

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Dpto. de QUÍMICA ORGÁNICA Y FARMACÉUTICA



***" α -QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA COMO
CATALIZADOR EN LA SÍNTESIS DE DIPÉPTIDOS"***

TESIS DOCTORAL

CARLOS TORRES FECED

Madrid, Enero de 1997

El **Dr. José Vicente Sinisterra Gago**, Catedrático de Química Orgánica y Farmacéutica y el **Dr. Andrés R. Alcántara León**, Profesor Titular de Química Orgánica y Farmacéutica del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

que la presente Memoria titulada:

" α -QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA COMO CATALIZADOR EN LA SÍNTESIS DE DIPÉPTIDOS"

que presenta D. Carlos Torres Feced para optar al grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizada bajo su dirección y reúne las condiciones necesarias para ser juzgada por el tribunal correspondiente, autorizando así su presentación.

Para que conste donde proceda firman el presente certificado en Madrid, 30 de Enero de 1997.

Fdo: Dr. José Vicente Sinisterra Gago

Fdo:Dr. Andrés R. Alcántara León



CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID
TEL.: 394 18 23
FAX: 394 18 22

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y FARMACÉUTICA

**D. JOSÉ VICENTE SINISTERRA GAGO, CATEDRÁTICO Y DIRECTOR DEL
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y FARMACÉUTICA DE LA FACUL-
TAD DE FARMACIA EN LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,**

CERTIFICA: que **D. CARLOS TORRES FECED** ha realizado en los laboratorios de este Departamento, bajo la dirección del Dr. José V. Sinisterra Gago y del Dr. Andrés R. Alcántara León, el presente trabajo de Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor en Farmacia, con el título:

***" α -QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA
COMO CATALIZADOR EN LA SÍNTESIS DE
DIPÉPTIDOS"***

Y para que conste donde proceda, a petición del interesado, firmo el presente en Madrid, a veintinueve de Enero de mil novecientos noventa y siete.



Memoria presentada para optar
al grado de Doctor en Farmacia por:
CARLOS TORRES FECED

***" α -QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA COMO
CATALIZADOR EN LA SÍNTESIS DE DIPÉPTIDOS"***

Directores: **Dr. José Vicente Sinisterra Gago**
Dr. Andrés R. Alcántara León

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid

Madrid, Enero de 1997

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A D. Andrés R. Alcántara León, por su magistral dirección, por las enseñanzas de él recibidas, y por los buenos momentos que hemos compartido durante la realización de este trabajo.

A D. José Vicente Sinisterra Gago, por su dirección, y por el interés prestado en todo momento.

A Chema, Miki, Pepa y Mayda, con los que he compartido muy buenos momentos, trabajando codo con codo durante estos años y de los que guardo un entrañable recuerdo.

A Nieves Cabezas por su confianza y amistad.

A Mercedes Villacampa y al futuro Dr. José M^a Pérez, con los que he disfrutado de experiencias muy agradables fuera del departamento.

A Chami, Sonia, Isabel e Isidoro con los que pasado el último período de este trabajo disfrutando de su amistad.

A Antonio, Juancho y Ana por los ratos pasados juntos y por su pequeña contribución a este trabajo, y al resto de compañeros que han pasado o aún están en los laboratorios 1, 2 y 3.

A Angel Rumero y Carmen del Campo por sus consejos y colaboración en la finalización de este trabajo.

A la profesora Elena de la Cuesta por despertar mi interés por el apasionante mundo de la Química Orgánica

Al resto de los componentes de este departamento, por hacer de éste un agradable lugar de trabajo.

A la Comunidad de Madrid, por su aportación económica en forma de beca de *Formación de Personal Investigador*.

A D. Javier Burguillo, por su interés y colaboración en la realización de las fotografías de microscopía electrónica.

A D. J. M. Guisán y a su grupo de trabajo por los derivados inmovilizados sobre agarosa indispensables para llevar a cabo la presente Memoria.

A D^a. M^a Helena Gil, por su disposición y ayuda prestada, suministrando los copolímeros requeridos para obtener los derivados objeto de estudio.

A mi familia y más concretamente a mis padres por la ayuda y comprensión prestada, sin la cual este trabajo no se hubiera podido realizar.

***A mi tía
Angelina y abuelos***

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

<u>I.1.- ENZIMAS: ASPECTOS GENERALES</u>	1
<u>I.1.1.- ESTRUCTURA, CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA</u>	1
<u>I.1.2.- CATÁLISIS ENZIMÁTICA Y SU APLICACIÓN EN PROCESOS</u> <u>BIOCATALIZADOS</u>	5
<u>I.2.- PROTEASAS: CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN</u>	8
<u>I.3.- α-QUIMOTRIPSINA</u>	10
<u>I.3.1.- ESTRUCTURA Y OBTENCIÓN</u>	10
<u>I.3.2.- ESTRUCTURA DEL CENTRO ACTIVO</u>	18
<u>I.3.3.- REACCIONES DE HIDRÓLISIS</u>	25
<u>I.3.4.- SELECTIVIDAD DE LA α-QUIMOTRIPSINA</u>	31
<u>I.4.- SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CATALIZADA POR ENZIMAS</u>	37
<u>I.4.1.- PROTEASAS EN LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS:</u> <u>PERSPECTIVAS Y LIMITACIONES</u>	37
<u>I.4.2.- MECANISMOS DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS</u>	44
<u>I.4.3.- FACTORES QUE INFLUYEN EN EL RENDIMIENTO</u> <u>DE LA SÍNTESIS DE UN ENLACE PEPTÍDICO</u>	51
<u>I.4.4.- ASPECTOS EXPERIMENTALES DE LA SÍNTESIS</u> <u>DE PÉPTIDOS CATALIZADA POR ENZIMAS</u>	65

II.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

71

II.1.- PLAN DE TRABAJO

71

III.- PARTE EXPERIMENTAL

72

III.1.- ENZIMAS, SUSTRATOS Y REACTIVOS

72

III.1.1.- ENZIMAS

72

III.1.2.- SUSTRATOS

72

III.1.3.- DISOLVENTES

72

<u>III.1.4.- OTROS REACTIVOS</u>	74
<u>III.1.5.- APARATAJE EMPLEADO</u>	75
<u>III.1.6.- PROGRAMAS INFORMÁTICOS</u>	75
<u>III.2.- CARACTERIZACIÓN DEL PREPARADO COMERCIAL</u>	78
<u>III.2.1.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO</u>	
<u>DE LA α-QUIMOTRIPSINA COMERCIAL</u>	78
<u>III.2.2.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA</u>	
<u>α-QUIMOTRIPSINA NATIVA</u>	81
<u>III.3.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DERIVADOS</u>	
<u>DE α-QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA SOBRE COPOLÍMEROS</u>	
<u>DE INJERTO (PE/HEMA)</u>	84
<u>III.3.1.- PREPARACIÓN DEL SOPORTE (PE/HEMA)</u>	84
<u>III.3.2.- INMOVILIZACIÓN COVALENTE DE LA α-QUIMOTRIPSINA</u>	
<u>SOBRE COPOLÍMEROS DE INJERTO (PE/HEMA)</u>	88
<u>III.3.3.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA</u>	
<u>DE LOS DERIVADOS INMOVILIZADOS</u>	91
<u>III.4.- DERIVADOS INMOVILIZADOS SOBRE</u>	
<u>GELES DE AGAROSA</u>	91
<u>III.4.1.- ACTIVACIÓN DEL SOPORTE</u>	91
<u>III.4.2.- INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA</u>	93
<u>III.5.- SÍNTESIS PEPTÍDICA CATALIZADA POR α-QUIMOTRIPSINA</u>	
<u>INMOVILIZADA EN MEDIOS ORGÁNICO-ACUOSOS</u>	93
<u>III.6.- ENSAYOS CON DERIVADOS DE α-QUIMOTRIPSINA</u>	
<u>INMOVILIZADA SOBRE COPOLÍMEROS DE INJERTO (PE/HEMA)</u>	96
<u>III.6.1.- ENSAYOS DE ESTABILIDAD ENZIMÁTICA</u>	96
<u>III.6.2.- ENSAYOS DE ABRASIÓN</u>	103
<u>III.6.3.- HIDRÓLISIS DE BTEE</u>	104
<u>III.6.4.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS</u>	
<u>CINÉTICAMENTE CONTROLADAS</u>	105
<u>III.6.5.- SÍNTESIS DE PÉPTIDOS TERMODINÁMICAMENTE</u>	

<u>CONTROLADAS</u>	108
<u>III.6.6.- REACCIONES MÚLTIPLES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS</u> <u>Y POSTERIOR PURIFICACIÓN DE LOS MISMOS</u>	109
<u>III.7.- ENSAYOS REALIZADOS CON DERIVADOS DE</u> <u>α-QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA SOBRE GELES DE AGAROSA</u> ..	111
<u>III.7.1.- HIDRÓLISIS DE BTEE</u>	111
<u>III.7.2.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CINÉTICAMENTE</u> <u>CONTROLADAS, EFECTO DE DIVERSAS VARIABLES</u>	112
<u>III.7.3.- SÍNTESIS DE PÉPTIDOS TERMODINÁMICAMENTE</u> <u>CONTROLADAS</u>	114
<u>III.8.- REACCIONES CON SUSTRATOS NO NATURALES</u>	115
<u>III.8.1.- SÍNTESIS QUÍMICA DE LOS ÉSTERES,</u> <u>SUSTRATOS DE LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS</u>	115
<u>III.8.2.- HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EMPLEANDO SUSTRATOS</u> <u>NO CONVENCIONALES</u>	116
<u>IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	118
<u>IV.1.- ENSAYOS CON LOS DERIVADOS DE α-QUIMOTRIPSINA</u> <u>INMOVILIZADA SOBRE COPOLÍMEROS DE INJERTO</u>	118
<u>IV.1.1.- CARACTERÍSTICAS DE LOS DERIVADOS DE</u> <u>α-QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA SOBRE</u> <u>COPOLÍMEROS DE INJERTO</u>	118
<u>IV.1.2.- ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A LA DESACTIVACIÓN</u> ..	126
<u>IV.1.3.- ENSAYOS DE ABRASIÓN</u>	139
<u>IV.1.4.- REACCIONES DE HIDRÓLISIS</u>	140
<u>IV.1.5.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS</u> <u>CINÉTICAMENTE CONTROLADAS</u>	143
<u>IV.1.6.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS</u> <u>TERMODINÁMICAMENTE CONTROLADAS</u>	181
<u>IV.1.7.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS</u>	

<u>EN REACTOR DISCONTINUO Y POSTERIOR</u>	
<u>PURIFICACIÓN DE LOS MISMOS</u>	182
<u>IV.2.- ENSAYOS CON DERIVADOS INMOVILIZADOS SOBRE</u>	
<u>GELES DE AGAROSA</u>	196
<u>IV.2.1.- CARACTERIZACIÓN DE LOS DERIVADOS INMOVILIZADOS</u>	
<u>SOBRE GELES DE AGAROSA</u>	196
<u>IV.2.2.- REACCIONES DE HIDRÓLISIS DE BTEE</u>	197
<u>IV.2.3.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS</u>	
<u>CINÉTICAMENTE CONTROLADAS</u>	202
<u>IV.2.4.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS</u>	
<u>TERMODINÁMICAMENTE CONTROLADAS</u>	233
<u>IV.3.- SUSTRATOS NO NATURALES</u>	236
<u>IV. 2.1.-INTRODUCCIÓN</u>	236
<u>IV.3.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	248
<u>V.- CONCLUSIONES</u>	268
<u>VI.- BIBLIOGRAFÍA</u>	270

I.- INTRODUCCIÓN

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- ENZIMAS: ASPECTOS GENERALES

I.1.1.- ESTRUCTURA, CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA.

Las enzimas son proteínas desarrolladas por las células de los organismos vivos con la función específica de catalizar reacciones químicas *in vivo* (1). También son capaces de catalizar *in vitro* reacciones en las que intervienen tanto sustratos naturales como no naturales (2,3). Cuando el sustrato transformado pertenece a este segundo tipo, se emplea la denominación de BIOTRANSFORMACIÓN para designar el proceso.

Como todas las proteínas, las enzimas poseen una estructura primaria, secundaria y terciaria. La estructura primaria se debe a la secuencia de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, mientras que la secundaria y terciaria confieren a la enzima su forma tridimensional (**Figura 1**). La estructura cuaternaria sólo aparece en aquellas enzimas constituidas por varias subunidades, las cuales se asocian entre sí, mediante uniones de tipo no covalente.

Debido a su estructura proteica, las enzimas son sensibles a los cambios que se producen en su entorno. La presencia de disolventes orgánicos, iones, la variación del pH, de la temperatura o del microentorno, pueden alterar la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria y pueden provocar la desnaturalización de la enzima, es decir, la pérdida de su estructura ordenada. En general, la mayoría de las enzimas desarrollan su actividad óptima a pH=7.0 y a una temperatura de 37°C, si bien existen excepciones, tales como las alcalasas que trabajan a un pH > 8.0, las lipasas, que trabajan en las interfases aceite-agua y son bastante resistentes a la presencia de disolventes orgánicos, o las enzimas de "termófilos" o "arqueas", cuya temperatura óptima de trabajo es igual o superior a 60 °C.

Las enzimas se han clasificado sistemáticamente por el Comité Internacional de Enzimología en 6 clases principales, cada una de las cuales se divide a su vez en subclases, según el tipo de reacción que catalizan (**Tabla 1**). Cada enzima se designa por un nombre recomendado, generalmente corto y apropiado para su uso habitual, por un nombre sistemático, que identifica la reacción que cataliza, y por un número de clasificación que

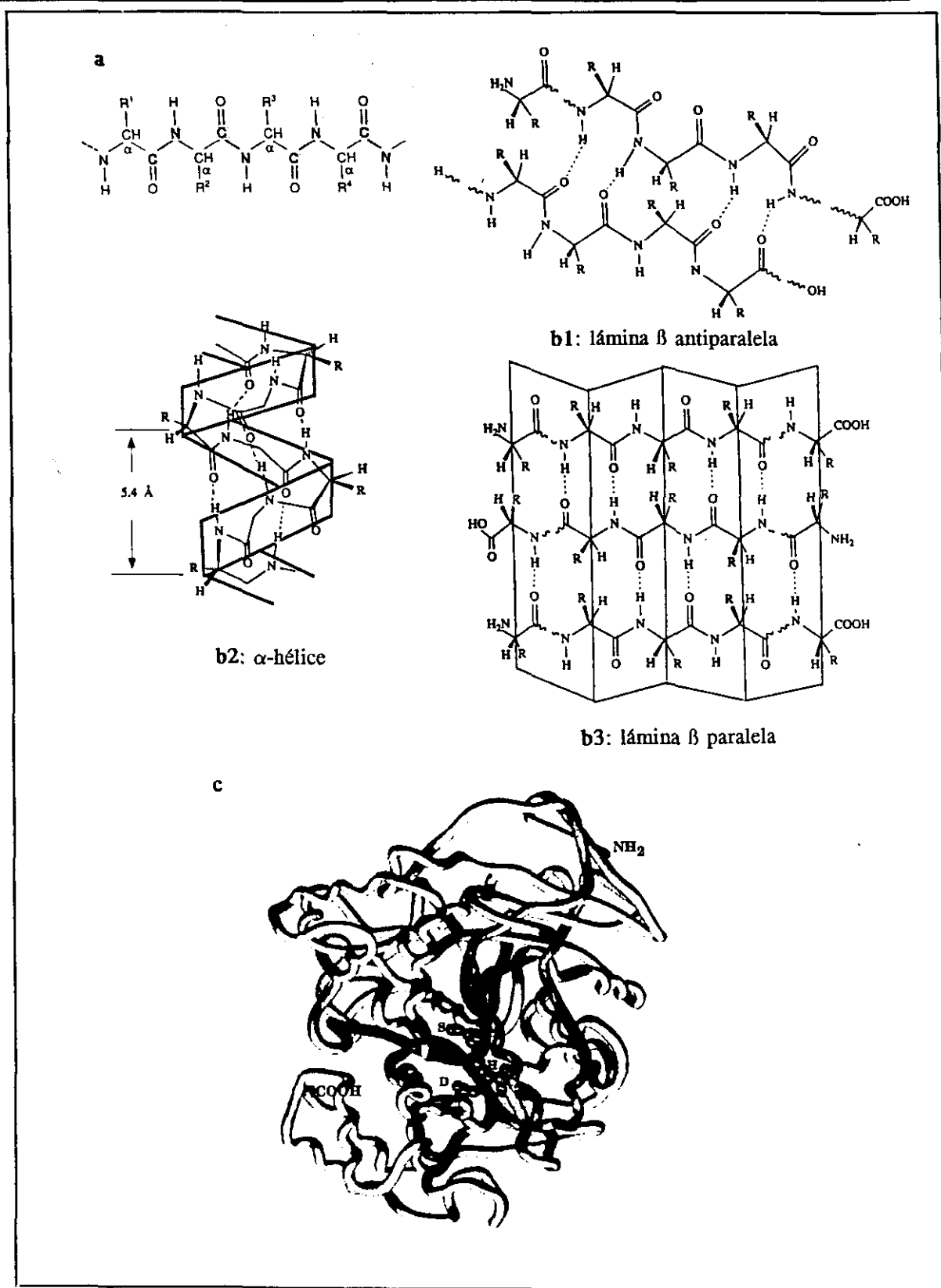


Figura 1.- Estructura de las enzimas: (a) estructura primaria; (b) estructura secundaria; (c) estructura terciaria.

Identifica a la enzima de forma inequívoca. Para ilustrar con un ejemplo, la enzima α -quimotripsina, empleada en la presente Tesis viene clasificada con el número E.C. 3.4.21.1, donde E.C. son las iniciales en inglés de Comisión de Enzimas, la primera cifra «3» representa el nombre de la clase (hidrolasa), la segunda cifra «4» representa a la subclase (enlaces peptídicos, ya que rompen este tipo de enlaces), la tercera cifra «21» a la sub-subclase (Serin-proteasas, ya que la unión al carboxilo se realiza a través de un resto de serina) y la cuarta cifra «1» que indica que la ruptura del enlace peptídico se produce en la vecindad de un aminoácido aromático.

Tabla 1. Clasificación internacional de las enzimas.

1.- OXIDO REDUCTASAS: (<i>Reacciones de oxido-reducción</i>)	1.1 - Actúan sobre alcoholes $> -OH$ 1.2 - Actúan sobre cetonas $> C=O$ 1.3 - Actúan sobre alquenos $> =CH-$ 1.4 - Actúan sobre grupos amino $-NH_2$ 1.5 - Actúan sobre grupos imino $=NH$
2.- TRANSFERASAS: (<i>Transferencia de grupos funcionales</i>)	2.1 - Grupos de un átomo de C 2.2 - Grupos aldehídicos o cetónicos 2.4 - Grupos glucosilo 2.7 - Grupos fosfato 2.8 - Grupos que contienen azufre
3.- HIDROLASAS: (<i>Reacciones de hidrólisis</i>)	3.1 - Esteres 3.2 - Enlaces glucosídicos 3.4 - Enlaces peptídicos 3.5 - Otros enlaces C-N 3.6 - Anhídridos de ácido
4.- LIASAS: (<i>Adición a dobles enlaces</i>)	4.1 - $> C=C <$ 4.2 - $> C=O$ 4.3 - $> C=N-$
5.- ISOMERASAS (<i>Reacciones de isomerización</i>)	5.1 - Racemasas
6.- LIGASAS: (<i>Formación de enlaces con escisión de ATP</i>)	6.1 - Entre átomos de C y O 6.2 - Entre átomos de C y S 6.3 - Entre átomos de C y N 6.4 - Entre átomos de C y C

De los seis tipos de enzimas existentes, las hidrolasas (esterasas, lipasas y proteasas, etc) son las más empleadas en Síntesis Orgánica por las siguientes razones:

- 1) Accesibilidad comercial de las enzimas hidrolíticas de muy diverso origen;
- 2) Su buena estabilidad en presencia de medios no acuosos;
- 3) No suelen requerir cofactor para su acción catalítica.

Estas razones explican porqué más del 60 % de todas las Biotransformaciones de compuestos no naturales descritas durante las dos últimas décadas en la bibliografía habitual de la Química Orgánica se han realizado con hidrolasas (**Figura 2**).

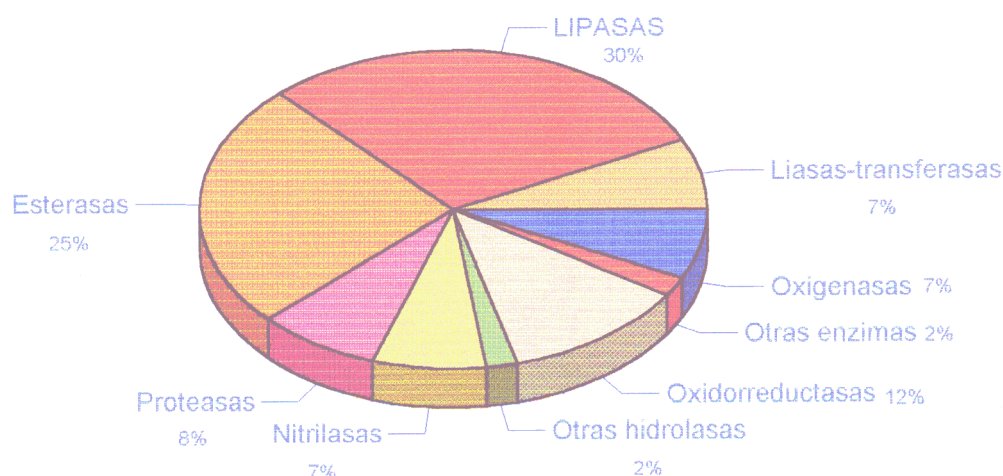


Figura 2.- Enzimas empleadas en Biotransformaciones

Las enzimas hidrolíticas se pueden emplear tanto en medio acuoso como en medios orgánicos. En el primer caso, nos encontramos ante procesos de hidrólisis catalizadas por las hidrolasas, cuyo interés en Síntesis Orgánica es limitado ya que pocos sustratos no naturales son solubles en agua. Mayor interés tienen los procesos catalizados en medios orgánico-acuosos, donde las enzimas catalizan una gran variedad de reacciones sintéticas: esterificaciones, interesterificaciones, lactonizaciones, tiotransesterificaciones, aminolisis, oximolisis, formación de enlaces amida, etc.

1.1.2.- CATÁLISIS ENZIMÁTICA Y SU APLICACIÓN EN PROCESOS BIOCATALIZADOS.

Las enzimas, como catalizadores, tienen las siguientes características principales, que pasamos a comentar:

1) Como todo catalizador, **aumentan la velocidad de la reacción** al disminuir la energía de activación necesaria para que ésta se lleve a cabo.

Las enzimas normalmente catalizan las reacciones con mayor eficacia que los catalizadores inorgánicos. Como ejemplo citaremos la descomposición del agua oxigenada en agua y oxígeno. La energía de activación necesaria para que suceda la reacción en ausencia de catalizador es de 75 KJ/mol. Esta energía se reduce a 50 KJ/mol en presencia de platino, y disminuye a 8 KJ/mol si se hace en presencia de peroxidasa (denominada clásicamente catalasa). Esto justifica el interés aplicado de los biocatalizadores.

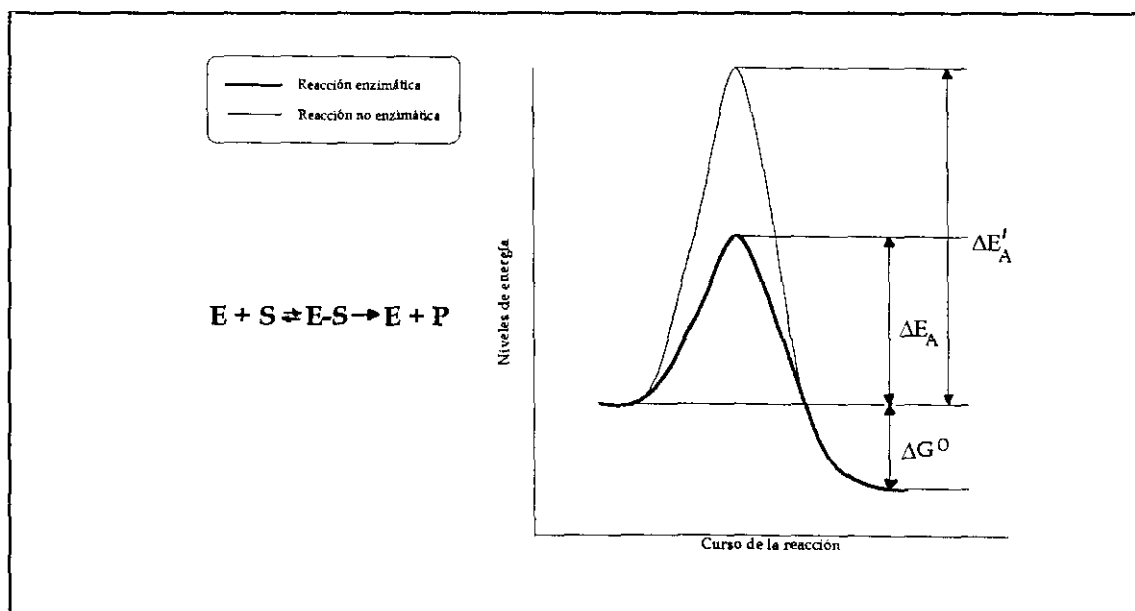


Figura 3.- Efecto de la catálisis enzimática sobre la energía de activación. ΔE_A es la energía libre de activación para una reacción catalizada por una enzima mientras que $\Delta E'_A$ es la de una reacción no catalizada. ΔG° es la energía libre de la reacción.

2) **Las enzimas son catalizadores selectivos:** la formación del complejo enzima-sustrato sucede en una pequeña región de la enzima denominada centro activo, el cual suele estar localizado en un hueco o cavidad de la estructura proteica. La selectividad de las enzimas es la base de muchas de sus aplicaciones en Síntesis Orgánica, ya que ofrecen la posibilidad de llevar a cabo transformaciones muy selectivas con estructuras quirales, polifuncionales o lábiles. La especificidad enzimática reside inherentemente en este centro activo, que posee las dimensiones correctas, la topología adecuada y el alineamiento óptimo de grupos contraiónicos y regiones hidrofóbicas para acomodar a un sustrato específico. Solamente unos pocos aminoácidos (entre 5 y 10) dentro del centro activo están directamente implicados en la catálisis enzimática y constituyen el centro de fijación. Estos aminoácidos no están localizados consecutivamente en la cadena polipeptídica, sino que se encuentran juntos tras el plegamiento característico de la enzima; por ello, la alteración de la estructura de la proteína puede desactivar el catalizador. No obstante, aquellos aminoácidos que no intervienen directamente en la catálisis también son importantes, ya que son esenciales en el mantenimiento de la conformación activa de la enzima.

Se han propuesto varios modelos para explicar la selectividad de las enzimas hacia un determinado sustrato. El modelo de "la llave y la cerradura" (4), que da una versión rígida de las enzimas, ha sido ampliamente superado por el modelo del "acoplamiento o encaje inducido" (5). En este modelo, el sustrato induce la orientación de los residuos en el centro activo para que se realice la unión al centro de fijación y suceda la catálisis.

3) **Las enzimas pueden ser objeto de regulación**, es decir, su actividad catalítica puede estar influenciada por la concentración de sustratos, productos y otras especies químicas presentes en solución. El tema de la regulación de las enzimas, de enorme importancia en los sistemas metabólicos donde normalmente actúan, es un inconveniente cuando se emplean como catalizadores en reacciones *in vitro* con sustratos no naturales. Así, cuando la concentración del producto de la reacción biocatalizada aumenta hasta cierto valor, puede existir una inhibición de la enzima por producto final lo cual reduce el interés de la aplicación de estas enzimas al no poder trabajar en grandes concentraciones de reactivos (6, 7). Existen dos formas de evitar este problema:

I) La eliminación del producto del medio de reacción a medida que se va formando

(a veces resulta un proceso no excesivamente sencillo).

II) El aumento de la cantidad de enzima (lo que supone un aumento en el coste del proceso).

4) Ciertas enzimas pueden requerir la **presencia de cofactores** para que sean activas. El aporte de estos cofactores y su regeneración significa un encarecimiento del proceso biocatalizado.

5) **La mayoría de las enzimas son solubles en agua** y presentan mayor actividad *in vivo* a pH=7-8 y a temperatura ambiente. Esto complica su utilización *in vitro* con sustratos no naturales, generalmente lipóides.

6) **Se pueden utilizar varias enzimas en combinación** para realizar transformaciones que sucedan en varios pasos sucesivos. Esto no es técnicamente viable, por lo que muchas veces se acude al empleo de la célula entera.

7) Las enzimas, dada su estructura proteica, **se degradan en condiciones relativamente suaves**. Los químicos, acostumbrados a conservar sus catalizadores metálicos durante mucho tiempo sin una pérdida considerable de actividad, se enfrentan con unos biocatalizadores que requieren un manejo mucho más cuidadoso; ésto implica muchas veces el que se busquen catalizadores inorgánicos menos eficaces pero más estables en las condiciones de reacción.

Las enzimas se pueden desnaturalizar mediante diversos mecanismos como:

- I) La acción de proteasas presentes como contaminantes en los preparados enzimáticos;
- II) La temperatura o los cambios de composición del medio, que pueden alterar la conformación de la proteína;
- III) La contaminación microbiana;
- IV) La autooxidación; etc.

Por ello la manipulación de las enzimas, tanto durante su utilización como durante su conservación, exige un manejo más delicado que el de otro tipo de catalizadores.

De todo lo dicho podemos concluir que la inestabilidad, el precio elevado y la especificidad respecto al sustrato son los principales inconvenientes que presentan las enzimas para ser utilizadas como catalizadores industriales con sustratos no naturales. Sin embargo,

muchos de estos problemas se han superado en los últimos años de investigación en biotransformaciones:

1) Existen ya una gran cantidad de enzimas comercialmente muy baratas, que transforman muchos sustratos estereoselectivamente originando intermedios de síntesis no accesibles económicamente por otras vías.

2) Con el objetivo de utilizar los biocatalizadores en procesos industriales a gran escala, se han desarrollado técnicas que mejoran la estabilidad de las enzimas y que facilitan su recuperación y reutilización (8); como ejemplos, citaremos la inmovilización y la modificación química.

3) Los avances de la Biología Molecular y los nuevos métodos del ADN recombinante han permitido la manipulación del material genético, el aislamiento de genes productores de enzimas y su expresión en otros microorganismos con el fin de obtener determinadas proteínas en grandes cantidades (9). Como consecuencia de esto, el precio de las enzimas ha bajado espectacularmente.

Estas técnicas también permiten la alteración controlada de las enzimas, creando enzimas artificiales con nuevas actividades.

4) La limitación que supone la insolubilidad de ciertos sustratos no naturales en agua se ha visto en parte superada por la posibilidad de realizar reacciones en sistemas heterogéneos en los que una pequeña parte del sustrato está presente en la disolución donde se suspende la enzima (10). Esto se logra empleando cosolventes orgánicos como el etilenglicol, el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO) o la dimetilformamida (DMF), donde las enzimas son bastante estables (11).

1.2.- PROTEASAS: CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN

Las enzimas que producen la ruptura de enlaces peptídicos (amídicos) en sustratos proteicos se denominan PROTEASAS (o también peptidasas). Estas enzimas llevan a cabo la catálisis en reacciones de transferencia de acilo, en las cuales un resto acilo es transferido a una molécula de agua.

El comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica, en sus reglas

dictadas a tal fin en 1984, clasificó a las proteasas dentro del grupo de enzimas hidrolíticas, junto con esterasas, glicosidasas y lipasas (**Tabla 1, Sección 1.1.1**). Históricamente, las enzimas hidrolíticas que actúan sobre sustratos proteicos fueron de los primeros catalizadores biológicos en ser purificados y caracterizados, debido, en parte, a su estabilidad.

Las proteasas pueden, a su vez, clasificarse en dos tipos, dependiendo de su especificidad en la ruptura de los enlaces peptídicos: cuando el enlace susceptible de ser roto se encuentra en el interior de una cadena polipeptídica, la enzima se considera una ENDOPEPTIDASA; si por el contrario, la ruptura se lleva a cabo en el grupo amino terminal o en el carboxilo terminal, la enzima es una EXOPROTEASA, las cuales pueden ser, por tanto, bien aminopeptidasas o carboxipeptidasas.

Las proteasas se dividen en relación a su función fisiológica, en dos clases diferentes:

a) Proteasas que degradan los polipéptidos y las proteínas con fines digestivos y nutricionales. Tales enzimas funcionan tanto extracelularmente (en el tracto intestinal) como intracelularmente (en los orgánulos hidrolíticos intracelulares llamados lisosomas, situados fundamentalmente en las células del hígado y riñón).

b) Proteasas que tienen como función la limitación y control de la proteólisis de sustratos proteicos, para lo cual degradan o activan enzimas. Unos ejemplos de este tipo de transformación aparecen en la **Tabla 2**.

Tabla 2.- Proteasas actuando en procesos de control de funciones fisiológicas.

FUNCION FISIOLÓGICA	EJEMPLO
Mecanismos de defensa	Coagulación sanguínea
Producción hormonal	Proinsulina-Insulina
Digestión	Zimógeno-Proteasa activa
Uniones macromoleculares	Fibrinógeno-Fibrina Procolágeno-Colágeno
Desarrollo y crecimiento	Proquitina sintetasa-quitina sintetasa

Según su mecanismo de acción las proteasas se dividen por grupos (12):

1.-Proteasas con un residuo de SERINA en el centro activo (endoproteasas), también llamadas SERINPROTEASAS. Según su origen, se pueden dividir a su vez en dos familias: aquellas que se extraen de órganos de mamíferos, como son la α -quimotripsina, tripsina, y elastasa; y por otro lado, las que se obtienen a partir de microorganismos bacterianos, como es el caso de la subtilisina.

2.-Proteasas con un residuo CISTEINA en el centro activo (endoproteasas), también llamadas SULFHIDRILPROTEASAS tales como la papaína.

3.-Metaloproteasas (endoproteasas y exoproteasas) que contienen un metal en su estructura, bien provenientes del páncreas de mamíferos (carboxipeptidasa A) o bien de origen bacteriano como la termolisina.

4.-Proteasas con un residuo ASPÁRTICO en su centro activo, ASPARTILPROTEASAS (penicilinopepsina).

L.3- α -QUIMOTRIPSINA

L.3.1.- ESTRUCTURA Y OBTENCIÓN

La α -quimotripsina es, según las clasificaciones de proteasas dadas en la **Sección I.1.1**, una ENDOPROTEASA con un residuo SERINA en el centro activo.

Su origen se encuentra en las células acínicas del páncreas, donde se sintetiza en forma de precursor inerte, el quimotripsinógeno A, el cual está formado por una sola cadena polipeptídica de 245 residuos aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 25 KDa. Este precursor inerte es transportado por el jugo pancreático hasta el intestino delgado, donde es atacado por la tripsina (SERINPROTEASA), lo que origina la ruptura de un enlace peptídico crucial para originar la enzima plenamente activa. Esta ruptura ocurre entre los residuos Arg₁₅ e Ile₁₆, (13, 14), originando un producto, compuesto por dos cadenas, completamente activo, llamado π -quimotripsina. Esta forma de la enzima no es estable en el intestino y sufre dos rupturas más (catalizadas por otras dos moléculas de quimotripsina) originando sucesivamente δ -quimotripsina (ruptura Leu₁₃-Ser₁₄) y α -quimotripsina (Thr₁₄₇ -

Asn₁₄₈) (Figura 4).

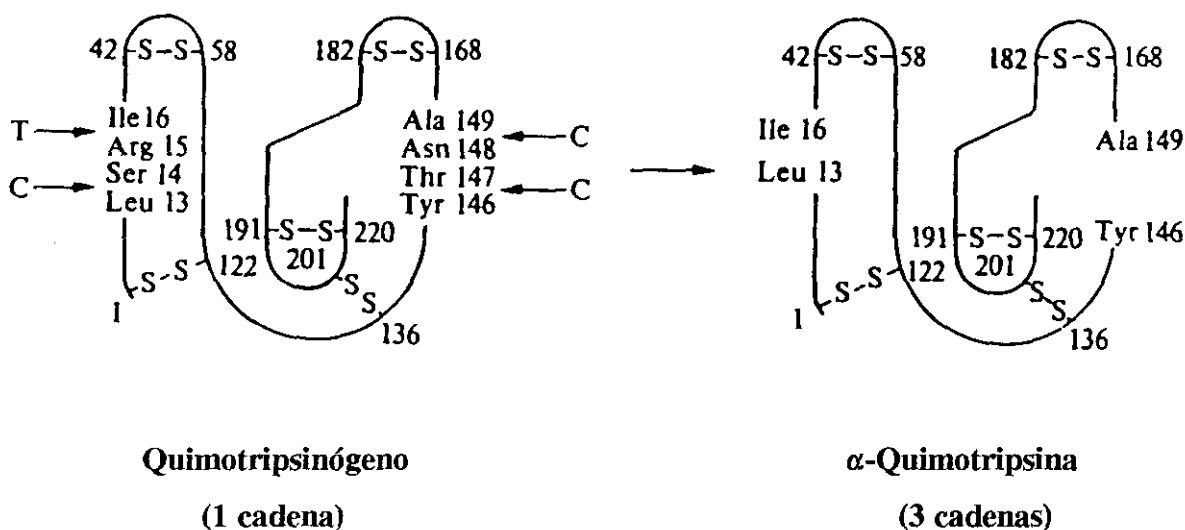


Figura 4.-Activación de quimotripsinógeno. T y C representan la acción de tripsina y quimotripsina respectivamente.

Esta última, la α -quimotripsina, es, por tanto, una enzima cuya estructura está formada por tres cadenas polipeptídicas unidas entre sí por puentes disulfuro. Una representación esquemática de la misma se muestra en la **Figura 5**.

Así, la α -quimotripsina consta de 241 residuos aminoacídicos con un peso molecular aproximado de 24,8 KDa; las tres cadenas pépticas unidas por enlaces disulfuro constan de 13, 131 y 97 residuos respectivamente y se denominan A, B y C.

Los residuos esenciales para la actividad catalítica de la proteína aparecen señalados con círculos en la **Figura 5**, y son Asp₁₀₂, His₅₇ y Ser₁₉₅. Los aminoácidos que intervienen en la conversión de quimotripsinógeno inactivo en α -quimotripsina activa están marcados con cuadros y son: Ile₁₆, Asp₁₉₄ e His₄₀. Muchos otros aminoácidos, que no están marcados, son importantes para la unión del sustrato porque forman la cavidad en la cual se fijan las cadenas

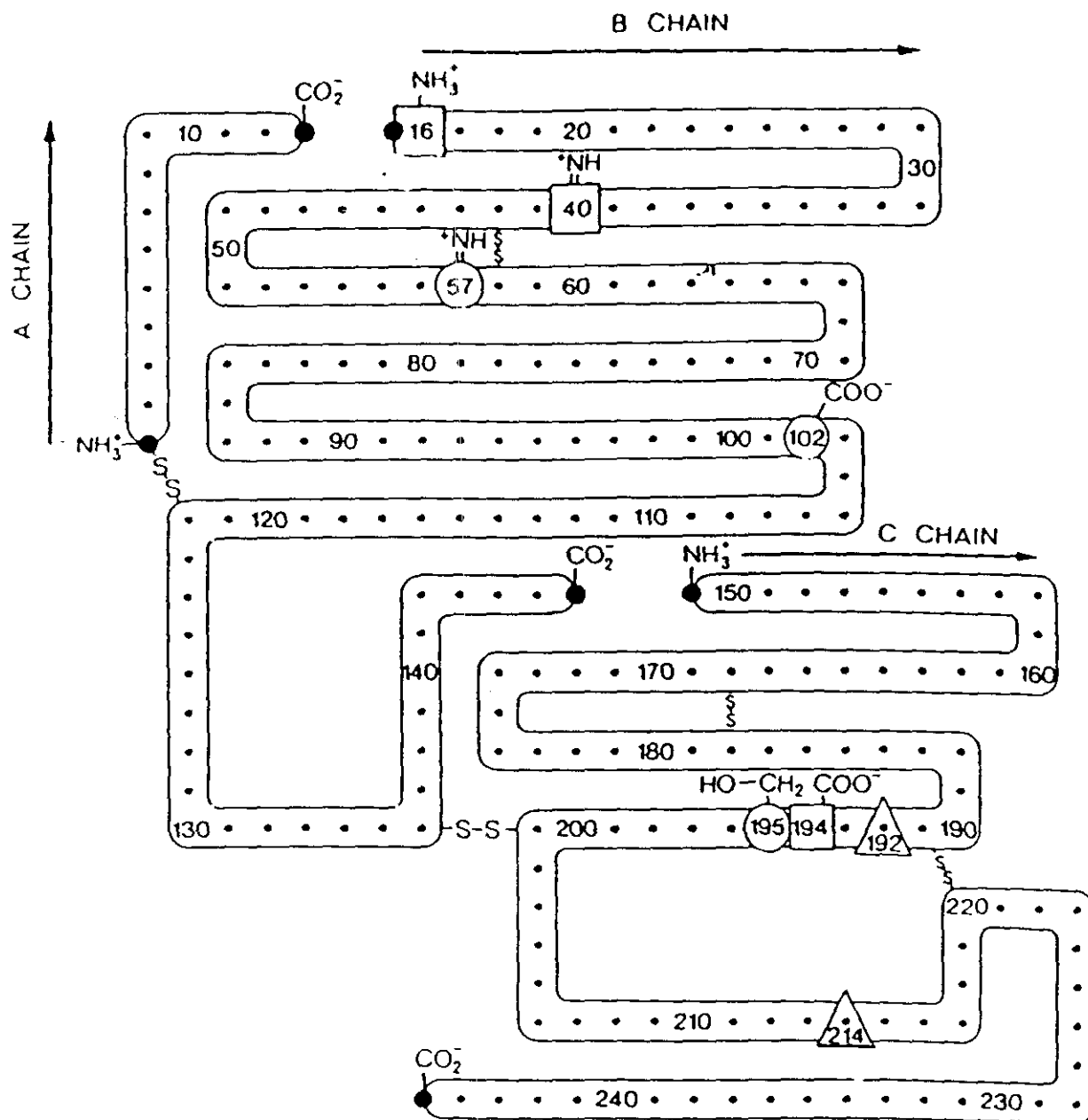


Figura 5.-Secuencia de aminoácidos de la α -quimotripsina bovina, según Hartley y cols (15, 16) y Meloun y cols (17).

- (●) Residuos amino y carboxilo terminales.
- (○) Residuos implicados en la reacción catalítica.
- (□) Residuos implicados en la activación del quimotripsinógeno.
- (Δ) Residuos implicados en la unión de los sustratos al centro activo.

laterales hidrofóbicas de los sustratos específicos de la α -quimotripsina (18); por otra parte, existen otros dos residuos marcados con triángulos que también están implicados en la unión de los sustratos, pero que se sitúan fuera del centro activo, y son Ser₂₁₄ (18) y Met₁₉₂ (19, 20).

En 1967 se obtuvo un mapa de Rayos X de densidades electrónicas de alta resolución de la Tosil- α -quimotripsina (21, 22). Posteriores cálculos permitieron mejorar el mapa de densidad electrónica, lo que hizo que se pudieran analizar coordinaciones atómicas de casi toda la molécula (23).

La Tosil- α -quimotripsina es un derivado inactivo de la α -quimotripsina que se obtiene por tosilación del resto de serina del centro activo (24, 25). La Tosil- α -quimotripsina cristalina tiene la misma estructura que la α -quimotripsina cristalina (26), salvo unas pocas diferencias en el centro activo. Los cristales pertenecen al grupo espacial P2, con unas distancias $a=49.3$ Å, $b=67.3$ Å, $c=65.9$ Å y un ángulo $\beta=101.8^\circ$. La celdilla unidad contiene dos moléculas de enzima (27) y aparece representada en la **Figura 6**.

La molécula de enzima es elipsoidal, con unas dimensiones de aproximadamente 51 Å a lo largo del eje cristalográfico "a" y 40 Å en los ejes "b" y "c". La molécula está un poco aplanada en el centro activo y presenta un agujero en la superficie el cual tiene un papel muy importante en la unión a los sustratos específicos.

Los residuos 235-245 de la parte C-terminal forman una α -hélice. En esta zona, el último enlace peptídico tiene una orientación que produce un estrechamiento de la hélice semejante a la estructura de hélice 3.0_{10} (28). Este efecto ya ha sido observado en la Mioglobina y en la Lisozima. La estructura recibe el nombre de α_{II} -hélice (29). Los residuos 164-173 también presentan estructura en α -hélice; esta hélice está distorsionada por la existencia de un enlace de hidrógeno 3.0_{10} en el centro de la hélice. El cuidadoso examen de este tramo acentúa la dificultad de decidir si la relación de los dos enlaces peptídicos consecutivos es más típica de la α -hélice o de la hélice 3.0_{10} ya que la distancia total de los ángulos diedros, característicos de las dos hélices, es solo de 35° (29).

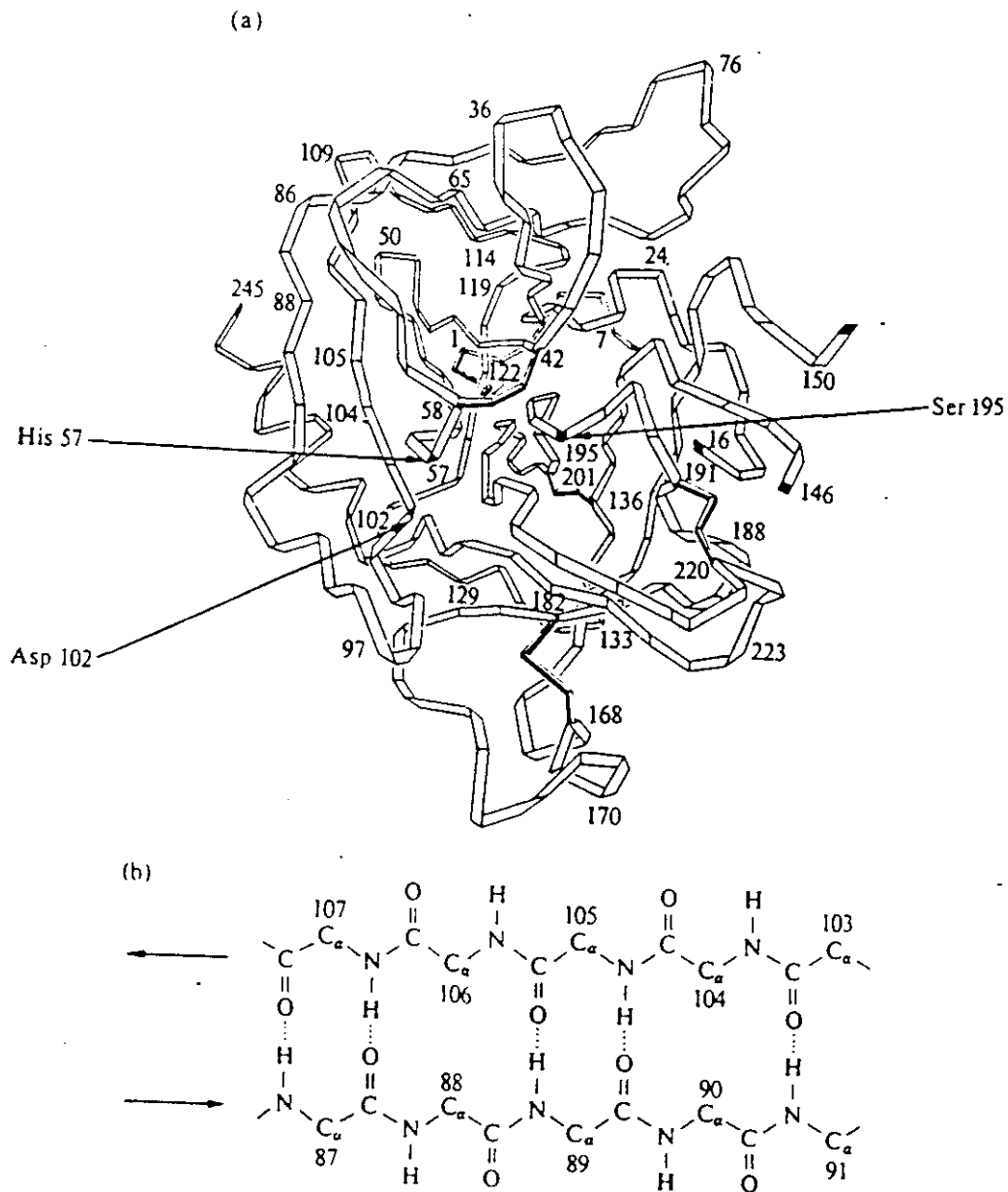


Figura 6.- (a) Estructura de la α -quimotripsina. (b) Representación de los puentes de hidrógeno en la estructura antiparalela de la α -quimotripsina.

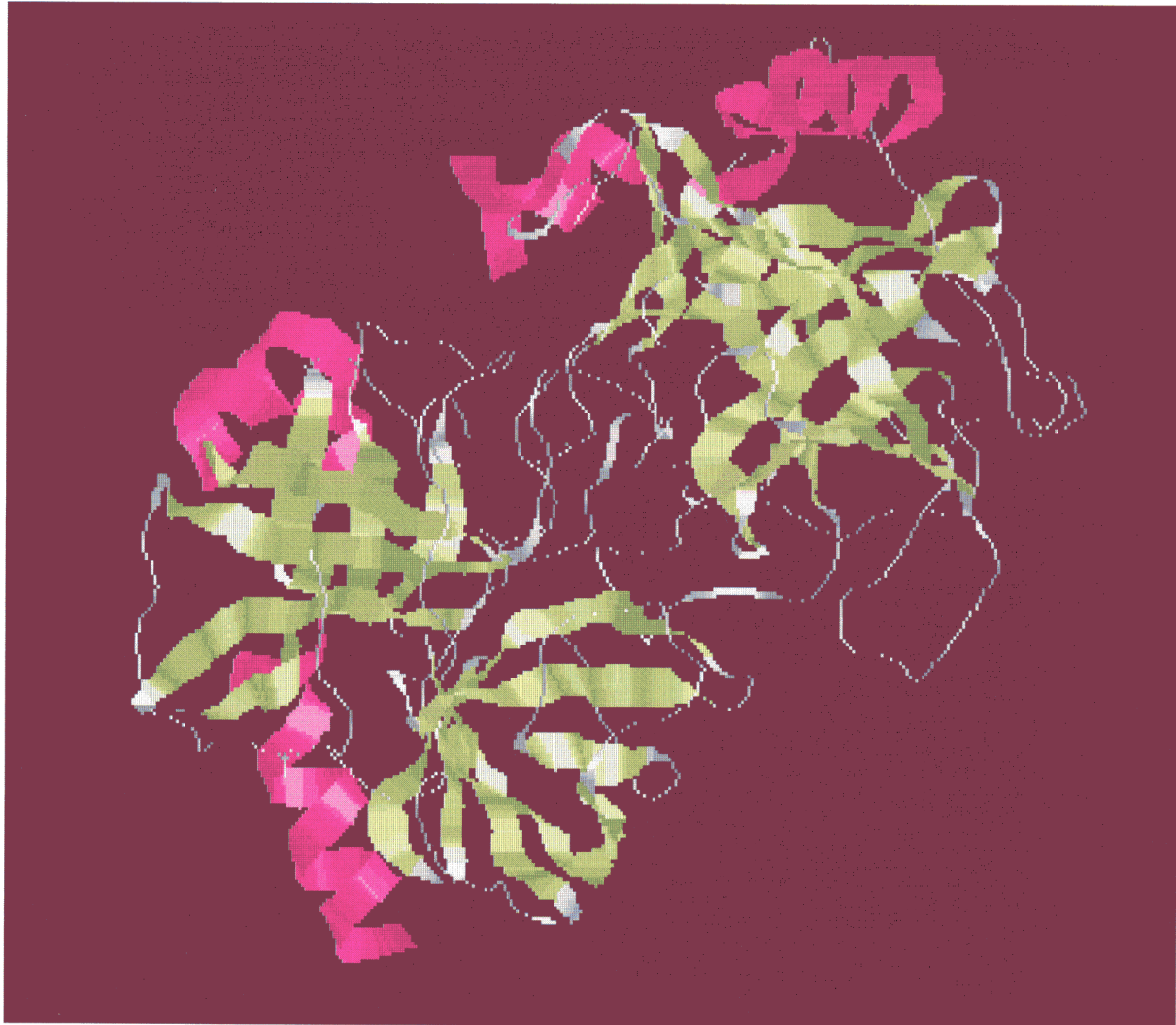


Figura 7.- Estructura de la α -quimotripsina, procedente del *Brookhaven Protein Data Bank*.

La disposición antiparalela de láminas plegadas (30) es bastante común en la molécula de α -quimotripsina, aunque no hay regiones extensas de lámina plegada regular. Por el trazado de la cadena principal en zig-zag, casi todos los residuos que forman los puentes de hidrógeno de la cadena principal están muy próximos. El modelo de líneas en zig-zag se utiliza para recalcar la distancia de dos unidades plegadas en la molécula entre los residuos 27-112 y 133-230. Cada una de estas unidades consta de una serie de seis líneas antiparalelas que siguen el mismo patrón; dentro de cada unidad hay algunos puentes de hidrógeno del tipo de láminas plegadas antiparalelas entre cada una de esas líneas y sus vecinas. Además, existen puentes de hidrógeno entre la sexta y la primera línea de cada unidad, de tal forma que las seis líneas se unen formando un cilindro (31, 32). Estos cilindros están tan distorsionados que son casi irreconocibles, pero cada uno contiene un núcleo de residuos hidrofóbicos.

En la cadena principal de la proteína los enlaces de hidrógeno se establecen entre un grupo amido y el carbonilo del tercer residuo posterior. Este tipo de enlace de hidrógeno es característico de la hélice 3.0_{10} (29) y muy común en la molécula de α -quimotripsina, especialmente al final de las vueltas o rizos donde la cadena polipeptídica se tuerce y vuelve a ser paralela a su dirección original (32).

Todos los grupos cargados de la proteína se sitúan en la superficie de la molécula, excepto el grupo α -amino de la Ile₁₆ y los grupos carboxílicos de Asp₁₀₂ y Asp₁₉₄. Aunque existen muchos grupos hidrofóbicos en la superficie de la molécula como Phe₃₉ y Phe₄₁, la α -quimotripsina presenta la tendencia general, observada en otras proteínas, a tener los grupos hidrofóbicos colocados hacia el interior y los grupos ionizables expuestos hacia el exterior. También se ha visto que hay varias moléculas de agua atrapadas dentro de la molécula de proteína (33). Los diferentes entornos de los residuos de la enzima aparecen en la **Tabla 3**.

Tabla 3.- Entorno de las cadenas de aminoácidos en la α -quimotripsina.

CADENA LATERAL				GRUPO FUNCIONAL		
Amino-ácido	Externo	Superficie ^a	Interno ^b	Grupo	Externo	Interno
Gly	11	3	8			
Ala	13	3	6			
Val	4	8	11			
Leu	2	7	8			
Ile	3	3	4			
Ser	20	3	3	Hidroxilo	21	5
Thr	15	4	3	Hidroxilo	19	3
Asp	7	1	1	Carboxilo	7	2
Glu	4	1	0	Carboxilo	5	0
Asn	11	2	0	Amida	11	2
Gln	6	3	1	Amida	8	2
Lys	14	0	0	Amino	14	0
Arg	3	0	0	Guanidino	3	0
His	0	2	2	Imidazol-N	1	3
Phe	1	5	0			
Tyr	2	2	0	Hidroxilo	3	1
Trp	0	6	2	Indol-N	3	5
Pro	3	3	3			
Cys	3	4	3	Sulfuro	5	5
Met	1	0	1	Sulfuro	1	1

^a Superficie, significa: que solo un lado de la cadena lateral es accesible al agua.

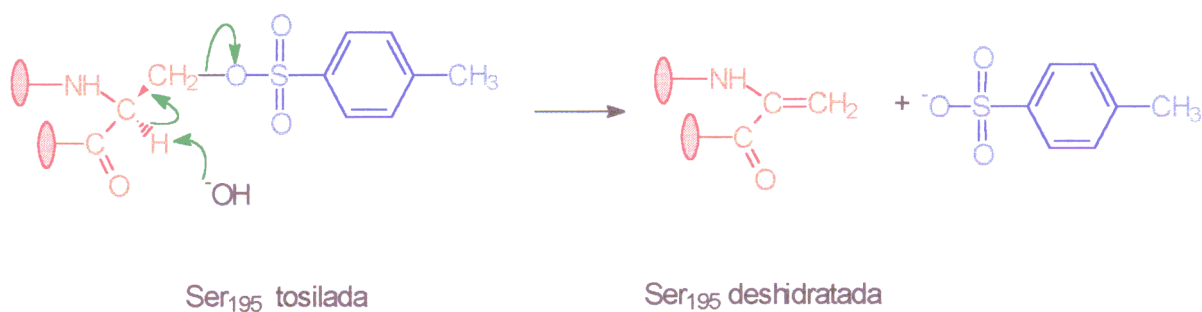
^b Interno, significa: inaccesible al agua, asumiendo que la estructura cristalográfica observada sea rígida.

I.3.2.-ESTRUCTURA DEL CENTRO ACTIVO DE LA α -QUIMOTRIPSINA

Son muy numerosos los trabajos cuyo objetivo es el conocimiento del centro activo de la α -quimotripsina (34-53). Para no cansar al lector hemos intentado centrarnos unicamente en aquellos aspectos fundamentales desde el punto de vista catalítico, resumiendo al máximo las descripciones morfológicas.

I.3.2.1.-Residuos implicados en la acilación.

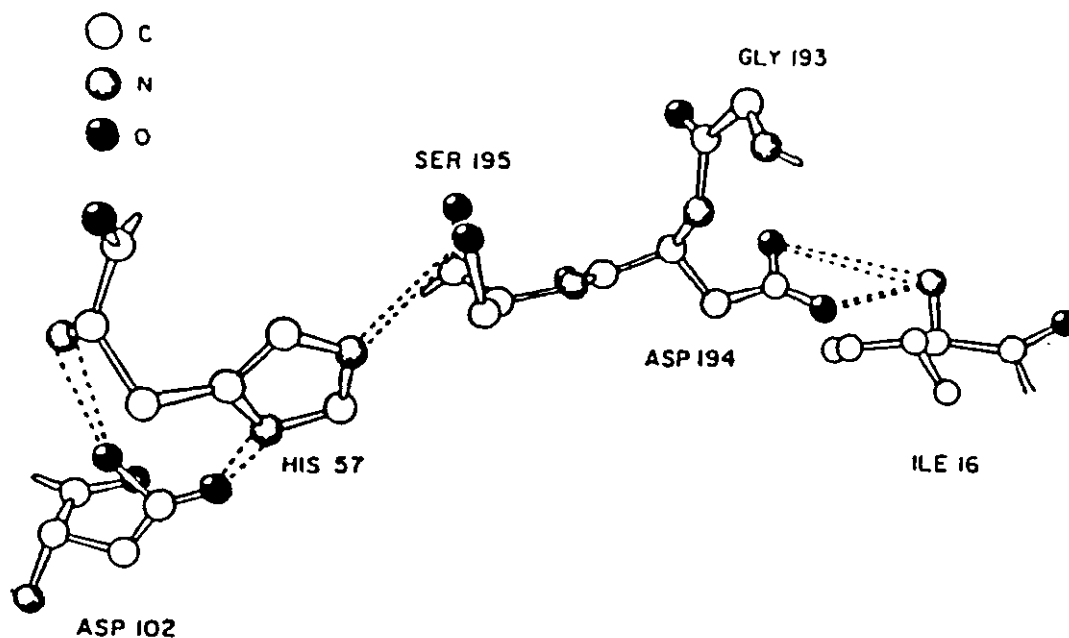
Es lógico pensar que el residuo acilado debe encontrarse en la región espacial donde existe la catálisis, esto es, en el centro activo. Para poder determinar cuál es el residuo o residuos que se acilaban se llevaron a cabo estudios de acilación con diferentes reactivos, y se concluyó que era un oxígeno el grupo nucleófilo que sufría la acilación: en la reacción estequiométrica con fluorofosfato de diisopropilo, sólo un residuo serina de los 28 que hay presentes mostró las propiedades nucleofílicas necesarias (54, 55). Mediante una serie de estudios cristalográficos se asignó este residuo a la Ser₁₉₅ (56). Ello implicaría que la modificación de la Ser₁₉₅ hace imposible el acto catalítico. Weiner y cols. (57) demostraron que la modificación de la serina por deshidratación formal en medio básico en la enzima tosilada, tal y como se expone en el **Esquema 1**, produce la inactivación de la enzima.



Esquema 1.- Reducción de la Ser₁₉₅.

Este experimento probaba que el residuo de la Ser₁₉₅ juega un papel vital en el proceso catalítico.

Normalmente, la ionización del grupo -OH de los residuos de serina, necesaria para llevar a cabo el incremento de nucleofilia del átomo de oxígeno y poder realizar el ataque nucleofílico que conduzca al intermedio acil-enzima, es insignificante debido al alto valor del pKa (≈ 14) del grupo -CH₂-OH. Debería existir alguna especie de catálisis básica que aumente la nucleofilia de la Ser₁₉₅ para facilitar esta disociación. Así, el complejo ES' se produce mediante un sistema de movimientos de densidad electrónica (58) en el cual están implicados tres residuos aminoacídicos: serina, histidina, y ácido aspártico, denominada TRIADA DE AMINOÁCIDOS del centro activo. Concretamente en el caso de la α -quimotripsina, estos residuos son la Ser₁₉₅, la His₅₇ y el Asp₁₀₂, hecho que fue deducido mediante estudios de difracción de Rayos X (58), los cuales mostraron un ordenamiento preciso de los tres residuos.



Esquema 2.-Representación de la triada catalítica.

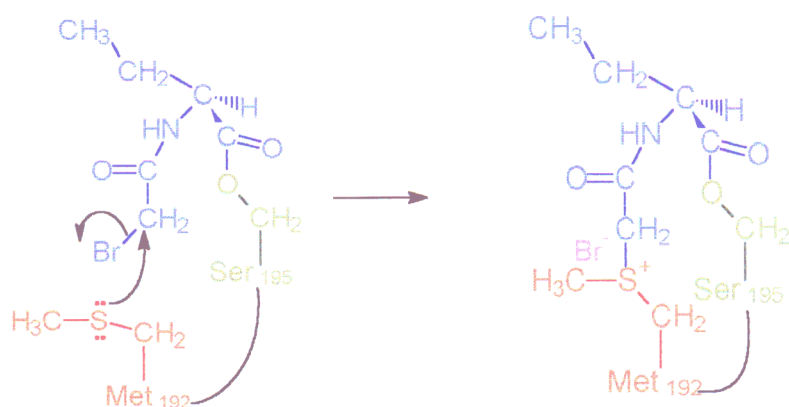
en las ionizaciones microscópicas del sistema. El valor de k_{cat} depende de un pKa de 6.7 a 7.0, y este pKa se asigna normalmente a la disociación de un protón de la forma catiónica de His₅₇. No obstante también se podría asignar a un grupo β -carboxílico, del Asp₁₀₂, el cual normalmente presenta un pKa de aproximadamente 4.5. No obstante, este último residuo se encuentra en un entorno hidrófobo en el interior de la proteína, y este medio elevaría el pKa de este grupo carboxílico, puesto que el anión carboxilato sería menos estable en un medio de baja constante dieléctrica. Por tanto, Hunkapiller y cols. (59) postularon que los pKa de los residuos de His₅₇ y de Asp₁₀₂ estaban invertidos, y que la ionización que se produce a valores de pH de aproximadamente 7.0 se debía a la pérdida de un protón del grupo carboxilo de un residuo aspártico en presencia de un anillo neutro de imidazol en lugar de la pérdida de un protón de un catión imidazólico en presencia de un anión carboxilato. Estas suposiciones se vieron refrendadas mediante un estudio realizado en una serin-proteasa de origen bacteriano, la proteasa α -lítica de *Myxobacter* 495 (59). Dicha enzima sólo presenta un residuo histidina, concretamente el situado en el centro activo, el cual puede ser marcado con ¹³C, y analizado con RMN, a fin de calcular los valores concretos de pKa, los cuales resultaron ser 4.0 para el catión imidazólico y 6.7 para el carboxilo del ácido aspártico. Posteriores estudios de RMN (60, 61) ya realizados sobre la propia α -quimotripsina, así como otros estudios de difracción de neutrones, (62) reafirmaron estos valores de pKa para los residuos mencionados.

La mutagénesis dirigida también ha sido empleada para reafirmar la importancia del residuo de Asp₁₀₂ (63), realizando el cambio de este aminoácido por una asparragina. El valor de k_{cat} calculado resultó ser 5000 veces menor que el de la enzima nativa, lo que demuestra que este residuo Asp₁₀₂ es importante, pero no imprescindible, para la catálisis. Mediante marcadores de afinidad se demostró también que la mutación de Asp₁₀₂ a Asn origina efectos considerablemente mayores sobre la reactividad de la Ser₁₉₅ que sobre la His₅₇. Otros estudios de mutagénesis dirigida demostraron que las tres cadenas laterales implicadas en el sistema de intercambio de densidad electrónica actúan de modo sinérgico para aumentar la velocidad de catálisis (64).

Un residuo metionina, concretamente Met₁₉₂, también tiene cierta importancia en la catálisis, debido a su cercanía con el centro activo. Esto fue demostrado por Lawson y Schramm (65), al realizar la acilación de la Ser₁₉₅ con N-(bromoacetil)- α -aminobutirato de p-

Schramm (65), al realizar la acilación de la Ser₁₉₅ con N-(bromoacetil)- α -aminobutirato de p-nitrofenilo; el grupo bromoacetilo se sitúa cerca del centro activo y puede reaccionar con un nucleófilo cercano, como es el azufre del residuo Met₁₉₂ tal y como muestra el **Esquema 3**. La enzima acilada es aún activa, pero los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten (K_m y k_{cat}) se encuentran alterados puesto que parte del centro activo se encuentra bloqueado.

Es importante también considerar el papel desempeñado por el residuo Gly₁₉₃, que forma un enlace por puente de hidrógeno mediante un grupo -NH- de la cadena polipeptídica y el carbonilo de un sustrato o inhibidor; la Ile₁₆ y el Asp₁₉₄, que forman un par iónico esencial para mantener a la enzima en una conformación activa (66), y por último la Ser₂₁₄ que forma un enlace de hidrógeno mediante un oxígeno carbonílico de la cadena y el -NH- del amido del sustrato (34).



Esquema 3.-Importancia de la metionina en la catálisis.

I.3.2.2.-Mecanismo de acción

El mecanismo cualitativo de hidrólisis de un sustrato polipeptídico por parte de la α -quimotripsina se divide en los siguientes pasos:

a) PASO DE ACILACIÓN

El sustrato se une al centro de unión de la enzima, mediante un puente de hidrógeno entre un hidrógeno del grupo N-acilamino y el grupo carbonilo de la Ser₂₁₄, de forma que el grupo carbonilo reactivo se coloca con su oxígeno entre los -NH- de la cadena de los grupos Ser₁₉₅ y Gly₁₉₃ (**Esquema 4**), originando el complejo ES (paso a₁).

No obstante, es posible que el enlace de hidrógeno entre el oxígeno y la Gly₁₉₃ sea más largo y débil. Ahora se produce el primer paso químico, ataque del hidróxilo de la Ser₁₉₅ al carbono carbonílico para formar un intermedio tetraédrico (paso a₂). Durante este ataque, el protón del hidróxilo es transferido al imidazol de la His₅₇, mientras el residuo Asp₁₀₂ retira el otro protón del anillo de imidazol. De esta forma se ha aumentado la nucleofilia del grupo hidróxilo de la Ser₁₉₅.

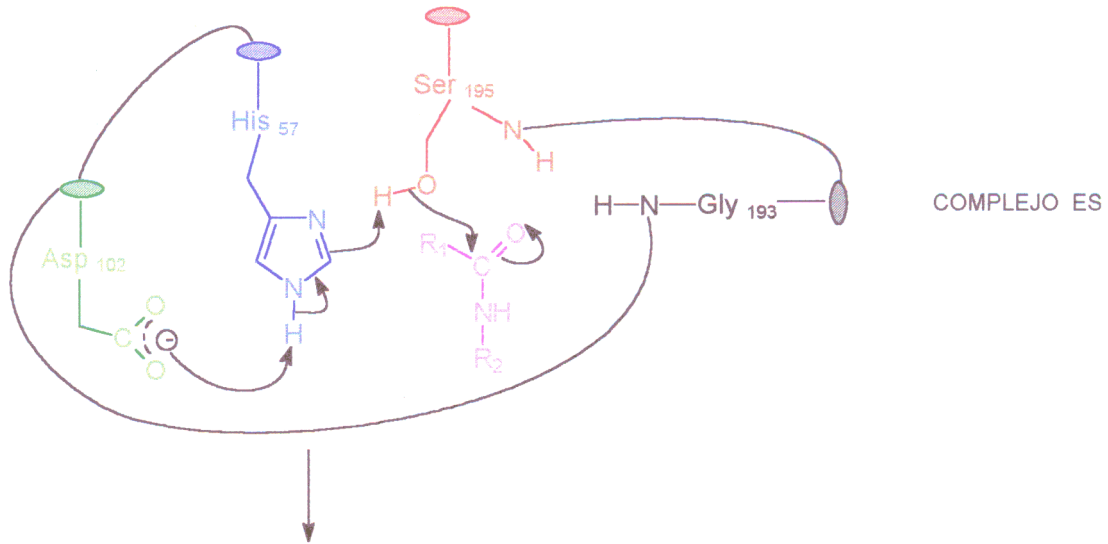
El oxígeno, con su carga negativa, se mueve hacia posiciones más cercanas al -NH- del residuo Gly₁₉₃, formando un enlace de hidrógeno más corto y fuerte. El estado de transición se estabiliza con respecto al complejo ES debido a las mejores interacciones del grupo saliente y el centro activo de la enzima, más concretamente al enlace de hidrógeno con la citada glicina. El intermedio tetraédrico posteriormente se rompe (paso a₃), para formar el complejo acil-enzima produciéndose la liberación del primer producto de la reacción hidrólisis.

En el **Esquema 4** se muestran los pasos (a₁, a₂, a₃) que componen el proceso de acilación.

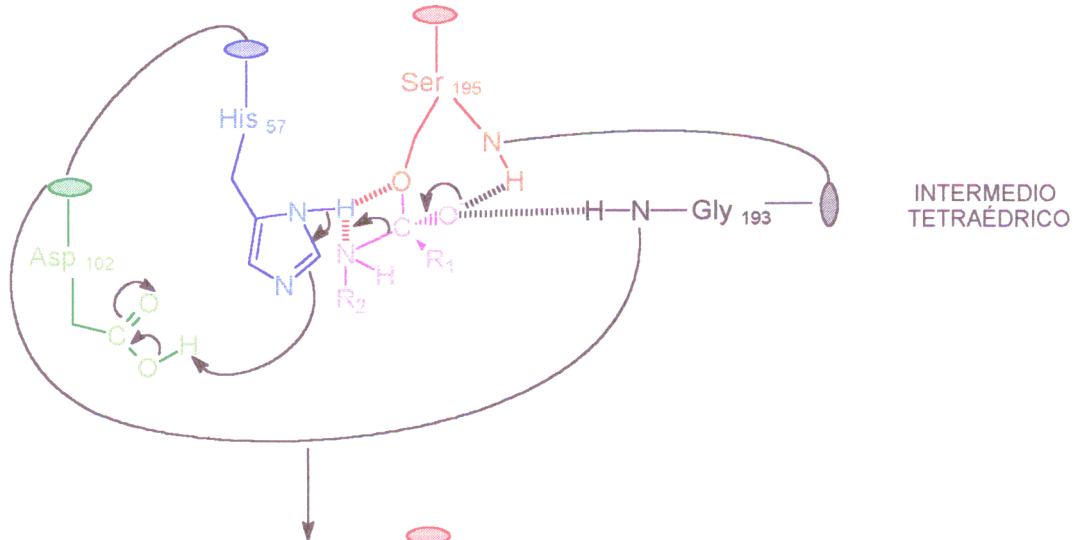
b) PASO DE DEACILACIÓN

El proceso de deacilación supone el ataque de una molécula de agua, que actúa como nucleófilo, atacando al complejo acil-enzima. Según el principio de reversibilidad microscópica, los pasos implicados en esta reacción han de seguir mecanismos similares a los del proceso directo. La activación de la molécula para actuar como nucleófilo se produce de modo similar al hidroxilo de la Ser₁₉₅; de nuevo funciona el mecanismo de desplazamiento de densidad de carga electrónica entre la triada de aminoácidos del centro activo, tal y como se representa en el **Esquema 5**.

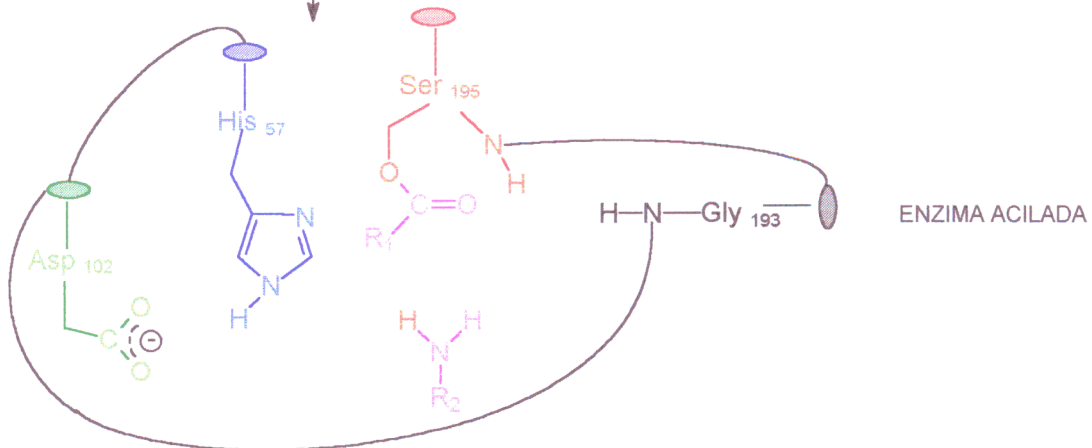
a₁)



a₂)

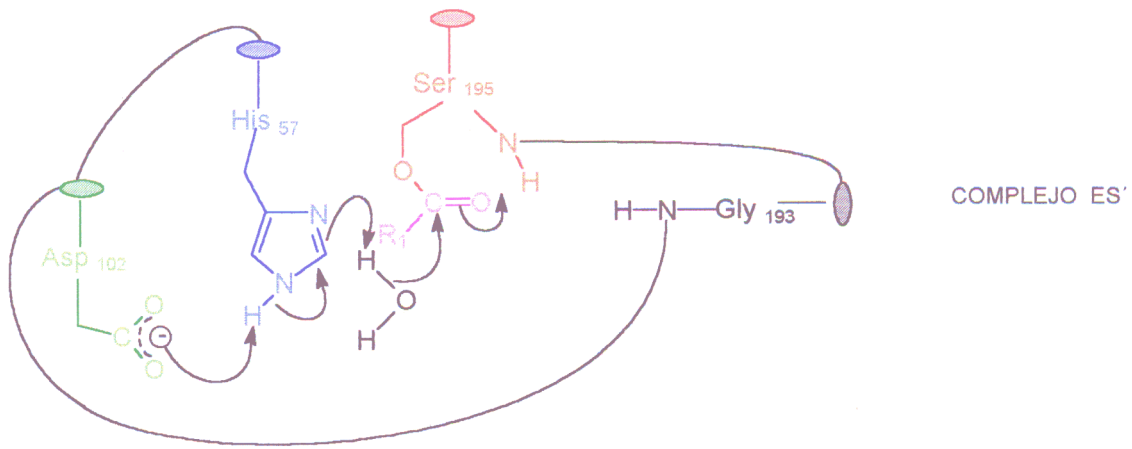


a₃)

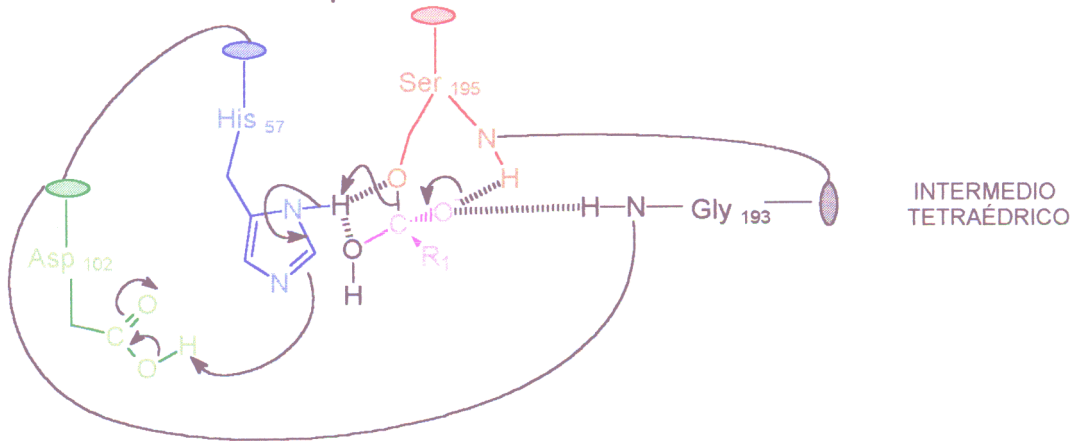


Esquema 4.-Proceso de acilación de la enzima.

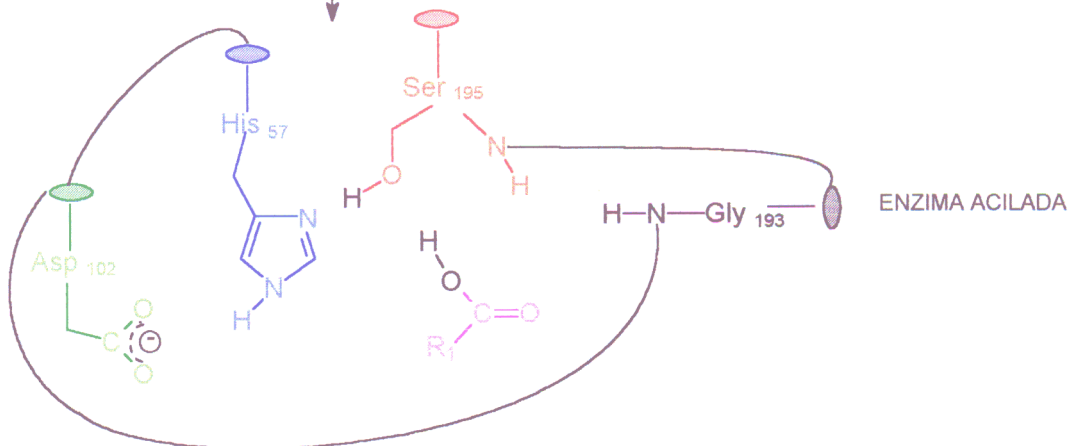
a₁)



a₂)



a₃)

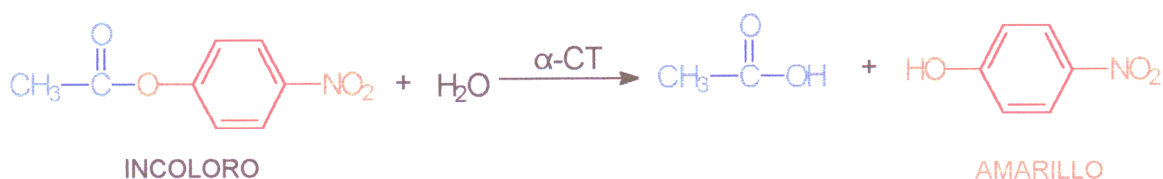


Esquema 5.-Proceso de hidrólisis del complejo acil-enzima.

La eficacia catalítica se produce puesto que el sistema de desplazamiento de densidad electrónica evita la existencia de espacios inestables, que presenten separación de cargas, y facilita el transporte de los protones entre los residuos enzimáticos, sustratos y productos finales.

I.3.3.- REACCIONES DE HIDRÓLISIS

Históricamente, la primera observación de la valoración de la α -quimotripsina, se realizó con el sustrato acetato de p-nitrofenilo (**Esquema 6**), en 1954, en el ya clásico experimento de Hartley y Kilby (67).



Esquema 6.- Reacción de hidrólisis del acetato de p-nitrofenilo.

Es evidente que el éster no puede guardar parecido con el modelo estructural de los sustratos de la α -quimotripsina comentados anteriormente (**Sección I.1.1**). No obstante, el hecho de la gran acidez del p-nitrofenóxido originado ($\text{pK}_a=7.0$) y el gran valor del coeficiente de extinción molar del mismo ($\epsilon_{400\text{nm}} = 18000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) (68), nos permite disponer de un ensayo muy sensible para la monitorización de la hidrólisis catalizada enzimáticamente. Como parece lógico, el acetato de p-nitrofenilo (pNPA) es un pobre sustrato de la enzima. No obstante, cuando se llevaron a cabo estas medidas, se observó un valor matemáticamente distinto de cero al extrapolar (a tiempo cero) los valores de absorbancia frente al tiempo en la curva cinética. Posteriormente se comprobó que dicho valor extrapolado coincidía, al ser transformado a moles de anión p-nitrofenóxido, de manera estequiométrica con la cantidad de enzima empleada, como se muestra en la **Figura 8**.

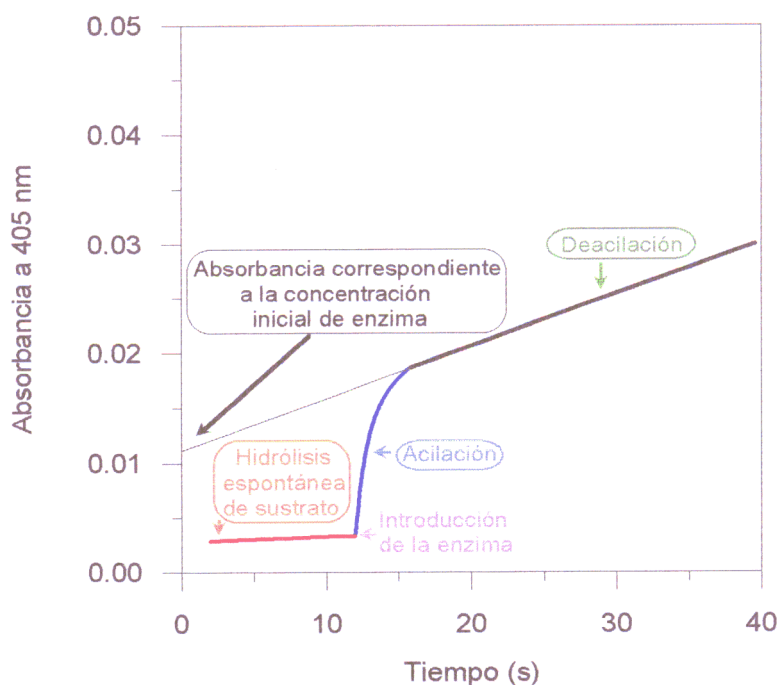
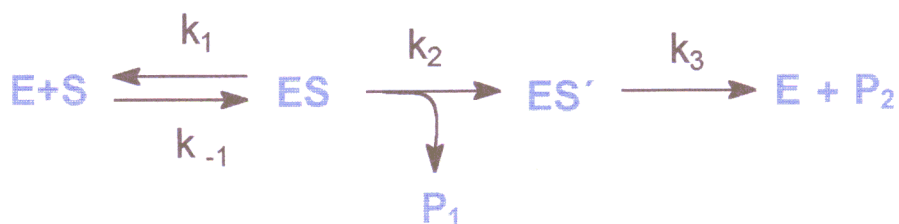


Figura 8.- Cinética de la hidrólisis del éster del acetato de p-nitrofenilo

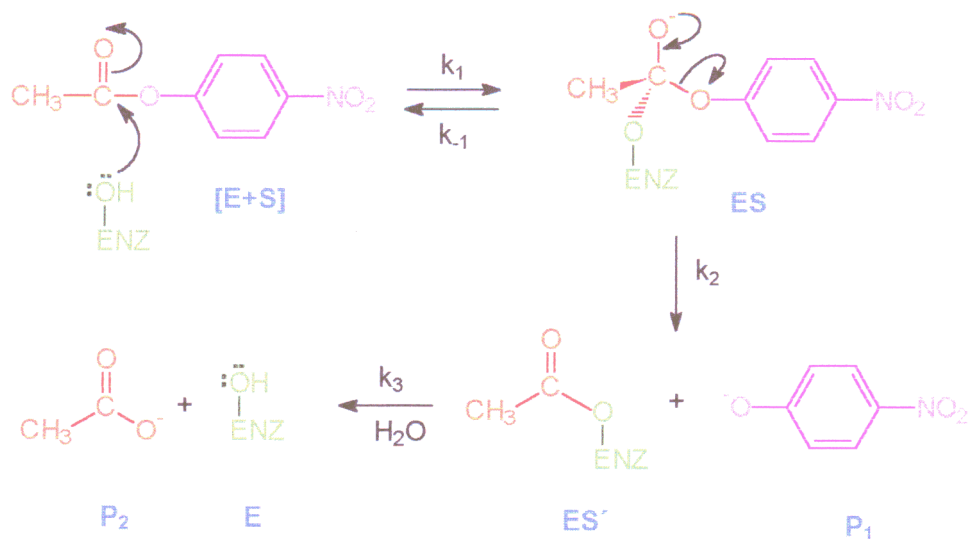
Es difícil admitir que el anión p-nitrofenóxido se produzca de manera instantánea. Presumiblemente, debe formarse a una velocidad rápida pero finita. Así pues, estamos ante una **CINÉTICA BIFÁSICA**, donde se producen dos reacciones a velocidades significativamente diferentes, tal y como se expresa en el siguiente esquema, empleando la nomenclatura clásica de Michaelis-Menten (69).



Esquema 7.- Mecanismo general de hidrólisis.

En este caso, ES' representa un intermedio de reacción que se origina a partir de ES después de que se haya producido algún cambio químico y uno de los productos (P_1) haya sido liberado. Posteriormente, ES' se rompe para liberar la enzima inalterada y el segundo producto

de reacción. Para la α -quimotripsina, según Hartley y Kilby (67), P_1 es el anión p-nitrofenolato y P_2 es el producto final siendo $k_2 > k_3$. Como k_1 es muy rápido, k_3 será el paso determinante de la velocidad de reacción. Por tanto, estos autores postularon el siguiente mecanismo:



Esquema 8.- Mecanismo de la reacción de hidrólisis del acetato de p-nitrofenilo.

ES sería un intermediario covalente del tipo acil-enzima (de geometría tetraédrica) producido por el ataque nucleofílico a través de $-OH$ (grupo nucleófilo) (**Esquema 8**), que desplaza al anión p-nitrofenóxido (un buen saliente) como primer producto. Así, la liberación inicial del p-nitrofenóxido representa una rápida acilación de toda la enzima en disolución, lo que supone una cantidad estequiométrica del producto cromóforo. El siguiente paso (más lento) sería la hidrólisis del complejo acil-enzima (ES') para liberar la enzima y el anión acetato (**Figura 8**).

Este comportamiento fue definido como *explosión inicial* de p-nitrofenóxido ("initial burst") (67), y así se adaptó el término para otras reacciones enzimáticas que presentan el mismo comportamiento (70). Por tanto, se definió el término **VALORACIÓN** para una reacción de este tipo, que origina un producto intermedio fácilmente valorable generalmente por espectrofotometría ultravioleta-visible (71), con las condiciones cinéticas de que $[E] \ll [S]$, $[S] \geq K_m$, y $k_2 \geq k_3$.

Desde que se describió este fenómeno de valoración de la enzima, han aparecido en la

bibliografía otros casos con: cinamato de o-nitrofenilo (72), con N-*trans*-cinamoil-imidazol (73), con un sustrato específico de la α -quimotripsina, el N-acetil-*L*-triptofanato de metilo (66) o con la sultona del ácido 2-hidroxí-5-nitro- α -tolueno-sulfónico (74).

En la hipótesis de Hartley y Kilby se predijo que el complejo ES' debe presentar una geometría covalente. Posteriormente esta hipótesis fue confirmada con diferentes experimentos:

1.-Un estudio cinético mediante la técnica "stopped flow" de la hidrólisis de un tripéptido con elastasa demostró que la descomposición de un intermedio tetraédrico para producir la enzima acilada es el paso limitante de la reacción hidrolítica total (75).

2.-Mediante estudio de Rayos X de complejos formados por tripsina y moléculas proteicas pequeñas que actúan como potentes inhibidores. (76, 77)

3.-Reduciendo la temperatura de la reacción hidrolítica hasta el punto de lograr el aislamiento del complejo tetraédrico (78).

1.3.3.1.- Diferencias entre ésteres y amidas

Dado que el paso fundamental del proceso químico es la acilación de la enzima para originar el complejo acil-enzima, éste es el primer paso a estudiar.

Para ello vamos a comentar brevemente la formación del complejo acil-enzima en la hidrólisis de ésteres y en la hidrólisis de amidas (hidrolisis de péptidos).

El mecanismo de hidrólisis del acetato de p-nitrofenilo se ha usado como modelo para estudiar la hidrólisis de ésteres catalizada por α -quimotripsina (**Esquema 8** anteriormente expuesto). El proceso implica la acetilación del grupo -OH de la Ser₁₉₅ y tiene lugar en dos etapas (79, 80), como ya se ha comentado.

Guntfreund y Sturtevant sugirieron que la hidrólisis de todos los ésteres catalizada por α -quimotripsina tiene el mismo mecanismo que el observado para el caso de la hidrólisis del acetato de p-nitrofenilo (81, 82).

Cuando el sustrato *S* es el éster etílico de la N-benzoil-*L*-tirosina, sustrato que se empleará a menudo en la presente Memoria, P₁ es etanol y P₂ es N-benzoil-*L*-tirosina, k₁ es la constante de disociación del complejo enzima-sustrato y ES' es la enzima acilada, en la que

el oxígeno del -OH de la Ser₁₉₅ está unido al carbono carboxílico de la N-benzoil-L-tirosina.

a) Estudios cinéticos de la hidrólisis de ésteres

La velocidad de hidrólisis de ésteres catalizada por α -quimotripsina se ha medido bien mediante valoración del ácido liberado en la reacción de hidrólisis (83), bien empleado métodos espectrofotométricos (84, 85). Cuando la concentración inicial de sustrato $[S_0]$ es mayor que la concentración de enzima, $[E]$, las representaciones de velocidad frente a concentración de sustratos nos permiten determinar los parámetros cinéticos (86, 87).

Las constantes cinéticas para el proceso indicado anteriormente son:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]} = \frac{k_2 \times k_3}{k_2 + k_3} \quad [1]$$

$$K_m = k_1 \times \frac{k_3}{k_2 + k_3} \quad [2]$$

En este caso, se ha visto que $k_2 > k_3$ con lo que los parámetros cinéticos se pueden escribir como:

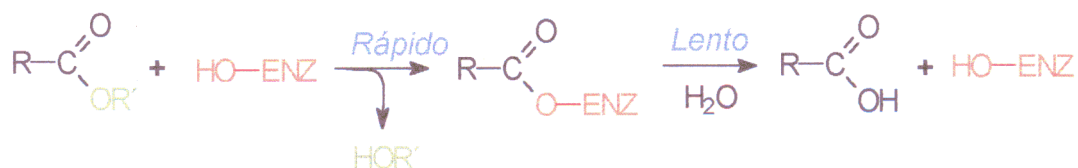
$$k_{cat} = k_3$$

$$K_m = (k_3/k_2)$$

Para explicar la influencia del alcohol en el proceso se ha realizado hidrólisis de diferentes ésteres de N-acetil-L-fenilalanina (R = Metilo, Etilo, o p-nitrofenilo) (88), analizando los valores de k_{cat} para cada uno de ellos, observándose que eran similares, lo que indica que el paso limitante del proceso, por analogía con la hidrólisis del acetato de p-nitrofenilo, debería ser la descomposición del complejo N-acetil-L-fenilalanina- α -quimotripsina.

De todos estos datos se deduce que la hidrólisis de ésteres tiene lugar a través de la formación rápida de un intermedio cuya ruptura es el paso limitante de la velocidad de

reacción (90, 91, 92). Así pues, la hidrólisis de ésteres puede visualizarse como:



Esquema 9.- Hidrólisis de ésteres.

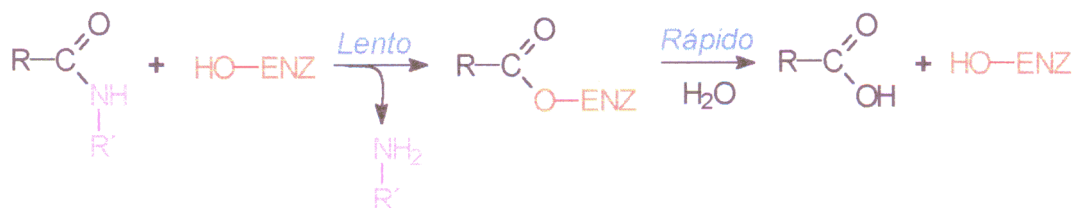
b) Hidrólisis de amidas

En este caso, la formación del complejo acil-enzima es el paso limitante, lo que ha podido deducirse a través de experimentos de equilibrio y cinéticos realizados por diversos autores (93-96). La técnica empleada para medir los parámetros cinéticos es similar a la empleada para los ésteres (97). Según estos datos, la constante de formación de dicho intermedio es más pequeña que la constante de velocidad de deacilación. Además la concentración del complejo acil-enzima debe ser muy pequeña, por lo que puede aplicarse el principio del estado estacionario.

$$k_{\text{cat}} = k_2$$

$$K_m = k_1$$

Por lo tanto, la hidrólisis de amidas puede visualizarse como:

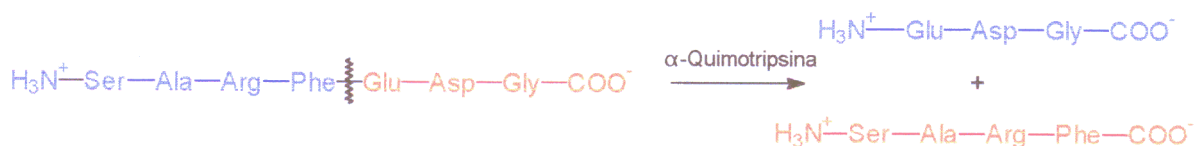


Esquema 10.- Hidrólisis de amidas.

I.3.4.- SELECTIVIDAD DE LA α -QUIMOTRIPSINA

I.3.4.1.- Sustratos específicos

Las proteínas y polipéptidos ingeridos en la dieta alimenticia son los sustratos naturales y fisiológicos de la α -quimotripsina, y sobre ellos actúa como una endopeptidasa con una amplia, aunque fácilmente definible, especificidad. Esta enzima produce la ruptura de los enlaces unidos a residuos aromáticos (y más lentamente, en residuos hidrofóbicos). Por tanto, se romperán enlaces peptídicos donde intervengan con su grupo carboxilo: Phe, Tyr, Trp (33, 96) y en un proceso que requiere un mayor período de incubación; His (97), Leu (97, 98), Met (99), Ala y Gly (100), siendo la hidrólisis de los ésteres de esta última 100 veces más lenta que la de los ésteres de Ala.



Esquema 11.-Representación de la ruptura de un enlace peptídico, a nivel de un aminoácido aromático llevada a cabo por la α -quimotripsina.

Esto hace que se considere a la α -quimotripsina como una proteasa que actúa sobre aminoácidos hidrófobos, cuando estos participan en el enlace amido con su grupo carboxílico. La cadena lateral del sustrato no precisa la presencia de un grupo aromático, ya que se ha comprobado que al sustituir el anillo de benceno de la fenilalanina por un resto ciclohexilo la velocidad de hidrólisis no varía apreciablemente (100, 101). Estos resultados son consecuentes con la información que se tiene acerca de la forma y la naturaleza hidrofóbica de la zona de unión de los sustratos a la α -quimotripsina.

Niemann, Cohen y cols. emprendieron un reconocimiento a gran escala de la topografía del centro activo de la α -quimotripsina (15, 102, 103). Este tema fue también tratado por Cunningham (104). A partir de estos trabajos se desarrolló el concepto de la presencia de

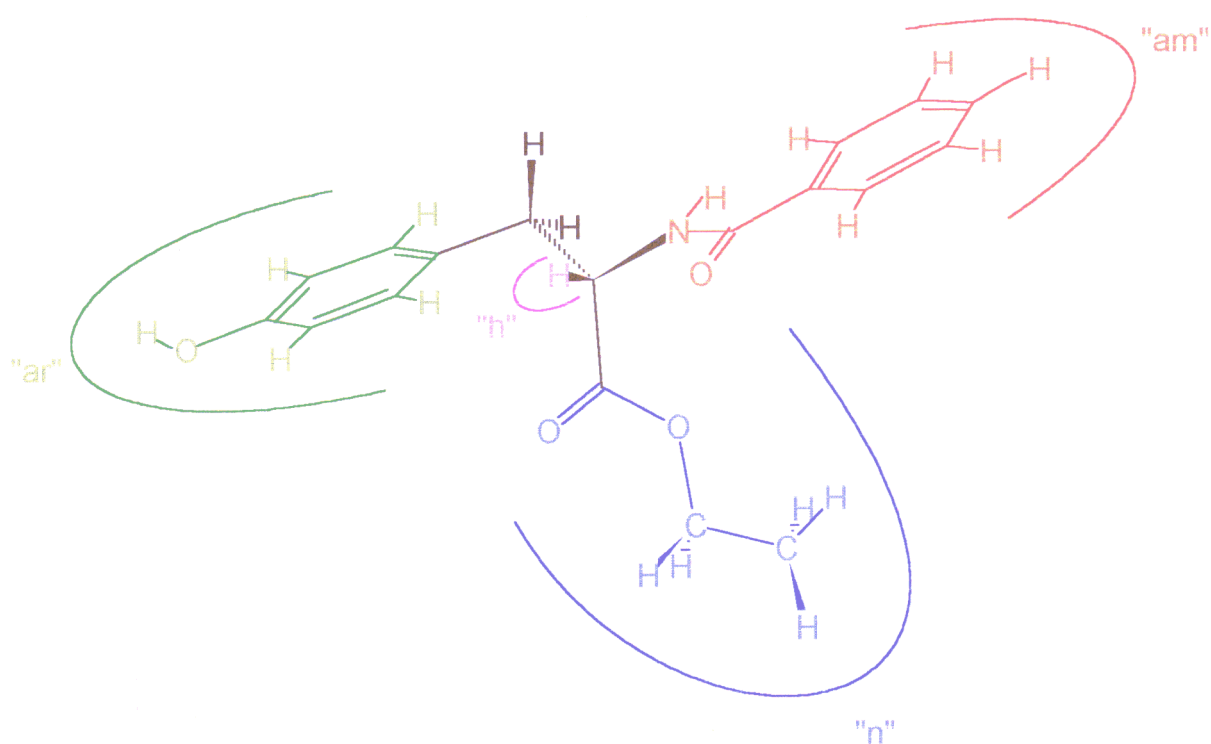
cuatro sub-centros orientados hacia los vértices de un tetraedro en el cual el carbono asimétrico es el centro (**Esquema 12**). Cohen indicó que en cada uno de esos cuatro lugares se colocaba un determinado grupo funcional:

"ar" grupo arilo

"am" grupo acilamido

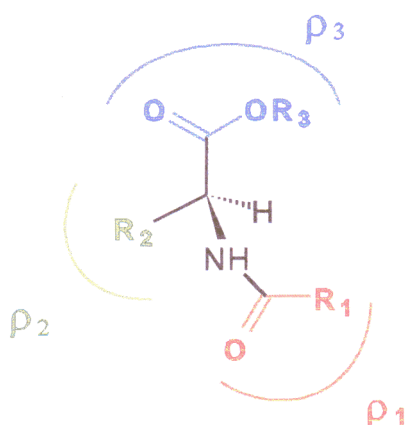
"n" lugar hidrolítico

"h" *L*-hidrógeno



Esquema 12.- Estructura del centro activo de α -quimotripsina, con el sustrato N-benzoil-*L*-tirosinato de etilo (BTEE) situado en él.

Existe otra nomenclatura que describe los distintos subsitios del centro activo, y empleamos para discutir la forma de unión del sustrato a la α -quimotripsina, a la cual nos referiremos al discutir la unión de sustratos no naturales al centro activo de la enzima. Así, los aminoácidos de la serie *L*, se unirían a la enzima para ser hidrolizados según el **Esquema 13** (105):



Esquema 13.- Unión de los aminoácidos de la serie *L* al centro activo de la α -quimotripsina.

Los derivados de la Tirosina-O-alkilada (106) y p-Iodo-*L*-fenilalanina (51) se hidrolizan muy lentamente. Este hecho concuerda exactamente con los resultados cristalográficos que indican que los sustratos que tienen cadenas laterales muy largas no encajan correctamente en el centro "ar" y por tanto se hidrolizarán más lentamente.

Los sustratos que llevan radicales unidos al carbono- β de la cadena lateral (Valina, Isoleucina y β,β -Dimetil-fenilalanina) se unen peor a la enzima y, por tanto, se hidrolizan más lentamente que los correspondientes sustratos no ramificados.

La metilación del carbono α tiene un fuerte efecto sobre la actividad enzimática, ya que disminuye la velocidad de hidrólisis tres órdenes de magnitud respecto a la fenilalanina, aunque no afecta apenas a la fuerza de enlace del sustrato con el enzima (106, 107).

La conformación del N-formil-*L*-triptófano observada en estudios cristalográficos indica que el hidrógeno- α está en contacto con el oxígeno carbonílico del grupo formilo (18). Esta

observación sugiere que el impedimento estérico en esta posición no permite al grupo acilamido del carbono- α alcanzar la conformación adecuada, impidiendo así que el enlace sensible al proceso de hidrólisis adopte la correcta conformación para ser hidrolizado.

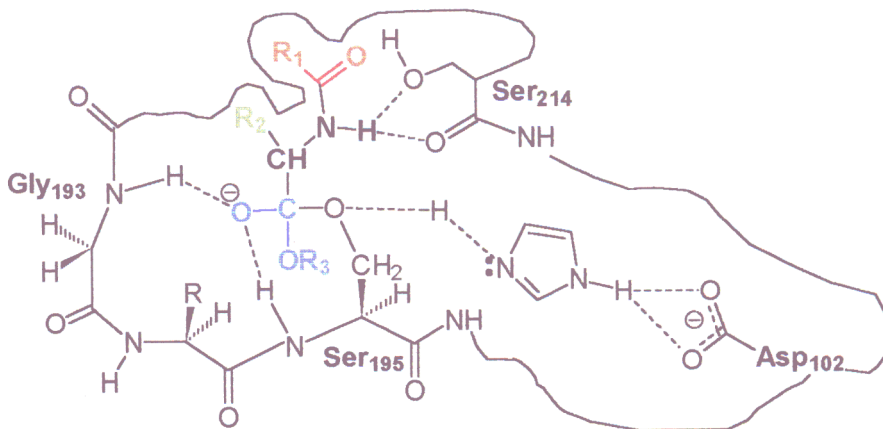
El grupo acilamido, que está unido al residuo aminoacídico específico, tiene un importante efecto sobre la reactividad de la α -quimotripsina. La sustitución de ese grupo amido -NH- por un éster (108) o por un grupo metileno (102) o incluso la presencia de un resto metilo en el citado grupo amido provocan una disminución en la reactividad y en la estereoespecificidad de la α -quimotripsina (102, 106, 109). Ingles y Knowles (50) demostraron que el aumento de la reactividad de los sustratos con grupo amido no era debido a que se unieran más fuertemente a la enzima, sino que era el resultado de una orientación más favorable de estos sustratos específicos. Estos autores demostraron que la energía de la interacción enzima-acilamido era similar a la del enlace de hidrógeno y sugirieron que esa energía de enlace era compensada forzando al sustrato a una configuración de alta energía.

Mediante estudios cristalográficos se ha visto que el grupo amido del N-formil-L-triptófano está orientado de tal forma que puede establecer un enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo de la Ser₂₁₄ (18). Si el resto aromático de un sustrato específico está unido firmemente al centro "ar", entonces la función acilamido podría evitar la rotación alrededor del enlace α - β del residuo aminoacídico, y así el enlace que va a ser hidrolizado adoptaría la orientación adecuada para la actuación hidrolítica de la enzima.

Los resultados cristalográficos sobre la unión de sustratos a la α -quimotripsina son confusos debido a la interacción con Tyr₁₄₆ de una molécula de agua adyacente al entorno de la zona de interacción del acilamido. Por ello, los datos de Rayos X no dan evidencia acerca de la adquisición de una conformación de alta energía por parte del sustrato, si bien tampoco la excluyen de la unión.

Norin y cols. (110) empleando la metodología de la Mecánica Molecular (M.M.) han postulado semicuantitativamente la estereoquímica de los sustratos susceptibles de hidrólisis de ésteres catalizada por α -quimotripsina. Estos autores proponen un esquema del estado de transición más detallado que el indicado por Hansch y cols (111) para explicar la enantiopreferencia observada, analizando las interacciones de los grupos que rodean al centro

estereogénico y los diversos aminoácidos del centro activo de la enzima. Este modelo aparece representado en el siguiente esquema:

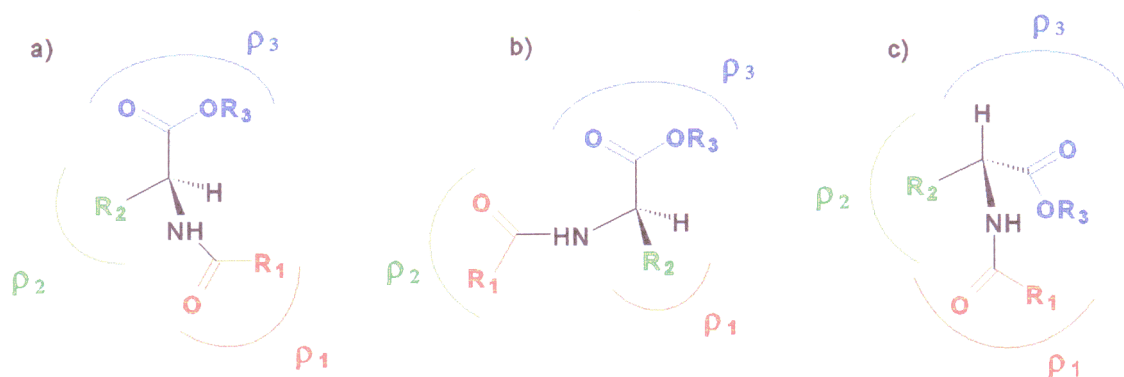


Esquema 14.- Estereoquímica de los sustratos susceptibles de hidrólisis de ésteres catalizada por α -quimotripsina, según el modelo de Norin y cols.

La α -quimotripsina presenta estereopreferencia por los aminoácidos de la serie *L* (112, 113). La hidrólisis, catalizada por α -quimotripsina, del éster etílico de la N-acetil-*D*-fenilalanina es del orden de 10^6 - 10^7 veces más lenta que la de su correspondiente isómero *L* (115). En los derivados de N-formil-fenilalanina, la velocidad de hidrólisis del isómero *L* es 10^4 veces mayor que la del isómero *D* (105). Los estereoisómeros *D* se comportan como inhibidores competitivos; además, los isómeros *D* se unen ligeramente peor a la enzima que los correspondientes isómeros *L* (114, 115). Niemann sugirió que los sustratos *D* se unirían de forma normal a los lugares de enlace "ar" y "n" de la enzima, pero la unión por los lugares del grupo acilamido y el hidrógeno- α serían anormales (105). La lenta hidrólisis de esos sustratos *D* se explicaría basándose en la importancia de esas dos interacciones para la actividad hidrolítica. Cohen sugirió que el hidrógeno- α ocupa el subsitio "h" en el centro activo y esto provoca que la cadena lateral de los estereoisómeros *D* de los sustratos naturales se coloque en el lugar "ar" provocando que los centros hidrolítico y aminoacilo (116) no tengan los grupos funcionales que le son propios.

Los intentos de unir sustratos *D* análogos al centro activo de cristales de α -quimotripsina han sido un fracaso, quizá debido a la inestabilidad de los cristales.

Se ha propuesto una forma alternativa de enlace que parece ser más probable. Los lugares "ar" y "am" estarían ocupados por el grupo arilo y el amido; y el hidrógeno- α estaría apuntando hacia la Ser₁₉₅ y el enlace éster o amido hacia la parte externa de la molécula. La forma sugerida por Niemann anteriormente, con el lugar "ar" ocupado y con el grupo éster o amido correctamente orientado para la hidrólisis parece ser posible en el caso de los compuestos *D* (15). Esta particular conformación podría ser extraña debido a la no influencia de la orientación del grupo amido, pero estos resultados estructurales no indican que la acilación de los sustratos *D* sea imposible, aunque los dos efectos mencionados podrían hacer que tuviera lugar lentamente. Hansch y cols. (111), han postulado, después de un concienzudo estudio Q.S.A.R sobre las hidrólisis de ésteres de aminoácidos *D* y *L* los requerimientos geométricos que se necesita para que el éster interaccione con la α -quimotripsina, en estado nativo, como sustrato o inhibidor.



Esquema 15.- Disposición de los sustratos, aminoácidos de las series *D* (a) y *L* (b), y de un inhibidor (c), en el centro activo de la α -quimotripsina.

Las cinéticas de hidrólisis del N-acetil-(*D,L*)-triptófano de p-nitrofenilo indican que los donadores de acilo reaccionan con la Ser₁₉₅ rápidamente para dar un complejo N-acetil-(*D,L*)-triptófano-enzima, siendo el complejo *D*-acilenzima el que se hidróliza más lentamente (117). Este aspecto de la estereoespecificidad se ha cuantificado mediante el estudio de las

velocidades de deacilación de los complejos (*D* y *L*)-acil- α -quimotripsina procedentes del proceso de hidrólisis de los ésteres de p-nitrofenilo de algunos aminoácidos naturales (118).

La velocidad de deacilación del complejo acil-enzima depende directamente de la fuerza de enlace de la cadena lateral del aminoácido, aumentando en la serie *L* y disminuyendo en la serie *D*. Las diferencias de velocidad observadas para la deacilación de los distintos aminoácidos de la serie *L* dependen fundamentalmente de factores entrópicos (119).

El valor obtenido en el proceso de hidrólisis de los derivados del *L*-triptófano implica que la orientación es casi perfecta para la deacilación del complejo acil-enzima por el agua (51).

I.4.- SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CATALIZADA POR ENZIMAS

I.4.1.- PROTEASAS EN LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS: LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS

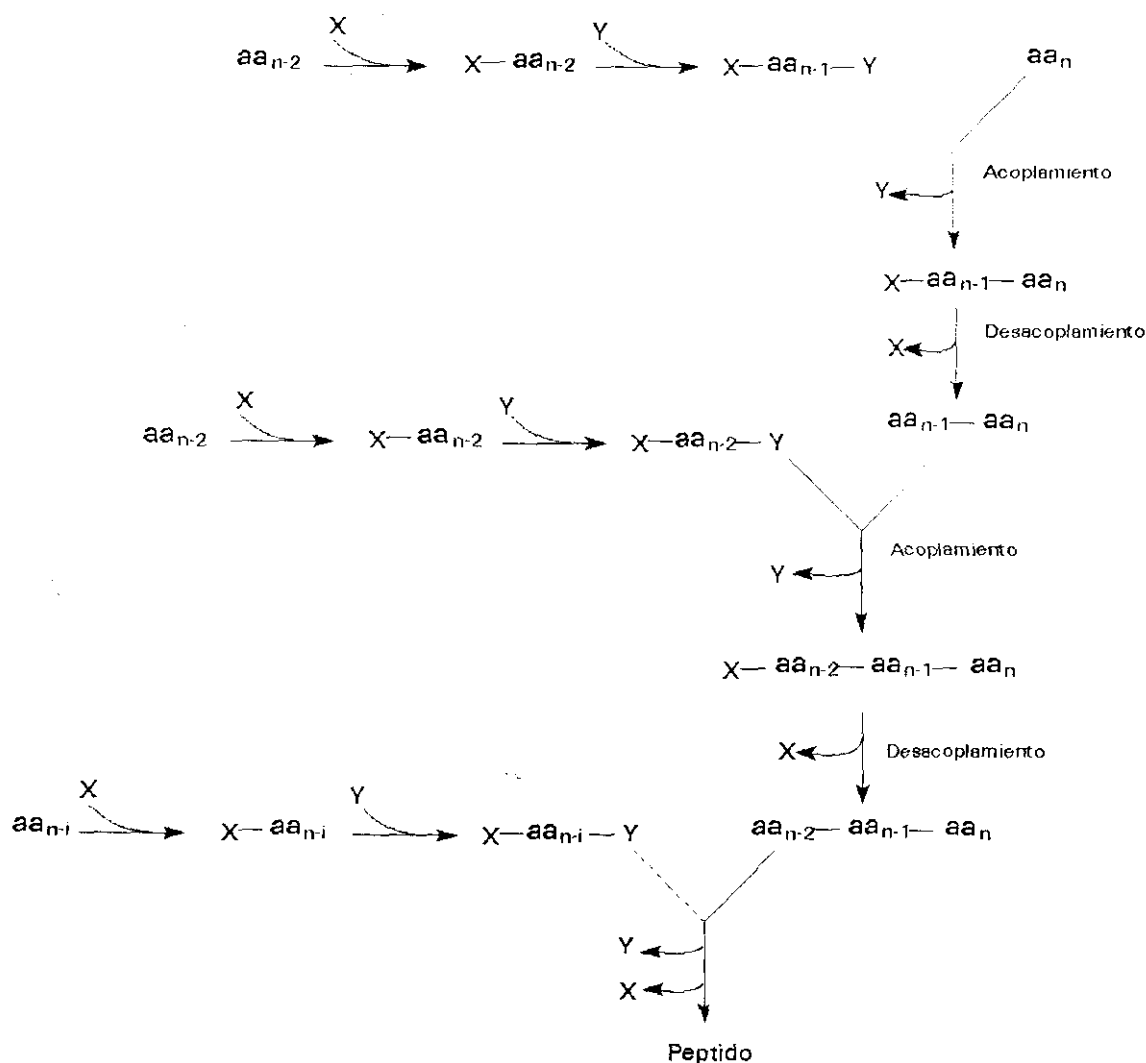
Los péptidos son polímeros de aminoácidos de pequeño peso molecular (desde 2 hasta 100 residuos aminoácídicos), que presentan una enorme versatilidad funcional. Estos pueden: estimular o inhibir la liberación de hormonas, actuar como edulcorantes, toxinas, agentes quimiotácticos, factores de crecimiento, analgésicos, neurotransmisores, etc. (120). El interés por el estudio y síntesis de péptidos ha ido paralelo con la velocidad con que se van descubriendo nuevos péptidos biológicamente activos. Así mientras en una revisión publicada en 1953 "Naturally Occurring Peptides" (121), se presentan las estructuras conocidas de solamente seis péptidos, hoy día la cifra es del orden de millares de péptidos conocidos.

Recomendamos al lector el excelente trabajo de revisión bibliográfica recientemente publicado por Vulfson y cols., en el cual se citan innumerables ejemplos de péptidos biológicamente activos (122).

La variedad de propiedades biológicas de los péptidos hace que la síntesis, tanto de péptidos naturales, como de análogos sintéticos, tenga un enorme interés y diferentes campos de aplicación. Un ejemplo de ello sería el uso de péptidos sintéticos como agentes terapéuticos, v. g., los análogos sintéticos de hormonas peptídicas, que podrían tener nuevas e importantes

propiedades farmacológicas: mayor potencia de acción, diferente especificidad biológica, mayor estabilidad, etc.

La automatización de la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida descrita por Merrifield (123) ha permitido en la actualidad obtener péptidos mediante un proceso sencillo y automatizado, el cual aparece reflejado en el **Esquema 21**.



Esquema 21.- Síntesis en fase sólida, X e Y son reactivos de protección y activación respectivamente

No obstante, este proceso presenta algunas desventajas frente a otros métodos de síntesis de péptidos, como se puede observar en la **Tabla 7**, en la que se comparan entre sí los diferentes métodos de inmovilización.

Tabla 7.- Comparación de los diferentes métodos empleados actualmente en la síntesis de péptidos (122).

Condiciones generales	Síntesis química en fase sólida	Síntesis química en fase líquida	Síntesis enzimática	Ingeniería Genética
Escala típica	mg., dg. ó g.	g., kg. ó tonel.	g., kg. ó tonel.	g., kg. ó tonel.
Longitud del péptido	de medio a largo	de corto a medio	corto	largo y proteínas
Limitaciones de la secuencia	ninguna	ninguna	alguna ¹	ninguna
Protecciones	global	parcial o global	minima	ninguna
Coste de sustratos y reactivos	muy caro	caro	relativamente barato	barato
Condiciones de reacción	peligroso ²	peligroso ²	suave/no peligroso	suave
Racemizaciones	algunas	algunas	ninguna	ninguna
Pureza ³	muy elevada	elevada	media/elevada	baja/media
Estado de desarrollo	bien establecido	bien establecido	avanzado	comenzando
Aplicaciones	restringida a investigación	muy empleada en investigación e industria	algunos usos industriales	muy empleada en investigación e industria
Futuras perspectivas	debido a su elevado coste, se emplea para obtener productos farmacéuticos de elevado valor	péptidos cortos o medios de uso farmacéutico con elevado valor	Alimentos y productos farmacéuticos de medio a alto valor, atractiva para la producción de aditivos alimentarios	método ideal para péptidos largos y proteínas

¹ Problemas en la unión de aminoácidos tales como prolina e hidroxiprolina.

² La naturaleza tóxica de los reactivos empleados tanto para las protecciones y desprotecciones hace que este método sea peligroso para la salud.

³ Rendimiento de la secuencia deseada.

Numerosos son los procesos de síntesis peptídica catalizados por α -quimotripsina como demuestra la **Tabla 8**, en la cual se resumen algunos procesos catalizados por proteasas.

Tabla 8.- Ejemplos de síntesis de péptidos biológicamente activos, empleando proteasas (122).

Péptido	Secuencia	Síntesis	Enzimas ¹
Aspartamo	Asp-Phe	Total	Tl
Kiotorfina	Tyr-Arg	Total	α -CT
edulcorante de lisina	Phe-Lys	Total	α -CT
Péptido nutricional	Tyr-Trp-Val	Total	α -CT, Pa
γ -MSH de bovino (9-12) ²	His-Phe-Arg-Trp	Total	α -CT, Tl, Tr
γ -MSH de bovino (13-16) ²	Asp-Arg-Phe-Gly	Total	α -CT, CY, Tr
Leu-enkefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	Total	α -CT, Pa
2-D-Ala, 5-D-Leu-enkefalina	Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu	Parcial	α -CT, Tl
Dinorfina (1-8)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile	Total	α -CT, Pa, Tr
Colecistoquinina (26-33)	Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe	Parcial	α -CT, Pa, Tl
FCE de ratón ³	His-Ile-Glu-Ser-Leu-Asp-Ser-Tyr-Thr-Cys	Parcial	Cp, CY, Tr, V8
Antígeno de Hepatitis B (122-129)	Arg-Thr-Cys-Met-Thr-Thr-Ala-Gln	Total	CY, Pa, Tr
Somatostatina ⁴	(-Ala-Gly-Cys-Lys-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-)	Parcial	α -CT, Tl, Tr

¹ Abreviaturas: Cp, quimopapaina; α -CT, α -quimotripsina; CY, carboxipeptidasa Y cíclica; Pa, papaina; Tl, termolisina; Tr, tripsina; V8, proteasa V8.

² Fragmento de la hormona γ -melanocito estimulante.

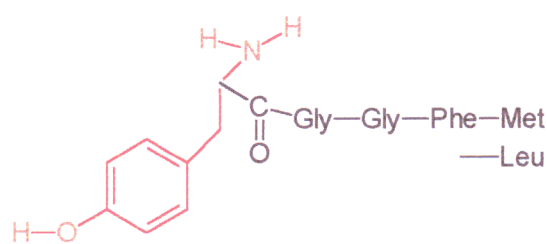
³ Fragmento del factor de crecimiento epicraneal de ratón.

⁴ Péptido cíclico unido a Ala-Cys.

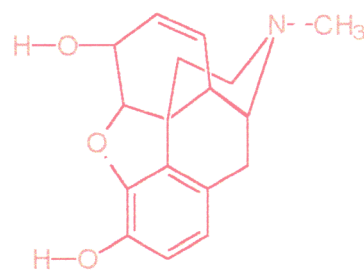
Actualmente, muchos autores emplean dipéptidos modificados; como precursores de productos cíclicos con interés terapéutico (con grupos funcionales o radicales que no aparecen

habitualmente en estos aminoácidos) y requieren un manejo especial, para mantener inalterados ciertos residuos, para lo cual la especificidad de las enzimas facilitaría enormemente el proceso (124).

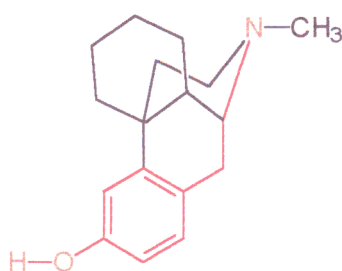
Otro ejemplo en el que la síntesis de péptidos catalizada por proteasas resulta interesante, es la obtención de péptidos opioides (kiorfina, encefalinas, endorfinas etc.) (125), los cuales presentan una gran similitud morfológica con fármacos opiáceos, como se demuestra en la **Esquema 22**:



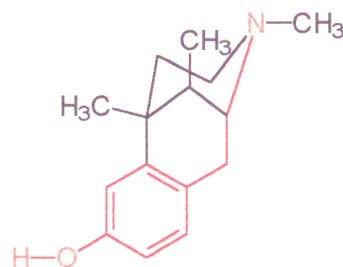
Encefalinas



Morfina



Levorfanol



Metazocina

Esquema 22.- Semejanzas entre las estructuras de péptidos opioides y fármacos opiáceos.

Así, pequeños cambios en estas moléculas pueden causar grandes alteraciones en actividad, llegando incluso a la obtención de inhibidores (**Tabla 9**), por lo cual el empleo de enzimas específicas, que no modifiquen los grupos funcionales de los aminoácidos o de sus derivados, resulta realmente atractivo (126).

Tabla 9.- Potencia relativa de varios péptidos y derivados respecto a la Met-enkefalina (126).

Estructura	Vaso deferente	Ileón de Cobaya
Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu	8.3	1.8
I-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu	0.6	0.5
I ₂ -Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu	0.02	0.2
Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Met-NH ₂	3.8	7.7
Tyr-D-Met-Gly-Phe-Leu-OMe	2.9	0.06
Tyr-D-Met-Gly-Phe-Leu-NH ₂	3.6	2.7
Tyr-D-Met-Gly-Phe-Pro-NH ₂	0.9	0.02
N-Me-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-NH ₂	6.4	0.01
N-Me-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-NH ₂	0.8	4.8
Tyr-D-Ala-Gly-Δ ¹ -Phe-Met-NH ₂	—	8.6

Pero donde la síntesis de péptidos catalizada por enzimas resulta realmente interesante es en procesos de tipo convergente, en los que dos péptidos se unen para originar otro de mayor tamaño, como muestra la **Tabla 10**.

Tabla 10.- Ejemplos de semisíntesis y modificación de proteínas empleando proteasas (122).

Péptido/proteína	Condensación/modificación	Enzima ¹
Ribonucleasa A bovina	(1-19)-Ala + Ser-(22-124)	Su
Nucleasa de estafilococo	(6-48)-Lys + Gly-(51-149)	Tr
Citocromo C equino	(1-37)-Arg + Lys-(40-104)	Cp
Somatotropina humana	(1-133)-Arg + Thr-(136-191)	Tr
Análogo de insulina humana	(Des-B23-B30)-Arg + Gly-(B23-B30)	Tr
(F-His ¹²)-(F-His ¹¹⁹) y (F-His ^{12,119})-RNasa ²	(1-20) + (21-51) + (52-63) + (64-76) + (77-97) + (98-115) + (116-124) ³	Sl
Insulina humana	(B30-Ala)-insulina porcina a (B30-Thr)-insulina humana	Ap
Hemoglobina-(Gly ^{α142})	Hb-Arg(141) a Hb-Arg(141)-Gly-NH ₂ (142)	Tr
FRHC(1-29)NH ₂ ⁴	FRHC(1-28)-Ala a FRHC(1-28)-Arg	CY

¹ Abreviaturas: Ap, proteasa de *Acromobacter*; Cp, quimopapaína; carboxipeptidasa Y cíclica; Sl, subtiligasa; Su, subtilisina; Tr, tripsina.

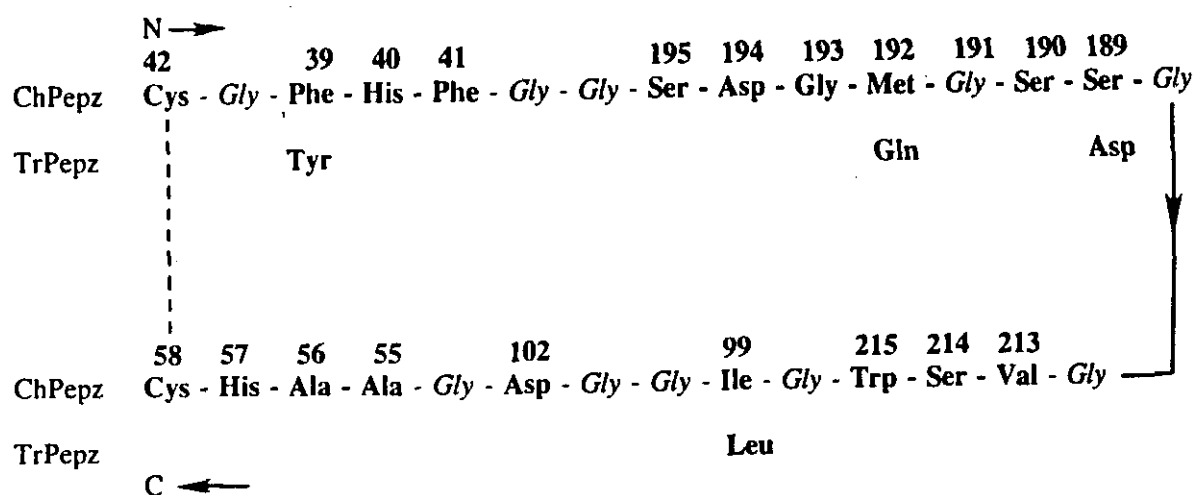
² Ribonucleasa A con residuos de histidina reemplazados por 4-fluor-histidina (F-His).

³ Condensaciones llevadas a cabo desde C terminal a N terminal.

⁴ Factor regulador de la hormona del crecimiento.

Finalmente, los recientes estudios basados en el conocimiento del centro activo de muchos biocatalizadores, así como la aparición de nuevas moléculas, augura un prometedor futuro a la catálisis con enzimas.

Dentro de esta línea destacan los trabajos de B. W. Matthews y cols. (127), los cuales han llevado a cabo síntesis de dos oligopéptidos cíclicos de 29 aminoácidos con actividad catalítica semejante a la α -quimotripsina o a la tripsina. Para ello, estos autores han demostrado que basta con modificar 4 aminoácidos (Esquema 23).



Esquema 23.- Representación de oligopéptidos, con actividad similar a la α -quimotripsina (ChPepz) y a la tripsina (TrPepz) (127).

1.4.2.- MECANISMOS DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS

Durante los últimos años han aparecido en la bibliografía muchos trabajos en los que se demuestra que las proteasas, cuya misión *in vivo* es la hidrólisis de péptidos, pueden utilizarse para catalizar el proceso inverso (síntesis de péptidos) (128-132). Esta metodología tiene interés práctico en el caso de la síntesis convergente de péptidos (133) o bien si se emplean aminoácidos funcionalizados, situaciones éstas en que la síntesis en fase sólida tipo Merrifield (123) tiene severas limitaciones.

Actualmente se emplean numerosas proteasas en la síntesis de hormonas peptídicas (134), neuropéptidos (135), edulcorantes tales como el aspartamo (136) y algunas otras proteínas como las que se emplean en la semisíntesis de la insulina humana (122).

Las proteasas pueden catalizar la síntesis de péptidos por dos metodologías diferentes:

- 1) Síntesis cinéticamente controlada.
- 2) Síntesis termodinámicamente controlada.

Estos dos procesos aparecen reflejados en la **Figura 9**.

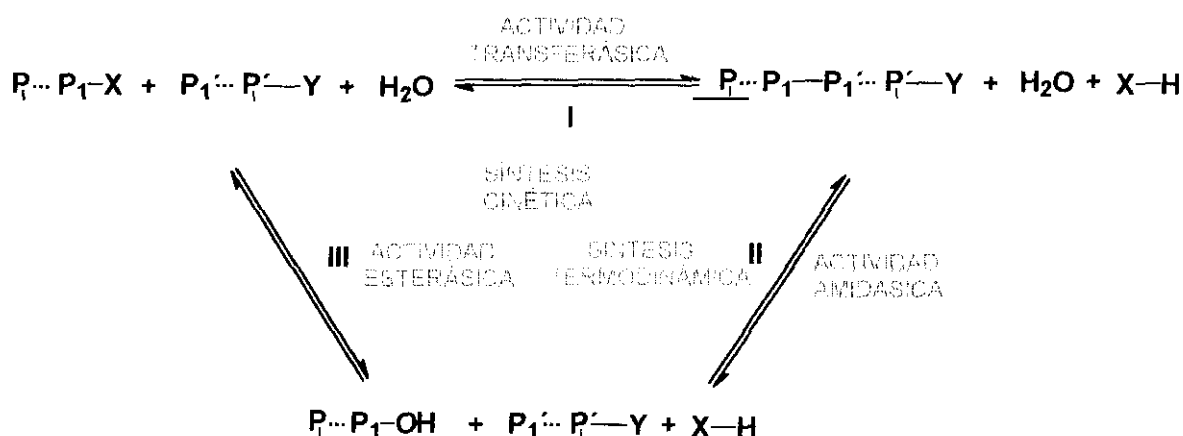


Figura 9.- Síntesis del péptido $\text{P}_1 \cdots \text{P}_1\text{-P}_1' \cdots \text{P}_1'\text{-Y}$ por ambas metodologías: Síntesis cinéticamente controlada (I+II+III) y síntesis termodinámicamente controlada (II).

El proceso cinéticamente controlado (I-III) intenta mimetizar a la naturaleza y requiere la presencia de un donador de acilo activado, generalmente en forma de éster (péptido o aminoácido), el cual transfiere un grupo acilo a otro sustrato que actúa como nucleófilo (aminoácido o péptido) (reacción I). En esta reacción, la proteasa actúa como transferasa. Compitiendo con esta reacción está la hidrólisis del éster (reacción III). El péptido producto también puede ser sustrato de la enzima y puede hidrolizarse (reacción II). El rendimiento total de la reacción depende entonces de la relación entre las constantes aparentes de velocidad transferásica e hidrolítica $(k_T/k_H)_{app.}$, y la velocidad con la que el producto es hidrolizado. Cuando la relación $(k_T/k_H)_{app.}$ es elevada, el producto $P_1...P_1-P_1'...P_1'-Y$ puede obtenerse con altos rendimientos incluso a pesar de que los productos $P_1...P_1-OH$ y $P_1'...P_1'-Y$ sean los termodinámicamente estables. Es por ello por lo que esta metodología se conoce también como "modelo cinético" ó de "no equilibrio", y conduce a los máximos rendimientos en péptido a cortos tiempos de reacción.

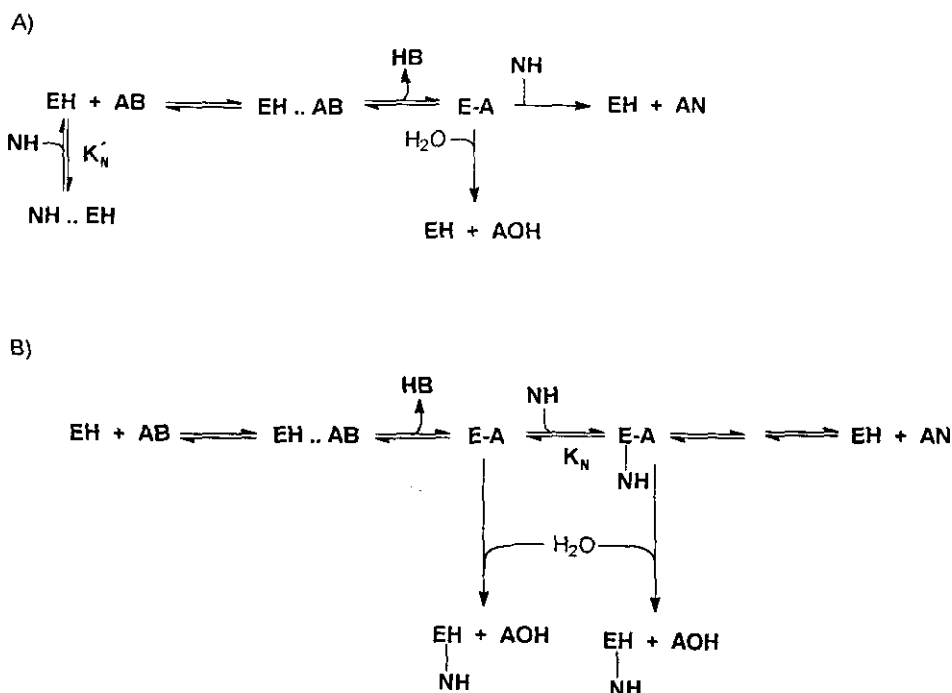
Esta formación de péptido en ausencia de equilibrio de concentraciones requiere de sustratos activados; por el contrario, el proceso termodinámico se consigue por reacción directa del ácido (molécula donadora de acilo, $P_1...P_1-OH$) y el nucleófilo ($P_1'...P_1'-Y$, reacción II). En este caso la proteasa actúa como una verdadera "péptido sintetasa" deteniéndose el proceso cuando se alcanza el equilibrio entre los moles de péptido sintetizados e hidrolizados; aunque la enzima no interviene en el equilibrio, influye en la reacción aumentando la velocidad con la cual éste se establece (Figura 9, reacción II).

Centrándonos en el proceso cinéticamente controlado, diremos que para que una proteasa pueda utilizarse como catalizador de este proceso se necesita que la relación entre las constantes de velocidad transferásica e hidrolítica $(k_T/k_H)_{app.}$, sea superior a 1000 (137). Estos valores tan elevados son necesarios para minimizar la transferencia del grupo acilo a la molécula de agua (hidrólisis), a bajas concentraciones de péptido ($< 10^{-3}$). Esto solamente lo cumplen las proteasas que forman un intermedio covalente acil-enzima y por lo tanto, son las que pueden ser usadas para catalizar una síntesis de péptidos cinéticamente controlada.

I.4.2.1.- Síntesis cinéticamente controlada (S.C.C.)

Existen dos mecanismos para las reacciones de condensación catalizadas por serin-proteasas, los cuales han sido ampliamente estudiados por Riechman y Kasche (138-140). El primero (**Esquema 16-A**) precisa la adsorción del nucleófilo (NH) en el centro activo antes de que tenga lugar la formación del complejo acil-enzima (EA). Según este mecanismo, la velocidad de síntesis de péptido será siempre proporcional a la concentración de nucleófilo que actúa como reactivo y activador enzimático.

En el otro mecanismo (**Esquema 16-B**), la adsorción del nucleófilo tiene lugar una vez formado el complejo acil-enzima (EA) (141, 142). El producto de condensación deseado sólo puede formarse a partir de este complejo ternario. Este mecanismo implica dos intermedios reactivos enzima-sustrato (E-A y E(NH-A)) capaces ambos de reaccionar con el agua.



Esquema 16.- Posibles mecanismos para la semisíntesis de péptidos catalizada por serin-proteasas. Símbolos, EH, enzima; AB, donador de acilo; HB, grupo saliente, alcohol; E-A acil-enzima; NH nucleófilo; AOH, producto de hidrólisis; AN producto de condensación; K_N , constante de equilibrio de unión del nucleófilo al complejo acil-enzima y K_N constante de equilibrio de unión del nucleófilo a la enzima.

En este tipo de mecanismos el rendimiento viene controlado por tres factores:

a) Porcentaje de moléculas de enzima que tengan el nucleófilo adsorbido en el centro activo. Dependen de la afinidad de la enzima por el nucleófilo y de la concentración de este.

b) Posibilidad de que el nucleófilo sea capaz de superar al agua en su afinidad por el complejo acil-enzima

c) Velocidad de hidrólisis del péptido formado, pues en este tipo de síntesis los rendimientos máximos son transitorios, ya que los productos formados son termodinámicamente inestables.

Por tanto, los máximos rendimientos se conseguirán cuando la relación de las constantes aparentes de velocidad transferásica/hidrolítica $(k_T/k_H)_{app}$ sea lo más alta posible y cuanto menor sea la velocidad de hidrólisis del péptido formado. Las variables que influyen en la interacción enzima-sustrato deben jugar un papel fundamental en el curso de la reacción y en el rendimiento del producto de síntesis.

Según el valor relativo de la velocidad de síntesis (V_{AN}) y de hidrólisis del péptido formado tenemos dos interacciones extremas:

1) Cuando la velocidad de síntesis (V_{AN}) es similar a la velocidad de hidrólisis del péptido formado.

La expresión que nos da el máximo rendimiento en péptido $[AN]_{max}$ para este caso sería:

$$[AN]_{max} = \frac{(k_T/k_H)_{app} \times [NH]}{[H_2O] + (k_T/k_H)_{app} \times [NH]} \times \frac{(k_{cat}/k_m)_{AB,NH}}{(k_{cat}/k_m)_{AN,NH}} \times [AB] \quad [3]$$

Donde $[NH]$ es la concentración de nucleófilo y $[AB]$ es la concentración de donador de acilo.

La expresión [3] se puede simplificar para este caso 1) de la siguiente manera [4]:

$$[AN]_{max} = \alpha \times \beta \times [AB] \times [NH] \quad [4]$$

Donde α depende de $(k_T/k_H)_{app}$ y de la constante de equilibrio de unión del nucleófilo (NH) al complejo acil-enzima (K_N), β depende de las propiedades del donador de acilo activado, y de la concentración de producto final en presencia del nucleófilo. El valor de $(k_T/k_H)_{app}$ puede determinarse a partir del cociente de velocidades transferásica (V_{AN}) e

hidrolítica (V_{AOH}) [5]:

$$\frac{V_{AN}}{V_{AOH}} = \left(\frac{k_T}{k_H}\right)_{app} \times \frac{[NH]}{[H_2O]} \quad [5]$$

El análisis de estas ecuaciones (143, 144) ha permitido definir una constante " p " que nos proporciona una medida de la máxima cantidad de péptido que se puede obtener en un proceso cinéticamente controlado catalizado por una transferasa en presencia de un nucleófilo, y que también equivale a la cantidad de nucleófilo a la cual la velocidad de síntesis (V_{AN}) se iguala con la de hidrólisis (V_{AOH}).

$$p = \left(\frac{k_T}{k_H}\right)_{app} \times [H_2O] = \frac{V_{AOH}}{V_{AN}} \times [NH] \quad [6]$$

Este parametro también representa la concentración de nucleófilo a la cual ambas velocidades se igualan (145).

Ejemplos típicos son los procesos de acilación de 6-APA y 7-ACA catalizados por penicilin G acilasa (146) o la acilación de hidratos de carbono (142).

II) Cuando la velocidad de síntesis (V_{AN}) es mucho mayor que la de hidrólisis del péptido formado. Esto sucede en la síntesis de péptidos (138, 141, 147), con ésteres como donadores de acilo activados y con proteasas de una relación de constantes de velocidad $(k_T/k_H)_{app}$, elevada. Para $[NH]_0$ (concentración inicial de nucleófilo) $\gg [AN]_{max}$, el contenido de nucleófilo y la relación $(k_T/k_H)_{app}$, son practicamente constantes durante la síntesis. Por lo tanto la expresión para $[AN]_{max}$ se transforma en:

$$[AN]_{max} = \frac{[AB]_0 \times [NH]_0}{[H_2O] \times (k_T/k_H) + [NH]_0} \quad [7]$$

A diferencia de lo que sucede en el primer caso, el rendimiento máximo no depende de β (Ecuación [4]). En ambos casos el rendimiento máximo no depende de la cantidad de enzima añadida, la cual sólo influye en el tiempo requerido para alcanzar el máximo de conversión (137, 139).

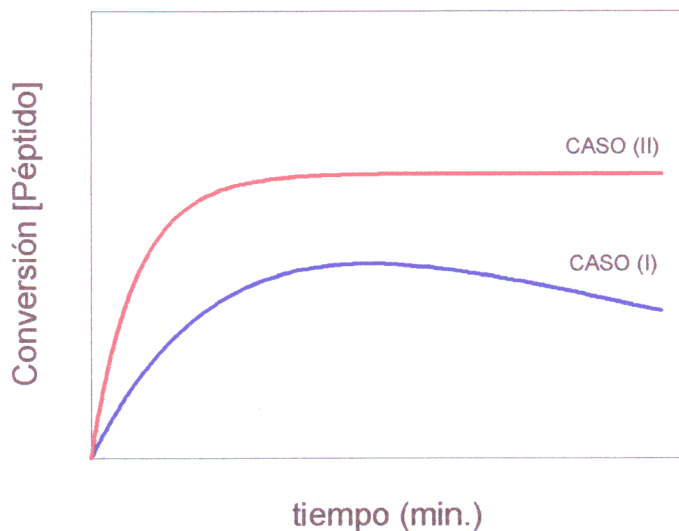


Figura 10.- Variación de la concentración de [AN] a lo largo de la reacción para los casos (I) cuando la velocidad de síntesis es del mismo orden que la de hidrólisis del péptido formado y caso (II) cuando la velocidad de hidrólisis del péptido formado es mucho menor que la de síntesis.

Por último, según el medio de reacción tenemos dos metodologías para llevar a cabo la síntesis cinéticamente controlada:

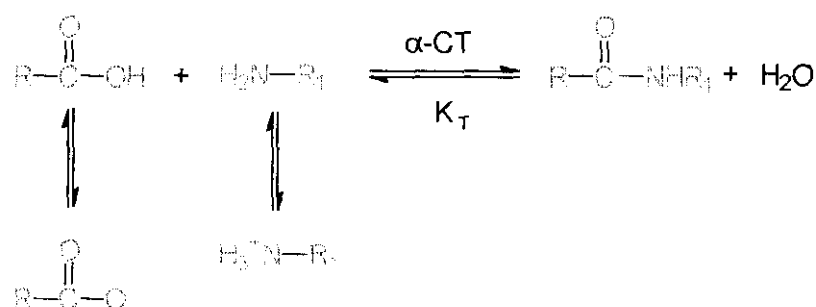
- 1) Si se emplean disolventes miscibles con agua estamos en **condiciones monofásicas**.
 - 2) Si se emplean disolventes inmiscibles con agua tenemos las **condiciones bifásicas**.
- Las particularidades de una y otra metodología se discutirán más adelante.

I.4.2.2.- Síntesis termodinámicamente controlada (S.T.C.)

La síntesis termodinámicamente controlada en sistemas monofásicos con mezclas agua-codisolvente orgánico o en sistemas bifásicos es, en principio, la estrategia más sencilla para sintetizar enlaces peptídicos con proteasas debido a que: (a) es una reacción directa entre el ácido carboxílico (donador de acilo) y el nucleófilo (grupo amino); (b) la activación del donador de acilo es innecesaria, lo cual abarata el proceso; (c) el producto de la reacción es estable; (d) la purificación del producto es más fácil que en la S.C.C., ya que hay un

componente menos.

En la bibliografía hay pocos estudios sistemáticos sobre esta estrategia (137, 148, 149). De forma simple, el esquema de esta aproximación sintética puede ser representado de la siguiente forma:



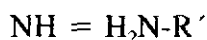
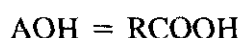
Esquema 17.- Mecanismo de la Síntesis Termodinámicamente Controlada

Podemos observar que tan sólo las formas no iónicas del ácido (AOH) y el nucleófilo (NH) están implicadas en la reacción de síntesis. Como ya hemos comentado, la enzima no influye en el rendimiento obtenido, si no que este es función de la constante de equilibrio termodinámico, K_T . La enzima, por tanto, sólo disminuye el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio.

Evidentemente, el agua es un componente no deseado si se pretende desplazar el equilibrio en el sentido de la síntesis. Es por ello por lo que se suele trabajar a bajas concentraciones de agua en el medio:

$$\frac{K_T}{a_w} = \frac{[\text{AN}]}{[\text{AOH}] \times [\text{NH}]} \quad [8]$$

donde:



De esta forma, la constante de equilibrio termodinámico deberá englobar un término dependiente de la concentración de agua, a_w .

A partir de esta ecuación, la concentración de péptido en el equilibrio puede ser también representada como una función de la concentración total del ácido y amina, tal y como indica la ecuación [9]:

$$[AN] = K_f \times K_{no-ion} \times \frac{[AOH] \times [NH]}{[H_2O]} \quad [9]$$

donde el rendimiento final es función de K_{no-ion} , que es la razón entre el producto de las concentraciones de las formas no ionizadas de nucleófilo [NH] y de donador de acilo [AOH] en el equilibrio y el producto de las concentraciones totales del ácido y la amina. Evidentemente, la proporción relativa de las formas ionizadas y sin ionizar depende del pH, de la constante dieléctrica del medio, etc. Por ello, el rendimiento dependerá del pH, de los pKs de los grupos amino y ácido, de la fuerza iónica, de la naturaleza del tampón, de la temperatura, del disolvente y de la cantidad de agua presente en la reacción.

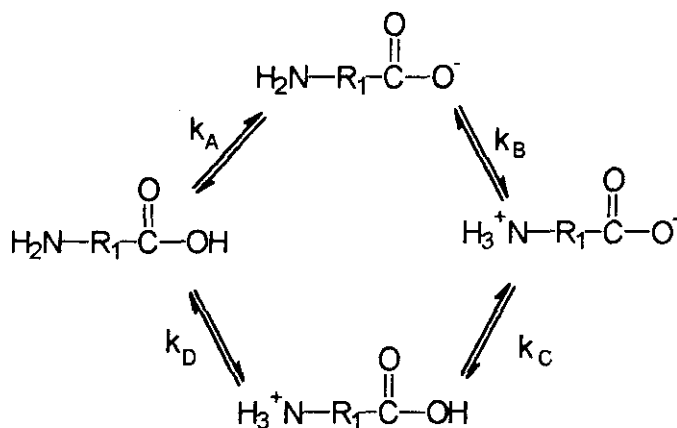
I.4.3.- FACTORES QUE INFLUYEN EN EL RENDIMIENTO DE LA SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE UN ENLACE PEPTÍDICO

I.4.3.1.- Importancia del pH

a) Síntesis termodinámicamente controlada

A la vista de la ecuación [9], los rendimientos máximos se conseguirán para un valor de pH comprendido entre el pKa del ácido y el pKa del nucleófilo. El valor máximo de K_{no-ion} se alcanza cuando la diferencia de pKs entre el grupo amino y el ácido es mínima (Esquema 18):

Una forma de disminuir la diferencia de pKa entre los dos sustratos consiste en proteger tanto el amino del aminoácido que actúa de donador de acilo como el carboxilo del aminoácido que actúa de nucleófilo, utilizando para tal protección grupos hidrofóbicos y apolares. De esta forma se disminuye la influencia mutua de los grupos amino y ácido a través del efecto inductivo. La forma más común es acetilar el grupo amino lo que se traduce en un aumento del pKa del ácido, y amidificar el grupo carboxílico, lo cual disminuye la basicidad del grupo amino.



Esquema 18.- Equilibrio entre las formas iónicas y no iónicas de los sustratos

El ejemplo más clásico es el caso de la glicina (Tabla 4):

Tabla 4.- Variación de los pKa, empleando grupos protectores y disolventes (150).

Aminoácidos	pKa (ácido)	pKa (amino)	Δ pKa
Glicina	2.35	9.8	7.4
N-Acetil-glicina/H ₂ O	3.6	8.2	4.6
N-Acetil-glicina en (80% DMSO)	6.9	8.1	1.2

Por otro lado, la introducción de estructuras apolares en la molécula favorece su solubilidad en medios orgánico-acuosos, los cuales, al tener una constante dieléctrica menor que el agua, desfavorecen la ionización de $-\text{COOH}$ y $-\text{NH}_2$, aumentándose los $(\text{pK}_a)_{\text{app}}$ de ambos grupos, tal y como se indica en la **Tabla 4** para la glicina en un medio con un 80% de DMSO (151).

Según el disolvente sea o no miscible en agua hay que diferenciar: S.T.C. en sistemas monofásicos (152, 153) y S.T.C. en sistemas bifásicos con bajo contenido en agua (154-156) cuyas peculiaridades comentaremos al hablar del papel de los disolventes en el proceso.

b) Síntesis cinéticamente controlada

En este tipo de reacciones, el donador de acilo generalmente tiene el grupo carboxilo activado en forma de éster, y su grupo amino está protegido (benzoilado, acetilado, etc.) y el nucleófilo presenta su grupo carboxilo bloqueado en forma de amida, por tanto, sólo el grupo amino del nucleófilo es el que nos va a condicionar el pH óptimo de trabajo, el cual debe ser superior al pK_a del grupo amino de nucleófilo (157); no obstante, no interesa que el pH sea demasiado elevado ya que se incrementa la concentración de grupos OH^- , los cuales compiten con el grupo amino del nucleófilo por el complejo acil-enzima causando un descenso en la relación $(k_T/k_H)_{\text{app}}$, con lo cual disminuye el rendimiento final en péptido.

Así, algunos de los factores que habrá que tener en cuenta a la hora de diseñar ensayos de este tipo serían: la naturaleza de los sustratos, la enzima empleada, (ya que muchas se desnaturalizan a pHs elevados, p.e. penicilin amidasa), y la naturaleza de las especies del tampón (p. e., el Tris puede actuar como nucleófilo compitiendo con el aminoácido cuando el pH es superior a 8 (149, 158), aunque por el contrario, otros autores como Mattiasson y cols han conseguido muy buenos resultados con esta base (159)). Para concluir, podemos afirmar que el pH ideal para este tipo de reacciones está comprendido entre 8-10.

I.4.3.2.- Influencia de la temperatura

a) Síntesis termodinámicamente controlada

Teniendo en cuenta que la reacción entre aminoácidos no cargados para la formación de un enlace peptídico es endotérmica (143) podríamos afirmar que al aumentar la temperatura se elevaría el rendimiento. No obstante, debemos tener en cuenta en este planteamiento teórico que muchos catalizadores se desnaturalizan cuando incrementamos la temperatura; por lo tanto, no podemos generalizar ni extrapolar de un sistema a otro.

b) Síntesis cinéticamente controlada

No existen muchos trabajos al respecto (137, 160), aunque algunos autores afirman que la temperatura óptima es inferior a 20 °C (139), Mattiasson y cols (161, 162), han descrito un aumento en el rendimiento en péptido debido a un aumento en la relación $(k_T/k_H)_{app}$, debido a un acusado descenso de k_H aparente, cuando se trabaja a temperaturas inferiores a 0 °C. De igual forma Ullmann y cols. (163) también describen recientemente la síntesis de di y tripéptidos empleando α -quimotripsina, tripsina o papaína en sistemas a 0 °C, obteniéndose éstos con altos rendimientos, y con una minimización en los problemas derivados de los procesos de aislamiento y purificación. Sin embargo otros autores aseguran que un incremento en la temperatura también causa un aumento en el rendimiento en péptido al incrementarse k_T .

1.4.3.3.- Influencia de la fuerza iónica

a) Síntesis termodinámicamente controlada

Un aumento de la fuerza iónica estabilizaría los iones libres, causando un descenso en la constante de equilibrio k_T , al desestabilizar las formas no ionizadas, que son las reactivas. Se ha observado que el pKa del grupo carboxilo desciende mientras que el del grupo amino se mantiene constante o aumenta con la fuerza iónica, lo cual dificulta el proceso al aumentar el ΔpKa . En el caso de productos solubles en H₂O obtenidos por condensación, incrementando la fuerza iónica disminuimos el rendimiento final, ya que el péptido obtenido es más difícil de aislar y purificar.

b) Síntesis cinéticamente controlada

En todos los casos, la fuerza iónica influye en la unión del nucleófilo al centro activo de la enzima, el cual puede estar cargado, por lo que, cuando las cargas implicadas sean opuestas, un aumento en la fuerza iónica estabilizaría estas, disminuyendo la atracción entre el nucleófilo y el centro activo y por lo tanto el rendimiento (137). En cambio, si las cargas que presentan el nucleófilo y el subsitio de unión al centro activo son iguales (como sucede en la síntesis de péptidos) un aumento en la fuerza iónica causaría un incremento en el rendimiento final a péptido.

1.4.3.4.-Influencia del disolvente

De todos los parámetros que caracterizan a un disolvente orgánico: coeficiente de solubilidad de Hildebrand (δ), la constante dieléctrica (ϵ), el momento dipolar (μ) o el coeficiente de partición P (en el sistema n-octanol/agua), etc., éste último es el que ejerce una mayor influencia en la actividad catalítica de la enzima (164). Así, se ha podido comprobar como la actividad enzimática es baja en disolventes con un $\log P < 2$, moderada si $2 < \log P < 4$, y alta si el $\log P > 4$. Aquellos disolventes con un $\log P$ mayor de 4, no alteran *la capa de agua esencial* situada alrededor del biocatalizador, con lo que este permanece activo. Por el contrario, estos disolventes con elevado coeficiente de partición reducen notoriamente la solubilidad de muchos de los sustratos, por lo que su empleo en reacciones biocatalíticas no se puede generalizar.

La naturaleza del disolvente orgánico afecta a la estabilidad y actividad enzimática por tres vías:

a) Inhibiendo o inactivando la enzima, por interacción directa con ella, ya que el disolvente orgánico puede distorsionar los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrófobas que mantienen la estructura proteica, provocando una disminución de su actividad y estabilidad (165).

b) Los disolventes orgánicos pueden interaccionar con sustratos o con productos de la reacción. Por ejemplo, el cloroformo provoca una significativa disminución de la actividad

catalítica de la peroxidasa durante la reacción de oxidación de fenoles (166).

c) El disolvente orgánico puede interaccionar con el agua esencial que rodea a las enzimas, provocando la alteración de su conformación activa. Como comentamos anteriormente la interacción entre el disolvente y el agua esencial de la enzima es directamente proporcional a la polaridad del disolvente. Así, los disolventes de mayor $\log P$ son los que menos afectan a la actividad de las enzimas (167).

a) Síntesis termodinámicamente controlada

En general se ha observado que la presencia de disolventes orgánicos disminuyen las constantes de disociación, aumentando la constante de equilibrio y por lo tanto también el rendimiento final en péptido (137, 168).

b) Síntesis cinéticamente controlada

En un principio, el empleo de disolventes hidrófilos en medios con una cierta cantidad de agua reduciría las reacciones de hidrólisis aumentando el rendimiento final en péptido, por lo que la adición de disolventes con un $\log P$ bajo mejoraría la síntesis del péptido (como sucede para el caso I), empleando DMF (160, 169, 170)). Por otro lado, el catalizador necesita de una pequeña cantidad de agua para realizar su actividad (monocapa de hidratación), de manera que si ésta es capturada por el disolvente o por el soporte (en caso de que la proteína esté inmovilizada), no se observaría reacción; en consonancia con estas afirmaciones, Reslow y cols. definieron el concepto de acuofilia del cual, hablaremos más ampliamente en otro apartado. Así, numerosos autores han llevado a cabo ensayos en los que se mide la actividad de agua óptima para cada reacción biocatalítica (171-173).

Con respecto a la naturaleza del disolvente conviene comentar que los disolventes de mayor $\log P$ son los menos perjudiciales para la enzima (174). Por otro lado, no parece recomendable el empleo de alcoholes como disolventes debido a la aparición reacciones de transesterificación (158, 175).

I.4.3.4.1.- Influencia de la naturaleza del disolvente.

Centrándonos ahora en el caso de la resolución de ésteres (1^{er} paso de la síntesis cinéticamente controlada) diremos que ésta es sensible a la naturaleza del disolvente, en especial en el caso de trabajar con disolventes hidrofílicos o inmiscibles con agua, tal y como se ve en la **Tabla 5**, para el caso de la resolución del éster racémico de la tirosina (175).

De la **Tabla 5** se deduce que hay que emplear disolventes apróticos (acetonitrilo, acetona, etc.), en vez de alcoholes o DMF, que interaccionan con la proteína o conducen a procesos de interesterificación.

I.4.3.5.- Importancia del agua en las reacciones biocatalizadas en un medio orgánico

Si bien las reacciones catalizadas por enzimas se comenzaron a estudiar en agua, cada día se ha impuesto de forma progresiva el empleo de medios orgánicos ligeramente hidratados. Ello se debe a que las enzimas en estos disolventes miscibles en agua son menos sensibles a la desactivación que en medios acuosos. Esto se ha explicado porque la enzima está cinéticamente atrapada en su estado nativo y activo, en parte debido a la baja constante dieléctrica del medio, potenciándose así las uniones electrostáticas que rigidifican la molécula (176), como se ha comprobado por medidas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (177).

Otra propiedad que se ve muy afectada es la especificidad del biocatalizador (164b, 178). En esta línea se ha descrito la alteración de la especificidad por sustrato en la metanolisis y en la hidrólisis de aminoácidos N-sustituídos, catalizada por α -quimotripsina, en la aminólisis de ésteres catalizada por subtilisina en diferentes medios (179), etc. Este hecho se ha atribuido a la variación de la relación k_{cat}/K_m (164b), por efecto de la solvatación del biocatalizador, de los reactivos y del complejo acil-enzima.

Asimismo, Klibanov y cols han descrito la variación de la enantioselectividad de la subtilisina *Calsberg* en la síntesis de péptidos con *L* y *D* aminoácidos (180, 181). Estos efectos se explican en la misma línea del razonamiento anterior, ya que ambos enantiómeros se solvatan de forma diferente según la geometría del disolvente. En este sentido Arroyo y

Sinisterra (182) han demostrado como el disolvente afecta a la resolución de (*R,S*) ketoprofeno vía esterificación enantioselectiva catalizada por la lipasa de *C. antartica* al emplear (+) ó (-) carvona como disolvente.

Tabla 5.- Resolución del éster étfico de la (*D,L*)-tirosina (50 mM), empleando α -quimotripsina (10 μ M), disolvente/agua (9/1), volumen total= 20 ml, T=30 °C (175).

Disolvente	Rendimiento	e.e./%	E
Metanol	0	--	--
Etanol	34	96	80
1-Propanol	46	89	39
2-Propanol	41	85	22
1-Butanol	20	95	49
2-Metil-i-propanol	13	> 99	> 230
2-Butanol	42	96	102
2-Metil-2-propanol	39	83	18
1-pentanol	38	93	49
3-Metil-1-butanol	41	92	46
2-Metil-2-butanol	41	82	18
Tetrahidrofurano	49	> 99	> 752
1.4-Dioxano	49	95	126
Acetonitrilo	48	> 99	> 646
Acetona	50	> 99	> 1060
DMF ^b	32	92	37
DMA ^b	41	> 99	> 412

^b 50 % de agua.

La presencia del agua es fundamental en la actividad catalítica de las enzimas, ya que ayuda a mantener la conformación activa mediante interacciones de tipo no covalente, interacciones no electrostáticas, enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (183). Al sustituir el agua por un disolvente orgánico se produce, en principio, una distorsión de la estructura proteica con la consiguiente pérdida de actividad enzimática. De hecho ninguna enzima sería capaz de mantenerse activa en un disolvente totalmente anhidro si no fuera por

la presencia de una mínima cantidad de agua. De esta forma, una enzima en un medio orgánico se puede mantener completamente hidratada y activa mediante la adición de un pequeño volumen de agua, el cual previene la posible alteración que pueda provocar el medio orgánico de reacción en el microentorno de la proteína. En este principio se basa la catálisis enzimática en medios prácticamente anhidros, tema que ha merecido el interés de muchos investigadores y la organización de varios congresos internacionales (184).

Es obvio que la presencia de agua es necesaria para la catálisis enzimática; lo que no parece tan claro es la cantidad mínima que requiere una enzima para mantenerse activa. Por ejemplo son suficientes únicamente 50 moléculas de agua por una de enzima para que la α -quimotripsina sea activa en octano (185). En el caso de otras enzimas hidrolíticas como la subtilisina o lipasas también es necesaria una cantidad mínima de agua (186-188). Pero para otras enzimas es fundamental un gran nivel de hidratación; como ejemplos nos encontramos la peroxidasa de rábano que dobla su actividad con un 0.25 % (v/v) de tampón en tolueno respecto a un 0.025 % (189); y la polifenol oxidasa, que necesita aproximadamente un 0.5 % (v/v) de agua (3.5×10^7 moléculas de agua por molécula de enzima) para ser activa en cloroformo (190). Entre el primer caso y este último existe una gran variación en cuanto a la cantidad de agua presente en el medio necesaria para la actividad de las enzimas mencionadas. Por tanto, esta magnitud no es del todo satisfactoria para controlar la actividad de la enzima en medios orgánicos ligeramente hidratados. Un método más correcto es relacionar la actividad catalítica con la cantidad de agua *disponible* por la enzima en un disolvente orgánico. De aquí surge la necesidad de recurrir al concepto de **actividad de agua (a_w)**, que parece ser el parámetro que mejor describe la distribución del agua en sistemas multifásicos (191).

I.4.3.5.1.- Actividad de agua: definición.

Si suponemos un sistema cerrado en el que una fase gaseosa húmeda se encuentra en equilibrio con una fase líquida, también húmeda, podemos definir la actividad de agua (a_w) de la fase líquida a una temperatura dada como [10]:

$$a_w = \frac{f_w}{f_w^\circ} \quad [10]$$

donde f_w es la fugacidad del agua de la mezcla a la temperatura de equilibrio, y f_w° es la fugacidad del agua pura a la misma temperatura.

Si la concentración del agua en el sistema es pequeña (como sucede en los procesos biocatalizados en medios orgánicos ligeramente hidratados) y se trabaja a bajas presiones (p. e. a presión ambiental a 1 atm), se puede suponer que el vapor de agua se comporta como un gas ideal, y podemos sustituir la fugacidad por la presión de vapor [11]:

$$a_w = \frac{P_w}{P_w^\circ} \quad [11]$$

La presión de vapor del agua pura en estas condiciones se considera igual a la unidad.

La ecuación transformada y expresada en tanto por ciento se define como *Humedad Relativa en Equilibrio* (HRE) [12].

$$HRE = P_w \times 100 = a_w \times 100 \quad [12]$$

1.4.3.5.2.- Isotermas de adsorción

En la práctica la actividad de agua (a_w) se determina introduciendo la muestra en una cámara de medida cerrada, a temperatura constante y con un volumen lo más pequeño posible. Pasado un tiempo, se alcanza el equilibrio entre la humedad del aire de la cámara y la de la muestra. Esta humedad relativa del aire en la cámara de medida corresponde a P_w y si consideramos $P_w^\circ = 1$ obtenemos el valor de a_w a partir de [11].

La forma más común de representar estos datos, es una curva que nos de la variación de la cantidad de agua añadida (g. de agua/g. de muestra) frente a la a_w . Según las medidas sean efectuadas durante la deshidratación de la muestra desorción o en el curso de la rehidratación de la misma adsorción o resorción) se obtendrán dos curvas, que no tienen porqué coincidir (fenómeno de histéresis).

Una isoterma de adsorción se divide en tres zonas:

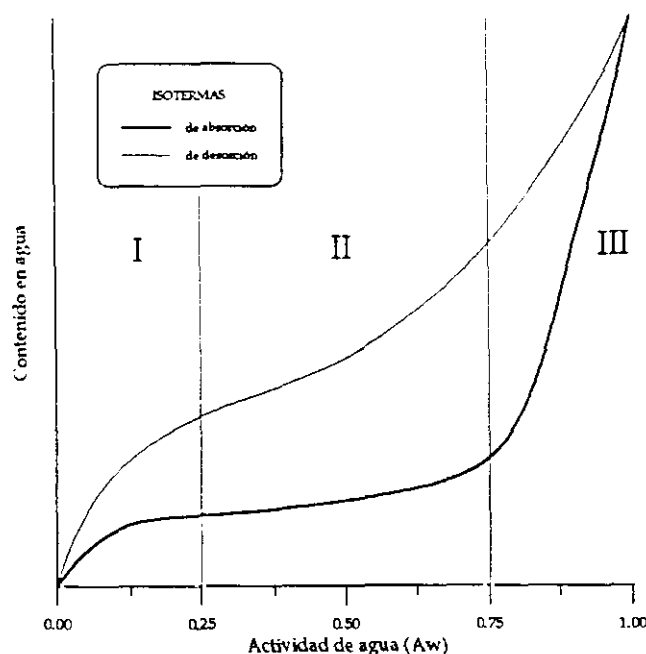


Figura 11.- Isoterma teórica de adsorción-desorción

Zona I. El agua presente en esta zona de la isoterma es el agua más fuertemente unida y más inmóvil, por lo que para el caso de las proteínas correspondería al agua de cristalización. Este agua está unida a zonas polares de la proteína por interacciones agua-ión o agua-dipolo. La entalpía de vaporización de este agua es mucho mayor que la del agua pura y no puede congelarse a -40°C . El límite de las zonas I y II corresponde al contenido de humedad "monocapa". Por "monocapa" se entiende no la cobertura de toda la materia seca por una capa simple de moléculas de agua densamente empaquetadas, sino que se trata de la cantidad de agua necesaria para formar una simple capa de moléculas de agua "monocapa" sobre los grupos altamente polares de la materia seca.

Zona II. El agua añadida en la zona II ocupa los restantes sitios de la primera capa y varias capas adicionales (agua en multicapa). La entalpía de vaporización del agua en multicapa es ligera o moderadamente mayor que la del agua pura.

Zona III. El agua de la zona III es la que menos fuertemente ligada y más móvil (molecularmente) y se denomina "agua de la fase masiva". Tiene una entalpía de vaporización igual que la del agua pura, por lo que se trata de agua congelable.

I.4.3.5.3.- Competencia por el agua en un sistema biocatalítico

La disponibilidad del agua alrededor de las moléculas activas de enzima depende de la presencia de elementos en el sistema que pueden competir por el agua, según sea su afinidad por la misma, tales como: los disolventes orgánicos, los reactivos, los aditivos y los soportes.

1) Disolventes: los disolventes compiten con la enzima por el agua. Según su polaridad, estos disolventes podrán solubilizar mayor (polares) o menor (apolares) cantidad de agua, y todo ello redundará en la actividad catalítica de la enzima. Esta capacidad de captación de agua por parte del disolvente se verá reflejada en su isoterma de adsorción. Peter Halling pudo comprobar la similitud de las isotermas de las proteínas en aire y en disolventes de diferente polaridad hasta un valor de a_w próximo a 0.5 (192). De este descubrimiento se deduce que el disolvente no influye en el agua fuertemente ligada a la enzima, la cual suele corresponder con el agua que queda después de la liofilización.

2) Reactivos: la naturaleza y la concentración de los sustratos pueden alterar la distribución del agua en el sistema. Una concentración elevada de alcohol (193) o de ácido (194) en una reacción de esterificación catalizada por enzimas puede provocar una disminución drástica de la actividad enzimática debido al aumento de la capacidad de la fase orgánica para solubilizar agua, y por lo tanto de sustraerla del biocatalizador. Se pueden fijar unas condiciones óptimas de a_w en el medio que permitan compatibilizar una elevada concentración de reactivos con una actividad enzimática interesante.

3) Aditivos: las sales pueden competir por el agua con la enzima (195). De la misma forma los azúcares presentes en muchos preparados comerciales de enzimas son capaces de captar agua (171, 196, 197), por lo que algunos autores han observado desplazamientos de las

curvas de adsorción de agua empleando sorbitol como aditivo (171). Compuestos similares al agua (glicerol y glicoles (198), la N,N-dimetilformamida (199) y el dimetilsulfóxido (200)) son capaces de alterar la actividad enzimática. La adición de estos compuestos produce un incremento en la actividad de muchos biocatalizadores en medios orgánicos con a_w baja, pues actúan como miméticos del agua.

4) Soportes: Reslow demostró claramente en 1988 como la naturaleza del material que soportaba la enzima inmovilizada era capaz de influir en la actividad catalítica (201). La causa de este comportamiento era la *acuofilia* del soporte, definida como la capacidad de éste de retener agua en un sistema que emplea como disolvente orgánico diisopropiléter. Estudios análogos (194, 202) demostraron que los soportes hidrofóbicos favorecen la actividad catalítica frente a los soportes de tipo hidrofílico. De todas formas, ni la capacidad del soporte para adsorber agua, ni su contenido en agua pueden pronosticar una actividad determinada en una reacción biocatalizada.

En el equilibrio, la a_w será la misma en todas las fases del sistema, incluyendo el soporte donde la enzima se encuentra inmovilizada. Controlando el valor de a_w del sistema, se ha podido comprobar que el perfil actividad enzimática/ a_w es prácticamente el mismo en la mayoría de los soportes empleados (203-206).

I.4.3.5.4.- Influencia de la cantidad de agua en la resolución de mezclas racémicas.

La cantidad de agua presente en la reacción para la resolución enantioselectiva del éster étflico de la (D,L)-tirosina, catalizada por α -quimotripsina resultó ser fundamental para diferentes disolventes como se refleja en la **Figura 12** (175):

Los rendimientos obtenidos difieren de un disolvente a otro, según aumenta la cantidad de agua, pero el exceso enantiomérico sigue el mismo comportamiento en todos los disolventes, disminuyendo cuando el porcentaje de agua presente en la reacción es elevado, aunque el rendimiento sea muy alto, debido a una hidrólisis química indiscriminada de ambos esteroisómeros, frente a una hidrólisis enzimática mucho más selectiva hacia el isómero L. Esta

tiene lugar con menores porcentajes de agua, y controlada por ciertos residuos del centro activo, variando la enantioselectividad de los catalizadores enzimáticos.

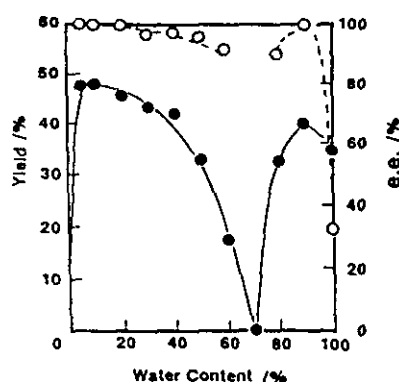


Fig. 1. Resolution of D,L-tyrosine ethyl ester in acetonitrile-water. D,L-Tyrosine ethyl ester 50 mM, CT 10 μ M, 30°C, 24 h. O: e.e.; ●: yield.

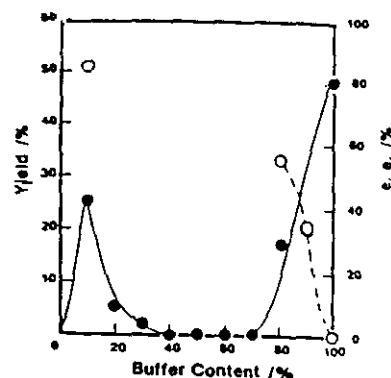


Fig. 2. Resolution of D,L-tyrosine ethyl ester in acetonitrile-aqueous phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0). D,L-Tyrosine ethyl ester 50 mM, CT 10 μ M, 30°C, 24 h. O: e.e.; ●: yield.

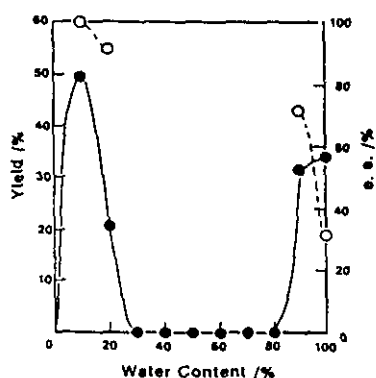


Fig. 3. Resolution of D,L-tyrosine ethyl ester in THF-water. D,L-Tyrosine ethyl ester 50 mM, CT 10 μ M, 30°C, 24 h. O: e.e.; ●: yield.

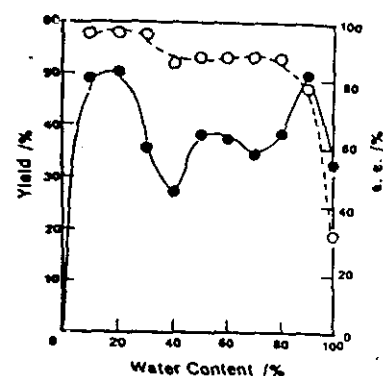


Fig. 4. Resolution of D,L-tyrosine ethyl ester in 1,4-dioxane-water. D,L-Tyrosine ethyl ester 50 mM, CT 10 μ M, 30°C, 24 h. O: e.e.; ●: yield.

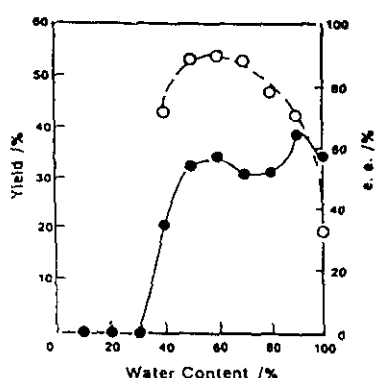


Fig. 5. Resolution of D,L-tyrosine ethyl ester in DMF-water. D,L-Tyrosine ethyl ester 50 mM, CT 10 μ M, 30°C, 24 h. O: e.e.; ●: yield.

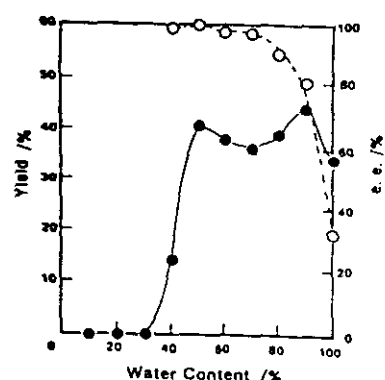


Fig. 6. Resolution of D,L-tyrosine ethyl ester in DMA-water. D,L-Tyrosine ethyl ester 50 mM, CT 10 μ M, 30°C, 24 h. O: e.e.; ●: yield.

Figura 12.- Importancia del porcentaje de agua en la hidrólisis del éster de la (D,L)-tirosina, empleando diferentes disolventes orgánicos, tomada del artículo (175).

I.4.4.- ASPECTOS EXPERIMENTALES DE LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CATALIZADA POR ENZIMAS

I.4.4.1.- Las enzimas: pureza y purificación

Generalmente los preparados comerciales de proteasas son impuros, ya que pueden contener diferentes formas de una misma proteasa (α y β -tripsina) y/u otras proteasas impurificando la preparación. En el primer caso, en el que existan varias formas de la misma enzima, estas influyen en el rendimiento del proceso cinéticamente controlado. Asimismo, la presencia de otras proteasas puede originar reacciones de hidrólisis indeseables, tanto para los reactivos como para los productos. Por lo tanto, es fundamental en los procesos de control cinético, el trabajar con proteasas puras a fin de lograr una buena reproductibilidad.

El isoelectoenfoque sería un método rápido que conviene realizar para visualizar la pureza de la proteasa (207, 208), si bien no se han de descartar ensayos de contenido proteico y test de actividad esterásica

I.4.4.2.- Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas tiene como objetivo lograr biocatalizadores estables, reutilizables y fáciles de manejar. Existen varias metodologías que se pueden agrupar en tres tipos:

- a) Unión a un soporte (de forma covalente, por fuerzas electrostáticas o por adsorción física).
- b) Reticulado usando reactivos bi o polifuncionales.
- c) Atrapamiento en matrices, microcápsulas, liposomas, micelas reversas, etc.

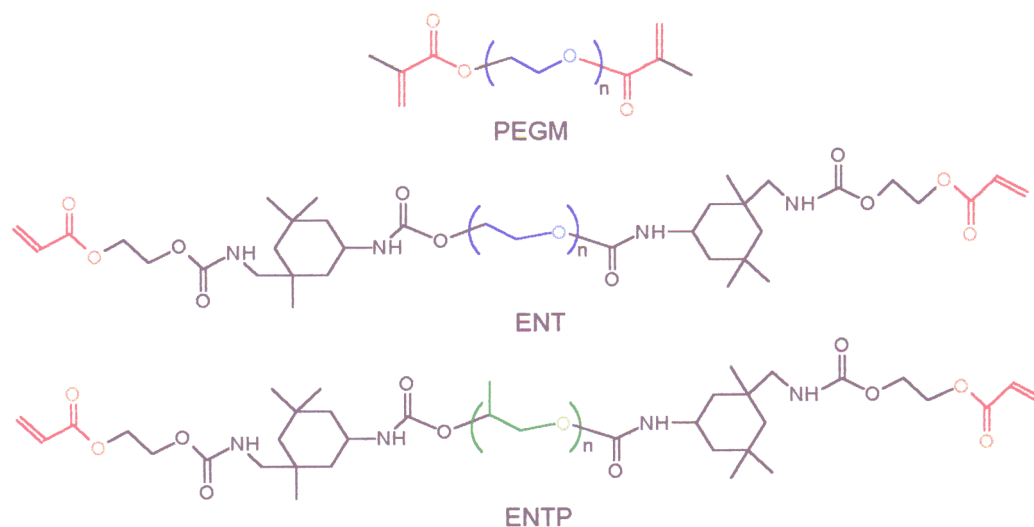
En el caso de la α -quimotripsina se han descrito diversas metodologías de inmovilización y sería prolijo detallar todas. Entre las más interesantes citaremos la inmovilización sobre geles de agarosa activados con grupos formilo (209), agarosa activada con grupos amino (210), β -ciclodextrinas (211), polimetacrilatos (212), copolímeros de estireno (213).

Asimismo, la enzima se ha adsorbido sobre sepiolita (214), etilcelulosa (215), alcohol polivinílico (216), etc. Para el lector interesado en este tema recomendamos la excelente revisión bibliográfica realizada por Mosbach (217).

Para poder analizar en profundidad el comportamiento de los sistemas inmovilizados que se emplearán en la presente Tesis Doctoral, formados por dos componentes uno hidrófobo, polietileno (PE), y otro más hidrofílico como es el metacrilato de 2'-hidroxietilo (HEMA) (218, 219), debemos exponer someramente como Fukui *y cols.* (220, 221) han solucionado los problemas de transferencia de masa empleando derivados en los que la enzima o célula se encuentra atrapada y que presentan muchas similitudes con nuestros sistemas. Así, estos autores describen 4 grandes grupos de metodologías para la inmovilización por atrapamiento:

a) Método de las resinas obtenidas por fotoentrecruzamiento

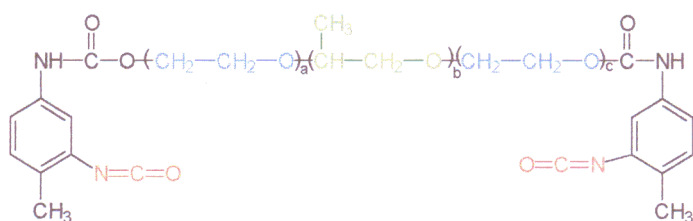
Este método se basa en la iluminación a una longitud de onda próxima al ultravioleta capaz de iniciar la polimerización del monómero, durante 3-5 minutos, para conseguir inmovilizar el catalizador en el interior del polímero, los cuales pueden presentar diferente composición, como se observa en el **Esquema 19**.



Esquema 19.- Estructuras de resinas típicas empleadas para inmovilizar biocatalizadores por fotoentrecruzamiento; PEGM (formado a partir de polietilenglicol y metacrilato), ENT (obtenido a partir de hidroxietilacrilato, isoforona, diisocianato y polietilenglicol y ENTP (igual que el anterior pero en vez de emplear polietilenglicol, se utiliza polipropilenglicol).

b) Método del uretano

Este método es más simple y útil que el anterior, ya que simplemente consiste en hacer reaccionar en una disolución acuosa de biocatalizador (durante 30-60 minutos) a grupos de isocianato terminales de una molécula de prepolímero (**Esquema 20**) con los de otra molécula de prepolímero, formando un residuo de urea y liberando dióxido de carbono, originando así una estructura reticular que inmovilice al catalizador en su interior.



Esquema 20.- Fórmula general de un prepolímero de uretano (PU).

c) Método de irradiación

Se han empleado diferentes monómeros funcionales para inmovilizar biocatalizadores por atrapamiento vía γ -irradiación (que varía según el tipo de monómero), tales como: alcohol polivinílico (5-7 Mrad) (222), diacrilato de polietilenglicol (223), dimetacrilato de polietilenglicol (1 Mrad y a una temperatura de -24°C) (223, 224).

d) Entrecruzamiento de varios prepolímeros en presencia de agentes químicos

En esta ocasión la unión de varios prepolímeros se realiza a través de moléculas con varios grupos funcionales tales como glioxal, glutaraldehído, alcohol polivinílico oxidado con peryodato, dimetacrilato de polietilenglicol, etc. Así, por ejemplo, se han inmovilizado enzimas por atrapamiento, vía polimerización radicalaria de ácido acrílico y N,N-dimetilaminoetil-metacrilato en presencia de dimetacrilato de polietilenglicol como agente entrecruzante.

En todos los casos los prepolímeros pueden presentar diferente longitud en las cadenas (de polietilenglicol, polipropilenglicol etc), pudiendo obtener soportes con diferentes: tamaños de poro, pesos moleculares, propiedades físico-químicas (solubilidad, punto de fusión, etc),

y con un mayor o menor carácter apolar, el cual beneficia o dificulta, junto con el tamaño de poro, el acceso de los sustratos al centro catalítico según la polaridad de estos, como podemos observar en la **Tabla 6**:

Tabla 6.- Efecto del gel en la oxidación de esteroides y en el coeficiente de reparto entre el gel y el disolvente (220).

Entradas	Gel	Colesterol		Dehidroepiandrosterona	
		Act. Rel. (%) ^a	p ^b	Act. Rel. (%) ^a	p ^b
1	ENTP-2000	102	2.00	108	2.36
2	ENT-4000 : ENTP-2000 (15 : 85)	97	1.58	NA	NA
3	ENT-4000 : ENTP-2000 (30 : 70)	86	1.13	NA	NA
4	ENT-4000 : ENTP-2000 (70 : 30)	0	0.16	NA	NA
5	ENT-4000 : ENTP-2000 (85 : 15)	0	0.06	NA	NA
6	ENT-4000	0	0.02	77	0.31
7	PU-3	75	0.63	107	1.67
8	PU-3 : PU-6 (75 : 25)	24	0.24	96	1.48
9	PU-3 : PU-6 (50 : 50)	0	0.02	88	1.16
10	PU-3 : PU-6 (25 : 75)	0	0.03	73	0.48
11	PU-6	0	0.01	70	0.30

NA: No analizado

^a Actividad relativa del biocatalizador inmovilizado con respecto a las células libres expresada en porcentaje (enzima libre = 100%).

^b Coeficiente de partición de colesterol o dehidroepiandrosterona entre el gel y el disolvente

En esta tabla podemos observar como el coeficiente de partición de los reactivos entre el gel y el disolvente es fundamental para la actividad del catalizador. Así, los biocatalizadores inmovilizados en geles con menor coeficiente de partición son los que presentan peores actividades, (entradas 4, 5, 6, 9, 10 y 11), tanto para el colesterol como para la dehidroepiandrosterona, presentando esta segunda mayor valor de actividad relativa que el primero, al igual que sucede con su coeficiente de partición.

Si bien la inmovilización estabiliza al biocatalizador frente a los cambios del medio, añade una complicación más al estudio del proceso, ya que el soporte no es inerte y compite con la enzima por el agua del medio, lo cual es muy importante en procesos de síntesis de péptidos cinéticamente controlada en medios orgánicos ligeramente hidratados. Este punto ha sido ampliamente discutido por Reslow y cols. (201) introduciendo el término de acuofilia del soporte, como ya hemos comentado anteriormente.

Aun teniendo en cuenta esas complicaciones que presenta, la inmovilización de catalizadores resulta una metodología muy atractiva, ya que nos permite recuperar el catalizador y reutilizarlo en un nuevo ciclo de síntesis, consiguiendo reducir los costes del proceso como muestra la **Figura 13**.

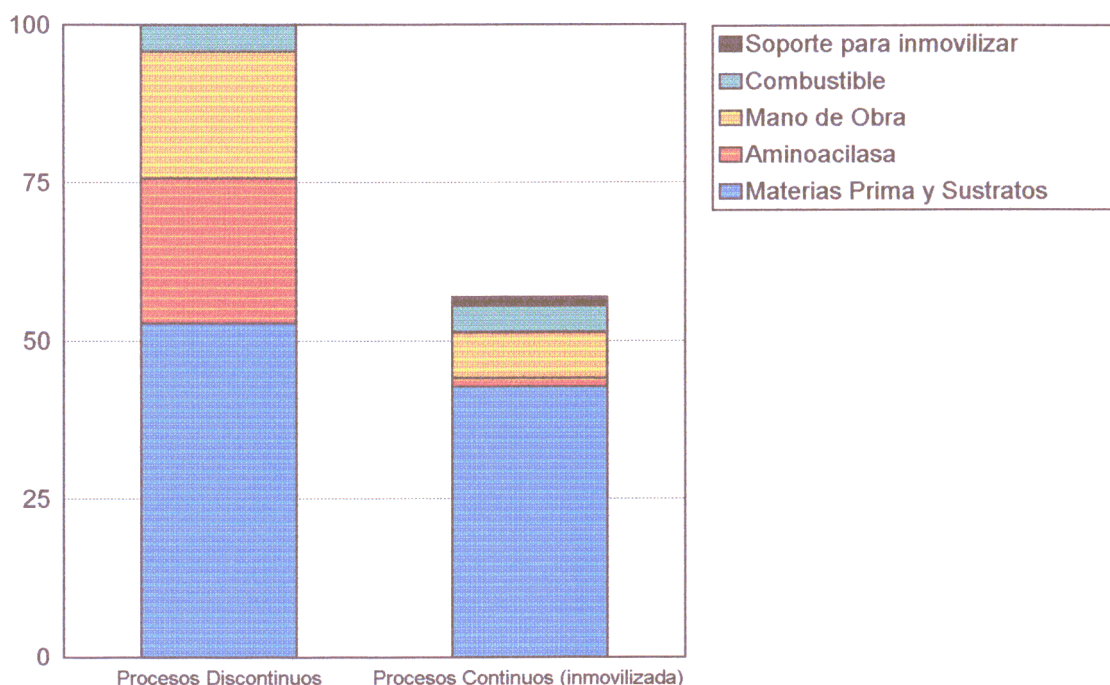


Figura 13.- Comparación de los costes de producción en la síntesis de *L*-aminoácidos, en procesos dicontínuos (enzima libre) y en procesos continuos (enzima inmovilizada) (225).

I.4.4.3.- Sustratos y tampones

En general, diremos que la funcionalización de los sustratos es mucho más sencilla que en el caso de la síntesis en fase sólida tipo Merrifield o empleando métodos químicos.

En una S.T.C, conviene emplear aminoácidos que tengan protegidos los grupos funcionales que no van a estar implicados en la reacción. No obstante, dada la quimioselectividad de las proteasas, no se han de proteger los grupos de las cadenas laterales.

La situación resulta algo más complicada en el caso de la S.C.C, ya que el donador de acilo además de tener bloqueado el grupo amino (en forma de amida) también precisa que el grupo carboxilo esté activado como éster.

Con respecto a los tampones, como ya hemos comentado anteriormente, no parece influir demasiado su naturaleza.

II.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

II.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

De lo indicado en el apartado anterior, se deduce que la búsqueda de nuevos derivados de enzimas, y en especial de α -quimotripsina, es un tema de interés en Biotecnología por las muchas aplicaciones sintéticas que posee. En esta línea se han desarrollado por miembros de nuestro grupo derivados modificados químicamente de α -quimotripsina, o inmovilizados sobre agarosa, vía tosilo o vía glicidol.

No obstante, estos derivados tienen muchos problemas a la hora de ser utilizados con fines preparativos dadas sus pobres propiedades mecánicas. Es por ello por lo que se planteó la colaboración con el grupo de la Dra. Gil de la Universidad de Coimbra, a fin de obtener derivados inmovilizados de α -quimotripsina sobre copolímeros, cuyas propiedades mecánicas y su resistencia a los efectos producidos por la variación del pH, de porcentaje de medio orgánico, y de su naturaleza, los hacía candidatos idóneos para desarrollar una nueva familia de biocatalizadores de posible uso en Síntesis Orgánica. Para lograr este objetivo se ha abordado el siguiente Plan de Trabajo, en el cual hemos utilizado como término de comparación un derivado inmovilizado de α -quimotripsina suministrado por el Dr. Guisán.

II.1 PLAN DE TRABAJO

- 1) Caracterización de los derivados inmovilizados de α -quimotripsina.
- 2) Estudios de abrasión y estabilidad térmica de los derivados inmovilizados obtenidos sobre copolímeros de injerto
- 3) Optimización de la actividad transferásica del derivado α -quimotripsina-agarosa.
- 4) Optimización de la actividad transferásica del derivado α -quimotripsina-copolímeros.
- 5) Estudios de reutilización de los derivados de α -quimotripsina-copolímeros.
- 6) Estudios de quimioselectividad de los derivados inmovilizados.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.- PARTE EXPERIMENTAL

III.1.- ENZIMAS, SUSTRATOS Y REACTIVOS

III.1.1.- ENZIMAS

El biocatalizador empleado a lo largo de toda la Memoria ha sido la α -quimotripsina de páncreas de bovino (E. C. 3.4.21.1), tipo II, de la casa SIGMA (artículo 4129), con una actividad específica de 48 unidades/mg de sólido y 50 unidades/mg de proteína (una unidad internacional de actividad es la cantidad de proteína activa que hidroliza 1 μ mol de éster etílico de la N-benzoil-L-tirosina por minuto a pH=7.8 y a 25°C). Esta enzima se conserva en su estado de polvo liofilizado a -15°C.

III.1.2.- SUSTRATOS

Para medir la actividad de la α -quimotripsina se han empleado:

- p-Nitroanilida de la N-glutaril-L-fenilalanina (GpNA) (SIGMA).
- p-Nitroanilida de la N-benzoil-L-tirosina (BTpNA) (SIGMA).

Como donadores de acilo:

- Éster etílico de la N-benzoil-L-tirosina (BTEE) (Bz-L-Tyr-OEt) (SIGMA).
- Éster etílico de la N-acetil-L-fenilalanina (APEE) (Ac-L-Phe-OEt) (SIGMA).
- N-acetil-L-tirosina (Ac-L-Tyr-OH) (SIGMA).

Y como nucleófilos:

- Hidrocloreuro de L-alaninamida (H-L-Ala-NH₂) (SIGMA).
- Hidrocloreuro de L-leucinamida (H-L-Leu-NH₂) (SIGMA).
- Hidrocloreuro de L-metioninamida (H-L-Met-NH₂) (SIGMA).
- Hidrocloreuro de L-glicinamida (H-L-Gly-NH₂) (SIGMA).
- Hidrocloreuro de L-serinamida (H-L-Ser-NH₂) (SIGMA).
- Hidrocloreuro de L-aspartamida (H-L-Asp-NH₂) (SIGMA).
- Dihidrocloreuro de L-argininamida (H-L-Arg-NH₂) (SIGMA).

En la determinación del número de centros activos en un preparado se empleó:

-Sultona del ácido 2'-hidroxi-5'-nitrofenil-metanosulfónico (SULTONA) (SIGMA).

Precusores de sustratos y sustratos no convencionales:

- Éster N-(4-Clorobutanoil)-L-triptofanato de metilo
- N-(3-indolilmetil)-glicinato de etilo.
- (Cis 1,3) 1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H- β -carbolina-3-carboxilato de metilo.
- Ácido ($\pm$) 2-fenilbutírico (ALDRICH).
- Ácido ($\pm$) 3-fenilbutírico (ALDRICH).
- Ácido ($\pm$) tetrahidrofurano-2-carboxílico (ALDRICH).
- Ácido ($\pm$) tetrahidrofurano-3-carboxílico (ALDRICH).
- Ácido ($\pm$) 1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico (ALDRICH).
- (*R*) Mandelato de etilo (FLUKA).
- (*S*) Mandelato de etilo (FLUKA).
- (*R,S*) Mandelato de etilo (FLUKA).
- (*R,S*) Mandelato de bencilo (FLUKA).
- (*R,S*) Mandelato de isoamilo (FLUKA).

III.1.3.-DISOLVENTES

- Acetato de etilo (PANREAC) (99.8% de pureza).
- Acetonitrilo (SCHARLAU) (>99% de pureza).
- 1,4-Butanodiol (MERCK) (98% de pureza).
- Diclorometano (SCHARLAU) (>99% de pureza).
- N,N-Dimetilformamida (MERCK) (>99% de pureza).
- Etanol absoluto (MERCK) (>99% de pureza).
- Isobutilmetilcetona (MERCK) (>99% de pureza).
- Metanol (MERCK) (>99% de pureza).
- 1-Propanol (SCHARLAU) (>99% de pureza).
- Tolueno (MERCK) (>98% de pureza)
- 1,1,1-Tricloroetano (MERCK) (>99% de pureza).

III.1.4.-OTROS REACTIVOS

- Acetato sódico (PANREAC).
- Acetona (SCHARLAU).
- Ácido acético (PROBUS).
- Ácido cítrico (MERCK).
- Ácido clorhídrico 35-36% (MERCK).
- Ácido bórico (PANREAC).
- Albúmina bovina (SIGMA).
- Bicarbonato sódico (PANREAC).
- Borato sódico (PANREAC).
- Carbonato sódico (PROBUS).
- Carbonato potásico (PROBUS).
- N-Ciclohexil-N'-(2-(metilmorfolino)etil)-carbodiimida-4-tolueno-sulfonato (CMC) (MERCK).
- Citrato sódico cristalizado dihidrato (MERCK).
- Fosfato dipotásico (MERCK).
- Fosfato disódico (PANREAC).
- Fosfato monopotásico (PANREAC).
- Fosfato monosódico monohidrato (PANREAC).
- Hidróxido sódico (MERCK).
- Metacrilato de 2'-hidroxietilo (HEMA) (Biochemical Co. Poole, Dorset, U.K.).
- Polietileno (PE), suministrado por Telcon Plastics. Ltd. U.K.
- Sulfato de cobre (II) pentahidrato (MERCK).
- Trietilamina (ALDRICH).
- Tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris) (MERCK).
- Triton X 100 (MERCK)

Todos estos reactivos presentan la pureza de grado analítico o superior.

III.1.5.- APARATAJE EMPLEADO

- Espectrofotómetro de ultravioleta-visible Shimadzu 2100 UV. equipado con un sistema de termostatación por recircularización de agua, con cubetas de un paso óptico de 1 cm, y un volumen total de 3 ml.

-Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), LDC, con una columna C₈, Nucleosil 128 (LDM) (fase reversa).

-Valorador volumétrico ATI ORION AF8 (para medir la cantidad de agua, mediante el método de Karl-Fisher).

- Espectrómetro Resonancia Magnética Nuclear (RMN) BRUCKER 250 MHZ).

III.1.6.- PROGRAMAS INFORMÁTICOS

a) Programas para ajustes matemáticos. *SIMFIT V. 4.0* (226).

A lo largo de esta Tesis Doctoral se ha utilizado como herramienta de cálculo el paquete integrado *SIMFIT* versión 4.0 para llevar a cabo el ajuste de los datos experimentales a determinadas ecuaciones matemáticas.

Este paquete informático, diseñado por W. G. Bardsley, escrito en lenguaje Fortran compilado y desarrollado en base a rutinas de regresión no lineal de la librería "NAG WORKSTATION", emplea algoritmos de optimización matemática por iteración con el objetivo de minimizar la función Sumatorio de Residuales (SSQ) definida mediante el método de mínimos cuadrados.

La función SSQ se define como:

$$SSQ = \sum (y_i - f(p, x_i))^2 \quad [13]$$

donde y_i es un dato experimental obtenido para la variable independiente "y", cuando la variable dependiente "x" adopta un valor " x_i ".

P son los parámetros óptimos del ajuste

Las suposiciones estadísticas en las que se basa el criterio de los mínimos cuadrados son: que la ecuación por ajustar es la correcta, el error en la respuesta es estrictamente aditivo

y los errores son independientes entre sí y siguen una distribución homocedástica (varianza constante), esto es, las medidas se han hecho con la misma precisión. Este tipo de regresión se denomina regresión sin pesos estadísticos.

No obstante la mayoría de las veces las medidas experimentales siguen una distribución heterocedástica (diferente varianza), y se hace necesario dar más importancia a los datos de menor error frente a los de mayor error. Para ello, lo que se hace es corregir los residuales con un factor llamado peso estadístico (w_i), que es inversamente proporcional a la varianza de los datos (el cuadrado de la desviación estándar).

$$W_i = \frac{1}{S_i^2} \quad [14]$$

De esta forma, la función que se optimiza se denomina sumatorio ponderado de residuales (WSSQ), que se define como:

$$WSSQ = \sum (1/S_i^2) \times (y_i - f(p, x_i))^2 \quad [15]$$

La desviación estándar en las mediciones de la variable dependiente se determina mediante réplicas. De esta forma, se le asigna a cada conjunto de medidas (y_i) su desviación estándar correspondiente, que se utiliza para ponderar el error. No obstante esta metodología es recomendable siempre que el número de réplicas obtenidas por cada valor de la variable "y" sea mayor o igual que 3. Como esto no es factible en muchas ocasiones, otra metodología que puede sugerirse consiste en determinar el error experimental promedio que tiene el método y asignar a cada punto dicho error experimental como error relativo constante; generalmente se toma como valor de dicho error el 5 %.

Como parámetros que cuantifican la bondad del ajuste, el paquete **SIMFIT** calcula el valor del coeficiente de determinación (R^2). Por otra parte, cuando se utilizan como pesos estadísticos las desviaciones típicas de los errores (o estimaciones de las mismas), la función WSSQ sigue una distribución Ji-cuadrado (χ^2) con "g" grados de libertad, siendo $g = n^\circ$ de puntos experimentales - n° de parámetros del ajuste. De esta forma, por comparación del valor de ji-cuadrado con WSSQ se puede establecer la bondad del ajuste. El programa **SIMFIT**

calcula automáticamente la probabilidad de que ji-cuadrado exceda del valor de WSSQ. Así, cuando la probabilidad de ji-cuadrado sea mayor de WSSQ es menor de 0.01 (nivel de significancia del 1 %) o menor de 0.05 (nivel de significancia del 5 %), se debería rechazar el ajuste utilizando dichos niveles de significación.

SIMFIT también permite establecer criterios de bondad de ajustes a través del estudio de los residuales, los cuales, en un óptimo deberían quedar distribuidos al azar y no deberían presentar una correlación serial significativa, por lo que el número de residuales positivos y negativos debe ser similar, y no debe haber series largas de residuales con el mismo signo, ni tampoco muy pocas series. El número de residuales positivos se designa con la letra "n", y el de residuales negativos con la letra "m" y el n° de series con "r". **SIMFIT** establece dos test acerca de las series, que deben dar una probabilidad (p) comprendida entre $\alpha/2$ y $1-\alpha/2$ ($\alpha=0.05$ ó 0.01 según el nivel de significancia con el que se trabaje). La prueba de los signos, también desarrollada por este programa, debe dar una probabilidad de $p \geq \alpha$ para poder considerar el ajuste como bueno. Un nuevo estadístico que el programa calcula es el test de Durbon-Watson, que indica la posibilidad de que exista una correlación seriada, esto es, que el signo que presente un residual venga impuesto por el signo del anterior. Normalmente, cuando el valor de dicho estadístico está comprendido entre 1.5 y 2.5 se puede descartar dicho efecto.

Es frecuente que los parámetros del ajuste deban ser distintos de cero, pues el hecho de anularse suele conllevar el que la variable respuesta "y" no dependa de alguna variable explicativa "x", que lleve consigo una simplificación del modelo debido a la desaparición funcional del mismo. Así para determinar si un parámetro puede considerarse nulo o no, éste se mide en unidades estándar, es decir, se calcula el cociente:

$$T = (\text{Valor estimado del parámetro}) / (\text{error de estándar de su estimación}) \quad [16]$$

si el valor de este cociente T esta dentro de ciertos límites que se consultan en las tablas estadísticas de la "t" de Student, considerando como grados de libertad ($g=n^o$ de puntos - n^o de parámetros) puede ser que el parámetro se anule; si por el contrario, el valor de T rebasa esos límites, entonces el valor del parámetro es distinto de cero. El programa **SIMFIT**

suministra automáticamente toda esta información mediante un parámetro de redundancia.

b) Programas de modelización molecular, *Hiperchem TM. V 3.0 for windows* (227).

Los cálculos de Mecánica y Dinámica Molecular de la estructura de los sustratos objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral, se realizaron con el programa **HIPERCHEM**

El estudio por Dinámica Molecular se realizó a alta temperatura debido a la mayor eficacia para atravesar barreras de energía en el espacio conformacional multidimensional. Se eligió una temperatura de 100 °K como punto de partida, ya que permite a la molécula explorar un número de conformaciones separadas por barreras energéticas significativas. Para evitar el riesgo, inherente a toda simulación de Dinámica Molecular (D.M.) a alta temperatura de que la estructura encontrada corresponda a un mínimo local de alta energía se realizaron con cada uno de los conformeros obtenidos procesos de D.M. sucesivos de 1ps (T=450 °K); 10ps (T=350 °K); 12ps (T=300 °K).

Finalmente, la geometría de los conformeros de mínima energía obtenidos se analizaron por Mecánica Molecular (M.M.) mediante el uso del método MM+ como campo de fuerzas. Primeramente se analizó el algoritmo "steepest descent" de forma interactiva hasta un gradiente de 0.1 Kcal/mol Å. Una vez optimizada esta estructura se procedió a una nueva optimización utilizando el algoritmo "Fletcher-Reeves" con gradiente conjugado hasta un valor de 0.02 Kcal/mol Å, que permitió considerar los efectos de la conjugación de dobles enlaces, tan importante a priori, en las moléculas objeto de estudio.

III.2.- CARACTERIZACIÓN DEL PREPARADO COMERCIAL

III.2.1.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO DE LA α -QUIMOTRIPSINA COMERCIAL

Para la determinación del porcentaje de proteína presente en el preparado comercial se empleó el método del Microbiuret, (228) empleando el reactivo de Benedict, cuya preparación se detalla a continuación:

Se disuelven 86.5 g de citrato sódico cristalizado ($2\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 11\text{H}_2\text{O}$) y 50 g de

carbonato sódico anhidro en 250 ml de agua (se filtra si es necesario). Se añade con agitación continua una solución de 8.65 g de sulfato cúprico cristalizado disuelto en 50 ml de agua, y se diluye a 500 ml. La solución resultante debe quedar perfectamente transparente.

Posteriormente se preparó una solución de seroalbúmina bovina en tampón fosfato pH=6.0, 0.1 M, de una concentración de 0.8 mg/ml.

Las condiciones experimentales empleadas para la construcción de la recta de calibrado en la determinación de proteína por el método del Microbiuret se muestra en la **Tabla 11** (como referencia se empleó el contenido del blanco);

Tabla 11.- Cálculo de la cantidad de proteína presente en una disolución, empleando seroalbúmina bovina como patrón.

Tubo	NaOH (0.1M) (ml)	R. Benedict (ml)	Tampón fosfato pH=6.0 (0.1 M) (ml)	Disol. Albúmina (ml)	Albúmina (mg)	Abs. (330 nm) (D.O.)
Blanco	4.0	0.2	1.0	0.0	0.00	0.000
Blanco	4.0	0.2	1.0	0.0	0.00	0.000
1a	4.0	0.2	0.8	0.2	0.16	0.054
1b	4.0	0.2	0.8	0.2	0.16	0.051
2a	4.0	0.2	0.6	0.4	0.32	0.098
2b	4.0	0.2	0.6	0.4	0.32	0.092
3a	4.0	0.2	0.5	0.5	0.40	0.117
3b	4.0	0.2	0.5	0.5	0.40	0.105
4a	4.0	0.2	0.4	0.6	0.48	0.114
4b	4.0	0.2	0.4	0.6	0.48	0.121
5a	4.0	0.2	0.2	0.8	0.64	0.160
5b	4.0	0.2	0.2	0.8	0.64	0.164
6a	4.0	0.2	0.1	0.9	0.72	0.192
6b	4.0	0.2	0.1	0.9	0.72	0.190
7a	4.0	0.2	0.0	1.0	0.80	0.197
7b	4.0	0.2	0.0	1.0	0.80	0.202

El contenido de los tubos se agitó bien y se dejó reaccionar durante 1 h. a 25 °C de temperatura, para que se forme el complejo coloreado entre los iones Cu (II) y los restos amino y carboxilo de los enlaces peptídicos. Transcurrido ese tiempo se midió la absorbancia a 330 nm. En la cubeta de referencia se empleó el blanco que no contenía proteína, y con el cual se realizó el autocero.

Siguiendo esta metodología obtuvimos la siguiente recta de calibrado:

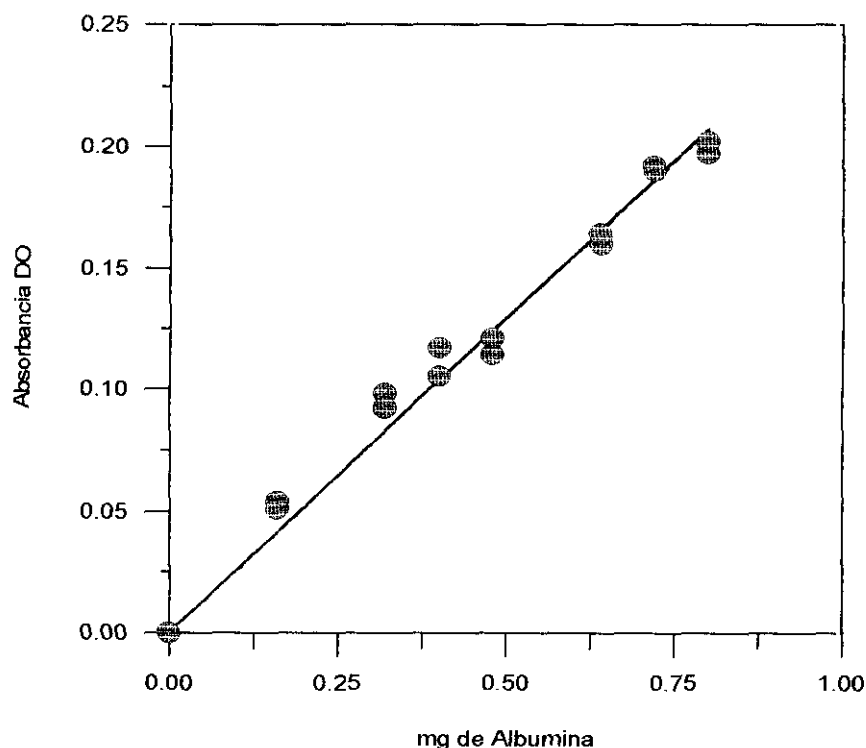


Figura 14.- Recta de calibrado para el cálculo de la cantidad de proteína presente en una disolución, empleando seroalbúmina bovina como patrón.

Los parámetros de esta recta son los siguientes:

-Pendiente= (0.245 ± 0.001) (D.O./mg de albúmina)

-Ordenada en el origen= (0.000 ± 0.001) , no es significativa según el test "t de Student" al 99% de certeza.

- $R^2=0.994$

El preparado comercial utilizado en la preste Tesis Doctoral posee un contenido en proteína de un $(83 \pm 4)\%$, calculado por el método del Microbiuret (228).

III.2.2.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE α -QUIMOTRIPSINA NATIVA

Para cuantificar la actividad hidrolítica de la enzima nativa, se empleó como reacción estándar, la hidrólisis del GpNA (229), cuantificando la cantidad de p-nitroanilina liberada por valoración espectrofotométrica a 410 nm. Para ello, a fin de calcular el coeficiente de extinción molar de la p-nitroanilina a esa longitud de onda, se realizó una curva patrón variando la concentración de p-nitroanilina según se muestra a continuación en la **Tabla 12** (como referencia se empleó el contenido del blanco):

Tabla 12.- Cálculo del coeficiente de extinción molar de la p-nitroanilina.

Tubo	Tampón ^a (ml)	Vol. pNA ^b (ml)	[pNA] ($\times 10^{-2}$ mM)	Abs. ^c (D.O.)
Blanco	5.0	0.0	0.00	0.000
1a	4.0	1.0	1.77	0.130
1b	4.0	1.0	1.77	0.132
1c	4.0	1.0	1.77	0.126
2a	3.0	2.0	3.53	0.254
2b	3.0	2.0	3.53	0.254
2c	3.0	2.0	3.53	0.256
3a	2.0	3.0	5.30	0.369
3b	2.0	3.0	5.30	0.374
3c	2.0	3.0	5.30	0.372
4a	1.0	4.0	7.07	0.492
4b	1.0	4.0	7.07	0.497
4c	1.0	4.0	7.07	0.495
5a	0.0	5.0	8.83	0.642
5b	0.0	5.0	8.83	0.643
5c	0.0	5.0	8.83	0.643

^a Tampón fosfato monopotásico/fosfato dipotásico pH=7.8 (0.1M).

^b Disolución madre de pNA (8.83×10^{-2} mM).

^c Absorbancia medida a 410 nm.

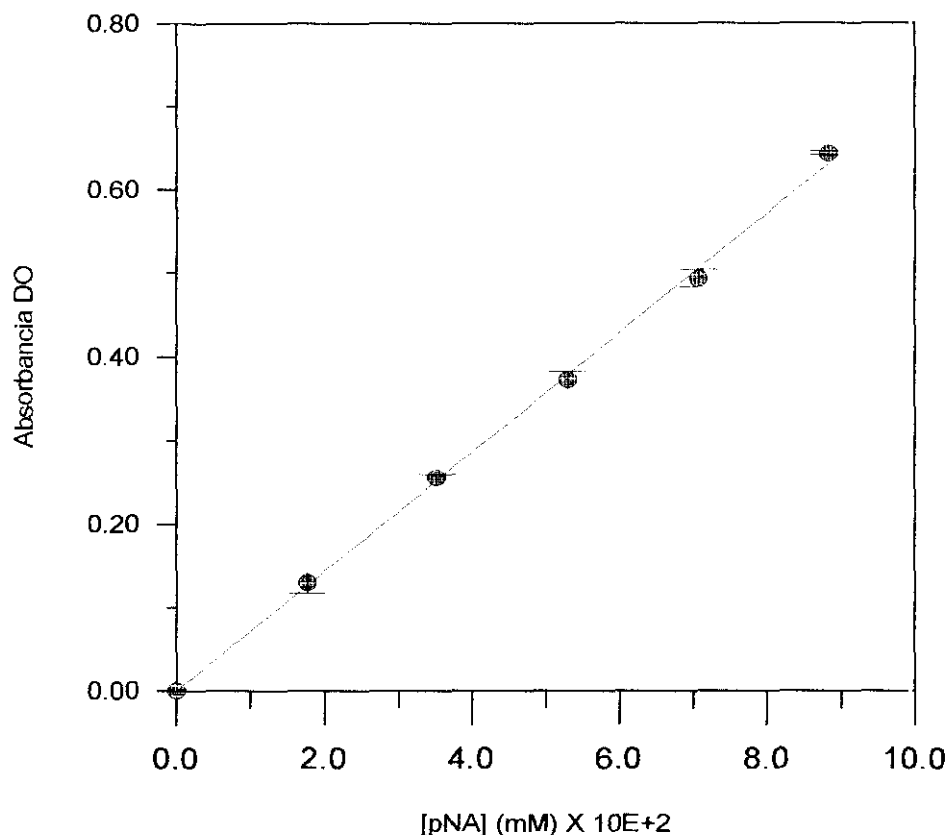


Figura 15.- Cálculo del coeficiente de extinción molar de la p-nitroanilina.

El valor de la pendiente de esta recta coincide con el coeficiente de extinción molar (ϵ), que resultó ser:

-Pendiente = $(0.0717 \pm 0.0003) \text{ (mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$.

-La ordenada en el origen no es significativa según el test "t de Student" al 99% de certeza .

- $R^2 = 0.999$.

Una vez llevada a cabo esta valoración espectrofotométrica, se cuantificó la actividad hidrolítica de la α -quimotripsina nativa, realizando diferentes ensayos de hidrólisis de GpNA (0.015 M en DMF) (229) empleando distintas cantidades de una disolución de α -quimotripsina comercial preparada en tampón fosfato pH=6.0, 0.1 M de una concentración de 1.37 mg/ml.

Así, se realizó un protocolo que aparece indicado en la siguiente **Tabla 13** (como

referencia se empleó el contenido del blanco):

Para calcular la velocidad inicial de reacción se cuantificó el incremento de absorbancia producido a 410 nm debido a la liberación de p-nitroanilina en un intervalo de tiempo de 25 minutos y una temperatura de 25 °C, el cual, mediante el empleo del coeficiente de extinción molar calculado anteriormente, pudimos transformar dicho valor en actividad hidrolítica, cuantificada como μ moles de p-nitroanilina liberada por minuto.

Para medir la actividad hidrolítica específica, esto es, expresando la actividad por unidad de cantidad de enzima, se procedió a la representación de la velocidad medida frente a la cantidad de preparado comercial presente en cada ensayo, obteniéndose así la representación que aparece indicada en la **Figura 16**.

Tabla 13.- Cálculo de la actividad hidrolítica específica.

Tubo	α -Quimotr.		Tampón ^a	GpNA	Abs. ^b	Actividad ^c
	(ml)	(mg)	(ml)	(ml)	(D.O.)	
Blanco	0.0	0.000	4.5	0.5	0.000	0.000
1a	0.1	0.137	4.4	0.5	0.141	0.788
1b	0.1	0.137	4.4	0.5	0.141	0.900
2a	0.2	0.274	4.3	0.5	0.247	1.382
2b	0.2	0.274	4.3	0.5	0.247	1.488
3a	0.3	0.411	4.2	0.5	0.441	2.466
3b	0.3	0.411	4.2	0.5	0.421	2.356
4a	0.4	0.548	4.1	0.5	0.545	3.048
4b	0.4	0.548	4.1	0.5	0.555	3.104
5a	0.5	0.685	4.0	0.5	0.666	3.726
5b	0.5	0.685	4.0	0.5	0.690	3.860

^a Tampón fosfato monopotásico/fosfato dipotásico pH=7.8 (0.1M).

^b Absorbancia medida a 410 nm.

^c Actividad en (μ M pNA/min.).

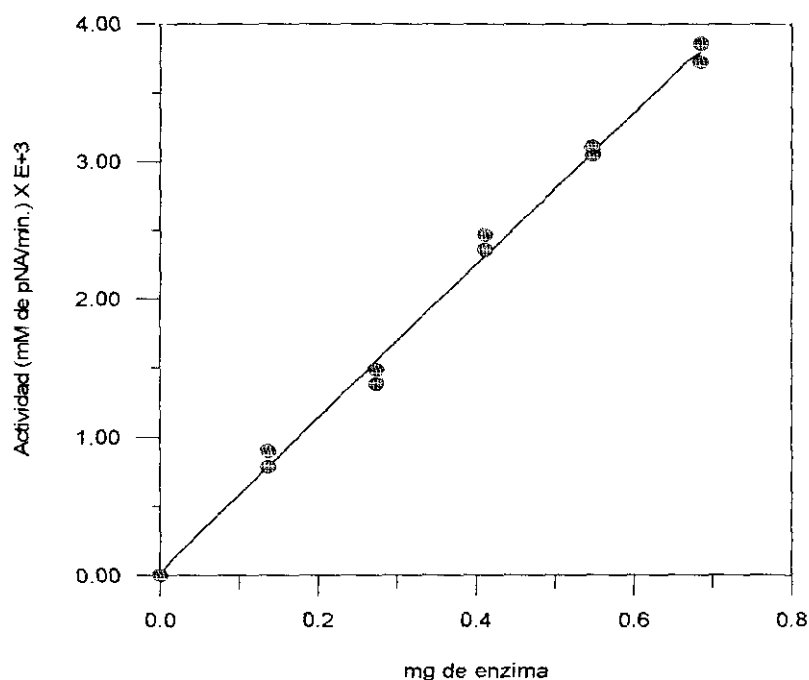


Figura 16.- Cálculo de la actividad hidrolítica específica de la α -quimotripsina comercial.

Así, la actividad hidrolítica específica de la α -quimotripsina comercial empleada en la presente Memoria coincide con el valor de la pendiente de la recta.

-Pendiente = $(2.54 \pm 0.04) \mu\text{M de pNA liberados min.}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ de enzima}$,

-La ordenada en el origen no fue significativa según el test "t de Student" al 99% de certeza.

- $R^2 = 0.997$.

III.3.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DERIVADOS α -QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA SOBRE COPOLÍMEROS DE INJERTO (PE/HEMA)

III.3.1- PREPARACIÓN DEL SOPORTE (PE/HEMA)

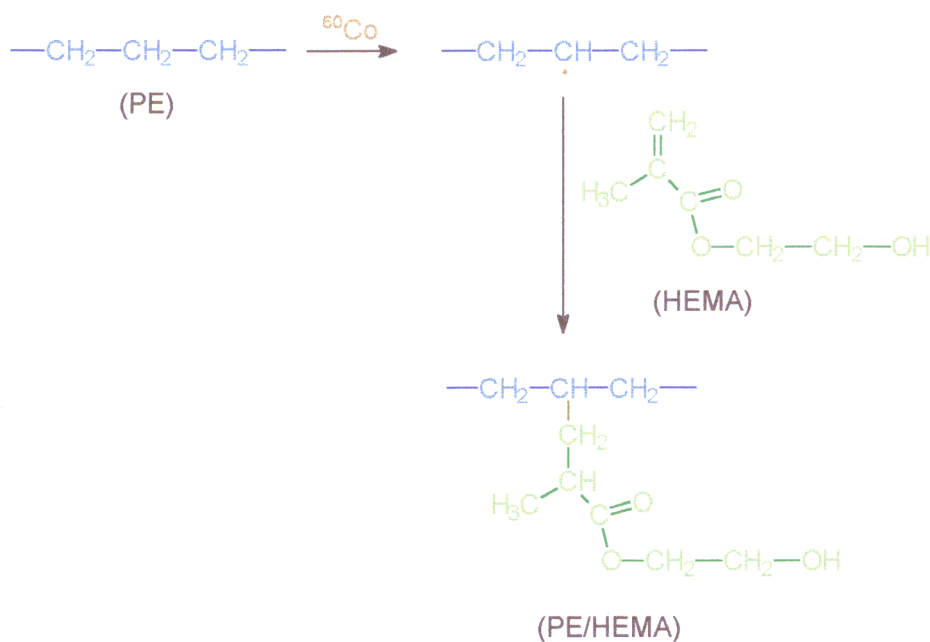
III.3.1.1.- Síntesis del copolímero (PE/HEMA)

El polietileno comercial primeramente fue purificado por extracción en soxhlet con

etanol absoluto durante 6 horas y posterior secado hasta peso constante a 40°C. Por otro lado, se preparó una solución de 30 ml de metacrilato de 2'-hidroxietilo en metanol (10% p/p). Posteriormente, se dispersaron 2g. de polietileno en los 30 ml de la solución anteriormente preparada y todo ello se irradió con ^{60}Co a 18 rad/seg durante 72 horas a 25°C de temperatura y en presencia de aire.

A continuación, se diluyó la mezcla con metanol hasta un volumen 6 veces mayor y se filtró, lavando el residuo sólido con metanol. Posteriormente, para arrastrar el metacrilato de 2'-hidroxietilo (HEMA) no unido al polietileno, se llevó a cabo una extracción en soxhlet con metanol y se secó a 40°C hasta peso constante.

Finalmente, se realizó otra extracción en soxhlet, esta vez con tolueno, durante 5.5 horas, con el fin de obtener el polietileno no injertado. Para medir el polietileno no injertado se dejó enfriar el volumen resultante de la extracción, con lo que se produjo la precipitación del polietileno no injertado. Se dejó secar el sólido hasta pesada constante.



Esquema 24.- Reacción de síntesis del copolímero (PE/HEMA)

El rendimiento del injerto se calculó según la ecuación [17], donde E_p representa la cantidad de HEMA presente en el copolímero en relación al polietileno existente en el mismo:

$$E_p = \frac{M_c - (M - F)}{(M - F)} * 100 \quad [17]$$

M_c = copolímero puro

M = polietileno inicial

F = polietileno extraído por el soxhlet

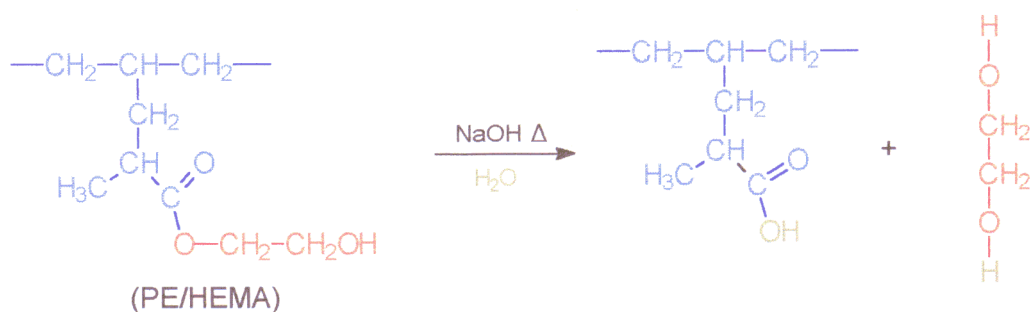
Para expresar el porcentaje de HEMA en función de la masa total del soporte empleamos la expresión [18], que nos parece más correcta al no superar nunca el 100% (esta segunda expresión es la que emplearemos para calcular el porcentaje de injerto a lo largo de esta memoria):

$$E = \frac{M_c - (M - F)}{M_c} * 100 \quad [18]$$

Donde E representa el porcentaje de HEMA en relación a la masa total de copolímero.

III.3.1.2.-Hidrólisis del copolímero formado

Se pesaron 2 g. de copolímero (PE/HEMA) y se añadieron a una solución de hidróxido sódico 1 M recientemente preparada (50 ml). Posteriormente, se adicionaron 2 ml de Tritón X 100 y se mantuvieron a reflujo durante 4 horas.



Esquema 25.- Hidrólisis del copolímero.

A continuación se lavó el copolímero sobre una placa de vidrio poroso con agua abundante hasta que la espuma desapareció y se lavó posteriormente el residuo sólido con HCl 1 M (50 ml) para neutralizar el hidróxido de sodio que pudiera quedar. Para finalizar, se realizó un segundo lavado del copolímero injertado e hidrolizado, con agua, y se dejó secar a 40 °C durante 24 h .

Para calcular el número de grupos carboxilo libres provenientes de la hidrólisis, se añadió un exceso de NaOH 0.05 M (10 ml) a un matraz que contenía 50 mg del copolímero de injerto hidrolizado y se mantuvo en agitación durante 24 h; pasado ese tiempo, se filtró el contenido y 5 ml del sobrenadante se diluyeron con agua hasta un volumen final de 25 ml, que posteriormente fueron valorados con HCl 0.01 M. La diferencia entre los moles de NaOH añadidos y los obtenidos en la valoración con HCl se corresponde con la concentración de restos carboxilato libres en el copolímero. De esta forma se obtuvieron unos soportes que se denominaron C1, C2 y C3, cuyas características diferenciales se comentarán más adelante en la **Sección (IV.1.1)**.

III.3.1.2.1.- Modificaciones del método de hidrólisis.

En el caso de los derivados con un 54.5% de injerto (respecto a la masa total de soporte) existen ciertas diferencias en el proceso de hidrólisis:

-Para obtener C4, se partió de 1 g de copolímero que se hidrolizó empleando una solución de NaOH 1 M (50 ml), 1 ml de Tritón X 100, y se dejó todo ello a reflujo durante 4 horas.

-En el caso del derivado C5, intentando aumentar el porcentaje de hidrólisis, se partió de 4 g de polímero los cuales se depositaron en el seno de una solución de NaOH 2 M (200 ml), añadiéndose a continuación 4 ml de Triton X 100, dejando la mezcla a reflujo durante 24 h.

Por otra parte, se suavizó el proceso de hidrólisis, empleando sólo 50 ml de NaOH (2 M) para 2 g de copolímero y 2 ml de Tritón X 100 durante 4 horas. Así se obtuvo el copolímero C6.

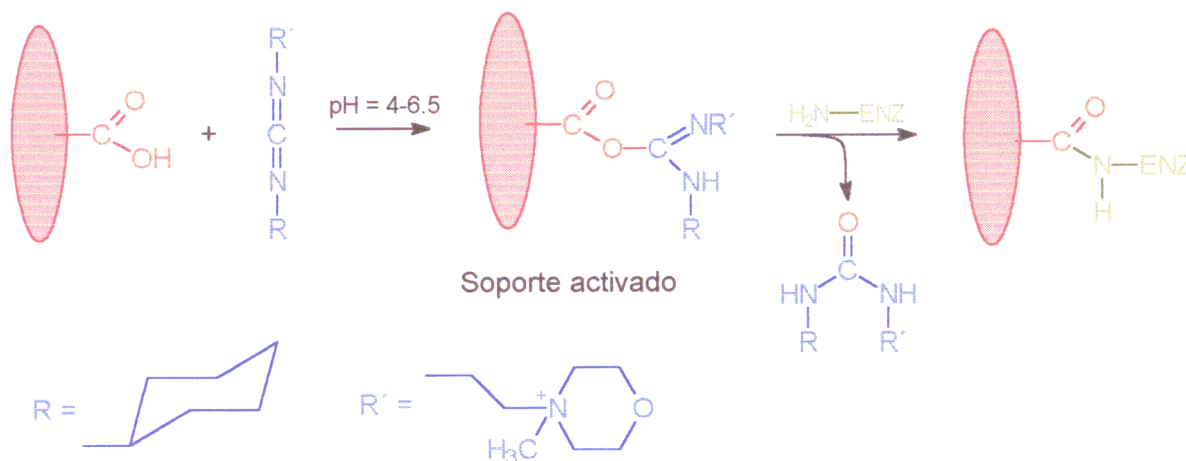
Los resultados de estas modificaciones junto con las propiedades de los copolímeros

C1, C2 y C3 anteriormente mencionados se recogen en la **Tabla 16** (Sección IV.1.1).

III.3.2.- INMOVILIZACIÓN COVALENTE DE LA α -QUIMOTRIPSINA SOBRE COPOLÍMEROS DE INJERTO (PE/HEMA).

Para llevar a cabo el proceso de inmovilización, se prepararon 100 ml de una solución de tampón fosfato de pH=6.0 (0.1 M), a la que se adicionaron 2 g. de copolímero (PE/HEMA) seco, 400 mg de enzima y 400 mg de CMC (N-ciclohexil-N'-(2-(metilmorfolino)etil)-carbodiimida-4-tolueno-sulfonato).

Se mezcló todo en un matraz Erlenmeyer y se mantuvo con agitación durante 18 horas a 4 °C, para que tuviera lugar la reacción de inmovilización, la cual se llevó a cabo mediante la unión de los grupos carboxilo del soporte, activados con la carbodiimida, y los restos ϵ -amino de grupos lisisna de la proteína, tal y como aparece indicado en el **Esquema 26**:



Esquema 26.- Reacción de inmovilización de α -quimotripsina sobre copolímeros de injerto (PE/HEMA).

Posteriormente, se filtró el contenido del matraz para eliminar los restos de dialquilurea y la enzima no unida covalentemente al soporte, llevando a cabo un posterior lavado con tampón fosfato de pH=6.0, 0.1 M (el mismo con el que se realizó la inmovilización) (2 $\times$ 50

ml).

En los líquidos de los filtrados se determinó la cantidad de enzima existente empleando el método del Microbiuret (228), tal y como se indica en la **Sección III.2**. Así, al conocer, la cantidad de enzima añadida inicialmente, por diferencia se puede calcular fácilmente la carga enzimática del derivado. Siguiendo esta metodología se obtuvieron los derivados **C1-CT**, **C2-CT**, **C3-CT**.

Para convertir los valores de absorbancia en unidades de concentración construimos una recta de calibrado empleando en vez de seroalbúmina bovina como patrón la enzima comercial ya caracterizada disuelta en tampón fosfato de pH=6.0 (0.1 M), resultando una concentración en el tubo madre de 1.76 mg de enzima/ml. Siguiendo el protocolo que se muestra en la **Tabla 14**, calculamos la carga enzimática de los derivados (como referencia, se empleó el blanco):

Tabla 14.- Cálculo de la cantidad de proteína presente en una disolución empleando α -quimotripsina como patrón.

Tubo	NaOH ^a (ml)	R. Benedict (ml)	Tampón ^b (ml)	Enzima (ml)	α -Quimot. (mg)	Abs. ^c (D.O.)
Blanco	4.0	0.2	1.0	0.0	0.000	0.000
Blanco	4.0	0.2	1.0	0.0	0.000	0.000
1a	4.0	0.2	0.8	0.2	0.352	0.080
1b	4.0	0.2	0.8	0.2	0.352	0.082
2a	4.0	0.2	0.6	0.4	0.704	0.155
2b	4.0	0.2	0.6	0.4	0.704	0.146
3a	4.0	0.2	0.5	0.5	0.880	0.190
3b	4.0	0.2	0.5	0.5	0.880	0.188
4a	4.0	0.2	0.4	0.6	1.056	0.231
4b	4.0	0.2	0.4	0.6	1.056	0.239
5a	4.0	0.2	0.2	0.8	1.408	0.309
5b	4.0	0.2	0.2	0.8	1.408	0.313
6a	4.0	0.2	0.1	0.9	1.584	0.347
6b	4.0	0.2	0.1	0.9	1.584	0.330
7a	4.0	0.2	0.0	1.0	1.760	0.382
7b	4.0	0.2	0.0	1.0	1.760	0.378

^a Solución de NaOH (0.1M)

^b Tampón fosfato monopotásico/fosfato dipotásico pH=6.0 (0.1 M)

^c Absorbancia medida a una longitud de onda de 330 nm.

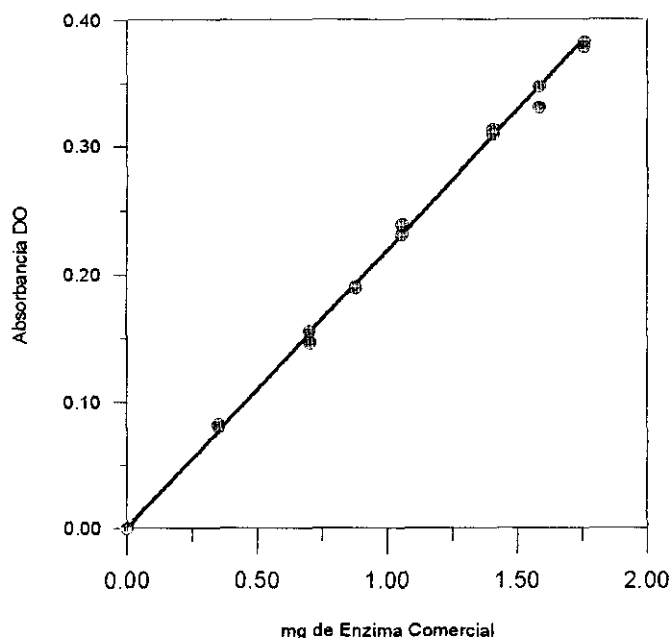


Figura 17.- Recta de calibrado para el cálculo de la cantidad de proteína empleando α -quimotripsina comercial, caracterizada, como patrón.

Los parámetros de esta recta resultaron ser :

-Pendiente= (0.215 ± 0.001) (D.O/mg de enzima)

-La ordenada en el origen no fue significativa según el test "t de Student" (99% de certeza)

- $R^2=0.999$

III.3.2.1.- Modificación del proceso de inmovilización

A fin de intentar mejorar el método de inmovilización y aumentar la carga enzimática, en el caso de los derivados de mayor porcentaje de injerto se introdujeron diferentes modificaciones en el proceso descrito en el apartado anterior:

a) Para favorecer los choques intermoleculares se redujo el volumen a la mitad.

b) Por otra parte y a fin de estudiar las posibles diferencias entre el método de inmovilización "one-pot" en un solo paso y una metodología secuencial, se puso en contacto la CMC con la solución de copolímero durante 24 h.; transcurrido ese tiempo, se añade la enzima y se deja reaccionar a 4 °C de temperatura durante otras 24 h. Con esto pretendemos

activar el soporte antes de reaccionar con la enzima al hacer reaccionar los restos carboxilato del soporte con la CMC evitando que esta reaccione con los grupos carboxilato de la enzima, y sí con los residuos ϵ -amino de lisina.

Siguiendo estas modificaciones se obtuvieron los derivados C4-CT, C5-CT, y C6-CT (ver Tabla 16, Sección IV.1.1).

III.3.3.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS DERIVADOS INMOVILIZADOS

Para determinar la actividad enzimática de los derivados inmovilizados, se realizó un ensayo similar al que se describe para la enzima nativa, empleando GpNA como sustrato. Para ello, se procedió a incubar 25 mg del derivado inmovilizado en 4.5 ml de tampón fosfato pH=7.8, 0.1 M a 25 °C, con 0.5 ml de una disolución de GpNA en DMF (229) de concentración 0.015 M.

Transcurridos 25 minutos, la reacción se detiene por filtración a través de una placa de vidrio Pyrex del n° 4, separando así el derivado sólido del resto de los componentes de la reacción. Posteriormente se midió la absorbancia a 410 nm originada por la p-nitroanilina liberada presente en los líquidos del filtrado, y por interpolación en las curvas de calibrado empleadas para la enzima comercial en la Sección III.3 (Fig. 15 y 16), se obtuvieron los valores de actividad retenida de los derivados, expresada en comparación con la cantidad porcentual de enzima nativa que nos proporcionaría la misma actividad hidrolítica, (Tabla 16).

III.4.- DERIVADOS INMOVILIZADOS SOBRE GELES DE AGAROSA

Estos derivados fueron suministrados por el grupo del Dr. Guisán, para compararlos con los derivados obtenidos sobre copolímeros de injerto.

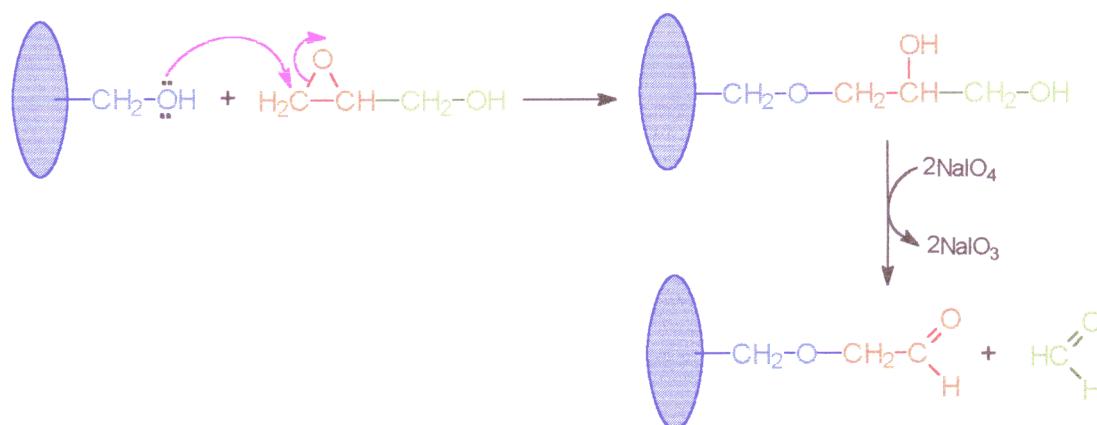
III.4.1.- ACTIVACIÓN DEL SOPORTE.

La activación de los geles de agarosa la realizaron siguiendo la metodología del

glicidol, (230, 231), que esencialmente se puede resumir en una primera reacción de los geles de agarosa (6% de entrecruzamiento) con glicidol (2,3-epoxipropanol) (**Esquema 27**), lo que condujo a la obtención de un intermedio glicidil-agarosa ($\text{Ag-O-CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{OH}$), que seguidamente oxidaron con periodato sódico a $\text{pH}=7.0$, obteniendo de esta forma geles glioxil-agarosa ($\text{Ag-O-CH}_2\text{-CHO}$) con diferente grado de activación según la cantidad de glicidol empleada inicialmente (**Tabla 16 Sección IV.2.1**).

a) Para obtener soportes con poca activación emplearon simplemente los grupos aldehído provenientes de la oxidación del soporte. Así sobre 150 ml de gel suspendido en 30 ml de agua se añade periodato de sodio en una cantidad suficiente en cada caso para oxidar todos los grupos glicerilo existentes sobre el soporte y previamente valorados. Se agita suavemente a temperatura ambiente durante 3 h., lavándose a continuación con agua y empaquetándose para medir su volumen exacto. Siguiendo esta metodología se obtuvieron los soportes **AGU1** y **AGU2**.

b) En el caso de los soportes más activados, a 150 ml de gel empaquetado y suspendido en 30 ml de agua se añaden 50 ml de una solución de NaOH 1.7 N conteniendo 28.5 mg/ml de borohidruro de sodio. Sobre esta suspensión se añade el glicidol muy lentamente controlando la temperatura, manteniéndose todo en agitación suave durante 18 h. a temperatura ambiente. Seguidamente se lavan los geles abundantemente con agua. A continuación se añade periodato de sodio en cantidad suficiente para oxidar todos los grupos gliceril existentes sobre el soporte. De esta forma se obtuvo el soporte **AGM1**, con mayor cantidad de restos aldehído que los soportes **AGU1** y **AGU2**.



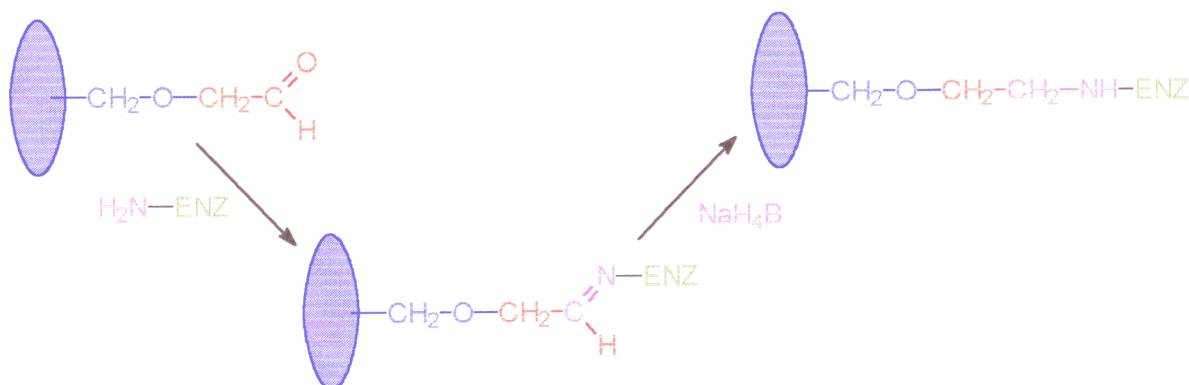
Esquema 27.- Reacción de activación de los geles de agarosa.

III.4.2.- INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA.

La unión de la enzima fue llevada a cabo por el grupo del Dr. Guisán, según se describe en la bibliografía (230-233).

Se disuelve una cantidad de α -quimotripsina según la carga del derivado a obtener, (teniendo en cuenta que se inmoviliza toda la enzima ofrecida al soporte activado, siempre que la relación enzima/soporte no sea superior a 40 mg de enzima/ml de gel), en 40 ml de tampón borato, pH=10.0, 0.1 M, a la cual añadieron 40 ml de una suspensión de agarosa activada, que contenía 20 ml de gel. Esta mezcla se mantuvo en agitación muy ligera, a 25 °C, tomando a diferentes tiempos alícuotas tanto de la suspensión como del sobrenadante, y su actividad fue analizada espectrofotométricamente, empleando BTEE como sustrato, tal y como esta descrito (231).

Después de 3 horas, el derivado enzimático se redujo empleando borohidruro sódico y tampón borato de pH=10.0 0.1 M, siguiendo el procedimiento de los geles tripsina-agarosa (233). De esta forma:



Esquema 28.-Reacción de inmovilización de α -quimotripsina sobre geles de agarosa activados con glicidol.

III.5.- SÍNTESIS PEPTÍDICA CATALIZADA POR α -QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA EN MEDIOS ORGÁNICO-ACUOSOS

La reacción estándar de síntesis del dipéptido modelo Bz-*L*-Tyr-*L*-Leu-NH₂ se llevó a

cabo en un reactor tipo tanque agitado, de un volumen aproximado de 50 ml, el cual se introdujo en un baño termostatzado a 25 °C. Como medio acuoso se empleó tampón Tris/HCl 0.1M pH=9.0, 0.1 M y como codisolventes orgánicos se probaron: 1,1,1-tricloroetano, metilisobutilcetona, acetato de etilo, acetonitrilo, N,N-dimetilformamida, 1,4-butanodiol y etanol absoluto, en diferentes proporciones desde 10/90 hasta 99/1 (% , v/v), disolvente orgánico/tampón.

Los donadores de acilo utilizados fueron BTEE o APEE (10 mM), y como nucleófilo se emplearon H-L-Leu-NH₂, H-L-Ala-NH₂, H-L-Arg-NH₂, H-L-Met-NH₂, H-L-Ser-NH₂, H-L-Asp-NH₂, H-L-Gly-NH₂, (40 mM), (en forma de clorhidrato); el volumen final fue en todos los casos de 20 ml y, puesto que el nucleófilo estaba en forma de clorhidrato, se añadió una cantidad de trietilamina equimolecular respecto a la cantidad de HCl, a fin de lograr la perfecta solubilización de la muestra y no causar ninguna variación de pH.

Posteriormente, se procedió a agitar la muestra durante 30 minutos para lograr una buena disolución de todos los componentes, y realizar la toma de muestra correspondiente a tiempo cero. A continuación, se añadió la enzima libre o inmovilizada sobre los diferentes soportes, en concentraciones variables desde 0.48 mg de enzima/ml hasta 0.044 mg de enzima/ml. Una vez añadida la enzima, se fueron tomando muestras a diferentes tiempos de reacción que se analizaron por HPLC.

Por lo que respecta a la toma de muestras, ésta se llevó a cabo succionando desde la mezcla de reacción un volumen de 0.05 ml, que posteriormente fue diluido con 0.85 ml de una disolución de naftaleno en acetonitrilo (0.47 mM), que actúa de patrón interno y 0.1 ml de alcohol etílico con el fin de anular la actividad enzimática, obteniendo de esta forma un volumen final de 1 ml. Estas muestras se cromatografiaron inmediatamente empleando la técnica de HPLC, o bien se almacenaron en el congelador a -15 °C hasta su posterior análisis.

Las muestras se filtraron con un filtro tipo GV de la casa "Technokroma" de un diámetro de poro de 0.22 µm, con el fin de eliminar las partículas de derivado inmovilizado que pudieran obstruir las precolumnas del HPLC, pasando el contenido a un vial, para lograr la separación y cuantificación de los productos.

El análisis por HPLC se realizó con un cromatógrafo LDC empleando una columna C₈ Nucleosil 128 (LDM). El eluyente fue acetonitrilo/H₂O (55/45) (v/v). La longitud de onda

empleada fue de 270 nm en el caso de BTEE y 254 nm en el caso del APEE. Conociendo las cantidades iniciales de naftaleno y sustrato se pueden calcular los rendimientos a los diferentes tiempos de reacción empleando la técnica del patrón interno, con el cálculo del factor de respuesta "f" según las expresiones siguientes:

$$f = \frac{A_p}{A_n} * \frac{[n]}{[p]} \quad [19]$$

f=Factor de respuesta

A_p=Área del producto

A_n=Área del naftaleno

[n]=Concentración inicial de naftaleno

[p]=Concentración inicial de producto

$$[p]_{ti} = \frac{A_p}{A_n} * \frac{[n]}{f} \quad [20]$$

[p]_{ti}=Concentración de producto a un tiempo determinado

$$(\%P)_{ti} = \frac{[p]_{ti} * V_r * V_v}{V_e * M_t} * 100 \quad [21]$$

(%p)_{ti}=Tanto por ciento de producto en reactor

V_r=Volumen remanente

V_e=Volumen extraído

V_v=Volumen del vial (1 ml)

M_t=Moles totales de producto

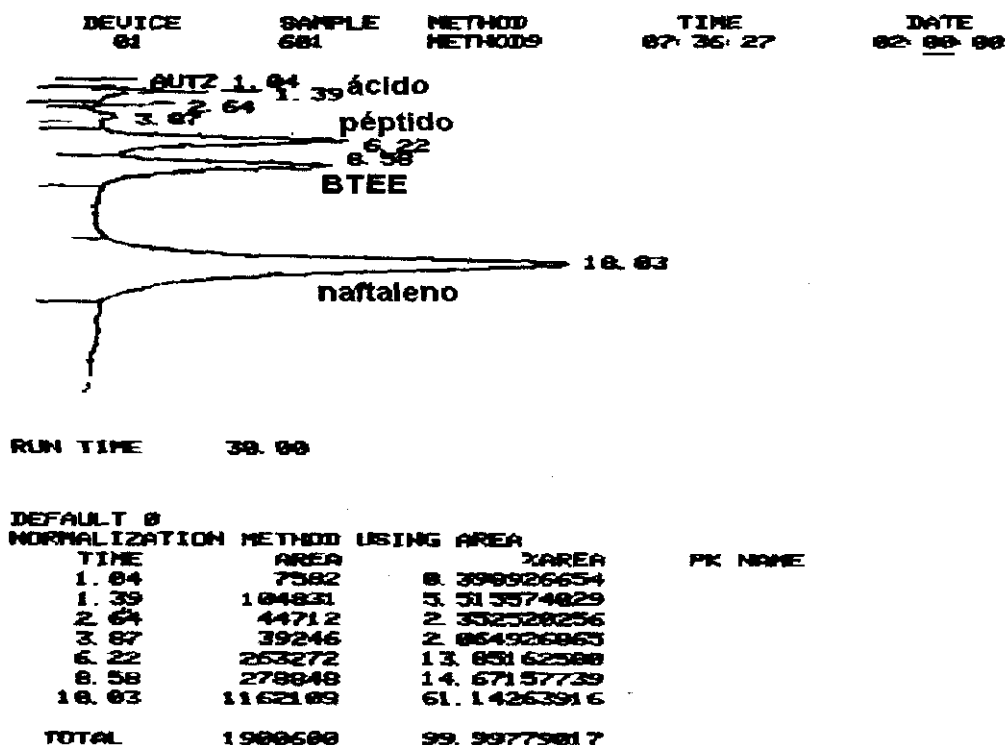


Figura 18.- Cromatograma de una muestra a un tiempo diferente de cero. Síntesis del dipéptido modelo Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂.

III.6.- ENSAYOS CON DERIVADOS DE α -QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA SOBRE COPOLÍMEROS DE INJERTO (PE/HEMA)

A fin de comprobar la estabilidad operacional de los derivados inmovilizados de α -quimotripsina sobre copolímeros de injerto PE/HEMA, se llevaron a cabo una serie de estudios fundamentales desde el punto de vista de Ingeniería Enzimática.

III.6.1.- ENSAYOS DE ESTABILIDAD ENZIMÁTICA

En primer lugar, se comprobó la variación de la estabilidad enzimática en condiciones de almacenamiento, y a diferentes temperaturas, tanto en condiciones de hidrólisis como de síntesis.

A) En condiciones de hidrólisis

Para comparar la estabilidad de nuestros derivados con la de la enzima libre se llevó a cabo un estudio similar para ambos sistemas.

1) Enzima libre

a) Actividad enzimática:

La actividad enzimática fue determinada espectrofotométricamente a 25 °C y a una longitud de onda de análisis de 410 nm) utilizando como sustrato N-benzoil-L-tirosin-p-nitroanilida (BTpNA) (4.39 mM en acetona) (258). Para definir el ensayo estándar de actividad se necesitaron:

- 2.6 ml de tampón Tris/HCl pH=8.0, 0.1 M.
- 25 μ l de BTpNA (4.39 mM en acetona).
- 0.275 ml de acetona.
- 0.1 ml de solución tampón (cubeta de referencia) ó 0.1 ml de solución de enzima (0.62 mg/ml) (cubeta de muestra) preparada en tampones: ác. cítrico/citrato sódico pH=3.0, 0.05 M; ác. bórico/NaOH pH=9.0, 0.05 M; y ác. bórico/NaOH pH=9.0 0.05 M con un 10% de N,N-dimetilformamida (v/v) .

Primeramente, se calculó el coeficiente de extinción molar (ϵ) de este sustrato, para obtener directamente las velocidades iniciales expresadas en (mmoles/min.), para lo cual se construyó una curva de calibrado de absorbancia frente a concentración de sustrato empleando una disolución madre de BTpNA en acetona (4.39 mM) y otra disolución de enzima en tampón de almacenamiento ác. cítrico/citrato de pH=3.0, (0.1M) muy concentrada (10 mg de enzima/ml), para hidrolizar rápidamente el sustrato y comprobar la variación de la absorbancia a 410 nm en función de la concentración de sustrato, según se describe en el siguiente protocolo, **Tabla 15**, (como referencia se empleo el contenido del blanco):

Tabla 15.- Cálculo del coeficiente de extinción molar del BTpNA.

Tubo	Tampón ^a (ml)	Acet. (ml)	Enz. ^b (ml)	BTpNA ^c (ml)	[BTpNA] (mM)	A ₀ ^d (D.O.)	A _∞ ^e (D.O.)	A _∞ ^e -A ₀ ^d (D.O.)
Blanco	2.6	0.300	0.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1	2.6	0.295	0.1	0.005	0.007	0.003	0.081	0.079
2	2.6	0.285	0.1	0.015	0.022	0.002	0.227	0.225
3	2.6	0.275	0.1	0.025	0.037	0.003	0.382	0.379
4	2.6	0.250	0.1	0.050	0.073	0.004	0.673	0.669
5	2.6	0.225	0.1	0.075	0.110	0.005	1.005	1.000
6	2.6	0.200	0.1	0.100	0.146	0.007	1.493	1.486
7	2.6	0.175	0.1	0.125	0.183	0.008	2.003	1.995
8	2.6	0.150	0.1	0.150	0.220	0.011	2.326	2.315

^a Tampón Tris/HCl pH=8.0, 0.1 M.

^b Disolución de enzima (1.0 mg/ml).

^c Disolución de BTpNA (4.39 mM).

^d Absorbancia a 410 nm debida al tampón, a la acetona, y al sustrato, antes de tener lugar su hidrólisis.

^e Absorbancia a 410 nm debida a p-nitroanilina liberada tras la hidrólisis enzimática del sustrato.

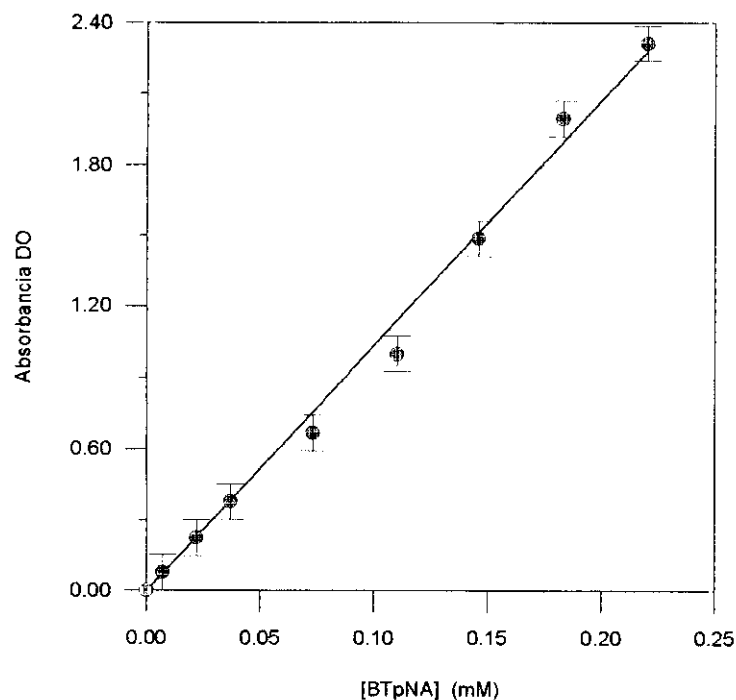


Figura 19.- Recta de calibrado para determinar el coeficiente de extinción molar del BTpNA.

Parámetros de la recta:

-Pendiente = $(10.6 \pm 0.2) \text{ (mM}^{-1}\text{)}$

-Ordenada en el origen es no significativa con un 99% de certeza, según el test "t de Student".

- $R^2 = 0.997$

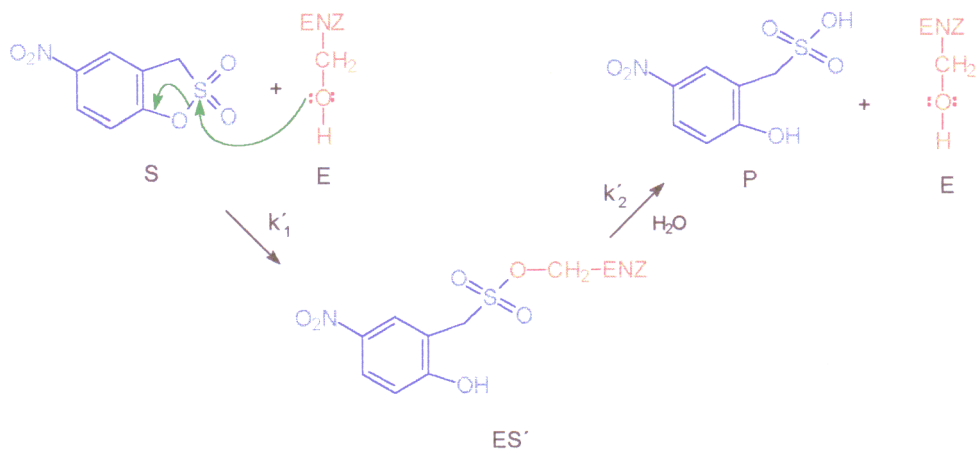
Así el valor de la pendiente de esta curva coincide con el coeficiente de extinción molar (ϵ), resultando $\epsilon = (10.6 \pm 0.2) \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$.

Para realizar el estudio de estabilidad térmica de la enzima libre se incubaron varios tubos de ensayo con soluciones de enzima (0.62 mg/ml) en los diferentes tampones anteriormente indicados, a 2, 25, 37 y 50 °C, de los cuales se fueron tomando muestras a diferentes tiempos para cuantificar la actividad enzimática remanente siguiendo el ensayo estándar. Considerando el valor inicial de actividad como el 100%, se estudió la estabilidad del catalizador en diferentes condiciones de pH y temperatura.

Conviene comentar que dentro del tubo de ensayo no existe agitación aunque el sistema termostatizador sí la presenta. Este dato puede ser interesante para luego comparar con sistemas bifásicos en agitación.

b) Medida de la concentración de centros activos en disoluciones enzimáticas:

Para conocer la concentración de centros activos se empleó como sustrato valorante la sultona del ácido 2'-hidroxi-5'-nitrofenil-metanosulfónico (S) la cual reacciona con la enzima dando lugar a un compuesto coloreado (ES') (**Esquema 29**) cuya absorbancia a 390 nm es función de la concentración de centros activos que presenta la disolución (74).



Esquema 29.- Reacción de α -quimotripsina con la sultona del ácido 2'-hidroxi-5'-nitrofenil-metanosulfónico

De esta forma se prepararon disoluciones de enzima de 5 mg/ml en tampones: ác. cítrico/citrato sódico pH=3.0 (0.05 M) y ác. bórico/borato sódico pH=9.0, 0.05 M, con un 10% de N,N-dimetilformamida (v/v), las cuales se incubaron a 2 y 25 °C para tomar alícuotas de 0.1 ml a diferentes tiempos y llevar a cabo el siguiente ensayo estándar, a una longitud de onda de 390 nm y a 25 °C de temperatura:

-Cubeta de referencia 3 ml de tampón Tris/HCl pH=7.5, 0.1 M.

-Cubeta de muestra 3 ml del mismo tampón, a la cual se añaden 0.1 ml de disolución enzimática preparada con los tampones anteriormente citados, y se cuantifica el aumento de absorbancia que causa la enzima (A_1). Posteriormente se añaden 0.05 ml de una disolución de la citada sultona (2.98 mM) en acetonitrilo originándose un incremento brusco en el valor de la absorbancia al reaccionar la enzima con el sustrato, para dar el complejo ES' (**Figura 20**) (A_2). Posteriormente, la absorbancia sigue aumentando debido a que la enzima continua con el proceso de hidrólisis del resto de las moléculas de sustrato (**Figura 20**).

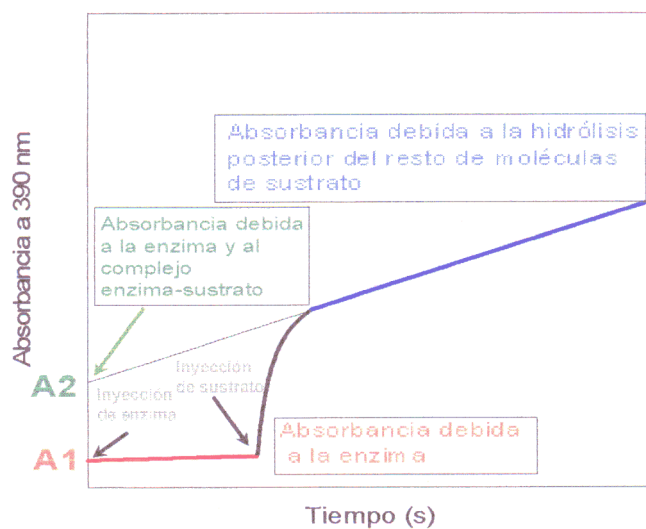


Figura 20.- Medida de la concentración de centros activos.

De esta forma se produce el fenómeno conocido como explosión ("burst"), ya comentado en la (Sección I.1.3.3), fenómeno que sucede cuando un intermedio unido a la enzima se acumula en el transcurso de la reacción. Así, el primer mol de sustrato reacciona rápidamente con la enzima para formar cantidades estequiométricas del intermedio unido a la enzima y del producto, y posteriormente el siguiente paso es más lento, pues depende de la ruptura del intermedio para liberar el catalizador.

Sí k_1 es mucho mayor que k_2 la formación del intermedio ES es fácilmente medible y con lo cual también es sencillo conocer la concentración (molaridad) de centros activos de la solución enzimática.

De esta forma con sustratos tales como el acetato de p-nitrofenilo (67), N-*trans*-cinamoil-imidazol (73) o la sultona (74), es posible medir de esta forma el número de centros activos presentes en la preparación enzimática.

Según esto empleando, la siguiente expresión extraída de la bibliografía (74) podemos obtener la concentración de centros activos de la disolución

$$M_E = \frac{31.5 * (A_2 - A_1)}{\epsilon_{ES}} \quad [6]$$

M_E = Molaridad de centros activos

A_1 = Absorbancia debida a la enzima en (D.O.)

A_2 = Absorbancia debida a la enzima y al complejo enzima-sustrato en (D.O.)

ϵ_{ES} = Coeficiente de extinción molar del complejo enzima sustrato, que a esa longitud de onda presenta un valor de $8564 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (74).

La proporción de centros activos del preparado comercial con respecto a la masa total de sólido, utilizado en la presente Memoria, calculada por este método y contrastada con los valores obtenidos en otros ensayos, empleando N-*trans*-cinamoil-imidazol (73) y acetato de p-nitrofenilo (71) como sustratos, resultó ser $(59 \pm 4)\%$.

2) Enzima inmovilizada

Los ensayos de estabilidad de la enzima inmovilizada se llevaron a cabo con los distintos derivados incubándolos en estado sólido, en condiciones de almacenamiento a una temperatura de 2 °C. Se fueron tomando cantidades alícuotas de 10 mg del derivado C6-CT cada cierto tiempo para realizar el ensayo estándar de actividad hidrolítica con GpNA (229), (descrito en el apartado de caracterización de los derivados inmovilizados (**Sección III.3.3**)). En lugar de emplear BTpNA, cuya hidrólisis es muy rápida, lo que proporcionaría un gran error en la medida de absorbancia al tener que filtrar el resultado de la reacción, tratando con derivados insolubles, es más conveniente emplear como sustrato GpNA, ya que su hidrólisis es mucho más lenta (229).

Al trabajar con este tipo de derivados insolubles, la reacción directa en la cubeta del espectrofotómetro es muy compleja siendo necesario un sistema de agitación dentro de la misma cubeta, apareciendo entonces el fenómeno de "scatering", debido a las variaciones de absorbancia causadas por la agitación del derivado insoluble.

B) En condiciones de síntesis

1) Enzima libre

Se realizaron varios ensayos de estabilidad en condiciones generales de síntesis (**Sección III.5**) para estudiar la influencia del medio orgánico y de la temperatura en una hipotética desnaturalización de la enzima en dichos procesos. Para ello, se añadieron 20 ml de medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v) en un reactor tipo tanque agitado. Posteriormente, se adicionaron 1.5 mg de enzima libre (0.075 mg de enzima libre/ml), dejando incubar la mezcla a diferentes temperaturas 25, 37 y 50 °C, durante cierto tiempo. Transcurrido este, se incorporan al reactor 0.1334 g de *L*-Leu-NH₂, 112 µl de trietilamina, y 0.0627 g. de BTEE. Todo esto se termostató a 25 °C durante 24 h. y se tomaron muestras del reactor a diferentes tiempos para analizarlas por HPLC, como en el proceso general de síntesis descrito anteriormente (**Sección III.5**). Aunque la enzima se incubó a diferentes

temperaturas, el ensayo estándar de síntesis de péptidos se repitió en todos los casos a 25 °C, obteniéndose la velocidad inicial de conversión a péptido, la cual nos servirá para construir las curvas de desactivación enzimática, a partir del tiempo cero al cual consideraremos el 100% de actividad como valor obtenido de velocidad inicial.

2) Enzima inmovilizada

Se realizaron los mismos ensayos que en el caso de la enzima libre, salvo que en esta ocasión se empleó el derivado C6-CT (1.3 mg. de derivado/ml que equivalen a 0.113 mg de enzima/ml).

III.6.2.- ENSAYOS DE ABRASIÓN

Estos ensayos se llevaron a cabo con el fin de comprobar si existe parte de enzima no unida covalentemente al soporte, o bien para observar si en los procesos a los que se somete al derivado inmovilizado se produce alguna separación física de la enzima con respecto del soporte. De producirse estos fenómenos tendríamos resultados erróneos en el proceso estudiado. Según estos planteamientos se llevaron a cabo dos tipos de ensayos:

a) Ensayo en condiciones de síntesis.

Se tomaron 6 reactores tipo tanque agitado, a los que se les añadió 10 ml de medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M 97/3, (v/v), se dejaron agitando 15 minutos, pasado ese tiempo, se introdujeron 50 mg del derivado C5-CT en tres de ellos y otros 50 mg del derivado C6-CT en cada uno de los tres restantes, manteniéndose en agitación durante 24 h. Pasado ese tiempo se filtró el contenido a través de una placa vidrio Pyrex del n° 4.

1) 1 ml del filtrado se utilizó para llevar a cabo el estudio de la cantidad de proteína presente en el mismo, utilizando el método del Microbiuret descrito anteriormente (228) en el Apartado III.2.1.

2) 5 ml también del filtrado se adicionaron a 15 ml del mismo medio, junto con 0.0627 g de BTEE (10 mM), 0.1334 g de H-L-Leu-NH₂ (40 mM), y 112 µl de trietilamina, para comprobar la existencia o no de actividad en síntesis de la enzima presente la fase líquida, siguiendo la metodología descrita en el **Apartado III.5**.

b) Ensayo en condiciones de hidrólisis.

Para estudiar la influencia del medio acuoso en los posibles procesos de desorción de la enzima en condiciones de hidrólisis, se operó de manera análoga al caso anterior salvo que en esta ocasión el medio empleado fue tampón KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH=7.8 (0.1 M) (10 ml), en ausencia de un co-disolvente orgánico.

Transcurridas 24 h de incubación se filtró el contenido del reactor y se realizaron:

1) El ensayo de cantidad de proteína presente en la fase líquida, con 1 ml del filtrado, empleando para ello, el método del Microbiuret (228) (**Sección III.2.1**).

2) El ensayo de actividad enzimática tuvo lugar en condiciones de hidrólisis con 4.5 ml del filtrado y 0.5 ml de GpNA (0.015 M en DMF) durante 25 minutos a 25 °C de temperatura, (como se describe en la **Sección III.3** al hablar de la actividad de la enzima comercial) (229).

III.6.3.- HIDRÓLISIS DE BTEE

III.6.3.1.- Estudio cinético del proceso de hidrólisis

Se llevó a cabo en las mismas condiciones en las que realizaríamos posteriormente los procesos de síntesis empleando como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 2/1, (v/v). Como ejemplo se tomó el biocatalizador C5-CT (1.3 mg de derivado/ml, equivalente a 0.053 mg de enzima/ml) y a diferencia de los procesos de síntesis no se utilizó nucleófilo, solamente donador de acilo, (BTEE), cuya concentración se fue aumentando desde 5 hasta 90

mM.

El avance de la reacción se analizó por HPLC de la misma forma que se describe para los procesos de síntesis en la **Sección III.5**, cuantificando ahora la desaparición del sustrato (BTEE) con el tiempo.

III.6.3.2.- Influencia de la proporción de acetato de etilo/medio acuoso

Para conocer el comportamiento de nuestros derivados en los procesos de hidrólisis en función de la cantidad de agua presente en el medio se llevaron a cabo ensayos de hidrólisis empleando la misma cantidad de derivado con una concentración de donador de acilo 10 mM en reactor (0.0627 g) y el medio empleado fue diferente en cada caso, variando la relación AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, desde 99/1 hasta 10/90, (v/v). El progreso de la reacción se siguió como en el caso de los procesos sintéticos por HPLC empleando también el naftaleno como patrón interno.

III.6.4.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CINÉTICAMENTE CONTROLADAS

III.6.4.1.- Variación de la concentración de enzima

Con la finalidad de estudiar el comportamiento en procesos de síntesis en el seno de disolventes orgánicos de los derivados preparados, sobre copolímeros de injerto primeramente centramos nuestro interés en determinar el intervalo de concentración de catalizador en el cual este presenta una actividad óptima para la síntesis de péptidos. Así variamos la concentración de los derivados C1-CT y C2-CT, desde 0.48 mg de enzima/ml hasta 0.044 mg de enzima/ml, para un volumen total de 20 ml. El medio empleado fue AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1M, en proporción 2/1, (v/v). Como donador de acilo se empleó BTEE (10 mM) y como nucleófilo H-L-Leu-NH₂ (40 mM).

Empleando estas condiciones llevamos a cabo las reacciones de síntesis a 25°C de temperatura siguiendo el esquema general descrito en la **Sección III.5**.

III.6.4.2.- Ensayos con diferentes sustratos

Como donadores de acilo se estudiaron el éster etílico de la N-benzoil-*L*-tirosina (BTEE), el éster etílico de la N-acetil-*L*-fenilalanina (APEE) y como nucleófilos *L*-leucinamida (H-*L*-Leu-NH₂) y *L*-alaninamida (H-*L*-Ala-NH₂) (en forma de clorhidrato por lo que también añadimos una cantidad equimolecular de trietilamina necesaria para neutralizar el HCl procedente del nucleófilo y no modificar el pH); la relación donador de acilo/nucleófilo empleada fue 1/4, (10 y 40 mM en reactor respectivamente). Estas reacciones tuvieron lugar en el seno de un sistema bifásico formado por AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, en proporciones 2/1, (v/v) usando como catalizador el derivado C1-CT (E=38.0% de injerto) (2.75 mg de derivado/ml, 0.24 mg de enzima/ml).

Para conocer la influencia del porcentaje de injerto con respecto a la reactividad de la enzima se realizó el mismo ensayo que en el párrafo anterior empleando como derivado C5-CT (E=54.5% de injerto), (1.3 mg de derivado/ml, equivalente a 0.053 mg de enzima/ml) y como medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 99/1, (v/v).

Además de estas reacciones se realizaron otras empleando el derivado C4-CT, (1.3 mg de derivado/ml, 0.24 mg de enzima/ml) como catalizador, BTEE (10 mM) como donador de acilo y como nucleófilos (40 mM): H-*L*-Leu-NH₂, H-*L*-Met-NH₂, H-*L*-Ser-NH₂, H-*L*-Gly-NH₂, H-*L*-Asp-NH₂, H-*L*-Arg-NH₂. El medio fue AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v).

El proceso se siguió como se detalla en la **Sección III.5.**

III.6.4.3.- Ensayos con diferentes disolventes

Para conocer el comportamiento de nuestros derivados y de la enzima libre frente al log*P* del disolvente (234), se llevaron a cabo reacciones en el seno de diferentes disolventes, tales como: 1,1,1-tricloroetano (log*P*=2.49), acetato de etilo (log*P*=0.73), etanol (log*P*= - 0.32), acetonitrilo (log*P*= - 0.34), 1,4-butanodiol (log*P*= - 0.92), N,N-dimetilformamida (log*P*= - 1.01), empleando BTEE (10 mM) como donador de acilo, H-*L*-Leu-NH₂ (40 mM) como nucleófilo y como catalizadores: a) C1-CT (2.75 mg de derivado/ml equivalente a 0.24 mg de enzima/ml) 99/1, (v/v), disolvente orgánico/Tris pH=9.0, 0.1 M, b) C5-CT (1.3 mg

de derivado/ml equivalente a 0.053 mg de enzima/ml) 97/3, (v/v), disolvente orgánico/Tris pH=9.0, 0.1 M, c) y la α -quimotripsina libre (0.075 mg de enzima/ml) 97/3, (v/v), disolvente orgánico/Tris pH=9.0, 0.1 M. El resto de condiciones son las mismas que las descritas en el **Apartado III.5.**

III.6.4.4.- Variación del porcentaje de disolvente

Es ampliamente reconocida la importancia de la cantidad de agua presente en el seno de la reacción para conseguir una buena relación péptido/ácido. Así, para profundizar en este aspecto se realizaron experimentos con los derivados: C1-CT, C2-CT, C3-CT y C4-CT (0.24 mg de enzima/ml) empleando diferentes proporciones de medio desde 99/1 hasta 2/1 (v/v), AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, y con el derivado C5-CT (0.053 mg de enzima/ml) siendo en este caso las proporciones de medio objeto de estudio; 99/1, 1/1, (v/v) y tampón Tris pH=9.0 0.1 M saturado con acetato de etilo.

En todos los casos los sustratos empleados fueron BTEE como donador de acilo y H-L-Leu-NH₂ como nucleófilo, en concentración 10 y 40 mM respectivamente. El resto de condiciones coincidieron con las del apartado anterior.

III.6.4.5.- Síntesis de péptidos a diferentes temperaturas

Se llevo a cabo la síntesis del dipéptido modelo Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, empleando BTEE (10 mM) y H-L-leu-NH₂ (40 mM), como medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 99/1, (v/v). El derivado empleado en todas las reacciones fue C4-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalente a 0.24 mg de enzima/ml), y el parámetro que se modificó en cada caso fue la temperatura de la reacción, realizando ensayos a 4, 25 y 37 °C, analizándose los resultados por HPLC como en los experimentos anteriores.

III.6.4.6.- Variación de la concentración de donador de acilo

Se realizó según se describe en la Sección III.5, teniendo en cuenta que en esta ocasión el parámetro que se modificó fue la concentración de donador de acilo (BTEE) desde 5 hasta 20 mM, manteniendo constante la concentración de nucleófilo (H-L-Leu-NH₂) en 40 mM. El derivado elegido fue C5-CT (1.3 mg de derivado/ml o lo que es lo mismo 0.053 mg de enzima/ml) en un medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3 (v/v).

El progreso de las reacciones se siguió por HPLC según se describe en la Sección III.5.

III.6.4.7.- Variación de la concentración de nucleófilo

Para conocer la afinidad del nucleófilo por el complejo acil-enzima a lo largo del proceso, se llevó a cabo la síntesis del dipéptido modelo Bz-L-Tyr-L-Leu-NH₂, partiendo de BTEE (10 mM) y concentraciones crecientes de nucleófilo H-L-Leu-NH₂ desde 5 mM hasta 50 mM, como sustratos. Como medio se empleó AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v). El derivado que catalizó estas reacciones fue C5-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalente a 0.053 mg de enzima/ml, en todos los casos).

El avance de las reacciones se siguió por HPLC según se describe en la Sección III.5.

III.6.5.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS TERMODINÁMICAMENTE CONTROLADAS

Estos ensayos se realizaron como los anteriores, empleando el derivado C5-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalente a 0.053 mg de enzima/ml), el medio de reacción fue AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, y como donador de acilo se utilizó la N-acetil-L-tirosina en forma de ácido (10 mM), y como nucleófilo L-leucinamida en forma de clorhidrato (50 mM). Se aumenta la cantidad de nucleófilo para favorecer este tipo de reacciones.

III.6.6.- REACIONES MÚLTIPLES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS Y POSTERIOR PURIFICACIÓN DE LOS MISMOS

III.6.6.1.- Reutilización de los derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre copolímeros

La forma más práctica para conocer si un derivado posee buenas propiedades mecánicas consiste en realizar ensayos de reutilización en las condiciones generales de síntesis, (Sección III.5) empleando los derivados C1-CT, C2-CT (0.24 mg de enzima/ml) en una proporción de disolvente orgánico, 4/1, (v/v) AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1M, y el derivado C4-CT (0.24 mg de enzima/ml) utilizando como medios de reacción; AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, y 1,1,1-tricloroetano/Tris pH=9.0, 0.1 M, 99/1, (v/v). Tras un primer ciclo de síntesis, se filtró a través de una placa de vidrio Pyrex del n° 4 el contenido del reactor, quedando el péptido y el derivado en la parte superior y pasando a los líquidos de lavado el resto de los componentes; el residuo sólido se lava con 50 ml de disolvente 3 veces, y posteriormente se vuelve a lavar con 50 ml de tampón otras 3 veces con el fin de eliminar al máximo el péptido y disolvente que pueda retener el derivado, para que continúe siendo activo en reacciones posteriores.

La toma de muestras y el avance de la reacción se siguió por HPLC como se describe en la Sección III.5.

III.6.6.2.- Síntesis consecutivas dentro del mismo reactor

A fin de conocer la posibilidad de reutilizar el catalizador sin necesidad de separarlo del seno de la reacción se diseñó una estrategia para llevar a cabo reacciones consecutivas dentro del mismo reactor. Así, la primera síntesis se realizó siguiendo la metodología general de síntesis, empleando como medio AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M 97/3, (v/v) V=20 ml, una relación donador de acilo (BTEE ó APEE)/nucleófilo (H-L-Leu-NH₂ ó H-L-Ala-NH₂) de 1/4, una cantidad de derivado C4-CT de 0.0253 g, (0.113 mg de enzima/ml) y 112 μ l de trietilamina, siguiendo el progreso de la reacción por HPLC. Una vez consumido todo el donador de acilo, en ese mismo reactor se adicionó la misma cantidad de donador de acilo

empleada en la primera síntesis; por otro lado, de nucleófilo se añadió la cuarta parte que en la primera síntesis para mantener la relación donador de acilo/nucleófilo en 1/4, y por lo tanto sólo se adicionaron 28 μ l de trietilamina, analizándose por HPLC el progreso de la reacción. Este ciclo consecutivo se repitió hasta 11 veces en el caso del dipéptido Bz-L-Tyr-L-Ala-NH₂.

III.6.6.3.- Purificación del péptido obtenido en las síntesis consecutivas

El péptido obtenido de la forma descrita en el apartado anterior es relativamente insoluble en el acetato de etilo, estando este disolvente casi saturado con un 3% de (Tris/HCl pH=9.0, 0.1 M) (el acetato de etilo saturado con ese tampón admite un $(3.91 \pm 0.05 \%)$ (v/v) de fase acuosa, medido por el método Karl-Fisher, en un aparato ATI ORIÓN AF8).

Primeramente, se añaden 50 ml de tampón (Tris/HCl pH=9.0, 0.1 M) a una ampolla de decantación que contiene el crudo de la reacción. La mezcla se agita varias veces y se separan las dos fases, repitiendo este proceso dos veces más; de esta forma, a la fase acuosa pasan las sales del ácido fruto de las reacciones secundarias de hidrólisis, el exceso de nucleófilo que no reacciona y el clorhidrato de trietilamina. En la fase orgánica se encuentran tanto el dipéptido como el derivado inmovilizado, ambos suspendidos, más algunas trazas de éster (soluble en acetato de etilo) sin reaccionar que se eliminan lavando otras tres veces con acetato de etilo y filtrando a través de una placa de vidrio Pyrex del n° 4.

Para separar el dipéptido del derivado enzimático, se añaden 25 ml de DMF y se filtra lentamente. Esta operación se repite otras dos veces, y así conseguimos separar el dipéptido del derivado enzimático, ya que este último no es soluble en DMF. Para eliminar el disolvente la mezcla se concentra a vacío a 50 °C con la ayuda de tolueno, que forma un azeótropo con DMF. Posteriormente, el sólido de color blanquecino se congela y se liofiliza durante 48 horas.

III.7.- ENSAYOS REALIZADOS CON DERIVADOS DE α -QUIMOTRIPSINA INMOVILIZADA SOBRE GELES DE AGAROSA

III.7.1.- HIDRÓLISIS DE BTEE

III.7.1.1.- Estudio cinético del proceso de hidrólisis

Se realizaron exactamente los mismos ensayos que con los derivados inmovilizados sobre copolímeros de injerto descritos en la **Sección III.6.3.1**, salvo que en esta ocasión los catalizadores fueron AGU2-CT y AGM1-CT (8.85 mg de derivado/ml, equivalentes a 0.076 mg de enzima/ml en reactor, en ambos casos). También, al igual que ocurría anteriormente con el otro grupo de derivados, se empleó BTEE como sustrato, variando su concentración desde 5 hasta 90 mM en reactor.

III.7.1.2.- Influencia de la proporción de medio acetato de etilo/medio acuoso

Para conocer el comportamiento de los derivados preparados empleando como soporte geles de agarosa en los procesos de hidrólisis, en función de la cantidad de agua presente en el medio, se emplearon 0.177 g de los derivados AGU2-CT y AGM1-CT (0.076 mg de enzima/ml) en cada reacción y la concentración de donador de acilo empleada fue 10 mM en reactor (0.0627 g de BTEE). En este tipo de reacciones, de hidrólisis, obviamente no se empleó nucleófilo y el medio usado fue diferente en cada caso, variando la relación AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M desde 99/1 hasta 10/90 (v/v). El progreso de la reacción se siguió como en el caso de los procesos sintéticos por HPLC empleando también el naftaleno como patrón interno.

III.7.2.-REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CINÉTICAMENTE CONTROLADAS. EFECTO DE DIVERSAS VARIABLES.

III.7.2.1.- Variación de la cantidad de enzima añadida

Para estudiar la influencia en el proceso de síntesis de la concentración de catalizador se realizaron varios ensayos con el derivado AGU1-CT, en los que la cantidad de enzima presente en el reactor varió desde 0.48 mg de enzima/ml hasta 0.044 mg de enzima/ml (desde 0.354 g hasta 0.031 g de derivado), para un volumen total de 20 ml. El medio empleado fue AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1M en proporciones 2/1, (v/v). Como donador de acilo se empleó BTEE (10 mM) y como nucleófilo H-L-Leu-NH₂ (40 mM).

Empleando estas condiciones se llevaron a cabo las reacciones de síntesis a 25°C de temperatura siguiendo el esquema general descrito en la Sección III.5.

III.7.2.2.- Ensayos con diferentes sustratos

Como donadores de acilo se emplearon el éster etílico de la N-benzoil-L-tirosina (BTEE), el éster etílico de la N-acetil-L-fenilalanina (APEE) y como nucleófilos L-leucinamida (H-L-Leu-NH₂) y L-alaninamida (H-L-Ala-NH₂) en forma de clorhidrato, por lo que también añadimos una cantidad equimolecular de trietilamina para neutralizar el HCl procedente del nucleófilo y no variar el pH. La relación donador de acilo/nucleófilo empleada fue (1/4), 10 y 40 mM en reactor respectivamente.

Los disolventes utilizados en estos experimentos fueron 1,1,1-tricloroetano y la metilisobutilcetona en proporciones 99/1, (v/v) disolvente orgánico/Tris pH=9.0, 0.1 M.

El derivado empleado en todos los casos fue AGU1-CT (8.85 mg de derivado/ml equivalentes a 0.24 mg de enzima/ml). El desarrollo del proceso sigue el esquema general (Sección III.5)

III.7.2.3.- Ensayos con diferentes disolventes

También como en el caso de los derivados obtenidos con copolímeros de injerto el disolvente habitual fue acetato de etilo ($\log P=0.73$), empleando como medio acuoso tampón (Tris/HCl pH=9.0, 0.1 M), en proporción disolvente orgánico/tampón de 99/1, (v/v), aunque también se han empleado puntualmente para estudiar la influencia del $\log P$; 1,1,1-tricloroetano ($\log P=2.49$), metilisobutilcetona ($\log P=1.38$), 1,4-butanodiol ($\log P= - 0.92$), N,N-dimetilformamida ($\log P= - 1.01$), (234), empleando BTEE (10 mM) como donador de acilo y H-L-Leu-NH₂ (40 mM) como nucleófilo, el derivado utilizado fue AGU1-CT (8.85 mg de derivado/ml, o lo que es lo mismo 0.24 mg de enzima/ml) como catalizador del proceso. El resto de condiciones son las mismas que las descritas en la **Sección III.5**.

III.7.2.4.- Variación del porcentaje de disolvente

Se han llevado a cabo por un lado reacciones con el derivado AGU1-CT empleando diferentes concentraciones de derivado (1.6, 3.6, 8.85 mg de derivado/ml, o lo que es lo mismo, 0.044, 0.097, 0.24 mg de enzima/ml), utilizando como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M en distintas proporciones 99/1, 4/1, 2/1 y 1/1, (v/v); los sustratos empleados fueron BTEE como donador de acilo y como nucleófilos H-L-Leu-NH₂ y H-L-Ala-NH₂ en concentración 10 mM (donador de acilo) y 40 mM (nucleófilo).

Por otro lado, empleando los derivados AGU2-CT y AGM1-CT (8.85 mg de derivado/ml equivalentes a 0.076 mg de enzima/ml en todos los casos), se realizaron experimentos similares en los que el medio fue AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M en distintas proporciones 97/3, 1/1, (v/v) y tampón Tris/HCl pH=9.0, 0.1 M saturado con acetato de etilo, utilizando como sustratos BTEE (10 mM) y H-L-Leu-NH₂ (40 mM).

El resto de condiciones coincidieron con las del **Apartado III.5**.

III.7.2.5.- Variación de la concentración de donador de acilo

Se realizó siguiendo las directrices de la **Sección III.5** modificando en esta ocasión la

concentración de donador de acilo (BTEE) desde 5 mM hasta 20 mM, manteniendo constante la concentración de nucleófilo (H-*L*-Leu-NH₂) en 40 mM. Los derivados empleados también fueron AGU2-CT y AGM1-CT (8.85 mg de derivado/ml o lo que es lo mismo 0.076 mg de enzima/ml), y como medio se utilizó AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M 97/3 (v/v).

III.7.2.6.- Variación de la concentración de nucleófilo

Como en el caso de los derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre copolímeros de injerto se varió la concentración de nucleófilo (H-*L*-Leu-NH₂) desde 5 mM hasta 50 mM, manteniendo constante la concentración de donador de acilo BTEE (10 mM).

Como medio se empleó AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v). Los derivados que catalizaron estas reacciones fueron AGU2-CT y AGM1-CT (8.85 mg de derivado/ml, 0.076 mg de enzima/ml, en todos los casos).

El avance de las reacciones se siguió por HPLC según se describe en la **Sección III.5.**

III.7.3.- REACCIONES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS TERMODINÁMICAMENTE CONTROLADAS

Estos ensayos se realizaron con los derivados AGU2-CT y AGM1-CT (8.85 mg de derivado/ml, 0.076 mg de enzima/ml), empleando como medio de reacción AcOEt/Tris pH=9.0, 0.1 M, 97/3, (v/v), como donador de acilo se utilizó la N-acetil-*L*-tirosina (Ac-*L*-Tyr-OH) (10 mM), y como nucleófilo *L*-leucinamida en forma de clorhidrato (50 mM). La cantidad de nucleófilo es mayor que la empleada en las reacciones que transcurren bajo control cinético ya que aumentando la concentración de uno de los sustratos se obtienen mejores rendimientos (235).

III.8.- REACCIONES CON SUSTRATOS NO NATURALES

III.8.1.- SÍNTESIS QUÍMICA DE LOS ÉSTERES, SUSTRATOS DE LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS

a) Los sustratos fueron los siguientes ésteres: N-(4-clorobutanoil)-L-triptofanato de metilo, N-(3-indolilmetil)glicinato de etilo, (*Cis* 1,3) 1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1H- β -carbolina-3-carboxilato de metilo, que fueron suministrados por el grupo de la Dra. Avendaño.

b) Los ésteres etílicos racémicos de los ácidos: ác. ($\pm$)-2-fenilbutírico, ác. ($\pm$)-3-fenilbutírico, ác. ($\pm$) tetrahydrofurano-2-carboxílico, ác. ($\pm$) tetrahydrofurano-3-carboxílico y el ác. ($\pm$) 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina-3-carboxílico, fueron sintetizados siguiendo el siguiente protocolo general:

A una suspensión de 0.6 moles del correspondiente ácido en 200 ml de etanol se adiciona, a temperatura ambiente, gota a gota y con agitación, 0.12 moles de cloruro de tionilo. La mezcla se refluje durante 12 horas; pasado este tiempo, se concentra a sequedad y se añaden 200 ml de cloroformo saturado en amoníaco. La agitación se mantiene durante 2 horas, para a continuación filtrar a través de un filtro de pliegues. La concentración a sequedad del filtrado conduce a la obtención de los ésteres etílicos de los ácidos correspondientes, que se purifican redisolviendo el contenido sólido resultante de la concentración, en diclorometano (50 ml), a los que se adicionaron otros (3×50) ml de una solución alcalina de bicarbonato potásico (1 M), agitando cada vez convenientemente. Posteriormente se dejó reposar, para lograr la separación de ambas fases y así decantar a continuación. A la fase orgánica resultante de la tercera decantación, en la cual se encuentran los ésteres, se la sometió otra vez a la acción del rotavapor, para obtener el éster puro que se liofilizó, para someterle a las pruebas de análisis.

c) Los ésteres (*R*) mandelato de etilo, (*S*) mandelato de etilo, (*R,S*) mandelato de etilo, (*R,S*) mandelato de bencilo y (*R,S*) mandelato de isoamilo, fueron suministrados por el grupo del Dr. Guisán.

III.8.2.- HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EMPLEANDO SUSTRATOS NO CONVENCIONALES

Los dos primeros grupos de ésteres del apartado anterior se intentaron hidrolizar empleando enzima nativa y los derivados inmovilizados, sometiéndolos a dos metodologías de hidrólisis diferentes:

a) Condiciones de hidrólisis similares a las descritas por Salvador y cols. (209) en la hidrólisis del éster etílico de la N-benzoil-L-tirosina, con la enzima libre y con derivados de α -quimotripsina inmovilizada sobre agarosa.

Las reacciones se llevaron a cabo a 25 °C, en un reactor tipo tanque agitado empleando:

- 10 ml de DMF.
- 10 ml de tampón Tris/HCl pH=9.0 0.1 M.
- 10 mM de sustrato.
- 5 mg de α -quimotripsina libre.

El avance de la reacción se siguió por HPLC, como en el caso general de síntesis (**Apartado III.5**). A diferencia de lo descrito en esa Sección la muestra (200 μ l) fue recibida en un vial que contenía solamente 800 μ l de acetonitrilo. La absorbancia fue leída a una longitud de onda de 220 nm, en el caso de los derivados de los ácidos del tetrahydrofurano, el resto de sustratos, que si poseen algún resto aromático, se analizaron a 254 nm, de forma similar a la metodología estándar.

El porcentaje de hidrólisis se calculó a partir del área del pico de éster a tiempo cero, (antes de añadir la enzima), que representa el 100% del sustrato.

b) En busca de mejores resultados se utilizaron condiciones más drásticas, aumentando el porcentaje de agua presente en la reacción, empleando como disolvente orgánico acetato de etilo.

1) Enzima libre

Las condiciones de reacción fueron:

- 50 mM de sustrato.
- 20 ml de Tris/HCl pH=9.0 0.1 M saturado con acetato de etilo (el agua pura saturada con acetato de etilo admite hasta un 8% (v/v) (236).
- 5 mg de α -quimotripsina libre.

Para el análisis del curso de la reacción se siguió el esquema anterior.

Como los resultados mejoraron se empleó este segundo método con el grupo de los mandelatos y con los derivados inmovilizados sobre copolímeros y geles de agarosa.

2) Enzima inmovilizada

Los ensayos se realizaron exactamente igual que en el caso de la enzima libre, a diferencia del catalizador; empleando el derivado C5-CT (1.3 mg de derivado/ml equivalentes a 0.053 mg de enzima/ml) como derivado inmovilizado sobre copolímeros de injerto y AGM1 (8.85 mg de derivado/ml equivalentes a 0.076 mg de enzima/ml), como representante de los derivados inmovilizados sobre geles de agarosa.

ABRIR CAPÍTULO IV

