



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE POLIAMINOÁCIDOS Y POLIAMINOÁCIDO-ÉSTERES
EN MEDIO FLUIDO COMPRIMIDO POLAR ORGÁNICO:**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

Diego Eduardo Espinosa Castro



MÉXICO, Ciudad de México.

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: J. Eleazar Martinez Barajas

VOCAL: Carmina Montiel Pacheco

SECRETARIO: Miquel Gimeno Seco

1er. SUPLENTE: Oscar Hernandez Melendez

2° SUPLENTE: Francisca Morayna Gutierrez Luna

**LABORATORIO 314. DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, CONJUNTO E,
FACULTAD DE QUÍMICA. UNAM**

MIQUEL GIMENO SECO

DIEGO EDUARDO ESPINOSA CASTRO

**Se agradece a la DGAPA UNAM por el
proyecto PAPIIT IN 201317**

Agradecimientos

Se agradece a la empresa ENMEX SA de CV quien proveyó material necesario para la realización de esta tesis.

Índice

Resumen	3
Introducción	4
Antecedentes	6
Hipótesis	14
Objetivo general.....	14
Objetivos particulares	14
Procedimiento experimental	16
Medición de actividad enzimática	16
Desalinización de clorhidrato de L-Phe-OEt	17
Síntesis enzimática de Poli(L-Phe).....	18
Caracterización del producto de la reacción de polimerización	19
Resultados y discusión	23
Código	23
Caracterización de un polímero típico.....	25
Efecto de la temperatura de reacción sobre la síntesis de Poli(L)Phe	39
Efecto de la proporción enzima/sustrato sobre la síntesis de Poli(L)Phe	46
Efecto de la enzima utilizada sobre la síntesis de Poli(L)Phe.....	51
Conclusiones	56
Perspectivas	58
Bibliografía	60

Índice de tablas

Tabla 1 Reacciones enzimáticas en fluidos comprimidos estudiadas a partir de 1985.....	9
Tabla 2 Condiciones de síntesis de las muestras analizadas.....	24
Tabla 3 Resultados condensados de todas las síntesis realizadas.....	38
Tabla 4 Efecto de la temperatura sobre el rendimiento de la reacción de polimerización...	40
Tabla 5 Masas molares obtenidas a diferentes temperaturas de reacción.....	42
Tabla 6 Rendimientos obtenidos en la reacción de polimerización a diferentes . proporciones enzima/sustrato utilizadas.....	46
Tabla 7 Masas molares de Poli(L)Phe obtenida a diferentes proporciones . enzima/sustrato utilizadas para su síntesis.....	48
Tabla 8 Rendimientos alcanzados en la síntesis de Poli(L)Phe utilizando dos . enzimas diferentes.....	51
Tabla 9 Masas molares alcanzadas en la síntesis de Poli(L)Phe utilizando dos enzimas . diferentes.....	53

Índice de figuras

Figura 1 Oligomerización de (L) aminoácidos etil ésteres por catálisis de una . proteasa en medio acuoso con cosolventes presentado por Viswanathan, K, 2010...	8
Figura 2 Molécula de 1,1,1,2-tetrafluoroetano, también referido como R134-a.....	10
Figura 3 Reacción de polimerización de L-Phe-OEt.....	11
Figura 4 Desalinización de clorhidrato de L-Phe-OEt.....	17
Figura 5 Representación esquemática del reactor de alta presión utilizado.....	18
Figura 6 Espectro infrarrojo de la muestra DEE1142.....	25
Figura 7 Espectro UV de la muestra DEE1142.....	27
Figura 8 Espectro de dicroísmo circular muestra los resultados . asociados a varias estructuras secundarias.....	29
Figura 9 Espectro de dicroísmo circular de la muestra DEE1142.....	29
Figura 10 Resonancia del enlace peptídico.....	30
Figura 11 Poli(L)Phe.....	31
Figura 12 ¹ H-RMN de la muestra DEE1142.....	32
Figura 13 Termogravimetría de la muestra DEE1142.....	33
Figura 14 Temperatura de descomposición de cadenas de Poli(L)Phe de . diferente masa molar.....	34
Figura 15 Resultados obtenidos de estudio DSC a la muestra DEE1142.....	35
Figura 16 Efecto de la temperatura sobre el rendimiento de la reacción de . polimerización.....	41
Figura 17 Efecto de la temperatura de reacción sobre masa molar del polímero obtenido.	42
Figura 18 Rendimientos de todas las reacciones de polimerización realizadas . mostradas cronológicamente.....	43
Figura 19 Efecto de la proporción enzima/sustrato utilizado en la síntesis sobre . el rendimiento de la reacción.....	47
Figura 20 ¹ H-RMN de la muestra DEE1741.....	49
Figura 21 Efecto de la proporción enzima/sustrato utilizado en la síntesis sobre la . masa molar del polímero producido.....	50
Figura 22 Rendimientos alcanzados en la síntesis de Poli(L)Phe utilizando dos . enzimas diferentes.....	52
Figura 23 ¹ H-RMN de la muestra DEE1163. Proteasa Sigma-Aldrich.....	54
Figura 24 ¹ H-RMN de la muestra ENM1161. Proteasa ENMEX.....	54
Figura 25 Masas molares de Poli(L)Phe sintetizado utilizando dos enzimas diferentes.....	55

Resumen

Proteasas alcalinas como la Subtilisina Carlsberg y algunas otras proteasas comerciales son capaces de mantener su actividad en medios no acuosos como el 1,1,1,2 tetrafluoroetano (R-134a), a altas presiones (40.6 bar) y temperaturas (100°C). En condiciones subcríticas de R-134a la enzima puede ser utilizada como biocatalizador de una reacción de polimerización de L-fenilalanina etil ester.

Dicha reacción se llevó a cabo utilizando diferentes enzimas, a diferentes temperaturas y diferentes concentraciones de enzima. Los oligómeros obtenidos fueron caracterizados por medio de espectrometría UV-Visible, espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, dicroísmo circular, resonancia magnética nuclear, termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido.

Los análisis arrojaron resultados consistentes con trabajos previos y mostraron que temperaturas alrededor de 60°C favorecen mejores rendimientos. Por otro lado también se mostró que el uso de la enzima PA CONC 3000 distribuida por Enmex tiene como resultado rendimientos y niveles de polimerización significativamente superiores a los obtenidos mediante el uso de la Subtilisina distribuida por Sigma-Aldrich.

Introducción

En 1878 Wilhelm Kühne utilizó la palabra *enzima* para referirse a una sustancia presente “en levaduras” (*ενζυμων*) capaz de llevar a cabo la fermentación. Desde entonces y hasta el día de hoy el estudio y comprensión de las enzimas nos ha llevado a ser capaces de manipularlas, modificarlas y tomar ventaja de ellas.

Estos estudios han evolucionado de tal forma que a mediados de la década de los 80's se propuso la posibilidad de llevar a cabo una reacción enzimática utilizando un fluido comprimido como medio de reacción. Estos primeros estudios demostraron que la fosfatasa alcalina así como la colesterol oxidasa eran activas en CO₂ supercrítico. El experimento fue exitoso y presentó varias ventajas como fenómenos de transporte más eficientes y mejor transferencia de masa que posicionaron a esta nueva tecnología como un amplio páramo de posibilidades que abría la puerta a nuevas reacciones biocatalizadas, más rápidas y más eficaces.

Una de las áreas en las que se ha puesto a prueba el uso de enzimas en fluidos comprimidos ha sido la síntesis de polímeros. Existe cada vez mayor interés por generar polímeros biodegradables y, si es posible, bioactivos, ya que estos suelen tener funciones diversas. Por ejemplo, algunos polipéptidos sintéticos tienen características de materiales bioactivos los cuales tienen diferentes aplicaciones, por ejemplo pueden ser utilizados en sistemas de liberación controlada de fármacos o fungir como hidrocoloides en sistemas en los que estos son necesarios.

Sin embargo, la síntesis química de poliaminoácidos presenta varios obstáculos: bajos rendimientos, altos tiempos de reacción, altos costos, dificultades al escalarlo a niveles industriales, etcétera. El uso de enzimas como biocatalizadores de reacciones de poliamidación permite solucionar algunos de estos problemas aunque los estudios al respecto han sido principalmente en medios acuosos u orgánicos lo cual presenta problemas ambientales así como otros retos en el proceso de purificación.

En los últimos años se ha explorado la posibilidad de realizar la síntesis biocatalizada de este tipo de polímeros en un fluido supercrítico como medio de reacción. Aguirre *et al* (2018) reporta la síntesis exitosa de homopolímeros de L-fenilalanina utilizando la enzima Subtilisina Carlsberg (SC) en 1,1,1,2 tetrafluoroetano líquido puro como medio de reacción. En este trabajo se estudió el efecto del tiempo de reacción sobre el producto final; sin embargo, no se estudió la influencia de otros factores como la relación enzima – sustrato o la temperatura de reacción.

La síntesis de poli-L-fenilalanina (poli-LPhe) aún requiere investigación para lograr su obtención con una mayor eficiencia y calidad por lo que en la presente tesis se determinó profundizar en el estudio de este trabajo.

Antecedentes

Las proteínas son la familia de moléculas más versátil que se conoce. Diferentes secuencias de los mismos 20 aminoácidos pueden dar como resultado polímeros con funciones increíblemente diversas y al mismo tiempo específicas. Esta es la razón por la que desde hace décadas se ha intentado reproducir estos polímeros de manera sintética.

Con la síntesis de polipéptidos se pretende que estos, al adoptar estructuras complejas, puedan ser utilizados en diversas aplicaciones como en nanomedicina en donde fungirían como guía en la formación de nanoestructuras a través de interacciones intramoleculares e intermoleculares (Bonduelle, C. 2018). Entre otras varias funciones se puede enlistar la producción de biomateriales inteligentes, materiales con propiedades como el arreglo tridimensional bien definido y controlable, dándole así la capacidad de responder al ambiente, adaptando su comportamiento. Estos pueden ser utilizados en el diseño de sistemas de liberación de fármacos, ingeniería de tejidos, la producción de sistemas biosensores, etcétera (Löwik, D. 2010).

Con el fin de lograr la síntesis de estos polipéptidos existen varios métodos que se pueden utilizar. Dentro de los procedimientos químicos existentes uno de los más utilizados es el llamado método de Merrifield o síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS por sus siglas en inglés) en el que se producen oligómeros con una secuencia de aminoácidos muy precisa y controlada. Otra opción utilizada es la

polimerización por apertura de anillo (ROP por sus siglas en inglés) en la que los monómeros son polimerizados en un solo paso. (Bonduelle, C. 2018).

Sin embargo, en muchas ocasiones estos métodos se ven limitados debido al tamaño de polímero que se puede alcanzar, a los bajos rendimientos, a los largos tiempos de reacción y al costo de la purificación (Bonduelle, C. 2018). Además de que resultan poco amigables con el medio ambiente debido a los solventes utilizados y a la presencia de productos secundarios tóxicos. Estas son las razones por las que se han explorado métodos biotecnológicos capaces de sintetizar polímeros de aminoácidos con secuencias específicas.

Lamentablemente en la actualidad la gran mayoría de los trabajos que rodean la síntesis de proteínas por medio de métodos biotecnológicos se centran en la producción de proteínas naturales preexistentes, algunas con pequeños cambios, ya que "... la producción industrial a gran escala representa un reto, acercamientos que usan ingeniería genética [para producir polipéptidos sintéticos] resultan prometedores pero se requiere un desarrollo significativo de las plataformas biológicas que siguen restringiendo la escala y alcance de tales métodos" (Bonduelle, C. 2018).

En 2010 Viswanathan y colaboradores reportaron la síntesis enzimática de oligopéptidos de L-fenilalanina utilizando diferentes proteasas en medios acuosos o en una mezcla de agua con diferentes solventes orgánicos como DMSO, DMF, etanol, metanol y acetonitrilo (Figura 1). En este trabajo se concluye que el uso de cosolventes orgánicos es necesario para limitar la actividad proteolítica de la

enzima, por lo que la propagación de la cadena sigue representando un reto a resolver.

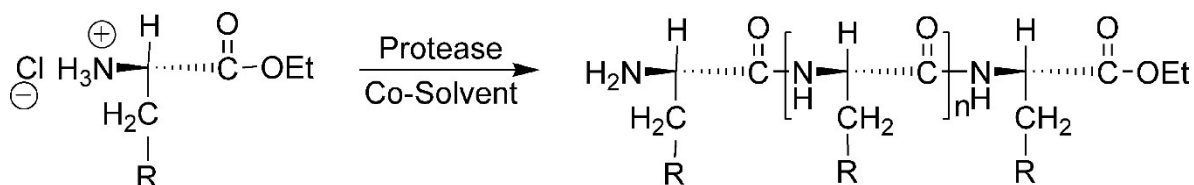


Figura 1: Oligomerización de (L) aminoácidos etil ésteres por catálisis de una proteasa en medio acuoso con cosolventes presentado por Viswanathan, K, 2010.

Al experimentar con diferentes medios de reacción es necesario considerar el uso de fluidos comprimidos, medio no utilizado en el trabajo arriba citado. A mediados de la década de los 80's se probó la posibilidad de llevar a cabo reacciones enzimáticas en fluidos supercríticos (Hammond , D. 1985) y, como se puede observar en la tabla 1, desde entonces se han estudiado varias reacciones utilizando diferentes enzimas (principalmente lipasas) en diferentes gases comprimidos (principalmente CO₂) como medio, en condiciones sub y supercríticas.

Esta técnica tiene varias ventajas. Al no usar solventes tóxicos permite reacciones amigables con el medio ambiente. También, en caso de alcanzar condiciones supercríticas, proporciona otras características al medio.

Tabla 1: Reacciones enzimáticas en fluidos comprimidos estudiadas a partir de 1985			
Reacción	Enzima	Autor	Año
Oxidación	Polifenol oxidasa	Hammond , D et al.	1985
	Colesterol oxidasa	Randolph, T et al.	1988
Transesterificación	Diferentes enzimas lipolíticas	Namakura, K et al.	1986
	Lipasa Novozym 435	Madras, G et al.	2004
Hidrólisis	Lipasa Novozym 435	Turner, C et al.	2001
	Lipasa Lipolase 100T	Primožič, M et al.	2003
Esterificación	Lipasa Novozym 435	Šabeder, S et al.	2005
	Lipasa Novozym 435	Dos Santos, P et al.	2016
Síntesis enantioselectiva	Lipasa EC 3.1.1.3	Palocci, C et al.	2008

Un fluido supercrítico es aquel que ha superado su presión y temperatura crítica, esto deriva en que no exista un cambio brusco de entalpía y densidad que marque la transición entre el estado líquido y el estado gaseoso de dicho compuesto. Así es como, al superar el punto crítico se obtiene un fluido con densidades tan altas como las de un líquido pero viscosidades tan bajas como las de un gas. Estas particulares

condiciones alcanzadas proporcionan varias ventajas al ser utilizadas como medio, por ejemplo la velocidad y efectividad alcanzadas por las reacciones gracias a sus particulares propiedades de transporte. Estas son originadas a partir de fenómenos de transferencia de masa más eficientes, alta difusión de solutos y baja viscosidad del fluido. (Knez, Ž. 2018).

A pesar de que el CO₂ es el gas más utilizado para lograr un fluido comprimido este es capaz de reaccionar con la enzima utilizada, formando carbamatos y afectando así la actividad del biocatalizador (Knez, Ž. 2018). Es necesario utilizar un gas compresible a bajas presiones, hidrofóbico (con el fin de generar condiciones similares a las que proporcionan los solventes orgánicos donde se minimiza la actividad proteolítica) pero suficientemente polar para ser capaz de disolver sustratos relativamente polares. Estas características son cumplidas por el 1,1,1,2-tetrafluoroetano (R-134a) (Figura 2) el cual ha sido exitosamente utilizado en la síntesis enzimática de poliésteres ramificados y poli-L-láctidas. (Guzmán, A. 2012).

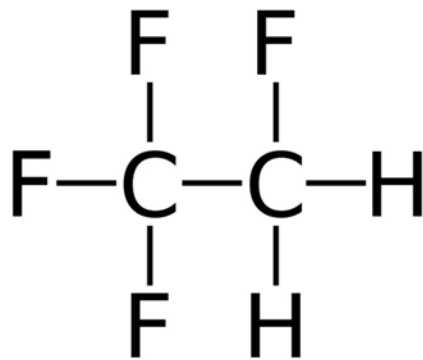


Figura 2: Molécula de 1,1,1,2-tetrafluoroetano, también referido como R134-a

El 1,1,1,2-tetrafluoroetano es un haloalcano comúnmente utilizado como refrigerante debido a su compresibilidad y su bajo efecto sobre el deterioro del ozono atmosférico. Es un fluido hidrofóbico pero moderadamente polar (constante dieléctrica $\epsilon = 9.5$ KHz y momento dipolar de 2.05 D), su temperatura y presión críticas son de 100.95°C y 40.6 bar. Estas características lo clasifican como un compuesto viable para ser utilizado como medio de reacción.

Aguirre (2018) llevó a cabo exitosamente la síntesis de poli-LPhe biocatalizada por subtilisina calsgberg (SC) esta vez en R-134a líquido como medio de reacción, utilizando L-fenilalanina etil éster como monómero ya que este es soluble en R-134a, a diferencia de la sal L-Phe-Et·HCl utilizada por Viswanathan, K et. al. (2010). El equivalente a 110 U de SC fueron agregados por cada 6 mmol del monómero, a 40°C durante 24 horas (tiempo al cual la reacción mostró mejor rendimiento).

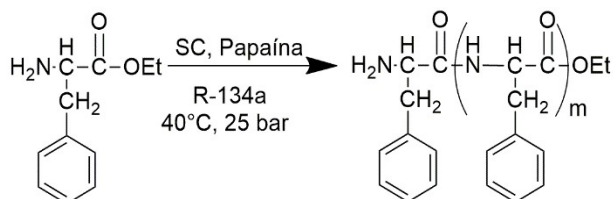


Figura 3: Reacción de polimerización de L-Phe-OEt (Aguirre, I. 2018)

En dicho artículo se reporta la polimerización de la L-Phe-OEt tal como se muestra en la figura 3 en donde la enzima, en ausencia de agua, cataliza la reacción. El grupo carboxilo actúa como donador del grupo acilo el cual forma un complejo con

la enzima, posteriormente el grupo amino funge como nucleófilo y reacciona con el complejo formado el enlace peptídico y liberando a la enzima.

Aguirre obtuvo polímeros de hasta 20 KDa y un rendimiento en peso de 35%. Esto representó una mejora sobre lo reportado por Viswanathan ya que la síntesis en medio acuoso con cosolventes, aunque se alcanzaban rendimientos alrededor de 50%, la masa molecular de los oligómeros obtenidos no superaron 1.3KDa.

La temperatura a la cual las reacciones se llevan a cabo es uno de los factores que afectan en mayor medida la actividad enzimática y por lo tanto también el rendimiento de una reacción biocatalizada. Esto aplica también en reacciones en fluidos supercríticos aunque, en contacto con un medio diferente al agua, la estabilidad de las enzimas cambiará, lo que hace posible que la temperatura óptima de reacción sea diferente por lo que la “temperatura óptima de operación debe de ser determinada para cada sistema de reacción” (Knez, Ž. 2018).

La enzima utilizada por Aguirre para la polimerización de L-Phe fue la Subtilisana Carlsberg (SC), una proteasa alcalina producida por *Bacillus licheniformis*. Esta es una endoproteasa extracelular con peso molecular de 27 KDa. Su sitio activo se encuentra en el aminoácido Ser-221 el cual se estabiliza formando puentes de hidrógeno con Asp-32 e Hist-64. (Neidhart & Petsko. 1988)

A pesar de que esta enzima presenta una actividad óptima a 60°C (Rao, M. 1998), la biosíntesis de poli (L-Phe) únicamente se ha efectuado a 40°C. No se ha buscado la temperatura óptima de operación ni se ha estudiado el efecto de la temperatura sobre las características del producto final. Adicionalmente, si la estabilidad de la

SC le permitiera trabajar a temperaturas mayores a 101°C y 41 bares de presión esto abriría la posibilidad realizar la reacción en condiciones supercríticas

En el presente trabajo se estudiará dicho efecto de la temperatura sobre el rendimiento en masa de la reacción, nivel de polimerización y otras características generales del polímero obtenido. También se investigará el efecto de la proporción enzima/sustrato sobre los resultados de la reacción en espera de comprender con mayor profundidad los fenómenos presentes en este proceso.

Hipótesis

La subtilisina Carlsberg producirá un polímero de L-fenilalanina en R 134a líquido como medio. Esta reacción se verá favorecida a mayor concentración de enzima y a temperaturas cercanas a la temperatura óptima de SC en agua (60°C).

Objetivo general

Estudiar la síntesis enzimática de poli L-fenilalanina utilizando 1,1,1,2 tetrafluoroetano (R-134a) comprimido como medio de reacción.

Objetivos particulares

Estudiar el efecto de la temperatura de reacción sobre el rendimiento en masa y el nivel de polimerización.

Estudiar el efecto de la cantidad de enzima utilizada en la reacción sobre el rendimiento en masa y el nivel de polimerización.

Caracterizar el polímero obtenido mediante resonancia magnética nuclear, dicroísmo circular, espectroscopia UV-Vis, espectroscopía IR, difracción de rayos X y análisis térmico.

Examinar la viabilidad de la reacción en R-134^a en estado supercrítico como medio de reacción.

Analizar la posibilidad de llevar a cabo la reacción utilizando una enzima diferente
(proteasa ENMEX)

Procedimiento experimental

A continuación se describen las técnicas utilizadas a lo largo de este trabajo experimental con el fin de producir y caracterizar los poliaminoácidos estudiados.

Medición de actividad enzimática

La medición de la actividad enzimática de las proteasas se llevó a cabo según el método reportado por Sigma Aldrich (Cupp-Enyard, C. 2008), el cual se describe a continuación.

Se incubó 1 mL de enzima en disolución con concentración 0.047 mg/mL en buffer de acetatos (10 mM CH_3COONa y 5 mM de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$) junto con 5 mL de caseína en disolución al 0.65% m/v en buffer de fosfatos (50 mM de K_2HPO_4 , pH 7.5) durante 10 minutos a 37°C en baño maría. La hidrólisis de caseína se detuvo agregando 5 mL de una disolución de ácido tricloroacético (Cl_3CCOOH) 110mM. Después de 30 minutos la fracción insoluble fue separada por centrifugación a 9000 rpm, 25°C durante 10 minutos. Se mezclaron 2 mL de sobrenadante y 5 mL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) 500 mM junto con 1 mL de reactivo de Folin & Ciocaltea, se dejó reaccionar durante 30 minutos después de los cuales se centrifugaron a 7000 rpm a 25°C durante 10 minutos. La absorbancia de las muestras fue medida a una longitud de onda de 660 nm en un espectrofotómetro Lambda 2S UV-Vis (Perkin Elmer Inc., USA).

Se realizó cada ensayo por triplicado además de un blanco en el que la enzima fue agregada después de la adición de ácido tricloroacético. Estas muestras fueron comparadas contra una curva patrón de tirosina. La actividad fue expresada en unidades de actividad (U) donde 1 U se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de tirosina por minuto.

Desalinización de clorhidrato de L-Phe-OEt

La desalinización de monómeros se llevó a cabo siguiendo la metodología reportada por Aguirre, I (2018) (figura 4) que a su vez es un procedimiento adaptado del trabajo de Bodanszky, M (1984), con la finalidad de trabajar con L-Phe-Et, monómero soluble en R-134a, a diferencia de la sal L-Phe-Et-HCl adquirida. En este procedimiento, 11 mL de una disolución de clorhidrato de L-Phe-OEt 21.4% m/v reaccionó con 5.5 mL de una disolución de carbonato de potasio (K_2CO_3) 3.9 M durante una hora con agitación vigorosa.

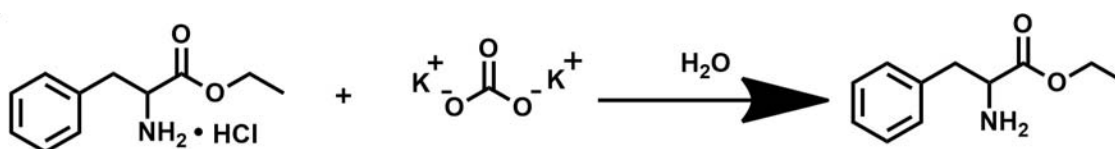


Figura 4: Desalinización de clorhidrato de L-Phe-OEt (Aguirre, I. 2018)

El éster de aminoácido desalinizado fue extraído con acetato de etilo y posteriormente separado destilando el acetato de etilo a presión reducida (45°C , 70 mmHg).

Síntesis enzimática de Poli(L-Phe)

Con el fin de obtener el polímero deseado se siguió la metodología propuesta por Aguirre (Aguirre, I. 2018) modificada. Esta se muestra a continuación.

Dentro de un reactor de alta presión (figura 5) se agregaron 6 mmol de L-Phe-OEt junto con diferentes cantidades de proteasa Subtilisina (S8 endoproteinasa EC. 3.4.21.62; origen *Bacillus licheniformis* distribuida por Sigma-Aldrich) y un agitador magnético. Posteriormente el reactor fue calentado con una chaqueta de calentamiento a 40°C y llenado con R-134a. Después el reactor fue llevado a la temperatura a la que se realizaría la síntesis y, una vez alcanzada, se le agregó más R-134a hasta alcanzar los 45 bar.

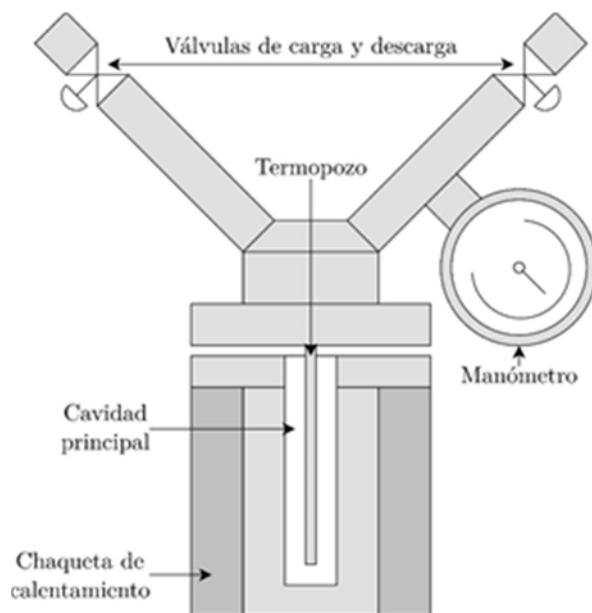


Figura 5: Representación esquemática del reactor de alta presión utilizado (Aguirre, I. 2018)

La mezcla reaccionó durante 24 horas en agitación. La reacción se detuvo elevando la temperatura a 130°C durante 10 minutos para después enfriar y liberar la presión. El contenido del reactor fue lavado con 50 mL de agua destilada y esta solución fue centrifugada a 7000 rpm durante 15 minutos para separar el monómero restante. El sobrenadante fue liofilizado y analizado.

Posteriormente se evaluó la reacción a tres temperaturas diferentes (40°C, 60°C y 105°C) manteniendo constante el resto de las variables; y a 3 concentraciones diferentes de enzima (8.3 U/mmol, 18.3 U/mmol y 28.3 U/mmol) expresadas en proporción al monómero agregado (Unidades de actividad enzimática / mmol de monómero). Las condiciones optimizadas para la síntesis fueron implementadas mediante el uso de una proteasa diferente (PA CONC 3000 distribuida por Enmex) Adicionalmente se realizaron controles en los que únicamente se agregó L-Phe-OEt y otros en los que sólo se agregó la enzima.

Caracterización del producto de la reacción de polimerización

Se utilizaron varias técnicas de análisis para caracterizar el polímero obtenido de la reacción biocatalizada por la Subtilisina Calsberg. A continuación se describen dichas técnicas.

Espectrometría UV- Visible

Se realizó una espectrometría UV-Visible directamente a las aguas de lavado del reactor para analizar el polímero obtenido de la síntesis y así tener indicios de la

presencia y características de este desde un inicio, sin tener la necesidad de esperar la liofilización para identificar la presencia o ausencia del producto.

En un espectrofotómetro Lambda 2S UV-Vis (Perkin Elmer Inc., USA) se realizó la espectrometría de barrido a la poli(L-Phe) redissuelto en agua destilada a longitudes de onda desde 500nm a 200nm en una celda de cuarzo de 1 cm.

Resonancia Magnética Nuclear

Las muestras liofilizadas fueron disueltas a una concentración de 60 mg/mL en una mezcla de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆)/ ácido trifluoroacético deuterado (TFA-d) (proporción 9.25:0.75). La disolución se sometió al análisis de Resonancia Magnética Nuclear unidimensional de protón (1 H RMN) en un espectrómetro Varian MR-400 (400 MHz) en donde se utilizó DMSO-d₆ como referencia interna. Los datos fueron analizados por el software MestReNova, versión 12.0 (Mestrelab Research S.L.).

Esta prueba se llevó a cabo con la finalidad de calcular el grado de polimerización alcanzado por la reacción y así poder calcular también la masa molecular de la molécula sintetizada. Adicionalmente fue también útil para ayudar a confirmar con mayor certeza la identidad del producto obtenido.

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Las muestras de poli(L-Phe) liofilizadas fueron analizadas mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), Reflectancia Total Atenuada (ATR) en un equipo Perkin-Elmer Spectrum 400.

El principal objetivo de realizar esta prueba fue identificar los grupos funcionales presentes en el compuesto sintetizado y a partir de estos confirmar que la identidad del polímero correspondiera con la esperada.

Dicroísmo circular

El polímero redissuelto en agua destilada a una concentración 0.28% m/v fue analizado en un espectropolarímetro JASCO J-715 (Jasco Inc., USA) a una longitud de onda de 190 a 260 nm, usando una celda de longitud de 1 mm a 20°C. Esta prueba se llevó a cabo con la finalidad de dilucidar una posible estructura secundaria o algún arreglo tridimensional que la poli(L)phe presentase.

Análisis termogravimétrico

Las muestras liofilizadas fueron analizadas en un equipo TGA 4000 Perkin Elmer de 30°C a 500°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min para así analizar la pérdida de masa del polímero a diferentes temperaturas con la finalidad de obtener la temperatura de descomposición de este.

Calorimetría diferencial de barrido

Las muestras liofilizadas fueron analizadas en un calorímetro DSC1 Mettler Toledo en tres ciclos de calentamiento 25°C-300°C, 300°C-25°C y 25°C-300°C a una velocidad de 10°C/min estudiando así los cambios energéticos que presenta el producto ante los cambios de temperatura y así estudiar los cambios de fase y transiciones vítreas que pudiera presentar.

Resultados y discusión

Código

El código utilizado para la identificación de las muestras refleja las condiciones utilizadas en dicha prueba (Tabla 2). Se compone de 4 elementos, letras seguidas por tres juegos de números. Las letras indican la enzima utilizada:

DEE Subtilicina de *B. lichenformis* Sigma-Aldrich

ENM Proteasa Enmex (PA CONC 3000)

C Control sin proteasa

El primer juego de números indica la concentración de enzima expresada en unidades internacionales de actividad enzimática (U):

5 50 U (8.3 U/mmol)

11 110 U (18.3 U/mmol)

17 170U (28.3 U/mmol)

El segundo juego de números indica la temperatura a la que fue realizada la síntesis.

4 40°C

6 60°C

105 105°C

El tercer juego de números indica la repetición de las condiciones

Tabla 2: Condiciones de síntesis de las muestras analizadas				
Muestra	Enzima	Concentración de enzima (U/mmol)	Temperatura (°C)	Repetición
C0.4.1	Control sin enzima	/	40	1
C0.6.1	Control sin enzima	/	60	1
C11.4.1	Subtilicina Sigma-Aldrich	18.3	40	1
DEE5.4.1	Subtilicina Sigma-Aldrich	8.3	40	1
DEE5.4.2	Subtilicina Sigma-Aldrich	8.3	40	2
DEE5.4.3	Subtilicina Sigma-Aldrich	8.3	40	3
DEE11.4.1	Subtilicina Sigma-Aldrich	18.3	40	1
DEE11.4.2	Subtilicina Sigma-Aldrich	18.3	40	2
DEE11.4.3	Subtilicina Sigma-Aldrich	18.3	40	3
DEE17.4.1	Subtilicina Sigma-Aldrich	28.3	40	1
DEE17.4.2	Subtilicina Sigma-Aldrich	28.3	40	2
DEE17.4.3	Subtilicina Sigma-Aldrich	28.3	40	3
DEE11.6.1	Subtilicina Sigma-Aldrich	18.3	60	1
DEE11.6.2	Subtilicina Sigma-Aldrich	18.3	60	2
DEE11.6.3	Subtilicina Sigma-Aldrich	18.3	60	3
DEE11.6.4	Subtilicina Sigma-Aldrich	18.3	60	4
DEE11.105.1	Subtilicina Sigma-Aldrich	18.3	105	1
DEE11.105.2	Subtilicina Sigma-Aldrich	18.3	105	2
DEE11.105.3	Subtilicina Sigma-Aldrich	18.3	105	3
ENM11.6.1	Proteasa Enmex	18.3	60	1
ENM11.6.2	Proteasa Enmex	18.3	60	2

Caracterización de un polímero típico

Con el fin de estudiar los resultados obtenidos en los diferentes estudios realizados a la Poli(L)Phe se tomarán como modelo los resultados de la muestra DEE1142.

La espectroscopía infrarroja (figura 6) fue utilizada para corroborar la identidad del compuesto obtenido comprobando que este corresponde con el que se tenía esperado.

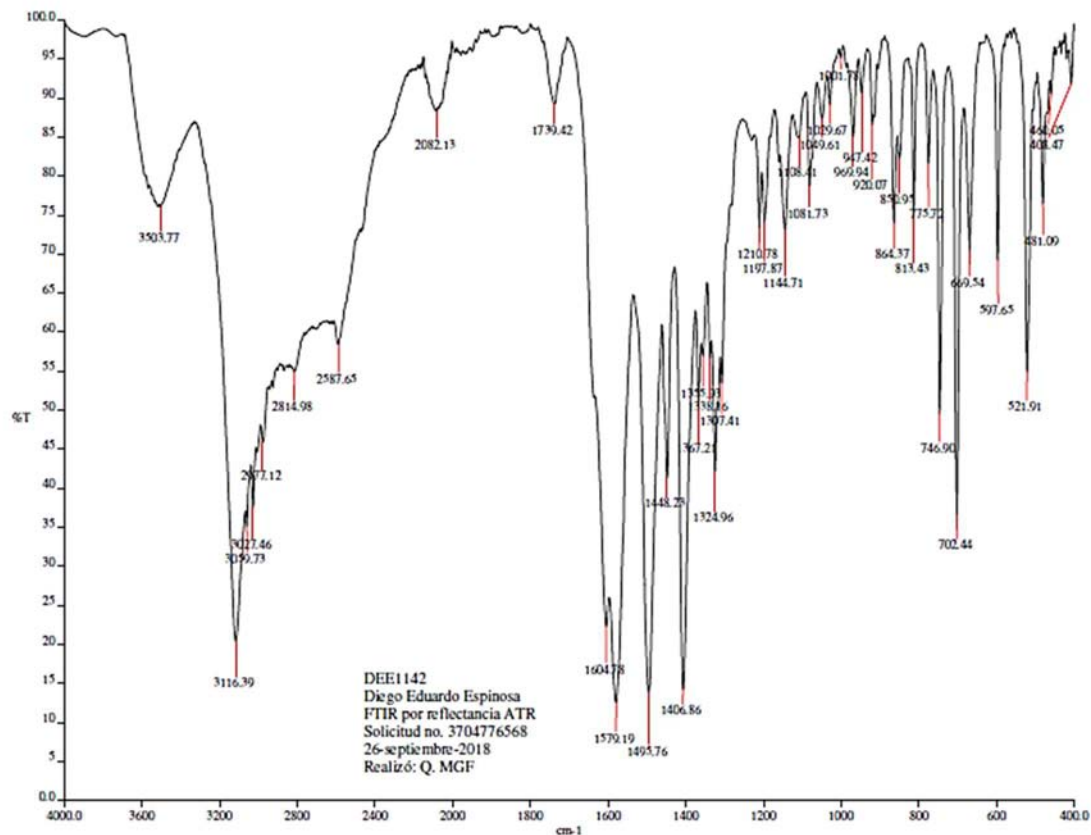


Figura 6: Espectro infrarrojo de la muestra DEE1142

La presencia del grupo funcional amida del enlace peptídico es la que confirma que la polimerización se ha llevado a cabo exitosamente por lo que las señales que le

corresponden en el espectro infrarrojo son las prioritarias a identificar. La señal mostrada en la figura 6 a 3503 cm^{-1} corresponde a la tensión N-H de dichas amidas secundarias, mientras que la flexión de este enlace se puede observar a 1579 cm^{-1} . Por otro lado la tensión del enlace C=O se observa a 1604 cm^{-1} .

La señal a 1739 cm^{-1} puede deberse a la tensión C=O del éster terminal, o tal vez a la presencia de monómero residual. Por otro lado, la señal a 2082 cm^{-1} puede deberse a la amina terminal protonada. En caso de que se forme el grupo -NH_3^+ éste podría contribuir a la solubilidad del polipéptido.

La información del FT-IR está complementada por los resultados obtenidos mediante espectrometría UV-Visible en donde la Poli(L)Phe muestra dos señales características: absorbancia alrededor de 258 nm típico del grupo aromático de la fenilalanina (por lo que también está presente en el espectro del monómero) y, a diferencia del L-Phe-OEt, el polímero presenta otra señal a 215 nm debido al enlace peptídico (Lee, V. 1990)

Como se puede apreciar en la figura 7, ambas señales se muestran claramente comprobando la presencia del polímero, en concordancia con lo obtenido por Aguirre (Aguirre, I. 2018), mostrándose diferente al monómero, probando así que la reacción se ha llevado a cabo.

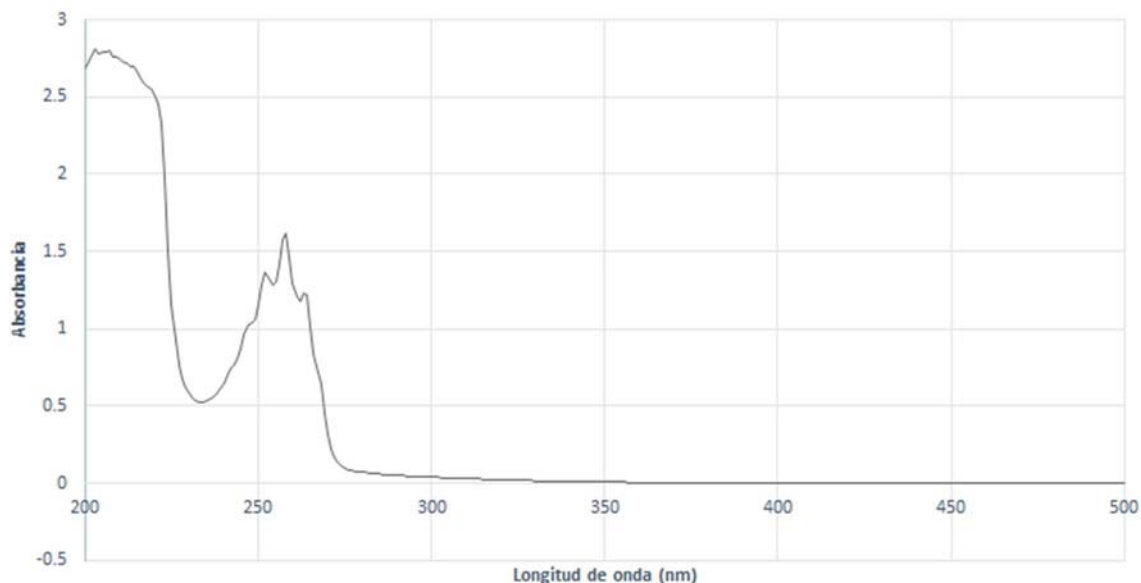


Figura 7: Espectro UV de la muestra DEE1142

Es importante señalar que todos los análisis por UV se realizaron a concentraciones diferentes del polímero, a lo cual se atribuye las diferencias de absorbancia entre las diferentes muestras. De haberse elegido una sola concentración (en la que ninguna señal se viera saturada), la intensidad de las señales serían únicamente consecuencia de su presencia en la molécula por lo que, probablemente, a mayor polimerización la señal a 215 nm se observaría más intensa respecto a la señal a 257 nm. De ser así, una relación entre la absorbancia máxima entre ambas señales podría ser utilizada para estimar de forma rápida y económica el nivel de polimerización de la molécula.

La naturaleza hidrofóbica de la fenilalanina llevaría a pensar que el polímero de este aminoácido sería, de igual manera, hidrofóbico. Sin embargo, el producto obtenido es un polvo altamente soluble en agua. Una explicación a este hecho podría ser la conformación de una estructura secundaria en la que los grupos hidrofóbicos se acomodan al centro de la molécula, exponiendo así las amidas formadas en la polimerización las cuales interactúan con el agua mediante puentes de hidrógeno.

Una característica importante que se busca comúnmente al producir polipéptidos sintéticos es la formación estructuras secundarias ya que éstas son generalmente las responsables de la complejidad estructural y la funcionalidad de las proteínas por lo que, si se quiere reproducir dicha funcionalidad, es necesario reproducir las estructuras complejas (Bonduelle, C. 2018)

El dicroísmo circular fue utilizado para poder determinar el plegamiento y una posible estructura secundaria del polipéptido sintetizado. Los resultados esperados en presencia de una estructura secundaria se muestran en la figura 8 (Ranjbar, B. 2009) y lo obtenido por los polímeros sintetizados se presentan en la figura 9.

Como se puede observar los resultados obtenidos no corresponden con los resultados que se esperarían al tener una estructura secundaria. A partir de estos resultados no se puede concluir que el polímero sintetizado presente estructuras secundarias tales como α -hélice o láminas- β , por lo que la causa principal de su solubilidad en agua permanece como una incógnita. A pesar de que no presente estas estructuras cabe la posibilidad de que su composición ocasione algún arreglo

o plegamiento que le permita lograr las características de solubilidad que presenta la Poli(L)Phe.

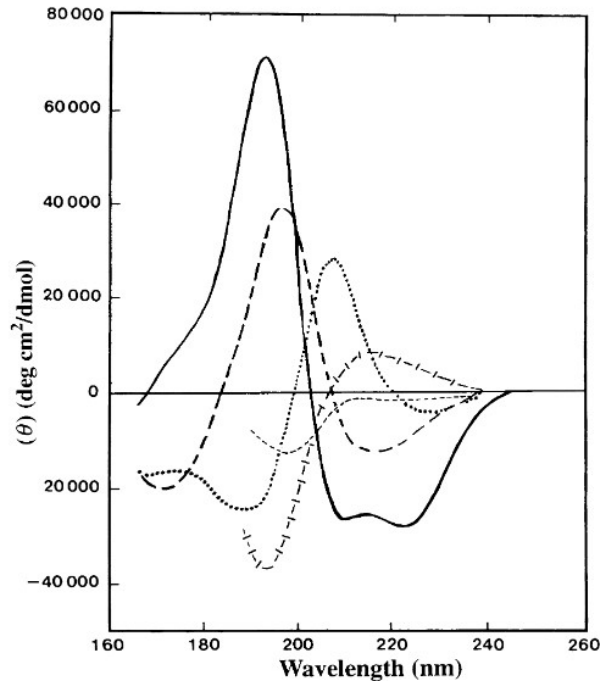


Figura 8: Espectro de dicroísmo circular muestra los resultados asociados a varias estructuras secundarias. α -hélice como línea continua, lámina β como línea interrumpida (guión largo), giro β como línea punteada, estructura irregular como línea interrumpida (guión corto).

(Ranjbar, B. 2009)

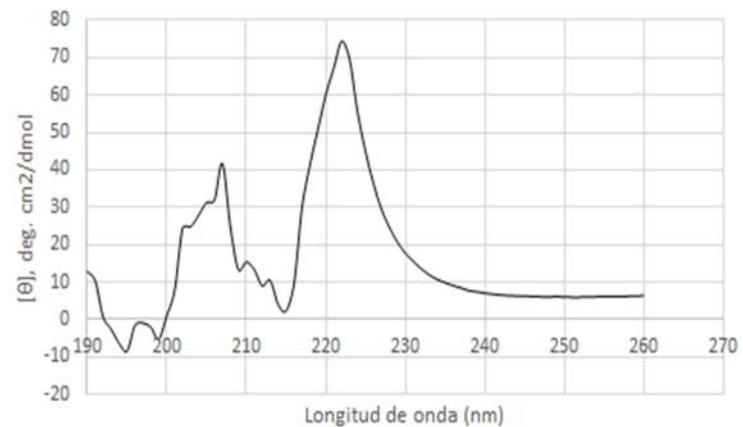


Figura 9: Espectro de dicroísmo circular de la muestra DEE1142

Otra posible razón de la solubilidad en agua puede deberse a la formación de una sal del polímero, con un grupo NH_3^+ en el amino terminal, junto con un acomodo en donde los grupos hidrofóbicos fenilo se posicionen al “interior” de la molécula, protegidos por los grupos amida expuestos que se encuentran en resonancia (figura 10) la cual permite interacción con moléculas polares como el agua.

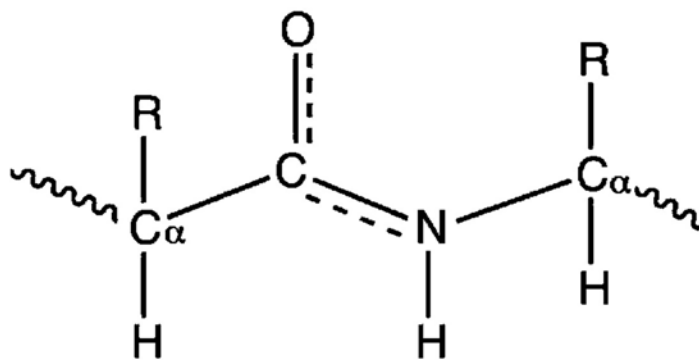


Figura 10: Resonancia del enlace peptídico

A pesar de estas teorías, los datos obtenidos no permiten dilucidar el arreglo tridimensional del polímero ni una explicación contundente y definitiva a su solubilidad en agua por lo que se necesita una mayor investigación.

RMN de Poli(L)Phe

Respecto a la resonancia magnética nuclear de protones realizada, esta no sólo contribuye a confirmar la identidad y estructura del compuesto sintetizado, sino también es necesario para estimar el nivel de polimerización (y con este la masa molar) del polipéptido.

En la figura 12 se muestran los resultados obtenidos de ^1H -RMN de la muestra DEE1142 en donde se muestran las señales esperadas para este compuesto y corresponden positivamente con lo encontrado en el estudio similar realizado por Aguirre en 2018.

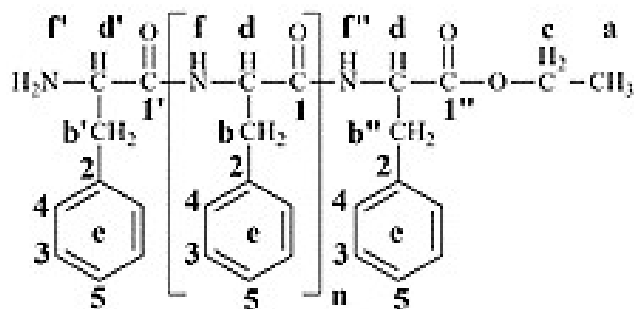


Figura 11: Poli(L)Phe

La señal a 2.5 ppm corresponde al DMSO con la cual está referenciado el espectro. El triplete cercano a 1 ppm corresponde a los 3 hidrógenos del metilo terminal (señalado como **a** en la figura 11). Sin importar la longitud del polipéptido obtenido éste siempre tendrá únicamente un solo metilo terminal, por lo que se puede asegurar que la señal cercana a 1 ppm integra para 3 protones y a partir de este valor se puede identificar cuántos protones dan origen a cada señal y así obtener el nivel de polimerización.

Por ejemplo, la señal cercana a 3 ppm es un doblete que corresponde a los dos protones del carbono **b** (**b'** y **b''**). Al dividir el valor integrado entre dos (dos protones son los que están presentes) se obtiene el número de monómeros que forman parte de la molécula. La señal cercana a 4.2 ppm corresponde a los protones del carbono **d** y junto a esta se presenta un doblete mucho más pequeño el cual corresponde a los protones del carbono **c**. Alrededor a 7.25 ppm se observa la señal de los cinco protones del anillo aromático (**e**) y por último, cercano a 8.3 ppm se encuentra la señal relacionada a los hidrógenos del nitrógeno **f** (**f'** y **f''**).

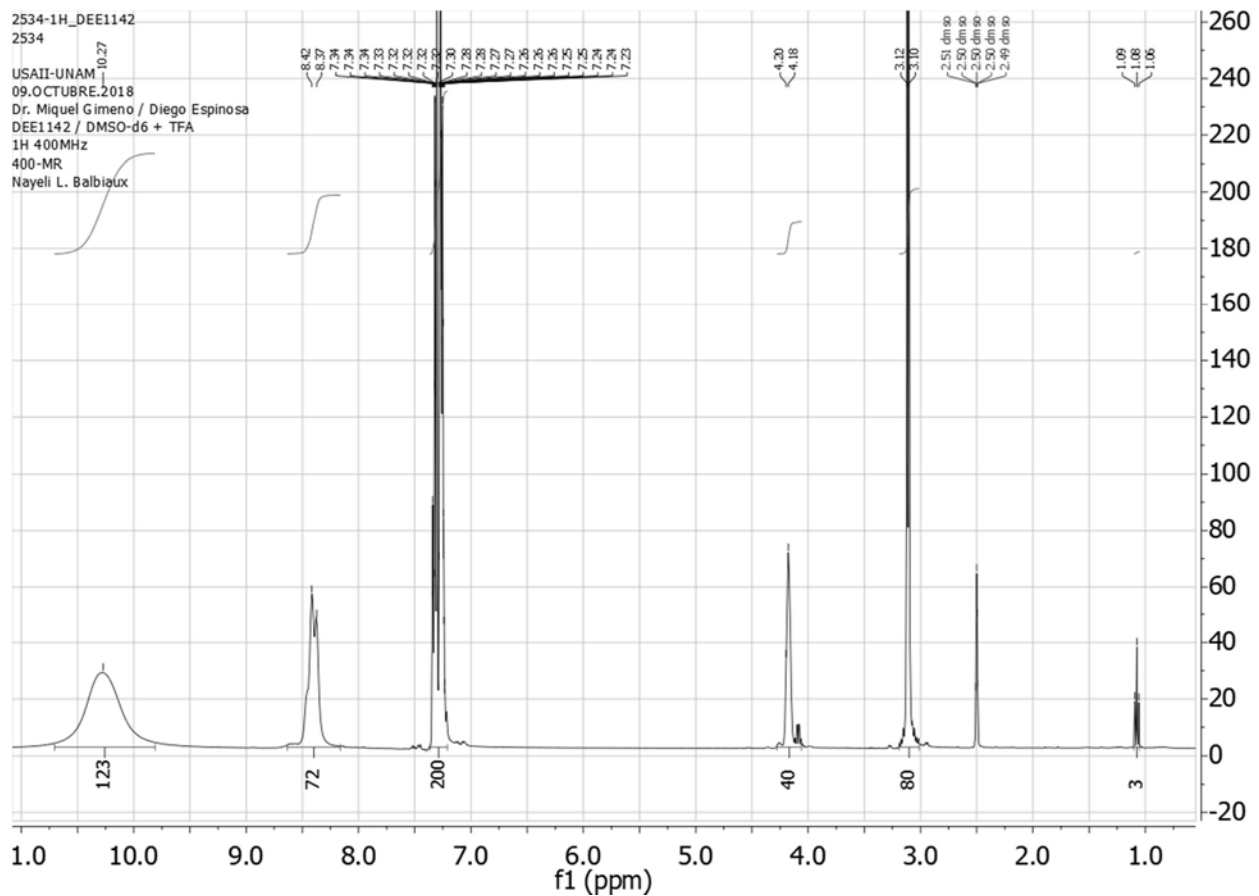


Figura 12: ¹H-RMN de la muestra DEE1142

En ciertas ocasiones, a diferencia del ejemplo arriba citado, los valores de polimerización obtenidos mediante la división de la integración de las señales **b**/2, **d**/1 y **e**/5 no eran exactamente los mismos. En dichos casos el nivel de polimerización obtenido a partir de la señal correspondiente al anillo aromático fue el elegido como el valor reportado en la Tabla 3 y con el cual se realizó el análisis de los resultados ya que se observó que este resultaba más consistente que los otros dos.

Adicionalmente, estudios termogravimétricos y calorimétricos fueron realizados con la finalidad de obtener más información de la Poli(L)Phe.

Termogravimetría de la Poli(L)Phe

El estudio termogravimétrico muestra la temperatura de descomposición (reportada en la Tabla 3) y puede reflejar hasta cierto punto la pureza del compuesto analizado. Las señales de peso derivado bien definidas indican una mayor pureza, mientras que más de una señal puede ser resultado de más de un compuesto (o probablemente, polipéptidos con un nivel de polimerización ligeramente diferente). La presencia del monómero en la muestra puede causar ruido e incluso una descomposición poco uniforme.

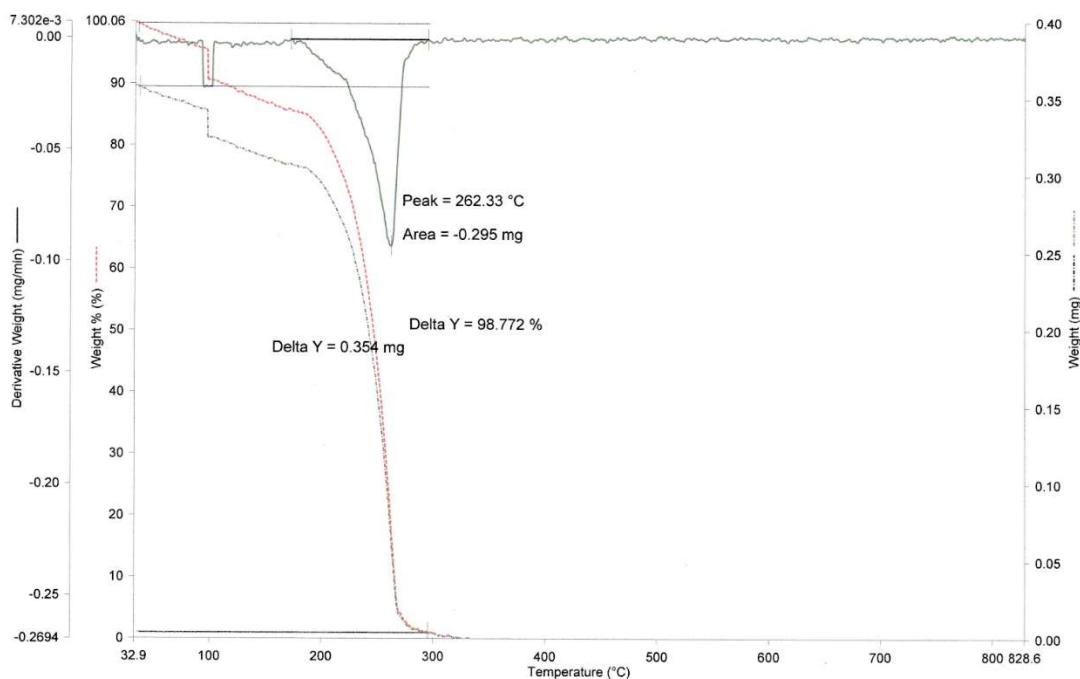


Figura 13: Termogravimetría de la muestra DEE1142

En la figura 13 se observan dos señales en la escala de peso derivado (línea sólida verde). La principal corresponde a la Poli(L)Phe la cual muestra una temperatura de descomposición de 262°C. Alrededor de 80-90°C hay otra señal que indica la repentina pérdida de masa la cual se muestra en las líneas punteadas; en verde se muestra la masa en mg y en rojo se muestra el porcentaje de masa residual respecto a la masa inicial. Esta señal entre 80 y 90°C es atribuible a la enzima residual que aún permanece presente en la muestra.

Se tenía la hipótesis que a mayor masa molar más energía sería necesaria para descomponer el compuesto, por lo tanto la temperatura de descomposición sería mayor. De ser cierto, una rápida prueba termogravimétrica sería suficiente para estimar la masa molar del polímero. Sin embargo la figura 14 sugiere que la hipótesis es falsa, sin importar la longitud de la cadena sintetizada, la temperatura de descomposición se mantiene relativamente constante alrededor de la temperatura de descomposición promedio: 255.3°C ($\sigma = 19.2$).

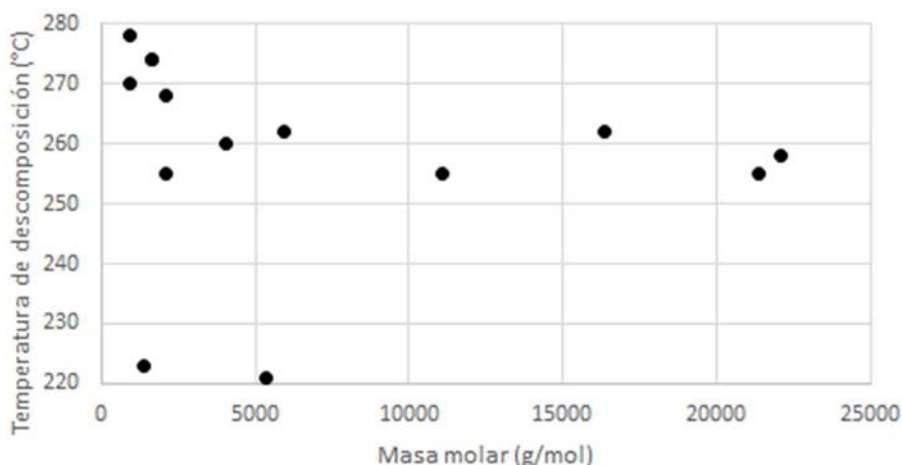


Figura 14: Temperatura de descomposición de cadenas de Poli(L)Phe de diferente masa molar

La desviación estándar es alta debido a que a bajos pesos moleculares (menores a 6000 g/mol) los resultados obtenidos son inconsistentes. Esto probablemente se debe a que en procesos de síntesis no muy exitosos se genera un polímero de bajo peso molecular junto con restos de monómero y otros subproductos, ocasionando un producto de baja pureza, la cual afecta la medición del punto de descomposición. Es por esto que pesos moleculares bajos (menores a 6000 g/mol) presentan una dispersión mayor de los resultados obtenidos en el estudio termogravimétrico.

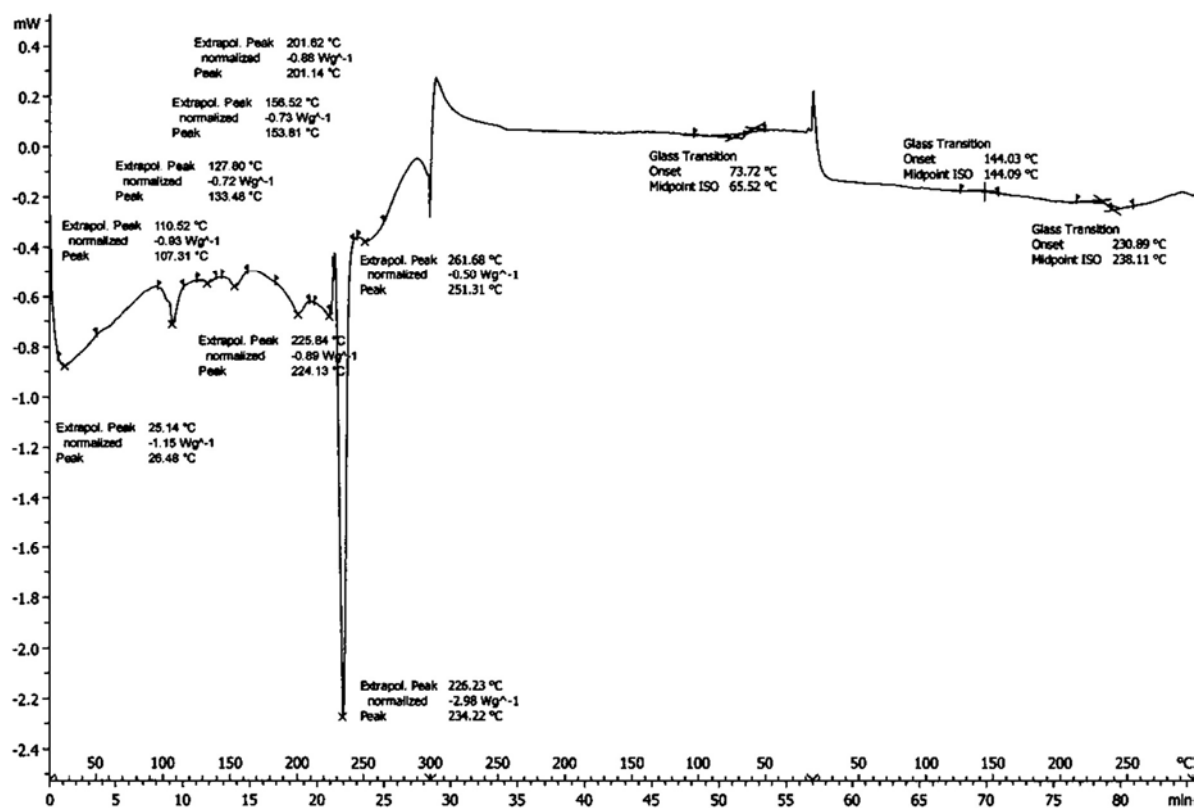


Figura 15: Resultados obtenidos de estudio DSC a la muestra DEE1142

Los resultados arrojados por el estudio calorimétrico (DSC) realizado figura 15 fueron realizados antes de conocer la temperatura de descomposición del polímero por lo que los ciclos fueron elegidos hasta 300 °C.

Los cambios energéticos en el primer ciclo son poco claros debido a que en esta historia térmica del mismo compuesto imposibilita una lectura clara con una línea base bien definida (James, J. 2017). Sin embargo, dos eventos relevantes pueden ser observados, uno endotérmico a 226°C e inmediatamente después uno exotérmico a 261°C. Este comportamiento es característico de fusión con descomposición (James, J. 2017) lo que nos indica que el polímero estudiado pasa brevemente a una fase líquida antes de descomponerse. La temperatura de fusión promedio de todas las muestras analizadas es de 239.5°C ($\sigma = 12.9$). Adicionalmente este estudio corrobora la temperatura de descomposición alrededor de 255°C obtenida por el estudio termogravimétrico.

En la mayor parte de los polímeros analizados por DSC se puede observar que en el segundo y tercer ciclos los cambios en la energía se vuelven mínimos casi imperceptibles. Es posible que esto se deba a que, al realizar este estudio hasta una temperatura de 300°C, la mayor parte del poliaminoácido se encontraba ya descompuesto para el segundo y tercer ciclos. Por esta razón sería necesario realizar el estudio con intervalos de temperatura diferentes que permitan preservar el compuesto.

A pesar del problema suscitado, se logran apreciar cambios sutiles en la línea base del segundo y tercer ciclo, pero no en los mismos puntos. Estos podrían ser

consecuencia de una transición vítrea ya que presentan un comportamiento similar al típico en una transición de este tipo. Por lo general se observa uno en el ciclo de temperatura decreciente y dos en el ciclo de temperatura creciente. Estos son muy poco claros, y a lo largo de todas las muestras analizadas existen variaciones demasiado grandes como para concluir algo respecto a estas.

La información obtenida del rendimiento general, la resonancia magnética nuclear y el análisis termogravimétrico se muestra condensada en la tabla 3.

Algunos de los datos presentados en la tabla 3 carecen de sentido ya que ciertas impurezas imposibilitaron su correcto análisis. Es necesario utilizar muestras de mayor pureza para obtener resultados claros y contundentes que ayuden a llegar a las conclusiones necesarias más fácilmente. Es por esta razón que es necesario encontrar un mejor método de separación y purificación del producto que permita la obtención de polímeros mucho más puros.

Tabla 3: Resultados condensados de todas las síntesis realizadas.				
Muestra	Rendimiento ¹ (%)	Nivel de polimerización ²	Masa molar (g/mol)	Temperatura descomposición (°C) ³
C0.4.1	17.9	6	929.21	278
C0.6.1	0	∅		
C11.4.1	24.4 ⁴	∅		
DEE5.4.1	51.1	75	11085.32	255
DEE5.4.2	48.3	14	2106.73	268
DEE5.4.3	50.5	11	1665.16	274
DEE11.4.1	19.2	27	4020.2	260
DEE11.4.2	89.6	40	5933.67	262
DEE11.4.3	55.9	6	929.21	270
DEE17.4.1	56	?		215
DEE17.4.2	62.5	36	5344.91	221
DEE17.4.3	55.3	14	2106.73	255
DEE11.6.1	82.1	111	16384.16	262
DEE11.6.2	1.7	∅		
DEE11.6.3	58	11	1665.16	274
DEE11.6.4	49.4	9	1370.78	223
DEE11.105.1	0	∅		
DEE11.105.2	0	∅		
DEE11.105.3	0	∅		
ENM11.6.1	63.5	150	22124.57	258
ENM11.6.2	67.3	145	21388.62	255

¹ Rendimiento en masa asumiendo el total de masa de L-Phe-OEt como 100%

² Número de repeticiones del monómero

³ Pico principal de peso derivado

⁴ Rendimiento en masa asumiendo el total de masa de enzima como 100%

Efecto de la temperatura de reacción sobre la síntesis de Poli(L)Phe

Con el fin de observar la influencia que tiene la temperatura a la que se efectúa la reacción de polimerización sobre el producto obtenido se llevó a cabo la reacción a diferentes temperaturas manteniendo constante el tiempo de reacción y la proporción enzima/sustrato, pero variando la temperatura.

Se estudió el sistema a tres temperaturas diferentes: 60°C, con la finalidad de poder corroborar los resultados reportados por Aguirre (Aguirre, I. 2018); 40°C, para poder observar la reacción a una temperatura menor y determinar así si 60°C representa un uso excesivo e innecesario de energía; y 105°C para ver no solo si a mayor temperatura se obtendrían mejores resultados, sino también poder observar si el 1,1,1,2-tetrafluoroetano en estado supercrítico (por arriba del punto crítico 101.06°C y 4.06 MPa. (Mota-Babiloni, A. 2019)) tendría efecto alguno sobre la síntesis de Poli(L)Phe.

En un inicio se contemplaba la posibilidad de que el R-134a en estado supercrítico contribuyera a un mejor rendimiento de la reacción así como a una mayor polimerización, esto debido a las propiedades que los gases presentan en estado supercrítico: transferencia de masa más eficiente debido a la alta difusión de solutos y baja viscosidad del medio lo que permite reacciones más rápidas y efectivas (Knez, Ž. 2018).

Es importante mencionar que, como se estableció anteriormente, en condiciones típicas (medio acuoso y atmósfera no controlada) la enzima subtilisina de *Bacillus licheniformis* se descompone y pierde toda actividad alrededor de los 85°C.

Normalmente esto descartaría su uso en en 1,1,1,2-tetrafluoroetano supercrítico. Sin embargo Aguirre, I (2018) reporta que la enzima presenta actividad incluso después de ser sometida a temperaturas mayores a 100°C en R-134a.

La razón no es clara pero es posible que la molécula de 1,1,1,2-tetrafluoroetano presente la polaridad necesaria debido a la alta electronegatividad del flúor, lo cual permite la interacción con la enzima promoviendo su estabilidad incluso en mayor medida que la que presenta en agua. Es posible que la estabilidad propiciada por el medio utilizado, incluso a las condiciones extremas de fluido supercrítico, sean suficientes para mantener la actividad de la enzima. Sin embargo, para conocer con precisión la razón por la cual la enzima mantiene su actividad a dichas temperaturas es necesaria mayor investigación.

Conociendo el dato anterior, experimentar a temperaturas a las que el 1,1,1,2-tetrafluoroetano logra condiciones supercríticas cobra valor, por lo que se tomó la decisión de llevarlo a cabo.

Tabla 4: Efecto de la temperatura sobre el rendimiento de la reacción de polimerización			
Observación	40°C	60°C	105°C
1	19.2%	82.1%	0%
2	89.6%	58%	0%
3	55.9%	49.4%	0%
Media	54.9%	63.1666667%	0%
Varianza	1239.79	287.343333	0
Desv est	35.2106518	16.9512045	0

En la tabla 4 vemos los resultados condensados de rendimientos obtenidos al variar la temperatura mismos que se pueden apreciar claramente en la figura 16.

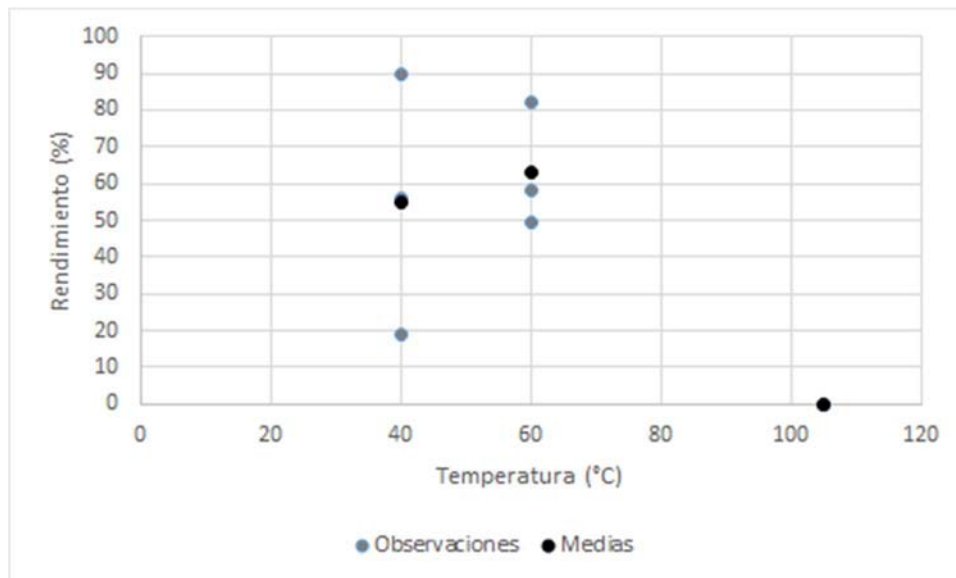


Figura 16: Efecto de la temperatura sobre el rendimiento de la reacción de polimerización

El análisis de varianzas indica que es seguro decir, con 95% de probabilidad, que los eventos a las tres temperaturas no son iguales, sin embargo este resultado es obtenido únicamente debido a que la reacción a 105°C es evidentemente diferente.

A pesar de que las medias parecen indicar una mejora de rendimiento a 60°C, un análisis de varianza de las primeras de temperaturas aisladas no permite asegurar que éstas condiciones presenten resultados estadísticamente diferentes, la variación dentro de una sola condición es muy grande por lo que, aunque la sospecha de que a 60°C se obtienen mejores rendimientos, no se tienen las pruebas necesarias para concluir esto, por lo que el experimento debe de ser repetido con

un mayor número de observaciones (si es posible) y con un mayor control sobre otras variables no consideradas.

En la tabla 5 observamos los resultados referentes a el cambio en la masa molar del polímero obtenido al variar la temperatura. Estos mismos se muestran en el figura 17.

Tabla 5: Masas molares obtenidas a diferentes temperaturas de reacción			
Observación	40°C	60°C	105°C
1	4020.2 g/mol	16384.16 g/mol	0 g/mol
2	5933.67 g/mol	1665.16 g/mol	0 g/mol
3	929.21 g/mol	1370.78 g/mol	0 g/mol
Media	3627.69333 g/mol	6473.36667 g/mol	0 g/mol
Varianza	6376701.09	73689533.3	0
Desv Est	2525.21308	8584.26079	0

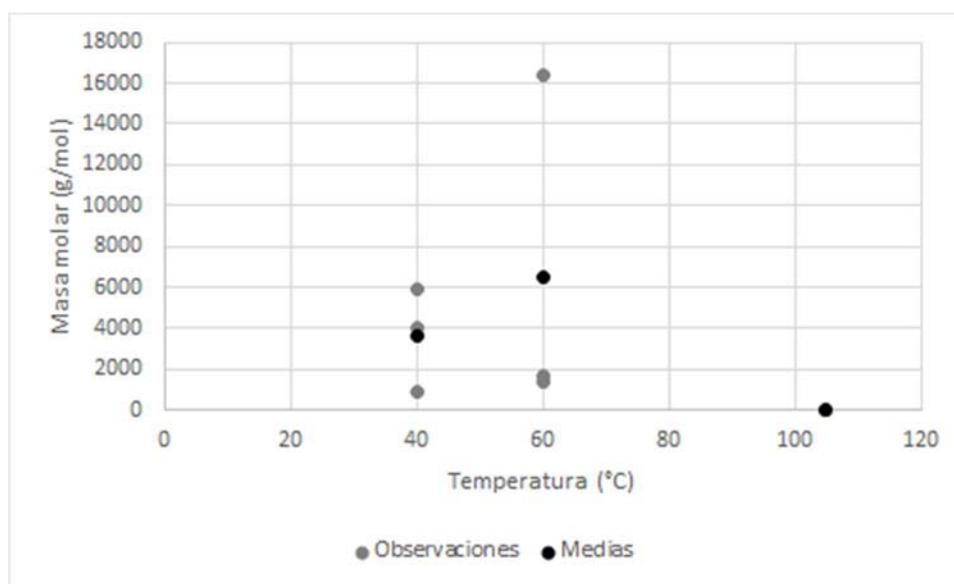


Figura 17: Efecto de la temperatura de reacción sobre masa molar del polímero obtenido

Al igual que en el caso anterior, el análisis de varianza muestra con 95% de probabilidad que entre condiciones existe diferencia estadísticamente significativa, pero únicamente debido a la diferencia a 105°C.

Las medias sugieren mejora a 60°C, es decir, resultados con mayor peso molecular, pero el análisis estadístico indica que no se puede asegurar que las dos condiciones (40°C y 60°C) sean diferentes entre sí, en este caso los resultados se muestra muy variables también.

Las altas variaciones en los resultados obtenidos podrían indicar que existe otra variable la cual no fue considerada durante la planeación experimental y que influye sobre los resultados.

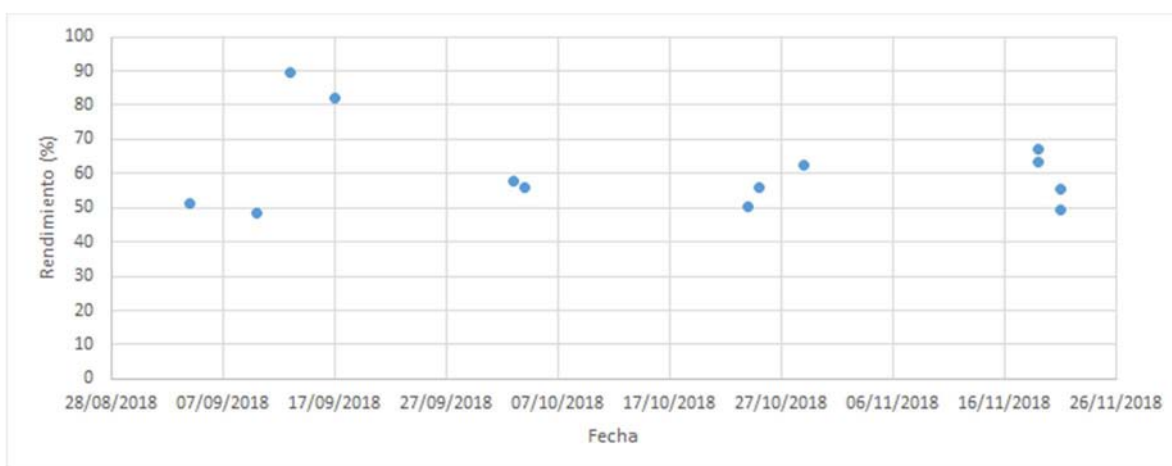


Figura 18: Rendimientos de todas las reacciones de polimerización realizadas mostradas cronológicamente

Si todos los rendimientos son graficados cronológicamente (figura 18) se puede observar que los porcentajes de rendimientos parecen estar agrupados. Sin

importar las condiciones a las que fueron llevadas a cabo los resultados se muestran similares entre aquellos que ocurrieron en fechas aproximadas.

Esto podría indicar que algún factor ambiental que cambie por temporada está afectando los resultados de la polimerización. La temperatura queda descartada ya que ésta fue cuidadosamente controlada. Sin embargo, la humedad del aire no se mantuvo constante, varía de una temporada a otra, y no fue medida ni controlada en el medio de reacción. Eso se traduce a que se debe controlar el A_w del sistema para obtener resultados confiables.

Las enzimas son muy susceptibles a la presencia de diferentes concentraciones de agua, requieren una pequeña cantidad de agua para poder actuar sobre su sustrato debido a las interacciones que se dan entre proteínas y agua. Cada enzima diferente tiene un funcionamiento óptimo a una concentración de agua específica (Knez, Ž. 2018).

Es por esta razón que variaciones en la humedad del aire que llega a encontrarse al interior del reactor previo al llenado de este con R-134a podría influir sobre los resultados en mayor medida de lo que se creía. En trabajos futuros esta variable no puede pasar por alto y los efectos de diferentes concentraciones de agua al interior del reactor también deben de ser estudiados.

A pesar de que el A_w no fue controlado, la tabla 5 sí presenta resultados valiosos. De esta se puede concluir que la reacción de polimerización a 105°C no produce Poli(L)Phe. Como se estableció anteriormente, la enzima mantiene actividad en las condiciones de temperatura y presión alcanzadas, por lo que su descomposición no

es la responsable de la ausencia de producto. Sin embargo, es posible que la descomposición del monómero provoque que la reacción no se lleve a cabo. Si el monómero se descompone antes de que la enzima pueda tener acción sobre él, la polimerización no ocurre, mostrando así ausencia de Poli(L)Phe después de 24 horas. Una metodología diferente es necesaria para evaluar los efectos que las condiciones supercríticas puedan tener sobre la reacción.

Efecto de la proporción enzima/sustrato sobre la síntesis de Poli(L)Phe

Para observar el efecto de la proporción enzima/sustrato sobre la reacción de polimerización se mantuvo constante la temperatura de reacción, el tiempo de reacción y la concentración de L-Phe-OEt, mientras que tres concentraciones diferentes de enzima fueron estudiadas: la utilizada por Aguirre, I (2018) (18.3 U de proteasa por cada mmol de L-Phe-OEt) con el fin de comparar con los resultados obtenidos en dicho estudio, una concentración mayor (28.3 U/mmol) y una concentración menor (8.3 U/mmol).

La subtilisina utilizada es uno de los componentes más costosos al llevar a cabo la reacción, por lo que es importante saber si se pueden reducir costos disminuyendo la cantidad de enzima utilizada sin dañar en gran medida los rendimientos o si, por el contrario, se obtienen resultados mucho mejores al aumentarla proporción enzima/sustrato.

Tabla 6: Rendimientos obtenidos en la reacción de polimerización a diferentes proporciones enzima/sustrato utilizadas			
Observación	8.3 U/mmol	18.3 U/mmol	28.3 U/mmol
1	51.1%	19.2%	56%
2	48.3%	89.6%	62.5%
3	50.5%	55.9%	55.3%
Media	49.97%	54.9%	57.93%
Varianza	2.17333333	1239.79	15.7633333
Desv Est	1.47422296	35.2106518	3.97030645

El efecto sobre el rendimiento de la reacción se muestra en la tabla 6 y en la figura 19. Como se puede observar en estas la variación antes discutida sigue presente, imposibilitando que el análisis estadístico declare con contundencia que existe diferencia entre los resultados obtenidos a diferentes condiciones.

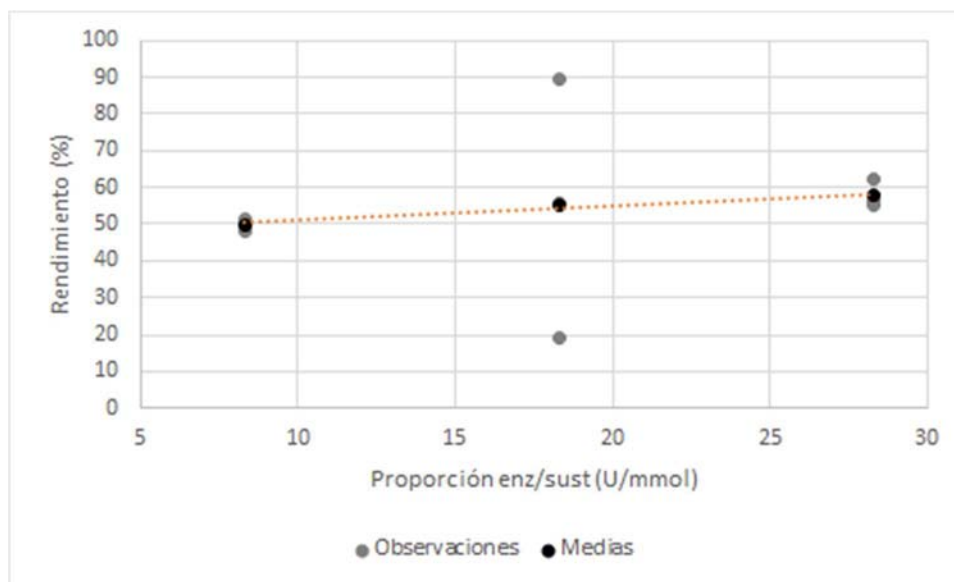


Figura 19: Efecto de la proporción enzima/sustrato utilizado en la síntesis sobre el rendimiento de la reacción

Sin embargo, el análisis de varianza realizado para establecer diferencia significativa únicamente entre 8.3 U/mmol y 28.3 U/mmol establece con 95% de confianza que los resultados obtenidos de estas no son iguales, es decir existe diferencia significativa al utilizar diferentes concentraciones de enzima.

La tendencia muestra que a mayor proporción enzima/sustrato, el rendimiento es también mayor, estableciendo así la hipótesis como cierta. Esto se debe a que la proteasa es la que está llevando a cabo la polimerización y la concentración de sustrato rebasa la capacidad de todas las enzimas presentes, por lo que si más

subtilisina es agregada habrá L-Phe-OEt disponible para ser polimerizado. El momento en el que hay demasiada enzima y no suficiente sustrato, teóricamente, el rendimiento se mantendría constante, sin embargo no se alcanzaron estas concentraciones en el experimento realizado.

Es claro que a mayor concentración de enzima, el rendimiento es mayor, sin embargo esto no significa que utilizar una mayor cantidad de enzima sea rentable o conveniente. En efecto, el rendimiento es mejor, pero este cambio no es abundante, 20 U/mmol más se traducen únicamente en un incremento del 8%, mientras que otras variables no identificadas (posiblemente humedad) pueden tener un efecto de casi 40% (muestra DEE 1142). Resultaría más relevante manipular esta variable no identificada que la cantidad de enzima utilizada.

Por otro lado, el efecto de la proporción enzima/sustrato sobre el nivel de polimerización se muestra en la tabla 7 y figura 21.

Tabla 7: Masas molares de Poli(L)Phe obtenida a diferentes proporciones enzima/sustrato utilizadas para su síntesis.			
Observación	8.3 U/mmol	18.3 U/mmol	28.3 U/mmol
1	11085.32 g/mol	4020.2 g/mol	
2	2106.73 g/mol	5933.67 g/mol	5344.91 g/mol
3	1665.16 g/mol	929.21 g/mol	2106.73 g/mol
Media	4952.40 g/mol	3627.69 g/mol	3725.82 g/mol
Varianza	28258246.1	6376701.09	5242904.86
Desv Est	5315.84858	2525.21308	2289.73904

No fue posible obtener la masa molar de la muestra DEE1741 debido a que, como se muestra en la figura 20 correspondiente a el análisis por resonancia magnética nuclear ^1H -RMN, la señal normalmente encontrada alrededor de 1ppm no se observa, probablemente debido a un error durante la realización del estudio, o alguna singularidad no prevista en donde el polímero perdió su metilo terminal. El análisis se llevó a cabo con los datos disponibles, es decir, utilizando únicamente dos repeticiones.

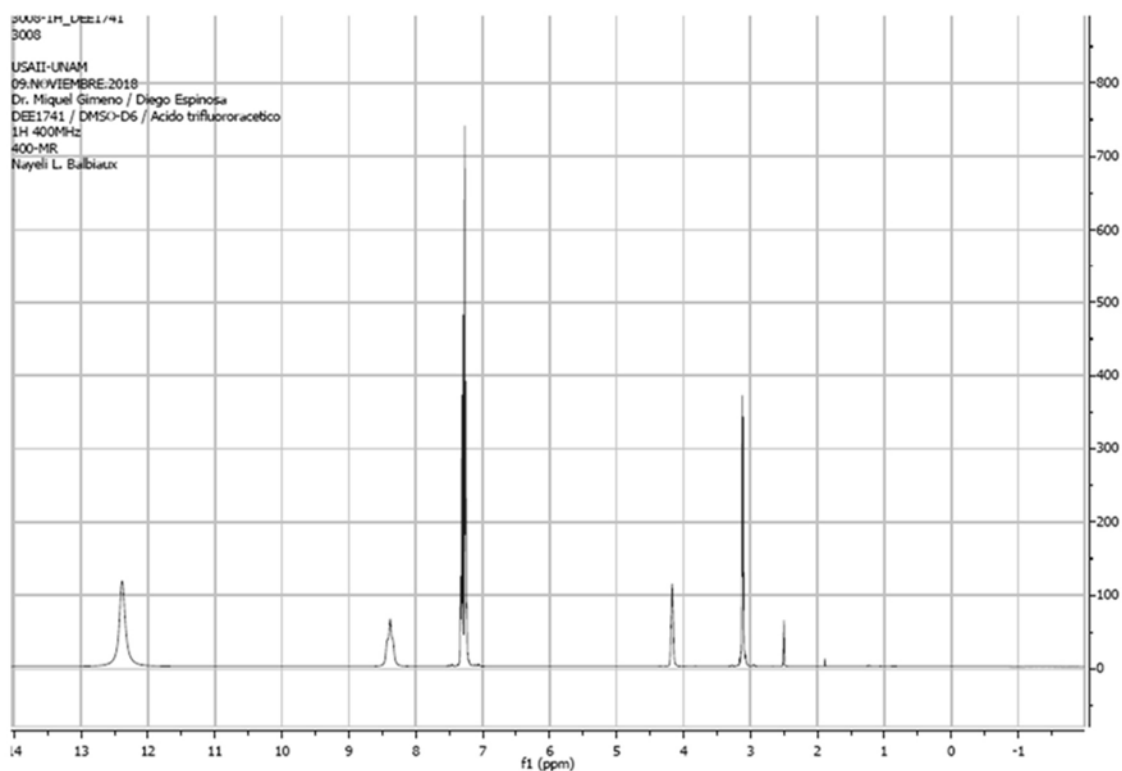


Figura 20: ^1H -RMN de la muestra DEE1741

La gran varianza ya discutida sigue presente también en estos datos. El análisis de varianzas indica con 95% de confianza que no se puede establecer diferencia entre

las condiciones analizadas. Sin tener control de la variable desconocida será imposible determinar el efecto de la proporción enzima sustrato sobre el nivel de polimerización logrado por la reacción.

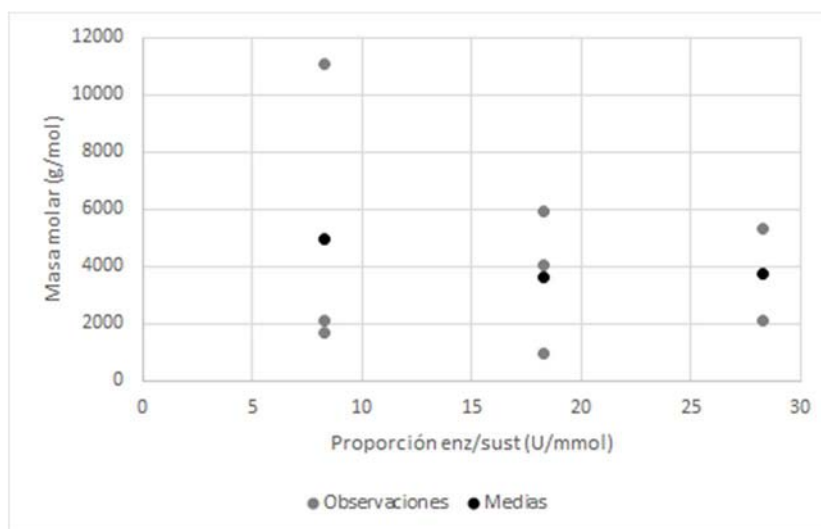


Figura 21: Efecto de la proporción enzima/sustrato utilizado en la síntesis sobre la masa molar del polímero producido

Efecto de la enzima utilizada sobre la síntesis de Poli(L)Phe

Como ya fue establecido anteriormente, el uso de una enzima de mayor pureza como la subtilisina de *Bacillus Licheniformis* representa una gran parte del gasto económico que conlleva la síntesis de Poli(L)Phe. Por esta razón, si se pretende llevar a cabo una reacción de polimerización más económica y rentable, es necesario encontrar diferentes alternativas al uso de la enzima propuesta por Aguirre, I (2018), distribuida por Sigma Aldrich.

La proteasa alcalina bacteriana Enmex (PA CONC 3000) es comercializada como suplemento alimenticio con el objetivo de mejorar la digestión de la proteína consumida. Su composición no es divulgada por la compañía productora pero se conoce que se trata de una proteasa alcalina que no se encuentra pura, contiene otros compuestos solubles que permanecen en la mezcla después de su extracción.

Los resultados correspondientes al efecto del uso de diferentes enzimas sobre el rendimiento general de la reacción se muestran en la tabla 8 y en la figura 22.

Tabla 8: Rendimientos alcanzados en la síntesis de Poli(L)Phe utilizando dos enzimas diferentes		
Observación	Sigma	Enmex
1	58%	63.5%
2	49.4%	67.3%
Media	53.7%	65.4%
Varianza	36.98	7.22
Desv Est	6.08111832	2.68700577

Como se puede apreciar claramente en la figura 22 existe una ligera diferencia en los rendimientos obtenidos durante la polimerización. La enzima Enmex presenta un rendimiento promedio de 65.4% que representa una ventaja mayor al 10% sobre los resultados obtenidos utilizando la enzima Sigma Aldrich.

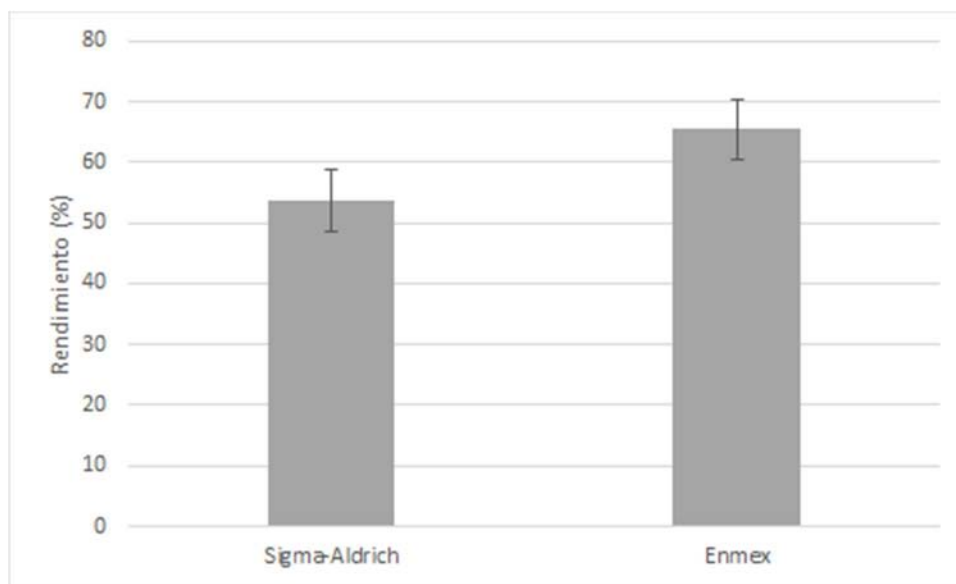


Figura 22: Rendimientos alcanzados en la síntesis de Poli(L)Phe utilizando dos enzimas diferentes

Esta mejora puede deberse probablemente a que la enzima Enmex tiene una mayor afinidad sobre los monómeros y poliaminoácidos de (L)Phe, por lo que produce una cantidad mayor del compuesto. También es posible que la impureza de esta enzima trabaje a su favor si es que la mezcla cuenta con más de una enzima y, de esta manera, la sinergia entre dos o más proteasas promuevan la reacción.

Por otro lado, el efecto de las diferentes enzimas sobre el nivel de polimerización alcanzado en la reacción de síntesis de poli(L)Phe se puede observar en la tabla 9 y en la figura 25. Estos datos fueron obtenidos a partir de resultados de RMN como

los presentados en las figuras 23 y 24, presentados como ejemplo de la gran diferencia de área bajo las curvas de las señales.

Tabla 9: Masas molares alcanzadas en la síntesis de Poli(L)Phe utilizando dos enzimas diferentes		
Observación	Sigma	Enmex
1	1665.16 g/mol	22124.57 g/mol
2	1370.78 g/mol	21388.62 g/mol
Media	1517.97 g/mol	21756.595 g/mol
Varianza	43329.7922	270811.201
Desv Est	208.158094	520.395236

El análisis de varianzas muestra contundentemente que existe diferencia estadísticamente significativa entre los resultados logrados por la enzima Sigma Aldrich y la enzima Enmex. Mientras que el efecto sobre el rendimiento es ligeramente mayor al utilizar la enzima Enmex, los polímeros obtenidos por esta son de mucho mayor tamaño, específicamente 14.3 veces más grandes.

Es importante recordar que los productos utilizados son muy diferentes, mientras que la enzima de Sigma Aldrich busca proporcionar la enzima más pura posible con el fin de tener menor variación estandarizando así los procedimientos experimentales; la enzima distribuida por Enmex busca ofrecer un producto lo más funcional posible que, en este caso, significa un producto capaz de hidrolizar grandes cadenas proteicas de manera más eficiente.

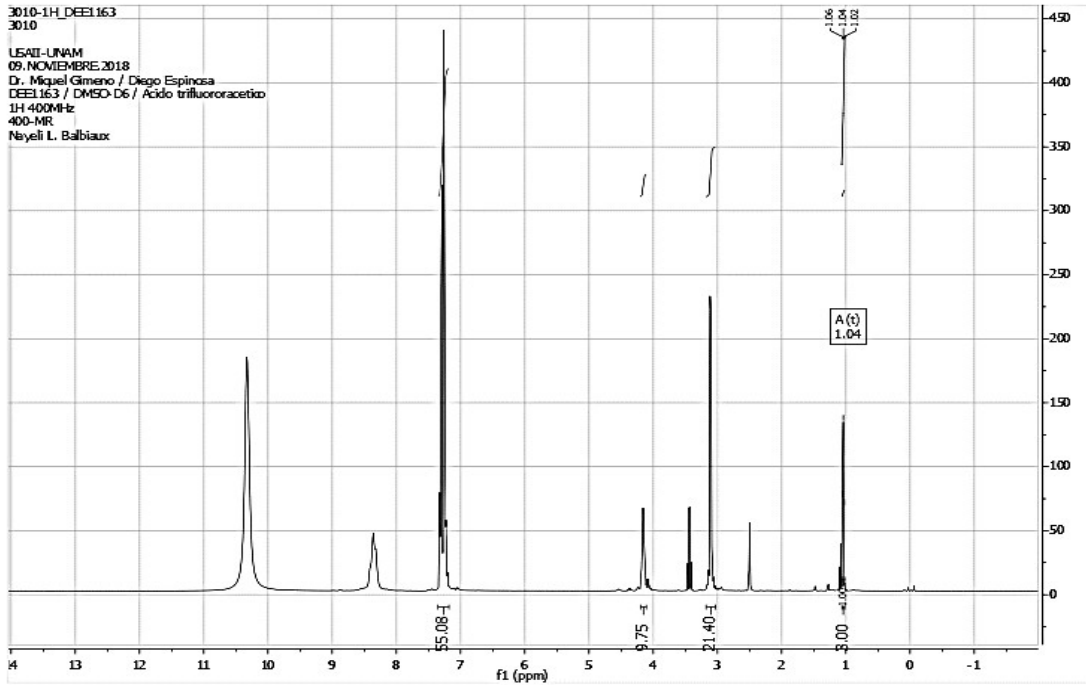


Figura 23: ^1H -RMN de la muestra DEE1163. Proteasa Sigma-Aldrich

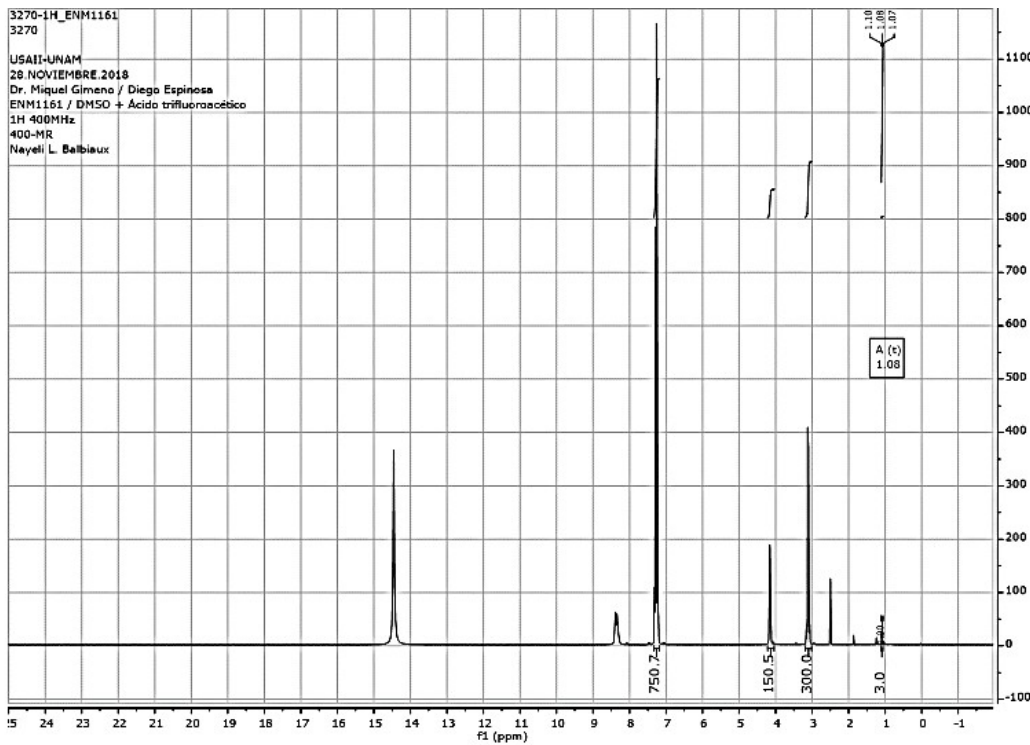


Figura 24: ^1H -RMN de la muestra ENM1161. Proteasa ENMEX

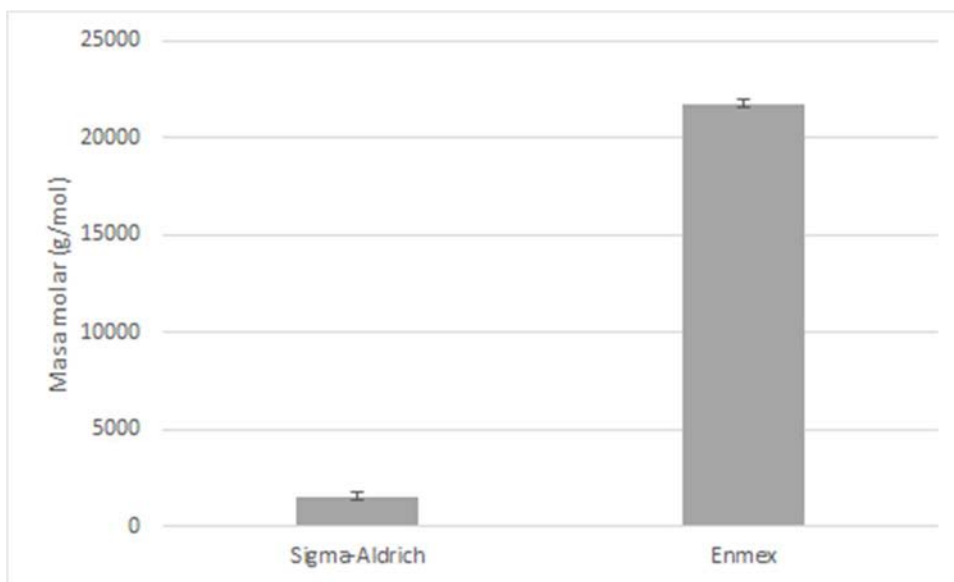


Figura 25: Masas molares de Poli(L)Phe sintetizado utilizando dos enzimas diferentes

Esto significa que el producto probablemente está diseñado de tal forma que se tenga gran especificidad y preferencia por polímeros largos. Al invertir el sentido de la reacción bajo las condiciones correctas, tal y como se ha hecho en el procedimiento experimental, esa especificidad se traduce en la producción de polímeros de gran tamaño.

Conclusiones

Se logró exitosamente la síntesis de Poli(L)Phe comprobando la reproducibilidad de los resultados obtenidos por Aguirre (2018). El polímero obtenido presentó una temperatura promedio de descomposición de 255.3°C y una temperatura de fusión promedio de 139.5°C. El compuesto no parece presentar estructuras secundarias tales como α -hélice o láminas- β .

Los resultados muestran una tendencia a obtener un mayor rendimiento de reacción y polímeros de mayor masa molecular cuando la síntesis se realiza a temperaturas cercanas a 60°C, sin embargo las repeticiones realizadas no permiten llegar a una conclusión estadísticamente significativa que determine una temperatura ideal a la cual sea conveniente llevar a cabo la reacción.

El uso de una proporción mayor de enzima/sustrato tiene como consecuencia un rendimiento ligeramente mayor. El uso de 28.3 U/mmol representó un incremento del 8% en el rendimiento de reacción sobre el uso de 8.3 U/mmol. La mejora es pequeña tomando en cuenta el alto costo de utilizar mayor cantidad de enzima por lo que si se busca reducir costos, utilizar menor cantidad de enzima es una opción viable ya que su efecto sobre el rendimiento será mínimo.

Por otro lado, el efecto de la proporción enzima/sustrato sobre la masa molar de los polímeros obtenidos es incierta, se requiere mayor experimentación en condiciones más controladas para poder determinarlo con seguridad. Probablemente exista otra variable que no fue tomada en cuenta durante la experimentación la cual fue el origen de las grandes variaciones entre los resultados. Esta variable aparenta

depender de cuestiones ambientales, por lo que se sospecha de la humedad dentro del reactor.

La descomposición a altas temperaturas del monómero utilizado imposibilita llevar a cabo la reacción de síntesis en R-134a supercrítico desde un inicio. Se hipotetiza que llevar a cabo una síntesis incrementando gradualmente la temperatura permitiría sintetizar Poli(L)Phe a las condiciones necesarias para alcanzar el estado supercrítico.

La polimerización mediante el uso de la enzima PA CONC 3000 distribuida por Enmex presenta un rendimiento 12% mayor al alcanzado mediante el uso de la subtilisina de *Bacillus Licheniformis* pura distribuida por Sigma Aldrich. La enzima Enmex también da como producto un polímero con masa molar 14.3 veces mayor a los obtenidos mediante el uso de la Enzima de Sigma Aldrich.

Perspectivas

Desarrollar una metodología que permita obtener un producto más puro, aplicando un método de separación adecuado el cual lleve a muestras con menos impurezas, facilitando así el análisis de éstas con el fin de poder observar resultados más confiables y de los cuales se pueda llegar a mejores conclusiones

Realizar un diseño experimental que permita dilucidar el mecanismo mediante el cual el polímero obtenido es estabilizado en medio acuoso.

Determinar el efecto de la presencia de agua sobre la síntesis de Poli(L)Phe con el fin de determinar si esta es responsable de las grandes dispersiones obtenidas. En caso de no ser así es necesario encontrar la variable que afecta en tales magnitudes los resultados de rendimiento y nivel de polimerización.

Repetir los experimentos necesarios para estudiar el efecto de la temperatura de reacción y la proporción enzima/sustrato sobre el rendimiento y nivel de polimerización, esta vez teniendo un mayor control sobre todas las variables.

Utilizar la enzima PA CONC 3000 (distribuida por Enmex) en la síntesis de poliaminoácidos diferentes teniendo como objetivo evaluar la ventaja que representa su uso en la producción de otros polímeros.

Con el fin de estudiar los efectos y posibles beneficios de la polimerización en R-134a supercrítico se propone realizar la síntesis no a una temperatura constante a lo largo de toda la reacción, sino a una temperatura variable, empezando por 40°C en donde se asegura la estabilidad tanto del monómero como de la enzima y

también se propicia la polimerización espontánea, como podemos observar en la tabla 3 (muestra C041), aunque con bajo rendimiento.

Una vez formados polímeros pequeños se propone incrementar paulatinamente la temperatura, aumentando así la actividad de la enzima hasta llegar a las condiciones supercríticas en donde se podría evaluar el efecto de éstas sobre la reacción sin que la temperatura descomponga las moléculas de L-Phe-OEt ya que, para este punto, no estarían presentes como monómero, sino como pequeños polímeros los cuales, según se observa en la Tabla 3, incluso con únicamente 6 repeticiones son ya resistentes hasta 270°C.

Se hipotetiza que utilizando este método de síntesis con un incremento paulatino de la temperatura de reacción se puede incrementar el rendimiento y el nivel de polimerización, además de que se obtendría un producto de mayor pureza al no dejar atrás L-Phe-OEt sin reaccionar, este no generaría las impurezas cuya presencia dificultan el análisis de los resultados.

Bibliografía

Aguirre, I. S., Montiel, C., Bustos-Jaimes, I., Medina-Gonzalez, Y., Tecante, A., & Gimeno, M. (2018). Chemoenzymatic synthesis of polypeptides in neat 1,1,1,2-tetrafluoroethane solvent. *Royal Society of Chemistry Advances*, 8(63), 35936-35945.

Bodanszky, M. (1984). Alkyl esters of amino acids. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 23(1), 111-111.

Bonduelle, C. (2018). Secondary structures of synthetic polypeptide polymers. *Polymer Chemistry*, 9(13), 1517-1529.

Cupp-Enyard, C. (2008). Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate. *Journal of Visualized Experiments*, (19), 1-3.

dos Santos, P., Meireles, M. A. A., & Martínez, J. (2017). Production of isoamyl acetate by enzymatic reactions in batch and packed bed reactors with supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, 127, 71-80.

Hammond, M. Karel, A.M. Klibanov, V.J. Krukonis Enzymatic reactions in supercritical gases. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 11 (1985), pp. 393-400

James, J. (2017). Thermomechanical analysis and its applications. *Thermal and rheological measurement techniques for nanomaterials characterization* (pp. 159-171)

Knez, Ž. (2018). Enzymatic reactions in subcritical and supercritical fluids. *Journal of Supercritical Fluids*, 134, 133-140.

Lee, V. (1990). *Peptide and protein drug delivery*. Marcel Dekker. Estados Unidos. Pág 256.

Löwik, D. W. P. M., Leunissen, E. H. P., Van Den Heuvel, M., Hansen, M. B., & Van Hest, J. C. M. (2010). Stimulus responsive peptide based materials. *Chemical Society Reviews*, 39(9), 3394-3412.

Madras, G., Kolluru, C., & Kumar, R. (2004). Synthesis of biodiesel in supercritical fluids. *Fuel*, 83(14-15 SPEC. ISS.), 2029-2033.

Mota-Babiloni, A., Navarro-Esbrí, J., Pascual-Miralles, V., Barragán-Cervera, Á., & Maiorino, A. (2019). Experimental influence of an internal heat exchanger (IHx) using R513A and R134a in a vapor compression system. *Applied Thermal Engineering*, 147, 482-491.

Nakamura, K., Chi, Y. M., Yamada, Y., & Yano, T. (1986). Lipase activity and stability in supercritical carbon dioxide. *Chemical Engineering Communications*, 45(1-6), 207-212.

Neidhart, D.J., Petsko; G.A. (1988). The refined crystal structure of subtilisin Carlsberg at 2.5 Å resolution. *Protein Eng.*2(4):271-6.

Palocci, C., Falconi, M., Chronopoulou, L., & Cernia, E. (2008). Lipase-catalyzed regioselective acylation of tritylglycosides in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 45(1), 88-93.

Primožič, M., Habulin, M., & Knez, Z. (2003). Parameter optimization for the enzymatic hydrolysis of sunflower oil in high-pressure reactors. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(7), 643-646.

Randolph, T. W., Blanch, H. W., & Prausnitz, J. M. (1988). Enzyme-catalyzed oxidation of cholesterol in supercritical carbon dioxide. *AIChE Journal*, 34(8), 1354-1360.

Ranjbar, B., & Gill, P. (2009). Circular dichroism techniques: Biomolecular and nanostructural analyses- A review. *Chemical Biology and Drug Design*, 74(2), 101-120.

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.

Turner, C., King, J. W., & Mathiasson, L. (2001). On-line supercritical fluid extraction/enzymatic hydrolysis of vitamin A esters: A new simplified approach for the determination of vitamins A and E in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 553-558.

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.