

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

TERMOLISINA COMO CATALISADOR NA SÍNTESE DE
DI- E TRIPEPTÍDEOS CONTENDO ASPARAGINA

MARIA TERÊSA MACHINI

Dissertação apresentada ao
Departamento de Bioquímica,
para a obtenção do título
de MESTRE EM CIÊNCIAS.

SÃO PAULO - 1985

Dissertação preparada no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química - Universidade de São Paulo

Orientador: Profa.Dra. MINEKO TOMINAGA

Dedico este trabalho:

Aos meus pais: Delício e Therezinha

Aos meus irmãos: José Fernando e
Maria Auxiliadora

Ao Antonio

Pelo incentivo, apoio, compreensão e amor que sempre me dedicaram.

Agradeço à Profa.Dra. Mineko Tominaga, minha orientadora e amiga, pelo apoio, compreensão, ensinamentos e incentivo constante durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos Profs.Drs. Wolfgang F. Seidel e José Muradian, pela eficiente colaboração, ensinamentos e amizade.

À amiga Elisabeth, pela ajuda dispensada no início deste trabalho.

Ao José Bráz de Picolli, pela excelente assistência técnica.

Aos amigos do laboratório de Síntese Enzimática de Peptídeos: Ayako, Neusa, Odila e Leôncio pela colaboração e convívio diário agradável.

À Profa. Riva Moscovici e ao Prof.Dr. Yoshio Kawano, que gentilmente realizaram as análises elementares e o registro dos espectros no infravermelho, respectivamente.

Ao Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina, pela realização cuidadosa das análises de aminoácidos.

Ao Antonio, pela ilustração deste trabalho.

À Carminha, pelo excelente serviço de datilografia.

Às bibliotecárias Moema Rodrigues dos Santos e Maria Amélia Rocha Costa pela revisão das referências bibliográficas.

À FAPESP, CNPq e FINEP, pelo auxílio financeiro concedido.

À todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

ABREVIACÕES

Os resíduos de aminoácidos e reagentes químicos são a breviados de acordo com as normas de IUPAC-IUB (J. Biol. Chem. 242: 6489-6497, 1970;Ibid 250: 3215-3216, 1975) exce- to alguns solventes orgânicos.

Acn - acetonitrila

AcOEt - acetato de etila

An - acetona

Boc - terc-butiloxicarbonil

Boc-SDP - tiocarbonato de t-butil-S-(4,6-dimetil)-2-pirimi- dina

Bzh - benzidril

CCD - cromatografia em camada delgada

CDCl₃ - clorofórmio deuterado

CD₃COCD₃ - acetona deuterada

CHCl₃ - clorofórmio

DCC - diciclo-hexil-carbodiimida

DMSO-d₆ - dimetilsulfóxido deuterado

EE - ter etílico

P - éter de petróleo

EtOH - etanol

ΔG°_{hid} - variação de energia livre de Gibbs de hidrólise

ΔG°_{ion} - variação de energia livre de Gibbs de ionização

IV - infravermelho

K_{sin} - constante de síntese

MeOH - metanol

Moz - p-metoxi-benziloxicarbonil

OBu^t - éster terc-butílico
OBzl - éster benzílico
OEt - éster etílico
ONp - éster p-nitrofenílico
OPCP - éster pentaclorofenílico
OPFP - éster pentafluorofenílico
P.F. - ponto de fusão
RM¹H - ressonância magnética protônica
TFA - ácido trifluoroacético
TMS - tetrametilsilano
Tos - 4-toluenosulfonil
Tris-HCl - cloridrato de tris-hidroximetil-amino-metano
Z - benziloxicarbonil

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUÇÃO	1
1. Síntese de peptídeos	1
2. Síntese química de peptídeos contendo asparagi <u>n</u> a como componente carboxílico	2
3. Síntese enzimática de peptídeos	7
3.1. Histórico	7
3.2. Fatores que favorecem a formação de liga <u>ç</u> ão peptídica	9
3.3. Especificidade de proteases	13
4. Termolisina como catalisador na síntese peptí <u>d</u> ica	15
5. Proposição	18
II. MATERIAIS E MÉTODOS	19
1. Reagentes e solventes	19
2. Métodos analíticos	19
2.1. Análise elementar	19
2.2. Análise de aminoácidos	20
2.3. Cromatografia em camada delgada	20
2.4. Ponto de fusão	21
2.5. Poder rotatório específico	21
2.6. Ressonância magnética protônica	21
2.7. Espectros de absorção no infravermelho	22
2.8. Eletroforese	22
3. Métodos preparativos	22
3.1. Síntese de derivados de L-aminoácidos	22
3.1.1. Síntese de N _α -terc-butiloxicar <u>b</u> onil-L-asparagina	22
3.1.2. N _α -p-metoxibenziloxicarbonil-L-asparagin <u>a</u>	23
3.1.3. Ésteres benzílicos de L-aminoáci <u>d</u> os	23
3.1.4. Ésteres etílicos de L-aminoácidos	24
3.1.5. Éster etílico de N _α -benziloxicar <u>b</u> onil-L-asparagina	24

	Pág.
3.2. Síntese química de dipeptídeos	25
3.2.1. Éster benzílico de N _~ -terc-butioxycarbonil-L-asparagil-L-isoleucina	25
3.2.2. Éster benzílico de N _α -terc-butiloxycarbonil-L-isoleucil-L-leucina	26
3.2.3. Éster benzílico de N _α -terc-butiloxycarbonil-L-isoleucil-L-glicina	27
3.2.4. Éster benzílico de N _α -terc-butiloxycarbonil-L-isoleucil-L-alanina	27
3.2.5. Éster benzílico de N _α -terc-butiloxycarbonil-L-isoleucil-L-fenilalanina	28
3.3. Remoção do grupo terc-butiloxycarbonil com ácido trifluoroacético	28
3.4. Remoção do grupo benziloxycarbonil por hidrogenação catalítica	29
3.5. Incubação de N _α -terc-butiloxycarbonil-L-asparagina com papaína	29
3.6. Incubação de N _α -benziloxycarbonil-L-asparagina com papaína	29
3.7. Incubação de éster etílico de N _α -benziloxycarbonil-L-asparagina com α-quitripsina	30
3.8. Incubação de N _α -benziloxycarbonil-L-asparagina com termolisina	30
3.9. Síntese enzimática de dipeptídeos contendo asparagina	31
3.9.1. Método geral empregado na formação de ligações peptídicas	31
3.9.2. Determinação da condição ótima de síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl	32
3.9.2.1. Estudo do efeito do pH	32

	Pág.
3.9.2.2. Estudo do efeito do tempo de reação	32
3.9.2.3. Estudo do efeito da concentração de enzima	33
3.9.2.4. Estudo do efeito da concentração de acetato de sódio	33
3.9.2.5. Estudo do efeito do volume de acetato de sódio 0,2 M	34
3.9.2.6. Estudo do efeito da variação da proporção entre os componentes carboxílico e amínico	34
3.9.2.7. Estudo do efeito da temperatura	35
3.9.2.8. Estudo do efeito da adição de solventes orgânicos ao meio de reação	35
3.9.3. Estudo do efeito da variação do grupo protetor de N _α -aminogruppo no acoplamento entre N _α -acil-L-asparagina e o tosilato do éster benzílico de isoleucina	35
3.9.4. Estudo comparativo do acoplamento entre Boc-Asn-OH e tosilatos de ésteres benzílicos de isoleucina, leucina e fenilalanina	36
3.9.5. Síntese de Z-Asn-Ile-OBzl, Z-Asn-Leu-OBzl, Moz-Asn-Ile-OBzl Boc-Asn-Leu-OBzl, Moz-Asn-Leu-OBzl-Z, Asn-Leu-OEt, Boc-Asn-Phe-OBzl, Z Asn-Phe-OBzl, Moz-Asn-Phe-OBzl, Z-Asn-Phe-OEt, Z-Asn-Val-OBzl e Moz-Asn-Val-OBzl	36
3.9.6. Estudo da influência da temperatura sobre a síntese de Z-Asn-Ile-OBzl	37

	Pág.
3.10. Síntese enzimática de tripeptídeos con- tendo asparagina - Método geral emprega- do na síntese de Moz-Asn-Ile-Gly-OBzl, Moz-Asn-Ile-Ala-OBzl, Moz-Asn-Ile-Leu- OBzl e Moz-Asn-Ile-Phe-OBzl	37
III. RESULTADOS	39
1. Síntese de derivados de L-aminoácidos e de dipeptídeos por método químico	39
1.1. Rendimentos e caracterização dos deriva- dos de L-aminoácidos e dos dipeptídeos	39
1.2. Éster etílico de N _α -benziloxicarbonil- L-asparagina	39
2. Incubação de N _α -terc-butiloxicarbonil-L- <u>aspa</u> ragina, N _α -benziloxicarbonil-L-asparagina e éster etílico de N _α -benziloxicarbonil-L- <u>aspa</u> - ragina na presença de papaína, α-quimotripsi- na e termolisina	42
3. Síntese enzimática de dipeptídeos contendo <u>as</u> paragina	43
3.1. Síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl	43
3.2. Determinação da condição ótima de síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl	44
3.2.1. Estudo da influência do pH	44
3.2.2. Estudo do efeito do tempo de rea- ção	45
3.2.3. Estudo do efeito da concentração de enzima	45
3.2.4. Estudo do efeito da concentração de acetato de sódio	48
3.2.5. Estudo do efeito do volume de ace- tato de sódio	48
3.2.6. Estudo do efeito da variação da proporção entre os componentes car- boxílico e amínico na síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl	51

	Pág.
3.2.7. Estudo do efeito da temperatura na síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl	53
3.2.8. Estudo do efeito da adição de solvente orgânico ao meio de reação	53
3.3. Estudo do efeito da variação do grupo protetor de N _α -aminogruppo no acoplamento entre N _α -acil-L-asparagina e o tosilato de éster benzílico de isoleucina	53
3.4. Estudo comparativo de acoplamento entre N _α -terc-butiloxicarbonil-L-asparagina e os tosilatos de ésteres benzílicos de L-isoleucina, L-leucina e L-fenilalanina	55
3.5. Síntese de Z-Asn-Ile-OBzl	55
3.6. Síntese de Moz-Asn-Ile-OBzl	59
3.7. Síntese de Boc-Asn-Leu-OBzl	61
3.8. Síntese de Z-Asn-Leu-OBzl	63
3.9. Síntese de Moz-Asn-Leu-OBzl	64
3.10. Síntese de Z-Asn-Leu-OEt	65
3.11. Síntese de Boc-Asn-Phe-OBzl	67
3.12. Síntese de Z-Asn-Phe-OBzl	69
3.13. Síntese de Moz-Asn-Phe-OBzl	70
3.14. Síntese de Z-Asn-Phe-OEt	71
3.15. Síntese de Z-Asn-Val-OBzl	73
3.16. Síntese de Moz-Asn-Val-OBzl	75
4. Síntese enzimática de tripeptídeos contendo asparagina	76
4.1. Síntese de Moz-Asn-Ile-Gly-OBzl	76
4.2. Síntese de Moz-Asn-Ile-Ala-OBzl	79
4.3. Síntese de Moz-Asn-Ile-Leu-OBzl	81
4.4. Síntese de Moz-Asn-Ile-Phe-OBzl	82
5. Espectros de RM ¹ H dos di- e tripeptídeos sintetizados enzimaticamente	85 a 102
 IV. DISCUSSÃO	 103
1. Esterificação de N _α -benziloxicarbonil-L-asparagina	103
2. Estabilidade de N _α -acil-L-asparagina na presença de papaína, α-quimotripsina e termolisina	106

	Pág.
3. Síntese enzimática de di- e tripeptídeos	108
3.1. Estudo metodológico da síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl	108
3.2. Análise comparativa dos resultados obtidos na síntese de di- e tripeptídeos	113
V. CONCLUSÕES	121
VI. SUMÁRIO	123
SUMMARY	124
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

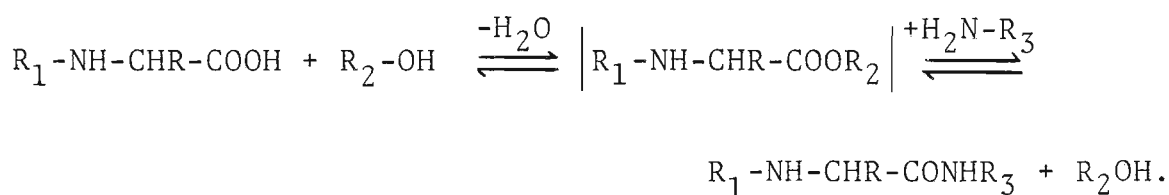
I. INTRODUÇÃO

1. Síntese de peptídeos

A descoberta e o isolamento de vários peptídeos biologicamente ativos, na década de 1950, estimularam o estudo da síntese laboratorial dos mesmos. Os métodos desenvolvidos foram o da síntese clássica ou em solução, o da síntese em fase sólida ou síntese de Merrifield e mais recentemente o método enzimático.

A formação de ligação peptídica baseia-se no princípio do ataque nucleofílico do α -aminogruppo de um aminoácido (componente amínico) à carboxila de baixa densidade eletrônica de outro aminoácido (componente carboxílico). Os requisitos necessários para sua formação são: 1) Proteção adequada dos grupos funcionais dos componentes carboxílico e amínico, para que se obtenha uma sequência inequívoca. 2) Ativação da carboxila do componente carboxílico através da formação de um intermediário reativo do tipo $R_1\text{-NH-CHR-COOR}_2$, onde R_1 é um grupo protetor de α -aminogruppo e R_2 um grupo que atrai elétrons (Esquema 1).

Esquema 1 - Reação de formação de ligação peptídica.



A síntese total de um peptídeo é um processo laborioso, pois consiste na soma de um grande número de etapas:

proteção dos grupos funcionais de aminoácidos, ativação da carboxila do componente carboxílico, formação da ligação peptídica entre os componentes (reação de acoplamento), desproteção parcial para a elongação desejada e adição do novo resíduo de aminoácido ou fragmento peptídico convenientemente protegido. Estas etapas se repetem até que a sequência desejada seja concluída, quando é realizada a desproteção total que fornece o peptídeo a ser purificado e caracterizado.

Atualmente, o conhecimento amplo das metodologias de síntese clássica e em fase sólida, permite a obtenção de cadeias peptídicas bastante longas com mais de uma centena de resíduos de aminoácidos (Yajima e Fujii, 1981; Gutte e Merrifield, 1971).

2. Síntese química de peptídeos contendo asparagina como componente carboxílico

Algumas reações de acoplamento na síntese química de peptídeos, são acompanhadas de reações secundárias que resultam na formação de subprodutos indesejáveis no meio reacional. A incorporação de N_{α} -acil-L-asparagina a peptídeos ou derivados de L-aminoácidos é uma destas reações (Bodanszky, 1984). Gish e col. (1956) observaram a formação de um composto anidro juntamente com o peptídeo desejado, nos acoplamentos entre Z-Asn-OH e H-Cys(SBzl)-OMe e entre Tos-Gln-Asn-OH e H-Cys(Bzl)-OMe pelos métodos de ativação com pirofosfite em solução de dietilfosfite e com N,N'-diciclo-hexilcarbodiimida em solução de tetra-hidrofurano e dimetilformamida. No mesmo ano, Ressler (1956) utilizou do tetraetilpirofosfite para ^{acoplar} preparar Tos-Ile-Gln-Asn-OH e

¹⁴
H-Cys-(S-Bzl)-OMe sugeriu a possibilidade de formação de nitrila no meio de reação, como consequência da desidratação da cadeia lateral carboxamida da asparagina. O mesmo subproduto foi detectado por Bodanszky e du Vigneaud (1959) durante a preparação de Z-Asn-ONp utilizando N,N'-díciclo-hexilcarbodiimida como agente de ativação. Na tentativa de estudar esta reação secundária, Ressler e Ratzkin (1961) trataram Z-Asn-OH com N,N'-díciclo-hexilcarbodiimida, em solução de piridina. O produto por eles obtido, com rendimento de 78%, apresentou características concordantes com as da carbobenzoxi- β -cianoalanina, resultante da reação de Z-Asn-OH e cloreto de p-toluenosulfonila. Este resultado indicou que N,N'-díciclo-hexilcarbodiimida é capaz de converter Z-Asn-OH à nitrila correspondente em grande extensão. Mais tarde, Kisfaludy e col. (1975) demonstraram a ocorrência de rearranjo intramolecular em compostos como Z-Asn-OPCP, Z-Asn-OPFP e Z-Asn-ONp, em presença de dimetilformamida, resultando na formação das nitrilas correspondentes. Estes rearranjos se mostraram fortemente dependentes da temperatura e do solvente utilizado, sendo que nenhuma reação foi observada em dioxano e acetato de etila. Todos estes estudos permitiram concluir que a desidratação da N_{α} -acil-L-asparagina ocorre durante a etapa de sua ativação por reagentes acopladores.

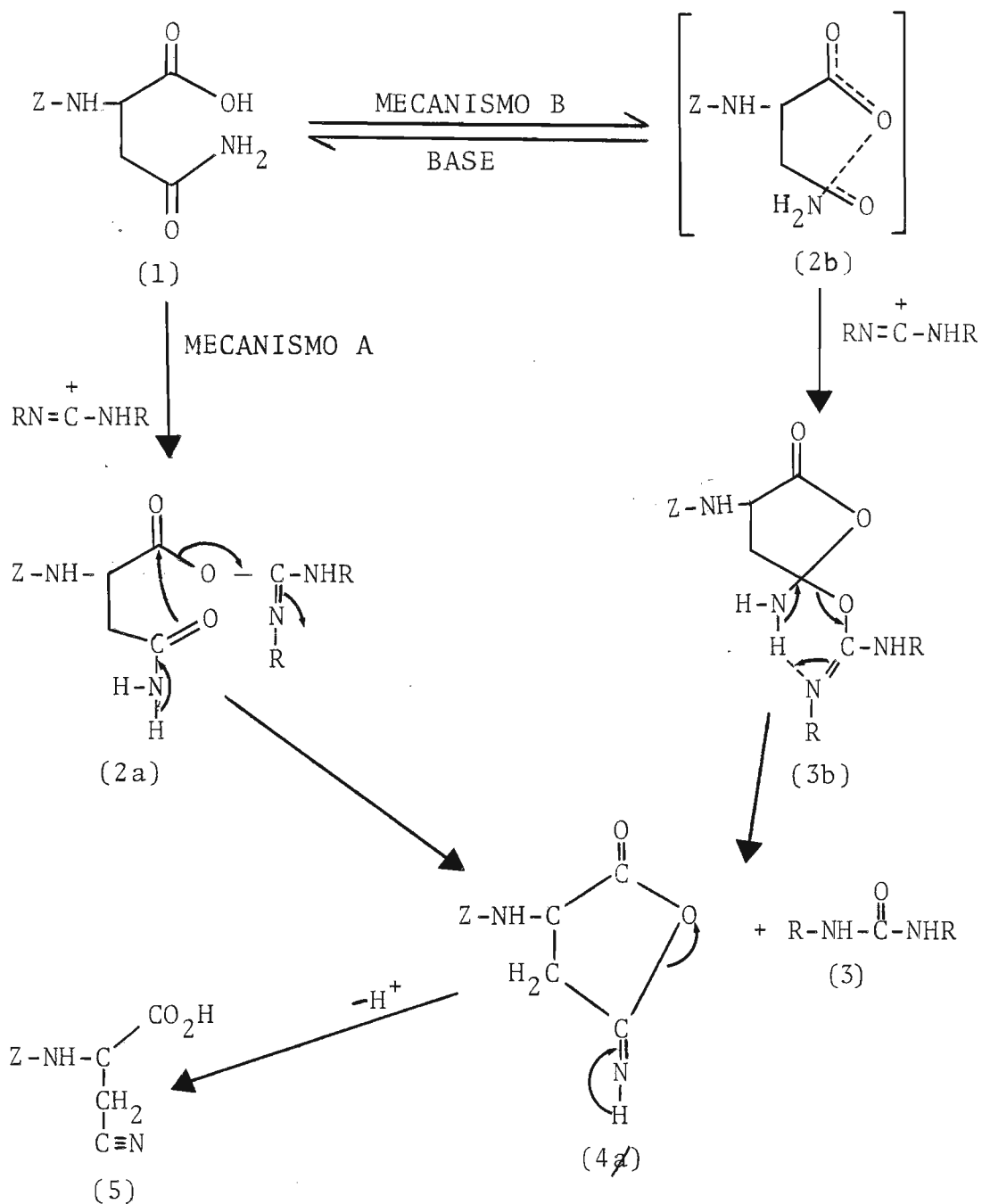
O mecanismo pelo qual ocorre a formação deste subproduto anidro foi estudado por vários pesquisadores. Stammer (1961) sugeriu a possibilidade da formação de uma isoimida intermediária através da interação intramolecular do grupo carboxamida e a carboxila ativada de Z-Asn-OH. Esta sugestão foi baseada na proposta feita anteriormente por Khorana (1953) de que o primeiro passo nas reações de acoplamento

que utilizam N,N'-díciclo-hexilcarbodiimida, poderia ser a formação de um aduto entre a carboxila do componente carboxílico e a carbodiimida. O mecanismo proposto por Stammer (Esquema 2 - Mecanismo A) teria portanto, como primeiro passo, a ligação da carboxila de Z-Asn-OH (1) e a carbodiimida para dar o composto 2a. Em seguida, o oxigênio da amida atacaria a carboxila ativada de 2a, formando uma isoimida cíclica (4) e a díciclo-hexiluréia (3). A reação posterior de 4 com base produziria a nitrila (5). Um mecanismo alternativo, similar ao já descrito para a síntese de maleisoimidas (Cotter e col., 1961), proposto por Liberek (1962) sugeria a formação de um composto cíclico (2b) a partir de Z-Asn-OH na presença de base. Este seria, em seguida, atacado pela N,N'-díciclo-hexilcarbodiimida protonada resultando num intermediário reativo (3b), o qual desidrataria através da formação de uma isoimida cíclica (4) e díciclo-hexiluréia (3). A perda do próton de 4 resultaria na formação da nitrila (5), conforme mostra o Esquema 2, mecanismo B.

Estudos realizados por Kashelkar e Ressler (1964) e Paul e Kende (1964), utilizando a marcação de Z-Asn-OH com O^{18} na sua carboxila, permitiram concluir que a reação de formação de nitrila se processa preferencialmente pelo mecanismo A. Concomitantemente, B ou outro mecanismo diferente de A e B, pode ocorrer em pequena extensão.

Para contornar o problema acima exposto, os acoplamentos que envolvem a asparagina como componente carboxílico, têm sido realizados através do método do éster ativo (Bodanszky, 1984). Por este método, o Z-Asn-ONp, obtido a partir da reação de Z-Asn-OH e p-nitrofenol na presença de

Esquema 2 - Mecanismos propostos por Stammer (1961) e Liberek (1962) para a formação de nitrila a partir de Z-Asn-OH e N,N'-diciclo-hexilcarbodiimida.



Onde Z = C₆H₅-CH₂-O-CO e R = ciclo-hexil.

N,N'-diciclo-hexilcarbodiimida, é separado da nitrila correspondente por meio de recristalizações sucessivas e utilizado na forma pura nas reações de acoplamento. O dipeptídeo resultante é geralmente livre de contaminação por subprodutos, mas o rendimento obtido no processo total de síntese é insatisfatório, ficando na ordem de 30% (Bodanszky e du Vigneaud, 1959). Além disso, a reação se processa vagarosamente exigindo algumas vezes longos períodos de tempo (Mojsov e col., 1980). Outros métodos alternativos têm sido explorados tais como a realização dos acoplamentos via óxido-redução (Mukaiyama e col., 1968) ou anidridos simétricos (Hemmasi e Bayer, 1974) e a adição de 1-hidroxibenzotriazol juntamente com a N,N'-diciclo-hexilcarbodiimida (König e Geiger, 1970a). Todos estes métodos, entretanto, não conseguem eliminar totalmente a ocorrência da desidratação (Mojsov e col., 1980). A proteção da função amida com o grupo 4,4'-dimetoxibenzidril (Mbh) descrita por König e Geiger (1970b) tem se mostrado bastante efetiva na prevenção da formação de nitrila. Esta proteção, porém, nem sempre propicia altos rendimentos de acoplamento, além de requerer mais uma etapa na preparação do aminoácido protegido. Uma forma alternativa de proteção do grupo amida descrita por Liberek (1961) é a sua transformação total em nitrila, que é então utilizada nos acoplamentos. Obtido o β -ciano-alanil peptídeo, a nitrila pode ser reidratada na presença de carbonato de sódio/peróxido de hidrogênio ou brometo de hidrogênio/ácido acético glacial para produzir o asparaginil peptídeo desejado. Uma das desvantagens desta desproteção, entretanto, é o fato de a reidratação não ser quantitativa.

A análise destes dados indica que, até o momento, o problema da formação de nitrila durante a incorporação de N_{α} -acil-L-asparagina a peptídeos ou derivados de L-aminoácidos pelo método químico, não está totalmente resolvido.

3. Síntese enzimática de peptídeos

3.1. Histórico

O método enzimático de síntese de ligações peptídicas data do século passado. Danilewski em 1886 (citado por Henriques e Gjaldbak, 1912) observou a formação de um precipitado de complexidade próxima a de uma proteína, quando extrato estomacal foi adicionado a uma solução contendo fibrina parcialmente digerida. Acreditou que essa precipitação era efetuada por uma enzima, pois o mesmo não ocorria quando o extrato era previamente aquecido a 100°C. Este resultado foi confirmado em 1895 por Okunew (citado por Henriques e Gjaldbak, 1912) e em 1901 Sawjalov deu ao precipitado obtido o nome de plasteína (Wasteneys e Borsook, 1930). A síntese de plasteína a partir de hidrolisados proteicos, na presença de pepsina e tripsina, foi intensamente estudada por vários pesquisadores no início deste século. Wasteneys e Borsook (1930, 1931) mostraram que a formação de plasteína, mediada por pepsina, era dependente do pH, da temperatura e da concentração de enzima.

As primeiras evidências inequívocas da formação de ligações peptídicas catalisadas por enzimas foram fornecidas por Bergmann e Fraenkel-Conrat (1938) e por Bergmann e Fruton (1938). Eles demonstraram que papaína e α -quimotripsina eram

capazes de catalisar a condensação de N-acil-L-aminoácidos com anilidas e fenil-hidrazidas de L-aminoácidos.

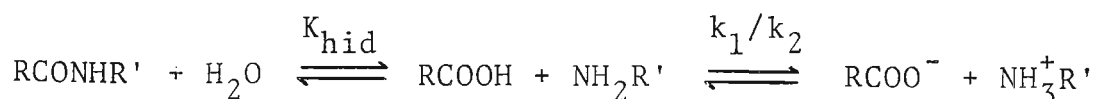
Até 1950, as investigações realizadas neste campo tinham como principal objetivo esclarecer o processo de biossíntese de proteínas. O esclarecimento deste mecanismo, na década de 1950, causou o esquecimento da síntese enzimática de peptídeos.

Na mesma época, peptídeos tais como ocitocina, angiotensina e bradicinina foram descobertos e isolados. A necessidade de confirmação de suas estruturas bem como o esclarecimento de seus mecanismos de ação sob os aspectos bioquímico, farmacológico e fisiológico, estimularam o desenvolvimento dos métodos de síntese química e de grupos protetores adequados. Como resultado destes fatores, vários processos de formação de ligação peptídica foram descritos e a síntese química teve um grande avanço, tornando-se o método usual para a obtenção de peptídeos em laboratório. Contudo, problemas como racemização, ocorrência de reações secundárias, cisão de ligação peptídica durante a desproteção final, não estão totalmente resolvidos. Por essa razão, a partir de 1977, surgiu um novo interesse na utilização de enzimas proteolíticas para a síntese de peptídeos. Saltman (1977), Morihara e Oka (1977~~a~~) e Isowa e col. (1977a) descreveram a síntese de vários peptídeos utilizando α -quimotripsina como catalisador. No mesmo ano, Isowa e col. (1977b) realizaram um estudo comparativo da síntese de vários di- e tripeptídeos com diferentes enzimas proteolíticas tais como: papaína, nagarse, pepsina e termolisina. Oka e Morihara (1977) comprovaram a viabilidade de se utilizar

tripsina para formação de ligações peptídicas entre derivados de L-aminoácidos ou peptídeos. Os trabalhos posteriores, descritos no período de 1978 a 1984, podem ser agrupados conforme o tipo de estudo realizado: 1) Síntese enzimática total ou parcial de oligopeptídeos biologicamente ativos ou de seus fragmentos: Kullmann (1979, 1980, 1981, 1982), Wong e col. (1979), Tominaga e col. (1983); 2) Estudo metodológico de síntese enzimática de peptídeos: Isowa e col. (1978), Oka (1980), Tsuzuki e col. (1980); 3) Estudo dos fatores cinéticos e termodinâmicos que determinam a formação de ligação peptídica catalisada por enzimas: Homandberg e col. (1978), Isowa e col. (1982), Fruton (1982), Petkov (1982), Petkov e Stoineva (1984), Martinek (1981). Todos estes estudos visam estabelecer as potencialidades, limitações, vantagens e desvantagens do método, com o intuito de torná-lo usual na obtenção de peptídeos.

3.2. Fatores que favorecem a formação de ligação peptídica

A reação de hidrólise de uma ligação peptídica, catalisada por proteases, é um processo reversível que consiste de duas etapas:



onde R e R' são grupos protetores,

O primeiro passo, a hidrólise da ligação peptídica para dar produtos não ionizados, é um processo endergônico ($\Delta G_{\text{hid}}^0 > 0$). O segundo passo, a ionização do grupo carboxila e protonação do aminogruppo, é um processo exergônico ($\Delta G_{\text{ion}} < 0$)

(Carpenter, 1960). Se $|\Delta G_{hid}^0| < |\Delta G_{ion}|$, a hidrólise da ligação peptídica é favorecida; se $|\Delta G_{hid}^0| \gg |\Delta G_{ion}|$, a reação de síntese é favorecida e se $|\Delta G_{hid}^0| \sim |\Delta G_{ion}|$, o equilíbrio pode ser controlado pela lei da ação das massas (Petkov, 1982). Em solução aquosa, $|\Delta G_{hid}^0| \ll |\Delta G_{ion}|$ predominando, portanto, a reação de hidrólise. Entretanto, as considerações acima mostram que em condições adequadas a reação de síntese de ligação peptídica, em solução aquosa, pode vir a predominar. Estas condições são alcançadas através de: a) adição de solvente orgânico ao meio de reação e introdução de grupos protetores; b) remoção do produto formado do meio de reação; c) utilização de componentes carboxílicos na forma de ésteres ou amidas.

a) Adição de solvente orgânico ao meio de reação e introdução de grupos protetores:

Devido ao fato do valor de ΔG_{hid}^0 ter aproximadamente o mesmo valor para ligações peptídicas típicas (Carpenter, 1960), a ocorrência de síntese depende do valor de ΔG_{ion} :

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

onde R = constante dos gases, T = temperatura absoluta, $pK_1 = pK_a$ da carboxila do componente carboxílico e $pK_2 = pK_a$ do aminogruppo do componente amínico.

Conseqüentemente, a porcentagem de síntese para um certo valor de pH é diretamente dependente dos valores de pK_1 e pK_2 (Petkov, 1982) e fatores que propiciem uma elevação no pK_1 ou diminuição no pK_2 devem, portanto, aumentá-la.

Homandberg e col. (1978) descreveram o efeito de vários solventes orgânicos no pKa aparente da Ac-Gly-OH e H-Gly-NH₂. Concluíram que conforme a natureza e a concentração do solvente utilizado, o valor de pK₁ da Ac-Gly-OH pode aumentar até três unidades de pK enquanto que o pK₂ da H-Gly-NH₂ permanece praticamente inalterado. Estudaram também o efeito da adição do solvente orgânico sobre a constante de equilíbrio para a reação de síntese de Z-Trp-Gly-NH₂, a partir de Z-Trp-OH (1 mM) e H-Gly-NH₂ (0,1 M) catalisada por α -quimotripsina e encontraram para K_{sin} os valores de 0,45 M⁻¹ e 38 M⁻¹ em solução aquosa e na presença de 1,4 butanodiol 85% (v/v), respectivamente. Este aumento foi atribuído a um provável aumento do pK₁ do componente carboxílico.

A introdução de grupos protetores causa também mudanças nos valores de pKa dos aminoácidos. Perrin (1965) observou que em solução aquosa, os valores de pK₁ de aminoácidos aumentam de uma unidade após a acilação do α -aminogruppo e os de pK₂ diminuem mais de uma unidade após o bloqueamento da carboxila. Isto sugere que a escolha adequada de grupos protetores pode alterar o valor de ΔG_{ion} de modo a favorecer a síntese de ligação peptídica (Petkov, 1982).

b) Remoção do produto formado do meio de reação

A extensão de síntese de R-CO-NH-R', em solução aquosa, a partir de R-COO⁻ e NH₃⁺-R' não depende somente de seus valores de pK₁ e pK₂, mas também da concentração das formas ionizadas e não ionizadas dos reagentes e da solubilidade do produto formado no meio de reação. Do ponto de vista termodinâmico, a separação do produto do meio de reação, quer seja como precipitado ou óleo, é um processo exer-

gônico. Portanto, fatores que reduzem a sua solubilidade tendem a aumentar a porcentagem de síntese (Fruton, 1982). Estes fatores são: a) Adição de sais inorgânicos ao meio de reação ou utilização de solução tampão mais concentrada (Okachi e Isowa, 1978; Isowa e col., 1979); b) utilização de grupos protetores hidrofóbidos (Fruton, 1949; Isowa e Ishikawa, 1979).

Além do fator termodinâmico, a remoção do produto do meio de reação favorece a formação de ligação peptídica, em solução aquosa, pela lei da ação das massas, pois com a sua retirada o equilíbrio da reação fica deslocado no sentido de síntese. O mesmo efeito é conseguido com a utilização do sistema bifásico, que consiste na realização da reação de síntese em uma mistura constituída por tampão e solvente orgânico imiscível, sob vigorosa agitação. O produto formado é continuamente retirado da fração aquosa pelo solvente orgânico. Este tipo de sistema tem sido estudado por Martinek e col. (1981) com sucesso. A síntese, por eles realizada, de Ac-Trp-Leu-NH₂ no sistema tampão/acetato de etila apresentou um rendimento 10⁵ vezes maior do que o obtido em solução aquosa.

c) Utilização de componentes carboxílicos na forma de ésteres ou amidas

Bergmann e Fraenkel-Conrat (1937) observou ^{aram} que a formação de Bz-Gly-NH-Ph, catalisada por papaína, foi mais rápida quando se utilizou Bz-Gly-NH₂ ao invés de Bz-Gly-OH. A ^{ram}tribuição a diferença observada à troca do grupo NH₂ da amida pela anilina, sem a ocorrência da hidrólise da mesma. Fruton

(1950) deu a este tipo de reação o nome de transamidação ou transpeptidação. A síntese de Bz-Tyr-Gly-NH₂ a partir de Bz-Tyr-NH₂ e H-Gly-NH₂ catalisada por α -quimotripsina, foi descrita por Fruton e col. (1951). Paralelamente, Tauber (1952) descreveu a formação de H-Phe-Phe-OEt pela mesma enzima, a partir de H-Phe-OEt. Através de vários dados termodinâmicos posteriormente descritos, ficou comprovado que reações de transamidação ou transpeptidação e de transesterificação, eram processos fortemente exergônicos (Fruton, 1982) e portanto capazes de favorecer termodinamicamente a reação de síntese de ligação peptídica, catalisada por proteases.

Um fator importante nas reações de transesterificação é a nucleofilicidade do componente amínico. Fastrez e Fersht (1973) sintetizaram Ac-Phe-Gly-NH₂ e Ac-Phe-Ala-NH₂, a partir de Ac-Phe-OEt, H-Gly-NH₂ e H-Ala-NH₂ na presença de α -quimotripsina e verificaram que H-Ala-NH₂ reage quatro vezes mais rápido do que H-Gly-NH₂, apesar de ambas apresentarem valores de pKa similares.

3.3. Especificidade de proteases

O conhecimento da especificidade de uma protease para a hidrólise de uma ligação peptídica ou éster de substratos sintéticos, é essencial para o uso adequado da enzima como catalisador de síntese da mesma, pois as características do substrato que influenciam a velocidade de quebra desta ligação estão envolvidas em sua síntese (Fruton, 1982).

De um modo geral, a escolha de uma protease, para a realização de um determinado acoplamento, é feita

analisando-se sua especificidade primária. Entretanto, quando se deseja sintetizar oligopeptídeos deve-se considerar também sua especificidade secundária, que tem grande influência sobre a especificidade primária. Na Tabela 1, página 14 estão mostradas as especificidades primárias de várias enzimas proteolíticas utilizadas na síntese de peptídeos.

Tabela 1 - Especificidade primária aparente de proteases para substratos sintéticos (Fruton, 1982)

Enzima	Sítio de clivagem preferencial
Serina Proteases	
Tripsina, Protease de <u>Streptomyces griseus</u> ,	Arg(Lys)↓
Protease I de <u>Achromobacter</u>	-Lys↓
Quimotripsina, Subtilisina,	-Trp(Tyr, Phe, Leu, Met)↓
Elastases, Protease α-lítica,	↖Ala(Ser, Met, Phe)↓
Protease de <u>Staphylococcus aureus</u> VB.	-Glu-(Asp)↓
Tiol Proteases	
Papaína, Ficina, Protease estreptocócica,	-Phe(Val, Leu)-X↓
Clostripaína, Catepsina B,	-Arg↓
Catepsina C.	H-X-Phe(Tyr, Arg)↓
Metaloproteases	
Termolisina, Protease neutra de <u>B. subtilis</u>	-Phe(Gly, Leu)↓-Leu(Phe)
Acil Proteases	
Pepsina, Penicilipepsina, <u>Rhizopus</u> Pepsina, Quimosina, Catepsina D, etc.	-Phe(Tyr, Leu)↓-Trp(Phe, Tyr)

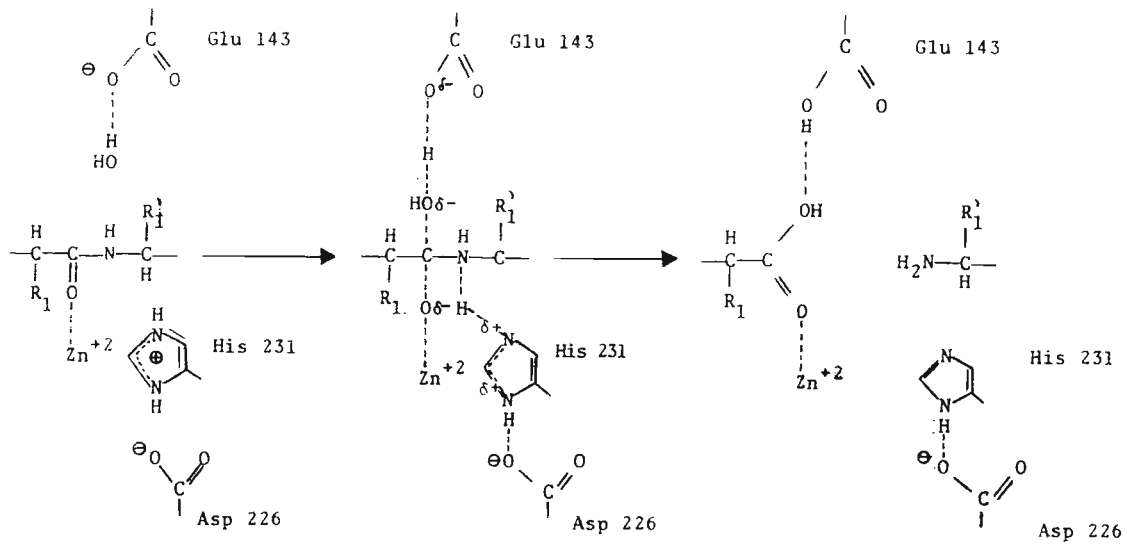
4. Termolisina como catalisador na síntese de peptídeos

A termolisina é uma metaloendopeptidase neutra de peso molecular 37.500 isolado de Bacillus termoproteoliticus (Ohta e col., 1966). Requer para sua atividade um átomo de zinco que está ligado no sítio ativo e sua termoestabilidade depende da presença de quatro íons cálcio, que se situam em três sítios distintos localizados na superfície da enzima (Latt e col., 1969; Feder e col., 1971; Dalhquist e col., 1976 e Matthews e col., 1974). Sua sequência de aminoácidos foi determinada por Titani e col. (1972). Vários estudos foram realizados com intuito de estabelecer o mecanismo de ação desta protease. Pangburn e Walsh (1975), concluíram através de modificação do sítio ativo da enzima com anidrido etoxifórmico, que o resíduo His 231 era essencial para sua atividade catalítica. Sugeriram um mecanismo pelo qual His 231 funcionaria como um doador de prótons durante a catálise e Glu 143 como um nucleófilo. Baseados nesta proposta, Kester e Matthews (1977), propuseram o mecanismo de ação ilustrado no esquema 3, página 16 que envolve a participação de três grupos da enzima: Glu 143, His 231 e zinco.

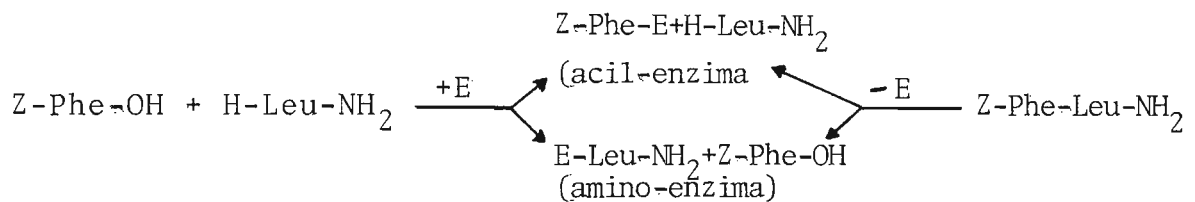
Este mecanismo, que é o mais aceito atualmente não leva obrigatoriamente à formação de um intermediário acil-enzima como as serino- e tiol-proteases, mas sim à formação de um complexo de enzima com os dois produtos de hidrólise, sendo que qualquer um deles pode ser liberado primeiro.

Para determinar a ordem de saída destes produtos, Morihara e col. (1978) baseado em estudos realizados anteriormente para a pepsina (Takahashi e Hofmann, 1975), incubaram paralelamente Z-Leu-Leu-OH e Z-Phe-Leu-OH com termolisina, a

Esquema 3 - Mecanismo de ação da termolisina proposto por Kester e Matthews (1977)



pH 7,0. Pelos resultados obtidos, sugeriram que o mecanismo de ação desta protease pode se processar via formação de um intermediário acil- ou amino-enzima. Sínteses de vários dipeptídeos catalisadas por termolisina, levaram Oka e Morihara (1980) a propor a formação destes intermediários conforme o seguinte esquema:



Até o momento, entretanto, não existem trabalhos descritos que comprovem a formação destes intermediários e em consequência a ordem de saída dos produtos de hidrólise.

No que se refere à especificidade, os primeiros estudos realizados neste sentido indicaram que esta enzima hidrolisa preferencialmente ligações peptídicas nas quais o resíduo de aminoácido doador do aminogruppo é hidrofóbico (Ile, Phe, Leu, Val). Esta preferência é acentuada pela presença de um resíduo de aminoácido hidrofóbico como doador da carbonila da ligação peptídica a ser hidrolisada (Mori-hara, 1974).

Em 1968, Mori-hara e Oka mostraram que o sítio ativo desta enzima é bastante extenso e que pode ser dividido em seis sub-sítios. Realizando hidrólise de substratos de peso molecular elevado com termolisina, Mori-hara e Tsuzuki (1970) demonstraram que a especificidade desta enzima é afetada por três resíduos do lado N-terminal, vicinais à ligação peptídica a ser clivada, e por dois do lado C-terminal, confirmando a sugestão anterior.

O conhecimento das características acima discutidas tem levado vários pesquisadores a utilizar termolisi-na como catalisador na síntese de peptídeos (Isowa e Ichikawa, 1979; Kullmann, 1982; Fruton, 1983). Os excelentes resultados por eles obtidos têm mostrado que esta enzima é um potente catalisador podendo ser amplamente utilizada no desenvolvimento desta metodologia

5. Proposição

O objetivo deste trabalho é estudar a viabilidade de incorporar N_{α} -acil-L-asparagina a derivados de L-aminoácidos e a peptídeos por catálise enzimática. Visa, também, desenvolver e ampliar os conhecimentos sobre esta metodologia de síntese de peptídeos, pois os dados existentes na literatura não permitem sua utilização sistemática.

Inicialmente, foram determinadas as condições ótimas de obtenção do dipeptídeo Boc-Asn-Ile-OBzl, mediante a catálise por termolisina, realizando-se um estudo metodológico que consistiu em analisar a influência de diversos fatores sobre sua extensão de síntese.

Posteriormente, foram realizadas sínteses enzimáticas de vários di- e tripeptídeos contendo L-asparagina como componente carboxílico.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Reagentes e solventes

Os seguintes derivados de L-aminoácidos foram preparados em nosso laboratório: Boc-Asn-OH, Boc-Ile-OH, Moz-Asn-OH, Z-Asn-OEt, Boc-Asn-ONp, H-Ile-OBzl.Tos, H-Leu-OBzl.Tos, H-Val-OBzl.Tos, H-Phe-OBzl.Tos, H-Gly-OBzl.Tos, H-Ala-OBzl.Tos, H-Leu-OEt.HCl e H-Ile-OEt-HCl.

Foram empregados reagentes de diversas procedências: L-aminoácidos (Ajinomoto do Brasil S.A.), H-Phe-OEt.HCl e termolisina (Protein Research Foundation), Z-Asn-OH (Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina), papaína (Sigma Chemical Co.), α -quimotripsina (Biobrás do Brasil S.A.). Os demais reagentes e solventes foram adquiridos da Merck, Carlo-Erba, Grupo Química e Riedel.

As enzimas foram utilizadas sem prévia purificação e apresentaram as seguintes atividades específicas: termolisina (9000-10000 PU.mg⁻¹), papaína (1,14 μ moles de BAEE.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína) e α -quimotripsina (700 UNF.mg⁻¹).

2. Métodos analíticos

2.1. Análise elementar

As quantidades percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram determinadas em um microanalisador do tipo CHN, modelo 240 da Perkin-Elmer, no laboratório de microanálise do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

2.2. Análise de aminoácidos

As hidrólises dos peptídeos foram realizadas usando cerca de $1,0 \times 10^{-3}$ g de material, na presença de ácido clorídrico 6M a 110°C por 72 horas. As amostras hidrolisadas foram secas em um evaporador rotatório, diluídas em 2 ml de tampão citrato de sódio, pH 2,2 (0,2M) e analisadas pelo método de Moore e Stein (1954) modificado por Moore (1968), em um analisador Beckman, modelo 120C, provido de válvulas injetoras de amostras de 0,25 ml. A estimativa da relação molar dos aminoácidos no hidrolisado foi feita considerando-se unitária a concentração do aminoácido mais próximo da média para todos os resíduos. O conteúdo de peptídeo (C.P.), em porcentagem, foi obtido relacionando-se o valor médio de milimoles por resíduo encontrado com o número de milimoles de peptídeos correspondente ao hidrolisado aplicado na coluna. Estas análises foram realizadas no Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina.

2.3. Cromatografia em camada delgada

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram feitas em placas de sílica-gel G-60 (Merck) de 0,25 mm de espessura, preparadas em nosso laboratório. Os sistemas de solventes empregados foram: clorofórmio/metanol, 95:5 (A); clorofórmio/metanol/ácido acético, 95:5:3 (B); clorofórmio/metanol/ácido acético 85:10:5, (C) e clorofórmio/metanol/ácido acético, 70:20:10 (D); n-butanol/acetato de etila/ácido acético/água 1:1:1:1 (E). O R_f para cada um dos solventes foi indicado como R_{fA} , R_{fB} , R_{fC} , R_{fD} e R_{fE} sendo os índices correspondentes aos sistemas de solventes acima descritos.

As substâncias foram localizadas borrifando-se as placas com uma solução de ácido clorídrico 3M ou uma mistura constituída por ácido bromídrico e ácido acético (1:3, v/v) seguida de uma solução alcoólica de ninidrina (2%, m/v) e aquecendo-as posteriormente até o desenvolvimento de coloração.

2.4. Ponto de fusão

Os pontos de fusão dos peptídeos e derivados de L-aminoácidos sintetizados foram determinados em um aparelho tipo Kofler, marca Monoscop V.S. Hans Bock, sem correção das temperaturas de fusão observadas.

2.5. Pôder rotatório específico

O poder rotatório específico $[\alpha]_D$ foi determinado através do polarímetro fotoelétrico "Pepol 60" (Bellingham e Stanley Ltda.) equipado com galvanômetro acessório modelo 7606/S da W.C. Pye Co., a fim de aumentar a sensibilidade das leituras. Foi utilizada uma fonte de xenônio, sendo que o comprimento de onda foi selecionado por meio de um monocromador Zeiss M4QIII. A cubeta de quartzo empregada, de caminho óptico de 5 cm, tinha capacidade para 2,3 ml.

2.6. Ressonância magnética protônica

Os espectros de ressonância magnética protônica (RM^1H) foram obtidos num espectrofotômetro Varian, modelo T-60. As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido ($DMSO-d_6$), clorofórmio ($CDCl_3$) e acetona (CD_3COCD_3) deuterados e o padrão de referência foi o tetrametilsilano (TMS).

2.7. Espectros de absorção no infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram obtidos no espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo IR-180, empregando-se pastilhas de KBr.

2.8. Eletroforese

As eletroforeses foram realizadas em tampão acetato de piridina, pH 4,9, $5,0 \times 10^{-2}$ M e em tampão carbonato de sódio 0,2 M, pH 9,9, sendo o material aplicado em papel Whatman nº 1, embebido previamente no tampão e submetido a uma tensão de 1000 volts por 60 minutos. As revelações foram feitas borrifando-se uma solução alcoólica de ninidrina (2%, m/v) sobre o papel, que foi aquecido a 100°C até o desenvolvimento de coloração.

3. Métodos preparativos

3.1. Síntese de derivados de L-aminoácidos

3.1.1. Síntese de N_{α} -terc-butiloxicarbonil-L-asparagina (Nagasawa e col., 1973)

A uma solução contendo 0,1 mol (13,2 g) de L-asparagina, 55 ml de água e 21 ml de trietilamina foi adicionado 0,11 mol (26,4 g) de tiocarbonato de t-butil-S-4,6-dimetil-2-pirimidina (Boc-SDP) dissolvido em 55 ml de dioxano. A mistura resultante foi mantida a temperatura ambiente por tempo variável (20-24 horas) e o desenvolvimento da reação acompanhado por CCD. Após o seu término, a mistura foi diluída com 150 ml de água sendo o Boc-SDP que não reagiu ex-

traído com 200 ml (2 x 100 ml) de acetato de etila. A fração aquosa, resfriada a 0°C e acidificada com ácido clorídrico 5 M até pH 2, foi deixada na geladeira por uma noite para a cristalização do produto. Após a sua filtração, lavagem com etanol gelado e recristalização em etanol, o produto obtido mostrou-se cromatograficamente puro. O rendimento da reação e alguns dados de caracterização do produto estão descritos na Tabela 2, página 40, seção de resultados.

3.1.2. N_α-p-metoxibenziloxicarbonil-L-asparagina (Nagasawa e col., 1973)

Este derivado foi obtido através do método descrito no item 3.1.1, página 22, partindo-se de 0,10 mol (13,2 g) de L-asparagina e de 0,11 mol (33,4 g) de 2-tiocarbonato de p-metoxibenzil-S-4,6-dimetilpirimidina (Moz-SDP). O produto cristalizado em água mostrou-se cromatograficamente puro. Os dados de sua caracterização estão expressos na Tabela 2, página 40, seção de resultados.

3.1.3. Ésteres benzílicos de L-aminoácidos (Cipera e Nicholls, 1955)

Em um balão de 500 ml contendo 50 ml de álcool benzílico e 100 ml de benzeno, foram colocados 0,10 mol de L-aminoácido e 0,12 mol (22,8 g) de ácido p-tolueno-sulfônico monohidratado. Este balão foi, em seguida, adaptado ao aparelho de Dean e Stark e aquecido em banho de óleo mantido a 100-110°C. Após a reação, que foi acompanhada por CCD, ter se completado foram adicionados 160 ml de éter etílico e 160 ml de éter de petróleo ao meio de reação, para a cris-

talização do produto. Este foi filtrado e recristalizado em sistema de solventes adequado até se apresentar puro em CCD. Os rendimentos obtidos e os dados de caracterização encontrados para os ésteres sintetizados estão descritos na Tabela 2, página 40, seção de resultados.

3.1.4. Ésteres etílicos de L-aminoácidos (Goodman e McGahren, 1967)

A suspensão de 0,10 mol de L-aminoácido em 200 ml de etanol saturada com cloreto de hidrogênio anidro foi agitada até a dissolução total do aminoácido. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD. Após o seu término, o resíduo sólido obtido da evaporação do etanol e do cloreto de hidrogênio a pressão reduzida, foi recristalizada em sistema de solventes apropriado e mostrou-se puro em CCD. Os rendimentos e os dados de caracterização encontrados para cada um dos ésteres sintetizados, estão expressos na Tabela 2, página 40, seção de resultados.

3.1.5. Éster etílico de N_α-benziloxicarbonil-L-asparagina (a: Taschner e col., 1963; b: Wang e col., 1977)

a: A suspensão resultante da adição de 60 ml de acetato de etila em $10,0 \times 10^{-3}$ mol (2,7 g) de Z-Asn-OH, foi adicionado $14,7 \times 10^{-3}$ mol (2,8 g) de ácido p-tolueno-sulfônico monohidratado. Após 4 dias de reação à temperatura ambiente, sob agitação, o Z-Asn-OH que não reagiu foi eliminado através de filtração. O filtrado, lavado com solução de bicarbonato de sódio (até atingir pH 7) e água, foi seco com sulfato de sódio anidro. O resíduo resultante da elimina-

ção do solvente, à pressão reduzida, foi recristalizado no sistema acetato de etila/ligroína até se mostrar puro em CCD. O rendimento da reação e as características do produto encontrados estão expressos no item 1.2, página 39, seção de resultados.

b: A solução contendo $15,0 \times 10^{-3}$ mol (3,6 g) de Z-Asn-OH em 42 ml de metanol e 200 ml de água foi transformado em sal de césio, mediante a adição de solução de carbonato de césio (20%, m/v). Em seguida, o solvente foi eliminado e o resíduo dissolvido em 39 ml de dimetilformamida seguido de eliminação do solvente à pressão reduzida por duas vezes. Ao sal branco resultante foram adicionados $16,0 \times 10^{-3}$ mol (1,3 ml) de iodeto de etila e 39 ml de dimetilformamida e a mistura foi deixada à temperatura ambiente, sob agitação, por 6 horas. Após a evaporação do solvente e tratamento com 50 ml de água, o produto solidificou. Este foi filtrado, dissolvido em 200 ml de acetato de etila, lavado com 60 ml de água (2 x 30 ml) e seco sobre sulfato de sódio anidro. O resíduo sólido obtido da evaporação do solvente, à pressão reduzida, foi recristalizado no sistema acetato de etila/éter de petróleo e mostrou-se puro em CCD. Suas características estão expressas no item 1.2, página 42, seção de resultados.

3.2. Síntese química de dipeptídeos

3.2.1. Éster benzílico de N_α-terc-butiloxicarbonil-L-asparagil-L-isoleucina (Bodansky, 1955)

A solução contendo $1,0 \times 10^{-3}$ mol (391 mg) de H-Ile-OBzl.Tos em dimetilformamida (volume suficiente para a

total dissolução de éster) foi resfriada em banho de gelo seco e acetona e neutralizada com N-metilmorfolina. A esta mistura foi adicionado $1,0 \times 10^{-3}$ mol (352 mg) de Boc-Asn-ONp e a reação foi deixada à temperatura ambiente, sob agitação. Seu desenvolvimento foi acompanhado por CCD e o pH verificado em intervalos de tempo regulares. Completada a reação, o produto formado foi precipitado pela adição de água. Sua pureza foi confirmada por CCD. O rendimento e a caracterização do produto estão mostrados na Tabela 3, página 41, seção de resultados.

3.2.2. Ester benzílico de N_{α} -terc-butiloxicarbonil-L-isoleucil-L-leucina (König e Geiger, 1970a)

À solução de $7,7 \times 10^{-3}$ mol (3,0 g) de H-Leu-OBzl.Tos em 22 ml de diclorometano foi resfriada em banho de gelo seco e acetona e neutralizada com N-metil-morfolina. A esta mistura foram adicionados $7,5 \times 10^{-3}$ mol (17 g) de Boc-Ile-OH, $7,5 \times 10^{-3}$ mol (1,5 g) de N,N'-diciclohexil-carbodiimida, $15,0 \times 10^{-3}$ mol (2,0 g) de 1-hidroxibenzotriazol e 22 ml de diclorometano. A reação foi deixada por 30 minutos em banho de gelo seco e acetona e posteriormente à temperatura ambiente, sendo o seu desenvolvimento acompanhado por CCD. Seu pH foi verificado em intervalos de tempos regulares. Terminada a reação, a diciclo-hexilurêia formada foi filtrada e o solvente evaporado à pressão reduzida. O resíduo resultante foi dissolvido em acetato de etila, lavado com ácido clorídrico 1 M, água, bicarbonato de sódio 5% (m/v) e água e seco sobre sulfato de sódio anidro. Após a evaporação do acetato de etila, o produto foi recristalizado no sistema éter etílico/éter de petróleo até se apresentar puro

em CCD. O rendimento e a caracterização do produto estão expressos na Tabela 3, página 41, seção de resultados.

3.2.3. Éster benzílico de N_{α} -terc-butiloxicarbonil-L-isoleucil-L-glicina (König e Geiger, 1970a)

Este dipeptídeo foi sintetizado segundo o método descrito no item 3.2.2, página 26, partindo-se de $7,4 \times 10^{-3}$ mol (1,7 g) de Boc-Ile-OH, $7,5 \times 10^{-3}$ mol (1,7 g) de H-Gly-OBzl.Tos, $7,5 \times 10^{-3}$ mol (1,5 g) de N,N'-diciclo-hexilcarbodiimida, $15,0 \times 10^{-3}$ mol (2,0 g) de 1-hidroxibenzotriazol e de 44 ml de diclorometano. O produto oleoso obtido após a eliminação do acetato de etila, foi cristalizado no sistema éter etílico/éter de petróleo e recristalizado no mesmo sistema de solventes até se mostrar cromatograficamente puro. O rendimento e os dados de sua caracterização estão descritos na Tabela 3, página 41, seção de resultados.

3.2.4. Éster benzílico de N_{α} -terc-butiloxicarbonil-L-isoleucil-L-alanina (König e Geiger, 1970a)

Este dipeptídeo foi sintetizado segundo o método descrito no item 3.2.2, página 26, a partir de $10,0 \times 10^{-3}$ mol (2,3 g) de Boc-Ile-OH, $10,0 \times 10^{-3}$ mol (3,5) de H-Ala-OBzl.Tos, $10,0 \times 10^{-3}$ mol (2,0 g) de N,N'-diciclo-hexilcarbodiimida, $20,0 \times 10^{-3}$ mol (2,7 g) de 1-hidroxibenzotriazol e 58 ml de diclorometano. O produto oleoso obtido após a eliminação do acetato de etila, foi cristalizado no sistema éter etílico/éter de petróleo e recristalizado no mesmo sistema de solventes até se apresentar puro na CCD. O rendimento e a caracterização do produto estão expressos na Tabela 3, página 41, seção de resultados.

3.2.5. Éster benzílico de N_α-terc-butiloxicarbonil-L-isoleucil-L-fenilalanina (König e Geiger, 1970)

Este dipeptídeo foi sintetizado de acordo com o método descrito no item 3.2.2, página 26, partindo-se de $6,9 \times 10^{-3}$ mol (1,6 g) de Boc-Ile-OH, $7,0 \times 10^{-3}$ mol (3,0 g) de H-Phe-OBzl.Tos, $7,0 \times 10^{-3}$ mol (1,4 g) de N,N'-diciclo-hexilcarbodiimida, $14,0 \times 10^{-3}$ mol (1,9 g) de 1-hidroxibenzo-triazol e 41 ml de diclorometano. O produto oleoso obtido, após a evaporação do acetato de etila, foi cristalizado no sistema etanol/água, mostrando-se cromatograficamente puro. O rendimento da reação e caracterização do produto estão expressos na Tabela 3, página 41, seção de resultados.

3.3. Remoção do grupo terc-butiloxicarbonil com ácido trifluoroacético (Schnabel e col., 1968)

O composto contendo o grupo Boc como protetor de α-aminogrupos a ser removido foi suspenso em diclorometano e resfriado em banho de gelo seco e acetona. À suspensão resultante foi adicionado o ácido trifluoroacético. Após 10 minutos a -70°C , a reação foi deixada se processar à temperatura ambiente, sob agitação. Seu desenvolvimento foi acompanhado por CCD e após o seu término, o solvente e o ácido trifluoroacético foram eliminados sob pressão reduzida. Ao resíduo obtido foi adicionado éter etílico anidro. Quando ocorreu a cristalização do produto, este foi filtrado e seco adequadamente. Nos casos em que o produto não cristalizou, o solvente foi eliminado por decantação e evaporação em evaporador rotatório. O óleo resultante foi deixado por uma noite em dessecador a vácuo na presença de hidróxido de potássio.

3.4. Remoção do grupo benziloxicarbonil por hidrogenação catalítica (Bergmann e Zervas, 1932)

O composto contendo o grupo benziloxicarbonil (Z) como protetor de α -aminogruppo foi dissolvido em metanol juntamente com o catalisador (carvão paladiado, 10%). A mistura resultante foi submetida à hidrogenação em uma bomba Parr a 15 psi (1 atmosfera). Completada a reação, que foi acompanhada por CCD, o catalisador foi eliminado por filtração em funil de placa sinterizada contendo uma camada de celulose em pó e o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida.

3.5. Incubação de N_{α} -terc-butiloxicarbonil-L-asparagina com papaína

Em 5 ml de solução-tampão acetato, 3 M, pH 4,9 foram dissolvidos $1,0 \times 10^{-3}$ mol (232 mg) de Boc-Asn-OH, 0,05 ml de β -mercaptoetanol e $3,9 \times 10^{-6}$ mol (90 mg) de papaína. A mistura resultante foi incubada a 5 ± 1 e $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 3 1/2 e 4 horas respectivamente. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD nos sistemas de solventes D e E, utilizando-se como padrões Boc-Asn-OH, Boc-Asp-OH, Asn e Asp. A mistura de reação foi submetida à eletroforese em pH 9,9. Os resultados obtidos estão descritos no item 2, página 42, seção de resultados.

3.6. Incubação de N_{α} -benziloxicarbonil-L-asparagina com papaína

Em 4 ml de uma mistura constituída por tampão acetato 3 M, pH 4,9 e dimetilformamida (1:1, v/v) foram dissolvidos $1,0 \times 10^{-3}$ mol (267 mg) de Z-Asn-OH, 0,05 ml de β -mercap

etanol e $3,9 \times 10^{-6}$ mol (90 mg) de papaína. A mistura resultante foi incubada a 38°C por 6 h, sob agitação. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD nos sistemas de solventes B e C, utilizando-se como padrões: Z-Asn-OH, Asn e Asp. Os resultados obtidos estão descritos no item 2, página 42, seção de resultados.

3.7. Incubação de éster etílico de N_{α} -benziloxicarbonil-L-asparagina com α -quimotripsina.

À suspensão resultante da adição de 10 ml de solução-tampão carbonato pH 9,9 em $2,5 \times 10^{-4}$ mol (74 mg) de Z-Asn-OEt foi adicionado dimetilformamida ou acetonitrila até a dissolução total do reagente. A solução resultante foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, sob agitação, na presença de $1,6 \times 10^{-6}$ mol (40 mg) de α -quimotripsina. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD nos sistemas de solventes B e C utilizando-se como padrão Z-Asn-OEt dissolvido em acetato de etila. Após o término da incubação, a enzima foi precipitada pela adição de acetona e filtrada. O solvente foi parcialmente evaporado e a solução resultante submetida à hidrogenação catalítica, de acordo com a técnica descrita no item 3.4, página 29. Os resultados da eletroforese, realizada a pH 4,9 após saponificação estão descritos no item 2, página 42, seção de resultados.

3.8. Incubação de N_{α} -benziloxicarbonil-L-asparagina com termolisina

Em 1,5 ml de uma mistura constituída por água e dimetilformamida (1:2, v/v) foram dissolvidos $0,5 \times 10^{-3}$ mol

(134 mg) de Z-Asn-OH e $1,9 \times 10^{-8}$ mol (0,7 mg) de termolisina. A solução resultante foi incubada a 38°C por 24 horas, sendo a reação acompanhada por CCD, utilizando-se como padrão Z-Asn-OH. Os resultados obtidos estão descritos no item 2, página 42, seção de resultados.

3.9. Síntese enzimática de dipeptídeos contendo asparagina

3.9.1. Método geral empregado na formação de ligações peptídicas

As reações enzimáticas de síntese para a obtenção dos dipeptídeos contendo asparagina foram realizadas em sistemas homogêneos de reação: os componentes carboxílico e amínico foram dissolvidos em tampão ou solução salina de pH e concentração conhecidos contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}\text{M}$. Após a dissolução completa ou parcial destes reagentes, quantidades estequiométricas de solução de hidróxido de sódio, de título conhecido, foram adicionadas ao meio de reação para neutralizar os componentes amínicos, que se encontravam na forma de tosilato ou cloridrato. O pH da solução foi verificado e a termolisina adicionada. A mistura resultante, incubada a temperaturas definidas, foi agitada por intervalos de tempo definidos. Os produtos obtidos, precipitados no meio de reação, foram filtrados em funis de placa porosa e lavados sucessivamente com ácido clorídrico 1M, água, bicarbonato de sódio 5% (m/v) e água gelados. Após a lavagem, foram secos em ~~dessecador~~ dessecador na presença de pentóxido de fósforo, até peso constante.

Nas reações em que os componentes carboxílico e amínico eram totalmente insolúveis nos tampões ou nas solu

ções salinas utilizadas, foram adicionados mínimos volumes de solventes orgânicos miscíveis tais como etanol, metanol, e dimetilformamida.

Nas reações em que o componente amínico era ésteretílico de L-aminoácido, foi adicionado 20% (m/v) de sulfato de amônio, após a adição da enzima.

3.9.2. Determinação da condição ótima de síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl

3.9.2.1. Estudo do efeito do pH

Um milimol (232 mg) de Boc-Asn-OH, $1,0 \times 10^{-3}$ mol (391 mg) de H-Ile-OBzl.Tos, 1 ml de hidróxido de sódio 1 M e $2,7 \times 10^{-7}$ mol (10 mg) de termolisina foram dissolvidos, na ordem descrita no item 3.9.1., página 31, em 20 ml de solução tampão 0,2 M de pH variáveis, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M. As misturas obtidas foram incubadas a $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 72 horas, sob agitação. Os produtos precipitados foram isolados conforme a técnica descrita no item 3.9.1, página 31 e os resultados encontrados estão expressos no item 3.2.1, página 44, seção de resultados. O mesmo estudo foi realizado paralelamente na presença de $5,3 \times 10^{-7}$ mol (20 mg) de enzima.

3.9.2.2. Estudo do efeito do tempo de reação

Um milimol (232 mg) de Boc-Asn-OH $1,0 \times 10^{-3}$ mol (391 mg) de H-Ile-OBzl.Tos, 1 ml de hidróxido de sódio 1 M e $5,3 \times 10^{-7}$ mol (20 mg) de termolisina foram dissolvidos, na ordem descrita no item 3.9.1, página 31, em 20 ml

de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6 contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M. As misturas obtidas foram incubadas por tempos variáveis a $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob agitação. Os produtos precipitados foram isolados conforme a técnica descrita no item 3.9.1, página 31 e os resultados encontrados estão expressos no item 3.2.2, página 45, seção de resultados.

3.9.2.3. Estudo do efeito da concentração de enzima

Um milimol (232 mg) de Boc-Asn-OH, $1,0 \times 10^{-3}$ mol (391 mg) de H-Ile-OBzl.Tos, 1 ml de hidróxido de sódio 1 M e diferentes quantidades de termolisina foram dissolvidos, na ordem descrita no item 3.9.1, página 31, em 20 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M. As misturas resultantes foram agitadas a $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Os produtos obtidos foram isolados de acordo com o método descrito no item 3.9.1, página 31 e os resultados encontrados estão descritos no item 3.2.3, página 45.

3.9.2.4. Estudo do efeito da concentração de acetato de sódio

As misturas contendo $1,0 \times 10^{-3}$ mol (231 mg) de Boc-Asn-OH, $1,0 \times 10^{-3}$ mol (391 mg) de H-Ile-OBzl.Tos, 1 ml de hidróxido de sódio 1 M e $2,7 \times 10^{-7}$ mol (10 mg) de termolisina dissolvidos, na ordem descrita no item 3.9.1, página 31, em 20 ml de solução de acetato de sódio, pH 6, de diferentes concentrações, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M foram incubadas a $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob agitação, por 48 horas. Os produtos precipitados foram isolados conforme descrito no

item 3.9.1, página 31. Os resultados obtidos estão expres-
sos no item 3.2.4, página 48, seção de resultados.

3.9.2.5. Estudo do efeito do volume de acetato de sódio
0,2 M

Um milimol (232 mg) de Boc-Asn-OH, $1,0 \times 10^{-3}$
mol (391 mg) de H-Ile-OBzl.Tos, 1 ml de hidróxido de sódio
1 M e $2,7 \times 10^{-7}$ mol (10 mg) de termolisina foram dissolvi-
dos, na ordem descrita no item 3.9.1, página 31, em diver-
sos volumes de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6 con-
tendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M. As misturas resultan-
tes foram incubadas a $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob agitação, por 48 horas.
Os precipitados obtidos foram isolados conforme descrito no
item 3.9.1, página 31. Os resultados estão apresentados no
item 3.2.5, página 48, seção de resultados.

3.9.2.6. Estudo do efeito da variação da proporção entre os
componentes carboxílico e amínico

As misturas contendo diversas proporções molares
entre os componentes carboxílico (Boc-Asn-OH) e amínico
(H-Ile-OBzl.Tos), quantidades equimolares às de componen-
te amínico de hidróxido de sódio 1 M e $5,3 \times 10^{-7}$ mol (20
mg) de termolisina dissolvidos, na ordem descrita no item
3.9.1, página 31, em 20 ml de solução de acetato de sódio
0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M, foram
incubadas a $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, sob agitação. Os produ-
tos obtidos foram isolados conforme a técnica descrita no
item 3.9.1, página 31 e os resultados estão descritos no
item 3.2.6, página 51, seção de resultados.

3.9.2.7. Estudo do efeito da temperatura

Um milimol (232 mg) de Boc-Asn-OH, $1,0 \times 10^{-3}$ mol (391 mg) de H-Ile-OBzl.Tos, 1 ml de hidróxido de sódio 1 M e $5,3 \times 10^{-7}$ mol (20 mg) de termolisina foram dissolvidos, na ordem descrita no item 3.9.1, página 31, em 20 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M. Estas misturas foram incubadas a 38 ± 1 e a $48 \pm 1^\circ\text{C}$ por 9 horas, sob agitação. O mesmo estudo foi realizado para 13 horas de reação. Os precipitados obtidos foram isolados de acordo com a técnica descrita no item 3.9.1, página 31. Os resultados estão descritos no item 3.2.7, página 63.

3.9.2.8. Estudo do efeito da adição de solventes orgânicos ao meio de reação

Sínteses deste dipeptídeo foram realizadas, conforme a técnica descrita no item 3.9.1, página 31, na presença de volumes variáveis de metanol e acetato de etila. As condições utilizadas e os respectivos rendimentos estão descritos no item 3.2.8, página 53.

3.9.3. Estudo do efeito da variação do grupo protetor de N_α -aminogrupos no acoplamento entre N_α -acil-L-asparagina e o tosilato do éster benzílico de isoleucina

As misturas contendo 2×10^{-3} mol de componente carboxílico (Boc-Asn-OH, Z-Asn-OH e Moz-Asn-OH), $1,0 \times 10^{-3}$ mol (391 mg) de H-Ile-OBzl.Tos, 1 ml de hidróxido de sódio 1 M e $5,3 \times 10^{-7}$ mol (20 mg) de termolisina dissolvidos na

ordem descrita no item 3.9.1, página 31, em 20 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M foram incubados, sob agitação, a $38 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. O mesmo estudo foi realizado partindo-se de $1,0 \times 10^{-3}$ mol de componente carboxílico e $1,0 \times 10^{-3}$ mol de componente amínico na presença de 10 mg de termolisina. Os precipitados foram isolados de acordo com a técnica descrita no item 3.9.1, página 31. Os resultados estão descritos no item 3.3, página 53, seção de resultados.

3.9.4. Estudo comparativo do acoplamento entre Boc-Asn-OH e tosilatos de ésteres benzílicos de isoleucina, leucina e fenilalanina

Um milimol (232 mg) de Boc-Asn-OH, $1,0 \times 10^{-3}$ mol de componente amínico (H-Ile-OBzl.Tos, H-Leu-OBzl.Tos ou H-Phe-OBzl-Tos.), 1 ml de hidróxido de sódio 1 M e $2,7 \times 10^{-7}$ mol (10 mg) de termolisina foram dissolvidos na ordem descrita no item 3.9.1, página 31, em 30 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M. As misturas resultantes foram agitadas a $38 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 e 72 horas. Os produtos foram isolados como o descrito no item 3.9.1, página 31. Os resultados estão apresentados no item 3.4, página 55, seção de resultados.

3.9.5. Síntese de Z-Asn-Ile-OBzl, Moz-Asn-Ile-OBzl, Boc-Asn-Leu-OBzl, Z-Asn-Leu-OBzl, Moz-Asn-Leu-OBzl, Z-Asn-Leu-OEt, Boc-Asn-Phe-OBzl, Z-Asn-Phe-OBzl, Moz-Asn-Phe-OBzl, Z-Asn-Phe-OEt, Z-Asn-Val-OBzl e Moz-Asn-Val-OBzl

Todos estes dipeptídeos foram sintetizados e isolados segundo o método geral de formação de ligação peptídica

ca, descrito no item 3.9.1, página 31. As condições de síntese e os respectivos rendimentos estão descritos no item 3, seção de resultados.

3.9.6. Estudo da influência da temperatura sobre a síntese de Z-Asn-Ile-OBzl

Um milimol (267 mg) de Z-Asn-OH, $1,0 \times 10^{-3}$ mol (391 mg) de Ile-OBzl.Tos, 1 ml de hidróxido de sódio 1 M e $2,7 \times 10^{-7}$ mol (10 mg) de termolisina foram dissolvidos, na ordem descrita no item 3.9.1, página 31, em 20 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M. As misturas obtidas foram incubadas em diversas temperaturas, por 3 horas, sob agitação. O mesmo estudo foi realizado para 1 hora de reação. Os produtos obtidos foram isolados conforme a técnica descrita no item 3.9.1, página 31. Os resultados estão expressos no item 3.5, página 55, seção de resultados.

3.10. Síntese enzimática de tripeptídeos contendo asparagina - Método geral empregado na síntese de Moz-Asn-Ile-Gly-OBzl, Moz-Asn-Ile-Ala-OBzl, Moz-Asn-Ile-Leu-OBzl e Moz-Asn-Ile-Phe-OBzl

Um milimol de Boc-Ile-Gly-OBzl, Boc-Ile-Ala-OBzl, Boc-Ile-Leu-OBzl e Boc-Ile-Phe-OBzl foram desprotegidos com ácido trifluoroacético conforme a técnica descrita no item 3.3., página 28. Os produtos obtidos dissolvidos em 20 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M, foram neutralizados com hidróxido de sódio 1 M. Após a adição de $1,0 \times 10^{-3}$ mol (298 mg) de

Moz-Asn-OH e da enzima, as misturas resultantes foram agitadas a $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por intervalos de tempo determinados. Os produtos obtidos, precipitados no meio de reação, foram filtrados em funis de placa porosa e lavados sucessivamente com ácido clorídrico 1M, água, bicarbonato de sódio 5% (m/v) e água gelados. A secagem foi realizada em dessecador na presença de pentóxido de fósforo, até peso constante. As condições de síntese e os respectivos rendimentos estão descrititos no item 4.

III. RESULTADOS

1. Síntese de derivados de L-aminoácidos e de dipeptídeos por método químico

1.1. Rendimentos e caracterização dos derivados de L-aminoácidos e dos dipeptídeos

Os resultados da preparação de Boc-Asn-OH e Moz-Asn-OH e de ésteres benzílicos e etílicos de L-aminoácidos obtidos de acordo com os métodos descritos nos itens 3.1.1, página 22, 3.1.2, página 23, 3.1.3, página 23, 3.1.4, página 24, respectivamente, estão resumidos na Tabela 2, página 40. A Tabela 3, página 41, mostra os dados de rendimento e caracterização dos dipeptídeos preparados por método químico, conforme descrito no item 3.2, páginas 25-28.

1.2. Éster etílico de N_α-benziloxicarbonil-L-asparagina

a) A síntese descrita no item 3.1.5, página 24 forneceu 1,18 g (rendimento: 42%) de Z-Asn-OEt cromatograficamente puro, que apresentou as seguintes características:

Análise elementar (%): Calculado: C 56,93; N 9,49; H 6,09
Encontrado: C 56,81; N 9,32; H 6,00

P.F. : 125-126^oC (Lit.: 126-127^oC)

C.C.D. : Rf_A 0,30; Rf_B 0,52; Rf_C 0,74

Tabela 2 - Rendimentos e caracterização dos derivados de L-aminoácidos

Composto	Rendimento (%)	Solvente de cristalização	Solvente de recristalização	Ponto de fusão Obs(°C)	Literatura(°C) ^d	CCD Rf
H-Val-OBzl.Tos ^a	53	EE/EP	EtOH/EE	160-163	158-160	0,54 ^C
H-Ile-OBzl.Tos ^a	58	EE/EP	An/EE	149-151	153-154	0,51 ^C
H-Leu-OBzl.Tos ^a	67	EE/EP	EtOH/EE	158-160	159-160	0,54 ^C
H-Phe-OBzl.Tos ^a	24	EE/EP	MeOH/EE	158-160	171-172	0,58 ^C
H-Gly-OBzl.Tos ^a	90	EE/EP	MeOH/EE	133-135	132-134	0,34 ^C
H-Ala-OBzl.Tos ^a	80	EE/EP	EtOH/EE	106-109	114	0,38 ^C
H-Leu-OEt.HCl ^b	87	EtOH/EE	-	129-131	134	0,64 ^D
H-Ile-OEt.HCl ^b	46	EtOH	-	162-165	-	0,36 ^D
Boc-Asn-OH ^C	67	H ₂ O	EtOH	173-176	175-177	0,69 ^D
Moz-Asn-OH ^C	75	H ₂ O	-	158-160	160-163	0,69 ^D

Os índices C e D referem-se aos sistemas de solventes empregados para CCD.

a: Cipera e Nicholls, 1955; b: Goodman e McGahren, 1967; c: Nagasawa e col., 1973; d: Greenstein e Winitz, 1961.

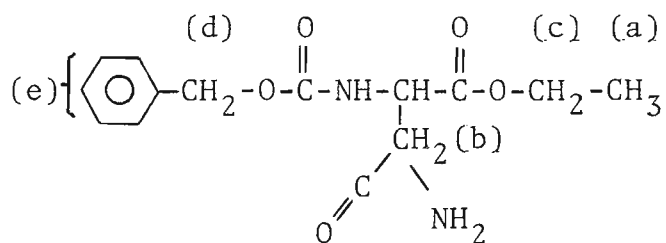
Tabela 3 - Rendimentos e caracterização dos dipeptídeos sintetizados pelo método químico

Composto	Rendimento (%)	Solvente de cristalização	Solvente de rescristalização	Ponto de Fusão Obs (°C)	CCD R _{fA}
Boc-Ile-Gly-OBzl ^a	37	EE/EP	EE/EP	94-95	0,74
Boc-Ile-Ala-OBzl ^a	91	EE/EP	EE/EP	108-109	0,76
Boc-Ile-Leu-OBzl ^a	33	EE/EP	EE/EP	101-102	0,78
Boc-Ile-Phe-OBzl ^a	66	EtOH/H ₂ O	-	132-133	0,79
Boc-Asn-Ile-OBzl ^b	73	H ₂ O	MeOH/H ₂ O	153-156	0,75

O índice A refere-se ao sistema de solvente empregado para CCD.

O índices a e b referem-se ao método de acoplamento empregado: a): DCC-HOBt e b) éster ativo-ONp.

RM¹H(60 MHz, CD₃COCD₃, TMS);



δ (ppm): (a): 1,20 (t); J = 7,0 Hz (d): 5,07 (s)
 (b): 2,78 (m,1) (e): 7,30 (s)
 (c): 4,22 (q); J = 7,0 Hz

O espectro de RM¹H deste composto está mostrado no item 5, página 85.

b) O procedimento descrito no item 3.1.5.b, página 25 forneceu um produto que quando analisado apresentou as seguintes características:

Análise elementar (%): Calculado : C 56,93; N 9,49; H 6,09

Encontrado : C 58,83; N 11,71; H 5,16

P.F.: 103-104^oC (Lit: 126-127^oC)

CCD : Rf_A : 0,31; Rf_B : 0,59; Rf_C : 0,63

2. Incubação de N_α-terc-butiloxicarbonil-L-asparagina, N_α-benziloxicarbonil-L-asparagina e éster etílico de N_α-benziloxicarbonil-L-asparagina na presença de papaína, α-quimotripsina e termolisina

As CCD das misturas de incubação de Boc-Asn-OH com papaína, realizadas nos sistemas de solventes D e E, apresentaram várias manchas, entre as quais uma com Rf similar aos Rf dos padrões Asn e Asp. As eletroforeses

(pH 9,9) apresentaram duas manchas com migrações correspondentes à Asn e Asp.

Os mesmos resultados foram obtidos nas CCD da mistura de incubação de Z-Asn-OH com papaína, realizadas nos sistemas de solventes B e C.

As CCD da mistura de incubação de Z-Asn-OEt com α -quimotripsina, realizadas no sistema de solventes B, apresentaram três manchas: uma com Rf correspondente ao reagente de partida (0,4), outra com Rf similar ao de Z-Asn-OH e uma terceira com Rf 0,3. Esta última de coloração amarela, sob aquecimento prolongado se tornou verde. A eletroforese (pH 4,9) apresentou duas manchas principais tendo uma delas migração correspondente a Asp.

As CCD da mistura de incubação de Z-Asn-OH com termolisina, realizadas no sistema de solventes B, apresentaram uma única mancha de Rf similar ao do reagente de partida.

3. Síntese enzimática de dipeptídeos contendo asparagina

3.1. Síntese de Boc-Asn-Ile-OBz¹.

Este dipeptídeo sintetizado de acordo com o método geral descrito no item 3.9.1, página 31 apresentou o mesmo comportamento cromatográfico quando comparado ao padrão autêntico obtido pelo método químico. Suas características, após recristalização no sistema metanol/água, foram as seguintes:

Análise elementar (%): Calculado : C 60,67; N 9,65; H 7,64
Encontrado : C 60,76; N 9,60; H 7,64

Tabela 4 - Efeito do pH na síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl

Tampão (pH)	Acetato 4,3	Acetato 5,0	Acetato 6,0	Acetato 6,5	Tris/HCl 7,0	Tris/HCl 8,0
Rendimento(%)	15	49	64	58	48	10
		59 ^a	71 ^a		53 ^a	

Condições experimentais: $1,0 \times 10^{-3}$ mol (232 mg) de Boc-Asn-OH; $1,0 \times 10^{-5}$ mol (391 mg) de H-Ile-OBzl.Tos; $2,7 \times 10^{-7}$ mol (10 mg) de termolisina, 1 ml de solução NaOH 1 M; 20 ml de solução tampão 0,2 M contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M; tempo de reação: 72 horas, temperatura: $38 \pm 1^\circ\text{C}$.
a - A mistura reacional continha $5,3 \times 10^{-7}$ mol (20 mg) de termolisina

3.2.2. Estudo do efeito do tempo de reação

Os resultados obtidos no estudo do efeito do tempo de reação na síntese deste dipeptídeo, descrito no item 3.9.9.2, página 32 estão expressos na Tabela 5 e na Figura 2, páginas 45 e 47.

Tabela 5 - Efeito do tempo de reação na síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl

Tempo de reação (h)	6	12	24	48	72
Rendimento (%)	26	43	64	66	67

Condições experimentais: $1,0 \times 10^{-3}$ mol (232 mg) de Boc-Asn-OH; $1,0 \times 10^{-5}$ mol (391 mg) de H-Ile-OBzl.Tos; $5,3 \times 10^{-7}$ mol (20 mg) de termolisina; 1 ml de solução de NaOH 1 M; 20 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M; temperatura: $38 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.2.3. Estudo do efeito da concentração de enzima

A Tabela 6 e a Figura 3, páginas 48 e 49 mostram os resultados obtidos no estudo do efeito da concentração de termolisina, descrito no item 3.9.2.3, página 33.

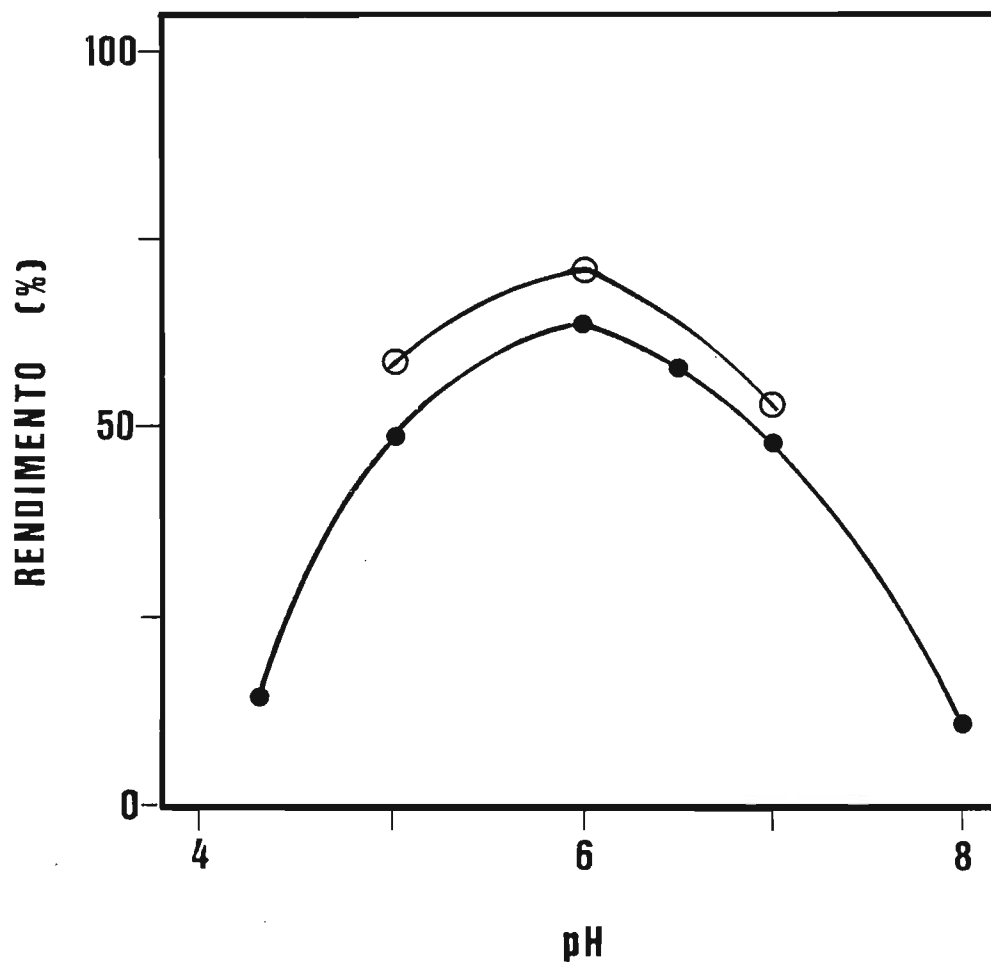


Figura 1 - Estudo do efeito do pH na síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl. Condições experimentais: $1,0 \times 10^{-3}$ mol de Boc-Asn-OH; $1,0 \times 10^{-3}$ mol de H-Ile-OBzl.Tos; 1 ml de NaOH 1 M; 20 ml de solução tampão 0,2 M contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M; Tempo de reação: 72 horas; temperatura: $38 \pm 1^\circ\text{C}$. Enzima: $2,7 \times 10^{-7}$ mol (●); $5,3 \times 10^{-7}$ mol (O).

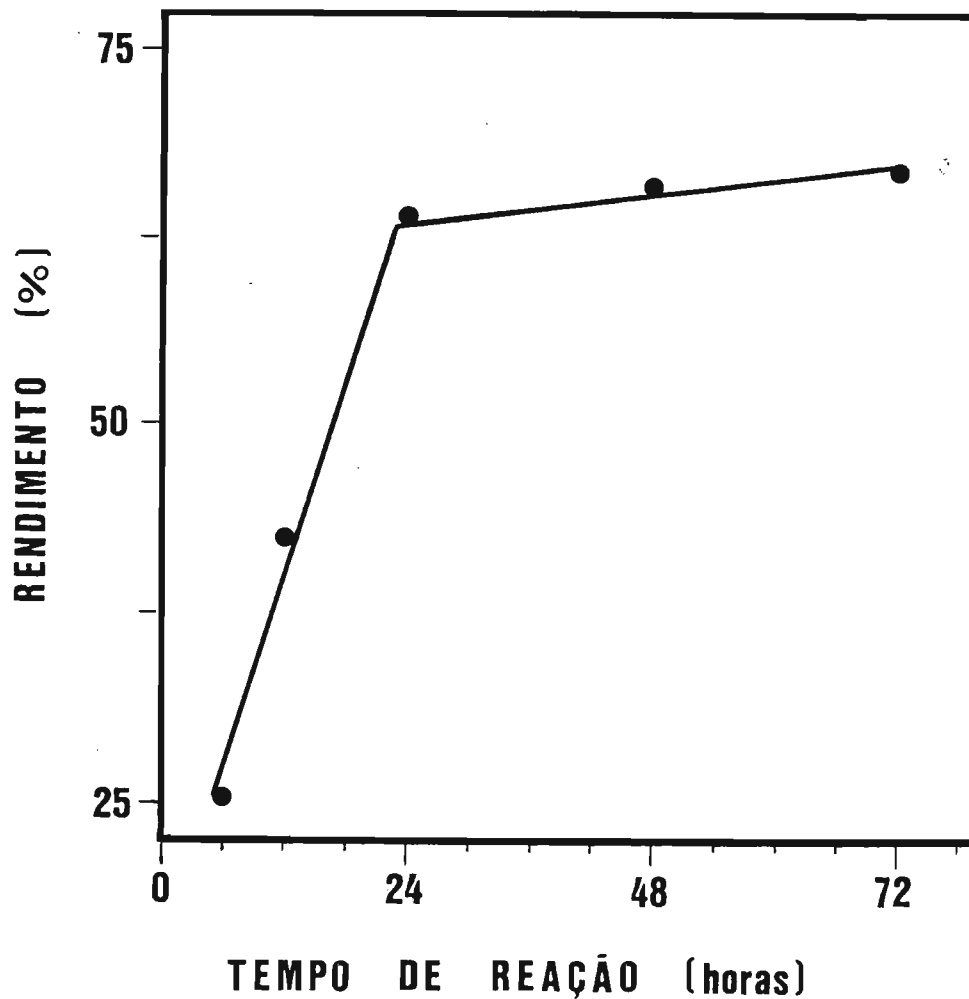


Figura 2 - Estudo do efeito do tempo de reação na síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl. Condições experimentais: $1,0 \times 10^{-3}$ mol de Boc-Asn-OH; $1,0 \times 10^{-3}$ mol de H-Ile-OBzl.Tos; 1 ml de NaOH 1 M; $5,3 \times 10^{-7}$ mol de termolisina; 20 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M; temperatura: $38 \pm 1^\circ\text{C}$.

Tabela 6 - Efeito da concentração de enzima na síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl

Concentração de enzima (10^{-6} M)	3,8	5,1	6,3	12,7	19,0	25,4	31,7	38,0	50,7
Rendimento(%)	38	40	48	62	64	66	64	65	66

Condições experimentais: $1,0 \times 10^{-3}$ mol (232 mg) de Boc-Asn-OH; $1,0 \times 10^{-3}$ mol (391 mg) de H-Ile-OBzl.Tos; 1 ml de solução de NaOH 1 M; 20 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M; tempo de reação: 48 horas; temperatura: $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.2.4. Estudo do efeito da concentração de acetato de sódio

Este estudo foi realizado nas condições descritas no item 3.9.2.4, página 33. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 7 e na Figura 4, páginas 48 e 50.

Tabela 7 - Efeito da concentração da solução de acetato de sódio na síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl

Concentração da solução de acetato de sódio pH 6,0 (M)	0,05	0,10	0,15	0,20	0,50	1,00	2,00
Rendimento (%)	62	62	63	63	59	49	33

Condições experimentais: $1,0 \times 10^{-3}$ mol (232 mg) de Boc-Asn-OH; $1,0 \times 10^{-3}$ mol (391 mg) de H-Ile-OBzl.Tos, $2,7 \times 10^{-7}$ mol (10 mg) de termolisina, 1 ml de solução de NaOH 1 M; 20 ml de solução de acetato de sódio pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M; tempo de reação: 48 horas; temperatura $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.2.5. Estudo do efeito do volume de acetato de sódio

Os resultados obtidos neste estudo, descrito no item 3.9.2.5, página 34 estão expressos na Tabela 8 e na Figura 5, páginas 51 e 52.

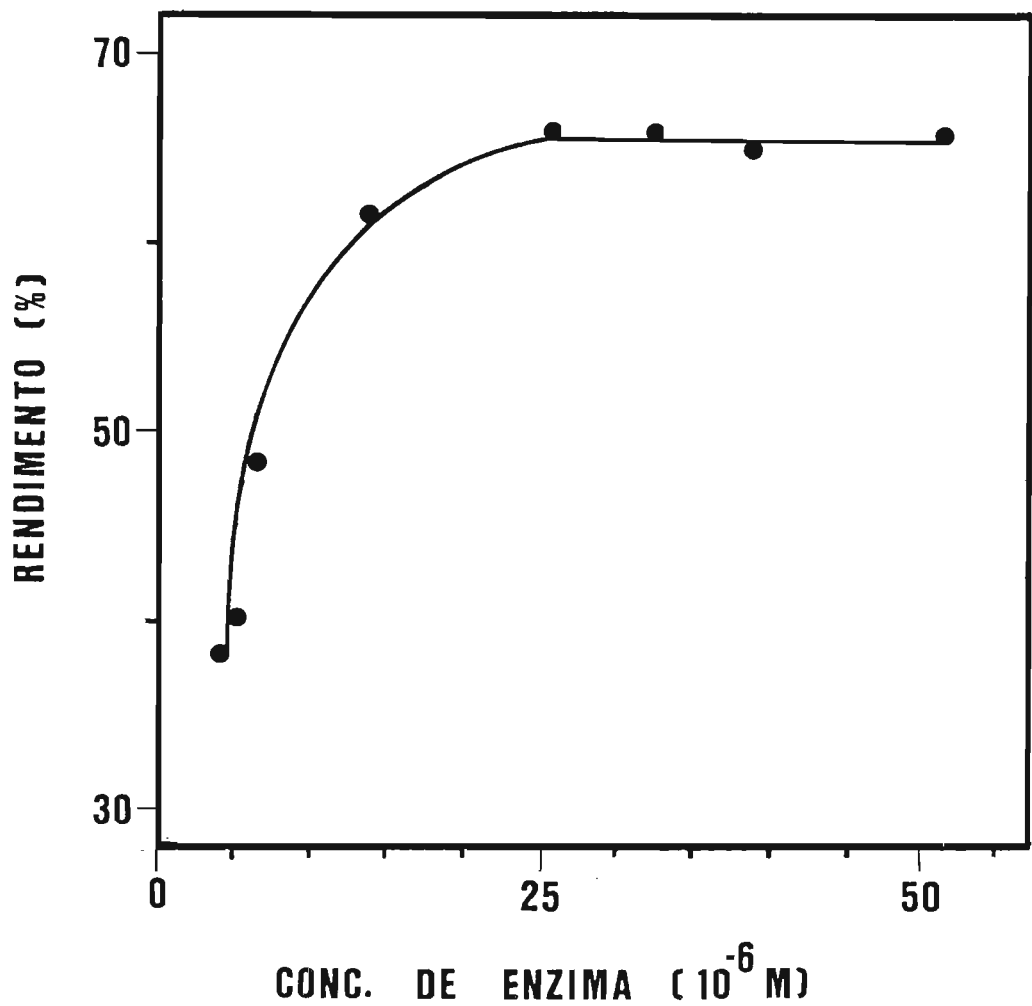


Figura 3 - Estudo do efeito da concentração de enzima na síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl. Condições experimentais: $1,0 \times 10^{-3}$ mol de Boc-Asn-OH; $1,0 \times 10^{-3}$ mol de H-Ile-OBzl.Tos; 1 ml de NaOH 1 M; 20 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M; tempo de reação: 48 horas; temperatura: $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

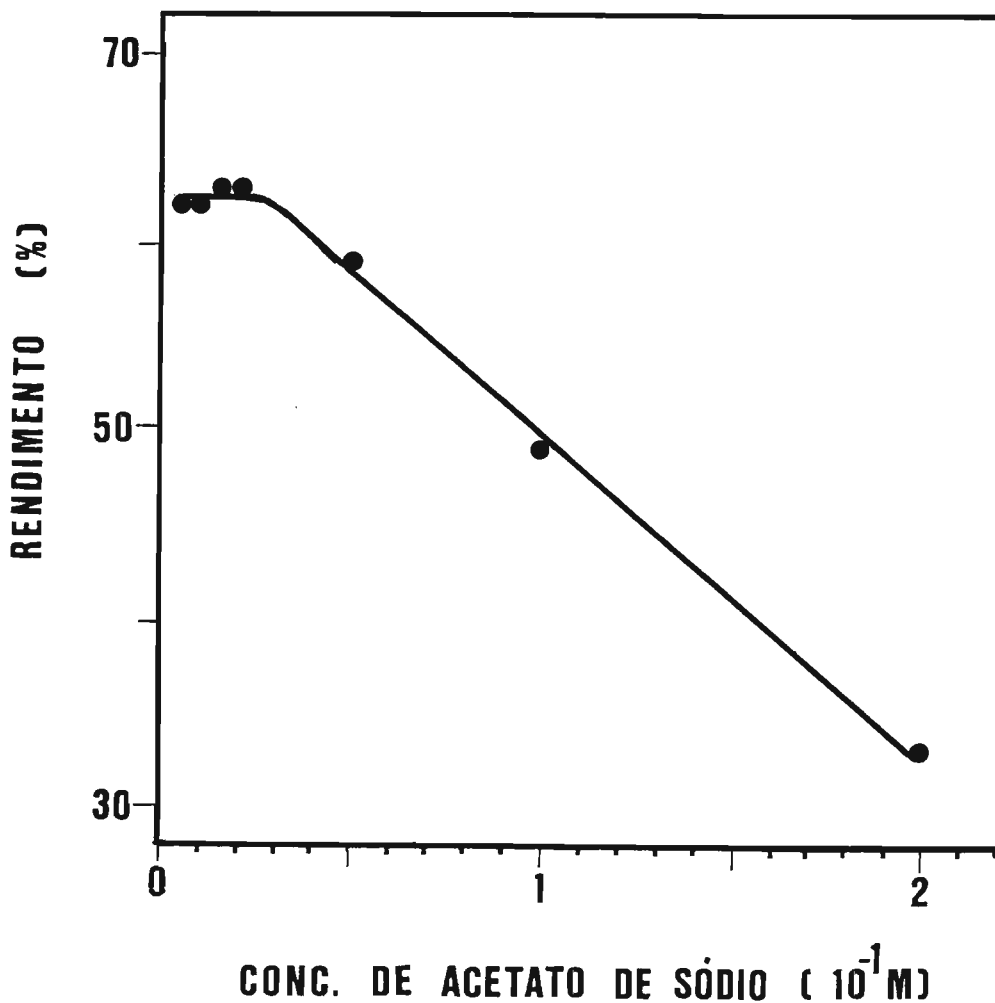


Figura 4 - Estudo do efeito da concentração de acetato de sódio na síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl. Condições experimentais: $1,0 \times 10^{-3}$ mol de Boc-Asn-OH; $1,0 \times 10^{-3}$ mol de H-Ile-OBzl.Tos; 1 ml de NaOH 1 M; $2,6 \times 10^{-7}$ mol de termolisina; 20 ml de solução de acetato de sódio pH 6,0 contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2} M$; tempo de reação: 48 horas; temperatura: $38 \pm 1^{\circ}C$.

Tabela 8 - Efeito do volume da solução de acetato de sódio na síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl

Volume da solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6,0 (ml) ^a	5	10	15	20	25	30	35
Rendimento (%)	70	66	63	62	67	60	38

Condições experimentais: $1,0 \times 10^{-3}$ mol (232 mg) de Boc-Asn-OH; $1,0 \times 10^{-3}$ (391 mg) de H-Ile-OBzl.Tos; $2,7 \times 10^{-7}$ mol (10 mg) de termolisina; 1 ml de solução de NaOH 1 M; tempo de reação: 48 horas; temperatura: $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

a - A solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, continha acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M.

3.2.6. Estudo do efeito da variação da proporção entre os componentes carboxílico e amínico na síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl

A Tabela 9, página 51 mostra os rendimentos obtidos na síntese deste dipeptídeo partindo-se de diferentes proporções entre os componentes carboxílico e amínico, descrita no item 3.9.2.6, página 34.

Tabela 9 - Efeito da variação da proporção entre os componentes carboxílico e amínico na síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl

Proporção Boc-Asn-OH: H-Ile-OBzl.Tos	Boc-Asn-OH (10^{-3} mol)	H-Ile-OBzl-Tos (10^{-3} mol)	Rendimento (%)
1,0 : 1,0	1,0	1,0	66
1,0 : 1,5	1,0	1,5	67
1,0 : 2,0	1,0	2,0	61
1,5 : 1,0	1,5	1,0	75
2,0 : 1,0	2,0	1,0	83
2,0 : 1,0 ^a	2,0	1,0	53

Condições experimentais: $5,3 \times 10^{-7}$ mol (20 mg) de termolisina; quantidades equimolares às de H-Ile-OBzl.Tos de solução de NaOH 1M, 20 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M; tempo de reação: 48 horas; temperatura: $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

a - Síntese realizada na presença de $2,6 \times 10^{-7}$ mol (10 mg) de termolisina.

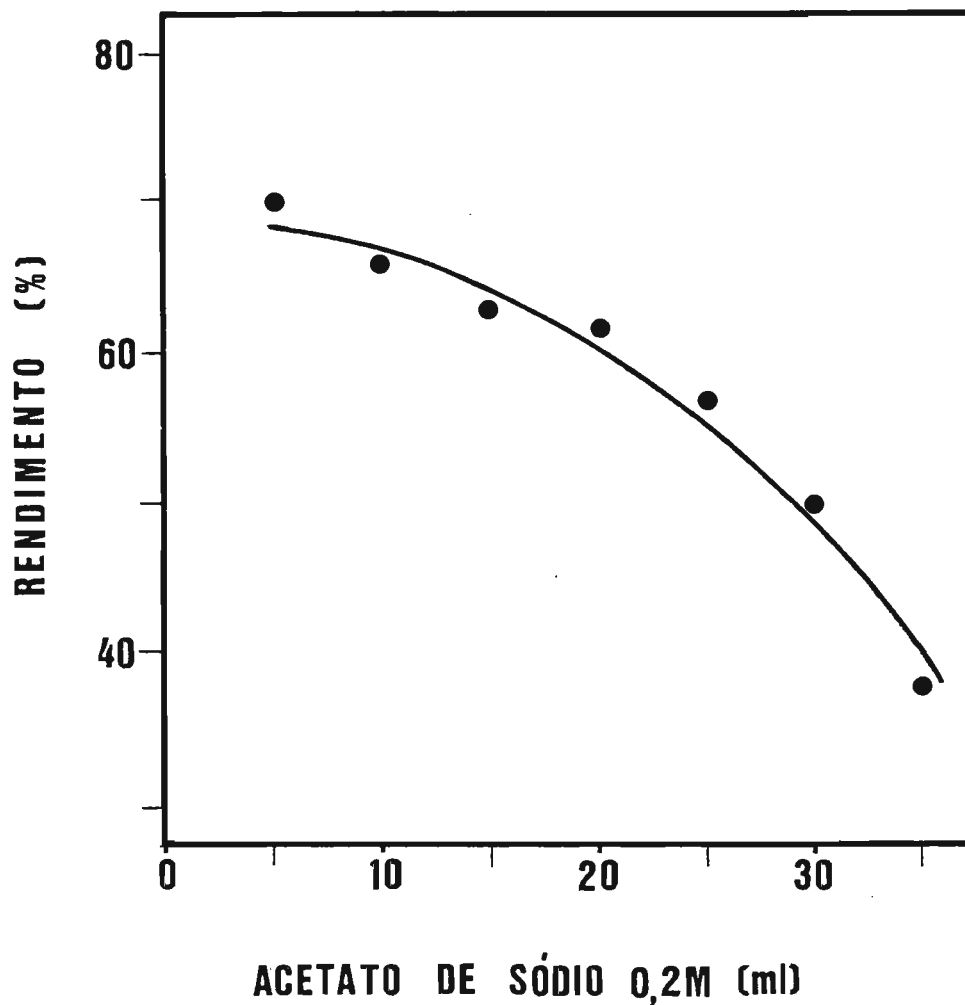


Figura 5 - Estudo do efeito do volume de acetato de sódio na síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl. Condições experimentais: $1,0 \times 10^{-3}$ mol de Boc-Asn-OH; $1,0 \times 10^{-3}$ mol de H-Ile-OBzl.Tos; 1 ml de NaOH 1 M; $2,7 \times 10^{-7}$ mol de termolisina; solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6 contendo acetato de cálcio 5×10^{-2} M; tempo de reação: 48 horas; temperatura: $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.2.7. Estudo do efeito da temperatura na síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl

Na Tabela 10, página 53 estão mostrados os rendimentos obtidos na síntese deste dipeptídeo a 38 ± 1 e a 48 ± 1 °C conforme a técnica descrita no item 3.9.2.7, página 35.

Tabela 10 - Efeito da temperatura na síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl

Temperatura (°C)	Rendimento (%)	
	9 horas	13 horas
38 ± 1	36	51
48 ± 1	53	56

Condições experimentais: $1,0 \times 10^{-3}$ mol (232 mg) de Boc-Asn-OH; $1,0 \times 10^{-3}$ mol (391 mg) de H-Ile-OBzl.Tos; $5,3 \times 10^{-7}$ mol (20 mg) de termolisina; 1 ml de solução de NaOH 1 M; 20 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M.

3.2.8. Estudo do efeito da adição de solvente orgânico ao meio de reação

A Tabela 11, página 54, mostra as condições e os rendimentos obtidos na síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl, segundo o método geral descrito no item 3.9.1, página 31, na presença de volumes variáveis de metanol e acetato de etila.

3.3. Estudo do efeito da variação do grupo protetor de N_{α} -aminogrupos no acoplamento entre N-acil-L-asparagina e o tosilato de éster benzílico de isoleucina

A Tabela 12, página 55 mostra os rendimentos da reação de acoplamento entre Boc-Asn-OH, Z-Asn-OH e

Tabela 11 - Efeito da adição de solvente orgânico ao meio de reação

Proporção Boc-Asn-OH:H-Ile-OBzl.Tos	Boc-Asn-OH (10^{-3} mol)	H-Ile-OBzl.Tos (10^{-3} mol)	Volume da solução ^a de acetato de sódio, 0,2M, pH 6,0 (ml)	Volume de MeOH (ml)	Volume de AcOEt (ml)	Rendimento (%)
1:2	1,0	2,0	18	2	-	47
1:2	1,0	2,0	16	-	0,84	73
2:1	2,0	1,0	10	4	-	79

Condições experimentais: $5,3 \times 10^{-7}$ mol de termolisina; quantidades equimolares às de H-Ile-OBzl.Tos de solução de NaOH 1 M; tempo de reação: 48 horas; temperatura: $38 \pm 1^\circ\text{C}$.

a- A solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6 continha acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M.

Moz-Asn-OH com H-Ile-OBz1.Tos, obtidos em diferentes proporções entre os componentes carboxílico e amínico, nas condições descritas no item 3.9.3, página 35.

Tabela 12 - Estudo do efeito da variação do grupo protetor de N_α-aminogruppo no acoplamento entre N_α-acil-L-asparagina e H-Ile-OBz1.Tos

Componente carboxílico	Proporção	Proporção
	$\frac{\text{componente carboxílico}}{\text{componente amínico}}$ 2:1	$\frac{\text{componente carboxílico}}{\text{componente amínico}}$ 1:1
Rendimento (%)		
Boc-Asn-OH	83	62
Z-Asn-OH	95	87
Moz-Asn-OH	95	87

Condições experimentais: 1 mol de solução de NaOH 1 M, 20 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M, $5,3 \times 10^{-7}$ mol (20 mg) de termolisina, tempo de reação: 48 horas; temperatura: $38 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.4. Estudo comparativo do acoplamento entre N_α-terc-butiloxi carbonil-L-asparagina e os tosilatos de ésteres benzílicos de L-isoleucina, L-leucina e L-fenilalanina

A Tabela 13, página 56 expressa os rendimentos obtidos no estudo comparativo do acoplamento de Boc-Asn-OH com H-Ile-OBz1.Tos, H-Leu-OBz1.Tos e H-Phe-OBz1.Tos, segundo as condições descritas no item 3.9.4, página 36.

3.5. Síntese de Z-Asn-Ile-OBz1

A Tabela 14, página 56 expressa as condições de síntese estudadas para a obtenção deste dipeptídeo de acordo com o método descrito no item 3.9.1, página 31 e indica os

Tabela 13 - Estudo comparativo do acoplamento de Boc-Asn-OH com H-Ile-OBzl.Tos, H-Leu-OBzl.Tos e H-Phe-OBzl.Tos

Componente amínico	Rendimento (%)	
	48 horas	72 horas
H-Ile-OBzl.Tos	50	49
H-Leu-OBzl.Tos	25	29
H-Phe-OBzl.Tos	57	60

Condições experimentais: $1,0 \times 10^{-3}$ mol de componente carboxílico; $1,0 \times 10^{-3}$ mol de componente amínico; $2,7 \times 10^{-7}$ mol (10 mg) de termolisina; 1,0 ml de solução de NaOH 1 M; 30 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M; temperatura: $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

rendimentos encontrados em presença de duas concentrações diferentes de termolisina, quando se utiliza diferentes proporções entre os componentes carboxílico e amínico.

Tabela 14 - Influência da proporção entre os substratos e da concentração de enzima na síntese de Z-Asn-Ile-OBzl

Proporção componente carboxílico: componente amínico	Z-Asn-OH (10^{-3} mol)	H-Ile- OBzl.Tos (10^{-3} mol)	Rendimento (%)	
			E = $1,3 \times 10^{-5}$ M	E = $2,5 \times 10^{-5}$ M
1:1	1,0	1,0	87	86
2:1	2,0	1,0	94	96

Condições experimentais: 1 ml de solução de NaOH 1 M; 20 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M; tempo de reação: 48 horas; temperatura: $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

O estudo do efeito da temperatura na síntese de Z-Asn-Ile-OBzl, foi realizado de acordo com a técnica descrita no item 3.9.6, página 37 para tempos de reação de 1 e 3 ho

ras respectivamente. Os resultados deste estudo estão expressos na Tabela 15 e Figura 6, páginas 57 e 58.

Tabela 15 - Efeito da temperatura na síntese de Z-Asn-Ile-OBzl

Tempo de reação (h)	Temperatura (°C)				
	28 [±] 1	38 [±] 1	48 [±] 1	55 [±] 1	68 [±] 1
1	33	53	66	74	75
3	-	73	80	83	81

Rend
menor

Condições experimentais: $1,0 \times 10^{-3}$ mol (267 mg) de Z-Asn-OH; $1,0 \times 10^{-3}$ mol (391 mg) de H-Ile-OBzl.Tos; 1 ml de solução de NaOH 1 M; $2,7 \times 10^{-7}$ mol (10 mg) de termolisina; 20 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M.

O dipeptídeo obtido nestas incubações, recristalizado no sistema acetato de etila/éter de petróleo, mostrou-se cromatograficamente puro e apresentou as seguintes características:

Análise elementar (%): Calculado : C 63,95; N 8,95; H 6,65

Encontrado : C 64,30; N 8,85; H 6,72

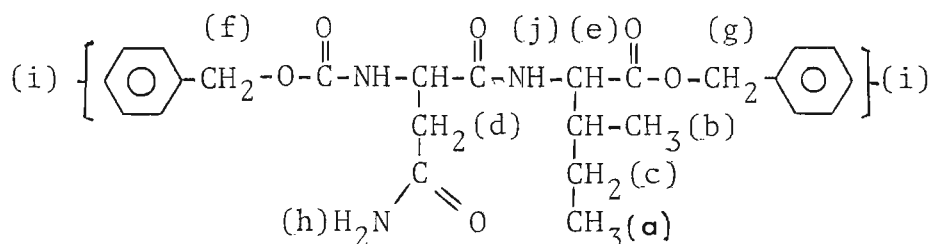
P.F.: 160-163°C

CCD : Rf_A: 0,39; Rf_B: 0,64; Rf_C: 0,86

Análise de aminoácidos: Ácido aspártico: 1,03

Isoleucina: 0,97

RM¹H (60 MHz, DMSO-d₆, TMS):



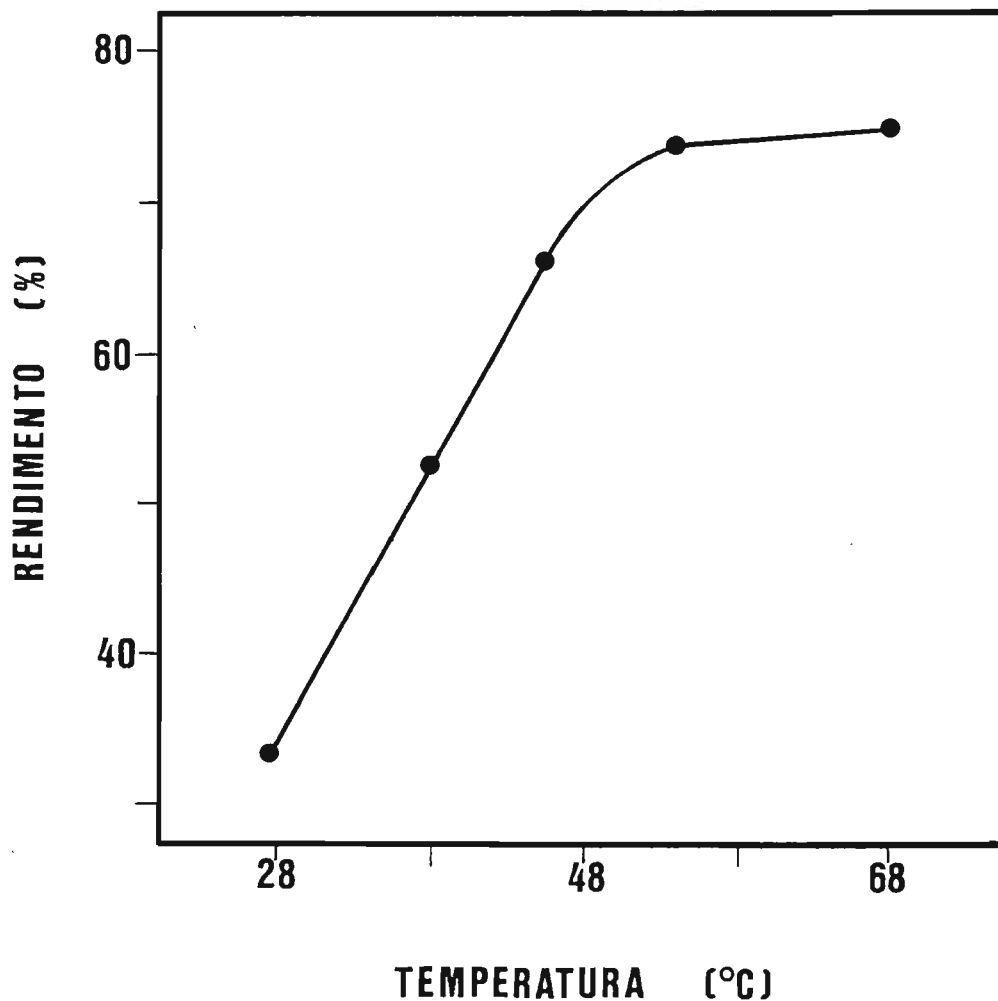


Figura 6 - Estudo do efeito da temperatura na síntese de Z-Asn-Ile-OBzl. Condições experimentais: $1,0 \times 10^{-3}$ mol de Z-Asn-OH; $1,0 \times 10^{-3}$ mol de H-Ile-OBzl; 1 ml de NaOH 1 M; $2,7 \times 10^{-7}$ mol de termolisina; 20 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6 contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M; tempo de reação: 1 hora.

δ (ppm)	(a): 0,67-0,83 (m)	(f): 5,00 (s)
	(b): 0,67-0,83 (m)	(g): 5,10 (s)
	(c): 0,83-1,47 (m)	(h): 6,87 (s,1)
	(d): 2,43 (d)	(i): 7,32 (s)
	(e): 3,90-4,70 (m)	(j): 7,93 (d)

O espectro de RM¹H deste composto está mostrado no item 5, página 87.

3.6. Síntese de Moz-Asn-Ile-OBzl

As condições de síntese de Moz-Asn-Ile-OBzl estudadas de acordo com o método descrito no item 3.9.1., página 31 e os respectivos rendimentos obtidos estão descritas na Tabela 16, página 60.

O dipeptídeo obtido nestas incubações, recrista lizado no sistema clorofórmio/éter de petróleo, mostrou cromatograficamente puro e apresentou as seguintes característi cas:

Análise elementar (%): Calculado: C 62,50; N 8,41; H 6,66

Encontrado: C 62,17; N 8,14; H 6,60

P.F.: 127-129^o

CCD: Rf_A: 0,41; Rf_B: 0,60; Rf_C: 0,85

Análise de aminoácidos: Ácido aspártico: 1,03

Isoleucina: 0,97

RM¹H (60 MHz, DMSO-d₆, TMS):

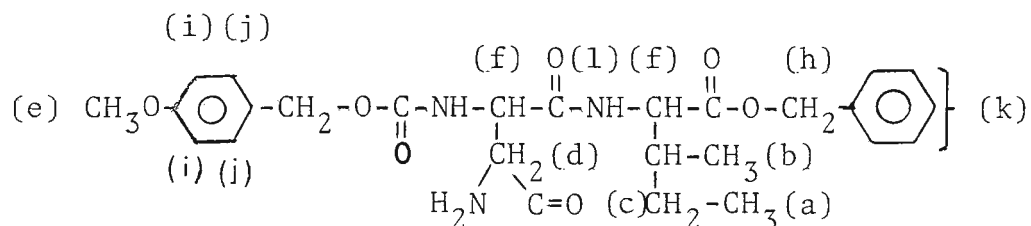


Tabela 16 - Influência da proporção entre os substratos e da concentração de enzima na síntese de Moz-Asn-Ile-OBz1

Proporção dos substratos	Moz-Asn-OH (10^{-3} mol)	H-Ile-OBz1.Tos (10^{-3} mol)	Concentração de termolisina (10^{-5} M)	Recuperação (%)
2:1	2,0	1,0	2,5	95
1:1	1,0	1,0	2,5	88
1:1	1,0	1,0	1,3	87

Condições experimentais: 1 ml de solução de NaOH 1 M; 20 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M; tempo de reação: 48 horas; temperatura $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

δ (ppm):	(a): 0,50-0,97 (m)	(g): 4,87 (s)
	(b): 0,50-0,97 (m)	(h): 5,07 (s)
	(c): 0,97-1,53 (m)	(i): 6,83 (d)
	(d): 2,37 (d)	(j): 7,22 (d)
	(e): 3,67 (s)	(k): 7,33 (s)
	(f): 4,07-4,57 (m)	(l): 8,00 (d)

O espectro de RM¹H deste composto está mostrado no item 5, página 88.

3.7. Síntese de Boc-Asn-Leu-OBzl

Na Tabela 17, página 61 estão descritas as condições de síntese estudadas para a obtenção deste dipeptídeo, segundo o método descrito no item 3.9.1, página 31 e os respectivos rendimentos obtidos.

Tabela 17 - Efeito da adição de solvente orgânico ao meio de reação na síntese de Boc-Asn-Leu-OBzl

Volume de solução ^a de acetato de sódio 0,2M, pH 6,0 (ml)	Volume de EtOH (ml)	Volume de DMF (ml)	Tempo de reação (h)	Rendimento (%)
20	-	-	48	34
30	-	-	48	25
30 ^b	-	-	72	29
36	-	-	48	30
8	5	-	48	10
14	4	2	72	9
10	3	3	48	10

Condições experimentais: $2,0 \times 10^{-3}$ mol (464 mg), $1,0 \times 10^{-3}$ mol (391 mg) de H-Leu-OBzl.Tos, $5,3 \times 10^{-7}$ mol (20 mg) de termolisina; 1 ml de solução de NaOH 1 M; temperatura: $38 \pm 1^\circ\text{C}$.
a - A solução salina de acetato de sódio, 0,2 M, pH 6, contém acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M. b - A mistura reacional continha $1,0 \times 10^{-3}$ mol (231 mg) de Boc-Asn-OH, $1,0 \times 10^{-3}$ mol (391 mg) de H-Leu-OBzl e $2,7 \times 10^{-7}$ (10 mg) de termolisina.

δ (ppm): (a): 0,63-1,07 (m) (f): 5,07 (s)
(b): 1,30-1,80 (m) (g): 6,80 (s,1)
(c): 2,42 (d) (h): 7,27 (s)
(d): 4,07-4,63 (m) (i): 8,13 (d)
(e): 4,98 (s)

O espectro de RM¹H deste produto encontra-se no item 5, página 90.

3.9. Síntese de Moz-Asn-Leu-OBzl

A síntese deste dipeptídeo foi realizada conforme a técnica descrita no item 3.9.1, página 31 utilizando-se as proporções 1:1 e 2:1 entre os componentes carboxílico e amínico, nas seguintes condições experimentais: Moz-Asn-OH ($1,0 \times 10^{-3}$ ou $2,0 \times 10^{-3}$ mol), $1,0 \times 10^{-3}$ mol (391 mg) de H-Leu-OBzl.Tos, $5,3 \times 10^{-7}$ mol (20 mg) de termolisina, 1 ml de solução de NaOH 1 M, 20 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M, tempo de reação: 48 horas; temperatura: $38 \pm 1^\circ\text{C}$. Os rendimentos obtidos foram 80 e 94 para as proporções 1:1 e 2:1 respectivamente.

Quando analisado em CCD, após recristalização no clorofórmio/éter de petróleo, o produto se apresentou puro. Suas características são:

Análise elementar (%): Calculado : C 62,50; N 8,41; H 6,66
Encontrado : C 62,71; N 8,29; H 6,63

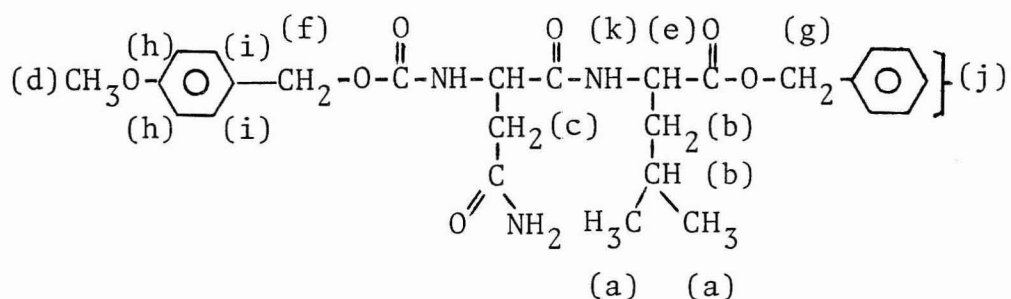
P.F.: 161-163^oC

CCD : Rf_A 0,34; Rf_B 0,66; Rf_C 0,85

Análise de aminoácidos: Ácido aspártico: 1,07

Leucina: 0,92

RM¹H (60 MHz, DMSO-d₆, TMS):



δ (ppm): (a): 0,63-1,07 (s,1) (g): 5,03 (s)
 (b): 1,22-1,78 (m) (h): 6,78 (d)
 (c): 2,33 (d) (i): 7,18 (d)
 (d): 3,63 (s) (j): 7,23 (s)
 (e): 4,10-4,47 (m) (k): 8,13 (d)
 (f): 4,85 (s)

O espectro de RM¹H deste dipeptídeo encontra-se no item 5, página 91.

3.10. Síntese de Z-Asn-Leu-OEt

A síntese deste dipeptídeo foi realizada conforme o procedimento descrito no item 3.9.1, página 31 em pH 6 e pH 8. Na Tabela 18, página 66 encontram-se apresentados os rendimentos obtidos e as condições experimentais utilizadas.

O produto obtido nestas reações, recristalizado no sistema acetona/H₂O, mostrou-se cromatograficamente puro e apresentou as características:

Tabela 18 - Influência do pH e da temperatura na síntese de Z-Asn-Leu-OEt

pH	Tempo de reação (h)	Temperatura (°C)	Rendimento (%)
8,0	48	38 ± 1	45
8,0	24	48 ± 1	31
6,0	24	48 ± 1	62

Condições experimentais: $1,0 \times 10^{-3}$ mol (267 mg) de Z-Asn-OH, $1,0 \times 10^{-3}$ mol (196 mg) de H-Leu-OEt-HCl, $2,7 \times 10^{-7}$ mol (10 mg) de termolisina, 1 ml de solução de NaOH 1 M, 2 g de sulfato de amônio, 10 ml de solução tampão Tris/HCl 0,2 M, pH 8 ou solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6,0, ambas contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M.

Análise elementar (%): Calculado: C 58,95; N 10,31; H 7,17

Encontrado: C 58,80; N 10,19; H 7,17

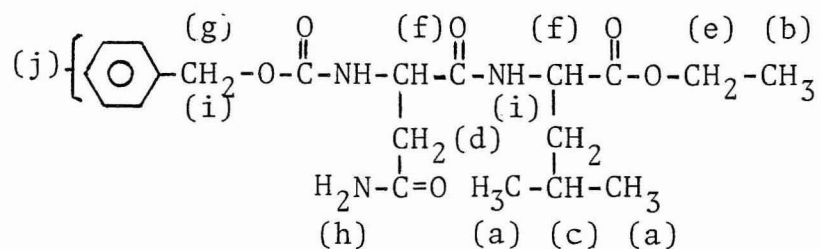
P.F.: 158-160°C

CCD : Rf_A 0,34; Rf_B 0,57; Rf_C 0,82

Análise de aminoácidos: Ácido aspártico = 1,01

Leucina = 0,99

RM¹H (60 MHz, CDCl₃, TMS):



δ (ppm): (a): 0,96 (d) (f): 4,4-4,8 (m)

(b): 1,3 (t) (g): 5,16 (s)

(c): 1,5-1,8 (m) (h): 5,9 (s,1)

(d): 2,75 (d) (i): 6,5 (d)

(e): 4,2 (q) (j): 7,36 (s)

O espectro de RM¹H deste dipeptídeo está mostrado no item 5, página 92.

3.11. Síntese de Boc-Asn-Phe-OBzl

A Tabela 19, página 68 expressa as condições estudadas para sintetizar Boc-Asn-Phe-OBzl conforme o procedimento descrito no item 3.9.1, página 31 e os respectivos rendimentos encontrados.

Quando a síntese foi realizada nas mesmas condições descritas na Tabela 19, página 68 utilizando-se 26 ml de tampão Tris/HCl 0,2 M, pH 8, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M ou uma mistura constituída por 14 ml do mesmo, 4 ml de etanol e 2 ml de dimetilformamida, os rendimentos encontrados foram de 30 e 25% respectivamente.

O dipeptídeo obtido em todas estas reações foi recristalizado no sistema metanol/água e mostrou-se cromatograficamente puro. Quando analisado, apresentou as seguintes características:

Análise elementar (%): Calculado: C 63,95; N 8,95; H 6,65

Encontrado: C 63,51; N 8,85; H 6,60

P.F.: 148-150°C

CCD : Rf_A 0,35; Rf_B 0,58; Rf_C 0,81

Análise de aminoácidos: Ácido aspártico: 0,99

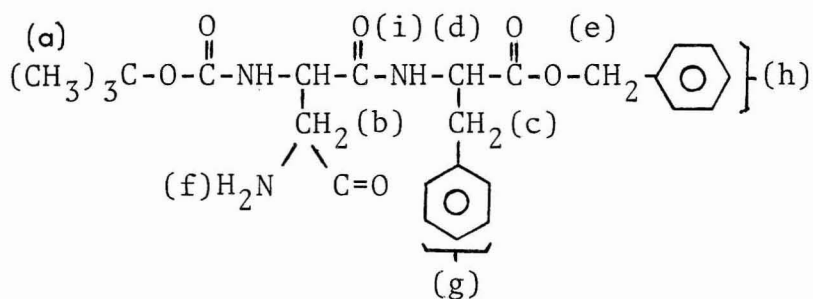
Fenilalanina: 1,01

RM¹H (60 MHz, DMSO-d₆, TMS):

Tabela 19 - Influência da presença de solvente orgânico no meio de reação na síntese de Boc-Asn-Phe-OBzl

Volume de solução ^a de acetato de sódio 0,2 M, pH 6,0 (ml)	Volume de EtOH (ml)	Volume de DMF (ml)	Tempo de reação (h)	Rendimento (%)
20	-	-	48	37
10	-	2	48	25
8	5	-	48	6
30	-	-	72	60
30	-	-	48	56
35 ^b	-	-	72	64

Condições experimentais: $2,0 \times 10^{-3}$ mol (464 mg) de Boc-Asn-OH, $1,0 \times 10^{-5}$ mol (427 mg) de H-Phe-OBzl.Tos, $5,3 \times 10^{-7}$ mol (20 mg) de termolisina, 1 ml de solução de NaOH 1 M, temperatura: $38 \pm 1^\circ\text{C}$.
 a - A solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6 continha acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M. b - A mistura reacional continha $1,0 \times 10^{-3}$ (232 mg) de Boc-Asn-OH, $1,0 \times 10^{-3}$ mol (427 mg) de H-Phe-OBzl.Tos e $2,7 \times 10^{-7}$ mol (10 mg) de termolisina.



δ (ppm): (a): 1,27 (s)	(f): 6,75 (s,1)
(b): 2,28 (d)	(g): 7,10 (s)
(c): 2,92 (d)	(h): 7,20 (s)
(d): 3,95-4,63 (m)	(i): 8,03 (d)
(e): 4,97 (s)	

O espectro de RM^1H obtido para este composto está mostrado no item 5, página 93.

3.12. Síntese de Z-Asn-Phe-OBzl

O rendimento encontrado na síntese deste composto, realizada de acordo com a técnica descrita no item 3.9.1, página 31 foi de 78%. As condições experimentais utilizadas foram: $1,0 \times 10^{-3}$ mol (267 mg) de Z-Asn-OH; $1,0 \times 10^{-3}$ mol (427 mg) de H-Phe-OBzl.Tos, $5,3 \times 10^{-7}$ mol (20 mg) de termolisina, 1 ml de solução de NaOH 1 M; 35 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M; tempo de reação: 72 horas; temperatura: $38 \pm 1^\circ\text{C}$. O produto obtido, recristalizado em acetona, mostrou-se cromatograficamente puro e apresentou as características:

Análise elementar (%): Calculado: C 66,79; N 8,34; H 5,80

Encontrado: C 66,17; N 8,19; H 5,83

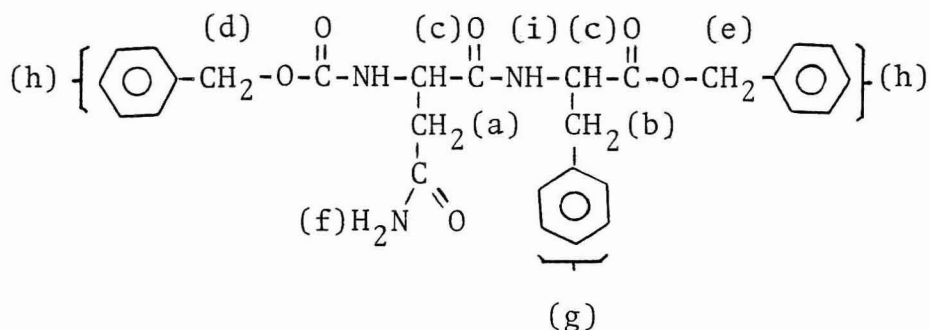
P.F.: 165-168°C

CCD: Rf_A 0,39; Rf_B 0,72; Rf_C 0,85

Análise de aminoácidos: Ácido aspártico: 0,97

Fenilalanina: 1,02

RM¹H (60 MHz, DMSO-d₆, TMS):



δ (ppm): (a): 2,35 (d)	(f): 6,78 (s,1)
(b): 2,97 (d)	(g): 7,10 (s)
(c): 4,12-4,70 (m)	(h): 8,25 (s)
(d): 4,92 (s)	(i): 8,17 (d)
(e): 5,02 (s)	

O espectro de RM¹H deste dipeptídeo encontra-se no item página 94.

3.13. Síntese de Moz-Asn-Phe-OBzl

Os rendimentos obtidos quando este dipeptídeo foi sintetizado segundo o procedimento descrito no item 3.9.1, página 31 utilizando-se 30 e 35 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, para as concentrações de enzima de $1,3 \times 10^{-5}$ M e $2,5 \times 10^{-5}$ M e os tempos de reação de 48 e 72 hoas, foram 79 e 95% respectivamente. As condições experimentais utilizadas foram as seguintes: $1,0 \times 10^{-3}$ mol (298 mg) de Moz-Asn-OH, $1,0 \times 10^{-3}$ mol (427 mg) de

H-Phe-OBzl.Tos, 1 ml de solução de NaOH 1M, temperatura: $38 \pm 1^\circ\text{C}$.

O dipeptídeo obtido nestas reações, recristaliza do no sistema clorofórmio/etanol/éter de petróleo, mostrou-se cromatograficamente puro e apresentou as características abaixo:

Análise elementar (%): Calculado: C 65,28; N 7,88; H 5,86

Encontrado: C 65,68; N 7,80; H 5,98

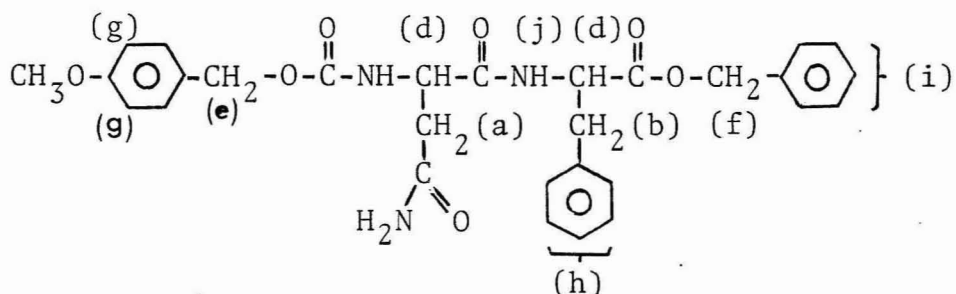
P.F.: $191-192^\circ\text{C}$

CCD: Rf_A 0,29; Rf_B 0,55; Rf_C 0,82;

Análise de aminoácidos: Ácido aspártico: 0,97

Fenilalanina: 1,02

RM^1H (60 MHz, DMSO- d_6 , TMS):



δ (ppm): (a): 2,38 (d) (f): 5,05 (s)
 (b): 3,00 (d) (g): 6,85 (d); J = 8,0 Hz
 (c): 3,70 (s) (h): 7,15 (s)
 (d): 4,05-4,68 (m) (i): 7,27 (s)
 (e): 4,92 (s) (j): 8,22 (d)

Seu espectro de RM^1H encontra-se no item 5, página 95.

3.14. Síntese de Z-Asn-Phe-OEt

As condições de síntese estudadas para a obtenção deste dipeptídeo, segundo o procedimento descrito no

3.9.1, página 31 e os respectivos rendimentos obtidos estão expressos na tabela abaixo:

Tabela 20 - Influência do pH e da temperatura na síntese de Z-Asn-Phe-OEt

pH	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Rendimento (%)
8,0	48	38 ± 1	69
8,0	24	48 ± 1	62
6,0	24	48 ± 1	80

Condições experimentais: $1,0 \times 10^{-3}$ mol (267 mg) de Z-Asn-OH, $1,0 \times 10^{-3}$ mol (230 mg) de H-Phe-OEt.HCl, $2,7 \times 10^{-7}$ mol (10 mg) de termolisina, 1 ml de solução de NaOH 1 M; 2 g de sulfato de amônio, 10 ml de solução tampão Tris/HCl 0,2 M, pH 8, ou solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, ambas contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M.

O produto obtido nestas incubações, recristalizado de metanol mostrou-se puro quando analisado em CCD e apresentou as seguintes características:

Análise elementar (%): Calculado: C 62,57; N 9,52; H 6,16

Encontrado: C 62,49; N 9,37; H 6,11

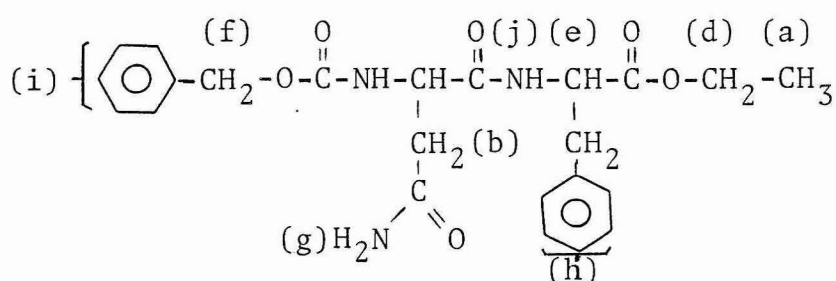
P.F.: 172-174°C

CCD : Rf_A 0,26; Rf_B 0,53; Rf_C 0,81

Análise de aminoácidos: Ácido aspártico: 0,95

Fenilalanina: 1,05

RM¹H (60 MHz, DMSO-d₆, TMS):



δ (ppm): (a): 1,07 (t); J = 7,0 Hz	(f): 4,95 (s)
(b): 2,38 (d)	(g): 6,83 (s,1)
(c): 2,95 (d)	(h): 7,1 ^o (s)
(d): 3,98 (q); J = 7,0 Hz	(i): 7,28 (s)
(e): 4,05-4,75 (m)	(j): 8,12 (d)

O espectro de RM¹H deste dipeptídeo está mostrado no item 5, página 96.

3.15. Síntese de Z-Asn-Val-OBzl

Os rendimentos obtidos bem como as condições de síntese estudadas para a obtenção deste dipeptídeo, segundo a técnica descrita no item 3.9.1, página 31 estão expressos na Tabela 21, página 74.

O produto destas reações, recristalizado no sistema acetato de etila/éter de petróleo, mostrou-se cromatograficamente puro e quando analisado apresentava as seguintes características:

Análise elementar (%): Calculado: C 63,28; N 9,22; H 6,42

Encontrado: C 63,11; N 9,08; H 6,33

P.F.: 162-164^oC

CCD: Rf_A 0,36; Rf_B 0,65; Rf_C 0,78

Análise de aminoácidos: Ácido aspártico: 1,01

Valina: 0,98

RM¹H (60 MHz, DMSO-d₆, TMS):

Tabela 21 - Influência do pH e do volume da solução tampão Tris/HCl 0,2 M, pH 8, na síntese de Z-Asn-Val-OBzl

Volume de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6,0 (ml)	Volume de tampão Tris/HCl, 0,2 M, pH 8,0 (ml)	Volume de MeOH (ml)	Volume de DMF (ml)	Rendimento (%)
-	7,0	2	1	44
-	10,5	2	1	49
10,5	-	2	1,5	25

Condições experimentais: $2,0 \times 10^{-3}$ mol (267 mg) de Z-Asn-OH, $1,0 \times 10^{-3}$ mol (379 mg) de H-Val-OBzl. Tos, $5,3 \times 10^{-7}$ mol (20 mg) de termolisina, 1,0 ml de solução de NaOH 1 M, tempo de reação: 72 horas; temperatura: $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Análise elementar (%): Calculado: C 61,80; N 8,65; H 6,43

Encontrado: C 61,01; N 8,44; H 6,25

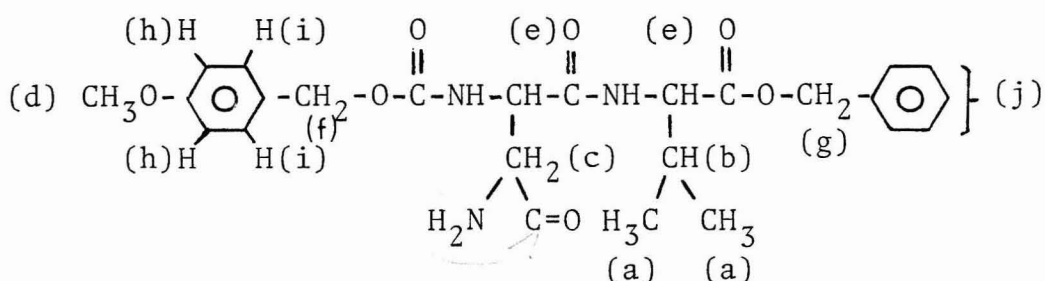
P.F.: 155-157°C

CCD: Rf_A 0,32; Rf_B 0,63; Rf_C 0,84

Análise de aminoácidos: Ácido aspártico: 1,03

Valina: 0,97

RM¹H (60 MHz, DMSO-d₆, TMS):



δ (ppm): (a): 0,65 (d); J = 6,9 Hz (g): 4,97 (s)

(b): 1,62-2,10 (m) (h): 6,68 (d); J=8,0 Hz

(c): 2,28 (d) (i): 7,08 (d); J=8,0 Hz

(d): 3,55 (s) (j): 7,18 (s)

(e): 3,88-4,48 (m) (k): 7,87 (d,1)

(f): 4,77 (s)

O espectro de RM¹H deste dipeptídeo está mostrado no item 5, página 98.

Os rendimentos encontrados nas melhores condições de síntese dos dipeptídeos descritos neste item e alguns dados de sua caracterização estão expressos na Tabela 22, página 77.

4. Síntese enzimática de tripeptídeos contendo asparagina

4.1. Síntese de Moz-Asn-Ile-Gly-OBzl

A Tabela 23, página 78 expressa os rendimentos de síntese deste tripeptídeo nas condições estudadas confor-

Tabela 22 - Dados de rendimentos e caracterização dos dipeptídeos sintetizados enzimaticamente

	Rendimento ^a (%)	Ponto de fusão observado	CCD (RF)			Solvente de recristalização
			A	B	C	
Boc-Asn-Ile-OBzl	83	126-127	0,35	0,60	0,86	MeOH/H ₂ O
Z-Asn-Ile-OBzl	96	160-163	0,39	0,64	0,84	AcOEt/EP
Moz-Asn-Ile-OBzl	95	127-129	0,41	0,60	0,85	CHCl ₃ /EP
Boc-Asn-Leu-OBzl	34	140-143	0,36	0,59	0,83	AcOEt/EP
Z-Asn-Leu-OBzl	79	139-141	0,38	0,57	0,81	AcOEt/EP
Z-Asn-Leu-OEt	62	158-159	0,34	0,57	0,82	An/H ₂ O
Moz-Asn-Leu-OBzl	94	161-163	0,34	0,66	0,85	CHCl ₃ /Et
Boc-Asn-Phe-OBzl	64	148-150	0,35	0,58	0,81	MeOH/H ₂ O
Z-Asn-Phe-OBzl	78	165-168	0,39	0,72	0,85	An
Z-Asn-Phe-OEt	80	172-174	0,26	0,53	0,81	MeOH
Moz-Asn-Phe-OBzl	95	191-192	0,29	0,55	0,82	CHCl ₃ /EtOH/EP
Z-Asn-Val-OBzl	49	162-164	0,36	0,65	0,78	AcOEt/EP
Moz-Asn-Val-OBzl	91	155-157	0,32	0,63	0,84	CHCl ₃ /EP

A, B e C referem-se aos sistemas de solventes empregados para CCD.

a - Os rendimentos indicados foram obtidos nas melhores condições encontradas para a síntese enzimática dos peptídeos enumerados.

me o método descrito no item 3.10, página 37 e os respectivos rendimentos encontrados.

Tabela 23 - Influência da concentração da enzima e do tempo de reação na síntese de Moz-Asn-Ile-Gly-OBzl

Concentração de termolisina (10^{-5} M)	Tempo de reação (h)	Rendimento (%)
1,3	3	78
1,3	6	88
0,5	5	88

Condições experimentais: $1,0 \times 10^{-3}$ mol (298 mg) de Moz-Asn-OH, H-Ile-Gly-OBzl.TFA obtido da desproteção com TFA de $1,1 \times 10^{-3}$ mol de Boc-Ile-Gly-OBzl, volume de solução de NaOH 1 M necessário para neutralizar o componente amínico; 20 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M, temperatura: $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

O tripeptídeo obtido nestas reações, recristalizado no sistema clorofórmio/etanol/éter de petróleo, mostrou-se cromatograficamente puro e apresentou as seguintes características:

Análise elementar (%): Calculado: C 60,42; N 10,07; H 6,51

Encontrado: C 60,29; N 9,92; H 6,54

P.F.: $225-230^{\circ}\text{C}$

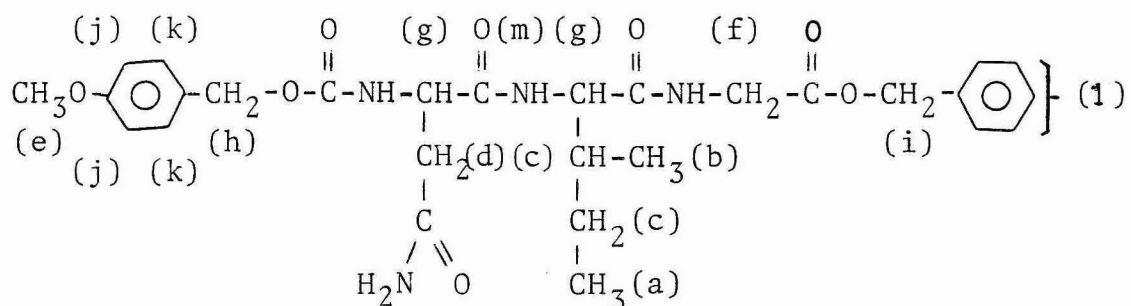
CCD : Rf_A 0,67 ; Rf_B 0,75 ; Rf_C 0,89 .

Análise de aminoácidos: Ácido aspártico: 1,03

Isoleucina: 0,95

Glicina: 1,01

RM^1H (60 MHz, DMSO- d_6 , TMS):



δ (ppm): (a): 0,55-1,02 (m)	(h): 4,90 (s)
(b): 0,55-1,02 (m)	(i): 5,08 (s)
(c): 1,42-1,95 (m)	(j): 6,82 (d); J=8,0 Hz
(d): 2,42 (d)	(k): 7,22 (d); J=8,0 Hz
(e): 3,68 (s)	(l): 7,32 (s)
(f): 3,85 (d); J=6,0 Hz	(m): 8,28 (d)
(g): 3,98-4,60 (m)	

O espectro de RM¹H deste composto encontra-se no item 5 pág.99.

4.2. Síntese de Moz-Asn-Ile-Ala-OBzl

As condições estudadas para a síntese deste composto, realizada conforme o método descrito no item 3.10, página 37 e os respectivos rendimentos obtidos estão expressos na Tabela 24, página 80.

O produto recristalizado no sistema clorofórmio/etanol/éter de petróleo mostrou-se cromatograficamente puro e apresentou as seguintes características:

Análise Elementar: Calculado: C 61,04; N 9,82; H 6,71

Encontrado: C 60,08; N 9,58; H 6,59

P.F.: 219-224°C

CCD : Rf_A 0,60; Rf_B 0,77; Rf_C 0,90

Análise de aminoácidos: Ácido aspártico: 1,01

Isoleucina: 1,03

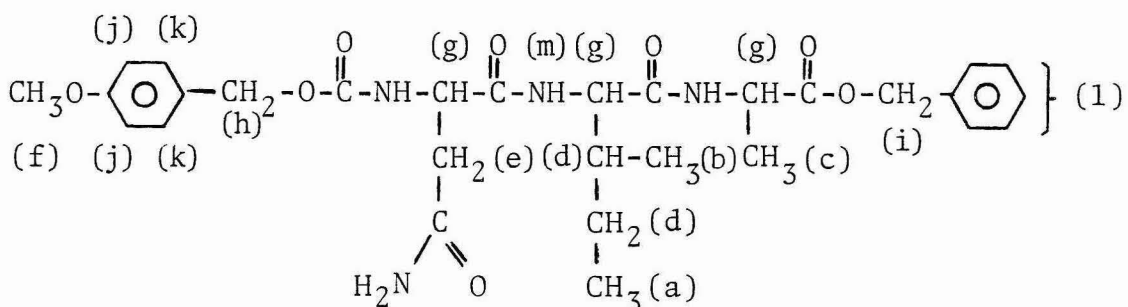
Alanina: 0,96

Tabela 24 - Influência da concentração de enzima e do tempo de reação na síntese de Moz-Asn-Ile-Ala-OBzl

Concentração de enzima (x 10 ⁻⁵ M)	Tempo de reação (h)	Rendimento (%)
1,3	2	93,4
1,3	6	94,5
0,5	5	90,5

Condições experimentais: 1,0 x 10⁻³ mol (298 mg) de Moz-Asn-OH, H-Ile-Ala-OBzl.TFA obtido da desproteção com TFA de 1,1 x 10⁻³ mol de Boc-Ile-Ala-OBzl, volume de solução de NaOH 1 M necessário para neutralizar o componente amínico, 20 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio 5,0 x 10⁻² M; temperatura: 38 ± 1°C.

RM¹H (60 MHz, DMSO-d₆, TMS):



δ (ppm): (a): 0,53-0,97 (m) (h): 4,88 (s)
 (b): 0,53-0,97 (m) (i): 5,03 (s)
 (c): 1,23 (d); J=7,0 Hz (j): 6,78 (d); J=8,0 Hz
 (d): 1,37-1,97 (m) (k): 7,13 (d), J=8,0 Hz
 (e): 2,37 (d) (l): 7,27 (s)
 (f): 3,68 (s) (m): 8,33 (d)
 (g): 3,93-4,53 (m)

O espectro de RM¹H deste tripeptídeo encontra-se no item 5, pág.100.

4.3. Síntese de Moz-Asn-Ile-Leu-OBzl

O rendimento obtido na síntese deste peptídeo, realizada conforme o método descrito no item 3.10, página 37 foi de 88% nas seguintes condições experimentais: $1,0 \times 10^{-3}$ mol (298 mg) de Moz-Asn-OH, H-Ile-Leu-OBzl.TFA obtido da desproteção com TFA de $1,1 \times 10^{-3}$ mol de Boc-Ile-Leu-OBzl, volume de solução de NaOH 1 M necessário para neutralizar o componente amínico, $1,1 \times 10^{-7}$ mol (4 mg) de termolisina, 20 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M, tempo de reação: 5 horas; temperatura: $38 \pm 1^\circ\text{C}$.

O produto recristalizado no sistema acetonitrila/éter de petróleo, mostrou-se cromatograficamente puro e apresentou as seguintes características:

Análise elementar (%): Calculado: C 62,73; N 9,14; H 7,23

Encontrado: C 59,08; N 8,56; H 6,90

P.F.: 214-216°C

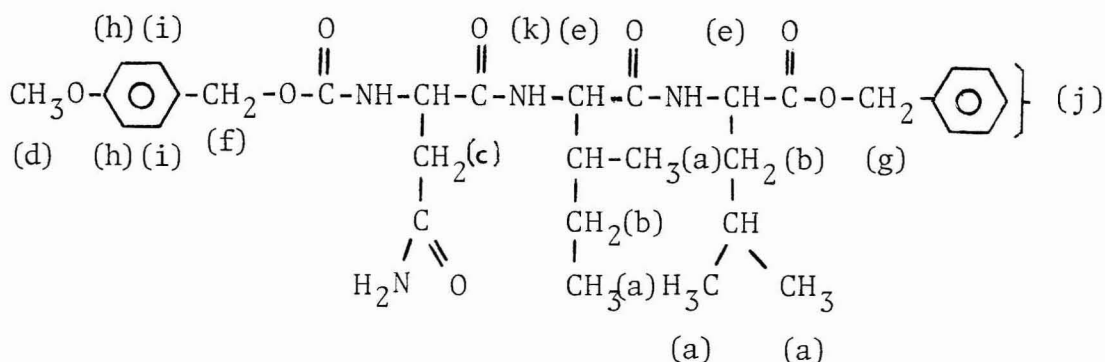
CCD: Rf_A 0,36; Rf_B 0,71; Rf_C 0,87

Análise de aminoácidos: Ácido aspártico: 1,00

Isoleucina: 1,03

Leucina: 0,98

RM^1H (60 MHz, DMSO- d_6 , TMS):



δ (ppm): (a): 0,53-1,03 (m) (g): 5,07 (s)
(b): 1,40-1,72 (m) (h): 6,85 (d); J=8,0 Hz
(c): 2,40 (d) (i): 7,22 (d); J=8,0 Hz
(d): 3,70 (s) (j): 7,30 (s)
(e): 3,90-4,60 (m) (k): 8,28 (d)
(f): 4,92 (s)

O espectro de RM^1H deste peptídeo está mostrado no item 5, página 101.

4.4. Síntese de Moz-Asn-Ile-Phe-OBzl

Os rendimentos encontrados na síntese deste tripeptídeo realizada conforme o método descrito no item 3.10, página 37 utilizando-se as concentrações de $1,3 \times 10^{-5}M$ e $0,5 \times 10^{-5}M$ de termolisina para os tempos de 5 e 6 horas, foram de 89 e 90% respectivamente. As condições experimentais escolhidas foram as seguintes: $1,0 \times 10^{-3}$ mol (298 mg) Moz-Asn-OH, H-Ile-Phe-OBzl.TFA obtido da desproteção com TFA obtido da desproteção com TFA de $1,1 \times 10^{-3}$ mol de Boc-Ile-Phe-OBzl, volume de solução de NaOH 1 M necessário para neutralizar o componente amínico, 20 ml de solução de acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}M$; temperatura: $38 \pm 1^\circ C$.

O tripeptídeo obtido, recristalizado no sistema clorofórmio/etanol/éter de petróleo, mostrou-se cromatograficamente puro e apresentou as seguintes características:
Análise elementar (%): Calculado: C 64,70; N 8,62; H 6,52
Encontrado: C 63,29; N 8,37; H 6,37

P.F.: 194-197°C

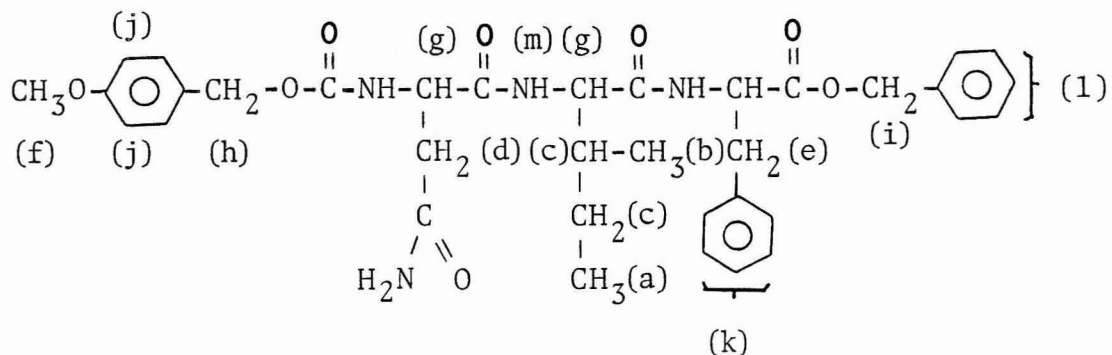
CCD : Rf_A 0,72; Rf_B 0,87; Rf_C 0,94.

Análise de aminoácidos: Ácido aspártico: 1,01

Isoleucina: 0,96

Fenilalanina: 1,03

RM¹H (60 MHz, DMSO-d₆) TMS):



δ (ppm): (a): 0,52-0,93 (m) (h): 4,92 (s)
 (b): 0,52-0,93 (m) (i): 4,98 (s)
 (c): 1,22-1,95 (m) (j): 6,85 (d); J = 8,0 Hz
 (d): 2,38 (d) (k): 7,15 (s)
 (e): 2,98 (d) (1): 7,23 (s)
 (f): 3,68 (s) (m): 8,40 (d)
 (g): 3,93-4,77 (m)

O espectro de RM¹H deste composto encontra-se no item 5, página 102.

Os rendimentos encontrados nas melhores condições de síntese dos tripeptídeos descritos neste item e alguns dados de sua caracterização estão expressos na Tabela 25, página 84.

Os dados de $|\alpha|_D$ calculados para os peptídeos sintetizados não foram relatados devido ao fato das medidas obtidas para um mesmo peptídeo apresentarem um desvio superior ao tolerável.

Tabela 25 - Dados de rendimentos e caracterização dos tripeptídeos sintetizados enzimaticamente

Peptídeo	Rendimento ^a (%)	Ponto de fusão observado (°C)			CCD Rf			Solvente de recristalização	
		A	B	C	A	B	C		
Moz-Asn-Ile-Gly-OBzl	88	235-230	0,67	0,75	0,89	0,67	0,75	0,89	CHCl ₃ /EtOH/EP
Moz-Asn-Ile-Ala-OBzl	95	219-224	0,60	0,77	0,90	0,60	0,77	0,90	CHCl ₃ /EtOH/EP
Moz-Asn-Ile-Leu-OBzl	88	214-216	0,36	0,71	0,87	0,36	0,71	0,87	Acn/EP
Moz-Asn-Ile-Phe-OBzl	89	194-197	0,72	0,87	0,94	0,72	0,87	0,94	CHCl ₃ /EtOH/EP

A, B e C referem-se aos sistemas de solventes empregados para CCD.

a - Os rendimentos indicados foram obtidos nas melhores condições encontradas para a síntese enzimática dos tripeptídeos enumerados.

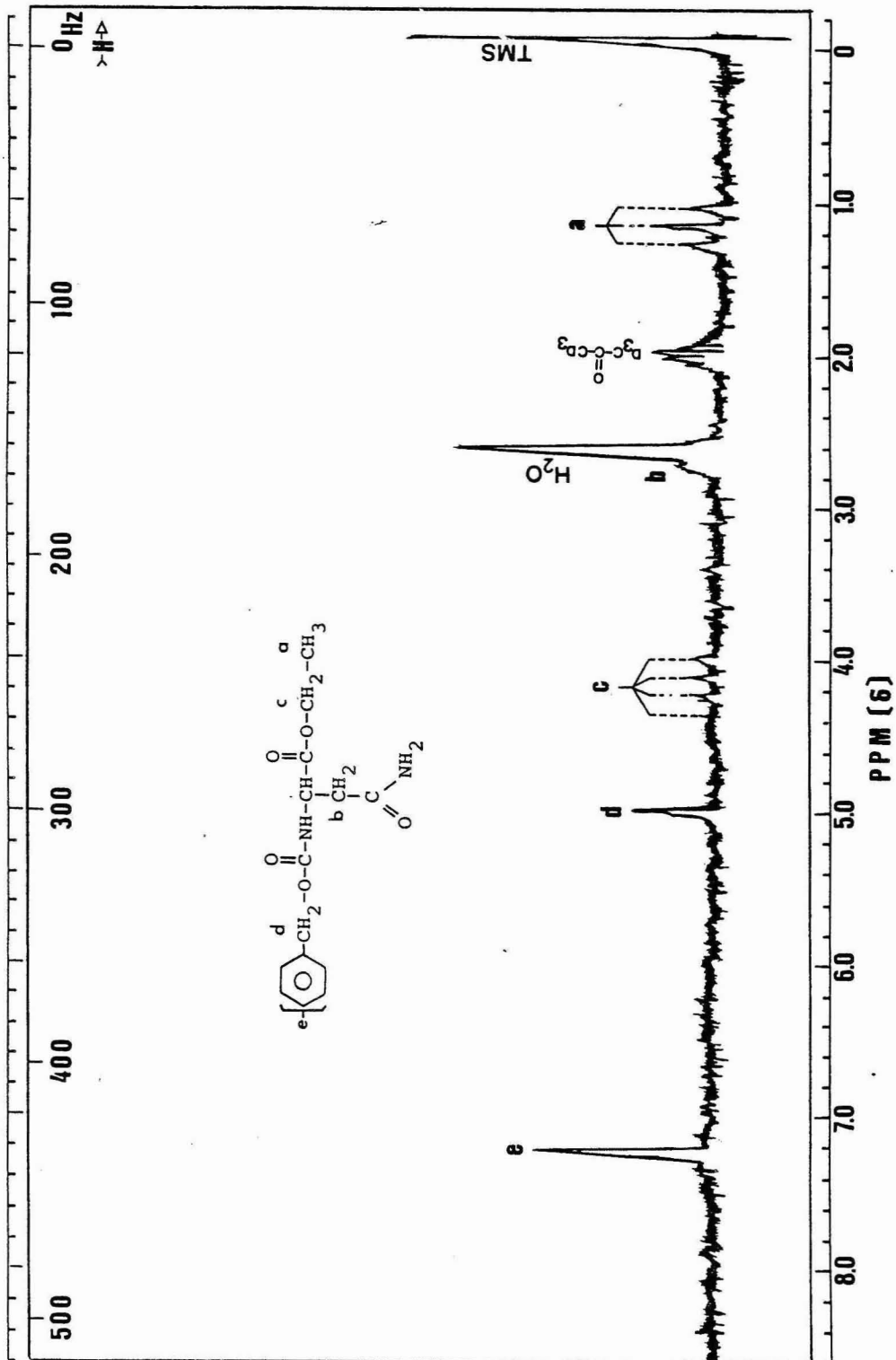


Figura 7 - Espectro de RM^1H de Z-Asn-OEt em CD_3COCD_3 , 60 MHz

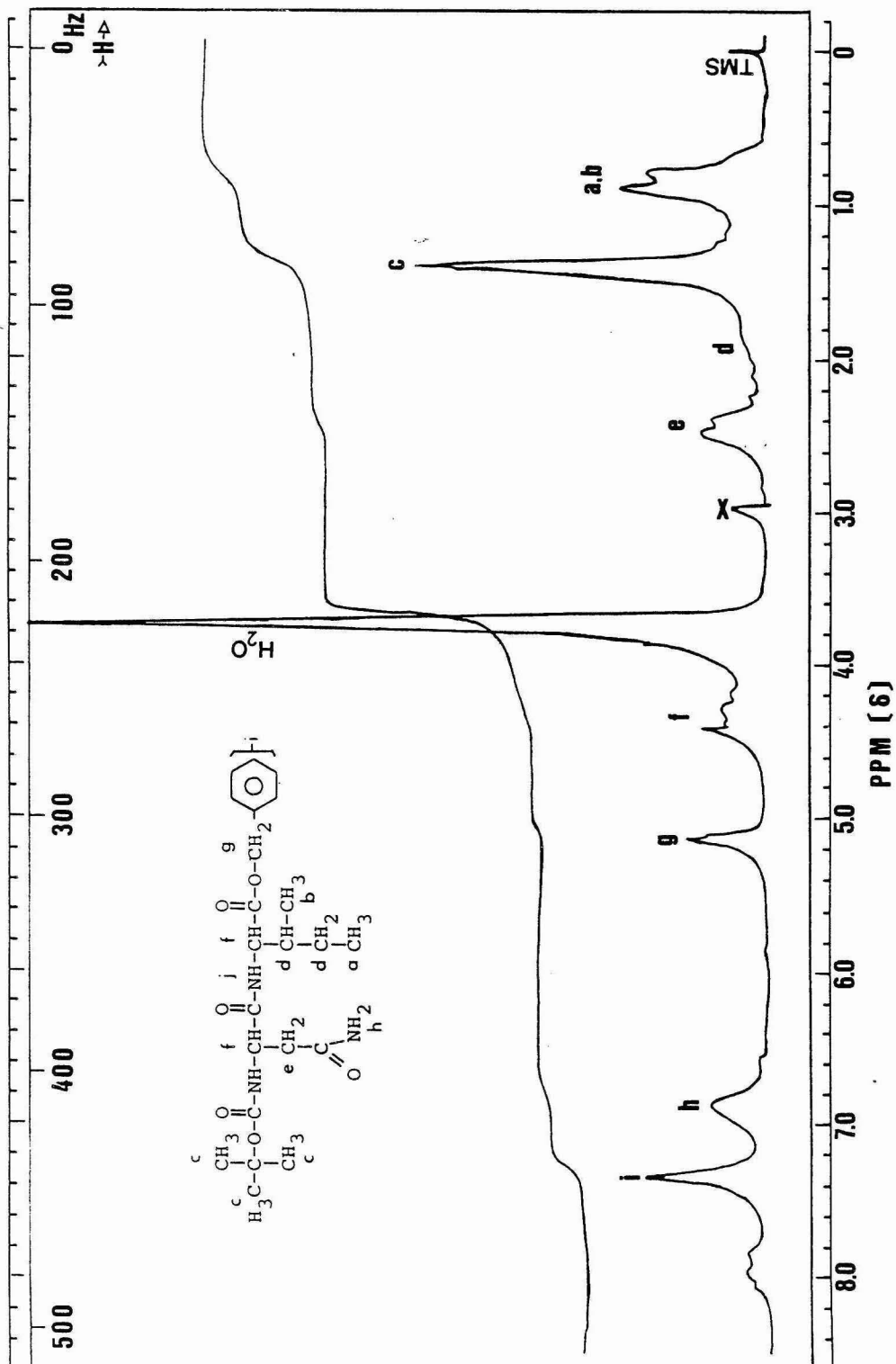


Figura 8 - Espectro de RM^1H de Boc-Asn-Ile-OBzl em DMSO-d_6 , 60 MHz.

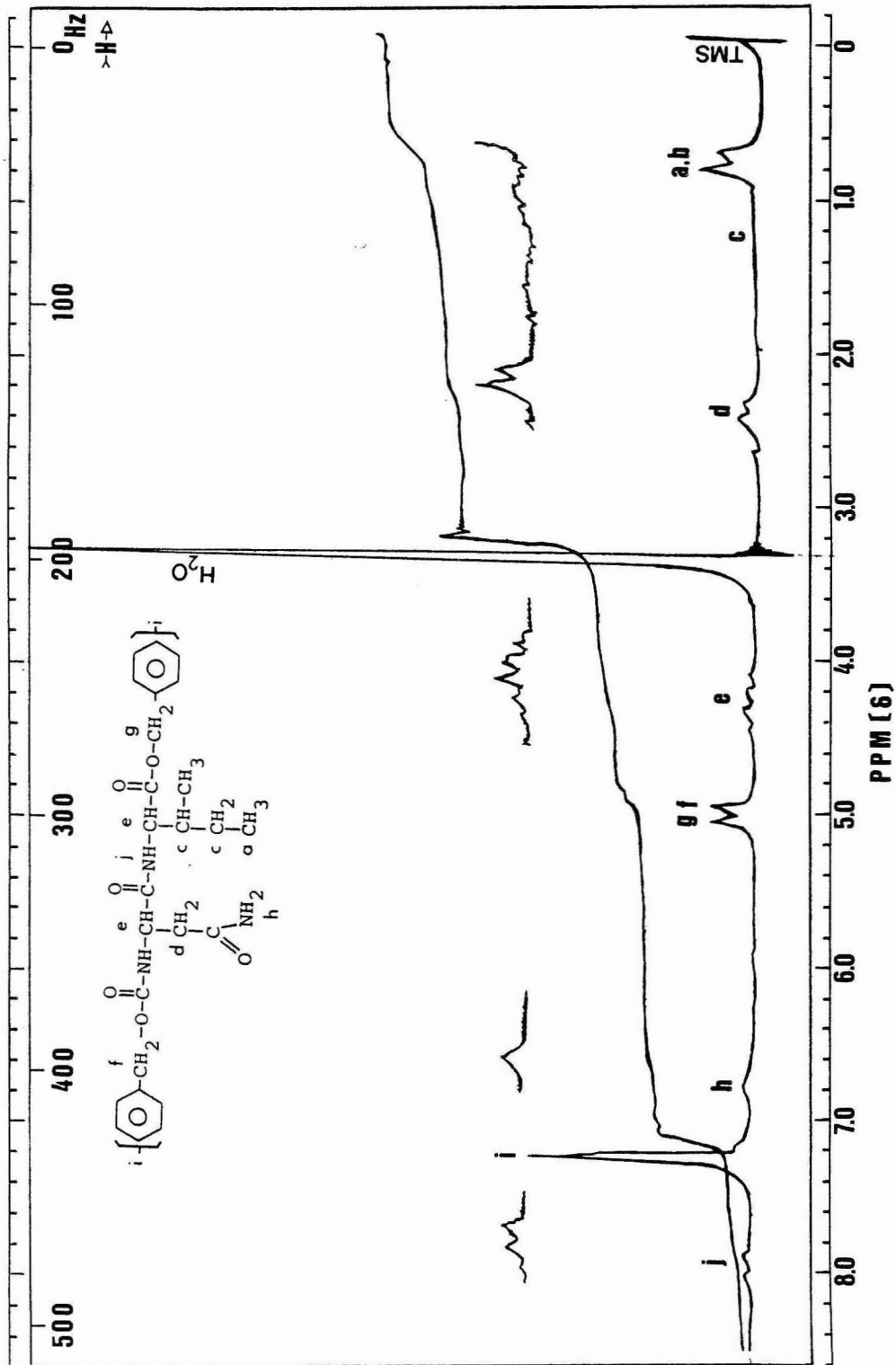


Figura 9 - Espectro de RM^1H de Z-Asn-Ile-OBzl em DMSO-d_6 , 60 MHz.

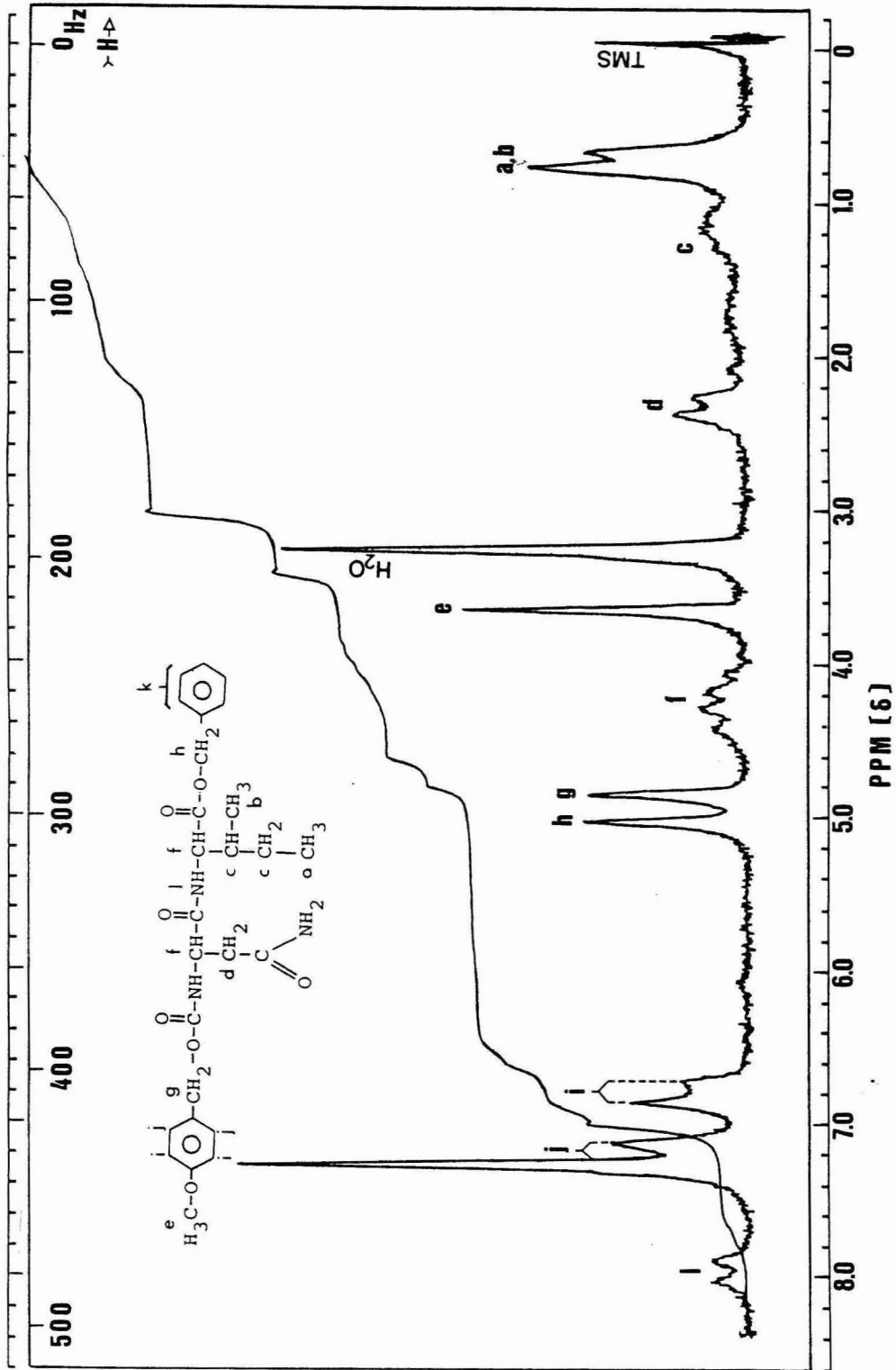


Figura 10 - Espectro de RM^1H de Moz-Asn-Ile-OBzl em DMSO-d_6 , 60 MHz.

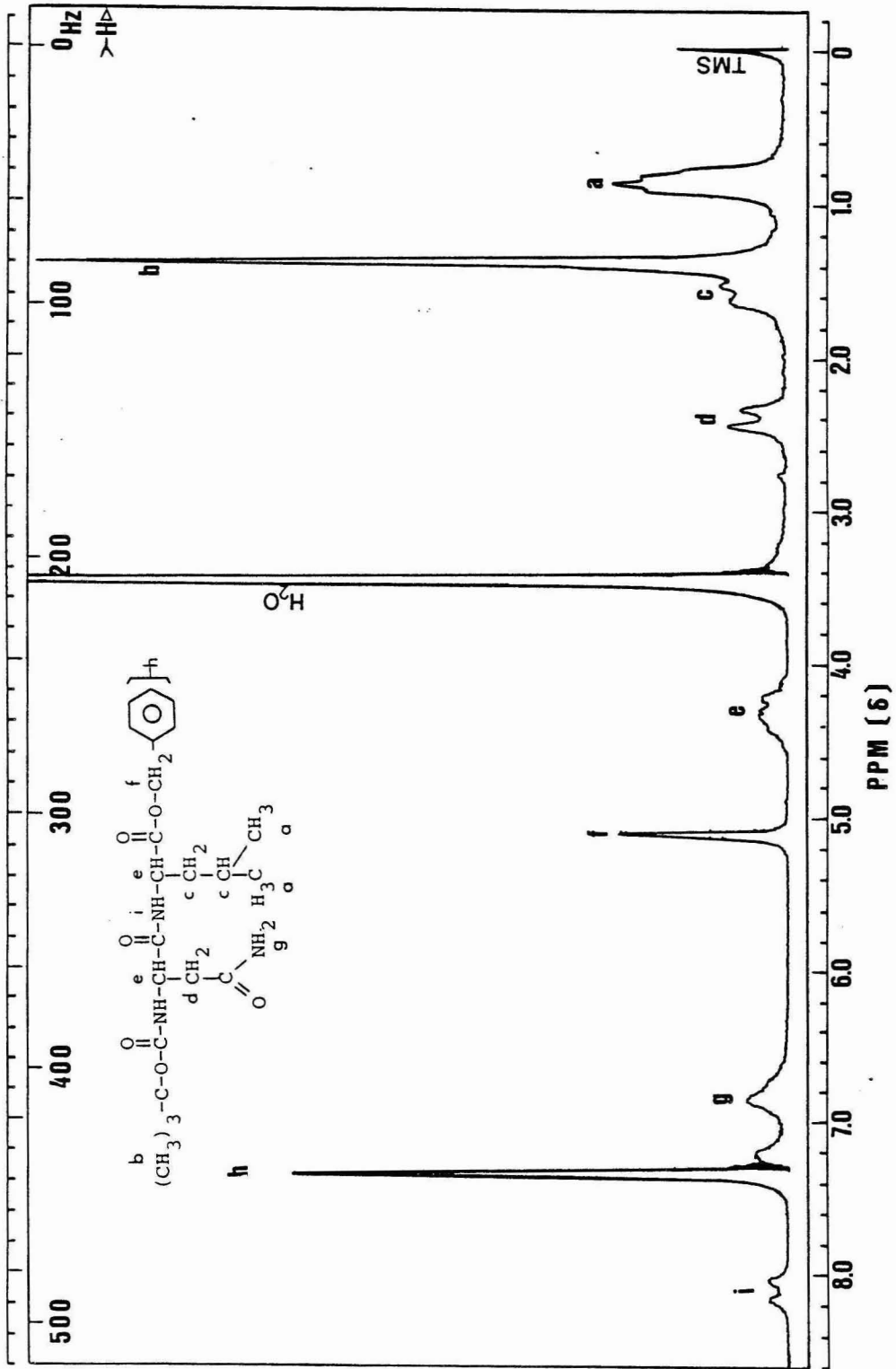


Figura 11 - Espectro de RM^1H de Boc-Asn-Leu-OBzl em DMSO-d_6 , 60 MHz.

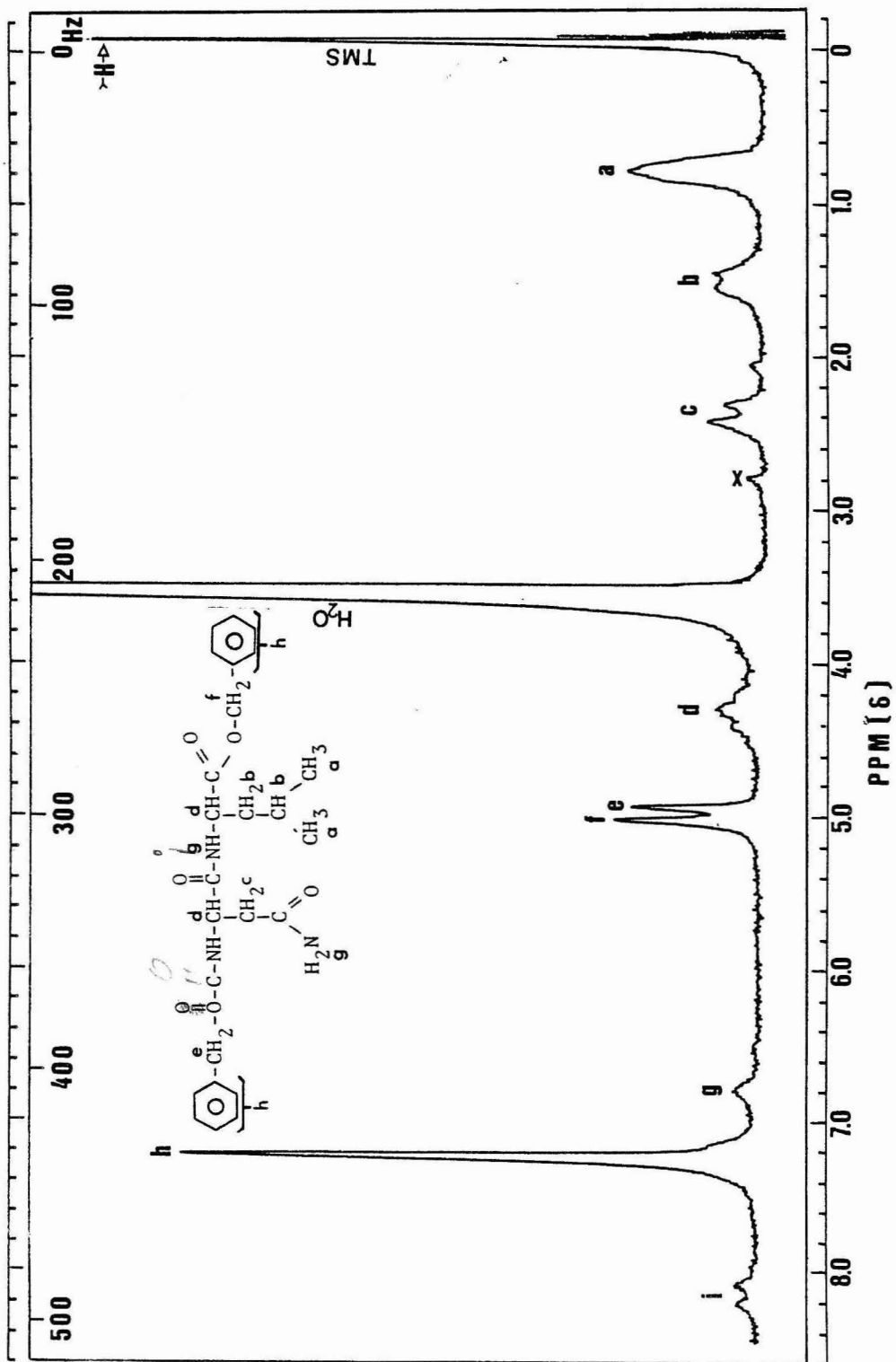


Figura 12 - Esp ctro de RM¹H de Z-Asn-Leu-OBzl em DMSO-d₆, 60 MHz.

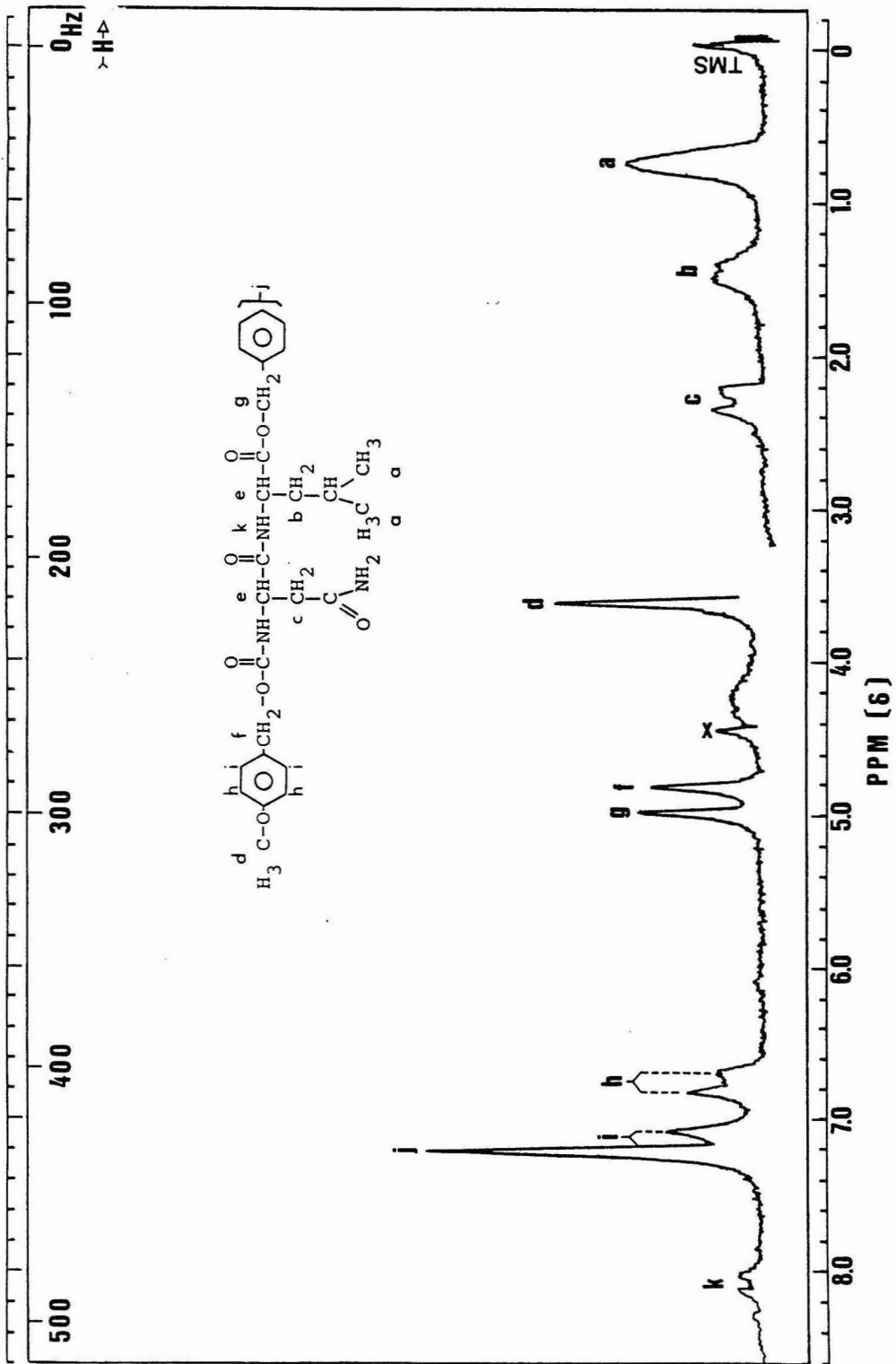


Figura 13 - Espectro de RM¹H de Moz-Asn-Leu-OBzl em DMSO-d₆, 60 MHz.

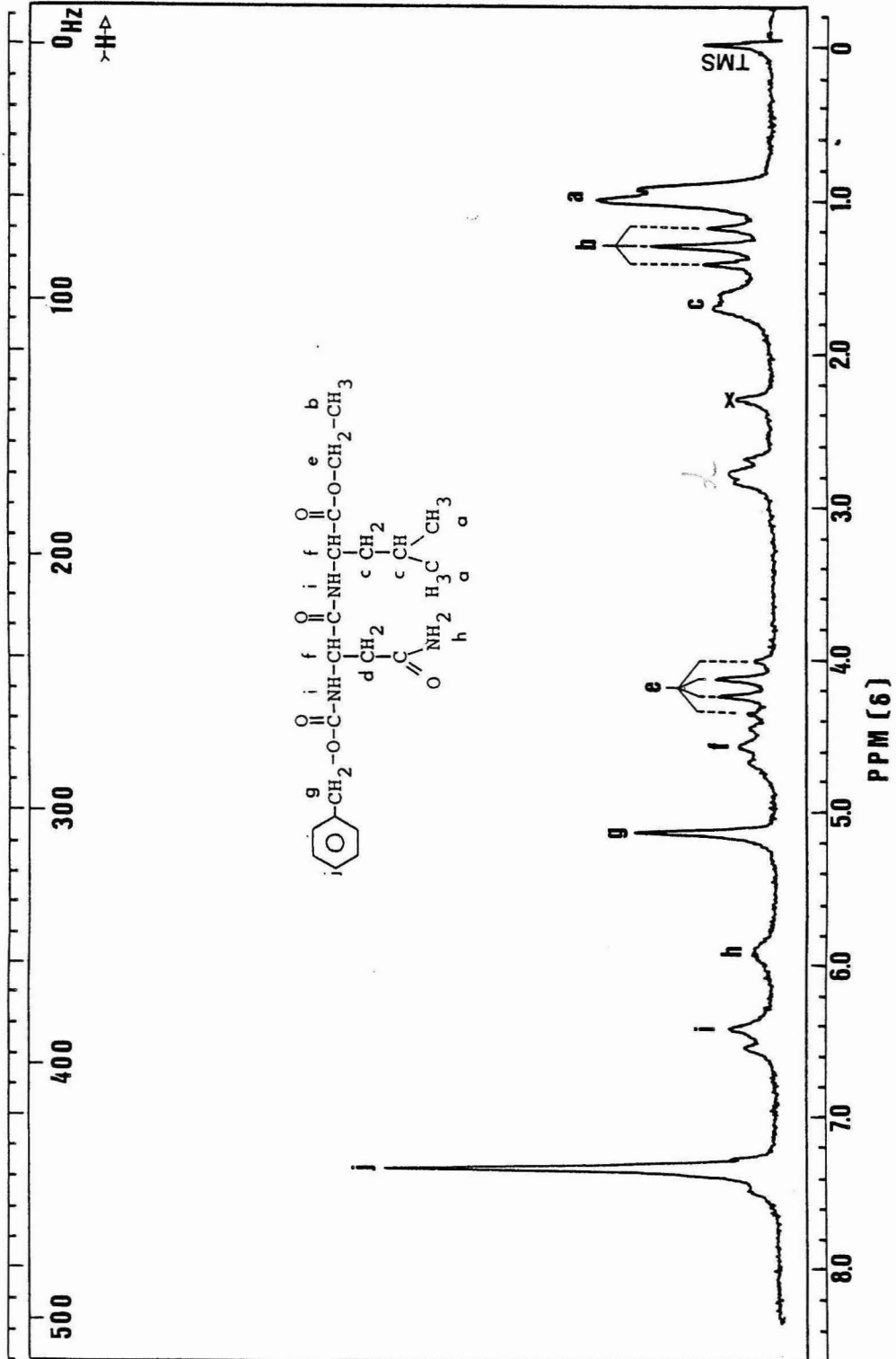


Figura 14 - Espectro de RM¹H de Z-Asn-Leu-OEt em CDCl₃, 60 MHz.

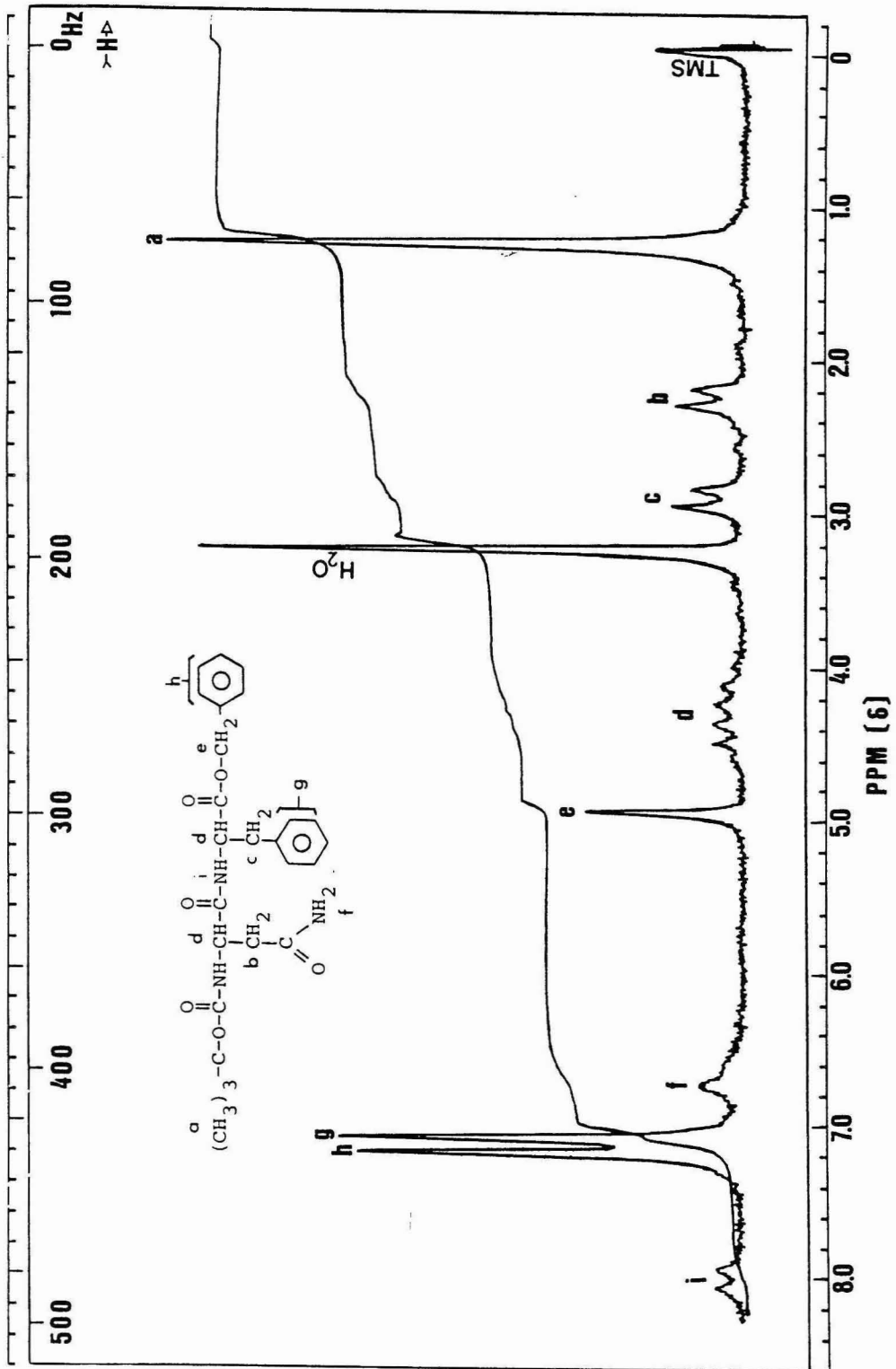


Figura 15 - Espectro de RM^1H de Boc-Asn-Phe-OBzl em DMSO-d_6 , 60 MHz.

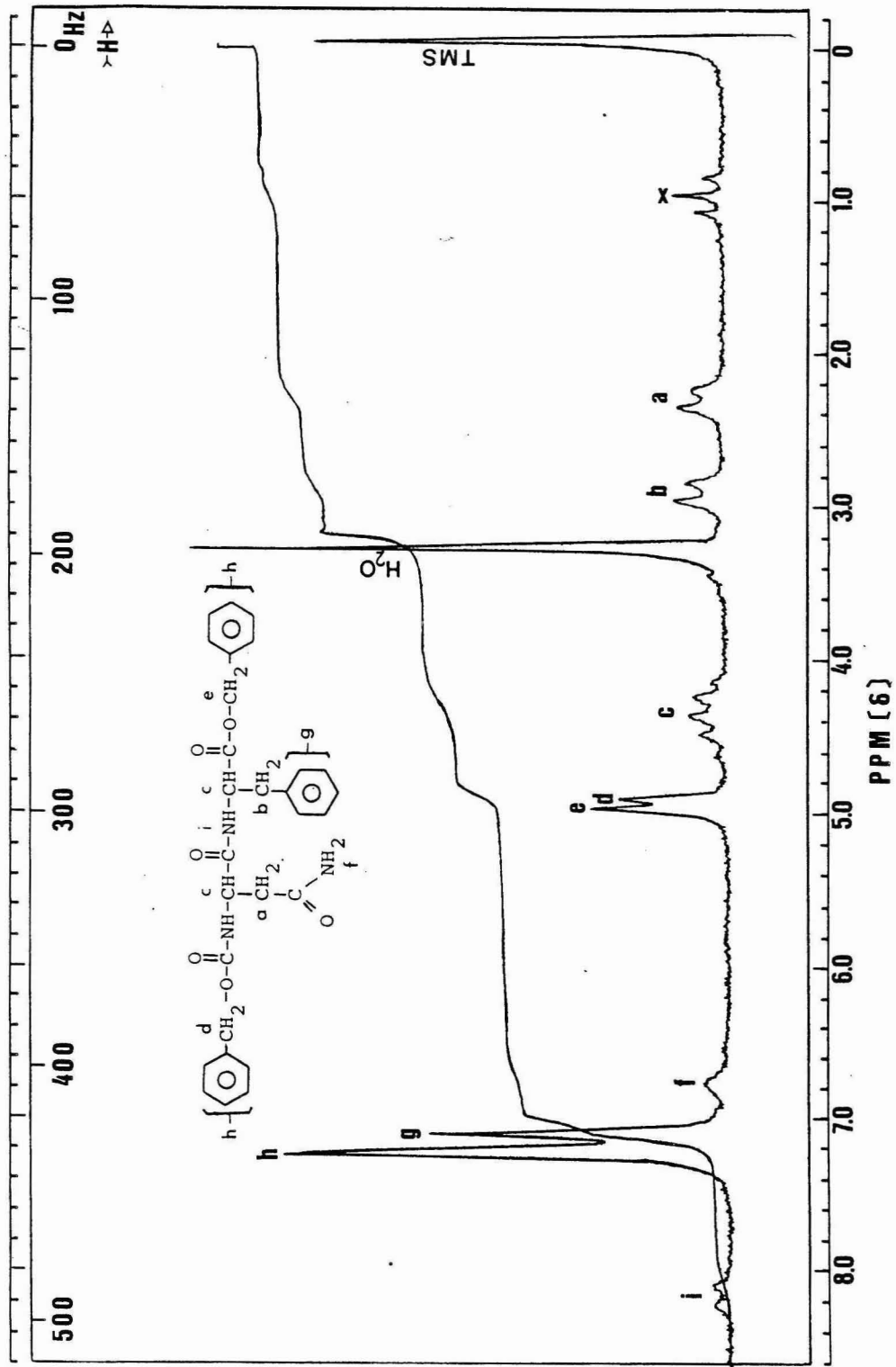


Figura 16 - Espectro de RM^1H de Z-Asn-Phe-OBzl em DMSO-d_6 , 60 MHz.

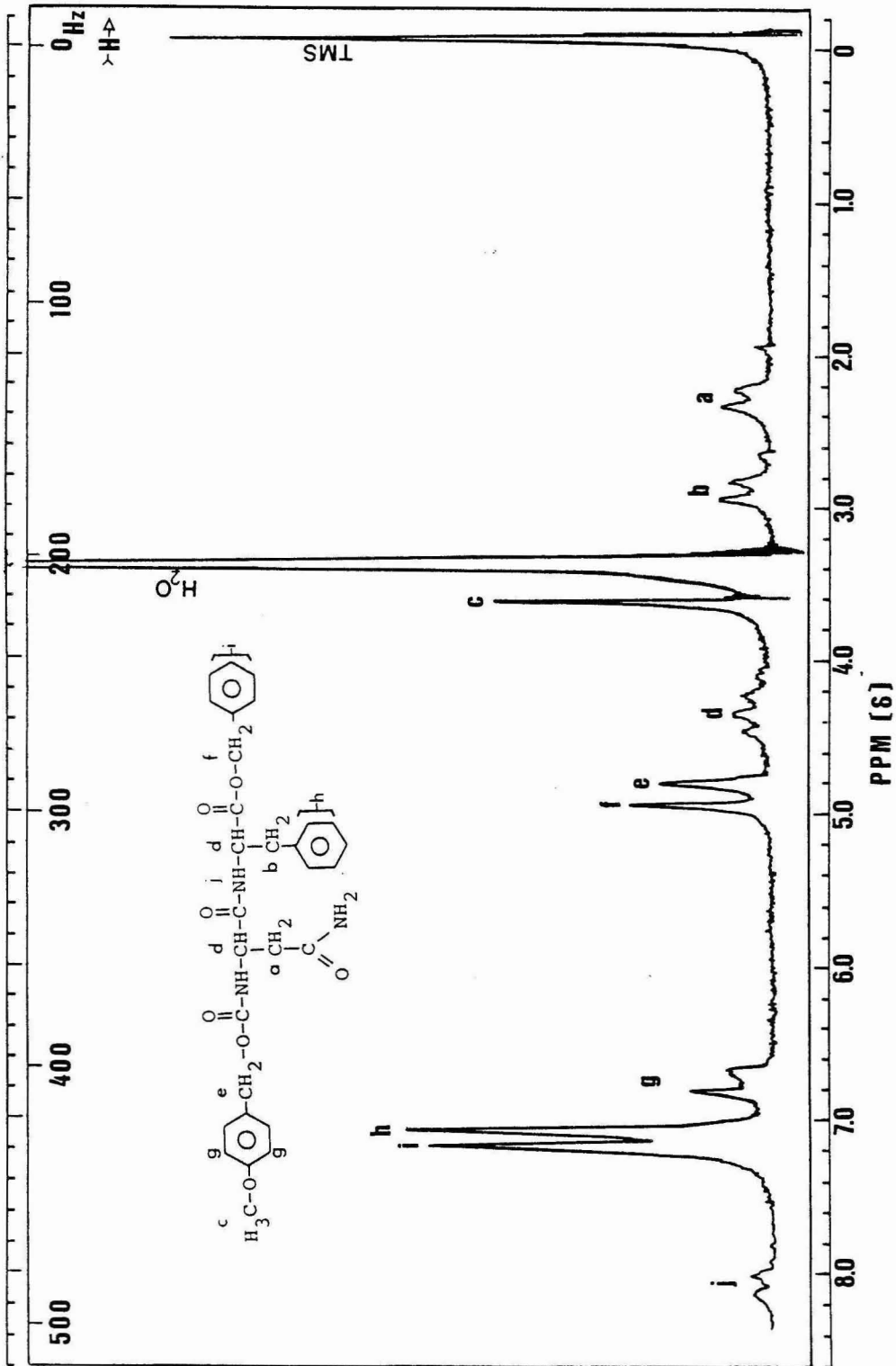


Figura 17 - Espectro de RM¹H de Moz-Asn-Phe-OBzl em DMSO-d₆, 60 MHz.

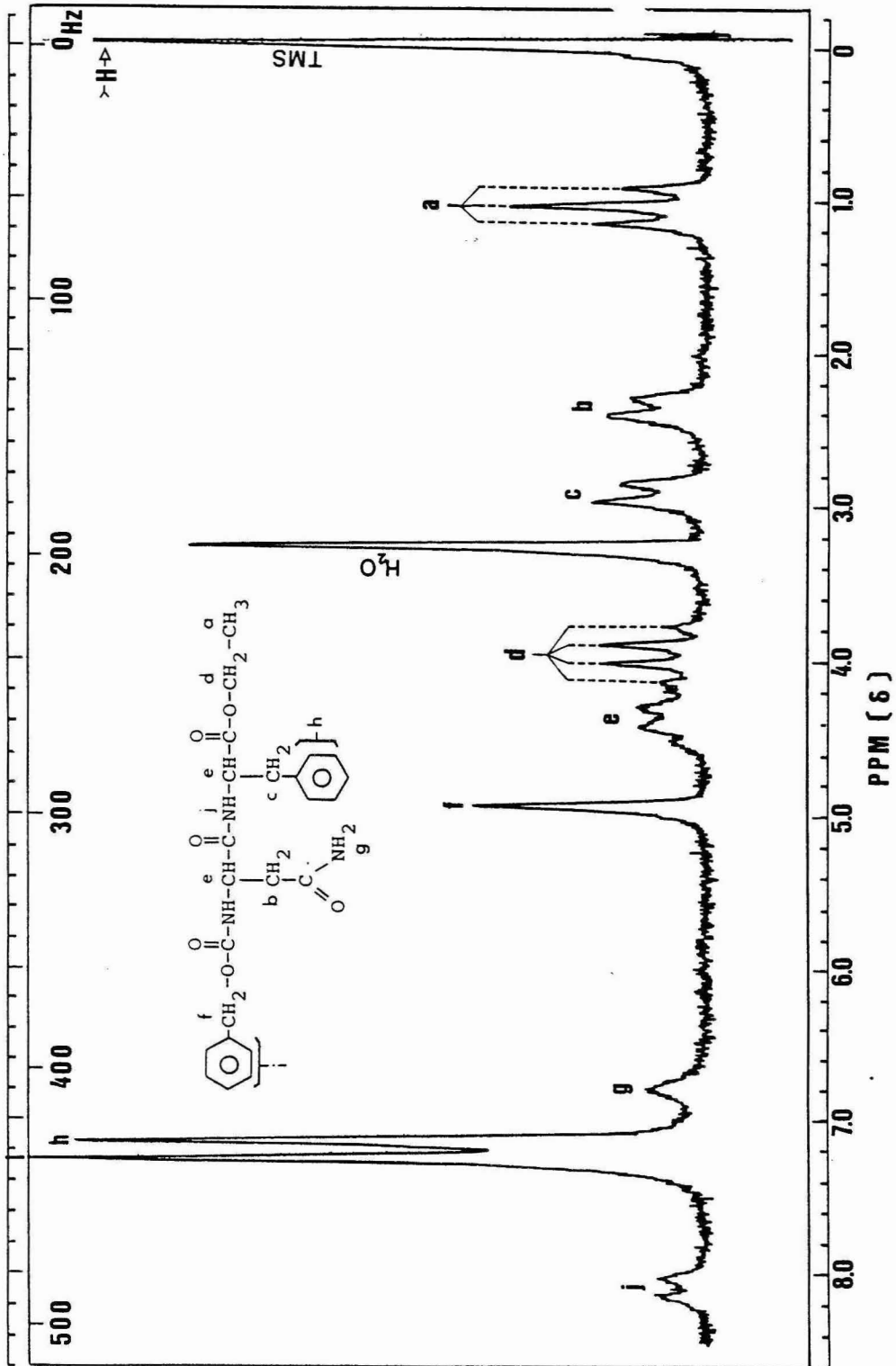


Figura 18 - Espectro de RM¹H de Z-Asn-Phe-OEt em DMSO-d₆, 60 MHz.

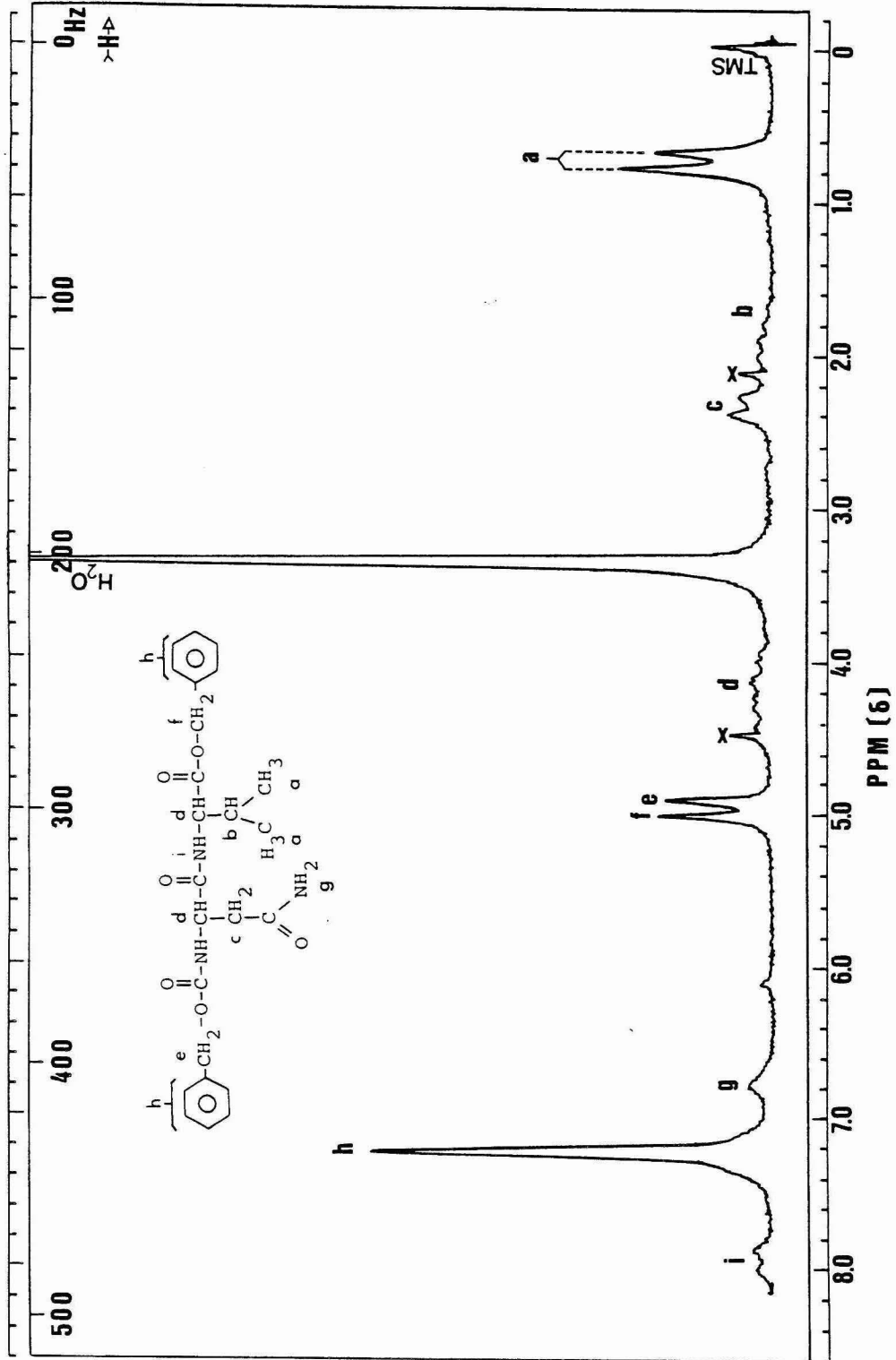


Figura 19 - Espectro de RM¹-H de Z-Asn-Val-OBzl em DMSO-d₆, 60 MHz.

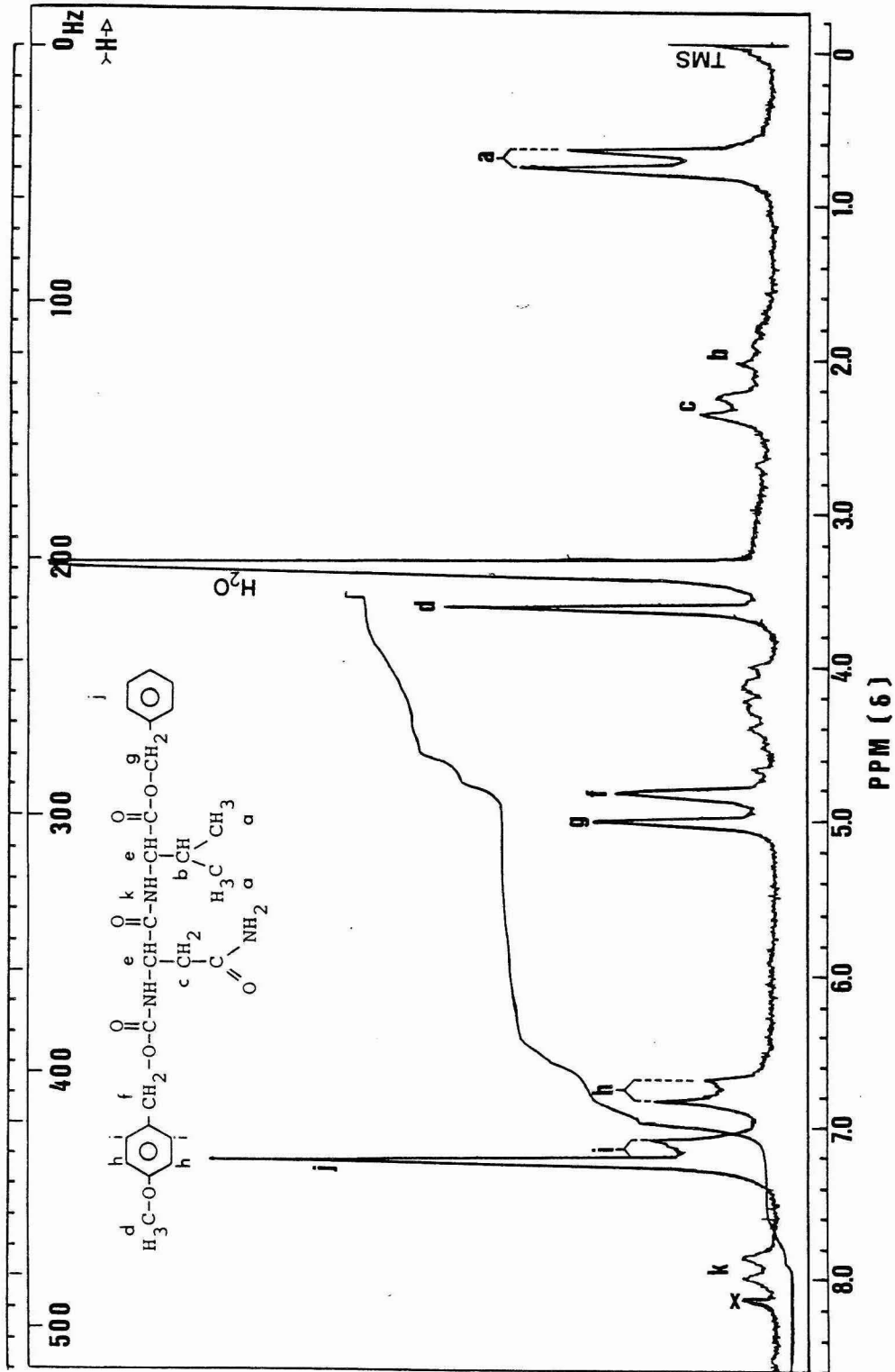


Figura 20 - Espectro de RM¹H de Moz-Asn-Val-OBzl em DMSO-d₆, 60 MHz.

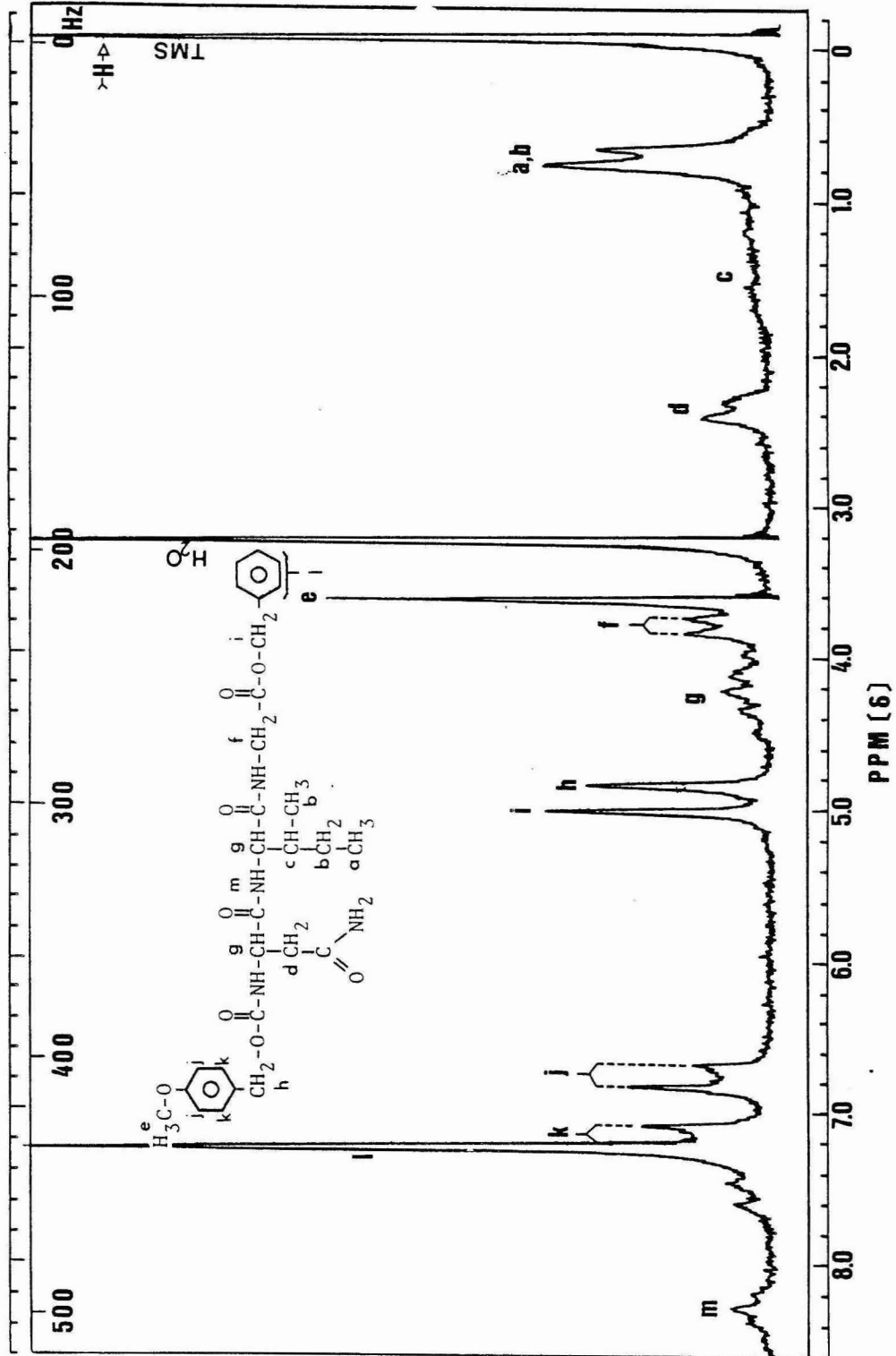


Figura 21 - Espectro de RM¹H de Moz-Asn-Ile-Gly-OBzl em DMSO-d₆, 60 MHz.

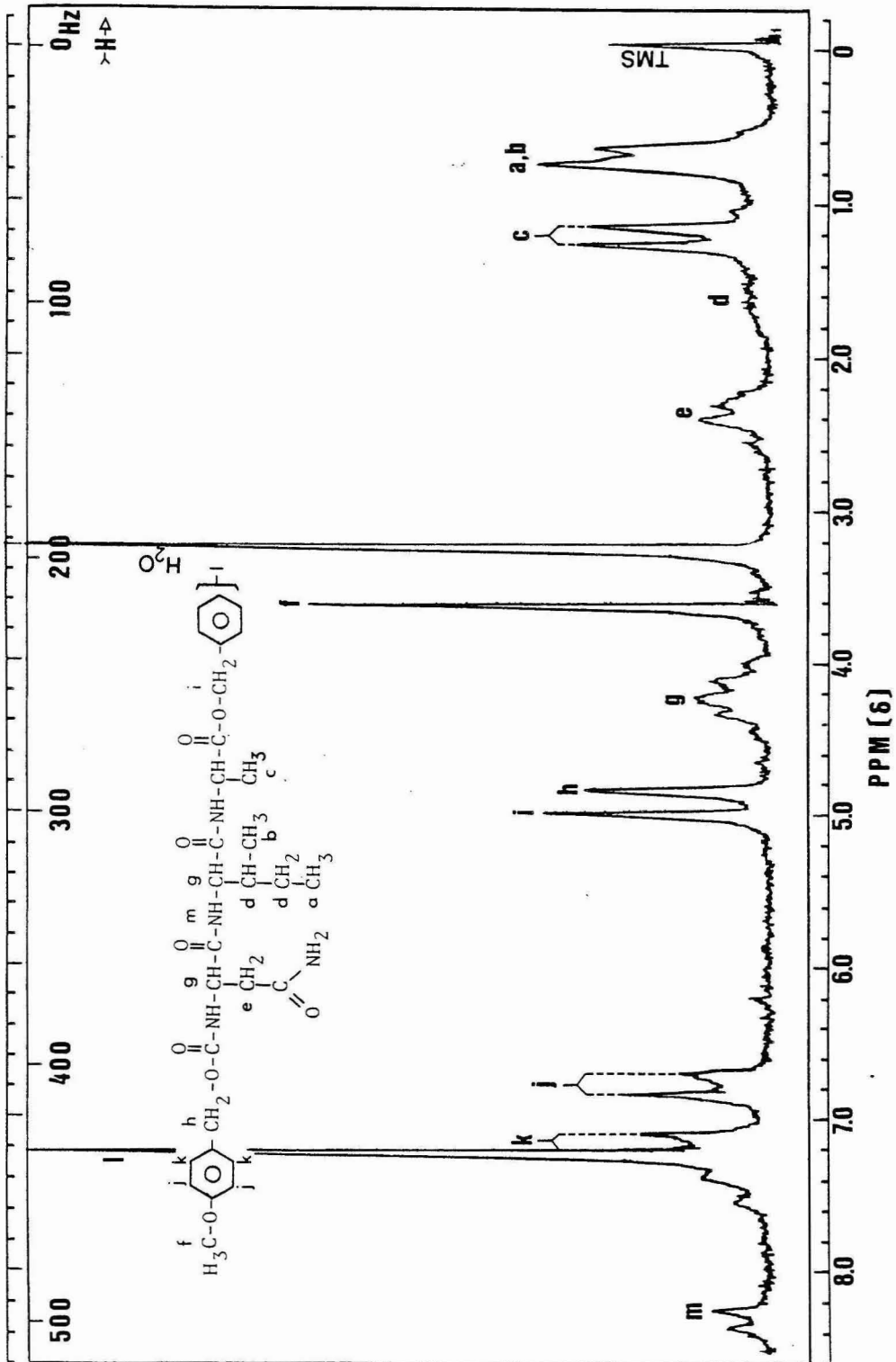


Figura 22 - Espectro de RM¹H de Moz-Asn-Ile-Ala-OBzl em DMSO-d₆, 60 MHz.

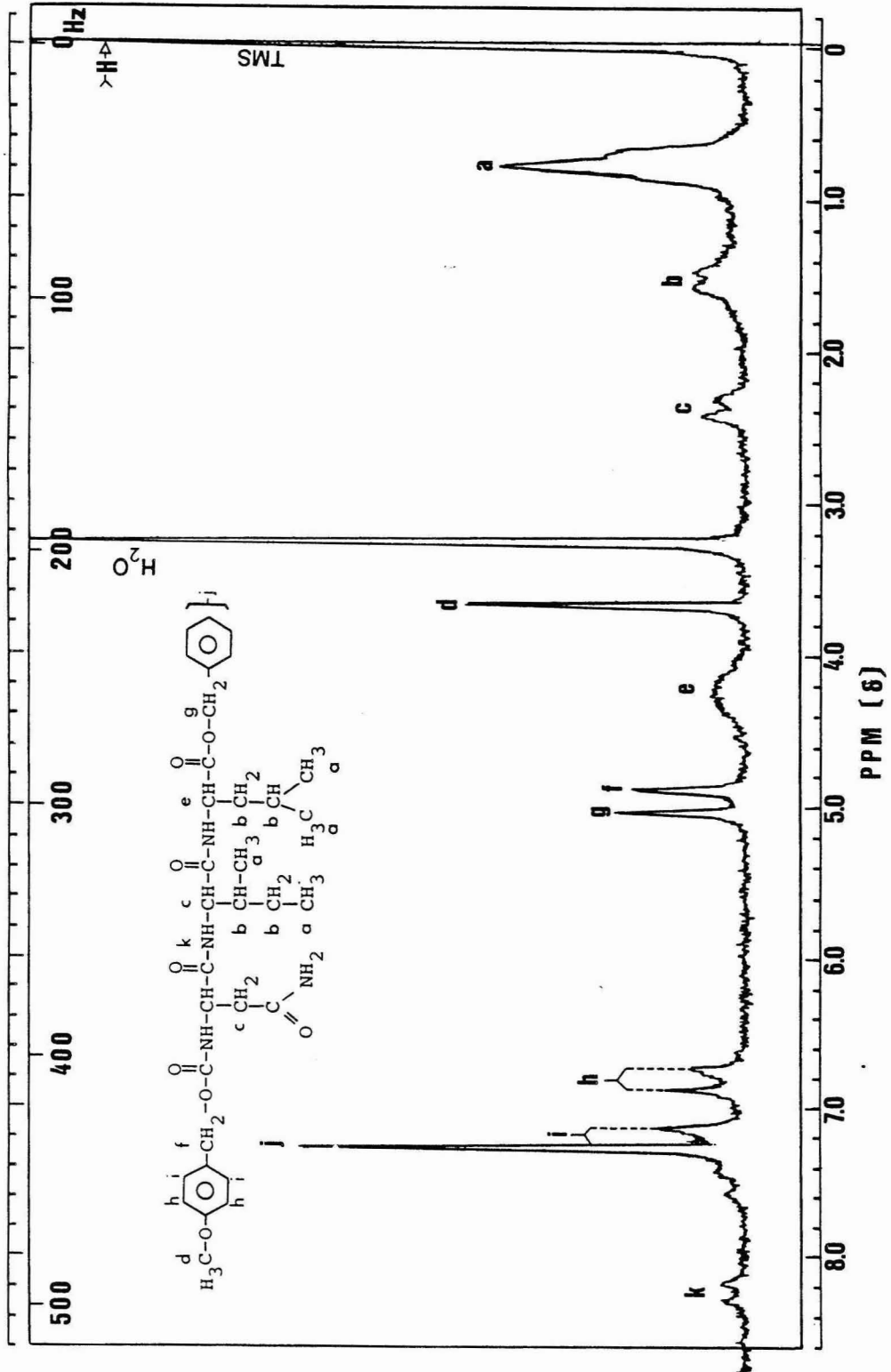


Figura 23 - Espectro de RM¹H de Moz-Asn-Ile-Leu-OBzl em DMSO-d₆, 60 MHz.

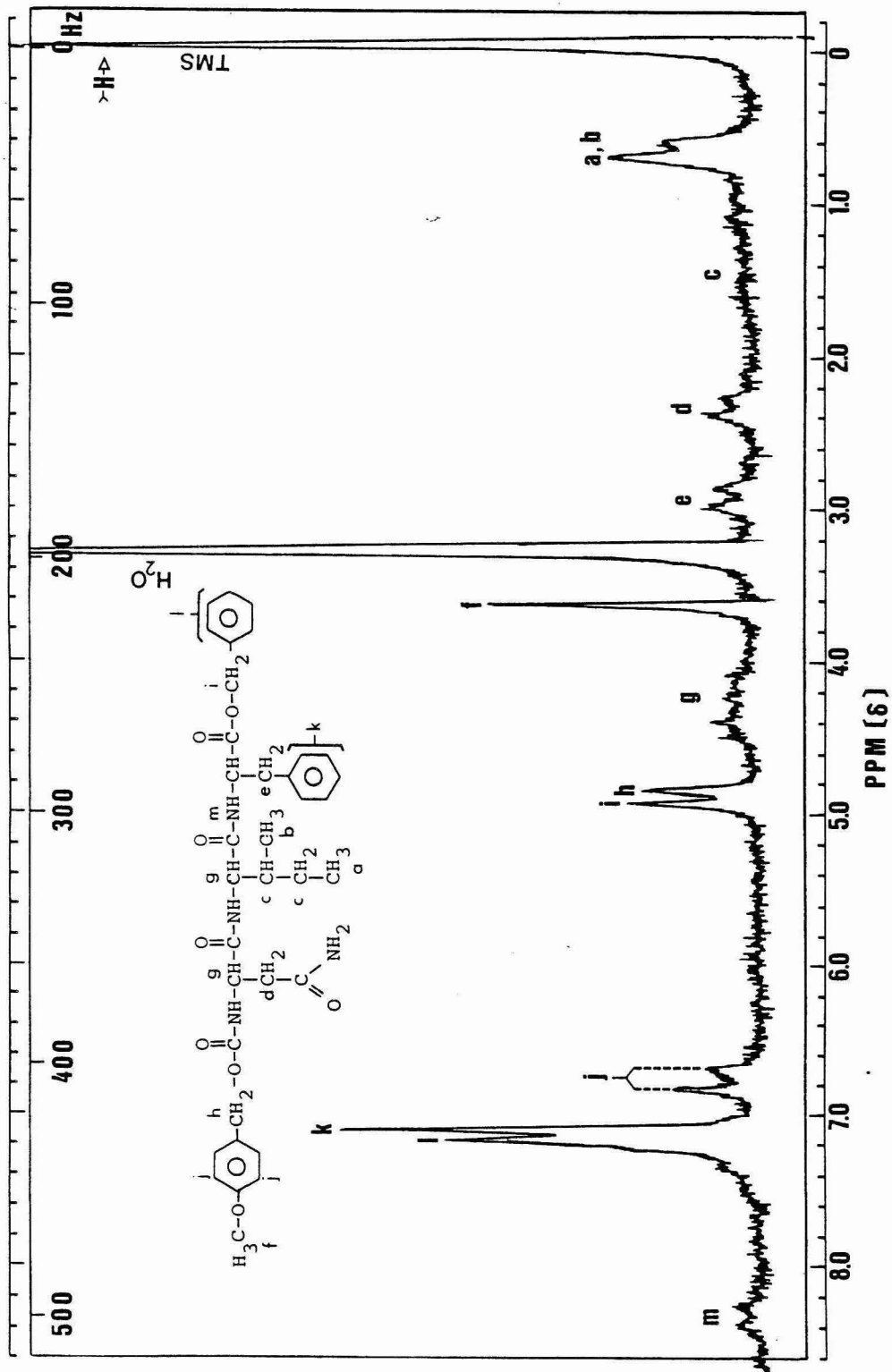


Figura 24 - Espectro de RM^1H de Moz-Asn-Ile-Phe-OBzl em DMSO-d_6 , 60 MHz.

IV. DISCUSSÃO

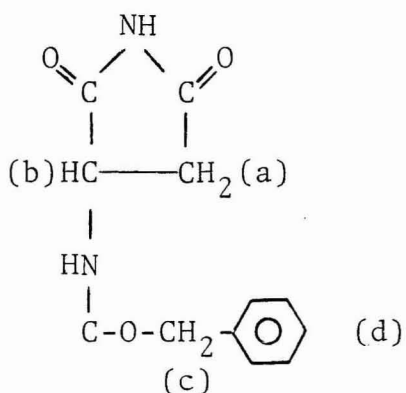
1. Esterificação de N_{α} -benziloxicarbonil-L-asparagina

A esterificação deste derivado de L-asparagina pelo método a, forneceu um produto cujos dados de análise elementar, P.F., Rf, RM^1H , mostrados no item 1.2, página 39, são concordantes com as de Z-Asn-OEt. A presença do grupo éster foi confirmada por espectroscopia no infravermelho. As bandas características foram: 1725 cm^{-1} , 1255 cm^{-1} e 1055 cm^{-1} correspondentes respectivamente a estiramento C=O e C-O-C assimétrico e simétrico, como pode ser observado na Figura 25, página 104. O composto obtido pelo método b, entretanto, apresentou as características de análise elementar, PF e Rf descritas no item 1.2, página 42, que são diferentes das esperadas para Z-Asn-OEt. Em seu espectro de RM^1H não foi detectada a presença do grupo éster, como mostra a Figura 26, página 105. Os deslocamentos químicos observados foram:

RM^1H (60 MHz, CD_3COCD_3 , TMS); δ (ppm): (a): 2,92 (d); $J=7,7$ Hz

(b): 4,57 (q); $J=7,7$ Hz

(c): 7,30 (s)



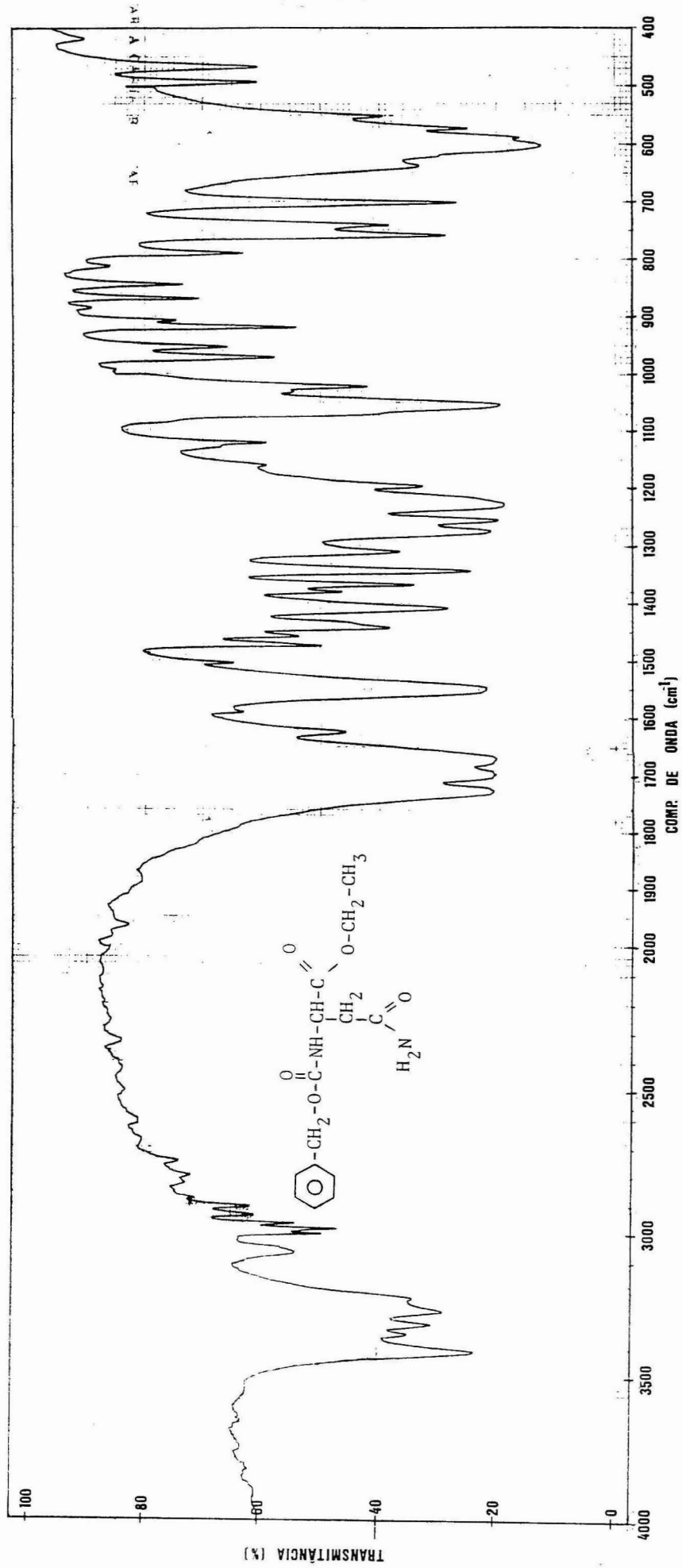


Figura 25 - Espectro na região do infravermelho de Z-Asn-OEt em pastilha de KBr.

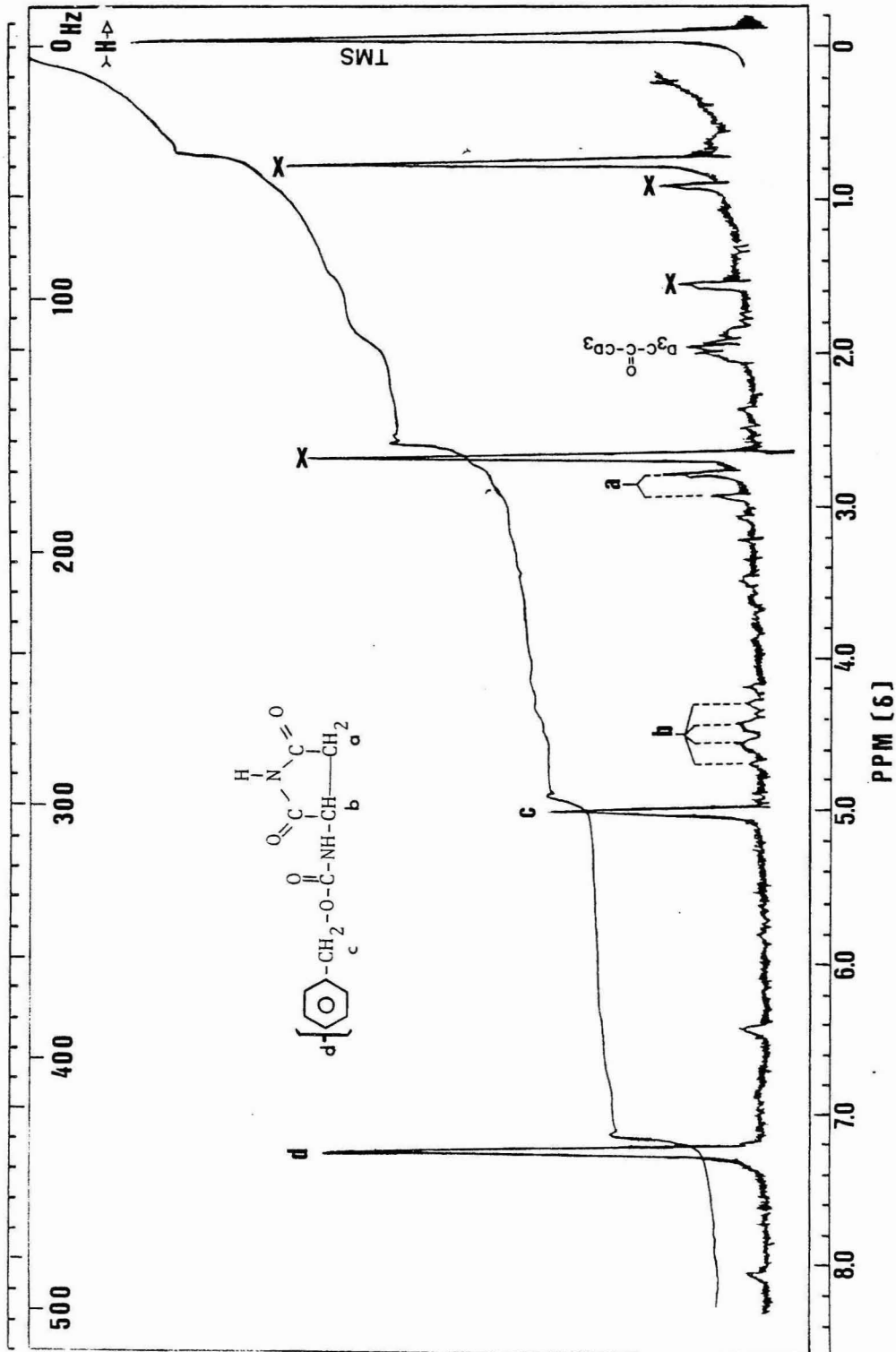


Figura 26 - Espectro de RM¹H de benziloxycarbonyl-L-aminosuccinimida em CD₃COCD₃, 60 MHz.

O espectro no infravermelho (Figura 27, página 107) forneceu bandas em 1785 cm^{-1} devido à vibração assimétrica de C=O e em $1720\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$ devido à vibração simétrica de C=O, características de imida (Nakanishi, 1962). Estes resultados sugerem que o composto obtido por este método é benziloxicarbonil-L-aminosuccinimida. Os valores de microanálise encontrados confirmam esta afirmação, pois estão em perfeita concordância com os cálculos teóricos. Sondheimer e Holley (1954) sintetizaram, através da reação de Z-Asn-OEt e NaOH, este composto que apresentou P.F. $79\text{-}81^{\circ}\text{C}$. Sua análise elementar, entretanto, não foi satisfatória pois a mesma foi realizada com o composto na forma impura. Este fato explica a diferença observada nos valores de PF entre o produto por nós obtido e o sintetizado por eles.

2. Estabilidade de N_{α} -acil-L-asparagina na presença de papaína, α -quimotripsina e termolisina

Durante o estudo da síntese de Boc-Asn-Cys(SBzl)-NH₂ catalisada por papaína (Tominaga e col., 1983) foi verificada a formação de um subproduto. Os resultados de análise elementar e eletroforese sugeriram ser o contaminante um produto resultante da hidrólise da carboxamida do resíduo de asparagina. Com o objetivo de estudar o comportamento de N_{α} -acil-L-asparagina na presença de papaína, α -quimotripsina e termolisina foram realizadas as incubações cujos resultados estão descritos no item 2, página 42.

A análise dos resultados da incubação de Boc-Asn-OH e Z-Asn-OH com papaína sugere a formação de Asp e Asn no meio de reação, resultante da hidrólise da carboxamida da asparagina e dos grupos Boc e Z.

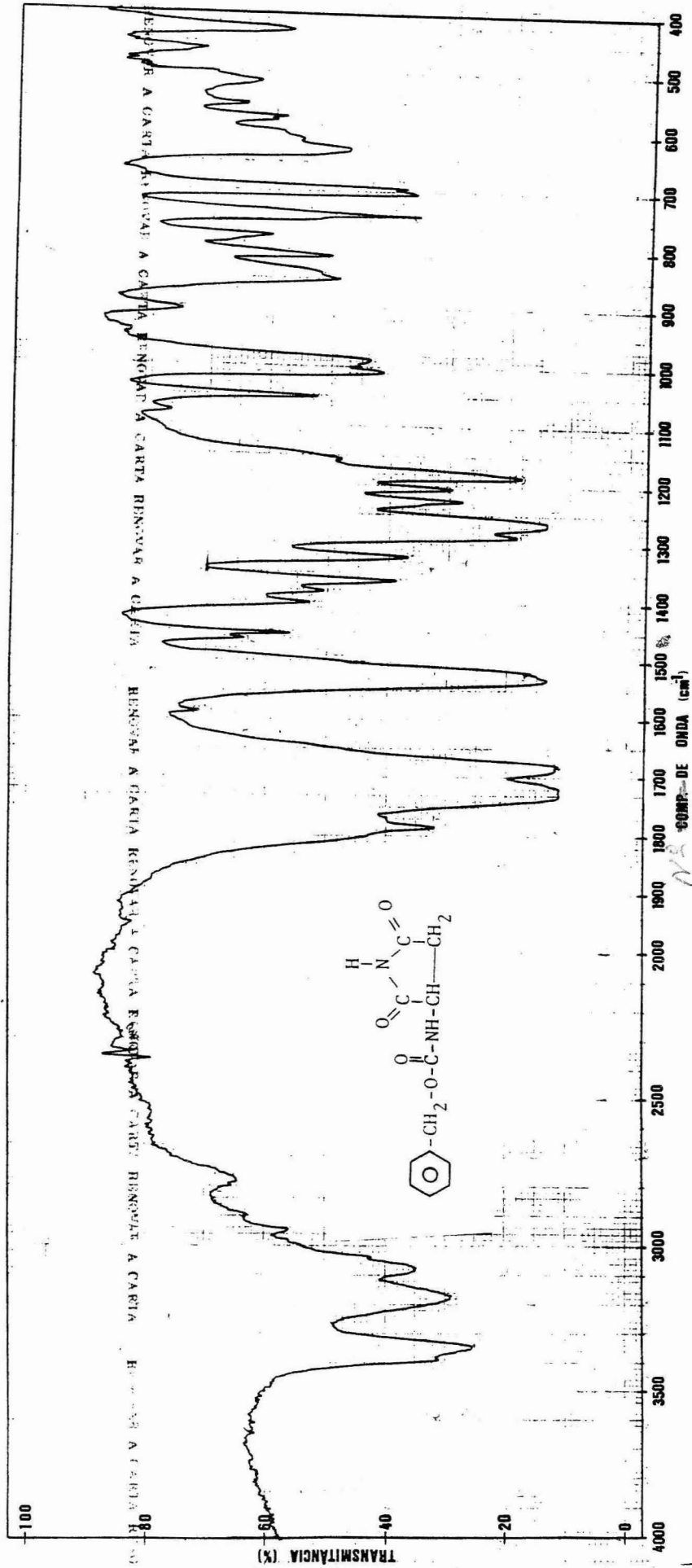


Figura 27 - Espectro na região do infravermelho de benziloxycarbonyl-L-aminosuccinimida em pastilha de KBr.

A incubação do Z-Asn-OEt com α -quimotripsina forneceu os mesmos produtos.

A termolisina foi a única enzima que, quando incubada com N_{α} -acil-L-asparagina, não provocou alterações do substrato. Este fato pode ser atribuído à ausência de atividades esterásica e amidásica características desta protease.

Com base nestes resultados, a termolisina foi escolhida como catalisador das reações de incorporação de N_{α} -acil-L-asparagina a derivados de aminoácidos e peptídeos.

3. Síntese enzimática de di- e tripeptídeos

Para estudar a viabilidade de incorporação de N_{α} -acil-L-asparagina a ésteres de aminoácidos e a peptídeos, mediante a catálise por termolisina, foram sintetizados os seguintes peptídeos: Boc-Asn-Ile-OBzl, Z-Asn-Ile-OBzl, Moz-Asn-Ile-OBzl, Boc-Asn-Leu-OBzl, Z-Asn-Leu-OBzl, Moz-Asn-Leu-OBzl, Boc-Asn-Phe-OBzl, Z-Asn-Phe-OBzl, Moz-Asn-Phe-OBzl, Z-Asn-Val-OBzl, Moz-Asn-Val-OBzl, Moz-Asn-Ile-Gly-OBzl, Moz-Asn-Ile-Ala-OBzl, Moz-Asn-Ile-Leu-OBzl e Moz-Asn-Ile-Phe-OBzl. A escolha dos componentes amínicos, na síntese dos dipeptídeos, foi baseada na especificidade primária desta enzima. A síntese dos tripeptídeos foi realizada visando também o estudo da especificidade secundária da termolisina para o resíduo P_2' , que até o momento, foi pouco estudada.

3.1. Estudo metodológico da síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl

A condição ótima de síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl foi estabelecida após a realização do estudo metodológico, no

qual analisamos a influência do pH, concentração de enzima, concentração e volume da solução de acetato de sódio que foi utilizada como solvente, proporção entre os componentes carboxílico e amínico, temperatura e adição do solvente orgânico ao meio de reação.

O estudo da influência do pH na síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl, Tabela 4, página 45 e Figura 1, página 46 mostrou que o ótimo do pH para a síntese deste dipeptídeo é 6,0. As sínteses que utilizam termolisina como catalisador, entretanto, tem sido realizadas em pH 7,0, 7,5 e 8,0 (Oka e Morihara, 1980; Isowa e Ichikawa, 1979; Kullmann, 1982 e Fruton, 1983). O nosso resultado está de acordo com o mecanismo de ação da termolisina proposto em 1977 por Kester e Matthews (Esquema 3, página 16) no qual os resíduos de His 231 e Glu 143 participam da catálise nas formas protonada e desprotonada, respectivamente. Pangburn e Walsh (1975) determinaram o pKa desta His através de modificação com anidrido etoxifórmico. O valor por eles encontrado foi 7,5. No mesmo trabalho, concluíram que o pKa do Glu 143 é 5,95. Como consequência, o ótimo de pH desta enzima se encontra na faixa intermediária entre estes valores de pKa.

O estudo do efeito do tempo de reação na formação deste dipeptídeo (Tabela 5, página 45 e Figura 2, página 47) mostrou que, nas condições utilizadas, a reação atinge o equilíbrio aparente em 24 horas, já que nenhuma diferença significativa de rendimento foi observada para os tempos de 48 e 72 horas. A utilização do termo equilíbrio-

aparente se explica pelo fato de o produto precipitar no meio de reação.

Nossos resultados obtidos no estudo da influência da concentração de enzima indicaram que a extensão de síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl aumenta em função do aumento da concentração de enzima até $1,27 \times 10^{-5}$ M (Tabela 6, página 48 e Figura 3, página 49). Acima desta concentração o rendimento permanece praticamente inalterado.

Como pode ser observado na Tabela 7, página 48 e Figura 4, página 50, a extensão de síntese deste dipeptídeo se mostrou dependente também da concentração da solução de acetato de sódio. A queda de rendimento, observada a partir de 0,5 M, pode ser explicada em termos da diminuição da solubilidade dos reagentes no meio de reação.

Visando obter informações com relação à influência da concentração dos substratos na porcentagem de síntese, foi realizado o estudo de variação do volume da solução de acetato de sódio, 0,2 M. Os resultados obtidos indicam que o rendimento da reação de síntese diminui paralelamente a diminuição da concentração dos substratos, como mostra a Tabela abaixo:

TABELA 26 - Estudo do efeito da concentração dos reagentes na síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl*

Volume da solução de acetato de sódio 0,2 M	5	10	15	20	25	20 ³	35
Concentração do substrato (10^{-3} M)	200	100	66	50	40	33	29
Rendimento (%)	70	66	63	62	57	50	38

* As condições experimentais estão descritas na Tabela 8, página 51

Estes dados entretanto, não podem ser considerados conclusivos, pois com o aumento do volume de solução de acetato de sódio, ocorreu diminuição concomitante da concentração de enzima.

O estudo do efeito da variação entre os componentes carboxílico e amínico (Tabela 9, página 51) mostra que uma maior porcentagem de síntese pode ser conseguida com o uso da proporção 2:1, para a qual foi obtido um rendimento de 85%. A utilização de proporções 1,0:1,5 e 1:2, entretanto, não produz o mesmo efeito. Este fato pode ser explicado pela diferença de solubilidade entre Boc-Asn-OH e H-Ile-OBzl.Tos, já que o primeiro é bastante solúvel na solução de acetato de sódio e o segundo é de difícil dissolução na mesma. Como consequência, quando a quantidade de Boc-Asn-OH é aumentada no meio reacional, ocorre o deslocamento do equilíbrio da reação para o sentido de formação de ligação peptídica, enquanto que o aumento da quantidade de H-Ile-OBzl.Tos não provoca este efeito, pois permanece praticamente insolúvel no meio de reação.

A influência da temperatura na extensão de síntese foi estudada em duas temperaturas apenas 38 e 48°C, já que o grupo Boc é termosensível. Para 9 horas de reação, foi observada uma diferença razoável entre os rendimentos obtidos, diferença esta que passa a ser insignificante para o tempo de 13 horas, apesar de a reação não ter ainda atingido o equilíbrio (Tabela 10, página 53). Duas hipóteses podem ser levantadas para explicar este fato: 1- decomposição do componente carboxílico devido à quebra da ligação entre o grupo Boc e L-asparagina. 2- Denaturação da

enzima devido ao aquecimento prolongado (13 horas). Para estudar a termoestabilidade da enzima nas condições de reação utilizadas foi realizado o estudo do acoplamento de Z-Asn-OH e H-Ile-OBzl.Tos, em várias temperaturas. A escolha deste grupo protetor de N_α-aminogruppo foi baseada no fato de o mesmo ser mais estável que o Boc. O estudo realizado mostrou que os rendimentos de reação em 3 horas são significativamente maiores do que os obtidos para 1 hora de incubação (Tabela 15, página 57), sugerindo que a termolisina mantém, mesmo que parcialmente, sua atividade após 1 hora de incubação a temperaturas superiores a 50°C. Em relação aos rendimentos obtidos, para 1 hora de reação as diferenças são significativas e o aumento da temperatura provoca o aumento da porcentagem de síntese. Para 3 horas, entretanto, os rendimentos obtidos ficaram em torno de 80%, sem diferenças significativas, mostrando que a reação atingiu o equilíbrio. Do ponto de vista de estratégia de síntese, os resultados acima indicam que o grupo Z, além da sua termoestabilidade, apresentou-se como um grupo protetor de L-asparagina mais adequado do que Boc, já que os rendimentos obtidos foram maiores em menor tempo de reação.

Como já foi discutido anteriormente, a utilização da proporção 1:2 entre os componentes na síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl, não produziu aumento no rendimento da reação em relação ao obtido na proporção 1:1, devido ao fato de o componente amínico ser pouco solúvel em solução de acetato de sódio 0,2 M. Visando dissolver o H-Ile-OBzl.Tos, foi realizado o estudo da adição de solventes orgânicos ao meio.

de reação. Na presença de acetato de etila foi observada uma maior porcentagem de acoplamento (Tabela 11, página 54). Na presença de metanol, entretanto, ocorreu a diminuição do rendimento da reação que pode ser explicado pelo fato de o produto formado ser bastante solúvel neste solvente. Por outro lado, o aumento do rendimento na presença de acetato de etila pode ser atribuído ao aumento da solubilidade do componente amínico no meio de reação e ao fato de o produto formado ser muito pouco solúvel neste solvente. A influência do mesmo no pK de Boc-Asn-OH deve ser descartado, pois o volume adicionado corresponde a apenas 5% do volume total da solução.

Os resultados acima discutidos indicam que a condição ótima de síntese de dipeptídeo Boc-Asn-Ile-OBzl é: Boc-Asn-OH, $9,5 \times 10^{-2}$ M; H-Ile-OBzl $4,7 \times 10^{-2}$ M; termolisina, $1,3 \times 10^{-7}$ M; solvente: acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio 5×10^{-2} M; tempo de reação: 48 horas; temperatura 38°C.

3.2. Análise comparativa dos resultados obtidos na síntese de di- e tripeptídeos

Com o intuito de escolher um grupo protetor que permitisse o acoplamento entre N_{α} -acil-L-asparagina e H-Ile-OBzl. Tos em maior extensão, realizamos a síntese de dipeptídeos protegidos com os grupos Boc, Z e Moz, sob as mesmas condições experimentais. Nossos resultados indicaram que os acoplamentos entre Z-Asn-OH ou Moz-Asn-OH e H-Ile-OBzl. Tos, forneceram produtos com rendimentos superiores aos obtidos quando foi utilizado o Boc (Tabela 12, página na

55). A possibilidade de sintetizar com bons rendimentos peptídeos protegidos com Z, Moz e Boc é importante do ponto de vista de estratégia de síntese, pois estes grupos apresentam diferentes comportamentos em relação às reações de desproteção. Por exemplo, o Boc e Moz podem ser facilmente removidos pelo ácido trifluoroacético enquanto que Z não. Por outro lado, os grupos Z e Moz podem ser removidos por hidrogenação catalítica.

Os resultados do estudo comparativo dos acoplamentos entre Boc-Asn-OH com H-Ile-OBzl, H-Leu-OBzl e H-Phe-OBzl, expressos na Tabela 13, página 56, mostram que a síntese de dipeptídeo Boc-Asn-Leu-OBzl, nas condições estudadas, apresentou rendimento menor em relação ao de Boc-Asn-Ile-OBzl e Boc-Asn-Phe-OBzl. Durante a dissolução dos substratos para a realização deste estudo, foi observado que a maior parte de H-Leu-OBzl.Tos permaneceu insolúvel. Para contornar este problema foram feitas sínteses deste dipeptídeo na presença de etanol e da mistura constituída por etanol e dimetilformamida. Os rendimentos obtidos ficaram em torno de 10%, como mostra a Tabela 17, página 61. Isowa e col. (1982) observaram a ocorrência de extensa síntese de Z-Ala-Phe-OBzl catalisada por papaína, quando a proporção solvente orgânico-água variava na faixa de 20:80 até 80:20. Devido ao fato das proporções solvente orgânico-água nas reações de síntese de Boc-Asn-Leu-OBzl se encontrarem nesta faixa, os rendimentos obtidos deveriam ser maiores.

Como os acoplamentos entre Z e Moz-Asn-OH com H-Ile-OBzl foram bem sucedidos realizamos as sínteses de Z-Asn-Leu-OBzl e Moz-Asn-Leu-OBzl, segundo as condições des-

critas nos itens 3.8, página 63 e 3.9, página 64. Excelentes resultados foram observados nestas reações, pois Z-Asn-Leu-OBzl e Moz-Asn-Leu-OBzl foram obtidos com rendimentos de 79 e 80%, respectivamente. Quando a síntese do último foi realizada utilizando-se a proporção 2:1 entre os componentes carboxílico e amínico, o rendimento da reação foi de 94%. Estes dados são concordantes com os obtidos por Oka e Morihara (1980) que utilizaram H-Leu-NH₂, H-Leu-OBu^t e H-Leu-NHPh nos acoplamentos com Z-Phe-OH obtendo os peptídeos com rendimentos superiores a 80%.

Os mesmos estudos realizados no acoplamento entre N_α-acil-L-asparagina e H-Leu-OBzl foram feitos para H-Phe-OBzl. A adição de etanol ou de dimetilformamida na reação entre Boc-Asn-OH e H-Phe-OBzl resultou na diminuição de rendimento de acoplamento, enquanto que o aumento do volume da solução de acetato de sódio, 0,2 M e do tempo de reação propiciaram maiores rendimentos de reação (Tabela 19, página 68). As reações utilizando o componente carboxílico protegido com Z e Moz, na ausência de solvente orgânico, apresentaram excelentes rendimentos (itens 3.12 e 3.13 páginas 69 e 70). A Tabela 27, página 116 resume os resultados obtidos na síntese de dipeptídeos contendo H-Ile-OBzl, H-Leu-OBzl e H-Phe-OBzl, em diferentes condições.

Os resultados discutidos acima permitem concluir que entre os três grupos protetores utilizados Boc, Moz e Z em síntese catalisada por termolisina, Z e Moz se mostraram como protetores melhores, permitindo a obtenção dos dipeptídeos com excelentes rendimentos. Pelo menos dois fatores devem ter contribuído para a maior extensão de

Tabela 27 - Rendimento e condições de sínteses de dipeptídeos sintetizados pelo método enzimático

Peptídeo	Rendimento (%)	Zn^{2+} $\times 10^{-3}$ mol	Asn $\times 10^{-3}$ mol	componente carboxílico $\times 10^{-3}$ mol	pH	enzima $\times 10^{-7}$ mol	tempo de reação (h)	AcDNA pH 6,0 ou Tris/HCl pH 8,0 volume/ml	Solvente orgânico MeOH EtOH AcOEt DMF
Boc-Asn-Ile-OBzl	70	1	1	1	6	2,7	48	5	- - - -
Boc-Asn-Ile-OBzl	62	1	1	1	6	2,7	48	20	- - - -
Boc-Asn-Ile-OBzl	62	1	2	2	6	5,3	48	20	- - - -
Boc-Asn-Ile-OBzl	83	2	1	1	6	5,3	48	20	- - - -
Boc-Asn-Ile-OBzl	10	1	1	1	8	2,7	72	20	- - - -
Boc-Asn-Ile-OBzl	47	1	2	2	6	5,3	48	18	- - - -
Boc-Asn-Ile-OBzl	73	1	2	2	6	5,3	48	16	- - - 0,84
Boc-Asn-Ile-OBzl	79	2	1	1	6	5,3	48	10	- - - -
Z-Asn-Ile-OBzl	87	1	1	1	6	5,3	48	20	- - - -
Z-Asn-Ile-OBzl	95	2	1	1	6	5,3	48	20	- - - -
Moz-Asn-Ile-OBzl	87	1	1	1	6	2,7	48	20	- - - -
Moz-Asn-Ile-OBzl	95	2	1	1	6	5,3	48	20	- - - -
Boc-Asn-Leu-OBzl	25	1	1	1	6	2,7	48	30	- - - -
Boc-Asn-Leu-OBzl	10	2	1	1	6	5,7	48	8	- - 5 - -
Boc-Asn-Leu-OBzl	9	2	1	1	6	5,7	48	14	- - 5 - 2
Boc-Asn-Leu-OBzl	10	2	1	1	6	5,7	48	10	- - 3 - -
Z-Asn-Leu-OBzl	79	1	1	1	6	5,7	48	20	- - - -
Moz-Asn-Leu-OBzl	80	1	1	1	6	5,7	48	20	- - - -
Moz-Asn-Leu-OBzl	94	2	1	1	6	5,7	48	20	- - - -
Boc-Asn-Phe-OBzl	57	1	1	1	6	2,7	48	30	- - - -
Boc-Asn-Phe-OBzl	60	1	1	1	6	2,7	72	30	- - - -
Boc-Asn-Phe-OBzl	25	2	1	1	6	5,3	48	10	- - - 2
Boc-Asn-Phe-OBzl	6	2	1	1	6	5,3	48	8	- - - 5 - -
Z-Asn-Phe-OBzl	78	1	1	1	6	5,3	72	35	- - - -
Moz-Asn-Phe-OBzl	79	1	1	1	6	2,7	48	30	- - - -
Moz-Asn-Phe-OBzl	95	1	1	1	6	5,3	72	35	- - - -
Z-Asn-Val-OBzl	44	2	1	1	8	5,3	72	7	- - 2 - -
Z-Asn-Val-OBzl	49	2	1	1	8	5,3	72	10,5	- - 2 - -
Z-Asn-Val-OBzl	24	2	1	1	6	5,3	72	10,5	- - 2 - 1,5 -
Moz-Asn-Val-OBzl	80	1	1	1	6	5,3	48	20	- - - -
Moz-Asn-Val-OBzl	91	2	1	1	6	5,3	18	20	- - - -

Condições experimentais: Serção de Resultados

síntese dos dipeptídeos protegidos com estes grupos em relação aos protegidos como o grupo Boc menor solubilidade dos produtos formados no meio de reação e maior interação do grupo protetor com o subsítio S_2 da termolisina. Esta última hipótese é baseada no trabalho de Fruton (1983), que demonstrou a preferência estereoespecífica da termolisina por aminoácidos hidrofóbicos na posição P_2 . No mesmo trabalho esse autor mostra que o valor de K_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$) na síntese de Z-Phe-Leu-NHPh é 73 ± 5 e o de Boc-Phe-Leu-NHPh é 49 ± 3 .

Foi efetuada também a síntese de Boc-Asn-Val-OBzl, nas condições descritas no estudo da variação do componente amínico. A quantidade do dipeptídeo formado foi desprezível e por essa razão o mesmo não foi isolado.

A constatação do fato de Z e Moz apresentarem-se como melhores protetores de α -aminogrupos, levou-nos a estudar a síntese de Z-Asn-Val-OBzl e Moz-Asn-Val-OBzl. Os acoplamentos entre Z-Asn-OH e H-Val-OBzl. Tos foram realizadas em pH 8 na presença de metanol e dimetilformamida utilizando-se as condições descritas por Kullmann(1982). Os rendimentos obtidos foram de 44 a 49%, quando se utilizaram volumes diferentes de solvente. A mesma síntese realizada em pH 6 forneceu o peptídeo com rendimento de 25% (Tabela 21, página 74). Estas foram as únicas reações de síntese por nós realizadas que apresentaram maior rendimento em pH 8. O fato de as três reações terem sido realizadas com volumes diferentes de solvente, isto é, em condições diferentes, não permite correlacionar e discutir os resultados obtidos. A síntese do mesmo dipeptídeo em ambos

os valores de pH na ausência de solvente orgânico, não foi realizada.

Os acoplamentos de Moz-Asn-OH com H-Val-OBzl.Tos em pH 6, na ausência de solvente orgânico foram de 80 e 91% para as proporções dos substratos 2:1 e 1:1, respectivamente. Como estes resultados são comparáveis aos rendimentos observados para os demais peptídeos protegidos com Moz e Z, provavelmente em pH 6,0 e na ausência de solvente orgânico, o rendimento da reação de Z-Asn-Val-OBzl seria da mesma ordem de grandeza.

Os resultados das sínteses dos tripeptídeos Moz-Asn-Ile-Gly-OBzl, Moz-Asn-Ile-Ala-OBzl, Moz-Asn-Ile-Leu-OBzl e Moz-Asn-Ile-Phe-OBzl, expressos nas Tabelas 23 e 24 páginas 78 e 80 e nos itens 4.3 e 4.4, páginas 81 e 82, mostraram que os mesmos foram obtidos com rendimentos superiores a 85% em 5 horas de reação, utilizando a concentração de enzima de $0,5 \times 10^{-5} M$.

O rendimento obtido na síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl utilizando-se a mesma concentração de termolisina, em 48 horas de reação foi de 40%, mostrando que a velocidade de formação de tripeptídeos é maior do que a de dipeptídeos para uma determinada concentração de enzima.

Como não foram obtidas diferenças significativas nos rendimentos dos tripeptídeos não foi possível estabelecer a especificidade secundária da termolisina para o resíduo P'_2 como havia sido proposto.

Um resumo das melhores condições de síntese encontradas para os di- e tripeptídeos estudados encontra-se na Tabela 28, página

TABELA 28 - Resumo das melhores condições encontradas para a síntese enzimática dos peptídeos estudados

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

a - A solução contém acetato de cálcio 5,0 x 10⁻² M. b - A mistura de reação foram adicionados 2,0 g de (NH₄)₂SO₄.
c - Os reagentes foram dissolvidos em uma mistura constituída por 10,5 ml de solução tampão Tris/HCl 0,2 M, pH 8, contendo acetato de cálcio 5,0 x 10⁻² M, 2 ml de MeOH e 1,5 ml de DMF. Todos os acoplamentos foram realizados a 38 ± 1°C, sob agitação com exceção de Z-Asn-Leu-OEt e Z-Asn-Phe-OEt que foram realizados a 48 ± 1°C.

Todos os tripeptídeos sintetizados foram obtidos com excelentes rendimentos e livres da contaminação por subprodutos. Estes resultados somados ao fato de a reação enzimática ser estereoespecífica sugerem que uma vez estabelecido, o método enzimático de incorporação de N_{α} -acil-L-asparagina a resíduos de aminoácido e a peptídeos poderá se tornar usual na obtenção de cadeias peptídicas contendo este aminoácido.

Nenhum dos peptídeos por nós sintetizados enzimaticamente foram obtidos, até o momento, utilizando o mesmo método.

V. CONCLUSÕES

1. N_{α} -acil-L-asparagina pode ser incorporada a derivados de L-aminoácidos e às cadeias peptídicas, mediante catálise por termolisina com bom rendimento e livre de contaminação por subprodutos.

2. Os excelentes rendimentos por nós obtidos se devem principalmente à precipitação dos produtos formados no meio de reação, já que a mesma favorece termodinamicamente a formação de ligação peptídica.

3. Os resultados do estudo metodológico realizado indicam que a condição ótima de síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl é: Boc-Asn-OH, $9,5 \times 10^{-2}$ M; H-Ile-OBzl, $4,7 \times 10^{-2}$ M; termolisina $1,3 \times 10^{-7}$ M; solvente, acetato de sódio 0,2 M, pH 6, contendo acetato de cálcio $5,0 \times 10^{-2}$ M; tempo de reação: 48 horas; temperatura 38°C .

4. O valor do pH ótimo por nós encontrado para as reações de síntese catalisadas por termolisina está de acordo com o mecanismo de ação da mesma, no qual His-231 e Glu-143 participam da catálise nas formas protonada e desprotonada respectivamente.

5. Quando se utiliza o grupo Z como protetor de asparagina, a síntese enzimática pode ser realizada a temperaturas superiores a 50°C , pois tanto o Z-Asn-OH como a termolisina são termoestáveis.

6. Entre os grupos Boc, Z e Moz utilizados como protetores de asparagina, Z e Moz permitiram a obtenção dos

dipeptídeos com excelentes rendimentos. Pelo menos dois fatores devem ter contribuído para a maior extensão de síntese de dipeptídeos protegidos como estes grupos em relação ao grupo Boc: menor solubilidade dos produtos formados no meio de reação e maior interação do grupo protetor com o subsítio S_2 da termolisina.

7. Os tripeptídeos requerem para a sua síntese menores concentrações de enzima e tempo de reação em relação aos dipeptídeos.

8. Como não foram obtidas diferenças significativas nos rendimentos dos tripeptídeos, não foi possível estabelecer a especificidade secundária da termolisina para o resíduo P'_2 como havia sido proposto.

9. No método enzimático de formação de ligação peptídica, as características estruturais dos reagentes e produtos tem importância relevante, motivo pelo qual as condições ótimas de síntese diferem de um peptídeo para outro.

SUMÁRIO

Com o objetivo de estudar a potencialidade do emprego de termolisina como catalisador nas reações de incorporação de N-acil-asparagina a ésteres de aminoácidos e peptídeos, foram sintetizados os seguintes di- e tripeptídeos:

Boc-Asn-Ile-OBzl, Z-Asn-Ile-OBzl, Moz-Asn-Ile-OBzl, Boc-Asn-Leu-OBzl, Z-Asn-Leu-OBzl, Moz-Asn-Leu-OBzl, Z-Asn-Leu-OEt, Boc-Asn-Phe-OBzl, Z-Asn-Phe-OBzl, Moz-Asn-Phe-OBzl, Z-Asn-Phe-OEt, Z-Asn-Val-OBzl, Moz-Asp-Val-OBzl, Moz-Asn-Ile-Gly-OBzl, Moz-Asn-Ile-Ala-OBzl, Moz-Asn-Ile-Leu-OBzl e Moz-Asn-Ile-Phe-OBzl. Todos os peptídeos foram obtidos na forma pura, com bom rendimento e foram analisados e caracterizados por cromatografia em camada delgada, ponto de fusão, análise elementar, análise de aminoácidos e ressonância magnética protônica. Entre os grupos protetores de asparagina, benziloxicarbonil e p-metoxibeniloxicarbonil permitiram a obtenção dos dipeptídeos com excelentes rendimentos. Foi observado que os tripeptídeos requerem para a sua síntese menores concentração de enzima e tempo de reação em relação aos dipeptídeos. Não foi possível estabelecer a especificidade secundária da termolisina para o resíduo P₂' pois os rendimentos dos tripeptídeos sintetizados não apresentaram diferença significativa. Foi também realizado um estudo metodológico para determinar as condições ótimas de síntese de Boc-Asn-Ile-OBzl, que consistiu em analisar a influência do pH, concentração de enzima, concentração e volume da solução de acetato de sódio, proporção entre os componentes carboxílico e amínico, temperatura e adição de solvente orgânico ao meio de reação.

SUMMARY

With the objective of studying the potential for the use of thermolysin as a catalyst in reactions of incorporation of N-acyl-asparagine into esters of amino-acids and peptides, the following di- and tripeptides were synthesized:

Boc-Asn-Ile-OBzl, Z-Asn-Ile-OBzl, Moz-Asn-Ile-OBzl, Boc-Asn-Leu-OBzl, Z-Asn-Leu-OBzl, Moz-Asn-Leu-OBzl, Z-Asn-Leu-OEt, Boc-Asn-Phe-OBzl, Z-Asn-Phe-OBzl, Moz-Asn-Phe-OBzl, Z-Z-Asn-Phe-OEt, Z-Asn-Val-OEt, Moz-Asn-Val-OBzl, Moz-Asn-Ile-Gly-OBzl, Moz-Asn-Ile-Ala-OBzl, Moz-Asn-Ile-Leu-OBzl e Moz-Asn-Ile-Phe-OBzl. All of these peptides were obtained in pure form in good yield and analyzed and characterized by thin layer chromatography, melting point, elemental analysis, aminoacid analysis and proton magnetic resonance. Among the protecting groups of asparagine, benzyloxy-carbonyl and p-methoxybenzyloxycarbonyl gave excellent yields of the dipeptides. Relative to the dipeptides, the synthesis of the tripeptides was found to require lower enzyme concentrations and temperatures. Since the yields of the tripeptides failed to exhibit significant differences, it was not possible to establish the existence of a secondary specificity of thermolysin for the residue P_2' . A methodological study was also performed to determine the optimum conditions for synthesis of Boc-Asn-Ile-OBzl. This study consisted of an analysis of the influence of pH, enzyme concentration, concentration and volume of the solution of sodium acetate, relative proportions of the carboxyl and amino components, temperature, and addition of organic solvent to the reaction medium.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- Bergmann, M. & Fraenkel-Conrat, H. - The role of specificity in the enzymatic synthesis of proteins. Synthesis with intracellular enzymes. J. Biol. Chem., Baltimore, 119: 707-20, 1937.
- Bergmann, M. & Fraenkel-Conrat, H. - The enzymatic synthesis of peptide bonds. J. Biol. Chem., Baltimore, 124: 1-6, 1938.
- Bergmann, M. & Fruton, J.S. - Some synthetic and hydrolytic experiments with chymotrypsin. J. Biol. Chem., Baltimore, 124: 321-9, 1938.
- Bergmann, M. & Zervas, L. - Über ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese. Ber. dtsh. Chem. Ges., Berlin, 65: 1192-201, 1932.
- Bodanszky, M. - Synthesis of peptides by aminolysis of nitrophenylesters. Nature, London, 175(4459): 685, 1955.
- Bodanszky, M. - Side reaction in peptide synthesis. In: Principles of Peptide Synthesis. Berlin, Springer-Verlag, 1984. p. 158-201. (Reactivity and Structure Concepts in Organic Chemistry, 16).
- Bodansky, M. & du Vigneau, V. - A Method of synthesis of long peptide chains using a synthesis of oxytocin as an example. J. Am. Chem. Soc., Washington, 81(21): 5688-95, 1959.
- Carpenter, F.H. - The free energy change in hydrolytic reactions: The non-ionized compound convention. J. Am. Chem. Soc., Washington, 82(5): 1111-22, 1960.
- Cipera, J.D. & Nicholls, R.V.V. - Preparation of benzyl esters amino acids. J.D. Cipera and R.V.V. Nicholls (McGill Univ., Montreal, Can.) Chemistry & Industry 1955, 16-17. Apud: Chem. Abs., 50: 810a, 1956.
- Cotter, R.J.; Sauwers, C.K.; Whelan, J.M. - The synthesis of N-substituted isomaleimides. J. Org. Chem., Easton, 26(1): 10-5, 1961.

* De acordo com as normas preconizadas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abrevituras dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI), Columbus, 1980.

- alquist, F.W.; Long, J.W.; Bigbee, W.L. - Role of calcium in the thermal stability of thermolysin. Biochemistry, Washington, 15(5): 1103-11, 1976.
- astrez, J. & Fersht, A.R. - Demonstration of the acyl-enzyme mechanism for the hydrolysis of peptides and anilides by chymotrypsin. Biochemistry, Washington, 12(11): 2025-34, 1973.
- ader, J.; Garret, L.R.; Wildi, B.S. - Studies on the role of calcium in thermolysin. Biochemistry, Washington, 10(24): 4552-5, 1971.
- ruton, J.S. - The synthesis of peptides. Adv. Protein Chem., New York, 5: 1-82, 1949.
- ruton, J.S. - The role of proteolytic enzymes in the biosynthesis of peptide bonds. J. Biol. Med., 22: 263-71, 1950.
- ruton, J.S. - Proteinase-catalyzed synthesis of peptide bonds. Adv. Enzymol. Relat. Areas-Mol. Biol., New York, 53: 239-306, 1982.
- ruton, J.S. - Proteinases as catalysts of peptide bond synthesis. Trans. N. Y. Acad. Sci., New York, 41: 49-56, 1983
- ruton, J.S.; Johnston, R.B.; Fried, M. - Elongation of peptide chains in enzyme-catalyzed transamidation reactions. J. Biol. Chem., Baltimore, 190(1): 39-53, 1951.
- ash, D.T.; Katsoyannis, P.G.; Hess, L.P.; Stedman, R.J. - Unexpected formation of anhydro compounds in the synthesis of asparaginyll and glutaminyll peptides. J. Am. Che. Soc., Washington, 78(22): 5954, 1956.
- odman, M. & McGharen, W.J. - Mechanistic studies of peptide oxazolone racemization. Tetrahedron, Oxford, 23: 2031-50, 1967.
- reenstein, J.P. & Winitz, M. - Chemical procedures for the synthesis of peptides. In:----- Chemistry of the Amino Acids. New York, John Wiley, 1961, v.2, p.763-1295.
- utte, B. & Merrifield, R.B. - The synthesis of ribonuclease A. J. Biol. Chem., Baltimore, 246(6): 1922-41, 1971.
- emmasi, B. & Bayer, E. - Coupling of glutamine by the carbodiimide method in the solid-phase synthesis of two C-terminal peptides of secretin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., Berlin, 355(4): 481-9, 1974.
- enriques, V. & Gjaldbak, I.K. - Untersuchungen über die Plast/leinbildung II Mitteilung, Hoppe-Seyler's. Z. Physiol. Chem., Berlin, 81: 439-57, 1912.
- omandberg, G.A.; Mattis, J.A.; Laskowski Jr., M. - Synthesis of peptide bonds by proteinases. Addition of Organic cosolvents shifts peptide bond equilibria toward synthesis. Biochemistry, Washington, 17(24): 5220-7, 1978.

a, Y. & Ichikawa, T. - Synthesis of N-acyl dipeptide derivatives by metalloproteinases. Bull. Chem. Soc. Jpn., Tokyo, 52(3): 796-800, 1979.

a, Y., Kakutani, M., Yaguchi, M. - The influence of water content in organic solvents on yields of peptide formation using proteases. In: Shiori, T., ed. Peptide chemistry, Osaka, Protein Research Foundation, 1982. p. 25-30.

a, Y.; Ichikawa, T.; Ohmori, M. - Peptide synthesis with proteases. Fragment condensation of Z-Leu-Gln-Gly-OH or Z-Gln-Gly-OH with H-Leu-Val-NH₂ using metalloproteinases. Bull. Chem. Soc. Jpn., Tokyo, 51(1): 271-6, 1978.

a, Y.; Ohmori, M.; Sato, M.; Mori, K. - The enzymatic synthesis of protected valine-5 angiotensin II amide-1. Bull. Chem. Soc. Jpn., Tokyo, 50(10): 2766-72, 1977a.

a, Y.; Ohmori, M.; Ichikawa, T.; Kurita, H.; Sato, M.; Mori, K. - The synthesis of peptides by means of proteolytic enzymes. Bull. Chem. Soc. Jpn., Tokyo, 50(10): 2762-5, 1977b.

Belikar, D.V. & Ressler, C. - An oxygen-18 study of the dehydration of asparagine amide with N,N'-dicyclohexylcarbodiimide and p-toluenesulfonyl chloride. J. Am. Chem. Soc., Washington, 86(12): 2467-73, 1964.

Ber, W.R. & Matthews, B.W. - Crystallographic study of the binding of dipeptide inhibitors to thermolysin: implications for the mechanism of catalysis. Biochemistry, Washington, 16(11): 2506-516, 1977.

Bana, H.G. - The chemistry of carbodiimides. Chem. Rev., Baltimore, 53(2): 145-66, 1953.

Balady, L.; Schön, I.; Renyer, M.; Görög, S. - Competitive intramolecular displacement of the neutral amide group. Rearrangement and dehydration reactions of asparagine and glutamine. J. Am. Chem. Soc., Washington, 97(19): 5588-9, 1975.

Berg, W. & Geiger, R. - A new method for the synthesis of peptides: Activation of the carboxyl group with dicyclohexylcarbodiimide by using 1-hydroxybenzotriazoles as additives. Chem. Ber., Weinheim, 103: 788, 1970a.

Berg, W. & Geiger, R. - New amide protecting group. Chem. Ber., Weinheim, 103: 2024, 1970b.

Berman, W. - Enzymatic synthesis of Leu- and Met-enkephalin. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, 91(2): 693-8, 1979.

Berman, W. - Proteases as catalysts for enzymic synthesis of opioid peptides. J. Biol. Chem., Baltimore, 255(17): 234-38, 1980.

- Kullmann, W. - Protease- mediated peptide bond formation. On some unexpected outcomes during enzymatic synthesis of Leu-enkephalin. J. Biol. Chem., Baltimore, 256(3): 1301-4, 1981.
- Kullmann, W. - Protease-catalyzed peptide bond formation: Application to synthesis of the COOH-terminal octapeptide of cholecystokinin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, 79(9): 2840-4, 1982.
- Latt, S.A.; Holmquist, B.; Valle, B.L. - Thermolysin: a zinc metalloenzyme. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, 37(2): 333-9, 1969.
- Liberek, B. - Tertiary butyl esters of protected β -ciano-L-alanyl peptides as possible intermediates in the preparations of L-asparaginil peptides. Chem. Ind., London, 26: 987-9, 1961.
- Liberek, B. - Nitrile groups in peptide chemistry. II. Intramolecular assistance of amide dehydration by neighboring carboxylate anion in carbobenzoxy-L-asparagine. Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Sci. Chim., Warsaw, 10: 227-31, 1962.
- Martinek, K.; Semenov, A.N.; Berezin, I. - Enzymatic synthesis in biphasic aqueous-organic systems I. Chemical equilibrium shift. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 658(1): 76-89, 1981.
- Matthews, B.W.; Weaver, L.J.; Kester, W. - The conformation of thermolysin. J. Biol. Chem., Baltimore, 249 (24): 8030-44, 1974.
- Mojsov, S.; Mitchell, A.R.; Merrifield, R.B. - A quantitative evaluation of methods for coupling asparagine. J. Org. Chem., Easton, 45(4): 555-60, 1980.
- Moore, S. - Amino acids analysis: Aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for ninhydrin reaction. J. Biol. Chem. Baltimore, 243(23): 6281-3, 1968.
- Morgan, G. & Fruton, J.S. - Kinetics of the action of thermolysin on peptide substrates. Biochemistry, Washington, 17(17): 3562-8, 1978.
- Morihara, K. - Comparative specificity of microbial proteinases. Adv. Enzymol., New York, 41: 179-243, 1974.
- Morihara, K. & Oka, T. - The complex active sites of bacterial neutral proteases in relation to their specificities. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, 30(6): 625-30, 1968.
- Morihara, K. & Oka, T. - α -Chymotrypsin as the catalyst for peptide synthesis. Biochem. J., London, 163(3): 531-42, 1977.

- Morihara, K. & Tsuzuki, H. - Thermolysin: kinetic study with oligopeptides. Eur. J. Biochem., Berlin, 15(2): 374-80, 1970.
- Morihara, K.; Tsuzuki, H.; Oka, T. - Acyl and amino intermediates in reaction catalyzed by thermolysin. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, 84(1): 95-101, 1978.
- Moore, S. & Stein, W.H. - A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. J. Biol. Chem., Baltimore, 211: 907-13, 1954.
- Mukaiyama, T.; Ueki, M., Maruyama, H.; Matsuda, R. - A new method for peptide synthesis by oxidation-reduction condensation. J. Am. Chem. Soc., Washington, 90(16): 4490-1, 1968.
- Nagasawa, T.; Kuroiwa, K.; Narita, K.; Isowa, Y. - New agents for butyloxycarbonylation and p-methoxybenzyl-oxy carbonylation of amino acids. Bull. Chem. Soc. Jpn., Tokyo, 46(4): 1269-72, 1973.
- Nakanishi, K. - Infrared absorption spectroscopy-practical, San Francisco, Holden, 1962, p. 218.
- Ohta, Y.; Ogura, Y.; Wada, A. - Thermostable protease from thermophila bacteria. I. Thermostability, physicochemical properties and amino acid composition. J. Biol. Chem., Baltimore, 241(24): 5919-25, 1966.
- Okachi, R. & Isowa, Y. - Use of hydrolases in synthesis. Kasaku to Seibutsu, Tokyo, 16(8): 536-46, 1978.
- Oka, T. & Morihara, K. - Trypsin as a catalyst for peptide synthesis. J. Biochem., Tokyo, 82(4): 1055-62, 1977.
- Oka, T. & Morihara, K. - Peptide bond synthesis catalyzed by thermolysin. J. Biochem., Tokyo, 88(3): 807-13, 1980.
- Pangburn, M.K. & Walsh, K.A. - Thermolysin and neutral protease: Mechanistic considerations. Biochemistry, Washington, 14(18): 4050-4, 1975.
- Paul, R. & Kende, A. - A mechanism for the N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-caused dehydration of asparagine and maleamic acid derivatives. J. Am. Chem. Soc., Easton, 86(19): 4162-6, 1964.
- Perrin, D.D. - Dissociation constant of organic bases in aqueous solution (Pure and applied chemistry). London: Butterworths, 1965. pp. 473. Apud: Chem. Abs., 63: 68, 1965.
- Petkov, D.D. - Enzyme peptide synthesis and semisynthesis: Kinetic and thermodynamic aspects. J. Theor. Biol., London, 98(31): 419-25, 1982.

- Petkov, D.D. & Stoineva, I. - Nucleophile specificity in chymotrypsin peptide synthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, 118: 317-23, 1984.
- Ressler, C. - Formation of α, γ -diaminobutyric from asparagine-containing peptides. J. Am. Chem. Soc., Easton, 78(22): 5956, 7, 1956.
- Ressler, C. & Ratzkin, H. - Synthesis of β -cyano-L-alanine and γ -cyano-L-aminobutyric acid, dehydration products of L-asparagine and L-glutamine; a new synthesis of amino acid nitriles. J. Org. Chem., Easton, 26(9): 3356-60, 1961.
- Saltman, R. - Co-oligopeptides of aromatic amino acids and glycine with variable distance between the aromatic residues. VII. Enzymatic synthesis of N-protected peptide amides. Biopolymers, New York, 16(3): 631-38, 1977.
- Schanabel, E.; Herzog, H.; Hoffmann, P.; Klauke, E.; Ugi, J. - Synthese und Verwendung von tert-butyl-oxycarbonylfluorid und anderen fluorkohlensäureestern zur Darstellung säurelabiler Urethan-derivate von Aminosäuren. Justus Liebig's Ann. Chem., Weinheim, 716: 175-85, 1968.
- Sondheimer, E. & Holley, R.W. - Imides from asparagine and glutamine. J. Am. Chem. Soc., Washington, 76(9): 2467-70, 1954.
- Stammer, C.H. - The synthesis of two peptides containing methylene-L-asparagine. J. Org. Chem., Easton, 26(7): 2556-60, 1961.
- Takahashi, M. & Hoffmann, T. - Acyl intermediates in penicillopepsin-catalysed reactions and a discussion of the mechanism of action of pepsins. Biochem. J., London, 147(3): 549-63, 1975.
- Taschner, E. von; Chimiak, A.; Biernat, J.F.; Wasilewski, C.; Sokolowska, T. - Darstellung der ~~W~~-tert-butylester von carbobenzoxy-glutaminsäure und-asparaginsäure und ihre Verwendung zu synthesen von α -dipetiden. Justus Liebig's Ann. Chem., Weinheim, 663: 188-93, 1963. W
- Tauber, H. - Phenylalanyl phenylalanine ethyl ester synthesis by chymotrypsin. J. Am. Chem. Soc., Washington, 74(3): 847-8, 1952.
- Titani, K.; Hermodson, M.A.; Ericson, L.H.; Walsh, K.A.; Neurath, H. - Amino acid sequence of thermolysin. Nature New Biol., London, 238: 35-7, 1972.
- Tominaga, M.; Pinheiro da Silva Filho, L.; Muradian, J.; Seidel, W.F. - Papain and chymotrypsin as catalysts for peptide synthesis. In: Sakakibara, S. - Peptide Chemistry 1982, Osaka, Protein Research Foundation, 1983, p. 271-5.

- Tsuzuki, H.; Oka, T.; Morihara, K. - Coupling between Cbz-ArgOH and Leu-X catalysed by trypsin and papain. J. Biochem., Tokyo, 88(3): 669-75, 1980.
- Wang, C.H.; Su-Sun, ; Gisin, B.F.; Winter, D.F.; Makofske, R.; Kulesha, I.D.; Tzougraki, C.; Meienhofer, J. - Facile synthesis of amino acid and peptide esters under mild conditions v.a cesium salts. J. Org. Chem., Washington, 42(8): 1286-90, 1977.
- Wasteneys, H. - Protein synthesis. Biol. Bull., Woods Hole, 60: 1-10, 1931.
- Wasteneys, H. & Borsook, H. - The enzymatic synthesis of protein. Physiol. Rev., Bethesda, 10(1): 110-45, 1930.
- Wong, C.H.; Chen, S.T.; Wang, K.T. - Enzymic synthesis of opioid peptides. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 576(1): 47-9, 1979.
- Yajima, H. & Fujii, N. - Studies on peptides. 103. Chemical synthesis of a crystalline protein with the full enzymatic activity of ribonuclease A. J. Am. Chem. Soc., Washington, 103(19): 5867-71, 1981.
- Zaoral, M. & Rudinger, J. - Amino-acids and peptides. XXV. Dehydration of derivatives of asparagine and glutamine, a new route of α , β -diaminobutyric acid, ornithine, and arginine. Coll. Czech. Chem. Commun., Prague, 24(6): 1993-6, 1959.