



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

*“Síntesis de péptidos antihipertensivos, utilizando fitoproteasas
autóctonas inmovilizadas”*

Doctorando: Ingeniera en Alimentos Anabella Lucía Origone.

Directora: Dra. Sonia Esther Barberis.

Co-director: Dr. Andrés Illanes Frontaura.

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

-2018-

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

CAPITULO 1.....	20
INTRODUCCIÓN.....	20
1. Antecedentes del tema.....	21
1.1. Péptidos. Generalidades y producción.....	21
1.2. Síntesis enzimática de péptidos.....	23
1.3. Proteasas: clasificación y mecanismos catalíticos.....	25
1.4. Proteasas como catalizadores de la síntesis de péptidos.....	28
1.4.1. Síntesis bajo control termodinámico.....	29
1.4.2. Síntesis bajo control cinético.....	31
1.5. Estrategias de síntesis enzimática de péptidos.....	34
1.5.1. Ingeniería de Medios: Sistemas Homogéneos y Sistemas Heterogéneos (Macroheterogéneos y Microheterogéneos).....	34
1.5.1.1. Sistemas Homogéneos.....	35
1.5.1.2. Sistemas Heterogéneos.....	36
1.5.2. Ingeniería del biocatalizador.....	38
1.5.2.1. Inmovilización en una matriz inerte.....	40
1.5.2.2. Inmovilización libre de soporte.....	41
1.5.2.3. Elección del método de inmovilización.....	43
1.5.3. Ingeniería de Sustrato.....	44
1.6. Avances y desafíos de la síntesis enzimática de péptidos.....	45
1.6.1. Péptidos Bioactivos. Antihipertensivos.....	48
OBJETIVO GENERAL.....	50
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
CAPITULO 2.....	53
METODOLOGÍAS.....	53
2.1. Preparación y caracterización de los extractos enzimáticos de <i>Asclepias curassavica</i> L	54
2.1.1. Material vegetal.....	54
2.1.2. Preparación del extracto crudo de <i>Asclepias curassavica</i> L	54

2.1.3. Determinación de la actividad proteolítica de asclepaína.....	55
2.1.4. Determinación de las preferencias de asclepaína frente a sustratos aminoacídicos sintéticos.....	55
2.1.5. Determinación de la estabilidad operacional de asclepaína en diferentes sistemas acuosos – orgánicos	56
2.1.6. Efecto de los solventes orgánicos sobre la estructura secundaria de asclepaína por Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	57
2.1.7. Modelado de superficie de asclepaína y papaína.....	58
2.2. Inmovilización enzimática.....	59
2.2.1. Síntesis del soporte de inmovilización enzimática: sílica sin funcionalizar (S). Inmovilización por adsorción de asclepaína y papaína en (S).....	60
2.2.2. Síntesis del soporte de inmovilización enzimática: glioxil-agarosa (GA). Inmovilización covalente de quimotripsina y de asclepaína en (GA).....	60
2.2.3. Síntesis del soporte de inmovilización enzimática: glioxil-sílica (GS). Inmovilización covalente multipuntual de asclepaína y papaína (GS).....	62
2.2.4. Síntesis del soporte de inmovilización enzimática: octil-glioxil-sílica (OGS). Inmovilización covalente multipuntual de asclepaína y papaína en (OGS).....	62
2.2.5. Inmovilización mediante agregados enzimáticos entrecruzados de papaína (CLEAs).....	63
2.2.6. Determinación de la estabilidad de asclepaína inmovilizada en sílica sin funcionalizar (S) y en octil-glioxil-sílica (OGS), utilizando sistemas acuosos– orgánicos	63
2.3. Aplicación de fitoproteasas como nuevos catalizadores para la síntesis de péptidos antihipertensivos en sistemas acuoso-orgánicos.....	64
2.3.1. Selección de las condiciones operacionales para las reacciones de síntesis enzimática de péptidos antihipertensivos.....	64
2.3.2. Selección de los péptidos tomados como modelo para las reacciones de síntesis de péptidos con potencial actividad antihipertensiva.....	65

2.3.3. Síntesis enzimática de péptidos bioactivos con potencial actividad antihipertensiva, utilizando asclepaína libre e inmovilizada.....	65
2.3.3.1. Síntesis enzimática bajo control cinético.....	66
2.3.3.2. Síntesis enzimática bajo control termodinámico.....	67
2.3.4. Maximización de los rendimientos en producto peptídico.....	67
2.4. Síntesis química de los patrones de los péptidos bioactivos tomados como modelo.....	68
2.4.1. Síntesis química de péptidos en fase sólida (SPPS), utilizando bolsas de polipropileno.....	68
2.4.2. Síntesis química de péptidos en fase sólida (SPPS), utilizando reactores.	69
2.4.3. Protocolo de purificación de péptidos sintetizados por vía química y enzimática	71
2.5. Determinación de las actividades biológicas <i>in vitro</i> de los péptidos sintetizados por vía enzimática	71
2.5.1. Determinación de la actividad antihipertensiva <i>in vitro</i>	71
2.5.2. Determinación de la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i>	72
2.5.3. Determinación de la actividad anticoagulante <i>in vitro</i>	73
2.6. Determinación <i>in vitro</i> de la toxicidad aguda de los péptidos sintetizados	74
2.7. Determinación de la estabilidad de los péptidos sintetizados en plasma humano.....	75
2.8. Determinación cuantitativa de fibrinógeno en plasma en presencia del péptido en estudio, mediante el método inmunoturbidimétrico.....	75
CAPITULO 3.....	77
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	77
3.1. Caracterización del extracto proteolítico pre-purificado de tallos y pecíolos de <i>Asclepias curassavica</i> L.....	78
3.1.1. Actividad proteolítica de asclepaína en solución acuosa.....	78
3.1.2. Estabilidad operacional de asclepaína en sistemas homogéneos (miscibles)	78

3.1.3. Estabilidad operacional de asclepaína en sistemas macroheterogéneos líquido-líquido (bifásicos).....	82
3.1.4. Preferencias de asclepaína en diferentes sistemas acuoso – orgánicos....	84
3.1.5. Efecto de los solventes orgánicos sobre la estructura secundaria de asclepaína en sistemas acuoso – orgánicos, por FTIR.....	87
3.2. Inmovilización enzimática.....	92
3.2.1. Inmovilización covalente de quimotripsina y asclepaína en glioxil-agarosa (GA) y en amino glioxil agarosa (AGA).....	92
3.2.2. Inmovilización de papaína por agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs).....	93
3.2.3. Inmovilización de asclepaína y papaína en sílica sin funcionalizar (S), en glioxil-sílica (GS) y en octil-glioxil-sílica (OGS).....	94
3.2.4. Modelado molecular de superficie de asclepaína y papaína.....	95
3.2.5. Determinación de la estabilidad catalítica de asclepaína inmovilizada en sílica (S), glioxil-sílica (GS) y en octil-glioxil-sílica (OGS), utilizando sistemas acuosos-orgánicos	97
3.3. Selección de las condiciones operacionales y los péptidos modelo a sintetizar por vía enzimática.....	101
3.3.1. Selección de péptidos y con potencial actividad antihipertensiva, tomados como modelo en este estudio	101
3.3.2. Selección de las condiciones operacionales para las reacciones de síntesis enzimática de péptidos bioactivos.....	102
3.3.3. Solubilidad y coeficiente de partición de los sustratos para las reacciones de síntesis enzimática de péptidos.....	103
3.4. Síntesis química en fase sólida (SPPS) de los análogos de los péptidos tomados como modelo	104
3.5. Síntesis enzimática de péptidos con potencial actividad antihipertensiva, en sistemas acuosos-orgánicos.....	108
3.5.1. Síntesis enzimática de N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG) en un sistema homogéneo, utilizando asclepaína soluble.....	108
3.5.1.1. Síntesis bajo control cinético.....	108

3.5.1.2. Síntesis bajo control termodinámico.....	114
3.5.2. Síntesis enzimática de N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG) en sistemas homogéneos, utilizando asclepaína inmovilizada en Octil-Glioxil-Sílica (OGS).....	118
3.5.2.1. Síntesis bajo control cinético.....	118
3.5.2.2. Síntesis bajo control termodinámico.....	123
3.5.3. Síntesis enzimática de N- α -CBZ- Gln-Gly-OH (Z-QG) en un sistema macroheterogéneo, utilizando asclepaína soluble	123
3.5.3.1. Síntesis bajo control cinético.....	123
3.5.3.2. Síntesis bajo control termodinámico.....	126
3.5.4. Síntesis enzimática de N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ), utilizando asclepaína soluble en un sistema macroheterogéneo (bifásico).....	126
3.5.4.1. Síntesis bajo control cinético.....	126
3.5.4.2. Síntesis bajo control termodinámico.....	130
3.6. Actividades biológicas <i>in vitro</i> de los péptidos sintetizados.....	130
3.6.1. Actividad antihipertensiva <i>in vitro</i> de N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG) y N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ).....	131
3.6.2. Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ).....	134
3.6.3. Actividad anticoagulante <i>in vitro</i> de N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ).....	136
3.7. Ensayos de toxicidad aguda de N-α-CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ) en ensayos <i>in vitro</i>, utilizando líneas celulares.....	137
3.8. Determinación de la estabilidad de N-α-CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ) en plasma humano.....	138
3.9. Determinación cuantitativa de fibrinógeno en plasma humano por el método inmunoturbidimétrico, en presencia de N-α-CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ).....	139
CAPITULO 4.....	141
CONCLUSIONES.....	141
CAPITULO 5.....	146

PROYECCIONES FUTURAS	146
CAPITULO 6	151
BIBLIOGRAFÍA	151

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de los diferentes métodos de inmovilización.....	44
Tabla 2. Diseño estadístico de los solventes orgánicos en función de sus parámetros físicoquímicos.....	56
Tabla 3. Tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de asclepaína en sistemas miscibles formados por buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, y 30 %, 50 % y 70 % v/v de diferentes solventes orgánicos miscibles. Tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de asclepaína en buffer: 5,55 h... 81	81
Tabla 4. Tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de asclepaína en sistemas bifásicos formados por buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, y 30 %, 50 % y 70 % v/v de diferentes solventes orgánicos inmiscibles. Tiempo de vida media de asclepaína en buffer: 5,55 h.....	82
Tabla 5. Preferencias del extracto pre-purificado de asclepaína en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 y en sistemas homogéneos, utilizando derivados N- α -CBZ-aminoacil-p-nitrofenil éster (Z-AA-pNO), a 40 °C.....	85
Tabla 6. Preferencias del extracto pre-purificado de asclepaína en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 y en sistemas bifásicos, utilizando derivados N- α -CBZ aminoacil-p-nitrofenil éster (Z-AA-pNO), a 40°C.....	86
Tabla 7. Áreas relativas de los componentes de la banda amida I del espectro infrarrojo de asclepaína cI en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 y en diferentes sistemas miscibles.....	89
Tabla 8. Coeficiente de similitud espectral (r) de asclepaína cI en buffer Tris- HCl 0,1 M pH 8 y en diferentes sistemas miscibles.....	89
Tabla 9. Áreas relativas de los componentes de la banda amida I del espectro infrarrojo de asclepaína cI en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 y en los medios inmiscibles seleccionados. Porcentajes en volumen.....	91
Tabla 10. Coeficiente de similitud espectral (r) de asclepaína cI en buffer y en los diferentes sistemas bifásicos.....	91
Tabla 11. Inmovilización de asclepaína y quimotripsina en glioxil agarosa (GA) y en amino glioxil agarosa (AGA).....	93

Tabla 12. Parámetros de inmovilización de asclepaína y papaína en diferentes soportes de sílice porosa. Ya: rendimiento de inmovilización en actividad. Yp: rendimiento de inmovilización en proteínas.....	95
Tabla 13. Potencial catalítico de asclepaína soluble e inmovilizada en sílica (S) y en octil-glioxil-sílica (OGS) en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 y en medios homogéneos formados por distintos porcentajes de metanol (v/v) en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, a 40 °C, durante 8 h. Potencial catalítico: actividad relativa / tiempo.....	101
Tabla 14. Péptidos con potencial actividad antihipertensiva, tomados como modelo en este estudio	102
Tabla 15. Rendimiento en producto (η) y grado de conversión del donador de acilo (α_s) en la síntesis bajo control cinético de N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG) a partir de N- α -CBZ-Val-pNO (Z-V-pNO) en un medio formado por 30 % v/v de metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando 200 μ l de asclepaína soluble (6 UI/mg) como catalizador, a 40 °C y 200 rpm.	112
Tabla 16. Rendimiento en producto (η) y grado de conversión del donador de acilo (α_s) en la síntesis bajo control cinético de N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG) a partir de N- α -CBZ-Val-pNO (Z-V-pNO), con una concentración de nucleófilo equivalente a 100 x Km en un medio formado por 30 % v/v de metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando 200 μ l de asclepaína soluble (6 UI/mg), a 40 °C y 200 rpm.....	114
Tabla 17. Rendimiento en producto (η) y grado de conversión del donador de acilo (α_s) en la síntesis bajo control termodinámico de N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG) en un medio formado por 30 % v/v de metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando 200 μ l de asclepaína soluble (6 UI/mg), a 40 °C y 200 rpm.....	117
Tabla 18. Rendimiento en producto (η) y grado de conversión del donador de acilo (α_s) en la síntesis bajo control cinético de N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG) a 40 °C y 200 rpm, utilizando asclepaína inmovilizada en Octil-Glioxil-Sílica (OGS) en un medio formado por metanol 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8.....	121
Tabla 19. Rendimiento en producto (η) y grado de conversión del donador de acilo (α_s) en la síntesis bajo control cinético de N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG) en un	

medio formado por metanol 50 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando asclepaína inmovilizada en Octil-Glioxil-Sílica (OGS), a 40 °C y 200 rpm.....	122
Tabla 20. Rendimiento en producto (η) y grado de conversión del donador de acilo (α_s) en la síntesis bajo control cinético de N- α -CBZ-Gln-Gly-OH (Z-QG) en un medio formado por 50 % v/v de acetato de etilo en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando 200 μ l de asclepaína soluble (6 UI/mg), a 40 °C y 200 rpm.....	125
Tabla 21. Rendimiento en producto (η) y grado de conversión del donador de acilo (α_s) en la síntesis bajo control cinético de N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ) en el medio de reacción formado por 50 % v/v de acetato de etilo en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando 200 μ l de asclepaína soluble (6 UI/mg), a 40 °C y 200 rpm....	130
Tabla 22. Porcentajes de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en presencia de los péptidos sintetizados.....	133
Tabla 23. Test de coagulación para evaluar la actividad anticoagulante del tripéptido N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ). APTT: Tiempo Parcial de Tromboplastina Activado. PT: Tiempo de Protrombina. TT: Tiempo de Trombina.....	136
Tabla 24. Efecto del péptido N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ) sobre la enzima trombina, usando la determinación cuantitativa de fibrinógeno en plasma mediante el método inmunoturbidimétrico.....	140

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación del mecanismo catalítico de las proteasas serínicas.....	26
Figura 2. Representación del mecanismo catalítico de las proteasas cisteínicas.....	27
Figura 3. Síntesis de péptidos catalizada por proteasas de acuerdo a la nomenclatura de Schechter and Berger (Schechter y Berger, 1967).....	45
Figura 4. Hoja y flores de <i>Asclepias curassavica</i> L.....	54
Figura 5. Estructura de MTS y su producto, Formazan.....	74
Figura 6. Variación en el tiempo de la actividad específica (UI/mg de proteína) de asclepaína en sistemas miscibles formados por buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 y diferentes solventes orgánicos miscibles: a) 30 %, b) 50 % y c) 70 % v/v a 40 °C durante 8 h de incubación y 200 rpm de agitación.....	79
Figura 7. Variación en el tiempo de la actividad específica (UI/mg de proteína) de asclepaína en sistemas bifásicos formados por buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 y diferentes solventes orgánicos inmiscibles: a) 30 %, b) 50 % y c) 70 % v/v, a 40 °C durante 8 h de incubación y 200 rpm de agitación.....	83
Figura 8. Espectro infrarrojo de asclepaína cI en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 a 25 °C (línea), DMS 70 % v/v (guión), metanol 30 % v/v (punto) y THF 70 % v/v (guión-puntos).....	88
Figura 9. Espectro infrarrojo de asclepaína cI en buffer Tris-HCl 0,1M pH 8 (línea), 1-octanol 30 % v/v (guión), hexano 50 % v/v (punto) y acetato de etilo 50 % v/v (guión-puntos), a 25°C.....	90
Figura 10. Modelado molecular superficial de asclepaína por medio del programa Yasara Structure (versión 17.4.17.W.64). a) Cara frontal. b) Cara posterior. Aminoácidos: verde y azul claro: polares; gris: no polares; azul: básicos y rojo: ácidos.....	96
Figura 11. Modelado molecular superficial de papaína por medio del programa Yasara Structure (versión 17.4.17.W.64). a) Cara frontal. b) Cara posterior.	

Aminoácidos: verde y azul claro: polares; gris: no polares; azul: básicos y rojo: ácidos.....	97
Figura 12. Estabilidad catalítica de asclepaína soluble e inmovilizada en sílica (S) y en octil glioxil sílica (OGS) en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, a 40 °C y 200 rpm, durante 24 h de incubación.	98
Figura 13. Estabilidad catalítica de asclepaína soluble e inmovilizada en sílica (S) y en octil glioxil sílica (OGS) en un sistema homogéneo formado por a) metanol 30 % v/v, b) metanol 50 % v/v, y c) 70 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, a 40 °C y 200 rpm, durante 24 h de incubación.	99
Figura 14. Cromatograma obtenido por RP-HPLC (a) y espectro de masa (b) del péptido amino terminal con potencial actividad antihipertensiva, Z-YQQ-NH ₂	105
Figura 15. Cromatograma obtenido por RP-HPLC (a) y espectro de masa (b) del péptido carboxi terminal con potencial actividad antihipertensiva, YQQ-OH.....	106
Figura 16. Cromatograma obtenido por RP-HPLC (a) y espectro de masa (b) del péptido amino terminal con potencial actividad antihipertensiva, YQQ-NH ₂	107
Figura 17. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control cinético de N- α -CBZ-Val-Gly-OH por RP-HPLC, en un medio homogéneo formado por metanol 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando asclepaína soluble como catalizador, luego de 1 min de reacción a 40 °C, 200 rpm. (I) N- α -CBZ-Val-Gly-OH (t _R : 3,6 min), (II) N- α -CBZ-Val-OH (t _R : 5,6 min), (III) pNO (t _R : 9,3 min) y (IV) N- α -CBZ-Val-pNO (t _R : 14,7 min).....	109
Figura 18. Cromatograma obtenido por RP-HPLC (a) y espectro de masa (b) del péptido carboxi terminal con potencial actividad antihipertensiva: Z-VG.....	110
Figura 19. Variación en el tiempo de la concentración de los diferentes componentes de la reacción de síntesis enzimática del dipéptido N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG) a 40 °C y 200 rpm en un medio miscible formado por 30 % v/v de metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando asclepaína soluble como catalizador.....	111
Figura 20. Variación en el tiempo de la concentración de los componentes de la reacción de síntesis enzimática del dipéptido N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG) a 40 °C	

y 200 rpm en un medio miscible formado por metanol al 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando una concentración de nucleófilo equivalente a 100 x Km de asclepaína soluble..... 113

Figura 21. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control termodinámico de N- α -CBZ-Val-Gly-OH por RP-HPLC, en un medio homogéneo formado por metanol al 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando asclepaína soluble como catalizador, luego de 3 h de reacción a 40 °C, 200 rpm. (I) N- α -CBZ-Val-Gly-OH (t_R : 3,6 min); (II) N- α -CBZ-Val-OH (t_R : 5,6 min)..... 115

Figura 22. Variación en el tiempo de la concentración de los componentes de la reacción de síntesis enzimática bajo control termodinámico del dipéptido N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG) en un medio miscible formado por metanol al 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando asclepaína libre como catalizador, a 40 °C y 200 rpm..... 116

Figura 23. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control cinético por RP-HPLC, luego de 1 min de reacción, en un medio homogéneo formado por metanol a) 30 % v/v y b) 50 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando asclepaína inmovilizada en OGS como catalizador, a 40 °C, 200 rpm. (I) N- α -CBZ-Val-OH (t_R : 2,6 min), (II) Z-VG (t_R : 3,75 min), (III) N- α -CBZ-Val-pNO (t_R : 5,13 min)..... 119

Figura 24. Variación en el tiempo de la concentración de los componentes de la reacción de síntesis enzimática del dipéptido N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG) en un medio miscible formado por a) 30 % ó b) 50 % v/v de metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, a 40 °C y 200 rpm, utilizando asclepaína inmovilizada en OGS como catalizador..... 120

Figura 25. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control cinético de N- α -CBZ-Gln-Gly-OH por RP-HPLC, en la fase orgánica de un medio macroheterogéneo formado por acetato de etilo 50 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando asclepaína soluble como catalizador, luego de 0,5 min de reacción a 40 °C, 200 rpm. (I) N- α -CBZ-Gln-pNO (t_R : 3.845 min) y (II) N- α CBZ-Gln-Gly-OH (t_R : 7,023 min)..... 124

Figura 26. Espectro de masa del péptido carboxi terminal con potencial actividad antihipertensiva: Z-QG-OH.....	124
Figura 27. Variación en el tiempo de la concentración de los componentes de la reacción de síntesis enzimática a 40 °C y 200 rpm del dipéptido N- α -CBZ-Gln-Gly-OH (Z-QG) en un medio macroheterogéneo formado por 50 % (v/v) de acetato de etilo en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando asclepaína soluble como catalizador.	125
Figura 28. Separación de los componentes de la reacción de síntesis enzimática de N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH por RP-HPLC de: a) fase acuosa y b) fase orgánica después de 5 minutos de reacción, usando asclepaína como catalizador, a 40 ° C y 200 rpm. I: producto principal (t_R : 9,8 min), II: enzima (t_R : 2–4 min), III: Z-Y-pNO (t_R : 5,7 min), IV: p-nitrofenol (t_R : 6,8 min), V: subproducto (t_R : 15,2 min). Línea punteada: control de reactivos.....	127
Figura 29. Cromatograma obtenido por RP-HPLC (a) y espectro de masa (b) del péptido con potencial actividad antihipertensiva N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ).....	128
Figura 30. Variación en el tiempo de la concentración de los componentes de la reacción de síntesis enzimática del dipéptido N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ) en el medio de reacción formado por 50 % (v/v) de acetato de etilo en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando asclepaína libre como catalizador, a 40 °C y 200 rpm.....	129
Figura 31. Curva de calibrado del sustrato de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) Abz-FRK-(Dnp)P-OH (FRET) en DMSO.....	131
Figura 32. Actividad enzimática de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) frente al sustrato Abz-FRK-(Dnp)P-OH (FRET) en DMSO, en función del tiempo.	132
Figura 33. Perfil de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) frente al inhibidor comercial captopril, utilizando Abz-FRK-(Dnp)P-OH (FRET) en DMSO.....	132

Figura 34. Cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a 37 °C y 180 rpm, en caldo Müller-Hinton en ausencia y presencia del tripéptido N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ) (0 a 230 μ g/mL)..... 135

Figura 35. Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 37 °C y 180 rpm, en caldo Müller-Hinton en ausencia y presencia del tripéptido N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ) (0 a 230 μ g/mL)..... 135

Figura 36. Actividad citotóxica *in vitro* de N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ) sobre la línea celular 293FT. \square C+: Control positivo; \blacksquare C-: Control negativo; Concentración del péptido: \boxtimes 0,7; \boxplus 2,1; \square 7 y \boxminus 21 ppm..... 138

Figura 37. Actividad anticoagulante retenida de N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ) en plasma humano sano en función del tiempo de incubación. Control APTT: 36 seg; Control PT: 14 seg; Control TT: 20 seg..... 139

RESUMEN

Los péptidos son polímeros que contienen entre dos y pocas docenas de aminoácidos, unidos por enlaces peptídicos entre el grupo carboxilo de uno de ellos y el grupo α -amino del siguiente, con límite de masa molecular de 6.000 Da y de relevancia para el cuidado de la salud y la nutrición.

El mercado mundial de péptidos está orientado principalmente a la industria farmacéutica, y se estima que alcanzará US \$ 23.70 millones en 2020, lo que significa una tasa de crecimiento anual compuesta de 2,8 % para el período 2014 a 2020. En contraste, la producción de péptidos bioactivos para uso alimenticio (nutracéuticos, alimentos funcionales y conservantes) es escasa, aunque es un ámbito de intensa investigación.

El objetivo general de este trabajo es aplicar proteasas pre-purificadas de *Asclepias curassavica* L. (*Asclepiadaceae*), una planta superior que crece en Argentina, en forma soluble o inmovilizada y en sistemas acuoso-orgánicos, como un nuevo catalizador de la síntesis de péptidos con potencial actividad antihipertensiva *in vitro*.

La originalidad de este trabajo está centrada tanto en la síntesis de péptidos con potencial actividad antihipertensiva *in vitro* utilizando fitoproteasas autóctonas, como en su potencial aplicación en la formulación de alimentos funcionales.

Para seleccionar los medios de reacción más promisorios de las síntesis de péptidos, se estudió el efecto de los solventes orgánicos sobre la actividad proteolítica y la estabilidad operacional de asclepaína en sistemas homogéneos y macroheterogéneos, utilizando la enzima libre e inmovilizada en diferentes soportes.

Los medios de reacción más promisorios fueron el sistema homogéneo formado por metanol 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, y el sistema macroheterogéneo formado por 50 % v/v de acetato de etilo en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8. En ellos, asclepaína expresó tiempos de vida media de 7,21 y 11,07 h, respectivamente.

El efecto de los de los solventes orgánicos sobre la estructura secundaria de asclepaína cI 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. Asclepaína cI no mostró diferencias significativas de r en buffer, metanol 30 % v/v o DMS 70 % v/v, en concordancia con el hecho de que en dichos medios miscibles se obtuvieron los mayores tiempos de vida media de asclepaína. Por el contrario, asclepaína cI en los sistemas bifásicos formados por 1-octanol 30 % v/v, hexano 50 % v/v, acetato de etilo 50 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, presentó diferencias espectrales significativas. Sin embargo, y a pesar de su menor similitud, asclepaína cI mostró mayor estabilidad en los sistemas bifásicos que en los sistemas miscibles seleccionados.

La selección del donador de acilo (sustrato limitante) para las reacciones de síntesis se realizó mediante un estudio de las preferencias de asclepaína por diversos derivados aminoacídicos sintéticos, en los medios de reacción previamente seleccionados.

Asclepaína en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 y en metanol 30 % v/v exhibió amplia preferencia por los derivados aminoacídicos no polares, especialmente por Val; mientras que en acetato de etilo 50 % v/v mostró preferencia por los aminoácidos polares, especialmente por Gln y Tyr.

A partir de la base de datos BIOPEP (2012) y de bibliografía, tomando como base las preferencias de asclepaína, se seleccionaron los péptidos Val-Gly (VG), Gln-Gly (QG) y Tyr-Gln (YQ), con actividad antihipertensiva *in vitro* con el objeto de sintetizarlos por vía enzimática. Se obtuvieron con éxito los péptidos Z-VG, análogo de VG, Z-QG, análogo de QG y Z-YQQ, análogo de YQ.

El péptido Z-VG fue sintetizado por vía enzimática bajo control cinético y termodinámico, en metanol al 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1M pH 8, utilizando asclepaína en forma soluble e inmovilizada. El rendimiento en producto de la reacción de síntesis bajo control cinético y termodinámico, utilizando asclepaína soluble, fue de 19 % y 13,5 %; pero se logró una maximización de 95 % de rendimiento empleando asclepaína inmovilizada en OGS bajo control cinético.

El péptido Z-QG fue obtenido mediante síntesis bajo control cinética y no así bajo control termodinámico; el rendimiento máximo alcanzado fue de 76,43 %.

El péptido Z-YQQ fue sintetizado por vía enzimática bajo control cinético en acetato de etilo 50 % (v/v) y buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8), con un rendimiento de 100 % utilizando asclepaína soluble como catalizador.

La actividad antihipertensiva de los péptidos Z-YQQ y Z-VG se evaluó como actividad inhibitoria de ECA en ensayos *in vitro*. El péptido de síntesis enzimática Z-YQQ-OH mostró un porcentaje de inhibición 35,5 % mayor al expresado por el péptido modelo YQ (Shamloo y col., 2015). Por el contrario, la actividad antihipertensiva del péptido Z-VG fue 37,3 % inferior a la del péptido análogo VG (Cheung y col., 1980). No obstante, en ambos casos los valores de IC₅₀ obtenidos son notablemente mayores que el valor correspondiente al del inhibidor comercial captopril (IC₅₀ de $0,21 \times 10^{-4}$ mM), dicha diferencia puede deberse a que no existe un método estandarizado para medir la actividad antihipertensiva *in vitro* como actividad inhibitoria de ECA; por lo que éstos valores serán corroborados por una nueva metodología.

Los resultados del párrafo anterior demuestran que Z-YQQ y Z-VG son promisorios agentes antihipertensivos, el primero en mayor medida. Por ello fue seleccionado para realizar estudios de toxicidad, estabilidad y otras actividades biológicas del mismo.

Al evaluar la actividad antimicrobiana de Z-YQQ en un cultivo batch a escala de laboratorio frente a una cepa Gram positiva (*S. aureus* ATCC 25923) y frente a una cepa Gram negativa (*E. coli* ATCC 25922) no se observó inhibición del crecimiento microbiano.

Por otra parte, se determinó la actividad anticoagulante del péptido Z-YQQ mediante Wiener Lab Test. El péptido sintetizado por vía enzimática Z-YQQ actuó sobre la vía general y sobre la vía extrínseca de la cascada de coagulación sanguínea, aumentando el tiempo de coagulación y retrasando el tiempo de polimerización de fibrinógeno a fibrina y la formación del coágulo, de manera similar a heparina. Dichos resultados pusieron de manifiesto su potencial, no solo como agente antihipertensivo, sino también como agente anticoagulante. Además, se demostró que el péptido Z-YQQ retuvo el 82 % de su actividad anticoagulante durante 15 min

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 Z-YQQ se determinó como porcentaje de viabilidad celular después de exponer, durante 4 h a 37 °C, la línea celular humana 293 FT a diferentes concentraciones del péptido mencionado. Se empleó el método estadístico Kruskal-Wallis ANOVA para evaluar las diferencias significativas en los valores de viabilidad celular y se determinó que Z-YQQ no fue citotóxico en ensayos *in vitro* a las concentraciones analizadas.

En general, esta tesis doctoral aporta nuevas estrategias y productos de interés para la industria alimenticia y farmacéutica, que implican una expansión del mercado actual y la potencial transferencia de resultados al sector socio-productivo interesado en los mismos. Además, contribuye al aprovechamiento de los recursos naturales renovables autóctonos de nuestro país, como son las fuentes vegetales de enzimas proteolíticas que han sido escasamente exploradas y no poseen patentes que dificulten su explotación.

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes del tema

1.1. Péptidos. Generalidades y producción

Los péptidos son heteropolímeros compuestos por residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos entre el grupo carboxilo de uno de ellos y el grupo α -amino del siguiente (Udenigwe, 2014). La definición en cuanto a la longitud de la cadena peptídica es bastante vaga. En general, se consideran que poseen entre dos y unas pocas docenas de aminoácidos y su masa molecular máxima se ha fijado arbitrariamente en 6.000 Da, siendo las moléculas de mayor masa atómica consideradas proteínas (Barberis y col., 2018).

Los péptidos son moléculas de suma importancia en el cuidado de la salud y la nutrición. Son ejemplos relevantes de esos campos de aplicación y del rango de tamaño molecular, la hormona insulina (51 residuos, 5.773 Da) y el edulcorante no calórico aspartamo (un dipéptido de ácido aspártico y fenilalanina esterificado) (Kusano y col., 2010; Tomabechi y col., 2010). No obstante, los péptidos pequeños y medianos son los más importantes para este tipo de aplicaciones.

Actualmente, la producción de péptidos y proteínas se realiza por diferentes tecnologías: - extracción a partir de fuentes naturales (Corrons y col., 2012), tecnología de ADN recombinante (Gill y col., 1996), - producción en sistemas de expresión libres de células (Katzen y col. 2005), - producción en animales transgénicos (Wright, 1991) y plantas (Cunningham y Porter, 1997), - síntesis química (Merrifield, 1963) y biocatálisis, utilizando enzimas proteolíticas y condiciones que favorezcan el desplazamiento del equilibrio de la reacción hacia la formación del enlace peptídico (Barberis y col., 2002, 2006 y 2008; Illanes y col., 2009 a, b).

El tamaño de la molécula peptídica determina la tecnología más adecuada para su producción. La tecnología del ADN recombinante es particularmente adecuada para la síntesis de péptidos grandes y proteínas, como lo ilustra el caso de la producción de insulina y otras hormonas (Walsh, 2005).

La síntesis química es una tecnología viable para la producción de péptidos pequeños y medianos que van desde aproximadamente 5 a 80 residuos aminoácidos (Kimmerlin y Seebach, 2005). Es por lo general una mejor opción que los métodos

biotecnológicos de ADN recombinante y biocatálisis para la síntesis de péptidos de tamaño medio, que comprenden la mayoría de las moléculas farmacéuticamente relevantes. También es una herramienta fundamental para estudiar la relación estructura-actividad (función) en las proteínas y péptidos, descubrir nuevos agentes terapéuticos de diagnóstico, en la producción de vacunas sintéticas (Noya y col., 2003) y en el diseño de biocatalizadores sintéticos (Carrea y col., 2005).

La síntesis química de péptidos se llevó a cabo originalmente en solución. Sin embargo, esta tecnología adquirió mayor importancia cuando Merrifield (1963) desarrolló la síntesis en fase sólida. Desde entonces, se han hecho significativos avances en el desarrollo de transportadores (*carriers*) poliméricos, enlazadores (*linkers*) y grupos protectores reversibles (Goodman, 2002), así como también en el desarrollo de métodos para la activación de la formación de enlaces covalentes (Albericio, 2004), los cuales constituyen poderosas herramientas para la investigación de proteínas y péptidos.

La síntesis enzimática es más restringida y prácticamente no se ha logrado aplicar a la producción de péptidos de más de 10 residuos, siendo la mayoría de los casos informados dipéptidos y tripéptidos (Kumar y Bhalla, 2005). En este sentido, las tecnologías para la producción de péptidos no son competitivas entre sí en la mayoría de los casos.

El objetivo final de un proceso a gran escala para la síntesis de un péptido es establecer su viabilidad tecnológica y económica y satisfacer los requisitos de las agencias reguladoras en términos de estándares de calidad del producto y validación del proceso. Para asegurar que el proceso de producción sea altamente reproducible y el producto final presente calidad constante se debe establecer un sistema de GMP (buenas prácticas de fabricación) (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2016). La validación del proceso debe considerar la reproducibilidad del mismo, en términos de rendimiento en productos intermedios y finales, así como también consistencia en el perfil de impurezas de dicho producto (Andersson y col., 2000). Esta es una tarea difícil en el caso de la síntesis de péptidos debido a la complejidad y al número de operaciones involucradas en el proceso de producción. Sin embargo, la rigurosidad de los requisitos de validación, a pesar del alto costo y el

tiempo necesario para ejecutarlo, tiene que ser apreciada como la forma adecuada de garantizar los más altos estándares de calidad y seguridad requeridos por el consumidor final.

1.2. Síntesis enzimática de péptidos

Las enzimas son catalizadores biológicos responsables del metabolismo celular, por lo que operan bajo condiciones suaves de reacción, compatibles con el funcionamiento celular. Para convertirse en biocatalizadores de proceso, las enzimas deben ser lo suficientemente robustas para soportar las duras condiciones de un proceso industrial que tiene por objetivo transformar materias primas en productos con valor agregado. Esto generalmente implica la modificación de la enzima para producir un biocatalizador estable (Illanes, 2008).

La síntesis de péptidos catalizada por proteasas en medios no convencionales (solventes orgánicos, fluidos supercríticos, mezclas eutécticas, líquidos iónicos) es una alternativa a la síntesis química, y puede ser aplicada en todo o parte de un proceso tecnológico (Illanes y col., 2009a,b). Algunos ejemplos relevantes son la síntesis enzimática del edulcorante no calórico aspartamo, el péptido dulce de lisina, la kyotorphin, la angiotensina, la encefalina y la dinorfina (Kullman, 1979; Takai y col., 1981; Kullman, 1982; Oyama y col., 1987; Aso, 1989; Nakanishi y col., 1990; Kimura y col., 1990a.; Clapés, 1997), y algunos dipéptidos y tripéptidos nutricionales (Kimura y col., 1990 b, c; Monter y col., 1991).

Los péptidos también se pueden sintetizar mediante sintetetasas no ribosómicas y algunos antibióticos peptídicos, como la gramicidina, se producen por fermentación con cepas bacterianas que las contienen. Sin embargo, las sintetetasas son complejas, lábiles y requieren coenzimas (Marahiel, 2009). Las enzimas proteolíticas son una opción tecnológica más atractiva, ya que son fáciles de producir, robustas, no requieren coenzimas y son disponible comercialmente a precios bajos.

Las enzimas proteolíticas comprenden el grupo de hidrolasas más importantes en términos tecnológicos, abarcando más de la mitad del mercado mundial de enzimas, con ventas mundiales anuales estimadas en alrededor de USD 2.800 millones para 2019 (Global Trends & Forecasts, 2016).

Las proteasas de plantas han sido ampliamente utilizadas en medicina y en diferentes procesos industriales de degradación (Badgujar y col., 2014; Barcia y col., 2009; Barberis y col., 2013). No obstante, las proteasas microbianas son las más importantes en términos de participación en el mercado, debido a las ventajas de su producción intensiva y bajo costo.

Actualmente, la búsqueda está centrada en encontrar nuevas proteasas más potentes y específicas, especialmente a partir de organismos exóticos que prosperan en ambientes extremos, siendo sus proteasas anormalmente estables y/o activas en tales condiciones. Como ejemplo, se pueden citar las proteasas termófilas y alcalofílicas del hongo marino *Engyodontum* (Chellapan y col., 2006).

Nuestro grupo de investigación en la Universidad Nacional de San Luis, a través de varios proyectos de investigación conjuntos con el Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CIPROVE) – Universidad Nacional de La Plata (Argentina), con el Centro de Neurociências e Biologia Celular - Universidade de Coimbra (Portugal), y más recientemente con el Laboratorio de Enzimas Hidrolíticas - Universidad de la República (Uruguay), está dedicado al aislamiento, caracterización y purificación de nuevas proteasas de plantas autóctonas, y ha demostrado la eficacia de las mismas para llevar a cabo reacciones de hidrólisis y de síntesis (Morcelle, 2004; Morcelle y col., 2006 y 2009; Guzmán y col., 2007; Illanes y col., 2009a,b; Quiroga y col., 2005, 2006, 2007, 2008 y 2011; Barberis y col., 2002, 2006, 2008 y 2013; Barcia y col., 2009). Cabe mencionar, que no existen otros grupos de investigación dedicados a la aplicación de enzimas proteolíticas de plantas como catalizadores de la síntesis de péptidos bioactivos. En la literatura solo se encuentran algunas contribuciones aisladas con proteasas de origen comercial (bromelina, papaína y ficina) (Miyazawa y col., 2014).

Hasta el momento, hemos estudiado proteasas de diferentes plantas autóctonas de la región sudamericana, como biocatalizadores de la síntesis de péptidos bioactivos. Entre ellas: *Araujia hortorum* Fournier, *Morrenia brachystephana* Griseb, *Morrenia odorata* (Hook. et Arn.) Lindeley, *Funastrum claussum* (Jacq.) Schlechter, *Acacia caven* (Mol.) Molina. (Barberis y col., 2002; Quiroga y col.,

2005; Morcelle y col., 2006; Guzmán y col., 2007; Quiroga y col., 2008; Quiroga y col., 2011).

Actualmente, iniciamos el estudio de tres nuevos extractos proteolíticos de plantas superiores autóctonas en relación con su utilidad como catalizadores enzimáticos en la síntesis de péptidos bioactivos, a saber: *Asclepias curassavica* (L.) Linneo, *Bromelia antiacantha* (Bertol.), *Solanum tuberosum leprosum*. No hay antecedentes bibliográficos de estas últimas como catalizadores de procesos de síntesis en medios no convencionales.

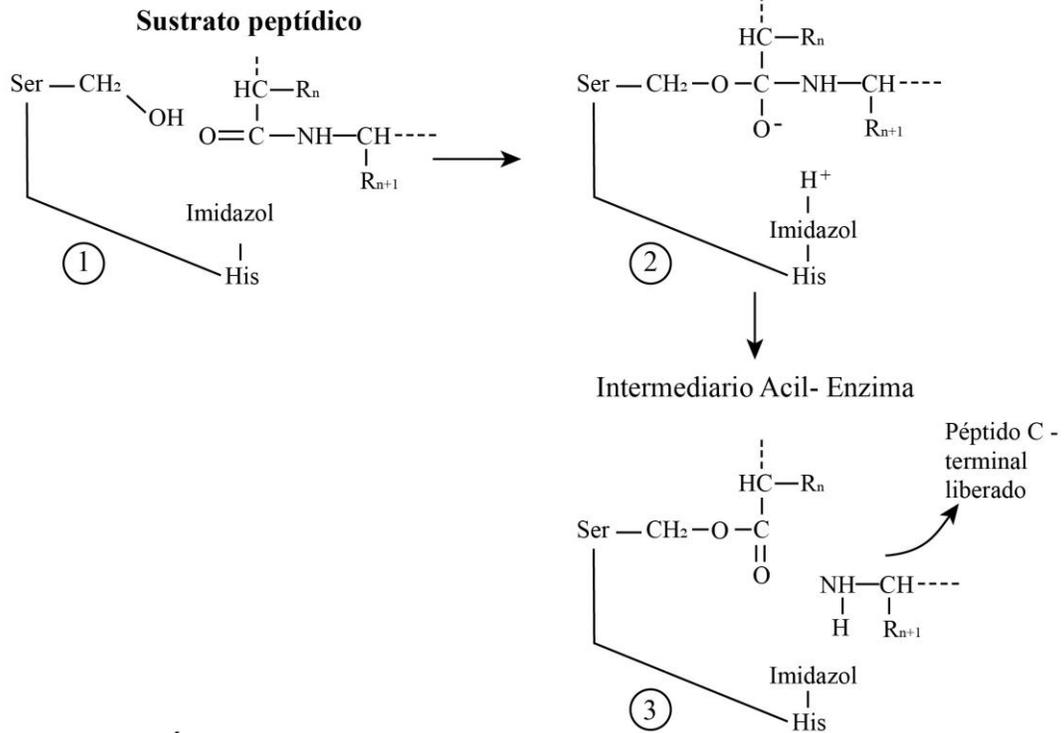
Además, nuestro grupo de investigación también colabora con un Proyecto de Investigación (PIP-CONICET) del Instituto de Investigaciones Biológicas, CCT-CONICET - Mar del Plata (Argentina). A través del mismo, se estudia la aplicación de una nueva proteasa extracelular secretada por la archaea haloalcalifílica *Natrialba magadii* como catalizador de la síntesis de péptidos bioactivos (De Castro y col., 2008).

1.3. Proteasas: clasificación y mecanismos catalíticos

Las proteasas son activas en condiciones suaves, con pH óptimo entre 6 y 8, son robustas y estables, no requieren cofactores estequiométricos y son altamente estéreo y regioselectivas. Estas propiedades son muy relevantes para su uso como catalizadores de la síntesis de péptidos (Bordusa, 2002).

Hay cinco familias de proteasas: serínicas, treonínicas, cisteínicas, aspárticas y metaloproteasas. 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. En las proteasas cisteínicas, como asclepaína (*Asclepias curassavica* L., Asclepiadaceae), el nucleófilo es un grupo sulfhidrilo siendo el donante de protones un residuo de histidina (Figuras 1, 2).

ACILACIÓN



DESACILACIÓN

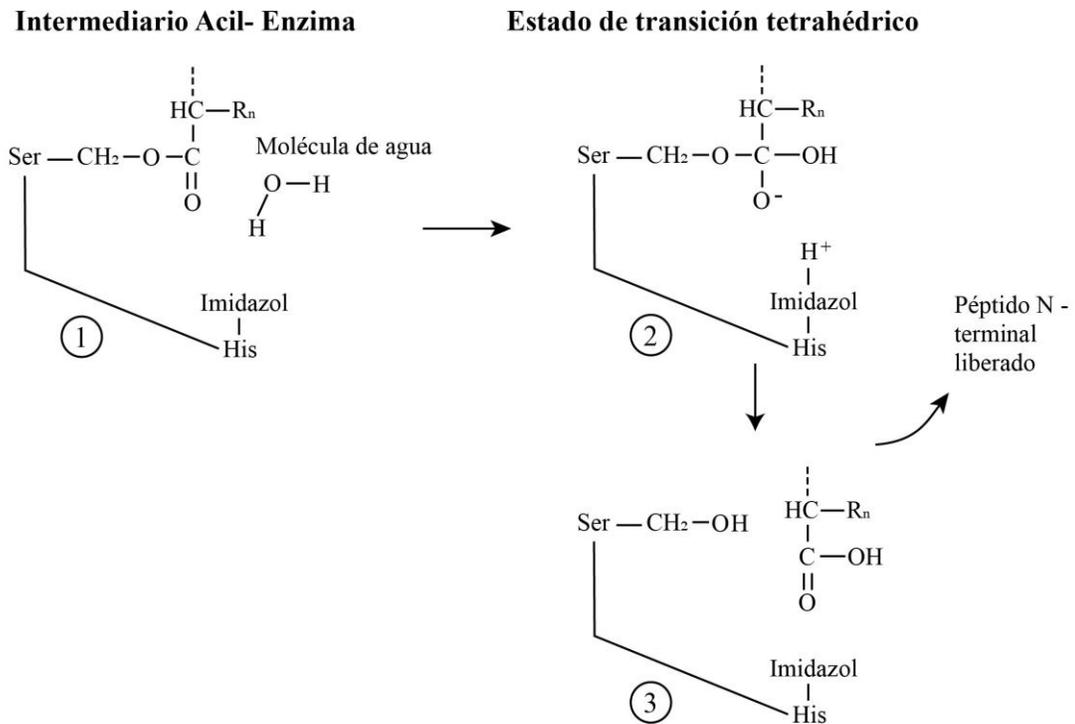


Figura 1. Representación del mecanismo catalítico de las proteasas serínicas.

ACILACIÓN

DESACILACIÓN

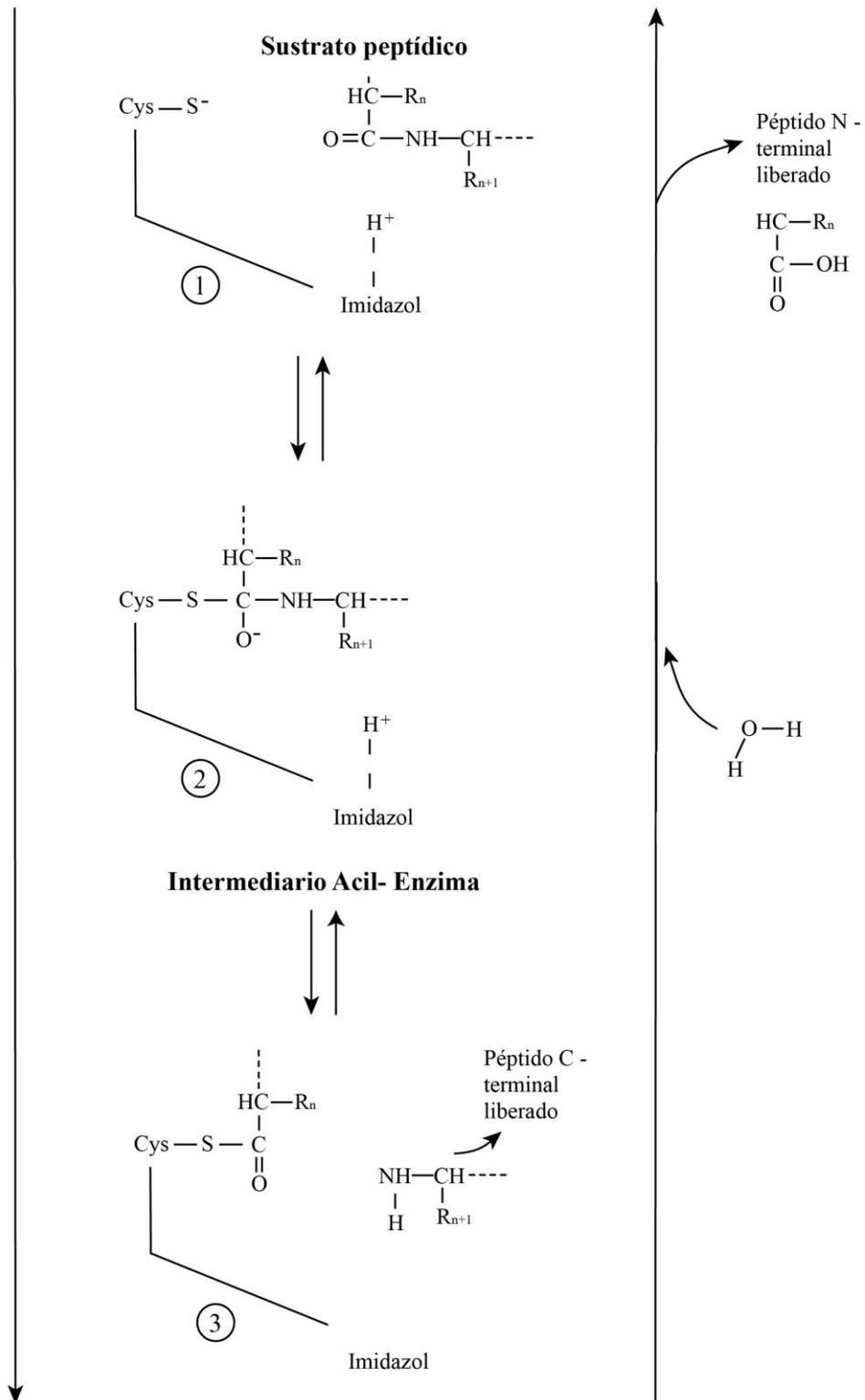


Figura 2. Representación del mecanismo catalítico de las proteasas cisteínicas.

1.4. 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 (preferencia) frente a aminoácidos, siendo posible en principio usar la mayoría de las endo y exoproteasas comercialmente disponibles (Kumar y Bhalla, 2005).

Sin embargo, cuando el medio de reacción es acuoso, el producto de síntesis (péptido) se hidroliza rápidamente por la acción de las proteasas. Es por ello que la biocatálisis en medios no convencionales ha ampliado el espectro de aplicación de las proteasas a aquellas reacciones que no proceden de manera efectiva en ambientes acuosos, como es la síntesis de enlaces peptídicos (Illanes y col., 2009a).

Los medios de reacción de la síntesis de péptidos incluyen solventes orgánicos (López Gallego y Schmidt-Dannert, 2010; Nuijens y col., 2011; Heck y col., 2009), fluidos supercríticos (Rezaei y col., 2007), mezclas eutécticas (Gill y Vulfson, 1994), estado sólido (Halling y col., 1995), líquidos iónicos (Park y Kazlauskas, 2003; Lou y col., 2004; Machado y Saraiva, 2005) y solventes eutécticos profundos (DES) (Maugeri y col., 2013).

Dichos medios 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 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, la variación en la especificidad de los sustratos y en algunos casos el aumento en la estereo y enantioselectividad en la resolución de mezclas racémicas (Klibanov, 2001).

En comparación con la síntesis química, la ventaja más importante de la biocatálisis es la especificidad de la reacción, lo que evita el requisito de protección de la cadena lateral del aminoácido. Subtilisina, quimotripsina, tripsina, termolisina y papaína han sido proteasas ampliamente utilizadas en trabajos de investigación sobre síntesis enzimática de péptidos (Barberis y col., 2008; Fité y col., 2002; Calvet y col., 2009).

Péptidos pequeños sintetizados enzimáticamente se utilizan en nutrición humana y animal, como productos farmacéuticos y como agroquímicos. Algunos ejemplos relevantes del uso de dichos péptidos son la síntesis del edulcorante no calórico aspartamo, del péptido dulce de lisina, de la kiotorfina, de la angiotensina, de la encefalina, de la dinorfina y la hemisíntesis de insulina humana (Guzmán y col., 2007).

Algunos péptidos pequeños han sido sintetizados a escala comercial en reactores enzimáticos continuos (Herrmann y col., 1991; Serralheiro y col., 1994). Kimura y col. (1990 b,c) han propuesto diversos tipos de reactores para sintetizar péptidos de aminoácidos esenciales utilizando papaína, α -quimotripsina, y termolisina. Telios Pharmaceutical Co. ha explorado la síntesis enzimática del tripéptido Arg-Gly-Asp como un nuevo fármaco para la cicatrización de quemaduras y úlcera cutánea (Chen y col., 1998).

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

1.4.1. Síntesis bajo control termodinámico

La síntesis controlada termodinámicamente (TCS) de péptidos con proteasas representa la reacción inversa de la hidrólisis del enlace peptídico, como 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 su 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 en TCS (Sakina y col., 1988).

Las principales ventajas de la TCS 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 del producto (determinado por la constante de equilibrio de la reacción), la alta razón másica enzima: sustrato que suele ser requerida y la necesidad de encontrar condiciones adecuadas de reacción para desplazar el equilibrio hacia la síntesis (Bordusa, 2002). 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 cambio de pH), del equilibrio de la reacción (es decir, por precipitación del producto) o por modificación de la composición del medio (por reducción de la actividad de agua del medio de reacción) (Jakubke y col., 1985).

La adición de cosolventes orgánicos y el uso de sistemas heterogéneos líquido-líquido (bifásicos 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 cosolventes 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).

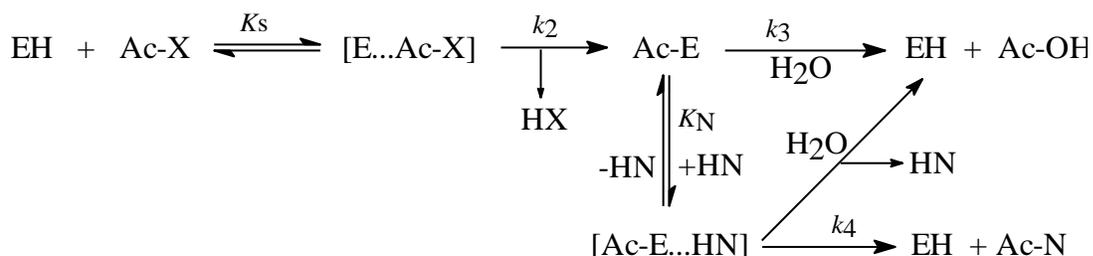
En sistemas bifásicos, la partición de los productos peptídicos de la fase acuosa (que contiene la enzima) a la fase orgánica desplaza el equilibrio hacia la síntesis, con el beneficio adicional de que el producto ya no se encuentra sometido a la hidrólisis. Sin embargo, las velocidades de reacción en 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 suelen mostrar muy baja actividad y estabilidad, y 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 puede aumentar la solubilidad de los reactantes y de la enzima.

En resumen, cada proceso de TCS 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 inmiscible), sistemas continuos (solvente hidrofóbico con baja actividad de agua), miscelas reversas (agua – solvente orgánico inmiscible – 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 del biocatalizador (estabilidad y actividad) y las preferencias (especificidad) del biocatalizador en dichos sistemas.

1.4.2. Síntesis bajo control cinético

La síntesis cinéticamente controlada (KCS) de péptidos utilizando proteasas, se puede representar mediante el siguiente esquema (Bordusa, 2002):



Donde: EH es la enzima libre; Ac-X es el sustrato donador de acilo; [E..Ac-X] es el complejo acil-enzima de Michaelis-Menten; HX es el grupo saliente; Ac-E es el intermediario acil-enzima, HN es el sustrato aceptor (nucleófilo), Ac-N es el producto de la síntesis (péptido) y Ac-OH es el producto de hidrólisis del donador de acilo.

Como se muestra en el esquema anterior, 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 [E...Ac-X] que colapsa para formar el intermediario covalente acil-enzima [Ac-E]. Este intermediario puede sufrir ataque nucleofílico por el agua o por un nucleófilo (HN), 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 TCS, sólo las proteasas serínica o cisteínicas pueden ser utilizadas para realizar la KCS, 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 KCS procede más rápido y requiere menor razón másica enzima:sustrato que la TCS porque el donador de acilo se encuentra ahora en la forma de un ácido carboxílico activado (Bordusa, 2002). A su vez, en la KCS la conversión del sustrato a producto no está limitada por el equilibrio de la reacción pero la desventaja es que el punto de máximo rendimiento es transiente, lo que hace más compleja la operación de detención de la reacción y recuperación del producto.

Papaína, termolisina, tripsina y α -quimotripsina son las enzimas más utilizadas en la KCS (Miyazawa y col., 2014; Björup y col., 1998; Fité y col., 2002). 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 razón entre las constantes de velocidad aparente transferasa a hidrolasa (K_T/K_H app) y la velocidad a la que se hidroliza el producto peptídico. Las proteasas utilizadas en la KCS tienen valores de (K_T/K_H) aparente en el rango de 102 a 104 (Kasche, 1996).

Los sistemas bifásicos no son adecuados para llevar a cabo la KCS ya que en este caso, los ésteres neutros, comúnmente utilizados como donantes de acilo, particionan con dificultad a la fase acuosa y por lo tanto la concentración en ella, 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. (Quiroga y col., 2008). 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.

La disminución de la actividad de agua mediante el uso de un cosolvente orgánico favorece la KCS (al igual que la TCS), 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, razón molar enzima: sustrato, son algunos de los parámetros que afectarán la KCS. 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).

En KCS las propiedades de la enzima serán determinantes en el rendimiento de la reacción, lo que no ocurre en TCS donde ello está limitado por el equilibrio de la reacción. Además, la velocidad de la reacción está determinada principalmente por la especificidad de la enzima por el donador de acilo. No obstante, es esencial el enlace específico del nucleófilo al subsitio S' de la proteasa para obtener un alto rendimiento de síntesis. Dado que tanto la especificidad por el donante de acilo como la unión del nucleófilo al subsitio S' son parámetros propios de cada enzima, la eficiencia de la KCS y el potencial como biocatalizador para la síntesis de péptidos diferencian mucho una proteasa de otra.

1.5. Estrategias de síntesis enzimática de péptidos

A pesar de sus buenas propiedades catalíticas, las proteasas no son catalizadores ideales para la síntesis de péptidos. Su especificidad y selectividad pueden limitar su potencial, particularmente en el caso de péptidos grandes, donde se producen reacciones hidrolíticas no deseadas sobre el producto formado y los sustratos. Además, el uso de medios de reacción no convencionales, tales como aquellos que contienen solventes orgánicos, y las condiciones de temperatura y pH requeridos para la síntesis pueden ser perjudiciales tanto para la actividad proteolítica como para la estabilidad de la enzima (Barberis y col., 2002; Bordusa, 2002; Quiroga y col., 2005). Sin embargo, hay diferentes estrategias para superar tales problemas, que comprenden la ingeniería del medio de reacción, del biocatalizador y de los sustratos (Lombard y col., 2005).

1.5.1. Ingeniería del medio de reacción: Sistemas homogéneos y heterogéneos (macroheterogéneos y microheterogéneos).

La ingeniería de medios se refiere a la manipulación racional de los medios de reacción para influenciar positivamente sobre las propiedades de las enzimas como biocatalizadores de las reacciones de síntesis (Clapés y col., 1990; Ryu y Dordick, 1992; Wescott y Klibanov, 1994). Esto frecuentemente implica la sustitución de los medios acuosos usuales por un medio no convencional en el cual el agua ha sido reemplazada parcialmente o principalmente por otro solvente (Hari Krishna, 2002).

Hay básicamente dos tipos de sistemas biocatalíticos en medios no convencionales: homogéneos y heterogéneos.

Los sistemas homogéneos están formados por una mezcla de agua y un solvente orgánico miscible con el agua (Castro y Knubovets, 2003). Los sistemas heterogéneos contemplan una segunda fase por la presencia de un solvente inmisible con el agua (Krieger y col., 2004) y pueden ser divididos en: - macroheterogéneos, en los cuales las dos fases líquidas inmiscibles son perceptibles a simple vista, y microheterogéneos, en el cual una de las dos fases (usualmente la fase acuosa que rodea a la enzima) no es perceptible a simple vista.

Ambos sistemas pueden realizarse con la enzima disuelta en el medio de reacción o insolubilizada en él, ya sea porque la proteína enzimática es insoluble en el medio de reacción o porque se encuentra inmovilizada en un soporte (carrier) (Illanes y Barberis, 1994). En este último caso, el sistema será siempre de naturaleza heterogénea.

El reemplazo de agua por otro solvente puede ser beneficioso para la síntesis enzimática de péptidos por una o varias de las siguientes razones, las cuales aplican de manera diferente a cada uno de los sistemas arriba mencionados: el aumento de la solubilidad de los sustratos peptídicos, especialmente de los aminoácidos hidrofóbicos, la atenuación de la reversión o competición de las reacciones hidrolíticas, la reducción de la hidrólisis de los productos de la reacción, la simplicidad de recuperación de los productos y/o del biocatalizador, y el aumento de la estabilidad térmica del biocatalizador.

1.5.1.1. Sistemas homogéneos

Los sistemas homogéneos están compuestos por una mezcla de agua y un solvente orgánico miscible con el agua (cosolvente), dentro de la cual la enzima se encuentra disuelta (Torres y Castro, 2004).

En concentraciones moderadamente altas los cosolventes son usualmente perjudiciales para la actividad enzimática porque tienden a penetrar en el microambiente acuoso que rodea a las moléculas de enzimas, alterando los patrones de interacción de la enzima con el solvente y distorsionando su estructura tridimensional (Klibanov, 1986; Zaks y Klibanov, 1988). Sin embargo, los polioles y glymes son notables excepciones a lo anterior (Castro, 2000; Illanes y Fajardo, 2001). Otra forma de enfrentar el problema de la inactivación enzimática es la inmovilización, siendo usual utilizarlas en esta configuración en sistemas homogéneos.

Hay varios ejemplos de proteasas y otras enzimas que catalizan la formación de enlaces peptídicos que han sido exitosamente empleadas en la síntesis de péptidos en tales medios (Illanes y col., 2009a; Yazawa y Numata, 2014).

Varios estudios han informado el efecto de los cosolventes sobre la actividad y la estabilidad de las proteasas y otras enzimas, en relación con el comportamiento de ellas en medios acuosos (Rodakiewicz-Nowak y col., 2000). En general, tanto la actividad como la estabilidad de dichas enzimas se han visto deterioradas, con las excepciones anteriormente señaladas.

1.5.1.2. Sistemas heterogéneos

Los sistemas heterogéneos están compuestos por dos líquidos inmiscibles, que usualmente son agua y un solvente orgánico hidrofóbico (Xu y col., 2013; Barberis y col., 2008).

Los sustratos se pueden disolver en la fase orgánica o en la fase acuosa, pero independientemente de la partición del sustrato, el biocatalizador siempre se disolverá en la fase acuosa.

El producto peptídico formado puede particionar a la fase orgánica, lo cual es altamente deseable para evitar su hidrólisis y conducir el equilibrio hacia la síntesis (Bordusa, 2002).

Los sistemas bifásicos han sido extensamente usados para la síntesis enzimática de péptidos y representan una buena estrategia porque son altamente flexibles y se pueden acomodar a las propiedades de los sustratos y productos (Murakami y col., 2000; Barberis y col., 2002, 2006 y 2008; Trusek-Holownia, 2003).

El principal inconveniente de los sistemas bifásicos es la presencia de una interfase que puede provocar restricciones difusionales a los sustratos y así, reducir la velocidad de la reacción. Si bien con intensa agitación se puede mejorar este efecto, la misma puede promover la inactivación de la enzima en la interfase (Barros y col., 2000). No obstante, este efecto no ha sido observado en las síntesis de péptidos llevadas a cabo en nuestro laboratorio utilizando fitoproteasas (Morcelle y col., 2006; Quiroga, 2005).

La suspensión de las enzimas prácticamente anhidras en solventes orgánicos hidrofóbicos se puede considerar como un sistema microheterogéneo, en el sentido que la fase líquida aparece como homogénea a simple vista; pero es un sistema

microscópicamente heterogéneo ya que la enzima sólida se encuentra cubierta de una delgada capa de agua unida fuertemente a ella y suspendida en el solvente orgánico hidrofóbico que la rodea. La enzima se encuentra protegida del solvente orgánico hidrofóbico, que es muy agresivo, por una capa de enzima desnaturalizada (Klibanov, 2001). Esta fue considerada como la más simple y promisoría estrategia para la síntesis enzimática de péptidos, puesto que explota las mayores ventajas de trabajar en medios no convencionales, principalmente la alta estabilidad, los cambios favorables en la especificidad de sustrato y la facilidad de recuperar el biocatalizador y el producto de la reacción (Westcott y Klibanov, 1994). El biocatalizador enzimático es simplemente un precipitado acetónico o un liofilizado de la enzima, el cual se suspende en un medio orgánico en el cual es completamente insoluble (Vossenber y col., 2012a).

La inmovilización no es esencial porque la enzima está insoluble en el medio de reacción, aunque puede ser conveniente por ofrecer una mayor superficie de contacto con el sustrato y proveer una estabilización adicional.

Los mejores resultados se han obtenido con solventes muy hidrofóbicos ($\log P > 4$; donde P es el coeficiente de partición entre *n*-octanol y agua), ya que la intrusión de dichos solventes en la capa de agua es menos probable y en consecuencia, la enzima está más protegida del contacto directo con las moléculas del solvente orgánico (Zaks y Klibanov, 1988).

La actividad de una enzima en tales medios es altamente dependiente del pH de la solución acuosa desde la cual fueron obtenidas (por precipitación o liofilización). Este fenómeno se denominó “memoria al pH” y se atribuye a que la enzima en un medio hidrofóbico retiene el estado de protonación de la solución acuosa a la cual ha sido expuesta previamente, lo que ha sido dilucidado por espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR) (Klibanov, 2001).

Más allá de las ventajas antes citadas, esta estrategia tiene serios inconvenientes, siendo el más importante de ellos la dramática disminución de la actividad que las enzimas usualmente expresan en esta clase de medios (Quiroga y col., 2005). Sin embargo, mediante la adición de formamida o etilenglicol (solventes que imitan al agua) al medio de reacción o de éteres corona durante la preparación de

enzimas liofilizadas se han logrado mejores resultados (van Unen y col., 2002). Además, los solventes hidrofóbicos no solubilizan algunos de los sustratos usados en las reacciones de síntesis, lo cual también se aplica a la síntesis de péptidos.

Otro sistema que puede ser considerado como microheterogéneo son las micelas reversas, las cuales se forman espontáneamente cuando pequeñas cantidades de agua se adicionan al solvente hidrofóbico en la presencia de un surfactante y bajo agitación (Gómez-Puyou y Gómez-Puyou, 1998). Se ha afirmado que el microambiente de la cavidad interna de las micelas es más natural para la enzima que el medio acuoso, lo que conduce en algunos casos a un aumento de la expresión de su potencial catalítico (Castro y Cabral, 1989). Sin embargo, las micelas tienen varios inconvenientes: son débiles mecánicamente, no hay métodos racionales para su optimización y el agente tensioactivo perjudica la recuperación y purificación de los productos (Bordusa, 2002). Los péptidos t-Boc-Arg-Gly-OEt y Ac-Gly-Asp-diOMe se han sintetizado con éxito bajo control cinético en medio orgánico, utilizando proteasas inmovilizadas en micelas reversas (Chen y col., 1998).

Una alternativa a las clásicas micelas reversas, son las micelas formadas por emulsiones agua en aceite (W/O), pero con alto contenido de agua (95 %), las que han sido propuestas por Clapés y col. (2001). Este sistema es opuesto al de las micelas reversas, y su aplicación en biocatálisis es muy limitada.

1.5.2. Ingeniería del biocatalizador

La ingeniería del biocatalizador se refiere a todas las estrategias dirigidas a obtener biocatalizadores adecuados para ser utilizados bajo las condiciones de síntesis e incluye alternativas que van desde la modificación química a la ingeniería genética y de proteínas (Bordusa, 2002; Adamczak y Hari-Krishna, 2004; Hudson y col., 2005; Genosphere Biotechnologies, 2012).

La solubilización de las enzimas en solventes orgánicos casi anhidros puede ser lograda mediante su modificación química. Tales modificaciones incluyen la acetilación no específica de los grupos amino libres de la enzima (Murphy y O'Fagain, 1997), y las modificaciones específicas con polímeros hidrofílicos que se unen a grupos anfipáticos en la superficie de la enzima (Salleh y col., 2002).

Otra estrategia para mejorar el desempeño del catalizador enzimático considera la manipulación de los genes que codifican la síntesis de la proteína enzimática (Arnold, 2001).

El diseño racional de proteínas fue la primera metodología utilizada en ingeniería de enzimas, la que consiste en un conjunto de técnicas de biología molecular, tales como la mutagénesis sitio dirigida, y es una poderosa herramienta para analizar la relación estructura-actividad y seleccionar enzimas mutantes con propiedades mejoradas de actividad, estabilidad y especificidad (Illanes y col., 2012). El éxito del diseño racional depende de los avances realizados en términos de determinación estructural, protocolos de modelamiento computacional y obtención de relaciones estructura – actividad (Adamczak y Hari Krishna, 2004).

Otra estrategia basada en técnicas de biología molecular para mejorar el desempeño de las enzimas es la evolución dirigida, la cual es adecuada cuando no hay disponible suficiente información sobre la estructura de la enzima (Dalby, 2011). La evolución dirigida consiste básicamente en series secuenciales de mutagénesis al azar de uno o más genes enzimáticos de partida, seguidas de una etapa de selección o enriquecimiento de las variantes enzimáticas con propiedades deseables (Illanes y col., 2012). La mutagénesis al azar ha sido exitosamente aplicada para mejorar la estabilidad térmica de subtilisina (Adamczak y Hari Krishna, 2004).

La insolubilización del biocatalizador por inmovilización a un soporte sólido o por agregación proteica (CLEC y CLEA) representa la estrategia más relevante de la ingeniería del biocatalizador para producir catalizadores enzimáticos robustos, adecuados para soportar las condiciones rigurosas (pH extremo, temperatura elevada, disolventes orgánicos y estrés mecánico) que prevalecen durante las reacciones de síntesis (Sheldon, 2011; Bernal y col., 2013; Bernal y col., 2014; Urrutia y col., 2013; Islan y col., 2014; Alvarenga y col., 2014; Romero y col., 2004; Santibañez y col., 2014).

La inmovilización se considera una plataforma tecnológica crucial para la preparación de biocatalizadores con propiedades mejoradas que permitan lograr un óptimo desempeño bajo condiciones de proceso (Agyei y Shanbhag, 2015).

Mediante diferentes tipos de inmovilización se ha logrado mejorar la estabilidad y actividad de diversos biocatalizadores en diferentes condiciones de reacción, permitiendo su reúso después de varios ciclos del proceso y operar en procesos continuos, lo que se traduce en la reducción de la cantidad de enzima requerida y de los costos de producción (Illanes y col., 2012; Singh y col., 2013). El aumento de la estabilidad se atribuye a la conformación más rígida del biocatalizador inmovilizado, lo que impide el despliegue de la enzima y la modificación de su sitio activo (Azevedo y col., 2001; Villeneuve y col., 2000). Los principales inconvenientes radican en la pérdida de la actividad enzimática durante el proceso de inmovilización y los altos costos de operación para la producción de las enzimas inmovilizadas (Sheldon y van Pelt, 2013).

Los métodos de inmovilización se pueden dividir en dos categorías: - inmovilización en una matriz inerte (carrier bound) o - inmovilización libre de soporte (carrier free) (Cao y col., 2003).

1.5.2.1. Inmovilización en una matriz inerte

Inmovilización covalente

Esta metodología se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con residuos aminoacídicos de la proteína. Entre los 20 aminoácidos que conforman la estructura de las enzimas, los más involucrados en la formación de enlaces con el soporte son Lys, Cys, Tyr e His, y en menor medida Met, Trp, Arg, Asp y Gln. El resto de los aminoácidos debido a su carácter hidrofóbico, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente (Tran y Balkus, 2011; Barbosa y col., 2015).

Más recientemente se han desarrollado soportes heterofuncionales los cuales, además de tener grupos reactivos epoxi, poseen un segundo grupo reactivo en el soporte (ej: grupos amino). Esto permite modificar la orientación de la enzima durante la inmovilización, lo que resulta en algunos casos en una mayor estabilización (Mateo y col., 2006, 2010). Esta técnica consta de dos pasos, en el primero se lleva a cabo la activación del soporte y en el segundo la aminación del mismo (Vieira y col., 2011). Este método le confiere una alta estabilidad operacional

a la enzima y es bastante flexible, por lo que la inmovilización puede adaptarse a las características particulares de cada proceso (Illanes y col., 2012).

Inmovilización por adsorción (unión no covalente)

Es llevada a cabo adsorbiendo la enzima sobre un soporte sólido mediante interacciones de van der Waals, electrostáticas, y/o hidrofóbicas (Stepankova y col., 2013). Este es un método simple y el soporte se puede recuperar después del agotamiento de la actividad enzimática, mediante la desorción de las proteínas.

Los rendimientos de inmovilización son generalmente altos y no involucra reactivos perjudiciales para el medioambiente. El principal inconveniente del método es que la enzima se puede desorber fácilmente de su soporte, aún por cambios sutiles en el medio de reacción (Illanes y col., 2012).

Inmovilización por entrapamiento

Consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carragenato o resinas de poliuretano. El entrapamiento puede ser en geles o en fibras sintéticas, que suelen ser más resistentes que los geles. En el primer caso, la enzima queda atrapada en el interior de un gel, mientras que en el segundo caso la enzima se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de la fibra sintética.

El entrapamiento es experimentalmente simple y la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura. Sin embargo, requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización de los monómeros (lograda por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico) que formarán el soporte, para evitar alteraciones de los grupos reactivos de la proteína (Arroyo, 1998).

1.5.2.2. Inmovilización libre de soporte

El uso de un soporte generalmente conduce a la disminución de la actividad enzimática. Este inconveniente no se supera aumentando la carga enzimática porque la pérdida de actividad ocurre debido a las restricciones difusionales internas de los

sustratos y a la posibilidad de unirse la enzima a través de grupos funcionales involucrados en su sitio activo. En consecuencia, existe un interés creciente en desarrollar la inmovilización libre de soportes, como los CLEAs. Además, la producción de éstos es simple y económica porque no se requiere proteína purificada o cristalizada como material de partida, ni de un soporte inerte (Sheldon, 2011; Sheldon y van Pelt, 2013; Roessl y col., 2010). En este método, la enzima constituye su propio soporte de modo que se obtienen concentraciones próximas al límite teórico de empaque (Cao y col. 2000; Cao, 2005).

Las enzimas inmovilizadas libres de soporte se preparan por entrecruzamiento químico de la proteína, utilizando glutaraldehído como principal agente de entrecruzamiento. Esta estrategia ha sido aplicada para el entrecruzamiento de enzimas en solución (CLEs), de cristales enzimáticos (CLEC) y, más recientemente, de agregados enzimáticos (CLEAs) (Illanes y col., 2012; Vossenber y col., 2012 b).

Entrecruzamiento de enzimas en solución (CLEs)

Los CLEs son obtenidos por entrecruzamiento de las enzimas disueltas, a través de la reacción de los grupos $-NH_2$ de su superficie con un reactivo químico bifuncional, tal como glutaraldehído (Sheldon y van Pelt, 2013). En la actualidad ya no se utilizan a nivel de proceso, principalmente debido a sus malas propiedades mecánicas y severas limitaciones de transferencia de masa (Illanes y col., 2012).

Entrecruzamiento de cristales enzimáticos (CLEC)

Los CLEC se forman por cristalización de la proteína enzimática y posterior entrecruzamiento con el reactivo bifuncional, normalmente glutaraldehído (Stepankova y col., 2013; Sheldon y van Pelt, 2013; Abraham y col., 2004). Son biocatalizadores robustos, altamente activos y de tamaño de partícula controlable, variando de 1 a 100 μm .

Los CLEC son significativamente más resistentes que la enzima soluble a la desnaturalización por calor, por disolventes orgánicos y por proteólisis. Su estabilidad operativa y facilidad de reciclaje, sumado a su alta productividad catalítica, los hace muy atractivos para biotransformaciones industriales (Amorim

Fernandes y col., 2005). Sin embargo, un inconveniente inherente a los CLEC es la necesidad de cristalizar la enzima previamente, lo cual se traduce en costos altos para muchas aplicaciones (Sheldon y van Pelt, 2013; Wilson y col., 2006b).

Agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs)

Los CLEAs son producidos por la formación de uniones covalentes (mediante un agente de entrecruzamiento) entre los agregados enzimáticos obtenidos mediante técnicas convencionales sencillas de precipitación de proteínas, tales como sales (sulfato de amonio y de sodio), solventes orgánicos (etanol, acetona) o polímeros no iónicos (polietilenglicol) (Cao, 2005; Stepankova y col., 2013).

Este método presenta mejores propiedades mecánicas que los CLEs y mayores rendimientos de actividad. Su producción es más simple y económica que los CLECs porque no se requiere proteína purificada y cristalizada como material de partida (Sheldon, 2011; Roessl y col., 2010).

Existen diferentes tipos de CLEAs:

- Por co-agregación de la enzima y el polímero o por encapsulación en partículas de gel (Wilson y col., 2006a,b).
- CLEAs de enzimas multiméricas con estabilidad aumentada mediante la prevención de la disociación de las subunidades (Wilson y col., 2004a,b).
- Combi-CLEAs que permiten múltiples reacciones en cascada (Dalal y col., 2007; Sheldon y col., 2007).

1.5.2.3. Elección del método de inmovilización

Aunque se han desarrollado y aplicado muchas técnicas de inmovilización a numerosas enzimas, se reconoce que no existe un método universalmente válido. No obstante, debido a la abundante información disponible se pueden comparar y seleccionar los métodos más adecuados para cada aplicación específica (Tabla 1).

La elección debe tener en cuenta las condiciones de la reacción, el tipo de sustrato y el tipo de reactor a utilizar, entre otros.

En general, los métodos de preparación difícil y de mayor costo proporcionan biocatalizadores más estables y duraderos; en cambio, aquellos métodos más

sencillos como la adsorción, donde la unión de la enzima con el soporte es débil, originan derivados inmovilizados que presentan pérdidas de actividad y que, operacionalmente, deben ser reemplazados frecuentemente (Arroyo, 1998).

Tabla 1: Comparación de los diferentes métodos de inmovilización.

Método	Entrampamiento	Entrecruzamiento	Adsorción	Unión covalente
Preparación	Difícil	Intermedia	Sencilla	Difícil
Fuerza de unión	Media	Débil-Media	Media	Fuerte
Actividad enzimática	Baja	Baja	Media	Alta
Regeneración soporte	Imposible	Imposible	Posible	Difícil
Costo del proceso	Medio	Medio	Bajo	Alto
Estabilidad	Alta	Alta	Baja	Alta
Resistencia microbiana	Si	Si	No	No

1.5.3. Ingeniería de sustrato

La mayoría de las proteasas son capaces de reconocer a más de un aminoácido como sustrato, pero no todas ellas son capaces de acoplar cualquier secuencia de aminoácidos (Bordusa, 2002).

Debido a la especificidad de las proteasas, pueden actuar como donadores de acilo aquellos aminoácidos cuya cadena lateral pueda ser reconocida por el subsitio S de la enzima. Por ejemplo, tripsina requiere sustratos que contengan Arg o Lys como carboxilo terminal. En cambio, los nucleófilos se reconocen en la región S' de la enzima (Figura 3).

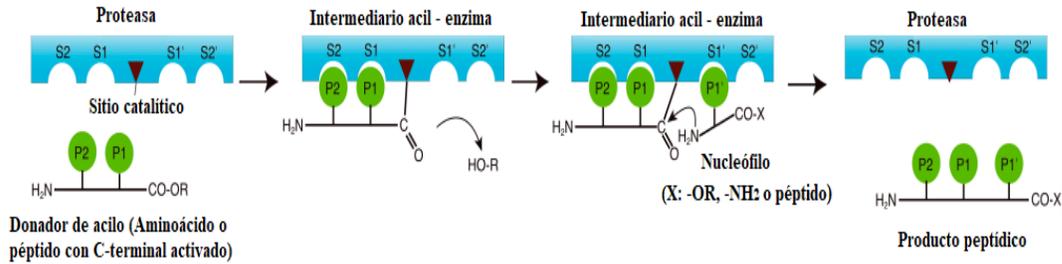


Figura 3. Síntesis de péptidos catalizada por proteasas de acuerdo a la nomenclatura de Schechter and Berger (Schechter y Berger, 1967).

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).

Por otra parte, la manipulación del grupo saliente del donador de acilo es generalmente útil para aumentar la especificidad de la proteasa hacia un aminoácido por el que la proteasa había demostrado previamente una menor preferencia, aumentando la velocidad de la reacción (Miyazawa y col., 2014). En KCS, es habitual utilizar aminoácidos sintéticos como donadores de acilo conteniendo diferentes grupos salientes (nitrilo, amino, oxialquil derivados, p-nitrofenilo, p-nitroanilina, entre otros).

La manipulación del grupo saliente afecta la relación aminólisis / hidrólisis de un donador de acilo y como consecuencia, el rendimiento de conversión en producto, aunque el intermediario acil-enzima formado sea el mismo.

Otra estrategia es el uso de sustratos miméticos, los cuales permiten la formación de un intermediario acil-enzima y el ataque nucleofílico que da lugar a la formación de la unión peptídica, pero ésta no puede ser hidrolizada porque no se corresponde con la especificidad de la proteasa (Lombard y col., 2005; Grünberg y col., 2000).

1.6. Avances y desafíos de la síntesis enzimática de péptidos

El desarrollo de nuevos métodos adecuados para la producción en gran escala de péptidos biológicamente activos con proteasas ha sido intensamente investigado

en las últimas décadas. Sin embargo, las enzimas son por lo general catalizadores lábiles, por lo que se requiere de proteasas más activas, específicas y estables, intentándose mejorar las proteasas existentes mediante el uso de tecnologías novedosas de ingeniería genética y de proteínas (Bernal y col., 2018; Xu y col., 2013).

El diseño de procesos que involucran reacciones enzimáticas implica la optimización de los parámetros operacionales más relevantes: pH, temperatura, concentración de solvente orgánico, actividad y estabilidad de la enzima bajo las condiciones de operación, solubilidad de los reactantes y estabilidad de los sustratos y productos.

La cantidad de variables críticas de un proceso enzimático hace que la optimización de los rendimientos de conversión y productividades en función de la economía del proceso sea dificultosa (Illanes y Wilson, 2003). En este sentido, la síntesis enzimática de péptidos es una tecnología menos madura que la síntesis química y no hay ningún protocolo de síntesis establecido, siendo cada situación un caso particular que tiene que ser extensamente estudiado y optimizado para ser tecnológicamente competitivo (Barberis y col., 2008).

La alta especificidad y reactividad bajo condiciones suaves de operación, lo cual es una característica de los procesos enzimáticos, puede tener un fuerte impacto sobre el análisis económico, ya que reducirá el número de operaciones requeridas para la síntesis y el gasto de energía, disminuyendo el impacto ambiental, como consecuencia de la menor cantidad de efluentes y el más bajo índice de toxicidad que en los procesos químicos. Este último aspecto es muy relevante, ya que los procesos enzimáticos se pueden considerar como una tecnología limpia (*green technology*), más acorde con el concepto de desarrollo sustentable.

El tamaño de los péptidos es la mayor restricción para la síntesis enzimática, puesto que no se ha desarrollado ningún protocolo automatizado que permita el crecimiento de la cadena peptídica. Además, los requerimientos de protección y la modificación de las variables operacionales en cada etapa dificultan el proceso, de modo que en la práctica solo péptidos pequeños (de menos de 10 residuos de aminoácidos) han sido sintetizados enzimáticamente con moderado éxito. Entre ellos

se consignan agentes antibióticos y antivirales, péptidos neuroactivos, anticancerígenos, reguladores enzimáticos e inhibidores, hormonas y péptidos inmunoactivos, péptidos funcionales de interés nutricional y sensorial, antioxidantes, y surfactantes (Barberis y col., 2008; Vlieghe y col., 2010; Dabur Research Foundation, 2003; Pharmacia Ab, 2007; Tanaka y col., 2009).

La baja expresión de la actividad enzimática en solventes no acuosos ha sido mejorada con el tratamiento de las enzimas con éteres en corona (van Unen y col., 2002).

La síntesis de péptidos utilizando solventes orgánicos como medio de reacción permanece limitada a la síntesis de di y tripéptidos. No obstante, una interesante estrategia fue diseñada para la síntesis enzimática del octapéptido del extremo C-terminal de colecistoquinina (CCK-8), el cual es un péptido biológicamente activo y de interés terapéutico para controlar la función gastrointestinal. La síntesis fue llevada a cabo en medio orgánico y fue diseñada de modo convergente, en el cual un tripéptido y un pentapéptido fueron sintetizados separadamente utilizando papaína, α -quimotripsina y termolisina (todas proteasas disponibles comercialmente y de bajo costo), y finalmente, se unieron enzimáticamente los dos fragmentos (Fité y col., 2002). El proceso se escaló a nivel de planta piloto y se realizó el análisis económico del mismo. El rendimiento global del proceso fue bastante bajo y el requerimiento de protección en las diferentes etapas del proceso fue el mayor obstáculo para llegar a una operación económicamente viable en gran escala. Sin embargo, la estrategia puede ser de utilidad para otros péptidos biológicamente activos.

El gran potencial de la síntesis enzimática de péptidos es la fuerza motriz de la investigación en torno al diseño de nuevos biocatalizadores enzimáticos, de sustratos y medios de reacción. Los avances en estas áreas ya son muy importantes, de modo que los resultados tecnológicos esperados seguramente se producirán en las próximas décadas (Illanes y col., 2009a,b).

La síntesis enzimática de péptidos ha resultado mejor alternativa tecnológica que la síntesis química solo en casos donde las propiedades de las enzimas tienen profundas implicancias en el proceso. Un caso ilustrativo de aquello es el edulcorante

no calórico aspartamo, el cual se produce comercialmente mediante un proceso enzimático utilizando la proteasa termolisina (Kusano y col., 2010).

Más allá de los avances tecnológicos en la síntesis de péptidos por biocatálisis, la baja productividad, el bajo rendimiento y el alto costo de las enzimas, son problemas que deben ser resueltos para hacer competitiva esta estrategia de proceso en un amplio espectro de casos.

Es importante señalar que el uso de solventes orgánicos, usualmente requeridos para llevar a cabo la síntesis enzimática de péptidos, impone restricciones adicionales en el diseño e ingeniería del proceso y contradice el concepto de tecnología limpia, de manera que se están realizados grandes esfuerzos para la sustitución de los solventes orgánicos por sistemas más sustentables ambientalmente, entre los cuales se encuentran los líquidos iónicos (Domínguez de María, 2012; Pinto y col., 2012; Noritomi y col., 2009a,b), los eutécticos profundos (Maugeri y col., 2013) y los medios de reacción sólidos o semisólidos (Halling y col., 1995). Sin embargo, estos sistemas están aún en un incipiente estado de desarrollo tecnológico.

El incremento en las regulaciones de seguridad y salud, y la demanda creciente de péptidos biológicamente activos por parte de la industria alimenticia y farmacéutica, han promovido una intensa búsqueda de alternativas biotecnológicas a la síntesis química de péptidos (Narai- Kamayama y col., 2009 y 2010; Jia y col., 2010; Perlikowska y col., 2010; Chen y col., 2012; Corrons y col., 2012; Poyarkova y col., 2012; Rao y col., 2012; Yousr y Howell, 2015; Nongonierma y col., 2015; Koyama y col., 2014).

1.6.1. Péptidos Bioactivos. Antihipertensivos

Actualmente, la base de datos BIOPEP informa que existen 2609 secuencias peptídicas con potenciales actividades biológicas, de las cuales algunas provienen de fuentes naturales y otras son productos de síntesis. Entre ellas, 556 secuencias peptídicas tienen potencial actividad antihipertensiva (son inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, ECA). Se han aislado y secuenciado también una gran cantidad de péptidos naturales con potencial actividad inmuno y citomoduladora, antimicrobiana, anticancerígena, agonista y antagonista opioide, antitrombótica,

quelante, anorexigénica y antiviral (BIOPEP Database, 2012). Algunos de ellos son multifuncionales porque ejercen varios de estos efectos simultáneamente.

A nivel mundial, existe un creciente interés en el desarrollo de *alimentos funcionales* (además de su valor nutritivo, mejoran una función del organismo o reducen el riesgo de sufrir una enfermedad) y *nutracéuticos* (aportan un beneficio para la salud de carácter médico, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades). Muchos de ellos han sido obtenidos a partir de la hidrólisis enzimática de ciertas proteínas alimenticias (leche, soja, suero, etc.), lo que permite liberar péptidos naturales (encriptados en la proteína) que poseen demostradas propiedades biológicas *in vitro* (antihipertensivas, antioxidantes, antimicrobiana, etc.) (Saint-Sauveur y col., 2008; Quirós y col., 2009; Muro Urista y col., 2011; Rao y col., 2012; Capriotti y col., 2016).

La nutrición apunta cada vez más a ser una ciencia que contribuya en la prevención de enfermedades. Así, por ejemplo, los péptidos con potenciales actividades antihipertensivas incorporados a alimentos podrían ser particularmente interesantes para mantener la salud de la población, ya que la hipertensión es uno de los problemas de salud pública más importantes del mundo (Hernández - Ledesma y col., 2011). Aunque no es la intención que los péptidos naturales reemplacen las drogas, pueden no obstante ocupar un lugar primordial en la prevención y en las primeras etapas del tratamiento de pacientes con hipertensión leve (Vermeirssen y col., 2004; Yousr y col., 2015; Coscueta y col., 2016).

En comparación con las drogas, a los péptidos naturales se les atribuyen algunas ventajas esenciales, como la ausencia de efectos adversos asociados con los fármacos sintéticos. Sin embargo, investigaciones futuras deberán contribuir a estudiar su biodisponibilidad, a determinar la estructura y los mecanismos moleculares de actividad, a evaluar su seguridad como ingredientes funcionales, a determinar su farmacocinética y toxicocinética, y a desarrollar análogos modificados que permitan una mayor expresión de su actividad biológica. Muchos de estos aspectos exceden el marco de esta tesis doctoral pero constituirán la proyección de nuestras futuras investigaciones.

OBJETIVO GENERAL

Aplicar proteasas pre-purificadas de los tallos y pecíolos de *Asclepias curassavica* L. (Asclepiadaceae), una planta superior que crece en Argentina, en forma soluble e inmovilizada y en sistemas acuoso-orgánicos, como un nuevo catalizador de la síntesis de péptidos bioactivos con potencial actividad *antihipertensiva*; de interés para la industria alimenticia y farmacéutica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener el extracto pre-purificado de los tallos y pecíolos de *Asclepias curassavica* L. (Asclepiadaceae) para ser utilizado como catalizador de la síntesis de péptidos bioactivos en sistemas acuoso-orgánicos.
2. Caracterizar el extracto pre-purificado de *A. curassavica* (asclepaína) en términos de actividad proteolítica, contenido de proteínas totales, estabilidad operacional en solución acuosa y en sistemas acuoso-orgánicos (homogéneos y macroheterogéneos), y preferencias por sustratos aminoacídicos sintéticos; con el objeto de seleccionar los medios de reacción y los sustratos más promisorios para llevar a cabo las reacciones de síntesis enzimática de péptidos con potencial actividad antihipertensiva.
3. Estudiar el efecto de los sistemas acuoso-orgánicos seleccionados sobre la estructura secundaria de asclepaína c I, por FTIR.
4. Realizar el modelado molecular superficial de asclepaína cI (*Asclepias curassavica*) y papaína (*Carica papaya*), utilizando el programa YASARA Structure (versión 17.4.17.W.64), con el objeto de conocer los residuos aminoacídicos que efectivamente podrán interactuar con los soportes de inmovilización.
5. Inmovilizar el extracto pre-purificado de asclepaína y de otras enzimas comerciales (papaína, quimotripsina) por diferentes metodologías: adsorción a

soportes sólidos sin funcionalizar (sílica), unión covalente simple (glioxil-agarosa y glioxil-sílica), unión covalente multipuntual (octil-glioxil-sílica), y entrecruzamiento con reactivos bifuncionales (CLEAs). Evaluar rendimiento en actividad y en proteínas, así como también la estabilidad enzimática en los medios de reacción seleccionados para las síntesis peptídica de interés.

6. Seleccionar péptidos modelo con potencial actividad antihipertensiva de la base de datos BIOPEP y de bibliografía, tomando como base las preferencias de asclepaína, para sintetizarlos bajo los mecanismos de control termodinámico y cinético, utilizando asclepaína soluble e inmovilizada como catalizador.
7. Analizar los componentes de las reacciones de síntesis enzimáticas (sustratos, productos y subproductos) por RP-HPLC, purificar los péptidos obtenidos y dilucidar su estructura por HPLC-MS o UPLC-MS.
8. Determinar el grado de conversión de sustrato en producto y los rendimientos en producto, utilizando asclepaína soluble e inmovilizada en los diferentes sistemas de reacción estudiados, para luego maximizar el rendimiento de los productos de síntesis.
9. Obtener péptidos análogos a los péptidos modelo por síntesis química en fase sólida (SPPS).
10. Determinar la actividad antihipertensiva *in vitro* de los productos peptídicos sintetizados por vía química y enzimática, y compararlas con las informadas en la bibliografía para los péptidos naturales (tomados como modelo en este estudio).
11. Determinar otras actividades biológicas de los péptidos sintetizados, la estabilidad en plasma humano y la potencial actividad citotóxica *in vitro* de los mismos, utilizando líneas celulares humanas 293FT.

12. Proyectar la producción en mayor escala de los péptidos con actividad antihipertensiva *in vitro* que resulten de interés.

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍAS

2.1. Preparación y caracterización de los extractos enzimáticos de *Asclepias curassavica* L.

2.1.1. Material vegetal

Asclepias curassavica L. pertenece a la familia Asclepiadaceae, es un subarbusto perenne con hojas opuestas de 5-15 cm de largo y terminadas en punta, savia lechosa (látex) y flores brillantes de color rojo-púrpura, dispuestas en forma de corona. Esta planta florece continuamente desde la primavera hasta el otoño (Dimitri, 1972). Es nativa de América del Sur, pero se encuentra en zonas tropicales y subtropicales.



Figura 4. Hoja y flores de *Asclepias curassavica* L.

2.1.2. Preparación del extracto crudo y pre-purificado de *Asclepias curassavica* L.

El extracto crudo se obtuvo a partir del látex de los tallos y pecíolos de la planta. El mismo fue recogido sobre buffer fosfato (0,1 M) pH 7 con cisteína (5 mM) y EDTA (5 mM), con la finalidad de evitar la oxidación y la actividad fenoloxidasa, respectivamente. Este homogeneizado (extracto proteolítico crudo) se centrifugó a 16.000 xg durante 1 h a 4 °C, obteniéndose el sobrenadante que constituye el extracto proteolítico pre-purificado (Liggieri y col., 2004).

2.1.3. Determinación de la actividad proteolítica de asclepaína

Se llevó a cabo utilizando N- α -benzoyl-L-arginina-4-nitroanilida.HCl (BAPNA, Sigma) como sustrato. 1 mg/mL de extracto enzimático se incubó con 5 mg/mL de sustrato en buffer Tris – HCl (0,1 M) pH 8,5, conteniendo cisteína (20 mM) como activador para proteasas cisteínicas. Después de 5 min de reacción a 37 °C en un baño termostático con agitación, se leyó la absorbancia de la p-nitroanilina liberada a λ : 410 nm y su concentración se obtuvo a partir de una curva de calibrado (Priolo y col., 2001). Una unidad de actividad enzimática (UI) se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de p-nitroanilina/min en las condiciones del ensayo. Alternativamente, la actividad enzimática fue ensayada siguiendo el aumento de la absorbancia a λ : 435 nm, producida por la liberación de *p*-nitrofenol (pNO) a partir de la hidrólisis de Boc-L-alanina-*p*-nitrofeniléster en buffer fosfato 25 mM (pH 7) y 20 % v/v de etanol, a 30 °C durante 60 seg.

2.1.4. Determinación de la estabilidad operacional de asclepaína en diferentes sistemas acuoso – orgánicos

La selección de los solventes orgánicos a utilizar, se realizó a partir 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 sistemas: miscibles (formados por buffer y un solvente orgánico miscible) y bifásicos (formados por buffer y un solvente orgánico inmiscible).

La estabilidad de asclepaína en sistemas miscibles y bifásicos se ensayó por medio de la incubación del extracto pre-purificado en la mezcla de reacción a 40 °C, 200 rpm, durante 24 h. Se tomaron muestras periódicamente y se determinó la actividad enzimática específica (UI/mg de proteína), usando BAPNA como sustrato. Cada medio estuvo constituido por buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8) y 30, 50 o 70 % v/v de solvente orgánico.

Tabla 2. Diseño estadístico de los solventes orgánicos en función de sus parámetros físicoquímicos.

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 físicoquímicos se diferencian más con el grupo anterior o con el siguiente (Barberis y col., 2006).

2.1.5. Determinación de las preferencias de asclepaína frente a sustratos aminoácidos sintéticos

Las preferencias del extracto proteolítico en buffer y en los medios acuoso-orgánicos se determinaron según Priolo y col. (2001). Proteínas totales se determinaron por el método de Bradford (1976).

El estudio de las preferencias de asclepaína (medida como actividad esterolítica) se realizó con 50 µL de solución enzimática, 100 µL de N-α-CBZ-Aminoácido-*p*-nitrofenil éster (disueltos en DMSO) y 850 µL de buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8). La mezcla se incubó en baño de agua a 40 °C durante 5 min y el *p*-nitrofenol liberado se determinó espectrofotométricamente a λ: 405 nm. Para determinar los micromoles de *p*-nitrofenol producidos durante la reacción se utilizó

una curva de calibración. Paralelamente, se realizaron dos blancos preparados de igual forma, pero uno sin sustrato y otro sin enzima. Para el análisis en medios acuoso-orgánicos, se reemplazó el buffer por el medio de reacción correspondiente.

Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de actividad enzimática (UCBZ). Una UCBZ se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de *p*-nitrofenol por min, en las condiciones del ensayo.

2.1.6. Efecto de los solventes orgánicos sobre la estructura secundaria de asclepaína por Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).

Asclepaína se incubó durante 24 h a 200 rpm y a temperatura ambiente en buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8) y en los medios acuoso-orgánicos seleccionados en la sección 2.1.5. 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 (reflectancia total atenuada). 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 KBr 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):

$$r = \frac{\sum^n x_i y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}} \quad \text{ec. (1)}$$

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.

2.1.7. Modelado de superficie de asclepaína y papaína

El conocimiento estructural sobre una enzima y sus interacciones con los sustratos, o con los soportes utilizados para inmovilizarla, guían y complementan las investigaciones experimentales sobre biocatálisis e ingeniería de proteínas. A su vez, el conocimiento sobre la estructura de una enzima o de un sistema biocatalítico se puede generar a través de programas informáticos desarrollados para el modelado molecular de proteínas.

Para el modelado molecular superficial de papaína (*Carica papaya*) y asclepaína (*Asclepias curassavica*) se utilizó el programa YASARA Structure (versión 17.4.17.W.64) (Krieger y col., 2002). Este programa posee protocolos para dos aplicaciones biocatalíticas específicas, que incluyen modelado de homología y modelado molecular haciendo uso de funciones de minimización de energía, simulaciones de acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular.

El modelo molecular superficial de asclepaína se generó a partir de la secuencia B7VF64 de la base de datos UNIPROT, utilizando los siguientes parámetros: velocidad de modelado: lenta; número de interacciones PSI-PLAST en

la búsqueda de plantilla (PsiBLAST): 3; valor máximo permitido (PSI-) BLAST E para considerar la plantilla: 0,5; número máximo de plantillas que se utilizarán (total de plantillas): 5; número máximo de plantillas con la misma secuencia (Templates SameSeq): 1; estado de oligomerización máximo (OligoState): 2 (dimérico); número máximo de variaciones de alineación por plantilla (alineaciones): 3; número máximo de conformaciones probadas por ciclo (LoopSamples): 50; cantidad máxima de residuos añadidos (extensión temporal): 10. El software generó 13 modelos a partir de los cuales YASARA combinó las 13 mejores partes de los mismos para obtener un modelo híbrido, con el objetivo de aumentar la precisión.

Para el modelado superficial de papaína de *Carica papaya*, se usaron las coordenadas de rayos X refinadas a 1,65 Angstroms (PDB 9PAP).

2.2. Inmovilización enzimática

Se utilizó papaína y quimotripsina para la puesta a punto de las técnicas de inmovilización descritas en esta sección.

La actividad enzimática se determinó de la forma indicada en la sección 2.1.3. y la concentración de proteínas se cuantificó mediante el método de Bradford (1976).

Los rendimientos de inmovilización fueron determinados en términos de rendimiento de actividad (Y_A) y de rendimiento de proteínas (Y_P):

$$Y_A = \frac{A_e}{A_o} \cdot 100 \quad \text{ec (2)}$$

$$Y_P = \frac{P_i}{P_C} \cdot 100 \quad \text{ec (3)}$$

Donde A_e es la actividad expresada (medida en el biocatalizador inmovilizado, previa resuspensión del mismo en buffer), A_o es la actividad ofrecida al soporte, P_i es la cantidad de proteína inmovilizada por gramo de soporte (diferencia entre la cantidad de proteína ofrecida y la presente en el sobrenadante centrifugado) y P_C es la proteína ofrecida por gramo de soporte.

2.2.1. Síntesis del soporte de inmovilización enzimática sílica sin funcionalizar (S). Inmovilización por adsorción de asclepaína y papaína en S

La síntesis de sílica se llevó a cabo a partir de una mezcla de reacción con la siguiente proporción molar de reactivos: SiO_2 : Na_2O : CTAB: EtAc: H_2O = 1: 0,3: 0,24: 7,2: 193. Esta mezcla se calentó a 80 °C durante 48 h en condiciones de reposo. El sólido obtenido se calcinó a 540 °C (velocidad de calentamiento de 1,5 °C/min) durante 6 h (Bernal y col., 2014).

La inmovilización se llevó a cabo contactando 0,2 g de soporte de sílica con 4 mL de solución enzimática de asclepaína (42 UI /g de soporte) o con 4 mL de solución de papaína (35 UI /g de soporte). Ambas soluciones fueron preparadas en buffer fosfato de potasio 25 mM (pH 7). Las suspensiones se incubaron a 25 °C bajo agitación suave hasta que la actividad en los sobrenadantes fue cero o constante. A continuación, los biocatalizadores se lavaron con agua y se secaron a 25 °C.

2.2.2. Síntesis del soporte de inmovilización enzimática glioxil-agarosa (GA). Inmovilización covalente de quimotripsina y asclepaína en GA

Esta metodología consiste en la activación de agarosa mediante la introducción de grupos dioles, que en un paso posterior son oxidados a aldehídos. De esta forma, se favorece la unión de los grupos aldehídos con los grupos amino no protonados de la proteína, mediante la formación de una base de Schiff y su posterior reducción, lo que da lugar a la inmovilización de la enzima al soporte mediante la formación de una amina secundaria.

Para la preparación del gel de glioxil-agarosa (GA) se lavó reiteradas veces la agarosa con abundante agua y se filtró con la ayuda de una bomba de vacío. Posteriormente, se contactaron 21 g de agarosa con 6 mL de agua destilada y 10 mL de NaOH (1,7 N) en un agitador de palas. Se adicionaron 0,285 g de NaBH_4 sobre la solución anterior. Luego, se colocaron 7,2 mL de glicidol (gota a gota), mantenido en hielo. Se dejó en agitación durante 15-18 h. Se filtró y se lavó con abundante agua.

Al gel activado se le adicionó 0,642 g de NaIO_4 disueltos en 30 mL de agua destilada y se llevó a un volumen final de 300 mL con agua destilada, para oxidar los grupos hidroxilo a aldehídos. Dado que la reacción de oxidación es equimolecular, la

concentración de hidroxilo se calcula a partir de la concentración inicial de NaIO_4 que quedó sin reaccionar después de 2 h, leyendo la absorbancia a λ : 435 nm y extrapolando en una curva de calibrado. Se filtró la agarosa funcionalizada y se lavó con abundante agua.

Inicialmente se realizó la inmovilización de quimotripsina en el soporte, según lo reportado por Bahamondes y col. (2015). Se contactaron 15 mL de buffer bicarbonato de sodio (10,5 mM), conteniendo 1,35 mg de la enzima y 1,5 g de soporte, lo que equivale a una carga ofrecida de 0,5 mg de proteínas/g de soporte. El curso de la inmovilización se siguió durante 40 min a 25 °C, tomando muestras periódicamente con la finalidad de medir la actividad en la suspensión y en el sobrenadante, utilizando N-benzoil-L-tirosina-etil éster (BTEE) como sustrato. La absorbancia se midió a λ : 256 nm durante 1 min.

Se realizó un control de actividad correspondiente a la enzima soluble (sujeta a las mismas condiciones experimentales que el biocatalizador inmovilizado) para evaluar la estabilidad enzimática durante el curso de la inmovilización.

Finalmente, se realizó la reducción de la base de Schiff formada por la unión de la enzima al soporte, dando lugar a un enlace amino estable entre ellos (Urrutia y col, 2013). Para ello se empleó 1 mg NaBH_4 /mL durante 20-30 min y la suspensión se filtró y lavó con abundante agua.

La inmovilización de asclepaína en glioxil-agarosa se llevó a cabo contactando 20 mg de asclepaína y 0,2 g de soporte, lo que es equivalente a ofrecer 0,7 mg de proteína/g de soporte, durante 3 h a 25 °C. Es decir, se ofreció al soporte una carga de proteína similar a la usada con quimotripsina.

Luego, se variaron algunas condiciones experimentales para mejorar el rendimiento. Entre ellas: aumento del tiempo de inmovilización (5 h), adición de glicerol al buffer bicarbonato de sodio (para proteger la enzima) y disminución de la carga de proteína (0,35 mg/g de soporte). Se leyó la absorbancia a λ : 348 nm durante 1 min, utilizando BOC-L-alanina-p nitrofenil éster como sustrato.

2.2.3. Síntesis del soporte de inmovilización enzimática glioxil-sílica (GS).

Inmovilización covalente simple de asclepaína y papaína en GS

Se contactó 1 g de sílica (sintetizada como se describió en 2.2.1.) con 30 mL del reactivo de funcionalización glicidil oxipropil trimetoxi silano (GPTMS) al 10 %, durante 6 h a 94 °C con agitación suave. Luego, se filtró, se lavó el soporte con una mezcla de agua/acetona (70:30 v/v) y se secó. La oxidación se llevó a cabo poniendo en contacto el soporte con una solución 0,1 M de NaIO₄ durante 2 h a 25 °C. La presencia de grupos glioxilo se verificó cualitativamente con el reactivo de Schiff y se cuantificó espectrofotométricamente por valoración por retorno con NaHCO₃/KI (Bernal, y col., 2014).

La inmovilización enzimática se llevó a cabo contactando 0,2 g de soporte (GS) con 4 mL de la solución de asclepaína (29 UI/g de soporte) o con 4 mL de la solución de papaína (33 UI/g de soporte). Dichas soluciones se prepararon en buffer NaHCO₃ 100 mM (pH 10) conteniendo 20 % (v/v) de glicerol. Ese valor de pH favoreció la formación de bases de Schiff entre los grupos aldehído del soporte y los grupos amino de lisina en la superficie de la proteína (Mateo, et al., 2006). La suspensión se incubó a 25°C bajo agitación suave hasta que la actividad en el sobrenadante fue cero o constante. Posteriormente, los biocatalizadores se redujeron durante 15 min con 1 mg de NaBH₄/mL de biocatalizador, se lavaron con agua y secaron a 25 °C.

2.2.4. Síntesis del soporte de inmovilización enzimática octil-glioxil-sílica (OGS).

Inmovilización covalente multipuntual de asclepaína y papaína en OGS

Se sintetizó un soporte heterofuncional de octil-glioxil-silica calentando a reflujo, tolueno con la mezcla de reactivos de funcionalización formada por GPTMS - octil trimetoxi silano (OTMS), en una proporción de 1: 1. El soporte funcionalizado se obtuvo calentando a reflujo 1 g de sílica en 30 mL de tolueno anhidro, durante 6 h a 105 ° C. El soporte se filtró y lavó con acetona y agua para eliminar el tolueno residual y los silanos. El proceso de oxidación para la formación de grupos glioxil se realizó como se mencionó anteriormente para el soporte GS (Bernal y col., 2014).

La inmovilización enzimática se llevó a cabo contactando 0,2 g de OGS con 4 mL de una solución de asclepaína (24 UI/g de soporte) o con 4 mL de una solución de papaína (24 UI/g de soporte). Dichas soluciones se prepararon en buffer K_2HPO_4 25 mM (pH 7). La suspensión se incubó a 25 °C bajo agitación suave hasta que la actividad en el sobrenadante fue cero o constante. Luego, los biocatalizadores se filtraron, se lavaron con agua y se restituyeron con buffer $NaHCO_3$ 100 mM (pH 10); se reiteró la incubación hasta actividad enzimática constante. Posteriormente se redujo el biocatalizador durante 20 min con 1 mg/mL de $NaBH_4$. Finalmente, se lavó con agua y se secó a 25 °C.

2.2.5. Inmovilización mediante agregados enzimáticos entrecruzados de papaína (CLEAs)

10 mL de la solución de papaína en buffer Na_2HPO_4 0,1 M (pH 7) se precipitaron con 40 mL de $(NH_4)_2SO_4$. Después de 30 min, se añadieron 4 mL de solución de glutaraldehído (25 %, v/v) para entrecruzar el precipitado enzimático, manteniendo la mezcla en agitación durante 1 h. Finalmente, el CLEA resultante se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min y se lavó con buffer Na_2HPO_4 0,1 M (pH 7). Este procedimiento se repitió cinco veces. Todos los pasos se realizaron en un baño de hielo a aproximadamente 2 °C.

2.2.6. Determinación de la estabilidad de asclepaína inmovilizada en sílica sin funcionalizar (S) y en octil-glioxil-sílica (OGS), utilizando sistemas acuoso-orgánicos

La estabilidad de asclepaína se ensayó con la enzima inmovilizada en los soportes en los que mostró mayor robustez y en los medios de reacción seleccionados para la síntesis peptídica (sección 2.1.4). El biocatalizador se incubó a 40 °C, 200 rpm, durante 24 h. Se tomaron muestras periódicamente y se determinó la actividad enzimática residual (UI/g de soporte), usando Boc-L-alanina- p-nitrofenil éster como sustrato. Finalmente, se determinó el potencial catalítico de asclepaína inmovilizada en S y OGS, que se define como el área bajo la curva de actividad proteolítica residual versus tiempo; hasta 8 h de incubación (Illanes, 2008).

2.3. Aplicación de fitoproteasas como nuevos catalizadores para la síntesis de péptidos antihipertensivos en sistemas acuoso-orgánicos

2.3.1. Selección de las condiciones operacionales para las reacciones de síntesis enzimática de péptidos antihipertensivos

Los sustratos (nucleófilo y donador de acilo) utilizados para la síntesis peptídica fueron seleccionados tomando como base las preferencias que demostraron los extractos enzimáticos por los sustratos aminoacídicos sintéticos.

Los medios de reacción se seleccionaron tomando como base las actividades específicas y estabildades operacionales de asclepaína en los medios acuoso-orgánicos, expresadas como actividad proteolítica residual, tiempo de vida media ($t_{1/2}$) y potencial catalítico.

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 acuoso-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: acetonitrilo 50 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 3. Columna: Hypersil BSD (Base Silica Deactivated) C₁₈ (250 x 4,6 mm), tamaño de partícula: 5 µm. Detector: UV-Visible. La longitud de onda (λ) se determinó a través de un barrido espectral, eligiendo aquella que condujo a la mayor absortividad para cada uno de los aminoácidos utilizados.

La temperatura y velocidad de agitación fueron de 40 °C y 200 rpm, respectivamente. Si bien la enzima no disminuye su actividad hasta 60 °C, se seleccionó 40 °C debido a la volatilidad (presión de vapor) de algunos solventes orgánicos utilizados como medio de reacción. El pH de la reacción resultó del compromiso entre la actividad óptima de la enzima frente al pH (Liggieri y col., 2004) y los valores de pK del aminoácido utilizado como nucleófilo.

2.3.2. Selección de los péptidos tomados como modelo para las reacciones de síntesis enzimática de péptidos con potencial actividad antihipertensiva

La selección de los péptidos provenientes de fuentes naturales o de síntesis química se realizó a partir de la base de datos BIOPEP (2012) y de bibliografía con el objeto de sintetizar *análogos* por vía enzimática, tomando como base las preferencias de asclepaína por diferentes sustratos aminoacídicos sintéticos en diferentes medios de reacción.

La búsqueda se centró en secuencias cortas, preferentemente dipéptidos, con potencial actividad antihipertensiva. Los péptidos seleccionados fueron: Val-Gly-OH (VG), Gln-Gly-OH (QG) y Tyr-Gln-OH (YQ) (Shamloo y col., 2015; Cheung y col., 1980).

2.3.3. Síntesis enzimática de péptidos bioactivos con potencial actividad antihipertensiva, utilizando asclepaína soluble e inmovilizada

Se utilizaron los extractos enzimáticos pre-purificados de asclepaína en forma soluble, tanto en sistemas macroheterogéneos líquido – líquido (bifásico) como en sistemas homogéneos (miscibles).

Se utilizaron las condiciones operacionales descritas en 2.3.1 y los medios de reacción que resultaron más promisorios para las síntesis peptídicas de interés, en base a la estabilidad de asclepaína.

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 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 sustrato limitante en producto durante el transcurso de cada reacción de síntesis.

En todos los casos, se condujo paralelamente un blanco con todos los reactivos 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).

2.3.3.1. Síntesis enzimática bajo control cinético

En base a los estudios de preferencias realizados en el medio acetato de etilo-50 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 8, se eligió N- α -CBZ-Tyr-pNO (Z-Y-pNO) (72,5 mM) como donador de acilo y L-Gln-OH (72,5 mM) como nucleófilo, con el fin de sintetizar el péptido N- α -CBZ-Tyr-Gln-OH (Z-YQ) análogo al antihipertensivo YQ (Shamloo y col., 2015).

La reacción de síntesis de Z-YQ se llevó a cabo en el sistema bifásico mencionado, donde la fase acuosa (buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 8) contenía 6 UI/mg de enzima (asclepaína), 2-mercaptoetanol (20 mM) y L-Gln-OH (72,5 mM), y la fase orgánica contenía Z-Y-pNO (72,5 mM). La concentración de Z-Y-pNO se estableció en base a su solubilidad en la fase orgánica del sistema bifásico elegido y al coeficiente de partición de dicho sustrato entre las fases (P: 1,28), ofreciéndole a la enzima (que se encuentra en la fase acuosa) una concentración equivalente a 78 veces su K_M (0,728 mM). Se utilizó 2-mercaptoetanol (20 mM) como activador de la enzima y la base trietilamina (TEA), en concentración equimolar al nucleófilo, para mantenerlo desprotonado.

Además, con idéntico criterio, se eligió N- α -CBZ-Val-pNO (Z-V-pNO) como donador de acilo y L-Gly-OH como nucleófilo, con el fin de sintetizar el análogo del péptido VG con actividad antihipertensiva (Cheung y col., 1980). Es decir, N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG). La concentración de Z-V-pNO se determinó en función de la solubilidad de este sustrato en el sistema miscible seleccionado.

La reacción de síntesis de Z-VG se estudió en un medio miscible formado por 30 % v/v de metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8) que contenía 6 UI/mg de enzima libre (asclepaína), Z-V-pNO (7,28 mM), L-Gly-OH (7,28 mM), 2-mercaptoetanol (20 mM) y TEA (7,28 mM). Esta misma reacción fue llevada a cabo con asclepaína inmovilizada en OGS (43 UI/g de soporte), respetando las condiciones descriptas previamente.

Las reacciones se llevaron a cabo a 40 °C en un agitador orbital de GFL (3031, Alemania) a 200 rpm. Se tomaron alícuotas periódicamente (0,1 mL) de las fases acuosa y orgánica (sistema heterogéneo) o de la mezcla (sistema homogéneo), 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) de la forma previamente descrita.

2.3.3.2. Síntesis enzimática bajo control termodinámico

Se siguió el mismo procedimiento descrito para la síntesis bajo control cinético pero los sustratos utilizados como donador de acilo no estaban activados. Es decir: N- α -CBZ-Tyr-OH (Z-Y-OH), N- α -CBZ-Val-OH (Z-V-OH) y N- α -CBZ-Gln-OH (Z-Q-OH).

2.3.4. Maximización de los rendimientos en producto peptídico

Se estudiaron las relaciones entre donador 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 en producto y grado de conversión del sustrato limitante en producto, en las reacciones de síntesis (utilizando las enzimas solubles e inmovilizadas). Estos parámetros se definen según las ecuaciones 4 y 5.

α_s es la cantidad de sustrato limitante que se transformó en producto y subproductos durante la reacción; η representa la cantidad real obtenida de producto, dividida por la cantidad teórica máxima que se podría obtener si todo el sustrato limitante se consumiera en la reacción. Se calcula porcentualmente como el cociente entre la concentración molar del producto obtenido y la concentración inicial del sustrato limitante (Trusek-Holownia, 2003).

$$\eta = \frac{[P]}{[S_0]} \times 100 \quad \text{ec. (4)}$$

$$\alpha_s = \frac{[So] - [St]}{[So]} \times 100 \quad \text{ec. (5)}$$

Donde: P es la concentración molar de producto, So es la concentración molar del donador de acilo al tiempo inicial, St es la concentración molar del donador de acilo a un tiempo de reacción determinado.

2.4. Síntesis química de análogos (carboxi y amino terminal) de los patrones de los péptidos bioactivos tomados como modelo

2.4.1. Síntesis química de péptidos en fase sólida (SPPS), utilizando bolsas de polipropileno

0,1 g de resina Fmoc-Rink amide AM (sustitución: 0,59 mmol/g; tamaño de partícula: 100-200 mesh) se colocó en bolsas de polipropileno. Dicha resina permite obtener péptidos con grupo 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 (fluorenilmetoxicarbonilo) 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 se realizaron lavados en DMF (tres veces durante 1 min), en isopropil alcohol (IPA) (una vez durante por 1 min); en azul de bromofenol 1 % (dos veces durante 1 min); en DMF (dos veces durante 1 min) y en DCM (dos veces durante 1 min), bajo condiciones de agitación a 200 rpm en un agitador 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'-tetrametiluroniotetrafluoro borato (TBTU) o N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) se usaron para dobles o triples

acoplamiento, respectivamente. Los restantes aminoácidos se ensamblaron mediante ciclos de acoplamiento y desprotección hasta completar la secuencia peptídica deseada. El grupo $N\alpha$ 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 (TFA) / H_2O / triisopropilsilano (92,5: 2,5: 2,5) v/v a temperatura ambiente durante 90 min y 200 rpm. El péptido se precipitó con éter etílico enfriado a $-70^\circ C$. Aquellos péptidos que no precipitaron, se trataron con H_2O miliQ previa evaporación del éter. Por último, los péptidos se purificaron por Sepak C_{18} , se liofilizaron y se analizaron por RP-HPLC, y se confirmó su peso molecular por MALDI-TOF.

2.4.2. Síntesis química de péptidos en fase sólida (SPPS), 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 terminal. 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) 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 nuevamente dos veces 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 celda 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)

$$\text{Sustitución} = \frac{(Fd * A)}{(e * l * m)} \quad \text{ec. (6)}$$

Fd: factor de dilución.

A: absorbancia a 300 nm.

e: coeficiente de extinción de 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 $N\alpha$ 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 / H_2O / triisopropilsilano (95: 2,5: 2,5) v/v a temperatura ambiente durante 90 min y 200 rpm.

El péptido se precipitó con éter etílico enfriado a -70°C , se purificó en una columna C_{18} (Merck), se liofilizó y se analizó por RP-HPLC y MALDI-TOF para confirmar su pureza y masa molecular.

2.4.3. Protocolo de purificación de péptidos sintetizados por vía química y enzimática

Para la purificación de los péptidos sintéticos se utilizaron columnas Sepak C_{18} (Clean-up® UCT) de 500 mg previamente activadas con 2 mL de metanol grado HPLC (dos veces) a un flujo de 1 mL/min, y lavadas con 2 mL de agua miliQ (dos veces) con la finalidad de eliminar impurezas. Se disolvió 10 mg de cada péptido 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).

2.5. Determinación de las actividades biológicas *in vitro* de los péptidos sintetizados por vía enzimática

2.5.1. 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 ECA.

La actividad inhibitoria de la ECA frente a diferentes concentraciones de los péptidos $\text{N-}\alpha\text{-CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH}$ (Z-YQQ), Z-VG y $\text{N-}\alpha\text{-CBZ-Gln-Gly-OH}$ (Z-QG) obtenidos por síntesis enzimática se determinó adicionando 2,5 μL de cada péptido (100 mg/mL) a 292,5 μL de buffer Tris HCl 0,1 M (pH 7), 3 μL de ECA (1:10 de ECA 0,02 UI/L), NaCl 50 mM y 10 μM de ZnCl_2 , y finalmente 2 μL 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 $\lambda_{\text{ex}} = 320 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$ 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 ECA.

2.5.2. Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro*

Se empleó un método cinético-turbidimétrico utilizando cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, 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 frascos Erlenmeyer de 10 mL con caldo de cultivo Müller-Hinton conteniendo 0,05 mL del inóculo previamente preparado, el caldo de cultivo y concentraciones crecientes del péptido en estudio. Los frascos Erlenmeyer se incubaron en una cámara de cultivo Rosi 1000 (37 °C, 180 rpm), se extrajeron alícuotas a intervalos de 20 min durante 200 min y se leyó la transmitancia (T) a λ : 720 nm. Se llevó a cabo un blanco conteniendo 0,05 mL del inóculo y 2,3 mL caldo de cultivo Müller-Hinton, sin agregado de péptido.

Mediante las ecuaciones (7) y (8) se calcularon los valores de ln Nt (unidades formadoras de colonia/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.

$$[\ln Nt = 27,1 - 8,56 \cdot T] \quad \text{ec. (7)}$$

$$[\ln Nt = 27,4 - 10,3 \cdot T] \quad \text{ec. (8)}$$

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).

2.5.3. Determinación de la actividad anticoagulante *in vitro*

La actividad anticoagulante de los péptidos en estudio 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 de péptido (0,7 ppm) en buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8).

Test de Tiempo de Trombina (TT). Este test evalúa el tiempo de conversión de fibrinógeno a fibrina. Se ensayó adicionando 50 μL de la solución estándar del péptido en estudio (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 200 μL del reactivo TT (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 (PT). Este test evalúa el tiempo de conversión de protrombina a trombina. Se ensayó pre-incubando el pool de plasma y el reactivo PT a 37 °C durante 3 min. Luego, se adicionó 25 μL de la solución estándar de péptido a 75 μL del pool de plasma pre-incubado. A dicha mezcla, se adicionó 200 μL del reactivo PT y se midió el tiempo de coagulación.

Test de Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado (APTT). Este test permite evaluar la acción del péptido en estudio sobre los factores de coagulación VIII, IX, XI y XII de la cascada de coagulación. Se adicionó 25 μL de la solución estándar de péptido a 75 μL del pool de plasma, y se incubó a 37°C durante 1 min. Luego, se agregó 100 μL del reactivo APTT y se incubó a 37 °C, durante 3 min. El tiempo de coagulación se determinó al adicionar 100 μL de CaCl_2 (25 mM).

Todos los ensayos se realizaron por quintuplicado y se compararon con un compuesto anticoagulante 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 péptido. Se realizaron análisis estadísticos en cada caso. Las diferencias se consideraron significativas para valores de $p < 0,05$.

2.6. Determinación *in vitro* de la toxicidad aguda de los péptidos sintetizados

La toxicidad potencial de los péptidos en estudio se analizó en la línea celular humana 293FT (Fotakis y Timbrell, 2006). Las células se cultivaron en botellas utilizando un medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con suero bovino fetal (FBS) al 10 % 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 y se contaron preparándose una suspensión de 5 x 10⁴ de células/mL. Se añadió 100 µL de suspensión de células /pocillo a una microplaca de 96 pocillos y se incubó durante toda 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 100 µL de solución de péptido 0,7; 2,1; 7 y 21 ppm en DMEM y se añadieron a los pocillos que contenían células. Se guardaron varios pocillos para controles de supervivencia (PBS en DMEM) y de toxicidad (20 % de DMSO en DMEM). La microplaca se incubó en condiciones de crecimiento durante 2 h. Luego, se añadieron 20 µL/pocillo de reactivo 3-(4,5-dimetil tiazol)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) (CellTiter 96R Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit, Promega), incubando durante 4 h adicionales en condiciones de crecimiento. Se midió la absorbancia del producto Formazan a λ: 490 nm cada 1 h hasta las 4 h, después de la adición del reactivo (Figura 5). Se determinó el porcentaje de supervivencia celular en base a una referencia (100 % viabilidad celular).

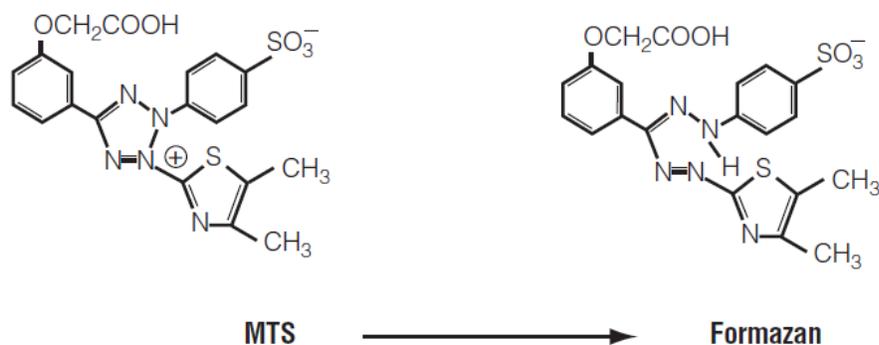


Figura 5. Estructura de MTS y su producto, Formazan.

2.7. Determinación de la estabilidad de los péptidos sintetizados en plasma humano

La estabilidad de los péptidos se determinó incubando 0,7 a 21 ppm del péptido en estudio en un conjunto de plasma humano de individuos sanos (no anticoagulados) a 37 °C. La actividad anticoagulante se determinó como APTT, PT 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).

2.8. Determinación cuantitativa de fibrinógeno en plasma en presencia del péptido en estudio, 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 determinación 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 : 340 nm.

Se usó la 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; 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 μL de fibrinógeno (5,69 mg/ml) (Wiener Lab., Argentina) en 165 μL 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 μL de fibrinógeno (5,69 mg/mL) (Wiener Lab., Rosario, Argentina) en 131 μL de buffer de ensayo (Tris - HCl 50 mM (pH 7,2) con NaCl 0,12 mM) y 34 μL 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 el péptido en estudio (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 1,5 mL de Solución A, se homogeneizaron y midieron a λ : 340 nm (DO_1), ajustando el espectrofotómetro a cero con agua destilada. Luego, se añadieron 300 μL de Solución B a esa mezcla, y se incubó a 27 °C durante 15 min. Se midió la absorbancia a λ : 340 nm (DO_2) y se calculó la diferencia ($\Delta A = \text{DO}_2 - \text{DO}_1$). 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 del péptido anticoagulante estudiado) se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{[\text{Muestra} - \text{C} (-)]}{[\text{Blanco}]} \times 100 \quad \text{ec. (9)}$$

CAPÍTULO 3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización del extracto proteolítico pre-purificado de tallos y pecíolos de *Asclepias curassavica* L.

Los estudios previos del extracto crudo de *Asclepias curassavica* L. demostraron que la máxima actividad proteolítica se obtuvo a pH 8,5 y se mantuvo prácticamente constante cuando fue incubada durante 2 h a 40, 50 y 60°C. La enzima fue completamente inhibida por el epóxido E-64 y activada por adición de cisteína o β -mercaptoetanol, sugiriendo que las proteasas aisladas pertenecen a la familia de proteasas cisteínicas. El índice electroforético (IEF) del extracto crudo mostró que la mayoría de las fracciones proteicas se localizaron cerca del cátodo, evidenciando su naturaleza básica, y el correspondiente zimograma corroboró su comportamiento proteolítico ($pI > 9,3$). El valor de K_M de la fracción más activa (asclepaína cI) fue de 0,7284 mM (Liggieri y col., 2004).

3.1.1. Actividad proteolítica de asclepaína en solución acuosa

El extracto pre-purificado de asclepaína preparado de la forma descrita en el Capítulo 2: Metodología, presentó 0,168 mg/mL de proteína total. La actividad proteolítica en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 a 37°C, utilizando BAPNA como sustrato y cisteína 20 mM como activador, fue 38,29 UI/mg de proteína.

3.1.2. Estabilidad operacional de asclepaína en sistemas homogéneos (miscibles)

La Figura 6 (a, b, c) muestra la actividad proteolítica residual (UI/mg de proteína) de asclepaína en sistemas homogéneos, formados por 30 %, 50 % y 70 % v/v de solvente orgánico miscible en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8; en función del tiempo.

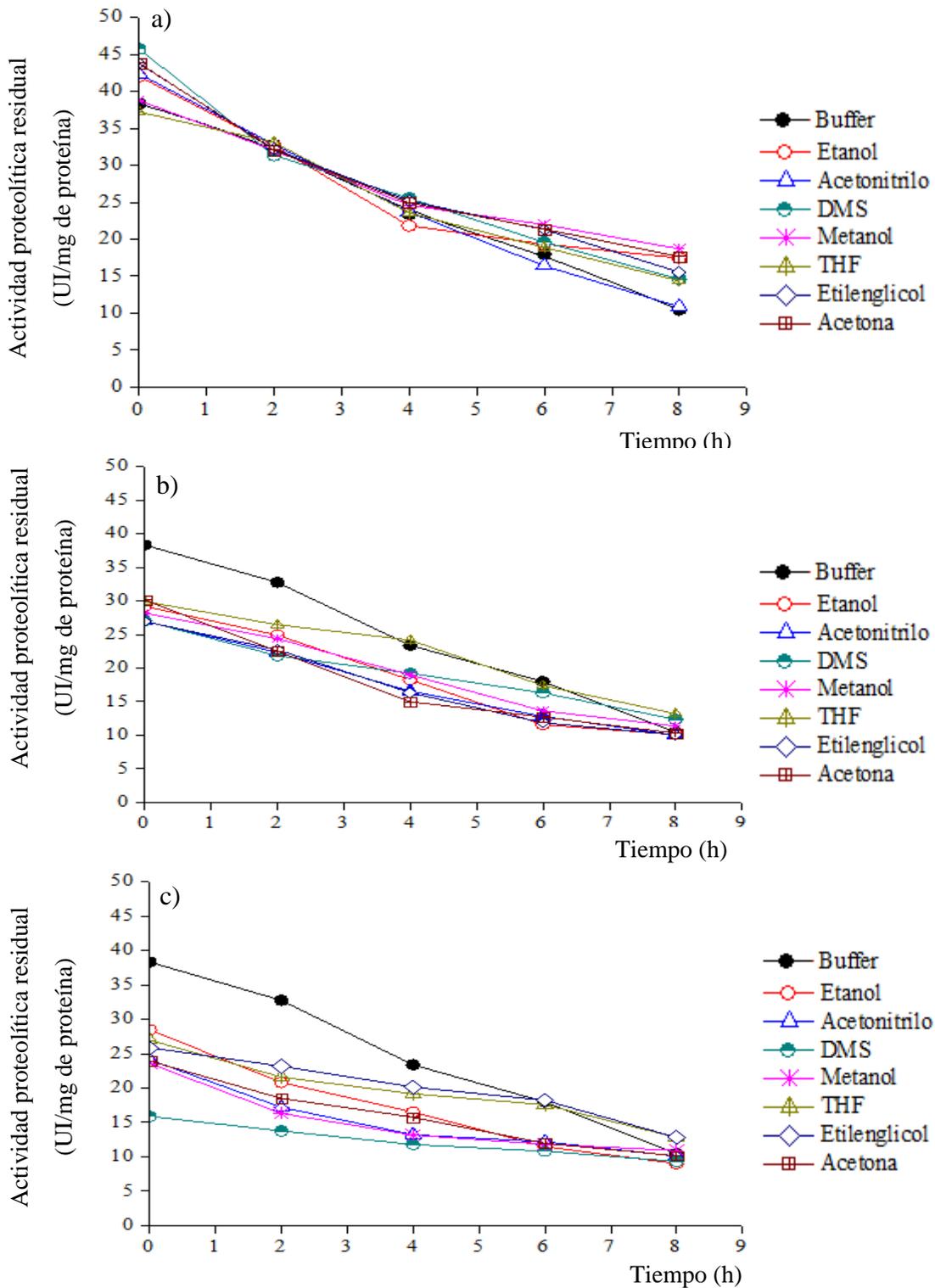


Figura 6. Variación en el tiempo de la actividad específica (UI/mg de proteína) de asclepaína en sistemas miscibles formados por buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 y diferentes solventes orgánicos miscibles: a) 30 %, b) 50 % y c) 70 % v/v a 40 °C durante 8 h de incubación y 200 rpm de agitación.

De acuerdo con la Figura 6, al aumentar la concentración de los solventes orgánicos estudiados, disminuye la actividad específica inicial de asclepaína. Sin embargo, en ningún caso se observó inactivación total por efecto de los solventes orgánicos. Dicha disminución de actividad es consistente con el hecho de que los solventes polares pueden afectar a las enzimas de al menos tres formas diferentes. Estos pueden penetrar dentro de la proteína y alterar el equilibrio de las interacciones hidrofóbicas, electrostáticas, fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno y en caso extremo, desnaturalizar las proteínas debido a cambios en la estructura secundaria y terciaria de las mismas (Yoon y Mckenzie, 2005; Serdakowski y Dordick, 2008; Maytorena y García Carreño, 2012).

Por otra parte, la presencia de un solvente orgánico puede producir cambios en la flexibilidad de las enzimas y desolvatar los sitios activos de éstas, restringiendo la accesibilidad del sustrato (impedimento estérico). Por último, la inhibición competitiva entre algunos solventes orgánicos y ciertos sustratos, es también responsable de la disminución de la actividad catalítica de las enzimas en presencia de solventes orgánicos miscibles con el agua (Klibanov, 2001; Graber y col., 2007; Toth y col, 2010).

La Tabla 3 muestra la estabilidad operacional de asclepaína en los sistemas miscibles anteriormente mencionados.

Contrariamente a lo esperado, asclepaína en etilenglicol, acetonitrilo, DMS, THF y acetona (70 % v/v) mostró un aumento del tiempo de vida media respecto a los valores obtenidos al emplear concentraciones más bajas de solvente orgánico.

El comportamiento de asclepaína en metanol fue similar al observado por Llerena y col. (2012) con papaína, la cual también disminuye su actividad con el aumento de la concentración de dicho solvente. Timasheff (2002) postuló que este efecto podría ser debido a cambios en la actividad de agua en el entorno de la enzima por la presencia de dicho solvente.

Por otro lado, otros autores demostraron que DMS aumentó la estabilidad proteica por su capacidad de unirse a regiones hidrofóbicas de las proteínas, evitando su agregación proteica y desnaturalización (Sitia y Braakman, 2003; Yoshida y col, 2002; Conn y col, 2002). Este efecto fue observado en proteínas específicas, tales

como la β -amiloplaqueta relacionados con la enfermedad de Alzheimer's (Soto, 2003).

Tabla 3. Tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de asclepaína en sistemas miscibles formados por buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, y 30 %, 50 % y 70 % v/v de diferentes solventes orgánicos miscibles. Tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de asclepaína en buffer: 5,55 h.

Solvente orgánico miscible	Tiempo de vida media ($t_{1/2}$, h)		
	30 %	50 %	70 %
Etilenglicol	5,35	5,14	7,23
Etanol	5,03	4,99	3,94
Acetonitrilo	4,75	4,76	5,06
DMS	4,75	6,3	7,87
Metanol	7,21	4,84	5,02
THF	5,98	5,97	7,16
Acetona	5,40	4,3	6,05

Etilenglicol le permitió expresar altas actividades proteolíticas a asclepaína, aún a 70 % (v/v), debido a que los polioles suelen ser estabilizantes de proteínas (Kumar y Venkatesh, 2012). Sin embargo, la compatibilidad química entre las enzimas y los polioles no puede ser generalizada debido a que polietilenglicol 6000 (Sigma-Aldrich), tuvo efecto perjudicial sobre tres enzimas proteolíticas diferentes del género *Bacillus* (Min Guan y col., 2016).

Tal como se observa en la Tabla 3, metanol al 30 % v/v, DMS, etilenglicol, o THF al 70 % v/v fueron los medios miscibles más estabilizantes para asclepaína pero en los dos últimos, la enzima presentó menores actividades iniciales; razón por la cual los dos primeros fueron seleccionados para los ensayos posteriores de preferencias y síntesis de péptidos.

3.1.3. Estabilidad operacional de asclepaína en sistemas macroheterogéneos líquido-líquido (bifásicos)

La Figura 7 (a, b, c) muestra la variación en el tiempo de la actividad proteolítica residual (UI/mg de proteína) de asclepaína en sistemas bifásicos formados por 30 %, 50 % y 70 % v/v de diferentes solventes orgánicos inmiscibles en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8.

La Tabla 4 muestra los tiempos de vida media ($t_{1/2}$, h) de asclepaína en sistemas bifásicos formados por 30 %, 50 % y 70 % v/v de diferentes solventes orgánicos inmiscibles en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8.

Tabla 4. Tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de asclepaína en sistemas bifásicos formados por buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, y 30 %, 50 % y 70 % v/v de diferentes solventes orgánicos inmiscibles. Tiempo de vida media de asclepaína en buffer: 5,55 h.

Solvente orgánico inmiscible	Tiempo de vida media ($t_{1/2}$, h)		
	30 %	50 %	70 %
Benceno	6,18	4,52	6,06
1-Octanol	12,86	8,19	7,61
Diclorometano	6,48	6,07	2,33
Eter etílico	6,02	6,01	6,13
Hexano	6,07	12,18	5,99
Clorobenceno	6,18	4,01	6,67
Acetato de etilo	6,17	11,07	2,22

Si bien las proteasas en los medios bifásicos son solubles en la fase acuosa, dejándolas menos expuestas a los solventes orgánicos, la partición de los mismos en la fase acuosa afectó de diferente manera a asclepaína. Estos resultados son concordantes con los obtenidos para otras proteasas (Quiroga y col., 2005.; Barberis y col., 2006.; Illanes y col., 2009 a, b).

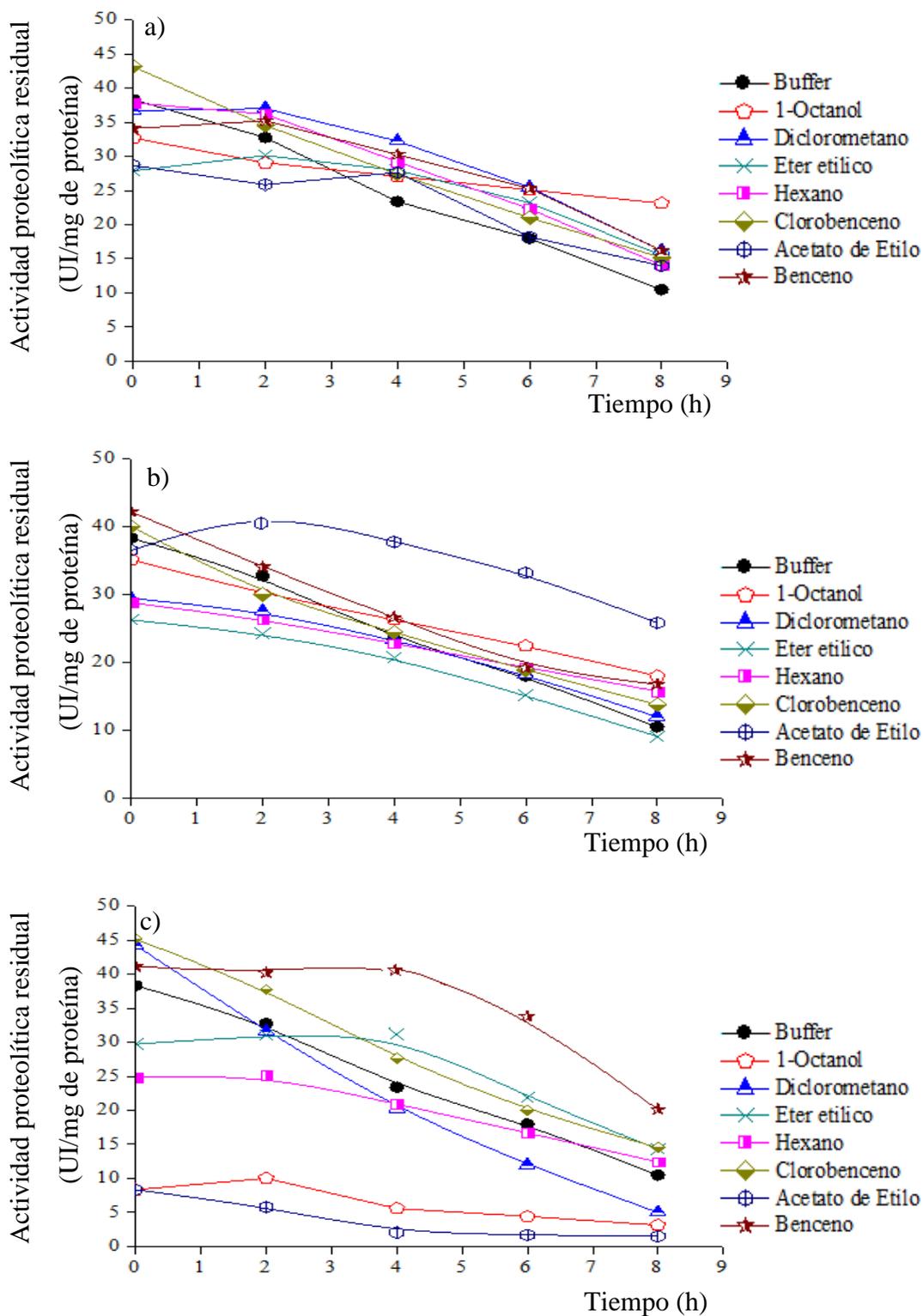


Figura 7. Variación en el tiempo de la actividad específica (UI/mg de proteína) de asclepaína en sistemas bifásicos formados por buffer Tris-HCl 0,1M pH 8 y diferentes solventes orgánicos inmiscibles: a) 30 %, b) 50 % y c) 70 % v/v, a 40°C durante 8 h de incubación y 200 rpm de agitación.

Asclepaína exhibió alta estabilidad en 1-octanol al 30 % v/v, hexano al 50 % v/v, acetato de etilo al 50 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8.

Sin embargo, cuando las concentraciones de dichos solventes orgánicos inmiscibles se incrementaron a 70 % v/v, los tiempos de vida media disminuyeron. Este efecto puede deberse a la orgánicos en la fase acuosa, los cuales pueden modificar el microambiente que rodea a la enzima, alterando las interacciones agua-proteína y cambiando la estructura tridimensional de la misma. Este fenómeno se llama *toxicidad molecular* y ha sido ampliamente reportado en la literatura (Illanes y col., 2012). Sin embargo, ese efecto no fue observado en los sistemas formados por 30 % y 50 % v/v de solvente orgánico, por lo que quedaría descartado. Por otra parte, el aumento del área interfacial puede haber causado inestabilidad enzimática, lo que otros autores han llamado *toxicidad de la fase* (Yang y col., 2004).

Finalmente se seleccionaron, tomando en cuenta la actividad enzimática específica inicial y la estabilidad operacional ($t_{1/2}$) de asclepaína, los sistemas macroheterogéneos formados por 1-octanol al 30 % v/v, hexano ó acetato de etilo al 50 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8. En estos sistemas, asclepaína expresó entre 40 y 60 % más actividad proteolítica residual al cabo de 8 horas, que en la mejor condición obtenida en sistema homogéneo con metanol 30 % v/v.

3.1.4. Preferencias de asclepaína en diferentes sistemas acuoso – orgánicos

La especificidad de las enzimas por diferentes sustratos está determinada por las cadenas laterales de los aminoácidos (básicas, ácidas, hidrofóbicas o hidrofílicas) que conforman el sitio activo de la molécula de enzima; a su vez, éstos determinan el tamaño y forma del sitio activo. Las interacciones de van der Waals, de repulsión y atracción entre el sitio activo y los sustratos determinan la especificidad para la unión sustrato-enzima. En soluciones acuosas, las interacciones hidrofóbicas que se establecen entre las cadenas laterales de los sustratos aminoacídicos y el sitio activo de la enzima, representan la fuerza principal que conduce a la unión de los mismos (Copeland, 2000; Fersht, 1999).

La Tabla 5 muestra las preferencias de asclepaína por los sustratos N- α -CBZ-aminoacil-p-nitrofenil éster en buffer Tris-HCl 0,1M pH 8, y en sistemas

homogéneos formados por DMS al 70 % v/v, metanol al 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8.

Tabla 5. Preferencias del extracto pre-purificado de asclepaína en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 y en sistemas homogéneos, utilizando derivados N- α -CBZ-aminoacil-p-nitrofenil éster (Z-AA-pNO), a 40 °C.

Z-AA-pNO	Buffer		DMS 70 % v/v		Metanol 30 % v/v	
	UCBZ	Preferencia (%)	UCBZ	Preferencia (%)	UCBZ	Preferencia (%)
Sustratos no polares y básico (Lys)						
Lys	0	0	3,11	9	2,85	2
Phe	36,53	29	18,38	54	2,09	1
Trp	0	0	13,36	39	5,8	3
Val	124,75	100	11,28	33	179,46	100
Ile	0	0	34,32	100	15,51	9
Leu	5	4	0,53	2	0	0
Ala	15,9	13	8,4	24	0	0
Sustratos polares						
Tyr	0,52	0	1,86	5	0	0
Gly	45,78	37	0	0	0	0
Asn	3,62	3	0	0	0	0
Gln	3,58	3	0	0	0	0

Asclepaína mostró mayor preferencia por los sustratos no polares en los medios miscibles citados y en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, particularmente por los derivados sintéticos de Val e Ile.

La Tabla 6 muestra las preferencias de asclepaína por sustratos N- α -CBZ-aminoacil-p-nitrofenil éster en buffer Tris-HCl 0,1M pH 8, y en los sistemas bifásicos en los que asclepaína mostró mayor actividad inicial y residual, tales como

hexano al 50 % v/v, acetato de etilo al 50 % v/v, 1-octanol al 30% v/v en buffer Tris-HCl 0,1M pH 8.

Según la Tabla 6, las preferencias de asclepaína en los sistemas bifásicos variaron en cada medio estudiado y respecto de las expresadas en buffer Tris-HCl 0,1M (pH 8) y en los sistemas homogéneos (Tabla 5).

Tabla 6. Preferencias del extracto pre-purificado de asclepaína en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 y en sistemas bifásicos, utilizando derivados N- α -CBZ aminoacil-p-nitrofenil éster (Z-AA-pNO), a 40°C.

Z-AA-pNO	Buffer		Acetato de etilo 50 % v/v		Hexano 50 % v/v		Octanol 30 % v/v	
	UCBZ	Preferencia (%)	UCBZ	Preferencia (%)	UCBZ	Preferencia (%)	UCBZ	Preferencia (%)
Sustratos no polares y básico (Lys)								
Lys	0	0	0	0	0	0	0	0
Phe	37	29	0	0	0	0	5	67
Trp	0	0	0	0	0	0	8	100
Val	125	100	0	0	18	35	6	77
Ile	0	0	3	18	0	0	2	25
Leu	5	4	9	54	0	0	0	0
Ala	16	13	1	5	8	16	0	0
Sustratos polares								
Tyr	0,52	0	13,6	80	0,94	2	0	0
Gly	45,78	37	1,1	6	32,51	65	0	0
Asn	3,62	3	0,38	2	50,22	100	0	0
Gln	3,58	3	17,06	100	41,4	82	0	0

En acetato de etilo al 50 % v/v, asclepaína mostró mayor preferencia por los aminoácidos polares Gln y Tyr, pero presentó baja actividad frente a Gly y Asn;

mientras que no fue capaz de escindir la unión éster de varios sustratos no polares (Phe, Trp o Val) y básico (Lys).

En hexano al 50 % v/v, asclepaína mostró actividad frente a todos los aminoácidos polares ensayados, especialmente Asn y Gln. Por el contrario, entre los aminoácidos no polares y básicos, solo mostró afinidad por Val y Ala.

Por el contrario, octanol al 30 % v/v, mostró mayor preferencia por los aminoácidos no polares Trp, Val, Phe e Ile y no tuvo actividad frente al resto de los sustratos.

Estos resultados podrían estar vinculados con cambios conformacionales de la enzima en cada medio, por lo que se estudió la estructura secundaria de asclepaína en los diferentes sistemas descritos mediante espectroscopía FTIR.

3.1.5. Efecto de los solventes orgánicos sobre la estructura secundaria de asclepaína en sistemas acuoso-orgánicos, determinada 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. 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).

En este trabajo, se analizó el efecto de los solventes orgánicos de los medios de reacción seleccionados para la síntesis de péptidos, sobre la estructura secundaria de asclepaína cI, utilizando FTIR. Dichos resultados se compararon con aquellos obtenidos en buffer Tris-HCl 0,1M pH 8.

La Figura 8 muestra los espectros infrarrojo de asclepaína cI (fracción purificada de mayor actividad del extracto proteolítico pre-purificado), en buffer Tris-HCl 0,1M pH 8 y en los sistema miscibles en los que la proteasa mostró mayor actividad y estabilidad, entre ellos: DMS al 70 % v/v, metanol al 30% v/v y THF al 70 % v/v.

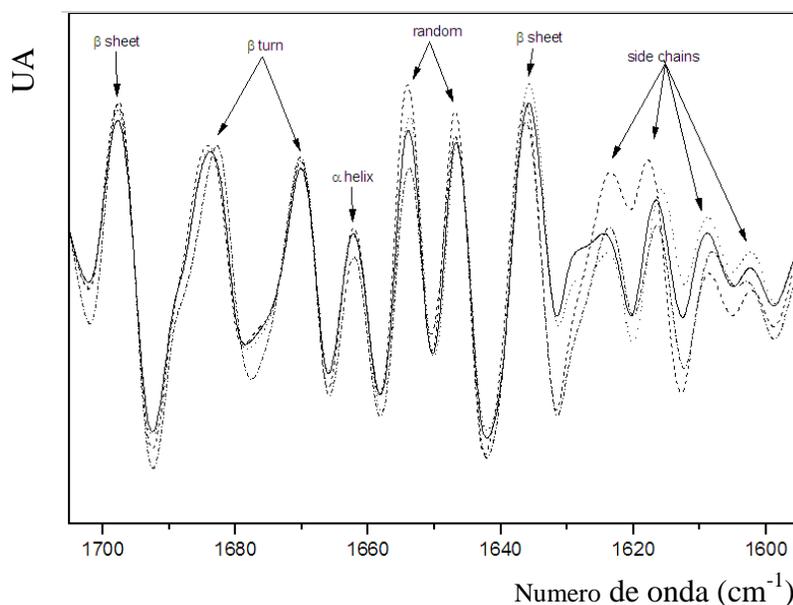


Figura 8. Espectro infrarrojo de asclepaína cI en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 a 25 °C (línea), DMS 70 % v/v (guión), metanol 30 % v/v (punto) y THF 70 % v/v (guión-puntos).

Para llevar a cabo la cuantificación relativa de los diferentes componentes de la banda amida I de asclepaína cI en los diferentes sistemas miscibles seleccionados, 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 7).

Las relaciones α -helix/ β -sheet 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 7).

La Tabla 8 presenta los valores del coeficiente de similitud espectral (r) que permitieron comparar las estructuras secundarias de asclepaína cI en buffer y en diferentes sistemas homogéneos estudiados.

De acuerdo a la Tabla 8, excepto el medio formado por buffer Tris HCl 0,1 M pH 8 y THF 70 % v/v, no hay diferencia significativa entre la estructura secundaria que adquiere asclepaína cI cuando se solubiliza en buffer, en metanol 30 % v/v o DMS 70 % v/v, en concordancia con el hecho de que dichos medios miscibles permitieron expresar los mayores tiempos de vida media a asclepaína.

Tabla 7: Áreas relativas de los componentes de la banda amida I del espectro infrarrojo de asclepaína cI en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 y en diferentes sistemas miscibles.

Bandas	Frecuencia ($\pm 2 \text{ cm}^{-1}$)	Buffer	Metanol (30 %)	DMS (70 %)	THF (70 %)
Áreas relativas					
β - Sheet	1636	0,2166	0,3664	0,4118	1,1124
	1697	0,1472	0,2468	0,2770	0,9324
α -Helix	1663	0,1430	0,2423	0,2740	0,7380
Random	1647	0,1450	0,1843	0,2757	0,748
	1655	0,1453	0,3045	0,2763	0,7443
β - Turn	1670	0,2523	0,3661	0,4810	1,1169
	1684	0,2530	0,4869	0,4813	1,3043
α -Helix/ β -Sheet		0,79	0,79	0,80	0,72

Tabla 8. Coeficiente de similitud espectral (r) de asclepaína cI en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 y en diferentes sistemas miscibles.

Medios miscibles	Coeficiente de similitud (r)
Buffer Tris-HCl 0,1M pH 8	1
Buffer Tris-HCl 0,1M pH 8 - metanol 30 % v/v	0,984
Buffer Tris-HCl 0,1M pH 8 - DMS 70 % v/v	0,938
Buffer Tris-HCl 0,1M pH 8 - THF 70 % v/v	0,785

La Figura 9 muestra los espectros infrarrojo de asclepaína cI en buffer Tris-HCl 0,1M pH 8 y en los sistemas bifásicos en los que la proteasa mostró mayor actividad y estabilidad, entre ellos: 1- octanol 30 % v/v, hexano 50 % v/v y acetato de etilo 50 % v/v.

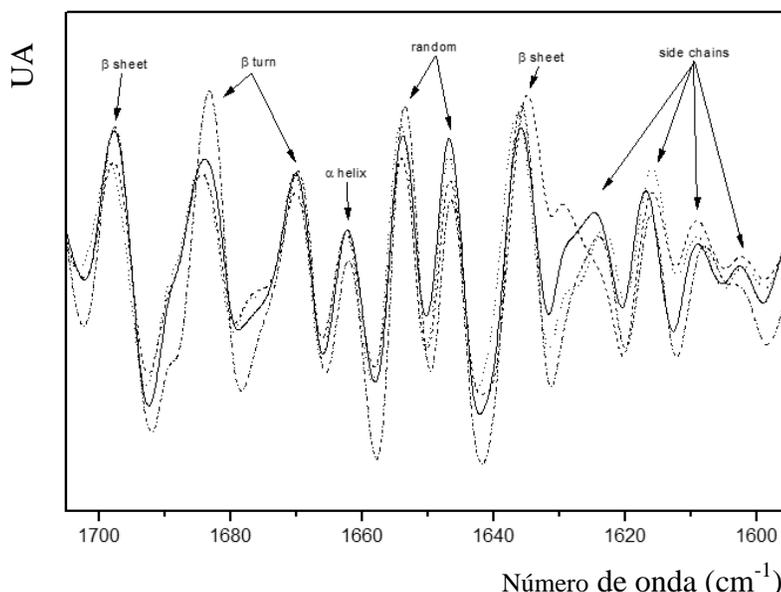


Figura 9. Espectro infrarrojo de asclepaína cI en buffer Tris-HCl 0,1M pH 8 (línea), 1-octanol 30 % v/v (guión), hexano 50 % v/v (punto) y acetato de etilo 50 % v/v (guión-puntos), a 25°C.

Para llevar a cabo la cuantificación relativa de los diferentes componentes de la banda amida I de asclepaína cI en los diferentes sistemas bifásicos seleccionados, se analizaron las áreas relativas de los componentes de la banda amida I (Tabla 9).

Las relaciones α -helix/ β -sheet fueron similares en todos los sistemas bifásicos estudiados, lo que indica ausencia de agregación proteica y consecuente desnaturalización.

La Tabla 10 presenta los valores del coeficiente de similitud espectral (r) que permitieron comparar las estructuras secundarias de asclepaína cI en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 y en los sistemas bifásicos estudiados.

De acuerdo a la Tabla 10, la estructura secundaria que adquiere asclepaína cI cuando se solubiliza en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 presenta diferencias significativas respecto a la que se obtiene en los sistemas bifásicos formados por el mencionado buffer y 1-octanol 30 % v/v, hexano 50 % v/v ó en acetato de etilo 50 % v/v.

Tabla 9: Áreas relativas de los componentes de la banda amida I del espectro infrarrojo de asclepaína cI en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 y en los medios inmiscibles seleccionados. Porcentajes en volumen.

Bandas	Frecuencia ($\pm 2 \text{ cm}^{-1}$)	Buffer	Octanol (30 %)	Hexano (50 %)	Acetato de etilo (50 %)
Áreas relativas					
β - sheet	1636	0,2166	69,680	0,5438	0,0611
	1698	0,1472	58,233	0,4537	0,0721
α -helix	1660	0,1430	46,159	0,3616	0,0528
Random	1647	0,1450	46,358	0,3625	0,0447
	1653	0,1453	46,441	0,3629	0,05
β - turn	1669	0,2523	81,028	0,6339	0,072
	1683	0,2530	81,085	0,6341	0,0839
α -helix/ β -sheet		0,79	0,72	0,73	0,79

Tabla 10. Coeficiente de similitud espectral (r) de asclepaína cI en buffer y en los diferentes sistemas bifásicos.

Medios inmiscibles	Coeficiente de similitud (r)
Buffer Tris-HCl 0,1M pH 8	1
Buffer Tris-HCl 0,1M pH 8 - octanol 30 % v/v	0,664
Buffer Tris-HCl 0,1M pH 8 - hexano 50 % v/v	0,627
Buffer Tris-HCl 0,1M pH 8 - acetato de etilo 50 % v/v	0,682

Asclepaína cI mostró mayor estabilidad en los sistemas bifásicos que en los sistemas miscibles seleccionados, a pesar de su menor similitud espectral. En consecuencia, en los medios bifásicos seleccionados asclepaína cI adquirió conformaciones diferentes que en buffer Tris HCl 0,1 M pH 8, que le permitieron aumentar su estabilidad en dichos medios. Por tal razón, y fuera del contexto de esta tesis doctoral, se está evaluando el efecto de las propiedades físico-químicas de los solventes orgánicos sobre la actividad de asclepaína cI por métodos de cálculo lineal.

3.2. Inmovilización enzimática

3.2.1. Inmovilización covalente de quimotripsina y asclepaína en glioxil-agarosa (GA) y en amino glioxil agarosa (AGA)

La Tabla 11 muestra los resultados obtenidos al inmovilizar asclepaína y quimotripsina en GA y en AGA (79,48 μ moles dioles/mL de gel).

Según la Tabla 11, quimotripsina inmovilizada en glioxil agarosa presentó un rendimiento de actividad (Y_a) de 81 %.

En condiciones de inmovilización similares, asclepaína mostró bajos rendimientos de actividad (cercanos a 10 %), pero al disminuir la actividad ofrecida a 2,75 (UI/g gel) el rendimiento en actividad incrementó a 54 %. Es probable, que los bajos Y_a obtenidos a altas cargas ofrecidas (0,7 mg proteína/g gel) sean debido a restricciones difusionales. Este fenómeno fue reportado por Bahamondes e Illanes, (2015), utilizando quimotripsina como catalizador.

Tabla 11. Inmovilización de asclepaína y quimotripsina en glioxil agarosa (GA) y en amino glioxil agarosa (AGA).

	quimotripsina en GA	asclepaína en GA	asclepaína en AGA
Carga ofrecida (mg proteína/g gel)	0,5	0,35	0,35
Tiempo de inmovilización (h)	0,67	5	5
Buffer NaHCO ₃	50 mM pH 10	100 mM pH 12*	100 mM pH 12*
Actividad ofrecida (UI/g gel)	34,2	2,75	4,4
Actividad expresada (UI/g gel)	27,53	1,48	0,75
Rendimiento de actividad (%)	81	54	17
Rendimiento de proteína (%)	57	68

*contiene 25 % v/v de glicerol

Se estudió la maximización del rendimiento en actividad (Y_a) de asclepaína inmovilizada en GA, variando cinco condiciones experimentales (en 2 niveles), a saber:

- Tiempo de inmovilización (3 h, 5 h)
- Carga enzimática ofrecida (0,7 mg proteína/g gel; 0,35 mg proteína/g gel)
- Concentración de buffer NaHCO_3 (50 mM, 100 mM)
- pH (10, 12)
- Adición de glicerol (0 %, 25 %)

Según se observa en la Tabla 11, el máximo valor de Y_a para asclepaína fue 54 % y se obtuvo al inmovilizarla en GA durante 5 h, con una carga enzimática de 0,35 mg de proteína/g de gel, en buffer NaHCO_3 pH 12 conteniendo 25 % v/v de glicerol.

Por otra parte, la inmovilización de asclepaína en amino-glioxil-agarosa permitió obtener mayores rendimientos de proteínas (Y_p), del orden de 68 %, pero se obtuvieron rendimientos de actividad 70 % menores que en GA.

Estos resultados indican que una alta carga proteica se unió al soporte pero la expresión de la actividad catalítica fue baja, probablemente debido a restricciones difusionales o unión del sitio activo al soporte (Illanes y col., 2010; Valencia y col., 2010).

3.2.2. Inmovilización de papaína por agregados enzimáticos entrecruzados (CLEAs)

La inmovilización de papaína mediante el entrecruzamiento con glutaraldehído, previa precipitación con una solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, no dio resultados satisfactorios. Se obtuvo un agregado enzimático coloreado que impidió determinar espectrofotométricamente la actividad enzimática, empleando BAPNA o Boc-L-alanina-*p*-nitrofeniléster como sustrato. Además, el uso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ condujo a la precipitación incompleta de papaína. Estos resultados no guardan concordancia con lo informado en bibliografía. Según Mengfan y col (2011), se obtuvieron CLEAs de papaína utilizando etanol como agente precipitante.

Actualmente, la investigación se orienta hacia la búsqueda de otros agentes precipitantes, como pueden ser 2-propanol, acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano,

dioxano, dimetilsulfóxido, polietilenglicol 1500, polietilenglicol 3400 y dimetoxietano. A su vez, la variación de la concentración del agente reticulante (glutaraldehído) podría propiciar la obtención de CLEAs de papaína (Matijosyte y col., 2010; Wilson y col., 2006b).

3.2.3. Inmovilización de asclepaína y papaína en sílica sin funcionalizar (S), en glioxil-sílica (GS) y en octil-glioxil-sílica (OGS)

La Tabla 12 muestra los parámetros de inmovilización de asclepaína y papaína en soportes de sílica porosa mediante distintas metodologías, que incluyeron: adsorción en S, unión covalente a GS y unión covalente a OGS.

Asclepaína en OGS expresó 1,8 veces más actividad (43 UI/g de soporte) que la ofrecida y permitió alcanzar un rendimiento máximo en actividad (Y_a) de 178 %. A pesar de ello, el rendimiento en proteínas (Y_p) de asclepaína en S fue comparativamente más alto (98 %) que en OGS. Esto indica que prácticamente la totalidad de la enzima se adsorbió a S pero solo se expresó 64 % de la actividad proteolítica ofrecida, probablemente por efecto de las restricciones difusionales (que impone la alta carga de proteína) al sustrato. Asclepaína en GS expresó una actividad 6 veces menor que la actividad ofrecida, lo que conllevó a un bajo rendimiento de actividad.

La inmovilización de asclepaína en OGS se vio favorecida al ocurrir en un primer paso la adsorción por interacción hidrofóbica, dando una mejor orientación a la enzima (como es demostrado en la sección 3.2.4.); mientras que en los soportes de S y GS solo se logró un rendimiento de actividad de 64 % y 16 %, respectivamente.

Papaína en S, GS y OGS expresó menor actividad que la ofrecida, especialmente en los dos últimos soportes. El rendimiento en proteínas (Y_p) de papaína en S fue 100 % pero el rendimiento en actividad solo alcanzó el 61 %. Según Wang y col. (2017), papaína pierde actividad a pH mayores que su pH óptimo (8); como la inmovilización por unión covalente (GS y OGS) se lleva a cabo a $\text{pH} \geq 10$, a diferencia de la inmovilización por adsorción (S) que permite trabajar al pH óptimo de la enzima, es probable que la baja actividad expresada por papaína en GS y OGS se deba al pH empleado.

En conclusión, asclepaína inmovilizada en OGS resultó ser el mejor catalizador obtenido.

Tabla 12. Parámetros de inmovilización de asclepaína y papaína en diferentes soportes de sílice porosa. Y_a : rendimiento de inmovilización en actividad. Y_p : rendimiento de inmovilización en proteínas.

Soporte	Actividad ofrecida (UI/g)	Actividad expresada (UI/g)	Y_a (%)	Y_p (%)
asclepaína				
sílica sin funcionalizar (S)	42	27	64	98
glioxil-sílica (GS)	60	10	16	9
octil-glioxil-sílica (OGS)	24	43	178	75
papaína				
sílica sin funcionalizar (S)	35	22	61	100
glioxil-sílica (GS)	33	8	25	11
octil-glioxil-sílica (OGS)	24	8	34	81

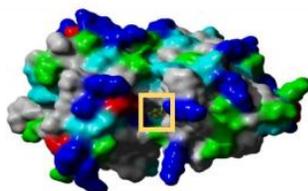
3.2.4. Modelado molecular de superficie de asclepaína y papaína

Se realizó el modelado molecular de superficie de asclepaína y de papaína por medio del programa Yasara Structure (versión 17.4.17.W.64), con el objeto de conocer la distribución de aminoácidos en la superficie enzimática y observar la presencia de residuos de Lys en el entorno del sitio activo de las enzimas; que podrían estar involucrados en la unión covalente al soporte y afectar el comportamiento de las enzimas inmovilizadas por los métodos empleados (GS y OGS).

La Figura 10 muestra el modelado superficial de asclepaína, donde se observa el sitio activo (en recuadro) y los residuos de aminoácidos coloreados de acuerdo a sus propiedades químicas. Según la Figura 10a, si bien asclepaína posee grupos básicos, incluyendo Lys, en el entorno del sitio activo, los parches hidrofóbicos en la cara opuesta de la enzima (Figura 10b) permitirían el anclaje y orientación de

asclepaína al soporte de OGS, exponiendo al sitio activo y evitando restricciones difusionales e impedimentos estéricos.

a)



b)

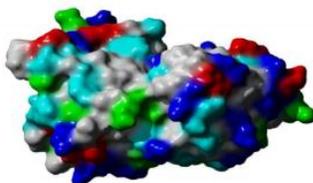


Figura 10. Modelado molecular superficial de asclepaína por medio del programa Yasara Structure (versión 17.4.17.W.64). a) Cara frontal. b) Cara posterior. Aminoácidos: verde y azul claro: polares; gris: no polares; azul: básicos y rojo: ácidos.

Por otro lado, a partir del modelado superficial se puede inferir que asclepaína en GS expresó una baja actividad debido a que los residuos de Lys cercanos al sitio activo podrían haberse unido al soporte, bloqueando al sitio activo y reduciendo la actividad enzimática. A diferencia del soporte heterofuncional de OGS, el soporte de GS no posee grupos funcionales hidrofóbicos que le permitieran una orientación óptima a asclepaína.

En bibliografía se ha informado el aumento de actividad para otras enzimas inmovilizadas, donde Y_a dependió de la superficie química del soporte (Bernal y col., 2014; 2018).

La Figura 11 presenta el modelado superficial de papaína donde se observa el sitio activo (recuadro) y los residuos de aminoácidos coloreados de acuerdo a sus propiedades químicas. Según la Figura 11a, la papaína posee grupos Lys en el entorno del sitio activo y parches hidrofóbicos en la cara opuesta de la enzima (Figura 11b), de manera similar a asclepaína. Sin embargo, es probable que la papaína se haya inmovilizado a los soportes GS y OGS por unión covalente de los residuos de Lys cercanos al sitio activo de las enzimas, causando pérdida de

actividad y/o cambios conformacionales que explicarían los resultados obtenidos con papaína inmovilizada en GS y OGS (Tabla 12).

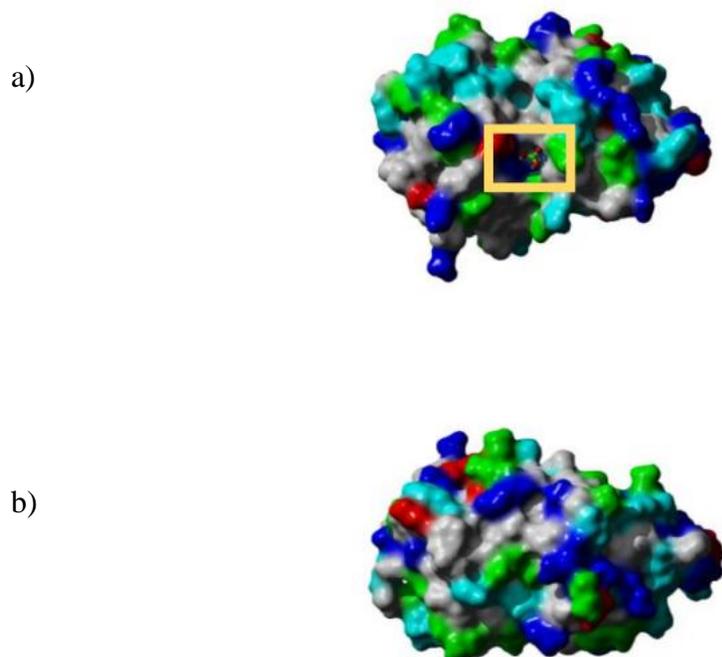


Figura 11. Modelado molecular superficial de papaína por medio del programa Yasara Structure (versión 17.4.17.W.64). a) Cara frontal. b) Cara posterior. Aminoácidos: verde y azul claro: polares; gris: no polares; azul: básicos y rojo: ácidos.

3.2.5. Determinación de la estabilidad catalítica de asclepaína inmovilizada en sílica (S), glioxil-sílica (GS) y octil-glioxil-sílica (OGS), utilizando sistemas acuosos-orgánicos

La Figura 12 muestra que la estabilidad catalítica de asclepaína soluble e inmovilizada en S y OGS (soportes en que la proteasa mostró los mayores valores de actividad expresada), en buffer Tris-HCl 0,1M pH 8, a 40 °C y 200 rpm, durante 24 h de incubación.

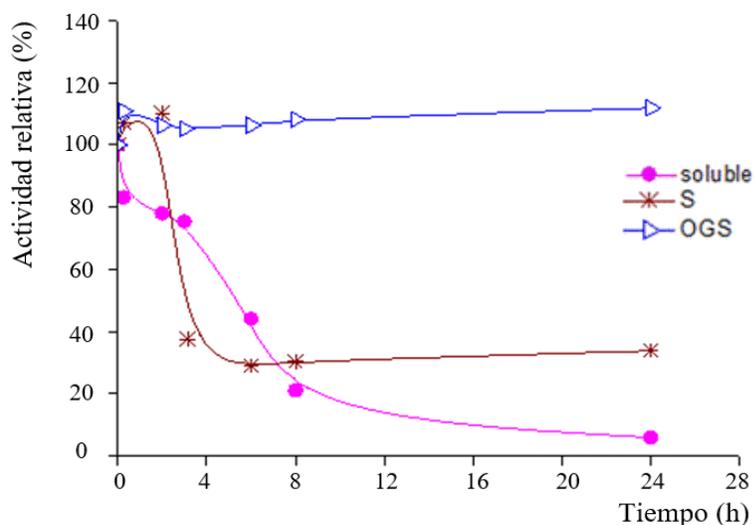


Figura 12. Estabilidad catalítica de asclepaína soluble e inmovilizada en sílica (S) y en octil glioxil sílica (OGS) en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, a 40 °C y 200 rpm, durante 24 h de incubación.

Asclepaína soluble e inmovilizada en S mostraron un marcado perfil de inactivación a partir de las 4 horas. La desorción de enzima desde soporte silíceo ha sido reportado en bibliografía (Bernal y col., 2011; Cao y col., 2000). Por el contrario, asclepaína en OGS no solo mantuvo su actividad durante 24 h sino que mostró al comienzo un incremento de 12 % en su actividad proteolítica. Estos resultados son concordantes con los informados por otros autores, utilizando diferentes enzimas (Mateo y col., 2002).

La Figura 13 muestra la estabilidad catalítica de asclepaína soluble e inmovilizada en S y en OGS, en un sistema homogéneo formado por metanol (30, 50 y 70 % v/v) en buffer Tris-HCl 0,1M pH 8, a 40°C y 200 rpm, durante 24 h de incubación. Dicho sistema fue seleccionado como el más promisorio para la síntesis de péptidos con actividad antihipertensiva *in vitro*.

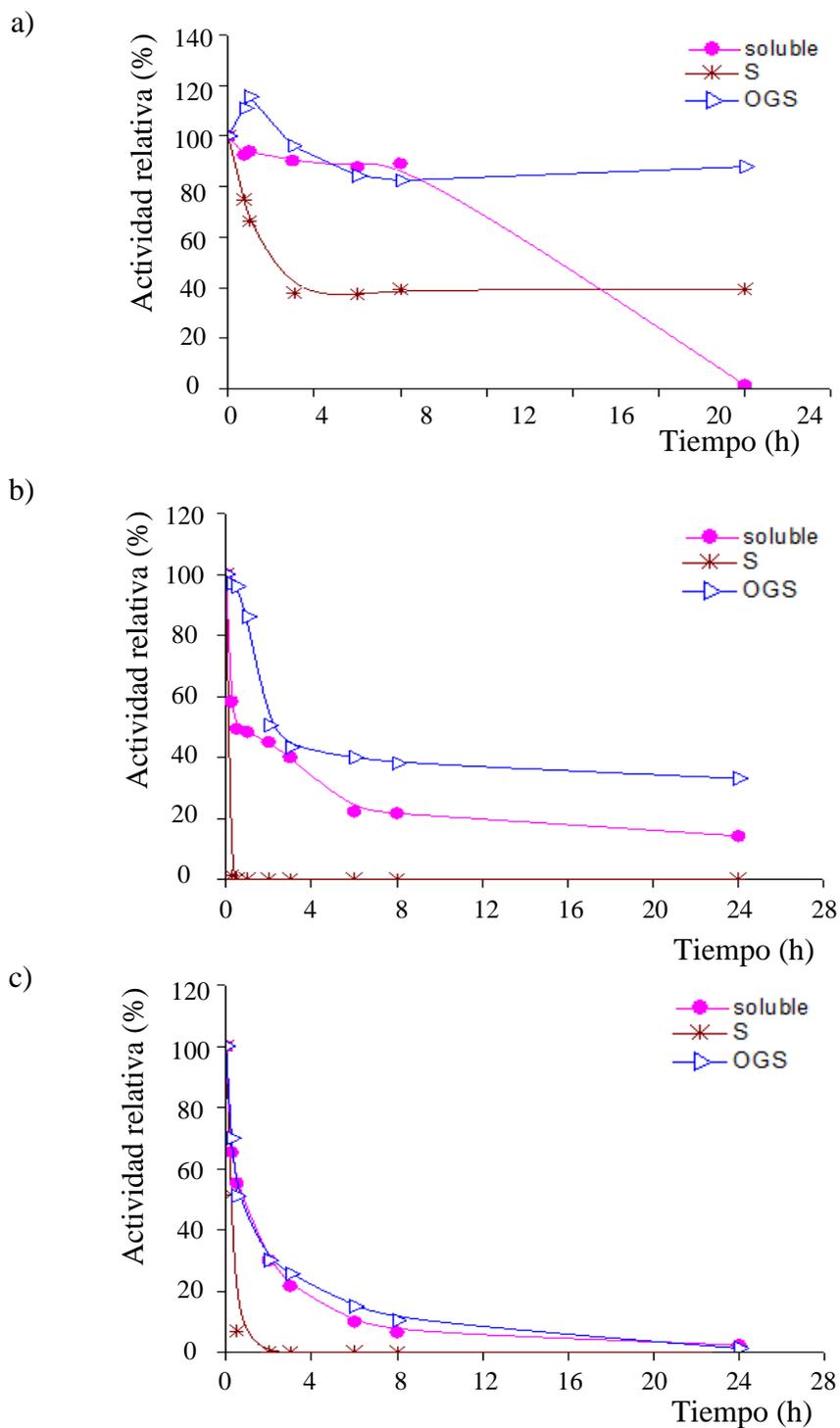


Figura 13. Estabilidad catalítica de asclepaína soluble e inmovilizada en sílica (S) y en octil glioxil sílica (OGS) en un sistema homogéneo formado por a) metanol 30 % v/v, b) metanol 50 % v/v, y c) 70 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1M pH 8, a 40 °C y 200 rpm, durante 24 h de incubación.

Según se observa en la Figura 13a, asclepaína soluble en metanol al 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 sufrió una pérdida de actividad de 8 % al cabo de 8 h y luego disminuyó su actividad hasta inactivarse completamente a las 24 h de incubación, al igual que lo observado para asclepaína soluble en la Figura 12. Sin embargo, al aumentar el porcentaje de metanol a 50 y 70 % v/v en el medio de reacción, asclepaína soluble mostró una pérdida de actividad de 78 y 93 % al cabo de 8 h, respectivamente, y se inactivó totalmente al cabo de 24 h en metanol al 70 % v/v.

Asclepaína inmovilizada en S mostró una pérdida del 60 % de su actividad luego de 8 h de incubación en metanol al 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1M pH, pero luego, se mantuvo estable hasta las 24 h de incubación, a diferencia de lo observado con la enzima soluble en el mismo medio de reacción. Sin embargo, al aumentar el porcentaje de metanol en el medio de reacción a 50 y 70 % v/v, asclepaína inmovilizada en S se inactivó completamente a las 15 min de incubación.

Finalmente, asclepaína inmovilizada en OGS retuvo el 88 % de su actividad inicial cuando se incubó en metanol al 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 al cabo de 24 h de incubación, a diferencia de lo observado con la enzima soluble (inactivación total) y con la enzima inmovilizada en S (40 % de actividad retenida). Sin embargo, al aumentar el porcentaje de metanol a 50 y 70 % v/v en el medio de reacción, asclepaína inmovilizada en OGS solo retuvo el 33 % de su actividad inicial en el primer caso y se inactivó completamente en el segundo, luego de 24 h de incubación. Asclepaína soluble también se inactivó completamente en metanol al 70 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH y retuvo 14 % de la actividad inicial en metanol 50 % v/v.

La Tabla 13 muestra el potencial catalítico de asclepaína soluble e inmovilizada en S y OGS, al ser incubadas en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 y en los medios de reacción formados por 30, 50 y 70 % v/v de metanol en buffer Tris HCl 0,1 M pH 8, luego de 8 h a 40 °C. Dichos valores fueron obtenidos a partir del área bajo las curvas presentadas en las Figuras 12 y 13, hasta las 8 h de incubación debido a la marcada tendencia de inactivación enzimática a partir de allí.

Según muestra la Tabla 13, asclepaína-OGS en el medio formado por 30 % v/v metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 es el biocatalizador más promisorio para la síntesis enzimática de péptidos bioactivos, ya que presentó el mayor potencial catalítico en las condiciones descriptas.

Tabla 13. Potencial catalítico de asclepaína soluble e inmovilizada en sílica (S) y en octil- glioxil-sílica (OGS) en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 y en medios homogéneos formados por distintos porcentajes de metanol (v/v) en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, a 40 °C, durante 8 h. Potencial catalítico: actividad relativa / tiempo.

Biocatalizador	Potencial catalítico al cabo de 8 h (% / h)			
	Buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 8	Metanol 30 %	Metanol 50 %	Metanol 70 %
Asclepaína libre	625	1476	570	260
Asclepaína-S	952	1001	12	31
Asclepaína-OGS	2616	2119	981	305

3.3. Selección de las condiciones operacionales y los péptidos modelo a sintetizar por vía enzimática

3.3.1. Selección de péptidos con potencial actividad antihipertensiva, tomados como modelo en este estudio

La selección de los péptidos modelo se realizó a partir de la base de datos BIOPEP (2012) y de bibliografía (Shamloo y col., 2015). La búsqueda se centró en secuencias cortas, preferentemente dipéptidos, con potencial actividad antihipertensiva en base a las preferencias de asclepaína en los medios de reacción seleccionados para las síntesis enzimáticas (Tabla 5 y 6). Los péptidos modelo seleccionados se muestran en la Tabla 14. Dichos péptidos serán posteriormente sintetizados por vía enzimática con el objeto de desarrollar tecnologías alternativas sustentables y más amigables con el medio ambiente, independientemente de la fuente natural que los provee, y proyectar su producción en gran escala.

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. Además, las fuentes naturales están sujetas a cierta variabilidad y su producción suele ser estacional o regional.

Tabla 14. Péptidos con potencial actividad antihipertensiva, tomados como modelo en este estudio

Péptido modelo	Fuente	IC₅₀ (μM)	Referencia
Val-Gly-OH (VG)	Síntesis química	1100	Cheung y col., (1980)
Tyr-Gln-OH (YQ)	Trigo sarraceno	628	Shamloo y col., (2015)
Gln-Gly-OH (QG)	Síntesis química	7400	Cheung y col., (1980)

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

Se seleccionaron como medios de reacción, un sistema bifásico macroheterogéneo formado por 50 % v/v acetato de etilo en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, y un sistema miscible homogéneo formado por 30 % v/v metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8.

Si bien en los medios bifásicos formados por 30 % v/v 1-octanol ó 50 % v/v hexano en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, la estabilidad de asclepaína fue alta, en dichos medios las actividades iniciales fueron menores que las expresadas por la enzima en acetato de etilo 50 % v/v (Tabla 4, Figura 7).

De manera similar, los medios miscibles formados por THF y DMS al 70 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, se descartaron porque en ellos asclepaína mostró alta estabilidad pero menor actividad proteolítica inicial (Tabla 3, Figura 6) que en metanol 30 % v/v.

Además, tanto en etilenglicol 70 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 como en 1-octanol 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, la solubilidad de los sustratos aminoacídicos sintéticos es muy baja.

De los resultados del estudio de preferencias de asclepaína en 30 % v/v de metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 (Tablas 5) surge que Val puede actuar como donador de acilo en la síntesis enzimática de VG.

De los resultados del estudio de preferencias de asclepaína en acetato de etilo 50 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 (Tabla 6), se deduce que Tyr y Gln pueden actuar como donadores de acilo en la síntesis enzimática de YQ y QG respectivamente.

En consecuencia, se seleccionaron Z-Val-pNO como donador de acilo y Gly-OH como nucleófilo para la síntesis enzimática de VG en metanol 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8. La concentración del donador de acilo se estableció en 10 veces el K_M de asclepaína cI (0,7284 mM) en buffer, para asegurar la saturación de la enzima por el sustrato.

Inicialmente, se trabajó con una concentración de nucleófilo equimolar (7,28 mM) y luego se incrementó (hasta su límite de solubilidad) para maximizar el rendimiento en producto.

En el medio bifásico formado por 50 % v/v acetato de etilo en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 se seleccionaron Z-Tyr-pNO y Z-Gln-pNO como donadores de acilo y Gln-OH y Gly-OH como nucleófilos para la síntesis enzimática de YQ y QG respectivamente. Para determinar la concentración de los reactantes en el medio de reacción, se tuvo en cuenta la solubilidad y el coeficiente de partición (P) de los donadores de acilo entre las fases y se estableció una concentración equimolecular entre los donadores de acilo y los nucleófilos.

Las condiciones de operación y el análisis de los sustratos, productos y subproductos de las reacciones de síntesis se describieron en la sección 2.3.3.

3.3.3. Solubilidad y coeficiente de partición de los sustratos para las reacciones de síntesis enzimática de péptidos

La solubilidad de los aminoácidos sintéticos a emplear como donador de acilo y nucleófilo en los medios de reacción seleccionados, permitió conocer la máxima concentración (saturación) a utilizar de cada uno de ellos en las reacciones de síntesis de péptidos.

Para la síntesis del péptido Z-VG en 30 % v/v de metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 se determinó una concentración máxima de 82 mM para Z-V-pNO y de 100 mM para Gly-OH.

Para la síntesis del péptido Z-YQ en un medio bifásico formado por 50 % v/v de acetato de etilo y 50 % v/v de buffer Tris-HCl 0,1 M pH se determinó una concentración de saturación de 90 mM para Z-Y-pNO y de 216 mM para Gln-OH, mientras que para la síntesis del péptido Z-QG, en el mismo medio, se determinó una concentración de saturación de 2,9 mM para Z-Q-pNO y de 3 mM para Gly-OH.

Luego, se determinaron los coeficientes de partición de Z-Y-pNO y Z-Q-pNO. El coeficiente de partición (P) se define como la razón entre la concentración de un componente en la fase acuosa y en la fase orgánica. Para ello, una cierta concentración del sustrato fue disuelto en el medio acuoso - orgánico e incubado a 25 °C y 200 rpm, durante 12 h. Se extrajeron muestras de las fases acuosa y orgánica y se determinó la concentración del aminoácido en cada fase por RP-HPLC en las condiciones descriptas en la Sección 2.3.1.

$$P = \frac{[\text{Soluta en fase orgánica}]}{[\text{Soluta en fase acuosa}]} \quad \text{ec. (10)}$$

Los coeficientes de partición (P) de Z-Y-pNO y de Z-Q-pNO en acetato de etilo 50 % (v/v) fueron de 1,280 y 1,282, respectivamente.

3.4. Síntesis química en fase sólida (SPPS) de los análogos de los péptidos tomados como modelo

Se realizó la síntesis en fase sólida de los péptidos análogos carboxi y amino terminal de los péptidos tomados como modelo en este estudio mediante las estrategias de síntesis secuencial descripta en las secciones 2.4.1 y 2.4.2 con el objeto de comparar la actividad antihipertensiva *in vitro* de los mismos con la que presentan los péptidos sintetizados por vía enzimática.

Los péptidos sintetizados por vía química fueron: Z-YQQ-NH₂, YQQ-OH y YQQ-NH₂.

Las Figuras 14 a 16 muestran los cromatogramas obtenidos por RP-HPLC y los espectros de masas de los péptidos sintetizados por SPPS, previamente mencionados.

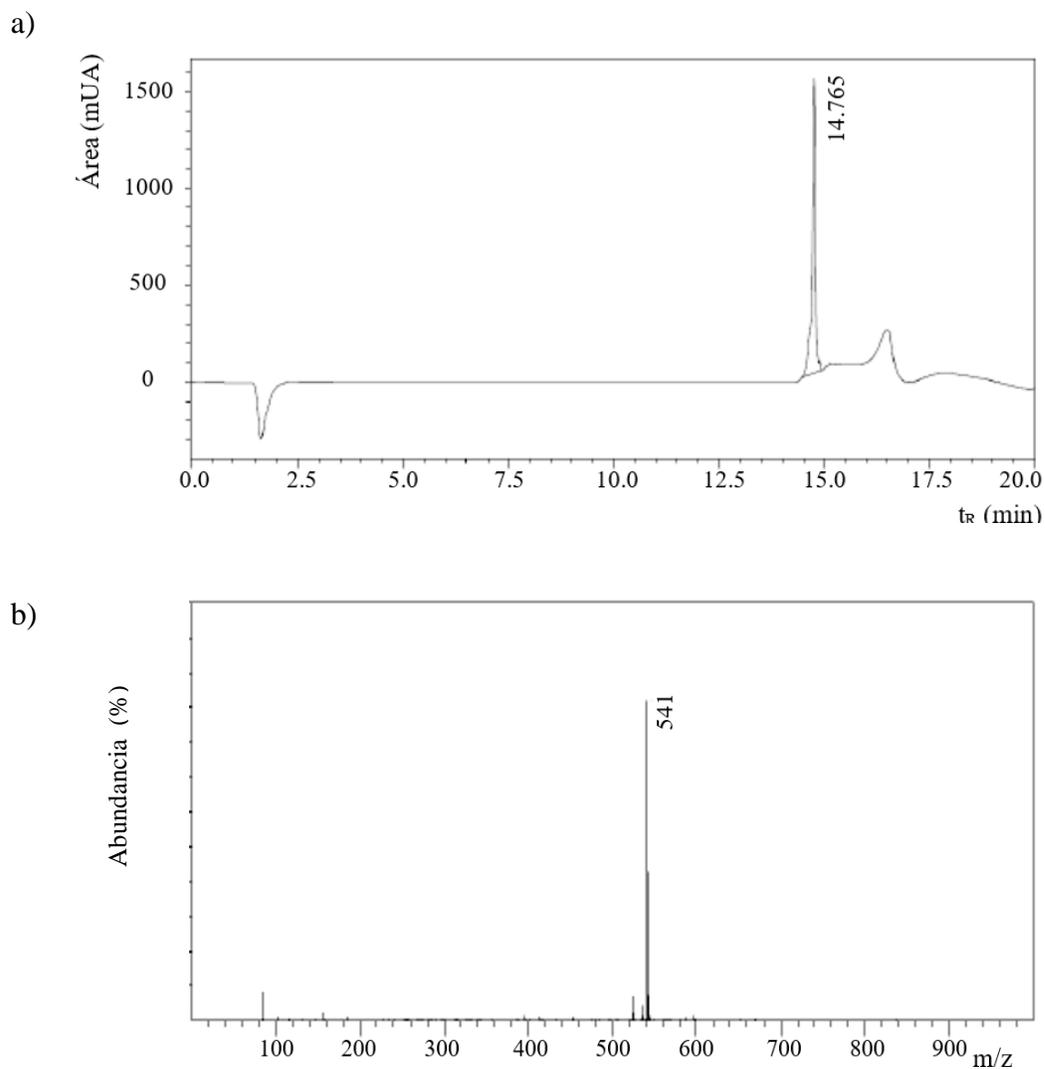
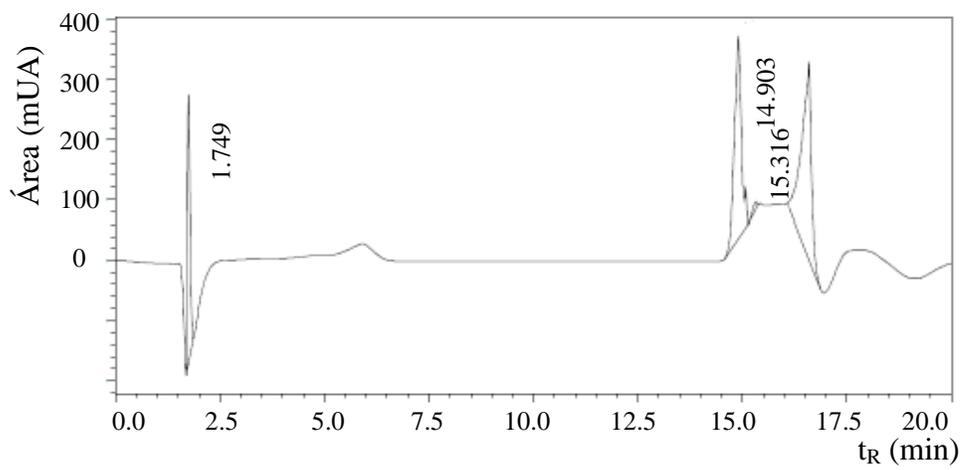


Figura 14. Cromatograma obtenido por RP-HPLC (a) y espectro de masa (b) del péptido amino terminal con potencial actividad antihipertensiva, Z-YQQ- NH₂.

a)



b)

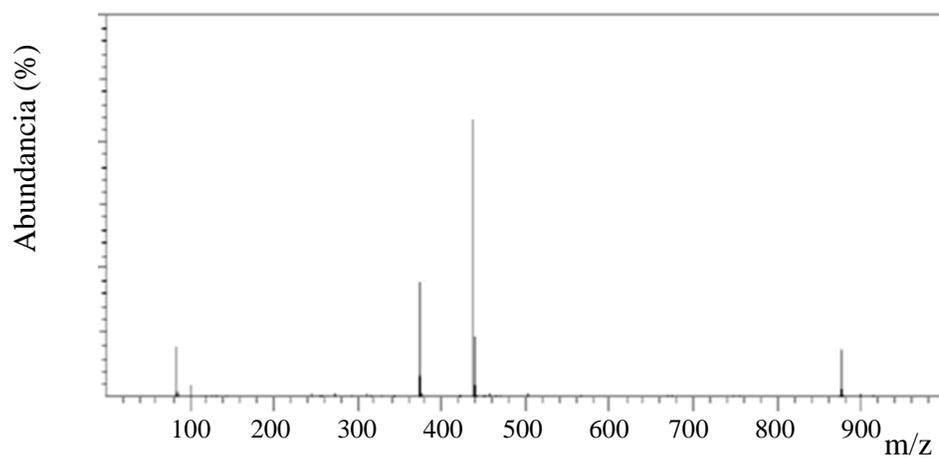
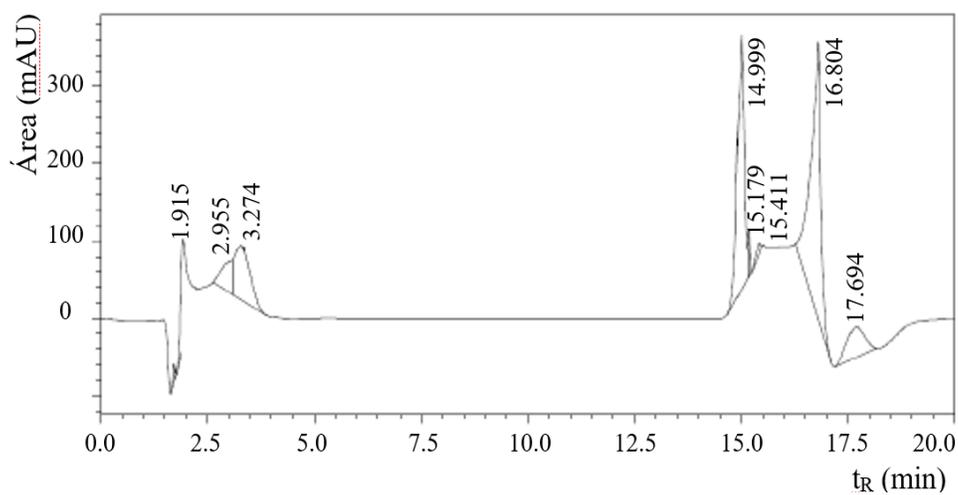


Figura 15. Cromatograma obtenido por RP-HPLC (a) y espectro de masa (b) del péptido carboxi terminal con potencial actividad antihipertensiva, YQQ-OH.

a)



b)

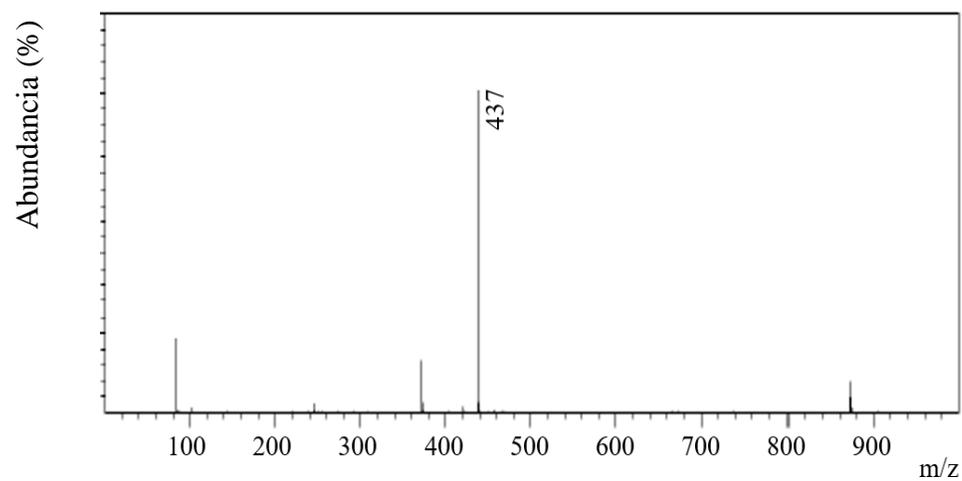


Figura 16. Cromatograma obtenido por RP-HPLC (a) y espectro de masa (b) del péptido amino terminal con potencial actividad antihipertensiva, YQQ- NH₂.

3.5. Síntesis enzimática de péptidos con potencial actividad antihipertensiva, en sistemas acuoso-orgánicos

3.5.1. Síntesis enzimática de N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG), en un sistema homogéneo, con asclepaína soluble

3.5.1.1. Síntesis bajo control cinético.

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

Mecanismo de reacción	control cinético
Medio de reacción	metanol 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8
Condiciones de reacción	40 °C, 200 rpm
Activador	2-mercaptoetanol (20 mM)
Donador de Acilo	N- α CBZ-Val-pNO (7,284 mM)
Enzima	asclepaína soluble 200 μ L (6 UI/mg)
Nucleófilo	L-Gly-OH (7,284 mM)
Base aceptora de H⁺	trietilamina (7,284 mM)

La Figura 17 muestra la separación de los componentes de una muestra representativa de la reacción de síntesis bajo control cinético de Z-VG, utilizando asclepaína soluble en el medio miscible formado por 30 % (v/v) de metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, después de 1 min de reacción. En el mismo se observa: (I) Z-VG (t_R : 3,6 min), (II) N- α -CBZ-Val-OH (t_R : 5,6 min), (III) pNO (t_R : 9,3 min) y (IV) N- α -CBZ-Val-pNO (t_R : 14,7 min).

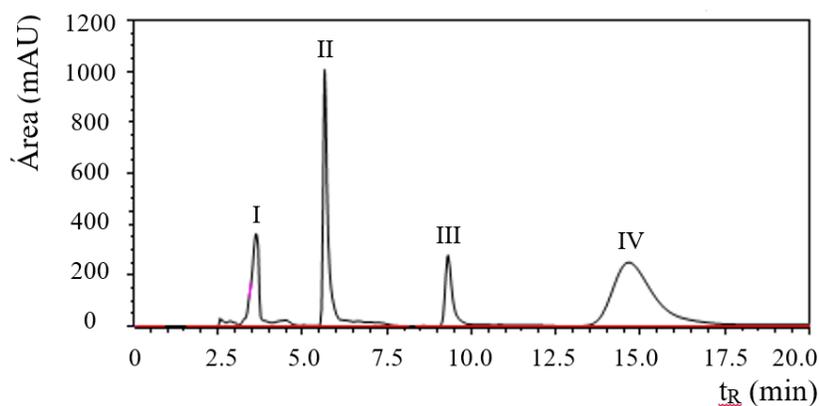
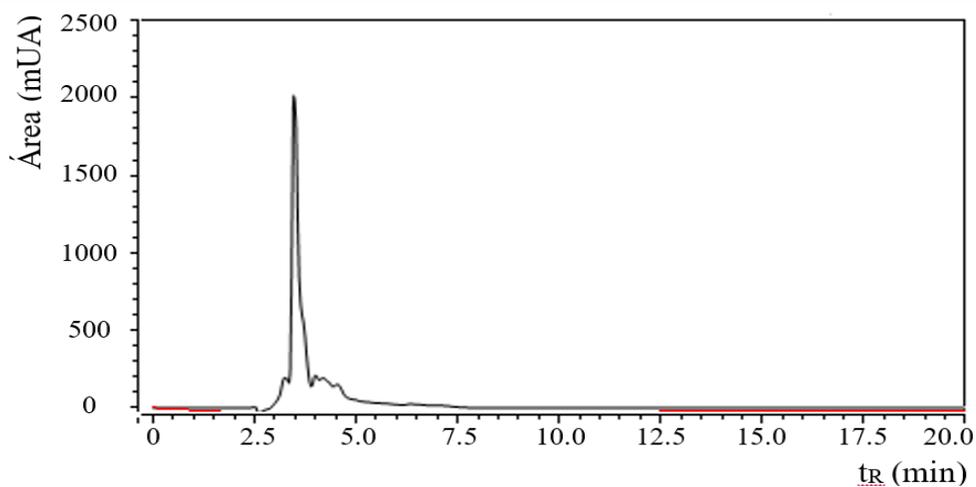


Figura 17. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control cinético de N- α -CBZ-Val-Gly-OH por RP-HPLC, en un medio homogéneo formado por metanol 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando asclepaína soluble como catalizador, luego de 1 min de reacción a 40 °C, 200 rpm. (I) N- α -CBZ-Val-Gly-OH (t_R : 3,6 min), (II) N- α -CBZ-Val-OH (t_R : 5,6 min), (III) pNO (t_R : 9,3 min) y (IV) N- α -CBZ-Val-pNO (t_R : 14,7 min).

Z-VG se purificó mediante una columna C₁₈, se secó en un equipo concentrador (Thermo Scientific Savant™ SPD131DDA SpeedVac), y se analizó por espectrometría de masas LCMS-2020 (Shimadzu), utilizando un espectrómetro de masas con una interfase de ionización por electrospray (ESI-MS). El espectro obtenido se muestra en la Figura 18.

a)



b)

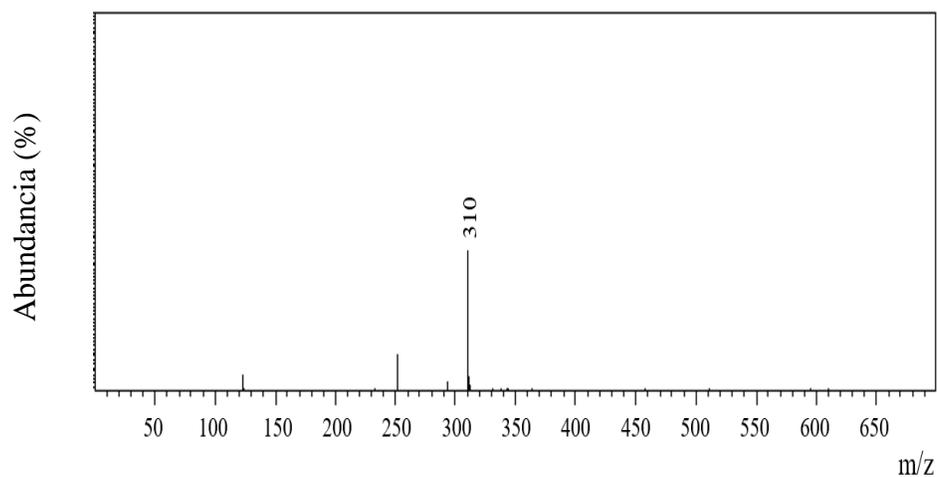


Figura 18. Cromatograma obtenido por RP-HPLC (a) y espectro de masa (b) del péptido carboxi terminal con potencial actividad antihipertensiva: Z-VG.

La Figura 19 muestra el perfil del sustrato limitante ($N\text{-}\alpha\text{-CBZ-Val-pNO}$), del producto de síntesis enzimática ($N\text{-}\alpha\text{-CBZ-Val-Gly-OH}$), del producto de hidrólisis ($N\text{-}\alpha\text{-CBZ-Val-OH}$) y de pNO, utilizando asclepaína soluble en un medio miscible formado por 30 % v/v de metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, a 40 °C y 200 rpm.

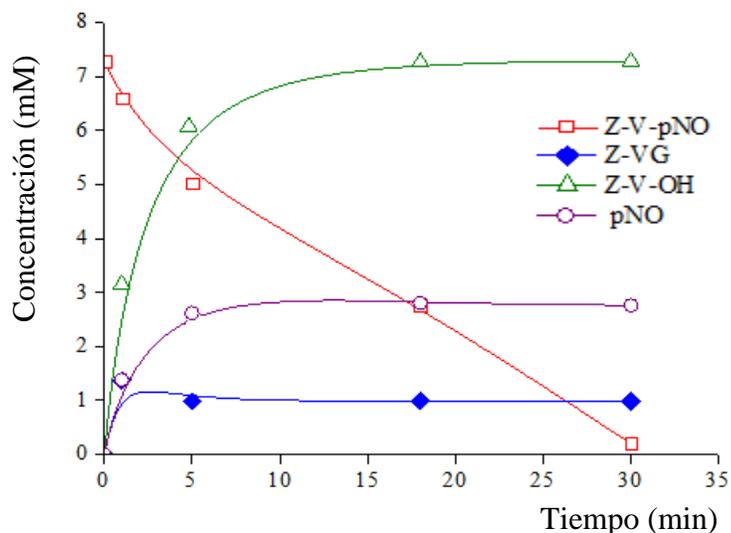


Figura 19. Variación en el tiempo de la concentración de los diferentes componentes de la reacción de síntesis enzimática del dipéptido N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG) a 40 °C y 200 rpm en un medio miscible formado por 30 % v/v de metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando asclepaína soluble como catalizador.

La Tabla 15 muestra el rendimiento 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-Val-Gly-OH a 40 °C y 200 rpm en un medio miscible formado por metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8.

Para la cuantificación de los parámetros rendimiento (η) y grado de conversión del donante de acilo (α_s) se definieron y aplicaron las ecuaciones 4 y 5.

Según muestra la Tabla 15, el máximo grado de conversión de sustrato en producto fue 97,3 % a los 30 min de reacción. Sin embargo, el máximo rendimiento en producto fue 18,8 % a 1 min de reacción. A partir de ese momento, el péptido sintetizado (Z-VG) disminuyó 28 % su concentración debido a la hidrólisis, afectando en 5 % el rendimiento en producto.

Este hecho indica que en la reacción de síntesis del péptido Z-VG bajo mecanismo de control cinético, actuaron como nucleófilos sobre el intermediario acil-enzima tanto el sustrato L-aminoacídico sintético Gly-OH (aminólisis) como el agua (hidrólisis). Es evidente que la relación aminólisis/hidrólisis se vio

desfavorecida en estas condiciones de reacción y se obtuvo una mayor cantidad del producto de hidrólisis (Z-V-OH) que del péptido esperado (Z-VG).

En consecuencia, se plantearon dos estrategias para optimizar el rendimiento en producto de síntesis (péptido): - aumentar la concentración del nucleófilo hasta el límite de solubilidad, - disminuir el contenido de agua en el medio de reacción (para evitar la formación del producto de hidrólisis).

Tabla 15. Rendimiento en producto (η) y grado de conversión del donador de acilo (α_s) en la síntesis bajo control cinético de N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG) a partir de N- α -CBZ-Val-pNO (Z-V-pNO) en un medio formado por 30 % v/v de metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando 200 μ L de asclepaína soluble (6 UI/mg) como catalizador, a 40 °C y 200 rpm.

Tiempo (min)	Z-V-pNO (mM)	Z-V-OH (mM)	pNO (mM)	Z-VG (mM)	α_s (%)	η (%)
0	7,285	0	0	0	0	0
1	6,595	3,15	1,38	1,370	9,46	18,8
5	5,020	7,20	2,95	0,984	31,08	13,5
18	2,756	8,86	2,80	0,985	62,00	13,5
30	0,197	10,60	2,76	0,985	97,30	13,5

La Figura 20 muestra el perfil del sustrato limitante (N- α -CBZ-Val-pNO), del producto de síntesis enzimática (Z-VG) y del producto de hidrólisis (N- α -CBZ-Val-OH), utilizando una concentración de nucleófilo equivalente a 100 x Km de asclepaína soluble (72,84 mM), en un medio miscible formado por 30 % v/v de metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, a 40 °C y 200 rpm.

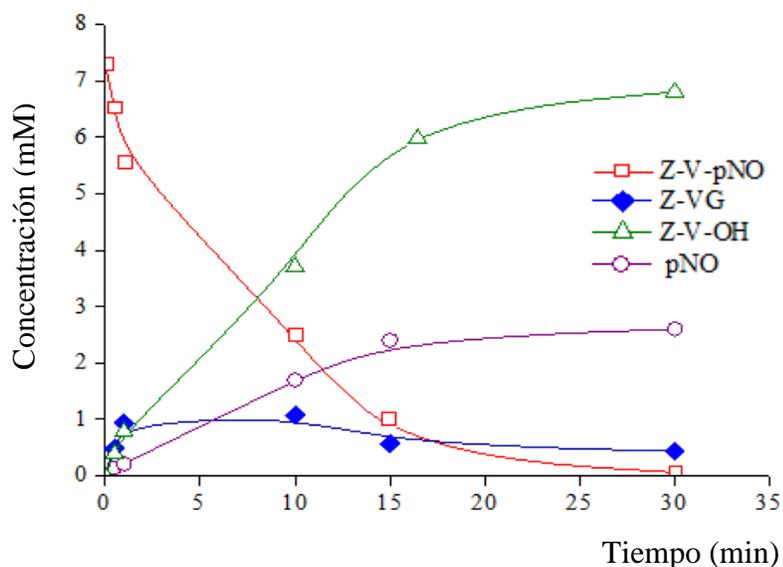


Figura 20. Variación en el tiempo de la concentración de los componentes de la reacción de síntesis enzimática del dipéptido N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG) a 40 °C y 200 rpm en un medio miscible formado por metanol al 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando asclepaína soluble y una concentración de nucleófilo equivalente a 100 x K_m de asclepaína en buffer.

La Tabla 16 muestra los rendimientos en producto después de incrementar diez veces la concentración del nucleófilo en la reacción de síntesis enzimática del dipéptido Z-VG, utilizando un medio miscible formado por 30 % v/v de metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, y asclepaína soluble como catalizador, a 40 °C y 200 rpm.

Los resultados obtenidos demuestran que el aumento de 10 veces en la concentración del nucleófilo no permitieron aumentar el rendimiento en producto y prácticamente la totalidad del sustrato donador de acilo se hidrolizó.

En virtud de lo anteriormente expuesto parece evidente que para disminuir la hidrólisis del donador de acilo es necesario trabajar en un sistema continuo formado por el solvente orgánico prácticamente anhidro. Sin embargo, las proteasas en dichos sistemas (continuos con baja actividad de agua) muestran baja actividad específica y pobre estabilidad operacional. Por tal razón, se planteó previamente realizar la inmovilización de asclepaína en soportes que le permitan superar aquellos inconvenientes.

Tabla 16. Rendimiento en producto (η) y grado de conversión del donador de acilo (α_s) en la síntesis bajo control cinético de N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG) a partir de N- α -CBZ-Val-pNO (Z-V-pNO) utilizando una concentración de nucleófilo equivalente a 100 x Km en un medio formado por 30 % v/v de metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando 200 μ l de asclepaína soluble (6 UI/mg), a 40 °C y 200 rpm.

Tiempo (min)	Z-VpNO (mM)	Z-V-OH (mM)	pNO (mM)	Z-VG (mM)	α_s (%)	η (%)
0	7,30	0	0	0	0	0
0,5	6,54	0,38	0,14	0,49	10,20	6,70
1	5,58	0,78	0,21	0,93	23,40	12,77
10	2,50	3,70	1,70	1,07	65,68	14,70
15	0,37	6,34	2,40	0,57	94,92	7,80
30	0,057	6,80	2,60	0,43	99,22	5,90

3.5.1.2. Síntesis bajo control termodinámico.

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	control termodinámico
Medio de reacción	metanol 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8
Condiciones de reacción	40 °C, 200 rpm
Activador	2-mercaptoetanol (20 mM)
Sustrato limitante	N- α CBZ-Val-OH (7,284 mM)
Enzima	asclepaína soluble 200 μ L (6 UI/mg)
Nucleófilo	L-Gly-OH (7,284 mM)
Base aceptora de H⁺	trietilamina (7,284 mM)

A continuación, se muestran los resultados obtenidos cuando se llevó a cabo la reacción de síntesis de Z-VG en un medio miscible formado por 30 % v/v de metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando asclepaína soluble.

La Figura 21 presenta la separación de los componentes de una muestra de dicha reacción de síntesis a las 3 h de reacción.

N- α -CBZ-Val-Gly-OH se purificó mediante una columna C₁₈, se secó en un equipo concentrador (Thermo Scientific Savant™ SPD131DDA SpeedVac), y se analizó por espectrometría de masas, utilizando un espectrómetro de masas LCMS-2020 (Shimadzu) con una interfase de ionización por electro spray (ESI-MS). El espectro obtenido guardó total similitud con el presentado en la Figura 17.

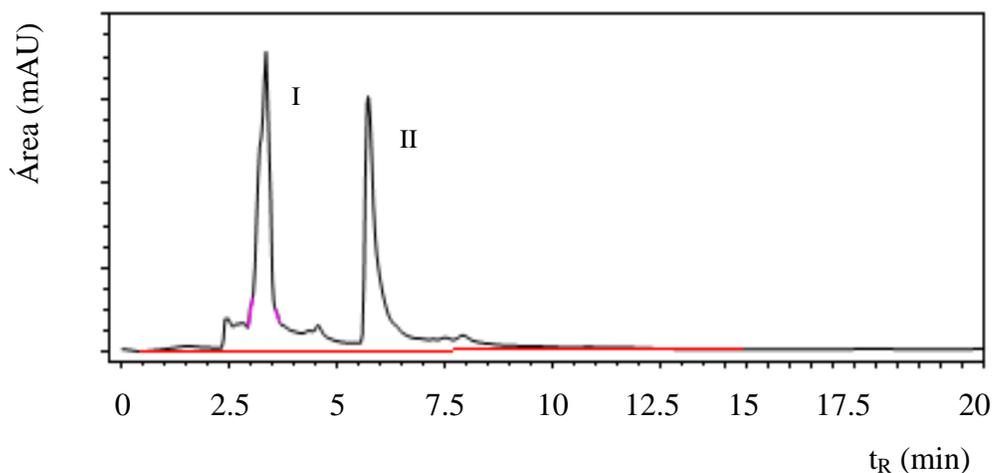


Figura 21. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control termodinámico de N- α -CBZ-Val-Gly-OH por RP-HPLC, en un medio homogéneo formado por metanol al 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando asclepaína soluble como catalizador, luego de 3h de reacción a 40 °C, 200 rpm. (I) N- α -CBZ-Val-Gly-OH (t_R : 3,6 min); (II) N- α -CBZ-Val-OH (t_R : 5,6 min).

La Figura 22 muestra la evolución en el tiempo del sustrato limitante (N- α -CBZ-Val-OH) y del producto de síntesis enzimática Z-VG, utilizando asclepaína soluble en un medio formado por metanol al 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, a 40 °C y 200 rpm.

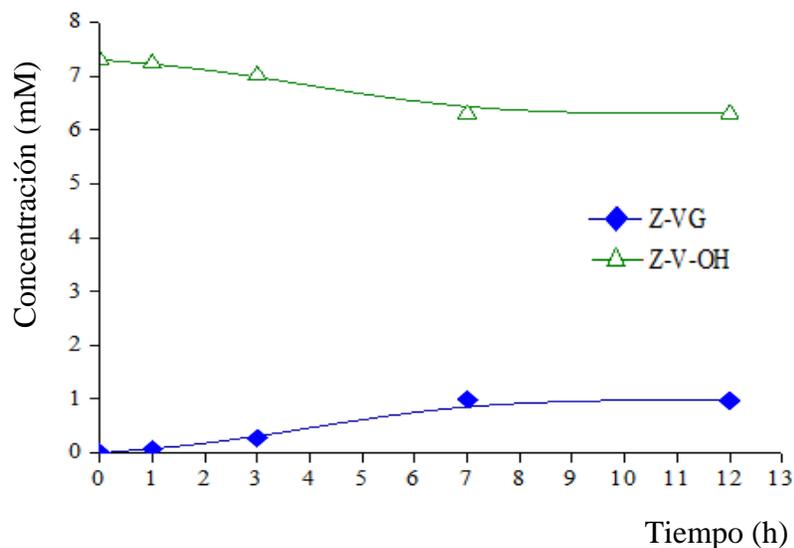


Figura 22. Variación en el tiempo de la concentración de los componentes de la reacción de síntesis enzimática bajo control termodinámico del dipéptido N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG) en un medio miscible formado por metanol al 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando asclepaína libre como catalizador, a 40 °C y 200 rpm.

La Tabla 17 muestra los rendimientos en producto y el grado de conversión del sustrato limitante (N- α -CBZ-Val-OH) en la reacción de síntesis enzimática bajo control termodinámico a 40 °C y 200 rpm del péptido Z-VG en un medio miscible formado por metanol al 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8.

Según la Tabla 17 el máximo rendimiento en producto fue de 13,5 % a las 7 h de reacción en coincidencia con a máxima conversión de sustrato en producto (17,7 %). Esto indica que 86,3 % de sustrato quedó sin consumir. El tiempo de vida media de asclepaína soluble en metanol (30 % v/v) en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 fue de 7,21 h (Tabla 3). Entonces la inactivación de la enzima no parece ser razón de la detención de la reacción de síntesis porque prácticamente el 50 % de la enzima debería estar aún activa después de 7 h de reacción. Sin embargo, las condiciones no son comparables porque en la reacción de síntesis se genera agua como producto de la condensación peptídica lo que podría haber disminuido la actividad de la enzima. Otra razón puede ser el control difuncional del donador de acilo a través de la interfase

del medio bifásico, lo que podrá resolverse mediante una mayor velocidad de agitación.

Tabla 17. Rendimiento en producto (η) y grado de conversión del donador de acilo (α_s) en la síntesis bajo control termodinámico de N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG) en un medio formado por 30 % v/v de metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando 200 μ L de asclepaína soluble (6 UI/mg), a 40 °C y 200 rpm.

Tiempo (h)	Z-VG (mM)	Z-V-OH (mM)	α_s (%)	η (%)
0	0	7,30	0	0
1	0,07	7,23	0,96	0,96
3	0,27	7,01	3,93	3,77
7	0,99	6,30	13,70	13,50
12	0,97	6,30	13,70	13,30

Finalmente, la relación enzima: sustrato limitante y otros factores que alteran la constante de equilibrio de ionización (K_{ion} , sección 1.4.1.), tales como pH, las bases aceptoras de protones (para reducir la acidez del grupo carboxilo del donador de acilo), la constante dieléctrica del medio (ϵ) y agentes precipitantes del producto peptídico son algunas variables que deberían ser estudiadas con el objeto de optimizar el rendimiento de la reacción de síntesis de Z-VG bajo control termodinámico, donde la constante de equilibrio de la reacción es la que determina el rendimiento en producto.

3.5.2. Síntesis enzimática de N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG), en sistema homogéneo, utilizando asclepaína inmovilizada en Octil-Glioxil-Sílica (OGS)

3.5.2.1. Síntesis bajo control cinético

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	control cinético
Medio de reacción	metanol 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8
Condiciones de reacción	40 °C, 200 rpm
Activador	2-mercaptoetanol (20 mM)
Donador de Acilo	N- α CBZ-Val-pNO (7,284 mM)
Enzima	asclepaína inmovilizada en OGS, 200 μ L (43 UI/g)
Nucleófilo	L-Gly-OH (7,284 mM)
Base aceptora de H⁺	trietilamina (7,284 mM)

A continuación, se muestran los resultados obtenidos cuando se llevó a cabo la síntesis de Z-VG en un medio miscible formado por 30 % ó 50 % v/v de metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando asclepaína inmovilizada en OGS.

La Figura 23 (a y b) presenta la separación de los componentes de una muestra de la reacción de síntesis bajo control cinético de Z-VG después de 15 min de reacción, utilizando asclepaína inmovilizada en OGS en los medios miscibles formados por 30 % ó 50 % (v/v) de metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8. En los mismos se observa: (I) N- α -CBZ-Val-OH (t_R : 2,6 min), (II) Z-VG (t_R : 3,75 min), (III) N- α -CBZ-Val-pNO (t_R : 5,13 min).

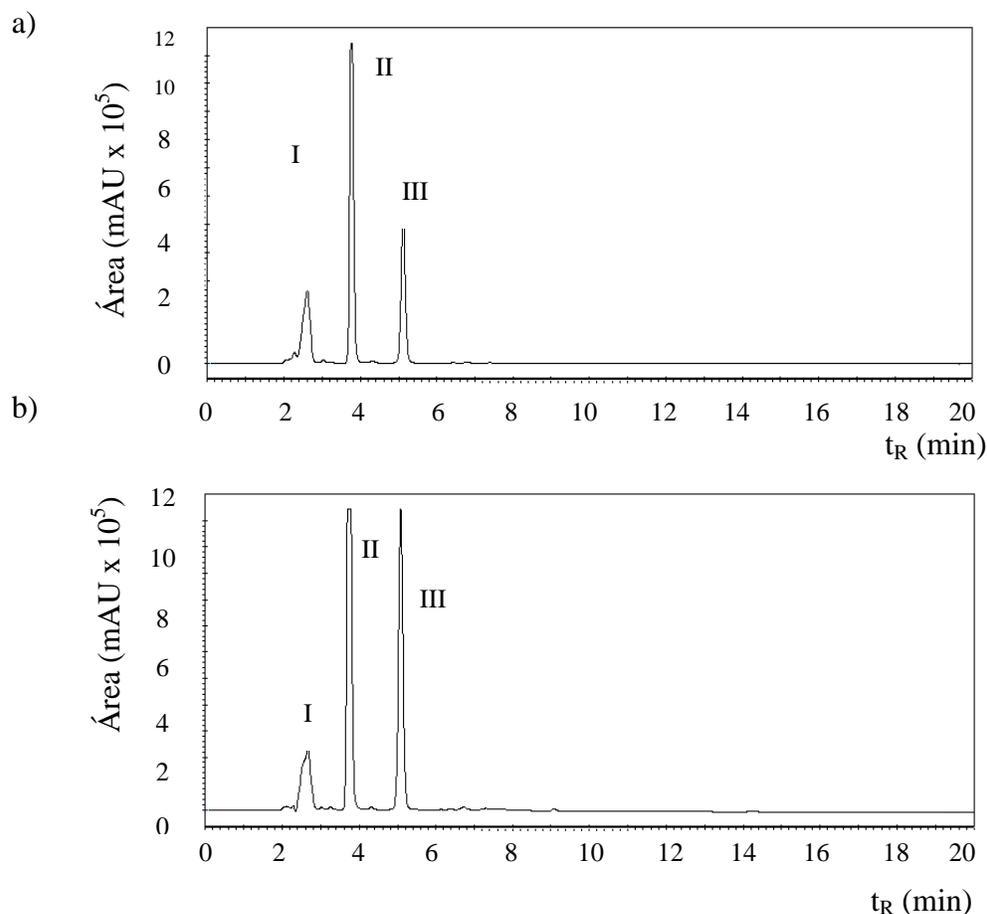


Figura 23. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control cinético por RP-HPLC, luego de 1 min de reacción, en un medio homogéneo formado por metanol a) 30 % v/v y b) 50 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1M pH 8, utilizando asclepaína inmovilizada en OGS como catalizador, a 40°C, 200 rpm. (I) N- α -CBZ-Val-OH (t_R : 2,6 min), (II) Z-VG (t_R : 3,75 min), (III) N- α -CBZ-Val-pNO (t_R : 5,13 min).

La Figura 24 (a, b) muestra la evolución en el tiempo del sustrato limitante (N- α -CBZ-Val-pNO), del producto de síntesis enzimática (Z-VG) y del producto de hidrólisis (N- α -CBZ-Val-OH), utilizando asclepaína inmovilizada en OGS, en un medio miscible formado por 30 % ó 50 % (v/v) de metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, a 40 °C y 200 rpm.

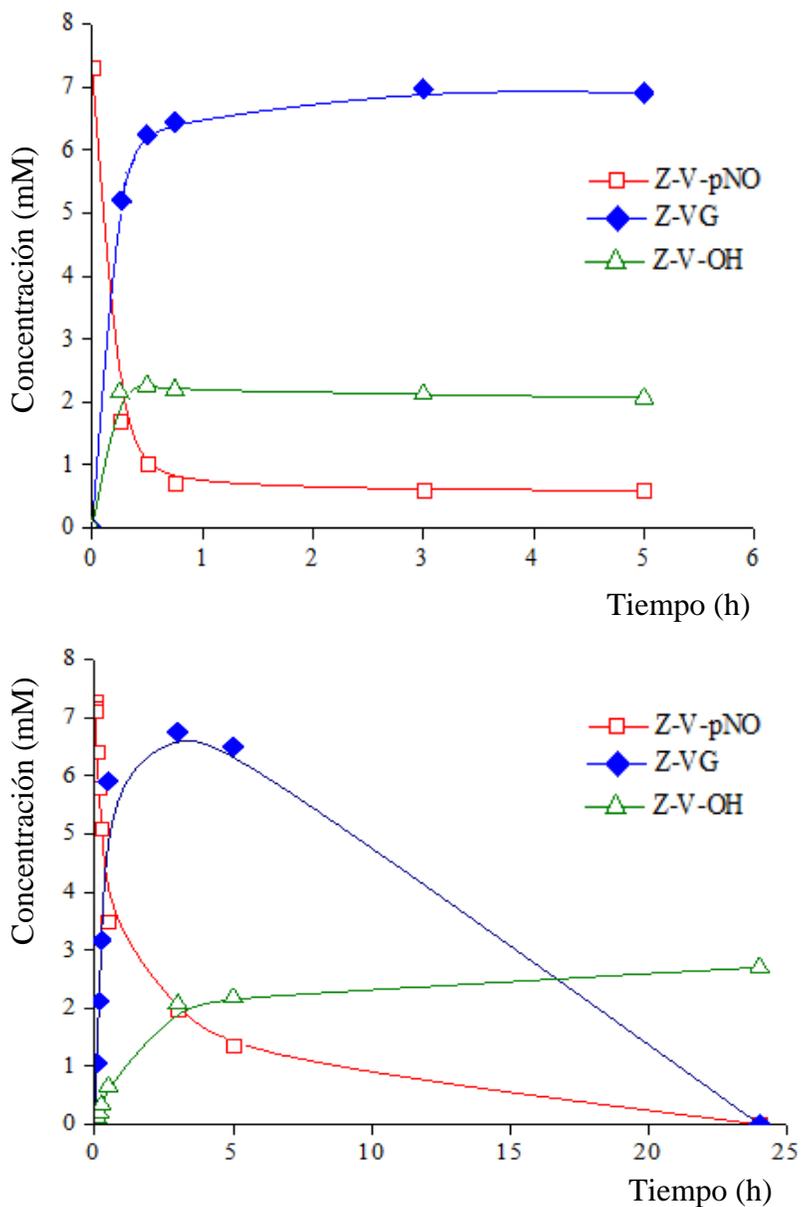


Figura 24. Variación en el tiempo de la concentración de los componentes de la reacción de síntesis enzimática del dipéptido N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG) en un medio miscible formado por a) 30 % ó b) 50 % v/v de metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, a 40 °C y 200 rpm, utilizando asclepaína inmovilizada en OGS como catalizador.

Z-VG se purificó mediante una columna C₁₈, se secó en un equipo concentrador (Thermo Scientific Savant™ SPD131DDA SpeedVac), y se determinó 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 es concordante con el presentado en la Figura 17.

La Tabla 18 muestra el rendimiento en producto y el grado de conversión del donador de acilo en la reacción de síntesis enzimática bajo control cinético del péptido Z-VG a 40 °C y 200 rpm, utilizando asclepaína inmovilizada en OGS, en un medio miscible formado por metanol 30% v/v en buffer Tris-HCl 0,1M pH 8. Los parámetros η (rendimiento) y α_s (grado de conversión del donante de acilo) se cuantificaron mediante las ecuaciones 4 y 5 respectivamente.

Tabla 18. Rendimiento en producto (η) y grado de conversión del donador de acilo (α_s) en la síntesis bajo control cinético de N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG) a 40 °C y 200 rpm, utilizando asclepaína inmovilizada en Octil-Glioxil-Sílica (OGS) en un medio formado por metanol 30% v/v en buffer Tris-HCl 0,1M pH 8.

Tiempo (min)	Z-V-pNO (mM)	Z-VG (mM)	Z-V-OH (mM)	α_s (%)	η (%)
0	7,30	0	0	0	0
15	1,70	5,70	2,23	77	78
30	1,03	6,24	2,26	86	85
45	0,70	6,44	2,19	90	88
180	0,60	6,97	2,12	92	95
300	0,60	6,90	2,06	92	95

Según muestra la Tabla 18 el máximo grado de conversión en sustrato fue 92 % a las 5 h de reacción, mientras que el máximo rendimiento en producto fue 95 % a las 3 h de reacción, sin verse el producto afectado por la hidrólisis en dicho tiempo.

En consecuencia, el η aumentó cinco veces cuando se utilizó asclepaína inmovilizada en OGS respecto de los valores obtenidos con la enzima soluble.

La Tabla 19 muestra los valores de η y α_s en la reacción de síntesis enzimática bajo control cinético del péptido Z-VG a 40 °C y 200 rpm, utilizando asclepaína inmovilizada en OGS, en un medio miscible formado por metanol 50% v/v en buffer Tris-HCl 0,1M pH 8..

Según la Tabla 19 el máximo grado de conversión de sustrato limitante fue 84,36 % a las 5 h de reacción. El máximo rendimiento en producto fue 93 % a las 3 h de reacción, valor muy similar al obtenido en el medio formado por metanol 30% v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8.

Tabla 19. Rendimiento en producto (η) y grado de conversión del donador de acilo (α_s) en la síntesis bajo control cinético de N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG) en un medio formado por metanol 50 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1M pH 8, utilizando asclepaína inmovilizada en Octil-Glioxil-Sílica (OGS), a 40 °C y 200 rpm.

Tiempo (h)	Z-V-pNO (mM)	Z-VG (mM)	Z-V-OH (mM)	α_s (%)	η (%)
0	7,29	0	0	0	0
0,01	7,18	0,10	0,01	1,5	1
0,02	7,12	0,20	0,02	2	3
0,08	6,40	1,06	0,11	12	15
0,17	5,80	2,12	0,20	20	29
0,25	5,10	3,16	0,33	30	43
0,50	3,50	5,9	0,65	52	81
3	1,96	6,75	2,07	73	93
5	1,14	6,50	2	84	89

De acuerdo a los resultados, la inmovilización de asclepaína en OGS permitió obtener el péptido deseado (Z-VG) en 30% o 50% v/v de metanol en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 con rendimientos del 98% y 93%, sin necesidad de reducir el contenido acuoso del medio de reacción.

3.5.2.2. Síntesis bajo control termodinámico

La síntesis de Z-VG bajo control termodinámico empleando asclepaína inmovilizada en Octil-Glioxil-Sílica (OGS), a 40 °C y 200 rpm, no procedió favorablemente y ningún producto de síntesis fue obtenido.

3.5.3. Síntesis enzimática de N- α -CBZ-Gln-Gly-OH (Z-QG), en un sistema macroheterogéneo, utilizando asclepaína soluble

3.5.3.1. Síntesis bajo control cinético

Las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo la reacción de síntesis de Z-QG, bajo control cinético en un medio macroheterogéneo se detallan a continuación:

Mecanismo de reacción	control cinético
Medio de reacción	acetato de etilo 50 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8
Condiciones de reacción	40 °C, 200 rpm
Activador	2-mercaptoetanol (20 mM)
Donador de Acilo	N- α CBZ-Val-pNO (6,5 mM)
Enzima	asclepaína soluble 200 μ L (6 UI/mg)
Nucleófilo	L-Gln-OH (6,5 mM)
Base aceptora de H⁺	trietilamina (6,5 mM)

La Figura 25 muestra la separación de los componentes de una muestra de la reacción de síntesis bajo control cinético de Z-QG, utilizando asclepaína soluble en el medio macroheterogéneo formado por acetato de etilo 50 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, después de 5 min de reacción. En el mismo se observa (I) N- α -CBZ-Gln-pNO (t_R : 3,845 min) y (II) N- α -CBZ-Gln-Gly-OH (t_R : 7,023 min).

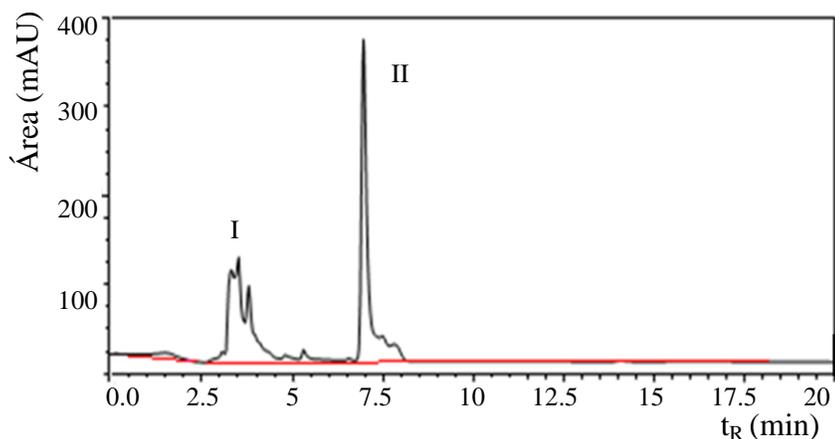


Figura 25. Separación de los componentes de la reacción de síntesis bajo control cinético de N- α -CBZ-Gln-Gly-OH por RP-HPLC, en la fase orgánica de un medio macroheterogéneo formado por acetato de etilo 50 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando asclepaína soluble como catalizador, luego de 0,5 min de reacción a 40 °C, 200 rpm. (I) N- α -CBZ-Gln-pNO (t_R : 3.845 min) y (II) N- α -CBZ-Gln-Gly-OH (t_R : 7,023 min).

Z-QG se purificó mediante una columna C₁₈, se secó en un equipo concentrador (Thermo Scientific Savant™ SPD131DDA SpeedVac), y se analizó por espectrometría de masas LCMS-2020 (Shimadzu), utilizando un espectrómetro de masas con una interfase de ionización por electropray (ESI-MS). El espectro obtenido se muestra en la Figura 26.

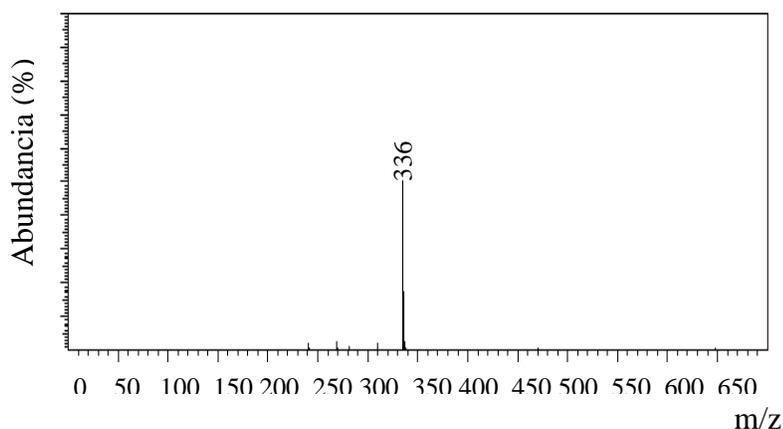


Figura 26. Espectro de masa del péptido carboxi terminal con potencial actividad antihipertensiva: Z-QG-OH.

La Figura 27 muestra la evolución en el tiempo del sustrato limitante (N- α -CBZ-Gln-pNO), del producto de síntesis enzimática (N- α -CBZ-Gln-Gly-OH), y del producto de hidrólisis (N- α -CBZ-Gln-OH), utilizando asclepaína soluble en un medio macroheterogéneo formado por 50 % v/v de acetato de etilo en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, a 40 °C y 200 rpm.

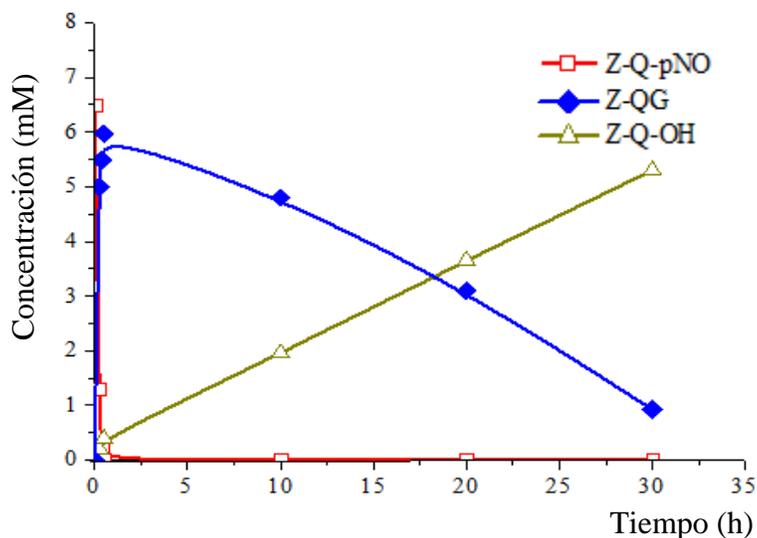


Figura 27. Variación en el tiempo de la concentración de los componentes de la reacción de síntesis enzimática a 40 °C y 200 rpm del dipéptido N- α -CBZ-Gln-Gly-OH (Z-QG) en un medio macroheterogéneo formado por 50 % (v/v) de acetato de etilo en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando asclepaína soluble como catalizador.

Tabla 20. Rendimiento en producto (η) y grado de conversión del donador de acilo (α_s) en la síntesis bajo control cinético de N- α -CBZ-Gln-Gly-OH (Z-QG) en un medio formado por 50 % v/v de acetato de etilo en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando 200 μ L de asclepaína soluble (6 UI/mg), a 40 °C y 200 rpm.

Tiempo (min)	Z-Q-pNO (mM)	Z-Q-OH (mM)	Z-QG (mM)	α_s (%)	η (%)
0	6,50	0	0	0	0
0,5	0	0,39	5,97	98	76,43
30	0	5,30	0,92	100	7,23

3.5.3.2. Síntesis bajo control termodinámico

La síntesis de Z-QG bajo control termodinámico empleando asclepaína soluble y N- α -CBZ-Gln-OH como sustrato limitante, a 40 °C y 200 rpm, no procedió favorablemente y ningún producto de síntesis fue obtenido.

3.5.4. Síntesis enzimática de N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ), utilizando asclepaína soluble en un sistema macroheterogéneo (bifásico)

3.5.4.1. Síntesis bajo control cinético

A continuación, se muestran los resultados obtenidos cuando se llevó a cabo la síntesis de Z-YQQ en un medio bifásico formado por 50 % v/v de acetato de etilo en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando asclepaína soluble.

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

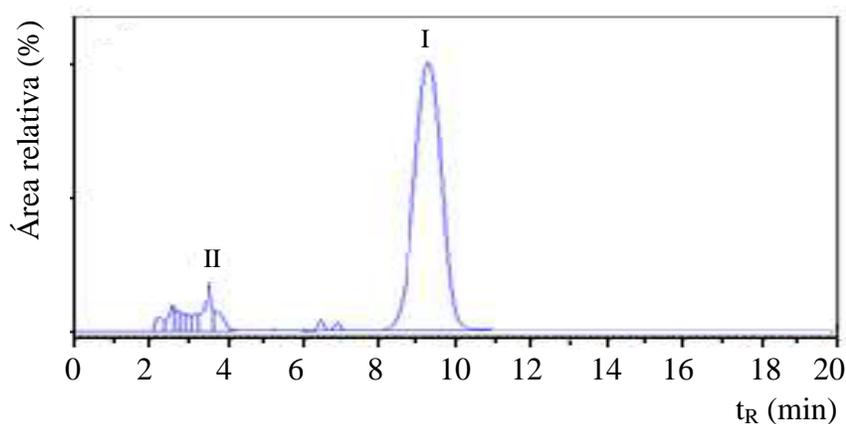
Mecanismo de reacción	control cinético
Medio de reacción	acetato de etilo 50 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8
Condiciones de reacción	40 °C, 200 rpm
Activador	2-mercaptoetanol (20 mM)
Donador de acilo	N- α CBZ-Tyr-pNO (72,5 mM)
Enzima	asclepaína soluble 200 μ L (6 UI/mg)
Nucleófilo	L-Gln-OH (72,5 mM)
Base aceptora de H⁺	trietilamina (72,5 mM)

La Figura 28 presenta la separación de los componentes de una muestra de la reacción de síntesis enzimática bajo control cinético de Z-YQQ, utilizando asclepaína soluble en un medio formado por acetato de etilo 50 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, 50 % v/v después de 5 min de reacción.

Según la Figura 28 (a), a tiempo de retención t_R : 9,8 min en la fase acuosa, se obtuvo el producto principal (I), que se hidrolizó después de 3 h de reacción. Además, se observó un subproducto a t_R : 15,2 min (V) en la fase orgánica, que

permaneció invariable durante todo el tiempo de reacción (Figura 28 b) y coincide con el blanco de reactivo (sin enzima).

a)



b)

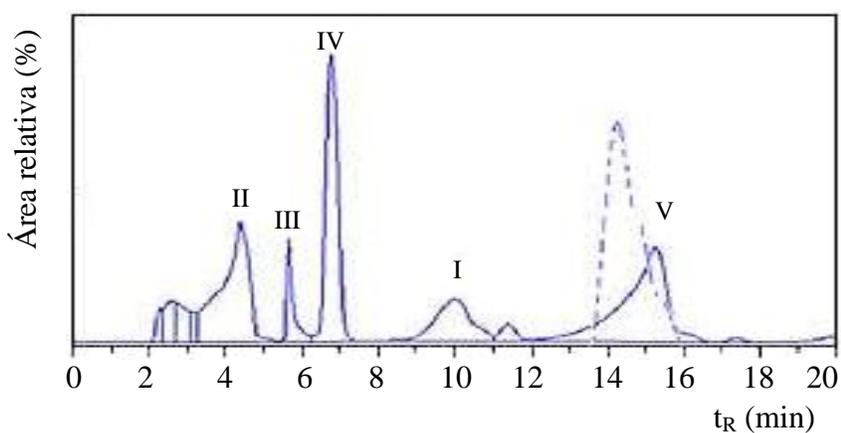


Figura 28. Separación de los componentes de la reacción de síntesis enzimática de N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH por RP-HPLC de: a) fase acuosa y b) fase orgánica después de 5 minutos de reacción, usando asclepaína como catalizador, a 40 °C y 200 rpm. I: producto principal (t_R : 9,8 min), II: enzima (t_R : 2-4min), III: Z-Y-pNO (t_R : 5,7 min), IV: p-nitrofenol (t_R : 6,8 min), V: subproducto (t_R : 15,2 min). Línea punteada: control de reactivos.

El producto obtenido en la fase acuosa se separó fácilmente al detener la agitación, se purificó mediante una columna C₁₈, se secó en un equipo concentrador (Thermo Scientific Savant™ SPD131DDA SpeedVac), y se determinó 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 de masas del producto principal de la reacción de la síntesis (I, t_R 9,8 min), reveló una masa iónica de m/z 568, correspondiente al péptido Z-YQQ y no al dipéptido esperado, Z-YQ (Figura 29).

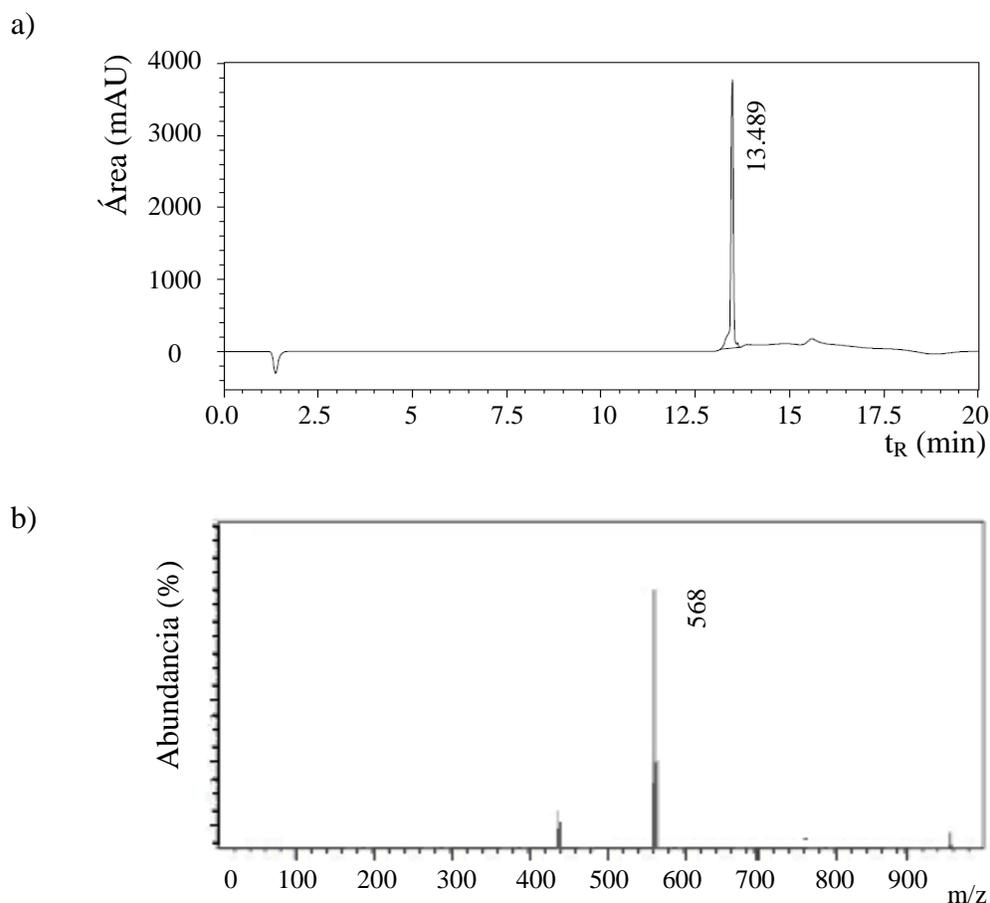


Figura 29. Cromatograma obtenido por RP-HPLC (a) y espectro de masa (b) del péptido con potencial actividad antihipertensiva N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ).

La Figura 30 muestra la evolución en el tiempo del sustrato limitante (N- α -CBZ-Tyr-pNO), del producto de síntesis enzimática (N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH), de la enzima y de pNO, en el medio de reacción formado por 50 % v/v de acetato de

etilo en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando asclepaína soluble, a 40 °C y 200 rpm.

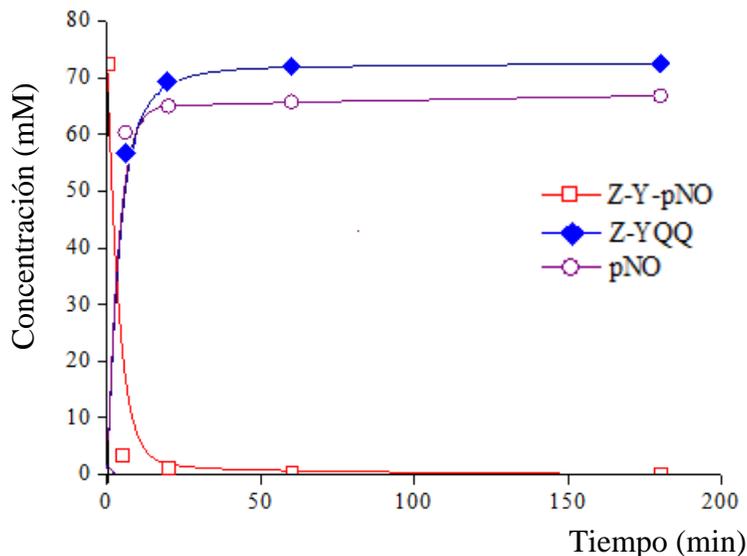


Figura 30. Variación en el tiempo de la concentración de los componentes de la reacción de síntesis enzimática del dipéptido N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ) en el medio de reacción formado por 50 % (v/v) de acetato de etilo en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando asclepaína libre como catalizador, a 40 °C y 200 rpm.

La Tabla 21 muestra el rendimiento en producto y el grado de conversión del donador de acilo en la reacción de síntesis enzimática bajo control cinético del péptido Z-YQQ en el medio de reacción formado por 50 % (v/v) de acetato de etilo en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando asclepaína libre como catalizador, a 40 °C y 200 rpm. Los parámetros η (rendimiento) y α_s (grado de conversión del donante de acilo) se cuantificaron mediante las ecuaciones 4 y 5 respectivamente.

Tabla 21. Rendimiento en producto (η) y grado de conversión del donador de acilo (α_s) en la síntesis bajo control cinético de N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ) en el medio de reacción formado por 50 % v/v de acetato de etilo en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, utilizando 200 μ l de asclepaína soluble (6 UI/mg), a 40 °C y 200 rpm.

Tiempo (min)	Z-Y-pNO (mM)	Z-YQQ (mM)	pNO (mM)	α_s (%)	η (%)
0	72,5	0	0	0	0
5	3,6	65	61	95	85
20	1,2	65	71	99	99
60	0,5	66	72	93	42
180	0	67	72,5	100	100

3.5.4.2. Síntesis bajo control termodinámico

La síntesis de Z-YQQ bajo control termodinámico empleando N- α CBZ-Tyr-OH como sustrato limitante y asclepaína soluble a 40 °C y 200 rpm, no procedió favorablemente y ningún producto de síntesis fue obtenido.

3.6. Actividades biológicas *in vitro* de los péptidos sintetizados

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 provenientes de fuentes naturales, son habitualmente investigados en torno a sus actividades antimicrobianas, antihipertensivas, anticoagulantes, antiinflamatorias, citoprotectora gastroduodenal, anti quorum sensing, irritante dérmica y alergológicas (Origone y col., 2015; Barberis y col., 2018; Origone y col., 2018; Barcia y col., 2016, 2018).

3.6.1. Actividad antihipertensiva *in vitro* de N- α -CBZ-Val-Gly-OH (Z-VG) y N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ)

La actividad antihipertensiva de los péptidos sintetizados por vía enzimática Z-VG y Z-YQQ se evaluó como actividad inhibitoria de la ECA en ensayos *in vitro*. Para ello, se preparó una solución stock del sustrato Abz-FRk-(Dnp)P-OH (FRET) en DMSO 100% (1 mg/mL) y a partir de ésta se hicieron diferentes diluciones para construir una curva de calibración (Figura 31). Luego, se realizó una curva de actividad de ECA para determinar la actividad de la misma en función del tiempo, utilizando FRET como sustrato (Figura 32). Además, se realizó una curva de inhibición de ECA frente a distintas concentraciones de captopril (inhibidor comercial de la enzima) (Figura 33).

Finalmente, se estudió la capacidad inhibitoria de ECA por parte de Z-VG y Z-YQQ, en comparación con los péptidos tomados como modelo en este estudio (VG, YQ y QG), con otros análogos obtenidos por síntesis química (Figuras 14 a 16) y con el inhibidor comercial captopril (Tabla 22).

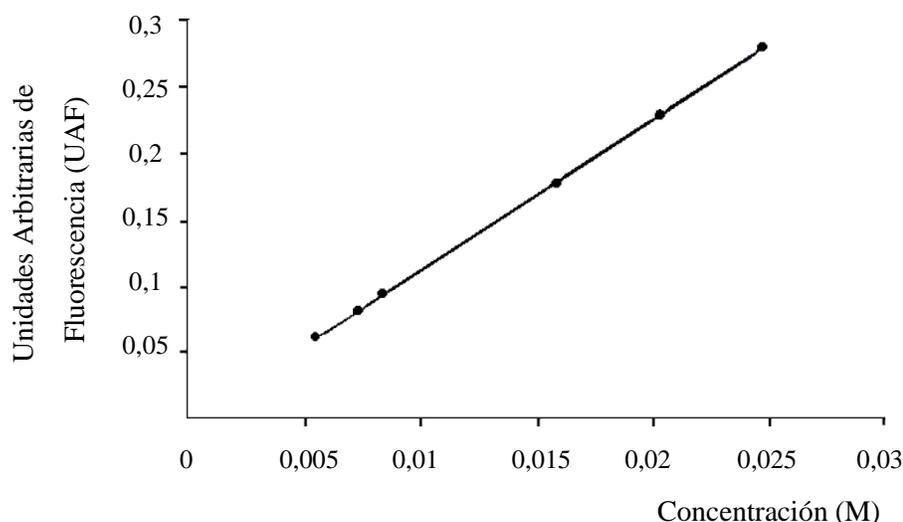


Figura 31. Curva de calibrado del sustrato de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) Abz-FRK-(Dnp)P-OH (FRET) en DMSO.

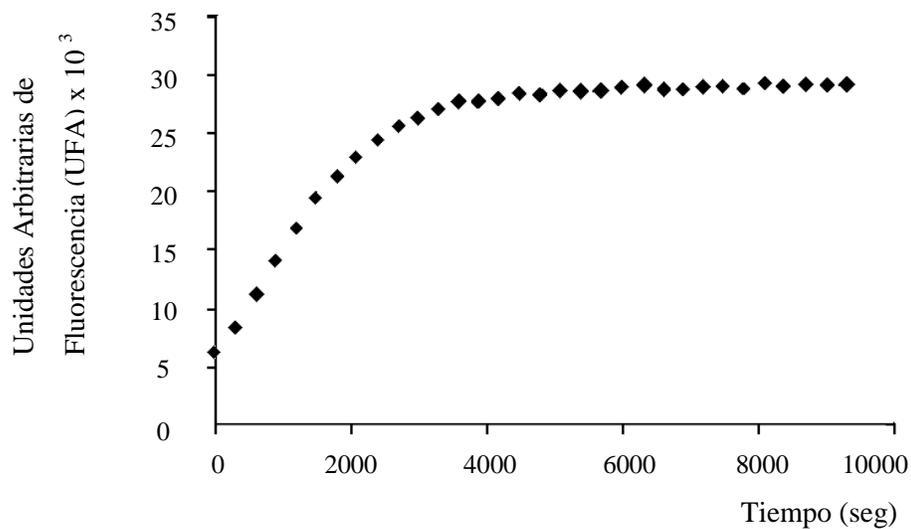


Figura 32. Actividad enzimática de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) frente al sustrato Abz-FRK-(Dnp)P-OH (FRET) en DMSO, en función del tiempo.

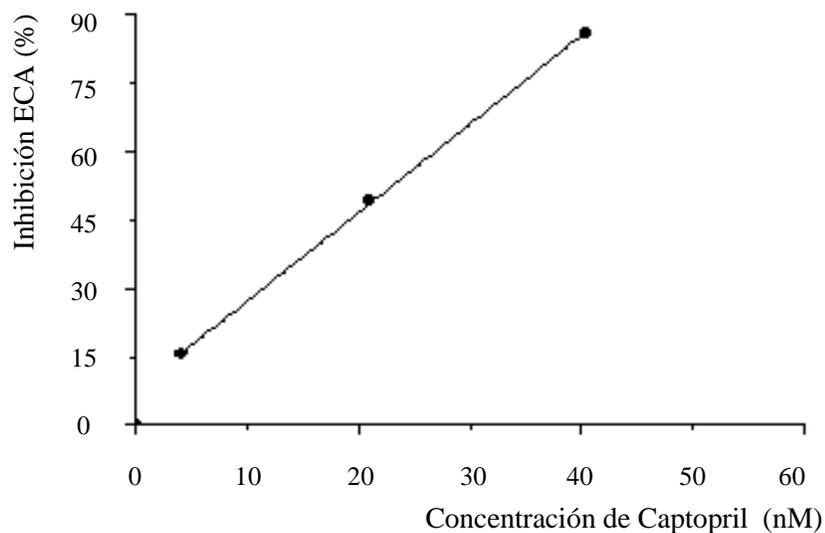


Figura 33. Perfil de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) frente al inhibidor comercial captopril, utilizando Abz-FRK-(Dnp)P-OH (FRET) en DMSO.

La Tabla 22 muestra los porcentajes de inhibición de la ECA obtenidos al incorporar 100 mg/mL de los péptidos en estudio.

Tabla 22. Porcentajes de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en presencia de los péptidos sintetizados.

Péptido	mg/mL	% Inhibición	IC₅₀ (mM)
VG ⁽¹⁾		69,8	1,10
YQ ⁽²⁾		50	0,63
QG ⁽³⁾			7,40
Z-VG	100	32,5	2,50
Z-YQQ	100	85,5	0,25
Z-YQQ-NH ₂	100	44,8	0,48
YQQ-OH	100	85,0	0,61
YQQ-NH ₂	100	17,23	1,25
Captopril ⁽⁴⁾	100	100	0,21x10 ⁻⁴

⁽¹⁾⁽³⁾ Cheung y col. (1980); ⁽²⁾ Shamloo y col. (2015); ⁽⁴⁾ Ondetti y Cushman (1982).

La actividad antihipertensiva del péptido Z-VG sintetizado por vía enzimática es 37,3% inferior a la informada por Cheung y col. (1980) para el péptido análogo VG.

Sorprendentemente, el péptido Z-YQQ sintetizado por vía enzimática en nuestro laboratorio presentó un porcentaje de inhibición 35,5% mayor a la expresada por YQ (Shamloo y col., 2015). Además, el análogo sintetizado por vía química (YQQ-OH) también mostró un porcentaje de inhibición similar al péptido obtenido por vía enzimática. Sin embargo, los análogos amino-terminal sintetizados por vía química expresaron porcentaje de inhibición de ECA menores que los carboxilo-terminal de idéntica secuencia peptídica. Este hecho fue informado previamente para otros péptidos en la bibliografía, sugiriendo que la unión selectiva del grupo carboxilo-terminal del péptido inhibidor de la ECA es determinante de su especificidad y actividad (Cheung y col., 1980).

Finalmente, los valores obtenidos de IC₅₀ para todos los péptidos informados en la Tabla 22, son notablemente más altos que los obtenidos por el inhibidor comercial captopril. Según la bibliografía, captopril presenta IC₅₀: 0,21x10⁻⁴ (Ondetti y Cushman, 1982). No obstante, es probable que dicha diferencia se deba a la metodología utilizada para medir la actividad inhibitoria de ECA. Justamente, el problema que se plantea al medir la actividad antihipertensiva *in vitro* como actividad inhibitoria de 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; Corrons y col., 2012).

Si bien, estos valores serán corroborados por una nueva metodología que se está poniendo a punto en nuestro laboratorio, es evidente que Z-YQQ y Z-VG son promisorios agentes antihipertensivos, en especial el primero. Por tal razón, dicho péptido fue seleccionado para realizar otros estudios de actividad inhibitoria, toxicidad y estabilidad para evaluar la efectividad, inocuidad y otras actividades biológicas del mismo.

3.6.2. Actividad antimicrobiana *in vitro* de N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ)

Según bibliografía, los péptidos frecuentemente presentan más de una actividad biológica (Mora y col., 2014; Singh y col., 2014).

A continuación se presentan los resultados obtenidos en el ensayo de determinación de actividad antimicrobiana del péptido Z-YQQ frente a *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25.922, bacterias representativas Gram positiva y Gram negativa, respectivamente.

En las Figuras 34 y 35 se ilustran las curvas de crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923 y a *E. coli* ATCC 25.922 en un caldo de cultivo Müller-Hinton, en presencia del péptido en estudio (0 a 230 μ g/mL).

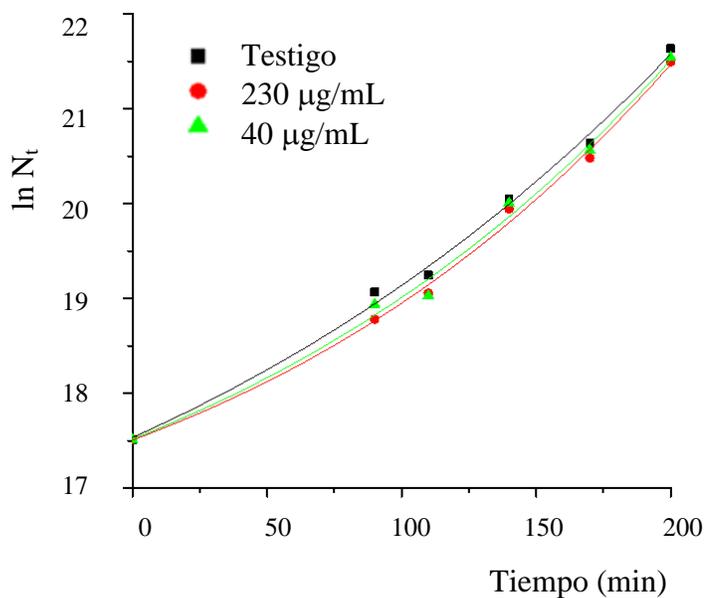


Figura 34. Cinética de crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a 37 °C y 180 rpm, en caldo Müller-Hinton en ausencia y presencia del tripéptido N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ) (0 a 230 $\mu\text{g/mL}$).

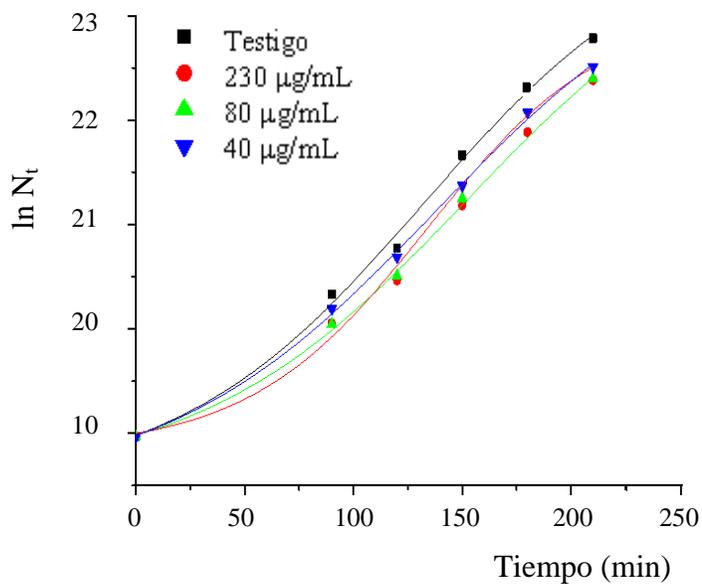


Figura 35. Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 a 37 °C y 180 rpm, en caldo Müller-Hinton en ausencia y presencia del tripéptido N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ) (0 a 230 $\mu\text{g/mL}$).

De acuerdo con los resultados obtenidos, el péptido Z-YQQ no presenta actividad antimicrobiana significativa en el rango estudiado.

3.6.3. Actividad anticoagulante *in vitro* de N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ)

La actividad anticoagulante del péptido Z- YQQ se determinó mediante Wiener Lab Test, tal como se describió en la sección 2.5.3. 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 (Thiruvengattarajan y col., 2014).

Según TT, se encontró que el péptido Z-YQQ causó un retraso de 10 seg en el tiempo de conversión de fibrinógeno a fibrina. Es decir, el tiempo de coagulación en la muestra (con péptido) fue 50 % más alto que en el control. Por otro lado, PT mostró que el péptido Z-YQQ causó un retraso de 19 seg en el tiempo de conversión de protrombina a trombina. Es decir, el tiempo de coagulación fue 136 % más alto en la muestra con péptido que en el control (Tabla 23).

Tabla 23. Test de coagulación para evaluar la actividad anticoagulante del tripéptido N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ). APTT: Tiempo Parcial de Tromboplastina Activado. PT: Tiempo de Protrombina. TT: Tiempo de Trombina.

	APTT (s) Control: 36 s	PT (s) Control: 14 s	TT (s) Control: 20 s
Valores de referencia	30 - 43	10 - 14	17 - 21
Z-YQQ	45	33	30
Heparina	56	33	31

Finalmente, la acción de Z-YQQ sobre algunos factores (VIII, IX, XI y XII) de la cascada de coagulación sanguínea se evaluó usando APTT. Aunque el péptido Z-YQQ causó 9 seg de retraso con respecto al control, no hay una diferencia significativa entre los valores obtenidos en el APTT y los valores de referencia. Por lo tanto, Z-YQQ no actuó sobre la vía intrínseca. De acuerdo con los resultados

informados, el tripéptido Z-YQQ actuó en la vía extrínseca de la cascada de coagulación.

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 APTT es 1,5 a 2,5 veces el valor de control (Eikelboom y Hirsh, 2006). De acuerdo con nuestros resultados, 0,7 ppm de heparina mostró valores similares de TT y PT que Z-YQQ, mientras que APTT fue más alto que en el último.

3.7. Ensayos de toxicidad aguda de N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ) en ensayos *in vitro*, utilizando líneas celulares

La Figura 36 muestra el porcentaje de viabilidad celular después de la exposición de la línea celular humana 293FT a diferentes concentraciones del péptido Z-YQQ (0,7 a 21 ppm), durante 4 h a 37 °C en atmósfera de aire enriquecido en 5 % de CO₂.

Se utilizó el método de Kruskal-Wallis ANOVA para evaluar las diferencias significativas en los valores de viabilidad celular después de exponer la línea celular humana 293FT a diferentes concentraciones de péptido y controles positivos (C +) y negativos (C-) y se determinó que el péptido Z-YQQ no produjo disminución ($p \leq 0,05$) en la viabilidad celular bajo las condiciones de la prueba de toxicidad. Cuando se utilizaron 0,7 ppm de péptido, se midió una tasa de viabilidad superior a la del control (100%). Sin embargo, esta diferencia fue menor del 10% por lo que no se consideró una proliferación significativa (Escobar y col., 2010). Este efecto podría estar relacionado al efecto de hormesis, término utilizado por los toxicólogos para referirse a una respuesta de dosis bifásica a un agente externo, que se caracteriza por una baja dosis de estimulación o efecto beneficioso y alta dosis de inhibidor o efecto tóxico (Mattson, 2008). Según la prueba de Kruskal-Wallis, Z-YQQ no fue citotóxico en el ensayo *in vitro* a las concentraciones analizadas.

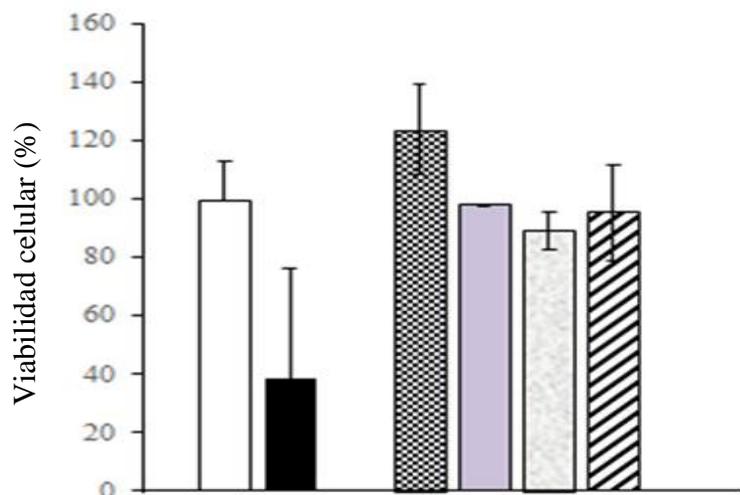


Figura 36. Actividad citotóxica *in vitro* de N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ) sobre la línea celular 293FT. □ C+: Control positivo; ■ C-: Control negativo; Concentración del péptido: ▨ 0,7; ▩ 2,1; ◻ 7 y ▤ 21 ppm.

3.8. Determinación de la estabilidad de N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ) en plasma humano

La Figura 37 muestra la actividad anticoagulante retenida (TT, PT y APTT) del péptido Z-YQQ en función del tiempo de incubación (min) en plasma humano sano. Según la Figura 37, el péptido Z-YQQ conservó entre el 83% y el 91% de actividad expresada en los test de tiempo de trombina (TT), el tiempo de protrombina (PT) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT), después de 15 min de incubación en plasma humano sano. Estos resultados muestran la alta estabilidad del péptido sintetizado en el rango de tiempo estudiado.

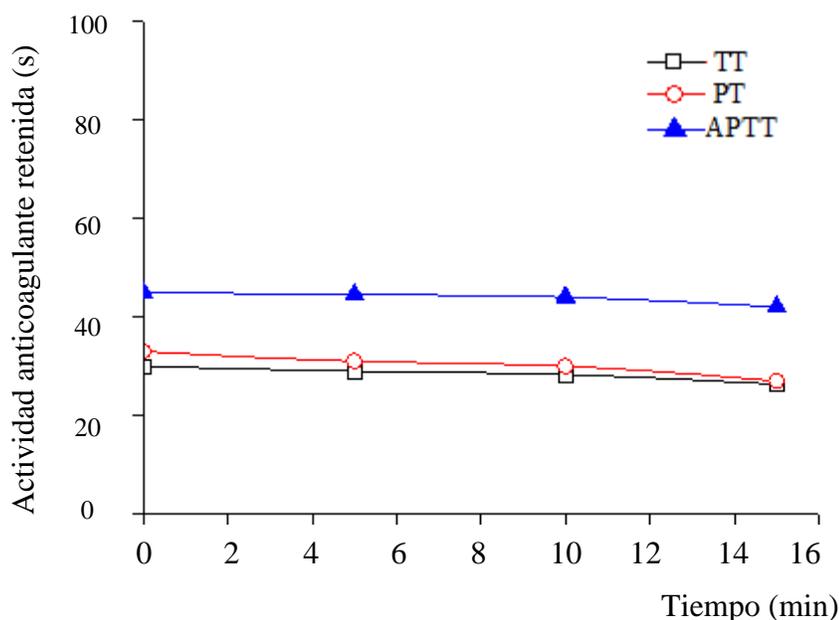


Figura 37. Actividad anticoagulante retenida de N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ) en plasma humano sano en función del tiempo de incubación. Control APTT: 36 seg; Control PT: 14 seg; Control TT: 20 seg.

3.9. Determinación cuantitativa de fibrinógeno en plasma humano por el método inmunturbidimétrico, en presencia de N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ)

La Tabla 24 muestra el efecto del péptido sintetizado (Z-YQQ) sobre la trombina, mediante la determinación cuantitativa de fibrinógeno en plasma humano por el método inmunturbidimétrico (Fibrinogen Turbiditest AA Line, Wiener Lab, Rosario, Argentina).

De acuerdo con la Tabla 24, la trombina fue inhibida por Z-YQQ (17 %), retrasando el tiempo de polimerización de fibrinógeno a fibrina y la formación de coágulos, de la misma manera que lo observado con heparina (18 %) en las condiciones de estudio.

Estos resultados son concordantes con los del test de coagulación, presentados en la Tabla 23, puesto que de acuerdo con los mismos, Z-YQQ actuó a nivel de la vía

extrínseca de la cascada de coagulación (TP) y de la vía común, retrasando el tiempo de conversión de fibrinógeno a fibrina (TT), con valores similares a heparina.

Tabla 24. Efecto del péptido N- α -CBZ-Tyr-Gln-Gln-OH (Z-YQQ) sobre la enzima trombina, usando la determinación cuantitativa de fibrinógeno en plasma mediante el método inmunturbidimétrico.

	Concentración de fibrinógeno (mg/ml)	Porcentaje de inhibición (%)
Blanco control (BC)	0,83	(a)
Control negativo (-)	0,50	(b)
Control positivo (+)	0,65	18
Z-YQQ	0,64	17

(a) Contenido total de fibrinógeno en la muestra (sin trombina), (b) Contenido de fibrinógeno restante en la muestra después de la acción de la trombina, en las condiciones de estudio.

CAPITULO 4
CONCLUSIONES

El objetivo general de este trabajo fue aplicar proteasas pre-purificadas de *Asclepias curassavica* L. (*Asclepiadaceae*), una planta superior que crece en Argentina, en forma soluble o inmovilizada y en sistemas acuoso-orgánicos, como un nuevo catalizador de la síntesis de péptidos con potencial actividad antihipertensiva *in vitro*.

Para seleccionar los medios de reacción más promisorios de las síntesis de péptidos, se estudió el efecto de los solventes orgánicos sobre la actividad proteolítica y la estabilidad operacional de asclepaína en sistemas homogéneos y macroheterogéneos, utilizando la enzima libre e inmovilizada en diferentes soportes.

Los medios de reacción más promisorios fueron el sistema homogéneo formado por metanol 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, y el sistema macroheterogéneo formado por 50% v/v de acetato de etilo en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8. En ellos, asclepaína expresó tiempos de vida media de 7,21 y 11,07 h, respectivamente.

El efecto de los de los solventes orgánicos sobre la estructura secundaria de asclepaína cI 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.

Asclepaína cI en los sistemas miscibles estudiados, excepto en el medio formado por buffer Tris HCl 0,1 M pH 8 y THF 70 % v/v, no mostró diferencia significativa entre la estructura secundaria que adquirió cuando se solubilizó en buffer, en metanol 30 % v/v o DMS 70 % v/v, en concordancia con el hecho de que en dichos medios miscibles se obtuvieron los mayores tiempos de vida media de la enzima. Por el contrario, asclepaína cI en los sistemas bifásicos formados por 1-octanol 30 % v/v, hexano 50 % v/v, acetato de etilo 50 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8, presentó diferencias espectrales significativas. Sin embargo, y a pesar de su menor similitud, asclepaína cI mostró mayor estabilidad en los sistemas bifásicos que en los sistemas miscibles seleccionados. En los primeros, la alta estabilidad enzimática puede deberse a que asclepaína no se ve afectada por encontrarse en la fase acuosa, por lo que no entra en contacto con los solventes orgánicos directamente como si ocurre en sistemas homogéneos. Por lo tanto, los cambios en la expresión

catalítica de asclepaína cI en buffer y en los sistemas acuoso-orgánicos estudiados no están relacionados con los cambios estructurales de la enzima.

La selección del donador de acilo (sustrato limitante) para las reacciones de síntesis se realizó mediante un estudio de las preferencias de asclepaína por diversos derivados aminoacídicos sintéticos, en los medios de reacción previamente seleccionados.

Asclepaína en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 y en metanol 30 % v/v exhibió amplia preferencia por los derivados aminoacídicos no polares, especialmente por Val; mientras que en acetato de etilo 50 % v/v mostró preferencia por los aminoácidos polares, especialmente por Gln y Tyr.

A partir de la base de datos BIOPEP (2012) y de bibliografía, tomando como base las preferencias de asclepaína, se seleccionaron los péptidos Val-Gly (VG), Gln-Gly (QG) y Tyr-Gln (YQ), con actividad antihipertensiva *in vitro* con el objeto de sintetizarlos por vía enzimática.

Se obtuvieron con éxito los péptidos Z-YQQ, análogo de YQ, Z-VG, análogo de VG, y Z-QG, análogo de QG.

El péptido Z-YQQ fue sintetizado por vía enzimática bajo control cinético en acetato de etilo 50 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1M pH 8, con un rendimiento de 100 % utilizando *asclepaína* soluble como catalizador.

El péptido Z-VG fue sintetizado por vía enzimática bajo control cinético y termodinámico, en metanol al 30 % v/v en buffer Tris-HCl 0,1M pH 8, utilizando *asclepaína* en forma soluble e inmovilizada. El rendimiento en producto de la reacción de síntesis bajo control cinético utilizando *asclepaína* soluble fue de 19 % pero se logró una maximización de 95 % de rendimiento empleando *asclepaína* inmovilizada en OGS. El rendimiento en producto de la síntesis del péptido Z-VG bajo control termodinámico fue solo 13,5 %.

El péptido Z-QG fue obtenido mediante síntesis bajo control cinético y no así bajo control termodinámico; el rendimiento máximo alcanzado fue de 76,43 %.

La actividad antihipertensiva de los péptidos Z-YQQ y Z-VG se evaluó como actividad inhibitoria de ECA en ensayos *in vitro*. El péptido de síntesis enzimática Z-YQQ-OH mostró un porcentaje de inhibición 35,5% mayor al expresado por el

péptido modelo YQ (Shamloo y col., 2015). Por el contrario, la actividad antihipertensiva del péptido Z-VG fue 37,3 % inferior a la del péptido análogo VG (Cheung y col., 1980). No obstante, en ambos casos los valores de IC₅₀ obtenidos son notablemente mayores que el valor correspondiente al del inhibidor comercial captopril (IC₅₀ de 0,21x10⁻⁴ mM). Dicha diferencia puede deberse a que no existe un método estandarizado para medir la actividad antihipertensiva *in vitro* como actividad inhibitoria de ECA; por lo que éstos valores serán corroborados por una nueva metodología.

Los resultados mencionados en el párrafo anterior demuestran que Z-YQQ y Z-VG son promisorios agentes antihipertensivos, el primero en mayor medida. Por lo que fue seleccionado para realizar estudios de toxicidad, estabilidad y otras actividades biológicas del mismo.

Al evaluar la actividad antimicrobiana de Z-YQQ en un cultivo batch a escala de laboratorio frente a una cepa Gram positiva (*S. aureus* ATCC 25923) y frente a una cepa Gram negativa (*E. coli* ATCC 25922) no se observó inhibición del crecimiento microbiano.

Por otra parte, se determinó la actividad anticoagulante del péptido Z-YQQ mediante Wiener Lab Test. El péptido sintetizado por vía enzimática Z-YQQ actuó sobre la vía general y sobre la vía extrínseca de la cascada de coagulación sanguínea, aumentando el tiempo de coagulación y retrasando el tiempo de polimerización de fibrinógeno a fibrina y la formación del coágulo, de manera similar a heparina. Dichos resultados pusieron de manifiesto su potencial, no solo como agente antihipertensivo, sino también como agente anticoagulante. Además, se demostró que el péptido Z-YQQ retuvo el 82% de su actividad anticoagulante durante 15 min 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 Z-YQQ se determinó como porcentaje de viabilidad celular después de exponer, durante 4 h a 37 °C, la línea celular humana 293 FT a diferentes concentraciones del péptido mencionado. Se empleó el método estadístico Kruskal-Wallis ANOVA para evaluar las diferencias significativas en los

valores de viabilidad celular y se determinó que Z-YQQ no fue citotóxico en el ensayo *in vitro* a las concentraciones analizadas.

En general, esta tesis doctoral aporta nuevas estrategias y productos de interés para la industria alimenticia y farmacéutica, que implican una expansión del mercado actual y la potencial transferencia de resultados al sector socio-productivo interesado en los mismos. Además, contribuye al aprovechamiento de los recursos naturales renovables autóctonos de nuestro país, como son las fuentes vegetales de enzimas proteolíticas que han sido escasamente exploradas y no poseen patentes que dificulten su explotación.

CAPITULO 5
PROYECCIONES FUTURAS

Actualmente, la base de datos BIOPEP informa que existen 2609 secuencias peptídicas con potenciales actividades biológicas, de las cuales algunas provienen de fuentes naturales y otras son productos de síntesis. Entre ellos, 556 secuencias peptídicas tienen potencial actividad antihipertensiva, puesto que han demostrado ser inhibidores de la ACE (BIOPEP Database, 2012).

En los seres vivos, los péptidos endógenos tienen un importante protagonismo fisiológico. Esto hace que a priori sean considerados muy interesantes para el descubrimiento de nuevos fármacos (Vlieghe et al., 2010).

Sin embargo, el uso de los péptidos como agentes terapéuticos está limitado por la baja biodisponibilidad de los mismos debido a las barreras potenciales de la digestión gastrointestinal, pobre transportabilidad a través de las membranas y rápida eliminación del plasma (Segura – Campos et al., 2010).

Por lo tanto, para efectuar formulaciones de péptidos biodisponibles, se debe inhibir o modular la actividad proteolítica que degrada al péptido; reforzar su transporte transcelular; mejorar su penetración a través de la barrera mucosa; incrementar su vida media en la circulación; desarrollar péptidos análogos (miméticos) resistentes a proteasas que mantengan su actividad biológica, así como estabilizar a los mismos por conjugación a moléculas acarreadoras o por encapsulación (Mehta, 2004; López-Fandiño et al., 2006; Quiros et al., 2009).

Dentro de las estrategias químicas y/o enzimáticas generadas para mejorar la resistencia de los péptidos a las barreras potenciales de la digestión y absorción gastrointestinal, aumentar la efectividad y la disponibilidad, se incluyen: - la adición de elementos estructurales no peptídicos que pueden copiar o antagonizar las acciones biológicas de los péptidos naturales (péptido miméticos) (Pichereau and Allary, 2005); - las modificaciones estructurales, tales como: la adición de moléculas de polietilenglicol (pegilación), de ácidos grasos, isoprenoides y colesterol (lipidación) así como de carbohidratos (glicosilación) (Biron et al., 2008); - las modificaciones químicas, como la formación de enlaces disulfuro entre residuos de cisteína (ciclización), la sustitución aminoacídica y la N-metilación (Genosphere Biotechnologies, 2012).

A nivel nacional, no se producen péptidos bioactivos a escala industrial y solo

se reportaron 3 patentes de péptidos de interés farmacéutico (Dabur Research Foundation, 2003; Pharmacia Ab, 2007; Glaxo Group Limited, 2003).

A nivel mundial, existe también un creciente interés en el desarrollo de *alimentos funcionales* (además de su valor nutritivo, mejoran una función del organismo o reducen el riesgo de sufrir una enfermedad) y *nutracéuticos* (aportan un beneficio para la salud de carácter médico, incluyendo la prevención de enfermedades).

La nutrición apunta cada vez más a ser una ciencia que contribuya en la prevención de enfermedades. Es decir, no se pretende que los péptidos tengan un rol terapéutico, sino el de evitar o prevenir la enfermedad.

En este sentido, los péptidos con potenciales actividades antihipertensivas incorporados a alimentos no tendrán un rol terapéutico sino que podrían contribuir a mantener la salud de la población, evitando la hipertensión que es uno de los problemas de salud pública más importante del mundo (Maolin, 2018). Sin embargo, no existen alimentos funcionales aprobados en nuestro continente para su comercialización que contengan péptidos antihipertensivos.

Como único antecedente, el Ministerio de Salud y Bienestar de Japón adoptó un sistema de licencias FOSHU (Foods for Specific Health Use) para la incorporación de ciertos ingredientes activos de alimentos, tales como los péptidos antihipertensivos: Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro, y Val-Tyr (Matsufuji y col., 1995; Nakamura y col., 2005).

En consecuencia, las proyecciones de las investigaciones futuras están centradas en la aplicación de los péptidos con actividad antihipertensiva sintetizados en este trabajo de Tesis, para la formulación de alimentos funcionales.

Para ello, se proyecta estudiar la actividad antihipertensiva de los péptidos sintetizados en modelos *in vivo* y seleccionar matrices alimentarias que permitirán estudiar la solubilidad y estabilidad de dichos péptidos, antes y después de la digestión; su metabolismo, mecanismos de absorción y distribución, y citotoxicidad.

Sin embargo, no puede soslayarse la importancia de determinar previamente la inocuidad de un nuevo ingrediente/aditivo a ser incorporado a un sistema alimentario modelo. Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, se considera que los

péptidos no son tóxicos pero no existen protocolos oficiales para su caracterización (Gil-Chavez et al., 2013).

Por analogía con otros aditivos alimentarios, y siguiendo las recomendaciones de JECFA (WHO-JECFA, 2018), sería esencial evaluar la relación dosis-respuesta y la frecuencia de administración sin observación de efectos adversos. Para ello, sería necesario determinar parámetros específicos en animales, órganos aislados de animales o cultivos celulares, tales como: dosis letal 50 (DL₅₀), dosis efectiva media (DE₅₀), índice terapéutico (IT), margen de seguridad (MS), ingesta diaria admitida (IDA), entre otros. De esta forma se podría inferir el grado de toxicidad / inocuidad del péptido en estudio.

Los estudios de los peptídicos sintéticos en seres humanos, denominada fase clínica, requerirán de la autorización de organismos nacionales o internacionales (ANMAT, FDA, EMA). En el caso de los fármacos, los mismos se realizan siguiendo protocolos específicos como las Normas de Buenas Prácticas Clínicas (GCP); delineadas a escala internacional por la Conferencia Internacional de Armonización (ICH), la cual está conformada por el Comité de Medicamentos de Uso Humano de la Agencia Europea de Medicamentos (CHMP-EMA), los organismos de regulación y farmacovigilancia de Estados Unidos de Norteamérica (FDA) y Japón (MHW), y la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Finalmente, los péptidos de mayor interés deberán ser producidos en mayor escala para su aplicación a sistemas reales de interés alimenticio y farmacéutico. Para ello, será necesario establecer la viabilidad tecnológica y económica del proceso, al mismo tiempo que se satisfacen los requisitos de las agencias reguladoras en términos de estándares de calidad del producto y validación del proceso.

En ese sentido, asclepaína (del látex de tallos y pecíolos de *Asclepias curassavica* L.) tanto en forma soluble como inmovilizada en un soporte heterofuncional formado por octil-glioxil-sílica resultó ser un catalizador atractivo por su alta selectividad frente a los sustratos sintéticos, reproducibilidad en términos de los productos obtenidos, y por su excelente performance en las reacciones de síntesis peptídicas en medios acuoso- orgánicos de este trabajo de tesis. En

consecuencia, serían las configuraciones a elegir para futuros estudios de escalamiento en reactores enzimáticos.

CAPITULO 6
BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, T.; Joseph, J.; Bindhu, L. and K. Jayakumar (2004) Crosslinked enzyme crystals of glucoamylase as a potent catalyst for biotransformation. *Carbohydrate Research*, 339 (6): 1099-1104.
- Adamczak, M. and S. Hari-Krishna (2004) Strategies for improving enzymes for efficient biocatalysis. *Food Technology and Biotechnology*, 42 (4): 251-264.
- Agyei, D. and B.K.L. Shanbhag (2015) Enzyme engineering (immobilization) for food applications. In: Improving and tailoring enzymes for food quality and functionality (R. Yada, ed.), pp. 213-235. 1st Edition. Elsevier, 266 pages. ISBN: 978-1-7824-2297-8. Amsterdam, The Netherlands.
- Albericio, F., (2004) Developments in peptide and amide synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8: 211-221.
- Alvarenga, A.E.; Amoroso, M.J.; Illanes, A. and G.R. Castro (2014) Cross-linked α -l-rhamnosidase aggregates with potential application in food industry. *European Food Research and technology*, 238 (5): 797-801.
- Amorim Fernandes, J.F.; Mcalpine, M. and P.J. Halling (2005) Operational stability of subtilisin CLECs in organic solvents in repeated batch and in continuous operation. *Biochemical Engineering Journal*, 24 (1): 11-15.
- Andersson, L.; Blomberg, L.; Flegel, M.; Lepsa, L.; Nilsson, B. and M. Verlander (2000) Large-scale synthesis of peptides. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 55 (3): 227-250.
- Arnold, F.H. (2001) Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature*, 409 (6817): 253-257.
- Arroyo, M (1998) Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. *Ars Pharmaceutica*, 39 (2): 23-39.
- Aso, K (1989) Enzymatic approach to the synthesis of a lysine containing sweet peptide, N-acetyl-L-phenylalanyl-L-lysine. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53: 729-733.
- Azevedo, A.M.; Prazeres, D.M.; Cabral, J.M. and L.P.J. Fonseca (2001) Stability of free and immobilised peroxidase in aqueous-organic solvents mixtures. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 15 (4-6): 147-153.

- Badgujar, S.B.; Patel, V.V.; Bandivdekar, A.H. and R.T. Mahajan (2014) Traditional uses phytochemistry and pharmacology of *Ficus carica*. A Review. *Pharmaceutical Biology*, 52 (11): 1487-1503.
- Bahamondes, C., Wilson, L., Bernal, C. y A. Illanes (2015) Synthesis of the kyotorphin precursor benzoyl-L-tyrosine-L-argininamide with immobilized α -chymotrypsin in sequential batch with enzyme reactivation. *Biotechnology Progress*, 32(1): 54-59.
- 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 brachystephana* (Asclepiadaceae). *Journal of 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 pages. ISBN: 978-1-4020-8360-0. Berlin, Heidelberg, NY.
- Barberis, S.; Quiroga, E.; Barcia, C. and C. Liggieri (2013) Effect of laundry detergent formulation on the performance of alkaline phytoproteases. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16 (3). DOI: 10.2225/vol16-issue3-fulltext-1.
- Barberis, S; Origone, A; Adaro, M. and Grisel Bersi (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.). 5: 147 – 174 pp. Academic Press and Elsevier Inc. London, United Kingdom. ISBN: 8186623957.
- Barbosa, O.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, Á.; Torres, R.; Rodrigues, R.C. and R., Fernandez-Lafuente (2015) Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts (Review). *Biotechnology Advances*, 33 (5): 435-456.

- 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 y Medicine* (F.E. Dumont and J.A. Sacco, eds). Chapter 13, pp. 293 - 316. Nova Publisher. ISBN: 978-1-60741-257-1. USA.
- Barcia, C.; Cerutti, S.; Martínez, D. y S. Barberis (2016) *Acacia caven* pollen from South America. An useful bio-indicator of environmental pollution. A healthy food supplement?. *International Journal of Environmental Engineering*, 3 (1): 119 – 122. Seek Digital Library. IRED Headquarters, NY, USA (ISSN: 2374 – 1724).
- Barcia, C.; Coelho, A. S.; Veríssimo, P. y S. Barberis (2018) Acaciain peptidase: the first South American pollen peptidase potentially involved in respiratory allergy. *Immunology*. Enviado a publicar.
- Barros, R.J.; Wehtje, E. and P. Adlercreutz (2000) Mass transfer studies on immobilized α -chymotrypsin biocatalysts prepared by deposition for use in organic medium. *Biotechnology and Bioengineering*, 59 (3): 364-373.
- 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.; Urrutia, P.; Illanes, A. and L. Wilson (2013) Hierarchical meso-macroporous silica grafted with glyoxyl groups: Opportunities for covalent immobilization of enzymes. *New Biotechnology*, 5 (30): 500-506.
- Bernal, C.; Illanes, A. and L. Wilson (2014) Heterofunctional hydrophilic-hydrophobic porous silica as support for multipoint covalent immobilization of lipases: Application to lactulose palmitate synthesis. *Langmuir*, 12(30): 3557-3566.
- Bernal, C.; Poveda-Jaramillo, J.C. and M.Mesa (2018) Raising the enzymatic performance of lipase and protease in the synthesis of sugar fatty acid esters, by combined ionic exchange -hydrophobic immobilization process on aminopropyl silica support. *Chemical Engineering Journal*, 334: 760-767.

- Bernal, C.; Rodriguez, K. and R. Martínez (2018) Integrating enzyme immobilization and protein engineering: An alternative path for the development of novel and improved industrial biocatalysts. *Biotechnology Advances*, 36 (5): 1470-1480.
- 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.
- BIOPEP Database (2012) http://www.uwm.edu.pl/biochemia/biopep/Peptide_data
- Biron, E.; Chatterjee, J.; Ovadia, O.; Langenegger, D. and J. Brueggen (2008) Improving oral bioavailability of peptides by multiple N-methylation: somastatin analogues. *Angewandte Chemie*, 47: 2595-2599.
- Bordusa, F. (2002) Proteases in organic synthesis. *Chemical Reviews*, 102: 4817–4867.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Calvet, S.; Torres, J.L. y P. Clapés (2009) Enzymatic Peptide Synthesis in Organic Media. Synthesis of CCK-8 Dipeptide Fragments. *Biocatalysis and Biotransformation*, 13 (4): 201-216.
- Cao, L., van Rantwijk, F. and Sheldon, R.A. (2000) Cross-linked enzyme aggregates: a simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Organic Letters*. 2 (10) 1361-1364.
- Cao, L.; van Langen, L. and S. Roger (2003) Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier Free. *Current Opinion in Biotechnology*, 14 (4): 387-394.
- Cao, L. and R.D. Schmid (2005) Carrier-bound immobilized enzymes, principles, applications and design. Wiley-VCH, 578 pages. ISBN: 978-3-527-31232-0. Weinheim, Germany.
- Capriotti, A.L.; Cavaliere, C.; Piovesana, S.; Samperi, R. and A. Laganà (2016) Recent trends in the analysis of bioactive peptides in milk and dairy products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408 (11): 2677-2685.

- Carmona, A.K.; Schwager, S.L.; Juliano, M.A.; Juliano, L. and E.D. Sturrock (2006) A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay. *Nature Protocols*, 1: 1971–1976.
- Carmona, A.K.; Juliano, M.A. y L. Juliano (2009) The use of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) peptides for measurement of clinically important proteolytic enzymes. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 81 (3): 381-392.
- Carrea, G.; Colonna, S.; Kelly, D.; Lazcano, A.; Ottolina, G. and M. Roberts (2005) Polyamino acids as synthetic enzymes: mechanism, applications and relevance to prebiotic catalysis. *Trends in Biotechnology*, 23 (10): 507-513.
- Castro, G.R. (2000) Properties of soluble α -chymotrypsin in neat glycerol and water. *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 143-150.
- Castro, M.J.M. and J.M.S. Cabral (1989) Kinetic studies of hydrogenase in AOT reversed micelles. *Enzyme and Microbial Technology*, 11 (1): 6-11.
- Castro, G.R. and T. Knubovets (2003) Homogeneous biocatalysis in organic solvents and water organic mixtures. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23 (3):195-231.
- Chellapan, S.; Jasmin, C.; Basheer, S.; Elyas, K.K.; BHAT, S.G and M. Chandrasekaran (2006) Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS 10 under solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 41 (4): 956-961.
- Chen, Y.; Zhang, X.; Zheng, K.; Chen, S.; Wang, Q. and X. Wu (1998) Protease-catalyzed synthesis of precursor dipeptides of RGD with reverse micelles. *Enzyme and Microbial Technology*, 23 (3): 243-248.
- Chen, J.; Wang, Y.; Zhong, Q.; Wu, Y. and W. Xia (2012) Purification y characterization of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysate of grass carp protein. *Peptides*, 33 (1): 52-58.
- 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.

- Clapés, P.; Adlercreutz, P. and M. Bo (1990) Enzymatic peptide synthesis in organic media: a comparative study of water-miscible and water-immiscible solvent systems. *Journal of Biotechnology*, 15 (4): 323-338.
- Clapés, P. (1997) Enzymatic condensation of cholecystokinin CCK-8 (4-6) and CCK-8 (7-8) peptide fragments in organic media. *Biotechnology and Bioengineering*, 56: 456-463.
- Clapés, P.; Espelt, L.; Navarro, M.A. and S. Conxita (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 (8): 1394-1399.
- Conn, P.M., Leañós-Miranda, A. y J.A. Janovick (2002) Protein origami: therapeutic rescue of misfolded gene products. *Molecular Interventions*, 2 (5): 308-316.
- Copeland, R.A. (2000) *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. pp: 1-391, ISBN: 0-471-35929-7. Wiley-VCH, New York.
- 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.
- Coscieta, E.R.; Amorim, M.M.; Voss, G.B.; Nerli, B.B.; Picó, G.A. and M.E. Pintado (2016) Bioactive properties of peptides obtained from Argentinian defatted soy flour protein by corolase PP hydrolysis. *Food Chemistry*, 198: 36-44.
- Cunningham, C. and A. Porter (1997) *Recombinant proteins from plants – production and isolation of clinically useful compounds*. Humana Press, 308 pages. ISBN: 0-89- 603390-2. Totowa, N.J.
- Dabur Research Foundation, 2003. Patente Argentina. Péptidos para el tratamiento del cáncer. [http://www.patentesonline.cl/peptidos-para-el-tratamiento-del-cancer-15002 ar.html](http://www.patentesonline.cl/peptidos-para-el-tratamiento-del-cancer-15002-ar.html).
- Dalal, S.; Kapoor, M. and M.N. Gupta (2007) Preparation and characterization of combi-CLEAs catalyzing multiple non-cascade reactions. *Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic*, 44: 128-132.
- Dalby, P.A. (2011) Strategy and success for the directed evolution of enzymes. *Current Opinion Structural Biology*, 21: 1-8.

- De Castro, R.E.; Ruíz, D.M.; Giménez, M.I.; Silveyra, M.X.; Paggi, R.A. and J.A. Maupin-Furlow (2008) Gene cloning and heterologous synthesis of a haloalkaliphilic extracellular protease of *Natrialba magadii* (Nep). *Extremophiles*, 12: 677-677.
- Dimitri MJ (1972) 'Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Vol. I.' (Argentine Encyclopedia of Agriculture and Gardening; in Spanish) (Acme: Buenos Aires)
- 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. and W.S. Caughey (1994) Infrared methods for study of hemoglobin reactions and structures. *Methods Enzymology*, 232: 139–175.
- Eikelboom, J.W. and Hirsh, J. (2006) Monitoring unfractionated heparin with the APTT: time for a fresh look. *Schattauer GmbH*. 96: 547-52.
- Escobar, M.L.; Rivera, A. and G.F.A, Aristizabal (2010) Comparison of resazurin and MTT methods on studies of cytotoxicity in human tumor cell lines. *Vitae*, 17:67–74.
- Fersht, A. (1999) Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding. Edn.W.H.Freeman, New York.
- Fité, M.; Clapés, P.; López-Santín, J.; Benaiges, M.D. y G. Caminal (2002) Integrated Process for the Enzymatic Synthesis of the Octapeptide PhAcCCK-8. *Biotechnology Progress*, 18: 1214–1220.
- 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.
- 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.
- Genosphere Biotechnologies. Custom-Peptides-Modifications (2012) [http:// www.genosphere-biotech.com/](http://www.genosphere-biotech.com/).

- Gil-Chávez, G.J.; Villa, J.A.; Ayala-Zavala, F.; Heredia, J.B.; Sepulveda, D.; Yahia, E.M. and G.A. González-Aguilar (2013) Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, 5–23.
- Gill, I. and E.N. Vulfson (1994) Enzymatic catalysis in heterogeneous eutectic mixtures of substrates. *Trends in Biotechnology*, 12 (4): 118-122.
- 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.
- Glaxo Group Limited (2003) Patente Argentina. Péptidos compuestos que se ligan al receptor de trombopoietina.
- Global Trends & Forecasts (2016) Chemical Industry Market. <https://www.ihs.com/industry/chemical.html>
- Gómez-Puyou, M.T. and A. Gómez-Puyou (1998) Enzymes in low water systems. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 33 (1): 53-89.
- Goodman, M. (2002) Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry. Volume E22a. Synthesis of peptides and peptidomimetics. Georg Thieme Verlag Stuttgart. 903 pages. ISBN 1-58890-022-3. New York.
- 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.
- Grünberg, R.; Domgall, I.; Günther, R.; Rall, K.; Hofmann, H. and F. Bordusa (2000) Peptide bond formation mediated by substrate mimetics: Structure-guided optimization of trypsin for synthesis. *European Journal of Biochemistry*, 267 (24): 7024-7030.
- Guzmán, F.; Barberis, S. and A. Illanes (2007) Peptide synthesis: Chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10 (2): 279-314.
- 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 (3): 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.
- Hari-Krishna, S. (2002) Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. *Biotechnology Advances*, 20 (3-4): 239-267.
- 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.; Contreras, M. and I. Recio (2011) Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. Review Article. *Advances in Colloid y Interface Science*, 165 (1): 23-35.
- Herrmann, G.; Schwarz, A.; Wandrey, C.; Kula, M.R.; Knaup, G.; Drauz, K.H. and H. Berndt (1991) Scale up of enzymatic peptide synthesis in an enzyme membrane reactor. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 13: 346-353.
- Hudson, E.P.; Eppler, R.K. and D.S. Clark (2005) Biocatalysis in semi-aqueous and nearly anhydrous conditions. *Current Opinion in Biotechnology*, 16 (6): 637-643.
- 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 (4-6): 587-595.
- Illanes, A. and L. Wilson (2003) Enzyme reactor design under thermal inactivation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23(1): 61-93.
- Illanes, A. and S.E. Barberis (1994) Catálisis enzimática en fase orgánica. En: *Biotecnología de Enzimas* (A. Illanes ed.). Monografía 35. Serie Biología. pág. 225-254. Ediciones Universitarias de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
- Illanes, A (2008) *Enzyme Biocatalysis. Principles and Applications*. Springer, 392 ISBN: 1402083602.
- 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., Guzmán, F. and S. Barberis (2009b) Aplicaciones emergentes en reacciones de síntesis. En: *Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores. Aplicaciones Industriales* (N. Caffini ed.), pp 201 - 219. Capítulo 17. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). ISBN: 1023 – 8645. Buenos Aires, Argentina.
- Illanes, A.; González, J.M.; Gómez, J.M.; Valencia, P. y L. Wilson (2010) Diffusional restrictions in glyoxyl-agarose immobilized penicillin G acylase of different particle size and protein loading, *Electronic Journal of Biotechnology*, 13: 1–9.
- Illanes, A., Cauerhff, A., Wilson, L. and G.R. Castro (2012) Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresource Technology*, 115: 48–57.
- Islan, G.A.; Martines, Y.N.; Illanes, A. and G.R. Castro (2014) Development of novel alginate lyase cross-linked aggregates for the oral treatment of cystic fibrosis. *RSC Advances*, 23 (4): 11758-11765.
- Jakubke, H.; Kuhl, P. and A. Konnecke (1985) Basic principles of protease-catalized peptide bond formation. *Angewandte Chemie – International Edition in English*, 24 (2): 85-93.
- Jia, J.; Ma, H.; Zhao, W.; Wang, Z.; Tian, W.; Luo, L. and R. He (2010) The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chemistry*, 119 (1): 336-342.
- Kasche, V. (1996) Proteases in peptide synthesis. In: *Proteolytic enzymes – a practical approach* (Beynon, R.J. and J.S. Nond eds.), pp-125-143. 2nd Edition. IRL Press, 320 pages. ISBN-10 0-19-963662-1. Oxford, UK.
- 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.

- Kimmerlin, T. and D. Seebach (2005) 100 years of peptide synthesis: ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to β -peptide assemblies. *Journal of Peptide Research*, 65 (2): 229-260.
- Kimura, Y.; Nakanishi, K. and R. Matsuno (1990a) Enzymatic synthesis of the precursor of Leu-enkephalin in water-immiscible organic solvent systems. *Enzyme and Microbial Technology*, 12: 272-280.
- Kimura, Y., Muraya, K., Araki, Y., Matsuoka, H., Nakanishi, K. and R. Matsuno (1990b) Synthesis of peptides consisting of essential amino acids by a reactor system using three proteinases and an organic solvent. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54: 3331-3333.
- Kimura, Y.; Muraya, K.; Araki, Y.; Matsuoka, H.; Nakanishi, K. and R. Matsuno (1990c) 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. (1986) Enzymes that work in organic solvents. *Chemical Technology*, 16 (6): 354-359.
- Klibanov, A. M. (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, 409 (6817): 241-246.
- Koyama, M.; Hattori, S.; Amano, Y.; Watanabe, M. and K. Nakamura (2014) Blood pressure-lowering peptides from neo-fermented buckwheat sprouts: A new approach to estimating ACE-inhibitory activity. *PLoS ONE*, 9 (9): e105802. doi: 10.1371/journal.pone.0105802.
- Krieger E, Koraimann G, Vriend G (2002) Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA - a self-parameterizing force field. *Proteins*, 47: 393-402.
- 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.
- Kullman, W. (1979) Enzymatic synthesis of Leu- and Met-enkephalin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 91: 693-698.

- Kullman, W. (1982) Protease-catalyzed peptide bond formation: application to synthesis of the cooh-terminal octapeptide fragment of cholecystokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79: 2840-2844.
- Kumar, D. and T.C. Bhalla (2005) Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68 (6): 726-736.
- Kumar, A. and P. Venkatesu (2012) Overview of the stability of α chymotrypsin in different solvent media. *Chemical Reviews*, 112:4283–307.
- Kusano, M.; Yasukawa, K. and K. Inouye (2010) Synthesis of N-carbobenzoxy-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester catalyzed by thermolysin variants with improved activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 46 (3–4): 320-325.
- 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.
- Liggieri, C.; Arribére, M.C.; Trejo, S.A.; Canals, F.; Avilés, F. and N. Priolo (2004) Purification y biochemical characterization of asclepain cI from the latex *Asclepias curassavica* L. *Protein Journal*, 23 (6): 403-411.
- Llerena-Suster C.R., José, C.; Collins, S.E., Briand, L.E. and Morcelle S.R. (2012) Investigation of the structure and proteolytic activity of papain in aqueous miscible organic media. *Process Biochemistry*, 47: 47-56.
- Lombard, C.; Saulnier, J. and J. Wallach (2005) Recent trends in protease-catalyzed peptide synthesis. *Protein and Peptide Letters*, 12 (7): 621-629.
- López-Fandiño, R.; Otte, J. and J. van Camp (2006) Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal: Technological and Health Aspects of Bioactive Components of Milk*, 16 (11): 1277-1293.
- López-Gallego, F. and C. Schmidt-Dannert (2010) Multi-enzymatic synthesis. Review Article. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14 (2): 174-183.
- Lou, W.; Zong, M. and H. Wu (2004) Enhanced activity, enantioselectivity and stability of papain in asymmetric hydrolysis of D, L-p-hydroxyphenylglycine

- methyl ester with ionic liquid. *Biocatalysis and Biotransformation*, 22 (3): 171-176.
- Machado, M.F. and J.M. Saraiva (2005) Thermal stability and activity regain of horseradish peroxidase in aqueous mixtures of imidazolium-based ionic liquids. *Biotechnology Letters*, 27 (16): 1233-1239.
- Maolin, T.; Cong, W.; Cheng, C.; Ruyi, Z.; Hanxiong, L.; Weihong, L.; Lianzhou, J. and D. Ming (2018) Identification of a novel ACE-inhibitory peptide from casein and evaluation of the inhibitory mechanisms. *Food Chemistry*, (256): 98-104.
- Marahiel, M. (2009) Working outside the protein-synthesis rules: insights into non-ribosomal peptide synthesis. *Journal of Peptide Science*, 15: 799-807.
- Mateo, C.; Abian, O.; Fernández-Lafuente, R.; Guisan, J. M. (2000) *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 509-515.
- Mateo, C.; Abian, O.; Fernández-Lorente, G.; Pedroche, J.; Fernández-Lafuente, R.; Guisan, J. M.; Tam, A.; Daminati, M. (2002) Epoxy sepabeads: a novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnology Progress*, 18 (3): 629-634.
- Mateo, C.; Palomo, J.M.; Fuentes, M.; Betancor, L.; Grazu, V.; López-Gallego, F.; Pessela, B.C.C.; Hidalgo, A.; Fernández-Lorente, G.; Fernández-Lafuente, R. y J.M. Guisán (2006) Glyoxylagarose: a fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 274-280.
- Mateo, C.; Bolivar, J.M.; Godoy, C.A.; Rocha-Martin, B.C.; Pessela, J.A.; Curiel, R.; Muñoz, J.M.; Guisan, J.M y G. Fernández-Lorente (2010) Improvement of enzyme properties with a two-step immobilization process on novel heterofunctional supports. *Biomacromolecules*, 11: 3112-3117.
- Mattson, M.P. (2008) Dietary factors, hormesis and health. *Ageing Research Reviews*, 7 (1): 43-48.
- Matijosyte, I.; Arends, I.; Vries, S. y R.A. Sheldon (2010) Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62: 142-148.

- Matsufuji, H.; Matsui, T.; Ohshige, S.; Kawasaki, T.; Osajima, K. and Y. Osajima (1995) Antihypertensive effects of angiotensin fragments in SHR. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59 (8): 1398-1401.
- Maugeri, Z.; Leitner, W and P. Domínguez de María (2013) Chymotrypsin-catalyzed peptide synthesis in deep eutectic solvents. *European Journal of Organic Chemistry*, 4223–4228.
- Maytorena-Verdugo, C. y F. García-Carreño (2012) Uso de Enzimas en Solventes Orgánicos en la Industria de Bioprocesos, *BioTecnología*, 16 (1): 21-35.
- Mehta, N.M. (2004) Oral delivery and recombinant production of peptide hormones. Part I: Making oral delivery possible. *BioPharm International*, 17: 38-46.
- Mengfan, W.; Chenxi, J.; Wei, Q.; Qingxin, Y.; Xin, P.; Rongxin, S. y H. Zhimin (2011) Porous-CLEAs of papain: Application to enzymatic hydrolysis of macromolecules. *Bioresource Technology*, 102: 3541-3545.
- Merrifield, B. (1963) Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 85 (14): 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.
- 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.
- Monter, B., Herzog, B., Stehle, P., P. Fürst (1991) Kinetically controlled synthesis of dipeptides using ficin as biocatalyst. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 14: 183-191.
- 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. (2004) Síntesis de péptidos en medios orgánicos mediante el uso de nuevas fitoproteasas. Tesis Doctoral de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

- Morcelle del Valle, S.; Barberis, S.; Priolo, N.; Caffini, N. and P. Clapés (2006) Comparative behaviour of proteinases from the latex of *Carica papaya* y *Funastrum 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.). Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Capítulo 22. pp 317-331. ISBN: 1023 – 8645. Bs. As. Argentina.
- Murakami, Y; Yoshida, T; Hayashi, S. and A. Hirata (2000) Continuous enzymatic production of peptide precursor in aqueous/organic biphasic medium. *Biotechnology and Bioengineering*, 69 (1): 57-65.
- Muro Urista, C.; Álvarez Fernández, R.; Riera Rodríguez, F.; Arana Cuenca, A. and A. Téllez Jurado (2011) Review: Production and functionality of active peptides from milk. *Food Science and Technology International*, 17: 293-317.
- Murphy, A. and C. O’Fagain (1997) Corrigendum dipeptide synthesis using acetylated trypsin derivative. *Biotechnology Techniques*, 11 (9): 707.
- Nakamura, Y.; Yamamoto, N.; Sakai, K and T. Toshiaki (2005) Antihypertensive Effect of Sour Milk and Peptides Isolated from It That are Inhibitors to Angiotensin I-Converting Enzyme. *Journal of Dairy Science*, 78 (6): 1253-1257.
- Nakanishi, K., Takeuchi, A., Matsuno, R (1990) Long-term continuous synthesis of aspartame precursor in a column reactor with an immobilized thermolysin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32: 633-636.
- Narai-Kanayama, A. and K. Aso (2009) Angiotensin I-converting enzyme inhibitory oligo-tyrosine peptides synthesized by α -chymotrypsin. *Enzyme and Microbial Technology*, 44 (4): 235-241.
- Narai-Kanayama, A.; Shikata, Y.; Hosono, M. and K. Aso (2010) High level production of bioactive di- and tri-tyrosine peptides by protease-catalyzed reactions. *Journal of Biotechnology*, 150 (3): 343-347.

- Noritomi, H.; Suzuki, K.; Kikuta, M. and S. Kato (2009a) Catalytic activity of α -chymotrypsin in enzymatic peptide synthesis in ionic liquids. *Biochemical Engineering Journal*, 47 (1–3): 27-30.
- Noritomi, H.; Suzuki, K.; Kikuta, M. and S. Kato (2009b) Enzymatic synthesis of peptides in ionic liquids. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108 (1): S107.
- Nongonierma, A.B. and R.J. FitzGerald (2015) Bioactive proprieties of milk proteins in human: A Review. *Peptides*, 73: 20-34.
- Noya, O.; Patarroyo, M.E.; Guzmán, F. and B. Alarcón de Noya (2003) Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. *Current Protein and Peptide Science*, 4 (4): 299-308.
- 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.
- Ondetti, M.A. and D.W. Cushman (1982) Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annual Review of Biochemistry*, 51: 283-308.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2016) Supplementary guidelines on Good Manufacturing Practices for heating, ventilation and air-conditioning systems for non sterile pharmaceutical dosage forms. Working document QAS/15.639. http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/HVAC_QAS15-639_31082015.pdf.
- Origone, A.; Sturniolo, H.; Liggieri, C.; Cecatti, F.; Ardanáz, C. and S. Barberis (2015) Enzymatic synthesis of an antithrombotic peptide of interest as nutraceutic. 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 y S. Barberis (2018) Enzymatic and chemical synthesis of new anticoagulant peptides. *Biotechnology Progress*, 34 (5): 1093-1101.
- Oyama, K., Irino, S. and N. Hagi (1987) Production of aspartame by immobilized thermoase. *Methods in Enzymology*, 136: 503-516.

- Park, S. and R.J. Kazlauskas (2003) Biocatalysis in ionic liquids - advantages beyond green technology. *Current Opinion in Biotechnology*, 14 (4): 432-437.
- Perlikowska, R.; do-Rego, J.C.; Cravezic, A.; Fichna, J.; Wyrebska, A.; Toth, G. and A. Janecka (2010) Synthesis y biological evaluation of cyclic endomorphin-2 analogs. *Peptides*, 31 (2): 339-345.
- Pharmacia Ab (2007) Patente Argentina. Producción de péptidos. <http://www.patentes-online.com.ar/produccion-de-peptidos-50999>.
- Pichereau, C. and C. Allary (2005) Therapeutic peptides under the spotlight. *European Biopharmaceutical Review*, 5: 1-4.
- Pinto, P.; Costa, S.; Costa, A.; Passos, M.; Lima, J.; Lúcia, M. and M. Saraiva (2012) Trypsin activity in imidazolium based ionic liquids: evaluation of free and immobilized enzyme. *Journal of Molecular Liquids*, 171: 16-22.
- 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): e97-e105.
- 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 y 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.
- Quiroga, E. (2005) Aplicación de fitoproteasas a la síntesis enzimática de péptidos de interés para la industria química y de los alimentos. Tesis Doctoral en Bioquímica. Universidad Nacional de San Luis, San Luis, Argentina.
- Quiroga, E.; Priolo, N.; Marchese, J. and S. Barberis (2005) Stability of araujiain, a novel plant protease, on different organic systems. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 24: 204-208.

- Quiroga, E.; Priolo, N.; Marchese, J. and S. Barberis (2006) Behaviour of araujiain, a 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 solvent effect on the secondary structure of araujiain hI, in different media. *Biochemical Engineering Journal*, 35: 202-1985.
- 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. *Biochemical 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.
- Quirós, A.; Contreras, M.; Ramos, M.; Amigo, L. and I. Recio (2009) Stability to gastrointestinal enzymes and structure–activity relationship of β -casein-peptides with antihypertensive properties. *Peptides*, 30 (10): 1848-1853.
- 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.
- Rezaei, K.; Temelli, F. and E. Jenab (2007) Effects of pressure and temperature on enzymatic reactions in supercritical fluids. Review Article. *Biotechnology Advances*, 25 (3): 272-280.
- Rodakiewicz-Nowak, J.; Kasture, S.M.; Dudek, B. and J. Haber (2000) Effect of various water miscibles solvents on enzymatic activity of fungal laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11 (1): 1-11.
- Roessl, U.; Nahalka, J. and B. Nidetzky (2010) Carrier-free immobilized enzymes for biocatalysis. *Biotechnology Letters*, 32: 341-350.
- Romero, M.D.; Calvo, L.; Alba, C.; Daneshfar, A. and H.S. Ghaziaskar (2004) Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipasein n-hexane. *Enzyme and Microbial Technology*, 37: 42-48.
- Ryu, K. and J.S. Dordick (1992) How do organic solvents affect peroxidase structure and function? *Biochemistry*, 31 (9): 2588-2598.

- Sabbione, A.C.; Scilingo, A. and M.C. Añón (2015) Potential antithrombotic activity detected in amaranth proteins and its hydrolysates. *Journal of Food Science and Technology*, 60: 171-177.
- Saint-Sauveur, D.; Gauthier, S.; Boutin, Y. and A. Montoni (2008) Show preview immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions. *International Dairy Journal*, 18 (3): 260-270.
- Sakina, K.; Kawazura, K.; Morihara, K. and H. Yajima (1988) Enzymatic synthesis of cholecystokinin octapeptide. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 36 (10): 3915-3919.
- Salleh, A.B.; Basri, M.; Taib, M.; Jasmani, H.; Rahman, R., Rahman, M. and C. Razak (2002) Modified enzymes for reactions in organic solvents. *Applied Biochemistry and Bioengineering*, 103 (1-3): 349-358.
- Santibáñez, L.; Wilson, L. and A. Illanes (2014) Synthesis of ascorbyl palmitate with immobilized lipase from *Pseudomonas stutzeri*. *American Oil Chemists Society*, 91 (3): 405-410.
- 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. y A. Berger (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 27: 157–162.
- Serdakowski, A.L. and Dordick J.S. (2008) Enzyme activation for organic solvents made easy. *Trends in Biotechnology*, 26, 48-54.
- Segura - Campos, M.; Chel - Guerrero, L. and D. Betancur - Ancona (2010) Effect of digestion on bioavailability of peptides with biological activity. *Revista Chilena de Nutrición*, 37 (3): 386-391.
- Serralheiro, M.L.M.; Prazeres, D.M.F. and J.M.S. Cabral (1994) Dipeptide synthesis and separation in a reversed micellar membrane reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 16 (12): 1064-1073.
- Shamloo, M.; Eck, P. and B. Trust (2015) Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Cereals. *Journal of Human Nutrition & Food Science*, 3(1): 1057-1067.

- Sheldon, R.A.; Sorgedraeger, M. and M.H.A. Janssen (2007) Use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) for performing biotransformations. *Chemistry Today*, 25: 62-67.
- Sheldon, R. (2011) Cross-linked enzyme aggregates as industrial biocatalysts. *Organic Process Research & Development*, 15: 213-223.
- Sheldon, R.A. and S. van Pelt (2013) Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42: 6223-6235.
- Singh, R.K.; Tiwari, M.K.; Singh, R. and J.K. Lee (2013) From protein engineering to immobilization: Promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. *International Journal of Molecular Science*, 14: 1232-1277.
- Singh, B.P., Vij, S. and S. Hati (2014) Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, 54, 171-179.
- Sitia, R. and I. Braakman (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature*, 426 (6968): 891-894.
- Soto, C. (2003) Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 4 (1): 49-60.
- Stepankova, V.; Bidmanova, S.; Koudelakova, T.; Prokop, Z.; Chaloupkova, R. and J. Damborsky (2013) Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents. *ACS Catalysis*, 3: 2823-2836.
- Takai, H., Sakato, K., Nakamizo, N. and Y. Isowa (1981) Enzymatic synthesis of caerulein peptide. In: K. Oyama and S. Niiimura. *Peptide Chemistry* (eds.) Protein Research Foundation, Osaka, 213-214.
- 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.
- Tanaka, M.; Kajiwara, K.; Tokiwa, R.; Watanabe, K.; Ohno, H.; Tsutsumi, H.; Hata, Y.; Izumi, K.; Kodama, E.; Matsuoka, M.; Oishi, S. and N. Fujii (2009) Bioorganic synthesis of end-capped anti-HIV peptides by simultaneous cyanocysteine-mediated cleavages of recombinant proteins.
- Thiruvankatarajan, V.; Pruet, A. and S.D. Adhikary (2014) Coagulation testing in the perioperative period. *Indian Journal of Anaesthesia*, 58 (5): 565-572.

- Timasheff, S.N. (2002) Protein solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99: 9721-9726.
- Tomabechi, Y.; Suzuki, R.; Haneda, K. and T. Inazu (2010) Chemo-enzymatic synthesis of glycosylated insulin using a GlcNAc tag. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18 (3): 1259-1264.
- Torres, S. and G.R. Castro (2004) Nonaqueous 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.
- Tran, D.N. and K.J. Balkus (2011) Perspective of recent progress in immobilization of enzymes. *ACS Catalysis*, 1: 956-968.
- Trusek-Holownia, A. (2003) Synthesis of ZAlaPheOMe the precursor of bitter dipeptide in the two-phase ethyl acetate-water system catalysed by thermolysin. *Journal of Biotechnology*, 102 (2): 153-163.
- Udenigwe, C.C. (2014) Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. *Trends in Food Science and Technology*, 36: 137-143.
- Urrutia, P.; Mateo, C.; Guisan, J.M.; Wilson, L. and A. Illanes (2013) Immobilization of *Bacillus circulans* β -galactosidase and its application in the synthesis of galacto-oligosaccharides under repeated-batch operation. *Biochemical Engineering Journal*, 77: 41 -48.
- Valencia, P.; Flores, S.; Wilson, L. y A. Illanes (2010) Effect of particle size distribution on the simulation of immobilized enzyme reactor performance. *Biochemical Engineering Journal*, 49: 256–263.
- 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 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 (4-6): 877-882.
- Vermeirssen, V.; Camp, J.V. and W. Verstraete (2004) Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92 (3): 357-366.
- Vieira, M.F.; Vieira A.M.S.; Zanina G.M.; Tardioli, P.W.; Mateo, C. y J.M. Guisán (2011) β -Glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distinct reactive groups. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, (69): 47-53.
- Villeneuve, P.; Muderhwa, J.M.; Graille, J. and M.J. Haas (2000) Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 9 (4-6):113-148.
- Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J. and M. Khrestchatisky (2010) Synthetic therapeutic peptides: science and market. Review. *Drug Discovery Today*, 15 (1-2): 40-56.
- Vossenbergh, P.; Beeftink, H.H.; Nuijens, T.; Quaedflieg, P.J.L.M.; Cohen Stuart, M.A. and J. Tramper (2012a) 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.; Beeftink, H.H.; Nuijens, T.; Cohen Stuart, M.A. and J. Tramper (2012b) Selecting optimal conditions for alcalase CLEA-OM for synthesis of dipeptides in organic media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 75: 43-49.
- Walsh, G. (2005) Therapeutic insulins and their large-scale manufacture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67 (2): 151-159.
- Wang, G.; , Chen, D.; Zhang, L.; Wang, Y.; , Zhao, C.; Yan, X.; He, B.; Ma, Y.; and Wantai, Y (2017) A mild route to entrap papain into cross-linked PEG microparticles via visible light-induced inverse emulsion polymerization. *Journal of Materials Science*, 53 (2): 880-891.

- Wanka, L.; Cabrele, C.; Vanejews, M. and P.R. Schreiner (2007) γ -Aminoadamantane carboxylic acids through direct C-H bond amidations. *European Journal of Organic Chemistry*, 9: 1474-1490.
- Wescott, C.R. and A.M. Klibanov (1994) The solvent dependence of enzyme specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1206 (1): 1-9.
- WHO | Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) (2018) Food safety, https://www.who.int/foodsafety/areas_work/chemical-risks/jecfa/en/
- Wilson, L.; Illanes, A.; Abián, O.; Pessela, B.C.C.; Fernández-Lafuente, R. and J.M. Guisán (2004a) Co-aggregation of penicillin G acylase and polyionic polymers: An easy methodology to prepare enzyme biocatalysts stable in organic media. *Biomacromolecules*, 5 (3): 852-857.
- Wilson, L.; Betancor, L.; Fernández-Lorente, G.; Fuentes, M.; Hidalgo, A.; Guisán, J.M. and R. Fernández-Lafuente (2004b) Cross-linked aggregates of multimeric enzymes: A simple and efficient methodology to stabilize their quaternary structure. *Biomacromolecules*, 5 (3): 814-817.
- Wilson, L.; Palomo, J.M.; Fernández-Lorente, G.; Illanes, A.; Guisán, J.M. and R. Fernández-Lafuente (2006a) Improvement of the functional properties of a thermostable lipase from *alcaligenes* sp. via strong adsorption on hydrophobic support. *Enzyme and Microbial Technology*, 38 (7): 975-980.
- Wilson, L.; Fernandez-Lorente, G.; Fernandez-Lafuente, R.; Illanes, A., Guisan, J.M. and J.M. Palomo (2006b) CLEAs of lipases and poly-ionic polymers: a simple way of preparing stable biocatalysts with improved properties. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 750-755.
- Wright, G.; Carver, A.; Cotton, D.; Reeves, D.; Scott, A.; Simons, P.; Wilmot, 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. y 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, L.; Dordick, J.S. y S. Garde (2004) Hydration of enzymes in nonaqueous media consistent with solvent dependence of its activity. Volume 29, Issue 7, July 2018, Pages 1009-1016. *Biophysical Journal*, (87):812-821.
- Yazawa, K. and K. Numata, (2014) Recent advances in chemoenzymatic peptide syntheses. Review. *Molecules*, 19: 13755-13774.
- Yoon J.H. and Mckenzie, D. (2005) A comparison of the activities of three beta-galactosidases in aqueous-organic solvent mixtures. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 439-446.
- Yoshida, H.; Yoshizawa, T.; Shibasaki, F.; Shoji, S. and I., Kanazawa (2002) Chemical chaperones reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Neurobiology of Disease*, 10 (2): 88-99.
- Yours, M. and N. Howell (2015) Antioxidant and ACE inhibitory bioactive peptides purified from egg yolk proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12): 29161-29178.
- Zaks, A. and A.M. Klivanov (1988) The effect of water on enzyme action in organic media. *Journal of Biological Chemistry*, 263 (17): 8017-8021.