



FACULTAD DE QUIMICA, BIOQUIMICA Y FARMACIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

Tesis Doctoral

*Presentada a la Universidad Nacional de San Luis
Para obtener el título de Doctora en Bioquímica*

*“Síntesis de péptidos bioactivos, de interés alimenticio y
farmacéutico, utilizando nuevas fitoproteasas”*

Doctorando: Bioquímica Nacional Grisel Bersi.

Directora: Dra. Sonia Esther Barberis.

Co-directora: Dra. Fanny Guzman Quimbayo.

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Bromatología, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis.

-2018-

Dedicatoria

A mis padres y a mi hija....

Pilares fundamentales en mi vida

Agradecimientos

A mis padres...

Por el amor y el apoyo incondicional brindados día a día, por creer en mi y darme la oportunidad de seguir y cumplir mis metas, por acompañar mis logros y enseñarme a ser una persona de bien, inculcar en mi la perseverancia, la voluntad y la fortaleza para afrontar todos los desafíos de la vida. Todo esto no sería posible sin ustedes...gracias infinitas!

A mi hija...

Constanza eres el motor que enciende los latidos de mi corazón y me inspira a superarme y ser mejor día a día, la fuente de motivación más grande de mi vida, hija mía gracias...por tu amor infinito, por tu compañía y por la felicidad con la que alegras mi vida.

A mis hermanos...

Por el apoyo y la valiosa compañía en los momentos difíciles, por compartir mis logros como si fueran propios, por querer lo mejor para mi vida...Gracias por estar siempre!

A mi Directora y Co-Directora....

Muchas Gracias por su valiosa guía durante estos años, por la motivación constante, por compartir su conocimiento y permitirme crecer profesionalmente.

A mis amigos...

Ana, Mauri, Juani, Juan, Caro, Fer, Joha les agradezco a todos ustedes con toda mi alma por haber llegado a mi vida y compartir momentos agradables y momentos tristes, momentos que nos hacen crecer y valorar las personas que nos rodean.

A Diego Vallés y Ana M. Cantera...

Por la excelente predisposición siempre y por confiar en nuestro trabajo...Muchas Gracias!

A mis compañeros de Bromatología...

Por transmitir su conocimiento de forma desinteresada, por creer en mis capacidades, por el compañerismo, la comprensión y el apoyo brindado en todos estos años...a todos gracias!

A los integrantes del Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos y a los integrantes del Laboratorio de Membranas y Biomateriales...

Por la ayuda, la excelente predisposición y el cariño recibido...Gracias!

A los integrantes del Laboratorio de Diseño y Síntesis de Péptidos...

Por enseñarme a trabajar en equipo, por transmitir sus conocimientos y por recibirme tan gentilmente haciéndome sentir como en mi país a pesar de la distancia...Gracias!

A Gerardo, Nico, Moni por su excelente predisposición y ayuda!

¡Gracias a Dios y a la vida por este nuevo triunfo!

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	15
--------------	----

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN.....	24
-------------------	----

PÉPTIDOS BIOACTIVOS.....	25
--------------------------	----

Péptidos antimicrobianos.....	26
-------------------------------	----

Péptidos antihipertensivos.....	27
---------------------------------	----

Péptidos anticoagulantes.....	28
-------------------------------	----

TECNOLOGÍAS DE PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS.....	28
---	----

Síntesis química de péptidos.....	29
-----------------------------------	----

Síntesis enzimática de péptidos.....	33
--------------------------------------	----

Comparación entre las tecnologías de síntesis química y enzimática de péptidos..	34
--	----

PROTEASAS.....	38
----------------	----

Clasificación y mecanismos catalíticos.....	38
---	----

Proteasas como catalizadores de la síntesis de péptidos.....	39
--	----

Medios no convencionales para la síntesis enzimática de péptidos.....	40
---	----

Mecanismos de la síntesis enzimática de péptidos.....	47
---	----

OBJETIVO GENERAL.....	52
-----------------------	----

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
----------------------------	----

CAPITULO 2

METODOLOGÍAS.....	55
-------------------	----

<i>Preparación y caracterización de los extractos enzimáticos de Bromelia antiacantha Bertol.....</i>	<i>56</i>
---	-----------

Material vegetal.....	56
-----------------------	----

Preparación del extracto crudo de <i>Bromelia antiacantha</i> Bertol.....	56
---	----

Purificación preliminar del extracto crudo.....	56
Determinación de la actividad proteolítica de <i>antiacanthaina</i>	57
Determinación de las preferencias de <i>antiacanthaina</i> frente a sustratos aminoácidos sintéticos.....	57
Determinación de la estabilidad operacional de <i>antiacanthaina</i> en diferentes sistemas acuosos–orgánicos.....	58
Determinación del contenido acuoso de <i>antiacanthaina</i> suspendida en medios orgánicos casi anhidros.....	58
Efecto de los solventes orgánicos sobre la estructura secundaria de <i>antiacanthaina</i> por FTIR.....	60
<i>Inmovilización de antiacanthaina</i>	61
Inmovilización covalente multipuntual de <i>antiacanthaina</i> en sílica-glioxil (SGx)..	61
<i>Aplicación de fitoproteasas como nuevos catalizadores para la síntesis de péptidos bioactivos en sistemas acuosos-orgánicos</i>	63
Selección de las condiciones operacionales para las reacciones de síntesis enzimática de péptidos bioactivos	63
Selección de péptidos naturales tomados como modelo para las reacciones de síntesis, con potencial actividad antihipertensiva y antimicrobiana.....	64
Selección de péptidos <i>de novo</i> obtenidos en nuestro laboratorio a partir de fuentes naturales (proteínas casearias).....	64
Diseño de péptidos híbridos con potencial actividad antihipertensiva	65
Síntesis enzimática de los péptidos bioactivos seleccionados y diseñados, con potencial actividad antihipertensiva y antimicrobiana, utilizando <i>antiacanthaina</i> libre	66
Síntesis enzimática de los péptidos bioactivos seleccionados y diseñados, utilizando <i>antiacanthaina</i> inmovilizada.....	70
Maximización de los rendimientos en producto peptídico.....	70
<i>Síntesis química de péptidos bioactivos</i>	71

Síntesis química de péptidos en fase sólida (SPPS).....	71
Síntesis química simultánea de péptidos, utilizando bolsas de polipropileno.....	71
Síntesis química de péptidos utilizando reactores	72
<i>Purificación de péptidos sintéticos.....</i>	<i>73</i>
Protocolo de purificación para péptidos sintetizados por vía química y enzimática	73
<i>Determinación de las actividades biológicas in vitro de los péptidos (análogos, precursores e híbridos) sintetizados por vía química y enzimática</i>	<i>74</i>
Determinación de la actividad antihipertensiva <i>in vitro</i>	74
Determinación de la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i>	74
Determinación de la actividad anticoagulante <i>in vitro</i>	75
<i>Ensayos de toxicidad aguda de los péptidos sintetizados.....</i>	<i>76</i>
Determinación de la toxicidad aguda de los péptidos sintetizados en ensayos <i>in vitro</i> de línea celulares	76
<i>Determinación de la estabilidad de los péptidos sintetizados.....</i>	<i>77</i>
Determinación de la estabilidad de los péptidos sintetizados en plasma humano...77	
<i>Determinación cuantitativa de fibrinógeno en plasma en presencia de los péptidos sintetizados.....</i>	<i>77</i>
Determinación cuantitativa de fibrinógeno en plasma mediante el método inmunturbidimétrico.....	77
CAPITULO 3	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	79
<i>Caracterización del extracto pre-purificado de Bromelia antiacantha Bertol.....</i>	<i>80</i>
Actividad proteolítica de <i>antiacanthaina</i> en solución acuosa.....	80

Estabilidad operacional de <i>antiacanthaina</i> en medios formados por una solución acuosa y solventes orgánicos.....	80
Estabilidad operacional de <i>antiacanthaina</i> en sistemas homogéneos (miscibles)....	81
Estabilidad operacional de <i>antiacanthaina</i> en sistemas macroheterogéneos líquido-líquido (bifásicos)	84
Estabilidad operacional de <i>antiacanthaina</i> en sistemas microheterogéneos (contínuos).....	86
Contenido acuoso de <i>antiacanthaina</i> suspendida en medios orgánicos casi anhidros	87
Preferencia de <i>antiacanthaina</i> en buffer Tris-HCl 0,1M (pH 6).....	90
Preferencias de <i>antiacanthaina</i> en diferentes sistemas acuoso – orgánicos.....	91
Efecto de los solventes orgánicos sobre la estructura secundaria de <i>antiacanthaina</i> en sistemas acuoso – orgánicos, por FTIR.....	93
<i>Inmovilización de antiacanthaina</i>	98
Inmovilización covalente multipuntual de <i>antiacanthaina</i> en sílica-glioxil (SGx)...	98
<i>Selección de las condiciones y péptidos a sintetizar por vía química, enzimática y químo-enzimática</i>	99
Selección de péptidos naturales y de <i>novo</i> tomados como modelo para las reacciones de síntesis, con potencial actividad antihipertensiva y antimicrobiana.....	99
Selección de las condiciones operacionales para las reacciones de síntesis enzimática de péptidos bioactivos	100
Solubilidad y coeficiente de partición de los sustratos a utilizar en los medios de reacción seleccionados para las síntesis enzimáticas de péptidos.....	101
<i>Síntesis química en fase sólida (SPPS) de los patrones de los péptidos seleccionados</i>	102
<i>Síntesis enzimática de péptidos bioactivos en sistemas acuoso-orgánicos</i>	109

SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE PÉPTIDOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA.....	109
Síntesis enzimática de N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH (Z-YL), análogo de Tyr-Leu-OH, en sistemas homogéneo y macroheterogéneo.....	109
Síntesis enzimática de N- α -CBZ-Tyr-Gln-OH (Z-YQ), análogo del precursor (Tyr-Gln-OH) del tripéptido Tyr-Gln-Gln-OH (YQQ), en sistemas homogéneo y macroheterogéneo	119
SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE PÉPTIDOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	120
Síntesis enzimática de N- α -CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV), análogo del precursor (Tyr-Val-OH) del tripéptido Tyr-Val-Leu-OH (YVL), en sistemas homogéneo y macroheterogéneo	120
Síntesis de N- α -CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV) en un sistema continuo (acetato de etilo) con baja a_w ($X_w: 1 \times 10^{-5}$), usando <i>antiacanthaina</i> inmovilizada	129
SÍNTESIS QUIMO-ENZIMÁTICA DE UN PÉPTIDO HÍBRIDO.....	132
Síntesis quimo-enzimática del péptido híbrido N- α -CBZ-Tyr-Leu-Leu-OH (Z-YLL) en un sistema macroheterogéneo	132
<i>Actividades biológicas in vitro de los péptidos sintetizados...</i>	134
Actividad antihipertensiva <i>in vitro</i> de N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH (Z-YL), Tyr-Leu-OH (YL), N- α -CBZ-Tyr-Leu-Leu-OH (Z-YLL) y Tyr-Gln-Gln-OH (YQQ).....	134
Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de N- α -CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV), Tyr-Val-OH (YV) y Tyr-Val-Leu-OH (YVL).....	137
OTRAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS PÉPTIDOS SINTETIZADOS.....	142
Actividad anticoagulante <i>in vitro</i> de Tyr-Gln-Gln-OH (YQQ).....	142
<i>Ensayos de toxicidad aguda de los péptidos sintetizados en ensayos in vitro, utilizando líneas celulares.....</i>	143
Toxicidad aguda <i>in vitro</i> de Tyr-Gln-Gln-OH (YQQ).....	143

Determinación de la estabilidad de los péptidos sintetizados.....144

Estabilidad de Tyr-Gln-Gln-OH (YQQ) en plasma humano.....144

Determinación cuantitativa de fibrinógeno en plasma humano, en presencia de los péptidos sintetizados por el método inmunturbidimétrico.....145

CAPITULO 4

CONCLUSIONES.....148

CAPITULO 5

PROYECCIONES FUTURAS154

BIBLIOGRAFÍA.....155

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas de la síntesis química y enzimática de péptidos	35
Tabla 2. Diseño estadístico de los solventes orgánicos en función de sus parámetros físico-químicos.....	59
Tabla 3. Cantidad de agua adicionada a los solventes orgánicos para obtener una fracción relativa de agua en la enzima constante e igual a 1×10^{-5}	88
Tabla 4. Preferencias del extracto pre-purificado de <i>antiacanthaina</i> en buffer Tris- HCl (0,1 M) pH 6 frente a derivados N- α -CBZ-Aminoácido <i>p</i> -nitrofenil éster.....	91
Tabla 5. Preferencias del extracto pre-purificado de <i>antiacanthaina</i> en diferentes sistemas acuoso-orgánicos utilizando derivados N- α -CBZ-Aminoácidos <i>p</i> -nitrofenil éster	92
Tabla 6: Áreas relativas de los componentes de la banda amida I del espectro infrarrojo de <i>anticanthaína A</i> en buffer Tris-HCl (0,1 M) pH 8 y en diferentes sistemas acuoso-orgánicos.....	96
Tabla 7. Coeficiente de similitud espectral (<i>r</i>) de <i>antiacanthaina A</i> en buffer y en diferentes sistemas acuoso – orgánicos.....	97
Tabla 8. Péptidos naturales modelo y de <i>novo</i> con potencial actividad antimicrobiana y antihipertensiva.....	100
Tabla 9. Rendimiento en producto y grado de conversión del donador de acilo en la síntesis bajo control cinético de N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH, en un medio formado por acetato de etilo (50% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), conteniendo <i>antiacanthaina</i> libre, a 40°C y 200rpm.....	112
Tabla 10. Maximización del rendimiento en producto y grado de conversión del donador de acilo en la reacción de síntesis de N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH, en un medio formado por acetato de etilo (50%(v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), conteniendo <i>antiacanthaina</i> libre, a 40°C y 200rpm.....	113
Tabla 11. Rendimiento en producto y grado de conversión del donador de acilo en la síntesis enzimática bajo control cinético del péptido N- α -CBZ-Tyr-(Leu) ₂ -Leu-OH en un medio formado por metanol (30%(v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9); conteniendo <i>antiacanthaina</i> libre, a 40°C y 200rpm.....	117

Tabla 12. Rendimiento en producto y grado de conversión del donador de acilo en la síntesis enzimática del péptido N- α -CBZ-Tyr-Val-OH en un medio formado por acetato de etilo (50%(v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9); conteniendo <i>antiacanthaina</i> libre, a 40°C y 200rpm.....	122
Tabla 13. Maximización del rendimiento en producto de la reacción de síntesis enzimática del péptido N- α -CBZ-Tyr-Val-OH en un medio formado por acetato de etilo (50%(v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9); conteniendo <i>antiacanthaina</i> libre, a 40°C y 200rpm.....	123
Tabla 14. Rendimiento en producto y grado de conversión del donador de acilo en la síntesis enzimática bajo control cinético del péptido N- α -CBZ-Tyr-(Val) ₂ -Val-OH en un medio formado por metanol (30%(v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9); conteniendo <i>antiacanthaina</i> libre, a 40°C y 200rpm.....	128
Tabla 15. Rendimiento en producto y grado de conversión del donador de acilo en la síntesis bajo control cinético del péptido N- α -CBZ-Tyr-Val-OH, en un medio formado por acetato de etilo (50% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando <i>antiacanthaina</i> inmovilizada en sílica-glioxil; a 40°C y 200rpm.....	131
Tabla 16. Porcentajes de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en presencia de los péptidos sintetizados.....	136
Tabla 17. Test de coagulación para evaluar la actividad anticoagulante del tripéptido Tyr-Gln-Gln-OH (YQQ), obtenido por síntesis química. APTT: Tiempo Parcial de Tromboplastina Activado. PT: Tiempo de Protrombina. TT: Tiempo de Trombina.....	143
Tabla 18: Efecto del péptido Tyr-Gln-Gln-OH (YQQ) sobre la enzima trombina, usando la determinación cuantitativa de fibrinógeno en plasma mediante el método inmunoturbidimétrico.....	145

ÍNDICE DE FIGURAS





Figura 1. Esquema de síntesis en fase sólida (SPPS) :  : resina;  ,  : grupos protectores de las cadenas laterales;  : grupo protector α -amino. 1: acople del primer residuo; 2: desprotección; 3: acople de los siguientes residuos (ciclo iterativo); 4: clivaje y desprotección de cadenas laterales (Guzman, 2013).....	31
Figura 2. Representación del mecanismo catalítico de las proteasas cisteínicas.....	39
Figura 3. Representación del mecanismo de síntesis de péptidos cinéticamente controlada, utilizando proteasas.....	49
Figura 4. Síntesis de péptidos catalizada por proteasas de acuerdo a la nomenclatura de Schechter and Berger (Schechter y Berger, 1967).....	51
Figura 5: Hoja, flores y frutos de <i>Bromelia antiacantha</i> Bertol.....	56
Figura 6. Actividad enzimática específica (UI/mg de proteína) de <i>antiacanthaina</i> en sistemas miscibles formados por buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8) y diferentes solventes orgánicos miscibles: a) 30% b) 50% y c) 70% (v/v), a 40°C y 200 rpm de agitación, durante 24h de incubación.....	82
Figura 7. Actividad enzimática específica (UI/mg de proteína) de <i>antiacanthaina</i> en sistemas bifásicos formados por buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8) y diferentes solventes orgánicos inmiscibles: a) 30% b) 50% y c) 70% (v/v), a 40°C y 200 rpm de agitación, durante 24h de incubación.....	85
Figura 8. Actividad enzimática específica (UI/mg de proteína) de <i>antiacanthaina</i> en sistemas continuos formados por diferentes solventes orgánicos con bajo contenido acuoso (fracción relativa de agua en la enzima constante; $X_w: 1 \times 10^{-5}$), a 40°C y 200 rpm, durante 24h de incubación.....	89
Figura 9. Espectro infrarrojo de <i>antiacanthaina</i> A en: buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8) (línea), metanol 30%(v/v) (guión), acetonitrilo 70%(v/v) (puntos), a 25°C.....	95
Figura 10. Espectro infrarrojo de <i>antiacanthaina</i> A en: buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8) (línea), hexano 50%(v/v) (guión), acetato de etilo 50%(v/v) (puntos), a 25°C.....	95
Figura 11. Cromatograma obtenido por RP-HPLC (a) y espectro de masa (b) del péptido carboxi terminal Tyr-Val-Leu-OH (YVL) con potencial actividad antimicrobiana ...	103

Figura 12. Cromatograma obtenido por RP-HPLC (a) y espectro de masa (b) del péptido carboxi terminal Tyr-Val-OH (YV); precursor del péptido Tyr-Val-Leu-OH (YVL), con potencial actividad antimicrobiana.....	104
Figura 13. Cromatograma obtenido por RP-HPLC (a) y espectro de masa (b) del péptido carboxi terminal N- α -CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV); análogo del precursor Tyr-Val-OH (YV), con potencial actividad antimicrobiana.....	105
Figura 14. Cromatograma obtenido por RP-HPLC (a) y espectro de masa (b) del péptido carboxi terminal Tyr-Leu-OH (YL), con potencial actividad antihipertensiva.....	106
Figura 15. Cromatograma obtenido por RP-HPLC (a) y espectro de masa (b) del péptido carboxi terminal N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH (Z-YL); análogo del precursor Tyr-Leu-OH (YL), con potencial actividad antihipertensiva.....	107
Figura 16. Cromatograma obtenido por RP-HPLC (a) y espectro de masa (b) del péptido carboxi terminal Tyr-Gln-Gln-OH (YQQ), con potencial actividad antihipertensiva y anticoagulante.....	108
Figura 17. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control cinético por RP-HPLC, luego de 3h de reacción con N- α -CBZ-Tyr-pNO y Leu-OH, en un medio bifásico formado por acetato de etilo 50% (v/v) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando <i>antiacanthaina</i> libre como catalizador, a 40°C, 200 rpm. I: enzima; II: N- α -CBZ-Tyr-OH; III: N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH (Z-YL); IV: N- α -CBZ-Tyr-pNO. Fase acuosa: línea azul, Fase orgánica: línea negra.....	110
Figura 18. Variación de la concentración de los diferentes componentes de la reacción de síntesis enzimática del dipéptido N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH (Z-YL) en un medio bifásico formado por acetato de etilo (50% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando <i>antiacanthaina</i> libre como catalizador, a 40°C y 200rpm; en función del tiempo	111
Figura 19. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control termodinámico por RP-HPLC, durante 15h de reacción con N- α -CBZ-Tyr-OH y Leu-OH, en un medio bifásico formado por acetato de etilo (50% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando <i>antiacanthaina</i> libre como catalizador, a 40°C, 200 rpm. I: enzima; II: N- α -CBZ-Tyr-OH. Fase acuosa: línea azul; Fase orgánica: línea negra	114

Figura 20. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control cinético por RP-HPLC, luego de 1 min de reacción con N- α -CBZ-Tyr-pNO y Leu-OH, en un medio miscible formado por metanol (30% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador, a 40°C, 200 rpm. I: enzima; II: N- α -CBZ-Tyr-pNO; III: N- α -CBZ-Tyr-OH; IV: N- α -CBZ-Tyr- (Leu)₂-Leu-OH (Z-YLLL)115

Figura 21. Espectro de masas correspondiente a N- α -CBZ-Tyr-(Leu)₂-Leu-OH (Z-YLLL) obtenido por síntesis enzimática bajo control cinético en un medio miscible formado por metanol (30% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador; a 40°C y 200rpm. m/z: 654,85 (N- α -CBZ-Tyr-(Leu)₂-Leu-OH); m/z: 520,38 (Tyr-(Leu)₃); m/z: 426,73 (N- α -CBZ-Tyr-Leu); m/z: 384,69 (fragmento C₂₀H₂₂N₃O₅); m/z: 248,83 (fragmento C₁₂H₁₄N₃O₃)116

Figura 22. Variación de la concentración de los diferentes componentes de la reacción de síntesis enzimática del tetrapéptido N- α -CBZ-Tyr-(Leu)₂-Leu-OH (Z-YLLL), en un medio miscible formado por metanol (30%(v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador, a 40°C y 200 rpm; en función del tiempo.....117

Figura 23. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control termodinámico por RP-HPLC, durante 15h de reacción con N- α -CBZ-Tyr-OH y Leu-OH, en un medio miscible formado por metanol (30% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador; a 40°C, 200 rpm. I: enzima; II: N- α -CBZ-Tyr-OH.....119

Figura 24. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control cinético por RP-HPLC, luego de 1 h de reacción con N- α -CBZ-Tyr-pNO y Val-OH, en un medio bifásico formado por acetato de etilo (50% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador, a 40°C, 200 rpm. I: enzima, II: N- α -CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV), III: N- α -CBZ-Tyr-pNO. Fase acuosa: línea azul, Fase orgánica: línea rosa, Patrón externo: línea negra.....121

Figura 25. Variación de la concentración de los diferentes componentes de la reacción de síntesis enzimática del dipéptido N- α -CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV), en un medio bifásico formado por acetato de etilo (50 % (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 9),

utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador, a 40°C y 200rpm; en función del tiempo.....122

Figura 26. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control termodinámico por RP-HPLC, durante 15h de reacción con N- α -CBZ-Tyr-OH y Val-OH, en un medio bifásico formado por acetato de etilo (50% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador; a 40°C, 200 rpm. I: enzima; II: N- α -CBZ-Tyr-OH.124

Figura 27. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control cinético por RP-HPLC, luego de 1 min de reacción con N- α -CBZ-Tyr-pNO y Val-OH, en un medio miscible formado por metanol (30% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador, a 40°C, 200 rpm. I: enzima; II: N- α -CBZ-Tyr-pNO; III: N- α -CBZ-Tyr-OH; IV: N- α -CBZ-Tyr-(Val)₂-Val-OH (Z-YVVV)...
.....125

Figura 28. Variación de la concentración de los diferentes componentes de la reacción de síntesis enzimática del tetrapéptido N- α -CBZ-Tyr-(Val)₂-Val-OH (Z-YVVV), en un medio miscible formado por metanol (30 % (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 9), utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador, a 40°C y 200rpm; en función del tiempo.....126

Figura 29. Espectro de masas correspondiente a N- α -CBZ-Tyr-(Val)₂-Val-OH (Z-YVVV) obtenido por síntesis enzimática bajo control cinético en un medio miscible formado por metanol (30% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador; a 40°C y 200rpm. m/z: 612,58 (N- α -CBZ-Tyr-(Val)₂-Val-OH); m/z: 478,58 (Tyr-(Val)₃); m/z: 412,32 (N- α -CBZ-Tyr-Val); m/z: 370,32 (fragmento C₁₉H₁₉N₃O₃); m/z: 235,32 (fragmento C₁₁H₁₂N₃O₃).....127

Figura 30. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control termodinámico por RP-HPLC, durante 5h de reacción con N- α -CBZ-Tyr-OH y Val-OH, en un medio miscible formado por metanol (30% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador; a 40°C, 200 rpm.. I: enzima; II: N- α -CBZ-Tyr-OH.....129

Figura 31. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control cinético por RP-HPLC, luego de 30 min de reacción con N- α -CBZ-Tyr-pNO y Val-OH, en acetato de etilo con baja a_w (X_w: 1 x 10⁻⁵), utilizando *antiacanthaina* inmovilizada en

silica-glioxil como catalizador, a 40°C y 200 rpm. I: enzima (t _R : 3,1min); II: el producto Z-YV (t _R : 3,82min); III: Z-Y-pNO (t _R : 16,01min).....	131
Figura 32. Cromatograma obtenido por (a) RP-HPLC (b) espectrometría de masa del tripéptido híbrido N-α-CBZ-Tyr-Leu-Leu-OH (Z-YLL); obtenido por vía quimoenzimática.....	133
Figura 33. Curva de calibrado del sustrato de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) Abz-FRK-(Dnp)P-OH (FRET) en DMSO	134
Figura 34. Actividad enzimática de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) frente al sustrato Abz-FRK (Dnp)P-OH (FRET) en DMSO, en función del tiempo.....	135
Figura 35. Perfil de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) frente al inhibidor comercial captopril, utilizando Abz-FRK (Dnp)P-OH (FRET) en DMSO.....	135
Figura 36. Cinética de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 en caldo de cultivo Müller-Hinton, en ausencia y presencia del tripéptido Tyr-Val-Leu-OH (YVL) (25µg/ml y 50 µg/ml); a 37°C y 180rpm.....	137
Figura 37. Cinética de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 en caldo de cultivo Müller-Hinton, en ausencia y presencia del dipéptido Tyr-Val-OH (YV) (25µg/ml y 50 µg/ml); a 37°C y 180rpm.....	138
Figura 38. Cinética de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 en caldo de cultivo Müller-Hinton, en ausencia y presencia del dipéptido N-α-CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV) (25µg/ml y 50 µg/ml); a 37°C y 180rpm.....	138
Figura 39. Dependencia de la velocidad específica de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, en caldo de cultivo Müller-Hinton, a 37°C y 180rpm, en función de la concentración de: Tyr-Val-Leu-OH (YVL), Tyr-Val-OH (YV) y N-α-CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV)	139
Figura 40. Cinética de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 en caldo de cultivo Müller-Hinton, en ausencia y presencia del dipéptido Tyr-Val-Leu-OH (YVL) (25µg/ml y 50µg/ml); a 37°C y 180rpm.....	140

Figura 41. Cinética de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 en caldo de cultivo Müller-Hinton, en ausencia y presencia del dipéptido Tyr-Val-OH (YV) (50µg/ml); a 37°C y 180rpm.....	140
Figura 42. Cinética de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 en caldo de cultivo Müller-Hinton, en ausencia y presencia del dipéptido N-α-CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV) (25µg/ml y 50µg/ml); a 37°C y 180rpm.....	141
Figura 43. Dependencia de la velocidad específica de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 en caldo de cultivo Müller-Hinton, a 37°C y 180rpm, en función de la concentración de Tyr-Val-Leu-OH (YVL), Tyr-Val-OH (YV) y N-α-CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV).....	141
Figura 44. Actividad citotóxica <i>in vitro</i> de Tyr-Gln-Gln-OH (YQQ) sobre la línea celular 293FT (aislado clonal derivado de células renales embronarias humanas)....	144
Figura 45. Actividad anticoagulante retenida en un pool de plasma humano de individuos sanos después de su incubación con 0,7ppm de Tyr-Gln-Gln-OH (YQQ), en función del tiempo; expresada como: Tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT), Tiempo de protrombina (PT) y Tiempo de coagulación de trombina (TT). APTT Control: 36 s; Control TP: 14 s; Control TT: 20 s.....	145
Figura 46. Esquema de la cascada de coagulación. En letra negrilla, los factores anticoagulantes. HMWK: quininógeno de alto peso molecular; PK: precalicreína; ATIII: antitrombina; TFPI: inhibidor de la vía del factor tisular; PL: fosfolípido.....	146

RESUMEN

Los péptidos bioactivos son secuencias de dos a unas pocas docenas de aminoácidos y con una masa molecular inferior a 6000 Da, y producen diferentes efectos sobre los sistemas del cuerpo humano (cardiovascular, nervioso, digestivo, inmune, etc.). Dichos péptidos son de interés para la industria farmacéutica y alimenticia como agentes terapéuticos, nutracéuticos y conservantes alimentarios.

En este trabajo se propone aplicar proteasas pre-purificadas provenientes de los frutos de una planta que crece en Argentina, *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromelaceae), en forma soluble, suspendida o inmovilizada y en medios acuoso - orgánicos, como catalizador de la síntesis total o parcial de péptidos con potencial actividad antimicrobiana y antihipertensiva, de interés como conservantes alimentarios y nutracéuticos.

La originalidad de este trabajo está centrada tanto en la síntesis de péptidos con potencial actividad antimicrobiana y antihipertensiva *in vitro* utilizando fitoproteasas autóctonas, como en su potencial aplicación a alimentos como conservantes y nutracéuticos. Además, el desarrollo de péptidos híbridos por vía quimo-enzimática, para ampliar el espectro inhibitorio o la efectividad de las secuencias originales, también es un aspecto que aporta novedad científica a la investigación.

Se realizaron estudios de ingeniería de medios, de sustratos y del biocatalizador, con el objeto de encontrar las condiciones más promisorias para las reacciones de síntesis enzimática de péptidos con actividad antimicrobiana y antihipertensiva *in vitro*.

Para seleccionar los medios de reacción más promisorios de las síntesis de péptidos, se estudió el efecto de los solventes orgánicos (con diferente grado de hidrofobicidad e hidratación) sobre la actividad proteolítica inicial y la estabilidad operacional de *antiacanthaína* en sistemas homogéneos, macroheterogéneos y microheterogéneos, utilizando la enzima libre e inmovilizada en glioxil sílica.

En los sistemas homogéneos, formados por la mezcla de un solvente miscible y buffer Tris-HCl (0,1 M) pH 8, *antiacanthaína* expresó entre 3 y 60 % de las actividades proteolíticas en buffer Tris-HCl, obteniéndose los mejores resultados en metanol 30 % (v/v) y buffer Tris-HCl (0,1 M) pH 8. Sólo 70 % (v/v) de acetonitrilo en el mencionado buffer produjo la inactivación de la enzima.

En los sistemas macroheterogéneos (líquido – líquido), formados por la mezcla de un solvente inmiscible y buffer Tris-HCl (0,1 M) pH 8, los mejores resultados se

obtuvieron con acetato de etilo y hexano 50% (v/v). En estos medios, *antiacanthaína* expresó 108 y 119 % de las actividades proteolíticas en buffer Tris-HCl, respectivamente. No obstante, la mayoría de los medios bifásico estudiados fueron activantes y estabilizantes para la enzima.

Por el contrario, en los sistemas microheterogéneos (solventes orgánicos con bajo contenido acuoso, X_w en la enzima: 1×10^{-5}) *antiacanthaína* expresó muy bajas actividades proteolíticas, respecto de la obtenida en buffer Tris-HCl (0,1M) pH 8.

El efecto de los de los solventes orgánicos sobre la estructura secundaria de *antiacanthaína A* se estudió por FTIR, y se evaluó mediante el coeficiente de similitud espectral (r), tomando como referencia la estructura secundaria obtenida en buffer Tris-HCl (0,1 M) pH 8. Los resultados obtenidos indicaron que *antiacanthaína A* en los sistemas acuosos – orgánicos estudiados tuvo baja similitud espectral respecto de buffer. Sin embargo, algunas de dichas estructuras le impidieron expresar su actividad proteolítica mientras otras produjeron activación, tal es el caso de acetato de etilo y hexano (50% (v/v)). En consecuencia, los cambios en la expresión catalítica de *antiacanthaína* en los medios acuoso – orgánicos estudiados no están vinculados con la estructura secundaria que la enzima adquiere en ellos.

Para la selección del donador de acilo para las reacciones de síntesis, se realizaron estudios de preferencias de *antiacanthaína* por diversos derivados aminoácidos sintéticos, en los medios de reacción previamente descritos.

Antiacanthaína en buffer Tris-HCl (0,1 M) pH 8 exhibió amplia preferencia por los derivados aminoacídicos no polares (excepto Val); mientras que las preferencias de *antiacanthaína* en los sistemas acuoso – orgánicos estudiados variaron en cada uno de ellos, y también respecto de buffer. De manera similar que en solución acuosa, *antiacanthaína* en metanol 30 % (v/v) mantuvo sus preferencias por los aminoácidos no polares, mientras que en acetato de etilo o hexano 50 % (v/v) *antiacanthaína* mostró preferencia por los aminoácidos polares.

En consecuencia, en base a la estabilidad operacional de *antiacanthaína* se seleccionaron como sistemas de reacción más promisorios para las síntesis de péptidos bioactivos de interés, metanol 30% (v/v), acetato de etilo 50% (v/v) y hexano 50% (v/v); a 40 °C, pH 9 (en la fase acuosa) y 200 rpm. Además, en base a las preferencias de *antiacanthaína* en dichos medios de reacción, se seleccionó N- α -CBZ-Tyr-pNO como donador de acilo y Val-OH, Leu-OH o Gln-OH como nucleófilos.

A partir de la base de datos BIOPEP (2012) y tomando como base las preferencias de *antiacanthaína*, se seleccionaron los péptidos: Tyr-Leu-OH (YL) y Tyr-Val-Leu-OH (YVL), con actividad antihipertensiva y antimicrobiana *in vitro*, respectivamente; con el objeto de sintetizar por vía química y enzimática los *análogos*, o sus *precursores*. Además, y con el mismo objetivo, se seleccionaron otros péptidos obtenidos de *novo* en el Laboratorio de Bromatología (UNSL), a partir de hidrolizados de derivados casearios (Bersi y col., 2018). Resultó de particular interés el tripéptido Tyr-Gln-Gln (YQQ), puesto que dicha secuencia no se encuentra reportada en las bases de datos de péptidos bioactivos, tales como: PepBank, PeptideDB, BIOPEP; ni en las bases de datos de péptidos antimicrobianos APD2, Antimicrobial Peptide Database.

Se obtuvieron con éxito los péptidos N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH (Z-YL, análogo de YL) y N- α -CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV, análogo del precursor (YV) de YVL) por síntesis enzimática bajo control cinético en acetato de etilo 50% (v/v), utilizando *antiacanthaína* en forma libre como catalizador, con rendimientos en producto de 63 % y 52 % respectivamente. El grado de conversión de sustrato limitante en producto fue de 75 % y 100 %, respectivamente. Este hecho fue debido a la reacción competitiva de hidrólisis del sustrato, dando el producto de hidrólisis N- α -CBZ-Tyr-OH.

En cambio, en metanol 30% (v/v) la reacción de síntesis enzimática bajo control cinético dio lugar a la formación de los tetrapéptidos N- α -CBZ-Tyr-(Leu)₂-Leu-OH y N- α -CBZ-Tyr-(Val)₂-Val-OH, en lugar de los dipéptidos esperados; los cuales fueron dilucidados por espectroscopía de masas y poseen m/z: 654,85 y m/z: 612,58, respectivamente.

Además, la síntesis enzimática de Z-YL y Z-YV bajo control termodinámico no procedió exitosamente, tanto en acetato de etilo 50% (v/v) como en metanol 30% (v/v), indicando que la presencia de un donador de acilo activado es fundamental para que la síntesis de ambos péptidos pueda ser catalizada por *antiacanthaína*.

La síntesis enzimática de N- α -CBZ-Tyr-Gln-OH (Z-YQ, análogo del precursor (YQ) de YQQ) en sistemas homogéneo y macroheterogéneo no procedió. Probablemente, la alta preferencia de *antiacanthaína* por Gln en el medio bifásico (90%), en relación al derivado Tyr (70%), haya impedido el uso de éste último como donador de acilo por parte de la enzima. Estos resultados validan la estrategia aplicada para la selección de los sustratos en este trabajo.

Finalmente, se logró la síntesis quimo-enzimática del tripéptido híbrido N- α -CBZ-Tyr-Leu-Leu (Z-YLL, derivado de beta lactofina (Tyr-Leu-Leu-Phe) proveniente de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, en dos etapas que incluyeron la SPPS de Leu-Leu, y la unión de éste a N- α -CBZ-Tyr-pNO por síntesis enzimática, utilizando acetato de etilo (50%(v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9) como medio de reacción. La identidad y el peso del molecular del tripéptido Z-YLL fueron dilucidados por ESI-MS.

La actividad antihipertensiva de Z-YL (análogo de YL, sintetizado por vía enzimática), YQQ (péptido de *novo*, sintetizado por SPPS) y Z-YLL (péptido híbrido, sintetizado por vía quimo-enzimática); se evaluó como actividad inhibitoria de la ECA en ensayos *in vitro*. Sorprendentemente el péptido híbrido (Z-YLL), sintetizado por vía quimo-enzimática en nuestro laboratorio, presentó un porcentaje de inhibición notablemente superior (93%) a Z-YL (53%) y también mayor que YL (84%). Además, el péptido YQQ sintetizado (de *novo*) en nuestro laboratorio por SPPS presentó un porcentaje de inhibición de la ECA de 85%. Este valor es similar al informado por Mullally y col. (1996) para el péptido YL (84%).

La actividad antimicrobiana de YVL (sintetizado por SPPS); YV (precursor de YVL, sintetizado por SPPS) y Z-YV (análogo del precursor YV, sintetizado por vía enzimática); se evaluó en un cultivo de bach a escala de laboratorio, frente a una cepa grampositiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) y frente a una cepa gramnegativa (*Escherichia coli* ATCC 25922).

Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de YVL, YV y Z-YV frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fueron 57 μ g/ml, 49 μ g/ml y 50 μ g/ml, respectivamente. Estos resultados fueron 83, 57 y 61% mayores que la CIM de oxacilina (31,1 μ g/ml). En consecuencia los péptidos YVL, YV y Z-YV presentaron un efecto bacteriostático contra *S. aureus*.

Las CIM de YVL, YV y Z-YV frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 fueron 32 μ g/ml, 57 μ g/ml y 54 μ g/ml, respectivamente. Estos resultados fueron 1,5; 2,6 y 2,5 veces mayores que la CIM de ácido nalidíxico (21,7 μ g/ml). En consecuencia, los péptidos YVL, YV y Z-YV, presentaron un efecto bacteriostático contra *E. coli*.

Por otra parte, la actividad anticoagulante del péptido YQQ se determinó mediante Wiener Lab Test. El péptido YQQ (sintetizado químicamente), actuó en la vía intrínseca de la cascada de coagulación, específicamente sobre algunos factores de la

misma (VIII, IX, XI y XII) incrementando 105% el tiempo de coagulación con respecto al control.

Mediante la determinación cuantitativa de fibrinógeno en plasma humano por el método inmuniturbidimétrico, se demostró que YQQ solo causó el 4% de la inhibición de trombina, indicando que YQQ actúa en la vía intrínseca de la cascada de la coagulación en algún punto anterior del factor X. Este factor produce el factor Xa (activado) que permite la conversión de protrombina (II) en trombina (IIa), y ésta cataliza la conversión de fibrinógeno a fibrina y la formación del coágulo.

El valor de Tiempo Parcial de Tromboplastina Activado (APTT) observado para YQQ es 2 veces el valor del control (siendo el rango terapéutico aceptado 1,5 a 2,5 veces el valor del control de APTT) y 32% más alto que el valor de APTT para Heparina. Dichos resultados pusieron de manifiesto su potencial no solo como agente antihipertensivo sino también como anticoagulante. Además, se demostró que el péptido YQQ retuvo la actividad anticoagulante en un pool de plasma humano de individuos sanos, demostrando la alta estabilidad del péptido sintetizado en el rango de tiempo estudiado.

La toxicidad aguda del péptido YQQ se determinó como porcentaje de viabilidad celular después de la exposición de la línea celular humana 293 FT a diferentes concentraciones del péptido YQQ, durante 4 horas a 37 °C en atmósfera de 5% de aire enriquecido en CO₂.

El péptido YQQ no fue citotóxico en ensayos *in vitro* a las concentraciones estudiadas, ya que no produjo disminución significativa ($p \leq 0,05$) en la supervivencia celular en tales condiciones, según la prueba de Kruskal-Wallis. Bajo algunas condiciones de tratamiento, se midieron las tasas de supervivencia por encima del control (100%). Sin embargo, como estas diferencias son inferiores al 10%, no se consideran un efecto proliferativo significativo y parecen estar relacionadas con el fenómeno de hormesis, que se caracteriza por producir estimulación o efecto beneficioso a bajas dosis y efecto inhibitor o tóxico a altas dosis.

En general, este trabajo aporta nuevas estrategias y productos de interés para la industria alimenticia que implican una expansión del mercado actual en materia de nutrécicos y conservantes alimentarios seguros, y la potencial transferencia de resultados al sector socio-productivo interesado en los mismos.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Los péptidos bioactivos son porciones específicas de proteínas desde 2 hasta algunas docenas de residuos de aminoácidos con actividades biológicas deseables, en función de su composición y secuencia (Barberis y col., 2018).

La base de datos BIOPEP (Biopep 2018) informa sobre 3.587 péptidos con actividades: antimicrobiana (Adje y col., 2011), antihipertensiva (Bhat y col., 2017), antioxidante (Chakrabarti y col., 2014), anticancerígena (Alemán y col., 2011), antiadipogénica (Tsou y col., 2010), inmunomoduladora (Huang y col., 2010) antiinflamatoria (Ahn y col., 2015), antitrombótica (Sabbione y col., 2016), entre otras.

La bioactividad está determinada por la composición del péptido y la secuencia de aminoácidos, y muchos de ellos han revelado propiedades multifuncionales (Mora y col., 2014, Singh y col., 2014, Guzman y col., 2007).

En términos económicos, se prevé que el mercado mundial de péptidos para fármacos sea de US \$ 25.400 millones en 2018 (Fosgerau y Hoffman, 2015).

Más allá de las actividades biológicas demostradas por ensayos *in vitro*, los péptidos bioactivos deben alcanzar sus sitios diana en el lado luminal del tracto intestinal o en órganos periféricos específicos después de la absorción.

La biodisponibilidad y biodistribución del péptido, incluyendo la captación, el transporte, el paso de membranas biológicas y de las barreras celulares, dependen de una combinación de sus propiedades fisicoquímicas, tales como solubilidad acuosa, lipofilicidad, capacidad de formación de puentes de hidrógeno, estabilidad química y estabilidad metabólica (proteolítica y/o degradación enzimática) (Vlieghe y col., 2010). Finalmente, los péptidos deben unirse a receptores de superficie celular específicos, tales como receptores acoplados a proteína G (GPCR) o canales iónicos, donde activan efectos intracelulares (Fosgerau y Hoffmann 2015).

Según la bibliografía, los péptidos bioactivos presentan ventajas importantes tales como: 1) alta especificidad y selectividad por los tejidos diana; 2) poca o ninguna toxicidad; 3) eficacia a bajas concentraciones; 4) ausencia de acumulación; 5) ausencia de efectos secundarios; 6) fácil degradación en el medio ambiente (Uhlir y col., 2014; de Castro, 2015).

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) han sido identificados como posibles sustitutos de los productos químicos utilizados como fármacos o conservantes de alimentos (de Castro, 2016).

Existen escasos antecedentes de la aplicación de péptidos antimicrobianos a alimentos, y la mayoría de ellos provienen de la purificación de hidrolizados proteicos. Sin embargo, la purificación de un hidrolizado proteico es una metodología compleja, que debe realizarse en varias etapas y demanda largos tiempos de proceso. Por tal razón, su escalamiento resulta dificultoso (Souza y col., 2017).

Péptidos antimicrobianos

La creciente resistencia de los patógenos frente a muchos antibióticos comúnmente utilizados ha llevado a la investigación de nuevos compuestos con las mismas funciones (Bechinger y Lohner 2006).

Se sabe que los péptidos cortos (1-50 aminoácidos) con propiedades catiónicas a pH neutro y anfífilas, y con una gran cantidad de residuos hidrofóbicos, actúan como la primera barrera de defensa del organismo huésped, proporcionando actividad contra una amplia variedad de microorganismos patógenos tales como bacterias gramnegativas y grampositivas, hongos, virus y parásitos (Hancock y Sahl 2006; Cruz y col., 2014). Esto induce a pensar que dichas características son las deseables a la hora de sintetizar AMPs. Sin embargo, existen AMPs cortos (1-50 aminoácidos) de naturaleza aniónica en un rango de pH de 1 a 7, que presentan en su estructura un gran número de residuos de ácido aspártico y glutámico (Lavery y col., 2011).

En el primer caso, la atracción inicial entre el péptido y la célula diana se produce por unión electrostática entre el péptido catiónico y los componentes de la membrana celular externa cargada negativamente, tales como lipopolisacáridos en bacterias gramnegativas o ácido lipoteicoico en la superficie de bacterias grampositivas (Jenssen y col., 2006). Esta interacción electrostática elimina los cationes divalentes nativos (Mg^{2+} , Ca^{2+}) de la superficie de la célula, desestabilizando así la membrana externa y facilitando la entrada del péptido y posterior contacto peptídico con la membrana citoplasmática, proceso conocido como autopromotransmisión (Powers y Hancock 2003). Luego, el péptido puede permeabilizar la membrana citoplasmática y/o translocar a través de ella, según diferentes modelos mecánicos.

Así, los péptidos antimicrobianos se pueden clasificar en dos grupos principales: el primer grupo consiste en aquellos péptidos que actúan sobre la membrana citoplasmática formando poros, mientras el segundo grupo incluye aquellos que no tienen acción sobre la membrana citoplasmática del microorganismo diana, pero pueden

traslocar a través de ella y causar la inhibición de la síntesis de proteínas y la síntesis de ADN o ARN o interactuar con ciertas dianas intracelulares (Patrzykat y col., 2002, Powers y Hancock 2003 , Reddy y col., 2004, Jenssen y col., 2006). Para explicar la formación de poros, se han propuesto varios modelos, tales como poros toroidales, barricales, agregados y alfombras.

De los 464 péptidos antimicrobianos informados por BIOPEP (2018) solo excepcionalmente alguno de ellos se obtuvieron por síntesis química y ninguno de ellos por síntesis enzimática. Además, ninguno fue aplicado como conservante alimentario, lo que marca la originalidad de nuestra investigación.

Péptidos antihipertensivos

La hipertensión arterial afecta aproximadamente al 25% de la población adulta en todo el mundo y se prevé que llegará al 29% de la población en 2025, lo que supone un total de 1,56 billones de personas (Ngo y col., 2015). Aunque es una enfermedad controlable, la hipertensión se asocia con varias enfermedades cardiovasculares, como aterosclerosis, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular (Sheih y col., 2009).

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) desempeña un papel importante en la regulación de la presión arterial porque cataliza la conversión de la angiotensina-I (la forma inactiva) a la angiotensina-II (un vasoconstrictor) e inactiva la bradiquinina (un vasodilatador).

En consecuencia, los inhibidores sintéticos de la ECA, como captopril y enalapril, se usan a menudo para tratar la hipertensión y otras enfermedades del corazón relacionadas. Sin embargo, los inhibidores sintéticos pueden causar varios efectos secundarios, como tos, alteración del gusto, erupción cutánea y angioedema (Aleman y col., 2011).

Los péptidos antihipertensivos tienen la capacidad de modular el sistema renina-angiotensina (RAS) debido a que disminuyen las actividades de la renina o la enzima convertidora de angiotensina (ECA), estas dos enzimas principales regulan la presión sanguínea de los mamíferos. También, pueden mejorar la vía de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS). Por último, los péptidos pueden bloquear las interacciones entre los receptores de la angiotensina II (vasoconstrictor) y la angiotensina, pudiendo contribuir a la reducción de la presión arterial (Aluko, 2015, Puchalska y col., 2015).

Péptidos anticoagulantes

Los péptidos antitrombóticos inhiben la unión del fibrinógeno a una región receptora específica en la superficie de las plaquetas y también inhiben la agregación de plaquetas (Segura-Campos y col., 2014).

Varios péptidos antitrombóticos derivados de proteínas alimentarias se han descrito en los últimos años. Muchos de ellos están contenidos en la proteína de la leche κ -caseína, y exhiben homología de secuencia con las cadenas de fibrinógeno, lo que les permite actuar como inhibidores competitivos en los sitios de unión específicos de los receptores en la superficie de las plaquetas (Hayes, 2007).

También se ha descrito la presencia de péptidos antitrombóticos en otras fuentes de alimentos, como frijol terciopelo, colza y clara de huevo (Yang y col., 2007; Zhang y col., 2008).

Recientemente, se observó actividad antitrombótica *in vitro* en hidrolizados de amaranto y sus fracciones de proteína, pero no se encontró bioactividad en el aislado de proteína de soja (Sabbione y col., 2015). Estos hidrolizados de amaranto fueron capaces de inhibir la enzima trombina (EC 3.4.21.5), que es una proteasa serínica que participa al final de la cascada de coagulación catalizando la conversión de fibrinógeno en monómeros de fibrina (los que posteriormente se polimerizan).

TECNOLOGÍAS DE PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Existen diferentes tecnologías para la producción de péptidos, incluyendo: la extracción de fuentes naturales (Hippkiss y Browson, 2000); producción por ADN recombinante (Gill y col., 1996); producción de proteínas usando sistemas de expresión libres de células (Katzen y col., 2005); producción en plantas y animales transgénicos (Wright y col., 1991; Cunningham y Porter, 1997); producción por síntesis química (Du Vigneaud y col., 1953; Merrifield, 1963; Patarroyo y col., 1988; Patarroyo y Guzman, 2004) y síntesis enzimática de péptidos, utilizando enzimas proteolíticas (Illanes y Barberis, 1994; Quiroga y col., 2008).

Dentro de la extracción de fuentes naturales, la hidrólisis enzimática de las proteínas es una de las técnicas más utilizada para producir péptidos bioactivos, para mejorar las propiedades funcionales y biológicas de las proteínas, así como también para agregar valor a los subproductos con bajo valor comercial (Zarei y col., 2014; Luna-Vital y col., 2015; Mora y col., 2014).

Sin embargo, la purificación de un producto peptídico con cierta actividad biológica a partir de un hidrolizado proteico es una tarea engorrosa, consumidora de tiempo, y de alto costo, lo que dificulta su escalamiento. Actualmente las herramientas *in silico* permiten predecir tales actividades a partir de sustratos proteicos determinados, pero no todas las proteínas se encuentran en base de datos y además, las actividades predichas deben ser demostradas y validadas experimentalmente.

La validación es un proceso indispensable en productos y procesos sujetos a la inherente variabilidad de las fuentes biológicas.

Finalmente, las fuentes proteicas para la obtención de los péptidos de interés son, en muchos casos, estacionales (frutos, semillas) o propias de una región; lo que afecta la factibilidad y sustentabilidad de dichos procesos.

Si bien, la selección de la metodología para producir péptidos bioactivos, va a estar determinada por la longitud de la cadena peptídica, la síntesis química y enzimática son las tecnologías más utilizadas para péptidos pequeños y medianos. Existe amplio consenso en la información científica para afirmar que la primera metodología se aplica para la síntesis de hasta 50 residuos aminoácidos, mientras que la segunda permite la condensación de no más de 10 aminoácidos (Barberis y col., 2018).

Síntesis química de péptidos

Existen dos tipos de síntesis química de péptidos, síntesis en solución (síntesis clásica) y síntesis en fase sólida.

La síntesis de péptidos en solución se ha utilizado para la síntesis de pequeños péptidos compuestos sólo por unos pocos residuos de aminoácidos. Su principal ventaja es que los productos intermedios pueden aislarse y purificarse después de cada etapa de síntesis, desprotegerse y recombinarse para obtener péptidos más grandes de la secuencia deseada. Esta técnica es altamente flexible con respecto a la química del acoplamiento y la combinación de los bloques peptídicos (Guzman y col., 2007; Barberis y col., 2008).

Sin embargo, desde la introducción de la síntesis en fase sólida por Merrifield (1963), esta tecnología ha ganado más relevancia y se han hecho avances significativos en el desarrollo de soportes poliméricos (resinas) y enlazadores (linkers), grupos protectores reversibles y métodos para la activación de formación de enlaces covalentes,

contribuyendo de esta manera al avance de la química orgánica como una poderosa herramienta para la investigación de proteínas y péptidos (Goodman, 2002; Albericio, 2004).

La síntesis en fase sólida tiene muchas ventajas sobre el sistema clásico en solución, permitiendo la automatización de la reacción y evitando el problema de solubilización del péptido ya que éste permanecerá unido a la matriz sólida hasta finalizar la reacción (Guzman y col., 2007).

Las principales características de la síntesis en fase sólida son: 1) la secuencia peptídica se mantiene anclada a una matriz, que puede ser filtrada al final del proceso; 2) los ciclos repetidos de desprotección y acoplamiento se pueden automatizar; y 3) a menudo, el producto final se libera de la matriz y se desprotege en el mismo paso. Sin embargo, mediante la elección adecuada de los grupos protectores y enlazadores, el péptido puede ser desprotegido mientras permanece unido al soporte o liberado del soporte en la forma totalmente protegida (Shelton, 2013).

La síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) consiste en el alargamiento de una cadena peptídica anclada a una matriz sólida por adiciones sucesivas de aminoácidos, que están unidos por formación de enlaces amida (unión peptídica) entre el grupo carboxilo del aminoácido entrante y el grupo amino del aminoácido previamente unido a la matriz, hasta que se haya sintetizado la secuencia peptídica deseada (Nilsson y col., 2005).

Las estrategias principales de SPPS son la síntesis secuencial, la síntesis convergente y la ligadura química. La síntesis secuencial implica la adición por etapas de aminoácidos hasta que se sintetiza la secuencia deseada (Figura 1).

La síntesis convergente implica la síntesis independiente de secuencias de péptidos que luego se unen por condensación en fase líquida. En la ligadura química, esos fragmentos están unidos por reacciones quimio-selectivas que involucran a los enlaces tioéter (Lu y Tam, 2005), oxima (Nardin y col. 1998), hidrazona y tiazolidina (Tam y col., 1995).

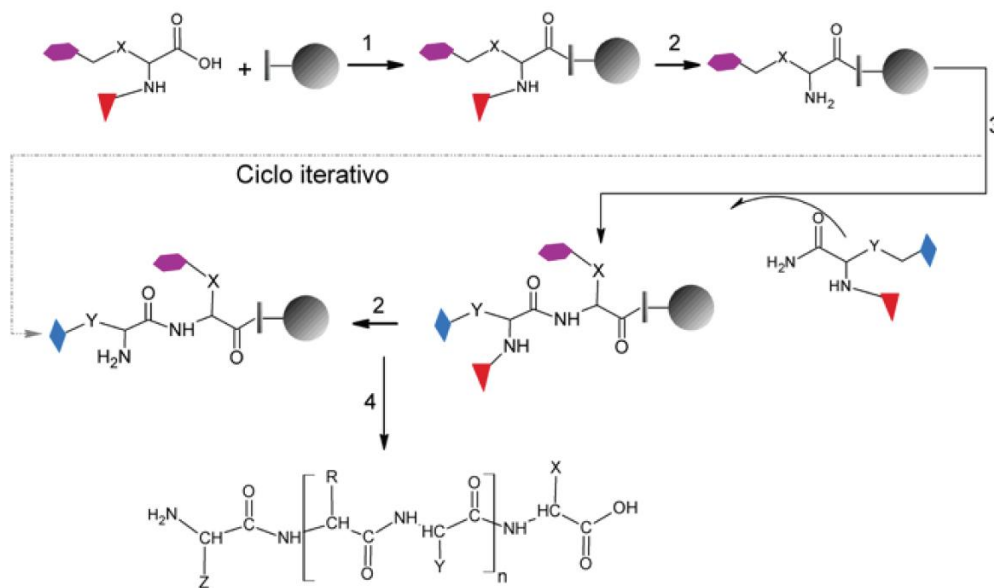


Figura 1. Esquema de síntesis en fase sólida (SPPS) : : resina; , : grupos protectores de las cadenas laterales; : grupo protector α -amino. 1: acople del primer residuo; 2: desprotección; 3: acople de los siguientes residuos (ciclo iterativo); 4: clivaje y desprotección de cadenas laterales (Guzman, 2013).

Síntesis secuencial: esta estrategia se usa para la síntesis de péptidos de tamaño pequeño a mediano que contienen hasta 50 residuos. Sin embargo, los polipéptidos de mayor tamaño se pueden construir usando la síntesis secuencial mediante la técnica de polimerización de cisteína, la construcción de dendrímeros usando matrices de lisina o la construcción de proteína sintética ensamblada con plantilla (TASP) (Tuchscherer y Mutter, 1996, Banfi y col., 2004).

La polimerización de cisteína se realiza localizando residuos de cisteína en los terminales amino y carboxi del péptido. La cisteína tiene un grupo sulfhidrilo propenso a la oxidación para formar puentes disulfuro de forma que el péptido puede polimerizarse tanto en los terminales amino como carboxi para producir polipéptidos de alto peso molecular. Esta técnica produce una amplia gama de especies peptídicas oxidadas que van desde el monómero cíclico y el dímero a polipéptidos de alto peso molecular (Guzman y col., 2007).

Un dendrímero es una macromolécula tridimensional polimérica de construcción arborescente. A diferencia de los polímeros lineales cuya distribución molecular es probabilística, los dendrímeros tienen una estructura química precisa, donde los enlaces químicos entre los átomos se puede describir con exactitud. Las macromoléculas

dendríméricas presentan una forma de crecimiento generacional (G_0 , G_1 , G_2).

Dendríméros tetraméricos del tipo doble-dímero (DDC) han sido empleados como agentes inmunogénicos candidatos para la síntesis de vacunas antimalaria, resultando en una mejor presentación que los polímeros cisteínicos en pruebas experimentales usando como modelo monos del género Aotus (Rivera y col., 2002).

Síntesis convergente: esta estrategia se usa para la síntesis de péptidos de hasta 50 residuos aminoacídicos producidos separadamente mediante síntesis secuencial y luego unidos mediante síntesis en solución o en fase sólida, pudiendo obtenerse así péptidos de gran tamaño. Una ventaja de esta técnica es que cada fragmento peptídico es purificado y caracterizado antes de su unión, lo que minimiza las reacciones laterales y permite un buen control del proceso de síntesis. No obstante, la síntesis convergente presenta algunos inconvenientes derivados de la baja solubilidad de los fragmentos peptídicos protegidos tanto en solventes acuosos (empleados en la purificación mediante HPLC) como orgánicos (empleados en las reacciones de acople). Adicionalmente, las velocidades de reacción de acoplamiento de los fragmentos peptídicos son mucho menores que para las especies aminoacídicas activadas empleadas en síntesis secuencial y el grupo C-terminal aminoacídico puede ser racemizado durante el acople. Algunos de estos inconvenientes han sido subsanados empleando mezclas de solventes que aumentan la solubilidad, tiempos de reacción prolongados para aumentar la eficiencia de acople y glicina o prolina en el extremo C-terminal para evitar la racemización. De este modo, y a pesar de sus inconvenientes técnicos, la síntesis convergente representa la mejor opción para la síntesis de péptidos de gran tamaño, como lo ilustran la síntesis convergente a gran escala del péptido P41 icf (un potente inhibidor de cathepsina humana L.) (Chiva y col., 2003) y del inhibidor de la fusión celular del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV 1), denominado T-20 (Bray, 2003).

Ligazón química: es una opción para la síntesis de péptidos de gran tamaño y proteínas. Se basa en la unión química de fragmentos peptídicos cortos no protegidos, los que son más fáciles de manipular dada su mayor solubilidad en los solventes empleados en la síntesis. Estos fragmentos peptídicos son funcionalizados con grupos que reaccionan de manera quimioselectiva con un solo grupo en el péptido aceptor, preservando así la integridad de las cadenas laterales no protegidas. Muchos péptidos y proteínas de interés biotecnológico han sido sintetizados mediante esta estrategia

usando diferentes tipos de ligandos para la formación de los enlaces peptídicos, que involucran tioéster, oxima, disulfuro y tiazolidina. El principal problema radica en la incorporación en la secuencia peptídica de enlaces no peptídicos. Sin embargo, hay muchos ejemplos de este tipo de estructuras no naturales que mantienen la funcionalidad del péptido análogo al natural (Guzmán, 2013).

La síntesis química a gran escala se ha convertido en una tecnología viable para la producción de péptidos pequeños y medianos, que comprenden la mayoría de las moléculas farmacéuticamente relevantes y que van desde aproximadamente 5 a 50 residuos; siendo a menudo una mejor opción tecnológica que los métodos biotecnológicos de DNA recombinante o biocatálisis (Vlieghe y col., 2010).

Según la bibliografía, más de 500 péptidos de interés farmacéutico en desarrollo preclínico y 140 péptidos en ensayos clínicos (que contienen menos de 50 aminoácidos) han sido aprobados por la FDA (Fosgerau y col., 2015). En contraste, solo existen dos péptidos aprobados para uso alimentario como antimicrobianos: nisina y lisozima; y ninguno como antihipertensivo (FDA, 2016).

Síntesis enzimática de péptidos

Las normas de seguridad de los procesos y productos son cada vez mayores y la demanda creciente de péptidos biológicamente activos de interés farmacológico y alimenticio han incitado una búsqueda intensiva de alternativas biotecnológicas a la síntesis química de péptidos (Das y col., 2012; Poyarkova y col., 2012; Rao y col., 2012).

El uso de enzimas con propósitos tecnológicos presupone transformar estos catalizadores fisiológicos en catalizadores de procesos, capaces de convertir materias primas en productos con valor agregado (Illanes y col., 2009a).

El mercado mundial de enzimas con aplicación industrial aumentó significativamente en los últimos años, e incluye enzimas utilizadas en aplicaciones industriales (alimentos y bebidas, productos de limpieza, producción de biocombustibles, piensos) y con aplicaciones especiales (investigación y biotecnología, diagnóstico y biocatalizadores) (Freedonia Group, 2016).

Las proteasas y las lipasas representan más del 50% de las enzimas utilizadas a nivel industrial (Feijossiota y Videla, 2011).

En la industria farmacéutica, alimentaria, textil, de los detergentes y de los

cueros las proteasas son utilizadas en diferentes etapas de la producción. La mayor parte de éstas provienen de fuentes microbianas, pero varias proteasas vegetales (papaína, bromelina y ficina) siguen siendo preferidas en un gran número de procesos.

La síntesis enzimática de péptidos es una tecnología menos madura que la síntesis química y a diferencia de ésta, no hay protocolos generales de síntesis enzimática disponibles, siendo cada situación un caso particular que tiene que ser estudiado y optimizado extensivamente para ser tecnológicamente competitivo. El elevado número de variables críticas en un proceso enzimático hace su optimización engorrosa. Sin embargo, muchas de las limitaciones de la síntesis química se pueden superar por la síntesis enzimática. Por tal razón, en nuestro trabajo se propone utilizar ambas metodologías en forma sinérgica, potenciando las ventajas de cada una de ellas (Barberis y col., 2008).

La alta especificidad y reactividad bajo condiciones suaves de operación, que es característica de los procesos enzimáticos, pueden tener un fuerte impacto en la economía del proceso y menores consecuencias para el medio ambiente. Es por ello que los procesos enzimáticos se pueden considerar como una *tecnología limpia*, más de acuerdo con el concepto de crecimiento sostenible, arrojando menores índices de toxicidad de los desechos producidos (Illanes y col., 2009b).

Comparación entre las tecnologías de síntesis química y enzimática de péptidos

La Tabla 1 resume las ventajas y desventajas de la síntesis química y enzimática.

En comparación con la síntesis química, la ventaja más importante de la biocatálisis es la especificidad de la reacción, lo que evita la necesidad de proteger las cadenas laterales de los aminoácidos. Además, las reacciones enzimáticas generalmente ocurren bajo condiciones suaves y con alta selectividad, permitiendo la conversión en producto sin racemización, que es una limitación de la síntesis química de péptidos. Por otra parte, desde el punto de vista ambiental, la síntesis enzimática causa menos contaminación y está más de acuerdo con el concepto de química verde (Schröder y col., 2013; Baker y col., 2013).

Pequeños péptidos sintetizados enzimáticamente se utilizan en nutrición humana y animal, como productos farmacéuticos y agroquímicos. Algunos ejemplos relevantes son la síntesis del edulcorante no calórico aspartamo, el péptido dulce de lisina,

quiotorfina, angiotensina, encefalina, dinorfina y la hemisíntesis de insulina humana (Guzmán y col., 2007).

Tabla 1. Ventajas y desventajas de la síntesis química y enzimática de péptidos.

Estrategia de síntesis	Ventajas	Desventajas
Química	<ul style="list-style-type: none"> - Síntesis de péptidos de tamaño mediano (menores a 50 aminoácidos). - Proceso rápido. - Fácilmente automatizable. 	<ul style="list-style-type: none"> - Racemización del C-terminal. - El producto se purifica al final de varias etapas. - Gran consumo de solventes orgánicos, reactivos de acoplamiento y activadores tóxicos. - Alto costo.
Enzimática	<ul style="list-style-type: none"> - Síntesis de péptidos cortos (hasta 10 aminoácidos). - Ausencia de racemización del C-terminal. - Apoya la química verde. - Bajo costo. - Alta quimio, regio y estereo-selectividad. 	<ul style="list-style-type: none"> - Bajo rendimiento y productividad. - Cada proceso de síntesis se debe estudiar en forma particular. No existen protocolos generales de síntesis. - Difícilmente automatizable.

La síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) es el método más comúnmente utilizado para péptidos de tamaño mediano y grande (10-50 residuos de aminoácidos). La SPPS requiere además de una protección completa de las cadenas laterales funcionalizadas, también reactivos de acoplamiento costoso y no favorable para el medio ambiente en al menos cantidades estequiométricas. Además, el requisito de resinas funcionalizadas y el uso de reactivos en exceso hace que SPPS sea un método costoso. La síntesis química de péptidos en solución se usa con mayor frecuencia para

péptidos pequeños que contienen 2 a 10 residuos de aminoácidos, pero la racemización C-terminal incontrolada durante el ensamblaje del fragmento es su principal desventaja.

Para péptidos más grandes, es más conveniente y económico utilizar condensación química de segmentos peptídicos más pequeños (Kaiser y col., 1989). Estos últimos pueden ser sintetizados por SPPS con alto rendimiento y pureza, y luego condensados para formar el producto deseado. Según esta estrategia, los productos finales son generalmente más fáciles de purificar y el rendimiento total es más alto. Desafortunadamente, la condensación de fragmentos químicos no siempre es factible debido a la racemización del residuo aminoacídico C-terminal del segmento N-terminal, así como a la baja solubilidad de los péptidos totalmente protegidos (Hale, 2003). Las técnicas de ligazón química sin racemización para péptidos no protegidos son conocidas, tales como la ligación química nativa y la ligación KAHA (α -cetoácido-hidroxilamina). Sin embargo, ambos métodos son dependientes de la secuencia (Dawson y col., 1994; Bode y col., 2006).

Las estrategias para la síntesis enzimática se encuentran aún en etapa de desarrollo y no existen protocolos para su validación y ampliación, por lo que cada producto particular debe desarrollarse como un estudio de caso en el que se debe optimizar un alto número de variables en términos de funciones objetivas basadas en costos, lo cual no es una tarea fácil. La productividad de la síntesis enzimática no es comparable a la de la síntesis química y, en general, los costos de los biocatalizadores siguen siendo elevados (Fité y col., 2002). Sin embargo, el potencial de los procesos enzimáticos para la síntesis de péptidos es evidente y es la fuerza propulsora que impulsa a resolver las restricciones actuales mediante intensa investigación y desarrollo en diferentes aspectos de la biocatálisis.

La combinación de la síntesis química y enzimática es probablemente el camino a seguir, ya que las buenas propiedades de cada tecnología se pueden usar sinérgicamente en el contexto de un objetivo de proceso. El creciente impacto y la adopción de la biocatálisis en las industrias farmacéutica y de química fina allanarán el camino para este fructífero encuentro (Illanes, 2016).

La síntesis quimo-enzimática de péptidos permite elongar o condensar fragmentos peptídicos obtenidos por síntesis de péptidos en solución o en fase sólida (SPPS) (Kousuke y Numata, 2017; Bordusa, 2002). Dicha combinación puede resultar en la simplificación de los protocolos de síntesis, facilitando el escalamiento y mejorando la economía del proceso, al mismo tiempo que favorece la sustentabilidad ambiental.

La aplicación de enzimas como reactivos de acoplamiento es una alternativa prometedora ya que evita la protección total de la cadena lateral de los aminoácidos y la racemización C-terminal durante el ensamblaje del fragmento, favoreciendo la caracterización y purificación del péptido final (Nuijens y col., 2011; Nuijens y col., 2012).

Un aspecto importante a considerar tanto para las reacciones enzimáticas como quimo-enzimáticas es la especificidad de las proteasas a utilizar como biocatalizador. Dicha especificidad es determinada por la tríada catalítica del sitio activo de la enzima y por los subsitios que rodean a la tríada catalítica, que juegan un papel importante en el reconocimiento de los sustratos (Berger y Schechter, 1970). Solo los sustratos con configuraciones moleculares adecuadas pueden ocupar los subsitios y posteriormente experimentar la reacción catalítica (Kousuke y Numata, 2017).

Así, tripsina (proteasa serínica) escinde selectivamente los enlaces amida de los aminoácidos básicos, como lisina y arginina; mientras que α -quimotripsina (que también es una proteasa serínica) reconoce eficientemente los aminoácidos aromáticos, como fenilalanina y tirosina. La proteinasa K, otra proteasa serínica, tiene una alta afinidad por los aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos, pero también puede polimerizar aminoácidos hidrofílicos, como cisteína e histidina. Papaína (una proteasa cisteínica) tiene una alta afinidad por los aminoácidos hidrofóbicos, que incluyen alanina y leucina, y una especificidad de sustrato relativamente amplia. Lo mismo ocurre con otras proteasas cisteínicas, como bromelina y clostripaína (Aso y Kodaka, 1992; Aso y col., 1992; Gololobov y col., 1993; Tōugu y col., 1993; Bordusa y col., 1997; Numata y col., 2010; Viswanathan y col., 2010; Qin y col., 2011; Ageitos y col., 2013; Ma y Numata, 2016).

Las proteasas que tienen alta afinidad por aminoácidos hidrofóbicos conducen a la precipitación del producto peptídico, evitando la hidrólisis de la cadena.

Además de seleccionar la proteasa adecuada es necesario optimizar las condiciones para la polimerización (pH, temperatura, relación enzima: sustrato, etc.) en función de los aminoácidos involucrados (Wehofsky y col., 2008; Sun y col., 2011; Tsuchiya y Numata, 2016).

La síntesis quimo-enzimática de péptidos se considera una tecnología verde, que conduce a altos rendimientos, evita el uso de químicos tóxicos, es fácilmente escalable y económica. A pesar de ello, aún es necesario abordar ciertos inconvenientes, como la dificultad para controlar las secuencias y sintetizar cadenas más largas.

PROTEASAS

Clasificación y mecanismos catalíticos

Las proteasas comprenden un grupo de hidrolasas (EC 3.4, NC-IUBMB) capaces de actuar sobre las uniones peptídicas. Son enzimas ampliamente estudiadas en términos de relación estructura-función por su importancia fisiológica (Krowarsch y col., 2005).

Hay siete familias de proteasas: serínicas, treonínicas, cisteínicas, aspárticas, metaloproteasas, glutámicas y asparagínicas. Las primeras cinco clases están presentes en plantas (Rawlings y col., 2010). En los tres primeros grupos, el nucleófilo en el centro catalítico es parte de un aminoácido, mientras que en los segundos dos grupos el nucleófilo es una molécula de agua activada (Morcelle y col., 2009).

En las proteasas cisteínicas, como *antiacanthaina* (*Bromelia antiacantha* Bertol., Bromeliadaceae), el nucleófilo es un grupo sulfhidrilo siendo el donador de protones un residuo de histidina (Figura 2).

Las proteasas son activas en condiciones suaves, con pH óptimo de 6 a 8, son robustas y estables, no requieren cofactores estequiométricos y también son altamente estereo y regioselectivas. Estas propiedades son muy relevantes para usarlas como catalizadores de procesos (Cheng, 2010; Barberis y col., 2008; Bordusa, 2002).

El potencial de las enzimas hidrolíticas para catalizar reacciones reversas de la hidrólisis, y que conducen a la formación de la unión peptídica (aminólisis), se conoce desde hace bastante tiempo. Sin embargo, su potencial tecnológico como catalizador de síntesis orgánicas se desarrolló en la década de 1980, paralelamente al estallido de la biocatálisis en medios no convencionales (no acuosos) (Illanes, 2016).

Las proteasas pueden catalizar no solo el clivaje de las uniones peptídicas sino también la reacción de formación de uniones peptídicas en medios de reacción adecuados. Tales reacciones no proceden eficientemente en medios acuosos, donde el potencial hidrolítico de la enzima prevalece, por lo que el medio de reacción a baja (y deseablemente controlada) actividad de agua es necesario para la síntesis de péptidos. Este es el mayor desafío de la síntesis de péptidos, usando proteasas como catalizador en medios no acuosos (solventes orgánicos, fluidos supercríticos, mezclas eutécticas, líquidos iónicos). Las proteasas, a diferencia de las lipasas, no están estructuralmente acondicionadas para actuar en tales ambientes. (Nuijens y col., 2012; Cheng, 2010).

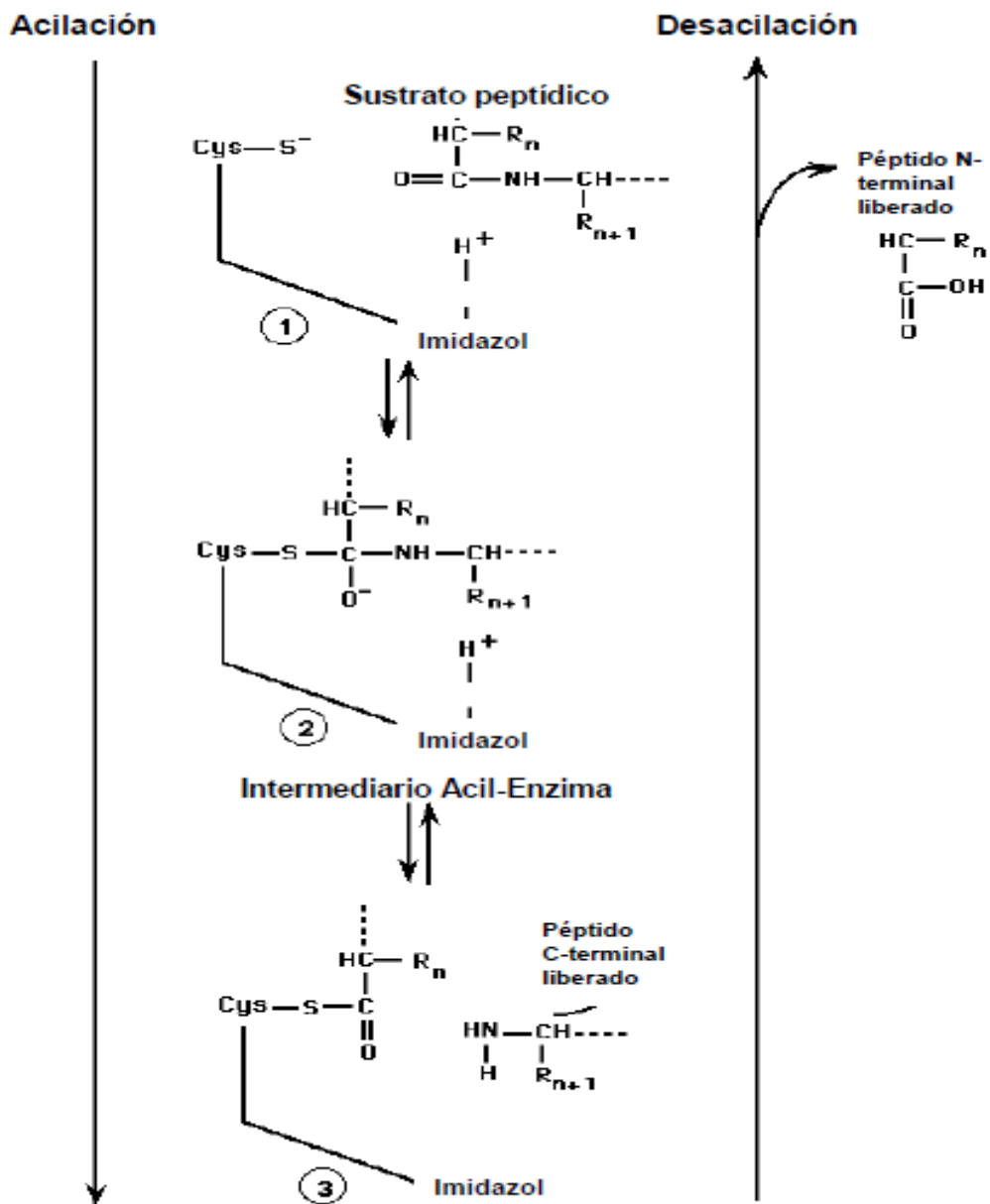


Figura 2. Representación del mecanismo catalítico de las proteasas cisteínicas.

Proteasas como catalizadores de la síntesis de péptidos

Las proteasas que se utilizan para la síntesis de péptidos se seleccionan sobre la base de su especificidad (preferencias) frente a aminoácidos, siendo posible en principio usar la mayoría de las endo y exoproteasas comercialmente disponibles (Priolo y col., 2001; Kumar y Bhalla, 2005).

Sin embargo, no todas ellas son capaces de expresar su potencial catalítico en medios no acuosos, ni mantener una estabilidad operacional adecuada durante las

reacciones de síntesis (Barberis y col., 2006; Quiroga y col., 2005; Illanes y col., 2009a).

Como se mencionó previamente, los medios de reacción de la síntesis de péptidos incluyen solventes orgánicos (Heck y col., 2009; López Gallego y Schmidt-Dannert, 2010; Nuijens y col., 2011), fluidos supercríticos (Brunner, 2010; Lopinet Serani y col., 2010; Aymonier y col., 2011), mezclas eutécticas (Zhang y col., 2012; Khandelwal y col., 2016), estado sólido (Halling y col., 1995) y líquidos iónicos (Franco-Vega y col., 2014; Hayes y col., 2015; Sprenger y col., 2015; Cao y Matsuma, 2016).

Sin embargo, en todos los casos es necesario llevar a cabo un cuidadoso diseño de los medios de reacción para propiciar las condiciones más promisorias para la síntesis peptídica de interés (Barberis y col., 2006).

Estos sistemas ofrecen ventajas potenciales como la posibilidad de utilizar sustratos poco solubles en agua; la modificación del equilibrio de la reacción como consecuencia de la alteración de los coeficientes de partición de sustratos y productos (en el caso de los sistemas bifásicos); la reducción de la inhibición de sustratos y productos; la facilidad de recuperar el biocatalizador y el producto; el aumento de la termoestabilidad del biocatalizador y, en algunos casos, la variación en la especificidad de los sustratos y el aumento en la estereo y enantioselectividad en la resolución de mezclas racémicas (Klibanov, 2001; Illanes y col., 2009b).

Medios no convencionales para la síntesis enzimática de péptidos

La ingeniería de medios está relacionada con la manipulación racional de los medios de reacción para encontrar las mejores condiciones para la síntesis de péptidos (Illanes y col., 2012). Con frecuencia, el agua se reemplaza por medios no convencionales, tales como: solventes orgánicos, líquidos iónicos, fluidos supercríticos, mezclas eutécticas profundas y soluciones acuosas.

Solventes orgánicos

Los solventes orgánicos, que contienen una cantidad controlada de agua, pueden aumentar la solubilidad de los sustratos, especialmente de los aminoácidos hidrofóbicos; reducir la hidrólisis de los productos, mejorar la recuperación de los productos /

biocatalizador e incrementar la estabilidad térmica del biocatalizador (Illanes y col., 2009a).

Hay dos tipos de sistemas biocatalíticos que usan solventes orgánicos: sistemas *homogéneos*, formados por una mezcla de agua y un solvente orgánico miscible, y sistemas *heterogéneos* en los que una segunda fase está formada por un solvente orgánico inmisible con agua (Barberis y col., 2008)) Los sistemas *heterogéneos* pueden ser *macro-heterogéneos*, si son evidentes dos fases líquidas inmiscibles, o *micro-heterogéneos* si una de las dos fases (generalmente la fase acuosa que rodea a la enzima) no es visible a simple vista. Ambos, sistemas *homogéneos* y *heterogéneos*, pueden llevarse a cabo con la enzima libre o insolubilizada en el medio de reacción, ya sea porque la enzima es insoluble en el medio de reacción o porque está inmovilizada en un soporte sólido (carrier). En este último caso, el sistema siempre será heterogéneo en naturaleza (Illanes y col. 2009b).

Los solventes orgánicos miscibles en concentraciones moderadamente altas son usualmente perjudiciales para la actividad y estabilidad enzimática, porque tienden a penetrar en el microambiente acuoso que rodea las moléculas de la enzima, alterando los patrones de interacción de la proteína con los medios y distorsionando su estructura tridimensional (Quiroga y col., 2007; Toth y col., 2010; Doukyu y Ogino, 2010; Stepankova y col, 2015). Sin embargo, los polioles y las glicinas son excepciones notables entre los solventes (Castro, 2000, Illanes y Fajardo, 2001).

Otra forma de circunscribir el problema de la inactivación enzimática es la inmovilización de la enzima. Existen varios ejemplos de proteasas y otras enzimas inmovilizadas que forman enlaces peptídicos que se han utilizado con éxito para la síntesis de péptidos en medios acuoso-orgánicos (Quiroga y col., 2011; Yazawa y Numata, 2014; Bernal y col., 2017; Bernal y col., 2018).

Los sistemas *macro-heterogéneos*, o también llamados sistemas bifásicos, están compuestos de dos líquidos inmiscibles que generalmente son agua y un solvente orgánico hidrofóbico (Xu y col., 2013). Los sustratos pueden disolverse en la fase orgánica o en la fase acuosa, pero independientemente de la partición del sustrato, el biocatalizador estará siempre en la fase acuosa. El producto peptídico formado en la fase acuosa puede particionar a la fase orgánica, lo que es muy deseable para evitar su hidrólisis y conducir el equilibrio hacia la síntesis (Bordusa, 2002).

Los sistemas bifásicos se han usado ampliamente para la síntesis enzimática de péptidos y representan una buena estrategia porque son muy flexibles y pueden

acomodar las propiedades de los sustratos y productos (Barberis y col., 2002, 2006, 2008; Trusek-Holownia, 2003).

El principal inconveniente de los sistemas bifásicos es la presencia de una interface que puede producir restricciones difusionales de los sustratos, reduciendo la velocidad de reacción. Aunque este efecto se puede mejorar con una agitación intensa, ésta puede promover la inactivación de la enzima en la interface (Illanes y col., 2012). Sin embargo, este efecto no se ha observado en la síntesis de péptidos llevada a cabo en nuestro laboratorio utilizando proteasas de plantas autóctonas (Morcelle y col., 2006; Quiroga y col., 2008).

La suspensión de enzimas casi anhidras en solventes orgánicos hidrofóbicos se puede considerar como un sistema *micro-heterogéneo*, debido a que la fase líquida parece homogénea a simple vista pero es un sistema microscópicamente heterogéneo, en el cual la enzima sólida se cubre con una capa delgada de agua (fuertemente unida a ella) dentro del solvente orgánico hidrofóbico que lo rodea. La enzima está protegida del solvente orgánico hidrofóbico, que es muy agresivo, por una capa de enzima desnaturalizada. Este sistema fue considerado como la estrategia más simple y prometedora para la síntesis enzimática de péptidos, ya que explota las mayores ventajas de trabajar en medios no convencionales, como son: evitar la reacción competitiva de hidrólisis de los sustratos, facilitar la recuperación del biocatalizador, mantener estable la enzima a muy elevadas temperaturas y, a veces, lograr cambios favorables en las especificidades de los sustratos (Klibanov, 2001).

El biocatalizador en un sistema *micro-heterogéneo* es simplemente un precipitado acetónico o liofilizado de la enzima que se suspende en un medio orgánico, en el que permanece completamente insoluble (Vossenbergh y col., 2012, 2013). La inmovilización no es necesaria porque la enzima es insoluble en el medio de reacción, aunque puede ser apropiada para ofrecer una mayor área superficial al sustrato y proporcionar una estabilización adicional a la enzima (Barberis y col., 2008).

Los mejores resultados en sistemas *micro-heterogéneos* se obtuvieron con solventes muy hidrofóbicos ($\log P > 4$, donde P es el coeficiente de partición entre n-octanol y agua) debido a que los solventes orgánicos no ingresan a la capa de agua y, en consecuencia, la enzima queda más protegida del contacto directo con ellos. Esta estrategia tiene serias desventajas, tales como la disminución dramática de la actividad enzimática y la baja solubilidad del sustrato en dichos solventes hidrofóbicos (Quiroga y col., 2005). Sin embargo, al agregar formamida o etilenglicol (solventes miméticos al

agua) al medio de reacción o éteres corona a la preparación de las enzimas liofilizadas, se han logrado mejores resultados (van Unen y col., 2002; Wang y col., 2016).

Otro sistema que puede considerarse *micro-heterogéneo* lo constituyen las micelas reversas, que se forman espontáneamente cuando se agregan pequeñas cantidades de agua al solvente hidrofóbico en presencia de un surfactante bajo agitación (Gómez-Puyou y Gómez-Puyou, 1998). Sin embargo, las micelas reversas tienen varios inconvenientes: son mecánicamente débiles, la optimización no se ha estandarizado y la recuperación y purificación de los productos se ve afectada por el surfactante (Bordusa, 2002). Una alternativa a las micelas reversas clásicas son las micelas formadas por agua en aceite (W/O), con un alto contenido de agua (95%) (Clapés y col., 2001).

Los solventes orgánicos convencionales, a pesar que presentan ventajas evidentes como medios de reacción, son generalmente volátiles, inflamables, explosivos y peligrosos para la salud y el medio ambiente, pudiendo producir toxicidad aguda y crónica y carcinogenicidad. Para mejorar los riesgos para la salud humana y el medio ambiente asociados con el uso de solventes orgánicos peligrosos, se han dedicado enormes esfuerzos para desarrollar medios de reacción verdes alternativos (Barberis y col., 2018).

Existe un interés creciente en desarrollar nuevos solventes ecológicos con propiedades similares o incluso mejores que los solventes orgánicos. Por lo tanto, los fluidos supercríticos, líquidos iónicos y mezclas eutécticas profundas surgieron como nuevos solventes verdes en el campo de la biocatálisis (Domínguez de María y col., 2012; Knez y col., 2014; Khandelwal y col., 2016).

Líquidos iónicos

Los líquidos iónicos pueden ser de naturaleza hidrofílica o hidrofóbica, y la principal ventaja que se les atribuye es la facilidad de preparación y extracción al final del proceso (Franco-Vega y col., 2014; Hayes y col., 2015; Sprenger y col., 2015; Cao y Matsuma, 2016).

Las líquidos iónicos se componen comúnmente de un catión orgánico (imidazolio, pirrolidinio, piridinio, y otros cationes exóticos) con una variedad de sustituyentes y un anión inorgánico u orgánico, como haluros, tetrafluoroborato (BF_4^-), hexafluorofosfato (PF_6^-), bis (trifluorometano) sulfonimida (NTf_2^-), y aniones más grandes que contienen grupos sulfonilol o fluoroalquilo. Los cationes dialquil

imidazolio con aniones BF_4^- y PF_6^- son los líquidos iónicos más clásicos utilizados en biocatálisis, más específicamente sales de 1-alkil-3-metilimidazolio y derivados (Hallett y Welton, 2011; Sudhakar y col., 2012; Domínguez de María y col., 2012; Caminiti y Gontrani, 2014).

Los líquidos iónicos se consideran solventes verdes porque no son inflamables, poseen baja presión de vapor, menor volatilidad que los solventes orgánicos y alta estabilidad térmica y química. Por lo general, son líquidos viscosos con punto de fusión menor a 100°C , aunque algunos permanecen en dicho estado hasta cerca de 400°C , debido a sus fuertes interacciones iónicas (Erbeldinger y col., 2010).

Además, son solventes versátiles ya que mediante cambios estructurales del catión o del anión, y/o de polaridad de los mismos, se puede mejorar la solvatación de los reactivos que son poco solubles en agua y en solventes orgánicos polares (Kosmulski y col., 2004; Earle y col., 2006; Ludwig y Kragl, 2007; Sawant y col., 2011; Chiappe y Rajamani, 2011; Ahrenberg y col., 2014). La solubilidad de los sustratos en los líquidos iónicos generalmente depende de la capacidad de ellos para formar enlaces de hidrógeno con los aniones (Novoselov y col., 2007).

Algunas enzimas en líquidos iónicos han presentado una mayor enantioselectividad, estabilidad, reciclabilidad y tasas de conversión que en los solventes orgánicos (Muhammad y col., 2010, Jaeger y col., 2015). La actividad y la estabilidad operacional de las enzimas en líquidos iónicos se puede aumentar ajustando las propiedades fisicoquímicas de éstos (van Rantwijk, 2007; Gorkey col., 2010).

En general, las propiedades fisicoquímicas de los líquidos iónicos juegan un papel importante en la estabilidad, actividad y estructura de diversas enzimas. Se estudiaron las actividades y estabildades de lipasa B de *Candida antarctica* (CAL-B) en forma libre e inmovilizada; y de otras lipasas, proteasas, oxidorreductasas, peroxidadasas y células enteras en líquidos iónicos anhidros, y se demostró que no eran desnaturalizadas o inactivadas (Madeira y col., 2000; Remsing y col., 2008; Hussain y col., 2008). Según varios autores, los líquidos iónicos que contienen aniones BF_4^- , PF_6^- o NTf_2^- permiten expresar altas actividades enzimáticas, enantioselectividad, reciclabilidad y conversión de sustrato en producto (Braeutigam y col. , 2007; Abe y col., 2008; Diego y col., 2009).

Solventes eutécticos

Los solventes eutécticos profundos son medios de reacción prometedores basados en sus bajos puntos de fusión, fácil disponibilidad, biodegradabilidad, reciclabilidad y bajo costo. Por lo general, están formados por una sal de amonio o de metal cuaternario y un donador de enlace de hidrógeno, como ácidos, amidas, aminas y alcoholes (Maugeri y Domínguez, 2012).

Los solventes eutécticos muestran propiedades físico-químicas similares a los líquidos iónicos, pero son solventes más baratos y más seguros que estos últimos para las reacciones de biocatálisis. Son en su mayoría líquidos a 100°C, tienen mayor densidad y viscosidad que el agua a temperatura ambiente, baja conductividad iónica y alta polaridad, pudiendo formar enlaces puente de hidrógeno. El punto de fusión se reduce drásticamente después de mezclar los dos componentes, en comparación con los que poseen los componentes originales (Khandelwal y col., 2016).

Al igual que los líquidos iónicos, los solventes eutécticos presentan la ventaja de tener extremadamente baja presión de vapor (baja volatilidad), que es muy atractiva para usarlos en tecnologías biocatalíticas verdes (Abbott y col., 2011; Rub y Konig, 2012; Zhang y col., 2012). Además, los solventes eutécticos se pueden preparar a partir de productos químicos fácilmente accesibles, tienen baja toxicidad y son biodegradables, especialmente cuando derivan del Cloruro de colina y otros productos químicos renovables. Cloruro de colina es una sal orgánica de uso común para formular solventes eutécticos, ya que es biocompatible con la mayoría de donadores de puentes hidrógeno (urea, glicerol o ácidos carboxílicos) que son baratos y ambientalmente benignos (Pham y col., 2010; Angell y col., 2012; Smith y col., 2014).

Un proceso enzimático de importancia industrial es la síntesis del péptido N-Ac-Phe-Gly-NH₂ en diferentes solventes eutécticos (Cloruro de colina / Gly, Cloruro de colina / urea, Cloruro de colina / xilitol), catalizado por α -quimiotripsina (Maugeri y col., 2013). Además, papaína inmovilizada en un material magnético se utilizó con éxito en la síntesis de N- (benciloxicarbonil) -alanil-glutamina (Z-Ala-Gln) en Cloruro de colina / urea (1:2) con un rendimiento del 71,5% (Cao y col., 2015).

Fluidos supercríticos

Los fluidos supercríticos son sustancias que se encuentran en condiciones de presión de vapor y temperatura superiores a su punto crítico, y se comportan como un híbrido entre un líquido y un gas; es decir, pueden difundir como un gas (por su

viscosidad y difusividad) y disolver sustancias como un líquido (por su densidad y capacidad de solvatación). Se caracterizan por el amplio rango de densidades que pueden adoptar, puesto que por encima de las condiciones críticas, pequeños cambios en la presión y la temperatura produce grandes cambios en la densidad. La combinación especial de dichas propiedades los convierte en solventes excelentes para diversas aplicaciones (Brunner, 2010).

Los procesos que involucran a los fluidos supercríticos son sustentables, amigables con el medio ambiente y tienen bajo costo. Su principal ventaja radica en la posibilidad de separar y secar el producto mediante una simple expansión, mientras que el gas se puede recuperar, reciclar y reutilizar sin pasos de purificación. Los beneficios ambientales del uso de fluidos supercríticos en los procesos industriales y el bajo consumo de energía durante los procesos de síntesis son las ventajas que los hace competitivos frente a los solventes orgánicos convencionales. Es por ello que se los denomina "los solventes verdes del futuro" (Loppinet Serani y col., 2010; Aymonier y col., 2011).

Los beneficios para la salud y la seguridad son evidentes en el uso de CO₂ y H₂O, el fluido supercrítico más importante. No son carcinogénicos, no son tóxicos, no son mutagénicos, no son inflamables y son termodinámicamente estables. Otro beneficio importante se refiere a la posibilidad de ajustar las propiedades termofísicas del fluido supercrítico, tales como difusividad, viscosidad, densidad y constante dieléctrica, simplemente variando la presión y/o la temperatura. Además, los fluidos supercríticos tienen excelentes propiedades de transferencia de calor (Knez y col., 2014). A manera de ejemplo, complejos de α -quimotripsina revestidos con surfactante catalizaron la síntesis de dipéptidos a partir de N-acetil-Phe-OEt y Gly-NH₂ en CO₂ supercrítico a 308,2°K (Mishima y col., 2003).

Soluciones acuosas

Finalmente, también se desarrolló una estrategia para la polimerización de aminoácidos hidrofóbicos en soluciones acuosas. Se investigó la eficiencia catalítica de papaína y bromelina en la reacción de polimerización del éster metílico de L-fenilalanina en soluciones acuosas. Se variaron las condiciones de reacción (pH, temperatura, tipo de proteasa, tiempo de reacción) y se encontró que papaína en buffer fosfato 0,2M (pH 8), a 40°C y durante 3h de reacción, condujo a los mejores resultados

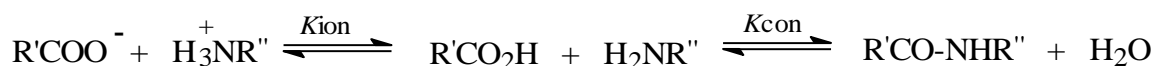
(Yu y col., 2016).

Mecanismos de la síntesis enzimática de péptidos

La síntesis de péptidos catalizada por proteasas puede proceder por dos mecanismos: control cinético y control termodinámico (Kumar y Bhalla, 2005).

Síntesis enzimática de péptidos bajo control termodinámico

La síntesis enzimática de péptidos controlada termodinámicamente representa la reacción inversa de la hidrólisis del enlace peptídico, siendo catalizada por proteasas, según se muestra en el esquema (Jakubke y col., 1985):



Donde K_{ion} es la constante de equilibrio de ionización y K_{con} es la constante de equilibrio de conversión.

Las proteasas, como cualquier catalizador, no alteran el equilibrio de la reacción sino simplemente aumentan la velocidad de la reacción para alcanzarlo. De acuerdo con el principio de reversibilidad microscópica, tanto la formación del enlace peptídico como la hidrólisis proceden por el mismo mecanismo y a través del mismo intermediario. La formación de un intermediario acilo de un ácido carboxílico es una reacción muy lenta y representa la etapa limitante de la velocidad en la síntesis bajo control termodinámico (Sakina y col., 1988).

Las principales ventajas de la síntesis bajo control termodinámico son el uso de un donador de acilo con el grupo carboxílico libre y la posibilidad de utilizar cualquier tipo de proteasas, independientemente de su mecanismo catalítico. Sus principales desventajas son las bajas velocidades de reacción y de rendimiento en producto (determinado por la constante de equilibrio de la reacción), la alta cantidad de enzima (biocatalizador) que suele ser requerida y la necesidad de encontrar las condiciones precisas de reacción para desplazar el equilibrio hacia la síntesis (Bordusa, 2002; Chen y col., 2010; Nuijens y col., 2012). Esto en la práctica puede producir severos compromisos con la actividad y la estabilidad de la enzima.

Del esquema anterior, es evidente que el equilibrio se desplazará hacia la hidrólisis en un medio acuoso. El desplazamiento del equilibrio hacia la formación del enlace peptídico se puede lograr mediante la manipulación del equilibrio de ionización

(es decir, por variación del pH) y del equilibrio de la reacción (es decir, por precipitación del producto o por modificación de la composición del medio) (Jakubke y col., 1985).

La adición de solventes orgánicos miscibles a medios acuosos, y el uso de sistemas macro-heterogéneos (bifásicos líquido-líquido, acuoso-orgánico) son buenas estrategias para desplazar el equilibrio hacia la síntesis. La presencia de solventes orgánicos reducirá la actividad de agua en el medio de reacción, lo que favorecerá el equilibrio, y también reducirá la constante dieléctrica del medio y la acidez del grupo carboxílico del donador de acilo y así, se aumentará la constante de equilibrio K_{ion} para promover la reacción de síntesis. El uso de solventes orgánicos miscibles es una estrategia bastante simple, pero las altas concentraciones de los mismos son generalmente perjudiciales para la actividad enzimática (Illanes y col., 2009a,b; Barberis y col., 2008).

En sistemas bifásicos, la partición de los productos peptídicos de la fase acuosa (que contiene la enzima) a la fase orgánica desplaza el equilibrio hacia la síntesis, con el beneficio adicional de que el producto ya no se encuentra sometido a la hidrólisis. Sin embargo, las velocidades de reacción en los sistemas bifásicos son bajas debido a la limitación por difusión del sustrato a través de la interfase. Además, las proteasas tienden a desnaturalizarse en la interfase agua-solvente orgánico (Halling, 1994).

El uso de solventes orgánicos hidrofóbicos con muy bajo contenido de agua puede, en principio, ser eficaz para la síntesis de péptidos porque reduce la reacción reversa de hidrólisis del producto peptídico formado. Sin embargo, las proteasas en dichos medios orgánicos netos suelen mostrar muy baja actividad y estabilidad, mientras los sustratos y productos suelen ser poco solubles en este tipo de medios de reacción. Sustituir el agua esencial para la biocatálisis por otro solvente orgánico capaz de formar enlaces puente de hidrógeno es una alternativa que puede aumentar la solubilidad de los reactantes y de la enzima (Quiroga y col., 2006).

En resumen, cada proceso de síntesis de péptidos bajo control termodinámico requiere de un estudio particular para determinar cuál es el mejor medio de reacción: sistemas miscibles (agua – solvente orgánico miscible), sistemas bifásicos (agua – solvente orgánico inmisible), sistemas continuos (solvente hidrofóbico con baja actividad de agua), miscelas reversas (agua – solvente orgánico inmisible – surfactante). Sin embargo, es esencial considerar también las características de la reacción, las propiedades físico-químicas de los sustratos y productos, así como también

la robustez (estabilidad y actividad) y las preferencias del biocatalizador en dichos sistemas.

Síntesis enzimática de péptidos bajo control cinético

La síntesis de péptidos cinéticamente controlada, utilizando proteasas, se puede representar mediante el siguiente esquema (Kenjiro y Keiji, 2014):

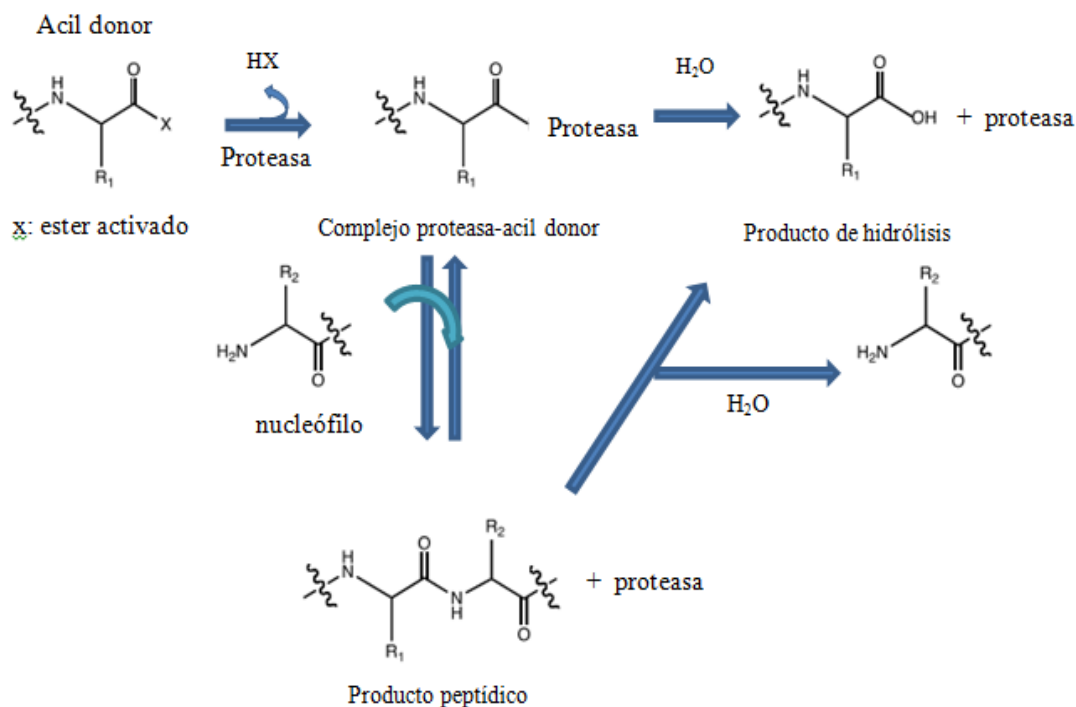


Figura 3. Representación del mecanismo de síntesis de péptidos cinéticamente controlada, utilizando proteasas.

Como se muestra en la Figura 3, el donador de acilo, que necesita ser activado en forma de un éster, una amida o un nitrilo, primero se une a la enzima para formar un complejo tetraédrico enzima-sustrato que colapsa para formar el intermediario covalente acil-enzima. Este intermediario puede sufrir ataque nucleofílico por el agua y por el nucleófilo, que puede ser una amina, un alcohol o un tiol que competirá con el agua por la reacción de desacilación. El éxito de la reacción de síntesis dependerá de la cinética de estas reacciones nucleofílicas, es por eso que esta estrategia se denomina "control cinético".

En oposición a la síntesis de péptidos bajo control termodinámico, sólo las proteasas serínica o cisteínicas pueden ser utilizadas para realizar la síntesis de péptidos

bajo control cinético, porque en este caso la enzima actúa como una transferasa y cataliza la transferencia de un grupo acilo desde el donador de acilo al aminoácido nucleófilo a través de la formación de un intermediario acil-enzima. Generalmente, la síntesis de péptidos bajo control cinético procede más rápido y requiere menor relación enzima: sustrato que la síntesis de péptidos bajo control termodinámico porque el donador de acilo se encuentra en la forma de un ácido carboxílico activado (Bordusa, 2002).

Papaína, termolisina, tripsina y α -quimotripsina fueron las enzimas más utilizadas en la síntesis de péptidos bajo control cinético (Björup y col., 1998; Fité y col., 2002; Miyazawa y col., 2014). Es deseable que el producto peptídico sea retirado del medio de reacción para evitar la hidrólisis secundaria no deseada. El rendimiento en producto del péptido dependerá de la relación entre las constantes de velocidad aparente transferasa a hidrolasa (KT/KH app) y la velocidad a la que se hidroliza el producto peptídico. Las proteasas utilizadas en la síntesis bajo control cinético tienen valores de (KT/KH) app en el rango de 10² a 10⁴ (Kasche, 1996).

Generalmente, los sistemas bifásicos no son adecuados para llevar a cabo la síntesis bajo control cinético ya que en este caso, los ésteres neutros comúnmente utilizados como donadores de acilo particionan con dificultad en la fase acuosa y por lo tanto la concentración en esa fase, donde se produce la reacción enzimática, es baja. Sin embargo, la síntesis de N- α -CBZ-Ala-Phe.OMe (un dipéptido saborizante para la industria alimenticia) se llevó a cabo con éxito en un sistema bifásico compuesto por buffer Tris-HCl (pH 8,5) y acetato de etilo (50% (v/v)), utilizando un extracto proteolítico crudo obtenido a partir del látex de *Araujia hortorum* Fourn. En este caso, el favorable coeficiente de partición del producto de la fase acuosa a la fase orgánica facilitó su recuperación y aumentó el rendimiento de la reacción. Además, el biocatalizador exhibió una alta especificidad y selectividad para la síntesis del dipéptido deseado sin polimerización significativa. Cuando la misma reacción se llevó a cabo utilizando papaína como biocatalizador, se obtuvo un derivado polimérico de Phe como producto de reacción (Quiroga y col., 2008).

La disminución de la actividad de agua mediante el uso de un solvente orgánico favorece la síntesis de péptidos bajo control cinético (al igual que la síntesis bajo control termodinámico), mediante la reducción de la hidrólisis del intermediario acil-enzima y del producto final, aunque nuevamente, el medio de reacción puede ser perjudicial para la enzima (Barberis y col., 2002).

Temperatura, pH, relación de concentración enzima: sustrato, son algunos parámetros que afectarán la síntesis de péptidos bajo control cinético. Un aumento en la concentración del nucleófilo supone un aumento en la velocidad del ataque nucleofílico al intermediario acil-enzima (Jakubke y col., 1985) y un aumento del pH también será beneficioso ya que aumentará el pK del nucleófilo, cuya única forma reactiva es la especie neutra (Barberis y col., 2002; Bordusa, 2002).

A diferencia de la síntesis de péptidos bajo control termodinámico, la propia enzima determinará la eficiencia en la síntesis de péptidos bajo control cinético. De acuerdo con la nomenclatura de Schechter y Berger, los donadores de acilo deben ser reconocidos en el subsitio S de la enzima, mientras los nucleófilos se reconocen en la región S' (Figura 4). La velocidad de la reacción está determinada principalmente por la especificidad de la enzima hacia el donador de acilo, y la unión específica del nucleófilo al subsitio S' de la proteasa es crítica para garantizar altos rendimientos (Schechter and Berger, 1967).

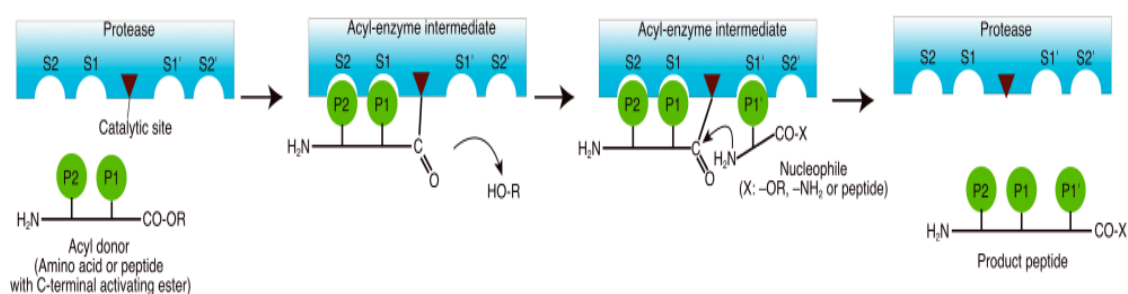


Figura 4. Síntesis de péptidos catalizada por proteasas de acuerdo a la nomenclatura de Schechter and Berger (Schechter y Berger, 1967).

Dado que tanto la especificidad por el donador de acilo como la unión del nucleófilo al subsitio S' son parámetros individuales de cada enzima, la eficiencia de la síntesis bajo control cinético y el potencial como biocatalizador para la síntesis de péptidos diferencian mucho una proteasa de otra.

A pesar de la gran potencialidad de las proteasas, como biocatalizadores de diversos procesos de hidrólisis y síntesis de péptidos, existen muy pocos antecedentes del uso de fitoproteasas como catalizadores de la síntesis de péptidos bioactivos, y los existentes están limitados a los reportados por nuestro grupo de investigación (UNSL) (Illanes y Barberis, 1994; Barberis y col., 2002, 2008; Quiroga y col., 2005, 2008, 2011;

Barcia y col., 2009; Morcelle y col., 2006, 2009).

En la bibliografía, no hay antecedentes del uso de fitoproteasas provenientes de los frutos de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae) como biocatalizador.

En virtud de los antecedentes previos, se plantean los siguientes objetivos generales y específicos:

OBJETIVO GENERAL

Aplicar proteasas pre-purificadas de los frutos de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae), una planta superior que crece en Argentina, en forma soluble, suspendida o inmovilizada, y en sistemas acuoso-orgánicos, como un nuevo catalizador de la síntesis total o parcial de péptidos bioactivos con potencial actividad *antihipertensiva* y *antimicrobiana*; de interés como conservantes alimentarios y nutraceúticos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener los extractos crudo y pre-purificado de los frutos de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae).
2. Caracterizar los extractos proteolíticos pre-purificados de los frutos de *Bromelia antiacantha* en solución acuosa y en sistemas acuoso-orgánicos.
3. Determinar la actividad proteolítica y la estabilidad operacional del extracto pre-purificado de *antiacanthaína* en solución acuosa.
4. Determinar la actividad proteolítica y la estabilidad operacional del extracto pre-purificado de *antiacanthaína* en sistemas homogéneos o miscibles (solvente orgánico miscible y agua), macro-heterogéneos o bifásicos (solvente orgánico hidrofóbico y agua) y micro-heterogéneos (solvente orgánico con actividad de agua muy baja y constante en la enzima).
5. Determinar las preferencias del extracto pre-purificado de *antiacanthaína* en los sistemas descriptos previamente, utilizando derivados aminoacídicos sintéticos.
6. Estudiar el efecto de los solventes orgánicos sobre la estructura secundaria de *antiacanthaina* A, en los sistemas descriptos previamente, por FTIR.
7. A partir de los objetivos específicos anteriores, seleccionar los medios de reacción,

los sustratos y las condiciones operacionales para llevar a cabo las reacciones de síntesis enzimática de péptidos bioactivos, con potencial actividad *antihipertensiva* y *antimicrobiana*.

8. Seleccionar péptidos naturales (modelo) con potencial actividad antihipertensiva y antimicrobiana de la base de datos BIOPEP, tomando como base las preferencias de *antiacanthaína*.
9. Alternativamente, seleccionar secuencias peptídicas de *novo* (obtenidas en nuestro laboratorio a partir de proteínas casearias) y con potencial actividad antihipertensiva o antimicrobiana.
10. Sintetizar los patrones de los péptidos naturales y de *novo*, seleccionados a partir de la base de datos BIOPEP y de nuestro laboratorio, por síntesis química en fase sólida (SPPS).
11. Sintetizar péptidos análogos a los naturales (o sus precursores) con potencial actividad antihipertensiva o antimicrobiana en sistemas homogéneos, macroheterogéneos y continuos con muy baja actividad de agua ($X_a: 1 \times 10^{-5}$), utilizando *antiacanthaína* libre como catalizador.
12. Inmovilizar *antiacanthaína* por unión covalente multipuntual en sílica – glioxil, para utilizarla como catalizador de las síntesis peptídicas de interés, y evaluar el rendimiento en actividad del biocatalizador obtenido.
13. Sintetizar péptidos con potencial actividad antihipertensiva o antimicrobiana en sistemas continuos con muy baja actividad de agua ($X_a: 1 \times 10^{-5}$), utilizando *antiacanthaína* inmovilizada en sílica – glioxil.
14. Diseñar péptidos híbridos con la expectativa de ampliar el espectro inhibitorio o la efectividad de los análogos naturales previamente seleccionados en base de datos.
15. Sintetizar los péptidos híbridos diseñados por vía quimo-enzimática.
16. Analizar los componentes de las reacciones de síntesis enzimáticas (sustratos, productos y subproductos) por RP-HPLC, utilizando los patrones peptídicos obtenidos por síntesis química como estándar externo.
17. Separar y purificar los péptidos obtenidos por síntesis química y por síntesis enzimática en los diferentes sistemas y dilucidar las estructuras de dichos péptidos por HPLC-MS o UPLC-MS.

18. Determinar el grado de conversión del sustrato limitante y los rendimientos en producto de las reacciones de síntesis enzimática, y comparar los resultados obtenidos utilizando *antiacanthaína* libre e inmovilizada en los diferentes sistemas de reacción estudiados.
19. Maximizar el rendimiento en producto en los sistemas de reacción enzimática más promisorios.
20. Determinar las actividades antimicrobianas y antihipertensivas *in vitro* de los productos peptídicos obtenidos y compararlas con las informadas en la bibliografía para los péptidos naturales (tomados como modelo en este estudio).
21. Determinar otras actividades biológicas de los péptidos obtenidos por síntesis química y/o enzimática.
22. Determinar la estabilidad de los péptidos sintetizados en plasma humano.
23. Evaluar la actividad citotóxica *in vitro* de los péptidos obtenidos por síntesis química y enzimática, utilizando líneas celulares 293FT.
24. Proyectar los resultados obtenidos en un proceso de mayor escala.

CAPITULO 2

METODOLOGÍAs

Preparación y caracterización de los extractos enzimáticos de *Bromelia antiacantha* Bertol.

Material vegetal

Bromelia antiacantha Bertol. es una planta terrestre que llega a medir hasta 2 metros de altura, presenta tallos cortos, sus hojas son largas y posee espinas en forma de rosetas. Las flores emergen del centro de las hojas y presentan un tono rojizo en su parte interna. Los frutos son de color amarillo-anaranjado y poseen forma de pequeñas bananas. Las plantas crecen en regiones de suelo húmedo y arenoso de América del Sur, principalmente en el sur de Brasil, en Uruguay (departamento de Rocha) y en el norte de Argentina (Misiones y Chaco) (Vallés y col., 2007).



Figura 5: Hoja, flores y frutos de *Bromelia antiacantha* Bertol.

Preparación del extracto crudo de *Bromelia antiacantha* Bertol.

El extracto crudo se obtuvo por trituración y homogenización de los frutos maduros congelados (50g) mezclados con buffer fosfato de sodio 0,1M (pH 6), EDTA 5 mM y cisteína 5 mM, con la finalidad de evitar la actividad fenoloxidasas y la oxidación, respectivamente. Este homogenizado se filtró y el filtrado se centrifugó a 16.000 xg durante 30 minutos. El sobrenadante se colectó, filtró y congeló a -20°C. Todas las operaciones se llevaron a cabo a 0-4°C (Vallés y col., 2007).

Purificación preliminar del extracto crudo

La purificación preliminar del extracto crudo (EC) se realizó mezclando el mismo con 1 a 5 volúmenes de acetona fría (-20°C), con agitación suave. Luego se lo dejó reposar por 20 minutos a -20°C. A continuación, se centrifugó a 16.000 xg por 30 minutos. El precipitado acetónico se disolvió con un volumen de buffer fosfato de sodio 0,1M (pH6) y se congeló a -20°C. Esto constituye el RAP (precipitado acetónico) el cual se disuelve en el momento de su uso con igual volumen de buffer Tris-HCl 0,1M

(pH8). La acetona presente previene las oxidaciones y reacciones irreversibles entre las enzimas y los compuestos fenólicos presentes en el EC (Vallés y col., 2007; Scopes, 1994).

Determinación de la actividad proteolítica de *antiacanthaina*

La actividad proteolítica de *antiacanthaina* se midió usando N- α benzoil-DL-arginina p-nitroanilida (BAPNA) como sustrato. 0,3 mg/mL de extracto enzimático se incubó con 5mg/mL de sustrato en buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8) conteniendo cisteína 20 mM como activador. Después de 5 min de reacción a 37°C, la absorbancia de la p-nitroanilina liberada se midió espectrofotométricamente a λ : 410 nm. Una unidad internacional de actividad enzimática (UI) se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de p-nitroanilina/min en las condiciones de ensayo (Quiroga y col., 2011). La determinación de la actividad enzimática específica de *antiacanthaina* en los sistemas acuoso-orgánico se llevó a cabo de manera similar, pero reemplazando el buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8), por los respectivos medios de reacción estudiados.

Determinación de las preferencias de *antiacanthaina* frente a sustratos aminoácidos sintéticos

Las preferencias del extracto proteolítico en buffer y en los medios no convencionales (acuoso-orgánico) se determinaron según Priolo y col. (2001). Proteínas totales se determinó por el método de Bradford (1976).

El estudio de las preferencias de *antiacanthaina* (medida como actividad esterolítica) se realizó con 50 μ l de solución enzimática, 100 μ l de N- α -CBZ-Aminoácido- p-nitrofenil éster (disueltos en DMSO) y 850 μ l de buffer Tris-HCl 0,1M (pH 6). Además se realizaron dos blancos preparados de igual forma, pero uno sin sustrato y otro sin enzima. Para el análisis en medios acuosos-orgánicos, se reemplazó el buffer por el medio de reacción correspondiente. La mezcla fue incubada en baño de agua a 40°C durante 5 min y el p-nitrofenol liberado se determinó espectrofotométricamente a λ : 405nm.

Los resultados se expresaron en U_{CBZ}/mg de proteína. Una unidad arbitraria de actividad enzimática (U_{CBZ}) se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto, en las condiciones del ensayo. Para determinar los micromoles de p-nitrofenol producidos durante la reacción se utilizó una curva de calibración.

Determinación de la estabilidad operacional de *antiacanthaina* en diferentes sistemas acuosos – orgánicos

La selección de los solventes orgánicos a utilizar, se llevó a cabo por medio de un diseño estadístico que permitió agrupar 70 solventes orgánicos según sus parámetros fisicoquímicos semejantes (Barberis y col., 2006) (Tabla 2). Dicho diseño redujo el número de experiencias en forma significativa, permitiendo tomar un solvente orgánico representativo de cada uno de los 17 grupos obtenidos y ensayarlos en los tres sistemas: miscibles (formados por buffer y un solvente orgánico miscible); inmiscibles (formados por buffer y un solvente orgánico inmiscible); y continuos (formados por un solvente orgánico con un pequeño contenido acuoso imperceptible al ojo humano).

La estabilidad de *antiacanthaina* en sistemas miscibles, bifásicos y continuos se ensayó por medio de la incubación del extracto crudo pre-purificado en la mezcla de reacción a 40°C, 200rpm, durante 24h. Se tomaron muestras periódicamente y se determinó la actividad enzimática proteolítica usando N- α -benzoil-DL-arginina- ρ -nitroanilida (BAPNA) como sustrato. Se determinó la actividad enzimática específica (UI/mg de proteína).

En el caso de sistemas miscibles y bifásicos, cada medio estuvo constituido por un solvente orgánico y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8) en proporciones 30:70, 50:50 y 70:30 (v/v).

Los sistemas continuos estuvieron constituidos por un solvente orgánico y pequeñas cantidades de agua adicionada (sin obtener un sistema bifásico), de modo tal de lograr el mismo grado de hidratación de la enzima, independientemente de la hidrofobicidad o hidrofiliidad del solvente utilizado.

Determinación del contenido acuoso de *antiacanthaina* suspendida en medios orgánicos casi anhidros

En un tubo de centrífuga previamente tarado, se suspendieron 0,4g de precipitado acetónico liofilizado y 1 ml de solvente orgánico con diferente grado de hidratación, y se incubaron durante 10 minutos a 40°C. Luego, la suspensión se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos. La cantidad de agua en el sobrenadante y en el pellet se determinó por el método de Karl-Fisher (Laitinen y Harris, 1975) utilizando un titulador columbimétrico KF (modelo CA-200, Mitsubishi).

La cantidad de agua en el pellet corresponde a la suma de la cantidad de agua unida a la enzima y a la cantidad de agua unida al solvente atrapado en la enzima. A la cantidad de agua del pellet se le restó la cantidad de agua unida al solvente atrapado, para calcular la cantidad de agua neta unida a la enzima.

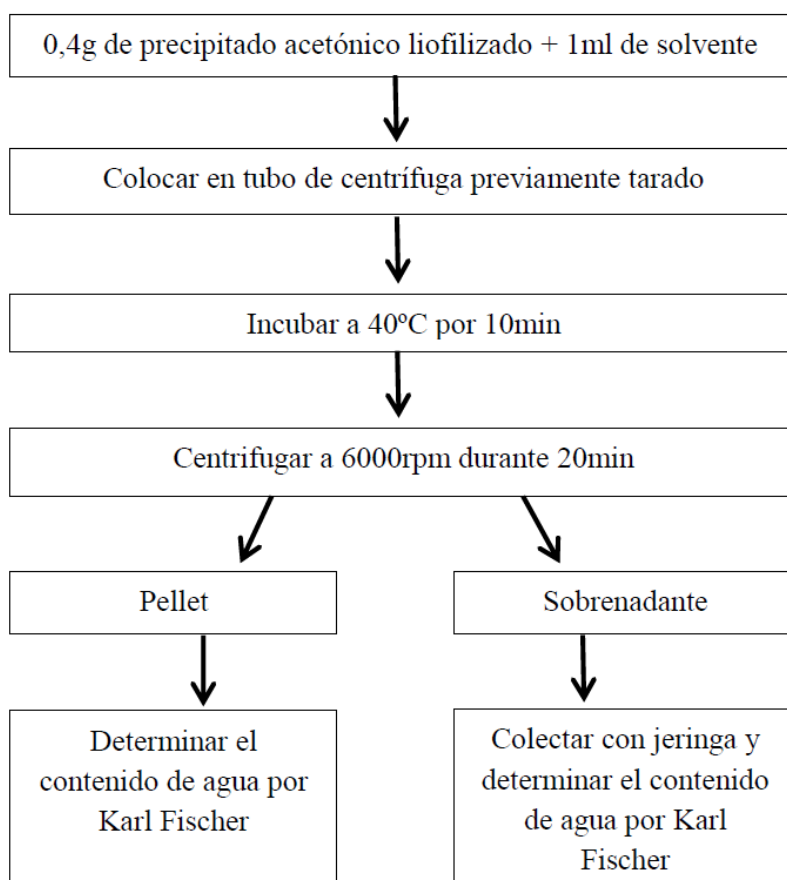
Tabla 2. Diseño estadístico de los solventes orgánicos en función de sus parámetros físico-químicos.

I	II	III	IV	V	VI
ETILENGLICOL FORMAMIDA*	TRIFLUOROETANOL HEXAFLUORO-2- PROPANOL	IODOBENCENO BROMOBENCENO CLOROBENCENO ANISOL* FENETOL	BENCENO* TOLUENO* o-XILENO m-XILENO p-XILENO	1,2 DICLOROETANO DICLOROMETANO TETRACLOROETANO	TETRACLOROETILENO TETRACLOROMETANO TRICLOROETILENO TRICLOROETANO 1-BROMOBUTANO 1-BROMOHEPTANO
VII	VIII	IX	X	XI	XII
DECALIN HEXADECANO	CICLOHEXANO* DECANO OCTANO HEPTANO ISO-OCTANO HEXANO* PENTANO	DI-n-BUTILÉTER DIETILÉTER DI- ISOPROPOLÉTER*	METANOL* ACIDO ACÉTICO	ETANOL* 1-PROPANOL	2-PROPANOL 1-BUTANOL* 3-METIL BUTANO 1-PENTANOL 1-HEXANOL t-BUTANOL 1-HEPTANOL 1-OCTANOL
XIII	XIV	XV	XVI	XVII	
BENZONITRILLO NITROBENCENO ACETOFENONA PIRIDINA* ETILBENZOATO	DIMETILSULFÓXIDO DIMETILFORMAMIDA* N-METILPIRROLIDINONA DIMETILACETAMIDA	PROPILEN CARBONATO NITROMETANO ACETONITRILLO* NITROETANO	PROPIONITRILLO CICLOHEXANO* PROPANONA BUTANONA	TETRAHIDROFURANO DIOXANO ACETATO DE ETILO ACETATO DE BUTILO ACETATO DE PENTILO 1,2 DIMETOXIETANO	

(*) Solventes orgánicos cuyos parámetros fisicoquímicos se diferencian más con el grupo anterior o con el siguiente (Barberis y col., 2006).

La cantidad de agua del solvente atrapado, fue calculada en base al peso del solvente atrapado (diferencia entre el peso del tubo con el pellet y el peso del tubo con la enzima seca) y a la medida del contenido de agua en el solvente (sobrenadante) (Zaks y Klivanov, 1988). La cantidad de agua en la enzima y en el solvente fue expresada como % (p/p) y % (v/v) de agua, respectivamente. La cantidad de agua en la enzima fue expresada como fracción relativa de agua (relación entre la concentración molar de agua en la enzima y la concentración molar del agua pura) y dicho valor fue

fijado en 1×10^{-5} , tomando como base lo informado por Quiroga y col., (2005). A continuación se muestra el diagrama del diseño experimental previamente descrito:



$$\text{Fracción relativa de agua en la enzima } (X_a) = \frac{\text{Concentración de H}_2\text{O en la enzima (M)}}{\text{Concentración de H}_2\text{O pura libre total (55M)}} \quad \text{ec. (1)}$$

Efecto de los solventes orgánicos sobre la estructura secundaria de *antiacanthaina* por FTIR

Antiacanthaina se incubó durante 24 h, 200 rpm y a temperatura ambiente en: buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8) y en medios acuosos-orgánicos conteniendo metanol 30% (v/v), acetonitrilo 70% (v/v), hexano 50% (v/v) y acetato de etilo 50% (v/v). Luego, los solventes se extrajeron y las muestras se secaron en un equipo Integrated SpeedVac® System (Savant, Modelo ISS110) para su posterior análisis en un equipo IR (Shimadzu, Affinity 1) equipado con los accesorios para ATR. Los espectros se midieron en el rango comprendido entre 1700 y 1600 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} .

Aproximadamente 0,5-1,0 mg de proteína se mezcló con 600 mg de bromuro de potasio y se convirtió en una fina pastilla utilizando una prensa hidráulica. Estudios previos, llevados a cabo por medio de espectroscopía FTIR, han demostrado que no hay ninguna alteración en el espectro infrarrojo de las proteínas causadas por el KBr (Prestrelski y col., 1993a, b; van der Wert y col., 2001). El espectro final se obtuvo por sustracción de la señal correspondiente al vapor de agua en la región comprendida entre 1500-1800 cm^{-1} (Dong y Caughey, 1994). Además, se llevó a cabo un espectro de referencia de cada uno de los medios acuoso-orgánicos analizados, observándose que ningún medio absorbió en la zona correspondiente a la banda amida I. Las cantidades relativas de los diferentes componentes de la banda amida I se determinaron por medio del análisis de la segunda derivada, mediante un software Shimadzu IR Solution.

El análisis de la segunda derivada permite analizar la semejanza entre dos espectros. Prestrelski y col. (1993a,b) desarrollaron un proceso matemático para calcular el coeficiente de similitud espectral (similitud, r):

$$r = \frac{\sum^n x_i y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}} \quad \text{ec. (2)}$$

Donde x_i e y_i son los valores de absorbancia del espectro de la referencia (buffer) y de la muestra (medio acuoso-orgánico) respectivamente, a una posición de frecuencia i (cm^{-1}) en la banda amida I. Dicho índice toma valores entre 0 y 1, donde 1 indica la máxima similitud espectral (Quiroga y col., 2007; Kendrick y col., 1996; Prestrelski y col., 1993a,b). Cuando hay grandes cambios conformacionales, las diferencias espectrales también son grandes por lo que el coeficiente r se hace pequeño.

Inmovilización de *antiacanthaina*

Inmovilización covalente multipuntual de *antiacanthaina* en sílica-glioxil (SGx)

Síntesis y caracterización del soporte sílica-glioxil (SGx)

La síntesis de sílica se llevó a cabo a partir de una mezcla de reacción con la siguiente composición molar: 1 SiO_2 : 0,30; Na_2O : 0,24; Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB): 7,2; acetato de etilo: 193 H_2O . La reacción de síntesis se realizó de la siguiente forma: 1,6 g CTAB (4,4 mM) se disolvió en 60 ml de agua para obtener una concentración de CTAB por encima de su concentración micelar

crítica. Luego, 12,8 ml acetato de etilo se añadieron a la solución del surfactante y finalmente, 4 g de silicato de sodio (18 mM) se dispersó en esta mezcla por agitación magnética, se calentó a 80°C durante 48h sin agitación. El sólido obtenido fue calcinado a 540°C (velocidad de calentamiento: 1,58°C/min) durante 3h.

La sílica sintetizada fue modificada químicamente: 1g de sílica (activada bajo vacío a 200°C) se sililó en 30 ml de solución acuosa de 10%(v/v) de glicidil oxipropil trimetoxisilano (GPTMS) (pH 8,5) y 94°C, durante 6h bajo agitación suave. La hidrólisis de grupos epoxi se realizó con H₂SO₄ (0,1M) durante 2h a 85°C. Después de la filtración, el soporte se lavó con la mezcla de agua/acetona (70:30) y se secó; la oxidación se realizó por contacto del soporte con una solución NaIO₄ 0,1M durante 2h a 25°C.

La concentración de grupos glioxilo se cuantificó espectrofotométricamente por valoración por retorno con NaHCO₃/KI (Bernal y col., 2012).

Inmovilización por unión covalente multipuntual

El soporte (0,309g) fue contactado con una solución de *antiacanthaina* preparada en buffer bicarbonato de sodio 0,1M (pH 10). La mezcla se dejó agitando a 200rpm, durante 2h a 25°C. Se tomó 1 ml de sobrenadante y se procedió a determinar la actividad enzimática. Se realizaron un blanco de inmovilización (enzima soluble) y un blanco de reactivos (no contiene BApNA). Luego, el biocatalizador se redujo utilizando 1mg de borohidruro de sodio por ml de solución de enzima, durante 15 min a 200rpm. Finalmente, se lavó el soporte con agua destilada.

El rendimiento de inmovilización en términos de actividad (IYa) se calculó como el porcentaje del cociente entre la actividad ofrecida (A_o) y la actividad expresada en el biocatalizador (A), según:

$$IYa = \frac{A}{A_o} \times 100 \quad \text{ec. (3)}$$

Determinación de la actividad de la enzima inmovilizada

Se pesó 0,07 g de enzima inmovilizada y se ensayó la actividad enzimática a 37°C y 200rpm, utilizando 1ml de N- α benzoil-DL-arginina p-nitroanilida (BApNA) (5 mg/ml) como sustrato, 1 ml de tampón Tris-HCl 0,1 M (pH 8) y 1 ml de cisteína 20 mM como activador. Después de 5 min de reacción, la mezcla se centrifugó 1 min a 5000 rpm. Se

tomó 1 ml de sobrenadante y la absorbancia de p-nitroanilina liberada se midió espectrofotométricamente a λ : 410 nm. Se realizó un blanco de reactivos, de la misma forma pero sin agregado de enzima. Una unidad internacional de actividad enzimática (UI) se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de p-nitroanilina/min en las condiciones de ensayo.

Aplicación de fitoproteasas como nuevos catalizadores para la síntesis de péptidos bioactivos en sistemas acuoso-orgánicos

Los ensayos se realizaron por triplicado y el análisis estadístico se efectuó en cada caso. Las diferencias se consideraron significativas para valores de $p < 0,05$.

Selección de las condiciones operacionales para las reacciones de síntesis enzimática de péptidos bioactivos

Los sustratos (nucleófilo y acildonor) se seleccionaron tomando como base las preferencias que demostraron los extractos enzimáticos por los sustratos sintéticos.

Los medios de reacción se seleccionaron tomando como base las estabilidades operacionales de las enzimas en los medios acuosos-orgánicos; siendo los más promisorios el medio bifásico formado por acetato de etilo (50% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9); y el medio miscible formado por metanol (30% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9).

Las concentraciones de los reactantes se determinaron en función de los parámetros cinéticos de la enzima purificada, la solubilidad de los sustratos y el coeficiente de partición de los sustratos en los diferentes medios acuosos-orgánicos seleccionados. Se establecieron las relaciones iniciales entre los mismos y con la enzima.

Las condiciones de operación del HPLC utilizadas para realizar el cálculo de los coeficientes de partición (P) fueron: Flujo isocrático de 0,8 ml/min. Fase móvil constituida por acetonitrilo–buffer Tris-HCl 0,1M (pH 3). Columna: Hypersil BSD (Base Silica Deactivated) C₁₈ (250 x 4,6mm), tamaño de partícula: 5 μ m. Detector: UV-Visible. Longitud de onda (λ): se determinó a través de un barrido espectral, eligiendo aquella que condujo a la mayor absorptividad para cada uno de los aminoácidos utilizados.

La temperatura y velocidad de agitación fueron de 40°C y 200rpm, respectivamente.

Si bien la temperatura óptima de la enzima en solución acuosa es de 63°C, dicho valor resultó poco conveniente para algunos medios acuosos-orgánicos, debido a la volatilidad (presión de vapor) de algunos solventes orgánicos. El pH de la reacción resultó del compromiso entre la actividad óptima de la enzima frente al pH (Vallés y col., 2007) y los valores de pK del aminoácido utilizado como nucleófilo.

Selección de péptidos naturales tomados como *modelo* para las reacciones de síntesis, con potencial actividad antihipertensiva y antimicrobiana

La selección de los péptidos provenientes de fuentes naturales se realizó a partir de la base de datos BIOPEP (2012), con el objeto de sintetizar *análogos* e *híbridos* tomando como base las preferencias de *antiacanthaina* por diferentes sustratos aminoacídicos sintéticos.

La búsqueda se centró en secuencias cortas, preferentemente di o tripéptidos, con potencial actividad antimicrobiana y antihipertensiva.

Los péptidos naturales (*modelo*) seleccionados fueron los siguientes: Tyr-Leu-OH (YL), Tyr-Val-OH (YV), Tyr-Val-Leu-OH (YVL). Todos ellos fueron sintetizados por vía química para ser utilizados como patrón en las reacciones de síntesis enzimáticas de dichos péptidos tomados como modelo en este estudio.

Selección de péptidos *de novo* obtenidos en nuestro laboratorio a partir de fuentes naturales (proteínas casearias)

Se seleccionaron también otros péptidos obtenidos *de novo* a partir de hidrolizados de derivados casearios en el Laboratorio de Bromatología (UNSL) (Bersi y col., 2018).

En este caso, las fracciones hidrolizadas que fueron obtenidas siguiendo un diseño estadístico experimental y que resultaron más promisorias por su alta actividad biológica (antihipertensiva o antimicrobiana) fueron separadas por electroforesis gel vertical e identificadas por MS/MS.

Resultó de particular interés el tripéptido Tyr-Gln-Gln-OH (YQQ), puesto que dicha secuencia no se encuentra reportada en las bases de datos de péptidos bioactivos, tales como: PepBank (Shtatland y col., 2007), PeptideDB (Liu y col., 2008), BIOPEP (Dziuba y col., 1999); ni en las bases de datos de péptidos antimicrobianos APD2, Antimicrobial Peptide Database (Wang y col., 2017) y CAMP (Thomas y col., 2010).

Diseño de péptidos híbridos con potencial actividad antihipertensiva

La hipertensión es un importante factor de riesgo cardiovascular. El sistema renina-angiotensina-aldosterona es un importante regulador de la presión sanguínea. La hipertensión arterial es un proceso multifactorial, por lo que los péptidos con actividad antihipertensiva pueden actuar de formas muy diversas, siendo la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) el mecanismo de acción más estudiado.

La unión de los péptidos a la ACE está influenciada por la secuencia tripeptídica C-terminal de los mismos, que puede interactuar con tres regiones del centro activo de la ACE (Ondetti y Cushman, 1982). Así, los aminoácidos de carácter hidrofóbico, como Tyr, Trp, Phe o Pro favorecen la unión a estas zonas. El péptido con secuencia C-terminal Phe-Ala-Pro, análogo al encontrado en el inhibidor presente en el extracto del veneno de serpiente, es uno de los más favorables para unirse al centro catalítico. La carga positiva del grupo guanidino o del grupo ϵ -amino de la Arg o Lys, respectivamente, contribuyen a la potencia inhibidora (Cheung y col., 1980).

La presencia de aminoácidos dicarboxílicos en la secuencia peptídica o de Pro como penúltimo aminoácido disminuye o anula la actividad inhibitoria de la ACE (Erdös, 1976; Cushman y col., 1977). El extremo N-terminal también influye en la actividad, y así, la presencia de Val o de Ile en esta posición incrementa la actividad inhibitoria de la ACE.

Se ha demostrado que varios fragmentos de las proteínas del lactosuero presentan diversas actividades biológicas. Específicamente, β -lactorfina, un tetrapéptido (f (102-105): Tyr-Leu-Leu-Phe-OH) derivado de β -lactoglobulina (β -Ig), se comporta como un agonista del receptor opioide (Teschemacher y col., 1997). Más recientemente, se ha informado que β -lactorfina podría mejorar la función arterial en ratas hipertensas espontáneamente (SHR) (Hernández-Ledesma y Hsieh, 2013).

En virtud de lo anteriormente expuesto, se plantea sintetizar el tripéptido derivado de β -lactorfina, (f (102-104): Tyr-Leu-Leu-OH (YLL), por vía quimioenzimática y ensayar su actividad antihipertensiva *in vitro* en forma comparativa a su precursor sintetizado por vía química: Tyr-Leu-OH (YL), y al análogo de éste obtenido por síntesis enzimática N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH (Z-YL).

Síntesis enzimática de los péptidos bioactivos seleccionados y diseñados, con potencial actividad antihipertensiva y antimicrobiana, utilizando *antiacanthaina* libre.

Se utilizaron los extractos enzimáticos pre-purificados de *antiacanthaina* en forma libre, tanto en sistemas macroheterogéneos líquido – líquido (bifásico) como en sistemas homogéneo (miscible).

Se utilizaron las condiciones operacionales que resultaron más promisorias para las síntesis de interés en los medios más estabilizantes para la enzima, según lo previamente descripto.

Se tomaron muestras periódicamente, y se siguió el curso de las reacciones de síntesis por medio del análisis de los sustratos, productos y subproductos por RP-HPLC.

Se evaluó la presencia de los péptidos *modelo* y *de novo* (producidos por síntesis enzimática) mediante el método de la adición del standard interno (patrón), utilizando como patrones los péptidos *modelo* y *de novo* sintetizados previamente por vía química (Nielsen, 2003; Valcarcel y Gomez, 1994).

Se dilucidaron las estructuras y los pesos moleculares de los péptidos sintetizados por espectrometría de masas (MS). Se evaluó el rendimiento en producto y el grado de conversión del donador de acilo durante el transcurso de cada reacción de síntesis.

En todos los casos, se condujo paralelamente un blanco con todos los reactante pero sin la enzima y otro blanco con la enzima sola en el medio de reacción (para descartar la posible liberación de péptidos de las enzimas) (Barberis y col., 2002).

Síntesis enzimática bajo control cinético

En base a los estudios de preferencias realizados en el medio acetato de etilo 50% (v/v), se eligió N- α -CBZ-Tyr-pNO (Z-Y-pNO) (17,25mM) como donador de acilo y L-Leu-OH (7,55mM) como nucleófilo, con el fin de sintetizar el péptido con potencial actividad antihipertensiva, análogo al natural N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH (Z-YL) (Mullally y col., 1996).

Además, con idéntico criterio se eligió N- α -CBZ-Tyr-pNO (Z-Y-pNO) (17,25mM) como donador de acilo y L-Val-OH (7,55mM) como nucleófilo, con el fin de sintetizar el péptido con potencial actividad antimicrobiana, análogo al natural, N- α -CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV) (López-Expósito y col., 2006).

La concentración de N- α -CBZ-Tyr-pNO se estableció en base a su máxima solubilidad en el sistema miscible o en la fase orgánica del sistema bifásico elegido. En este último caso, se tuvo en cuenta el coeficiente de partición entre las fases, resultando en una concentración equivalente a 10 veces el K_m (0,755mM) en la fase acuosa, donde se encuentra la enzima.

Las reacciones de síntesis se llevaron a cabo en un sistema bifásico consistente en 50%(v/v) de una fase acuosa (buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 9)) que contenía 8,66 UI/mg de enzima (*antiacanthaina*), 2-mercaptoetanol (20 mM) y L-Leu-OH o L-Val-OH (7,55mM), y una fase orgánica 50%(v/v) de acetato de etilo que contenía N- α -CBZ-Tyr-pNO (17,25mM). Se utilizó 2-mercaptoetanol (20mM) como activador y la base trietilamina (TEA), en concentración equimolar al nucleófilo, para mantener desprotonado el nucleófilo. Alternativamente, se utilizó 30%(v/v) de metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 9) como sistema miscible, respetando las condiciones descriptas aunque sin considerar los efectos de partición de los sustratos entre las fases.

Las reacciones se llevaron a cabo a 40°C en un agitador orbital de GFL (3031, Alemania) a 200 rpm. Se tomaron alícuotas periódicamente (0,1ml) de las fases acuosa y orgánica, durante 24 h, y se mezclaron con 0,1 ml de ácido trifluoroacético (TFA) al 1% (v/v) para finalizar la reacción. Simultáneamente, se realizaron tres tipos de control: la enzima en el medio de reacción (con el fin de determinar péptidos que podrían haberse liberado del extracto enzimático), de cada sustrato individual, y de todos los reactivos pero sin la enzima.

Los sustratos, productos y subproductos se separaron por RP-HPLC y las estructuras de los péptidos se dilucidaron mediante espectrometría de masas (MS).

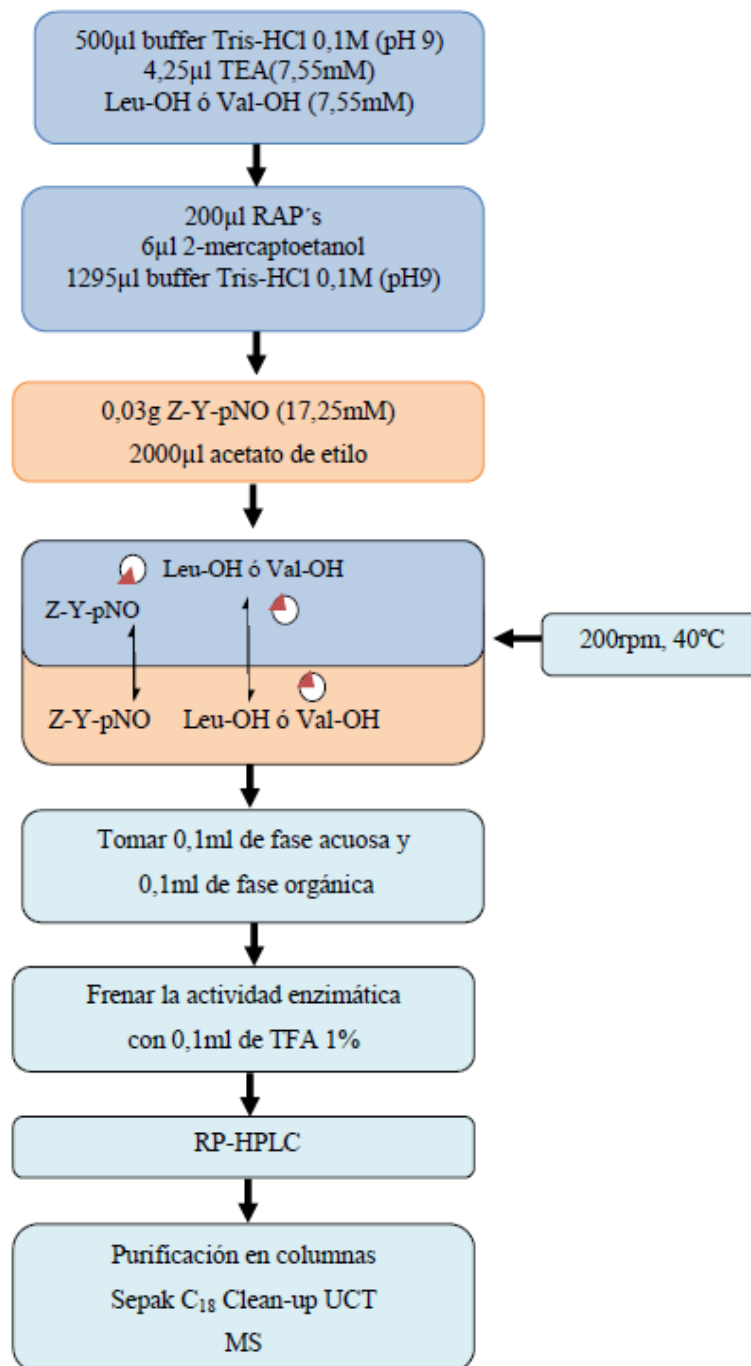
Síntesis enzimática bajo control termodinámico

En base a los estudios de preferencias realizados en el medio acetato de etilo 50% (v/v), se eligió N- α -CBZ-Tyr-OH (Z-Y-OH) (17,25mM) como donador de acilo y L-Leu-OH (7,55mM) como nucleófilo, con el fin de sintetizar el péptido con potencial actividad antihipertensiva, análogo al natural Z-Tyr-Leu-OH (Z-YL) (Mullally y col., 1996).

Además, con idéntico criterio se eligió N- α -CBZ-Tyr-OH (Z-Y-OH) (17,25mM) como donador de acilo y L-Val-OH (7,55mM) como nucleófilo, con el fin de sintetizar el péptido con potencial actividad antimicrobiana, análogo al natural Z-Tyr-Val-OH Z-

YV) (López-Expósito y col., 2006). Se siguió el mismo procedimiento descrito para la síntesis bajo control cinético.

A continuación se muestra el diagrama experimental de síntesis enzimática de péptidos en un sistema bifásico:



Control analítico de la síntesis de péptidos

RP-HPLC

La separación de los péptidos obtenidos por síntesis enzimática se realizó en un RP-HPLC (Ultimate 3000 Dionex) con detector UV equipado con una columna C₁₈ de 4,60 mm x 250 mm (Thermo Scientific, BDS Hypersil C₁₈). Las condiciones de elución isocrática fueron: volumen de inyección 20 µl, fase móvil formada por acetonitrilo al 50% (v/v) en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 3, flujo 0,8 ml/min, detector UV a λ: 254 nm, 25°C. Las condiciones de elución con gradiente fueron: volumen de inyección 20 µl, fase móvil formada por agua miliQ 0,05% de TFA y acetonitrilo puro, flujo 1ml/min. Gradiente 60:40 (A: B) en 7 min, detector UV a λ: 254 nm, 25°C.

MS

Se realizó por ionización por electrospray - espectrometría de masas (ESI-MS) en un equipo LCMS2020 (Shimadzu), cargando 2 µg de cada péptido en las siguientes condiciones: 4.5 kV, 350 °C, modo ion positivo, 20 min. Los datos resultantes se analizaron utilizando el software LabSolutions (versión 5.42, Shimadzu).

MÉTODO DEL ESTANDAR EXTERNO

Para la identificación y cuantificación de los péptidos sintetizados por vía enzimática, se utilizó el método del estándar externo que consistió en inyectar volúmenes constantes de soluciones de concentraciones conocidas y crecientes del péptido patrón (sintetizado por SPPS) en un RP-HPLC (Ultimate 3000 Dionex) con detector UV equipado con una columna C₁₈ de 4,60 mm x 250 mm (Thermo Scientific, BDS Hypersil C₁₈). Se realizó una curva de calibrado del área versus la concentración del péptido patrón, que permitió extrapolar el área del péptido sintetizado por vía enzimática y estimar su concentración, previa separación de los componentes de la mezcla de reacción (Koltoff y Sandel, 1969; Willard y col., 1981). La curva de calibración se repitió periódicamente para verificar la exactitud de la cuantificación y la identidad del péptido sintetizado por vía enzimática se evidenció inyectando el patrón (sintetizado por SPPS) junto a los componentes de la mezcla de reacción enzimática.

MALDI-TOF

Las muestras se prepararon en una placa micro scout mezclando 1 µl de solución peptídica (1 µg / µl en agua) y 1 µl de la matriz CHCA (10 µg / µl de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico en 50% (v/v) acetonitrilo y ácido fórmico al 0,1% (v/v)) y permitiendo que la mezcla se seque al aire. Luego se midieron las muestras en un Microflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics) mediante detección de la reflexión en modo ion

positivo, calibrado previamente con un estándar externo (700-1800 Da). Los espectros se registraron utilizando el software flexControl (versión 3.0, Bruker Daltonics GmbH).

Síntesis enzimática de los péptidos bioactivos seleccionados y diseñados, utilizando *antiacanthaina* inmovilizada

Se utilizaron los extractos pre-purificados de *antiacanthaina* inmovilizados en sílica-glioxil en un sistema microheterogéneos (continuo) formado por acetato de etilo con baja actividad de agua (Fracción molar de agua en la enzima, X_a : 1×10^{-5}).

La selección de acetato de etilo se basó en considerar que en dicho solvente orgánico (50% (v/v)) se obtuvieron resultados promisorios de las síntesis peptídicas de interés utilizando la enzima libre, en las condiciones operacionales previamente seleccionadas. Sin embargo, y debido a la alta proporción de fase acuosa, la reacción competitiva de hidrólisis del donador de acilo afectó el rendimiento en producto peptídico.

Se siguió el curso de las reacciones de síntesis por medio del análisis de los sustratos, productos y subproductos por RP-HPLC. Se dilucidaron las estructuras y los pesos moleculares de los péptidos sintetizados por MS.

Se evaluó el rendimiento en producto y el grado de conversión de donador de acilo de las reacciones de síntesis, usando las enzimas inmovilizadas.

En todos los casos, se condujo paralelamente un blanco con todos los reactante pero sin la enzima y otro blanco con la enzima sola en el medio de reacción (para descartar la posible liberación de péptidos de la enzima) (Barberis y col., 2002).

Maximización de los rendimientos en producto peptídico

Se estudiaron las relaciones entre donante de acilo/nucleófilo para las síntesis peptídicas de interés, con el objeto de maximizar los rendimientos en producto.

Se compararon los resultados obtenidos, en términos de rendimiento y grado de conversión en producto, en las reacciones de síntesis (utilizando las enzimas libres e inmovilizadas). Se evaluaron los resultados obtenidos para proyectarlos en un proceso de mayor escala.

Síntesis química de péptidos bioactivos

Síntesis química de péptidos en fase sólida (SPPS)

Síntesis química simultánea de péptidos, utilizando bolsas de polipropileno

0,1g de resina Fmoc-Rink amide AM (sustitución: 0,59mmol/g; tamaño de partícula: 100-200 mesh) se colocó en bolsas de polipropileno. Dicha resina permite obtener péptidos con grupos amida terminal. Se utilizaron 5 excesos de aminoácidos, 5 excesos del activador O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametiluroniohexafluoro fosfato (HBTU) y 1,5 equivalentes de diisopropiletil amida (DIEA).

La resina se desprotegió, eliminando los grupos Fmoc de los grupos funcionales de la misma, por medio de piperidina (20%) y tritón X-100 (1%) en DMF (dos veces durante 7 min); y lavados en DMF (tres veces durante 1 min); en isopropil alcohol (IPA) (una vez durante 1min); en azul de bromofenol 1% (dos veces durante 1 min); en DMF (dos veces durante 1 min) y en DCM (dos veces durante 1min), bajo condiciones de agitación a 200rpm en un shaker orbital. Las bolsas se colocaron en diferentes frascos de plástico en función de los aminoácidos a acoplar. Seguidamente, los aminoácidos se acoplaron uno a uno y se desprotegieron de igual forma que la descrita anteriormente. HBTU, OxymaPure® y DIEA se usaron como activador, como supresor de la racemización (preserva la quiralidad del C terminal del aminoácido acoplado) y como base (neutraliza los protones libres), respectivamente. Alternativamente, O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametiluroniotetrafluoroborato (TBTU) o N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) se usaron para dobles o triples acoplamientos, respectivamente. Los restantes aminoácidos se ensamblaron mediante ciclos de acoplamiento y desprotección hasta completar la secuencia peptídica deseada. El grupo N α de los aminoácidos acoplados se desprotegió siguiendo el mismo protocolo mencionado anteriormente. La finalización de la reacción de acoplamiento se verificó con el test de Kaiser (Sarin y col., 1981).

Finalmente, la desprotección de las cadenas laterales de los aminoácidos y el clivaje del péptido de la resina se realizó en función de la secuencia de aminoácidos del péptido, por tratamiento con una solución de ácidotrifluoroacético (TFA)/H₂O/triisopropilsilano (92.5:2.5:2.5) (v/v) a temperatura ambiente durante 90 min a 200rpm. El péptido se precipitó con éter etílico enfriado a -70°C. Aquellos péptidos que no precipitaron, se evaporó el éter y se precipitaron con H₂O miliQ. Por último, los péptidos se purificaron por Sepak C₁₈, se liofilizaron y se analizaron por RP-HPLC y se confirmó su peso molecular por MALDI-TOF.

Síntesis química de péptidos utilizando reactores

Se utilizaron 0,2 g de resina 2-cloro-tritilo (carga: 1,6 mmol/g, tamaño de partícula: 100-200 mesh) como soporte sólido para la síntesis de péptidos con grupos carboxilo terminales. La resina se colocó en reactores (jeringas de plástico con filtro de polipropileno).

Se añadieron dos equivalentes del primer aminoácido y cinco equivalentes de DIEA a una jeringa que contenía la resina. El acoplamiento se realizó a temperatura ambiente y 160 rpm en un agitador recíproco (IKA® Werke KS 501 Digital), durante 2 h. A continuación, se añadió metanol (0,5 ml/g de resina) a la resina y se separó del reactor mediante filtración al vacío después de 5 min (colector de vacío, Vacuubrand ME 1C). La resina se lavó dos veces con DCM, dos veces con DMF, y dos veces de nuevo con DCM (durante 1 min en todos los casos). Los solventes orgánicos (DCM, DMF) se secaron con perlas de tamiz molecular de 0,5 nm (Merck).

Posteriormente, se pesaron por duplicado 5-10 mg de resina seca acoplada con el primer aminoácido. Se añadió 1 ml de piperidina al 20% (v / v) en DMF y se agitó a 200 rpm durante 20 min. Después, se tomaron 30 µl de esa solución y se llevó a un volumen final de 3 ml con DMF en una célula de cuarzo. La absorbancia se midió a 300 nm, usando DMF como control. La sustitución se calculó usando la siguiente ecuación (Wanka y col., 2007).

$$\text{Sustitución} = \frac{(Fd \cdot A)}{(e \cdot l \cdot m)} \quad \text{ec. (4)}$$

Fd: factor de dilución.

A: absorbancia a 300 nm.

e: coeficiente de extinción dibenzofulveno ($7,8 \text{ mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

l: longitud del camino óptico (1 cm).

m: peso de la resina (mg).

Los siguientes aminoácidos se acoplaron uno tras otro a dos veces la concentración del primer aminoácido, que se desprotegió previamente con 20% de piperidina y 1% de Triton X-100 en DMF (dos veces durante 7 min) y se lavó en DMF (tres veces durante 1 min), en alcohol isopropílico (IPA) (una vez durante 1 min), en azul de bromofenol al 1% (dos veces durante 1 min), en DMF (dos veces durante 1 min) y en DCM (dos veces durante 1 min), en 200 rpm en un agitador orbital. Se utilizaron HBTU como activador,

OxymaPure® como supresor de la racemización (para preservar la quiralidad del C terminal del acoplado aminoácido) y DIEA como base (para neutralizar protones libres). Alternativamente, también se usaron TBTU o DIC como activadores para acoplamientos dobles y triples respectivamente, cuando fue necesario.

En resumen, el segundo aminoácido y los siguientes se ensamblaron mediante ciclos de acoplamiento y desprotección hasta que se obtuvo la secuencia peptídica deseada. El grupo N α de los aminoácidos acoplados se desprotegió siguiendo el protocolo mencionado. Las reacciones de acoplamiento se verificaron con la prueba de Kaiser (Sarin y col., 1981).

Finalmente, se llevó a cabo la desprotección de las cadenas laterales de aminoácidos y la escisión del péptido de la resina con una solución de TFA / H₂O / triisopropilsilano (95: 2,5: 2,5) (v/v) a temperatura ambiente durante 90 min a 200 rpm.

El péptido se precipitó con éter etílico enfriado a -70°C, se purificó en una columna C₁₈ (Merck), se liofilizó y se analizó por RP-HPLC y MALDI-TOF para confirmar su pureza y masa molecular.

Purificación de péptidos sintéticos

Protocolo de purificación para péptidos sintetizados por vía química y enzimática

Para la purificación de los péptidos sintéticos se utilizaron columnas Sepak C₁₈ (Clean-up® UCT) de 500mg previamente activadas con 2ml de metanol grado HPLC (dos veces) a un flujo de 1ml/min, y lavadas con 2ml de agua miliQ (dos veces) con la finalidad de eliminar impurezas. 10 mg de cada péptido se disolvió en agua miliQ y se eluyó por la columna (cuatro veces). Luego se eluyó la columna con soluciones de acetonitrilo en porcentajes crecientes de concentración: 0, 5, 10, 12,5, 15, 20, 22, 25, 27,5, 30, 40, 60, 80 y 100%, y en metanol 100%. Los eluidos se secaron en Speedvac, se suspendieron en agua miliQ y se congelaron para su liofilización (POE, Laboratorio de Diseño y Síntesis de Péptidos, NBC, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso).

Determinación de las actividades biológicas *in vitro* de los péptidos (análogos, precursores e híbridos) sintetizados por vía química y enzimática

Determinación de la actividad antihipertensiva *in vitro*

La determinación de actividad antihipertensiva *in vitro* se llevó a cabo según Carmona y col. (2009) utilizando el péptido FRET (Abz-FRK-(Dnp)P-OH como sustrato de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

La actividad inhibitoria de ECA frente a diferentes concentraciones de los péptidos N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH (Z-YL), Tyr-Leu-OH (YL), Tyr-Gln-Gln-OH (YQQ) y N- α -CBZ-Tyr-Leu-Leu-OH (Z-YLL), obtenidos por síntesis enzimática, química y quimioenzimática, se determinó adicionando 2,5 μ l de cada péptido (100 mg/ml) a 292,5 μ l de buffer Tris HCl 0,1 M (pH 7), 3 μ l de ECA (1:10 de ECA 0,02 UI/l), NaCl 50 mM y 10 μ M de ZnCl₂, y finalmente 2 μ l del sustrato FRET (1:10). La reacción se llevó a cabo a 37° C durante 590 seg. El aumento de la fluorescencia se midió a λ_{ex} = 320 nm, λ_{em} = 420 nm en un lector de placas automático (Tekan, Infinite M200 PRO) con controlador de temperatura. En paralelo se realizó un blanco sin inhibición, frente al sustrato FRET. Finalmente, se determinó la IC₅₀ de los péptidos mencionados, que es la concentración necesaria de un compuesto para reducir en un 50% la actividad *in vitro* de la enzima ECA.

Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro*

Se empleó un método cinético-turbidimétrico utilizando cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, mantenidas por sucesivos repiques en agar Müller–Hinton (Laboratorio Britania S.A.). Después de 24 h en estufa a 37°C, los cultivos en agar de *E. coli* y *S. aureus*, se transfirieron a 30 ml de un caldo de cultivo Müller-Hinton y se incubaron a 37°C durante 18 h, con permanente agitación, para ser usados como inóculos.

Las experiencias cinéticas de crecimiento microbiano (control) se llevaron a cabo en erlenmeyers de 10 ml con caldo de cultivo Müller-Hinton conteniendo 0,2 ml del inóculo previamente preparado, y concentraciones crecientes de cada péptido sintetizado (muestra). Los erlenmeyers se incubaron en una cámara de cultivo Rosi 1000 (37°C, 180 rpm), se extrajeron alícuotas a intervalos de 20 min durante 5 h y se leyó la transmitancia (T) a λ : 720 nm. Se llevó a cabo un blanco conteniendo 0,2 ml del inóculo en 10 ml caldo de cultivo Müller-Hinton, sin agregado de péptido.

Mediante las ecuaciones $[\ln Nt = 27,1 - 8,56 \cdot T]$ y $[\ln Nt = 27,4 - 10,3 \cdot T]$ se calcularon los valores de $\ln Nt$ (u.f.c/ml) a diferentes tiempos para construir las curvas de cinética de crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente, evaluando las

velocidades específicas de crecimiento de los mismos en ausencia (testigo) y en presencia de concentraciones crecientes de los péptidos de interés. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y las desviaciones estándar de la velocidad específica de crecimiento fueron menores a 0,001 (Talia y col, 2011; Álvarez y col., 2008).

Los resultados obtenidos fueron comparados con las actividades antimicrobianas de los péptidos naturales seleccionados como modelo en este estudio, informadas en la bibliografía.

Determinación de la actividad anticoagulante *in vitro*

La actividad anticoagulante de YQQ se determinó utilizando los test de Wiener Lab (Wiener, Argentina): Tiempo de Trombina (TT), Tiempo de Protrombina (PT) y Tiempo Parcial de Tromboplastina Activada (APTT). Se utilizó una solución estándar del péptido YQQ (0,7 ppm) en buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8).

Test de Tiempo de Trombina (TTT). Este test evalúa el tiempo de conversión de fibrinógeno a fibrina. Se ensayó adicionando 50 µl de la solución estándar del péptido YQQ (0,7 ppm) a 150 µl del pool de plasma, se incubó a 37°C durante 2 min. El tiempo de coagulación (seg) se determinó luego de la inducción de la coagulación por adición de 200µl del reactivo TTT (2.3 NIH/ml). NIH (National Institute of Health) es la unidad comercial de Trombina, y equivale a 1,1-1,3 UI de Trombina.

Test de Tiempo de Protrombina (PTT). Este test evalúa el tiempo de conversión de protrombina a trombina. Se ensayó pre-incubando el pool de plasma y el reactivo PTT a 37°C durante 3min. Luego, se adicionó 25 µl de la solución estándar de YQQ a 75 µl del pool de plasma pre-incubado. A dicha mezcla, se adicionó 200 µl del reactivo PTT y se midió el tiempo de coagulación.

Test de Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado (APTTT). Este test permite evaluar la acción sobre los factores de coagulación VIII, IX, XI y XII de la cascada de coagulación. Se adicionó 25 µl de la solución estándar de YQQ a 75 µl del pool de plasma, y se incubó a 37°C, durante 1 min. Luego, se agregó 100 µl del reactivo TTPA y se incubó a 37°C, durante 3 min. El tiempo de coagulación se determine al adicionar 100 µl de CaCl₂ (25mM).

Todos los ensayos se realizaron en quintuple y se compararon con un compuesto anticoagulante bien conocido (heparina, 5000 UI/ml equivalente a 50 mg /ml, Veinfar

Laboratory, Argentina) como control positivo en condiciones iguales que las de la muestra. Los controles negativos se llevaron a cabo en las mismas condiciones que las muestras, pero sin péptidos.

Se realizaron análisis estadísticos en cada caso. Las diferencias se consideraron significativas para valores de $p < 0.05$.

Ensayos de toxicidad aguda de los péptidos sintetizados

Determinación de la toxicidad aguda de los péptidos sintetizados en ensayos *in vitro* de líneas celulares

La toxicidad potencial de los péptidos se analizó en la línea celular humana 293FT (Fotakis y Timbrell, 2006). Las células se cultivaron en botellas utilizando medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con suero bovino fetal al 10% (FBS), incubadas a 37°C en una atmósfera de aire enriquecido en CO₂ al 5% hasta casi la confluencia (80%). Las células se tripsinizaron, se recuperaron en medio DMEM, se contaron y se prepararon en una suspensión de 5×10^4 células/ml, añadiéndose 100µl/pocillo a una microplaca de 96 pocillos y se dejaron crecer durante la noche en las condiciones mencionadas anteriormente.

Se eliminó el medio y las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se prepararon 100µl de solución de péptido 0,7, 2,1, 7 y 21ppm en DMEM y se añadieron a los pocillos que contenían células. Se guardaron varios pocillos para controles de supervivencia (PBS en DMEM) y controles de toxicidad (20% de DMSO en DMEM). La microplaca se incubó en condiciones de crecimiento durante 2h. Luego, se añadieron 20µl/pocillo de reactivo MTS (CellTiter 96R AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit, Promega), incubando 4h adicionales en condiciones de crecimiento. Se midió la absorbancia a λ : 490nm cada 1h hasta las 4h, después de la adición del reactivo. Se determinó el porcentaje de supervivencia celular en base a una referencia (100% viabilidad celular).

Determinación de la estabilidad de los péptidos sintetizados

Determinación de la estabilidad de los péptidos sintetizados en plasma humano

La estabilidad de los péptidos se determinó incubando (0,7 – 21 ppm) de péptido en un conjunto de plasma humano de individuos sanos (no anticoagulados) a 37°C.

La actividad anticoagulante se determinó como APTT, TP y TT (seg) según la metodología descrita por Wiener Lab Test y se graficó la actividad anticoagulante retenida del péptido en función del tiempo de incubación (min).

Determinación cuantitativa de fibrinógeno en plasma en presencia de los péptidos sintetizados

Determinación cuantitativa de fibrinógeno en plasma mediante el método inmunoturbidimétrico

El fibrinógeno es una glicoproteína presente en plasma y en los gránulos alfa de las plaquetas. Es el factor de coagulación que se encuentra en la concentración más alta en plasma. En presencia de traumatismo o lesión vascular, la trombina escinde el fibrinógeno, produciendo monómeros de fibrina que polimerizan espontáneamente y se estabilizan, dando lugar a una malla de fibrina insoluble.

El método inmunoturbidimétrico de fibrinógeno se basa en la reacción entre el fibrinógeno en plasma y los anticuerpos policlonales anti-fibrinógeno humano (cabra) en buffer fosfato, formando inmunocomplejos insolubles. La turbidez causada por estos inmunocomplejos es proporcional a la concentración de fibrinógeno en la muestra y puede medirse espectrofotométricamente a λ : 340nm.

Se usó una metodología de Fibrinogen Turbiditest AA Line modificada (Wiener Lab., Rosario, Argentina) para evaluar la acción inhibidora de los péptidos sintetizados sobre la enzima trombina.

Se utilizaron en el ensayo, Reactivo A: buffer fosfato, pH 7,4; Reactivo B: anticuerpos policlonales anti-fibrinógeno humano (cabra) en buffer fosfato, pH 7,4; y el kit de Fibrinogen Calibrator Turbitest AA de Wiener Lab. (curva de calibración de fibrinógeno).

Se prepararon tres controles y se incubaron junto con las muestras, como se describe a continuación:

Blanco que consistió en 25 μ l de fibrinógeno (5,69 mg/ml) (Wiener Lab., Argentina) en 165 μ l de buffer de ensayo (Tris-HCl 50 mM, pH 7,2 con NaCl 0,12 mM), según la metodología descrita. por Sabbione y col. (2015).

Control negativo (C-) que consistió en 25 μ l de fibrogeno (5,69 mg/ml) (Wiener Lab., Rosario, Argentina) en 131 μ l de buffer de ensayo (50 mM Tris - HCl pH 7,2 con 0,12 mM NaCl) y 34 μ l de 2.7 NIH/ml de trombina (Wiener Lab., Rosario, Argentina).

Control positivo (C+) que consistió en 25 µl de fibrinógeno (5,69 mg/ml) (Wiener Lab., Rosario, Argentina) en 131 µl de 0,7 ppm de heparina (5000 UI/ml o 50 mg/ml, Veinfar Laboratory, Argentina) y 34 µl de 2,7 NIH/ml de trombina (Wiener Lab., Rosario, Argentina).

Las muestras se prepararon de la misma manera que el control positivo, pero utilizando péptido sintetizado (0,7 ppm) en lugar de heparina.

Después de incubar los controles y las muestras a 37°C durante 10 min, se mezclaron 10 µl de cada control/muestra con 1,5ml de Solución A, se homogeneizaron y midieron a λ : 340 nm (DO1), ajustando el espectrofotómetro a cero con agua destilada. Luego, se añadieron 300 µl de Solución B a esa mezcla, y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Se midió la absorbancia a λ : 340 nm (DO2) y se calculó la diferencia ($\Delta A = DO2 - DO1$). La concentración de fibrinógeno de las muestras y los controles se obtuvo a partir de una curva de calibrado de Diferencia de absorbancia (ΔA) vs. Concentración de fibrinógeno (Fibrinogen Calibrator Turbitest AA, Wiener Lab., Rosario, Argentina).

El porcentaje de inhibición (fibrinógeno que no se convirtió en fibrina por la acción inhibidora de los péptidos anticoagulantes estudiados) se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{[\text{Muestra} - \text{C} (-)]}{[\text{Blanco}]} \times 100 \quad \text{ec. (5)}$$

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PRE-PURIFICADO DE *BROMELIA ANTIACANTHA* BERTOL.

La actividad proteolítica del precipitado acetónico de frutos maduros de *Bromelia antiacantha* Bertol. fue máxima (>80%) entre pH 5 y 7,6 y tuvo mayor estabilidad enzimática a pH 6. La temperatura óptima para la actividad específica es de 63°C. La enzima fue completamente inhibida por E-64 *trans*-epoxisuccinil leucina amida (4-guanidin) butano y ácido iodoacético, y activada por adición de cisteína o β -mercaptoetanol; sugiriendo que las proteasas aisladas pertenecen a la familia de proteasas cisteínicas. Por zimografía del precipitado acetónico se obtuvieron cinco bandas (pI 7,3 a 9,3), pero sólo tres de ellas (pI 7,3, 8,2 y 8,8) fueron proteolíticamente activas. El valor de K_m fue de 0,20mM (*antiacanthaina* A) y de 0,13mM (*antiacanthaina* B) (Valles y col., 2007).

Actividad proteolítica de *antiacanthaina* en solución acuosa

El extracto pre-purificado de *antiacanthaina* se preparó de la forma descrita en el Capítulo 2 (Metodologías), presentó 1,565 mg/ml de proteína total y expresó una actividad proteolítica específica de 8,44 UI/mg de proteína en buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8), a 37°C, utilizando cisteína (20 mM) como activador.

Estabilidad operacional de *antiacanthaina* en medios formados por una solución acuosa y solventes orgánicos

La ingeniería de medios está relacionada con la manipulación racional de los medios de reacción con el objeto de encontrar la mejor condición para la síntesis de péptidos (Illanes y col., 2012). Con frecuencia, el agua se reemplaza por medios no convencionales, como solventes orgánicos, líquidos iónicos, fluidos supercríticos y mezclas eutécticas profundas. Sus propiedades, ventajas y desventajas fueron discutidas en el Capítulo 1 (Introducción).

Los solventes orgánicos pueden aumentar la solubilidad de los sustratos, especialmente de los aminoácidos hidrofóbicos; reducir la hidrólisis de los productos, mejorar la recuperación de los productos y/o del biocatalizador e incrementar la estabilidad térmica del biocatalizador (Illanes y col., 2009a).

Por tal razón, en este trabajo, se utilizaron mezclas de agua y solventes orgánicos (conteniendo una cantidad controlada de agua), como medios de reacción de la síntesis de péptidos con potencial actividad antimicrobiana y antihipertensiva.

A continuación, se describen los resultados obtenidos de la estabilidad operacional de *antiacanthaina* en dos tipos de sistemas biocatalíticos que frecuentemente se usan con solventes orgánicos: - Sistemas homogéneos, formados por una mezcla de agua y un solvente orgánico miscible, y - Sistemas heterogéneos, en los que una segunda fase está formada por un solvente orgánico inmiscible con agua (Barberis y col., 2008).

A su vez, los sistemas heterogéneos estudiados fueron: - Macro-heterogéneos, cuando se evidenciaron las dos fases líquidas inmiscibles, y - Micro-heterogéneos, cuando una de las dos fases; en este caso, la fase acuosa que rodea la enzima, no era visible a simple vista (Illanes y col., 2009b). Además, en estos últimos sistemas se utilizó la enzima libre o insolubilizada en el medio de reacción, ya sea porque la enzima fue insoluble en el medio de reacción (enzima liofilizada en solventes hidrofóbicos con baja actividad de agua) o porque estaba inmovilizada en un soporte sólido (sílica glioxil). En cambio, en los sistemas homogéneos se utilizó enzima libre.

La selección de los solventes orgánicos utilizados, se realizó a partir de un diseño estadístico que permitió agrupar 70 solventes orgánicos según sus parámetros fisicoquímicos similares (Barberis y col., 2006). Se tomó un solvente de cada uno de los 17 grupos con el objeto de reducir el diseño experimental (Tabla 2). Se determinó la estabilidad operacional de *antiacanthaina* en dichos sistemas, conteniendo 30, 50 y 70% (v/v) de solvente orgánico en buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8), a 40°C y 200 rpm de agitación, durante 24 h de incubación. Los resultados se expresaron como actividad proteolítica residual (UI/mg) y tiempo de vida media ($t_{1/2}$, h).

Estabilidad operacional de *antiacanthaina* en sistemas homogéneos (miscibles)

De acuerdo a la Figura 6, *antiacanthaina* en medios formados por un solvente orgánico miscible y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8) mostró menor actividad inicial y residual que en buffer durante 24h; en todos los medios de reacción estudiados. Sólo fue inactivada por el medio formado por 70% (v/v) de acetonitrilo y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8).

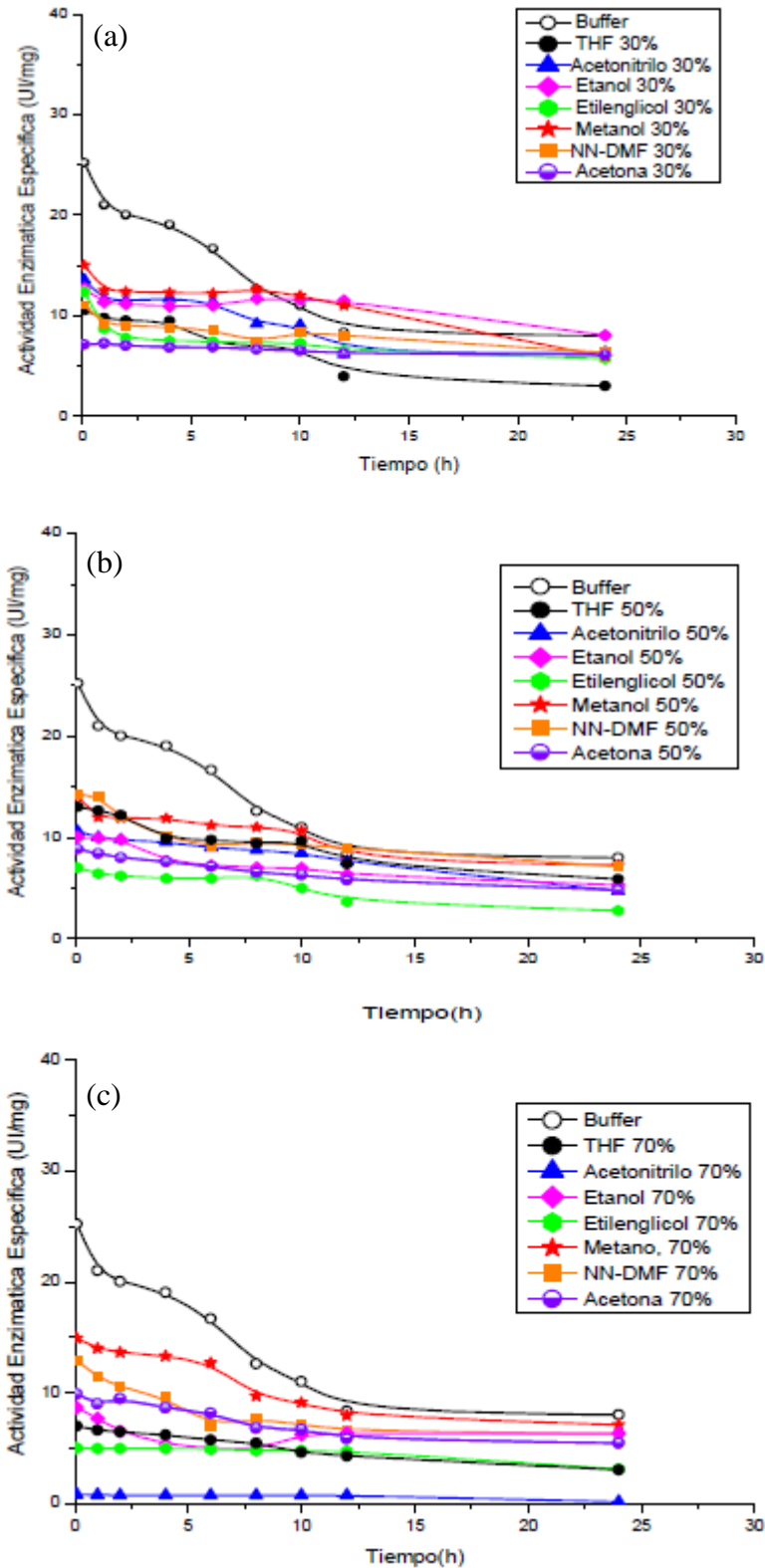


Figura 6. Actividad enzimática específica (UI/mg de proteína) de *antiacanthaina* en sistemas miscibles formados por buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8) y diferentes solventes orgánicos miscibles: a) 30% b) 50% y c) 70% (v/v), a 40°C y 200 rpm de agitación, durante 24h de incubación.

En general, los solventes orgánicos miscibles en concentraciones moderadamente altas son usualmente perjudiciales para la actividad y estabilidad enzimática, porque tienden a penetrar en el microambiente acuoso que rodea las moléculas de la enzima, alterando los patrones de interacción de la enzima con los medios de reacción y distorsionando su estructura tridimensional (Toth y col., 2010; Stepankova y col., 2015; Doukyu y Ogino, 2010). Además, los solventes orgánicos miscibles tienen tendencia a producir la desolvatación del sitio activo de la enzima, modificando su necesaria flexibilidad para acomodar el sustrato; la inhibición competitiva con los sustratos, o la desnaturalización de la enzima (Klibanov, 2001; Graber y col., 2007; Kim y col., 2000).

Según otros autores, los polioles y las glicinas fueron notables excepciones entre los solventes miscibles (Castro, 2000, Illanes y Fajardo, 2001). Contrariamente a lo esperado, etilenglicol en las concentraciones estudiadas no fue favorable para la expresión de la actividad y la estabilidad de *antiacantaina*, alcanzando sólo 48% de la actividad inicial en buffer y reteniendo 22% de la misma, al cabo de 24 h.

Las razones que podrían explicar el comportamiento de *antiacanthaina* en sistemas homogéneos, parecen estar relacionados con la disminución de la hidratación del sitio activo de la enzima y la modificación de los patrones de interacción puente de hidrógeno del agua con la molécula proteica. En este caso, la solubilidad del sustrato y las interacciones sustrato-etilenglicol no son consideradas porque la enzima fue incubada en cada sistema en ausencia de aquel.

Las actividades proteolíticas iniciales en los sistemas homogéneos estudiados oscilaron entre 3 y 60% del valor obtenido en buffer (25 UI/mg), obteniéndose las mayores actividades específicas en los medios formados por metanol 30, 50 y 70% (v/v).

Similares comportamientos han sido informados para otras enzimas incubadas en medios miscibles acuoso-orgánicos. La deshidrogenasa BIALDH y la peptidasa BsAPII de *Bacillus licheniformis* fueron inactivadas por acetonitrilo al 5-70% (v/v) (Min-Guan y col., 2016). Del mismo modo, las lipasas secretadas por *Burkholderia cepacia* y *Penicillium chrysogenum* 9' disminuyeron su actividad con el aumento de la concentración de acetonitrilo en el medio (Ishimoto y col., 2001; Bancercz y col., 2005).

En el caso de la esterasa secretada por *Pyrobaculum calidifontis* VA1 (Hotta y col., 2002), la lipasa de *Staphylococcus saprophyticus* M36 (Doukyu y Ogino, 2010), la lipasa de *Streptomyces* sp. CS268 (Mander y col., 2012) y las proteasas aisladas de

Bacillus cereus BG1 (Ghorbel y col., 2003) y de *Natrialba magadii* (Doukyu y Ogino, 2010) disminuyeron su actividad enzimática en presencia de concentraciones crecientes de acetonitrilo (entre 15 y 50% (v/v)). Además, la lipasa secretada por *Bacillus sphaericus* 205y fue completamente inactivada en presencia de acetonitrilo (Chin y col., 2003).

La inactivación de algunas proteasas y otras enzimas por efecto de los solventes orgánicos miscibles ha sido mejorada por la inmovilización de las mismas a soportes inertes, pudiendo ser aplicadas exitosamente a las reacciones de síntesis de péptidos en dichos medios (Illanes y col., 2009b; Yazawa y Numata, 2014).

Estabilidad operacional de *antiacanthaina* en sistemas macroheterogéneos líquido-líquido (bifásicos)

Los sistemas macroheterogéneos líquido – líquido, llamados sistemas bifásicos, están compuestos por dos líquidos inmiscibles que generalmente son agua y un solvente orgánico hidrofóbico (Xu y col., 2013).

Los sustratos pueden disolverse en la fase orgánica o en la fase acuosa, pero independientemente de la partición del sustrato, el biocatalizador estará siempre en la fase acuosa; quedando menos expuesto al solvente orgánico que en un medio homogéneo. No obstante, la partición del solvente orgánico en la fase acuosa puede afectar la actividad y estabilidad de la enzima (Quiroga y col., 2005).

La estabilidad de *antiacanthaina* fue estudiada en medios formados por buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8) y diferentes solventes orgánicos inmiscibles con el agua en una relación de 30, 50 y 70% (v/v), a 40°C y 200rpm de agitación, durante 24h de incubación.

La Figura 7 muestra los perfiles de actividad enzimática específica de *antiacanthaina* (UI/mg de proteína) en sistemas bifásicos formados por buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8) y un solvente orgánico inmiscible (30, 50 y 70%(v/v)), a 40°C y 200rpm de agitación, en función del tiempo.

En general, *antiacanthaina* en los medios formados por buffer y benceno, diclorometano, hexano y éter etílico (en todas las concentraciones estudiadas); y acetato de etilo al 50 y 70 %(v/v); mostraron mayor actividad enzimática residual que en buffer durante 24h. Los valores de actividad específica residual obtenidos fueron entre 231 y 149%, respecto de buffer.

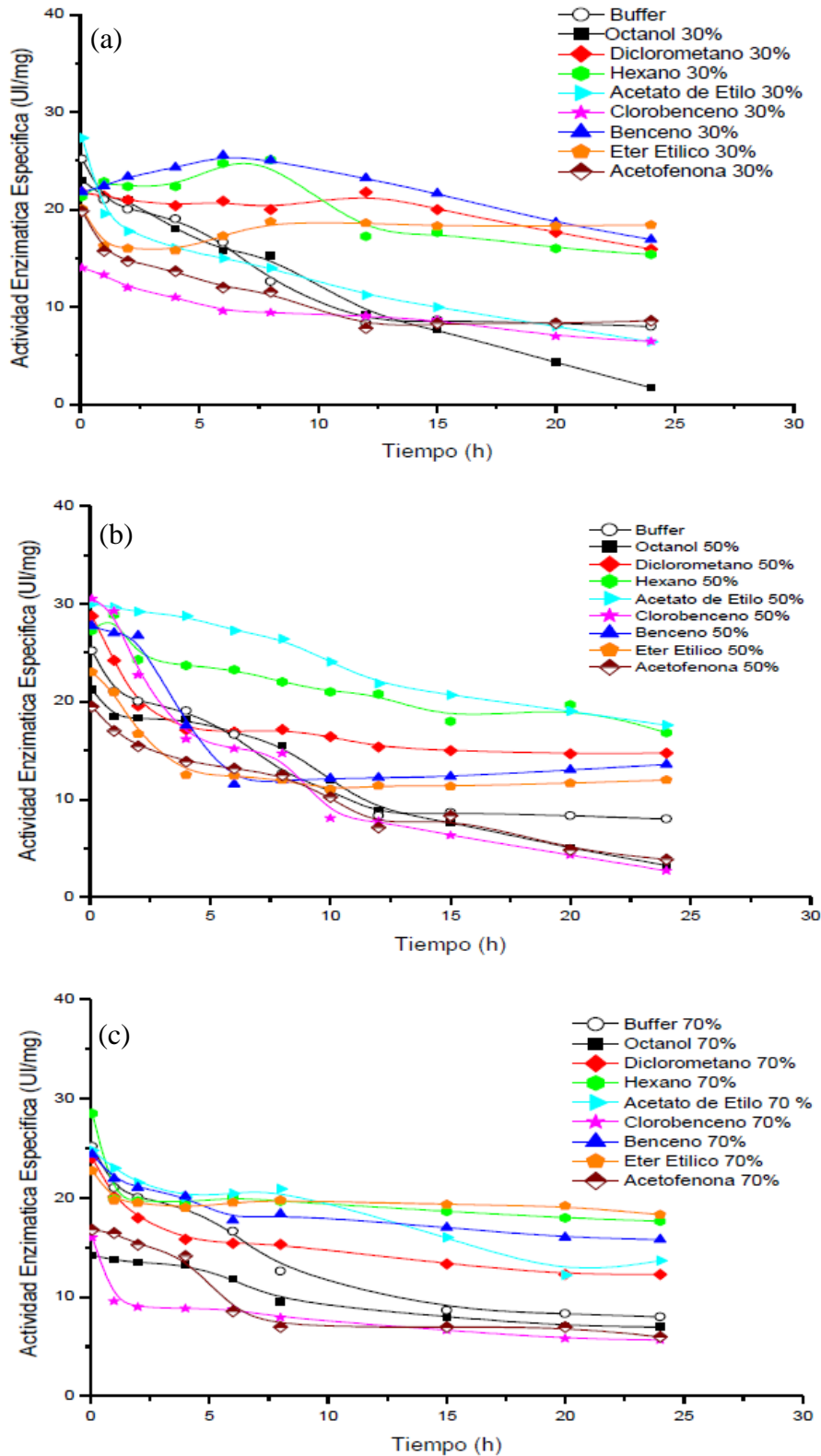


Figura 7. Actividad enzimática específica (UI/mg de proteína) de *antiacanthaina* en sistemas bifásicos formados por buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8) y diferentes solventes orgánicos inmiscibles: a) 30% b) 50% y c) 70% (v/v), a 40°C y 200 rpm de agitación, durante 24h de incubación.

La partición de los solventes orgánicos previamente mencionados hacia la fase acuosa redujo el grado de autólisis y produjo una considerable activación y estabilización de la enzima.

Por el contrario, *antiacanthaina* en clorobenceno, acetofenona y octanol (30, 50 y 70%, v/v) mostró menores actividades iniciales y residuales que en buffer aunque no se produjo la inactivación total de la enzima en ningún caso. Este fenómeno podría ser debido a la toxicidad de las moléculas del solvente orgánico disuelto en la fase acuosa (toxicidad molecular) y/o la presencia de una interfase orgánica (toxicidad de interfase) (Yang y Russell, 1996).

En resumen, los mejores resultados se obtuvieron con acetato de etilo y hexano (50%, v/v) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8). Las actividades proteolíticas iniciales fueron de 119 y 108% de los valores obtenidos en buffer. Al cabo de 24h, *antiacanthaina* en dichos medios mantuvo 49 y 51% de la actividad inicial, respectivamente; indicando que son medios promisorios para llevar a cabo la síntesis enzimática de péptidos bioactivos.

Los sistemas bifásicos se han utilizado ampliamente para la síntesis enzimática de péptidos y representan una buena estrategia porque son muy flexibles y pueden acomodar las propiedades de los sustratos y productos (Barberis et al., 2002, 2006, 2008; Trusek-Holownia, 2003). Es muy deseable que el producto peptídico formado pueda particionar en la fase orgánica, lo que evitaría su hidrólisis y conduciría el equilibrio hacia la síntesis (Bordusa, 2002).

El principal inconveniente de los sistemas bifásicos en biocatálisis es la presencia de una interface que puede producir restricciones difusionales de los sustratos, reduciendo la velocidad de reacción. Aunque este efecto se puede mejorar con una agitación intensa, ésta puede promover la inactivación de la enzima en la interface (Illanes y col., 2012). Este efecto no se ha observado en reacciones de síntesis de péptidos llevadas a cabo previamente en nuestro laboratorio, utilizando proteasas vegetales autóctonas (Morcelle y col., 2006, Quiroga y col., 2008).

Estabilidad operacional de *antiacanthaina* en sistemas microheterogéneos (continuos)

Los primeros estudios de enzimas en medios orgánicos con bajo contenido acuoso se llevaron a cabo disolviendo las mismas en un pequeño volumen de agua y

adicionando ésta al solvente orgánico puro, de tal manera que una capa acuosa imperceptible a simple vista rodea a la enzima y le permite mantener su conformación nativa. Por tal razón, se denominan usualmente sistemas continuos (Illanes y Barberis, 1994).

Sin embargo, cuando una reacción enzimática es llevada a cabo en medios orgánicos, el agua presente en el medio se distribuye entre las diferentes fases: agua unida a las moléculas de enzima, la cual influye fuertemente sobre su actividad; agua molecularmente disuelta en el solvente orgánico y agua asociada a otros componentes presentes en el medio (soportes, sustratos, activadores, etc). En consecuencia, el contenido de agua total del sistema no dice mucho acerca de la hidratación enzimática necesaria para mantener la conformación catalíticamente activa y expresar sus propiedades. Por ello, se prefiere analizar el efecto del agua en estos sistemas en términos de actividad termodinámica de agua (Halling, 1994; 2002; Illanes y Barberis, 1994).

Este parámetro denota la relación entre la presión de vapor del agua en una sustancia determinada y la presión de vapor del agua pura, a la misma temperatura, Además, permite determinar el grado de hidratación de la enzima y mantenerla “constante” en solventes con diferente grado de hidrofobicidad/hidrofilicidad.

La actividad termodinámica del agua (a_w) está relacionada directamente con la fracción molar de agua (X_w) y con el coeficiente de actividad (Y_w), según la ecuación (6):

$$a_w = X_w \cdot Y_w \quad \text{ec. (6)}$$

El coeficiente de actividad aumenta en función de la hidrofobicidad del solvente, por lo que una determinada a_w será obtenida a menores concentraciones acuosas en un medio hidrofóbico que en uno hidrofílico.

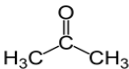
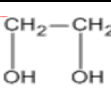
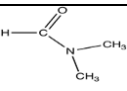
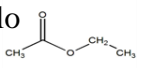
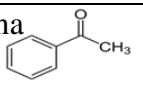



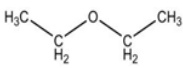
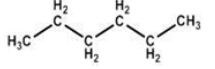
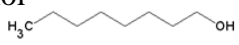
Contenido acuoso de *antiacanthaina* suspendida en medios orgánicos casi anhidros

La estructura tridimensional de las enzimas resulta del balance entre las uniones puente de hidrógeno, fuerzas iónicas, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas dentro de las proteínas, y entre la proteína y el solvente orgánico. Estas interacciones son influenciadas también por la temperatura y la fuerza iónica del medio. Sin embargo, las enzimas no sólo requieren una estructura secundaria y terciaria intacta en el medio de reacción, sino también una flexibilidad conformacional adecuada que es

proporcionada por el agua (Klibanov, 1997; Daniel y col., 2003; Diaz-Álvarez y col., 2011).

La Tabla 3 muestra la cantidad de agua adicionada a los solventes orgánicos (% (v/v)) para obtener una fracción relativa de agua en la enzima contante e igual a 1×10^{-5} .

Tabla 3. Cantidad de agua adicionada a los solventes orgánicos para obtener una fracción relativa de agua en la enzima constante e igual a 1×10^{-5} .

Solventes miscibles	Agua adicionada al solvente orgánico (% (v/v))	Agua en la enzima (% (p/p))	Fracción relativa de agua en la enzima (X_w)
Acetona 	0,565	107,60	1×10^{-5}
Etanol $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$	0,245	2,48	1×10^{-5}
Etilenglicol 	0.108	5,63	1×10^{-5}
NN-DMF 	0,217	6,08	1×10^{-5}
Solventes inmiscibles	Agua adicionada al solvente orgánico (% (v/v))	Agua en la enzima (% (p/p))	Fracción relativa de agua en la enzima (X_w)
Acetato de Etilo 	0	6,44	1×10^{-5}
Acetofenona 	0	2,76	1×10^{-5}
Benceno 	0	3,21	1×10^{-5}
Clorobenceno 	0	3,53	1×10^{-5}
Diclorometano 	0	1,83	1×10^{-5}
Éter Etilico 	0	4,21	1×10^{-5}
Hexano 	0	3,82	1×10^{-5}
Octanol 	0	6,35	1×10^{-5}

Es decir, las enzimas requieren una capa de agua unida a su superficie para exhibir flexibilidad conformacional y expresar actividad enzimática. La pérdida de

dicha flexibilidad conduce a una conformación molecular restringida, más rígida y resistente a las vibraciones térmicas, pero con capacidades más reducidas para la adecuada interacción enzima-sustrato, lo que a su vez reduce el grado de conversión del sustrato en producto (Ru y col., 1999).

Según la Figura 8, *antiacanthaina* en presencia de la mayoría de los solventes orgánicos con bajo contenido acuoso estudiados expresó una actividad proteolítica inicial muy baja que osciló entre 0,5 y 1 % con respecto a su actividad proteolítica en buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8) y solo excepcionalmente la mantuvo durante 24h en acetato de etilo. Dicho comportamiento podría ser debido a que en sistemas orgánicos prácticamente puros, el íntimo contacto con las enzimas puede resultar en una severa distorsión de la estructura, produciendo una rápida desnaturalización e inactivación (Torres y Castro, 2004).

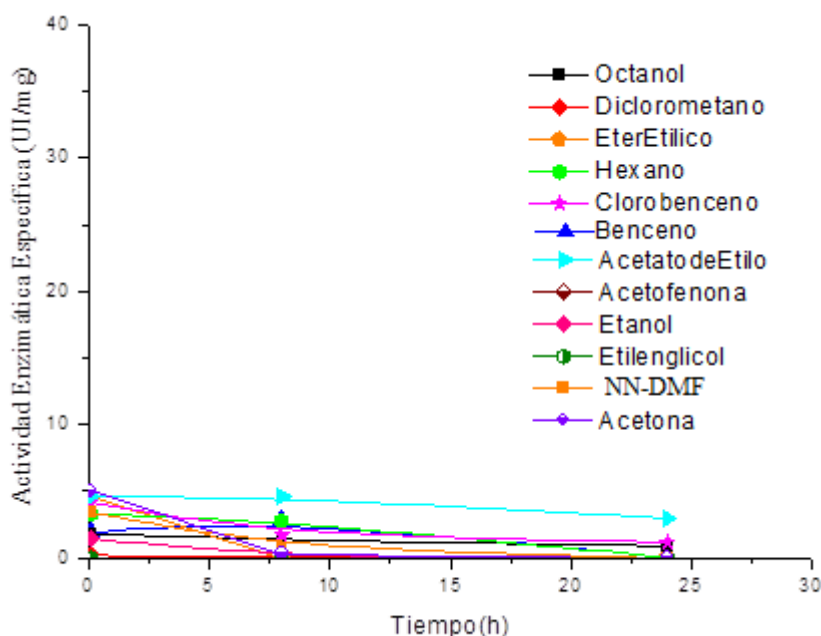


Figura 8. Actividad enzimática específica (UI/mg de proteína) de *antiacanthaina* en sistemas continuos formados por diferentes solventes orgánicos con bajo contenido acuoso (fracción relativa de agua en la enzima constante; $X_w: 1 \times 10^{-5}$), a 40°C y 200 rpm, durante 24h de incubación.

Similar comportamiento al observado por *antiacanthaina* en medios continuos (solvente orgánico con baja a_w) fue informado por otros autores. *Araujia*, una fitoproteasa proveniente de *Araujia hortorum* Fournier, mostró un comportamiento similar a *antiacanthaina* en solventes orgánicos con bajo contenido acuoso (Quiroga y col., 2005).

Según lo informado en la bibliografía, los solventes orgánicos hidrofílicos con baja a_w presentaron mayores efectos inactivantes que la mayoría de los solventes hidrofóbicos. Este efecto se adjudicó a la mayor capacidad de los solventes hidrofílicos de remover agua unida a la superficie de la proteína la cual es crucial para mantener la estructura y la función (Serdakowski y Dordick, 2008; Klibanov, 1997). Sin embargo, cualquiera sea la naturaleza del solvente orgánico, cuando la a_w es muy baja (fracción relativa constante de agua en la enzima; $X_w: 1 \times 10^{-5}$) *antiacanthaina* sufre rápida inactivación.

Preferencias de *antiacanthaina* en buffer Tris-HCl 0,1M (pH 6)

Una de las propiedades más destacadas de las enzimas como catalizadores es su elevada especificidad respecto a ciertos sustratos, ésta es la capacidad que posee la enzima de distinguir entre sustratos diferentes, aun cuando tengan estructura similar. Esta propiedad está determinada por la conformación del sitio activo de la enzima, constituido por un número reducido de residuos aminoacídicos, que permiten ubicar al sustrato en la posición correcta para que los grupos funcionales de la enzima efectúen su transformación química (Illanes, 2016).

Las preferencias de *antiacanthaina* por sustratos N- α -CBZ-Aminoácido *p*-nitrofenil éster en buffer Tris-HCl 0,1M (pH 6) se muestran en la Tabla 4.

Antiacanthaina en dicho medio acuoso exhibió amplia preferencia por Ile, seguida por Trp, Gly, Phe y Ala, mientras no expresó actividad frente a Val y Lys.

Claramente, *antiacanthaina* mostró alta preferencia por los derivados aminoacídicos no polares (excepto Val).

Excepcionalmente, entre los aminoácidos polares estudiados, *antiacanthaina* frente a N- α - CBZ-Gly-*p*-nitrofenil éster tuvo 27% de preferencia, probablemente debido al menor carácter polar de su cadena lateral.

Tabla 4. Preferencias del extracto pre-purificado de *antiacanthaina* en buffer Tris-HCl (0,1 M) pH 6 frente a devivados N- α -CBZ-Aminoácido *p*-nitrofenil éster.

N- α - CBZ-Aminoácido <i>p</i> -nitrofenil éster	Buffer Tris-HCl 0,1M (pH 6)
---	-----------------------------

	(%) preferencia	U _{CBZ} /mg de proteína
No polares		
Ala	23	119
Ile	100	508
Leu	14	73
Phe	23	117
Trp	38	193
Val	0	0
Polares		
Asn	4	21
Gln	5	26
Gly	27	139
Tyr	7	34
Básico		
Lys	0	0

Preferencias de *antiacanthaina* en diferentes sistemas acuoso-orgánicos

Ha sido ampliamente reportado en la literatura que al cambiar el medio de reacción (de una solución acuosa a un medio acuoso-orgánico e incluso cuando se reemplaza un solvente orgánico por otro) se puede manipular y, en algunos casos revertir, la especificidad de una enzima (Klibanov, 2001; Yang y col., 2004; Mattos y col., 2006; Quiroga y col., 2007).

Estudios de dinámica molecular y de Rayos X demostraron que los solventes más hidrofóbicos, como los alcanos, cuando se encuentran en el entorno del sitio activo de las enzimas tienden a reorientar las cadenas laterales de los aminoácidos, modificando su especificidad (Yennawar y col., 1994; Lousa y col., 2013;).

Aunque los solventes orgánicos no alteren el sitio activo de la enzima, afectan la actividad de la misma debido a que cambian su afinidad por el sustrato y la hidratación de los mismos (Wang y col., 2016). Además, los factores estéricos y las interacciones iónicas y electrónicas que se establecen entre las cadenas laterales y la enzima contribuyen al mantenimiento de la actividad, siendo diferentes en agua y en medios acuosos-orgánicos (Priolo, 2001).

Sin embargo, en otros casos, los solventes orgánicos afectaron la estructura global de la enzima y el sitio activo de las mismas (Carrera y Riva, 2000).

La Tabla 5 muestra las preferencias del extracto pre-purificado de *antiacanthaina* por sustratos sintéticos (actividad esterolítica, U_{CBZ}/mg de proteína) en un medio orgánico miscible formado por 30% de metanol y buffer Tris-HCl 0,1M (pH

6) y medios orgánicos inmiscibles conteniendo 50% de acetato de etilo ó 50% de hexano en dicho buffer. Dichos medios fueron seleccionados porque *antiacanthaina* expresó en ellos, su mayor actividad proteolítica residual después de 24h de reacción.

Tabla 5. Preferencias del extracto pre-purificado de *antiacanthaina* en diferentes sistemas acuoso-orgánicos utilizando derivados N- α -CBZ-Aminoácidos *p*-nitrofenil éster.

N- α - CBZ- Aminoácido <i>p</i> - nitrofenil éster	Metanol 30%		Acetato de etilo 50%		Hexano 50%	
	(%) preferencia	U _{CBZ} /mg de proteína	(%) preferencia	U _{CBZ} /mg de proteína	(%) preferencia	U _{CBZ} /mg de proteína
No polares						
Ala	30	132	23	12	0	0
Ile	10	44	24	13	0	0
Leu	21	93	17	9	0	0
Phe	100	443	0	0	0	0
Trp	0	0	11	6	0	0
Val	100	442	68	36	0	0
Polares						
Asn	0	0	100	53	0	0
Gln	5	24	90	48	100	47
Gly	0	0	66	35	34	16
Tyr	24	105	77	41	0	0
Básico						
Lys	11	48	60	32	0	0

Las preferencias de *antiacanthaina* en los medios anteriormente citados variaron notablemente respecto de las expresadas en buffer Tris-HCl 0,1M (pH 6) (Tabla 4), incluso fueron muy diferentes en cada medio estudiado.

En metanol (30% (v/v)), *antiacanthaina* mostró mayor preferencia por Phe y Val, ambos aminoácidos no polares, pero no fue capaz de escindir la unión éster de otros sustratos no polares como Trp. Además, dentro de los aminoácidos polares, Tyr y Gln presentaron baja preferencia (24 y 5%, respectivamente), mientras que Gly y Asn no pudieron ser hidrolizados en dicho medio de reacción.

En acetato de etilo (50% (v/v)), *antiacanthaina* mostró actividad frente a todos los aminoácidos ensayados (excepto Phe), aunque tuvo mayor preferencia por los aminoácidos polares Asn y Gln.

Por el contrario, en hexano (50% (v/v)), *antiacanthaina* solo mostró una gran afinidad por Gln, seguido por Gly; pero no fue capaz de escindir el resto de los aminoácidos

Estos resultados sugieren que *antiacanthaina*, en los medios acuoso-orgánicos seleccionados, sufrió al menos cambios en su funcionalidad que podrían o no estar relacionados con cambios estructurales de la enzima. Si bien la enzima mantuvo su habilidad intrínseca para interactuar con diferentes sustratos, lo que indicaría que la integridad del sitio activo se mantuvo, expresando una actividad específica en metanol (30% (v/v)) similar a la que se tuvo en buffer Tris-HCl 0,1M (pH 6) y casi 90% superior a la obtenida en los medios bifásicos ensayados.

Según la bibliografía, en agua los efectos hidrofóbicos juegan un rol clave en la unión del sustrato a la enzima, pero en presencia de un solvente orgánico se modifican las fuerzas que conducen a dicha unión. Además, en la unión entre la enzima y el sustrato no solo se pone en juego la energía de interacción entre ambos (afinidad) sino también la energía de desolvatación del sustrato que está próximo a unirse a la enzima (Dordick, 1992).

Estas observaciones nos indujeron a evaluar el efecto de los solventes orgánicos de los medios de reacción sobre la estructura secundaria de la enzima, utilizando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

Al mismo tiempo y fuera del contexto de esta tesis, se están evaluando los factores hidrofóbicos, electrónicos y estéricos de las cadenas laterales de los aminoácidos que gobiernan la actividad estereolítica de *antiacanthaina* por medio de métodos de cálculo lineal.

Efecto de los solventes orgánicos sobre la estructura secundaria de *antiacanthaina* en sistemas acuoso-orgánicos, por FTIR

Las estructuras secundaria y terciaria de las enzimas están mantenidas por numerosas interacciones no covalentes: uniones puente de hidrógeno, interacciones iónicas, hidrofóbicas y de van der Waals (Schultz y Schirmer, 1979). La ruptura de dichas fuerzas, como resultado de la adición de solventes orgánicos a una solución acuosa de enzima, puede conducir a cambios en la dinámica y conformación de la proteína que pueden traducirse en alteraciones de las funciones enzimáticas (Barberis y col., 2006).

Estrictamente, la correlación entre la estructura y la actividad catalítica de una enzima requiere de un estudio de la estructura del sitio activo y del efecto del medio de reacción sobre el estado de transición de la reacción (Kanerva y Klivanob, 1989).

Sin embargo, utilizando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) se puede estudiar la estructura secundaria de una proteína y se pueden comparar los cambios que se producen en las interacciones no covalentes (uniones tipo puente de hidrógeno, interacciones iónicas, y otros tipo de interacciones débiles) que mantienen la conformación de la enzima, como resultado de la adición de solventes orgánicos a una solución enzimática acuosa.

Los espectros vibracionales de las moléculas de proteínas están determinados por su estructura tridimensional y por las fuerzas de campos vibracionales. En consecuencia, el análisis de estos espectros puede proveer información sobre la estructura y las interacciones inter e intramoleculares. Se han identificado nueve modos vibracionales correspondientes al estiramiento del grupo amida en las proteínas (Susi, 1969; Krimm y Bandekar, 1986). Estas bandas vibracionales del grupo amida pueden ser descritas en términos de cinco desplazamientos coordinados en el plano (estiramiento C=O, C-N, N-H y flexión OCN y CNH) y tres fuera del plano (torsión C-N y flexión C=O y N-H) (Krimm y Bandekar, 1986).

Una de ellas, la banda amida I ($1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$) debida al estiramiento C=O de la proteína (al que se acoplan el estiramiento C-N fuera del plano y la flexión O=C-N) (Dong y col., 1995), constituye una prueba muy útil para la determinación de la estructura secundaria de las proteínas en solución, ya que es muy sensible a pequeñas variaciones en la geometría molecular y a los patrones de las uniones puente de hidrógeno dentro de las proteínas (Byler y Susi, 1986; Susi y Byler, 1986).

Cada tipo de estructura secundaria: α -helix (en hélice), β -sheet (en hoja plegada), β -turn (doblada) y random (desordenada), produce diferentes frecuencias de estiramiento C=O, que dan por resultado bandas de posiciones características en el espectro FTIR, las cuales son designadas por número de ondas (cm^{-1}). Las áreas relativas de cada banda permiten cuantificar la abundancia relativa de cada componente estructural (Dong and Caughey, 1994).

En este trabajo, se analizó el efecto de algunos solventes orgánicos sobre la estructura secundaria de *antiacanthaína A*, utilizando FTIR. Dichos resultados se compararon con aquellos obtenidos en buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8).

Las Figuras 9 y 10 muestran los espectros infrarrojo de *antiacanthaina A* en buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8), en sistemas homogéneos: metanol 30% (v/v) y acetonitrilo 70% (v/v), y en sistemas macroheterogéneos: hexano 50% (v/v) y acetato de etilo 50% (v/v).

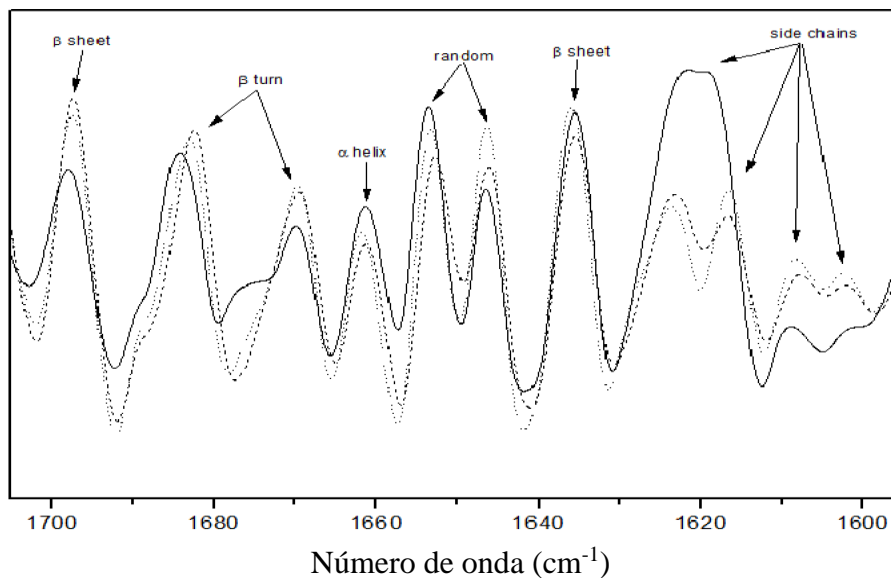


Figura 9. Espectro infrarrojo de *antiacanthaina A* en: buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8) (línea), metanol 30%(v/v) (guión), acetonitrilo 70%(v/v) (puntos) a 25°C.

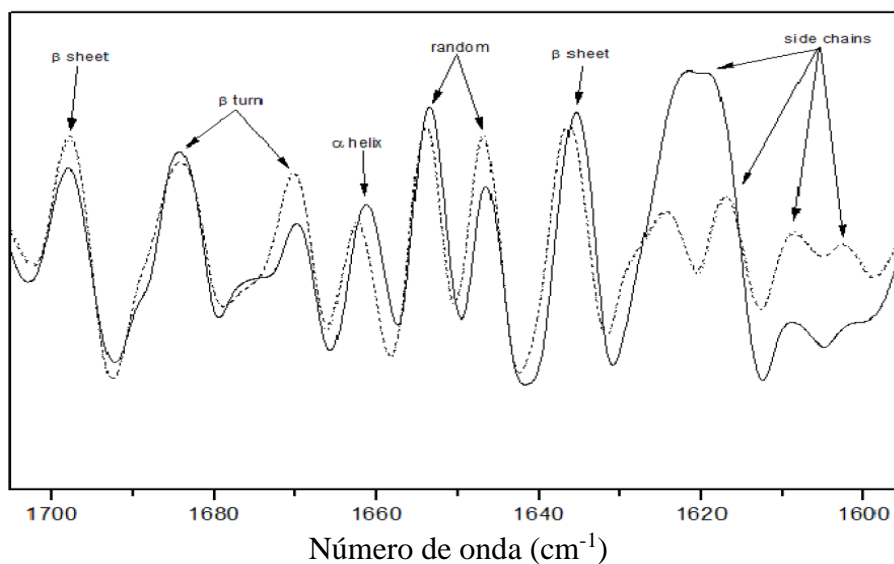


Figura 10. Espectro infrarrojo de *antiacanthaina A* en: buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8) (línea), hexano 50%(v/v) (guión), acetato de etilo 50%(v/v) (puntos) a 25°C.

La Tabla 6 muestra la posición de los diferentes componentes de la banda amida I de *antiacanthaina A*, asignados en base a estudios bibliográficos llevados a cabo sobre

numerosas proteínas en medio acuoso (Dong y col., 1990, 1995; Huang y col., 1995; Barth, 2000).

Los componentes random o desordenados han sido definidos por medio de estudios de cristalografía de rayos X como aquellos componentes que no son α -helix, β -sheet o β -turn (Dong y col., 1990).

La disminución (o la desaparición) de la banda β -sheet a 1689 cm^{-1} junto con el incremento (o la aparición) de una banda β -sheet a mayores números de onda (1698 cm^{-1}), la cual corresponde a uniones intermoleculares, es indicativo de la formación de agregados proteicos.

Para llevar a cabo la cuantificación relativa de los diferentes componentes de la banda amida I de *anticanthaína A* en los diferentes medios estudiados, se corrigió la línea base de la segunda derivada del espectro infrarrojo original y se analizaron las áreas relativas de los componentes de la banda amida I (Tabla 6).

Tabla 6: Áreas relativas de los componentes de la banda amida I del espectro infrarrojo de *anticanthaína A* en buffer Tris-HCl (0,1 M) pH 8 y en diferentes sistemas acuoso-orgánicos.

Bandas	Frecuencia ($\pm 2\text{ cm}^{-1}$)	Buffer	Metanol (30 %)	Acetonitrilo (70 %)	Acetato de etilo (50 %)	Hexano (50 %)
Áreas relativas						
β - sheet	1636	0,3072	0,1757	0,4770	0,1858	0,7994
	1698	0,3684	0,1759	0,4769	0,1262	0,5354
α -helix	1660	0,3067	0,1397	0,4753	0,1228	0,5319
Random	1647	0,2454	0,1405	0,3814	0,1251	0,5341
	1653	0,2460	0,1407	0,3817	0,1249	0,5342
β - turn	1669	0,4295	0,2449	0,5718	0,2168	0,9327
	1683	0,3686	0,2454	0,6672	0,2170	0,9329
β -sheet / α -helix		2,20	2,51	2	2,54	2,50

Las relaciones β -sheet/ α -helix suelen correlacionarse con un aumento de las interacciones intermoleculares, la agregación proteica y las posibilidades de

desnaturalización de la proteína. Sin embargo, en este estudio dichas relaciones fueron similares en todos los medios estudiados (Tabla 6).

La Tabla 7 presenta los valores del coeficiente de similitud espectral (r) que permitieron comparar las estructuras secundarias de *antiacanthaína A* en buffer y en diferentes sistemas acuoso-orgánicos, formados por solventes orgánicos y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8).

De acuerdo a la Tabla 7 podemos apreciar las notables diferencias que adquiere la estructura secundaria de *antiacanthaína A* cuando se solubiliza en buffer y en diferentes medios formados por buffer y solventes miscibles (metanol (30 % v/v) o acetonitrilo (70 % (v/v)), e inmiscibles (hexano (50 % (v/v)) y acetato de etilo (50 % (v/v))).

A pesar que *antiacanthaína A* en el medio miscible formado por metanol (30 % (v/v)) y buffer mostró la mayor diferencia espectral (r : 0,331), respecto de buffer, dicha estructura secundaria permitió expresar altas actividad enzimáticas relativas (60 % de lo obtenido en buffer) y notable estabilidad durante 24 h (Figura 6a).

Tabla 7. Coeficiente de similitud espectral (r) de *antiacanthaína A* en buffer y en diferentes sistemas acuoso - orgánicos.

Sistemas acuoso-orgánicos	Coeficiente de similitud (r)
Buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8)	1
Buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8)- metanol 30% (v/v)	0,331
Buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8)- acetonitrilo 70% (v/v)	0,564
Buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8)- hexano 50% (v/v)	0,507
Buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8)- acetato de etilo 50% (v/v)	0,558

Por el contrario, *antiacanthaína A* en el medio miscible formado por acetonitrilo (70 % (v/v)) y buffer mostró una diferencia espectral (r : 0,564), respecto de buffer. Según lo observado en la Figura 6c, las interacciones que dan lugar a la estructura secundaria que adquiere *antiacanthaína A* en dicho medio no permitieron expresar la actividad catalítica de la enzima.

Antiacanthaina A en los medios inmiscible estudiados (hexano y acetato de etilo 50% (v/v)), presentó una similitud espectral r : 0,507 y 0,558, respectivamente. A pesar de las diferencias en la estructura secundaria de *antiacanthaina A* en buffer y en dichos medios, éstos permitieron expresar las mayores actividades catalíticas iniciales, que correspondieron a 108 % y 119 % de las obtenidas en buffer (Figura 7b).

Antiacanthaina A sufrió cambios a nivel de estructura secundaria en todos los medios estudiados, pero ellos afectaron de diferente manera su actividad catalítica, a veces aumentándola o disminuyéndola.

En resumen, los cambios en la expresión catalítica de la enzima *antiacanthaina A* en buffer y en medios acuoso-orgánicos no están relacionados con la variación de la estructura secundaria de la enzima. Por tal razón, y fuera del contexto de este trabajo, se esta evaluando el efecto de las propiedades físico-químicas a los solventes orgánicos sobre la actividad de *antiacanthaina* por métodos de cálculo lineal.

INMOVILIZACIÓN DE ANTIACANTHAINA

Inmovilización covalente multipuntual de *antiacanthaina* en sílica-glioxil (SGx)

Los principales avances en la inmovilización de enzimas sobre soportes sólidos se han experimentado en la última década, en particular en agarosa (Mateo y col., 2006), aunque los mejores resultados se han obtenido en otros materiales, tales como sílica porosa (Lee y col., 2009). Las principales ventajas que presenta la sílica son: alta área superficial, estabilidad térmica y mecánica, facilidad de manejo, estabilidad para soportar altas velocidades de flujo en reactores continuos, y resistencia contra el ataque microbiano y por solventes orgánicos y carece de toxicidad (Zeglinski y col., 2007).

El control del tamaño de los poros en los soportes silíceos, la morfología y sus características químicas ofrecen características deseables en la preparación de biocatalizadores heterogéneos (Zeglinski y col., 2007; Hisamatsu y col., 2012; Fukushima y col., 2006). Aunque el tamaño de poro de la sílica se ha podido ajustar para la inmovilización de una gran variedad de biomoléculas, aumentando su tamaño para acomodar enzimas de peso molecular relativamente alto (masa molecular mayor a 100 kDa), sigue siendo un desafío. Los efectos positivos del aumento de tamaño de los poros son: el aumento de la capacidad de carga de la enzima, el incremento de las velocidades de difusión de los sustratos a los sitios activos de las enzimas y la mayor

movilidad/flexibilidad de la enzima dentro de las cavidades, lo que resulta en una mayor actividad enzimática (Bernal y col., 2011).

Los grupos silanol en la superficie de la sílice se pueden modificar por sililación, activando estos materiales para la unión covalente de la enzima, generando soportes cuyas superficies permiten diferentes orientaciones de la enzima y por lo tanto mejoran la biocatálisis (Mateo y col., 2006; Bernal y col., 2018).

Por lo anteriormente expuesto, se estudió la inmovilización de *antiacanthaina* en glioxil-sílica. El soporte mesoporoso silíceo usado para la inmovilización de *antiacanthaina* fue caracterizado previamente por Bernal y col. (2012).

Este tipo de soporte permitió una alta capacidad de carga de enzima y la estabilización del biocatalizador debido a la unión covalente de múltiples puntos enzima-soporte.

La actividad ofrecida de *antiacanthaina* fue de 49 UI/ml, lo que equivale a 0,32 UI/mg de soporte. Luego de la inmovilización, la actividad remanente en el sobrenadante fue de 14 UI/ml, que equivale a 0,092 UI/mg de soporte. La diferencia entre ambas dio una actividad teórica expresada de 0,23 UI/mg de soporte.

La actividad experimental expresada de *antiacanthaina* fue de 0,092UI/mg de soporte. Entonces, el rendimiento de inmovilización experimental (Y_a), fue:

$$Y_a = \frac{\text{Actividad experimental expresada}}{\text{Actividad teórica ofrecida}} \times 100 = \frac{0,092 \text{ UI/mg}}{0,23 \text{ UI/mg}} = 40\% \quad \text{ec. (7)}$$

SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES Y PÉPTIDOS A SINTETIZAR POR VÍA QUÍMICA, ENZIMÁTICA Y QUIMO-ENZIMÁTICA

Selección de péptidos naturales y de *novo* tomados como modelo para las reacciones de síntesis, con potencial actividad antimicrobiana y antihipertensiva

La selección de los péptidos provenientes de fuentes naturales se realizó a partir de la base de datos BIOPEP (2012), mientras que otros fueron obtenidos de *novo* a partir de hidrolizados de derivados casearios en el Laboratorio de Bromatología (UNSL) (Bersi y col., 2018). En este último caso, las fracciones hidrolizadas que resultaron más promisorias por su alta actividad biológica (anithipertensiva o antimicrobiana) fueron separadas por cromatografía en gel vertical e identificadas por MS/MS.

En ambos casos, la búsqueda se centró en secuencias cortas, preferentemente di o tripéptidos, con potencial actividad antimicrobiana y antihipertensiva.

Los péptidos modelo seleccionados se muestran en la Tabla 8.

Dichos péptidos fueron posteriormente sintetizados por vía química y enzimática con el objeto de desarrollar metodologías que permitan su producción en gran escala, independientemente de la fuente (exótica, estacional y/o sujeta a variabilidad) que los provee (ej. Sake, sardinas de Japón, efluentes industriales, agroalimentos, entre otros). Como ya se mencionó en el Capítulo 1: Introducción, la obtención de péptidos a partir de fuentes naturales no permite su producción en gran escala debido a la necesidad de llevar a cabo extensos y costosos procesos de purificación.

Tabla 8. Péptidos naturales modelo y de *novo* con potencial actividad antimicrobiana y antihipertensiva

Péptido modelo	Fuente natural	Actividad biológica	IC ₅₀ (μM)	Referencia
IQY	f (28-30) κ-caseína bovina	Antimicrobiano	---	López Expósito y col., 2006.
YVL	f (30-32) κ-caseína bovina	Antimicrobiano	---	López Expósito y col., 2006.
LY	músculo de sardina (Japón)	Antihipertensivo	18	Matsufuji y col., 1994.
VW	sake y residuos de sake	Antihipertensivo	1,40	Saito y col., 1994.
YL	β-lactorfina	Antihipertensivo	122	Mullally y col., 1996.
YQQ	f (43-45) κ-caseína caprina	Antihipertensivo y anticoagulante		Bersi y col., 2018.

Selección de las condiciones operacionales para las reacciones de síntesis enzimática de péptidos bioactivos

Se seleccionaron como medios de reacción, un medio inmisible formado por buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 9) y 50 % (v/v) acetato de etilo, y en un medio miscible formado por buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9) y 30% (v/v) metanol.

Si bien el medio inmisible formado por buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 9) y 50 % (v/v) hexano le permitió a *antiacanthaína* expresar altas actividades específicas, en dicho medio solo Gln y Gly mostraron preferencia por la enzima (Tabla 5). Dichos aminoácidos no están incluidos en los péptidos modelo como donador de acilo (Tabla 8).

Del estudio de preferencias de *antiacanthaina* en 50 % (v/v) acetato de etilo o 30% (v/v) metanol, y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9) y de los péptidos modelo (Tablas 5 y 8) parece probable que Tyr pueda actuar como donador de acilo de las síntesis enzimáticas de YVL, YL y YQQ.

Por el contrario, Ile y Leu tienen relativamente baja preferencia en los medios mencionados, por lo cual las probabilidades de sintetizar los péptidos IQY y LY serían menores. Además Trp no actuó como sustrato de *antiacanthaina* en metanol 30 % (v/v), indicando que en dicho medio sería poco probable la síntesis de VW.

En consecuencia, se seleccionó Z-Tyr-pNO como donador de acilo y Val-OH (Leu-OH o Gln-OH) como nucleófilo para la síntesis enzimática de YVL, YL y YQQ, o sus dipéptidos precursores (YV y YQ). La concentración del donador de acilo se estableció tomando como base el K_m de *antiacanthaina A* en buffer (0,75 mM), y la solubilidad de dicho sustrato en los medios de reacción. Adicionalmente, en el medio bifásico se determinó el coeficiente de partición del donador de acilo entre las fases. Se estableció una concentración equimolecular entre el donador de acilo y el nucleófilo. Sin embargo, en las reacciones de síntesis bajo control cinético, la concentración de este último se aumentó hasta su límite de solubilidad, con el objeto de maximizar el rendimiento en producto.

Los sustratos, productos y subproductos de las reacciones de síntesis se analizaron por RP-HPLC de la forma descrita en el Capítulo 2: Metodologías.

Paralelamente, se sintetizaron los patrones de los péptidos por síntesis química en fase sólida y se compararon con los productos de las reacciones de síntesis enzimática, mediante el método del estándar externo.

Los productos de las reacciones de síntesis química y enzimática se purificaron y las estructuras de los péptidos se dilucidaron por espectrometría de masas, para verificar la identidad de los mismos.

Solubilidad y coeficiente de partición de los sustratos a utilizar en los medios de reacción seleccionados para las síntesis enzimáticas de péptidos

La solubilidad de los aminoácidos sintéticos a utilizar como donador de acilo y nucleófilo permitió conocer la máxima concentración (saturación) en el medio de reacción elegido; siendo para N- α -CBZ-Tyr-pNO: 1,51 mM y 17,25mM en el medio miscible (metanol 30% (v/v)) y en el medio bifásico (acetato de etilo 50% (v/v)),

respectivamente. La solubilidad de Val-OH fue de 75,5mM tanto en el medio miscible como en el medio bifásico; y la solubilidad de Leu-OH fue de 113,25 mM y 37,75mM en el medio miscible y en el medio bifásico, respectivamente.

Luego, se determinó el coeficiente de partición (P) para cada aminoácido, ya que estos se distribuyen de diferente forma entre las fases acuosa y orgánica, según su grado de hidrofobicidad.

El coeficiente de partición (P) se define como la relación entre las concentraciones de un componente en la fase acuosa y en la fase orgánica.

Para ello, una cierta concentración de cada derivado aminoacídico, previamente seleccionado como donador de acilo y nucleófilo de las reacciones de síntesis, fue disuelto en el medio acuoso - orgánico e incubado a 25 °C y 200 rpm, durante 12 h. Se extrajeron sendas muestras de las fases acuosa y orgánica y se determinó la concentración del aminoácido en cada fase por RP-HPLC.

$$P = \frac{[\text{Soluta en fase orgánica}]}{[\text{Soluta en fase acuosa}]} \quad \text{ec. (8)}$$

El coeficiente de partición (P) de N- α -CBZ-Tyr-pNO en acetato de etilo 50%(v/v) fue de 1,28 y en hexano 50%(v/v) fue de 0,23.

SÍNTESIS QUÍMICA EN FASE SÓLIDA (SPPS) DE LOS PATRONES DE LOS PEPTÍDOS SELECCIONADOS

Se realizó la síntesis en fase sólida de los péptidos tomados como modelo en este estudio, mediante la estrategia de síntesis secuencial Fmoc/tBu, previamente descrita en el Capítulo 2: Metodologías.

Los péptidos sintetizados por vía química son: Tyr-Val-Leu-OH (YVL, con potencial actividad antimicrobiana), su precursor Tyr-Val-OH (YV) y un análogo de éste N- α -CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV); Tyr-Leu-OH (YL, con potencial actividad antihipertensiva), y el análogo N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH (Z-YL); Tyr-Gln-Gln-OH (YQQ, con potencial actividad antihipertensiva y anticoagulante). Todos ellos son péptidos carboxi terminal y la pureza fue de 95%.

Las Figuras 11 a 16 muestran los cromatogramas obtenidos por RP-HPLC y los espectros de masas de los péptidos sintetizados por SPPS, previamente mencionados.

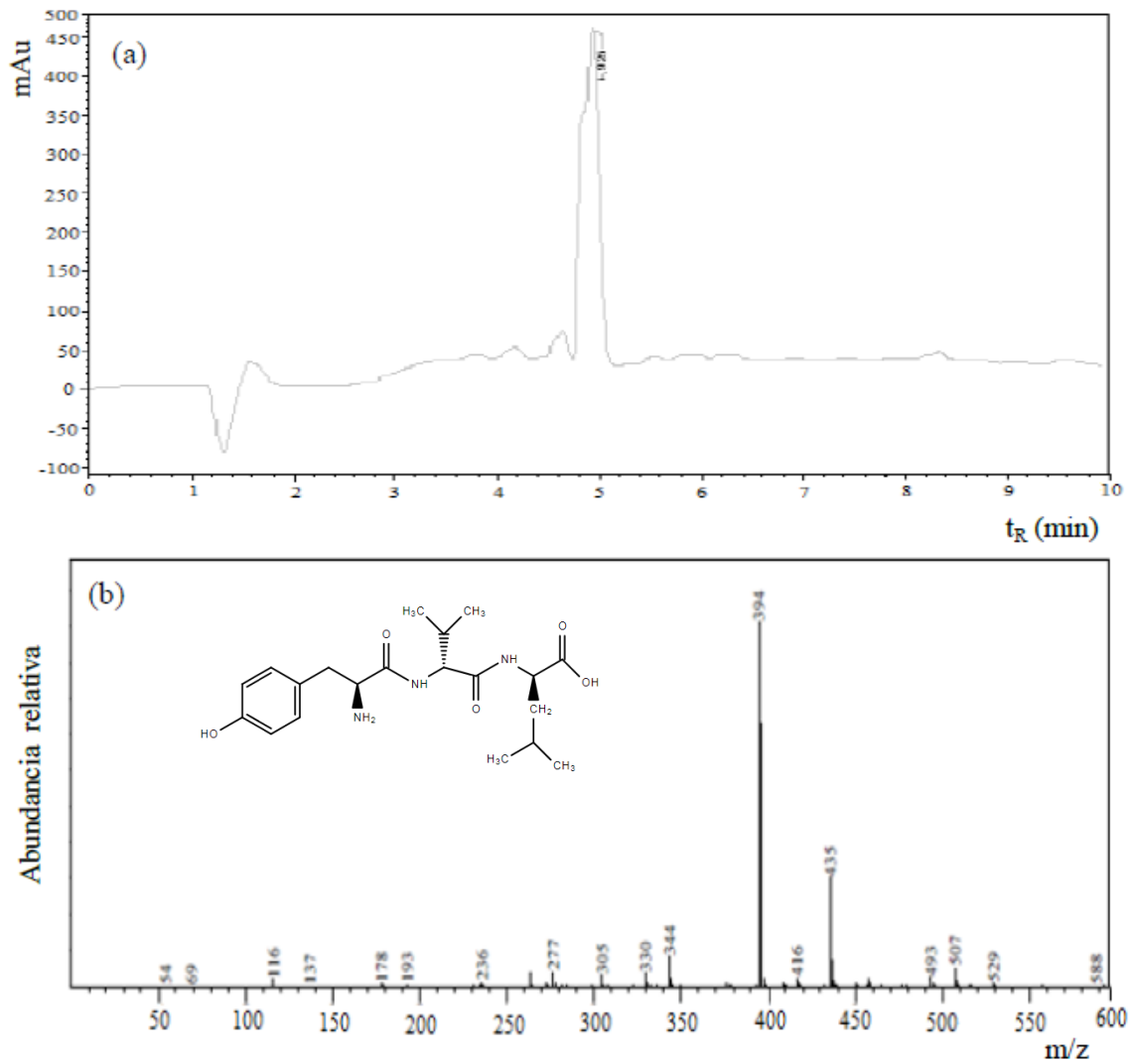


Figura 11. Cromatograma obtenido por RP-HPLC (a) y espectro de masa (b) del péptido carboxi terminal Tyr-Val-Leu-OH (YVL) con potencial actividad antimicrobiana.

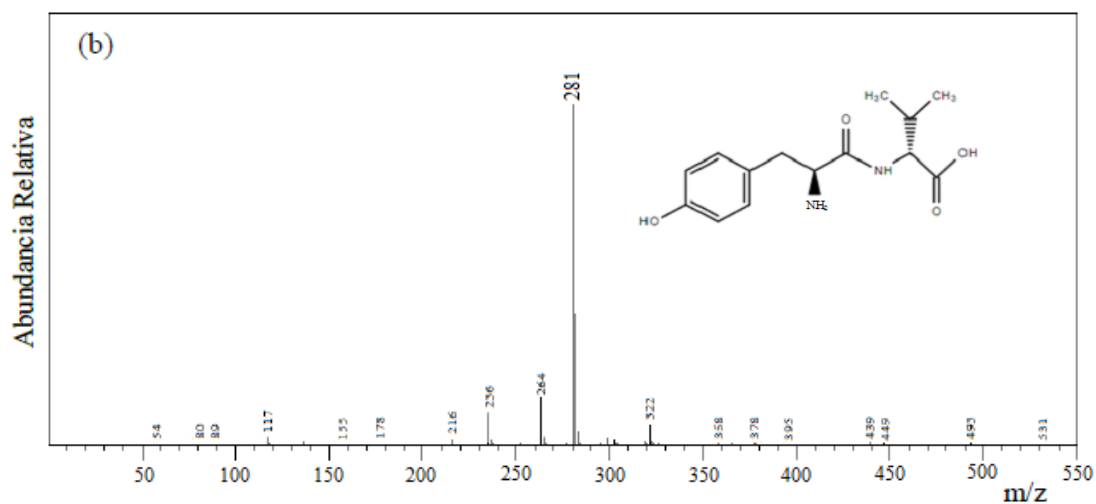
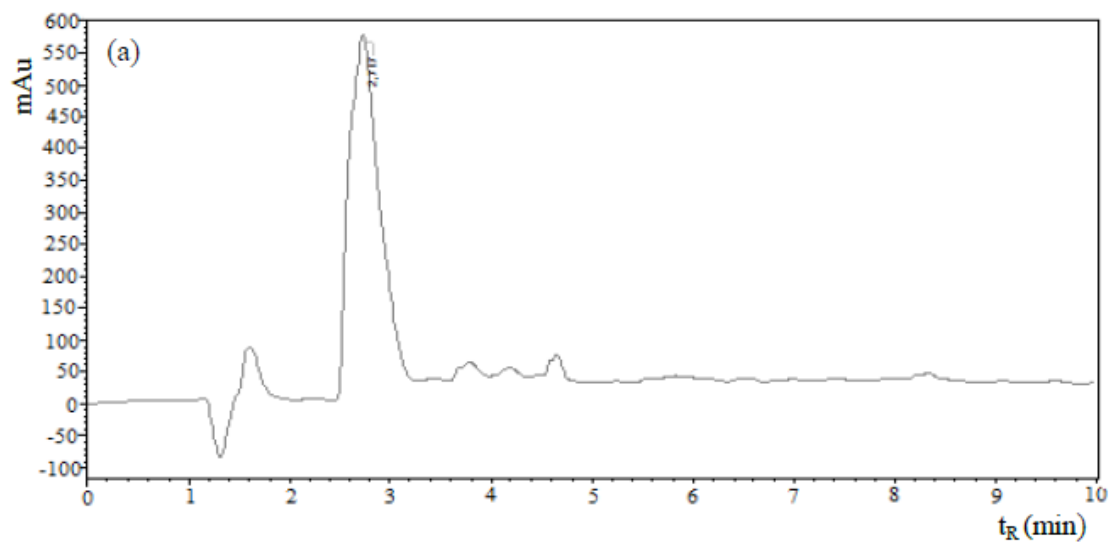


Figura 12. Cromatograma obtenido por RP-HPLC (a) y espectro de masa (b) del péptido carboxi terminal Tyr-Val-OH (YV); precursor del péptido Tyr-Val-Leu-OH (YVL), con potencial actividad antimicrobiana.

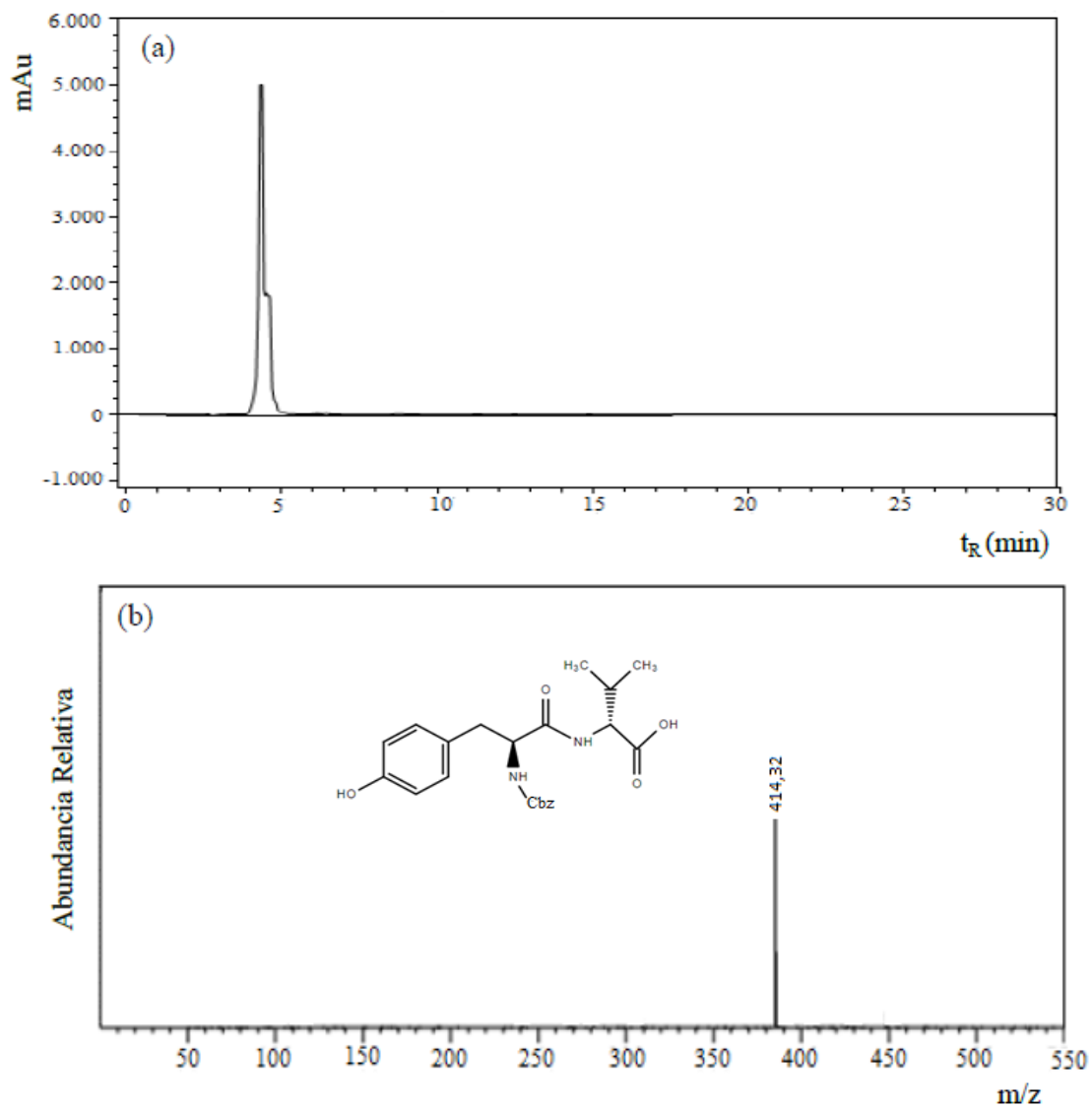


Figura 13. Cromatograma obtenido por RP-HPLC (a) y espectro de masa (b) del péptido carboxi terminal N- α -CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV); análogo del precursor Tyr-Val-OH (YV), con potencial actividad antimicrobiana.

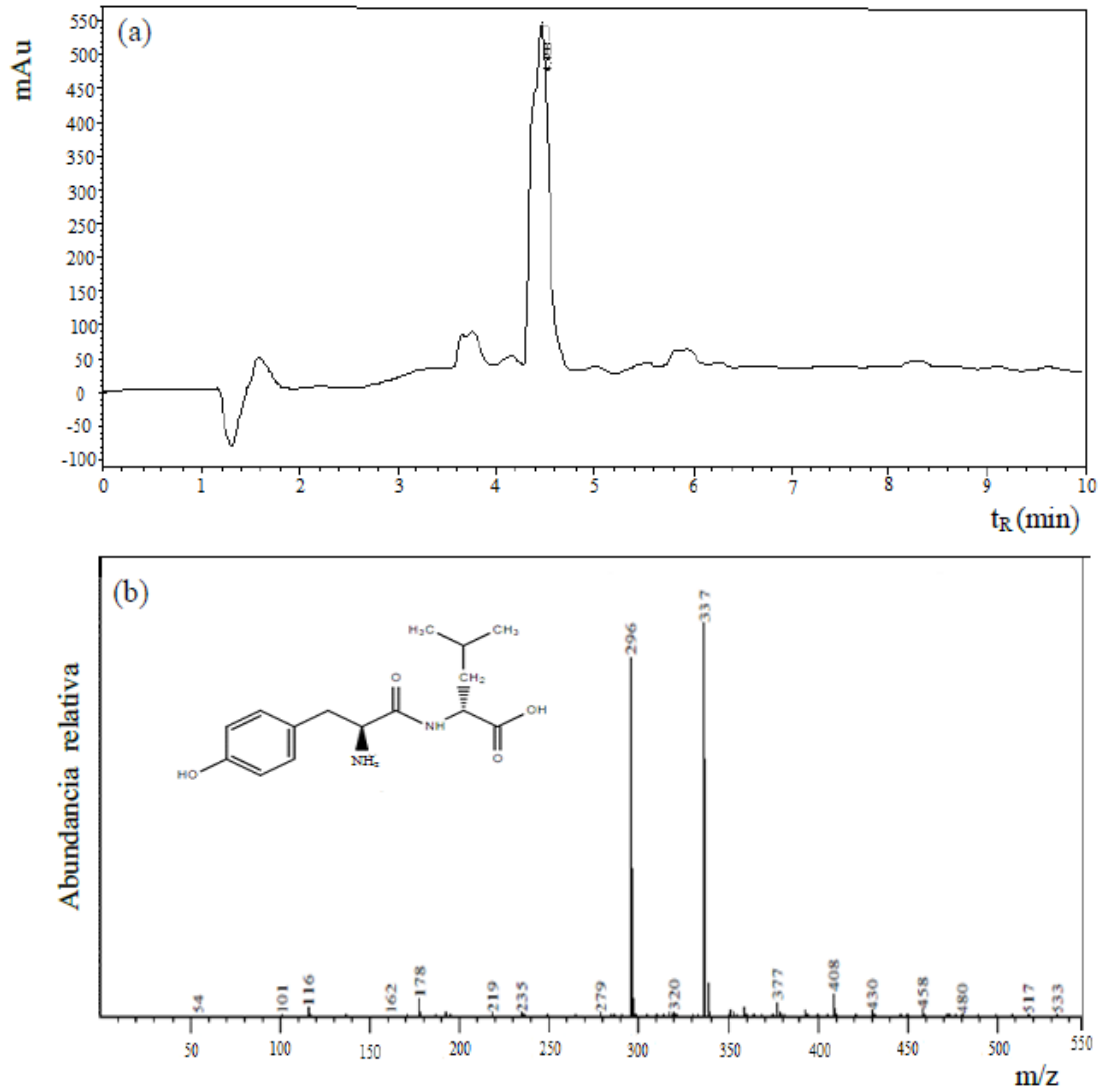


Figura 14. Cromatograma obtenido por RP-HPLC (a) y espectro de masa (b) del péptido carboxi terminal Tyr-Leu-OH (YL), con potencial actividad antihipertensiva.

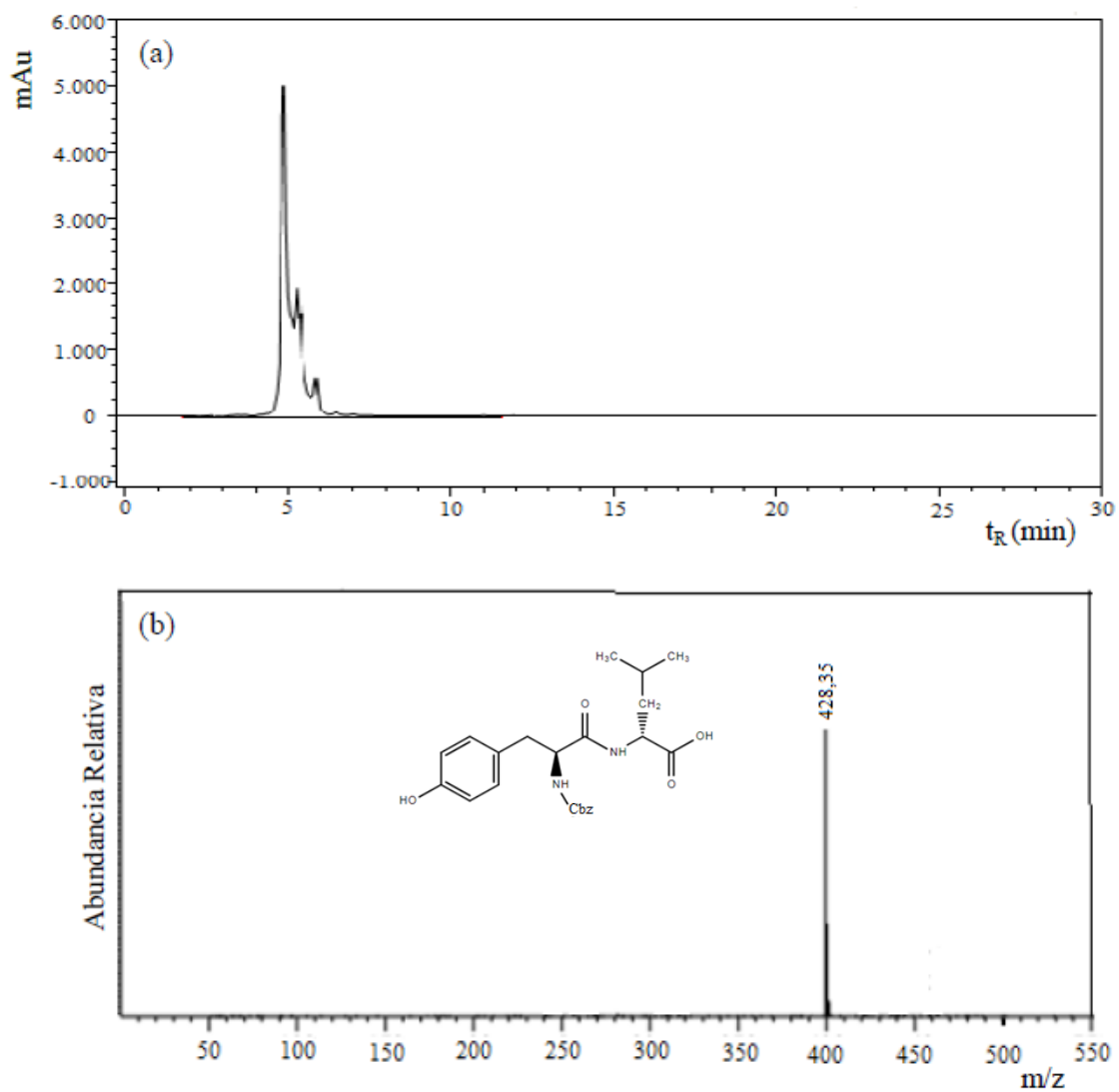


Figura 15. Cromatograma obtenido por RP-HPLC (a) y espectro de masa (b) del péptido carboxi terminal N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH (Z-YL); análogo del precursor Tyr-Leu-OH (YL), con potencial actividad antihipertensiva.

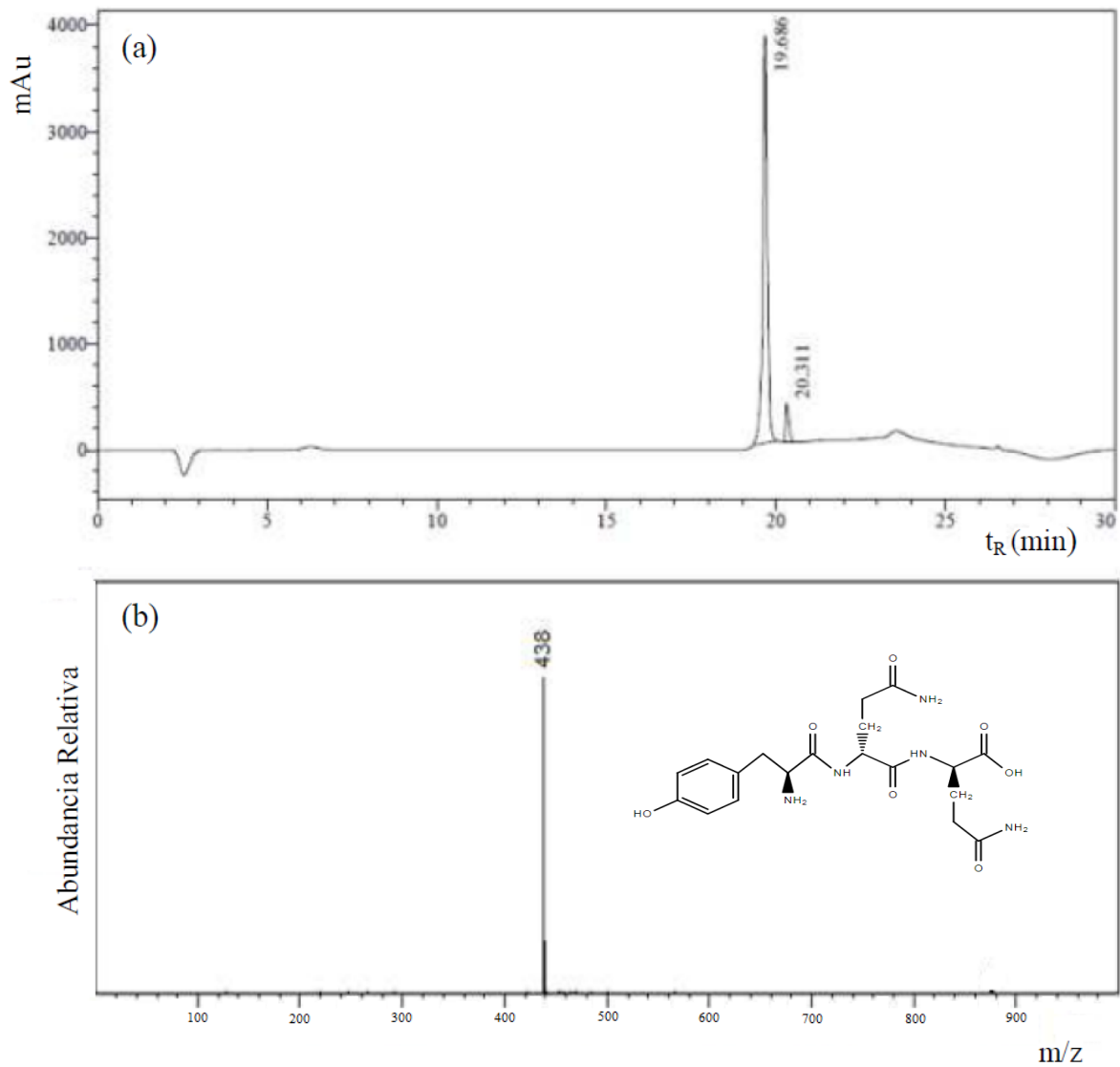


Figura 16. Cromatograma obtenido por RP-HPLC (a) y espectro de masa (b) del péptido carboxi terminal Tyr-Gln-Gln-OH (YQQ), con potencial actividad antihipertensiva y anticoagulante.

SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS EN SISTEMAS ACUOSO-ORGÁNICOS

SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE PÉPTIDOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA

Síntesis enzimática de N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH (Z-YL) análogo a Tyr-Leu-OH, en sistemas homogéneo y macroheterogéneo

A continuación, se muestran los resultados obtenidos cuando se llevó a cabo la síntesis de N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH en un medio bifásico formado por 50 % (v/v) de acetato de etilo y buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 9) y un medio miscible formado por 30 % (v/v) de metanol y buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 9).

Las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo la reacción de síntesis bajo control cinético en un medio bifásico se detallan a continuación:

Mecanismo de reacción:	Control cinético
Medio de reacción	buffer Tris-HCl (0,1 M) pH 9 y 50 % (v/v) acetato de etilo
Condiciones de reacción	40°C, 200rpm
Activador	2-mercaptoetanol (20mM)
Donador de Acilo	N- α CBZ-Tyr-pNO (17,25mM)
Enzima	<i>antiacanthaina</i> 200 μ L (8,66UI/mg)
Nucleófilo	L-Leu-OH (7,55mM)
Base aceptora de H⁺	trietilamina (7,55mM)

El cromatograma presentado en la Figura 17 corresponde a una muestra de la reacción de síntesis bajo control cinético, utilizando el medio bifásico formado por 50 % (v/v) de acetato de etilo y buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 9), después de 3h de reacción. En el mismo se observa: (I) enzima (t_R : 3-4,42min), (II) N- α -CBZ-Tyr-OH (t_R : 4,63 min), el producto (III) N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH (t_R : 5min) y (IV) N- α -CBZ-Tyr-pNO (t_R : 14,5min).

La identidad del producto de la reacción se determinó mediante el método del estándar externo, utilizando el péptido sintetizado por vía química (Figura 15).

N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH se purificó mediante una columna C₁₈, y se secó en un equipo concentrador (Thermo Scientific Savant™ SPD131DDA SpeedVac), para luego

verificar su peso molecular por espectrometría de masas LCMS-2020 (Shimadzu), utilizando un espectrómetro de masas con una interfase de ionización por electrospray (ESI-MS). El espectro obtenido guardó total similitud con el patrón de síntesis química en fase sólida (SPPS) (Figura 15).

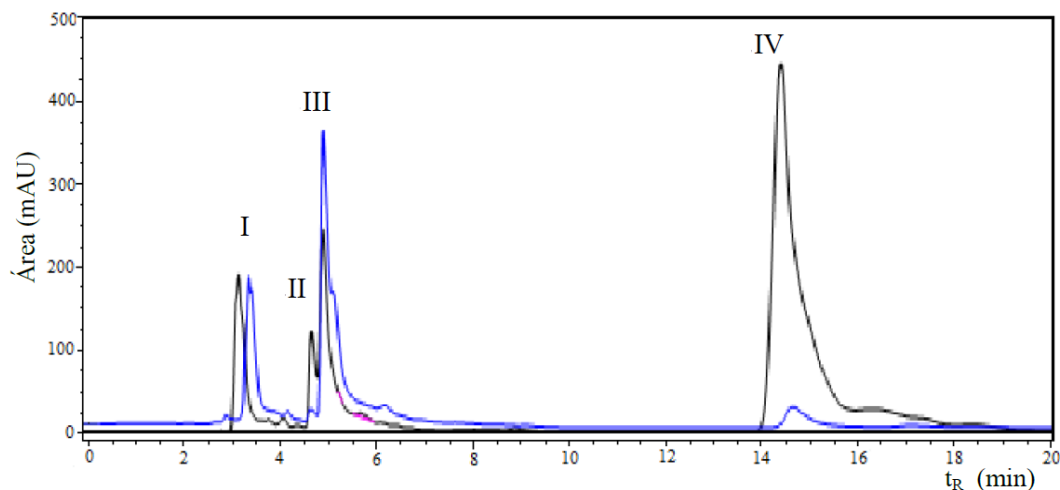


Figura 17. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control cinético por RP-HPLC, luego de 3h de reacción con N- α -CBZ-Tyr-pNO y Leu-OH, en un medio bifásico formado por acetato de etilo (50% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador, a 40°C, 200 rpm. I: enzima; II: N- α -CBZ-Tyr-OH; III: N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH (Z-YL); IV: N- α -CBZ-Tyr-pNO. Fase acuosa: línea azul, Fase orgánica: línea negra.

La Figura 18 muestra el perfil del sustrato limitante (N- α -CBZ-Tyr-pNO), producto de síntesis (N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH) y producto de hidrólisis (N- α -CBZ-Tyr-OH) en un medio bifásico formado por 50 % (v/v) acetato de etilo y buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 9), a 40°C y 200rpm.

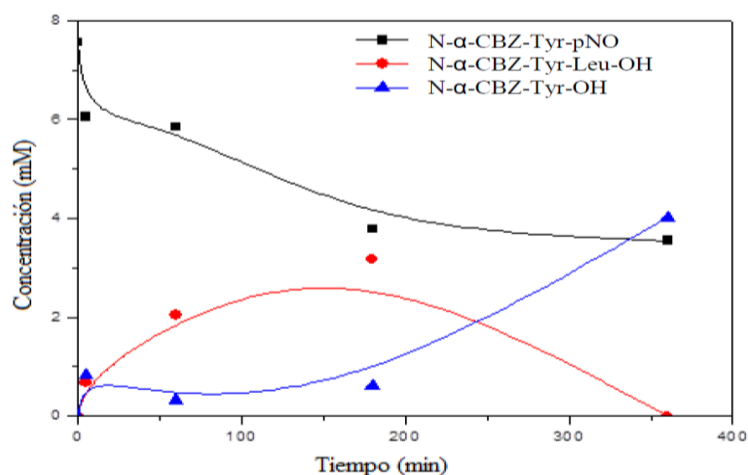


Figura 18. Variación de la concentración de los diferentes componentes de la reacción de síntesis enzimática del dipéptido N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH (Z-YL) en un medio bifásico formado por acetato de etilo (50% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador, a 40°C y 200rpm; en función del tiempo.

La Tabla 9 muestra los rendimientos en producto y el grado de conversión del donador de acilo en la reacción de síntesis enzimática bajo control cinético del péptido N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH en un medio bifásico formado por acetato de etilo (50%(v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9); a 40°C y 200rpm.

Para la cuantificación de los parámetros η (rendimiento) y α_s (grado de conversión del donante de acilo) se definieron y aplicaron las siguientes ecuaciones:

η (rendimiento): representa la cantidad real obtenida de producto, dividida por la cantidad teórica máxima que podría obtenerse (100% del sustrato limitante), si todo el reactivo limitante se consumiera en la reacción. Se calcula como el porcentaje del cociente entre la concentración del producto y la concentración inicial del reactivo limitante.

$$\eta = \frac{[P]}{[S_0]} \times 100 \quad \text{ec. (9)}$$

α_s (grado de conversión del donante de acilo) (Trusek-Holownia, 2003): se calcula a través de la ecuación (10).

$$\alpha_s = \frac{[S_0] - [S_t]}{[S_0]} \times 100 \quad \text{ec. (10)}$$

Donde S_0 corresponde a la concentración molar del donador de acilo al tiempo inicial, mientras que S_t es la concentración del mismo a un tiempo de reacción determinado.

Tabla 9. Rendimiento en producto y grado de conversión del donador de acilo en la síntesis bajo control cinético de N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH, en un medio formado por acetato de etilo (50% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), conteniendo *antiacanthaina* libre, a 40°C y 200rpm.

Tiempo de reacción (min)	N- α -CBZ-Tyr-pNO (mM)	N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH (mM)	N- α -CBZ-Tyr-OH (mM)	α_s (%)	η (%)
0	7,56	0	0	0	0
5	6,05	0,68	0,83	20	9
60	5,85	2,04	0,33	22,62	27
180	3,78	3,175	0,60	50	42
360	3,55	0	4,01	53	0

Según la Tabla 9 el máximo grado de conversión en sustrato fue del orden de 50%, en concordancia con el máximo rendimiento en producto (42%), a las 3 h de reacción. A partir de allí el péptido sintetizado (N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH) se hidrolizó, dejando 53% del sustrato limitante sin consumir.

Además, el rendimiento en producto de síntesis se vió afectado por la conversión de sustrato en producto de hidrólisis (N- α -CBZ-Tyr-OH).

Como ya se mencionó, en una reacción de síntesis bajo control cinético el intermediario acil-enzima particiona entre el nucleófilo (aminólisis) y el agua (hidrólisis). Según sea la relación aminólisis/hidrólisis se obtendrá mayor cantidad del dipéptido N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH o del producto de hidrólisis N- α -CBZ-Tyr-OH.

En consecuencia, para optimizar el rendimiento en producto de síntesis (péptido) se podría aumentar la concentración del nucleófilo hasta el límite de solubilidad o bien, disminuir el contenido de agua en el medio de reacción, lo que evitaría la formación del producto de hidrólisis.

La Tabla 10 muestra los rendimientos en producto después de incrementar 10 veces la concentración del nucleófilo (Tabla 10).

Tabla 10. Maximización del rendimiento en producto y grado de conversión del donador de acilo en la reacción de síntesis de N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH, en un medio formado por acetato de etilo (50%(v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), conteniendo *antiacanthaina* libre, a 40°C y 200rpm.

Tiempo de reacción (min)	N- α -CBZ-Tyr-pNO (mM)	N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH (mM)	N- α -CBZ-Tyr-OH (mM)	α_s	η
0	7,5	0	0	0	0
5	6	0,713	0,78	20	9,5
60	3,75	3	0,75	50	40
180	1,87	4,72	0,9	75	63
360	1,85	0	5,65	75	0

El aumento de 10 veces la concentración de nucleófilo permitió aumentar el rendimiento en producto en 21%, respecto de la concentración equimolecular entre donador de acilo y nucleófilo. Además, el grado de conversión del sustrato limitante se incrementó 25% respecto a aquella condición.

Las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la reacción de síntesis bajo control termodinámico en un medio bifásico se detallan a continuación:

Mecanismo de reacción:	<i>Control Termodinámico</i>
Medio de reacción	buffer Tris-HCl (0,1 M) pH 9 y 50 % (v/v) acetato de etilo
Condiciones de reacción	40°C, 200rpm
Activador	2-mercaptoetanol (20mM)
Donador de acilo	N- α CBZ-Tyr-OH (17,25mM)
Enzima	<i>antiacanthaina</i> 200 μ L (8,66UI/mg)
nucleófilo	L-Leu-OH (7,55mM)
Base aceptora de H⁺	trietilamina (7,55mM)

El cromatograma presentado en la Figura 19 corresponde a una muestra de la fase acuosa (azul) y de la fase orgánica (negro) de la reacción de síntesis bajo control termodinámico, utilizando como medio 50 % (v/v) de acetato de etilo y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), durante 15h de reacción. En el mismo se observa: (I) enzima (t_R : 3-4,42min) y (II) N- α -CBZ-Tyr-OH (t_R : 4,9min). A diferencia de lo observado en la

Figura 17 (control cinético) la síntesis del producto esperado N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH, no fue obtenido en las reacciones de síntesis bajo control termodinámico.

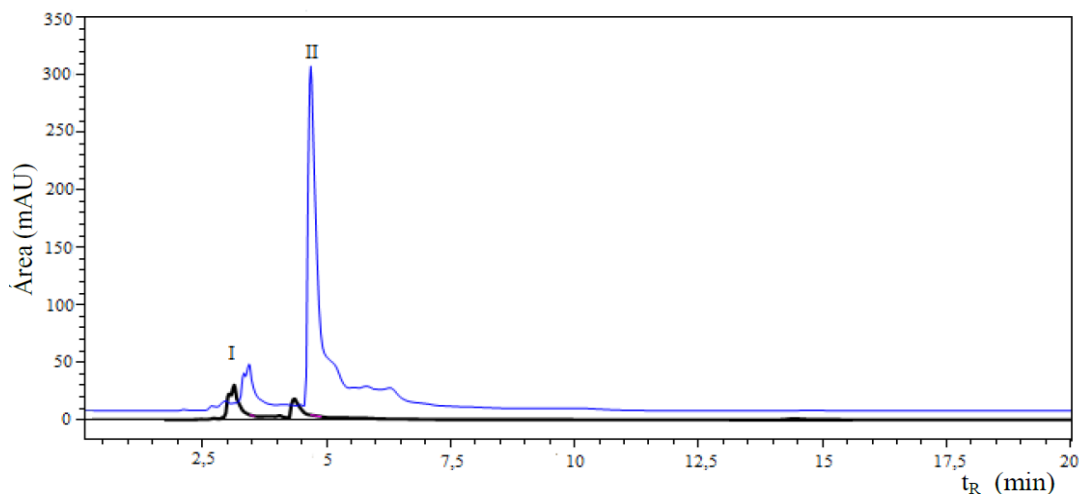


Figura 19. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control termodinámico por RP-HPLC, durante 15h de reacción con N- α -CBZ-Tyr-OH y Leu-OH, en un medio bifásico formado por acetato de etilo (50% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador, a 40°C, 200 rpm. I: enzima; II: N- α -CBZ-Tyr-OH. Fase acuosa: línea azul; Fase orgánica: línea negra.

Las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo la reacción de síntesis bajo control cinético en un medio miscible se detallan a continuación:

Mecanismo de reacción:	<i>Control cinético</i>
Medio de reacción	buffer Tris-HCl (0,1 M) pH 9 y 30 % (v/v) metanol
Condiciones de reacción	40°C, 200rpm
Activador	2-mercaptoetanol (20mM)
Donador de acilo	N- α -CBZ-Tyr-pNO (1,51mM)
Enzima	<i>antiacanthaina</i> 200 μ L (8,66UI/mg)
Nucleófilo	L-Leu-OH (7,55mM)
Base aceptora de H ⁺	triethylamina (7,55mM)

El cromatograma presentado en la Figura 20 corresponde a una muestra de la reacción de síntesis bajo control cinético, utilizando como medio 30 % (v/v) de metanol y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), después de 1 min de reacción. En el mismo se observa

(I) enzima (t_R : 1,94-3,5min), (II) N- α -CBZ-Tyr-pNO (t_R : 11,90min), (III) N- α -CBZ-Tyr-OH (t_R : 13,40min) y (IV) N- α -CBZ-Tyr-(Leu)₂-Leu-OH (t_R : 15,03min).

Se tomaron muestras periódicamente hasta las 24h de reacción, se analizaron en RP-HPLC y se corrieron blancos de reactivos y de enzima.

Las condiciones de elusión isocrática no permitieron la adecuada separación de los analitos, debiendo aplicar elusión por gradiente para lograrla. Las mejores condiciones de separación de los analitos, se logró incrementando la composición de la fase orgánica en la fase móvil (acetonitrilo) de forma lineal de 0 % a 40 % durante 20min.

Sin embargo, el producto no correspondió a N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH cuando se sintetizado por vía química (Figura 15). Por tal razón, dicho producto fue purificado mediante una columna C₁₈, secado en un equipo concentrador (Thermo Scientific Savant™ SPD131DDA SpeedVac), y analizado en un espectrómetro de masas con una interfase de ionización por electrospray (ESI-MS), utilizando un equipo LCMS-2020 (Shimadzu).

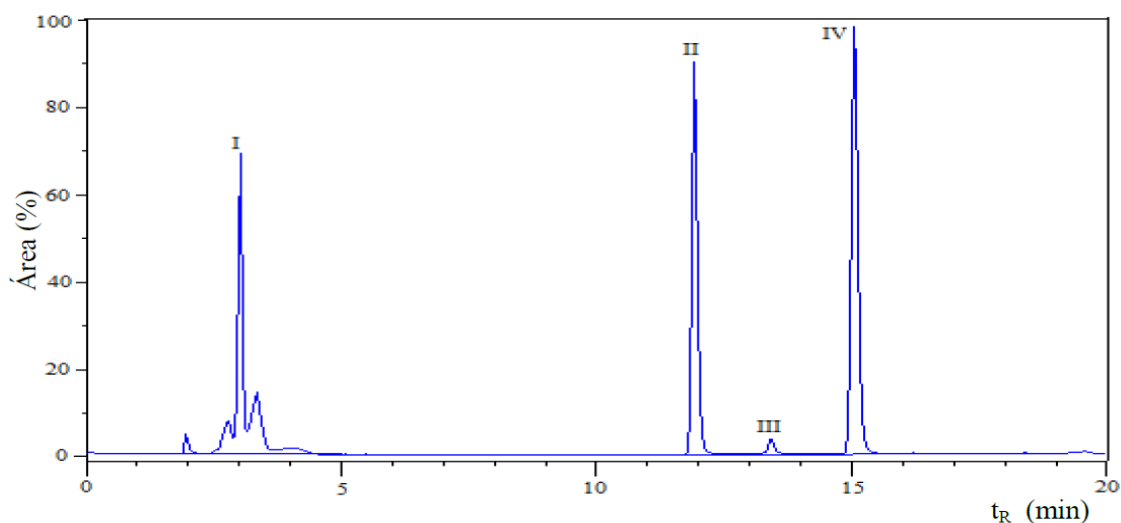


Figura 20. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control cinético por RP-HPLC, luego de 1 min de reacción con N- α -CBZ-Tyr-pNO y Leu-OH, en un medio miscible formado por metanol (30% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador, a 40°C, 200 rpm. I: enzima; II: N- α -CBZ-Tyr-pNO; III: N- α -CBZ-Tyr-OH; IV: N- α -CBZ-Tyr-(Leu)₂-Leu-OH (Z-YLLL).

La Figura 21 muestra el espectro de masas correspondiente al producto obtenido (IV) en la reacción de síntesis bajo control cinético presentado en la Figura 20.

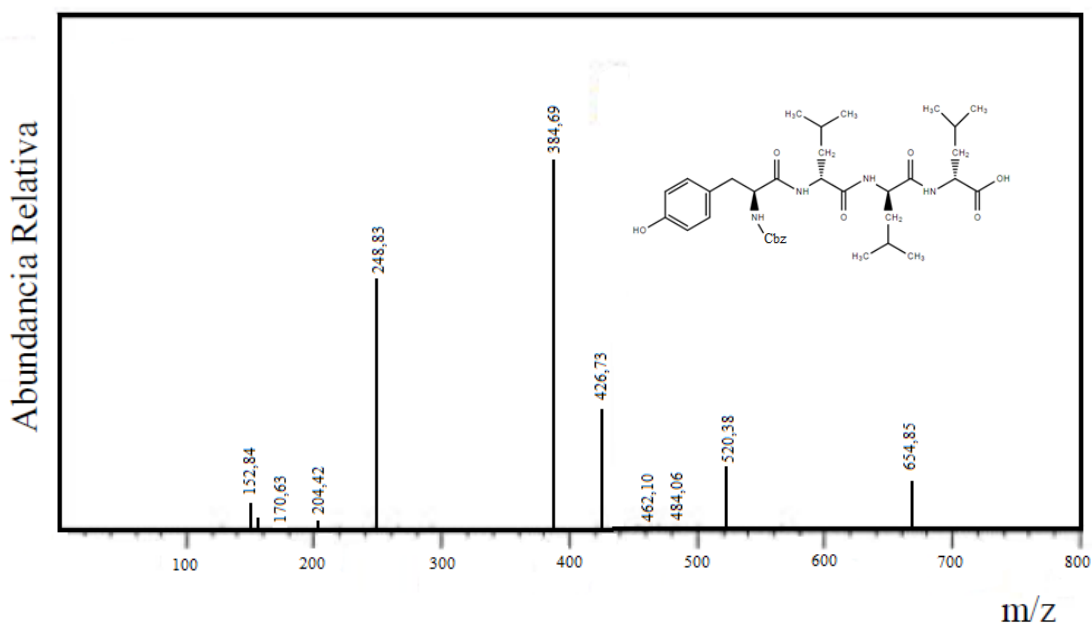


Figura 21. Espectro de masas correspondiente a N- α -CBZ-Tyr-(Leu)₂-Leu-OH (Z-YLLL) obtenido por síntesis enzimática bajo control cinético en un medio miscible formado por metanol (30% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador; a 40°C y 200rpm. m/z: 654,85 (N- α -CBZ-Tyr-(Leu)₂-Leu-OH); m/z: 520,38 (Tyr-(Leu)₃); m/z: 426,73 (N- α -CBZ-Tyr-Leu); m/z: 384,69 (fragmento C₂₀H₂₂N₃O₅); m/z: 248,83 (fragmento C₁₂H₁₄N₃O₃).

La Figura 22 muestra la variación de la concentración de sustrato limitante (N- α -CBZ-Tyr-pNO), de producto de síntesis (N- α -CBZ-Tyr-(Leu)₂-Leu-OH) y de producto de hidrólisis (N- α -CBZ-Tyr-OH) en función del tiempo de reacción. De acuerdo con la misma una alta concentración en producto se alcanza en los primeros minutos de reacción, pero al cabo de 30 min el producto se hidrolizó totalmente dejando sin convertir 13% del sustrato limitante.

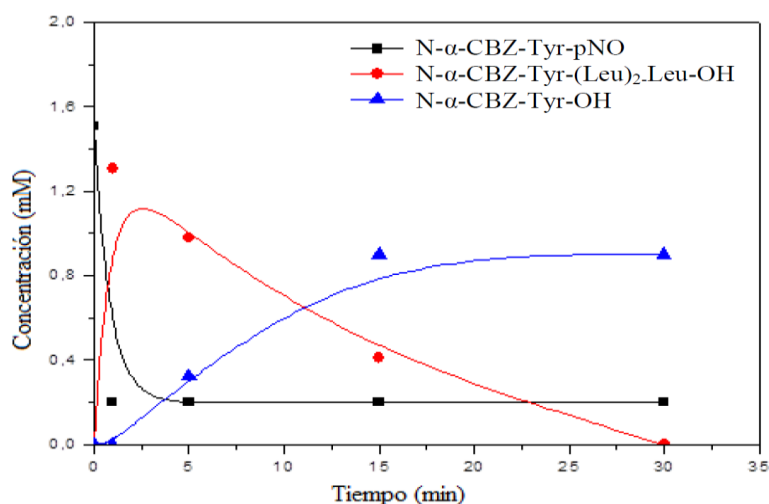


Figura 22. Variación de la concentración de los diferentes componentes de la reacción de síntesis enzimática del tetrapéptido N-α-CBZ-Tyr-(Leu)₂-Leu-OH (Z-YLLL), en un medio miscible formado por metanol (30 % (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 9), utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador, a 40°C y 200rpm; en función del tiempo.

La Tabla 11 presenta los rendimientos en producto y el grado de conversión del donante de acilo en la reacción de síntesis enzimática bajo control cinético del péptido N-α-CBZ-Tyr -(Leu)₂-Leu-OH en un medio formado por metanol (30%(v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9); a 40°C y 200rpm. Para la determinación de los parámetros η y α_s se utilizaron las ec. (9) y (10), respectivamente.

Tabla 11. Rendimiento en producto y grado de conversión del donador de acilo en la síntesis enzimática bajo control cinético del péptido N-α-CBZ-Tyr-(Leu)₂-Leu-OH en un medio formado por metanol (30%(v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9); conteniendo *antiacanthaina* libre, a 40°C y 200rpm.

Tiempo de reacción (min)	N-α-CBZ-Tyr-pNO (mM)	N-α-CBZ-Tyr-(Leu) ₂ -Leu-OH (mM)	N-α-CBZ-Tyr-OH (mM)	α_s (%)	η (%)
0	1,51	0	0	0	0
1	0,2	1,306	0	86	86,49
5	0,2	0,98	0,32	87	64,90
15	0,2	0,41	0,9	87	27,15
30	0,2	0	0,9	87	0

De acuerdo a los resultados expresados en la Tabla 11, *antiacanthaina* en metanol (30%(v/v)) fue capaz de sintetizar el tetrapéptido N- α -CBZ-Tyr-(Leu)₂-Leu-OH con un rendimiento máximo de 86,5%. Sin embargo, los rendimientos obtenidos disminuyeron rápidamente debido a la hidrólisis del producto a partir de los 5 min.

Las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo la reacción de síntesis bajo control termodinámico en un medio miscible se detallan a continuación:

Mecanismo de reacción:	<i>Control Termodinámico</i>
Medio de reacción	buffer Tris-HCl (0,1 M) pH 9 y 30 % (v/v) metanol
Condiciones de reacción	40°C, 200rpm
Activador	2-mercaptoetanol (20mM)
Donador de acilo	N- α - CBZ-Tyr-OH (1,51mM)
Enzima	<i>antiacanthaina</i> 200 μ L (8,66UI/mg)
Nucleófilo	L-Leu-OH (7,55mM)
Base aceptora de H⁺	trietilamina (7,55mM)

El cromatograma presentado en la Figura 23 corresponde a una muestra de la reacción de síntesis bajo control termodinámico, utilizando como medio 30 % (v/v) de metanol y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), durante 15h de reacción. En el mismo se observa: (I) enzima (t_R : 2-3,6min) y (II) N- α -CBZ-Tyr-OH (t_R : 13,9min).

De acuerdo a lo observado en la Figura 23 cuando el donador de acilo no está activado, la síntesis entre N- α -CBZ-Tyr-OH y L-Leu-OH no procede.

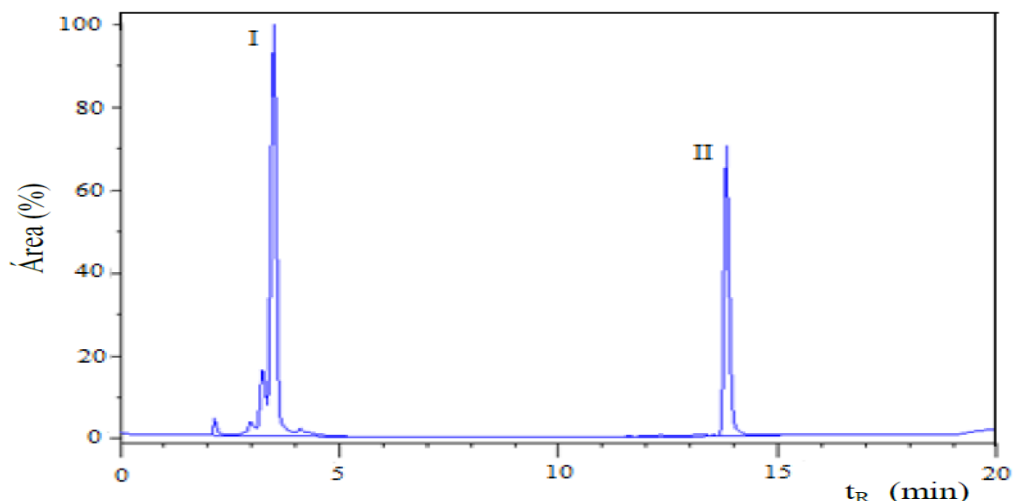


Figura 23. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control termodinámico por RP-HPLC, durante 15h de reacción con N- α -CBZ-Tyr-OH y Leu-OH, en un medio miscible formado por metanol (30% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador; a 40°C, 200 rpm. I: enzima; II: N- α -CBZ-Tyr-OH.

Síntesis enzimática de N- α -CBZ-Tyr-Gln-OH (Z-YQ), análogo del precursor (Tyr-Gln-OH) del tripéptido Tyr-Gln-Gln-OH (YQQ), en sistemas homogéneo y macroheterogéneo

Las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo la reacción de síntesis bajo control cinético en un medio bifásico formado por acetato de etilo (50% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9) y en un medio miscible formado por metanol (30% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9) fueron las mismas que para N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH. Sin embargo, en este caso la síntesis del dipéptido no se obtuvo en los medios citados, tanto bajo control cinético como bajo control termodinámico.

Es probable que la alta preferencia de *antiacanthaina* por Gln en el medio bifásico (90%), en relación al derivado Tyr (70%), haya impedido el uso de éste último como donador de acilo por parte de la enzima (Tabla 5).

En resumen:

La enzima *antiacanthaina* catalizó la síntesis de diferentes productos según el medio de reacción utilizado.

El péptido N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH (análogo al péptido natural con actividad antihipertensiva Tyr-Leu-OH), se obtuvo un bajo rendimiento de 63% en un medio bifásico formado por acetato de etilo (50%(v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9).

Bajo las mismas condiciones, en un medio miscible formado por metanol (30%(v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9) se obtuvo el tetrapéptido N- α -CBZ-Tyr-(Leu)₂-Leu-OH, con un rendimiento máximo de 86,50%.

Cuando el sustrato donador de acilo no estaba activado la síntesis no procedió, independientemente del medio de reacción, razón por la cual el producto no pudo sintetizarse bajo control termodinámico.

SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE PÉPTIDOS CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Síntesis enzimática de N- α -CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV), análogo del precursor (Tyr-Val-OH) de Tyr-Val-Leu-OH (YVL), en sistemas homogéneo y macroheterogéneo

A continuación se muestran los resultados obtenidos cuando se llevó a cabo la síntesis de N- α -CBZ-Tyr-Val-OH en un medio bifásico formado por acetato de etilo (50% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9) y en un medio miscible formado por metanol (30% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9).

Las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo la reacción de síntesis bajo control cinético en un medio bifásico se detallan a continuación:

Mecanismo de reacción:	<i>Control cinético</i>
Medio de reacción	buffer Tris-HCl (0,1 M) pH 9 y 50 % (v/v) acetato de etilo
Condiciones de reacción	40°C, 200rpm
Activador	2-mercaptoetanol (20mM)
Donador de acilo	N- α CBZ-Tyr-pNO (17,25mM)
Enzima	<i>antiacanthaina</i> 200 μ L (8,66UI/mg)
Nucleófilo	L-Val-OH (7,55mM)
Base aceptora de H⁺	trietilamina (7,55mM)

El cromatograma presentado en la Figura 24 corresponde a una muestra de la reacción de síntesis bajo control cinético, utilizando el medio formado por 50 % (v/v) de

acetato de etilo y buffer Tris-HCl (0,1 M) pH 9, después de 1 h de reacción. En el mismo se observa: (I) enzima (t_R : 3,-4,42min), (II) el producto N- α -CBZ-Tyr-Val-OH (t_R : 5,27 min) y (III) N- α -CBZ-Tyr-pNO (t_R : 14,5min).

La identidad del producto de la reacción (N- α -CBZ-Tyr-Val-OH), se determinó inicialmente mediante el método del estándar externo, utilizando el péptido sintetizado por vía química (Figura 13). N- α -CBZ-Tyr-Val-OH se purificó mediante una columna C₁₈, y se secó en un equipo concentrador (Thermo Scientific Savant™ SPD131DDA SpeedVac), para luego verificar su peso molecular por espectrometría de masas LCMS-2020 (Shimadzu), utilizando un espectrómetro de masas con una interfase de ionización por electrospray (ESI-MS). El espectro obtenido guardó total similitud con el patrón de síntesis química en fase sólida (SPPS) (Figura 13).

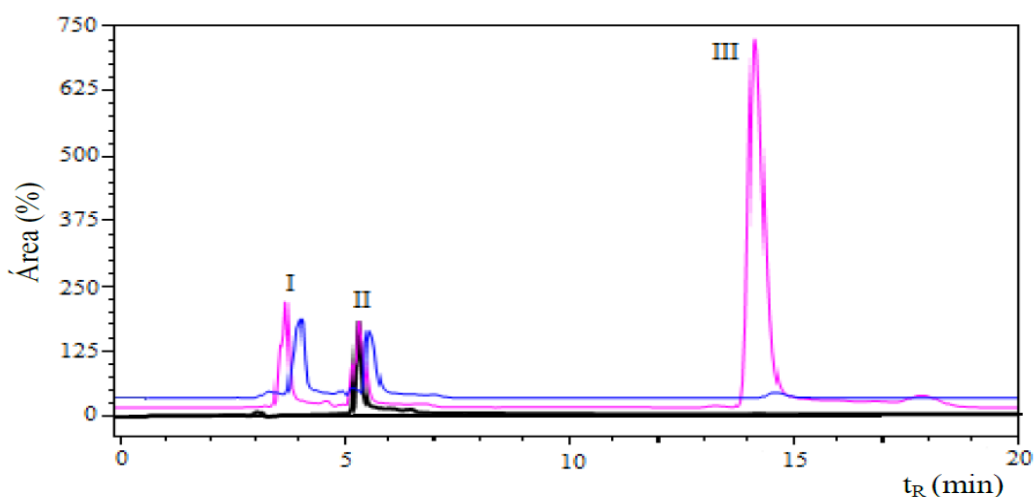


Figura 24. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control cinético por RP-HPLC, luego de 1 h de reacción con N- α -CBZ-Tyr-pNO y Val-OH, en un medio bifásico formado por acetato de etilo (50% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador, a 40°C, 200 rpm. I: enzima, II: N- α -CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV), III: N- α -CBZ-Tyr-pNO. Fase acuosa: línea azul, Fase orgánica: línea rosa, Patrón externo: línea negra.

La Figura 25 muestra la variación de la concentración del sustrato limitante (N- α -CBZ-Tyr-pNO), producto de síntesis (N- α -CBZ-Tyr-Val-OH) y producto de hidrólisis (N- α -CBZ-Tyr-OH) de la reacción de síntesis enzimática, en un medio

bifásico formado por acetato de etilo (50%(v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH9), a 40°C y 200 rpm.

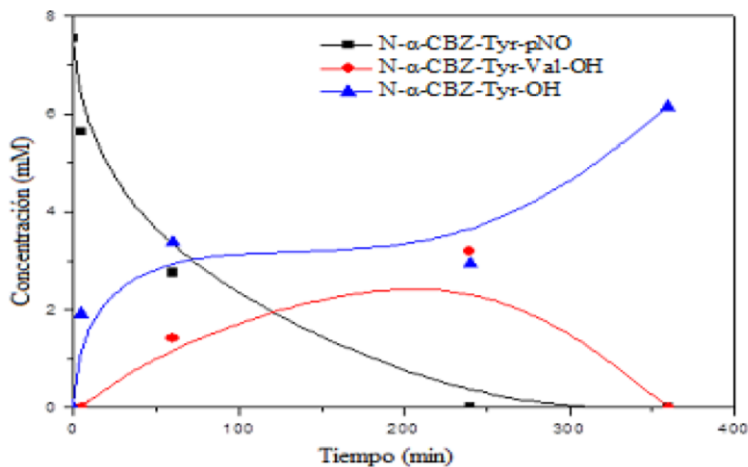


Figura 25. Variación de la concentración de los diferentes componentes de la reacción de síntesis enzimática del dipéptido N- α -CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV), en un medio bifásico formado por acetato de etilo (50 % (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 9), utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador, a 40°C y 200rpm; en función del tiempo.

La Tabla 12 presenta los rendimientos en producto (η) y el grado de conversión del donante de acilo (α_s) de la reacción de síntesis enzimática bajo control cinético del péptido N- α -CBZ-Tyr-Val-OH en un medio formado por acetato de etilo (50%(v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9). Para cuantificar dichos parámetros se utilizaron las ecuaciones (9) y (10).

Tabla 12. Rendimiento en producto y grado de conversión del donador de acilo en la síntesis enzimática del péptido N- α -CBZ-Tyr-Val-OH en un medio formado por acetato de etilo (50%(v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9); conteniendo *antiacanthaina* libre, a 40°C y 200rpm.

Tiempo de reacción (min)	N- α -CBZ-Tyr-pNO (mM)	N- α -CBZ-Tyr-Val-OH (mM)	N- α -CBZ-Tyr-OH (mM)	α_s (%)	η (%)
0	7,56	0	0	0	0
5	5,64	0	1,92	25,39	0
60	2,75	1,41	3,39	63,54	18,65
240	0	3,20	2,95	100	42,32
360	0	0	6,15	100	0

Si bien el grado de conversión de sustrato (limitante) máximo se alcanzó a las 4h de reacción y fue de 100%, sólo se obtuvo 42,32% de conversión en el producto deseado (N- α -CBZ-Tyr-Val-OH). Por tal razón, se incrementó la concentración del nucleófilo en 10 veces con la finalidad de maximizar η . Los resultados se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Maximización del rendimiento en producto de la reacción de síntesis enzimática del péptido N- α -CBZ-Tyr-Val-OH en un medio formado por acetato de etilo (50%(v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9); conteniendo *antiacanthaina* libre, a 40°C y 200rpm.

Tiempo de reacción (min)	N- α -CBZ-Tyr-pNO (mM)	N- α -CBZ-Tyr-Val-OH (mM)	N- α -CBZ-Tyr-OH (mM)	α_s (%)	η (%)
0	7,56	0	0	0	0
5	5,75	0,91	0,9	24	12
60	3,55	2,49	1,515	53	33
240	0,75	3,93	2,87	90	52
360	0,75	0	6,81	90	0

Según la Tabla 13, cuando la concentración del nucleófilo (Val-OH) se incrementó 10 veces (75,5 mM), que es la concentración máxima que permite el límite de solubilidad en el medio de reacción, se obtuvo el 90% de conversión del sustrato donador de acilo y un rendimiento en producto de 52%. Probablemente, este último valor podría ser mejorado disminuyendo la concentración de agua en el medio de reacción, ya que es solo 10% más alto que trabajando en concentraciones equimoleculares de los sustratos.

Las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo la reacción de síntesis bajo control termodinámico en un medio bifásico se detallan a continuación:

Mecanismo de reacción:	<i>Control Termodinámico</i>
Medio de reacción	buffer Tris-HCl (0,1 M) pH 9 y 50 % (v/v) acetato de etilo
Condiciones de reacción	40°C, 200rpm
Activador	2-mercaptoetanol (20mM)
Donador de acilo	N- α CBZ-Tyr-OH (17,25mM)
Enzima	<i>antiacanthaina</i> 200 μ L (8,66UI/mg)

Nucleófilo	L-Val-OH (7,55mM)
Base aceptora de H⁺	trietilamina (7,55mM)

El cromatograma presentado en la Figura 26 corresponde a una muestra de la fase acuosa (azul) y de la fase orgánica (negro) de la reacción de síntesis bajo control termodinámico, utilizando como medio 50 % (v/v) de acetato de etilo y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), durante 15h de reacción. En el mismo se observa: (I) enzima (t_R : 3-4,42min) y (II) N- α -CBZ-Tyr -OH (t_R : 4,9min).

El producto esperado N- α -CBZ-Tyr-Val-OH, no fue obtenido en las reacciones de síntesis bajo control termodinámico. Nuevamente, es evidente que *antiacanthaina* necesita tener como sustrato donadores de acilo activados para poder funcionar como catalizador de las síntesis de péptidos propuestas.

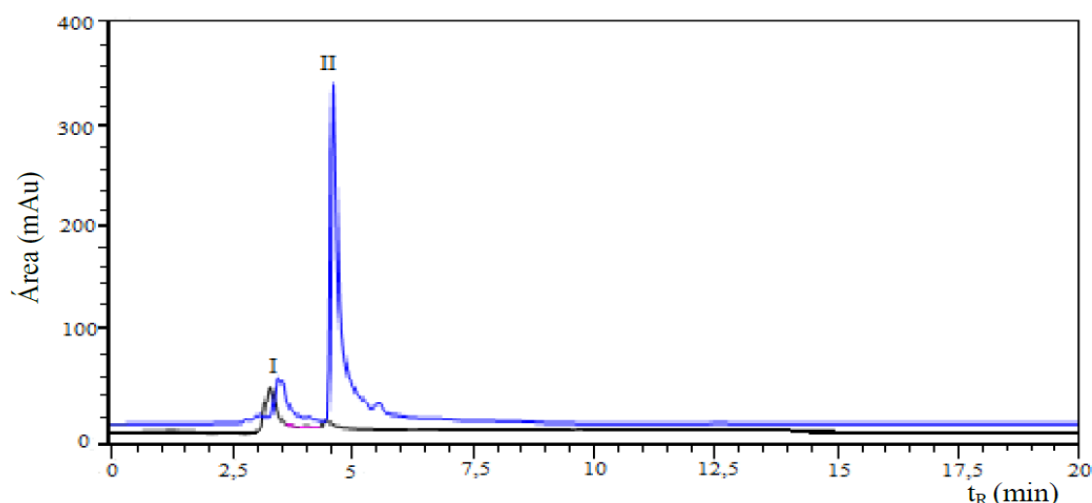


Figura 26. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control termodinámico por RP-HPLC, durante 15h de reacción con N- α -CBZ-Tyr-OH y Val-OH, en un medio bifásico formado por acetato de etilo (50% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador; a 40°C, 200 rpm. I: enzima; II: N- α -CBZ-Tyr-OH.

Las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo la reacción de síntesis bajo control cinético en un medio miscible se detallan a continuación:

Mecanismo de reacción:	<i>Control cinético</i>
Medio de reacción	buffer Tris-HCl (0,1 M) pH 9 y 30 % (v/v) metanol
Condiciones de reacción	40°C, 200rpm

Activador	2-mercaptoetanol (20mM)
Donador de acilo	N- α -CBZ-Tyr-pNO (1,51mM)
Enzima	<i>antiacanthaina</i> 200 μ L (8,66UI/mg)
Nucleófilo	L-Val-OH (7,55mM)
Base aceptora de H⁺	trietilamina (7,55mM)

El cromatograma presentado en la Figura 27 corresponde a una muestra de la reacción de síntesis bajo control cinético, utilizando como medio 30 % (v/v) de metanol y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), después de 1 min de reacción. En el mismo se observa: (I) enzima (t_R : 1,94-3,40min), (II) N- α -CBZ-Tyr-pNO (t_R : 11,93min), (III) N- α -CBZ-Tyr-OH (t_R : 13,31min) y (IV) N- α -CBZ-Tyr-(Val)₂Val-OH (t_R : 14,84min).

Las condiciones de elusión isocrática no permitieron la adecuada separación de los analitos, debiendo aplicar elusión por gradiente para lograrla. Al incrementar la composición de la fase móvil en la fase orgánica (acetonitrilo) de forma lineal de 0 % a 40 % durante 20min, se logró una adecuada separación de los analitos (Figura 27). Se tomaron muestras periódicamente hasta las 24h de reacción, se analizaron por RP-HPLC y se corrieron blancos de reactivos y de enzima.

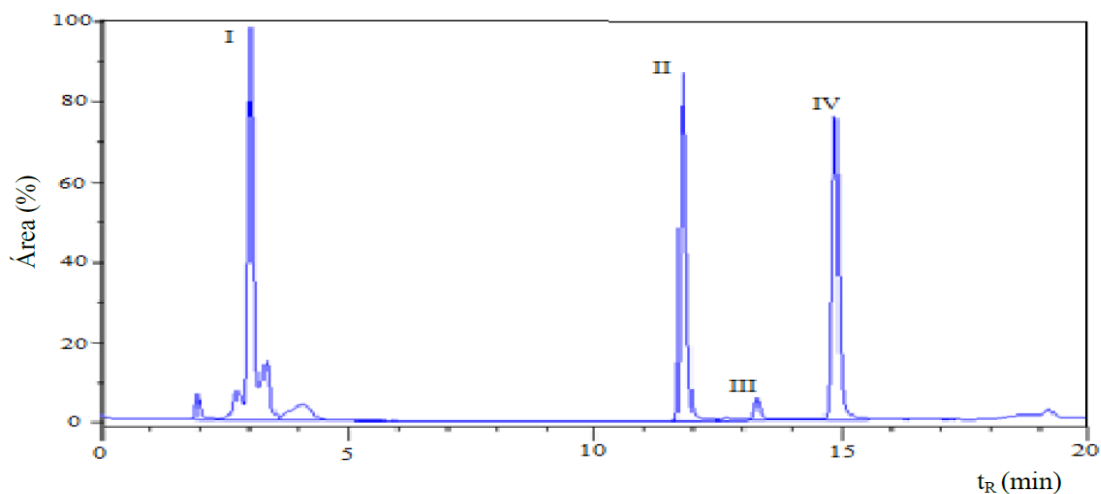


Figura 27. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control cinético por RP-HPLC, luego de 1 min de reacción con N- α -CBZ-Tyr-pNO y Val-OH, en un medio miscible formado por metanol (30% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador, a 40°C, 200 rpm. I: enzima; II: N- α -CBZ-Tyr-pNO; III: N- α -CBZ-Tyr-OH; IV: N- α -CBZ-Tyr-(Val)₂-Val-OH (Z-YVVV).

La Figura 28 muestra la variación de la concentración de sustrato limitante (N- α -CBZ-Tyr-pNO), de producto de síntesis (N- α -CBZ-Tyr-(Val)₂-Val-OH) y de producto de hidrólisis en función del tiempo de reacción.

De acuerdo con la misma, una alta concentración en producto se alcanza en los primeros minutos de reacción, pero al cabo de 15 minutos el producto se hidrolizó totalmente.

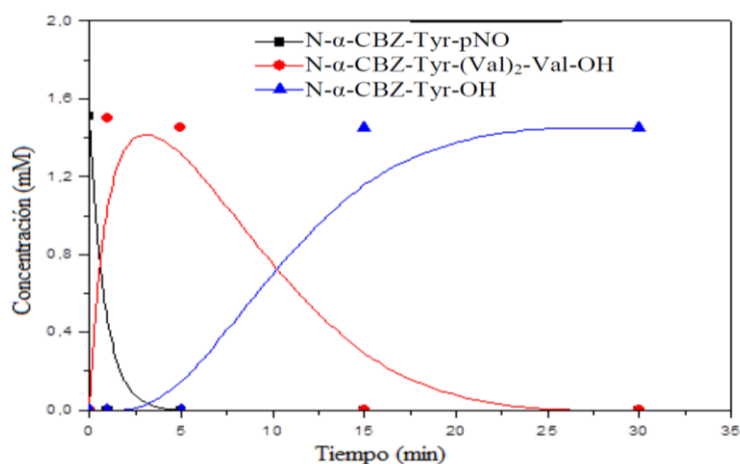


Figura 28. Variación de la concentración de los diferentes componentes de la reacción de síntesis enzimática del tetrapéptido N- α -CBZ-Tyr-(Val)₂-Val-OH (Z-YVVV), en un medio miscible formado por metanol (30 % (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 9), utilizando *antiacanthina* libre como catalizador, a 40°C y 200rpm; en función del tiempo.

A diferencia de lo observado en la reacción de síntesis bajo control cinético de N- α -CBZ-Tyr-Val-OH en 50% (v/v) de acetato de etilo y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9) (Figura 24), el producto esperado (N- α -CBZ-Tyr-Val-OH) no fue obtenido en las reacciones de síntesis bajo control cinético en el medio miscible citado. En cambio, la enzima fue capaz de sintetizar otro producto Z-Tyr-(Val)₂-Val-OH, el cual fue dilucidado por espectrometría de masas (Figura 29).

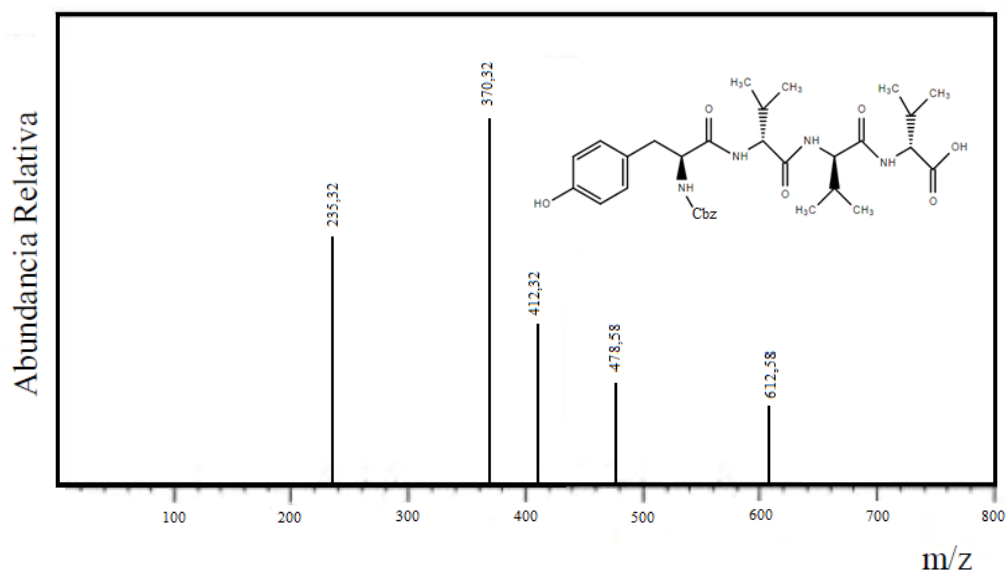


Figura 29. Espectro de masas correspondiente a N- α -CBZ-Tyr-(Val)₂-Val-OH (Z-YVVV) obtenido por síntesis enzimática bajo control cinético en un medio miscible formado por metanol (30% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador; a 40°C y 200rpm. m/z: 612,58 (N- α -CBZ-Tyr-(Val)₂-Val-OH); m/z: 478,58 (Tyr-(Val)₃); m/z: 412,32 (N- α -CBZ-Tyr-Val); m/z: 370,32 (fragmento C₁₉H₁₉N₃O₃); m/z: 235,32 (fragmento C₁₁H₁₂N₃O₃).

La Tabla 14, presenta los rendimientos en producto y grado de conversión del donador de acilo de la reacción de síntesis enzimática bajo control cinético del péptido N- α -CBZ-Tyr-(Val)₂-Val-OH en un medio formado por metanol (30% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9). Para el análisis y cuantificación de los productos obtenidos se utilizaron los parámetros de rendimiento (η) y grado de conversión (α_s) previamente definidos en las ecuaciones (9) y (10).

Tabla 14. Rendimiento en producto y grado de conversión del donador de acilo en la síntesis enzimática bajo control cinético del péptido N- α -CBZ-Tyr-(Val)₂-Val-OH en un medio formado por metanol (30%(v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9); conteniendo *antiacanthaina* libre, a 40°C y 200rpm.

Tiempo de reacción (min)	N- α -CBZ-Tyr-pNO (mM)	N- α -CBZ-Tyr-(Val) ₂ -Val-OH (mM)	N- α -CBZ-Tyr-OH (mM)	α_s (%)	η (%)
0	1,51	0	0	0	0
1	0	1,50	0	100	99,33
5	0	1,45	0	100	96
15	0	0	1,45	100	0
30	0	0	1,45	100	0

Según la Tabla 14, un rendimiento máximo de 99,33% se obtuvo a partir del comienzo de la reacción de síntesis, pero a partir de los 5 min descendió debido a la hidrólisis del producto. El grado de conversión de sustrato 100% (Figura 28).

Las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la reacción de síntesis bajo control termodinámico se detallan a continuación:

Mecanismo de reacción:	<i>Control Termodinámico</i>
Medio de reacción	buffer Tris-HCl (0,1 M) pH 9 y 30 % (v/v) metanol
Condiciones de reacción	40°C, 200rpm
Activador	2-mercaptoetanol (20mM)
Donador de acilo	N- α -CBZ-Tyr-OH (1,51mM)
Enzima	<i>antiacanthaina</i> 200 μ L (8,66UI/mg)
Nucleófilo	L-Val-OH (7,55mM)
Base aceptora de H ⁺	trietilamina (7,55mM)

El cromatograma presentado en la Figura 30 corresponde a una muestra de la reacción de síntesis bajo control termodinámico, utilizando como medio 30 % (v/v) de metanol y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), durante 5h de reacción. En el mismo se observa: (I) enzima (tr: 2-3,6min) y (II) N- α -CBZ-Tyr-OH (tr: 13,9min).

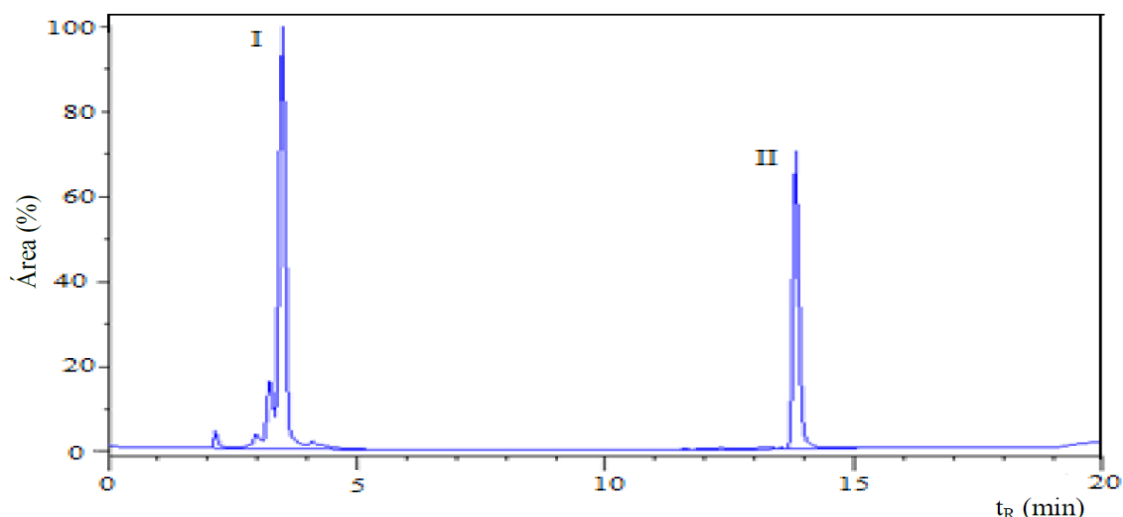


Figura 30. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control termodinámico por RP-HPLC, durante 5h de reacción con N- α -CBZ-Tyr-OH y Val-OH, en un medio miscible formado por metanol (30% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9), utilizando *antiacanthaina* libre como catalizador; a 40°C, 200 rpm. I: enzima; II: N- α -CBZ-Tyr-OH.

De acuerdo a lo observado en la Figura 30, cuando el donador de acilo no está activado, la síntesis entre N- α -CBZ-Tyr-OH y L-Val-OH no procede.

Síntesis de N- α -CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV) en un sistema contínuo (acetato de etilo) con baja a_w (X_w : 1×10^{-5}), usando *antiacanthaina* inmovilizada

Si bien *antiacanthaina* fue capaz de catalizar la síntesis de N- α -CBZ-Tyr-Val-OH y N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH en un medio bifásico formado por acetato de etilo (50%(v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9); los rendimientos máximos en productos (η) fueron del orden de 52% (a las 4h de reacción) y de 63% (a las 3h de reacción), respectivamente; pero luego cayeron drásticamente debido a la hidrólisis del producto favorecida por la presencia de 50% (v/v) de fase acuosa en el medio de reacción.

Además, si bien el grado de conversión de sustrato limitante (α_s) fue alto en todos los casos, la reacción de hidrólisis del donador de acilo (Z-Tyr-pNO) tuvo supremacía sobre la reacción de formación de la unión peptídica, produciendo rápidamente el producto de hidrólisis Z-Tyr-OH.

Este hecho obedeció a que la reacción competitiva de la síntesis peptídica, que es la reacción de hidrólisis del donador de acilo (cuando el nucleófilo es agua), se vió

también favorecida por la presencia de un alto contenido acuoso en el medio. La concentración del agua pura en la fase acuosa del medio bifásico es aproximadamente 55M, mientras los nucleófilos (Val-OH y Leu-OH) tienen un límite de solubilidad de 75,5 mM y 37,75 mM, respectivamente, en el sistema bifásico acetato de etilo (50%(v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9). Es por ello que lo ideal sería reducir el contenido acuoso en el medio de reacción para aumentar los rendimientos en producto (péptido) en las reacciones de síntesis.

Sin embargo, al disminuir la proporción de la fase acuosa en un medio bifásico formado por acetato de etilo-buffer condujo a una drástica reducción de la actividad específica de *antiacanthaina*, siendo < a 5% de la obtenida en buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9) (Figura 8).

Estas son las razones que condujeron a pensar que para utilizar *antiacanthaina* en acetato de etilo con baja actividad de agua ($X_w: 1 \times 10^{-5}$), era indispensable aumentar la estabilidad de la enzima mediante un método de inmovilización.

Se utilizó *antiacanthaina* inmovilizada en sílica-glioxil como catalizador de las reacciones de síntesis bajo control cinético de N- α -CBZ-Tyr-Val-OH, en acetato de etilo con baja a_w ($X_w: 1 \times 10^{-5}$). Dicho soporte permitió una alta capacidad de carga, adecuada estabilidad enzimática al cabo de 5 h en acetato de etilo con baja a_w ($X_w: 1 \times 10^{-5}$) y un rendimiento de inmovilización de 40%.

La separación de los componentes de las reacciones de síntesis bajo control cinético de N- α -CBZ-Tyr-Val-OH, utilizando la enzima inmovilizada en sílica-glioxil se muestra en la Figura 31.

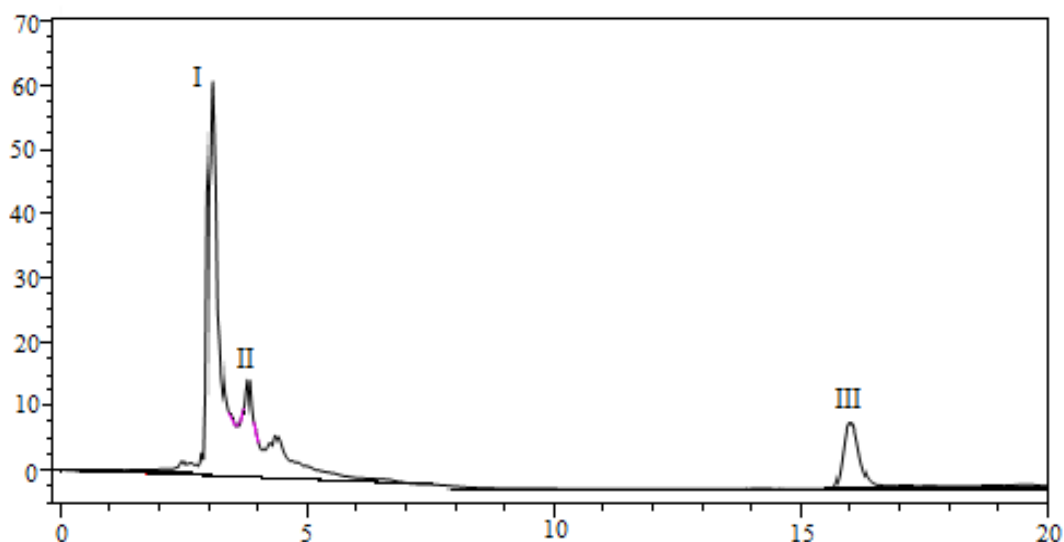


Figura 31. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control cinético por RP-HPLC, luego de 30 min de reacción con N- α -CBZ-Tyr-pNO y Val-OH, en acetato de etilo con baja a_w (X_w : 1×10^{-5}), utilizando *antiacanthaina* inmovilizada en sílica-glioxil como catalizador, a 40°C y 200 rpm. I: enzima (t_R : 3,1min); II: el producto Z-YV (t_R : 3,82min); III: Z-Y-pNO (t_R : 16,01min).

Los rendimientos en producto (η) y el grado de conversión de los sustratos limitantes (α_s) de la reacción previamente descrita se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15. Rendimiento en producto y grado de conversión del donador de acilo en la síntesis bajo control cinético del péptido N- α -CBZ-Tyr-Val-OH, en un medio formado por acetato de etilo con baja a_w (X_w : 1×10^{-5}) utilizando *antiacanthaina* inmovilizada en sílica-glioxil; a 40°C y 200rpm.

Tiempo de reacción (min)	Área del producto	Área Z-Tyr-PNO	α_s (%)	η (%)
	mAU.min	mAU.min		
0	0	33	0	0
1	4,13	32,51	1,5	12
5	4,79	15,25	54	14
30	4,79	13,96	57,7	14
60	0	14	57,6	0

Según la Tabla 15 un rendimiento máximo de 14% se obtuvo a partir de los 5 min, pero a partir de los 30 min descendió debido a la hidrólisis del producto. Estos valores son significativamente más bajos que los encontrados en acetato de etilo (50%

(v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9) (Tabla 13). No obstante, la X_w : 1×10^{-5} debería ser optimizada.

El grado de conversión de sustrato se mantuvo en niveles elevados 58% lo que podría deberse a la presencia de un subproducto (t_R : 4,3min, Figura 31). Es importante señalar que estos resultados son preliminares y que es necesario constatar la posible formación de subproductos de la reacción mediante separación de los componentes en RP-HPLC con gradiente de elusión.

SÍNTESIS QUIMO-ENZIMÁTICA DE UN PÉPTIDO HÍBRIDO

Síntesis quimo-enzimática del péptido híbrido N- α -CBZ-Tyr-Leu-Leu-OH (Z-YLL) en un sistema macroheterogéneo

Como se demostró previamente, por síntesis enzimática fue posible obtener el dipéptido N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH, análogo de Tyr-Leu-OH con potencial actividad antihipertensiva (Mullally y col., 1996). Este dipéptido proviene de la β -lactorfina (Tyr-Leu-Leu-Phe), que es un derivado de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina.

Con el objeto de indagar la actividad antihipertensiva de N- α -CBZ-Tyr-Leu-Leu-OH análogo al precursor (Tyr-Leu-Leu de la β -lactorfina) se diseñó su síntesis por vía quimo-enzimática en dos etapas.

Inicialmente, sintetizamos por SPPS el dipéptido Leu-Leu y lo utilizamos como nucleófilo de la síntesis enzimática, utilizando N- α -CBZ-Tyr-pNO como donador de acilo, en un medio formado por acetato de etilo (50% (v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9).

El cromatograma presentado en la Figura 32 corresponde al tripéptido híbrido obtenido por vía quimoenzimática, previa purificación con columna C_{18} y secado en equipo con concentrador (Thermo Scientific SavantTM SPD131DDA) para luego ser analizado en un espectrómetro de masa, con una interfase de ionización por electrospray (ESI-MS) utilizando un equipo LCMS-2020 (Shimadzu).

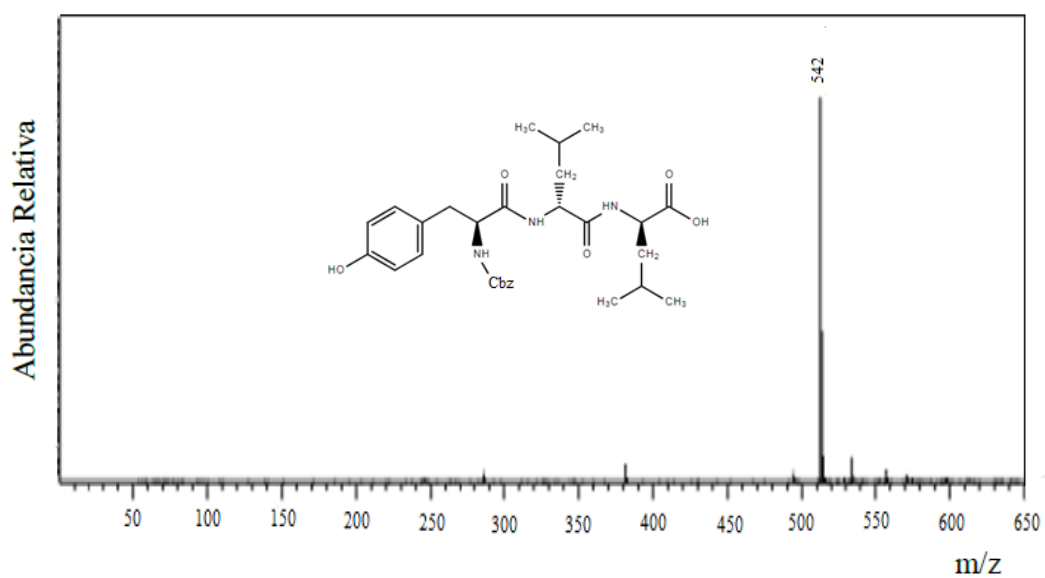
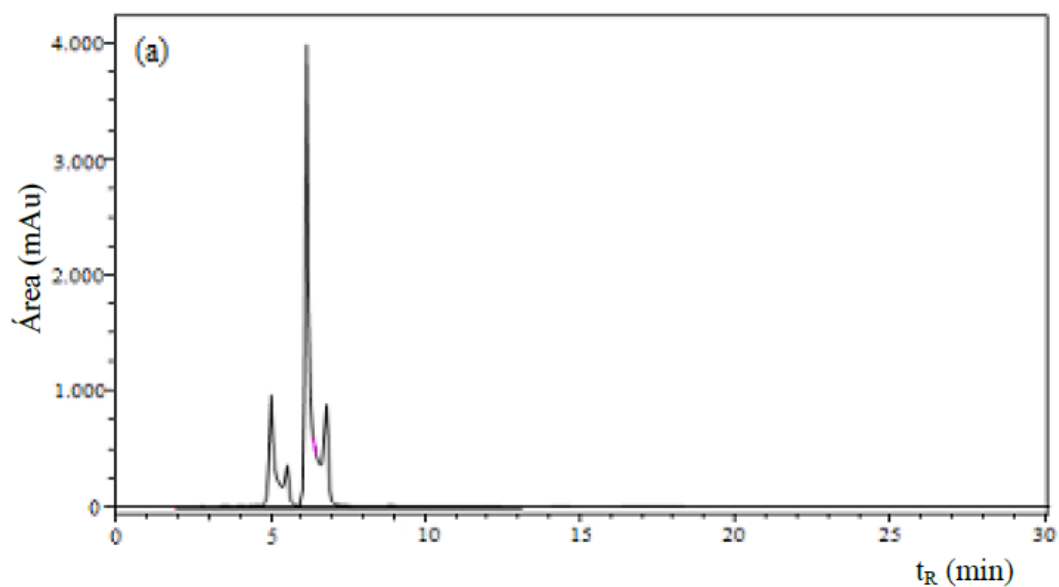


Figura 32. Cromatograma obtenido por (a) RP-HPLC (b) espectrometría de masa del tripéptido híbrido N- α -CBZ-Tyr-Leu-Leu-OH (Z-YLL); obtenido por vía quimioenzimática.

ACTIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VITRO* DE LOS PÉPTIDOS SINTETIZADOS

Actividad antihipertensiva *in vitro* de N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH (Z-YL), Tyr-Leu-OH (YL), N- α -CBZ-Tyr-Leu-Leu-OH (Z-YLL) y Tyr-Gln-Gln-OH (YQQ)

La actividad antihipertensiva de N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH (análogo de Tyr-Leu-OH, sintetizado por vía enzimática), Tyr-Gln-Gln-OH (péptido de *novo*, sintetizado por SPPS) y N- α -CBZ-Tyr-Leu-Leu-OH (péptido híbrido, sintetizado por vía quimioenzimática); se evaluó como actividad inhibitoria de la ECA en ensayos *in vitro*. Para ello, se preparó una solución stock de Abz-FRk-(Dnp) P-OH (FRET) en DMSO 100% (1 mg/ml) y a partir de ésta, diferentes diluciones para construir una curva de calibración (Figura 33), y se realizó una curva de actividad de ECA para determinar la actividad inicial de la misma en función del tiempo, utilizando FRET como sustrato (Figura 34). Además, se realizó una curva de inhibición de ECA frente a distintas concentraciones de un inhibidor comercial de la enzima captopril (Figura 35).

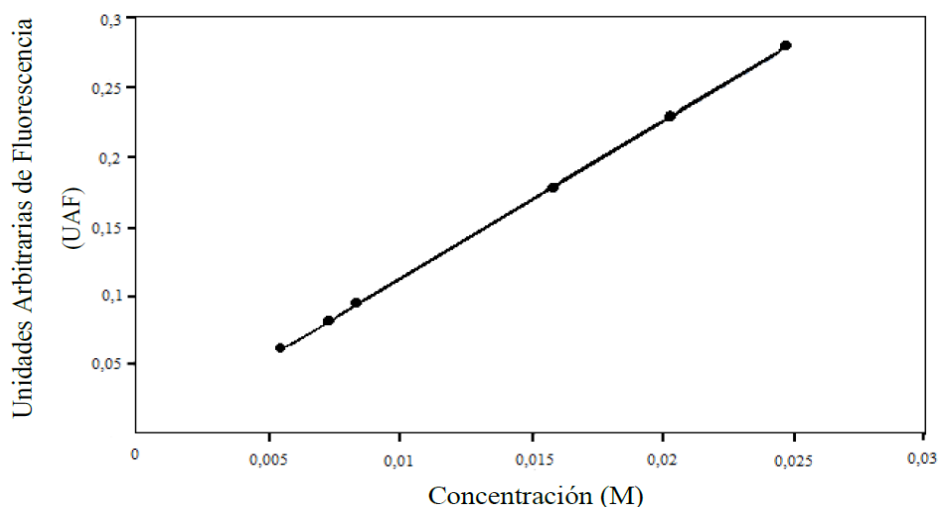


Figura 33. Curva de calibrado del sustrato de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) Abz-FRK-(Dnp)P-OH (FRET) en DMSO.

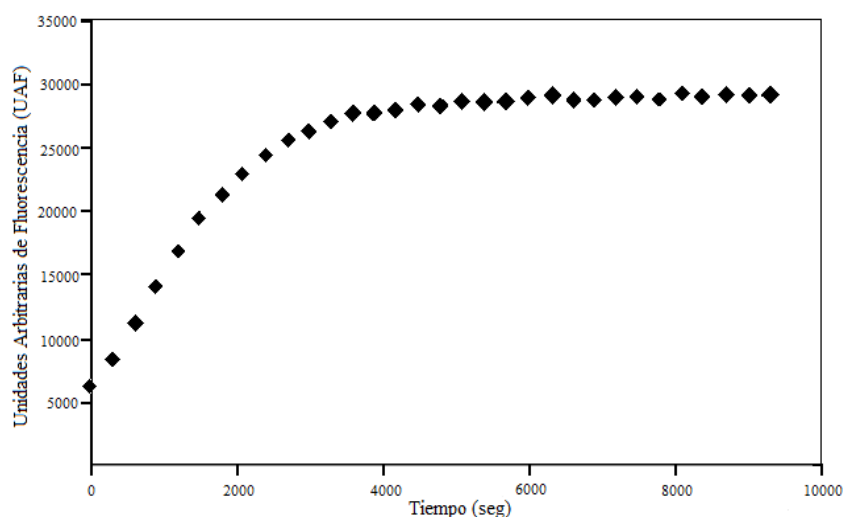


Figura 34. Actividad enzimática de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) frente al sustrato Abz-FRK (Dnp)P-OH (FRET) en DMSO, en función del tiempo.

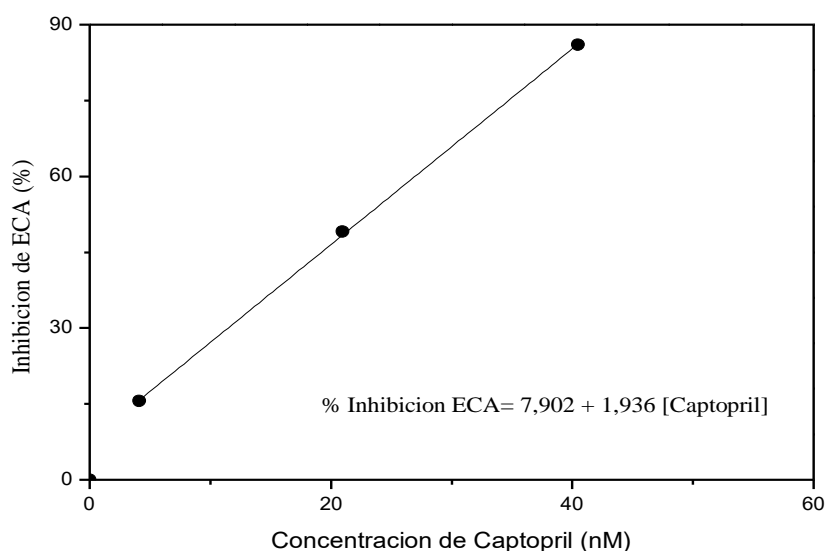


Figura 35 Perfil de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) frente al inhibidor comercial captopril, utilizando Abz-FRK (Dnp)P-OH (FRET) en DMSO.

Finalmente, se estudió la capacidad inhibitoria de la ECA por parte de N- α -CBZ-Tyr-Leu-OH, Tyr-Leu-OH, Tyr-Gln-Gln-OH y N- α -CBZ-Tyr-Leu-Leu-OH, en comparación con el inhibidor comercial captopril. La Tabla 16 muestra los porcentajes de inhibición de la ECA obtenidos al incorporar 100mg/ml de los péptidos en estudio. Sorprendentemente el péptido híbrido (N- α -CBZ-Tyr-Leu-Leu-OH), sintetizado por vía quimo-enzimática en nuestro laboratorio, presentó un porcentaje de inhibición notablemente superior (93%) a Tyr-Leu-OH (84%), tomado como modelo en este estudio.

Tabla 16. Porcentajes de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en presencia de los péptidos sintetizados.

Péptido	mg/ml	% Inhibición	IC ₅₀ (mM)
Z-YL	100	53	---
YL	100	84	0,122(1)
YQQ	100	85	0,61
Z-YLL	100	93	0,60
Captopril	100	100	0,21x10 ⁻⁴ (2)

(1) Según Mullaly y col. (1996). (2) Ondetti y Cushman (1982).

Por otra parte el péptido Tyr-Gln-Gln-OH sintetizado (de *novoo*) en nuestro laboratorio por SPPS presentó un porcentaje de inhibición de la ECA de 85%. Este valor es similar al informado por Mullally y col. (1996) para el péptido Tyr-Leu-OH (84%) (Tabla 16).

Según la bibliografía el péptido natural Tyr-Leu-OH presenta IC₅₀: 0,122mM (Mullally y col., 1996). El nuevo péptido híbrido sintetizado por vía quimo-enzimática (N- α -CBZ-Tyr-Leu-Leu-OH), produjo un claro perfil inhibitorio de la ECA (Tabla 16), que se tradujo en una IC₅₀: 0,60mM. Si bien este valor es cinco veces superior al informado para Tyr-Leu-OH, es probable que dicha diferencia se deba a la metodología utilizada para medir la actividad inhibitoria de la ECA. Justamente, el problema que se plantea al medir la actividad antihipertensiva *in vitro* como actividad inhibitoria de la ECA es la selección de la metodología a utilizar, ya que no existe un método estandarizado para tal determinación (Li y col., 2005, Carmona y col., 2006 y Corrons y col., 2012).

Si se comparan los porcentajes de inhibición de la ECA para Tyr-Leu-OH y N- α -CBZ-Tyr-Leu-Leu-OH en la Tabla 16 se advierte que el segundo muestra mayor inhibición que el primero, usando el procedimiento descrito en el Capítulo 2: Metodologías. Si bien, estos valores serán corroborados por una nueva metodología que se está poniendo a punto en nuestro laboratorio, es evidente que Tyr-Gln-Gln-OH y N- α -CBZ-Tyr-Leu-Leu-OH son promisorios agentes antihipertensivos. No obstante, mayores estudios de actividad inhibitoria y toxicidad deben ser llevados a cabo para evaluar la efectividad e inocuidad de los péptidos mencionados, mecanismos moleculares de actividad, farmacocinética y posibles efectos adversos.

Actividad antimicrobiana *in vitro* de N- α -CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV), Tyr-Val-OH (YV) y Tyr-Val-Leu-OH (YVL)

La actividad antimicrobiana de Tyr-Val-Leu-OH (sintetizado por SPPS); Tyr-Val-OH (precursor de Tyr-Val-Leu-OH, sintetizado por SPPS) y N- α -CBZ-Tyr-Val-OH (análogo del precursor Tyr-Val-OH, sintetizado por vía enzimática); se evaluó en un cultivo de bach a escala de laboratorio, frente a una cepa grampositiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) y frente a una cepa gramnegativa (*Escherichia coli* ATCC 25922).

Para ello, se prepararon nueve erlenmeyers conteniendo 10 ml de caldo Müller-Hinton, adicionados con concentraciones crecientes de los péptidos de interés (0-50 $\mu\text{g/ml}$). Paralelamente, se corrieron sendos blancos en idénticas condiciones pero sin péptido. Luego de la inoculación del caldo con 0,2ml de cada microorganismo a estudiar, se siguieron las cinéticas de crecimiento microbiano por espectrofometría. Se calcularon los valores de $\ln N$ (ufc/ml) y se graficaron las correspondientes curvas de crecimiento.

En las Figuras 36 a 38 se ilustran las curvas de crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 un caldo de cultivo Müller-Hinton, en presencia de (0-50 $\mu\text{g/ml}$) Tyr-Val-Leu-OH, Tyr-Val-OH y N- α -CBZ-Tyr-Val-OH. A partir de ellas, se calcularon las velocidades específicas de crecimiento (μ , 1/min) (Figura 39).

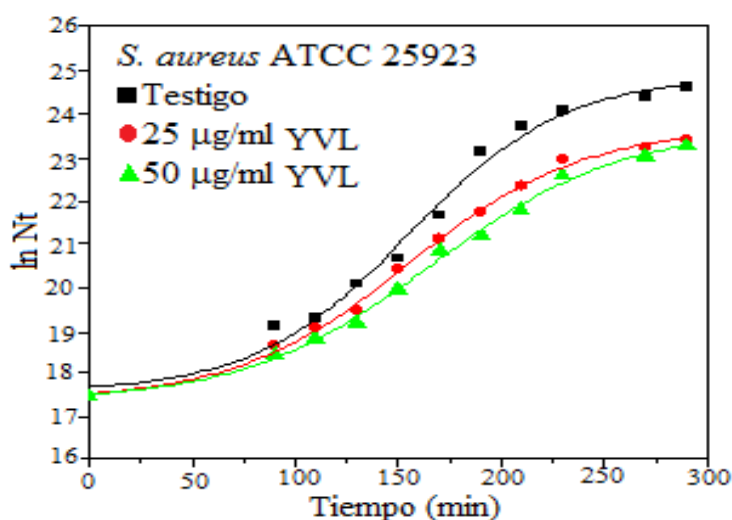


Figura 36. Cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, en caldo Müller-Hinton en ausencia y presencia del tripéptido Tyr-Val-Leu-OH (YVL) (25 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$); a 37°C y 180rpm.

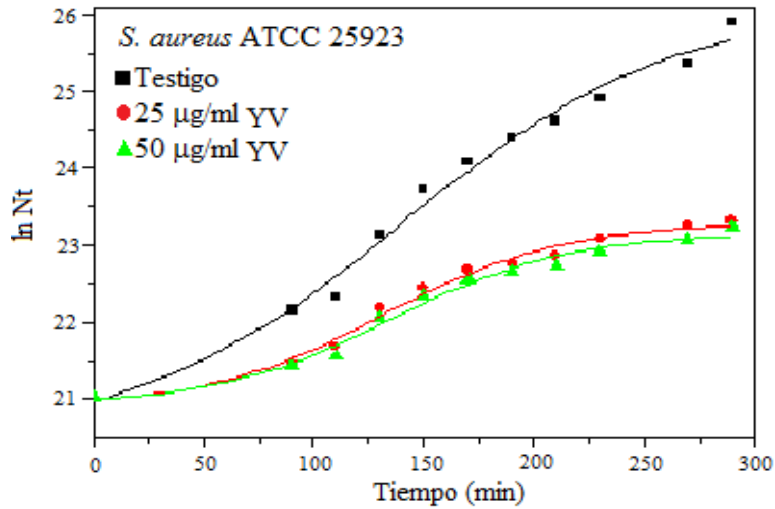


Figura 37. Cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, en caldo Müller-Hinton en ausencia y presencia del dipéptido Tyr-Val-OH (YV) (25µg/ml y 50 µg/ml); a 37°C y 180rpm.

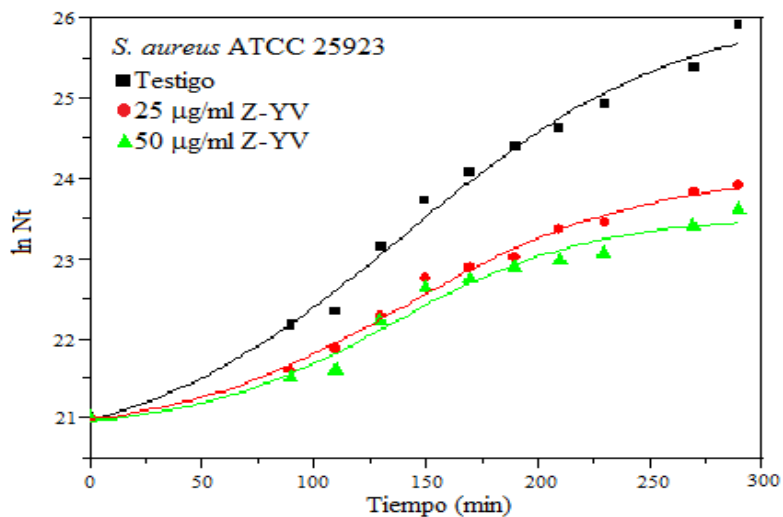


Figura 38. Cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, en caldo Müller-Hinton en ausencia y presencia del dipéptido N-α-CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV) (25µg/ml y 50 µg/ml); a 37°C y 180rpm.

De las Figuras 36 a 38, se deduce que tanto el precursor YV como el análogo del precursor Z-YV produjeron mayor inhibición de la velocidad de crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923 que el péptido modelo YVL.

A partir de la Figura 39, se obtuvo la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cada uno de los péptidos estudiados frente a *S. aureus*.

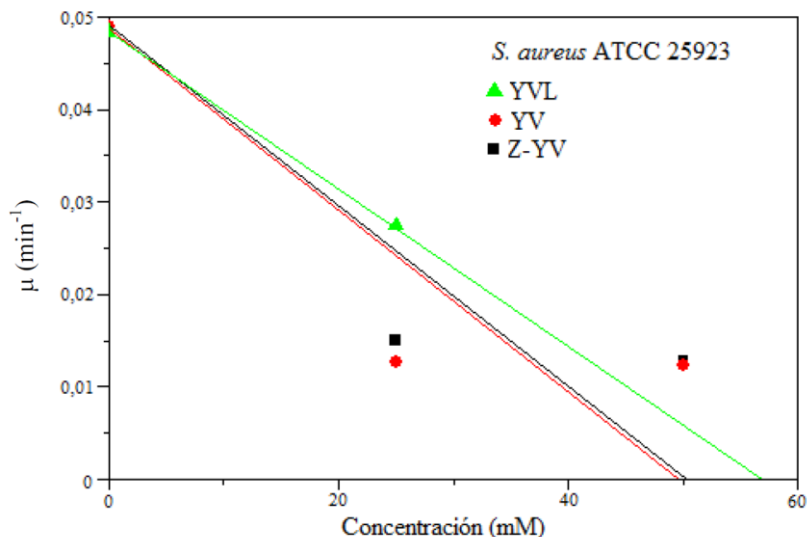


Figura 39. Dependencia de la velocidad específica de crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, en caldo Müller-Hinton, a 37°C y 180rpm; en función de la concentración de: Tyr-Val-Leu-OH (YVL), Tyr-Val-OH (YV) y N-α-CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV).

Las CIM para Tyr-Val-Leu-OH, Tyr-Val-OH y N-α-CBZ-Tyr-Val-OH fueron 57 μg/ml, 49μg/ml y 50μg/ml, respectivamente. Estos resultados fueron 83, 57 y 61% mayores que la CIM de oxacilina (31,1μg/ml) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Talia, 2011). En consecuencia, los péptidos Tyr-Val-Leu-OH, Tyr-Val-OH y N-α-CBZ-Tyr-Val-OH presentaron una acción antimicrobiana moderada contra *S. aureus*, más compatible con un efecto bacteriostático que bactericida.

Las Figuras 40 a 42, se ilustran las curvas de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 en caldo de Müller-Hinton, en presencia de Tyr-Val-Leu-OH, Tyr-Val-OH y N-α-CBZ-Tyr-Val-OH (0-50μg/ml), respectivamente. A partir de ellas, se calcularon las velocidades específicas de crecimiento (μ, 1/min) (Figura 43).

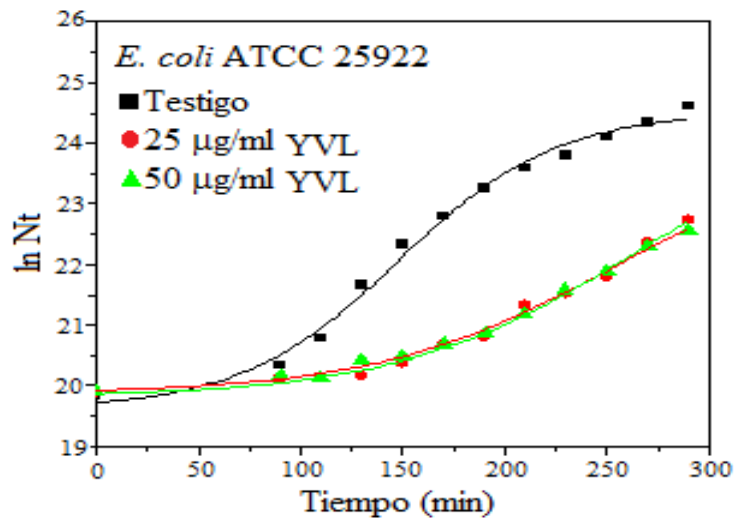


Figura 40. Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 en caldo Müller-Hinton, en ausencia y presencia del dipéptido Tyr-Val-Leu-OH (YVL) (25 µg/ml y 50µg/ml), a 37°C y 180rpm.

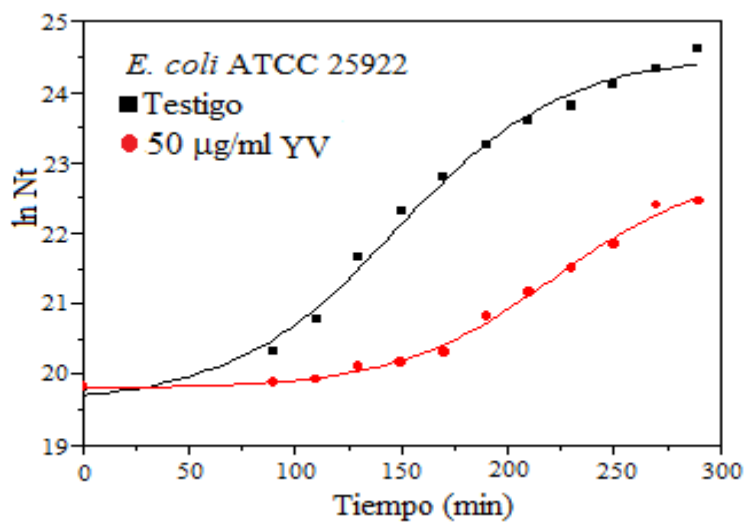


Figura 41. Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 en caldo Müller-Hinton, en ausencia y presencia del dipéptido Tyr-Val-OH (YV) (50µg/ml), a 37°C y 180rpm.

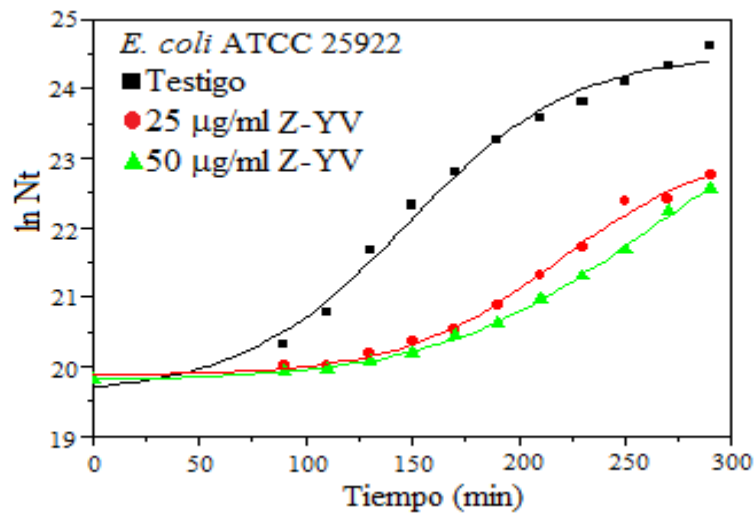


Figura 42. Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 en caldo Müller-Hinton, en ausencia y presencia del dipéptido N- α -CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV) (25 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$), a 37°C y 180rpm.

A diferencia del efecto observado frente a *S. aureus* ATCC 25923, el precursor (YV) y el análogo a éste (Z-YV) no produjeron diferencias significativas sobre la velocidad de crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 con respecto al péptido modelo YVL.

A partir de la Figura 43, se obtuvo la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cada uno de los péptidos estudiados.

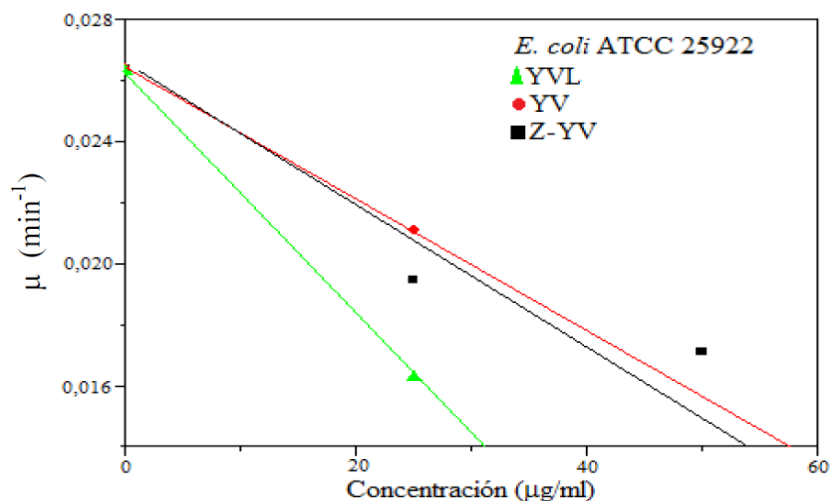


Figura 43. Dependencia de la velocidad específica de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 en caldo Müller-Hinton, a 37°C y 180rpm, en función de la concentración de Tyr-Val-Leu-OH (YVL), Tyr-Val-OH (YV) y N- α -CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV).

Las CIM para Tyr-Val-Leu-OH, Tyr-Val-OH y N- α -CBZ-Tyr-Val-OH fueron de 32 $\mu\text{g/ml}$, 57 $\mu\text{g/ml}$ y 54 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Estos resultados fueron 1,5; 2,6 y 2,5 veces mayores que la CIM de ácido nalidíxico (21,7 $\mu\text{g/ml}$) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 (Talia, 2011). En consecuencia, los péptidos Tyr-Val-Leu-OH, Tyr-Val-OH y N- α -CBZ-Tyr-Val-OH, presentaron una acción antimicrobiana leve contra *E. coli*, más compatible con un efecto bacteriostático que bactericida.

OTRAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS PÉPTIDOS SINTETIZADOS

Actividad anticoagulante *in vitro* de Tyr-Gln-Gln-OH (YQQ)

La bioactividad de un péptido está determinada por su composición y secuencia de aminoácidos, y muchos de ellos han revelado propiedades multifuncionales (Mora y col., 2014; Singh y col., 2014; Guzmán y col., 2007).

En nuestro laboratorio, los péptidos obtenidos por síntesis química y enzimática, o de fuentes naturales; son habitualmente investigados en torno a sus actividades antimicrobianas, antihipertensivas, anticoagulantes, antiinflamatorias, citoprotectora gastroduodenal, anti quorum sensing, irritante dérmica y alergológicas (Barberis y col., 2015; Origone y col., 2015; Barberis y col., 2018; Origone y col., 2018; Barcia y col., 2018a,b; Bersi y col., 2018).

A continuación se presenta la actividad anticoagulante *in vitro* del péptido antihipertensivo Tyr-Gln-Gln-OH.

La actividad anticoagulante del péptido Tyr-Gln-Gln-OH se determinó mediante Wiener Lab Test, tal como se describió en el Capítulo 2: Metodologías. Los test APTT y PT comúnmente permiten detectar anomalías en la vía intrínseca y extrínseca de la coagulación, respectivamente, mientras que el test TT permite detectar el contenido y la actividad coagulante del fibrinógeno en la vía común de la coagulación (Thiruvankatarajan y col., 2014).

El péptido Tyr-Gln-Gln-OH (sintetizado químicamente), actuó en la vía intrínseca de la cascada de coagulación, específicamente sobre algunos factores de la misma (VIII, IX, XI y XII) incrementando 105% el tiempo de coagulación con respecto al control (Tabla 17). Según la literatura, el ensayo de laboratorio ampliamente utilizado para monitorear la terapia de anticoagulación con heparina fraccionada, es APTT. Un

rango terapéutico aceptado para el APTT es 1,5 a 2,5 veces el valor de control (Eikelboom y Hirsh, 2006). En este caso, el valor observado para Tyr-Gln-Gln-OH es de 2 veces el valor del control.

Al comparar Tyr-Gln-Gln-OH con el control (+): heparina (0,7ppm), se observó que el valor de APTT de Tyr-Gln-Gln-OH fue 32% más alto que Heparina, lo que puso de manifiesto su potencial no solo como agente antihipertensivo sino también como anticoagulante.

Tabla 17. Test de coagulación para evaluar la actividad anticoagulante del tripéptido Tyr-Gln-Gln (YQQ), obtenido por síntesis química. APTT: Tiempo Parcial de Tromboplastina Activado. PT: Tiempo de Protrombina. TT: Tiempo de Trombina.

	APTT(s) Control: 36s	PT(s) Control: 14s	TT(s) Control: 20s
Valores de Referencia	30-43	10-14	17-21
YQQ	74	16	16
Heparina	56	33	31

Ensayos de toxicidad aguda de los péptidos sintetizados en ensayos in vitro, utilizando líneas celulares

Toxicidad aguda *in vitro* de Tyr-Gln-Gln-OH (YQQ)

La Figura 44 muestra el porcentaje de viabilidad celular después de la exposición de la línea celular humana 293 FT a diferentes concentraciones del péptido Tyr-Gln-Gln-OH (0,7 a 21 ppm), durante 4 horas a 37 °C en atmósfera de 5% de aire enriquecido en CO₂.

El método de Kruskal-Wallis se usó para probar las diferencias significativas entre los valores de viabilidad celular después de exponer la línea celular humana 293FT a diferentes concentraciones de Tyr-Gln-Gln-OH y los Controles positivo (C +) y negativo (C-) (McDonald, 2014).

El péptido Tyr-Gln-Gln-OH, sintetizado por vía química, no produjo ninguna disminución significativa ($p \leq 0.05$) en la supervivencia celular bajo las condiciones de la prueba de toxicidad. Bajo algunas condiciones de tratamiento, se midieron las tasas de supervivencia por encima del control (100%). Sin embargo, como estas diferencias son inferiores al 10%, no se consideran un efecto proliferativo significativo (Escobar y col., 2010). Probablemente, este efecto puede estar relacionado con el fenómeno de

hormesis, que es un término comúnmente utilizado por los toxicólogos para referirse a una respuesta de dosis bifásica a un agente ambiental. Se caracteriza por baja dosis de estimulación o efecto beneficioso y alta dosis de efecto inhibitor o tóxico (Mattson, 2008). Según la prueba de Kruskal-Wallis, Tyr-Gln-Gln-OH no fue citotóxico en ensayos *in vitro* a las concentraciones analizadas.

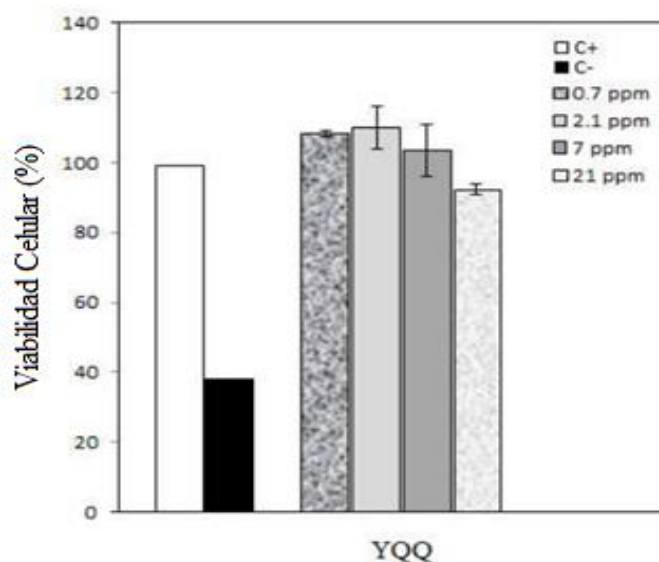


Figura 44. Actividad citotóxica *in vitro* de Tyr-Gln-Gln-OH sobre la línea celular 293FT (aislado clonal derivado de células renales embrionarias humanas).

Determinación de la estabilidad de los péptidos sintetizados

Estabilidad de Tyr-Gln-Gln-OH (YQQ) en plasma humano

La Figura 45 muestra la actividad anticoagulante retenida (TT, PT y APTT) del péptido YQQ como una función del tiempo de incubación (min) en un pool de plasma humano de individuos sanos. Según dicha figura, el péptido Tyr-Gln-Gln-OH conservó entre 82% y 93% del tiempo de trombina (TT), el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT), después de 15 min de incubación en plasma humano sano. Estos resultados muestran la alta estabilidad de los péptidos sintetizado en el rango de tiempo estudiado.

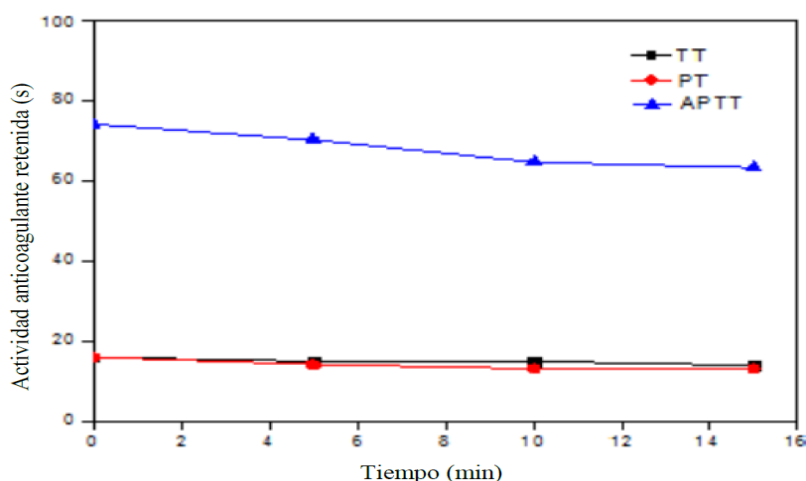


Figura 45. Actividad anticoagulante retenida en un pool de plasma humano de individuos sanos después de su incubación con 0,7ppm de Tyr-Gln-Gln-OH (YQQ), en función del tiempo; expresada como: Tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT), Tiempo de protrombina (PT) y Tiempo de coagulación de trombina (TT). APTT Control: 36 s; Control TP: 14 s; Control TT: 20 s.

Determinación cuantitativa de fibrinógeno en plasma humano en presencia de los péptidos sintetizados, por el método inmunturbidimétrico

La Tabla 18 muestra el efecto de Tyr-Gln-Gln-OH (YQQ) sobre la enzima trombina.

Tabla 18: Efecto del péptido Tyr-Gln-Gln-OH (YQQ) sobre la enzima trombina, usando la determinación cuantitativa de fibrinógeno en plasma mediante el método inmunturbidimétrico.

	Concentración de Fibrinógeno (mg/ml)	Inhibición (%)
Blanco	0,83	(a)
Control (-)	0,50	(b)
Control (+)	0,65	18
YQQ	0,53	4

(a) Contenido total de fibrinógeno en la muestra (sin trombina), (b) Contenido del fibrinógeno restante en la muestra después de la acción de trombina, bajo las condiciones de estudio. Control (-): 5,69 mg/ml de fibrinógeno en buffer de ensayo, con trombina (2,7 NIH/ml). Control (+): 5,69 mg/ml de fibrinógeno en buffer de ensayo, con trombina (2,7 NIH/ml) y heparina (0,7 ppm).

Según nuestros resultados, Tyr-Gln-Gln-OH (YQQ) solo causó el 4% de inhibición de trombina. Este hecho explica la acción de YQQ en las vías intrínsecas de la cascada de la coagulación en algún punto anterior del factor X, como se demostró previamente mediante los valores APTT (Tabla 17). El factor X produce el factor Xa (activado) que permite la conversión de protrombina (II) en trombina (IIa); y ésta cataliza la conversión de fibrinógeno en fibrina y la formación del coágulo (Figura 46)

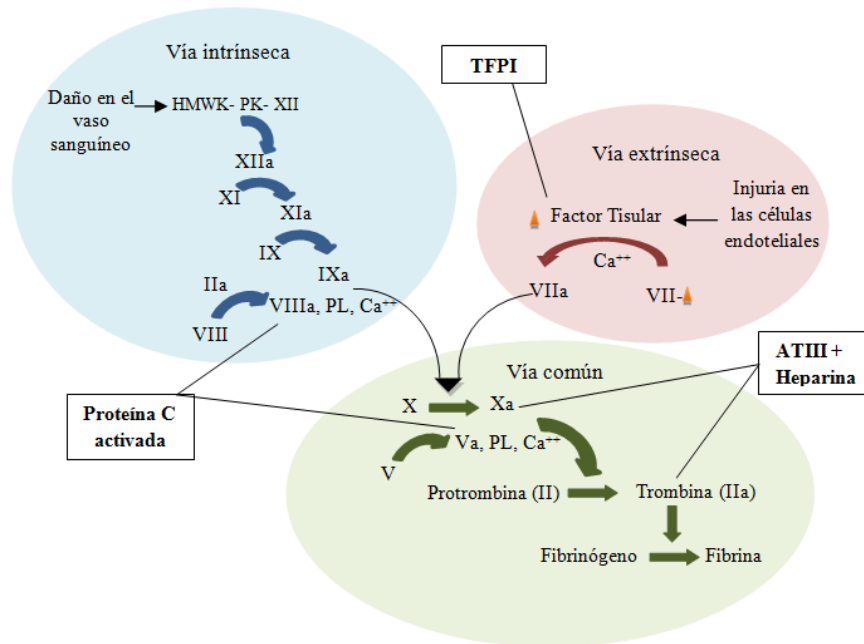


Figura 46. Esquema de la cascada de coagulación. En letra negrilla, los factores anticoagulantes. HMWK: quinínogeno de alto peso molecular; PK: precalicreína; ATIII: antitrombina; TFPI: inhibidor de la vía del factor tisular; PL: fosfolípido.

CAPITULO 4

CONCLUSIONES

El objetivo general de este trabajo fue aplicar proteasas pre-purificadas de los frutos de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae), una planta superior que crece en Argentina; en forma soluble, suspendida o inmovilizada, y en sistemas acuoso-orgánicos, como un nuevo catalizador de la síntesis total o parcial de péptidos bioactivos con potencial actividad *antihipertensiva* y *antimicrobiana*, de interés como conservantes alimentarios y nutracéuticos.

Para seleccionar los medios de reacción más promisorios de las síntesis de péptidos, se estudió el efecto de los solventes orgánicos (con diferente grado de hidrofobicidad e hidratación) sobre la actividad proteolítica inicial y la estabilidad operacional de *antiacanthaína* en sistemas homogéneos, macroheterogéneos y microheterogéneos, utilizando la enzima libre e inmovilizada en glioxil sílica.

Los medios de reacción más promisorios fueron los formados por el sistema homogéneo formado por metanol 30 % (v/v) y buffer Tris-HCl (0,1 M) pH 8, y el sistema macroheterogéneo formado por acetato de etilo 50% (v/v) y buffer Tris-HCl (0,1 M) pH 8. En ellos, *antiacanthaína* expresó 60 % y 108 % de la actividad proteolítica en buffer Tris-HCl. No obstante, la mayoría de los medios bifásico estudiados fueron activantes y estabilizantes para la enzima. Por el contrario, en los sistemas microheterogéneos (solventes orgánicos con bajo contenido acuoso, X_w en la enzima: 1×10^{-5}) *antiacanthaína* expresó muy bajas actividades proteolíticas, respecto de la obtenida en buffer Tris-HCl (0,1M) pH 8.

El efecto de los de los solventes orgánicos sobre la estructura secundaria de *antiacanthaína A* se estudió por FTIR y se evaluó mediante el coeficiente de similitud espectral (r), tomando como referencia la estructura secundaria obtenida en buffer Tris-HCl (0,1 M) pH 8. *Antiacanthaína A* en los sistemas acuosos – orgánicos estudiados tuvo baja similitud espectral respecto de buffer; pero mientras algunas estructuras secundarias le impidieron expresar su actividad proteolítica otras le produjeron activación, tal es el caso de acetato de etilo y hexano (50% (v/v)). En consecuencia, los cambios estructurales de *antiacanthaína A* por efecto de los solventes orgánicos no permiten justificar las actividades catalíticas de *antiacanthaína* en los medios acuoso – orgánicos estudiados.

La selección del donador de acilo para las reacciones de síntesis se realizó

mediante un estudio de las preferencias de *antiacanthaína* por diversos derivados aminoácidos sintéticos, en los medios de reacción previamente descritos. *Antiacanthaína* en buffer Tris-HCl (0,1 M) pH 8 y en metanol (30 % (v/v)) exhibió amplia preferencia por los derivados aminoácidos no polares, mientras que en acetato de etilo (50 % (v/v)) mostró preferencia por los aminoácidos polares.

A partir de la base de datos BIOPEP (2012) y tomando como base las preferencias de *antiacanthaína*, se seleccionaron los péptidos: Tyr-Leu-OH (YL) y Tyr-Val-Leu-OH (YVL), con actividad antihipertensiva y antimicrobiana *in vitro*, respectivamente; con el objeto de sintetizar por vía química y enzimática los *análogos* o sus *precursores*.

Además, y con el mismo objetivo, se seleccionaron otros péptidos obtenidos de *novo* en el Laboratorio de Bromatología (UNSL), a partir de hidrolizados de derivados casearios (Bersi y col., 2018). Resultó de particular interés el tripéptido Tyr-Gln-Gln (YQQ), puesto que dicha secuencia no se encuentra reportada en las bases de datos de péptidos bioactivos, tales como: PepBank, PeptideDB, BIOPEP; ni en las bases de datos de péptidos antimicrobianos APD2, Antimicrobial Peptide Database.

Se obtuvieron con éxito los péptidos N- α -CBZ- Tyr-Leu-OH (Z-YL, análogo de YL) y N- α -CBZ-Tyr-Val-OH (Z-YV, análogo del precursor (YV) de YVL) por síntesis enzimática bajo control cinético en acetato de etilo 50% (v/v), utilizando *antiacanthaína* en forma libre como catalizador, con rendimientos en producto de 63 % y 52 % respectivamente. El grado de conversión de sustrato limitante en producto fue de 75 % y 100 %, respectivamente. Este hecho fue debido a la reacción competitiva de hidrólisis del sustrato, dando el producto de hidrólisis N- α -CBZ- Tyr-OH.

En cambio, en metanol 30% (v/v) la reacción de síntesis enzimática bajo control cinético dio lugar a la formación de los tetrapéptidos N- α -CBZ-Tyr-(Leu)₂-Leu-OH y N- α -CBZ-Tyr-(Val)₂-Val-OH, en lugar de los dipéptidos esperados; los cuales fueron dilucidados por espectroscopía de masas y poseen m/z: 654,85 y 612,58, respectivamente.

Finalmente, se logró la síntesis quimo-enzimática del tripéptido híbrido N- α -CBZ-Tyr-Leu-Leu (Z-YLL, derivado de beta lactofina (Tyr-Leu-Leu-Phe) proveniente de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, en dos etapas que incluyeron la SPPS de Leu-Leu, y la unión de éste a N- α -CBZ-Tyr-pNO por síntesis enzimática, utilizando acetato de etilo (50%(v/v)) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 9) como medio de reacción. La

identidad y el peso del molecular del tripéptido Z-YLL fueron dilucidados por ESI-MS.

La actividad antihipertensiva de Z-YL (análogo de YL, sintetizado por vía enzimática), YQQ (péptido de *novo*, sintetizado por SPPS) y Z-YLL (péptido híbrido, sintetizado por vía quimo-enzimática); se evaluó como actividad inhibitoria de la ECA en ensayos *in vitro*.

Sorprendentemente, el péptido híbrido (Z-YLL) sintetizado por vía quimo-enzimática presentó un porcentaje de inhibición de la ECA notablemente superior (93%) al informado en la bibliografía para YL (84%). Además, el péptido YQQ sintetizado (de *novo*) en nuestro laboratorio por SPPS presentó un porcentaje de inhibición de 85%.

La actividad antimicrobiana de YVL (sintetizado por SPPS); YV (precursor de YVL, sintetizado por SPPS) y Z-YV (análogo del precursor YV, sintetizado por vía enzimática); se evaluó en un cultivo de bach a escala de laboratorio, frente a una cepa grampositiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) y frente a una cepa gramnegativa (*Escherichia coli* ATCC 25922).

Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de YVL, YV y Z-YV frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fueron 57µg/ml, 49µg/ml y 50µg/ml, respectivamente. Estos resultados fueron 83, 57 y 61% mayores que la CIM de oxacilina (31,1µg/ml). En consecuencia los péptidos YVL, YV y Z-YV presentaron un efecto bacteriostático contra *S. aureus*.

Las CIM de YVL, YV y Z-YV frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 fueron 32µg/ml, 57µg/ml y 54µg/ml, respectivamente. Estos resultados fueron 1,5; 2,6 y 2,5 veces mayores que la CIM de ácido nalidíxico (21,7µg/ml). En consecuencia, los péptidos YVL, YV y Z-YV, presentaron un efecto bacteriostático contra *E. coli*.

Por otra parte, la actividad anticoagulante del péptido YQQ (sintetizado químicamente) se determinó mediante Wiener Lab Test. Según dicho test, YQQ actuó en la vía intrínseca de la cascada de coagulación, específicamente sobre algunos factores de la misma (VIII, IX, XI y XII), incrementando 105% el tiempo de coagulación con respecto al control. Mediante la determinación cuantitativa de fibrinógeno en plasma humano por el método inmunturbidimétrico, se demostró que YQQ solo causó 4% de inhibición de trombina, ratificando que YQQ actúa en la vía intrínseca de la cascada de la coagulación en algún punto anterior del factor X. Este

factor produce el factor Xa (activado) que permite la conversión de protrombina (II) en trombina (IIa), y ésta cataliza la conversión de fibrinógeno a fibrina y la formación del coágulo.

El valor de Tiempo Parcial de Tromboplastina Activado (APTT) observado para YQQ es 2 veces el valor del control (siendo el rango terapéutico aceptado 1,5 a 2,5 veces el valor del control de APTT) y 32% más alto que el valor de APTT para Heparina. Dichos resultados pusieron de manifiesto su potencial no solo como agente antihipertensivo sino también como anticoagulante. Además, se demostró que el péptido YQQ retuvo la actividad anticoagulante en un pool de plasma humano de individuos sanos, demostrando la alta estabilidad del péptido sintetizado en el rango de tiempo estudiado.

La toxicidad aguda del péptido YQQ se determinó como porcentaje de viabilidad celular después de la exposición de la línea celular humana 293 FT a diferentes concentraciones del péptido YQQ, durante 4 horas a 37 °C en atmósfera de 5% de aire enriquecido en CO₂. El péptido YQQ no fue citotóxico en ensayos *in vitro* a las concentraciones estudiadas, ya que no produjo disminución significativa ($p \leq 0,05$) en la supervivencia celular en tales condiciones, según la prueba de Kruskal-Wallis. Bajo algunas condiciones de tratamiento, se midieron las tasas de supervivencia por encima del control (100%). Sin embargo, como estas diferencias son inferiores al 10% no se consideran un efecto proliferativo significativo y parecen estar relacionadas con el fenómeno de hormesis, que se caracteriza por producir estimulación o efecto beneficioso a bajas dosis y efecto inhibitorio o tóxico a altas dosis.

En general, este trabajo aporta nuevas estrategias y productos de interés para la industria alimenticia que implican una expansión del mercado actual en materia de nutracéuticos y conservantes alimentarios seguros, y la potencial transferencia de resultados al sector socio-productivo interesado en los mismos.

CAPITULO 5

PROYECCIONES FUTURAS

Los péptidos son polímeros que contienen entre dos y pocas docenas de aminoácidos, con límite de masa molecular de 6000 Da, y de relevancia para la salud y la nutrición.

Si bien existen diversas tecnologías de producción de péptidos bioactivos, la síntesis química y enzimática representan la mejor opción para la síntesis de péptidos pequeños y medianos. La falta de especificidad y la carga ambiental asociada a la síntesis química de péptidos puede superarse en principio mediante biocatálisis enzimática, pero las estrategias disponibles para la síntesis enzimática están en su mayor parte en fase de desarrollo y no existen protocolos para la validación y escalamiento. En la práctica, esto significa que solo los péptidos pequeños (principalmente dipéptidos) se pueden sintetizar de manera eficiente y rentable. Esta situación puede evolucionar en virtud del creciente desarrollo de la biocatálisis en medios no convencionales. La combinación de la síntesis química y enzimática de péptidos constituye una opción tecnológica valiosa, ya que las buenas propiedades de cada tecnología se pueden usar sinérgicamente en el contexto de un objetivo del proceso, y este trabajo constituye un avance en este sentido.

En contraste con el amplio desarrollo de péptidos terapéuticos, la producción comercial de péptidos bioactivos con propiedades específicas para uso alimenticio (nutracéuticos, alimentos funcionales y conservantes) es escaso, aunque es un ámbito de intensa investigación.

La industria alimenticia advierte sobre la necesidad de desarrollar nuevos conservantes alimenticios eficientes y seguros. El uso masivo de los métodos de conservación ha desarrollado resistencia a diferentes tratamientos por diversos patógenos alimentarios. Sin embargo, hasta el momento los únicos péptidos aprobados para su comercialización y utilización en alimentos son nisina (de origen bacteriano) y lisozima (de origen animal).

Al mismo tiempo, la hipertensión arterial afecta aproximadamente al 25% de la población adulta en todo el mundo, y se prevé que alcanzará el 29% de la población para 2025, lo que representa un total de 1.560 millones de personas. Está asociada con varias enfermedades cardiovasculares, como aterosclerosis, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular y su prevención disminuiría las tasas de morbilidad. Sin

embargo, no existen alimentos funcionales contenido péptidos antihipertensivos o formulaciones nutraceuticas (antihipertensivas) aprobadas para su comercialización.

En consecuencia, las proyecciones de las investigaciones futuras están centradas en llevar a cabo estudios vinculados a la actividad inhibitoria *in vivo* de los péptidos sintetizados en este trabajo de Tesis. Asi como también, en evaluar la efectividad e inocuidad, mecanismos moleculares de actividad, farmacocinética y posibles efectos adversos de los péptidos análogos, de *novo* e híbridos obtenidos en el desarrollo de esta Tesis doctoral.

BIBLIOGRAFÍA

Abbott, A.P.; Harris, R.C.; Ryder K.S.; Agostino, C.D.; Gladden, L.F. and M.D. Mantle (2011). Glycerol eutectics as sustainable solvent systems. *Green Chemistry*. 13: 82–90.

Abe, Y.; Kude, K.; Hayase, S.; Kawatsura, M.; Tsunashima, K. and T. Itoh (2008). Design of phosphonium ionic liquids for lipase-catalyzed transesterification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 51: 81–85.

Adje, E.Y.; Balti, R.; Kouach, M.; Guillochon, D. and N. Nedjar-Arroume (2011). α 67–106 bovine hemoglobin: A new family of antimicrobial angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *European Food Research and Technology*. 232: 637–646.

Ageitos, J.M.; Baker, P.J.; Sugahara, M. and K. Numata (2013). Proteinase K-catalyzed synthesis of linear and star oligo(L-phenylalanine) conjugates *Biomacromolecules*. 14: 3635-3642.

Ahn, C. B.; Cho, Y.S. and J.Y. Je (2015). Purification and anti-inflammatory action of tripeptide from salmon pectoral fin byproduct protein hydrolysate. *Food Chemistry*. 168: 151–156.

Ahrenberg, M.; Brinckmann, M.; Schmelzer, J.W.P.; Beck, W.; Schmidt, C.; Kebler, O.; Kragl, U.; Verevkin, P.V. and C. Schick (2014). Determination of volatility of ionic liquids at the nanoscale by means of ultra-fast scanning calorimetry. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 16: 2971-2980.

Albericio, F., (2004). Developments in peptide and amide synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*. 8: 211-221.

Alemán, A.; Pérez-Santín, E.; Bordenave-Juchereau, S.; Arnaudin, I.; Gómez-Guillén, M.C. and P. Montero (2011). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*. 44: 1044–1051.

Aluko, R.E.; Girgih, A.T.; He, R.; Malomo, S.; Li, H. and M. Offengenden (2015). Structural and functional characterization of yellow field pea seed (*Pisum sativum L.*) protein derived antihypertensive peptides. *Food Research International*. 77: 10-16.

Angell, C.A.; Ansari, Y. and Z. Zhao (2012). Ionic liquids: past, present and future. *Faraday Discussions*. 154: 9–27.

Aso, K. and H. Kodaka (1992). Trypsin-catalyzed oligomerization of L-Lysine Esters. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 56: 755-758.

Aymonier, C.; Le Meur, A.C. and V. Heroguez (2011). Synthesis of nanocomposite particles using supercritical fluids: a bridge with bio-applications. In: *Nanocomposite particles for bio-applications: materials and bio-interfaces*. (T. Trindade, A.L.D. da Silva Ed.), 145- 164 pp. Singapore: Pan Stanford Publishing Pte.

Baker, P.J. and K. Numata (2013). Polymerization of peptide polymers for biomaterial applications. In: *Polymer Science* (F.Yilmaz Ed.), 229–246 pp. Intech: Rijeka, Croatia.

Bancerz, R.; Ginalska, G.; Fiedurek, J. and A. Gromada (2005). Cultivation conditions and properties of extracellular crude lipase from the psychrotrophic fungus *Penicillium chrysogenum* 9'. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 6 (32): 253-260.

Banfi, D.; Mutter, M. and L. Patiny (2004). Versatile synthesis of Boc protected hydrazinoacetic acid and its application to the chemoselective ligation of TASP molecules. *Protein and Peptide Letters*. 11 (6): 539-542.

Barberis, S.; Quiroga, E.; Arribére, M.C. and N. Priolo (2002). Peptide synthesis in aqueous-organic biphasic systems catalyzed by a protease isolated from *Morrenia brachysthephana* (Asclepiadaceae). *Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 17 (1): 39-47.

Barberis, S.; Quiroga, E.; Morcelle, S.; Priolo N and J.M. Luco (2006). Study of phytoproteases stability in aqueous-organic biphasic systems using linear free energy relationships. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 38: 95-103.

Barberis, S.; Guzmán, F.; Illanes, A. and J. López-Santín. (2008). Study cases of enzymatic processes. In: *Enzyme biocatalysis: principles and applications* (A. Illanes Ed.), Chapter 6, 253-273 pp. Springer Science + Business Media B.V. 275 page. ISBN: 978-1-4020-8360-0. Berlin, Heidelberg, NY.

Barberis, S.; Bersi, G.; Origone, A.; Adaro, M. and J. Magallanes (2015). Nuevos ingredientes alimenticios con actividad anticoagulante a partir de las proteínas solubles de queso de cabra. *Actas del Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos-XV CYTAL*. http://aata-cytal2015.com.ar/data/arch_cont/trabajos/395.docx

Barberis, S.; Quiroga, H.G.; Barcia, C.; Talia, J.M. and N. Debattista (2018). Natural food preservative against microorganisms. Review. In: *Food safety and preservation: Modern biological approaches to improving consumer health* (A. M. Grumezescu and A. M. Holban, Ed.). 621–629 pp. Academic Press and Elsevier Inc. London, United Kingdom.

Barberis, S.; Adaro, M.; Origone, A.; Bersi, G.; Guzmán, F. and A. Illanes (2018). Peptide synthesis using proteases as catalyst. In: *Biotechnological applications of plant proteolytic enzymes* (M.G. Guevara and G.R. Daleo Ed.), Springer Nature Life Science.

Barcia, C.; Quiroga, E.; Ardanaz, C.; Quiroga, G. and S. Barberis (2009) *Acacia caven* (Mol.) Molina pollen proteases. Application to the peptide synthesis and to laundry detergents. In: *Biochemical Engineering. Series: Biotechnology in Agriculture, Industry and Medicine* (F.E. Dumont and J.A. Sacco, Ed.). Chapter 13, 293-316 pp. Nova Publisher. ISBN: 978-1-60741-257-1. USA.

Barcia, C.; Coelho, A.S.; Veríssimo, P. and S. Barberis (2018a). Purification of a novel aminopeptidase from the pollen of *Acacia caven*, potentially involved in respiratory allergic diseases. *Enviado a publicar*.

Barcia, C.; Barberis, S. and A. María (2018b) Gastroduodenal protective activity of *Acacia caven* pollen: an experimental biochemical study. *En redacción*.

Barth, A. (2000). The infrared absorption of amino acid side chains. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. 74:141–173.

Bechinger, B. and K. Lohner (2006). Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *BBA Biomembranes*. 1758: 1529–1539.

Bernal, C.; Sierra, L. and M. Mesa (2011). Application of hierarchical porous silica with a stable large porosity for *b-galactosidase* immobilization. *ChemCatChem*. 3: 1948–1954.

Bernal, C.; Sierra, L. and M. Mesa (2012). Improvement of thermal stability of β -galactosidase from *Bacillus circulans* by multipoint covalent immobilization in hierarchical macro-mesoporous silica. *Journal of Molecular Catalysis Enzymatic*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.05.023>.

Bernal, C.; Guzman, F.; Illanes, A. and L. Wilson (2017). Selective and eco-friendly synthesis of lipoaminoacid-based surfactants for food, using immobilized lipase and protease biocatalysts. *Food Chemistry*. 15 (239): 189-195.

Berger, A.I. and P. Schechter (1970). Mapping the active site of papain with the aid of peptide substrates and inhibitors. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*. 257(813): 249-264.

Bersi, G.; Origone, A.; Adaro, M. and S. Barberis (2018). Bioactive peptides as functional food ingredients. In: Handbook of Food Bioengineering. Role of Materials Science in Food Bioengineering (A.M. Grumezescu and A.M. Holban Ed.), Volume 19, Chapter 5, 147-174 pp. Elsevier. 553 page. ISBN: 978-0-12-811448-3. London, United Kingdom.

Bhat, Z.F.; Kumar, S., and H.F. Bhat (2017). Antihypertensive peptides of animal origin: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57 (3): 566-578. doi:10.1080/10408398.2014.898241

BIOPEP, 2012. <http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>

BIOPEP, 2018. <http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>

Björup, P.; Torres, J.; Adlercreutz, P. and P. Clapés (1998). Reaction medium engineering in enzymatic peptide fragment condensation: synthesis of eledoisin and LH-RH. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 6 (7): 891-901.

Bode, J.W.; Fox, R.M. and K.D. Baucom (2006). Chemoselective Amide Ligations by Decarboxylative Condensations of *N*-Alkylhydroxylamines and α -Ketoacids. *Angewandte Chemie*. 8 (118): 1270-1274.

Bordusa, F (2002). Proteases in organic synthesis. *Chemical Reviews*. 102: 4817–4867.

Bordusa, F.; Ullmann, D. and H.D. Jakubke (1997). Peptide synthesis from N- to C-terminus: an advantageous strategy using protease catalysis. *Angewandte Chemie International Edition*. 36: 1099-1101.

Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemical*. 72: 248-254.

Braeutigam, S.; Meyerand, S.B. and D.W. Botz (2007). Asymmetric whole cellbiotransformations in biphasic ionic liquid/water-systems by use of recombinant *Escherichia coli* with intracellular cofactor regeneration. *Tetrahedron: Asymmetry*. 18: 1883–1887.

Bray, B.L. (2003). Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2 (7): 587-593.

Brunner, G. (2010). Applications of supercritical fluids. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*. 1: 321-342.

Byler, D.M. and H. Susi (1986). Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers*. 3 (25): 469-487.

Cao, S.L.; Xu, H.; Xue-Hui, L.; Wen-Yong, L. and Z. Min-Hua (2015). Papain@magnetic nanocrystalline cellulose nanobiocatalyst: a highly efficient biocatalyst for dipeptide biosynthesis in deep eutectic solvents. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 3: 1589–1599.

Cao, C. and T. Matsuda (2016). Biocatalysis in organic solvents, supercritical fluids and ionic liquids. In: *Organic Synthesis Using Biocatalysis* (A. Goswami and J.D. Steurart Ed.), Chapter 3, 67-97 pp. Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-411518-7000135>.

Caminiti, R. and L. Gontrani (Ed.) (2014). *The Structure of Ionic Liquids*, 193 page., Springer International Publishing, ISBN: 978-3-319-01697-9, Berlin, Germany.

Carmona, K.A.; Schwager, S. and E.D. Sturrock (2006). A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I- converting enzyme assay. *Nature Protocols*. 1 (4): 1971-1976. DOI: 10.1038/nprot.2006.306

Carrea G. and Riva S. (2000), Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. *Angewandte Chemie*. 39: 2226–2254.

Castro, G.R. (2000). Properties of soluble α -chymotrypsin in neat glycerol and water. *Enzyme and Microbial Technology*. 27: 143-150.

Chakrabarti, S., Jahandideh, F. and J. Wu. (2014). Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. *BioMed Research International*. 1-11.

Chen, F.; Zhang, F.; Wang, A.; Li, H.; Wang, Q.; Zeng, Z.; Xie, T. (2010). Recent progress in the chemo-enzymatic peptide synthesis. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 4: 721–730.

Cheng, H.N. (2010). Enzyme-catalyzed synthesis of polyamides and polypeptides. In: *Biocatalysis in Polymer Chemistry* (K. Loos Ed.), 131–141pp. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, Germany.

Cheung, H.S.; Wang, F.L.; Ondetti, M.A.; Sabo, E.F. and D.W. Cushman (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *The Journal of Biological Chemistry*. 255 (2):401-407.

Chiappe, C. and Rajamani, S. (2011). Structural effects on the physico-chemical and catalytic properties of acidic ionic liquids: An overview. *European Journal of Organic Chemistry*. 28: 5517–5539.

Chin, J.H.; Raja Noor, Z.A.R.; Abu B.S. and B. Mahiran (2003). A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus*205y producing organic solvent-stable lipase. *Biochemical Engineering Journal*. (15) 2: 147–151.

Chiva, C.; Barthe, P.; Codina, A.; Gairi, M.; Molina, F.; Granier, C.; Pugnière, M.; Inui, T.; Nishio, H.; Nishiuchi, Y.; Kimura, T.; Sakakibara, S.; Albericio, F. and E. Giralt (2003). Synthesis and NMR structure of p41icf, a potent inhibitor of human cathepsin L. *Journal of the American Chemical Society*. 125: 1508-1517.

Clapés, P., Espelt, L., Navarro, M.A., Conxita, S. 2001. Highly concentrated water in oil emulsions as novel reaction media for protease-catalysed kinetically controlled peptide synthesis. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions*. 2: 1394-1399.

Corrons, M.; Bertucci, J.; Liggieri, C.; López, L. and M. Bruno (2012). Milk clotting activity and production of bioactive peptides from whey using *Maclura pomifera* proteases. *LWT-Food Science and Technology*. 47: 103-109.

Cruz, J.; Ortiz, C.; Guzmán, F.; Fernández-Lafuente, R. and R. Torres (2014). Antimicrobial peptides: promising compounds against pathogenic microorganisms. *Current Medicinal Chemistry*. 21: 2299-2321.

Cunningham, C. and A.J. Porter (1997). Recombinant proteins from plants – production and isolation of clinically useful compounds. Totowa, N.J; Humana Press, *Methods in Biotechnology*. 3: 308.

Cushman, D.W.; Cheung, H.S.; Sabo, E.F. and M.A. Ondetti (1977). Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxylalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry*, 16: 5484-5491.

Daniel, R.M.; Dunn, R.V.; Finney, J.L. and J.C. Smith (2003). The role of dynamics in enzyme activity. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 32: 69–92.

Das, R.; Dutta, A. and C. Bhattacharjee (2012). Preparation of sesame peptide and evaluation of antibacterial activity on typical pathogens. *Food Chemistry*. 131 (4): 1504-1509.

Dawson, P.E.; Muir, T.W.; Clark-Lewis, I. and S.B. Kent (1994). Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*. 266 (5186): 776-779.

de Castro, R. J. S. and Sato, H. H. (2016). Simultaneous hydrolysis of proteins from different sources to enhance their antibacterial properties through the synergistic action of bioactive peptides. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 8: 209-212. doi:10.1016/j.bcab.2016.09.014

de Castro, R.J.S. and H.H. Sato (2015). Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International*. 74: 185–198.

Degn, H.; Bohatka, S. and D. Lloyd (1992). Enzyme activity in organic solvent as a function of water activity determined by membrane inlet mass spectrometry. *Biotechnology Techniques*. 6: 161-164.

Diego, T.D.; Lozano, P.; Abad, M.A.; Steffensky, K.; Vaultier, M.J. and L. Iborra (2009). On the nature of ionic liquids and their effects on lipases that catalyze ester synthesis. *Journal of Biotechnology*. 140: 234–241.

Díaz-Álvarez, A.E.; Francos, J.; Lastra-Barreira, B.; Crochet, P. and V. Cadierno (2011). Glycerol and derived solvents: new sustainable reaction media for organic synthesis. *Chemical Communications*. 47: 6208–6227.

Domínguez de María, P. (Ed) (2012). *Ionic Liquids in Biotransformation and Organocatalysis: Solvents and Beyond*, Wiley, 1 - 456 pp, ISBN: 978-0-470-56904-7.

Dong, A.; Huang, P. and W.S. Caughey (1990). Protein secondary structure in water from second-derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry*. 29: 3303–3308.

Dong, A. and W.S. Caughey (1994). Infrared methods for study of hemoglobin reactions and structures. *Methods Enzymology*. 232: 139–175.

Dong, A.C.; Prestrelski, S.J.; Allison, S.D. and J.F. Carpenter (1995). Infrared spectroscopic studies of lyophilization and temperature induced protein aggregation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 84: 415–424.

Dordick, J.S. (1992). Designing Enzymes for Use in Organic Solvents. *Biotechnology Progress*. 4 (8): 259-267.

Doukyu, N. and H. Ogino (2010). Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal*. 48: 270-282.

Du Vigneaud, V., Ressler, C., Swan, J.M., Robets, C.W., Katsoyannis, P.G., and S. Gordon (1953). The synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin. *Journal of the American Chemical Society*. 75, 4879-4880.

Eijsink, V.G.; Bjørk, A.; Gåseidnes, S.; Sirevåg, R.; Synstad, B.; van den Burg; B. and G.J. Vriend (2004). Rational engineering of enzyme stability. *Biotechnology Advances*. 113 (1-3): 105-120.

Earle, M.J.; Esperança, J.M.S.S.; Gilea, M.A.; Canongia Lopes, J.N.; Rebelo, L.P.N.; Luís, P.N.; Magee, P.J.W.; Joseph, W.; Seddon, K.R. and J.A. Widegren (2006). The distillation and volatility of ionic liquids. *Nature*. 439: 831–834.

Dziuba, J.; Minkiewicz, P.; Nałęcz, D. and A. Iwaniak (1999). Database of biologically active peptide sequences. *Nahrung*. 43: 190–195.

Erbeldinger, M.; Mesiano, A.J. and A.J. Russell (2010). Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid an alternative to enzymatic catalysis in organic solvents. *Biotechnology Progress*. 16: 1129–1131.

Erdős, E.G. (1975). Angiotensin I converting enzyme. *Circulation Research*. 36: 247–255.

FDA, 2016. <https://www.fda.gov/>

Feijoo-Siota, L. and T.G. Villa (2011). Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food and Bioprocess Technology*. 4: 1066-1088.

Fité, M.; Alvaro, G.; Clapés, P.; López-Santín, J.; Benaiges, M.D. and G. Caminal (2002). Reactivity of easily removable protecting groups for glycine in peptide synthesis using papain as catalyst. *Enzyme and Microbial Technology*. 23 (3-4): 199-203.

Fosgerau, K. and T. Hoffmann (2015). Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug discovery today*. 20: 122-128.

Fotakis, G. and J.A. Timbrell (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*. 160: 171-177.

Franco-Vega, A.; Palou, E.; Ramírez-Corona, N. and A. López-Malo (2014). Ionic liquids: a "green" alternative for extraction processes in the food industry. *Selected topics of food engineering*. 8: 15-26.

Freedonia Group (2016). Freedonia Group. World Enzymes, The Freedonia Group, Inc., Cleveland, Ohio. <https://www.freedoniagroup.com/>

Fukushima, Y.; Kajino, T. and T. Itoh (2006). Enzymes bio-molecular assemblies in nanospaces of mesoporous silica. *Current Nanoscience*. 2: 211–218.

Ghorbel, B.; Sellami-Kamoun, A. and N. Moncef (2003). Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology*. 5 (32): 513–518.

Gill, I.; López-Fandiño, R.L.; Jorba, X. and E.N. Vulfson (1996). Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enzyme and Microbial Technology*. 18: 162-183.

Gololobov, M.L.; Stepanov, V.M.; Voyushina, T.L. and P. Adlercreutz (1993). The second nucleophile molecule binds to the acyl-enzyme-nucleophile complex in alpha-chymotrypsin catalysis. Kinetic evidence for the interaction. *European Journal of Biochemistry*. 217: 955-963.

Gómez-Puyou, M.T. and A. Gómez-Puyou (1998). Enzymes in low water systems. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 33: 53-89.

Goodman, M. (2002). Houben–Weyl. Methods of Organic Chemistry: Synthesis of peptides and peptide mimetics, vol. E 22a, New York.

Gorke, J.; Sreenc, F. and R. Kazlauskas (2010). Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 15: 40–53.

Graber, M.; Irague, R.; Rosenfeld, E.; Lamare, S.; Franson, L and K. Hult (2007). Solvent as a competitive inhibitor for *Candida Antarctica lipase B*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1774: 1052–1057.

Guzmán, F. (2013). Síntesis de Péptidos. In: Genómica funcional. Fundamentos y Aplicaciones (M. Seeger Pfeiffer and G. Padrón Ed.), 121-138 pp. Valparaíso, Chile.

Guzmán, F.; Barberis, S. and A. Illanes (2007). Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*. 10: 279-314.

Hale, K.J. (Ed.) (2003). *The Chemical Synthesis of Natural Products*; Blackwell Science, 442 pages, ISBN-13: 978-0849397486, London, United Kingdom.

Hallett, J.P. and T. Welton (2011). Room-temperature ionic liquids: solvents for synthesis and catalysis. *Chemical Reviews*. 111: 3508–3576.

Halling, P.J (1994). Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme and Microbial Technology*. 16: 178 – 206.

Halling, P.J.; Eichhorn, U.; Kuhl, P. and H.D. Jakubke (1995) Thermodynamics of solid-to-solid conversion and application to enzymic peptide synthesis. *Enzyme and Microbial Technology*. 17 (7): 601-606.

Halling, P.J. (2002). Biocatalysis in neat organic solvents: Fundamentals. In: *Enzymatic Catalysis Organic Synthesis* (G. Carrea and S. Riva Ed.), (1) 259–285 pp. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. ISBN: 978-3-527-31846-9. Weinheim, Germany.

Hancock, R.E.W. and H.G. Sahl (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*. 24: 1551–1557.

Hayes, M.; Stanton, C.; Fitzgerald, G.F. and R.P. Ross (2007). Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: Bioactive peptide functions. *Biotechnology Journal*. 2: 435–449.

Hayes, R.; Warr, G.G. and R. Atkin (2015). Structure and nanostructure in ionic liquids. *Chemical Reviews*. 115: 6357–6426.

Heck, T.; Geueke, B.; Seebach, D.; Osswald, S.; Ter Wiel, M.K.J. and H.P.E. Kohler (2009). β -Aminopeptidases: enzymatic degradation and synthesis of β -amino acid containing peptides y kinetic resolution of β -amino acid amides. *New Biotechnology*. 25: Supplement, S62.

Hernández-Ledesma, B. And C.C. Hsieh (2013). Bioactive food peptide in health and disease. Intech, Croatia, 276 page. <http://dx.doi.org/10.5772/3318>

Hipkiss, A.R. and C. Brownson (2000). A possible new role for the anti-ageing peptide carnosine. *Cellular and Molecular Life Science*. 57: 747-753.

Hisamatsu, K.; Shiomi, T.; Matsuura, S.I.; Nara, T.Y.; Tsunoda, T. and F. Mizukami (2012). *a*-amylase immobilization capacities of mesoporous silicas with different morphologies and surface properties. *Journal of Porous Materials*. 19: 95–102.

Hotta, Y.; Ezaki, S.; Atomi, H and T. Imanaka (2002). Extremely stable and versatile carboxyesterase from a hyperthermophilic archaeon. *Applied and Environmental Microbiology*. (68): 3925-3931.

Hou, R.Z.; Zhang, N.; Li, G.; Huang, Y.B.; Wang, H.; Xiao, Y.P.; Liu, Y.J.; Yang, Y.; Zhao, L. and X.Z. Zhang (2005). Synthesis of tripeptide RGD amide by a combination of chemical and enzymatic methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 37 (1-6): 9-15.

Huang, P.L.; Huang, Z.; Mashimo, H., Bloch, K.D.; Moskowitz, M.A.; Bevan, J.A. and M.C. Fishman (1995). Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. 377 (6546): 239-242.

Huang, S.; Chen, K.N.; Chen, Y.P.; Hong, W.S. and M.J. Chen (2010). Immunomodulatory properties of the milk whey products obtained by enzymatic and microbial hydrolysis. *International Journal of Food Science Technology*. 45: 1061–1067.

Hussain, W.; Pollard, D.J.; Truppo, M. and G.J. Lye (2008). Enzymatic ketone reductions with co-factor recycling: improved reactions with ionic liquid co-solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 55: 19–29.

Illanes, A. (1999). Stability of biocatalysts. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2: 7-15.

Illanes, A. and A. Fajardo (2001). Kinetically controlled synthesis of ampicillin with immobilized penicillin acylase in the presence of organic cosolvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 11: 587-595.

Illanes, A. (2008). *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Springer science.

Illanes, A. and S.E. Barberis (1994). Catálisis enzimática en fase orgánica. En: *Bioteología de Enzimas. Monografía 35. Serie Biología*. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, D.C., USA, Ediciones Universitarias de Valparaíso. pp. 225-254, Valparaíso, Chile.

Illanes, A.; Guzmán, F. and S.E. Barberis (2009b). Aplicaciones emergentes en reacciones de síntesis. En: *Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores. Aplicaciones Industriales* (Néstor Caffini Ed.), Capítulo 17. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). pp. 201 - 219. ISBN: 1023 – 8645. Buenos Aires, Argentina.

Illanes, A.; Guzmán, F. and S. Barberis (2009a) Proteases as powerful catalysts for organic synthesis. In: *Amino Acids, Peptides y Proteins in Organic Chemistry* (A. B. Hughes Ed.), pp. 341-361. Vol. 2, Part Three: Enzymes. Wiley-VCH, 683 pag. ISBN: 978-3-527-32098-1. Weinheim, Alemania.

Illanes, A.; Cauerhff, A.; Wilson, L. and G.R. Castro (2012). Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresource Technology*. 115: 48–57.

Illanes, A. (2016). Biocatalysis in organic media. In: *White Biotechnology for Sustainable Chemistry* (M.A. Coelho and A. Machado de Castro Ed.), Chapter 3, 36-51 pp. RSC Publishing. ISBN: 978-1-84973-816-3. Rio de Janeiro, Brazil.

Ishimoto, R.; Sugimoto, M. and F. Kawai (2001). Screening and characterization of trehalose-oleate hydrolyzing lipase. *FEMS Microbiology Letters Journal*. 195 (2): 231-235.

Jaeger, V.; Burney, P. and J. Pfaendtner (2015). Comparison of three ionic liquid-tolerant cellulases by molecular dynamics. *Biophysical Journal*. 108: 880–892.

Jakubke, H.; Kuhl, P. and A. Konnecke (1985). Basic principles of protease-catalyzed peptide bond formation. *Angewandte Chemie–International Edition in English*, 24 (2): 85-93.

Jenssen, H.; Hamill, P. and R. Hancock (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 19: 491-511.

Kaiser, E.T.; Mihara, H.; Laforet, G.A.; Kelly, J.W.; Walters, L.; Findeis, M.A. and T. Sasaki. (1989). Peptide and protein synthesis by segment synthesis-condensation. *Science*. 243: 187–192.

Kanerva, L.T. and A.M. Klibanov (1989). Hammett analysis of enzyme action in organic solvents. *Journal of The American Chemical Society*. 111 (17): 6864–6865.

Kasche, V. (1996) Proteases in peptide synthesis. In: Proteolytic enzymes—apactical approach (R.J. Beynon and J.S. Nond Ed.), 2nd Edition, 125-143 pp. IRL Press. ISBN-10-0-19-963662-1. Oxford, United Kingdom.

Katzen, F.; Chang, G. and W. Kudlicki (2005). The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends in Biotechnology*. 23: 150-156.

Kendrick, B.S.; Dong, A.; Allison, S.D.; Manning, M.C. and J.F. Carpenter (1996). Quantitation of the area of overlap between second-derivative amide I infrared spectra to determine the structural similarity of a protein in different states. *Journal of Pharmaceutical Science*. 85: 155–158.

Kenjiro, Y. and N. Keiji (2014). Recent advances in chemoenzymatic peptide syntheses. *Molecules*. 19: 13755-13774.

Khandelwal, S.; Kumar Tailor, Y. and K. Mahendra (2016). Deep eutectic solvents (DESs) as eco-friendly and sustainable solvent/catalyst systems in organic transformations. *Journal of Molecular Liquids*. 215: 345–386.

Kim,J.; Clark, D.S. and J.S. Dordick (2000). Intrinsic effects of solvent polarity on enzymic activation energies. *Biotechnology and Bioengineering*. 67: 112–116.

Kimura, Y.; Muraya, K.; Araki, Y.; Matsuoka, H.; Nakanishi, K. and R. Matsuno (1990). Synthesis of peptides consisting of essential amino acids by a reactor system using three proteinases and an organic solvent. *Agricultural and Biological Chemistry*. 54 (12): 3331-3333.

Klibanov A.M. (1997). Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends in Biotechnology*. 15 (3): 97–101.

Klibanov, A. M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*. 409: 241–246.

Knez, Z.; Marko, E.; Leitgeb, M.; Primo, M.; Knez, M. and M. Skerget (2014). Industrial applications of supercritical fluids: A review. *Energy*. 77: 235-243.

Kosmulski, M.; Gustafsson, J. and J.B. Rosenholm (2004). Thermal stability of low temperature ionic liquids revisited. *Thermochimica Acta*. 412: 47-53.

Kousuke, T. and K. Numat (2017). Chemoenzymatic synthesis of polypeptides for use as functional and structural materials. *Macromolecular Bioscience*. 17: 1700-1777. DOI: 10.1002/mabi.201700177.

Krieger, N.; Bhatnagar, T.; Baratti, J. C.; Baron, A. M.; De Lima, V.M. and D. Mitchell (2004). Non-Aqueous Biocatalysis in Heterogeneous Solvent Systems. *Food Technology and Biotechnology*. (42) 4: 279-286.

Krimm, S, and J. Bandekar (1986). Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Advances in Protein Chemistry*. 38: 181-364.

Krowarsch, D.J.; Zakrzewska, M.; Smalas, A.O. and J. Otlewski (2005). Structure-function relationships in serine protease-bovine pancreatic trypsin inhibitor interaction. *Protein and Peptide Letters*.12: 403-407.

Kumar, D. and T.C. Bhalla (2005) Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 68 (6): 726-736.

Laitinen, H.A. and W.E. Harris (1975). *Chemical Analysis*, 2nd Edition, 611 pages, McGraw-Hill, New York.

Laverty, G.; Gorman, S.P. and B.F. Gilmore (2011). The potential of antimicrobial peptides as biocides. *International Journal of Molecular Sciences*. 12: 6566-6596.

Lee, C.H.; Lin, T.S. and C.Y. Mou (2009). Mesoporous materials for encapsulating enzymes. *Nano Today*. 4: 165–179.

Li, G.; Liu, H.; Shi, Y. and G. Le (2005). Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 37 (2): 219–224.

Liu, F.; Baggerman, G.; Schoofs, L. and G.Wets (2008). The construction of a bioactive peptide database in metazoan. *Journal of Proteome Research*. 7: 4119-4131.

López-Expósito, I.; Minervini, F. ; Amigo, L. and I. Recio (2006). Identification of antibacterial peptides from bovine kappa-casein. *Journal of Food Protection*. 12: 2992-2997.

Lopez-Gallego, F. and C. Schmidt-Dannert (2010). Multi-enzymatic synthesis. *Review Article. Current Opinion in Chemical Biology*. 14 (2): 174-183.

Loppinet-Serani, A.; Aymonier, C. and F. Cansell (2010). Supercritical water for environmental technologies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 85: 583-589.

Lousa, D.; Baptista, A.M. and C.M. Soares (2013). A molecular perspective on nonaqueous biocatalysis: Contributions from simulation studies. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 15: 13723–13736.

Lu, Y.A. and J.P. Tam (2005). Peptide ligation by a reversible and reusable C-terminal thiol handle. *Organic Letters*. 7 (22): 5003-5006.

Ludwig, R. and U. Kragl (2007). Do we understand the volatility of ionic liquids?. *Angewandte chemie*. 46: 6582–6584.

Luna-Vital, D.A.; Mojica, L.; González de Mejía, E., Mendoza, S. and G. Loarca-Piña (2015). Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris L.*): A review. *Food Research International*.76: 39-50.

Ma, Y.; Li, Z. and K. Numata (2016). Synthetic short peptides for rapid fabrication of monolayer cell sheets. *ACS Biomaterials Science and Engineering*. 2: 697-706.

McDonald, J.H. (2014). Kruskal-Wallis Test. In: *Handbook of Biological Statistics* (3rd ed.), 157-164pp, Sparky House Publishing, Battimore, Maryland.

Madeira Lau, R.; van Rantwijk, F.; Seddon, K.R. and R.A. Sheldon (2000). Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids. *Organic Letters*. 2: 4189–4191.

Mander, P.; Cho, S.S.; Simkhada, J.R.; Choi, Y.H.; Park, D.J. and J.W. Ha (2012). An organic solvent-tolerant alkaline lipase from *Streptomyces sp.* CS268 and its application in biodiesel production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 17: 67–75.

Mateo, C.; Palomo, J.M.; Fuentes, M.; Betancor, L.; Grazu, V. and F. López-Gallego (2006). Glyoxyl agarose: a fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme and Microbial Technology*. 39: 274–280.

Matsufuji, H.; Matsui, T.; Seki, E.; Osajima, K.; Nakashima, M. and Y. Osajima (1994). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline proteinase hydrolysate derived from sardine muscle. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 58: 2244-2245.

Maugeri, Z. and P. Dominguez de Maria (2012). Novel choline-chloride-based deep eutectic solvents with renewable hydrogen bond donors: levulinic acid and sugar-based polyols. *SC Advance*. 2: 421-425.

Mattos, C.; Bellamacina, C.R.; Peisach, E.; Pereira, A.; Vitkup, D.; Petsko, G.A. and D. Ringe. (2006). Multiple solvent crystal structures: Probing binding sites, plasticity and hydration. *Journal of Molecular Biology*. 357: 1471–1482.

Merrifield, R., (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*. 85: 2149–2154.

Min-Guan, L.; Tzu-Fan, W.; Yi-Yu, C.; Meng-Chun C. and L. Long-Liu (2016). Catalytic activity and structural stability of three different *Bacillus* enzymes in water/organic co-solvent mixtures. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 59: 126–131.

Mishima, K.; Matsuyama, K.; Baba, M. and M. Chidori (2003). Enzymatic dipeptide synthesis by surfactant-coated α -chymotrypsin complexes in supercritical carbon dioxide. *Biotechnology Progress*. 19: 281–284.

Miyazawa, T.; Horimoto, T. and K. Tanaka (2014). Kinetically controlled peptide synthesis mediated by papain using the carbamoylmethyl ester as an acyl donor. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 20 (3):371-376.

Mora, L.; Escudero, E.; Fraser, P.D.; Aristoy, M.C. and F. Toldrá (2014). Proteomic identification of antioxidant peptides from 400 to 2500 Da generated in Spanish dry-cured ham contained in a size-exclusion chromatography fraction. *Food Reserch International*. 56: 68–76.

Mora, L.; Reig, M. and F. Toldrá (2014). Bioactive peptides generated from meat industry by products. *Food Research International*. 65: 334–349.

Morcelle del Valle, S.; Barberis, S.; Priolo, N.; Caffini, N. and P. Clapés (2006). Comparative behaviour of proteinases from the latex of *Carica papaya* and *Funarium clausum* as catalysts for the synthesis of Z-Ala-Phe-OMe. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 41: 117-124.

Morcelle, S.; Barberis, S. and P. Clapés (2009). Aplicaciones de peptidasas vegetales en reacciones de síntesis. En: Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores. Aplicaciones Industriales (N. Caffini Ed.), Capítulo 22. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). pp 317-331. ISBN: 1023 – 8645. Bs. As., Argentina.

Muhammad, M.; Kazunori, N.; Noriho, K. and G. Masahiro (2010). Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. *Biochemical Engineering Journal*. 48: 295–314.

Mullally, M.M.; Meisel, H. and FitzGerald R.J. (1996). Synthetic peptides corresponding to alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Biochemical Chemistry*. 377: 259-260.

Nardin, E.H.; Calvo-calle, J.M.; Oliveira, G.A.; Clavijo, P.; Nussenzweig, R.; Simon, R.; Zeng, W. and K. Rose (1998). *Plasmodium falciparum* polyoximes: highly immunogenic synthetic vaccines constructed by chemoselective ligation of repeat B-cell epitopes and a universal T-cell epitope of CS protein. *Vaccine*. 16 (6): 590-600.

Ngo, D.H.; Kang, K.H.; Ryu, B.; Vo, T.S.; Jung, W.K. and H.G. Byun (2015). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from antihypertensive skate (*Okamejei kenoei*) skin gelatin hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*. 174: 37–43.

Nilsson, B.L., Soellner, M.B. and R.T. Raines (2005). Chemical synthesis of proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 34, 91-118.

Noritomi, H.; Miyata, M.; Kato, S. and K. Nagahama (1995). Enzymatic synthesis of peptide in acetonitrile/supercritical carbon dioxide. *Biotechnology Letters*. 17, 1323-1328.

Novoselov, N.P.; Sashina, E.S.; Petrenko, V.E. and M. Zaborsky (2007). Study of dissolution of cellulose in ionic liquids by computer modeling. *Fibre Chemistry*. 39: 153–158.

Nuijens, T.; Cusan, C.; Schepers, A.; Kruijtzter, J.; Rijkers, D.; Liskamp, R. and P.J.L.M. Quaedflieg (2011). Enzymatic synthesis of activated esters y their subsequent use in enzyme-based peptide synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 71 (1–2): 79-84.

Nuijens, T.; Quaedflieg, P.J.L.M. and H.D. Jakubke (2012). Hydrolysis and synthesis of peptides. In: *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, (K. Drauz, H. Gröger and O. May Ed.), 3rd ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 675–748 pp. Weinheim, Germany.

Numata, K.; Cebe, P. and D.L. Kaplan (2010). Mechanism of enzymatic degradation of beta-sheet crystals. *Biomaterials*. 31: 2926-2933.

Ondetti, M.A. and D.W. Cushman (1982). Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annual Review of Biochemistry*. 51: 283-308.

Origone, A.; Sturniolo, H.; Liggieri, C.; Cecatti, F.; Ardanáz, C. and S. Barberis (2015). Enzymatic synthesis of an antithrombotic peptide of interest as nutraceutical. *Actas del Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos-XV CYTAL*. http://aata-cytal2015.com.ar/data/arch_cont/trabajos/398.docx

Origone, A.; Bersi, G.; Illanes, A.; Sturniolo, H.; Liggieri, C.; Guzmán, F. and S. Barberis (2018). Enzymatic and chemical synthesis of new anticoagulant peptides. *Biotechnology Progress*. John Wiley & Sons Inc. USA (Online ISSN: 1520-6033).

Patarroyo, M.E.; Amador, R.; Clavijo, P.; Moreno, A.; Guzman, F.; Romero, P.; Tascon, R.; Franco, A.; Murillo, L.A.; Ponton, G. and G. Trujillo (1988). A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 332: 158-161.

Patarroyo, J.H. and F. Guzman (2004). Peptídeos Sintéticos como Vacinas. In: *Biotecnología e Saúde* (M.R. De Almeida, A. Borem and G.R. Franco Ed.), pp. 113-139, Folha de Viçosa, Brazil.

Patrzykat, A.; Friedrich, C.L.; Zhang, L.; Mendoza, V. and R.E.W. Hancock (2002). Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. 46: 605–614.

Pera, L.M.; Baigori, M.D.; Pandey, A. and G. R. Castro (2015). Biocatalysis. *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. 16: 391-408.

Pham, T.P.T.; Cho, C.W. and Y.S. Yun (2010). Environmental fate and toxicity of ionic liquids: a review. *Water Research*. 44: 352–372.

Powers, J.P.S. and R.E.W. Hancock (2003). The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*. 24: 1681–1691.

Poyarkova, L.; Poyarkova, S.; Smirnova, I. and V. Kukhar (2012). Liporetro-D-peptides - A novel class of highly selective thrombin inhibitors. *Thrombosis Research*. 129 (4): 97-105.

Prestrelski, S.J., Arakawa, T. and J.F. Carpenter (1993a). Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 303: 465–473.

Prestrelski, S.J.; Tedeschi, N.; Arakawa, T. and J.F. Carpenter. (1993b). Dehydration-induced conformational changes in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophysical Journal*. 65: 661–671.

Priolo, N.; Arribére, M.C.; Caffini, N.; Barberis, S.; Vázquez, R.N. and J.M. Luco (2001). Isolation and purification of cysteine peptidases from the latex of *Araujia hortorum* fruits. Study of their esterase activities using partial least-squares (PLS) modeling. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 635: 1–13.

Puchalska, P.; Marina Alegre, M.L. and M.C. García López (2015). Isolation and characterization of peptides with antihypertensive activity in foodstuffs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 55: 521-551.

Qin, X.; Xie, W.; Su, Q.; Du, W. and R.A. Gross (2011). Protease-Catalyzed Oligomerization of L-Lysine Ethyl Ester in Aqueous Solution. *ACS Catalysis*. 1: 1022-1034.

Quiroga, E.; Priolo, N.; Marchese, J. and S. Barberis (2005). Stability of *Araujain*, a novel plant protease, in different organic systems. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. 24 (2): 204-208.

Quiroga, E.; Priolo, N.; Marchese, J. and S. Barberis (2006). Behaviour of *araujiain*, a new cysteine phytoprotease, in organic media with low water content. *Electronic Journal of Biotechnology*. 9: 18–25.

Quiroga, E.; Camí, G.; Marchese, J. and S. Barberis (2007). Organic solvents effect on the secondary structure of *araujiain h I*, in different media. *Biochemical Engineering Journal*. 35: 198–202.

Quiroga, E.; Priolo, N.; Obregón, D.; Marchese, J. and S. Barberis (2008). Peptide synthesis in aqueous-organic media catalyzed by proteases from latex of *Araujia hortorum* (Asclepiadaceae) fruits. *Biochemistry Engineering Journal*. 39: 115–120.

Quiroga, E.; Illanes, C.O.; Ochoa, N.A. and S. Barberis (2011). Performance improvement of *araujiain*, a cystein phytoprotease, by immobilization within calcium alginate beads. *Process Biochemistry*. 46: 1029–1034.

Rao, S.; Sun, J.; Liu, Y.; Zeng, H.; Su, Y. and Y. Yang (2012). ACE inhibitory peptides and antioxidant peptides derived from in-vitro digestion hydrolysate of hen egg white lysozyme. *Food Chemistry*. 135 (3): 1245-1252. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.05.059

Rawlings, N.D.; Barret, A.J. and A. Bateman (2010). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*. 38: 227-233.

Reddy, K.V.R.; Yedery, R.D. and C. Aranha (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 24: 536–547.

Reichardt, C. (1994). Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. *Chemical Reviews*. 94: 2319-2358.

Remsing, R.C.; Hernandez, G.; Swatloski, R.P.; Masefski, W.W.; Rogers, R.D. and G. Moyna (2008). Solvation of carbohydrates in N,N-dialkylimidazolium ionic liquids: a multinuclear NMR spectroscopy study. *The Journal of Physical Chemistry B*. 112: 11071–11078.

Rivera, Z.; Granados, G.; Pinto, M.; Varon, D.; Carvajal, C.; Chaves, F.; Calvo, J.; Rodriguez, R.; Guzman, F. and M.E Patarroyo (2002). Double dimer peptide constructs are immunogenic and protective against Plasmodium falciparum in the experimental Aotus monkey model. *Journal of Peptide Research*. 59 (2): 62-70.

Ru, M.T.; Dordick, J. S.; Reimer, J.A. and D.S. Clark (1999). Optimizing the salt-induced activation of enzymes in organic solvents: effects of lyophilization time and water content. *Biotechnology and Bioengineering*. 63: 233–241.

Rub, C. and B. Konig (2012). Low melting mixtures in organic synthesis—an alternative to ionic liquids?. *Green Chemistry*. 14: 2969–2982.

Sabbione, A.C.; Scilingo, A. and M.C. Anon (2015). Potential antithrombotic activity detected in amaranth proteins and its hydrolysates. *Journal of Food Science and Technology*. 60: 171–177.

Sabbione, A. C., Ibañez, S. M., Martínez, E. N., Añón, M. C. and A.A. Scilingo (2016). Antithrombotic and antioxidant activity of amaranth hydrolysate obtained by activation of an endogenous protease. *Plant Foods for Human Nutrition*. 71 (2): 174-182. doi:10.1007/s11130-016-0540-y

Saito, Y.; Wanezaki, K.N.; Kawato, A. and I. Satoshi (2014). Antihypertensive Effects of Peptide in Sake and Its By-products on Spontaneously Hypertensive Rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 5 (58): 812-816. <https://doi.org/10.1271/bbb.58.812>

Sakina, K.; Kawazura, K.; Morihara, K. and H. Yajima (1988). Enzymatic synthesis of cholecystokinin octapeptide. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 36 (10): 3915-3919.

Sarazin, C.; Goethals, G.; Seguin, J. P.; Legoy, M. D. and J.N. Barbotin (1992). Etude par spectroscopie RMN I Het ^{13}C de la synthese d'esters en milieu organique catalysee par une lipase: Influence de l'eau. *The Journal of Chemical Physics*. 89: 541-547.

Sarin, V.K.; Kent, S.B.; Tam, J.P. and R.B. Merrifield (1981). Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Analytical Biochemistry*. 117 (1): 147-157.

Schechter, I. and A. Berger (1967). On the size of the active site in proteases. I. *Papain*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 27: 157–162.

Schröder, H.; Strohmeier, G.A.; Leybold, M.; Nuijens, T.; Quaedflieg, P.J.L.M. and R. Breinbauer (2013). Racemization-free chemoenzymatic peptide synthesis enabled by the ruthenium-catalyzed synthesis of peptide enol esters via alkyne-addition and subsequent conversion using alcalase cross-linked enzyme aggregates. *Advanced Synthesis & Catalysis*. 355: 1799–1807.

Schulz, G.E., and R.H. Schirmer (1979). Principles of Protein Structure (Prinzipien der Proteinstruktur). In: Starch Biosynthesis Nutrition and Biomedical (C.R. Cantor Ed.), Springer Advanced Texts in Chemistry, Springer, 314 Pages. Verlag, Berlin. Heidelberg, New York.

Scopes R.K. (1994). Separation by precipitation. In: Protein purification: principles and practice (C.G. Robert Ed.), Vol. 96, 3rd Ed., 317–321 pp. New York: PringerVerlag NY Inc.

Segura-Campos, M.R.; Tovar-Benitez, M.; Chel-Guerrero, L. and D. Betancur-Ancona (2014). Functional and bioactive properties of velvet bean (*Mucuna pruriens*) protein hydrolysates produced by enzymatic treatments. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 8: 61–69.

Sheih, I.C.; Fang, T.J. and T.K. Wu (2009). Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. *Food Chemistry*. 115: 279–284.

Sheldon, R.A. and S. Van Pelt (2013). Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*. 42: 6223–6235.

Shelton, P.T. and K.J. Jensen (2013). Linkers, resins, and general procedures for solid-phase peptide synthesis. *Methods in Molecular Biology*. 1047: 23-41.

Shtatland, T.; Guettler, D.; Kossodo, M.; Pivovarov, M. and R. Weissleder (2007). PepBank -a database of peptides based on sequence text mining and public peptide data sources. *BMC Bioinformatics*. 8: 280.

Singh, B.P., Vij, S. and S. Hati (2014). Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*. 54: 171–179.

Smith, E.L.; Abbott, A.P. and K.S. Ryder (2014). Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chemical Reviews*. 114: 11060–11082.

Souza, D.D.; Sbardelotto, A.F.; Ziegler, D.D.R.; Pinto, L. M. N.; Ramos, R.C. D.S.; Marczak, L.D.F. and I.C. Tessaro (2017). Obtaining and purification of a highly soluble hydrolyzed rice endosperm protein. *Separation and Purification Technology*. 183: 279-292.

Sprenger, K.G.; Jaeger, V.W. and J. Pfaendtner (2015). The general amber force field (GAFF) can accurately predict thermodynamic and transport properties of many ionic liquids. *The Journal of Physical Chemistry B*. 119: 5882–5895.

Stepankova, V.; Damborsky, J. and R. Chaloupkova (2015). Hydrolases in non-conventional media: Implications for industrial biocatalysis. In: *Industrial Biocatalysis* (P.Grunwald Ed.), CRC Press, pp 583-620. ISBN 13 978-981-4463-89-8

Sudhakar, G.K.; Bhaskar, V.K. and V. Ruchi (2012). A review on ionic liquids-useful reaction green solvents for the future. *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research*. 1: 7–12.

Sun, H.; He, B.; Xu, J.; Wu, B. and P. Ouyang (2011). Efficient chemo-enzymatic synthesis of endomorphin-1 using organic solvent stable proteases to green the synthesis of the peptide. *Green Chemistry*. 13, 1680-1685.

Susi, H. (1969). Infrared spectra of biological macromolecules and related systems. In: *Structure and Stability of Biological Macromolecules* (S.N. Timasheff and G.D. Fasman Ed.), 575-663 pp., Marcel Dekker, New York.

Susi, H. and D.M. Biler (1986). Resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy of enzymes. *Methods in Enzymology*. 130: 290-311.

Talia, J.M.; Debattista, N.B. and N.B. Pappano (2011). New antimicrobial combinations: substituted chalcones-oxacillin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42 (2): 470-475.

Tam, J.P.; Lu, Y.; Liu, C.F. and J. Shao (1995). Peptide synthesis using unprotected peptides through orthogonal coupling methods. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92 (26): 12485-12489.

Teschemacher, H.; Koch, G. and V. Brantl (1997). Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymers*. 43: 99-117.

Thiruvenkatarajan, V.; Pruett, A. and S.D. Adhikary (2014). Coagulation testing in the perioperative period. *Indian Journal of Anaesthesia*. 58 (5): 565–572.

Thomas, S.; Karnik, S.; Shankar Barai, R.; Jayaraman, V.K. and S. Idicula-Thomas (2010). CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*. 38: 774–780.

Torres, S. and G. Castro (2004). Non-aqueous biocatalysis in homogeneous solvent systems. *Food Technology and Biotechnology*. 42 (4): 271–277.

Toth, K.; Sedlak, E.; Musatov, A. and G. Zoldak (2010). Activity of NADH oxidase from *Thermus thermophilus* in water/alcohol binary mixtures is limited by the stability of quaternary structure. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 64: 60–67.

Tõugu, V.; Meos, H.; Haga, M.; Aaviksaar, A. and H.D. Jakubke (1993). Peptide synthesis by chymotrypsin in frozen solutions. Free amino acids as nucleophiles. *FEBS Letters*. 329: 40-43.

Trusek-Holownia, A. (2003). Synthesis of Z-Ala–Phe.OMe the precursor of bitter dipeptide in the two-phase ethyl acetate-water system catalysed by thermolysin. *Journal of Biotechnology*. 102: 153-163.

Tsou, M.J.; Lin, W.; Lu, H.; Tsui, Y. and W. Chiang (2010). The effect of limited hydrolysis with neutrase and ultrafiltration on the anti-adipogenic activity of soy protein. *Process Biochemistry*. 45: 217–222.

Tsuchiya, K. and K. Numata (2016). *Papain*-Catalyzed Chemoenzymatic Synthesis of Telechelic Polypeptides Using Bis (Leucine Ethyl Ester) Initiator. *Macromolar Bioscience*. 16: 1001-1008.

Tuchscherer, G. and M. Mutter (1996). Template assisted protein de novo design. *Pure and Applied chemistry*. 68 (11): 2153-2162.

Uhlig, T.; Kyprianou, T.; Martinelli, F.G.; Oppici, C.A.; Heiligers, D. and D. Hills (2014). The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation. *EuPA Open Proteomics*. 4: 58–69.

Valcarcel Cases, M. and H.A. Gomez (1994). Analytical techniques in separation (M. Valcarcel Cases and H.A. Gomez Ed.), Reverté S.A., Barcelona, España.

Vallés, D.; Furtado, S. and A.M.B. Cantera (2007) . Characterization of news proteolytic enzymes from ripe fruits of *Bromelia antiacantha Bertol.* (Bromeliaceae). *Enzyme and Microbial Technology*. 40: 409-413.

van der Weert, M.; Haris, P.I.; Hennink, W.E. and D.J.A. Crommelin (2001). Fourier transform infrared spectrometric analysis of protein conformation: effect of sampling methods and stress factors. *Analytical Biochemistry*. 297: 160–169.

van Rantwijk, F. and R.A. Sheldon (2007). Biocatalysis in ionic liquids. *Chemical Reviews*. 107: 2757–2785.

van Unen, D.; Engbersen, J.F.J. and D.N. Reinhoudt (2002). Studies on the mechanism of crown-ether-induced activation of enzymes in non-aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 11: 877-882.

Viswanathan, K.; Omorebokhae, R.; Li, G. and R.A. Gross (2010). Protease-catalyzed oligomerization of hydrophobic amino acid ethyl esters in homogeneous reaction media using l-phenylalanine as a model system. *Biomacromolecules*. 11: 2152-2160.

Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J. and M. Khrestchatisky (2010). Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discovery Today*. 15: 40-56.

Vossenbergh, P.; Beeftink, H.H.; Nuijens, T.; Quaedflieg, P.J.L.M.; Cohen Stuart, M.A. and J. Tramper (2012). Performance of alcalase formulations in near dry organic media: effect of enzyme hydration on dipeptide synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 78: 24-31.

Vossenbergh, P.; H.H. Beeftink and A. Martien (2013). Process design for enzymatic peptide synthesis in near-anhydrous organic media. *Biocatalysis and Biotransformation*. 5 (31): 255-268.

Wang, S.; Meng, X.; Zhou, H.; Liu, Y., Secundo, F. and Y. Liu (2016). Enzyme stability and activity in non-aqueous reaction systems: A mini review. *Catalysts*. 6: 2-16.

Wang, G. and X.L.Z. Wang (2017). APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*. 4: 1087–1093.

Wanka, L.; Cabrele, C.; Vanejews, M. and P.R. Schreiner (2007). γ -Aminoadamantane carboxylic acids through direct C-H bond amidations. *European Journal Organic Chemistry*. 9: 1474-1490.

Wehofsky, N.; Pech, A.; Liebscher, S.; Schmidt, S.; Komeda, H.; Asano, Y. and F. Bordusa (2008). D-amino acid specific proteases and native all-L-proteins: a convenient combination for semisynthesis. *Angewandte Chemie International Edition*. 47: 5456-5460.

Wright, G.; Carver, A.; Cotton, D.; Reeves, D.; Scott, A.; Simons, P.; Wilmut, I.; Garner, I. and A. Colman (1991). High level expression of active human *alpha-1-antitrypsin* in the milk of transgenic sheep. *BioTechnology*. 9: 830-834.

Xu, J.; Sun, H.; He, X.; Bai, Z. and B. He (2013). Highly efficient synthesis of endomorphin-2 under thermodynamic control catalyzed by organic solvent stable proteases with in situ product removal. *Bioresource Technology*. 129: 663-666.

Yang, Z. and A.J. Russell (1996). Enzymatic reactions in organic media. (A.M.P. Koskinen and A.M. Klivanov Ed.), 42-69pp, Chapman & Hall: London.

Yang, L.; Dordick, J.S. and S. Garde. (2004). Hydration of enzyme in nonaqueous media is consistent with solvent dependence of its activity. *Biophysical Journal*. 87: 812–821.

Yang, W.G.; Wang, Z. and S.Y. Xu (2007). A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysate by microplate reader. *Chinese Chemical Letters*. 18: 449–451.

Yazawa, K. and N. Numata (2014). Recent advances in chemoenzymatic peptide syntheses. Review. *Molecules*. 19: 13755-13774.

Yennawar, N.H.; Yennawar, H.P. and G.K. Farber. (1994). X-ray crystal structure of *gamma-chymotrypsin* in hexane. *Biochemical Journal*. 33: 7326–7336.

Yu, J.; Lin, F.; Lin, S.; Pei, X.; Miao, J.; Chen, X.; Gang Wu, S. and A. Wang (2016). A comparative study of papain and bromelain in enzymatic oligomerization of L-Phe methyl ester in aqueous environment. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 133 (1): S95 – S99.

Zakcs A. and A.M. Klibanov (1988). The effect of water on enzyme action in organic media. *The Journal of Biological Chemists*. 17 (263): 8017-8021.

Zhang, S.B.; Wang, Z. and S.Y. Xu (2008). Antioxidant and antithrombotic activities of rapeseed peptides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 85: 521–527.

Zhang, Q.; De, K.; Vigier, O.; Royer, S. and F. Jerome (2012). Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews*. 41: 7108-7146.

Zarei, M.; Ebrahimpour, A.; Abdul-Hamid, A.; Anwar, F.; Bakar, F.A. and R. Philip (2014). Identification and characterization of papain-generated antioxidant peptides from palm kernel cake proteins. *Food Research International*. 62: 726–734.

Zeglinski, J.; Cabaj, A.; Strankowski, M.; Czerniak, J. and J.T. Haponiuk (2007). Silica xero gel hydrogen peroxide composites: their morphology, stability, and antimicrobial activity. *Colloid Surfaces B*. 54: 165–172.