

Biocatálise e nanotecnologia na síntese de peptídeos: propriedades e uso de α -quimotripsina ligada a nanopartículas superparamagnéticas

Raphaella M. Fernandes¹(IC), Cleber W. Liria¹(TC), Natalia J. S. Costa²(PG),
Liane M. Rossi²(PQ), M. Terêsa Machini Miranda^{1*}(PQ). *mtmirand@iq.usp.br

Departamentos de Bioquímica¹ e de Química Fundamental², Instituto de Química, USP, 05513-970, São Paulo, Brasil

Palavras Chave: síntese orgânica, peptídeo, enzimas, imobilização, nanomateriais, hidrólise de éster.

Introdução

Peptídeos são biomoléculas de grande diversidade funcional e, portanto, de enorme interesse científico. Quantidades apreciáveis desses compostos só podem ser conseguidas via síntese laboratorial. O nosso grupo de pesquisa tem estudado alternativas sintéticas ambientalmente amigáveis. A biocatálise tem sido o nosso alvo principal e as proteases as enzimas mais usadas^{1,2}. Tais biocatalisadores apresentam propriedades ainda mais interessantes quando imobilizadas em suportes insolúveis. Atualmente, devido à sua alta área superficial e fácil separação do meio reacional, as nanopartículas magnéticas figuram entre os materiais mais indicados para tal função.

Os objetivos deste trabalho foram: 1) quantificar a funcionalização por glutaraldeído de uma nanopartícula superparamagnética (NPSP) aminada; 2) imobilizar a protease α -quimotripsina (α QT) na NPSP funcionalizada; 3) determinar o conteúdo protéico e a atividade amidásica da α QT-NPSP; 4) determinar as condições ótimas para a sua estocagem; 5) estudar a possibilidade de sua reutilização; 6) investigar a sua aplicabilidade na catálise da hidrólise do éster de Z-Ala-Phe-OMe.

Resultados e Discussão

A síntese, funcionalização da NPSP aminada e imobilização de α QT na NPSP funcionalizada se basearam em protocolos já descritos³. O rendimento da funcionalização por glutaraldeído foi de 20%. O conteúdo protéico da α QT-NPSP foi determinado por hidrólise ácida total e análise de aminoácidos do hidrolisado (via HPLC de troca iônica e detecção por amperometria pulsada), sendo ele 46,4 mg de α QT/g de α QT-NPSP (23% de rendimento). As medidas de atividade enzimática frente ao substrato cromogênico Bz-DL-Tyr-pNA confirmaram que a imobilização foi bem sucedida, pois a α QT-NPSP se mostrou ativa. Em tempos iniciais de estocagem, a α QT-NPSP armazenada em suspensão em t.a. (α QT-NPSP *susp.*) ou a 4°C apresentou atividade 60% maior do que a estocada na forma seca a 4°C (Fig.1). A atividade da α QT-NPSP *susp.* frente à Bz-DL-Tyr-pNA se manteve após 10 ciclos de utilização, resultado comparável aos da literatura. A α QT-NPSP *susp.* foi capaz de catalisar a hidrólise do éster de Z-Ala-Phe-OMe (reação monitorada por

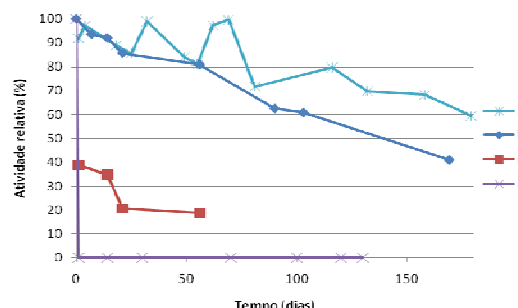


Figura 1. Estocagem de α QT-NPSP [em suspensão 4°C (a), em suspensão em t.a. (b), seca a 4°C (c)] e de α QT livre [em solução em t.a. (d)].

HPLC de fase reversa e por espectrometria de massas, Fig.2), podendo ser reutilizada por 4 ciclos sem perda significativa de atividade (apenas 10%).

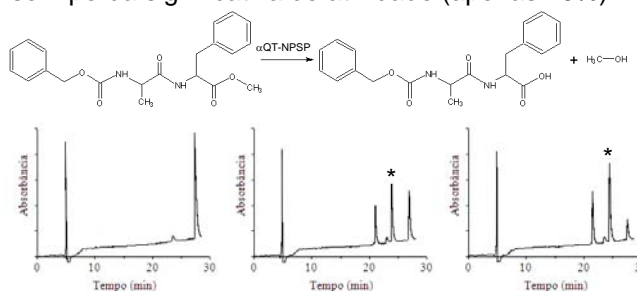


Figura 2. Hidrólise do éster de Z-Ala-Phe-OMe catalisada pela α QT-NPSP. *produto desejado.

Conclusões

Um novo método de determinar a eficiência de imobilização enzimática foi estabelecido; a α QT-NPSP estocada suspensa em tampão em t.a. foi mais estável (ativa por mais de 150 dias) do que a α QT livre estocada em solução em t.a. (inativa após 1 dia); ela se mostrou reutilizável (por pelo menos 10 ciclos frente à Bz-DL-Tyr-pNA) e capaz de catalisar seletiva e eficientemente a hidrólise do éster de um dipeptídeo (reutilizável por pelo menos 4 ciclos).

Agradecimentos

Financiamento/bolsas: FAPESP, CNPq e RUSP.

¹Machado, A.; Liria, C.W.; Proti, P.B.; Remuzgo, C.; Miranda, M.T.M. *Quim. Nova*, **2004**, 5, 781-789. ²Liria, C.W.; Romagna C.D.; Rodovalho, N.N.; Maranda S.R.; Miranda M.T.M. *J.Braz.Chem.Soc.*, **2008**, 19(8), 1574-1581. ³Rossi, L.M.; Silva, F.P.; Vono, L.L.R.; Kiyohara, P.K.; Duarte, E.L.; Itri, R.; Landers, R.; Machado, G. *Green Chem.*, **2007**, 9, 379-385.