

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

JOÃO PEDRO ALVES FAIRBANKS

**Estudo da possibilidade de produção de dipeptídeos
antimicrobianos por rota sintética verde**

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890
A original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
23/02/2023

JOÃO PEDRO ALVES FAIRBANKS

Estudo da possibilidade de produção de dipeptídeos antimicrobianos por rota sintética verde

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profª Drª Maria Terêsa Machini

São Paulo
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

F164e	Fairbanks, João Pedro Alves Estudo da possibilidade de produção de dipeptídeos antimicrobianos por rota sintética verde / João Pedro Alves Fairbanks. - São Paulo, 2023. 80 p.
	Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental. Orientador: Machini, Maria Terêsa
	1. Catálise. 2. Biotecnologia. 3. Enzimas proteolíticas. 4. Peptídeos. 5. Química Orgânica. I. T. II. Machini, Maria Terêsa, orientador.



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

"Estudo da possibilidade de produção de dipeptídeos antimicrobianos por rota sintética verde"

JOÃO PEDRO ALVES FAIRBANKS

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - no Programa de Química.

APROVADO(A) POR:

Profa. Dra. Maria Teresa Machini
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. Jeanine Giarolla Vargas
FCF - USP

Prof. Dr. Augusto Etchegaray Júnior
PUC - CAMPINAS

SÃO PAULO
12 de maio de 2023

AGRADECIMENTOS

Antes de iniciar, acho prudente me desculpar com os amigos e colegas cujos nomes não aparecem aqui, visto que são muitos os que acompanharam o desenvolvimento deste projeto. Recebam a minha gratidão.

Agradeço à toda minha família, em especial aos meus pais, Cilene e Marcelo, pelo apoio durante toda a minha trajetória.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria Terêsa Machini, por ter me acolhido no grupo (mesmo sob a pior das circunstâncias) e o proposto o presente projeto e ter me orientado durante a iniciação científica e, agora, no mestrado.

Agradeço aos membros do Laboratório de Química de Peptídeos da Universidade de São Paulo por toda a ajuda dispendida para o desenvolvimento deste projeto. Em especial:

- Ao Dr. Vitor Augusto Ungaro, ex-aluno de doutorado do laboratório, que me supervisionou durante a minha iniciação científica e me mostrou a síntese biocatalisada de peptídeos na prática.
- Ao Dr. Cléber Wanderlei Liria, especialista de laboratório, que me ajudou no desenvolvimento deste projeto desde análises até sugestões para experimentos.
- Ao M.Sc. Luiz Gustavo P. Nunes, doutorando, pela ajuda com os experimentos de atividade antifúngica e fungicida;
- Ao M.Sc. Luís Ricardo Pizzolato-Cezar, doutorando, pelas boas conversas e conselhos, principalmente na etapa final deste projeto;
- À Bel. Nancy M. Okuda-Shinagawa, doutoranda, pelos conselhos e questionamentos na parte experimental durante as reuniões de laboratório, que me ajudaram muito durante o período preparatório a minha qualificação.

Agradeço ao CNPq pela bolsa de mestrado (Proc.: 132600/2019-6). Minha orientadora e eu agradecemos a FAPESP (Procs nos.: 2018/194077, 2019/12913-7, 2022/018252) e o CNPq

(Proc.: 306755/2019-0) pelos apoios financeiros dados à nossa pesquisa no Laboratório de Química de Peptídeos, IQ-USP.

Agradeço a todos os professores do Instituto de Química da Universidade de São Paulo – instituição que me graduou Bacharel – por me introduzirem no universo da Química, no qual posso contemplar suas constelações e entender (melhor) seus fundamentos.

Agradeço aos meus amigos que me acompanharam nessa empreitada. Em especial: Amanda, Fernanda, Giancarlo, Juliana e Larissa, que me ofereceram apoio e compartilharam comigo muitas felicidades e frustrações. Que nossas amizades se fortaleçam e durem muitos anos.

“Todos os homens sonham, mas não da mesma forma. Os que sonham à noite, nos mais fundos recessos de suas mentes, despertam ao amanhecer para descobrir que tudo não passava de vaidade. Mas os sonhadores do dia são homens perigosos, pois podem se empenhar por seus sonhos de olhos abertos e convertê-los em realidade.”

T. E. Lawrence, *Os sete pilares da sabedoria*

RESUMO

Fairbanks, J.P.A. **Estudo da possibilidade de produção de dipeptídeos antimicrobianos por rota sintética verde**. 2023. 80p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nas últimas décadas, pesquisadores e profissionais de diferentes setores da saúde, da indústria e da alimentação passaram a investir no estudo de reações e processos químicos mais seletivos, simples, baratos e limpos do que os tradicionais; o objetivo principal era reduzir a geração de resíduos tóxicos e, portanto, proteger homem e ambiente. No mesmo período, a pesquisa focada em peptídeos expandiu o conhecimento sobre as propriedades desses biopolímeros e seu potencial de aplicação em diferentes áreas, principalmente saúde e alimentação humana. O presente estudo foi motivado por tal realidade; nosso objetivo foi explorar a possibilidade de substituir rotas de síntese química tradicional por rota verde alternativa na produção dos dipeptídeos *Lys-Trp-OBzl* e *Arg-Trp-OBzl*, descritos como capazes de inibir o crescimento e matar bactérias patogênicas ao homem. Para tanto, e com base em rota anteriormente estabelecida pelo nosso grupo, exploramos o uso do benziloxicarbonil (Z) como protetor de grupo amina, de biocatalisador proteolítico (tripsina bovina pancreática ou termolisina bacteriana) e da remoção do Z por reação de transferência catalítica de hidrogênio. Nas condições experimentais estudadas, os rendimentos de formação da ligação peptídica variaram de 1 % a 80 %. Quando ineditamente testado, um dos intermediários sintéticos obtidos, Z-Lys-Trp-OBzl, se mostrou capaz de inibir o crescimento e matar *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Várias das reações de remoção de Z estudadas foram quantitativas. Em conjunto, os resultados obtidos indicaram que a rota explorada é de fato seletiva, mais simples, barata e limpa do que aquelas de síntese química, porém demanda estudo adicional para ser aplicada na produção dos dipeptídeos de interesse e seus análogos.

Palavras-chave: *Química Verde, Biocatálise, Biotecnologia, Peptídeos antimicrobianos, Atividade Candidacida*

ABSTRACT

Fairbanks, J.P.A. **Study on the possibility of producing antimicrobial dipeptides by a green synthetic route**, 80p. Master Thesis - Graduate Program in Chemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

In the last decades, researchers and professionals from different segments of human health, food and industry invested in basic research focused on chemical reactions and processes more selective, simpler, cheaper and cleaner than those traditionally used; their main goal was to reduce the generation of toxic residues and, thus, to protect humans and the environment. In the meantime, research focused on peptides expanded the knowledge on their properties and high potential for applications in different areas, especially human health and food industry. The present study was inspired in this reality. Our objective was to explore the possibility of replacing the traditional synthetic routes by a more selective and greener one in the production of the dipeptides *Lys-Trp-OBzl* e *Arg-Trp-OBzl*, reported as able to inhibit growth and kill bacteria pathogenic to humans. So, and based on a green synthetic route developed by our research group, we explored the use of benzyloxycarbonyl (*Z*) as α -amine protecting group, of a proteolytic biocatalyst (bovine pancreatic trypsin or bacterial thermolysin), and of catalytic transfer hydrogenation to. In the experimental conditions studied, the yields of peptide bond formation varied from 1% to 80%. When unprecedently tested, one of the synthetic intermediates obtained, *Z-Lys-Trp-OBzl*, inhibited the growth and killed *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Several reactions of *Z* group removal studied were quantitative. Altogether, the results indicated that the green synthetic route explored is indeed more selective, simpler, cheaper and cleaner than those using chemical synthesis. However, it requires additional studies for the application in the production of the target dipeptides and analogues.

Key words: *Green Chemistry, Biocatalysis, Biotecnology, Antimicrobial peptides, Candidacidal activity.*

LISTA DE ABREVIATURAS

As abreviaturas dos aminoácidos estão de acordo com a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada, Eur. J. Biochem., 138:9-37, 1984)

Nome do Aminoácido	Código de 3 letras	Código de 1 letra	Nome IUPAC
Alanina	Ala	A	Ácido 2-amino-propanóico
Arginina	Arg	R	Ácido 2-amino-5-guanidinopentanóico
Asparagina	Asn	N	Ácido 2-amino-3-carbamoil-propanóico
Ácido aspártico	Asp	D	Ácido 2-amino butanodióico
Cisteína	Cys	C	Ácido 2-amino-3-mercaptopropanóico
Glutamina	Gln	Q	Ácido 2-amino-4-carbamoil-butanóico
Ácido glutâmico	Glu	E	Ácido 2-aminopentanodióico
Glicina	Gly	G	Ácido aminoetanóico
Histidina	His	H	Ácido 2-amino-3-(1 <i>H</i> -4-imidazol)-propanóico
Isoleucina	Ile	I	Ácido 2-amino-3-metil-pentanóico
Leucina	Leu	L	Ácido 2-amino-4-metil-pentanóico
Lisina	Lys	K	Ácido 2,6-diaminohexanóico
Metionina	Met	M	Ácido 2-amino-4-metiltio-butanóico
Fenilalanina	Phe	F	Ácido 2-amino-3-fenil-propanóico
Prolina	Pro	P	Ácido 2-pirrolidinocarboxílico
Serina	Ser	S	Ácido 2-amino-3-hidróxi-propanóico
Treonina	Thr	T	Ácido 2-amino-3-hidróxi-butanóico
Triptofano	Trp	W	Ácido 2-amino-3-(1 <i>H</i> -3-indoil)-propanóico
Tirosina	Tyr	Y	Ácido 2-amino-3-(4-hidróxi-fenil)-propanóico
Valina	Val	V	Ácido 2-amino-3-metil-butanóico
Aminoácido não especificado	X _{aa}	X	-

ACN: Acetonitrila

AcOEt: Acetato de Etila

Boc: *Tert*-butiloxicarbonil

DMF: N, N-dimetilformamida

DNA: Ácido desoxirribunucleico

Fmoc: 9-Fluorenil-metiloxicarbonil

ESI-MS: Espectrometria de massas com ionização *spray* de elétrons

I: Força iônica

LC-MS: Espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida

MeOH: Metanol

MS: Espectrometria de massas

RP-HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (ou desempenho) em Fase Reversa

TEA: Trietilamina

TFA: Ácido trifluoroacético

TLC: Cromatografia de Camada Delgada

TLN: Termolisina do *Bacillus termoproteoliticus rokko*

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

TRY: Tripsina pancreática bovina

Z: Benzilóxicarbonil

α QT: Alfa-quimotripsina pancreática bovina

MFC: Concentração fungicida mínima

MIC: Concentração inibitória mínima

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Química Verde	13
1.2. Peptídeos Antimicrobianos	16
1.3. Síntese de peptídeos	21
1.3.1. Síntese Química	21
1.3.2. Síntese via Tecnologia do <i>DNA</i> Recombinante	23
1.3.3. Síntese Biocatalisada	24
1.4. Remoção do grupo <i>Z</i>	30
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Materiais	34
3.2. Métodos Analíticos	35
3.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC) ...	35
3.2.2. Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas com Ionização por <i>Eletrospray</i> (LC/ ESI-MS)	35
3.2.3. Hidrólise ácida total seguida de análise de aminoácidos do hidrolisado via HPLC	36
3.2.4. Cálculo dos rendimentos reacionais da etapa de formação de ligação peptídica	36
3.3. Métodos preparativos	37
3.3.1. Método Geral para a Formação de ligações peptídicas catalisadas pela TRY	37
3.3.2. Remoção de <i>Z</i> por transferência catalítica de hidrogênio	38
3.4. Ensaio de atividade antimicrobiana <i>Z-Lys-Trp-OBzl</i> em <i>Candida parapsilosis</i> ..	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1. Síntese enzimática termodinamicamente controlada de ligação peptídica catalisada por TLN ou TRY	40
4.2. Síntese enzimática cineticamente controlada de ligação peptídica catalisadas por TRY	47
4.3. Atividade Antifúngica de <i>Z-Lys-Trp-OBzl</i>	61
4.4. Reações de transferência catalítica de hidrogênio para a remoção do grupo <i>Z</i>	63
5. CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
SÚMULA CURRICULAR	79

1. INTRODUÇÃO

1.1. Química Verde

É possível definir Química Verde ou Sustentável como o conjunto de princípios que visam a maior eficiência, o menor impacto ambiental e a menor periculosidade de reações e processos químicos. A partir dessa definição, deduz-se que tal química inovadora está mais direcionada à escolha consciente de reações químicas do que propriamente à proteção do ambiente. A **Tabela 1** lista os 12 princípios da Química Verde que se sustentam em dois pilares: o primeiro é o uso eficiente dos recursos (reagentes, solventes, energia) empregados nas reações químicas para minimizar a quantidade de resíduos por elas gerados; o segundo refere-se à segurança e ao impacto ambiental associado a tais reações (ANASTAS *et al.*, 2016).

Em relação ao primeiro pilar, cita-se a escolha de reações que incorporem todos os reagentes no produto final, tais como as reações de *Diels-Alder*. Estas reações apresentam 100% de economia atômica (EA), uma das métricas introduzida por Trost em 1991 e desde então utilizada para calcular a eficiência de reações químicas. Tal métrica também está relacionada com o segundo pilar, pois reações químicas com alta EA podem dispensar etapas de purificação do(s) produto(s) (SILVA; LACERDA; JONES JUNIOR, 2005). De fato, em geral, para reações químicas pouco eficientes a purificação do(s) produto(s) pode ser problemática não somente pelo tempo e grandes quantidades de solventes aquosos e orgânicos dispendidos, mas também pelo descarte destes, dos reagentes remanescentes e subprodutos formados no meio reacional (ZIMMERMAN *et al.*, 2020).

Tais considerações são especialmente importantes na química fina, que geralmente compreende sínteses, degradações, modificações e análise de moléculas complexas e quirais como fármacos, pesticidas, corantes e pigmentos, cujas funções dependem de isomeria específica. De fato, as condições reacionais empregadas podem favorecer a formação de

isômeros de difícil separação (POLLAK, 2007). Ignorar essas considerações pode acarretar problemas de saúde pública como aconteceu no século passado com a talidomida, um fármaco utilizado para enjoos matinais de gestantes, que levou ao nascimento de crianças com malformação congênita causada pela atividade teratogênica de isômero contaminante (LIMA; FRAGA; BARREIRO, 2001).

Em alguns casos, etapas de purificação de produtos sintéticos podem ser minimizados se os princípios de Química e Engenharia Verde (**Tabela 1**) forem seguidos. Para verificar a eficiência de processos, com base na razão entre a massa de rejeitos gerada (aqui incluem-se os solventes) e a massa de produto formada, uma outra métrica é utilizada: o fator-E. Essa métrica não está relacionada à reação química apenas, mas à obtenção dos produtos desejados, o que envolve etapas de purificação e isolamento deste (SHELDON, 2023).

Outra preocupação para a Química e a Engenharia Verde (**Tabela 1**) é o uso de espécies altamente reativas (*p.ex.* Isocianato de metila e fosgênio) tóxicas e persistentes que apresentam riscos à saúde e segurança do homem e do ambiente (ZIMMERMAN *et al.*, 2020). Um exemplo sobre os impactos gerados por tais espécies é o vazamento do gás Isocianato de metila, que era utilizado como intermediário para a síntese do pesticida *Sevin* na fábrica de Bopal (Índia) nos anos 80. Estima-se que morreram mais de 20.000 pessoas entre as 200.000 expostas ao gás (VARMA; VARMA, 2005; ZIMMERMAN *et al.*, 2020).

Reações químicas biocatalisadas estão de acordo com a maioria dos princípios da Química Verde e são recomendados pela sua régio- e enantioseletividade (SHELDON; BRADY, 2019), além de empregar catalisador biodegradável. Utilizando como exemplo a síntese de peptídeos, reações de formação de ligação peptídica biocatalisadas apresentam vantagens em relação às da química tradicional, que vão além da seletividade, como: o uso de água como solvente reacional, o emprego de reagentes minimamente protegidos e o uso de

Tabela 1 Os 12 princípios da Química e Engenharia Verdes. Adaptado de: ANASTAS; ZIMMERMAN, 2003; MA; TANG; LAI, 2005)

Química Verde	Engenharia Verde
Deve-se maximizar a incorporação de todos os materiais usados no produto final.	Garantir que toda adição e saída de materiais (e energia) sejam o mais inócuo possível.
Melhor prevenir a formação de resíduos que tratá-los futuramente.	Melhor prevenir a formação de resíduos que tratá-los futuramente.
O uso e síntese de compostos tóxicos à saúde e ao ambiente devem ser evitados.	Etapas de separação e purificação devem minimizar o consumo de reagentes e energia.
Produtos devem ser desenhados para preservar a eficácia e reduzir a toxicidade.	Produtos, reações e sistemas devem maximizar as transferências de massa e de energia.
O uso de substâncias auxiliares deve ser evitado sempre que possível e deve ser inócuo se empregado.	O uso de substâncias auxiliares e uso de energia para favorecer reações deve ser evitado.
As reações devem ser executadas a pressão e temperatura ambiente sempre que possível.	Decisões sobre o fim da vida do produto gerado devem ser consideradas.
Derivatizações devem ser evitadas sempre que possível.	Produtos com durabilidade planejada devem ser desejados.
Reagentes catalíticos (os mais seletivos possíveis) são superiores aos reagentes estequiométricos.	Deve-se evitar uma única metodologia global para os processos.
Os reagentes utilizados devem ser escolhidos de forma a minimizar acidentes.	Deve-se evitar reações com várias etapas ou que utilizam muitos componentes.
Métodos analíticos devem acompanhar as reações continuamente e em tempo real.	Design de produtos devem incluir a integração dos fluxos de energia e materiais.
Deve-se considerar a sobrevida dos produtos e seus metabólitos.	Deve-se considerar a sobrevida dos produtos.
Materiais utilizados na síntese devem vir de fontes renováveis.	Materiais (e energia) utilizada no processo devem vir de fontes renováveis.

baixas quantidades do biocatalisador, que pode ser recuperado e reutilizado quando utilizado na forma imobilizada (UNGARO, 2020). Além disso, os biocatalisadores podem ser obtidos a partir de fontes renováveis (SHELDON; BRADY, 2019), enquanto que catalisadores metálicos e inorgânicos necessitam da extração de recursos minerais limitados como paládio e platina (DODSON *et al.*, 2012).

1.2. Peptídeos Antimicrobianos

Microrganismos resistentes a mais de um tipo de antibiótico, os chamados multi-resistentes, podem causar muitas complicações a pacientes hospitalares (ABU-GHARBIA; ABD EL-FATTAH; ABDELREHIM, 2022), percebeu-se a necessidade de pesquisar agentes antimicrobianos alternativos. Dentre os possíveis candidatos estão os peptídeos antimicrobianos (AMPs), que portanto passaram a ser estudados ampla- e globalmente (**Figura 1**), inclusive pelo nosso grupo de pesquisa desde os anos 2000 (CARVALHO *et al.*, 2015; PIZZOLATO-CEZAR; OKUDA-SHINAGAWA; MACHINI, 2019; NUNES; REICHERT; MACHINI, 2021).

Os AMPs são biomoléculas formadas por resíduos de aminoácidos (a maioria entre 5 – 50) ligados entre si por ligações amida e que fazem parte do sistema imune inato dos seres vivos.

O modo de ação desses peptídeos bioativos, diferente daqueles dos antibióticos tradicionais, tem sido investigados (RAMESH *et al.*, 2016) e muitos modelos já foram propostos (**Figura 2**), sendo que a maioria deles envolve alterações e/ou danos à membrana plasmática alvo (que leva ao desequilíbrio osmótico, extravasamento do material citoplasmático ou ambos). No entanto, é sabido que alguns AMPs são capazes de penetrar a membrana celular sem danificá-la (*Cell-penetrating Peptides*) para chegar aos seus alvos intracelulares (REICHERT, 2019; NUNES; REICHERT; MACHINI, 2021).

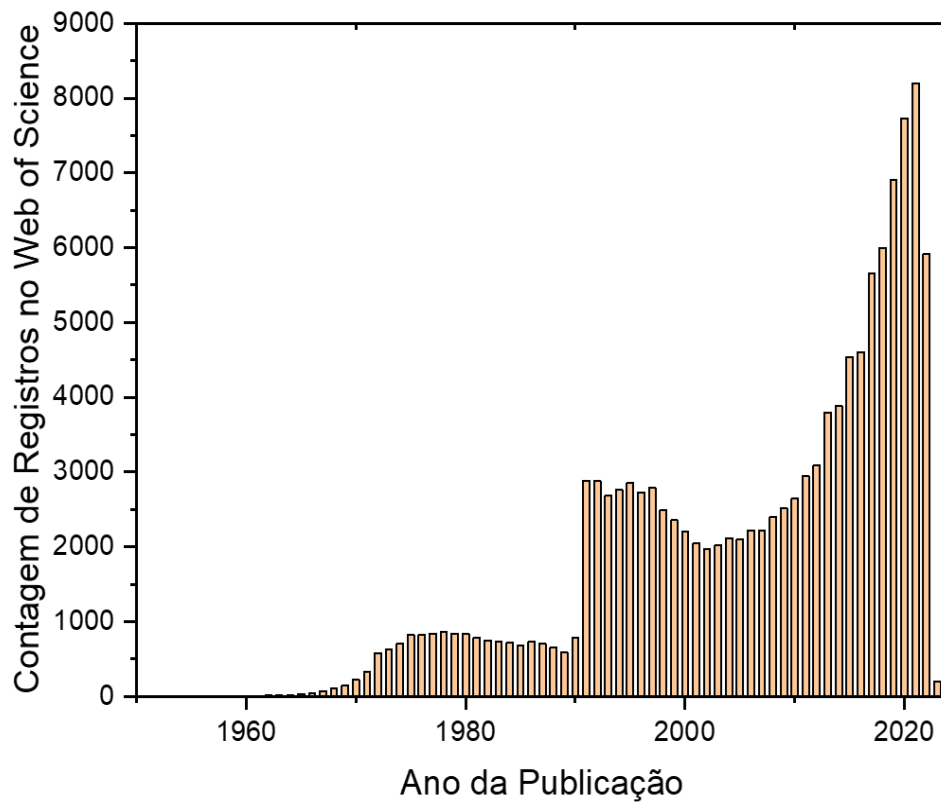


Figura 1 Contagem de artigos de 1950-2023 sobre AMPs no banco de dados Web of Science.

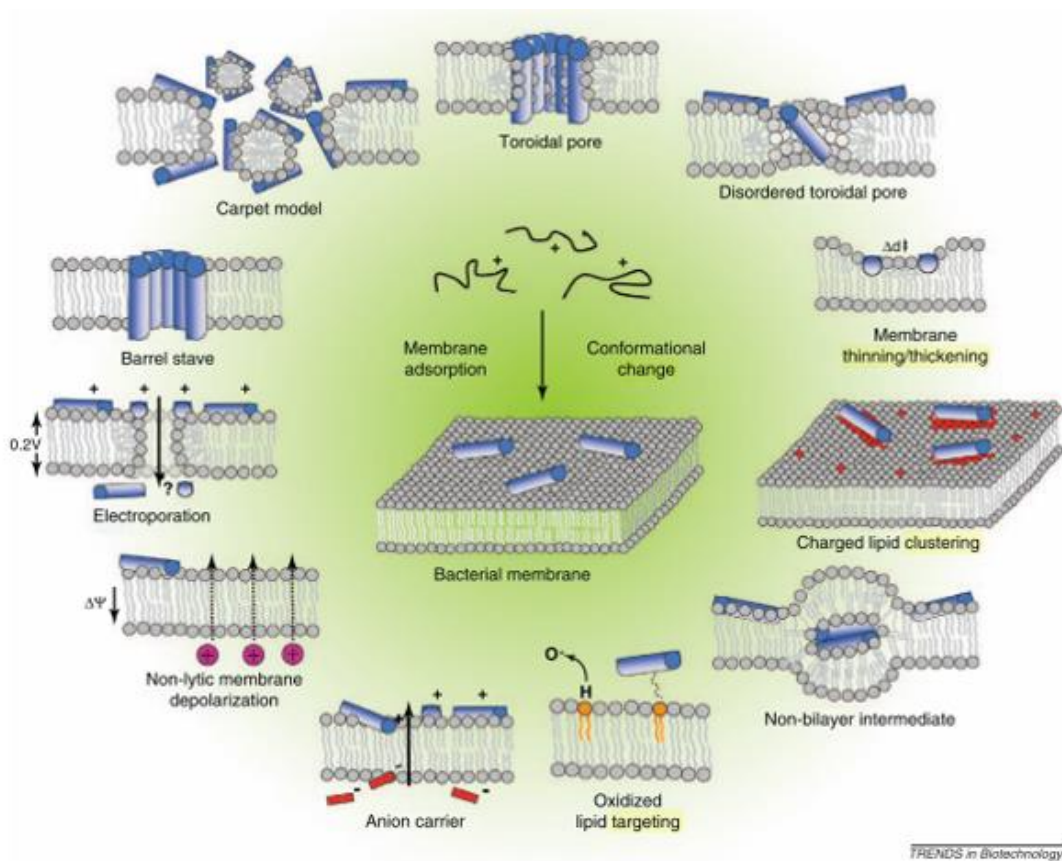


Figura 2 Modos de ação propostos para os AMPs. Retirado de: NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011.

Trabalhos da literatura mostram que dois tipos de aminoácidos são importantes para a atividade biológica dos AMPs: os catiônicos, cujos grupos das cadeias laterais estabelecem ligações iônicas com os elementos negativamente carregados das paredes (lipopolissacarídeos) e membrana plasmática (fosfolipídeos) celulares microbianas, e os hidrofóbicos, cujos grupos das cadeias laterais são capazes de interagir com as cadeias carbônicas dos fosfolipídeos e lipídeos esteroides membranares (ARIAS *et al.*, 2018). Sabe-se, ainda, que a coexistência destes dois tipos de aminoácidos produz estruturas anfipáticas em boa parte dos AMPs conhecidos, bem como que o aumento da hidrofobicidade da estrutura geralmente é acompanhado de aumento de atividade hemolítica (WANG *et al.*, 2019).

Atualmente existem 3569 peptídeos provenientes de fontes naturais catalogados no *Antimicrobial Peptide Database* (APD3; <https://aps.unmc.edu/>). As magaininas são exemplos clássicos, isolados de pele de sapos *Xenopus laevis* em 1987 (ZASLOFF, 1987) e envolvidos na defesa desse anfíbio frente a microorganismos patogênicos (THAPA; DIEP; TØNNESEN, 2020). A cheferina I é um AMP presente em raízes de *Capsella bursa-pasteoris*, descrito em 2000 (PARK *et al.*, 2000).

Cientes de que o isolamento de AMPs a partir de fontes naturais é uma tarefa dispendiosa e que tais fontes são limitadas [por exemplo, a pele ventral de um sapo *Xenopus laevis* fornece ~1 mg do AMP de 37 resíduos de aminoácidos magainina 2 (ZASLOFF, 1987)], faz-se necessário sintetizar em laboratório esses peptídeos para viabilizar o seu estudo e possíveis usos, os quais depois dependerão de comercialização (DUFFULER *et al.*, 2022).

Motivos que dificultam a síntese de AMPs em escala de produção são o preço total do processo, a necessidade de infraestrutura laboratorial sofisticada para realizá-lo acompanhado de análises e purificação dos produtos bruto e purificado. Além disso, muitas vezes o número de resíduos de aminoácidos é alto e nem sempre as etapas de formação da ligação peptídica e de remoção dos grupos protetores são quantitativas, podendo gerar subprodutos ou ocorrer

agregação das cadeias peptídicas em crescimento (MACHADO et al., 2004; PARADÍS-BAS; TULLA-PUCHE; ALBERICIO, 2016). Portanto, AMPs curtos podem ser candidatos a novos agentes antimicrobianos mais vantajosos devido aos menores gastos e maior produtividade pelo menor número de reações a serem feitas (RAMESH et al., 2016).

A quiotorfina, dipeptídeo (*Tyr-Arg*), que apresentou potencial analgésico extraído do cérebro bovino nos anos 1970 (TAKAGI et al., 1979) por ser capaz de atravessar a membrana hematoencefálica, é um dos AMPs curtos mais estudados na literatura, especialmente após o relato de que o *Lys-Tyr-Arg*, um análogo tripeptídico da quiotorfina, apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli* (MIC 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e *S. aureus* (MIC 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (CATIAU et al., 2011), mostrando-se um potente microbiano de amplo espectro. No entanto, pouco se sabe sobre a atividade hemolítica ou hematotóxica desse tripeptídeo. A literatura descreve que o *Tyr-Arg-NH₂*, que corresponde à quiotorfina amidada e à sequência mínima com atividade antimicrobiana, não apresentou hematotoxicidade (RIBEIRO et al., 2012).

Outros AMPs curtos são os derivados dipeptídicos *L-Arg-L-Trp-OBzl* e *L-Lys-L-Trp-OBzl*, que apresentaram valores baixos de MIC para cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (**Tabela 2**) (STRØM et al., 2003) — um organismo patogênico extensivamente espalhado no mundo (ABU-GHARBIA; ABD EL-FATTAH; ABDELREHIM, 2022) — além de não apresentarem hematoxicidade nas concentrações testadas, indicando um potencial para o uso clínico.

Os dois dipeptídeos, sintetizados pelo método químico em solução, contêm a mesma proporção entre grupos químicos catiônicos e hidrofóbicos, além de um éster benzílico. Combinados estes elementos estruturais parecem justificar os seus baixos valores de MIC, pois análogos contendo éster metílico se mostraram inativos (STRØM et al., 2003). Por outro lado, a **Tabela 2** deixa evidente que isômeros de *Arg-Trp-OBzl* também são igualmente ou mais ativos, o que não ocorre com *Lys-Trp-OBzl*.

Tabela 2 Valores de MIC obtidos para os peptídeos sintetizados por STRØM et al., 2003. Adaptado de: STRØM et al., 2003. Os aminoácidos escritos com letras minúsculas correspondem aos isômeros D.

Sequência peptídica	MIC (µmol/L)			
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>S. aureus</i> resistente à metecilina (ATCC 33591)	<i>S. epidermidis</i> resistente à metecilina (ATCC 27626)
Arg-Trp-Arg-Trp-OBzl	63,0	3,2	3,2	3,2
Arg-Trp-arg-trp-OBzl	94,5	6,3	3,2	3,2
Trp-Arg-Trp-OBzl	117,7	7,8	7,8	7,8
trp-arg-trp-OBzl	1,2	0,1	0,1	0,1
trp-Arg-Trp-OBzl	117,7	31,4	31,4	15,7
Trp-Arg-OBzl	> 485,1	369,5	138,6	138,6
Arg-Trp-OBzl	> 485,1	110,8	110,8	55,4
arg-Trp-OBzl	> 485,1	55,4	55,4	55,4
arg-trp-OBzl	> 485,1	110,8	110,8	44,3
Lys-Trp-OBzl	> 485,1	118,1	59,1	59,1
lys-Trp-OBzl	> 485,1	177,2	118,1	59,1
Lys-trp-OBzl	> 485,1	177,2	118,1	59,1
Arg-Phe-OBzl	> 485,1	485,1	485,1	181,9
Lys-Phe-OBzl	> 485,1	> 485,1	> 485,1	520,3

Uma possível explicação para o insucesso dos dipeptídeos contra *E. coli* seria a incapacidade destas moléculas de baixa massa molar para atravessar a parede celular desta bactéria *Gram*-negativa (EPAND; EPAND, 2011). De fato, sequências maiores apresentam valores de *MIC* menores tanto para *E. coli* como para *S. aureus* (uma bactéria *Gram*-positiva) (**Tabela 2**), o que sugere que os precursores desses dipeptídeos (que teriam tamanhos moleculares) poderiam ser ativos frente à *E. coli*.

Rotas sintéticas que exploram biocatálise podem substituir aquelas tradicionalmente utilizadas para a produção de antibióticos como cefalexina, as quais que geram muitos resíduos que não recicláveis, utilizam solventes clorados e condições reacionais drásticas (PAN *et al.*, 2022). Com este propósito, em 2020, Fan *et alli* empregaram a penicilina acilase e, portanto, condições reacionais mais brandas e proteção mínima dos reagentes empregados na síntese

deste antibiótico β -lactâmico. (FAN; LI; LIU, 2020), as quais são compatíveis com os princípios de Química Verde.

Como os animais superiores não conseguem metabolizar a maioria dos antibióticos tradicionais, eles são excretados. Não sendo biodegradáveis, eles contaminam esgotos e água, o que vem criando um grande problema para as saúdes humana e do ambiente visto que podem levar à seleção e proliferação de microrganismos resistentes a antibióticos excretados (LI; ZHANG, 2011). Portanto, uma das vantagens dos AMPs é que eles e seus metabólitos (aminoácidos livres e derivados de aminoácidos) são biodegradáveis oferecendo maior segurança.

1.3. Síntese de peptídeos

Existem três tipos: síntese química de peptídeos; síntese via tecnologia do DNA recombinante e síntese biocatalisada (ou enzimática). Estes se subdividem em modalidades e podem ser empregados de forma combinada.

1.3.1. Síntese Química

A síntese química pode ser realizada em solução ou em fase sólida. Nela ocorre a proteção total dos grupos não envolvidos nas diferentes etapas da rota sintética escolhida e a ativação da α -carboxila do componente carboxílico por um reagente químico (**Figura 3**) gerando um intermediário que sofre ataque nucleofílico da α -amina livre do aceptor de acila (MACHADO et al., 2004).

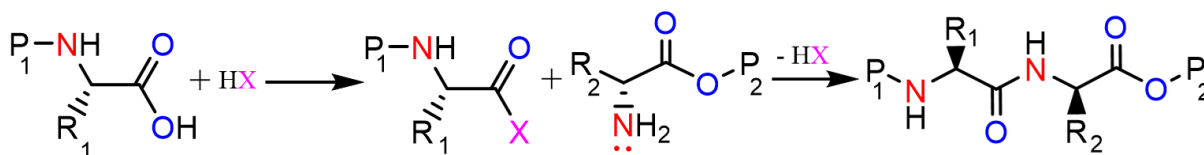


Figura 3 Representação da formação de uma ligação peptídica por método químico. R_1 , R_2 : cadeias laterais; P_1 , P_2 grupos protetores; X : grupo ativador.

Atualmente, vários são os reagentes ativadores empregados, entre eles estão as carbodiimidias (*p.ex.*: DCC) (SHEEHAN; HESS, 1955) e os sais de urônio (*p.ex.*: HBTU) (DOURTOGLOU; ZIEGLER; GROSS, 1978; STRØM *et al.*, 2003). Também possível verificar em trabalhos mais antigos, métodos de ativação do grupo carboxila α , azidas e cloretos (JARADAT, 2018). Também emprega-se o 1-hidroxi-benzotriazol (1-HOBt) como reagente aditivo aos ativadores, a fim de minimizar a enantiomerização dos aminoácidos ativados (KÖNIG; GEIGER, 1970).

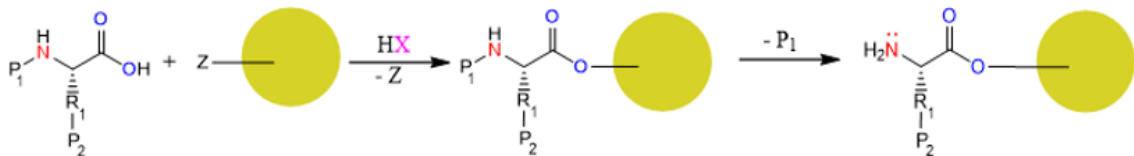
Até a década de 50, poucos trabalhos sobre a síntese de peptídeos foram publicados, o que se deve a dois fatores: (i) a maioria dos trabalhos provinham da Alemanha e (ii) os trabalhos publicados tratavam da síntese de di- e tripeptídeos – afinal, a única forma de sintetizar peptídeos era a química orgânica clássica em solução que se baseava em solubilizar os derivados de aminoácidos, o reagente ativador e uma base para reagirem em meio orgânico anidro. Essa abordagem, portanto, é conhecida como síntese química em solução ou clássica introduzida por Theodor Curtius e Emil Fischer no início do século XX (NAIDER; GOODMAN, 2004).

Somente com a síntese e a determinação estrutural da ocitocina, um hormônio octapeptídico de interesse comercial (MACHINI; LIRIA, 2020), que rendeu a du Vigneaud o prêmio Nobel de química em 1955, é que o interesse na pesquisa em peptídeos ganhou importância global. No entanto, mesmo que a síntese clássica seja uma metodologia prática, ela não é recomendada para a síntese de peptídeos contendo mais de 5 resíduos de aminoácidos devido ao grande trabalho experimental e os baixos rendimentos sintéticos obtidos. Um exemplo desse problema pode ser compreendido pelo relato de Merrifield para a síntese em solução do pentapeptídeo *Ser-His-Leu-Val-Glu*, cujo rendimento final foi de 7% após 11 meses de trabalho árduo (MITCHELL, 2008).

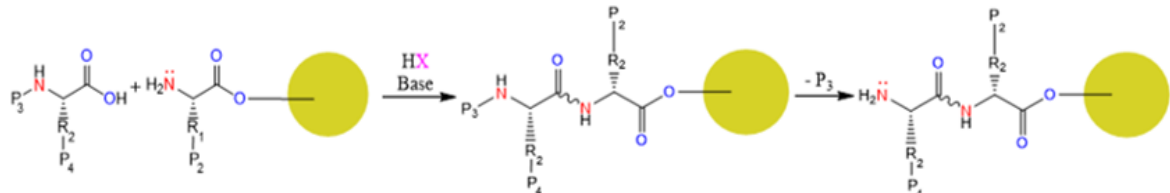
Assim, a introdução da síntese de peptídeos em fase sólida (*Solid Phase Peptide Synthesis* ou SPPS) por Merrifield na década de 60 – inspirada pela a síntese de proteínas pela maquinaria ribossomal (MITCHELL, 2008) - alavancou as pesquisas e a produção de peptídeos sintéticos mundialmente a partir de 1964. Este método de síntese química apresenta 2 vantagens notórias: (i) a não necessidade de isolar os intermediários sintéticos, diminuindo o tempo de síntese e o trabalho experimental; (ii) a possibilidade de automação da síntese (FELIX, 2008), pois a SPPS compreende as etapas sumarizadas na **Figura 4**. O peptídeo bruto assim produzido deverá ser purificado e caracterizado quimicamente.

O método da fase sólida possibilita a síntese individual ou múltipla ou a geração de bibliotecas de peptídeos sintéticos (GUZMÁN *et al.*, 2021).

Acoplamento do aminoácido C-terminal na resina (a síntese ocorre na direção C→N) e remoção do grupo protetor P₁



Acoplamento do(s) próximo(s) aminoácidos e remoção do grupo protetor P₃ (n vezes, n: número de aminoácidos)



Clivagem do peptídeo sintetizado da resina após n acoplamentos de aminoácidos, gerando o produto bruto

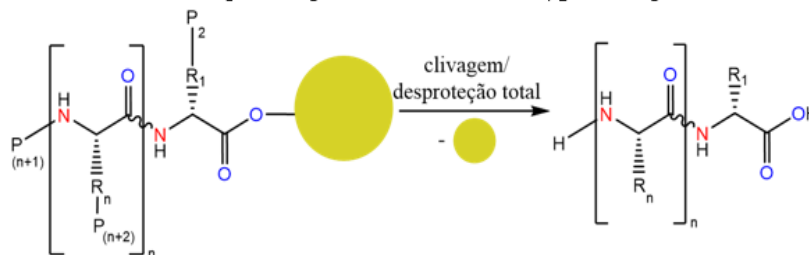


Figura 4 Etapas da formação de um peptídeo utilizando a metodologia química SPPS. R: cadeia lateral de aminoácido; P: protetor de R; Z: grupo reativo da resina

1.3.2. Síntese via Tecnologia do DNA Recombinante

Nesta metodologia, a síntese de peptídeos é realizada utilizando-se da maquinaria ribossomal de organismos que são, previamente, geneticamente modificados (HULEANI *et*

al., 2022). Resumidamente, com o emprego de técnicas de biologia molecular (plasmídeo específico e clonagem molecular) insere-se um fragmento de DNA correspondente ao peptídeo de interesse no DNA do organismo que o expressará ligado a uma sequência proteica. O peptídeo bruto obtido será liberado através de tratamento da sequência com proteases, purificado e caracterizado quimicamente.

Um exemplo desse tipo de síntese é o uso da tecnologia *Phage-Display*, no qual o peptídeo é expresso fusionado à uma proteína de superfície do fago que os expressou (*MACHADO et al.*, 2004), é muito utilizado atualmente em pesquisa devido à sua ampla aplicabilidade — especialmente, por tornar possível a criação bibliotecas de peptídeos com tamanhos e sequências variados que servirão para ensaios de ligação ou reconhecimento de alvos específicos sem a necessidade de purificação das sequências peptídicas expressas (*JAROSZEWICZ et al.*, 2022).

Dados recentes mostram que é possível alterar a atividade de algumas enzimas através de mutações usando tais métodos, como feito nos estudos de evolução dirigida de enzimas (*WRUBLEWSKI*, 2019).

1.3.3. Síntese Biocatalisada

Observando a reação de formação da ligação peptídica (**Figura 3**), pode-se concluir que é possível ativar o componente carboxílico por meio de enzimas, que são biocatalisadores que apresentam altas regio-; quimio- e estereoseletividades. Tais propriedades dispensam o uso de grupos protetores nas cadeias laterais dos aminoácidos usados na síntese peptídica como reagentes de partida. Diante dessas vantagens, o interesse no uso isolado do método enzimático ou dele combinado com o método químico de síntese peptídica aumentou (*DEBECKER et al.*, 2021).

Além disso, enzimas atuam em condições reacionais mais brandas do que as usadas para catalisadores inorgânicos e orgânicos convencionais (*KLIBANOV et al.*, 2000). As

reações biocatalisadas geram menor quantidade de resíduos, requerem menor grau de proteção de grupos reativos, permitem a formação de menos subprodutos e necessitam de menos etapas de purificação. Tais características, além de aumentar o interesse na aplicação dessa classe de catalisadores seletivos em reações químicas *in vitro*, condizem com os princípios de Química Verde – não apenas pelo uso de catálise, mas pela possibilidade de um número menor de etapas em relação aos métodos químicos (SHELDON; BRADY, 2019).

Existem vários tipos de biocatalisadores com diferentes atividades e mecanismos de ação que podem catalisar diferentes tipos de reações químicas (MOSS, 2019). Neste trabalho, o foco está na síntese catalisada por peptidases (ou proteases), *i.e.* enzimas proteolíticas capazes de hidrolisar ligações peptídicas. Para esta classe de enzima, convencionou-se o reconhecimento do substrato pela nomenclatura de Schechter e Berger (SCHECHTER; BERGER, 1968), pela qual os sítios de reconhecimento da enzima são reconhecidos pela letra *S* e os resíduos de aminoácidos do substrato pela letra *P* (**Figura 5**). Assim, tem-se que os resíduos de aminoácidos referentes ao doador e receptor de acila envolvidos na formação da ligação peptídica são denominados P_1 e P_1' , respectivamente, e os sítios que reconhecem as cadeias laterais dos respectivos aminoácidos são denominados S_1 e S_1' . Os resíduos de aminoácidos vizinhos são denominados P_N, \dots, P_2 e P_2', \dots, P_N' , em relação às suas ligações a P_1 e P_1' . Para proteases, a condição necessária para a síntese peptídica é o reconhecimento primário do substrato pelas proteases (**Tabela 3**), *i.e.* o reconhecimento do doador ou do receptor de acila com alta afinidade pela protease dada pelos sítios S_1' e S_1 .

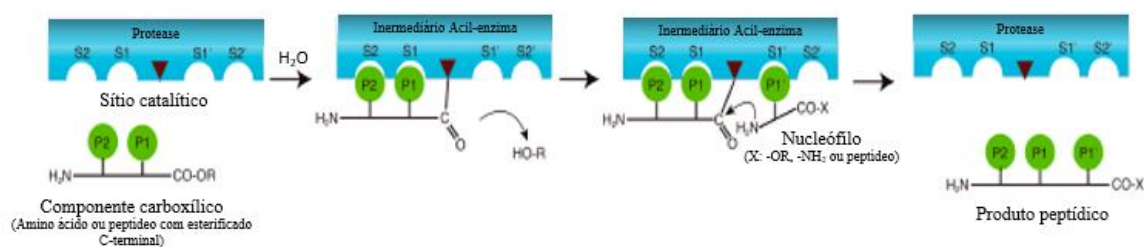


Figura 5 Representação de Schechter e Berger para a formação da ligação peptídica a partir de um éster – Adaptado de: YAZAWA; NUMATA, 2014.

As peptidases também apresentam reconhecimento secundário, que ocorre quando outros sítios da protease reconhecem resíduos de aminoácidos vizinhos aos aminoácidos em P_1' e P_1 , fazendo com que a enzima apresente maior ou menor atividade em relação à ela – sobre esta especificidade, pode-se citar como exemplo a preferência a resíduos de aminoácidos volumosos nas posições P_2 e P_3 para a α -QT pancreática bovina na hidrólise de substratos peptídicos com a ligação P_1 - P_1' , onde P_1 corresponde a um resíduo de aminoácido aromático (SCHELLENBERGER; JAKUBKE, 1991).

Tabela 3 Especificidade de algumas proteases aplicadas em síntese de peptídeos (Bairoch, 2000)

Protease (Número E.C.)	Especificidade Primária
TRY (3.4.21.4)	$P_1 = Arg; Lys$
α -QT (3.4.21.1)	$P_1 = Tyr; Trp; Phe; Leu$
TLN (3.4.24.27)	$P_1' = Leu; Phe$
Carboxipeptidase A (3.4.15.1)	$P_1' \neq Pro$ $P_2' \neq Asp; Glu$

Desde o final dos anos 1980, a classe das hidrolases vem sendo explorada na síntese de peptídeos em alguns laboratórios da Europa, Japão e no IQ-USP (MIRANDA et al., 1986; CHENG et al, 1989; MIRANDA et al, 1991; LIRIA et al., 2008; UNGARO et al, 2015; BIAŁKOWSKA; MORAWSKI; FLORCZAK, 2017). O fato das peptidases catalisarem tanto a quebra quanto a formação da ligação peptídica se deve à similaridade de extensões reacionais da hidrólise e da acilação do componente α -carboxílico (**Figura 6A**) – decorrente do *princípio da reversibilidade microscópica* (KULLMANN, 1987).

De fato, em meio aquoso, a hidrólise da ligação peptídica ocorre em duas etapas: a hidrólise (**B1**) e a ionização dos grupos terminais dos produtos formados (**B2**) (Figura 7B). Sob o ponto de vista termodinâmico, a etapa (**B1**) é endergônica ($\Delta G_{hid}^\circ > 0$), enquanto que a etapa (**B2**) é exergônica ($\Delta G_{ion}^\circ < 0$). Visto que a reação global é espontânea, tem-se que a magnitude

da energia livre de Gibbs da etapa **B2** é maior que a de **B1** (PETKOV, 1982; MARTIN, 1998) e que a reação inversa não é espontânea. Por isso, para viabilizar a síntese frente à hidrólise se busca manipular os substratos e meio reacional por duas modalidades distintas discutidas a seguir:

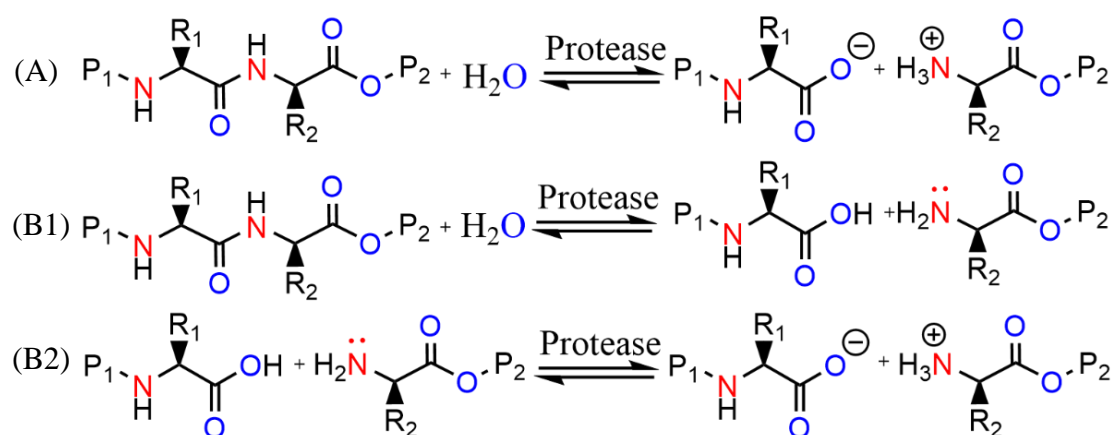


Figura 6 Reação global de hidrólise de uma ligação peptídica por proteases em meio aquoso (A). Semi-reações de hidrólise (B1) e ionização dos produtos formados (B2), onde R₁ e R₂ correspondem as cadeias laterais dos aminoácidos em P₁' e P₁.

a) Síntese termodinamicamente controlada

Nesta modalidade, o produto formado corresponde ao produto termodinâmico da reação e, portanto, ela se baseia em diminuir o ΔG_{ion} , através da modulação dos pKas dos aminoácidos e do pH do meio reacional ou acoplado à formação da ligação peptídica evento fortemente exergônico, *p. ex.* a retirada constante do produto formado do meio reacional, de forma a tornar a reação global espontânea (MIRANDA, 1989). Analisando a dependência entre os valores dos pKas dos aminoácidos que atuarão como componentes carboxílico (pK₁) e amino (pK₂) envolvidos na formação da ligação peptídica, foi verificada a existência da seguinte relação entre ΔG_{ion} , os pKas de grupos amino e carboxila dos componentes envolvidos e o pH do meio reacional (Equação 1) (KULLMANN, 1985):

$$\Delta G_{\text{ion}} = RT \ln(1 + 10^{pH-pK_1} + 10^{pK_2-pH} + 10^{pK_2-pK_1}) \quad \text{(Equação 1)}$$

Assim, as estratégias de favorecer termodinamicamente a síntese da ligação peptídica *in vitro* a partir de aminoácidos catalisada pela peptidase se dão pela adição de solventes

orgânicos (miscíveis ou imiscíveis) ao meio reacional ou uso de aminoácidos parcialmente protegidos como substratos. Nesses casos, a mudança da constante dielétrica do meio reacional ou o efeito de redução de grupos ionizáveis levarão à uma mudança no valor dos pKas dos grupos amina e carboxila dos substratos (HOMANDBERG *et al.*, 1978; MORIHARA, 1987; MACHADO *et al.*, 2004).

A proteção dos grupos citados acima ainda pode diminuir a solubilidade do produto formado em meio aquoso. Por exemplo, na formação de *Z-Phe-Leu-NH₂* catalisada por α QT, tem-se maiores rendimentos sintéticos quanto maior a concentração dos derivados de L-aminoácidos usados (MORIHARA, 1987) – sendo isso uma prática recorrente na literatura para outros tipos de enzimas visto que os valores de constante de equilíbrio para estas reações são muito pequenos (BORDUSA, 2002).

Outra maneira de favorecer a formação da ligação peptídica se dá pela separação do produto formado durante o tempo de reação. Uma das maneiras de consegui-la se dá pela adição de agentes caotrópicos (*p. ex.* sulfato de amônio) ao meio reacional (MIRANDA, 1989). Neste caso faz-se necessário um estudo sistemático para o agente utilizado a fim de evitar que a enzima não precipite ou que o sal utilizado afete a atividade enzimática (MIRANDA *et al.*, 1986; UNGARO *et al.*, 2015). Também é possível fazer uso do sistema bifásico, constituído de um solvente orgânico imiscível em água e uma solução aquosa, onde a enzima fica na fase aquosa e os reagentes se particionam entre as fases. Durante a reação, o produto tende a difundir-se para a fase orgânica – permitindo a retirada do produto formado do meio reacional.

b) Síntese cineticamente controlada

Nesta modalidade, o produto reacional é o produto cinético da reação e o produto da hidrólise do éster do doador de acila é o produto termodinâmico da reação. Isso ocorre devido a competição pela ligação ao complexo acil-enzima (R^1CO-E , na Figura 8) entre o componente amínico (H_2N-R^2) e a água (JAKUBKE; KUHL; KÖNNECKE, 1985). Assim, deve-se

determinar o rendimento de formação do produto em tempo definido, visto que a reação hidrolítica sempre estará presente e o produto formado pode ser hidrolisado pela protease (o que é chamado de hidrólise secundária) (SCHELLENBERGER; JAKUBKE, 1991). O uso do componente carboxílico esterificado aumenta a velocidade de formação do complexo acil-enzima e também a favorece termodinamicamente a reação (JAKUBKE; KUHL; KÖNNECKE, 1985).

A maior limitação para esta abordagem sintética é o uso exclusivo de serino- (E.C. 3.4.21) e cisteíno- (E.C. 3.4.22) proteases, visto que estas enzimas apresentam atividade esterásica e tioesterásica (LIRIA, 2004). Também é possível utilizar lipases, visto que elas apresentam atividade hidrolítica e, por não terem atividade proteolítica, os produtos formados não são hidrolisados (LIRIA, 2004; LIRIA *et al.*, 2008). Mesmo assim tal modalidade emprega menores concentrações de enzima (MORIHARA, 1987) e gera produtos mais rapidamente do que a síntese termodinamicamente controlada. A **Figura 7** sumariza todas as possibilidades para, mediante a biocatálise, sintetizar diferentes produtos a partir de um éster de aminoácido ou peptídeo.

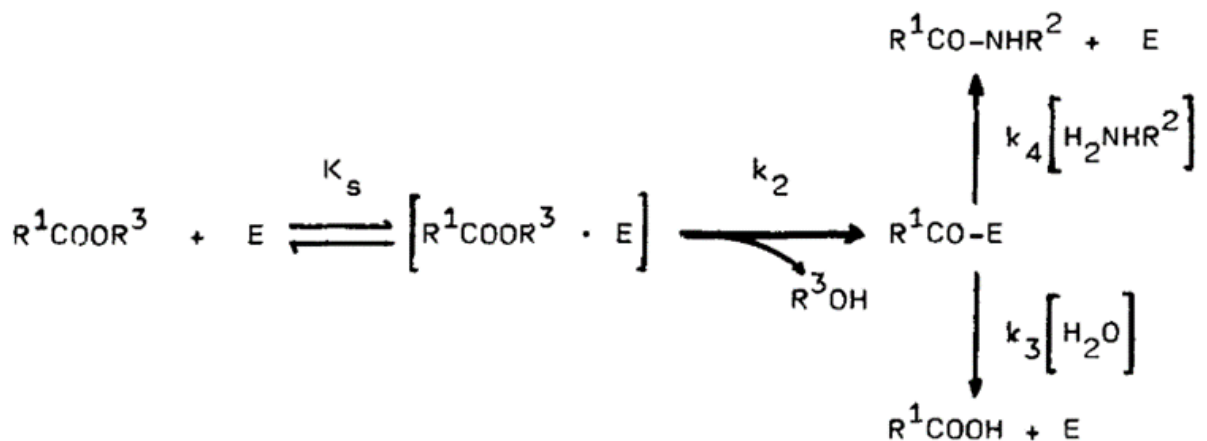


Figura 7 Esquema para uma reação cineticamente controlada. Verifica-se, que após a formação do complexo enzima substrato, este pode reagir com um aminoácido (reação k_4) ou com água (reação k_3). Onde R^1COOR^3 corresponde a um éster de aminoácido ou peptídeo e H_2NHR^2 corresponde a um novo aminoácido – Retirado de: JAKUBKE; KÖNNECKE, 1987.

Um dos principais reveses no uso de biocatalisadores em processos industriais é a sua baixa estabilidade em reatores (KLIBANOV *et al.*, 2000). Para contornar este problema

enzimas proteolíticas podem ser imobilizadas a fim de aumentar as suas estabilidades química e térmica, bem como garantir a atividade hidrolítica a ser manipulada para a síntese. Além disso, inúmeros estudos mostram a possibilidade de reuso do biocatalisador imobilizado – tornando a biocatálise mais rentável, o que seria desejado no tópico aqui discutido (*LIRIA et al.*, 2014; *CAO et al.*, 2016; *UNGARO*, 2020).

1.4. Remoção do grupo Z

A presença de grupos protetores dos grupos α -amina e α -carboxila dos substratos para a síntese peptídica catalisada por peptidases tem como papel garantir a formação inequívoca da ligação peptídica e facilitá-la. Eventualmente, estes protetores devem ser removidos a fim de obter o peptídeo com a α -amina desprotegida.

Alguns dos grupos protetores de α -aminas comumente utilizados em síntese de peptídeos são Z, *Boc* e *Fmoc* (**Figura 8**). O Z é de grande interesse em sínteses biocatalisadas por ser facilmente removido por reações de hidrogenólise (**Figura 9**), como hidrogenação catalítica (fonte de H: H_2 (g)) e transferência catalítica de hidrogênio (fontes de H: sais de formiato, ácido fórmico) por ser uma reação limpa e gerar produtos tolueno e CO_2 menos nocivos ao ambiente quando comparado com desproteções utilizando meios ácidos (*BODANSKY; ONDETTI*, 1966).

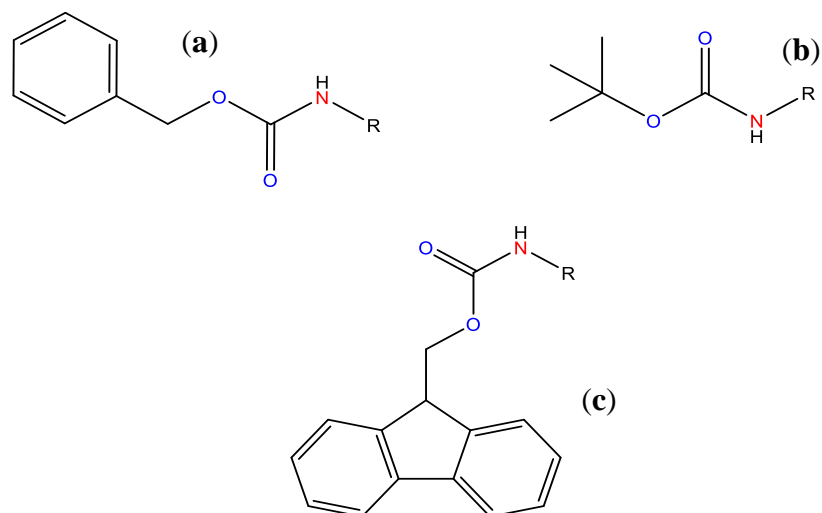


Figura 8 Exemplos de grupos protetores do amino. (a) Z (a); (b) Boc e (c) Fmoc, onde R representa o aminoácido ou peptídeo protegido pelo componente amino.

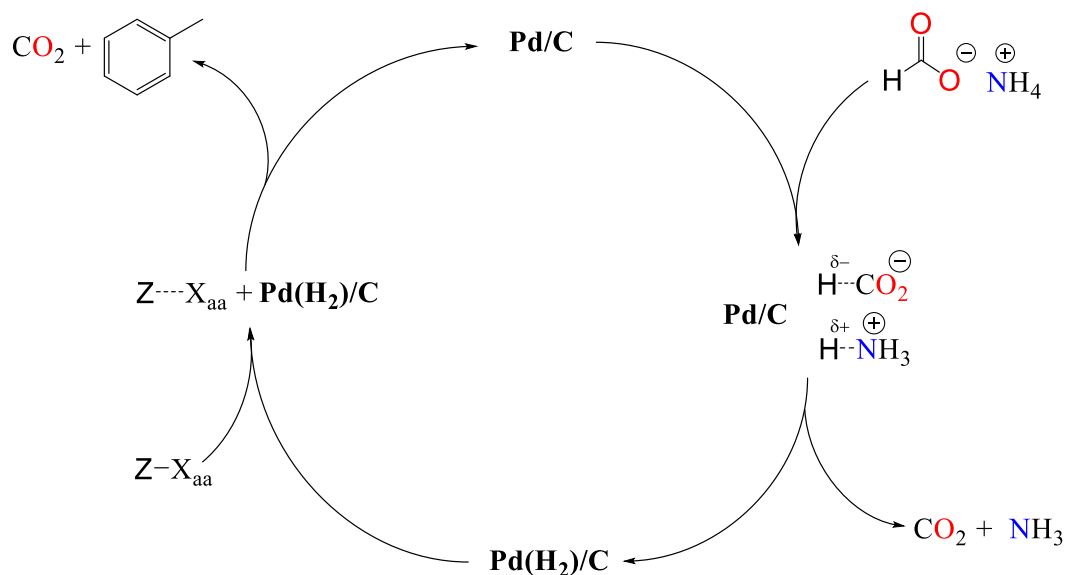


Figura 9 Possível mecanismo da reação de transferência catalítica de hidrogênio para a remoção do grupo Z em um aminoácido genérico (X_{aa}) usando formiato de amônio como fonte de hidrogênio.

As reações de hidrogenólise tem como catalisador o paládio, que faz a cisão homolítica do éster de benzila e promove sua descarboxilação espontânea (BODANSKY; ONDETTI, 1966). Normalmente, este metal é utilizado na forma de carvão paladiado (C/Pd) adicionado à reação. No entanto, o uso de C/Pd nem sempre é recomendado, visto que esse material pode ser pirofórico na presença de vapores de solventes orgânicos em concentrações de 5-10%, pode não produzir resultados reprodutíveis independentemente da fonte, é difícil de ser recuperado do meio reacional, não é reutilizável e os produtos da hidrogenação catalisada por ele podem

produzir compostos contaminados com o metal (ROSSI et al., 2007; SHELDON, 2019; YAKUKHNOV; ANANIKOV, 2019).

Em laboratórios de pesquisa é mais comum realizar as hidrogenações catalíticas, apesar de o gás H_2 ser perigoso devido à inflamabilidade, o que justifica a sua impraticidade para reações em larga escala e o uso de medidas de setups experimentais seguros. Assim, tem-se na hidrogenação por transferência (*ip. lit.* do inglês, *transfer hydrogenation* ou TH) uma alternativa mais segura, na qual são utilizadas espécies doadoras de hidrogênio de baixo custo, mais seguras e de fácil manipulação (JOHNSTONE; WILBY; ENTWISTLE, 1985; WANG; ASTRUC, 2015). Neste caso, espécies como o ácido fórmico são atraentes tanto por serem fontes seguras e convenientes para a doação de hidrogênio (DAGA; TADDEI; VARCHI, 2001; ELAMIN *et al.*, 1979; JOHNSTONE; WILBY; ENTWISTLE, 1985; LI *et al.*, 2016). No entanto, algumas hidrogenólises usando o ácido fórmico apresentaram menores valores de conversão dos substratos (RAJAGOPAL; SPATOLA, 1995), sendo preferível o uso de sais formiato, especialmente o formiato de amônio (GOWDA; ABIRAJ, 2002).

O nosso grupo de pesquisa foi pioneiro no emprego do nanocatalisador de Pd produzido pelo grupo da Prof^a. Dr^a. Liane C. Rossi ($Fe_3O_4@sílica-Pd$; ROSSI et al., 2007) em síntese peptídica. Nós o utilizamos em substituição ao C/Pd com sucesso na hidrogenação catalítica para remover o grupo Z de *Z-Ala-Phe*, *Z-Asp-Phe-OMe* e *Z-Phe-Phe* para obter os dipeptídeos sintéticos de grande interesse científico e na indústria (alimentos e materiais) *Ala-Phe* (flavorizante), aspartame (adoçante sintético) e difenilalanina (peptídeo auto-montável) (UNGARO et al., 2015; UNGARO, 2020).

2. OBJETIVOS

Dado o valor científico e o alto potencial de uso dos dipeptídeos *Lys-Trp-OBzl* e *Arg-Trp-OBzl* como agentes antimicrobianos, a pesquisa aqui descrita foi realizada com o objetivo de investigar a possibilidade de empregar a rota sintética anteriormente desenvolvida pelo grupo (UNGARO et al., 2015; UNGARO, 2020; **Figura 10**) para produzi-los de forma enantiosseletiva e mais limpa do que o método de síntese química em solução. Tal rota se mostrou apropriada para a síntese de outros dipeptídeos citados e na **Figura 10**.

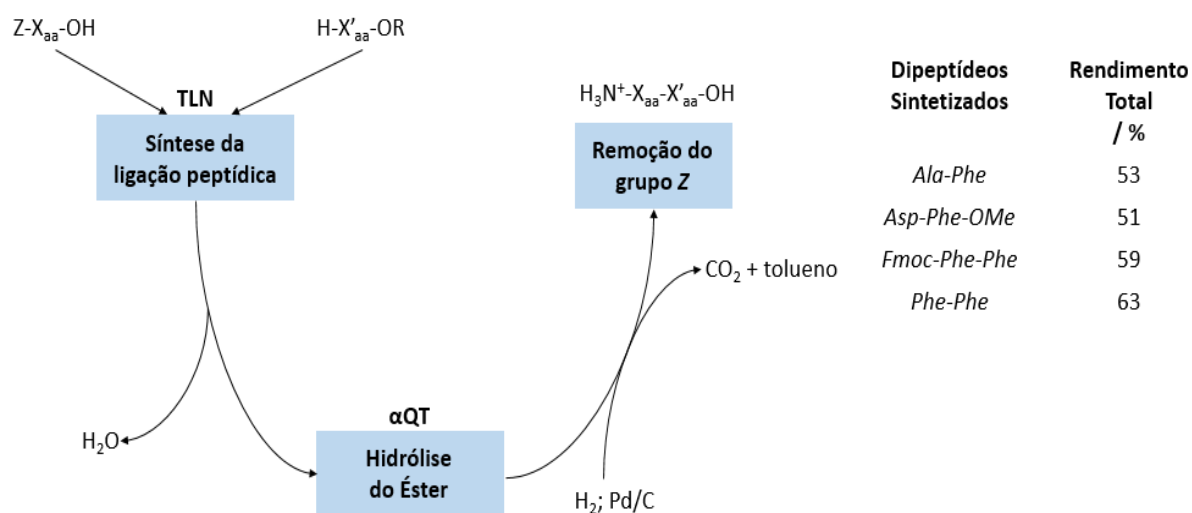


Figura 10 Rota sintética (UNGARO et al., 2015; UNGARO, 2020), onde *-OH* se refere à carboxila livre, *-OR* a éster, *Z-* ao benziloxicarbonil, *Fmoc-* é 9-fluorenilmetiloxicarbonil.

Para atingir tal objetivo geral, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

1. Sintetizar os dipeptídeos *Arg-Trp-OBzl* e *Lys-Trp-OBzl* mediante catálise pela tripsina pancreática bovina (TRY).
2. Testar a atividade biológica do intermediário *Z-Lys-Trp-OBzl* frente a *Candida parapsilosis*, a fim de verificar se este também apresenta atividade antifúngica.
3. Testar a possibilidade de utilizar formiatos como fontes de hidrogênio para as reações de hidrogenólise do grupo protetor *Z*.

4. Verificar a região-seletividade das reações de hidrogenólise na desproteção de Z e ésteres benzílicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Materiais

Neste trabalho foram utilizados derivados de aminoácidos: *Z-Lys-OMe.HCl*, *Trp-OBzl.HCl* e *Z-Lys-OBzl.TosH* (Bachem California, EUA); *Z-Arg-OBzl.TosH* (ChemImpex, Illinois, EUA); *Phe-OBzl.TosH* (Peptide Research Foundation, Osaka, Japão); *Phe-NH₂* (Sigma, Missouri, EUA). Caso necessário, os contraíons foram neutralizados utilizando TEA (Merck, Hohenbrunn, Alemanha). As enzimas utilizadas neste projeto foram a termolisina do *Bacillus termoproteoliticus rokko* (Sigma, Missouri, EUA) a tripsina de *Bos taurus* tratada com TPCCK (Sigma, Missouri, EUA).

Para o preparo das soluções tampão foram utilizados: tris(hidroximetil)-aminometano (*Tris.HCl*) (Sigma, São Paulo, Brasil); Acetato de sódio (Carlos Erba, Val-du-Reuil, França). Os solventes utilizados foram *MeOH* 99,8% (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil); *DMF* (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA); *n-Hexano* (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil); *AcOEt* (Synth, São Paulo, Brasil); *HFIP* (Sigma, Missouri, EUA); *TFE* (Sigma, Missouri, EUA); *ACN* de grau analítico (Merck, Missouri, EUA).

Como doadores de hidrogênio utilizou-se o formiato de amônio (Sigma, Missouri, EUA) cedido pela Prof^a Dr^a Marisa Helena Gennari de Medeiros.

O micro-organismo utilizado nos testes de atividade antimicrobiana foi a *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Os reagentes utilizados nos ensaios biológicos foram: meio PDB pH 5, peptona, ágar e dextrose da Synth (São Paulo, Brasil) ou *BD* (Maryland, EUA).

3.2. Métodos Analíticos

3.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC)

Para as análises, fracionamentos e purificação utilizou-se um cromatógrafo equipado de bombas Constametric 3500 e 3200 da Thermo Separation Products (Flórida, EUA). Utilizou-se também detectores UV-vis Spectromonitor 3100 da LDC Analytical; coluna analítica C18 (0,46 cm x 25,00 cm, 5 μ M, 300 Å) e semi-preparativa C18 (1,0 cm x 25,00 cm, 5 μ M, 300 Å) (Grace Vydac, Grace, EUA). Os cromatogramas foram registrados usando software *DataApex Clarity* (DataApex, Rep. Tcheca).

As eluições dos compostos das colunas foram feitas por meio de um gradiente linear utilizando como fase móvel a mistura dos solventes 0,1% TFA em água deionizada (A) e misturas de ACN / água (dependendo das propriedades químicas dos produtos) contendo 0,9 % de TFA (B). O fluxo empregado foi de 1 mL min⁻¹ (para coluna analítica) ou 3 mL min⁻¹ (para a coluna semi-preparativa) e o comprimento de onda utilizado de 210 nm.

3.2.2. Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas com Ionização por *Eletrospray* (LC/ ESI-MS)

Nesta técnica, alíquotas das misturas reacionais foram injetadas em sistema de RP-HPLC da Shimadzu Corporation (Quioto, Japan) (fluxo de 1 mL min⁻¹) composto por um degaseificador modelo DGU-20A3, duas bombas modelo LC-20AD, um injetor Rheodyne 8125, um forno de coluna modelo CTO-20A, uma pré-coluna C18 (5 x 2 mm, 4,6 mm) Shim-pack GVP-ODS e uma coluna Vydac C18 (150 x 2 mm, com diâmetro da partícula de 4,6 μ m e do poro de 12 nm) Shim-pack VP-ODS. Este sistema era acoplada a um espectrômetro de massas AmaZon X da Bruker Daltonics (Fahrenheitstraße, Alemanha) com fonte de ionização do tipo electrospray, modo ESI positivo e com analisador do tipo Ion trap. A voltagem aplicada no capilar foi de 3500 V. Para as análises dos espectros foi utilizado o software *HyStar 3.2*. Os

solventes utilizados no LC tiveram composição escolhidas de acordo com de cada derivado de aminoácido e dipeptídeo.

3.2.3. Hidrólise ácida total seguida de análise de aminoácidos do hidrolisado via HPLC

Quantidades específicas do material a ser analisado foram submetidas à hidrólise gasosa ácida total a 130 °C em uma estação de trabalho Pico-Tag (Waters, USA), ambas na presença de uma solução 50 % (v/v) de HCl/ ácido propiônico por 24h sob atmosfera de N₂.

Os hidrolisados ácidos obtidos foram liofilizados, dissolvidos em água e filtrados para serem analisados em sistema de HPLC Dionex (Califórnia, EUA) composto por um amostrador automático (AS40), bomba quaternária (GS50), forno para a coluna (LC25), coluna de troca iônica (2 x 250 mm, AminoPac PA10), detector eletroquímico (ED50) e uma plataforma “Chromeleon” para controle e aquisição de dados. A identificação e quantificação foram feitas por análise comparativa de uma solução-padrão de 19 aminoácidos de concentrações conhecidas (DING; YU; MOU, 2002; OKUDA-SHINAGAWA *et al.*, 2017).

3.2.4. Cálculo dos rendimentos reacionais da etapa de formação de ligação peptídica

Z-Lys-Trp-OBzl

Devido à grande quantidade de reações testadas juntou-se as alíquotas pré-analisadas dos meios reacionais e o produto *Z-Lys-Trp-OBzl* foi fracionado por RP-HPLC (**Figura 11**). As frações analisadas por ESI-MS /infusão direta, foram juntadas e liofilizadas. O material resultante foi solubilizado em 90% ACN/ 0,09% TFA e analisado por RP-HPLC, LC-MS e por análise de aminoácidos, para determinar a área do pico do aminoácido *Lys* e a concentração do *Z-Lys-Trp-OBzl*. O resultado da mostrou concentração de 1,3558 mmol L⁻¹ para *Z-Lys-Trp-OBzl* possibilitando relacionar área do pico de *Z-Lys-Trp-OBzl* com o número de mols estimar

a quantidade de produto. Tal relação permitiu estimar o rendimento sintético de cada reação de formação de *Z-Lys-Trp-OBzl*.

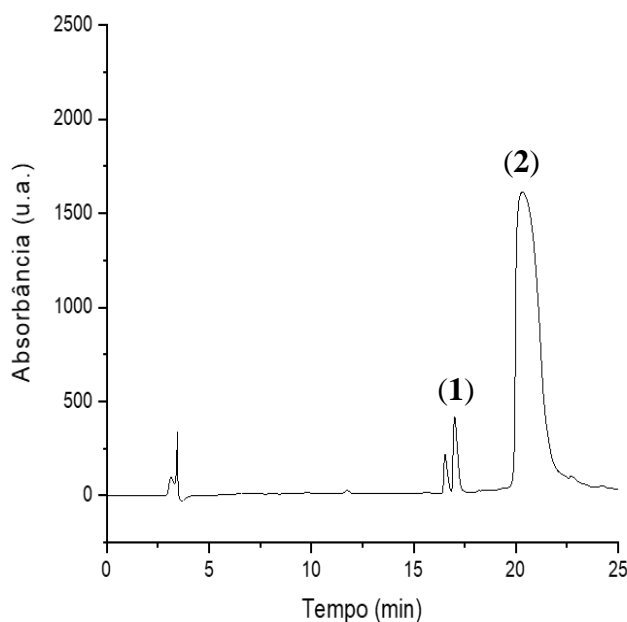


Figura 11 Perfil cromatográfico do *Z-Lys-Trp-OBzl* purificado. Condições de RP-HPLC: volume de injeção: 50 μ L); colunas: Vydac C18 (0,46 cm x 25,00 cm, 5 μ M, 300 \AA); solvente A: 0,1% TFA/ água; solvente B: 90% ACN/ 0,09% TFA/ água; fluxo: 1 mL min^{-1} (B); gradiente linear: 5 – 95% de B; comprimento de onda: 210 nm. Picos integrados e compostos identificados: *Trp-OBzl* (1); *Z-Lys-Trp-OBzl* (2).

Demais reações

Para as outras reações, estimou-se os rendimentos de formação dos produtos a partir de curvas de calibração feitas com os respectivos *Z-aminoácidos* e derivados, cálculo de áreas dos picos que os representam nos perfis de RP-HPLC obtidos no monitoramento das reações. Quando foi usado doador de acila esterificado, o total de *Z-X_{aa}* foi descontado do total do *Z-X_{aa}-OR* inicial.

3.3. Métodos preparativos

3.3.1. Método Geral para a Formação de ligações peptídicas catalisadas pela TRY

As reações foram realizadas primeiro solubilizando o doador de acila na alíquota de cossolvente empregado ou no próprio tampão, quando a temperatura utilizada permitiu a solubilização do reagente. Após a dissolução completa ou parcial do acceptor de acila e se necessário, adicionou-se quantidades equivalentes de TEA para neutralizar os contraíons

deixando o nucleófilo em sua forma ativa. Depois, adicionou-se o doador de acila e a enzima (sólido ou volume de solução estoque da enzima no tampão reacional). As misturas foram incubadas em temperaturas definidas e agitadas em *shaker* por intervalos de tempo definidos. Algumas reações foram feitas sem a enzima para servir de controles.

As reações foram monitoradas por RP-HPLC usando como solventes 0,1% TFA/ H₂O (solvente A) e 90 % ACN/ 0,09% TFA/ H₂O (solvente B), gradiente linear de 5 a 95% do solvente B, fluxo de 1 ml min⁻¹ e leitura em 210 nm. Os produtos reacionais foram identificados por espectrometria de massas ESI-MS.

Para reações em escala preparativa, tentou-se extrair o produto do meio reacional com AcOEt (3 vezes). A fração acetálica foi lavada com HCl 1 mol L⁻¹ (3 vezes, a fim de remover, especialmente, o acceptor de acila *Trp-OBzl*) e com água MilliQ (1 vez, a fim de remover sais formados pela lavagem anterior). A fração acetálica resultante foi seca em rotoevaporador Büchi Waterbath B-480 (BÜCHI Labortechnik, Suíça).

3.3.2. Remoção de Z por transferência catalítica de hidrogênio

As reações foram feitas seguindo um protocolo similar ao das reações de hidrogenação catalítica realizadas no laboratório (UNGARO et al., 2015; UNGARO, 2020) e da literatura (LINDEBERG, 1987). Foram adicionados o C/Pd (10%) (cerca de 10% da massa do peptídeo), formiato de amônio (2 equivalentes) e 500 µL de MeOH. Quando percebeu-se o desprendimento de gás da suspensão, adicionou-se 1 equivalente do *Z-aminoácido* ou *Z-aminoácido-OR*. A reação foi acompanhada por *TLC* e, algumas vezes por RP-HPLC e LC-MS, até a remoção total do *Z-X_{aa}* ou até 72 h de reação.

3.4. Ensaio de atividade antimicrobiana *Z-Lys-Trp-OBzl* em

Candida parapsilosis

Atividade anticandidal

Em cada poço de uma microplaca de 96 poços foram pipetados 10 μL de uma série de diluições de *Z-Lys-Trp-OBzl* ($1 \text{ mmol L}^{-1} - 1,95 \mu\text{mol L}^{-1}$) – preparadas a partir de uma alíquota do material purificado por meio de diluições seriadas –, 10 μL de água Milli-Q e 80 μL de uma suspensão de leveduras ($\text{Abs}_{595 \text{ nm}} = 0,444$) com concentração final de $2,5 \cdot 10^4$ células mL^{-1} em meio PDB (**Figura 12**).

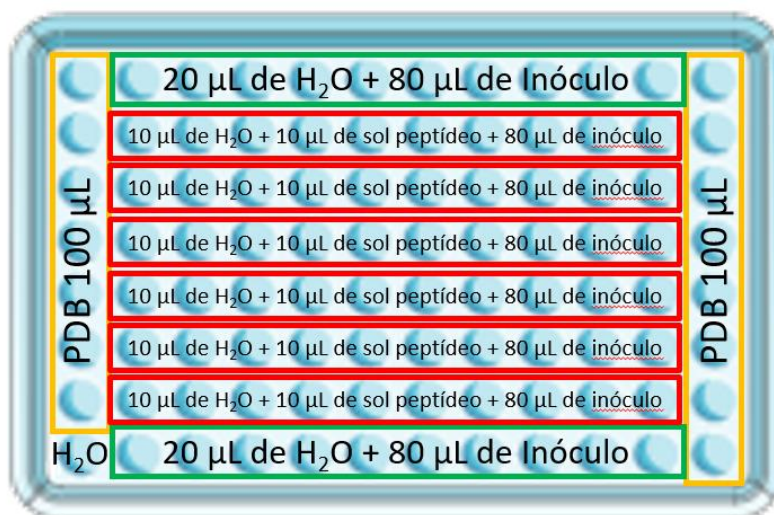


Figura 12 Esquema da placa para o ensaio antifúngico de *Z-Lys-Trp-OBzl* contra a *C. parapsilosis*.

Como controle positivo para o crescimento da *C. parapsilosis* utilizou-se 20 μL de água Milli-Q e 80 μL do inóculo e para controle negativo utilizou-se 100 μL do meio *PDB*, Anfotericina B ($78 \text{ nmol L}^{-1} - 40 \mu\text{mol L}^{-1}$). A placa foi mantida em estufa a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h, sem agitação e sob uma atmosfera úmida. O crescimento celular foi verificado qualitativamente (por meio da visualização da placa e dos conteúdos dos poços) e quantificado a partir das medidas de absorbância em 595 nm em um leitor de microplacas (Labsystem iEMS Analyser), sendo que o valor da *MIC* corresponde à concentração mínima para inibição total do crescimento do microrganismo. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

Atividade candidacida

Tomou-se 100 μL dos conteúdos dos poços da placa que indicaram inibição do crescimento fúngico e do poço de concentração imediatamente inferior à *MIC* para uso como

controles positivos neste ensaio. Em seguida, alíquotas de 100 μ l também foram retiradas e utilizadas para plaqueamento em ágar Sabouraud e as placas resultantes foram incubadas a 35 °C por 24h. O valor de *MFC* foi determinado pela concentração de AMP em que não se observou o crescimento celular no ágar.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese enzimática termodinamicamente controlada de ligação peptídica catalisada por TLN ou TRY

Esta é a etapa 1 da rota sintética escolhida mostrada em Objetivos.

Além de *Lys-* e *Arg-Trp-OBzl* terem se mostrado mais ativos do que os análogos que tiveram o éster benzílico substituído (**Tabela 2**; STRØM; REKDAL; SVENDSEN, 2002), neste estudo de rota sintética o emprego do *Trp-OBzl* como doador de acila se justifica pela necessidade de proteção da α -carboxila do *Trp* para reconhecimento em S_1' como substrato pela endoprotease escolhida TRY ou TLN (a não esterificação poderia levar ao insucesso da reação de formação da ligação peptídica; SAJGÓ, 1979) e para redução do *pKa* de α -amina do aminoácido, tornando-o um aceptor de acila (ou nucleófilo) mais eficiente no pH escolhido de trabalho (PETKOV, 1982).

Inicialmente, elas foram catalisadas por TLN devido à especificidade primária desta enzima por aminoácidos hidrofóbicos em P_1' (ODA *et al.*, 2005). Assim, tentou-se a síntese do *Z-Lys-Trp-OBzl* (**Tabela 4**) e do *Z-Arg-Trp-OBzl* usando quantidades equivalentes do doador e aceptor de acila, bem como excesso molar do último (2 vezes), pois estudos anteriores do nosso grupo usando tais condições experimentais forneceram os produtos desejados com rendimentos reacionais médios-altos (LIRIA *et al.*, 2014; UNGARO *et al.*, 2015; UNGARO, 2020). Infelizmente, nenhum produto foi formado em quantidade significativa a partir de múltiplas tentativas (dados não apresentados).

Cabe informar que no monitoramento por RP-HPLC da reação A (**Tabela 4**) observou-se a formação de produto com tempo de retenção muito próximo ao do dipeptídeo desejado, porém experimentos de coeluição dos meios reacionais com o padrão *Z-Lys-Trp-OBzl* mostrados na **Figura 13 A** indicou que ele não correspondia ao dipeptídeo desejado.

Além disso, a comparação do cromatograma da reação 1 com cromatogramas de reações de formação de *Z-Arg-Trp-OBzl* nas mesmas condições da reação 1 e de alguns cromatogramas de sínteses dos dois dipeptídeos mostrou a presença do mesmo pico (**Figura 13 B**). Após eluição e coleta do produto correspondente seguidas de análise por MS – infusão direta (**Figura 13 C**), verificou-se que este apresentava massa molar coincidente com a de um fragmento da TLN [*IYQNESG*, simulado pela ferramenta *PeptideCutter* (GASTEIGER *et al.*, 2005)], o que pode ser explicado pela ocorrência de autólise da enzima no meio reacional. Este fator pode ter contribuído para o insucesso das reações realizadas.

Tabela 4 Condições reacionais testadas para a síntese de *Z-Lys-Trp-OBzl* catalisadas por TLN ou TRY.

Reação	[Z-Lys] mmol L ⁻¹	[Trp-OBzl] mmol L ⁻¹	Enz.	[E] μmol L ⁻¹	T /°C	Co- solvente	Concentração Cossolvente / % (vol)	Rendimento reacional / %
1	50	100	TLN	32	50	AcOEt	50	0
2	100	50	TLN	35	50	AcOEt	50	0
3	5	8	TLN	42	50	-	-	0
4	13	18	TRY	43	37,5	-	-	0
5	12	18	TRY	33	60	-	-	0
6 ^a	25	250	TRY	35	35	DMF	40	10
7 ^b	25	250	TRY	35	35	DMF	40	11
8 ^c	25	250	TRY	35	35	DMF	40	8

Condições Reacionais: Tampão Tris 50 mmol L⁻¹, pH 8, contendo: cloreto de cálcio: 20 mmol L⁻¹. Os aceptores de acila na forma de cloridratos foram neutralizados com TEA. Agitação: 300 rpm.

a) Solução de acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 6, contendo CaCl₂: 20 mmol L⁻¹ (pH aparente do meio = 7,5);

b) Solução de Tris 50 mmol L⁻¹, pH 7, contendo CaCl₂: 20 mmol L⁻¹ (pH aparente do meio = 7);

c) Solução de Tris 50 mmol L⁻¹, pH 8, contendo CaCl₂: 20 mmol L⁻¹ (pH aparente do meio = 8).

Na literatura referente a sínteses catalisadas por TLN (OKA; MORIHARA, 1980) encontra-se relatos de que os rendimentos de reações de formação de ligação peptídica envolvendo *Leu-OR* como acceptor de acila foram baixos mesmo quando se empregou grande

excesso deste (5 X), o que provavelmente se deve à solubilidade moderada deste éster de *Leu* nos meios reacionais. O mesmo pode ocorrer com *Trp-OBzl*, outro fator que pode ter afetado negativamente as reações realizadas até então. Por outro lado, muitas são as sínteses de dipeptídeos protegidos catalisadas por TLN bem sucedidas, incluindo aquelas descritas nos nossos trabalhos prévios como MIRANDA *et al.*, 1989, MIRANDA *et al.*, 1991; LIRIA *et al.*, 2014; UNGARO *et al.*, 2015; UNGARO, 2020). Porém, nestes estudos o doador de acila não era *Z-Arg* ou *Z-Lys*.

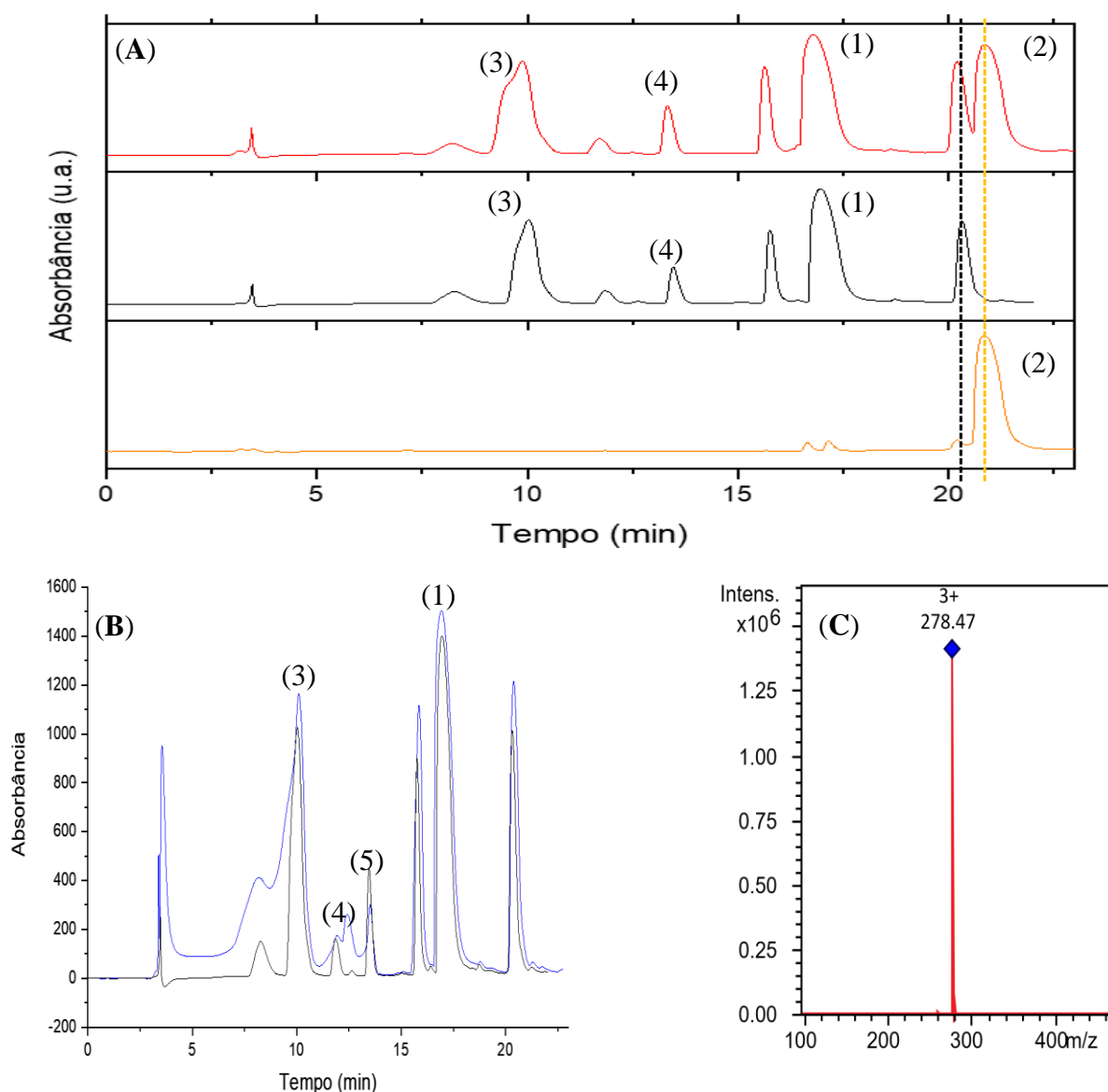


Figura 13 Cromatogramas dos experimentos de coeluição do meio reacional 1 com o padrão de *Z-Lys-Trp-OBzl* (A); entre os meios reacionais de síntese de *Z-Arg-Trp-OBzl* com *Z-Lys-Trp-OBzl* (B) e espectro de massas do material eluído em 20 min (C).

Comentários: A – solução da alíquota de 72h e do padrão de *Z-Lys-Trp-OBzl* (vermelho); alíquota do meio reacional após 72h de reação (preto) e padrão de *Z-Lys-Trp-OBzl* (laranja); B – solução das alíquotas de 72h das reações de *Z-Arg-Trp-OBzl* e *Z-Lys-Trp-OBzl* (azul) e alíquota do meio reacional após 72h de reação do *Z-Lys-Trp-OBzl* (preto). Condições de RP-HPLC: volume de injeção 10 μ L (A – laranja); 60 μ L (A - vermelho); 70 μ L (B - azul) e 50 μ L (diluído 10 vezes; B - restante); coluna: Vydac C18; solvente A: 0,1% TFA/ água; solvente B: 90% ACN/ 0,09% TFA/ água; fluxo: 1 mL min⁻¹; gradiente linear: 5 – 95% de B em 30 min; comprimento de onda: 210 nm. Condições MS: voltagem do capilar: 4,5 kV; Temperatura: 220°C; modo de ionização: ES+. Picos: *Trp-OBzl* (1); *Z-Lys-Trp-OBzl* (2); *Trp* (3); *Z-Lys* (4); *Z-Arg* (5); *Z-Arg-Trp-OBzl* (6); *Z-Lys-OMe* (7).

Assim, considerou-se que a troca do biocatalisador deveria ser tentada, pois outra enzima teria inclusive um pH ótimo diferente que poderia ser um fator relevante em novas reações.

Muitos artigos descrevem uso de excesso de acceptor de acila (INOUE et al., 1979; TSUZUKI; OKA; MORIHARA, 1980; JAKUBKE; KÖNNECKE, 1987; KULLMANN, 1987) em reações cineticamente controladas de formação de ligação peptídica usando a TRY como biocatalisador, que fornecem os dipeptídeos desejados com rendimentos satisfatórios. Neste estudo os alvos têm a *Lys* ou a *Arg* na posição P_1 e, portanto, o *Z-Lys* e *Z-Arg* seriam substratos bons e específicos dessa enzima.

Quando isso foi feito usando excesso de 10 vezes do acceptor de acila variando o pH aparente dos meios reacionais, verificou-se que a reação a 35°C gerou os produtos desejados (**Figuras 14 e 15**) confirmados por ESI-MS (**Figura 16**). O principal motivo para o emprego do excesso de nucleófilo seria o de favorecer a formação de produto pela lei de ação das massas (BORDUSA, 2002) .

Observou-se uma diferença nos perfis das curvas do monitoramento das reações para a síntese do *Z-Arg-Trp-OBzl* e do *Z-Lys-Trp-OBzl* (**Figura 14**). Para o *Z-Lys-Trp-OBzl* (**Figura 14 A**), parece que o pH aparente estudado teve pouca influência sobre o rendimento reacional, visto que os valores de área obtidas são próximos (maiores para pH 7-8) e o perfil das curvas é similar nos diferentes pH. Além disso, reparou-se que em 24h de reação, as áreas dos picos representativos do produto desejado diminuiriam consideravelmente, indicando a hidrólise secundária dele pela TRY.

Já para a síntese do *Z-Arg-Trp-OBzl* (**Figura 14 B**), verificou-se que a maior quantidade foi formada rapidamente em 6,5, porém em pH 8, foram obtidos valores altos superiores aos obtidos em pH 7, porém em menor quantidade que no pH 6,5.

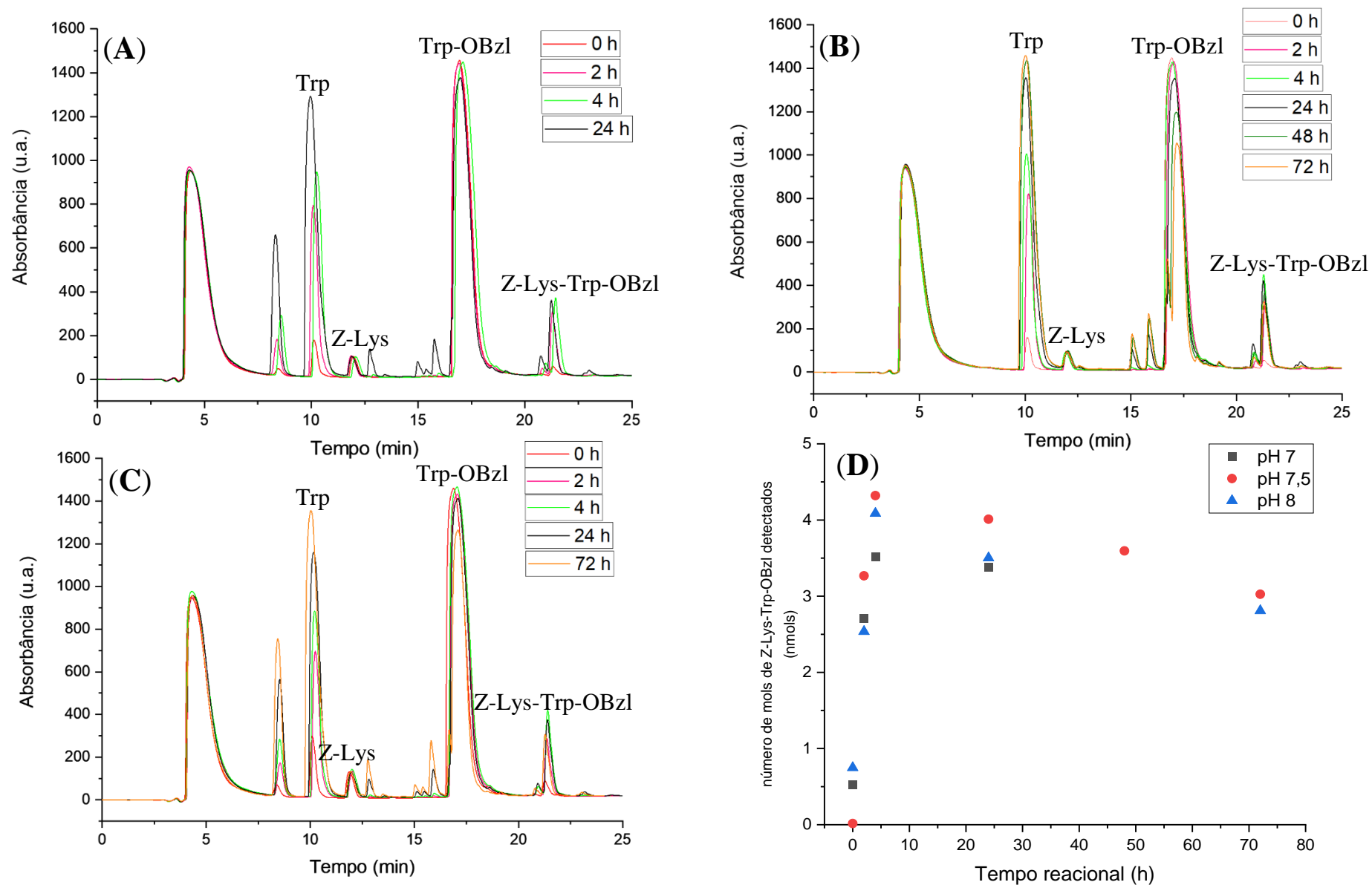


Figura 14 Cromatogramas referentes ao monitoramento das sínteses de *Z-Lys-Trp-OBzl* (A – C) e cinética de formação do *Z-Lys-Trp-OBzl* (D) catalisadas por TRY. Valores de pH aparente dos meios reacionais: 7 (A); 7,5 (B); 8 (C). Condições de RP-HPLC: volume de injeção 10 μ L; coluna: Vydac C18; solvente A: 0,1% TFA/ água; solvente B: 90% ACN/ 0,09%TFA/ água; fluxo: 1 mL min^{-1} ; gradiente linear: 5 – 95% de B em 30 min; comprimento de onda: 210 nm.

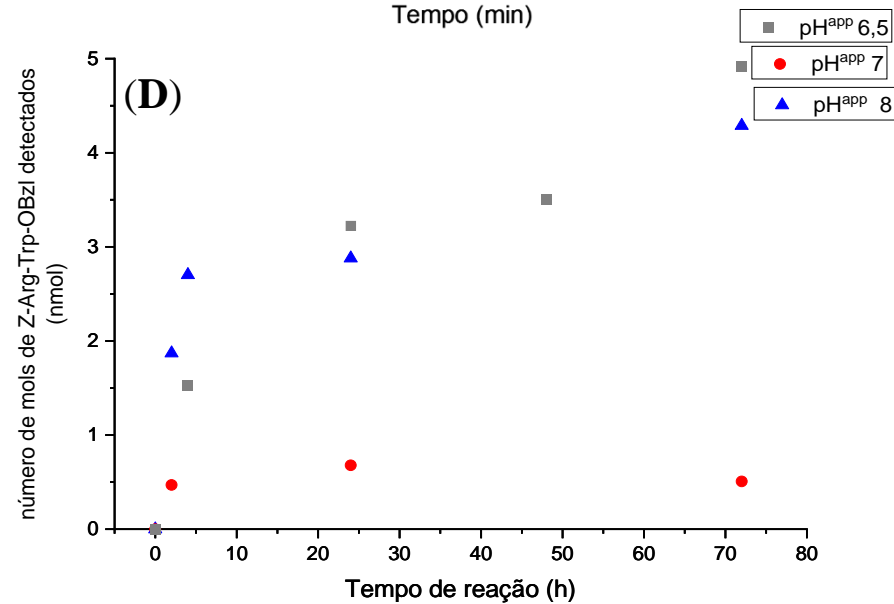
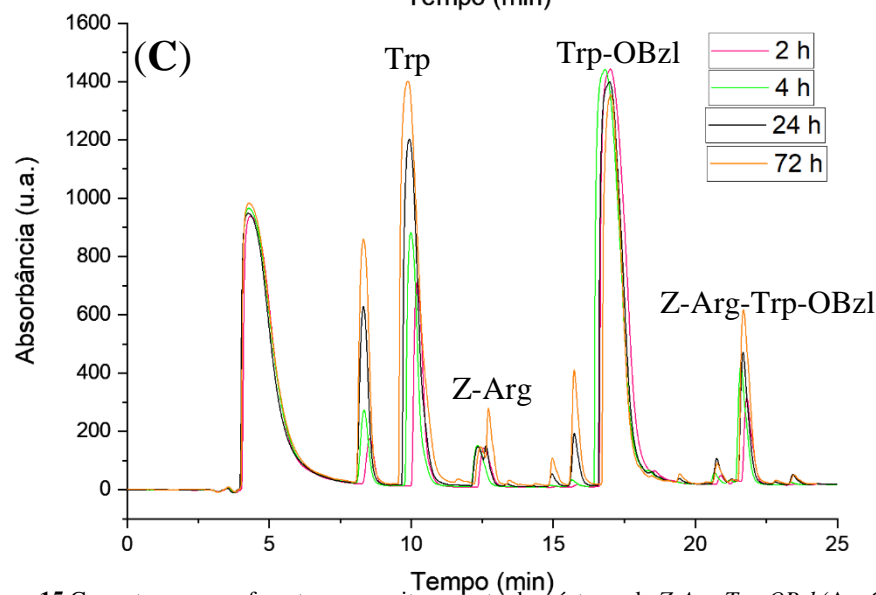
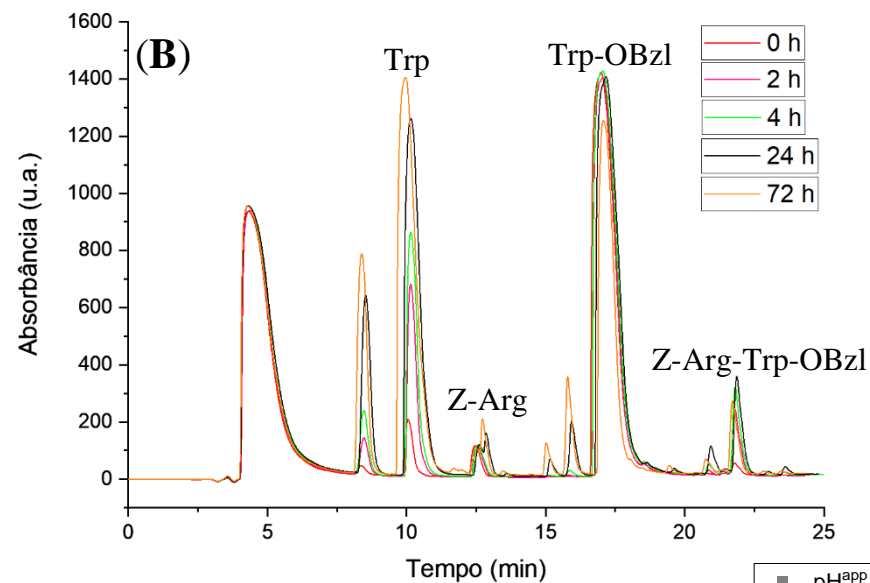
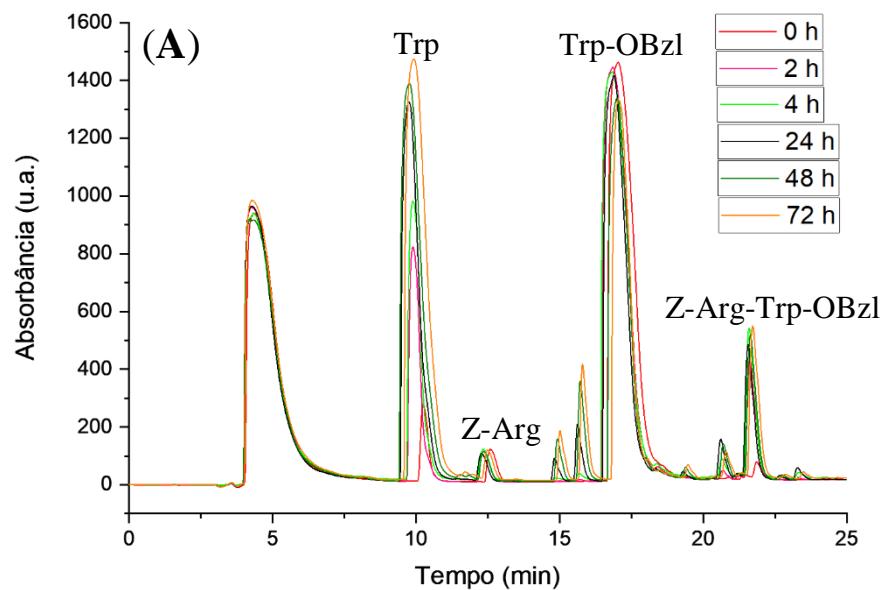


Figura 15 Cromatogramas referentes ao monitoramento das sínteses de *Z-Arg-Trp-OBzl* (A – C) e cinética de formação de *Z-Arg-Trp-OBzl* (D) catalisadas por TRY em diferentes pH aparentes. Valores de pH aparente dos meios reacionais: 6,5 (A); 7 (B); 8 (C). Condições de RP-HPLC: volume de injeção 10 μ L; coluna: Vydac C18; solvente A: 0,1% TFA/ água; solvente B: 90% ACN/ 0,09%TFA/ água; fluxo: 1 mL min^{-1} ; gradiente linear: 5 – 95% de B em 30 min; comprimento de onda: 210 nm.

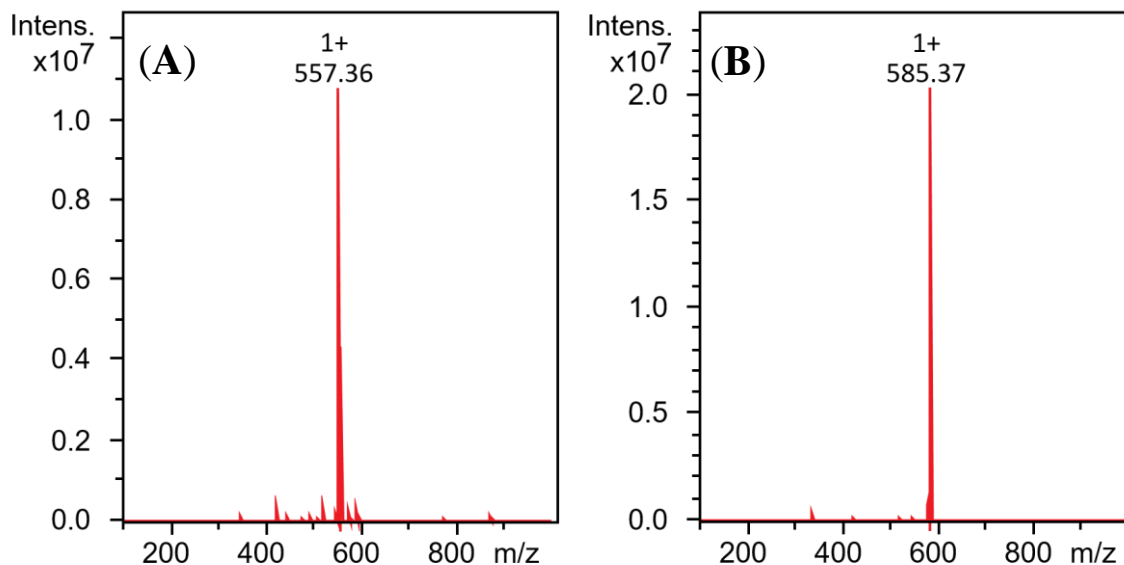


Figura 16 Espectros de *ESI-MS* obtidos através de infusão direta dos produtos de síntese de *Z-Lys-Trp-OBzl* ($m/1$ esperado: 557,63) (A) e de *Z-Arg-Trp-OBzl* ($m/1$ esperado: 585,61) (B).

A variação do pH aparente nos mostraria o pH ótimo para a etapa 1 das sínteses – o qual espera-se ser igual à faixa de pH ótimo da enzima. De acordo com a literatura, a faixa pH ótimo de sínteses termodinamicamente controladas com a tripsina estaria entre 6 e 7 (KULLMANN, 1987) e, em alguns trabalhos, fez-se necessário o uso de meios com grandes quantidades de solventes orgânicos (BLANCO; ALVARO; GUISÁN, 1991). Mesmo que tal faixa de pH não corresponda à da atividade ótima da tripsina reportada pelo nosso grupo (entre 8 – 10) (UNGARO, 2020), os resultados obtidos mostram que foi possível sintetizar os dipeptídeos usando a etapa 1 da rota de escolha por síntese termodinamicamente controlada nas condições discutidas acima com os seguintes rendimentos calculados: *Z-Lys-Trp-OBzl*: 8-11% em pH 7-8 após 4 h, e *Z-Arg-Trp-OBzl*: 1-11% em pH 6,5-8 após 72 h. Como mostrado na **Figura 15**, neste segundo caso os rendimentos foram calculados pelo desaparecimento de *Z-Arg* nos meios reacionais e o pico referente a ele sofre interferência ao longo das reações que compromete os cálculos de área.

4.2. Síntese enzimática cineticamente controlada de ligação peptídica catalisadas por TRY

Z-Lys-Trp-OBzl

Visto que os dois alvos do projeto são dipeptídeos compostos por um aminoácido básico em P_1 e triptofano em P_1' , buscou-se otimizar a etapa 1 utilizando o *Z-Lys-Trp-OBzl* como modelo da reação de formação da ligação peptídica catalisada por TRY. Assim, dois outros tipos de meios reacionais foram empregados: 1) Meios aquo-orgânicos compostos majoritariamente por tampão. 2) Meios orgânicos compostos majoritariamente por solventes orgânicos. Em paralelo, o doador de acila passou a ser usado na forma esterificada (*Z-Lys-OMe*), pois a TRY também tem atividade esterásica necessária às sínteses cineticamente controladas.

a) Meios aquo-orgânicos compostos majoritariamente por tampão (Tabela 5)

Devido à dificuldade em solubilizar o acceptor de acila apenas em tampão (*i.e. Trp-OBzl*), tentamos abordagens que utilizassem o mínimo possível de cossolvente miscível em água e temperaturas mais elevadas. A condição da reação A da **Tabela 5** permitiu a solubilização do acceptor de acila. Ela foi usada em estudo prévio do grupo para a síntese de *Z-Trp-Trp-OBzl* catalisada pela TLN (dados não publicados) e por LIRIA et al., 2014, UNGARO et al., 2015; UNGARO, 2020 e, em princípio, o seu emprego para reações catalisadas pela TRY não seria tão problemático em tempos reacionais curtos, pois a enzima pancreática bovina conseguiria manter-se ativa em temperaturas mais altas em sistemas tampão contendo íons cálcio (SIPOS; MERKEL, 1970).

Os rendimentos de muitas das tentativas de síntese realizadas (**Tabela 5**), mostram que a reação U foi a que atingiu o maior rendimento reacional. O uso de excesso de acceptor de acila não trouxe aumento significativos à produtividade, sugerindo que a presença de éster

benzílico no *Trp* pode levar a impedimento estérico na interação com TRY, visto que o uso de amidas e fenilhidrazidas de *Trp* já foram reportadas com sucesso para a síntese de dipeptídeos catalisadas por esta endopeptidase (KULLMANN, 1983; EICHHORN et al., 1997).

As **Figuras 17A** e **17B** mostram os resultados do monitoramento das reações *G* e *U* por RP-HPLC. Para essas reações, pode-se concluir pela não visualização o pico correspondente ao *Z-Lys-OMe* ($t_R \sim 15$ min), que ele é o reagente limitante da reação e que em 30 min é o tempo máximo de formação de *Z-Lys-Trp-OBzl*, que posteriormente é consumido por hidrólise da ligação peptídica formada. Os cromatogramas ainda mostram o aparecimento de 2 picos, sendo o primeiro o *Z-Lys* ($t_R \sim 11$ min) e o segundo o *Z-Lys-Trp-OBzl* ($t_R \sim 21$ min) confirmado por ESI-MS (**Figura 17 C**), visto que este apresentou $m/z = 557,33$ ($m/1$ esperado = 557,7). Entretanto, as reações não apresentaram bons rendimentos de formação do dipeptídeo.

As demais reações feitas com DMF foram monitoradas por *TLC*, com a qual verificou-se qual seria o melhor tempo com base nas manchas de *Trp-OBzl* e do que pareceu ser o *Z-Lys-Trp-OBzl* (R_F de 0,66 e 0,57 respectivamente). Em seguida os tempos 0 e o que apresentou maior da mancha de R_F 0,57 foram cromatografados por RP-HPLC seguindo os mesmos critérios e fornecendo os rendimentos apontados na **Tabela 5**, na qual os tempos reacionais correspondem aos tempos de maior rendimento.

Uma análise rápida dos dados nos permite verificar que o aumento da concentração da enzima não incrementou o rendimento reacional, mas fez com que o tempo ótimo reacional fosse menor, o que condiz com a literatura sobre o uso desta metodologia (BRATOVANOVA; STOINEVA; PETKOV, 1988). Sobre o uso do solvente, notou-se que o DMF é melhor porque contribui para solubilizar o aceptor de acila, permitindo o uso dele em maiores concentrações, porém em *L* e *M*, obteve-se o mesmo rendimento reacional em 4 h. Os melhores rendimentos foram obtidos em 40 % de DMF (% volume; reações *U*, *V* e *W*), mas eles ainda são muito baixos, o que provavelmente se deve à redução da atividade enzimática devido a

Tabela 5 – Condições reacionais testadas para a síntese cineticamente controlada de *Z-Lys-Trp-OBzl*

Reação	[Z-Lys-OMe] / mol L ⁻¹	[Trp-OBzl] / mol L ⁻¹	Temperatura / °C	Cossolvente	Concentração de Cossolvente / % (volume)	Reagentes são solúveis?	Rendimento máximo / %	Tempo reacional ótimo / min
A	0,1	0,12	60	-	-	Sim	1	15
B ^a	0,03	0,03	37	MeOH	20	Não	4	0
C ^a	0,02	0,03	37	MeOH	40	Não	5	0
D	0,03	0,03	37	MeOH	40	Não	5	15
E	0,02	0,03	37	MeOH	65	Sim	3	30
F ^b	0,03	0,03	15	MeOH	40	Não	3	30
G ^b	0,02	0,03	37,5	MeOH	40	Não	6	30
I	0,1	0,12	37	DMF	12,5	Não	2	2
J	0,1	0,12	15	DMF	12,5	Não	3	15
K	0,1	0,12	15	DMF	25	Não	5	15
L	0,02	0,1	15	DMF	12,5	Não	4	15
M	0,02	0,03	15	DMF	12,5	Sim	4	15
N	0,05	0,06	15	DMF	12,5	Sim	3	15
O	0,1	0,12	15	DMF	50	Sim	9	30
P ^b	0,1	0,12	15	DMF	50	Não	5	60
Q ^c	0,1	0,12	15	DMF	50	Sim	9	30
R	0,1	0,12	15	DMF	40	Sim	13	60
S ^b	0,1	0,12	15	DMF	40	Não	14	30
T	0,1	0,12	25	DMF	40	Sim	10	5
U ^c	0,03	0,24	15	DMF	40	Sim	16	30
V ^c	0,05	0,24	15	DMF	40	Sim	13	30
W ^c	0,1	0,24	15	DMF	40	Sim	12	30
X ^c	0,2	0,24	15	DMF	40	Sim	9	60

Condições Reacionais: Tampão Tris 50 mmol L⁻¹, pH 8, contendo: CaCl₂: 20 mmol L⁻¹. Os aceptores de acila na forma de cloridratos foram neutralizadas com TEA. Concentração de tripsina pancreática de bovina no meio reacional: 1 μmol L⁻¹. Agitação: 300 rpm.

a) Concentração de tripsina pancreática bovina no meio reacional: 21 μmol L⁻¹. b) Contém: 1 mol L⁻¹ de sulfato de amônio. c) Tampão: Tris 0,2 mol L⁻¹, pH 8, contendo: cloreto de cálcio: 50 mmol L⁻¹.

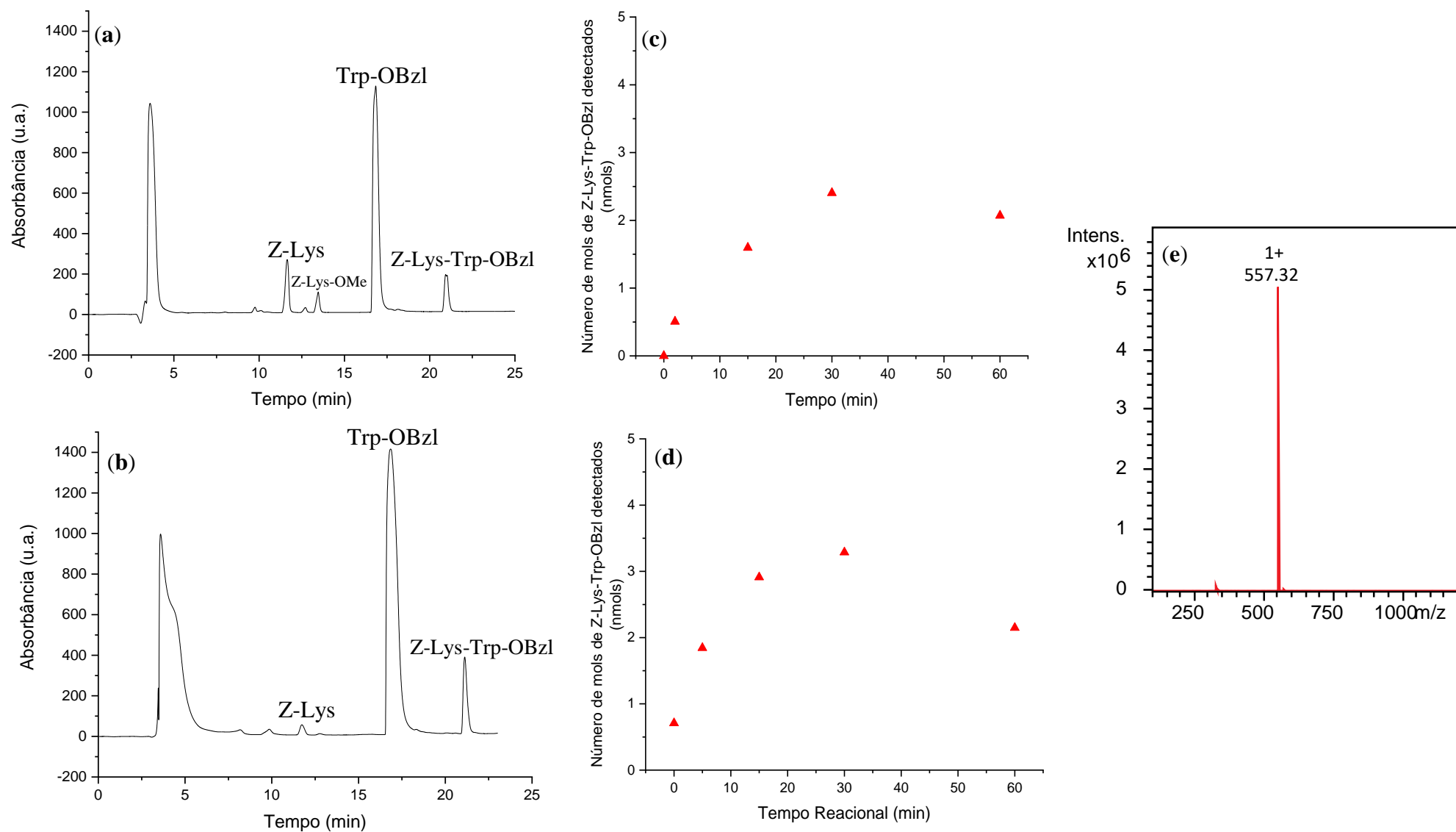


Figura 17 Perfis cromatográficos para as reações *G* (a) e *U* (b) da Tabela 5 (gráficos inseridos: cinéticas de formação do produto) e a cinética de formação das respectivas reações (c – d, respectivamente) e espectro de massas obtidos por infusão direta do pico correspondente ao dipeptídeo (Z-Lys-Trp-OBzl; $t_R = 21$ min) (e). Condições de *RP-HPLC*: volume de injeção 10 μL (A) e 50 μL (10x diluído; B); coluna: Vydac C18; solvente A: 0,1% TFA/ água; solvente B: 90% ACN/ 0,09%TFA/ água; fluxo: 1 mL min^{-1} ; gradiente linear: 5 – 95% de B em 30 min; comprimento de onda: 210 nm. Condições *ESI-MS*: voltagem do capilar: 4,5 kV; Temperatura: 220°C; modo de ionização: ES^+ .

mudanças estruturais como as evidenciadas em Subtilisina, uma Serino-protease que exibe ligação de hidrogênio entre o anel imidazólico da *His*₆₄ e o resíduo ácido de *Asp*₃₂ da tríade catalítica desta enzima, que é inativada em meios reacionais contendo 50% (% , em volume) de DMF (BORDUSA, 2002).

Visto que o produto hidrolítico (*Z-Lys*) formado a partir de *Z-Lys-OMe* e da hidrólise secundária do produto formado *Z-Lys-Trp-OBzl* parece ser o majoritário nas reações realizadas e que o aumento da concentração de nucleófilo não causou aumentos significativos no rendimento do *Z-Lys-Trp-OBzl*, uma das hipóteses para aumentar os rendimentos da síntese de *Z-Lys-Trp-OBzl* seria o uso de solventes orgânicos com as quais o meio reacional não inativaria a TRY e em que a quantidade de água (o nucleófilo da reação da hidrólise) seria drasticamente reduzida de modo a aumentar a velocidade da reação de aminólise (*i.e.* da formação do *Z-Lys-Trp-OBzl*) frente a hidrólise do intermediário acil-enzima (ES).

b) Meios orgânicos compostos majoritariamente por solventes orgânicos (Tabela 6)

As condições testadas foram baseadas em estudos anteriores do grupo (BEMQUERER *et al.*, 1998; LIRIA *et al.*, 1998; LIRIA, 2004; LIRIA *et al.*, 2008) e em trabalhos da literatura utilizando TRY como catalisador da formação da ligação peptídica (ČEŘOVSKÝ, 1990; NISHINO *et al.*, 1992). As reações foram monitoradas por RP-HPLC e as identificações feitas por LC-MS ou ESI-MS – infusão direta (**Figura 18**).

Para as reações contendo AcOEt ou Hexano (*D a H* – **Tabela 6**) verificou-se a formação de sistema bifásico. O sucesso da reação depende da velocidade na formação do produto dipeptídico e da partição deste para a fase orgânica. A escolha de hexano deve-se à grande diferença de polaridade entre o hexano e o tampão, mas infelizmente o *Trp-OBzl* se mostrou pouco solúvel neste solvente orgânico como é no tampão, tornando o sistema pouco atrativo. Já o AcOEt, além de solubilizar o *Trp-OBzl*. No entanto, o resultado mostra que o rendimento

reacional usando AcOEt (reação *E* – **Tabela 6**) foi péssimo comparado às reações usando hexano (reação *D* – **Tabela 6**).

Quanto às tentativas em meio orgânico monofásico, foi usado ACN que em trabalhos da literatura se mostrou apropriado para a síntese de ligações peptídicas catalisadas pela TRY (ČEŘOVSKÝ, 1990). Como exemplos do resultado, a reação *A* da **Tabela 6**, houve solubilização dos reagentes no meio reacional, mas não se verificou formação do produto nos tempos testados. Na reação *B*, foi formado o dipeptídeo quando excesso de acceptor de acila foi utilizado, ainda que este não tenha se solubilizado totalmente, indicando aumento da velocidade da reação aminolítica da acil-enzima.

Em princípio, a força iônica do meio pode afetar os rendimentos das reações. Um exemplo disto, são as reações *I* – *K* (**Tabela 6**), nas quais verificou-se um aumento no rendimento reacional com o aumento da força iônica do meio reacional, indo de 1% (reação *I*, $I = 85 \text{ mmol L}^{-1}$) a 6% (reação *K*, $I = 155 \text{ mmol L}^{-1}$). O mesmo não foi observado para reações em outras condições experimentais.

Sumarizando, sob o ponto de vista de rendimento de formação de produto, as sínteses cineticamente controladas, tanto em meios contendo alta ou baixíssima quantidade de água no meio reacional não se mostraram vantajosas. Como mostra a **Tabela 6**, algumas só atingiram o rendimento máximo em tempos superiores a 24 h. Na maioria delas, *Z-Lys* também foi formado a partir do doador de acila *Z-Lys-OMe*.

Tabela 6 – Condições reacionais testadas para a síntese cineticamente controladas de *Z-Lys-Trp-OBzl* em meios majoritariamente orgânicos

Reação	[Z-Lys-OMe] / mol L ⁻¹	[Trp-OBzl] / mol L ⁻¹	Temperatura / °C	Cossolvente	Concentração de cossolvente / % (volume)	Os reagentes estão solúveis?	Houve formação de Produto?	Rendimento máximo / %	Tempo reacional ótimo / h
A ^a	0,03	0,03	30	ACN	90	Sim	Não	-	-
B ^a	0,10	0,20	32	ACN	90	Não	Sim	8	1
C ^a	0,10	0,20	30	ACN	95	Não	Sim	7	4
D	0,10	0,12	37	Hexano	96	Não	Sim	4	0,5
E	0,10	0,12	37	AcOEt	96	Sim	Sim	1	1
F ^c	0,03	0,24	37	AcOEt	96	Não	Não	-	-
G ^c	0,03	0,24	37	Hexano	96	Não	Não	-	-
H ^d	0,05	0,07	37	Hexano	80	Não	Não	-	-
I	0,10	0,12	25	HFIP:DMF (1:1)	96	Sim	Sim	1	1
J ^b	0,10	0,20	25	TFE:DMF (1:1)	96	Sim	Sim	6	24
K ^b	0,10	0,20	25	HFIP:DMF (1:1)	96	Sim	Sim	6	48

Condições Reacionais: Tampão Tris 50 mmol L⁻¹, pH 8, contendo: CaCl₂: 20 mmol L⁻¹. O acceptor de acila usado na forma de cloridrato foi neutralizado com TEA. Concentração de TRY no meio reacional: 1 μmol L⁻¹. Agitação: 300 rpm.

a) Fase aquosa: solução de CaCl₂ 10 mmol L⁻¹ e concentração de TRY no meio reacional: 27 μmol L⁻¹.

b) Fase aquosa: tampão Tris 50 mmol L⁻¹, pH 8, contendo CaCl₂ 100 mmol L⁻¹ ou CaCl₂ 10 mmol L⁻¹.

c) Fase aquosa: tampão Tris 0,2 mol L⁻¹, pH 8, contendo: CaCl₂ 50 mmol L⁻¹. Concentração de TRY: 0,6 μmol L⁻¹.

d) Reação catalisada utilizando cPPL, concentração de lipase: 50 mg mL⁻¹.

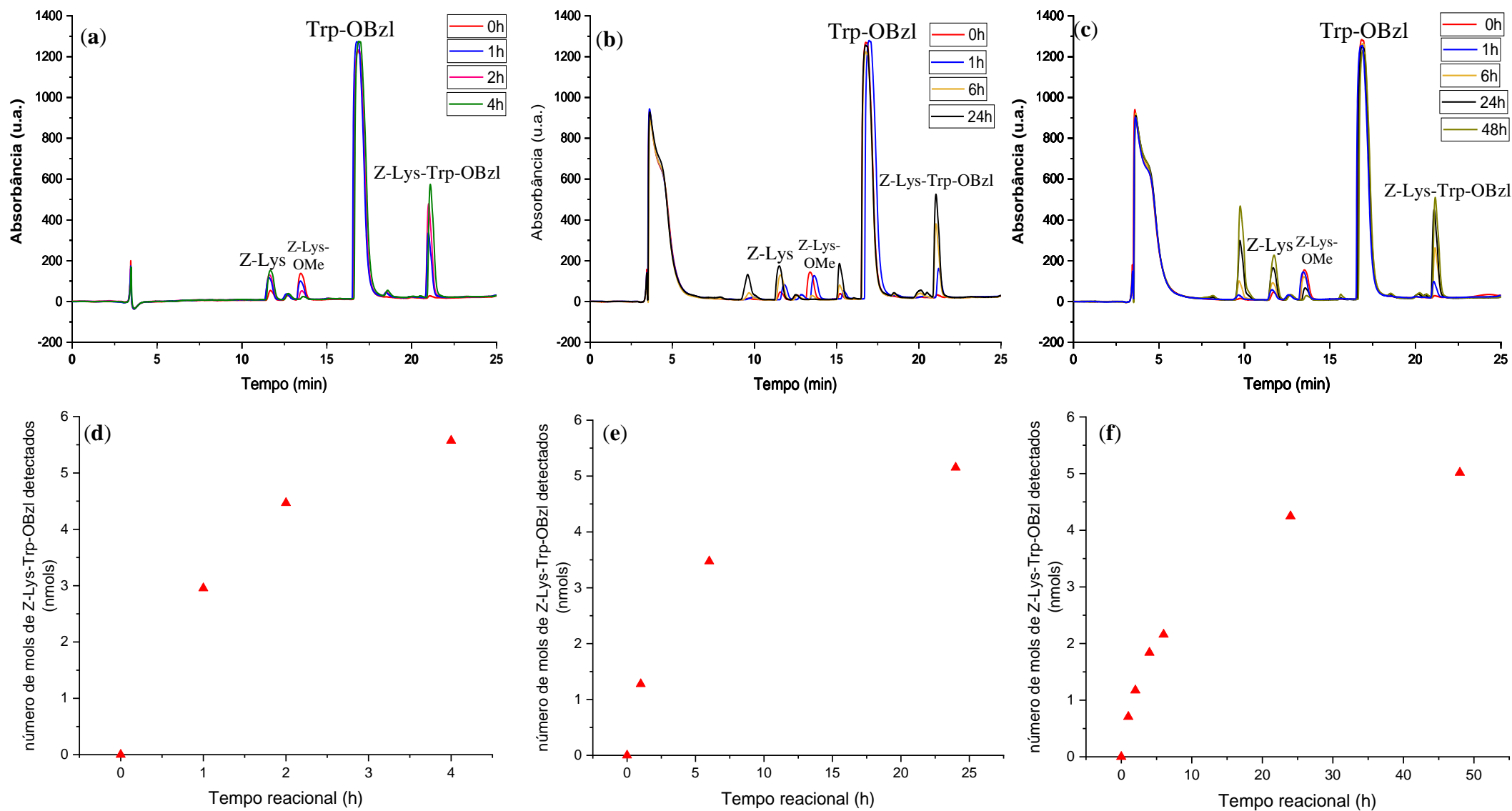


Figura 18 Perfis cromatográficos das reações *C* (a); *J* (b) e *K* (c) da **Tabela 6** e o número de mols de *Z-Lys-Trp-OBzl* formados para as reações *C* (d); *J* (e) e *K* (f). Condições de *RP-HPLC*: volume de injeção 50 μL (10x diluído); coluna: Vydac C18; solvente A: 0,1% TFA/ água; solvente B: 90% ACN/ 0,09%TFA/ água; fluxo: 1 mL min^{-1} ; gradiente linear: 5 – 95% de B; comprimento de onda: 210 nm.

Z-Arg-Trp-OBzl

Só tivemos tempo hábil de testar duas condições experimentais em tentativas de síntese cineticamente controlada deste precursor do dipeptídeo de interesse *Arg-Trp-OBzl*:

Reação	[Z-Arg-OBzl] / mol L ⁻¹	[Trp-OBzl] / mol L ⁻¹	Rendimento máximo / %	Tempo reacional ótimo / min
A	0,10	0,12	27	60
B	0,20	0,24	25	60

Condições Reacionais: Tampão Tris 0,2 mol L⁻¹, pH 8, contendo: CaCl₂: 50 mmol L⁻¹ e DMF (40% em volume). Concentração de TRY no meio reacional: 1 μmol L⁻¹. Os aceptores de acila na forma de cloridratos foram neutralizados com TEA. Agitação: 300 rpm e Temperatura: 15°C.

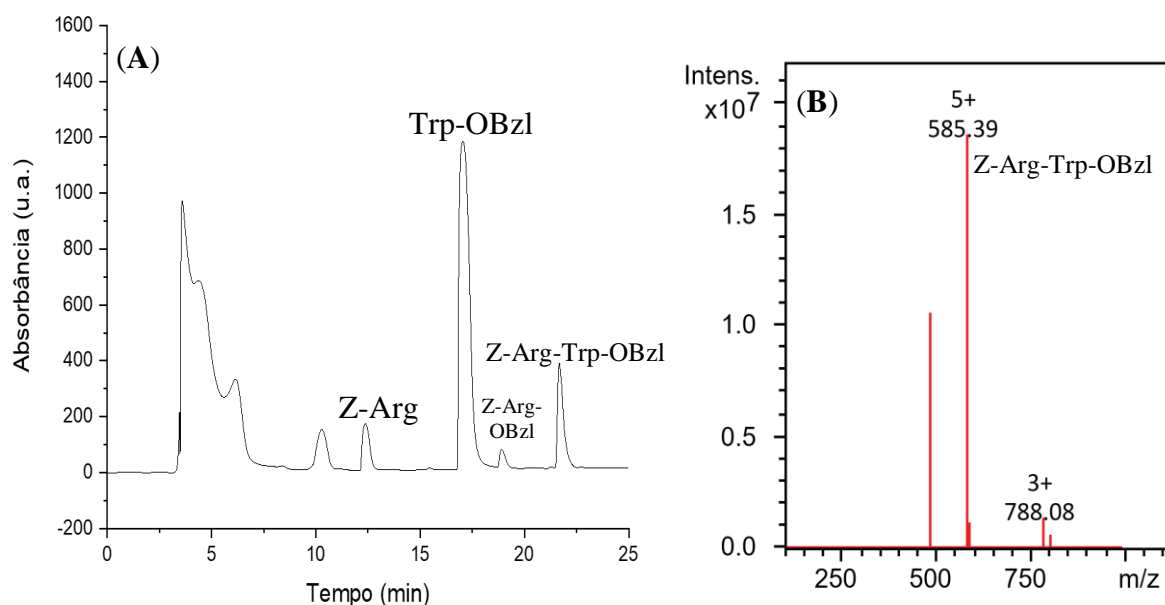


Figura 19 Cromatograma do monitoramento da síntese cineticamente controlada de *Z-Arg-Trp-OBzl* catalisada por TRY(A). Espectro de MS por infusão direta produto formado ($m/z = 585,61$) (B). Condições de *RP-HPLC*: volume de injeção 50 μL (10x diluído; B); coluna Vydac C18; solvente A: 0,1% TFA/ água; solvente B: 90% ACN/ 0,09% TFA/ água; fluxo: 1mL min⁻¹; gradiente linear: 5 – 95% de B em 30 min; comprimento de onda: 210 nm. Condições de *ESI-MS*: voltagem do capilar: 4,5 kV; Temperatura: 220°C; modo de ionização: ES⁺.

Z-Lys- ou Z-Arg-X-OR (onde, X-OR = Trp-OBzl, Phe-OBzl ou Phe-NH₂)

Uma hipótese para os baixos rendimentos obtidos para as reações de formação de ligação peptídica aqui descritas também poderia ser a natureza química e propriedades do aceptor de acila *HCl.Trp-OBzl*, que não o tornariam um bom substrato para TRY a ser reconhecido, e ligado ao seu *S₁'*, independentemente das condições reacionais empregadas.

Assim, foram realizadas reações comparativas de ésteres de *Z-Lys* ou *Z-Arg* empregando *HCl*. *Trp-OBzl*, *HCl.Phe-OBzl* e *Phe-NH₂* como aceptores de acila (TSUZUKI; OKA; MORIHARA, 1980) nas condições da reação *R* da **Tabela 5**.

As **Figuras 20-23** mostram os resultados obtidos. Os rendimentos de todas as reações foram calculados de forma diferente do descrito anteriormente para as sínteses cineticamente controladas de formação de *Z-Lys-Trp-OBzl*; desta vez os cálculos foram feitos a partir da medida das áreas de *Z-X_{aa}-OR* inicial, *Z-X_{aa}* e dipeptídeo formado ao longo do tempo reacional (60 min). Isto foi feito inclusive para as reações de formação de *Z-Lys-Trp-OBzl*, a fim de conseguir comparar os rendimentos obtidos nas diferentes reações. Quando foram calculados os rendimentos obtidos utilizando o padrão de *Z-Lys-Trp-OBzl*, verificou-se para as reações partindo de *Z-Lys-OBzl* e o *Z-Lys-OMe*, eles foram 14% e 13%, respectivamente. Já os rendimentos estimados pelo novo cálculo foram mais altos: ~25% e ~30%. Também se observou que *Z-Lys-OMe*, usado em nossas reações anteriores para obter o dipeptídeo, mostrou-se um doador de acila menos efetivo do que o *Z-Lys-OBzl*, bem como *Trp-OBzl* um pior acceptor de acila do que *Phe-OBzl* e *Phe-NH₂*. Portanto, a combinação de reagentes de partida empregada neste estudo se mostrou vantajosa para a preparação dos dos *Z*-dipeptídeos desejados com rendimentos satisfatórios.

Na **Figura 20** também se observa que os *Z*-dipeptídeos *Z-Lys-Phe-OBzl* e *Z-Lys-Phe-NH₂* podem ser obtidos usando biocatálise por TRY com rendimentos superiores a 50%, chegando a 80% em 60 min de reação. Os resultados também indicaram que os aminoácidos amidados são melhores substratos para a endoprotease pancreática, o que corrobora com os dados da literatura (OKA; MORIHARA, 1977; BLANCO; ALVARO; GUIÓSÁN, 1991; BAHAMONDES et al., 2016, 2017).

Também se verificou que, dentre os aminoácidos utilizados como aceptores de acila, o melhor foi a *Phe*. Isso pode ser explicado pela preferência em *S_I'* da TRY por aminoácidos

com cadeias laterais hidrofóbicas (OKA; MORIHARA, 1977; RODRIGUEZ *et al.*, 2008) e comparando os índices de hidropatia (*HI*) dos aminoácidos, verifica-se que *Phe* (*HI* = 2,8) é mais apolar que o *Trp* (*HI* = - 0,9) (NELSON; COX, 2008).

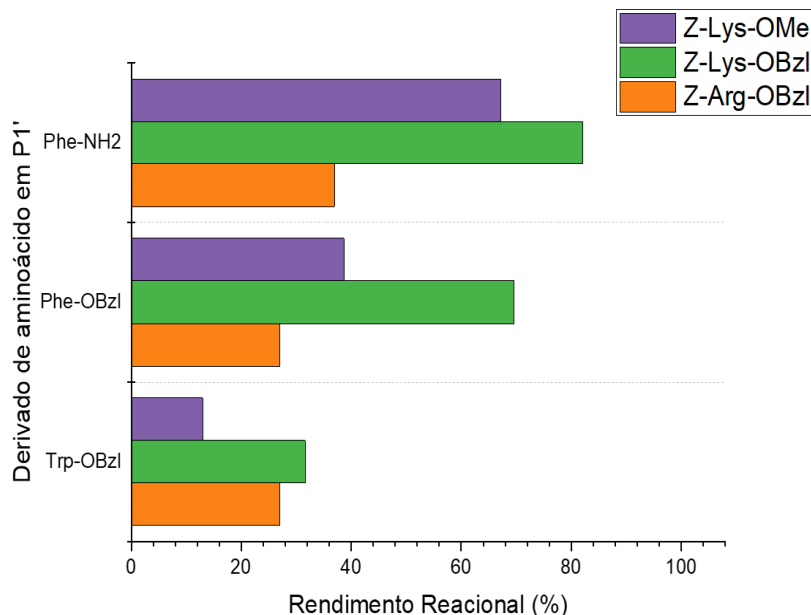


Figura 20 Rendimentos da formação da ligação peptídica entre *Z-Lys-OMe*; *Z-Lys-OBzl* ou *Z-Arg-OBzl* e os diferentes aceptores de acila. Condições reacionais: Concentração dos doadores de acila (0,1 mol L⁻¹), concentração dos aceptores de acila (0,12 mol L⁻¹) – os aceptores de acila que continham contraíon *HCl* ou *TosH*, foram neutralizados com quantidades equimolares de TEA. Os reagentes foram solubilizados em solução de tampão Tris 0,2 mol L⁻¹ pH 8, contendo: 50 mmol L⁻¹ de cloreto de cálcio e 40% (v/v) de DMF. Temperatura: 15 °C; Agitação: 300 rpm.

No entanto, analisando os cromatogramas das reações com *Arg* em *P1* (**Figuras 21 -23**), aparentemente os rendimentos reacionais são sempre inferiores às reações com *Lys* em *P1* independente do acceptor de acila utilizado. Isso indica que a TRY tem preferência por *Lys* na posição *P1* para estas reações. No entanto, segundo a literatura, a enzima apresentaria uma preferência a *Arg* que a *Lys* em *P1* (CRAIK *et al.*, 1985) devido a interação do grupo guanidina da cadeia lateral da *Arg* com o resíduo *Asp189* em *S1*, enquanto que o grupo ε-amina da *Lys* interagiria com interações mediadas por água (BRIAND *et al.*, 1999), logo os menores rendimentos da formação da ligação peptídica de *Z-Arg-Trp-OBzl* em sínteses cineticamente controladas não estão relacionados à TRY, mas às condições reacionais empregadas para estas sínteses. Para confirmar esta hipótese, mais sínteses cineticamente controladas utilizando o *Z-Arg-OBzl* como doador de acila seriam necessárias.

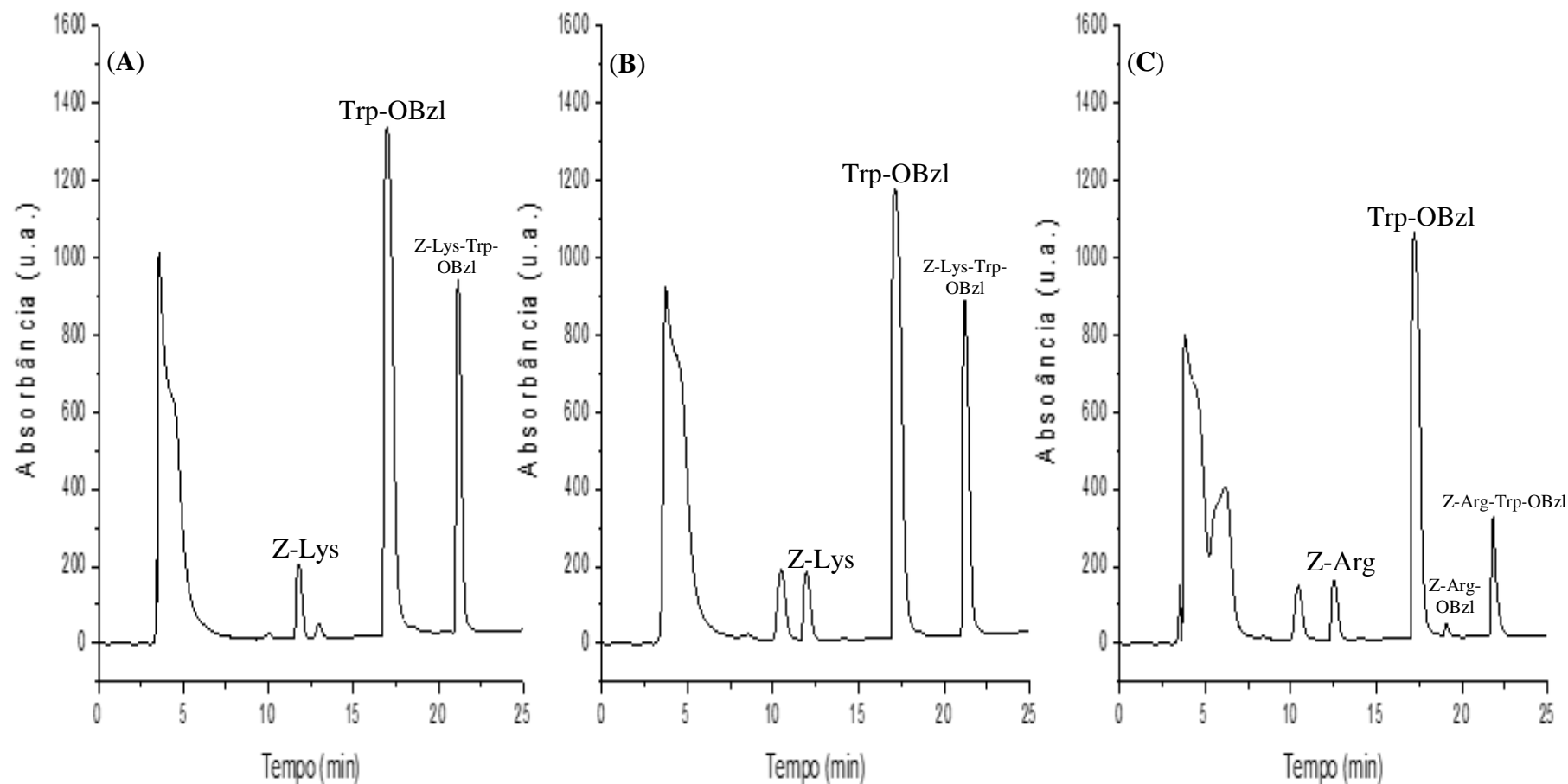


Figura 21 Perfis cromatográficos do monitoramento das sínteses catalizadas por TRY utilizando *Z-Lys-OMe* (A); *Z-Lys-OBzl* (B) e *Z-Arg-OBzl* (C) como doadores de acila ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e *Trp-OBzl* ($0,12 \text{ mol L}^{-1}$) como acceptor de acila após 60 min de reação. Condições de *RP-HPLC*: volume de injeção $50 \mu\text{L}$ (10x diluído); coluna: Vydac C18; solvente A: 0,1% TFA/ água; solvente B: 90% ACN/ 0,09% TFA/ água; fluxo: 1 mL min^{-1} ; gradiente linear: 5 – 95% de B em 30 min; comprimento de onda: 210 nm. Picos: *Trp-OBzl* (1); *Z-Lys-Trp-OBzl* (2); *Z-Lys* (4); *Z-Arg* (5); *Z-Arg-Trp-OBzl* (6) e *Z-Arg-OBzl* (8).

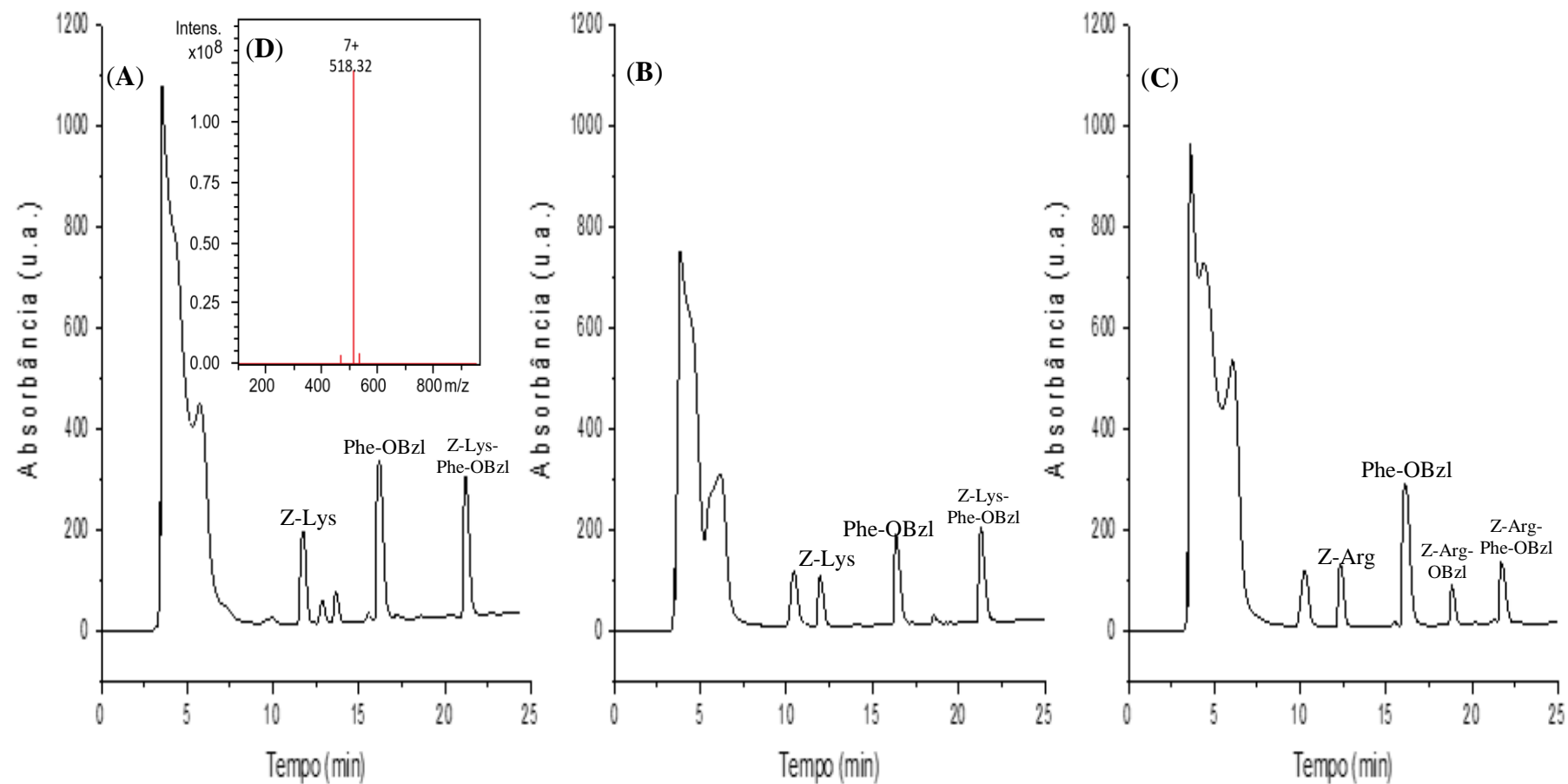


Figura 22 Perfis cromatográficos do monitoramento das sínteses catalisadas por TRY utilizando *Z-Lys-OMe* (A); *Z-Lys-OBzl* (B) e *Z-Arg-OBzl* (C) como doadores de acila ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e *Phe-OBzl* ($0,12 \text{ mol L}^{-1}$) como acceptor de acila após 60 min de reação; e *ESI-MS* do *Z-Lys-Phe-OBzl* (D). Condições de *RP-HPLC*: volume de injeção $50 \mu\text{L}$ (10x diluído); coluna: Vydac C18; solvente A: 0,1% TFA/ água; solvente B: 90% ACN/ 0,09% TFA/ água (A – D); fluxo: 1 mL min^{-1} ; gradiente linear: 5 – 95% de B em 30 min; comprimento de onda: 210 nm. Condições de *ESI-MS*: voltagem do capilar: 4,5 kV; Temperatura: 220°C ; modo de ionização: ES^+ .

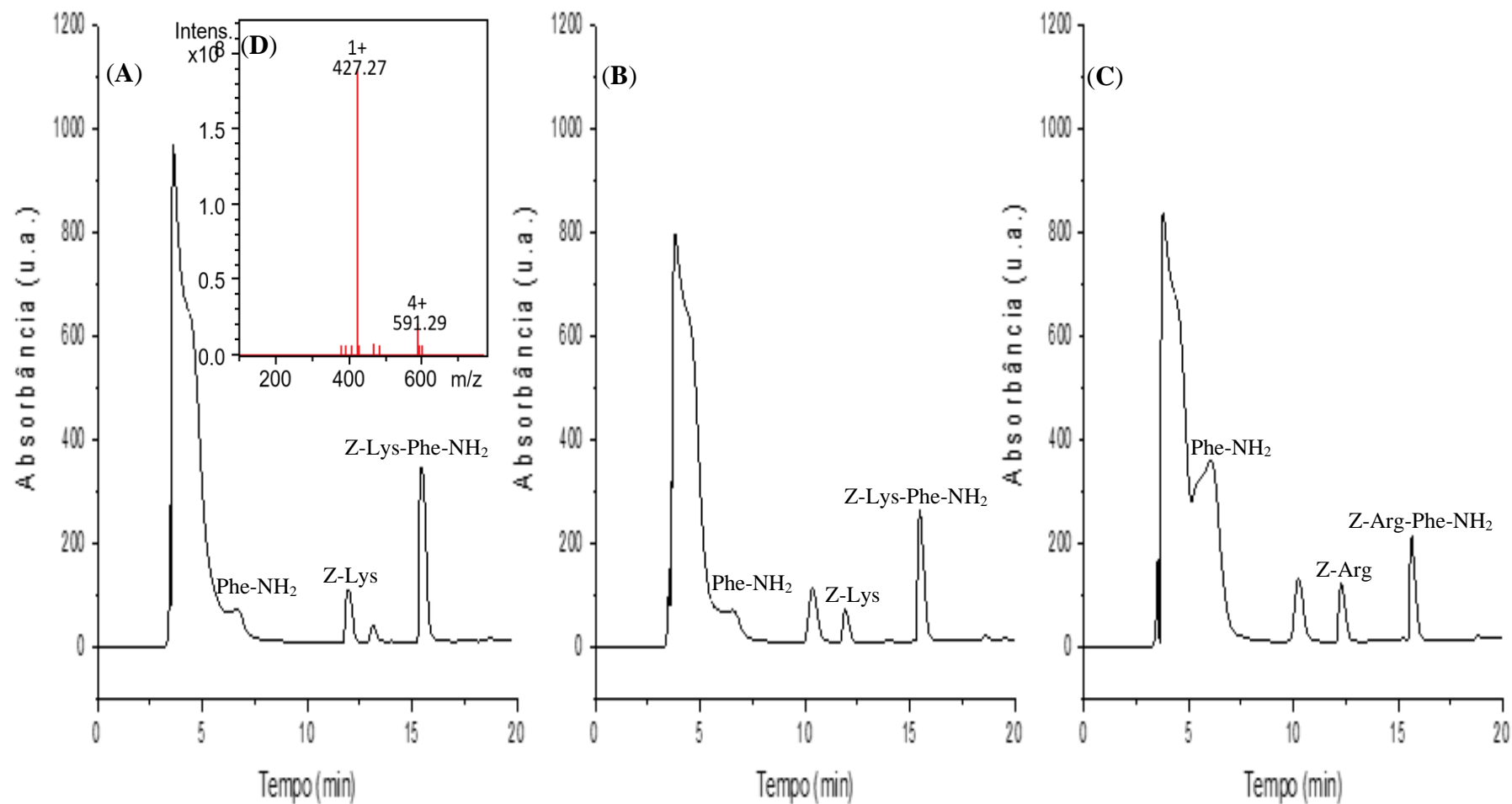


Figura 23 Perfis cromatográficos do monitoramento das sínteses catalisadas por TRY utilizando *Z-Lys-OMe* (A); *Z-Lys-OBzl* (B) e *Z-Arg-OBzl* (C) como doadores de acila ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e *Phe-NH₂* ($0,12 \text{ mol L}^{-1}$) como acceptor de acila após 60 minutos de reação; e o *ESI-MS* do *Z-Lys-Phe-NH₂* (D). Condições de *RP-HPLC*: volume de injeção $50 \mu\text{L}$ ($10\times$ diluído); coluna: Vydac C18; solvente A: 0,1% TFA/ água; solvente B: 90% ACN/ 0,09% TFA/ água; fluxo: 1 mL min^{-1} ; gradiente linear: 5 – 95% de B em 30 min; comprimento de onda: 210 nm. Condições de *ESI-MS*: voltagem do capilar: 4,5 kV; Temperatura: 220°C ; modo de ionização: ES^+ .

4.3. Atividade Antifúngica de *Z-Lys-Trp-OBzl*

Como descrito na Introdução desta dissertação, mais especificamente na **Tabela 2** os dipeptídeos escolhidos neste estudo como alvos apresentaram atividade e bons valores de MIC para cepas de *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes à meticilina (STRØM *et al.*, 2003), as quais causam infecções de difícil tratamento. Este fato ilustra a urgência de novas opções de agentes antimicrobianos. Ainda, os dipeptídeos *Lys-Trp-OBzl* e *Arg-Trp-OBzl* apresentam baixa massa molar, característica atraente em AMPs.

Segundo a tabela, o primeiro é mais potente do que o segundo. Ambos tiveram suas estruturas modificadas (**Tabela 2**) na busca de análogos mais potentes, mas até hoje ninguém os testou ainda protegidos nos grupos α -amina. Dado que isolamos e caracterizamos *Z-Lys-Trp-OBzl* produzido enzimaticamente em quantidade suficiente, a ideia nos pareceu atraente. Visto que vimos estudando AMPs de massa molar bastante superior em diferentes espécies de Cândida (MASMAN *et al.*, 2006; GRIECO *et al.*, 2005), decidiu-se testá-lo frente à uma delas.

Verificou-se MIC de 12,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ contra a *C. parapsilosis*. Além disso, em um novo experimento, os conteúdos dos poços foram plaqueados em ágar Saboraud para determinar a atividade fungicida do precursor (**Figura 23**) que foi confirmada na mesma concentração.

Se comparado o *Arg-Trp-OBzl* com *Trp-Arg-Trp-OBzl* da **Tabela 2**, nota-se que o aumento da apolaridade da molécula diminui significativamente a MIC em bactérias como *E. coli* e *S. aureus* (STRØM *et al.*, 2003), o que justificaria antever uma maior atividade (e MIC menor) de *Z-Lys-Trp-OBzl* para *E. coli* em relação a *Lys-Trp-OBzl*. No entanto, mais que o aumento da apolaridade, ou igualmente importante, é o aumento do volume da parte apolar, que pode explicar os menores valores de MIC para moléculas contendo *Trp* ao invés de *Phe* ou *Tyr* (STRØM; REKDAL; SVENDSEN, 2002; STRØM *et al.*, 2003). Portanto, outros grupos protetores mais volumosos que o Z poderiam ser testados com vistas a melhorar a bioatividade dos dipeptídeos-alvo.

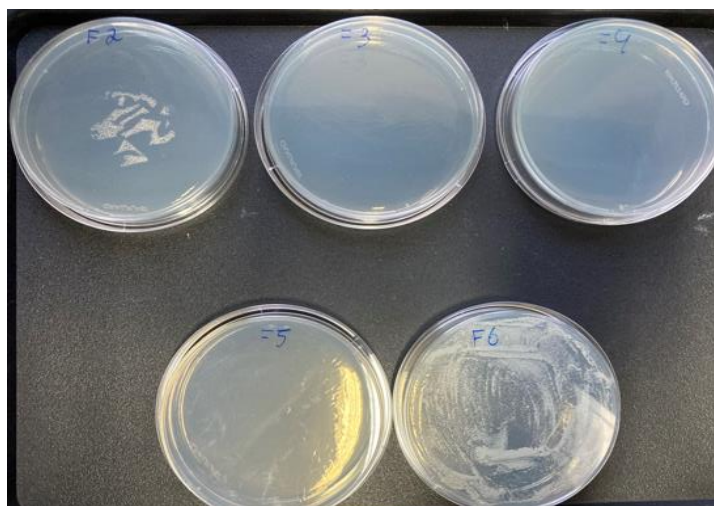


Figura 23 Resultado do ensaio de atividade fungicida do *Z-Lys-Trp-OBzl* contra a *C. parapsilosis*. Concentrações do *Z-Lys-Trp-OBzl*: $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (F2); $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ (F3); $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ (F4); $12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (F5) e $6,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ (F6). Na placa F2, as manchas se devem a condensação de água na parte interna da placa e não ao crescimento do fungo no ágar.

Uma preocupação levantada pelo cromatograma do *Z-Lys-Trp-OBzl* purificado da **Figura 11** foi uma possível interferência do *Trp-OBzl* contaminante, já que esse também tem caráter anfipático (carga positiva na α -amina e grupos apolares éster benzílico e indol). No entanto, nas condições do teste de atividade anti-Candida realizado o *Trp-OBzl* foi usado como controle e não apresentou atividade fungistática ou fungicida — descartando qualquer efeito aditivo.

Tais resultados são inéditos, mas se faz necessário verificar a atividade hemolítica do *Z-Lys-Trp-OBzl* mesmo sabendo que o *Lys-Trp-OBzl* não é hemolítico em concentrações inferiores a $850 \mu\text{mol L}^{-1}$ (STRØM *et al.*, 2003). De fato, evidências apontadas na literatura sugerem que o caráter hemolítico de alguns peptídeos está relacionado à quantidade de *Trp* (com cadeia lateral apolar) na molécula (STRØM; REKDAL; SVENDSEN, 2002). Assim, a adição do grupo *Z* na estrutura do dipeptídeo *Lys-Trp-OBzl* pode ou não conferir atividade hemolítica ao dipeptídeo na concentração correspondente à MFC.

Não foi possível ainda testar o *Z-Arg-Trp-OBzl*, nem os *Z-Lys-* ou *Z-Arg-X_{aa}-OR* (onde, $X_{aa}\text{-OR} = \text{Trp-OBzl}$, Phe-OBzl ou Phe-NH_2) também estudados e obtidos por biocatálise, que ao contrário do método químico tradicional não gera enantiômeros do produto desejado —

aspecto de suma importância para moléculas terapêuticas. Neste sentido, o nosso grupo de pesquisa deverá expandir esta parte do estudo, que inclui aspectos aqui discutidos.

4.4. Reações de transferência catalítica de hidrogênio para a remoção do grupo Z

Z-Lys

As tentativas de substituir o método clássico de hidrogenação catalítica de remoção do grupo Z de peptídeos usando o gás H₂ como fonte de hidrogênios, se iniciaram usando *Z-Lys* porque ele representa a parte protegida do produto de interesse – *i.e.* *Z-Lys-Trp-OBzl*.

A reação empregou formiato de amônio em excesso molar como fonte de hidrogênios e MeOH como solvente. O sal de formiato é o mais recomendado para esta finalidade devido à presença do próton no cátion amônio que possibilita a remoção do grupo Z (SHELL, 1994). Entretanto, estudos da literatura consideram que MeOH também poderia doar seu hidrogênio, logo a reação de transferência de hidrogênio pode ter ocorrido pela doação de hidrogênio do formiato ou do MeOH (RAJAGOPAL; SPATOLA, 1995). Verificou-se que houve conversão total do *Z-Lys* após 2h de reação, o que foi confirmado por *TLC* e *RP-HPLC* (**Figura 24**). Na reação conduzida sem o Formiato, a reação se mostrou bastante lenta.

Com esse resultado, imaginou-se que as reações de transferência catalítica de hidrogênio podem ser executadas à pressão e temperatura ambientes em qualquer laboratório minimamente equipado, o que condiz com os princípios de química verde (TANG *et al.*,

2008). A mancha vermelha, revelada com solução de ninidrina, referente ao íon amônio mostrou que, mesmo após a reação ter se encerrado, ainda há formiato de amônio no meio reacional, sugerindo que o uso de excesso de sal Formiato é dispensável. Neste caso o produto desprotegido, *Lys*, terá contra-íons formiato nas ϵ - e α -aminas (GOWDA; ABIRAJ, 2002).

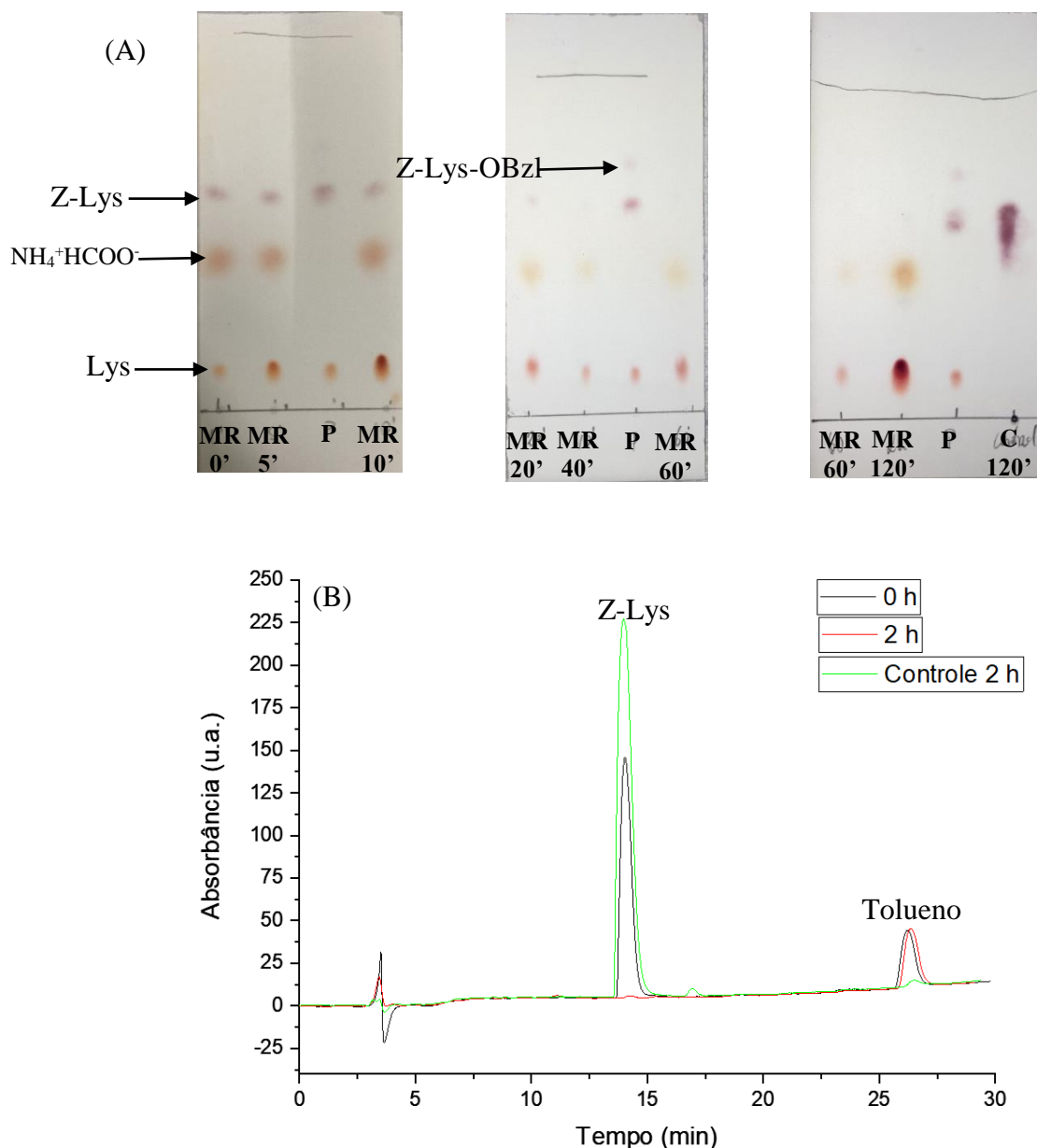


Figura 24 Reações de remoção do Z de Z-Lys; monitoramento por TLC (A) e por RP-HPLC em 0h e 2h, sendo o controle sem formiato após 2h (B). Condições de RP-HPLC: volume de injeção 18 μ L (6x diluída); coluna: Vydac C18; solvente A: 0,1% TFA/ água; solvente B: 90% ACN/ 0,09% TFA/ água; fluxo: 1 mL min⁻¹; gradiente linear: 5 – 95% de B em 30 min; comprimento de onda: 210 nm. Condições de TLC: fase móvel: 1-butanol, água, ácido acético (3, 1, 1); fase estacionária: sílica-gel 60 F₂₅₄. Manchas foram reveladas com solução de ninidrina 0,28 mol L⁻¹ em etanol absoluto. MR refere-se às alíquotas dos meios reacionais coletadas em tempos específicos; P refere-se à mistura de *Lys*, Z-Lys e Z-Lys-OBzl; C refere-se ao controle sem formiato de amônio.

Z-Arg

A reação foi realizada nas condições já comentadas acima. A **Figura 25** mostra que foi possível formar *Arg* já em 10 min. No entanto, a análise do RP-HPLC (Figura 27 B) somente após 24h toda o *Z-Arg* foi consumido (ou seja, a desproteção foi total).

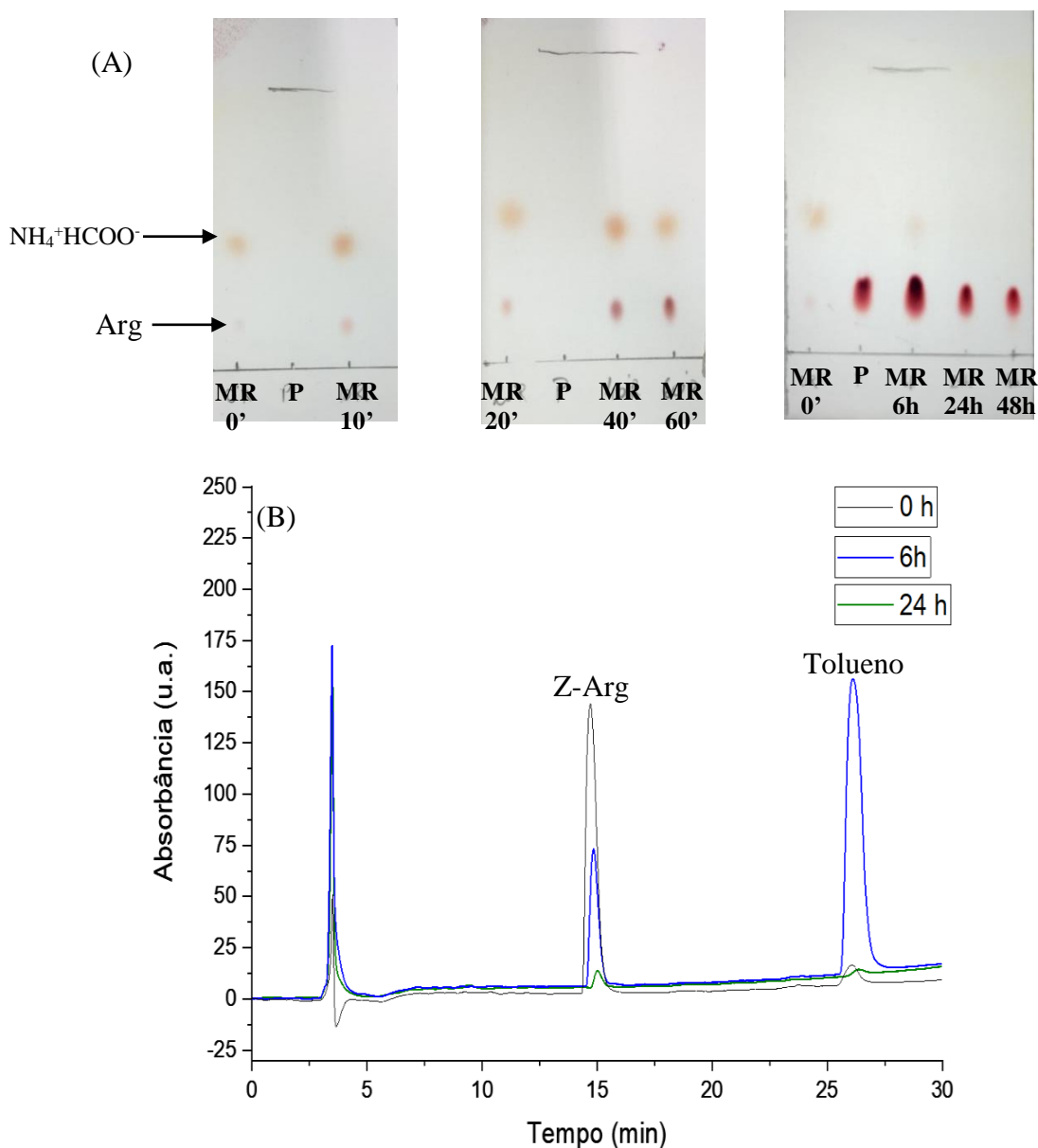


Figura 25 Reação de remoção de Z de *Z-Arg*; monitoramento por TLC (A) e por RP-HPLC nos tempos 0 h, 6 h e 24 h (B). Condições de RP-HPLC: volume de injeção 18 μL (6x diluída); coluna: Vydac C18; solvente A: 0,1% TFA/ água; solvente B: 90% ACN/ 0,09% TFA/ água; fluxo: 1 mL min^{-1} ; gradiente linear: 5 – 95% de B em 30 min; comprimento de onda: 210 nm. Condições de TLC: fase móvel: 1-butanol, água, ácido acético (3, 1, 1); fase estacionária: sílica-gel 60 F₂₅₄. Manchas foram reveladas com solução de ninidrina 0,28 mol L^{-1} em etanol absoluto. MR refere-se às alíquotas dos meios reacionais coletadas em tempos específicos; P refere-se à mistura de *Arg* e *Z-Arg*.

Z-Lys-OBzl

Como no dipeptídeo *Z-Lys-Trp-OBzl* coexistem o Z e o éster benzílico, se mostrou prudente realizar a transferência catalítica de hidrogênio em estudo usando como modelo a *Z-Lys-OBzl*. Utilizou-se as mesmas condições que para a *Z-Lys*.

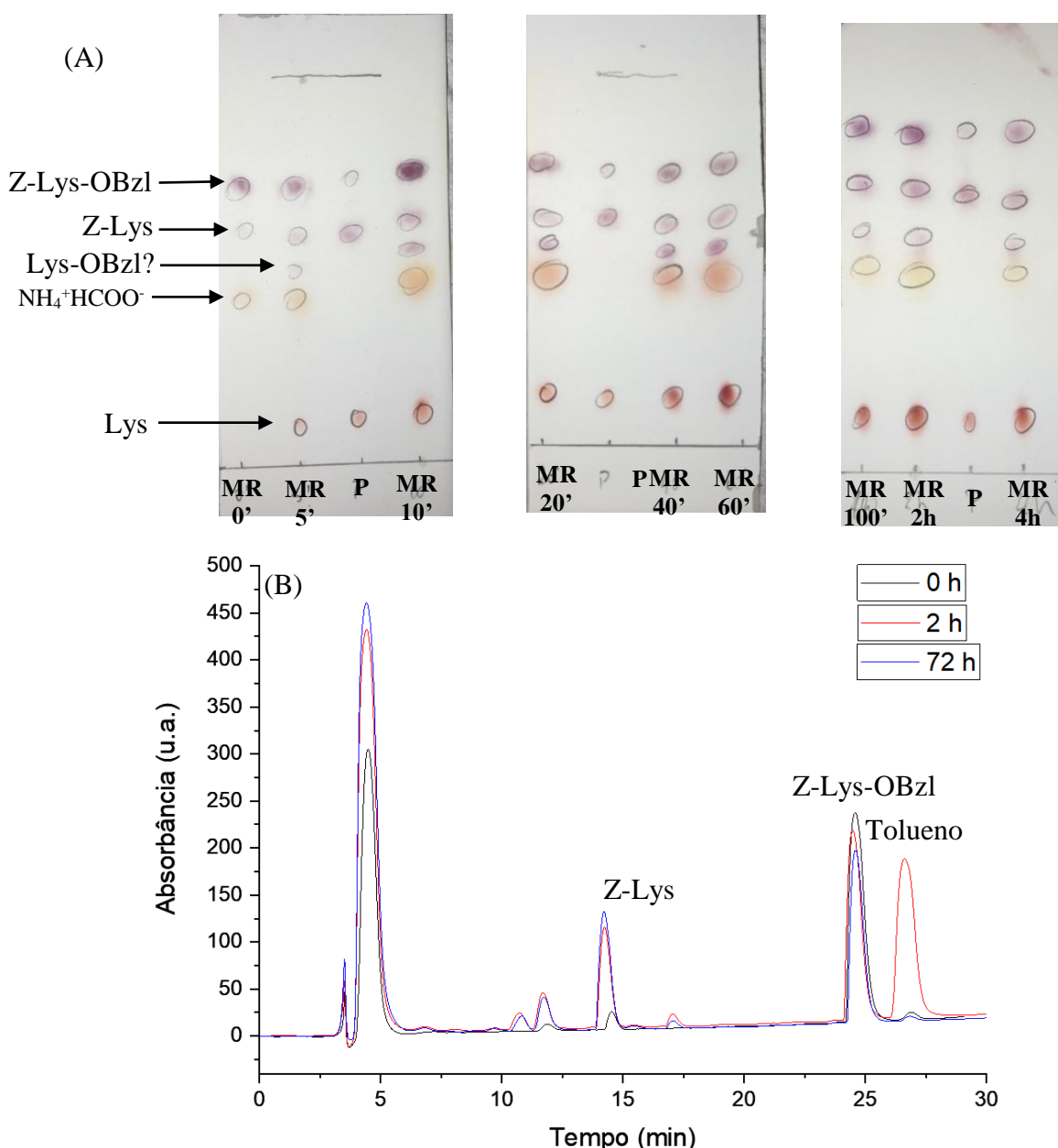


Figura 26 Reação de remoção do Z de *Z-Lys-OBzl*; monitoramento por *TLC* (A) e por *RP-HPLC* dos tempos 0h, 2h e 72h (B). Condições de *RP-HPLC*: volume de injeção 18 μL (6x diluída); coluna: Vydac C18; solvente A: 0,1% TFA/ água; solvente B: 60% ACN/ 0,09% TFA/ água; fluxo: 1 mL min^{-1} ; gradiente linear: 5 – 95% de B em 30 min; comprimento de onda: 210 nm. Condições de *TLC*: fase móvel: 1-butanol, água, ácido acético (3, 1, 1); fase estacionária: sílica-gel 60 F₂₅₄. Manchas foram reveladas com solução de ninidrina 0,28 mol L^{-1} em etanol absoluto. MR refere-se às alíquotas dos meios reacionais coletadas em tempos específicos; P refere-se à mistura de *Lys*, *Z-Lys* e *Z-Lys-OBzl*.

Nessa reação, verificou-se a formação dos *Z*-Lys e *Lys* evidenciados por TLC e RP-HPLC (**Figura 26**). O aparecimento de um produto formado, cujo R_f é inferior ao do *Z*-Lys (**Figura 26 A**), revelada com ninidrina, indicou que *Lys-OBzl* poderia também estar presente no meio, mas os perfis cromatográficos (**Figura 26B**) mostraram que majoritariamente o produto formado foi *Z*-Lys, ou seja, nas condições empregadas ocorre a remoção do éster benzílico. Esta observação não foi interessante para o nosso propósito de substituir o gás H_2 e tornar a etapa 2 da rota sintética adequada para obter os dipeptídeos alvo deste trabalho de forma limpa e mais segura, pois a substituição feita visa a remoção do *Z* e não a remoção do éster benzílico.

Analisando as reações de hidrogenólise para a remoção do *Z* e do éster benzílico (**Figura 27**) (ROSENMUND; ZETZSCHE, 1921; ELAMIN et al., 1979; GOWDA; ABIRAJ, 2002) nota-se que a diferença entre as duas reações é a liberação de CO_2 para a remoção do *Z*, o que tornaria esta reação mais favorável do que a saída do éster. Além disso, existem indícios na literatura que a remoção regioseletiva de *Z* é possível (DAGA; TADDEI; VARCHI, 2001).

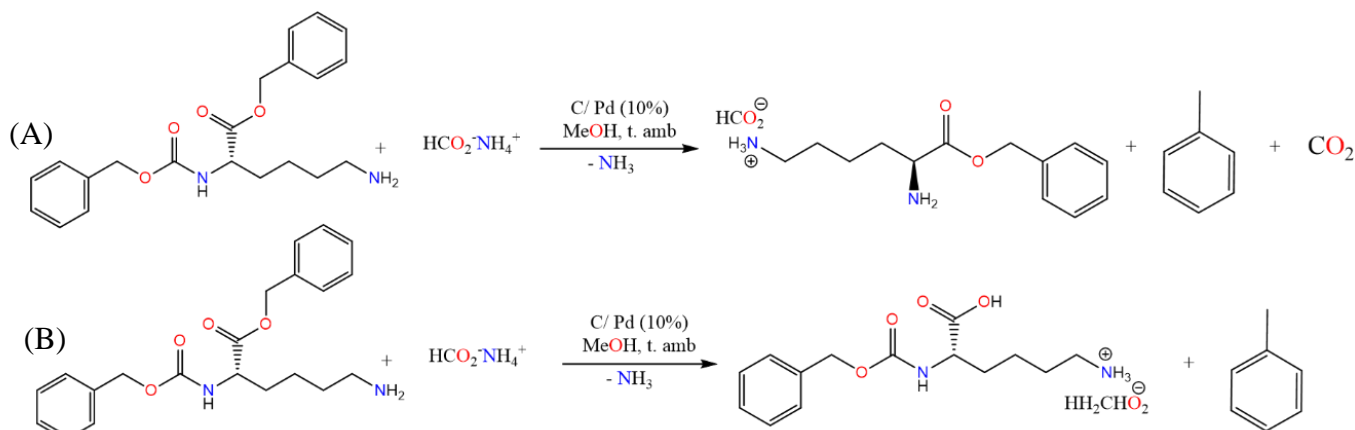


Figura 27 Representação de reações de hidrogenólise dos grupos *Z* (A) e do éster benzílico (B).

Z-Asp-Phe-OMe

Finalmente, foi tentada a desproteção de um *Z*-dipeptídeo para verificar a possibilidade de que a transferência catalítica de hidrogênio usando formiato de amônio poderia ser usada na

rota sintética para outros dipeptídeos-alvo. Foi escolhido o *Z-Asp-Phe-OMe*, precursor do dipeptídeo aspartame *Asp-Phe-OMe*, já sintetizado anteriormente por nós pela rota limpa proposta em 2015 (UNGARO et al, 2015; UNGARO, 2020). A remoção do Z de *Z-Asp-Phe-OMe* em presença de formiato de amônio (**Figura 27**) foi descrita em 1987 (LINDEBERG, 1987).

O monitoramento da reação por RP-HPLC (**Figura 28A**) mostrou a formação do produto desejado após 1h de reação, o que foi confirmado por ESI-MS (**Figura 28B**). Comparando estes dados apresentados com os apresentados por UNGARO, 2020, que empregou a hidrogenação catalítica para remover o grupo Z do mesmo dipeptídeo em 2h, pode-se concluir que a hidrogenação catalítica é mais rápida que a transferência catalítica de hidrogênio para a desproteção deste dipeptídeo.

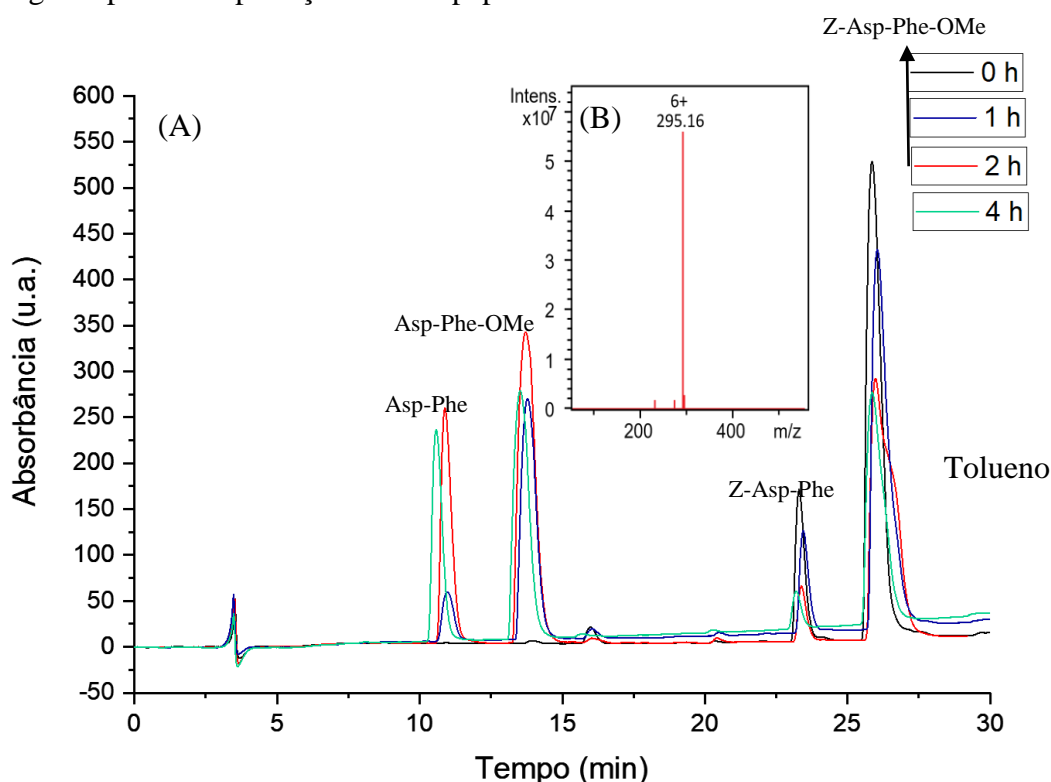


Figura 30 Reação de remoção de Z de *Z-Asp-Phe-OMe*; monitoramento por RP-HPLC nos tempos 0h, 1h, 2h e 4h (A); análise por ESI-MS do *Asp-Phe-OMe* (m/1 esperado: 294,1). Condições de RP-HPLC: volume de injeção 18 μ L (6x diluída); coluna: Vydac C18; solvente A: 0,1% TFA/ água; solvente B: 60% ACN/ 0,1% TFA/ água; fluxo: 1 mL min⁻¹; gradiente linear: 5 – 95% de B em 30 min; comprimento de onda: 210 nm. Condições de ESI-MS: voltagem do capilar: 4,5 kV; Temperatura: 220°C; modo de ionização: ES⁺.

Este estudo e os resultados apresentados são inéditos.

5. CONCLUSÕES

A pesquisa aqui apresentada é básica e está relacionada à Química Sintética Fina, à Química e Função de Biomoléculas, Química Verde e Biocatálise, a compostos com potencial de ser tornar drogas terapêuticas. Ela aborda problemas de saúde pública e ambiental, que tem sido a motivação científica do nosso grupo e laboratório. No trabalho de Mestrado realizado,

1. Foi possível sintetizar os dois precursores sintéticos *Z-Lys-Trp-OBzl* e *Z-Arg-Trp-OBzl* dos alvos antimicrobianos mediante catálise por TLN ou TRY, mesmo que os rendimentos reacionais tenham sido baixos. Como análogos foram obtidos com rendimentos significativamente mais altos, conclui-se que a combinação acceptor e doador de acila (e suas proteções mínimas exigidas) + biocatalisador + estratégia sintética + condições experimentais precisa ser melhor explorada.

2. Pela primeira vez, verificou-se que *Z-Lys-Trp-OBzl* apresenta atividade anti-*Candida* e candidacida, pois ele foi capaz de inibir o crescimento celular e matar cepa de *C. parapsilosis*. Naturalmente, dadas as suas características físico-químicas (carga líquida positiva em pH neutro, caráter anfipático e baixa massa molar), espera-se poder sintetizá-lo em escala preparativa para, além de prosseguir o estudo da possibilidade de uso rota sintética limpa anteriormente descrita, testar a atividade deste contra *S. aureus* e outras espécies de *Candida*.

3. Foi possível remover o grupo *Z*, vantajoso e amplamente empregado na síntese peptídica, de *Z*-aminoácidos e do *Z*-aspartame utilizando reações de transferência catalítica de hidrogênio, no caso com formiato de amônio, que são limpas e de alta segurança em laboratório. No entanto, para a remoção regioseletiva do *Z* de *Z-X_{aa}-OBzl* são necessários estudos adicionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-GHARBIA, M.; ABD EL-FATTAH, M.; ABDELREHIM, K. Bacterial Profile in Urine, Burns, and Wounds in Diabetic and non-Diabetic Patients. **Egyptian Journal of Medical Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 113–119, 1 jan. 2022. Disponível em: <https://ejmm.journals.ekb.eg/article_212002.html>.

ANASTAS, P.; HAN, B.; LEITNER, W.; POLIAKOFF, M. “Happy silver anniversary”: Green Chemistry at 25. **Green Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 12–13, 2016. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C5GC90067K>>.

ANASTAS, P. T.; ZIMMERMAN, J. B. Peer Reviewed: Design Through the 12 Principles of Green Engineering. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 5, p. 94A-101A, 1 mar. 2003. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es032373g>>.

ARIAS, M.; PIGA, K. B.; HYNDMAN, M. E.; VOGEL, H. J. Improving the activity of trp-rich antimicrobial peptides by Arg/Lys substitutions and changing the length of cationic residues. **Biomolecules**, v. 8, n. 2, 1 jun. 2018.

BAHAMONDES, C.; ÁLVARO, G.; WILSON, L.; ILLANES, A. Effect of enzyme load and catalyst particle size on the diffusional restrictions in reactions of synthesis and hydrolysis catalyzed by α -chymotrypsin immobilized into glyoxal-agarose. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 172–179, 1 fev. 2017.

BAHAMONDES, C.; WILSON, L.; BERNAL, C.; ILLANES, A.; ÁLVARO, G.; GUZMÁN, F. Synthesis of the kyotorphin precursor benzoyl-L-tyrosine-L-argininamide with immobilized α -chymotrypsin in sequential batch with enzyme reactivation. **Biotechnology Progress**, v. 32, n. 1, p. 54–59, 1 jan. 2016.

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. **Journal of Peptide Research**, v. 51, n. 1, p. 29–37, 1998.

BIAŁKOWSKA, A. M.; MORAWSKI, K.; FLORCZAK, T. Extremophilic proteases as novel and efficient tools in short peptide synthesis. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 44, n. 9, p. 1325–1342, 23 set. 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10295-017-1961-9>>.

BLANCO, R. M.; ALVARO, G.; GUISÁN, J. M. Enzyme reaction engineering: Design of peptide synthesis by stabilized trypsin. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, n. 7, p. 573–583, 1991.

BODANSKY, M.; ONDETTI, M. **Peptide Chemistry A Practical Textbook**. 1st. ed. [s.l.] John Wiley and Sons Inc, 1966.

BORDUSA, F. Proteases in organic synthesis. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4817–4867, dez. 2002.

BRATOVANOVA, E. K.; STOINEVA, I. B.; PETKOV, D. D. Yield optimization in the

kinetically controlled enzymic peptide synthesis. **Tetrahedron**, v. 44, n. 12, p. 3633–3637, jan. 1988. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040402001859937>>.

BRIAND, L.; CHOBERT, J. M.; GANTIER, R.; DECLERCK, N.; TRAN, V.; LÉONIL, J.; MOLLÉ, D.; HAERTLÉ, T. Impact of the lysine-188 and aspartic acid-189 inversion on activity of trypsin. **FEBS Letters**, v. 442, n. 1, p. 43–47, 8 jan. 1999.

CAO, Y.; WEN, L.; SVEC, F.; TAN, T.; LV, Y. Magnetic AuNP@Fe₃O₄ nanoparticles as reusable carriers for reversible enzyme immobilization. **Chemical Engineering Journal**, v. 286, p. 272–281, 2016.

CARVALHO, L. A. C.; REMUZGO, C.; PEREZ, K. R.; MACHINI, M. T. Hb40-61a: Novel analogues help expanding the knowledge on chemistry, properties and candidacidal action of this bovine α -hemoglobin-derived peptide. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1848, n. 12, p. 3140–3149, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.09.010>>.

CATIAU, L.; TRAISNEL, J.; DELVAL-DUBOIS, V.; CHIHIB, N. E.; GUILLOCHON, D.; NEDJAR-ARROUME, N. Minimal antimicrobial peptidic sequence from hemoglobin alpha-chain: KYR. **Peptides**, v. 32, n. 4, p. 633–638, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2010.12.016>>.

ČEŘOVSKÝ, V. Free trypsin-catalyzed peptide synthesis in acetonitrile with low water content. **Biotechnology Letters**, v. 12, n. 12, p. 899–904, dez. 1990. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF01022587>>.

CRAIK, C. S.; LARGMAN, C.; FLETCHER, T.; ROCZNIAK, S.; BARR, P. J.; FLETTERICK, R.; RUTTER, W. J. Redesigning trypsin: Alteration of substrate specificity. **Science**, v. 228, n. 4697, p. 291–297, 1985.

DAGA, M. C.; TADDEI, M.; VARCHI, G. Rapid microwave-assisted deprotection of N-Cbz and N-Bn derivatives. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n. 31, p. 5191–5194, 2001.

DE MIRANDA, M. T. M.; CHENG, E.; MURADIAN, J.; SEIDEL, W. F.; TOMINAGA, M. Thermolysin as a catalyst in enzymatic synthesis of asparagine-containing peptides. **Bioorganic Chemistry**, v. 14, n. 2, p. 182–193, jun. 1986. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0045206886900295>>.

DEBECKER, D. P.; SMEETS, V.; VAN DER VERREN, M.; MEERSSEMAN ARANGO, H.; KINNAER, M.; DEVRED, F. Hybrid chemoenzymatic heterogeneous catalysts. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 28, p. 100437, 1 abr. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452223620301346>>.

DING, Y.; YU, H.; MOU, S. Direct determination of free amino acids and sugars in green tea by anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 982, n. 2, p. 237–244, dez. 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967302016503>>.

DODSON, J. R.; HUNT, A. J.; PARKER, H. L.; YANG, Y.; CLARK, J. H. Elemental sustainability: Towards the total recovery of scarce metals. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 51, p. 69–78, 2012. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2011.09.008>>.

DOURTOGLOU, V.; ZIEGLER, J.-C.; GROSS, B. L'HEXAFLIJOROPHOSPHATE DE O-BENZOTRIAZOLYL-N,N-TETRAMETHYLURONIUM : UN REACTIF DE COUPLAGE PEPTIDIQUE NOUVEAU ET EFFICACE. **Tetrahedron Letters**, n. 15, p. 1269–1272, 1978.

DUFFULER, P.; BHULLAR, K. S.; DE CAMPOS ZANI, S. C.; WU, J. Bioactive Peptides: From Basic Research to Clinical Trials and Commercialization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 12, p. 3585–3595, 30 mar. 2022. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.1c06289>>.

EICHHORN, U.; BECK-PIOTRASCHKE, K.; SCHAAF, R.; JAKUBKE, H.-D. Solid-phase Acyl Donor as a Substrate Pool in Kinetically Controlled Protease-Catalysed Peptide Synthesis. **Journal of Peptide Science**, v. 3, p. 261–266, 1997.

ELAMIN, B.; ANANTHARAMAIAH, G. M.; ROYER, G. P.; MEANS, G. E. Removal of Benzyl-Type Protecting Groups from Peptides by Catalytic Transfer Hydrogenation with Formic Acid. **Journal of Organic Chemistry**, 1979. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo01333a048>>.

EPAND, R. M.; EPAND, R. F. Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents. **Journal of Peptide Science**, v. 17, n. 5, p. 298–305, maio 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/psc.1319>>.

ESTRADA-MATA, E.; NAVARRO-ARIAS, M. J.; PÉREZ-GARCÍA, L. A.; MELLADO-MOJICA, E.; LÓPEZ, M. G.; CSONKA, K.; GACSER, A.; MORA-MONTES, H. M. Members of the Candida parapsilosis complex and Candida albicans are differentially recognized by human peripheral blood mononuclear cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. JAN, p. 1–11, 2016.

FAN, Y.; LI, Y.; LIU, Q. Efficient enzymatic synthesis of cephalexin in suspension aqueous solution system. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 2020.

FELIX, A. M. A brief biography of Bruce Merrifield: His life and legacy. **Biopolymers - Peptide Science Section**, v. 90, n. 3, p. 158–161, 2008.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *In: The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. p. 571–607.

GOWDA, D. C.; ABIRAJ, K. Heterogeneous catalytic transfer hydrogenation in peptide synthesis. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 9, n. 4–5, p. 153–165, 2002.

GRIECO, P.; ROSSI, C.; GATTI, S.; COLOMBO, G.; CARLIN, A.; NOVELLINO, E.; LAMA, T.; LIPTON, J. M.; CATANIA, A. Design and synthesis of melanocortin peptides with candidacidal and anti-TNF- α properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1384–1388, 10 mar. 2005.

GUZMÁN, F.; GAUNA, A.; ROMAN, T.; LUNA, O.; ÁLVAREZ, C.; PAREJA-BARRUETO, C.; MERCADO, L.; ALBERICIO, F.; CÁRDENAS, C. Tea bags for fmoc solid-

phase peptide synthesis: An example of circular economy. **Molecules**, v. 26, n. 16, 2021.

HOMANDBERG, G. A.; BERG; MATTIS, J. A.; LASKOWSKI, M. Synthesis of Peptide Bonds by Proteinases. Addition of Organic Cosolvents Shifts Peptide Bond Equilibria toward Synthesis. **Biochemistry**, v. 17, n. 24, p. 5220–5227, 1978.

HULEANI, S.; ROBERTS, M. R.; BEALES, L.; PAPAIOANNOU, E. H. Escherichia coli as an antibody expression host for the production of diagnostic proteins: significance and expression. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 42, n. 5, p. 756–773, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1967871>>.

INOUE, K.; WATANABE, K.; MORIHARA, K.; TOCHINO, Y.; KANAYA, T.; EMURA, J.; SAKAKIBARA, S. Enzyme-Assisted Semisynthesis of Human Insulin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 101, n. 3, p. 751–752, 1 fev. 1979.

JAKUBKE, H. -D; KUHL, P.; KÖNNECKE, A. Basic Principles of Protease-Catalyzed Peptide Bond Formation. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 24, n. 2, p. 85–93, 1985.

JAKUBKE, H. D.; KÖNNECKE, A. Peptide synthesis using immobilized proteases. **Methods in enzymology**, v. 136, n. 1985, p. 178–88, 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3316928>>.

JARADAT, D. M. M. Thirteen decades of peptide synthesis: key developments in solid phase peptide synthesis and amide bond formation utilized in peptide ligation. **Amino Acids**, v. 50, n. 1, p. 39–68, 28 jan. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00726-017-2516-0>>.

JAROSZEWICZ, W.; MORCINEK-ORŁOWSKA, J.; PIERZYNOWSKA, K.; GAFFKE, L.; WĘGRZYN, G. Phage display and other peptide display technologies. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 46, n. 2, 3 mar. 2022. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsre/article/doi/10.1093/femsre/fuab052/6407522>>.

JOHNSTONE, R. A. W.; WILBY, A. H.; ENTWISTLE, I. D. Heterogeneous catalytic transfer hydrogenation and its relation to other methods for reduction of organic compounds. **Chemical Reviews**, v. 85, n. 2, p. 129–170, 1 abr. 1985. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr00066a003>>.

KLIBANOV, A. M.; SAMOKHIN, G. P.; MARTINEK, K.; BEREZIN, I. V. A new approach to preparative enzymatic synthesis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 67, n. 6, p. 737–747, 20 mar. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022916302538>>.

KÖNIG, W.; GEIGER, R. Racemisierung bei Peptidsynthesen. **Chemische Berichte**, v. 103, n. 7, p. 2024–2033, 21 jul. 1970. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cber.19701030704>>.

KULLMANN, W. Protease-Catalyzed Synthesis of Melanocyte-Stimulating Hormone (MSH) Fragments. **Journal of Protein Chemistry**, v. 2, n. 4, p. 289–301, 1983.

KULLMANN, W. Proteases as catalytic agents in peptide synthetic chemistry: Shifting the

extent of peptide bond synthesis from a “quantité négligeable” to a “quantité considérable”. **Journal of Protein Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 1–22, 1985.

KULLMANN, W. **Enzymatic Peptide Synthesis**. [s.l.] CRC Press, 1987.

LI, B.; ZHANG, T. Mass flows and removal of antibiotics in two municipal wastewater treatment plants. **Chemosphere**, v. 83, n. 9, p. 1284–1289, 2011.

LI, S. S.; TAO, L.; WANG, F. Z. R.; LIU, Y. M.; CAO, Y. Heterogeneous Gold-Catalyzed Selective Semireduction of Alkynes using Formic Acid as Hydrogen Source. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 358, n. 9, p. 1410–1416, 2016.

LIMA, L. M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. O renascimento de um fármaco: talidomida. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 683–688, out. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422001000500016&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

LINDEBERG, G. A convenient synthesis of aspartame. **Journal of Chemical Education**, v. 64, n. 12, p. 1062–1064, 1987.

LIRIA, C. W. **Novas observações e perspectivas do uso de lipase na síntese de peptídeos**. 2004. 2004.

LIRIA, C. W.; BEMQUERER, M. P.; MIRANDA, M. T. M. Premature removal of N(α)-9-fluorenylmethoxycarbonyl in thermodynamically controlled enzymatic coupling trials. **Tetrahedron Letters**, v. 39, n. 24, p. 4207–4210, 1998.

LIRIA, C. W.; ROMAGNA, C. D.; RODOVALHO, N. N.; MARANA, S. R.; MIRANDA, M. T. M. Dipeptide synthesis in biphasic medium: evaluating the use of commercial porcine pancreatic lipase preparations and the involvement of contaminant proteases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 8, p. 1574–1581, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532008000800018&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

LIRIA, C. W.; UNGARO, V. A.; FERNANDES, R. M.; COSTA, N. J. S.; MARANA, S. R.; ROSSI, L. M.; MACHINI, M. T. Synthesis, properties, and application in peptide chemistry of a magnetically separable and reusable biocatalyst. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 11, 2014.

MA, W.; TANG, C.; LAI, L. Specificity of trypsin and chymotrypsin: Loop-motion-controlled dynamic correlation as a determinant. **Biophysical Journal**, v. 89, n. 2, p. 1183–1193, 2005.

MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M. T. M. Sínteses química e enzimática de peptídeos: Princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 781–789, 2004.

MACHINI, M.; LIRIA, C. Purificação de Produtos Biotecnológicos. *In*: KILIKIAN, B.; JR., P. **Fundamentos para a produção, purificação e caracterização de peptídeos de interesse biotecnológico**. 2. ed. São Paulo, Brasil: Blücher, 2020. p. 701–727.

MARTIN, B. R. Free energies and equilibria of peptide bond hydrolysis and formation.

Biopolymers, v. 45, n. 5, p. 351–353, 1998.

MASMAN, M. F.; RODRÍGUEZ, A. M.; SVETAZ, L.; ZACCHINO, S. A.; SOMLAI, C.; CSIZMADIA, I. G.; PENKE, B.; ENRIZ, R. D. Synthesis and conformational analysis of His-Phe-Arg-Trp-NH₂ and analogues with antifungal properties. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 22, p. 7604–7614, 15 nov. 2006.

MIRANDA, M. T. M. **Síntese Enzimática de Peptídeos Contendo Asparagina e Transesterificação em Metanol de Ésteres de Peptídeos na Presença de Ca(II)**. 1989. Universidade de São Paulo, 1989.

MITCHELL, A. R. **Bruce Merrifield and solid-phase peptide synthesis: A historical assessment** **Biopolymers - Peptide Science Section** John Wiley and Sons Inc., 2008.

MORIHARA, K. Using proteases in peptide synthesis. **Trends in Biotechnology**, v. 5, n. 6, p. 164–170, jun. 1987. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0167779987900904>>.

MOSS, G. P. **Enzyme Nomenclature**. Disponível em: <<https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/>>.

NAIDER, F.; GOODMAN, M. Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry: Synthesis of Peptides and Peptidomimetics . *In*: FELIX, A.; MORODER, L.; TONIOLO, C. 4th. ed. Mahwah, EUA: Thieme Medical Publishers, 2004. p. 1–14.

NELSON, D. L. .; COX, M. M. Lehninger's Principle of Biochemistry. *In*: [s.l: s.n.]

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464–472, set. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779911000886>>.

NISHINO, N.; XU, M.; MIHARA, H.; FUJIMOTO, T. Use of Hexafluoroisopropyl Alcohol in Tryptic Condensation for Partially Protected Precursor of α -Melanocyte Stimulating Hormone. **Tetrahedron Letters**, v. 33, n. 22, p. 3137–3140, 1992.

NUNES, L. G. P.; REICHERT, T.; MACHINI, M. T. His-Rich Peptides, Gly- and His-Rich Peptides: Functionally Versatile Compounds with Potential Multi-Purpose Applications. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 27, n. 4, p. 2945–2963, 21 dez. 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s10989-021-10302-z>>.

ODA, K.; TAKAHASHI, T.; TAKADA, K.; TSUNEMI, M.; NG, K. K.; HIRAGA, K.; HARADA, S. Exploring the subsite-structure of vimelysin and thermolysin using FRETSLibraries. v. 579, p. 5013–5018, 2005.

OKA, T.; MORIHARA, K. Trypsin as a Catalyst for Peptide Synthesis. **The Journal of Biochemistry**, v. 82, n. 4, p. 1055–1062, 1977. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jb/article-abstract/82/4/1055/883882>>.

OKA, T.; MORIHARA, K. Peptide Bond Synthesis Catalyzed by Thermolysin. **The Journal of Biochemistry**, v. 88, n. 3, p. 807–813, jul. 1980. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jb/article/814116/Peptide>>.

OKUDA-SHINAGAWA, N. M.; MOSKALENKO, Y. E.; JUNQUEIRA, H. C.; BAPTISTA, M. S.; MARQUES, C. M.; MACHINI, M. T. Fluorescent and Photosensitizing Conjugates of Cell-Penetrating Peptide TAT(47-57): Design, Microwave-Assisted Synthesis at 60 °c, and Properties. **ACS Omega**, v. 2, n. 11, p. 8156–8166, 2017.

PAN, X.; XU, L.; LI, Y.; WU, S.; WU, Y.; WEI, W. Strategies to Improve the Biosynthesis of β -Lactam Antibiotics by Penicillin G Acylase: Progress and Prospects. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, n. July, p. 1–14, 2022.

PARADÍS-BAS, M.; TULLA-PUCHE, J.; ALBERICIO, F. The road to the synthesis of “difficult peptides”. **Chemical Society Reviews**, v. 45, n. 3, p. 631–654, 2016. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C5CS00680E>>.

PARK, C. J.; PARK, C. B.; HONG, S. S.; LEE, H. S.; LEE, S. Y.; KIM, S. C. Characterization and cDNA cloning of two glycine- and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastoris*. **Plant Molecular Biology**, v. 44, n. 2, p. 187–197, 2000.

PETKOV, D. D. Enzyme peptide synthesis and semisynthesis: Kinetic and thermodynamic aspects. **Journal of Theoretical Biology**, v. 98, n. 3, p. 419–425, out. 1982. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002251938290128X>>.

PIZZOLATO-CEZAR, L. R.; OKUDA-SHINAGAWA, N. M.; MACHINI, M. T. Combinatory Therapy Antimicrobial Peptide-Antibiotic to Minimize the Ongoing Rise of Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JULY, p. 1–5, 9 ago. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.01703/full>>.

POLLAK, P. **Fine Chemicals: the Industry and the Business**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2007.

RAJAGOPAL, S.; SPATOLA, A. F. Mechanism of Palladium-Catalyzed Transfer Hydrogenolysis of Aryl Chlorides by Formate Salts. **Journal of Organic Chemistry**, v. 60, n. 5, p. 1347–1355, 1 mar. 1995.

RAMESH, S.; GOVENDER, T.; KRUGER, H. G.; DE LA TORRE, B. G.; ALBERICIO, F. Short AntiMicrobial Peptides (SAMPs) as a class of extraordinary promising therapeutic agents. **Journal of Peptide Science**, p. 438–451, 1 jul. 2016.

REICHERT, T. **Análogos sintéticos da cheferina I: interação com íons metálicos divalentes e o seu efeito na internalização celular e nas atividades anticandida e candidacida**. 2019. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-27062019-103116/>>.

RIBEIRO, M. M. B.; FRANQUELIM, H. G.; TORCATO, I. M.; RAMU, V. G.; HERAS, M.; BARDAJI, E. R.; CASTANHO, M. A. R. B. Antimicrobial properties of analgesic kyotorphin peptides unraveled through atomic force microscopy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 420, n. 3, p. 676–679, 13 abr. 2012.

RODRIGUEZ, J.; GUPTA, N.; SMITH, R. D.; PEVZNER, P. A. Does Trypsin Cut Before Proline? **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 1, p. 300–305, jan. 2008. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr0705035>>.

ROSENMUND, K. W.; ZETZSCHE, F. Über die Beeinflussung der Wirksamkeit von Katalysatoren. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 54, n. 8, p. 2038–2042, 1921.

SAJGÓ, M. Untersuchungen über den enzymatischen Abbau von tert-Butyltryptophan-haltigen Peptiden. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie**, v. 360, n. 1, p. 9–12, jan. 1979. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/bchm2.1979.360.1.9/html>>.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. ON THE ACTIVE SITE OF PROTEASES. III. MAPPING THE ACTIVE SITE OF PAPAIN; SPECIFIC PEPTIDE INHIBITORS OF PAPAIN. **Biochemical and Biophysical research communications**, v. 32, n. 5, p. 898–902, 1968.

SCHELLENBERGER, V.; JAKUBKE, H.-D. Protease-Catalyzed Kinetically Controlled Peptide Synthesis. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 30, n. 11, p. 1437–1449, nov. 1991. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.199114371>>.

SHEEHAN, J. C.; HESS, G. P. A New Method of Forming Peptide Bonds. **Journal of the American Chemical Society**, v. 77, n. 4, p. 1067–1068, 1 fev. 1955.

SHELDON, R. A. The E factor at 30: a passion for pollution prevention. **Green Chemistry**, 2023.

SHELDON, R. A.; BRADY, D. Broadening the Scope of Biocatalysis in Sustainable Organic Synthesis. **Chemsuschem**, v. 12, n. 13, p. 2859–2881, 2019.

SHELL, A. **Peptides**. Boston, MA: Birkhäuser Boston, 1994. 1–23 p.

SILVA, F. M. da; LACERDA, P. S. B. de; JONES JUNIOR, J. Desenvolvimento sustentável e química verde. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 103–110, 2005.

SIPOS, T.; MERKEL, J. R. An Effect of Calcium Ions on the Activity, Heat Stability, and Structure of Trypsin. **Biochemistry**, v. 9, n. 14, p. 2766–2775, 1970.

STRØM, M. B.; HAUG, B. E.; SKAR, M. L.; STENSEN, W.; STIBERG, T.; SVENDSEN, J. S. The pharmacophore of short cationic antibacterial peptides. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 1567–1570, 2003.

STRØM, M. B.; REKDAL, Ø.; SVENDSEN, J. S. Antimicrobial activity of short arginine- and tryptophan-rich peptides. **Journal of Peptide Science**, v. 8, n. 8, p. 431–437, 2002.

TAKAGI, H.; SHIOMI, H.; UEDA, H.; AMANO, H. A novel analgesic dipeptide from bovine brain is a possible Met-enkephalin releaser. **Nature**, v. 282, n. 5737, p. 410–412, 1979.

TANG, S. Y.; BOURNE, R. A.; SMITH, R. L.; POLIAKOFF, M. The 24 Principles of Green Engineering and Green Chemistry: “IMPROVEMENTS PRODUCTIVELY”. **Green Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 268, 2008. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=b719469m>>.

THAPA, R. K.; DIEP, D. B.; TØNNESEN, H. H. Topical antimicrobial peptide formulations for wound healing: Current developments and future prospects. **Acta Biomaterialia**, v. 103, p. 52–67, fev. 2020. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706119308542>>.

TÓTH, R.; NOSEK, J.; MORA-MONTES, H. M.; GABALDON, T.; BLISS, J. M.; NOSANCHUK, J. D.; TURNER, S. A.; BUTLER, G.; VÁGVÖLGYI, C.; GÁCSER, A. Candida parapsilosis: From genes to the bedside. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, p. 1–38, 2019.

TSUZUKI, H.; OKA, T.; MORIHARA, K. Coupling between Cbz-Arg-OH and Leu-X Catalyzed by Trypsin and Papain. **The Journal of Biochemistry**, v. 88, n. 3, p. 669–675, jul. 1980. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jb/article/813946/Coupling>>.

UNGARO, V. A. **Desenvolvimento , estudo e aplicações de nanobiocatalisadores proteolíticos magnéticos**. 2020. Universidade de São Paulo, 2020.

UNGARO, V. A.; LIRIA, C. W.; ROMAGNA, C. D.; COSTA, N. J. S.; PHILIPPOT, K.; ROSSI, L. M.; MACHINI, M. T. A green route for the synthesis of a bitter-taste dipeptide combining biocatalysis, heterogeneous metal catalysis and magnetic nanoparticles. **Rsc Advances**, v. 5, n. 46, p. 36449–36455, 2015.

VARMA, R.; VARMA, D. R. The Bhopal Disaster of 1984. **Bulletin of Science, Technology & Society**, v. 25, n. 1, p. 37–45, 27 fev. 2005. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0270467604273822>>.

WANG, D.; ASTRUC, D. The Golden Age of Transfer Hydrogenation. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 13, p. 6621–6686, 2015.

WANG, J. J.; DOU, X. J.; SONG, J.; LYU, Y. F.; ZHU, X.; XU, L.; LI, W. Z.; SHAN, A. S. Antimicrobial Peptides: Promising Alternatives in the Post Feeding Antibiotic Era. **Medicinal Research Reviews**, v. 39, n. 3, p. 831–859, 2019.

WRUBLEWSKI, D. T. Analysis for Science Librarians of the 2018 Nobel Prize in Chemistry: Directed Evolution of Enzymes and Phage Display of Peptides and Antibodies. **Science and Technology Libraries**, v. 38, n. 1, p. 51–69, 2 jan. 2019.

YAZAWA, K.; NUMATA, K. Recent advances in chemoenzymatic peptide syntheses. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 13755–13774, 2014.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 15, p. 5449–5453, 1987.

ZIMMERMAN, J. B.; ANASTAS, P. T.; ERYTHROPEL, H. C.; LEITNER, W. Designing for a green chemistry future. **Science**, v. 367, n. 6476, p. 397–400, 24 jan. 2020. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.aay3060>>.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: João Pedro Alves Fairbanks

Local e data de nascimento: São Paulo – SP; 27 de julho de 1996

Nacionalidade: Brasileira

E-mail: joao.fairbanks@gmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2º grau:

Escola Técnica Estadual Professor Basílides de Godoy

Ensino Médio: 2011 – 2013

Graduação:

Universidade de São Paulo, Instituto de Química

Bacharelado em Química: fev/2015 – fev/2019

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Iniciação Científica:

Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Laboratório de Química de Peptídeos

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Terêsa Machini

Período: 2016 – 2018

Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Laboratório de Espectroscopia Molecular

Orientador: Prof Dr Rômulo Augusto Ando

Período: 2018 - 2019

ATIVIDADE DE ENSINO

Monitoria: Físico-Química I (QFL 1241 – Química Integral)

Período: 1º semestre - 2019

Professor: Dr Rômulo Augusto Ando

DISCIPLINAS CURSADAS

- **QFL 5930-5** Noções de Segurança em Laboratórios de Química e Bioquímica, Ética e Responsabilidade em Pesquisa (2 créditos) – Conceito: A.
- **QFL 5618-6** Química Quântica I (12 créditos) – Conceito: C.
- **QFL 5925-6** Prática de Ensino em Química (3 créditos) – Conceito: A.
- **QFL 5601-4** Espectroscopia Molecular II (12 créditos) – Conceito: A.
- **QFL 5619-4** Microscopia Raman: Fundamentos e Aplicações (8 créditos) – Conceito: A.
- **QFL 5939-12** Tópicos Avançados de Química I (2 créditos) – Conceito: A.
- **QFL 5940-10** Tópicos Avançados de Química II (2 créditos) – Conceito: A

BOLSA RCEBIDA

- CNPq, 03/2019 a 02/2021 (Bolsa de Mestrado)

PUBLICAÇÕES

Um manuscrito relatando o estudo da síntese de dipeptídeos mediante biocatálise está sendo preparado com vistas à publicação.