



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE POLI-ALFA-L-LISINA EN EL MEDIO
1,1,1,2-TETRAFLUOROETANO EN ESTADO LÍQUIDO**

TESIS

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

PRESENTA

ESPINOZA GONZÁLEZ JORGE ÁNGEL



Ciudad Universitaria, CD. MX.

2022



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: Profesor: BARZANA GARCIA EDUARDO

VOCAL: Profesor: LEON CEDEÑO FERNANDO

SECRETARIO: Profesor: GIMENO SECO MIQUEL

1er. SUPLENTE: Profesor: GAVILANES RUIZ MARINA

2° SUPLENTE: Profesor: MONTIEL PACHECO CARMINA

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

MIQUEL GIMENO SECO

ESPINOZA GONZÁLEZ JORGE ÁNGEL

Agradecimientos

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

Tabla de contenido	
Resumen	5
Introducción.....	6
Antecedentes.....	8
Métodos de síntesis	9
Reacción con proteasas para polimerización	14
Uso de grupos protectores.....	15
1,1,1,2 Tetrafluoroetano como medio de reacción	18
Hipótesis.....	19
Objetivo general.....	19
Objetivos particulares	19
Metodología.....	20
Actividad enzimática.....	21
Desalinización	21
Prueba de solubilidad.....	22
Síntesis enzimática	22
Desprotección	23
Caracterización	23
Resultados y discusión	24
Desalinización de Aminoácidos.....	24
Pruebas de solubilidad.....	25
Duplicado de reacción.....	25
Control sin enzima	27
Resultados RMN-H1	27
Resultados RMN-C13.....	29
Resultados FT-IR(ATR).....	30
Conclusiones.....	33
Perspectivas.....	34
Bibliografía	35

Resumen

La síntesis enzimática de polipéptidos ofrece una alternativa verde a los métodos convencionales de síntesis como Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) ya que estas usan de reactivo tóxicos, condiciones de reacción duras (presiones y temperaturas altas), subproductos tóxicos, o procesos de purificación costosos.

Usando una proteasa como Subtilisina Carlsberg, estando en un medio de reacción hidrofóbico no convencional 1, 1, 1, 2-tetrafluoroetano (R-134) comprimido y que no daña la capa de ozono permite polimerizar esteres de aminoácido de lisina unida a el protector hidrofóbico Cbz, usando condiciones de reacción de moderadas a leves (presión de 25 bares).

Los productos fueron analizados por RMN- H^1 y RMN- C^{13} para confirmar su estructura correcta de poli- α -L-Lisina protegida se logró identificar las bandas del grupo protector Cbz. También fueron analizados por FT-IR(ATR) para confirmar los anillos aromáticos del protector Cbz y los enlaces amida del enlace peptidico. Posteriormente se planteó eliminar con una reacción de desprotección con HBr el grupo de protección para obtener poli- α -L-Lisina desprotegida.

Introducción

Los antibióticos son un tipo de medicamentos utilizados para prevenir y tratar infecciones bacterianas. La resistencia a los antibióticos se produce cuando las bacterias mutan y se vuelven capaces de resistir los efectos de estos fármacos. La resistencia a los antibióticos ha generado un especial interés en desarrollar nuevas alternativas para combatir patógenos que aumentan la morbilidad y mortalidad de la población.

La síntesis de polipéptidos polares que sean biocompatibles y con una función antimicrobiana (lo que los hace adecuados para combatir a estas bacterias multirresistentes) son de alto interés y se han desarrollado distintas técnicas para obtenerlos como: Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) o hidrolizados proteicos; el inconveniente de estas técnicas es el uso de reactivos tóxicos, condiciones de reacción duras (presiones y temperaturas altas), subproductos tóxicos, o procesos de purificación costosos.

Una alternativa a estas técnicas para síntesis de péptidos podría ser el uso de proteasas, y aunque se les conoce por su facilidad para hidrolizar proteínas, esta técnica también se puede utilizar en la dirección inversa, lo que facilita la síntesis de péptidos. La síntesis enzimática ofrece un método flexible, que emplea condiciones de reacción suaves, con ausencia de racemización y haciendo uso de los principios de la química verde.

Los reportes de síntesis de polipéptidos por vía enzimática usan disoluciones acuosas tamponadas. Sin embargo, la reacción de hidrólisis en medio acuoso limita la elongación de cadena de polipéptidos, aumentando los productos de bajo peso molecular u oligopéptidos. Con el fin de ampliar la aplicabilidad de las enzimas, se han desarrollado algunas alternativas. En particular, el uso de procesos en medios no acuosos (medio tipo GRAS) puede propiciar ventajas en la síntesis de materiales poliméricos.

Además, la ausencia de trazas de residuos tóxicos, como el grupo Fmoc, que se usa en SPPS, creemos puede tener un potencial biomédico considerable, así investigando las propiedades de los polipéptidos sintetizados por la variación sistemática de sus cadenas laterales y formar estructuras con actividad farmacológica.

Antecedentes

Los 20 aminoácidos “estándares” que forman a las proteínas, todos ellos coinciden en tener en su estructura un grupo carboxílico (-COOH) y un grupo amino (-NH₂) unido al mismo átomo de carbono, denominado carbono α, al cual también está unido un hidrógeno y una cadena lateral (R); es esta cadena lateral la cual les diferencia y confiere propiedades químicas específicas a cada aminoácido.

Los aminoácidos forman cadenas para formar proteínas funcionales, lo consiguen a partir de una reacción de condensación (formación de un enlace con eliminación de una molécula de agua). El enlace resultante (peptídico) CO-NH, es un enlace amida, también llamado enlace peptídico, las estructuras formadas por dos, tres, unos pocos (3-10) y muchas unidades de aminoácidos se conocen respectivamente, como dipéptidos, tripéptidos, conocidos como oligopéptidos, y los polipéptidos cuando se tienen pesos moleculares superiores. (Lodish, 2008)

Las proteínas al desempeñar funciones en las células de todo ser vivo desde la parte estructural de la célula, hasta funciones metabólicas y reguladoras en la misma, se han convertido en una fuente de interés científico, y con el afán de comprenderlas mejor se desarrollaron técnicas para sintetizar péptidos en el laboratorio, y aunque son menos complejos que las proteínas, poseen características que los hacen de importancia en el área biomédica e industrial.

Métodos de síntesis

La síntesis de polipéptidos *in vivo* se realiza una vez sintetizado los mRNA durante la traducción que es la conversión de la secuencia de nucleótidos del RNA en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido, donde participan los distintos RNA (mensajeros, ribosómicos, y de transferencia). Los primeros polipéptidos que se sintetizaron por métodos químicos estaban compuestos sólo por un tipo de aminoácidos y por lo tanto se les conocía como homopolímeros u homopolipéptidos.

Estos sirvieron como compuestos para modelos valiosos y abrieron la puerta a nuevas formas de aplicación y síntesis. La primera síntesis química de un polipéptido con actividad biológica fue la de la hormona oxitocina que es un nonapéptido (formado por 9 aminoácidos), realizada por Vincent de Vigneaud por lo que se le otorgo el premio nobel en 1955 (Voet, 2007).

En la actualidad, los métodos de síntesis de péptidos usados con mayor frecuencia son predominantemente de naturaleza química, un ejemplo de estos es la *síntesis peptídica en fase sólida (SPPS)* desarrollada por Bruce Merrifield (1962), generalmente se llevan a cabo a través de una secuencia de tres pasos.

- a) Primero, todas las funcionalidades de los reactivos, que no deben participar en la reacción, deben protegerse selectivamente, Ej. Grupo Fmoc que es utilizado para proteger el extremo N-terminal.
- b) Luego, el grupo carboxilo debe activarse en un segundo paso para permitir la formación del enlace peptídico.
- c) Finalmente, los grupos protectores deben eliminarse en su totalidad, si la síntesis es completa, o el extremo amino o carboxilo terminal debe liberarse selectivamente si la síntesis va a continuar.

Para esta metodología es necesario un proceso riguroso que implica protecciones y desprotecciones. Dos de los principales problemas asociados con la síntesis química de péptidos son el peligro de racemización, particularmente durante el paso de activación, y un riguroso paso de purificación. (Gutte, 1995)

El uso de enzimas a nivel investigación en síntesis de péptidos ha sido reportada recientemente (Kullman, 1987)

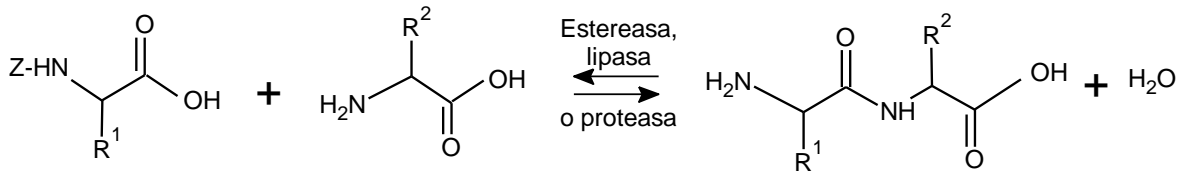
Tabla 1. Comparación de procesos químico y enzimático para sintetizar péptidos.

	<i>QUÍMICO</i>	<i>ENZIMÁTICO</i>
<i>Estereoselectividad</i>	Baja	Alta
<i>Rango de aminoácidos</i>	Ancho	Limitado
<i>Requisitos del grupo de protección</i>	Alto	Moderado
<i>Subproductos</i>	Algunos (Tóxicos)	Insignificantes
<i>Peligro de racemización</i>	Algunos	Ninguno
<i>Condiciones de la reacción</i>	Muy altas	Moderadas-Normales

Se pueden usar proteasas que su función sea corte de péptidos para catalizar la reacción inversa (condensación), siempre que el mecanismo proceda a través de un intermedio de acil-enzima covalente, generalmente involucrando un nucleófilo Ser-OH o Cys-SH.

Dado que muchas hidrolasas de éster carboxílico (esterasas, lipasas) también forman un intermedio de acil-enzima, igualmente se pueden emplear. (Yazawa, 2016)

Hidrólisis inversa (Control termodinámico)



Aminólisis de ésteres (Control cinético)

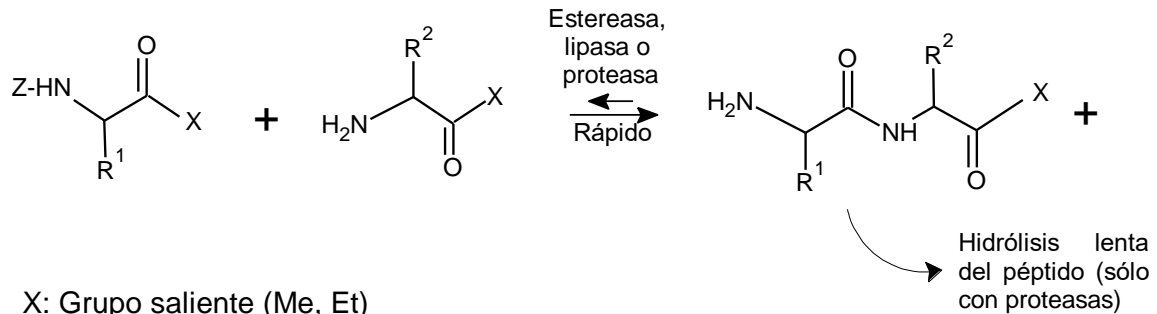


Figura 1. Síntesis enzimática de péptidos por proteasas y carboxil éster hidrolasas

Control termodinámico

Como la reacción es reversible, esta se puede controlar termodinámicamente. En condiciones fisiológicas, el equilibrio en las reacciones catalizadas por proteasas se favorece hacia el lado de la proteólisis. Para hacer que la dirección cambie hacia la síntesis de péptidos, se pueden aplicar ciertas limitaciones en el proceso:

- Uno de los reactivos se usa en exceso.
- Disminuir el agua disponible del sistema mediante la adición de co-disolventes orgánicos miscibles en agua o sales.
- El uso de disolventes orgánicos puros inmiscibles en agua está limitado por la baja solubilidad de los reactivos en estos sistemas lipofílicos.

Control cinético

La aminólisis de ésteres, implica una reacción irreversible controlada cinéticamente, en la que un nucleófilo débil y uno fuerte (agua y una amina) compiten por el intermedio acil-enzima. Como se mencionó anteriormente, esta reacción puede considerarse irreversible.

El péptido formado durante la aminólisis del éster puede ser cortado hidrolíticamente por proteasas en una reacción posterior (lenta) en presencia de agua; estas reacciones deben terminarse antes de que se alcance el equilibrio (fig. 2). Por supuesto, la hidrólisis de péptidos puede desprejarse cuando se utilizan hidrolasas no proteolíticas, tales como esterases y lipasas.

En general, los ésteres de L-aminoácidos de origen natural (N-protegidos) de alcoholes de cadena corta, como los ésteres metílicos y etílicos, suelen ser suficientemente reactivos como "aceptores" para lograr una rapidez de reacción razonable en la síntesis de péptidos enzimáticos mediante aminólisis.

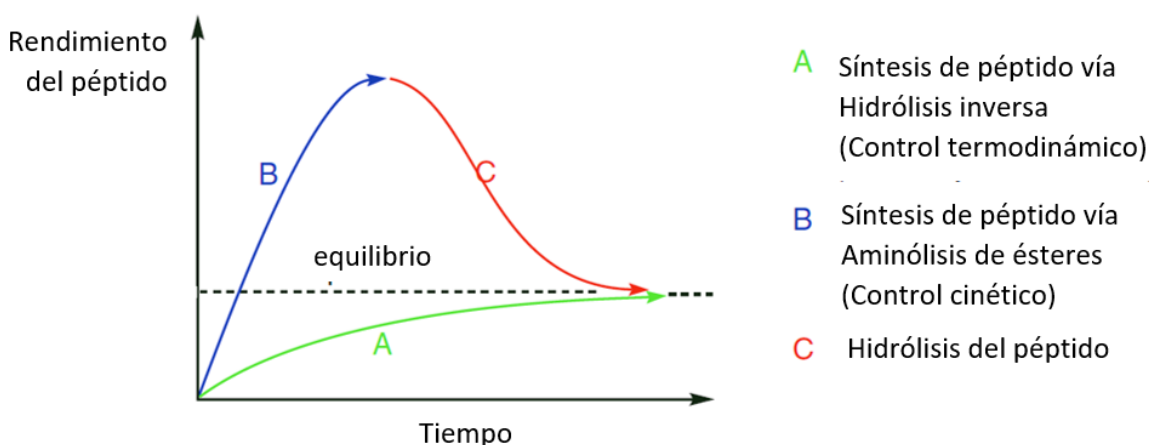


Figura 2. Síntesis enzimática de péptidos bajo control termodinámico y cinético.

Cada enzima tiene cierta selectividad por su sustrato, y se tiene la necesidad de cubrir la síntesis enzimática de péptidos aplicable a todas las posibles combinaciones de aminoácidos. Aunque la biblioteca existente de proteasas no está específicamente completa para cada aminoácido, nos proporciona una buena cobertura para trabajar (Tabla 2). Es importante destacar la "escasez" de una enzima dirigida a los derivados de la prolina.

Tabla 2. Selectividad de Proteasas

PROTEASA	TIPO	ESPECIFICIDAD
Proteasa <i>achromobacter</i>	Serín-Proteasa	-Lys-X
α -quimotripsina, subtilisina		-Trp(Tyr,Phe,Leu,Met)-X
Elastasa		-Ala(Ser,Met,Phe)-X
Tripsina, proteasa <i>Streptomyces griseus</i>		-Arg(Lys)-X
Proteasa <i>Staphylococcus aureus</i> V8		-Glu(Asp)-X
Papaina, ficina	Cisnteín-Proteasa	-Phe(Val,Leu)-X
Catepsina B		-Arg-X
Catepsina C		X-Phe(Tyr,Arg)-X
Termolisina, proteasa <i>B. subtilis</i>	Metaloprotasa	-Phe(Gly,Leu)-Leu(Phe)
Proteasa ii <i>myxobacter</i>		X-Lys
Pepsina, catepsina D	Carboxil-proteasa	-Phe(Tyr,Leu)- Trp(Phe,Tyr)

X: Resíduo de aminoácidos o péptido no especificado.

Proteasa para reacciones de polimerización

Las subtilisinas, también conocida como alcalasas, son serina endoproteasa extracelulares derivan de la especie bacteriana de la que fue aislada, *Bacillus subtilis*. La estrategia de condensación de fragmentos catalizados por subtilisina se estableció en un disolvente orgánico puro usando fragmentos peptídicos con múltiples grupos protectores de la cadena lateral. (Yazawa, 2016) También se han utilizado otras proteasas para síntesis de polipéptidos (en fase acuosa) como: papaína, bromelina, tripsina y lipasas.

Como la síntesis bajo control cinético depende de un éster C-terminal levemente activado (o amida), acilando rápidamente una serina o cisteína proteasa. El intermediario enzima-acilo formado sufre una desacilación competitiva limitada por la rapidez de ataque del agua y de un nucleófilo (otro aminoácido) para dar la acumulación temporal del producto formado por la consiguiente hidrólisis debido al ataque del agua. Debido a este mecanismo de reacción, el rendimiento del producto depende de la diferente rapidez del ataque del agua y del nucleófilo al complejo enzima-acilo y de la degradación del producto por la misma proteasa en presencia del agua, debido a esto las propiedades de la misma enzima y la concentración del nucleófilo, son de vital importancia. (Yagasaki, 2008)

Químicamente, la aminólisis de ésteres de aminoácidos implica el ataque nucleofílico de la amina de un aminoácido al carbonilo del éster de otro sustrato dando como producto un dipéptido y un alcohol. La hidrólisis implica el ataque de la molécula de agua dando como producto ya sea aminoácidos libres o el acortamiento de un polipéptido formado a oligopéptidos. En la figura 3 se muestra un esquema general del mecanismo en el caso de la reacción enzimática.

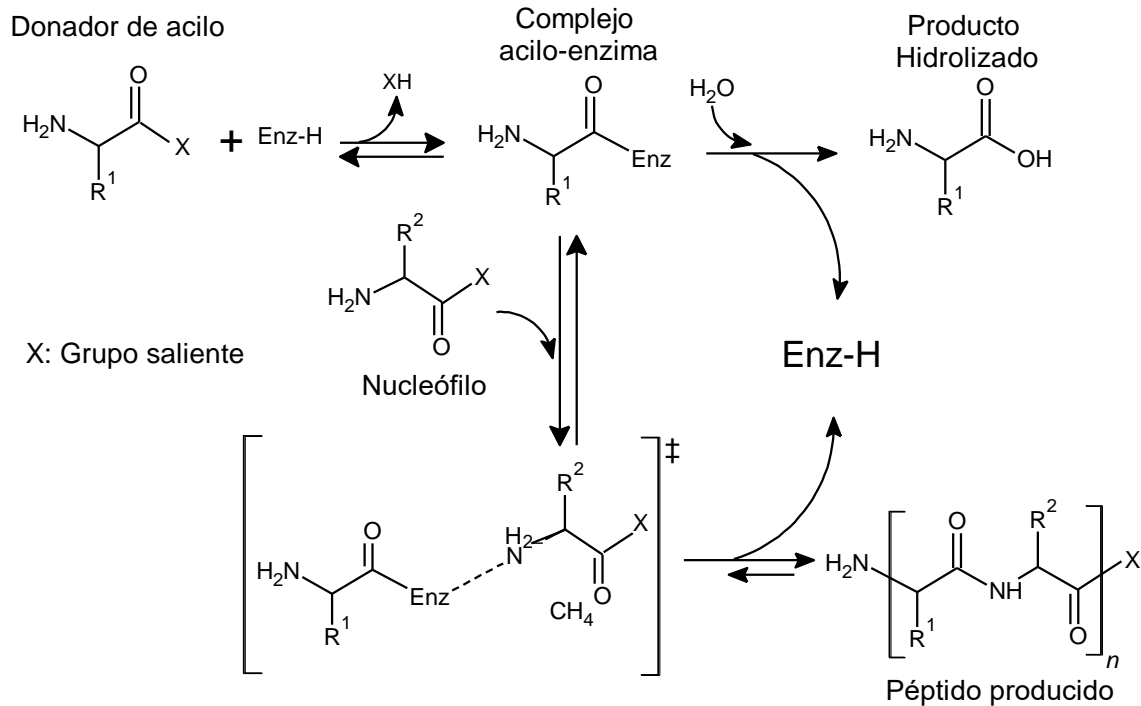


Figura 3. Rutas de la reacción de hidrolisis o síntesis enzimática de péptidos.

Uso de grupos protectores

Uno de los principales estrategias en la síntesis de péptidos es la protección de los grupos funcionales laterales de los aminoácidos, éstos deben protegerse para evitar la formación de un enlace peptídico no deseado en algunas ocasiones como en el caso de la Lisina (Lys) por tener un amino terminal en posición ϵ . Estos deben ser químicamente estables en las condiciones en las que se da la síntesis peptídica, y ser fácilmente removibles en condiciones suaves que no alteren la formación del enlace peptídico al final o en fases intermediarias de la síntesis. (Navarrete, 2007)

Carboxibencilo

También asignado con la abreviatura Cbz, este método de protección fue el desarrollado por Zervas en 1932. Se basa en la acilación de una amina con cloruro de Carbobenzoxilo para dar una amida (Figura 4).

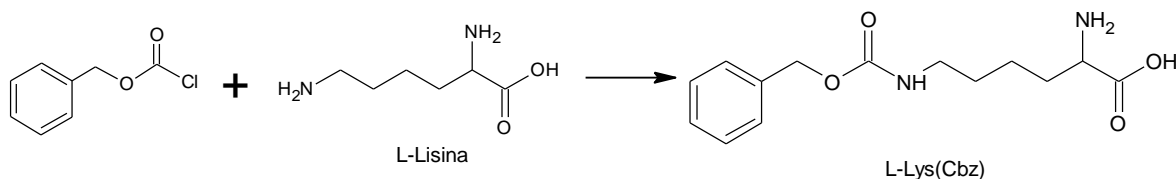


Figura 4. Reacción de acilación para obtener un aminoácido protegido, tomando a la ϵ -lisina como ejemplo.

Estas amidas, a diferencia de las amidas comunes, pueden degradarse por métodos que dejan intacto el enlace peptídico. La ruptura puede darse por hidrogenación catalítica o por hidrólisis con HBr en ácido acético frío. (Merrifield,1997)

Uso de disolventes

El agua es un disolvente poco usado para casi todas las reacciones de síntesis en la química orgánica preparativa porque la mayoría de los compuestos orgánicos son poco solubles en este medio. Además, la eliminación de agua es tediosa y costosa debido a su alto punto de ebullición y alto calor de vaporización. Las reacciones secundarias como la hidrólisis, la racemización, la polimerización y la descomposición a menudo se facilitan en presencia de agua.

En el caso de los biocatalizadores, la cantidad de agua necesaria para retener la actividad catalítica depende de la enzima (Bell, 1995). Por ejemplo, la α -quimotripsina necesita solo 50 moléculas de agua por molécula de proteína para permanecer catalíticamente activa (Zaks, 1986), que es mucho menos de lo que se necesita para formar una monocapa de agua alrededor de la enzima. Otras enzimas, como la

subtilisina y varias lipasas, son similares en su necesidad de concentraciones bajas de agua (Zaks, 1988). En otros casos, sin embargo, se requiere una concentración alta.

Las transformaciones biocatalíticas realizadas en medios orgánicos ofrecen las siguientes ventajas:

- a) Dado que un medio orgánico es un ambiente hostil ya que implica someter a las células vivas a un reactivo tóxico, la contaminación microbiana es insignificante. Esto es particularmente importante para las reacciones a escala industrial, donde mantener la esterilidad puede ser un problema grave.
- b) Dado que muchas de las reacciones responsables de la desnaturalización de las enzimas son reacciones hidrolíticas y, por lo tanto, requieren agua, se puede esperar que las enzimas sean más estables en un entorno hidrofóbico de bajo contenido de agua (Aldercreutz, 1987)
- c) Sin embargo, la ventaja más importante es la posibilidad de cambiar los equilibrios termodinámicos para favorecer la síntesis sobre la hidrólisis. Por lo tanto, al usar enzimas hidrolasas (principalmente lipasas y proteasas), los ésteres (Koshiro, 1985), los poliésteres (Morrow, 1990) las lactonas (Gutman, 1989) las amidas y los péptidos (Kullman, 1987) pueden sintetizarse en una forma quimio, regio y enantioselectiva.
- d) Al tener un sistema donde la única agua presente proviene de la propia enzima y no del medio, esta toma únicamente al nucleófilo y sintetiza un polipéptido, evitando así que las moléculas de agua en el medio no lleven a cabo procesos de hidrólisis del producto.

1,1,1,2 Tetrafluoroetano como medio de reacción

En lugar de disolventes orgánicos volátiles y tóxicos se pueden usar fluidos comprimidos inocuos como el dióxido de carbono en estado líquido supercrítico, algunos hidrofluorocarbonos no tóxicos, entre otros, que tienen propiedades de solubilidad similares a las de un disolvente convencional, o se pueden utilizar como co-disolventes para la transformación enzimática de compuestos orgánicos. (Nakamura, 1990).

Las ventajas más importantes de este tipo de disolventes son la falta de toxicidad, la fácil eliminación y la baja viscosidad, intermedia entre las de los gases y las de los líquidos. Esta última propiedad asegura una alta difusión, siendo aproximadamente de uno a dos órdenes de magnitud más alta que en los disolventes comunes. Además, pequeñas variaciones de temperatura o presión pueden producir grandes cambios de solubilidad cerca del punto crítico en el caso de CO₂, lo que permite controlar las propiedades catalíticas de una enzima, como la rapidez de reacción.

Además, algunos hidrofluorocarbonos orgánicos también son útiles para prevenir la hidrólisis del complejo proteasa-acilo, debido a las cantidades reducidas de agua incluidas en la reacción. (Yazawa, 2016). Uno de estos medios es el 1,1,1,2-Tetrafluoroetano (R134a) en estado líquido. Este medio es mucho más polar que el CO₂, similar al THF o cloroformo, y dio un buen resultado en la polimerización un homopolímero de L-Fenilalanina, además de no ser tóxico y no dañar la capa de ozono. (Aguirre, 2018). Cabe decir que esta reacción no es posible con CO₂ debido a la baja solubilidad de sustratos en este disolvente.

Hipótesis

El uso de la proteasa Subtilisina Carlsberg polimerizará la L-lisina-OMe utilizando 1,1,1,2-tetrafluoroetano comprimido como medio de reacción, en una ruta de dos etapas que incluye un paso de desprotección del grupo N-Cbz

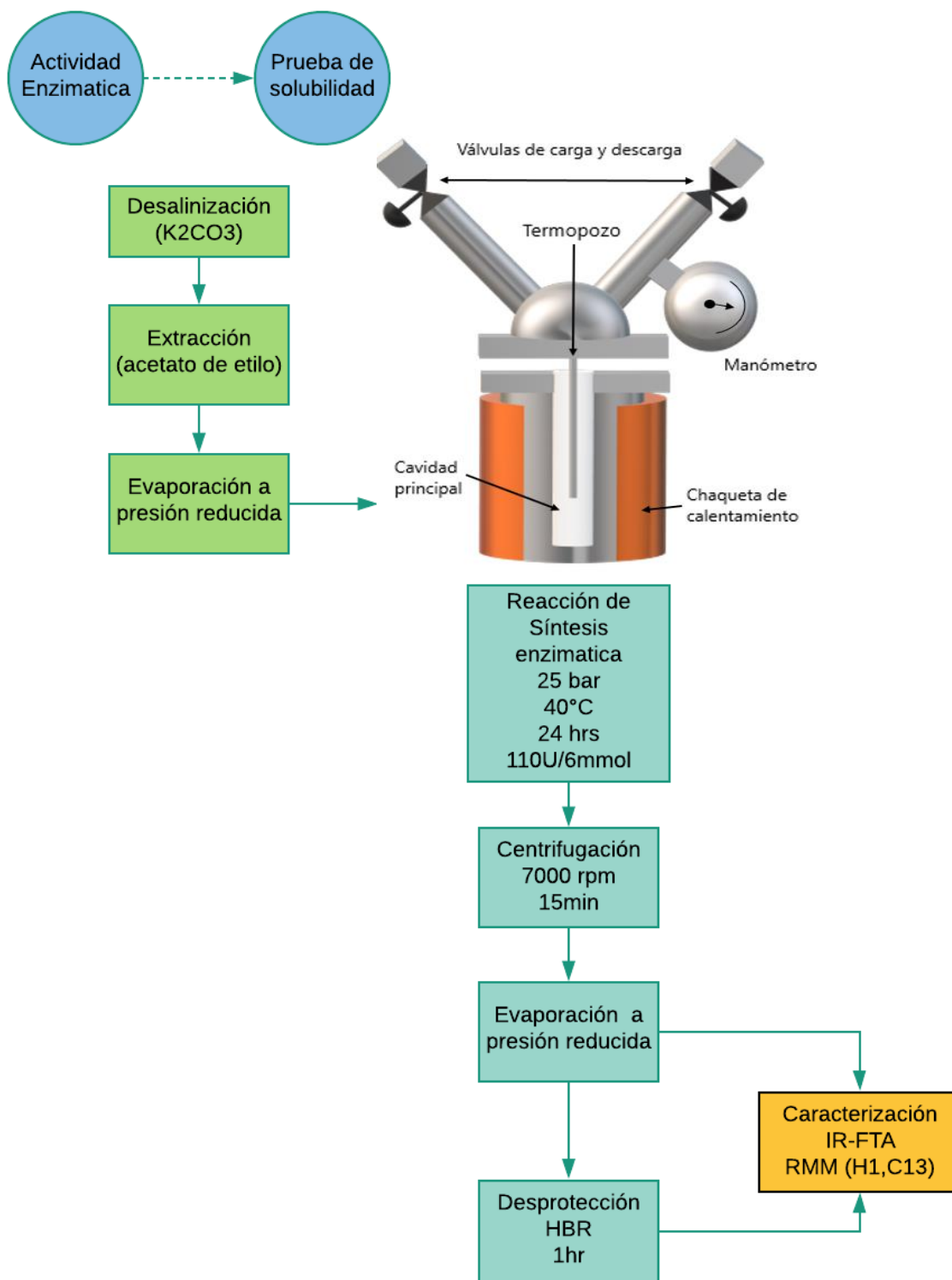
Objetivo general

Determinar una ruta de síntesis enzimática adecuada en medio no acuoso para producir un polipéptido de L-Lisina-OMe.

Objetivos particulares

- Identificar si el monómero es soluble en el medio de reacción.
- Establecer una ruta de polimerización enzimática adecuada para el clorhidrato L-Lys(Z)-OMe.
- Estudiar la estructura del polipéptido sintetizado.
- Establecer la ruta de desprotección del grupo CBz del producto.

Metodología



Actividad enzimática

Se utilizó la enzima Subtilisina Carlsberg o Subtilisina A de *Bacillus subtilis*, con un peso molecular de 27 KDa, la medición de la actividad enzimática de la proteasa se realizó con un método espectrofotométrico al principio del proyecto, tomando a caseína como sustrato como sigue:

Se realizó por triplicado, donde se incubó 1mL de la enzima (0.047 mg/mL) y 5 mL de caseína (0.65% m/v) 10 min en baño maría a 37°C. Después se adicionaron 5 mL de Ac. Tricloroacético (110mM) para detener la reacción de hidrólisis precipitando la proteína; se dejó reposar 30 min y se centrifugó 9000 rpm/10 min para retirar la proteína precipitada. En un tubo Falcon se adicionaron 2 mL de este sobrenadante, 5mL Na₂CO₃, 1 mL de Reactivo de Folin & Ciocalteu's se deja reaccionar 30 min y se leyó la absorbancia a 660 nm, se realizó un blanco donde se adiciona primero el Ác. Tricloroacético y después la enzima. Los resultados se compararon con una curva patrón de tirosina (1.1mM). En este método una unidad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que produce un µg de tirosina en 1 min. (Sigma Aldrich, 1999)

Desalinización

La desalinización del clorhidrato el monómero sustrato se realizó modificando la metodología del trabajo de Bodansky (1994), se usaron 5.5 mL de carbonato de potasio (3.9 M) y 11 mL con una concentración de 21.4 %m/v del hidrato del monómero H-Lys(Z)-OMe con agitación vigorosa durante una hora; el producto se aisló por medio de una extracción líquido-líquido con acetato de etilo y se recuperó el producto con una evaporación a presión reducida.

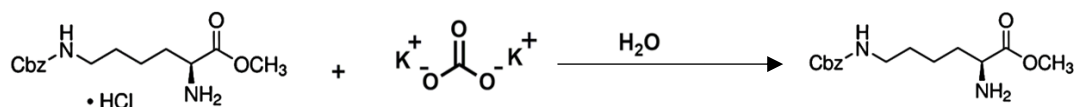


Figura 5. Desalinización de clorhidrato de L-Lys(Z)-OMe

Prueba de solubilidad

Se realizó una prueba de solubilidad al principio del proyecto del monómero desalinizado en el medio de reacción R134a, se utilizó un reactor con mirillas de cuarzo capaces de soportar la presión y permitiendo observar al interior. Se desalinizó previamente el monómero y se colocó en la cámara con mirillas junto con un agitador, se cerró y se colocó a condiciones de reacción (40 °C y 25 bar de presión), visualmente se confirmó la solubilidad en el medio.

Síntesis enzimática

Para obtener el polímero deseado se siguió la metodología propuesta por Aguirre (Aguirre, I. 2018) en el reactor de alta presión se colocó dentro un agitador de cruz, y la proporción del monómero desalinizado y de enzima con las cuales se reportó para la síntesis de cadenas largas de Poli-Fenilalanina (110U/6mmol de monómero). Se prosiguió a cerrar el reactor como se muestra la Figura 5 y llenarlo de R134a a través de la válvula con ayuda de la bomba de aguja (260D high-pressure Teledyne Isco syringe pump) se calentó la celda con una chaqueta de calentamiento hasta llegar a los 40 °C medidos con termopares, hasta tener una presión de 25 bares, se mantuvo la reacción durante 24 h con agitación.

Después del tiempo de reacción se aumentó la temperatura a 110 °C por 15 min para detener la reacción, se enfrió el reactor (5 °C aprox.) y se liberó lentamente la presión, se hizo un lavado con acetato de etilo para recuperar el producto, se centrifugó a 7000 rpm por 20 min el sobrenadante se recuperó y se secó con un extractor de disolventes a presión reducida acoplado a una bomba de disolventes. Se realizó por duplicado de los cuales se mandaron a caracterizar por RMN-H¹ para observar que eran iguales, además de un control sin enzima.

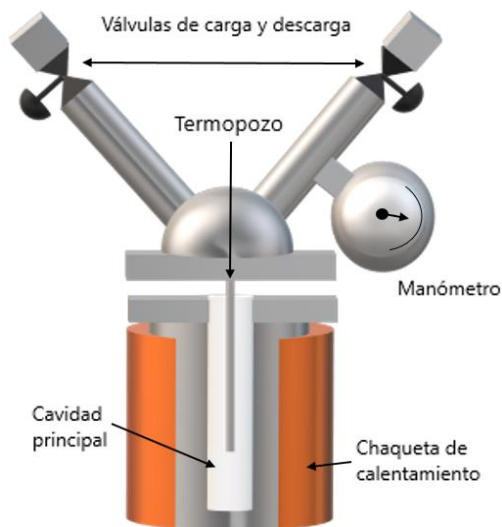


Figura 6. Diagrama del reactor de alta presión utilizado Aguirre (2018)

Desprotección

Se siguió la metodología propuesta por Seyhan (2004) eliminando el grupo benciloxicarbonilo (CBz) utilizando ácido bromhídrico 33% en presencia de ácido acético anhídrido, se mantuvo la reacción 2 h a temperatura ambiente. Se hizo precipitar adicionando un exceso de éter etílico, el sólido fue recuperado con centrifugación y posteriormente secado a vacío.

Caracterización

Resonancia Magnética Nuclear.

De una dimensión fue realizada en un espectrómetro Varian MR-400 (400MHz); en una disolución de las muestras secas en dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆)/ácido trifluoroacético deuterado (TFA-d) (9.25:0.75), a una concentración de 20 mg/mL. Los datos fueron analizados por MestReNova, versión 12.0.2 (Mestrelab Reseach S.L., www.mestrelab.com, 2018)

Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier.

Para determinar los grupos funcionales presentes en los productos de reacción, se analizaron las muestras secas por FT-IR(ATR). Los resultados fueron obtenidos en un equipo Perkin-Elmer Spectrum 400.

Resultados y discusión

Los resultados de la actividad enzimática residual se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Actividad enzimática de Subtilisina Carlsberg.

Absorbancia (660nm)	Concentración (μM)	U/mg enzima
0.438	0.320	3.74
0.444	0.302	3.47
0.433	0.294	3.44
Promedio		3.55

Este promedio de la actividad de la enzima se relacionó con los mmol de monómero para que en el reactor tuviera una actividad de 110U/6mmol de monómero, esta actividad fue la establecida por Aguirre (2018) donde se obtuvo una cadena de Poli-fenilalanina de mayor longitud.

Desalinización de Aminoácidos

Debido que los esteres de aminoácido están clorhidratados para permitir su solubilidad en agua, se realizó una reacción de desalinización para permitir su solubilidad en el medio de reacción (R-134), después de la evaporación a presión reducida se obtuvo un líquido aceitoso ligeramente amarillo con un rendimiento en masa de 60 %, se verifico la liberación de la sal del compuesto al poner a prueba su solubilidad en el medio 1,1,1,2-Tetrafluoroetano en las condiciones en las que se realizaría el experimento.

Pruebas de solubilidad

La prueba de solubilidad se realizó ya que se debe de asegurar que el sustrato de la enzima sea soluble en el medio de reacción, el grupo protector Cbz le confiere una hidrofobicidad al compuesto por lo que debería ser soluble en el medio de reacción.

Como se muestra en la Figura 7, "a" se muestra el reactor de mirillas después de ser llenado con R134a y se ven "gotas" insolubles de lo que es el monómero, al aumentar la temperatura del reactor a 40 °C que es la temperatura de reacción, el monómero se solubiliza por completo con ayuda de la agitación, se observó una sola fase lo que confirma que el monómero es soluble en el medio de reacción y se prosiguió con la reacción de síntesis en el reactor de alta presión.

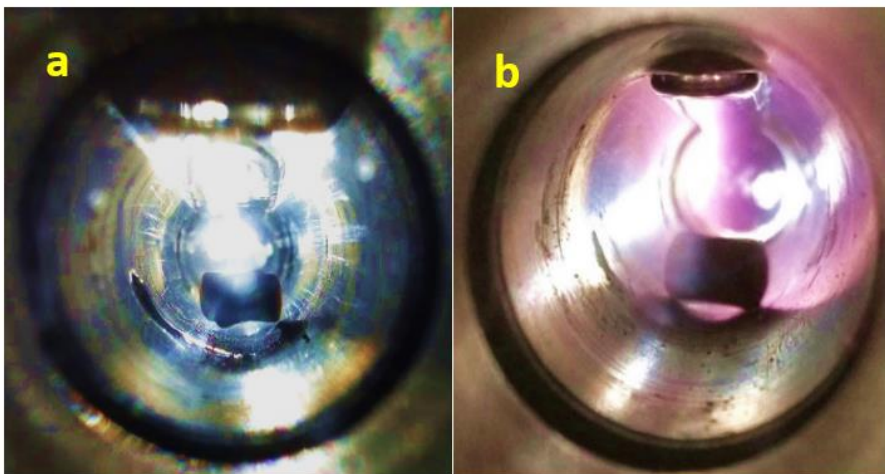


Figura 7. Experimento de solubilidad con Reactor de mirillas, a) Se observa el monómero sin solubilizarse, b) El monómero y el medio de reacción en una sola fase.

Duplicado de reacción

Se obtuvieron dos espectros muy similares por lo que la reacción tiene reproducibilidad, en cuanto al rendimiento se obtuvo se mantuvo constante, de la primera reacción de 430 mg y la segunda 450 mg de producto, hablando de un 44 % de rendimiento.

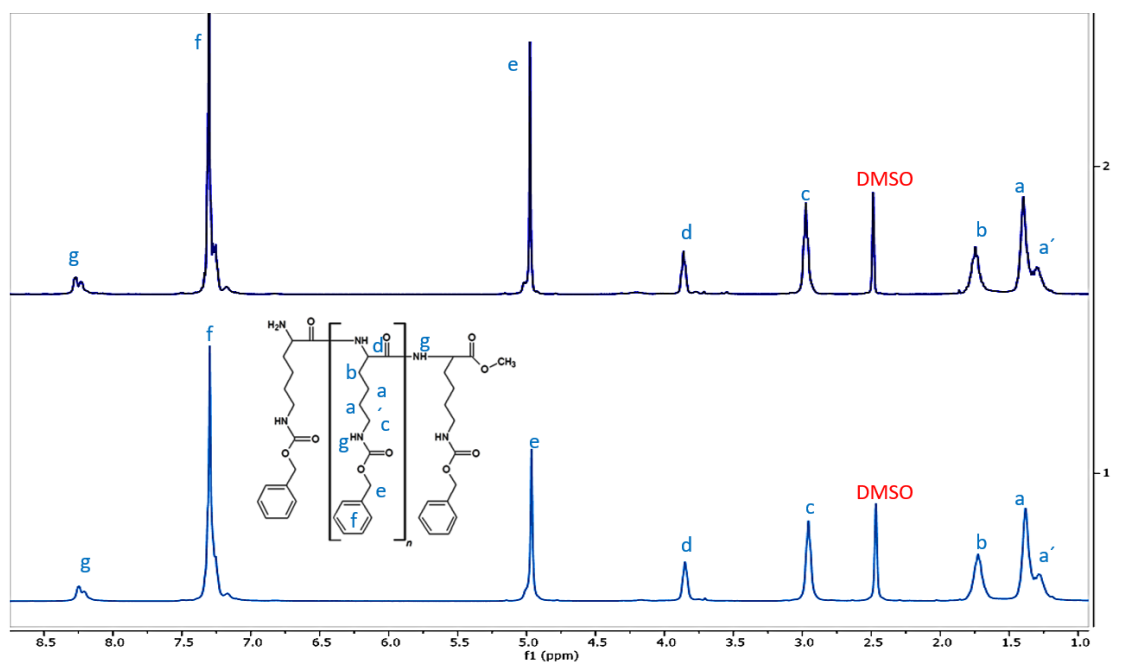


Figura 8. RMN-H¹ de la reproducibilidad de la reacción

En la Figura 9 se muestra el producto que se obtiene después de una reacción de síntesis enzimática normal, un polvo fino de color blanco que queda en todo el reactor después de despresurizarlo. Este polvo blanco es insoluble en agua, se lava con acetato de etilo y se evapora a presión reducida para así obtener nuestro producto seco.

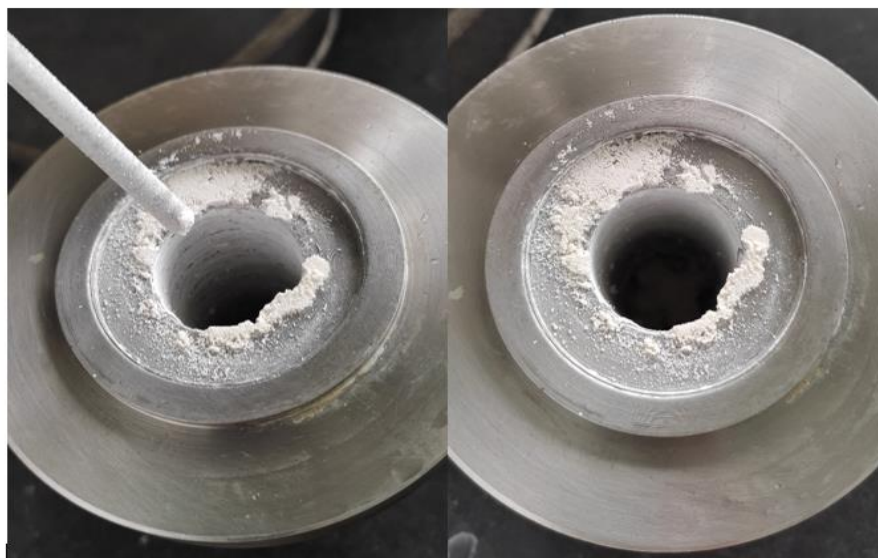


Figura 9. Reactor recién abierto después de la reacción de síntesis enzimática.

Control sin enzima

Se realizó un control dónde no se añadió al reactor la enzima Subtilisina Carlsberg, para comprobar que era su actividad la que lograba la reacción, se procedió a las mismas condiciones, después de despresurizar el reactor no se encontró rastros de un polvo blanco (Fig. 9), Se encontró con un semi-líquido viscoso que era insoluble, se realizaron pruebas de caracterización dónde no aparecían indicios de una polimerización (señales de enlace peptídico) si no que era la estructura del monómero.

Resultados RMN- H^1

Las señales que se presentan en la Figura 8 como parte del grupo protector CBz son las marcadas con las letras "e" y "f" que corresponden al grupo protector carboxibenxilo (Cbz) al metileno y al anillo bencílico respectivamente, descartando las barras de referencia de los disolventes deuterados, D_2O y DMSO, para el monómero y la estructura polimérica respectivamente.

La presencia de la nueva banda en campo alto a 8.25 ppm, marcada como "g" se presenta como el protón acoplado al nitrógeno del grupo amida que pertenece al enlace peptídico por lo que se asemeja a la obtención de una estructura de polipéptidos. Después de la desprotección con HBr/AcOH se tendrá que disminuir o desaparecer la señal "e" en 5 ppm y la señal "f" en 7.4 ppm, se asegura que los enlaces peptídicos son estables en cualquiera de las condiciones empleadas para la eliminación del grupo protector Cbz, por un lado los grupos amino se protegen en forma de carbamato en esa forma no son ni básicos ni nucleofílicos y los grupo carboxilo se protegen en forma de éster metílico o etílico que son relativamente poco reactivos (Seyhan, 2004) si no es así la señal "h" se vería aumentada por la hidrólisis (Figura 10).

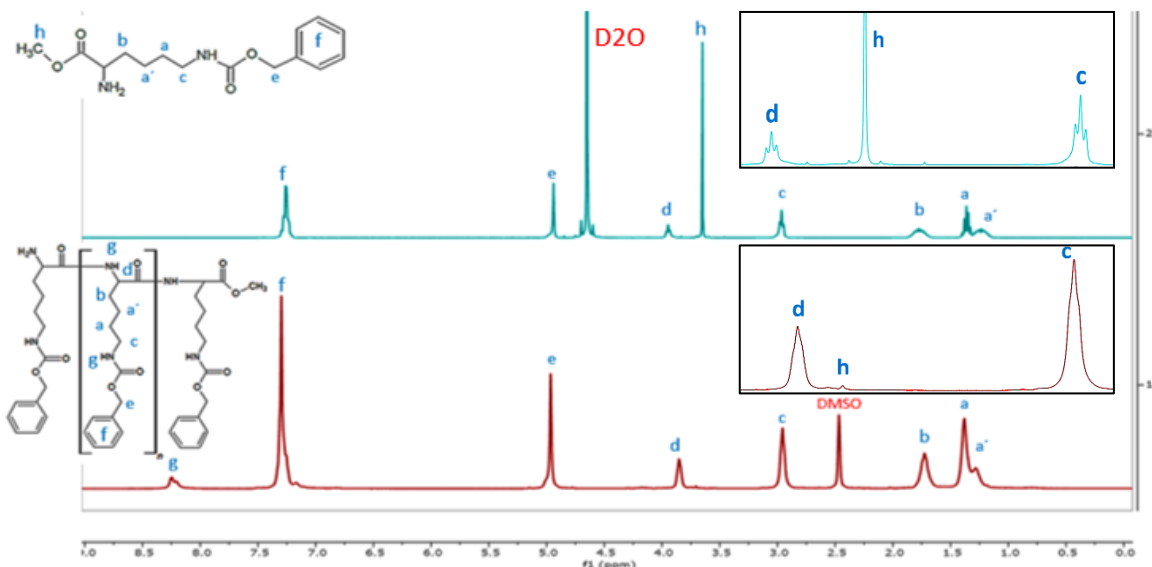


Figura 9. RMN- H^1 en la parte superior se muestra el monómero L-Lys(Z)-OMe y en la inferior el obtenido después de la reacción con un acercamiento desde 2.8 ppm a 4.0 ppm.

La banda marcada como "h" es el metilo terminal del éster del monómero se ve disminuida después de la reacción (Figura 8) comprobando que se ha removido para poder sintetizarse el enlace peptídico disminuyendo la presencia de este metilo terminal y, por lo tanto, disminuyendo su señal en el espectro.

En la Figura 10 se muestra un acercamiento y cómo influye la polimerización en la eliminación del grupo metilo del éster del aminoácido, así mismo se hizo un cálculo aproximado basado en el peso molecular del monómero y la proporción en la que disminuyó la señal de este metileno para calcular el peso molecular del producto final, al hacerlo nos dio un peso molecular aproximado de 20 KDa.

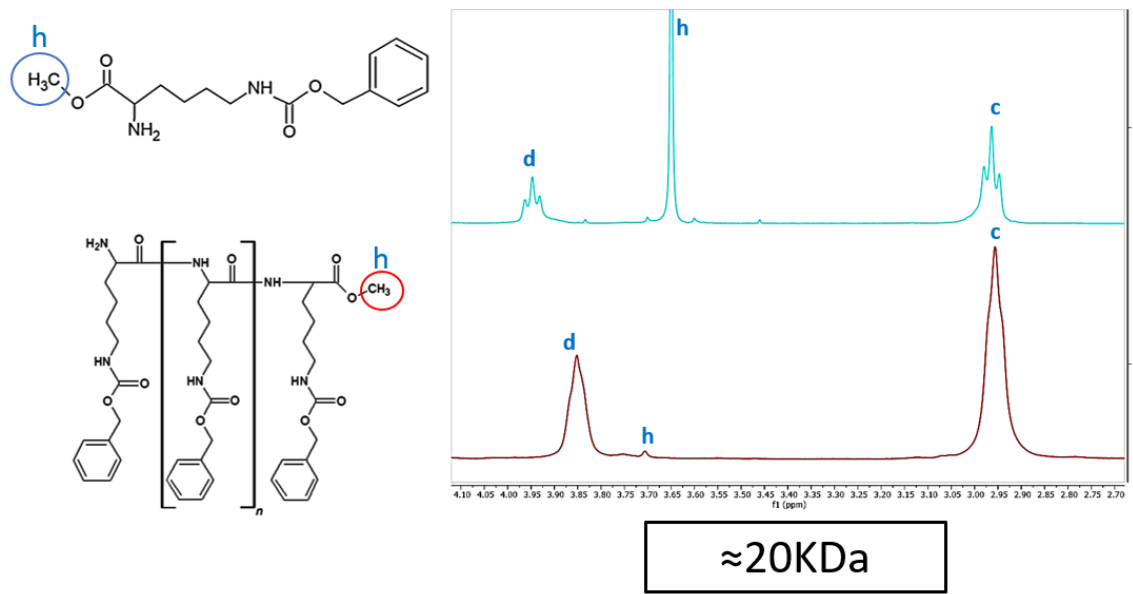


Figura 10. Acercamiento de RMN- H^1 comparando el monómero y polipéptido de L-Lisina protegida.

Resultados RMN- C^{13}

Los resultados de la RMN- C^{13} (Figura 11) arrojan la presencia de los dos carbonilos arriba de 155ppm, la banda marcada con "1" se asigna al aminoácido Lisina y el número "2" perteneciente al grupo protector Cbz, la marca como "a" perteneciente al metilo terminal del monómero que en la estructura polipeptídica se observa una desaparición de esta banda al igual que en el RMN- H^1 , los carbonos intermedios debajo de 70ppm pertenecen a los carbonos de la estructura de Lisina excepto la banda "g" ya que es el metileno conectado al anillo bencílico del grupo protector, los carbonos del anillo bencílico son un triplete en 130 ppm y un singulete en 138ppm son también parte del grupo protector carboxibencilo, las señales de los disolventes deuterados de referencia, DMSO- d_6 y TFA- d aparecen en 40ppm y con dos cuatripletos en 116 ppm y 160 ppm, respectivamente.

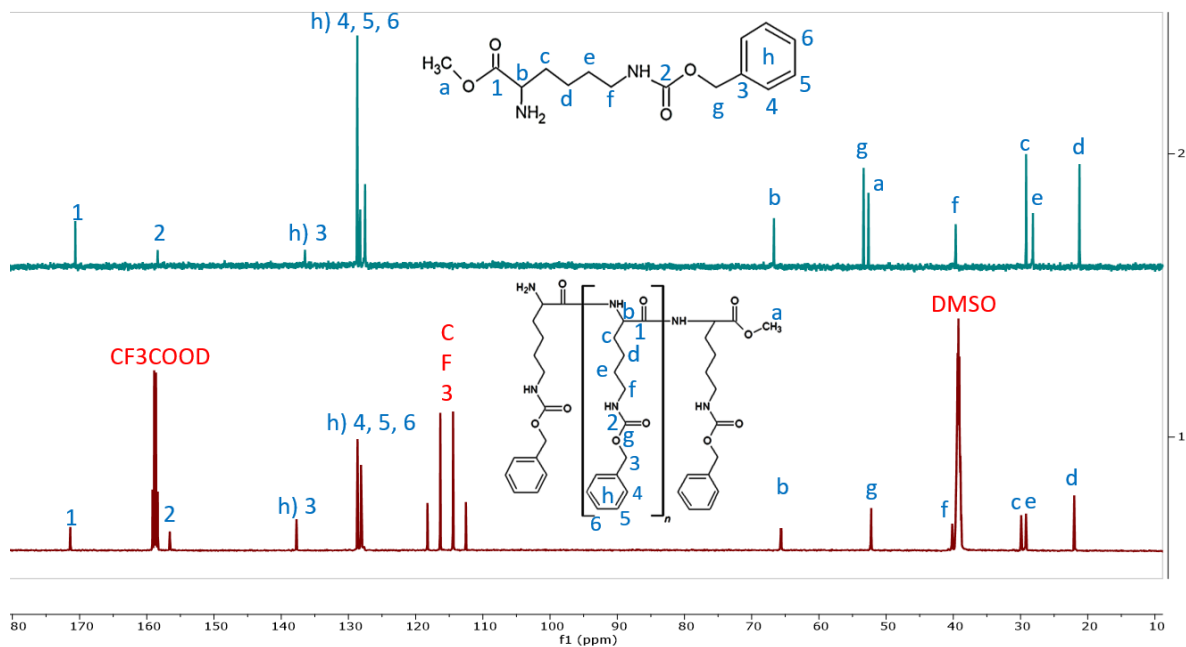


Figura 11. RMN-C¹³ en la parte superior se muestra el monómero L-Lys(Z)-OMe y en la inferior el obtenido después de la reacción.

Resultados FT-IR(ATR)

Se realizó una comparación del monómero protegido L-Lys(Z)-OMe con el aminoácido natural L-lisina para poder localizar los grupos funcionales agregados y la diferencia estructural que se esperaba en el polipéptido (Figura 12), con intensidad media en 3350 cm⁻¹ se observa el estiramiento del grupo amida propio del monómero al estar este grupo en la unión del aminoácido con el grupo protector, se observa una gran banda ancha por parte del aminoácido L-lisina por el grupo -OH, esa banda cubre la región de los 2800-3000 cm⁻¹ donde se ven los metilos y metilenos, la banda en 2100 cm⁻¹ se puede deber a CO₂ presente al momento de hacer el análisis, en 1600-1800 cm⁻¹ se aprecia los grupos carbonilos de los compuesto, como ya se mencionó el monómero tiene dos carbonilos uno ya presente en la estructura del aminoácido y otro del grupo protector, hay una banda de mayor intensidad en 1250 cm⁻¹ está pertenece al grupo éster del monómero que claramente en el aminoácido natural no existe, por último

una banda de baja intensidad pero con una gran diferencia entre ambos espectros en la ubicada en 750 cm^{-1} pertenece a los estiramientos del anillo bencílico del grupo protector del monómero.

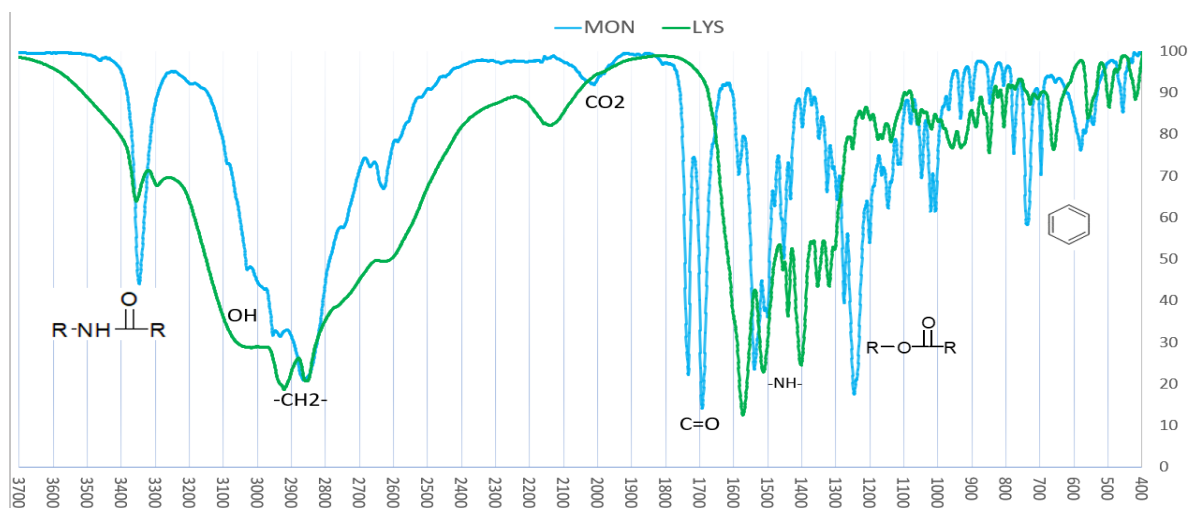


Figura 12. Espectro infrarrojo obtenido de color azul se muestra el monómero L-Lys(Z)-OMe y de color verde una muestra de L-lisina.

Como se muestra en la Figura 13, la comparación del monómero y del polipéptido, se sigue apreciando la banda de 3350 cm^{-1} del grupo amida, el área de $2400\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ se ve más definida y se aprecia lo que puede ser $\text{-CH}_2\text{-}$ y -CH_3 con una diferencia en intensidad entre el polímero que tiene una menor intensidad, en 1700 cm^{-1} se observa un sólo carbonilo por parte del polipéptido ya que ambos están haciendo una señal de amida, anteriormente había dos señales una por cada uno de los grupos carbonilos correspondiente al enlace amida y otro corresponde al grupo éster, al estar estructurados en un polipéptido ambos dan la banda de amidas.

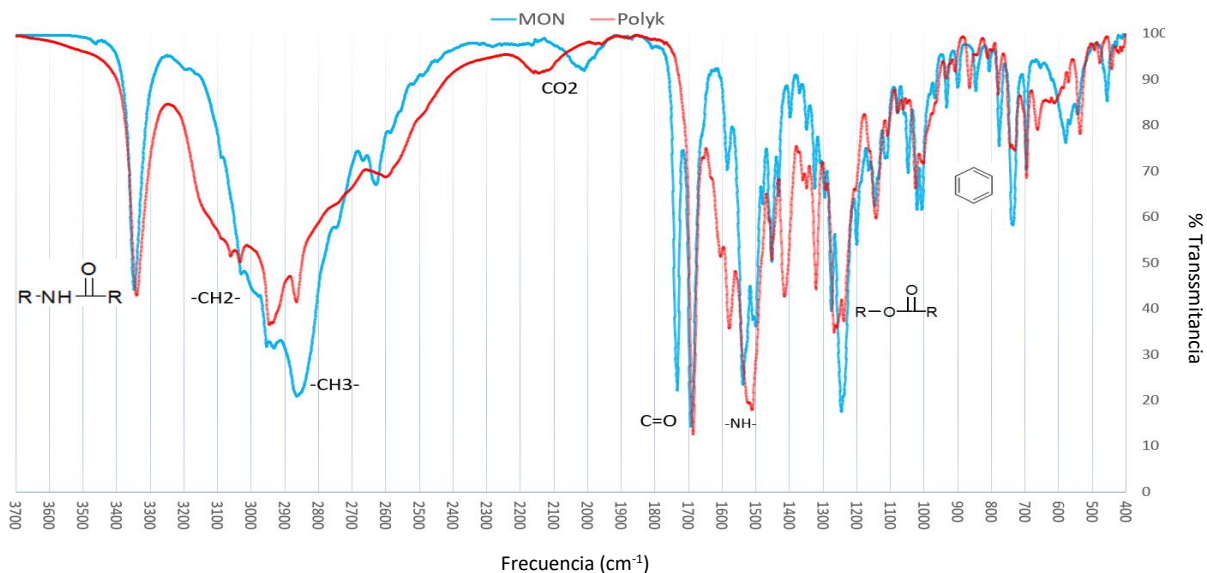


Figura 12. Espectro infrarrojo obtenido de color azul se muestra el monómero L-Lys(Z)-OMe y de color rojo el obtenido después de la reacción.

Después de la reacción de desprotección (Figura 14) a comparación del producto protegido se ve una disminución en la banda del bencilo característica principal del grupo de protección, a 3500 cm⁻¹ se muestra un aumento de aquella banda que puede representar el aumento de aminas (-NH₂) resultado de la desprotección, a comparación con la L-lisina (Figura 12) la banda de 3500 cm⁻¹ no es producto de un -OH y similarmente tiene la banda de carbonilo desplazada, puede ser dado por la vibración N-H presentes de la amina a 1640-1560 cm⁻¹.

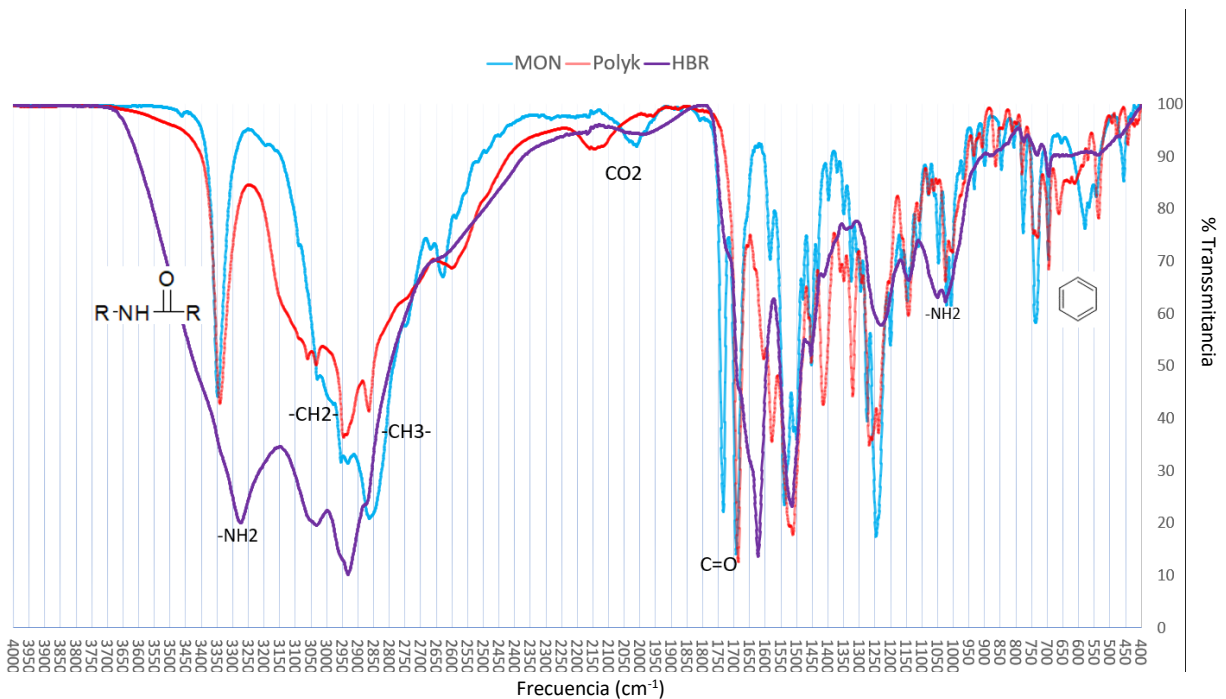


Figura 14. Espectro infrarrojo obtenido de color azul se muestra el monómero L-Lys(Z)-OMe, de rojo el polipéptido protegido obtenido y de color morado el resultado después de la reacción de desprotección.

Conclusiones

Se logró trazar una ruta de polimerización enzimática capaz de reproducir la síntesis de un polipéptido de poli- α -L-Lisina a partir de un monómero con un grupo protector en la amina ϵ en el medio de reacción R-143 líquido. Se estudió la estructura del polipéptido producido por la enzima Subtilisina Carlsberg a través de técnicas espectroscópicas, donde se localizaron las bandas pertenecientes al enlace amida de producción de un polipéptido y del grupo de protección carboxibencilo (Cbz), después de una reacción de desprotección con HBr, se logró apreciar disminución de bandas pertenecientes al grupo protector y al aumento de bandas pertenecientes a grupos amina como resultado.

Perspectivas

- Optimizar la reacción de desprotección para tener un mayor rendimiento y caracterizar el producto.
- Probar una distinta ruta de desprotección, como la hidrogenación catalizada con Pd-C.
- La síntesis de un polipéptido con aminoácidos polares como la lisina y no polares como la fenilalanina podría tener actividad antimicrobiana.

Bibliografía

- Curtis, H., 2008. Biología. 7ª Edición. Madrid. Ed. Medica Panamericana, 200-201
- Gutte, B., 1995. Peptides. Synthesis, structures and applications. Zurich. 3-6, 94-100, 114.
- Lodish H., 2008, Molecular Cell Biology. 6ª Edición. Massachusetts 60-63
- Hovgaard, L., 2013. Pharmaceutical Formulation Development of peptides and proteins, 2ª Edición, CRC Press. New York. 1-3.
- Navarrete, L. 2007. Síntesis de péptidos. Disponible en: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/sintesis_de_peptidos.pdf [Último acceso 24 de noviembre del 2019]
- Yazawa, K. Numata, K. 2016. Recent Advances in Chemoenzymatic Peptides Syntheses. Journal Molecules ISSN: 11420-3049
- Aguirre, I. 2018. Chemoenzymatic synthesis of polypeptides in neat 1,1,1,2-tetrafluoroethane solvent. Royal Society of Chemistry Advances, 8(63)
- Brogden, K. 2005. Antimicrobial peptides: Pore Formers or metabolic inhibitors in bacteria? The University of Iowa. USA. Institute for Dental Research
- Mestrelab, 2018. MestReNova. Disponible en: <https://mestrelab.com> [Último acceso 30 de agosto del 2019]
- Seyhan, E., Química Orgánica. Estructura y Reactividad. Tomo 2. Caracas. Ed. Reverté. 1220

- Kullmann W (1987) Enzymatic Peptide Synthesis. CRC, Boca Raton
- Bell G, Halling PJ, Moore BD, Partidge J, Rees DG (1995) Trends Biotechnol.
- Zaks A, Klibanov AM (1986) Journal of the American Chemical Society Soc. 108: 2767
- Zaks A, Klibanov AM (1988) Journal of the American Chemical Society 263: 3194
- Nakamura K (1990) Trends Biotechnol.
- Aldercreutz P, Mattiasson B (1987) Biocatalysis 1: 99
- Koshiro S, Sonomoto K, Tanaka A, Fukui S (1985) J. Biotechnol. 2: 47
- Morrow CJ, Wallace JS (1990) Synthesis of polyesters by lipase-catalysed polycondensation in organic media. In: Abramowicz DA (ed) Biocatalysis. Van Nostrand Reinhold, New York, p 25
- Gutman AL, Bravdo T (1989) J. Organic Chemistry. 54: 4263
- Sigma, A. 1999. Enzymatic assay of protease. USA. Product Information. SSCASE01.001.
- Voet, D., 2007 Fundamental of Biochemistry. 2^a Edición. Madrid. Ed. Medica Panamericana., 77–80, 212-215
- Yagasaki, M. 2008. Synthesis and application of dipeptides; current status and perspectives. Applied Microbiology and biotechnology 81, 13–22.