



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA

INGENIERÍA QUÍMICA – PROCESOS

“SÍNTESIS DE POLIAMIDAS BIOCATALIZADA POR PROTEASAS”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA:

M.I. ISABEL SARAID AGUIRRE DÍAZ

TUTOR

DR. MIQUEL GIMENO SECO, FACULTAD DE QUÍMICA

COMITÉ TUTOR

DR. ALBERTO TECANTE CORONEL, FACULTAD DE QUÍMICA

DRA. CARMINA MONTIEL PACHECO, FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado:

Presidente: Joaquín Palacios Alquisira

Secretario: Carmina Montiel Pacheco

Vocal: Ismael Bustos Jaimes

1^{er}. Suplente: Roeb García Arrazola

2^{do}. Suplente: Miquel Gimeno Seco

Lugar o lugares donde se realizó la tesis: Laboratorio 314, Conjunto E de la Facultad de Química, Ciudad Universitaria, UNAM.

TUTOR DE TESIS:

DR. MIQUEL GIMENO SECO

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que se me otorgó con CVU No. 491028 y a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA UNAM) por el proyecto PAPIIT IN 201317.

Asimismo, quiero agradecer a CONACyT, al Módulo de Apoyos COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO y al grupo de trabajo “Fluides Supercritiques” du Département Laboratoire de Génie Chimique, en Instituto Nacional Politécnico de Toulouse, por el apoyo y por permitirme utilizar sus equipos e instalaciones para realizar una estancia de Investigación. Tutora: Dra. Yaocihuatl Medina, Toulouse, Francia 2017.

También agradezco la asesoría técnica de la Dra. Carmina Montiel Pacheco, y el Dr. Alberto Tecante.

*A mi familia, Elvia Díaz, Margarita Domínguez, Eduardo García,
Judith, Jerónimo Alcaide, Benjamín Paredes, Susana Rubín, Liz Galindo,
a mis amigos del L-314, del grupo de Coyoacán, del equipo de
Benjamín Paredes y de Toulouse.
Cada uno de ustedes han sido mis compañeros de aventuras,
especialmente Alejandra Romero.*

¡MUCHAS GRACIAS y SOBRE TODO A DIOS!

ÍNDICE

REVIEW	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	4
1.1. Poliamidas.....	4
1.2. Polipéptidos.....	5
1.3. Métodos de síntesis.	5
1.3.1. Síntesis enzimática de polipéptidos.	7
1.3.2. Enzimas usadas en la síntesis de polipéptidos.....	8
1.3.2.1. Proteasas.	8
1.3.2.1.1. Serín Proteasa.....	10
1.3.2.1.2. Cisteín Proteasa	12
1.4. Fluidos comprimidos	13
1.4.1. Dióxido de Carbono.	14
1.4.2. 1,1,1,2-tetrafluoroetano.....	14
CAPÍTULO 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
2.1. Hipótesis.....	17
2.2. Objetivos.	17
2.2.1. Objetivo general.....	17
2.2.2. Objetivos particulares.	17
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	19
3.1. Materiales.....	19

3.2. Acondicionamiento de la papaína.	19
3.3. Determinación de la actividad enzimática de las proteasas.	19
3.3.1. Estabilidad enzimática en R-134a.....	20
3.3.2. Desnaturalización térmica.....	20
3.4. Prueba de solubilidad.....	21
3.4.1. Desalinización de los monómeros.	22
3.5. Síntesis enzimática de polipéptidos	22
3.5.1. Síntesis enzimática de homopolipéptidos.	22
3.5.2. Síntesis enzimática del copolipéptido.	23
3.6. Caracterización fisicoquímica.....	23
3.6.1. Resonancia Magnética Nuclear.	24
3.6.2. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier	24
3.6.3. Espectroscopia de masas por MALDI-Tof.....	24
3.6.4. Difracción de rayos x de polvo (DRXP).....	25
3.6.5. Dicroísmo circular.	25
3.6.6. UV-Visible.	25
3.6.7. Microscopia confocal.	26
3.7. Análisis estadístico.....	26
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	27
4.1. Prueba de solubilidad de los monómeros.....	27
4.2. Desalinización de los monómeros.....	27
4.2.1. Prueba de solubilidad de L-Leu-OEt y L-Fen-OEt en CO ₂	28
4.2.2. Prueba de solubilidad de L-Leu-OEt y L-Fen-OEt en R.134a.	33
4.2.3. Prueba de solubilidad de L-Leu-OEt y L-Fen-OEt en mezcla de CO ₂ /R-134a.	33

4.3. Estudio de la estabilidad enzimática en el R-134a.....	35
4.4. Síntesis enzimática de polipéptidos.	37
4.4.1. Efecto de la enzima papaína en la reacción de polimerización.....	38
4.5. Resultados de la caracterización fisicoquímica	39
4.5.1. Resultados de FT-IR.....	39
4.5.2. Resultados de RMN.....	42
4.5.3. Resultados de MALDI-TOF.....	44
4.5.4. Resultados de UV-Vis.....	45
4.5.5. Actividad enzimática residual en los polímeros.....	45
4.6. Efecto del tiempo en la síntesis de polipéptidos en R-134a líquido.....	46
4.7. Resultados de Dicroísmo Circular.	48
4.8. Resultados de difracción de rayos en polvo.	49
4.9. Resultados de microscopia confocal.	52
CONCLUSIONES	54
PERSPECTIVAS	55
REFERENCIAS	56
ANEXOS	60

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Clasificación de poliamidas.	4
Figura 2. Enfoques tecnológicos para la obtención de polipéptidos.	6
Figura 3. Mecanismo propuesto para una polimerización de apertura de anillo de NCA iniciado por una amina nucleofílica.....	7
Figura 4. Síntesis de péptidos catalizada por proteasas	9
Figura 5. Modelo de síntesis enzimática de péptidos a través del control cinético	10
Figura 6. Sitio catalítico de la serín proteasa (Neitzel, 2010) (a). Estructura cristalina de serín proteasa de <i>bacillus subtilis</i> (1SBC) (Neidhart & Petsko, 1988) (b).	11
Figura 7. Sitio catalítico de la cisteína proteasa (Neitzel, 2010) (a). Estructura cristalina de cisteín proteasa de <i>carica papaya</i> (9PAP) (Kamphuis, Kalk, & Swarte, 1984) (b).	12
Figura 8. Diagrama de Entalpía-Presión (P) del R-134a (NIST, 2017)	15
Figura 9. Diagrama de Presión (P) – Densidad (ρ) a diferentes isothermas (40, 50, 105 y 120 °C) (NIST, 2017)	15
Figura 10. Parámetros solvatocrómicos (Kamlet-Taft) del R-134a como función de la densidad: π^* (a) y β (b) (Lagalante, Hall, & Bruno, 1998).	16
Figura 11. Celda de alta presión con volumen variable, graduador de volumen (1), termopar (2), manómetro (3) (Medina, et al., 2017).	21
Figura 12. Esquema de desalinización de los monómeros. A) Desalinización del clorhidrato de L-Fen-OEt. B) Desalinización del clorhidrato de L-Leu-OEt.....	22
Figura 13. Vista de la celda de alta presión.....	23
Figura 14. Prueba de solubilidad de L-Leu-OE en R-134a (40°C y 25 bares).	27
Figura 15. Prueba de solubilidad en CO ₂ de los monómeros: a) L-Leu-OEt (1 g) en CO ₂ (323 bar, 40 ± 2°C) b) L-Fen-OEt (1 g) en CO ₂ (323 bar, 40 ± 2°C).....	28

Figura 16. Esquema de reacción general para la formación de carbamatos.....	29
Figura 17. RMN- ¹³ C de los carbamatos de L-Leu-OEt (muestra 3) (A) y de L-Fen-OEt (muestra 4) (B).....	30
Figura 18. Espectros de FT-IR de carbamato de L-Leu-OEt (muestra 3) (A) y carbamato de L-Fen-OEt (muestra 4) (B).	32
Figura 19. Prueba de visibilidad en la celda de alta presión de L-Leu-OEt (a) y L-Fen-OEt (b) sin disolvente.	33
Figura 20. Prueba de solubilidad en R-134a de L-Leu-OEt a 4 bar y 40 ± 2°C (a), L-Fen-OEt a 6.3 bar y 14.8 ± 2°C (b) y a 320 bar y 39 ± 2°C (c).	34
Figura 21. Prueba de solubilidad en la mezcla de CO ₂ /R-134a de los monómeros: a) L-Leu-OEt en CO ₂ /R-134a (323 bar, 40 ± 2°C). b) Punto de turbidez de L-Leu-OEt en CO ₂ /R-134a (315-317 bar, 40 ± 2°C). c) L-Fen-OEt en CO ₂ /R-134a (323 bar, 40 ± 2°C). d) Punto de turbidez de L-Fen-OEt en CO ₂ /R-134a (300 bar, 40 ± 2°C).....	35
Figura 22. Actividad enzimática residual de a) Papaína y b) SC, después de haber sido incubadas en R-134a líquido (40±2°C, 25 bares).....	36
Figura 23. Actividad enzimática residual de la enzima SC después de someterla a un a) Tratamiento térmico en R-134a (101°C, >100 bares) por 10 min, b) Tratamiento térmico sin R134a (115°C y 4.92 bares durante 21 min).	37
Figura 24. Esquemas de reacción de polimerización de poli(L-Leu-OEt) (A), poli(L-Fen-OEt) (B) y poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt) (C).	38
Figura 25. Rendimiento en peso (gráfica de líneas) y masa molecular (gráfica de barras) de a) reacción sin SC (24 h) (muestras 7-12) y b) reacción con SC (24 h) (muestras 13-18). Donde los polipéptidos corresponden: A : Poli(L-LeuOEt) (muestras 7-8 y 13-14, respectivamente), B : Poli(L-Fen-OEt) (muestras 9-10 y 15-16, respectivamente), C : Poli(L-LeuOEt-co-L-FenOEt) (muestras 11-12 y 17-18, respectivamente).....	39

Figura 26. Espectros de FT-IR de A) L-Leu-OEt (muestra 1) B) L-Fen-OEt (muestra 2) C) poli(L-Leu-OEt) (muestra 13) D) poli(L-Fen-OEt) (muestra 15) E) poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt) (muestra 17).....	40
Figura 27. Espectros de ¹ H de los polipéptidos 1) Poli(L-Leu-OEt) (muestra 13), 2) Poli(L-Fen-OEt) (muestra 15) y 3) Poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt) (muestra 17).44	
Figura 28. Espectro de UV-Vis de L-Fen-OEt (muestra 2) (línea punteada) y poli(L-Fen-OEt) (muestra 15) (línea lisa).....	45
Figura 29. Rendimiento en peso (gráfica de líneas) y masa molecular (gráfica de barras) de a) Poli(L-Leu-OEt) (muestras 19-26), b) Poli(L-Fen-OEt) (muestras 27-34), c) Poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt) (muestras 35-42). *p< 0.05 determinado por ANOVA de la media de comparación múltiple por la prueba de Tukey.....	47
Figura 30. Relación de grado de polimerización entre poli(L-Fen-OEt) y poli(L-Leu-OEt) en el copolipéptido (muestras 35-42) a diferentes horas.	48
Figura 31. Espectro de DC de poli(L-Fen-OEt) (muestra 15) en disolución acuosa.	49
Figura 32. DRXP de poli(L-Leu-OEt) vs GP (muestras 19-26).	50
Figura 33. DRXP de poli(L-Fen-OEt) vs GP (muestras 27-34).	51
Figura 34. DRXP de poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt) vs GP (muestras 35-42).	51
Figura 35. Microscopia confocal de los homopolímeros y copolímeros.....	53

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1. Caracterización de L-Leu-OEt (a) (muestra 1) y L-Fen-OEt (b) (muestra 2).....	28
Tabla 2. Resultados de RMN- ¹ H de los carbamatos de L-Leu-OEt (a) (muestra 3) y L-Fen-OEt (b) (muestra 4).....	29
Tabla 3. Comparación de masa molecular y rendimiento en peso en la biocatálisis de poli(L-Fen-OEt) (muestra 5 y muestra 6).....	38
Tabla 4. Principales señales de la formación de amidas en los materiales, poli(L-Leu-OEt) (muestra 13), Poli(L-Fen-OEt) (muestra 15) y Poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt) (muestra 17).....	41
Tabla 5. Ensayo de la actividad enzimática residual en los polímeros producidos.....	46
Tabla 6. Resultados del índice de cristalinidad de los materiales. Poli(L-Leu-OEt): muestras 19, 21, 23 y 25; Poli(L-Fen-OEt): muestras 27, 29, 31 y 33; Poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt): muestras 35, 37, 39 y 41.....	50

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética de Carbono 13.
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón.
2D-COSY	Dos dimensiones- CORrelated SpectroscopY, por sus siglas en inglés.
2D-HMBC	Dos dimensiones- Heteronuclear Multiple Bond Correlation, por sus siglas en inglés.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ANOVA	Analysis of variance, por sus siglas en inglés.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia.
Asp	Ácido aspártico.
(FC)s	Fluidos comprimidos.
atm	Atmósfera.
CCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico.
CDCl ₃	Cloroformo deuterado.
CF ₃ COOH	Ácido trifluoroacético.
Da	Dalton.
DC	Dicroísmo circular.
din	Dina.
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido Deuterado.
DRXP	Difracción de Rayos X de Polvo.
FT-IR(ATR)	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (Reflectancia atenuada).
GP	Grado de polimerización.
HFCs	Hydrofluorocarbons, por sus siglas en inglés.
His	Histidina.
L-Fen-OEt	L-Fenilalaninato de etilo ó L-fenilalanina etil éster.
L-Leu-OEt	L-Leucinato de etilo ó L-leucina etil éster.
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight, por sus siglas en inglés.
m Ω .cm	MegaOhm-centímetro.
NC-IUB	Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, por sus siglas en inglés.
P-A	Proteasa-acilo.
Pc	Presión crítica.
pH	Potencial de hidrogeno.
R12	Diclorodifluorometano.
R-134a	1,1,1,2-tetrafluoroetano.
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
SC	Subtilisina Carlsberg.
scCO ₂	Dióxido de carbono supercrítico.
SEM	Scanning Electron Microscope, por sus siglas en inglés.
Ser	Serina.

T _c	Temperatura crítica.
TFA	Ácido Trifluoroacético.
TFA-d	Ácido Trifluoroacético Deuterado.
UR	Unidades de repetición.
UV-Vis	Espectroscopia de Ultravioleta-Visible.
ϵ	Constante dieléctrica.
α	Hydrogen Bond Donation ability, por sus siglas en inglés.
β	Hydrogen Bond Acceptance ability, por sus siglas en inglés.
μ	Momento dipolar (1 D = 3.33 X 10 ⁻³⁰ C m).
*	
π	Polaridad

REVIEW

Two hydrophobic amino acid esters, L-Leucine (L-Leu-OEt) and L-phenylalanine (L-Fen-OEt), were homopolymerized and copolymerized using two proteases; papain and subtilisin Calsberg (SC) as biocatalysts in an unconventional reaction medium, compressed 1,1,1,2-tetrafluoroethane (R134a).

Both enzymes maintained their enzymatic activity after being incubated in liquid R134a, despite being exposed to temperatures of 100 °C. Although, papain showed greater enzymatic activity with respect to SC, the latter proved to be a better biocatalyst.

The yields by weight, both of the homopolymerization and the copolymerization of L-Leu-OEt and L-Fen-OEt using the SC, did not show any response to the changes in the reaction time, which allowed obtaining solid products and whites with a yield around 50%.

The maximum molecular mass obtained from the polymerization with the SC was an average of 19 919 Da, with a chain size of 134 repetition units (UR); this was the result of the homopolymerization of L-Fen-OEt in a reaction time of 24 h. While for homopolymerization of L-Leu-OEt with SC, the maximum average molecular mass was 13,646 Da and a chain size of 119 RU, in a reaction time of 48 h. On the other hand, the copolymerization of L-Leu-OEt and L-Fen-OEt with SC, had the best result at 6 h of reaction with an average molecular mass of 13 527 Da and 101 UR. According to these results, the affinity of the enzyme was significantly higher for L-Fen-OEt.

Finally, the homopolyptides showed a higher crystallinity than the copolypeptides with the random incorporation of L-Fen-OEt and L-Leu-OEt. In addition, the evaluation of the secondary structure by FT-IR and circular dichroism (DC), indicate that this type of peptides do not have a repetitive folding like that of proteins, but it does have a disordered folding, which is commonly seen in peptides.

RESUMEN

Dos ésteres de aminoácidos hidrofóbicos, L-Leucinato de etilo (L-Leu-OEt) y L-Fenilalaninato de etilo (L-Fen-OEt), fueron homopolimerizados y copolimerizados empleando dos proteasas; papaína y subtilisina Calsberg (SC) como biocatalizadores en un medio de reacción no convencional, 1,1,1,2-tetrafluoroetano comprimido (R134a).

Ambas enzimas mantuvieron su actividad enzimática después de ser incubadas en el R134a líquido, a pesar de ser expuestas a temperaturas de 100 °C. Aunque, la papaína presentó mayor actividad enzimática con respecto a la SC, esta última demostró ser mejor biocatalizador.

Los rendimientos en peso, tanto de la homopolimerización como la copolimerización de L-Leu-OEt y L-Fen-OEt usando la SC, no mostraron ninguna respuesta a los cambios en el tiempo de reacción, lo que permitió la obtención de productos sólidos y blancos con un rendimiento alrededor del 50 %.

La máxima masa molecular obtenida de la polimerización con la SC fue un promedio de 19 919 Da, con un tamaño de cadena de 134 unidades de repetición (UR); este fue el resultado de la homopolimerización de L-Fen-OEt en un tiempo de reacción de 24 h. Mientras que para homopolimerización de L-Leu-OEt con SC, la máxima masa molecular promedio fue de 13 646 Da y un tamaño de cadena de 119 UR, en un tiempo de reacción de 48 h. Por otro lado, la copolimerización de L-Leu-OEt y L-Fen-OEt con SC, tuvo el mejor resultado a las 6 h de reacción con una masa molecular promedio de 13 527 Da y 101 UR. De acuerdo a estos resultados, la afinidad de la enzima fue significativamente mayor para L-Fen-OEt.

Finalmente, los homopolipéptidos mostraron una cristalinidad más alta que los copolipéptidos con la incorporación aleatoria de L-Fen-OEt y L-Leu-OEt. Además, la evaluación de la estructura secundaria mediante FT-IR y dicroísmo circular (DC), indican que este tipo de péptidos no tienen un plegamiento repetitivo como el de las proteínas, pero si tiene un plegamiento desordenado, que es comúnmente visto en los péptidos.

INTRODUCCIÓN

Los péptidos son una clase de poliamidas que están formados por cadenas de aminoácidos, los cuales se unen entre sí mediante enlaces covalentes entre un grupo amina y un grupo carboxilo, este enlace se reconoce como el enlace peptídico y de acuerdo a su tamaño pueden ser nombrados como oligopéptidos, péptidos y polipéptidos. Además, participan en muchas funciones fisiológicas y bioquímicas importantes, por lo tanto, su producción se realiza por un proceso biológico que ocurre a nivel celular.

A través del incremento del conocimiento de las funciones bioactivas de los polipéptidos naturales, se despertó el interés de estos compuestos en las ciencias farmacológicas y médicas. Por ello se ha recurrido a los polipéptidos sintéticos, que también han demostrado tener aplicaciones biológicas dentro de estas áreas y además tienen la habilidad para plegarse de manera independiente.

Por ende, a lo largo de la historia se han desarrollado diferentes estrategias de obtención de polipéptidos sintéticos, tales como químicas y biotecnológicas. Por un lado, la opción más atractiva ha sido la síntesis química directa, ya que estos procedimientos han logrado optimizar el rendimiento, la secuencia de los aminoácidos y el grado de polimerización de hasta algunas proteínas de relevancia biológica. Por otro lado, estas técnicas no son selectivas y producen mezclas racémicas.

Una alternativa a esta desventaja, es el uso de enzimas, ya que la misma producción puede ser llevada a cabo en un paso de reacción y de manera selectiva en menor tiempo y de manera amigable con el medio ambiente.

Este hecho ha llamado mucho la atención en los últimos años, lo que ha llevado a profundizar en esta estrategia con el fin de optimizar el uso de las enzimas hacia la obtención de polipéptidos sintéticos.

Con base en lo anterior, este trabajo es el primero en demostrar la síntesis de polipéptidos de L-Leu-OEt y L-Fen-OEt, mediada por proteasas en un medio poco utilizado, como es el 1,1,1,2-tetrafluoroetano (R-134a) en condición líquida (40° C, 25 bar).

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1. Poliamidas.

Las poliamidas son macromoléculas que están enlazados entre un grupo amina y un grupo carboxilo, mejor conocido, como enlace amida (HN-CO). Además, son consideradas como polímeros polares, debido a la polaridad del enlace amida, ya que tiene átomos altamente electronegativos (nitrógeno y oxígeno), que, dependiendo de la cantidad de grupos metilenos u otros y de la estructura que presenten, pueden generar un momento dipolar (Pérez, et al., 2014).

Estas se pueden clasificar de acuerdo a su obtención, como origen natural y origen artificial, a su vez, se subdividen de acuerdo a la composición de la cadena principal (**Figura 1**).

En el caso de las poliamidas de origen artificial se pueden clasificar tres tipos, que son las poliamidas alifáticas, poliftalamidas y aramidas, las cuales se constituyen en su cadena principal de grupos alifáticos, semiaromáticos y aromáticos, respectivamente.

Por otro lado, las poliamidas de origen natural finalmente son proteínas que están constituidas por polipéptidos, donde la cadena principal se compone de 20 aminoácidos estándar.

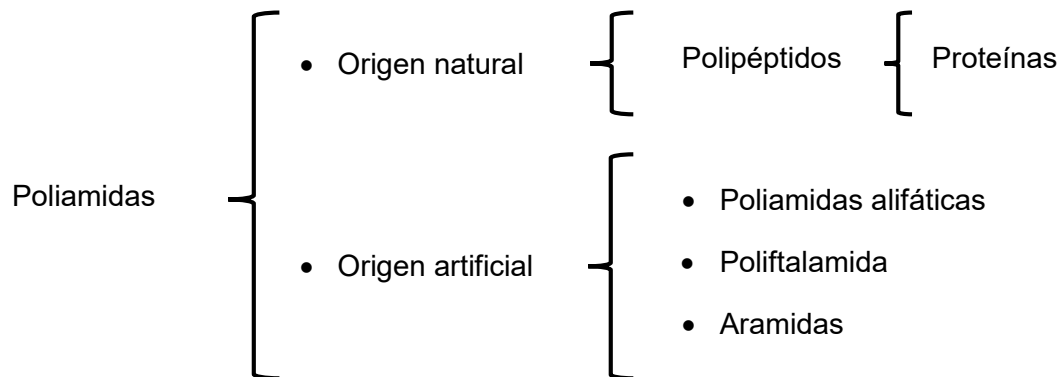


Figura 1. Clasificación de poliamidas.

Dentro de las principales aplicaciones de las poliamidas son el moldeo por inyección, extrusión, películas y fibras en la industria automotriz, eléctrica y electrónica, embalaje y

extrusión por ser materiales termoplásticos con alta resistencia mecánica, térmica y química (Page, 2000; Rulkens & Koning, 2012).

1.2. Polipéptidos.

Los péptidos, formalmente son polímeros de aminoácidos, conectados por enlaces amida (enlace peptídico) entre un grupo carboxilo de un aminoácido y un grupo amino del siguiente aminoácido. Y En función de su tamaño puede ser nombrados como oligopéptidos (10-15 UR), polipéptidos (15-50 UR) y proteínas (>50 UR) (Sewald & Jakubke, 2002).

Los péptidos naturales y proteínas usualmente contienen los 20 aminoácidos estándar. Mientras que los péptidos sintéticos, por un lado pueden estar compuestos por aminoácidos estándar, como también pueden involucrar otras cadenas funcionales (por ejemplo grupos β -, γ -ácido carboxílico y ϵ -amino) (Oppermann & Steinbüchel, 2002).

La conformación y funcionalidad de los polipéptidos, se basan en las propiedades que les confieren los aminoácidos. Cada aminoácido varía su estructura, tamaño y carga eléctrica debido a que tiene dos grupos funcionales (amino y carboxilo), una cadena lateral o grupo R y un hidrógeno, todos a su vez están unidos al mismo átomo de carbono (carbono alfa) o centro quiral.

En años anteriores, estos compuestos han atraído el interés científico en el mundo, ya que participan en una amplia variedad de funciones biológicas con una alta eficiencia, además son bloques de construcción que presentan una amplia versatilidad para la fabricación de arquitecturas supramoleculares que proporcionan una plataforma única para el diseño de biomateriales de autoensamblaje, es decir que tienen la habilidad para plegarse de manera independiente (Loo, Zhang, & Hauser, 2012).

1.3. Métodos de síntesis.

La formación de los polipéptidos naturales y proteínas *in vivo* requiere de procesos selectivos de activación catalizados por enzimas, donde participan cientos de macromoléculas, incluidas ARNm, ARNt, enzimas activadoras, factores proteínicos y los ribosomas de las células vivas.

En 1901 se obtuvo la síntesis del primer péptido sintético, el dipéptido de glicil-glicina por Emil Fisher, y con este hecho se marcó el comienzo de la síntesis de polipéptidos en la historia (Lira, 2007).

Brevemente, en la **Figura 2** se presentan los enfoques tecnológicos comúnmente utilizados para la producción de polipéptidos, tales como el enfoque químico y el enfoque biotecnológico.

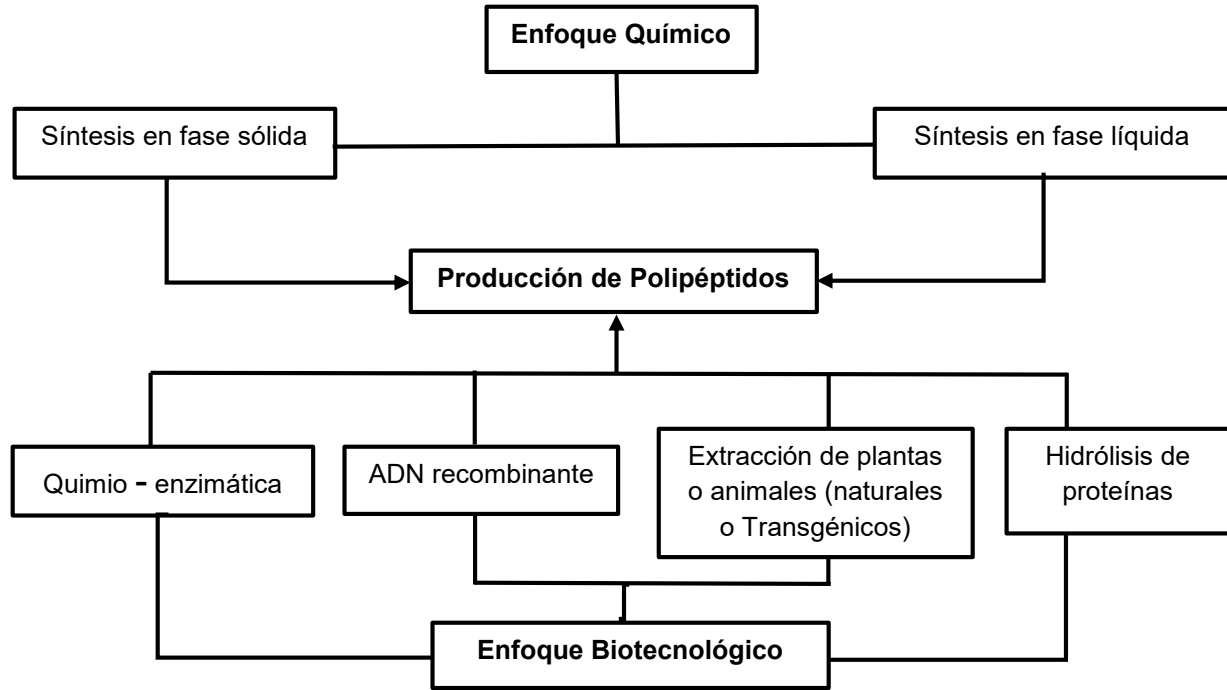


Figura 2. Enfoques tecnológicos para la obtención de polipéptidos.

Dentro del enfoque químico se han derivado dos estrategias importantes, la síntesis en fase líquida y en fase sólida, la finalidad de ambas reacciones es favorecer la reacción de condensación de polipéptidos y disminuir o eliminar la reacción de hidrólisis.

La síntesis en fase sólida involucra diferentes reactivos de acoplamiento y de protección. Para lo cual se generan varios pasos de reacción y la utilización de grandes cantidades de disolventes orgánicos. Sin embargo, también han ofrecido polipéptidos de una secuencia ordenada y tamaños definidos, es decir que los residuos de aminoácidos y la cantidad de ellos van colocados de acuerdo a los requerimientos la molécula diseñada (Stawikowski & Fields, 2012; Valeur & Bradley, 2009).

Mientras tanto en la síntesis en fase líquida, la metodología más prometedora ha sido la polimerización de apertura de anillo en un paso a partir de monómeros de anhídrido α -

aminoácido-N-carboxianhidrido (NCA) (**Figura 3**), debido al uso de reactivos fácilmente disponibles para obtener productos con altos rendimientos.

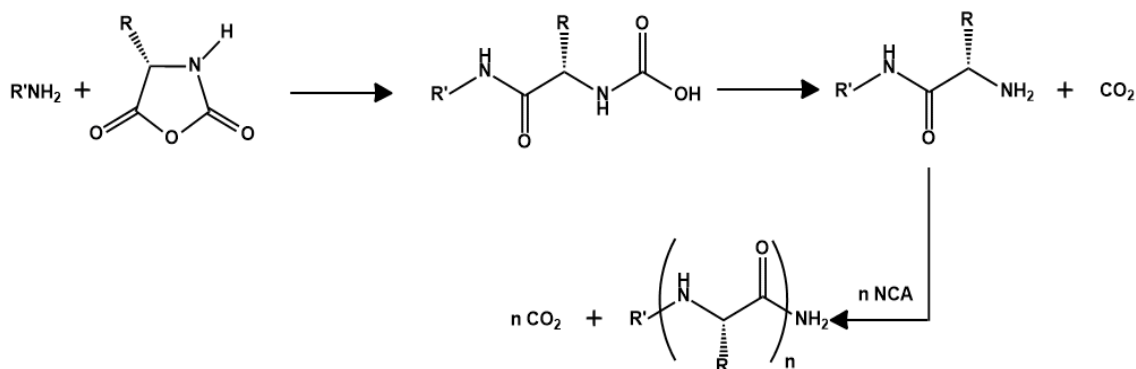


Figura 3. Mecanismo propuesto para una polimerización de abertura de anillo de NCA iniciado por una amina nucleofílica.

En contraste, el enfoque biotecnológico se basa en la utilización fuentes renovables con la capacidad de extrapolar sus virtudes nativas en la obtención de polipéptidos en condiciones amigables hacia el medio ambiente, tales como ADN recombinante, extracción a partir de plantas o animales tanto naturales como transgénicos a través de la degradación de proteínas y la utilización de enzimas como catalizadores para sintetizarlos. No obstante, algunas de estas técnicas, como ADN recombinante, están sometidas a rigurosos controles de calidad, altos costos de operación y rendimientos bajos (Lax, 2010).

Particularmente, cada enfoque se ha desarrollado con la finalidad de satisfacer ciertas necesidades del material que se ha requerido, es decir, tamaño, secuencia, conformación, pureza y bioactividad.

1.3.1. Síntesis enzimática de polipéptidos.

En las pasadas tres décadas, la síntesis enzimática de polímeros ha llamado la atención, ya que las enzimas son catalizadores que en su ambiente nativo funcionan óptimamente.

Las enzimas son enantioselectivas, regioselectivas y quimioselectivas, es decir que presentan un reconocimiento selectivo hacia un cierto enantiómero, o la posición de un grupo o bien un grupo funcional.

Sin embargo, al querer trasladar sus habilidades catalíticas fuera de su ambiente nativo, se encuentran algunas limitantes como su dependencia hacia el pH de la disolución, la concentración del sustrato y la presencia de disolventes orgánicos (Kadokawa & Kobayashi, 2010; Krishna, 2002). Razones por las cuales han surgido nuevas tendencias en la síntesis enzimática con respecto al medio, a el sustrato y a las mismas enzimas, para mejorar el rendimiento de estas en la síntesis (Bordusa, 2002).

1.3.2. Enzimas usadas en la síntesis de polipéptidos.

Las enzimas a diferencia de los catalizadores inorgánicos, tienen un sitio catalítico que realiza una doble función, unir el sustrato y catalizar la reacción. El grupo de las hidrolasas, tales como lipasas, esterasas y proteasas han sido reportadas para usos sintéticos.

1.3.2.1. Proteasas.

Las proteasas, también conocidas como peptidasas de acuerdo a la recomendación de la NC-IUB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, por sus siglas en inglés) tienen sitios catalíticos con cierta geometría y potencial electrostático, que influyen en la afinidad hacia residuos de aminoácidos con el fin de hidrolizar enlaces peptídicos en las proteínas.

Sin embargo, en 1898 van't Hoff postulo que bajo el principio de reversibilidad de las reacciones químicas las proteasas podrían catalizar la síntesis de péptidos, además en 1937 se demostró la biocatálisis del enlace peptídico mediante proteasas (papaína y quimopapaína) por algunos investigadores (Bergmann & Conrat, 1937; Bergmann & Fruton, 1938).

Actualmente también son utilizadas en esterificaciones, transesterificaciones, síntesis de glicoconjugados y resolución cinética (Chaiken, et al., 1982; Bordusa, 2002).

En la década de los 70's, Berger y Schechter demostraron el mecanismo de la reacción de hidrólisis realizada por las proteasas; ya que al dividirse el sitio catalítico en dos extremos facilita el encuentro entre el donador de acilo y el nucleófilo (**Figura 4**) (Berger & Schechter, 1970).

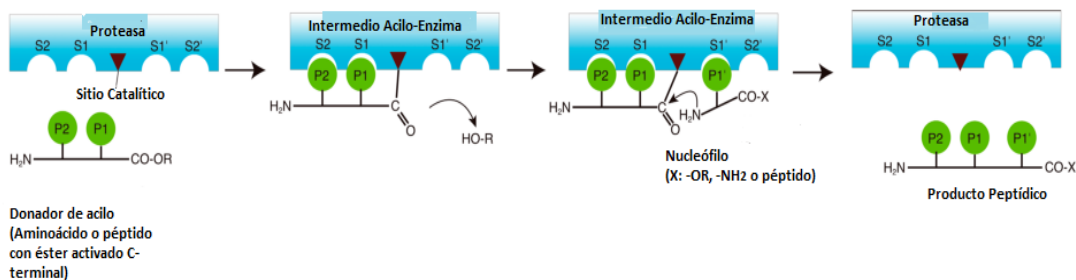


Figura 4. Síntesis de péptidos catalizada por proteasas (Yazawa & Numata, 2014).

En la síntesis de polipéptidos, estudios previos han demostrado que se lleva a cabo mediante dos métodos que son el control termodinámico (hidrólisis reversible) y control cinético (reacción de aminólisis).

El control termodinámico consiste en ajustar el equilibrio hacía la síntesis del enlace peptídico, mediante un grupo carboxilo libre para actuar como donador del grupo acilo seguido por el paso de condensación. Para favorecer este equilibrio se recurre a la modificación de la solubilidad de los productos (polipéptidos) utilizando disolventes orgánicos o mezclas bifásicas (orgánica/acuosa), dependiendo de la estabilidad de la enzima. Dentro de las principales desventajas se encuentran rendimientos bajos, velocidades de reacción lentas y el empleo de grandes cantidades de enzima.

Por otro lado, el control cinético se basa en que la enzima actúa como una transferasa que permite la transferencia del grupo acilo al grupo amina (nucleófilo) del aminoácido. Para ello se requiere que el grupo acilo este activado y que las proteasas sean de la clase serina y cisteína, que permitan la formación del complejo proteasa-acilo (P-A); el cual permite que haya una competencia entre las reacciones de hidrólisis y de aminólisis (**Figura 5**), para hidrolizar o formar el enlace péptido, respectivamente.

A pesar de que el ambiente acuoso propicia una competencia entre las reacciones de síntesis e hidrólisis se han logrado sintetizar homopolímeros y heteropolímeros de L-aminoácidos utilizando serín y cisteín proteasas. Mediante una búsqueda de las mejores condiciones de actividad proteolítica, pH, concentración del sustrato y tiempo de reacción, se ha encontrado que máximo grado de polimerización (GP) no es superior a 13.5 UR con un rendimiento del 36%. Sin embargo, la mayoría

de las reacciones llevadas a cabo en este medio ambiente tienen GP en un intervalo de 6-9 UR.

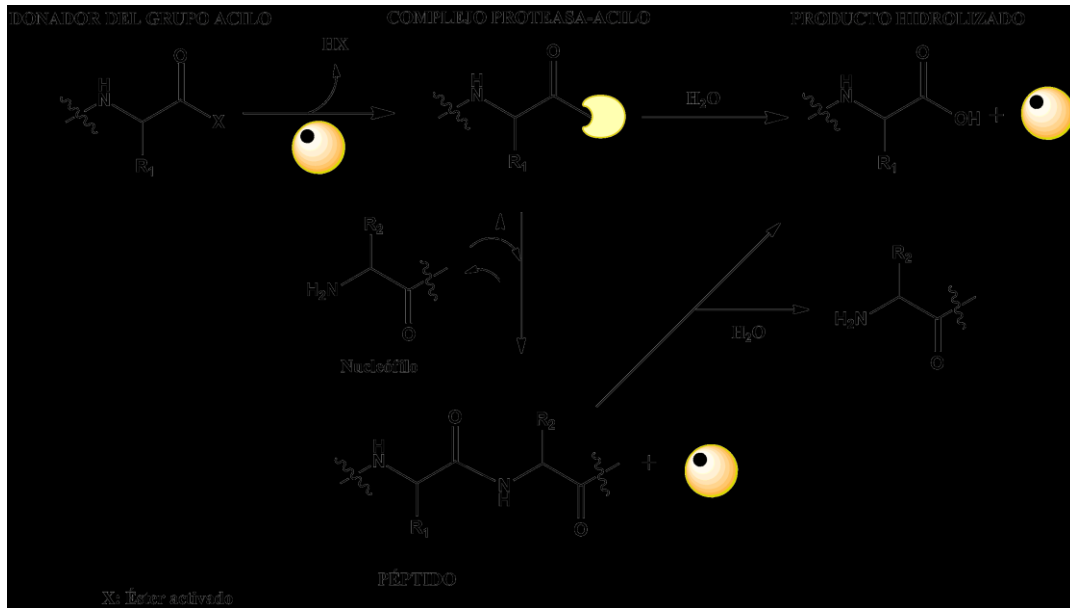


Figura 5. Modelo de síntesis enzimática de péptidos a través del control cinético (Yazawa & Numata, 2014).

1.3.2.1.1. Serín proteasa.

Estas proteasas se caracterizan por tener en su sitio catalítico a los residuos de serina (Ser), histidina (His) y ácido aspártico (Asp). Su mecanismo catalítico, como se muestra en la Figura 6a, consiste en que el grupo OH de Ser actúa como un nucleófilo y ataca al grupo carbonilo del enlace peptídico del sustrato, a su vez el par de electrones del átomo de nitrógeno de His acepta el átomo de hidrogeno del grupo OH de Ser, mientras que el grupo carboxilo en Asp establece un enlace hidrogeno con His, lo cual permite mejorar el carácter electronegativo del par de electrones mencionados anteriormente.

Dentro de esta subclase de proteasas se encuentra la subtilisina Calsberg (SC) (**Figura 6b**) la cual es producida por la bacteria *Bacillus licheniformis* y fue descubierta en 1947 por Linderstrom, Lang y Ottesen en los laboratorios Carlsberg (Rao, et al., 1998).

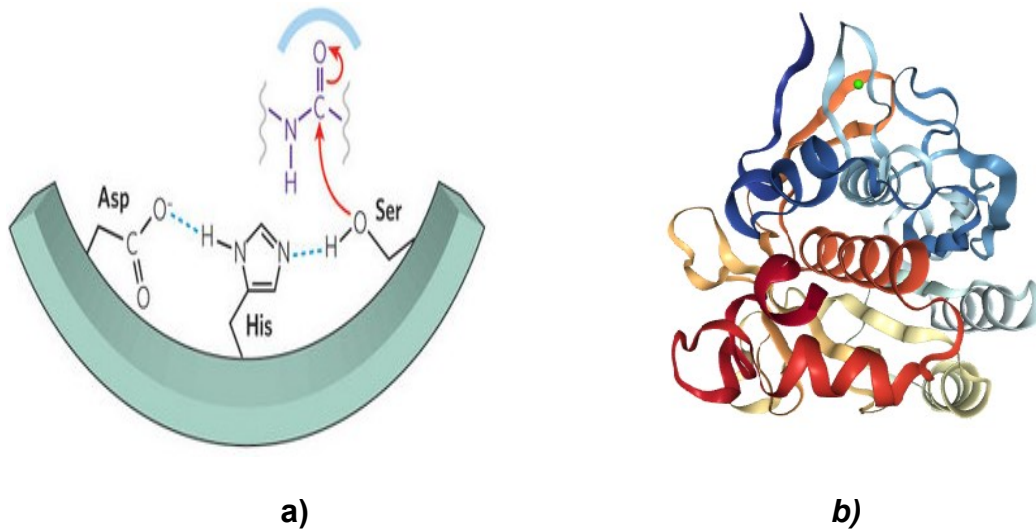


Figura 6. Sitio catalítico de la serín proteasa (Neitzel, 2010) **(a)**. Estructura cristalina de serín proteasa de *bacillus subtilis* (1SBC) (Neidhart & Petsko, 1988) **(b)**.

Esta enzima actúa como una endoproteasa extracelular y tiene un peso molecular 27.5 kDa, además exhibe una amplia especificidad de sustratos. Sus condiciones óptimas se encuentran a 60°C y un pH de 10 (Rao, et al., 1998).

Además, se ha demostrado que la SC mantiene su estabilidad y actividad catalítica en medios orgánicos, lo cual le ha permitido ser utilizada en la síntesis de péptidos en intervalos de temperatura moderada (25-37°C) y hasta 60°C, pero a esta temperatura la SC muestra una ligera desactivación (Toplak, et al., 2015).

Por otro lado, la SC también ha permitido la resolución de mezclas racémicas de alcoholes secundarios, ácidos carboxílicos, transesterificación en aminoácidos en Hidrofluorocarbonos (HFCs) comprimidos (Saul, et al., 2004; Saul, et al., 2007).

1.3.2.1.2. Cisteín proteasa.

La cisteín proteasa tienen en su sitio activo al residuo de cisteína el cual actúa como nucleófilo, además es auxiliado por el residuo de histidina que es el donador de protones para la formación del intermedio P-A (**Figura 7a**).

Dentro de la clase de cisteín proteasa se encuentra la papaína (**Figura 7b**) que es aislada del latex de la fruta tropical de *Carica papaya*. Esta fue la primera enzima cristalizada y ha sido una de las enzimas más estudiadas, ya que fue la primera en reconocerse como cisteín proteasa. Esta enzima exhibe actividad catalítica como endoproteasa, amidasa y esterasa, y ha sido ampliamente estudiada en sistemas acuosos donde ha demostrado ser estable y activa dentro de los intervalos de 4-10 y 80°C de pH y temperatura, respectivamente.

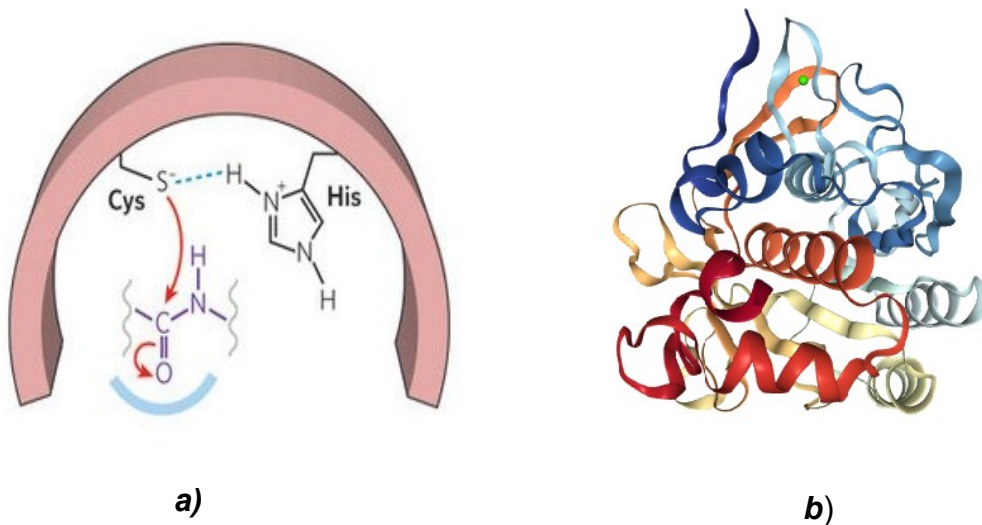


Figura 7. Sitio catalítico de la cisteína proteasa (Neitzel, 2010) (a). Estructura cristalina de cisteín proteasa de *carica papaya* (9PAP) (Kamphuis, Kalk, & Swarte, 1984) (b).

Adicionalmente, esta enzima también se ha estudiado en medios totalmente orgánicos y los resultados mostraron que puede catalizar reacciones, tales como polimerización de D,L-aminoácidos, síntesis de ésteres de aminoácidos y síntesis de péptidos, bajo una variedad de condiciones de reacción, pero la especificidad es distinta de la mostrada en medios acuosos (Stevenson & Storer, 1990), la desnaturalización parcial de esta enzima, inducida por una suspensión en propanol, puede ser parcialmente reversible (Matsubara, et al., 2006).

Otro dato interesante de esta enzima, es que estudios anteriores demostraron que la actividad enzimática de la papaína al ser incubada en dióxido de carbono supercrítico (scCO₂), aumenta al incrementar la temperatura, pero la temperatura optima fue de 40 °C (Wimmer & Zarevúcka, 2010).

1.4. Fluidos comprimidos.

Un fluido comprimido es aquel que se encuentra bajo condiciones mecánicas y termodinámicas, que dependiendo de las condiciones de T y P con respecto a la temperatura crítica y presión crítica (T_c y P_c, respectivamente) se puede considerar un líquido subcrítico ($P > P_c$ y $T < T_c$), un fluido supercrítico ($P > P_c$ y $T > T_c$) y un gas licuado ($P < P_c$ y $T < T_c$).

Los fluidos supercríticos, en términos generales, son gases comprimidos que tiene la virtud de tener difusividad y viscosidad cercana a la de los gases y una densidad parecida a la de los líquidos, mientras que un fluido subcrítico tiene propiedades intermedias entre un líquido y un fluido supercrítico (Marcus, 2005).

La importancia de su aplicación radica en que sus propiedades de solvatación, que es una característica importante que determina la solubilidad de los solutos. La principal virtud de los fluidos supercríticos es que estas propiedades de solvatación pueden ser variadas en un amplio intervalo de T y P (Marcus, 1993). Los más reconocidos han sido el CO₂ e HFCs.

En años recientes se ha incrementado la tendencia hacia el uso de disolventes verdes como medios de reacción, de extracción y de separación, debido a que son medios no tóxicos, no inflamables, que no dejan residuos y que son fácilmente eliminados. Los fluidos comprimidos pueden ser considerados como disolventes verdes ya que poseen esas características y además pueden ser reutilizados (Marcus, 2005).

1.4.1. Dióxido de Carbono.

El CO₂ tiene puntos de T_c y P_c bajos (T_c = 30.95°C, P_c = 73.8 bar), además tiene excelentes propiedades físicas como baja viscosidad, alta difusividad, ausencia de tensión superficial y buenas propiedades de transporte (transferencia de masa y de calor) que lo han hecho muy atractivo en diversas operaciones.

En 1985 se empleó el scCO₂ por primera vez como medios de reacción en hidrólisis mediada por lipasas (Nakamura et al., 1985), oxidación de algunas benzoquinonas mediante polifenol oxidasas (Hammond et al., 1985) y la hidrólisis de p-nitrofenil fosfato mediante fosfatasas (Randolph et al., 1985).

A pesar de las ventajas que tiene, su constante dieléctrica tiene valores cercanos a cero ($\mu = 0$ D) que son una desventaja en la disolución de componentes polares (Medina, Camy, & Condoret, 2012). Además, se ha demostrado que tiene un efecto negativo en la estabilidad y actividad de varias enzimas, principalmente porque puede formar complejos de carbamato-enzima, que pueden cambiar la conformación de las enzimas (Bordusa, 2002).

1.4.2. 1,1,1,2-tetrafluoroetano.

El 1,1,1,2-tetrafluoroetano (R-134a) es un compuesto que pertenece a la familia de HFCs, su fórmula química está compuesta por tres átomos de flúor acoplados a la cadena del etano (C₂H₂F₃) (**Figura 8**).

Tiene un punto crítico accesible, donde la T_c = 101°C y la P_c = 40.6 bar (**Figura 8**), presenta baja viscosidad (0.21 cP a 25°C) y baja tensión superficial (8.7 din/cm) que le permite tener buena capacidad de humectación y penetración en diferentes matrices (Corr, 2002).

En contraste con el CO₂, los HFCs tienen mayor potencial de solvatación ya que tienen un momento dipolar permanente que permite la formación de fuertes fuerzas atractivas en solución, como dipolo-dipolo o dipolo-dipolo inducido, lo cual mejora la solubilidad de compuestos polares (Lagalante, Hall, & Bruno, 1998).

El R-134a no es una excepción, ya que en estudios anteriores se ha demostrado que su potencial de solvatación tiene correlación lineal con la densidad y la densidad como variable intensiva depende de la T y la P (**Figura 9**).

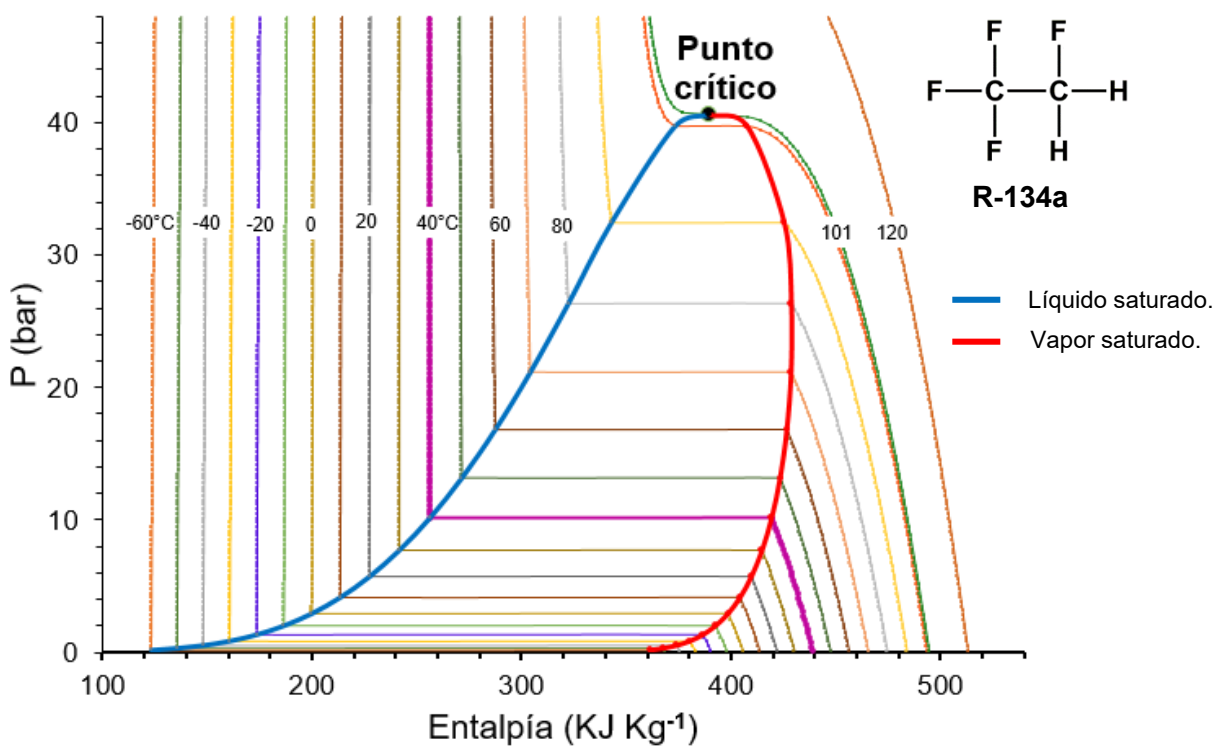


Figura 8. Diagrama de Entalpía-Presión (P) del R-134a (NIST, 2017).

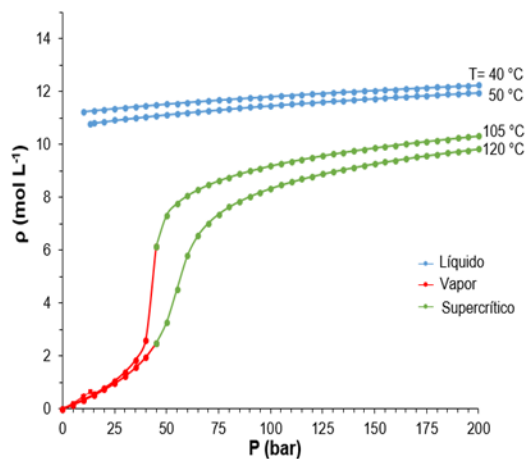


Figura 9. Diagrama de Presión (P) – Densidad (ρ) a diferentes isotermas (40, 50, 105 y 120 °C) (NIST, 2017).

El parámetro π^* mostró ser relativamente alto a mayor densidad, por su momento dipolar y constante dieléctrica ($\mu = 2.06$ D y $\epsilon = 9.5$ KHz, respectivamente) y por sus sustituyentes asimétricos de átomos de flúor (**Figura 10a**), por otro lado, el parámetro β mostró valores negativos, lo cual indica que este disolvente es ligeramente pobre como aceptor de enlaces hidrogeno (**Figura 10b**) (Lagalante, Hall, & Bruno, 1998). Por sus características físicas y químicas, puede ser utilizado como un fluido hidrofóbico moderadamente polar en comparación con disolventes orgánicos, como el tetrahidrofurano y el éter dietílico, además es inmiscible con el agua.

Sus principales aplicaciones después de 1987, incluyen sistemas de refrigeración, ya que reemplazó al diclorodifluorometano tras el mandato del "Protocolo de Montreal", así mismo se ha utilizado como propulsor en las latas de aerosol y como propelente en el tratamiento de asma (con el nombre de norfluorano) (Suberu et al., 2016), además, se ha utilizado en el espumado de polímeros, en extracciones de productos naturales y en medios de reacción.

El R-134a como medio de reacción ha participado en resolución de alcoholes, desimetrización, transesterificación y polimerización de poliésteres mediados con lipasas y proteasas (Saul, et al., 2004; Ball, et al., 2009; García, et al., 2007; Guzmán, et al., 2012; López, et al., 2010).

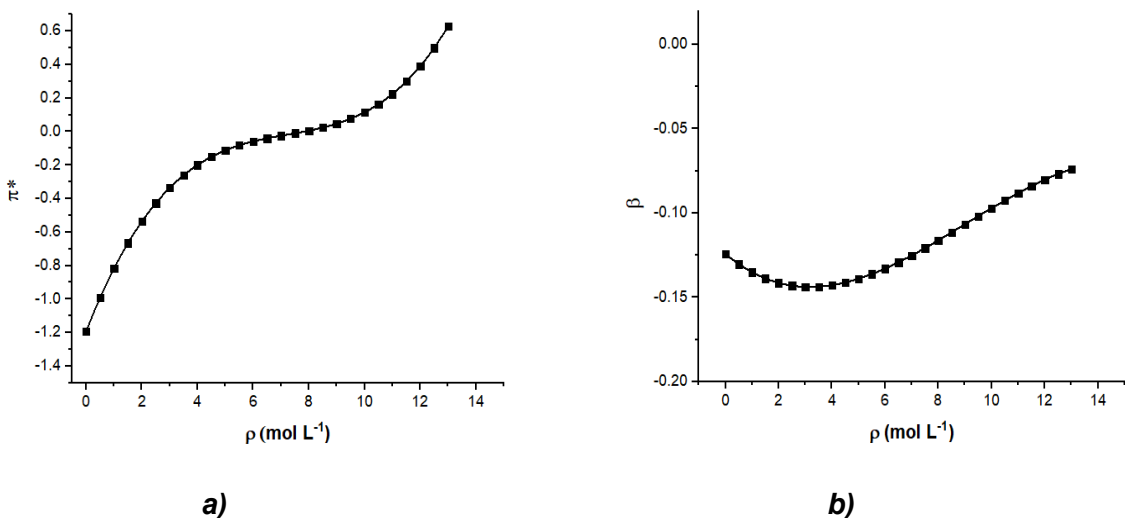


Figura 10. Parámetros solvatocrómicos (Kamlet-Taft) del R-134a como función de la densidad: π^* (a) y β (b) (Lagalante, Hall, & Bruno, 1998).

CAPÍTULO 1. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis.

En la actualidad, la síntesis enzimática de péptidos hidrofóbicos, L-Leucina (L-Leu) y L-Fenilalanina (L-Fen), ha sido mediada por cisteín y serín proteasas en medios acuosos, donde la temperatura favorable ha sido 40 °C.

Por otro lado, el R-134a líquido con la ayuda de la SC, ha mostrado ser un medio de reacción favorable en resoluciones enzimáticas de mezclas racémicas de aminoácidos.

Aunado a lo anterior, este trabajo pretende demostrar que la síntesis de polimerización de L-Leu y L-Fen catalizadas por SC y papaína, se verá favorecida por el uso del R-134a líquido como medio de reacción, a una temperatura de 40°C y a una presión superior a la presión de equilibrio liquido-gas (10.17 bar).

2.2. Objetivos.

2.2.1. Objetivo general.

Diseñar un método de polimerización y copolimerización de los ésteres de etilo de L-Leu y L-Fen, que sea catalizado con proteasas (SC y papaína) en R-134a líquido (40°C y 25 bar), con la finalidad de obtener polipéptidos con longitud de cadena superior a las 10 UR y además con una distribución de masa molecular monodispersa.

2.2.2. Objetivos particulares.

- Determinar cualitativamente la solubilidad de los ésteres de etilo de L-Fen y L-Leu en fluidos comprimidos.
- Medir la actividad proteolítica residual de las proteasas, SC y papaína, después de ser expuestas en R-134a líquido, para conocer su estabilidad enzimática.

- Estudiar las condiciones de polimerización enzimática en el R-134a líquido que permita obtener polipéptidos y copolipéptidos de los monómeros seleccionados.
- Caracterización de los productos obtenidos mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR), para determinar su estructura química, masa molecular y grado de polimerización.
- Utilizar técnicas tales como DC y UV-vis para evaluar el plegamiento de las macromoléculas obtenidas.

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este capítulo se describen los materiales y técnicas utilizadas para obtener y caracterizar los productos de este trabajo de investigación.

3.1. Materiales.

Clorohidrato de L-Leucinato de etilo (L-Leu-OEt·HCl) (pureza $\geq 99\%$), Clorohidrato de L-Fenilalanina de etilo (L-Fen-OEt·HCl) (pureza $\geq 99\%$), Subtilisina Carlsberg o Subtilisina A (serín proteasa S8 endoproteinasa EC. 3.4.21.62; origen bacillus licheniformis, peso molecular 27 KDa), papaína cruda (cisteína proteasa EC 3.4.22.2, origen *Cacarica papaya*, peso molecular 23 KDa), reactivo de Folin & Ciocaltea's, acetato de calcio monohidratado ($\text{Ca}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), carbonato de potasio (K_2CO_3), ácido trifluoroacético (TFA) y L-tirosina fueron provistas por Sigma-Aldrich, además, el fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4), carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3), ácido tricloroacético en cristales (Cl_3CCOOH), cloruro de calcio anhidro (CaCl_2), acetato de sodio trihidratado ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) y acetato de etilo ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) fueron provistos por J.T. Baker. Por otro lado, la caseína láctica fue suministrada por Reactivos Química Meyer. El cilindro de gas de 1,1,1,2-Tetrafluoroetano (60 Kg, Dupont Suva-R134a) fue suministrado por CEI de México SA de CV (México).

3.2. Acondicionamiento de la papaína.

Previo a su utilización, la papaína cruda fue acondicionada para retirar la materia insoluble de acuerdo a la metodología planteada por Fagerland (Fagerland, Finne, & Numata, 2014). La cual consistió en preparar una disolución de papaína cruda (60 mg/mL) en agua MilliQ (18.2 m Ω .cm @ 25°C), agitar suavemente, centrifugar durante 20 min (9000 rpm, 4°C), liofilizar el sobrenadante y almacenar la papaína a -80°C.

3.3. Determinación de la actividad enzimática de las proteasas.

La actividad enzimática de las proteasas fue evaluada con algunas adaptaciones de la metodología de Sigma Aldrich (Cupp-Enyard, 2008) para determinar su actividad proteolítica, donde una unidad (U) de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de tirosina por minuto.

Cada ensayo de actividad enzimática se realizó por triplicado con su respectivo blanco, como se describe a continuación. Durante 10 min se incubó en baño María (37°C), 5 mL de caseína al 0.65% en buffer de fosfatos (50 mM de K₂HPO₄, pH 7.5) con 1 mL de la disolución de enzima (0.047 mg/mL) en buffer de acetato (10 mM de CH₃COONa con 5mM de Ca(CH₃CO₂)₂), excepto el blanco. La degradación de la caseína por la proteasa fue parada con 5 mL de Cl₃CCOOH (110mM), incluyendo al blanco, al cual además se le adicionó 1 mL de disolución de enzima. Después de 30 min de incubación las muestras y el blanco se centrifugaron durante 10 min (9000 rpm, 25°C), para remover la fracción insoluble.

Posteriormente, se tomaron 2 mL de sobrenadante de cada una de las muestras y del blanco, y se les adicionó 5 mL de Na₂CO₃ (500 mM), seguido de la adición inmediata de 1 mL de reactivo de Folin & Ciocaltea's. Después de 30 min de incubación, las muestras y el blanco se centrifugaron (7000 rpb, 25°C) durante 10 min.

Finalmente, se midió la absorbancia de cada muestra (2 mL) usando un espectrofotómetro Lambda 2S UV-Vis (Perkin Elmer Inc., USA) a una longitud de onda de 660 nm.

3.3.1. Estabilidad de las enzimas en R-134a.

Con la finalidad de determinar la actividad enzimática residual, las proteasas (6 mg) se colocaron dentro de un sobre de papel filtro antes de ser introducidas en la celda, posteriormente la celda se selló y se colocó al vacío durante 10 minutos. Después de que la celda alcanzará los 40 °C, se procedió a llenar la celda con R-134a a una presión de 25 bares, una vez, que estas condiciones fueron alcanzadas se incubaron las muestra a diferentes tiempos, 3, 6, 24 y 48 h. Al finalizar el periodo de incubación en R-134a, la celda se enfrió a 5°C para retirar la enzima y realizar el ensayo de actividad enzimática.

3.3.2. Desnaturalización térmica.

Las proteasas se incubaron a 40 °C durante diferentes tiempos (3, 6, 24 y 48 h) en el R-134a, al finalizar cada tiempo se calentó la celda a 100°C durante 10 min y se dejó enfriar a 5°C. Posteriormente se realizaron las pruebas de actividad enzimática.

Otro proceso térmico utilizado para desnaturalizar a la enzima, consistió en someter a las proteasas a 115°C y 4.9 bares durante 21 min en una autoclave HIRAYAMA (HA-300M11, USA) y finalmente se evaluó la actividad enzimática.

3.4. Prueba de solubilidad.

Debido a que CO₂ mejora su capacidad polar en condiciones súper críticas (40°C, 150 bar) y el R-134a líquido (40°C, 25 bar) es relativamente polar, se probó la solubilidad de L-Leu-OEt y L-Fen-OEt en ambos gases, mediante una prueba visual en una celda de alta presión y volumen variable (9.6-31.3 cm³, Top Industrie, Francia) equipada con tres ventanas de zafiro (**Figura 11**).

La prueba consistió en colocar una muestra de 6 mmol y un agitador magnético dentro de la celda de alta presión, misma que fue sellada. La temperatura fue ajustada a 40°C mediante un baño termostático y un termopar (J type, precisión de ±0.1 K) colocado en el interior de la celda. Una vez, que la temperatura se alcanzó y se mantuvo por diez minutos, la celda fue llenada mediante una bomba de aguja (260D high-pressure Teledyne Isco syringe pump) con gas CO₂ (150 bar) o mediante un gradiente de presión con R-134a (7.2 bar, 14 °C), respectivamente.

Para determina el punto de enturbiamiento, el pistón de la celda se movió progresivamente en el orden de disminuir el volumen de la celda.

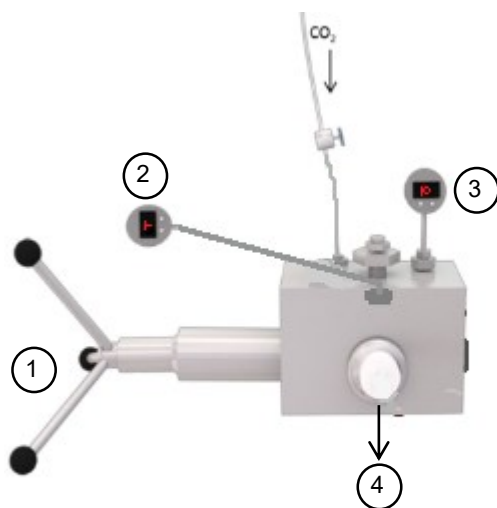


Figura 11. Celda de alta presión con volumen variable, graduador de volumen (1), termopar (2), manómetro (3) (Medina, et al., 2017).

3.4.1. Desalinización de los monómeros.

La metodología que se utilizó para desalinizar los monómeros, fue adaptada del trabajo de Bodanszky (Bodanszky & Bodanszky, 1994), brevemente, esta consistió en mezclar una disolución de K_2CO_3 (3.9 M) con cada uno de los clorhidratos de los L-ésteres de aminoácido (21.4 % en peso), después de 1 h de agitación vigorosa, se realizó una extracción con acetato de etilo (4 x 20 mL) y finalmente se secó a presión reducida (45°C, 70 mmHg), el esquema de desalinización se muestra en la **Figura 12**.

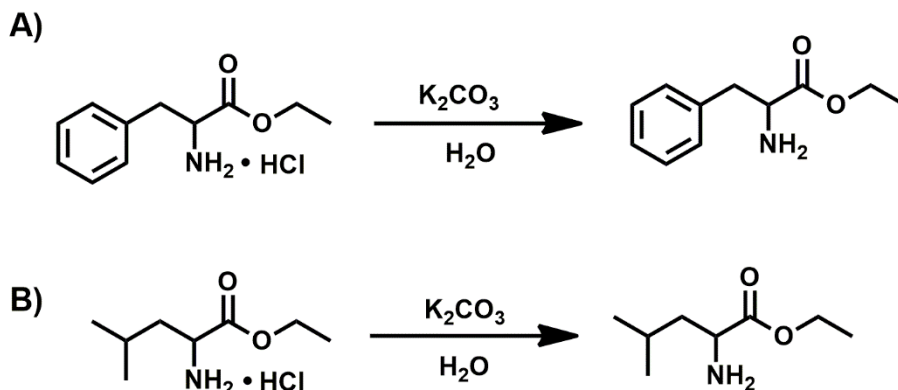


Figura 12. Esquema de desalinización de los monómeros. **A)** Desalinización del clorhidrato de L-Fen-OEt. **B)** Desalinización del clorhidrato de L-Leu-OEt. .

3.5. Síntesis enzimática de polipéptidos.

3.5.1. Síntesis enzimática de homopolipéptidos.

Para realizar la síntesis enzimática de L-Leu-OEt y L-Fen-OEt, primero se calentó la celda de alta presión (**Figura 13**) a 40°C, una vez estabilizada la temperatura, se colocaron individualmente en el interior cada monómero (6 mmol) y la SC (110 U). Se colocó la celda durante 10 minutos a la presión de vacío y en seguida, se llenó con R-134a (40°C, 25 bar) y se dejó en agitación durante diferentes tiempos de reacción (3, 6, 24, 48 h), cada tiempo de reacción se realizó por duplicado y con un blanco.

Para finalizar la polimerización enzimática, la celda se calentó hasta 100°C durante diez minutos y se dejó enfriar a 5°C toda la noche. La mezcla de reacción se extrajo de la celda mediante lavados acuosos (agua MilliQ, 18.2 mΩ.cm @ 25°C) (48 mL) y la separación entre el monómero y el producto se realizó mediante centrifugación (7000 rpm, 20 min), donde el sobrenadante fue recolectado y liofilizado.

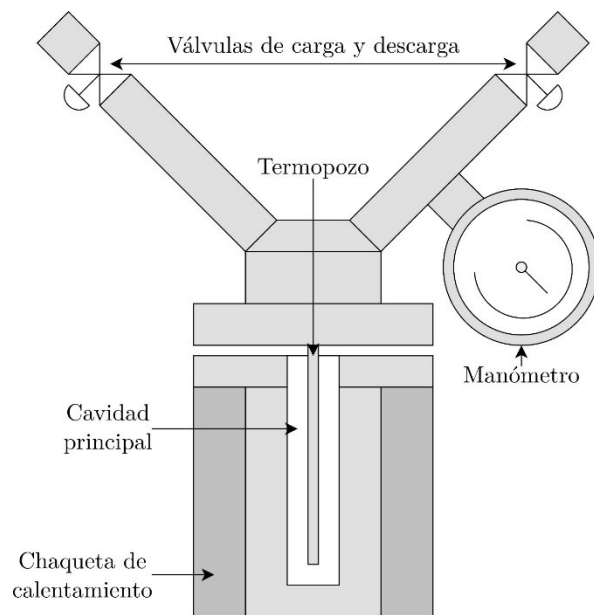


Figura 13. Vista de la celda de alta presión.

3.5.2. Síntesis enzimática del copolipéptido.

La copolimerización enzimática entre la L-Leu-OEt y L-Fen-OEt se realizó con la misma metodología de los homopolímeros, a diferencia de que en vez de colocar sólo un monómero se colocaban ambos en una relación 1:1 (3mmol:3mmol) en la misma celda de alta presión (**Figura 13**).

3.6. Caracterización fisicoquímica.

La caracterización fisicoquímica de los productos obtenidos se desarrolló mediante experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en solución, Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR), espectrometría de masas con ionización-desorción asistida por láser evaluando el tiempo de vuelo (MALDI-Tof, por sus siglas en inglés), Dicroísmo circular (DC), UV-Visible (UV-Vis), difracción de rayos X de polvo (DRXP) y microscopia confocal.

3.6.1. Resonancia Magnética Nuclear.

Los análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en una y dos dimensiones se realizaron en un espectrómetro Varian MR-400 (400 MHz). Los datos fueron analizados por

MestReNova, versión 12.0 (Mestrelab Research S.L., www.mestrelab.com, 2018) y los desplazamientos químicos están reportados en ppm.

Las muestras de L-Leu-OEt y L-Fen-OEt se analizaron en cloroformo deuterado (CDCl_3) (60mg/mL) y se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Mientras que las muestras liofilizadas, obtenidas de las polimerizaciones enzimáticas, se disolvieron en una mezcla de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) / ácido trifluoroacético deuterado (TFA- d) (9.25:0.75), a una concentración de 60 mg/mL y se utilizó el DMSO- d_6 como referencia interna de 2.5 y 39.52 ppm, para RMN- ^1H y RMN- ^{13}C , respectivamente.

3.6.2. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier.

Con el fin de determinar los grupos funcionales presentes en los productos de reacción, se analizaron las muestras mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR). Los resultados fueron obtenidos en un equipo Perkin-Elmer Spectrum 400.

Las muestras de L-Leu-OEt, L-Fen-OEt, poli(L-Fen-OEt) y poli(L-Leu-O-co-L-Fen-OEt) en polvo fueron analizadas mediante Reflectancia Total Atenuada (ATR, por sus siglas en inglés), mientras que en las muestras de poli(L-Leu-OEt) se utilizaron pastillas de KBr.

3.6.3. Espectroscopia de masas por MALDI-Tof.

Los espectros fueron obtenidos mediante un equipo de MALDI-Tof/Tof 4800 Plus Analyzer (Applied Biosystems) equipado con un láser YAG(Y3AI5012) de 355 nm, los análisis se llevaron a cabo a 6500 mv, en modo reflectrón. Las matrices utilizadas fueron ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CCA, por sus siglas en inglés) y ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (SA, por sus siglas en inglés).

El análisis se realizó solo a los productos de las reacciones de polimerización de 24 h, las cuales se disolvieron ($3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en DMSO, conteniendo 0.1% vol/vol de TFA, posteriormente $2 \mu\text{L}$ de esta disolución fueron mezclados con $2 \mu\text{L}$ de matriz ($25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de CCA y/o SA, conteniendo 0.1% vol/vol de TFA) y se colocaron en un plato de acero y permitir que se secaran a temperatura ambiente. Los resultados se analizaron empleando una base de datos en la que se tomó en cuenta el incremento del DP, así como los aductos correspondientes de Na y K.

3.6.4. Difracción de rayos X de polvo.

Los espectros de difracción de rayos X de polvo (DRXP) fueron obtenidos de un difractómetro de rayos X, MODELO D8 ADVANCE DAVINVI, Configuración THETA-THETA, marca BRUKER AXS, usando radiación $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) y una velocidad de goniómetro de $0.5^\circ(2\theta) \text{ min}^{-1}$.

3.6.5. Dicroísmo circular.

El espectro de dicroísmo circular (DC) fue adquirido en un espectropolarímetro JASCO J-715 (Jasco Inc., USA) a una longitud de onda desde los 190 a 260 nm, usando una celda de longitud de 1 mm a temperatura ambiente (aprox. 18°C). La elepticidad es reportada como mdeg.

La muestra de poli(L-Fen-OEt) de la que se adquirió el espectro, fue colectada inmediatamente después de la reacción de polimerización con agua (5.5 mg/mL) y almacenada a 4°C previo a la adquisición del espectro.

3.6.6. UV-Visible.

Los espectros de UV-Vis fueron adquiridos en un espectrofotómetro Lambda 2S UV-Vis (Perkin Elmer Inc., USA) a una longitud de onda desde los 500 a 200 nm y a una temperatura ambiente (20°C), en una celda de longitud de 1 cm.

La muestra de L-Fen-OEt se disolvió en agua (10 mg/mL) al igual que poli(L-Fen-OEt) (5.5 mg/mL) y de cada una se tomaron 2 mL para adquirir el espectro.

3.6.7. Microscopia confocal.

El auto-ensamble y la formación de fibras se observó a través de una microscopia del láser confocal en el equipo SV1000 (Olympus, Japón), con una longitud de onda de excitación de 405 nm de emisión de acuerdo a lo que anteriormente se ha reportado (Andersen, et al., 2011).

En estos experimentos, se disolvieron las muestras de poli(L-Fen-OEt) y poli(L-Leu-OEt) en MeOH (60%) a una concentración de 10 mg/mL, posteriormente, se colocó una gota (15 μ L) de esta disolución en un cubreobjetos de vidrio y se secó a temperatura ambiente (20 °C). Finalmente, se realizaron las microscopias.

3.7. Análisis estadístico.

Para estudiar el efecto del tiempo en la polimerización de polipéptidos se realizó por duplicado cada reacción a diferentes tiempos (3, 6, 24 y 48 h) y se determinó el promedio y su respectiva desviación estándar del GP y rendimiento en peso, la diferencia entre todos los tiempos de reacción se evaluó mediante el análisis estadístico por ANOVA, y la prueba de Turkey fue aplicada para determinar la diferencia significativa entre los grupos, el nivel de confianza fue ajustado al 95% ($p < 0.05$) (OriginPro software, Microcal Corp., USA).

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Prueba de solubilidad de los monómeros.

Se probó la solubilidad de los clorhidratos de L-Leu-OEt y L-Fen-OEt solo en el R-134a líquido, debido a que está reportado que el CO₂ no disuelve sales, no obstante, los resultados mostraron que estas sales no se disuelven como se observa en la **Figura 14**.



Figura 14. Prueba de solubilidad de L-Leu-OE en R-134a (40°C y 25 bares).

4.2. Desalinización de los monómeros.

Debido que no se lograron solubilizar los clorhidratos de L-Leu-OEt y L-Fen-OEt en el R-134a líquido, se realizó una reacción ácido base para desalinizar estas sales.

Se obtuvieron líquidos color ámbar, con un rendimiento en masa de 58 y 49 % para L-Leu-OEt y L-Fen-OEt, respectivamente. La caracterización de RMN y FT-IR (**Tabla 1**) demostró la liberación de la amina de la sal.

Principalmente, los espectros de FT-IR mostraron el estiramiento de una amina primaria (N-H₂), mediante la aparición de dos picos en el intervalo de 3500 - 3100 cm⁻¹ con una intensidad media, por otro lado, los espectros de RMN-¹³C mostraron una diferencia contundente en el desplazamiento entre el enlace de la amina primaria y el carbono alfa (NH₂-CH), con respecto al enlace NH₂-CH de los clorhidratos de ésteres de aminoácidos.

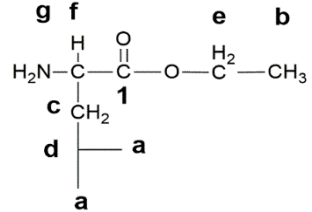
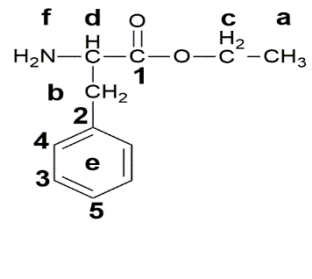
<p>a)</p> 	<p>RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4.15 (m, 2-H) (e), 3.44 (dd, 1-H) (f), 1.78 (m, 1-H) (d), 1.55 (m, 1-H) (c), 1.4 (m, 1-H) (c), 1.28 (dd, 3-H) (b), 0.94 (m, 6-H) (a).</p> <p>RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 176.67 (1), 60.67 (e), 52.91 (f), 44.18 (c), 24.79 (d), 23.0 (a), 21.88 (a), 14.25 (b).</p> <p>FT-IR 3452.67, 3382.23, 3315.65, 2956.90, 2871.25, 1730.70, 1603.72, 1468.58, 937.71, 863.51, 837.59 cm⁻¹.</p>
<p>b)</p> 	<p>RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.25 (m, 5-H) (e), 4.16 (q, 2-H) (c), 3.7 (dt, 1-H) (d), 3.07 (dd, 1-H) (b), 2.86 (dd, 1-H) (b), 1.23 (t, 3-H) (a).</p> <p>RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 175.49 (1), 137.81 (2), 129.82 (4), 129.02 (5), 127.29 (3), 61.41 (c), 56.37 (d), 41.66 (b), 14.69 (a).</p> <p>FT-IR 3380.94, 3314.06, 2981.41, 2935.91, 1951.18, 1887.76, 1729.08, 1603.85, 1180.29, 1027.88, 743.71, 699.17 cm⁻¹.</p>

Tabla 1. Caracterización de L-Leu-OEt (**a**) (muestra 1) y L-Fen-OEt (**b**) (muestra 2).

4.2.1. Prueba de solubilidad de L-Leu-OEt y L-Fen-OEt en CO₂.

El CO₂ supercrítico ha sido reconocido por sus propiedades fisicoquímicas en el uso de extracciones, reacciones enzimáticas y la modulación de propiedades físicas de algunos disolventes. Por ello se investigó a condiciones supercríticas (323 bar, 40±2°C), si su polaridad es la suficiente para disolver. Sin embargo, las pruebas mostraron que no hubo solubilidad de ninguno de estos dos, por el contrario, apareció un precipitado blanco de consistencia pastosa, como se muestra en las **Figuras 15a** y **Figuras 15b**.

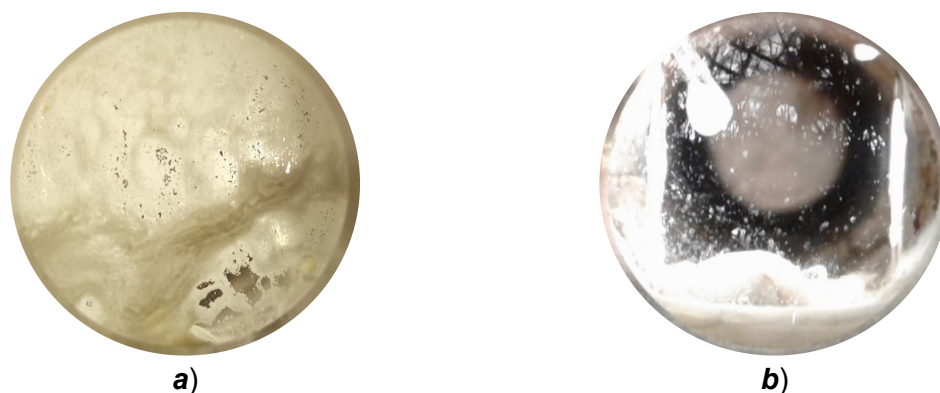


Figura 15. Prueba de solubilidad en CO₂ de los monómeros: a) L-Leu-OEt (1 g) en CO₂ (323 bar, 40 ± 2°C) b) L-Fen-OEt (1 g) en CO₂ (323 bar, 40 ± 2°C).

En trabajos anteriores se han demostrado que tanto aminas alifáticas o cíclicas, incluso los grupos amino que se encuentran en los aminoácidos pueden absorber CO₂ para formar carbamatos (Yang et al., 2016; Zhang et al., 2017), un esquema general de reacción se presenta en la **Figura 16**.

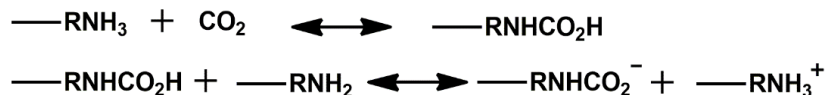


Figura 16. Esquema de reacción general para la formación de carbamatos.

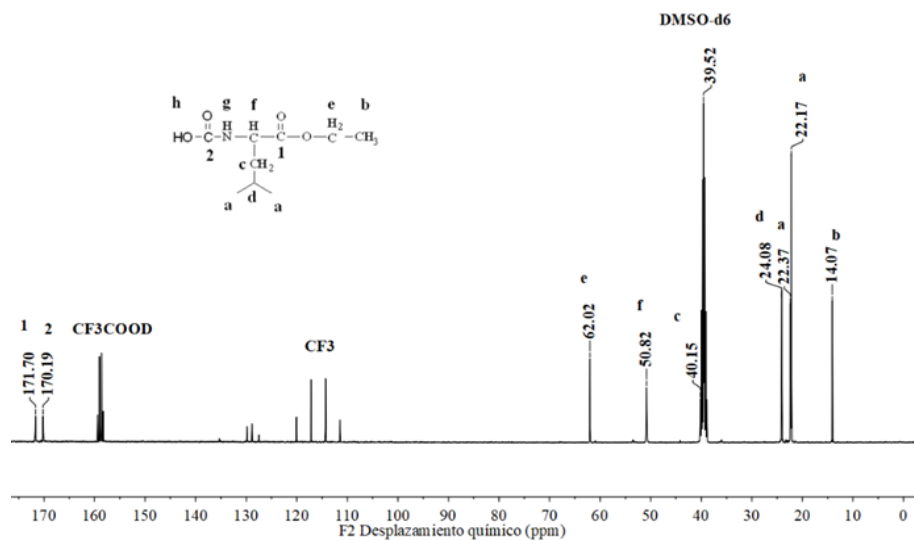
Ya que estudios anteriores han demostrado la formación de carbamatos en aminoácidos, se analizaron los precipitados de L-Leu-OEt y L-Fen-OEt por RMN tanto de protón (**Tabla 2**) como de carbono (**Figura 17**), donde el rasgo peculiar que se obtuvo fue la presencia de dos desplazamientos en el intervalo de 169-172 ppm.

Se puede elucidar que uno de ellos corresponde al carbonilo del aminoácido y el otro al carbonilo del carbamato. Mientras tanto, las otras señales se mantuvieron muy cercanas a las materias primas debido al cambio del disolvente y la integración de otro grupo funcional a la molécula. Además, el desplazamiento de los protones fue similar a las materias primas y la integración de los protones correspondió a cada grupo funcional que tuviera acoplados protones a un enlace de distancia.

a)		¹H-RMN (400 MHz, [D ₆]DMSO/CF ₃ COOH) δ 8.67-8.40 (m, 4-H) (g), 4.17 (s, 2-H) (e), 3.89 (s, 1-H) (f), 1.80-1.71 (m, 1-H) (d), 1.63 (td, 2-H) (c), 1.21 (t, 3-H) (b), 0.87 (dt, 6-H) (a).
b)		¹H-RMN (400 MHz, [D ₆]DMSO/CF ₃ COOH) δ 8.90-8.40 (dt, 2-H), (7.32-7.22 (m, 5-H), 4.19 (d, 2-H) (c), 4.05 (m, 1-H) (d), 3.21 (dt, 1-H) (b), 3.06 (dd, 2-H) (b), 1.05 (t, 3-H) (a).

Tabla 2. Resultados de RMN-¹H de los carbamatos de L-Leu-OEt (**a**) (muestra 3) y L-Fen-OEt (**b**) (muestra 4).

A)



B)

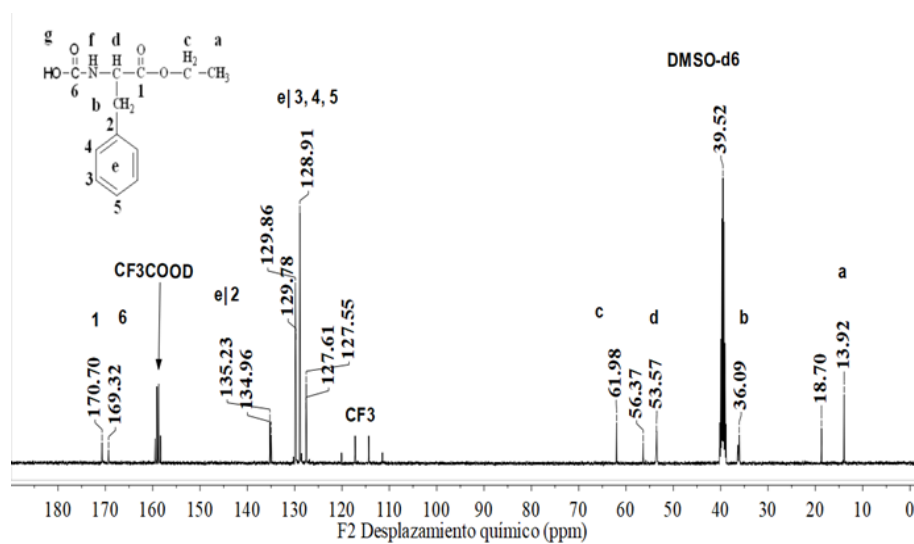


Figura 17. RMN-¹³C de los carbamatos de L-Leu-OEt (muestra 3) (A) y de L-Fen-OEt (muestra 4) (B).

Los espectros de FT-IR (**Figura 18**) permitieron confirmar la formación de carbamatos conforme a la absorción de los grupos funcionales principales (N-H, C=O), que han sido referenciados anteriormente como carbamatos o uretanos (RNHCO-OR') (Socrates, 2004). De los cuales hay tres características importantes en los espectros.

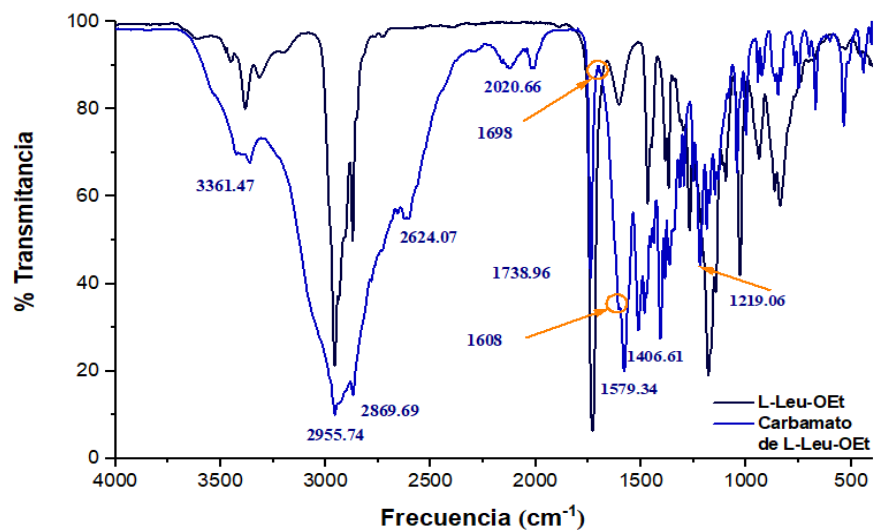
Primero, las vibraciones de estiramiento N-H de los uretanos secundarios absorbieron en las regiones de 3361.47 y 3367 cm^{-1} para L-Leu-OET y L-Fen-OEt, respectivamente. Concomitantemente, las vibraciones de doblamiento N-H que para los monómeros resulta ser una pequeña absorción (1603 cm^{-1}), en los carbamatos estas absorciones además de traslaparse, con señales de estiramiento asimétrico, incrementan su porcentaje de transmitancia (1608 cm^{-1} y 1603 cm^{-1} , respectivamente).

Segundo, la combinación de las vibraciones de la deformación N-H y de estiramiento C-N absorbieron en 1579.34 y 1557.44 cm^{-1} , respectivamente, con una intensidad fuerte. Conjuntamente, se observan las absorciones relacionadas con las vibraciones de estiramiento C-N y C-O de intensidad media a 1219.06 y 1225.10 cm^{-1} , respectivamente.

Tercero, como se pudo observar aparecieron nuevas señales dentro del intervalo 1738.96 -1406.61 cm^{-1} , concernientes a las vibraciones de estiramiento C=O del nuevo grupo formado (COOH) a partir del acoplamiento entre el CO₂ y NH₂, sin embargo, las absorciones que aparecen en 1698 (pico muy pequeño) y 1673, respectivamente, son las correspondientes a ciertos grupos (Gurkan et al., 2010; Socrates, 2004; Yang et al., 2016).

Adicionalmente, aparecieron nuevas señales en el intervalo 2400-1900 cm^{-1} , tanto para L-Leu-OEt como para L-Fen-OEt, que indican que sí hubo acoplamiento con el CO₂ (Gurkan, et al., 2010).

A)



B)

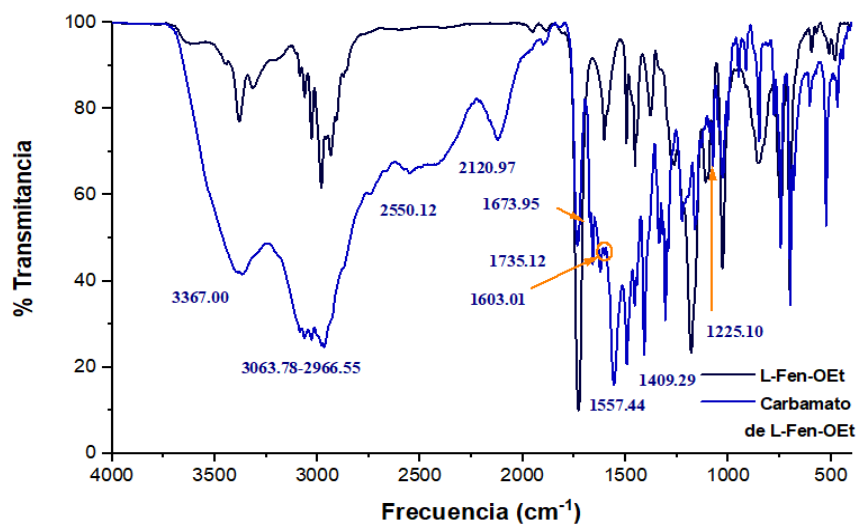


Figura 18. Espectros de FT-IR de carbamato de L-Leu-OEt (muestra 3) **(A)** y carbamato de L-Fen-OEt (muestra 4) **(B)**.

4.2.2. Prueba de solubilidad de L-Leu-OEt y L-Fen-OEt en R-134a.

Además de probar la solubilidad en CO₂, se probó en R-134a, para ello se muestra los compuestos de L-Leu-OEt y L-Fen-OEt previos a colocar el R-134a en la celda de alta presión, como se muestra en la **Figura 19**.



Figura 19. Prueba de visibilidad en la celda de alta presión de L-Leu-OEt (a) y L-Fen-OEt (b) sin disolvente.

Posteriormente, se observó que la L-Leu-OEt aumento su volumen, lo cual se atribuyó a que es en el R-134a (**Figura 20a**). Este compartamiento fue similar para la L-Fen-OEt. es soluble y además se mantuvo así aun cuando la presión fue aumentada (**Figura 20b** y **20c**).

4.2.3. Prueba de solubilidad de L-Leu-OEt y L-Fen-OEt en mezcla de CO₂/R-134a.

Dado que comercialmente es más accesible el CO₂ que el R134a comprimidos, se indagó la solubilidad de L-Leu-OEt y L-Fen-OEt en una mezcla de CO₂/R-134a.

Para ello se probó la solubilidad de L-Leu-OEt en una mezcla de CO₂/R-134a (20:7.57), las condiciones de operación iniciales fueron 323 bares y 40±2°C dentro de la celda de alta presión (**Figura 21a**), despues se aumento y disminuyó el volumen de la celda consecutivamente hasta encontrar y corroborar el punto de turbuidez, que fue en un intervalo de 315-317 bares de presión (**Figura 21b**), esto indico que la L-Leu-OEt es soluble en esta mezcla, pero sin sobrepasar el intervalo de la presión de turbuidez.

En conjunto se realizó la prueba de solubilidad de la L-Fen-OEt en una mezcla de CO₂/R-134a (2.75:24.82) (**Figura 21c**) y al igual que el experimento anterior se seleccionaron las mismas condiciones iniciales de operación. Para esta prueba se encontró que el punto de turbidez fue a 300 bares (**Figura 21d**), por lo tanto, la L-Fen-OEt es soluble a esta concentración, pero en un intervalo menor que la presión de turbidez.

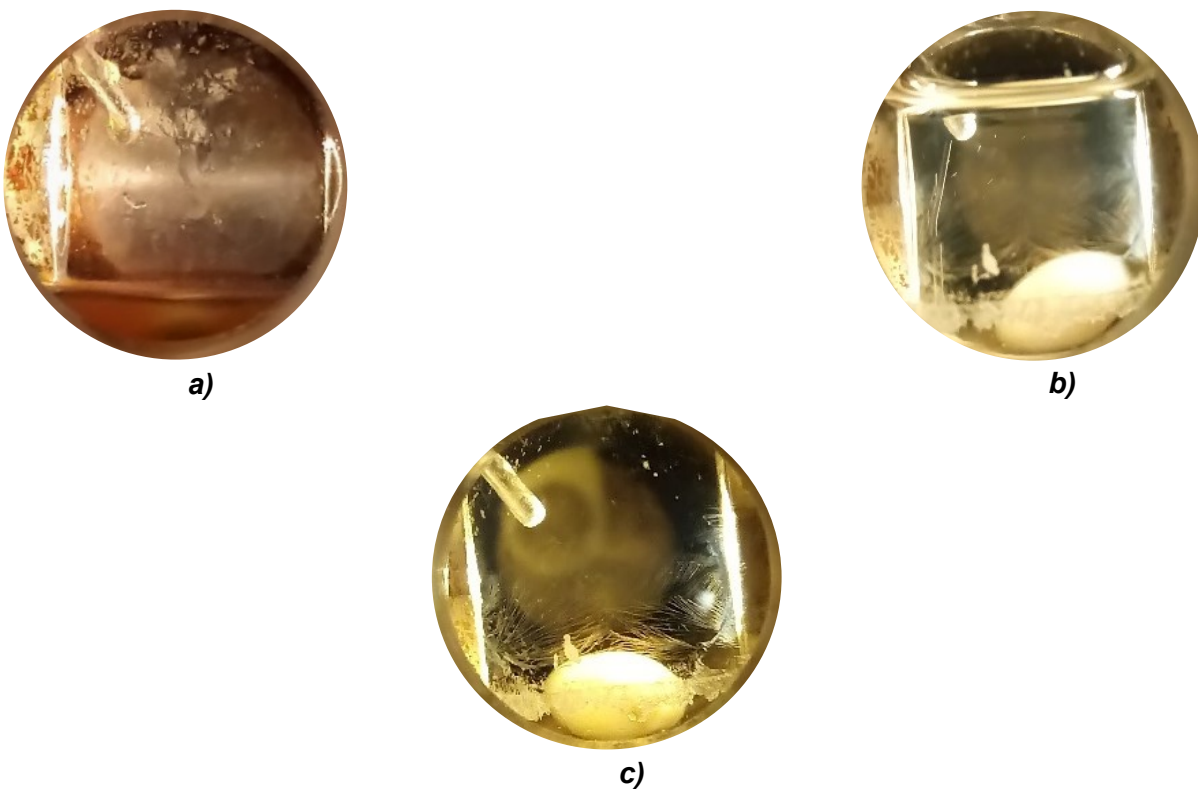


Figura 20. Prueba de solubilidad en R-134a de L-Leu-OEt a 4 bar y $40 \pm 2^\circ\text{C}$ (a), L-Fen-OEt a 6.3 bar y $14.8 \pm 2^\circ\text{C}$ (b) y a 320 bar y $39 \pm 2^\circ\text{C}$ (c).

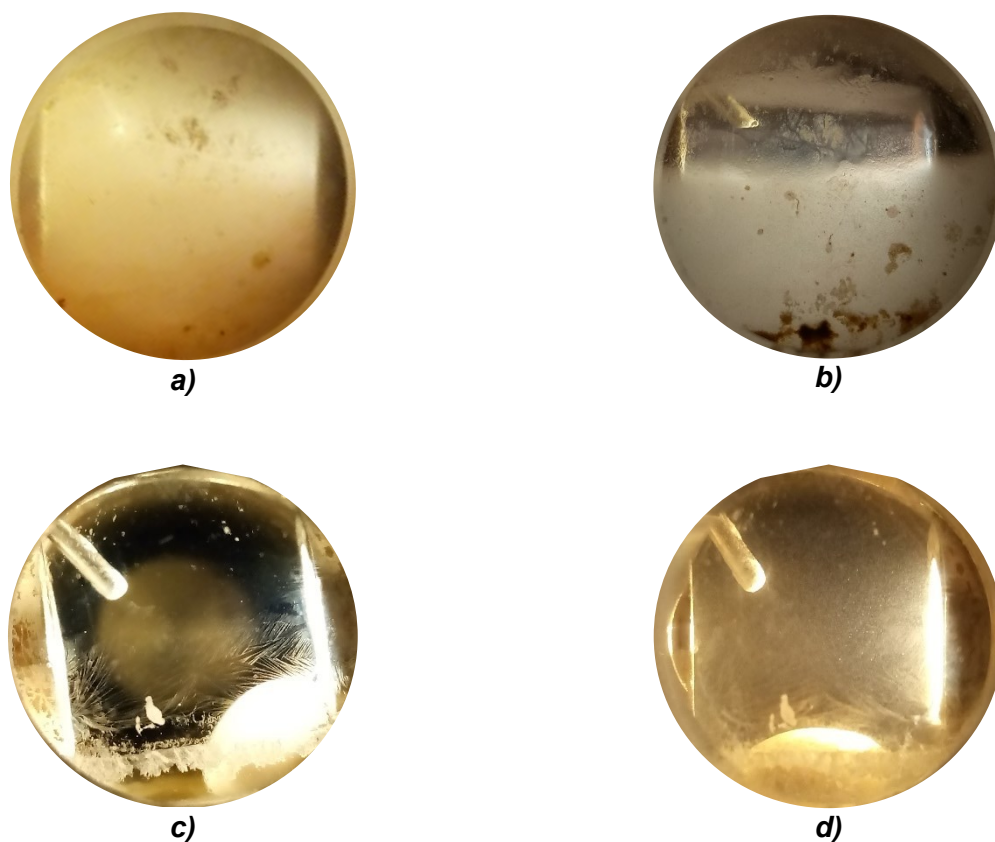


Figura 21. Prueba de solubilidad en la mezcla de CO₂/R-134a de los monómeros: **a)** L-Leu-OEt en CO₂/R-134a (323 bar, 40 ± 2°C). **b)** Punto de turbidez de L-Leu-OEt en CO₂/R-134a (315-317 bar, 40 ± 2°C). **c)** L-Fen-OEt en CO₂/R-134a (323 bar, 40 ± 2°C). **d)** Punto de turbidez de L-Fen-OEt en CO₂/R-134a (300 bar, 40 ± 2°C).

4.3. Estudio de la estabilidad enzimática en el R-134a.

De acuerdo a la posibilidad de influenciar las propiedades de las enzimas mediante la alteración de su medio de reacción nativo, se puede tomar ventaja de las proteasas hacia la síntesis enzimática de péptidos (Bordusa, 2002).

Para ello se estudió la estabilidad enzimática de la papaína y la SC en el R134a líquido con respecto al tiempo, como se muestra en la **Figura 22a** y **22b**. Los resultados del análisis estadístico para ambas enzimas, mostraron que no hay pérdida de la actividad enzimática a través del tiempo, es decir sin diferencia significativa ($p < 0.05$).

Para validar la estabilidad de las proteasas en el R134a líquido, se seleccionó a la SC por tener una menor actividad enzimática que la papaína, para ello se realizaron pruebas de desnaturalización térmica en R-134a supercrítico (101°C, >100 bares) y un proceso térmico sin disolvente (115°C, 4.92 bares) durante 21 min.

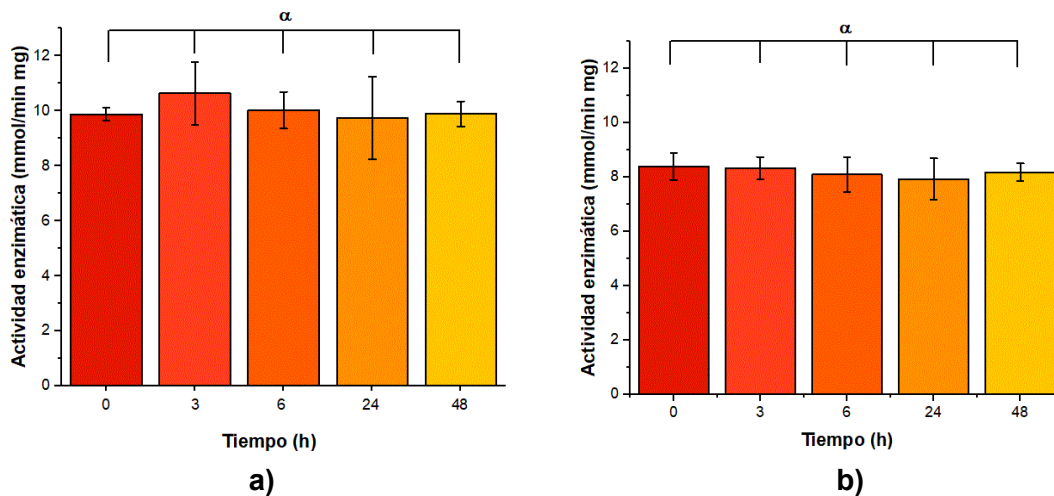


Figura 22. Actividad enzimática residual de **a)** Papaína y **b)** SC, después de haber sido incubadas en R-134a líquido (40±2°C, 25 bares).

Los resultados del análisis estadístico de la actividad enzimática residual de la SC, después de haber sido incubada en R-134a supercrítico (**Figura 23a**), no mostraron una pérdida significativa de actividad enzimática en los grupos evaluados ($p < 0.05$). Sin embargo, al someterla a un tratamiento térmico sin R-134a (115°C y 4.92 bares durante 21 min) los resultados mostraron a la enzima totalmente desnaturalizada (**Figura 23b**).

De acuerdo con reportes anteriores, la pérdida de la actividad enzimática en disolventes orgánicos se debe al cambio de la polaridad en el sitio activo de las enzimas, debido al intercambio que hay de moléculas de agua por moléculas de disolvente que afectan el plegado de la enzima (Bansal, et al., 2010). Además, el R-134a líquido es poco soluble en agua (Karamoddin & Varaminian, 2013), más hidrofóbico que el CO₂ presurizado (Jackson, Bowman, & Fulton, 1995) y su polaridad no es suficiente para solubilizar las enzimas, por lo tanto esto permitió que las enzimas guardaran su conformación estructural terciaria.

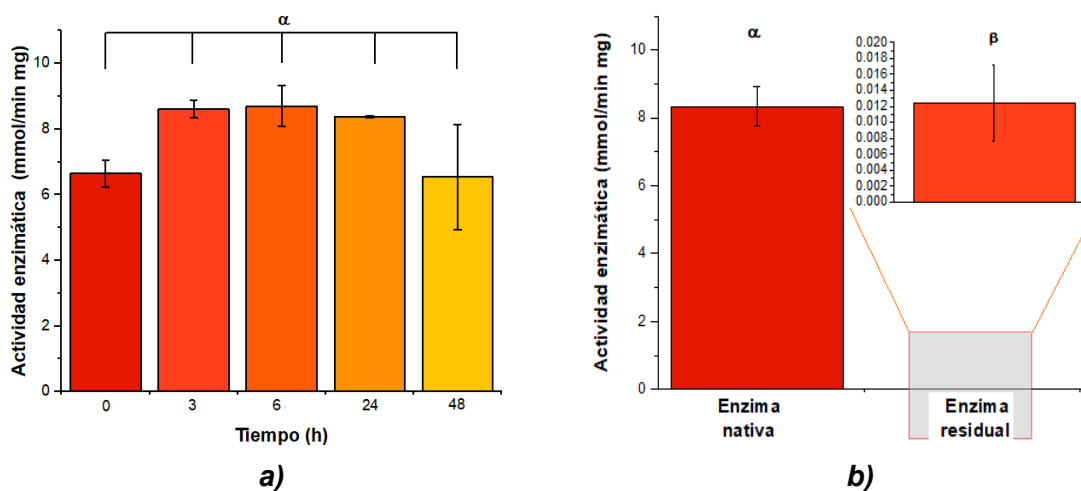


Figura 23. Actividad enzimática residual de la enzima SC después de someterla a un **a)** Tratamiento térmico en R-134a (101°C, >100 bares) por 10 min, **b)** Tratamiento térmico sin R134a (115°C y 4.92 bares durante 21 min).

4.4. Síntesis enzimática de polipéptidos.

Para realizar la síntesis de poli(L-Leu-OEt) (**Figura 24A**), poli(L-Fen-OEt) (**Figura 24B**) y poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt) (**Figura 24C**) previamente se determinó la actividad enzimática de la SC y la papaína en condiciones nativas, siendo éstas de 8.4 y 9.9 U/g, respectivamente.

Cada reacción de polimerización se corroboró en el R-134a líquido ($40 \pm 2^\circ\text{C}$ y 25 bares) con 110 U de proteasa (SC y papaína) y 6 mmoles de sustrato (L-Leu-OEt y L-Fen-OEt) en un tiempo de 24 h.

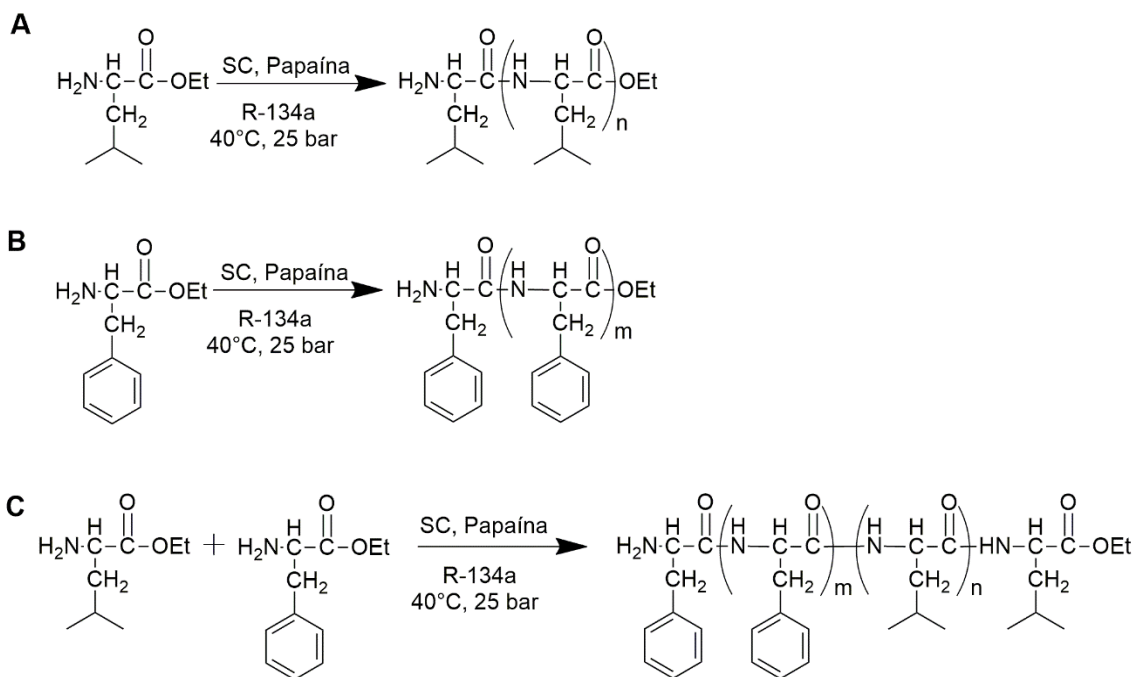


Figura 24. Esquemas de reacción de polimerización de poli(L-Leu-OEt) (**A**), poli(L-Fen-OEt) (**B**) y poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt) (**C**).

4.4.1. Efecto de la enzima en la reacción de polimerización.

Estudios anteriores han mostrado que las proteasas más versátiles son la papaína y la SC. Pero mediante una exploración rápida de su potencial biocatalítico a las condiciones de reacción en el R-134a (40 °C y 25 bar) durante 24 h, demostró que hay mejores resultados de biocatálisis con la SC (**Tabla 3**), ya que esta enzima permitió un mayor grado de polimerización.

Enzima	Masa molecular (Da)	Rendimiento en peso (%)
Papaína	2120.4	30.6
SC	18914.0	35.0

Tabla 3. Comparación de masa molecular y rendimiento en peso en la biocatálisis de poli(L-Fen-OEt) (muestra 5 y muestra 6).

Una vez que la polimerización fue contundente y que con la SC se obtienen mayores GP que con la papaína, se realizó una exploración rápida para comprobar que la reacción estaba siendo favorecida por la reacción biocatalítica y no por la reacción química. Para ello

se realizaron reacciones de homopolimerización y copolimerización sin enzima, en este caso sin SC.

Los resultados de estas pruebas se muestran en la **Figura 25**, y como se puede notar, la síntesis química está muy por debajo de la síntesis biocatalítica, a saber 660.8 ± 22.2 Da < 19919.4 ± 1005.3 Da, respectivamente. Por lo tanto, la SC amerita su reconocimiento como biocatalizador en este medio.

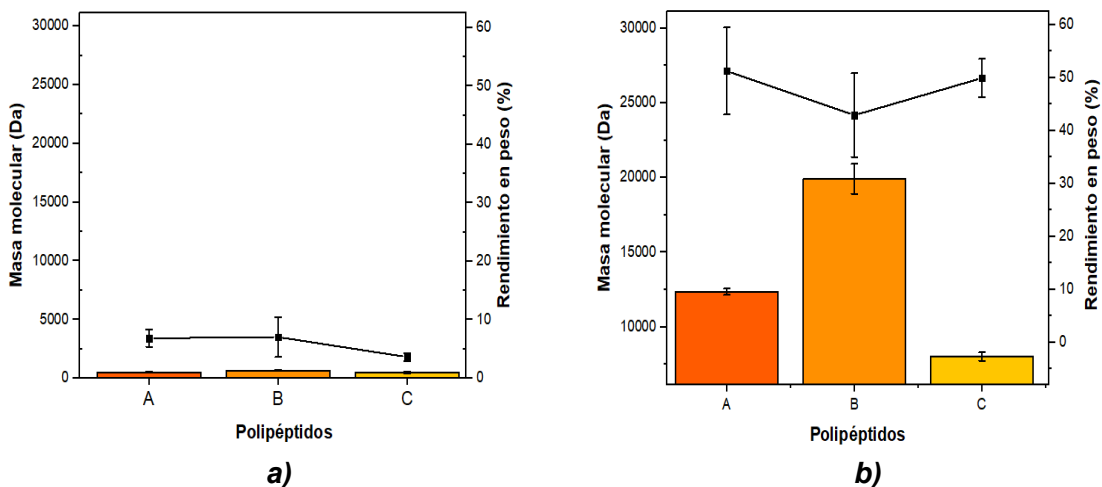


Figura 25. Rendimiento en peso (gráfica de líneas) y masa molecular (gráfica de barras) de **a)** reacción sin SC (24 h) (muestras 7-12) y **b)** reacción con SC (24 h) (muestras 13-18). Donde los polipéptidos corresponden: **A:** Poli(L-LeuOEt) (muestras 7-8 y 13-14, respectivamente), **B:** Poli(L-Fen-OEt) (muestras 9-10 y 15-16, respectivamente), **C:** Poli(L-LeuOEt-co-L-FenOEt) (muestras 11-12 y 17-18, respectivamente).

4.5. Resultados de la caracterización fisicoquímica.

Las técnicas utilizadas para su determinación fueron FT-IR, RMN de ^1H , ^{13}C y 2D (COSY y HMBQC), MALDI-TOF y UV-Vis, las cuales permitieron demostrar la formación del enlace peptídico, así como la pureza y el grado de polimerización de los polipéptidos. Los resultados de obtenidos de estas polimerizaciones se discuten en los siguientes párrafos.

4.5.1. Resultados de FT-IR.

En los espectros de FT-IR (**Figura 26**) fue interesante resaltar tres aspectos importantes, primero las diferencias encontradas entre los monómeros (**Figura 26A** y **Figura 26B**) y los polipéptidos (**Figura 26C**, **Figura 26D** y **Figura 26E**), segundo, la formación del grupo amida, y tercero la absorción correspondiente a la Amida I.

Los cambios que mostraron los espectros de polipéptidos de la **Figura 26** se encuentran señalizadas en los recuadros de colores con líneas punteadas, a saber, son las vibraciones de estiramiento N-H (línea color morado) que pasaron de ser una amina secundaria a una mezcla de señales debidas a las amidas, 3380 cm^{-1} a 3500 cm^{-1} , respectivamente.

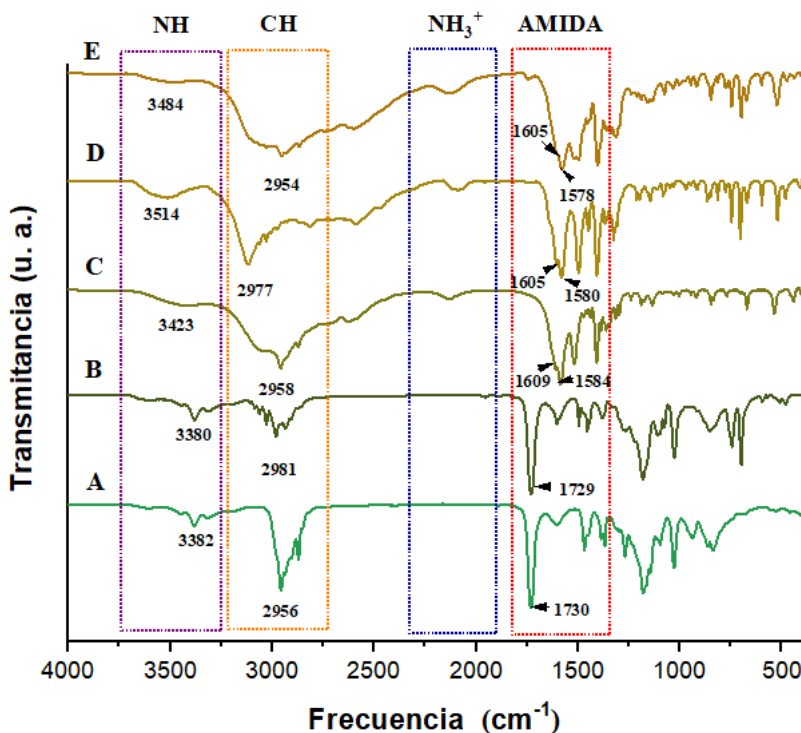


Figura 26. Espectros de FT-IR de **A)** L-Leu-OEt (muestra 1) **B)** L-Fen-OEt (muestra 2) **C)** poli(L-Leu-OEt) (muestra 13) **D)** poli(L-Fen-OEt) (muestra 15) **E)** poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt) (muestra 17).

El siguiente cambio que se señala en el recuadro naranja corresponden a las vibraciones de estiramiento del enlace C-H, donde se percató el ensanchamiento de las vibraciones de estiramiento del enlace C-H (intervalo de 3250-2750 cm^{-1}), lo cual dio indicio de una mayor población de estos grupos funcionales en los polímeros que en los sustratos. Además, en el recuadro azul se muestran la aparición de nuevas señales en los espectros de polipéptidos, alrededor de 2100 cm^{-1} , que pueden deberse a la formación de una sal de amina (RNH_3^+). Finalmente, las vibraciones de C=O procedentes del carboxilo del éster de los aminoácidos (1730-1729 cm^{-1}) disminuyó para el copolipéptido e incluso desapareció en

los homopolipéptidos, desplazando esta señal a la correspondiente de un enlace del tipo amida (recuadro rojo), por lo que se puede especular que es debido a la superposición de las vibraciones de estiramiento de la amida.

El segundo aspecto importante está relacionado con la discusión de las señales de absorción debidas a la formación del enlace amida que de acuerdo a estudios anteriores (Bonduelle, 2017), se han señalado ocho tipo de bandas características de una proteína o polipéptido (Kong & Yu, 2007). Sin embargo, la obtención de todas estas bandas de absorción está limitado por varios factores, principalmente de la sensibilidad del instrumento y las correlaciones entre los plegamientos de estas moléculas aunados a las bandas individuales de otros grupos funcionales.

Por lo tanto, las bandas de absorción que fueron más distinguibles (**Tabla 4**) son cuatro señales de amida que corresponden a las señales de Amida A (3300 cm^{-1} , aproximadamente) que es parte de la resonancia de Fermi y depende de la fuerza del enlace N-H, además va acompañada de una segunda señal alrededor de 3100 cm^{-1} (Amida B), la vibración de estiramiento C=O generalmente aparece dentro del intervalo de 1600-1690 cm^{-1} (Amida I) y vibraciones de doblamiento del enlace N-H y estiramiento del enlace C-N que está dentro del intervalo 1480-1575 cm^{-1} (Amida II) (Kong & Yu, 2007).

Designación	Poli(L-Leu-OEt) (Frecuencia cm^{-1})	Poli(L-Fen-OEt) (Frecuencia cm^{-1})	Poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt) (Frecuencia cm^{-1})
Amida A	3423.8	3514.8	3489.2
Amida B	3050.0	3118.8	3059.9
Amida I	1609.0	1605.3	1605.0
Amida II	1584.6	1580.3	1578.6

Tabla 4. Principales señales de la formación de amidas en los materiales, poli(L-Leu-OEt) (muestra 13), Poli(L-Fen-OEt) (muestra 15) y Poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt) (muestra 17).

Además, la técnica de FT-IR es una técnica sensible a la estructura secundaria que se encuentran en las proteínas y por lo tanto ha permitido estudiar los procesos de un mal plegado y la formación de agregados (Miller, Bourassa, & Smith, 2013).

Por lo tanto, el tercer punto a discutir se relaciona con la absorción de la Amida I, ya que además de ser una señal característica de este tipo de materiales, también es susceptible a los cambios en la estructura secundaria de los polipéptidos y proteínas (Miller et al., 2013); las conformaciones del tipo α -helices, hojas β y giros tienen señales específicas a la frecuencia de 1650, 1630 y 1656 cm^{-1} , respectivamente (Bonduelle, 2017).

El tipo de conformaciones que adquiere un polipéptido, está relacionada con el tipo de grupo en su cadena lateral, particularmente esta reportado que para la L-Leu hay tendencia a formar hojas β con torsiones inusuales (Barlow, Haq, & Raval, 2001). De igual manera la L-Fen muestra estas conformaciones (Tamamis et al., 2009), pero al incrementar el número de residuos de este aminoácido el comportamiento o el impedimento estérico de los anillos impiden esta morfología en cadenas más grandes (Adams et al., 2008).

La determinación de una conformación específica para los materiales que se obtuvieron en este trabajo, fue difícil definir, ya que las señales que se obtuvieron en estos espectros (**Figura 12**) se solaparon con otras señales, esto se puede deber a la influencia varios factores como son el método de obtención, el método de adquisición en el FT-IR, la disolución utilizada para su determinación, el grupo lateral o el tamaño de cadena (Qin, Fabre, & Buehler, 2013).

4.5.2. Resultados de RMN.

La técnica de RMN es muy basta en el estudio estructural de diferentes moléculas y por lo tanto ha sido muy utilizada en el descubrimiento de nuevas moléculas y también de macromoléculas.

En este trabajo se utilizaron las técnicas de ^1H , ^{13}C y 2D (COSY y HMBQC) para confirmar la formación de los polipéptidos, determinar la masa molecular, conocer cualitativamente el grado de pureza del producto de reacción.

En la **Figura 27** se muestran los resultados obtenidos de RMN- ^1H , estos resultados reflejaron lo que se estaba esperando de la formación de los polipéptidos, el hecho contundente de que las señales correspondientes al metilo (**a**) y metileno (**b**) de la cadena terminal fueran en proporción más pequeñas o hasta casi imperceptibles que el resto de las demás señales que formaron parte de la UR. Asimismo, otra señal representativa que se observó de la polimerización fue el protón acoplado al N en el grupo amida (**f**).

En conjunto los resultados de RMN-¹³C (**ANEXO 1**) mostraron diferente proporción entre la UR y el metilo de la cadena terminal (**a, b**), hasta ahí es un buen indicio de la polimerización de los monómeros. Se esperaba también la aparición de dos señales en los homopolímeros dentro del intervalo de 169-174 ppm que corresponderían al desplazamiento de los dos grupos carbonilos, el del enlace amida y el éster de la cadena terminal, sin embargo, solo se apreció un carbonilo, lo cual se atribuyó a la insuficiencia de magnetización del carbono cuaternario de la cadena terminal o al impedimento estérico hacía ese grupo funcional. Aparentemente, para el copolipéptidos si se encontraron dos señales de carbonilo (**1** y **2**), pero estos dos desplazamientos correspondieron a los carbonilos del grupo amida que están influenciados por el grupo R de los residuos de aminoácidos y por lo tanto se sigue presenciado el mismo efecto del carbonilo del éster que ocurrió en los homopolímeros.

Los espectros representativos de 2D-COSY y 2D-HMBC para cada homopolipéptido y copolipéptido, se muestran en el **ANEXO 2-4**, los resultados corroboran la obtención de estas macromoléculas y la ausencia de hidrólisis.

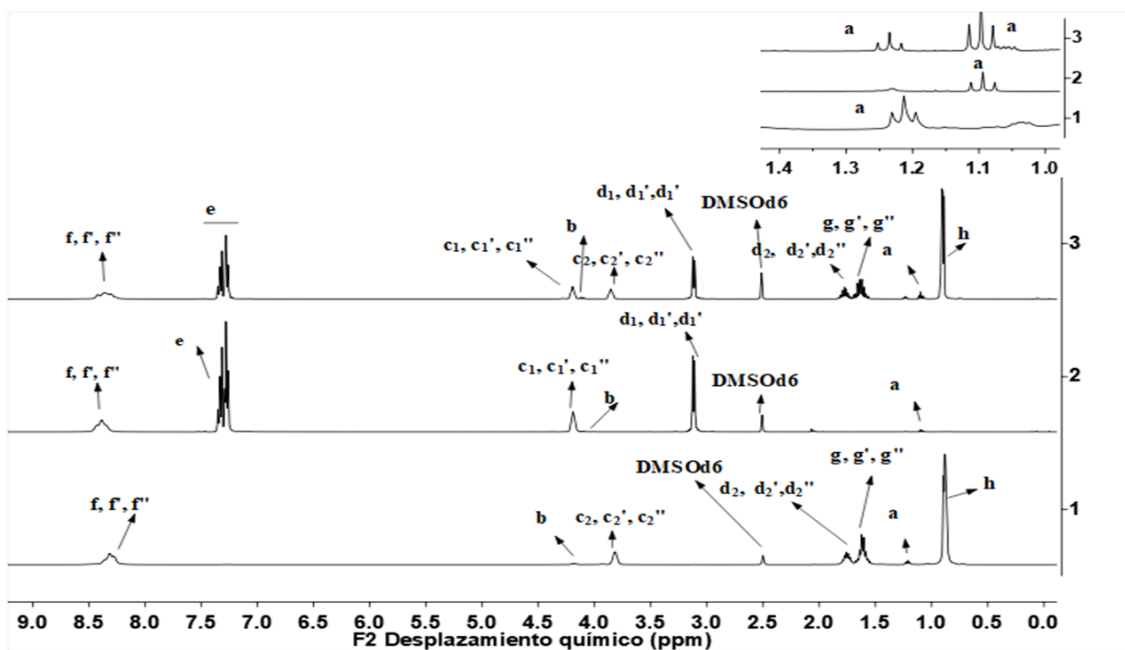
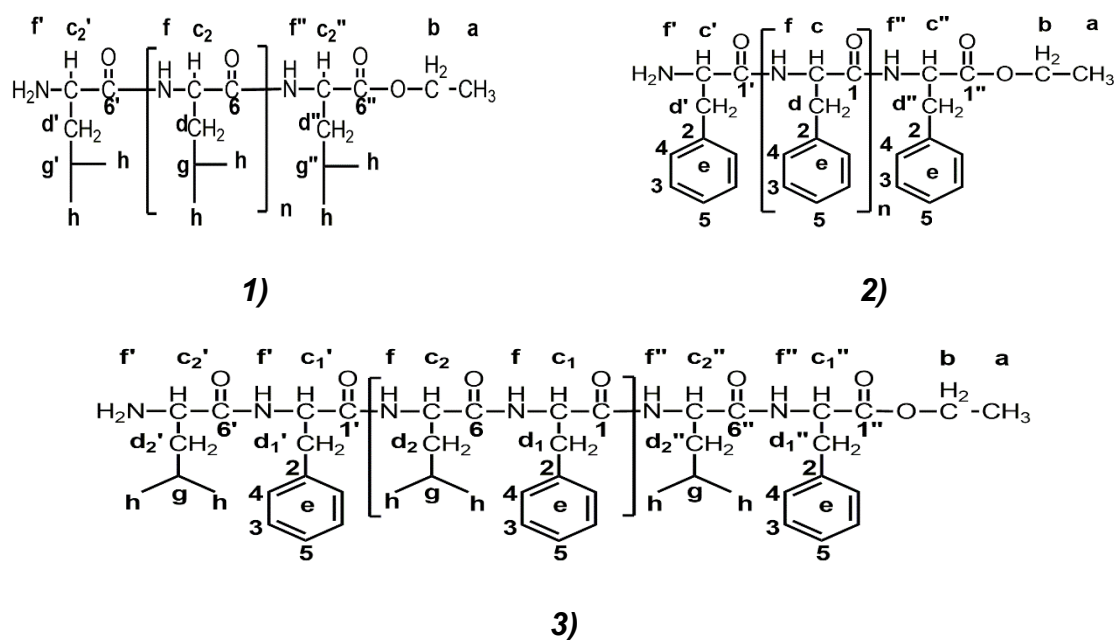


Figura 27. Espectros de ^1H de los polipéptidos **1)** Poli(L-Leu-OEt) (muestra 13), **2)** Poli(L-Fen-OEt) (muestra 15) y **3)** Poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt) (muestra 17).

4.5.3. Resultados de MALDI-TOF.

A pesar de que esta técnica es muy utilizada en la determinación de masas moleculares de polímeros sintéticos, proteínas y polipéptidos por proveer resultados exactos de moléculas intactas (Lewis et al., 2006), también, puede detectar mayormente productos fragmentados de L-Fen que de poli(L-Fen), lo cual resulta en una subestimación de la masa

molecular (Viswanathan et al., 2010), además su detección es sensible a la ionización de los materiales.

A pesar de estas premisas se realizaron algunas pruebas para analizar la masa molecular tanto del homo como del copolipéptido, y como no era de extrañarse los resultados fueron muy dispersos y la correlación con algún aducto fue difícil (**Anexo 5-7**).

4.5.4. Resultados de UV-Vis.

Otra evidencia contundente de la formación de poli(L-Fen-OEt) se mostró con espectro de UV correspondiente al polipéptido y su monómero (**Figura 28**), donde se aprecia claramente diferencias entre la absorción y, además el desplazamiento que se encuentra a 220 nm corresponde al enlace amida.

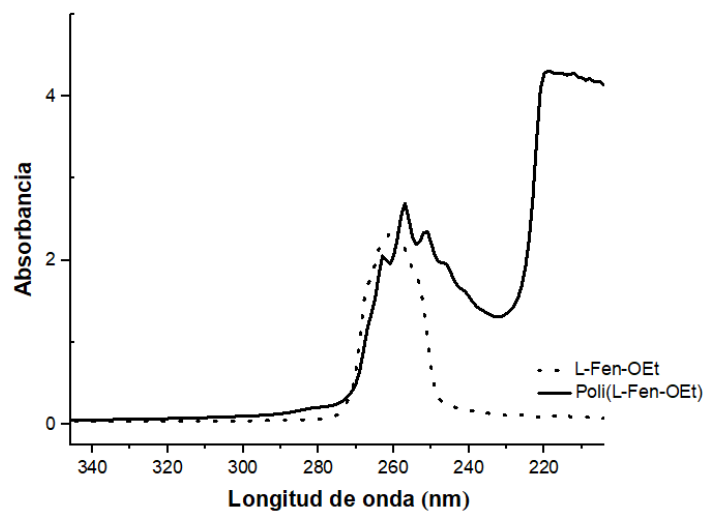


Figura 28. Espectro de UV-Vis de L-Fen-OEt (muestra 2) (línea punteada) y poli(L-Fen-OEt) (muestra 15) (línea lisa).

4.5.5. Actividad enzimática residual en los polímeros.

Como se mencionó anteriormente, las proteasas (papaína y SC) no pierden actividad enzimática en el R-134a líquido y además se favorece la síntesis de polipéptidos, por lo tanto, se realizaron determinaciones de actividad enzimática en los polipéptidos obtenidos de la reacción general, los resultados se presentan en la **Tabla 5**.

Polipéptido	Porcentaje de actividad enzimática residual (%)
Poli(L-Fen-OEt) (muestra 15)	8.80
Poli(L-Leu-OEt) (muestra 13)	2.56
Poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt) (muestra 17)	26.44

Tabla 5. Ensayo de la actividad enzimática residual en los polímeros producidos.

4.6. Efecto del tiempo en la síntesis de polipéptidos en R-134a líquido.

El tiempo es una variable de gran importancia en un proceso de polimerización, por ello se decidió estudiar el comportamiento del rendimiento en masa y el GP en la obtención de poli(L-Leu-OEt), poli(L-Fen-OEt) y poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt), a través de diferentes tiempos (3, 6, 24 y 48 h) en una reacción biocatalizada con SC en R134a líquido.

Los resultados obtenidos por medio del análisis estadístico ANOVA (**Figura 29a, 29b, 29c**), mostraron que el tiempo de reacción no afecta de manera significativa el rendimiento en peso de los polipéptidos para ninguno de los casos. No obstante, el incremento de tiempo tuvo efectos diferentes en el GP de cada una de los polipéptidos obtenidos.

En el caso particular de la poli(L-Leu-OEt) (**Figura 29a**) el análisis estadístico mostró dos grupos, de acuerdo a las diferencias significativas obtenidas por el análisis estadístico, lo cual fue indicativo que la enzima no se inhibe con el producto y que puede tener mayor reconocimiento por las cadenas largas en su ciclo catalítico a través del tiempo.

En el caso de la polimerización de poli(L-Fen-OEt), se mostró un comportamiento interesante, ya que después de las 24 h su máximo GP decreció significativamente, de acuerdo al análisis estadístico (**Figura 29b**); además, este comportamiento fue similar en la síntesis de poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt) (**Figura 29c**). Esto es una evidencia de que ambas reacciones alcanzaron el equilibrio y, además, esto descarta una terminación anticipada por la precipitación de los polipéptidos formados en el medio.

Las evidencias experimentales permitieron deducir que la enzima tiene un reconocimiento enzimático diferente entre la polimerización de poli(L-Leu-OEt) y poli(L-Fen-OEt), que puede atribuirse a las reacciones de alcoholisis o proteólisis.

Por otro lado, los resultados de la relación de L-Fen-OEt/L-Leu-OEt mostraron que la enzima tiene mayor afinidad por el sustrato L-Fen-OEt (**Figura 30**), esto puede ser debido a la hidrofobicidad del sustrato.

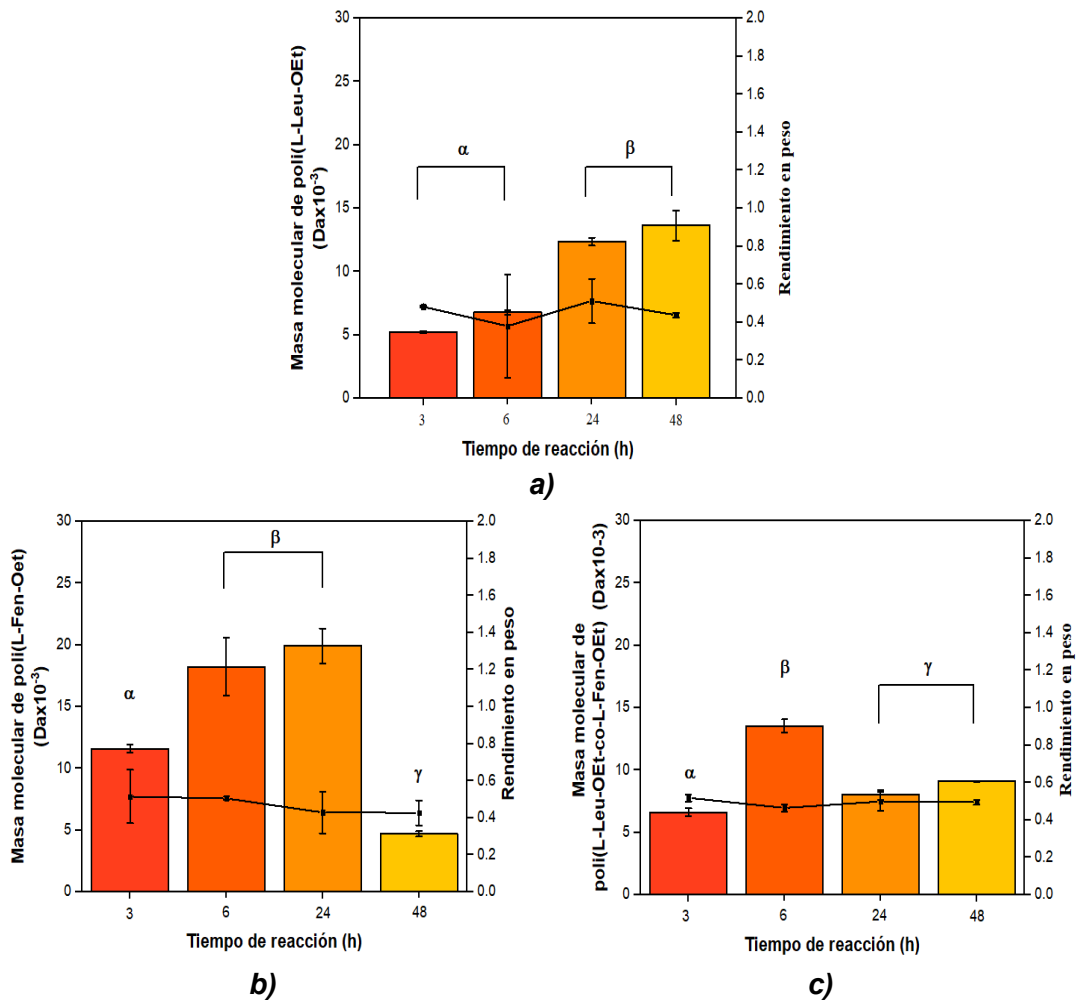


Figura 29. Rendimiento en peso (gráfica de líneas) y masa molecular (gráfica de barras) de **a)** Poli(L-Leu-OEt) (muestras 19-26), **b)** Poli(L-Fen-OEt) (muestras 27-34), **c)** Poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt) (muestras 35-42). *p< 0.05 determinado por ANOVA de la media de comparación múltiple por la prueba de Tukey.

Como refuerzo a descartar la reacción de hidrólisis, se llevaron a cabo espectros de 2D-RMN (**ANEXO 2, 3 y 4**) para confirmar los productos secundarios que se obtienen. Después de ser analizados los espectros, no se encontró ninguna prueba de algún polipéptido hidrolizado.

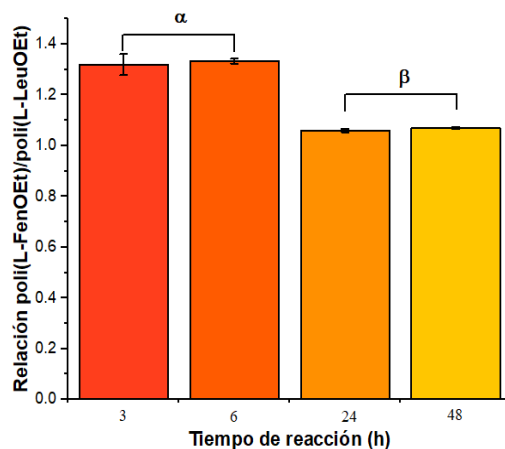


Figura 30. Relación de grado de polimerización entre poli(L-Fen-OEt) y poli(L-Leu-OEt) en el copolipéptido (muestras 35-42) a diferentes horas.

4.7. Resultados de Dicroísmo Circular.

Ya que la determinación de los espectros de FT-IR dio una introducción a lo que es la esencia de los polipéptidos, es decir la capacidad de estas macromoléculas de formar estructuras terciarias, se realizó una exploración de su conformación mediante DC de poli(L-Fen-OEt).

Los resultados del espectro de DC (**Figura 31**) demostraron que no hay una estructura repetitiva típica de proteínas (tacticidad). Tampoco se parece al DC de la L-Fen-OEt, además es un espectro positivo, contrario a lo esperado para hélices α o hebras β . Este resultado, parece en realidad que no se tiene estructura definida, pero de todos modos deber organizarse para esconder los fenilos del agua y permitir las extracciones.

Este resultado concuerda con los datos analizados de los espectros de FT-IR, ya que no se pudo asignar al plegamiento de una proteína común, ni a los polipéptidos químicamente mediados. Sin embargo, los restos de fenilo deben obstaculizar el agua en una estructura secundaria; propiedades que valdría la pena investigar.

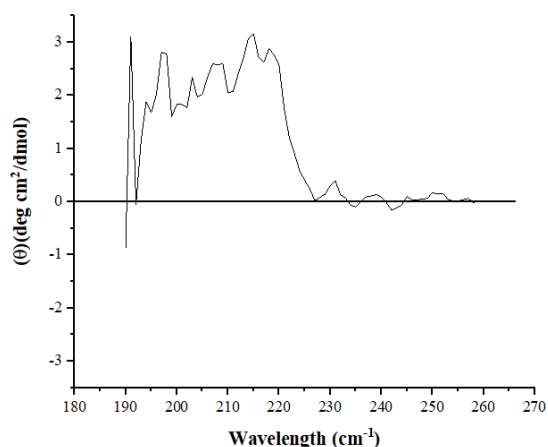


Figura 31. Espectro de DC de poli(L-Fen-OEt) (muestra 15) en disolución acuosa.

4.8. Resultados de difracción de rayos X de polvo.

La técnica de DRXP fue utilizada para evaluar el ensamble molecular de los polipéptidos y como característica importante se encontró que estos polipéptidos tienen alta cristalinidad, principalmente los homopolipéptidos (**Tabla 6**), ya que al provenir de la síntesis biocatalizada permite que su regularidad espacial sea simétrica en la cadena principal.

Particularmente, se observó que la poli(L-Leu-OEt) mostró mayor cristalinidad que la poli(L-Fen-OEt) y poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt) (**Tabla 6**), esto se puede atribuir a su regularidad química, ya que al ser un homopolipéptido que tiene el grupo isobutil (grupo R del aminoácido) favorece su aproximación y empaquetamiento de la cadena principal, como se puede apreciar de la **Figura 32**, donde se pudo observar que la región cristalina mostró picos muy bien definidos, mientras que la región amorfa es casi despreciable.

Por otro lado, la poli(L-Fen-OEt) (**Figura 33**) mostró un incremento en la región amorfa en comparación con el poli(L-Leu-OEt), este hecho se puede atribuir al grupo fenilo (grupo R del aminoácido) que es un grupo funcional más voluminoso que el grupo isobutil.

Como se ha remarcado la regularidad química favorece la formación de cristales en los polímeros, este hecho aclara el comportamiento de la cristalinidad en el copolipéptido (**Figura 34**), como se puede observar la región amorfa es mayor que los homopolipéptidos.

Otro hecho importante fue la relación entre la masa molar y la cristalinidad de los polipéptidos (**Figura 32-34**), ya que en los tres casos no se pudo encontrar una influencia clara de la masa molecular en la cristalinidad, como fue el caso de la influencia del tiempo

en el grado de polimerización, además está establecido que las posibles conformaciones de polímeros semicristalinos son limitadas tanto por las fuerzas inter- e intra-moleculares como por la polaridad de los sustituyentes, por lo tanto, la estructura secundaria de los polipéptidos mediados por enzimas en el R-134a seguiría siendo una pregunta abierta que vale la pena explorar.

Tiempo de reacción (h)	Poli(L-Leu-OEt)	Poli(L-Fen-OEt)	Poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt)
3	86.0	73.1	55.6
6	88.7	87.8	62.2
24	96.0	65.6	69.1
48	91.6	68.7	69.6

Tabla 6. Resultados del índice de cristalinidad de los materiales. Poli(L-Leu-OEt): muestras 19, 21, 23 y 25; Poli(L-Fen-OEt): muestras 27, 29, 31 y 33; Poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt): muestras 35, 37, 39 y 41.

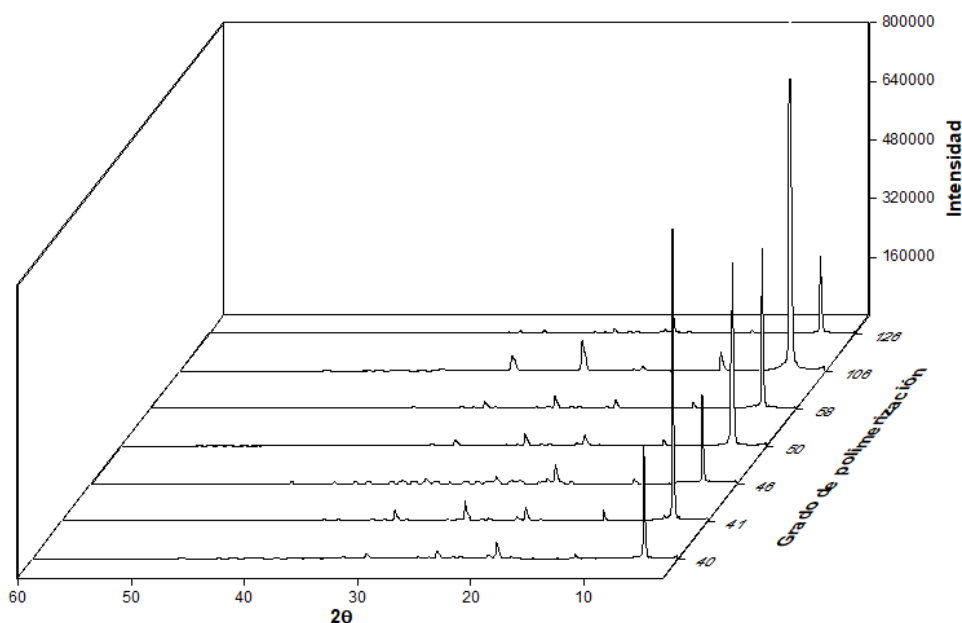


Figura 32. DRXP de poli(L-Leu-OEt) vs GP (muestras 19-26).

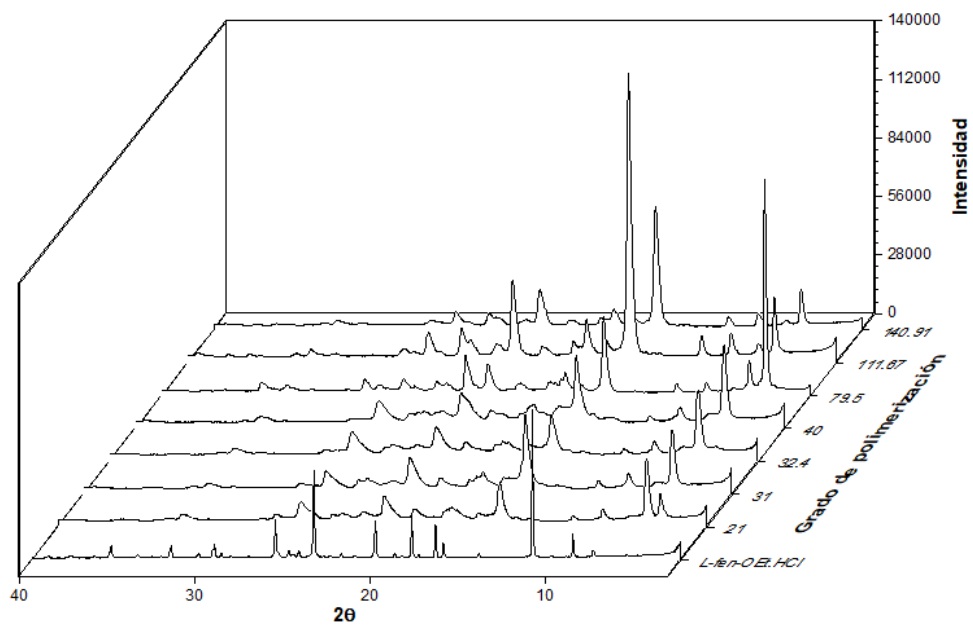


Figura 33. DRXP de poli(L-Fen-OEt) vs GP (muestras 27-34).

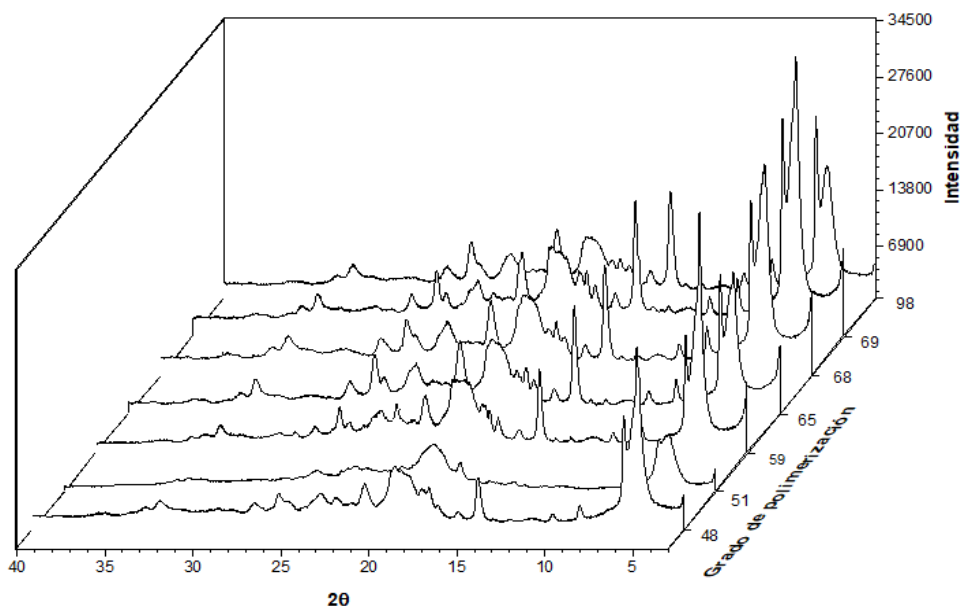


Figura 34. DRXP de poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt) vs GP (muestras 35-42).

4.9. Resultados de microscopia confocal.

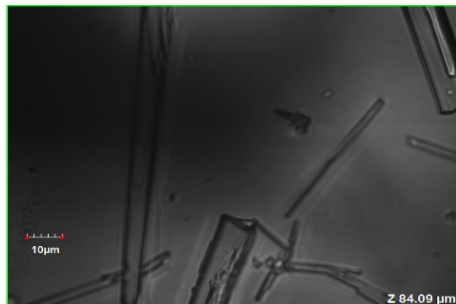
Los polipéptidos tienden a formar múltiples estructuras dependiendo de sus concentraciones, de las condiciones utilizadas de reacción o de los medios utilizados para su cristalización, algunos ejemplos anteriormente estudiados han sido oligopéptidos de polifenilalanina (Ryan et al., 2010; Zhu et al., 2010).

Particularmente, en cada material estudiado por microscopia confocal mostraron algunos agregados cristalinos (**Figuras**), debido principalmente a su habilidad para auto-ensamblarse y al método utilizado en el trabajo final de reacción, que fue un ambiente no controlado para su cristalización. Brevemente, el trabajo final de reacción consistió en enfriar a -80°C la disolución acuosa de polipéptido y finalmente liofilizarla.

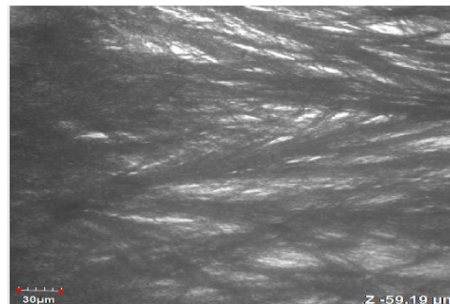
Por un lado, se encontró que la poli(L-Fen-OEt) formó una estructura semicristalina tubular (**Figura 35a**) sin tener un ambiente controlado de cristalización, lo cual corresponde con estudios anteriores que han deducido de sus trabajos auto-ensambles de nanotubos y nanocables (Amdursky & Stevens, 2015). Por otro lado, al controlar el ambiente de cristalización o estimulación en una disolución de MeOH/H₂O, los agregados cristalinos tienen en ensamblarse en forma de fibras (**Figura 35b**), parecidas a la ramificación de un árbol (dendrita).

En cambio, la muestra analizada de poli(L-Leu-OEt) sin y con estimulación no mostró algún ensamble particular (**Figura 35 c y d**, respectivamente), esto se puede atribuir a la alta cristalinidad que se encontró de este material, ya que en reportes anteriores han asociado inversamente proporcional el auto-ensamble y el porcentaje de cristalinidad (Zhu et al., 2010). No obstante, el estudio de su auto-ensamble puede ser inducido al utilizar otros disolventes en su estimulación.

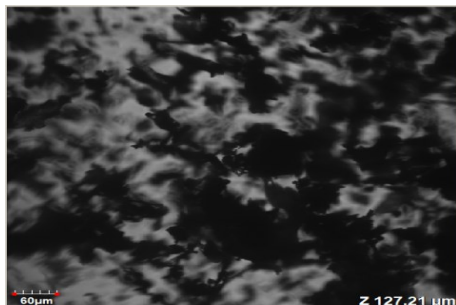
Finalmente, la muestra analizada de poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OET) al ser un material de menor cristalinidad que los homopolipéptidos mostró un mayor contenido de nanofibras aleatorias a pesar de no haber sido estimulada (**Figura 35e**). En relación a esto, la estimulación permitió observar ensamblajes repetitivos, como dendritas, algunas nano vesículas y nano fibras. Este comportamiento se puede atribuir primero, a la formación de un copolipéptido en bloques y segundo, al patrón seguido de los residuos de aminoácido que lo componen.



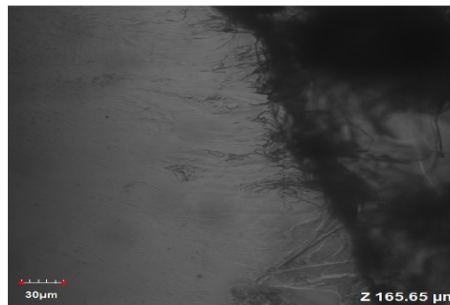
a) Poli(L-Fen-OEt) (muestra 15) sin estimulación.



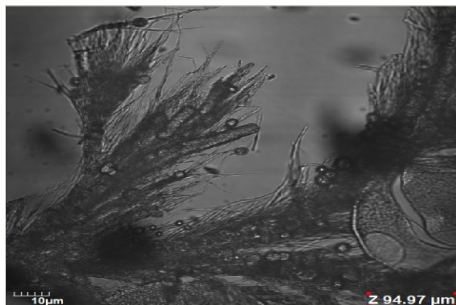
b) Poli(L-Fen-OEt) (muestra 15) con estimulación.



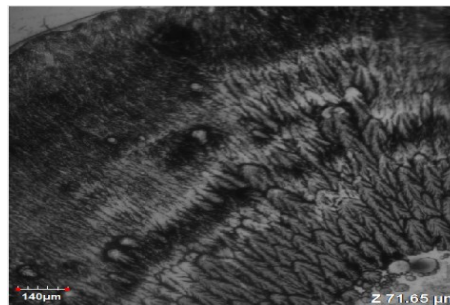
c) Poli(L-Leu-OEt) (muestra 13) sin estimulación.



d) Poli(L-Leu-OEt) (muestra 13) con estimulación.



e) Poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt) (muestra 17) sin estimulación.



f) Poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt) (muestra 17) con estimulación.

Figura 35. Microscopia confocal de los homopolímeros y copolímeros.

A partir de estos resultados, sería interesante utilizar otras mezclas de disolventes para conocer más su estimulación y realizar microscopía electrónica de barrido (SEM).

CONCLUSIONES

Las pruebas de solubilidad de L-Leu-Oet y L-Fen-OEt mostraron que el R134a comprimido hasta el estado líquido logró ser mejor disolvente que el scCO₂, ya que tiene mayor polaridad. Además, el scCO₂ mostró un gran inconveniente al reaccionar con la L-Leu-Oet y L-Fen-OEt al producir carbamatos. No obstante, la formación de carbamatos se limitó al mezclar el R-134a con CO₂, y así también mantener la solubilidad de los mismos.

Por otro lado, tanto la SC como la papaína mostraron mantener la actividad enzimática en un proceso térmico al ser incubadas en R-134a líquido, que a diferencia del otro proceso térmico que se llevó a cabo sin el R134a la SC perdió su actividad enzimática. Lo cual indicó que tanto la serín como la cisteín proteasa son muy estables en el R-134a líquido a pesar de los contrastes térmicos.

Una vez que se realizó una reacción modelo para probar la polimerización de L-Leu-OEt y L-Fen-OEt en el R-134a líquido, se comprobó que la SC fue casi nueve veces mejor biocatalizador que la papaína al comparar la masa molecular de ambos polipéptidos.

La SC mostró ser más efectiva en la polimerización de la L-Fen-OEt que de la L-Leu-OEt, ya que se obtuvo una mayor masa molecular en menos tiempo (19 919 Da y 13 646 Da, respectivamente). Además, mostró mayor afinidad hacia el monómero de L-Fen-OEt en la obtención del copolipéptido al presentar una relación 1.8:1 (L-Fen-OEt:L-Leu-OEt).

Las caracterizaciones de los materiales obtenidos mostraron que el índice de cristalinidad es mayor en los homopolipéptidos que en los copolipéptidos, además el estudio de DC demostró una característica peculiar de los polipéptidos, que es la ausencia de plegamientos repetitivos.

Este trabajo demostró que el uso del R134a en estado líquido permitió la biocatálisis de los ésteres de aminoácidos, L-Leu-OEt y L-Fen-OEt.

PERSPECTIVAS

Debe hacerse un estudio termodinámico a profundidad con la finalidad de conocer más apropiadamente las interacciones entre el R-134a y los ésteres de aminoácidos, para conocer la fase de equilibrio donde se lleva a cabo la reacción.

Conocer la cinética enzimática en este medio sería favorable para tener mejores rendimientos en costo, tiempo y recursos.

Ofrecer mayor información sobre la estructura química permitiría conocer más beneficios del medio de reacción.

Abundar más la parte de la caracterización de la estructura secundaria y el auto-ensamble de estos materiales abrirá el panorama de la síntesis de polipéptidos en fluidos comprimidos.

REFERENCIAS

- [1] Adams, D. J., Atkins, D., Cooper, A. I., Furzeland, S., Trewin, A., & Young, I. (2008). Vesicles from peptidic side-chain polymers synthesized by atom transfer radical polymerization. *Biomacromolecules*, 9(11), 2997–3003.
- [2] Andersen, K. B., Castillo-Leon, J., Hedström, M., & Svendsen, W. E. (2011). Stability of diphenylalaninepeptidenanotubes in solution. *Nanoscale*, 3(3), 994–998.
- [3] Bansal, V., Delgado, Y., Fasoli, E., Ferrer, A., Griebenow, K., Secundo, F., & Barletta, G. L. (2010). Effect of prolonged exposure to organic solvents on the active site environment of subtilisin Carlsberg. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64(1–2), 38–44.
- [4] Barlow, S. M., Haq, S., & Raval, R. (2001). Bonding, organization, and dynamical growth behavior of tripeptides on a defined metal surface: Tri-L-alanine and Tri-L-leucine on Cu{100}. *Langmuir*, 17(11), 3292–3300.
- [5] Berger, A., & Schechter, I. (1970). Mapping the active site of papain with the aid of peptide substrates and inhibitors. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 257(813), 249–264.
- [6] Bergmann, M., & Conrat, H. F. (1937). The role of specificity in the enzymatic synthesis of proteins syntheses with intracellular enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 119(2), 707–720.
- [7] Bergmann, M., & Fruton, J. S. (1938). Some synthetic and hydrolytic experiments with chymotrypsin. *Journal of Biological Chemistry*, 124(1), 321–329.
- [8] Bodanszky, M., & Bodanszky, A. (1994). The Dicyclohexylcarbodiimide (DCC, DCCI) Method [1]. In *The Practice of Peptide Synthesis* (2nd Edition, pp. 118–119). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [9] Bonduelle, C. (2017). Secondary structures of synthetic polypeptide polymers. *Polymer Chemistry*, 00, 1–3.
- [10] Bordusa, F. (2002). Proteases in organic synthesis. *Chemical Reviews*, 102(12), 4817–4867.
- [11] Corr, S. (2002). 1,1,1,2-Tetrafluoroethane; from refrigerant and propellant to solvent. *Journal of Fluorine Chemistry*, 118, 55–67.
- [12] Cupp-Enyard, C. (2008). Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate. *Journal of Visualized Experiments*, (19), 1–3.
- [13] Gurkan, B. E., de la Fuente, J. C., Mindrup, E. M., Ficke, L. E., Goodrich, B. F., Price, E. A., ... Brennecke, J. F. (2010). Equimolar CO(2) absorption by anion-functionalized ionic liquids. *J. Am. Chem. Soc.*, 132(7), 2116–2117.
- [14] Guzmán-Lagunes, F., López-Luna, A., Gimeno, M., & Bárzana, E. (2012). Enzymatic synthesis of poly-L-lactide in supercritical R134a. *Journal of Supercritical Fluids*, 72, 186–190.
- [15] Hammond, D. A., Karel, M., Klibanov, A. M., & Krukonis, V. J. (1985). Enzymatic reactions in supercritical gases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 11(5), 393–400.
- [16] Jackson, K., Bowman, L. E., & Fulton, J. L. (1995). Water Solubility Measurements In Supercritical Fluids and High-Pressure Liquids Using Near-Infrared Spectroscopy. *Analytical*

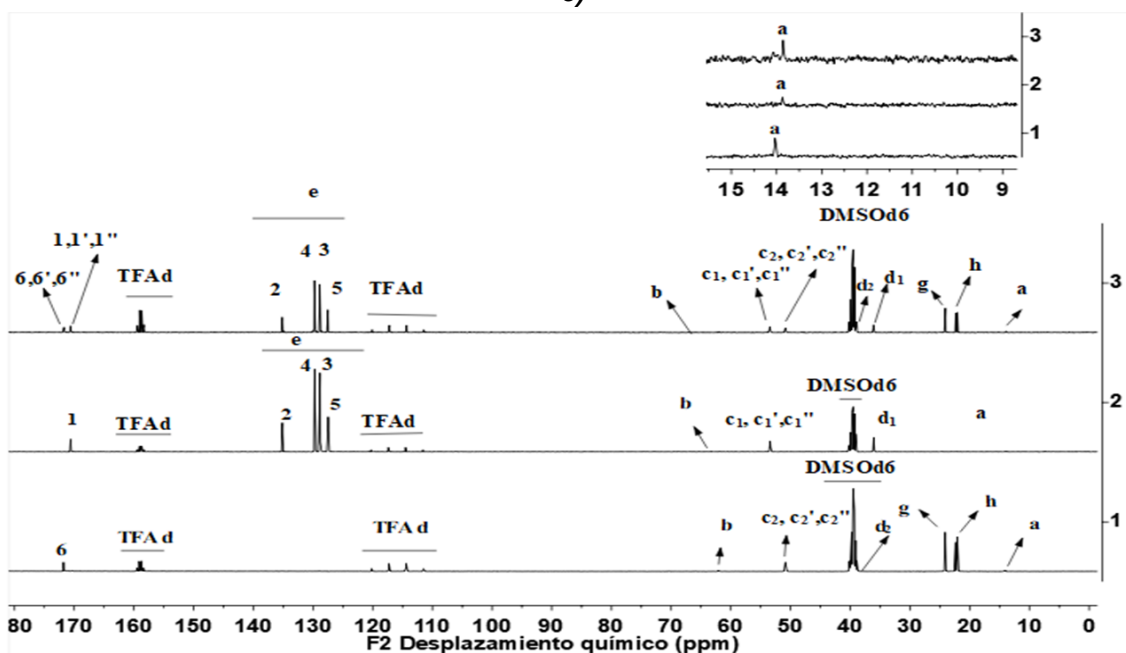
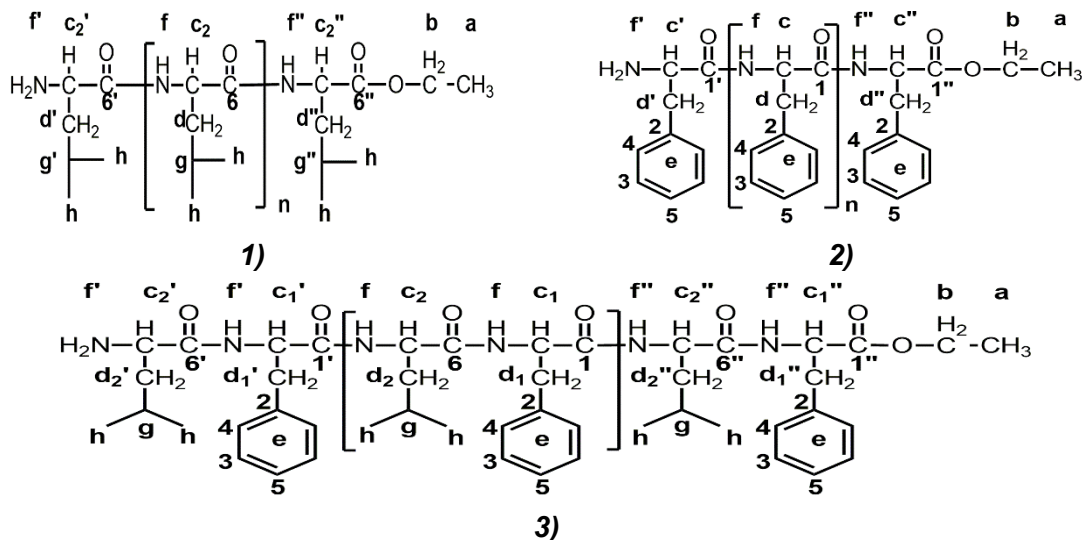
- Chemistry*, 67(14), 2368–2372.
- [17] Kadokawa, J., & Kobayashi, S. (2010). Polymer synthesis by enzymatic catalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(2), 145–153.
- [18] Kamphuis, I. G., Kalk, K. H., & Swarte, M. B. (1984). Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 179, 233–256.
- [19] Karamoddin, M., & Varaminian, F. (2013). Solubility of R22, R23, R32, R134a, R152a, R125 and R744 refrigerants in water by using equations of state. *International Journal of Refrigeration*, 36(6), 1681–1688.
- [20] Kong, J., & Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8), 549–559.
- [21] Krishna, S. H. (2002). Developments and trends in enzyme catalysis in. *Biotechnology Advances*, 20, 239–267.
- [22] Lagalante, A. F., Hall, R. L., & Bruno, T. J. (1998). Kamlet–Taft Solvatochromic Parameters of the Sub- and Supercritical Fluorinated Ethane Solvents. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(34), 6601–6604.
- [23] Lax, R. (2010). The Future of Peptide Development in the Pharmaceutical Industry. *PharManufacturing: The International Peptide Review*, 4, 10–15.
- [24] Lewis, J. K., Wei, J., & Siuzdak, G. (2006). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 5880–5894.
- [25] Lira Navarrete, E. (2007). *Síntesis de péptidos*. Cuernavaca.
- [26] Loo, Y., Zhang, S., & Hauser, C. A. E. (2012). From short peptides to nanofibers to macromolecular assemblies in biomedicine. *Biotechnology Advances*, 30(3), 593–603.
- [27] López-Luna, A., Gallegos, J. L., Gimeno, M., Vivaldo-Lima, E., & Bárzana, E. (2010). Lipase-catalyzed syntheses of linear and hyperbranched polyesters using compressed fluids as solvent media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67(1–2), 143–149.
- [28] Marcus, Y. (1993). The Properties of Organic Liquids that are Relevant to their use as Solvating Solvents. *Chemical Society Reviews*, 22(6), 409–416.
- [29] Marcus, Y. (2005). Solvatochromic probes in supercritical fluids. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 18(5), 373–384.
- [30] Matsubara, T., Fujita, R., Sugiyama, S., & Kawashiro, K. (2006). Stability of Protease in Organic Solvent: Structural Identification by Solid-State NMR of Lyophilized Papain Before and After 1-Propanol Treatment and the Corresponding Enzymatic Activities. *Biotechnology and Bioengineering*, 93, 928–933.
- [31] Medina-Gonzalez, Y., Camy, S., & Condoret, J. S. (2012). Cellulosic materials as biopolymers and supercritical CO₂ as a green process: chemistry and applications. *International Journal of Sustainable Engineering*, 5(1), 47–65.
- [32] Medina-Gonzalez, Y., Jarray, A., Camy, S., Condoret, J. S., & Gerbaud, V. (2017). CO₂-Expanded Alkyl Lactates: A Physicochemical and Molecular Modeling Study. *Journal of*

- Solution Chemistry*, 46(2), 259–280.
- [33] Miller, L. M., Bourassa, M. W., & Smith, R. J. (2013). 106. FTIR proteinas.pdf. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(10), 2339–2346.
- [34] Nakamura, K., Min Chi, Y., Yamada, Y., & Yano, T. (1985). Lipase activity and stability in supercritical carbon dioxide. *Chemical Engineering Communications*, 45, 207–212.
- [35] Neidhart, D. J., & Petsko, G. A. (1988). The refined crystal structure of subtilisin Carlsberg at 2.5 Å resolution. *Protein Eng*, 2, 271–276.
- [36] Neitzel, J. J. (2010). No Title. *Nature Education*, 3(9), 21–25.
- [37] NIST. (2017). NIST Libro del Web de Química. Retrieved from
- [38] Oppermann-Sanio, F. B., & Steinbüchel, A. (2002). Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganisms and biotechnological production. *Naturwissenschaften*, 89(1), 11–22.
- [39] Qin, Z., Fabre, A., & Buehler, M. J. (2013). Structure and mechanism of maximum stability of isolated alpha-helical protein domains at a critical length scale. *The European Physical Journal E*, 36(5), 53.
- [40] Randolph, T. W., Blanch, H. W., Prausnitz, J. M., & Wilke, C. R. (1985). Enzymatic catalysis in a supercritical fluid. *Biotechnology Letters*, 7(5), 325–328.
- [41] Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 597–635.
- [42] Ryan, D. M., Anderson, S. B., Senguen, F. T., Youngman, R. E., & Nilsson, B. L. (2010). Self-assembly and hydrogelation promoted by F 5-phenylalanine. *Soft Matter*, 6(3), 475–479.
- [43] Saul, S., Corr, S., & Micklefield, J. (2004). Biotransformations in low-boiling hydrofluorocarbon solvents. *Angewandte Chemie - International Edition*, 43(41), 5519–5523.
- [44] Saul, S. J. P., Micklefield, J., & Corr, S. (2007). Enzymatic process for stereo-selective preparation of chemical compounds in hydrofluorocarbon solvents. US.
- [45] Sewald, N., & Jakubke, H. (2002). *Peptides : Chemistry and Biology*.
- [46] Socrates, G. (2004). *Infrared and Raman characteristic group frequencies. Infrared and Raman characteristic group frequencies*.
- [47] Stawikowski, M., & Fields, G. B. (2012). Introduction to peptide synthesis. *Current Protocols in Protein Science*, 1(SUPPL.69), 1–13.
- [48] Stevenson, D. E., & Storer, A. C. (1990). Papain in organic solvents: determination of conditions suitable for biocatalysis and the effect on substrate specificity and inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*, 37, 519–527.
- [49] Suberu, J., Yamin, P., Cornell, R., Sam, A., & Lapkin, A. (2016). Feasibility of Using 2,3,3,3-Tetrafluoropropene (R1234yf) as a Solvent for Solid-Liquid Extraction of Biopharmaceuticals. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 4(5), 2559–2568.
- [50] Tamamis, P., Adler-Abramovich, L., Reches, M., Marshall, K., Sikorski, P., Serpell, L., ...

- Archontis, G. (2009). Self-assembly of phenylalanine oligopeptides: Insights from experiments and simulations. *Biophysical Journal*, 96(12), 5020–5029.
- [51] Toplak, A., Nuijens, T., Quaedflieg, P. J. L. M., Wu, B., & Janssen, D. B. (2015). Peptide synthesis in neat organic solvents with novel thermostable proteases. *Enzyme and Microbial Technology*, 73–74, 20–28.
- [52] Valeur, E., & Bradley, M. (2009). Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem. Soc. Rev.*, 38(2), 606–631.
- [53] Viswanathan, K., Omorebokhae, R., Li, G., & Gross, R. A. (2010). Protease-catalyzed oligomerization of hydrophobic amino acid ethyl esters in homogeneous reaction media using L-phenylalanine as a model system. *Biomacromolecules*, 11(8), 2152–2160.
- [54] Wimmer, Z., & Zarevúcka, M. (2010). A review on the effects of supercritical carbon dioxide on enzyme activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(1), 233–253.
- [55] Yang, Q., Wang, Z., Bao, Z., Zhang, Z., Yang, Y., Ren, Q., ... Dai, S. (2016). New Insights into CO₂ Absorption Mechanisms with Amino-Acid Ionic Liquids. *ChemSusChem*, 9(8), 806–812.
- [56] Yazawa, K., & Numata, K. (2014). Recent advances in chemoenzymatic peptide syntheses. *Molecules*, 19(9), 13755–13774.
- [57] Zhang, Q., Yuan, H. Y., Fukaya, N., Yasuda, H., & Choi, J. C. (2017). Direct synthesis of carbamate from CO₂ using a task-specific ionic liquid catalyst. *Green Chemistry*, 19(23), 5614–5624.
- [58] Zhu, P., Yan, X., Su, Y., Yang, Y., Li, J. (2010). Solvent-Induced Structural Transition of Self-Assembled Dipeptide: From Organogels to Microcrystals. *Chemistry-A European Journal*, 16(10), 3176–3183.

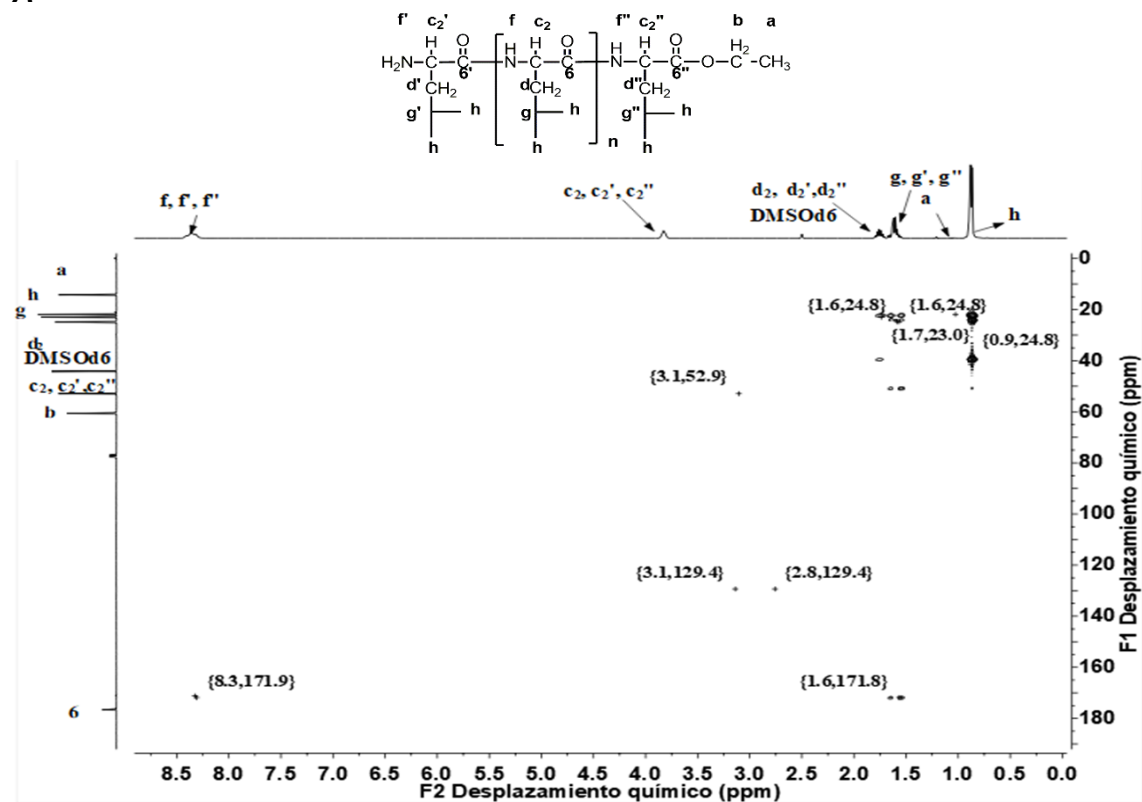
ANEXOS

Anexo 1. Espectros de ^{13}C -RMN de los polipéptidos **1)** Poli(L-Leu-OEt), **2)** Poli(L-Fen-OEt) y **3)** Poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt).

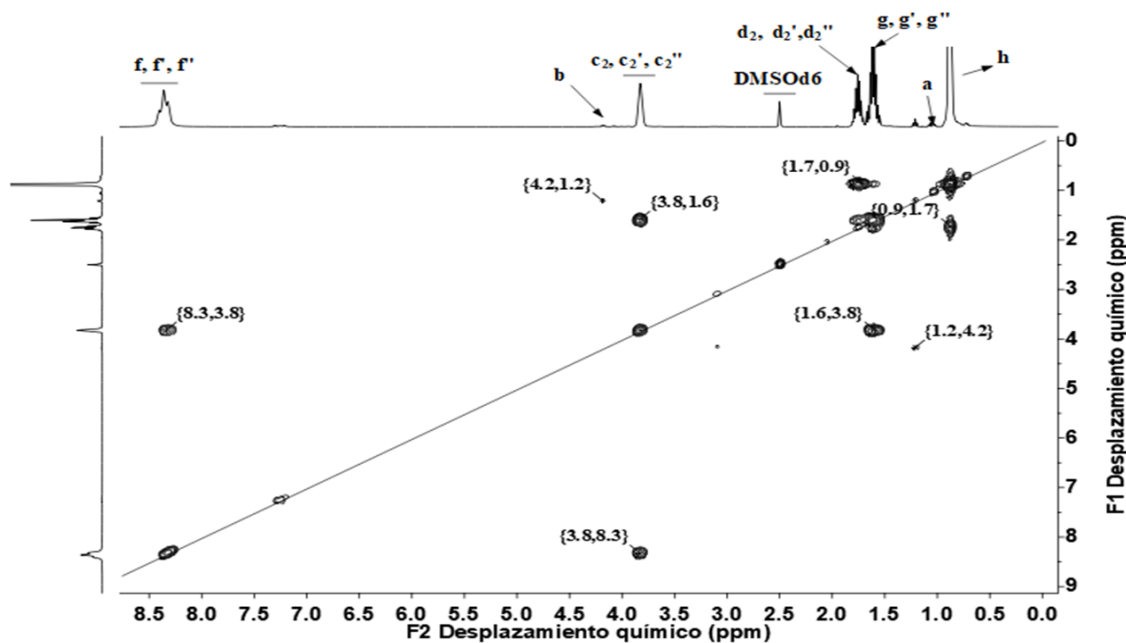


Anexo 2. Espectros de 2D-RMN de los polipéptidos Poli(L-Leu-OEt) **(A)** HMBC, **(B)** COSY.

A

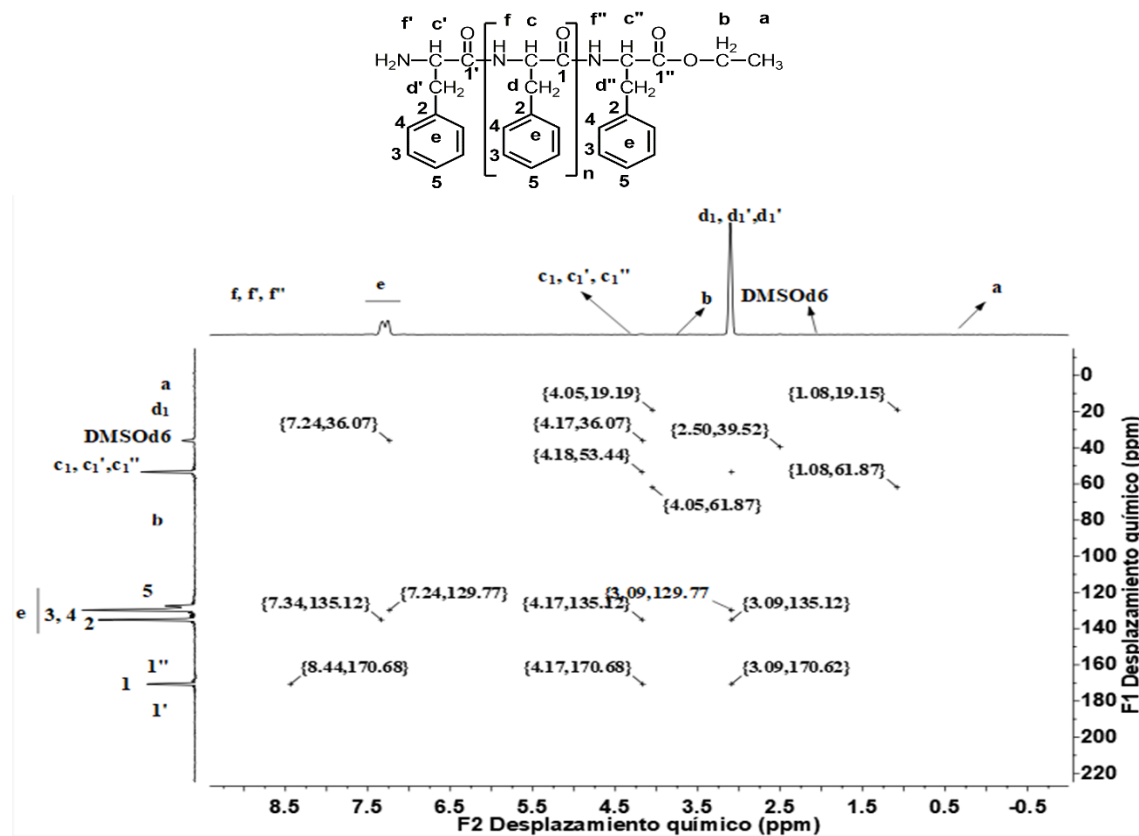


B

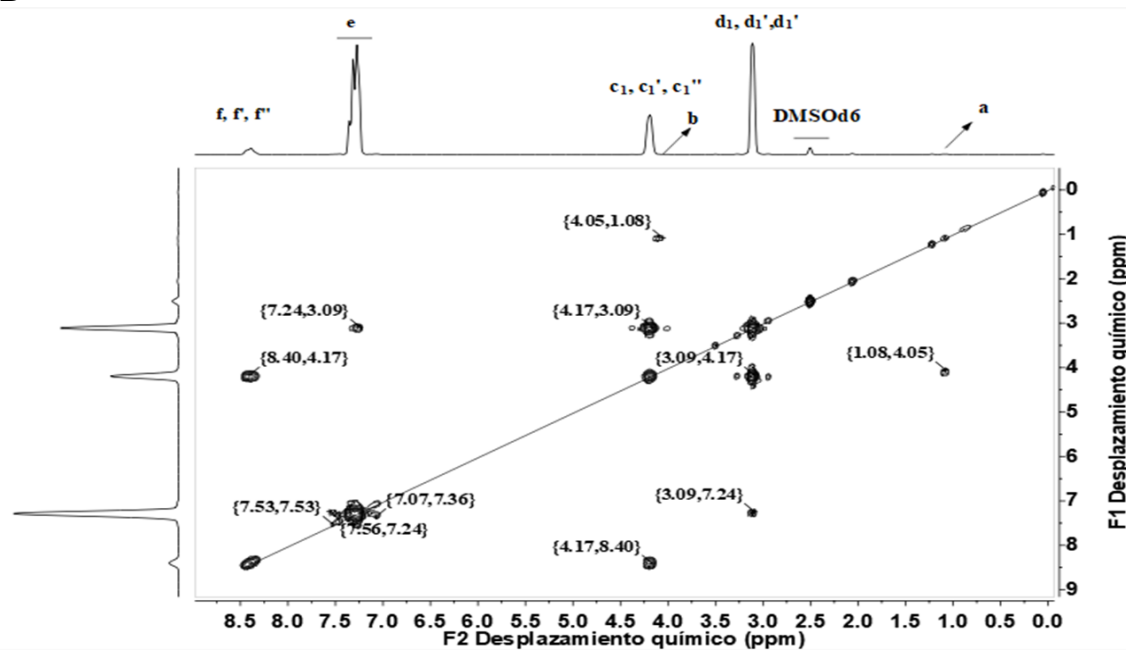


Anexo 3. Espectros de 2D-RMN de los polipéptidos Poli(L-Fen-OEt), **(A)** HMBC, **(B)** COSY.

A

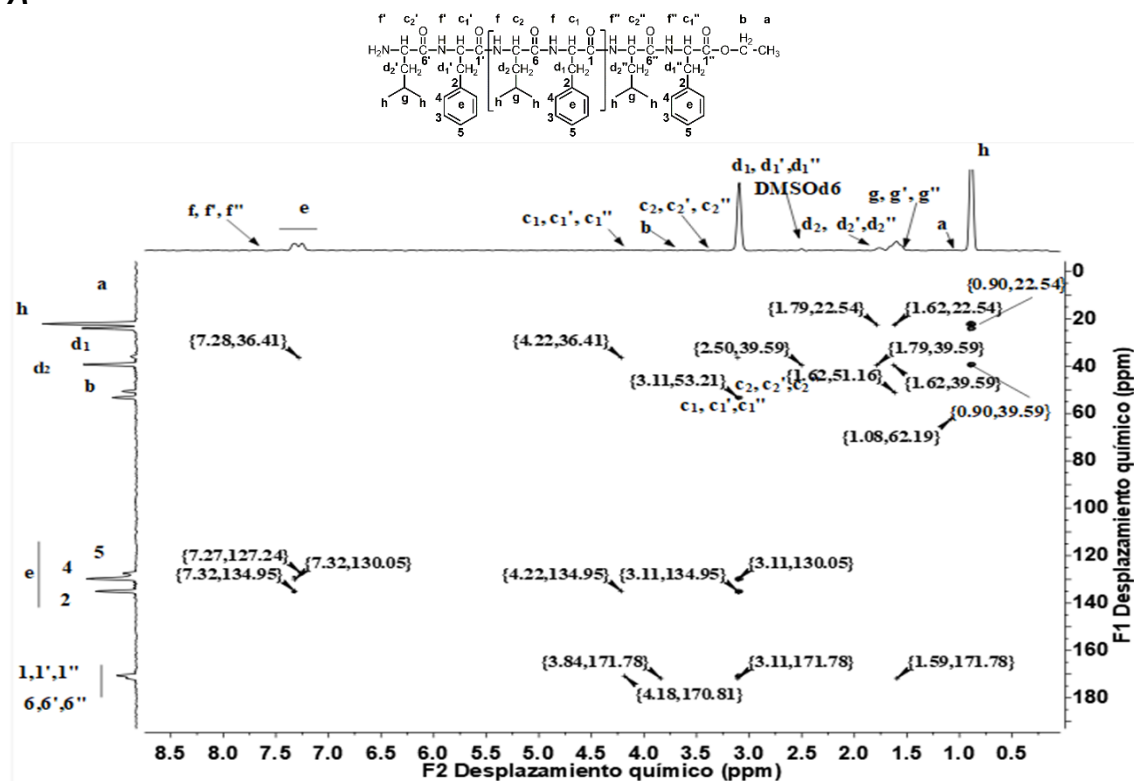


B

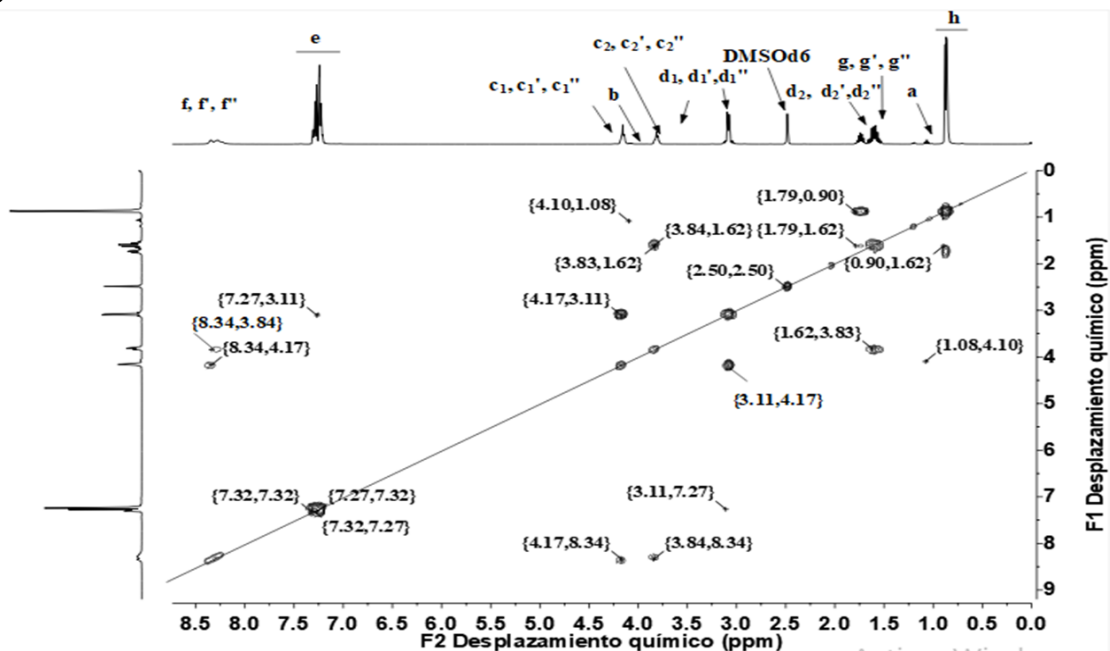


Anexo 4. Espectros de 2d-RMN Poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt), (A) HMBC, (B) COSy

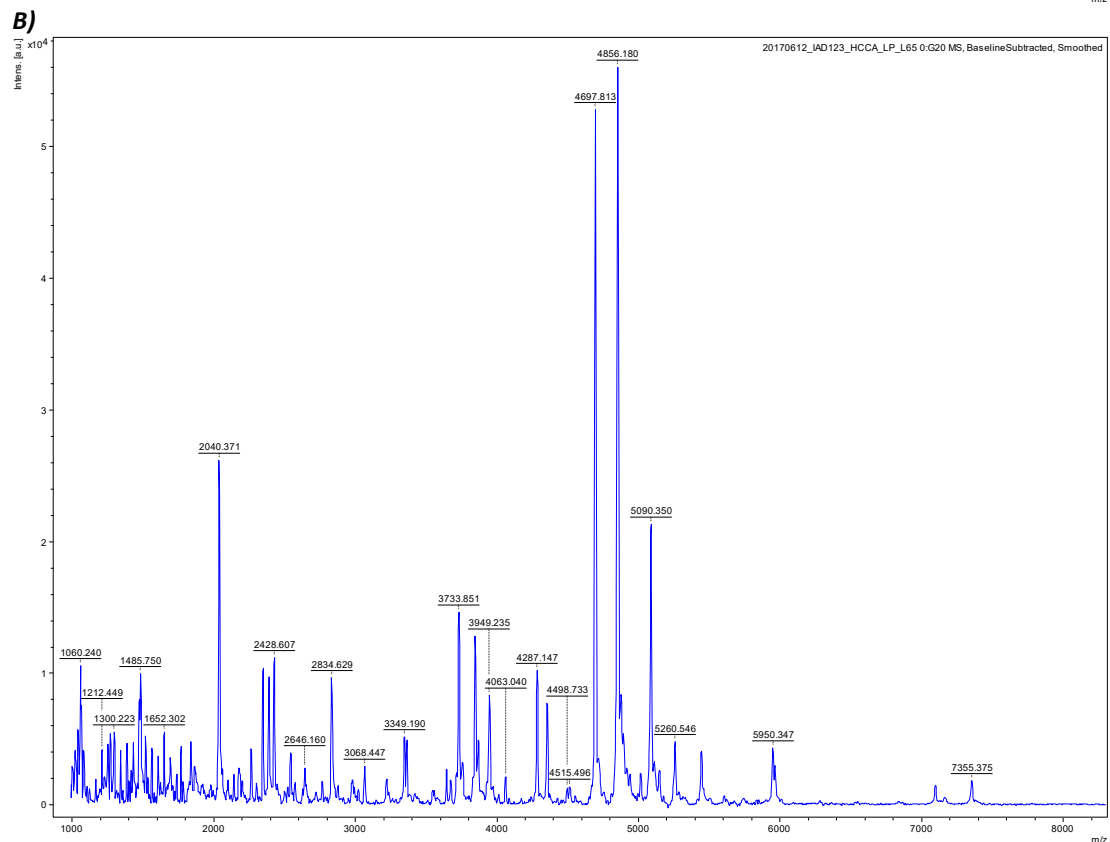
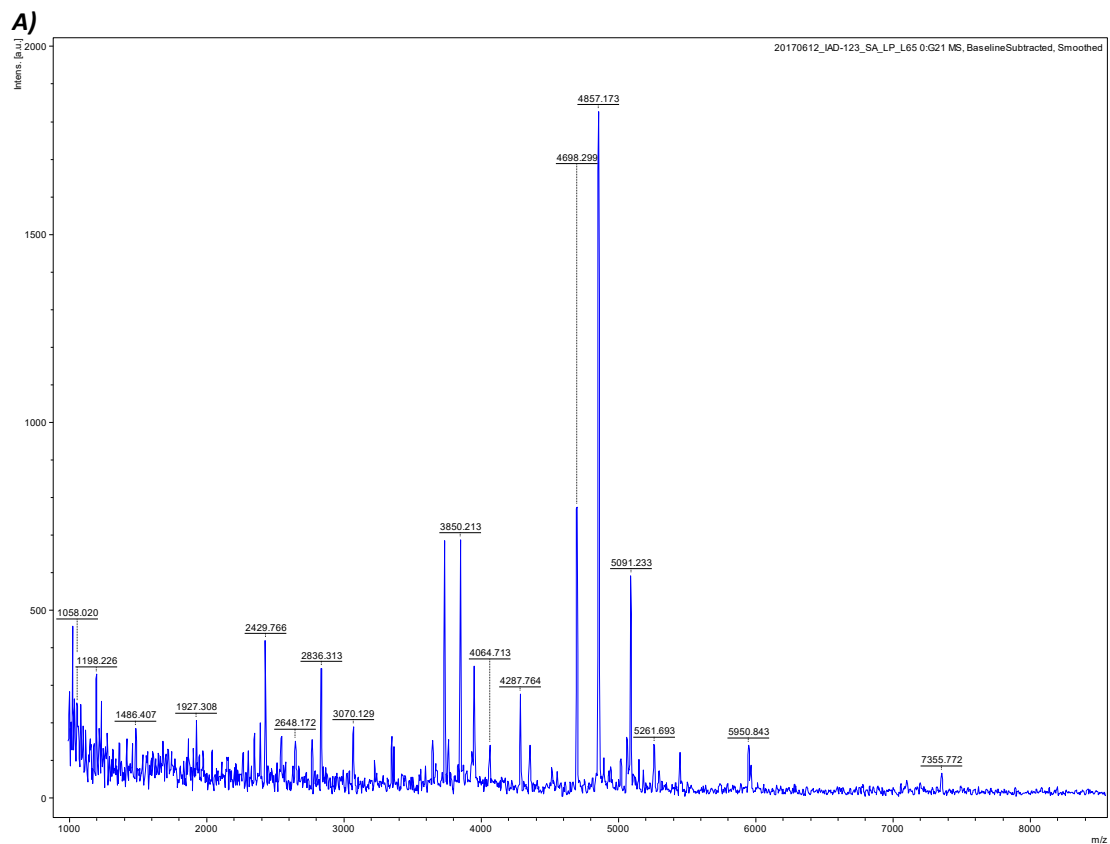
A



B

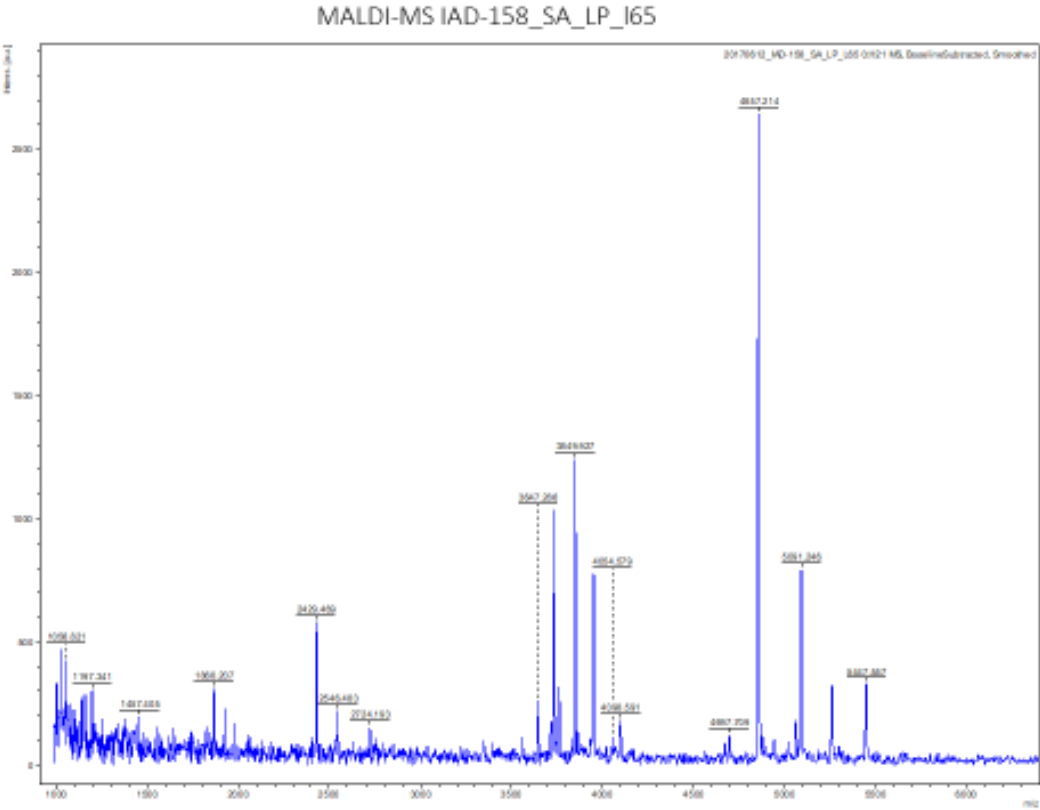


Anexo 5. Espectros de MALDI-Tof de Poli(L-Leu-OEt) en la matriz SA **(A)** CCA**(B)**

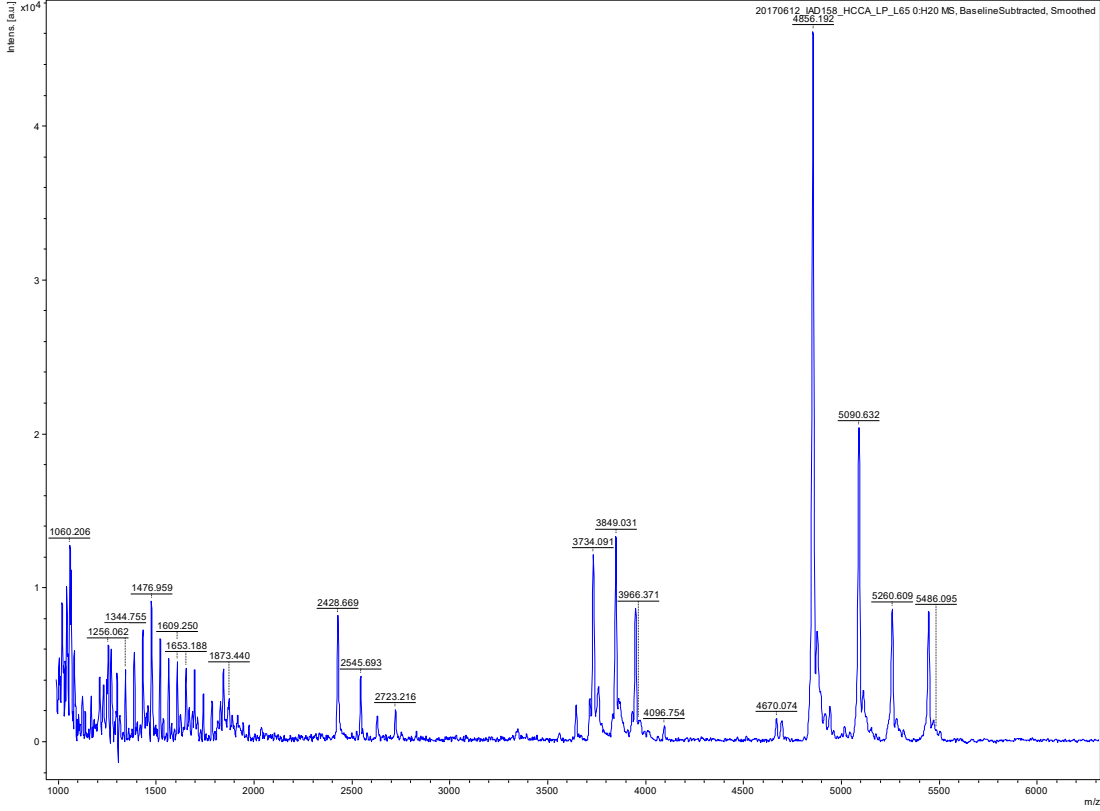


Anexo 6. Espectros de MALDI-Tof de Poli(L-Fen-OEt) en la matriz SA **(A)** CCA**(B)**

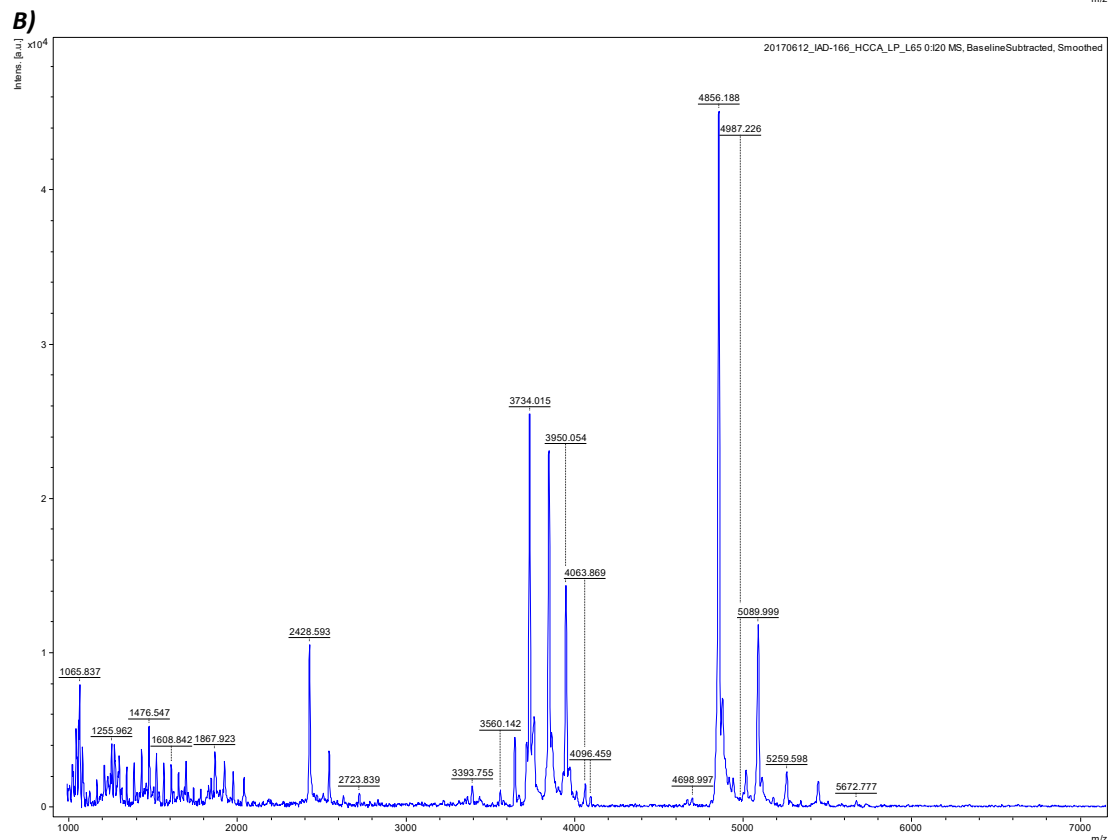
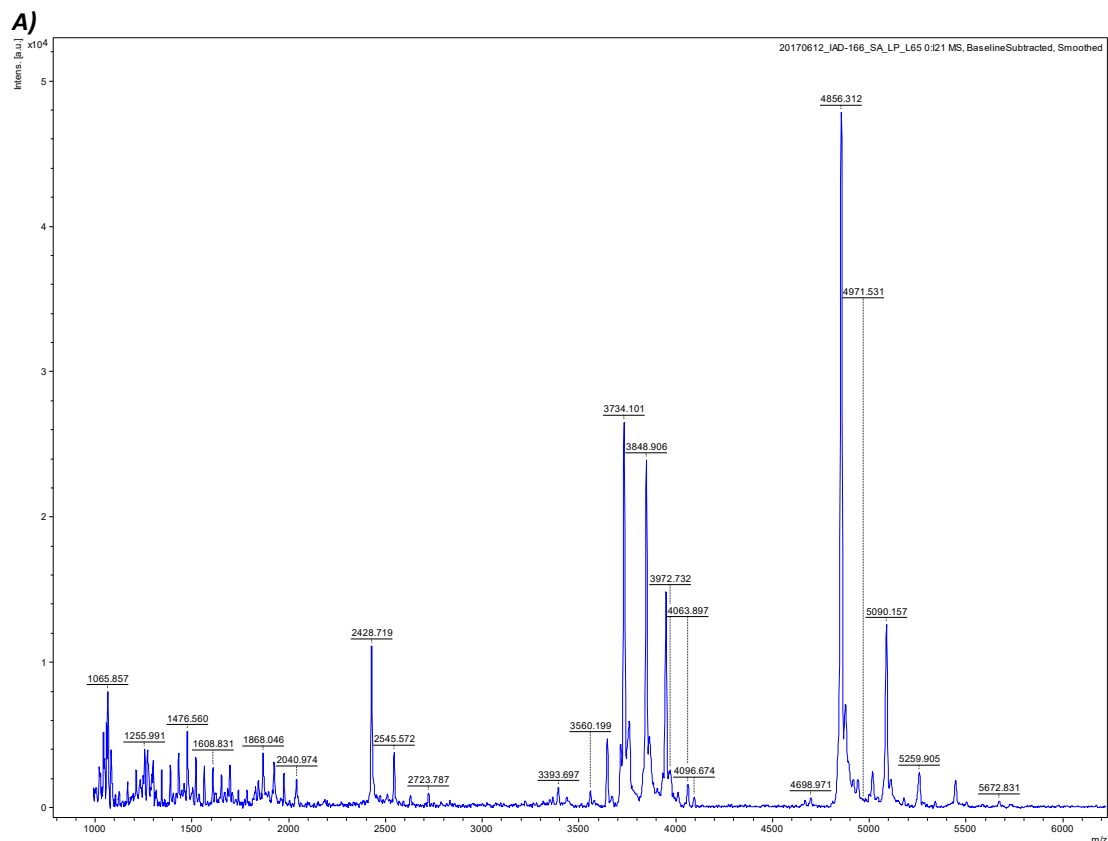
A)



B)



Anexo 7. Espectros de MALDI-Tof de Poli(L-Leu-OEt-co-L-Fen-OEt) en la matriz SA (A) CCA(B)





Cite this: *RSC Adv.*, 2018, 8, 35936

Chemoenzymatic synthesis of polypeptides in neat 1,1,1,2-tetrafluoroethane solvent†

Isabel S. Aguirre-Díaz,^a Carmina Montiel,^a Ismael Bustos-Jaimes,^b Yaocihuatl Medina-Gonzalez,^c Alberto Tecante^a and Miquel Gimeno^{id}*^a

Chemoenzymatic polypeptide synthesis offers several advantages over chemical or other biological routes, however, the use of aqueous-based media suffers from reverse hydrolysis reactions that challenge peptide chain propagation. Herein, the protease from subtilisin Carlsberg biocatalyzed the synthesis of poly-L-PheOEt, poly-L-LeuOEt, and the copolymers poly-L-PheOEt-co-L-LeuOEt from their amino acid ethyl ester substrates in a neat liquid 1,1,1,2-tetrafluoroethane solvent. The products, achieved in acceptable yields (ca. 50%), were fully characterized showing relatively high molar mass (ca. 20 000 Da for poly-L-PheOEt). This non-toxic low-boiling hydrofluorocarbon enhances enzymatic peptide propagation by limiting hydrolysis owing to its hydrophobic and relatively polar characteristics that sustain the protease activity and solubilize substrates and products. Computational molecular dynamic calculations were used to assess the L-PheOEt/L-LeuOEt-solvent and polypeptide-solvent interactions in this system. Additionally, the homopolypeptides displayed higher crystallinity than the copolypeptides with random incorporation of amino acid ethyl esters, notwithstanding the significantly highest specificity for Phe in this system. Interestingly, secondary structure characterization of the products by FTIR and circular dichroism suggests a non-common peptide folding.

Received 7th August 2018
 Accepted 17th October 2018

DOI: 10.1039/c8ra06657d

rsc.li/rsc-advances

Introduction

Synthetic polypeptides are interesting materials as they can mimic the characteristics of proteins.^{1–3} In this regard, the polypeptide primary and secondary structures are crucial for a wide range of applications as advanced and smart materials.⁴ Therefore, research of polypeptides increases more and more from controlled drug delivery, the targeting of specific biological responses to self-assembly studies and hydrogel formation towards bioactive materials, among others.^{5,6} For their synthesis, the Merrifield solid phase, to attain sequence-controlled short peptide structures, is currently the most used,⁷ although there are some limitations due to excessive costs, low product yield derived from time-consuming steps, and expensive purifications. Another chemical approach is the one-step ring opening polymerization from *N*-carboxy anhydride monomers.⁵ However, the approaches based on the enzymes offers mild and more environmentally friendly conditions with the absence of toxicity and side reactions,⁶ which might result in improved polypeptide characteristics. The

protease-mediated syntheses of oligopeptides in pure aqueous media or water mixed with organic solvents, *i.e.* MeOH, DMSO, DMF, proved successful.⁸ Therein, the use of highly hydrophilic media allows the solubility of the amino acid-based substrates, mainly amino acid esters while keeping adequate enzymatic activities. To do so, the subtilisin Carlsberg (SC) protease is mostly employed but also papain, trypsin, and chymotrypsin, among others.⁶ However, despite favorable biocatalytic properties in these media, the chain propagation is challenging owing to the reversible hydrolytic reaction. Recently, the bioengineering of microbial proteases, amidases, and peptidases has emerged in the sought for efficient peptide synthesis, macrocyclization and segment condensation in water.^{9–14} Other approaches include the stability of these enzymes in neat organic solvents or co-solvent systems, thus improving substrates and products solubilities.¹⁵ Additionally, it is worth mentioning recent advances on transpeptidation and macrocyclization of peptides by sortase and butelase ligase enzymes, although these require specific segment recognition.^{16,17} In general, these reports render low molar mass products when polypeptide synthesis from amino acid substrates or the use of non-commercial enzymes that increase the production costs.

Generally, the use of neat hydrophobic organic media such as toluene, hexane, or hydrophobic ionic liquids for enzymatic polymer synthesis is restricted to commercial lipases to produce mainly polyesters. These biotransformations are enhanced by the low polarity of substrates and products and good lipase enzyme stabilities.¹⁸ Additionally, these enzyme-mediated

^aFacultad de Química, Depto. de Alimentos y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), CDMX, Mexico. E-mail: mgimeno@unam.mx

^bFacultad de Medicina, Depto. de Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), CDMX, Mexico

^cINPT, UPS, Laboratoire de Genie Chimique UMR CNRS 5503, Universite de Toulouse, 4, Allée Emile Monso, F-31030 Toulouse, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c8ra06657d



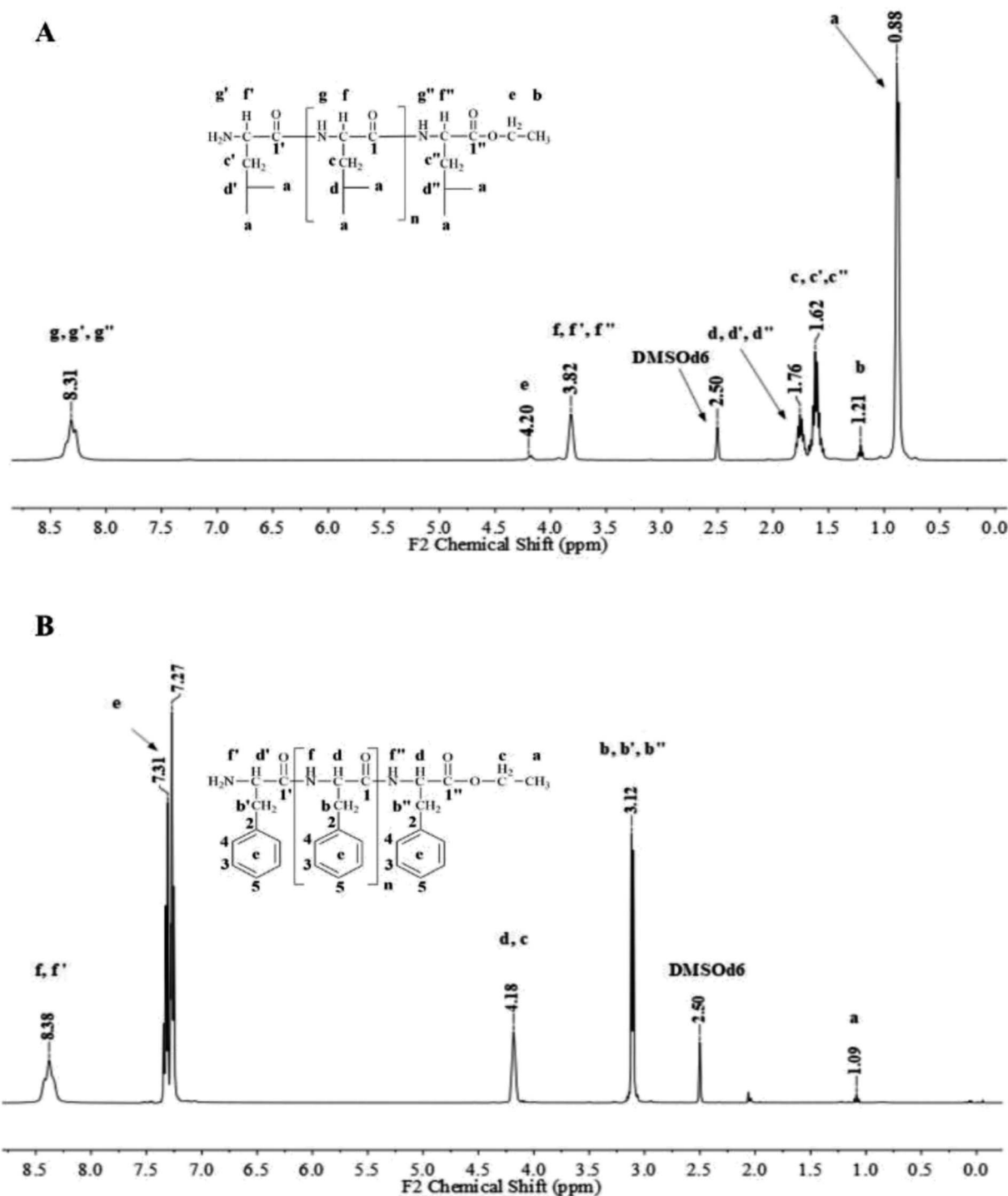


Fig. 1 Representative ^1H NMR spectra with signal assignments for poly(L-LeuOEt) (A); poly(L-PheOEt) (B).

polymer synthesis includes non-toxic and green compressed fluids (CF)s solvents with remarkable advantages compared to other media regarding low toxicity and green processes.^{19–21} The hydrophobic and relatively polar compressed 1,1,1,2-tetrafluoroethane in combination with commercial lipases produced the poly-L-lactide and branched polyesters.²⁰ This organic CF is non-toxic with no ozone depleting potential (ODP) and approved for biomedical uses under the generic name of norflurane, *i.e.* propellant for metered dose inhalers.^{22,23} This low-

boiling hydrofluorocarbon becomes easily liquid under small pressure and solubilizes relatively polar substrates while keeping its hydrophobic and aprotic characteristics to inhibit depolymerization and more importantly, to sustain hydrolase-type activities for biotransformations.^{24–26} This work is first to describe a chemoenzymatic synthesis of polypeptides in this neat fluid (313.15 K, 25 bar). For this purpose, L-leucine and L-phenylalanine ethyl esters were used as model substrates and the consequent products were attained in higher yields and



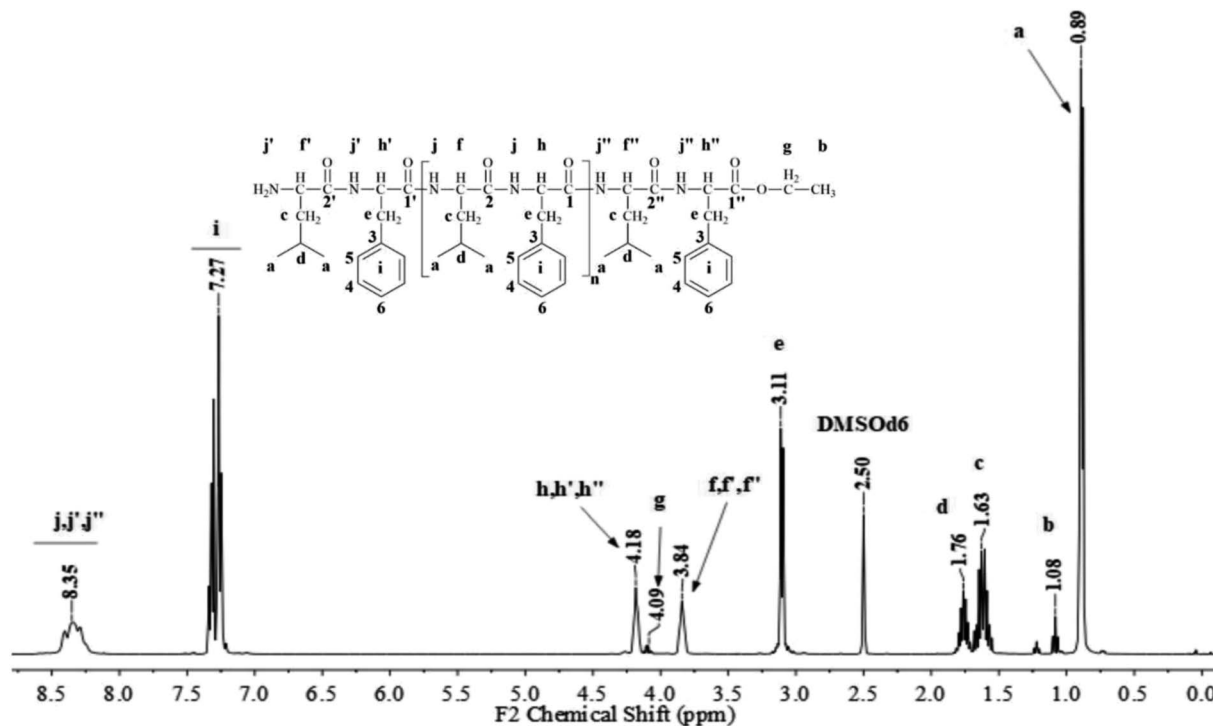


Fig. 2 Representative ^1H NMR spectrum with signal assignments for poly(L-LeuOEt-co-L-PheOEt).

Table 1 Polypeptide reaction yields and crystallinity percentages

Entry	Time (h)	Yield (%)	Crystallinity ^a (%)
Poly(L-LeuOEt)	3	48.19	86.0
Poly(L-LeuOEt)	6	38.04	88.7
Poly(L-LeuOEt)	24	51.26	96.0
Poly(L-LeuOEt)	48	43.79	91.6
Poly(L-PheOEt)	3	51.48	73.1
Poly(L-PheOEt)	6	50.51	87.8
Poly(L-PheOEt)	24	42.91	65.6
Poly(L-PheOEt)	48	42.73	68.7
Poly(L-LeuOEt-L-PheOEt)	3	51.88	55.6
Poly(L-LeuOEt-L-PheOEt)	6	46.48	62.2
Poly(L-LeuOEt-L-PheOEt)	24	49.94	69.1
Poly(L-LeuOEt-L-PheOEt)	48	68.85	69.6

^a Data from the integration of crystalline and amorphous areas in the PXRD spectra.

molar masses than previous protease-mediated approaches. Additionally, computational molecular dynamic (MD) studies and the Flory–Huggins parameter (δ) and energy of mixing calculations assessed the substrates and products interactions with the solvent for this novel system.

Results and discussion

Solubility of monomers in the CFs and SC activity in the liquid 1,1,1,2-tetrafluoroethane

The view-cell experiments corroborated the solubility of monomers in organic CF solvent under the experimental conditions. Noteworthy, the initial experiments conducted in

liquid CO_2 as well as in its supercritical state displayed null solubility of the monomers and the presence of carbamates from degradation of the amino acid esters. Evidence of the latter by ^1H NMR spectroscopy and the lack of solubility ruled out the use of this inorganic CF in our system (see ESI Data 2† for representative ^1H NMR spectrum of a produced carbamate).

The residual activity of SC samples after treatment in the organic CF up to 48 h showed no significant differences to that for the untreated enzyme. These results provide further evidence for the sustained SC activity to allow biotransformations in this low-boiling hydrofluorocarbon as reported by Micklefield and co-workers at the UMIST (UK) in transesterification reactions.²⁶ Generally, the activities of hydrolases in hydrophilic organic solvents miscible with water decrease after prolonged exposure. The change in polarity in the active site arising from water partitioning to the media explains this effect. However, water has low miscibility in this organic CF (1 g L^{-1} at 313.15 K), which precludes for water stripping. Additionally, the hydrogen-bonding capacity associated with fluorine atoms might be relevant in keeping the configuration at the enzyme active site at the operational temperatures, as reported by Yu *et al.*²⁴ Therefore, the evidence might suggest that the polarity and hydrophobicity of this organic CF, as well as the hydrogen-bonding capacity of the fluorine moieties, might explain the SC activity in this system.

SC-mediated polypeptide syntheses and characterization

Fig. 1 and 2 show the representative ^1H NMR spectra for the enzymatically synthesized homopolypeptides and copolypeptides, respectively, with the signal assignments (see ESI Information 3† for the complete 1D and 2D NMR spectra with signal assignments in products).



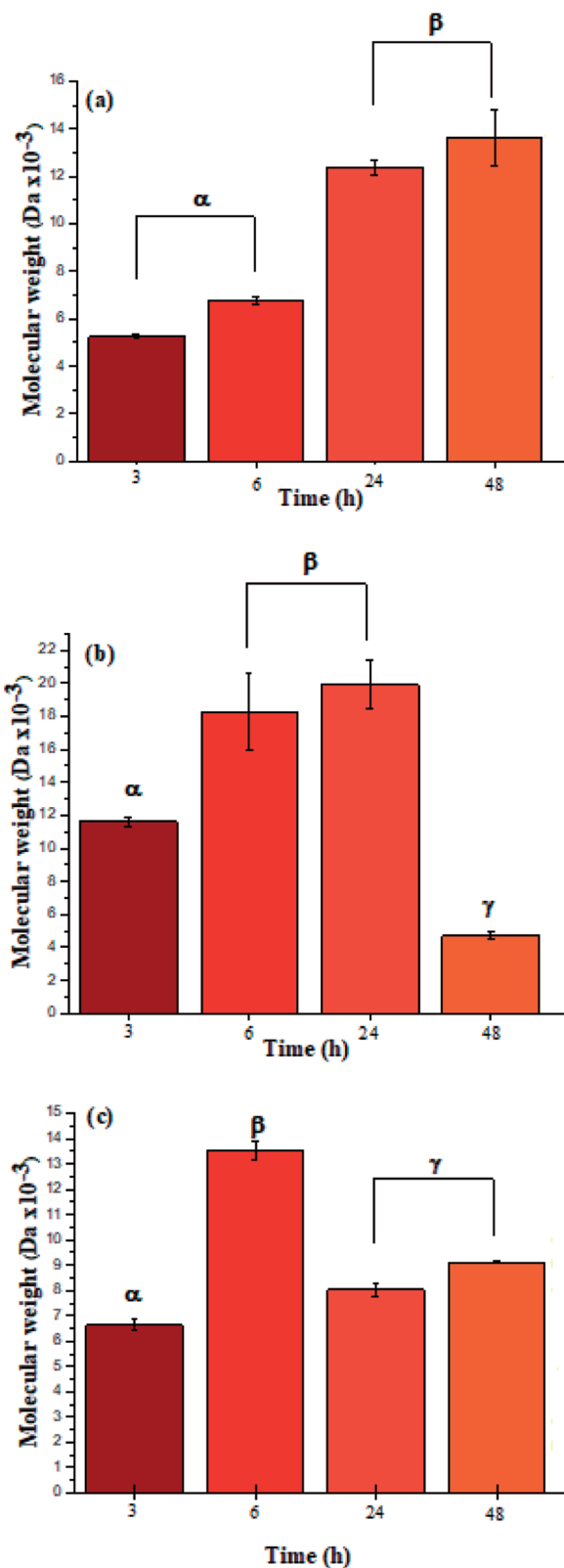


Fig. 3 Molar mass distributions calculated by integration of the characteristic ¹H NMR signals for polypeptides poly(L-LeuOEt) (a); poly(L-PheOEt) (b), and poly(L-LeuOEt-co-L-PheOEt) (c).

The ATR-FTIR bands at 1550 cm⁻¹ also corroborated the presence of amide bonds (see ESI Information 4[†] for the ATR-FTIR spectra and band assignments).⁴ Additionally, the UV

spectra for L-PheOEt substrates differs from that for poly(L-PheOEt), as shown in the ESI File 5,[†] and with the typical absorption of peptides at 215 nm, which provides further evidence on this reaction. The relationships between the product yields and molar mass distributions to reaction times are shown in Table 1 and Fig. 3a–c, respectively.

The recovered products after purification show no variation in yields but in molar masses, which suggests that propagation occurs by the condensation of peptide segments rather than successive incorporation of amino acid ester units. Interestingly, after 24 h, the maximum molar mass of poly(L-PheOEt) (Fig. 3b) decreases significantly, while that for poly(L-LeuOEt) (Fig. 3a) increases until 48 h. The decrease in molar mass but not in yields for the latter as well as in the copolymers (Fig. 3c) evidences that the reaction reached the equilibrium. This condition rules out an earlier termination by precipitation of the growing peptide chains from the media, which was corroborated by the view-cell experiments. Noteworthy, in addition to hydrolysis reaction, the alcoholysis, as transesterification with the released ethanol may occur, producing ethyl esters, which in turn are substrate for the reaction. On the other hand, there is a dramatic molar mass decrease for poly(L-PheOEt) at longer times, which might be ascribed to the alcoholysis or proteolysis, but an opposite behavior for poly(L-LeuOEt) as it increases weight after 24 h. This experimental evidence might be related to the different enzymatic recognition, which is also apparent for poly(L-LeuOEt-co-L-PheOEt). In the co-polypeptide syntheses, the maximum molar mass was at 24 h (Fig. 3c), and it tends to decrease with the decrease of L-Phe repeat units (Fig. 4).

In this regard, several authors reported substrate specificity in SC for hydrophobic amino acid residues, particularly for Phe benzene ring, although others showed that it might also depend on the reaction media.^{27–29} In the present study, the enzyme was significantly specific for the most hydrophobic L-Phe units in short reaction time products whereas tends to the equimolar ratio in longer reaction times as shown in Fig. 4. The evidence of this behavior in SC accounts for the prevalence of Phe unit recognition

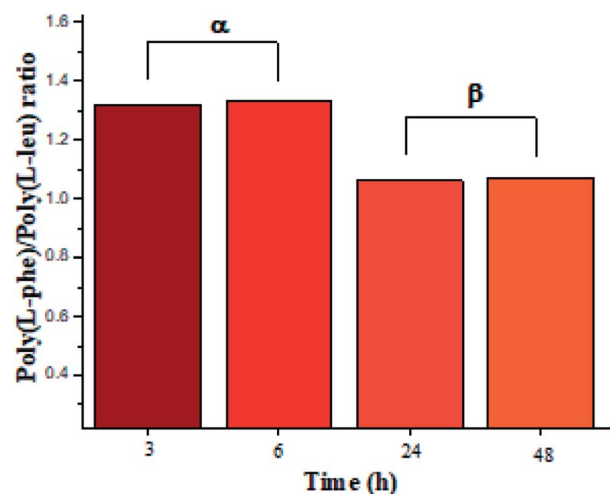


Fig. 4 L-PheOEt/L-LeuOEt repeat unit ratio calculated by integration of the characteristic ¹H NMR signals for each repeat unit.



as the co-polypeptide reaction proceeds, which also prompts for random incorporation of repeat units in all the synthesized co-polypeptides. Li *et al.* reported the influence of pH and type of enzyme, *i.e.* SC, on the production of oligopeptides of poly(L-PheOEt) in aqueous-based media. Their strategy was to minimize enzymatic activity losses by addition of co-solvents such as DMSO, DMF, EtOH, MeOH and ACN which also helped to solubilize the as well as products.³⁰ The use of this organic CF solvent rules out the control of the reaction pH allowing the solubilities of substrates and products as well as the preservation of the enzymatic activity which explains the enhanced propagation of the polypeptide chains. Noteworthy, control reactions (24 h) without the addition of the enzyme resulted in only 7.05% yield of poly(L-PheOEt) with a molar mass of 661 Da. The same reaction for poly(L-LeuOEt) attained only 6.85% yield of a 520 Da oligomer (see ESI File 6† for a graphical representation of the results in control reactions). Therefore, this demonstrates the contribution of the biocatalyst to the growing peptide chains in this system. Worth to note, the liquid 1,1,1,2-tetrafluoroethane is highly miscible with conventional organic solvents²² and other CFs such as compressed CO₂ (ref. 31) as well as ionic liquids.³² Therefore, enzymatic studies in this system might be extended with other co-solvent mixtures.

Interestingly, the secondary structure in our polypeptides does not match α -helix or β -sheet folding according to the reported assignments on FTIR spectra in the solid state.⁴ The reports assign amide I bands at 1656 cm⁻¹, 1650 cm⁻¹ and 1630 cm⁻¹ for coils, α -helix, and β -sheets, respectively. For the corresponding amide II bands, they are assigned at 1535 cm⁻¹, 1546 cm⁻¹ and 1530 cm⁻¹ for coils, α -helix, and β -sheets, respectively.^{4,33} However, in our recorded FTIR spectra (ESI File 4†) two bands at 1605 cm⁻¹ and 1580 cm⁻¹ were always observed for all samples. Additionally, the band at 1730 cm⁻¹ in the poly(L-LeuOEt) spectra might be due to terminal units. This signal is probably overlapped by the bands for monosubstituted phenyl in poly(L-PheOEt) and poly(L-LeuOEt-co-L-PheOEt) spectra. As described before, to the best of our knowledge, there is no data for secondary structure in early reported enzyme-mediated polypeptides to compare to our data. Additionally, the CD spectrum for poly(L-PheOEt) shown in Fig. 5 agrees with FTIR data as could not be assigned to common protein folding nor that reported for chemically-mediated polypeptides.^{4,5} Nonetheless, the phenyl moieties must hinder water in a secondary structure; properties that might be worth to investigate. Another feature was the high crystallinity of the polypeptides in the PXRD spectra, as shown in

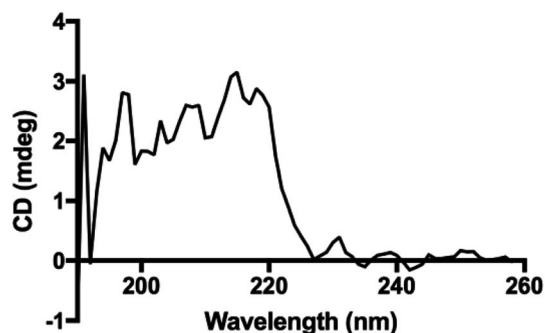


Fig. 5 CD spectrum for poly(L-PheOEt) in aqueous solution.

Table 1 (see ESI File 7† for PXRD diffraction patterns of the enzymatically synthesized polypeptides).

The percentage of crystallinity does not correlate to the molar mass of the polypeptides. However, there was a decrease as the molar mass decreased for poly(L-PheOEt) at 24 and 48 h reactions, and the opposite occurred for poly(L-LeuOEt) for the same reaction times, concomitantly to its molar mass increase. In addition to this trend, the crystallinity was significantly higher for homopolypeptides as compared to the co-polypeptides, which evidences an increasing disorder among the peptide chains in the case of the latter. Nevertheless, the relation between molar mass and crystallinity with the secondary structure of the enzyme-mediated polypeptides in this organic CF would remain an open question that is worth exploring.

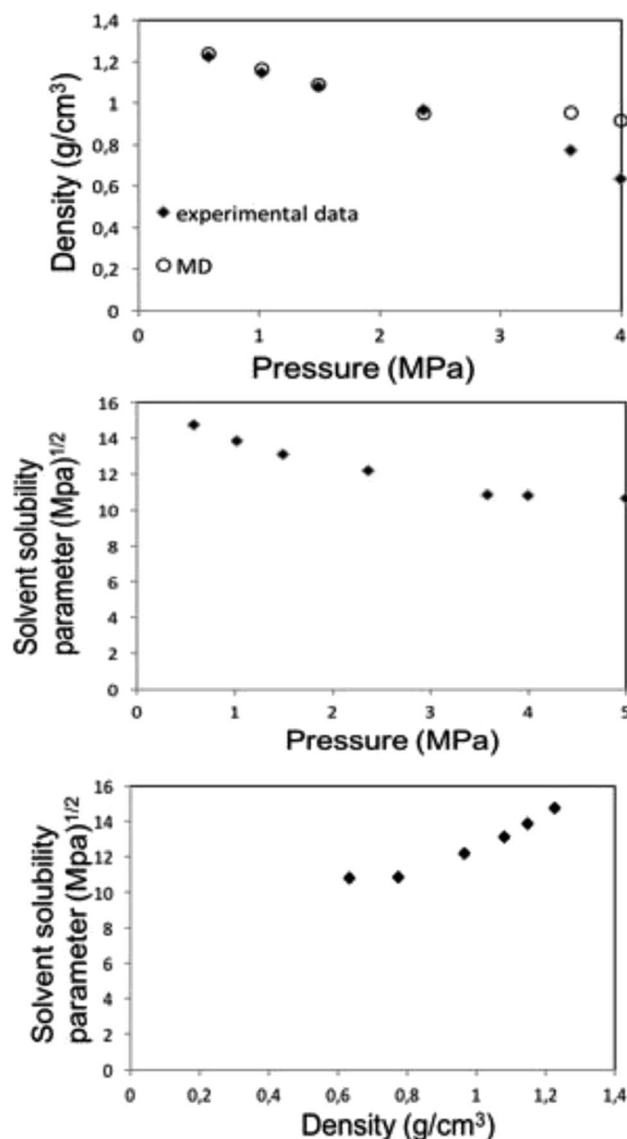


Fig. 6 MD calculation for liquid 1,1,1,2-tetrafluoroethane (313.15 K; 25 bar) density (top) and solubility (center) parameters as a function of pressure along the bubble point curve, experimental data taken from Blanke *et al.*³⁴ Liquid 1,1,1,2-tetrafluoroethane solubility parameter as a function of density (below).



Computational modeling studies

Molecular modeling for density and solubility parameters.

Fig. 6 shows the MD calculations for the density and solubility parameter of the liquid 1,1,1,2-tetrafluoroethane (313.15 K, 25 bar) together with literature data along the bubble point curve,³⁴ as well as the variation of the solubility parameter with density.

Along the bubble curve, the pressure increase is related to a temperature increase. Thus, the decrease of the solubility parameter is mainly due to the increase of the temperature which then is in line with the evolution of the Kamlet–Taft parameter (π^*), in agreement to the solvatochromic measurements by Abbott and Eardley (1999).³¹ In another related work, Lagalante and co-workers reported an increase in π^* with density in this solvent together with an increase in hydrogen-bond acceptor ability parameter (β) with density.³⁵ In turn, our MD simulations predict an increase in the solubility parameter with density. On the other hand, the Flory–Huggins parameter for the solvent–polymer and solvent–copolymer systems in Fig. 7 display an increase in this parameter, which indicates a decrease in miscibility.

This behavior is more pronounced for the two polymers and decreases as poly(L-PheOEt) > poly(L-LeuOEt) > poly(L-LeuOEt-co-L-PheOEt) indicating a better solubility of the copolymer in this organic CF than that for the two polymers individually.

Energy of mixing. Our objective was to compute the Gibbs free energy mixtures of the mixtures composed of liquid CF-poly(L-PheOEt), CF-poly(L-LeuOEt) and CF-copolymer, relative to that of the two pure compounds by using the Flory–Huggins interaction parameter (χ_{i-j}). This parameter relates to solubility parameters as, the solvent will be poorer for this polymer when χ_{i-j} increases, and on the contrary, a decrease in χ_{i-j} improves solubility of the polymer. Fig. 8 shows the calculated ΔG of mixing for the systems as a function of the volume fraction of the polypeptide. The calculations predict partial miscibility of this system and the appearance of phase separation at temperatures above 328 K and 313 K for CF-poly(L-PheOEt) and CF-poly(L-LeuOEt), respectively. This behavior can result from the decrease in the solubility parameter of the solvent at higher temperatures (Fig. 6). Nonetheless, at the operational temperature used in this study, the solutions are predicted to be thermodynamically miscible for all volume fractions of the polypeptides. Concerning the copolymer behavior, the calculated Gibbs energy of mixing is negative for all temperatures, which points out to spontaneous mixing concomitantly with the regular solution theory.

This behavior can arise from the lower polymerization degree, and consequently, the lower molar mass, obtained for the copolymer than for the two polymers. Additionally, density is lower for the copolymer than for polymers, indicating a higher free volume between the copolymer chains, allowing more sites available for interaction with the solvent. From solubility

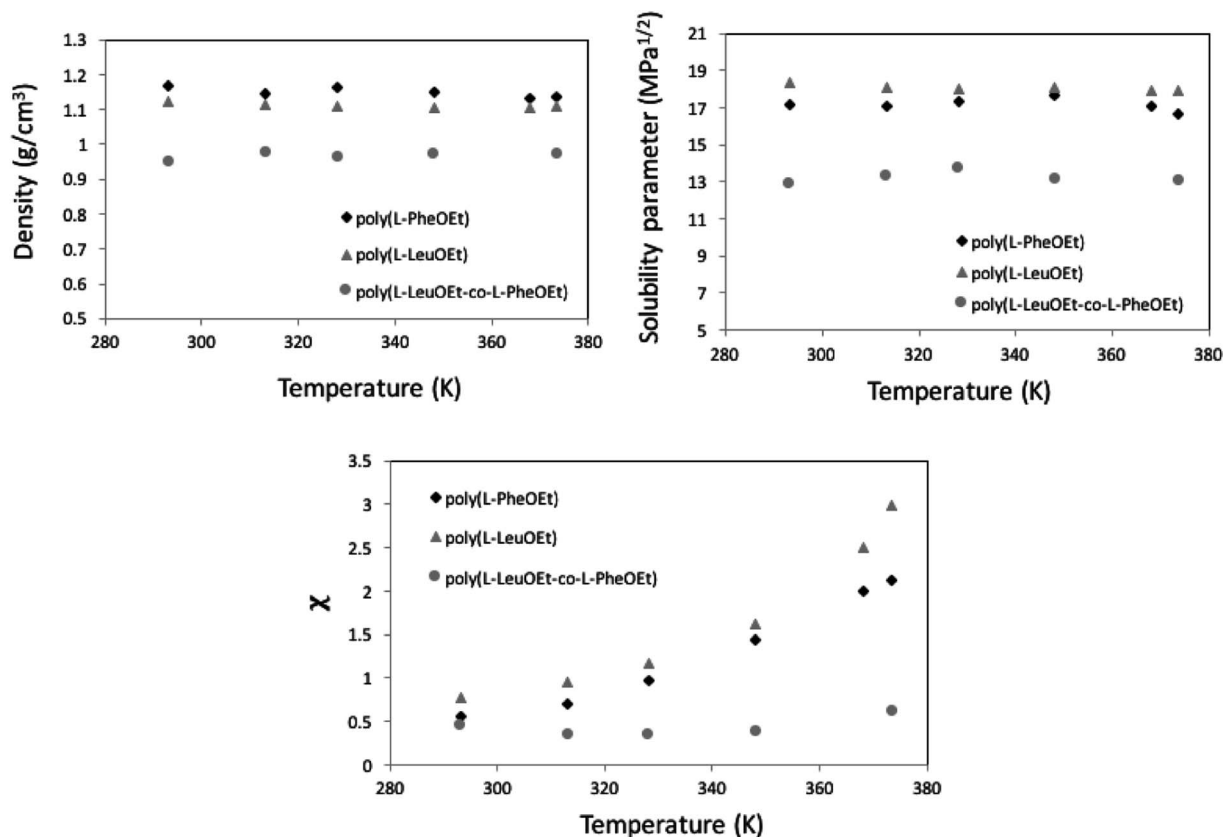


Fig. 7 MD calculation as a function of temperature, for density (top) and Hildebrand solubility parameters (center) for the polypeptides. Flory–Huggins parameter for 1,1,1,2-tetrafluoroethane (313.15 K; 25 bar)-polypeptide systems (below).



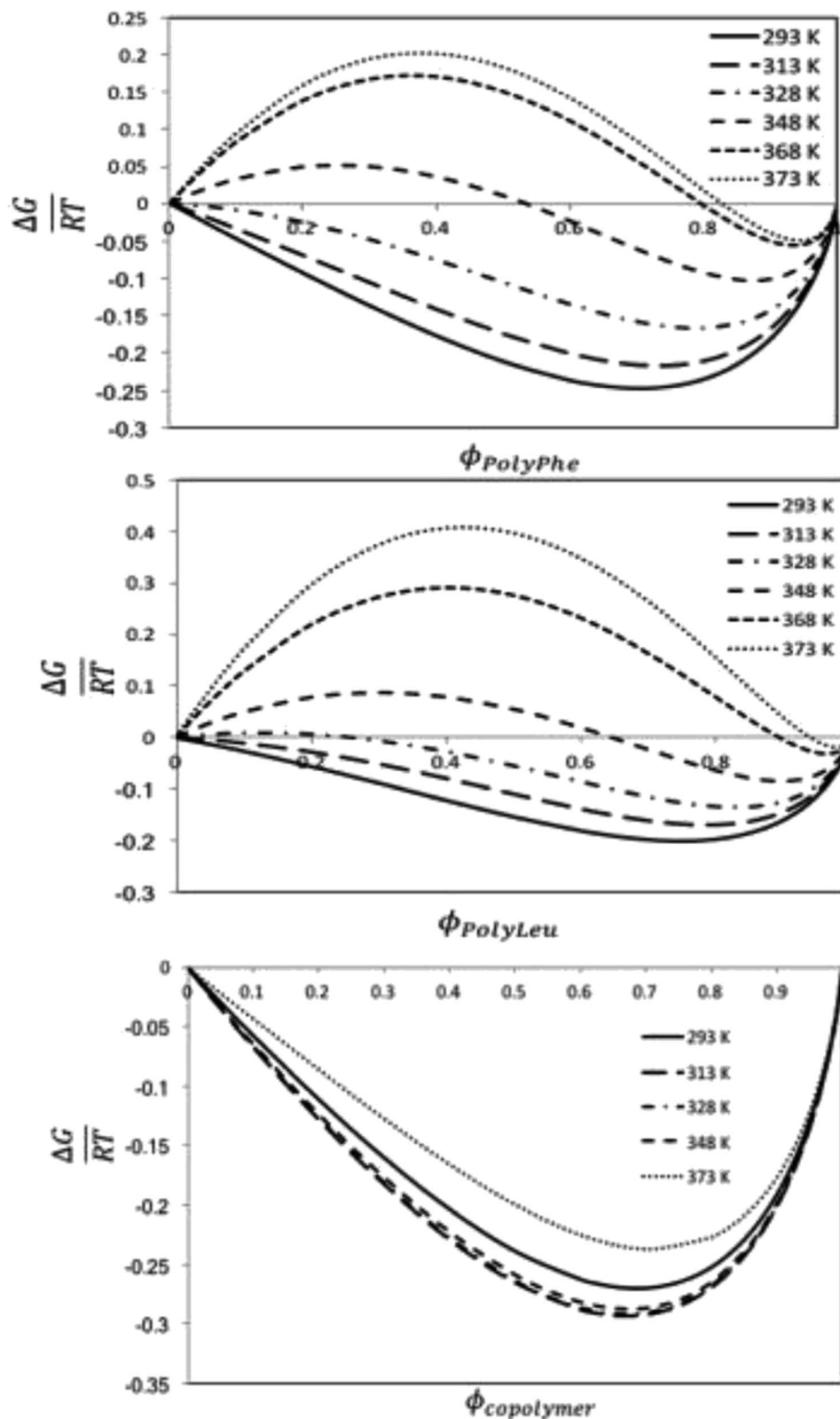


Fig. 8 Calculated ΔG energy of mixing to polymer volume fraction at different temperatures relationships for the CF-poly(L-PheOEt) (top), CF-poly(L-LeuOEt) (center) and CF-poly(L-LeuOEt-co-L-PheOEt) (below) systems.

parameters, there is a more significant mismatch between solubility parameters values for this CF and the homopolypeptides than that observed for poly(L-LeuOEt-co-L-PheOEt), which also

explains the better solubility of the copolymer in the solvent. Noteworthy, no experimental data on the phases behavior of these systems is available in the literature.



Conclusions

Synthetic polypeptides using L-LeuOEt and L-PheOEt as model substrates has been successfully achieved using SC protease in the neat 1,1,1,2-tetrafluoroethane compressed to its liquid state. Comparative experiments with scCO₂ solvent gave unsuccessful results owing to low polarity and the presence of carbamates. Product characterizations showed high molar mass polymers of up to 20 000 Da for poly-L-PheOEt. The enzyme showed significant affinity for the L-PheOEt monomer with up to a 1.8 : 1 (L-Phe : L-Leu) molar ratio of the copolypeptide. The computational studies based on molecular dynamics calculations assessed the solubility behavior of these systems by using the regular solution theory through the calculation of the Flory–Huggins solvent–polymer parameter. These calculations show that the copolymer has better miscibility with the organic CF than the polymers, which has been explained by the higher mismatch in the Hildebrand solubility parameters between the solvent and the polymers than between the solvent and the copolymer. The Gibbs energy of mixing calculations predict thermodynamically miscible liquid 1,1,1,2-tetrafluoroethane-copolypeptide mixtures for all the studied temperatures and volume fractions, whereas phase separation is expected to occur for this CF to homopolypeptide systems for some temperatures and polymer volume fractions.

Experimental

Materials

Sigma-Aldrich supplied L-leucine ethyl ester hydrochloride [L-LeuOEt·HCl] ($\geq 99\%$ purity), L-phenylalanine ethyl ester hydrochloride [L-PheOEt·HCl] ($\geq 99\%$ purity). Desalting proceeded by the preparation of 11 mL of potassium hydroxide (39 mmol) in solution, which was added to a 22 mL solution of the L-amino acid ethyl ester hydrochloride (26 mmol). After stirring for 1 h, the mixture was extracted four times with ethyl acetate (20 mL). The organic extracts were dried over calcium chloride and the solvent removed under reduced pressure to give a yellow liquid with a 60% yield. Sigma-Aldrich supplied SC (Subtilisin A serine S8 endoproteinase EC.3.4.21.62; 27 kDa) from *Bacillus licheniformis*. For enzyme activity, SC was incubated in liquid 1,1,1,2-tetrafluoroethane for 3, 6, 24 and 48 h, then dissolved (0.064 mg mL⁻¹) in a solution (10 mM sodium acetate buffer with 5 mM calcium acetate, pH 7.5). The proteolytic assay proceeded as follows: one unit (U) of protease activity was equivalent to 1 μ mol of L-tyrosine (JT Baker Mexico) liberated by the amount of enzyme per minute. Data is the result of three replicates and compared to a control without CF treatment. The U for the subtilisin Carlsberg used in this work was 8.39 ± 0.5 mmol min⁻¹ mg⁻¹. CEI de Mexico SA de CV (Mexico) supplied 1,1,1,2-tetrafluoroethane Dupont Suva-R134a 60 kg cylinder.

Experimental assessment of the solubility of monomers in liquid 1,1,1,2-tetrafluoroethane and compressed carbon dioxide

L-LeuOEt and L-PheOEt substrates, individually (6 mmol) or as an equimolar mixture of both (3 mmol) were placed in a st-316

cylindrical view cell (40 mL) equipped with three sapphire windows, magnetic stirrer, and an external ceramic heating jacket. Experiments were conducted with and without enzyme. The CF was feed into the vessel by an ISCO 160XD Syringe pump under stirring at 25 bar and 313.15 K. The complete solubility of monomers was assessed visually throughout the sapphire windows. Identical experiments were carried out with scCO₂ (313.15 K and 120 bar).

Enzymatic polypeptide syntheses in liquid 1,1,1,2-tetrafluoroethane

In a typical experiment, SC (110 U), an amino acid ethyl ester (6 mmol) or the mixture (3/3 mmol) and a magnetic bar were placed inside a high-pressure-resistant st-316 cylindrical vessel (40 mL) equipped with two Swagelok (USA) high-pressure valves and an external ceramic heating jacket. Co-polymerization reactions were identically carried out by adding 6 mmol of a 1 : 1 equimolar mixture of both amino acid ethyl esters. Then, the CF was feed into the vessel by the ISCO 160XD Syringe pump until the desired pressure (25 bar) was achieved at 313.15 K. The reaction mixture was magnetically stirred for 3, 6, 24 and 48 h. After each time, the vessel was cooled to room temperature and pressure relieved to atmospheric pressure and the contents were collected in deionized water (18.2 m Ω cm @ 313.15 K). Samples were centrifuged at 7000 $\times g$ for 20 min, and the supernatant was recovered and lyophilized to obtain the polypeptides as white powders. The supernatant aqueous extract of poly(L-PheOEt) were directly used in CD analyses. Product yields were calculated gravimetrically as a percentage from initial amino acid or the mixture of amino acids ethyl esters mass to product mass.

Poly(L-LeuOEt): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆/7.5% CF₃-COOH δ ppm): 0.89 (dd, $J = 6.6, 3.4$ Hz, 270H) (a), 1.22 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H) (b), 1.54–1.68 (m, $J = 7.0$ Hz, 90H) (c), 1.76 (dp, $J = 13.3, 6.7$ Hz, 45H) (d), 3.83 (d, $J = 7.5$ Hz, 45H) (e), 4.20 (dd, $J = 7.1, 2.8$ Hz, 2H) (f), 8.33 (d, $J = 16.4$ Hz, 77H) (g). Poly(L-PheOEt): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆/7.5% CF₃-COOH δ ppm): 1.07 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H) (a), 3.02–3.19 (m, 152H) (b), 4.10 (dd, $J = 7.1, 2.0$ Hz, 2H) (c), 4.11–4.22 (m, 76H) (d), 7.20–7.35 (m, 76H) (e), 8.26–8.43 (m, 97H) (f). Poly(L-LeuOEt-co-L-PheOEt): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆/7.5% CF₃-COOH δ ppm): 0.89 (dd, $J = 6.5, 3.7$ Hz, 132H) (a), 1.08 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H) (b), 1.53–1.70 (m, 44H) (c), 1.75 (dq, $J = 13.3, 6.7$ Hz, 22H) (d), 3.10 (d, $J = 6.5$ Hz, 58H) (e), 3.83 (d, $J = 7.4$ Hz, 22H) (f), 4.09 (dd, $J = 7.1, 2.0$ Hz, 2H) (g), 4.11–4.21 (m, 29H) (h), 7.16–7.37 (m, 145H) (i), 8.18–8.76 (m, 576H) (j).

Control reactions for both operating conditions were carried out during 24 h without the biocatalyst. Identical experiments were conducted with supercritical CO₂ (313.15 K, 120 bar).

Characterization of polypeptides

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ¹H NMR, ¹³C NMR, and 2D NMR spectra were recorded on a Varian VNMR and MR (400 MHz) spectrometer at room temperature controlled with VNMRs. NMR experiments were performed in deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-d₆) containing 7.5% deuterated



trifluoroacetic acid (TFA-d) at 60 mg mL⁻¹. Methyl end group was selected to determine molar mass compared to assigned signals of the repeat units in ¹H NMR spectra. L-PheOEt to L-LeuOEt ratios in the co-polypeptides were calculated according to the integration of the characteristic signals of each repeat unit on the ¹H NMR spectra. ATR-FTIR spectra were recorded in a Perkin-Elmer Spectrum 400 spectrometer from 400 to 4000 cm⁻¹. Powder X-ray diffraction (PXRD) spectra were acquired in the 3° ≤ 2θ ≤ 60° range with a Bruker D8 Advance diffractometer using Cu Kα radiation (λ = 1.5406 Å) and goniometer speed of 0.5°(2θ) min⁻¹. Crystallinity percentages were obtained by integration of the corresponding crystalline and amorphous areas on the spectra. Circular dichroism (CD) spectrum was recorded on a JASCO J-715 Spectropolarimeter (Jasco Inc., USA) for an aqueous extract of poly(L-PheOEt) at room temperature using a 1 mm path length cell. Spectra were acquired from 190 to 260 nm, and ellipticity is reported as mdeg. UV-Vis spectra for poly(L-PheOEt) and L-PheOEt were recorded in a Lambda 2S UV-Vis spectrophotometer (Perkin Elmer Inc., USA) at room temperature in a 1 cm path length cell, from 500 to 200 nm.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by ANOVA test to compare the means of all times of reaction, and Tukey's test was applied to determine a statistically significant difference between groups. The test confidence level was set at 95% (*p* < 0.05) (OriginPro software, Microcal Corp., USA).

Computational modeling of solvent-product interactions

MD calculated density, solubility parameters and Cohesive Density Energy (CED) for the compressed 1,1,1,2-tetrafluoroethane, poly(L-PheOEt), poly(L-LeuOEt) and the copolypeptides at different temperatures and pressures. For these calculations, a box containing liquid 1,1,1,2-tetrafluoroethane and the polymers were simulated at a fixed temperature and pressure in the NPT ensemble. The degree of polymerization (DP) during molecular modeling was set to the experimental value for 24 h of reaction. Geometries for all molecules under study were initially optimized at the B3LYP/DNP level of theory. The hybrid density functional (B3LYP) and the double numerical with dynamic nuclear polarization (DNP) basis set within the DFT was carried out by the software package DMol3 in the Materials Studio suite from Biovia. Given the size of the polymers treated, the approximate atomic point charges were determined by the Gasteiger method. Simulated boxes for MD calculations were set with periodic boundaries in all directions containing a total of 500 molecules for the CF, 10 molecules in the case of poly(L-PheOEt) and poly(L-LeuOEt) and 8 molecules for poly(L-LeuOEt-co-L-PheOEt). The ensemble used was the isobaric-isothermal ensemble (NPT). A typical simulation box for both compounds is shown in the ESI File 1.† MD simulations were performed as follows, NPT equilibration and density production runs of 1 200 000 steps were performed by using the Forcite module from the Materials Studio suite from Biovia. All runs were performed with a time step of 1 fs. L-J and the coulombic cut-off

was set to 15 Å. Calculations were performed in the Occigen super-calculator (BullX SCS6) of the CINES (Centre Informatique National de l'Enseignement Supérieur) in Montpellier, France. Density of liquid 1,1,1,2-tetrafluoroethane (313.15 K, 25 bar) and polypeptides were calculated by MD simulations using the Forcite module with the COMPASSII (Condensed-phase Optimized Molecular Potentials for Atomistic Simulation Studies) force field,³⁶ which is a force field optimized for condensed-phase systems where the parameters are derived from quantum mechanics data and calculations as well as from fittings of the experimental condensed phase properties. During polymers and copolymer construction, polymerization degree was fixed to 134 in the case of poly(L-PheOEt) and 108 in the case of poly(L-LeuOEt). The Leu/Phe ratio for the copolymer was 1.05, and the polymerization degrees were fixed to 29 for poly(L-LeuOEt) and 31 for poly(L-PheOEt). The molar mass of the copolypeptide was fixed to 8044 Da while for poly(L-LeuOEt) and those for poly(L-PheOEt) were 12 366 Da and 19 923 Da, respectively. Next, the cohesive energy density (CED, eqn (1)) was determined by sampling the system and collecting data from the last 400 ps from the production runs.

$$E_{\text{CED}} = \frac{U_{\text{vdw}} + U_{\text{Q}}}{vM} \quad (1)$$

where U_{vdw} and U_{Q} are the van der Waals and electrostatic energy, respectively. The solubility parameter of each component (δ) can be expressed by eqn (2)

$$\delta = \sqrt{\delta_{\text{vdw}}^2 + \delta_{\text{Q}}^2} \quad (2)$$

where δ_{vdw} and δ_{Q} represent the contributions from van der Waals forces and electrostatic interactions, respectively, and calculated from eqn (3) and (4)

$$\delta_{\text{Q}} = \sqrt{E_{\text{Q}}} = \sqrt{\frac{U_{\text{Q}}}{vM}} \quad (3)$$

$$\delta_{\text{vdw}} = \sqrt{E_{\text{vdw}}} = \sqrt{\frac{U_{\text{vdw}}}{vM}} \quad (4)$$

where E_{Q} is the electrostatic energy density and E_{vdw} is the van der Waals energy density; the solubility parameter has dispersion and electrostatic components, which together with hydrogen bonding are frequently used to study and explain solvency phenomena.

The solubility parameter of each component (δ_i) was readily calculated from CED by equation (5)

$$\delta_i = \left(\frac{\sum E_{\text{coh}}}{\sum V_{\text{m}}} \right)^{1/2} = (\text{CED})^{1/2} \quad (5)$$

Flory-Huggins theory and energy of mixing. The Flory-Huggins interaction parameters for liquid 1,1,1,2-tetrafluoroethane and the enzymatically synthesized polypeptides at different *T* and *P* were obtained using eqn (6) (ref. 37)

$$\chi_{i-j} = \frac{V_i}{RT} (\delta_i - \delta_j)^2 + 0.34 \quad (6)$$



where χ_{i-j} is the solvent–polymer interaction parameter; V_i is the molar volume of the solvent; R is the gas constant; T is the absolute temperature and δ_i and δ_j are the solubility parameters for the solvent and the polymer, respectively.

The Gibbs energies of mixing for the CF-poly(L-PheOEt), CF-poly(L-LeuOEt) and CF-copolypeptide systems were calculated as a function of the volume fraction of the polymer at different temperatures by eqn (7)

$$\frac{\Delta G}{RT} = \phi_{\text{solv}} \ln \phi_{\text{solv}} + \frac{\phi_{\text{pol}}}{N} \ln \phi_{\text{pol}} + \chi \phi_{\text{solv}} \phi_{\text{pol}} \quad (7)$$

where ϕ represents the volume fraction of the solvent or the polymer and N the polymerization degree and χ the Flory–Huggins interaction parameter. For the calculation concerning the polymer, N was fixed to 30, as experimentally polymerization degrees obtained were 29 for poly(L-LeuOEt) and to 31 for poly(L-PheOEt).

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

We thank DGAPA-PAPIIT for funding project IN201317. We also like to thank CONACyT for scholarship (ISAD). Authors thank the French facilities GENCI and CINES for the allocation of resources to use the supercomputer OCCIGEN for the MD study (project DARI A0030807414).

Notes and references

- 1 T. J. Deming, Synthetic polypeptides for biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.*, 2007, **32**, 858.
- 2 J. M. Palomo, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 32658.
- 3 T. J. Deming, Ring-Opening polymerization of amino acid N-Carboxyanhydrides, in *Polymer Science: A Comprehensive Review*, ed. K. Matyjaszewski, M. Möller, Elsevier Ltd, London, 2012, vol. 5, pp. 427–449.
- 4 C. Bonduelle, *Polym. Chem.*, 2018, **9**, 1517.
- 5 T. J. Deming, Ring-Opening polymerization of amino acid N-Carboxyanhydrides, in *Polymer Science: A Comprehensive Review*, ed. K. Matyjaszewski, M. Möller, Elsevier BV, 2012, vol. 4, p. 427.
- 6 K. Tsuchiya and K. Numata, *Macromol. Biosci.*, 2017, **17**, 1700177.
- 7 A. R. Mitchell, *Biopolymers*, 2008, **90**, 175.
- 8 K. Viswanathan, R. Omorebokhae, G. Li and R. A. Gross, *Biomacromolecules*, 2010, **11**, 2152.
- 9 A. Toplak, T. Nuijens, P. J. L. M. Quaedflieg, B. Wu and D. B. Janssen, *Enzyme Microb. Technol.*, 2015, **73–74**, 20–28.
- 10 A. Bastida, R. M. Blanco, S. G. Zárate, E. García-Junceda and J. M. Guisán, *Biocatal. Biotransform.*, 2018, **36**, 271–278.
- 11 P. G. Gudeangadi, K. Tsuchiya, T. Sakai and K. Numata, *Polym. Chem.*, 2018, **9**, 2336.
- 12 A. Toplak, T. Nuijens, P. J. L. M. Quaedflieg, B. Wu and D. B. Janssen, *Adv. Synth. Catal.*, 2016, **358**, 2140.
- 13 B. Wu, H. J. Wijma, L. Song, H. J. Rozeboom, C. Poloni, Y. Tian, M. I. Arif, T. Nuijens, P. J. L. M. Quaedflieg, W. Szymanski, B. L. Feringa and D. B. Janssen, *ACS Catal.*, 2016, **6**, 5405.
- 14 M. I. Arif, A. Toplak, W. Szymanski, B. L. Feringa, T. Nuijens, P. J. L. M. Quaedflieg, B. Wu and D. B. Janssen, *Adv. Synth. Catal.*, 2014, **356**, 2197.
- 15 T. Nuijens, A. Toplak, P. J. L. M. Quaedflieg, J. Drenth, B. Wu and D. B. Janssen, *Adv. Synth. Catal.*, 2016, **358**, 4041.
- 16 J. M. Antos, M. C. Truttmann and H. L. Ploegh, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2016, **38**, 111.
- 17 G. K. T. Nguyen, X. Hemu, J.-P. Quek and J. P. Tam, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2016, **55**, 12802.
- 18 S. Kobayashi, *Polym. Adv. Technol.*, 2015, **26**, 677.
- 19 R. García-Arrazola, M. Gimeno and E. Bárzana, *Macromolecules*, 2007, **40**, 4119.
- 20 F. Guzmán-Lagunes, A. López-Luna, M. Gimeno and E. Bárzana, *J. Supercrit. Fluids*, 2012, **72**, 186.
- 21 A. López-Luna, J. L. Gallegos, M. Gimeno, E. Vivaldo-Lima and E. Bárzana, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2010, **67**, 143.
- 22 S. J. Corr, *J. Fluorine Chem.*, 2002, **118**, 55.
- 23 W. F. S. Sellers, *Allergy, Asthma, Clin. Immunol.*, 2017, **13**, 30.
- 24 G. Yu, Y. Xue, W. Xu, J. Zhang and C. H. Xue, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, **34**, 793.
- 25 A. J. Ball, S. Corr and J. Micklefield, *Tetrahedron Lett.*, 2009, **50**, 3543.
- 26 S. Saul, S. Corr and J. Micklefield, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, **43**, 5519.
- 27 C. R. Wescott and A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 1629.
- 28 R. Z. Hou, Y. Yang, G. Li, Y. B. Huang, H. Wang, Y. J. Liu, L. Xu and X. Z. Zhang, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2006, **44**, 73.
- 29 A. K. Chaudhary, S. V. Kamat, E. J. Beckman, D. Nurok, R. M. Kleyle, P. Hajdu and A. J. Russell, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 12891.
- 30 G. Li, V. K. Raman, W. Xie and R. A. Gross, *Macromolecules*, 2008, **41**, 7003.
- 31 A. P. Abbott and C. A. Eardley, *J. Phys. Chem. B*, 1999, **103**, 2504.
- 32 M. Mena, K. Shirai, A. Tecante, E. Bárzana and M. Gimeno, *J. Supercrit. Fluids*, 2015, **103**, 77–82.
- 33 S. Lecommandoux, M. F. Achard, J. F. Langenwalter and H. A. Klok, *Macromolecules*, 2001, **34**, 9100.
- 34 W. Blanke, G. Klingenberg and R. Weiss, *Int. J. Thermophys.*, 1995, **16**, 1143.
- 35 A. F. Lagalante, R. L. Hall and T. J. Bruno, *J. Phys. Chem. B*, 1998, **102**, 6601.
- 36 H. Sun, Z. Jin, C. Yang, R. L. C. Akkermans, S. H. Robertson, N. A. Spensley, S. Miller and S. M. Todd, *J. Mol. Model.*, 2016, **22**, 47.
- 37 J. A. Emerson, D. T. W. Toolan, J. R. Howse, E. M. Furst and T. H. Epps, *Macromolecules*, 2013, **46**, 6533.



conferenceseries.com

Best Poster Award

Awarded to ISABEL S. AGUIRRE-DIAZ

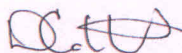
for presenting the poster entitled:

PROTEASE-MEDIATED SYNTHESIS OF POLYPEPTIDES IN
COMPRESSED (1,1,1,2-TETRAFLUOROETHANE MEDIA

at the "5th International Conference on Organic and Inorganic Chemistry"

held during July 12-13, 2018 in Paris, France

The award has been attributed in recognition of research paper quality, novelty and significance.



Don M Coltart

University of Houston, USA



Vidal Virginie

Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris- Chimie ParisTech, France