

Síntese da ligação peptídica catalisada por lipases

Cleber W. Liria (PG)*, Nicolas Nishikido R.(IC), Carolina D. Romagna (IC), M. Terêsa M. Miranda (PQ)
cwliria@iq.usp.br, mtmirand@iq.usp.br

Laboratório de Química de Peptídeos, Departamento de Bioquímica, IQ-USP, C.P. 26077, 05513-970, SP, Brasil.

Palavras Chave: síntese da ligação peptídica, peptídeos, biocatálise

Introdução

Os peptídeos são compostos orgânicos de grande diversidade funcional. Como as suas sínteses químicas totais demandam proteção total das cadeias laterais dos aminoácidos, freqüentemente empregam solventes clorados e são acompanhadas de epimerização, agregação e inúmeras reações secundárias, a biocatálise passou a ser vista como uma alternativa atraente.

Há vários anos estudamos as sínteses química e enzimática de peptídeos. A constatação de que a catálise por proteases é adequada à síntese de peptídeos curtos, mas inapropriada à obtenção de peptídeos mais longos devido à ocorrência de hidrólise secundária dos reagentes e produtos, nos levou a buscar biocatalisadores alternativos¹.

O presente trabalho descreve os resultados obtidos no estudo da formação da ligação peptídica mediada por lipases pancreática suína (PPL) e de *Cândida cylindracea* (CCL). Contrariamente à hidrólise, síntese ou transesterificação de ésteres de aminoácidos e de peptídeos, a formação da ligação peptídica por estas esterases é ainda muito pouco estudada.

HPLC em 1h de reação foram os seguintes: 77% para Z-Phe-Gly-NH₂, 74% para Z-Tyr-Gly-NH₂, 20% para Z-Thr-Gly-NH₂ e 6% para Z-Asp-Gly-NH₂. Como esperado, eles refletiram a preferência da PPL bruta na hidrólise dos ésteres de Z-aa-OMe (aa: Arg, Asp, Gln, Glu, His, Leu, Lys, Phe, Ser, Thr e Tyr) mediada pela PPL bruta, que recentemente foi determinada por nós^{3,4}.

Faz-se necessário mencionar que o grupo Z foi removido em algumas das reações realizadas em presença de enzima. Tal observação inédita se mostrou merecedora de investigação, pois os protocolos rotineiros de remoção deste grupo empregam condições reacionais drásticas e de alta periculosidade. Sabendo que a PPL bruta contém vários contaminantes com atividade hidrolítica (α -quimotripsina, tripsina e carboxipeptidases A e B), incubamos alguns Z-aa com estas proteases. Os resultados obtidos nos levaram a concluir que a PPL bruta e as carboxipeptidases A e B são capazes de catalisar a remoção do Z de vários dos Z-aa testados. Esta observação revela uma possível alternativa para a resolução enantiomérica de Z-aa de alto valor comercial.

Resultados e Discussão

Inicialmente, realizamos uma investigação sistemática empregando ZAsp-OMe ou Ac-Tyr-OEt (Z: benziloxicarbonil; Ac: acetil) como doador de acila, H-Gly-NH₂ como acceptor de acila, duas PPLs (bruta e purificada) e duas CCLs como catalisadores. Os dados obtidos via monitoramento das reações por RP-HPLC e LC/ESI-MS indicaram que: 1) o conteúdo de n-hexano na mistura reacional afeta a eficiência do acoplamento; 2) a mistura bifásica de n-hexano/Tris-HCl, 0,5M, pH 8 (8:2, v:v) é particularmente adequada para este propósito; 3) além de muito barata, a PPL bruta leva a uma maior produtividade; 4) a PPL purificada comercial é menos ativa e tão impura quanto a PPL bruta; 5) as proteases pancreáticas presentes na PPL bruta contribuem para a alta eficiência catalítica observada, mas causam a hidrólise do produto^{2,5}; 6) as CCLs levam a uma menor produtividade sem, entretanto, hidrólise do produto.

De posse deste conhecimento, realizamos novas reações envolvendo Z-Phe-OMe, Z-Tyr-OMe, Z-Thr-OMe ou Z-Asp-OMe, H-Gly-NH₂ e PPL bruta nas mesmas condições experimentais citadas acima. Os rendimentos de acoplamento estimados por 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

Conclusões

1) O meio bifásico n-hexano/Tris-HCl, 0,5M, pH 8 (8:2, v:v) leva à ativação da cPPL, um catalisador barato e poderoso da formação da ligação peptídica; 2) Nestas condições, a eficiência catalítica obedece a preferência desta preparação enzimática por Z-aa-OMe e, portanto, o conhecimento desta preferência é essencial para o sucesso de sínteses peptídicas mediadas por PPL bruta; 3) Esta preparação enzimática é também capaz de remover o grupo Z de Z-Tyr, Z-Phe, Z-Trp, Z-Lys, Z-Arg e Z-Leu com a eficiência adequada a processos sintéticos.

Agradecimentos

Financiamento: FAPESP e CNPq.

¹ Bemquerer, M.P.; Liria, C.W.; Kitagawa, K.; Miranda, M.T.M.; Tomiaga, M., *J. Pept. Res.*, **1998**, 51:29-37.

² Liria, C.W. & Miranda, M.T.M., *In Peptides 2000*; Martinez, J.; Fehrents, J.-A., eds.; EDK: Paris, **2001**, 331-232.

³ Liria, C.W.; Bordusa, F. and Miranda, M.T.M., *In Peptides 2002*; Benedetti, E.; Pedone, C., eds.; Edizioni Ziino: Napoli, **2002**, 222-223.

⁴ Liria, C.W., *Tese de Doutorado*, **2004**, 110p., IQ-USP.

⁵ Liria, C.W. & Miranda, M.T.M., *New findings in lipase-catalyzed peptide synthesis*, Manuscrito em preparação.