



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE POLIPÉPTIDOS
Y SU APLICACIÓN BIOMÉDICA.**

TESIS

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

PRESENTA

ANGEL HERNÁNDEZ ALONSO

TUTOR

DR. MIQUEL GIMENO SECO



Ciudad Universitaria, CDMX. 2023



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: BARZANA GARCÍA EDUARDO

VOCAL: FARRES GONZÁLEZ SARABIA AMELIA MARIA DE GUADALUPE

SECRETARIO: GIMENO SECO MIQUEL

1er. SUPLENTE: MONTIEL PACHECO CARMINA

2° SUPLENTE: PEDROZA GARCÍA JOSE ANTONIO

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

ASESOR DEL TEMA:

DR. MIQUEL GIMENO SECO

SUSTENTANTE (S):

ANGEL HERNÁNDEZ ALONSO

Agradecimientos

A la empresa ENMEX S.A. de C.V. quien proveyó el material necesario para la realización de esta tesis.

Al Subprograma 127 Formación Básica de Investigación por interesarme en actividades de investigación y en la realización de un posgrado.

A DGAPA UNAM por el financiamiento a través del proyecto PAPIIT UNAM-DGAPA IN200123

INDICE

ANTECEDENTES.....	5
Polipéptidos.	5
Aplicaciones biomédicas de los polipéptidos.	6
Síntesis de polipéptidos.	9
Proteasas en la síntesis de polipéptidos.	11
Subtilisina de Carlsberg.....	13
Medios no convencionales de reacción.	14
Solventes Orgánicos	15
Líquidos Iónicos.....	15
Disolventes Eutécticos Profundos.....	16
Fluidos comprimidos	17
1,1,1,2-tetrafluoroetano	17
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	19
Hipótesis	19
Objetivo General	19
Objetivos particulares.....	19
MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	20
Materiales.....	20
Metodología.....	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
CONCLUSIONES.....	33
REFERENCIAS.....	34

ANTECEDENTES

Polipéptidos.

La investigación de las propiedades estructurales y funcionales de las proteínas siempre ha sido una prioridad de los bioquímicos. Las proteínas pueden distinguirse según sus pesos moleculares con base en su número de aminoácidos (a veces llamados residuos de aminoácidos) y por la secuencia de éstos. Las proteínas tienen propiedades que son asociadas con su estructura primaria, secundaria y estructuras de mayor orden, por lo tanto, poseen funciones fisiológicas y bioquímicas importantes, su producción se realiza por un proceso biológico que ocurre a nivel celular.

Recientemente ha habido interés en desarrollar rutas sintéticas para la preparación de imitadores de estos polímeros naturales, así como secuencias de polipéptidos totalmente artificiales para aplicaciones en biotecnología, como ingeniería de tejidos, administración de fármacos y como terapéutica. Un polipéptido sintético que imita un biopolímero ofrece la ventaja potencial de estar compuesto de componentes mucho más simples, donde solo se incorporan las características deseadas, lo que facilita la preparación y limita la reactividad secundaria (Deming, 2007).

Los polipéptidos de síntesis son formados mediante una reacción de condensación, un grupo amino de un aminoácido que forma un enlace amida con el grupo carboxílico de otro aminoácido como se muestra en la Figura 1. Los polímeros que consisten en un solo tipo de monómero son llamados homopolímeros y los polímeros que contienen al menos dos tipos de monómeros son llamados copolímeros (Figura 2) Las propiedades de estos polipéptidos son ajustables por el número de unidades de residuos de aminoácidos y su secuencia, teniendo aplicaciones útiles en distintos campos, pero especialmente ámbitos médicos (McKee et al. 2003, Deming et al. 2007, Kobayashi et al. 2019).

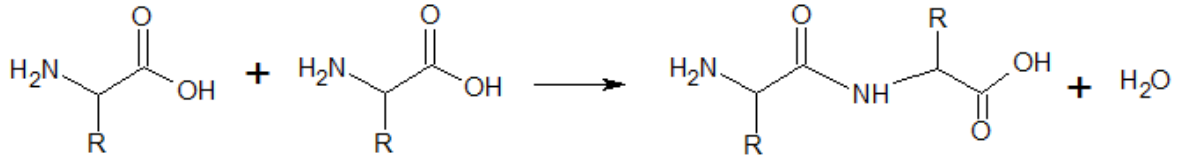


Figura 1. Representación del enlace peptídico entre dos aminoácidos. Elaboración propia.



Homopolipéptido



Copolipéptido

Figura 2. Representación de un homopolipéptido y copolipéptido. Elaboración propia.

Como una clase de materiales con excelente biocompatibilidad, biodegradabilidad, diversidad química y capacidad para adoptar estructuras de mayor orden, los polipéptidos sintéticos son ampliamente reconocidos como uno de los polímeros de imitación biológica más importantes para aplicaciones biomédicas. Tienen gran importancia en el desarrollo de productos de la industria biomédica y de la salud, y tienen un gran potencial de desarrollo. Los métodos de preparación de polipéptidos están en constante desarrollo, satisfaciendo las necesidades de la ciencia y la producción (Song et al. 2017, Feng et al. 2022).

Aplicaciones biomédicas de los polipéptidos.

Estos materiales sintéticos imitan a un biopolímero, lo cual ofrece la ventaja de estar compuesto por componentes mucho más simples, donde solo se incorporan las características deseadas, que derivan de las propiedades de secuencias controladas y composiciones de sus monómeros de aminoácidos constituyentes. Ha habido un interés reciente en el desarrollo de rutas sintéticas para la preparación secuencias polipeptídicas totalmente artificiales para aplicaciones como la

ingeniería de tejidos, la administración de fármacos y como agentes terapéuticos (Qvit et al. 2017).

Los biomateriales utilizados en aplicaciones de ingeniería de tejidos deben ser capaces de llenar y asumir la forma de un tejido de reemplazo, respaldar los procesos celulares necesarios para regenerar tejido que funcionará como tejido nativo, permitir un intercambio eficiente de nutrientes y desechos para respaldar esas células, proporcionar las propiedades físicas necesarias requeridas para un tejido determinado. Los polipéptidos son atractivos para aplicaciones de ingeniería de tejidos donde las propiedades mecánicas de la cadena polipeptídica son importantes junto con la capacidad de controlar con precisión las propiedades fisicoquímicas del andamio que se quiera obtener. Los polipéptidos se sintetizan muy fácilmente a las escalas necesarias para la ingeniería de tejidos y se pueden entrecruzar fácilmente para formar espumas, geles y fibras. En muchos casos, los péptidos son utilizados como modificadores para mejorar la biocompatibilidad de andamios poliméricos, lo que da como resultado una modificación en sus características fisicoquímicas, propiedades mecánicas y biodegradabilidad, lo que a la vez influye en la actividad biológica de los biomateriales (Nettles et al. 2010, Klimek & Ginalska, 2020).

Los materiales polipeptídicos adoptan estructuras secundarias estables que incluyen hélices α y láminas β , las cuales exhiben comportamientos de autoensamblaje únicos con interesantes propiedades biológicas, estas estructuras pueden variar debido a estímulos externos. Los polipéptidos se buscan especialmente para su uso en la administración de fármacos debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y estructuras secundarias ajustables (Wang et al. 2021). Entre varios acarreadores de medicamento, las nanoestructuras peptídicas ensambladas han llamado la atención por la administración de medicamentos y parecen ser un enfoque prometedor para el tratamiento de diversas enfermedades mejorando la disponibilidad temporal y espacial de agentes terapéuticos, es deseable tener un sistema de administración de fármacos eficaz que sea estable frente a la dilución en medios biológicos. Los mecanismos de

autoensamblaje permiten la formación de varios tipos de nanopartículas, como tubos, vesículas e hidrogeles, cada uno adecuado para la administración de distintos tipos de medicamentos (Habibi et al. 2016, Wang et al. 2021). De forma análoga a los liposomas, que son estructuras esféricas anfifílicas acarreadoras de principios activos, tanto desde un enfoque biológico como sintético, algunos autores han denominado como pepsomas a algunas de estas aproximaciones usando derivados de polipéptidos a modo de acarreadores o liberadores de fármacos de forma controlada (Sedighi et al. 2023).

Durante la última década ha surgió un interés científico e industrial en el uso de péptidos como agentes terapéuticos, pueden ser utilizados para el tratamiento de condiciones médicas, por lo tanto, incrementa la calidad de vida. Varios péptidos que han sido utilizados para tratamientos terapéuticos muestran actividades farmacológicas y pueden ser clasificados en base a su modo de acción, suelen actuar como hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores. En términos de agentes terapéuticos, existen dos clases de péptidos, aquellos que son extraídos de recursos naturales y aquellos que son diseñados y sintetizados. Los péptidos naturales se pueden extraer y modificar con fines terapéuticos. El diseño de péptidos sintéticos está basado en péptidos que se encuentran en el cuerpo humano, o desde un diseño de basado en la estructura del receptor de proteínas. Estos biomateriales tienen una serie de ventajas, como alta especificidad, alta actividad biológica, bajo costo y alta capacidad de penetración en la membrana (Mandal et al. 2014, Fosgerau and Hoffmann, 2015, Lemes et al, 2016). Sin embargo, la estabilidad, la toxicidad y la inmunogenicidad siguen siendo las principales preocupaciones de quienes desarrollan fármacos basados en péptidos (Ke et al. 2016).

Gracias a las recientes mejoras en la caracterización de su mecanismo de acción, estrategias de formulación que mejoran la estabilidad química y metabólica, y protocolos avanzados de síntesis química que reducen los costos de fabricación, pero también enfrentándose barreras técnicas, así como riesgos regulatorios y comerciales (Mahlpuu et al. 2020).

Síntesis de polipéptidos.

Así como las proteínas, la síntesis de péptidos se realiza in vivo, es un método biológico donde la síntesis es llevada a cabo vía traducción de la información secuencial del RNAm por ribosomas a aminoácidos siguiendo el dogma central sobre el flujo de información genética. Esto permite que las secuencias polipeptídicas deseadas se puedan obtener mediante el diseño de construcciones de ADN adecuadas y con ellas transformar los genes del huésped, que producirá nuevos péptidos (Kobayashi et al. 2019). Usando la síntesis in vivo, es difícil incorporar múltiples aminoácidos no naturales o incluir modificaciones peptídicas como la acilación (de ácidos grasos) o la amidación (C-terminal), que es mucho más sencilla usando la síntesis química.

La síntesis química se logra principalmente por condensación de aminoácidos. Los grupos que no necesitan reaccionar deben protegerse temporalmente cuando la materia prima sintética contiene monómeros de aminoácidos con un grupo funcional que pudiera participar en la reacción de condensación para obtener un polipéptido sintético con una secuencia específica, y luego debe llevarse a cabo una reacción de desprotección para asegurar la orientación de esta síntesis (Nilsson et al. 2005, Guevara y Daleo 2018). El método químico incluye la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) o síntesis de péptidos en fase líquida (LPPS). La síntesis en solución consiste en que el aminoácido C-terminal está enlazado a un grupo protector, mientras que su nitrógeno α permanece desprotegido, mientras que el segundo aminoácido está protegido sólo en su nitrógeno α . Esto es importante ya que el ácido carboxílico desprotegido y el grupo amino desprotegido participan en la formación del enlace peptídico. Una vez que se complete el acoplamiento del segundo aminoácido, se elimina el grupo protector de nitrógeno α y se purifica el éster dipéptido crudo. Este proceso se repite hasta obtener el péptido deseado. El paso final es eliminar el grupo protector final de nitrógeno α y cualquier grupo protector de la cadena lateral. La SPPS se basa en el mismo principio de la LPPS, consiste en la elongación de una cadena peptídica donde el primer aminoácido es unido a un soporte polimérico insoluble mediante un enlace de esterificación con su C-terminal, se acopla el siguiente aminoácido protegido en su nitrógeno α y este

proceso se repite hasta obtener el péptido de la secuencia y la longitud deseadas (Jois S. 2022).

En muchas ocasiones estos métodos de síntesis se ven limitados debido a la corta elongación de la cadena polipeptídica que se puede alcanzar, también a los bajos rendimientos, a los largos tiempos de reacción y alto costo de la purificación. Además de que resultan poco amigables con el medio ambiente debido a los solventes que son utilizados y a la presencia de productos secundarios tóxicos (Bonduelle et al. 2018).

La polimerización enzimática es un método sintético para la síntesis de una variedad de materiales polipeptídicos. Este método verde, fácil, escalable y económico para la síntesis de polipéptidos es ventajoso para el desarrollo de materiales polipeptídicos artificiales (Tsuchiya y Numata 2017). Las enzimas utilizadas para la polimerización enzimática de monómeros de aminoácidos son las proteasas, que originalmente rompen el enlace peptídico en polipéptidos y proteínas. Los monómeros de aminoácido, generalmente en forma de éster, son polimerizados mediante sucesivas reacciones de aminólisis, en la presencia de una proteasa propagando la cadena peptídica bajo condiciones de reacción optimizadas, resultando en la formación de un polipéptido con subproductos de alcoholes pequeños como metanol o etanol, por tanto, esta polimerización enzimática mediante proteasas tiene varias ventajas en comparación con las técnicas de condensación convencionales. Su característica más importante es que la polimerización se realiza en medios no acuosos en estado líquido, a condiciones suaves, y tanto los catalizadores como los sustratos se originan a partir de biomasa. (Kobayashi et al. 2019). Subtilisinas, quimotripsinas, tripsinas y papainas son proteasas ampliamente utilizadas para la síntesis de péptidos (Guzmán et al. 2007).

Sin embargo, tales reacciones no procederán de manera eficiente si los medios de reacción no se diseñan y evalúan cuidadosamente. Para la síntesis de péptidos se necesitan actividades de agua apropiadas y, si es posible, controladas a niveles bajos. Esta es la principal amenaza ya que las proteasas no están estructuralmente condicionadas por naturaleza para actuar en dichos entornos. Entonces, es

necesario desarrollar la ingeniería de medios y la ingeniería de catalizadores para superar estos inconvenientes.

El objetivo principal para el desarrollo de esta área es encontrar procesos de síntesis que sean más amigables con el medio ambiente y que impliquen temperaturas de reacción más bajas, lo que reduce el uso de energía.

Proteasas en la síntesis de polipéptidos.

Las proteasas (también denominadas enzimas proteolíticas, peptidasas, o proteinasas) son un grupo de enzimas involucradas en muchas funciones fisiológicas, además de ser utilizadas como catalizadores para aplicaciones biotecnológicas. Su principal función catalítica es hidrolizar los enlaces peptídicos de las proteínas. Sin embargo, bajo condiciones bajas de contenido de agua en el medio de reacción el equilibrio es desplazado hacia la aminólisis y las proteasas han demostrado ser catalizadores efectivos en la formación de enlaces peptídicos de manera estereoespecífica bajo condiciones suaves sin necesidad de activación. Estas enzimas están distribuidas en todas las plantas, animales y microorganismos. Los campos de aplicación de las proteasas son muy diversos, incluyendo la ciencia y tecnología de los alimentos, las industrias farmacéuticas y la fabricación de detergentes (Haddoub et al. 2009, Guevara y Daleo 2018).

Las proteasas son activas en condiciones suaves, con un pH óptimo en el rango de 6 a 8; son robustos y estables, no requieren cofactores estequiométricos y además son altamente estereoespecíficas y regioselectivas (Bordusa et al. 2002). Estas propiedades son bastante relevantes para usarlas como catalizadores en la síntesis orgánica. Esto es posible porque las proteasas pueden formar enlaces peptídicos (Figura 2), además de catalizar el corte de estos (So et al. 2000).

Hay cinco familias de proteasas en las que los grupos serina, cisteína, treonina, aspártico o metálico desempeñan un papel catalítico principal. Los primeros dos grupos de proteasas han sido los más estudiados, donde en la cisteína proteasas el nucleófilo es un grupo sulfhidrilo y el mecanismo catalítico es similar al de las serina proteasas en las que el nucleófilo parte de un hidroxilo de residuo de serina y donde

el donador de protones es un residuo de histidina. La amplia especificidad de las proteasas restringe su aplicación en la síntesis de péptidos en fase acuosa, ya que el producto peptídico que se acumula durante la reacción puede ser hidrolizado por la misma proteasa empleada con el propósito de la síntesis con la reacción de síntesis (Schellenberger et al. 1991).

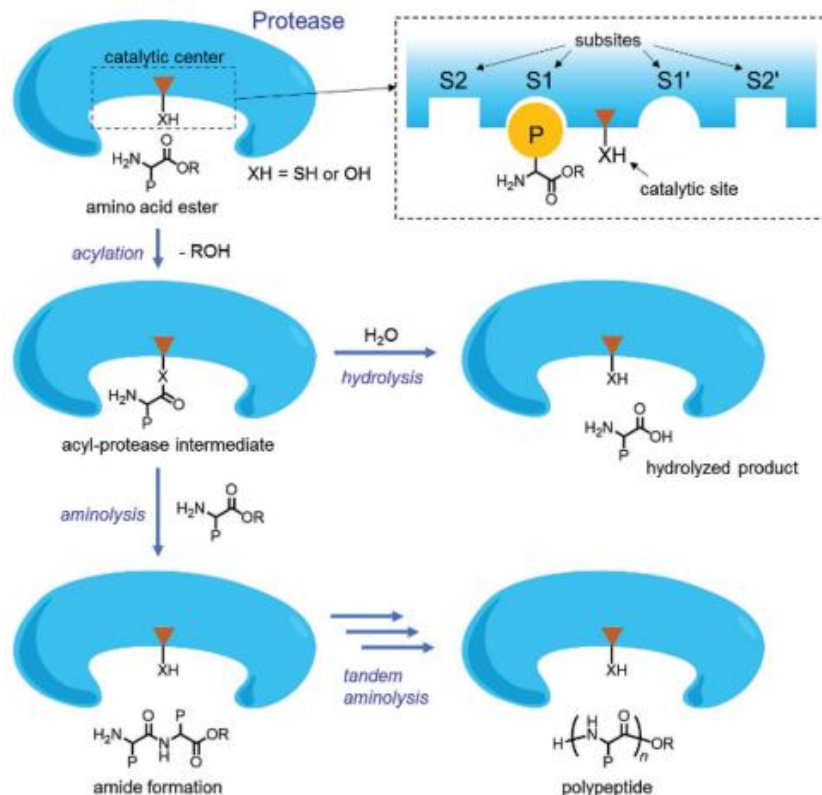


Figura 3. Mecanismo propuesto por Tsuchiya, K. y Numata, K., 2017.

Un punto clave de utilizar la clase serín o cistein proteasas en la síntesis de polipéptidos es que estas enzimas realizan la síntesis bajo un control cinético y un control termodinámico. En el control cinético, la proteasa está actuando como transferasas y catalizando la transferencia de un grupo acilo a un grupo amina del aminoácido que hace el ataque nucleofílico, a través de la formación del intermediario acil-enzima. Este intermediario puede ser atacado nucleofilicamente por agua y por un nucleófilo (HN), el cual puede ser una amina, un alcohol o un tior que provocará una competencia de reacciones entre la formación o ruptura del

enlace peptídico. Por otro lado, la síntesis bajo control termodinámico con proteasas representa el reverso de la ruptura hidrolítica del enlace peptídico. De acuerdo con el principio de reversibilidad microscópica, la formación y la hidrólisis del enlace peptídico proceden por el mismo mecanismo y a través del mismo intermediario como se muestra en la Figura 2 (Guzmán et al. 2007, Williams et al. 2009).

Este método sintético sencillo, escalable y ecológico, catalizado por proteasas, promete poner a la mano varias posibles aplicaciones de los polipéptidos para la producción de materiales funcionales, por lo tanto, el uso de este proceso enzimático promueve la sustentabilidad de la industria química (Tsuchiya y Numata 2017).

Subtilisina de Carlsberg.

En términos de una combinación de características (actividad, rangos de pH y temperatura y costos de producción), las subtilisinas o subtilasas han resultado ser la clase más popular de proteasas. Las subtilasas son una de las clases más grandes de serina proteasas que están codificadas en los genomas de todas las formas de vida, incluidos los virus. Por secuencia de aminoácidos, las subtilasas se subdividen en seis familias: subtilisinas, termitasas, proteinasas K, peptidasas lantibióticas, kexinas y pirolisinas. Las subtilisinas a su vez se clasifican en varias subfamilias: subtilisinas verdaderas, proteasas altamente alcalinas, proteasas intracelulares, subtilisinas intermedias y subtilisinas de alto peso molecular (Rožanov et al 2021).

Todas las subfamilias de subtilisinas son prometedoras para la biotecnología. La primera serina proteasa alcalina que obtuvo un uso generalizado fue la subtilisina A (EC 3.4.21.62), que es una serina proteasa alcalina de *Bacillus subtilis*. La enzima debe su nombre a la especie de su bacteria productora. La historia del descubrimiento y estudio de las subtilisinas comenzó en un centro de investigación de una compañía cervecera llamada Carlsberg, y la primera enzima descrita se llama “Subtilisina Carlsberg” a partir de *Bacillus licheniformis* (Rožanov, A. S. (2021)). El centro catalítico de las serín proteasas está formado por tres residuos de aminoácidos: Asp-32, His-64 y Ser-221 como es mostrado en la Figura 3. Debido a

que el residuo de aminoácido que lleva a cabo el ataque nucleofílico es Ser-221, las subtilisinas y las enzimas proteolíticas relacionadas se denominan serina proteinasas (Rozanov et al. 2021).



Figura 4. Subtilisin Carlsberg y su sitio catalítico Asp-32 (rojo), His-64 (amarillo) y Ser-221 (verde)

Schmitke et al (1997) demostraron que las estructuras cristalinas de la SC y en particular, las estructuras del sitio activo son esencialmente las mismas en dos disolventes orgánicos no relacionados (dioxano y acetonitrilo) y con las del agua.

Medios no convencionales de reacción.

El interés en el uso de medios no convencionales (no acuosos) ha aumentado después del reconocimiento de que algunos biocatalizadores, especialmente los categorizados como hidrolasas, pueden ser activos en medios no convencionales y la aplicación estos es muy atractiva en las rutas de síntesis orgánica. La biocatálisis en medios no convencionales ha ampliado el espectro de aplicación de las proteasas a aquellas reacciones que no pueden desarrollarse de manera efectiva en ambientes acuosos, esto es, la síntesis de enlaces peptídicos en lugar de su hidrólisis (Quiroga et al. 2000, Priyadarshini y Pandey 2018).

Las hidrolasas pueden catalizar la reacción inversa de la hidrólisis cuando se realiza en entornos de bajo contenido de agua, lo que abre la oportunidad para que estos

conocidos catalizadores se utilicen en procesos de síntesis de moléculas bioactivas de alto valor. Las condiciones para la biocatálisis enzimática en medios no convencionales ha sido un tema de gran atención. Frecuentemente el agua es reemplazada por solventes orgánicos, líquidos iónicos, fluidos comprimidos y mezclas eutécticas (Illanes et al. 2015).

Solventes Orgánicos

Los solventes orgánicos que contienen una baja cantidad de agua pueden incrementar la solubilidad de los substratos, especialmente de los hidrofóbicos, reducir la hidrólisis de los productos y mejorar la recuperación del producto y/o del biocatalizador (Illanes et al. 2009).

Existen dos tipos de sistemas usando solventes orgánicos, el sistema homogéneo que está formado por una mezcla de agua y un solvente orgánico miscible y el sistema heterogéneo en el cual se forma una segunda fase por un solvente orgánico inmiscible con el agua (Barberis et al. 2008).

El uso de solventes orgánicos como medio de reacción para la biocatálisis ha demostrado ser útil para ampliar el campo de las aplicaciones de biocatalizadores. Sin embargo, la explotación de las ventajas de usar sistemas orgánicos acuosos o incluso disolventes orgánicos puros está limitada por dos factores: el riesgo de desactivación de enzimas y la naturaleza peligrosa para el medio ambiente de los disolventes (Stepankova, Damborsky y Chaloupkova 2014).

Hay un interés creciente en el desarrollo de nuevos solventes amigables con el ambiente con propiedades similares o mejores, por lo tanto, los fluidos comprimidos, líquidos iónicos y mezclas eutécticas han emergido como nuevos solventes en el campo de la biocatálisis.

Líquidos Iónicos

Los líquidos iónicos (LI) pueden ser hidrofílicos o hidrofóbicos, y su principal ventaja es la fácil preparación. Los LI están compuestos por un catión y un anión orgánicos o inorgánico, están clasificados como solventes verdes porque tienen propiedades físicas y químicas como baja presión de vapor, una menor volatilidad que los

solventes orgánicos, inflamables y una alta estabilidad térmica y química (Erbeldinger et al. 2010). Se presentan como líquidos viscosos a temperatura ambiente y pueden ser ajustados para mejorar la solubilidad de los reactantes que son escasamente solubles en agua y solventes orgánicos polares. Estas propiedades juegan un rol importante sobre la estabilidad, actividad y estructura de las enzimas, en los LI presentan una mayor enantioselectividad, estabilidad y velocidades de conversión que en los solventes orgánicos. Se ha probado la actividad de una diversidad de enzimas en LI, incluyendo las proteasas, y se encontró que no fueron desnaturalizadas o desactivadas (Muhammad et al. 2010; Jaeger et al. 2015).

Los LI se han introducido en la química orgánica para satisfacer la creciente demanda de tecnologías limpias en los procesos industriales. Se pueden considerar como los disolventes ideales debido a la posibilidad de modificar los aniones o los cationes que componen estas sales líquidas.

Disolventes Eutécticos Profundos

Los solventes eutécticos profundos (DES) muestran características similares a los LI, pero son más baratos y seguros, además, contienen componentes sin carga y, por lo tanto, no son completamente iónicos. Pueden ser un medio de reacción prometedor por su bajo punto de fusión, gran disponibilidad, biodegradabilidad y bajo costo. Son preparados a partir de productos químicos de fácil acceso y con baja toxicidad, comúnmente están formados por una sal cuaternaria de amonio y un donador de enlaces de hidrógeno, como amidas, aminas y alcoholes (Maugeri, Dominguez de Maria et al. 2012). Como los LI, los DES son mayormente líquidos a temperaturas por debajo de los 100°C y tienen mayor densidad y viscosidad que el agua a temperatura ambiente, contienen baja conductividad y alta polaridad debido a la gran cantidad de enlaces de hidrógeno que pueden formar (Khandelwal et al. 2016).

Los DES pueden servir como disolventes clave para la futura síntesis de macromoléculas orgánicas y contribuir a procesos biocatalíticos económicamente viables, sostenibles y eficientes, lo que representa un avance en el área de la

ingeniería de medios para biocatálisis (Stepankova, Damborsky y Chaloupkova 2014). Curiosamente, aunque el agua no es beneficiosa para las reacciones reversibles en general, las mezclas de DES-agua pueden funcionar mejor que los DES puros.

Fluidos comprimidos

Los fluidos comprimidos (FC) se han convertido en excelentes solventes. Algunos de ellos se pueden manejar en estado supercrítico, como el dióxido de carbono, siendo este un estado de la materia que combina las propiedades de viscosidad y difusividad de los gases y propiedades como la densidad y propiedades de solvatación de los líquidos. Son no cancerígenos, no tóxicos, no mutagénicos, no inflamables y termodinámicamente estables. Los procesos que utilizan FC son sustentables, amigables con el ambiente y de bajo costo. Su principal ventaja es la separación y secado del producto por simple expansión. (Aymonier et al. 2011; Brunner et al. 2010). Las propiedades solubilizantes de los FC se pueden ajustar usando presión y temperatura; por lo tanto, estos solventes ofrecen la posibilidad de solubilizar reactivos hidrófobos en procesos de polimerización. Por lo tanto, ha habido una investigación considerable sobre las reacciones de polimerización en FC (Brunner et al. 2010).

Los procesos de síntesis en FC ofrecen ventajas importantes sobre los solventes orgánicos, como el respeto al medio ambiente y su principal ventaja es la posibilidad de separar y secar el producto por simple expansión, mientras que el gas puede recuperarse, reciclarse y reutilizarse sin etapas de purificación. Para los procesos industriales, los beneficios al ambiente y el bajo consumo de energía durante su operación son los principales argumentos para reemplazar los solventes orgánicos convencionales por los FC (Knez, 2009).

1,1,1,2-tetrafluoroetano

El 1,1,1,2-tetrafluoroetano (R-134a) es un fluorocarbono gaseoso que se fabrica mediante la reacción del fluoruro de hidrógeno con el triclorometileno en un sistema cerrado. Se utiliza principalmente como refrigerante para refrigeración de "alta temperatura", como refrigeradores domésticos y acondicionadores de aire para

automóviles. Otros usos potenciales incluyen la aplicación en el soplado de espuma plástica, como solvente para aplicaciones especiales de limpieza. Debido a su baja toxicidad se ha usado como propulsor de aerosol para inhaladores médicos y como extintor de incendios en lugar de halones. El R-134a es un gas no tóxico a presión atmosférica, aprobado por la FDA para aplicaciones farmacéuticas, no destruye la capa de ozono como los clorofluorocarbonos y requiere presiones relativamente bajas de entre 20 y 30 bar para comprimirlo a un estado líquido (National Research Council 2002, Saul et al 2004).

Se decidió utilizar R-134a como medio de reacción para este proyecto de investigación porque se ha demostrado que permite la disolución de los sustratos de éster de aminoácidos y el crecimiento de cadenas peptídicas manteniendo la actividad de la proteasa en un ambiente con bajo contenido de agua (Aguirre-Díaz et al. 2018, Espinoza-González et al. 2023).

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

El uso de la proteasa Subtilisin Carlsberg en 1,1,1,2-tetrafluoroetano comprimido logrará la polimerización de L-Fenilalanina-OEt, L-Triptófano-OEt, L-Histidina-OMe y un copolipéptido de L-Fenilalanina y L-Triptófano.

Los polipéptidos sintetizados enzimáticamente podrán utilizarse para formar materiales con morfologías de interés en el campo de la biomedicina.

Objetivo General

Estudiar la síntesis enzimática de poli(PheOEt), poli(L-TrpOEt), poli(L-HistOMe) y poli(L-TrpOEt-co-L-PheOEt) en 1,1,1,2-tetrafluoroetano en estado líquido como medio de reacción, utilizando Subtilisina de Carlsberg como biocatalizador. Además de ampliar la aplicación de estos materiales sintetizados enzimáticamente en el estudio de liberación del fármaco cloroquina.

Objetivos particulares

- Sintetizar y caracterizar los polipéptidos obtenidos mediante resonancia magnética nuclear para demostrar su estructura molecular.
- Diseñar materiales de interés biomédico a partir de un polipéptido en forma de nanotubos de alfa-hélices auto ensamblados
- Estudiar la liberación del fármaco cloroquina desde un material a base de polipéptidos

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Materiales

Éster etílico de L-Triptófano hidrociorado [L-TrpOEt·HCl] (pureza \geq 99%), éster etílico de L-fenilalanina hidrociorado [L-PheOEt·HCl] y éster metílico de L-Histidina dihidrociorado [L-HisOMe·2HCl] (pureza \geq 97%) fueron suministrados por Sigma-Aldrich, 1,1,1,2-Tetrafluoroetano cilindro de 60 Kg de Dupont (Suva-R134a) fue suministrado por CEI de México S.A. de C.V. (México), Subtilisina Carlsberg (serina proteasa S8 endoproteinasa EC. 3.4.21.62; origen bacillus licheniformis, peso molecular 27 kDa) fue suministrada por ENMEX S.A. de C.V.

Metodología

Desalinización de los monómeros.

Para el éster etílico de L-Fenilalanina se siguió la metodología de Aguirre-Díaz, I. S. que consiste en preparar una disolución de clorhidrato éster etílico de L-Fenilalanina (6g) en agua (20mL) y una disolución de carbonato de potasio (5.41g) en agua (10mL), después de 1h de agitación vigorosa, se realizó una extracción con acetato de etilo (4x 20mL) y finalmente se secó a presión reducida a 45°C en un rotaevaporador.

En la desalinización del monómero de triptófano, se siguió la metodología de Aguirre-Díaz, I. S. (2018) con modificaciones debido al distinto comportamiento que tuvo este aminoácido. Se preparó una disolución de clorhidrato éster etílico de L-Triptófano (2.89g) en agua (160mL) y una disolución de carbonato de potasio (2.5g) en agua (10mL). Se mezclaron y se agitaron vigorosamente durante 1 hora. Posteriormente se realizó una extracción de fase orgánica con acetato de etilo (2 x 80mL) y finalmente se obtuvo el éster etílico de aminoácido libre de acetato de etilo por medio de una destilación a presión reducida a 45°C en un rotaevaporador.

En la desalinización del monómero de histidina se realizó como se describe a continuación. Se colocaron 2g de diclorhidrato éster metílico de L-Histidina junto con 30mL de etanol en un vaso de precipitado, se agregaron 15mL de hidróxido de

potasio (2M) y se agitó vigorosamente durante una hora. Después se filtró la sal sobrante de la mezcla mediante filtración y finalmente se obtuvo el éster metílico de aminoácido libre mediante una destilación a presión reducida a 70°C.

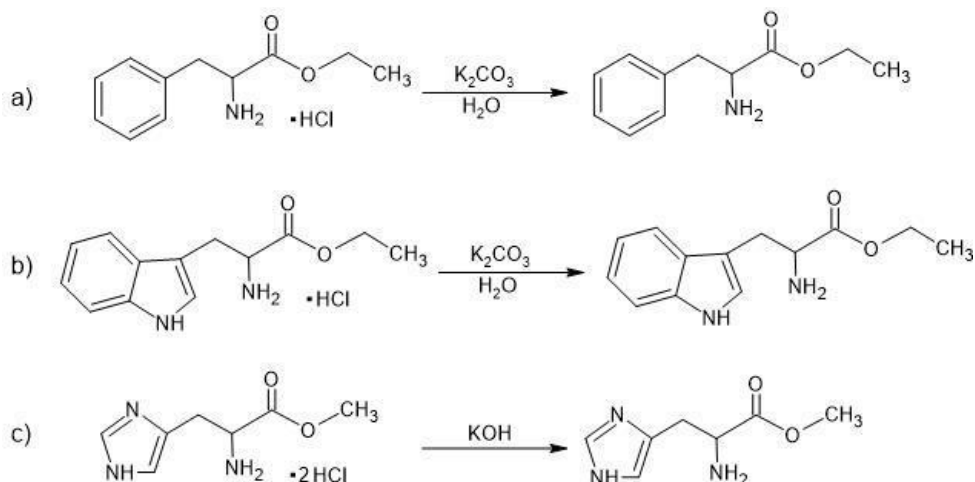


Figura 5. Esquema de desalinización de monómeros. a) clorhidrato de éster etílico de L-fenilalanina b) clorhidrato de éster etílico de L-Triptófano c) diclorhidrato de éster metílico de L-Histidina. Elaboración propia.

Solubilidad de los monómeros.

La solubilidad de los monómeros fue evaluada mediante una prueba visual, se colocaron 6 mmol en una celda de alta presión con ventanas de zafiro sintético y un agitador magnético. La celda fue llenada con 1,1,1,2-tetrafluoroetano (30 bar) y llevada a una temperatura de 40°C mediante una chaqueta de calentamiento y medida por un termopar colocado en el interior de la celda.

Síntesis enzimática de Poli(L-Triptófano-OEt) y Poli(L-Histidina-OMe)

En el interior de la celda se colocó 6 mmol del monómero, la proteasa de Subtilisina Carlsberg (110 U) y un agitador magnético. La celda fue cerrada y calentada a 40°C una vez que la celda se llenó con R-134a hasta llegar a una presión de 30 bar, se dejó en constante agitación durante un tiempo de reacción de 24 horas, después de ese tiempo de reacción la celda se dejó enfriar en un cuarto frío a 4°C. El producto de la reacción se retiró de la celda después de despresurizar el reactor para retirar el R-134a y abrirlo, mediante lavados acuosos (agua MilliQ, 18.2 mΩ.cm @ 25°C)

utilizando el menor volumen posible se retira el producto, se realizó una centrifugación (9000 rpm, 10 min) utilizando amicones de 3 kDa para separar oligómeros y monómero que no reaccionó, donde el sobrenadante fue recolectado y liofilizado.

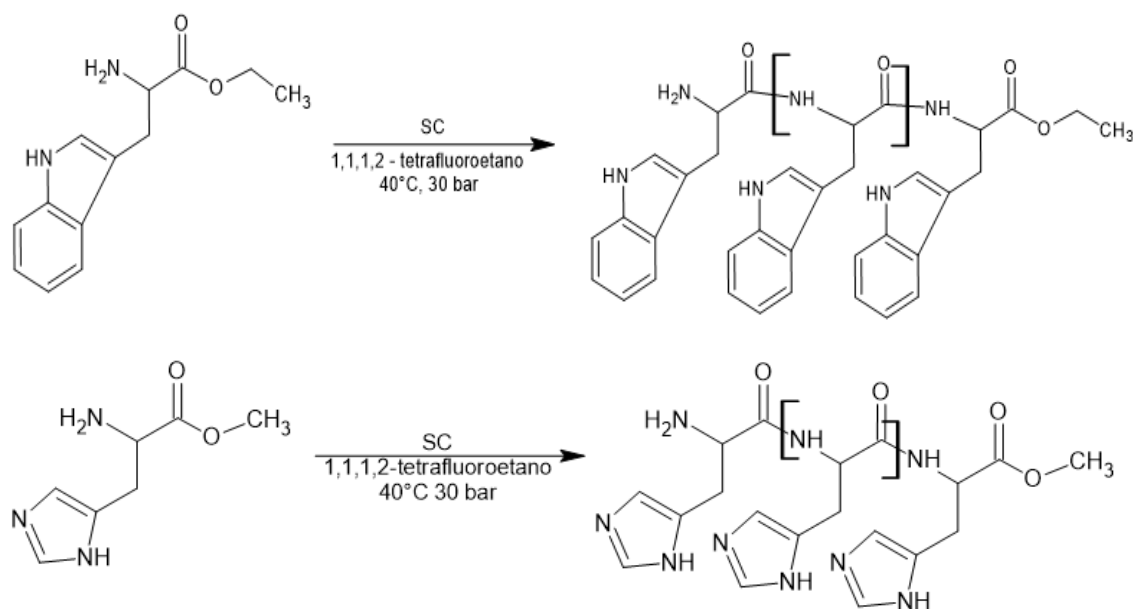


Figura 6. Reacción de polimerización de L-Trp-OEt y L-Hist-OMe en R-134a (40°C, 30 bar) catalizada por SC.

Síntesis enzimática de Poli(L-Fenilalanina-co-L-Triptófano)

La copolimerización enzimática entre la L-Fenilalanina-OEt y L-Triptófano-OEt se realizó con la misma metodología del homopolímero, a diferencia de que en vez de colocar sólo un monómero se colocaban ambos en una relación 1:1 (3mmol:3mmol) en la misma celda de alta presión a las mismas condiciones de reacción.

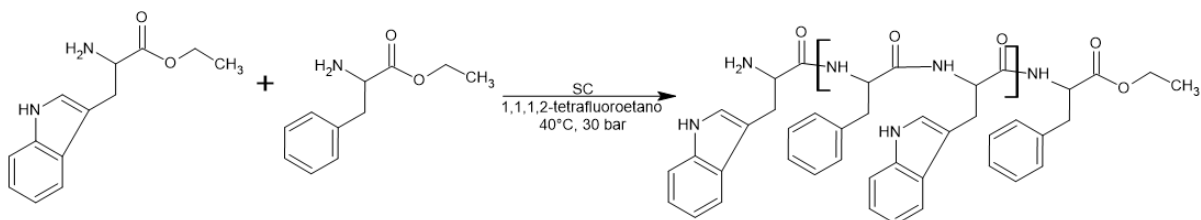


Figura 7. Reacción de polimerización entre L-Phe-OEt y L-Trp-OEt en R-134a (40°C, 30 bar) catalizada por SC.

Control sin enzima.

Se realizó un control dónde se añadió el monómero al reactor, pero sin añadir la enzima Subtilisina Carlsberg, para comprobar que era su actividad la que hace posible la reacción, se realizó a las mismas condiciones de temperatura y presión (40°C, 30bar), después de enfriar, despresurizar y abrir el reactor se encontró con un líquido viscoso.

Caracterización de los Polipéptidos.

Resonancia Magnética Nuclear.

Los experimentos de RMN fueron realizados en un espectrómetro --- para ¹H-RMN. Los datos fueron analizados por MestReNova, versión 12.0.0.

Autoensamblaje de poli(L-Fenilalanina-OEt)

Se utilizó Poli(L-Fenilalanina-OEt) (PLP) sintetizada y bien caracterizada por Aguirre-Díaz S. I., con un peso molecular promedio de 20,000 Da para el autoensamblaje, se siguió la metodología de Romero-Montero, A. et al (2021), cambiando el cosolvente 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) por alcohol isopropílico (AIP) y se seleccionaron las mejores condiciones reportadas. El procedimiento fue el siguiente: Partiendo de una solución madre con una concentración de 7.6 mg/mL de PLP en agua mili-Q se mezcló con AIP como cosolvente con 1% en volumen, esto permite que un proceso de autoensamblaje forme nanotubos con una morfología homogénea. De la solución se tomaron 20 µL, se colocaron sobre un cubreobjetos de microscopio y se dejaron secar a 4 °C para una evaporación lenta del disolvente.

Morfología de los nanotubos.

Se tomaron imágenes de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras de nanotubos se cultivaron en un cubreobjetos de vidrio.

Carga de cloroquina en nanotubos de PLP y estudios de liberación del fármaco asistido por HPLC.

La carga de cloroquina (Clq) en los nanotubos se realizó formulando una solución madre (7.6mg/mL) de nanotubos en agua Mili-Q mezclada con isopropanol hasta una concentración de 4.2mg/mL, esta solución de nanotubos diluida se mezcló con una solución de Clq en relación de masa 1:1 (PLP:Clq). Luego, se depositaron 3 mL en una caja de petri y se dejaron secar en una habitación fresca para impulsar el autoensamblaje. Se realizó el mismo procedimiento para el control de nanotubos, pero sin agregar Clq. Posteriormente, los nanotubos se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) para formular los tratamientos; nanotubos como control y nanotubos cargado con Clq (Clq-Nt). La liberación de Clq se determinó mediante HPLC por triplicado de la siguiente manera: los experimentos se llevaron a cabo disolviendo las muestras en 20 mL del medio de liberación que consiste en una solución de PBS a pH 7,4 a 37 °C en un agitador rotatorio a 80 rpm. Se tomaron alícuotas (1 mL) intervalos predeterminados y se reemplazó con medio nuevo. Se filtraron las alícuotas con una membrana de 0,22 µm para cuantificar el Clq en un cromatógrafo líquido Agilent serie 1200 equipado con un detector de diodos a 260 nm y una columna C18 (3,9 × 150 mm; simetría). Se ajustaron acetonitrilo (A) y trietilamina acuosa al 0,1 % (pH 3,0) con fases móviles de ácido fosfórico (B) a un caudal de 0,6 ml/min. La elución en gradiente fue 10 % A entre 0 y 1,9 min, 10 % a 40 % A entre 1,9 y 2,0 min y 40 % A entre 2,0 y 3,3 min. Para el reequilibrio de la columna, se mantuvo un 10 % de A entre 3,3 y 5,00 min (Miranda et al., 2015).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La desalinización de monómeros con la metodología antes mencionada fue exitosa, desde el primer paso de desalinización, donde se observó que el éster desalinizado de triptófano es insoluble en agua, mientras que, en el caso del éster de fenilalanina e histidina, el monómero desalinizado permanece soluble en agua.

El resultado de la solubilidad de los ésteres de aminoácidos desalinizados fue exitoso, como se ve en la Figura 8, a través de una celda de alta presión de volumen variable equipada con tres ventanas de zafiro y un agitador magnético la cual fue bien cerrada se logró ver la solubilidad de los monómeros en R-134a. Como se puede observar se logró una mezcla de fases del R-134a. Para la prueba que se realizó con el monómero triptófano e histidina, se mostró una fase líquida homogénea y esto permitió observar que los monómeros si son solubles y se mantuvo así aun cuando la presión fue aumentada y se alcanzó una temperatura de 40°C, lo cual comprueba que el R-134a es un buen medio de reacción.

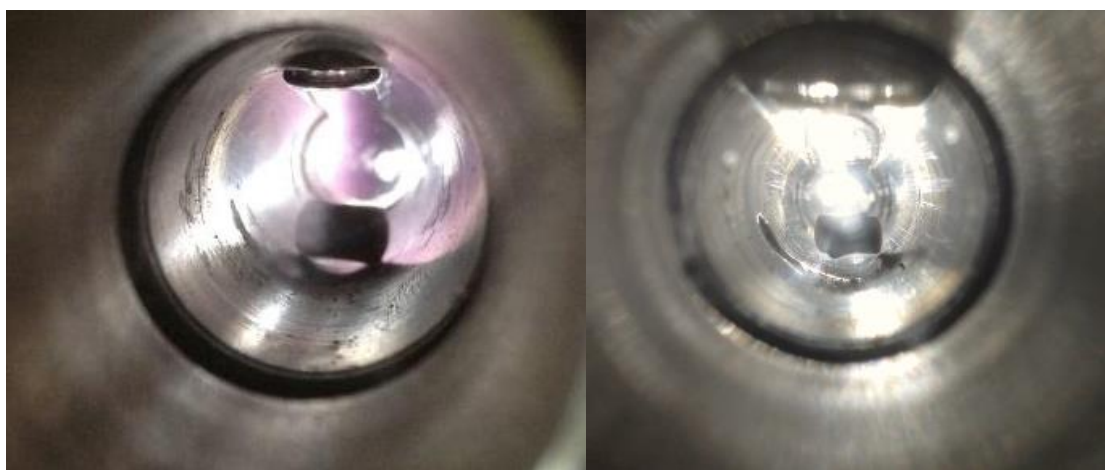


Figura 8. Prueba de solubilidad en R-134a a 30 bar y 40 °C de los monómeros de L-Trp-OEt (izquierda) y L-Hist-OMe (derecha).

Caracterización de los Polipéptidos.

Resultados de ^1H -RMN

En este trabajo se utilizó la técnica de ^1H para confirmar la formación de polipéptidos. En la Figura 8 se comparan los resultados obtenidos de ^1H -RMN del monómero y del producto de la reacción, estos resultados reflejaron lo que se estaba esperando de la formación de los polipéptidos, el hecho de que las señales correspondientes a los carbonos “13” y “14” están en proporción más pequeñas o hasta casi imperceptibles, a diferencia de las señales del monómero, estas señales se encuentran en mayor proporción. La integración de la señal asignada al grupo éster etílico, que para el polipéptido se desplazó ligeramente al campo inferior para

el carbono “13” y se mantuvo para el carbono “14”, permite estimar un peso molecular de aproximado de 70 kDa.

Patchornik et al 1954 reportan un politriptófano sintetizado químicamente a partir de N-carboxil-L-Triptófano en dioxano con un peso molecular promedio de 17kD. La utilización de solventes como el dioxano y éter de petróleo, solventes considerados como contaminantes a cantidades muy pequeñas, los largos tiempos de reacción y de purificación, son las grandes desventajas de este método frente al sintetizado en R-134a, un método de síntesis más amigable con el ambiente, de un solo paso. (Patchornik et al 1954, Sela et al 1961)

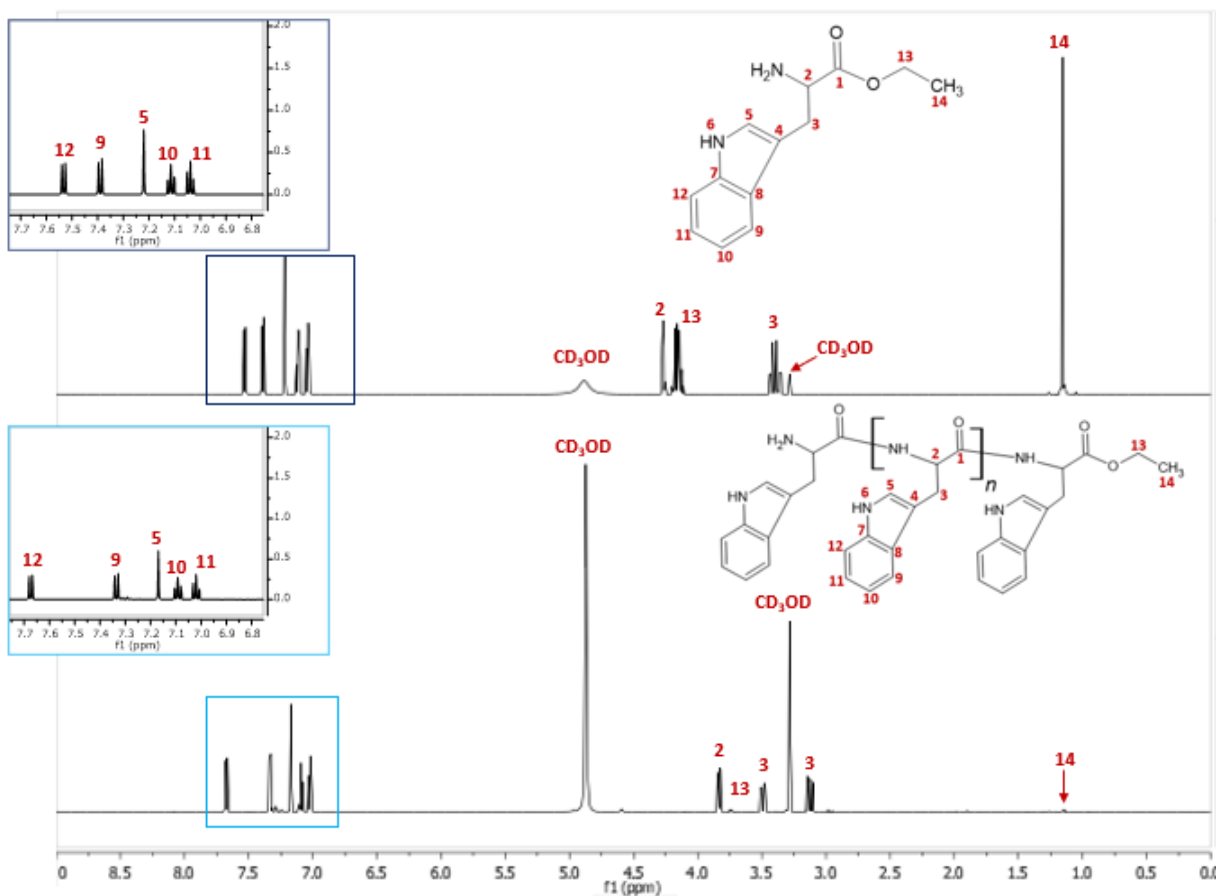


Figura 9. ¹H-RMN del Monómero de L-Triptófano-OEt (parte superior) y del producto de la reacción (parte inferior).

En estudios previos donde Aguirre-Díaz 2018 y Espinoza-González 2023 lograron sintetizar copolipéptidos de L-PheOEt con L-LeuOEt y L-LysOMe respectivamente, se decidió realizar la síntesis para la formación del copolipéptido poli(L-fenilalanina-co-Triptófano) el cual se muestra en la Figura 9.

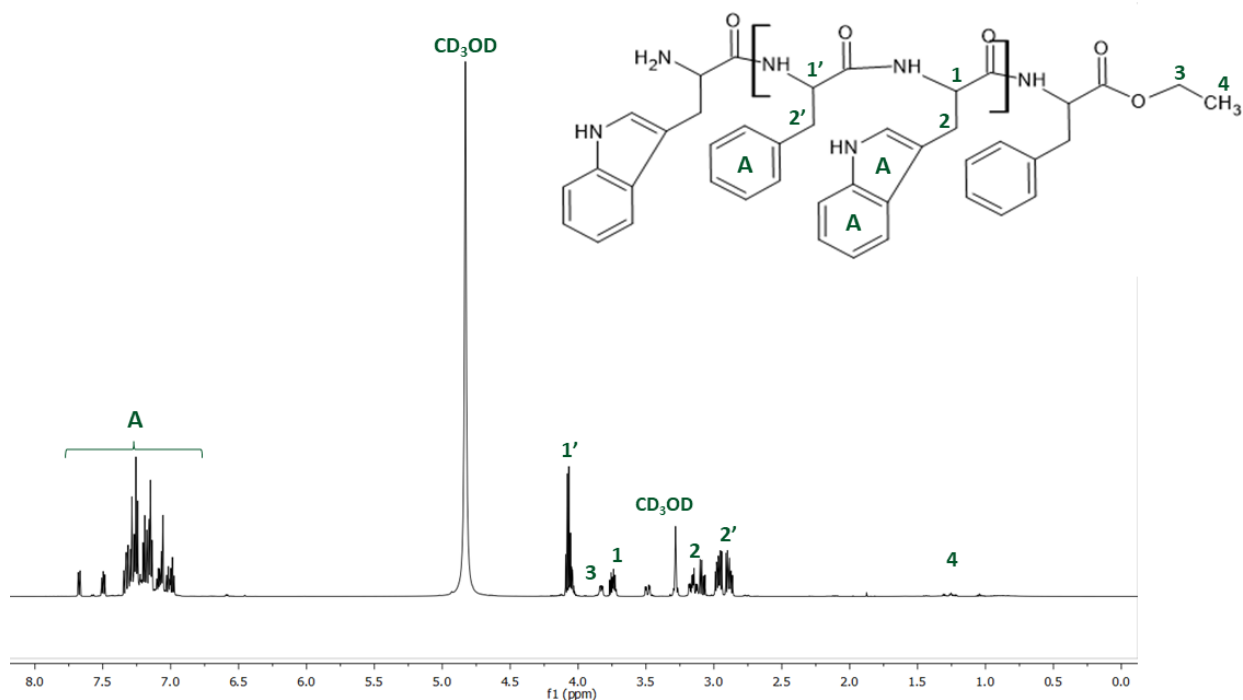


Figura 10. ^1H -RMN del copolímero de L-Fenilalanina-co-L-Triptófano.

Para el monómero de L-Histidina-OMe se realizó ^1H -RMN para verificar que fue desalinizado el monómero, en la Figura 10 al parecer la señal que corresponde al grupo metilo (9) desaparece cuando se desaliniza, lo cual puede suceder si el éster se hidroliza durante el proceso de desalinización. También se aprecia un desplazamiento en las señales de los hidrógenos del imidazol de los carbonos 6 y 8, así como el H alfa para el monómero “libre de sal”, puede que exista interferencia por interacciones tipo enlace de hidrógeno entre los grupos amina del imidazol con anillos aromáticos de ésteres de aminoácidos.

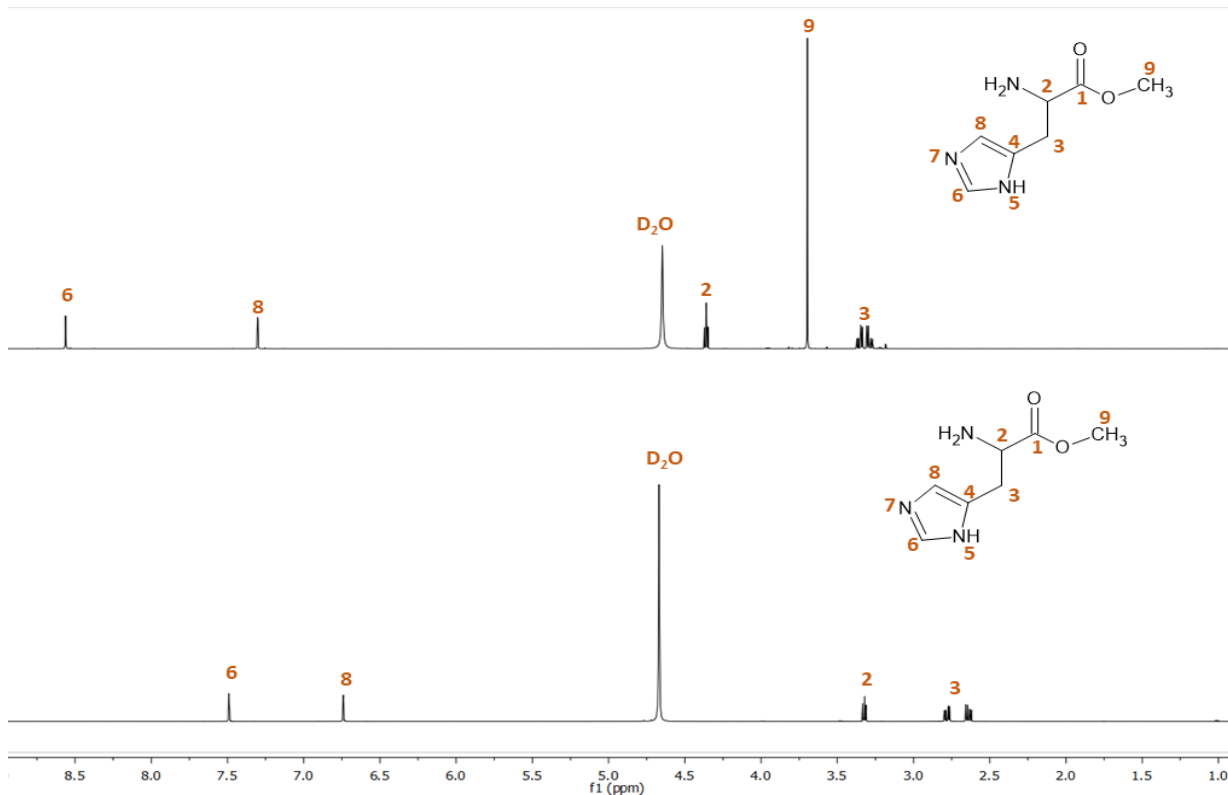


Figura 11. ¹H-RMN del Monómero dihidroclorado de L-Histidina-OMe (parte superior) y Monómero dihidroclorado de L-Histidina-OMe (parte inferior).

La Figura 11 muestra el ¹H-RMN del polímero de L-Histidina-OMe en el cual el desplazamiento de los protones fue similar, se tienen las mismas señales a la del monómero desalinizado y la integración de los protones correspondió a cada grupo funcional que tuviera acoplados protones a un enlace de distancia.

Se parte de un éster metílico de histidina que fue hidrolizado, obteniendo solamente el aminoácido histidina, teniendo en cuenta que durante la reacción de aminólisis el éster de aminoácido da como subproducto un alcohol pequeño, el medio de reacción sigue siendo libre de agua para continuar con la aminólisis, pero al tener solamente al aminoácido en el medio de reacción, el subproducto será agua, lo cual promoverá la reacción de hidrólisis. La pérdida del grupo metilo en el proceso de desalinización no hace posible la polimerización de la histidina. Este resultado no puede ser comparado debido a que no es concluyente tener un homopolipéptido de histidina.

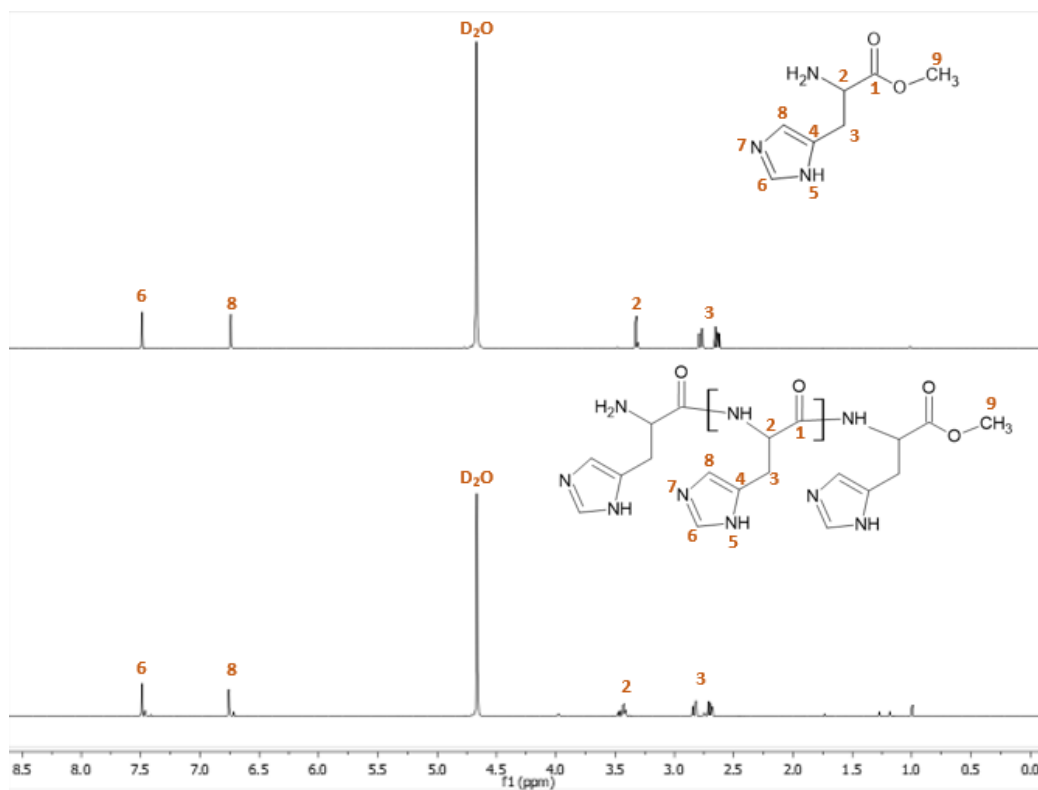


Figura 12. ¹H-RMN del Monómero de L-Histidina-OMe desalinizado (parte superior) y del producto de la reacción (parte inferior).

Morfología de los nanotubos

La preparación y el autoensamblaje de nanotubos peptídicos mediante un proceso de inducción de disolventes ha demostrado ser el método de formulación más común. Sin embargo, un factor importante que limita este enfoque a los productos farmacéuticos es el uso de disolventes orgánicos. La muestra de poli(L-Fenilalanina-OEt) (PLP) presentó autoensamblaje supramolecular, se observaron muestras de nanotubos con diámetros promedios de $0.21 \pm 0.04 \mu\text{m}$, diámetros más pequeños que los reportados para difenilalaninas (Alam et al 2016). El cosolvente HFIP fue reemplazado por AIP que desencadena el autoensamblaje de estructuras nanotubulares en agua. La toxicidad del HFIP reduce la aceptabilidad de tales formulaciones para la industria farmacéutica, los reguladores y los pacientes. El cosolvente AIP es un menos tóxico y contaminante. La cantidad de cosolvente utilizada para la generación de nanotubos es muy pequeña, siendo mayoritariamente agua el entorno para lograr el autoensamblado de la PLP, lo cual

puede ser de interés para aplicaciones biomédicas. Las micrografías ópticas son evidencia de la presencia de nanotubos de PLP, como se muestra en la Figura 11. Vale la pena señalar que la formación nanotubos de dímeros de fenilalanina reportados en la literatura donde también se utiliza AIP como cosolvente, no presentaron citotoxicidad (Alam et al 2016).

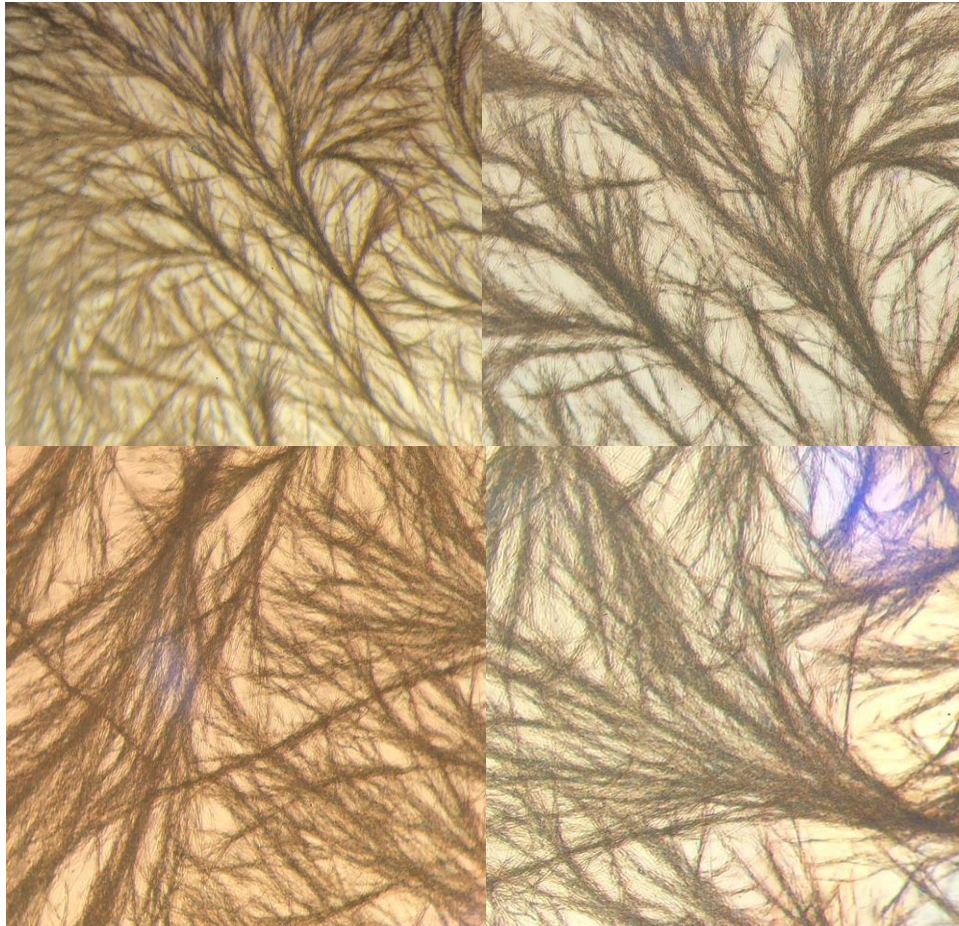


Figura 13. Micrografías ópticas de PLP autoensamblada a 4 °C en relación AIP/H₂O 1:99.

Los análisis SEM presentados en la Figura 12 corroboran que PLP se autoensambla con una morfología de tubos definidos a 4 °C en 0.5 mg/mL con una proporción de 1:99 de AIP/H₂O. Es notable que bajo estas condiciones el proceso de autoensamblaje se controla permitiendo estructuras bien definidas con un tamaño homogéneo. Anteriormente se ha demostrado que los parámetros fisicoquímicos, por ejemplo, la concentración y la proporción agua/cosolventes utilizados para la preparación son importantes para controlar el tamaño de estas estructuras (Amaral

et al 2012, Romero-Montero et al 2021). Aunque la polidispersidad no se descarta es probable que se formen microtubos durante los pasos de secado en la preparación de la muestra.

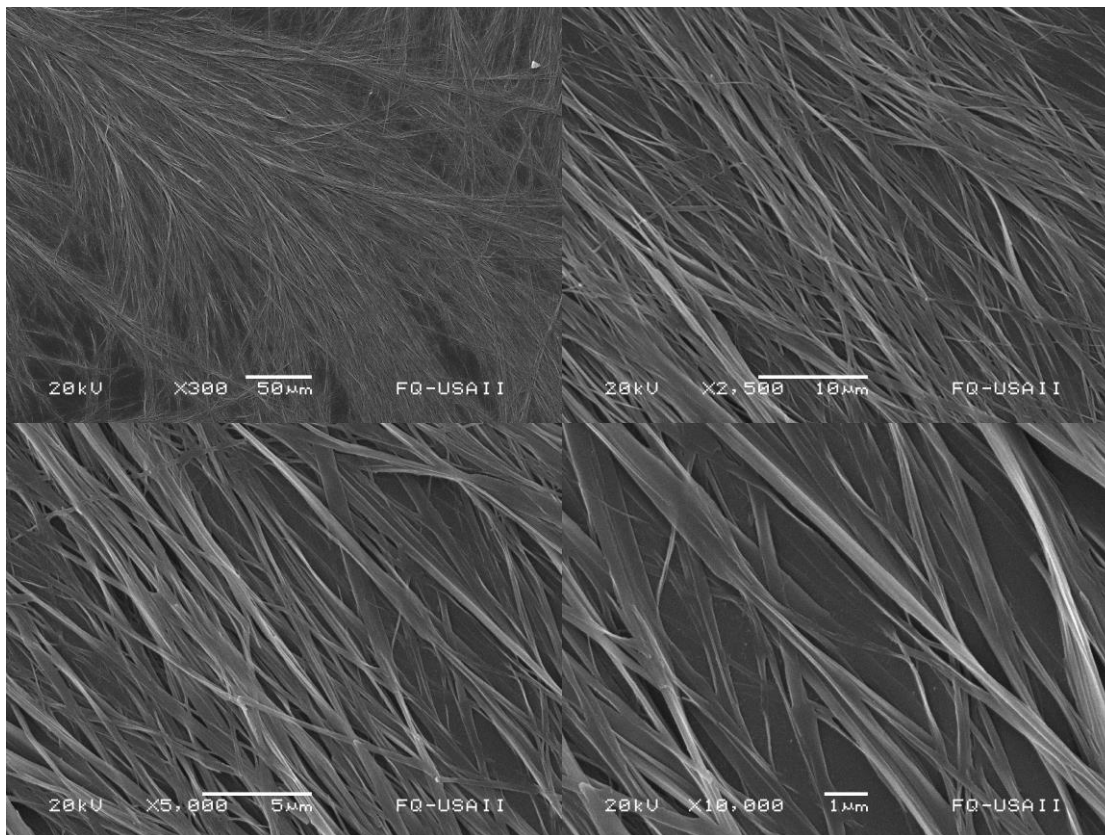


Figura 14. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) para los nanotubos PLP obtenidos a 4 °C y en relación 1:99 AIP/H₂O.

Carga de cloroquina en nanotubos de PLP y liberación del fármaco.

La formación de nanotubos también procede de una relación 1:99 AIP/H₂O a 4°C con una relación molar 1:1 PLP:CLQ. La presencia de CLQ en el medio no tiene ningún efecto sobre el autoensamblaje de PLP en nanotubos en estas condiciones óptimas reportadas. Para comprobar que los nanotubos de PLP envuelven el fármaco, se realizó la misma metodología para envolver una proteína fluorescente y se realizaron las micrografías de la Figura 13, la fluorescencia observada proviene del interior de los nanotubos, donde se puede notar más fluorescencia donde se encuentra mayor concentración de enzima fluorescente, a pesar de que no se puede

descartar la auto fluorescencia del polipéptido y de que la proteína este en la superficie por interacciones con el polipéptido.

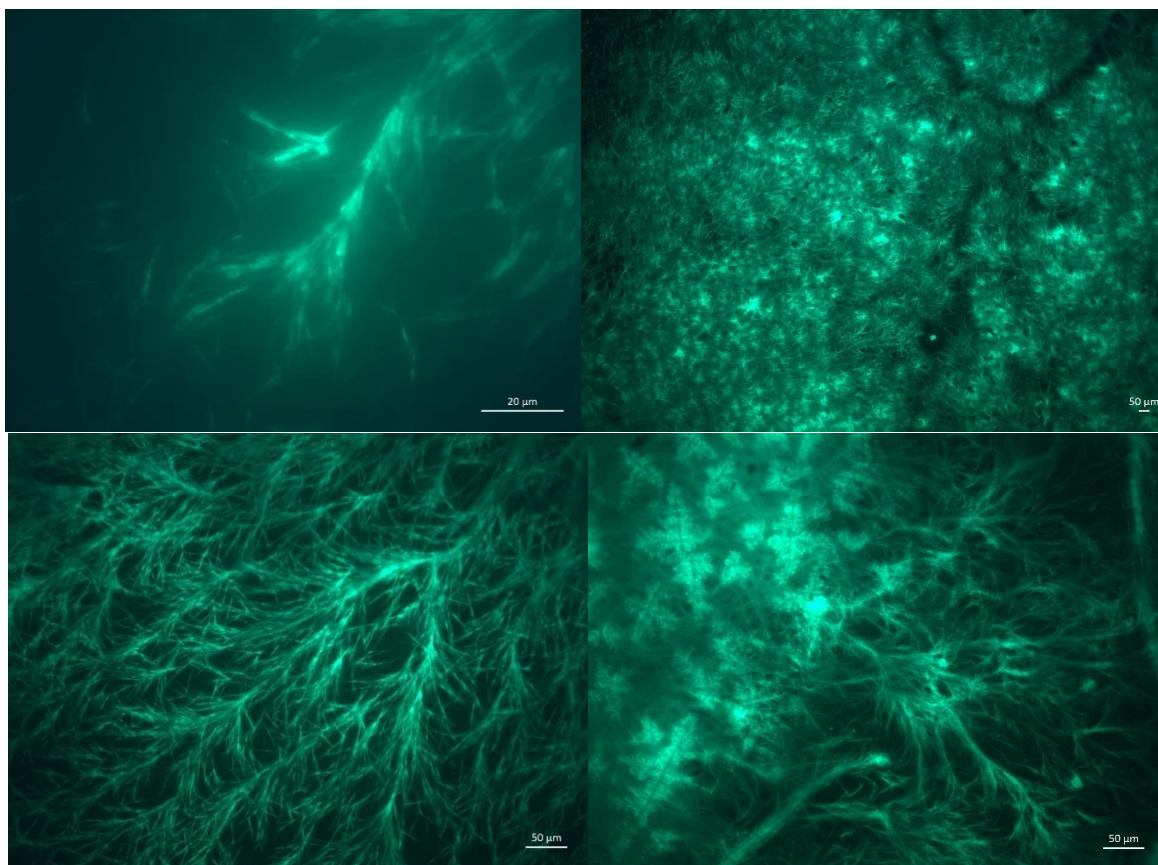


Figura 15. Micrografías de nanotubos 1:99 AIP:H₂O cargados con enzima fluorescente.

En la Figura 14 se muestra el ensayo de liberación de CLQ en un medio fisiológico (PBS), mostrando que se lleva a cabo de manera controlada desde el primer día para la muestra de relación másica PLP: CLQ 1:1, con un aproximado de 95% de liberación del fármaco en 15 días. Este comportamiento de liberación controlada donde el fármaco es liberado gradualmente a una velocidad limitada por los nanotubos, podría reducir la frecuencia de administración, permitiendo que un medicamento de duración de acción corta pueda ser administrado con menor frecuencia.

Estudios previos reportan la liberación de cloroquina en sistemas de nanoestructuras de carbono, donde a diferencia de los nanotubos de PLP la liberación completa del medicamento se da en un día, además de que estos

materiales tienen limitantes como altos costos de producción, impurezas y poca solubilidad de los materiales (Sanz et al 2011, Jha et al 2020).

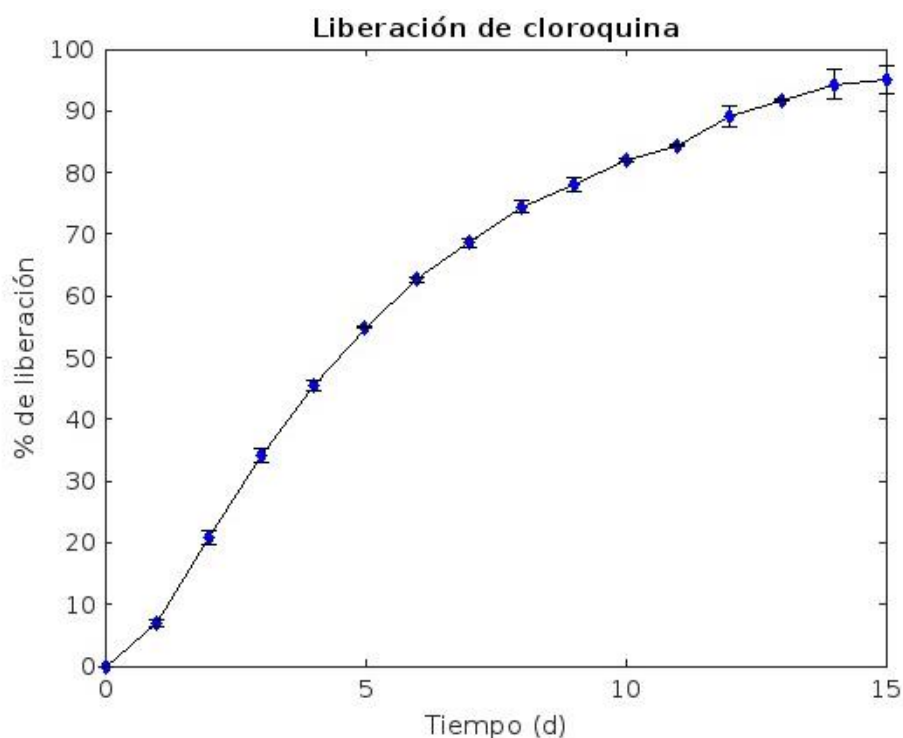


Figura 16. Liberación de CLQ de nanotubos de PLP/CLQ 1:1

CONCLUSIONES

Se sintetizó con éxito el homopolipéptido de L-Triptófano-OEt y el copolipéptido de L-Fenilalanina-co-L-Triptófano, usando proteasa SC en el medio R-134a en estado líquido, con el $^1\text{H-RMN}$ se pueden integrar las señales y aproximar que se obtuvo una cadena de 300 unidades de repetición. El medio no convencional de reacción que fue un fluorocarbono se encontró como un medio adecuado para producir estos polipéptidos por medios enzimáticos.

La evidencia de la consecución del polipéptido de L-Histidina-OMe no es concluyente, debido a que el $^1\text{H-RMN}$ del monómero desalinizado es igual que el supuesto polímero.

Se demostró el autoensamblaje en nanotubos en condiciones de 1% en volumen de cosolvente orgánico de la PLP (4.2mg/mL). Además, la carga con CLQ no afecta el

autoensamblaje del polipéptido y el estudio de liberación ha sido exitoso. Lo cual comprueba la aplicación de polipéptidos enzimáticos sintetizados en un disolvente orgánico en un esquema de liberación prolongada de este fármaco por 15 días o más.

REFERENCIAS.

1. Aguirre-Díaz, 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. *RSC advances*, 8(63), 35936-35945.
2. Alam, S., Panda, J. J., Mukherjee, T. K., & Chauhan, V. S. (2016). Short peptide based nanotubes capable of effective curcumin delivery for treating drug resistant malaria. *Journal of nanobiotechnology*, 14(1), 1-14.
3. Amaral, H. R., Kogikoski Jr, S., Silva, E. R., Souza, J. A., & Alves, W. A. (2012). Micro-and nano-sized peptidic assemblies prepared via solid-vapor approach: Morphological and spectroscopic aspects. *Materials Chemistry and Physics*, 137(2), 628-636.
4. Aymonier, C., Le Meur, A. C., & Heroguez, V. (2011). Synthesis of nanocomposite particles using supercritical fluids: a bridge with bio-applications. *Nanocomposite particles for bio-applications: materials and bio-interfaces*. Pan Stanford Publishing Ltd, Singapore, 145-164.
5. Barberis, S., Guzmán, F., Illanes, A., López-Santín, J., Wilson, L., Álvaro, G., Feijoo, G. (2008). Study cases of enzymatic processes. *Enzyme biocatalysis: principles and applications*, 253-378.
6. Bonduelle, C. (2018). Secondary structures of synthetic polypeptide polymers. *Polymer Chemistry*, 9(13), 1517-1529
7. Brunner, G. (2010). Applications of supercritical fluids. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 1, 321-342.
8. Deming, T. J. (2007). Synthetic polypeptides for biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 32(8-9), 858-875.
9. Erbedinger M, Mesiano AJ, Russell AJ (2010) Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid an alternative to enzymatic catalysis in organic solvents. *Biotechnol Prog* 16:1129–1131
10. Espinoza-González, Á., Hernández-Valencia, C., Cedeño-Caero, L., Sánchez-Sánchez, R., Montiel, C., & Gimeno, M. (2023). Protease-catalyzed synthesis of α -poly-L-Lysine and amphiphilic poly(L-lysine-co-L-phenylalanine) in a neat non-toxic organic solvent. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 46(4), 515-522.
11. Feng, L., Wang, Y., Yang, J., Sun, Y. F., Li, Y. W., Ye, Z. H., ... & Yang, K. (2022). Overview of the preparation method, structure and function, and application of

- natural peptides and polypeptides. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 153, 113493.
12. Guevara, M. G., & Daleo, G. R. (Eds.). (2018). *Biotechnological Applications of Plant Proteolytic Enzymes*. Springer International Publishing.
 13. Guzmán, F., Barberis, S., & Illanes, A. (2007). Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(2), 279-314.
 14. Guzmán-Lagunes, F., López-Luna, A., Gimeno, M., & Bárzana, E. (2012). Enzymatic synthesis of poly-L-lactide in supercritical R134a. *The Journal of Supercritical Fluids*, 72, 186-190.
 15. Habibi, N., Kamaly, N., Memic, A., & Shafiee, H. (2016). Self-assembled peptide-based nanostructures: Smart nanomaterials toward targeted drug delivery. *Nano today*, 11(1), 41-60.
 16. Haddoub, R., Dauner, M., Stefanowicz, F. A., Barattini, V., Laurent, N., & Flitsch, S. L. (2009). Enzymatic synthesis of peptides on a solid support. *Organic & biomolecular chemistry*, 7(4), 665-670.
 17. Hobbs, H. R., & Thomas, N. R. (2007). Biocatalysis in supercritical fluids, in fluorinated solvents, and under solvent-free conditions. *Chemical reviews*, 107(6), 2786-2820.
 18. Illanes, A. (2015). Biocatalysis in organic media. In *White biotechnology for sustainable chemistry* (pp. 36-51).
 19. Illanes, A., Guzmán, F., & Barberis, S. E. (2009). Proteases as powerful catalysts for organic synthesis.
 20. Jaeger, V., Burney, P., & Pfaendtner, J. (2015). Comparison of three ionic liquid-tolerant cellulases by molecular dynamics. *Biophysical journal*, 108(4), 880-892.
 21. Jha, R., Singh, A., Sharma, P. K., & Fuloria, N. K. (2020). Smart carbon nanotubes for drug delivery system: A comprehensive study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 58, 101811.
 22. Jois, S. D. (Ed.). (2022). *Peptide Therapeutics: Fundamentals of Design, Development, and Delivery* (Vol. 47). Springer Nature.
 23. Ke, Z., Zhang, X., Cao, Z., Ding, Y., Li, N., Cao, L., ... & Xiao, W. (2016). Drug discovery of neurodegenerative disease through network pharmacology approach in herbs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 78, 272-279.
 24. Khandelwal, S., Tailor, Y. K., & Kumar, M. (2016). Deep eutectic solvents (DESs) as eco-friendly and sustainable solvent/catalyst systems in organic transformations. *Journal of Molecular Liquids*, 215, 345-386.
 25. Klimek, K., & Ginalska, G. (2020). Proteins and peptides as important modifiers of the polymer scaffolds for tissue engineering applications—a review. *Polymers*, 12(4), 844.
 26. Knez, Ž. (2009). Enzymatic reactions in dense gases. *The Journal of supercritical fluids*, 47(3), 357-372.

27. Kobayashi, S., Uyama, H., & Kadokawa, J. I. (Eds.). (2019). *Enzymatic polymerization towards green polymer chemistry*. Singapore: Springer.
28. Kumar, D., & Bhalla, T. C. (2005). Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 68, 726-736.
29. Lemes, A. C., Sala, L., Ores, J. D. C., Braga, A. R. C., Egea, M. B., & Fernandes, K. F. (2016). A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. *International journal of molecular sciences*, 17(6), 950.
30. Mahlapuu, M., Björn, C., & Ekblom, J. (2020). Antimicrobial peptides as therapeutic agents: Opportunities and challenges. *Critical reviews in biotechnology*, 40(7), 978-992.
31. Mandal, S. M., Roy, A., Ghosh, A. K., Hazra, T. K., Basak, A., & Franco, O. L. (2014). Challenges and future prospects of antibiotic therapy: from peptides to phages utilization. *Frontiers in pharmacology*, 5, 105.
32. Maugeri, Z., & de María, P. D. (2012). Novel choline-chloride-based deep-eutectic-solvents with renewable hydrogen bond donors: levulinic acid and sugar-based polyols. *Rsc Advances*, 2(2), 421-425.
33. McKee, T., McKee, J. R., & González de Buitrago, J. M. (2003). *Bioquímica: la base molecular de la vida*.
34. Moniruzzaman, M., Nakashima, K., Kamiya, N., & Goto, M. (2010). Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. *Biochemical Engineering Journal*, 48(3), 295-314.
35. National Research Council. (2002). 1, 1, 1, 2-Tetrafluoroethane (HFC-134a): Acute Exposure Guideline Levels. In *Acute Exposure Guideline Levels for Selected Airborne Chemicals: Volume 2*. National Academies Press (US).
36. Nettles, D. L., Chilkoti, A., & Setton, L. A. (2010). Applications of elastin-like polypeptides in tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, 62(15), 1479-1485.
37. Nilsson, B. L., Soellner, M. B., & Raines, R. T. (2005). Chemical synthesis of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 34, 91-118.
38. Priyadarshini, A., & Pandey, P. (2018). *Enzymes in non-conventional media. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology: Fundamentals, Advances, and Practices for a Greener Future*. first ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
39. Qvit, N., Rubin, S. J., Urban, T. J., Mochly-Rosen, D., & Gross, E. R. (2017). Peptidomimetic therapeutics: scientific approaches and opportunities. *Drug discovery today*, 22(2), 454-462.
40. Romero-Montero, A., Aguirre-Díaz, I. S., Puiggali, J., del Valle, L. J., & Gimeno, M. (2021). Self-assembly of supramolecular chemoenzymatic poly-L-phenylalanine. *Polymer Chemistry*, 12(9), 1199-1209.
41. Saul S, Corr S, Micklefield J (2004) Biotransformations in Low-Boiling hydrofluorocarbon Solvents. *Angew Chem Int Ed* 43: 5519–5523

42. Sanz, V., Tilmaciu, C., Soula, B., Flahaut, E., Coley, H. M., Silva, S. R. P., & McFadden, J. (2011). Chloroquine-enhanced gene delivery mediated by carbon nanotubes. *Carbon*, 49(15), 5348-5358.
43. Schmitke, J. L., Stern, L. J., & Klibanov, A. M. (1997). The crystal structure of subtilisin Carlsberg in anhydrous dioxane and its comparison with those in water and acetonitrile. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(9), 4250-4255.
44. Sedighi, M., Mahmoudi, Z., Ghasempour, A., Shakibaie, M., Ghasemi, F., Akbari, M., ... & Shahbazi, M. A. (2023). Nanostructured multifunctional stimuli-responsive glycopolyptide-based copolymers for biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 354, 128-145.
45. Sela, M., Steinberg, I. Z., & Daniel, E. (1961). Optical rotatory properties of poly-L-tryptophan. *Biochimica et Biophysica Acta*, 46(3), 433-440
46. Stepankova, V., Damborsky, J., & Chaloupkova, R. (2014). Hydrolases in non-conventional media: implications for industrial biocatalysis. *Industrial biocatalysis*, 583-629.
47. Patchornik, A., Sela, M., & Katchalski, E. (1954). Polytryptophan. *Journal of the American Chemical Society*, 76(1), 299-300.
48. Verma, M. L., & Chandel, A. (Eds.). (2019). *Biotechnological production of bioactive compounds*. Elsevier. 116.
49. Wang, X., Song, Z., Wei, S., Ji, G., Zheng, X., Fu, Z., & Cheng, J. (2021). Polypeptide-based drug delivery systems for programmed release. *Biomaterials*, 275, 120913.
50. Williams, R. J., Smith, A. M., Collins, R., Hodson, N., Das, A. K., & Ulijn, R. V. (2009). Enzyme-assisted self-assembly under thermodynamic control. *Nature nanotechnology*, 4(1), 19-24.