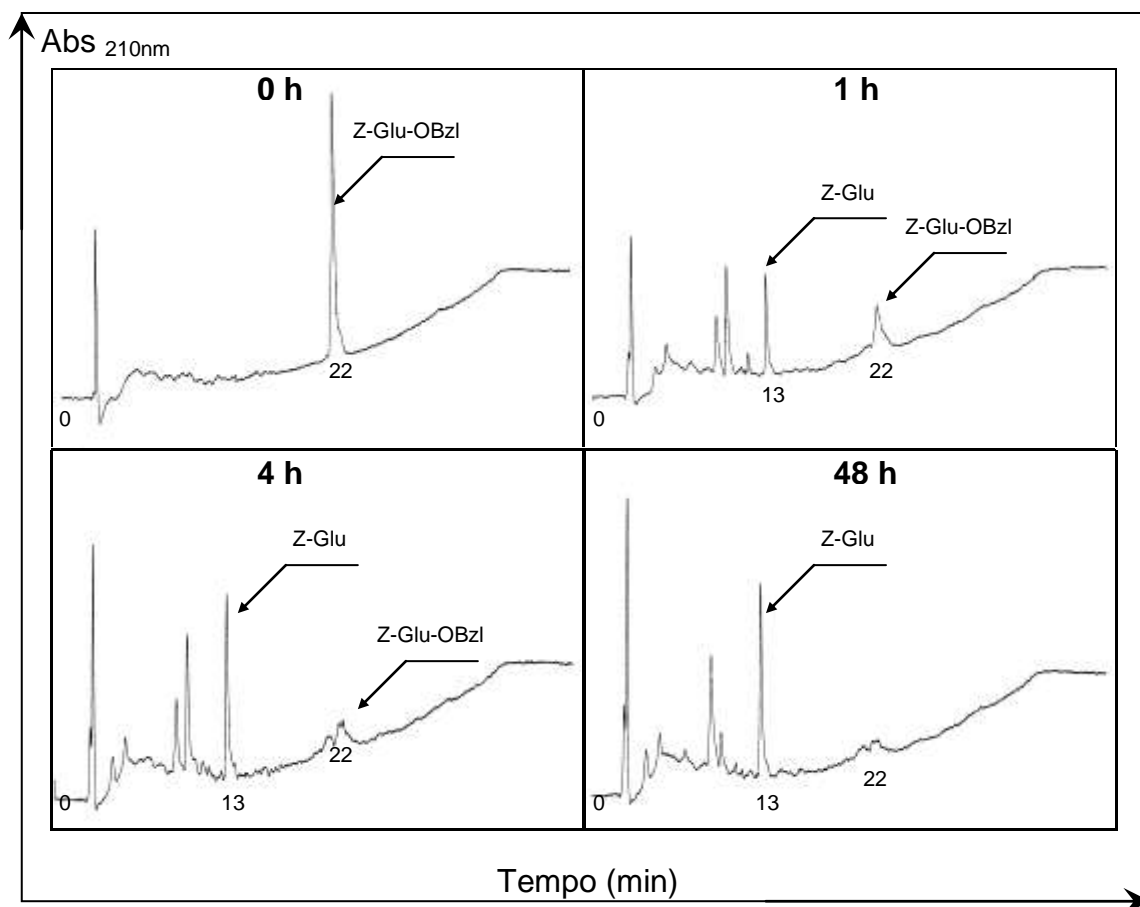


FIGURA 25: Perfis de RP-HPLC da reação de hidrólise do éster de Z-Glu-OBzl catalisada por cPPL. Condição de análise: gradiente linear = 5 a 95% de B em 30min, solvente A = 0,1% de TFA em água, solvente B = 80% de ACN em água contendo 0,1% de TFA, coluna = C₁₈ Vydac, 5 μ m, 300Å, 0,46 cm x 25cm, fluxo = 1mL/min e λ = 210nm.

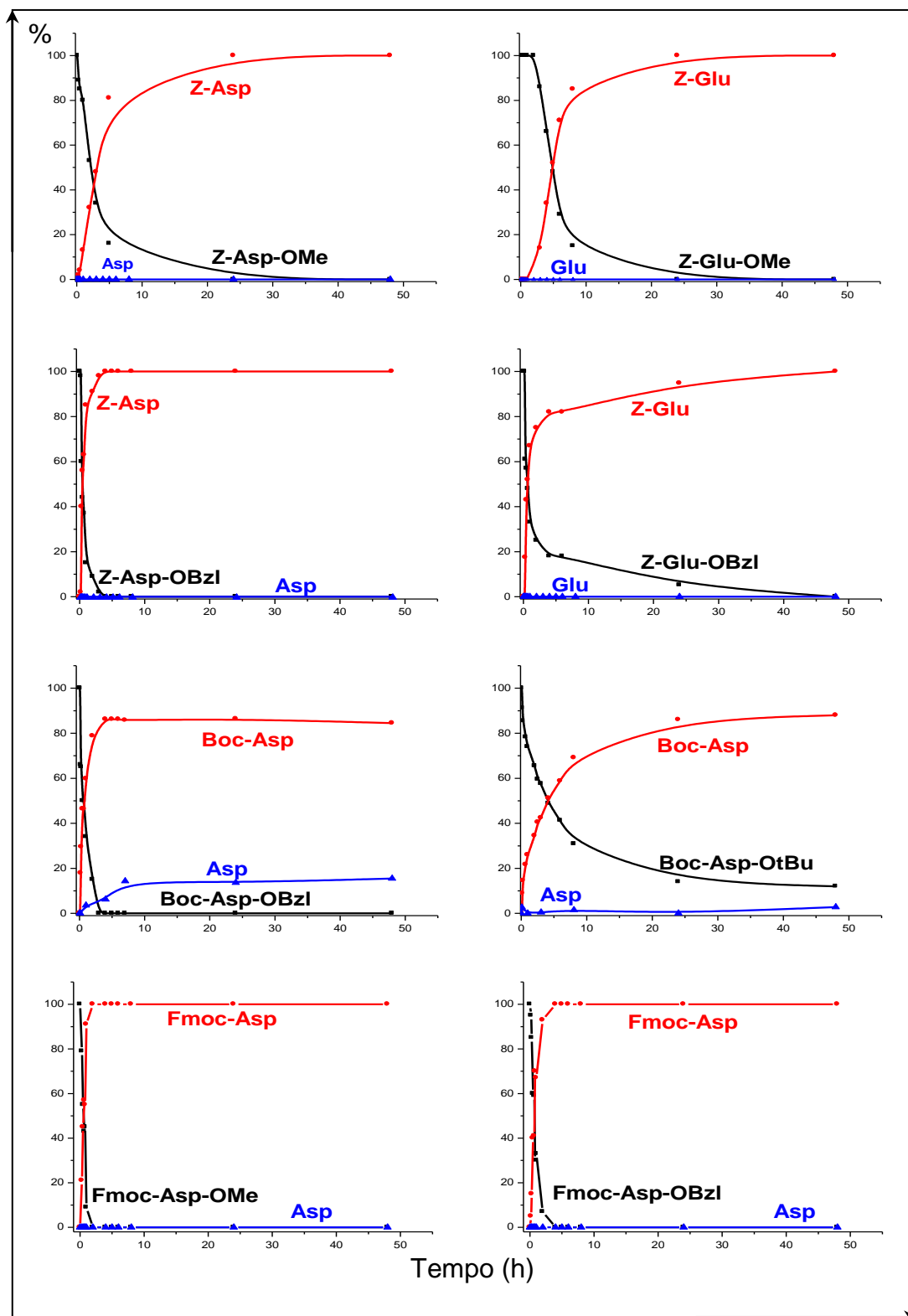


FIGURA 26: Desenvolvimento de reações de hidrólise de diferentes ésteres de N_{α} -acil-aminoácidos catalisadas por cPPL.

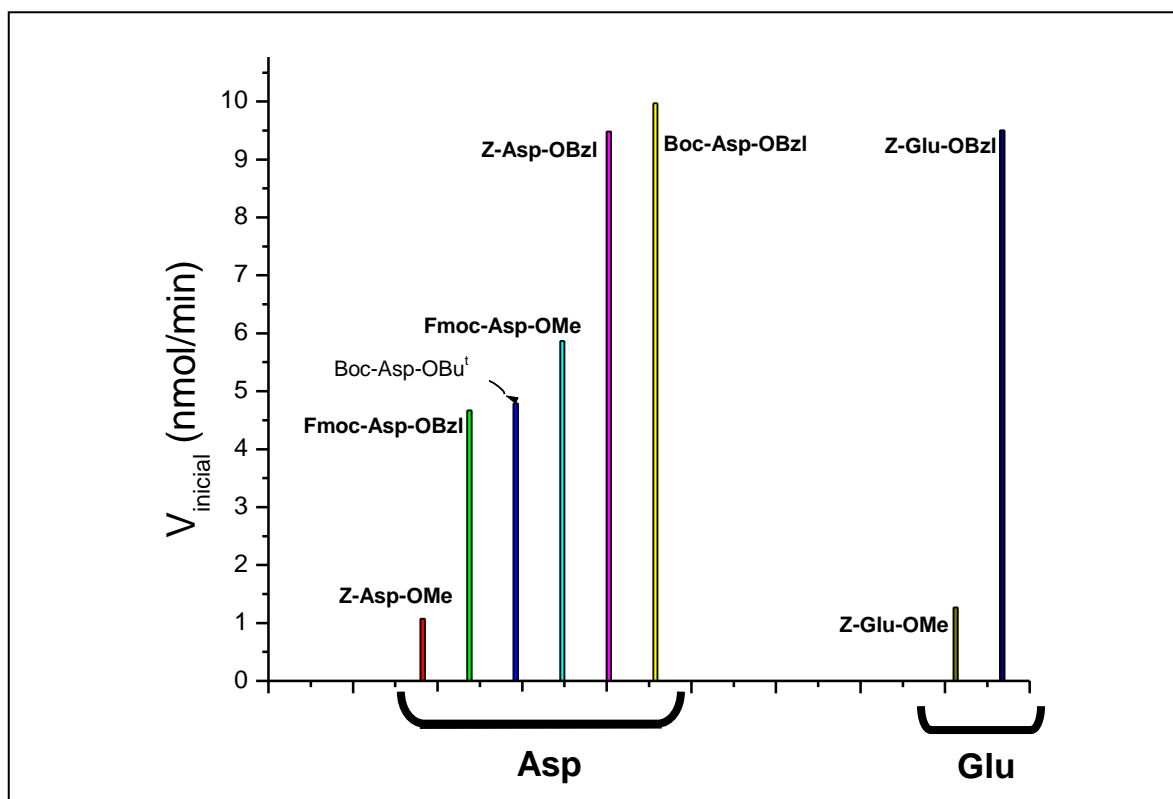


FIGURA 27: Velocidades iniciais de hidrólise de diferentes ésteres de N_{α} -acil-aminoácidos catalisada por cPPL.

Como se observa, nenhuma diferença considerável foi detectada entre a velocidade inicial de hidrólise do éster metílico de Z-Asp-OMe e de Z-Glu-OMe, nem tão pouco entre aquelas de hidrólise do éster de Z-Asp-OBzl e de Z-Glu-OBzl, indicando que a pequena diferença na cadeia lateral dos dois aminoácidos não afetou cineticamente estas reações. Por outro lado, a do éster de Z-Asp-OBzl se mostrou 8-9 vezes superior a de Z-Asp-OMe, sugerindo uma preferência da cPPL por ésteres mais volumosos. A troca do grupo Z pelo grupo Fmoc (Fmoc-Asp-OBzl) resultou na diminuição da velocidade inicial de hidrólise para a metade, indicando que o aumento do volume deste protetor não foi adequado. A redução do tamanho do éster de Fmoc-Asp-OBzl para Fmoc-Asp-OMe não resultou em grandes melhoras. A substituição simultânea do protetor por Boc e da do éster por OBU^t (Boc-Asp-OBu^t) também não se mostrou muito promissora, porém a combinação de Boc e OBzl (Boc-Asp-OBzl) forneceu a velocidade inicial mais alta dentre as observadas. Estes testes indicaram que a cPPL prefere hidrolisar ésteres de cadeia mais volumosa e/ou de caráter

aromático.

Estes resultados indicam que contrariamente aos trabalhos de Margolin e Klibanov (1987) e West e Wong (1987): a natureza do éster pode influenciar a eficiência da aminólise de ésteres catalisada por cPPL.

4.5 – Estudo da remoção do grupo Z de Z-aminoácidos catalisada por cPPL

Todas as informações da literatura destacando a estabilidade química do grupo Z e descritas no item 4.3 (Waldmann & Sebastian, 1994, West & Wong, 1986) se chocam com a observação também descrita naquele item de relativa instabilidade deste grupo frente a cPPL. Assim, decidiu-se realizar uma investigação cuidadosa envolvendo os 20 Z-aminoácidos.

Inicialmente, buscou-se verificar experimentalmente se a contribuição dos contaminantes proteásicos da cPPL, tripsina e α -quimotripsina, nesta remoção poderia ser excluída. Para tanto, foram realizadas quatro incubações utilizando n-hexano:tampão Tris-HCl 0,5M, pH 8,0 (80:20, v:v), 50mg/mL de protease (tripsina ou α -quimotripsina) e 0,02M do Z-aminoácido (Z-Lys ou Z-Tyr). Também foram feitas incubações-controle de Z-Lys na ausência de tripsina e de Z-Tyr na ausência de α -quimotripsina, cujos resultados evidenciaram total estabilidade dos substratos no meio reacional. Os resultados obtidos na presença das enzimas são mostrados a seguir na FIGURA 28.

Como se observa, Z-Lys foi totalmente estável em presença de tripsina e Z-Tyr foi praticamente estável frente à α -quimotripsina (remoção de Z de apenas ~10% em 50h), o que confirmou que a atividade esterásica da lipase ou, mesmo da possível carboxipeptidase A contaminante, deveria ser responsável pela remoção significativa de Z durante as reações descritas no estudo e itens anteriores envolvendo estes substratos. O mecanismo pelo qual esta remoção poderia ocorrer é apresentado no ESQUEMA 2.

Assim, os Z-derivados de Asp, Glu, His, Met, Ser, Asn, Gly, Ala, Val, Ile, Pro, Trp, Phe, Tyr, Lys, Arg, Gln, Thr, Cys e Leu foram incubados na presença e ausência de cPPL. Para cada uma das reações foi determinado o consumo do substrato (Z-Aminoácido) através de suas análises por RP-HPLC nos tempos 0,

10, 20, 30 e 40 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 24 e 48h. Nas FIGURAS 29 e 30 são mostrados exemplos de cromatogramas resultantes do monitoramento das incubações de Z-Tyr e Z-Arg.

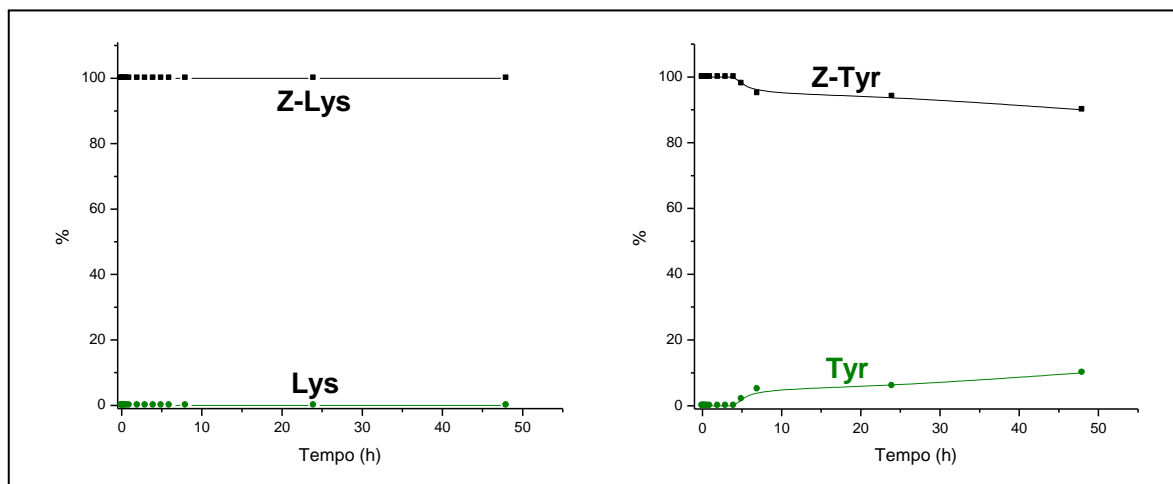
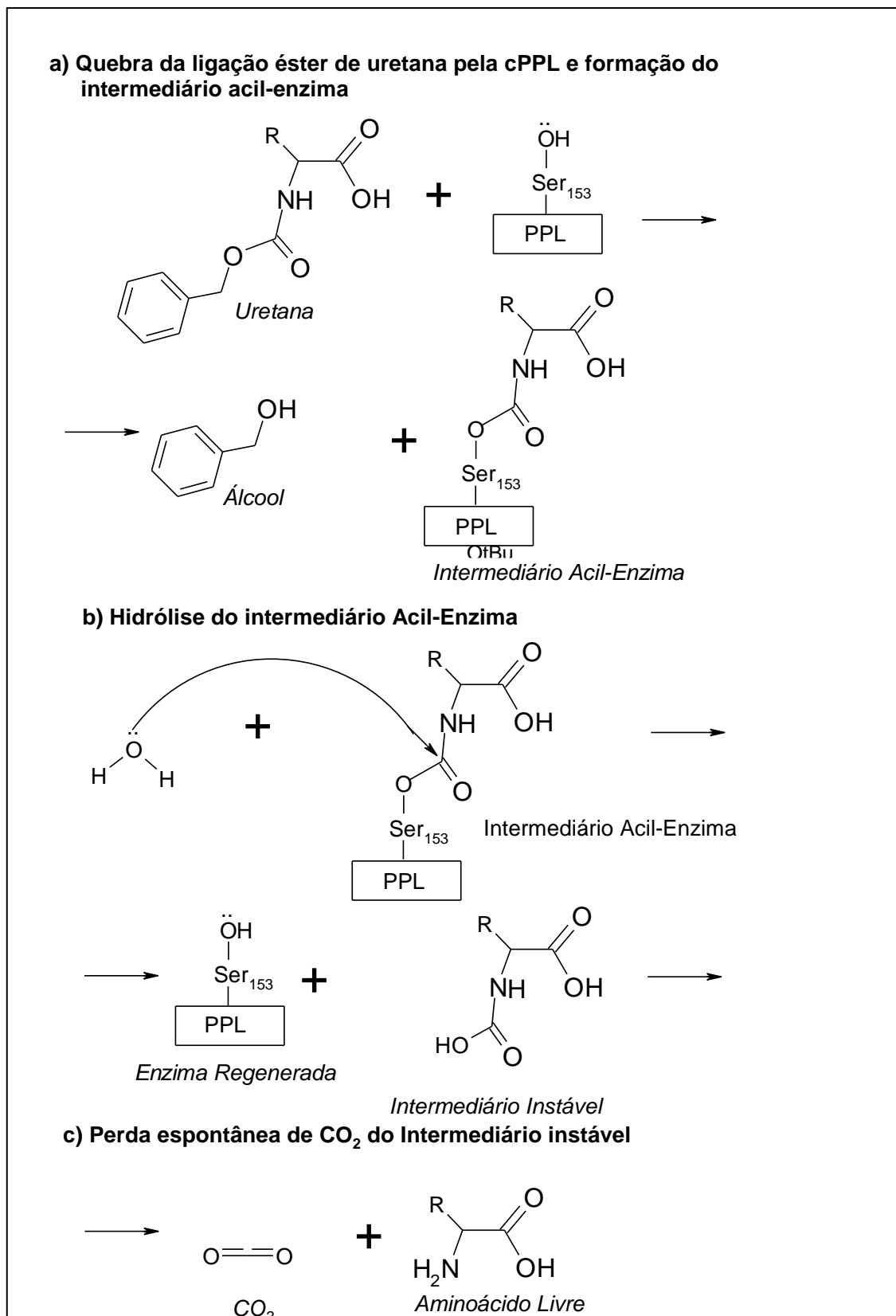


FIGURA 28: Estabilidade de Z-Lys e Z-Tyr frente à tripsina e à α -quimotripsina, respectivamente.

A FIGURA 31 reúne todas as curvas de consumo do substrato obtidas a partir das análises por RP-HPLC dos meios reacionais e de formação do aminoácido livre nos mesmos obtidos a partir das análises por IEX-HPLC. Diante delas é possível concluir que a cPPL catalisou a hidrólise da ligação éster da uretana formada entre o grupo Z e 11 dos 20 aminoácidos proteínogênicos. Para os demais não foi detectada ocorrência desta reação até 48 h de incubação. Na ausência de cPPL, todos os substratos se mostraram estáveis nos meios reacionais por no mínimo 48 h (dados não mostrados).

As velocidades iniciais de formação dos aminoácidos livres (produto), mostradas na FIGURA 32 obedeceram a seguinte ordem: Tyr > Phe > Ser > Gln > Lys > His > Trp > Leu > Met > Arg > Ile.

A TABELA 9 revela que ela é semelhante à ordem observada para a remoção do Z no estudo anterior (item 4.3). Por outro, ambas parecem diferir daquela possivelmente encontrada se calculadas as velocidades iniciais de hidrólise dos ésteres dos Z-aminoácidos-OMe testados. Sem dúvida, para a remoção do Z os melhores substratos foram o Z-Tyr e o Z-Phe, porém para a hidrólise do éster metílico o Z-Arg-OMe e o Z-Lys-OMe foram os preferidos.



ESQUEMA 2: Proposição do possível esquema de hidrólise do éster de uretana formado entre o benziloxicarbonil (Z) e aminoácidos catalisada por PPL.

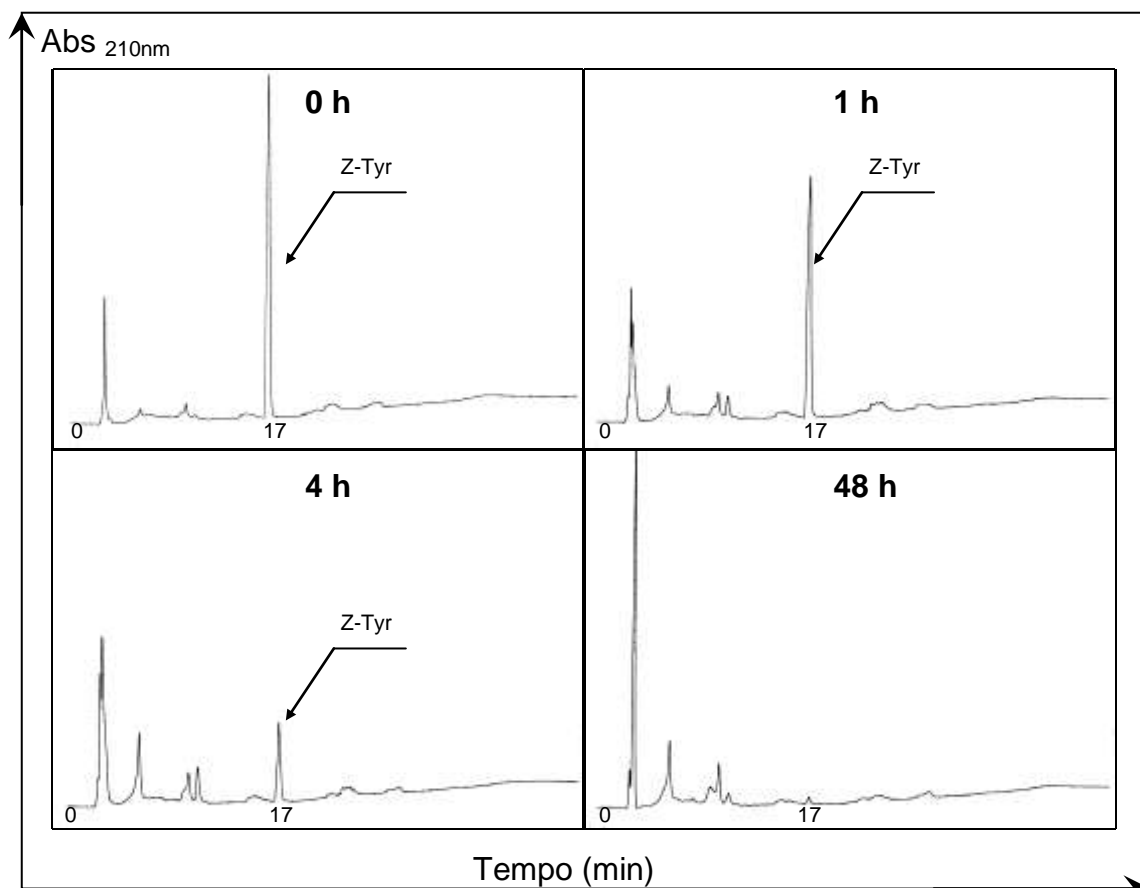


FIGURA 29: Perfis de RP-HPLC da reação de remoção do grupo Z do Z-Tyr catalisada por cPPL. Condição de análise: gradiente linear = 5 a 95% de B em 30min, solvente A = 0,1% de TFA em água, solvente B = 80% de ACN em água contendo 0,1% de TFA, coluna = C₁₈ Vydac, 5 μ m, 300Å, 0,46 cm x 25cm, fluxo = 1mL/min e λ = 210nm.

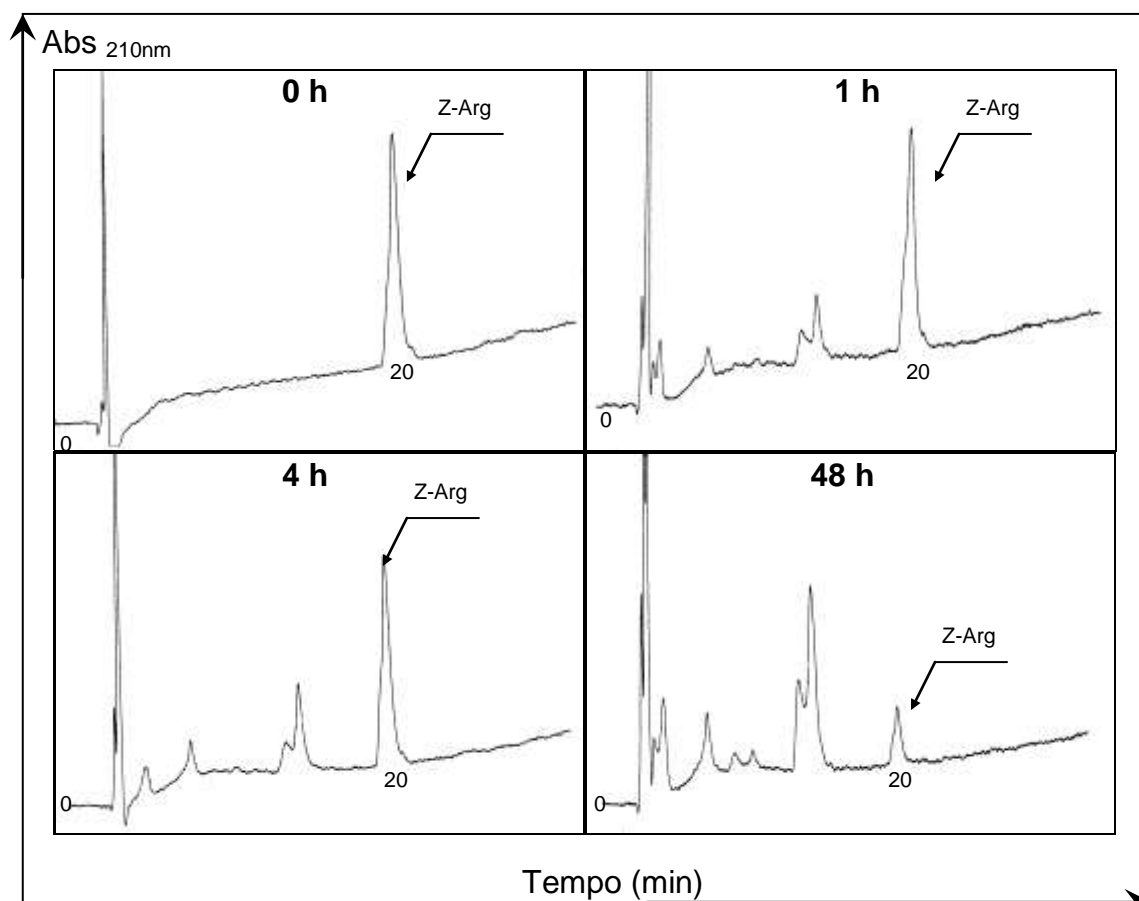


FIGURA 30: Perfis de RP-HPLC da reação de remoção do grupo Z do Z-Arg catalisada por cPPL. Condição de análise: gradiente linear = 5 a 95% de B em 30min, solvente A = 0,1% de TFA em água, solvente B = 40% de ACN em água contendo 0,1% de TFA, coluna = C₁₈ Vydac, 5 μ m, 300Å, 0,46 cm x 25cm, fluxo = 1mL/min e λ = 210nm.

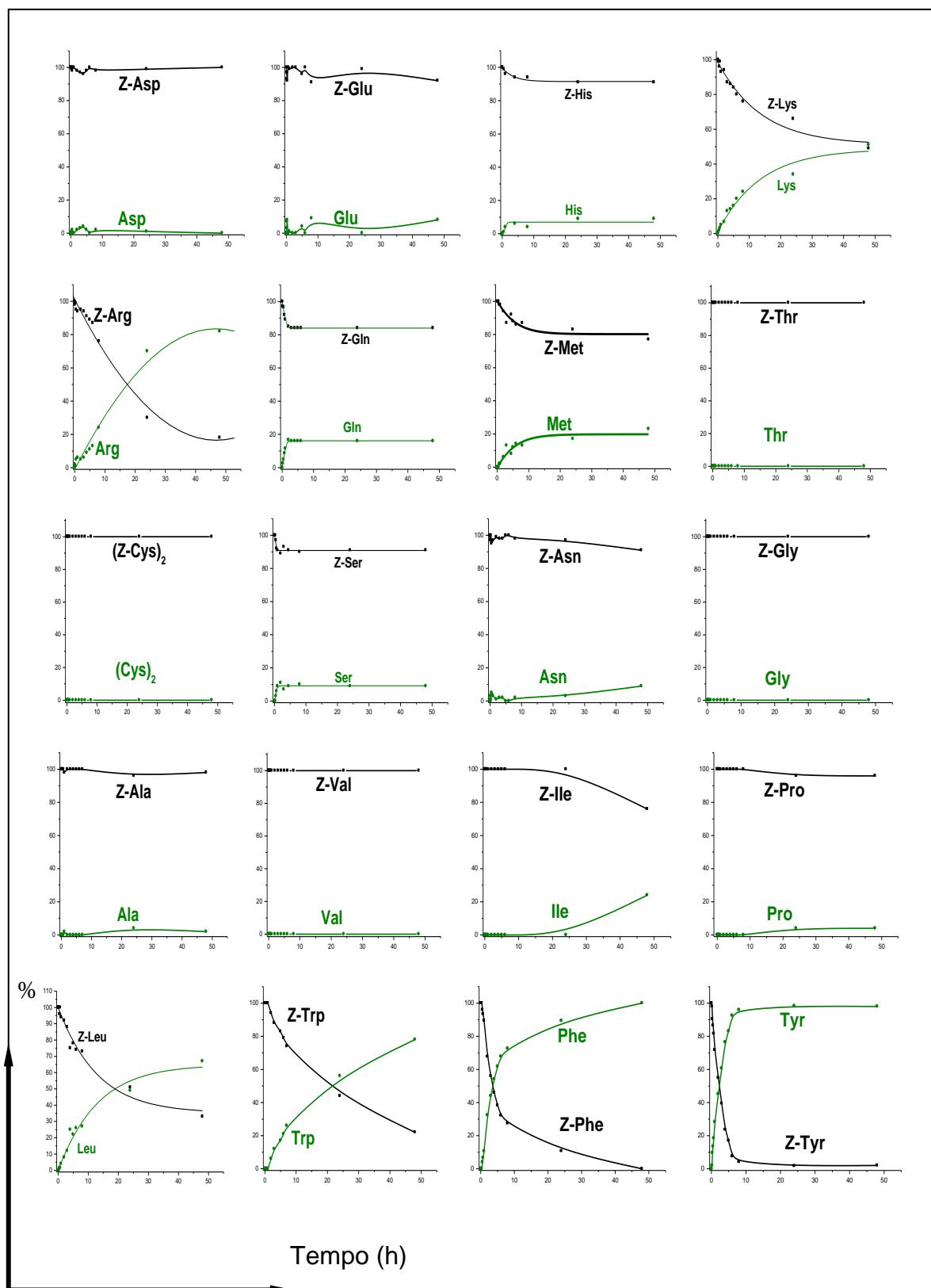


FIGURA 31: Desenvolvimento das reações de remoção do grupo benziloxycarbonil (Z) de Z-aminoácidos catalisada por cPPL.

Pela FIGURA 31 percebe-se que a cPPL não catalisa a remoção do grupo Z de Gly e que o faz com alta e pouca eficiência quando Z-Phe e Z-Arg, respectivamente, são os substratos. Curiosamente, Zhang e colaboradores (2001 e 2003) utilizaram o Z como grupo protetor no substrato Z-Gly-OEt e Bz no substrato Bz-Arg-OEt de sínteses mediadas por lipase pancreática suína sem apresentarem nenhuma justificativa para tais escolhas. Kawashiro e colaboradores (1993) empregaram Z-Phe-OEt como DA na síntese de Z-Phe-Phe-NH₂ mediada por lipase pancreática suína, acompanhando a formação de produto até 6 h de reação, sem fazerem nenhum comentário sobre uma possível instabilidade do grupo Z no sistema reacional.

Quando é analisado o conjunto de resultados relativos aos Z-Ser, Z-Gln, Z-Met e Z-His mostrados nas FIGURAS 31 e 32 e TABELA 8, percebe-se que inicialmente a formação do produto é bastante rápida. Porém, a reação de remoção parece atingir o equilíbrio mesmo quando a concentração de substrato é ainda muito alta, ou seja, quando a percentagem de aminoácido livre é baixa (15%).

Para confirmar se, de fato, estas reações atingiram o equilíbrio foi concebido um conjunto de experimentos utilizando quatro diferentes concentrações iniciais de Z-Gln (10, 20, 30 e 60mM). As curvas de consumo de substrato ao longo do tempo, apresentadas na FIGURA 33, confirmaram a nossa suposição.

Também foi realizado um quinto experimento a fim de investigar a possibilidade de deslocamento do equilíbrio pela adição de substrato em determinado momento reacional. Para tanto 20mM de Z-Gln foi adicionado ao meio reacional no início e após 24 horas de incubação. Os resultados são mostrados na FIGURA 34. Eles reforçaram ainda mais que a cinética de remoção do grupo Z deste substrato é do tipo que atinge o equilíbrio em baixas percentagens de conversão substrato a produto.

A similaridade do comportamento cinético desta reação de remoção de Z dos substratos Z-Ser, Z-Met e Z-His dispensou a realização de experimentos do mesmo tipo para todas elas.

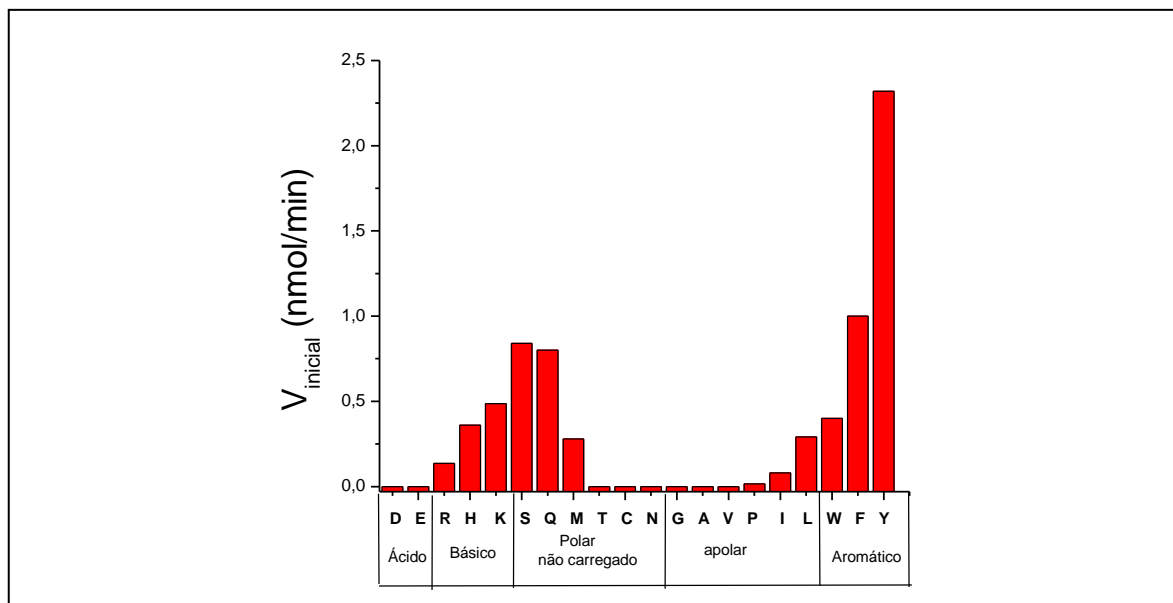


FIGURA 32: Velocidades iniciais de remoção do grupo Z de Z-aminoácidos mediante catálise por cPPL.

TABELA 9: Percentagem de remoção do grupo Z catalisada por cPPL em 4 horas de reação a partir de Z-aminoácidos-OMe ou Z-aminoácidos.

Aminoácido	Z-aminoácido-OMe	Z-aminoácido	
	% de remoção	% de remoção	V_i ($\mu\text{M}/\text{min}$)
			Vinda da Fig 32
Tyr	45	76	116
Phe	40	54	50
Trp	-	15	20
Leu	5	20	15
Gln	0	9	40
Met	-	8	14
Ser	0	10	42
Arg	2	10	7
Lys	5	14	25
His	0	5	18
Pro	-	0	1
Ile	-	0	4
Val	-	0	0
Ala	-	0	0
Gly	-	0	0
Asn	-	0	0
Cys	-	0	0
Thr	0	0	0
Glu	0	0	0
Asp	0	0	0

Fica claro, portanto, que o grupo Z pode ser removido com eficiência adequada a processos sintéticos que envolvam os seguintes Z-aminoácidos: Tyr, Phe, Trp, Lys, Arg e Leu. Esta possibilidade é inédita e despertou o nosso interesse em verificá-la para Z-peptídeos [já que o grupo Z é freqüentemente empregado como protetor em síntese química e biocatalisada em solução, (Bodanszky, 1984, West & Wong, 1987 e Kawashiro e col., 1993)] e Z-compostos orgânicos [o grupo Z é muito usado em sínteses de compostos orgânicos que requerem proteção ortogonal já que as condições para a sua remoção não propiciam a remoção da maioria dos outros grupos protetores utilizados, Coleman & Carpenter, 1992].

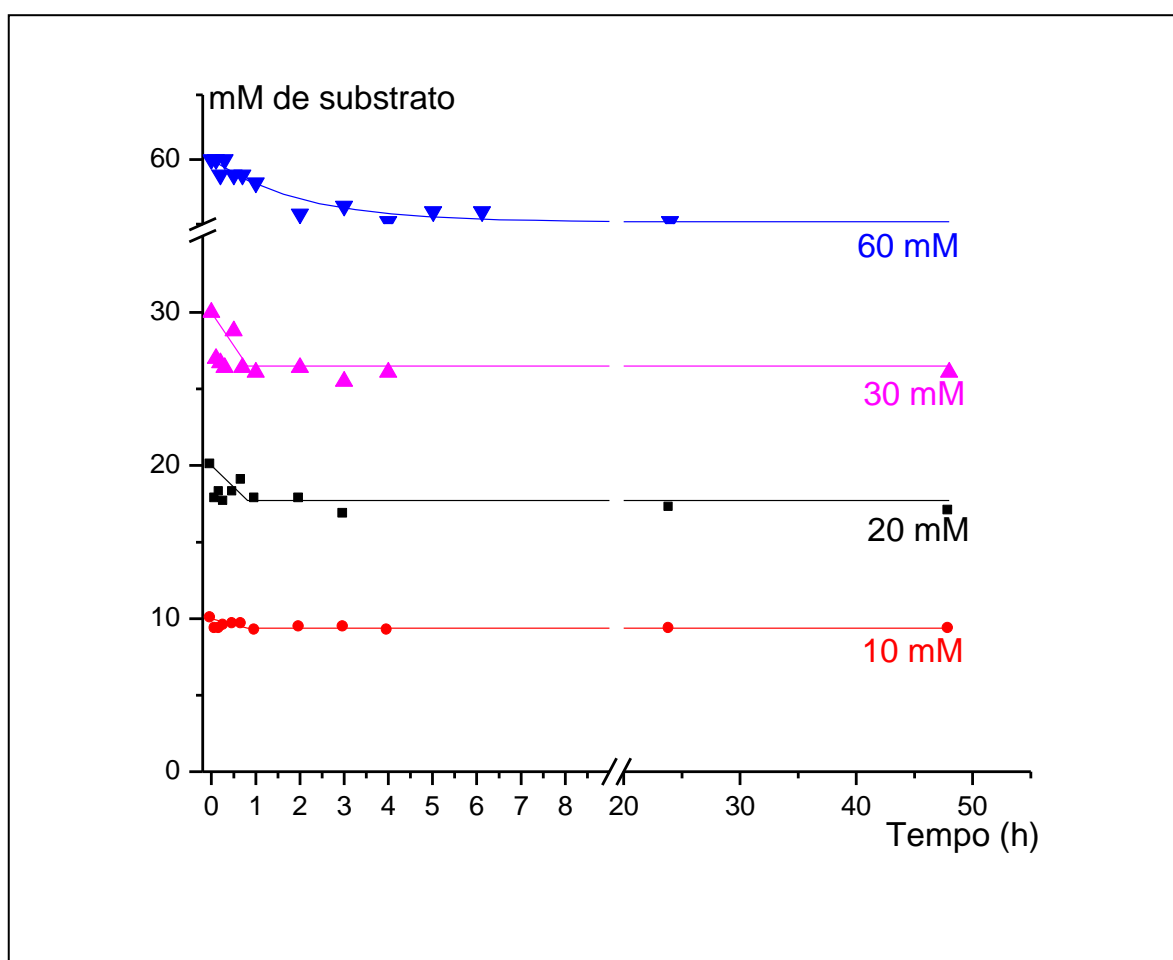


FIGURA 33: Desenvolvimento das reações de remoção do grupo Z catalisada por cPPL realizadas empregando-se quatro diferentes concentrações iniciais de Z-Gln.

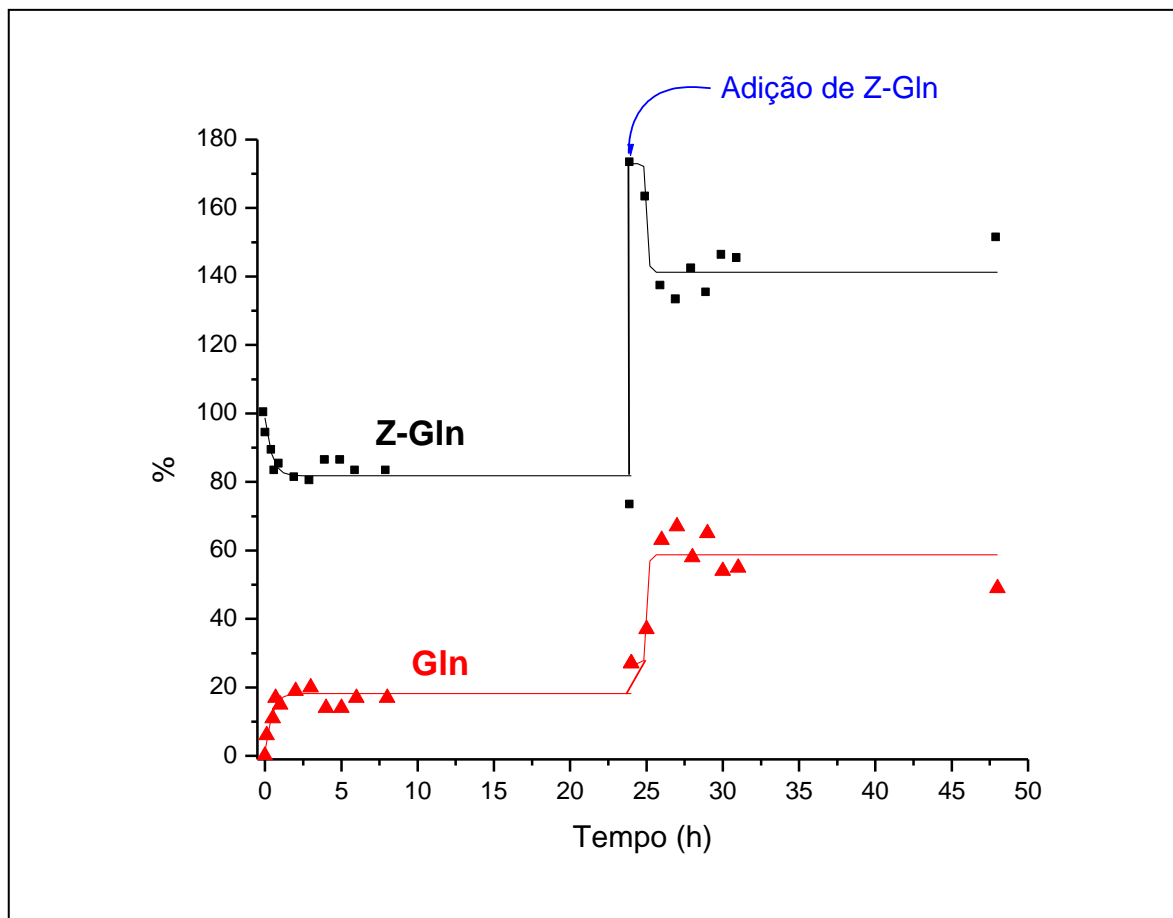


FIGURA 34: Desenvolvimento da reação de desproteção de Z-Gln catalisada por cPPL sujeita à adições propositalis de Z-Gln.

4.6 – Tentativa preliminar de remoção do grupo Z do dipeptídeo Z-Gly-Phe catalisada por cPPL

Como ficou demonstrado a cPPL não foi capaz de catalisar a remoção do grupo Z de Z-Gly, mas o fez para Z-Phe muito eficientemente. Estas observações nos levaram a questionar se a presença de uma fenilalanina no substrato poderia levar ao seu reconhecimento pela cPPL. Assim, foi realizada a incubação do dipeptídeo Z-Gly-Phe, obtido da Sigma Co. (EUA), com cPPL nas mesmas condições reacionais descritas no item 4.5. Alguns cromatogramas obtidos no monitoramento desta reação por RP-HPLC são mostrados na FIGURA 35. A curva de consumo de Z-Gly-Phe ao longo do tempo está mostrada na FIGURA 36.

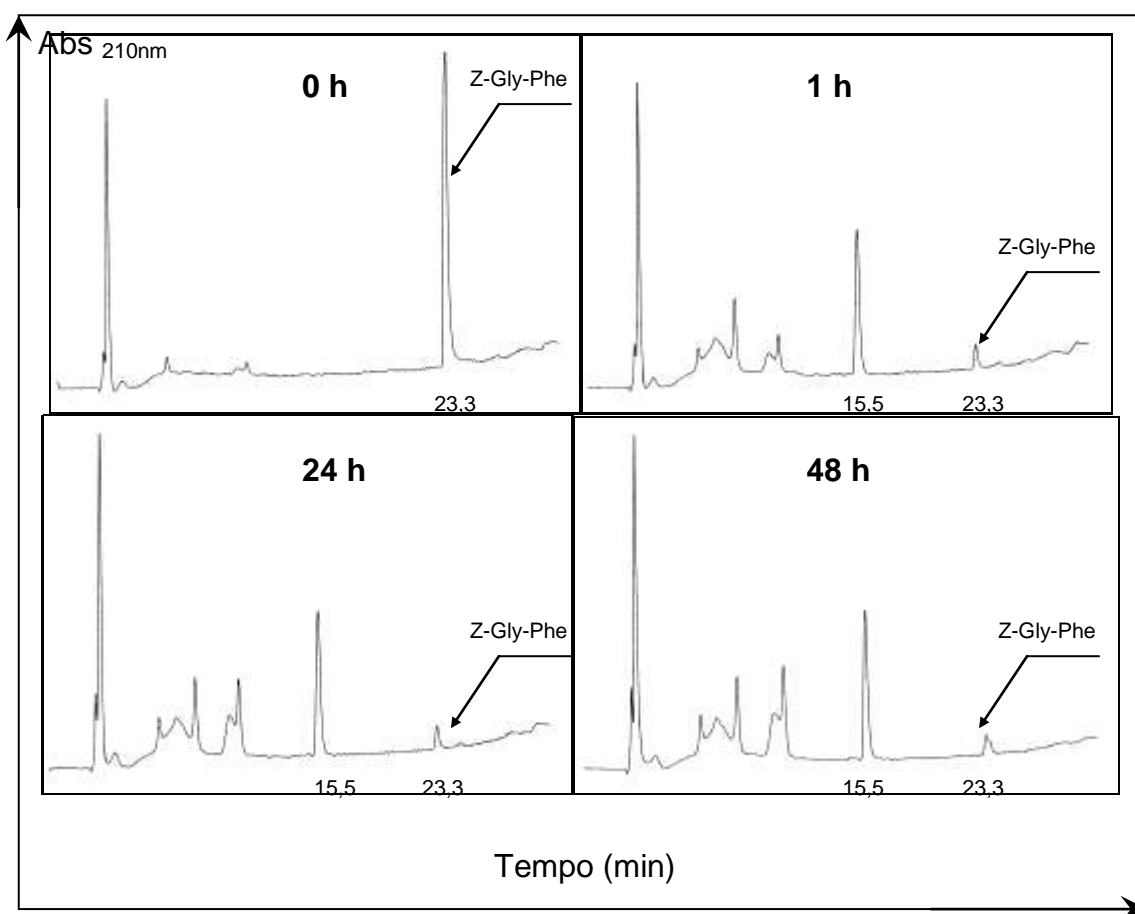


FIGURA 35: Perfis de RP-HPLC da reação de remoção do grupo Z de Z-Gly-Phe catalisada por cPPL. Condição de análise: gradiente linear = 5 a 95% de B em 30min, solvente A = 0,1% de TFA em água, solvente B = 60% de ACN em água contendo 0,1% de TFA, coluna = C₁₈ Vydac, 5 μ m, 300 \AA , 0,46 cm x 25cm, fluxo = 1mL/min e λ = 210nm.

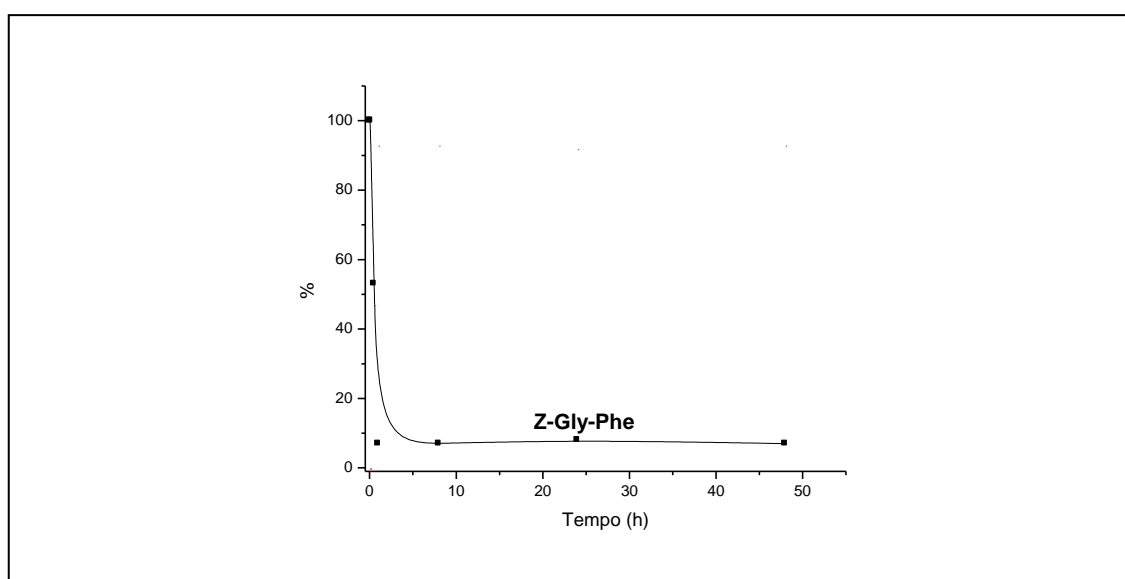


FIGURA 36: Curva de consumo de Z-Gly-Phe ao longo do tempo em presença de cPPL.

Esta reação também foi monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD). Diferentes formas de revelação foram empregadas (FIGURA 37): o borrifamento da placa com uma solução 0,2% de ninidrina em acetona seguida de aquecimento permitiu revelar os compostos com grupo amino livre (manchas coloridas em B; *Moore & Stein, 1948*); o borrifamento com uma solução HBr:HAc (1:1, *Stewart & Young, 1984*) seguido de borrifamento com uma solução 0,2% de ninidrina em acetona e aquecimento permitiu revelar todos os compostos que continham o grupo Z e que o perderam durante a incubação com cPPL (manchas de C).

Os resultados obtidos sugeriram que a cPPL foi capaz de remover o grupo Z de Z-Gly-Phe e que, portanto, um dos produtos formados no meio reacional (FIGURA 35) deve corresponder ao dipeptídeo livre (Gly-Phe). É provável que um outro produto corresponda a Z-Gly, pois como citado anteriormente a cPPL empregada parece conter carboxipeptidase A (TABELA 6) capaz de hidrolisar a ligação peptídica presente em Z-Gly-Phe (*Whitaker, 1966*). A confirmação destas hipóteses é importante e deve ser conseguida nos próximos meses.

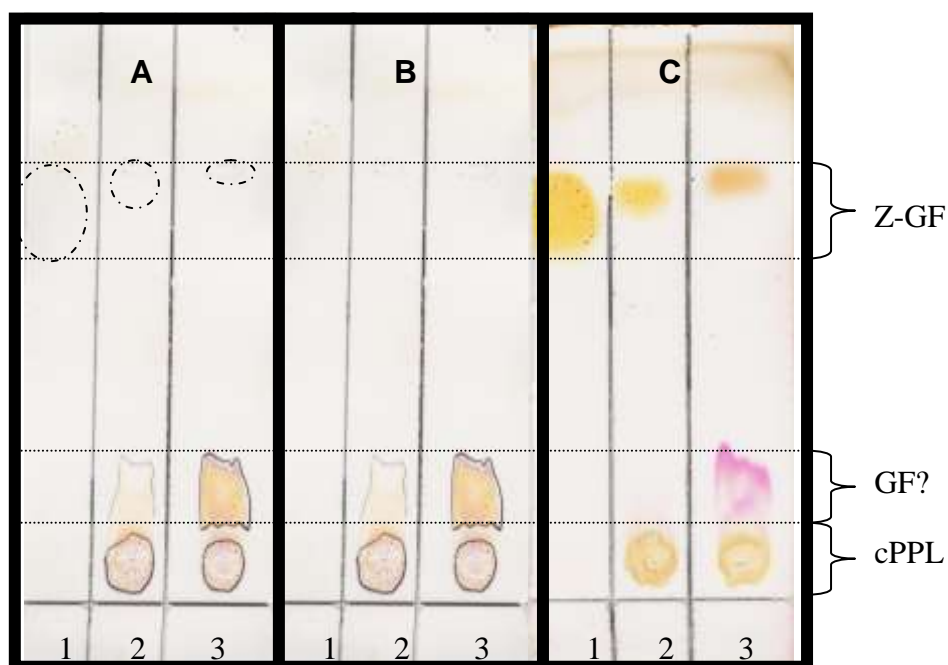


FIGURA 37: Cromatografia em camada delgada da incubação de Z-Gly-Phe com cPPL Padrão (1), tempo 0h (2) e tempo 1h (3). Eluente: CHCl₃:MeOH:HAc, 85:10:5, (v:v:v). Revelação: exposição à lâmpada UV, $\lambda=254\text{nm}$, e em seguida à solução 0,2% de ninidrina em acetona e aquecimento (A), exposição à solução 0,2% de ninidrina em acetona e aquecimento (B), exposição à solução de HBr:HAc (1:1) seguida de exposição à solução 0,2% de ninidrina em acetona e aquecimento (C).

5 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

a) Caracterização de preparações lipásicas comerciais

As lipases comerciais microbianas (CCLs) foram mais ativas do que as pancreáticas suínas (PPLs) na hidrólise de ésteres dos triglicerídeos presentes no óleo de oliva.

A caracterização das lipases adquiridas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (PAGE-SDS) se mostrou muito eficiente para: 1) detectar possíveis contaminantes proteásicos; 2) mostrar que as lipases microbianas apresentam alto grau de pureza.

A α -quimotripsina e a tripsina foram confirmadas como contaminantes proteásicos na cPPL e pPPL. Ambas as preparações lipásicas também estão contaminadas com peptídeos de pesos moleculares inferiores a 10 kDa e, provavelmente, com as carboxipeptidases A e B.

b) Estudo da síntese de Ac-Tyr-Gly-NH₂

Para a maioria das reações, a adição de trietilamina (para neutralizar o acceptor de acila Gly-NH₂.HCl) e o aumento da temperatura (de 22 para 37°C) resultaram em um aumento significativo no rendimento de formação do produto.

A melhor condição reacional encontrada para a síntese do dipeptídeo foi: sistema bifásico formado pela mistura n-hexano/tampão Tris-HCl 0,5M, pH 8,0 80/20, (v:v), 50mg/mL de lipase, 0,05M de DA, 0,5M de AA neutralizado com trietilamina, 37°C e 300 rpm.

Apesar de apresentar uma baixa atividade lipásica, a cPPL catalisou a formação de ligação peptídica mais eficientemente do que a pPPL e as duas CCLs (que apresentaram altas atividades lipásicas).

O dipeptídeo formado nas reações catalisadas por PPLs não se manteve estável, indicando a ocorrência de hidrólise secundária mediada pelos contaminantes

proteásicos contidos nestas preparações.

Os resultados obtidos neste estudo são qualitativamente superiores aos descritos na literatura.

Pela primeira vez foi demonstrada que a atividade esterásica do contaminante α -quimotripsina pode, de fato, contribuir para a eficiência da síntese de ligação peptídica catalisada por cPPL. Embora alguns autores tivessem comentado esta possibilidade, nenhum deles realizou estudo similar ao aqui descrito (*West & Wong, 1987, So e col., 1998*).

c) Estudo do efeito do conteúdo de n-hexano na eficiência da síntese de Z-Asp-Gly-NH₂

A cPPL se mostrou eficiente no meio contendo n-hexano/tampão provavelmente porque este sistema apresenta duas características importantes para a ação catalítica das lipases que são: 1) elevada estabilidade em n-hexano (*Ader e col., 1997*); 2) formação de interface hidrofóbica.

O aumento da percentagem de n-hexano no meio reacional, com conseqüente aumento da interface hidrofóbica, favoreceu a aminólise do intermediário acil-enzima em detrimento da hidrólise da mesma. Assim, este trabalho também é o primeiro a empregar o sistema bifásico n-hexano:tampão Tris-HCl, 0,5 M, pH 8,0 (80:20, v:v) em sínteses de peptídeos catalisada por cPPL nas quais os substratos são solúveis em tampão. Este sistema, portanto, pode ser a chave do sucesso conseguido.

d) Estudo da preferência de cPPL por ésteres de N α -acil-aminoácidos

No estudo sistemático inédito realizado a cPPL catalisou a hidrólise do éster metílico de todos os Z-aminoácidos testados. Entretanto, ela exibiu elevada preferência pelo éster metílico de Z-Lys, Z-Arg e Z-His, média preferência pelo de Z-Phe e Z-Tyr e baixa preferência pelo de Z-Asp, Z-Glu, Z-Gln, Z-Ser, Z-Thr e Z-

Leu. A α -quimotripsina parece contribuir para a média preferência por Z-Phe-OMe e Z-Tyr-OMe. O mesmo não ocorreu com a tripsina em relação à elevada preferência por Z-Lys-OMe e Z-Arg-OMe. Uma possível contribuição de carboxipeptidase A não foi excluída.

Durante a hidrólise do éster metílico de Z-Tyr, Z-Phe, Z-Leu, Z-Lys e de Z-Arg ocorreu a remoção do grupo Z. Portanto, dois produtos foram gerados nos meios reacionais: o Z-aminoácido e o aminoácido totalmente livre impossibilitando a determinação das velocidades iniciais destas reações.

A cPPL preferiu hidrolisar ésteres de Z ou Boc-Asp ao invés dos ésteres de Fmoc-Asp. Logo, a estrutura do grupo protetor influenciou na eficiência da hidrólise do éster.

A cPPL exibiu preferência pelo éster benzílico de substratos nos quais ele era associado aos protetores de grupo amino Z ou Boc: Z-Asp-OBzl e Boc-Asp-OBzl.

e) Estudo da remoção do grupo Z de Z-aminoácidos catalisada por cPPL

A cPPL catalisou a remoção do grupo Z de 11 dos 20 Z-aminoácidos proteinogênicos. Esta observação também é inédita e pode ser de grande utilidade em sínteses química e biocatalisadas de peptídeos ou mesmo em síntese orgânica.

Se consideradas as eficiências geralmente requeridas em processos sintéticos, esta reação é perfeitamente aplicável para Z-Tyr, Z-Phe, Z-Trp, Z-Lys, Z-Arg e Z-Leu.

Em geral, as reações de hidrólise da ligação éster de uretana formada entre o grupo Z e o aminoácido foram mais lentas do que as de hidrólise dos ésteres metílico, etílico, terc-butílico e benzílico. As velocidades iniciais obtidas no estudo com os 20 Z-aminoácidos proteinogênicos obedecem a seguinte ordem: Tyr > Phe > Ser > Gln > Lys > His > Trp > Leu > Met > Arg > Ile.

A reação de remoção do Z de Z-Gln se apresentou como um exemplo de reação

muito rápida inicialmente e que atinge o equilíbrio ainda quando os rendimentos de formação de produto são baixos. O mesmo parece ser verdadeiro para Z-His, Z-Ser e Z-Met, o que não é interessante sob o ponto de vista sintético.

Tendo em vista todos os resultados e conclusões obtidos nesta Tese é possível vislumbrar dois caminhos para a continuidade do projeto: i) explorar a aplicação de cPPL na química de peptídeos; ii) estudar a cPPL usando derivados de aminoácidos e peptídeos para esclarecer as reações biocatalisadas de transferência de fase aqui descritas e estabelecer as suas bases moleculares. Quanto ao primeiro pretende-se explorar: 1) a utilização da cPPL (livre e imobilizada) e o sistema bifásico descrito na síntese de dipeptídeos e tripeptídeos de interesse comercial; 2) a possibilidade de acoplamento entre fragmentos peptídicos (síntese de peptídeos maiores) catalisados por CCLs ou PPLs previamente purificadas ou tratadas com inibidores proteásicos específicos (projeto de Tese de doutorado de Patrícia B. Proti); 3) a possibilidade de remoção, mediada por cPPL, de protetores de grupo α -amino que formam ligação éster de uretana com peptídeos e outros compostos orgânicos. Quanto ao estudo da preparação enzimática pretende-se estabelecer a especificidade da cPPL na catálise da hidrólise do éster de $N\alpha$ -acil-aminoácidos empregando um protetor de grupo α -amino estável a ela, bem como identificar qual é a enzima presente em cPPL capaz de catalisar a remoção de Z observada. Este estudo deverá empregar lipase pancreática suína altamente purificada em reações-controle.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADER, U.; ANDERSCH, P.; BERGER, M.; GEORGENS, U.; HAASE, B.; HERMANN, J.; LAUMEN, K.; SEEMAYER, R.; WALDINGER, C.; SCHNEIDER, M. P., Screening Techniques for Lipase Catalyst Selection, *Method. Enzymol.*, 286: 351-385, 1997.

ALLEN, J.V. & WILLIAMS, J.M.J., Dinamic kinetic resolution with enzyme and palladium combinations, *Tetrahedron Lett.*, 37 (11): 1859-1862, 1996.

ALLEVI, P.; CIGHETTI, G.; ANASTASIA, M., Cleavage of Benzyloxycarbonyl-5-oxazolidinones to alpha-benzyloxycarbonylamino-alpha-alkyl esters by alcohols and sodium hydrogen carbonate, *Tetrahedron Lett.*, 42 (31): 5319-5321, 2001.

ALTREUTER, D.H.; DORDICK, J.S.; CLARK, D.S., Solid-phase peptide synthesis by ion-paired alpha-chymotrypsin in nonaqueous media, *Biotechnol. Bioeng.*, 81 (7): 809-817, 2003.

ARRIZON-LOPEZ, V.; BIEHLER, R.; CUMMINGS, J.; HARBAUGH, J., Beckman system 6300 high-performance amino acid analyzer, In: High-performance liquid chromatography of peptides and proteins: separation, analysis and conformation, Colin T. Mant & Robert S. Hodges (Eds.), CRC Press Inc.: Boca Raton, Florida, 859-863, 1991.

AULD, D.S. & HOLMQUIST, B., Carboxypeptidase A. Differences in the mechanisms of ester and peptide hydrolysis, *Biochemistry*, 13 (21): 4355-4361, 1974.

BALLESTEROS, A.; BERNABÉ, M.; CRUZADO, C.; MARTÍN-LOMAS, M.; OTERO, C., Regioselective deacylation of 1,6-anhydro-beta-D-galactopyranose derivatives catalyzed by soluble and immobilized lipases, *Tetrahedron*, 45 (22): 7077-7082, 1989.

BARANOWSKA, B.; CHMIELOWSKA, M.; WOLINSKA-WITORT, E.; ROGUSKI, K.; WASILEWSKA-DZIUBINSKA, E., The relationship between neuropeptides and hormones in starvaton, *Neuroendocrinol. Lett.*, 22 (5): 349-355, 2001.

BEHAN, D.P.; KHONGSALY, O.; LIU, X.J.; LING, N.; GOLAND, R.; NASMAN, B.; OLSSON, T.; DESOUZA, E.B., Measurement of corticotropin-releasing factor (CRF), CRF-binding protein (CRF-BP), and CRF/CRF-BP complex in human plasma by two-site enzyme-linked immunoabsorbant assay, *J. Clin. Endocr. Metab.*, 81 (7): 2579-2586, 1996.

BEMQUERER, M.P.; ADLERCREUTZ, P.; TOMINAGA, M., Pepsin-catalyzed peptide-synthesis in organic media – studies with free and immobilized enzyme, *Int. J. Pep. Protein Res.*, 44 (5): 448-456, 1994.

BEMQUERER, M.P.; LIRIA, C.W.; KITAGAWA, K.; MIRANDA, M. T. M.; TOMINAGA, M., Mixtures of Trifluoroethanol or Hexafluoroisopropanol and

Dimethylformamide are not of General Applicability for Peptide Condensations Catalyzed by Trypsin, *J. Pept. Res.*, 51: 29-37, 1998.

BEMQUERER, M.P.; THEOBALDO, F.C.; TOMINAGA, M., Pepsin-catalyzed peptide-synthesis in biphasic systems, *Biomed. Biochim. Acta.*, 50: 10-11, 1991.

BENEDETTI, F.; BERTI, F.; LINDA, P.; MIERTUS, S.; SABOT, A., Modeling of solvent effects in the activation of the lipase from *Rhizomucor miehei*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 6 (7): 839-844, 1996.

BERGMANN, M. & FRAENKEL-CONRAT, H., The enzymatic synthesis of peptide bonds, *J. Biol. Chem.*, 124: 1-6, 1938.

BODANSZKY, M., Peptide chemistry: a practical textbook, 2nd. edition, Heidelberg, Germany, Springer-Verlag Berlin, 1993.

BORDUSA, F., Enzymes for peptide cyclization, *Chembiochem*, 2 (6): 405-409, 2001.

BORDUSA, F., Proteases in organic synthesis, *Chem. Rev.*, 102 (12): 4817-4867, 2002a.

BORDUSA, F., Substrate mimetics in protease catalysis: Characteristics, kinetics, and synthetic utility, *Curr. Protein Pept. Sci.*, 3 (2): 159-180, 2002b.

BORDUSA, F.; DAHL, C.; JAKUBKE, H. D.; BURGER, K.; KOKSCH, B., Synthesis of alpha-fluoroalkyl substituted peptides via enzymatic fragment condensation, *Tetrahedron: Asymmetr.*, 10 (2): 307-313, 1999.

BORGIA, J.A. & FIELDS, G.B., Chemical synthesis of proteins. *Tibtech.*, 18, 243-251, 2000.

BORREGUERO, I.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V.; RUMBERO, A.; HERMOSO, J. A.; ALCÁNTRA, A. R., Regioselective resolution of 1,n-diols catalyzed by lipases; a rational explanation of the enzymatic selectivity, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 11: 1013-1024, 2001.

BOTTA, M.; CERNIA, E.; CORELLI, F.; MANETTI, F.; SORO, S.; Probing the substrate specificity for lipases. II. Kinetic and modelin studies on the molecular reecognition of 2-arylpropionic esters by *Candida rugosa* and *Rhizomucor miehei* lipases, *Biochim. Biophys. Acta*, 1337, 302-310, 1997.

BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A.M.; DEREWENDA, Z.S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J.P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGE-JENSEN, B.; NORSKOV, L.; THIM, L.; MENGE, U., A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase, *Nature*, 343 (6260): 767-770, 1990.

BREDDAM, K.; WIDMER, F.; MELDAL, M., Amidation of growth-hormone releasing-factor (1-29) by serine carboxypeptidase catalyzed transpeptidation, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 37 (2): 153-160, 1991.

BRÍGIDO, M.M. & MARANHÃO, A.Q., Bibliotecas apresentadas em fagos, *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 26: 44-51, 2002.

BROMER, W.W.; SINN, L.G.; STAUB, A.; BEHRENS, O.K., The amino acid sequence of glucagons, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (15): 3858-3860, 1956.

BRZOWSKI, A.M.; DEREWENDA, U.; DEREWENDA, Z.S.; DODSON, G.G.; LAWSON, D.M.; TURKENBURG, J.P.; BJORKLING, F.; HUGEJENSEN, B.; PATKAR, S.A.; THIM, L., A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex, *Nature*, 351 (6326): 491-494, 1991.

BURRIT, J.B.; BOND, C.W.; DOSS, K.W.; JESAITIS, A.J., Filamentous phage display of oligopeptide libraries, *Anal. Biochem.*, 238: 1-13, 1996.

BYRON, R. Lipases part A: biotechnology, ed. *Method. Enzymol.*, v. 284, ed. Orlando Academic Press, 1997.

CANTLEY, L.C. & TURK, B.E., The use of peptide libraries to define substrates and inhibitors of proteases, *Biopolymers*, 71 (3): L13, 2003.

CARTIER, G.E.; YOSHIKAMI, D.J.; GRAY, W.R.; LUO, S.Q.; OLIVERA, B.M.; MCINTOSH, J.M., A new alpha-conotoxin which targets alpha 3 beta 2 nicotinic acetylcholine receptors, *J. Biol. Chem.* 271 (13): 7522-7528, 1996.

CEBRIAN, J.; DOMINGO, V.; REIG, F., Synthesis of peptide sequences related to thrombospondin: factors affecting aspartimide by-product formation, *J. Pept. Res.*, 62 (6): 238-244, 2003.

CEROVSKY, V. & BORDUSA, F., Protease-catalyzed fragment condensation via substrate mimetic strategy: a useful combination of solid-phase peptide synthesis with enzymatic methods, *J. Pept. Res.*, 55 (4): 325-329, 2000.

CEROVSKY, V.; KOCKSKÄMPER, J.; GLIETSCH, H.G.; BORDUSA, F., Semisynthesis of Ht31(493-515): Involvement of PKA-Anchoring Proteins in the Regulation of the cAMP-Dependent Chloride Current in Heart Cells, *CHEMBIOCHEM*, 1 (2): 126-129, 2000

CHAILLOU, E.; BAUMONT, R.; TRAMU, G.; TILLET, Y., Long-term undernutrition followed by short-term refeeding effects on the corticotropin-releasing hormone containing neurones in the paraventricular nucleus: An immunohistochemical study in sheep, *J. Neuroendocrinol.*, 14 (4): 269-275, 2002.

CHAMORRO, C.; GONZÁLEZ-MUÑIZ, R.; CONDE, S., Regio- and enantioselectivity of the *Candida antarctica* lipase catalyzed amidations of Cbz-L- and Cbz-D-glutamic acid diesters, *Tetrahedron-asymmetr.*, 6 (9): 2343-2352, 1995.

CHEN, S.-T.; LIN, S.-L.; HSIAO, S.-C.; WANG, K.-T., One-pot synthesis of cathepsin inhibitors: N α -protected N-peptidyl-o-acetyl hydroxylamines catalysed by alcalase followed by lipase in anhydrous t-butanol, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2

(12): 1685-1690, 1992.

CHEN, S.-T.; TSAI, C.-F.; WANG, K.-T., Incorporation of unnatural amino acid derivatives into a peptide bond via an oxime ester catalysed by papain or lipase, *Chem. Commun.*, (2):165-166, 1996.

CHENG, E.; MIRANDA, M.T.M.; TOMINAGA, M., Thermolysin and alphachymotrypsin mediated synthesis of triptides containing proline, *Int. J. Pep. Protein Res.*, 31 (2): 116-125, 1988.

CHIOU, A.-J.; WU, S.-H.; WANG, K.-T., Enantioselective hydrolysis of hydrophobic amino acid derivatives by lipases, *Biotechnol. Lett.*, 14 (6): 461-464, 1992.

CHO, Y.K. & NORTHROP, D.B., Transpeptidation by porcine pepsin catalyzed by a noncovalent intermediate unique to its iso-mechanism, *J. Biol. Chem.*, 273 (38): 24305-24308, 1998.

CLAPES, P.; ESPELT, L.; NAVARRO, M.A.; SOLANS, C., Highly concentrated water-in-oil emulsions as novel reaction media for protease-catalysed kinetically controlled peptide synthesis, *J. Chem. Soc. Perk. T.*, 2 (8): 1394-1399, 2001.

COLEMAN, R.S. & CARPENTER, A.J., Synthesis of the Aziridino[1,2-a]pyrrolidine substructure of the antitumor agents azinomycin A and B, *J. Org. Chem.*, 57 (22): 5813-5815, 1992.

COLLINS, Y.F.; MCSWEENEY, P.L.H.; WILKINSON, M.G., Evidence of a relationship between autolysis of starter bacteria and lipolysis in Cheddar cheese during ripening, *J. Dairy Res.*, 70 (1): 105-113, 2003.

CONDE, S. & LÓPEZ-SERRANO, P., Regioselective lipase-catalysed amidation of N-blocked L- and D-aspartic acid diesters, *Eur. J. Org. Chem.*, 5: 922-929, 2002.

CONDE, S.; SERRANO, P.L.; FIERROS, M.; BIEZMA, M.I.; MARTINEZ, A.; FRANCO, M.I.R., Regioselective lipase-catalyzed synthesis of L-glutamic α -monoamide derivatives effect of the N-blocking group, *Tetrahedron*, 53 (34): 11745-11752, 1997.

CONDE, S. & LÓPEZ-SERRANO, P., MARTINEZ, A. Regioselective lipase-catalysed gamma-monoamidation of D-glutamic acid diesters: effect of the N-protecting group, *Tetrahedron Asymmetr.*, 11 (12): 2537-2545, 2000.

CYGLER, M.; GROCHULSKI, P.; KAZLAUSKAS, R.J.; SCHRAG, J.D.; BOUTHILLIER, F.; RUBIN, B.; SERRIQI, A.N.; GUPTA, A.K., A structural basis for the chiral preferences of lipases, *J. Am. Chem. Soc.*, 116: 3180-3186, 1994.

DANILEWSKI, B., The organoplastic forces of the organism (in Russian), in *Comprehensive Biochemistry*, Vol. 32, Elsevier, Amsterdam, 1977.

DAVEY, M.W.; ROMMELAERE, H.; DEBOECK, S.; GOETHALS, M.; VANDAMME, J.; VANDEKERCKHOVE, J., Trypsin-mediated semisynthesis of salmon-calcitonin, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 45 (4): 380-385, 1995.

DAVOLL, H.; TURNER, R.A.; PIERCE, J.G.; DUVIGNEAUD, V., An investigation of the free amino groups in oxytocin and desulfurized oxytocin preparations, *J. Biol. Chem.*, 93 (1): 363-370, 1951.

DE MARTIN, L.; EBERT, C.; GARDOSI, L.; LINDA, P., High isolated yields in thermolysin-catalysed synthesis of Z-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester in toluene at controlled water activity, *Tetrahedron Lett.*, 42 (19): 3395-3397, 2001.

DEREWENDA, Z.S.; DEREWENDA, U.; DODSON, G.G., The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1,9 Å Resolution, *J. Mol. Biol.*, 227: 818-839, 1992.

DESCHREVEL B.; VINCENT, J.C.; RIPOLL, C.; THELLIER, M., Thermodynamic parameters monitoring the equilibrium shift of enzyme-catalyzed hydrolysis/synthesis reactions in favor of synthesis in mixtures of water and organic solvent, *Biotechnol. Bioeng.*, 81 (2): 167-177, 2003.

DU VIGNEAUD, V.; LAWLER, H.C.; POPENOE, E.A., Enzymatic cleavage of glycinamide from vasopressin and a proposed structure for this pressor-antidiuretic hormone of posterior pituitary, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (19): 4880-4881, 1953.

DUERFAHRT, T.; DOEKEL, S.; SONKE, T.; QUAEDFLIEG, P.J.L.M.; MARAHIEL, M.A., Construction of hybrid peptide synthetases for the production of alpha-L-aspartyl-L-phenylalanine, a precursor for the high-intensity sweetener aspartame, *Eur. J. Biochem.*, 270 (22): 4555-4563, 2003.

EASWAR, S.; ARGADE, N.P., Amano PS-catalysed enantioselective acylation of (+/-)-alpha-methyl-1,3-benzodioxole-5-ethanol: an efficient resolution of chiral intermediates of the remarkable antiepileptic drug candidate, (-)-talampanel, *Tetrahedron-Asymmetr.* 14 (3): 333-337, 2003.

ERDÉLYI, M. & GOGOLL, A., Rapid microwave-assisted solid phase peptide synthesis, *Synthesis*, 11: 1592-1596, 2002.

FABER, K., Biotransformations in Organic Chemistry, A Textbook 3rd Edition, Springer, 1997.

FADNAVIS, N.W. & DESHPANDE, A., Synthetic applications of enzymes entrapped in reverse micelles & organo-gels, *Curr. Org. Chem.*, 6 (4): 393-410, 2002.

FAN, K.K.; OUYANG, P.; WU, X.J.; LU, Z.H., Enhancement of the activity of papain in mixed reverse micellar systems in the presence of Tween80, *J. Chem. Technol. Biot.*, 76 (1): 27-34, 2001.

FERJANCICBIAGINI, A.; GAERTNER, H.; PUIGSERVER, A., Papain-catalyzed hydrolysis of and amino-acid-incorporation into BSA and ZEIN substrates in low water-organic media, *J. Agr. Food Chem.*, 41 (7): 1152-1157, 1993.

FIELDS, G.B., Solid-phase peptide synthesis, ed. *Methods in Enzymology*, Academic Press: New York, USA, v.289, 1997.

FITE, M.; ÁLVARO, G.; CLAPES, P.; LOPEZ-SANTIN, J.; BENAIGES, M.D.; CAMINAL, G., Reactivity of easily removable protecting groups for glycine in peptide synthesis using papain as catalyst, *Enzyme Microb. Technol.*, 23 (3-4): 199-203, 1998.

FITE, M.; CLAPES, P.; LOPEZ-SANTIN, J.; BENAIGES, M.D., Caminal, G., Integrated process for the enzymatic synthesis of the octapeptide PhAcCCK-8, *Biotechnol. Progr.*, 18 (6): 1214-1220, 2002.

FRANK, R., The SPOT-synthesis technique - synthetic peptide arrays on membrane supports - principles and applications, *J. Immunol. Methods*, 267 (1): 13-26, 2002.

FRANSEN, M.C.R.; JONGEJAN, H.; KOOIJMAN, H.; SPEK, A.L.; MONDRIL, N.L.F.L.C.; SANTOS, P.M.A.C.B.; GROOT, A., Resolution of a tetrahydrofuran ester by *Candida rugosa* lipase (CRL) and an examination of CRL's stereochemical preference in organic media, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 7 (2): 497-510, 1996.

GARCIA-URDIALES, E.; REBOLLEDO, F.; GOTOR, V., Enzymatic one-pot resolution of two nucleophiles: alcohol and amine, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 11 (7): 1459-1463, 2000.

GARCIA-URDIALES, E.; REBOLLEDO, F.; GOTOR, V., Kinetic resolution of (+/-)-1-phenylbutan-1-ol by means of CALB-catalyzed aminolyses: A study on the role of the amine in the alcohol resolution, *Adv. Synth. Catal.*, 343 (6-7): 646-654, 2001.

GARDOSSI, L.; BIANCHI, D.; KLIBANOV, A.M., Selective acylation of peptides catalyzed by lipases in organic solvents, *J. Am. Chem. Soc.*, 113: 6328-6329, 1991.

GERISCH, S.; JAKUBKE, H.-D.; KREUZFELD, H.J., Enzymatic peptide synthesis in frozen aqueous systems: Use of N-alpha-unprotected unusual acyl donors, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 6 (12): 3039-3045, 1995.

GETUN, I.V.; FILIPPOVA, I.Y.; LYSOGORSKAYA, E.N.; OKSENOIT, E.S., SDS-subtilisin catalyzed synthesis of tetra-peptides containing multifunctional amino acid residues in ethanol, *J. Mol. Catal. B-Enzym*, 15: 105-110, 2001.

GEWEHR, M.; BRAUN, P.; SEITZ, O.; KUNZ, H., Enzymatic hydrolysis of hydrophilic esters by lipases in the synthesis of peptides and glycopeptides, In *Peptides 1996*, Robert Ramage and Roger Epton (Eds), The European Peptide

Society, 421-422, 1998.

GEYSEN, H.M. & MASON, T.J., Screening chemically synthesized peptide libraries for biologically-relevant molecules, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3 (3): 397-404, 1993.

GHANEM A., The utility of cyclodextrins in lipase-catalyzed transesterification in organic solvents: enhanced reaction rate and enantioselectivity, *Org. Biomol. Chem.* 1 (8): 1282-1291, 2003.

GILL, I.; LOPEZFANDINO, R.; VULFSON, E., Enzymatic oligopeptide synthesis using a minimal protection strategy - sequential assembly of a growing oligopeptide chain, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (23): 6175-6181, 1995.

GORMAN, J.J., An apparatus for simultaneous manual solid-phase synthesis of multiple peptide analogs, *Anal. Biochem.* 136 (2): 397-406, 1984.

GROCHULSKI, P.; LI, Y.G.; SCHRAG, J. D.; BOUTHILLIER, F.; SMITH, P.; HARRISON, D.; RUBIN, B.; CYGLER, M., Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase, *J. Biol. Chem.*, 268: 12843-12847, 1993.

GUM, A.G.; KAPPES-ROTH, T.; WALDMANN, H., Enzyme-labile protecting groups in peptide synthesis: Development of glucose- and galactose-derived urethanes, *Chem.-Eur. J.*, 6 (20): 3714-3721, 2000.

GÜNTHER, R.; STEIN, A.; BORDUSA, F., Investigations on the enzyme specificity of clostripain: a new efficient biocatalyst for the synthesis of peptide isosteres, *J. Org. Chem.*, 65 (5): 1672-1679, 2000.

GUO, L.; ZHANG, L.Z.; LU, Z.M.; XU, Z., Synthesis of a CCK-8C-terminal tripeptide derivative catalyzed by immobilized enzyme, *Acta Chim. Sinica*, 61 (3): 406-410, 2003.

HAENSLER, M.; ULLMANN, G.; JAKUBKE, H.-D., The application of papain, ficin and clostripain in kinetically controlled peptide synthesis in frozen aqueous solutions, *J. Pept. Sci.*, 1: 283-287, 1995.

HAENSLER, M.; WEHOFSKY, N.; GERISCH, S.; WISSMANN, J.-D.; JAKUBKE, H.-D., Reverse catalysis of elastase from porcine pancreas in frozen aqueous systems, *Biol. Chem.*, 379 (1): 71-74, 1998.

HARA, S. & YAMAKAWA, M., Production in *Escherichia coli* of moricin, a novel type antibacterial peptide from the silkworm, *Bombyx mori*, *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 220 (3): 664-669, 1996.

HARRIS, J.I. & LERNER, A.B., Amino-acid sequence of the alpha-melanocyte-stimulating hormone, *Nature*, 179 (4574): 1346-1347, 1957.

HARRISON, S.J.; MCMANUS, A.M.; MARCUS, J.P.; GOULTER, K.C.; GREEN,

J.L.; NIELSEN, K.J.; CRAIK, D.J.; MACLEAN, D.J.; MANNERS, J.M., Purification and characterization of a plant antimicrobial peptide expressed in *Escherichia coli*, *Protein Expres. Purif.*, 15 (2): 171-177, 1999.

HE, S.; BAUMAN, D.; DAVIS, J.S.; LOYOLA, A.; NISHIOKA, K.; GRONLUND, J.L.; REINBERG, D.; MENG, F.Y.; KELLEHER, N.; MCCAFFERTY, D.G., Facile synthesis of site-specifically acetylated and methylated histone proteins: Reagents for evaluation of the histone code hypothesis, *P. Natl. Acad. Sci.*, 100 (21): 12033-12038, 2003.

HERRMANN, G.; SCHWARZ, A.; WANDREY, C.; KULA, M. R., KNAUP, G., DRAUZ, K. H.; BERNDT, H., Scale-up of enzymatic peptide synthesis in an enzyme membrane reactor, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 13 (3): 346-353, 1991.

HÖGGER, H.-E.; EDLUND, H.; BERGLUND, P.; HEDNSTRÖM, E., Water Activity Influences Enantioselectivity in a lipase-catalysed resolution by esterification in an organic solvent, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 4 (10): 2123-2126, 1993.

HÖKFELT, T.; BROBERGER, C.; XU, Z.Q.D.; SERGEYEV, V.; UBINK, R.; DIEZ, M., Neuropeptides – an overview, *Neuropharmacology*, 39, 1337-1356, 2000.

HOLMAN, G.M.; NACHMAN, R.J.; COAST, G.M., Isolation, characterization and biological activity of a diuretic myokinin neuropeptide from the housefly, *Musca domestica*, *Peptides*, 20 (1): 1-10, 1999.

HOUNG, J.-Y.; WU, M.-L.; CHEN, S.-T., Kinetic resolution of amino acid esters catalyzed by lipases, *Chirality*, 8: 418-422, 1996.

HUANG, W.Z.; BEHARRY, Z.; ZHANG, Z.; PALZKILL, T., A broad-spectrum peptide inhibitor of beta-lactamase identified using phage display and peptide arrays, *Protein Eng.*, 16 (11): 853-860, 2003.

IROKAWA, A., Estudo Metodológico de Síntese Enzimática do Tripeptídeo Z-Cys(SBzl)-Tyr-IleOBut, Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química da USP, São Paulo, 1989.

ISOWA, Y.; OHMORI, M.; ICHIKAWA, T.; MORI, K.; NONAKA, Y.; KIHARA, K.; OYAMA, K.; SATOH, H.; NISHIMURA, S., The thermolysin-Catalysed condensation reactions of N-substituted aspartic and glutamic acids with phenylalanine alkyl esters, *Tetrahedron Lett.*, 28: 2611-2612, 1979.

IVANOV, I.P.; YOMTOVA, V.M.; PETKOV, D.D., Semispecific ester substrates of trypsin as acyl donors in kinetically controlled peptide synthesis, *Biocatal. Biotransfor.*, 14: 195-204, 1997.

JACOBSEN, R.B.; DELACRUZ, R.G.; GROSE, J.H.; MCINTOSH, J.M.; YOSHIKAMI, D.; OLIVERA, B.M., Critical residues influence the affinity and selectivity of alpha-conotoxin MI for nicotinic acetylcholine receptors, *Biochemistry-US*, 38 (40): 13310-13315, 1999.

JAKUBKE, H.-D., Protease-catalyzed peptide synthesis: basic principles, new synthesis strategies and medium engineering, *J. Chin. Chem. Soc.*, 41: 355-370, 1994.

JAKUBKE, H.-D., Peptide ligases-tools for peptide synthesis, *Angew. Chem. Int. Edit.*, 34 (2): 175-177, 1995.

JAKUBKE, H.D.; KUHL, P.; KONNECKE, A., Basic principles of protease-catalyzed peptide-bond formation, *Angew. Chem. Int. Edit.*, 24 (2): 85-93, 1985.

JANES, L.E.; KAZLAUSKAS, R.J., Empirical rules for the enantioselectivity of lipase from *Aspergillus niger* toward secondary alcohols and carboxylic acids, specially α -amino acids, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 8(22): 3719-3733, 1997.

JANSSEN, A.E.M.; VAIDYA, A.M.; HALLING, P.J., Substrate specificity and kinetics of *Candida rugosa* lipase in organic media, *Enzyme Microb. Tech.*, 18: 340-346, 1996.

JAROWICKI; K. AND KOCIENSKI; P., Protecting Groups, *J. Chem. Soc. Perk. T.*, 1: 2109-2135, 2001.

JUVVADI, P.; VUNNAM, S.; YOO, B.; MERRIFIELD, R.B., Structure-activity studies of normal and retro pig cecropin-melittin hybrids, *J. Pept. Res.*, 53 (3): 244-251, 1999.

KAISER, E.T.; 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, 595-598, 1970.

KAWASHIRO, K.; KAISO, K.; MINATO, D.; SUGIYAMA, S.; HAYASHI, H., Lipase-catalyzed peptide synthesis using Z-amino acid esters as acyl donors in aqueous water-miscible organic solvents, *Tetrahedron*, 49 (21): 4541-4548, 1993.

KEIL, B., Trypsin, in *The Enzymes*, 3rd Ed., Part III, Boyer, P. D. (Ed.), Academic Press: New York, 249, 1971.

KELLY, K.A. & JONES, D.A., Isolation of a colon tumor specific binding peptide using phage display selection, *Neoplasia*, 5 (5): 437-444, 2003.

KIM, K. K.; SONG, H. K.; SHIN, D. H.; HWANG, K.Y.; SUH, S. W., The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor, *Structure*, 5 (2): 173-185, 1997.

KIM, S.H.; PARK, B.S.; YUN, F.Y.; JE, Y.H.; WOO, S.D.; KANG, S.W.; KIM, K.Y.; KANG, S.K., Cloning and expression of a novel gene encoding a new antibacterial peptide from Silkworm, *Bombyx mori*, *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 246: 388-392, 1998.

KITAGUCHI, H., In *Enzymatic Reactions in Organic Media*, Koskinen, A. M. P.;

Klibanov, A. M., eds.; Blackie Academic & Professional: London, p. 224, 1996.

KITAGUCHI, H.; TAI, D.-F.; KLIBANOV, A. M., Enzymatic formation of an isopeptide bond involving the ϵ -amino group of Lysine, *Tetrahedron Lett.*, 29(43): 5487-5488, 1988.

KLEIN, J.U.; PRYKHODZKA, A.; CEROVSKY, V., The applicability of subtilisin Carlsberg in peptide synthesis, *J. Pept. Sci.*, 6 (11): 541-549, 2000.

KLIBANOV, A., Enzyme stabilization by immobilization, *Anal. Biochem.*, 93: 1-25, 1979.

KOCIENSKI; P.J., Protecting Groups, Thieme, Foundations of Organic Chemistry Series, 1994

KOHLI, R.M.; WALSH, C.T.; BURKART, M.D., Biomimetic synthesis and optimisation of cyclic peptide antibiotics, *Nature*, 418, 658-661, 2002.

KOPCHICK, J.J., History and future of growth hormone research, *Horm. Res.*, 60: 103-112 Suppl. 3, 2003.

KOSKINEN, A.M.P.; KLIBANOV, A.M., Enzymatic Reactions in Organic Media, Blackie Academic & Professional, London, UK, 1996.

KUHL, P.; EICHHORN, U.; JAKUBKE, H.-D., Enzymatic peptide-synthesis in microaqueous, solvent-free systems, *Biotechnol. Bioeng.*, 45 (3): 276-278, 1995.

KUNUGI, S.; YANAGI, Y.; KITAYAKI, M.; TANAKA, N.; UEHARAKUNUGI, Y.B., Effects of high-pressure on the activity and spectroscopic properties of carboxypeptidase Y, *Chem. Soc. Jpn.*, 70 (6): 1459-1463, 1997.

KUNZ, H.; KOWALCZYK, D.; BRAUN, P., BRAUN, G., Enzymatic hydrolysis of Hydrophilic diethyleneglycol and polyethyleneglycol esters of peptides and glycopeptides by lipases, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33 (3): 336-339, 1994.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M., Principles of Biochemistry, Worth Publishers: New York, 1993.

LENARDÃO, E.J.; FREITAG, R.A.; DABDOUB, M.J.; BATISTA, A.C.F.; SILVEIRA, C.C., "Green chemistry" – os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa, *Quim. Nova*, 25 (1): 123-129, 2003.

LIN, S.M. & LOWE, C.R., C-terminal labeling of immunoglobulin G with a cysteine derivative by carboxypeptidase Y catalyzed transpeptidation, *Anal. Biochem.*, 285 (1): 127-134, 2000.

LIRIA, C. W.; BEMQUERER, M. P.; MIRANDA, M. T. M., Premature Removal of N^α-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl in Thermodynamically Controlled Enzymatic Coupling Trials, *Tetrahedron Lett.*, 39: 4207-4210, 1998.

LIRIA, C.W.; BORDUSA, F.; MIRANDA, M.T.M., Peptide synthesis mediated by lipases: further studies and new perspective, In *Peptides 2002*; Benedetti, E.; Pedone, C., eds.; Edizioni Ziino: Napoli, 222-223, 2002.

LIRIA, C.W.; MIRANDA, M.T.M., Influence of reaction conditions on peptide bond formation catalyzed by lipases, In *Peptides 2000*; Martinez, J.; Fehrents, J.-A., eds.; EDK: Paris, 331-232, 2001.

LIU, P.; TIAN, G. L.; LEE, K. S.; WONG, M. S.; YE, Y. H., Full enzymatic synthesis of a precursor of bioactive pentapeptide OGP(10-14) in organic solvents, *Tetrahedron Lett.*, 43 (13): 2423-2425, 2002a.

LIU, P.; YE, Y.H.; TIAN, G.L.; LEE, K.S.; WONG, M.S.; LO, W.H., Synthesis of a precursor of bioactive pentapeptide OGP(10-14) and the fragment of enkephalin catalyzed by MCM-22 immobilized or free proteases in organic solvents, *Synthesis-Stuttgart*, 6: 726-732, 2002b.

LOPEZ-GARCIA, M.; ALFONSO, I.; GOTOR, V., Synthesis of (R)-3,4-diaminobutanoic acid by desymmetrization of dimethyl 3-(benzylamino)glutarate through enzymatic ammonolysis, *J. Org. Chem.*, 68 (2): 648-651, 2003.

LORENZINI, D.M.; FUKUZAWA, A.H.; DA-SILVA, P.I.; MACHADO-SANTELLI, G.; BIJOVSKI, A.T.; DRAFRE, S., Molecular cloning, expression analysis and cellular localization of gomesin, an anti-microbial peptide from hemocytes of the spider, *Acanthoscurria gomesiana*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 33: 1011-1016, 2003.

LOWTHER, W.T. & DUNN, B.M., The promiscuous active site specificity binding preferences of the fungal aspartic proteinase, Rhizopuspepsin, *Protein Peptide Lett.*, 5 (6): 303-316, 1998.

LUU, T.; PHAM, S.; DESHPANDE, S., Automated multiple peptide synthesis: Improvements in obtaining quality peptides, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 47 (1-2): 91-97, 1996.

MACHADO, A.; LIRIA, C.W.; PROTI, P.B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M.T.M., Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações, *Quim. Nova*, 2004. Aceito para publicação.

MARCZAK, E.D.; LIPKOWSKI, A.W., Application of lipases for enantioselective preparation of N-protected amino acid, In *Peptides 1998*, Sándor Bajusz and Ferenc Hudecz (Eds) The European Peptide Society, Akadémiai Kiadó, Budapest, 138-139, 1999.

MARGOLIN, A. L. & KLIBANOV, A. M., Peptide synthesis catalyzed by lipases in anhydrous organic solvents, *J. Am. Chem. Soc.*, 109: 3902-3804, 1987.

MARSHALL, G.R., Solid-phase synthesis: A paradigm shift, *J. Pept. Sci.*, 9 (9): 534-544, 2003.

MARTINEZ, A.; LANOT, C.; PEREZ, C.; CASTRO, A.; LOPEZ-SERRANO, P.;

CONDE, S., Lipase-catalysed synthesis of new acetylcholinesterase inhibitors: N-benzylpiperidine amino acid derivatives, *Bioorgan. Med. Chem.*, 8 (4): 731-738, 2000.

MARUYAMA, T.; NAGASAWA, S.I.; GOTO, M., Enzymatic synthesis of sugar amino acid esters in organic solvents, *J. Biosci. Bioeng.*, 94 (4): 357-361, 2002.

MARUYAMA, T.; NAKAJIMA, M.; KONDO, H.; KAWASAKI, K.; SEKI, M.; GOTO, M., Can lipases hydrolyze a peptide bond?, *Enzyme Microb. Tech.*, 32(6): 655-657, 2003.

MATOS, J.R.; WEST, J.B.; WONG, C.-H., Lipase catalyzed synthesis of peptides: preparation of a penicillin G precursor and other peptides, *Biotechnol. Lett.*, 9(4), 233-236, 1987.

MERRIFIELD, B. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2154, 1963.

MIHARA, H.; XU, M.; NISHINO, N.; FUJIMOTO, T., Application of tryptic condensation strategy for the synthesis of alpha-melanocyte stimulating hormone, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 41 (4): 405-410, 1993.

MIRANDA, L.P. & ALEWOOD, P.F., Accelerated chemical synthesis of peptides and small proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 1181-1186, 1999.

MIRANDA, M.T.M.; CHENG, E.; MURADIAN, J.; SEIDEL, W.F.; TOMINAGA, M., Thermolysin as a catalyst in enzymatic-synthesis of asparagine-containing peptides, *Bioorg. Chem.*, 14 (2): 182-193, 1986.

MIRANDA, M.T.M. & TOMINAGA, M., Thermolysin as a catalyst in enzymatic-synthesis of asparagines-containing peptides-II, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 37: 128-133, 1991.

MIRANDA, M.T.M.; THEOBALDO, F.C.; TOMINAGA, M., Transesterification of peptide esters and peptidyl resins in methanol-containing calcium acetate, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 37: 451-456, 1991.

MIYAZAWA, T.; HIRAMATSU, M.; MURASHIMA, T.; YAMADA, T., *Aspergillus melleus* protease-catalyzed peptide synthesis using the carbamoylmethyl ester as an acyl donor in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol/N,N-dimethylformamide, *Biotechnol. Lett.*, 24 (23): 1945-1949, 2002.

MIYAZAWA, T.; IWANAGA, H.; UEJI, S.; YAMADA, T., Porcine pancreatic lipase catalyzed enantioselective hydrolysis of esters of N-protected unusual amino acids, *Chem. Lett.*, 12: 2219-2222, 1989.

MIYAZAWA, T.; MIO, M.; WATANABE, Y.; YAMADA, T.; KUMATA, S., Lipase-catalyzed transesterification procedure for the resolution of non-protein amino acids, *Biotechnol. Lett.*, 14 (9): 789-794, 1992.

MOORE, S. & STEIN, W.H., Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids, *J. Biol. Chem.*, 176 (1): 367-388, 1948.

MOREE, W.J.; SEARS, P.; KAWASHIRO, K.; WITTE, K.; WONG, C.H., Exploitation of subtilisin BPN' as catalyst for the synthesis of peptides containing noncoded amino acids, peptide mimetics and peptide conjugates, *J. Am. Chem. Soc.* 119 (17): 3942-3947, 1997.

MORIHARA, K.; OKA, T.; TSUZUKI, H.; TOCHINO, Y.; KANAYA, T., Achromobacter protease I-catalyzed conversion of porcine insulin into human insulin, *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 92 (2): 396-402, 1980.

MORIS, F.; GOTOR, V., Selective aminoacylation of nucleosides through an enzymatic reaction with oxime aminoacyl esters, *Tetrahedron*, 50(23): 6927-6934, 1994.

NASCIMENTO, M.; DA COSTA NETO, P.R.; MAZZUCO, L.M., Biotransformação de óleos e gorduras, *Biotecnologia*, 19: 28-35, 2001

NICOLAU, A.; KOKOTOS, G.; CONSTANTINOV-KOKOTOS, V.; RANSAC, S.; VERGER, R.; GIBBONS, W.A., The inhibition of pancreatic lipase and phospholipase A2 by lipid mimetics and lipopeptides, In *Peptides 1996*, Robert Ramage and Roger Epton (Eds), The European Peptide Society, 679-680, 1998.

NISHINO, N.; XU, M.; MIHARA, H.; FUJIMOTO, T., Hexafluoroisopropyl alcohol is a useful cosolvent with dimethylformamide for tryptic synthesis of peptides, *Chem. Lett.*, 2: 327-330, 1992a.

NISHINO, N.; XU, M.; MIHARA, H.; FUJIMOTO, T., Tryptic condensation combined with peptide segment synthesis-condensation strategy for the efficient synthesis of human growth hormone releasing factor (1-29) amide, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 8: 648-650, 1992b.

NISHINO, N.; XU, M.; MIHARA, H.; FUJIMOTO, T., Use of hexafluoroisopropyl alcohol in tryptic condensation por patially protected precursor of alpha-melanocyte stimulating hormone, *Tetrahedron Lett.*, 33 (22): 3137-3140, 1992c.

PERSICHETTI, R.A.; STCLAIR, N.L.; GRIFFITH, J.P.; NAVIA, M.A.; MARGOLIN, A.L., Cross-linked enzyme crystals (clecs) of thermolysin in the synthesis of peptides, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (10): 2732-2737, 1995.

RABINOVICH, A.K. & RIVIER, J.E., SPPS using high temperature. In *Peptides: Chemistry, Structure and Biology (Proceedings of the 13th American Peptide Symposium)*; Escom Scientific Publ.: Leiden, 71-73, 1994.

RALL, K. & BORDUSA, F., Substrate mimetics-specific peptide ligases: studies on the synthetic utility of a zymogen and zymogen-like enzymes, *J. Org. Chem.*, 67 (25): 9103-9106, 2002.

REIMER, U.; REINEKE, U.; SCHNEIDER-MERGENER, J., Peptide arrays: from

macro to micro, *Curr. Opin. Biotech.*, 13 (4): 315-320, 2002.

RESLOW, M.; ALDERCREUTZ, P.; MATTIASON, B., On the importance of support material for bioorganic synthesis: influence of water partition between solvent, enzyme and solid support in water-poor reaction media, *Eur. J. Biochem.*, 172: 573-578.

RIDDIHOUGH, G., Structural Biology - Picture an enzyme at work, *Nature*, 362 (6423): 793, 1993.

RIVIER, J.E. & MIRANDA, M.T.M., Solid-phase peptide synthesis at elevated temperature. In *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics: Commemorating 100 years of Peptide Research*; Goodman, M., ed.; Houben-Weyl Editorial, Thieme Stuttgart: New York, 806-813, 2001.

ROURKE, I.J.; JOHNSON, A.H.; DIN, N.N.; PETERSEN, J.G.L.; REHFELD, J.F., Heterologous expression of human cholecystokinin in *Saccharomyces cerevisiae* - Evidence for a lysine-specific endopeptidase in the yeast secretory pathway, *J. Biol. Chem.*, 272 (15): 9720-9727, 1997.

RUBIN, B., Grease pit chemistry exposed, *Nat. Struct. Biol.*, 1 (9): 568-572, 1994.

RUIZ, C.M.R., Estudo da síntese convergente de peptídeos em fase sólida: abordagem clássica e uso de temperatura alta, Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Química da USP, São Paulo, 2003, 105p.

SAKAKIBARA, S., Synthesis of large peptides in solution, *Biopolymers*, 37, 17-28, 1995.

SAKINA, K.; KAWAZURA, K.; MORIHARA, K.; YAJIMA, H., Enzymatic synthesis of cholecystokinin-octapeptide, *Chem. Pharm. Bull.*, 36 (10): 3915-3919, 1988.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T., Molecular cloning : A laboratory manual, 2nd. ed., Plainview : Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANCHEZ, V.M.; REBOLLEDO, F.; GOTOR, V., *Candida antarctica* lipase-catalyzed doubly enantioselective aminolysis reactions. Chemoenzymatic synthesis of 3-hydroxypyrrolidines and 4-(silyloxy)-2-oxopyrrolidines with two stereogenic centers, *J. Org. Chem.*, 64 (5): 1464-1470, 1999.

SANCHEZ-BARRENA, M.J.; MARTINEZ-RIPOLL, M.; GALVEZ, A.; VALDIVIA, E.; MAQUEDA, M.; CRUZ, V.; ALBERT, A., Structure of bacteriocin AS-48: From soluble state to membrane bound state, *J. Mol. Biol.* 334 (3): 541-549, 2003.

SANDLER, B.; MURAKAMI, M.; CLARDY, J., Atomic structure of the trypsin-aeruginosin 98-B complex, *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (3): 595-596, 1998.

SANGER, F.; THOMPSON, E.O.P.; KITAI, R., Amide groups of insulin, *Biochem. J.*, 59 (3): 509-518, 1955.

SARDA, S. & DESNUELLE, P., Action de la lipase pancréatique sur les esters un émulsion, *Biochim. Biophys. Acta*, 30: 513-521, 1958.

SAVJALOV, W.W., Zur theorie der eiweissverdauung, *Pflügers Arch. Ges. Physiol.*, 85: 171, 1901.

SCHRAG, J. D.; LI, Y.; WU, S.; CYGLER, M., Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotichum candidum*, *Nature*, 351: 761-764, 1991.

SCHELLENBERGER, V. & JAKUBKE, H.-D., Protease-catalyzed kinetically controlled peptide synthesis, *Angew. Chem. Int. Edit.*, 30: 1437-1449, 1991.

SCHELLENBERGER, V.; TURCK, C.W.; RUTTER, W.J., Role of the S' Subsites in Serine Protease Catalysis. Active-Site Mapping of Rat Chymotrypsin, Rat Trypsin, α -Lytic Protease, and Cercarial Protease from *Schistosoma mansoni*, *Biochemistry*, 33: 4251-4257, 1994.

SCHMID, M.F. & HERRIOT, J.R., Structure of carboxypeptidase B at 2.8 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, 103 (1): 175-190, 1976.

SCHOELLMANN, G. & SHAW, E., Direct Evidence for the presence of histidine in the active center of chymotrypsin, *Biochemistry*, 2: 252-255, 1963.

SCHWINN; D. AND BANNWARTH; W., Perfluoro-tagget benzyloxycarbonyl protecting group and its application in fluoruous biphasic systems, *Helv. Chim. Acta*, 85 (1): 255-264, 2002.

SHAW; E., MARES-GUIA, M. AND COHEN, W., Evidence for an active-center histidine in trypsin through use of a specific reagent, 1-Chloro-3-tosylamino-7-amino-2-heptanona, the Chloromethyl Ketone derived from N α -Tosyl-L-lysine, *Biochemistry*, 4 (10): 2219-2224, 1965.

SHAW, E., Site-specific reagents for chymotrypsin and trypsin, *Method. Enzymol.* 11: 677-686, 1967.

SHIN, J.S. & KIM, B.G., Revisiting the effect of water content on enzymatic peptide synthesis in non-aqueous medium, *Biotechnol. Lett.*, 24 (22): 1903-1905, 2002.

SMITH, G.P., Filamentous fusion phage – novel vectors that display cloned antigens on the virion surface, *Science*, 228 (4705): 1315-1317, 1985.

SO, J.-E.; KANG, S.-H.; KIM, B.-G., Lipase-Catalyzed Synthesis of Peptides Containing D-Amino Acid, *Enzyme Microb. Tech.*, 23: 211-215, 1998.

STEWART, J.M. & YOUNG, J.D.; Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed.; Pierce Chemical Company Rockford: Illinois, 1984.

STURTEVANT, F., Does aspartame cause methanol toxicity, *Food Chem. Toxicol.*, 23 (10): 961-961, 1985.

SUCKLING, C.J., Enzyme Chemistry - Impact and applications, Chapman and Hall Ltd., New York, USA, 255p, 1984.

SUGIHARA, A.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, S.; NAKAI, T.; KAKUNO, T.; NAGAO, T.; WATANABE, Y.; TOMINAGA, Y., A new type of aminoacyltransferase from *Saccharothrix* sp AS-2 favorable for the synthesis of D-amino acid-containing peptides, *J. Biochem.*, 131 (2): 247-254, 2002.

SUZUKI, H.; MIYAKAWA, N.; KUMAGAI, H., Enzymatic production of gamma-L-glutamyltaurine through the transpeptidation reaction of gamma-glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli* K-12, *Enzyme Microb. Tech.*, 30 (7): 883-888, 2002.

THEOBALDO, F.C.; LIRA, E.; CHENG, E.; IROKAWA, A.; TOMINAGA, M., Esterification of N-protected-tyrosine by α -chymotrypsin in a high-concentration of ethanol, *Biotechnol. Tech.*, 5 (1): 73-76, 1991.

TIETZ; N.W. & FIERECK; E.A., A Specific Method for Serum Lipase Determination, *Clin. Chim. Acta*, , 13: 352, 1966.

TSUZUKI, H.; OKA, T.; MORIHARA, K., Coupling Between Cbz-Arg-Oh And Leu-X Catalyzed By Trypsin And Papain, *J. Biochem.-Tokyo*, 88 (3): 669-675, 1980.

TUNDO, P.; ANASTAS, P.; BLACK, D.S.; BREEN, J.; COLLINS, T.; MEMOLI, S.; MIYAMOTO, J.; POLYAKOFF, M.; TUMAS, W.; Synthetic pathways and processes in green chemistry. Introductory overview, *Pure Appl. Chem.*, 72 (7): 1207-1228, 2000.

TYNDALL, J.D.A.; SINCHAIKUL, S.; FOTHERGILL-GILMORE, L.A.; TAYLOR, P.; WALKINSHAW, M.D., Crystal structure of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1, *J. Mol. Biol.*, 323 (5): 859-869, 2002.

ULIJN, R.V.; BARAGANA, B.; HALLING, P.J.; FLITSCH, S.L., Protease-catalyzed peptide synthesis on solid support, *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (37): 10988-10989, 2002.

ULIJN, R.V.; DE MARTIN, L.; GARDOSI, L.; HALLING, P.J., Biocatalysis in reaction mixtures with undissolved solid substrates and products, *Curr. Org. Chem.*, 7 (13): 1333-1346, 2003.

ULLMANN D.; BORDUSA, F.; SALCHERT, K.; JAKUBKE, H.-D., A new simple route to the synthesis of protease substrates in ice, *Tetrahedron-Asymmetr.*, 7 (7): 2047-2054, 1996.

VAN DEN BERG, B.; TESSARI, M.; BOELENS, R.; DIJKMAN, R.; DE HAAS, G.H.; KAPTEIN, R.; VERHEIJ, H.M., Solution structure of porcine pancreatic phospholipase A2 complexed with micelles and a competitive inhibitor, *J. Biomol. NMR*, 5 (2): 110-121, 1995.

VAN TILBEURGH, H.; SARDA, L.; VERGER, R.; CABBILLAU, C., Structure of the

pancreatic lipase-procolipase complex, *Nature*, 359: 159-162, 1992.

VARANDA, L.M.; MIRANDA, M.T.M., Solid-phase peptide synthesis at elevated temperatures: a search for an optimized synthesis condition of unsulfated cholecystokinin-12, *J. Pept. Res.*, 50: 102-108, 1997.

VERGER R., 'Interfacial activation' of lipases: Facts and artefacts, *Trends Biotechnol.*, 15 (1): 32-38, 1997.

VERLANDER, M., Large-scale manufacturing methods for peptides – a status report, *Chim oggi*, 20 (7-8): 62-66, 2002.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, CH.W., Fundamentals of Biochemistry. Upgrade Edition, John Wiley & Sons: New York, USA, 2002.

WALDMANN, H. & SEBASTIAN, D., Enzymatic protecting group techniques, *Chem. Rev.*, 94 (4): 911-937, 1994.

WANG, C.Z.; JIANG, H.; OU, Z.L.; CHEN, J.S.; CHI, C.W., cDNA cloning of two A-superfamily conotoxins from *Conus striatus*. *Toxicon*, 42: 613-619, 2003.

WANG, X.Q.; WANG, C.S.; TANG, J.; DYDA, F.; ZHANG, X.J.C., The crystal structure of bovine bile salt activated lipase: insights into the bile salt activation mechanism, *Structure*, 5 (9): 1209-1218, 1997.

WATSON, J.D. & CRICK, F.H.C., Molecular structure of nucleic acid, *Nature*, 4356: 737-738, 1953.

WEHOFSKY, N.; KIRBACH, S. W.; HAENSLER, M.; WISSMANN, J. D.; BORDUSA, F., Substrate mimetics and freezing strategy: A useful combination that broadens the scope of proteases for synthesis, *Org. Lett.*, 2 (14): 2027-2030, 2000.

WEHOFSKY, N.; THUST, S.; BURMEISTER, J.; KLUSMANN, S.; BORDUSA, F., all-D-polypeptides: Novel targets for semisynthesis, *Angew. Chem. Int. Edit.*, 42 (6): 677-679, 2003.

WEST, J. B. & WONG, C. H., Enzyme-Catalyzed Irreversible Formation of Peptides Containing D-Amino Acids, *J. Org. Chem.*, 51: 2728-2735, 1986.

WEST, J.B. & WONG, C.H., Use de Nonproteases in Peptide Synthesis, *Tetrahedron Lett.*, 28: 1629-1632, 1987.

WHITAKER, J.R., Kinetics of the carboxypeptidase A-catalyzed hydrolysis of benzyloxycarbonylglycyl-L-phenylalanine, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 22 (1): 6-12, 1966.

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 Publishers B. V. (Biochemical Division),

79-87, 1985.

WONG, W.K.R.; ALI, A.B.; MA, M.C., Cloning, expression, and characterization of diuretic hormone *Manduca* diuresin from *Manduca sexta* in *Escherichia coli*, *Protein Express. Purif.*, 29: 51-57, 2003.

XING, G.W.; TIAN, G.L.; YE, Y.H., Influence of reaction conditions on syntheses of sweetener precursors catalyzed by thermolysin in tert-amyl alcohol, *J. Pept. Res.*, 52 (4): 300-304, 1998.

XU, S.J.; RALL, K.; BORDUSA, F., Enzymatic coupling of specific peptides at nonspecific ligation sites: Effect of Asp189Glu mutation in trypsin on substrate mimetic-mediated reactions, *J. Org. Chem.* 66 (5): 1627-1632, 2001.

YANG, H.W.; ZHAO, C.X.; ROMO, D., Studies of the tandem Mukaiyama aldol-lactonization (TMAL) reaction: A concise and highly diastereoselective route to beta-lactones applied to the total synthesis of the potent pancreatic lipase inhibitor, (-)-panclicin D, *Tetrahedron*, 53 (48): 16471-16488, 1997.

YENNAWAR, H.P.; YENNAWAR, N.H.; FARBER, G.K., A Structural Explanation for Enzyme Memory in Nonaqueous Solvents, *J. Am. Chem. Soc.*, 117 (2): 577-585, 1995.

YOKOMATSU, T.; MINOWA, T.; MURANO, T.; SHIBUYA, S., Enzymatic desymmetrization of prochiral 2-benzyl-1,3-propanediol derivatives: a practical chemoenzymatic synthesis of novel phosphorylated tyrosine analogues, *Tetrahedron*, 54: 9341-9356, 1998.

YU, H.-M.; CHEN, S.-T.; WANG, K.-T., Enhanced coupling efficiency in solid-phase peptide synthesis by microwave irradiation, *J. Org. Chem.*, 57 (18): 4781-4784, 1992.

ZHANG, L.Q.; ZHANG, Y.D.; XU, L.; LI, X.L.; YANG, X.C.; XU, G.L.; WU, X.X.; GAO, H.Y.; DU, W.B.; ZHANG, X.T.; ZHANG, X.Z., Lipase-catalyzed synthesis of RGD diamide in aqueous water-miscible organic solvents, *Enzyme Microb. Tech.* 29: 129-135, 2001.

ZHANG, L.Q.; XU, L.; YANG, X.C.; WU, X.X.; ZHANG, X.Z., Lipase-catalyzed synthesis of precursor dipeptides of RGD in aqueous water-miscible organic solvents, *Prep. Biochem. Biotech.* 33 (1): 1-12, 2003.

ZHOU, Y.Y.; YANG, T.; WANG, N.; XU, L.; HUANG, Y.B.; WU, X.X.; YANG, X.C.; ZHANG, X.Z., Chemo-enzymatic synthesis of tripeptide RGD in organic solvents, *Enzyme Microb. Tech.* 33 (1): 55-61, 2003.